醇将淋巴细胞与骨髓瘤细胞融合，以形成杂交瘤细胞(Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp. 59-103, Academic Press, 1986)。

将如此制备的杂交瘤细胞在合适的培养基中接种和培养，例如含有抑制未融合的亲本骨髓瘤细胞生长或存活的一种或多种物质的培养基。例如，若亲本骨髓瘤细胞缺乏酶次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(HGPRT或HPRT)，则用于杂交瘤的培养基典型的将含有次黄嘌呤、氨基喋呤和胸苷（HAT培养基），这些物质阻止HGPRT缺陷细胞生长。

在某些实施方案中，骨髓瘤细胞是那些高效融合、支持所选抗体生成细胞稳定的高水平生成抗体、并对诸如HAT培养基的培养基敏感的。例示性的骨髓瘤细胞包括但不限于鼠骨髓瘤系，诸如那些可从索尔克研究所细胞分配中心(Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California, USA)获得的MOPC-21和MPC-11小鼠肿瘤及可从美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, USA)获得的SP-2或X63-Ag8-653细胞所衍生的。人骨髓瘤和小鼠-人异源骨髓瘤细胞系也已记载用于生成人单克隆抗体(Kozbor, J. Immunol. 133:3001 (1984); Brodeur等, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63, Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)。

可对杂交瘤细胞正在其中生长的培养液测定结合CD22的单克隆抗体的生成。优选的是，通过免疫沉淀或通过体外结合测定法，诸如放射免疫测定法(RIA)或酶联免疫吸附测定法(ELISA)，测定由杂交瘤细胞生成的单克隆抗体的结合特异性。单克隆抗体的结合亲和力可通过例如Munson等, Anal. Biochem. 107:220 (1980)的Scatchard分析来测定。

在鉴定得到生成具有期望特异性、亲和力和/或活性的抗体的杂交瘤细胞后，该克隆可通过有限稀释规程进行亚克隆并通过标准方法进行培养(Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp. 59-103, Academic Press, 1986)。适于这一目的的培养基包括例如D-MEM或RPMI-1640培养基。另外，杂交瘤细胞可以在动物中作为腹水瘤进行体内培养。可通过常规免疫球蛋白纯化规程，诸如例如蛋白A-Sepharose、羟磷灰石层析、凝胶电泳、透析或亲和层析，将亚克隆分泌的单克隆抗体与培养液、腹水或血清适当分开。

2. 某些文库筛选方法

本发明的抗CD22抗体可以通过使用组合库筛选具有期望活性的抗体来

创建。例如，本领域知道用于构建噬菌体展示库及对此类文库筛选具有期望的结合特性的抗体的多种方法。此类方法一般记载于Hoogenboom等 (2001) 于: Methods in Molecular Biology 178:1-37 (O'Brien等编, Human Press, Totowa, NJ)，在某些实施方案中是Lee等 (2004) J. Mol. Biol. 340:1073-1093。

在原理上，通过筛选噬菌体文库来选择合成抗体克隆，所述噬菌体文库含有展示融合至噬菌体外壳蛋白的各种抗体可变区(Fv)片段的噬菌体。通过针对所需抗原的亲和层析来淘选此类噬菌体文库。表达能够结合所需抗原的Fv片段的克隆被吸附至抗原，从而与文库中不结合的克隆分开。然后将结合的克隆从抗原上洗脱，而且可以通过额外的抗原吸附/洗脱循环进一步富集。本发明的任何抗CD22抗体可以如下获得，即设计合适的抗原筛选规程来选择感兴趣的噬菌体克隆，接着使用来自感兴趣的噬菌体克隆的Fv序列和Kabat等, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), 卷1-3中记载的合适的恒定区(Fc)序列来构建全长抗CD22抗体克隆。

在某些实施方案中，抗体的抗原结合域由两个约110个氨基酸的可变(V)区形成，分别来自轻链(VL)和重链(VH)，都呈现三个高变环(HVR)或互补决定区(CDR)。可变域可以功能性的展示在噬菌体上，或是作为单链Fv (scFv)片段(其中VH和VL通过短的、柔性的接头共价相连)，或者作为Fab片段(其中它们各自与恒定域融合且非共价相互作用)，如Winter等, Ann. Rev. Immunol., 12: 433-455 (1994)所述。在用于本文时，编码scFv的噬菌体克隆和编码Fab的噬菌体克隆统称为"Fv噬菌体克隆"或"Fv克隆"。

VH和VL基因的全集可以通过聚合酶链式反应(PCR)分开克隆，并在噬菌体文库中随机重组，然后可以搜索抗原结合克隆，如Winter等, Ann. Rev. Immunol., 12: 433-455 (1994)所述。来自经免疫来源的文库能提供对免疫原有高亲和力的抗体，无需构建杂交瘤。或者，可以克隆未免疫的全集，用于为广泛的非自身的及自身的抗原提供单一人抗体来源，无需任何免疫，如Griffiths等, EMBO J, 12: 725-734 (1993)所述。最后，未免疫的文库还可以以合成方式来构建，即从干细胞克隆未重排的V基因，并使用包含随机序列的PCR引物来编码高度可变的CDR3区及用来在体外实现重排，如Hoogenboom和Winter, J. Mol. Biol., 227: 381-388 (1992)所述。

在某些实施方案中，通过与次要外壳蛋白pIII融合，使用丝状噬菌体来

展示抗体片段。抗体片段可以展示为单链Fv片段，其中VH与VL结构域通过柔性多肽间隔物在同一多肽链上相连，例如如Marks等，J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991)所述，或者展示为Fab片段，其中一条链与pIII融合，另一条链分泌入细菌宿主细胞周质，在此装配Fab-外壳蛋白结构，其通过替换一些野生型外壳蛋白而展示在噬菌体表面上，例如如Hoogenboom等，Nucl. Acids Res., 19: 4133-4137 (1991)所述。

一般而言，从收获自人或动物的免疫细胞获得编码抗体基因片段的核酸。如果希望文库偏向抗CD22克隆，那么可以给受试者免疫CD22以产生抗体应答，并回收脾细胞和/或循环B细胞或其它外周血淋巴细胞(PBL)用于文库构建。在一个优选的实施方案中，如下得到了偏向抗CD22克隆的人抗体基因片段文库，即在携带功能性人免疫球蛋白基因阵列（且缺乏功能性内源抗体生成系统）的转基因小鼠中产生抗CD22抗体应答，使得CD22免疫产生生成针对CD22的人抗体的B细胞。生成人抗体的转基因小鼠的生成在下文中有描述。

可以如下获得抗CD22反应性细胞群的进一步富集，即使用合适的筛选规程来分离表达CD22特异性膜结合抗体的B细胞，例如通过使用CD22亲和层析进行的细胞分离或者细胞对荧光染料标记的CD22的吸附及后续的荧光激活细胞分选(FACS)。

或者，来自未免疫供体的脾细胞和/或B细胞或其它PBL的使用提供了可能的抗体全集的更佳展现，而且还容许使用CD22在其中没有抗原性的任何动物（人或非人的）物种构建抗体文库。对于构建体外掺入抗体基因的文库，从受试者收获干细胞以提供编码未重排抗体基因区段的核酸。可以从多种动物物种（诸如人、小鼠、大鼠、兔类、luprine、犬、猫、猪、牛、马、和禽类等）获得感兴趣的免疫细胞。

从感兴趣的细胞回收编码抗体可变基因区段（包括VH和VL区段）的核酸并扩增。就重排的VH和VL基因文库而言，可以如下获得所需DNA，即从淋巴细胞分离基因组DNA或mRNA，接着用与重排的VH和VL基因的5'和3'末端匹配的引物进行聚合酶链式反应(PCR)，如Orlandi等，Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 86: 3833-3837 (1989)所述，由此构建多样性V基因全集供表达。可以从cDNA和基因组DNA扩增V基因，反向引物位于编码成熟V结构域的外显子的5'末端，正向引物基于J区段内部，如Orlandi等 (1989)和Ward等，Nature,

341: 544-546 (1989)所述。然而，为了从cDNA进行扩增，反向引物还可基于前导外显子内，如Jones等, Biotechnol., 9: 88-89 (1991)所述，正向引物基于恒定区内，如Sastry等, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 86: 5728-5732 (1989)所述。为了使互补性最大化，引物中可以掺入简并性，如Orlandi等 (1989)或Sastry等 (1989)所述。在某些实施方案中，如下将文库多样性最大化，即使用靶向每个V基因家族的PCR引物来扩增免疫细胞核酸样品中存在的所有可获得的VH和VL重排，例如如Marks等, J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991)或Orum等, Nucleic Acids Res., 21: 4491-4498 (1993)所述。为了将所扩增的DNA克隆入表达载体，可以在PCR引物的一端引入罕见的限制性位点作为标签，如Orlandi等 (1989)所述，或者用带标签的引物进行进一步的PCR扩增，如Clackson等, Nature, 352: 624-628 (1991)所述。

合成重排的V基因全集可以在体外从V基因区段衍生。大多数人VH基因区段已经克隆和测序(Tomlinson等, J. Mol. Biol., 227: 776-798 (1992))，并定位(Matsuda等, Nature Genet., 3: 88-94 (1993))；这些克隆的区段（包括H1和H2环的所有主要构造）可用于生成多样性VH基因全集，用到编码序列和长度多样性的H3环的PCR引物，如Hoogenboom和Winter, J. Mol. Biol., 227: 381-388 (1992)所述。VH全集还可如下生成，所有序列多样性集中于单一长度的长H3环，如Barbas等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 4457-4461 (1992)所述。人Vκ和Vλ区段已经克隆和测序(Williams和Winter, Eur. J. Immunol., 23: 1456-1461 (1993))，而且可用于生成合成轻链全集。基于一系列VH和VL折叠结构及L3和H3长度的合成V基因全集将编码具有可观结构多样性的抗体。扩增编码V基因的DNA后，依照Hoogenboom和Winter, J. Mol. Biol., 227: 381-388 (1992)的方法，可以在体外重排种系V基因区段。

抗体片段全集可以如下构建，即以数种方式将VH与VL基因全集联合在一起。可以在不同载体中创建各个全集，并在体外重组载体，例如如Hogrefe等, Gene, 128: 119-126 (1993)所述，或者在体外通过组合感染来重组载体，例如Waterhouse等, Nucl. Acids Res., 21: 2265-2266 (1993)中记载的loxP系统。体内重组方法利用Fab片段的双链性质来克服因大肠杆菌转化效率施加的库容量限制。分开克隆未免疫的VH和VL全集，一个克隆入噬菌粒，另一个克隆入噬菌体载体。然后通过用噬菌体感染含噬菌粒的细菌使得每个细胞包含一种不同组合来联合两个文库，库容量只受细胞存在数的限制（约10^{12}个克

隆)。两种载体都包含体内重组信号,使得VH与VL基因重组到单一复制子上,并共包装成噬菌体病毒粒。这些巨型文库提供了大量的具有优良亲和力(Kd^{-1}为约10^{-8} M)的多样性抗体。

或者,可以将全集依次克隆入同一载体,例如如Barbas等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 7978-7982 (1991)所述,或者通过PCR装配到一起,然后克隆,如Clackson等, Nature, 352: 624-628 (1991)所述。PCR装配还可用于将VH和VL DNA与编码柔性肽间隔物的DNA连接以形成单链Fv (scFv)全集。在另一种技术中,"细胞内PCR装配"用于通过PCR在淋巴细胞内联合VH与VL基因,然后克隆所连接基因的全集,如Embleton等, Nucl. Acids Res., 20: 3831-3837 (1992)所述。

未免疫文库(naive library)(天然的或合成的)生成的抗体可具有中等亲和力(Kd^{-1}为约10^{6}-10^{7} M^{-1}),但还可以如下在体外模拟亲和力成熟,即构建和再次选择次生文库,如Winter等 (1994), 见上文所述。例如,在Hawkins等, J. Mol. Biol., 226: 889-896 (1992)的方法或Gram等, Proc. Natl. Acad. Sci USA, 89: 3576-3580 (1992)的方法中,使用易错聚合酶在体外随机引入突变(Leung等, Technique, 1: 11-15 (1989))。另外,可以通过随机突变一个或多个CDR来进行亲和力成熟,例如在选定的个别Fv克隆中使用携带跨越感兴趣CDR的随机序列的引物进行PCR并筛选更高亲和力的克隆。WO 9607754 (公布于1996年3月14日)记载了用于在免疫球蛋白轻链的互补决定区中诱导诱变以创建轻链基因文库的方法。另一种高效方法是将通过噬菌体展示选出的VH或VL结构域与得自未免疫供体的天然存在V结构域变体全集组合,并在数轮链改组中筛选更高亲和力,如Marks等, Biotechnol., 10: 779-783 (1992)所述。此技术容许生成亲和力约10^{-9} M或更低的抗体和抗体片段。

文库的筛选可通过本领域已知的多种技术来实现。例如,CD22可用于包被吸附板的孔,在附着至吸附板的宿主细胞上表达,或用于细胞分选,或者偶联至生物素以用链霉亲合素包被的珠捕捉,或者用于淘选噬菌体展示库的任何其它方法。

在适于至少部分噬菌体颗粒结合吸附剂的条件下,使噬菌体文库样品接触固定化的CD22。正常情况下,选择包括pH、离子强度、温度等等的条件来模拟生理学条件。结合至固相的噬菌体进行清洗,然后用酸洗脱,例如如Barbas等, Proc. Natl. Acad. Sci USA, 88: 7978-7982 (1991)所述,或者用碱洗

脱，例如如Marks等, J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991)所述，或者通过CD22抗原竞争洗脱，例如在与Clackson等, Nature, 352: 624-628 (1991)的抗原竞争法类似的规程中。噬菌体在单轮选择中可以富集20-1,000倍。此外，富集的噬菌体可以在细菌培养物中进行培养，并进行更多轮选择。

选择的效率取决于许多因素，包括清洗过程中解离的动力学，及单个噬菌体上的多个抗体片段是否能同时结合抗原。具有较快解离动力学（和弱结合亲和力）的抗体可以通过使用短时间的清洗、多价噬菌体展示、及固相中的高抗原包被密度来保留。高密度不仅通过多价相互作用而稳定了噬菌体，而且有利于已解离的噬菌体的再结合。具有较慢解离动力学（和强结合亲和力）的抗体的选择可以通过使用长时间的清洗和单价噬菌体展示（如Bass等, Proteins, 8: 309-314 (1990)和WO 92/09690所述）及低抗原包被密度（如Marks等, Biotechnol., 10: 779-783 (1992)所述）来促进。

有可能在对CD22具有不同亲和力的噬菌体抗体之间进行选择，甚至是亲和力略有差异的。然而，选定抗体的随机突变（例如如有些亲和力成熟技术进行）有可能产生许多突变体，多数结合抗原，少数具有更高的亲和力。通过限制CD22，罕见的高亲和力噬菌体能竞争胜出。为了保留所有较高亲和力的突变体，可以将噬菌体与过量的生物素化CD22一起温育，但是生物素化CD22的浓度低于CD22的目标摩尔亲和常数。然后用链霉亲合素包被的顺磁珠捕捉高亲和力的结合噬菌体。此类“平衡捕捉”容许依照结合亲和力来选择抗体，其灵敏性容许从大大过量的低亲和力噬菌体中分离出亲和力只有原值2倍的突变体克隆。还可以操作清洗结合至固相的噬菌体的条件来进行基于解离动力学的区分。

抗CD22克隆可以基于活性进行选择。在某些实施方案中，本发明提供了结合天然表达CD22的活细胞的抗CD22抗体。在一个实施方案中，本发明提供了阻断CD22配体与CD22之间的结合但不阻断CD22配体与第二蛋白质结合的抗CD22抗体。对应于此类抗CD22抗体的Fv克隆可以如下选出: (1) 如上所述从噬菌体文库分离抗CD22克隆，并任选通过在合适的细菌宿主中培养来扩增所分离的噬菌体克隆群; (2) 选出分别想阻断和不阻断其活性的CD22和第二蛋白质; (3) 使抗CD22噬菌体克隆吸附至固定化的CD22; (4) 使用过量的第二蛋白质来洗脱任何不想要的、识别CD22结合决定簇（其与第二蛋白质的结合决定簇交叠或共享）的克隆; 并(5) 洗脱在步骤(4)后仍然吸

附的克隆。任选的是，具有期望的阻断/不阻断特性的克隆可以通过一次或多次重复本文所述选择规程来进一步富集。

编码本发明杂交瘤衍生单克隆抗体或噬菌体展示Fv克隆的DNA易于使用常规规程分离和测序（例如通过使用设计成自杂交瘤或噬菌体DNA模板特异性扩增感兴趣的重链和轻链编码区的寡核苷酸引物）。一旦分离，可将DNA置于表达载体中，然后将该表达载体转染入原本不生成免疫球蛋白蛋白质的宿主细胞，诸如大肠杆菌细胞、猿COS细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或骨髓瘤细胞，以在重组宿主细胞中获得所需单克隆抗体的合成。关于编码抗体的DNA在细菌中的重组表达的综述性论文包括Skerra等，Curr. Opinion in Immunol., 5: 256 (1993)及Pluckthun, Immunol. Revs, 130: 151 (1992)。

编码本发明Fv克隆的DNA可以联合编码重链和/或轻链恒定区的已知DNA序列（例如适宜的DNA序列可得自Kabat等，见上文）以形成编码全长或部分重链和/或轻链的克隆。应当领会，任何同种型的恒定区都可用于此目的，包括IgG、IgM、IgA、IgD和IgE恒定区，而且此类恒定区可以得自任何人或动物物种。衍生自一种动物（诸如人）物种的可变域DNA，然后与另一动物物种的恒定区DNA融合以形成“杂合的”全长重链和/或轻链的编码序列的Fv克隆包括在本文所用“嵌合”和“杂合”抗体的定义中。在某些实施方案中，衍生自人可变DNA的Fv克隆与人恒定区DNA融合以形成全长或部分人重链和/或轻链的编码序列。

还可以修饰编码衍生自本发明杂交瘤的抗CD22抗体的DNA，例如通过替代，即用人重链和轻链恒定域的编码序列替换衍生自杂交瘤克隆的同源鼠源序列(例如如Morrison等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6851-6855 (1984)中的方法)。可以进一步修饰编码杂交瘤或Fv克隆衍生抗体或片段的DNA，通过共价接合免疫球蛋白编码序列和非免疫球蛋白多肽的整个或部分编码序列。可以以该方式制备具有本发明的Fv克隆或杂交瘤克隆衍生抗体的结合特异性的“嵌合”或“杂合”抗体。

3. 载体、宿主细胞和重组方法

为了重组生产本发明的抗体，分离编码它的核酸，并将其插入可复制载体，用于进一步克隆（DNA扩增）或表达。可使用常规规程容易的分离编码抗体的DNA并测序（例如使用能够与编码抗体重链和轻链的基因特异性结合的寡核苷酸探针）。可利用许多载体。载体的选择部分取决于将要使用的宿

主细胞。一般而言，宿主细胞或是原核或是真核（通常是哺乳动物）起源的。应当领会，任何同种型的恒定区可用于此目的，包括IgG、IgM、IgA、IgD和IgE恒定区，而且此类恒定区可以从任何人或动物物种获得。

使用原核宿主细胞生成抗体：

载体构建

可使用标准重组技术来获得编码本发明抗体多肽构件的多核苷酸序列。可以从抗体生成细胞诸如杂交瘤细胞分离期望的多核苷酸序列并测序。或者，可使用核苷酸合成仪或PCR技术合成多核苷酸。一旦得到，将编码多肽的序列插入能够在原核宿主中复制并表达异源多核苷酸的重组载体。为了本发明目的，可使用本领域可获得的且知道的许多载体。适宜载体的选择将主要取决于将要插入载体的核酸的大小和将要用载体转化的具体宿主细胞。根据其功能（扩增或表达异源多核苷酸，或二者兼之）及其与它在其中驻留的具体宿主细胞的相容性，每种载体含有多种构件。载体构件通常包括但不限于复制起点、选择标志基因、启动子、核糖体结合位点(RBS)、信号序列、异源核酸插入物、和转录终止序列。

一般而言，与宿主细胞一起使用包含衍生自与这些宿主相容物种的复制子和控制序列的质粒载体。载体通常携带复制位点，以及能够在转化细胞中提供表型选择的标志序列。例如，通常用衍生自大肠杆菌物种的质粒pBR322转化大肠杆菌。pBR322包含编码氨苄青霉素(Amp)和四环素(Tet)抗性的基因，由此提供轻松鉴定转化细胞的手段。pBR322、其衍生物、或其它微生物质粒或噬菌体还可包含或经修饰而包含可被微生物生物体用于表达内源蛋白质的启动子。Carter等，美国专利No. 5,648,237中详细记载了用于表达特定抗体的pBR322衍生物的例子。

另外，可以将包含与宿主微生物相容的复制子和控制序列的噬菌体载体用作这些宿主的转化载体。例如，可使用噬菌体诸如λGEM.TM.-11来构建可用于转化易感宿主细胞诸如大肠杆菌LE392的重组载体。

本发明的表达载体可包含两种或更多启动子-顺反子对，它们编码每一种多肽构件。启动子是位于顺反子上游（5'）的非翻译调控序列，它调控顺反子的表达。原核启动子通常分成两类，诱导型的和组成性的。诱导型启动子指响应培养条件的变化（例如营养物的存在与否或温度变化）而启动受其控制的顺反子的升高水平转录的启动子。

众所周知受到多种潜在宿主细胞识别的大量启动子。通过限制酶消化切下源DNA中的启动子并将分离的启动子序列插入本发明的载体，由此可以将选择的启动子与编码轻链或重链的顺反子DNA可操作连接。天然启动子序列和许多异源启动子都可用于指导靶基因的扩增和/或表达。在有些实施方案中，使用异源启动子，因为与天然靶多肽启动子相比，它们通常容许所表达靶基因的更高转录和更高产量。

适用于原核宿主的启动子包括PhoA启动子、β-半乳糖苷酶和乳糖启动子系统、色氨酸(trp)启动子系统、和杂合启动子诸如tac或trc启动子。然而，在细菌中有功能的其它启动子（诸如其它已知的细菌或噬菌体启动子）也是合适的。它们的核苷酸序列已经发表，由此熟练工作人员能够使用提供任何所需限制性位点的接头或衔接头将它们与编码靶轻链和重链的顺反子可操作连接（Siebenlist等, Cell 20: 269 (1980)）。

在本发明的一个方面，重组载体内的每个顺反子都包含指导所表达多肽穿膜转运的分泌信号序列构件。一般而言，信号序列可以是载体的构件，或者它可以是插入载体的靶多肽DNA的一部分。为了本发明目的而选择的信号序列应当是受到宿主细胞识别并加工（即被信号肽酶切除）的信号序列。对于不识别并加工异源多肽的天然信号序列的原核宿主细胞，将信号序列用选自例如下组的原核信号序列替代：碱性磷酸酶、青霉素酶、Ipp、或热稳定的肠毒素II (STII)前导序列、LamB、PhoE、PelB、OmpA和MBP。在本发明的一个实施方案中，表达系统的两个顺反子中都使用的信号序列是STII信号序列或其变体。

在另一方面，依照本发明的免疫球蛋白的生成可以在宿主细胞的细胞质中发生，因此不需要在每个顺反子内存在分泌信号序列。在那点上，免疫球蛋白轻链和重链在细胞质内表达、折叠和装配而形成功能性免疫球蛋白。某些宿主菌株（例如大肠杆菌trxB-菌株）提供有利于二硫键形成的细胞质条件，从而容许所表达蛋白质亚基的正确折叠和装配。Proba和Pluckthun, Gene 159: 203 (1995))。

本发明的抗体可使用如下表达系统来生成，其中所表达多肽构件的数量比率可以受到调控，从而将分泌且正确装配的本发明抗体的产量最大化。此类调控是至少部分通过同时调控多肽构件的翻译强度而实现的。

Simmons等，美国专利No. 5,840,523中公开了用于调控翻译强度的一种

技术。它在顺反子内利用翻译起始区(TIR)的变体。对于指定的TIR，可创建具有一定范围翻译强度的一系列氨基酸或核酸序列变体，由此提供针对特定链的期望表达水平调节此因素的方便手段。可通过常规诱变技术导致能改变氨基酸序列的密码子变化来生成TIR变体。在某些实施方案中，核苷酸序列中的变化是沉默的。TIR中的改变可包括例如Shine-Dalgarno序列的数目或间距的改变，及信号序列中的改变。用于生成突变型信号序列的一种方法是在编码序列的开始端生成不改变信号序列氨基酸序列的“密码子库”（即变化是沉默的）。这可通过改变每个密码子的第三个核苷酸位置来实现；另外，有些氨基酸，诸如亮氨酸、丝氨酸、和精氨酸，具有多种第一个和第二个位置，这可在建库中增加复杂性。Yansura等，METHODS: A Companion to Methods in Enzymol. 4: 151-158 (1992)中详细记载了这种诱变方法。

在一个实施方案中，对于载体中的每个顺反子，生成具有一定范围TIR强度的一组载体。这个有限集合提供了每条链的表达水平以及期望抗体产物的产量在各种TIR强度组合下的比较。可通过量化报道基因的表达水平来测定TIR强度，Simmons等，美国专利No. 5,840,523中有详细描述。根据翻译强度的比较，选择期望的个别TIR在本发明的表达载体构建物中进行组合。

适于表达本发明抗体的原核宿主细胞包括古细菌（Archaebacteria）和真细菌（Eubacteria），诸如革兰氏阴性或阳性生物体。有用细菌的例子包括埃希氏菌属（Escherichia）（如大肠埃希氏菌E. coli）、芽孢杆菌属（Bacillus）（如枯草芽孢杆菌B. subtilis）、肠杆菌属（Enterobacteria）、假单胞菌属（Pseudomonas）（如铜绿假单胞菌P. aeruginosa）物种、鼠伤寒沙门氏菌（Salmonella typhimurium）、粘质沙雷氏菌（Serratia marcescans）、克雷伯氏菌属（Klebsiella）、变形菌属（Proteus）、志贺氏菌属（Shigella）、根瘤菌属（Rhizobium）、透明颤菌属（Vitreoscilla）、或副球菌属（Paracoccus）。在一个实施方案中，使用革兰氏阴性细胞。在一个实施方案中，使用大肠杆菌细胞作为本发明的宿主。大肠杆菌菌株的例子包括菌株W3110（Bachmann, Cellular and Molecular Biology, 卷2, Washington, D.C., 美国微生物学学会, 1987, 第1190-1219页；ATCC保藏号27,325）及其衍生物，包括具有基因型W3110 ΔfhuA (ΔtonA) ptr3 lac Iq lacL8 ΔompTΔ(nmpc-fepE) degP41 kanR的菌株33D3（美国专利No. 5,639,635）。其它菌株及其衍生物，诸如大肠杆菌294（ATCC 31,446）、大肠杆菌B、大肠杆菌λ1776（ATCC 31,537）和大肠杆菌

RV308（ATCC 31,608）也是合适的。这些例子只是例示而非限制。本领域知道用于构建具有指定基因型的任何上述细菌衍生物的方法，参见例如Bass等, Proteins 8: 309-314 (1990)。通常必需考虑复制子在细菌细胞中的可复制性来选择适宜的细菌。例如，在使用众所周知的质粒诸如pBR322、pBR325、pACYC177或pKN410来提供复制子时，大肠杆菌、沙雷氏菌属、或沙门氏菌属物种可能适于用作宿主。通常，宿主细胞应当分泌最小量的蛋白水解酶，而且可能希望在细胞培养中掺入额外的蛋白酶抑制剂。

抗体生成

用上述表达载体转化宿主细胞，并在为了诱导启动子、选择转化子或扩增编码期望序列的基因而适当改动的常规营养培养基中进行培养。

转化即将DNA导入原核宿主，使得DNA能够进行复制，或是作为染色体外元件或是通过染色体成分。根据所用宿主细胞，使用适于此类细胞的标准技术进行转化。采用氯化钙的钙处理通常用于具有坚固细胞壁屏障的细菌细胞。另一种转化方法采用聚乙二醇/DMSO。使用的还有一种技术是电穿孔。

在本领域知道的且适于培养选定宿主细胞的培养基中培养用于生成本发明多肽的原核细胞。合适培养基的例子包括添加了必需营养补充物的LB培养基(Luria broth)。在有些实施方案中，培养基还含有根据表达载体的构建而选择的选择剂，以选择性容许包含表达载体的原核细胞生长。例如，向用于培养表达氨苄青霉素抗性基因的细胞的培养基中添加氨苄青霉素。

在碳源、氮源、和无机磷酸盐源以外，还可含有适当浓度的任何必需补充物，或是单独加入或是作为与另一种补充物或培养基的混合物，诸如复合氮源。任选的是，培养基可含有一种或多种选自下组的还原剂：谷胱甘肽、半胱氨酸、胱胺、巯基乙酸盐/酯、二硫赤藓糖醇和二硫苏糖醇。

在合适的温度培养原核宿主细胞。在某些实施方案中，对于培养大肠杆菌，培养温度的范围为约20℃至约39℃、约25℃至约37℃、或约30℃。主要取决于宿主生物体，培养基的pH可以是范围为约5至约9的任何pH。在某些实施方案中，对于大肠杆菌，pH是约6.8至约7.4、或约7.0。

如果本发明的表达载体中使用诱导型启动子，那么在适于激活启动子的条件下诱导蛋白质表达。在本发明的一个方面，使用PhoA启动子来控制多肽的转录。因此，为了诱导，在磷酸盐限制培养基中培养经过转化的宿主细胞。在某些实施方案中，磷酸盐限制培养基是C.R.A.P培养基（参见例如Simmons

等, J. Immunol. Methods 263: 133-147 (2002))。根据所采用的载体构建物，可采用多种其它诱导物，正如本领域所知道的。

在一个实施方案中，所表达的本发明多肽分泌入宿主细胞的周质并从中回收。蛋白质回收通常涉及破坏微生物，通常通过诸如渗压震扰(osmotic shock)、超声处理或裂解等手段。一旦细胞遭到破坏，可通过离心或过滤清除细胞碎片或整个细胞。可以通过例如亲和树脂层析进一步纯化蛋白质。或者，蛋白质可以转运入培养液并从中分离。可以从培养液清除细胞，并将培养物上清液过滤和浓缩，用于进一步纯化所生成蛋白质。可使用普遍知道的方法诸如聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)和Western印迹分析进一步分离和鉴定所表达蛋白质。

在本发明的一个方面，通过发酵过程大量进行抗体生产。多种大规模补料-分批发酵规程可用于生产重组蛋白。大规模发酵具有至少1000升的容量，在某些实施方案中是约1,000至100,000升的容量。这些发酵罐使用搅拌器叶轮来分配氧和养分，尤其是葡萄糖（优选的碳源/能源）。小规模发酵通常指在体积容量不超过约100升的发酵罐中进行的发酵，范围可以是约1升至约100升。

在发酵过程中，通常在将细胞在合适条件下培养至期望密度（例如OD550约180-220，在此阶段细胞处于早期稳定期）后启动蛋白质表达的诱导。根据所采用的载体构建物，可使用多种诱导物，正如本领域知道的和上文描述的。可以在诱导前将细胞培养更短的时间。通常将细胞诱导约12-50小时，但是可使用更长或更短的诱导时间。

为了提高本发明多肽的产量和质量，可修改多项发酵条件。例如，为了改善所分泌抗体多肽的正确装配和折叠，可使用过表达伴侣蛋白诸如Dsb蛋白（DsbA、DsbB、DsbC、DsbD和/或DsbG）或FkpA（具有伴侣活性的一种肽基脯氨酰-顺式,反式-异构酶）的额外载体来共转化宿主原核细胞。已经证明伴侣蛋白促进在细菌宿主细胞中生成的异源蛋白质的正确折叠和溶解度。Chen等, J. Biol. Chem. 274: 19601-19605 (1999); Georgiou等, 美国专利No. 6,083,715; Georgiou等, 美国专利No. 6,027,888; Bothmann和Pluckthun, J. Biol. Chem. 275: 17100-17105 (2000); Ramm和Pluckthun, J. Biol. Chem. 275: 17106-17113 (2000); Arie等, Mol. Microbiol. 39: 199-210 (2001))。

为了将所表达异源蛋白质（尤其是对蛋白水解敏感的异源蛋白质）的蛋

白水解降至最低，可以将蛋白水解酶缺陷的某些宿主菌株用于本发明。例如，可修饰宿主细胞菌株，在编码已知细菌蛋白酶的基因中进行遗传突变，诸如蛋白酶III、OmpT、DegP、Tsp、蛋白酶I、蛋白酶Mi、蛋白酶V、蛋白酶VI及其组合。可以获得有些大肠杆菌蛋白酶缺陷菌株，参见例如Joly等 (1998)见上文；Georgiou等，美国专利No. 5,264,365; Georgiou等，美国专利No. 5,508,192; Hara等, Microbial Drug Resistance 2: 63-72 (1996)。

在一个实施方案中，在本发明的表达系统中使用蛋白水解酶缺陷且经过过表达一种或多种伴侣蛋白的质粒转化的大肠杆菌菌株作为宿主细胞。

抗体纯化

在一个实施方案中，进一步纯化本文中生成的抗体蛋白质以获得基本上同质的制品，用于进一步的测定和使用。可采用本领域知道的标准蛋白质纯化方法。下面的规程是合适纯化规程的例示：免疫亲和或离子交换柱上的分级、乙醇沉淀、反相HPLC、硅土或阳离子交换树脂诸如DEAE上的层析、层析聚焦、SDS-PAGE、硫酸铵沉淀、和使用例如Sephadex G-75的凝胶过滤。

在一个方面，将固定化在固相上的蛋白A用于本发明抗体产物的免疫亲和纯化。蛋白A是来自金黄色葡萄球菌（Staphylococcus aureas）的41kD细胞壁蛋白质，它以高亲和力结合抗体Fc区。Lindmark等, J. Immunol. Meth. 62: 1-13 (1983))。蛋白A固定化其上的固相可以是具有玻璃或石英表面的柱子，或者可控孔径玻璃柱或硅酸柱。在有些应用中，柱子以诸如甘油等试剂包被，用以有可能防止污染物的非特异粘附。

作为纯化的第一步，可以将衍生自如上所述细胞培养物的制备物施加到蛋白A固定化固相上，使得感兴趣抗体特异性结合蛋白A。然后清洗固相以清除与固相非特异性结合的污染物。最后通过洗脱从固相回收感兴趣抗体。

使用真核宿主细胞生成抗体：

在真核宿主细胞中使用的载体通常包含一种或多种下列非限制性构件：信号序列、复制起点、一种或多种标志基因、增强子元件、启动子、和转录终止序列。

信号序列构件

在真核宿主细胞中使用的载体还可在感兴趣成熟蛋白质或多肽的N端包含信号序列或具有特异性切割位点的其它多肽。可以选择受到宿主细胞识别并加工（即被信号肽酶切除）的异源信号序列。在哺乳动物细胞表达中，可

利用哺乳动物信号序列以及病毒分泌前导，例如单纯疱疹病毒gD信号。将此类前体区的DNA连接到编码抗体的DNA的读码框中。

复制起点

通常，哺乳动物表达载体不需要复制起点构件。例如，SV40起点通常可能只因包含早期启动子才使用。

选择基因构件

表达和克隆载体可包含选择基因，也称为选择标志。典型的选择基因编码如下蛋白质：(a)赋予对抗生素或其它毒素的抗性，例如氨苄青霉素、新霉素、甲氨蝶呤或四环素；(b)补足相应的营养缺陷；或(c)提供不能从复合培养基获得的关键营养物。

选择方案的一个例子利用药物来阻滞宿主细胞的生长。经异源基因成功转化的那些细胞生成赋予药物抗性的蛋白质，因而幸免于选择方案。此类显性选择的例子使用药物新霉素、霉酚酸和潮霉素。

适于哺乳动物细胞的选择标志的另一个例子是能够鉴定有能力摄取抗体核酸的细胞的选择标志，诸如DHFR、胸苷激酶、金属硫蛋白I和II（优选灵长类金属硫蛋白基因）、腺苷脱氨酶、鸟氨酸脱羧酶等。

例如，在有些实施方案中，可以首先通过将所有转化子在含有甲氨蝶呤（Mtx，DHFR的一种竞争性拮抗剂）的培养基中进行培养来鉴定经DHFR选择基因转化的细胞。在有些实施方案中，在采用野生型DHFR时，适宜的宿主细胞是DHFR活性缺陷的中国仓鼠卵巢(CHO)细胞系（例如ATCC CRL-9096）。

或者，可通过在含有针对选择标志的选择剂诸如氨基糖苷抗生素例如卡那霉素、新霉素或G418的培养基中培养细胞来选择经编码抗体、野生型DHFR蛋白、和另一种选择标志诸如氨基糖苷3'-磷酸转移酶(APH)的DNA序列转化或共转化的宿主细胞（特别是包含内源DHFR的野生型宿主）。参见美国专利No. 4,965,199。

启动子构件

表达和克隆载体通常包含受到宿主生物体识别的启动子，且与编码感兴趣多肽（例如抗体）的核酸可操作连接。已知真核细胞的启动子序列。例如，事实上所有真核基因都具有富含AT区，它位于起始转录的位点上游约25至30个碱基处。在许多基因的转录起点上游70至80个碱基处发现的另一种序列是

CNCAAT区，其中N可以是任何核苷酸。在大多数真核基因的3'端是AATAAA序列，它可能是向编码序列的3'端添加聚腺苷酸(polyA)尾的信号。在某些实施方案中，任何或所有这些序列可以合适的插入真核表达载体。

在哺乳动物宿主细胞中由载体转录受到例如从病毒（诸如多瘤病毒、禽痘病毒、腺病毒（诸如2型腺病毒）、牛乳头瘤病毒、禽类肉瘤病毒、巨细胞病毒、逆转录病毒、乙肝病毒、和猿病毒40 (SV40)）基因组获得的、来自异源哺乳动物启动子（例如肌动蛋白启动子或免疫球蛋白启动子）的、来自热休克启动子的启动子的控制，倘若此类启动子与宿主细胞系统相容的话。

方便的以SV40限制性片段的形式获得SV40病毒的早期和晚期启动子，该片段还包含SV40病毒复制起点。方便的以HindIII E限制性片段的形式获得人巨细胞病毒的立即早期启动子。美国专利No. 4,419,446中公开了使用牛乳头瘤病毒作为载体在哺乳动物宿主中表达DNA的系统。美国专利No. 4,601,978中记载了该系统的一种修改。还可参见Reyes等, Nature 297: 598-601 (1982)，其记载了在小鼠细胞中在来自单纯疱疹病毒的胸苷激酶启动子的控制下表达人β-干扰素cDNA。或者，可使用劳氏肉瘤病毒长末端重复序列作为启动子。

增强子元件构件

常常通过在载体中插入增强子序列来提高高等真核细胞对编码本发明抗体的DNA的转录。现在知道来自哺乳动物基因（球蛋白、弹性蛋白酶、清蛋白、甲胎蛋白和胰岛素）的许多增强子序列。然而，通常使用来自真核细胞病毒的增强子。例子包括SV40复制起点晚期侧的增强子（bp 100-270）、巨细胞病毒早期启动子增强子、多瘤病毒复制起点晚期侧的增强子、和腺病毒增强子。还可参见Yaniv, Nature 297: 17-18 (1982)，其记载了激活真核启动子的增强子元件。增强子可剪接入载体，位于抗体多肽编码序列的5'或3'位置，但是一般位于启动子的5'位点。

转录终止构件

在真核宿主细胞中使用的表达载体可以还包含终止转录和稳定mRNA所必需的序列。此类序列通常可从真核或病毒DNA或cDNA非翻译区的5'端和偶尔的3'端获得。这些区域包含编码抗体的mRNA的非翻译区中转录成聚腺苷酸化片段的核苷酸区段。一种有用的转录终止构件是牛生长激素聚腺苷酸化区。参见WO94/11026及其中公开的表达载体。

宿主细胞的选择和转化

适于克隆或表达本文载体中的DNA的宿主细胞包括本文描述的高等真核细胞，包括脊椎动物宿主细胞。脊椎动物细胞在培养（组织培养）中的繁殖已经成为常规规程。有用哺乳动物宿主细胞系的例子有经SV40转化的猴肾CV1系（COS-7，ATCC CRL 1651）、人胚肾系（293细胞或为悬浮培养而亚克隆的293细胞，Graham等，J. Gen. Virol. 36: 59 (1977)）、幼仓鼠肾细胞（BHK，ATCC CCL 10）、中国仓鼠卵巢细胞/-DHFR（CHO，Urlaub等，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77: 4216 (1980)）、小鼠塞托利(Sertoli)细胞（TM4，Mather，Biol. Reprod. 23: 243-251 (1980)）、猴肾细胞（CV1，ATCC CCL 70）、非洲绿猴肾细胞（VERO-76，ATCC CRL 1587）、人宫颈癌细胞（HELA，ATCC CCL 2）、犬肾细胞（MDCK，ATCC CCL 34）、牛鼠(buffalo rat)肝细胞（BRL 3A，ATCC CRL 1442）、人肺细胞（W138，ATCC CCL 75）、人肝细胞（Hep G2，HB 8065）、小鼠乳瘤（MMT 060562，ATCC CCL 51）、TRI细胞（Mather等，Annals N.Y. Acad. Sci. 383: 44-68 (1982)）、MRC 5细胞、FS4细胞和人肝瘤(hepatoma)系（Hep G2）。

为了生成抗体，用上文所述表达或克隆载体转化宿主细胞，并在为了诱导启动子、选择转化子或扩增编码期望序列的基因而适当改动的常规营养培养基中进行培养。

宿主细胞的培养

可在多种培养基中培养用于生成本发明抗体的宿主细胞。商品化培养基诸如Ham氏F10（Sigma）、极限必需培养基（MEM，Sigma）、RPMI-1640（Sigma）、和Dulbecco氏改良Eagle氏培养基（DMEM，Sigma）适于培养宿主细胞。另外，可使用下列文献中记载的任何培养基作为宿主细胞的培养基：Ham等，Meth. Enz. 58: 44 (1979); Barnes等，Anal. Biochem. 102: 255 (1980); 美国专利No. 4,767,704; 4,657,866; 4,927,762; 4,560,655; 5,122,469; WO 90/03430; WO 87/00195; 或美国专利Re. 30,985。任何这些培养基可根据需要补充激素和/或其它生长因子（诸如胰岛素、运铁蛋白或表皮生长因子）、盐（诸如氯化钠、钙、镁和磷酸盐）、缓冲剂（诸如HEPES）、核苷酸（诸如腺苷和胸苷）、抗生素（诸如GENTAMYCIN™药物）、痕量元素（定义为通常以微摩尔范围的终浓度存在的无机化合物）、和葡萄糖或等效能源。还可以适宜浓度含有本领域技术人员知道的任何其它补充物。培养条件诸如温度、

pH等即为表达而选择的宿主细胞先前所用的，这对于普通技术人员是显然的。

抗体的纯化

在使用重组技术时，可以在细胞内生成抗体，或者直接分泌入培养基。如果在细胞内生成抗体，那么首先可以通过例如离心或超滤清除微粒碎片，或是宿主细胞或是裂解片段。如果抗体分泌入培养基，那么可以首先使用商品化蛋白质浓缩滤器（例如Amicon或Millipore Pellicon超滤单元）浓缩来自此类表达系统的上清液。可以在任何上述步骤中包括蛋白酶抑制剂诸如PMSF以抑制蛋白水解，而且可包括抗生素以防止外来污染物的生长。

可使用例如羟磷灰石层析、凝胶电泳、透析和亲和层析（亲和层析是一种便利的技术）来纯化从细胞制备的抗体组合物。蛋白A作为亲和配体的适宜性取决于抗体中存在的任何免疫球蛋白Fc结构域的种类和同种型。蛋白A可用于纯化基于人γ1、γ2、或γ4重链的抗体（Lindmark等, J. Immunol. Methods 62: 1-13 (1983)）。蛋白G推荐用于所有小鼠同种型和人γ3（Guss等, EMBO J. 5: 1567-1575 (1986)）。亲和配体所附着的基质可以是琼脂糖，但是可使用其它基质。物理稳定的基质诸如可控孔径玻璃或聚(苯乙烯二乙烯)苯能获得比琼脂糖更快的流速和更短的加工时间。若抗体包含CH3结构域，则可使用Bakerbond ABX™树脂（J. T. Baker，Phillipsburg，NJ）进行纯化。根据待回收的抗体，也可使用其它蛋白质纯化技术诸如离子交换柱上的分级、乙醇沉淀、反相HPLC、硅土上的层析、肝素SEPHAROSE™上的层析、阴离子或阳离子交换树脂（诸如聚天冬氨酸柱）上的层析、层析聚焦、SDS-PAGE和硫酸铵沉淀。

在任何初步纯化步骤之后，可以将含有感兴趣抗体和污染物的混合物进行进一步的纯化，例如低pH疏水相互作用层析，使用pH约2.5-4.5的洗脱缓冲液，优选在低盐浓度（例如约0-0.25M盐）进行。

一般而言，用于制备供研究、测试和临床使用的抗体的各种方法是本领域已完善建立的，与上文所述方法是一致的和/或本领域技术人员认为对于特定的感兴趣抗体是适宜的。

免疫偶联物

本发明还提供了包含偶联有一种或多种细胞毒剂的本发明任何抗CD22

抗体的免疫偶联物（可互换的称为“抗体-药物偶联物”或“ADC”），所述细胞毒剂诸如化疗剂、药物、生长抑制剂、毒素（例如细菌、真菌、植物或动物起源的酶活性毒素或其片段）或放射性同位素（即放射偶联物）。

在某些实施方案中，免疫偶联物包含抗CD22抗体和化疗剂或其它毒素。本文中（上文）描述了可用于生成免疫偶联物的化疗剂。也可使用酶活性毒素及其片段，这些酶活性毒素及其片段已在说明书中描述。

在某些实施方案中，免疫偶联物包含抗CD22抗体和一种或多种小分子毒素，包括但不限于小分子药物，诸如加利车霉素(calicheamicin)、美登木素生物碱(maytansinoids)、多拉司他汀(dolastatin)、auristatin、单端孢霉素(trichothecene)和CC1065及这些药物具有细胞毒活性的片段。此类免疫偶联物的例子在下文中有更为详细的讨论。

1. 例示性的免疫偶联物－抗体-药物偶联物

本发明的免疫偶联物（或“抗体-药物偶联物”(“ADC”)）可以是下文通式I，其中抗CD22抗体经任选的接头(L)与一个或多个药物模块(D)偶联（即共价附着）。

$$Ab–(L–D)_p \qquad \text{通式I}$$

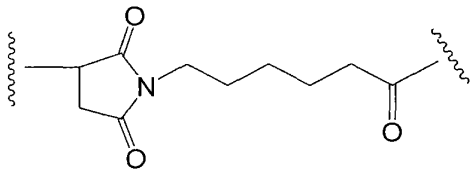
因而，抗CD22抗体可直接地或经接头地偶联至药物。在通式I中，p是每个抗体的平均药物模块数，其范围可以是例如每个抗体约1个到约20个药物模块，在某些实施方案中是每个抗体1个到约8个药物模块。

例示性的接头

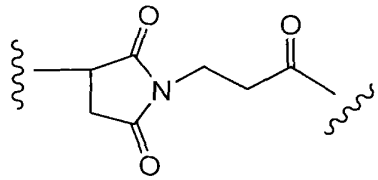
本文中披露了例示性的接头和药物模块。接头可以包含一种或多种接头构件。例示性的接头构件包括6-马来酰亚氨基己酰基(“MC”)、马来酰亚氨基丙酰基(“MP”)、缬氨酸-瓜氨酸(“val-cit”或“vc”)、丙氨酸-苯丙氨酸(“ala-phe”)、对氨基苄氧羰基(“PAB”)、N-琥珀酰亚氨基4-(2-吡啶基硫代)戊酸酯(“SPP”)、N-琥珀酰亚氨基4-(N-马来酰亚氨基甲基)环己烷-1羧酸酯(“SMCC”)、和N-琥珀酰亚氨基(4-碘-乙酰基)氨基苯甲酸酯(“SIAB”)。本领域知道多种接头构件，下文也描述了一些。

接头可以是便于在细胞中释放药物的“可切割接头”。例如，可使用酸不稳定接头（例如腙）、蛋白酶敏感（例如肽酶敏感）接头、光不稳定接头、二甲基接头、或含二硫化物接头(Chari等, Cancer Research 52:127-131 (1992); 美国专利No. 5,208,020)。

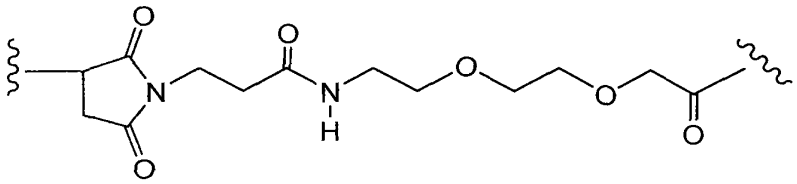
在有些实施方案中，接头构件可以包含将抗体连接至另一接头构件或药物模块的“延伸物单元”(stretcher unit)。例示性的延伸物单元显示于下文（其中波形线指示共价附着至抗体的位点）：



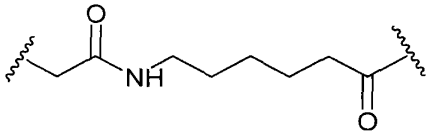
MC



MP



MPEG



。

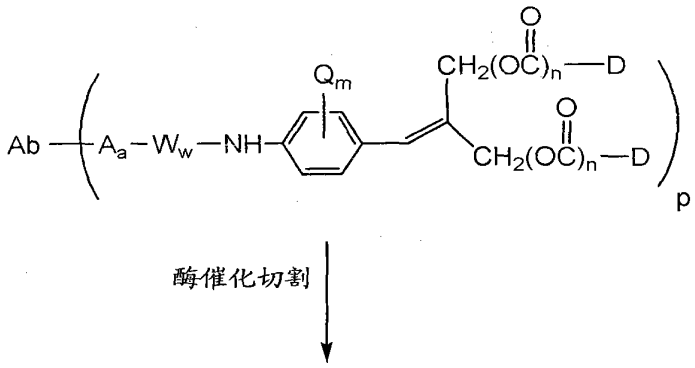
在有些实施方案中，接头构件可以包含氨基酸单元。在一个这样的实施方案中，氨基酸单元容许蛋白酶切割接头，由此便于在暴露于胞内蛋白酶（诸如溶酶体酶）后从免疫偶联物释放药物。参见例如Doronina等 (2003) Nat. Biotechnol. 21:778-784。例示性的氨基酸单元包括但不限于二肽、三肽、四肽、和五肽。例示性的二肽包括：缬氨酸-瓜氨酸(vc或val-cit)；丙氨酸-苯丙氨酸(af或ala-phe)；苯丙氨酸-赖氨酸(fk或phe-lys)；或N-甲基-缬氨酸-瓜氨酸(Me-val-cit)。例示性的三肽包括：甘氨酸-缬氨酸-瓜氨酸(gly-val-cit)和甘氨酸-甘氨酸-甘氨酸(gly-gly-gly)。氨基酸单元可以包含天然存在的氨基酸残基，以及次要氨基酸和非天然存在氨基酸类似物，诸如瓜氨酸。氨基酸单元可以在它们对特定酶（例如肿瘤相关蛋白酶，组织蛋白酶B、C和D，或血浆蛋白酶）的酶促切割的选择性方面进行设计和优化。

在有些实施方案中，接头构件可以包含将抗体连接（或是直接的或是通

过延伸物单元和/或氨基酸单元）至药物模块的“间隔物”单元。间隔物单元可以是“自我牺牲的”(self-immolative)或“非自我牺牲的”。“非自我牺牲的”间隔物单元指间隔物单元的部分或整体在ADC的酶促（蛋白水解）切割后保持结合于药物模块的间隔物单元。非自我牺牲的间隔物单元的例子包括但不限于甘氨酸间隔物单元和甘氨酸-甘氨酸间隔物单元。还涵盖对序列特异性酶促切割易感的肽间隔物的其它组合。例如，肿瘤细胞相关蛋白酶对含甘氨酸-甘氨酸间隔物单元的ADC的酶促切割将导致甘氨酸-甘氨酸-药物模块从ADC的剩余部分释放。在一个这样的实施方案中，甘氨酸-甘氨酸-药物模块然后在肿瘤细胞中进行分开的水解步骤，如此从药物模块切割甘氨酸-甘氨酸间隔物单元。

“自我牺牲的”间隔物单元容许释放药物模块而没有分开的水解步骤。在某些实施方案中，接头的间隔物单元包含对氨基苄基单元。在一个这样的实施方案中，将对氨基苯甲醇经酰胺键附着至氨基酸单元，并且在苯甲醇与细胞毒剂之间生成氨基甲酸酯、甲基氨基甲酸酯、或碳酸酯。参见例如Hamann等 (2005) Expert Opin. Ther. Patents (2005) 15:1087-1103。在一个实施方案中，间隔物单元是对氨基苄氧羰基(PAB)。在某些实施方案中，对氨基苄基单元的亚苯基部分是用Qm取代的，其中Q是-C_1-C_8烃基、-O-(C_1-C_8烃基)、-卤素、-硝基、或-氰基；而m是范围为0-4的整数。自我牺牲的间隔物单元的例子进一步包括但不限于在电子上与对氨基苯甲醇相似的芳香族化合物(参见例如US 2005/0256030 A1)，诸如2-氨基咪唑-5-甲醇衍生物(Hay等 (1999) Bioorg. Med. Chem. Lett. 9:2237)和邻位或对位氨基苄基乙缩醛。可以使用在酰胺键水解后发生环化的间隔物，诸如取代的和未取代的4-氨基丁酸酰胺(Rodrigues等, Chemistry Biology, 1995, 2, 223)；适当取代的双环[2.2.1]和双环[2.2.2]环体系(Storm,等, J. Amer. Chem. Soc., 1972, 94, 5815)；及2-氨基苯基丙酸酰胺(Amsberry等, J. Org. Chem., 1990, 55, 5867)。消除在甘氨酸a位取代的含胺药物(Kingsbury等, J. Med. Chem., 1984, 27, 1447)也是可用于ADC的自我牺牲的间隔物的例子。

在一个实施方案中，间隔物单元是下文所示分支的双(羟甲基)苯乙烯(BHMS)单元，其可用于掺入和释放多个药物。



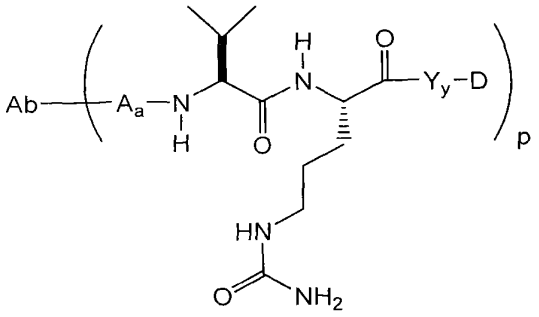
其中Q是-C_1-C_8烃基、-O-(C_1-C_8烃基)、-卤素、硝基、或氰基；m是范围为0-4的整数；n是0或1；而p的范围是1到约20。

接头可以包含任何一种或多种上述接头化合物。在某些实施方案中，接头在下述ADC通式II中显示在方括号内

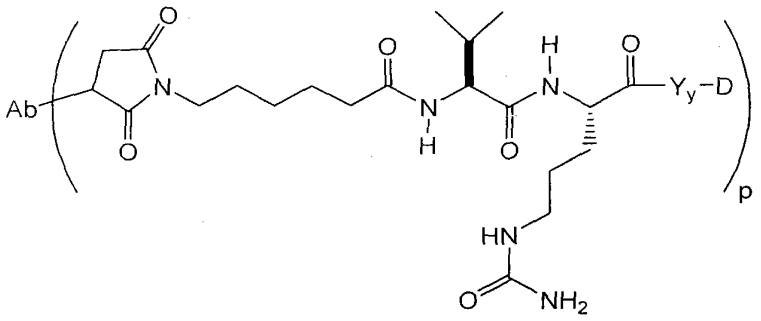
$$Ab\text{-}([Aa\text{-}Ww\text{-}Yy]\text{-}D)_p \qquad \text{通式II}$$

其中A是延伸物单元，而a是0到1的整数；W是氨基酸单元，而w是0到12的整数；Y是间隔物单元，而y是0、1、或2；且Ab、D、和p如上文通式I的定义。此类接头的例示性实施方案记载于US 2005-0238649 A1，明确收入本文作为参考。

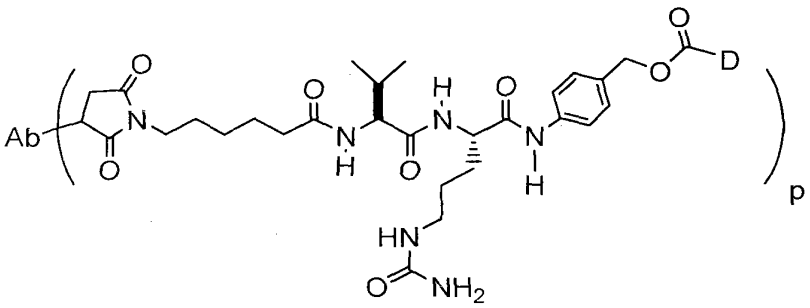
显示了下文通式II的ADC背景中的例示性接头构件及其组合：



Val-Cit或VC



MC-val-cit



MC-val-cit-PAB

接头构件，包括延伸物、间隔物、和氨基酸单元，可以通过本领域已知方法合成，诸如US 2005-0238649 A1中所记载的。

例示性的药物模块

美登素和美登木素生物碱

在有些实施方案中，免疫偶联物包含偶联有一个或多个美登木素生物碱分子的本发明抗体。美登木素生物碱是通过抑制微管蛋白多聚化来发挥作用的有丝分裂抑制剂。美登素最初从东非灌木齿叶美登木（Maytenus serrata）分离得到（美国专利No. 3,896,111）。随后发现某些微生物也生成美登木素生物碱，诸如美登醇和C-3美登醇酯（美国专利No. 4,151,042）。例如下列美国专利公开了合成美登醇及其衍生物和类似物：4,137,230; 4,248,870; 4,256,746; 4,260,608; 4,265,814; 4,294,757; 4,307,016; 4,308,268; 4,308,269; 4,309,428; 4,313,946; 4,315,929; 4,317,821; 4,322,348; 4,331,598; 4,361,650; 4,364,866; 4,424,219; 4,450,254; 4,362,663; 及4,371,533。

美登木素生物碱药物模块在抗体-药物偶联物中是有吸引力的药物模块，因为它们：(i)相对易于通过发酵或发酵产物的化学修饰或衍生化来制备；(ii)易于用适于通过非二硫化物接头偶联至抗体的官能团衍生化；(iii)在血浆中稳定；且(iv)有效针对多种肿瘤细胞系。

适于用作美登木素生物碱药物模块的美登素化合物是本领域公知的，而

且可以依照已知方法从天然来源分离，或是使用遗传工程技术生产(参见Yu等 (2002) PNAS 99:7968-7973)。美登醇和美登醇类似物也可以依照已知方法合成制备。

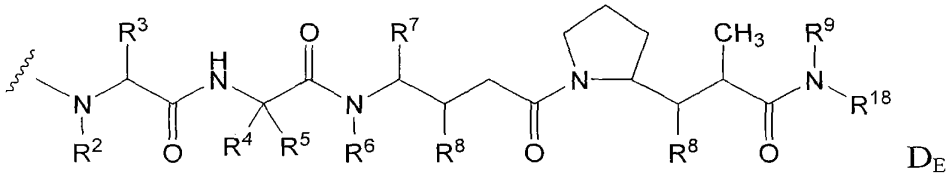
美登木素生物碱药物模块的例示性实施方案包括: DM1; DM3; 和DM4，正如本文中所公开的。

Auristatin和多拉司他汀

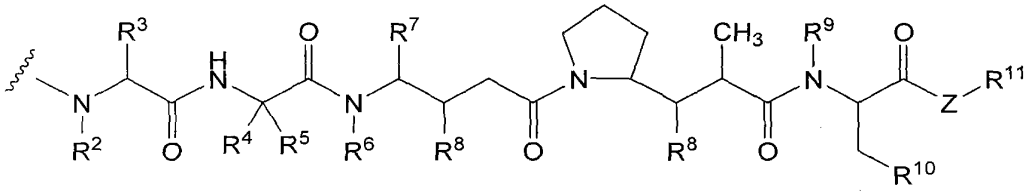
在有些实施方案中，免疫偶联物包含与多拉司他汀(dolastatin)或多拉司他汀肽类似物或衍生物（例如auristatin）(美国专利No. 5,635,483; 5,780,588)偶联的本发明抗体。多拉司他汀和auristatin已经显示出干扰微管动力学、GTP水解、及核和细胞分裂(Woyke等 (2001) Antimicrob. Agents and Chemother. 45(12):3580-3584)且具有抗癌(美国专利No. 5663149)和抗真菌活性(Pettit等 (1998) Antimicrob. Agents Chemother. 42:2961-2965)。多拉司他汀或auristatin药物模块可经由肽药物模块的N(氨基)末端或C(羧基)末端附着于抗体(WO 02/088172)。

例示性的auristatin实施方案包括N-末端连接的单甲基auristatin药物模块DE和DF，披露于Senter等, Proceedings of the American Association for Cancer Research, 卷45, 摘要号623, 2004年3月28日，明确将其公开内容完整收入本文作为参考。

肽药物模块可以选自下文通式D_E和D_F:



D_E



D_F

其中D_E和D_F的波形线指示抗体或抗体-接头构件的共价附着位点，且每个位置是独立的

R^2选自H和C_1-C_8烃基;

R^3选自H、C_1-C_8烃基、C_3-C_8碳环、芳基、C_1-C_8烃基-芳基、C_1-C_8烃基-(C_3-C_8

碳环)、C_3-C_8杂环和C_1-C_8烃基-(C_3-C_8杂环);

R^4选自H、C_1-C_8烃基、C_3-C_8碳环、芳基、C_1-C_8烃基-芳基、C_1-C_8烃基-(C_3-C_8碳环)、C_3-C_8杂环和C_1-C_8烃基-(C_3-C_8杂环);

R^5选自H和甲基;

或者R^4与R^5一起形成碳环且具有通式-$(CR^aR^b)_n$-,其中R^a和R^b独立地选自H、C_1-C_8烃基和C_3-C_8碳环,而n选自2、3、4、5和6;

R^6选自H和C_1-C_8烃基;

R^7选自H、C_1-C_8烃基、C_3-C_8碳环、芳基、C_1-C_8烃基-芳基、C_1-C_8烃基-(C_3-C_8碳环)、C_3-C_8杂环和C_1-C_8烃基-(C_3-C_8杂环);

每个R^8独立地选自H、OH、C_1-C_8烃基、C_3-C_8碳环和O-(C_1-C_8烃基);

R^9选自H和C_1-C_8烃基;

R^{10}选自芳基或C_3-C_8杂环;

Z为O、S、NH或NR^{12},其中R^{12}为C_1-C_8烃基;

R^{11}选自H、C_1-C_{20}烃基、芳基、C_3-C_8杂环、-$(R^{13}O)_m$-R^{14}或-$(R^{13}O)_m$-$CH(R^{15})_2$;

m是范围为1-1000的整数;

R^{13}为C_2-C_8烃基;

R^{14}为H或C_1-C_8烃基;

R^{15}每次出现独立为H、COOH、-$(CH_2)_n$-$N(R^{16})_2$、-$(CH_2)_n$-SO_3H或-$(CH_2)_n$-SO_3-C_1-C_8烃基;

R^{16}每次出现独立为H、C_1-C_8烃基或-$(CH_2)_n$-COOH;

R^{18}选自-$C(R^8)_2$-$C(R^8)_2$-芳基、-$C(R^8)_2$-$C(R^8)_2$-(C_3-C_8杂环)和-$C(R^8)_2$-$C(R^8)_2$-(C_3-C_8碳环);且

n是范围为0到6的整数。

在一个实施方案中,R^3、R^4和R^7独立为异丙基或仲丁基,而R^5为-H或甲基。在一个例示性的实施方案中,R^3和R^4各自为异丙基,R^5为-H,而R^7为仲丁基。

在又一个实施方案中,R^2和R^6各自为甲基,而R^9为-H。

在又一个实施方案中,R^8每次出现为-OCH_3。

在一个例示性的实施方案中,R^3和R^4各自为异丙基,R^2和R^6各自为甲基,R^5为-H,R^7为仲丁基,R^8每次出现为-OCH_3,而R^9为-H。

在一个实施方案中，Z为-O-或-NH-。

在一个实施方案中，R^{10}为芳基。

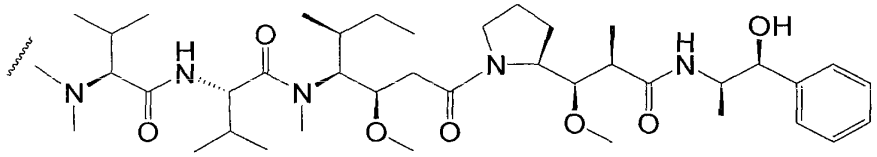
在一个例示性的实施方案中，R^{10}为-苯基。

在一个例示性的实施方案中，若Z为-O-，则R^{11}为-H、甲基或叔丁基。

在一个实施方案中，若Z为-NH，则R^{11}为$-CH(R^{15})_2$，其中R^{15}为$-(CH_2)_n-N(R^{16})_2$，而R^{16}为$-C_1-C_8$烃基或$-(CH_2)_n-COOH$。

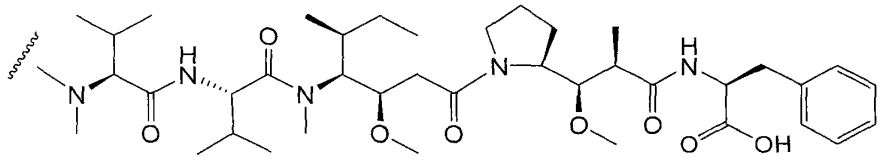
在另一个实施方案中，若Z为-NH，则R^{11}为$-CH(R^{15})_2$，其中R^{15}为$-(CH_2)_n-SO_3H$。

通式D_E的一种例示性auristatin实施方案是MMAE，其中波形线指示共价附着至抗体-药物偶联物的接头(L):



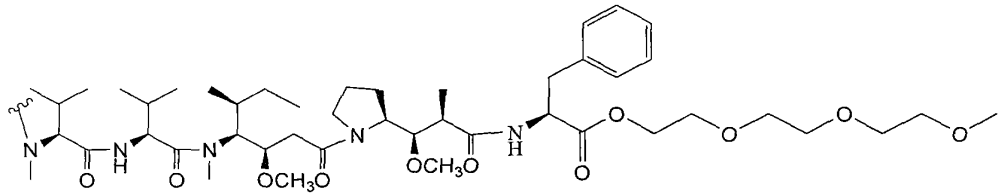
MMAE

通式D_F的一种例示性auristatin实施方案是MMAF，其中波形线指示共价附着至抗体-药物偶联物的接头(L)（参见US 2005/0238649及Doronina等(2006) Bioconjugate Chem. 17:114-124):

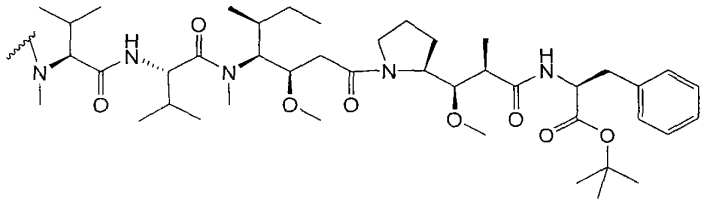


MMAF

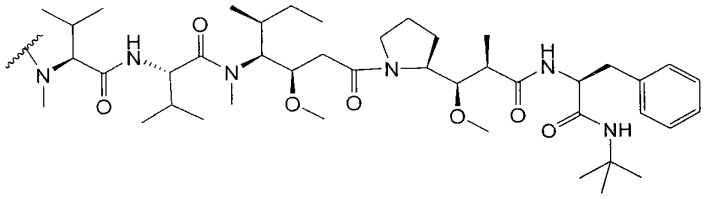
其它药物模块包括以下MMAF衍生物，其中波形线指示共价附着至抗体-药物偶联物的接头(L):

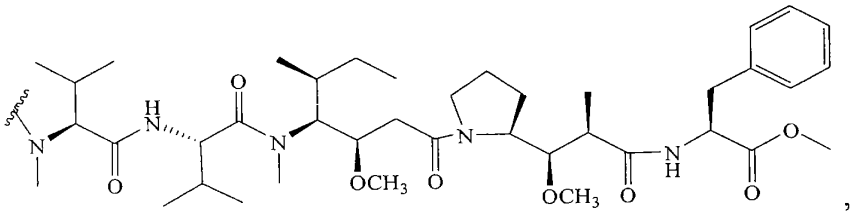


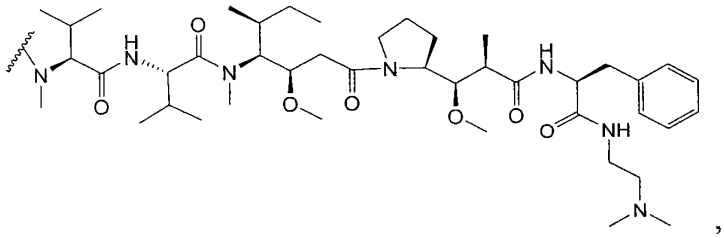
,

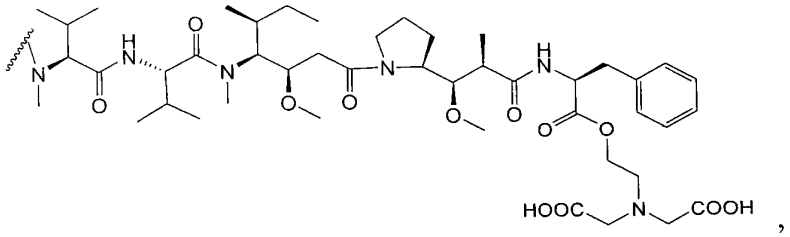


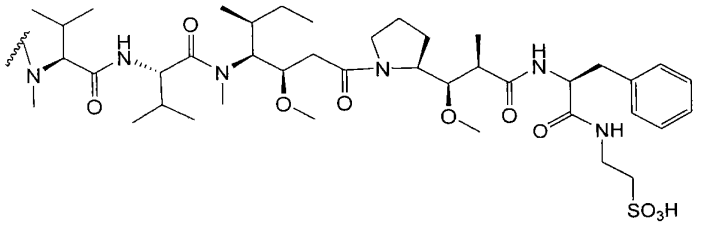
,

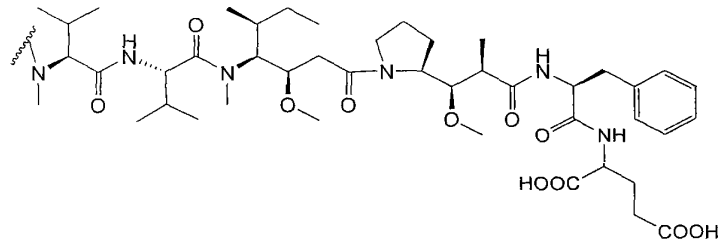

,


,

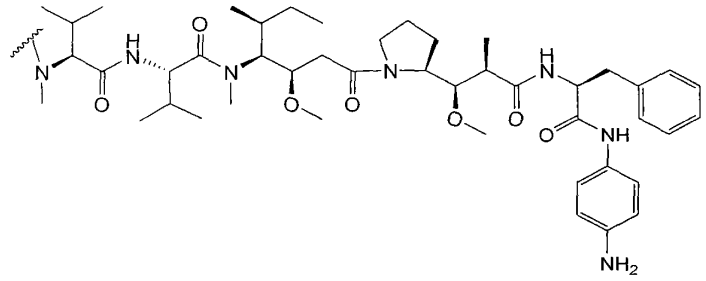

,


,


,



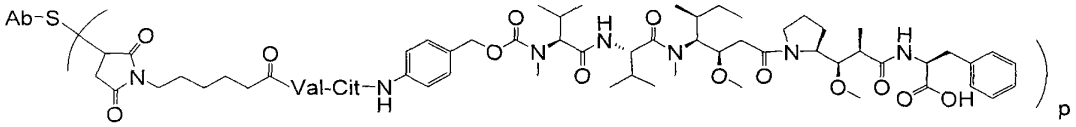
，和



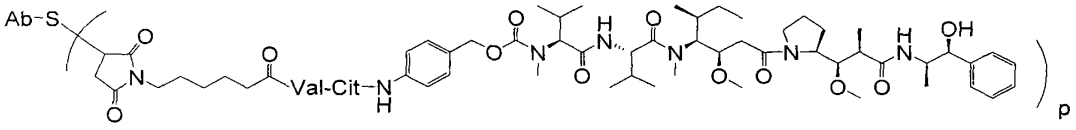
。

一方面，可以将亲水性基团在R^{11}处附着于药物模块，所述亲水性基团包括但不限于三乙二醇酯(triethylene glycol ester, TEG)，如上所述。不限于任何特定理论，所述亲水性基团有助于药物模块的内在化和不聚集(non-agglomeration)。

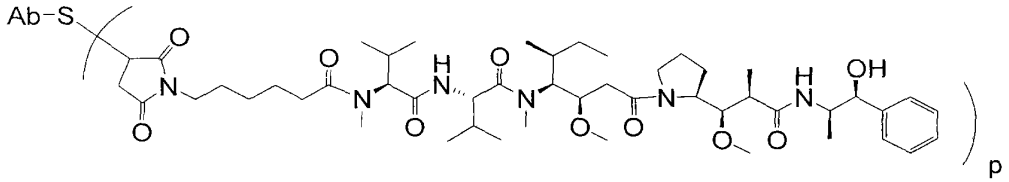
包含auristatin/多拉司他汀或其衍生物的通式I ADC的例示性实施方案记载于US 2005-0238649 A1及Doronina等 (2006) Bioconjugate Chem. 17:114-124，明确收入本文作为参考。包含MMAE或MMAF及各种接头构件的通式I ADC的例示性实施方案具有如下结构和缩写（其中"Ab"是抗体；p是1到约8；"Val-Cit"是缬氨酸-瓜氨酸二肽；而"S"是硫原子）：



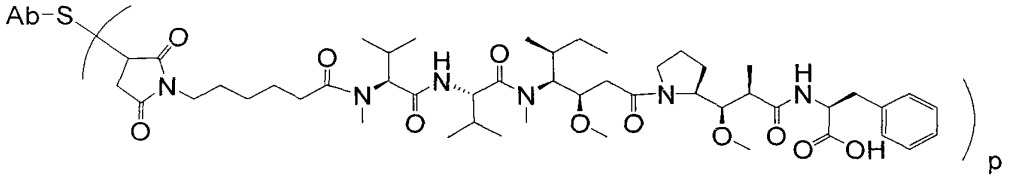
Ab-MC-vc-PAB-MMAF



Ab-MC-vc-PAB-MMAE



Ab-MC-MMAE



Ab-MC-MMAF

包含MMAF及各种接头构件的通式I ADC的例示性实施方案进一步包括Ab-MC-PAB-MMAF和Ab-PAB-MMAF。有趣的是，包含经不可蛋白水解切割的接头附着于抗体的MMAF的免疫偶联物显示出具有与包含经可蛋白水解切割的接头附着于抗体的MMAF的免疫偶联物相当的活性。参见Doronina等 (2006) Bioconjugate Chem. 17:114-124。在这种情况中，认为药物释放是由细胞中的抗体降解来实现的。同上。

典型的是，基于肽的药物模块可通过在两个或更多氨基酸和/或肽片段之间形成肽键来制备。此类肽键可依照例如肽化学领域众所周知的液相合成法来制备(参见E. Schröder和K. Lübke, "The Peptides", 卷1, pp 76-136, 1965, Academic Press)。auristatin/多拉司他汀药物模块可依照以下文献中的方法来制备：US 2005-0238649 A1; 美国专利No.5635483; 美国专利No.5780588; Pettit等 (1989) J. Am. Chem. Soc. 111:5463-5465; Pettit等 (1998) Anti-Cancer Drug Design 13:243-277; Pettit, G.R.等, Synthesis, 1996, 719-725; Pettit等 (1996) J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1 5:859-863; 及Doronina (2003) Nat. Biotechnol. 21(7):778-784。

具体而言，通式D_F的auristatin/多拉司他汀药物模块诸如MMAF及其衍生物可以使用US 2005-0238649 A1及Doronina等 (2006) Bioconjugate Chem. 17:114-124中记载的方法来制备。通式D_E的auristatin/多拉司他汀药物模块诸如MMAE及其衍生物可以使用Doronina等 (2003) Nat. Biotech. 21:778-784中记载的方法来制备。可以通过常规方法方便地合成药物-接头模块MC-MMAF、MC-MMAE、MC-vc-PAB-MMAF、和MC-vc-PAB-MMAE，例

如Doronina等 (2003) Nat. Biotech. 21:778-784及美国专利申请公开号US 2005/0238649 A1中所记载的，然后将它们偶联至感兴趣的抗体。

药物载荷

药物载荷(loading)由p表示，即通式I的分子中每个抗体的平均药物模块数。药物载荷的范围可以为每个抗体1-20个药物模块(D)。通式I的ADC包括偶联有一定范围（1-20个）药物模块的抗体的集合。来自偶联反应的ADC制备物中每个抗体的平均药物模块数可以通过常规手段来表征，诸如质谱、ELISA测定法、和HPLC。还可以测定ADC在p方面的定量分布。在有些情况中，将p为某数值的同质ADC从具有其它药物载荷的ADC中分离、纯化、和表征可以通过诸如反相HPLC或电泳的手段来实现。

对于有些抗体-药物偶联物，p可能受到抗体上附着位点数目的限制。例如，若附着是半胱氨酸硫醇，正如上文例示性实施方案中的那样，则抗体可能只有一个或数个半胱氨酸硫醇基，或者可能只有一个或数个有足够反应性的硫醇基，可附着接头。在某些实施方案中，较高的药物载荷，例如p>5，可引起某些抗体-药物偶联物的聚集、不溶性、毒性、或丧失细胞通透性。在某些实施方案中，本发明ADC的药物载荷的范围为1到约8；约2到约6；约3到约5；约3到约4；约3.1到约3.9；约3.2到约3.8；约3.2到约3.7；约3.2到约3.6；约3.3到约3.8；或约3.3到约3.7。事实上，对于某些ADC已经显示了每个抗体药物模块的最佳比率可以为小于8，可以为约2到约5。参见US 2005-0238649 A1（完整收入本文作为参考）。

在某些实施方案中，在偶联反应中将少于理论最大值的药物模块偶联至抗体。抗体可包含例如赖氨酸残基，其不与药物-接头中间物或接头试剂起反应，如下文所讨论的。只有最具反应性的赖氨酸基团可以与胺反应性接头试剂起反应。一般而言，抗体不包含许多游离的和反应性的半胱氨酸硫醇基，其可连接药物模块；事实上，抗体中的大多数半胱氨酸硫醇基以二硫桥形式存在。在某些实施方案中，可以在部分或完全还原性条件下用还原剂诸如二硫苏糖醇(DTT)或三羰基乙基膦(TCEP)还原抗体以产生反应性半胱氨酸硫醇基。在某些实施方案中，将抗体置于变性条件以暴露反应性亲核基团，诸如赖氨酸或半胱氨酸。

ADC的载荷（药物/抗体比率）可以以不同方式来控制，例如通过：(i) 限制药物-接头中间物或接头试剂相对于抗体的摩尔过量，(ii) 限制偶联反应的

时间或温度，(iii) 半胱氨酸硫醇修饰的部分或限制还原性条件，(iv) 通过重组技术对抗体的氨基酸序列进行工程改造，使得半胱氨酸残基的数目和位置为了控制接头-药物附着的数目和/或位置而进行改变（诸如如本文中和WO2006/034488（完整收入本文作为参考）中所述而制备的thioMab或thioFab）。

应当理解，若超过一个亲核基团与药物-接头中间物或者与接头试剂和接下来的药物模块试剂起反应，则所得产物是具有一个或多个药物模块附着于抗体之分布的ADC化合物混合物。可以通过对抗体特异性的和对药物特异性的双重ELISA抗体测定法自混合物计算每个抗体的平均药物数。混合物中的各种ADC分子可以通过质谱来鉴定，并通过HPLC来分离，例如疏水相互作用层析(参见例如Hamblett, K.J.等，"Effect of drug loading on the pharmacology, pharmacokinetics, and toxicity of an anti-CD30 antibody-drug conjugate," Abstract No. 624, American Association for Cancer Research, 2004 Annual Meeting, March 27-31, 2004, Proceedings of the AACR, 卷45, March 2004; Alley, S.C.等，"Controlling the location of drug attachment in antibody-drug conjugates," Abstract No. 627, American Association for Cancer Research, 2004 Annual Meeting, March 27-31, 2004, Proceedings of the AACR, 卷45, March 2004)。在某些实施方案中，可以通过电泳或层析从偶联混合物中分离具有单一载荷值的同质ADC。

制备免疫偶联物的某些方法

可以采用本领域技术人员知道的有机化学反应、条件和试剂通过数种路径来制备通式I的ADC，包括：(1)抗体的亲核基团经共价键与二价接头试剂反应形成Ab-L，接着与药物模块D反应；和(2)药物模块的亲核基团经共价键与二价接头试剂反应形成D-L，接着与抗体的亲核基团反应。经后一种路径制备通式I的ADC的例示性方法记载于US 2005-0238649 A1，明确收入本文作为参考。

抗体的亲核基团包括但不限于：(i) N末端胺基；(ii) 侧链胺基，例如赖氨酸；(iii) 侧链硫醇基，例如半胱氨酸；和(iv) 糖基化抗体中糖的羟基或氨基。胺、硫醇、和羟基是亲核的，能够与接头模块上的亲电子基团反应而形成共价键，而接头试剂包括：(i) 活性酯类，诸如NHS酯、HOBt酯、卤代甲酸酯、和酸性卤化物；(ii) 烃基和苄基卤化物，诸如卤代乙酰胺；(iii) 醛、

酮、羧基和马来酰亚胺基团。某些抗体具有可还原的链间二硫化物，即半胱氨酸桥。可通过还原剂诸如DTT（二硫苏糖醇）或三羰基乙基膦(TCEP)处理使抗体完全或部分还原，从而具有与接头试剂偶联的反应性。每个半胱氨酸桥理论上将形成两个反应性硫醇亲核体。或者，可经由赖氨酸残基的修饰将硫氢基引入抗体，例如通过使赖氨酸残基与2-亚氨基硫烷（Traut氏试剂）起反应，导致胺转变为硫醇。可以通过导入一个、两个、三个、四个、或更多个半胱氨酸残基（例如通过制备包含一个或多个非天然半胱氨酸氨基酸残基的变体抗体）而将反应性硫醇基导入抗体。

还可通过抗体上的亲电子基团（诸如醛或酮羰基）与接头试剂或药物上的亲核基团之间的反应来生成本发明的抗体-药物偶联物。接头试剂上的有用亲核基团包括但不限于酰肼(hydrazide)、肟(oxime)、氨基(amino)、肼(hydrazine)、缩氨基硫脲(thiosemicarbazone)、肼羧酸酯(hydrazine carboxylate)、和芳基酰肼(arylhydrazide)。在一个实施方案中，修饰抗体以导入能够与接头试剂或药物上的亲核取代基起反应的亲电子模块。在另一个实施方案中，可以用例如高碘酸盐氧化剂氧化糖基化抗体的糖，从而形成可与接头试剂或药物模块的胺基团反应的醛或酮基团。所得亚胺Schiff碱基可形成稳定的连接，或者可以用例如硼氢化物试剂还原而形成稳定的胺连接。在一个实施方案中，糖基化抗体的碳水化合物部分与半乳糖氧化酶或偏高碘酸钠的反应可以在抗体中生成羰基(醛基和酮基)，它可与药物上的适宜基团反应(Hermanson, Bioconjugate Techniques)。在另一个实施方案中，包含N-末端丝氨酸或苏氨酸残基的抗体可以与偏高碘酸钠反应，导致在第一个氨基酸处生成醛(Geoghegan和Stroh, (1992) Bioconjugate Chem. 3:138-146; US 5362852)。这样的醛可与药物模块或接头亲核体反应。

药物模块上的亲核基团包括但不限于：胺、硫醇、羟基、酰肼、肟、肼、缩氨基硫脲、肼羧酸酯、和芳基酰肼基团，它们能够与接头模块上的亲电子基团反应而形成共价键，而接头试剂包括：(i) 活性酯类，诸如NHS酯、HOBt酯、卤代甲酸酯、和酸性卤化物；(ii) 烃基和苄基卤化物，诸如卤代乙酰胺；(iii) 醛、酮、羧基、和马来酰亚胺基团。

本发明的化合物明确涵盖但不限于用如下交联试剂制备的ADC: BMPS、EMCS、GMBS、HBVS、LC-SMCC、MBS、MPBH、SBAP、SIA、SIAB、SMCC、SMPB、SMPH、sulfo-EMCS、sulfo-GMBS、sulfo-KMUS、sulfo-MBS、

sulfo-SIAB、sulfo-SMCC和sulfo-SMPB、及SVSB（琥珀酰亚氨基-(4-乙烯基砜)苯甲酸酯），它们可通过商业途径获得（例如Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., U.S.A；参见2003-2004年度应用手册和产品目录(2003-2004 Applications Handbook and Catalog)第467-498页）。

还可使用多种双功能蛋白质偶联剂来制备包含抗体和细胞毒剂的免疫偶联物，诸如N-琥珀酰亚氨基3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯(SPDP)，琥珀酰亚氨基-4-(N-马来酰亚氨基甲基)环己烷-1-羧酸酯(SMCC)，亚氨基硫烷(IT)，亚氨酸酯（诸如盐酸己二酰亚氨酸二甲酯）、活性酯类（诸如辛二酸二琥珀酰亚氨基酯）、醛类（诸如戊二醛）、双叠氮化合物（诸如双(对-叠氮苯甲酰基)己二胺）、双重氮衍生物（诸如双(对-重氮苯甲酰基)-乙二胺）、二异硫氰酸酯（诸如甲苯2,6-二异氰酸酯）、和双活性氟化合物（诸如1,5-二氟-2,4-二硝基苯）的双功能衍生物。例如，可以如Vitetta等, Science 238:1098 (1987)中所述制备蓖麻毒蛋白免疫毒素。碳-14标记的1-异硫氰酸苄基-3-甲基二亚乙基三胺五乙酸(MX-DTPA)是用于将放射性核苷酸与抗体偶联的例示性螯合剂。参见WO94/11026。

或者，可通过例如重组技术或肽合成来制备包含抗体和细胞毒剂的融合蛋白。重组DNA分子可以包含各自编码偶联物的抗体和细胞毒部分的区域，彼此或是毗邻或是由编码接头肽的区域分开，该接头肽不破坏偶联物的期望特性。

在又一个实施方案中，可以将抗体与“受体”（诸如链霉亲合素）偶联从而用于肿瘤预先靶向，其中对患者施用抗体-受体偶联物，接着使用清除剂由循环中清除未结合的偶联物，然后施用与细胞毒剂（例如放射性核苷酸）偶联的“配体”（例如亲合素）。

2. 例示性的偶联物 – 硫醇抗体-药物偶联物

半胱氨酸改造抗CD22抗体的制备

可通过多种方法制备编码本发明的亲本抗CD22抗体和半胱氨酸改造抗CD22抗体的氨基酸序列变体的DNA，包括但不限于自天然来源分离（在天然存在的氨基酸序列变体的情况中）、通过定点诱变（或寡核苷酸介导的诱变）(Carter等 (1985) Nucleic Acids Res. 13:4431-4443; Ho等 (1989) Gene (Amst.) 77:51-59; Kunkel等 (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:488; Liu等 (1998) J. Biol. Chem. 273:20252-20260)、PCR诱变(Higuchi, (1990) 于PCR

Protocols, pp.177-183, Academic Press; Ito等 (1991) Gene 102:67-70; Bernhard等 (1994) Bioconjugate Chem. 5:126-132; 及Vallette等 (1989) Nuc. Acids Res. 17:723-733)和对较早制备的编码多肽的DNA的盒式诱变(Wells等 (1985) Gene 34:315-323)来制备。诱变方案、试剂盒和试剂可通过商业途径获得，例如QuikChange® 多重定点诱变试剂盒(Stratagene, La Jolla, CA)。还可以使用双链质粒DNA作为模板通过基于PCR的诱变通过寡核苷酸介导的诱变来生成单一诱变(Sambrook和Russel, (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第3版; Zoller等 (1983) Methods Enzymol. 100:468-500; Zoller, M.J. 和Smith, M. (1982) Nucl. Acids Res. 10:6487-6500)。还可以通过限制性片段操作或通过使用合成寡核苷酸的交叠延伸PCR构建重组抗体的变体。诱变引物编码半胱氨酸密码子替换物。标准诱变技术可以用于产生编码此类突变型半胱氨酸改造抗体的DNA（Sambrook等, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989; 及Ausubel等, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York, N.Y., 1993）。

噬菌体展示技术(McCafferty等, (1990) Nature 348:552-553)可用于在体外从来自未免疫供体的免疫球蛋白可变域(V)基因全集生成抗CD22人抗体和抗体片段。依照这种技术，将抗体可变域基因以符合读码框的方式克隆入丝状噬菌体诸如M13或fd的主要或次要外壳蛋白基因，并在噬菌体颗粒表面上展示为功能性抗体片段。因为丝状噬菌体颗粒包含噬菌体基因组的单链DNA拷贝，以抗体的功能特性为基础进行的选择也导致编码展示那些特性的抗体的基因得到选择。如此，噬菌体模拟B细胞的一些特性(Johnson等 (1993) Current Opinion in Structural Biology 3:564-571; Clackson等 (1991) Nature, 352:624-628; Marks等 (1991) J. Mol. Biol. 222:581-597; Griffith等 (1993) EMBO J. 12:725-734; US 5565332; US 5573905; US 5567610; US 5229275)。

抗CD22抗体可以使用已知的寡肽合成方法来化学合成，或者可以使用重组技术来制备和纯化。适宜的氨基酸序列或其部分可以使用固相技术通过直接肽合成来生成(Stewart等, Solid-Phase Peptide Synthesis, (1969) W.H. Freeman Co., San Francisco, CA; Merrifield, (1963) J. Am. Chem. Soc., 85:2149-2154)。体外蛋白质合成可以使用手动技术或通过自动化来进行。自动化固相合成可以例如采用受t-BOC或Fmoc保护的氨基酸并使用Applied

Biosystems肽合成仪(Foster City, CA)依照制造商的说明书来进行。抗CD22抗体或CD22多肽的各个部分可以分开地化学合成，并使用化学或酶促方法联合以生成期望的抗CD22抗体或CD22多肽。

已经开发了用于生成抗体片段的多种技术。传统上，通过蛋白水解消化完整抗体来衍生这些片段(Morimoto等 (1992) Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117; 及Brennan等 (1985) Science, 229:81)，或者直接由重组宿主细胞生成这些片段。Fab、Fv和scFv抗CD22抗体片段都可在大肠杆菌中表达及由大肠杆菌分泌，如此容许容易的生成大量的这些片段。可以从上文讨论的噬菌体抗体库中分离抗体片段。或者，可以直接从大肠杆菌回收Fab'-SH片段并化学偶联以形成$F(ab')_2$片段(Carter等 (1992) Bio/Technology 10:163-167)，或者，直接从重组宿主细胞培养物分离$F(ab')_2$片段。抗CD22抗体可以是单链Fv片段(scFv)(WO 93/16185; US 5571894; US 5587458)。抗CD22抗体片段还可以是“线性抗体”(US 5,641,870)。此类线性抗体片段可以是单特异性的或双特异性的。

下文描述主要涉及通过培养经包含抗CD22抗体编码核酸的载体转化或转染的细胞来生成抗CD22抗体。编码抗CD22抗体的DNA可以得自自认为具有抗CD22抗体mRNA且以可检测水平表达之的组织制备的cDNA文库。因而，人抗CD22抗体或CD22多肽DNA可以方便地得自自人组织制备地cDNA文库。抗CD22抗体编码基因还可以得自基因组文库或已知的合成规程（例如自动化核酸合成）。

本发明的设计、选择和制备方法能够得到具有亲电子官能度反应性的半胱氨酸改造抗CD22抗体。这些方法进一步能够获得抗体偶联物化合物，诸如在指定的、设计的、选择性的位点上具有药物分子的抗体-药物偶联物(ADC)化合物。抗体表面上的反应性半胱氨酸残基容许通过硫醇反应性基团，诸如马来酰亚胺或卤代乙酰基特异性地偶联药物模块。Cys残基的硫醇官能度与马来酰亚胺基团的亲核反应性高于蛋白质中任何其它氨基酸官能度，诸如赖氨酸残基的氨基或N-末端氨基约1000倍。碘乙酰和马来酰亚胺试剂中的硫醇特异性官能度可以与胺基团反应，但需要更高的pH(>9.0)和更长的反应时间(Garman, 1997, Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach, Academic Press, London)。可以通过标准Ellman测定法来估计蛋白质中游离硫醇的量。免疫球蛋白M为二硫化物连接的五聚体的例子，而免疫球蛋白G为内部二硫

桥将各亚基键合在一起的蛋白质的例子。在诸如这种蛋白质中，用诸如二硫苏糖醇(DTT)或硒醇还原二硫键(Singh等 (2002) Anal. Biochem. 304:147-156)是产生反应性游离硫醇所需的。这种方法可以导致抗体的三级结构和抗原结合特异性丧失。

PHESELECTOR(用于选择反应性硫醇的噬菌体ELISA)测定法任选以ELISA噬菌体形式检测抗体中反应性半胱氨酸基团，由此辅助半胱氨酸改造抗体的设计(WO 2006/034488)。在孔表面上包被半胱氨酸改造抗体，随后与噬菌体颗粒一起温育，添加HRP标记的二抗，并检测吸光度。可以以快速、有力和高流通量方式筛选噬菌体上展示的突变蛋白。可以使用与从抗体或其它蛋白的随机蛋白质-噬菌体文库鉴定游离Cys掺入的适当反应性位点相同的方法生成半胱氨酸改造抗体的文库并且进行结合选择。这项技术包括使噬菌体上展示的半胱氨酸突变蛋白与也为硫醇反应性的亲和试剂或报告基团反应。

PHESELECTOR测定法任选筛选抗体中的反应性硫醇基团。通过该方法鉴定A121C变体是例示性的。可以高效地搜索整个Fab分子以鉴定更多的带有反应性硫醇基团的ThioFab变体。采用参数，表面可及分数(fractional surface accessibility)来鉴定和定量溶剂与多肽中的氨基酸残基的可及性。将表面可及性表述为可以由溶剂分子，例如水接触的表面积(Å^2)。水占据的空间近似为1.4Å半径球体。软件为自由可获得的或可许可的(Secretary to CCP4, Daresbury Laboratory, Warrington, WA4 4AD,United Kingdom, Fax:(+44) 1925 603825，或通过因特网：www.ccp4.ac.uk/dist/html/INDEX.html)，如使用计算具有已知X射线晶体学衍生坐标的蛋白质的每个氨基酸的表面可及性的算法的晶体学程序CCP4 Suite ("The CCP4 Suite: Programs for Protein Crystallography"(1994) Acta. Cryst. D50:760-763)。执行表面可及性计算的两种例示性软件模块为"AREAIMOL"和"SURFACE"，其基于B.Lee和F.M.Richards (1971) J.Mol.Biol. 55:379-400的算法。AREAIMOL将蛋白质的溶剂可及表面定义为探针球(probe sphere) (代表溶剂分子)在蛋白质的Van der Waals表面上翻转时其中心的位置。AREAIMOL如下计算溶剂可及表面积，即在关于每个原子的扩充球体上产生表面点(距原子中心的距离等于原子和探针半径的总和)，并且消除那些属于位于与相邻原子相关的等同球体内的点。AREAIMOL找到了PDB坐标文件中原子的溶剂可及面积并概括了残基、

链和整个分子的可及面积。可以将各原子的可及面积（或面积差）存储成假拟-PDB输出文件。AREAIMOL假设了每个成分的单一半径并仅识别有限数量的不同成分。

AREAIMOL和SURFACE报导了绝对可及性，即平方埃(Å)数。通过参比多肽内氨基酸相关标准状态来计算表面可及分数。参比状态为三肽Gly-X-Gly，其中X为感兴趣的氨基酸，且参比状态应为“扩展的”构象，即像那些在β链中的构象。扩展的构象使X的可及性达到最大值。用计算的可及面积除以Gly-X-Gly三肽参比状态中的可及面积并报告商数，其为可及性分数。可及性百分比为可及性分数乘以100。计算表面可及性的另一种例示性算法基于程序xsae的SOLV模块(Broger, C., F. Hoffman-LaRoche, Basel)，它基于多肽的X射线坐标计算氨基酸残基与水球体的可及性分数。可以使用可得到的晶体结构信息来计算抗体中每个氨基酸的表面可及性分数(Eigenbrot等(1993) J Mol Biol. 229:969-995)。

编码半胱氨酸改造抗体的DNA易于使用常规规程来分离和测序（例如通过使用能够与编码鼠抗体重链和轻链的基因特异性结合的寡核苷酸探针）。杂交瘤细胞充当此类DNA的来源。一旦分离，可以将DNA置入表达载体，然后转染入原本不生成抗体蛋白的宿主细胞，诸如大肠杆菌细胞、猿COS细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、或其它哺乳动物宿主细胞，诸如骨髓瘤细胞(US 5807715; US 2005/0048572; US 2004/0229310)，以获得单克隆抗体在重组宿主细胞中的合成。

在设计和选择后，可如下生成具有改造的、高度反应性的未配对的Cys残基的半胱氨酸改造抗体，例如ThioFab: (i) 在细菌例如大肠杆菌系统(Skerra等 (1993) Curr. Opinion in Immunol. 5:256-262; Plückthun (1992) Immunol. Revs. 130:151-188)或哺乳动物细胞培养物系统(WO 01/00245)例如中国仓鼠卵巢细胞(CHO)中表达；和(ii) 使用常用的蛋白质纯化技术纯化(Lowman等(1991) J. Biol. Chem. 266(17):10982-10988)。

改造的Cys硫醇基团与亲电子的接头试剂和药物-接头中间体起反应而形成半胱氨酸改造抗体-药物偶联物和其它经标记的半胱氨酸改造抗体。半胱氨酸改造抗体的和存在于亲本抗体中的、配对并形成链间和链内二硫键的Cys残基不具有任何反应性硫醇基团（除非用还原剂处理）且不与亲电子的接头试剂或药物-接头中间体起反应。新近改造的Cys残基可以保持不配对，

而且能够与亲电子的接头试剂或药物-接头中间体（诸如药物-马来酰亚胺）起反应（即偶联）。例示性的药物-接头中间体包括：MC-MMAE、MC-MMAF、MC-vc-PAB-MMAE、和MC-vc-PAB-MMAF。重链和轻链中经改造的Cys残基的结构位置依照连续编号系统来编号。此连续编号系统与自N末端起始的Kabat编号系统(Kabat等 (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD)有关，与Kabat编号方案（底行）的区别在于标示为a、b、c的插入。使用Kabat编号系统，实际的线性氨基酸序列可包含更多或更少的氨基酸，对应于可变域FR或CDR中的缩短或插入。经半胱氨酸改造的重链变体位点通过连续编号方式和Kabat编号方案来标示。

在一个实施方案中，通过包括下列步骤的方法来制备半胱氨酸改造抗CD22抗体：

(a) 用半胱氨酸替换亲本抗CD22抗体的一个或多个氨基酸残基；并

(b) 通过使半胱氨酸改造抗体与硫醇反应性试剂起反应来测定半胱氨酸改造抗CD22抗体的硫醇反应性。

半胱氨酸改造抗体可以比亲代抗体更具与硫醇反应性试剂的反应性。

游离半胱氨酸氨基酸残基可以位于重链或轻链中或者恒定域或可变域中。还可以通过用一个或多个半胱氨酸氨基酸替换抗体片段的氨基酸来改造抗体片段，例如Fab，以形成半胱氨酸改造抗体片段。

本发明的另一个实施方案提供了制备（生成）半胱氨酸改造抗CD22抗体的方法，包括：

(a) 将一个或多个半胱氨酸氨基酸引入亲本抗CD22抗体以生成半胱氨酸改造抗CD22抗体；并

(b) 测定半胱氨酸改造抗体与硫醇反应性试剂的硫醇反应性；

其中半胱氨酸改造抗体比亲代抗体更具与硫醇反应性试剂的反应性。

制备半胱氨酸改造抗体的方法的步骤(a)可以包括：

(i) 诱变编码半胱氨酸改造抗体的核酸序列；

(ii) 表达半胱氨酸改造抗体；和

(iii) 分离和纯化半胱氨酸改造抗体。

制备半胱氨酸改造抗体的方法的步骤(b)可以包括在选自噬菌体或噬菌粒颗粒的病毒颗粒上表达半胱氨酸改造抗体。

制备半胱氨酸改造抗体的方法的步骤(b)还可以包括:

(i) 使半胱氨酸改造抗体与硫醇反应性亲和试剂反应以生成亲和标记的半胱氨酸改造抗体; 和

(ii) 测量亲和标记的半胱氨酸改造抗体与俘获介质的结合。

本发明的另一个实施方案是对带有高反应性的未配对的半胱氨酸氨基酸的半胱氨酸改造抗体筛选硫醇反应性的方法, 包括:

(a) 将一个或多个半胱氨酸氨基酸引入亲本抗体以生成半胱氨酸改造抗体;

(b) 使半胱氨酸改造抗体与硫醇反应性亲和试剂反应以生成亲和标记的半胱氨酸改造抗体; 和

(c) 测量亲和标记的半胱氨酸改造抗体与俘获介质的结合; 和

(d) 测定半胱氨酸改造抗体与硫醇反应性试剂的硫醇反应性。

筛选半胱氨酸改造抗体的方法的步骤(a)可以包括:

(i) 诱变编码半胱氨酸改造抗体的核酸序列;

(ii) 表达半胱氨酸改造抗体; 和

(iii) 分离和纯化半胱氨酸改造抗体。

筛选半胱氨酸改造抗体的方法的步骤(b)可以包括在选自噬菌体或噬菌粒颗粒的病毒颗粒上表达半胱氨酸改造抗体。

筛选半胱氨酸改造抗体的方法的步骤(b)还可以包括:

(i) 使半胱氨酸改造抗体与硫醇反应性亲和试剂反应以生成亲和标记的半胱氨酸改造抗体; 和

(ii) 测量亲和标记的半胱氨酸改造抗体与俘获介质的结合。

抗CD22 10F4 IgG变体的半胱氨酸改造

通过本文所述半胱氨酸改造方法, 将半胱氨酸引入全长嵌合亲本单克隆抗CD22抗体, 在重链118(EU编号方式)(相当于重链第121位, 连续编号方式)位点。

将亲本抗体, 即"std抗CD22 Hu 10F4v3 Fc"(重链序列: SEQ ID NO:88, 轻链序列: SEQ ID NO:87, 图5B)进行半胱氨酸改造以产生"A118C thio hu抗CD22 10F4v3"(重链序列: SEQ ID NO:92, 轻链序列: SEQ ID NO:91, 图17)、"S400C thio hu抗CD22 10F4v3"(重链序列: SEQ ID NO:93, 轻链序列: SEQ ID NO:91, 图17)、或"V205C thio抗CD22 10F4v3"(重链序列:

SEQ ID NO:88，轻链序列：SEQ ID NO:91，图5B和17）。

通过在含有1 mM半胱氨酸的培养基中瞬时发酵在CHO（中国仓鼠卵巢）细胞中表达这些半胱氨酸改造的单克隆抗体。

经过标记的半胱氨酸改造抗CD22抗体

半胱氨酸改造抗CD22抗体可以位点特异性地和高效地与硫醇反应性试剂偶联。硫醇反应性试剂可以为多功能接头试剂；俘获物，即亲和、标记物试剂（例如生物素-接头试剂）；检测标记物（例如荧光团试剂）；固相固定化试剂（例如SEPHAROSE™、聚苯乙烯或玻璃）或药物-接头中间体。硫醇反应性试剂的一个例子为N-乙基马来酰亚胺(NEM)。在一个例示性的实施方案中，ThioFab与生物素-接头试剂的反应得到了生物素化的ThioFab，由此可以检测和测量改造的半胱氨酸残基的存在和反应性。ThioFab与多功能接头试剂反应得到了带有可以与药物模块试剂或其它标记物进一步反应的官能化接头的ThioFab。ThioFab与药物-接头中间体的反应得到了ThioFab-药物偶联物。

本文所述的例示性方法一般可以应用于鉴定和生产抗体，并且更一般地通过应用本文所述的设计和筛选步骤用于其它蛋白质。

此类方法可以应用于其它硫醇反应性试剂的偶联，其中反应性基团为例如马来酰亚胺、碘乙酰胺、吡啶基二硫化物或其它硫醇反应性偶联配偶(Haugland, 2003, Molecular Probes Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, Molecular Probes, Inc.; Brinkley, 1992, Bioconjugate Chem. 3:2; Garman, 1997, Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach, Academic Press, London; Means (1990) Bioconjugate Chem. 1:2; Hermanson, G., 于 Bioconjugate Techniques (1996) Academic Press, San Diego, pp. 40-55, 643-671)。硫醇反应性试剂可以为药物模块；荧光团，诸如荧光染料，像荧光素或罗丹明；用于成像或放射性治疗金属的螯合剂；肽基或非肽基标记物或检测标签；或清除改性剂(clearance-modifying agent)，诸如聚乙二醇的各种异构体；结合第三组分的肽；或另一种碳水化合物或亲脂剂。

半胱氨酸改造抗CD22抗体的用途

半胱氨酸改造抗CD22抗体及其偶联物可用作治疗剂和/或诊断剂。本发明还提供了预防、控制、治疗或改善一种或多种与B细胞相关病症有关的症状的方法。具体而言，本发明提供了预防、控制、治疗或改善一种或多种与

细胞增殖性病症有关的症状的方法，所述细胞增殖性病症诸如癌症，例如淋巴瘤、非何杰金氏淋巴瘤(NHL)、攻击性NHL、复发性攻击性NHL、复发性无痛性NHL、顽固性NHL、顽固性无痛性NHL、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、小淋巴细胞性淋巴瘤、白血病、毛细胞白血病(HCL)、急性淋巴细胞性白血病(ALL)、和套细胞淋巴瘤。本发明还提供了用于诊断CD22相关病症或发生此类病症的素因的方法，以及用于鉴定优先结合B细胞相关CD22多肽的抗体及其抗原结合片段的方法。

本发明的另一个实施方案致力于半胱氨酸改造抗CD22抗体用于制备药物的用途，所述药物可用于治疗对于B细胞相关病症是响应性的疾患。

半胱氨酸改造抗体-药物偶联物（硫醇抗体-药物偶联物）

本发明的另一方面是包含半胱氨酸改造抗CD22抗体(Ab)和auristatin药物模块(D)的抗体-药物偶联物化合物，其中所述半胱氨酸改造抗体通过接头模块(L)经由一个或多个游离半胱氨酸氨基酸附着至D；该化合物具有通式I:

$$Ab–(L–D)_p \qquad I$$

其中p为1、2、3或4；且其中半胱氨酸改造抗体通过如下过程来制备，所述过程包括将亲本抗CD22多肽的一个或多个氨基酸残基用一个或多个游离半胱氨酸替换。

图10显示了半胱氨酸改造抗CD22抗体-药物偶联物(ADC)的实施方案，其中auristatin药物模块附着至轻链（LC-ADC）、重链（HC-ADC）、和Fc区（Fc-ADC）中经改造的半胱氨酸基团。

半胱氨酸改造抗CD22抗体-药物偶联物的潜在优点包括安全性改善（治疗指数更大）、PK参数改进、抗体的链间二硫键保留（其可稳定偶联物并保持其活性结合构象）、药物偶联位点确定、和自半胱氨酸改造抗体与药物-接头试剂的偶联而制备半胱氨酸改造抗体-药物偶联物导致更均一的产物。

接头

“接头”、“接头单元”、或“连接”指包含使抗体共价附着于药物模块的共价键或原子链的化学模块。在各个实施方案中，接头以L表示。“接头”(L)为可用于连接一个或多个药物模块(D)和抗体单元(Ab)而形成通式I的抗体-药物偶联物(ADC)的双功能或多功能模块。可以使用具有供结合药物和抗体用的反应性官能度的接头而便利地制备抗体-药物偶联物(ADC)。半胱氨酸改造抗体(Ab)的半胱氨酸硫醇可以与接头试剂、药物模块或药物-接头中间体的

亲电子官能团形成键。

一方面，接头具有反应性位点，该位点具有与存在于抗体上的亲核半胱氨酸具有反应性的亲电子基团。抗体的半胱氨酸硫醇与接头上的亲电子基团具有反应性并且与接头形成共价键。有用的亲电子基团包括但不限于马来酰亚胺和卤代乙酰胺基团。

接头包括：二价基，诸如亚烃基(alkyldiyl)、亚芳基、亚杂芳基；模块，诸如-$(CR_2)_nO(CR_2)_n$-、烃氧基重复单元（例如聚亚乙基氧基(polyethylenoxy)、PEG、聚亚甲基氧基(polymethyleneoxy)）和烃氨基（例如聚乙烯氨基，Jeffamine™）；及二酸酯和酰胺，包括琥珀酸酯、琥珀酰胺、二乙醇酸酯、丙二酸酯和己酰胺。

半胱氨酸改造抗体与接头试剂或药物-接头中间体，与亲电子官能团诸如马来酰亚胺或α-卤代羰基依照Klussman等 (2004) Bioconjugate Chemistry 15(4):765-773, 766页上的偶联方法和依照实施例x的方案起反应。

接头可以由一种或多种接头构件构成。例示性的接头构件包括6-马来酰亚氨基己酰基("MC")、马来酰亚氨基丙酰基("MP")、缬氨酸-瓜氨酸("val-cit"或"vc")、丙氨酸-苯丙氨酸("ala-phe"或"af")、对氨基苄氧羰基("PAB")、N-琥珀酰亚氨基4-(2-吡啶基硫代)戊酸酯("SPP")、N-琥珀酰亚氨基4-(N-马来酰亚氨基甲基)环己烷-1羧酸酯("SMCC")、和N-琥珀酰亚氨基(4-碘-乙酰基)氨基苯甲酸酯("SIAB")、亚乙基氧基-CH_2CH_2O-作为一个或多个重复单元（"EO"或"PEO"）。本领域知道别的接头构件，本文中也描述了一些。

在一个实施方案中，ADC的接头L具有通式：

$$—A_a—W_w—Y_y—$$

其中：

-A-为共价附着于抗体(Ab)半胱氨酸硫醇的延伸物单元；

a为0或1；

每个-W-独立为氨基酸单元；

w独立为0-12的整数；

-Y-为共价附着于药物模块的间隔基单元；且

y为0、1或2。

延伸物单元

当存在时，延伸物单元(-A-)能够连接抗体单元与氨基酸单元(-W-)。在这

方面，抗体(Ab)具有可以与延伸物的官能团形成键的官能团。抗体中可以存在的有用官能团(或是天然的或是经化学操作的)包括但不限于硫氢基(-SH)、氨基、羟基、羰基(carboxy)、碳水化合物的异头(anomeric)羟基、和羧基。一方面，抗体官能团是硫氢基或氨基。硫氢基可以通过还原抗体上的分子内二硫键来生成。或者，硫氢基可以通过抗体赖氨酸模块的氨基使用2-亚氨基硫烷（Traut氏试剂）或另一种硫氢基生成试剂的反应来生成。在一个实施方案中，抗体(Ab)具有能与延伸物单元的亲电子官能团形成键的游离半胱氨酸硫醇基团。式II和III描绘了式I中的例示性延伸物单元，其中Ab-、-W-、-Y-、-D、w和y如上文所定义且R^{17}为选自下列的二价基：$(CH_2)_r$、C_3-C_8碳环基、O–$(CH_2)_r$、亚芳基、$(CH_2)_r$–亚芳基、–亚芳基–$(CH_2)_r$–、$(CH_2)_r$–(C_3-C_8碳环基)、(C_3-C_8碳环基)–$(CH_2)_r$、C_3-C_8杂环基、$(CH_2)_r$–(C_3-C_8杂环基)、–(C_3-C_8杂环基)–$(CH_2)_r$–、–$(CH_2)_rC(O)NR^b(CH_2)_r$–、–$(CH_2CH_2O)_r$–、–$(CH_2CH_2O)_r$–CH_2–、–$(CH_2)_rC(O)NR^b(CH_2CH_2O)_r$–、–$(CH_2)_rC(O)NR^b(CH_2CH_2O)_r$–$CH_2$–、–$(CH_2CH_2O)_rC(O)NR^b(CH_2CH_2O)_r$–、–$(CH_2CH_2O)_rC(O)NR^b(CH_2CH_2O)_r$–$CH_2$–和–$(CH_2CH_2O)_rC(O)NR^b(CH_2)_r$–；其中$R^b$为H、$C_1$-$C_6$烃基、苯基或苄基；且r独立为1-10的整数。

亚芳基包括通过从芳族环体系中除去两个氢原子而衍生的6-20个碳原子的二价芳族烃基。典型的亚芳基包括但不限于衍生自苯、取代的苯、萘、蒽、联苯等的基团。

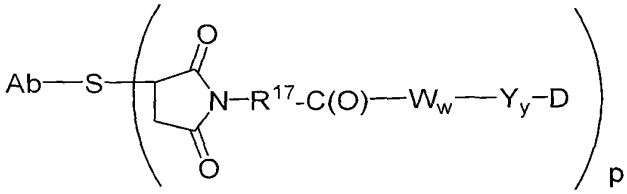
杂环基包括一个或多个环原子为杂原子（例如氮、氧和硫）的环体系。杂环基包含1-20个碳原子和1-3个选自N、O、P和S的杂原子。杂环可以为具有3-7个环成员的单环（2-6个碳原子和1-3个选自N、O、P和S的杂原子）或具有7-10个环成员的双环（4-9个碳原子和1-3个选自N、O、P和S的杂原子），例如：双环[4,5]，[5,5]，[5,6]或[6,6]体系。杂环记载于Paquette, Leo A.; "Principles of Modern Heterocyclic Chemistry", W.A. Benjamin, New York, 1968, 特别是1, 3, 4, 6, 7, 和9章; "The Chemistry of Heterocyclic Compound, A series of Monographs", John Wiley & Sons, New York, 1950至今, 特别是卷13, 14, 16, 19, 和28; 及J. Am. Chem. Soc.(1960) 82:5566。

举例而言而非限制，杂环的例子包括：吡啶基、二氢吡啶基、四氢吡啶基(哌啶基)、噻唑基、四氢噻吩基(tetrahydrothiophenyl)、硫氧化的四氢噻吩基、嘧啶基、呋喃基、噻吩基(thienyl)、吡咯基、吡唑基、咪唑基、四唑基、

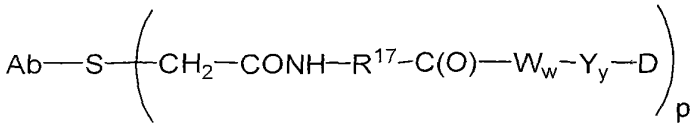
苯并呋喃基、硫杂萘基（thianaphthalenyl）、吲哚基、indolenyl、喹啉基、异喹啉基、苯并咪唑基、哌啶基、4-哌啶酮基、吡咯烷基、2-吡咯烷酮基、吡咯啉基、四氢呋喃基、双-四氢呋喃基(bis-tetrahydrofuranyl)、四氢吡喃基、双-四氢吡喃基(bis-tetrahydropyranyl)、四氢喹啉基、四氢异喹啉基、十氢喹啉基、八氢喹啉基、吖辛因基(azocinyl)、三嗪基、6H-1,2,5-噻二嗪基、2H,6H-1,5,2-二噻嗪基、噻吩基、噻蒽基、吡喃基、异苯并呋喃基、色烯基、呫吨基、酚噁噻基(phenoxathinyl)、2H-吡咯基、异噻唑基、异噁唑基、吡嗪基、哒嗪基、吲嗪基、异吲哚基、3H-吲哚基、1H-吲唑基、嘌呤基、4H-喹嗪基、酞嗪基、萘啶基、喹喔啉基、喹唑啉基、噌啉基、蝶啶基、4Ah-咔唑基、咔唑基、β-咔啉基、菲啶基、吖啶基、嘧啶基、菲咯啉基、吩嗪基、吩噻嗪基、呋咱基、吩噁嗪基、异色满基、色满基、咪唑烷基、咪唑啉基、吡唑烷基、吡唑啉基、哌嗪基、二氢吲哚基、异二氢吲哚基、奎宁环基、吗啉基、噁唑烷基、苯并三唑基、苯并异噁唑基、羟吲哚基、苯并噁唑啉基和靛红酰基(isatinoyl)。

碳环基包括具有3-7个碳原子（作为单环）或7-12个碳原子（作为双环）的饱和或不饱和环。单环碳环具有3-6个环原子，更通常地为5或6个环原子。双环碳环具有7-12个环原子，例如排列成双环[4,5]，[5,5]，[5,6]或[6,6]体系，或者9或10个环原子，排列成双环[5,6]或[6,6]体系。单环碳环的例子包括环丙基、环丁基、环戊基、1-环戊-1-烯基、1-环戊-2-烯基、1-环戊-3-烯基、环己基、1-环己-1-烯基、1-环己-2-烯基、1-环己-3-烯基、环庚基和环辛基。

根据式I ADC的所有例示性实施方案诸如II-VI应当理解，即使在未明确表述的情况中，有1-4个药物模块与抗体连接（p＝1-4），这取决于改造的半胱氨酸残基的数目。



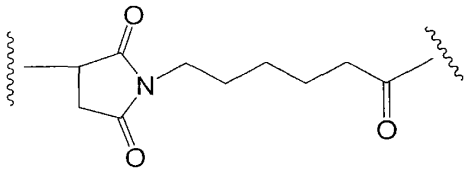
II



III

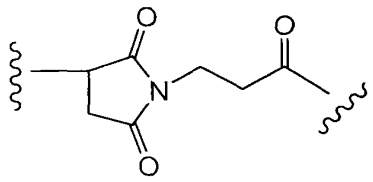
例示性式II延伸物单元衍生自马来酰亚氨基-己酰基(MC)，其中R^{17}为

-$(CH_2)_5$-:



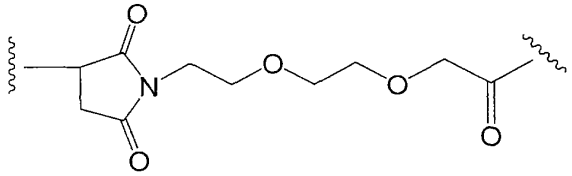
MC

例示性式II延伸物单元衍生自马来酰亚氨基-丙酰基(MP)，其中R^{17}为-$(CH_2)_2$-:

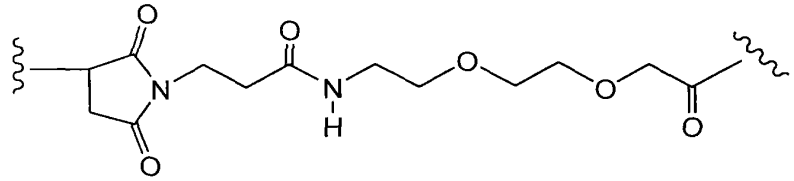


MP

另一种例示性式II延伸物单元，其中R^{17}为-$(CH_2CH_2O)_r$-CH_2–且r为2:

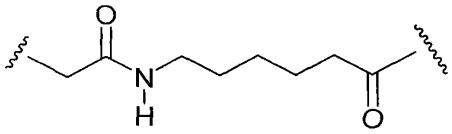


另一种例示性式II延伸物单元，其中R^{17}为–$(CH_2)_rC(O)NR^b(CH_2CH_2O)_r$–$CH_2$–，其中$R^b$为H和每个r为2:

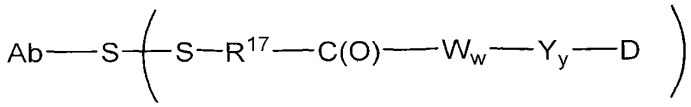


MPEG

另一种例示性式III延伸物单元，其中R^{17}为-$(CH_2)_5$-:



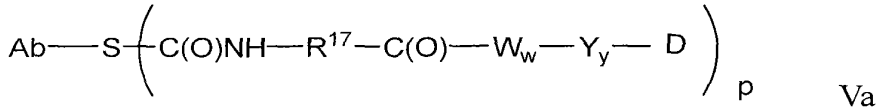
在另一个实施方案中，延伸物单元通过抗体的改造半胱氨酸的硫原子与延伸物单元的硫原子之间的二硫键与半胱氨酸改造抗CD22抗体连接。该实施方案的代表性延伸物单元以式IV描绘，其中R^{17}、Ab-、-W-、-Y-、-D、w和y如上文所定义。



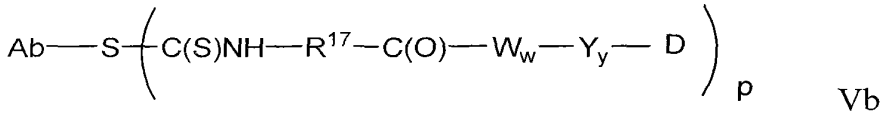
IV

在又一个实施方案中，延伸物的反应性基团含有可以与抗体的游离半胱

氨酸硫醇形成键的硫醇反应性官能团。硫醇反应性官能团的例子包括但不限于：马来酰亚胺；α-卤代乙酰基；活化的酯类，诸如琥珀酰亚胺酯、4-硝基苯基酯、五氟苯基酯、四氟苯基酯；酸酐类；酸性氯化物或酰基氯类(acid chloride)；磺酰氯类；异氰酸酯类和异硫氰酸酯类。该实施方案的代表性延伸物单元以式Va和Vb描绘，其中-R^{17}-、Ab-、-W-、-Y-、-D、w和y如上文所定义。



Va



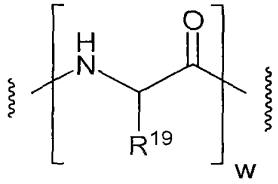
Vb

在另一个实施方案中，接头可以为树状类型接头(dendritic type linker)，其用于通过分支的多功能接头模块将超过一个药物模块共价附着于抗体(Sun等 (2002) Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 12:2213-2215; Sun等 (2003) Bioorganic & Medicinal Chemistry 11:1761-1768 ; King (2002) Tetrahedron Letters 43:1987-1990)。树状接头可以增加药物与抗体的摩尔比，即载荷，它与ADC的效能相关。如此，如果半胱氨酸改造抗体仅携带一个反应性半胱氨酸硫醇基团，那么可以通过树状接头附着众多药物模块。

氨基酸单元

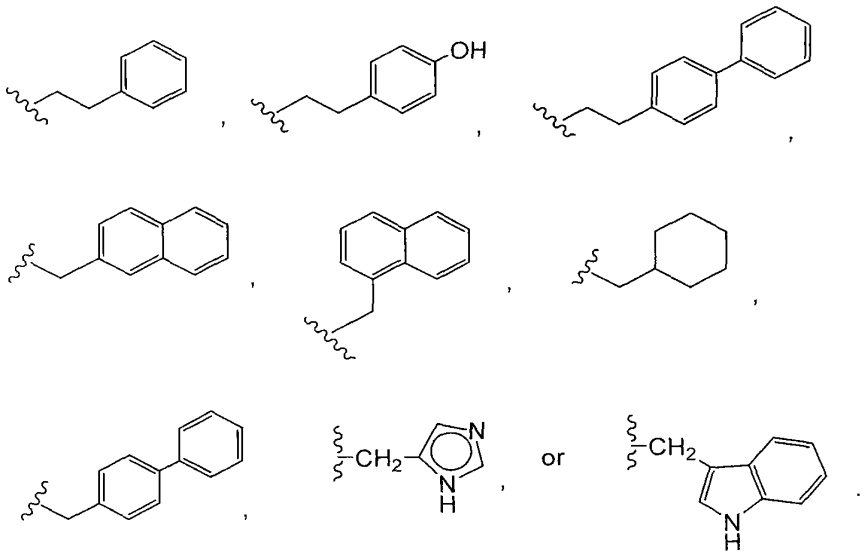
接头可以包含氨基酸残基。如果存在，那么氨基酸单元(-W_w-)使本发明的半胱氨酸改造抗体-药物偶联物(ADC)的抗体(Ab)与药物模块(D)连接。

-W_w-为二肽、三肽、四肽、五肽、六肽、七肽、八肽、九肽、十肽、十一肽或十二肽单元。包含氨基酸单元的氨基酸残基包括那些天然存在的以及次要的氨基酸和非天然存在的氨基酸类似物，诸如瓜氨酸。各个-W-单元独立地具有如下所示的方括号内的通式，且w为0-12的整数：



其中R^{19}为氢、甲基、异丙基、异丁基、仲丁基、苄基、对羟基苄基、-CH_2OH、-$CH(OH)CH_3$、-$CH_2CH_2SCH_3$、-CH_2CONH_2、-CH_2COOH、-$CH_2CH_2CONH_2$、-CH_2CH_2COOH、-$(CH_2)_3NHC(=NH)NH_2$、-$(CH_2)_3NH_2$、-$(CH_2)_3NHCOCH_3$、

$-(CH_2)_3NHCHO$、$-(CH_2)_4NHC(=NH)NH_2$、$-(CH_2)_4NH_2$、$-(CH_2)_4NHCOCH_3$、$-(CH_2)_4NHCHO$、$-(CH_2)_3NHCONH_2$、$-(CH_2)_4NHCONH_2$、$-CH_2CH_2CH(OH)CH_2NH_2$、2-吡啶基甲基-、3-吡啶基甲基-、4-吡啶基甲基-、苯基、环己基、



当R^{19}不为氢时，R^{19}所附着的碳原子为手性的。R^{19}所附着的各个碳原子独立地以(S)或(R)构型或外消旋混合物附着。氨基酸单元如此可以为对映体方面纯的、外消旋的或非对映异构体的。

例示性的$-W_w-$氨基酸单元包括二肽、三肽、四肽或五肽。例示性的二肽包括：缬氨酸-瓜氨酸(vc或val-cit)、丙氨酸-苯丙氨酸(af或ala-phe)。例示性的三肽包括：甘氨酸-缬氨酸-瓜氨酸(gly-val-cit)和甘氨酸-甘氨酸-甘氨酸(gly-gly-gly)。构成氨基酸接头构件的氨基酸残基包括天然存在的氨基酸，以及次要氨基酸和非天然存在的氨基酸类似物，诸如瓜氨酸。

可以用一种或多种酶（包括肿瘤相关蛋白酶）酶促切割氨基酸单元，以释放药物模块(-D)，其在一个实施方案中在体内释放时被质子化以提供药物(D)。可以在特定酶（例如肿瘤相关蛋白酶，组织蛋白酶B、C和D，或纤溶酶蛋白酶）的酶促切割的选择性方面设计和优化氨基酸接头构件。

间隔物单元

在氨基酸单元存在时（w = 1-12），间隔物单元$(-Y_y-)$（在存在时，y = 1或2）使氨基酸单元$(-W_w-)$与药物模块(D)连接。或者，在氨基酸单元不存在时，间隔物单元使延伸物单元与药物模块连接。在氨基酸单元和延伸物单元

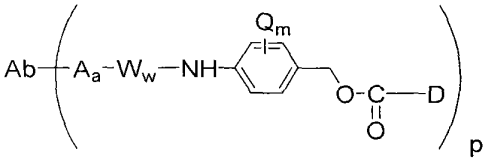
都不存在时(w, y = 0)，间隔物单元还使药物模块与抗体单元连接。间隔物单元有两大类：自我牺牲(self-immolative)和非自我牺牲的。非自我牺牲的间隔物单元为部分或所有间隔物单元在从抗体-药物偶联物或药物模块-接头切割（特别是酶促切割）氨基酸单元后保持与药物模块结合的间隔物单元。当含有甘氨酸-甘氨酸间隔物单元或甘氨酸间隔物单元的ADC通过肿瘤细胞相关蛋白酶、癌细胞相关蛋白酶或淋巴细胞相关蛋白酶进行酶促切割时，甘氨酸-甘氨酸-药物模块或甘氨酸-药物模块从Ab-A_a-Ww-上切割下来。在一个实施方案中，在靶细胞内发生独立的水解反应，其切割甘氨酸-药物模块的键并释放药物。

在另一个实施方案中，-Y_y-为对氨基苄基氨基甲酰基(PAB)单元，其亚苯基部分被Q_m取代，其中Q为-C_1-C_8烃基、-O-(C_1-C_8烃基)、-卤素、-硝基或-氰基；且m为0-4的整数。

非自我牺牲的间隔物单元(-Y-)的例示性实施方案为：-Gly-Gly-；-Gly-；-Ala-Phe-；-Val-Cit-。

在一个实施方案中，提供了药物模块-接头或ADC或其药学可接受的盐或溶剂化物，其中间隔物单元不存在(y=0)。

或者，含有自我牺牲的间隔物单元的ADC可以释放-D。在一个实施方案中，-Y-为通过PAB基团的氨基氮原子连接至-Ww-且通过碳酸酯、氨基甲酸酯或醚基团直接连接至-D的PAB基团，其中ADC具有如下例示性结构：

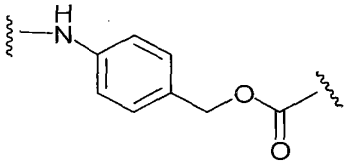


其中Q为-C_1-C_8烃基、-O-(C_1-C_8烃基)、-卤素、-硝基或-氰基；m为0-4的整数；且p为1－4。

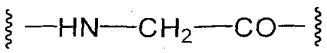
自我牺牲的间隔物的其它例子包括但不限于在电子方面与PAB基团类似的芳族化合物，诸如2-氨基咪唑-5-甲醇衍生物(Hay等 (1999) Bioorg. Med. Chem. Lett. 9:2237)、杂环PAB类似物（US 2005/0256030）、β-葡糖苷酸（WO 2007/011968）、和邻位或对位氨基苄基乙缩醛。可以使用在酰胺键水解时进行环化的间隔物，诸如取代和未取代的4-氨基丁酸酰胺类(Rodrigues等 (1995) Chemistry Biology 2:223)、适当取代的双环[2.2.1]和双环[2.2.2]环体系(Storm等 (1972) J. Amer. Chem. Soc. 94:5815)和2-氨基苯基丙酸酰胺类(Amsberry等

(1990) J. Org. Chem. 55:5867)。消去在甘氨酸上取代的含胺药物(Kingsbury等(1984) J. Med. Chem. 27:1447)也是可用于ADC的自我牺牲的间隔物的例子。

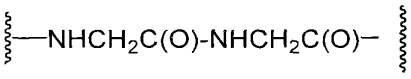
例示性的间隔物单元(-Y_y-)以式X-XII表示:



X



XI

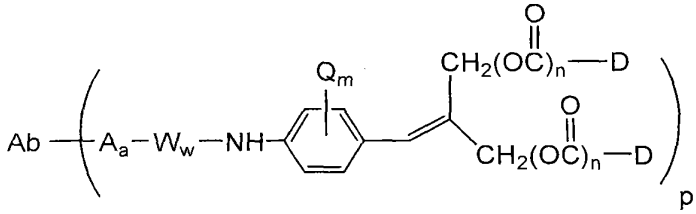


XII

树状接头

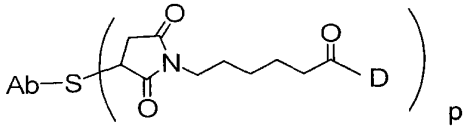
在另一个实施方案中，接头L可以为树状类型接头(dendritic type linker)，其用于通过分支的多功能接头模块将超过一个药物模块共价附着于抗体(Sun等 (2002) Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 12:2213-2215; Sun等(2003) Bioorganic & Medicinal Chemistry 11:1761-1768)。树状接头可以增加药物与抗体的摩尔比，即载荷，它与ADC的效能相关。如此，如果半胱氨酸改造抗体仅携带一个反应性半胱氨酸硫醇基团，那么可以通过树状接头附着众多药物模块。分支的树状接头的例示性实施方案包括2,6-双(羟甲基)-对甲酚和2,4,6-三(羟甲基)-酚树状聚物单元(WO 2004/01993; Szalai等 (2003) J. Amer. Chem. Soc. 125:15688-15689; Shamis等 (2004) J. Amer. Chem. Soc. 126:1726-1731; Amir等 (2003) Angew. Chem. Int. Ed. 42:4494-4499)。

在一个实施方案中，间隔物单元为分支的双(羟甲基)苯乙烯(BHMS)，它可以用于掺入和释放众多药物，其具有如下结构:

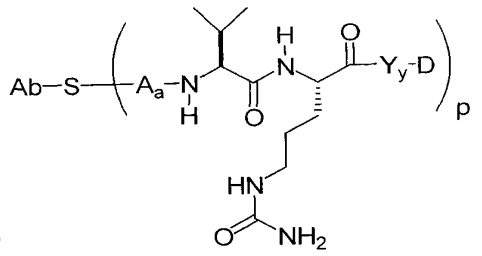


其包含2-(4-氨基亚苄基)丙烷-1,3-二醇树状聚物单元(WO 2004/043493; de Groot等 (2003) Angew. Chem. Int. Ed. 42:4490-4494)，其中Q为-C_1-C_8烃基，-O-(C_1-C_8烃基)、-卤素、-硝基或-氰基; m为0-4的整数; n为0或1; 且p为1-4。

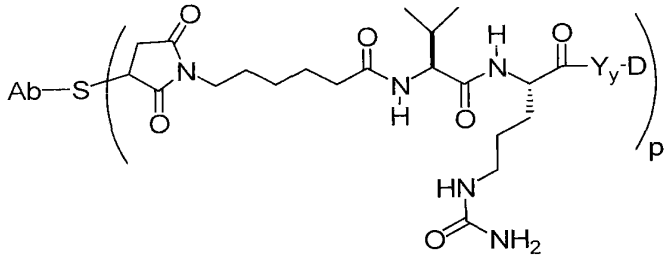
式I抗体-药物偶联物化合物的例示性实施方案包括XIIIa (MC)、XIIIb (val-cit)、XIIIc (MC-val-cit)、和XIIId (MC-val-cit-PAB):



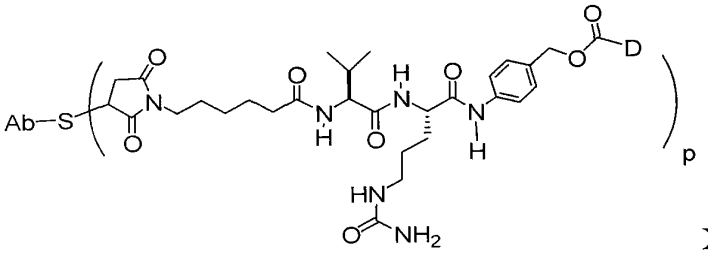
XIIIa



XIIIb

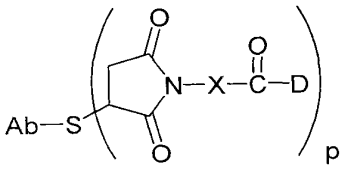


XIIIc

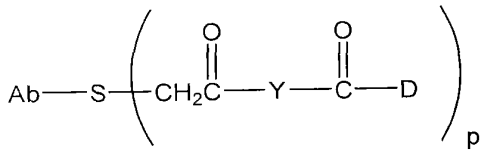


XIIId

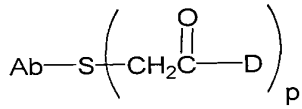
式Ia抗体-药物偶联物化合物的其它例示性实施方案包括XIVa-e:



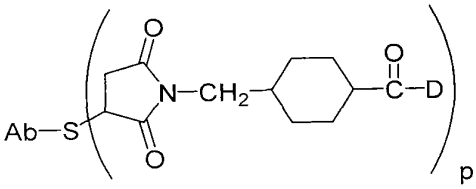
XIVa



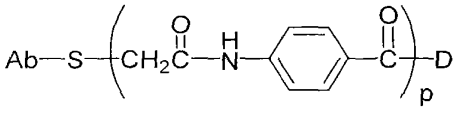
XIVb



XIVc

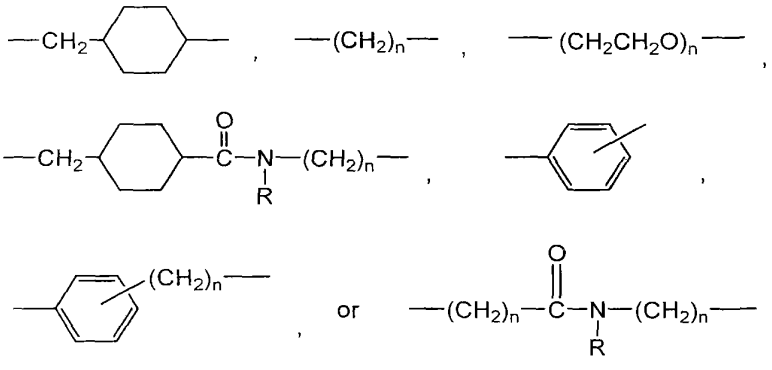


XIVd

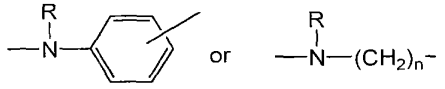


XIVe

其中X为:



Y为:



且R独立为H或C_1-C_6烃基; 且n为1-12。

在另一个实施方案中，接头具有反应性官能团，该反应性官能团具有与存在于抗体上的亲电子基团具有反应性的亲核基团。抗体上有用的亲电子基团包括但不限于醛和酮羰基。接头的亲核基团的杂原子可以与抗体上的亲电子基团反应并且与抗体单元形成共价键。接头上有用的亲核基团包括但不限于酰肼、肟、氨基、肼、缩氨基硫脲(thiosemicarbazone)、肼羧酸酯和芳基酰肼。抗体上的亲电子基团提供了用于附着接头的便利位点。

典型地,可以通过在两个或更多氨基酸和/或肽片段之间形成肽键来制备肽类型的接头。例如，可以按照肽化学领域众所周知的液相合成法(E. Schröder和K. Lübke(1965) "The Peptides", 卷1, pp 76-136, Academic Press)来制备此类肽键。可以通过包括间隔物、延伸物和氨基酸单元的反应的任意组合或顺序来装配接头中间体。间隔物、延伸物和氨基酸单元可以采用本质上为亲电子、亲核或游离基的反应性官能团。反应性官能团包括但不限于羧基、羟基、对硝基苯基碳酸根、异硫氰酸根和离去基团，诸如O-甲磺酰基、O-甲苯磺酰基、-Cl、-Br、-I; 或马来酰亚胺。

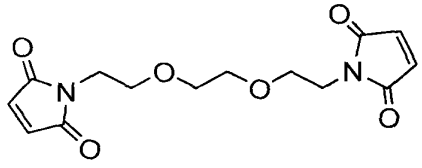
在另一个实施方案中，接头可以用调节溶解性或反应性的基团取代。例如，带电荷的取代基，诸如磺酸根(-SO_3^-)或铵可以增加试剂的水溶性并且有利于接头试剂与抗体或药物模块的偶联反应，或有利于Ab-L（抗体-接头中

间体）与D的偶联反应或D-L（药物-接头中间体）与Ab的偶联反应，这取决于用于制备ADC的合成途径。

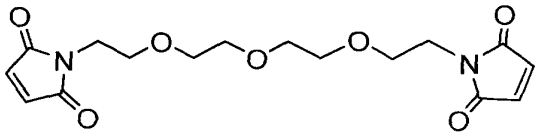
接头试剂

可以使用多种双功能接头试剂来制备包含抗体和auristatin的偶联物，诸如N-琥珀酰亚氨基3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯(SPDP)，琥珀酰亚氨基-4-(N-马来酰亚氨基甲基)环己烷-1-羧酸酯(SMCC)，亚氨基硫烷(IT)，亚氨酸酯（诸如盐酸己二酰亚氨酸二甲酯）、活性酯类（诸如辛二酸二琥珀酰亚氨基酯）、醛类（诸如戊二醛）、双叠氮化合物（诸如双(对-叠氮苯甲酰基)己二胺）、双重氮衍生物（诸如双(对-重氮苯甲酰基)-乙二胺）、二异硫氰酸酯（诸如甲苯2,6-二异氰酸酯）、和双活性氟化合物（诸如1,5-二氟-2,4-二硝基苯）的双功能衍生物。

也可以用如下接头试剂来制备抗体-药物偶联物：BMPEO、BMPS、EMCS、GMBS、HBVS、LC-SMCC、MBS、MPBH、SBAP、SIA、SIAB、SMPB、SMPH、sulfo-EMCS、sulfo-GMBS、sulfo-KMUS、sulfo-MBS、sulfo-SIAB、sulfo-SMCC和sulfo-SMPB、及SVSB(琥珀酰亚氨基-(4-乙烯基砜)苯甲酸酯)；并且包括双马来酰亚胺试剂：DTME、BMB、BMDB、BMH、BMOE、$BM(PEO)_3$和$BM(PEO)_4$，它们可购自Pierce Biotechnology, Inc., Customer Service Department, P.O. Box 117, Rockford, IL. 61105 U.S.A, U.S.A 1-800-874-3723, International +815-968-0747。双马来酰亚胺试剂任选将半胱氨酸改造抗体的硫醇基团按照依次或同时的方式附着至含硫醇药物模块、标记物或接头中间体。除马来酰亚胺外的其它与半胱氨酸改造抗体、药物模块、标记物或接头中间体的硫醇基团具有反应性的官能团包括碘乙酰胺、溴乙酰胺、乙烯基吡啶、二硫化物、吡啶基二硫化物、异氰酸根和异硫氰酸根。



$BM(PEO)_3$

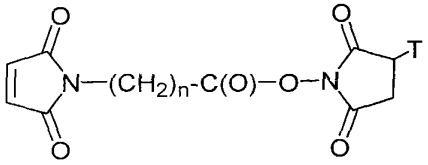


$BM(PEO)_4$

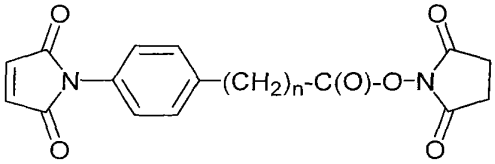
还可以通过其它商业来源，诸如Molecular Biosciences Inc. (Boulder, CO)获得或按照下列文献中所述的规程合成有用的接头试剂：Toki等 (2002) J. Org. Chem. 67:1866-1872； Walker, M.A. (1995) J. Org. Chem. 60:5352-5355；

Frisch等 (1996) Bioconjugate Chem. 7:180-186; US 6214345; WO 02/088172; US 2003130189; US2003096743; WO 03/026577; WO 03/043583; 和WO 04/032828。

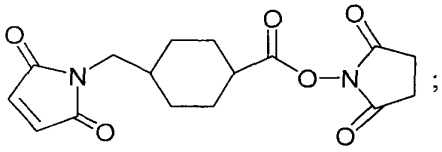
可以通过使下列接头试剂与氨基酸单元的N-末端反应将式(IIIa)的延伸物引入接头:



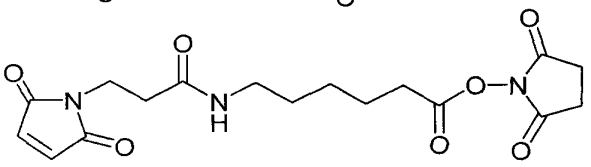
其中n为1-10的整数且T为-H或-SO_3Na;



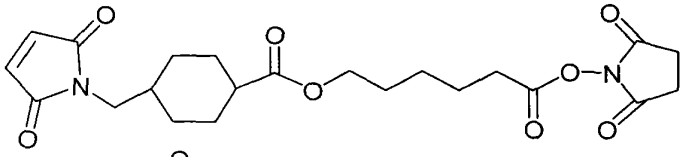
其中n为0-3的整数;



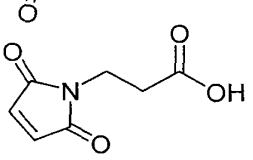
;



;

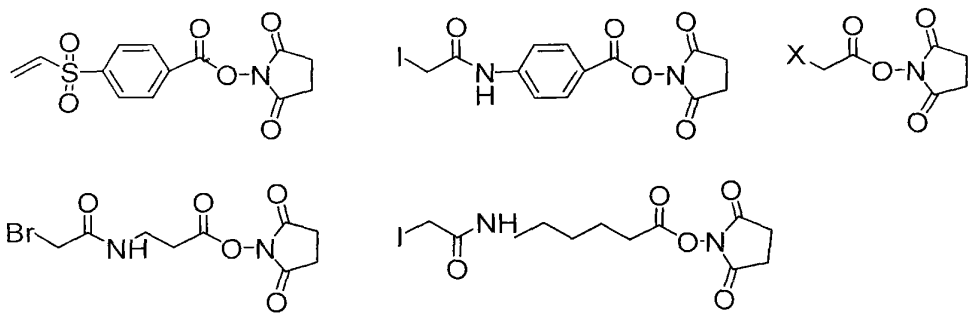


; and



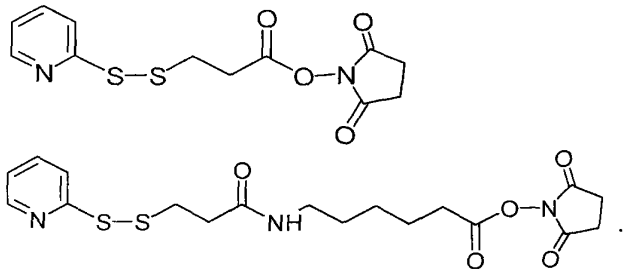
.

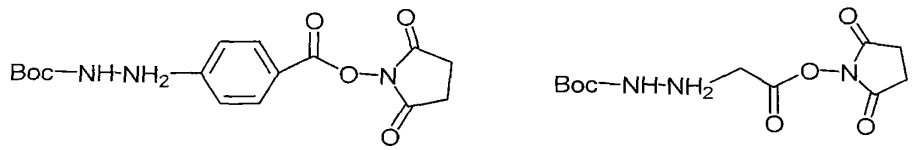
可以通过使下列双功能试剂与氨基酸单元的N-末端反应将延伸物单元引入接头:



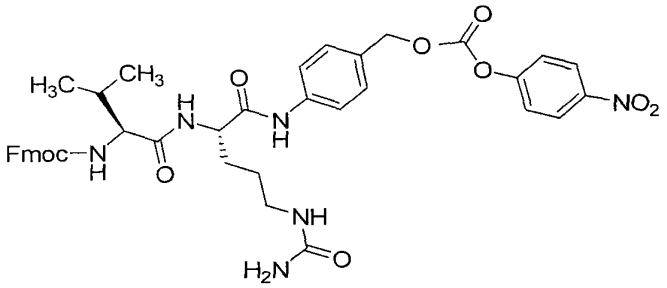
其中X为Br或I。

还可以通过使下列双功能试剂与氨基酸单元的N-末端反应将式中的延伸物单元引入接头：

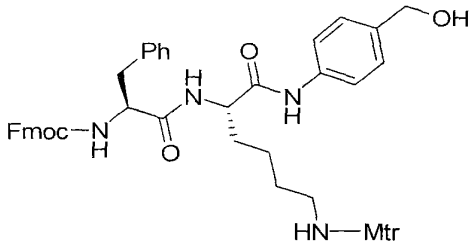




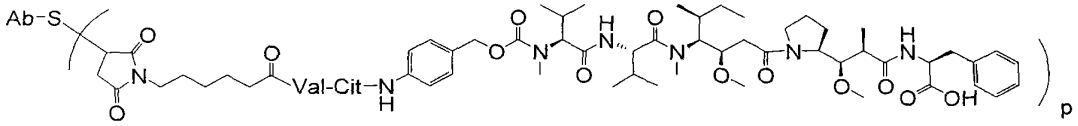
具有马来酰亚胺延伸物和对氨基苄基氨基甲酰基(PAB)自我牺牲间隔物的例示性缬氨酸-瓜氨酸(val-cit或vc)二肽接头试剂具有如下结构：



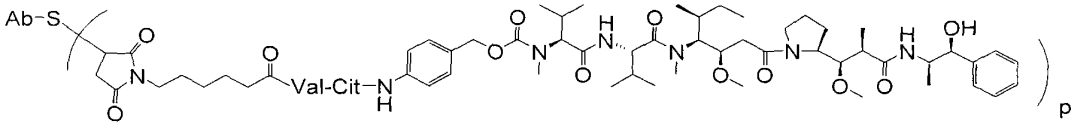
具有马来酰亚胺延伸物单元和PAB自我牺牲间隔物单元的例示性phe-lys（Mtr，单-4-甲氧基三苯甲基）二肽接头试剂可以按照Dubowchik等 (1997) Tetrahedron Letters, 38:5257-60所述制备且具有如下结构：



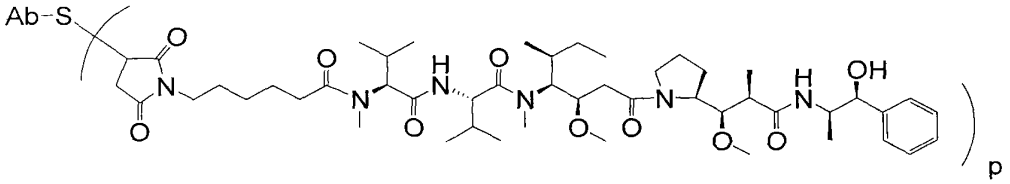
本发明的例示性抗体-药物偶联物化合物包括:



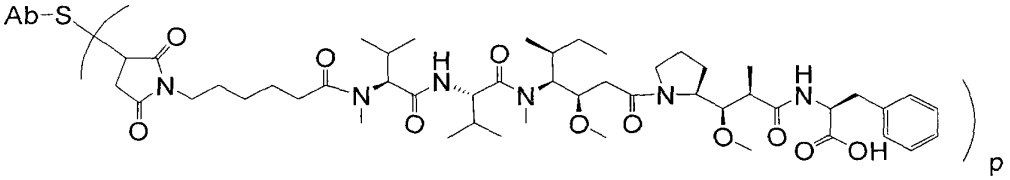
Ab-MC-vc-PAB-MMAF



Ab-MC-vc-PAB-MMAE



Ab-MC-MMAE



Ab-MC-MMAF

其中Val为缬氨酸; Cit为瓜氨酸; p为1、2、3或4; 且Ab为半胱氨酸改造抗CD22抗体。

半胱氨酸改造抗CD22抗体-药物偶联物的制备

可以通过数种途径，采用本领域技术人员公知的有机化学反应、条件和试剂来制备式I的ADC，包括: (1) 使半胱氨酸改造抗体的半胱氨酸基团与接头试剂反应，从而通过共价键形成抗体-接头中间体Ab-L，随后与活化的药

物模块D反应；和(2) 使药物模块的亲核基团与接头试剂反应，从而通过共价键形成药物-接头中间体D-L，随后与半胱氨酸改造抗体的半胱氨酸基团反应。偶联方法(1)和(2)可以与各种半胱氨酸改造抗体、药物模块和接头一起使用以制备式I的抗体-药物偶联物。

抗体半胱氨酸硫醇基团为亲核性的并且能够与接头试剂和药物-接头中间体上的亲电子基团反应而形成共价键，所述亲电子基团包括：(i) 活性酯类，诸如NHS酯类、HOBt酯类、卤代甲酸酯类和酸性氯化物类；(ii) 烃基和苄基卤化物，诸如卤代乙酰胺类；(iii) 醛类、酮类、羧基和马来酰亚胺基团；和(iv) 通过硫化物交换的二硫化物，包括吡啶基二硫化物。药物模块上的亲核基团包括但不限于：胺、硫醇、羟基、酰肼、肟、肼、缩氨基硫脲、肼羧酸酯和芳基酰肼基团，它们能够与接头模块和接头试剂上的亲电子基团反应而形成共价键。

可以如下使半胱氨酸改造抗体变成反应性的以便偶联接头试剂，即用还原剂，诸如DTT（Cleland氏试剂，二硫苏糖醇）或TCEP（三(2-羧乙基)膦盐酸盐）处理(Getz等 (1999) Anal. Biochem. 273:73-80; Soltec Ventures, Beverly, MA)，接着再氧化以再形成链间和链内二硫键（实施例x）。例如，在37°C用约50倍过量的TCEP将在CHO细胞中表达的全长半胱氨酸改造的单克隆抗体(ThioMab)还原3小时以还原的半胱氨酸加合物的二硫键，其可以在新引入的半胱氨酸残基与存在于培养基中的半胱氨酸之间形成。用10 mM乙酸钠, pH 5稀释还原后的ThioMab并且加载至10 mM乙酸钠, pH 5中的HiTrap S柱上并且用含有0.3M氯化钠的PBS洗脱。在室温用稀(200 nM)硫酸铜($CuSO_4$)水溶液重新建立亲本Mab中存在的半胱氨酸残基之间的二硫键过夜。或者，脱氢抗坏血酸(DHAA)是有效的氧化剂，用于在半胱氨酸加合物的还原性切割之后重新建立半胱氨酸改造抗体的链内二硫化物基团。可以使用本领域公知的其它氧化剂，即氧化性试剂和氧化性条件。环境空气氧化也是有效的。这种温和的部分再氧化步骤有效地高保真度地形成链内二硫键并保护新引入的半胱氨酸残基的硫醇基团。加入约10倍过量的药物-接头中间体，例如MC-vc-PAB-MMAE，混合并且在室温放置约1小时，以进行偶联并形成10F4v3抗CD22抗体-药物偶联物。将偶联混合物进行凝胶过滤、加载和通过HiTrap S柱洗脱以除去过量的药物-接头中间体和其它杂质。

附图12显示了制备由细胞培养物表达的用于偶联的半胱氨酸改造抗体

的一般方法。当细胞培养基含有半胱氨酸时，可以在新引入的半胱氨酸氨基酸和培养基中的半胱氨酸之间形成二硫化物加合物。必须将这些半胱氨酸加合物（描绘为图12中的例示性ThioMab（左）中的环）还原以生成具有偶联反应性的半胱氨酸改造抗体。将半胱氨酸加合物和可能的各个链间二硫键用还原剂诸如TCEP还原性切割以产生还原形式的抗体。在部分氧化条件下，用硫酸铜、DHAA、或暴露于环境氧而重新形成配对半胱氨酸残基之间的链间二硫键。新引入的、改造的和未配对的半胱氨酸残基仍然可用于与接头试剂或药物-接头中间体反应而形成本发明的抗体偶联物。哺乳动物细胞系中表达的ThioMabs通过-S-S-键形成产生外部偶联至改造的Cys的Cys加合物。因此，纯化的ThioMabs如实施例x所述通过还原和再氧化规程处理以产生反应性ThioMabs。这些ThioMabs用于偶联含有马来酰亚胺的细胞毒性药物、荧光团和其它标记物。

筛选方法

本发明的又一个实施方案致力于测定怀疑含有CD22多肽的样品中CD22多肽的存在的方法，其中该方法包括使所述样品暴露于结合CD22多肽的半胱氨酸改造抗CD22抗体或其抗体-药物偶联物，并测定半胱氨酸改造抗CD22抗体或其抗体-药物偶联物与样品中CD22多肽的结合，其中存在有所述结合表明样品中存在CD22多肽。任选地，所述样品可包含怀疑表达CD22多肽的细胞（其可以是癌细胞）。所述方法中所采用的半胱氨酸改造抗CD22抗体或其抗体-药物偶联物可任选地可检测地标记、附着至固体支持物、等等。

本发明的另一个实施方案致力于诊断哺乳动物中肿瘤的存在的方法，其中该方法包括：(a)使包含得自哺乳动物的组织细胞的测试样品接触结合CD22多肽的半胱氨酸改造抗CD22抗体或其抗体-药物偶联物，并(b)检测半胱氨酸改造抗CD22抗体或其抗体-药物偶联物与测试样品中的CD22多肽之间复合物的形成，其中形成了复合物表明哺乳动物中存在肿瘤。任选地，半胱氨酸改造抗CD22抗体或其抗体-药物偶联物是可检测地标记的、附着至固体支持物的、等等，和/或组织细胞的测试样品得自怀疑具有癌性肿瘤的个体。

抗体-药物偶联物的代谢物

本文所述ADC化合物的体内代谢产物也落在本发明的范围内，就此类产

物相对于现有技术为新的且非显而易见的而言。此类产物可能源自例如所施用化合物的氧化、还原、水解、酰胺化、酯化、酶促切割、等等。因而，本发明包括通过如下方法产生的新的和非显而易见的化合物，所述方法包括使本发明的化合物与哺乳动物接触足以产生其代谢产物的一段时间。

一般如下鉴定代谢产物，即制备放射性标记的（例如^{14}C或^{3}H）ADC，将其以可检测剂量（例如大于约0.5mg/kg）胃肠外施用于动物（诸如大鼠、小鼠、豚鼠、猪、猴）或人，允许足够时间让代谢发生（通常约30秒到30小时），及从尿液、血液或其它生物学样品分离其转化产物。这些产物易于分离，因为它们是经过标记的（其它的通过使用能够结合在代谢物中幸存的结合表位的抗体来分离）。按照常规方式，例如通过MS、LC/MS或NMR分析来测定代谢物结构。一般而言，按照与本领域技术人员众所周知的常规药物代谢研究相同的方式对代谢物进行分析。转化产物，只要没在其它情况中在体内发现它们，即可用于诊断测定法以用于本发明ADC化合物的治疗性剂量给药。

药物组合物

抗体-药物偶联物（包括硫醇抗体-药物偶联物）的施用

可以通过适合于待治疗疾患的任何途径来施用本发明的抗体-药物偶联物(ADC)，包括硫醇抗体-药物偶联物(TDC)。典型地，胃肠外施用ADC，即输注、皮下、肌肉内、静脉内、真皮内、鞘内和硬膜外。

为了治疗这些癌症，在一个实施方案中，抗体-药物偶联物经静脉内输注来施用。经输注而施用的剂量范围为大约1μg/m^{2}至大约10,000μg/m^{2}每剂，一般是每周一剂，总共一剂、两剂、三剂或四剂。或者，剂量范围是大约1μg/m^{2}至大约1000μg/m^2、大约1μg/m^{2}至大约800μg/m^2、大约1μg/m^{2}至大约600μg/m^2、大约1μg/m^{2}至大约400μg/m^2、大约10μg/m^{2}至大约500μg/m^2、大约10μg/m^{2}至大约300μg/m^2、大约10μg/m^{2}至大约200μg/m^2、和大约1μg/m^{2}至大约200μg/m^2。剂量给药可以每天一次、每周一次、每周多次但少于每天一次、每月多次但少于每天一次、每月多次但少于每周一次、每月一次或间歇地施用以减轻或缓和疾病的症状。施用可以以任何已公开的间隔持续进行，直至所治疗的白血病、淋巴瘤的症状或肿瘤消退。施用可以在实现症状消退或减轻后继续进行，其中所述消退或减轻因所述继续施用而延长。

本发明还提供了减轻自身免疫性疾病的方法，包括给患有自身免疫性疾病的患者施用治疗有效量的任一前述实施方案的人源化10F4抗体-药物偶联物。在优选的实施方案中，所述抗体静脉内或皮下施用。所述抗体-药物偶联物以大约1μg/m^{2}至大约100mg/m^{2}每剂的剂量范围静脉内施用，在一个具体的实施方案中，剂量是1μg/m^{2}至大约500μg/m^2。剂量给药可以每天一次、每周一次、每周多次但少于每天一次、每月多次但少于每天一次、每月多次但少于每周一次、每月一次或间歇地施用以减轻或缓和疾病的症状。施用可以以任何已公开的间隔持续进行，直至所治疗的自身免疫性疾病的症状减轻或缓和。施用可以在实现症状减轻或缓和后继续进行，其中所述减轻或缓和因所述继续施用而延长。

本发明还提供了治疗B细胞病症的方法，包括给患有B细胞病症（诸如B细胞增殖性病症，包括但不限于淋巴瘤和白血病）或自身免疫性疾病的患者施用治疗有效量的任一前述实施方案的人源化10F4抗体，该抗体未偶联至细胞毒性分子或可检测分子。该抗体通常在大约1μg/m^{2}至大约1000mg/m^{2}的剂量范围内施用。

一方面，本发明还提供了包含至少一种本发明抗CD22抗体和/或至少一种其免疫偶联物和/或至少一种本发明抗CD22抗体-药物偶联物的药物配制剂。在有些实施方案中，药物配制剂包含：1) 抗CD22抗体和/或抗CD22抗体-药物偶联物和/或其免疫偶联物，和2) 药学可接受载体。在有些实施方案中，药物配制剂包含：1) 抗CD22抗体和/或其免疫偶联物，和任选的2) 至少一种别的治疗剂。

包含本发明抗体或免疫偶联物或本发明抗体-药物偶联物的药物配制剂通过将具有期望纯度的抗体或抗体-药物偶联物与任选的生理学可接受载体、赋形剂或稳定剂(《Remington's Pharmaceutical Sciences》，第16版，Osol,A.编，1980）混合来制备成水溶液或冻干剂型或其它干燥剂型的形式供贮存。可接受的载体、赋形剂或稳定剂在所采用的剂量和浓度对接受者是无毒的，并且包括：缓冲剂，诸如磷酸盐、柠檬酸盐、组氨酸和其它有机酸；抗氧化剂，包括抗坏血酸和甲硫氨酸；防腐剂（诸如氯化十八烷基二甲基苄基铵；氯己双铵；苯扎氯铵、苄索氯铵；酚、丁醇或苄醇；对羟基苯甲酸烷基酯，诸如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯；邻苯二酚；间苯二酚；环己醇；3-戊醇；和间甲酚）；低分子量（少于约10个残基）多肽；蛋白质，诸如血

清清蛋白、明胶或免疫球蛋白；亲水性聚合物，诸如聚乙烯吡咯烷酮；氨基酸，诸如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸；单糖、二糖和其它碳水化合物，包括葡萄糖、甘露糖或糊精；螯合剂，诸如EDTA；糖类，诸如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨醇；成盐抗衡离子，诸如钠；金属复合物（例如Zn-蛋白质复合物）；和/或非离子表面活性剂，诸如TWEEN™、PLURONICS™或聚乙二醇(PEG)。用于体内施用的药物配制剂一般是无菌的。这易于通过无菌滤膜过滤来实现。

活性成分还可包载于例如通过凝聚技术或通过界面聚合制备的微胶囊中（例如分别是羟甲基纤维素或明胶微胶囊和聚(甲基丙烯酸甲酯)微胶囊）、在胶状药物投递系统中（例如脂质体、清蛋白微球体、微乳剂、纳米颗粒和纳米胶囊）、或在粗滴乳状液中。此类技术公开于Remington's Pharmaceutical Sciences, 第16版, Osol, A.编 (1980)。

可以制备持续释放制剂。持续释放制剂的合适例子包括含有本发明抗体或免疫偶联物的固体疏水聚合物的半透性基质，该基质是定型产品的形式，例如薄膜或微胶囊。持续释放基质的例子包括聚酯、水凝胶（例如聚(2-羟乙基-甲基丙烯酸酯)或聚(乙烯醇)）、聚交酯(美国专利No. 3,773,919)、L-谷氨酸和L-谷氨酸γ-乙酯的共聚物、不可降解的乙烯-乙酸乙烯、可降解的乳酸-乙醇酸共聚物诸如LUPRON DEPOT™（由乳酸-乙醇酸共聚物和醋酸亮丙瑞林构成的可注射微球体）及聚-D-(-)-3-羟基丁酸。虽然诸如乙烯-乙酸乙烯和乳酸-乙醇酸等聚合物能够释放分子达100天以上，但是某些水凝胶释放蛋白质的时间较短。当所封装的抗体或免疫偶联物在体内长时间维持时，它们可能由于暴露于37℃的潮湿环境而变性或聚集，导致生物学活性损失和免疫原性可能改变。可以根据相关机制来设计合理的稳定化策略。例如，如果发现聚集机制是经由硫醇-二硫化物互换的分子间S-S键形成，那么可通过修饰巯基残基、自酸性溶液冻干、控制含水量、采用适宜添加剂和开发特定聚合物基质组合物来实现稳定化。

抗体-药物偶联物治疗

涵盖本发明的抗体-药物偶联物(ADC)可以用于治疗各种疾病或病症，例如其特征在于肿瘤抗原过表达的疾病或病症。例示性的疾患或过度增殖性病症包括良性或恶性肿瘤；白血病和淋巴样恶性肿瘤。其它病症包括神经元、

神经胶质、星形胶质细胞、下丘脑、腺体、巨噬细胞、上皮、基质(stromal)、囊胚腔、炎性、血管发生性和免疫学病症，包括自身免疫性病症。

可以在携带肿瘤的高级灵长类和人体临床试验中进一步测试在动物模型和基于细胞的测定法中鉴定的ADC化合物。可以设计人体临床试验以测试本发明的抗CD22单克隆抗体或免疫偶联物在发生B细胞增殖性病症的患者中的功效，所述B细胞增殖性病症包括但不限于淋巴瘤、非何杰金氏淋巴瘤(NHL)、攻击性NHL、复发性攻击性NHL、复发性无痛性NHL、顽固性NHL、顽固性无痛性NHL、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、小淋巴细胞性淋巴瘤、白血病、毛细胞白血病(HCL)、急性淋巴细胞性白血病(ALL)、和套细胞淋巴瘤。可以设计临床试验以评价ADC与已知治疗方案的组合的功效，所述的已知治疗方案诸如牵涉已知化疗剂和/或细胞毒性剂的化疗和/或放疗。

一般地，待治疗的疾病或病症为过度增殖性疾病，诸如B细胞增殖性病症和/或B细胞癌症。本文中待治疗的癌症的例子包括但不限于选自下组的B细胞增殖性病症：淋巴瘤、非何杰金氏淋巴瘤(NHL)、攻击性NHL、复发性攻击性NHL、复发性无痛性NHL、顽固性NHL、顽固性无痛性NHL、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、小淋巴细胞性淋巴瘤、白血病、毛细胞白血病(HCL)、急性淋巴细胞性白血病(ALL)、和套细胞淋巴瘤。

癌症可以包含表达CD22的细胞，使得本发明的ADC能够结合癌细胞。为了测定癌症中的CD22表达，可以利用各种诊断/预后测定法。在一个实施方案中，可以通过IHC来分析CD22过表达。可以对来自肿瘤活检的石蜡包埋的组织切片进行IHC测定法并根据染色程度和所检查肿瘤细胞中的比例而给予(accord) CD22蛋白质染色强度标准。

为了预防或治疗疾病，ADC的适当剂量取决于上文所定义的待治疗疾病的类型、疾病的严重程度和进程、施用所述分子是为了预防还是为了治疗目的、先前的疗法、患者的临床史和对抗体的应答、及主治医师的判定。一次性地或在一系列治疗中将所述分子适当施用于患者。根据疾病的类型和严重程度，对患者施用的初始候选剂量为大约1μg/kg至15mg/kg（例如0.1-20mg/kg）的分子，例如，或是通过一次或多次分开的施用，或是通过连续输注。典型的每日剂量范围可以为大约1μg/kg至100mg/kg或更大，这取决于上文所述因素。对患者施用的例示性ADC剂量范围为大约0.1至大约10mg/kg患者体重。

对于持续数天或更长时间的反复施用，根据状况，持续治疗，直至发生对疾病症状的期望抑制。例示性的剂量给药方案包括施用大约4mg/kg的初始加载剂量，随后施用大约2mg/kg抗ErbB2抗体的每周维持剂量。其它剂量方案也是有用的。该疗法的进展易于通过常规技术和测定法来监测。

联合疗法

可以将本发明的抗体-药物偶联物(ADC)与具有抗癌特性的第二种化合物在药物组合配制剂中联合或作为联合疗法的给药方案。药物组合配制剂或给药方案中的第二种化合物优选具有对组合中的ADC的补充活性，使得它们彼此不会产生不利影响。

第二种化合物可以为化疗剂、细胞毒剂、细胞因子、生长抑制剂、抗激素剂和/或心脏保护剂。此类分子以对指定目的有效的量适当地联合存在。含有本发明ADC的药物组合物还可以具有治疗有效量的化疗剂，诸如微管蛋白形成抑制剂、拓扑异构酶抑制剂或DNA结合剂。

一方面，所述第一化合物是本发明的抗CD22 ADC，而所述第二化合物是抗CD20抗体（或是裸抗体或是ADC）。在一个实施方案中，所述第二化合物是抗CD20抗体利妥昔单抗(rituximab, Rituxan®)或2H7 (Genentech, Inc., South San Francisco, CA)。可以与本发明的抗CD22 ADC一起用于联合免疫疗法的另一种抗体包括但不限于抗VEGF（例如Avastin®）。

可以将其它治疗方案与依照本发明所鉴定的抗癌药联合施用，包括但不限于放疗和/或骨髓和外周血移植、和/或细胞毒剂、化疗剂、或生长抑制剂。在这样的一个实施方案中，化疗剂是诸如例如下列药剂或药剂组合：环磷酰胺、羟基柔红霉素、阿霉素、多柔比星(doxorubincin)、长春新碱(Oncovin™)、泼尼松龙、CHOP、CVP、或COP、或免疫治疗剂诸如抗CD20（例如Rituxan®）或抗VEGF（例如Avastin®）。联合疗法可以作为同时或序贯方案施用。当序贯施用时，可以以两次或多次施用来施用所述组合。联合施用包括使用分开的配制剂或单一药物配制剂的共施用，和任意次序的序贯施用，其中优选有一段时间所有活性剂同时发挥其生物学活性。

在一个实施方案中，使用ADC的治疗牵涉联合施用本文中所鉴定的抗癌药和一种或多种化疗剂或生长抑制剂，包括共施用不同化疗剂鸡尾酒或混合物。化疗剂包括紫杉烷类（诸如帕利他塞(paclitaxel)和多西他赛(docetaxel)）

和/或蒽环类抗生素。本领域技术人员可以按照制造商的说明书或凭经验确定的使用此类化疗剂的制备物和剂量给药方案。此类化疗剂的制备物和剂量给药方案还记载于"Chemotherapy Service", (1992) M.C. Perry编, Williams & Wilkins, Baltimore, Md。

任何上述共施用的药剂的合适剂量就是那些当前使用的剂量，而且可以由于新鉴定的药剂和其它化疗剂或治疗的联合作用（协同作用）而降低。

联合疗法可以提供"协同作用"并且证实是"协同性"的，即当一起使用活性组分时所实现的效果大于分开使用所述化合物时所产生的效应之和。当活性组分为如下情况时可以获得协同效应：(1) 共同配制和施用或在合并的单位剂量配制剂中同时投递；(2) 作为分开的配制剂交替或平行投递；或(3) 通过一些其它方案。当在交替疗法中投递时，在序贯施用或投递所述化合物时，例如通过不同注射器中的不同注射，可以获得协同效应。一般而言，在交替疗法中，序贯地，即依序地施用每种活性组分的有效剂量，而在联合疗法中，一起施用两种或更多活性组分的有效剂量。

抗体-药物偶联物的代谢物

本文所述ADC化合物的体内代谢产物也落在本发明的范围内，就此类产物相对于现有技术为新的且非显而易见的而言。此类产物可能源自例如所施用化合物的氧化、还原、水解、酰胺化、酯化、酶促切割、等等。因而，本发明包括通过如下方法产生的新的和非显而易见的化合物，所述方法包括使本发明的化合物与哺乳动物接触足以产生其代谢产物的一段时间。

一般如下鉴定代谢产物，即制备放射性标记的（例如^{14}C或^{3}H）ADC，将其以可检测剂量（例如大于约0.5mg/kg）胃肠外施用于动物（诸如大鼠、小鼠、豚鼠、猪、猴）或人，允许足够时间让代谢发生（通常约30秒到30小时），及从尿液、血液或其它生物学样品分离其转化产物。这些产物易于分离，因为它们是经过标记的（其它的通过使用能够结合在代谢物中幸存的结合表位的抗体来分离）。按照常规方式，例如通过MS、LC/MS或NMR分析来测定代谢物结构。一般而言，按照与本领域技术人员众所周知的常规药物代谢研究相同的方式对代谢物进行分析。转化产物，只要没在其它情况中在体内发现它们，即可用于诊断测定法以用于本发明ADC化合物的治疗性剂量给药。

使用抗CD22抗体和免疫偶联物的其它方法

诊断方法和检测方法

一方面，本发明的抗CD22抗体和免疫偶联物可用于检测生物学样品中CD22的存在。术语“检测”在用于本文时涵盖定量或定性检测。在某些实施方案中，生物学样品包含细胞或组织。在某些实施方案中，此类组织包括相对于其它组织以更高水平表达CD22的正常的和/或癌性的组织，例如B细胞和/或B细胞相关组织。

一方面，本发明提供了检测生物学样品中CD22的存在的方法。在某些实施方案中，所述方法包括在容许抗CD22抗体结合CD22的条件下使生物学样品接触抗CD22抗体，并检测在抗CD22抗体与CD22之间是否形成复合物。

一方面，本发明提供了诊断与CD22表达升高有关的病症的方法。在某些实施方案中，所述方法包括使测试细胞接触抗CD22抗体；通过检测抗CD22抗体对CD22的结合来测定测试细胞的CD22表达水平（或是定量的或是定性的）；并比较测试细胞的CD22表达水平与对照细胞（例如与测试细胞相同组织起源的正常细胞或以与这样的正常细胞相当的水平表达CD22的细胞）的CD22表达水平，其中测试细胞的CD22表达水平比对照细胞高指示存在与CD22表达升高有关的病症。在某些实施方案中，测试细胞得自怀疑患有与CD22表达升高有关的病症的患者。在某些实施方案中，所述病症是细胞增殖性病症，诸如癌症或肿瘤。

可以使用本发明的抗体诊断的例示性细胞增殖性病症包括B细胞病症和/或B细胞增殖性病症，包括但不限于淋巴瘤、非何杰金氏淋巴瘤(NHL)、攻击性NHL、复发性攻击性NHL、复发性无痛性NHL、顽固性NHL、顽固性无痛性NHL、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、小淋巴细胞性淋巴瘤、白血病、毛细胞白血病(HCL)、急性淋巴细胞性白血病(ALL)、和套细胞淋巴瘤。

在某些实施方案中，诊断或检测方法，诸如上文所述，包括检测抗CD22抗体对在细胞表面上表达的CD22或在得自在其表面上表达CD22的细胞的膜制备物中的CD22的结合。在某些实施方案中，所述方法包括在容许抗CD22抗体结合CD22的条件下使细胞接触抗CD22抗体，并检测在抗CD22抗体与细胞表面上的CD22之间是否形成复合物。用于检测抗CD22抗体对在细胞表面上表达的CD22的结合的例示性测定法是“FACS”测定法。

可以使用某些其它方法来检测抗CD22抗体对CD22的结合。此类方法包括但不限于本领域公知的抗原结合测定法，诸如Western印迹、放射免疫测定法、ELISA（酶联免疫吸附测定法）、“三明治/夹心式”免疫测定法、免疫沉淀测定法、荧光免疫测定法、蛋白A免疫测定法、和免疫组化(IHC)。

在某些实施方案中，抗CD22抗体是经过标记的。标记物包括但不限于直接检测的标记物或模块（诸如荧光、显色、电子密度、化学发光、和放射性标记物），以及间接检测的模块，诸如酶或配体，例如通过酶促反应或分子相互作用。例示性的标记物包括但不限于放射性同位素^{32}P、^{14}C、^{125}I、^{3}H、和^{131}I，荧光团诸如稀土螯合物或荧光素及其衍生物，罗丹明及其衍生物，丹酰，伞形酮，萤光素酶例如萤火虫萤光素酶和细菌萤光素酶(美国专利No. 4,737,456)，萤光素，2,3-二氢萘嗪二酮，辣根过氧化物酶(HRP)，碱性磷酸酶，β-半乳糖苷酶，葡糖淀粉酶，溶菌酶，糖氧化酶例如葡萄糖氧化酶、半乳糖氧化酶、和葡萄糖-6-磷酸脱氢酶，杂环氧化酶诸如尿酸酶和黄嘌呤氧化酶，偶联利用过氧化氢氧化染料前体的酶诸如HRP、乳过氧化物酶、或微过氧化物酶，生物素/亲合素，自旋标记物，噬菌体标记物，稳定自由基等等。

在某些实施方案中，抗CD22抗体是固定化在不溶性基质上的。固定化能够将抗CD22抗体与仍然在溶液中游离的任何CD22分开。这可以如下常规进行：或是通过在测定规程之前使抗CD22抗体不溶解，即通过吸附至水不溶性基质或表面(Bennich等, U.S. 3,720,760)或通过共价偶联（例如使用戊二醛交联）；或者通过在抗CD22抗体与CD22之间形成复合物之后使抗CD22抗体不溶解，即例如通过免疫沉淀。

可以使用本发明的免疫偶联物来实施诊断或检测的任何上述实施方案，或是用所述免疫偶联物替换抗CD22抗体或是所述免疫偶联物与抗CD22抗体一起使用。

治疗方法

本发明的抗体或免疫偶联物可用于例如体外、回体(ex vivo)、和体内治疗方法。一方面，本发明提供了在体内或在体外抑制细胞生长或增殖的方法，所述方法包括在容许免疫偶联物结合CD22的条件下使细胞暴露于抗CD22抗体或其免疫偶联物。“抑制细胞生长或增殖”意味着将细胞的生长或增殖降低至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、或

100%，而且包括诱导细胞死亡。在某些实施方案中，所述细胞是肿瘤细胞。在某些实施方案中，所述细胞是B细胞。在某些实施方案中，所述细胞是异种移植物，例如本文中所例示的。

一方面，本发明的抗体或免疫偶联物可用于治疗或预防B细胞增殖性病症。在某些实施方案中，所述细胞增殖性病症与CD22的表达和/或活性升高有关。例如，在某些实施方案中，所述B细胞增殖性病症与B细胞表面上的CD22表达升高有关。在某些实施方案中，所述B细胞增殖性病症是肿瘤或癌症。有待用本发明的抗体或免疫偶联物治疗的B细胞增殖性病症的例子包括但不限于淋巴瘤、非何杰金氏淋巴瘤(NHL)、攻击性NHL、复发性攻击性NHL、复发性无痛性NHL、顽固性NHL、顽固性无痛性NHL、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、小淋巴细胞性淋巴瘤、白血病、毛细胞白血病(HCL)、急性淋巴细胞性白血病(ALL)、和套细胞淋巴瘤。

一方面，本发明提供了治疗B细胞增殖性病症的方法，包括给个体施用有效量的抗CD22抗体或其免疫偶联物。在某些实施方案中，用于治疗B细胞增殖性病症的方法包括给个体施用有效量的药物配制剂，其包含抗CD22抗体或抗CD22免疫偶联物和任选的至少一种别的治疗剂，诸如下文所提供的。在某些实施方案中，用于治疗细胞增殖性病症的方法包括给个体施用有效量的药物配制剂，其包含 1) 包含抗CD22抗体与细胞毒剂的免疫偶联物；和任选地 2) 至少一种别的治疗剂，诸如下文所提供的。

一方面，本发明的至少有些抗体或免疫偶联物可结合来自人以外物种的CD22。因而，本发明的抗体或免疫偶联物可用于结合例如包含CD22的细胞培养物中的、人中的、或具有本发明抗体或免疫偶联物与其交叉反应的CD22的其它哺乳动物（例如黑猩猩、狒狒、狨、猕猴和恒河猴，猪或小鼠）中的CD22。在一个实施方案中，抗CD22抗体或免疫偶联物可用于靶向B细胞上的CD22，其通过使所述抗体或免疫偶联物接触CD22以形成抗体或免疫偶联物-抗原复合物使得免疫偶联物中所偶联的细胞毒素到达细胞内部来实现。在一个实施方案中，所述CD22是人CD22。

在一个实施方案中，抗CD22抗体或免疫偶联物可用于结合患有与CD22表达和/或活性升高有关的病症的个体中的CD22的方法，所述方法包括给个体施用抗体或免疫偶联物使得个体中的CD22得到结合。在一个实施方案中，所结合的抗体或免疫偶联物内在化入表达CD22的B细胞。在一个实施方案

中，所述CD22是人CD22，所述个体是人个体。或者，所述个体可以是表达抗CD22抗体与其结合的CD22的哺乳动物。还有，所述个体可以是导入了CD22的个体（例如通过施用CD22或通过表达编码CD22的转基因）。

可以出于治疗目的将抗CD22抗体或免疫偶联物施用于人。此外，可以出于兽医目的或作为人类疾病的动物模型将抗CD22抗体或免疫偶联物施用于表达抗体与其交叉反应的CD22的非人哺乳动物（例如灵长类动物、猪、大鼠、或小鼠）。关于后者，此类动物模型可用于评估本发明抗体或免疫偶联物的治疗功效（例如测试施用的剂量和时间进程）。

本发明的抗体或免疫偶联物可以在治疗中单独使用或联合其它组合物使用。例如，本发明的抗体或免疫偶联物可以与至少一种别的治疗剂和/或佐剂共施用。在某些实施方案中，别的治疗剂是细胞毒剂、化疗剂、或生长抑制剂。在这样一个实施方案中，化疗剂是诸如例如下列药剂或药剂组合，环磷酰胺、羟基柔红霉素、阿霉素、多柔比星(doxorubincin)、长春新碱(Oncovin™)、泼尼松龙、CHOP、CVP、或COP、或免疫治疗剂诸如抗CD20（例如Rituxan®）或抗VEGF（例如Avastin®），其中所述联合疗法可用于治疗癌症和/或B细胞病症，诸如B细胞增殖性病症，包括淋巴瘤、非何杰金氏淋巴瘤(NHL)、攻击性NHL、复发性攻击性NHL、复发性无痛性NHL、顽固性NHL、顽固性无痛性NHL、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、小淋巴细胞性淋巴瘤、白血病、毛细胞白血病(HCL)、急性淋巴细胞性白血病(ALL)、和套细胞淋巴瘤。

上文所述此类联合疗法涵盖联合施用（其中两种或更多治疗剂包含在同一配制剂中或分开的配制剂中）和分开施用，其中本发明抗体或免疫偶联物的施用可以在别的治疗剂和/或佐剂的施用之前、同时、和/或之后进行。本发明的抗体或免疫偶联物还可以与放疗联合。

本发明的抗体或免疫偶联物（及任何别的治疗剂或佐剂）可以通过任何合适的手段来施用，包括胃肠外、皮下、腹膜内、肺内、和鼻内，及损伤内施用（如果希望局部治疗的话）。胃肠外输注包括肌肉内、静脉内、动脉内、腹膜内、或皮下施用。另外，通过脉冲输注来施用抗体或免疫偶联物是合适的，特别是使用递减剂量的抗体或免疫偶联物。剂量给药可以通过任何合适的路径，例如通过注射，诸如静脉内或皮下注射，这部分取决于施用是短暂的还是长时间的。

可以与优良医学实践一致的方式配制、剂量给药和施用本发明的抗体或免疫偶联物。在此内容中考虑的因素包括所治疗的具体病症、所治疗的具体哺乳动物、患者个体的临床状况、病症的起因、投递药剂的部位、施药的方法、施药的日程安排、和医学从业人员知道的其它因素。不是必需而是任选将抗体或免疫偶联物与目前用于预防或治疗所讨论病症的一种或多种药剂一起配制。此类其它药剂的有效量取决于配制剂中存在的抗体或免疫偶联物的量、病症或治疗的类型、和上文讨论的其它因素。这些通常是以与本文所用相同的剂量和施用路径使用，或是本文所述剂量的大约1-99%，或是凭经验/在临床上确定为适宜的任何剂量和任何路径。

对于疾病的预防或治疗，本发明抗体或免疫偶联物的适宜剂量（在单独使用或联合一种或多种其它别的治疗剂诸如化疗剂时）将取决于待治疗疾病的类型、抗体或免疫偶联物的类型、疾病的严重程度和进程、施用抗体或免疫偶联物是出于预防还是治疗目的、先前的疗法、患者的临床史和对抗体或免疫偶联物的响应、及主治医师的判断。合适的是，一次性或通过一系列治疗将抗体或免疫偶联物施用于患者。根据疾病的类型和严重程度，施用于患者的初始候选剂量可以是约1μg/kg至100mg/kg（例如0.1mg/kg-20mg/kg）抗体或免疫偶联物，例如或是通过一次或多次分开施药或是通过连续输注。根据上文所述因素，典型日剂量的范围可以是约1μg/kg至100mg/kg或更多。对于持续数天或更长的重复施药，根据状况，通常持续治疗直至疾病症状发生期望的抑制。抗体或免疫偶联物的例示剂量的范围可以是约0.05mg/kg至约10mg/kg。如此，可以对患者施用一剂或多剂约0.5mg/kg、2.0mg/kg、4.0mg/kg或10mg/kg（或其任意组合）的抗体或免疫偶联物。此类剂量可间歇施用，例如每周或每三周（例如使得患者接受约2剂至约20剂，例如约6剂抗体或免疫偶联物）。可施用一剂较高的初始加载剂量，后续一剂或多剂较低剂量。例示性剂量给药方案包括施用一剂约4mg/kg抗体的初始加载剂量，后续每周一剂约2mg/kg抗体的维持剂量。然而，其它剂量方案也可能是有用的。这种疗法的进程易于通过常规技术和测定法来监测。

测定法

本发明的抗CD22抗体和免疫偶联物可以通过本领域知道的各种测定法来表征其物理/化学特性和/或生物学活性。

活性测定法

一方面，提供了用于鉴定具有生物学活性的抗CD22抗体或其免疫偶联物的方法。生物学活性可以包括例如抑制细胞生长或增殖的能力（例如“细胞杀伤”活性）、或诱导细胞死亡（包括程序性细胞死亡（凋亡））的能力。还提供了在体内和/或在体外具有此类生物学活性的抗体或免疫偶联物。

在某些实施方案中，测试抗CD22抗体或其免疫偶联物在体外抑制细胞生长或增殖的能力。抑制细胞生长或增殖的测定法是本领域公知的。细胞增殖的某些测定法，以本文所述“细胞杀伤”测定法为例，测量细胞存活力(viability)。这样的一种测定法是CellTiter-Glo™发光细胞存活力测定法，其可购自Promega (Madison, WI)。该测定法基于存在的ATP（有代谢活性的细胞的一项指标）的定量来测定培养物中的可存活细胞数。参见Crouch等 (1993) J. Immunol. Meth. 160:81-88; 美国专利No. 6602677。该测定法可以以96孔或384孔形式进行，使之适应自动化高通量筛选(HTS)。参见Cree等 (1995) AntiCancer Drugs 6:398-404。该测定法规程牵涉直接向培养细胞添加单一试剂（CellTiter-Glo®试剂）。这导致细胞溶解和通过萤光素酶反应产生的发光信号的生成。发光信号与存在的ATP的量成正比，后者直接与培养物中存在的可存活细胞数成正比。可以通过光度计或CCD照相机成像装置来记录数据。发光输出表述成相对光单位(RLU)。

细胞增殖的另一种测定法是“MTT”测定法，一种测量3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯基四唑氮溴化物被线粒体还原酶氧化成甲臜(formazan)的比色测定法。像CellTiter-Glo™测定法一样，此测定法指示细胞培养物中存在的有代谢活性的细胞的数目。参见例如Mosmann (1983) J. Immunol. Meth. 65:55-63; 及Zhang等 (2005) Cancer Res. 65:3877-3882。

一方面，测试抗CD22抗体在体外诱导细胞死亡的能力。诱导细胞死亡的测定法是本领域公知的。在有些实施方案中，此类测定法测量例如膜完整性的丧失，其通过碘化丙啶(PI)、锥虫蓝(参见Moore等 (1995) Cytotechnology, 17:1-11)、或7AAD的摄取来指示。在一种例示性PI摄取测定法中，将细胞在补充有10%热灭活FBS (Hyclone)和2mM L-谷氨酰胺的Dulbecco氏改良Eagle培养基(D-MEM):Ham氏F-12 (50:50)中培养。如此，该测定法在缺乏补体和免疫效应细胞时进行。将细胞以3x10^{6}个/盘的密度接种入100x20mm盘，并容许附着过夜。除去培养基，并用单独的新鲜培养基或含有各种浓度抗体或免

疫偶联物的培养基更换。将细胞温育3天时间段。处理后，将细胞单层用PBS清洗，并通过胰蛋白酶处理而脱离。然后将细胞于4°C以1200rpm离心5分钟，将沉淀物重悬于3ml冷的Ca^{2+}结合缓冲液(10mM Hepes, pH 7.4, 140mM NaCl, 2.5mM $CaCl_2$)，并等分入35mm盖有滤网(strainer-capped)的12x75mm管（1ml/管，3管/处理组）以除去细胞团块。然后向管中加入PI (10μg/ml)。使用FACSCAN™ 流式细胞仪和FACSCONVERT™ CellQuest 软件 (Becton Dickinson)分析样品。根据PI摄取的测定诱导统计学显著水平的细胞死亡的抗体或免疫偶联物如此得到鉴定。

一方面，测试抗CD22抗体或免疫偶联物在体外诱导凋亡（程序性细胞死亡）的能力。诱导凋亡的抗体或免疫偶联物的一种例示性测定法是膜联蛋白结合测定法。在一种例示性的膜联蛋白结合测定法中，将细胞如上一段所述培养并接种入盘。除去培养基，并用单独的新鲜培养基或含有0.001-10μg/ml抗体或免疫偶联物的培养基更换。3天温育期后，将细胞单层用PBS清洗，并通过胰蛋白酶处理脱离。然后将细胞如上一段所述离心，重悬于Ca^{2+}结合缓冲液，并等分入管。然后向管中加入经过标记的膜联蛋白（例如膜联蛋白V-FITC）(1μg/ml)。使用FACSCAN™ 流式细胞仪和FACSCONVERT™ CellQuest软件(Becton Dickinson)分析样品。相对于对照诱导统计学显著水平的膜联蛋白结合的抗体或免疫偶联物如此得到鉴定。诱导凋亡的抗体或免疫偶联物的另一种例示性测定法是组蛋白DNA ELISA比色测定法，其用于检测基因组DNA的核小体间降解。此类测定法可使用例如细胞死亡检测ELISA试剂盒(Roche, Palo Alto, CA)来进行。

可用于任何上述体外测定法的细胞包括天然表达CD22或经改造而表达CD22的细胞或细胞系。此类细胞包括相对于同一组织起源的正常细胞过表达CD22的肿瘤细胞。此类细胞还包括表达CD22的细胞系（包括肿瘤细胞系）和在正常情况下不表达CD22但经CD22编码核酸转染的细胞系。

一方面，测试抗CD22抗体或其免疫偶联物在体内抑制细胞生长或增殖的能力。在某些实施方案中，测试抗CD22抗体或其免疫偶联物在体内抑制肿瘤生长的能力。体内模型系统，诸如异种移植物模型，可用于此类测试。在一种例示性异种移植物系统中，将人肿瘤细胞导入适当免疫受损的非人动物，例如SCID小鼠。将本发明的抗体或免疫偶联物施用于所述动物。测量抗体或免疫偶联物抑制或降低肿瘤生长的能力。在上述异种移植物系统的某些

实施方案中，所述人肿瘤细胞是来自人类患者的肿瘤细胞。可用于制备异种移植物模型的此类细胞包括人白血病和淋巴瘤细胞系，包括但不限于BJAB-luc细胞（经萤光素酶报告基因转染的EBV阴性伯基特氏淋巴瘤细胞系、Ramos细胞(ATCC, Manassas, VA, CRL-1923)、Raji细胞(ATCC, Manassas, VA, CCL-86)、SuDHL-4细胞(DSMZ, Braunschweig, Germany, AAC 495)、DoHH2细胞(参见Kluin-Neilemans, H.C.等, Leukemia 5:221-224 (1991)及Kluin-Neilemans, H.C.等, Leukemia 8:1385-1391 (1994))、Granta-519细胞(参见Jadayel, D.M.等, Leukemia 11(1):64-72 (1997))。在某些实施方案中，通过皮下注射或通过移植入合适的位点（诸如乳房脂肪垫），将人肿瘤细胞导入适当免疫受损的非人动物。

结合测定法和其它测定法

一方面，对抗CD22抗体测试其抗原结合活性。例如，在某些实施方案中，对抗CD22抗体测试其结合在细胞表面上表达的CD22的能力。可以将FACS测定法用于此类测试。

一方面，可以将竞争测定法用于鉴定与鼠10F4.4.1抗体、人源化10F4v1抗体、人源化10F4v3抗体和/或鼠5E8.1.8抗体竞争结合CD22的单克隆抗体。在某些实施方案中，此类竞争性抗体与鼠10F4.4.1抗体、人源化10F4v1抗体、人源化10F4v3抗体和/或鼠5E8.1.8抗体结合相同的表位（例如线性表位或构象表位）。例示性的竞争测定法包括但不限于常规测定法，诸如Harlow和Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual, 14章 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY)中所提供的。定位抗体所结合表位的详细的例示性方法见Morris (1996) "Epitope Mapping Protocols," 于Methods in Molecular Biology 卷66 (Humana Press, Totowa, NJ)。若两种抗体各自阻断彼此50%或更多的结合，则说这两种抗体结合相同表位。

在一种例示性的竞争测定法中，将固定化的CD22在包含结合CD22的第一经标记抗体（例如鼠10F4.4.1抗体、人源化10F4v1抗体、人源化10F4v3抗体和/或鼠5E8.1.8抗体）和要测试其与第一抗体竞争结合CD22的第二未标记抗体的溶液中温育。所述第二抗体可以存在于杂交瘤上清液中。作为对照，将固定化的CD22在包含第一经标记抗体但没有第二未标记抗体的溶液中温育。在容许第一抗体结合CD22的条件下温育后，除去过量的未结合抗体，并测量与固定化的CD22结合的标记物的量。如果测试样品中与固定化CD22

结合的标记物的量相对于对照样品有实质性降低，那么这指示所述第二抗体与所述第一抗体竞争结合CD22。在某些实施方案中，固定化的CD22存在于细胞表面上或得自在其表面上表达CD22的细胞的膜制备物中。

一方面，纯化的抗CD22抗体可以通过一系列测定法进一步表征，包括但不限于N-末端测序、氨基酸分析、非变性大小排阻、高压液相层析(HPLC)、质谱、离子交换层析、和木瓜蛋白酶消化。

在一个实施方案中，本发明涵盖改良的抗体，其具有一些但非所有效应器功能，这使之成为如下许多应用的期望候选物，其中抗体的体内半衰期是重要的，但某些效应器功能（诸如补体和ADCC）不是必需的或有害的。在某些实施方案中，测量抗体的Fc活性以确保只保留了期望的特性。可进行体外和/或体内细胞毒性测定法来证实CDC和/或ADCC活性的降低/消除。例如，可以进行Fc受体(FcR)结合测定法来确认抗体缺乏FcγR结合（从此有可能缺乏ADCC活性），但保留FcRn结合能力。介导ADCC的主要细胞，NK细胞，只表达FcγRIII，而单核细胞表达FcγRI、FcγRII和FcγRIII。Ravetch和Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-92 (1991)第464页表3总结了造血细胞上的FcR表达。美国专利No. 5,500,362或5,821,337中记载了评估感兴趣分子的ADCC活性的体外测定法的例子。可用于此类测定法的效应细胞包括外周血单个核细胞(PBMC)和天然杀伤(NK)细胞。或者/另外，可以在体内评估感兴趣分子的ADCC活性，例如在动物模型中，诸如Clynes等 PNAS (USA) 95:652-656 (1998)中所披露的。还可以进行C1q结合测定法来证实抗体不能结合C1q及从此缺乏CDC活性。为了评估补体激活，可进行CDC测定法，例如如Gazzano-Santoro等, J. Immunol. Methods 202:163 (1996)中所记载的。还可以使用本领域知道的方法进行FcRn结合和体内清除/半衰期测定。

实施例

下文是本发明方法和组合物的实施例。应当理解，根据上文提供的全面描述，可以实施各种其它的实施方案。

实施例1：鼠抗人CD22单克隆抗体的制备

制备了能够特异性结合人CD22的鼠单克隆抗体。对六周龄BALB/c雌性小鼠在它们的爪垫中免疫接种Ribi氏佐剂中纯化后的缺乏结构域3和4的人

CD22 加his-8标签的胞外结构域(SEQ ID NO:30 (ECD)在C末端加序列GRAHHHHHHHH)或者包含结构域1-7的CD22加his-8标签的胞外结构域(SEQ ID NO:28 (ECD)加上述His序列标签)。在初始免疫接种后一周和三周，以同样的方式实施后续的注射。在最终注射后三天，将腹股沟和腘淋巴结去除并合并，并通过将组织经过钢丝网(steel gauze)来制备单细胞悬液。将该细胞与小鼠骨髓瘤，诸如P3X63-Ag8.653 (ATCC CRL 1580)以4:1比率在含50% w/v聚乙二醇4000的高葡萄糖(DMEM)中融合。然后以2x10^5每孔的密度将融合后的细胞铺于96孔组织培养板中。24小时后，添加HAT选择性培养基(次黄嘌呤/氨基喋呤/胸苷，Sigma, #H0262)。融合后14天，使用酶联免疫吸附测定法(ELISA)对正在生长的细胞的上清液测试人CD22特异性抗体的存在。

根据显示抗体特异性结合人CD22的基于细胞的测定法和平板测定法，选择鼠抗人CD22 10F4.4.1 (mu 10F4)和5E8.1.8 (mu 5E8)单克隆抗体，用于进一步研究。所述测定法在后续段落中有描述。

基于ELISA的测定法：如下实施通过ELISA的抗CD22抗体筛选，且于室温完成所有温育。将测试平板(Nunc Immunoplate)用50nM碳酸钠缓冲液(pH9.6)中纯化后的CD22包被2小时，然后用磷酸盐缓冲盐水(PBS)中0.5%牛血清清蛋白封闭30分钟，然后用含0.05% Tween 20的PBS (PBST)清洗4次。添加测试抗体上清液，并以摇动方式温育2小时，然后用PBST清洗4次。通过添加100μl/孔溶液(在25ml磷酸盐柠檬酸盐缓冲液(pH5.0)中含有10mg二盐酸邻苯二胺(Sigma, #P8287)和10μl 30%过氧化氢溶液）并温育15分钟来对所述平板显色。通过添加100μl/孔2.5M硫酸停止该反应。通过用自动化ELISA读板仪在490nm吸光度读取该平板来获得数据。

实施例2：用于分析抗人CD22单克隆抗体(MAb)的基于FACS的测定法

将在其表面上表达人CD22的CHO细胞与100μl FACS缓冲液（PBS, pH 7.4中的0.1% BSA, 10mM叠氮化钠）中抗CD22杂交瘤上清液在4°C温育30分钟，接着用FACS缓冲液清洗一次。如下测定抗CD22结合的量：将抗体/细胞混合物的等分试样与多克隆的FITC偶联的山羊或家兔抗小鼠IgG (Accurate Chem. Co., Westbury, NY)（用于鼠测试抗体）或者山羊或家兔抗人IgG（用于人源化抗体）在4°C温育30分钟，接着用FACS缓冲液清洗三次。

实施例3：人源化抗CD22抗体的制备

产生了人源化10F4抗体，其中通过定点诱变(Kunkel等, Methods Enzymol. (1987), 154:367-382)修饰高变区(HVR)氨基酸残基（可互换地称为互补性决定区或CDR）以得到两种变体，即人源化10F4v1和人源化10F4v2（本文中还分别称为"10F4v1"或"hu10F4v1"或者"10F4v2"或"hu10F4v2"）。本文中所披露的一些研究中所使用的第三种型式，即人源化10F4v3（"10F4v3"或"hu10Fv3"）具有与hu10F4v2相同的成熟蛋白质轻链和重链氨基酸序列，但在用于蛋白质表达的载体中包含不同的信号序列。

如本文中所公开的实施鼠10F4抗体的人源化。简言之，将鼠10F4的轻链和重链高变区克隆入修饰后的共有框架序列，以产生图2A和2B中所示的轻链和重链可变区氨基酸序列。图3和图4中显示了可用作本发明抗体的框架序列的备选轻链和重链框架序列。

将基本上如Lee等, J. Mol. Biol. 340:1073-93 (2004)所述，具有两个在*pho*A启动子控制下的可读框的单价Fab-g3展示载体(pV0350-2B)噬菌粒用于10F4抗体的人源化。第一个可读框包含用于蛋白质分泌的大肠杆菌热稳定STII信号序列，其与受体轻链序列的VL和CH1结构域融合。第二个可读框包含STII信号序列，其与受体重链序列的VH和CH1结构域接着截短的次要噬菌体外壳蛋白P3融合。

将来自鼠10F4的VH和VL结构域（分别为SEQ ID NO:89和90）分别与人亚组III共有VH (huIII)结构域(SEQ ID NO:24)和人共有κI (huK1)结构域(SEQ ID NO:25)比对。将鼠抗人CD22单抗10F4的高变区（HVR，可互换地称为互补性决定区(CDR)）氨基酸序列如下插入共有框架序列。将mu10F4抗体的轻链HVR (HVR-L1 (Kabat位置24-34)、HVR-L2 (Kabat位置50-56)和HVR-L3 (Kabat位置89-97))改造入人κI (huK1)共有序列抗体框架，以生成人源化10F4v1轻链(SEQ ID NO:17, 图2B)。将mu10F4抗体的重链HVR (HVR-H1 (Kabat位置26-35)、HVR-H2 (Kabat位置49-65)和HVR-H3 (Kabat位置95-102))改造入修饰后的人亚组III (humIII)共有VH结构域（其在三个位置上不同于humIII序列：使用了R71A、N73T和L78A(参见Carter等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4285 (1992)），以生成人源化10F4v1重链可变区(SEQ ID NO:16, 图2A)。通过使用针对各个高变区的分开的寡核苷酸的Kunkel诱变来实施HVR

进入受体框架的遗传工程。通过标准DNA测序技术来测定每个克隆的序列。依照Kabat编号方式(Kabat等 (1991), 见上文)对图2A和2B中所示高变区和框架区编号。对轻链和重链测序，并在图2A和2B中显示了huKI、humIII、鼠10F4、人源化10F4v1和人源化10F4v2的可变域（包括HVR和框架区(FR)）氨基酸序列。人源化10F4v3抗体具有与10F4v2同样的氨基酸序列。

通过本领域已知的多种方法制备了编码抗体、抗体片段、VL结构域或VH结构域的氨基酸序列变体的核酸分子。这些方法包括但不限于从天然来源(在天然存在的氨基酸序列变体的情况中)分离或通过对早期制备的变体或非变体型式的抗体、抗体片段、VL结构域或VH结构域进行寡核苷酸介导的诱变（或定点诱变）、PCR诱变和盒式诱变来制备。例如，可以使用Kunkel的方法通过寻找(targeting) VH中和任选的一个或多个CDR中VL可及氨基酸位置并用变体氨基酸进行氨基酸替代来创建文库。参见例如Kunkel等，Methods Enzymol. (1987), 154:367-382和本文中的实施例。下文实施例中还描述了随机化序列的产生。

寡核苷酸的序列对于本发明多肽的CDR (HVR)或FR区中的特定位置包括一种或多种经设计的密码子集合(codon set)。密码子集合是用于编码期望变体氨基酸的一套不同的核苷酸三联体序列。依照IUB代码，可使用符号来代表密码子集合以指明特定核苷酸或核苷酸等摩尔混合物，正如下文所示。

IUB代码

G 鸟嘌呤

A 腺嘌呤

T 胸腺嘧啶

C 胞嘧啶

R (A或G)

Y (C或T)

M (A或C)

K (G或T)

S (C或G)

W (A或T)

H (A或C或T)

B (C或G或T)

V (A或C或G)

D (A或G或T)

N (A或C或G或T)

例如，在密码子集合DVK中，D可以是核苷酸A或G或T；V可以是A或G或C；而K可以是G或T。该密码子集合可以表示18种不同的密码子，且可以编码氨基酸Ala、Trp、Tyr、Lys、Thr、Asn、Lys、Ser、Arg、Asp、Glu、Gly和Cys。

可以使用标准方法来合成寡核苷酸或引物集合。可以合成（例如通过固相合成）含下列序列的一套寡核苷酸，所述序列代表由该密码子集合所提供的核苷酸三联体的所有可能组合，且其会编码期望的一组氨基酸。在某些位置上具有选定核苷酸“简并性”的寡核苷酸的合成是那一领域中公知的。具有某些密码子集合的此类核苷酸集合可以使用商品化的核酸合成仪(可购自例如Applied Biosystems, Foster City, CA)合成，或者可以商购(例如购自Life Technologies, Rockville, MD)。因此，具有特定密码子集合的一套合成寡核苷酸会典型地包括具有不同序列的多个寡核苷酸，其差异由全序列内的密码子集合来确立。在依照本发明使用时，寡核苷酸具有容许杂交至可变域核酸模板的序列，且还可以包括用于克隆目的的限制酶位点。

在一种方法中，可通过寡核苷酸介导的诱变产生编码变体氨基酸的核酸序列。该技术是本领域公知的，如Zoller等，1987, Nucleic Acids Res. 10:6487-6504所记载。简言之，通过将编码期望密码子集合的寡核苷酸集合杂交至DNA模板来产生编码变体氨基酸的核酸序列，其中该模板是含有可变区核酸模板序列的单链形式质粒。杂交后，使用DNA聚合酶合成该模板的整个第二条互补链，因而其会掺入寡核苷酸引物，并会含有寡核苷酸集合所提供的密码子集合。

一般地，使用长度至少为25个核苷酸的寡核苷酸。最优的寡核苷酸会具有12至15个核苷酸，其与编码一个或多个突变的一个或多个核苷酸的任一侧上的模板完全互补。这确保该寡核苷酸会正确杂交至单链DNA模板分子。使用本领域已知的技术，诸如Crea等, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA, 75:5765 (1978)所记载的，轻易地合成该寡核苷酸。

通过载体产生DNA模板，所述载体或是那些衍生自噬菌体M13载体的(商品化的M13mp18和M13mp19载体是适合的)，或是那些含有单链噬菌体复

制起点的，如Viera等, Meth. Enzymol., 153:3 (1987)所述。如此，可将待突变的DNA插入这些载体之一以产生单链模板。单链模板的生成记载于Sambrook等 (见上文)第4.21-4.41节。

为了改变天然DNA序列，将寡核苷酸在合适的杂交条件下杂交至单链模板。然后添加DNA聚合酶（通常是T7 DNA聚合酶或DNA聚合酶I的Klenow片段）以合成该模板的互补链，其中使用该寡核苷酸作为用于合成的引物。如此，形成异源双链体分子，使得DNA的一条链编码基因1的突变形式，而另一条链（原始模板）编码基因1的天然的、未改变的序列。然后将该异源双链体分子转化入合适的宿主细胞，通常是原核细胞，诸如大肠杆菌JM101。在培养该细胞后，将它们铺在琼脂糖平板上，并使用经32-磷酸盐放射性标记的寡核苷酸引物来筛选以鉴定含突变型DNA的细菌菌落。

可以修改上文刚刚描述的方法，使得产生同源双链体分子，其中质粒的两条链都含有一个或多个突变。所述修改如下：将单链寡核苷酸退火至上文所述单链模板。将三种脱氧核糖核苷酸即脱氧核糖腺苷酸(deoxyriboadenosine)(dATP)、脱氧核糖鸟苷酸(deoxyriboguanosine)(dGTP)和脱氧核糖胸苷酸(deoxyribothymidine)(dTT))的混合物与称为dCTP-(aS)的经修饰硫醇脱氧核糖胞苷酸(thiodeoxyribocytosine)（其可获自Amersham）混合。将该混合物添加至模板-寡核苷酸复合物。在将DNA聚合酶添加至该混合物后，产生在突变碱基之外与模板同样的DNA链。另外，该DNA新链会含有替代dCTP的dCTP-(aS)，其发挥保护该DNA新链免受限制性内切核酸酶消化的作用。在用合适的限制酶使双链异源双链体的模板链产生缺刻后，可以用ExoIII核酸酶或另一种合适的核酸酶消化该模板链，越过含有待诱变位点的区域。然后停止该反应以使分子仅是部分为单链。然后在存在所有四种脱氧核糖核苷酸三磷酸、ATP和DNA连接酶时，使用DNA聚合酶来形成完整的双链DNA同源双链体。然后可以将该同源双链体分子转化入合适的宿主细胞。

如之前所指出，寡核苷酸集合的序列长度对于杂交至模板核酸是足够的，但不是必需含有限制性位点。通过载体产生DNA模板，所述载体或是那些衍生自噬菌体M13载体的，或是含有单链噬菌体复制起点的，如Viera等Meth. Enzymol., 153:3 (1987)所述。如此，必须将待突变的DNA插入这些载体之一以产生单链模板。单链模板的产生记载于Sambrook等（见上文）第4.21-4.41节。

依照另一种方法，可以如下产生文库，即提供上游和下游寡核苷酸集合，每个集合具有众多寡核苷酸，其具有不同的序列，所述不同序列由寡核苷酸序列内提供的密码子集合所确立。可以在聚合酶链式反应中使用上游和下游寡核苷酸集合，以及可变域模板核酸序列以产生PCR产物“文库”。该PCR产物可以称为“核酸盒”，因为它们可以与其它有关的或无关的核酸序列（例如病毒外壳蛋白和二聚化结构域）融合，其使用已确立的分子生物学技术。

可以在使用可变域核酸模板序列作为模板的聚合酶链式反应中使用寡核苷酸集合以产生核酸盒。该可变域核酸模板序列可以是含有靶核酸序列（即编码有待替代的氨基酸的核酸序列）的免疫球蛋白重链任何部分。该可变区核酸模板序列是具有第一条核酸链和互补的第二条核酸链的双链DNA分子的一部分。该可变域核酸模板序列含有可变域的至少一部分，并具有至少一个CDR。在有些情况中，该可变域核酸模板序列含有超过一个CDR。上游寡核苷酸集合和下游寡核苷酸集合的成员的杂交可以以可变域核酸模板序列的上游部分和下游部分为靶物。

上游引物集合的第一个寡核苷酸可以杂交至第一条核酸链，而下游引物集合的第二个寡核苷酸可以杂交至第二条核酸链。寡核苷酸引物可包括一个或多个密码子集合，并设计成杂交至可变区核酸模板序列的一部分。在PCR之后，这些寡核苷酸的使用可以将两个或更多个密码子集合引入PCR产物（即核酸盒）。杂交至核酸序列中编码抗体可变域的区域的寡核苷酸引物包括编码CDR残基（其作为氨基酸替代的靶物）的部分。

还可以合成上游和下游寡核苷酸集合以包括寡核苷酸序列内的限制性位点。这些限制性位点可以便于核酸盒（即PCR反应产物）插入具有别的抗体序列的表达载体。在一个实施方案中，将限制性位点设计成便于核酸盒的克隆，而不导入额外核酸序列或消除最初的CDR或框架核酸序列。

可以将核酸盒克隆入任何适于表达部分或完整的轻链或重链序列的载体，其含有经PCR反应产生的目标氨基酸替代。依照本发明中详述的方法，将该核酸盒克隆入容许生成与整个或部分病毒外壳蛋白融合的部分或完整轻链或重链序列（即产生融合蛋白）的载体并展示在颗粒或细胞的表面上。虽然数种类型的载体是可获得的，并可用于实施本发明，但噬菌粒载体是用于此处的优选载体，因为它们可以相对容易地构建，而且可以轻易地扩增。一般地，噬菌粒载体含有多种构件，包括启动子、信号序列、表型选择基因、

复制起点、和本领域普通技术人员知道的其它必需构件。

在要表达特定变体氨基酸组合时，核酸盒含有能够编码整个或部分重链或轻链可变域且能够编码变体氨基酸组合的序列。为了生成含有这些变体氨基酸或变体氨基酸组合的抗体，像在文库中，可以将核酸盒插入含有别的抗体序列（例如轻链和重链可变区的整个或部分可变域或恒定域）的表达载体。还可以将这些别的抗体序列与其它核酸序列（诸如编码病毒外壳蛋白的序列）融合，并因此容许生成融合蛋白。

实施例4：可变区序列测定

通过标准规程测定了鼠的和人源化的10F4单克隆抗体的核酸和氨基酸序列。使用RNeasy®迷你试剂盒（Qiagen，德国），从产生小鼠抗人CD22 10F4.4.1单克隆抗体的杂交瘤细胞中提取总RNA。使用RT-PCR以简并引物扩增轻链可变域(VL)和重链可变域(VH)。正向引物对该抗体的VL区和VH区的N末端氨基酸序列是特异性的。分别地，将该轻链和重链反向引物设计成退火至轻链恒定域(CL)和重链恒定域1 (CH1)中的区域，其在种间是高度保守的。将扩增的VH和VL克隆入pRK哺乳动物细胞表达载体（Shields等, J. Biol. Chem. 276:659-04 (2000)）。使用常规测序方法测定插入片段的多核苷酸序列。在图2A和2B中显示了鼠嵌合10F4和人源化10F4v1和人源化10F4v2的轻链和重链可变区的氨基酸序列。

在HVR-L1的第28位处进一步修饰人源化10F4v1（SEQ ID NO:9）（参见图2B）。用缬氨酸残基替代那个位置上的天冬酰胺残基(N28V)以产生HVR-L1 (SEQ ID NO:10)，用于hu10F4v2和hu10F4v3变体，其显示了改进的结合亲和力。这些变体包含与成熟抗体相同的可变域和恒定域序列，而仅在本发明成熟抗体中没有找到的信号序列上不同。

在hu10F4v1 HVR-L1高变区（参见图2B）的氨基酸Asn28 (N28)和/或Asn30 (N30)之一或两者上产生别的氨基酸序列修饰。因为N28和N30是可能用于脱氨基作用的位点，因此测试了在这些位点上的氨基酸改变。例如，择一地用A、Q、S、D、V或I替代第28位天冬酰胺(N28)，且择一地用A或Q替代第30位天冬酰胺(N30)。表2中提供了依照本发明的HVR-L1结构域中的氨基酸序列改变以及它们的结合亲和力，其使用标准规程以噬菌体ELISA测定法形式的竞争分析(IC50)来测试。

表2: hu 10F4v1抗体的替代变体

HVR-L1中的氨基酸改变 图2B	HVR-L1 SEQ ID NO	结合亲和力(nM)
没有改变 (N28, N30)	9	8
N28A, N30	19	8
N28Q, N30	20	7.3
N28S, N30	21	12
N28D, N30	22	12
N28V, N30	10	7.3
N28I, N30	23	9.8
N28, N30A	32	7.7
N28, N30Q	33	10

为了产生人源化10F4抗体的全长人IgG1型式，将重链和轻链分开地亚克隆入先前所述的pRK质粒(Gorman, C.M.等 (1990), DNA Protein Eng. Tech. 2: 3)。使用高效规程(Graham等,见上文和Gorman, C.M., Science 221: 551)，将合适的重链和轻链质粒（依赖于期望的序列改变）共转染入经腺病毒转化的人胚肾细胞系（称为293 (Graham, F.L等 (1977), J. Gen. Virol. 36: 59)）。将培养基更换成无血清的，并每天收获，多至5天。使用蛋白A-Sepharose CL-4B (Pharmacia)从合并的上清液中纯化抗体。将洗脱的抗体通过G25凝胶过滤更换缓冲液入PBS，使用Centriprep-30或Centricon-100 (Millipore)通过超滤作用浓缩，并存储在4℃。使用总IgG结合ELISA测定抗体浓度。

依照本发明的例示性重链IgG1恒定域在图5A中有描述。例示性人轻链κ恒定域包含例如

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHDVYACEVTHQGLSSPVTK SFNRGEC (SEQ ID NO:37)。h10F4v2的全长氨基酸序列显示在图5B中，其中通过划下划线指出轻链和重链的恒定区。h10F4v1、v2和v3抗体是IgG1同种性。

抗CD22抗体的表征

实施例5：表位作图

依照如下规程确定了10F4.4.1和5E8.1.8抗体结合的CD22表位。将缺乏CD22主要同等型(CD22β)的7个免疫球蛋白样结构域之任一个或多个的CD22序列克隆并转化入细胞，用于稳定表达。例如，将缺乏结构域1 (Δ1)、结构域2 (Δ2)、或结构域3和4 (Δ3,4)的CD22变体克隆、转化入CHO细胞，并在该细胞上表达。对照细胞表达CD22β。使用Stratagene QuikChange XL™试剂盒实施删除。通过删除第22-138位氨基酸来实施结构域1的删除；通过删除第139-242位氨基酸来实施结构域2的删除；且删除的结构域3和4可用作次要同等型CD22α(删除第241-417位氨基酸)。所有的氨基酸数值指Wilson, G.L.等 (参见Wilson, G.L.等, J. Exp. Med. 173:137-146 (1991)中的图1)的全长前体CD22β的编号方式。图14是删除的结构域的图示。使用同种型对照通过流式细胞术测定结合。使用山羊抗小鼠IgG Alexa 488检测10F4.4.1的结合。使用生物素化山羊抗小鼠IgG加链霉亲合素PE来检测5E8.1.8的结合。在不存在特定ECD结构域时对鼠10F4.4.1或鼠5E8.1.8抗体结合的不利影响表明该抗体结合那些结构域。鼠10F4.4.1和5E8.1.8在这些条件下显示相同的结合特征。两者都不结合缺乏结构域1或结构域2的CD22，而都结合包含结构域1和2但缺乏结构域3和4的CD22。使用该方法，确定了10F4.4.1和5E8.1.8结合人CD22的结构域1和2，在SEQ ID NO:27第22位氨基酸至第240位氨基酸的序列内(参见Wilson, G.L.等 (1991) 见上文)。

实施例6：对可溶性抗原的结合亲和力的表征

使用BIACORE®3000系统(Biacore, Inc., Piscataway, NJ)通过表面等离振子共振测量测定了鼠和人源化10F4抗体对可溶性CD22胞外结构域(ECD)的结合亲和力。简言之，将羧甲基化的右旋糖苷生物传感器芯片(CM5, Biacore Inc.)用盐酸N-乙基-N'-(3-二甲基氨基丙基)-碳二亚胺(EDC)和N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)依照供应商的说明书来活化。用以10mM乙酸钠pH 4.8稀释至5μg/ml的抗CD22IgG1抗体10F4（鼠的或人源化的）包被这些经活化的芯片，之后，以5μl/分钟的流速注射偶联抗体以达到大约500应答单位(RU)。继而，注射1M乙醇胺以封闭未反应的基团。对于动力学测量，在25°C以30μl/分钟的流速注射人CD22β-ECD-His标签的可溶性抗原在含0.05% Tween 20的PBS中的二倍连续稀释物（大约500nM至大约7.8nM）。使用简单一对一朗格缪尔

(Langmuir)结合模型（BIAevaluation软件3.2版）计算结合速率(k_{on})和解离速率(k_{off})。以比率k_{off}/k_{on}计算平衡解离常数(Kd)。使用抗CD22抗体RFB4作为对照(Chemicon International, Inc., Temecula, CA, 产品目录No. CBL147)。该实验结果显示在下文表2中。

表2：抗CD22对可溶性人CD22的结合亲和力
(BIACORE®分析)

克隆	$k_{on}/10^5$	$k_{off}/10^{-4}$	Kd (nM)
鼠10F4	0.19	2.8	15
嵌合10F4	0.26	4.2	16
人源化10F4v1	0.18	3.5	19
人源化10F4v2	0.32	2.5	7.8
对照RFB4	0.33	1.4	4.2

实施例7：对细胞表面抗原的结合亲和力的表征

使用竞争测定法检查了鼠10F4.4.1和人源化10F4v1和10F4v2对CHO细胞表面上表达的人和猕猴(cyno) CD22的结合亲和力。简言之，CHO细胞稳定地表达全长人CD22 (SEQ ID NO:27)或猕猴(cyno) CD22 (SEQ ID NO:31)。将抗CD22抗体（鼠或人源化10F4v1或v2）用Iodogen® [^{125}I]试剂碘化至大约10μCi/μg的比活。使用连续稀释的、未标记的抗CD22抗体实施基于细胞的竞争性结合测定法。容许抗体在4°C结合细胞4小时。依照利用非线性曲线拟合程序（参见例如Munson等, Anal Biochem, 107: 220-239, 1980）实施的标准Scatchard分析来测定抗体的结合亲和力，即K_D。该实验结果显示于下文表3。

表3：对人和猕猴CD22的10F4单抗结合亲和力

抗体	人CD22 Kd (nM)	猕猴CD22 Kd (nM)
Mu 10F4.4.1	2.4	2.3
Hu 10F4v1*	1.1, 1.7	1.4, 1.8
Hu 10F4v2	1.6	2.1
*重复的测定		

该结果表明鼠和人源化10F4以近似相等的亲和力结合CHO细胞表面上表达的人和猕猴CD22。

实施例8：抗CD22抗体-药物偶联物的生成

如下生成抗CD22 ADC，即将抗CD22抗体RFB4、鼠5E8、鼠10F4、人源化10F4v1、人源化thioMab 10F4v1 (thio-10F4v1)、人源化10F4v2和人源化10F4v3与下列药物-接头模块偶联：spp-DM1、smcc-DM1、MC-vc-PAB-MMAE、MC-vc-PAB-MMAF、MC-MMAE和MC-MMAF，这些药物和接头模块披露于本文以及2004年2月5日公布的WO2004/010957和2005年9月9日公布的WO2006/034488（将每一篇专利申请都完整收入本文作为参考）。在偶联前，使用依照WO 2004/010957中记载的方法学的标准方法，用TCEP部分地还原该抗体。使用依照在Doronina等 (2003) Nat. Biotechnol. 21:778-784和US 2005/0238649 A1中记载的方法学的标准方法，将部分还原的抗体与上述药物-接头模块偶联。简言之，将部分还原的抗体与药物接头模块结合以容许该模块与半胱氨酸残基偶联。淬灭该偶联反应，并纯化ADC。通过HPLC测定每种ADC的药物载荷（每个抗体的药物模块平均数）。用于制备ADC的其它有用的接头包括但不限于BMPEO、BMPS、EMCS、GMBS、HBVS、LC-SMCC、MBS、MPBH、SBAP、SIA、SIAB、SMPB、SMPH、thio-EMCS、thio-GMBS、thio-KMUS、thio-MBS、thio-SIAB、thio-SMCC、和thio-SMPB、和SVSB（琥珀酰亚氨基-(4-乙烯基砜)苯甲酸酯），并包括双马来酰亚胺试剂：DTME、BMB、BMDB、BMH、BMOE、$BM(PEO)_3$和$BM(PEO)_4$。

还通过与抗体的赖氨酸残基偶联来生成抗CD22 ADC。将抗体的赖氨酸转化成硫氢基团，使用例如如本文中所公开的Traut氏试剂(Pierce Chemical Co.)。所得硫氢基团具有与用于制备ADC的接头或接头药物分子的反应性。或者，如下生成ADC，即将抗CD22抗体上的赖氨酸与接头SPP（N-琥珀酰亚氨基4-(2'-吡啶基硫代)戊酸酯）起反应，所述接头可以是已经附着至药物分子的或者可以随后与药物分子（诸如美登木素生物碱）起反应。例如，如下修饰抗体，即与SPP起反应，接着与f偶联，如Wang, L.等, Protein Science 14:2436-2446 (2005)中所披露的（完整收入本文作为参考）。还可以将抗CD22抗体上的赖氨酸残基与接头SMCC (Pierce Chemical Co.)在pH7-9起反应，使得SMCC的胺反应性N-羟基琥珀酰亚胺（NHS酯）与该抗体形成稳定的酰胺键。将SMCC的硫氢基反应性马来酰亚胺基团与DM1的硫氢基团在pH 6.5-7.5

起反应（参见Pierce Chemical Co., piercenet.com）以形成ADC。将赖氨酸或半胱氨酸残基与接头-药物起反应以生成ADC，其包含大约1-8个接头药物分子每个抗体，或者1-6、1-4、1-3或1-2个接头药物分子每个抗体的平均药物载荷。

依照该方法制备ADC抗CD22(RFB4)-SMCC-DM1和抗GP120-SMCC-DM1，其中制备了低(1.95)、中等(3.7)、高(6.75)药物载荷的RFB4-smcc-DM1。制备了高(6.1)药物载荷的抗GP120-smcc-DM1。显示了这些ADC在体内是有效的，正如下文实施例9和表9中所显示的。÷

实施例9：抗CD22抗体-药物偶联物的功效

功效决定因素的体外研究

确定了淋巴瘤细胞系中抗CD22 ADC（或TDC）功效的决定因素。已知在B细胞表面上表达的CD22在结合其配体或抗体后被内在化(Sato, S.等, Immunity 5:551-562 (1996))。为了测试CD22的B细胞表面表达水平和/或CD22的内在化水平是否和如何影响功效，实施了下列体外研究。

人CD22在多种淋巴瘤细胞系上的表面表达

将19种在其表面上表达不同量的CD22的淋巴瘤细胞系培养，并在对数生长期收获。将细胞在含有100μg/ml各种正常小鼠IgG和正常人IgG的FACS洗涤缓冲液（PBS; 0.5%牛血清清蛋白; 0.1%叠氮化钠）中重悬，并保持在冰上。用抗huCD22 APC (mIgG1, 克隆RFB4, Southern Biotech #9361-11)或鼠IgG1 APC同种型(BD Pharmingen #555751)对大约1x10^6个细胞/100μl在冰上染色30分钟。用7-AAD (BD Pharmingen #559925)对死亡的细胞染色。在BD FacsCalibur™流式细胞仪上获得数据，并用FlowJo™软件分析数据。如下测定hu10F4v3-SMCC-DM1或每种游离药物(DM1、MMAF或MMAE)的IC50测定，即如上培养淋巴瘤细胞，在对数期收获培养的细胞，并在96孔板中每孔90μl培养基中接种5,000个细胞。在检测范围内连续稀释ADC和游离药物（对于ADC从300μg/ml开始或对于游离药物从90nM开始，并稀释至基本上没有测定靶物）。将10μl稀释的ADC或游离药物的等分试样添加至含有细胞的重复孔，并在37°C温育3天。将100μl CellTiter Glo™添加至每个孔，并温育30分钟。检测化学发光，并使用Prism™软件分析数据。该结果显示在图6A中，其中高的表面CD22水平与hu10F4v3-SMCC-DM1的低IC50（更高的功效）相

关。图6C表明细胞对游离药物的内在敏感性和ADC的IC50之间存在更强的相关性。

通过FACS测定法测定hu10F4v3-SMCC-DM1的内在化。

简言之，通过标准FACS技术，在存在hu10F4v3-SMCC-DM1时用CD22-FITC (RFB4)对淋巴瘤细胞染色，并在冰上温育20-30分钟。为了在初始染色后测定细胞表面上的CD22水平，将细胞在冷RPMI/10% FBS培养基中清洗，并添加200μl预热的RPMI/10%FBS，且在37 °C温育15分钟。添加80μl染色缓冲液和20μl热灭活的正常小鼠血清(HI NMS)，接着在冰上温育15分钟。添加抗DM1-Alexa-647，在冰上温育20-30分钟并清洗细胞，并用200μl PBS/1%低聚甲醇固定，之后进行FACS分析。为了在初始染色后测定CD22的表面和内部染色，用冷RPMI/10%FBS清洗细胞，添加预热的RPMI/10% FBS，并将细胞在37°C温育15分钟。然后将细胞用FACS洗液清洗，并用固定剂A (Dako™ #k2311)在室温固定15分钟，并用固定剂B (Dako™)重复该步骤。添加染色缓冲液和HI NMS，并将细胞混合物在冰上温育15分钟。添加固定剂B，接着添加抗DM1-Alexa-647，并在室温温育20-30分钟。将细胞在FACS洗液中清洗，并在PBS/1%低聚甲醇中固定。使用BD FacsCalibur™流式细胞仪对每个细胞混合物实施FACS分析（表面染色、内在化后表面染色和内部染色），并用FlowJo™软件分析结果。该结果显示于图6B（其中大量的内在化DM1与低IC50（高功效）相关）和图6D（其中通过荧光显微术使内在化的DM1显现）。

体内功效研究

为了测试偶联或未偶联毒素的抗CD22单克隆抗体在体内降低肿瘤体积能力方面的功效，采用了如下方案。

给每只SCID小鼠在体侧皮下接种$2x10^7$个人B细胞淋巴瘤细胞系。人细胞系包括人伯基特氏淋巴瘤细胞系Daudi、Ramos和Raji细胞（可获自美国典型培养物保藏中心，Manassas，VA，USA），和其它B细胞系，包括U-698-M细胞和Su-DHL-4细胞（可获自DSMZ，Braunschweig，Germany；Su-DHL-4细胞是经过萤光素酶报告基因转染的）、DoHH2细胞(Kluin-Neilemans, H.C. (1991)，见上文)、和Granta-519（套细胞淋巴瘤细胞，Jadayel, D.M.等，Leukemia 11(1):64-72 (1997)）、和BJAB-luc细胞（表达报告基因萤光素酶的BJAB人B细胞成淋巴细胞样细胞系）。在肿瘤达到介于100-200 mm^3之间的平

均肿瘤体积时，将小鼠分组，并在第0天通过静脉内注射偶联或未偶联毒素的抗体处理（如下表4-16中所显示的）。

抗CD22-美登素药物偶联物降低B细胞肿瘤体积

给65只SCID小鼠在体侧皮下注射0.2ml体积每只小鼠中的$2x10^7$个BJAB-luc细胞。在HBSS中悬浮细胞。在平均肿瘤大小达到100-200 mm^3时，将小鼠随机分成各9只小鼠的4组，并给予下文表4中指明的抗CD22或对照抗体的单一I.V.处理（通过尾静脉）。

表4

体内肿瘤体积缩小

抗体施用

施用的抗体	TI	PR	CR	Ab剂量 (mg/kg)	DM1剂量 (μg/m2)	药物比率 (药物模块/Ab)
抗Her2-smcc-DM1	9/9	0	0	4.2	200	3.2
mu10F4-smcc-DM1	9/9	2	0	3.0	200	4.6
hu10F4v2-smcc-DM1	9/9	0	0	3.4	200	4.0
hu10F4v1	9/9	0	0	3.4	---	---
“TI”指每组在最终时间点的肿瘤发病率;分子指携带肿瘤的动物的数目，而分母指动物的总数目。“PR”指肿瘤自其最初体积消退50-99%的动物的数目。“CR”指获得完全消退的动物的数目。						

在注射抗体后，对每个处理组中的平均肿瘤体积监测32天。用游标卡尺量取肿瘤的测量值。通过与对照和未偶联抗体比较来测定偶联毒素的抗CD22抗体的功效。结果显示于图7A。相对于未偶联的抗CD22抗体和非特异性对照抗体，鼠和人源化10F4v1-smcc-DM1单克隆抗体显著地减缓了肿瘤生长。

使用与上文相同的方案，实施测定法来比较偶联毒素的人源化10F4v2与下文表5中所指出的偶联毒素的鼠抗体和裸人源化抗体。

表5

体内肿瘤体积缩小

抗体施用

施用的抗体	TI	PR	CR	Ab剂量 (mg/kg)	DM1剂量 (μg/m2)	药物比率 (药物模块/Ab)

抗Her2-smcc-DM1	9/9	0	0	4.2	200	3.2
mu10F4-smcc-DM1	7/9	1	2	4.7	200	2.9
hu10F4v2-smcc-DM1	8/9	1	1	4.5	200	3.0
hu10F4v2	9/9	0	0	4.5	---	---
“TI”指每组在最终时间点的肿瘤发病率；分子指研究组中肿瘤动物的数目，而分母指动物的总数目。“PR”指肿瘤自其最初体积消退50-99%的动物的数目。“CR”指获得完全消退的动物的数目。						

在注射抗体后，对每个处理组中的平均肿瘤体积监测32天。用游标卡尺量取肿瘤的测量值。通过与对照和未偶联抗体比较来测定偶联毒素的抗CD22抗体的功效。结构显示于图7B。相对于未偶联的抗CD22抗体和非特异性对照抗体，鼠10F4-smcc-DM1和人源化10F4v2-smcc-DM1单克隆抗体显著地减缓了肿瘤生长。

依照本文中所公开的偶联方法，将抗CD22抗体通过spp接头或smcc接头偶联至DM1。将裸抗CD20抗体用作阳性对照，而将毒素偶联物抗HER2-spp-DM1和抗HER2-smcc-DM1用作阴性对照。给80只SCID小鼠在体侧皮下注射0.2ml体积每只小鼠中的$2x10^7$个BJAB-luc细胞。在HBSS中悬浮细胞。在平均肿瘤大小达到100-200 mm^3时，将小鼠随机分成各10只小鼠的6组，并实施测试抗体或对照抗体的静脉内注射。每周一次重复剂量给药，共3剂。参见表6。

表6

体内肿瘤体积缩小

抗体施用

施用的抗体	Ab剂量 (mg/kg)	DM1剂量 (μg/m2)
抗Her2-spp-DM1 *	4	214
抗Her2-smcc-DM1 **	6.9	405
抗CD22-spp-DM1 *	5	214
抗CD22-spp-DM1	2.5	107
抗CD22-smcc-DM1 **	10	405
裸抗CD22	10	---
* 匹配的药物载荷		

** 匹配的药物载荷

对平均肿瘤体积每周两次地监测3周，然后每周一次地监测共8周。肿瘤体积随时间的改变（图7C）显示，以214和107μg/m^{2}DM1服用的抗CD22-spp-DM1和以405μg/m^{2}服用的抗CD22-smcc-DM1在BJAB-luc异种移植物肿瘤中显示了强的且相当的抗肿瘤活性。所有抗CD22 ADC组显示完全应答。

依照本文中所公开的偶联方法，将抗CD22抗体RFB4、5E8和7A2经smcc接头偶联至DM1。使用毒素偶联物抗HER2-smcc-DM1（其在本文中可互换地称为HER-smcc-DM1或HER2-smcc-DM1）作为阴性对照。

检查了这些抗体降低SCID小鼠中各种异种移植物中的肿瘤体积的能力。用于在小鼠中产生异种移植物肿瘤的人B细胞淋巴瘤细胞系是Ramos细胞和BJAB-luc细胞。对于每种异种移植物，给SCID小鼠在体侧皮下注射0.1ml体积/小鼠中的5x10^{6}个B细胞淋巴瘤Ramos细胞（或0.2ml中的2x10^{7}个BJAB-luc细胞）。在HBSS中悬浮细胞。在平均肿瘤大小达到100-200 mm^{3}时，将小鼠随机分成各8-10只小鼠的组，并给每只小鼠测试抗体或对照抗体的单一静脉内注射。使每组的DM1药物加载标准化至200μg/m^{2}以提供所施用DM1的剂量。每周两次地监测平均肿瘤体积4周。结果分别显示于下文表7和8并绘图于图8A和8B。

表7

体内肿瘤体积缩小，Ramos异种移植物

抗体施用

施用的抗体	Ab剂量 (mg/kg)	DM1剂量 (μg/m^2)
抗HER2-smcc-DM1	4.2	200
抗CD22(7A2)-smcc-DM1	3.8	200
抗CD22(5E8)-smcc-DM1	3.8	200
抗CD22(RFB4)-smcc-DM1	3.2	200

表8

体内肿瘤体积缩小，BJAB-luc异种移植物

抗体施用

施用的抗体	Ab剂量 (mg/kg)	DM1剂量 ($\mu g/m^2$)	药物比率 (药物模块/Ab)
抗HER2-smcc-DM1	4.2	200	3.2
抗CD22 (7A2)-smcc-DM1	3.8	200	3.6
抗CD22(5E8)-smcc-DM1	3.8	200	3.6
抗CD22(RFB4)-smcc-DM1	3.2	200	4.25

这些结果显示，抗CD22-smcc-DM1抗体-药物偶联物相对于对照抗体或裸抗CD22抗体显著地降低了BJAB-luc异种移植物和Ramos中的B细胞肿瘤体积。

检查了抗体药物载荷（一群抗体中每个抗体所偶联的药物分子的平均数）对抗CD22-smcc-DM1抗体-药物偶联物降低BJAB-luc SCID小鼠异种移植物中肿瘤体积的能力的影响。给140只SCID小鼠在体侧皮下注射0.2ml体积每只小鼠中的$2x10^7$个BJAB-luc细胞。在HBSS中悬浮细胞。在平均肿瘤大小达到100-200 mm^3时，将小鼠随机分成各8-10只小鼠的组，并给每只小鼠测试抗体或对照抗体的单一静脉内注射。施用具有相对低的、中等的或高的药物负载的抗CD22(RFB4)-smcc-DM1群（平均药物心载荷分别为每个抗体偶联了1.95、3.7或6.75个DM1分子）作为测试抗体。裸RFB4抗体和抗GP120-smcc-DM1（高的药物载荷）是对照。将抗体-药物偶联物（测试和对照）的剂量标准化至5mg/kg蛋白质水平的剂量。接头偶联物附着至抗体是通过赖氨酸残基实现的。参见表9。

表9

体内肿瘤体积缩小，BJAB-luc异种移植物

抗CD22(RFB4)-smcc-DM1施用

施用的抗体	Ab剂量 (mg/kg)	DM1剂量 ($\mu g/m^2$)	药物比率 (药物模块/Ab)
抗CD22(RFB4)（裸抗体）	10	--	--
抗CD22(RFB4)-smcc-DM1（低的）	5	144	1.95
抗CD22(RFB4) -smcc-DM1（中等的）	5	273	3.7
抗CD22(RFB4)-smcc-DM1（高的）	5	497	6.75
抗GP120-smcc-DM1（高的）	5	449	6.1

在以匹配的蛋白质水平(5mg/kg)服用时，以高药物载荷（6.75个DM1分

子每个抗体分子）加载的抗CD22(RFB4)-smcc-DM1比具有3.7中等载荷的抗体-药物偶联物略微更多地缩小了肿瘤体积，然而具有低药物载荷的抗体-药物偶联物的影响与对照偶联物或裸抗体没有差异。结果绘制于图9。

抗CD22-auristatin药物偶联物缩小B细胞肿瘤体积

检查了抗CD22-auristatin MMAF药物偶联物对小鼠异种移植物中肿瘤体积的影响。依照本文中所公开的方法，将抗CD22(RFB4)和对照抗体抗GP120通过MC-vcPAB接头或MC接头偶联至MMAF。给SCID小鼠在体侧皮下注射0.2ml体积每只小鼠中的$5x10^6$个Ramos细胞。在HBSS中悬浮细胞。在平均肿瘤大小达到100-200 mm^3时，将小鼠随机分成各8-10只小鼠的组，并给每只小鼠测试抗体或对照抗体的单一静脉内注射。给小鼠施用的药物剂量、药物载荷（药物比率）和抗体剂量显示于表10。

表10

体内肿瘤体积缩小，Ramos异种移植物

抗CD22(RFB4)-MMAF偶联物施用

施用的抗体	MMAF剂量 ($\mu g/m^2$)	Ab剂量 (mg/kg)	药物比率 (药物模块/Ab)
抗CD22(RFB4)-MCvcPAB-MMAF	405	6.6	4.2
抗CD22(RFB4)-MC-MMAF	405	6.9	4.0
抗GP120-MCvcPAB-MMAF	405	5.8	4.8
抗GP120-MC-MMAF	405	5.9	4.7

在Ramos RA1异种移植物中，抗CD22-MC-MMAF与抗CD22-MC-vc-PAB-MMAF相比显示了相当的活性。结果绘制于图10。

检查了抗CD22-auristatin MMAE和DM1药物偶联物对小鼠异种移植物中肿瘤体积的影响。依照本文中所公开的方法，将抗CD22(RFB4)和对照抗体抗GP120通过MC-vcPAB接头或MC接头偶联至MMAE，或通过smcc接头偶联至DM1。给SCID小鼠在体侧皮下注射0.1ml体积每只小鼠中的$5x10^6$个Ramos细胞。在HBSS中悬浮细胞。施用PBS作为对照。在平均肿瘤大小达到100-200 mm^3时，将小鼠随机分成各8-10只小鼠的组，并给每只小鼠测试抗体或对照抗体的单一静脉内注射。给小鼠施用的药物剂量、药物载荷（药物比率）和抗体剂量显示于表11。

表11

体内肿瘤体积缩小，Ramos异种移植物

抗CD22(RFB4)-MMAE和DM1偶联物施用

施用的抗体	MMAE或DM1剂量 ($\mu g/m^2$)	Ab剂量 (mg/kg)	药物比率 (剂量模块/Ab)
抗GP120-smcc-DM1	405	6.7	4.1
抗CD22(RFB4)-smcc-DM1	405	6.5	4.25
抗GP120-MCvcPAB-MMAE	405	6.0	4.7
抗CD22(RFB4)-MCvcPAB-MMAE	405	6.3	4.5
PBS	--	--	--

抗CD22-MCvcPAB-MMAE在Ramos RA1异种移植物中显示了有力的抗肿瘤活性。与抗CD22-smcc-DM1相比，抗CD22-MCvcPAB-MMAE显示了优越的活性。结果绘制于图11。

检查了抗CD22-auristatin MMAF和DM1药物偶联物对小鼠异种移植物中肿瘤体积的影响。施用抗CD22 hu10F4v2-MC-MMAF、hu10F4v2-smcc-DM1和thio-10F4v1-MC-MMAF，并关于对肿瘤体积的影响进行比较。对照抗体是抗Her2-MC-MMAF和抗Her2-smcc-DM1。给SCID小鼠在体侧皮下注射0.2ml体积每只小鼠中的$2x10^7$个BJAB-luc细胞。在HBSS中悬浮细胞。在平均肿瘤大小达到100-200mm^3时，将小鼠随机分成各8-10只小鼠的组，并给每只小鼠测试抗体或对照抗体的单一静脉内注射。"Thio"指thioMab，如本文中所公开，其中将接头-药物模块通过抗体上的半胱氨酸改造位点偶联至抗体。给小鼠施用的药物剂量、药物负载（药物比率）和抗体剂量显示于表12。

表12

体内肿瘤体积缩小，BJAB-luc异种移植物

Hu10F4 MMAF和DM1偶联物施用

施用的抗体	MMAF或DM1剂量 ($\mu g/m^2$)	Ab剂量 (mg/kg)	药物比率 (药物模块/Ab)
抗Her2-MC-MMAF	100	1.1	6.3
Hu10F4v2-MC-MMAF	100	2.0	3.4
Hu10F4v2-MC-MMAF	50	1.0	3.4
Thio-hu10F4v1-MC-MMAF	100	4.6	1.5

Thio-hu10F4v1-MC-MMAF	50	2.3	1.5
抗Her2-smcc-DM1	200	4.2	3.2
Hu10F4v2-smcc-DM1	200	4.5	3.0
Hu10F4v2-smcc-DM1	100	2.3	3.0

Hu10F4v2 ADC在BJAB-luc异种移植物中显示了有力的抗肿瘤活性。结果绘制于图12。

使用上文实验中所公开的规程，检查了不同剂量的hu10F4v3-smcc-DM1和-MC-MMAF ADC在不同异种移植物中的功效。如上文所公开的那样制备SuDHL4-luc的异种移植物、DoHH2和Granta-519异种移植物。在平均肿瘤大小达到100-200mm^{3}时，将小鼠随机分成各8-10只小鼠的组，并给每只小鼠测试抗体或对照抗体的单一静脉内注射。给小鼠施用的药物剂量、药物载荷（药物比率）和抗体剂量显示于表13A-13C，且结果显示于图13A-13C。

表13A

体内肿瘤体积缩小，

Hu10F4v3-MMAF和DM1偶联物施用

在SuDHL-4-luc异种移植物中

施用的抗体	MMAF或DM1剂量 (μg/m^2)	Ab剂量 (mg/kg)	药物比率 (药物/Ab)
抗Her2-smcc-DM1	600	11.9	3.3
Hu10F4v3-smcc-DM1	600	13.6	2.9
Hu10F4v3-smcc-DM1	300	6.8	2.9
抗Her2-MC-MMAF	600	9.9	4.0
Hu10F4v3-MC-MMAF	600	13.3	3.0
Hu10F4v3-MC-MMAF	300	6.6	3.0

表13B

体内肿瘤体积缩小，

Hu10F4v3-MMAF和DM1偶联物施用

在DoHH2异种移植物中

施用的抗体	MMAF或DM1剂量 (μg/m^2)	Ab剂量 (mg/kg)	药物比率 (药物/Ab)

抗Her2-smcc-DM1	600	11.9	3.3
Hu10F4v3-smcc-DM1	600	11.8	3.35
Hu10F4v3-smcc-DM1	300	5.9	3.35
抗Her2-MC-MMAF	600	9.9	4.0
Hu10F4v3-MC-MMAF	600	13.1	3.04
Hu10F4v3-MC-MMAF	300	6.6	3.04
裸hu10F4v3	--	13.1	--

表13C

体内肿瘤体积缩小，

Hu10F4v3-MMAF和DM1偶联物施用

在Granta-519异种移植物中

施用的抗体	MMAF或DM1剂量 ($\mu g/m^2$)	Ab剂量 (mg/kg)	药物比率 (药物/Ab)
抗Her2-smcc-DM1	300	5.9	3.3
Hu10F4v3-smcc-DM1	300	5.9	3.35
Hu10F4v3-smcc-DM1	150	2.9	3.35
抗Her2-MC-MMAF	300	4.9	4.0
Hu10F4v3-MC-MMAF	300	6.6	3.04
Hu10F4v3-MC-MMAF	150	3.3	3.04
裸hu10F4v3	--	6.6	--

抗CD22 hu10F4v3-smcc-DM1和-MC-MMAF ADC在所有测试的异种移植物模型中显示了有力的肿瘤缩小。

实施例10：半胱氨酸改造抗CD22抗体的制备

如本文中所公开的那样实施半胱氨酸改造抗CD22抗体的制备。通过本文中所公开的方法对编码10F4v3抗体（其具有与10F4v2（轻链，SEQ ID NO:87；和重链，SEQ ID NO:88，图5B）相同的可变区和恒定区序列）的DNA进行诱变以修饰轻链、重链或重链Fc区。对编码轻链的DNA进行诱变以用半胱氨酸替代如图17A中所显示的轻链（人源化抗体10F4v3 thiomab的轻链SEQ

ID NO:91）中的Kabat第205位（顺序第210位）缬氨酸。对编码重链的DNA进行诱变以用半胱氨酸替代如图17B中所显示的重链（人源化抗体10F4v3 thiomab的重链SEQ ID NO:92）中的EU第118位（顺序第121位）丙氨酸。对Fc区进行诱变以用半胱氨酸替代如图17C中所显示的重链Fc区（重链SEQ ID NO:93）中的EU第400位（顺序第403位）丝氨酸。

制备半胱氨酸改造抗CD22抗体，用于通过还原和再氧化进行的偶联

将CHO细胞中所表达的全长的、半胱氨酸改造的抗CD22单克隆抗体(ThioMab)溶解于约pH8.0的500mM硼酸钠和500mM氯化钠，并用约50-100倍过量的1mM TCEP（盐酸三（2-羧乙基）膦；Getz等 (1999) Anal. Biochem. 273:73-80; Soltec Ventures, Beverly, MA）在37°C还原大约1-2小时。将还原后的ThioMab稀释并加载到10mM乙酸钠pH 5中的HiTrap S柱上，并用含0.3M氯化钠的PBS洗脱。将洗脱的还原后ThioMab用2mM脱氢抗坏血酸(dhAA)在pH 7处理3小时，或用2mM硫酸铜($CuSO_4$)水溶液在室温处理过夜。环境空气氧化作用也可能是有效的。通过Sephadex G25树脂上的洗脱来更换缓冲液，并用含1mM DTPA的PBS洗脱。如下检查硫醇/Ab值，即根据溶液在280nm的吸光度测定还原抗体浓度，并通过与DTNB (Aldrich, Milwaukee, WI)的反应并测定412nm吸光度来测定硫醇浓度。

实施例11：通过半胱氨酸改造抗CD22抗体和药物-接头中间体的偶联来制备半胱氨酸改造抗CD22抗体-药物偶联物

在实施例10的还原和再氧化规程后，将半胱氨酸改造抗CD22抗体溶解于PBS（磷酸盐缓冲盐水）缓冲液，并在冰上冷却。将相对于改造的半胱氨酸每个抗体大约1.5摩尔当量的auristatin药物-接头中间体（诸如MC-MMAE（马来酰亚氨基乙酰基-单甲基auristatin E）、MC-MMAF、MC-val-cit-PAB-MMAE或MC-val-cit-PAB-MMAF）（其具有硫醇反应性官能团（诸如马来酰亚胺））溶解于DMSO，在乙腈和水中稀释，并添加至PBS中冷却的、还原的、再氧化的抗体。在大约1小时后，添加过量的马来酰亚胺以淬灭反应，并给任何未反应的抗体硫醇基团加帽。通过离心超滤来浓缩反应混合物，并将半胱氨酸改造抗CD22抗体-药物偶联物纯化，并通过经过PBS中G25树脂的洗脱来脱盐，在无菌条件下通过0.2μm滤器过滤，并冷冻用于贮存。

如下实施hu 10F4v3 HC(A118C)thiomab-BMPEO-DM1的制备。通过双马来酰亚胺试剂$BM(PEO)_4$ (Pierce Chemical)修饰hu 10F4v3 HC(A118C) thiomab上的游离半胱氨酸，在抗体表面上留下未反应的马来酰亚胺基团。这是如下实现的，即将$BM(PEO)_4$溶解于50%乙醇/水混合物中至10mM浓度，并将10倍摩尔过量的$BM(PEO)_4$添加至在磷酸盐缓冲盐水中含大约1.6mg/ml(10微摩尔）浓度的hu4D5Fabv8-(V110C)ThioFab的溶液，并容许其反应1小时。通过含150mM NaCl的30mM柠檬酸盐pH 6缓冲液中的凝胶过滤(HiTrap柱, Pharmacia)除去过量的$BM(PEO)_4$。将溶解于二甲基乙酰胺(DMA)的大约10倍摩尔过量的DM1添加至hu4D5Fabv8-(V110C)ThioFab-BMPEO中间体。还可以采用二甲基甲酰胺(DMF)来溶解药物模块试剂。容许反应混合物反应过夜，之后凝胶过滤或透析入PBS以除去未反应的药物。使用PBS中S200柱上的凝胶过滤来除去高分子量聚集体，并提供纯化后的hu 10F4v3 HC(A118C) thiomab-BMPEO-DM1。

通过相同的方案，制备了对照HC (A118C) MAb-MC-MMAF、对照HC ThioMab-MC-MMAF 、 对 照 HC ThioMab-MCvcPAB-MMAE 和 对 照 HC ThioMab-BMPEO-DM1。

通过上文规程，制备并测试了下列半胱氨酸改造抗CD22抗体-药物偶联物:

通过A118C thio hu 10F4v3和MC-MMAF的偶联而获得的thio hu thio-HC-10F4v3-MC-MMAF;

通过A118C thio hu 10F4v3和MC-val-cit-PAB-MMAE的偶联而获得的thio hu thio -HC-10F4v3-MC-val-cit-PAB-MMAE;

通过A118C thio hu HC-10F4v3和bmpeo-DM1的偶联而获得的thio hu HC-10F4v3-bmpeo-DM1;

通过V205C thio hu LC-10F4v3和MC-val-cit-PAB-MMAE的偶联而获得的thio hu LC-10F4v3-MC-val-cit-PAB-MMAE; 和

通过S400C thio hu Fc-10F4v3和MC-val-cit-PAB-MMAE的偶联而获得的thio hu Fc-10F4v3-MC-val-cit-PAB-MMAE。

实施例12: 半胱氨酸改造的ThioMab-药物偶联物对细胞表面抗原的结合亲和力的表征

通过FACS分析测定了thio hu 10F4v3-药物偶联物对BJAB-lucs细胞上所表达的CD22的结合亲和力。简言之，使100μl中大约1x10^{6}个细胞与不同量的下列抗CD22 ThioMab-药物偶联物之一接触：thio hu LC(V205C) 10F4v3-MCvcPAB-MMAE、thio hu Fc(S400C) 10F4v3-MCvcPAB-MMAE、thio hu HC(A118C) 10F4v3-MCvcPAB-MMAE、thio hu HC(A118C) 10F4v3-MC-MMAF或thio hu HC(A118C) 10F4v3-BMPEO-DM1 (分别参见图18A-18E)。使用生物素化的山羊抗huFc加链霉亲合素-PE检测结合至细胞表面的抗CD22抗体。图18A-18E的图示表明抗原结合对所有测试的thiomab-药物偶联物是近似相同的。

实施例13：抗CD22 ThioMab-药物偶联物的体内肿瘤体积缩小的测定法

依照本文实施例9中所公开的规程，测试了依照实施例11制备的thiomab-药物偶联物缩小异种移植物模型中B细胞肿瘤体积的能力。对具有Granta-519细胞异种移植物肿瘤的SCID小鼠在第0天以下文表14中所示剂量施用对照和抗CD22人源化10F4v3 thiomab-药物偶联物。对照HC(A118C) thiomab是抗HER2 4D5抗体。

表14

体内肿瘤体积缩小，

Thio Hu10F4v3 MMAE和MMAF偶联物施用

在Granta-519异种移植物中

施用的抗体	MMAF或DM1剂量 ($\mu g/m^2$)	Ab剂量 (mg/kg)	药物比率 (药物/Ab)
Thio对照HC(A118C)-MC-MMAF	100	3.99	1.65
Thio对照HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	100	4.33	1.55
Thio 10F4v3-HC(A118C)-MC-MMAF	100	3.41	1.95
Thio 10F4v3-LC(V205C)-MCvcPAB-MMAE	100	4.23	1.6
Thio10F4v3-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	100	3.76	1.8
Thio 10F4v3-Fc(S400C)-MCvcPAB-MMAE	100	4.23	1.6

该实验的结果显示于图19。施用表14中所示剂量的thio10F4v3-LC-(V205C)-MCvcPAB-MMAE和thio10F4v3-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE thiomab-药物偶联物引起平均肿瘤体积在研究期间缩小。

使用相同的方案，在CB17 SCID小鼠中的Granta-519异种移植物中测试了别的thiomab-药物偶联物，只是测试了不同的药物剂量。对照抗体或对照thiomab是抗HER2 4D5抗体或HC(A118C) thiomab。结果显示于下文表15。

表15

体内肿瘤体积缩小，

Thio Hu10F4v3-MMAE、MMAF和DM1偶联物施用

在Granta-519异种移植物中

施用的抗体	MMAF或DM1剂量 ($\mu g/m^2$)	Ab剂量 (mg/kg)	药物比率 (药物/Ab)
10F4v3-MC-MMAF	150	3.2	3.1
Thio对照HC(A118C)-BMPEO-DM1	300	10.3	1.9
Thio 10F4v3-HC(A118C)-BMPEO-DM1	150	5.2	1.9
Thio 10F4v3-HC(A118C)-BMPEO-DM1	300	10.4	1.9
Thio对照HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	150	6.5	1.55
Thio10F4v3-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	150	5.3	1.9
Thio10F4v3-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	75	2.7	1.9
Thio对照HC(A118C)-MC-MMAF	150	5.2	1.9
Thio 10F4v3-HC(A118C)-MC-MMAF	150	5.1	1.95
Thio 10F4v3-HC(A118C)-MC-MMAF	75	2.6	1.95

该实验的结果显示于图20A。施用150和75$\mu g/m^2$的thio10F4v3-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE thiomab-药物偶联物引起平均肿瘤体积在研究期间缩小。在相同的研究中，在各剂量组中测定了前7天的百分比体重变化。绘制于图20B的结果表明这些thiomab-药物偶联物的施用在此期间没有引起重量减轻。

在类似的研究中，使用与上文实施例中所公开的相同的异种移植物研究方案，改变施用的TDC和剂量，研究了TDC在CB17 SCID小鼠中的滤泡性淋巴瘤DOHH2异种移植物中的功效。TDC和剂量显示于下文表16。

表16

体内肿瘤体积缩小，

Thio Hu10F4v3-MMAE、MMAF和DM1偶联物施用

在DOHH2异种移植物中

施用的抗体	MMAF或DM1剂量 ($\mu g/m^2$)	Ab剂量 (mg/kg)	药物比率 (药物/Ab)
10F4v3-MC-MMAF	300	6.4	3.1
Thio对照HC(A118C)-BMPEO-DM1	600	21.9	1.79
Thio10F4v3-HC(A118C)-BMPEO-DM1	600	20.8	1.9
Thio10F4v3-HC(A118C)-BMPEO-DM1	300	10.4	1.9
Thio对照HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	600	26.0	1.55
Thio10F4v3-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	600	21.4	1.9
Thio10F4v3-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	300	10.7	1.9
Thio对照HC(A118C)-MC-MMAF	600	20.8	1.9
Thio10F4v3-HC(A118C)-MC-MMAF	600	20.4	1.95
Thio10F4v3-HC(A118C)-MC-MMAF	300	10.2	1.95

图20C的曲线图绘制了用相同的重链A118C抗CD22 TDC，但以如图16所示的更高剂量处理的CB17 SCID小鼠中的滤泡性淋巴瘤DOHH2异种移植物中平均肿瘤体积随时间的变化。抗CD22 10F4v3-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE TDC似乎是该研究中的测试药剂中最有效的。然而，在该实验中升高的剂量水平，注意到抗HER2-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE对照有一些功效。该活性可能归因于药物自循环中ADC的释放。抗CD22 hu10F4-HC(A118C)-MC-MMAF和-BMPEO-DM1测试剂显示了中等的功效，而且与这些接头升高的稳定性一致，非结合性抗HER2对照显示出很小的活性。图20D是来自DOHH2异种移植物研究的小鼠中百分比重量变化的曲线图，其显示了在本研究的前14天期间重量没有显著变化。

实施例14：抗CD22-药物偶联物在大鼠和猕猴中的安全性

hu10F4抗CD22抗体与猕猴(cyno)CD22交叉反应，其亲和力等同于人CD22。hu10F4抗CD22抗体不与大鼠CD22交叉反应。结果，分别在大鼠和猕猴中评估了抗CD22-药物偶联物的靶物不依赖性和靶物依赖性的安全性和毒性。

在大鼠中的安全性和毒性

对于大鼠中的安全性和毒性研究，实施了两项研究。在一项研究中，第

1天给大鼠静脉内剂量给药hu10F4v3-SMCC-DM1、-SPP-DM1、-MC-vc-PAB-MMAE或-MC-MMAF偶联物，其中经可切割的(-vc-或-spp-)或不可切割的(MC或SMCC (也称为MCC))接头连接药物。施用媒介作为对照。在第5天（供药动学分析用）和第12天（在尸检时）收集血液样品。每周至少三次地进行临床观察和体重记录。监测血清AST（天冬氨酸氨基转移酶），作为毒性的指示。在服用20mg/kg包含可切割接头的hu10F4v3-vcMMAE和hu10F4v3-SPP-DM1的大鼠中，血清AST水平在第5天相对于第0天升高了（图21A）。在服用20mg/kg hu10F4v3-MC-MMAF或hu10F4v3-MCC-DM1（不可切割的接头，图21B）的大鼠中，嗜中性粒细胞水平在第5天相对于第0天升高了。在服用hu10F4v3-vc-MMAE或hu10F4v3-SPP-DM1的大鼠中，嗜中性粒细胞水平在第5天相对于第0天降低了。在服用包含可切割接头的ADC的大鼠中，升高的血清AST和降低的嗜中性粒细胞表明此类ADC的毒性升高。

在相同的大鼠研究中，第一天给每组六只动物服用20、40或60 mg/kg hu10F4v3-MC-MMAF或hu10F4v3-SMCC-DM1，并监测12天。在服用hu10F4v3-MC-MMAF的动物中，没有观察到下列指标：体重减轻、血清肝酶升高、血小板减少、或嗜中性粒细胞减少。在服用hu10F4v3-SMCC-DM1的大鼠中，在40和60mg/kg的剂量水平观察到体重的可逆减轻和血清肝酶的可逆升高，而在60mg/kg剂量观察到嗜中性粒细胞的可逆减少和血小板的瞬时减少。

在猕猴中的安全性和毒性。

为了评估抗CD22 ADC在灵长类模型中的安全性和毒性，将30只猕猴分配至下列处理组：媒介对照（6只动物），2、4和6mg/m^{2}药物剂量的hu10F4v3-SMCC-DM1（等同于0、10、20和30mg/kg抗体剂量；4只动物每剂量组），和2、4、6mg/m^{2}剂量的hu10F4v3-MC-MMAF（4只动物每剂量组）。第1天和第22天给动物静脉内剂量服药。在体重变化、食物消耗和病理学指标方面评价动物。收集并测定血液样品以评估毒理学效应、药效学效应和抗药物抗体效应。每组中半数动物在第25天和第43天中的一天实施安乐死，并收集组织样品。

在任一ADC组中，没有发现明显的体重变化。依照相关领域中公知的标准方法测定血清肝酶AST（天冬氨酸氨基转移酶）、ALT（氨基转移酶）和GGT（γ-谷氨酰转肽酶）的水平。在服用30mg/kg任一ADC的动物中观察到

血清肝酶的可逆升高，尽管ALT在DM1组中升高了，而AST和GGT在MMAF组中升高了。在DM1组中，在服用20mg/kg剂量的4只动物中的2只和服用30mg/kg剂量的4只动物中的4只中坐骨神经变性是最低限度的至中等的。在MMAF组中，在服用30mg/kg剂量的4只动物中的1只中坐骨神经变性是最低限度的。显微镜检查来自各种器官的组织。30mg/kg MMAF组4只动物中的2只具有意义不明的肺损害，而在DM1组中没有观察到。

通过测量第0天和第22天服药的猕猴中43天里血液$CD20^+$细胞水平，测定了hu10F4v3-MC-MMAF和-SMCC-DM1 ADC对外周B细胞的消减。使用荧光标记的抗CD20抗体通过FACS测定了研究期间定期收集的血液。抗CD22 MMAF和DM1 ADC消减猕猴外周B细胞，正如图22A（MMAF组)和图22B（DM1组）所示。观察到MMAF或DM1 ADC对其它淋巴细胞群没有显著影响，如图23A和23B所示，其中显示了相同时间段里没有显著消减$CD4^+$细胞。

Hu10F4v3-SMCC-DM1相对于对照消减了猕猴扁导体样品中的生发中心B细胞，正如图24A和24B中的显微照片所示。在图24A中圈出了例示性的生发中心。在10mg/kg剂量水平观察到生发中心B细胞的完全消除，正如图24B所示。在相同条件下施用hu10F4v3-MC-MMAF ADC后获得了相同的结果。

服用10mg/kg Hu10F4v3-MC-MMAF自猕猴的脾滤泡性生发中心消减了正在分裂的B细胞。参见图25A中的示图及图25B和25C中的组织显微照片。在相同条件下测试hu10F4v3-SMCC-DM1 ADC时获得了相同的结果。生发中心在使用Ki-67染色的图25B中为暗区域，而在图25D中用可检测标记的抗IgD染色时为由暗区域围绕的未染色区域。图25C和25E中显示了生发中心的丢失，这是由于抗10F4v3-MC-MMAF消减了生发中心B细胞。如此，这些抗有丝分裂药物对正在增殖的B细胞群体有影响。

下列杂交瘤已经保藏于美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection, PO Box 1549, Manassas, VA, 20108, USA (ATCC)):

细胞系	ATCC编号	保藏日期
杂交瘤10F4.4.1	PTA-7621	2006年5月26日
杂交瘤5E8.1.8	PTA-7620	2006年5月26日

这些保藏是依据国际承认用于专利程序的微生物保藏布达佩斯条约

(Budapest Treaty)及其（布达佩斯条约）实施细则的规定进行的。这保证了自保藏之日起保存存活保藏物30年。这些细胞系可根据布达佩斯条约的条款通过ATCC获得，并服从Genentech公司与ATCC之间的协议，它保证了在有关美国专利授权后或者在任何美国或外国专利申请向公众公开后，以两者中居先者为准，公众可永久且不受限制的获得所述细胞系，而且保证了依据35 USC §122及依照它的管理章程（包括37 CFR §1.14，特别要提及886 OG 638）由美国专利和商标局长批准的个人将有资格获得所述细胞系。

本申请的受让人已同意，若保藏的细胞系在合适条件下培养时丢失或遭到破坏，则他将在接到通知后迅速用同一细胞系的存活样本更换。所保藏细胞系的可获得性并不解释为对违反任何政府的机构依据其专利法所授予的权利实施本发明的许可。

尽管为了清楚理解的目的已经通过举例说明的方式较为详细的描述了上述发明，说明书和实施例不应解释为限制发明范围。明确将本申请中所引用的所有专利和科学文献的公开内容完整收入本文作为参考。

<110> 健泰科生物技术公司（Genentech, Inc.）等

<120> 抗体和免疫偶联物及其用途

<130> P2262R1

<150> US 60/911,829
<151> 2007-04-13

<150> US 60/908,941
<151> 2007-03-29

<150> US 60/809,328
<151> 2006-05-30

<160> 93

<210> 1
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 此序列是合成的

<400> 1
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
20 25

<210> 2
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 此序列是合成的

<400> 2
Gly Tyr Glu Phe Ser Arg Ser Trp Met Asn
5 10

<210> 3
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 此序列是合成的

<400> 3
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
5 10

<210> 4
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 此序列是合成的

<400> 4
Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Ser Gly Lys
1 5 10 15

Phe Lys Gly

<210> 5
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 此序列是合成的

<400> 5
Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu
1 5 10 15

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 6
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 此序列是合成的

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

<210> 7
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 此序列是合成的

<400> 7
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
5 10

<210> 8
<211> 23
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 此序列是合成的

<400> 8
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
20

<210> 9
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 此序列是合成的

<400> 9
Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Phe Leu
1 5 10 15

Glu

<210> 10

<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 此序列是合成的

<400> 10
Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Val Gly Asn Thr Phe Leu
1 5 10 15

Glu

<210> 11
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 此序列是合成的

<400> 11
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 12
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 此序列是合成的

<400> 12
Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
5

<210> 13
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 此序列是合成的

<400> 13
Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
1 5 10 15

Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
20 25 30

Tyr Cys

<210> 14
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 此序列是合成的

<400> 14
Phe Gln Gly Ser Gln Phe Pro Tyr Thr
5

<210> 15
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 此序列是合成的

<400> 15
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
5 10

<210> 16
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 此序列是合成的

<400> 16
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Glu Phe Ser
20 25 30

Arg Ser Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
35 40 45

Glu Trp Val Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr
50 55 60

Ser Gly Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser
65 70 75

Ser Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
80 85 90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Ser Ser Trp Asp Trp
95 100 105

Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
110 115 120

<210> 17
<211> 113
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 此序列是合成的

<400> 17
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val
20 25 30

His Ser Asn Gly Asn Thr Phe Leu Glu Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
35 40 45

Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp
65 70 75

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr
80 85 90

Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gln Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gln
95 100 105

Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg

110

<210> 18
<211> 113
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 此序列是合成的

<400> 18
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val
20 25 30

His Ser Val Gly Asn Thr Phe Leu Glu Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
35 40 45

Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp
65 70 75

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr
80 85 90

Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gln Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gln
95 100 105

Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
110

<210> 19
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 此序列是合成的

<400> 19
Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Ala Gly Asn Thr Phe Leu
1 5 10 15

Glu

<210> 20
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 此序列是合成的

<400> 20
Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Gln Gly Asn Thr Phe Leu
1 5 10 15

Glu

<210> 21
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 此序列是合成的

<400> 21
Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Ser Gly Asn Thr Phe Leu
1 5 10 15

Glu

<210> 22
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 此序列是合成的

<400> 22
Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asp Gly Asn Thr Phe Leu
1 5 10 15

Glu

<210> 23
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 此序列是合成的

<400> 23
Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Ile Gly Asn Thr Phe Leu
1 5 10 15

Glu

<210> 24
<211> 113
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 此序列是合成的

<400> 24
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
20 25 30

Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
35 40 45

Glu Trp Val Ser Val Ile Ser Gly Asp Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr
50 55 60

Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser
65 70 75

Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
80 85 90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
95 100 105

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
110

<210> 25

<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 此序列是合成的

<400> 25
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser
20 25 30

Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
35 40 45

Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
65 70 75

Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
80 85 90

Tyr Asn Ser Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
95 100 105

Ile Lys

<210> 26
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 此序列是合成的

<400> 26
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly
1 5 10 15

Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
20 25 30

<210> 27
<211> 847
<212> PRT
<213> 人类 (Homo sapiens)

<400> 27
Met His Leu Leu Gly Pro Trp Leu Leu Leu Leu Val Leu Glu Tyr
1 5 10 15

Leu Ala Phe Ser Asp Ser Ser Lys Trp Val Phe Glu His Pro Glu
20 25 30

Thr Leu Tyr Ala Trp Glu Gly Ala Cys Val Trp Ile Pro Cys Thr
35 40 45

Tyr Arg Ala Leu Asp Gly Asp Leu Glu Ser Phe Ile Leu Phe His
50 55 60

Asn Pro Glu Tyr Asn Lys Asn Thr Ser Lys Phe Asp Gly Thr Arg
65 70 75

Leu Tyr Glu Ser Thr Lys Asp Gly Lys Val Pro Ser Glu Gln Lys
80 85 90

Arg Val Gln Phe Leu Gly Asp Lys Asn Lys Asn Cys Thr Leu Ser

95 100 105

Ile His Pro Val His Leu Asn Asp Ser Gly Gln Leu Gly Leu Arg
110 115 120

Met Glu Ser Lys Thr Glu Lys Trp Met Glu Arg Ile His Leu Asn
125 130 135

Val Ser Glu Arg Pro Phe Pro Pro His Ile Gln Leu Pro Pro Glu
140 145 150

Ile Gln Glu Ser Gln Glu Val Thr Leu Thr Cys Leu Leu Asn Phe
155 160 165

Ser Cys Tyr Gly Tyr Pro Ile Gln Leu Gln Trp Leu Leu Glu Gly
170 175 180

Val Pro Met Arg Gln Ala Ala Val Thr Ser Thr Ser Leu Thr Ile
185 190 195

Lys Ser Val Phe Thr Arg Ser Glu Leu Lys Phe Ser Pro Gln Trp
200 205 210

Ser His His Gly Lys Ile Val Thr Cys Gln Leu Gln Asp Ala Asp
215 220 225

Gly Lys Phe Leu Ser Asn Asp Thr Val Gln Leu Asn Val Lys His
230 235 240

Thr Pro Lys Leu Glu Ile Lys Val Thr Pro Ser Asp Ala Ile Val
245 250 255

Arg Glu Gly Asp Ser Val Thr Met Thr Cys Glu Val Ser Ser Ser
260 265 270

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

Leu Lys Lys Gln Asn Thr Phe Thr Leu Asn Leu Arg Glu Val Thr
290 295 300

Lys Asp Gln Ser Gly Lys Tyr Cys Cys Gln Val Ser Asn Asp Val
305 310 315

Gly Pro Gly Arg Ser Glu Glu Val Phe Leu Gln Val Gln Tyr Ala
320 325 330

Pro Glu Pro Ser Thr Val Gln Ile Leu His Ser Pro Ala Val Glu
335 340 345

Gly Ser Gln Val Glu Phe Leu Cys Met Ser Leu Ala Asn Pro Leu
350 355 360

Pro Thr Asn Tyr Thr Trp Tyr His Asn Gly Lys Glu Met Gln Gly
365 370 375

Arg Thr Glu Glu Lys Val His Ile Pro Lys Ile Leu Pro Trp His
380 385 390

Ala Gly Thr Tyr Ser Cys Val Ala Glu Asn Ile Leu Gly Thr Gly
395 400 405

Gln Arg Gly Pro Gly Ala Glu Leu Asp Val Gln Tyr Pro Pro Lys
410 415 420

Lys Val Thr Thr Val Ile Gln Asn Pro Met Pro Ile Arg Glu Gly
425 430 435

Asp Thr Val Thr Leu Ser Cys Asn Tyr Asn Ser Ser Asn Pro Ser
440 445 450

Val Thr Arg Tyr Glu Trp Lys Pro His Gly Ala Trp Glu Glu Pro

455 460 465

Ser Leu Gly Val Leu Lys Ile Gln Asn Val Gly Trp Asp Asn Thr
470 475 480

Thr Ile Ala Cys Ala Arg Cys Asn Ser Trp Cys Ser Trp Ala Ser
485 490 495

Pro Val Ala Leu Asn Val Gln Tyr Ala Pro Arg Asp Val Arg Val
500 505 510

Arg Lys Ile Lys Pro Leu Ser Glu Ile His Ser Gly Asn Ser Val
515 520 525

Ser Leu Gln Cys Asp Phe Ser Ser Ser His Pro Lys Glu Val Gln
530 535 540

Phe Phe Trp Glu Lys Asn Gly Arg Leu Leu Gly Lys Glu Ser Gln
545 550 555

Leu Asn Phe Asp Ser Ile Ser Pro Glu Asp Ala Gly Ser Tyr Ser
560 565 570

Cys Trp Val Asn Asn Ser Ile Gly Gln Thr Ala Ser Lys Ala Trp
575 580 585

Thr Leu Glu Val Leu Tyr Ala Pro Arg Arg Leu Arg Val Ser Met
590 595 600

Ser Pro Gly Asp Gln Val Met Glu Gly Lys Ser Ala Thr Leu Thr
605 610 615

Cys Glu Ser Asp Ala Asn Pro Pro Val Ser His Tyr Thr Trp Phe
620 625 630

Asp Trp Asn Asn Gln Ser Leu Pro His His Ser Gln Lys Leu Arg
635 640 645

Leu Glu Pro Val Lys Val Gln His Ser Gly Ala Tyr Trp Cys Gln
650 655 660

Gly Thr Asn Ser Val Gly Lys Gly Arg Ser Pro Leu Ser Thr Leu
665 670 675

Thr Val Tyr Tyr Ser Pro Glu Thr Ile Gly Arg Arg Val Ala Val
680 685 690

Gly Leu Gly Ser Cys Leu Ala Ile Leu Ile Leu Ala Ile Cys Gly
695 700 705

Leu Lys Leu Gln Arg Arg Trp Lys Arg Thr Gln Ser Gln Gln Gly
710 715 720

Leu Gln Glu Asn Ser Ser Gly Gln Ser Phe Phe Val Arg Asn Lys
725 730 735

Lys Val Arg Arg Ala Pro Leu Ser Glu Gly Pro His Ser Leu Gly
740 745 750

Cys Tyr Asn Pro Met Met Glu Asp Gly Ile Ser Tyr Thr Thr Leu
755 760 765

Arg Phe Pro Glu Met Asn Ile Pro Arg Thr Gly Asp Ala Glu Ser
770 775 780

Ser Glu Met Gln Arg Pro Pro Arg Thr Cys Asp Asp Thr Val Thr
785 790 795

Tyr Ser Ala Leu His Lys Arg Gln Val Gly Asp Tyr Glu Asn Val
800 805 810

Ile Pro Asp Phe Pro Glu Asp Glu Gly Ile His Tyr Ser Glu Leu

815 820 825

Ile Gln Phe Gly Val Gly Glu Arg Pro Gln Ala Gln Glu Asn Val
830 835 840

Asp Tyr Val Ile Leu Lys His
845

<210> 28
<211> 660
<212> PRT
<213> 人类 (Homo sapiens)

<400> 28
Ser Lys Trp Val Phe Glu His Pro Glu Thr Leu Tyr Ala Trp Glu
1 5 10 15

Gly Ala Cys Val Trp Ile Pro Cys Thr Tyr Arg Ala Leu Asp Gly
20 25 30

Asp Leu Glu Ser Phe Ile Leu Phe His Asn Pro Glu Tyr Asn Lys
35 40 45

Asn Thr Ser Lys Phe Asp Gly Thr Arg Leu Tyr Glu Ser Thr Lys
50 55 60

Asp Gly Lys Val Pro Ser Glu Gln Lys Arg Val Gln Phe Leu Gly
65 70 75

Asp Lys Asn Lys Asn Cys Thr Leu Ser Ile His Pro Val His Leu
80 85 90

Asn Asp Ser Gly Gln Leu Gly Leu Arg Met Glu Ser Lys Thr Glu
95 100 105

Lys Trp Met Glu Arg Ile His Leu Asn Val Ser Glu Arg Pro Phe
110 115 120

Pro Pro His Ile Gln Leu Pro Pro Glu Ile Gln Glu Ser Gln Glu
125 130 135

Val Thr Leu Thr Cys Leu Leu Asn Phe Ser Cys Tyr Gly Tyr Pro
140 145 150

Ile Gln Leu Gln Trp Leu Leu Glu Gly Val Pro Met Arg Gln Ala
155 160 165

Ala Val Thr Ser Thr Ser Leu Thr Ile Lys Ser Val Phe Thr Arg
170 175 180

Ser Glu Leu Lys Phe Ser Pro Gln Trp Ser His His Gly Lys Ile
185 190 195

Val Thr Cys Gln Leu Gln Asp Ala Asp Gly Lys Phe Leu Ser Asn
200 205 210

Asp Thr Val Gln Leu Asn Val Lys His Thr Pro Lys Leu Glu Ile
215 220 225

Lys Val Thr Pro Ser Asp Ala Ile Val Arg Glu Gly Asp Ser Val
230 235 240

Thr Met Thr Cys Glu Val Ser Ser Ser Asn Pro Glu Tyr Thr Thr
245 250 255

Val Ser Trp Leu Lys Asp Gly Thr Ser Leu Lys Lys Gln Asn Thr
260 265 270

Phe Thr Leu Asn Leu Arg Glu Val Thr Lys Asp Gln Ser Gly Lys
275 280 285

Tyr Cys Cys Gln Val Ser Asn Asp Val Gly Pro Gly Arg Ser Glu

290 295 300

Glu Val Phe Leu Gln Val Gln Tyr Ala Pro Glu Pro Ser Thr Val
305 310 315

Gln Ile Leu His Ser Pro Ala Val Glu Gly Ser Gln Val Glu Phe
320 325 330

Leu Cys Met Ser Leu Ala Asn Pro Leu Pro Thr Asn Tyr Thr Trp
335 340 345

Tyr His Asn Gly Lys Glu Met Gln Gly Arg Thr Glu Glu Lys Val
350 355 360

His Ile Pro Lys Ile Leu Pro Trp His Ala Gly Thr Tyr Ser Cys
365 370 375

Val Ala Glu Asn Ile Leu Gly Thr Gly Gln Arg Gly Pro Gly Ala
380 385 390

Glu Leu Asp Val Gln Tyr Pro Pro Lys Lys Val Thr Thr Val Ile
395 400 405

Gln Asn Pro Met Pro Ile Arg Glu Gly Asp Thr Val Thr Leu Ser
410 415 420

Cys Asn Tyr Asn Ser Ser Asn Pro Ser Val Thr Arg Tyr Glu Trp
425 430 435

Lys Pro His Gly Ala Trp Glu Glu Pro Ser Leu Gly Val Leu Lys
440 445 450

Ile Gln Asn Val Gly Trp Asp Asn Thr Thr Ile Ala Cys Ala Arg
455 460 465

Cys Asn Ser Trp Cys Ser Trp Ala Ser Pro Val Ala Leu Asn Val
470 475 480

Gln Tyr Ala Pro Arg Asp Val Arg Val Arg Lys Ile Lys Pro Leu
485 490 495

Ser Glu Ile His Ser Gly Asn Ser Val Ser Leu Gln Cys Asp Phe
500 505 510

Ser Ser Ser His Pro Lys Glu Val Gln Phe Phe Trp Glu Lys Asn
515 520 525

Gly Arg Leu Leu Gly Lys Glu Ser Gln Leu Asn Phe Asp Ser Ile
530 535 540

Ser Pro Glu Asp Ala Gly Ser Tyr Ser Cys Trp Val Asn Asn Ser
545 550 555

Ile Gly Gln Thr Ala Ser Lys Ala Trp Thr Leu Glu Val Leu Tyr
560 565 570

Ala Pro Arg Arg Leu Arg Val Ser Met Ser Pro Gly Asp Gln Val
575 580 585

Met Glu Gly Lys Ser Ala Thr Leu Thr Cys Glu Ser Asp Ala Asn
590 595 600

Pro Pro Val Ser His Tyr Thr Trp Phe Asp Trp Asn Asn Gln Ser
605 610 615

Leu Pro His His Ser Gln Lys Leu Arg Leu Glu Pro Val Lys Val
620 625 630

Gln His Ser Gly Ala Tyr Trp Cys Gln Gly Thr Asn Ser Val Gly
635 640 645

Lys Gly Arg Ser Pro Leu Ser Thr Leu Thr Val Tyr Tyr Ser Pro

650 655 660

<210> 29
<211> 647
<212> PRT
<213> 人类 (Homo sapiens)

<400> 29
Met His Leu Leu Gly Pro Trp Leu Leu Leu Leu Val Leu Glu Tyr
1 5 10 15

Leu Ala Phe Ser Asp Ser Ser Lys Trp Val Phe Glu His Pro Glu
20 25 30

Thr Leu Tyr Ala Trp Glu Gly Ala Cys Val Trp Ile Pro Cys Thr
35 40 45

Tyr Arg Ala Leu Asp Gly Asp Leu Glu Ser Phe Ile Leu Phe His
50 55 60

Asn Pro Glu Tyr Asn Lys Asn Thr Ser Lys Phe Asp Gly Thr Arg
65 70 75

Leu Tyr Glu Ser Thr Lys Asp Gly Lys Val Pro Ser Glu Gln Lys
80 85 90

Arg Val Gln Phe Leu Gly Asp Lys Asn Lys Asn Cys Thr Leu Ser
95 100 105

Ile His Pro Val His Leu Asn Asp Ser Gly Gln Leu Gly Leu Arg
110 115 120

Met Glu Ser Lys Thr Glu Lys Trp Met Glu Arg Ile His Leu Asn
125 130 135

Val Ser Glu Arg Pro Phe Pro Pro His Ile Gln Leu Pro Pro Glu
140 145 150

Ile Gln Glu Ser Gln Glu Val Thr Leu Thr Cys Leu Leu Asn Phe
155 160 165

Ser Cys Tyr Gly Tyr Pro Ile Gln Leu Gln Trp Leu Leu Glu Gly
170 175 180

Val Pro Met Arg Gln Ala Ala Val Thr Ser Thr Ser Leu Thr Ile
185 190 195

Lys Ser Val Phe Thr Arg Ser Glu Leu Lys Phe Ser Pro Gln Trp
200 205 210

Ser His His Gly Lys Ile Val Thr Cys Gln Leu Gln Asp Ala Asp
215 220 225

Gly Lys Phe Leu Ser Asn Asp Thr Val Gln Leu Asn Val Lys His
230 235 240

Pro Pro Lys Lys Val Thr Thr Val Ile Gln Asn Pro Met Pro Ile
245 250 255

Arg Glu Gly Asp Thr Val Thr Leu Ser Cys Asn Tyr Asn Ser Ser
260 265 270

Asn Pro Ser Val Thr Arg Tyr Glu Trp Lys Pro His Gly Ala Trp
275 280 285

Glu Glu Pro Ser Leu Gly Val Leu Lys Ile Gln Asn Val Gly Trp
290 295 300

Asp Asn Thr Thr Ile Ala Cys Ala Ala Cys Asn Ser Trp Cys Ser
305 310 315

Trp Ala Ser Pro Val Ala Leu Asn Val Gln Tyr Ala Pro Arg Asp

320 325 330

Val Arg Val Arg Lys Ile Lys Pro Leu Ser Glu Ile His Ser Gly
335 340 345

Asn Ser Val Ser Leu Gln Cys Asp Phe Ser Ser Ser His Pro Lys
350 355 360

Glu Val Gln Phe Phe Trp Glu Lys Asn Gly Arg Leu Leu Gly Lys
365 370 375

Glu Ser Gln Leu Asn Phe Asp Ser Ile Ser Pro Glu Asp Ala Gly
380 385 390

Ser Tyr Ser Cys Trp Val Asn Asn Ser Ile Gly Gln Thr Ala Ser
395 400 405

Lys Ala Trp Thr Leu Glu Val Leu Tyr Ala Pro Arg Arg Leu Arg
410 415 420

Val Ser Met Ser Pro Gly Asp Gln Val Met Glu Gly Lys Ser Ala
425 430 435

Thr Leu Thr Cys Glu Ser Asp Ala Asn Pro Pro Val Ser His Tyr
440 445 450

Thr Trp Phe Asp Trp Asn Asn Gln Ser Leu Pro Tyr His Ser Gln
455 460 465

Lys Leu Arg Leu Glu Pro Val Lys Val Gln His Ser Gly Ala Tyr
470 475 480

Trp Cys Gln Gly Thr Asn Ser Val Gly Lys Gly Arg Ser Pro Leu
485 490 495

Ser Thr Leu Thr Val Tyr Tyr Ser Pro Glu Thr Ile Gly Arg Arg
500 505 510

Val Ala Val Gly Leu Gly Ser Cys Leu Ala Ile Leu Ile Leu Ala
515 520 525

Ile Cys Gly Leu Lys Leu Gln Arg Arg Trp Lys Arg Thr Gln Ser
530 535 540

Gln Gln Gly Leu Gln Glu Asn Ser Ser Gly Gln Ser Phe Phe Val
545 550 555

Arg Asn Lys Lys Val Arg Arg Ala Pro Leu Ser Glu Gly Pro His
560 565 570

Ser Leu Gly Cys Tyr Asn Pro Met Met Glu Asp Gly Ile Ser Tyr
575 580 585

Thr Thr Leu Arg Phe Pro Glu Met Asn Ile Pro Arg Thr Gly Asp
590 595 600

Ala Glu Ser Ser Glu Met Gln Arg Pro Pro Pro Asp Cys Asp Asp
605 610 615

Thr Val Thr Tyr Ser Ala Leu His Lys Arg Gln Val Gly Thr Met
620 625 630

Arg Thr Ser Phe Gln Ile Phe Gln Lys Met Arg Gly Phe Ile Thr
635 640 645

Gln Ser

<210> 30
<211> 483
<212> PRT
<213> 人类 (Homo sapiens)

<400> 30
Ser Lys Trp Val Phe Glu His Pro Glu Thr Leu Tyr Ala Trp Glu
1 5 10 15

Gly Ala Cys Val Trp Ile Pro Cys Thr Tyr Arg Ala Leu Asp Gly
20 25 30

Asp Leu Glu Ser Phe Ile Leu Phe His Asn Pro Glu Tyr Asn Lys
35 40 45

Asn Thr Ser Lys Phe Asp Gly Thr Arg Leu Tyr Glu Ser Thr Lys
50 55 60

Asp Gly Lys Val Pro Ser Glu Gln Lys Arg Val Gln Phe Leu Gly
65 70 75

Asp Lys Asn Lys Asn Cys Thr Leu Ser Ile His Pro Val His Leu
80 85 90

Asn Asp Ser Gly Gln Leu Gly Leu Arg Met Glu Ser Lys Thr Glu
95 100 105

Lys Trp Met Glu Arg Ile His Leu Asn Val Ser Glu Arg Pro Phe
110 115 120

Pro Pro His Ile Gln Leu Pro Pro Glu Ile Gln Glu Ser Gln Glu
125 130 135

Val Thr Leu Thr Cys Leu Leu Asn Phe Ser Cys Tyr Gly Tyr Pro
140 145 150

Ile Gln Leu Gln Trp Leu Leu Glu Gly Val Pro Met Arg Gln Ala
155 160 165

Ala Val Thr Ser Thr Ser Leu Thr Ile Lys Ser Val Phe Thr Arg
170 175 180

Ser Glu Leu Lys Phe Ser Pro Gln Trp Ser His His Gly Lys Ile
185 190 195

Val Thr Cys Gln Leu Gln Asp Ala Asp Gly Lys Phe Leu Ser Asn
200 205 210

Asp Thr Val Gln Leu Asn Val Lys His Pro Pro Lys Lys Val Thr
215 220 225

Thr Val Ile Gln Asn Pro Met Pro Ile Arg Glu Gly Asp Thr Val
230 235 240

Thr Leu Ser Cys Asn Tyr Asn Ser Ser Asn Pro Ser Val Thr Arg
245 250 255

Tyr Glu Trp Lys Pro His Gly Ala Trp Glu Glu Pro Ser Leu Gly
260 265 270

Val Leu Lys Ile Gln Asn Val Gly Trp Asp Asn Thr Thr Ile Ala
275 280 285

Cys Ala Ala Cys Asn Ser Trp Cys Ser Trp Ala Ser Pro Val Ala
290 295 300

Leu Asn Val Gln Tyr Ala Pro Arg Asp Val Arg Val Arg Lys Ile
305 310 315

Lys Pro Leu Ser Glu Ile His Ser Gly Asn Ser Val Ser Leu Gln
320 325 330

Cys Asp Phe Ser Ser Ser His Pro Lys Glu Val Gln Phe Phe Trp
335 340 345

Glu Lys Asn Gly Arg Leu Leu Gly Lys Glu Ser Gln Leu Asn Phe

```
                350                 355                 360

Asp Ser Ile Ser Pro Glu Asp Ala Gly Ser Tyr Ser Cys Trp Val
                365                 370                 375

Asn Asn Ser Ile Gly Gln Thr Ala Ser Lys Ala Trp Thr Leu Glu
                380                 385                 390

Val Leu Tyr Ala Pro Arg Arg Leu Arg Val Ser Met Ser Pro Gly
                395                 400                 405

Asp Gln Val Met Glu Gly Lys Ser Ala Thr Leu Thr Cys Glu Ser
                410                 415                 420

Asp Ala Asn Pro Pro Val Ser His Tyr Thr Trp Phe Asp Trp Asn
                425                 430                 435

Asn Gln Ser Leu Pro Tyr His Ser Gln Lys Leu Arg Leu Glu Pro
                440                 445                 450

Val Lys Val Gln His Ser Gly Ala Tyr Trp Cys Gln Gly Thr Asn
                455                 460                 465

Ser Val Gly Lys Gly Arg Ser Pro Leu Ser Thr Leu Thr Val Tyr
                470                 475                 480

Tyr Ser Pro
```

<210> 31
<211> 846
<212> PRT
<213> 黑猩猩 (Pan troglodytes)

```
<400> 31
 Met His Leu Leu Gly Pro Trp Leu Leu Leu Leu Glu Tyr Leu Ala
   1               5                  10                  15

 Phe Ser Asp Ser Ser Lys Trp Asn Ile Glu His Pro Gly Thr Ile
                20                  25                  30

 Tyr Ala Trp Glu Gly Ala Cys Ile Trp Val Pro Cys Thr Tyr Arg
                35                  40                  45

 Val Leu Asp Gly Ala Leu Glu Thr Phe Ile Leu Phe His Asn Pro
                50                  55                  60

 Glu Tyr Asn Gln Asn Met Ser Lys Phe Glu Gly Thr Arg Leu Tyr
                65                  70                  75

 Glu Ser Thr Lys Asp Gly Lys Val Pro Ser Gly Gln Lys Arg Val
                80                  85                  90

 Gln Phe Leu Gly Asn Lys Ile Asn Asn Asn Cys Thr Leu Ser Ile
                95                 100                 105

 His Pro Val His Val Asn Asp Ser Gly Gln Leu Gly Leu Arg Met
               110                 115                 120

 Val Ser Lys Thr Glu Lys Trp Met Glu Arg Ile His Leu Asn Val
               125                 130                 135

 Ser Glu Arg Pro Phe Pro Pro Arg Ile Gln Leu Pro Pro Lys Leu
               140                 145                 150

 Gln Glu Ser Gln Glu Val Thr Leu Thr Cys Leu Leu Asn Phe Ser
               155                 160                 165

 Cys Tyr Gly Tyr Gln Ile Gln Leu Gln Trp Leu Leu Glu Gly Ala
               170                 175                 180

 Pro Met Arg Gln Ala Ala Val Thr Leu Thr Ser Leu Ser Thr Lys
```

185 190 195

Ser Val Phe Thr Arg Ser Glu Leu Lys Phe Ser Pro Gln Trp Ser
200 205 210

His His Gly Lys Ile Val Thr Cys Glu Leu His Asp Val Asp Gly
215 220 225

Lys Val Leu Ser Glu Asp Thr Val Gln Leu Asn Val Lys His Thr
230 235 240

Pro Lys Leu Thr Ile Glu Val Thr Pro Asn Glu Thr Ile Val Arg
245 250 255

Lys Gly Asp Ser Val Thr Met Thr Cys Lys Val Asn Ser Ser Asn
260 265 270

Pro Glu Tyr Thr Thr Val Ser Trp Leu Lys Asp Asp Ile Pro Leu
275 280 285

Lys Glu Gln Asn Thr Leu Met Leu Thr Leu His Glu Val Thr Lys
290 295 300

Ser Gln Thr Gly Thr Tyr Cys Cys Arg Val Ser Asn Asp Val Gly
305 310 315

Pro Ala Thr Ser Glu Lys Val Phe Leu Gln Val Gln Tyr Ala Pro
320 325 330

Glu Pro Ser Arg Val Gln Ile Ser Gln Ser Pro Ala Val Glu Gly
335 340 345

Ser Glu Val Asn Phe Leu Cys Ile Ser Pro Ala Asn Pro Leu Pro
350 355 360

Thr Asn Tyr Thr Trp Tyr His Asn Gly Lys Glu Val Gln Gly Arg
365 370 375

Thr Glu Lys Gln Phe Gln Ile Gln Lys Ile Leu Pro Trp His Ala
380 385 390

Gly Thr Tyr Ser Cys Val Ala Glu Asn Ile Leu Gly Ile Gly Glu
395 400 405

Arg Gly Pro Gly Thr Glu Leu Asp Val Gln Tyr Pro Pro Lys Lys
410 415 420

Val Thr Met Val Ile Glu Asn Pro Thr Pro Ile Arg Glu Gly Asp
425 430 435

Thr Val Thr Leu Ser Cys Asn Tyr Ser Ser Ser Asn Pro Ile Val
440 445 450

Asn His Tyr Glu Trp Arg Pro Arg Gly Ala Trp Glu Glu Pro Ser
455 460 465

Leu Gly Val Leu Lys Ile Gln Asn Ile Gly Trp Asn Asn Thr Ala
470 475 480

Val Ala Cys Ala Ala Cys Asn Asn Trp Cys Ser Trp Ala Ser Pro
485 490 495

Val Thr Leu Asn Val Leu Tyr Ala Pro Arg Gly Val Arg Val Arg
500 505 510

Lys Ile Lys Pro Leu Ser Glu Ile His Ser Gly Asn Leu Val Ser
515 520 525

Leu Gln Cys Asp Phe Ser Ser Ser His Pro Lys Glu Val Gln Phe
530 535 540

Phe Trp Glu Lys Asn Gly Ser Leu Leu Gly Lys Glu Ser Gln Leu

545 550 555

Asn Phe Asp Ser Ile Ser Pro Glu Asp Ala Gly Ser Tyr Ser Cys
560 565 570

Trp Val Asn Asn Ser Ile Gly Gln Thr Ala Ser Lys Ala Trp Thr
575 580 585

Leu Glu Val Leu Tyr Ala Pro Arg Arg Leu Arg Val Ser Met Ser
590 595 600

Gln Gly Asn Gln Val Met Glu Gly Lys Thr Ala Ile Leu Thr Cys
605 610 615

Glu Ser Asp Ala Asn Pro Pro Val Tyr Ser Tyr Ala Trp Phe Asp
620 625 630

Trp Asn Asn Gln Ser Leu Pro Tyr Ser Gly Arg Met Leu Arg Leu
635 640 645

Glu Pro Val Lys Val Gln His Ser Gly Ala Tyr Trp Cys Gln Gly
650 655 660

Thr Asn Arg Val Gly Lys Gly His Ser Pro Leu Ile Thr Leu Thr
665 670 675

Val Tyr Tyr Ser Pro Glu Thr Ile Gly Arg Arg Val Ala Val Gly
680 685 690

Leu Gly Ser Cys Leu Ala Ile Leu Ile Leu Ala Met Cys Gly Phe
695 700 705

Lys Val Gln Arg Arg Trp Lys Arg Thr Gln Ser Gln Gln Gly Leu
710 715 720

Gln Glu Asn Ser Ser Gly Gln Ser Phe Phe Val Arg Asn Lys Lys
725 730 735

Val Arg Arg Thr Pro Leu Ser Glu Gly Pro His Ser Leu Gly Cys
740 745 750

Tyr Asn Pro Met Met Glu Asp Gly Ile Ser Tyr Ala Thr Leu Arg
755 760 765

Phe Pro Glu Thr Asn Thr Pro Arg Thr Gly Asp Ala Glu Thr Ser
770 775 780

Glu Leu Gln Arg Leu Pro Pro Asp Cys Asp Asp Thr Val Thr Tyr
785 790 795

Ser Val Leu Gln Lys Arg Gln Val Gly Asp Tyr Glu Asn Val Ile
800 805 810

Pro Asp Phe Pro Glu Asp Glu Gly Ile His Tyr Ser Glu Leu Ile
815 820 825

Gln Phe Gly Phe Gly Glu Arg Pro Gln Ala Gln Glu Asn Val Asp
830 835 840

Tyr Val Ile Val Lys His
845

<210> 32
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 此序列是合成的

<400> 32
Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Ile Gly Ala Thr Phe Leu

1 5 10 15

Glu

<210> 33
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 此序列是合成的

<400> 33
Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Ile Gly Gln Thr Phe Leu
1 5 10 15

Glu

<210> 34
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 此序列是合成的

<400> 34
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly
1 5 10 15

Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Glu Phe Ser
20 25 30

Arg Ser Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Arg
35 40 45

Glu Trp Ile Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr
50 55 60

Ser Gly Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser
65 70 75

Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Val Asp
80 85 90

Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Asp Gly Ser Ser Trp Asp Trp
95 100 105

Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
110 115 120

<210> 35
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 此序列是合成的

<400> 35
Asp Ile Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu
1 5 10 15

Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val
20 25 30

His Ser Asn Gly Asn Thr Phe Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro
35 40 45

Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe

```
                50                  55                  60

 Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
                65                  70                  75

 Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val
                80                  85                  90

 Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gln Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly
                95                 100                 105

 Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
               110
```

<210> 36
<211> 847
<212> PRT
<213> 人类 (Homo sapiens)

```
<400> 36
 Met His Leu Leu Gly Pro Trp Leu Leu Leu Leu Val Leu Glu Tyr
   1               5                  10                  15

 Leu Ala Phe Ser Asp Ser Ser Lys Trp Val Phe Glu His Pro Glu
                20                  25                  30

 Thr Leu Tyr Ala Trp Glu Gly Ala Cys Val Trp Ile Pro Cys Thr
                35                  40                  45

 Tyr Arg Ala Leu Asp Gly Asp Leu Glu Ser Phe Ile Leu Phe His
                50                  55                  60

 Asn Pro Glu Tyr Asn Lys Asn Thr Ser Lys Phe Asp Gly Thr Arg
                65                  70                  75

 Leu Tyr Glu Ser Thr Lys Asp Gly Lys Val Pro Ser Glu Gln Lys
                80                  85                  90

 Arg Val Gln Phe Leu Gly Asp Lys Asn Lys Asn Cys Thr Leu Ser
                95                 100                 105

 Ile His Pro Val His Leu Asn Asp Ser Gly Gln Leu Gly Leu Arg
               110                 115                 120

 Met Glu Ser Lys Thr Glu Lys Trp Met Glu Arg Ile His Leu Asn
               125                 130                 135

 Val Ser Glu Arg Pro Phe Pro Pro His Ile Gln Leu Pro Pro Glu
               140                 145                 150

 Ile Gln Glu Ser Gln Glu Val Thr Leu Thr Cys Leu Leu Asn Phe
               155                 160                 165

 Ser Cys Tyr Gly Tyr Pro Ile Gln Leu Gln Trp Leu Leu Glu Gly
               170                 175                 180

 Val Pro Met Arg Gln Ala Ala Val Thr Ser Thr Ser Leu Thr Ile
               185                 190                 195

 Lys Ser Val Phe Thr Arg Ser Glu Leu Lys Phe Ser Pro Gln Trp
               200                 205                 210

 Ser His His Gly Lys Ile Val Thr Cys Gln Leu Gln Asp Ala Asp
               215                 220                 225

 Gly Lys Phe Leu Ser Asn Asp Thr Val Gln Leu Asn Val Lys His
               230                 235                 240

 Thr Pro Lys Leu Glu Ile Lys Val Thr Pro Ser Asp Ala Ile Val
               245                 250                 255

 Arg Glu Gly Asp Ser Val Thr Met Thr Cys Glu Val Ser Ser Ser
```

260 265 270

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

Leu Lys Lys Gln Asn Thr Phe Thr Leu Asn Leu Arg Glu Val Thr
290 295 300

Lys Asp Gln Ser Gly Lys Tyr Cys Cys Gln Val Ser Asn Asp Val
305 310 315

Gly Pro Gly Arg Ser Glu Glu Val Phe Leu Gln Val Gln Tyr Ala
320 325 330

Pro Glu Pro Ser Thr Val Gln Ile Leu His Ser Pro Ala Val Glu
335 340 345

Gly Ser Gln Val Glu Phe Leu Cys Met Ser Leu Ala Asn Pro Leu
350 355 360

Pro Thr Asn Tyr Thr Trp Tyr His Asn Gly Lys Glu Met Gln Gly
365 370 375

Arg Thr Glu Glu Lys Val His Ile Pro Lys Ile Leu Pro Trp His
380 385 390

Ala Gly Thr Tyr Ser Cys Val Ala Glu Asn Ile Leu Gly Thr Gly
395 400 405

Gln Arg Gly Pro Gly Ala Glu Leu Asp Val Gln Tyr Pro Pro Lys
410 415 420

Lys Val Thr Thr Val Ile Gln Asn Pro Met Pro Ile Arg Glu Gly
425 430 435

Asp Thr Val Thr Leu Ser Cys Asn Tyr Asn Ser Ser Asn Pro Ser
440 445 450

Val Thr Arg Tyr Glu Trp Lys Pro His Gly Ala Trp Glu Glu Pro
455 460 465

Ser Leu Gly Val Leu Lys Ile Gln Asn Val Gly Trp Asp Asn Thr
470 475 480

Thr Ile Ala Cys Ala Arg Cys Asn Ser Trp Cys Ser Trp Ala Ser
485 490 495

Pro Val Ala Leu Asn Val Gln Tyr Ala Pro Arg Asp Val Arg Val
500 505 510

Arg Lys Ile Lys Pro Leu Ser Glu Ile His Ser Gly Asn Ser Val
515 520 525

Ser Leu Gln Cys Asp Phe Ser Ser Ser His Pro Lys Glu Val Gln
530 535 540

Phe Phe Trp Glu Lys Asn Gly Arg Leu Leu Gly Lys Glu Ser Gln
545 550 555

Leu Asn Phe Asp Ser Ile Ser Pro Glu Asp Ala Gly Ser Tyr Ser
560 565 570

Cys Trp Val Asn Asn Ser Ile Gly Gln Thr Ala Ser Lys Ala Trp
575 580 585

Thr Leu Glu Val Leu Tyr Ala Pro Arg Arg Leu Arg Val Ser Met
590 595 600

Ser Pro Gly Asp Gln Val Met Glu Gly Lys Ser Ala Thr Leu Thr
605 610 615

Cys Glu Ser Asp Ala Asn Pro Pro Val Ser His Tyr Thr Trp Phe

620 625 630

Asp Trp Asn Asn Gln Ser Leu Pro His His Ser Gln Lys Leu Arg
635 640 645

Leu Glu Pro Val Lys Val Gln His Ser Gly Ala Tyr Trp Cys Gln
650 655 660

Gly Thr Asn Ser Val Gly Lys Gly Arg Ser Pro Leu Ser Thr Leu
665 670 675

Thr Val Tyr Tyr Ser Pro Glu Thr Ile Gly Arg Arg Val Ala Val
680 685 690

Gly Leu Gly Ser Cys Leu Ala Ile Leu Ile Leu Ala Ile Cys Gly
695 700 705

Leu Lys Leu Gln Arg Arg Trp Lys Arg Thr Gln Ser Gln Gln Gly
710 715 720

Leu Gln Glu Asn Ser Ser Gly Gln Ser Phe Phe Val Arg Asn Lys
725 730 735

Lys Val Arg Arg Ala Pro Leu Ser Glu Gly Pro His Ser Leu Gly
740 745 750

Cys Tyr Asn Pro Met Met Glu Asp Gly Ile Ser Tyr Thr Thr Leu
755 760 765

Arg Phe Pro Glu Met Asn Ile Pro Arg Thr Gly Asp Ala Glu Ser
770 775 780

Ser Glu Met Gln Arg Pro Pro Arg Thr Cys Asp Asp Thr Val Thr
785 790 795

Tyr Ser Ala Leu His Lys Arg Gln Val Gly Asp Tyr Glu Asn Val
800 805 810

Ile Pro Asp Phe Pro Glu Asp Glu Gly Ile His Tyr Ser Glu Leu
815 820 825

Ile Gln Phe Gly Val Gly Glu Arg Pro Gln Ala Gln Glu Asn Val
830 835 840

Asp Tyr Val Ile Leu Lys His
845

<210> 37
<211> 42
<212> PRT
<213> 人类 (Homo sapiens)

<400> 37
Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
1 5 10 15

Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn
20 25 30

Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys
35 40

<210> 38
<211> 218
<212> PRT
<213> 人类 (Homo sapiens)

<400> 38
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
1 5 10 15

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val

```
                20                  25                  30

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
            35                  40                  45

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
        50                  55                  60

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
    65                  70                  75

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
80                  85                  90

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
            95                  100                 105

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
        110                 115                 120

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
    125                 130                 135

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
140                 145                 150

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
            155                 160                 165

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
        170                 175                 180

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
    185                 190                 195

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
200                 205                 210

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
            215

<210> 39
<211> 217
<212> PRT
<213> 人类 (Homo sapiens)

<400> 39
 Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
   1               5                  10                  15

 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
            20                  25                  30

 Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe
            35                  40                  45

 Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
        50                  55                  60

 Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val
    65                  70                  75

 Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
80                  85                  90

 Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
            95                  100                 105

 Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
        110                 115                 120

 Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
```

```
                125                 130                 135

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
                140                 145                 150

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
                155                 160                 165

Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
                170                 175                 180

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
                185                 190                 195

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
                200                 205                 210

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
                215

<210> 40
<211> 217
<212> PRT
<213> 人类 (Homo sapiens)

<400> 40
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
  1               5                  10                  15

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
                20                  25                  30

Thr Cys Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe
                35                  40                  45

Lys Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
                50                  55                  60

Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val
                65                  70                  75

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
                80                  85                  90

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
                95                 100                 105

Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
                110                 115                 120

Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
                125                 130                 135

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
                140                 145                 150

Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Asn Thr Thr Pro
                155                 160                 165

Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
                170                 175                 180

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile Phe Ser Cys
                185                 190                 195

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln Lys Ser
                200                 205                 210

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
                215

<210> 41
```

<211> 218
<212> PRT
<213> 人类（Homo sapiens）

<400> 41
Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
1 5 10 15

Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
20 25 30

Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln
35 40 45

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
50 55 60

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
65 70 75

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
80 85 90

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys
95 100 105

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
110 115 120

Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
125 130 135

Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
140 145 150

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
155 160 165

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg
170 175 180

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
185 190 195

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Thr Tyr Gln Lys
200 205 210

Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
215

<210> 42
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 此序列是合成的

<400> 42
Cys Asp Lys Thr His Thr Gly Gly Gly Ser Gln Arg Leu Met Glu
1 5 10 15

Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp Glu Asp Asp Phe
20 25 30

<210> 43
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 此序列是合成的

<400> 43
Gln Arg Leu Met Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu
1 5 10 15

Trp Glu Asp Asp Phe
20

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

<220>
<223> 此序列是合成的

<400> 44
Gln Arg Leu Ile Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu
1 5 10 15

Trp Glu Asp Asp Phe
20

<210> 45
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 此序列是合成的

<400> 45
Arg Leu Ile Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp
1 5 10 15

Glu Asp Asp

<210> 46
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 此序列是合成的

<400> 46
Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp
5 10

<210> 47
<211> 14
<212> PRT
<213> 人类 (Homo sapiens)

<400> 47
Trp Val Arg Arg Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly
5 10

<210> 48
<211> 32
<212> PRT
<213> 人类 (Homo sapiens)

<400> 48
Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met
1 5 10 15

Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

Ala Arg

<210> 49
<211> 23
<212> PRT
<213> 人类 (Homo sapiens)

<400> 49
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro
1 5 10 15

Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys
20

<210> 50
<211> 25
<212> PRT
<213> 人类 (Homo sapiens)

<400> 50
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly
1 5 10 15

Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser
20 25

<210> 51
<211> 13
<212> PRT
<213> 人类 (Homo sapiens)

<400> 51
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
5 10

<210> 52
<211> 31
<212> PRT
<213> 人类 (Homo sapiens)

<400> 52
Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met
1 5 10 15

Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

Ala

<210> 53
<211> 30
<212> PRT
<213> 人类 (Homo sapiens)

<400> 53
Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met
1 5 10 15

Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 54
<211> 30
<212> PRT
<213> 人类 (Homo sapiens)

<400> 54
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser
1 5 10 15

Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Val Ser

20 25 30

<210> 55
<211> 14
<212> PRT
<213> 人类 (Homo sapiens)

<400> 55
Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
5 10

<210> 56
<211> 32
<212> PRT
<213> 人类 (Homo sapiens)

<400> 56
Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
1 5 10 15

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

Ala Arg

<210> 57
<211> 25
<212> PRT
<213> 人类 (Homo sapiens)

<400> 57
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser
1 5 10 15

Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser
20 25

<210> 58
<211> 13
<212> PRT
<213> 人类 (Homo sapiens)

<400> 58
Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
5 10

<210> 59
<211> 31
<212> PRT
<213> 人类 (Homo sapiens)

<400> 59
Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
1 5 10 15

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

Ala

<210> 60
<211> 30
<212> PRT
<213> 人类 (Homo sapiens)

<400> 60
Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
1 5 10 15

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

20 25 30

<210> 61
<211> 30
<212> PRT
<213> 人类 (Homo sapiens)

<400> 61
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
20 25 30

<210> 62
<211> 14
<212> PRT
<213> 人类 (Homo sapiens)

<400> 62
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser
5 10

<210> 63
<211> 32
<212> PRT
<213> 人类 (Homo sapiens)

<400> 63
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
1 5 10 15

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

Ala Arg

<210> 64
<211> 25
<212> PRT
<213> 人类 (Homo sapiens)

<400> 64
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
20 25

<210> 65
<211> 13
<212> PRT
<213> 人类 (Homo sapiens)

<400> 65
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
5 10

<210> 66
<211> 31
<212> PRT
<213> 人类 (Homo sapiens)

<400> 66
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
1 5 10 15

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

Ala

<210> 67
<211> 30
<212> PRT
<213> 人类 (Homo sapiens)

<400> 67
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
1 5 10 15

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 68
<211> 30
<212> PRT
<213> 人类 (Homo sapiens)

<400> 68
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys
20 25 30

<210> 69
<211> 32
<212> PRT
<213> 人类 (Homo sapiens)

<400> 69
Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu
1 5 10 15

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

Ser Arg

<210> 70
<211> 31
<212> PRT
<213> 人类 (Homo sapiens)

<400> 70
Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu
1 5 10 15

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

Ser

<210> 71
<211> 32
<212> PRT
<213> 人类 (Homo sapiens)

<400> 71
Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu
1 5 10 15

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

Ala Arg

<210> 72

<211> 31
<212> PRT
<213> 人类 (Homo sapiens)

<400> 72
Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu
1 5 10 15

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

Ala

<210> 73
<211> 30
<212> PRT
<213> 人类 (Homo sapiens)

<400> 73
Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu
1 5 10 15

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 74
<211> 23
<212> PRT
<213> 人类 (Homo sapiens)

<400> 74
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
20

<210> 75
<211> 15
<212> PRT
<213> 人类 (Homo sapiens)

<400> 75
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 76
<211> 32
<212> PRT
<213> 人类 (Homo sapiens)

<400> 76
Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
1 5 10 15

Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
20 25 30

Tyr Cys

<210> 77
<211> 10
<212> PRT
<213> 人类 (Homo sapiens)

<400> 77
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
5 10

<210> 78

<211> 14
<212> PRT
<213> 人类 (Homo sapiens)

<400> 78
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
5 10

<210> 79
<211> 15
<212> PRT
<213> 人类 (Homo sapiens)

<400> 79
Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 80
<211> 32
<212> PRT
<213> 人类 (Homo sapiens)

<400> 80
Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
1 5 10 15

Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr
20 25 30

Tyr Cys

<210> 81
<211> 23
<212> PRT
<213> 人类 (Homo sapiens)

<400> 81
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro
1 5 10 15

Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys
20

<210> 82
<211> 15
<212> PRT
<213> 人类 (Homo sapiens)

<400> 82
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 83
<211> 32
<212> PRT
<213> 人类 (Homo sapiens)

<400> 83
Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
1 5 10 15

Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr
20 25 30

Tyr Cys

<210> 84
<211> 23
<212> PRT
<213> 人类 (Homo sapiens)

<400> 84
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu
1 5 10 15

Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys
20

<210> 85
<211> 15
<212> PRT
<213> 人类 (Homo sapiens)

<400> 85
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 86
<211> 32
<212> PRT
<213> 人类 (Homo sapiens)

<400> 86
Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
1 5 10 15

Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr
20 25 30

Tyr Cys

<210> 87
<211> 219
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 此序列是合成的

<400> 87
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val
20 25 30

His Ser Val Gly Asn Thr Phe Leu Glu Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
35 40 45

Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
65 70 75

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr
80 85 90

Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gln Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gln
95 100 105

Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val
110 115 120

Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala
125 130 135

Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
140 145 150

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

155 160 165

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
170 175 180

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
185 190 195

Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
200 205 210

Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
215

<210> 88
<211> 450
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 此序列是合成的

<400> 88
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Glu Phe Ser
20 25 30

Arg Ser Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
35 40 45

Glu Trp Val Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr
50 55 60

Ser Gly Lys Phe Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser
65 70 75

Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
80 85 90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Ser Ser Trp Asp Trp
95 100 105

Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
110 115 120

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser
125 130 135

Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys
140 145 150

Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
155 160 165

Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
170 175 180

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
185 190 195

Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
200 205 210

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
215 220 225

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met

245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
260 265 270

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
275 280 285

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
290 295 300

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
305 310 315

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
320 325 330

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
335 340 345

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
350 355 360

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
365 370 375

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
380 385 390

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
395 400 405

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
410 415 420

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
425 430 435

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
440 445 450

<210> 89
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 此序列是合成的

<400> 89
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly
1 5 10 15

Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Glu Phe Ser
20 25 30

Arg Ser Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Arg
35 40 45

Glu Trp Ile Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr
50 55 60

Ser Gly Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser
65 70 75

Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Val Asp
80 85 90

Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Asp Gly Ser Ser Trp Asp Trp
95 100 105

Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

110 115 120

<210> 90
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 此序列是合成的

<400> 90
Asp Ile Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu
1 5 10 15

Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val
20 25 30

His Ser Asn Gly Asn Thr Phe Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro
35 40 45

Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
65 70 75

Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val
80 85 90

Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gln Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly
95 100 105

Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
110

<210> 91
<211> 219
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 此序列是合成的

<400> 91
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val
20 25 30

His Ser Val Gly Asn Thr Phe Leu Glu Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
35 40 45

Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
65 70 75

Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr
80 85 90

Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gln Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gln
95 100 105

Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val
110 115 120

Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala
125 130 135

Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys

```
                  140                 145                 150

  Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
                  155                 160                 165

  Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
                  170                 175                 180

  Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
                  185                 190                 195

  Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Cys
                  200                 205                 210

  Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
                  215

<210> 92
<211> 450
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 此序列是合成的

<400> 92
  Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
    1               5                  10                  15

  Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Glu Phe Ser
                   20                  25                  30

  Arg Ser Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
                   35                  40                  45

  Glu Trp Val Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr
                   50                  55                  60

  Ser Gly Lys Phe Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser
                   65                  70                  75

  Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
                   80                  85                  90

  Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Ser Ser Trp Asp Trp
                   95                 100                 105

  Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
                  110                 115                 120

  Cys Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser
                  125                 130                 135

  Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys
                  140                 145                 150

  Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
                  155                 160                 165

  Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
                  170                 175                 180

  Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
                  185                 190                 195

  Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
                  200                 205                 210

  Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
                  215                 220                 225

  Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
```

230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
260 265 270

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
275 280 285

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
290 295 300

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
305 310 315

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
320 325 330

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
335 340 345

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
350 355 360

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
365 370 375

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
380 385 390

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
395 400 405

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
410 415 420

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
425 430 435

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
440 445 450

<210> 93
<211> 450
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 此序列是合成的

<400> 93
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Glu Phe Ser
20 25 30

Arg Ser Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
35 40 45

Glu Trp Val Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr
50 55 60

Ser Gly Lys Phe Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser
65 70 75

Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
80 85 90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Ser Ser Trp Asp Trp

95 100 105

Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
110 115 120

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser
125 130 135

Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys
140 145 150

Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
155 160 165

Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
170 175 180

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
185 190 195

Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
200 205 210

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
215 220 225

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
245 250 255

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
260 265 270

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
275 280 285

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
290 295 300

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
305 310 315

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
320 325 330

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
335 340 345

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
350 355 360

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
365 370 375

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro
380 385 390

Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Cys Asp Gly
395 400 405

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
410 415 420

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
425 430 435

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
440 445 450

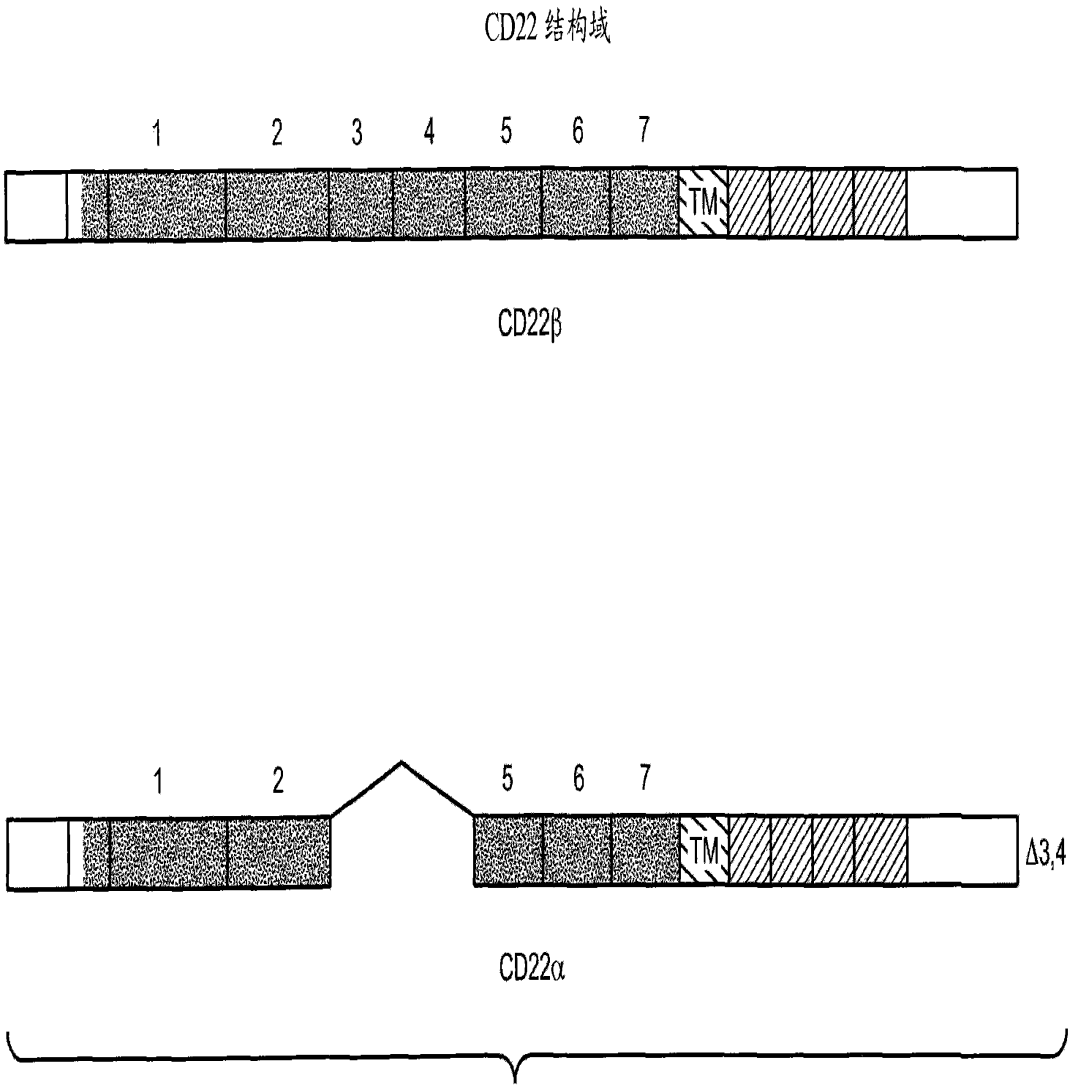


图 1A

```
  1 mhllgpwlll lvleylafsd sskwvfehpe tlyawegacv wipctyrald gdlesfilfh
 61 npeynkntsk fdgtrlyest kdgkvpseqk rvqflgdknk nctlsihpvh lndsgqlglr
121 mesktekwme rihlnvserp fpphiqlppe iqesqevtlt cllnfscygy piqlqwlleg
181 vpmrqaavts tsltiksvft rselkfspqw shhgkivtcq lqdadgkfls ndtvqlnvkh
241 tpkleikvtp sdaivregds vtmtcevsss npeyttvswl kdgtslkkqn tftlnlrevt
301 kdqsgkyccq vsndvqpqrs eevflqvqya pepstvqilh spavegsqve flcmslanpl
361 ptnytwyhng kemqgrteek vhipkilpwh agtyscvaen ilgtgqrgpg aeldvqyppk
421 kvttviqnpm piregdtvtl scnynssnps vtryewkphg aweepslgvl kiqnvgwdnt
481 tiacarcnsw cswaspvaln vqyaprdvrv rkikplseih sgnsvslqcd fssshpkevq
541 ffwekngrll gkesqlnfds ispedagsys cwvnnsigqt askawtlevl yaprrlrvsm
601 spgdqvmegk satltcesda nppvshytwf dwnnqslphh sqklrlepvk vqhsgaywcq
661 gtnsvgkgrs plstltvyys petigrrvav glgsclaili laicglklqr rwkrtqsqqg
721 lqenssgqsf fvrnkkvrra plsegphslg cynpmmedgi syttlrfpem niprtgdaes
781 semqrpprtc ddtvtysalh krqvgdyenv ipdfpedegi hyseliqfgv gerpqaqenv
841 dyvilkh  (SEQ ID NO: 27)
```

图 1B

```
  1 mhllgpwlll lvleylafsd sskwvfehpe tlyawegacv wipctyrald gdlesfilfh
 61 npeynkntsk fdgtrlyest kdgkvpseqk rvqflgdknk nctlsihpvh lndsgqlglr
121 mesktekwme rihlnvserp fpphiqlppe iqesqevtlt cllnfscygy piqlqwlleg
181 vpmrqaavts tsltiksvft rselkfspqw shhgkivtcq lqdadgkfls ndtvqlnvkh
241 ppkkvttviq npmpiregdt vtlscnynss npsvtryewk phgaweepsl gvlkiqnvgw
301 dnttiacaac nswcswaspv alnvqyaprd vrvrkikpls eihsgnsvsl qcdfssshpk
361 evqffwekng rllgkesqln fdsispedag syscwvnnsi gqtaskawtl evlyaprrlr
421 vsmspgdqvm egksatltce sdanppvshy twfdwnnqsl pyhsqklrle pvkvqhsgay
481 wcqgtnsvgk grsplstltv yyspetigrr vavglgscla ililaicglk lqrrwkrtqs
541 qqglqenssg qsffvrnkkv rraplsegph slgcynpmme dgisyttlrf pemniprtgd
601 aessemqrpp pdcddtvtys alhkrqvgtm rtsfqifqkm rgfitqs  (SEQ ID NO:29)
```

图 1C

```
MHLLGPWLLLLEYLAFSDS SKWNIEHPGTIYAWEGACIWVPCTYRVLDGA
LETFILFHNPEYNQNMSKFEGTRLYESTKDGKVPSGQKRVQFLGNKINNNC
TLSIHPVHVNDSGQLGLRMVSKTEKWMERIHLNVSERPFPPRIQLPPKLQE
SQEVTLTCLLNFSCYGYQIQLQWLLEGAPMRQAAVTLTSLSTKSVFTRSEL
KFSPQWSHHGKIVTCELHDVDGKVLSEDTVQLNVKHTPKLTIEVTPNETIV
RKGDSVTMTCKVNSSNPEYTTVSWLKDDIPLKEQNTLMLTLHEVTKSQTGT
YCCRVSNDVGPATSEKVFLQVQYAPEPSRVQISQSPAVEGSEVNFLCISPA
NPLPTNYTWYHNGKEVQGRTEKQFQIQKILPWHAGTYSCVAENILGIGERG
PGTELDVQYPPKKVTMVIENPTPIREGDTVTLSCNYSSSNPIVNHYEWRPR
GAWEEPSLGVLKIQNIGWNNTAVACAACNNWCSWASPVTLNVLYAPRGVRV
RKIKPLSEIHSGNLVSLQCDFSSSHPKEVQFFWEKNGSLLGKESQLNFDSI
SPEDAGSYSCWVNNSIGQTASKAWTLEVLYAPRRLRVSMSQGNQVMEGKTA
ILTCESDANPPVYSYAWFDWNNQSLPYSGRMLRLEPVKVQHSGAYWCQGTN
RVGKGHSPLITLTVYYSPETIGRRVAVGLGSCLAILILAMCGFKVQRRWKR
TQSQQGLQENSSGQSFFVRNKKVRRTPLSEGPHSLGCYNPMMEDGISYATL
RFPETNTPRTGDAETSELQRLPPDCDDTVTYSVLQKRQVGDYENVIPDFPE
DEGIHYSELIQFGFGERPQAQENVDYVIVKH  (SEQ ID NO:31)
```

图 1D

抗 CD22 10F4 变体的重链可变域序列比对

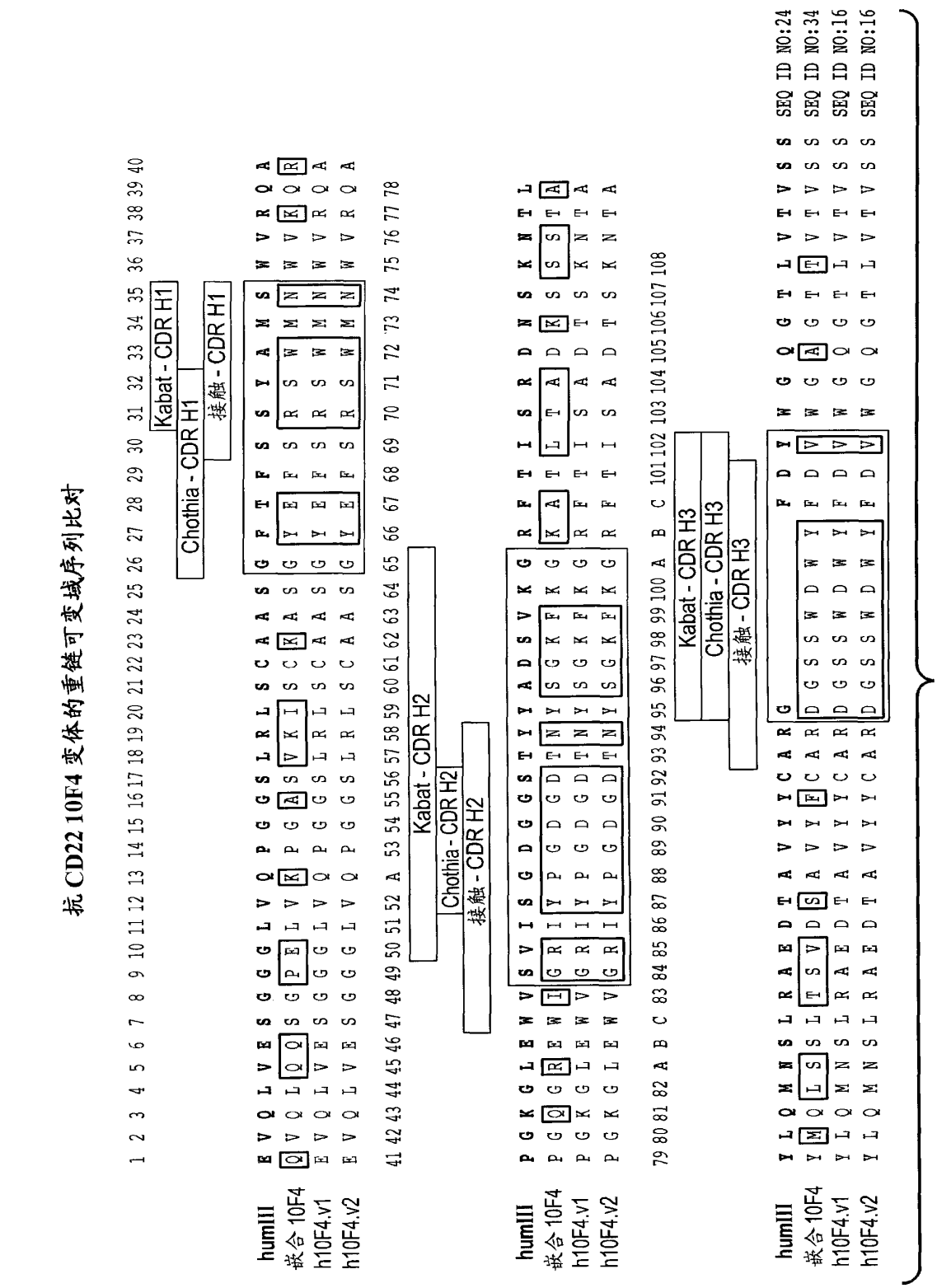


图 2A

抗 CD22 10F4 变体的轻链可变域序列比对

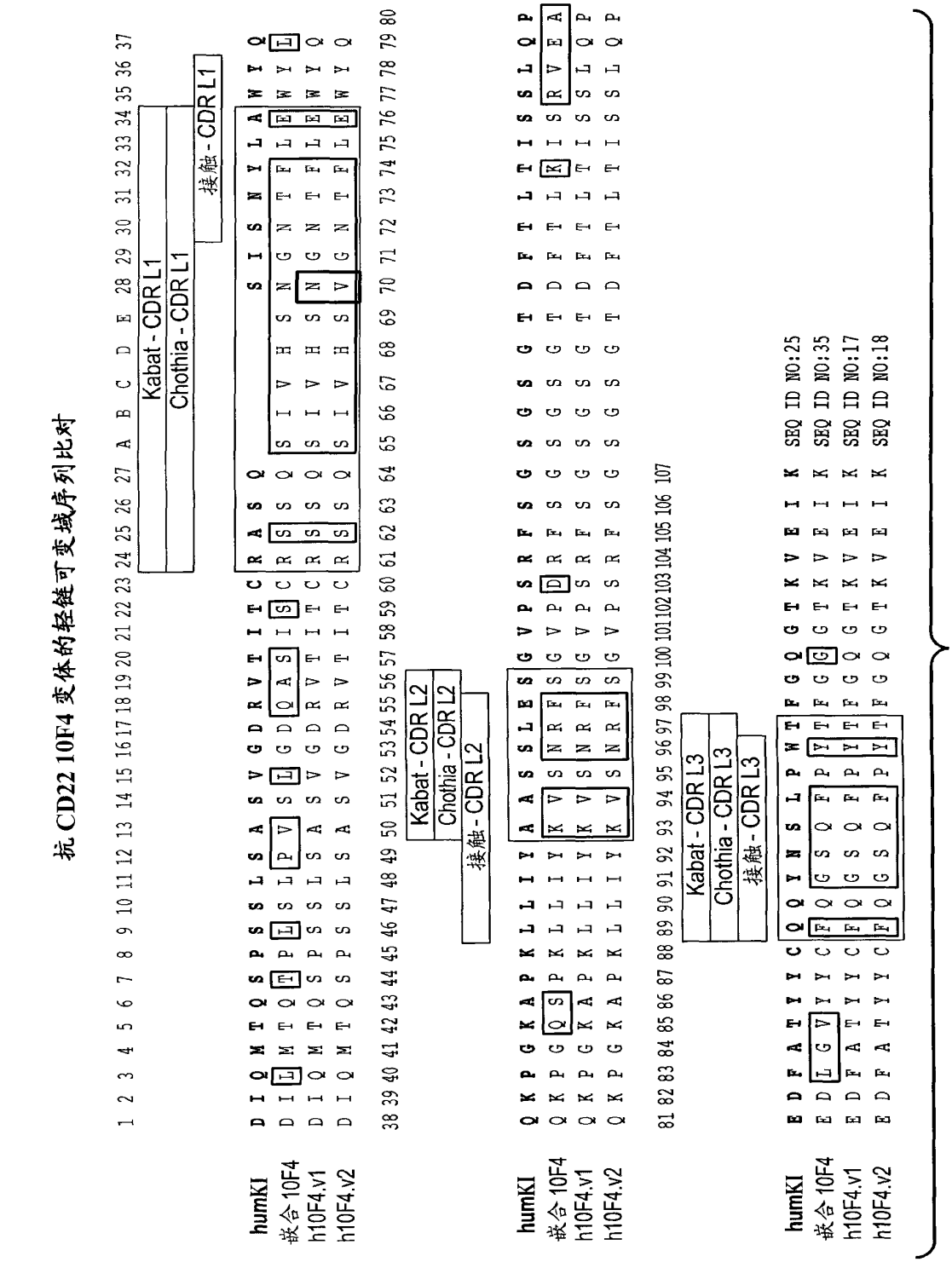


图 2B

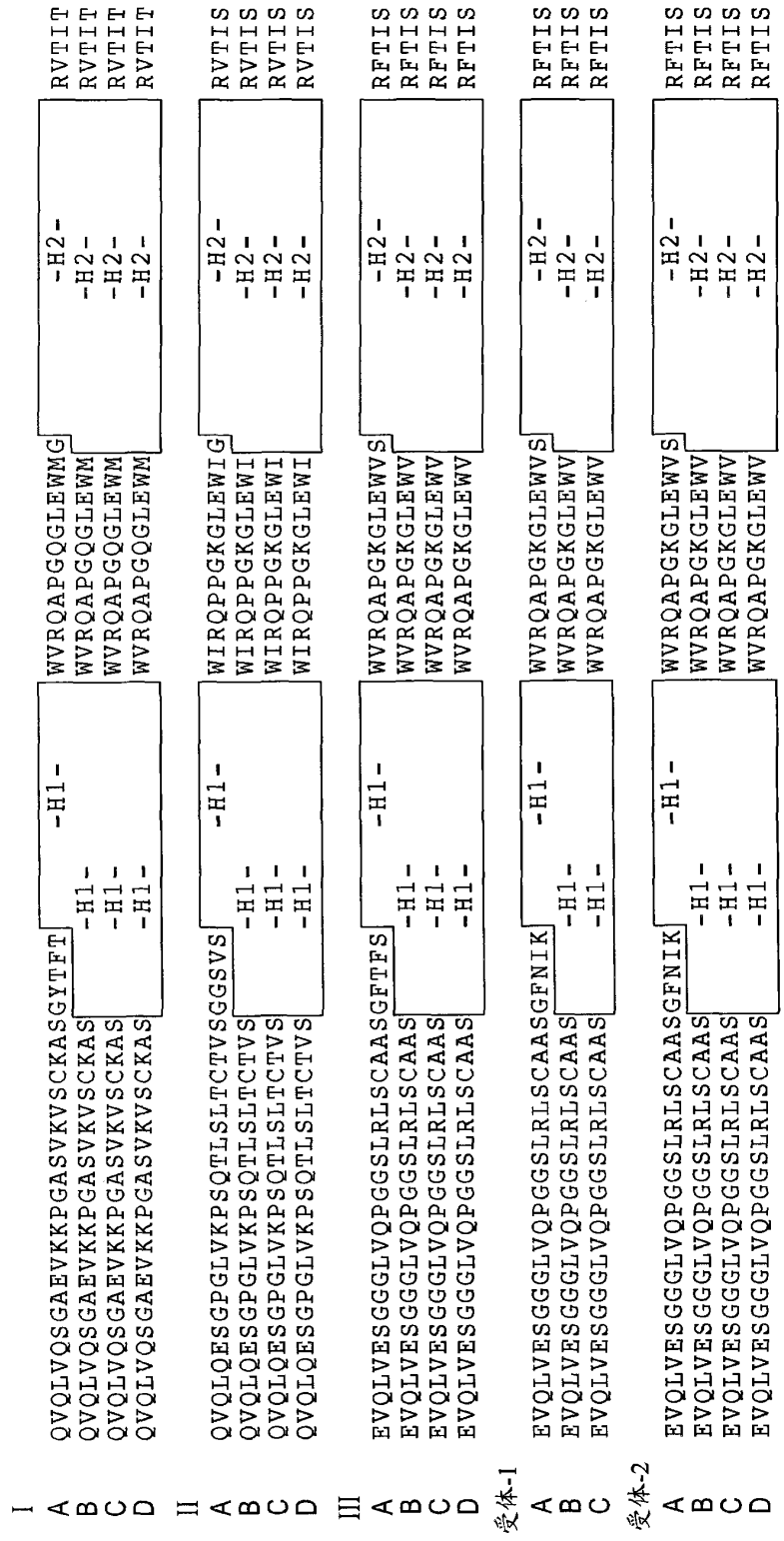

I
A QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT -H1- WVRQAPGQGLEWMG -H2- RVTIT
B QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS -H1- WVRQAPGQGLEWM -H2- RVTIT
C QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS -H1- WVRQAPGQGLEWM -H2- RVTIT
D QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS -H1- WVRQAPGQGLEWM -H2- RVTIT
II
A QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSVS -H1- WIRQPPGKGLEWIG -H2- RVTIS
B QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVS -H1- WIRQPPGKGLEWI -H2- RVTIS
C QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVS -H1- WIRQPPGKGLEWI -H2- RVTIS
D QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVS -H1- WIRQPPGKGLEWI -H2- RVTIS
III
A EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS -H1- WVRQAPGKGLEWVS -H2- RFTIS
B EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS -H1- WVRQAPGKGLEWV -H2- RFTIS
C EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS -H1- WVRQAPGKGLEWV -H2- RFTIS
D EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS -H1- WVRQAPGKGLEWV -H2- RFTIS
受体-1
A EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIK -H1- WVRQAPGKGLEWVS -H2- RFTIS
B EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS -H1- WVRQAPGKGLEWV -H2- RFTIS
C EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS -H1- WVRQAPGKGLEWV -H2- RFTIS
受体-2
A EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIK -H1- WVRQAPGKGLEWVS -H2- RFTIS
B EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS -H1- WVRQAPGKGLEWV -H2- RFTIS
C EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS -H1- WVRQAPGKGLEWV -H2- RFTIS
D EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS -H1- WVRQAPGKGLEWV -H2- RFTIS

图 3A

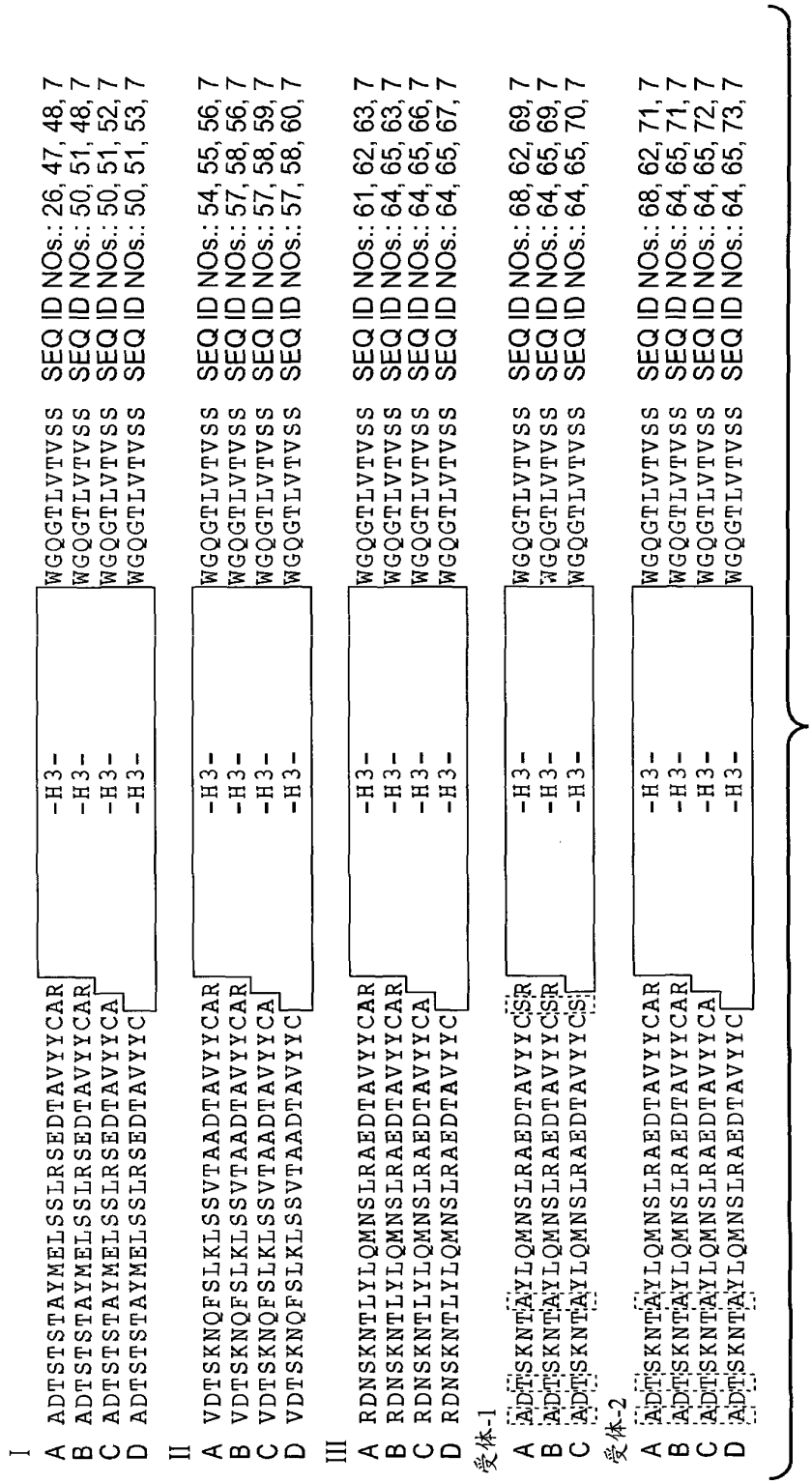

I
A ADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR -H3- WGQGTLVTVSS SEQ ID NOs:. 26, 47, 48, 7
B ADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR -H3- WGQGTLVTVSS SEQ ID NOs:. 50, 51, 48, 7
C ADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCA -H3- WGQGTLVTVSS SEQ ID NOs:. 50, 51, 52, 7
D ADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYC -H3- WGQGTLVTVSS SEQ ID NOs:. 50, 51, 53, 7
II
A VDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR -H3- WGQGTLVTVSS SEQ ID NOs:. 54, 55, 56, 7
B VDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR -H3- WGQGTLVTVSS SEQ ID NOs:. 57, 58, 56, 7
C VDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCA -H3- WGQGTLVTVSS SEQ ID NOs:. 57, 58, 59, 7
D VDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYC -H3- WGQGTLVTVSS SEQ ID NOs:. 57, 58, 60, 7
III
A RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR -H3- WGQGTLVTVSS SEQ ID NOs:. 61, 62, 63, 7
B RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR -H3- WGQGTLVTVSS SEQ ID NOs:. 64, 65, 63, 7
C RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA -H3- WGQGTLVTVSS SEQ ID NOs:. 64, 65, 66, 7
D RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC -H3- WGQGTLVTVSS SEQ ID NOs:. 64, 65, 67, 7
受体-1
A ADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSR -H3- WGQGTLVTVSS SEQ ID NOs:. 68, 62, 69, 7
B ADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSR -H3- WGQGTLVTVSS SEQ ID NOs:. 64, 65, 69, 7
C ADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCS -H3- WGQGTLVTVSS SEQ ID NOs:. 64, 65, 70, 7
受体-2
A ADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR -H3- WGQGTLVTVSS SEQ ID NOs:. 68, 62, 71, 7
B ADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR -H3- WGQGTLVTVSS SEQ ID NOs:. 64, 65, 71, 7
C ADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCA -H3- WGQGTLVTVSS SEQ ID NOs:. 64, 65, 72, 7
D ADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC -H3- WGQGTLVTVSS SEQ ID NOs:. 64, 65, 73, 7

图 3B

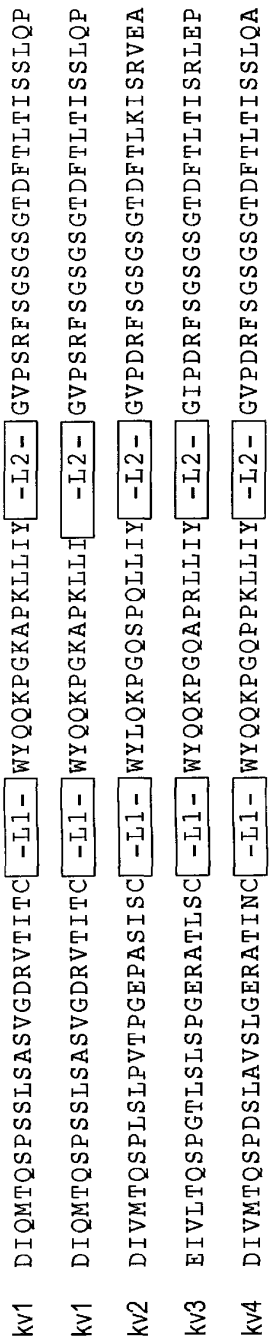

kv1 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC -L1- WYQQKPGKAPKLLIY -L2- GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP
kv1 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC -L1- WYQQKPGKAPKLLI -L2- GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP
kv2 DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISC -L1- WYLQKPGQSPQLLIY -L2- GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEA
kv3 EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC -L1- WYQQKPGQAPRLLIY -L2- GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEP
kv4 DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC -L1- WYQQKPGQPPKLLIY -L2- GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQA

图 4A

kv1 EDFATYYC -L3- FGQGTKVEIK SEQ ID NOs.: 74, 75, 76, 77
kv1 EDFATYYC -L3- FGQGTKVEIK SEQ ID NOs.: 74, 78, 76, 77
kv2 EDVGVYYC -L3- FGQGTKVEIK SEQ ID NOs.: 49, 79, 80, 77
kv3 EDFAVYYC -L3- FGQGTKVEIK SEQ ID NOs.: 81, 82, 83, 77
kv4 EDVAVYYC -L3- FGQGTKVEIK SEQ ID NOs.: 84, 85, 86, 77

图 4B

```
          230        240        250        260        270
humIgG1     PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV
humIgG2     PAP-PVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYV
humIgG3     PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYV
humIgG4     PAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYV
               ****                                 *     * *

          280        290        300        310        320
humIgG1     DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
humIgG2     DGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP
humIgG3     DGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP
humIgG4     DGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP
                           *   *         *                   *

          330        340        350        360        370
humIgG1     APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
                                          D L
humIgG2     APIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
humIgG3     APIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
humIgG4     SSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
            **        *                  *

          380        390        400        410        420
humIgG1     EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH
humIgG2     EWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH
humIgG3     EWESSGQPENNYNTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFSCSVMH
humIgG4     EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMH
              *        *    *            *          *   *

          430        440
humIgG1     EALHNHYTQKSLSLSPGK  SEQ ID NO.: 38
humIgG2     EALHNHYTQKSLSLSPGK  SEQ ID NO.: 39
humIgG3     EALHNRFTQKSLSLSPGK  SEQ ID NO.: 40
humIgG4     EALHNHYTQKSLSLSLGK  SEQ ID NO.: 41
              **         *
```

κ 轻链恒定区共有序列:

```
RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK
VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKV
YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC  SEQ ID NO: 37
```

图 5A

抗-CD22 h10F4v2 轻链

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQSIVHSVGNTFLEWYQQKPGKAPKLLI
YKVSNRFSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCFQGSQFPYTFGQG
TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL
QSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK
SFNRGEC (SEQ ID NO:87)

抗-CD22 h10F4v2 重链

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYEFSRSWMNWVRQAPGKGLEWVGRIYP
GDGDTNYSGKFKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGSSWDWY
FDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV
SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT
KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN
GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL
VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:88)

图 5B

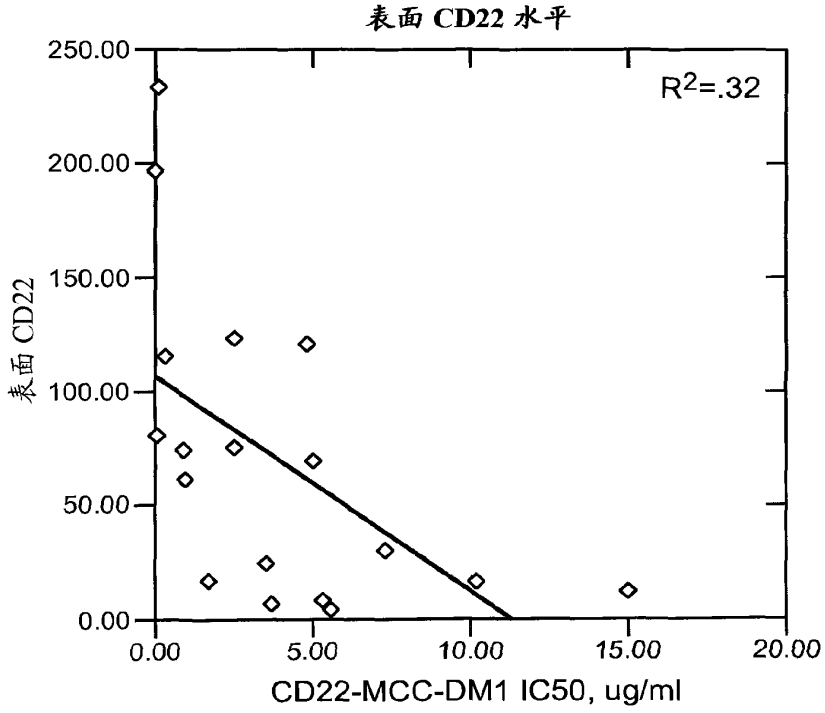

表面 CD22 水平
250.00
200.00
150.00
100.00
50.00
0.00
表面 CD22
R2=.32
0.00
5.00
10.00
15.00
20.00
CD22-MCC-DM1 IC50, ug/ml

图 6A

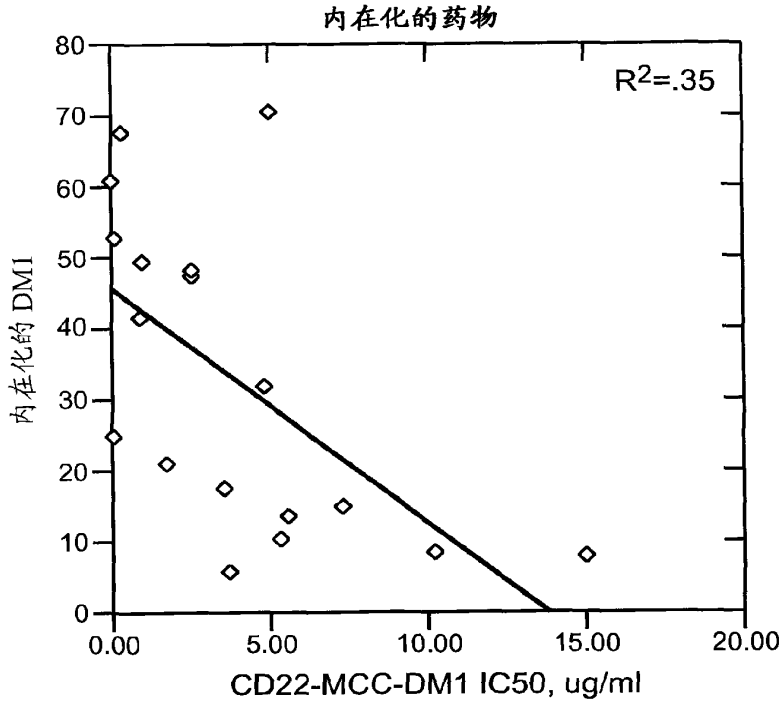

内在化的药物
80
70
60
50
40
30
20
10
0
内在化的 DM1
R2=.35
0.00
5.00
10.00
15.00
20.00
CD22-MCC-DM1 IC50, ug/ml

图 6B

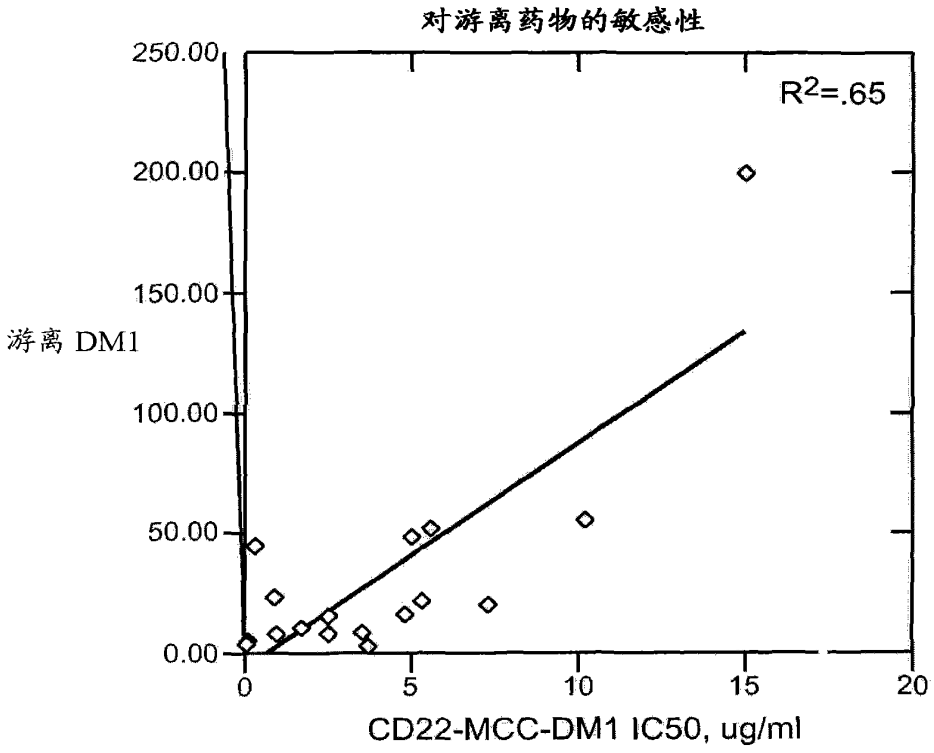

对游离药物的敏感性
250.00
200.00
150.00
100.00
50.00
0.00
游离 DM1
R^2=.65
0
5
10
15
20
CD22-MCC-DM1 IC50, ug/ml

图 6C

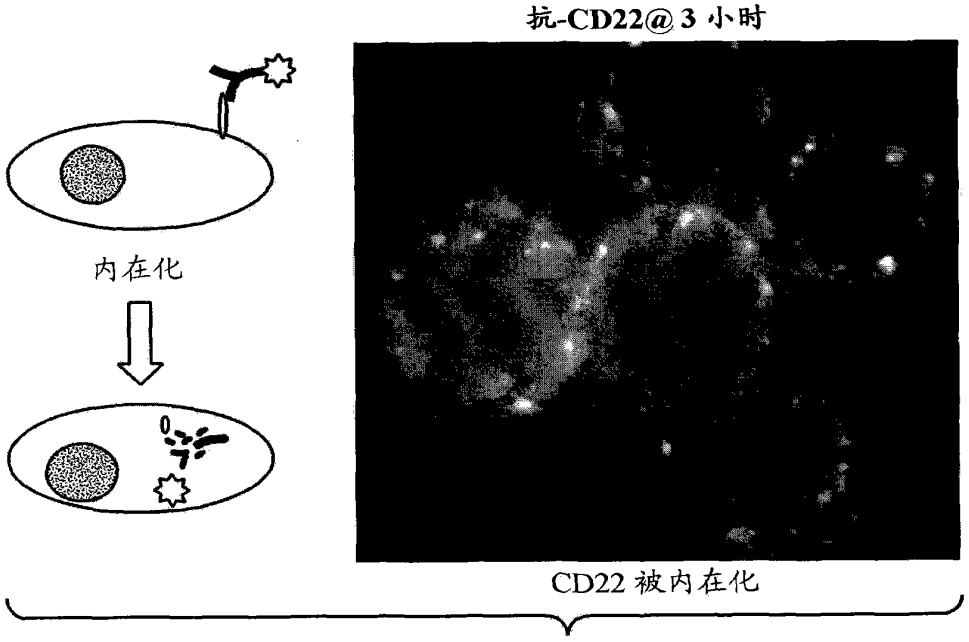

抗-CD22@3 小时
内在化
CD22 被内在化

图 6D

BJAB-luc 异种移植物模型中的抗 CD22(10F4v1)-smcc-DM1

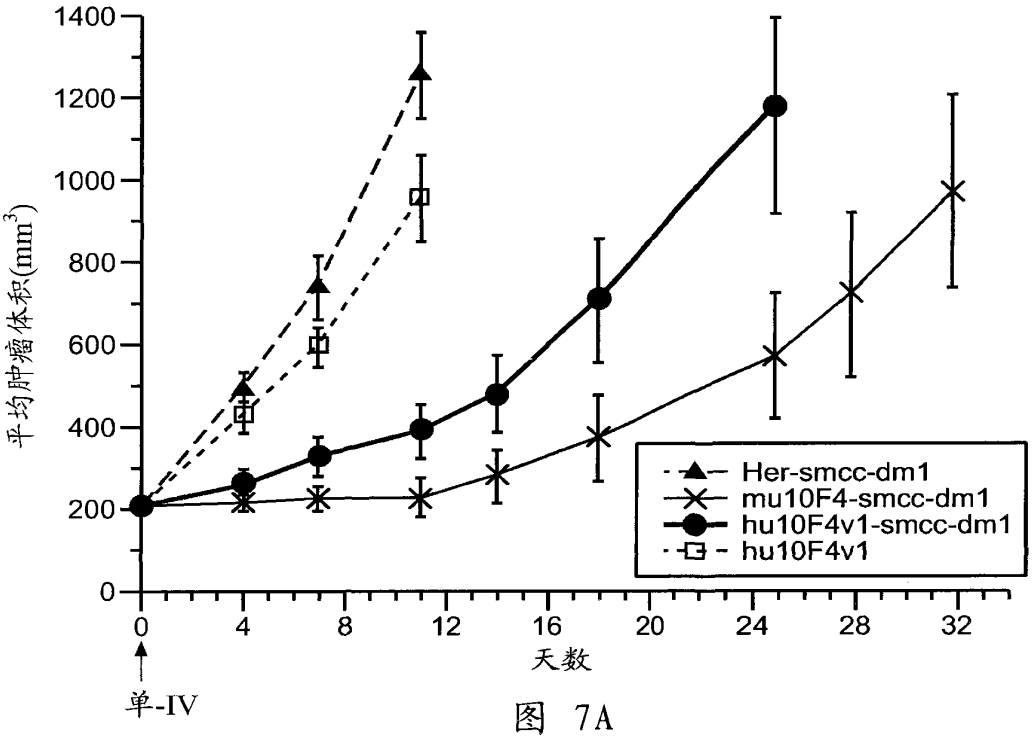


图 7A

BJAB-luc 异种移植物模型中的抗 CD22(10F4v2)-smcc-DM1 和裸抗体

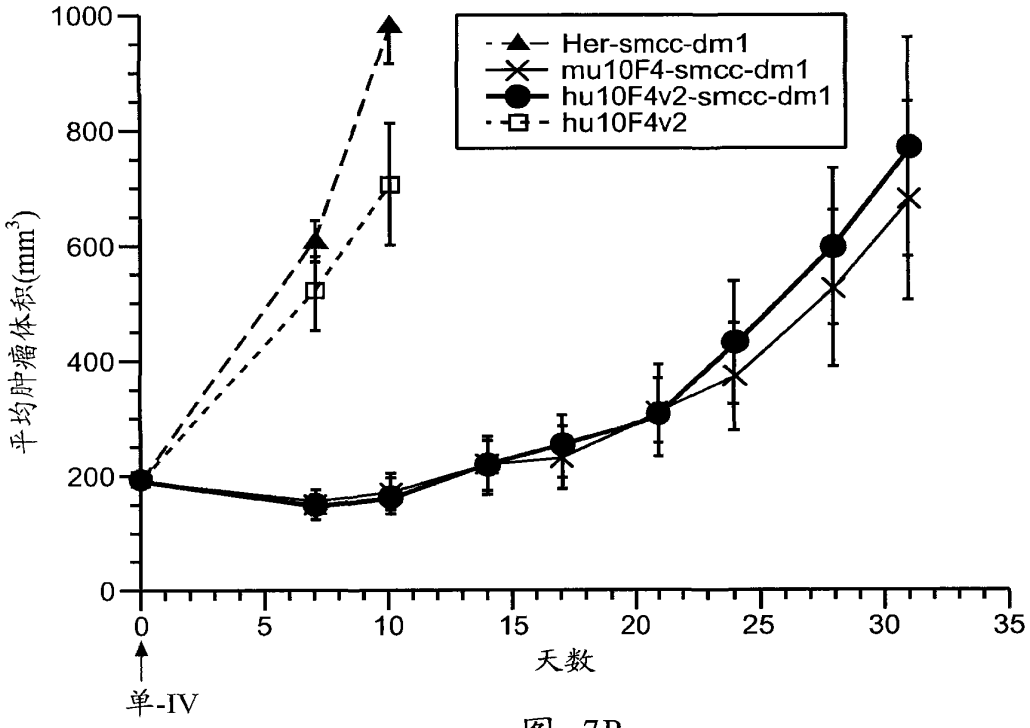


图 7B

BJAB-luc 异种移植物模型中的抗 CD22-spp-DM1 和-smcc-DM1

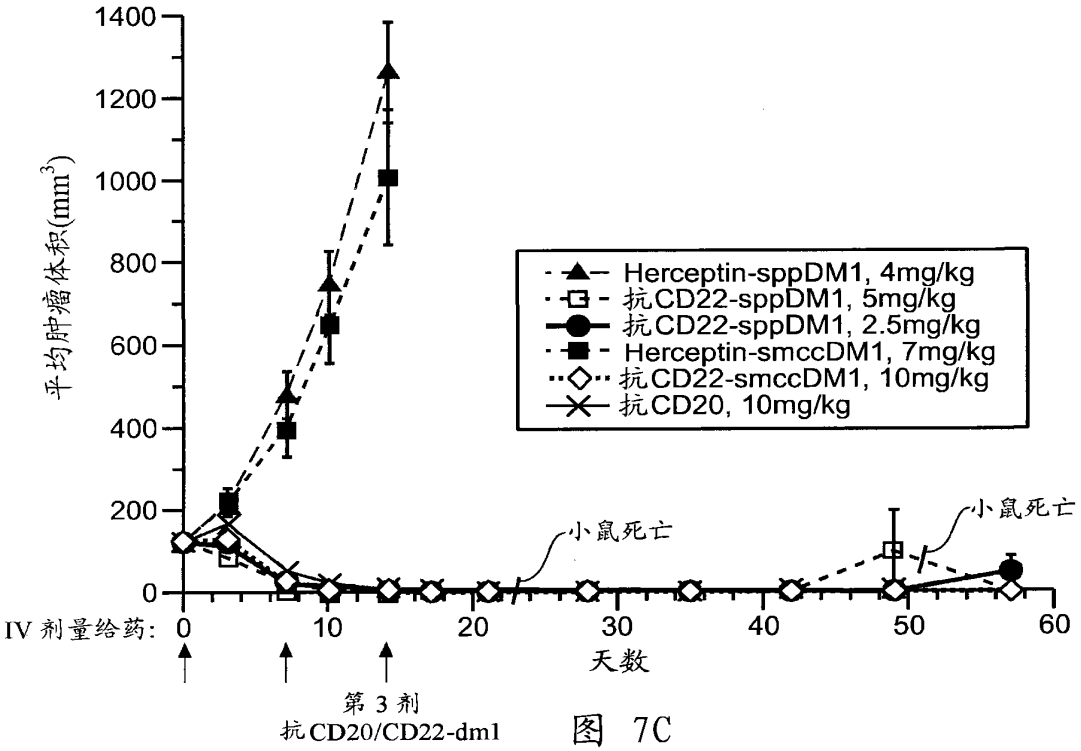


图 7C

Ramos 异种移植物模型中的抗 CD22-smcc-DM1

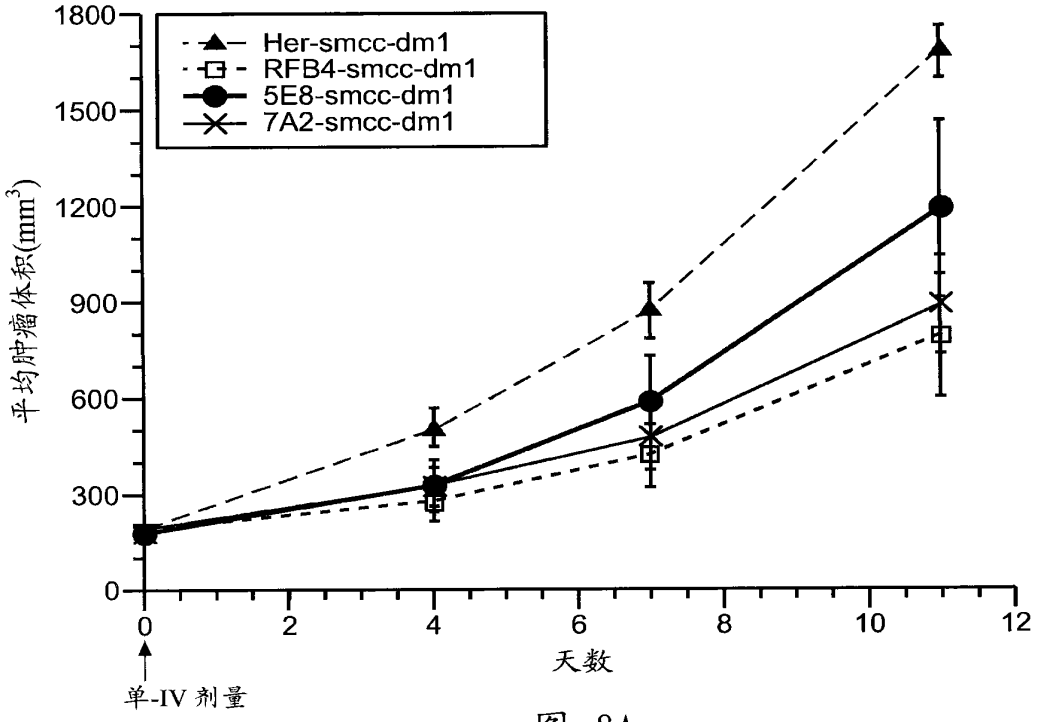


图 8A

BJAB-luc 异种移植物模型中的抗 CD22-smcc-DM1

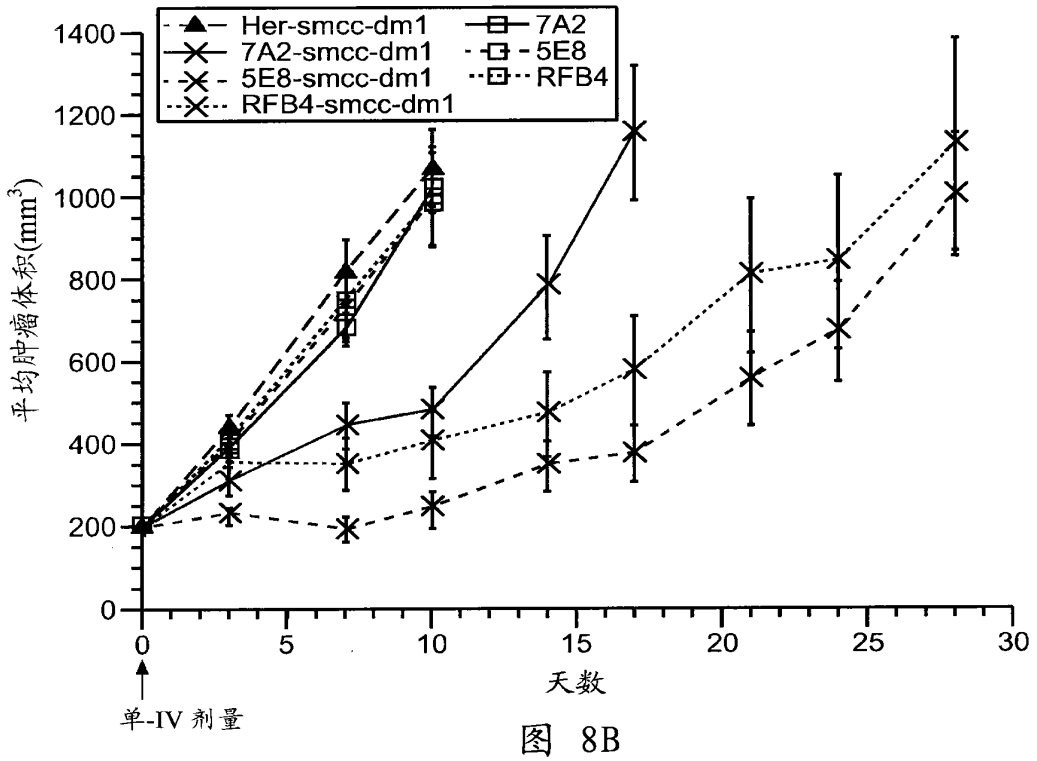


图 8B

抗 CD22(RFB4)-smcc-DM1, BJAB-luc 异种移植物模型中的各种药物负载

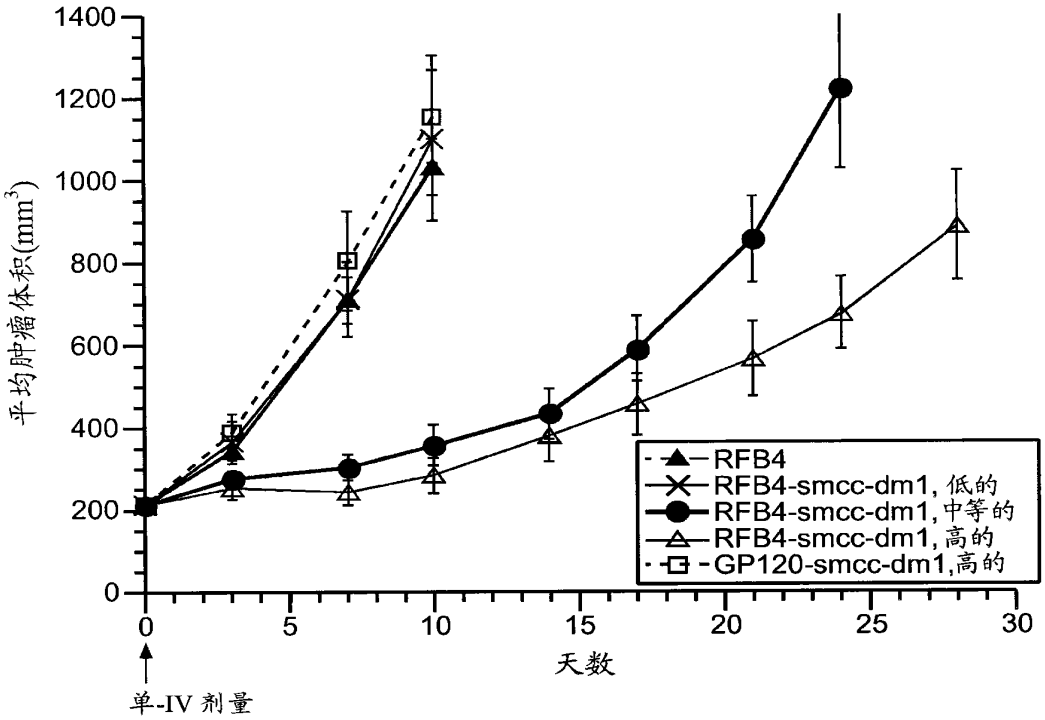


图 9

OnCusp
Ex. 1002

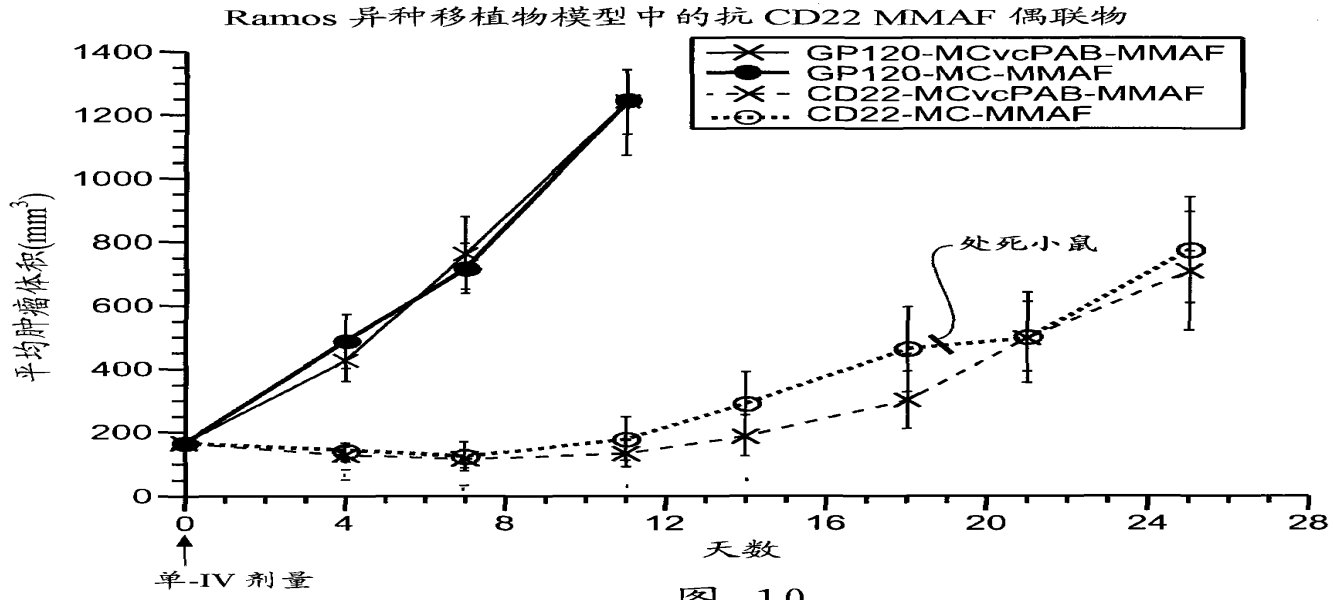


图 10

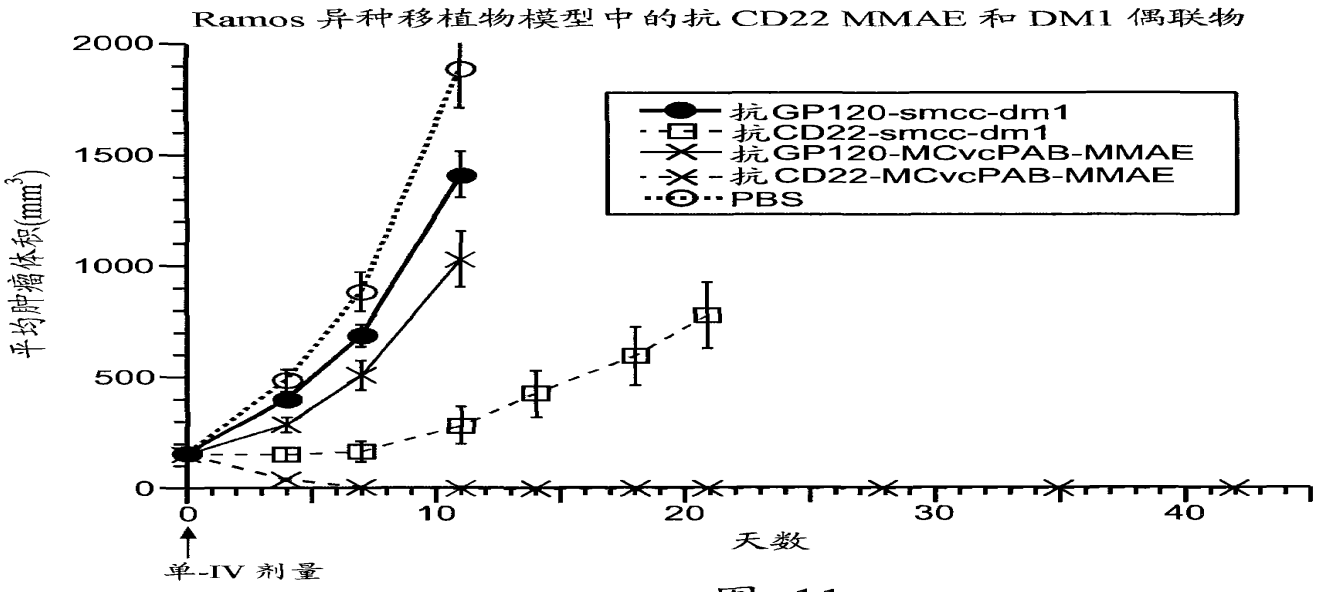


图 11

6988 of 14295

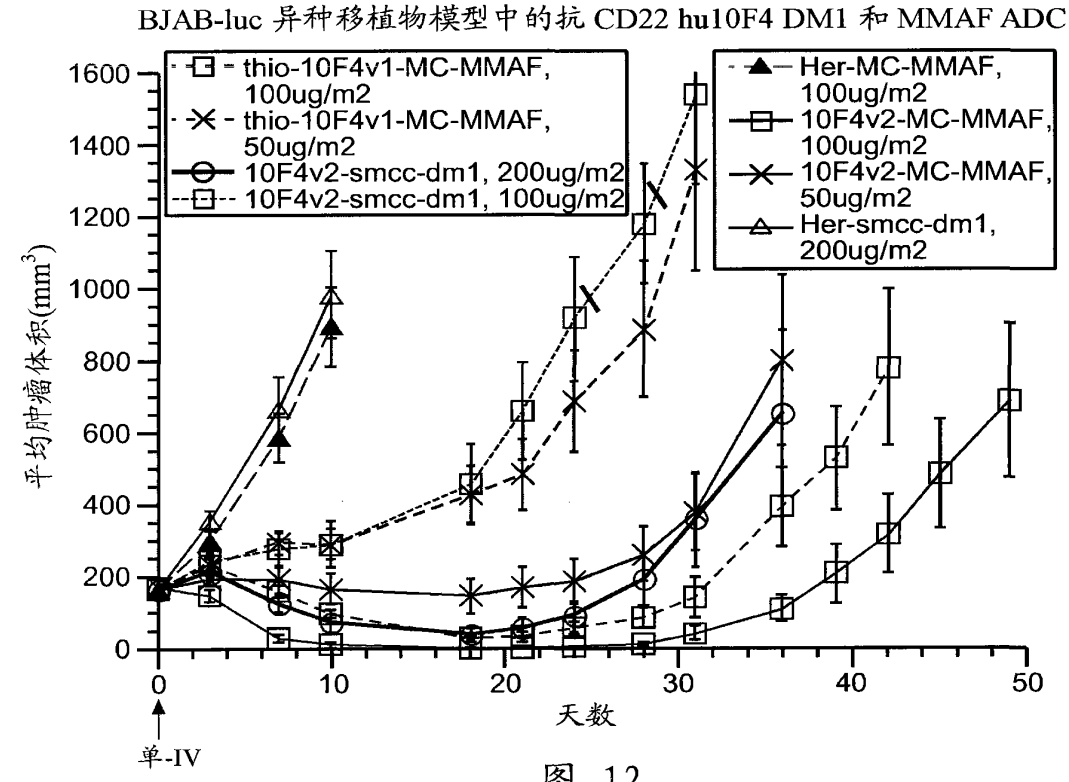

BJAB-luc 异种移植物模型中的抗 CD22 hu10F4 DM1 和 MMAF ADC
thio-10F4v1-MC-MMAF, 100ug/m2
thio-10F4v1-MC-MMAF, 50ug/m2
10F4v2-smcc-dm1, 200ug/m2
10F4v2-smcc-dm1, 100ug/m2
Her-MC-MMAF, 100ug/m2
10F4v2-MC-MMAF, 100ug/m2
10F4v2-MC-MMAF, 50ug/m2
Her-smcc-dm1, 200ug/m2
平均肿瘤体积(mm3)
天数
单-IV

图 12

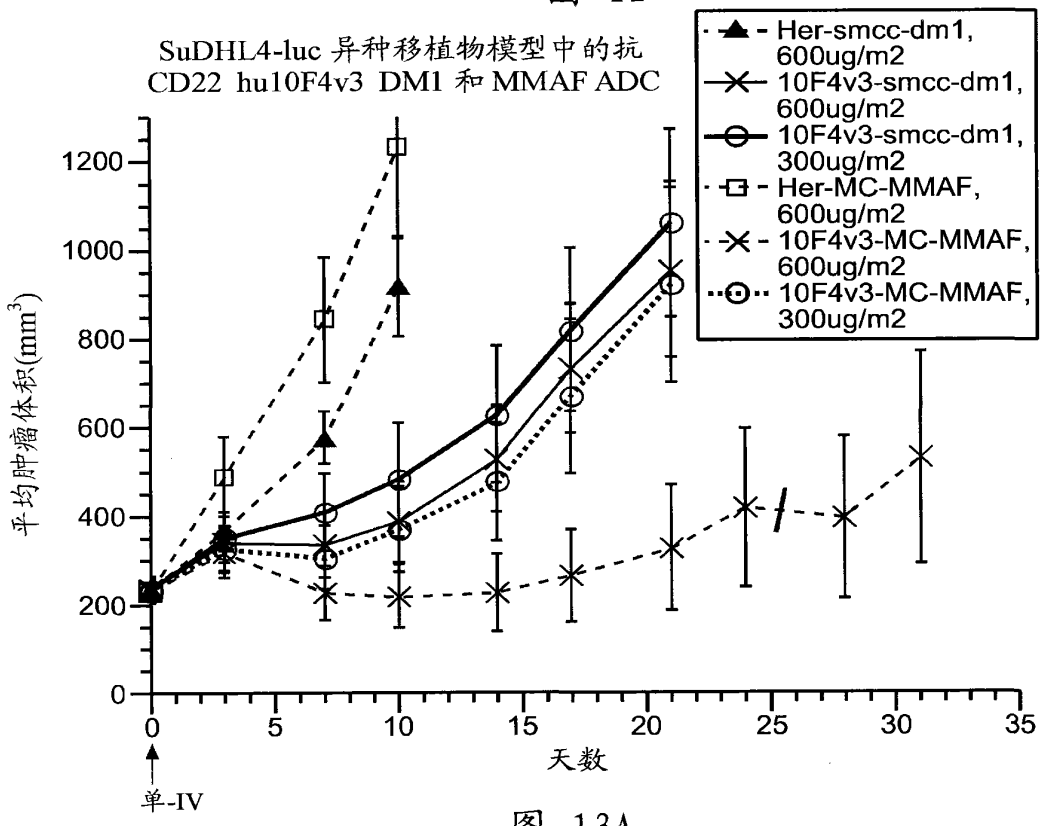

SuDHL4-luc 异种移植物模型中的抗 CD22 hu10F4v3 DM1 和 MMAF ADC
Her-smcc-dm1, 600ug/m2
10F4v3-smcc-dm1, 600ug/m2
10F4v3-smcc-dm1, 300ug/m2
Her-MC-MMAF, 600ug/m2
10F4v3-MC-MMAF, 600ug/m2
10F4v3-MC-MMAF, 300ug/m2
平均肿瘤体积(mm3)
天数
单-IV

图 13A

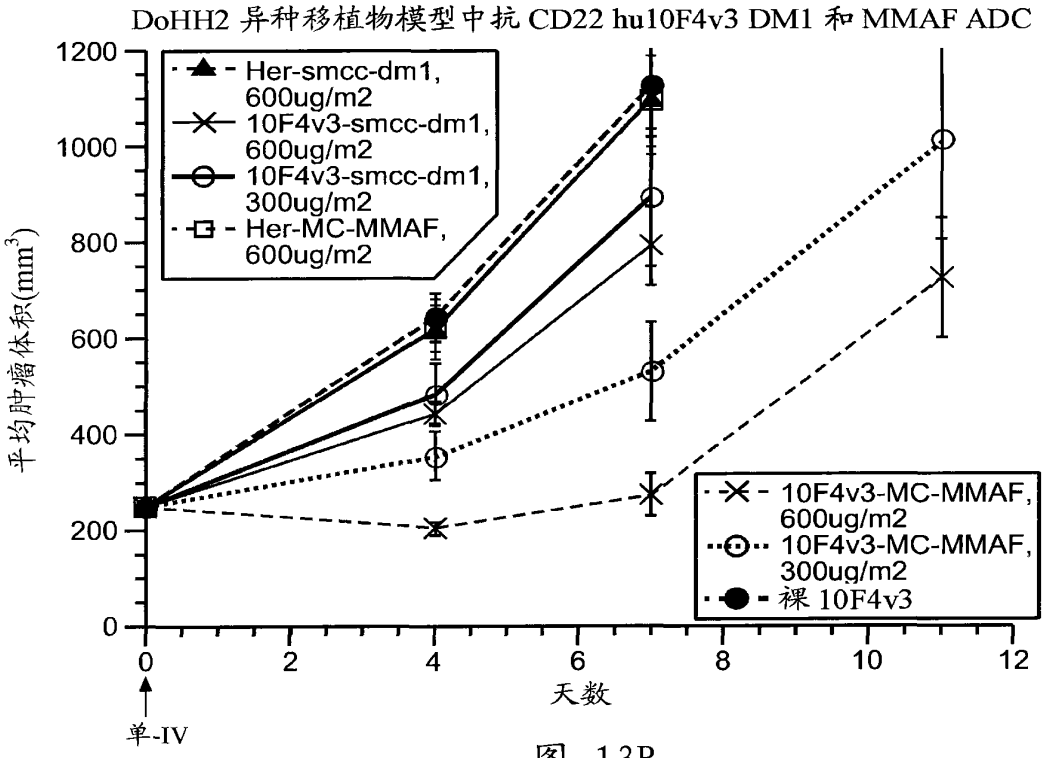

DoHH2 异种移植物模型中抗 CD22 hu10F4v3 DM1 和 MMAF ADC
Her-smcc-dm1, 600ug/m2
10F4v3-smcc-dm1, 600ug/m2
10F4v3-smcc-dm1, 300ug/m2
Her-MC-MMAF, 600ug/m2
10F4v3-MC-MMAF, 600ug/m2
10F4v3-MC-MMAF, 300ug/m2
裸 10F4v3
平均肿瘤体积(mm3)
天数
单-IV

图 13B

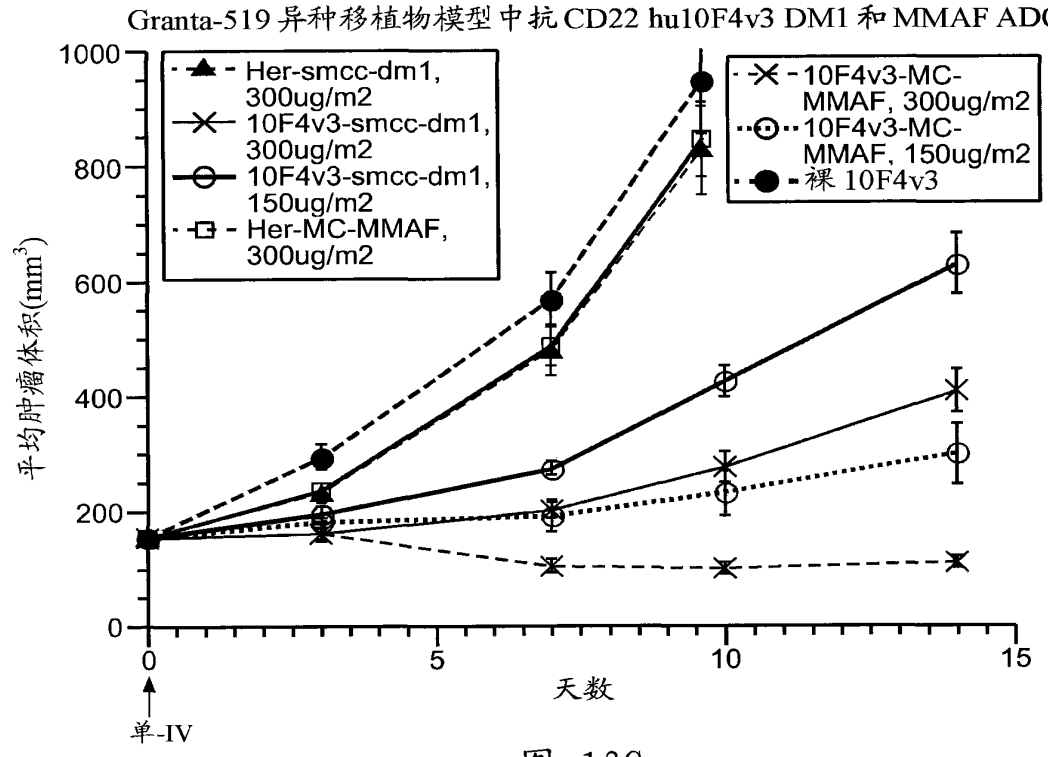

Granta-519 异种移植物模型中抗 CD22 hu10F4v3 DM1 和 MMAF ADC
Her-smcc-dm1, 300ug/m2
10F4v3-smcc-dm1, 300ug/m2
10F4v3-smcc-dm1, 150ug/m2
Her-MC-MMAF, 300ug/m2
10F4v3-MC-MMAF, 300ug/m2
10F4v3-MC-MMAF, 150ug/m2
裸 10F4v3
平均肿瘤体积(mm3)
天数
单-IV

图 13C

用于表位绘图的 CD22 结构域删除

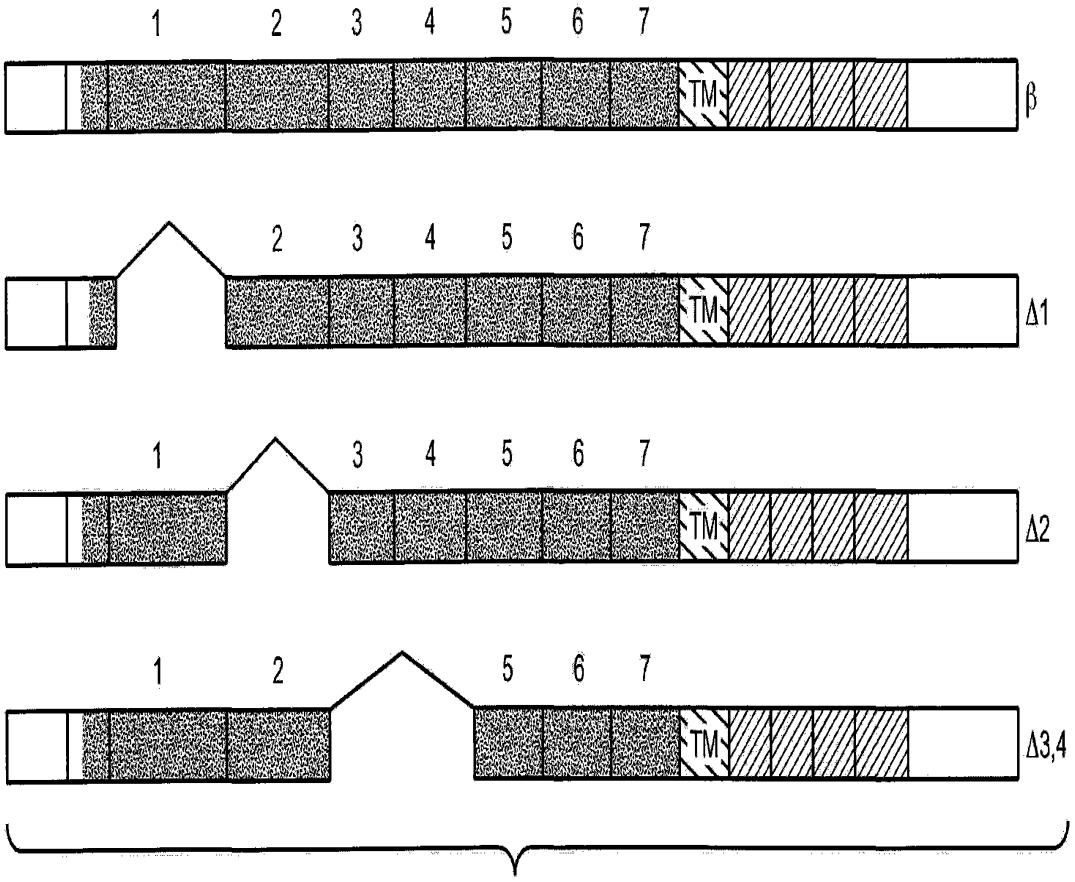


图 14

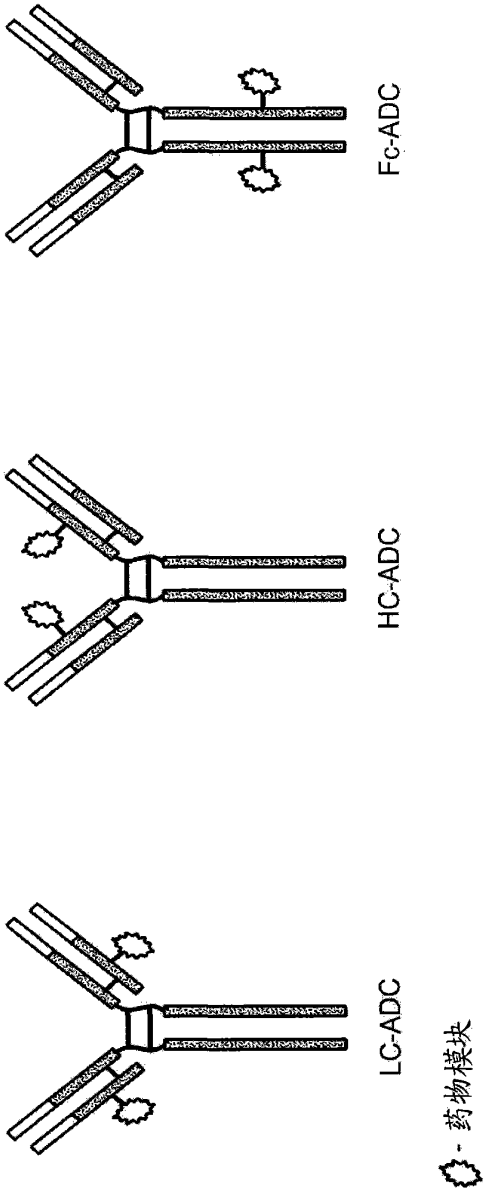


图 15

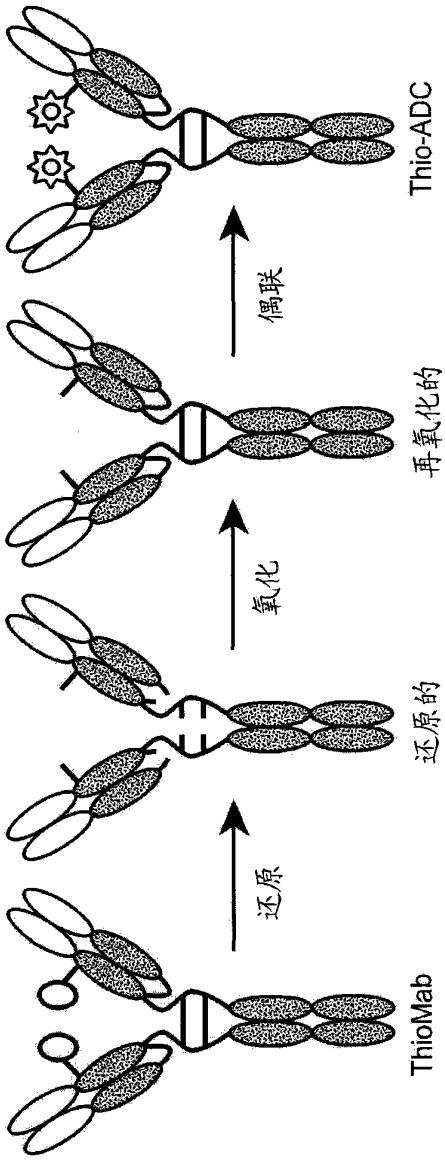


图 16

抗 CD22 V205C h10F4v3 半胱氨酸改造的轻链

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQSIVHSVGNTFLEWYQQKPGKAPKLLI
YKVSNRFSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCFQGSQFPYTFGQG
TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL
QSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPCTK
SFNRGEC (SEQ ID NO:91)

图 17A

抗 CD22 A118C h10F4v3 半胱氨酸改造的重链

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYEFSRSWMNWVRQAPGKGLEWVGRIYP
GDGDTNYSGKFKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGSSWDWY
FDVWGQGTLVTVSSCSTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV
SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT
KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN
GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL
VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:92)

图 17B

抗 CD22 S400C h10F4v3 半胱氨酸改造的 Fc 区

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYEFSRSWMNWVRQAPGKGLEWVGRIYP
GDGDTNYSGKFKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGSSWDWY
FDVWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV
SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT
KVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN
GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL
VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDCDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:93)

图 17C

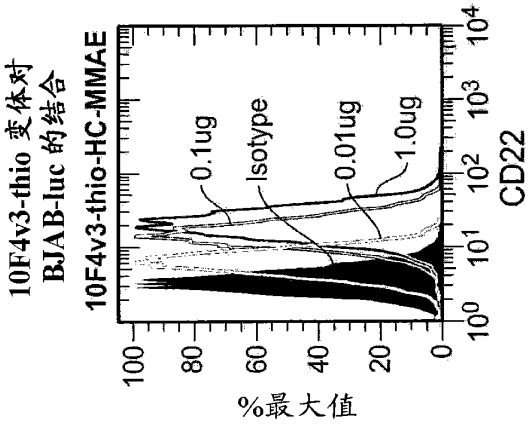


图 18A

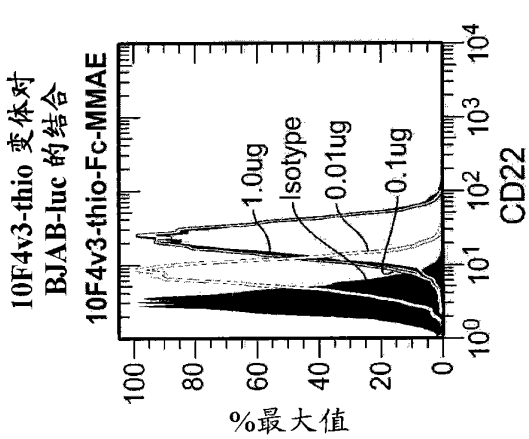


图 18B

图 18C

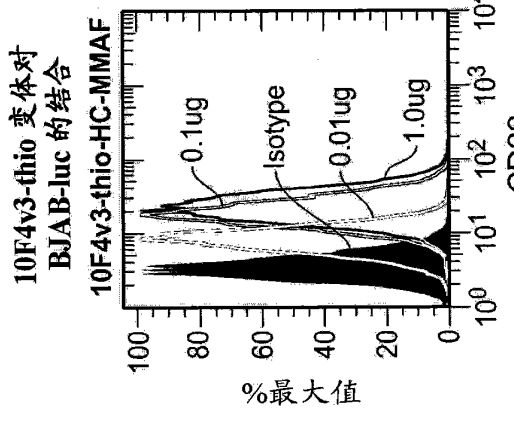


图 18D

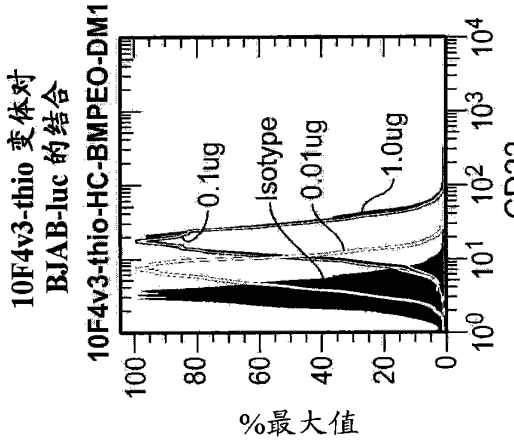


图 18E

对 SCID 小鼠中 Granta-519 异种移植物施用的抗 CD22 TDC 的效果

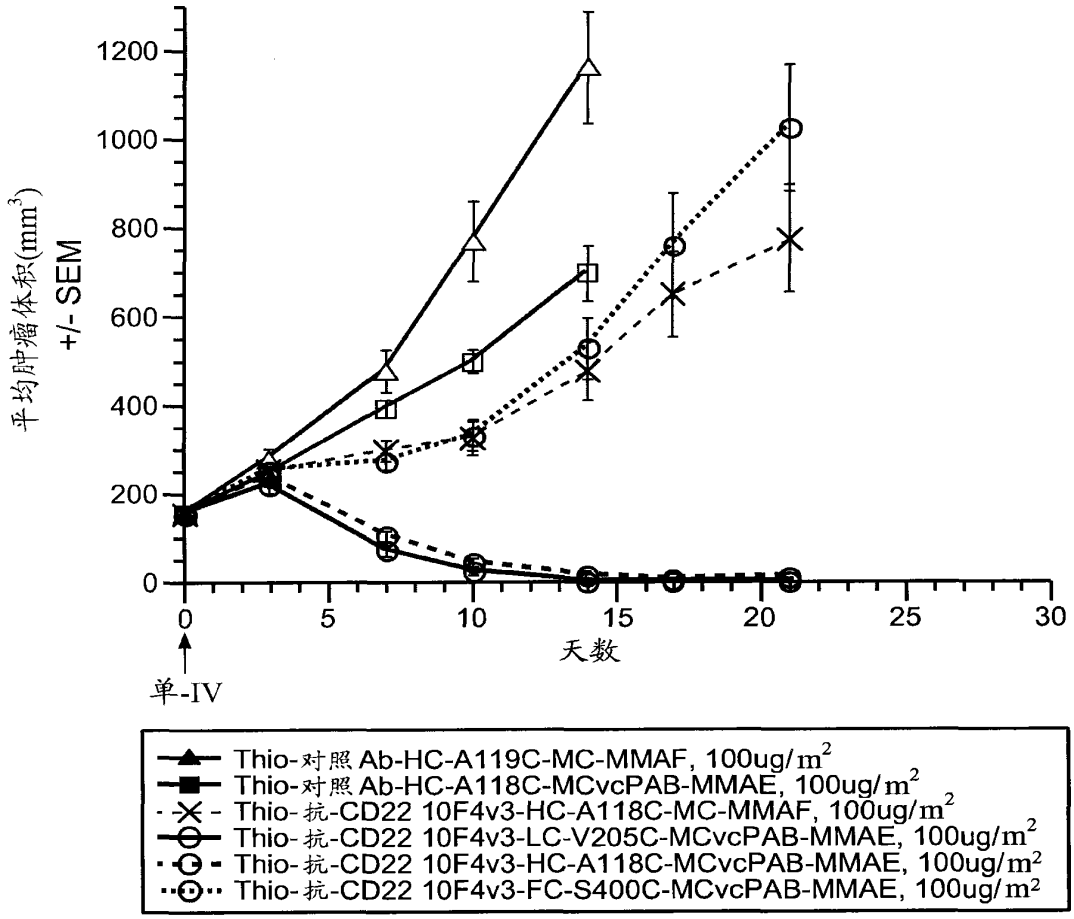


图 19

OnCusp
Ex. 1002

抗 CD22 thio HC(A118C) 10F4v3-BMPEO-DM1，-MCvcPAB-MMAE 和-MC-MMAF 对 CB17 SCID 小鼠中的人套细胞淋巴瘤 Granta-519 异种移植物

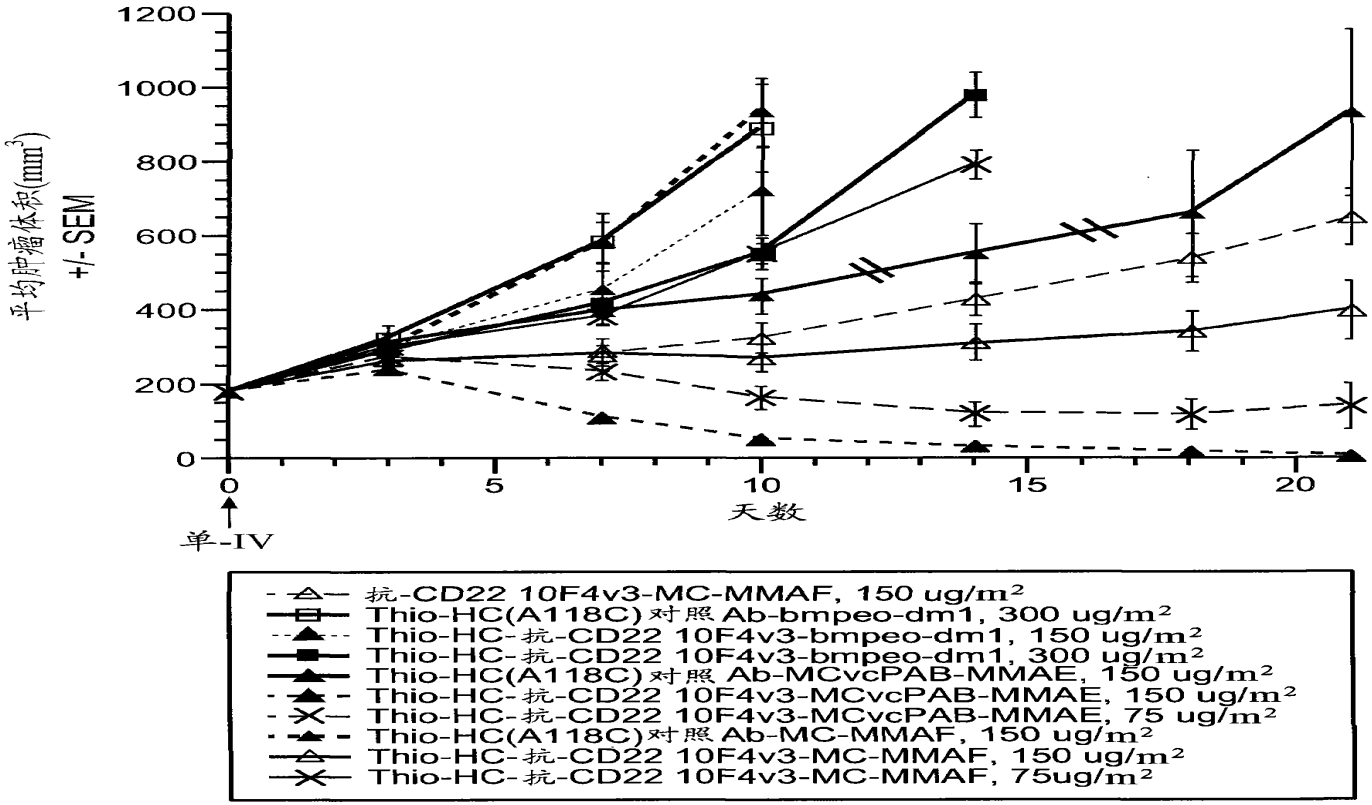


图 20A

6996 of 14295

Thio-HC-A121C-抗-CD22 10F4v3-bmpeo-dm1, -MCvcPAB-MMAE 和 -MC-MMAF 对 CB17 SCID 小鼠中的滤泡性淋巴瘤 DOHH2 异种移植物

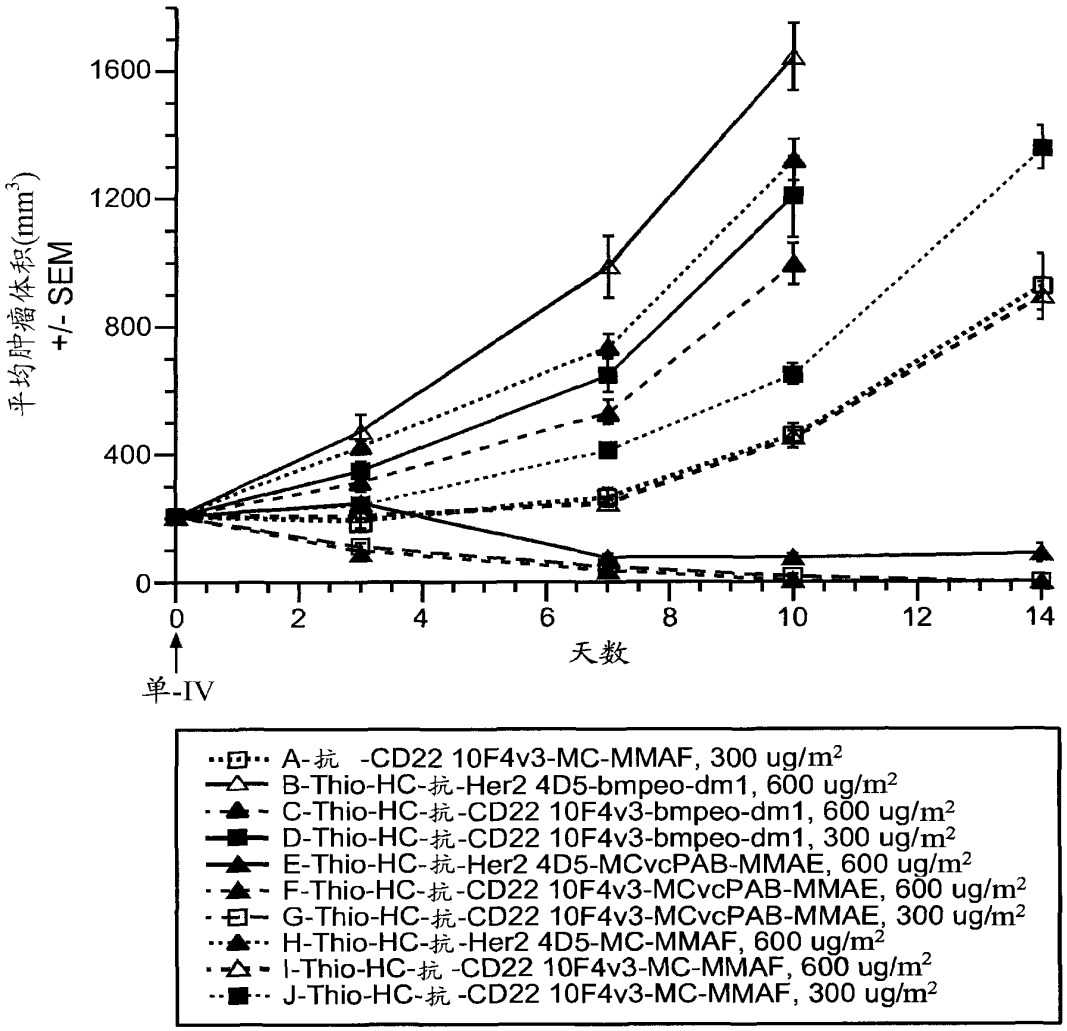


图 20B

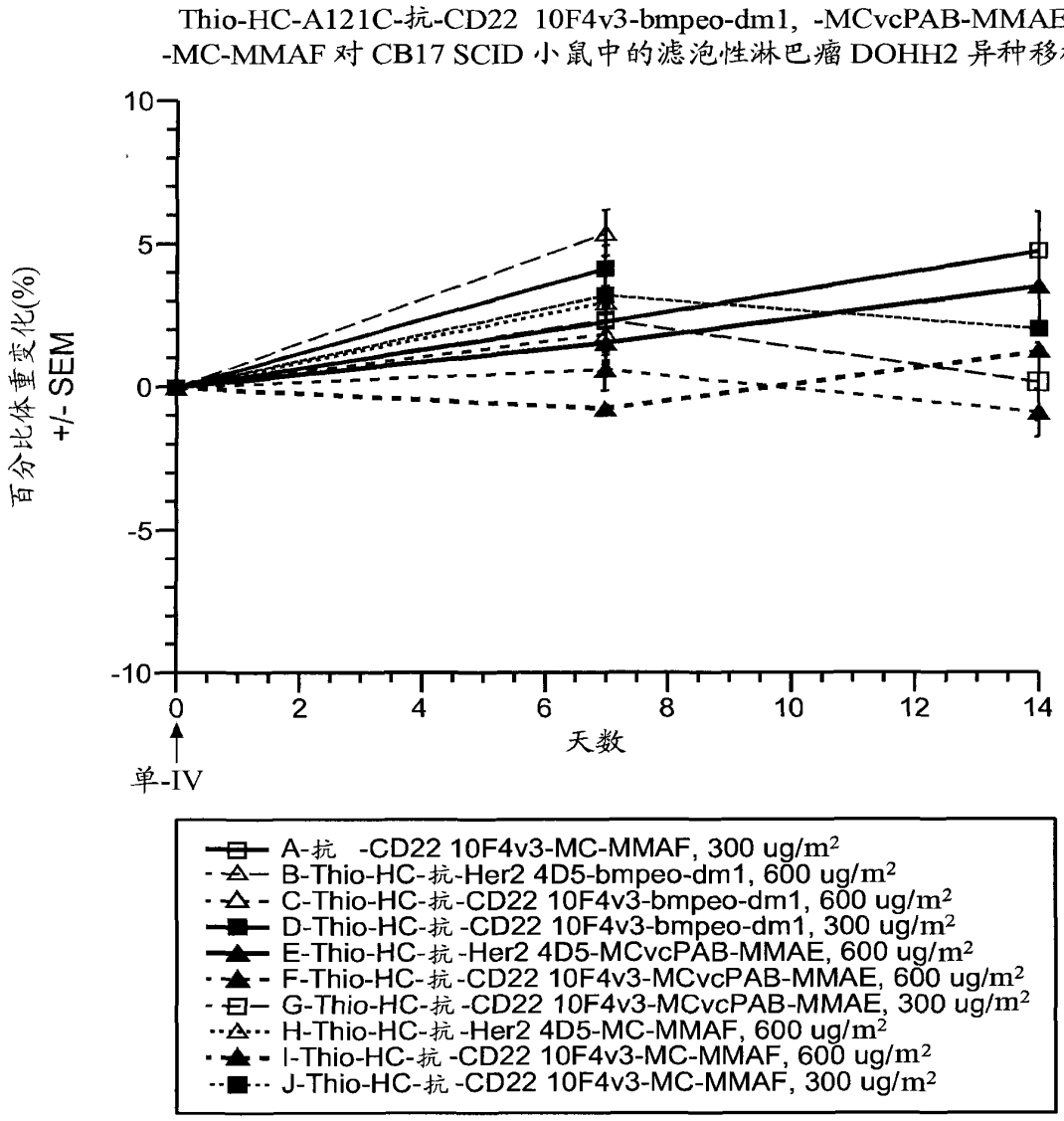

Thio-HC-A121C-抗-CD22 10F4v3-bmpeo-dm1, -MCvcPAB-MMAE 和
-MC-MMAF 对 CB17 SCID 小鼠中的滤泡性淋巴瘤 DOHH2 异种移植物
百分比体重变化(%)
+/- SEM
10
5
0
-5
-10
0
2
4
6
8
10
12
14
天数
单-IV
A-抗 -CD22 10F4v3-MC-MMAF, 300 ug/m2
B-Thio-HC-抗-Her2 4D5-bmpeo-dm1, 600 ug/m2
C-Thio-HC-抗-CD22 10F4v3-bmpeo-dm1, 600 ug/m2
D-Thio-HC-抗 -CD22 10F4v3-bmpeo-dm1, 300 ug/m2
E-Thio-HC-抗 -Her2 4D5-MCvcPAB-MMAE, 600 ug/m2
F-Thio-HC-抗 -CD22 10F4v3-MCvcPAB-MMAE, 600 ug/m2
G-Thio-HC-抗 -CD22 10F4v3-MCvcPAB-MMAE, 300 ug/m2
H-Thio-HC-抗 -Her2 4D5-MC-MMAF, 600 ug/m2
I-Thio-HC-抗 -CD22 10F4v3-MC-MMAF, 600 ug/m2
J-Thio-HC-抗 -CD22 10F4v3-MC-MMAF, 300 ug/m2

图 20C

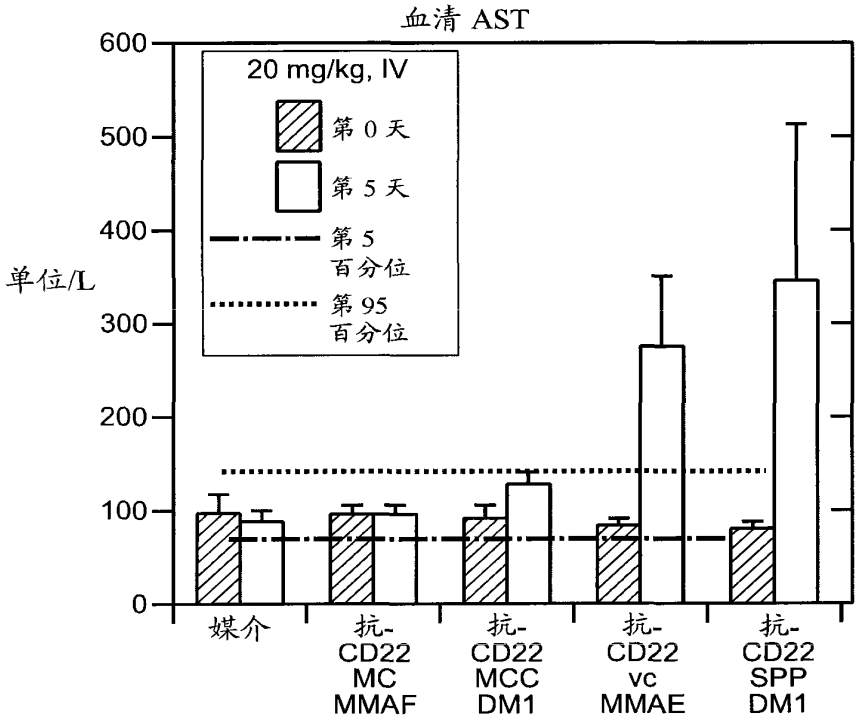

血清 AST
600
500
400
300
200
100
0
单位/L
20 mg/kg, IV
第 0 天
第 5 天
第 5 百分位
第 95 百分位
媒介
抗-CD22 MC MMAF
抗-CD22 MCC DM1
抗-CD22 vc MMAE
抗-CD22 SPP DM1

图 21A

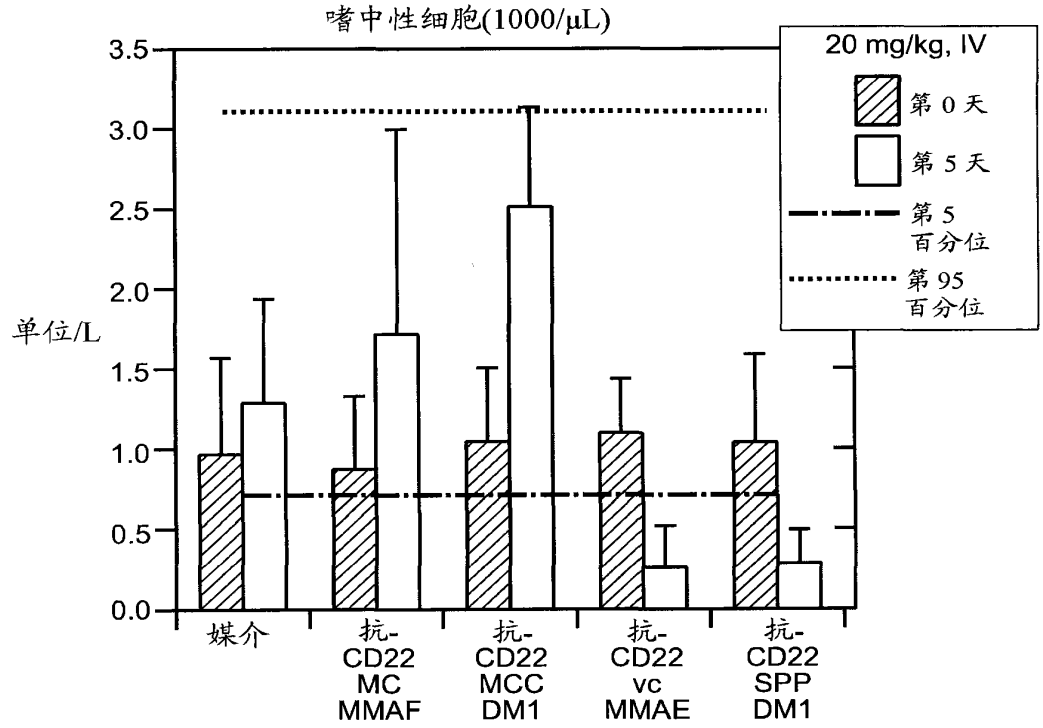

嗜中性细胞(1000/μL)
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
单位/L
20 mg/kg, IV
第 0 天
第 5 天
第 5 百分位
第 95 百分位
媒介
抗-CD22 MC MMAF
抗-CD22 MCC DM1
抗-CD22 vc MMAE
抗-CD22 SPP DM1

图 21B

OnCusp
Ex. 1002

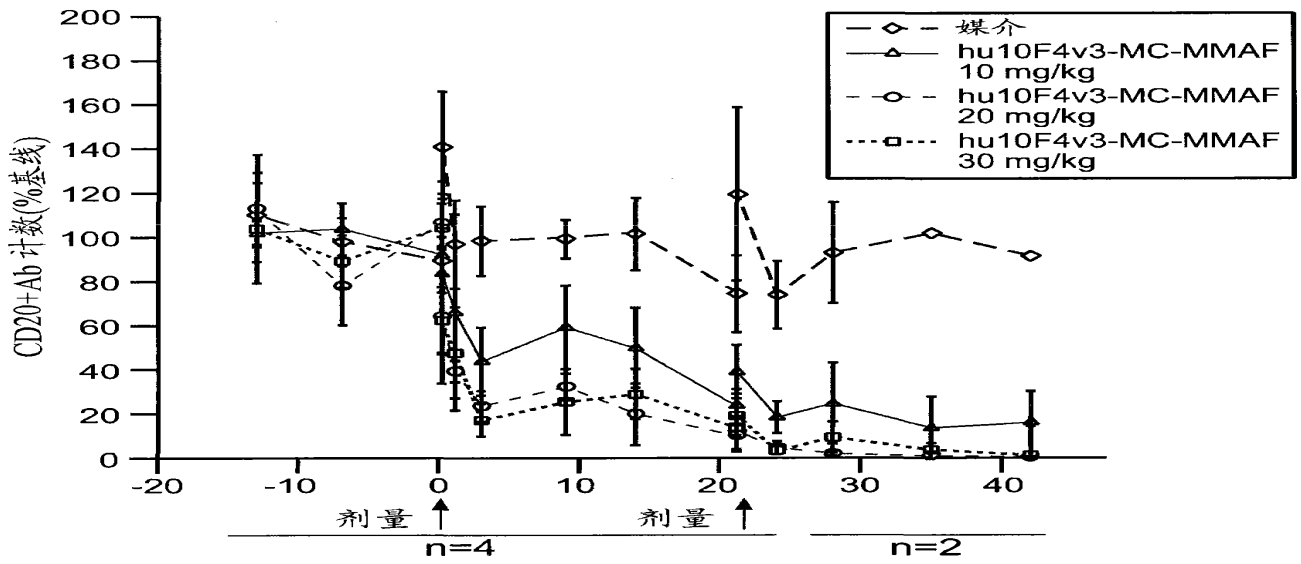


图 22A

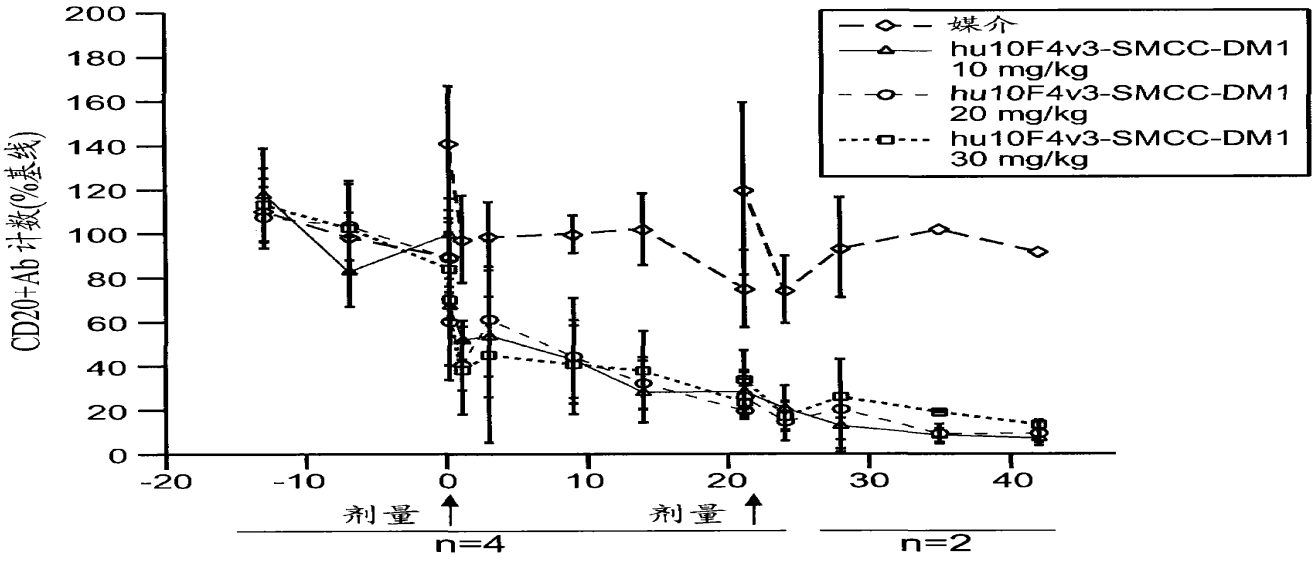


图 22B

7000 of 14295

OnCusp
Ex. 1002

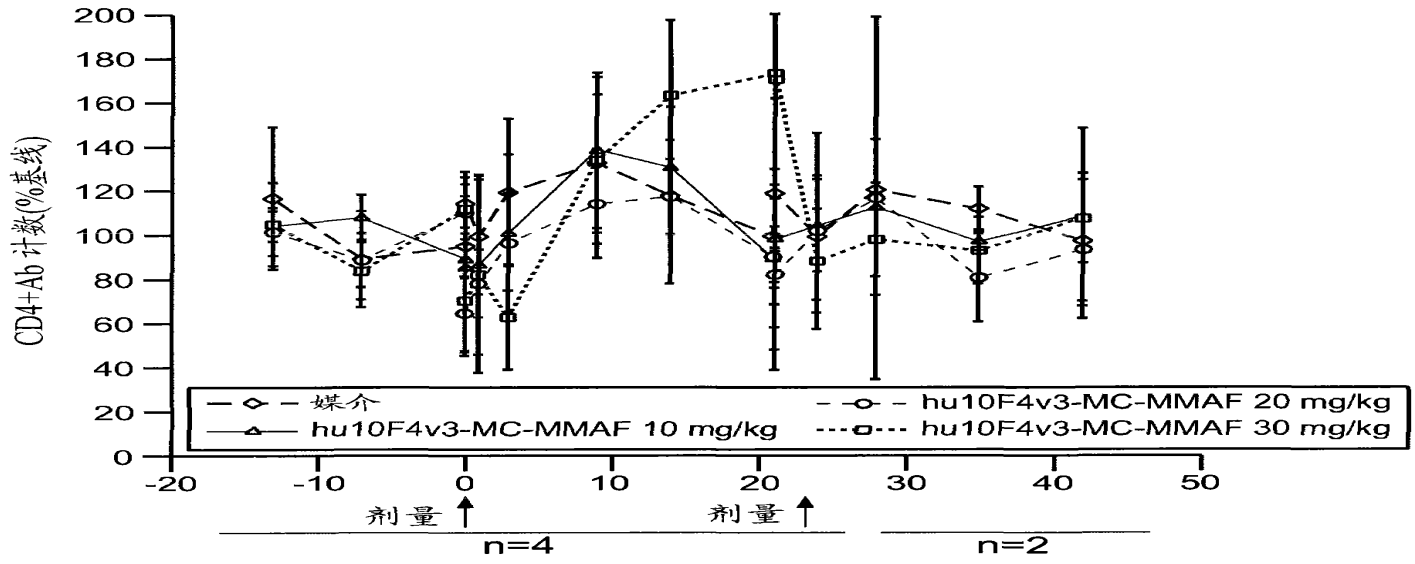


图 23A

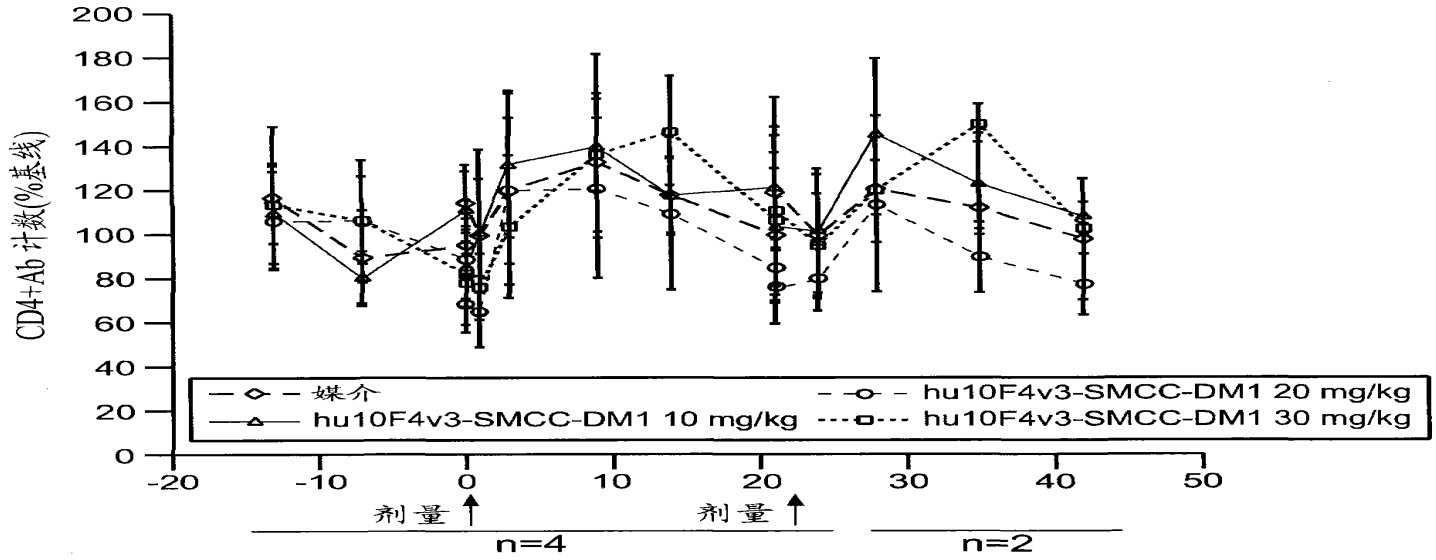


图 23B

7001 of 14295

媒介对照扁桃体

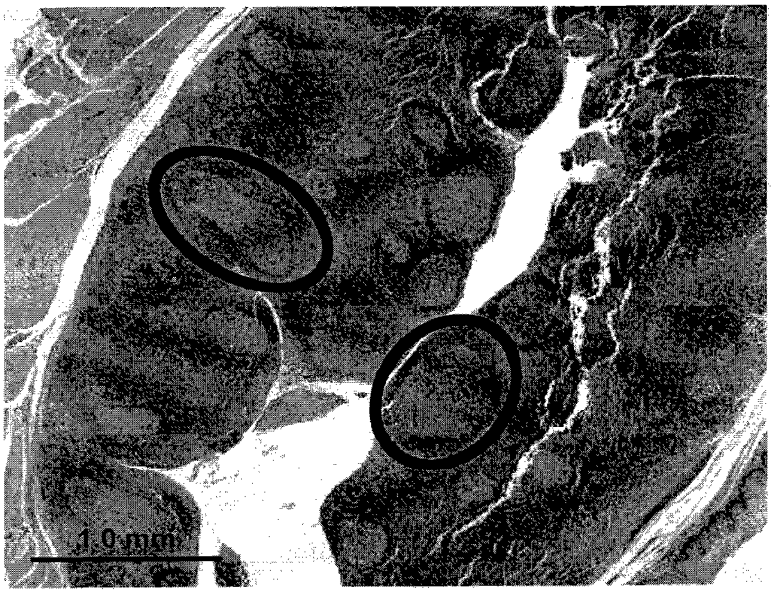


图 24A

hu10F4v3-SMCC-DM1 扁桃体

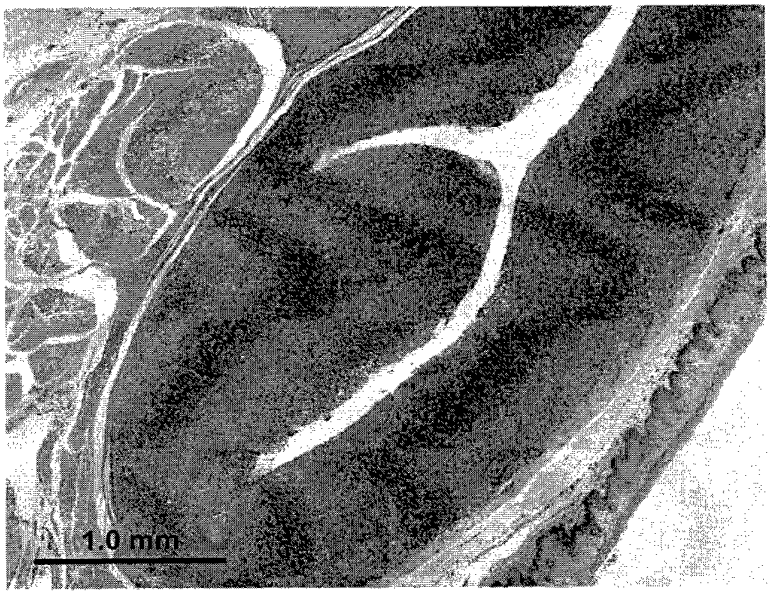


图 24B

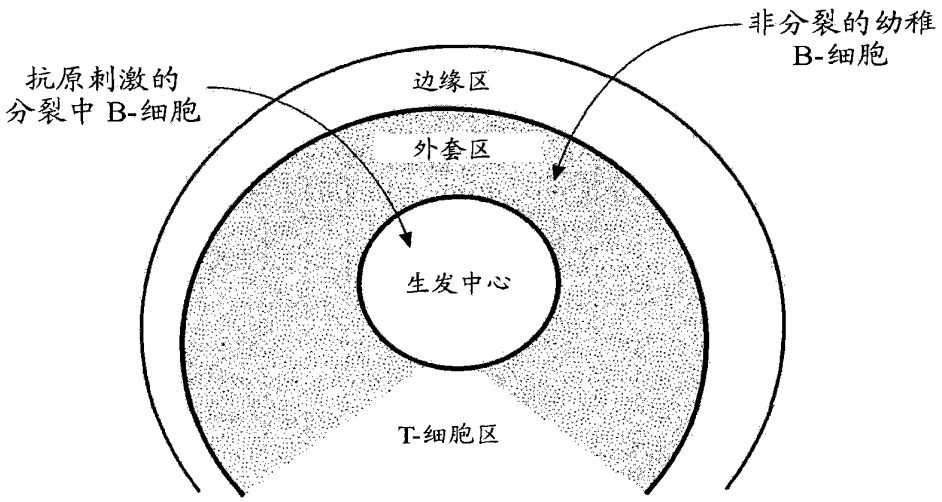


图 25A

Ki-67 染色
(分裂中的细胞)

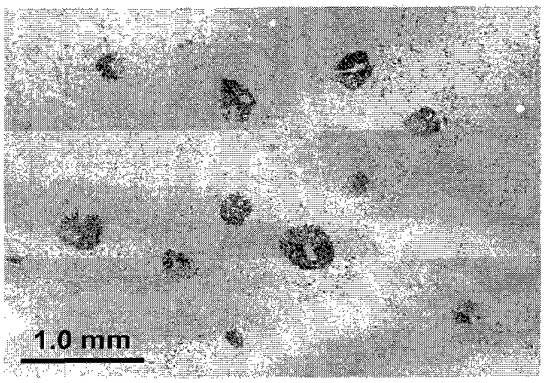


图 25B

抗 IgD 染色
(幼稚 B-细胞)

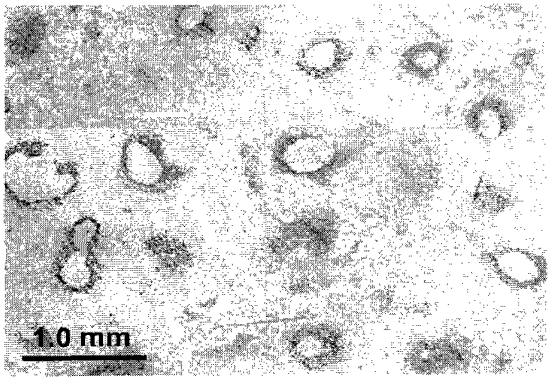
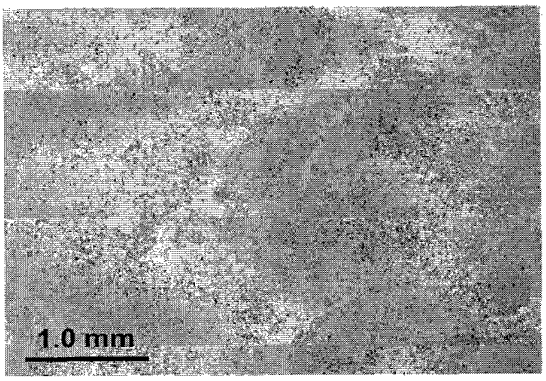


图 25D

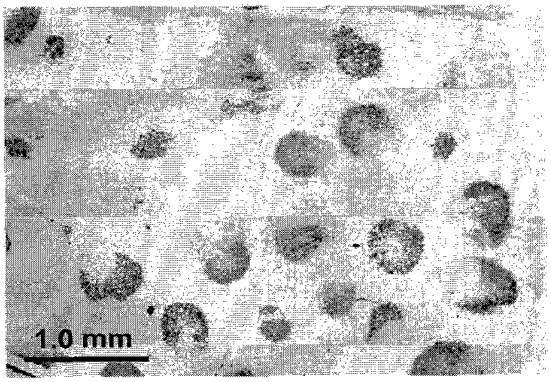
媒介



抗-CD22-MC-MMAF
(10 mg/kg)

图 25C

媒介



抗-CD22-MC-MMAF
(10 mg/kg)

图 25E

(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 102481364 A
(43)申请公布日 2012.05.30

(21)申请号 201080032478.2

(22)申请日 2010.07.21

(30)优先权数据
61/227,599 2009.07.22 US

(85)PCT申请进入国家阶段日
2012.01.17

(86)PCT申请的申请数据
PCT/US2010/042686 2010.07.21

(87)PCT申请的公布数据
WO2011/011474 EN 2011.01.27

(71)申请人 安龙制药公司
地址 美国新泽西州

(72)发明人 普加·萨普拉

(74)专利代理机构 北京市兰台律师事务所 11354
代理人 陈耀东

(51)Int.Cl.
A61K 39/395(2006.01)
A61K 31/44(2006.01)

权利要求书 6 页 说明书 36 页 附图 3 页

(54)发明名称

用HER2受体拮抗剂联合7-乙基-10-羟基喜树碱的多臂聚合缀合物治疗HER2阳性癌症的方法

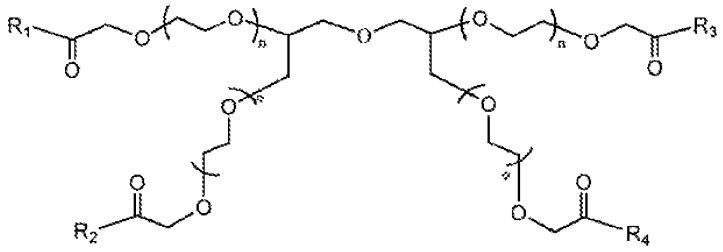
(57)摘要

本发明涉及治疗哺乳动物中HER2阳性癌症的方法。本发明包括将HER2拮抗剂与7-乙基-10-羟基喜树碱的聚合前药联合施用给需要其的哺乳动物。

CN 102481364 A

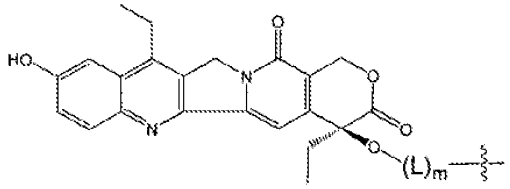
1. 一种治疗哺乳动物中 HER2 阳性癌症的方法，该方法包括向所述哺乳动物联合施用 HER2 受体拮抗剂与有效量的式 (I) 化合物或其药学上可接受的盐：

(I)



其中

R_1、R_2、R_3 和 R_4 独立地为 OH 或



其中

L 为双功能连接基；

(m) 为 0 或正整数，其中当 (m) 等于或大于 2 时每个 L 相同或不同；以及

(n) 为正整数；

条件是 R_1、R_2、R_3 和 R_4 不全为 OH。

2. 权利要求 1 的方法，其中 HER2 受体拮抗剂选自抗 HER2 抗体、反义 ErbB2 寡核苷酸和它们的组合。

3. 权利要求 2 的方法，其中抗 HER2 抗体与 HER2 区域 IV 或 HER2 区域 II 的胞外区域结合。

4. 权利要求 2 的方法，其中所述抗 HER2 抗体包含曲妥珠单抗或帕妥珠单抗。

5. 权利要求 1 的方法，其中所述 HER2 阳性癌症呈转移性或非转移性。

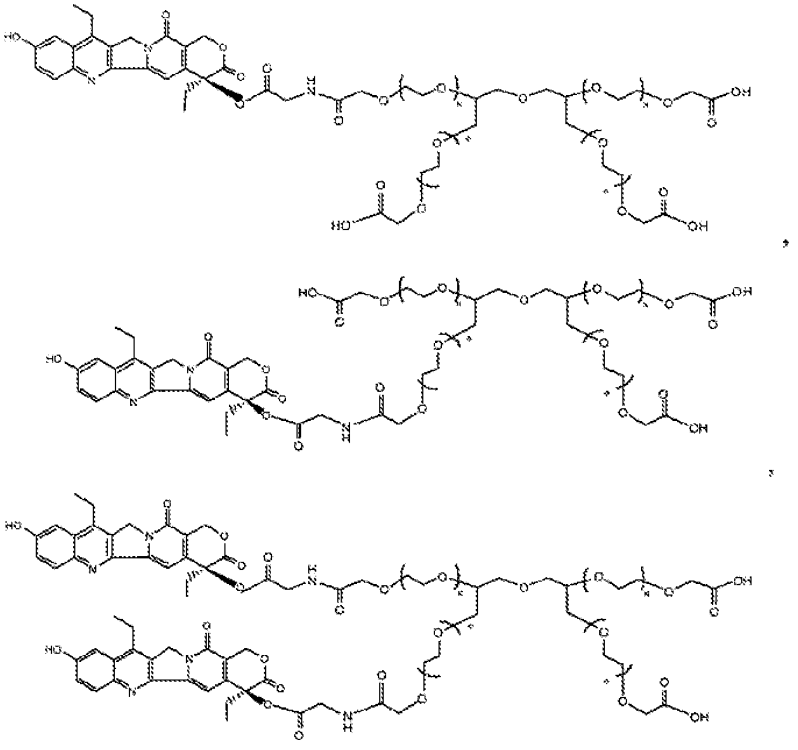
6. 权利要求 1 的方法，其中所述 HER2 阳性癌症对 HER2 受体拮抗剂呈耐受性或顽固性。

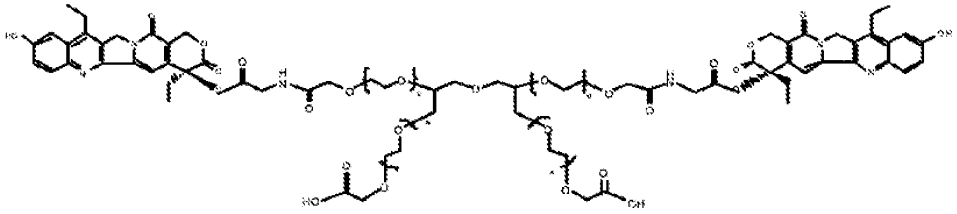
7. 权利要求 1 的方法，其中所述 HER2 阳性癌症选自实体肿瘤，乳癌，胃癌，卵巢癌，胃癌，子宫癌，子宫浆液性子宫内膜癌，前列腺癌，膀胱癌，唾液腺癌，肾腺癌，和乳腺癌。

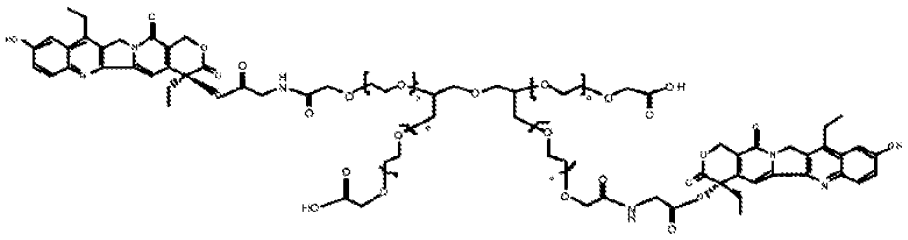
8. 权利要求 1 的方法，其中 (n) 为约 28 至 341 的整数，使得式 (I) 化合物的聚合部分的总分子量为约 5,000 至约 60,000 道尔顿。

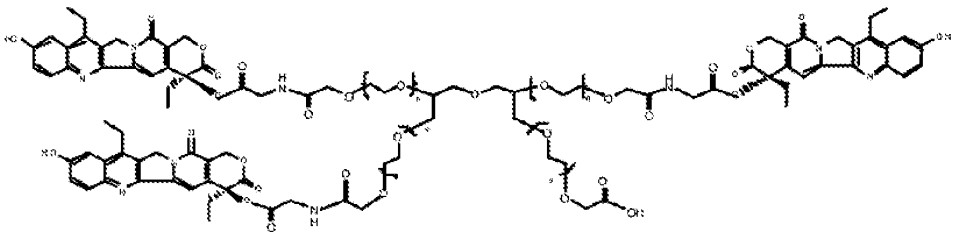
9. 权利要求 8 的方法，其中 (n) 为约 114 至 239 的整数，使得式 (I) 化合物的聚合部分的总分子量为约 20,000 至约 42,000 道尔顿。

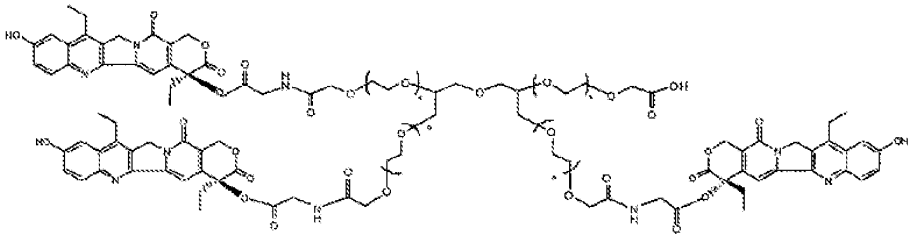
10. 权利要求 1 的方法，其中式 (I) 的化合物选自：



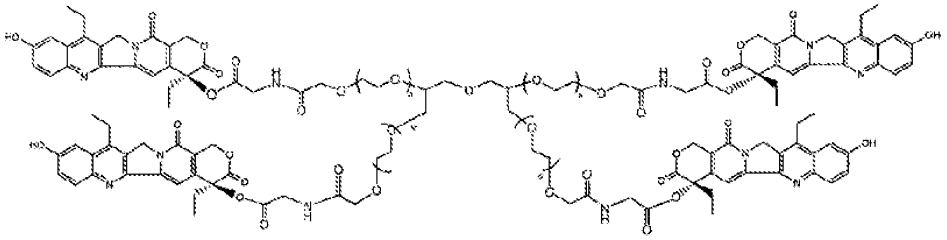






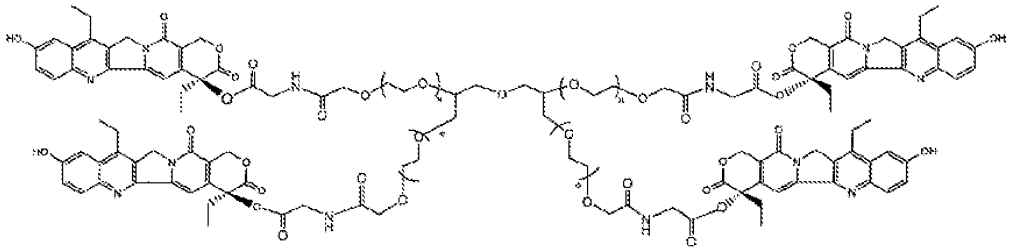


和



11. 权利要求 1 的方法，其中式 (I) 的化合物为：

(Ia)



12. 权利要求 1 的方法，其中将式 (I) 化合物以约 0.5mg/m^2 身体表面 / 剂至约 50mg/m^2 身体表面 / 剂的量施用给哺乳动物，并且其中该量为式 (I) 化合物中所包括的 7- 乙基 -10- 羟基喜树碱的重量。

13. 权利要求 1 的方法，其中将式 (I) 化合物以约 1mg/m^2 身体表面 / 剂至约 18mg/m^2 身体表面 / 剂的量施用给哺乳动物，并且该量为式 (I) 化合物中所包括的 7- 乙基 -10- 羟基喜树碱的重量。

14. 权利要求 1 的方法，其中按照如下方案将式 (I) 化合物施用给哺乳动物：每周约 1.25mg/m^2 身体表面 / 剂至约 16.5mg/m^2 身体表面 / 剂，持续 3 周，然后 1 周不治疗，并且该量为式 (I) 化合物中所包括的 7- 乙基 -10- 羟基喜树碱的重量。

15. 权利要求 14 的方法，其中每周施用给哺乳动物的量为约 5mg/m^2 身体表面 / 剂，该量为式 (I) 化合物中所包括的 7- 乙基 -10- 羟基喜树碱的重量。

16. 权利要求 4 的方法，其中将抗 HER2 受体抗体以约 2mg/kg 至约 8mg/kg 的量施用给哺乳动物。

17. 权利要求 2 的方法，其中将反义 ErbB2 寡核苷酸或其医药学上可接受的盐联合式 (I) 化合物或其医药学上可接受的盐施用给哺乳动物。

18. 权利要求 17 的方法，其中所述反义 ErbB2 寡核苷酸与与 ErbB2 前 mRNA 或 mRNA 的至少 8 个连续核苷酸互补。

19. 权利要求 17 的方法，其中所述反义 ErbB2 寡核苷酸的长度包含约 8 至约 50 个核苷酸。

20. 权利要求 17 的方法，其中所述反义 ErbB2 寡核苷酸包含与 SEQ ID NO：1 中所给出的至少 8 个连续核苷酸互补的核苷酸。

21. 权利要求 17 的方法，其中所述反义 ErbB2 寡核苷酸包含一个或多个硫代磷酸酯核苷酸间连接基。

22. 权利要求 17 的方法，其中所述反义 ErbB2 寡核苷酸包括一个或多个锁核酸 (LNA)。

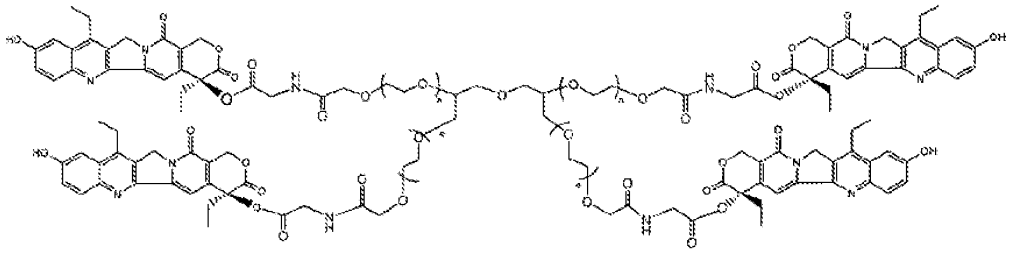
23. 权利要求 17 的方法，其中在哺乳动物中将反义 ErbB2 寡核苷酸以约 2 至约 50mg/kg/ 剂的量进行施用。

24. 权利要求 1 的方法，还包括确定哺乳动物中 HER2HER2 阳性癌症的存在。

25. 一种治疗哺乳动物中 HER2 阳性癌症的方法，该方法包括：

(a) 通过确定哺乳动物中使 HER2 过表达的癌症的存在来鉴别具有 HER2 阳性癌症的哺乳动物；和

(b) 向具有 HER2 阳性癌症的哺乳动物联合施用有效量的包含曲妥珠单抗的 HER2 受体拮抗剂和有效量的式 (Ia) 化合物或其医药学上可接受的盐：



其中 (n) 为约 227，使得式 (Ia) 化合物的聚合部分的总分子量为约 40,000 道尔顿。

26. 一种提高具有 HER2 阳性癌症的哺乳动物中 HER2 受体拮抗剂效果的方法，该方法包括向所述哺乳动物联合施用 HER2 受体拮抗剂与有效量的权利要求 1 的式 (Ia) 化合物或其医药学上可接受的盐。

27. 一种抑制哺乳动物中 HER2 阳性细胞的生长或增殖的方法，该方法包括：

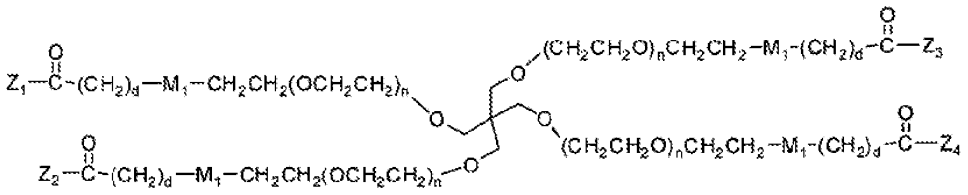
(a) 确定哺乳动物的细胞中 HER2 表达的存在；和

(b) 向具有 HER2 阳性细胞的哺乳动物联合施用 HER2 受体拮抗剂与权利要求 1 的式 (Ia) 化合物或其医药学上可接受的盐。

28. 一种治疗哺乳动物中 HER2 阳性癌症的方法，该方法包括向所述哺乳动物联合施用 HER2 受体拮抗剂与有效量的喜树碱、喜树碱类似物、喜树碱或其类似的聚合缀合物、或者它们药学上可接受的盐。

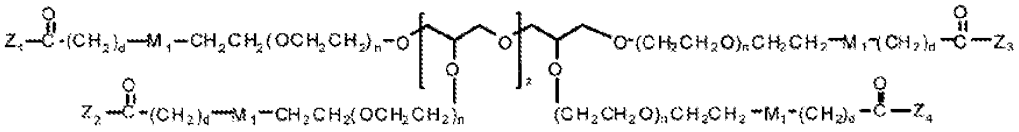
29. 权利要求 28 的方法，其中所述聚合缀合物为式 (II) 或式 (III) 化合物：

(II)



或

(III)



其中

Z_1、Z_2、Z_3 和 Z_4 独立地是 OH 或 $(L)_g$-D；

L 是双官能连接基；

D 是喜树碱或喜树碱类似物；

M_1 是 O、S 或 NH，优选 O；

(d) 是 0 或约 1- 约 10 的正整数；

(z) 是 0 或约 1- 约 29 的正整数；

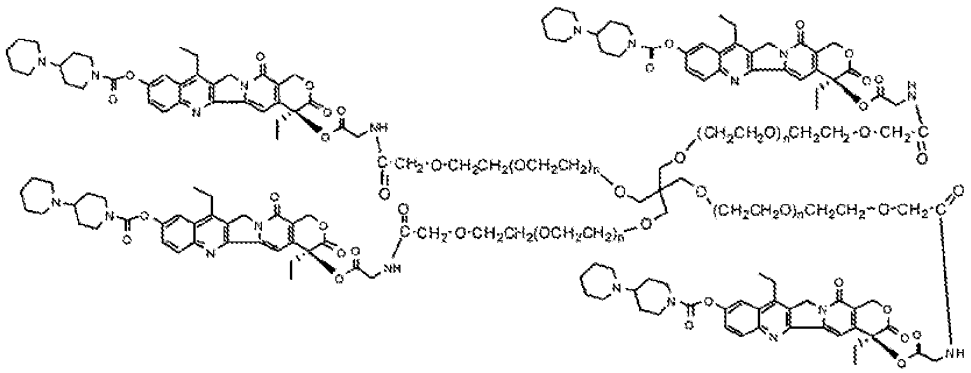
m 为 0 或正整数；且

(n) 是约 10- 约 2,300 的正整数使得所述化合物的聚合部分具有约 2,000- 约 100,000 道尔顿的总数均分子量，

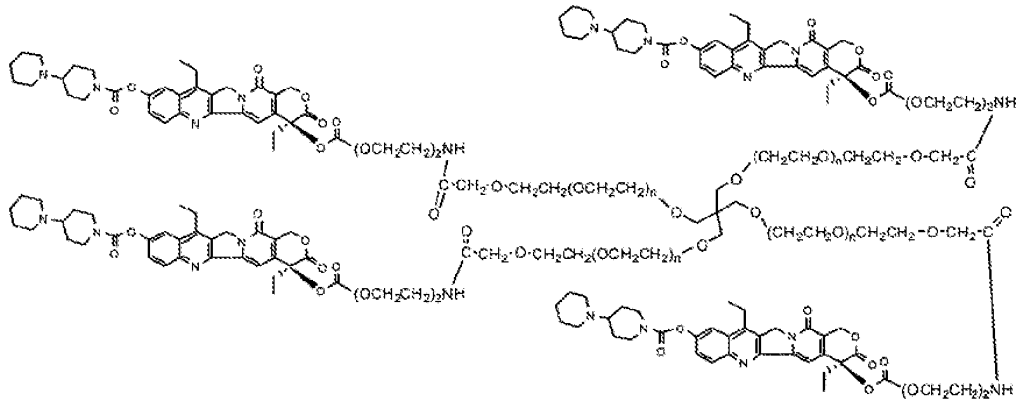
条件是 Z_1、Z_2、Z_3 和 Z_4 不全为 OH。

30. 权利要求 29 的方法，其中 D 选自喜树碱、SN38、拓扑替康和 CPT-11。

31. 权利要求 29 的方法，其中所述聚合缀合物为



或



，

其中 (n) 为约 28 至 341 的整数，使得式 (II) 化合物的聚合部分的总分子量为约 5,000 至约 60,000 道尔顿。

用 HER2 受体拮抗剂联合 7- 乙基 -10- 羟基喜树碱的多臂聚合缀合物治疗 HER2 阳性癌症的方法

[0001] 相关申请的交叉参考

[0002] 本申请要求 2009 年 7 月 22 日提交的美国临时专利申请 61/227,599 的优先权，通过引用将其内容并入本文。

发明领域

[0003] 本发明涉及治疗 HER2 阳性癌症的方法。特别地，本发明涉及通过联合施用（给药，administer）HER2 拮抗剂与 7- 乙基 -10- 羟基喜树碱的聚乙二醇缀合物来治疗哺乳动物中的 HER2 阳性癌症的方法。

[0004] 发明背景

[0005] 乳癌是美国妇女中最常见的癌症类型。最近研究显示约 20-25％的乳癌呈 HER2（人表皮生长因子受体）阳性。HER2 蛋白质，也称作 HER2 受体或 HER2/neu 或 ErbB2，发现于体内一些正常细胞的表面上。HER2 起到调节细胞生长和存活的作用。HER2 蛋白质、编码基因和 HER2 蛋白质的抗体详细描述于美国专利 No. 6,165,464 中，通过引用将该专利以其全文并入本文。

[0006] 研究显示当乳癌肿瘤使 HER2 蛋白质过表达时乳癌可以更具有侵袭性。HER2 阳性肿瘤比不显 HER2 阳性的肿瘤生长和蔓延得更快。在 HER2 阳性乳癌中，癌细胞具有每个细胞中异常高的 HER2 基因拷贝数目。参见 Slamon DJ 等，Science 244 :707-712, 1989 ；和 Pegram M 等，Semin. Oncol. 27 :13-19. 2000。据报导，HER2 阳性乳癌是非 HER2 阳性乳癌复发率的 2.5 倍。还提出，HER2 过表达与对化学治疗剂的耐受性有关。

[0007] 曲妥珠单抗（trastuzumab）是人源化单克隆抗体，其选择性地结合 HER2（或 HER2/neu）受体的区域 IV。曲妥珠单抗通过与 HER2 蛋白质结合抑制肿瘤细胞生长。临床研究显示，曲妥珠单抗的使用使具有侵袭性 HER2 阳性癌症的那些中复发的风险降低一半以上。

[0008] 还具有各种用曲妥珠单抗联合化学治疗剂来治疗癌症的尝试，其试图获得协同效应和降低治疗剂的副作用。试举几例，与曲妥珠单抗联合治疗的包括多西紫杉醇 / 吉非替尼 (Gefitinib)/ 曲妥珠单抗，卡培他滨 (capecitabine)/ 紫杉醇 / 曲妥珠单抗，卡铂 (carboplatin)/ 多西紫杉醇 / 曲妥珠单抗，卡铂 / 吉西他滨 / 紫杉醇 / 曲妥珠单抗，卡铂 / 紫杉醇 / 曲妥珠单抗，顺铂 / 多西紫杉醇 / 曲妥珠单抗，环磷酰胺 / 阿霉素 (doxorubicin)/ 曲妥珠单抗，环磷酰胺 / 氟脲嘧啶 (fluorouracil)/ 甲氨蝶呤 / 曲妥珠单抗等。还参见，例如，美国专利 No. 6,313,138 ；6,462,017 ；6,537,988 ；和 6,846,816。显示曲妥珠单抗与化学疗法联合延长了在早期阶段和晚期阶段转移性癌症的妇女生存。例如，对于接受曲妥珠单抗和化学疗法的患者，中位生存期提高到 26.2 个月，相比之下仅接受化学疗法的患者的中位生存期为 20.0 个月。

[0009] 遗憾地是，患者需要接受长时间例如一年的曲妥珠单抗治疗。这种长期用曲妥珠单抗治疗具有反作用。还报导，仅用曲妥珠单抗治疗或联合化学疗法治疗导致心力衰竭。还报导，患者接受曲妥珠单抗联合基于蒽环类抗癌药的化学疗法是危险的。接受曲妥珠单

抗联合化学治疗剂例如阿霉素、环磷酰胺以及紫杉醇或多西紫杉醇的大量患者产生心力衰竭。由此，曲妥珠单抗结合疗法需要患者在曲妥珠单抗结合疗法之前或期间就他们的心脏功能进行测试，并且建议心脏有问题的患者不接受或停止曲妥珠单抗结合疗法。曲妥珠单抗（tratuzumab）的延长使用还使化学疗法所致的中性粒细胞减少恶化。

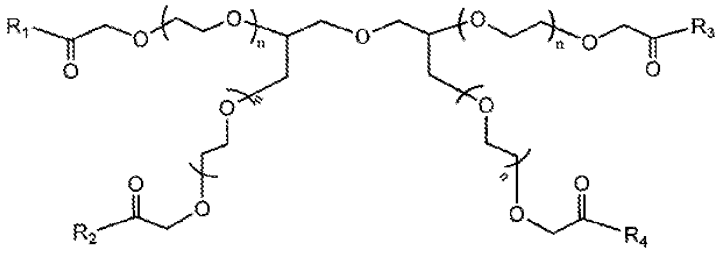
[0010] 因此，仍需要治疗 HER2 阳性癌症的方法。本发明解决了该需求。

[0011] 发明概述

[0012] 在本发明的一个方面中，提供了在哺乳动物中治疗 HER2 阳性癌症的方法。该方法包括向哺乳动物联合施用 HER2 受体拮抗剂与有效量的式（I）化合物或其药学上可接受的盐：

[0013]

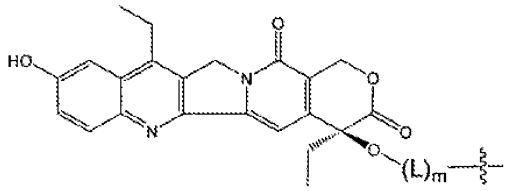
(I)



[0014] 其中

[0015] R_1、R_2、R_3 和 R_4 独立地为 OH 或

[0016]



[0017] 其中

[0018] L 为双官能连接基，并且当（m）等于或大于 2 时每个 L 相同或不同。

[0019] m 为 0 或正整数；且

[0020] （n）为正整数；

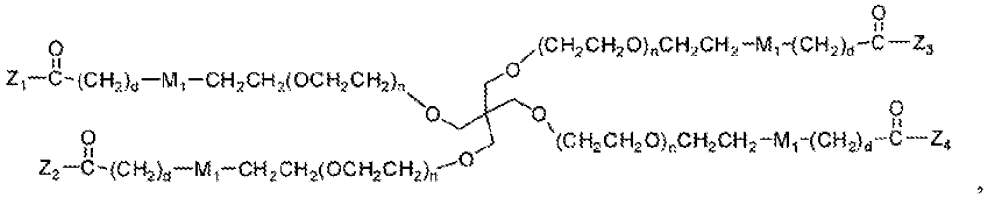
[0021] 条件是 R_1、R_2、R_3 和 R_4 不全为 OH。

[0022] 在本发明的可选方面中，提供了在哺乳动物中治疗 HER2 阳性癌症的方法，包括：该方法包括向所述哺乳动物联合施用 HER2 受体拮抗剂与有效量的喜树碱、喜树碱类似物、喜树碱或其类似的聚合缀合物、或者它们药学上可接受的盐。

[0023] 在一个实施方案中，该方法通过向具有 HER2 阳性癌症的哺乳动物施用 HER2 受体拮抗剂以及喜树碱或其类似物的聚合缀合物来进行。聚合缀合物包括式（II）或（III）的化合物：

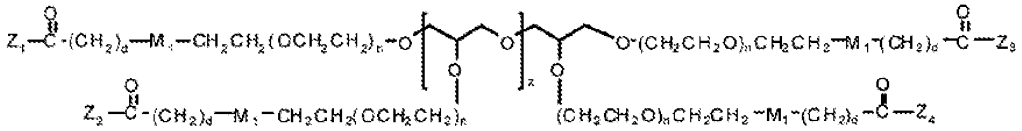
[0024]

(II)



或

(III)



[0025] 其中

[0026] Z_1、Z_2、Z_3 和 Z_4 独立地是 OH 或 $(L)_m$-D；

[0027] L 为双官能连接基；

[0028] D 是喜树碱或喜树碱类似物；

[0029] M_1 是 O、S 或 NH，优选 O；

[0030] (d) 是 0 或约 1- 约 10 的正整数；

[0031] (z) 是 0 或约 1- 约 29 的正整数；

[0032] (m) 为 0 或正整数，其中当 (m) 等于或大于 2 时每个 L 相同或不同；以及

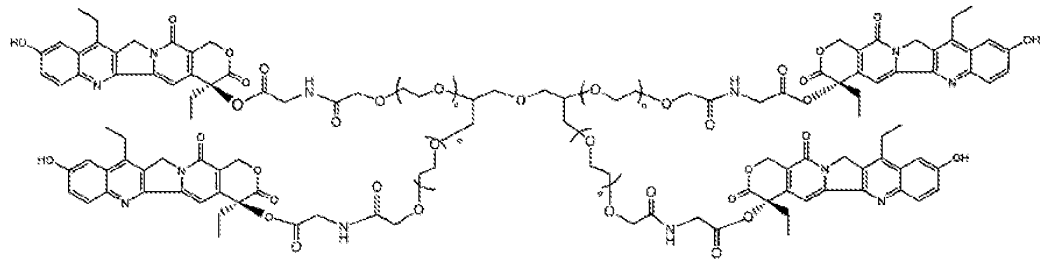
[0033] (n) 是约 10- 约 2,300 的正整数使得所述化合物的聚合部分具有约 2,000- 约 100,000 道尔顿的总数均分子量。

[0034] 条件是 Z_1、Z_2、Z_3 和 Z_4 不全为 OH。

[0035] 在一个实施方案中，本文所述方法中使用的 HER2 拮抗剂包括以商标 Herceptin ® 市售的曲妥珠单抗，其如美国专利 No. 5,821,337 和 6,165,464 所详细描述，通过引用将它们并入本文。

[0036] 在一个优选实施方案中，本文所述方法中使用的 7- 乙基 -10- 羟基喜树碱的聚合前药包括具有如下结构的 4 臂 PEG-7- 乙基 -10- 羟基喜树碱的缀合物：

[0037]



[0038] 其中 n 为约 28 至约 341，优选约 114 至约 239，且更优选约 227。

[0039] 在又一个实施方案中，本文所述方法包括：

[0040] (a) 确定具有癌症的哺乳动物中 HER2 阳性癌症的存在；和

[0041] (b) 向具有 HER2 阳性癌症的哺乳动物联合施用有效量的 HER2 受体拮抗剂与有效量的式 (I)（或者式 (II) 或式 (III)）化合物。

[0042] 在另一个方面，本发明提供了提高 HER2 受体拮抗剂在具有 HER2 阳性癌症的哺乳动物中的效果的方法。

[0043] 在又一个方面，本发明提供了抑制 HER2 阳性细胞的生长或增殖的方法以及向哺乳动物中的 HER2 阳性细胞递送喜树碱例如 7- 乙基 -10- 羟基喜树碱的方法。

[0044] 本发明的一个优点是，本发明提供了利用基于 HER2 拮抗剂的疗法有效治疗对含 HER2 拮抗剂的疗法没有响应的患者，或者对 HER2 拮抗剂初始有响应但是后来产生耐受性的患者的手段。患者可得益于意想不到的对 HER2 拮抗剂例如曲妥珠单抗和帕妥珠单抗 (pertuzumab) 的耐受性的缺乏和 / 或减小。

[0045] 另一个优点是，本发明提供了治疗具有差的预后的患者的手段。认为 HER2 表达与抗药性和总体上差的预后有关。相比于其中 HER2 拮抗剂不与本文所述化合物联合施用的治疗，HER2 拮抗剂在与根据本发明的本文所述式 (I) 化合物（或者式 (II) 或 (III) 化合物）一起施用时，显著有效地抑制肿瘤生长和 / 或增殖。

[0046] 又一个优点是，与单独 HER2 疗法相比，本发明提高了 HER2 拮抗剂的治疗效果，并且允许某些有需要的患者接受 HER2 结合疗法较短时间或较少的量。与 HER2 结合疗法有关或由其导致的副作用可通过 HER2 拮抗剂疗法的增强效果而得以减轻。

[0047] 其它优点由下面描述和附图将变得明显。

[0048] 就本发明而言，“HER2 阳性癌症”和“HER2 过表达癌症”可互换使用。在 HER2- 阳性癌细胞中，具有过量的细胞表面上 HER2 蛋白质和 / 或编码 HER2/neu 基因扩增。HER2 表达水平可通过本领域已知的技术以及本文稍后所述的那些方法进行测量。与非 HER2 阳性癌症或者正常细胞或组织相比，HER2 阳性癌症具有较多的 HER2 蛋白质或基因表达。例如，HER2 通过免疫组织化学（“IHC”）分析法进行测定，该分析法测量癌细胞表面上过表达的 HER2 蛋白质的量。IHC 分析法基于细胞膜染色的染色强度和完全性按 0 至 3+ 级进行评分。例如，按 IHC 分析法分数为 3+ 的癌症认为是 HER2 阳性癌症。按 IHC 分析法分数为 2+ 的癌症可以通过荧光原位杂交（“FISH”）分析法进一步检测，其中阳性 FISH 分析法证实所述癌症是 HER2 阳性。FISH 分析法测量癌细胞中存在的 HER2/neu 基因拷贝的数目。FISH 测试结果由肿瘤细胞内 20 个间期核中 HER2 信号数目与染色体 17 信号数目的比率来提供。正常样本显示出 < 2.0 的比率，而具有 HER2/neu 扩增的样本具有大于或等于 2.0 的比率并且定义为 HER2 阳性 (FISH+)。

[0049] 术语“HER2 受体拮抗剂”和“HER2 拮抗剂”是指抑制 HER2 蛋白质或基因的表达或功能的化合物。就本发明而言，HER2 拮抗剂是指例如受体酪氨酸激酶抑制剂，尤其是 HER2 受体蛋白质抑制剂。仅以举例方式，HER2 拮抗剂包括抗 HER2 抗体。HER2 拮抗剂的定义还意欲包括反义 HER2 寡核苷酸。

[0050] 就本发明而言，术语“辅助治疗”是指除主要（最初）治疗外还给予的治疗。辅助治疗是为有助于达到最终目标而设计的附加治疗。

[0051] 就本发明而言，术语“早期”或“早期阶段”乳癌是指癌症尚没有扩散到胸部或臂下淋巴结（称作腋窝淋巴结）以外。阶段 0、I 和 II 以及一些阶段 III 癌症通常认为是早

期阶段。

[0052] 就本发明而言，顽固性或耐受性癌症定义为对于以前的抗癌疗法或治疗没有响应的癌症，所述疗法或治疗不包括本文所述式（I）化合物（或者式（II）或（III）化合物）。在一方面，当HER2受体拮抗剂例如HER2抗体（例如曲妥珠单抗和帕妥珠单抗）单独使用或者与不包括式（I）化合物（或者式（II）或（III）化合物）的化学疗法联合时，癌症对其显耐受性或顽固性。在一个实施方案中，癌症对Herceptin®单独治疗或者对Herceptin®加上不包括本文所述式（I）化合物的化学疗法显顽固性或耐受性。所述癌症可以是在治疗开始时就是顽固性或耐受性的，或治疗期间/之后可能变为顽固性或耐受性的。因此，顽固性癌症包括在治疗开始时没有响应，或初始短期有响应但对治疗没有响应的肿瘤。顽固性癌症还包括对于抗癌治疗有响应，但对于随后的治疗周期没有响应的肿瘤。就本发明而言，顽固性癌症还可包括看起来被抗癌治疗抑制，但中断治疗后最多5年（有时高达10年或更长时间）复发的肿瘤。抗癌治疗可使用单独的化学治疗药物，单独的放射或其组合。为了说明并不是为了限制，将理解顽固性癌症与耐受性癌症可互换使用。

[0053] 就本发明而言，顽固性或耐受性癌症的成功治疗应理解为是指：在本文所述联合治疗期间和/或之后与没有本文所述的联合治疗相比，顽固性或耐受性症状或病症得到抑制、最小化或缓解。得到最小化、缓解或抑制的顽固性病症可以通过本领域技术人员考虑的临床指标证实。在一个实施例中，当与不存在本文所述的治疗时相比，当肿瘤生长和/或复发中实现至少5%或优选10%，更优选20%或更高（即，30、40、50%或更高）抑制或下降时（包括本领域技术人员考虑的其它临床指标），应该认为成功治疗了顽固性或耐受性癌症。表示顽固性癌症的严重度和程度改变的临床指标可由临床医师确定。

[0054] 就本发明而言，除非另外指明，术语“癌症”和“肿瘤”可互换使用。除非另外指明，否则癌症涵盖良性、恶性和/或转移性癌症。癌症可以是较大侵袭性或较小侵袭性。侵袭性表型是指形成肿瘤和发生转移的增殖速率和能力。与较小侵袭性的肿瘤相比，侵袭性癌症增殖得较快，并且更容易形成肿瘤和发生转移。

[0055] 就本发明而言，“肿瘤/癌症的治疗”应该理解是指，与没有接受本文所述联合治疗的患者相比，在完成本文所述联合治疗后的患者中实现肿瘤生长、肿瘤负荷和转移的抑制、减轻或缓解，肿瘤消退，或者肿瘤复发和/或新生癌生长的抑制。当患者获得积极临床结果时，认为实现了成功治疗。例如，在与不存在本文所述联合治疗时相比，当本领域技术人员所考虑的肿瘤生长（包括其它临床指标）实现至少10%或优选20%，更优选30%或更高（即，40、50%）的下降时（包括的其它临床），应该认为是成功的治疗。用于确定由本文所述治疗所致的肿瘤临床特征变化的其它方法包括：活检，例如肿瘤活检，使用抗体、放射性同位素、染料的免疫组织化学研究，及全血球计数（CBC）。

[0056] 就本发明而言，根据本发明所考虑的与HER2过表达有关的疾病或病症包括其中HER2蛋白质或基因在病况的病理或进展中起作用的病况。

[0057] 就本发明而言，术语“有效量”和“足量”应该指实现所需效果或治疗效果的量，该效果是本领域技术人员能够理解的。用于待治疗的各哺乳动物或人类患者的有效量易于由本领域技术人员在可提供所要临床反应并同时避免与良好实施不一致的不当作用的范围内确定。下文提供了剂量范围

[0058] 就本发明而言，术语“残基”应该理解为是指化合物的一部分，对此其为，即7-乙

基-10-羟基喜树碱、氨基酸等，其在经历与其它化合物的取代反应后仍保留。

[0059] 就本发明而言，术语“含聚合物的残基 (polymeric containing residue)”或“PEG 残基”各自应该理解为是指聚合物或 PEG 的一部分，其在经过与例如氨基酸，含 7- 乙基 -10- 羟基喜树碱的化合物反应后保留。

[0060] 就本发明而言，术语“烷基”是指饱和的脂肪烃，包括直链、支链和环状烷基。术语“烷基”还包括烷硫基 - 烷基 (alkyl-thio-alkyl)、烷氧基烷基、环烷基烷基、杂环烷基、C_{1-6} 烷基羰基烷基。优选地，烷基具有 1-12 个碳。更优选，其为低级烷基，具有约 1-7 个碳，且更优选约 1-4 个碳。烷基可以是取代的或未取代的。当被取代时，取代基优选包括：卤素、氧基、叠氮基、硝基、氰基、烷基、烷氧基、烷硫基、烷硫基 - 烷基、烷氧基烷基、烷基氨基、三卤甲基、羟基、巯基、羟基、氰基、烷基甲硅烷基、环烷基、环烷基烷基、杂环烷基、杂芳基、烯基、炔基、C_{1-6} 烃基、芳基和氨基。

[0061] 就本发明而言，本文所用的术语“取代的”是指加入一个下述部分或用一个下述部分替换官能团或化合物中所含的一个或多个原子：卤素、氧基、叠氮基、硝基、氰基、烷基、烷氧基、烷硫基、烷硫基 - 烷基、烷氧基烷基、烷基氨基、三卤甲基、羟基、巯基、羟基、氰基、烷基甲硅烷基、环烷基、环烷基烷基、杂环烷基、杂芳基、烯基、炔基、C_{1-6} 烷基羰基烷基、芳基和氨基。

[0062] 就本发明而言，术语“烯基”是指含有至少一个碳 - 碳双键的基团，包括直链、支链和环状基团。优选地，所述烯基具有约 2-12 个碳。更优选地，其为低级烯基，具有约 2-7 个碳，更优选地约 2-4 个碳。所述烯基可以是取代的或未取代的。当取代时，取代基包括：卤素、氧基、叠氮基、硝基、氰基、烷基、烷氧基、烷硫基、烷硫基 - 烷基、烷氧基烷基、烷基氨基、三卤甲基、羟基、巯基、羟基、氰基、烷基甲硅烷基、环烷基、环烷基烷基、杂环烷基、杂芳基、烯基、炔基、C_{1-6} 烃基、芳基和氨基。

[0063] 就本发明而言，术语“炔基”是指含有至少一个碳 - 碳三键的基团，包括直链、支链和环状基团。优选地，所述炔基具有约 2-12 个碳。更优选地，其为低级炔基，具有约 2-7 个碳，更优选约 2-4 个碳。所述炔基可以为取代的或未取代的。当取代时，取代基包括：卤素、氧基、叠氮基、硝基、氰基、烷基、烷氧基、烷硫基、烷硫基 - 烷基、烷氧基烷基、烷基氨基、三卤甲基、羟基、巯基、羟基、氰基、烷基甲硅烷基、环烷基、环烷基烷基、杂环烷基、杂芳基、烯基、炔基、C_{1-6} 烃基、芳基和氨基。“炔基”的实例包括炔丙基（即丙炔基）和 3- 己炔基。

[0064] 就本发明而言，术语“芳基”是指含有至少一个芳环的芳香烃环体系。该芳香环任选为稠合的，或与其它芳香烃环或非芳香烃环连接。芳基的实例包括，例如，苯基、萘基、1,2,3,4- 四氢萘和联苯基。芳基的优选实例包括苯基和萘基。

[0065] 就本发明而言，术语“环烷基”是指 C_{3-8} 环烃。环烷基的实例包括环丙基、环丁基、环戊基、环己基、环庚基和环辛基。

[0066] 就本发明而言，术语“环烯基”是指含有至少一个碳 - 碳双键的 C_{3-8} 环烃。环烯基的实例包括环戊烯基、环戊二烯基、环己烯基、1,3- 环己二烯基、环庚烯基、环庚三烯基和环辛烯基。

[0067] 就本发明而言，术语“环烷基烷基”是指被 C_{3-8} 环烷基取代的烷基。环烷基烷基的实例包括环丙基甲基和环戊基乙基。

[0068] 就本发明而言，术语“烷氧基”是指具有指定碳原子数且通过氧桥与母体分子部分

相连的烷基。烷氧基的实例包括，例如，甲氧基、乙氧基、丙氧基和异丙氧基。

[0069] 就本发明而言，术语“烷芳基”是指被烷基取代的芳基。

[0070] 就本发明而言，术语“芳烷基”是指被芳基取代的烷基。

[0071] 就本发明而言，术语“烷氧基烷基”是指被烷氧基取代的烷基。

[0072] 就本发明而言，术语“氨基”是指本领域已知的通过用有机基团替换一个或多个氢基团而从氨衍生的含氮基团。例如，术语“酰基氨基”和“烷基氨基”分别是具有酰基和烷基取代基的特定 N- 取代的有机基团。

[0073] 就本发明而言，术语“卤素”或“卤”是指氟、氯、溴和碘。

[0074] 就本发明而言，术语“杂原子”是指氮、氧和硫。

[0075] 就本发明而言，术语“杂环烷基”是指含有至少一个杂原子的非芳香环体系，所述杂原子选自氮、氧和硫。杂环烷基环可任选与其它杂环烷基环和 / 或非芳香烃环稠合，或与它们相连。优选的杂环烷基具有 3-7 元。杂环烷基的实例包括，例如，哌嗪、吗啉、哌啶、四氢呋喃、吡咯烷和吡唑。优选的杂环烷基包括哌啶基、哌嗪基、吗啉基和吡咯烷基。

[0076] 就本发明而言，术语“杂芳基”是指含有至少一个杂原子的芳香环体系，所述杂原子选自 :氮、氧和硫。杂芳基环可以与一个或多个杂芳基环、芳香或非芳香烃环或杂环烷基环稠合，或与它们相连。杂芳基的实例包括，例如，吡啶、呋喃、噻吩、5,6,7,8- 四氢异喹啉和嘧啶。杂芳基的优选实例包括噻吩基、苯并噻吩基、吡啶基、喹啉基、吡嗪基、嘧啶基、咪唑基、苯并咪唑基、呋喃基、苯并呋喃基、噻唑基、苯并噻唑基、异噁唑基、噁二唑基、异噻唑基、苯并异噻唑基、三唑基、四唑基、吡咯基、吲哚基、吡唑基和苯并吡唑基。

[0077] 在一些实施方案中，取代烷基包括羧基烷基、氨基烷基、二烷基氨基、羟基烷基和巯基烷基 ；取代烯基包括羧基烯基、氨基烯基、二烯基氨基、羟基烯基和巯基烯基 ；取代炔基包括羧基炔基、氨基炔基、二炔基氨基、羟基炔基和巯基炔基 ；取代环烷基包括例如 4- 氨环己基的部分 (moiety)。

[0078] 就本发明而言，“正整数”应该理解为包括等于或大于 1（例如从约 1 到约 10 和，从约 1 到约 6 的整数）的整数，且本领域技术人员将理解其在普通领域技术人员理解的合理范围内。

[0079] 就本发明而言，术语“连接”应理解为包括共价（优选）或非共价连接一个基团至另一个基团上，即，由于化学反应的结果。

[0080] 就本发明而言，除非另外说明，术语“核酸”或“核苷酸”适用于单链或双链的脱氧核糖核酸（“DNA “）、核糖核酸（“RNA”）以及它们的任何化学修饰形式。

[0081] 优选地，要根据本发明进行治疗的哺乳动物是人。

附图说明

[0082] 图 1 描述了实施例 4 中所述 4 臂 -PEG-Gly-(7- 乙基 -10- 羟基喜树碱）在人血浆、磷酸盐缓冲溶液和盐水中的稳定性。

[0083] 图 2 描述了 pH 对实施例 4 中所述的 4 臂 -PEG-Gly-(7- 乙基 -10- 羟基喜树碱）的稳定性的影响。

[0084] 图 3A 描述了实施例 5 中所述的 4 臂 -PEG-Gly-(7- 乙基 -10- 羟基喜树碱）的药代动力学分布。

[0085] 图 3B 描述了实施例 5 中所述的 4 臂 -PEG-Gly-(7- 乙基 -10- 羟基喜树碱）的药代动力学分布。显示了 4 臂 -PEG-Gly-(7- 乙基 -10- 羟基喜树碱）缀合物的肠肝循环。

[0086] 图 4 描述了如实施例 6 所述在小鼠中肿瘤生长的抑制，所述小鼠异种移植有对 Herceptin ®和帕妥珠单抗显顽固性的人 JIMT-1 乳腺肿瘤。

[0087] 图 5 描述了如实施例 7 所述在小鼠中肿瘤生长的抑制，所述小鼠异种移植有人 N87 胃癌。

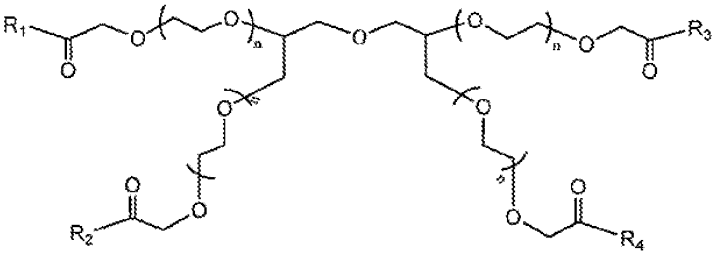
[0088] 发明详述

[0089] A. 概述

[0090] 在本发明的一个方面中，提供了在哺乳动物中治疗 HER2 阳性癌症的方法，包括：该方法包括：

[0091] 向哺乳动物联合施用 HER2 受体拮抗剂与有效量的式 (I) 化合物或其药学上可接受的盐：

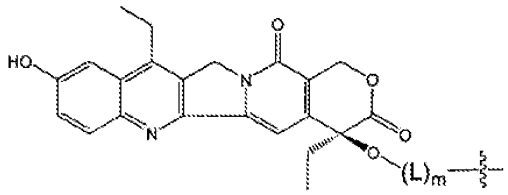
[0092]

(I) 

[0093] 其中

[0094] R_1、R_2、R_3 和 R_4 独立地为 OH 或

[0095]



[0096] 其中

[0097] L 为双功能连接基；

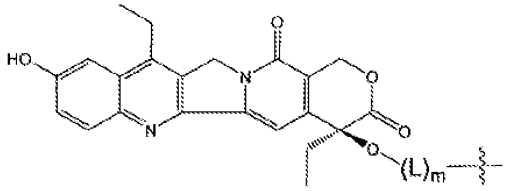
[0098] (m) 是 0 或正整数，优选 0 或约 1- 约 10 的整数（例如 1、2、3、4、5、6），其中当 (m) 等于或大于 2 时每个 L 相同或不同；和

[0099] (n) 为正整数；

[0100] 条件是 R_1、R_2、R_3 和 R_4 不全为 OH。

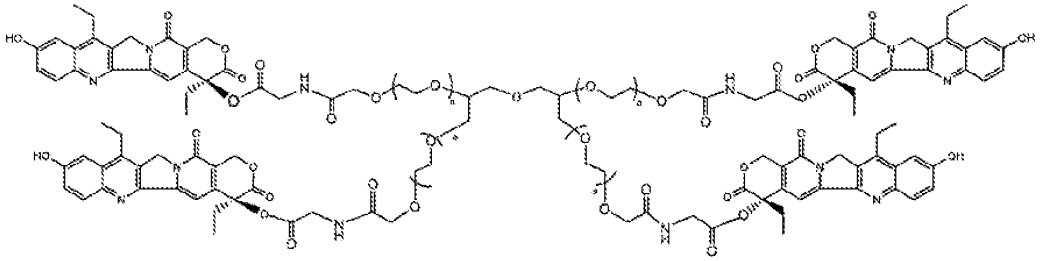
[0101] 在一个优选实施方案中，该方法包括向哺乳动物联合施用 HER2 受体拮抗剂与式 (I) 化合物，式 (I) 中 R_1、R_2、R_3 和 R_4 均为：

[0102]



[0103] 在更优选的方面，所述方法包括联合施用 HER2 受体拮抗剂与式 (Ia) 化合物：

[0104]



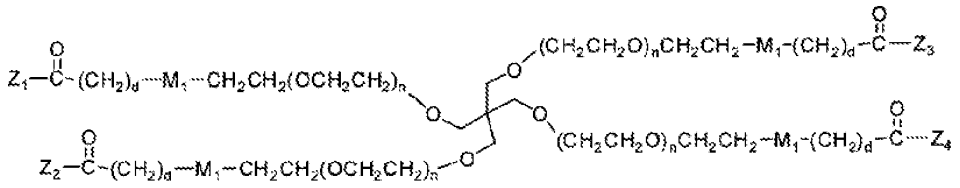
[0105] 其中 (n) 为约 227，使得该化合物的聚合部分具有约 40,000 道尔顿 (dalton) 的总数均分子量。

[0106] 在本发明的可选方面中，提供了在哺乳动物中治疗 HER2 阳性癌症的方法，包括：该方法包括向所述哺乳动物联合施用 HER2 受体拮抗剂与有效量的喜树碱、喜树碱类似物、喜树碱或其类似的聚合缀合物、或者它们药学上可接受的盐。

[0107] 在一个实施方案中，该方法通过向具有 HER2 阳性癌症的哺乳动物施用 HER2 受体拮抗剂以及喜树碱或其类似物的聚合缀合物来进行。聚合缀合物包括式 (II) 或 (III) 的化合物：

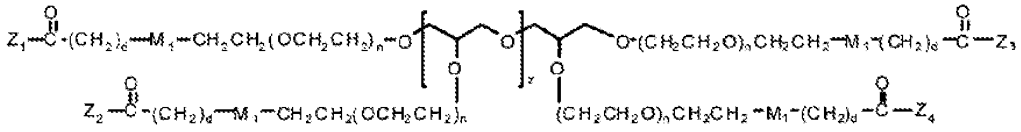
[0108] (II)

[0109]



或

(III)



[0110] 其中，

[0111] Z_1、Z_2、Z_3 和 Z_4 独立地是 OH 或 $(L)_m$-D；

[0112] L 为双功能连接基；

[0113] D 是喜树碱或喜树碱类似物；

[0114] M_1 是 O、S 或 NH，优选 O；

[0115] (d) 是 0 或约 1- 约 10 的正整数，优选 0、1、2 或 3，更优选 0 或 1；

[0116] (d) 是 0 或约 1- 约 29 的正整数，优选 1、5、13 或 29；

[0117] (m) 是 0 或正整数，优选 0 或约 1- 约 10 的整数（例如 1、2、3、4、5、6），其中当 (m) 等于或大于 2 时每个 L 相同或不同；和

[0118] (n) 是约 10- 约 2,300 的正整数使得所述化合物的聚合部分具有约 2,000- 约 100,000 道尔顿的总数均分子量。

[0119] 条件是 Z_1、Z_2、Z_3 和 Z_4 不全为 OH。

[0120] 在一个特定实施方案中，SN38 在其 20-OH 位置通过双官能连接基例如甘氨酸、丙氨酸、蛋氨酸等连接到式 (II) 或 (III) 的多臂聚乙二醇。或者，喜树碱、拓扑替康或 CPT-11 在其 20-OH 位置通过双官能连接基例如甘氨酸、丙氨酸、蛋氨酸、肌氨酸等连接到式 (II) 或 (III) 的多臂聚乙二醇。

[0121] 将 HER2 拮抗剂和式 (I) 化合物（或者式 (II) 或 (III) 化合物）以足以获得所需治疗效果的量施用。

[0122] 可用本文所述方法治疗的 HER2 阳性癌症包括但不限于实体肿瘤，乳癌，胃癌，卵巢癌，胃癌，子宫癌，子宫浆液性子宫内膜癌，前列腺癌，膀胱癌，唾液腺癌，肾腺癌，乳腺癌。上述列举并不排除其它情况，且当然本领域技术人员将认识到其它本文没有具体列出的 HER2 癌症也包括在本发明的范围内。

[0123] HER2 阳性癌症可以呈转移性或非转移性。

[0124] 在一方面，本文所述方法可用于治疗这样的 HER2 阳性癌症，在 HER2 受体拮抗剂例如 HER2 抗体例如曲妥珠单抗和帕妥珠单抗单独使用或者与不包括式 (I) 化合物（或者式 (II) 或 (III) 化合物）的化学疗法联合时，该癌症对其呈耐受性或顽固性。本文所述的联合治疗还适用于治疗对抗 HER2 抗体敏感的 HER2 阳性癌症。不希望受理论束缚，相比于在没有本文所述式 (I) 化合物的情况下用抗 HER2 抗体的治疗时，本文所述方法增强 HER2 拮抗剂的治疗效果和 / 或减轻 HER2 阳性癌症对 HER2 受体拮抗剂的耐受性。

[0125] 在其它方面，本文所述方法包括识别病人具有 HER2 阳性癌症的步骤。

[0126] 在备选方面，本发明提供了一种治疗与 HER2 蛋白质或基因（例如基因表达）含量较高（与具有正常 HER2 表达或不具有过量 HER2 表达的哺乳动物中所观察到的相比）相关的疾病或病症的方法。涉及 HER2 蛋白质或基因的过度表达的病理状况得益于本文所述的治疗。该方法可这样进行，其中联合施用 HER2 受体拮抗剂与式 (I) 化合物（或者式 (II) 或 (III) 化合物）或者其医药学上可接受的盐。

[0127] 在一个实施方案中，HER2 受体拮抗剂可与式 (I) 化合物（或者式 (II) 或 (III) 化合物）同时或相继施用。

[0128] 在另一个实施方案中，HER2 受体拮抗剂包括抗 HER2 抗体、反义 ErbB2 寡核苷酸和它们的组合。

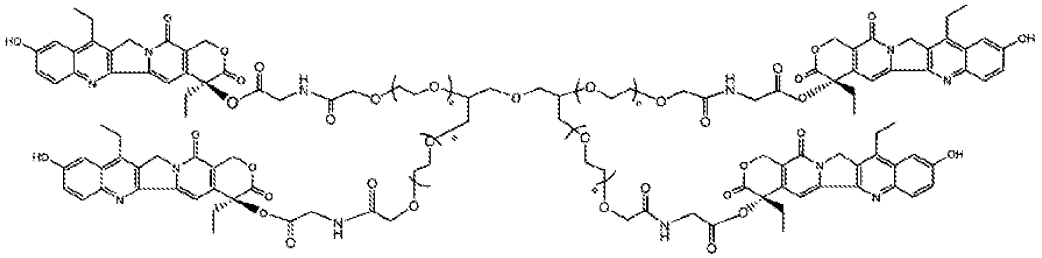
[0129] 在一个优选实施方案中，该方法包括以下步骤：

[0130] (a) 通过例如确定哺乳动物中使 HER2 过表达的癌症的存在来鉴别具有 HER2 阳性癌症的哺乳动物；和

[0131] (b) 向具有 HER2 阳性癌症的哺乳动物联合施用有效量的 HER2 受体拮抗剂，优选曲

妥珠单抗与有效量的式 (Ia) 化合物或其医药学上可接受的盐：

[0132]



[0133] 其中 (n) 优选为约 227，使得式 (Ia) 化合物的聚合部分的总分子量为约 40,000 道尔顿。

[0134] 在本发明的备选方面中，提供了治疗哺乳动物中酪氨酸激酶依赖性疾病或病症的方法，包括：HER2 受体是酪氨酸激酶并且其涉及病理状况例如癌症。该方法包括向具有过表达 HER2 依赖性疾病的哺乳动物联合施用 HER2 受体拮抗剂与式 (I)（或者式 (II) 或式 (III)）化合物。这些方法优选包括鉴别患有该疾病或病症的患者的步骤。

[0135] 在另一个方面，本发明提供了提高 HER2 受体拮抗剂在具有 HER2 阳性癌症的哺乳动物中的效果的方法。该方法包括联合施用 HER2 受体拮抗剂与有效量的式 (I) 化合物（或者式 (II) 或 (III) 化合物）。

[0136] 在又一个方面中，本发明提供了一种抑制哺乳动物中 HER2 阳性细胞的生长，增殖或转移的方法，其通过向哺乳动物联合施用 HER2 受体拮抗剂与本文所述式 (I) 化合物（或者式 (II) 或 (III) 化合物）或者其医药学上可接受的盐，或者通过将 HER2 受体拮抗剂联合本文所述式 (I) 化合物（或者式 (II) 或 (III) 化合物）或者其医药学上可接受的盐与癌细胞或组织接触。在一个特定实施方案中，该方法包括：

[0137] (a) 确定细胞中 HER2 表达的存在；和

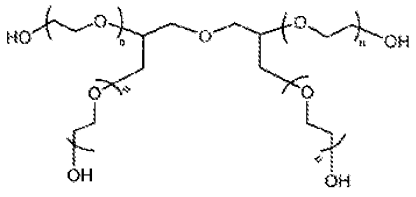
[0138] (b) 将 HER2 受体拮抗剂与有效量的权利要求 1 的式 (I)（或者式 (II) 或 (III)）化合物或其医药学上可接受的盐施用给需要其的哺乳动物。在某些方面，细胞为癌性细胞。

[0139] B. 聚合化合物

[0140] 1. 多臂聚合物

[0141] 本文所述的化合物的聚合部分包括多臂 PEG 连接至 7- 乙基 -10- 羟基喜树碱的 20-OH 基团。在本发明的一个方面中，缀合前，7- 乙基 -10- 羟基 - 喜树碱的聚合前药包括四臂 PEG，其具有下述结构：

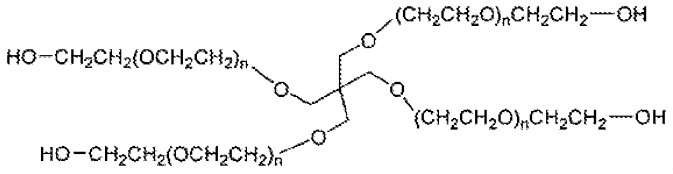
[0142]



[0143] 其中 n 为正整数。

[0144] 或者，聚合化合物在缀合之前使用具有如下结构的 4 臂 PEG：

[0145]



[0146] 多臂 PEG 物是描述于 NOF Corp. Drug Delivery System catalog, Ver. 8, 2006 年 4 月中的那些，其内容在此引入作为参考。

[0147] 在本发明的一个优选实施方案中，聚合物的聚合度 (n) 为约 28 至约 341，以提供具有总数均分子量为约 5,000Da 至约 60,000Da 的聚合物，且优选为约 114 至约 239，以提供具有总数均分子量为约 20,000Da 至约 42,000Da 的聚合物。(n) 表示在聚合物链中重复单元的数量，且其依赖于聚合物的分子量。在本发明的一个特别优选的实施方案中，n 为约 227 以提供总数均分子量为约 40,000Da 的聚合物部分。

[0148] 2. 双官能连接基

[0149] 在本发明的一些优选方面，双功能连接基包括氨基酸。所述氨基酸可以选自任何已知天然存在的 L- 氨基酸，例如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸、蛋氨酸、半胱氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、赖氨酸、精氨酸、组氨酸、脯氨酸和 / 或其组合，仅举出少数。另一方面，L 可以是肽残基。肽的大小可以变化，例如从大约 2 到大约 10 个氨基酸残基 (例如 2、3、4、5 或 6)。

[0150] 天然氨基酸的衍生物和类似物，以及多种已知的非天然氨基酸 (D 或 L)，疏水的或非疏水的，也可以用于本发明的范围。简单举例，氨基酸类似物和衍生物包括 :

[0151] 2- 氨基己二酸、3- 氨基己二酸、β - 丙氨酸、β - 氨基丙酸、

[0152] 2- 氨基丁酸、4- 氨基丁酸、γ - 氨基丁酸 (piperidinic acid)、6- 氨基己酸、

[0153] 2- 氨基庚酸、2- 氨基异丁酸、3- 氨基异丁酸、

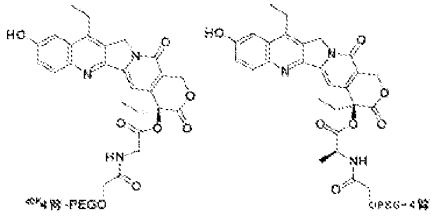
[0154] 2- 氨基庚二酸、2,4- 氨基丁酸、锁链素、2,2- 二氨基庚二酸，

[0155] 2,3- 二氨基丙酸、n- 乙基甘氨酸、N- 乙基天冬酰胺、3- 羟基脯氨酸、

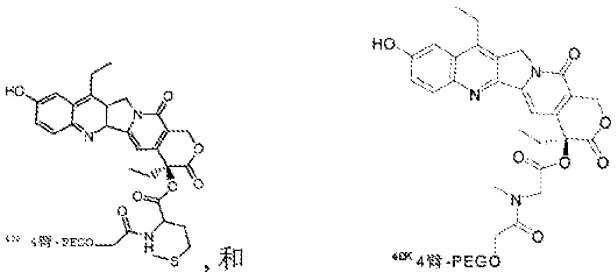
[0156] 4- 羟基脯氨酸、异锁链素、别异亮氨酸、N- 甲基甘氨酸或肌氨酸、

[0157] N- 甲基 - 异亮氨酸、6-N- 甲基 - 赖氨酸、N- 甲基缬氨酸、正缬氨酸、正亮氨酸、鸟氨酸以及其它许多物质，它们列于 63Fed. Reg. , 29620, 29622 中，在此引入作为参考。一些优选的 L 基团包括甘氨酸、丙氨酸、蛋氨酸或肌氨酸。例如，所述化合物可以为 :

[0158]



(化合物 9：甘氨酸)，(化合物 12：丙氨酸)



，和

(化合物 18：蛋氨酸)，(化合物 23：肌氨酸)

[0159] 为了方便描述而不是为了限制，示出四臂 PEG 中的一臂。四臂 PEG 中的一臂，至多 4 臂可与 7- 乙基 -10- 羟基 - 喜树碱缀合。

[0160] 更优选地，本发明所述的治疗使用包括甘氨酸作为连接基团 (L) 的化合物。

[0161] 在本发明的可选方面中，连接聚合物和 7- 乙基 -10- 羟基喜树碱的 L 可选自：

[0162] $-[C(=O)]_x(CR_{22}R_{23})_z-$，

[0163] $-[C(=O)]_x(CR_{22}R_{23})_z-O-$，

[0164] $-[C(=O)]_x(CR_{22}R_{23})_z-NR_{26}-$，

[0165] $-[C(=O)]_xO(CR_{22}R_{23})_z-$，

[0166] $-[C(=O)]_xO(CR_{22}R_{23})_zO-$，

[0167] $-[C(=O)]_xO(CR_{22}R_{23})_yNR_{26}-$，

[0168] $-[C(=O)]_yNR_{21}(CR_{22}R_{23})_z-$，

[0169] $-[C(=O)]_yNR_{21}(CR_{22}R_{23})_zO-$，

[0170] $-[C(=O)]_yNR_{21}(CR_{22}R_{23})_yNR_{26}-$，

[0171] $-[C(=O)]_x(CR_{22}R_{23}O)_z-$，

[0172] $-[C(=O)]_xO(CR_{22}R_{23}O)_z-$，

[0173] $-[C(=O)]_yNR_{21}(CR_{22}R_{23}O)_z-$，

[0174] $-[C(=O)]_x(CR_{22}R_{23}O)_z(CR_{24}R_{25})_y-$，

[0175] $-[C(=O)]_xO(CR_{22}R_{23}O)_z(CR_{24}R_{25})_y-$，

[0176] $-[C(=O)]_yNR_{21}(CR_{22}R_{23}O)_z(CR_{24}R_{25})_y-$，

[0177] $-[C(=O)]_x(CR_{22}R_{23}O)_z(CR_{24}R_{25})_yO-$，

[0178] $-[C(=O)]_x(CR_{22}R_{23})_y(CR_{24}R_{25}O)_x-$，

[0179] $-[C(=O)]_xO(CR_{22}R_{23}O)_z(CR_{24}R_{25})_yO-$，

[0180] $-[C(=O)]_yO(CR_{22}R_{23})_z(CR_{24}R_{25}O)_y-$，

[0181] $-[C(=O)]_yNR_{21}(CR_{22}R_{23}O)_z(CR_{24}R_{25})_yO-$，

[0182] $-[C(=O)]_v-NR_{21}-(CR_{22}R_{23})_t-(CR_{24}R_{25}O)_y-$,

[0183] $-[C(=O)]_v-(CR_{22}R_{23})_sO-(CR_{28}R_{29})_t-$,

[0184] $-[C(=O)]_v-(CR_{22}R_{23})_sNR_{26}-(CR_{28}R_{29})_t-$,

[0185] $-[C(=O)]_v-(CR_{22}R_{23})_sS-(CR_{28}R_{29})_t-$,

[0186] $-[C(=O)]_vO(CR_{22}R_{23})_tO-(CR_{28}R_{29})_t-$,

[0187] $-[C(=O)]_vO(CR_{22}R_{23})_tNR_{26}-(CR_{28}R_{29})_t-$,

[0188] $-[C(=O)]_vO(CR_{22}R_{23})_sS-(CR_{28}R_{29})_t-$,

[0189] $-[C(=O)]_vNR_{21}-(CR_{22}R_{23})_tO-(CR_{28}R_{29})_t-$,

[0190] $-[C(=O)]_vNR_{21}-(CR_{22}R_{23})_tNR_{26}-(CR_{28}R_{29})_t-$,

[0191] $-[C(=O)]_vNR_{21}-(CR_{22}R_{23})_tS-(CR_{28}R_{29})_t-$,

[0192] $-[C(=O)]_v-(CR_{22}R_{23}CR_{28}R_{29}O)_tNR_{26}-$,

[0193] $-[C(=O)]_v-(CR_{22}R_{23}CR_{28}R_{29}O)_t-$,

[0194] $-[C(=O)]_vO(CR_{22}R_{23}CR_{28}R_{29}O)_tNR_{26}-$,

[0195] $-[C(=O)]_vO(CR_{22}R_{23}CR_{28}R_{29}O)_t-$,

[0196] $-[C(=O)]_vNR_{21}-(CR_{22}R_{23}CR_{28}R_{29}O)_tNR_{26}-$,

[0197] $-[C(=O)]_vNR_{21}-(CR_{22}R_{23}CR_{28}R_{29}O)_t-$,

[0198] $-[C(=O)]_v-(CR_{22}R_{23}CR_{28}R_{29}O)_t-(CR_{24}R_{25})_y-$,

[0199] $-[C(=O)]_vO(CR_{22}R_{23}CR_{28}R_{29}O)_t-(CR_{24}R_{25})_y-$,

[0200] $-[C(=O)]_vNR_{21}-(CR_{22}R_{23}CR_{28}R_{29}O)_t-(CR_{24}R_{25})_y-$,

[0201] $-[C(=O)]_v-(CR_{22}R_{23}CR_{28}R_{29}O)_s-(CR_{24}R_{25})_sO-$,

[0202] $-[C(=O)]_v-(CR_{22}R_{23})_s-(CR_{24}R_{25}CR_{28}R_{29}O)_y-$,

[0203] $-[C(=O)]_v-(CR_{22}R_{23})_s-(CR_{24}R_{25}CR_{28}R_{29}O)_yNR_{26}-$,

[0204] $-[C(=O)]_vO(CR_{22}R_{23}CR_{28}R_{29}O)_t-(CR_{24}R_{25})_yO-$,

[0205] $-[C(=O)]_vO(CR_{22}R_{23})_t-(CR_{24}R_{25}CR_{28}R_{29}O)_y-$,

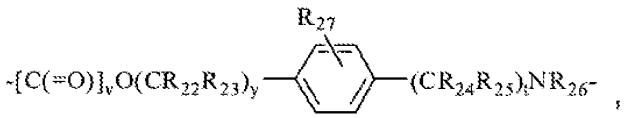
[0206] $-[C(=O)]_vO(CR_{22}R_{23})_t-(CR_{24}CR_{25}CR_{28}R_{29}O)_vNR_{26}-$,

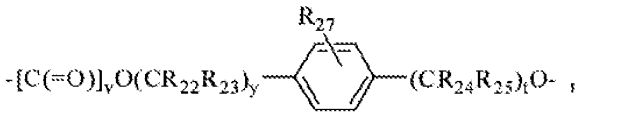
[0207] $-[C(=O)]_vNR_{21}-(CR_{22}R_{23}CR_{28}R_{29}O)_t-(CR_{24}R_{25})_yO-$,

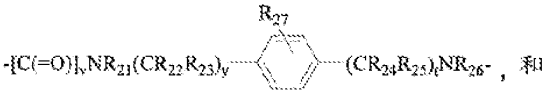
[0208] $-[C(=O)]_vNR_{21}-(CR_{22}R_{23})_t-(CR_{24}R_{25}CR_{28}R_{29}O)_y-$,

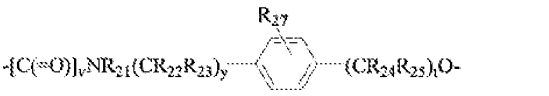
[0209] $-[C(=O)]_vNR_{21}-(CR_{22}R_{23})_t-(CR_{24}R_{25}CR_{28}R_{29}O)_yNR_{26}-$,

[0210]









[0211] 其中：

[0212] R_{21}-R_{99} 独立地选自氢、氨基、被取代的氨基、叠氮基、羧基、氰基、卤素、羟基、硝基、甲硅烷基醚 (silyl ether)、磺酰基、巯基、C_{1-6} 烷基巯基、芳基巯基、被取代的芳基巯基、被取代的 C_{1-6} 烷硫基、C_{1-6} 烷基、C_{2-6} 烯基、C_{2-6} 炔基、C_{3-10} 支链烷基、C_{3-8} 环烷基、C_{3-8} 被取代的烷基、C_{2-6} 被取代的烯基、C_{2-6} 被取代的炔基、C3-8 被取代的环烷基、芳基、被取代的芳基、杂芳基、被取代的杂芳基、C_{1-6} 杂烷基、被取代的 C_{1-6} 杂烷基、C_{1-6} 烷氧基、芳氧基、C_{1-6} 杂烷氧基、杂芳氧基、C_{2-6} 烷酰基、芳基羰基、C_{2-6} 烷氧基羰基、芳氧基羰基、C_{2-6} 烷酰基氧基、芳基羰基氧基、C_{2-6} 被取代的烷酰基、被取代的芳基羰基、C_{2-6} 被取代的烷酰基氧基、被取代的芳氧基羰基、C_{2-6} 被取代的烷酰基氧基和被取代的芳基羰基氧基；

[0213] (t)、(t') 和 (y) 独立地选自 0 或正整数，优选为约 1- 约 10，例如 1、2、3、4、5 和 6；且

[0214] (v) 为 0 或 1。

[0215] 本发明范围内所预期到的双官能连接基包括其中取代基或变量的组合可允许使得这样的组合产生稳定化合物的那些。

[0216] 在一些优选实施方案中，L 可以包括：

[0217] -[C(=O)]$_v$-$(CH_2)_t$-，

[0218] -[C(=O)]$_v$-$(CH_2)_t$-O-，

[0219] -[C(=O)]$_v$-$(CH_2)_t$-NH-，

[0220] -[C(=O)]$_v$O$(CH_2)_t$-，

[0221] -[C(=O)]$_v$O$(CH_2)_t$O-，

[0222] -[C(=O)]$_v$O$(CH_2)_t$NH-，

[0223] -[C(=O)]$_v$NH$(CH_2)_t$-，

[0224] -[C(=O)]$_v$NH$(CH_2)_t$O-，

[0225] -[C(=O)]$_v$NH$(CH_2)_t$NH-，

[0226] -[C(=O)]$_v$-$(CH_2O)_t$-，

[0227] $-[C(=O)]_x O(CH_2O)_z-$,

[0228] $-[C(=O)]_x NH(CH_2O)_z-$,

[0229] $-[C(=O)]_x(CH_2O)_t(CH_2)_v-$,

[0230] $-[C(=O)]_x O(CH_2O)_t(CH_2)_y-$,

[0231] $-[C(=O)]_x NH(CH_2O)_z(CH_2)_y-$,

[0232] $-[C(=O)]_x(CH_2O)_t(CH_2)_y O-$,

[0233] $-[C(=O)]_x(CH_2)_t(CH_2O)_y-$,

[0234] $-[C(=O)]_x O(CH_2O)_t(CH_2)_y O-$,

[0235] $-[C(=O)]_x O(CH_2)_t(CH_2O)_y-$,

[0236] $-[C(=O)]_x NH(CH_2O)_z(CH_2)_y O-$,

[0237] $-[C(=O)]_x NH(CH_2)_z(CH_2O)_y-$,

[0238] $-[C(=O)]_x(CH_2)_t O-(CH_2)_{t'}-$,

[0239] $-[C(=O)]_x(CH_2)_t NH-(CH_2)_{t'}-$,

[0240] $-[C(=O)]_x(CH_2)_t S-(CH_2)_{t'}-$,

[0241] $-[C(=O)]_x O(CH_2)_t O-(CH_2)_{t'}-$,

[0242] $-[C(=O)]_x O(CH_2)_t NH-(CH_2)_{t'}-$,

[0243] $-[C(=O)]_x O(CH_2)_t S-(CH_2)_{t'}-$,

[0244] $-[C(=O)]_x NH(CH_2)_t O-(CH_2)_{t'}-$,

[0245] $-[C(=O)]_x NH(CH_2)_t NH-(CH_2)_{t'}-$,

[0246] $-[C(=O)]_x NH(CH_2)_t S-(CH_2)_{t'}-$,

[0247] $-[C(=O)]_x(CH_2CH_2O)_t NH-$,

[0248] $-[C(=O)]_x(CH_2CH_2O)_t-$,

[0249] $-[C(=O)]_x O(CH_2CH_2O)_t NH-$,

[0250] $-[C(=O)]_x O(CH_2CH_2O)_t-$,

[0251] $-[C(=O)]_x NH(CH_2CH_2O)_t NH-$,

[0252] $-[C(=O)]_x NH(CH_2CH_2O)_t-$,

[0253] $-[C(=O)]_x(CH_2CH_2O)_t(CH_2)_y-$,

[0254] $-[C(=O)]_x O(CH_2CH_2O)_t(CH_2)_y-$,

[0255] $-[C(=O)]_x NH(CH_2CH_2O)_t(CH_2)_y-$,

[0256] $-[C(=O)]_x(CH_2CH_2O)_t(CH_2)_y O-$,

[0257] $-[C(=O)]_x(CH_2)_t(CH_2CH_2O)_y-$,

[0258] $-[C(=O)]_x(CH_2)_t(CH_2CH_2O)_y NH-$,

[0259] $-[C(=O)]_x O(CH_2CH_2O)_t(CH_2)_y O-$,

[0260] $-[C(=O)]_x O(CH_2)_t(CH_2CH_2O)_y-$,

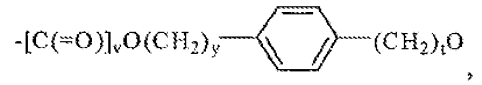
[0261] $-[C(=O)]_x O(CH_2)_t(CH_2CH_2O)_y NH-$,

[0262] $-[C(=O)]_x NH(CH_2CH_2O)_t(CH_2)_y O-$,

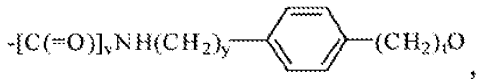
[0263] $-[C(=O)]_x NH(CH_2)_t(CH_2CH_2O)_y-$,

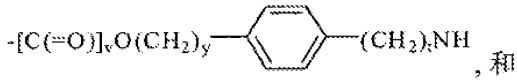
[0264] $-[C(=O)]_x NH(CH_2)_t(CH_2CH_2O)_y NH-$,

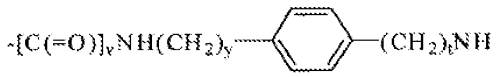
[0265]



[0266]







[0267] 其中 (t)、(t') 和 (y) 独立地选自 0 或正整数，优选为约 1- 约 10（例如 1、2、3、4、5 和 6）；且

[0268] (v) 为 0 或 1。

[0269] 在本发明的一些方面，式 (I)（式 (II) 或 (III)）化合物包括 1 至约 10 个（例如 1，2，3，4，5 或 6 个）的双官能连接基单元。在本发明的一些优选方面中，所述化合物包括 1 个单位的双官能连接基，且因此 m 为 1。

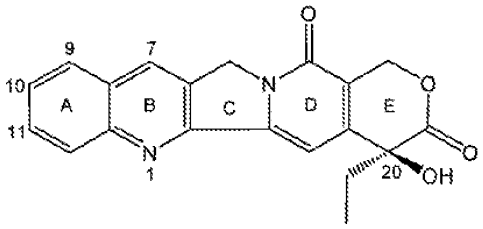
[0270] 其它连接基见于 Greenwald 等人 (Bioorganic&Medicinal Chemistry，1998，6：551-562) 的表 1，其内容在此引入作为参考。

[0271] 3、喜树碱和相关喜树碱类似物

[0272] 喜树碱是中国本土的喜树 (camptoteca accuminata) 和印度本土的臭味假柴龙树 (nothapodytes foetida) 产生的水不溶性的细胞毒性生物碱。还已知喜树碱与相关化合物和类似物是潜在抗癌或抗肿瘤剂并且已显示它们在实验室动物中表现出这些体外和体内活性。例如，本文所述用于治疗的喜树碱类似物包括 SN38、喜树碱、拓扑替康 (topotecan) 和 CPT-11。

[0273] 喜树碱和一些相关的类似物具有下述结构：

[0274]

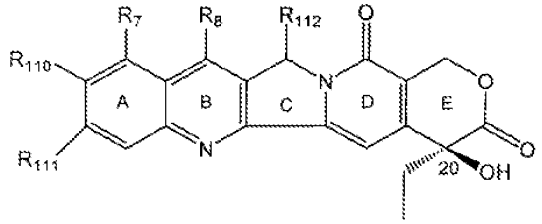


[0275] 从该母核结构，已经制备了一些已知的类似物。例如，A 环在 10- 位和 / 或 11- 位可以被 OH 取代。A 环还可以被直链或支链 C_{1-30} 烷基或 C_{1-17} 烷氧基取代，任选通过杂原子（即 -O 或 -S）与环相连。B 环可以在 7- 位被直链或支链 C_{1-30} 烷基（优选 C_2 烷基）、C_{5-6} 环烷基、C_{1-30} 烷氧基、苯基烷基等，烷基氨基甲酸酯、烷基卡巴肼、苯基肼衍生物等取代。其它取代可能在 C、D 和 E 环中。参见，例如，美国专利号 5,004,758；4,943,579；RE32,518，其内容在此引入作为参考。本领域技术人员应理解，10- 羟基喜树碱、11- 羟基喜树碱和 10，11- 二羟基喜树碱类似物是天然产物，其为 C. Acuminata 及其亲缘类中较少含有的成分之

一。这些化合物的其它取代，即 7- 烷基 -、7- 取代的烷基 -、7- 氨基 -、7- 氨基烷基 -、7- 芳烷基 -、9- 烷基 -、9- 芳烷基 - 喜树碱等衍生物，可使用已知合成技术制得而无需付出过多劳动。一些喜树生物碱具有下述结构：

[0276]

(IV)



[0277] 其中

[0278] R_7 选自 NO_2，NH_2，N_3，氢，卤素，F，Cl，Br，I，COOH，OH，O-C_{1-8} 烷基，SH，S-C_{1-3} 烷基，CN，CH_2NH_2，NH-C_{1-3} 烷基，CH_2-NH-C_{1-3} 烷基，N(C_{1-3} 烷基)$_2$，$CH_2N(C_{1-3}$ 烷基)$_2$，O-、NH- 和 S-$CH_2CH_2N(CH_2CH_2OH)_2$，

[0279] O-、NH- 和 S-$CH_2CH_2CH_2N(CH_2CH_2OH)_2$，O-、NH- 和 S-$CH_2CH_2N(CH_2CH_2CH_2OH)_2$，

[0280] O-、NH- 和 S-$CH_2CH_2CH_2N(CH_2CH_2CH_2OH)_2$，O-、NH- 和 S-$CH_2CH_2N(C_{1-3}$ 烷基)$_2$，

[0281] O-、NH- 和 S-$CH_2CH_2CH_2N(C_{1-3}$ 烷基)$_2$，CHO 和 C_{1-3} 烷基；

[0282] R_8 选自 H 或 C_{1-8} 烷基和 $CH_2NR_9R_{10}$，

[0283] 其中

[0284] R_9 选自氢、C_{1-6} 烷基、C_{3-7} 环烷基、C_{3-7} 环烷基 -C_{1-6} 烷基、C_{2-6} 烯基、羟基 -C_{1-6} 烷基、C_{1-6} 烷氧基 -C_{1-6} 烷基；或者

[0285] R_{10} 选自氢、C_{1-8} 烷基、C_{3-7} 环烷基、C_{3-7} 环烷基 -C_{1-6} 烷基、C2-6 烯基、羟基 -C_{1-6} 烷基、C_{1-6} 烷氧基 -C_{1-6} 烷基，且 R_{10} 可以为 -COR11，其中 R_{11} 为氢、C_{1-8} 烷基、全卤 -C_{1-6} 烷基、C_{3-7} 环烷基、C_{3-7} 环烷基 -C_{1-6} 烷基、C_{2-8} 烯基、羟基 -C_{1-6} 烷基、C_{1-8} 烷氧基、C_{1-8} 烷氧基 -C_{1-6} 烷基；或

[0286] R_{110}-R_{111} 各自独立地选自：氢；卤素；酰基；烷基；取代的烷基；烷氧基；取代的烷氧基；烯基；炔基；环烷基；羟基；氰基；硝基；叠氮基；酰氨基；肼；氨基；取代的氨基；羟基羰基 (hydroxcarbonyl)；烷氧基羰基；烷基羰基氧基；烷基羰基氨基；氨基甲酰基氧基；芳基磺酰基氧基；烷基磺酰基氧基；-C(R_{117}) = N-(O)j-R_{118}，其中 R_{117} 为 H、烷基、烯基、环烷基或芳基，(j) 为 0 或 1，且 R_{118} 为 H、烷基、烯基、环烷基或杂环基；和 R_{119}C(O)O-，其中 R_{119} 为卤素、氨基、取代的氨基、杂环基、取代的杂环基或 R_{120}-O-$(CH_2)_k$-，其中 k 为 1-10 的整数，且 R_{120} 为烷基、苯基、取代的苯基、环烷基、取代的环烷基、杂环基或取代的杂环基；或

[0287] R_7 与 R_{110} 一起或 R_{110} 与 R_{111} 一起形成取代的或未取代的亚甲基二氧基、亚乙基二氧基或亚乙基氧基；且

[0288] R_{112} 为 H 或 OR'，其中 R' 为烷基、烯基、环烷基、卤代烷基或羟基烷基。

[0289] 优选的芳基是苯基和萘基。优选的杂环烷基环包括哌啶。当 R_9 和 R_{10} 与和它们相连的氮原子一起时，合适的杂环包括：氮丙啶、氮杂环丁烷、吡咯烷、哌啶、六亚甲基亚胺 (hexamethylenimine)、咪唑烷、吡唑烷、异噁唑烷、哌嗪、N- 甲基哌嗪、四氢氮杂 N- 甲基四

氢氮杂、噻唑烷等。

[0290] 出于描述的容易性且不加以限制，所述描述涉及 7- 乙基 -10- 羟基喜树碱或作为喜树碱类似物的 CPT-11，作为优选和示例化合物。应理解，请求保护的发明包括所述这样的衍生物和类似物，只要所述类似物具有 OH，例如 20-OH 基团，其目的是连接到聚合物。喜树碱或喜树碱类物可以是外消旋混合物或光学纯异构体。优选地，在多臂聚合物前药中使用基本上纯和活性的形式，例如 20(S) 喜树碱或喜树碱类似物。

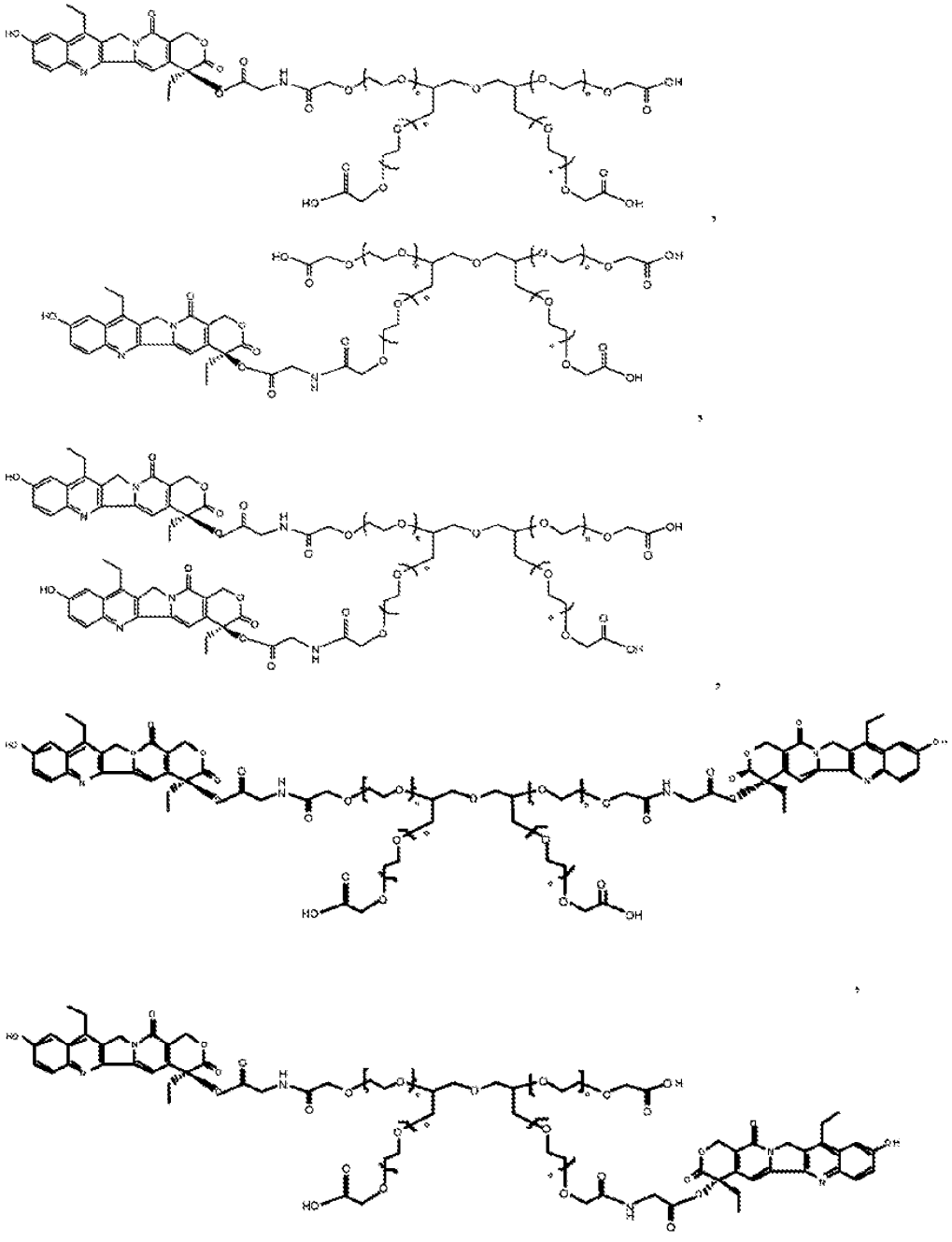
[0291] 4. 聚合化合物的合成

[0292] 大体上，本文所述治疗所用聚合化合物通过使 1 或更多当量的活化的多臂聚合物与例如，每个活性位点 1 或更多当量的氨基酸 -(20)-7- 乙基 -10- 羟基喜树碱反应而制备，反应条件为足以使氨基与聚合物的羧酸反应并形成连接。合成细节描述于美国专利 No. 7, 462, 627，将其内容全文并入本文作为参考。

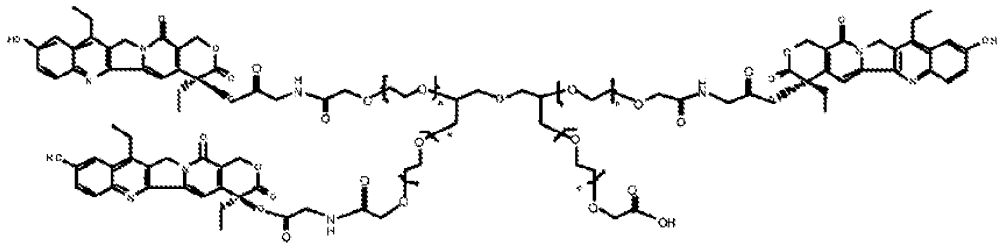
[0293] 优选的双官能连接基的实例包括甘氨酸、丙氨酸、蛋氨酸、肌氨酸等，并且在美国专利 No. 7, 462, 627 的实施例中描述了合成。

[0294] 根据本发明，施用的化合物包括：

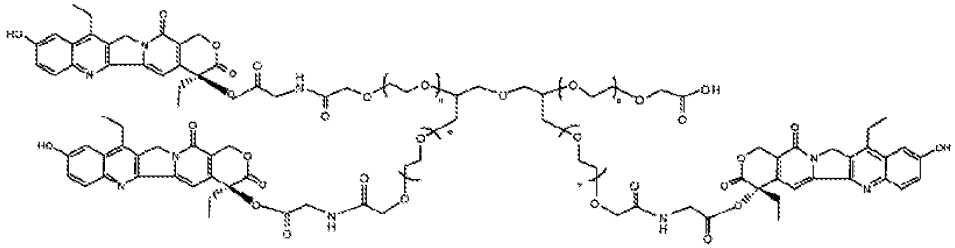
[0295]



[0296]

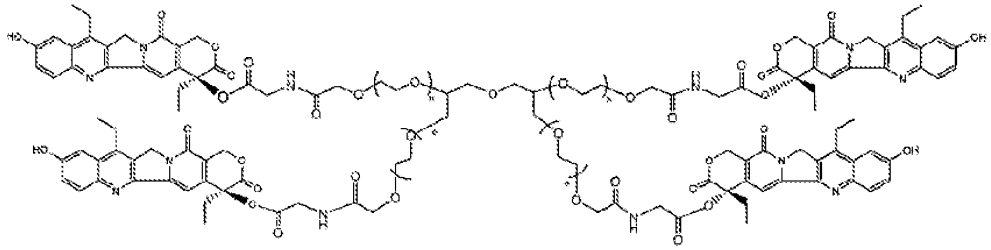


,



;

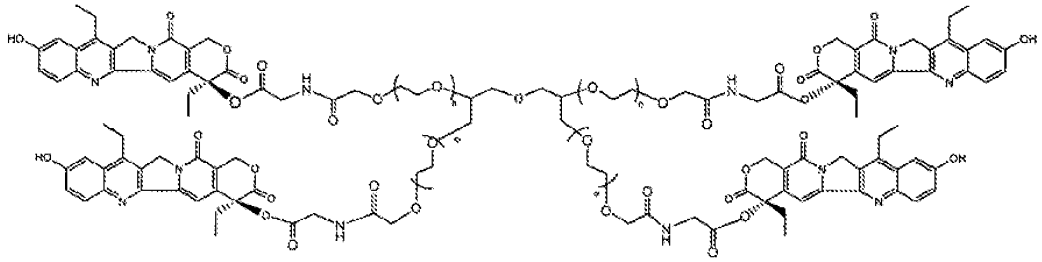
和



。

[0297] 一种特别优选的实施方案包括施用具有下述结构的化合物：(Ia)

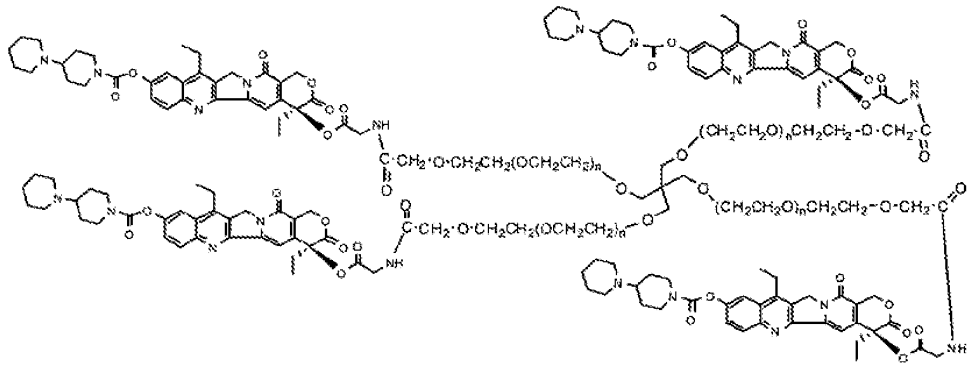
[0298]



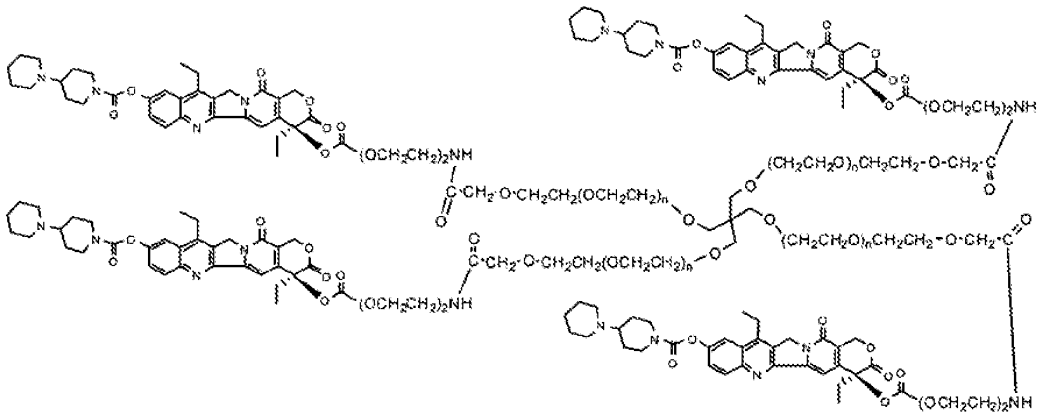
[0299] 其中聚合物的所有四臂均通过甘氨酸与 7- 乙基 -10- 羟基喜树碱轭合，且聚合物部分具有的总数均分子量为约 40,000 道尔顿。

[0300] 用于本文所述治疗的替代实施方案包括：

[0301]



或



[0302] 其中 (n) 为约 28 至 341 的整数，使得式 (II) 化合物的聚合部分的总分子量为约 5,000 至约 60,000 道尔顿，优选约 20,000 或 40,000 道尔顿。

[0303] 在其它实施方案中，本文所述的治疗使用 WO2005/028539 中所述的聚合物化合物，通过引用将其内容全文并入本文。

[0304] C. HER2 拮抗剂

[0305] 许多类型的癌症与提高的 ER2 蛋白质和基因水平有关。HER2 蛋白质催化末端磷酸酯从 ATP 转移到蛋白质底物的酪氨酸残基。HER2 受体拮抗剂和 HER2 拮抗剂通常是指抑制 HER2 蛋白质或基因的功能或表达的化合物。HER2 受体拮抗剂可直接地或者通过其中涉及 HER2 蛋白质的下游或上游细胞信号传导通路来抑制 HER2 受体功能。特别地，用于本文所述联合治疗的 HER2 受体拮抗剂包括直接抑制 HER2 受体功能或 HER2 受体的表达，而不是通过下游或上游细胞信号传导通路来抑制 HER2 受体功能的抗 HER2 抗体和反义 HER2 寡核苷酸。

[0306] 在一个实施方案中，本文所述联合治疗通过联合施用抗 HER2 受体抗体与式 (I)（或者式 (II) 或 (III)）化合物来进行。抗体与 HER2 受体蛋白质 (p185) 结合。优选地，用于本文所述治疗的抗体与 HER2 受体的胞外区域例如 HER2 区域 II 和 / 或 IV 结合。一个特定的实施方案使用曲妥珠单抗。另一个特定的实施方案使用帕妥珠单抗。

[0307] 商品名为 Herceptin ®的曲妥珠单抗是重组人源性单克隆抗体，其对准人表皮生长因子受体 2(HER2)。在与肿瘤细胞表面上的 HER2 受体结合后，曲妥珠单抗引起抵抗使

HER2 受体过表达的肿瘤细胞的抗体依赖性细胞介导的细胞毒性。HER2 被许多腺癌、特别是乳癌过表达。曲妥珠单抗以 CAS 登记号 No. 180288-69-1 进行登记。关于曲妥珠单抗的详细信息描述于美国专利 No. 6, 165, 464，通过引用将该专利的内容并入本文。

[0308] 商品名为 Omnitarg® 的帕妥珠单抗也是重组人源性单克隆抗体，其对准 HER2 受体的胞外二聚区域。(CAS 登记号 No. 380610-27-5)。帕妥珠单抗与 HER2 受体的二聚区域结合并且抑制 HER2 受体蛋白质与其它 HER 酪氨酸激酶受体蛋白质二聚的能力。受体蛋白质二聚的能力阻止 HER 信号传导通路的激活，从而导致肿瘤细胞的细胞凋亡。帕妥珠单抗还称作 rhuMAb 2C4，其描述于例如美国专利 No. 6, 949, 245 和 5, 821, 337，通过引用将其并入本文。

[0309] 在另一个实施方案中，本文所述方法可以这样进行，其中将式 (I)（或者式 (II) 或 (III)）化合物与反义 HER2(ErbB2) 寡核苷酸或其药学上可接受的盐一起施用。反义 HER2 寡核苷酸可同时或相继施用。

[0310] 在一个实施方案中，HER2 寡核酸包括与 HER2 前 mRNA 或 mRNA 的至少 8 个连续核苷酸互补的核酸。

[0311] "寡核苷酸"通常为相对短的多核苷酸，例如长度大小为约 2- 约 200 个核苷酸，优选约 8- 约 50 个核苷酸，更优选约 8- 约 30 个核苷酸。根据本发明的寡核苷酸通常为合成的核酸，并且为单链的，除非另有说明。术语"多核苷酸"和"多核酸"在本文中也可以同义使用。

[0312] 寡核苷酸（类似物）不限于寡核苷酸的单一物质，而是可设计为与许多这类部分一同起作用。所预期的核酸分子可包括硫代磷酸酯核酸间连接修饰，糖修饰，核酸碱基修饰和 / 或磷酸酯主链修饰。寡核苷酸可含有天然的磷酸二酯主链或硫代磷酸酯主链或任何其它改性主链类似物例如 LNA（锁核酸），PNA（具有肽主链的核酸），CpG 低聚物等，例如在 Tides2002, Oligonucleotide and Peptide Technology Conferences, 6-8 月, 2002, Las Vegas, NV 和 Oligonucleotide&Peptide Technologies, 18th&19th 2003 年 11 月, Hamburg, Germany 公开的那些，通过引用将其内容并入本文。

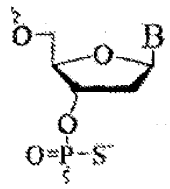
[0313] 本发明所预期的寡核苷酸的修饰包括，例如，向寡核苷酸中引入另外的电荷、极化度、氢键、静电相互作用和官能团的官能部分的加成或者取代。这种修饰包括但不限于 2′ - 位糖修饰，5- 位嘧啶修饰，8- 位嘌呤修饰，环外胺的修饰，4- 硫代尿苷的取代，5- 溴或 5- 碘尿嘧啶的取代，主链修饰，甲基化，碱基配对组合如异碱基 (isobase) 异胞苷 (isocytidine) 和异胍 (isoguanidine)，及类似组合。本发明范围内预期的寡核苷酸修饰还可包括 3′ 和 / 或 5′ 帽子结构。

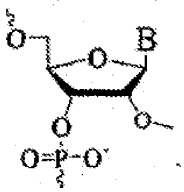
[0314] 就本发明而言，"帽子结构"将理解为表示化学改性部分，其引入在寡核苷酸的任一末端。所述帽子可以存在于 5′ - 末端 (5′ - 帽子）或 3′ - 末端 (3′ - 帽子）或可存在于这两个末端。5′ - 帽子的非限制性实施例包括反转的无碱基残基（部分），4′，5′ - 亚甲基核苷；1-(β-D- 赤型呋喃糖基）核苷，4′ - 硫代核苷，碳环核苷；1,5- 失水己糖醇核苷；L- 核苷；α - 核苷；改性的碱基核苷；二硫代磷酸酯连接；苏型 - 戊呋喃糖基核苷；无环 3′，4′ - 开环核苷；无环 3,4- 二羟基丁基核苷；无环 3,5- 二羟基戊基核苷；3′ -3′ - 反转核苷部分；3′ -3′ - 反转无碱基部分；3′ -2′ - 反转核苷部分；3′ -2′ - 反转无碱基部分；1,4- 丁二醇磷酸盐；3′ - 氨基磷酸酯；磷酸己酯；磷酸氨基己基酯；3′ - 磷酸酯；

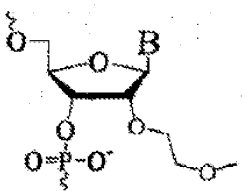
3′ -硫代磷酸酯；二硫代磷酸酯；或者桥接或非桥接甲基膦酸酯部分。描述在WO 97/26270进行了详细描述，通过引用将其内容并入本文。3′ -帽子可包括例如4′，5′ -亚甲基核苷；1-(β-D-赤型呋喃糖基)核苷；4′ -硫代核苷，碳环核苷；5′ -氨基烷基磷酸酯；1,3-二氨基-2-丙基磷酸酯；3-氨丙基磷酸酯；6-氨基己基磷酸酯；1,2-氨基十二烷基磷酸酯；羟基丙基磷酸酯；1,5-失水己糖醇核苷；L-核苷；α-核苷；改性的碱基核苷；二硫代磷酸酯；苏型-戊呋喃糖基核苷；无环3′，4′ -开环核苷；3,4-二羟基丁基核苷；3,5-二羟基戊基核苷；5′ -5′ -反转核苷部分；5′ -5′ -反转无碱基部分；5′ -氨基磷酸酯；5′ -硫代磷酸酯；1,4-丁二醇磷酸酯；5′ -氨基；桥接和/或非桥接5′ -氨基磷酸酯，硫代磷酸酯和/或二硫代磷酸酯，桥接或非桥接甲基膦酸酯和5′ -巯基部分。还参见Beaucage and Iyer，1993，Tetrahedron 49，1925；通过引用将其内容并入本文。

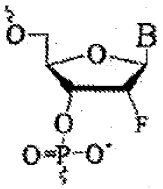
[0315] 核苷类似物的非限制性举例具有以下结构：

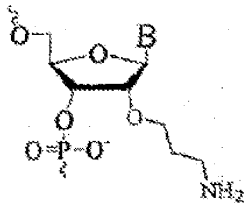
[0316]

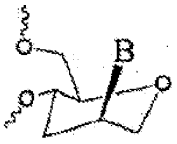

硫代磷酸酯
(Phosphorthioate)

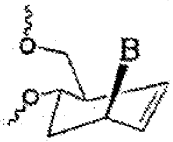

2'-O-甲基

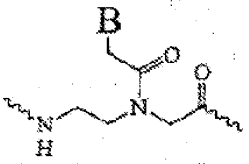

2'-MOE

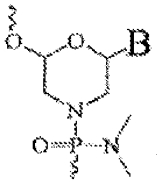

2'-氟

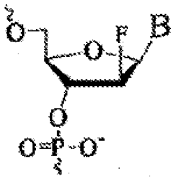

2'-AP

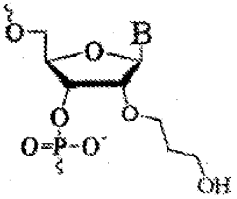

HNA

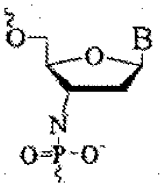

CeNA

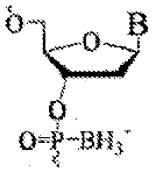

PNA

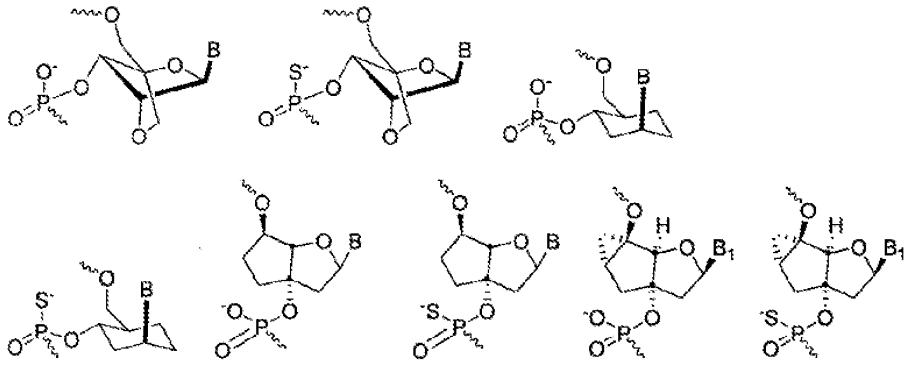

吗啉代


2'-F-ANA


2'-(3-羟基)丙基


3'-氨基磷酸酯
(Phosphoramidate)


硼烷磷酸酯(Boranophosphates)



[0317] 核苷类似物的更多实例参见Freier&Altmann;Nucl.Acid Res.,1997,25,4429-4443和Uhlmann;Curr.Opinion in Drug Development,2000,3(2),293-213,其各自

的内容通过引用并入本文。

[0318] 如本文中所使用的，术语“反义”是指与编码基因产物或者编码控制序列的特定 DNA 或 RNA 序列互补的核苷酸序列。术语“反义链”用于指与“有义链”互补的核酸链。在细胞代谢的正常运转中，DNA 分子的有义链是编码多肽和 / 或其它基因产物的链。有义链充当合成信使 RNA(“mRNA”) 转录物（反义链）的模板，后者进而指导合成任何编码的基因产物。反义核酸分子可通过本领域任何已知的方法制备，包括按病毒启动子的反向连接感兴趣的基因而进行的合成，这允许合成互补链。一旦引入到细胞中，该转录的链即与细胞产生的天然序列结合形成双链体。这些双链体随后阻断 mRNA 的进一步转录或其翻译。在本领域还已知的是，标识“负”或者 (-) 是指反义链，而“正”或者 (+) 是指有义链。

[0319] 就本发明而言，“互补”将理解为表示与另一个核酸序列形成氢键的核酸序列。互补百分数表示接邻残基在可与第二核酸序列形成氢键即 Watson-Crick 碱基对的核酸分子中的百分数，即 10 分之 5,6,7,8,9,10 为 50%,60%,70%,80%,90% 和 100% 互补。“完全互补”表示核酸序列的所有接邻残基与第二核酸序列中相同数目的接邻残基形成氢键。

[0320] 用于本文所述纳米颗粒的核酸（例如一种或多种相同或不同的寡核苷酸或寡核苷酸衍生物）可包括约 10- 约 1000 核酸，优选相对短的多核苷酸，例如，长度大小优选为约 8- 约 30 个核苷（例如约 8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29 或 30）。

[0321] 在用于本文所述的有效核酸的一方面，具有天然的磷酸二酯主链或硫代磷酸酯主链或任何其它改性主链类似物的寡核苷酸和寡脱氧核苷包括：

[0322] LNA（锁核酸）；

[0323] PNA（具有肽主链的核酸）；

[0324] 短干扰 RNA(siRNA)；

[0325] 微 RNA(miRNA)；

[0326] 具有肽主链的核酸 (PNA)；

[0327] 磷酰二胺吗啉代寡核苷酸 (PMO)；

[0328] 三环 -DNA；

[0329] 诱捕 ODN（双链寡核苷酸）；

[0330] 催化 RNA 序列 (RNAi)；

[0331] 核酶；

[0332] 适体；

[0333] 镜相异构物 (spiegelmer)L- 构象寡核苷酸）；

[0334] CpG 寡聚物等，如下列文献中所公开的那些：

[0335] Tides 2002, Oligonucleotide and Peptide Technology Conferences, 2002 年 5 月 6-8 日，Las Vegas, NV；和 Oligonucleotide&Peptide Technologies, 18th&19th 2003 年 11 月，Hamburg, Germany，通过引用将它们的内容并入本文。

[0336] 在用于本文所述方法的核酸的另一方面，寡核苷酸可任选包括任何合适的本领域已知核苷类似物和衍生物，包括下表 1 中列出的那些：

[0337] 表 1 代表性的核苷类似物和衍生物

[0338]

4- 乙酰基胞苷	5- 甲氧基氨基甲基 -2- 硫代尿苷
5-(羧基羟基甲基) 尿苷	β ,D- 甘露糖基辫苷
2′ -O- 甲基鼠苷	5- 甲氧基羰基甲基 -2- 硫代尿苷
5- 甲氧基羰基甲基尿苷	5- 羧基甲基氨基甲基 -2- 硫代尿苷
5- 甲氧基尿苷	5- 羧基甲基氨基甲基尿苷
二氢尿苷	2- 甲硫基 -N6- 异戊烯基腺苷
2′ -O- 甲基假尿苷	N-[(9- β -D- 呋喃核糖基 -2- 甲硫基嘌呤 -6- 基) 氨甲酰基] 苏氨酸
D- 半乳糖基辫苷	N-[(9- β -D- 呋喃核糖基嘌呤 -6- 基)N- 甲基氨甲酰基] 苏氨酸
2′ -O- 甲基尿苷	尿苷 -5- 羟乙酸 - 甲基酯
2′ - 卤代 - 腺苷	2′ - 卤代 - 胞苷
2′ - 卤代 - 鸟苷	2′ - 卤代 - 胸腺嘧啶
2′ - 卤代 - 尿苷	2′ - 卤代 - 甲基胞苷
2′ - 氨基 - 腺苷	2′ - 氨基 - 胞苷
2′ - 氨基 - 鸟苷	2′ - 氨基 - 胸腺嘧啶
2′ - 氨基 - 尿苷	2′ - 氨基 - 甲基胞苷
肌甙	尿苷 -5- 羟乙酸
N6- 异戊烯基腺苷	Wybutoxosine
1- 甲基腺苷	假尿苷
1- 甲基假尿苷	辫苷 (Queuosine)
1- 甲基鸟苷	2- 硫代胞苷

[0339]

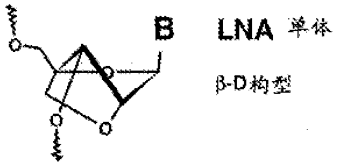
1- 甲基肌甙	5- 甲基 -2- 硫代尿苷
2,2- 二甲基鸟苷	2- 硫代尿苷
2- 甲基腺苷	4- 硫代尿苷

2- 甲基鸟苷	5- 甲基尿苷
3- 甲基胞苷	N-[(9- β -D- 呋喃核糖基嘌呤 -6- 基)- 氨甲酰基] 苏氨酸
5- 甲基胞苷	2′ -O- 甲基 -5- 甲基尿苷
N6- 甲基腺苷	2′ -O- 甲基尿苷
7- 甲基尿苷	Wybutosine
5- 甲基氨基甲基尿苷	3-(3- 氨基 -3- 羧基 - 丙基) 尿苷
锁 - 腺苷	锁 - 胞苷
锁 - 鸟苷	锁 - 胸腺嘧啶
锁 - 尿苷	锁 - 甲基胞苷

[0340] 在一个优选实施方案中，反义 HER2(ErbB2) 寡核苷酸包括与 SEQ ID NO：1(GenBank 等级号 X03363) 中所给序列的至少 8 个连续核苷酸互补的核苷酸。还参见，Yamamoto,T 等 Nature 319 :230-234,1986 ;Papewalis,J. 等 Nucleic Acids Res.1 :5452,1991，通过引用将它们每一个的内容以其全文并入本文。

[0341] 优选地，本文所述的根据本发明的寡核苷酸包括一个或多个硫代磷酸酯核苷间连接基（主链）和一个或多个锁核苷酸 (LNA)。优选地，LNA 单体包括如下面所示的 2′ -O，4′ -C 亚甲基二环核苷酸：

[0342]



[0343] D. 具有 HER2 阳性癌症的病人的选择

[0344] 本文所述的治疗有益于具有 HER2 阳性癌症的病人。本文所述的治疗显著地延长生存。通过测量 HER2 表达水平来预先确定接受本文所述治疗的具有 HER2 阳性癌症的病人的选择。对于本文所述的治疗，除 HER2 表达水平外，还应该考虑患者的临床病历来选择病人。

[0345] 可通过本领域已知的技术测量 HER2 蛋白质或基因水平，所述技术包括但不限于免疫组织化学 (IHC)、银染原位杂交 (SISH)、显色原位杂交 (CISH)、荧光原位杂交 (FISH)、虚拟染色体组型、基于 PCR 的方法和本领域已知的其它方法。每种类型的分析具有长处和局限性。因此，当通过分析组合进行确定，而不是依靠单一分析排除本文所述治疗的潜在益处时，对具有 HER2 阳性癌症的病人的选择可较为可靠。当前，推荐的分析是 IHC 和 FISH 的组合。

[0346] 一般而言，细胞或组织中的 HER2 表达可通过测量 HER2 受体蛋白质表达或 HER2

基因扩增的水平进行评估。FDA 批准了有助于确定 HER2 表达的若干 HER2 试验并且具有若干可商购的测试。这些分析使用 IHC 和 / 或 FISH 分析。例如，商购分析包括 Dako HercepTest™(Carpinteria, CA, USA) 和 Ventana Pathway ® HER-2/neu(AZ, USA)，其测量 HER2 蛋白质的水平 (IHC 分析)；以及 PathVysion ®和 HER2FISH pharmDx™，其测量基因扩增的水平 (FISH 分析)。有关评估试验试样中 HER2 表达的详细信息和指导原则提供在检测试剂盒的各自包装说明书中，通过引用将上述检测试剂盒的各自包装说明书的内容并入本文。HER2 表达测量结果的评估和核实应该遵循检测试剂盒的包装说明书中找到的指导原则。

[0347] HercepTest™ 和 Pathway™ 检测试剂盒均使用 IHC 并且测量试验组织或细胞中的 HER2 蛋白质水平。这些都是高度标准化、半定量的分析。IHC 试验结果的解释使用按 0 至 3+ 等级的评分系统；基于染色强度和细胞膜染色完全性的评论者 (reviewer) 的解释，0(阴性)，1+(阴性)，2+(分界线 / 弱阳性)，或 3+(阳性)。等级 0 表示每个细胞存在 < 20,000 个受体，并且不存在明显的膜染色或在少于 10% 的肿瘤细胞中观测到膜染色。等级 1+ 表示每个细胞存在约 100,000 个受体，在多于 10% 的肿瘤细胞中观测到弱的膜染色，但是膜被部分染色。等级 2+ 表示每个细胞存在约 500,000 个受体，在多于 10% 的肿瘤细胞中观测到弱至适中的完全膜染色。等级 3+ 表示每个细胞存在约 2,000,000 个受体，并且在多于 10% 的肿瘤细胞中观测到强烈完全膜染色。

[0348] 关于 FISH 测试，肿瘤通过数计 HER2/neu 基因拷贝数量而理解为 HER2 阴性 (FISH-) 或阳性 (FISH+)。HER2 蛋白质过表达和基因扩增的存在高度关联。FISH 分析披露了具有 IHC 2+ 或 IHC 3+ 的一些病人不具有基因扩增 (FISH-)，从而提出这些病人可能是假阳性。根据 PathVysion ®技术，约 40% 的 IHC- 阳性病人 (2+/3+) 不具有基因扩增，即 FISH 阴性。因此，建议具有 IHC 2+ 的病人参考 FISH 试验。

[0349] 本文所述的联合治疗优选给予 IHC 2+ 或 3+ 和 / 或 FISH+ 病人。此外，当其它技术例如 PCR 方法用于 HER2 阳性病人的选择时，联合治疗可给予相对于 IHC 2+ 或 3+ 和 / 或 FISH+ 的具有 HER2 状况的病人。

[0350] E. 组合物 / 制剂

[0351] 包含本文所述聚合物缀合物和 HER2 拮抗剂的药物组合物可以通过本领域已知方法制备，例如使用多种已知的混合、溶解、制粒、研磨、乳化、胶囊化、包埋 (entrapping) 或冻干方法。组合物可与一种或多种包括赋形剂和辅料的生理可接受载体一起配制，所述载体有助于将活性化合物加工成可用于医药的制剂。适宜的制剂取决于所选的施用途径。本发明的许多方面中优选胃肠外途径。

[0352] 对于注射，非限制性地包括静脉内、肌内和皮下注射，本文所述式 (I)(或者式 (II) 或 (III)) 化合物可以在水性溶液中配制，优选在生理相容的缓冲液例如生理盐水缓冲液或极性溶剂，包括但不限于吡咯烷酮或二甲亚砜中配制。

[0353] 本文所述的化合物还可配制为用于胃肠外施用，例如通过大量推注或连续输液。用于注射的制剂可以单位剂型存在，例如在安瓿或多剂量容器中。有用的组合物包括但不限于在油性或水性媒介中的悬浮剂、溶液或乳剂，还可包括填充剂例如助悬剂、稳定剂和 / 或分散剂。用于胃肠外施用的的药物组合物包括水溶形式的水性溶液，该水溶形式例如但非限制的为活性化合物的盐 (优选)。另外，活性化合物的悬浮液可以在亲脂性媒介中制

备。适宜的亲脂性媒介包括脂肪油例如芝麻油、合成脂肪酸酯例如油酸乙酯和三酸甘油酯，或材料例如脂质体。水性注射悬浮液可包含增加悬浮液粘度的物质，例如羧甲基纤维素钠、山梨糖醇或者葡聚糖。任选的，悬浮液还可包含适宜的稳定剂和 / 或增加化合物溶解度的试剂以制备高浓度溶液。或者，活性成分可以是粉末形式以在使用前用适宜的媒介，例如无菌、无热原的水配制。在一个实施方案中，可用抑菌水将曲妥珠单抗进行再配制用于注射。

[0354] 对于口服施用，化合物可通过将活性物质与本领域已知的药学可接受的载体组合配制。这些载体能使本发明化合物配制为片剂、丸剂、锭剂、糖衣丸、胶囊、液体、凝胶剂、糖浆、糊剂、浆液、溶液、悬浮剂、用于稀释在患者饮用水中的浓溶液和悬浮剂、用于稀释在患者食物中的预混合剂等，用于患者口服摄取。用于口服的药物制剂可以使用固体赋形剂，可选地研磨所得混合物，和将混合物制粒，随后如果需要加入其它适宜辅料得到片剂或糖衣芯而制备。特别的，有用的赋形剂是，填充剂如糖，包括乳糖、蔗糖、甘露糖醇或山梨糖醇，纤维素制剂例如玉米淀粉、小麦淀粉、米淀粉和马铃薯淀粉及其它原料例如明胶、西黄蓍胶、甲基纤维素、羟丙基 - 甲基纤维素、羧基 - 甲基纤维素钠、和 / 或聚乙烯吡咯烷酮 (PVP)。如果需要，还可加入崩解剂，例如交联的聚乙烯吡咯烷酮、琼脂、或者海藻酸。还可使用盐，例如海藻酸钠盐。

[0355] 对于吸入施用，本发明化合物可以使用加压包装或喷雾器和适宜的推进剂，以气雾剂喷雾形式方便地递送。

[0356] 化合物还可以使用例如常规栓剂基质例如可可脂或其它甘油酯，配制为直肠组合物例如栓剂或灌肠剂。

[0357] 除了前述制剂，化合物还可制剂为储库制品 (depot preparation)。这样的长效制剂可以通过植入（例如皮下或肌内）或肌肉内注射施用。对于这一施用途径，本发明的化合物可以与适宜的聚合的或疏水材料（例如在乳剂中与药理学上可接受的油）、与离子交换树脂配制或作为微溶衍生物如非限制性的微溶盐。

[0358] 还可使用其它的递送体系例如脂质体和乳剂。

[0359] 另外，化合物可使用持续释放 (sustained-release) 系统，例如包含治疗剂的固体疏水聚合物的半渗透基质。已经制备出多种持续释放材料，且为本领域技术人员所熟知。持续释放的胶囊可以根据其化学性质，持续数周至超过 100 天释放化合物。根据特定化合物的化学性质和生物稳定性，还可采用其它的稳定策略。

[0360] F. 剂量

[0361] 对于本发明的方法使用的任何化合物，治疗有效量可以由体外试验开始推定。然后，可以配制供动物模型使用的剂量以实现包括有效剂量的周期浓度范围。这样的信息随后可用于更加精确地确定用于患者的剂量。

[0362] 施用的组合物（如，用作前药）的量，将依赖于其中包括的母体分子（在该情形中为 7- 乙基 -10- 羟基喜树碱）。大体上，本文所述方法中所用的前药的量为在哺乳动物中有效实现所需治疗结果的量。当然，不同前药化合物的剂量根据母体化合物、体内水解速率、聚合物的分子量等而有所变化。而且，当然，剂量可根据剂型和施用途径变化。

[0363] 然而，一般地，本文所述 7- 乙基 -10 羟基喜树碱的聚合酯衍生物可以按如下量施用用于系统性递送：约 0.3- 约 90mg/m^2 身体表面，和优选约 0.5- 约 50mg/m^2 身体表面 / 剂，更优选约 1- 约 18mg/m^2 身体表面 / 剂，和甚至更优选约 1.25mg/m^2 身体表面 / 剂 - 约

16.5mg/m² 身体表面 / 剂。一些特定的剂量包括下述之一 :1.25,2.5,5,9,10,12,13,14,15,16 和 16.5mg/m²/ 剂。一个优选的剂量包括 5mg/m² 身体表面 / 剂。

[0364] 本文所述式 (I)(或者式 (II) 或式 (III)) 化合物可按如下量施用 :0.3~ 约 90mg/m2 身体表面 / 周,例如约 1~ 约 18mg/m² 身体表面 / 周。在特定实施方案中,剂量方案可以例如为 :在 4 周的周期中有 3 周是约 5- 约 7mg/m2 身体表面 / 周,每 3 周以约 1.25- 约 45mg/m² 注射一次,和 / 或在 4 周的周期中每周以约 1- 约 16mg/m² 注射三次。

[0365] 治疗方案可以例如基于每 3 周一次施用的单一剂量,或作为多周治疗方案的一部分分成多剂量。因此,治疗方案可以包括例如对于一个治疗周期每 3 周施用 1 次,或者对于一个周期每周施用 1 次持续 3 周然后停用 1 周。还考虑到给予 1 个或多个周期的治疗直到得到所需临床结果。

[0366] 上述范围是说明性的,且本领域技术人员将根据临床经验和治疗效果确定所选前药的最佳剂量。此外,确切的制剂、施用途径和剂量可根据病人情况由个体医师选择。精确剂量将依赖于病况的阶段和严重程度,以及要治疗的患者的个体特征,且是本领域普通技术人员能够理解的。

[0367] 而且,本文所述的化合物的毒性和治疗效果可以使用本领域已知的方法通过细胞培养或实验动物中的标准药学方法确定。

[0368] 在一些优选实施方案中,所述治疗方案包括施用量范围为每周约 1.25- 约 16.5mg/m² 体表面 / 剂,持续 3 周,然后 1 周不治疗,且重复约 3 个周期或更多,直到观测到所需结果。每个周期的施用量可以为约 2.5 至约 16.5mg/m² 体表面积 / 剂量。

[0369] 在一个具体实施方案中,7- 乙基 -10- 羟基喜树碱的聚合酯衍生物可以按一个剂量施用,例如 5,9 或 10mg/m²/ 周持续 3 周,接着 1 周停止治疗。当使用 2 个或更多治疗周期时治疗周期的剂量可以设计为逐步升高的剂量方案。聚合药物优选通过 IV 输注施用。

[0370] 在另一个具体实施方案中,式 (I)(或者式 (II) 或式 (III)) 的化合物以约 12- 约 16mg/m² 身体表面 / 剂的剂量施用。该剂量可以每周给予。该治疗方案包括,式 (I)(或者式 (II) 或式 (III)) 的化合物以每周约 12~ 约 16mg/m² 身体表面 / 剂的的量施用持续 3 周,接着 1 周停止治疗。

[0371] 在又一个具体实施方案中,剂量方案可以为每三周约 10mg/m² 身体表面 / 剂。

[0372] 替代方案包括 :对于治疗儿科患者,疗程是基于每 3 周约 1.85mg/m² 身体表面 / 剂 / 天持续 5 天的方案、每 25 天约 1.85~ 约 7.5mg/m² 身体表面 / 剂 / 天持续 3 天的方案,或每 3 周一次约 22.5mg/m² 身体表面 / 剂的方案,而对于治疗成人患者,方案是基于每 3 周约 13mg/m² 身体表面 / 剂,或每 6 周约 4.5mg/m² 身体表面 / 剂 / 周持续 4 周。本文所述的化合物可与第二治疗剂组合施用。在一个实施方案中,联合疗法包括在各循环中与第二药剂组合的约 0.75mg/m² 身体表面 / 剂 / 天持续 5 天的方案。

[0373] 或者,可根据体重施用化合物。在哺乳动物中全身性递送式 (I)(或者式 (II) 或式 (III)) 化合物的剂量范围将为约 1 至约 100mg/kg/ 周,且较佳为约 2- 约 60mg/kg/ 周。因此,该量的范围为约 0.1mg/kg 体重 / 剂至约 30mg/kg 体重 / 剂,优选为约 0.3mg/kg 至约 10mg/kg。具体剂量如施用 10mg/kg,q2d x 5 施用方案 (多剂量) 或 30mg/kg,单剂量施用方案。

[0374] 在本发明所有施用聚合物缀合物的方面中,所述剂量基于 7- 乙基 -10- 羟基喜树

碱的量，而不是所施用的聚合物缀合物的量。考虑给予 1 个或多个周期的治疗直到得到所需临床结果。当然，本发明化合物的精确量、频率和施用时间将根据患者的性别、年龄和医药状况以及主治医师确定的疾病的严重程度而变化。上文给出的重量表示治疗所用 PEG 缀合 7- 乙基 -10- 羟基 - 喜树碱中存在的 7- 乙基 -10- 羟基喜树碱的重量。PEG 缀合的 7- 乙基 -10- 羟基喜树碱的实际重量将根据 PEG 的重量和 PEG 的负载量（例如，任选为每个多臂 PEG 对应 1-4 个当量的 7- 乙基 -10- 羟基喜树碱）而变化。

[0375] HER2 拮抗剂可联合式 (I)（或者式 (II) 或 (III)）化合物同时或相继施用。联合治疗方案包括施用约 0.5/kg 至约 15mg/kg 体重，即约 2mg/kg 至约 8mg/kg/ 剂，例如 2,4,5,6,8mg/kg/ 剂的抗 HER2 抗体。

[0376] 在一个实施方案中，曲妥珠单抗的施用是基于如下方案：在联合疗法期间和之后，初始剂量为 4mg/kg 静脉注射，接着是每周 2mg/kg/ 剂静脉注射，或者初始剂量为 8mg/kg 静脉注射，接着是每 3 周 6mg/kg/ 剂静脉注射，直到获得所需临床结果。曲妥珠单抗的剂量施用信息描述于 Herceptin ®的药品说明书，通过引用将其内容并入本文。

[0377] 在另一个实施方案中，帕妥珠单抗的施用量是：在本文所述联合疗法期间和之后，每 3 周约 0.5 至约 15mg/kg/ 剂静脉注射。帕妥珠单抗基于如下方案给予：每 3 周 5mg/kg/ 剂。参见 Agus, D.B., 等, Journal of Clinical Oncology, 23 :2534-2543, 2005, 通过引用将其内容并入本文。

[0378] 联合疗法方案包括以约 2- 约 100mg/kg/ 剂（例如，2,3,4,5,6,8,10,15,20,25,30,35,40,50,60,70,100mg/kg/ 剂）的量施用反义寡核苷酸。例如，联合疗法疗程剂量包括用约 2- 约 50mg/kg/ 剂的量的反义 HER2 寡核苷酸进行治疗。优选地，联合疗法中所施用的反义寡核苷酸的量为约 4- 约 25mg/kg/ 剂。

[0379] 在联合疗法的一个方面，该方案包括在联合疗法期间以每周约 4- 约 18mg/kg/ 剂，或者每周约 4- 约 9.5mg/kg/ 剂的量施用反义 HER2 寡核苷酸。

[0380] 在一个具体实施方案中，联合疗法方案包括在 6 周的周期中以每周约 4- 约 18mg/kg/ 剂的量施用反义 HER2 寡核苷酸持续 3 周（即约 8mg/kg/ 剂）。另一个具体实施方案包括每周约 4- 约 9.5mg/kg/ 剂（即，约 4.1mg/kg/ 剂）。

[0381] 在本发明涵盖的 HER2 拮抗剂与本文所述式 (I)（或者式 (II) 或 (III)）化合物联合施用时，组合物中的单独组分可以在分别或联合药物制剂中以任何合宜的途径相继或同时施用。当 HER2 拮抗剂与式 (I)（或者式 (II) 或 (III)）化合物相继施用时，可以首先施用式 (I)（或者式 (II) 或 (III)）化合物或者 HER 拮抗剂。例如，HER2 拮抗剂与式 (I)（或者式 (II) 或 (III)）化合物可以在一个方案中以相继方式使用，该方案可提供有益的联合效果。当 HER2 拮抗剂与式 (I)（或者式 (II) 或 (III)）化合物以同时方式施用时，该联合可以在相同或不同药物组合物中进行施用。

[0382] 本发明的其它方面包括将 HER2 拮抗剂和本文所述的化合物与其它化学疗法或放射疗法联合，用以获得另外的益处。

实施例

[0383] 提供下述实施例用于进一步理解本发明，但不是为了以任何方式限制本发明的有效范围。

[0384] 实施例 1. 毒性数据

[0385] 使用裸鼠研究 4 臂 -PEG-Gly-(7- 乙基 -10- 羟基喜树碱)(化合物 9) 的最大耐受剂量(" MTD")。监测小鼠 14 天的死亡率和疾病信号,且当体重减少 > gt ;治疗前的体重的 20%时处死。

[0386] 下表 2 显示了每种化合物(单剂量和多剂量施用)的最大耐受剂量。对小鼠隔天施用多剂量施用的每个剂量,持续 10 天,然后再观察 4 天,因此总共 14 天。

[0387] 表 2. 裸小鼠中的 MTD 数据

[0388]

化合物	剂量水平 (mg/kg)	存活数/总数	注释
化合物 9 单剂	25	5/5	
	30	5/5	
	35	4/5	小鼠由于体重减轻大于 20%而被处以安乐死
化合物 9 多剂*	10	5/5	
	15	3/5	小鼠由于体重减轻大于 20%而被处以安乐死
	20	0/5	小鼠由于体重减轻大于 20%而被处以安乐死

[0389] 发现在单剂量施用时,4 臂 -PEG-Gly-(7- 乙基 -10- 羟基喜树碱)(化合物 9) 的 MTD 为 30mg/kg,当多剂量施用 (q2d x 5) 时为 10mg/kg。

[0390] 实施例 2. PEG 缀合物的性质

[0391] 下表 3 显示了 4 种不同的 PEG-(7- 乙基 -10- 羟基喜树碱)缀合物在盐水溶液中的溶解度。所有 4 种 PEG-(7- 乙基 -10- 羟基喜树碱)缀合物显示出高达 4mg/mL 相当于 7- 乙基 -10- 羟基喜树碱的良好溶解性。在人血浆中,7- 乙基 -10- 羟基喜树碱从 PEG 缀合物中稳定释放 22 至 52 分钟的倍增时间 (doubling time),且如下述实施例 3 所述释放表现出 pH 和浓度依赖。

[0392] 表 3. PEG-7- 乙基 -10- 羟基喜树碱缀合物的性质

[0393]

化合物	在盐水中的溶解度 (mg/mL)[a]	在人类血浆中的 $t_{1/2}$ (min)[b]	在血浆中的倍增时间(min)[c]		
			人类	小鼠	大鼠
化合物 9(Gly)	180	12.3	31.4	49.5	570
化合物 12(Ala)	121	12.5	51.9	45.8	753
化合物 23(Sar)	ND	19.0	28.8	43.4	481
化合物 18(Met)	142	26.8	22.2	41.9	1920

[0394] [a]7- 乙基 -10- 羟基喜树碱在盐水中不溶

[0395] [b]PEG 缀合物半衰期

[0396] [c]7- 乙基 -10- 羟基喜树碱从缀合物中的形成速率

[0397] 室温下 PEG-Gly-7- 乙基 -10- 羟基喜树碱缀合物在盐水中和其它水性介质中表现

出良好的稳定性，持续时间高达 24 小时。

[0398] 实施例 4. 浓度和 pH 对稳定性的影响

[0399] 基于我们先前的工作，在 20-OH 位酰化保护了活性封闭形式的内酯环。使用基于 UV 的 HPLC 方法监测大鼠和人血浆中的水稳定性和水解性质。室温下将 4 臂 PEG-Gly-(7- 乙基 -10- 羟基喜树碱）缀合物（化合物 9）与每个样品孵育 5 分钟。

[0400] PEG-7- 乙基 -10- 羟基喜树碱缀合物在缓冲液中的稳定性是 pH 依赖性的。图 1 显示了 4 臂 PEG-Gly-(7- 乙基 -10- 羟基喜树碱）在多种样品中的稳定性。图 2 显示了 7- 乙基 -10- 羟基喜树碱从 PEG-Gly-(7- 乙基 -10- 羟基喜树碱）中的释放速率随 pH 升高而增加。

[0401] 实施例 5. 药物代谢动力学特性

[0402] 向无肿瘤的 Balb/C 小鼠单次 (single) 注射 20mg/kg 的 4 臂 PEG-Gly-(7- 乙基 -10- 羟基喜树碱）缀合物。在多个时间点处死小鼠，并通过 HPLC 分析血浆中完整的缀合物和释放的 7- 乙基 -10- 羟基 - 喜树碱。使用非代谢区分析 (non-compartmental analysis)(WinNonlin) 完成药物代谢动力学分析。详见下表 4。

[0403] 表 4. 药物代谢动力学数据

[0404]

参数	化合物 9	由化合物 9 释放的 7- 乙基 -10- 羟基喜树碱
AUC(h*μg/mL)	124,000	98.3
终点 $t_{1/2}$(Hr)	19.3	14.2
C_{max}(μg/mL)	20,500	13.2
CL(mL/hr/kg)	5.3	202
Vss(mL/kg)	131	3094

[0405] 如图 3A 和 3B 中所示，7- 乙基 -10- 羟基喜树碱的聚乙二醇化产生更长周期的半衰期和对于天然药物 7- 乙基 -10- 羟基喜树碱的高暴露 (exposure)。观测到 4 臂 -PEG-Gly-(7- 乙基 -10- 羟基喜树碱）缀合物的肠肝循环。PEG-Gly-(7- 乙基 -10- 羟基喜树碱）在小鼠中的药物代谢动力学特性是双相性的，在起始 2 小时期间表现出快速血浆分布相，在随后 18-22 小时表现出对于缀合物的终末消除半衰期，伴随地在 18-26 小时表现出对于 7- 乙基 -10- 羟基喜树碱的终末消除半衰期（图 3B）。

[0406] 此外，在大鼠中研究了 4 臂 PEG-Gly-(7- 乙基 -10- 羟基 - 喜树碱）的药物代谢动力学特性。在大鼠中，使用的剂量水平为 3、10 和 30mg/kg（相应于 7- 乙基 -10- 羟基喜树碱）。在大鼠中的药物代谢动力学特性与在小鼠中的一致。

[0407] 在大鼠中，4 臂 PEG-Gly-(7- 乙基 -10- 羟基喜树碱）表现出从循环中双相清除，在大鼠中消除半衰期为 12-18 小时。从 4 臂 PEG-Gly-7- 乙基 -10- 羟基喜树碱缀合物中释放的 7- 乙基 -10- 羟基喜树碱的表观消除半衰期为 21-22 小时。在大鼠中，最大血浆浓度 (Cmax) 和曲线下面积 (AUC) 以剂量依赖的方式增加。在小鼠或大鼠中从 4 臂 PEG-Gly 缀合

物中释放的 7- 乙基 -10- 羟基喜树碱的表观半衰期明显比报道的从 CPT-11 中释放的 7- 乙基 -10- 羟基喜树碱的表观半衰期更长，且从 4 臂 PEG-Gly-(7- 乙基 -10- 羟基喜树碱) 中释放的 7- 乙基 -10- 羟基喜树碱的暴露明显比报道的从 CPT-11 中释放的 7- 乙基 -10- 羟基喜树碱的暴露更高。在大鼠中，母体化合物的清除率为 0.35mL/hr/kg。估算的母体化合物的稳态分布体积 (Vss) 为 5.49mL/kg。在大鼠中，释放的 7- 乙基 -10- 羟基喜树碱的清除率为 131mL/hr/kg。在大鼠中，估算的释放的 7- 乙基 -10- 羟基喜树碱的 Vss 为 2384mL/kg。在小鼠和大鼠中观察到释放的 7- 乙基 -10- 羟基喜树碱的肝肠循环。

[0408] 实施例 6. 对 Herceptin ® 呈顽固性的人乳腺肿瘤异种移植的小鼠的治疗效果

[0409] 测量含有 HER2 受体拮抗剂的疗法抵抗裸小鼠中生长的顽固性人 JIMT-1 乳腺肿瘤的治疗效果。通过将小的肿瘤片段植入裸小鼠的左侧副腰窝 (auxiliary flank) 区上的单一皮下位置来建立肿瘤。每周观测两次肿瘤植入位置，一旦明显则进行测量。通过用卡规测量二维尺寸并且进行计算来测定每只鼠的肿瘤体积。当肿瘤达到 100mm^3 的平均体积时，将该小鼠分成由以下组成的它们的实验组 :未治疗的对照品，仅仅 Herceptin ®，仅仅化合物 9，以及化合物 9 和 Herceptin ® 的联合。在腹膜内以 q7d 提供 5mg/kg 体重 / 剂的 Herceptin ®。在静脉内以 q2d×5 提供 4mg/kg/ 剂的化合物 9。对于联合治疗，分别以 q7d 提供 5mg/kg/ 剂和以 q2d×5 提供 4mg/kg/ 剂的 Herceptin ® 和化合物 9。使化合物 9 施用 1 分钟后接着在当天 (day 0) 进行 Herceptin ® 治疗。不存在化合物 9 和 Herceptin ® 的治疗相重合的其它天数。在这些实验中，施用的化合物 9 的量均是基于 7- 乙基 -10- 羟基喜树碱的量，而不是施用的聚合物缀合物的量。在该研究开始时和第 28 天时测量鼠重量和肿瘤尺寸。

[0410] 用 Herceptin ® 和化合物 9 单独治疗在第 28 天时分别产生约 28% 和 51% TGI。用 Herceptin ® 和化合物 9 的联合治疗产生约 81% TGI。在表 5 中给出结果。

[0411] 表 5。JIMT-1 乳腺肿瘤异种移植的鼠模型的治疗效果

[0412]

治疗方法	TGI (%)
对照品	-
Herceptin® i.p.	28.34
化合物 9 i.v.	50.74
Herceptin® i.p. & 化合物 9 i.v.	80.80

[0413] 在各个时间点测量的肿瘤体积示于图 4 中。化合物 9 和 Herceptin ® 的联合与单独的化合物 9 或 Herceptin ® 相比显著地抑制肿瘤生长。结果显示，在乳腺癌症治疗方面，Herceptin ®，在与化合物 9 一起施用时，比单独的 Herceptin ® 或化合物 9 显著地更加有效。

[0414] 使用本文所述的化合物与 HER2 受体拮抗剂联合的治疗意想不到的改善了和 / 或避免了与含 HER2 拮抗剂的治疗有关的耐受性。人体 JIMT-1 乳腺肿瘤对 HER2 抗体例如曲妥珠单抗和帕妥珠单抗呈顽固性。本文所述的治疗提供了通过避免和减少可能的抗药物性更有效地治疗对 HER2 拮抗剂呈顽固性癌症的方法。当将 HER2 拮抗剂与本文所述的化合物一起施用时，患者和医师可受益于对含 HER2 拮抗剂的治疗呈耐受性的意想不到的缺乏和 /

或减小。

[0415] 实施例 7、人体胃癌异种移植的小鼠的治疗效果

[0416] 测定含有 HER2 受体拮抗剂的疗法抵抗裸小鼠中生长的人胃癌 N87 的治疗效果。通过皮下注射在裸小鼠中建立人体 N87 胃癌。随机划分小鼠组并用 Herceptin ®单独地，化合物 9 单独地，以及这二者的联合进行治疗。在腹膜内以 Q7d 提供 20mg/kg 体重 / 剂的 Herceptin ®。在静脉内以 q2d×5 提供 5mg/kg/ 剂的化合物 9。对于联合治疗，分别以 q2d×5 提供 5mg/kg/ 剂和以 q7d 提供 20mg/kg/ 剂的化合物 9 和 Herceptin ®。施用的化合物 9 的量基于 7- 乙基 -10- 羟基喜树碱的量计。

[0417] 在图 5 中给出了结果。用 Herceptin ®单独治疗的小鼠中肿瘤继续生长。在第 40 天时，与 0 天相比，肿瘤体积提高了 613%。用 Herceptin ®单独治疗的小鼠中的肿瘤体积比得上对照品未治疗的小鼠。单独的 Herceptin ®没有抑制胃肿瘤生长。用化合物 9 单独治疗有效地抑制了肿瘤生长。在用 Herceptin ®和化合物 9 的联合治疗的小鼠中，通过与 0 天相比的第 40 天，肿瘤体积减小了 23%。接受联合治疗的肿瘤从第 5 天开始退缩（低于基准值）直到该研究的 48 天。用 Herceptin ®单独治疗的 71%的动物到第 52 天由于过度肿瘤负荷（ > 1700mm3）或肿瘤溃疡而牺牲。在用 Herceptin ®加上化合物 9 治疗的组中，86%的小鼠存活直到第 95 天（该研究的最后一天）。第 80 天以前，在用四臂 ^{40k}PEG-Gly-(7- 乙基 -10- 羟基喜树碱）治疗的 5 只存活小鼠中，均具有 < 1500mm^3 的肿瘤。

[0418] 结果显示，在与本文所述的化合物联合施用时，显著地提高了 HER2 受体拮抗剂的治疗效果和存活率。本文所述的治疗提供了使用基于 HER2 拮抗剂的治疗的更有效的方法。

[0419] 本文引用了各种参考物。通过引用将它们的全部内容以其全文并入本文。

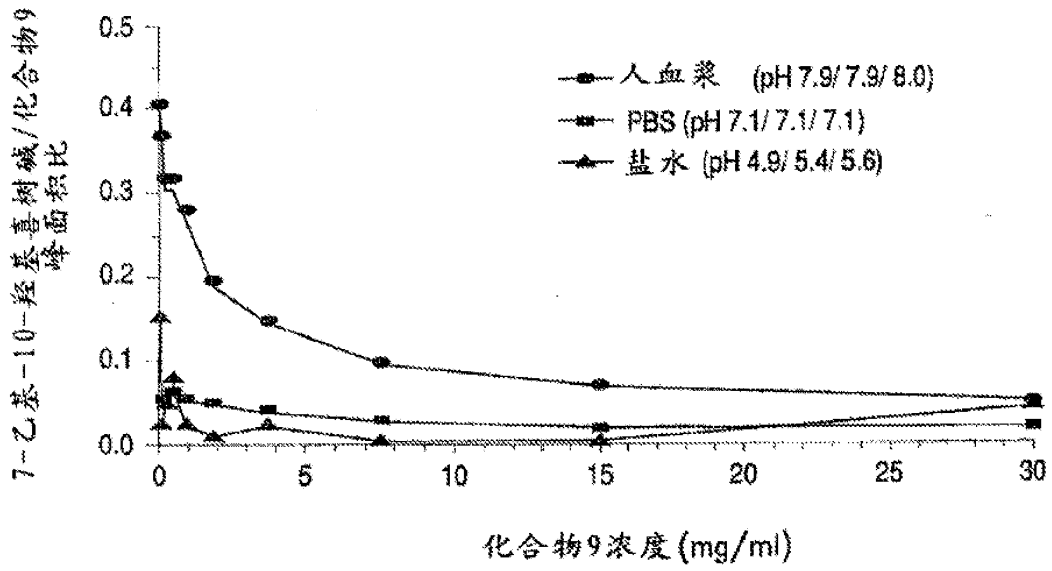

7-乙基-10-羟基喜树碱/化合物9
峰面积比
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
0
5
10
15
20
25
30
人血浆 (pH 7.9/ 7.9/ 8.0)
PBS (pH 7.1/ 7.1/ 7.1)
盐水 (pH 4.9/ 5.4/ 5.6)
化合物9浓度(mg/ml)

图 1

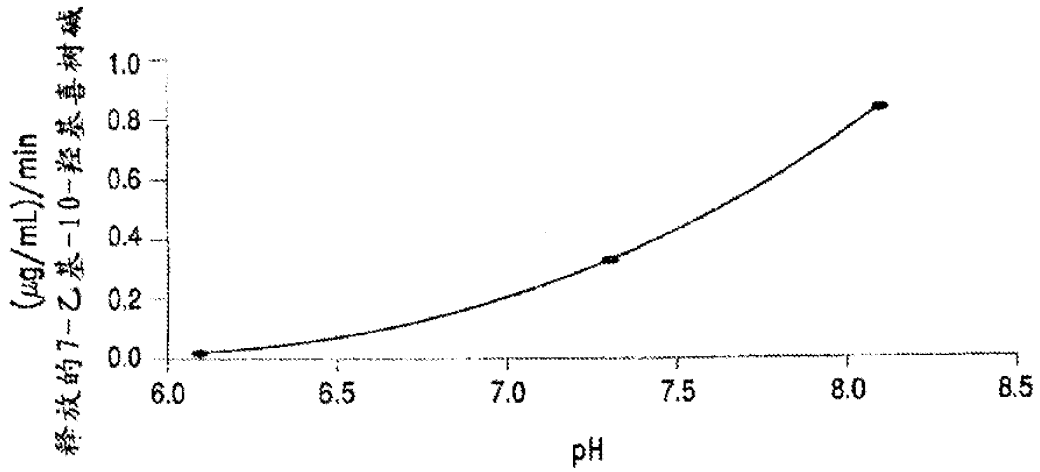

释放的7-乙基-10-羟基喜树碱
(μg/mL)/min
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
6.0
6.5
7.0
7.5
8.0
8.5
pH

图 2

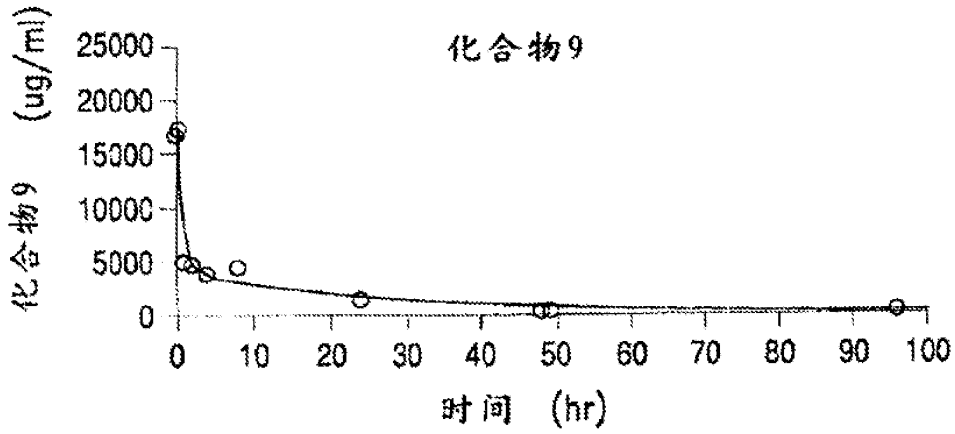

化合物9
化合物9 (ug/ml)
25000
20000
15000
10000
5000
0
0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
时间 (hr)

图 3A

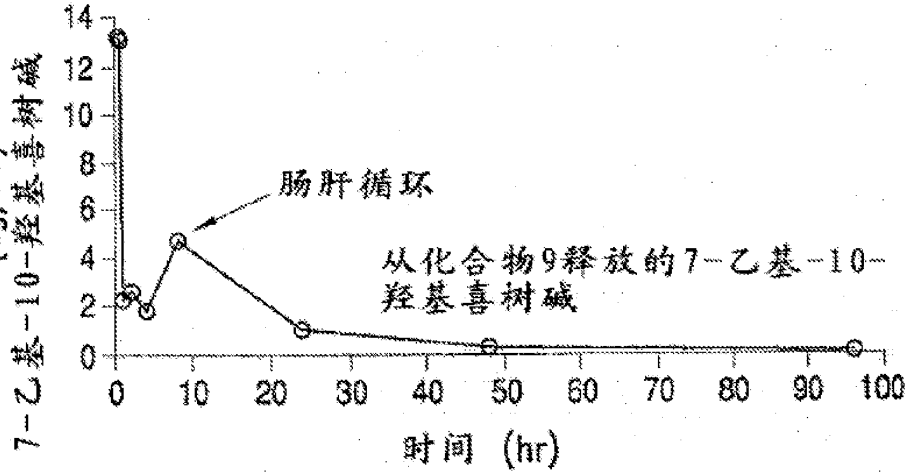

7-乙基-10-羟基喜树碱 (ug/ml)
14
12
10
8
6
4
2
0
肠肝循环
从化合物9释放的7-乙基-10-羟基喜树碱
0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100
时间 (hr)

图 3B

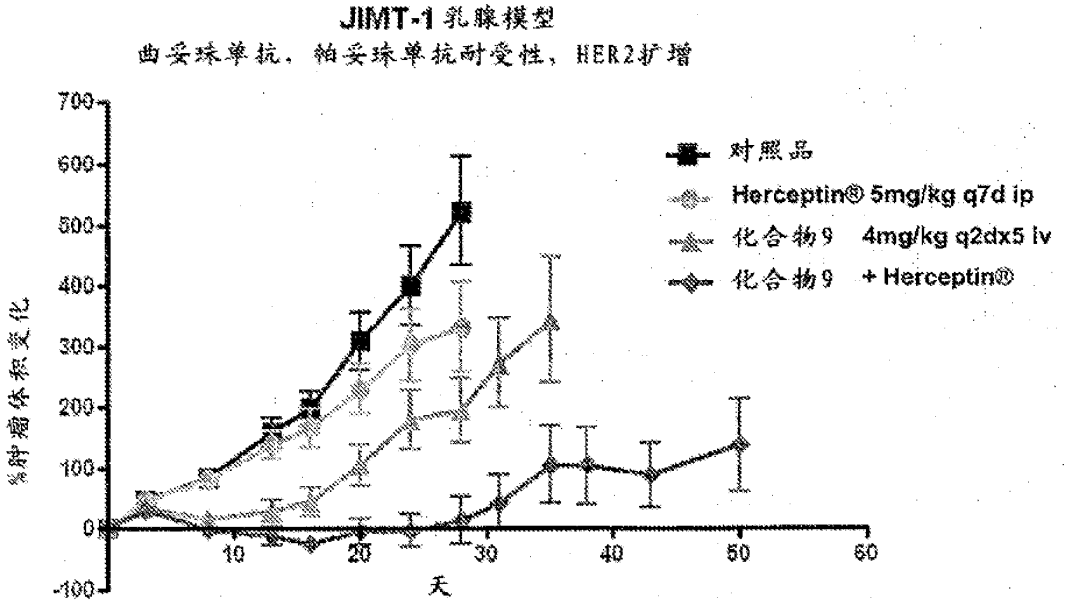

JIMT-1 乳腺模型
曲妥珠单抗、帕妥珠单抗耐受性、HER2扩增
%肿瘤体积变化
天
对照品
Herceptin® 5mg/kg q7d ip
化合物9 4mg/kg q2dx5 iv
化合物9 + Herceptin®

图 4

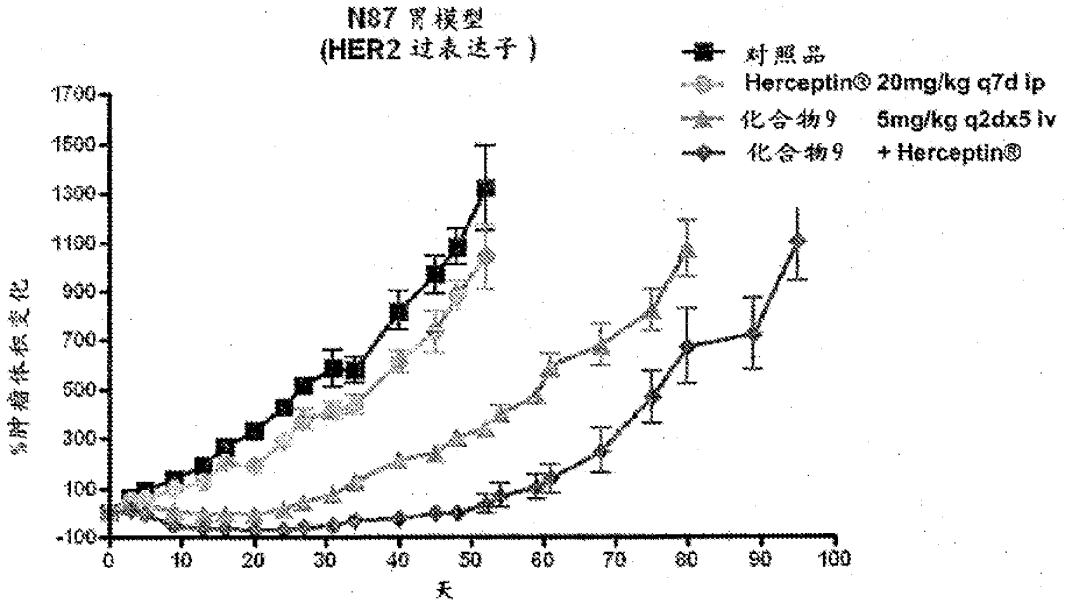

N87 胃模型
(HER2 过表达子)
%肿瘤体积变化
天
对照品
Herceptin® 20mg/kg q7d ip
化合物9 5mg/kg q2dx5 iv
化合物9 + Herceptin®

图 5

Espacenet

Bibliographic data: CN1227499 (A) — 1999-09-01

Drug complexes

Inventor(s): KAZUHIRO INOUE [JP]; HIROSHI SUSAKI [JP]; MASAHIRO IKEDA [JP] ± (INOUE KAZUHIRO, ; SUSAKI HIROSHI, ; IKEDA MASAHIRO)

Applicant(s): DAIICHI SEIYAKU CO [JP] ± (DAIICHI PHARMACEUTICAL CO., LTD)

Classification: **- international:** ***A61K47/48;*** (IPC1-7): A61K47/48
- cooperative: **A61K47/61**

Application number: CN1997197008 19970605

Priority number (s): JP19960144421 19960606

Also published as: AT273715 (T) AU2978797 (A) AU723392 (B2) CA2257245 (A1) DE69730332 (T2) more

Abstract not available for CN1227499 (A)
Abstract of corresponding document: EP0916348 (A1)

A drug complex characterized in that a residue of a drug compound such as antineoplastic agents and a carboxy(C1-4)alkyldextran polyalcohol obtained by treating a dextran under conditions that enable substantially complete polyalcoholization are bound to each other by means of a spacer comprising an amino acid or a spacer comprising peptide-bonded 2 to 8 amino acids. Said complex is characterized in that it has excellent selectivity to tumorous sites so as to exhibit high antineoplastic activity and also achieves reduced appearance of toxicity.

OnCusp
Ex. 1002

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int.Cl[6]
A61K 47/48

[12]发明专利申请公开说明书

[21]申请号 97197008.4

[43]公开日 1999年9月1日

[11]公开号 CN 1227499A

[22]申请日 97.6.5 [21]申请号 97197008.4
[30]优先权
[32]96.6.6 [33]JP [31]144421/96
[86]国际申请 PCT/JP97/01914 97.6.5
[87]国际公布 WO97/46260 日 97.12.11
[85]进入国家阶段日期 99.2.2
[71]申请人 第一制药株式会社
地址 日本东京中央区
共同申请人 株式会社药物靶向输送系统研究所
[72]发明人 井上和泓 洲崎浩 池田政浩
久我洋 熊泽荣治 东乡明子

[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 张元忠 杨丽琴

权利要求书3页 说明书54页 附图页数13页

[54]发明名称 药物复合物

[57]摘要

药物复合物，其特征是通过含有1个氨基酸的间隔基或含有肽式键合的2～8个氨基酸的间隔基，使实质上在可完全多元醇化的条件下处理的羧基C_{1-4}烷基葡聚糖多元醇和抗肿瘤剂等的医药化合物的残基结合而构成的。对肿瘤部位选择性好，可以发挥高的抗肿瘤作用，并可以降低毒性。

ISSN1008-4274

OnCusp
Ex. 1002

权　利　要　求　书

1．药物复合物，其特征是通过含有1个氨基酸的间隔基或含有肽式键合的2～8个氨基酸的间隔基，使羧基C_{1-4}烷基葡聚糖多元醇和医药化合物的残基结合。

2．权利要求1所述的药物复合物，其特征是构成羧基C_{1-4}烷基葡聚糖多元醇是在实质上可完全多元醇化的条件下处理葡聚糖而得到的葡聚糖多元醇。

3．权利要求1或2所述的药物复合物，其特征是羧基C_{1-4}烷基葡聚糖多元醇是羧甲基葡聚糖多元醇。

4．权利要求1至3任何一项所述的药物复合物，其中的医药化合物是抗肿瘤剂或抗炎剂。

5．权利要求4所述的药物复合物，其中的医药化合物是显示浓度依赖型的抗肿瘤作用的抗肿瘤剂。

6．权利要求4所述的药物复合物，其中的医药化合物是显示时间依赖型的抗肿瘤作用的抗肿瘤剂。

7．权利要求4所述的药物复合物，其中的抗肿瘤剂是阿霉素或（1S，9S）－1－氨基－9－乙基－5－氟－2，3－二氢－9－羟基－4－甲基－1H，12H－苯并[de]吡喃并（3′，4′：6，7）中氮茚并[1，2-b]喹啉－10，13（9H，15H）－二酮。

8．权利要求5至7任何一项的药物复合物，其中的间隔基是用－X－Z－表示的二肽（－X－Z－表示疏水性氨基酸（X）和亲水性氨基酸（Z）进行肽式键合分别成为N末端侧及C末端侧后，从形成的二肽的N末端的氨基及C末端的羧基分别除去1个氢原子及1个羟基后的残基）或含有该二肽作为部分肽序列的间隔基。

9．权利要求8所述的药物复合物，其中的疏水性氨基酸是苯基丙氨酸，亲水性氨基酸是甘氨酸。

10．权利要求9所述的药物复合物，其中的间隔基是（N末端）－Gly－Gly－Phe－Gly－。

11．权利要求5至10任何一项所述的药物复合物，其中抗肿瘤剂的残基导入量是1～15重量%范围。

12．权利要求5至10任何一项所述的药物复合物，其中抗肿瘤剂的

残基导入量是 3 - 10 重量% 范围。

13. 权利要求 5 至 10 任何一项所述的药物复合物，其中抗肿瘤剂的残基导入量是 5 - 6 重量% 范围。

14. 权利要求 1 所述的药物复合物，其中用 N_2H - Gly - Gly - Phe - Gly - COOH 表示的肽的 N 末端是以酰胺键与羧甲基葡聚糖多元醇的羧基结合，该肽的 C 末端是以酰胺键与（1S, 9S）- 1 - 氨基 - 9 - 乙基 - 5 - 氟 - 2, 3 - 二氢 - 9 - 羟基 - 4 - 甲基 - 1H, 12H - 苯并[de]吡喃并（3′, 4′ : 6, 7）中氮茚并[1, 2-b]喹啉 - 10, 13（9H, 15H）- 二酮的 1 - 氨基结合。

15. 权利要求 14 所述的药物复合物，其中（1S, 9S）- 1 - 氨基 - 9 - 乙基 - 5 - 氟 - 2, 3 - 二氢 - 9 - 羟基 - 4 - 甲基 - 1H, 12H - 苯并[de]吡喃并（3′, 4′ : 6, 7）中氮茚并[1, 2-b]喹啉 - 10, 13（9H, 15H）- 二酮残基的导入量是 2 ~ 10 重量% 的范围。

16. 权利要求 14 或 15 所述的药物复合物，其中羧基 C_{1-4} 烷基葡聚糖多元醇是分子量为 5, 000 ~ 500, 000 范围的羧甲基葡聚糖多元醇，羧甲基化度是 0.01 ~ 2.0 范围。

17. 权利要求 14 或 15 所述的药物复合物，其中羧基 C_{1-4} 烷基葡聚糖多元醇是分子量 50, 000 ~ 450, 000 范围的羧甲基葡聚糖多元醇，羧甲基化度是 0.1 ~ 1.0 范围。

18. 权利要求 14 或 15 所述的药物复合物，其中羧基 C_{1-4} 烷基葡聚糖多元醇是分子量 200, 000 ~ 400, 000 范围的羧甲基葡聚糖多元醇，羧甲基化度是 0.3 ~ 0.5 范围。

19. 权利要求 14 所述的药物复合物，其中（1S, 9S）- 1 - 氨基 - 9 - 乙基 - 5 - 氟 - 2, 3 - 二氢 - 9 - 羟基 - 4 - 甲基 - 1H, 12H - 苯并[de]吡喃并（3′, 4′ : 6, 7）中氮茚并[1, 2-b]喹啉 - 10, 13（9H, 15H）- 二酮残基的导入量 5 ~ 6 重量% 的范围、羧基 C_{1-4} 烷基葡聚糖多元醇的分子量大约是 228, 000，羧甲基化度约是 0.4。

20. 药物传递载体，其特征是用于结合医药化合物的药物传递载体，其含有羧基 C_{1-4} 烷基葡聚糖多元醇。

21. 权利要求 20 所述的药物传递载体，其中羧基 C_{1-4} 烷基葡聚糖多元醇的分子量是 5, 000 ~ 500, 000，羧基 C_{1-4} 烷基化度是 0.01 ~ 2.0 范围。

22．权利要求 20 所述的药物传递载体，其中羧基 C_{1-4} 烷基葡聚糖多元醇的分子量是 50, 000 ~ 450, 000，羧基 C_{1-4} 烷基化度是 0.1 ~ 1.0 范围。

23．权利要求 20 所述的药物传递载体，其中羧基 C_{1-4} 烷基葡聚糖多元醇的分子量是 200, 000 ~ 400, 000 范围，羧基 C_{1-4} 烷基化度是 0.3 ~ 0.5 范围。

24．权利要求 20 至 23 任何一项所述的药物传递载体，其中羧基 C_{1-4} 烷基葡聚糖多元醇是羧甲基葡聚糖多元醇。

25．羧基 C_{1-4} 烷基葡聚糖多元醇在制备含有结合医药化合物残基的羧基 C_{1-4} 烷基葡聚糖多元醇的药物复合物中的应用。

26．羧基 C_{1-4} 烷基葡聚糖多元醇在通过间隔基或不通过间隔基制备医药化合物残基和羧基 C_{1-4} 烷基葡聚糖多元醇相结合的药物复合物中的应用。

OnCusp
Ex. 1002

说　明　书

药物复合物

技术领域

本发明涉及医药上有用的药物复合物。进而具体地说，本发明涉及通过间隔基，将多糖衍生物的羧基 C_{1-4} 烷基葡聚糖多元醇与抗肿瘤剂或抗炎剂的医药化合物结合形成的药物复合物。

背景技术

治疗肺癌或消化道癌等固型癌或白血病等血癌时所用的抗肿瘤剂，是通过静脉给药或经口给药等给药途径给药到全身后，转送到特定的肿瘤部位，阻碍及抑制癌细胞增殖，发挥治疗效果。可是，由于全身给药的抗肿瘤剂，迅速从血液中进入肝脏、网状系统脏器或迅速排泄到尿中，使血液中浓度降低、向肿瘤部位转送有时不充分。另外，对于通常的抗肿瘤剂本身，由于向肿瘤部位传送的选择性低（肿瘤选择性），抗肿瘤剂遍布在全身的各细胞或组织，对于正常细胞和组织起着细胞毒素作用，所以呕吐、发烧或脱发等副作用的发生率极高。因此，希望能开发出将抗肿瘤剂高效且选择性地移送到肿瘤部位的方法。

作为这样的方法，提出了将抗肿瘤剂与多糖高分子结合，延缓抗肿瘤剂从血液中的消失，且提高对肿瘤组织的定向性的方案。例如特公平 7 - 84481 号公报中公开了通过席夫碱或酰胺键，在羧甲基化的甘露葡聚糖衍生物中导入道诺红霉素、阿霉素、丝裂霉素 C 或博来霉素等的药物复合物。作为该发明的甘露葡聚糖衍生物，也可用羧甲基化的甘露葡聚糖多元醇。可是，甘露葡聚糖衍生物的支链多，结构复杂，所以难以得到适于医药品制备的均一品质。

另外，在国际公开 WO 94/19376 号中公开了在具有羧基的多糖羧基上结合肽链（氨基酸数 1 - 8 ）、进而通过该肽链结合阿霉素、道诺红霉素、丝裂霉素 C 或博来霉素等的药物复合物。作为具有羧基的多糖，可举出除了原来的该结构中具有羧基的多糖（例如透明质酸等）之外，在原来的该结构中不具有羧基的多糖（例如プルラン、葡聚糖、壳多糖等）的羟基中导入羧基 C_{1-4} 烷基或将丙二酸或琥珀酸等多元酸进行酯结合导入羧基的多糖类等。该药物复合物，其结构特征是通过间隔基将阿

霉素等药物和上述多糖部分结合起来，得到比阿霉素优良的抗肿瘤效果，同时也减轻了毒、副作用。

此外，对于采用将多元醇化多糖衍生物作为药物传递载体的药物复合物有关的技术，有“关于多糖－肽－阿霉素复合物的研究、多糖载体的血液中稳定性和抗肿瘤效果的关系”（第 10 次日本 DDS 学会讲演要旨集，279，1994）；“关于多糖－肽－阿霉素复合物的研究、体内动力学和抗肿瘤效果”（第 9 次日本药物动态学会年会讲演要旨集，292，1994）；第 19 次研究开发动向研讨会（医药品机构主办）要旨集，D－9，1995；及“有关通过多糖载体，向肿瘤进行药物传递的研究”（第 12 次胶体、界面技术研讨会，日本化学会，讲演要旨集，51，1995）等报告。

发明的公开

本发明的目的在于提供将抗肿瘤剂或抗炎剂等有效成分，可选择部位地移送到肿瘤部位的药物复合物。更具体地说，本发明的目的是提供含有抗肿瘤剂或抗炎剂等的医药化合物作为部分结构的药物复合物，可长时间滞留在血液中，且在肿瘤部位或炎症部位中可选择部位地送入该医药化合物的药物复合物。另外，本发明的另一个目的在于提供制备具有上述特征的药物复合物的方法。

本发明者们为了达到上述目的，对于国际公开 WO 94/19376 号公开的药物复合物进行改良的结果表明，作为多糖部分，若使用将葡聚糖多元醇化的葡聚糖衍生物的羧基 C_{1-4} 烷基化产物代替具有羧基的多糖类，给药后的药物可长时间地维持高浓度的同时，可大幅度地改善对于肿瘤部位或炎症部位的选择性。另外，还发现这样的化合物可显著地增强抗肿瘤效果等主药效力；另一方面，降低了毒性。本发明就是基于这些而完成的。

即，本发明提供了一种药物复合物，其特征是通过含有 1 个氨基酸的间隔基或含有肽式键合的 2 ~ 8 个氨基酸的间隔基，使羧基 C_{1-4} 烷基葡聚糖多元醇和医药化合物的残基结合。另外，按照本发明的另一方案，可提供含有上述药物复合物的医药及以上述药物复合物作为有效成分的医药组合物，例如充填到安瓿中的冷冻干燥品状态的注射用或滴注用制剂等。进而，按照本发明的又一方案，可提供上述药物复合物的制备方法。

作为上述发明的优选的方案，可提供上述药物复合物，其特征是构成羧基 C_{1-4} 烷基葡聚糖多元醇的葡聚糖多元醇实质上是在可完全多元醇化的条件下，将葡聚糖处理得到的葡聚糖多元醇；上述药物复合物的羧基 C_{1-4} 烷基葡聚糖多元醇是羧甲基葡聚糖多元醇；上述药物复合物的医药化合物是抗肿瘤剂或抗炎剂；上述医药复合物的医药化合物是显示依赖于浓度的抗肿瘤作用的抗肿瘤剂（在更高浓度下，显示更强的抗肿瘤作用的抗肿瘤剂：在本说明书中，也叫作浓度依赖型的抗肿瘤剂）；上述药物复合物的医药化合物是显示依赖于时间的抗肿瘤作用的抗肿瘤剂（在更长作用时间下，显示更强的抗肿瘤作用的抗肿瘤剂：在本说明书中也叫作时间依赖型的抗肿瘤剂）；以及抗肿瘤剂是葡聚糖或（1S, 9S）－1－氨基－9－乙基－5－氟－2, 3－二氢－9－羟基－4－甲基－1H, 12H－苯并[de]吡喃并（3′, 4′：6, 7）中氮茚并[1, 2-b]喹啉－10, 13（9H, 15H）－二酮。

另外，作为同样优选的方案，可提供间隔基是用－X－Z－表示的二肽（－X－Z－是指疏水性氨基酸（X）和亲水性氨基酸（Z）分别成为N末端侧及C末端侧，进行肽式键合后，从形成的二肽的N末端的氨基及C末端的羧基分别除去1个氢原子及1个羟基的残基）或间隔基含有该二肽作为部分肽序列的上述药物复合物；疏水性氨基酸是苯基丙氨酸，而亲水性氨基酸是甘氨酸的上述药物复合物；间隔基是（N末端）－Gly－Gly－Phe－Gly－的上述药物复合物；以及抗肿瘤剂的残基导入量是1～15重量%、优选的是3～10重量%、最优选的是5～6重量%范围的上述药物复合物。

作为本发明特别优选的方案，提供用 NH_2－Gly－Gly－Phe－Gly－COOH 表示的肽的N末端，与羧甲基葡聚糖多元醇的羧基进行酰胺结合，该肽的C末端与（1S, 9S）－1－氨基－9－乙基－5－氟－2, 3－二氢－9－羟基－4－甲基－1H, 12H－苯并[de]吡喃并（3′, 4′：6, 7）中氮茚并[1, 2-b]喹啉－10, 13（9H, 15H）－二酮的1－氨基和酰胺结合形成的上述药物复合物；（1S, 9S）－1－氨基－9－乙基－5－氟－2, 3－二氢－9－羟基－4－甲基－1H, 12H－苯并[de]吡喃并（3′, 4′：6, 7）中氮茚并[1, 2-b]喹啉－10, 13（9H, 15H）－二酮残基的导入量是2～10重量%范围的上述药物复合物；以及羧基 C_{1-4} 烷基葡聚糖多元醇的分子量是5,000～500,000的范围、优选的是50,000～

OnCusp
Ex. 1002

450,000 的范围、更优选 200,000 ~ 400,000 范围的羧甲基葡聚糖多元醇、羧甲基化度范围是每一构成糖残基为 0.01 ~ 2.0 、优选的是 0.1 ~ 1.0 、最优选的是 0.3 ~ 0.5 的上述药物复合物。

按照本发明的另一个方案，可提供含有由羧基 C_{1-4} 烷基葡聚糖多元醇的药物传送的载体。对于该发明的优选的方案，羧基 C_{1-4} 烷基葡聚糖多元醇的分子量是 5, 000 ~ 500, 000 的范围、优选的是 50, 000 ~ 450, 000 的范围、最优选的是 200, 000 ~ 400, 000 的范围、羧基 C_{1-4} 烷基化度的范围是每一构成糖残基为 0.01 ~ 2.0 、优选的是 0.1 ~ 1.0 、最优选的是 0.3 ~ 0.5 。作为最优选的载体，可提供羧甲基葡聚糖多元醇。从本发明的另一个观点看，提供了在制备含有与医药化合物的残基结合的羧基 C_{1-4} 烷基葡聚糖多元醇的药物复合物中羧基 C_{1-4} 烷基葡聚糖多元醇。

作为本发明的优选的方案，可提供在制备药物复合物中羧基 C_{1-4} 烷基葡聚糖多元醇的应用，其特征是在制备通过间隔基将医药化合物的残基和羧基 C_{1-4} 烷基葡聚糖多元醇结合形成药物复合物中的应用，以及通过含有 1 个氨基酸的间隔基或肽式键合的含有 2 ~ 8 个氨基酸的间隔基，将羧基 C_{1-4} 烷基葡聚糖多元醇和医药化合物的残基结合。

图的简单说明

图 1 是表示本发明的药物复合物（由例 8 制备的）的 GPC 图。

图 2 是表示本发明的药物复合物（由例 8 制备的）的紫外线吸收光谱图。

图 3 是表示本发明的药物复合物（由例 9 制备的）的 GPC 图。

图 4 是表示本发明的药物复合物（由例 9 制备的）的紫外线吸收光谱图。

图 5 是表示本发明的药物复合物（由例 10 制备的）的紫外线吸收光谱图。

图 6 是表示本发明的药物复合物（由例 15 制备的）的 GPC 图。

图 7 是表示本发明的药物复合物（由例 15 制备的）的紫外线吸收光谱图。

图 8 是表示本发明的药物复合物（由例 28 制备的）的 GPC 图。

图 9 是表示本发明的药物复合物（由例 28 制备的）的紫外线吸收光谱图。

图 10 是表示本发明的药物复合物（由例 29 制备的）的 GPC 图。

图 11 是表示本发明的药物复合物（由例 29 制备的）的紫外线吸收光谱图。

图 12 是表示本发明的药物复合物（由例 34 制备的）的 GPC 图。

图 13 是表示本发明的药物复合物（由例 34 制备的）的紫外线吸收光谱图。

图 14 是表示本发明的药物复合物（由例 39 制备的）的 GPC 图。

图 15 是表示本发明的药物复合物（由例 39 制备的）的紫外线吸收光谱图。

图 16 是表示本发明的药物复合物（由例 41 制备的）的 GPC 图。

图 17 是表示本发明的药物复合物（由例 41 制备的）的紫外线吸收光谱图。

图 18 是表示本发明的药物复合物（由例 44 制备的）的 GPC 图。

图 19 是表示本发明的药物复合物（由例 44 制备的）的紫外线吸收光谱图。

图 20 是表示本发明的药物复合物（由例 47 制备的）的 GPC 图。

图 21 是表示本发明的药物复合物（由例 47 制备的）的紫外线吸收光谱图。

图 22 是表示本发明的药物复合物（由例 55 制备的）的 GPC 图。

图 23 是表示本发明的药物复合物（由例 55 制备的）的紫外线吸收光谱图。

图 24 是表示本发明的药物复合物（图例 15 制备的）的体内动态图。图中的各点表示三个例子的平均值。

实施本发明的最佳方案

本发明的药物复合物，其特征是通过含有 1 个氨基酸的间隔基或含有肽式键合的 2 － 8 个氨基酸的间隔基，使羧基 C_{1-4} 烷基葡聚糖多元醇和医药化合物的残基结合形成。

本发明的药物复合物含有的医药化合物的残基，来自例如作为抗肿瘤剂、抗炎剂、抗菌剂等的医药，包括人的哺乳类的疾病治疗和/或预防所用的医药化合物，由其部分结构而构成的。但是，产生残基的医药化合物，不受上述的限制。另外，作为医药化合物，也可使用具有能与间隔基结合的 1 或 1 以上的反应性官能基（例如氨基、羧基、烃基、硫醇

基、酯基等）的任何一种。在本说明书中，所说的医药化合物，也包括含有其本身具有医药作用的化合物的主要结构作为其部分结构，可在生物体内再生该化合物的前药化合物。

更具体地说，在本说明书中，所说的医药化合物的残基是指在假定通过医药化合物中的反应性官能基和间隔基中的反应性官能基的反应（例如脱水缩合等）形成间隔基和医药化合物残基的结合时，来自存在于结合后的化合物中的医药化合物的部分结构。例如，在用 D－NH_2、D－COOH、D－COOR、D－OH、D－SH、D－$CONH_2$、D－NH－COOR（R 是低级烷基等）表示医药化合物时，医药化合物的残基分别用 D－NH－（D－NH－CO－Q 等）、D－CO－（D－CO－NH－Q、D－CO－O－Q、D－CO－S－Q 等）、D－CO－（D－CO－NH－Q、D－CO－O－Q、D－CO－S－Q 等）、D－O－（D－O－CO－Q、D－O－Q 等）、D－S－（D－S－CO－Q、D－S－Q 等）、D－CONH－（D－CO－NH－CO－Q 等）、D－NH－CO－（D－NH－CO－O－Q、D－NH－CO－NH－Q 等）表示（括号内表示间隔基和医药化合物残基的结合、Q 表示间隔基中除去反应性官能基剩余的部分结构）。但是，间隔基和医药化合物残基的结合种类，不受上述所限制。医药化合物的残基，除了间隔基的 N 末端氨基或 C 末端羧基之外，也可结合在构成间隔基的氨基酸的反应性官能基上。

作为医药化合物的残基，例如可适宜地使用阿霉素、道诺红霉素、丝裂霉素 C、博来霉素、环胞苷、长春新碱、长春碱、甲氨喋呤、铂系抗肿瘤剂（顺氯氨铂或其衍生物）、紫杉醇或其衍生物、喜树碱或其衍生物（特开平 6－87746 号公报所述的抗肿瘤剂，优选的是权利要求 2 所述的（1S, 9S）－1－氨基－9－乙基－5－氟－2, 3－二氢－9－羟基－4－甲基－1H, 12H－苯并[de]吡喃并（3′, 4′：6, 7）中氮茚并[1, 2-b]喹啉－10, 13（9H, 15H）－二酮等）等的抗肿瘤剂的残基。另外，也可适宜使用例如琥珀酸氢可的松、琥珀酸泼尼松等的甾系抗炎剂或甲灭酸、氟灭酸、双氯芬酸、布洛芬、氨苄噻吡酯等非甾体抗炎药的残基。

作为与医药化合物残基结合的间隔基，可使用含有 1 个氨基酸的间隔基或肽式键合的 2～8 个氨基酸的间隔基。更具体地说，间隔基具有 1 个氨基酸的残基（指从氨基酸的氨基及羧基分别除去 1 个氢原子及 1 个

OnCusp
Ex. 1002

羟基的残基）、或含有肽式键合的 2 ~ 8 个氨基酸的低聚肽的残基（指从 N 末端的氨基及 C 末端的羧基，分别除去 1 个氢原子及 1 个羟基的残基）的形态。

优选的间隔基是含有 2 ~ 6 个氨基酸的低聚肽的残基。对于构成间隔基的氨基酸的种类没有特别限制，例如可使用 L - 或 D - 氨基酸，优选的是 L - 氨基酸，除了 α - 氨基酸外，也可使用 β - 丙氨酸、ε - 氨基己酸、γ - 氨基丁酸等。这些 α - 氨基酸以外的氨基酸，优选配置在接近多糖衍生物的位置上。

对于间隔基的结合方向没有特别限制，一般是通过酰胺键，可将间隔基的 N 末端与羧基 C_{1-4} 烷基葡聚糖多元醇的羧基结合，将间隔基的 C 末端与医药化合物的氨基结合。另外，作为肽间隔基的构成单元，含有赖氨酸残基，若将赖氨酸残基的 α - 氨基及 ε - 氨基，分别与其他的氨基酸的羧基进行酰胺结合，由于肽间隔基的两末端为 N 末端，所以可结合医药化合物的羧基。进而，在间隔基中，作为构成单位，含有 1 个或 1 个以上的二胺化合物或二羧酸化合物的残基（例如乙二胺等的二胺的残基或琥珀酸等的二羧酸的残基），也可分别利用两末端是 N 末端的间隔基及两末端是 C 末端的间隔基。

对于间隔基的氨基酸序列没有特别限制，例如间隔基是用 - X - Z - 表示的二肽的残基（X 表示疏水性氨基酸的残基、Z 表示亲水性氨基酸的残基、- X - Z - 是指疏水性氨基酸（X）和亲水性氨基酸（Z）进行肽式键合后，分别成为 N 末端侧及 C 末端侧，从二肽的 N 末端的氨基及 C 末端的羧基分别除去 1 个氢原子及 1 个羟基的残基）或可适宜使用含有该二肽的残基作为部分肽序列的间隔基。作为疏水性氨基酸，例如可使用苯基丙氨酸、酪氨酸、亮氨酸等，作为亲水性氨基酸，例如可使用甘氨酸、丙氨酸等。间隔基也可具有这样的二肽残基的重复序列（例如 - X - Z - X - Z -、- X - Z - X - Z - X - Z - 等）。

若使用含有这样的二肽结构的间隔基，间隔基在被认为肽酶多的肿瘤部位或炎症部位被水解，在该部位上高浓度地游离医药化合物。含有上述二肽的间隔基和医药化合物结合形成的部分结构是本发明的药物复合物的优选部分结构。作为医药化合物的残基，例如使用浓度依赖型的抗肿瘤剂（例如阿霉素）等时，特别优选的是使用含有用 - X - Z - 表

示的上述的二肽残基构成的间隔基或含有该二肽残基作为部分肽序列的间隔基。

另外，作为医药化合物的残基，即使在使用必须在一定浓度以上有持续作用时间的时间依赖型的抗肿瘤剂，也可通过使用上述的间隔基，达到高抗肿瘤效果，例如可举出特开平 6 - 87746 号公报所述的抗肿瘤剂，优选的是权利要求 2 所述的抗肿瘤剂。一般，不受上述的间隔基限制，而从抗肿瘤剂的作用机理、体内动态或毒性显示的特征、在体内的抗肿瘤剂的游离性等观点看，有必要选择优选的间隔基。另外，一般，对于增殖迅速的癌种，优选的是选择可在短期游离出高浓度的医药化合物的上述间隔基。

间隔基的具体例子如下所示，但本发明的药物复合物所使用的间隔基不受这些例子限制，当然本专业人员可适宜选择，以给与医药化合物适宜的游离速度。表中，肽序列的左侧是 N 末端、在 C 末端侧结合医药化合物的残基。D - Phe 表示 D - 苯基丙氨酸残基、其他的氨基酸表示 L - 氨基酸。另外，游离速度的大小是根据对于结合了阿霉素的药物复合物的感染 Walker 256 癌的白鼠的药效显示程度、或感染 Walker 256 癌白鼠肿瘤部位的游离阿霉素浓度来判定的。在这些间隔基中，最好使用对于阿霉素，优选的是（N 末端）- Gly - Gly - Phe - Gly - 等在短时间内可游离出高浓度的医药化合物的间隔基。

表 1

（a）游离速度大的间隔基
- Leu - Gly -
- Tyr - Gly -
- Phe - Gly -
- Gly - Phe - Gly -
- Gly - Gly - Phe - Gly -
- Gly - Phe - Gly - Gly -
- Phe - Gly - Gly - Gly -
- Phe - Phe - Gly - Gly -
- Gly - Gly - Gly - Phe - Gly -



（b）游离速度比较大的间隔基
- Gly - Gly - Phe - Phe -
- Gly - Gly - Gly - Gly - Gly - Gly -
（c）游离速度比较小的间隔基
- Phe - Phe -
- Ala - Gly -
- Pro - Gly -
- Gly - Gly - Gly - Phe -
（d）游离速度小的间隔基
- Gly -
- D - Phe - Gly -
- Gly - Phe -
- Ser - Gly -
- Gly - Gly -
- Gly - Gly - Gly -
- Gly - Gly - Gly - Gly -

对于构成本发明药物复合物的多糖衍生物部分的羧基C_{1-4}烷基葡聚糖多元醇的多元醇化度，没有特别限制，但构成羧基C_{1-4}烷基葡聚糖多元醇的葡聚糖多元醇，优选的是实质上是在可完全多元醇化的条件下，处理葡聚糖而得到的葡聚糖多元醇。例如将极过量的高碘酸钠和硼氢化钠，依次与葡聚糖作用，可得到适合作为本发明的药物复合物的原料化合物的实质上完全多元醇化的葡聚糖多元醇。当然，葡聚糖的多元醇化的方法，不受上述的限制，对于本专业人员，只要是可使用的，可采用其中的任何一种方法。

对于葡聚糖的种类，没有特别的限制，可以任何比例含有 α - D - 1, 6 - 键。例如，可使用α - D - 1, 6 - 键的比例在 85 % 以上、90 % 以上或 95 % 以上的葡聚糖等。对于葡聚糖的分子量，没有特别限制，但例如可使用 10, 000 - 2, 000, 000 范围的，优选的是使用 50, 000 - 800, 000 范围的。作为构成羧基 C_{1-4} 烷基的 C_{1-4} 烷基，可使用直链或支链的 C_{1-4} 烷基，具体地例如甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、叔丁基等，但优选的是可使用甲基。羧基 C_{1-4} 烷基化，例如，对于葡聚糖多元

醇的羟基，可通过使氯代醋酸、溴代醋酸、α－氯丙酸、α－甲基－α－氯丙酸、β－氯丙酸、α－甲基－β－氯丙酸、α－氯代丁酸、β－氯代丁酸、γ－氧代丁酸等的卤代 C_{1-4} 烷基羧酸、优选的是氯代醋酸进行反应，将羟基部分或完全地羧基 C_{1-4} 烷基化。

例如，只要将葡聚糖多元醇溶解在不参与反应的惰性溶剂（例如水、N, N－二甲基甲酰胺、二甲基亚砜等）、在碱（例如氢氧化钠或氢氧化钾等）存在下，添加卤代 C_{1-4} 烷基羧酸或其盐，在冰冷下乃至 100 ℃左右温度范围下，反应数分钟－数日就可以。羧基 C_{1-4} 烷基的导入程度，可通过例如适宜选择羧基 C_{1-4} 烷基化的反应温度和作为试料使用的卤代 C_{1-4} 烷基羧酸及碱量容易地进行调节，其调节方法是专业人员所公知的。对于葡聚糖多元醇的羟基的羧基 C_{1-4} 烷基化的程度，没有特别限制，例如对于每个构成糖残基是 0.01 ~ 2.0 的范围、优选是 0.1 ~ 1.0、最优选的是 0.3 ~ 0.5 的范围。羧基 C_{1-4} 烷基葡聚糖多元醇的分子量在用凝胶过滤法测定时，是 5,000 ~ 500,000 左右、优选的是 50,000 ~ 450,000 左右、最优选的是 200,000 ~ 400,000 左右。

上述的羧基 C_{1-4} 烷基葡聚糖多元醇，作为药物传递的载体是有用的。将医药化合物与羧基 C_{1-4} 烷基葡聚糖多元醇结合的药物复合物，其特征是例如具有肿瘤选择性等的优良选择性，另外，可长时间维持高的血中浓度。作为医药化合物和羧基 C_{1-4} 烷基葡聚糖多元醇的结合，例如可采用以酯键将两者直接结合的方法，通过上述所说的间隔基等采用适宜间隔基，将两者结合的方法等。

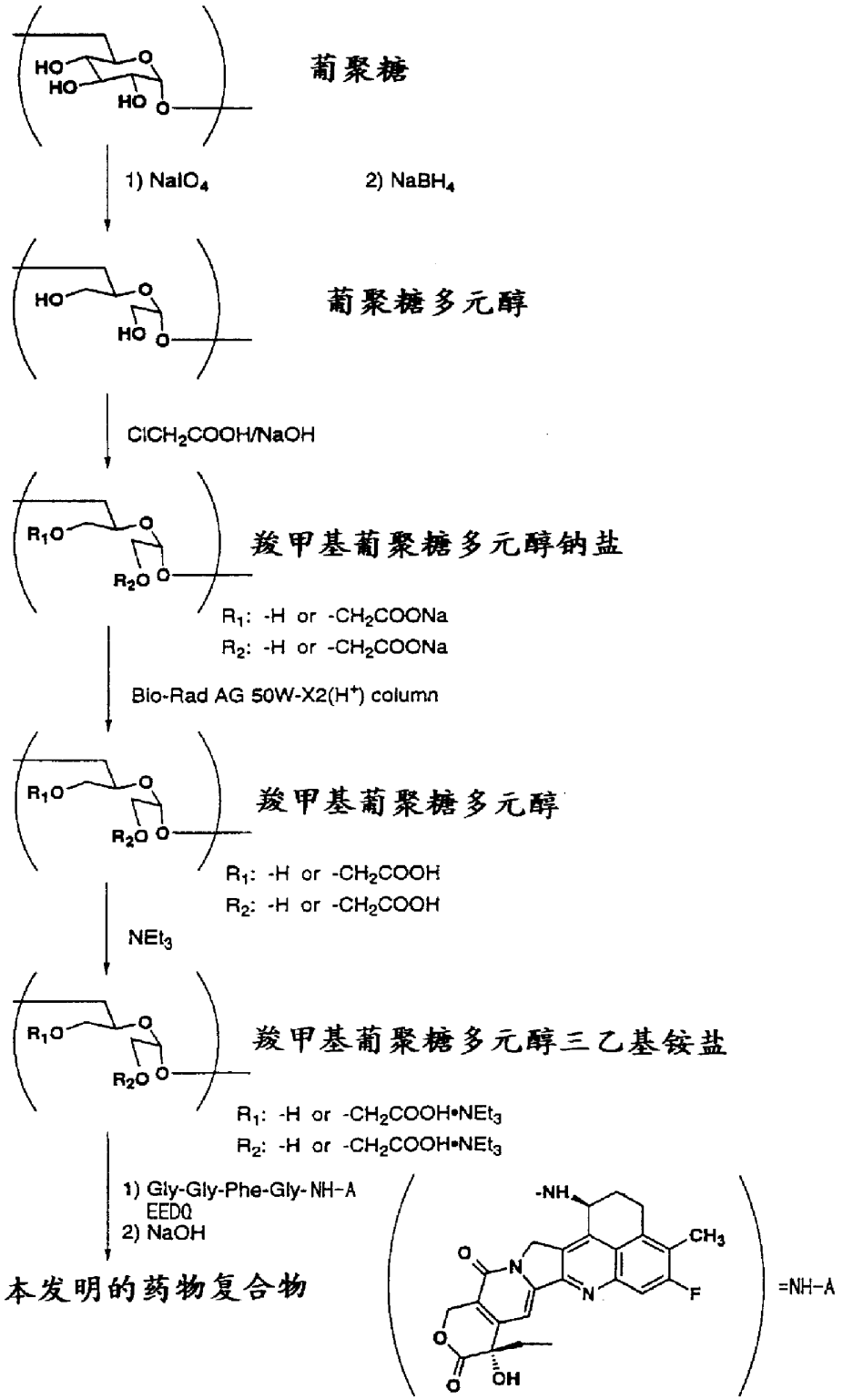
对于通过间隔基结合的药物复合物，可通过将和医药化合物的残基结合的间隔基与上述得到的羧甲基葡聚糖多元醇的羧基结合，制备本发明的药物复合物。间隔基和羧甲基葡聚糖多元醇的羧基的结合，一般是通过酰胺键将间隔基的 N 末端胺基和羧甲基葡聚糖多元醇的羧基结合形成的。当然，间隔基和羧甲基葡聚糖多元醇的羧基的结合不受上述所限制，也可用其他的化学键和 1 或 1 以上的间隔基结合。例如可通过间隔基的 C 末端羧基和羧甲基葡聚糖多元醇的羧基形成酸酐，或也可将乙二胺等二胺化合物作为间隔基使用，将各个羧基与二胺的各个氨基进行酰胺结合。

在通过酰胺键将间隔基的 N 末端氨基和羧甲基葡聚糖多元醇的羧基结合时，除了使用肽链合成所采用的通常的脱水缩合剂，例如 N, N′－二

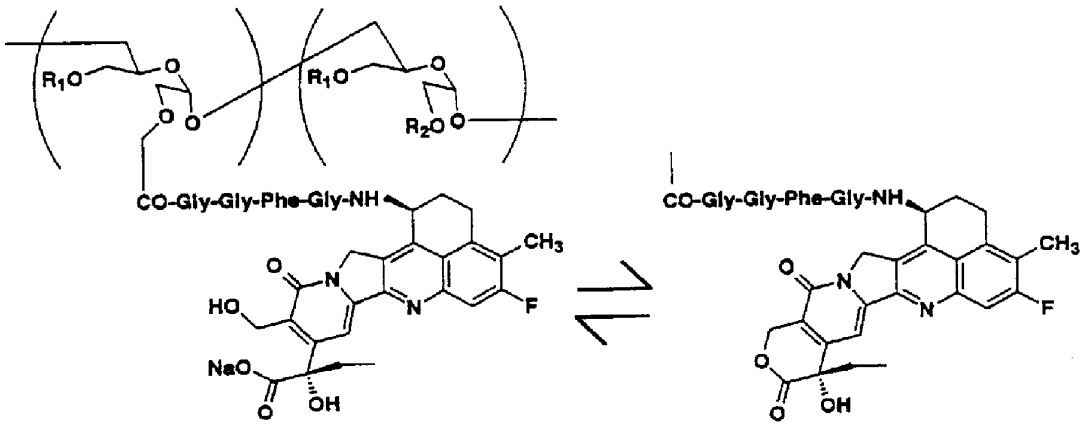
环己基碳化二亚胺（ DCC ）等的 N, N′－二环烷基碳化二亚胺类、 1 －乙基－ 3 －（ 3 －二甲基氨基丙基）碳化二亚胺（ EDAPC ）等的碳化二亚胺衍生物、 1 －羟基苯并三唑（ HOBT ）等的苯并三唑衍生物之外，也可使用 1 －乙氧基羰基－ 2 －乙氧基－ 1, 2 －二羟基喹啉（ EEDQ ）等。另外，也可通过活性酯法或酰卤法进行反应。

对于导入到羧甲基葡聚糖多元醇的医药化合物残基量，没有特别限制，但可从医药化合物残基的物理化学性质以及本发明的药物复合物的体内动态、药效及毒性等出发适宜选择。一般，可选择 0.1 ~ 30 重量%、优选的是 1 ~ 15 重量%、更优选的是 3 ~ 10 重量%、最优选的是 5 ~ 6 重量%左右的范围。例如，通过吸光度分析等可容易地决定导入到羧甲基葡聚糖多元醇的医药化合物残基的比例。

作为本发明的药物复合物的制备方法的一个例子，在导入特开平 6 － 87746 号公报的权利要求 2 所述的抗肿瘤剂的医药化合物的残基时，制备方法如下图所示，但本发明的药物复合物及其制备方法不受该图所示的限制。在下图中，医药化合物残基的导入量，例如是 1 ~ 15 重量%、优选的是 2 ~ 10 重量%左右。另外，在下图中，仅表示导入多元醇类结构单元中的 1 个或 2 个羧甲基的结构单元，但应理解本发明的药物复合物的多糖衍生物部分不是通过重复上述结构单元而构成的。


葡聚糖
1) $NaIO_4$
2) $NaBH_4$
葡聚糖多元醇
$ClCH_2COOH/NaOH$
羧甲基葡聚糖多元醇钠盐
R_1: -H or $-CH_2COONa$
R_2: -H or $-CH_2COONa$
Bio-Rad AG 50W-X2(H^+) column
羧甲基葡聚糖多元醇
R_1: -H or $-CH_2COOH$
R_2: -H or $-CH_2COOH$
NEt_3
羧甲基葡聚糖多元醇三乙基铵盐
R_1: -H or $-CH_2COOH{\bullet}NEt_3$
R_2: -H or $-CH_2COOH{\bullet}NEt_3$
1) Gly-Gly-Phe-Gly-NH-A
EEDQ
2) NaOH
本发明的药物复合物
=NH-A

本发明的药物复合物



上述的医药化合物，在酸性水性溶剂中（例如 pH 为 3 左右），其平衡偏向形成内酯环的化合物（闭环体），另一方面，在碱性水性溶剂中（例如 pH 10 左右），其平衡偏向内酯环开环化合物（开环体），但向这样的闭环体及开环体导入相应残基的药物复合物，具有相同的抗肿瘤效果，全都包括在本发明的范围内这是不言而喻的。另外，若在反应系中存在内酯环开环了的反应种时，则来自内酯环的羧基和来自间隔基的氨基之间显著地进行缩合反应，不仅反应收率降低，而且得不到作为目的的均一的药物复合物。此时可通过选择地使用闭环体作为反应种，来避免这样的副反应。

即，将羧甲基葡聚糖多元醇的钠盐变成三乙基铵盐后，在非水系（不含水的有机溶剂）中，通过将结合了上述医药化合物的残基的间隔基的 N 末端氨基与羧甲基葡聚糖多元醇的羧基进行缩合，可抑制副反应，可有效地制备目的物。作为可溶解在有机溶剂的羧甲基葡聚糖多元醇的盐，例如除了三乙基铵盐和三甲基铵盐等的三烷基铵盐之外，可使用 N－甲基吡咯烷、N－甲基吗啉、二甲基氨基吡啶（DMAP）等的有机碱的盐。作为有机溶剂，可使用 N, N－二甲基甲酰胺、二甲基亚砜等。

本发明的药物复合物，根据医药化合物的残基种类（例如抗肿瘤剂或抗炎剂等的医药化合物的残基），在肿瘤部位或炎症部位等处，可特异地显示所希望的医药活性，且可减少医药化合物本身具有的毒性。虽然不应局限于任何特定的理论，但本发明的药物复合物的多糖衍生物部分（例如羧甲基葡聚糖多元醇）由于具有极优良的血液中滞留性及对于

肿瘤、炎症部分的积累性，所以作为药物传递的载体是有用的，本发明的药物复合物具有肿瘤选择性及炎症部位选择性。另外，对于肿瘤部位或炎症部位，由于被认为显示有蛋白酶（肽酶），所以本发明的药物复合物的间隔基容易被水解，使游离的医药化合物发挥药效。

含有本发明的药物复合物的医药，通常可以冷冻干燥品等形式填充到安瓿中，作为用时溶解型的注射用或滴注用制剂等非经口给药用制剂，提供于临床上，但本发明的医药制剂形态不受上述形态限制。对于上述制剂的制备，可使用在本专业界可用的例如助溶剂、 pH 调节剂、稳定剂等制剂用辅料。对于本发明药物的给药量没有特别限制，但通常应该考虑构成医药化合物残基的医药化合物的给药量、导入到本发明药物复合物中的医药化合物的残基量、患者的状态或疾病种类等决定。例如，在将以 6 重量％左右的比例导入特开平 6 － 87746 号公报的权利要求 2 所述的抗肿瘤剂的残基的本发明的药物复合物进行非经口给药时，一般，每 1 天，对于 $1m^2$ 体表面积，约 1 ～ 500mg 左右、优选的是约 10 ～ 100mg 的范围一次给药，每 3 ～ 4 周重复进行。

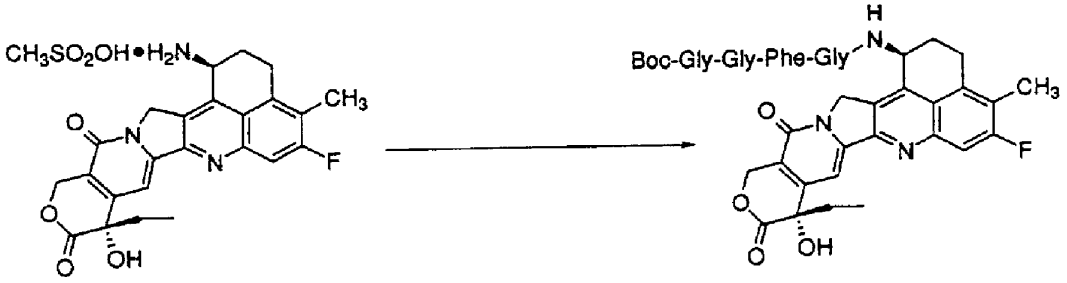
实施例

以下，用实施例进一步具体说明本发明，但本发明的范围不受下述实施例限制。实施例中，“A － NH －”表示象在特开平 6 － 87746 号公报的权利要求 2 所述的药物化合物（在实施例中，也称为“ DX － 8951 ”）那样具有内脂环的药物化合物中，用 A － NH_2 表示具有闭环内酯环的医药化合物时，该医药化合物的残基，其中的一个例子是在上述图中，用 A － NH － 表示的基团（形成内酯环的）。另外， A′－ NH － 表示用 A － NH － 表示的医药化合物残基中的内酯环是闭环型或开环型中任何一种或它们的混合形态，－ DXR 表示来自阿霉素的残基，－ D51 － 7059 表示来自例 55 所示的紫杉醇衍生物的残基。

另外，实施例中没有特别说明时，羧甲基葡聚糖多元醇的羧甲基化度（每个构成糖残基的羧甲基的取代度）是通过将羧甲基葡聚糖多元醇的钠盐变成游离酸型后，溶解在 0.1N 氢氧化钠水溶液中，用 0.1N 盐酸滴定求出的。将羧甲基葡聚糖多元醇的钠盐的水溶液，加到 Bio － Rad AG50W － x2 （ H^+ 型）柱上，将通过液冷冻干燥作为试样使用。将该试样溶解在规定过量的 0.1N 氢氧化钠水溶液中，以酚酞作为指示剂，用 0.1N 盐酸滴定。将试样的采取量定为 s （ mg ）、 0.1N 氢氧化钠水溶液

的规定过量定为 a（ml）、0.1N 盐酸的滴定量定为 b（ml），用 13.4（a－b）/[s－5.8（a－b）]式求出羧甲基化度。另外，药物的导入量（重量%），从利用药物的特征吸收的吸光度分析（362nm 附近）求出。进而，凝胶过滤法按照以下条件进行（柱：TSK gel G4000 PW_{XL}、洗脱液：0.1M NaCl、流速：0.8ml/min、柱温：40℃）。

例 1：3′－N－（Boc－Gly－Gly－Phe－Gly）－NH－A（A－NH_2 = DX－8951）



将 Boc－Gly－Gly－Phe－Gly（600mg）及 N－羟基丁二酰亚胺（160mg），溶解到 N, N－二甲基甲酰胺（20ml）中，冷却到 4℃后，添加 N, N′－二环己基碳化二亚胺（280mg）。在该溶液中，加入溶解了特开平 6－87746 号公报的权利要求 2 所述的医药化合物的甲磺酸盐（600mg：上述公报的实施例 50 所述的化合物）和三乙胺（0.16ml）的 N, N－二甲基甲酰胺（30ml）溶液，在避光、室温下，一边搅拌 16 小时；一边进行反应。将该反应液减压干固，用硅胶柱色谱（洗脱液：含有 0.5％醋酸的二氯甲烷：甲醇＝10：1 溶液）精制，得到标题化合物（1.0g）。

^{1}H-NMR (DMSO-d_6) δ: 8.40 (d, 1H, J=8.3 Hz), 8.10-8.17 (m, 2H), 7.91-8.01 (m, 1H), 7.78 (d, 1H, J=10.75 Hz), 7.32 (s, 1H), 6.94-6.96 (m, 1H), 6.50 (s, 1H), 5.57 (t, 1H, J= 4.5Hz), 5.43 (s, 2H), 5.23 (s, 2H), 3.77 (dd, 2H, J= 5.85Hz, J = 8.80Hz), 3.70 (d, 2H, J= 4.40Hz), 3.65 (d, 2H, J= 5.35Hz), 3.56 (d, 2H, J= 5.85), 3.15-3.25 (m, 2H), 2.40 (s, 3H), 2.05-2.25 (m, 1H), 1.86 (m, 2H), 1.35 (s, 9H), 0.88 (t, 3H, J= 7.35).

Mass (FAB); m/e 854 (M+1)

例 2： 3′－N－（Boc－Gly－Gly－Gly－Phe）－NH－A（A－NH_2 = DX－8951）的合成

将 Boc－Gly－Gly－Gly－Phe（600mg）及 N－羟基丁二酰亚胺（160mg），溶解在 N, N－二甲基甲酰胺（20ml）中，冷却到 4℃后，添加 N, N′－二环己基碳化二亚胺（280mg）。在该溶液中，加入溶解了 DX－8951 的甲磺酸盐（600mg）和三乙胺（0.16mg）的 N, N－二甲基甲酰胺（30ml）溶液，在避光、室温下，一边搅拌 16 小时；一边进行反应。该反应液进行减压干固，用硅胶柱色谱（洗脱液：含有 0.5 %醋酸的二氯甲烷：甲醇＝ 10：1 溶液）精制，得到标题化合物（700mg）。

^{1}H-NMR (DMSO-d_6) δ: 8.57 (d, 1H, J= 7.8Hz), 8.19 (d, 1H), 8.05-8.07 (m, 2H), 7.79 (d, 1H, J= 11.2Hz), 7.32 (s, 1H), 7.10 (d, 2H, J= 7.8Hz), 6.93-7.03 (m, 4H), 6.51 (s, 1H), 5.52-5.55 (m, 1H), 5.44 (s, 2H), 5.18 (d, 1H, J= 18.5Hz), 4.84 (d, 1H, J= 18.5Hz), 4.57-4.59 (m, 1H), 3.57-3.71 (m, 6H), 3.15-3.25 (m, 2H), 3.00-3.02 (m, 1H), 2.80-2.90 (m, 1H), 2.40 (s, 3H), 2.05-2.25 (m, 1H), 1.86 (m, 2H), 1.35 (s, 9H), 0.88 (t, 3H, J= 7.35Hz).

Mass (FAB) ; m/e 854 (M+1)

例 3： 3′－N－（Boc－Gly－Gly－Gly－Gly）－NH－A（A－NH_2 = DX－8951）的合成

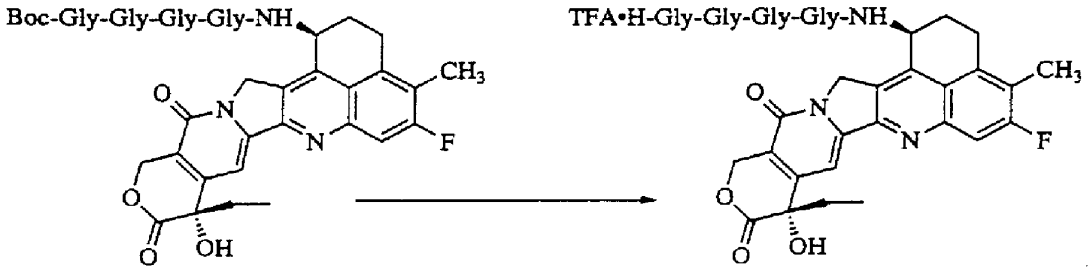
将 Boc－Gly－Gly－Gly－Gly（120mg）及 N－羟基丁二酰亚胺（39mg），溶解在 N, N－二甲基甲酰胺（20ml）中，冷却到 4℃后，添加 N, N′－二环己基碳化二亚胺（70mg）。在该溶液中，加入溶解了 DX－8951 的甲磺酸盐（150mg）和三乙胺（0.039ml）的 N, N－二甲基甲酰胺（10ml）溶液，在避光、室温下，一边搅拌 16 小时；一边进行反应。将该反应液进行减压干固，用硅胶柱色谱（洗脱液：二氯甲烷：甲醇＝ 10：1 溶液）精制残渣，得到标题化合物（100mg）。

^{1}H-NMR (DMSO-d_6) δ: 8.40 (d, 1H, J= 8.3 Hz), 8.10-8.17 (m, 2H), 7.91-8.01 (m, 1H), 7.78 (d, 1H, J= 10.75 Hz), 7.32 (s, 1H), 6.94-6.96 (m, 1H), 6.50 (s, 1H), 5.57 (t, 1H, J= 4.5Hz), 5.43 (s, 2H), 5.23 (s, 2H), 3.77 (dd, 2H, J= 5.85Hz, J = 8.80Hz), 3.70 (d, 2H, J= 4.40Hz), 3.65 (d, 2H, J= 5.35Hz), 3.56 (d, 2H, J= 5.

85Hz), 3.15-3.25 (m, 2H), 2.40 (s, 3H), 2.05-2.25 (m, 1H), 1.86 (m, 2H), 1.35 (s, 9H), 0.88 (t, 3H, J= 7.35Hz).

Mass (FAB); m/e 764 (M+1)

例 4：3′－N－（Gly－Gly－Gly－Gly）－NH－A（A－NH_2 = DX－8951）三氟醋酸盐的合成



将 3′－N－（Boc－Gly－Gly－Gly－Gly）－NH－A（A－NH_2 = DX－8951）（79mg），溶解在三氟醋酸（3ml）中，放置 1 小时。馏去溶剂，用甲醇（30ml）共沸 2 次，用乙醇（30ml）共沸 2 次后，用乙醚洗涤残渣，得到标题化合物（80mg）。

^{1}H-NMR (DMSO-d_6) δ: 8.59-8.61 (m, 1H), 8.50 (d, 1H, J= 8.3Hz), 8.21-8.27 (m, 2H), 7.91-8.01 (br, 3H), 7.81 (d, 1H, J= 11.2Hz), 7.32 (s, 1H), 6.50-6.52 (br, 1H), 5.57-5.59 (m, 1H), 5.43 (s, 2H), 5.23 (s, 2H), 3.80-3.82 (m, 3H), 3.70-3.75 (m, 3H), 3.15-3.25 (m, 2H), 2.41 (s, 3H), 2.05-2.25 (m, 1H), 1.86-1.88 (m, 2H), 0.88 (t, 3H, J= 7.35Hz).

例 5：羧甲基葡聚糖多元醇的三乙基铵盐的合成

将葡聚糖 T 2000（10g，ファルマシア社制，平均分子量 2,000,000），溶解到 0.1M 醋酸缓冲液（pH 5.5、1,000ml）中，加入高碘酸钠（33.0g）的水溶液（1000ml）。避光，4℃下，搅拌 10 天后，加入乙二醇（7.0ml），搅拌 1 夜。在冰冷下，使用 8M 氢氧化钠水溶液，将反应液调节到 pH 为 7.5。加入硼氢化钠（14g），溶解后，在室温下搅拌 1 夜。在冰冷下，用醋酸调节反应液的 pH 为 5.5，在 4℃下，搅拌 1 小时后，在冰冷下，使用 8M 氢氧化钠水溶液调节 pH 为 7.5。通过使用 BIOMAX－30 膜（ミリポア社制）的超滤法，从得到的水溶液中除

去低分子成分。将高分子成分进行冷冻干燥，得到葡聚糖多元醇。将该葡聚糖多元醇，在 pH 3.0 下，处理 1 小时后，用 BIOMAX - 50 膜除去低分子成分，接着，用 BIOMAX - 100 膜除去高分子成分，冷冻干燥，得到精制的葡聚糖多元醇（ 2.0g ）。该物质的分子量（凝胶过滤法、葡聚糖标准）是 220K 。

将该精制葡聚糖多元醇（ 1.8g ）、加入到将氢氧化钠（ 10.5g ）溶解在水（ 45ml ）得到的水溶液中，在室温下溶解。在该溶液中，在冰冷下，加入一氯醋酸（ 15g ）溶解后，在室温下反应 20 小时。用醋酸将该反应液的 pH 调节到 8 后，通过使用 BIOMAX - 10 膜的超滤法除去低分子成分。将高分子成分进行冷冻干燥，得到羧甲基葡聚糖多元醇的钠盐（ 1.8g ）。该物质的分子量（凝胶过滤、葡聚糖标准）是 330K ，羧甲基化度是 0.8 。

将上述的羧甲基葡聚糖多元醇的钠盐（ 300mg ）溶解在水中，装入到 Bio - Rad AG50W - X2 （ 200 - 400 目、 H^+ 型）柱（ 1.5 × 8.6cm ），用水洗脱。在该洗脱液中加入三乙胺（ 0.5ml ）后，冷冻干燥，得到羧甲基葡聚糖多元醇的三乙铵盐（ 380mg ）。将羧甲基葡聚糖多元醇的钠盐（各 300mg ），与上述相同地处理，得到羧甲基葡聚糖多元醇的三乙铵盐（ 380mg 、 400mg ）。

例 6 ：羧甲基葡聚糖多元醇的钠盐的合成

将用上述例 5 得到的羧甲基葡聚糖多元醇的钠盐（ 0.15g ），加入到将氢氧化钠（ 1.05g ）溶解在水（ 4.5ml ）中得到的水溶液中，在室温下溶解。在该溶液中，在冰冷下，加入一氯醋酸（ 1.5g ）溶解后，在室温下反应 18 小时。用醋酸将该反应液的 pH 调节到 8 ，滴入到 90ml 的甲醇中后，加入 3M 氯化钠水溶液（ 0.15ml ），用离心分离（ 3500rpm 、 8 分钟），收集析出的沉淀。用甲醇洗涤该沉淀后，溶解到水（ 5ml ）中，加入 3M 氯化钠水溶液（ 0.15ml ）。用米利波阿过滤器(0.45μm ）过滤该水溶液，将滤液滴入到 35ml 的乙醇中，收集用离心分离（ 3500rpm 、 8 分钟）析出的沉淀。用乙醇洗涤该沉淀后，溶解到水中，使用透析膜（スペクトラポア 1 、切割下的分子量是 6,000 - 8,000 ），对于纯水进行透析。用米利波阿过滤器(0.22μm ）过滤透析内液后，冷冻干燥，得到羧甲基葡聚糖多元醇的钠盐（ 0.18g ）。该物质的每个糖残基的羧甲基化度（碱滴定法）是 1.2 。

例 7：羧甲基葡聚糖多元醇的钠盐的合成

将由例 5 得到的精制葡聚糖多元醇（ 0.2g ），加入到将氢氧化钠（ 0.84g ）溶解在水（ 6ml ）中得到的水溶液中，在室温下溶解。在冰冷下，在该溶液中加入一氯醋酸（ 1.2g ）、溶解后，在室温下反应 18 小时。用醋酸将该反应液的 pH 调节成 8，滴入到 120ml 的甲醇中，加入 3M 氯化钠水溶液（ 0.2ml ），收集用离心分离（ 350rpm 、 8 分钟）析出的沉淀。用甲醇洗涤该沉淀后，溶解到 5ml 的水中，加入 3M 氯化钠水溶液（ 0.2ml ）。用米利波阿过滤器(0.45μm ）过滤该水溶液，将滤液滴入到 35ml 的乙醇中，用离心分离收集（ 3500rpm 、 8 分钟）析出的沉淀。用乙醇洗涤该沉淀后，溶解在水中、使用透析膜（スペクトラポア 1 、临界（ cut off ）分子量 6, 000 － 8, 000 ），对于纯水进行透析。用米利波阿过滤器(0.22μm ）过滤透析内液后，冷冻干燥，得到羧甲基葡聚糖多元醇的钠盐（ 0.20g ）。该物质的每个糖残基的羧甲基化度（碱滴定法）是 0.4 。

例 8：羧甲基葡聚糖多元醇－ Gly － Gly － Gly － Phe － NH － A′（ A － NH_2 = DX － 8951 ）的合成

将由例 5 得到的羧甲基葡聚糖多元醇的三乙铵盐（ 380mg 、羧甲基化度 0.8 ），溶解到 N, N －二甲基甲酰胺（ 30ml ）中。在该溶液中，依次加入 3′－ N －（ Gly － Gly － Gly － Phe ）－ NH － A （ A － NH_2 = DX － 8951)的三氟醋酸盐（ 49mg)的 N, N －二甲基甲酰胺（ 5ml ）溶液、三乙胺（ 0.017ml ）、 1 －乙氧基羰基－ 2 －乙氧基－ 1, 2 －二羟基喹啉（ 380mg ），在室温下，一边搅拌 1 夜，一边反应。用 1M 氢氧化钠水溶液，将反应液的 pH 调节到 10 后，每 5ml 滴入到 25ml 的乙醇中。在该混合物中，加入 3M 氯化钠水溶液（ 1ml ）、乙醚（ 5ml ），用离心分离收集（ 3500rpm 、 8 分钟）析出的沉淀。

将该沉淀溶解到水中，使用透析膜（スペクトルポア 1 、临界分子量 6, 000 － 8, 000 ）对于纯水进行透析，用米利波阿过滤器(0.22μm ）过滤透析内液后，冷冻干燥，将得到的粗生成物溶解到水（ 30ml ），用 0.1M 氢氧化钠水溶液调节 pH 为 9，在 37 ℃下，处理 1 小时。将该处理液与上述相同地透析后，将得到的透析内液用米利波阿过滤器(0.22μm ）进行过滤，冷冻干燥，得到标题化合物 289mg 。将本化合物溶解到 0.1M 氯化钠水溶液中后，用 GPC（柱: 东ソ－株式会社制 TSK Gel PW － 4000XL 、

溶剂: 0.1M NaCl、流速: 0.8ml/min）分析的结果及本化合物的紫外线吸收光谱（0.1M Tris 缓冲液、pH 9.0、0.25mg/ml）分别如图 1 及图 2 所示。根据 0.1M Tris（トリス）缓冲液（pH 9.0）中的 362nm 的吸光度，定量本化合物的医药化合物残基含量是 5.3 %（W/W）。

例 9：羧甲基葡聚糖多元醇－Gly－Gly－Phe－Gly－NH－A′（A－NH_2 = DX－8951）合成

按照与例 8 相同的方法，将用与例 4 相同方法从 3′－N－（Boc－Gly－Gly－Phe－Gly）－NH－A（A－NH_2 = DX－8951）（50mg）脱 Boc 化得到的 3′－N－（Gly－Gly－Phe－Gly）－NH－A 的三氟醋酸盐导入到由例 5 得到的羧甲基葡聚糖多元醇的三乙基铵盐（380mg），合成标题化合物（300mg）。将本化合物溶解到 0.1M 氯化钠水溶液中，用 GPC（柱: 东ソ－株式会社制 TSK Gel PW－4000 XL、溶剂: 0.1M NaCl、流速: 0.8ml/min）分析的结果及本化合物的紫外线吸收光谱（0.1M Tris 缓冲液、pH 9.0、0.19mg/ml）分别如图 3 及图 4 所示。根据 0.1M Tris 缓冲液（pH 9.0）中的 362nm 的吸光度，定量本化合物的医药化合物残基含量是 5.3 %（W/W）。

例 10：羧甲基葡聚糖多元醇－Gly－Gly－Gly－Gly－NH－A′（A－NH_2 = DX－8951）的合成

用与例 8 相同的方法，将 3′－N－（Boc－Gly－Gly－Gly－Gly）－NH－A（A－NH_2 = DX－8951）（41mg）用与例 4 相同的方法脱 Boc 化得到的 3′－N－（Gly－Gly－Gly－Gly）－NH－A 的三氟醋酸盐，导入到由例 5 得到的羧甲基葡聚糖多元醇的三乙基铵盐（380mg）中，合成标题化合物（190mg）。本化合物的紫外线吸收光谱（0.1M Tris 缓冲液、pH 9.0、0.34mg/ml）如图 5 所示。根据在 0.1M Tris 缓冲液（pH 9.0）中的 362nm 的吸光度定量本化合物的医药化合物残基含量是 5.3 %（W/W）。

例 11：本发明的药物复合物的抗肿瘤作用

将小鼠纤维肉瘤 Meth A 细胞 1×10^6 个，移植到 BALB/c 系的雄性小鼠（7 周龄）的右鼠趾部皮下，作成感染 Meth A 癌小鼠（1 组 7 只）。第 7 天，将溶解在注射用蒸馏水中的例 9 的药物复合物，每 4 天，4 次给药于感染 Meth A 癌小鼠的尾静脉中。移植后的第 21 天，摘出肿瘤，测定重量，用下式:

OnCusp
Ex. 1002

肿瘤增殖抑制率（%）=[1 -（检体给药组的平均肿瘤重量/对照组的平均肿瘤重量）]× 100 算出肿瘤增殖抑制率。其结果，由例 9 得到的本发明的药物复合物未发现毒性（体重减少），与上述医药化合物本身（没有间隔基及多糖衍生物）比较，抗肿瘤效果大幅度地增强。多糖衍生物本身（例 5）及仅导入间隔基的医药化合物残基（按照例 4 的方法，从例 1 的化合物脱 Boc 化得到的 H_2N - Gly - Gly - Phe - Gly - NH - A（A - NH_2 = DX - 8951）的三氟醋酸盐）是无效的。

表 2

被测化合物	给药量（mg/kg）	抑制率（%）
医药化合物本身	7.5 × 4	76
	1.875 × 4	46
	0.9375 × 4	36
例 9 的化合物	1.4[1)] × 4	94
	0.7[1)] × 4	59
	0.35[1)] × 4	41

[1)] 医药化合物换算量

例 12：本发明的药物复合物的抗肿瘤作用

用与例 11 相同方法，作成感染 Meth A 癌小鼠（1 组 6 只）、第 7 天，与例 8 及例 9 的药物复合物单次给药时的抗肿瘤作用比较。其结果，抗肿瘤作用的程度是（多糖衍生物）- Gly - Gly - Phe - Gly - NH - A′ >（多糖衍生物）- Gly - Gly - Gly - Phe - NH - A′ > 医药化合物本身。不通过间隔基而将医药化合物残基与例 5 的羧甲基葡聚糖多元醇的羧基直接结合的化合物（医药化合物残基的导入量：6.2 重量%）是无效的。

OnCusp
Ex. 1002

表 3

被测化合物	给药量（ mg/kg ）	抑制率（ % ）
医药化合物本身	60	77
	20	59
例 8 的化合物	10[1)]	85
	5[1)]	76
例 9 的化合物	5[1)]	98
	2.5[1)]	87

[1)] 医药化合物换算量

例 13： 羧甲基葡聚糖多元醇的三乙基铵盐的合成

将葡聚糖 T 500 （ 10g 、フアルマシア社制、分子量 500K ），溶解到 0.1M 醋酸缓冲液（ pH 5.5 、 1000ml ）中，加入高碘酸钠（ 33g ）的水溶液（ 1000ml ）。在避光下，在 4 ℃下搅拌 10 天，加入乙二醇（ 7.0ml ），搅拌 1 夜。使用 8M 氢氧化钠水溶液，将反应液的 pH 调节成 7.5 。加入硼氢化钠（ 14g ）溶解后，搅拌 1 夜。冰冷反应液后，用醋酸调节 pH 为 5.5 ，在 4 ℃下搅拌 1 小时后，用 8M 氢氧化钠水溶液调节 pH 为 7.5 ，得到溶解 1 。另外，对于葡聚糖 T 500 （ 10g 、フアルマシア社、分子量 500K ），进行上述一系列操作，得到溶液 2 。进而，对于葡聚糖 T250 （各 10g 、フアルマシア社制、分子量 250K ），进行上述的一系列操作，得到溶液 3 和溶液 4 。将这些溶液 1 ~ 4 混合，通过使用 BIOMAX - 50 膜的超滤法，除去低分子成分，将高分子级分冷冻干燥，得到葡聚糖多元醇（ 25g ）。该物质的分子量（凝胶过滤、プルラン标准）是 163K 。

将该葡聚糖多元醇（ 11g ），加入到在水（ 330ml ）中溶解氢氧化钠（ 46.2g ）得到的水溶液中，在室温下溶解。在冰冷下，在该溶液中加入一氯醋酸（ 66g ），使其溶解后，在室温下，反应 1 夜。用醋酸将该反应液的 pH 调节到 9 后，通过使用 BIOMAX - 30 膜的超滤法脱盐。将未通过膜的残留溶液冷冻干燥，得到羧甲基葡聚糖多元醇的钠盐（ 13g ）。该物质的分子量（凝胶过滤、プルラン标准）是 228K 、羧甲基化度是 0.4 。

将该羧甲基葡聚糖多元醇的钠盐（ 600mg ）溶解在水中，放到 Bio - Rad AG 50W - X2 （ 200 - 400 目、 H^+ 型）柱（直径 44mm 、长 210mm ）中，用水洗脱。在该洗脱液中加入三乙胺（ 0.93ml ）后，冷冻干燥，得到标题化合物（ 690mg ）。

例 14： 3′ - N - （ Gly - Gly - Phe - Gly ） - NH - A （ A - NH_2 = DX - 8951 ）三氟醋酸盐的合成

将由例 1 得到的 3′ - N - （ Boc - Gly - Gly - Phe - Gly ） - NH - A （ A - NH_2 = DX - 8951 ）（ 79mg)溶解在三氟醋酸（ 3ml ）中，放置 1 小时。馏去溶剂，用甲醇（ 30ml)共沸 2 次、用乙醇（ 30ml ）共沸 2 次后，将残渣用乙醚洗涤，得到标题化合物（ 80mg ）。

^{1}H-NMR (DMSO-d_6) δ: 8.53 (d, 1H, J= 8.3Hz), 8.40-8.48 (m, 2H), 8.28 (d, 1H, J= 8.3Hz), 7.95-8.07 (br, 3H), 7.81 (d, 1H, J= 10.2Hz), 7.30-7.37 (m, 2H), 7.15-7.30 (m, 5H), 6.50-6.55 (br, 1H), 5.50-5.57 (m, 1H), 5.41 (d, 2H, J= 7.82Hz), 5.25 (s, 2H), 4.55-4.62 (m, 1H), 3.55-3.92 (m, 6H), 3.15-3.25 (br, 2H), 2.98-3.03 (m, 1H), 2.73-2.82 (m, 1H), 2.40 (s, 3H), 2.05-2.25 (m, 1H), 1.84-1.92 (m, 2H), 0.88 (t, 3H, J= 7.35Hz).

例 15： 羧甲基葡聚糖多元醇 - Gly - Gly - Phe - Gly - NH - A′（ A - NH_2 = DX - 8951 ）的合成

将由例 13 得到的羧甲基葡聚糖多元醇的钠盐（ 400mg ）置换成三乙铵盐（ 470mg ），溶解在 N, N - 二甲基甲酰胺（ 30ml ）中。在该溶液中，依次加入由例 14 得到的 3′ - N - （ Gly - Gly - Phe - Gly ） - NH - A （ A - NH_2 = DX - 8951)的三氟醋酸盐（ 62mg)的 N, N - 二甲基甲酰胺（ 5ml ）溶液、三乙胺（ 0.02ml ）、 1 - 乙氧基羰基 - 2 - 乙氧基 - 1, 2 - 二羟基喹啉（ 470mg ），避光下在室温下搅拌 1 夜，一边进行反应。将每 5ml 的该反应液滴入到各 10ml 的乙醇中。在其中加入 3M 氯化钠水溶液（ 2.5ml ）、乙醚（ 20ml ），离心分离收集析出的沉淀。将该沉淀溶解到 0.5M 氯化钠水溶液中，冰冷下，用 0.1M 氢氧化钠水溶液将 pH 调到 9 后，使用透析膜（スペクトルポア 1 、临界分子量 6000 - 8000 ），对于纯水进行透析。用米利波阿过滤器(0.22μm ）过滤透析内液后，冷冻干燥，得到标题化合物（ 600mg ）。将本化合物溶解到 0.1M 氯化钠水溶液中，用 GPC（柱: 东ソ - TSK Gel PW - 4000XL 、

溶剂： 0.1M NaCl 、流速： 0.8ml/min ）分析的结果及本化合物的紫外线吸收光谱（ 0.1M Tris 缓冲液、 pH 9.0 、 0.01mg/ml ）分别如图 6 及图 7 所示。根据在 0.1M Tris 缓冲液（ pH 9.0 ）中的 362nm 的吸光度，定量本化合物的医药化合物残基含量是 5.8 %（ W/W ）。

例 16： 3′－ N －（ Gly － Gly － Gly － Phe ）－ NH － A（ A － NH_2 = DX － 8951 ）三氟醋酸盐的合成

将由例 2 所得到的 3′－ N －（ Boc － Gly － Gly － Gly － Phe ）－ NH － A（ A － NH_2 = DX － 8951 ）（ 79mg ），溶解在三氟醋酸（ 3ml ）中，放置 1 小时。馏去溶剂，用甲醇（ 30ml ）共沸 2 次、用乙醇（ 30ml ）共沸 2 次后，用乙醚洗涤残渣，得到标题化合物（ 80mg ）。

^{1}H-NMR (DMSO-d_6) δ： 8.62-8.66 (m, 2H), 8.23 (d, 1H, J= 8.3Hz), 8.18-8.20 (m, 1H), 7.98-8.10 (br, 2H), 7.79 (d, 1H, J= 10.7Hz), 7.32 (s, 1H), 7.09 (d, 2H, J = 7.3Hz), 6.93-7.03 (m, 4H), 6.50-6.60 (br, 1H), 5.52-5.55 (m, 1H), 5.44(s, 2H), 5.18 (d, 1H, J= 18.5Hz), 4.80 (d, 1H, J= 18.5Hz), 4.57-4.59 (m, 1H), 3.57-3.71 (m, 6H), 3.15-3.25 (m, 2H), 3.00-3.02 (m, 1H), 2.80-2.90 (m, 1H), 2.50 (s, 3H), 2.05-2.25 (m, 1H), 1.86-2.00 (m, 2H), 0.88 (t, 3H, J= 7.35Hz).

例 17： 羧甲基葡聚糖多元醇－ Gly － Gly － Gly － Phe － NH － A′（ A － NH_2 = DX － 8951 ）的合成

将由例 13 得到的羧甲基葡聚糖多元醇的钠盐（ 1.0g ），置换成三乙基铵盐（ 1.2g ），溶解在 N, N －二甲基甲酰胺（ 90ml ）中。在该溶液中，依次加入由例 16 得到的 3′－ N －（ Gly － Gly － Gly － Phe ）－ NH － A（ A － NH_2 = DX － 8951 ）的三氟醋酸盐（ 158mg ）的 N, N －二甲基甲酰胺（ 15ml ）溶液、三乙胺（ 0.05ml ）、 1 －乙氧基羰基－ 2 －乙氧基－ 1, 2 －二羟基喹啉（ 1.2g ），避光、室温下，一边搅拌 1 夜、一边反应。将每 5ml 该反应液滴入到各 10ml 的乙醇中。在其中加入 3M 氯化钠水溶液（ 2.5ml ）、乙醚（ 20ml ），离心分离收集析出的沉淀。将该沉淀溶解在 0.5M 氯化钠水溶液中，冰冷下，用 0.1M 氢氧化钠水溶液调节 pH 为 9 后，使用透析膜（スペクトルポア 1 、临界分子量 6000 － 8000 ），对于纯水进行透析。用米利波阿过滤器(0.22μm ）过滤透析内液后，冷冻干燥，得到标题化合物（ 1.4g ）。根据 0.1M Tris 缓冲液（ pH 9.0 ）中的 362nm 的吸光度，定量本化合物的医药化合物残

基含量是 5.2 %（W/W）。

例 18： Boc - Gly - Phe - Leu - OH 的合成

将 H - Gly - Phe - Leu - OH（3.0g），加入到 50 % 的二噁烷水溶液（48ml）中、冰冷。在该溶液中加入含有 1N 氢氧化钠水溶液（9.45ml）和 $(Boc)_2O$（2.27g）的二噁烷（24ml）溶液，搅拌 1 夜。在反应液中加入 1N 盐酸（9.45ml），馏去溶剂。用硅胶柱色谱（洗脱液：二氯甲烷：甲醇= 5：1 溶液）精制得到的残渣，得到标题化合物（2.5g）。

例 19： Boc - Gly - Phe - Leu - Gly - OBzl 的合成

将由例 18 得到的 Boc - Gly - Phe - Leu - OH（2.4g）及 N - 羟基丁二酰亚胺（656mg）溶解在 N, N - 二甲基甲酰胺（50ml）中，冷却到 4 ℃后，加入 N, N′- 二环己基碳化二亚胺（1.17g），搅拌 2 小时。在该溶液中加入溶解了 H - Gly - OBzl 的甲苯磺酸盐（1.9g）和三乙胺（0.79ml）的 N, N - 二甲基甲酰胺（40ml）溶液，在室温下一边搅拌 16 小时；一边反应。将该反应液减压干固，用硅胶柱色谱（洗脱液：二氯甲烷：甲醇= 50 : 1 溶液）精制残渣，得到标题化合物（2.0g）。

^{1}H-NMR(DNSO-d_6) δ：8.20-8.30 (m, 1H), 8.12 (d, 1H, J= 8.3Hz), 7.83 (d, 1H, J= 8.3Hz), 7.32-7.37 (m, 5H), 6.89-6.95 (m, 1H), 5.12 (s, 1H), 4.52-4.59 (br, 1H), 4.34 (dd, 1H, J= 7.3Hz, J= 15.1Hz), 3.93 (dd, 1H, J= 5.5Hz, J= 17.2Hz), 3 .84 (dd, 1H, J= 5.5Hz, J= 17.2Hz), 3.54 (dd, 1H, J= 5.9Hz, J= 16.7Hz), 3.42 (dd, J= 5.9Hz, J= 16.7Hz), 3.00 (dd, 1H, J= 4.4Hz, 13.7Hz), 2.78 (dd, 1H, J= 8.8Hz, J= 13.2Hz), 1.50-1.65 (m, 1H), 1.45 (t, 2H, J= 7.3Hz), 1.36 (s, 9H), 0.86 (d, 3H, J= 6.4Hz), 0.82 (d, 3H, J= 6.4Hz).

例 20： Boc - Gly - Phe - Leu - Gly - OH 的合成

将由例 19 得到的 Boc - Gly - Phe - Leu - OBzl（1.7g）溶解到醋酸乙酯（30ml）和甲醇（30ml）的混合溶液中后，加入 5 % Pd - C（1.5g），进行接触还原。过滤反应液，减压干固滤液，得到标题化合物（1.15g）。

例 21： 3′- N -（Boc - Gly - Phe - Leu - Gly）- NH - A（A - NH_2 = DX - 8951）的合成

将由例 20 得到的 Boc - Gly - Phe - Leu - Gly - OH（200mg）及 N - 羟基丁二酰亚胺（58mg）溶解在 N, N - 二甲基甲酰胺（5ml）中，冷却到 4 ℃后，加入 N, N' - 二环己基碳化二亚胺（104mg）、溶解。在该溶液中加入溶解了 DX - 8951 的甲磺酸盐（224mg）和三乙胺（0.059ml）的 N, N - 二甲基甲酰胺（5ml）溶液，在避光、室温下，一边搅拌 16 小时；一边反应。将该反应液减压干固，用硅胶柱色谱（洗脱液：含有 0.5 % 醋酸的二氯甲烷：甲醇 = 10：1 溶液）精制残渣，得到标题化合物（200mg）。

^{1}H-NMR (DMSO-d_6) δ : 8.35 (d, 1H, J=7.8Hz), 8.08-8.18 (m, 2H), 7.75-7.85 (m, 2H), 7.32 (s, 1H), 7.10 (d, 2H, J=6.8Hz), 7.08-7.13 (m, 3H), 6.85-6.95 (br, 1H), 6.40-6.65 (br, 1H), 5.52-5.55 (m, 1H), 5.46 (d, 1H, J=18.5Hz), 5.37(d, 1H, J=18.5Hz), 5.24 (s, 2H), 4.44-4.52 (m, 1H), 4.15-4.25 (m, 1H), 3.68-3.72 (m, 2H), 3.40-3.52 (m, 2H), 3.15-3.25 (br, 2H), 2.85-2.95 (m, 1H), 2.65-2.75 (m, 1H), 2.40 (s, 3H), 2.05-2.25 (m, 1H), 1.80-1.91 (m, 2H), 1.50-1.65 (m, 1H), 1.45 (t, 2H, J=7.3Hz), 1.35 (s, 9H), 0.88 (t, 3H, J=7.4), 0.86 (d, 3H, J=6.4Hz), 0.82 (d, 3H, J=6.4Hz).

例 22：3' - N - (Gly - Phe - Leu - Gly) - NH - A (A - NH_2 = DX - 8951) 三氟醋酸盐的合成

将由例 21 得到的 3' - N - (Boc - Gly - Phe - Leu - Gly) - NH - A (A - NH_2 = DX - 8951)（97mg）溶解在三氟醋酸（3ml）中，放置 1 小时。馏去溶剂，用甲醇（30ml）共沸 2 次、用乙醇（30ml）共沸 2 次后，用乙醚洗涤残渣，得到标题化合物（95mg）。

^{1}H-NMR (DMSO-d_6) δ : 8.57 (d, 1H, J=8.3Hz), 8.47 (d, 1H, J=8.3Hz), 8.32 (d, 1H, J=7.8Hz), 8.17 (t, 1H, J=5.5Hz), 7.81-7.91 (br, 3H), 7.79 (d, 1H, J=10.7Hz), 7.32 (s, 1H), 7.21-7.23 (m, 5H), 7.12-7.17 (m, 1H), 6.45-6.55 (br, 1H), 5.57 (q, 1H, J=4.4Hz), 5.43 (d, 1H, J=16.1Hz), 5.34 (d, 1H, J=16.1Hz), 5.23 (s, 2H), 4.67 (dt, 1H, J=4.0Hz, J=9.0Hz), 4.31 (dd, 1H, J=8.5Hz, J=15.0Hz), 4.0-4.4 (br, 1H), 3.74-3.76 (m, 2H), 3.56 (dd, 1H, J=6.0Hz, J=16.0Hz), 3.41 (dd, 1H, J=6.0Hz, J=16.0Hz), 3.17-3.19 (br, 2H), 3.02 (dd, 1H, J=4.0Hz, J=14.0Hz), 2.70 (dd, 1H,

J=10.0Hz, J=14.0Hz), 2.40 (s, 3H), 2.05-2.15 (m, 1H), 1.85 (dt, 2H, J=7.0Hz, J=14.0Hz), 1.50-1.55 (m, 1H), 1.45 (t, 2H, J=6.0Hz), 1.35 (s, 9H), 0.88 (t, 3H, J=7.4), 0.85 (d, 3H, J=6.4Hz), 0.80 (d, 3H, J=6.4Hz).

例 23：羧甲基葡聚糖多元醇－ Gly － Phe － Leu － Gly － NH － A′（ A － NH_2 = DX － 8951 ）的合成

将由例 13 得到的羧甲基葡聚糖多元醇的三乙基铵盐（ 690mg ），溶解到 N, N －二甲基甲酰胺（ 50ml ）中。在该溶液中，依次加入由例 22 得到的 3′－ N －（ Gly － Phe － Leu － Gly ）－ NH － A （ A － NH_2 = DX － 8951)的三氟醋酸盐（ 95mg)的 N, N －二甲基甲酰胺（ 10ml ）溶液、三乙胺（ 0.03ml ）、 1 －乙氧基羰基－ 2 －乙氧基－ 1, 2 －二羟基喹啉（ 690mg ），在室温下一边搅拌 1 夜；一边反应。将每 5ml 该反应液滴入到各 10ml 的乙醇中。在其中，加入 3M 氯化钠水溶液（ 2.5ml)、乙醚（ 20ml ），离心分离收集析出的沉淀。将该沉淀溶解在 0.5M 食盐水中，冰冷下用 0.1M 氢氧化钠水溶液调节 pH 为 9 后，使用透析膜（スペクトルポア 1 、临界分子量 6000 － 8000 ），对于纯水进行透析。用米利波阿过滤器(0.22μm ）过滤透析内液后，冷冻干燥滤液，得到标题化合物（ 600mg ）。根据 0.1M Tris 缓冲液（ pH 9.0 ）中的 362nm 的吸光度，定量本化合物的医药化合物残基含量是 4.8 %（ W/W ）。

例 24：羧甲基葡聚糖多元醇的三乙基铵盐的合成

将葡聚糖 T 500 （ 50g 、ファルマシア社制、分子量 500K ），溶解到 0.1M 醋酸缓冲液（ pH 5.5 、 5000ml ）中，加入高碘酸钠（ 165.0g ）的水溶液（ 5000ml ）。一边避光；一边在 4 ℃下搅拌 10 天后，加入乙二醇（ 35.0ml ），搅拌 1 夜。使用 8M 氢氧化钠水溶液，将反应液的 pH 调到 7.5 后，加入硼氢化钠（ 70g ）、溶解后，搅拌 1 夜。冰冷反应液，用醋酸将反应液的 pH 调到 5.5，在 4 ℃下搅拌 1 小时后，使用 8M 氢氧化钠水溶液，将 pH 调到 7.5 。从得到的水溶液，通过使用 BIOMAX －50 膜用超滤法除去低分子成分。将高分子成分冷冻干燥，得到葡聚糖多元醇（ 27.1g ）。该物质的分子量（凝胶过滤、プルラン标准）是 140K 。

将该葡聚糖多元醇（ 5g ），加入到将氢氧化钠（ 21g ）溶于水（ 150ml ）得到的水溶液中，在室温下溶解。在冰冷下，在该溶液中加

入一氯醋酸（ 30g ）、溶解后，在室温下，反应 1 夜。用醋酸将该反应液的 pH 调节到 8 后，通过使用 BIOMAX - 50 膜用超滤法脱盐。将未通过膜的残留溶液冷冻干燥，得到羧甲基葡聚糖多元醇的钠盐（ 5.6g ）。该物质的分子量（凝胶过滤、プルラン标准）是 263K 、羧甲基化度是 0.4 。

将该羧甲基葡聚糖多元醇的钠盐（ 2.0g ）溶解在水中，装入到 Bio - Rad AG 50W - X2 （ 200 - 400 目、 H^+ 型）柱（直径 44mm 、长 210mm ），用水洗脱。在该洗脱液中加入三乙胺（ 4ml ）后，冷冻干燥，得到标题化合物（ 2.2g ）。

例 25： 羧甲基葡聚糖多元醇的三甲基铵盐的合成

将由例 24 得到的羧甲基葡聚糖多元醇的钠盐（ 1.0g ）溶解在水中，装入到 Bio - Rad AG 50W - X2 （ 200 - 400 目、 Me_3NH^+ 型）柱中，用水洗脱。将该洗脱液冷冻干燥，得到标题化合物（ 950mg ）。

例 26： 3′ - N - （ Gly - Gly - Phe - Gly ） - NH - A （ A - NH_2 = DX - 8951 ）盐酸盐的合成

将用与例 4 相同方法从 3′ - N - （ Boc - Gly - Gly - Phe - Gly ） - NH - A （ A - NH_2 = DX - 8951 ）（ 400mg ）得到的 3′ - N - （ Gly - Gly - Phe - Gly ）- NH - A 三氟醋酸盐溶解在水 - MeOH （ 1 : 4 ）中，装入到 Bio - Rad AG 1 - X8 （ 200 - 400 目、 Cl^- 型）柱（ 1.5cm × 8.6cm ）中，用上述溶剂洗脱。将该洗脱液浓缩后，冷冻干燥，得到标题化合物（ 310mg ）。

^{1}H-NMR (DMSO-d_6) δ: 8.53 (d, 1H, J=8.5Hz), 8.46-8.48 (m, 1H), 8.37-8.39 (m, 1H), 7.95 (d, 1H, J=8.0Hz), 7.80 (s, 3H), 7.78 (d, 1H, J=11.1Hz), 7.34 (s, 1H), 7.14-7.24 (m, 5H), 6.50(s, 1H), 5.56-5.60 (m, 1H), 5.35-5.40 (m, 2H), 5.24 (s, 2H), 4.51-4.56 (m, 1H), 3.86 (dd, J=4.8, 13.5Hz, 1H), 3.68-3.79 (m, 3H), 3.54 (s, 2H), 3.15-3.22 (m, 2H), 3.01 (dd, J=5.6, 13.5Hz, 1H), 2.78 (dd, J=9.6, 3.5Hz, 1H), 2.41 (s, 3H), 2.12-2.23 (m, 2H), 1.81-1.89 (m, 2H), 0.88 (t, 3H, J=7.2Hz).

Mass (FAB); m/e 753 (M+1)

例 27：羧甲基葡聚糖多元醇－ Gly － Gly － Phe － Gly － NH － A′（ A － NH_2 = DX － 8951 ）的合成

将由例 25 得到的羧甲基葡聚糖多元醇的三甲基铵盐（ 0.1g)溶解到 N, N －二甲基甲酰胺（ 6ml ）中。在该溶液中，依次加入由例 26 得到的 3′－ N －（ Gly － Gly － Phe － Gly ）NH － A（ A － NH_2 = DX － 8951 ）的盐酸盐（ 24mg ）的 N, N －二甲基甲酰胺（ 10ml ）溶液、三乙胺（ 5μl ）、 1 －乙氧基羰基－ 2 －乙氧基－ 1, 2 －二羟基喹啉（ 0.1g ），在室温下一边搅拌 1 夜；一边反应。将每 5ml 的该反应液滴入到各 10ml 的乙醇中。在其中加入 3M 氯化钠水溶液（ 2.5ml ）、乙醚（ 20ml ），离心分离收集（ 3500rpm 、 8 分钟）析出的沉淀。将该沉淀溶解到 0.5M 食盐中，冰冷下用 0.1M 氢氧化钠水溶液调节 pH 为 9 。将得到的水溶液，通过使用 BIOMAX － 30 膜用超滤法脱盐。用米利波阿过滤器(0.22μm ）过滤未通过膜的残留溶液后，冷冻干燥，得到标题化合物（ 90mg ）。根据在 0.1M Tris 缓冲液（ pH 9.0 ）中的 362nm 的吸光度，定量本化合物的医药化合物残基含量是 11 %（ W/W ）。

例 28：羧甲基葡聚糖多元醇－ Gly － Gly － Phe － Gly － NH － A′（ A － NH_2 = DX － 8951 ）的合成

将由例 25 得到的羧甲基葡聚糖多元醇的三甲基铵盐（ 0.1g)溶解在 N, N －二甲基甲酰胺（ 6ml ）中。在该溶液中依次加入由例 26 得到的 3′－ N －（ Gly － Gly － Phe － Gly ）－ NH － A（ A － NH_2 = DX － 8951 ）的盐酸盐（ 36mg ）的 N, N －二甲基甲酰胺（ 10ml ）溶液、三乙胺（ 8μl ）、 1 －乙氧基羰基－ 2 －乙氧基－ 1, 2 －二羟基喹啉（ 0.1g ），在室温下，一边搅拌 1 夜；一边反应。将每 5ml 的该反应液滴入到各 10ml 的乙醇中。在其中加入 3M 氯化钠水溶液（ 2.5ml ）、乙醚（ 20ml ），离心分离收集（ 3500rpm 、 8 分钟）析出的沉淀。将该沉淀溶解到 0.5M 食盐水中，在冰冷下用 0.1M 氢氧化钠水溶液调节 pH 为 12 。通过使用 BIOMAX － 30 膜用超滤法，将得到的水溶液脱盐。用米利波阿过滤器(0.22μm ）过滤未通过膜的残留溶液后，冷冻干燥，得到标题化合物（ 80mg ）。将本化合物溶解到 0.1M 氯化钠水溶液中，用 GPC（柱：东ソ－ TSK Gel PW － 4000XL 、溶剂： 0.1M NaCl 、流速： 0.8ml/min ）分析的结果及本化合物的紫外线吸收光谱（ 0.1M Tris 缓冲液、 pH 9.0 、 36μg/ml ）分别如图 8 及图 9 所示。根据在 0.1M Tris

OnCusp
Ex. 1002

缓冲液（ pH 9.0 ）中的 362nm 的吸光度，定量本化合物的医药化合物残基含量是 15 %（ W/W ）。

例 29： 羧甲基葡聚糖多元醇－ Gly － Gly － Gly － Phe － NH － A′（ A － NH_2 = DX － 8951 ）的合成

将葡聚糖 T 250 （ 20g 、 EXTRASYNTHESE 制、平均分子量 250K ）溶解在 0.1M 醋酸缓冲液（ pH 5.5 、 2000ml ）中，加入高碘酸钠（ 66.0g ）的水溶液（ 2000ml ）。避光下，在 4 ℃下搅拌 10 天后，加入乙二醇（ 14.0ml ），搅拌 1 夜。在冰冷下使用 8M 氢氧化钠水溶液，将反应液的 pH 调节成 7.5 。加入硼氢化钠（ 28g ）、溶解后，在室温下搅拌 1 夜。冰冷反应液，用醋酸调节反应液的 pH 为 5.5 ，在 4 ℃下搅拌 1 小时，在冰冷下使用 8M 氢氧化钠水溶液，调 pH 为 7.5 。通过使用 BIOMAX － 30 膜用超滤法，从得到的水溶液中除去低分子成分，得到未通过膜的残留溶液 1 。另外，将葡聚糖 T 250 （ 50g 、 EXTRASYNTHESE 制、平均分子量 250K ）溶解到 0.1M 醋酸缓冲液（ pH 5.5 、 5000ml ）中，加入高碘酸钠（ 165g ）的水溶液（ 5000ml ）。一边避光；一边在 4 ℃下搅拌 10 天后，加入乙二醇（ 35.0ml ），搅拌 1 夜。在冰冷下使用 8M 氢氧化钠水溶液调节反应液的 pH 为 7.5 。加入硼氢化钠（ 70g ）溶解后，在室温下搅拌 1 夜。在冰冷下，用醋酸将反应液的 pH 调节成 5.5 ，在 4 ℃下搅拌 1 小时后，冰冷下使用 8M 氢氧化钠水溶液调节 pH 为 7.5 。通过使用 BIOMAX － 30 膜用超滤法，从得到的水溶液中除去低分子成分，得到未通过膜的残留溶液 2 。将残留溶液 1 和残留溶液 2 混合，使用 BIOMAX － 30 膜，用超滤法将通过 BIOMAX － 50 膜的成分中除去低分子成分、冷冻干燥，得到葡聚糖多元醇（ 25.7g ）。该物质的分子量（凝胶过滤、プルラン标准）是 47K 。

将该葡聚糖多元醇（ 5g ）加入到将氢氧化钠（ 35g ）溶于水（ 150ml ）得到的水溶液中，在室温下溶解。在冰冷下，在该溶液中加入一氯醋酸（ 50g ）、溶解后，在室温下反应 18 小时。用醋酸将该反应液的 pH 调到 8 后，通过使用 BIOMAX － 50 膜用超滤法脱盐。冷冻干燥未通过膜的残留溶液，得到羧甲基葡聚糖多元醇的钠盐（ 7.2g ）。该物质的分子量（凝胶过滤、プルラン标准）是 127K 、羧甲基化度是 0.8 。将该羧甲基葡聚糖多元醇的钠盐（ 2.2g ）溶解在水中，装入到 Bio － Rad AG 50W － X2 （ 200 － 400 目、 H^+ 型）柱（直径 44mm 、长 210mm ）

OnCusp
Ex. 1002

中，用水洗脱。在该洗脱液中加入三乙胺（ 4ml ），冷冻干燥，得到羧甲基葡聚糖多元醇的三乙基铵盐（ 2.69g ）。

将该羧甲基葡聚糖多元醇的三乙基铵盐（ 2.67g ）溶解到 N, N － 二甲基甲酰胺（ 200ml ）中。在该溶液中依次加入将从与例 2 相同地合成的 3′－ N －（ Boc － Gly － Gly － Gly － Phe ）－ NH － A（ A － NH_2 = DX － 8951 ）（ 350mg ）与例 16 相同方法脱 Boc 化，得到的 3′－ N －（ Gly － Gly － Gly － Phe ）－ NH － A 的三氟醋酸盐和三乙胺（ 0.116ml ）溶解到 N, N － 二甲基甲酰胺（ 10ml ）中形成的溶液、将 1 － 乙氧基羰基 － 2 － 乙氧基 － 1, 2 － 二羟基喹啉（ 2.67g ）溶解到 N, N － 二甲基甲酰胺（ 10ml ）中得到的溶液，在室温下，一边搅拌 1 夜；一边反应。在该反应液中加入 3M 氯化钠水溶液（ 100ml ），将该反应液每 8ml 滴入到各 30ml 的乙醇中。分别加入 3M 氯化钠水溶液（ 1ml ）、乙醚（ 5ml ），离心分离收集（ 3500rpm 、 8 分钟）析出的沉淀。用丙酮洗涤该沉淀，溶解在水中，加入 3M 氯化钠水溶液（ 10ml)后，用 0.1M 氢氧化钠水溶液调节 pH 为 9，在 37 ℃下处理 1 小时。通过使用 BIOMAX － 10 膜用超滤法，将该处理液脱盐。用米利波阿过滤器(0.22μm ）过滤未通过膜的残留溶液后，冷冻干燥，得到标题化合物（ 2.30g ）。将本化合物溶解到 0.1M 氯化钠水溶液中，用 GPC（柱: 东ソ － TSK Gel PW － 4000XL 、溶剂: 0.1M NaCl 、流速: 0.8ml/min ）分析的结果及本化合物的紫外线吸收光谱（ 0.1M Tris 缓冲液、 pH 9.0 、 0.20mg/ml ）分别如图 10 及图 11 所示。根据 0.1M Tris 缓冲液（ pH 9.0 ）中的 362nm 的吸光度，定量本化合物的医药化合物残基含量是 5.8 %（ W/W ）。

例 30： 羧甲基葡聚糖多元醇的三乙基铵盐的合成

在葡聚糖 T10 （ 20g 、ファルマシア社制、平均分子量 10K)的 0.1M 醋酸缓冲液（ pH 5.5 ）溶液（ 2000ml ）中，加入高碘酸钠（ 66.0g ）的水溶液（ 2000ml ）。一边避光；一边在 4 ℃下搅拌 10 天后，加入乙二醇（ 14.0ml ），搅拌 1 夜。在冰冷下，使用 8M 氢氧化钠水溶液，将反应液的 pH 调到 7.5 。加入硼氢化钠（ 28g ）、溶解后，在室温下搅拌 1 夜。冰冷反应液，用醋酸调节 pH 为 5.5 、在 4 ℃下搅拌 1 小时后，冰冷下用 8M 氢氧化钠水溶液调节 pH 为 7.5 。通过使用 BIOMAX － 5 膜(ミリポア社制）用超滤法，从得到的水溶液中除去低分子成分，将未通过膜的残留溶液通过 BIOMAX － 30 膜。将得到的通过液冷冻干燥，得到

葡聚糖多元醇（ 8.0g ）。该物质的分子量（凝胶过滤、プルラン标准）是 13K 。

将该葡聚糖多元醇（ 3.7g ）加入到将氢氧化钠（ 25.9g ）溶于水（ 111ml ）中得到的水溶液中，在室温下溶解。在冰冷下，在该溶液中加入一氯醋酸（ 37g ）、溶解后，在室温下反应 20 小时。用醋酸将该反应液的 pH 调节到 8 后，通过使用 BIOMAX - 5 膜用超滤法脱盐。将未通过膜的残留溶液冷冻干燥，得到羧甲基葡聚糖多元醇的钠盐（ 6.2g ）。该物质的分子量（凝胶过滤、プルラン标准）是 37K 、羧甲基化度是 0.9 。

将该羧甲基葡聚糖多元醇的钠盐（ 6.0g ）溶解在水中，装入到 Bio - Rad AG 50W - X2 （ 200 - 400 目、 H^+ 型）柱中，用水洗脱。在该洗脱液中加入三乙胺（ 9.3ml ）后，冷冻干燥，得到标题化合物（ 7.2g ）。

例 31 ： 羧甲基葡聚糖多元醇的三乙基铵盐的合成

将由例 30 得到的葡聚糖多元醇（ 3.9g ）加入到将氢氧化钠（ 16.3g ）溶解到水（ 117ml ）得到的水溶液中，在室温下溶解。在冰冷下，在该溶液中加入一氯醋酸（ 23.4g ）、溶解后，在室温下反应 18 小时。用醋酸将该反应液的 pH 调节成 8 后，通过使用 BIOMAX - 5 膜用超滤法脱盐。将未通过膜的残留液冷冻干燥，得到羧甲基葡聚糖多元醇的钠盐（ 5.0g ）。该物质的分子量（凝胶过滤、プルラン标准）是 28K ，羧甲基化度是 0.5 、将该羧甲基葡聚糖多元醇的钠盐（ 4.8g ）与例 30 相同地变成三乙基铵盐，得到标题化合物（ 5.6g ）。

例 32 ： 羧甲基葡聚糖多元醇的三乙基铵盐的合成

在葡聚糖 4 （ 20g 、フナコシ社制、平均分子量 4K - 6K ）的 0.1M 醋酸缓冲液（ pH 5.5 ）溶液（ 2000ml ）中，加入高碘酸钠（ 66.0g ）的水溶液（ 2000ml ）中。一边避光；一边在 4 ℃下搅拌 10 天后，加入乙二醇（ 14.0ml ），搅拌 1 夜。在冰冷下，用 8M 氢氧化钠水溶液，将反应液的 pH 调节到 7.5 。加入硼氢化钠（ 28g ）、溶解后，在室温下搅拌 1 夜。冰冷反应液，用醋酸调节 pH 为 5.5 、在 4 ℃下搅拌 1 小时后、冰冷下使用 8M 氢氧化钠水溶液，调节 pH 到 7.5 。通过使用 BIOMAX - 3 膜（ミリポア社制）用超滤法从得到的水溶液中除去低分子成分。将得到的通过液冷冻干燥，得到葡聚糖多元醇（ 6.0g ）。该物质的分子量（凝胶过滤、プルラン标准）是 9K 。将该葡聚糖多元醇（ 2.7g ），加入到将氢氧化钠（ 18.9g ）溶解到水（ 81ml ）得到的水溶液中，在室温下洗

脱。在冰冷下，在该溶液中加入一氯醋酸（ 27g ）、溶解后，在室温下反应 20 小时。用醋酸将该反应液的 pH 调节成 8 后，使用 BIOMAX - 5 膜用超滤法脱盐。将未通过膜的残留溶液冷冻干燥，得到羧甲基葡聚糖多元醇的钠盐（ 4.2g ）。该物质的分子量（凝胶过滤、プルラン标准）是 20K、羧甲基化度是 0.9 。

将该羧甲基葡聚糖多元醇的钠盐（ 4.0g ），与例 30 相同地变成三乙基铵盐，得到标题化合物（ 4.8g ）。

例 33： 羧甲基葡聚糖多元醇的三乙基铵盐的合成

将由例 32 得到的葡聚糖多元醇（ 2.7g ），加入到将氢氧化钠（ 11.3g ）溶在水（ 81ml ）得到的水溶液中，在室温下溶解。在冰冷下，在该溶液中加入一氯醋酸（ 16.2g ）、溶解后，在室温下反应 18 小时。用醋酸将该反应液的 pH 调到 8 后，使用 BIOMAX - 5 膜用超滤法脱盐。将未通过膜的残留溶液冷冻干燥，得到羧甲基葡聚糖多元醇的钠盐（ 2.7g ）。该物质的分子量（凝胶过滤、プルラン标准）是 16K、羧甲基化度是 0.5 。将该羧甲基葡聚糖多元醇的钠盐（ 2.7g ）与例 30 相同地置换成三乙基铵盐，得到标题化合物（ 3.1g ）。

例 34： 羧甲基葡聚糖多元醇 - Gly - Gly - Phe - Gly - NH - A′（ A - NH_2 = DX - 8951 ）的合成

将由例 30 得到的羧甲基葡聚糖多元醇的三乙基铵盐（ 1.5g)溶解在 N, N - 二甲基甲酰胺（ 90ml ）中。在该溶液中依次加入三乙胺（ 0.07ml ）和 3′ - N - （ Gly - Gly - Phe - Gly ） - NH - A （ A - NH_2 = DX - 8951 ）的三氟醋酸盐（ 210mg ）的 N, N - 二甲基甲酰胺（ 40ml ）溶液、 1 - 乙氧基羰基 - 2 - 乙氧基 - 1, 2 - 二羟基喹啉（ 1.5g ），在室温下，一边搅拌 1 夜；一边反应。将每 5ml 的该反应液滴入到各 10ml 的乙醇中。分别加入 3M 氯化钠水溶液（ 2.5ml ）、乙醚（ 20ml ），离心分离收集（ 3500rpm 、 8 分钟）析出的沉淀。将该沉淀溶解到 0.5M 食盐水中，冰冷下用 0.1M 氢氧化钠水溶液调节 pH 为 9 。通过使用 BIOMAX - 3 膜用超滤法，将得到的水溶液脱盐。用米利波阿过滤器(0.22μm ）过滤未通过膜的残留溶液后，冷冻干燥，得到标题化合物（ 1.3g ）。将本化合物溶解在 0.1M 氯化钠水溶液后，用 GPC（柱: 东ソ - TSK Gel PW - 4000XL 、溶剂: 0.1M NaCl 、流速: 0.8ml/min ）分析的结果及本化合物的紫外线吸收光谱（ 0.1M Tris 缓冲液、 pH

9.0、65μg/ml）分别如图 12 及图 13 所示。根据 0.1M Tris 缓冲液（pH 9.0）中的 362nm 的吸光度，定量本化合物的医药化合物残基含量是 6.4%（W/W）。

例 35：羧甲基葡聚糖多元醇－Gly－Gly－Phe－Gly－NH－A′（A－NH_2 = DX－8951）的合成

将由例 31 得到的羧甲基葡聚糖多元醇的三乙基铵盐（1.2g），溶解在 N, N －二甲基甲酰胺（90ml）中。在该溶液中依次加入三乙胺（0.056ml）和 3′－N－（Gly－Gly－Phe－Gly）－NH－A（A－NH_2 = DX－8951）的三氟醋酸盐（168mg）的 N, N －二甲基甲酰胺（30ml）溶液、1－乙氧基羰基－2－乙氧基－1, 2－二羟基喹啉（1.2g），在室温下一边搅拌 1 夜；一边反应。将每 5ml 的该反应液滴入到各 10ml 的乙醇中。分别地加入 3M 氯化钠水溶液（2.5ml）、乙醚（20ml），离心分离收集（3500rpm、8 分钟）析出的沉淀。将该沉淀溶解在 0.5M 食盐水中、冰冷下用 0.1M 氢氧化钠水溶液调节 pH 为 9。通过使用 BIOMAX－3 膜用超滤法将得到的水溶液脱盐。用米利波阿过滤器（0.22μm）过滤未通过膜的残留溶液，冷冻干燥，得到标题化合物（1.0g）。根据 0.1M Tris 缓冲液（pH 9.0）中的 362nm 的吸光度，定量本化合物的医药化合物残基含量是 4.8 %（W/W）。

例 36：羧甲基葡聚糖多元醇－Gly－Gly－Phe－Gly－NH－A′（A－NH_2 = DX－8951）的合成

将由例 32 得到的羧甲基葡聚糖多元醇的三乙基铵盐（1.2g），溶解在 N, N －二甲基甲酰胺（90ml）中。在该溶液中依次加入三乙胺（0.056ml）和 3′－N－（Gly－Gly－Phe－Gly）－NH－A（A－NH_2 = DX－8951）的三氟醋酸盐（168mg）的 N, N －二甲基甲酰胺（30ml）溶液、1－乙氧基羰基－2－乙氧基－1, 2－二羟基喹啉（1.2g），在室温下，一边搅拌 1 夜；一边反应。将每 5ml 的该反应液滴入到各 10ml 的乙醇中。分别加入 3M 氯化钠水溶液（2.5ml）、乙醚（20ml），离心分离收集（3500rpm、8 分钟）析出的沉淀。将该沉淀溶解在 0.5M 食盐水中，冰冷下用 0.1M 氢氧化钠水溶液调节 pH 为 9。通过使用 BIOMAX－3 膜用超滤法将得到的水溶液脱盐。用米利波阿（0.22μm）过滤未通过膜的残留溶液后，冷冻干燥、得到标题化合物（1.0g）。根据 0.1M Tris 缓冲液（pH 9.0）中的 362nm 的吸光度，

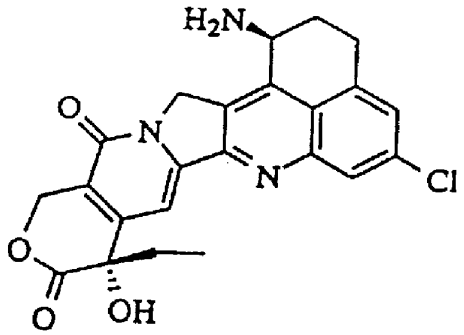
定量本化合物的医药化合物残基含量是5.9 %（ W/W ）。

例 37： 羧甲基葡聚糖多元醇－ Gly － Gly － Phe － Gly － NH － A′（ A － NH_2 = DX － 8951 ）的合成

将由例 33 得到的羧甲基葡聚糖多元醇的三乙基铵盐（ 1.5g)溶解在 N, N －二甲基甲酰胺（ 90ml ）中。在该溶液中依次加入三乙胺（ 0.07ml ）、 3′－ N －（ Gly － Gly － Phe － Gly ）－ NH － A（ A － NH_2 = DX － 8951 ）的三氟醋酸盐（ 210mg ）的 N, N －二甲基甲酰胺（ 40ml ）溶液、 1 －乙氧基羰基－ 2 －乙氧基－ 1, 2 －二羟基喹啉（ 1.5g ），在室温下一边搅拌 1 夜；一边反应。将每 5ml 的该反应液滴入到各 10ml 的乙醇中。分别加入 3M 氯化钠水溶液（ 2.5ml ）、乙醚（ 20ml ），离心分离收集（ 3500rpm 、 8 分钟）析出的沉淀。将该沉淀溶解到 0.5M 食盐水中，冰冷下用 0.1M 氢氧化钠水溶液调节 pH 为 9。通过使用 BIOMAX － 3 膜用超滤法，将得到的水溶液脱盐。用米利波阿过滤器(0.22μm ）过滤未通过膜的残留溶液后，冷冻干燥，得到标题化合物（ 1.3g ）。根据 0.1M Tris 缓冲液（ pH 9.0 ）中的 362nm 的吸光度定量本化合物的医药化合物残基含量是 4.6 %（ W/W ）。

例 38： Boc － Gly － Gly － Phe － Gly － NH － A（ A － NH_2 = DW － 8286 ）的合成

将 Boc － Gly － Gly － Phe － Gly（ 42mg ）及 N －羟基丁二酰亚胺（ 12mg ）溶解在 N, N －二甲基甲酰胺（ 2ml ）中，在 4 ℃下冷却后，加入 N, N′－二环己基碳化二亚胺（ 22mg ）。在该溶液中加入溶解了用下式：



表示的化合物 [（ 1S, 9S ）－ 1 －氨基－ 5 －氟－ 9 －乙基－ 2, 3 －二氢－ 9 －羟基－ 1H, 12H －苯并[de]吡喃并（ 3′, 4′ : 6, 7)中氮茚并[1, 2-b]

喹啉－ 10, 13 （ 9H, 15H ）－二酮: DW － 8286] 的盐酸盐（ 50mg ）和三乙胺（ 0.01ml ）的 N, N －二甲基甲酰胺（ 6ml ）溶液，在室温，一边避光搅拌 16 小时；一边反应。将该反应液减压干固，用硅胶柱色谱（洗脱液：含有 0.5 % 醋酸的二氯甲烷 ： 甲醇 = 10 : 1 溶液）精制残渣，得到标题化合物（ 27mg ）。

^{1}H-NMR($CDCl_3$) δ : 8.10-8.20 (br, 1H), 7.95-8.05 (br, 1H), 7.70-7.80 (br, 2H), 7.50-7.60 (br, 1H), 7.40-7.50 (br, 1H), 7.10-7.25 (m, 5H), 7.05-7.15 (br, 1H), 5.85-5.95 (br, 1H), 5.50-5.60 (br, 1H), 5.40-5.50 (m, 1H), 5.25-5.35 (m, 1H), 5.05-5.15 (m, 1H), 4.90-5.00 (m, 1H), 4.70-4.80 (br, 1H), 4.10-4.25 (br, 2H), 3.60-3.90 (m, 4H), 3.10-3.40 (m, 3H), 2.95-3.05 (br, 1H), 2.15-2.30 (br, 1H), 1.75-1.90 (br, 2H), 1.39 (s, 9H), 0.80-1.00 (m, 3H).

例 39： 羧甲基葡聚糖多元醇－ Gly － Gly － Phe － Gly － NH － A′（ A － NH_2 = DW － 8286 ）的合成

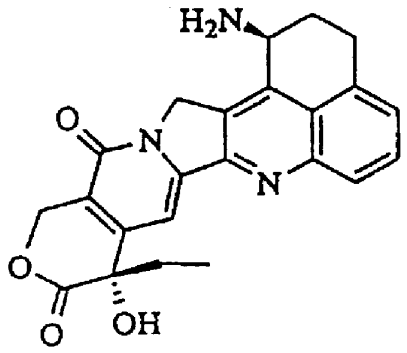
将由例 24 得到的羧甲基葡聚糖多元醇的三乙基铵盐（ 175mg ），溶解在 N, N －二甲基甲酰胺（ 20ml ）中。在该溶液中，依次加入用与例 4 相同方法从由例 38 得到的 3′－ N －（ Boc － Gly － Gly － Phe － Gly ）－ NH － A （ A － NH_2 = DW － 8286 ）（ 27mg ）脱 Boc 化得到的 3′－ N －（ Gly － Gly － Phe － Gly ）－ NH － A 的三氟醋酸盐（ 29mg ）和三乙胺（ 9μl ）的 N, N －二甲基甲酰胺（ 5ml ）溶液、 1 －乙氧基羰基－ 2 －乙氧基－ 1, 2 －二羟基喹啉（ 175mg ）、在室温下，一边搅拌 1 夜; 一边反应。将每 5ml 的该反应液滴入到各 10ml 的乙醇中。在其中加入 3M 氯化钠水溶液（ 2.5ml ）、乙醚（ 20ml ），离心分离收集（ 3500rpm 、 8 分钟）析出的沉淀。将该沉淀溶解在 0.5M 食盐水中，冰冷下，用 0.1M 氢氧化钠溶液调节 pH 为 9 。通过使用 BIOMAX － 30 膜用超滤法，将得到的水溶液脱盐。用米利波阿过滤器(0.22μm ）过滤未通过膜的残留溶液后，冷冻干燥，得到标题化合物（ 135mg ）。将本化合物溶解到 0.1M 氯化钠水溶液中后，用 GPC （柱: 东ソ－ TSK Gel PW － 4000XL 、溶剂: 0.1M NaCl 、流速: 0.8ml/min ）分析的结果及本化合物的紫外线吸收光谱（ 0.1M Tris 缓冲液、 pH 9.0 、 99μg/ml)分别如图 14 及图 15 所示。根据 0.1M Tris 缓冲液（ pH 9.0 ）中的 362nm

OnCusp
Ex. 1002

的吸光度定量，本化合物的医药化合物残基含量是 6.1 %（W/W）。

例 40：3′－N－（Boc－Gly－Gly－Phe－Gly）－NH－A（A－NH_2 = DW－8089）的合成

将 Boc－Gly－Gly－Phe－Gly（163mg）及 N－羟基丁二酰亚胺（45mg）溶解到 N, N－二甲基甲酰胺（10ml）中，冷却到 4 ℃后，加入 N, N′－二环己基碳化二亚胺（79mg）。在该溶液中加入溶解了用下式:



表示的化合物 [（1S, 9S）－1－氨基－9－乙基－2, 3－二氢－9－羟基－1H, 12H－苯并[de]吡喃并（3′, 4′：6, 7）中氮茚并[1, 2-b]喹啉－10, 13（9H, 15H）－二酮：DW－8089] 的甲苯磺酸盐（170mg）和三乙胺（0.054ml）的 N, N－二甲基甲酰胺（30ml）溶液，在避光、室温下，一边搅拌 1 夜；一边反应。将该反应液减压干固，用硅胶柱色谱（洗脱液：含有 0.5 % 醋酸的二氯甲烷：甲醇 = 94：6 溶液）精制残渣，得到标题化合物（100mg）。

^{1}H-NMR (DMSO-d_6) δ: 8.51 (d, 1H, J=8.5Hz), 8.41 (t, 1H, J=5.6Hz), 8.29 (s, 1H), 8.17 (d, 1H, J=8.0Hz), 8.03 (d, 1H, J=8.0Hz), 7.90 (dd, 1H, J=4.8, 5.6Hz), 7.79 (t, 1H, J=5.6Hz), 7.53 (d, 1H, J=7.2Hz), 7.36 (s, 1H), 7.13-7.25 (m, 5H), 6.94-6.95 (m, 1H), 5.60-5.63 (m, 1H), 5.36-5.47 (m, 2H), 5.21-5.30 (m, 2H), 4.42-4.47 (m, 1H), 3.63-3.96 (m, 3H), 3.51-3.59 (m, 3H), 3.31-3.40 (m, 1H), 3.09-3.21 (m, 1H), 3.02 (dd, 1H, J=4.8, 13.5Hz), 2.76-2.81 (m, 1H), 2.13-2.17 (m, 2H), 1.85-1.90 (m, 2H), 1.37 (s, 9H), 0.89 (t, 3H, J=8.0Hz).

Mass (FAB); m/e 822 (M+1)

例 41：羧甲基葡聚糖多元醇－ Gly － Gly － Phe － Gly － NH － A′（ A － NH_2 = DW － 8089 ）的合成

将由例 24 得到的羧甲基葡聚糖多元醇的三乙基铵盐（ 1.6g)溶解到 N, N －二甲基甲酰胺（ 60ml ）中。在该溶液中，依次溶解将从例 40 得到的 3′－ N －（ Boc － Gly － Gly － Phe － Gly ）－ NH － A（ A － NH_2 = DW － 8089 ）（ 200mg ）用与例 4 相同方法脱 Boc 化得到的 3′－ N －（ Gly － Gly － Phe － Gly ）－ NH － A 的三氟醋酸盐和三乙胺（ 0.07ml ）溶于 N, N －二甲基甲酰胺（ 20ml ）得到的溶液、 1 －乙氧基羰基－ 2 －乙氧基－ 1, 2 －二羟基喹啉（ 1.6g ），在室温下，一边搅拌 1 夜；一边反应。将每 5ml 的该反应液滴入到各 10ml 的乙醇中。分别加入 3M 氯化钠水溶液（ 2.5ml ）、乙醚（ 25ml ），离心分离收集（ 2500rpm 、 8 分钟）析出的沉淀。用乙醇洗涤该沉淀后，溶解在水中，加入 3M 氯化钠水溶液（ 20ml), 用 0.1M 氢氧化钠水溶液调节 pH 为 9。通过使用 BIOMAX － 10 膜用超滤法，将该溶液脱盐。用米利波阿过滤器(0.22μm ）过滤未通过膜的残留溶液后，冷冻干燥，得到标题化合物（ 1.20g ）。将本化合物溶解到 0.1M 氯化钠水溶液中，用 GPC（柱: 东ソ－ TSK Gel PW － 4000XL 、溶剂： 0.1M NaCl 、流速: 0.8ml/min ）分析的结果及本化合物的紫外线吸收光谱（ 0.1M Tris 缓冲液、 pH 9.0 ， 0.26mg/ml)分别如图 16 及图 17 所示。根据 0.1M Tris 缓冲液（ pH 9.0 ）中的 362nm 的吸光度，定量本化合物的医药化合物残基含量是 5.0 %（ W/W ）。

例 42： Trt － Gly － Gly － Phe － Gly － OH 的合成

将 Trt － Gly － Gly － Phe － Gly － OBzl （ 670mg ）、 10 % Pd － C （ 100mg ）及甲酸铵（ 200mg ）加入到 DMF （ 5ml ）中，搅拌 3 小时。过滤反应液，将滤液减压干固，用硅胶柱色谱（洗脱液: 二氯甲烷 ： 甲醇 = 8 : 1 溶液）精制残渣，得到标题化合物（ 300mg ）。

^{1}H-NMR(CD_3OD) δ : 7.16-7.45 (m, 20H), 4.66 (dd, 1H, J=9.8, 5.4Hz), 3.93 (d, 1H, J=16.6Hz), 3.80 (d, 1H, J=17.6Hz), 3.78 (d, 1H, J=16.6Hz), 3.68 (d, 1H, J=17.1Hz), 3.23 (dd, 1H, J=14.2, 5.4Hz), 2.90 (d, 1H, J=13.7Hz), 2.90 (s, 1H).

例 43： 3′－ N －（ Gly － Gly － Phe － Gly ）－ DXR 盐酸盐的合成

将 Trt - Gly - Gly - Phe - Gly - OH（100mg）及 N - 羟基丁二酰亚胺（22mg）溶在 DMF（4ml）中，冰冷下，加入 N, N′ - 二环己基碳化二亚胺（40mg），在 4 ℃下搅拌 2 小时。在该溶液中加入溶解了 N - 甲基吗啉（0.019ml）和阿霉素（DXR）盐酸盐（92mg）的 DMF（20ml）溶液，在 4 ℃下搅拌 16 小时。将该反应液减压干固，用硅胶柱色谱（洗脱液：二氯甲烷：甲醇 = 20：1 溶液）精制残渣。将得到的化合物溶解在 75 % 醋酸 1ml 中，搅拌 1 小时。加入水（20ml），过滤析出的固体并除去，将滤液冷冻干燥，将得到的粉末溶于水（5ml）中。将该溶液通过 AG - 1X8（Cl^- 型）柱，用水洗脱后，用二氯甲烷洗涤，将水层冷冻干燥，得到标题化合物（40mg）。

^{1}H-NMR(CD_3OD) δ : 7.95 (d, 1H, J=7.3Hz), 7.82 (t, 1H, J=7.8Hz), 7.54 (d, 1H, J=8.3Hz), 7.16-7.26 (m, 5H), 5.43 (d, 1H, J=3.4Hz), 5.14 (br, 1H), 4.72 (s, 2H), 4.42 (dd, 1H, J=8.3, 6.8Hz), 4.30 (q, 1H, J=6.8Hz), 4.14-4.18 (m, 1H), 4.03 (d, 1H, J=16.6Hz), 4.02 (s, 3H), 3.86 (d, 1H, J=18.5Hz), 3.83 (d, 1H, J=17.1Hz), 3.75 (d, 1H, J=16.1Hz), 3.73 (d, 1H, J=16.1Hz), 3.62 (br, 1H), 3.58 (d, 1H, J=16.6Hz), 3.10-3.15 (m, 2H), 3.00 (d, 1H, J=18.6Hz), 2.94 (dd, 1H, J=14.2, 8.8Hz), 2.38 (d, 1H, J=14.2Hz), 2.18 (dd, 1H, J=14.2, 4.4Hz), 1.94-2.00 (m, 1H), 1.71 (dd, 1H, J=12.7, 4.4Hz), 1.28 (d, 3H, J=6.3Hz).

例 44：羧甲基葡聚糖多元醇 - Gly - Gly - Phe - Gly - DXR 的合成

将例 24 得到的羧甲基葡聚糖多元醇的钠盐（1.5g），用与例 25 相同方法变换成三乙基铵盐（1.2g）后，将该化合物的 400mg 溶解在 N, N - 二甲基甲酰胺（24ml）中。在该溶液中依次加入 3′ - N - (Gly - Gly - Phe - Gly) - DXR 的盐酸盐（76mg）的 N, N - 二甲基甲酰胺（24ml）溶液、三乙胺（24μl）、1 - 乙氧基羰基 - 2 - 乙氧基 - 1, 2 - 二羟基喹啉（400mg），在室温下一边搅拌 1 夜；一边反应。将每 5ml 的反应液滴入到各 10ml 的乙醇中。在其中加入 3M 氯化钠水溶液（2.5ml）、乙醚（20ml），离心分离收集（3500rpm、8 分钟）析出的沉淀。将该沉淀溶解 0.5M 食盐水中，通过使用 BIOMAX - 30 膜用超滤法脱盐。用米利波阿过滤器(0.22μm）过滤未通过膜的残留溶液后，冷冻干燥，得到标题化合物（40mg）。将本化合溶解到 0.1M 氯化钠水溶

液中，用 GPC（柱: 东ソ - TSK Gel PW - 4000XL、溶剂: 0.1M NaCl、流速: 0.8ml/min ）分析的结果及本化合物的紫外线吸收光谱（ 0.01M Tris 缓冲液、 pH 7.4 、 36μg/ml)分别如图 18 及图 19 所示。根据在 PBS（ pH 7.4 ）中的 480nm 的吸光度定量，本化合物的医药化合物残基含量是 6.0 %（ W/W ）。

例 45： 羧甲基葡聚糖多元醇的三乙基铵盐的合成

将葡聚糖 T150（ 20g、ファルマシア社制、平均分子量 150K ）溶解在 0.1M 醋酸缓冲液（ pH 5.5 、 2000ml ）中，加入高碘酸钠（ 66.0g ）的水溶液（ 2000ml ）中。一边避光; 一边在 4 ℃下搅拌 10 天后，加入乙二醇（ 14.0ml ），搅拌 1 夜。在冰冷下使用 8M 氢氧化钠水溶液，将反应液的 pH 调为 7.5 。加入硼氢化钠（ 28g ）、溶解后，在室温下搅拌 1 夜。冰冷反应液，用醋酸调节 pH 为 5.5 ，在 4 ℃下搅拌 1 小时。在冰冷下，用 8M 氢氧化钠水溶液调节 pH 为 7.5 。通过使用 BIOMAX - 5 膜（ミリポア社制）用超滤法，将得到的水溶液浓缩到 500ml ，得到溶液 1 。对于葡聚糖 T110（ 20g ），进行一系列的上述操作，得到溶液 2 。将溶液 1 和溶液 2 混合，将混合溶液的 pH 调为 3.0 ，在 40 ℃下恒温 4 小时后，将 pH 调为 7 ，得到含有低分子化的葡聚糖多元醇的溶液。使之通过 BIOMAX - 30 膜，再使用 BIOMAX - 5 膜脱盐后冷冻干燥，得到葡聚糖多元醇（ 4.6g ）。该物质的分子量（凝胶过滤、プルラン标准）是 17K 。

将该葡聚糖多元醇（ 2.5g ）加入到将氢氧化钠（ 17.5g ）溶于水（ 75ml ）得到的水溶液中，在室温下溶解。在该溶液中、冰冷下，加入一氯醋酸（ 25g ），溶解后，在室温下反应 20 小时。用醋酸将该反应液的 pH 调为 9 后，通过使用 BIOMAX - 5 膜用超滤法脱盐。将未通过膜的残留溶液冷冻干燥，得到羧甲基葡聚糖多元醇的钠盐（ 4.0g ）。该物质的分子量（凝胶过滤、プルラン标准）是 45K 、 CM 化度是 0.9 。

将该羧甲基葡聚糖多元醇的钠盐（ 3.7g ）溶解在水中，加到 Bio - Rad AG 50W - X2（ 200 - 400 目、 H^+ 型）柱上，用水洗脱。在该洗脱液中加入三乙胺（ 5.8ml ）后，冷冻干燥，得到标题化合物（ 4.4g ）。

例 46： 羧甲基葡聚糖多元醇 - Gly - Gly - Gly - Phe - NH - A′（ A - NH_2 = DX - 8951 ）的合成

OnCusp
Ex. 1002

将由例 45 得到的羧甲基葡聚糖多元醇的三乙基铵盐（ 4.4g)溶解在 N, N －二甲基甲酰胺（ 300ml ）中。在该溶液中依次加入含有三乙胺（ 0.19ml ）和 3′－ N －（ Gly － Gly － Gly － Phe ）－ NH － A （ A － NH_2 = DX － 8951 ）的三氟醋酸盐（ 580mg ）的 N, N －二甲基甲酰胺（ 45ml ）溶液、 1 －乙氧基羰基－ 2 －乙氧基－ 1, 2 －二羟基喹啉（ 4.4g ），避光、室温下，一边搅拌，一边反应。用 1M 氢氧化钠水溶液调节该反应液的 pH 为 10 后，将每 5ml 滴入到各 25ml 的乙醇中。在其中加入 3M 氯化钠水溶液（ 1ml ）、乙醚（ 5ml ）、离心分离收集（ 3500 、 8 分钟）析出的沉淀。将该沉淀溶解在水中，使用透析膜（スペクトルポア 1 、临界分子量 6000 － 8000 ），对于纯水进行透析，用米利波阿过滤器(0.22μm ）过滤透析内液后，冷冻干燥，得到标题化合物（ 3.4g ）。根据 0.1 Tris 缓冲液（ pH 9.0 ）中的 362nm 的吸光度，定量本化合物的医药化合物残基含量是 4.6 %（ W/W ）。

例 47： α －甲基羧甲基葡聚糖多元醇－ Gly － Gly － Gly － Phe － NH － A′（ A － NH_2 = DX － 8951 ）的合成

将由例 45 得到的葡聚糖多元醇（ 2g ）加入到将氢氧化钠（ 14g ）溶于水（ 60ml ）得到的水溶液中，在室温下溶解。在该溶液中，在冰冷下，加入 α －溴丙酸（ 19ml ）、溶解后，在室温下反应 18 小时。用醋酸将该反应液的 pH 调成 8 后，通过使用 BIOMAX － 50 膜的超滤法脱盐。将未通过膜的残留溶液冷冻干燥，得到 α －甲基羧甲基葡聚糖多元醇的钠盐（ 2.95g ）。该物质的分子量（凝胶过滤、プルラン标准）是 45K 。每个糖残基的 α －甲基羧基甲基化度，以羧甲基葡聚糖多元醇为基准，如下求出。将 α －甲基羧甲基葡聚糖多元醇的钠盐水溶液放入到 Bio － Rad AG 50W － X2 （ H^+ 型）柱中，将通过液冷冻干燥，作为试样使用。将该试样溶解在规定的过剩量的 0.1N 氢氧化钠水溶液中，将酚酞作为指示剂，用 0.1N 盐酸滴定。取试样的采取量为 s mg 、 0.1N 氢氧化钠水溶液的规定过剩量为 a(ml)、 0.1N 盐酸的滴定量为 b(ml)、用 13.4（ a － b ）/［ s － 7.2 （ a － b ）］公式求出 α －甲基羧甲基化度。其结果， α －甲基羧甲基化度是 0.8 。

将该 α －甲基羧甲基葡聚糖多元醇的钠盐（ 2.2g ）溶解于水中，装入到 Bio － Rad AG 50W － X2 （ 200 － 400 目、 H^+ 型）柱（直径 44

mm、长 210mm），用水洗脱。在该洗脱液中加入三乙胺（4ml）后，冷冻干燥，得到 α－甲基羧甲基葡聚糖多元醇的三乙基铵盐（2.69g）。

将该 α－甲基羧甲基葡聚糖多元醇的三乙基铵盐（2.68g）溶解在 N, N－二甲基甲酰胺（60ml）中。在该溶液中依次加入将从与例 2 相同合成的 3′－N－（Boc－Gly－Gly－Gly－Phe）－NH－A（A－NH_2 = DX－8951）（350mg）用与例 16 相同方法脱 Boc 化得到的 3′－N－（Gly－Gly－Gly－Phe）－NH－A 的三氟醋酸盐和三乙胺（0.116ml）溶解在 N, N－二甲基甲酰胺（10ml）得到的溶液、将 1－乙氧基羰基－2－乙氧基－1, 2－二羟基喹啉（2.68g）溶解在 N, N－二甲基甲酰胺（10ml）得到的溶液，在室温下，一边搅拌 1 夜；一边反应。在该反应液中加入 3M 氯化钠水溶液，将每 6ml 滴入到各 30ml 的乙醇中。分别加入 3M 氯化钠水溶液（1ml）、乙醚（5ml），离心分离收集（3500rpm、8 分钟）析出的沉淀。用丙酮洗涤该沉淀后，溶解于水中，加入 3M 氯化钠水溶液（10ml），用 0.1M 氢氧化钠水溶液调节 pH 为 9。在 37 ℃下，处理 1 小时。通过使用 BIOMAX－10 膜用超滤法将该处理液脱盐。用米利波阿过滤器(0.22μm）过滤来通过膜的残留溶液后，冷冻干燥，得到标题化合物（2.15g）。将本化合物溶解到 0.1M 氯化钠水溶液中后，用 GPC（柱：东ソ－TSK Gel PW－4000XL、溶剂：0.1M NaCl、流速：0.8ml/min）分析的结果及本化合物的紫外线吸收光谱（0.1M Tris 缓冲液、pH 9.0、0.21mg/ml）分别如图 20 及图 21 所示。根据 0.1M Tris 缓冲液（pH 9.0）中的 362nm 的吸光度，定量本化合物的医药化合物残基含量是 5.9 %（W/W）。

例 48：3′－N－（Gly－Phe－Gly）－NH－A（A－NH_2 = DX－8951）三氟醋酸盐的合成

将 Phe－Gly－OBzl 的对甲苯磺酸盐（3.06g）、Boc－Gly－OH（1.10g）、N－羟基丁二酰亚胺（941mg）、N－甲基吗啉（0.725ml）、N, N－二甲基甲酰胺（40ml）的混合物，冷却到 4 ℃后，加入 N, N′－二环己基碳化二亚胺（1.56g）。在室温下一边搅拌 1 夜；一边反应后，将反应液减压干固。用硅胶柱色谱（洗脱液：二氯甲烷：甲醇＝98：2 溶液精制残渣，得到 Boc－Gly－Phe－Gly－OBzl（1.93g）。

OnCusp
Ex. 1002

^{1}H-NMR (DMSO-d_6) δ: 8.52 (dd, 1H, J=5.6, 6.4Hz), 7.97 (d, 1H, J=8.8Hz), 7.30-7.39 (m, 5H), 7.15-7.26 (m, 5H), 6.83 (t, 1H, J=5.6Hz), 5.14 (s, 1H), 4.52-4.57 (m, 1H), 3.87-3.96 (m, 2H), 3.57 (dd, 1H, J=5.6, 16.7Hz), 3.43 (dd, 1H, J=5.6, 16.7Hz), 3.01 (dd, 1H, J=4.8, 14.3Hz), 2.77 (dd, 1H, J=5.6, 14.3Hz), 1.37 (s, 9H).

将得到的 Boc - Gly - Phe - Gly - OBzl（1.78g）溶解到醋酸乙酯（60ml）中，在 5 % - Pd - C（1.8g）存在下，接触还原 24 小时。过滤掉催化剂，将滤液减压浓缩，得到 Boc - Gly - Phe - Gly - OH（1.41g）。

^{1}H-NMR (DMSO-d_6) δ: 8.35 (t, 1H, J=5.6Hz), 7.94 (d, 1H, J=8.8Hz), 7.15-7.26 (m, 5H), 6.85 (dd, 1H, J=5.6, 6.4Hz), 4.52-4.58 (m, 1H), 3.76 (d, 2H, J=5.6Hz), 3.56 (dd, 1H, J=6.4, 16.7Hz), 3.43 (dd, 1H, J=5.6, 16.7Hz), 3.03 (dd, 1H, J=5.0, 13.5Hz), 2.79 (dd, 1H, J=9.5, 13.5Hz), 1.37 (s, 9H).

将由上述得到的 Boc - Gly - Phe - Gly - OH（500mg）及 N - 羟基丁二酰亚胺（161mg）溶解到 N, N - 二甲基甲酰胺（10ml）中。在该溶液中加入溶解了 DX - 8951 的甲磺酸盐（530mg）和三乙胺（0.146ml）的 N, N - 二甲基甲酰胺（50ml）的溶液，冷却到 4 ℃后，加入 N, N′- 二环己基碳化二亚胺（268mg），避光、室温下，一边搅拌 1 夜；一边反应。将该反应液减压干固，用硅胶柱色谱（洗脱液：二氯甲烷：甲醇 = 96 : 4 溶液）精制残渣，得到 3′- N - (Boc - Gly - Phe - Gly) - NH - A（A - NH_2 = DX - 8951）（100mg）。

^{1}H-NMR (DMSO-d_6) δ: 8.39 (d, 1H, J=8.0Hz), 8.34 (t, 1H, J=5.6Hz), 7.98 (d, 1H, J=7.2Hz), 7.78 (d, 1H, J=10.3Hz), 7.33 (s, 1H), 7.13-7.24 (m, 5H), 6.80 (dd, 1H, J=5.6, 6.4Hz), 5.55-5.61 (m, 1H), 5.44 (d, 1H, J=16.0Hz), 5.41 (d, 1H, J=16.0Hz), 5.25 (s, 2H), 4.43-4.46 (m, 1H), 3.69-3.79 (m, 2H), 3.50 (dd, 1H, J=5.6, 16.7Hz), 3.41 (dd, 1H, J=5.6, 16.7Hz), 3.16-3.19 (m, 2H), 2.98 (dd, 1H, J=4.8, 14.3Hz), 2.79 (dd, 1H, J=9.5, 14.3Hz), 2.41 (s, 3H), 2.19-2.25 (m, 1H), 2.10-2.15 (m, 1H), 1.82-1.90 (m, 2H), 1.35 (s, 9H), 0.88 (t, 3H, J=8.0Hz).

Mass (FAB): m/e 797 (M+1)

OnCusp
Ex. 1002

将得到的 3′－N－（Boc－Gly－Phe－Gly）－NH－A（A－NH_2 = DX－8951）（100mg）溶解在三氟醋酸（3ml）中，放置 1 小时。馏去溶剂，用甲醇（30ml）共沸 2 次、用乙醇（30ml）共沸 2 次后，用醚洗涤残渣，得到标题化合物（80mg）。

^{1}H-NMR (DMSO-d_6) δ: 8.52-8.62 (m, 1H), 7.94 (s, 3H), 7.79 (t, 1H, J=11.1Hz), 7.34 (s, 1H), 7.15-7.27 (m, 5H), 6.52 (s, 1H), 5.57-5.61 (m, 1H), 5.36-5.46 (m, 2H), 5.24 (s, 2H), 4.66-4.70 (m, 1H), 3.69-3.81 (m, 2H), 3.61-3.68(m, 1H), 3.40-3.47 (m, 1H), 3.15-3.23 (m, 1H), 3.01 (dd, 1H, J=4.0, 13.5Hz), 2.77 (dd, 1H, J=9.5, 13.5Hz), 2.12-2.23 (m, 2H), 1.81-1.91 (m, 2H), 0.89 (t, 3H, J=7.2Hz).
Mass (FAB); m/e 697 (M+1)

例 49：3′－N－（Phe－Gly）－NH－A（A－NH_2 = DX－8951）三氟醋酸盐的合成

将 Boc－Phe－Gly（771mg）及 N－羟基丁二酰亚胺（300mg）溶解在 N, N－二甲基甲酰胺（10ml）中。在该溶液中加入溶解了 DX－8951 的甲磺酸盐（1058mg）、三乙胺（0.293ml）的 N, N－二甲基甲酰胺（50ml）溶液，冷却到 4℃后，加入 N, N′－二环己基碳化二亚胺（494mg），在避光、室温下，一边搅拌 1 夜；一边反应。将该反应液减压干固，用硅胶柱色谱（洗脱液：二氯甲烷：甲醇 = 98：2 溶液）精制残渣，得到 3′－N－（Boc－Phe－Gly）－NH－A（A－NH_2 = DX－8951）（1.20g）。

^{1}H-NMR (DMSO-d_6) δ: 8.29 (d, 1H, J=8.0Hz), 8.21 (t, 1H, J=4.8Hz), 7.76 (d, 1H, J=10.3Hz), 7.32 (s, 1H), 7.13-7.25 (m, 5H), 6.92 (d, 1H, J=7.2Hz), 6.49 (s, 1H), 5.56-5.61 (m, 1H), 5.44 (d, 1H, J=15.9Hz), 5.38 (d, 1H, J=15.9Hz), 5.25 (s, 2H), 4.08-4.12 (m, 1H), 3.78 (d, 1H, J=4.8Hz), 3.16-3.25 (m, 2H), 2.99 (dd, 1H, J=4.0, 13.5Hz), 2.72 (dd, 1H, J=10.3, 13.5Hz), 2.40 (s, 3H), 2.09-2.35 (m, 2H), 1.80-1.91 (m, 2H), 1.16 (s, 9H), 0.88 (t, 3H, J=8.0Hz).
Mass (FAB); m/e 741 (M+1)

将由上述得到的 3′－N－（Boc－Phe－Gly）－NH－A（170mg）溶在三氟醋酸（4ml）中，放置 1 小时。馏去溶剂，用甲醇（10ml）共沸 2 次、用乙醇（10ml）共沸 2 次后，用乙醚洗涤残渣，得到标题化合物（100mg）。

^{1}H-NMR (DMSO-d_6) δ: 8.88 (t, 1H, J=4.8Hz), 8.68 (d, 1H, J=8.7Hz), 8.05-8.15 (m, 3H), 7.79 (d, 1H, J=11.1Hz), 7.26-7.36 (m, 5H), 6.52 (d, 1H, J=7.2Hz), 5.57-5.62 (m, 1H), 5.43 (d, 1H, J=15.9Hz), 5.38 (d, 1H, J=15.9Hz), 5.19-5.28 (m, 1H), 4.10-4.18 (m, 1H), 3.93 (dd, 1H, J=4.8, 16.7Hz), 3.82 (dd, 1H, J=4.8, 16.7Hz), 3.17-3.24 (m, 2H), 3.14 (dd, 1H, J=4.8, 13.5Hz), 2.95 (dd, 1H, J=8.0, 13.5Hz), 2.42 (s, 3H), 2.14-2.25 (m, 2H), 1.83-1.91 (m, 2H), 0.89 (t, 3H, J=8.0Hz).

Mass (FAB); m/e 640 (M+1)

例 50: 3′-N-Gly-NH-A (A-NH_2 = DX-8951)三氟醋酸盐的合成

将 DX-5981 的甲磺酸盐 (530mg) 和三乙胺 (0.28ml) 溶解在 N,N-二甲基甲酰胺 (10ml) 中，冷却到 4℃后，加入 Boc-Gly 的 N-羟基丁二酰亚胺酯 (327mg)。避光、室温下，一边搅拌 1 夜；一边反应。将该反应液减压干固，用硅胶柱色谱 (洗脱液: 二氯甲烷 : 甲醇 = 98 : 2 溶液)精制残渣，得到 3′-N-(Boc-Gly)-NH-A (A-NH_2 = DX-8951) (500mg)。

^{1}H-NMR (DMSO-d_6) δ: 8.38 (d, 1H, J=8.3Hz), 7.77 (d, 1H, J=10.7Hz), 7.31 (s, 1H), 6.89-6.91 (m, 1H), 6.49 (s, 1H), 5.55-5.59 (m, 1H), 5.45 (d, 1H, J=16.1Hz), 5.38 (d, 1H, J=16.1Hz), 5.27 (d, 1H, J=19.0Hz), 5.18 (d, 1H, J=19.0Hz), 3.50-3.62 (m, 2H), 3.15-3.19 (m, 2H), 2.41 (s, 3H), 2.18-2.24 (m, 1H), 2.08-2.12 (m, 1H), 1.81-1.91 (m, 2H), 1.31 (s, 9H), 0.87 (t, 3H, J=8.0Hz).

Mass (FAB); m/e 593 (M+1)

将由上述得到的 3′-N-(Boc-Gly)-NH-A (100mg) 溶解到三氟醋酸 (2ml) 中，放置 1 小时。蒸出溶剂，用甲醇 (10ml) 共沸 2 次、用乙醇 (10ml) 共沸 2 次后，用乙醚洗涤残渣，得到标题化合物 (70mg)。

^{1}H-NMR (DMSO-d_6) δ: 8.88 (d, 1H, J=8.8Hz), 8.08 (s, 3H), 7.81 (d, 1H, J=11.2Hz), 7.34 (s, 1H), 6.52 (s, 1H), 5.63-5.67 (m, 1H), 5.45 (d, 1H, J=16.7Hz), 5.40 (d, 1H, J=16.7Hz), 5.36 (d, 1H, J=19.1Hz), 5.25 (d, 1H, J=19.1Hz), 3.56 (s, 2H), 3.11-3.19 (m, 2H), 2.43 (s, 3H), 2.23-2.28 (m, 1H), 2.11-2.19 (m, 1H), 1.81

-1.91 (m, 2H), 0.88 (t, 3H, J=8.0Hz).

Mass (FAB); m/e 493 (M+1)

例 51： 羧甲基葡聚糖多元醇的三甲基铵盐的合成

将葡聚糖 T 500 （ 50g 、ファルマシア社制、分子量 500K ）溶解到 0.1M 醋酸缓冲液（ pH 5.5 、 5000ml ）中，加入高碘酸钠（ 165.0g ）的水溶液（ 5000ml ）。一边避光；一边在 4 ℃下搅拌 10 天后，加入乙二醇（ 35.0ml ），搅拌 1 夜。用 8M 氢氧化钠水溶液，将反应液的 pH 调到 7 。加入硼氢化钠（ 70g ）、溶解后，搅拌 1 夜。冰冷反应液，用醋酸调节 pH 为 5.5 ，在 4 ℃下搅拌 1 小时后，用 8M 氢氧化钠水溶液调节 pH 为 7.5 。通过使用 BIOMAX - 50 膜用超滤法，将得到的水溶液脱盐。将未通过膜的残留液冷冻干燥，得到葡聚糖多元醇（ 20.2g ）。该物质的分子量（凝胶过滤、プルラン标准）是 159K 。

将该葡聚糖多元醇（ 7.5g ）加入到将氢氧化钠（ 31.5g ）溶于水（ 225ml ）得到的水溶液中，在室温下使其溶解。在冰冷下，在该溶液中加入一氯醋酸（ 45g ）、溶解后，在室温下反应 1 夜。用醋酸将该反应液的 pH 调成 8 后，通过用 BIOMAX - 50 膜用超滤法脱盐。将未通过膜的残留溶液冷冻干燥，得到羧甲基葡聚糖多元醇的钠盐（ 8.5g ）。该物质的分子量（凝胶过滤、プルラン标准）是 274K ，羧甲基化度是 0.4 。将该羧甲基葡聚糖多元醇的钠盐（ 2.0g ）溶于水中，加入到 Bio - Rad AG 50W - X2 （ 200 - 400 目、 H^+ 型）柱（直径 44mm 、长度 210mm ）中，用水洗脱。在该洗脱液中加入三乙胺（ 4ml ）后，冷冻干燥，得到标题化合物（ 2.2g ）。

例 52： 羧甲基葡聚糖多元醇 - Gly - Phe - Gly - NH - A′（ A - NH_2 = DX - 8951 ）的合成

将由例 51 得到的羧甲基葡聚糖多元醇的三乙基铵盐（ 200mg ），溶解在 N, N - 二甲基甲酰胺（ 7ml ）中。在该溶液中，依次加入由例 48 得到的 3′ - N - （ Gly - Phe - Gly ） - NH - A （ A - NH_2 = DX - 8951 ）的三氟醋酸盐（ 41mg ）的 N, N - 二甲基甲酰胺（ 5ml ）溶液、三乙胺（ 0.014ml ）、 1 - 乙氧基羰基 - 2 - 乙氧基 - 1, 2 - 二羟基喹啉（ 100mg ），在室温下一边搅拌 1 夜；一边反应。将每 5ml 的该反应液滴入到各 10ml 的乙醇中。在其中加入 3M 氯化钠水溶液（ 2.0ml ）、

OnCusp
Ex. 1002

乙醚（ 25ml ），离心分离收集（ 3500rpm 、 8 分钟）析出的沉淀。将该沉淀溶于 0.5M 食盐水中，在冰冷下，用 0.1M 氢氧化钠水溶液调 pH 为 9 。通过使用 BIOMAX - 50 膜用超滤法，将得到的水溶液脱盐。用米利波阿过滤器(0.22μm)，将未通过膜的残留溶液过滤后，冷冻干燥，得到标题化合物（ 190mg ）。根据 0.1M Tris 缓冲液（ pH 9.0 ）的 362nm 的吸光度，定量本化合物的医药化合物残基含量是 4.5 % （ W/W ）。

例 53： 羧甲基葡聚糖多元醇- Phe - Gly - NH - A′（ A - NH_2 = DX - 8951 ）的合成

将由例 24 得到的羧甲基葡聚糖多元醇的钠盐（ 2.5g ）溶解于水中，放入到 Bio - Rad AG 50W - X2 （ 200 - 400 目、 Et_3NH^+ 型）柱中，用水洗脱。将该洗脱液冷冻干燥，得到羧甲基葡聚糖多元醇的三乙基铵盐（ 2.5g ）。

将该羧甲基葡聚糖多元醇的三乙基铵盐（ 200mg)溶解在 N, N - 二甲基甲酰胺（ 12ml).在该溶液中依次加入由例 49 得到的 3′ - N - （ Phe - Gly)- NH - A （ A - NH_2 = DX - 8951)的三氟醋酸盐（ 42mg ）和三乙胺（ 0.016ml ）的 N, N - 二甲基甲酰胺（ 5ml ）溶液、 1 - 乙氧基羰基- 2 - 乙氧基- 1, 2 - 二羟基喹啉（ 200mg ）中，避光、室温下，一边搅拌 1 夜; 一边反应。在该反应液中，加入水（ 300ml ），使用超滤膜 10K（フィルトロン社制）进行超滤。用 0.1N 氢氧化钠水溶液，将未通过膜的残留溶液的 pH 调为 10 ，使之通过滤膜（ 0.16μm 、フィルトロン社制）。通过使用 BIOMAX - 50 膜，将通过的溶液脱盐，接着，用米利波阿过滤器（ 0.22μm ）过滤后，冷冻干燥，得到标题化合物（ 180mg ）。根据 0.1M Tris 缓冲液（ pH 9.0 ）中的 362nm 的吸光度，定量本化合物的医药化合物残基含量是 6.1 % （ W/W ）。

例 54： 羧甲基葡聚糖多元醇- Gly - NH - A′（ A - NH_2 = DX - 8951 ）的合成

将由例 51 得到的羧甲基葡聚糖多元醇的三乙基铵盐（ 370mg ）溶解在 N, N - 二甲基甲酰胺（ 10ml ）中. 在该溶液中依次加入由例 50 得到的 3′ - N - Gly - NH - A （ A - NH_2 = DX - 8951 ）的三氟醋酸盐（ 57mg)的 N, N - 二甲基甲酰胺（ 3ml)溶液、三乙胺（ 0.027ml)、 1 - 乙氧基羰基- 2 - 乙氧基- 1, 2 - 二羟基喹啉（ 185mg ），在室温下，一边搅拌 1 夜; 一边反应。将每 5ml 的该反应液，滴入到各 10ml

的乙醇中。在其中加入 3M 氯化钠水溶液（ 2.0ml ）、乙醚（ 25ml ），离心分离（ 3500rpm， 8 分钟）收集析出的沉淀。将该沉淀溶解在 0.5M 食盐水中，冰冷下，用 0.1M 氢氧化钠水溶液，将 pH 调为 9 。通过使用 BIOMAX - 50 膜用超滤法，将得到的水溶液脱盐。用米利波阿过滤器（ 0.22μm ）过滤来通过膜的残留溶液后，冷冻干燥，得到标题化合物（ 290mg ）。根据 0.1M Tris 缓冲液（ pH 9.0 ）中的 362nm 的吸光度，定量本化合物的医药化合物残基含量是 0.5 %（ W/W ）。

例 55： 羧甲基葡聚糖多元醇 - Gly - Gly - Phe - Gly - D51 - 7059 的合成

将 Boc - Gly - Gly - Phe - Gly - OH （ 200mg ），溶解在三氟醋酸（ 4ml ）中，搅拌 1.5 小时。馏去溶剂，用甲醇（ 10ml ）共沸 2 次、用乙醇（ 10ml ）共沸 2 次后，用乙醚洗涤残渣，得到 Gly - Gly - Phe - Gly - OH 的三氟醋酸盐（ 225mg ）。

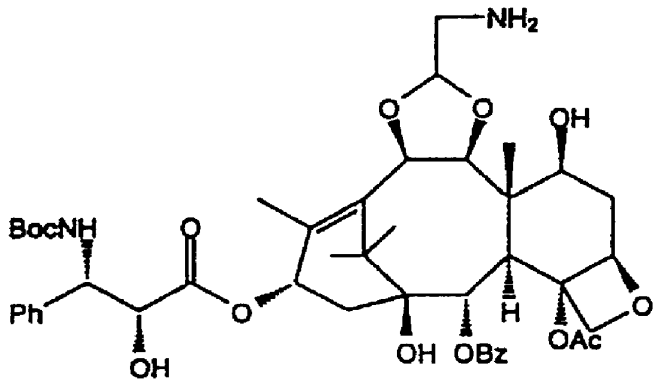
^{1}H-NMR (DMSO-d_6) δ: 8.48 (dd, 1H, J=5.β, 5.6Hz), 8.59 (dd, 1H, J=5.6, 6.4Hz), 8.29 (d, 1H, J=4.8Hz), 7.23-7.26 (m, 4H), 7.16-7.20 (m, 1H), 4.58 (ddd, 1H, J=4.8, 4.8, 10.4Hz), 3.89 (dd, 1H, J=5.6, 16.7Hz), 3.76-3.79 (m, 2H), 3.67 (dd, 1H, J=5.6, 16.7Hz), 3.56 (s, 2H).

将由上述得到的 Gly - Gly - Phe - Gly - OH 的三氟醋酸盐（ 200mg ），溶解到水（ 10ml ）中，加入三乙胺，将 pH 调成 9 后，加入 9 - 芴基（フレオレニル）甲基 N - 羟基丁二酰亚胺二碳酸盐（ 200mg ）的乙腈（ 5ml ）溶液，接着，使用三乙胺，一边将 pH 维持在 8.0 - 8.5 ；一边在室温下搅拌 4 小时。在反应液中加入 1.5N 盐酸（ 50ml ），滤出析出的沉淀，用水洗涤后，用硅胶柱色谱（洗脱液：二氯甲烷 ： 甲醇 = 4 ： 1 溶液）精制，得到 Fmoc - Gly - Gly - Phe - Gly - OH （ 151mg ）。

^{1}H-NMR (DMSO-d_6) δ: 8.28-8.32 (m, 1H), 8.08-8.12 (m, 1H), 7.85-7.89 (m, 2H), 7.68-7.72 (m, 2H), 7.57-7.65 (m, 1H), 7.38-7.43 (m, 2H), 7.29-7.34 (m, 2H), 7.20-7.25 (m, 4H), 7.14-7.17 (m, 1H), 4.45-4.52 (m, 1H), 4.26-4.30 (m, 2H), 4.19-4.24 (m, 1H), 3.77 (dd, 1H, J=5.6, 16.7Hz), 3.58-3.69 (m, 4H), 3.42-3.52 (m, 1H), 3.06 (dd, 1H, J=4.0, 13.5Hz), 2.78 (dd, 1H, J=4.0, 13.5Hz).

OnCusp
Ex. 1002

将由上述得到的 Fmoc - Gly - Gly - Phe - Gly - OH（24mg）、用下式:



表示的紫杉醇衍生物（D51 - 7059： 9, 10 - O -（2 - 氨基亚乙基）- 13 - O -[3 -（叔丁氧羰基氨基）- 2 - 羟基 - 3 - 苯基] - 丙酰基 - 10 - 二乙酰基 - 9 - 二氢 バカチン III）及 N - 羟基丁二酰亚胺（7mg）溶解到 N, N - 二甲基甲酰胺（1ml）中。将该溶液冷却到 4℃后，加入 N, N′ - 二环己基碳化二亚胺（9mg），在室温下，一边搅拌 1 夜；一边反应。将该反应液减压干固，用硅胶柱色谱（洗脱液: 二氯甲烷 : 甲醇 = 96 : 4 溶液）精制残渣，得到 Fmoc - Gly - Gly - Phe - Gly - D51 - 7059（21mg）。

^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 8.06 (d, 2H, J=8.1Hz), 7.75 (d, 2H, J=8.1Hz), 7.18-7.61 (m, 23H), 7.62 (dd, 1H, J=7.2, 8.0Hz), 6.07 (dd, 1H, J=7.9, 8.8Hz), 5.98 (d, 1H, J=4.8Hz), 5.63 (d, 1H, J=8.8Hz), 5.00-5.40 (m, 4H), 4.92 (s, 1H), 4.60-4.69 (m, 2H), 4.41 (d, 2H, J=6.4Hz), 4.35 (d, 1H, J=8.0Hz), 4.29 (d, 1H, J=8.0Hz), 4.21 (t, 1H, J=7.5Hz), 3.96-4.07 (m, 3H), 3.73-3.86 (m, 4H), 3.37-3.41 (m, 1H), 3.19-3.23 (m, 1H), 3.00 (dd, 1H, J=8.0, 13.5Hz), 2.85-2.89 (m, 3H), 2.29 (s, 3H), 2.05-2.40 (m, 4H), 1.57 (s, 3H), 1.56 (s, 3H), 1.53 (s, 3H), 1.40 (s, 9H), 1.22 (s, 3H).

Mass (FAB); m/e 1413 (M+Na)

将由上述得到的 Fmoc - Gly - Gly - Phe - Gly - D51 - 7059（21mg）溶解在二氯甲烷（1.8ml）中，加入哌嗪（0.2ml）后，在室温下，反应 1 小时。用硅胶柱色谱（洗脱液: 二氯甲烷 : 甲醇 = 94 : 6

OnCusp
Ex. 1002

溶液）精制该反应液，得到 Gly - Gly - Phe - Gly - D51 - 7059（16mg）。

^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 8.10 (d, 2H, J=8.1Hz), 7.89-7.94 (m, 1H), 7.62 (dd, 1H, J=7.2, 8.0Hz), 7.45-7.50 (m, 2H), 7.17-7.42 (m, 12H), 7.10-7.16 (m, 1H), 6.97 (dd, 1H, J=5.6, 6.4Hz), 6.08 (dd, 1H, J=8.0, 8.7Hz), 6.02 (d, 1H, J=4.8Hz), 5.62 (d, 1H, J=11.1Hz), 5.23-5.30 (m, 1H), 5.23 (d, 1H, J=7.2Hz), 5.10 (s, 1H), 4.98-5.00 (m, 1H), 4.60-4.63 (m, 1H), 4.38 (d, 1H, J=8.8Hz), 4.33 (d, 1H, J=8.8Hz), 4.13 (s, 1H), 4.04 (dd, 1H, J=5.6, 16.7Hz), 3.93 (dd, 1H, J=5.6, 16.7Hz), 3.82 (d, 1H, J=7.2Hz), 3.73-3.82 (m, 2H), 3.43-3.49 (m, 1H), 3.30-3.38 (m, 2H), 3.24 (dd, 1H, J=6.4, 14.3Hz), 3.04 (dd, 1H, J=8.0, 14.3Hz), 2.89-3.07 (m, 3H), 2.30 (s, 3H), 2.01-2.50 (m, 4H), 1.70 (s, 3H), 1.62 (s, 3H), 1.61 (s, 3H), 1.40 (s, 9H), 1.26 (s, 3H).

Mass (FAB); m/e 1169 (M+1)

将由上述方法合成的 Gly - Gly - Phe - Gly - D51 - 7059（33mg）溶解在 N, N - 二甲基甲酰胺（0.5ml）中。在该溶液中，依次加入由例 24 得到的羧甲基葡聚糖多元醇的三乙基铵盐（180mg）的 N, N - 二甲基甲酰胺（7ml）溶液、1 - 乙氧基羰基 - 2 - 乙氧基 - 1, 2 - 二羟基喹啉（180mg）、在室温下，一边搅拌 1 夜，一边反应。将每 4ml 的该反应液滴入到各 10ml 的乙醇中。分别加入 3M 氯化钠水溶液（2.0ml）、乙醚（25ml），离心分离收集（2500rpm、8 分钟）析出的沉淀。用乙醇洗涤该沉淀后，溶解在水中，放到 Bio - Rad AG 50W - X2（200 - 400 目、Na^+ 型）柱（直径 15mm、长 85mm）中，用水洗脱，得到洗脱液 1。另外，将 Gly - Gly - Phe - Gly - D51 - 7059（10mg）溶解在 N, N - 二甲基甲酰胺（0.5ml）中后，依次加入由例 24 得到的羧甲基葡聚糖多元醇的三乙铵盐（60mg）的 N, N - 二甲基甲酰胺（5ml）溶液、1 - 乙氧基羰基 - 2 - 乙氧基 - 1, 2 - 二羟基喹啉（60mg）的 N, N - 二甲基甲酰胺（0.25ml）溶液，在室温下，一边搅拌 1 夜；一边反应。将该反应液滴入 10ml 的乙醇中后，加入 3M 氯化钠水溶液（2.0ml）、乙醚（25ml），离心分离收集（2500rpm、8 分钟）析出的沉淀。用乙醇洗涤该沉淀后，溶解于水中，放入 Bio - Rad AG 50W - X2（200 - 400 目、Na^+ 型）柱（直径 15mm、长 85mm），用水

洗脱，得到洗脱液 2 。将洗脱液 1 及洗脱液 2 混合后，通过使用 BIOMAX - 50 膜的超滤法，进行脱盐。用米利波阿过滤器(0.22μm) 过滤未通过膜的残留溶液后，冷冻干燥，得到标题化合物 (208mg) 。将本化合物溶解在 0.1M 氯化钠水溶液中后，用 GPC (柱: 东ソ - TSK Gel PW - 4000XL 、溶剂: 0.1M NaCl 、流速: 0.8ml/min) 分析结果及本化合物的紫外线吸收光谱 (甲醇 : 水 = 10 : 1 溶液、 1.69mg/ml) 分别如图 22 及图 23 所示。根据甲醇 : 水 = 10 : 1 溶液中的 240nm 的吸光度，定量本化合物的医药化合物残基含量是 5.3 % (W/W) 。

例 56 : 本发明的药物复合物的抗肿瘤作用

用与例 11 相同方法，作成感染 Meth A 癌小鼠 (1 组 6 只) ，对于例 15 的药物复合物，用与例 12 相同方法，研究单次给药时的抗肿瘤作用。其结果，例 15 的药物复合物，与例 12 的医药化合物本身相比，显示出显著增强的抗肿瘤效果及有效用量范围的扩大。

被测化合物	给药量 (mg/kg)[1)]	抑制率 (%)
例 15 的化合物	10	100
	5	99
	2.5	95
	1.25	83

[1)] 医药化合物换算量

例 57 : 本发明的药物复合物的抗肿瘤作用

将人的胃癌 SC - 6 的肿块，移植到裸鼠 (BALB/c - nu/nu 、雄性) 的右鼠颈 (径) 部皮下，作成感染 SC - 6 癌的裸鼠 (1 组 5 只) 。移植后的第 24 天将溶解在注射用蒸馏水中的例 15 的药物复合物静脉内单次给药、将其抗肿瘤作用，与医药化合物本身进行比较。其结果，例 15 的药物复合物，与医药化合物本身比较，没有显示毒性死亡、发挥了高的抗肿瘤效果。

OnCusp
Ex. 1002

被测化合物	给药量 (mg/kg)	抑制率（%）	死亡小鼠数/使用小鼠数
医药化合物本身	60	98	2/5
	15	61	0/5
例 15 的化合物	8[1)]	100	0/5
	2[1)]	71	0/5

1) 医药化合物换算量

例 58：本发明的药物复合物的抗肿瘤作用

用与例 57 相同方法，作成感染人肺癌的 QG－90 癌的裸鼠（1 组 5 只）。在移植后的第 16 天，将溶解在注射用蒸馏水中的例 15 的药物复合物单次静脉给药，将其抗肿瘤作用与医药化合物本身进行比较。其结果，例 15 的药物复合物，与医药化合物本身比较，显示显著增强的抗肿瘤效果和有效用量范围的扩大。

被测化合物	给药量 (mg/kg)	抑制率（%）	死亡小鼠数/使用小鼠数
医药化合物本身	50	60	0/5
	12.5	51	0/5
例 15 的化合物	7[1)]	98	0/5
	1.75[1)]	97	0/5

1) 医药化合物换算量

例 59：本发明的药物复合物的抗肿瘤作用

用与例 11 相同方法，作成感染 Meth A 癌白鼠（1 组 6 只），用与例 12 相同方法，将单次给与例 41 的药物复合物时的抗肿瘤作用，与医药化合物本身相比较，其结果，例 41 的药物复合物，与医药化合物本身比较，显示显著增强的抗肿瘤效果及有效用量范围的扩大。

被测化合物	给药量 (mg/kg)[1)]	抑制率（%）
医药化合物本身	100	64
	50	56
	25	34
例 41 的化合物	25[1)]	99
	12.5[1)]	95
	6.25[1)]	81
	3.125[1)]	61

[1)] 医药化合物换算量

例 60：本发明的药物复合物的抗肿瘤作用

用与例 11 相同方法，作成感染 Meth A 癌小鼠（1 组 6 只），用与例 12 相同方法，研究分别单次给与例 29、例 46 及例 47 的各药物复合物时的抗肿瘤作用。

其结果，任何一种药物复合物都显示了高的抗肿瘤效果和宽的有效用量范围。

被测化合物	给药量 (mg/kg)[1)]	抑制率（%）
例 29 的化合物	30	99
	20	99
	10	89
	5	79
例 46 的化合物	100	94
	80	92
	40	82
	20	75
例 47 的化合物	100	96
	80	94
	40	97
	20	75

[1)] 医药化合物换算量

OnCusp
Ex. 1002

例 61： 本发明的药物复合物的抗肿瘤作用

用与例 11 相同方法，作成感染 Meth A 癌小鼠（ 1 组 6 只），对于例 44 的药物复合物，用与例 12 相同方法单次给药，将其抗肿瘤作用与医药化合物本身（阿霉素）比较。其结果，例 44 的药物复合物与医药化合物比较，显示了显著的抗肿瘤效果的增强及有效用量范围的扩大。

被测化合物	给药量 (mg/kg)	抑制率（ % ）	死亡小鼠数/使用小鼠数
医药化合物本身	20		6/6
	10	64	0/6
	5	39	0/6
例 44 的化合物	40[1)]	96	0/6
	20[1)]	96	0/6
	10[1)]	87	0/6
	5[1)]	76	0/6

1) 医药化合物换算量

例 62： 本发明的药物复合物的体内动态

用与例 11 相同方法，作成感染 Meth A 癌小鼠，对于例 15 的药物复合物，用与例 12 相同方法，单次给药（ 10mg/kg：医药化合物换算量），研究药物复合物在各组织内的浓度推移。其结果，例 15 的药物复合物显示了显著高的血液中滞留性、向肿瘤组织高移送性及对于肝脏和小肠的高肿瘤选择性。其结果如图 24 所示。

产业上的可利用性

导入抗肿瘤剂的医药化合物残基的本发明药物复合物，其特征是肿瘤部位选择性优良、可发挥高效抗肿瘤作用的同时，显示的毒性也降低。

OnCusp
Ex. 1002

说 明 书 附 图

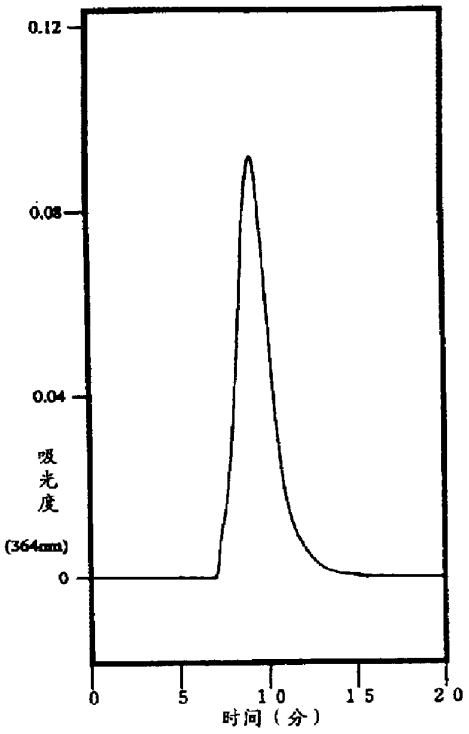


图 1

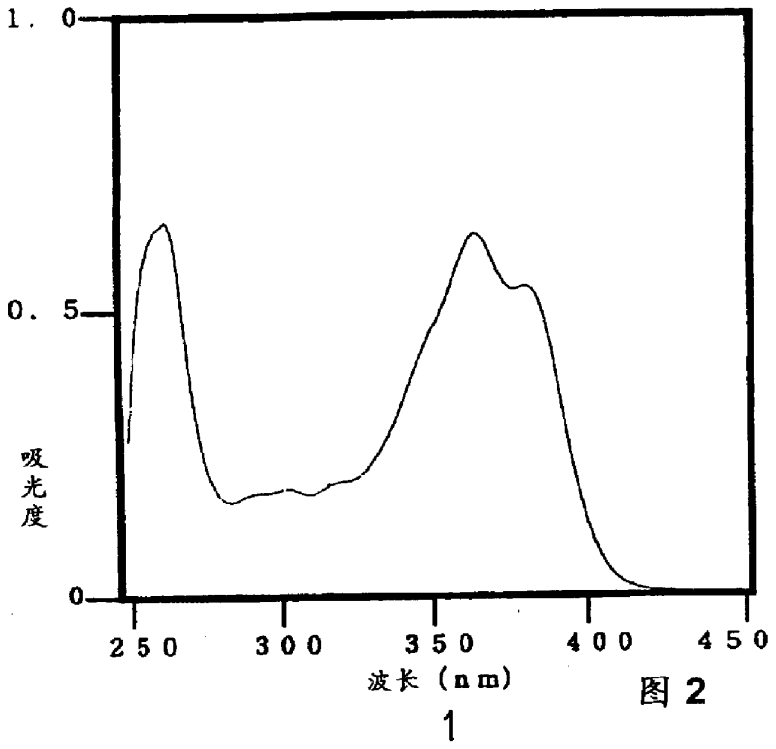


图 2

OnCusp
Ex. 1002

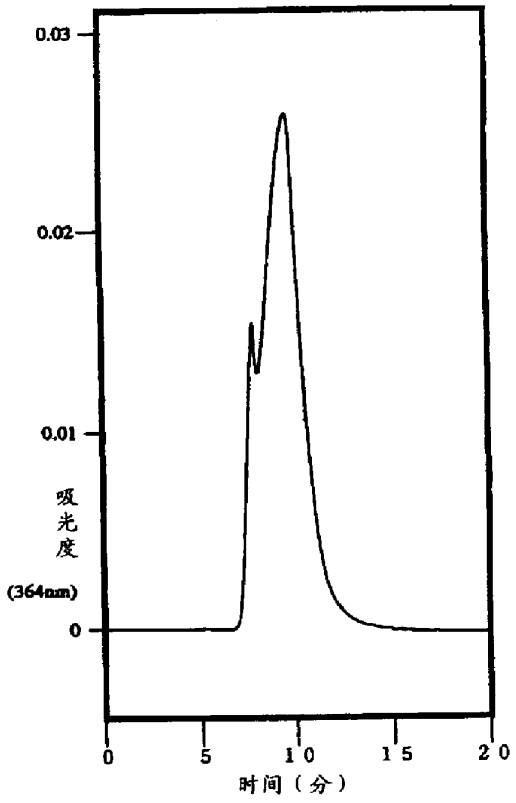


图 3

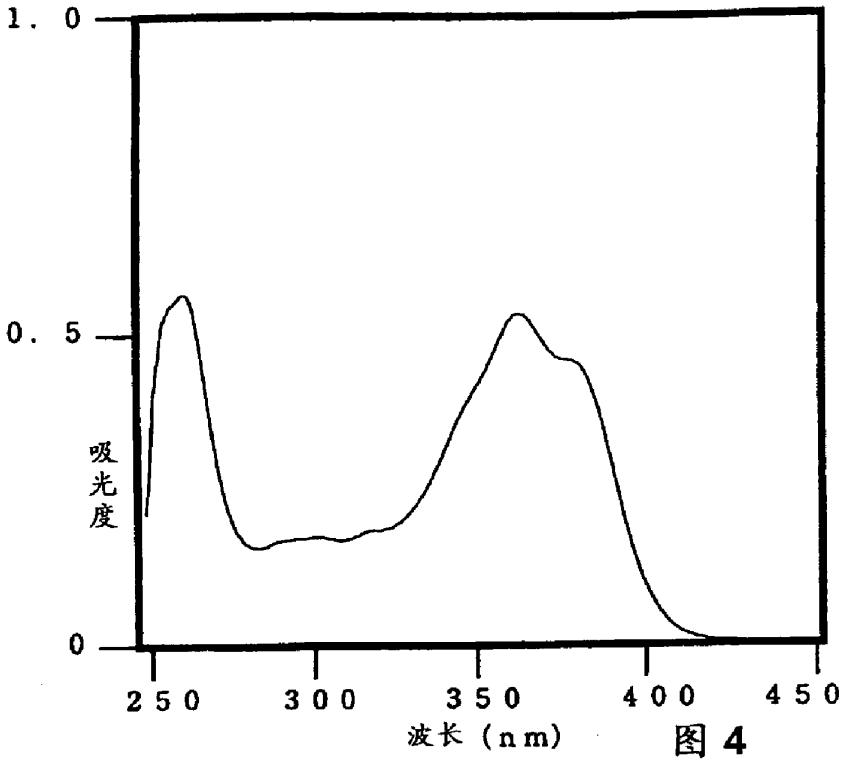


图 4

OnCusp
Ex. 1002

02.02

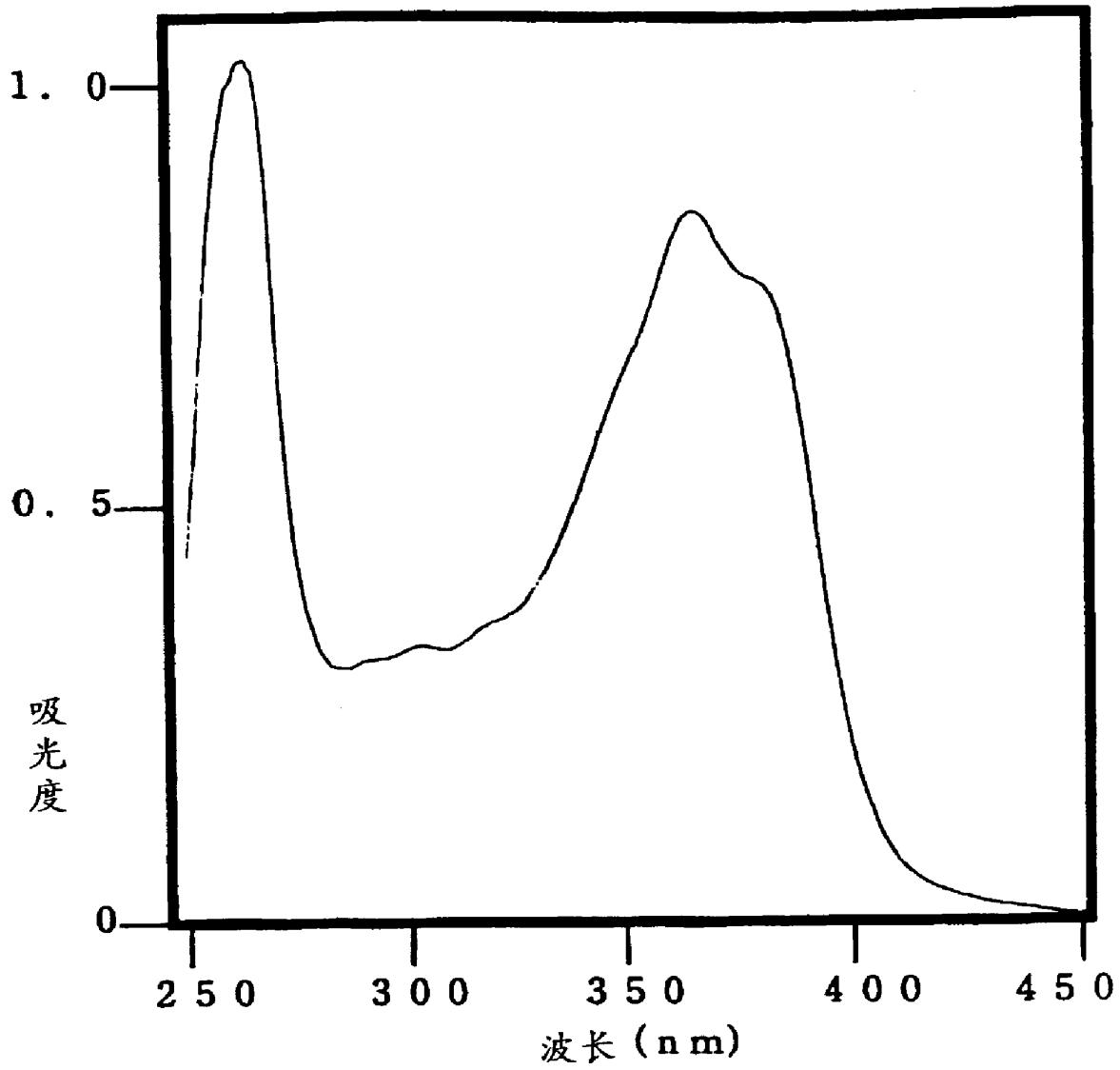


图 5

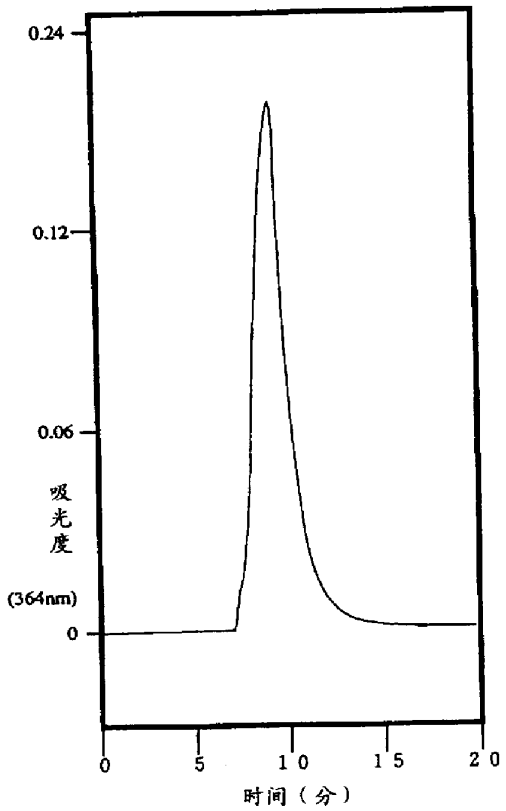

0.24
0.12
0.06
吸光度
(364nm)
0
0
5
10
15
20
时间（分）

图 6

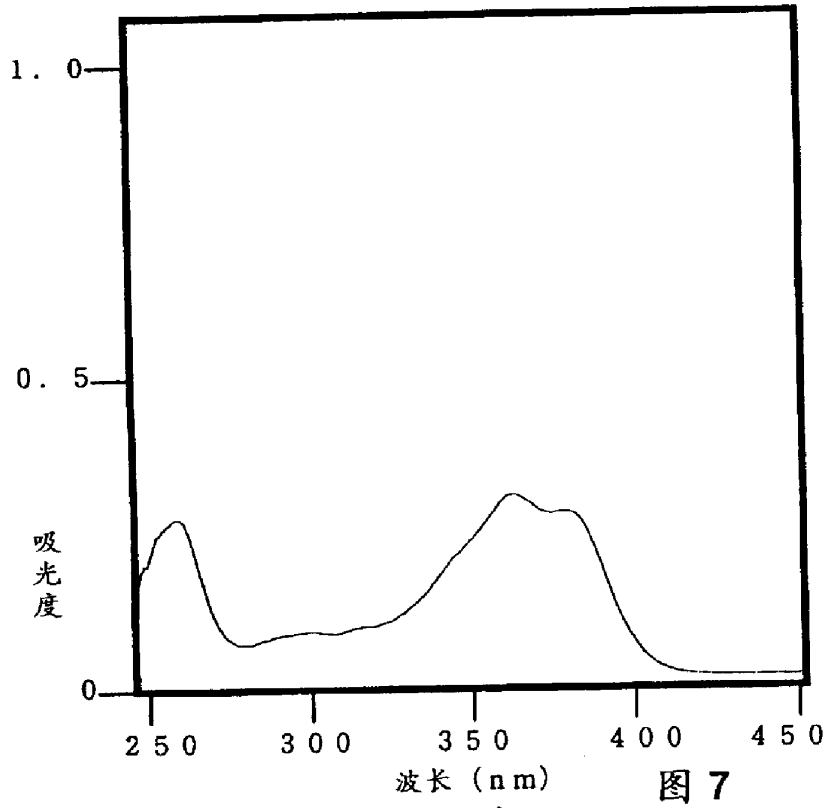

1．0
0．5
0
吸光度
250
300
350
400
450
波长（nm）

图 7

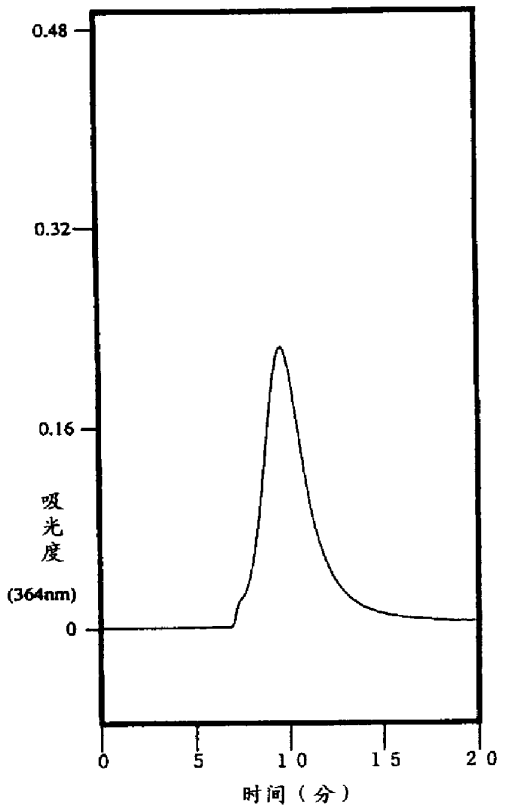

0.48
0.32
0.16
吸光度
(364nm)
0
0
5
10
15
20
时间（分）

图8

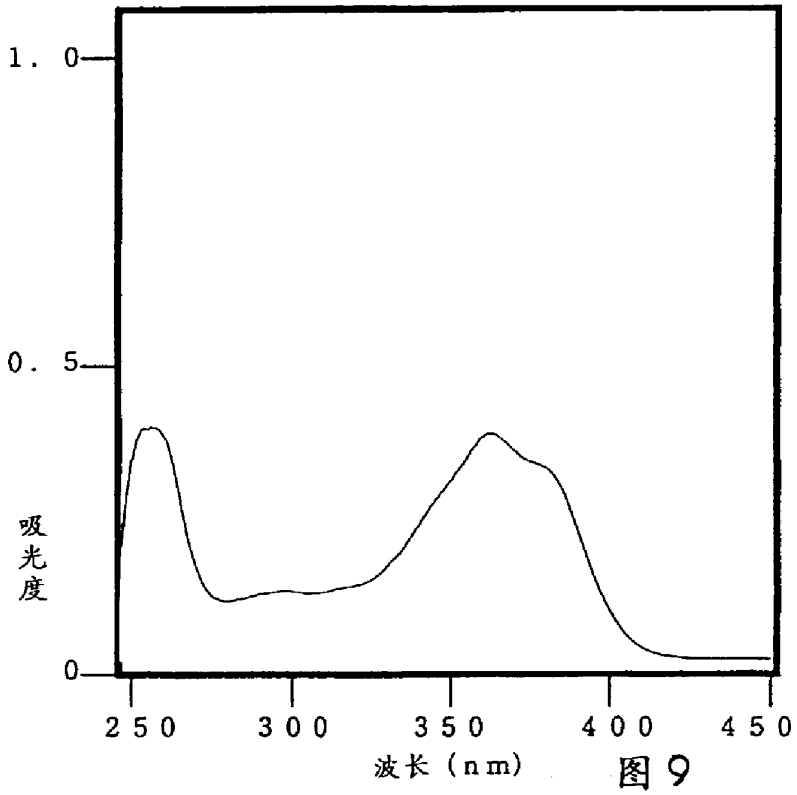

1.0
0.5
0
吸光度
250
300
350
400
450
波长（nm）

图9

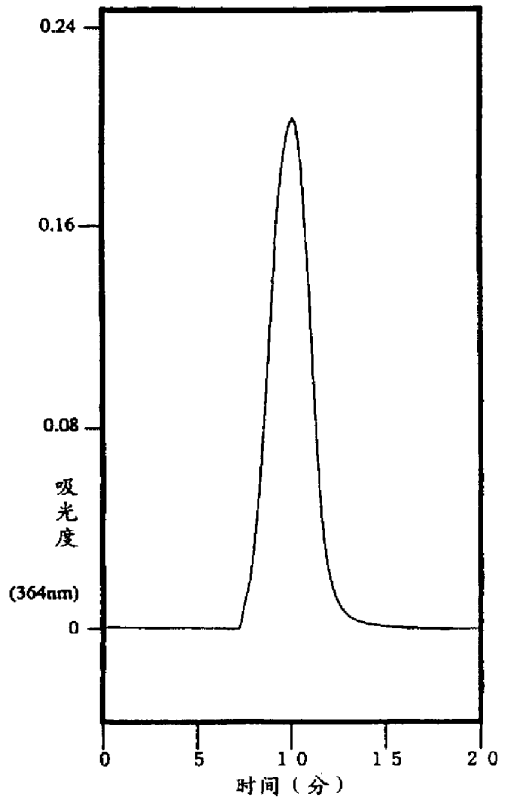

0.24
0.16
0.08
吸光度
(364nm)
0
0
5
10
15
20
时间（分）

图 10

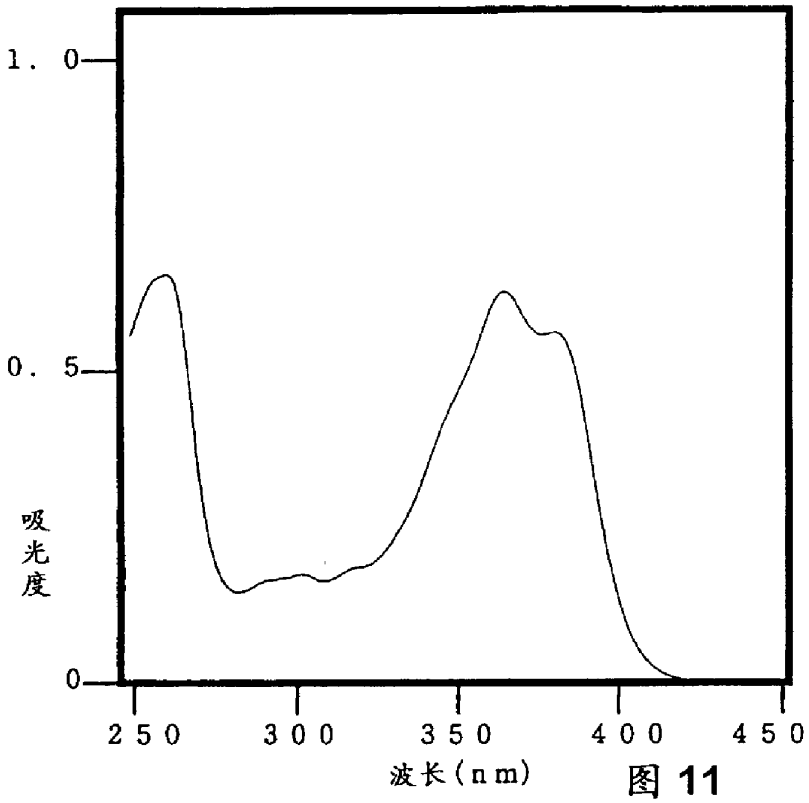

1．0
0．5
0
吸光度
250
300
350
400
450
波长(nm)

图 11

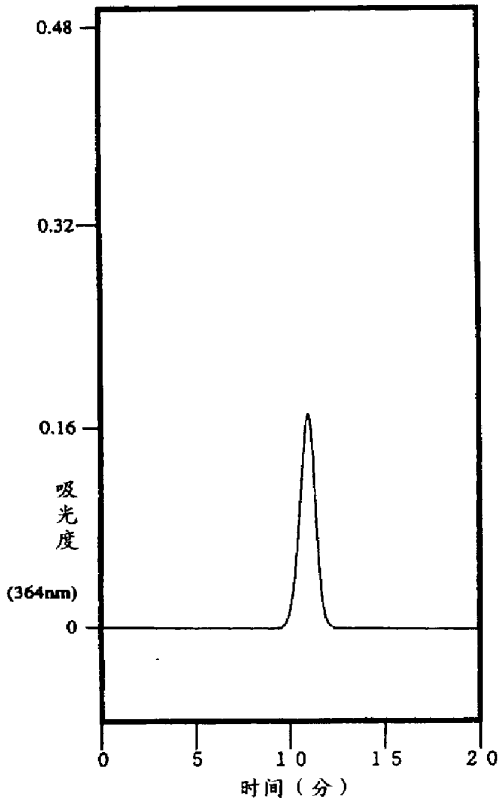

0.48
0.32
0.16
吸光度
(364nm)
0
0
5
10
15
20
时间（分）

图 12

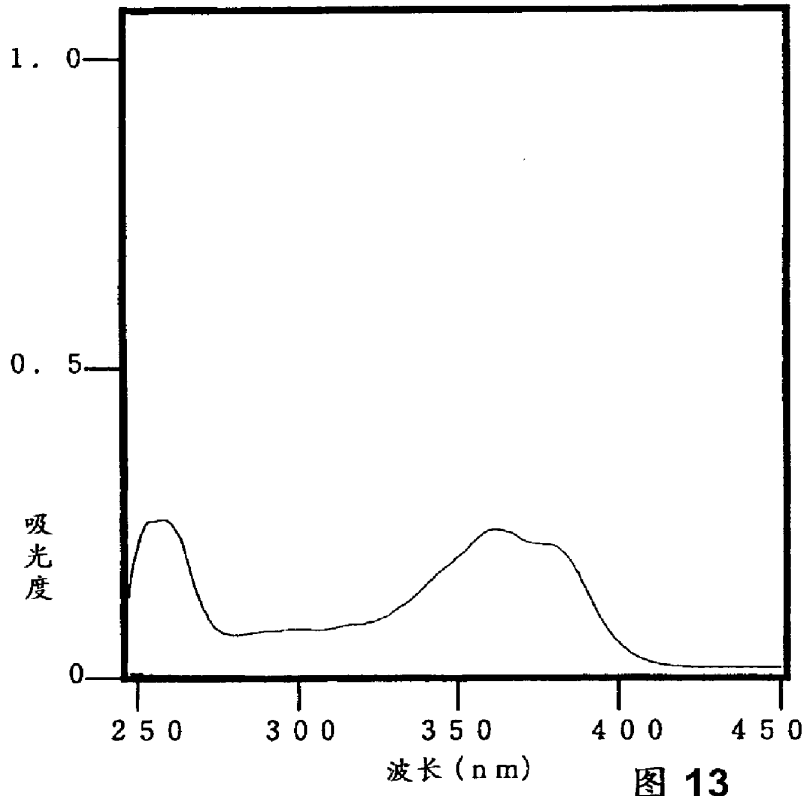

1．0
0．5
0
吸光度
250
300
350
400
450
波长（nm）

图 13

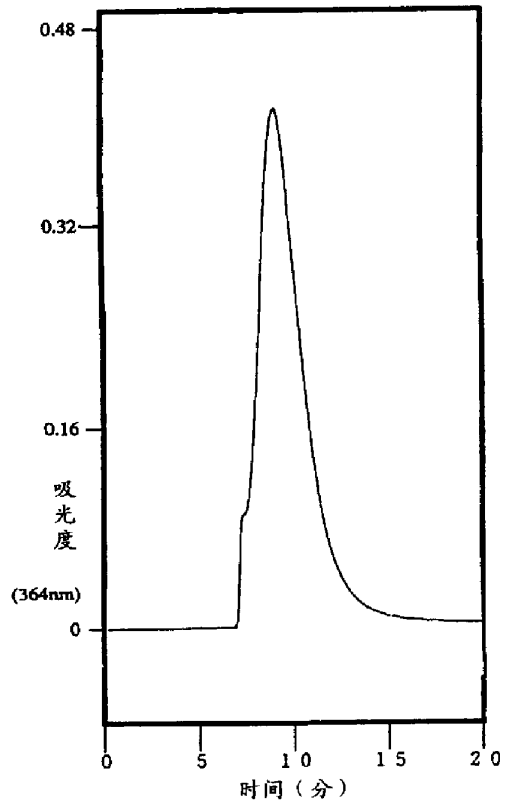

0.48
0.32
0.16
吸光度
(364nm)
0
0
5
10
15
20
时间（分）

图 14

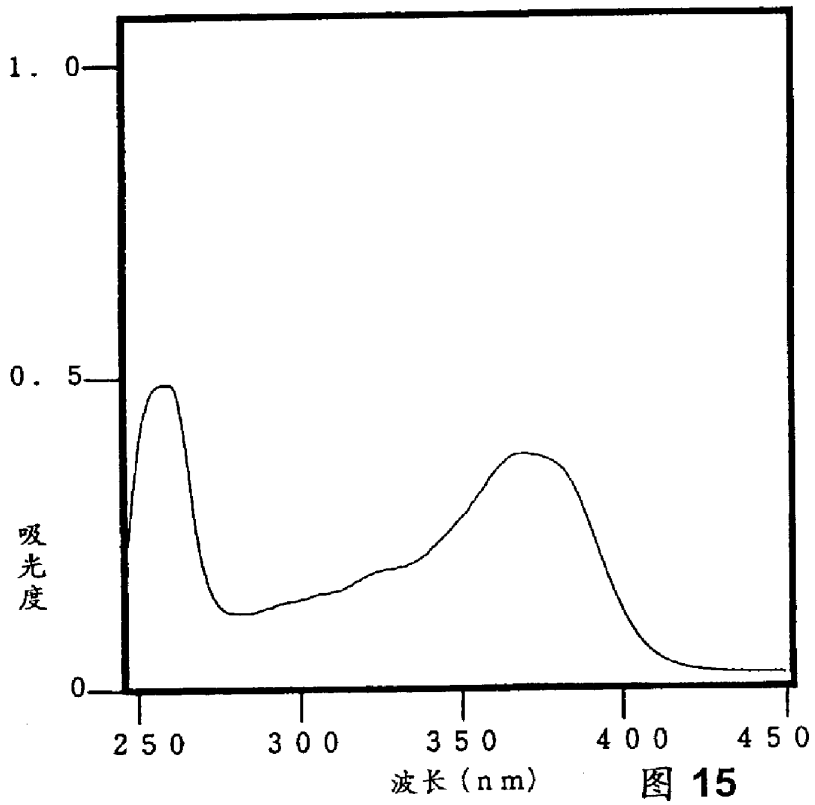

1．0
0．5
0
吸光度
250
300
350
400
450
波长（nm）

图 15

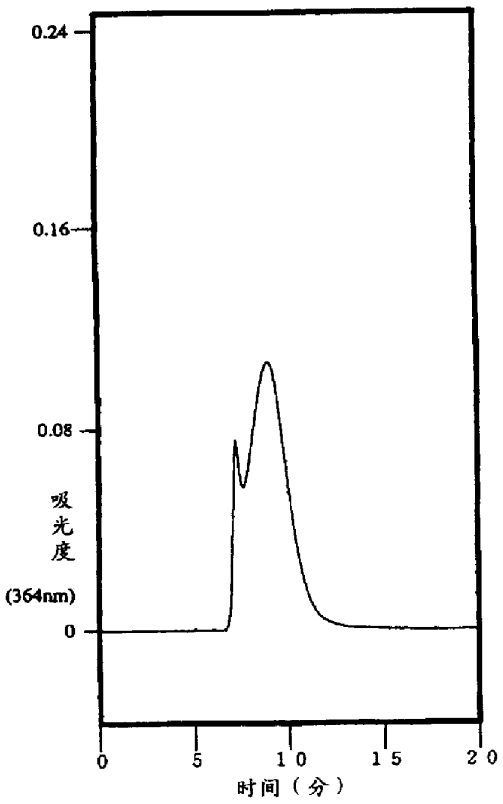

0.24
0.16
0.08
吸光度
(364nm)
0
0
5
10
15
20
时间（分）

图 16

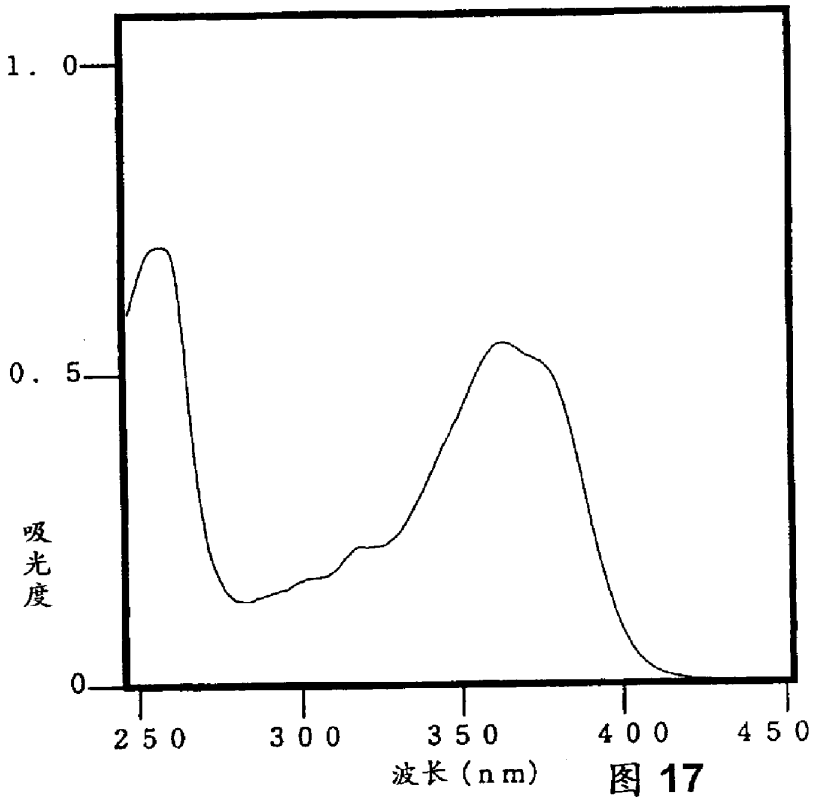

1．0
0．5
0
吸光度
250
300
350
400
450
波长（nm）

图 17

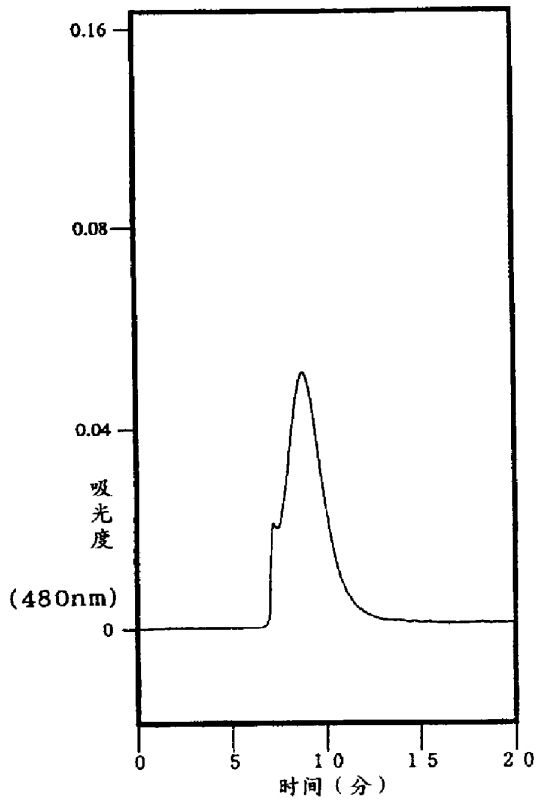

0.16
0.08
0.04
吸光度
(480nm)
0
0
5
10
15
20
时间（分）

图 18

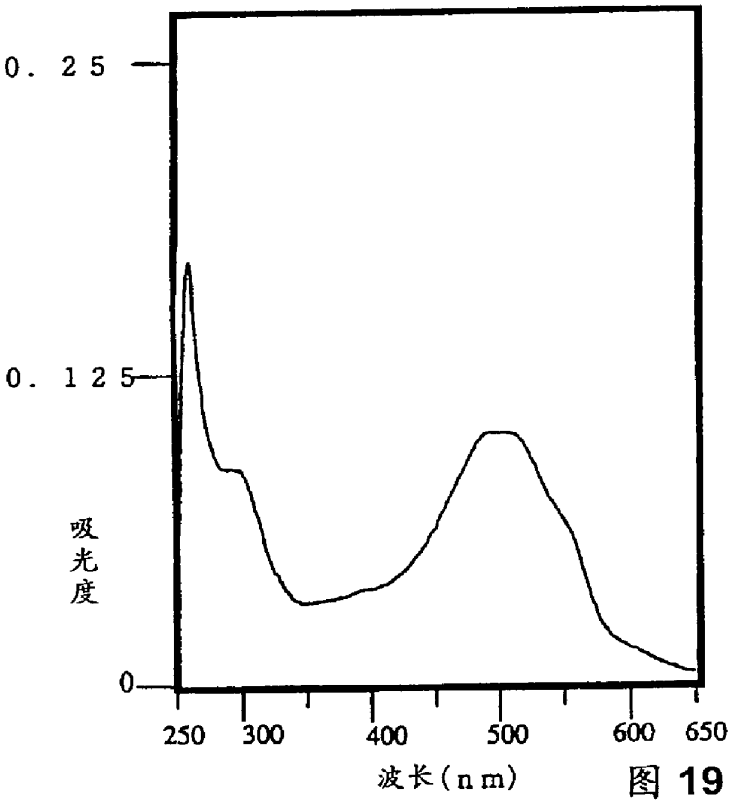

0.25
0.125
吸光度
0
250
300
400
500
600
650
波长(nm)

图 19

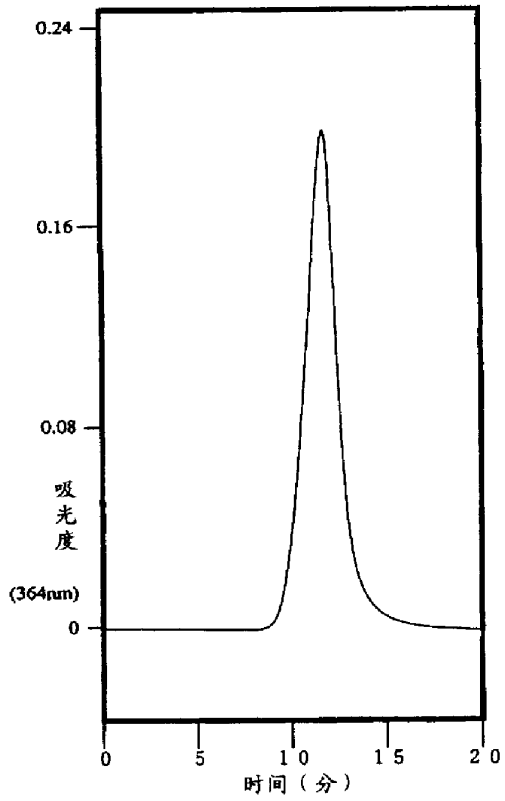

0.24
0.16
0.08
吸光度
(364nm)
0
0
5
10
15
20
时间（分）

图 20

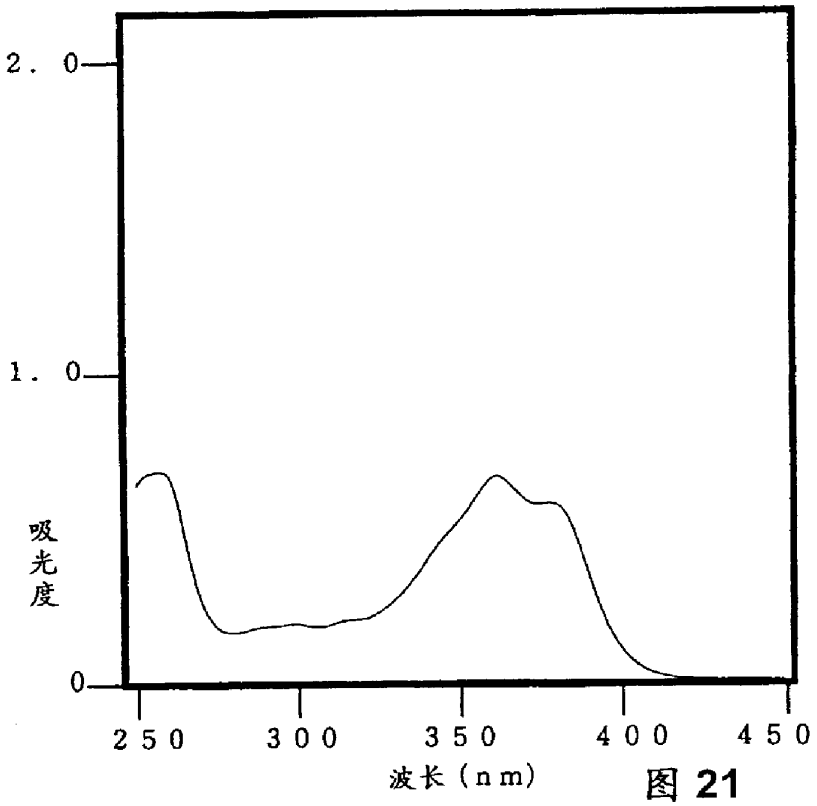

2．0
1．0
0
吸光度
250
300
350
400
450
波长（nm）

图 21

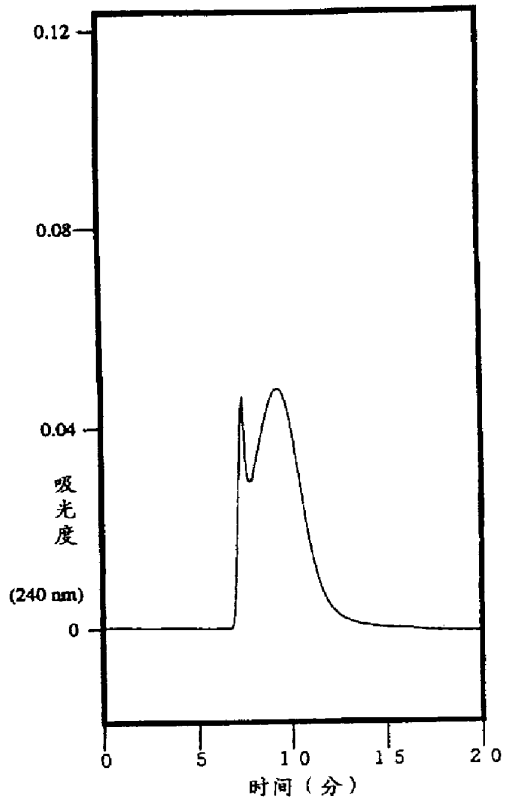

0.12
0.08
0.04
吸光度
(240 nm)
0
0
5
10
15
20
时间（分）

图 22

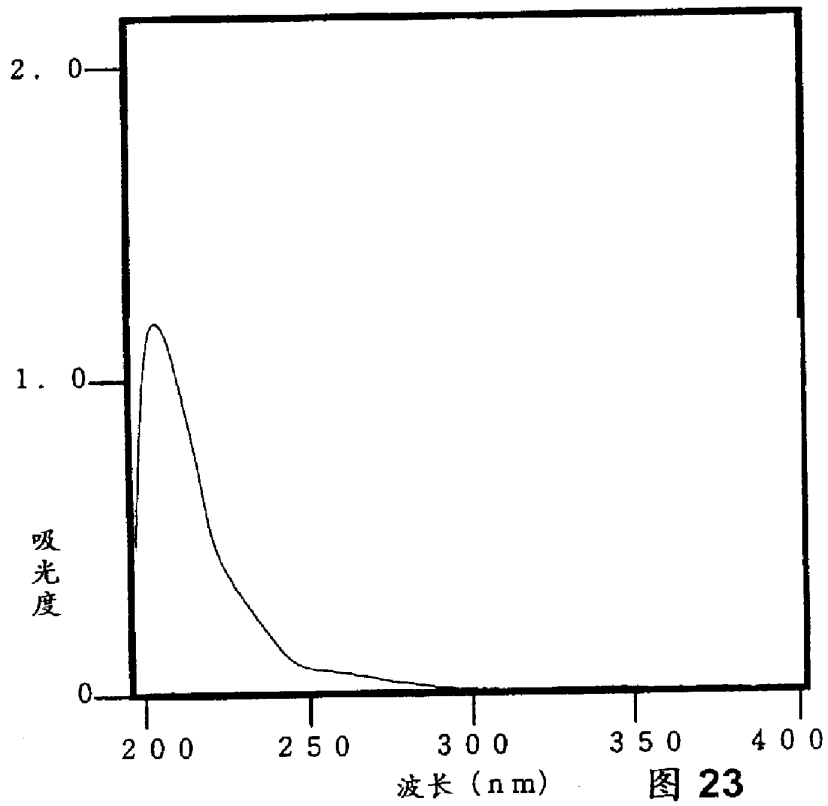

2．0
1．0
吸光度
0
200
250
300
350
400
波长（nm）

图 23

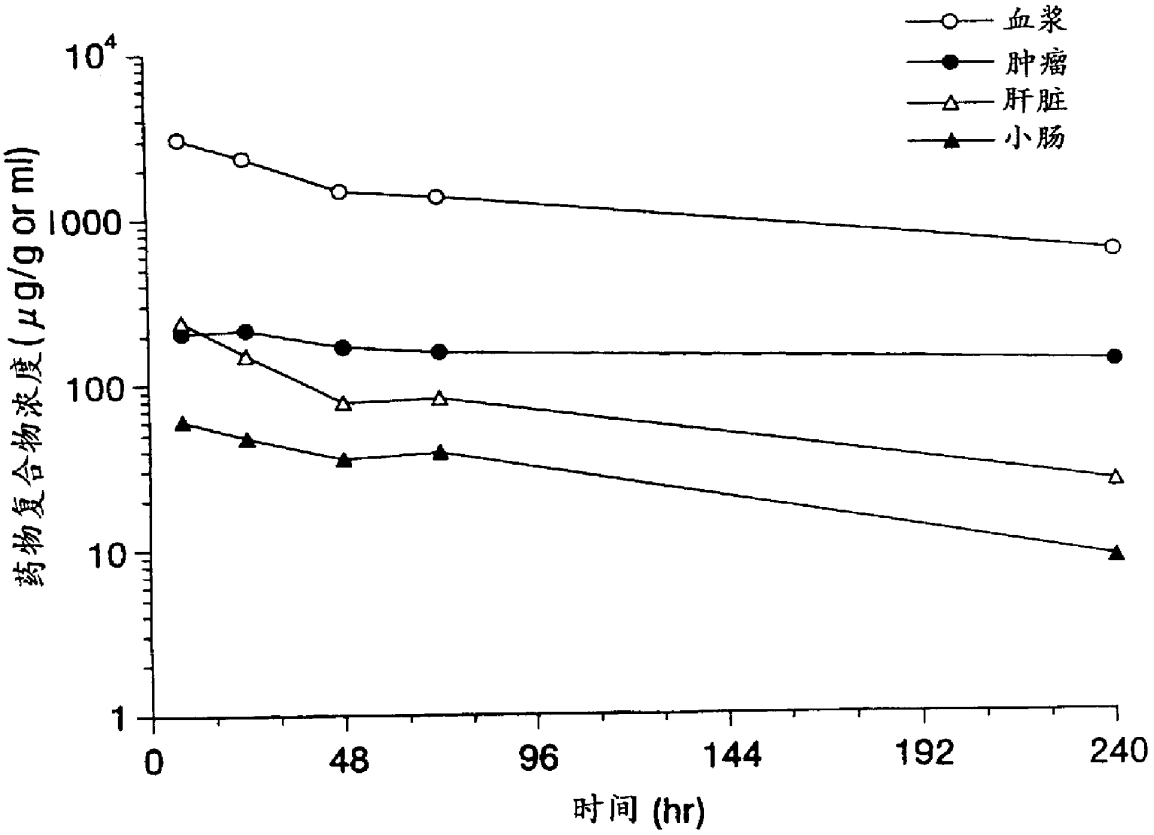

血浆
肿瘤
肝脏
小肠
药物复合物浓度(μg/g or ml)
10^4
1000
100
10
1
0
48
96
144
192
240
时间 (hr)

图 24

Espacenet

CN1764478A Anti-cancer anthracycline drug-antibody conjugates

Applicants: IMMUNOMEDICS INC [US]

Inventors: GRIFFITHS GARY L [US]

Classifications:
IPC ***A61K39/395; A61K47/48; C07K16/46;***

CPC **A61K39/395 (KR); A61K47/50 (KR); A61K47/6809 (EP); A61K47/6849 (EP); A61K47/6889 (EP); A61P35/00 (EP); A61P35/02 (EP); A61P37/02 (EP); A61P37/04 (EP); A61P43/00 (EP);**

Priorities: US2004001367W 2004-01-20; US44212503P 2003-01-24

Application: CN1764478A·2004-01-20

Publication: CN1764478A·2006-04-26

Published as: **AT500845T; AU2004207494A1; AU2004207494B2; AU2004207494C1; AU2009212806A1; AU2009212806B2; BRPI0406574A; CA2510664A1; CA2510664C;** CN1764478A;**CN1764478B; EP1594548A1; EP1594548B1; IL169769A; JP2006515892A; JP4805137B2; JP2011012083A; JP5501927B2; KR20050104354A; KR101053739B1; MXPA05007851A; PL378012A1; RU2005126717A; RU2349343C2; US2005271671A1; WO2004067038A1; US2004202666A1**

Anti-cancer anthracycline drug-antibody conjugates

Abstract

This invention involves the therapeutic conjugate with the ability to lead antigenically to various. The conjugate contains and leads antibodies or its antigen-binding fragments and anthracene ciclamicin chemotherapeutics. The targeting antibody is connected with the ciclamicin chemotherapeutics of anthracene through the piecing including hydrazide portion.

OnCusp
Ex. 1002

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
A61K 47/48 (2006.01)

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200480007880.X

[43] 公开日 2006 年 4 月 26 日

[11] 公开号 CN 1764478A

[22] 申请日 2004.1.20
[21] 申请号 200480007880.X
[30] 优先权
[32] 2003.1.24 [33] US [31] 60/442,125
[86] 国际申请 PCT/US2004/001367 2004.1.20
[87] 国际公布 WO2004/067038 英 2004.8.12
[85] 进入国家阶段日期 2005.9.23
[71] 申请人 免疫医疗公司
地址 美国新泽西州
[72] 发明人 G·L·格里菲思斯

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 李 波 刘 玥

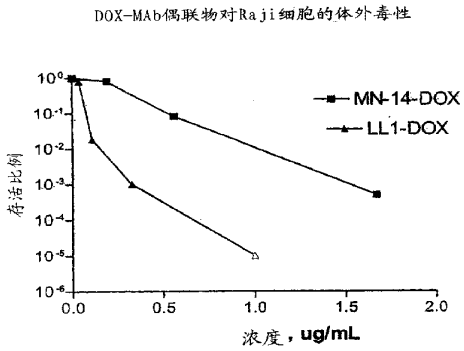
权利要求书 6 页 说明书 27 页 附图 5 页

[54] 发明名称

蒽环霉素 – 抗体偶联物

[57] 摘要

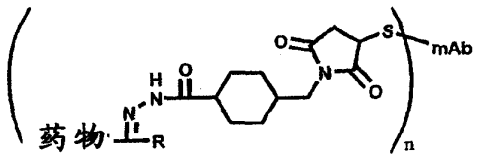
本发明涉及具有导向于各种抗原能力的治疗性偶联物。偶联物含有导向抗体或其抗原结合片段和蒽环霉素化疗药物。靶向抗体和蒽环霉素化疗药物通过包括酰肼部分的接头连接。



1. 蒽环霉素药物和抗体的偶联物，其中所述蒽环霉素药物和所述抗体通过包含酰肼和马来酰亚胺的接头连接。

2. 权利要求 1 的偶联物，其中所述接头是 4-（N-马来酰亚胺基甲基）环己烷-1-羧酰肼。

3. 具有下式的权利要求 1 的偶联物:



4. 权利要求 1 的偶联物，其中 mAb 针对肿瘤-相关抗原。

5. 权利要求 4 的偶联物，其中内化抗体导向于所述肿瘤-相关抗原。

6. 权利要求 1 的偶联物，其中所述偶联物导向于癌，肉瘤，淋巴瘤，白血病，神经胶质瘤或皮肤癌。

7. 权利要求 6 的偶联物，其中所述皮肤癌是黑素瘤。

8. 权利要求 4 的偶联物，其中所述肿瘤-相关抗原选自 CD74，CD22，EPG-1，CEA，结肠-特异性抗原-p 粘蛋白（CSAp），碳酸酐酶 IX，HER-2／neu，CD19，CD20，CD21，CD23，CD25，CD30，CD33，CD40，CD45，CD66，NCA90，NCA95，CD80，甲胎蛋白（AFP），VEGF，EGF 受体，P1GF，MUC1，MUC2，MUC3，MUC4，PSMA，GD2，GD3 神经节苷脂，HCG，EGP-2，CD37，HLA-D-DR，CD30，Ia，Ii，A3，A33，Ep-CAM，KS-1，Le（y），S100，PSA，肌腱蛋白，叶酸受体，Tn 和 Thomas-Friedenreich 抗原，肿瘤坏死抗原，肿瘤血管生成抗原，Ga 733，IL-2，MAGE，和它们的组合。

9. 权利要求 8 的偶联物，其中所述肿瘤-相关抗原选自 CD74，CD19，CD20，CD22，CD33，EPG-1，MUC1，CEA 和 AFP。

10. 权利要求 4 的偶联物，其中所述肿瘤-相关抗原包括 B-细胞，T-细胞，骨髓细胞的谱系抗原（CDs），或与血液恶性肿瘤相关的抗原。

11. 权利要求 1 的偶联物，其中所述抗体选自 LL1，LL2，L243，

C2B8，A20，MN-3，M195，MN-14，抗-AFP，Mu-9，PAM-4，RS7，RS11 和 17-1A。

12. 权利要求 1 的偶联物，其中所述接头连接抗体上的还原的二硫键。

13. 权利要求 1 的偶联物，其中所述蒽环霉素药物选自柔红霉素，阿霉素，表柔比星，2-吡咯啉阿霉素，吗啉代-阿霉素，和氰基吗啉代-阿霉素。

14. 权利要求 13 的偶联物，其中所述蒽环霉素药物通过 13-酮基部分与抗体连接。

15. 权利要求 12 的偶联物，其中所述还原的二硫键是抗体上的链间二硫键。

16. 权利要求 1 的偶联物，其中所述抗体是鼠抗体，嵌合抗体，灵长动物化抗体，人源化抗体，或人抗体。

17. 权利要求 16 的偶联物，其中所述抗体是 IgG 的片段。

18. 权利要求 16 的偶联物，其中所述抗体针对 B-细胞。

19. 权利要求 18 的偶联物，其中所述抗体针对选自 CD19，CD20，CD21，CD22，CD23，CD30，CD37，CD40，CD52，CD74，CD80，和 HLA-DR 的抗原。

20. 权利要求 19 的偶联物，其中所述抗体是 LL1，LL2，L243，C2B8，或 hA20。

21. 权利要求 1 的偶联物，其中每分子抗体有 6-10 个蒽环霉素药物分子。

22. 权利要求 1 的偶联物，其中抗体-蒽环霉素偶联物内化到靶细胞中。

23. 权利要求 22 的偶联物，其中抗体-蒽环霉素偶联物内化到靶细胞中，并且在细胞表面上再表达抗原。

24. 权利要求 1 的偶联物，其中抗体总的电荷没有改变。

25. 权利要求 1 的偶联物，其中蒽环霉素药物带有烷基化部分。

26. 权利要求 25 的偶联物，其中烷基化部分是烯胺。

27. 权利要求 26 的偶联物，其中蒽环霉素药物是 2-吡咯啉基-阿霉素。

28. 制备权利要求 1 的偶联物的方法，其中接头首先与蒽环霉素

药物偶联，从而产生蒽环霉素药物-接头偶联物，并且其中所述蒽环霉素药物-接头偶联物接着偶联硫醇-还原的单克隆抗体或抗体片段。

29. 权利要求 28 的方法，其中在与硫醇-还原的单克隆抗体或抗体片段 偶联之前不纯化蒽环霉素药物-接头偶联物。

30. 制备权利要求 1 的偶联物的方法，其中蒽环霉素药物上第二个反应性官能不受破坏。

31. 制备权利要求 1 的偶联物的方法，其中蒽环霉素药物上的烷基化基团不受破坏。

32. 制备权利要求 1 的偶联物的方法，其中所述蒽环霉素药物是2-吡咯啉基-阿霉素，吗啉代-阿霉素，或氰基吗啉代-阿霉素。

33. 一种治疗哺乳动物疾病的方法，包括施用权利要求 1 的抗体和蒽环霉素药物的偶联物。

34. 权利要求 33 的方法，其中所述哺乳动物是人。

35. 权利要求 33 的方法，其中抗体-药物偶联物是静脉内，腹膜内，动脉内，鞘内，膀胱内或肿瘤内给药。

36. 权利要求 33 的方法，其中抗体-药物偶联物是作为药团或输液给药。

37. 权利要求 33 的方法，其中抗体-药物偶联物是以反复和／或周期为基础给药。

38. 权利要求 33 的方法，其中哺乳动物患有癌症。

39. 权利要求 33 的方法，其中哺乳动物患有皮肤癌，头颈癌，肺癌，乳腺癌，前列腺癌，卵巢癌，子宫内膜癌子，宫颈癌，胃癌，结肠癌，直肠癌，膀胱癌，脑癌，胰腺癌，淋巴系统癌，肉瘤或黑素瘤。

40. 权利要求 33 的方法，其中哺乳动物患有 B-或 T-细胞癌。

41. 权利要求 40 的方法，其中哺乳动物患有非何杰金氏淋巴瘤，何杰金氏病，淋巴细胞白血病，髓细胞白血病，或多发性骨髓瘤 。

42. 权利要求 39 的方法，其中哺乳动物患有黑素瘤。

43. 权利要求 33－42 任一项的方法，其中抗体-蒽环霉素偶联物在其他标准治疗法之前、同时或之后施用。

44. 权利要求 43 任一项的方法，其中所述标准治疗法选自放射疗法，手术和化学疗法。

45. 一种治疗哺乳动物疾病的方法，包括施用导向于相同病变细胞上不同抗原或相同抗原的不同表位的抗体和蒽环霉素药物偶联物中的两种或多种。

46. 一种治疗哺乳动物疾病的方法，包括在第二种以抗体为基础的治疗之前、同时或之后施用抗体和蒽环霉素药物的偶联物，使得与偶联物中的抗体相比，第二抗体为基础的治疗中的第二抗体导向于病变细胞上的不同抗原或相同抗原的不同表位。

47. 权利要求 1 的偶联物，其中所述抗体是单克隆抗体。

48. 权利要求 1 的偶联物，其中所述抗体是抗体片段。

49. 权利要求 1 的偶联物，其中所述抗体是抗体融合蛋白。

50. 权利要求 49 的偶联物，其中所述抗体融合蛋白是多价的。

51. 权利要求 49 的偶联物，其中所述抗体融合蛋白是多特异性的。

52. 权利要求 49 的偶联物，其中所述抗体融合蛋白包括两个或多个相同或不同的天然的或合成的抗体，单链抗体或具有相同或不同特异性的抗体片段，其中所述抗体或抗体片段选自 LL1，LL2，M195，MN-3，RS7，17-1A，RS11，PAM-4，KC4，BrE3，MN-14，Mu-9，Immu31，CC49，Tn 抗体，J591，Le（y）抗体和 G250。

53. 一种在合适的容器中含有单克隆抗体和蒽环霉素药物的偶联物的试剂盒，其中所述蒽环霉素药物和所述抗体通过包含酰肼和马来酰亚胺的接头连接。

54. 权利要求 53 的试剂盒，其中在无菌容器中提供液体，冷冻或冻干形式的单克隆抗体-蒽环霉素药物偶联物。

55. 权利要求 54 的试剂盒，其中单克隆抗体-蒽环霉素药物偶联物被稀释或重新配制用于对患者给药。

56. 权利要求 43 的方法，进一步包括施用一种或多种免疫调节剂。

57. 权利要求 44 的方法，进一步包括施用一种或多种免疫调节剂。

58. 权利要求 45－46 任一项的方法，进一步包括施用一种或多种免疫调节剂。

59. 权利要求 56 的方法，其中所述免疫调节剂选自干扰素，细

胞因子，干细胞生长因子，集落-刺激因子，淋巴毒素和其他造血因子。

60. 权利要求 59 的方法，其中所述干扰素是α-干扰素，β-干扰素或γ-干扰素。

61. 权利要求 59 的方法，其中所述造血因子选自白介素，集落刺激因子，粒细胞巨噬细胞-集落刺激因子。

62. 权利要求 61 的方法，其中所述白介素选自 IL-1，IL-2，IL-3，IL-6，IL-10，IL-12，IL-18，和 IL-21。

63. 权利要求 59 的方法，其中所述造血因子选自红细胞生成素，血小板生成素，G-CSF 和 GM-CSF。

64. 权利要求 59 的方法，其中所述免疫调节剂或造血因子在免疫偶联物治疗之前，期间或之后施用。

65. 权利要求 59 的方法，其中所述免疫调节剂增强所述偶联物的效力。

66. 权利要求 57 的方法，其中所述免疫调节剂选自干扰素，细胞因子，干细胞生长因子，集落-刺激因子，淋巴毒素和其他造血因子。

67. 权利要求 66 的方法，其中所述干扰素是α-干扰素，β-干扰素或γ-干扰素。

68. 权利要求 66 的方法，其中所述造血因子选自白介素，集落刺激因子，粒细胞巨噬细胞-集落刺激因子。

69. 权利要求 68 的方法，其中所述白介素选自 IL-1，IL-2，IL-3，IL-6，IL-10，IL-12，IL-18，和 IL-21。

70. 权利要求 66 的方法，其中所述造血因子选自红细胞生成素，血小板生成素，G-CSF 和 GM-CSF。

71. 权利要求 66 的方法，其中所述免疫调节剂或造血因子在免疫偶联物治疗之前，期间或之后施用。

72. 权利要求 66 的方法，其中所述免疫调节剂增强所述偶联物的效力。

73. 权利要求 58 的方法，其中所述免疫调节剂选自干扰素，细胞因子，干细胞生长因子，集落-刺激因子，淋巴毒素和其他造血因子。

74. 权利要求 73 的方法，其中所述干扰素是α-干扰素，β-干扰素或γ-干扰素。

75. 权利要求 73 的方法，其中所述造血因子选自白介素，集落刺激因子，粒细胞巨噬细胞-集落刺激因子。

76. 权利要求 75 的方法，其中所述白介素选自 IL-1，IL-2，IL-3，IL-6，IL-10，IL-12，IL-18，和 IL-21。

77. 权利要求 73 的方法，其中所述造血因子选自红细胞生成素，血小板生成素，G-CSF 和 GM-CSF。

78. 权利要求 73 的方法，其中所述免疫调节剂或造血因子在免疫偶联物治疗之前，期间或之后施用。

79. 权利要求 73 的方法，其中所述免疫调节剂增强所述偶联物的效力。

80. 一种蒽环霉素药物和抗体的偶联物，其中所述蒽环霉素药物和所述抗体通过包含酰肼和马来酰亚胺的接头连接，并且其中免疫调节剂进一步与所述抗体偶联。

蒽环霉素-抗体偶联物

发明领域

本发明涉及具有导向于各种抗原能力的治疗性偶联物（conjugate）。所述偶联物包含导向部分和化学治疗药物。导向部分和化学治疗药物通过含有细胞内可裂解部分的接头连接。

发明背景

很多年来，能用于向人类癌症特异性送递化疗药物的抗体一直是特异性导向的药物治疗领域的科学家们的一个目标。这个目标的实现最终可以给癌症化学疗法带来魔力弹这个概念。朝着这个目标的显著进展随着 1975 年 Kohler 和 Milstein 的杂交瘤技术的出现，以及接之而来的制备单克隆抗体（mAbs）的能力而发展。在过去 25 年间，已经制备出抗癌细胞上过量表达的很多抗原靶的 mAbs。针对药物、毒素、放射性核素或其他治疗剂本身，或者它们的偶联物，已经临床前，并且随后临床上试验了很多 mAbs 。一般情况下，mAbs 本身，经常称作“裸 mAbs”，对于患有实体肿瘤的患者以长期存活标准看还没有成功，虽然最近用抗乳腺和结肠癌的 mAb 治疗已经看到存活优势（分别抗 HER2-neu 和 17-1A 的 mAbs）。对于血液恶性肿瘤，使用裸 mAbs，特别是抗 B-细胞淋巴瘤（抗 B-细胞表面上 CD20 和 CD22 的 mAbs）实现更大程度成功。

然而，显然，使用肿瘤-相关 mAbs 和合适的毒性剂的偶联物比抗大多数临床癌症病例的裸 mAbs 更有效。这里，mAb 还载有对于病变组织是特异性的毒性剂，除了毒性之外，其本身固有 mAb 的 Fc 部分提供的天然或重组工程效应物功能，例如补体固定和 ADCC（抗体依赖细胞毒性），其设置作用机理导致细胞溶解作用。然而，有可能 Fc 部分对于治疗功能不是必需的，在 mAb 片段情况下，其他机理，例如细胞凋亡，抑制血管生成，抑制转移活性，和／或影响肿瘤细胞粘附，可能起作用。毒性剂最常是化疗药物，发射粒子的放射性核素，或者细菌或植物毒素。各种偶联物类型有着它自己特定优点。穿透性放射性核素和细菌和植物毒素是十分有毒的，其毒性通常比标准化疗药物高

几个数量级。这使得前两者可以与 mAbs 一起使用，因为在临床情形中，摄入到疾病组织中的 mAbs 量非常低。临床实践中低的 mAb 肿瘤摄入和癌症化疗药物相对低毒性谱的联合，是为什么 mAb-药物偶联物迄今为止不能做到承诺的主要原因。

在为研究人癌症而建立的临床前动物异种移植模型中，描述过能竞争性消退甚至治愈动物肿瘤的很多 mAb 偶联物。然而，在很多这样的动物异种移植模型中，肿瘤摄入 mAb 偶联物经常是每克组织 10-50% 注射剂量，而在临床情形下，每克组织肿瘤摄入 0.1-0.0001 %注射剂量更正常。意料之中的是 用更具有毒性的放射性核素和毒素制备的 mAb 偶联物临床上一般比用标准化疗药物制备的相应的 mAb-药物偶联物远远要好。然而，放射性核素 mAb 偶联物由于与肿瘤定位活性相比大大过量的循环的衰变的放射性的存在经常能产生大的毒性。毒素-mAb 偶联物有着双重缺点：大的非靶组织损伤和大的对一般使用的植物或细菌蛋白质的免疫反应性。而现在能制备人或人源化形式的（互补决定区移植的）mAbs，任何偶联物的毒性部分的去免疫作用可能显著阻碍进步。

虽然目前可看到临床研究中没有必然的效力，但是 mAb-药物偶联物仍然具有令人感兴趣的理论优点。药物本身结构是完全确定的，不以异构体存在，并且通常在远离 mAbs 的抗原结合区的特定位点的非常确定的偶联化学，可以与 mAb 蛋白连接。与涉及 Abs 和毒素的化学偶联物相比，MAb-药物偶联物制备更具有可重复性，因此更有商业发展前途并且容易获得管理批准。因为这样的原因，尽管碰到挫折，但是对 mAb 药物偶联物的兴趣持续不断。但是，在最近的一些情况下，临床前结果已经相当有希望 。在偶联化学中继续精益求精，最新考虑了去除或减少 mAb 的免疫原性质的能力，考虑到有用的 mAb-药物偶联物对于临床癌症治疗的难以捉摸的前景。

对 mAb-药物偶联物的相关早期工作发现，在使用化学键的体外和体内临床前试验期间经常导致药物效力的损失。因此，很多年以前就认识到，理想地，一旦通过 mAb 成分被靶细胞内化，为了成为有用的治疗，药物需要以它原来的形式释放。然后上世纪八十年代和九十年代早期焦点大都集中在药物和 mAb 之间化学接头的性质上。尤其是，根据肿瘤中的 pH 经常低于正常生理 pH 的发现，开发了使用温和的

酸可裂解的接头制备的偶联物（美国专利 Nos. 4，542，225; 4，569，789; 4，618，492 ; 和 4，952，394）。这项研究在 Trail 等的划时代文章中达到顶峰（Science 261 : 212-215（1993）），这篇文章证明，临床前研究中，用合适的接头制备的 mAb-阿霉素（DOX）偶联体能用来治愈携带各种人肿瘤异种移植物的小鼠。使用在被导向的肿瘤细胞上有非常大量的受体的抗体（称作 BR96）实现这个有希望的结果，mAb-药物偶联物被高度取代（每个 mAb 单位 6-8 个 DOX 残基），以反复为基础，以大剂量施用偶联物。

在临床情形中，肿瘤对 mAbs 的摄入非常低，因为这个变量在某种程度上是寻址的更有毒性的药物，需要实现期望的治疗效果。在几种不同的 mAb-药物偶联物的开发中使用更有毒性的药物（美国专利 Nos. 5，208，020; 5，416，064; 5，877，296;和 6，015，562）。这些努力使用药物，例如 maytansinoids 和 calicheamicin 的衍生物，它们本质上太有毒性不能在标准化疗中使用。 与 mAb 的偶联使得相对于单独化疗可见到的经常是非特异性的细胞和蛋白质结合，相对更多的药物被导向于肿瘤。由于肿瘤靶上通常可见的低水平抗原结合位点，象这些的药物的敏锐毒性可能会克服临床上见到的肿瘤-定向的 mAb 的低水平。在临床前研究中，在比先前用标准药物例如 DOX，用 mAb-药物偶联物见到的相比低得多的 mAb-药物偶联物剂量，见到携带人肿瘤异种移植物的小鼠的治愈（Liu 等，Proc. Natl. Acad. Sci. USA93 : 8616-8623（1996）和 Hinman 等，Cancer Res. 53 : 3336-3342（1993））。在 maytansinoid-mAb 偶联物情况下（Liu），治疗所需要的偶联物的量比以前用 DOX 偶联物（Trail，上文）需要的少 50 倍以上。

在这些偶联物的开发中，认为药物和 mAb 之间的接头对于体外和体内保留好的抗肿瘤活性是决定性的。用分子内可裂解部分（腙）和药物和 mAb 之间的易发生还原的键（二硫键）制备所述偶联物。体内血清条件下腙键显然是稳定的，发现二硫键对于实际使用通常不足够稳定。在 calicheamicins 情况下，以位阻大的（成对二甲基）二硫键置换标准二硫键而制备偶联物，或者在 maytansinoids 情况下用甲基二硫键置换标准二硫键而制备偶联物。进行这项工作时，对较新的蒽环霉素-取代的 mAb 偶联物继续分离工作。在较新的 DOX 偶联 mAbs 情况下，发现通过仅插入腙作为可裂解单元，并且通过硫醚键而不是

二硫键连接 DOX 和 mAb，获得卓越结果（美国专利 No. 5，708，146）。当以相同的方式连接时，还使用能使每个 Mab 取代位点 DOX 单元数目加倍的支化接头，获得新的 DOX-Mab 偶联物效力增加近一个数量级（King 等，Bioconjugate Chem. 10:279-288，(1999)）。

发明概述

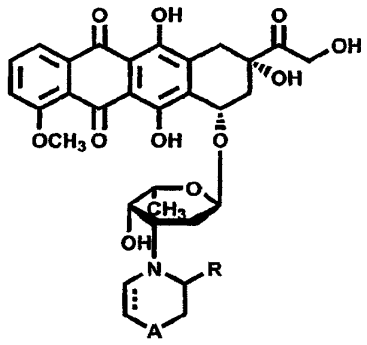
本发明涉及蒽环霉素药物的新的内化抗体偶联物。具体实施方案举例来说是阿霉素（DOX），表柔比星，吗啉代阿霉素（吗啉代-DOX），氰基吗啉代-阿霉素（氰基吗啉代-DOX），和 2-吡咯啉基（pyrrolino）-阿霉素（2-PDOX）的偶联物。 2-PDOX 是特别有毒的，其结构中插入烯胺，其不仅作为嵌入剂和拓扑异构酶起作用，而且还作为具有增加的毒性的烷化剂。和 DOX 一样，2-PDOX 具有相对好的水溶性，这意味着其能以多取代量偶联 mAbs 而不沉淀 mAb。下面详细描述的药物始终以每 mAb 分子 8 个药物部分的平均水平（典型地测得 7－9）被取代。但是药物的数目也可以是每 mAb 分子 6－10 个分子之间的范围。

一方面，本发明涉及一种免疫偶联物，包括导向部分，蒽环霉素药物，和通过巯基结合导向部分并且通过分子内可裂解部分结合蒽环霉素化疗药物的接头。

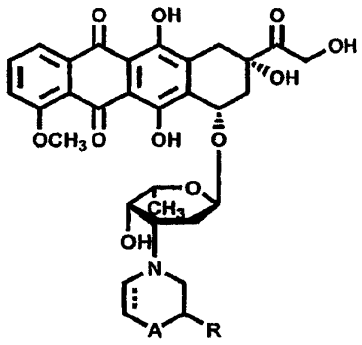
在本发明优选的实施方案中，导向部分是 mAb，蒽环霉素化疗药物是 DOX，2-PDOX，吗啉代-DOX 和吗啉代氰基-DOX，并且分子内可裂解部分是腙。

另一方面，本发明涉及一种免疫偶联物，包括导向于疾病的抗体和蒽环霉素化疗药物。近 30－40 年左右已经合成几百种蒽环霉素药物例子，在别处对它们进行了详细讨论（参见：Anthracycline Antibiotics；New Analogs，methods of Delivery，and Mechanisms of Action，Waldemar Priebe，Editor，ACS Symposium Series 574，American Chemical Society，Washington DC，1994）。认为这样的类似物在本发明的范围内。

在优选的实施方案中，本发明涉及一种免疫偶联物，包括导向于疾病的抗体和式 I 和 II 的蒽环霉素化疗药物：



(I)



(II)

其中，A 不存在或者其可以选自 NH，N-烷基，N-环烷基，O，S，和 CH_2；虚线表示单键或双键；并且 R 是 H 或 CN；接头通过硫化物基团结合导向部分，而通过分子内可裂解部分结合蒽环霉素化疗药物。当 A“不存在”时，通过单键连接每一侧与 A 邻接的碳原子，这样得到五元环。

如这里使用的，“烷基”指饱和脂肪烃基，包括 1－20 碳原子的直链和支链基团当本文中提到数字范围，如“1-20”，意思是在这种情况下烷基可以含有 1 个碳原子，2 个碳原子，3 个碳原子，等，至多包括 20 个碳原子）。含有 1－4 个碳原子的烷基称作低级烷基。更优选地，烷基是具有 1－10 个碳原子的中等大小烷基，例如，甲基，乙基，丙基，2-丙基，正丁基，异丁基，叔丁基，戊基等等。最优选地，它是具有 1－4 个碳原子的低级烷基，例如甲基，乙基，丙基，2-丙基，正丁基，异丁基，或叔丁基，等等。

如这里使用的，“环烷基”指 3－8 元全碳单环，全碳 5-元/6-元或 6-元/6-元稠合双环或多环稠合环（“稠合”环体系意思是体系中的每一个环与体系中另外一个环共有相邻的碳原子对）基团，其中环中的一个或多个可以含有一个或几个双键，但是所有环都没有完全偶联的 pi-电子体系。环烷基的例子不限于环丙烷，环丁烷，环戊烷，环戊烯，环己烷，环己二烯，金刚烷，环庚烷，环庚三烯等等。 环烷基可以被取代或不被取代。

在另一个优选实施方案中，分子内可裂解部分是腙。

在优选实施方案中，mAb 是导向于肿瘤-相关抗原的 mAb。肿瘤-相关抗原定义为以比正常细胞中更高的量由肿瘤细胞或者它们的脉管

系统表达的抗原，其中正常细胞对于患者生存所必需的细胞功能是重要的。肿瘤-相关抗原也可以是与不同正常细胞相关的抗原，例如造血细胞，B-细胞，T-细胞或骨髓细胞中的谱系抗原，从而患者能生存，伴有所述正常细胞暂时的选择性减少，而表达相同抗原的恶性细胞被足够破坏，以减轻患者症状并且还改善患者状况。mAb 还可以与血液恶性肿瘤相关的抗原反应。

在另一个实施方案中，mAb 选自 B-细胞，T-细胞，骨髓-细胞，和其他造血细胞-相关抗原，例如 B-细胞中的 CD19，CD20，CD21，CD22，CD23;骨髓细胞中的 CD33，CD45，和 CD66; T-细胞中的 IL-2（TAC 或 CD25）; 不同造血肿瘤类型中的 MUC1，肌腱蛋白，CD74，HLA-DR，CD80; 各种癌中的 CEA，CSAp，MUC1，MUC2，MUC3，MUC4，PAM4，EGP-1，EGP-2，AFP，HCG，HER2/neu，EGFR，VEGF，P1GF，Le（y），碳酸酐酶 IX，PAP，PSMA，MAGE，S100，肌腱蛋白，和 TAG-72，神经胶质瘤中的肌腱蛋白，和脉管系统和内皮细胞，以及一些肿瘤的支持性基质表达的抗原。

在另一个优选的实施方案中，mAb 选自 LL1（抗-CD74），LL2（抗-CD22），hA20 和利妥希玛（抗-CD20），M195（抗-CD33），RS7（抗-上皮糖蛋白-1（EGP-1）），17-1A（抗-EGP-2），PAM-4，BrE3，和 KC4（都是抗-MUC1），MN-14（抗-癌胚抗原（CEA）），Mu-9（抗-结肠-特异性抗原-p），Immu 31（抗甲胎蛋白），抗-TAG-72（例如，CC49），抗-Tn，J591（抗-PSMA），BC-2（抗-肌腱蛋白抗体）和 G250（抗-碳酸酐酶 IX mAb）。 使用这些偶联物可以定向的其他有用的抗原包括 HER-2/neu，CD19，CD20（例如，C2B8，hA20，cA20，1F5 Mabs）CD21，CD23，CD33，CD40，CD80，甲胎蛋白（AFP），VEGF，EGF 受体，P1GF（胎盘生长因子），ILGF-1（胰岛素样生长因子-1），MUC1，MUC2，MUC3，MUC4，PSMA，神经节苷脂，HCG，EGP-2（例如，17-1A），CD37，HLA-DR，CD30，Ia，Ii，A3，A33，Ep-CAM，KS-1，Le（y），S100，PSA，肌腱蛋白，叶酸受体，Thomas-Friedenreich 抗原，肿瘤坏死抗原，肿瘤血管生成抗原，Ga 733，IL-2（CD25），T101，MAGE，CD66，CEA，NCA95，NCA90 或其组合。

在特别优选的实施方案中，导向性 mAb 针对随后被抗体快速内化的表面抗原。

在特别优选的实施方案中，导向性 mAb 针对 CD74 的表面抗原。

在另一个优选的实施方案中，接头是 4-[N-马来酰亚胺基甲基]环庚烷-1-羧酰肼基。

本发明还描述了制备本发明的组合物的方法，以及所述组合物的使用方法。

附图的简要描述

图 1 是利用描述的方法制备的蒽环霉素-抗体偶联物的代表性大小排阻 HPLC 谱图。

图 2 详细描述 1 微克／毫升药物-mAb 偶联物浓度的抗 Burkitt 淋巴瘤 Raji 细胞的 DOX-LL1 偶联物与非导向性 MN-14 抗体的 DOX 偶联物相比的体外效力。DOX-LL1 偶联物与 DOX-MN-14 偶联物相比，表现出存活细胞级分中三个数量级的差异。

图 3 详细说明裸鼠 DU145 前列腺异种移植物模型中单一 100 微克剂量的 2-PDOX-RS7 偶联物的效力。

图 4 详细说明侵袭性 RAJI/SCID 小鼠全身肿瘤模型中单一剂量的 LL1 抗体的 2-PDOX-和 DOX-偶联物的效力。对动物 i. v. 注射 Raji B-细胞淋巴瘤细胞，并且五天后用图中指定的偶联物治疗。

图 5 详细说明侵袭性 RAJI/SCID 小鼠全身肿瘤模型中单一剂量的 2-PDOX-LL1 抗体与不施用偶联物的未处理对照或者给与非导向性对照偶联物 2-PDOX-MN-14 的动物组相比的效力。

优选实施方案的详细描述

除非另有说明，如这里使用的，“一个”意思是“一个或多个”。

导论

化疗药物，例如上面讨论的那些，能通过几种方法与抗体偶联，形成 mAb-药物偶联物。例如，化疗药物可以在还原 mAb 链间二硫键之后与 mAb，或其片段连接。这种方法产生每个抗体分子平均 8－10 个（取决于 IgG 类型）游离巯基，并且以在还原反应中使用的硫醇的有限水平以可重复方式这样做。这种化疗药物的连接方法是有利的，由于下面的原因：首先，在亲水性赖氨酸残基上没有暴露的 mAb 或其片段上内部或半内部位点中放置连接的化疗药物。由于 mAb 的放置了化疗药物的更多的疏水性区域而使它们保持更稳定。第二，这样的位点不改变 mAb 或其片段的总电荷。第三，当使用 mAb 裸形式时，内部硫醇的放置较不可能干扰特别重要的 ADCC 和补体作用 。因此，选择不

干扰的连接位点，使得 ADCC 和补体固定，能与 mAbs，或 mAb 片段互补，起药物送递载体作用。第四，与暴露的赖氨酸基团上放置多个化疗药物分子相比，内部硫醇位置的放置较不可能导致对化疗药物的免疫反应。在一些实施方案中，与偶联前抗体电荷相比，Ab-药物偶联物中抗体的总电荷不改变。这是因为在偶联反应中没有利用赖氨酸残基，因此，没有游离的带正电荷的氨基被修饰形成例如中性酰胺键。

抗体

如这里描述的，抗体指全长（即，天然存在的或者正常免疫球蛋白基因片段重组方法形成的）免疫球蛋白分子（例如，IgG 抗体）或免疫球蛋白分子的免疫活性（即，特异性结合）部分，象抗体片段。

抗体片段是抗体的一部分，例如 F（ab′）$_2$，F（ab）$_2$，Fab′，Fab，Fv，scFv（单链 Fv）等。不考虑结构，抗体片段结合完整抗体识别的相同的抗原，因此，它是抗体的一部分的抗原结合片段。

术语“抗体片段”还包括通过与特异抗原结合形成复合体的象抗体一样作用的任何合成的或基因工程蛋白质。例如，抗体片段包括可变区构成的分离的片段，例如由重链和轻链可变区构成的“Fv”片段，其中重链和轻链可变区通过肽接头连接的重组单链多肽分子(“scFv 蛋白质”)，和由模拟超变区的氨基酸残基构成的最小识别单位。可以以不同方法构建 Fv 片段，得到多价和／或多特异性结合形式。多价结合形式与抗特异性表位的一个以上结合位点反应，而多特异形式与一个以上表位（抗原的或甚至抗特异性抗原和不同抗原）结合。

根据这里讨论的，术语抗体融合蛋白是重组产生的抗原-结合分子，其中具有相同或不同特异性的相同或不同天然抗体，单链抗体或抗体片段中的两个或多个被连接。融合蛋白至少包括一个特异性结合位点。

融合蛋白的价指融合蛋白具有抗原或表位结合臂或位点的总数；即单价，二价，三价或多价。抗体融合蛋白的多价意思是它利用了与抗原结合中多个相互作用的优点，从而提高了与抗原结合或与不同抗原结合的亲合力。特异性指抗体融合蛋白能结合多少不同类型的抗原或表位；即单特异性，二特异性，三特异性或多特异性。使用这些定义，天然抗体，例如 IgG，是二价的，因为它具有两个结合臂，但是是单特异性的，因为它结合一种类型的抗原或表位。单特异性多价融

合蛋白对于相同的抗原或表位有一个以上结合位点。例如，单特异性二价抗体是具有与相同抗原反应的两个结合位点的融合蛋白。融合蛋白可以包括不同抗体成分或相同抗体成分的多个拷贝的多价或多特异性组合。

在本发明优选的实施方案中，使用抗体，例如单克隆抗体（mAbs），和快速内化抗体，以识别或结合在靶细胞是高水平表达的并且相对于正常组织优先或只在病变细胞上表达的标记物或肿瘤相关抗原。本发明范围内有用的抗体包括抗肿瘤相关抗原的抗体，例如具有如上所述性质的抗体（并且表现出内化进入细胞和微生物的水平的不同性质），对癌症包括但不限于使用下面的 mAb: LL1（抗-CD74），LL2（抗-CD22），M195（抗-CD33），MN3（抗-NCA90），RS7（抗-上皮糖蛋白-1（EGP-1）），PAM-4，BrE3 和 KC4（都是抗-MUC1），MN-14（抗-癌胚胎抗原（CEA）），Mu-9（抗-结肠-特异性抗原-p），Immu 31（抗甲胎蛋白），抗-TAG-72（例如，CC49），抗-Tn，J591（抗-PSMA），M195（抗- CD33）和 G250（抗-碳酸酐酶 IX mAb）。使用这些偶联物可以导向的其他有用抗原和这样的抗原的不同表位包括 HER-2/neu,，CD19，CD20（例如，C2B8，hA20，1F5 Mabs）CD21，CD23，CD25，CD30，CD33，CD37，CD40，CD74，CD80，甲胎蛋白（AFP），VEGF，EGF 受体，P1GF，MUC1，MUC2，MUC3，MUC4，PSMA，PAP，碳酸酐酶 IX，TAG-72，GD2，GD3,，HCG，EGP-2（例如，17-1A），HLA-DR，CD30，Ia，A3，A33，Ep-CAM，KS-1，Le（y），S100，PSA，肌腱蛋白，叶酸受体，Tn 或 Thomas-Friedenreich 抗原，肿瘤坏死抗原，肿瘤血管生成抗原，Ga733,，T101，MAGE，或者它们的组合。2002 年 11 月 15 日申请的发明名称是“定向送递治疗药物的多特异性多价复合体的应用”的美国临时申请登记号 No.60／426379 中公开了多种上述抗原。

在本发明另一个优选的实施方案中，使用快速内化的抗体，然后在细胞表面上再表达，使得细胞持续吸收和增加循环抗体-化疗药物偶联物。在优选实施方案中，所述药物是蒽环霉素，并且抗体-蒽环霉素偶联物内化于靶细胞中，然后在细胞表面上再表达。最优选的抗体／抗原对的例子是 LL1 和 CD74(不变链，II 类特异性陪伴分子，Ii)。CD74 抗原在 B 细胞淋巴瘤，某些 T 细胞淋巴瘤，黑素瘤和一些其他癌上高度表达（Ong 等，Immunology 98 : 296-302（1999））.

在优选实施方案中，在人疾病的治疗中使用的抗体是人或人源化（CDR-移植到人构架中）抗体形式；但是能使用鼠，嵌合和灵长动物化抗体形式。对于兽医应用，相同物种 IgG 可能是最有效的载体，但是交叉物种 IgGs 也是有用的，例如对狗使用鼠抗体（例如，L243 抗-HLA-DR mAb 用于治疗犬淋巴瘤）。最优选使用相同物种免疫球蛋白（IgG）分子作为送递试剂，使免疫反应最小化。当考虑反复治疗时，这是特别重要的。对于人，人 IgG 抗体或人源化 IgG 抗体较不可能产生患者的抗-IgG 免疫应答。导向于内化抗原，在与靶细胞结合之后，象 hLL1 和 hLL2 这样的抗体快速内化，这意味着偶联的化疗药物快速内化于细胞中。

免疫调节剂，例如细胞因子，也能偶联于单克隆抗体-蒽环霉素药物，或者能施用与本发明的优选实施方案的嵌合，人源化或人单克隆抗体-蒽环霉素药物偶联物不偶联的免疫调节剂。可以在施用本发明的优选实施方案的单克隆抗体-蒽环霉素药物偶联物之前，同时或之后施用免疫调节剂。免疫调节剂还可以和由与不同抗原结合的一个或多个抗体构成的杂合抗体偶联。这样的抗原也可以是免疫调节剂。例如，在施用抗体组合的同时，之前或之后，CD40 或其他免疫调节剂可以和抗-CSAp 或抗-CSAp/非-CSAp 抗体联合给药。单克隆抗体-蒽环霉素 偶联物可以与抗 CD40 联合，或者与抗 CD40 偶联成融合蛋白来使用。

如这里使用的，术语“免疫调节剂”包括细胞因子，干细胞生长因子，淋巴毒素，例如肿瘤坏死因子（TNF），和造血因子，例如白介素（例如，白介素-1（IL-1），IL-2，IL-3，IL-6，IL-10，IL-12，IL-18，和 IL-21），集落刺激因子（例如，巨噬细胞集落刺激因子（G-CSF）和粒细胞巨噬细胞集落刺激因子（GM-CSF）），干扰素（例如，干扰素-α，β 和 γ），指定为“S1 因子”的干细胞生长因子，红细胞生成素和血小板生成素。 合适的免疫调节剂部分的例子包括 IL-2，IL-6，IL-10，IL-12，IL-18，IL-21，干扰素-γ，TNF-α，等。

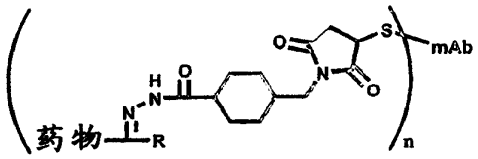
免疫调节剂是根据本发明定义的治疗剂，当存在时，它改变，抑制或刺激身体的免疫系统。典型地，本发明中有用的免疫调节剂刺激免疫细胞增殖或者在免疫应答级联中激活，例如巨噬细胞，B-细胞，和/或 T-细胞。这里描述的免疫调节剂的例子是细胞因子，其是与特

异性抗原接触时一个细胞群（例如激发的 T-淋巴细胞）释放的大约 5－20kD 的可溶性小蛋白，它作为细胞之间细胞间介质起作用。本领域技术人员理解，细胞因子的例子包括淋巴因子，单核因子，白介素，和几种相关的信号传递分子，例如肿瘤坏死因子（TNF）和干扰素。趋化因子是一组细胞因子。一些白介素和干扰素是刺激 T 细胞或其他免疫细胞增殖的细胞因子的例子。

在本发明优选的实施方案中，免疫调节剂提高蒽环霉素药物-抗体偶联物的效力，并且在某些情况下是通过宿主的刺激物效应细胞。

抗体-化疗药物偶联物

本发明涉及蒽环霉素药物和抗体的偶联物，其中蒽环霉素药物和抗体通过包括酰肼和马来酰亚胺的接头连接。接头优选是 4-（N-马来酰亚胺基甲基）环己烷-1-羧酰肼。偶联物优选具有下式:



其中 n 是 6 至 10。

此外，抗体针对或识别肿瘤相关抗原。抗体可以是单克隆抗体，其抗原-结合片段或者抗体融合蛋白。抗体融合蛋白可以是多价和/或多特异性的。偶联物中的抗体融合蛋白可以包括两个或多个相同或不同的天然的或合成的抗体，单链抗体或具有相同或不同特异性的抗体片段 。融合蛋白的抗体或抗体片段选自 LL1，LL2，M195，MN-3，RS7，17-1A，RS11，PAM-4，KC4，BrE3，MN-14，Mu-9，Immu31，CC49，Tn 抗体，J591，Le（y）抗体和 G250。

通过抗体内化可以导向于这种肿瘤相关抗原。偶联物用于导向于癌，肉瘤，淋巴瘤，白血病，神经胶质瘤或皮肤癌，例如黑素瘤 。肿瘤相关抗原优选选自 CD74，CD22，EPG-1，CEA，结肠-特异性抗原-p 粘蛋白（CSAp），碳酸酐酶 IX，HER-21neu，，CD19，CD20，CD21，CD23，CD25，CD30，CD33，CD40，CD45，CD66，NCA90，NCA95，CD80，甲胎蛋白（AFP），VEGF，EGF 受体，P1GF，MUC1，MUC2，MUC3，MUC4，PSMA，

GD2，GD3 神经节苷脂，HCG，EGP-2，CD37，HLA-D-DR，CD30，Ia，Ii，A3，A33，Ep-CAM，KS-1，Le（y），S100，PSA，肌腱蛋白，叶酸受体，Tn 和 Thomas-Friedenreich 抗原，肿瘤坏死抗原，肿瘤血管生成抗原，Ga 733，IL-2，MAGE，和它们的组合。更优选地，肿瘤相关抗原选自 CD74，CD19，CD20，CD22，CD33，EPG-1，MUC1，CEA 和 AFP。这些肿瘤相关抗原可以是 B-细胞，T-细胞，骨髓细胞的谱系抗原（CDs），或与血液恶性肿瘤相关的抗原。

偶联物的抗体部分可以是鼠，嵌合，灵长动物化的，人源化，或人抗体部分。抗体可以是完整免疫球蛋白或者其抗原-结合片段，例如 IgG 或者其片段。优选地，抗体针对 B-细胞，例如选自 CD19，CD20，CD21，CD22，CD23，CD30，CD37，CD40，CD52，CD74，CD80，和 HLA-DR 的抗原。抗体，其抗原-结合片段或融合蛋白优选选自 LL1，LL2，L243，C2B8，A20，MN-3，M195，MN-14，抗-AFP，Mu-9，PAM-4，RS7，RS11 和 17-1A。更优选地，抗体是 LL1，LL2，L243，C2B8，或 hA20。另外，抗体通过与抗体上还原的二硫键连接的接头与药物连接，其可以是抗体上的链间二硫键。

偶联物的蒽环霉素药物部分选自柔红霉素，阿霉素，表柔比星，2-吡咯啉基阿霉素，吗啉代-阿霉素，和氰基吗啉代-阿霉素。此外，蒽环霉素药物可通过 13-酮基部分与抗体连接。优选地，每分子抗体有 6-10 个分子的蒽环霉素药物。另外，抗体-蒽环霉素偶联物内化到靶细胞中，然后抗原在细胞表面上再表达。

本发明涉及这里描述的偶联物的制备方法，其中接头首先与蒽环霉素药物偶联，从而产生蒽环霉素药物-接头偶联物，并且其中蒽环霉素药物-接头偶联物接着偶联硫醇还原的单克隆抗体或抗体片段。与硫醇还原的单克隆抗体或抗体片段偶联之前可以将蒽环霉素药物-接头偶联物纯化，但是不必须这样做。因此，优选地，在与硫醇还原的单克隆抗体或抗体片段偶联之前不需要纯化蒽环霉素药物-接头偶联物。偶联物的制备方法应该如此，使得蒽环霉素药物上第二反应官能团不被破坏。另外，偶联物的制备方法不应该破坏蒽环霉素药物上的烷基化基团。偶联物中的蒽环霉素药物优选是 2-吡咯啉基-阿霉素，吗啉代-阿霉素或氰基吗啉代-阿霉素。

为了与抗体偶联，分别将化疗药物分子活化，使得它们包含在中

性 pH 下对硫醇反应特异性的游离马来酰亚胺基团。当化疗药物带有反应性酮时，利用可商购的接头 4-（N-马来酰亚胺基甲基）环己烷-1-羧酰肼（M_2C_2H；Pierce Chemical Co.，Rockford，IL）[Molecular Biosciences，Inc.，Boulder，CO 也提供其三氟乙酸盐]能将酮转化为腙，如下文方案 I 所示。

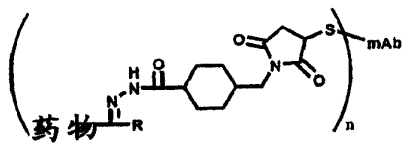
在方案 I 中，药物是化疗药物，优选蒽环霉素药物，并且 R 基团是氢原子或任选地被羟基（-OH）取代的 C_1-C_6 烷基。



方案 1

不受理论约束，认为接头 M_2C_2H 在本发明优选实施方案中是特别有用的基团，有两个原因。第一，认为接头中的环己基稳定腙官能团。重要的是使用的腙键对于血清条件基本上是稳定的，并且环己基邻近形成的腙，导致与更标准的直链烷基相比更稳定的腙。第二，一旦化疗药物-mAb 偶联物内化到细胞中，则酮与这种羧酰肼反应产生的腙被裂解。

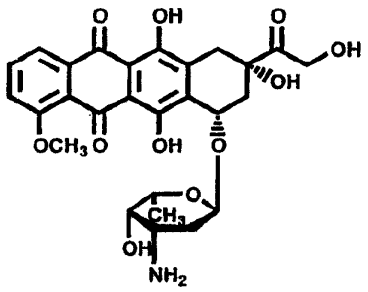
对于还原的 mAb 上可获得的巯基稍微过量（1-5 倍摩尔）的马来酰亚胺-取代的化疗药物在水溶液中与还原的 mAb 混合。在中性，接近中性或低于中性 pH 下进行反应，优选大约 pH4 至大约 pH7。让成分进行大约 5 至大约 30 分钟短时间的反应。然而，本领域技术人员明白，就反应时间和 pH 来说可以优化反应条件。下面方案所示的化疗药物-mAb 偶联物（其中 n 是 1－10 的整数，优选 1－8），然后通过大小排阻色谱法和疏水性相互作用色谱柱从化疗药物和其他缓冲成分分离。在优选的实施方案中，药物是蒽环霉素并且 n 是 6－10 的整数。



化疗药物-mAb 偶联物

上面的条件对于 2-PDOX 是最优的。反应条件要最优，因为这保证只有 mAb 的自由产生的硫醇基团与马来酰亚胺活化的药物反应，而反应条件对 2-PDOX 的烯胺不起作用。令人惊奇的是硫醇-马来酰亚胺偶联能在可烷基化的基团的存在下进行，例如烯胺基团。

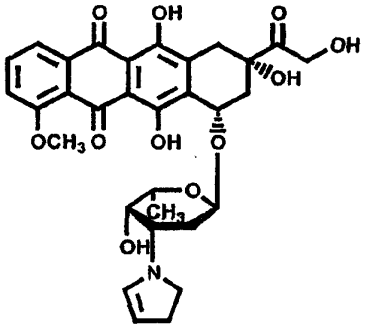
在本发明优选的实施方案中，使用的化疗药物是蒽环霉素药物。这些药物包括原来这组成员之一，阿霉素（DOX，如下所示），及其异构体，表柔比星代表的一大类衍生物。



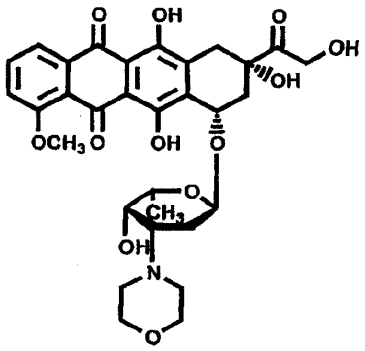
DOX

阿霉素和表柔比星都在癌症治疗中广泛使用。在本发明另一个优选的实施方案中，化疗药物包括高毒性 2-PDOX 的类似物，即，吗啉代-和氰基吗啉代-阿霉素（分别是吗啉代-DOX 和氰基吗啉代 DOX）。在另一个优选的实施方案中，化疗药物包括柔红霉素。

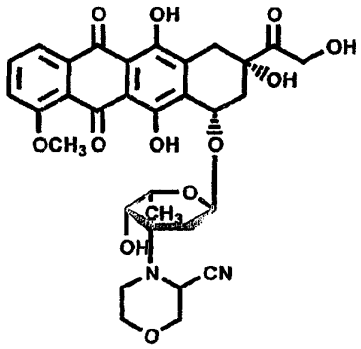
本领域技术人员认识到本发明优选实施方案的蒽环霉素药物包含多个反应性基团，可以称作第二反应官能团，在药物与接头偶联之前和／或药物-接头偶联物与 mAb 偶联之前，要求用现有技术中公知的保护基团将其保护；保护作用是必须的，这样不会破坏反应基团的完整性。参见 Greene 和 Wuts，Protective Groups in Organic Synthesis（John Wiley & Sons 第二版 1991。反应基团包括蒽环霉素药物中的蒽醌核心中的羰基；某些条件下可以与亲核试剂反应的基团。其他反应基团包括位于蒽环霉素药物分子中的各种醇基；某些条件下可以与亲电试剂反应的基团。最后，其他反应基团包括 DOX 中存在的胺基和 2-PDOX 中存在的烯胺;这两种都与亲电试剂反应。在带有烷基化基团（例如，2-PDOX 的烯胺）的蒽环霉素药物情况下，需要控制反应条件，使得烷基化基团的完整性不被破坏。



2-PDOX



吗啉代 -DOX



氰基吗啉代 -DOX

蒽环霉素类这类药物中，为了制备更大或更小毒性的免疫偶联物，以它们不同的毒性为基础，可以互换毒性 1-10，000 倍范围不同（3-4 个数量级）的各个药物。蒽环霉素类能通过几种机理对靶细胞施加毒性作用，包括抑制 DNA 拓扑异构酶 2（top 2），插入到 DNA 中，氧化还原反应和结合某些细胞内或膜蛋白。另外，可以设计具有另外的细胞杀伤机理的类似物，例如被烷基化的可能性。举例的类似物是带有烷基化部分的蒽环霉素类，如 2- PDOX 类似物的情况。在这个例子中，烷基化部分是烯胺基团。在 2-PDOX 类似物中，吡咯啉环中的烯胺在生理条件下对于亲核试剂是高反应性的。

药物组合物和给药方法

本发明的一些实施方案涉及含有本发明的 mAb-药物偶联物和药学可接受载体或赋形剂的药物组合物。所谓“药学可接受载体”意指但

不限于无毒固体，半固体或液体填料，稀释剂，胶囊化材料或者本领域技术人员公知的配制辅助剂。稀释剂，例如多元醇，聚乙二醇和葡聚糖，可以用来提高偶联物的生物半寿期。

本发明还涉及治疗哺乳动物疾病的方法，包括施用这里描述的抗体和蒽环霉素药物的偶联物。本发明方法还包括在其他标准治疗法之前、同时或之后施用这里描述的抗体-蒽环霉素偶联物，其中所述标准治疗法选自放射疗法，手术和化学疗法。

本发明意在包括治疗哺乳动物疾病的方法，包括施用导向于相同病细胞上不同抗原或相同抗原的不同表位的抗体和蒽环霉素药物偶联物中的两种或多种。另外，本发明意在包括治疗哺乳动物疾病的方法，包括在以第二种抗体为基础的治疗之前、同时或之后施用抗体和蒽环霉素药物的偶联物，使得与偶联物中的抗体相比，第二抗体为基础的治疗中第二抗体导向于病变细胞上的不同抗原或相同抗原的不同表位。

在一些实施方案中，单独的 mAb-药物偶联物或者含有本发明的 mAb-药物偶联物和药学可接受载体或赋形剂的药物组合物可以在对受试者治疗的方法中使用，包括对受试者施用治疗有效量的本发明的 mAb-药物偶联物。

在优选的实施方案中，受试者是哺乳动物。例举的哺乳动物包括人，猪，绵羊，山羊，马，小鼠，狗，猫，牛等。可以用本发明的 mAb-药物偶联物治疗的疾病包括癌症，例如皮肤癌，头颈癌，肺癌，乳腺癌，前列腺癌，卵巢癌，子宫内膜癌，宫颈癌，结肠癌，直肠癌，膀胱癌，脑癌，胃癌，胰腺癌，淋巴系统癌。通过施用治疗有效量的本发明的 mAb-药物偶联物 可以治疗患有 B-或 T-细胞癌，非何杰金氏淋巴瘤，何杰金氏病，淋巴细胞或髓细胞白血病，多发性骨髓瘤，肉瘤和黑素瘤的患者。

本发明的 mAb-药物偶联物可以静脉内，腹膜内，动脉内，鞘内，膀胱内或肿瘤内给药。偶联物可以以反复和／或周期为基础，以药团剂或输注给与。根据药物的剂量和就副作用而言的偶联物的耐受性，输注可以重复一次或多次，由负责的主治医师决定。本领域技术人员明白能凭经验确定本发明的 mAb-药物偶联物的有效量。对需要治疗癌症的受试者施用和一种或几种药学可接受赋形剂组合的药物组合物药

物。要理解，当对人患者给药时，在合理医学判定范围内由负责的主治医师决定本发明的药剂或组合物的总的日用量 。对于特定患者的特定治疗有效剂量水平取决于多个因素：要实现的细胞反应的类型和程度；使用的特异性 mAb-药物偶联物或组合物的活性；使用的特异性 mAb-药物偶联物或组合物；患者的年龄，体重，一般健康状况，性别和饮食；给药时间，给药途径，和药剂排泄速度；治疗持续时间；与特定药剂联合或同时使用的药物等医药领域公知的因素。例如，本领域公知药物起始剂量是比实现期望的治疗效果所需要的剂量更低的水平，并且逐渐增加剂量，直到实现期望的效果。

在本发明的优选的实施方案中，在其他标准治疗法包括放疗、手术或化疗之前、同时或之后施用抗体-蒽环霉素偶联物。

在另一个优选的实施方案中，施用抗体和蒽环霉素药物的一种或多种偶联物，偶联物导向于病变细胞上相同抗原或相同抗原上的不同表位 。在另一个优选的实施方案中，在另一种以抗体为基础的治疗之前、同时或之后给与抗体和蒽环霉素药物的偶联物。这种附加的以抗体为基础的治疗可以包括施用两种或多种以抗体为基础的治疗，包括裸治疗，其中单独给与抗体或者与另一种治疗药剂联合施用，该药剂是与抗体偶联的或没有偶联的。偶联可以使用本文公开的接头或其他类型的接头。当给与两种以抗体为基础的治疗时，这些治疗无论施用哪一种抗体，第二种抗体导向于相同病变细胞上不同的抗原或相同抗原上的不同表位 。第二种抗体也与另一种（不同）药物或者与治疗性同位素偶联，这样提供以抗体为基础的治疗。也理解这种治疗能联合，在施用增强抗肿瘤效果或预防或减轻治疗偶联物的脊髓抑制效果的细胞因子之前，同时或之后施用。

上面确定的每一种治疗方法另外可以包括施用一种或多种免疫调节剂。这些免疫调节剂可以选自干扰素，细胞因子，干细胞生长因子，集落-刺激因子，淋巴毒素和其他造血因子。干扰素优选α-干扰素，β-干扰素或γ-干扰素，造血因子可以选自红细胞生成素，血小板生成素，白介素（ILs），集落刺激因子（CSF），粒细胞巨噬细胞-集落刺激因子（GM-CSF）。白介素可以选自 IL-1，IL-2，IL-3，IL-6，IL-10，IL-12，IL-18，和 IL-21。免疫调节剂或造血因子可以在免疫偶联物治疗之前，期间或之后施用。施用免疫调节剂来增强施用的本发明偶

联物的效力。

试剂盒

本发明的优选实施方案还涉及在合适的容器中含有单克隆抗体和蒽环霉素药物的偶联物的试剂盒。偶联物优选包括含有酰肼和马来酰亚胺的接头。在无菌容器中提供液体，冷冻或冻干形式的单克隆抗体-蒽环霉素药物偶联物。在对需要治疗的患者施用之前能将单克隆抗体-蒽环霉素药物偶联物稀释或重新配制。

在另一个实施方案中，其中通过接头连接蒽环霉素药物和抗体的蒽环霉素药物和抗体偶联物含有酰肼和马来酰亚胺，并且其中至少一种免疫调节剂进一步与抗体偶联。然后根据这里描述的，对需要治疗的患者施用单独的偶联物或者与其它治疗联合施用。

不限制本发明的范围，通过下面的实施例详细描述本发明。

实施例

概述

根据最初 Nagy 等的描述（Proc. Natl. Acad. Sci, U. S. A. 93: 2464-2469（1996））为基础，利用改进的方法制备 2-吡咯啉基-阿霉素。利用公开的方法（Acton 等，J. Med. Chem. 27: 638-645（1984））从阿霉素合成吗啉代-DOX 和氰基吗啉代-DOX 。

实施例 1: 2-PDOX 的合成

2-吡咯啉基-阿霉素（2-PDOX）的合成: 4-碘代丁醛: 2-（3-氯丙基）-1，3-二氧戊环（1.3 mL; 10 mM）溶解于含有 30 克碘化钠（200 毫摩尔; 20-倍过量）的 200 毫升丙酮中。将溶液回流 24 小时后蒸发至干。在下面的反应中使用粗混合物。阿霉素盐酸盐（550 毫克，946 微摩尔）溶解于 6.5 毫升的 DMF 中，并且加入 3.86 克（19.48 毫摩尔，20-倍过量）的 4-碘代丁醛，接着加入 500 微升 N，N-二异丙基乙胺（DIPEA）。五分钟之后，通过在 Waters NovaPakC-18 柱子上用梯度洗脱通过反相 HPLC 将材料纯化。梯度是: 90: 10 洗脱剂 A 至 70: 30 洗脱剂 B，每分钟 75 毫升，经 40 分钟，其中洗脱剂 A 是 0.1%三氟乙酸（TFA）并且洗脱剂 B 是含有 0.1% TFA 的 90% 乙腈。电子喷射质

谱证实产物的身份，M + H^+ = 596。

实施例 2 ：2-PDOX 与抗-CD22 抗体人源化 LL2（hLL2）的偶联

a）2-PDOX 的活化：2-PDOX（5.95 毫克；$1x10^{-5}$ 摩尔）与一摩尔当量的商业上可购得的接头 4-（N-马来酰亚胺基甲基）环己烷-1-羧酰肼（M_2C_2H；Pierce Chemical Co.，Rockford，IL）（2.88 毫克；$1x10^{-5}$ 摩尔）在 0.5 毫升二甲亚砜（DMSO）中混合。反应混合物在 50-60 ℃下在减压下被加热 30 分钟。通过制备 RP- HPLC 纯化期望的产物，使用下面成分构成的梯度： 0.3 % 乙酸铵和 90% 乙腈，pH 4.4 中 0.3 % 乙酸铵，从大多数没有反应的 2-PDOX（洗脱，早大约 0.5 分钟）和从没有反应的 M_2C_2H（更早洗脱）分离期望的产物。通过参考相对于乙腈／乙酸铵缓冲液 中 2-PDOX 的标准溶液的样品（496nm）的 UV 吸收水平估计回收的量 。如果不是立即使用，将马来酰亚胺活化的 2-PDOX 冷冻并且冻干。当需要与抗体进一步反应时，采用最小量的 DMSO。

b）hLL2 IgG 的还原 ：4℃下用 100 微升 1.8 M Tris HCl 缓冲液处理 1-毫升 LL2 抗体样品（8-12 mg/mL），接着用 3 微升 2-巯基乙醇处理。让还原反应进行 10 分钟，并且通过在含有 1 mM EDTA 作为抗氧化剂的 0.1 M 乙酸钠，pH 5.5 中平衡过的两个连续 G-50-80 Sephadex 旋转柱纯化还原的抗体。通过 280 nm UV 吸光度分析产物，通过 Ellman 反应，在 410 nm 检测，测定每摩尔抗体硫醇基的数目。这些还原条件导致每个抗体产生大约 8-12 个硫醇基，相应于抗体链间二硫键的完全还原 。

c）活化的 2-PDOX 与还原的 hLL2 的偶联：用马来酰亚胺基活化的 2-PDOX 处理来自上面 b）的硫醇还原的抗体，不用使含水/DMSO 混合物中 DMSO 的最终浓度达到高于 25% 。4℃下反应 15 分钟之后，通过用 0.2 M 乙酸铵，pH 4.4 中平衡过的 G-50-80 旋转柱洗脱，接着通过在相同缓冲液中平衡过的 SM-2 Bio-Beads 的柱子渗滤，获得没有未反应马来酰亚胺基-DOX 的期望的产物。通过在 280 和 496 nm 下通过 UV 扫描分析产物，从而估计 2-PDOX 与 mAb 的摩尔比。通过 MALDI-TOF 质谱分析测得 2-PDOX 与 Mab 之绝对比。UV 和 MS 分析都证明在这组反应条件下获得每摩尔 hLL2 抗体 7-8 单位的 2-PDOX 的取代比例。通过大小排阻 HPLC（GF-250 柱，Bio-Rad，Hercules CA），流速 1 毫

升/分钟，0.2 M 乙酸盐缓冲液，pH 5.0，使用设置在 496 nm 的 UV 检测器，基本上所有的检测峰在 LL2 抗体的滞留时间附近洗脱出来。这表明产物中存在极少游离药物。2-PDOX-hLL2 偶联物样品等份分为单级分，典型是 0.1-1.0mg，冷冻备用，或者将它们冻干。根据需要，将它们解冻并且重新配制用于进一步实验。

实施例 3: 2-PDOX 与抗-CD74 抗体人源化 LL1（hLL1）的偶联

a）2-PDOX 的活化: 2-PDOX（5.95 毫克; $1x10^{-5}$ 摩尔）与一摩尔当量的商业上可购得的接头 4-（N-马来酰亚胺基甲基）环己烷-1-羧酰肼（M_2C_2H；Pierce Chemical Co.，Rockford，IL）（2.88 毫克; $1x10^{-5}$ 摩尔）在 0.5 毫升 DMSO 中混合。反应混合物在 50-60℃下在减压下被加热 30 分钟。通过制备 RP- HPLC 纯化期望的产物，使用下面成分构成的梯度: 0.3 % 乙酸铵和 90% 乙腈，pH 4.4 中 0.3 % 乙酸铵，从大多数没有反应的 2-PDOX（洗脱，早大约 0.5 分钟）和从没有反应的 M_2C_2H（更早洗脱）分离期望的产物。通过参考相对于乙腈／乙酸铵缓冲液 中 2-PDOX 的标准溶液的样品（496nm）的 UV 吸收水平估计回收的量 。如果不是立即使用，将马来酰亚胺活化的 2-PDOX 冷冻并且冻干。当需要与抗体进一步反应时，采用最小量的二甲基甲酰胺（DMF）或 DMSO。

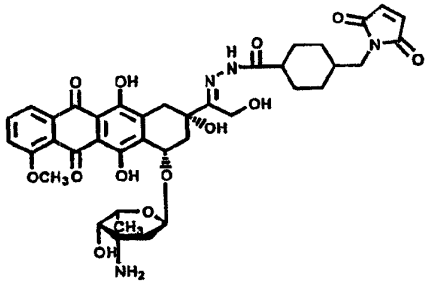
b）hLL1 IgG 的还原 :4℃下用 100 微升 1.8 M Tris HCl 缓冲液处理 1-毫升 hLL1 抗体样品（8-12 mg/mL），接着用 3 微升 2-巯基乙醇处理。让还原反应进行 10 分钟，并且通过在含有 1 mM EDTA 作为抗氧化剂的 0.1 M 乙酸钠，pH 5.5 中平衡过的两个连续 G-50-80 Sephadex 旋转柱纯化还原的抗体。通过 280 nm UV 吸光度分析产物，通过 Ellman 反应，在 410 nm 检测，测定每摩尔抗体硫醇基的数目。这些还原条件导致每个抗体产生大约 8-10 个硫醇基，相应于抗体链间二硫键的完全还原 。

c）活化的 2-PDOX 与还原的 hLL1 的偶联: 用来自 a）的马来酰亚基胺活化的 2-PDOX 处理来自上面 b）的硫醇还原的抗体，含水/DMSO 混合物中 DMSO 的最终浓度是 15% 。4℃下反应 15 分钟之后，通过用 0.2 M 乙酸铵，pH 4.4 中平衡过的 G-50-80 旋转柱洗脱，接着通过在相同缓冲液中平衡过的 SM-2 Bio-Beads 的柱子渗滤，获得没有未反

应马来酰亚胺硫醇-DOX 的期望的产物。通过在 280 和 496 nm 下通过 UV 扫描分析产物，从而估计 2-PDOX 与 mAb 的摩尔比。通过 MALDI-TOF 质谱分析测得 2-PDOX 与 Mab 之绝对比。UV 和 MS 分析证明在这组反应条件下获得每摩尔 hLL1 抗体 7-8 单位的 2-PDOX 的取代比例。通过大小排阻 HPLC 分析（GF-250 柱，Bio-Rad，Hercules CA），流速 1 毫升/分钟，0.2 M 乙酸盐缓冲液，pH 5.0，使用设置在 496 nm 的 UV 检测器，基本上一个检测峰在 hLL1 抗体的滞留时间附近洗脱出来。这表明产物中存在极少或没有游离药物。2-PDOX-hLL1 偶联物样品等份分为单一级分，典型是 0.1-1.0mg，冷冻备用，或者将它们冻干。根据需要，将它们解冻并且重新配制用于进一步实验。

实施例 4: DOX 与抗-CD74 抗体 hLL1 的偶联

a) DOX 的活化: DOX（$1x10^{-5}$ 摩尔）与一摩尔当量的商业上可购得的接头 4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酰肼(M_2C_2H; Pierce Chemical Co.，Rockford，IL)（2.88 毫克; $1x10^{-5}$ 摩尔）在 0.5 毫升 DMSO 中混合。反应混合物在 50-60℃下被加热 30 分钟。通过制备 RP-HPLC 纯化下面所示期望的中间体，使用下面成分构成的梯度: 0.3 % 乙酸铵和 90% 乙腈，pH 4.4 中 0.3 % 乙酸铵，从没有反应的 DOX（洗脱，早大约 0.5 分钟）和从没有反应的 M_2C_2H（更早洗脱）分离期望的产物。



通过参考相对于乙腈／乙酸铵缓冲液 中 DOX 的标准溶液的样品（496nm）的 UV 吸收水平估计没有反应的 DOX 的量 。如果不是立即使用，将马来酰亚胺活化的 DOX 冷冻并且冻干。当需要与抗体进一步

反应时，采用最小量的 DMF 或 DMSO。

b）hLL1 IgG 的还原 ：4℃下用 100 微升 1.8 M Tris HCl 缓冲液处理 1-毫升 hLL1 抗体样品（10 mg/mL），接着用 3 微升 2-巯基乙醇处理。让还原反应进行 10 分钟，并且通过在含有 1 mM EDTA 作为抗氧化剂的 0.1 M 乙酸钠，pH 5.5 中平衡过的两个连续 G-50-80 Sephadex 旋转柱纯化还原的抗体。通过 280 nm UV 吸光度分析产物，通过 Ellman 反应，在 410 nm 检测，测定每摩尔抗体硫醇基的数目。这些还原条件导致每个抗体产生大约 8-10 个硫醇基，相应于抗体链间二硫键的完全还原 。

c）活化的 DOX 与还原的 hLL1 的偶联：用来自上面 a）的马来酰亚胺基活化的 DOX 处理来自上面 b）的硫醇还原的抗体，含水/DMSO 混合物中 DMSO 的最终浓度是 15% 。4℃下反应 15 分钟之后，通过用 0.2 M 乙酸铵，pH 4.4 中平衡过的 G-50-80 旋转柱洗脱，接着通过在相同缓冲液中平衡过的 SM-2 Bio-Beads 的柱子渗滤，获得没有未反应马来酰亚胺基-DOX 的期望的产物。通过在 280 和 496 nm 下通过 UV 扫描分析产物，从而估计 DOX 与 mAb 的摩尔比。通过 MALDI-TOF 质谱分析测得 DOX 与 Mab 之绝对比。UV 和 MS 分析都证明在这组反应条件下获得每摩尔 hLL1 抗体 7-8 单位的 DOX 的取代比例。通过大小排阻 HPLC（GF-250 柱，Bio-Rad，Hercules CA），流速 1 毫升/分钟，0.2 M 乙酸盐缓冲液，pH 5.0，使用设置在 496 nm 的 UV 检测器，基本上一个检测峰在 hLL1 抗体的滞留时间附近洗脱出来。痕迹（见图 1；496 nm 下的 UV 检测器，设置检测 DOX）表明阿霉素-LL1 偶联物基本上是 9 分钟左右滞留时间的单一峰，没有聚集的蛋白质物质或游离 DOX（滞留时间 14 分钟左右）。这表明产物中存在极少或没有游离药物。DOX-hLL1 偶联物样品等份分为单级分，典型是 0.1-1.0mg，冷冻备用，或者将它们冻干。根据需要，将它们解冻并且重新配制用于进一步实验。

实施例 5 ：阿霉素与 hLL1 的偶联和 dox-hLL1 偶联物的配制

a） 阿霉素与 SMCC 酰肼反应

在 13 毫升 1: 2 甲醇: 乙醇（无水）中混合 90 mg 的阿霉素（1.56 x10^{-4} mol）和 60.23 mg 的 SMCC 酰肼，并且加入 10.4 微升三氟乙酸。

室温下避光将混合物搅拌 4 小时。然后将反应溶液通过 0.22 微米注射器过滤器过滤到 100 mL 圆底烧瓶中。加入 75 微升二异丙基乙胺并且在 300℃下在旋转蒸发器上蒸发溶剂。残余物用 4 x 40 mL 乙腈接着用 1 x 4 0 mL 二乙醚研制，并且在高真空下在旋转蒸发器上干燥成粉末。将粉末再溶解于 5 mL 无水甲醇，再如上所述蒸发至干，然后在-200℃下贮存直到需要。

b）用二硫苏糖醇还原 hLL1-IgG

在 20 mL 圆底烧瓶中混合 8.4 mL 的 hLL1-IgG（10.3 mg/mL，5.78 x 10^{-7} mol），160 微升 0.1 M 磷酸钠缓冲液，pH 7.5，500 微升的 0.2 M EDTA，pH 7.0，和 290 微升的去离子水。通过在真空和氩气氛之间将溶液循环六次而将混合物去氧。通过通入氩气 10 分钟而将新制备的 40 mM 二硫苏糖醇（DTT）水溶液（0.015g 于 2.4 mL 水中，2.3 x10^{-5} 摩尔;对于 IgG 40-倍摩尔过量）去氧，并且向去氧 hLL1 抗体溶液加入 640 微升的这种 DTT 水溶液。得到的混合物在 37℃下温育 1 小时。通过用去氧 10 mM PBS/100 mM L-组氨酸，pH 7.4 缓冲液渗滤（一个 30K 过滤器，氩气下，4℃下），纯化还原的抗体。持续加入缓冲液，直到总的滤液体积是 300 mL。还原的 hLL1 溶液（hLL1-SH）的体积减小到 10 mL。

c）阿霉素-SMCC 与 hLL1-SH 的偶联和偶联物的纯化

活化的阿霉素（1.9 mL，2.09 x10^{-5} 摩尔，对于 IgG 36-倍过量）溶解于二甲亚砜（DMSO）溶液，并且室温下氩气下缓慢加入 hLL1-SH 抗体溶液（40 mL）。DMSO 的最终浓度是 5%。温和搅拌下让反应在 4℃下进行 40 分钟。将反应混合物加载于 BioBeadTM（Bio-Rad，Richmond CA）柱（1.5 cm 直径 x 34 cm 高，用 10 mM PBS/100 mM L-组氨酸，pH 7.4 缓冲液平衡过），并且以 2 mL/min 洗脱。在 Amicon 过滤装置中浓缩产物偶联物并且在冻干之前配制用于通过 0.22 微米注射过滤器过滤。

d）偶联物配制和冻干

向 40 mL 的上面的 hLL1-dox 溶液加入 8 mL 的 0.5M 甘露糖醇水溶液和 0.48 mL 的 1% 吐温 20，得到最终浓度 1.64 mg/mL hLL1-dox，82.5mM 甘露糖醇，和 0.01%吐温 20。以 1 mg 和 10mg dox-hLL1 数量（分别 3 和 10 mL 小瓶）冻干样品，在干冰上冷冻，并且在真空下

冻干 48 小时。真空封闭小瓶，在-20℃避光密闭贮存备用。

实施例 6: 抗体的吗啉代-DOX 和氰基吗啉代-DOX 偶联物的制备

利用 Acton 等的方法（J.Med.Chem. 27:-638-645（1984）），通过用 2，2′-氧-双[乙醛] 对阿霉素还原性烷基化来制备吗啉代-DOX 和氰基吗啉代-DOX 。

这些 DOX 类似物以对于 DOX 和 2-PDOX 类似物如上所述相同的方式与 M_2C_2H 偶联。氰基吗啉代-DOX 在室温下在无水甲醇（代替 DMSO）中用 10 %摩尔过量的酰肼偶联过夜。去除溶剂，接着通过急骤层析法提供腙。电喷射质谱分析: M+H m/e 872，M+Na 894;M-H 870。以类似方式，使用 1.5 当量试剂，采用 SMCC-酰肼在无水甲醇中反应 4 小时将吗啉代-DOX 衍生化为它的腙，并且通过急骤层析纯化产物。电喷射质谱分析: M+H m/e 847，M-H m/e 845，M+C1 m/e 881。

如上面实施例 2－4 中所述，将抗体的链间二硫键还原为游离硫醇，产生二硫化物-还原的 mAbs，利用实施例 2，3，和 4 的 c）部分中描述的相同的方法制备偶联物。制备下面的吗啉代-DOX 和氰基吗啉代-DOX 的 mAb 偶联物:

<u>吗啉代-DOX-抗体偶联物:</u>

mRS7 偶联物 : 药物与 mAb 取代之比: 6.4:1。

mMN-14 偶联物: 药物与 mAb 取代之比: 8.9:1。

<u>氰基吗啉代-DOX-抗体偶联物:</u>

mRS7 偶联物: 药物与 mAb 取代之比: 5.3:1。

mMN-14 偶联物: 药物与 mAb 取代之比: 7.0:1。

实施例 7 ：蒽环霉素-抗体偶联物的体外效力

从美国典型培养物保藏中心（ATCC，Rockville，MD）获得 Raji B-淋巴瘤细胞，并且在加有谷氨酰胺，丙酮酸盐，青霉素和链霉素（Life Technologies，Grand Island，NY）的含有 12.5%胎牛血清（Hyclone，Logan，UT）的 RPMI 1640 培养基中培养。简要地说，在 24-孔板的孔中，$3.75x10^5$ 个细胞与指定浓度的药物-mAb 偶联物在 1.5 mL 组织培养基中温育 2 天。然后将细胞转移到含有 20 毫升培养基的 T25 烧瓶中，并且温育最多 21 天，或者直到细胞扩增 16-倍。在第 0 天，第 2

天，然后每 3－5 天使用台盼蓝进行活细胞计数。从没有处理的细胞的生长速度计算加倍时间，从处理的细胞扩增 16-倍需要的时间计算存活比例，假定处理不影响加倍时间。能容易检测单个的保留的活细胞。在 1 微克/毫升药物-mAb 偶联物浓度下，DOX-LL1 偶联物表现出与 DOX-MN-14 偶联物相比存活细胞比例的三个数量级的差异。见图 2。

实施例 8 ：用蒽环霉素-抗体偶联物治疗带肿瘤动物

a) 对实体肿瘤异种移植模型的治疗

用 DU145 人前列腺癌细胞对无胸腺裸鼠组皮下注射。大约两周之后，当动物体内长出可触摸的前列腺肿瘤异种移植物时，用单剂量的药物-抗体偶联物 2-PDOX-RS7 治疗一半动物，另一半保持未处理（对照）。图 3 说明未处理小鼠中肿瘤异种移植物生长与用 2-PDOX-RS7 治疗的小鼠异种移植物生长。证明用药物-抗体偶联物治疗动物，在延迟异种移植物生长方面的治疗性效果。

b) 动物模型中全身癌的治疗

NCr-SCID 小鼠，每组 10 个动物，通过尾静脉注射对每个动物静脉内注射 2.5 $x10^6$ 人 Burkitt's B-细胞淋巴瘤细胞系 Raji 的悬浮液。五天之后，动物未接受处理或者用单剂量的 350 微克 DOX-LL1 或 150 微克 2-PDOX-LL1 治疗。图 4 给出试验结果。没有接受处理的动物由于全身癌症而瘫痪并且在注射 Raji 细胞之后 23 天左右死亡。用 LL1 抗体的 DOX-和 2-PDOX-偶联物治疗的动物存活延长的时间，相当于对于 2-PDOX-LL1-治疗的动物寿命延长四倍左右，相对于 DOX-LL1 治疗的动物寿命延长甚至更多。

c) 动物模型中全身癌的治疗

NCr-SCID 小鼠，每组 10 个动物，通过尾静脉注射对每个动物静脉内注射 2.5 $x10^6$ 人 Burkitt's B-细胞淋巴瘤细胞系 Raji 的悬浮液。五天之后，动物未接受处理或者用单剂量的 150 微克 2-PDOX-LL1 或 150 微克 2-PDOX-MN-14（非特异性对照抗体偶联物）治疗。图 5 给出试验结果。没有接受处理的动物由于全身癌症而瘫痪并且在注射 Raji 细胞之后 23 天左右死亡。用 2-PDOX-MN-14 偶联物处理的动物也是如此。用 2-PDOX-LL1 抗体偶联物治疗的动物存活延长的时间。

从上面的描述，本领域技术人员容易确认本发明的基本特征，不

脱离本发明的精神和范围，能对本发明进行各种改变和修饰，使它适合各种应用和条件而不用过度的试验。这里引用的所有的专利，专利申请和公开物在此全文引作参考。

参考文献

美国专利文献:

Arcamone 等，美国专利 No. 4，125，607
Greenfield 等，美国专利 No. 5，122，368
Janaky 等，美国专利 No. 6，214，969
Kaneko 等，美国专利 No. 5，349，066
Kaneko 等，美国专利 No. 5，137，877
McKenzie 等，美国专利 No. 5，798，097
King 等，美国专利 No. 6，307，026
King 等，美国专利 No. 5，824，805
King 等，美国专利 No. 5，162，512
Moreland 等，美国专利 No. 5，241，078
Schally 等，美国专利 No. 6，184，374
Schally 等，美国专利 No. 5，843，903
Willner 等，美国专利 No. 5，708，146
Willner 等，美国专利 No. 5，622，929
Willner 等，美国专利 No. 5，606，017

其他参考文献:

Anthracycline Antibiotics: New Analogs, Methods of Delivery, and Mechanisms of Action. *ACS Symposium Series 574*, W. Priebe, editor, Publ. American Chemical Society, 1995.

Acton *et al.*, *J. Med. Chem.*, 27:638-645, 1984.

Arencibia *et al.*, *Anticancer Drugs*, 12:71-78, 2001.

Benali *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 97:9180-9185, 2000.

Chastzistamou *et al.*, *Clin. Cancer Res.*, 6:4158-4165, 2000.

Denmeade *et al.*, *Cancer Res.*, 58:2537-40, 1998.

Dubowchik *et al.*, *Bioconjug. Chem.*, 13:855-869,2002.

Halmos *et al., Cancer Lett.,* 136:129-136, 1999.

Hansen *et al., Biochem J.,* 320:393-300, 1996.

Kahan *et al., Breast Cancer Res. Treat.,* 59:255-262, 2000.

Kahan *et al., Int. J. Cancer,* 82:592-598, 1999.

Kahan *et al., Cancer* 85:2608-2615, 1999.

Kiaris *et al., Eur. J. Cancer,* 37:620-628, 2001.

Kiaris *et al., Br. J. Cancer,* 81:966-971, 1999.

Koppan *et al., Cancer Res.,* 58:4132-4137, 1998.

Krebs *et al., Cancer Res.,* 60:4194-4199, 2000.

Michel *et al., Clin. Cancer Res.,* 8:2632-2639, 2002.

Miyazaki *et al., Am. J. Obstet. Gynecol.* 180:1095-103, 1999.

Miyazaki *et al., J. Natl. Cancer Inst.,* 89:1803-1809, 1997.

Mosure *et al., Cancer Chemother. Pharmacol.,* 40:251-258, 1997.

Nagy *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.,* 97:829-834, 2000.

Nagy *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.,* 95:1794-1799, 1998.

Nagy *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.,* 94:652-656, 1997.

Nagy *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.,* 93:7269-7273, 1996.

Nagy *et al., Proc. Natl. Acad. Sci, U.S.A.,* 93:2464-2469, 1996.

Ong *et al. Immunology,* 98:296-302, 1999.

Pawlyk-Byczkowska *et al., Cancer Res.,* 49:4568-4577, 1989.

Plonowski *et al., Int. J. Cancer,* 88:652-657, 2000.

Plonowski *et al., Cancer Res.,* 60:2996-3001, 2000.

Plonowski *et al., Cancer Res.,* 59:1947-1953, 1999.

Roche *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.,* 90:8581-8585, 1993.

Schally *et al., Clin. Cancer Res.,* 7:2854-2861, 2001.

Schally *et al., Prostate,* 45:158-166, 2000.

Schally *et al., Eur. J. Endocrinol.,* 141:1-14, 1999.

Shih *et al. Cancer Immunol. Immunother.,* 49:208-216, 2000.

Suzawa *et al., J. Contr. Release,* 79:229-242, 2002.

Westphalen *et al., Int. J. Oncol.* 17:1063-1069, 2000.

Wraight *et al., J. Biol. Chem.,* 265:5787-5792, 1990.

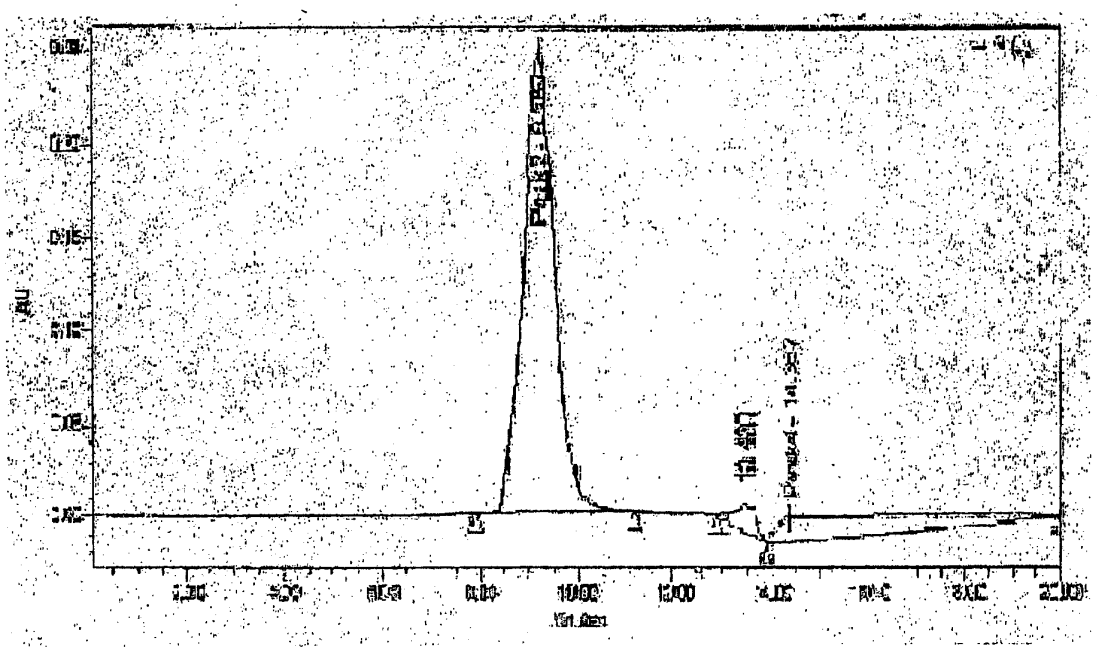


图 1

DOX-MAb偶联物对Raji细胞的体外毒性

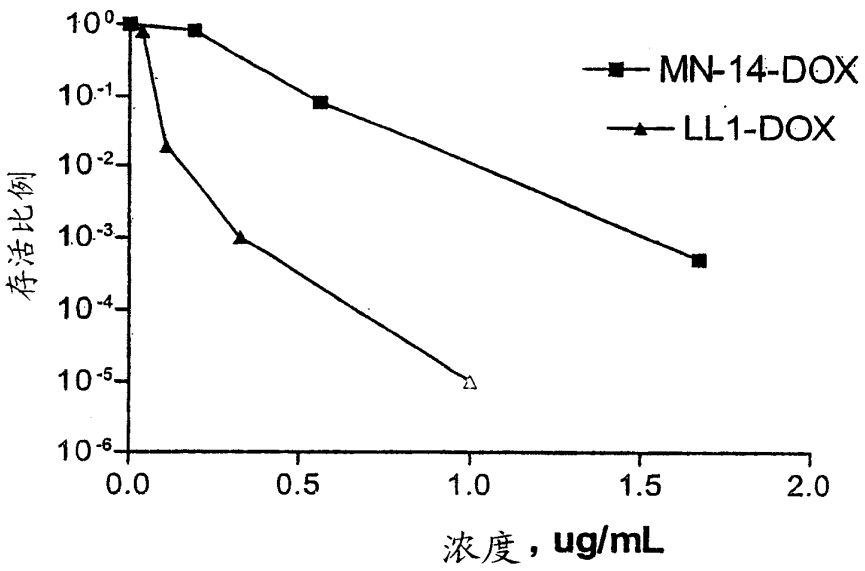


图 2

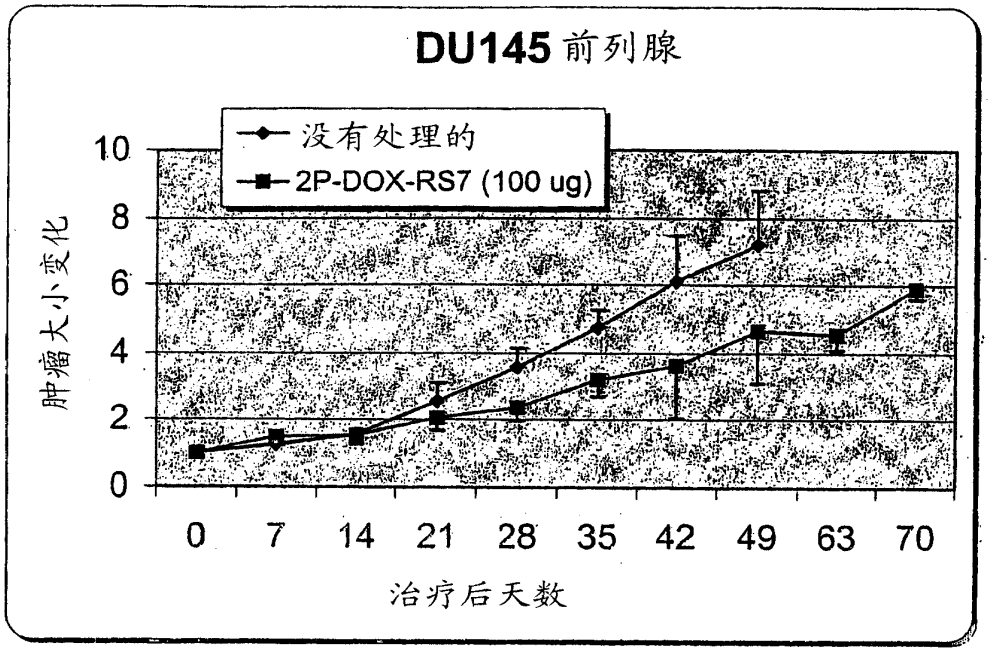

DU145 前列腺
没有处理的
2P-DOX-RS7 (100 ug)
肿瘤大小变化
10
8
6
4
2
0
0
7
14
21
28
35
42
49
63
70
治疗后天数

图 3

用致死剂量Raji细胞 i.v.处理五天之后
用单-350微克剂量的LL1-DOX或单一150微克
剂量的LL1-2-PDOX治疗小鼠的存活

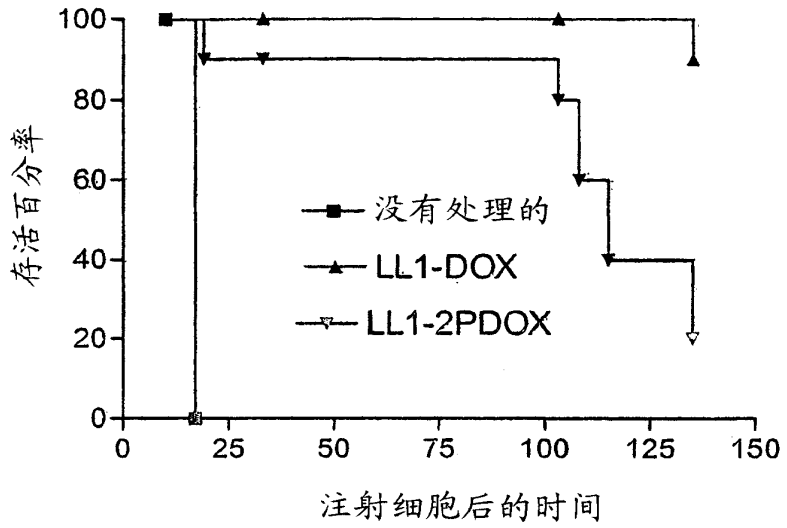


图 4

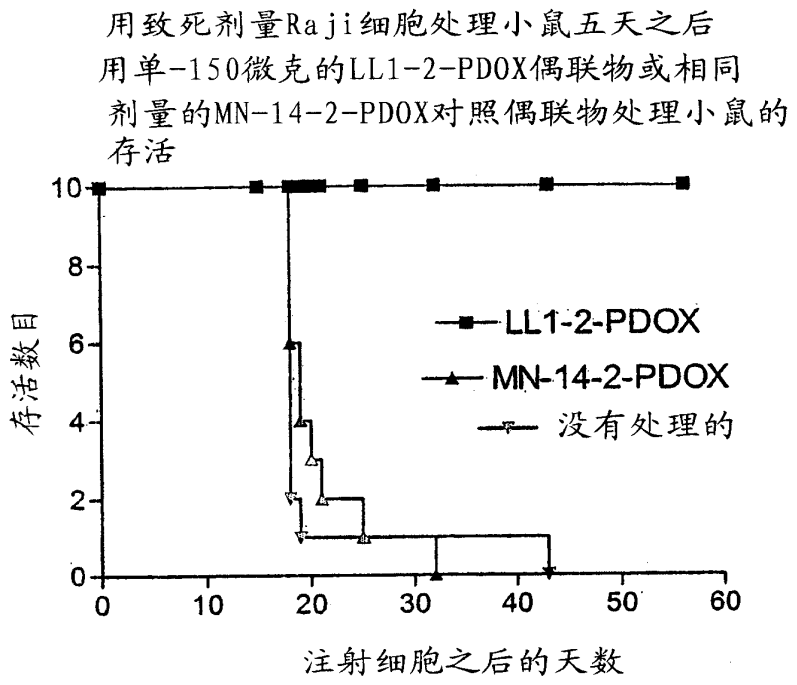

用致死剂量Raji细胞处理小鼠五天之后
用单-150微克的LL1-2-PDOX偶联物或相同
剂量的MN-14-2-PDOX对照偶联物处理小鼠的
存活
存活数目
10
8
6
4
2
0
0
10
20
30
40
50
60
LL1-2-PDOX
MN-14-2-PDOX
没有处理的
注射细胞之后的天数

图 5

(19) Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets

(11) EP 1 155 702 A1

(12) EUROPEAN PATENT APPLICATION
published in accordance with Art. 158(3) EPC

(43) Date of publication:
21.11.2001 Bulletin 2001/47

(21) Application number: **99952805.2**

(22) Date of filing: **29.10.1999**

(51) Int Cl.[7]: **A61K 47/48**, A61K 47/30, A61K 47/26, A61K 31/47

(86) International application number:
PCT/JP99/06016

(87) International publication number:
WO 00/25825 (11.05.2000 Gazette 2000/19)

(84) Designated Contracting States:
AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU MC NL PT SE
Designated Extension States:
AL LT LV MK RO SI

(30) Priority: **30.10.1998 JP 31013098**
19.11.1998 JP 32927298

(71) Applicant: **DAIICHI PHARMACEUTICAL CO., LTD.**
Chuo-ku, Tokyo 103-8234 (JP)

(72) Inventors:
- **SUSAKI, Hiroshi,**
Daiichi Pharmaceutical Co. Ltd.
Tokyo 134-8630 (JP)
- **INOUE, Kazuhiro,**
Daiichi Pharmaceutical Co. Ltd.
Tokyo 134-8630 (JP)
- **KUGA, Hiroshi, Daiichi Pharmaceutical Co., Ltd.**
Tokyo 134-8630 (JP)
- **IKEDA, Masahiro,**
Daiichi Pharmaceutical Co. Ltd.
Tokyo 134-8630 (JP)
- **SHIOSE, Yoshinobu,**
Daiichi Pharmaceutical Co. Ltd.
Tokyo 134-8630 (JP)
- **KORENAGA, Hiroshi,**
Daiichi Pharmaceutical Co. Ltd
Tokyo 134-8630 (JP)

(74) Representative:
Sternagel, Fleischer, Godemeyer & Partner
Patentanwälte
An den Gärten 7
51491 Overath (DE)

(54) DDS COMPOUNDS AND METHOD FOR ASSAYING THE SAME

(57) A DDS compound comprising a carboxy(C_{1-4}) alkyldextran polyalcohol modified with a saccharide compound and a residue of drug compound bound to the carboxy(C_{1-4})alkyldextran polyalcohol, and a method for measuring a DDS compound in which a polymer carrier and a residue of drug compound are bound to each other by means of a spacer comprising 2 to 8 amino acids linked by peptide bond(s), which comprises the steps of treating the DDS compound with a peptidase, and measuring the resulting hydrolysate.

EP 1 155 702 A1

Printed by Jouve, 75001 PARIS (FR)

Description

Technical Field

[0001] The present invention relates to a DDS compound (DDS: drug delivery system) in which a carbogy(C_{1-4}) alkyldextran polyalcohol modified with a saccharide compound and a drug compound such as antineoplastic agents are bound to each other. The present invention also relates to a method for measurement of a DDS compound in which a polymer carrier and a drug compound such as antineoplastic agents are bound to each other.

Background Art

[0002] Antineoplastic agents, used for treatment of solid cancers such as lung cancer or digestive organ carcinomas and blood cancers such as leukemia, are systemically administered through routes of administration such as intravenous or oral administration, and then, are distributed to certain tumorous sites and inhibit or suppress the proliferation of cancer cells to exhibit their therapeutic efficacy. However, the systemically-administered antineoplastic agents are rapidly taken into livers and reticuloendothelial organs from blood, or rapidly excreted into urine, and accordingly, their blood concentrations may be sometimes too low to distribute to tumorous sites sufficiently. In addition, common antineoplastic agents themselves do not distribute tumorous sites selectively (tumor selectivity), and therefore, the antineoplastic agents are uniformly distributed over various tissues and cells of the whole body and act as cytotoxins also against normal cells and tissues, which results in problems of the appearance of adverse effects, e.g., emesis, pyrexia, or alopecia at an extremely high rate. Therefore, it has been desired to develop a means of efficiently and selectively distributing antineoplastic agents to tumorous sites.

[0003] As one of such means, a process was proposed in which a polysaccharide derivative having carboxyl groups is used as a polymer carrier, and an antineoplastic agent is bound to the polymer carrier to delay the disappearance of the antineoplastic agent from blood and to enhance selectivity to tumor tissues. For example, International Publication WO94/19376 discloses a DDS compound in which a peptide chain (the number of amino acid residues: 1 to 8) is bound to a carboxyl group of a polysaccharide having carboxyl groups, and doxorubicin, daunorubicin, mitomycin C, bleomycin or the like is further bound by means of the peptide chain. In addition, Japanese Patent Publication (KOKOKU) No. (Hei) 7-84481/1995 discloses a DDS compound in which the aforementioned antineoplastic agent is introduced into a carboxymethylated mannoglucan derivative by means of a Schiff base or an acid amide bond.

[0004] These DDS compounds (also referred to as "drug complexes") are characterized in that they have more excellent antineoplastic activity, reduced toxicity and adverse effects compared to antineoplastic agents, per se, that are bound to polymer carriers. The inventors of the present invention have provided a DDS compound which is formed by binding a polymer carrier such as polysaccharide compounds to a drug compound such as antineoplastic agents by means of a spacer consisting of one to eight amino acids, and which can site-selectively distribute the drug compound such as antineoplastic agents to target tissues (International Publication WO97/46260). They have also found that a carboxy(C_{1-4})alkyldextran polyalcohol has highly desirable characteristics as a polymer carrier, and provided a DDS compound containing a carboxy(C_{1-4})alkyldextran polyalcohol as a polymer carrier (the above mentioned International Publication).

[0005] As for technologies relating to DDS compounds utilizing polyalcoholized polysaccharide derivatives as polymer carriers, some reports are available, for example, "Researches on polysaccharide-peptide-doxorubicin complexes - Correlations between stabilities of polysaccharide carriers in blood and their anti-neoplastic activities" (Abstracts of 10th Meeting of the Japan Society of Drug Delivery System, 279, 1994); "Researches on polysaccharide-peptide-doxorubicin complexes-Pharmacokinetics and anti-neoplastic activity" (Abstracts of 9th Annual Meeting of Japanese Society for the study of xenobiotics, 292, 1994); Abstracts of 19th Seminar of Trends in Research and Development (held by The Organization for Pharmaceutical Safety and Research), D-9, 1995; and "Researches on drug delivery to a tumor tissue by polysaccharide carriers" (Abstracts of 12th Colloid and Interface Technology Symposium, The Chemical Society of Japan, 51, 1995).

[0006] As means for enhancing organ selectivity of polysaccharide compounds and the like, for example, saccharide-modified polyglutamic acid derivatives (Japanese Patent Unexamined Publication (KOKAI) (Hei) No. 5-178986/1993), saccharide-modified polylysine derivatives (Japanese Patent Un-examined Publication (KOKAI) (Hei) No. 5-222187/1993), D-galactopyranosylgluconic acid derivatives of a poly- ε -substituted-L-lysine (Japanese Patent Unexamined Publication (KOKAI) (Hei) No. 7-70311/1995), saccharide-modified poly-ω -substituted-L-glutamic acid derivatives (Japanese Patent Unexamined Publication (KOKAI) (Hei) No. 7-228688/1995), polysaccharide compounds bound to a saccharide compound by means of a linker (Japanese Patent Unexamined Publication (KOKAI) (Hei) No. 8-85703/1996), glucosyl-protein derivatives (Japanese Patent Un-examined Publication (KOKAI) (Hei) No. 9-118699/1997) and the like have been known. However, any techniques for enhancing organ selectivity of DDS compounds have not been reported so far in which a carboxy(C_{1-4})alkyldextran polyalcohol is used as a polymer carrier.

[0007] When a DDS compound is clinically used in which a polymer carrier and a residue of a drug compound are linked to each other by means of a spacer containing an oligopeptide, it is necessary to accurately measure a blood concentration of the DDS compound, per se, and also to accurately measure a content of the residue of the drug compound, such as antineoplastic agents introduced to the DDS compound, to determine an appropriate dosage or to test lot differences of products. The measurements of a blood concentration of a DDS compound and a content of residue of a drug compound in the DDS compound have conventionally been performed by measuring the DDS compound directly, per se, based on fluorescence of the drug compound or its UV absorption without cleaving the drug compound or the drug compound bound with a part of the spacer from the DDS compound. Furthermore, a method based on NMR analysis of a DDS compound, per se, and a method of measuring a decomposed product obtained by an acid treatment of a DDS compound have also been proposed.

[0008] However, those methods have problems in that a quantitative measurement of a decomposed product by an acid treatment cannot be performed when the drug compound is susceptible to an acid, and accuracy of the NMR analysis is insufficient. Moreover, UV absorption of a residue of a drug compound present in a DDS compound may cause a shift of maximum absorption wavelength or a change in molar extinction coefficient relative to the drug compound itself because of effects of a polymer carrier or a peptide spacer, and therefore, it is generally difficult to accurately measure a content of a residue of a drug compound introduced into a DDS compound. It is extremely difficult to quantitatively measure a DDS compound in tissues after administration to living bodies by the methods based on NMR analysis or UV absorption.

Description of the Invention

[0009] An object of the present invention is to provide a means for enhancing organ selectivity (e.g., selectivity to liver or the like) of DDS compounds containing a carboxy(C_{1-4})alkyldextran polyalcohol as a polymer carrier, and to provide a DDS compound having the aforementioned characteristics.

[0010] Another object of the present invention is to provide a polysaccharide compound useful as a raw material for the manufacture of DDS compounds having the aforementioned characteristics.

[0011] A still further object of the present invention is to provide a method for measuring a DDS compound in which a polymer carrier and a residue of a drug compound are bound to each other by means of a spacer that comprises an oligopeptide. More specifically, the object of the present invention is to provide a method for accurately measuring the DDS compound, per se, or a content of the residue of the drug compound such as antineoplastic agents introduced to the DDS compound. Further specifically, the object of the present invention is to provide a method for determining an acurate concentration of the DDS compound in blood or a tissue after administration, or a method for determining of a content of the residue of the drug compound introduced to the DDS compound accurately.

[0012] The inventors of the present invention earnestly conducted intensive studies to achieve the foregoing objects, and as a result, found that a DDS compound with extremely high organ selectivity was obtainable by using a carboxy (C_{1-4})alkyldextran polyalcohol modified with a saccharide compound as a polymer carrier, and that a DDS compound containing the carboxy(C_{1-4})alkyldextran polyalcohol bound to galactose, in particular, had excellent liver selectivity.

[0013] Moreover, the inventors of the present invention also found that a blood concentration of a DDS compound or a content of residues of a drug compound introduced to the DDS compound can be accurately and easily determined by treating a DDS compound with a peptidase in which a polymer carrier and a residue of drug compound are bound to each other by means of a spacer containing an oligopeptide, and measuring a resulting hydrolysate. The present invention was achieved on the basis of these findings.

[0014] The present invention thus provides a DDS compound comprising a carboxy(C_{1-4})alkyldextran polyalcohol modified with a saccharide compound and a residue of a drug compound bound to the carboxy(C_{1-4})alkyldextran polyalcohol.

[0015] According to preferred embodiments of the DDS compound, the present invention provides the above DDS compound wherein the carboxy(C_{1-4})alkyldextran polyalcohol modified with a saccharide compound and the residue of a drug compound are bound to each other by means of a spacer; the above DDS compound wherein the spacer comprises one amino acid or 2 to 8 amino acids linked by peptide bond(s); the above DDS compound wherein the carboxy(C_{1-4})alkyldextran polyalcohol modified with a saccharide compound is formed by binding a saccharide compound and a carboxy(C_{1-4})alkyldextran polyalcohol by means of a linker; and the above DDS compound wherein the carboxy(C_{1-4})alkyldextran polyalcohol modified with a saccharide compound is a compound with cluster modification by a saccharide compound bound by means of a linker.

[0016] The present invention also provides a DDS compound which is obtainable by binding a residue of a drug compound to a carboxy(C_{1-4})alkyldextran polyalcohol in which a part of carboxyl groups of the carboxy(C_{1-4})alkyl moiety are modified with a saccharide compound.

[0017] According to preferred embodiments of the DDS compound, the present invention provides the above DDS compound which is obtainable by binding the carboxy(C_{1-4})alkyldextran polyalcohol and the residue of a drug com-

pound by means of a spacer; and the above DDS compound which is obtainable by binding the residue of drug compound to the carboxy(C_{1-4})alkyldextran polyalcohol which is produced by binding the saccharide compound or a linker bound to the saccharide compound to a part of carboxyl groups of the carboxy(C_{1-4})alkyl moiety of the carboxy(C_{1-4})-alkyldextran polyalcohol.

[0018] The present invention further provides a DDS compound which is obtainable by modifying, with a saccharide compound, a carboxy(C_{1-4})alkyldextran polyalcohol in which a residue of a drug compound is bound to a part of carboxyl groups of the carboxy(C_{1-4})alkyl moiety by means of a spacer.

[0019] According to preferred embodiments of the aforementioned DDS compound, the present invention provides the above DDS compound which is obtainable by binding the carboxy(C_{1-4})alkyldextran polyalcohol and the saccharide compound by means of a linker; and the above DDS compound which is obtainable by modifying, with a saccharide compound, a carboxy(C_{1-4})alkyldextran polyalcohol produced by binding a residue of a drug compound to a part of carboxyl groups of the carboxy(C_{1-4})alkyl moiety by means of a spacer comprising one amino acid or a spacer comprising 2 to 8 amino acids linked by peptide bond(s).

[0020] According to further preferred embodiment of the present invention, there are provided the above DDS compounds wherein the saccharide compound is galactose, galactosamine or derivatives thereof; the above DDS compounds wherein the dextran polyalcohol that constitutes the carboxy(C_{1-4})alkyldextran polyalcohol is a dextran polyalcohol which is obtained by treating a dextran under conditions that enable substantially complete polyalcoholization; the above DDS compounds wherein the carboxy(C_{1-4})alkyldextran polyalcohol is carboxymethyldextran polyalcohol; the above DDS compounds wherein substitution degree of galactose or galactosamine or a derivative thereof, or a that of a clustered galactose or galactosamine or a derivative thereof is 0.01 to 1.0 per saccharide residue of the carboxy(C_{1-4})alkyldextran polyalcohol; the above DDS compounds wherein the drug compound is an antineoplastic agent or an anti-inflammatory agent; the above DDS compounds wherein the drug compound is (1S,9S)-1-amino-9-ethyl-5-fluoro-2,3-dihydro-9-hydroxy-4-methyl-1H,12H-benzo[de]pyrano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]-quinoline-10,13 (9H,15H)-dione; and the above DDS compounds which are a medicament for treating liver cancer.

[0021] According to other aspects of the present invention, there are provided a carboxy(C_{1-4})alkyldextran polyalcohol modified with a saccharide compound; a polymer carrier comprising a carboxy(C_{1-4})alkyldextran polyalcohol modified with a saccharide compound; and a carboxy(C_{1-4})alkyldextran polyalcohol modified with a saccharide compound for a use in the manufacture of the above DDS compounds. According to further aspect of the present invention, there is provided a use of a carboxy(C_{1-4})alkyldextran polyalcohol modified with a saccharide compound for the manufacture of the above DDS compounds.

[0022] According to a still further aspect of the present invention, there is provided a method for measuring a DDS compound in which a polymer carrier and a residue of a drug compound are bound to each other by means of a spacer comprising 2 to 8 amino acids linked by peptide bond(s), which comprises the steps of treating the DDS compound with a peptidase, and measuring a resulting hydrolysate.

[0023] According to preferred embodiments of the aforementioned method, there are provided the above method which is used for measurement of the DDS compound contained in a sample from a living body; the above method which is used for measurement of content of the residue of a drug compounds introduced to the DDS compound; the above method wherein the hydrolysate is the drug compound; the above method wherein the hydrolysate is a compound consisting of the residue of a drug compound bound with a part of the spacer; and the above method wherein a part of the spacer is one amino acid derived from the spacer.

[0024] According to further preferred embodiments of the aforementioned method of the present invention, there are provided the above method wherein the polymer carrier is those having carboxyl groups, preferably a polysaccharide derivative having carboxyl groups; the above method wherein the polymer carrier is a carboxy(C_{1-4})-alkyldextran polyalcohol, preferably carboxymethyldextran polyalcohol; the above method wherein the dextran polyalcohol that constitutes the carboxy(C_{1-4})-alkyldextran polyalcohol is a dextran polyalcohol which is obtained by treating a dextran under conditions that enable substantially complete polyalcoholization; the above method wherein the polymer carrier is modified with a saccharide compound; the above method wherein the drug compound introduced to the DDS compound is an antineoplastic agent or an anti-inflammatory agent; the above method wherein the spacer is a tetrapeptide represented as, from the N-terminal, -Gly-Gly-Phe-Gly- or a tetrapeptid represented as, from the N-terminal, -Gly-Gly-Gly-Phe-; the above method wherein the spacer is a group represented as, from the N-terminal, -Gly-Gly-Phe-Gly-NH-Y'-CH_2-O-CO- or -Gly-Gly-Gly-Phe-NH-Y'-CH_2-O-CO- wherein Y' represents p-phenylene group; the above method wherein the peptidase is α -chymotrypsin or papain; and the above method wherein the drug compound is (1S,9S)-1-amino-9-ethyl-5-fluoro-2,3-dihydro-9-hydroxy-4-methyl-1H,12H-benzo[de]pyrano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinoline-10,13(9H,15H)-dione.

[0025] According to a particularly preferred embodiment of the above method of the present invention, the above method can be used for measurement of a DDS compound in which a carboxy(C_{1-4})alkyldextran polyalcohol and (1S,9S)-1-amino-9-ethyl-5-fluoro-2,3-dihydro-9-hydroxy-4-methyl-1H,12H-benzo[de]pyrano[3',4':6,7]-indolizino[1,2-b]quinoline-10,13(9H,15H)-dione are bound to each other by means of a spacer comprising a tetrapeptide represented as,

from the N-terminal, -Gly-Gly-Phe-Gly- or a tetrapeptide represented as, from the N-terminal, -Gly-Gly-Gly-Phe-, and the DDS compound or a content of the antineoplastic agent introduced to the DDS compound can be measured by using α -chymotrypsin as the peptidase, and by measuring (1S,9S)-9-ethyl-5-fluoro-1-glycylamino-2,3-dihydro-9-hydroxy-4-methyl-1H,12H-benzo[de]pyrano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]-quinoline-10,13(9H,15H)-dione as the hydrolysate.

Brief Explanation of the Drawings

[0026]

Fig. 1 shows blood and ascites concentrations of DDS compound measured by the method of the present invention (Example 4).
Fig. 2 shows blood and ascites concentrations of DDS compound measured by the method of the present invention (Example 5).
Fig. 3 shows an ultraviolet absorption spectrum of the DDS compound containing a polymer carrier modified with a saccharide compound (Example 6).
Fig. 4 shows a GPC chart of the DDS compound containing a polymer carrier modified with a saccharide compound (Example 6).
Fig. 5 shows the properties of the DDS compounds prepared in Example 6 ((C) and (D))which accumulated in liver.
Fig. 6 shows an ultraviolet absorption spectrum of the DDS compound of the present invention (Example 6, (D)).
Fig. 7 shows an ultraviolet absorption spectrum of the DDS compound of the present invention (Example 7).
Fig. 8 shows an ultraviolet absorption spectrum of the DDS compound of the present invention (Example 9).
Fig. 9 shows a GPC chart of the DDS compound of the present invention (Example 6, (D)).
Fig. 10 shows a GPC chart of the DDS compound of the present invention (Example 7).
Fig. 11 shows a GPC chart of the DDS compound of the present invention (Example 9).

Best Mode for Carrying out the Invention

[0027] The DDS compound of the present invention is characterized in that it comprises a carboxy(C1-4)alkyldextran polyalcohol modified with a saccharide compound and a residue of a drug compound bound to the carboxy(C_{1-4})alkyldextran polyalcohol. More specifically, the DDS compound of the present invention includes those (1) wherein the carboxy(C_{1-4})alkyldextran polyalcohol modified with a saccharide compound and the residue of a drug compound are bound to each other without a spacer, and (2) wherein the carboxy(C_{1-4})alkyldextran polyalcohol modified with a saccharide compound and the residue of a drug compound are bound to each other by means of a spacer.

[0028] Examples of those wherein the carboxy(C_{1-4})alkyldextran polyalcohol modified with a saccharide compound and the residue of a drug compound are bound to each other by means of a spacer include, for example, those wherein the carboxy(C_{1-4})alkyldextran polyalcohol modified with a saccharide compound and the residue of drug compound are bound to each other by means of a spacer that comprises one amino acid; those wherein the carboxy(C_{1-4})alkyldextran polyalcohol modified with a saccharide compound and the residue of drug compound are bound to each other by means of a spacer that comprises 2 to 8 amino acids linked by peptide bond(s), or a spacer comprising an oligopeptide which comprises 2 to 8 amino acids linked by peptide bond(s) and is bound to a linking group represented by -NH-Y-CO- wherein Y represents an alkylene group having 1 to 8 carbon atoms or -C_6H_4-CH_2-O- wherein -C_6H_4- represents a phenylene group which may have one or more substituents, preferably represents p-phenylene group. The term "modified" used herein should be construed in its broadest sense, which includes modifications with a covalent bond by direct binding of, or indirect binding by means of a linker of a saccharide compound and a carboxy(C_{1-4})alkyldextran polyalcohol, and the term should not be construed as any limiting sense.

[0029] The residue of a drug compound contained in the above DDS compound is a main partial structure derived from a drug compound used for therapeutic and/or preventive treatment of diseases of mammals including humans as a medicament, for example, an antineoplastic agent, an anti-inflammatory agent, an antibacterial agent or the like. However, a use of the drug compound from which the residue is derived is not limited to those mentioned above. As the drug compound, any compounds may be used so long as they have one or more reactive functional groups capable of participating in bond formation with a carboxy(C_{1-4})alkyldextran polyalcohol or a spacer (for example, amino group, carboxyl group, hydroxyl group, thiol group, ester group or the like). The residue of the drug compound may be bound to either a carboxyl group of the carboxy(C_{1-4})alkyldextran polyalcohol or a reactive functional group present in the spacer (for example, when a peptide spacer is used, an N-terminal amino group, a C-terminal carboxyl group, a reactive functional group present in an amino acid constituting the spacer and the like). The term "drug compound" used in the present specification also includes a prodrug compound which contains, as a part thereof, a major structure of a drug compound having pharmacological activity, per se, and can reproduce the compound *in vivo*.

[0030] More specifically, the term "residue of a drug compound" used in the present specification means a partial structure derived from the drug compound existing in the compound after bond formation, assuming that a bond between the carboxy(C_{1-4})alkyldextran polyalcohol or the spacer and the residue of a drug compound is formed through a reaction (e.g., dehydration condensation and the like) of a reactive functional group of the drug compound and a reactive functional group of the carboxy(C_{1-4})alkyldextran polyalcohol or the spacer. For example, when the drug compound is represented by D-NH_2, D-COOH, D-COOR, D-OH, D-SH, D-$CONH_2$, or D-NH-COOR (R is a lower alkyl group or the like), the residue of the drug compound is represented by D-NH- (D-NH-CO-Q etc.), D-CO- (D-CO-NH-Q, D-CO-O-Q, D-CO-S-Q, etc.), D-CO- (D-CO-NH-Q, D-CO-O-Q, D-CO-S-Q, etc.), D-O- (D-O-CO-Q, D-O-Q, etc.), D-S- (D-S-CO-Q, D-S-Q, etc.), D-CONH- (D-CO-NH-CO-Q etc.), and D-NH-CO- (D-NH-CO-O-Q, D-NH-CO-NH-Q, etc.), respectively (the parenthesized formulas represent binding modes between the spacer or the carboxy(C_{1-4})alkyldextran polyalcohol and the residue of the drug compound, wherein Q represents a partial structure of the spacer and the carboxy(C_{1-4})alkyldextran polyalcohol excluding a reactive functional group and a carboxyl group, respectively). However, the type of the bond between the spacer or the carboxy(C_{1-4})alkyldextran polyalcohol and the residue of the drug compound is not limited to those mentioned above.

[0031] As the residue of the drug compound, for example, residues of antineoplastic agents such as doxorubicin, daunorubicin, mitomycin C, bleomycin, cyclocytidine, vincristine, vinblastine, methotrexate, platinum antineoplastic agents (cisplatin or derivatives thereof), taxol or derivatives thereof, camptothecin or derivatives thereof (antineoplastic agents described in Japanese Patent Unexamined Publication (KOKAI) No. (Hei) 6-87746/1994, preferably (1S,9S)-1-amino-9-ethyl-5-fluoro-2,3-dihydro-9-hydroxy-4-methyl-1H,12H-benzo[de]pyrano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]-quinoline-10,13-(9H,15H)-dione disclosed in claim 2 or the like) may preferably be used. In addition, residues of steroidal anti-inflammatory agents such as hydrocortisone succinate and prednisolone succinate, and nonsteroidal anti-inflammatory agents such as mefenamic acid, flufenamic acid, diclofenac, ibuprofen, and tinoridine are also preferred.

[0032] Where a spacer comprising one amino acid or a spacer comprising 2 to 8 amino acids linked by peptide bond (s) is used as the spacer that binds the drug compound to the carboxy(C_{1-4})alkyldextran polyalcohol, the spacer has a form of a residue of one amino acid, which means a residue obtained by removing one hydrogen atom and one hydroxyl group from an amino group and a carboxyl group of the amino acid, respectively, or a residue of an oligopeptide comprising 2 to 8 amino acids linked by peptide bond(s), which means a residue obtained by removing one hydrogen atom and one hydroxyl group from the N-terminal amino group and the C-terminal carboxyl group of the oligopeptide, respectively.

[0033] Preferred spacers are residues of oligopeptides comprising 2 to 6 amino acids. Kinds of amino acids constituting of the spacer are not particularly limited, and for example, L- or D-amino acids, preferably L- amino acids can be used, and β -alanine, ε-aminocaproic acid, γ -aminobutyric acid or the like may also be used as well as α -amino acids. These amino acids other than α-amino acids are preferably located close to the polysaccharide compound in the spacer.

[0034] For example, where an oligopeptide spacer is used, the bonding direction is not particularly limited, and generally, the N-terminal of the spacer can be bound to a carboxyl group of the carboxy(C_{1-4})alkyldextran polyalcohol by means of an acid-amide bond, and the C-terminal of the spacer can be bound to an amino group of the drug compound. Alternatively, for example, where a lysine residue is incorporated as a unit of the peptide spacer, the α-amino group and theε -amino group of the lysine residue are allowed to form respective acid-amide bonds with carboxyl groups of other amino acids so as to form N-terminals at both ends of the peptide spacer, which enables bond formation with carboxyl groups of the drug compounds. In addition, by incorporating one or more residues of diamine compounds or dicarboxylic acid compounds (residues of diamine compounds such as ethylenediamine or dicarboxylic acid compounds such as succinic acid) as units in a spacer, a spacer having either N-terminals or C-terminals at both ends any be utilized.

[0035] Where a spacer comprising an oligopeptide is used, the amino acid sequence thereof is not particularly limited. Preferably used spacers include, for example, a spacer being a residue of a dipeptide represented by -X-Z-, wherein X represents a residue of a hydrophobic amino acid and Z represents a residue of a hydrophilic amino acid; and -X-Z- means a residue which consists of a dipeptide that is formed by a peptide bond between a hydrophobic amino acid (X) and a hydrophilic amino acid (Z) at the N-terminal side and the C-terminal side, respectively, and whose one hydrogen atom and one hydroxyl group are removed from the amino group at the N-terminal and the carboxyl group at the C-terminal, respectively, and a spacer containing a residue of the dipeptide as a partial peptide sequence. As the hydrophobic amino acid, for example, phenylalanine, tyrosine, leucine or the like can be used, and as the hydrophilic amino acid, for example, glycine, alanine or the like can be used. The spacer may have a repeated sequence of the dipeptide residues (for example, -X-Z-X-Z-, -X-Z-X-Z-X-Z- and the like).

[0036] By using the spacer containing such dipeptide structure, the spacer can be hydrolyzed in tumorous sites or inflammatory sites, which is considered abundant in peptidase, to release the drug compound at a high concentration in the sites immediately. Accordingly, the partial structure formed by binding the spacer containing the above dipeptide and the drug compound to each other is a preferred partial structure of the DDS compound according to the present

invention. Where a residue of an antineoplastic agent exhibiting antineoplastic activity (e.g., doxorubicin) dependent on the concentration is used as the residue of the drug compound, a spacer composed of the above dipeptide residue represented by -X-Z- or a spacer containing the above dipeptide residue as a partial peptide sequence may be preferably used.

[0037] In addition, where a time-dependent type antineoplastic agent which requires a retained working time at over a certain concentration is used as the residue of the drug compound, enhanced antineoplastic activity may sometimes be obtained by using the above spacer. Examples of such an antineoplastic agent include the antineoplastic agents disclosed in the Japanese Patent Unexamined Publication (KOKAI) No. (Hei) 6-87746/1994, preferably the antineoplastic agent disclosed in claim 2. The spacers are not limited to those mentioned above, and it is generally necessary to choose an appropriate spacer from viewpoints of the mode of action of the antineoplastic agent, characteristics in pharmacokinetics or appearance of toxicity, releasability *in vivo* of the antineoplastic agent and the like. For carcinomas exhibiting rapid proliferation, it is generally preferred to choose the above spacer capable of releasing the drug compound at a high concentration in a short time.

[0038] Specific examples of oligopeptides that can be used as the spacer are shown in the following table; however, spacers used for the DDS compounds of the present invention are not limited to those mentioned below. It can be readily understood that one of ordinary skilled in the art can appropriately determine whether or not a spacer is used, or choose the type of a spacer when a spacer is used so as to achieve an optimum releasing rate of a drug compound. In the table, the left ends of peptide sequences are N-terminals and the residues of drug compounds are bound to C-terminals. D-Phe represents the D-phenylalanine residue and the other amino acids represent L-amino acids. The degrees of the releasing rate were judged from the degree of appearance of efficacy of the DDS compounds carrying doxorubicin against Walker 256 tumor-bearing rats, or from free doxorubicin concentrations at tumorous sites of Walker 256 tumor-bearing rats. For doxorubicin, a spacer that can release the drug compound at a high concentration immediately, e.g., -Gly-Gly-Phe-Gly-, is preferably used among the listed spacers.

Table 1

(a) Spacers having high releasing rate

-Leu-Gly-

-Tyr-Gly-

-Phe-Gly-

-Gly-Phe-Gly-

-Gly-Gly-Phe-Gly-

-Gly-Phe-Gly-Gly-

-Phe-Gly-Gly-Gly-

-Phe-Phe-Gly-Gly-

-Gly-Gly-Gly-Phe-Gly-

(b) Spacers having relatively high releasing rate

-Gly-Gly-Phe-Phe-

-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-

(c) Spacers having relatively low releasing rate

-Phe-Phe-

-Ala-Gly-

-Pro-Gly-

-Gly-Gly-Gly-Phe-

(d) Spacers having low releasing rate

-Gly-

-D-Phe-Gly-

-Gly-Phe-

-Ser-Gly-

-Gly-Gly-

-Gly-Gly-Gly-

-Gly-Gly-Gly-Gly-

[0039] The DDS compound of the present invention is characterized to have a carboxy(C_{1-4})alkyldextran polyalcohol modified with a saccharide compound as a polymer carrier. The degree of polyalcoholization of the carboxy(C_{1-4}) alkyldextran polyalcohol contained in the DDS compound of the present invention is not particularly limited. Preferably, dextran polyalcohols constituting the carboxy(C_{1-4})alkyldextran polyalcohol may be those obtained by treating a dextran under a condition which enables substantially complete polyalcoholization.

[0040] The sort of the dextran used for the preparation of the carboxy(C_{1-4})alkyldextran polyalcohol is not particularly

limited, and the dextran may contain α-D-1,6-linkages at any rate. For example, dextran containing α-D-1,6-linkages at a rate of 85% or more, 90% or more, or 95% or more can be used. The molecular weight of the dextran is not particularly limited, and for example, dextran having a molecular weight of from about 1,000 to about 2,000,000, preferably from about 3,000 to about 800,000 can be used. As the C_{1-4} alkyl group constituting the carboxy(C_{1-4})alkyl group of the carboxy(C_{1-4})alkyldextran polyalcohol, a linear or branched C_{1-4} alkyl group, specifically, methyl group, ethyl group, n-propyl group, isopropyl group, n-butyl group, sec-butyl group or the like can be used, and methyl group can preferably be used.

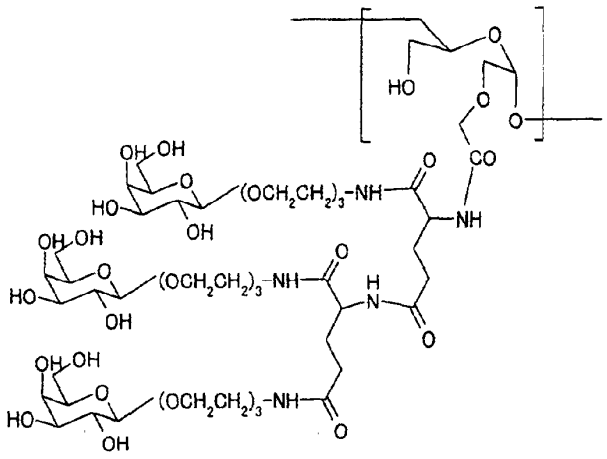
[0041] When dextran is used as a starting material, the dextran can be treated successively with a large excess amount of sodium periodate and sodium borohydride to obtain a dextran polyalcohol subjected to substantially complete polyalcoholization. However, the method for the polyalcoholization of dextran is not limited to the method mentioned above, and any method available to those skilled in the art may be utilized. The carboxy(C_{1-4})alkylation can be carried out, for example, by reacting a halogenated (C_{1-4})alkylcarboxylic acid such as chloroacetic acid, bromoacetic acid, α -chloropropionic acid, α-methyl- α-chloropropionic acid, β-chloropropionic acid, α -methyl- β -chloropropionic acid, α-chlorobutyric acid, β-chlorobutyric acid, or γ -chlorobutyric acid, preferably chloroacetic acid, with hydroxyl groups of the dextran polyalcohol to achieve partial or complete carbaoxy(C_{1-4})alkylation of the hydroxyl groups.

[0042] For example, the dextran polyalcohol is dissolved in an inert solvent which does not participate in the reactions (e.g., water, N,N-dimethylformamide, or dimethyl sulfoxide), and the resulting solution is added with a halogenated (C_{1-4})alkylcarboxylic acid or a salt thereof in the presence of a base (e.g., sodium hydroxide or potassium hydroxide), and then the mixture is allowed to react for several minutes to several days at a temperature under ice-cooling to about 100°C. The degree of introduction of the carboxy(C_{1-4})alkyl group may be easily controlled, for example, by suitably choosing the reaction temperature of the carboxy(C_{1-4})alkylation or the amount of the halogenated (C_{1-4})alkyl carboxylic acid or bases used as reagents, and these means are well-known to those skilled in the art. The degree of the carboxy (C_{1-4})alkylation based on one sugar residue of the dextran polyalcohol is not particularly limited, and for example, the degree may be in the range of from 0.01 to 2.0, preferably from 0.1 to 1.0.

[0043] Kinds of the saccharide compound used for the modification of the carboxy(C_{1-4})alkyldextran polyalcohol are not particularly limited, and those skilled in the art can appropriately choose the saccharide compound depending on the type of an organ to be a target of the DDS compound, pharmacokinetics and the like. As the saccharide compound, any of monosaccharides, oligosaccharides, and derivatives thereof may be used. Furthermore, kinds of a bond between the saccharide compound and the carboxy(C_{1-4})alkyldextran polyalcohol are not particularly limited. The saccharide compound and the carboxy(C_{1-4})alkyldextran polyalcohol may be, for example, directly bound through an O- α -glycosidic linkage or O- β -glycosidic linkage, or the both may be bound to each other by means of an appropriate linker. The term "linker" used herein must be construed in its broadest sense so as to include any linkers that can be used for the binding between the saccharide compound residue and the carboxy(C_{1-4})alkyldextran polyalcohol. The amount of the saccharide compound introduced to the carboxy(C_{1-4})alkyldextran polyalcohol (degree of substitution) is not particularly limited, and the amount can suitably be chosen depending on various conditions such as the kind of the saccharide compound, desired degree of selectivity, and the kind of the drug compound. The amount may generally be about 0.01 to about 1.0 per saccharide residue of the carboxy(C_{1-4})alkyldextran polyalcohol.

[0044] When a linker is used, kinds of the linker are not particularly limited. It is preferable to use, for example, a linker represented by -O-$(CH_2)_n$-NH- (n is an integer of from 1 to 16) or -$(O\text{-}CH_2CH_2)_m$-NH- (m is an integer of from 1 to 10). The carboxy(C_{1-4})alkyldextran polyalcohol can be modified with a saccharide compound by binding the O-terminal or the N-terminal, preferably the N-terminal of the aforementioned linker to a saccharide compound by means of an O-α-glycosidic linkage or O-β -glycosidic linkage, and binding the other end of the linker to a carboxyl group of the carboxy(C_{1-4})alkyldextran polyalcohol by means of an amide bond or an ester bond.

[0045] It is also possible to produce a cluster-modified compound by using a linker suitable for the so-called cluster modification. The cluster-modified compounds are those with a bunch of saccharide compounds attached to the carboxyl group of the carboxy(C_{1-4})alkyldextran polyalcohol by means of a linker suitable for the cluster modification, and specific means for their manufacture are disclosed in, for example, Japanese Patent Nos. 2774417, 2774429, Biol. Pharm. Bull., 20, pp.259-266, 1997 and the like. In the cluster-modified compound, plural saccharide compounds are located in a certain limited space, thereby the compound has characteristic features of enhanced affinity for a receptor and an excellent organ selectivity. An example of the cluster modification in the DDS compound of the present invention is shown below (in the following formula, a partial structure of the carboxy(C_{1-4})alkyldextran polyalcohol molecule modified with a cluster is shown, and a residue of the drug compound is omitted). However, the mode of the cluster modification used for the DDS compound of the present invention is not limited to the following example, and it should be understood that any appropriate means can be selected by those skilled in the art.



[0046] Examples of the monosaccharides include, for example, hexoses such as glucose, fructose, mannose, galactose, fucose, neuraminic acid and uronic acid; hexosamines such as galactosamine and glucosamine; pentoses such as ribose, deoxyribose, arabinose and xylose and the like. As the derivatives thereof, for example, N- or O-acyl derivatives, O-alkyl derivative, sulfuric acid esters, phosphoric acid esters thereof and the like may be used. More specific examples of the derivatives of monosaccharides include N-acetylneuraminic acid, N-acetylgalactosamine, N-acetylglucosamine, mannose-6-phosphate, galactose-3-phosphate, 6-O-benzoylglucose, 6-O-carboxymethyl-N-acetylglucosamine, 2-N-benzylglucosamine and the like. As the oligosaccharides, for example, linear or blanched heterooligosaccharide or homooligosaccharides constituted by the aforementioned monosaccharides or derivatives thereof can be used. More specifically, sucrose, sialyl Lewis A, sialyl Lewis X, lactose, maltose, Lewis X, sulfated Lewis X and the like may be used. Among them, as the saccharide compound which enhances liver selectivity, galactose or galactosamine or derivatives thereof, and oligosaccharides which has galactose or N-acetylgalactosamine at the non-reducing terminal (e.g., lactose) are preferred, and galactose and N-acetylgalactosamine are particularly preferred.

[0047] Methods for producing the DDS compound of the present invention are not particularly limited. General manufacturing processes are shown below, and their specific examples will be detailed in the examples in the specification. Those skilled in the art can readily manufacture a DDS compound that falls within the scope of the present invention by referring to the general explanation set out below and preparation methods described in the examples, and by appropriately choosing starting materials, reagents, reaction conditions and the like, and if necessary, by modifying and altering the methods. In general, the DDS compound of the present invention can be produced by modifying a carboxy(C_{1-4})alkyldextran polyalcohol with a saccharide compound according to a suitable method, and allowing the modified compound to react with the residue of the drug compound, or with a spacer that is bound to a residue of drug compound. A carboxy(C_{1-4})alkyldextran polyalcohol can be generally prepared in the form of an aqueous solution of an alkali metal salt such as sodium salt or potassium salt, and the modification with a saccharide compound and the reaction with a drug compound (or a spacer bound to the drug compound) can be performed in water or an organic solvent containing water.

[0048] Alternatively, a carboxy(C_{1-4})alkyldextran polyalcohol or a carboxy(C_{1-4})alkyldextran polyalcohol modified with a saccharide compound may be converted into an organic amine salt, and subsequent reactions may be performed in an organic solvent which is substantially free from water. As the organic amine salt, for example, salts of aliphatic amines such as triethylamine, trimethylamine, or triethanolamine; salts of alicyclic and aromatic amines such as N-methylpyrrolidine, N-methylpiperidine, N-methylmorpholine, or dimethyl-aminopyridine; or quaternary ammonium salts such as tetramethylammonium chloride or tetraethylammonium chloride can be used. The conversion from the sodium salt of the carboxy(C_{1-4})alkyldextran polyalcohol or the carboxy(C_{1-4})alkyldextran polyalcohol modified with a saccharide compound into a corresponding organic amine salt can be carried out by using an ion exchange resin or the like. For example, a sodium salt of a carboxymethyldextran polyalcohol or a saccharide-modified compound thereof may be dissolved in water, applied to a column charged with Bio-Rad AG50W-X2 (200-400 mesh, H^+ type) resin, and eluted with water, and then the resulting effluent can be added with an organic amine such as triethylamine and lyophilized. Alternatively, it is also possible to carry out the conversion by one step, i.e., by dissolving a sodium salt of a car-

boxymethyldextran polyalcohol or a saccharide-modified compound thereof in water and then passing the solution through a triethylammonium type resin.

[0049] The bond between the drug compound, per se, and a carboxyl group of the carboxy(C_{1-4})alkyldextran polyalcohol, or the bond between the spacer bound to the drug compound and a carboxyl group of the carboxy(C_{1-4}) alkyldextran polyalcohol can generally be formed by binding a reactive amino group of the drug compound, per se, or a reactive amino group of the spacer (N-terminal amino group or the like in a peptide spacer) to a carboxyl group of the carboxy(C_{1-4})alkyldextran polyalcohol by means of an acid-amide bond. However, the bond between the drug compound or the spacer and the carboxyl group of the carboxy(C_{1-4})alkyldextran polyalcohol is not limited to the above-described bond, and other chemical bonds and linkages utilizing one or more spacers may be used. For example, an acid anhydride may be formed between a C-terminal carboxyl group of a peptide spacer or a carboxyl group of the drug compound and a carboxyl group of the carboxy(C_{1-4})alkyldextran polyalcohol, or by using a diamine compound such as ethylenediamine used as a spacer, each of the carboxyl groups may be bound by means of an acid-amide bond to each of amino groups of the diamine compound.

[0050] When a reactive amino group of a drug compound, per se, or the N-terminal amino group of a spacer is bound to a carboxyl group of the carboxymethyldextran polyalcohol by means of an acid-amide bond, dehydration condensation agents ordinarily used for synthesis of peptide chains, for example, N,N'-dicycloalkylcarbodiimides such as N,N'-dicyclohexylcarbodiimide (DCC), carbodiimide derivatives such as 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDAPC), 1-ethoxycarbonyl-2-ethoxy-1,2-dihydroxyquinoline (EEDQ) and the like can be used. In this case, benzotriazole derivatives such as 1-hydroxybenzotriazole (HOBT) may be added as required. In addition, the reaction may also be performed by the activated ester method or the acid halide method.

[0051] When the reaction is performed in a non-aqueous system, any organic solvents may be used so long as they are substantially free from water and can dissolve the reactants (an organic amine salt of a carboxymethyldextran polyalcohol modified with a saccharide compound and a drug compound or a spacer bound to a drug compound and the like). For example, N,N-dimethylformamide, dimethyl sulfoxide, acetamide, N-methylpyrrolidone, sulfolane and the like can preferably be used. Although the amount of the residue of the drug compound which is introduced into the carboxy(C_{1-4})alkyldextran polyalcohol modified with a saccharide compound is not particularly limited, the amount should be suitably chosen depending on the sort of the residue of a drug compound, and from the viewpoints of pharmacokinetics, efficacy, and toxicity of the DDS compound. Generally, the range of approximately from 0.1 to 30% by weight, preferably approximately from 2 to 15% by weight can be chosen. When the antineoplastic agent disclosed in claim 2 of the Japanese Patent Unexamined Publication (KOKAI) No. (Hei) 6-87746/1994 is used as the drug compound, the amount of the drug compound to be introduced may be, for example, about 1 to 15% by weight, preferably about 4 to 8% by weight. The ratio of residues of the drug compound introduced to the carboxy(C_{1-4})alkyldextran polyalcohol can be easily determined by, for example, absorption spectrometric analysis.

[0052] For example, as for the antineoplastic agent disclosed in claim 2 of the Japanese Patent Unexamined Publication (KOKAI) No. (Hei) 6-87746/1994 is used as the drug compound, it is known that the equilibrium of the drug compound lies to the compound whose lactone ring is closed (the ring-closed compound) in an acidic aqueous medium (for example, approximately at pH 3), whereas the equilibrium lies to the compound whose lactone ring is opened (the ring-opened compound) in a basic aqueous medium (for example, approximately at pH 10). The DDS compounds introduced with the residue corresponding to each of the ring-closed and ring-opened compounds have similar antineoplastic activity. However, when a reactant in the form of the ring-opened compound is present and the carboxy(C_{1-4}) alkyldextran polyalcohol modified with a saccharide compound is reacted with the spacer bound to the aforementioned drug compound (e.g., an oligopeptide spacer), a condensation reaction will proceed between a carboxyl group derived from the lactone ring and an amino group derived from the spacer. Due to the side reaction, a yield may significantly be decreased, and moreover, a desired DDS compound cannot sometimes be uniformly obtained. Such side reaction can be avoided by using the ring-closed compound as a reactant in a non-aqueous system that does not allow the equilibrium.

[0053] The DDS compound of the present invention is characterized in that it can specifically exhibit desired pharmacological activity at a local site such as tumorous sites or inflammatory sites depending on the sort of a residue of a drug compound (e.g., residues of drug compounds such as antineoplastic agents or anti-inflammatory agents), and can reduce toxicity inherent to the drug compound, per se. Furthermore, the DDS compound of the present invention also has excellent blood vessel permeability. Since s protease (peptidase) is expressed at tumorous sites or inflammatory sites, the DDS compound having a spacer comprising an oligopeptide is readily hydrolyzed at the spacer moiety to allow the released drug compound to be incorporated into cells and exhibit its efficacy, or the DDS compound is taken into the cells with the aid of a receptor present in a target cell which recognizes the saccharide, and the drug compound released by the action of a protease exhibits its efficacy.

[0054] The carboxy(C_{1-4})alkyldextran polyalcohol is hardly recognized as an exogenous macromolecule in living bodies, for example, in liver, spleen, bone marrow and the like, and for this reason, the compound distributes to these kinds of organ insufficiently. Whilst, depending on the kind of the saccharide compound, the compound can be distrib-

uted at a high concentration in organs abundant in saccharide receptors for the saccharide compound. For example, a DDS compound of the present invention which comprises a carboxy(C_{1-4})alkyldextran polyalcohol modified with galactose has excellent liver selectivity. Therefore, the DDS compound that is bound to an antineoplastic agent as the drug compound is useful for the treatment of liver cancer.

[0055] A medicament comprising the DDS compound of the present invention may generally be filled in vials or the like in the form of a lyophilized product or other, and provided for clinical use as preparations for parenteral administration such as injections or drip infusions which are dissolved upon use. However, the form of pharmaceutical preparations of the medicament is not limited to the aforementioned forms. For the manufacture of the aforementioned pharmaceutical preparations, pharmaceutical additives available in the field of the art, for example, solubilizers, pH modifiers, stabilizers and the like, can be used, and the pharmaceutical preparation can be prepared as a pharmaceutical composition. Although the dose of the above medicament is not particularly limited, it should normally be decided in view of the dose of the drug compound that constitutes the residue of the drug compound, the amount of the residue of the drug compound introduced into the DDS compound, the condition of a patient, the sort of a disease and the like. For example, where a DDS compound introduced with about 6% by weight of the residue of the antineoplastic agent mentioned in claim 2 of Japanese Patent Unexamined Publication (KOKAI) No. (Hei) 6-87746/1994 is parenterally administered, about 0.1 to 100 mg, preferably about 1 to 30 mg per m^2 of body surface area per day may generally be administered once a day, and the administration may preferably repeated every 3 to 4 weeks.

[0056] According to another aspect of the present invention, there is provided a method for measuring a DDS compound in which a polymer carrier and a residue of a drug compound are bound to each other by means of a spacer that comprises 2 to 8 amino acids linked by peptide bond(s), which comprises the step of treating the DDS compound with a peptidase, and measuring the resulting hydrolysate.

[0057] The term "measurement" used herein should be construed in its broadest sense including measurements performed for quantitative and qualitative determinations. The term preferably means quantitative measurement. The DDS compounds to be measured by the measurement method of the present invention are those comprising a polymer carrier and a residue of drug compound bound to each other by means of a spacer that comprises 2 to 8 amino acids linked by peptide bond(s), and the compound should not be construed in any limitative way. Examples of the spacer comprising 2 to 8 amino acids linked by peptide bond(s) include, for example, a spacer consisting essentially of 2 to 8 amino acids linked by peptide bond(s), as well as a spacer which comprises an oligopeptide consisting of 2 to 8 amino acids linked by peptide bond(s) and said oligopeptide is bound to a bridging group represented by -NH-Y-CO- wherein Y represents a bridging group such as an alkylene group having 1 to 8 carbon atoms or $-C_6H_4-CH_2-O-$ wherein $-C_6H_4$ represents a phenylene group which may have one or more substituents, preferably represents p-phenylene group. The measuring method of the present invention can be used for, for example, measurement of a concentration of the DDS compound, per se, contained in biological samples such as blood or body fluids. The method of the present invention can also be used for measurement of amount of residue of a drug compounds introduced into a DDS compound (for example, weight % of the residue of a drug compounds relative to the total weight of the DDS compound or the like).

[0058] The residue of drug compound contained in the DDS compound to be measured by the method of the present invention has the same meaning as that explained above. Any drug compound may be used so long as they have one or more functional groups capable of binding to the spacer (for example, amino group, carboxyl group, hydroxyl group, thiol group, ester group etc.). The residue of drug compound may be bound to the N-terminal amino group or the C-terminal carboxyl group of the spacer, or a reactive functional group present in an amino acid that constitutes the spacer.

[0059] Specific examples of the residue of drug compound are same as those explained for the DDS compounds comprising a carboxy(C_{1-4})alkyldextran polyalcohol modified with a saccharide compound and a residue of drug compound bound to each other by means of a spacer. Preferred residues of the drug compounds are also the same as those explained above.

[0060] The residue of drug compound contained in the DDS compound to be measured by the method of the present invention binds to a polymer carrier by means of a spacer. A preferred spacer is a residue of oligopeptide that consists of 2 to 8 amino acids linked by peptide bond(s), or a spacer comprising 2 to 8 amino acids linked by peptide bond(s) which is bound to a bridging group represented by $-NH-Y'-CH_2-O-CO-$ wherein Y' represents p-phenylene group. The kind of amino acids constituting the spacer, bonding direction of the spacer, amino acid sequences, specific examples thereof and the like are the same as those explained for the DDS compounds comprising a carboxy(C_{1-4})alkyldextran polyalcohol modified with a saccharide compound and a residue of drug compound bound to each other by means of a spacer.

[0061] As the polymer carrier that constitutes the DDS compound to be measured by the method of the present invention, for example, synthetic polymers and the like may be used as well as the polysaccharide derivatives. Any polysaccharide derivatives and synthetic polymers may be used so long as they do not exhibit substantial toxicity against living bodies, and they can function as a drug carrier. For example, any polysaccharide derivatives and synthetic polymers that have conventionally been used for the production of DDS compounds can be utilized as the polymer

carrier. For example, polysaccharide derivatives having carboxyl groups can preferably be used, and polyalcoholized polysaccharide derivatives can most preferably be used. Examples of the synthetic polymer include, for example, polyethylene glycols; polyamino acids such as polyglutamic acids, polyaspartic acids and polylysines; derivatives of polyvinyl compounds such as N-(2-hydroxypropyl)-methacrylamide derivatives.

[0062] More specifically, as the polysaccharide derivatives having carboxyl groups, for example, polysaccharides and derivatives thereof that are chemically or biologically modified can be used, and those having carboxyl groups in their molecules can preferably be used. As examples of the polymer carrier having carboxyl groups in the molecule, polysaccharides such as hyaluronic acid, pectic acid, alginic acid, chondroitin, and heparin; and polysaccharides such as pullulan, dextran, mannan, chitin, inulin, levan, xylan, araban, mannoglucan, and chitosan in which all or a part of hydroxyl groups are introduced with functional groups having a carboxyl group can be used. For example, those having carboxy(C_{1-4})alkylated hydroxyl groups or those having hydroxyl groups esterified with one of carboxyl groups of a polybasic acid can preferably be used. In addition, those obtained by polyalcoholizing the above polysaccharides and then introducing functional groups having a carboxyl group may also be used.

[0063] A DDS compound using a carboxy(C_{1-4})alkyldextran polyalcohol as the polymer carrier is a particularly preferred measuring object according to the method of the present invention. The polyalcoholization degree of the carboxy (C_{1-4})alkyldextran polyalcohol, the kinds of dextran used for the manufacture thereof, the manufacturing process and the like are the same as those explained for the DDS compound comprising a carboxy(C_{1-4})alkyldextran polyalcohol modified with a saccharide compound and a residue of drug compound bound to each other by means of a spacer.

[0064] In addition, a DDS compound using a polymer carrier modified with a saccharide compound as the polymer carrier is also a preferred object for the measurement method of the present invention. For example, a carboxy(C_{1-4}) alkyldextran polyalcohol modified with a saccharide compound can suitably be used as the polymer carrier. The method for modifying a polymer carrier with a saccharide compound, the kind of the saccharide compound and the like are the same as those explained for the carboxy(C_{1-4})alkyldextran polyalcohol modified with a saccharide compound.

[0065] The object of the measurement method of the present invention may be a DDS compound produced by using a linker suitable for the so-called cluster modification (so-called cluster-modified compound). The concept of the cluster modification is the same as that explained for the carboxy(C_{1-4})alkyldextran polyalcohol modified with a saccharide compound.

[0066] The method of the present invention is characterized in that a hydrolysate is measured that is obtained by subjecting a DDS compound to a treatment with a peptidase for the measurement of the DDS compound. Kinds of the peptidase are not particularly limited so long as they can hydrolyze the oligopeptide moiety (an oligopeptide moiety comprising 2 to 8 amino acids linked by peptide bond(s)) contained in the spacer of the DDS compound. For example, subtilisin, α -chymotrypsin, type IV collagenase, pepsine, thermolysin, papain, elastase and the like can be used. Among them, α-chymotrypsin and papain are preferred.

[0067] Although types of the hydrolysate are not particularly limited, those detectable by ordinary spectrophotometric techniques such as those utilizing ultraviolet absorption spectrum and fluorescence spectrum are preferred. Generally, the drug compound, per se, may be detected, as well as a compound comprising a part of the spacer that remains and binds to the residue of a drug compound, for example, a drug compound to which one amino acid derived from the spacer is bound, a drug compound to which an oligopeptide consisting of 2 to 8 amino acids derived from the spacer is bound, a drug compound to which one amino acid or the aforementioned oligopeptide derived from the spacer is bound by means of a bridging group represented by -NH-Y-CO- wherein Y represents an alkylene group having 1 to 8 carbon atoms or a group represented by -C_6H_4-CH_2-O- wherein -C_6H_4- represents a phenylene group which may have one or more substituents, preferably represents p-phenylene group. As for the aforementioned hydrolysate, a part or all of reactive functional groups of the drug compound may be hydrolyzed. A desired hydrolysate can be measured by suitably choosing a peptidase depending on the sort of the DDS compound,.

[0068] As a sample for the measurement, samples from living bodies which are collected from animals including humans administered with a DDS compound, such as blood, lymph, saliva, urine, feces and extracted tissue can be used, as well as an aqueous solution of DDS compound or a solution of DDS compound in an aqueous organic solvent that does not substantially inhibit the enzymatic reaction. Suitable conditions have been known in the art for various peptidases, and those skilled in the art can readily choose suitable reaction conditions such as a substrate concentration, pH, a buffering agent, a reaction temperature, and a reaction time depending on the kind of the peptidase. Usually, the sample is subjected to a pretreatment such as homogenization and deproteinization, then a peptidase is added to a reaction mixture after dilution so as to have a desired concentration of a DDS compound as a substrate, and the reaction can be continued until the DDS compound is completely hydrolyzed.

[0069] The method for measuring the hydrolysate is not particularly limited. When the DDS compound or the amount of an introduced drug compound is quantitatively measured, it is desirable to use ordinary spectrophotometric techniques such as those based on ultraviolet absorption spectrum measurement and fluorescence spectrum measurement, which are used alone or in combination. The measurement may be performed by optionally applying a separation such as by using a high performance liquid chromatography. An accurate quantitative measurement can be performed

by preparing a calibration curve beforehand in a measurement system. Typical examples of the method of the present invention are specifically described in detail in the examples of the specification, and accordingly, those skilled in the art can readily carry out the method of the present invention by referring to the above general explanation and specific explanation in the examples, and if necessary, by adding modifications or alterations to the disclosed methods.

Examples

[0070] The present invention will be explained more specifically by examples; however, the scope of the present invention is not limited to the following examples.

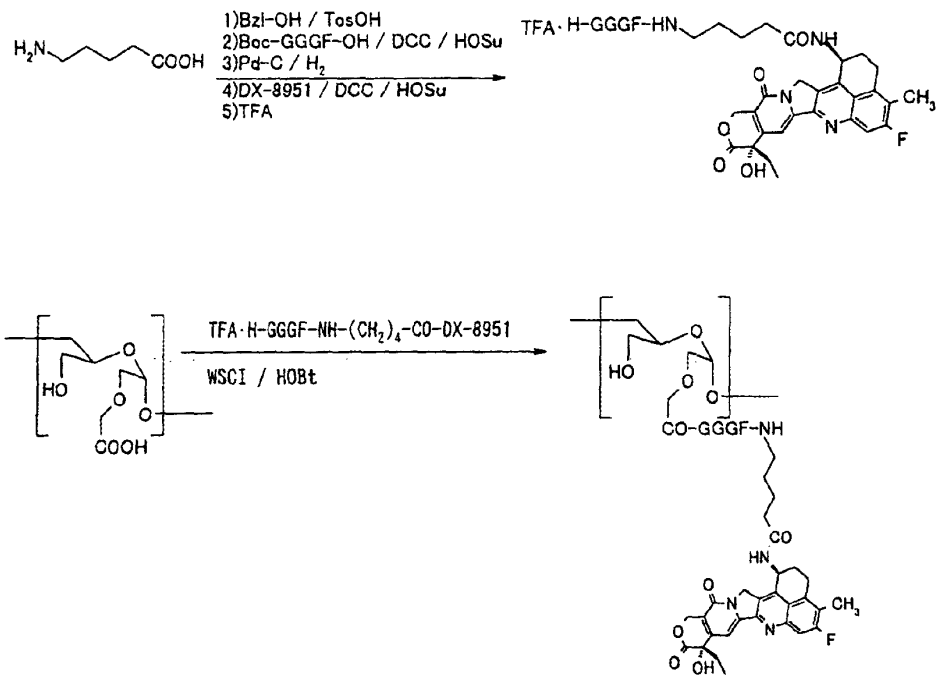
Example 1

[0071] A DDS compound (Compound 1) in which a carboxymethyldextran polyalcohol (occasionally abbreviated as "CM-Dex-PA" or "CM-dextran polyalcohol" hereinafter in the examples) as a polymer carrier and an antineoplastic agent ((1S,9S)-1-amino-9-ethyl-5-fluoro-2,3-dihydro-9-hydroxy-4-methyl-1H,12H-benzo[de]-pyrano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinoline-10,13(9H,15H)-dione disclosed in claim 2 of Japanese Patent Unexamined Publication (KOKAI) (Hei) No. 6-87746/1994 (abbreviated as "DX-8951" in hereinafter in the examples) were bound by means of a tetrapeptide spacer represented as -Gly-Gly-Phe-Gly- (the oligopeptide is shown as the sequence from their N-terminals, and others are shown in the same manner hereinafter in the examples) was produced according to the method described in Example 15 of International Publication WO97/46260. As the CM-Dex-PA, that having an average molecular weight of 228K, and a carboxymethylation degree (degree of substitution with carboxymethyl groups per constitutional saccharide residue) of 0.4 was used.

[0072] 10 μl of a solution of the above DDS compound prepared as 400 μg/ml in distilled water was added to 180 μl of Britton Robinson buffer (pH 6.0), and the mixture was further added with 10 μl of an α-chymotrypsin solution prepared as 10 mg/ml in distilled water. The reaction mixture was incubated at 40°C for 2 hours, and added with 200 μl of 0.5 N HCl solution containing 50% of acetonitrile, and the released hydrolysate (a compound in which glycine derived form the spacer was bound to the amino group of DX-8951 by a peptide bond, which is the compound mentioned in Example 50 of International Publication WO97/46260, abbreviated as "G-DX 8951" hereinafter in the examples) was quantified by HPLC. For the HPLC analysis, a Symmetry C18 (4.6 × 100 mm; 3.5 μm, Watars Co.) column was used, and the elution was performed with 0.1 M sodium acetate (pH 5.0) containing 36.5% of organic solvent (methanol:acetonitrile = 1:2), and the hydrolysate was detected by fluorescent spectroscopy (Ex. 375 nm and Em. 445 nm). As a result, the DX-8951 content of the aforementioned DDS compound was found to be 5.7%. On the other hand, the DX-8951 content of the aforementioned DDS compound was calculated to be 4.9% based on UV absorption (366 nm) of DX-8951 measured by a spectrophotometer.

Example 2

[0073]



[0074] A DDS compound (Compound 2) in which CM-Dex-PA and DX-8951 were bound by means of a spacer represented by -Gly-Gly-Gly-Phe-NH-$(CH_2)_4$-CO- was prepared as follows. 5-Aminopentanoic acid (1.0 g), p-toluenesulfonic acid (1.95 g), and benzyl alcohol (5 ml) were allowed to react in toluene (50 ml) at 140°C for 5 hours while removing the produced water by using a Dean-Stark apparatus. The reaction mixture was concentrated, and the resulting residue was solidified by adding ether. The solid obtained was filtrated, washed with ether, and dried to obtain 2.9 g of tosylic acid salt of 5-aminopentanoic acid benzyl ester.

[0075] Boc-Gly-Gly-Gly-Phe-OH (575 mg), HOSu (182 mg), and DCC (326 mg) were dissolved in DMF (20 ml), and the mixture was stirred for 30 minutes. The solution was added with a solution of p-toluenesulfonic acid salt of 5-aminopentanoic acid benzyl ester (500 mg) and triethylamine (0.184 ml) dissolved in DMF (10 ml), and the mixture was stirred for 3 days at room temperature. The reaction mixture was concentrated, and the residue was purified by column chromatography (CH_2Cl_2:MeOH = 20:1) to obtain 380 mg of Boc-Gly-Gly-Gly-Phe-NH-$(CH_2)_4$-COOBzl (Bzl represents benzyl group). The Boc-Gly-Gly-Gly-Phe-NH-$(CH_2)_4$-COOBzl (380 mg) was dissolved in methanol containing 50% of water (20 ml), and the solution was added with 5% Pd-C (water content; 50%, 300 mg) and stirred overnight under hydrogen at ordinary pressure. The catalyst in the reaction mixture was removed by filtration, and the filtrate was concentrated to dryness to obtain Boc-Gly-Gly-Gly-Phe-NH-$(CH_2)_4$-COOH (330 mg).

[0076] The Boc-Gly-Gly-Gly-Phe-NH-$(CH_2)_4$-COOH (150 mg), DCC (70 mg) and HOSu (40 mg) were dissolved in DMF, and the solution was stirred for 30 minutes. A solution of DX-8951 (160 mg) and triethylamine (0.040 ml) dissolved in DMF was added to the above solution, and then the mixture was stirred overnight at room temperature. The reaction mixture was concentrated, and the resulting residue was purified by column chromatography (CH_2Cl_2:MeOH = 20:1) to obtain Boc-Gly-Gly-Gly-Phe-NH-$(CH_2)_4$-CO-DX-8951 (110 mg). The Boc-Gly-Gly-Gly-Phe-NH-$(CH_2)_4$-CO-DX-8951 (110 mg) was dissolved in TFA (2 ml), and the solution was allowed to react for 1 hour. The reaction mixture was concentrated, and the resulting residue was solidified by addition of ether. The supernatant was removed, and the solid was dried to obtain 100 mg of trifluoroacetic acid salt of H-Gly-Gly-Gly-Phe-NH-$(CH_2)_4$-CO-DX-8951.

^{1}H-NMR (DMSO-d_6): δ 8.45-8.55 (m, 2H), 8.28-8.35 (m, 2H), 7.95-8.10 (br, 2H), 7.79 (d, 1H, J=10.7 Hz), 7.70-7.75 (m, 1H), 7.32 (s, 1H), 7.20-7.30 (m, 5H), 7.15-7.25 (m, 4H), 6.50-6.60 (br, 1H), 5.50-5.60 (m, 1H), 5.40-5.50 (m, 2H), 5.18 (s, 2H), 4.50-4.60 (m, 1H), 3.55-3.95 (m, 7H), 3.00-3.25 (m, 5H), 2.75-2.85 (m, 1H), 2.50 (s, 3H), 2.15-2.25 (m,

4H), 1.86-2.00 (m, 2H), 1.55-1.65 (m, 2H), 1.45-1.55 (m, 2H), 0.88 (t, 3H, J=7.35Hz)

[0077] CM-Dex-PA (350 mg) produced by the method described in Example 13 of Japanese Patent Unexamined Publication (KOKAI) (Hei) No. 8-144421/1996, having an average molecular weight of 337K and a carboxymethylation degree (degree of substitution with carboxymethyl groups per constitutional saccharide residue) of 0.4, was dissolved in water (10 ml). To this solution, a solution of trifluoroacetic acid salt of H-Gly-Gly-Gly-Phe-NH-$(CH_2)_4$-CO-DX-8951 (50 mg) dissolved in methanol (10 ml) was added, and the mixture was further added with a solution of HOBt (7 mg) dissolved in methanol (5 ml). The reaction mixture was adjusted to pH 7.0, added with water-soluble carbodiimide (10 mg), and then the mixture was stirred for 14 hours. The reaction mixture was further added with water-soluble carbodiimide (10 mg), stirred for 2 hours, and then added with water-soluble carbodiimide (10 mg) and stirred for 2 hours. The reaction mixture was diluted with ultrapure water, and the low molecular weight substances were removed by using an ultrafiltration membrane (50K). The filtrate was lyophilized, and the resulting powder was dissolved in 3 M aqueous NaCl, and the solution was added dropwise to ethanol. The deposited solid was separated by centrifugation. After the supernatant was removed, the solid was dissolved in water again. The low molecular weight substances were removed with an ultrafiltration membrane (50K), and the filtrate was passed through a 0.22 μm filter, and lyophilized to obtain 280 mg of the target compound.

[0078] A solution of the aforementioned DDS compound prepared as 2.63 mg/ml in distilled water (10 μl) was added with 490 μl of a solution of α-chymotrypsin prepared as 2 mg/ml in Britton Robinson buffer (pH 6), or a solution of subtilisin A prepared as 2 mg/ml in Tris-HCl (pH 9). The reaction mixture was incubated at 40°C for 2 hours, and added with 500 μl of 0.5 N HCl solution containing 50% of acetonitrile. The released hydrolysate [NH_2-$(CH_2)_4$-CO-DX-8951] was quantitatively measured by HPLC. For the HPLC analysis, a Symmetry C18 (4.6 × 100 mm; 3.5 μ m, Watars Co.) column was used, and elution was performed with 0.1% trifluoroacetic acid solution containing 32% of organic solvent (methanol:acetonitrile = 1.2), and the hydrolysate was detected by fluorescent spectroscopy (Ex. 375 nm and Em. 445 nm). As a result, the NH_2-$(CH_2)_4$-CO-DX-8951 was eluted at about 4.8 minutes. When the DX-8951 content in the above DDS compound was calculated to be 3.2% by using a calibration curve prepared with NH_2-$(CH_2)_4$-CO-DX-8951. On the other hand, when the DX-8951 content was calculated based on UV absorption of the aforementioned DDS compound by using a calibration curve prepared with DX-8951, the content was calculated as 2.9%.

Example 3

[0079] The DX-8951 content in the DDS compound prepared in Example 1 (Compound 1) was measured by using (1) subtilisin A (0.1 M Tris-HCl, pH 9.0), (2) α -chymotrypsin (0.1 M Tris-HCl, pH 8.0), and (3) thermolysin (0.1 M Tris-HCl/1 mM $CaCl_2$, pH 9.0). 10 μl of a solution of Compound 1 prepared as 400 μg/ml was added to 180 μl of a buffer for each enzyme (final concentration; 20 μg/ml). To this mixture, 10 μl of each enzyme prepared as 100 mg/ml in each buffer was added (final concentration; 5 mg/ml), and the mixture was allowed to react for 3 hours at 40°C. After the reaction, 200 μl of 0.5 N HCl solution containing 50% of acetonitrile was added to the mixture, and 10 μl of the mixture was analyzed by HPLC. For the HPLC analysis, a Symmetry C18 (4.6×250 mm) column was used, and elution was performed with 0.1 M AcONa buffer (pH 5.0) containing 31% of organic solvent (acetonitrile:methanol = 2:1). The hydrolysate was measured by fluorescent spectroscopy (Ex. 375 nm and Em. 445 nm), and the hydrolysate in the enzymatic reaction mixture was quantitatively determined by using calibration curves which were prepared by using solutions containing 2 nmol/ml of each of G-DX-8951, DX-8951 and DX-8951 bound with phenylalanine-glycine derived from the spacer of Compound 1 (FG-DX-8951). As a result, it was found that the subtilisin A and the α -chymotrypsin released 100% of G-DX-8951 from Compound 1 under the aforementioned conditions. The thermolysin released 100% of FG-DX-8951.

Example 4

[0080] Meth A cells subcultured in abdominal cavities were intraperitoneally transplanted into BALB/c (♂) mice (1×10^6 cells/mouse). After 5 days, Compound 1 (DX-8951 content: 5.2%) was intraperitoneally administered to the mice in an amount of 10 or 2.5 mg/kg (amount in terms of DX-8951). At 2, 4, 8, 24, and 48 hours after the administration, blood was collected from hearts. The collected blood was left for 10 minutes, and centrifuged at 12,000 rpm for 10 minutes to obtain blood serum. At the same time, tumorous ascites was also collected. 25 μl of the serum and the tumorous ascites were each added with 100 μl of water containing 80% of methanol, and centrifuged at 12,000 rpm for 5 minutes. 25 μl of the supernatant was added with 225 μl of a thermolysin solution prepared as 2 mg/ml in 0.1 M Tris-HCl, pH 8.5/0.1 M $CaCl_2$, and the mixture was allowed to react at 50°C for 1 hour. Then, the reaction mixture was added with 250 μ l of 0.5 N HCl solution containing 50% of acetonitrile, and 20 μl of the mixture was subjected to HPLC analysis. For the HPLC analysis, a Symmetry C18 (4.6 × 100 mm) column was used, and elution was performed with 0.1 M AcONa solution (pH 5.0) containing 41% of a mixture of methanol and acetonitrile (1:2), and the hydrolysate was detected by fluorescent spectroscopy (Ex. 375 nm and Em. 445 nm). As a result, when 10 mg/kg was administered,

the concentration of Compound 1 in the ascites decreased with time, whilst the blood concentration gradually increased after the administration and reached the maximum concentration at 24 hours, and after then the concentration was kept at almost the same level as the ascites concentration (Fig. 1). When 2.5 mg/kg was administered, the changes in concentrations in blood and ascites were similar to those observed at 10 mg/kg administration.

Example 5

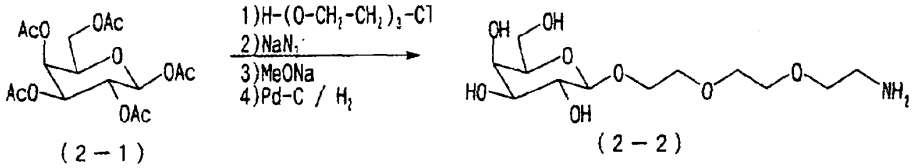
[0081] Meth A cells subcultured in abdominal cavities were intraperitoneally transplanted into BALB/c (♂) mice (1×10^6 cells/mouse). After 5 days, Compound 1 (DX-8951 content: 6.6%) was intraperitoneally administered to the mice in an amount of 10 or 2.5 mg/kg (amount based on DX-8951, each group consisted of 3 mice). After the administration, blood was collected from hearts with time (5 and 30 minutes, and 2, 4, 8, 24, and 48 hours). The collected blood was left for 10 minutes, and centrifuged at 12,000 rpm for 10 minutes to obtain blood serum. At the same time, tumorous ascites was also collected. 25 μl of the serum and the tumorous ascites were each added with 225 μl of an α-chymotrypsin solution prepared as 2 mg/ml in Britton Robinson Buffer (pH 6), and the mixture was allowed to react at 40°C for 2 hour. Then, the reaction mixture was added with 250 μl of 0.5 N HCl solution containing 50% of acetonitrile, and centrifuged at 12,000 rpm for 5 minutes, and 10 μl of the supernatant was subjected to HPLC analysis. Estimated concentrations of Compound 1 were calculated from the concentration of G-DX-8951 obtained by the HPLC analysis and the DX-8951 content of Compound 1 used. The HPLC analysis was performed under the same conditions as Example 4. As a result, when 10 mg/kg was administered, the concentration of Compound 1 in blood decreased with time. The concentration in ascites gradually increased after the administration, and reached substantially the same level as the blood concentration at 48 hours (Fig. 2). When 2.5 mg/kg was administered, the changes in concentrations of Compound 1 in blood and ascites were similar to those observed at 10 mg/kg administration.

Example 6

[0082] A DDS compound comprising a polymer carrier modified with a saccharide compound was prepared as follows. In the following scheme, only one or two constitutional units introduced with carboxymethyl groups were exemplified as the constitutional units of the saccharide chain, however, it should be understood that the carboxymethyldextran polyalcohol moiety of the DDS compounds described in the examples are not formed by the repetition of the constitutional units. The carboxymethylation degree (degree of substitution with carboxymethyl groups per saccharide residue as a building unit) was determined by converting the sodium salt of the carboxymethyldextran polyalcohol into free acid form, and then dissolving the free acid in aqueous 0.1 N sodium hydroxide and titrating the solution with 0.1 N hydrochloric acid. An aqueous solution of the sodium salt of the carboxymethyldextran polyalcohol was applied to a Bio-Rad AG50W-x2 (H^+) column, and the passed solution was lyophilized and used as a sample. The sample was dissolved in a given excess amount of 0.1 N aqueous sodium hydroxide, and titrated with 0.1 N hydrochloric acid by using phenolphthalein as an indicator. The carboxymethylation degree was determined in accordance with the equation: $13.4(a-b)/[s-5.8(a-b)]$ wherein symbol "s" represents the amount of the collected sample (mg), symbol "a" represents the given excess amount of 0.1 N aqueous sodium hydroxide (ml), and symbol "b" represents the amount of 0.1 N hydrochloric acid required for the titration (ml). The amount of the introduced drug (% by weight) was calculated from the results of absorption spectrometry (around 362 nm) utilizing the characteristic absorption of the drug. The gel filtration was performed under the following conditions: column; TSK gel G4000 PW_{XL}, eluate; 0.1 M NaCl, flow rate; 0.8 ml/min, and column temperature; 40°C.

(A) Synthesis of Compound 2-2

[0083]



(2 − 1)　　(2 − 2)

[0084] Compound 2-1 (5.0 g) and 2-[2-(2-chloroethoxy)ethoxy]ethanol (3.75 ml) were dissolved in dichloromethane (75 ml), and the solution was added with boron trifluoride ether complex (7.7 g) and stirred for 5 hours. The reaction

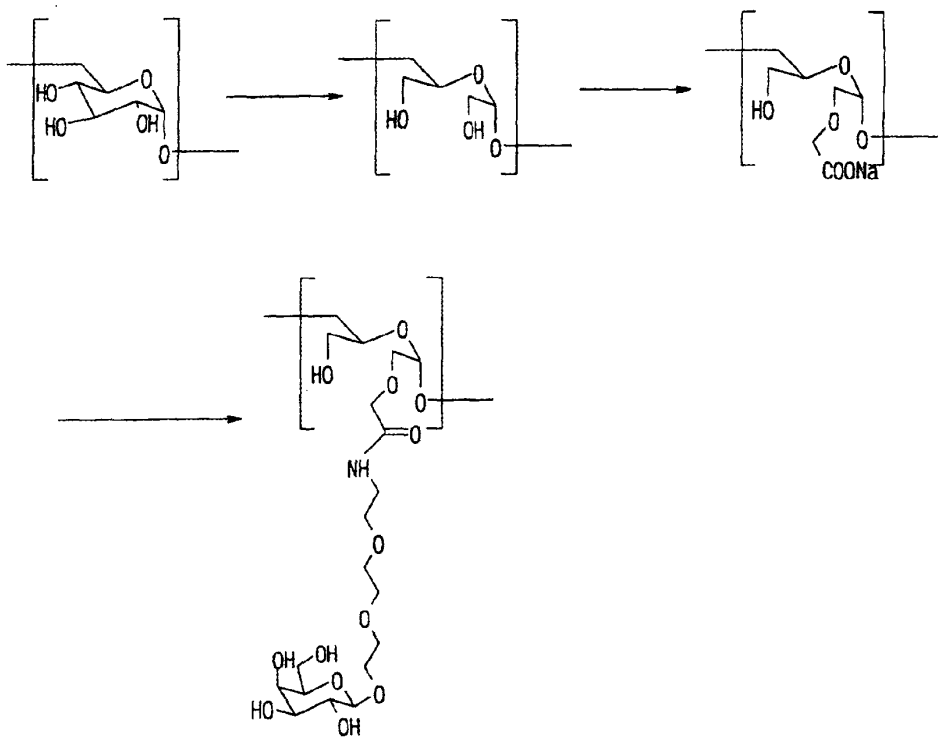
mixture was diluted with dichloromethane (100 ml), and the organic layer was washed with water, saturated aqueous sodium hydrogencarbonate, and then with brine, and dried over magnesium sulfate. After the magnesium sulfate was removed by filtration, the solvent was evaporated, and the resulting residue was purified by column chromatography (hexane:ethyl acetate = 2:1) using silica gel to obtain 3.3 g of chlorinated compound. The chlorinated compound obtained (3.3 g) and NaN_3 (2.0 g) were stirred at 60°C for 2 days in DMF (15 ml). The solvent was evaporated, and the residue was dissolved in a mixture of ethyl acetate and water. The organic layer was washed with water, and dried over magnesium sulfate, and then the magnesium sulfate was removed by filtration. The solvent was evaporated to obtain 2.8 g of azide compound.

[0085] The azide compound obtained (1.5 g) was dissolved in methanol (30 ml), and the solution was added with a 28% MeONa solution in methanol until the pH reached 10, and the resulting mixture was stirred for 1 hour. Then, the reaction mixture was added with Dowex 50 WX8 (H^+) until the mixture became neutral, and the resin was removed by filtration and the solvent was evaporated. The resulting residue was dissolved in a mixture of methanol (50 ml) and water (10 ml), and the solution was added with 5% Pd-C (water content; 50%, 2.0 g) and stirred overnight under hydrogen at ordinary pressure. The catalyst was removed by filtration, and the solvent was evaporated to obtain 1.2 g of Compound 2-2.

^{1}H-NMR (DMSO-d_6): δ 4.20-4.30 (1H, br), 4.00-4.10 (1H, br), 3.80-3.85 (1H, br), 3.50-3.75 (14H, m), 2.75-2.90 (2H,m)

(B) Synthesis of galactose-modified CM-dextran polyalcohol

[0086]



[0087] An aqueous solution (2000 ml) of sodium periodate (66.0 g) was added to 0.1 M solution of dextran 4 (Funakoshi Co. Ltd., average molecular weight; 4000-6000, 20 g) in acetate buffer (pH 5.5, 2000 ml). The mixture was shielded from the light and stirred at 4°C for 10 days. Then, the mixture was added with ethylene glycol (14.0 ml) and stirred overnight. The reaction mixture was adjusted to pH 7.5 with 8 M aqueous sodium hydroxide under ice cooling, and added with sodium borohydride (28 g). After the sodium borohydride was dissolved, the mixture was stirred overnight at room temperature. The mixture was adjusted to pH 5.5 with acetic acid under ice cooling, and stirred at 4°C

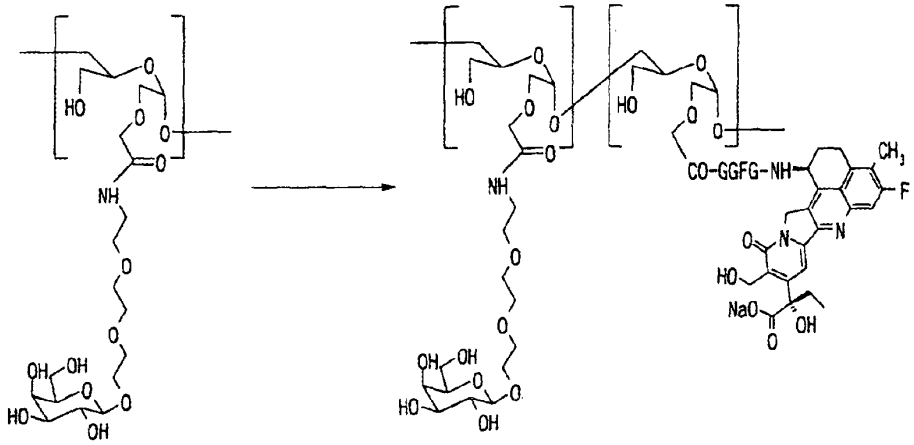
for 1 hour. The mixture was adjusted to pH 7.5 with 8 M aqueous sodium hydroxide under ice cooling. The above procedure was repeated twice, and the resulting two butches of aqueous solution were combined, and low molecular weight fractions were removed by ultrafiltration using a Biomax-3 membrane (Millipore) to obtain a residual solution. The residual solution was passed through a Biomax-30 membrane. The passed solution was desalted by ultrafiltration using a Biomax-3 membrane and lyophilized to obtain purified dextran polyalcohol (12.0 g). The molecular weight (gel filtration, pullulan standard) of the resulting product was 9K.

[0088] The above purified dextran polyalcohol (9.4 g) was added to an aqueous solution obtained by dissolving sodium hydroxide (39.3 g) in water (282 ml), and dissolved at room temperature. Monochloroacetic acid (56.4 g) was added to the solution under ice cooling and dissolved, and the mixture was allowed to react for 20 hours at room temperature. The reaction mixture was adjusted to pH 8 with acetic acid, and subjected to ultrafiltration using a Biomax-5 membrane to remove low molecular weight fractions. The residual solution was lyophilized to obtain sodium salt of carboxymethyl (abbreviated as "CM" hereinafter in the examples)-dextranpolyalcohol (12 g). The resulting sodium salt of CM-dextran polyalcohol (4.0 g) was added to an aqueous solution obtained by dissolving sodium hydroxide (17 g) in water (120 ml), and dissolved at room temperature. Monochloroacetic acid (24 g) was added to the solution under ice cooling and dissolved, and then the mixture was allowed to react for 20 hours at room temperature.

[0089] The reaction mixture was adjusted to pH 8 with acetic acid, and low molecular weight fractions were removed by ultrafiltration using a Biomax-5 membrane. The residual solution was lyophilized to obtain sodium salt of CM-dextran polyalcohol (4.0 g). The molecular weight (gel filtration, pullulan standard) of the resulting product was 14K, and the carboxymethylation degree per saccharide residue was 0.7 as determined by alkalimetry. The resulting sodium salt of CM-dextran polyalcohol (1.0 g) was dissolved in water (100 ml), and the solution was added with a methanol solution (100 ml) of Compound 2-2 (800 mg) of Example 1. The solution was further added with water-soluble carbodiimide hydrochloride (240 mg) 3 times every 2 hours, and then the mixture was stirred for 6 hours in total. The solvent in the reaction mixture was evaporated, and the resulting oil was dissolved in water and desalted by ultrafiltration using a Biomax-3 membrane. The resulting aqueous solution was lyophilized to obtain 1.1 g of the title compound. The galactose content in the product was 1.0 per 10 saccharide residues as determined by the phenol-sulfuric acid method.

(C) Synthesis of galactose-modified CM-dextran polyalcohol-Gly-Gly-Phe-Gly-DX-8951

[0090]

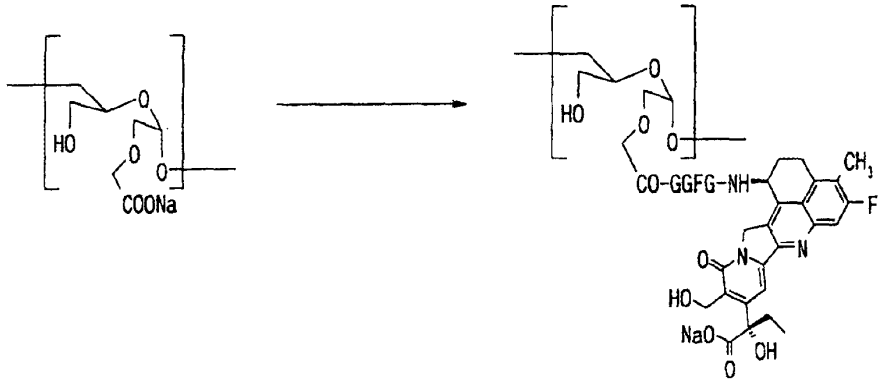


[0091] The sodium salt (1.0 g) of the galactose-modified CM-dextran polyalcohol obtained in the above (B) was dissolved in water (30 ml), and the solution was added with a solution of trifluoroacetic acid salt of Gly-Gly-Phe-Gly-DX-8951 (150 mg) and 1-hydroxybenzotriazole (35 mg) in methanol (40 ml). The solution was adjusted to pH 7.0, and then added with water-soluble carbodiimide hydrochloride (35 mg) 3 times every 2 hours and stirred overnight. The solvent in the reaction mixture was removed by evaporation, and the resulting residue was dissolved in 3 M aqueous sodium chloride (20 ml), and the solution was added dropwise to ethanol (100 ml). The deposited precipitates were collected by centrifugation (3500 rpm, 8 minutes). The precipitates were dissolved in water and desalted by ultrafiltration using a Biomax-3 membrane. The residual solution, which did not pass through the membrane, was filtered through

a Millipore filter (0.22 μm), and lyophilized to obtain 900 mg of the title compound. The resulting product was dissolved in 0.1 M aqueous sodium chloride, and analyzed by GPC (column; TOSOH TSK GelPW-4000XL, solvent; 0.1 M aqueous NaCl, flow rate; 0.8 ml/min). The results of the GPC analysis and an ultraviolet absorption spectrum (in 0.1 M Tris buffer, pH 9.0) of the compound are shown in Figs. 3 and 4, respectively. The DX-8951 content in the compound was found as 4.9% (w/w) by quantitative analysis based on absorption spectrophotometry at 366 nm in 0.1 M Tris buffer containing 30% of acetonitrile (pH 10.0).

(D) Synthesis of CM-dextran polyalcohol-Gly-Gly-Phe-Gly-DX-8951

[0092]



[0093] The sodium salt of the CM-dextran polyalcohol obtained in the above (B) (2.0 g) was dissolved in water, and the solution was passed through Dowex-50 WX8 (Et_3NH^+) to obtain triethylammonium salt of CM-dextran polyalcohol (1.9 g). The resulting triethylammonium salt of CM-dextran polyalcohol (1.9 g) was dissolved in an aqueous solution containing 50% of N,N-dimethylformamide. The solution was successively added with a solution of triethylamine (0.112 ml) and trifluoroacetic acid salt of Gly-Gly-Phe-Gly-DX-8951 (350 mg) in N,N-dimethylformamide (10 ml), and 1-ethoxycarbonyl-2-ethoxy-1,2-dihydroxyquinoline (1.9 g), and the mixture was allowed to react overnight at room temperature with stirring. The solvent in the reaction mixture was removed by evaporation, and the resulting residue was dissolved in 3 M aqueous sodium chloride (20 ml), and the solution was added dropwise to ethanol (100 ml). The deposited precipitates were collected by centrifugation (3500 rpm). These precipitates were dissolved in water, and desalted by ultrafiltration using a Biomax-3 membrane. The residual solution that did not pass through the membrane was filtered by a Millipore filter (0.22 μm), and lyophilized to obtain 1.4 g of the title compound. The resulting product was dissolved in 0.1 M aqueous sodium chloride, and analyzed by GPC (column; TOSOH TSK GelPW-4000XL, solvent; 0.1 M aqueous NaCl, flow rate; 0.8 ml/min). The result of the GPC analysis and ultraviolet absorption spectrum (in 0.1 M Tris buffer, pH 9.0) of the compound are shown in Figs. 6 and 9, respectively. The DX-8951 content in the compound was found as 5.2% (w/w) by quantitative analysis based on absorption spectrophotometry at 366 nm in 0.1 M Tris buffer containing 30% of acetonitrile (pH 10.0).

(E) Measurement of DDS compound

[0094] The galactose-modified DDS compound obtained in the above (C), and the DDS compound of the above (D) as a control were each dissolved in distilled water for injection so as to give a concentration of 0.5 mg/ml based on DX-8951. Each of the aqueous solutions of the DDS compounds was intravenously injected to C57BL/6 mice (each group consisting of five mice) in the tails. The dose was 5 mg/kg based on DX-8951. After the administration, livers were extracted with time (0.5, 1, 2, 4, and 24 hours), and the amounts of the DDS compounds in the livers were determined. The liver was added with 5 times weight of water and homogenized. The homogenate was centrifuged at 3000 rpm for 10 minutes, and the supernatant was further centrifuged at 15,000 rpm for 15 minutes. 50 μl of the resulting supernatant was added with 450 μl of an α -chymotrypsin solution prepared as 2 mg/ml in Britton-Robinson Buffer (B. R.B), and the mixture was allowed to react at 40°C for 2 hours. After then, the mixture was added with 500 μl of 0.5 N HCl solution containing 50% of acetonitrile, and centrifuged at 12,000 rpm for 5 minutes. The amount of released G-DX-8951 was measured by subjecting 20 μl of the supernatant to HPLC analysis to determine the amounts of DDS

compounds. 50, 10, and 2 μg/ml aqueous solutions of each of the DDS compounds used for the administration were prepared in distilled water, and 50 μl of each solution was subjected to enzymatic treatment and G-DX8951 was quantified to prepare calibration curves.

Conditions of HPLC analysis
Column: Symmetry C18 (4.6 x 100 mm)
Flow rate: 1.0 ml/min
Column temperature: 40°C
Detection wavelength (fluorescence): Ex. 375 nm and Em. 445 nm
Eluate: methanol:acetonitrile = 1:2 (29%), 0.1% TFA (71%)

[0095] The results are shown in Fig. 5. The aforementioned galactose-modified DDS compound exhibited higher liver accumulation compared to the control DDS compound (aforementioned (D)).

Example 7: Synthesis of galactose-modified CM-dextran polyalcohol-Gly-Gly-Phe-Gly-DX-8951

[0096] A solution of dextran T500 (Pharmacia, molecular weight; 500K, 50 g) in 0.1 M acetate buffer (pH 5.5, 5000 ml) was added with an aqueous solution (5000 ml) of sodium periodate (165.0 g). The solution was shielded from the light and stirred at 4°C for ten days, and then added with ethylene glycol (35.0 ml) and stirred overnight. The reaction mixture was adjusted to pH 6.5 with 8 M aqueous sodium hydroxide under ice cooling, and added with a suspension of sodium borohydride (70 g) in water (2000 ml). After the sodium borohydride was dissolved, the solution was stirred overnight at room temperature. The solution was cooled on ice, adjusted to pH 5.5 with acetic acid, and stirred at 4°C for one hour. The solution was adjusted to pH 7.5 with 8 M aqueous sodium hydroxide under ice cooling. The resulting solution was subjected to ultrafiltration using a Biomax-50 membrane to remove low molecular weight fractions and a residual solution was obtained. The residual solution was passed through an ultrafiltration membrane (1000K, Filtron Co.). The passed solution was desalted by ultrafiltration using a Biomax-50 membrane, and lyophilized to obtain dextran polyalcohol (21.1 g). The molecular weight (gel filtration, pullulan standard) of the product was 128K.

[0097] The resulting polyalcohol (5 g) was added to an aqueous solution obtained by dissolving sodium hydroxide (13.84 g) in water (150 ml), and dissolved in the solution at room temperature. Sodium salt of monochloroacetic acid (61.6 g) was added to the solution under ice cooling and dissolved in the solution, and then the mixture was allowed to react overnight at room temperature. The reaction mixture was adjusted to pH 8.5, and then low molecular weight fractions were removed by ultrafiltration using a Biomax-50 membrane. High molecular weight fractions were lyophilized to obtain sodium salt of CM-dextran polyalcohol (6.2 g). The molecular weight (gel filtration, pullulan standard) of the resulting product was 428K, and the degree of carboxymethylation per saccharide residue was found as 0.9 by alkalimetry. The resulting sodium salt of CM-dextran polyalcohol (500 mg) was dissolved in water (50 ml), and the solution was added with a solution of Compound 2-2 (400 mg) of Example 1 in methanol (20 ml) and a solution of 1-hydroxybenzotriazole (160 mg) in methanol (20 ml). The mixture was further added with water-soluble carbodiimide hydrochloride (120 mg) 3 times every 2 hours, and stirred for 6 hours in total. The solvent in the reaction mixture was removed by evaporation, and the resulting oil was dissolved in water and subjected to ultrafiltration using a Biomax-50 membrane to remove low molecular weight fractions. The residual solution was lyophilized to obtain 600 mg of the desired compound. The galactose content of the product was found as 1.7 per 10 saccharide residues determined by the phenol-sulfuric acid method.

[0098] The resulting sodium salt of galactose-modified CM-dextran polyalcohol (200 mg) was dissolved in water (3 ml), and the solution was added with a solution of trifluoroacetic acid of Gly-Gly-Phe-Gly-DX-8951 (27 mg) in methanol (3 ml) and a solution of 1-hydroxybenzotriazole (7 mg) in methanol (3 ml). The resulting solution was adjusted to pH 7.0, added with water-soluble carbodiimide hydrochloride (7 mg) 3 times every 2 hours, and stirred overnight. The solvent in the reaction mixture was removed by evaporation, and the resulting residue was dissolved in 3 M aqueous sodium chloride (10 ml), and then the solution was added dropwise to ethanol (100 ml). The deposited precipitates were collected by centrifugation (3500 rpm). The precipitates were dissolved in water, and desalted by ultrafiltration using a Biomax-50 membrane. The residual solution that did not pass through the membrane was filtered by a Millipore filter (0.22 μm), and lyophilized to obtain 180 mg of the title compound. The product was dissolved in 0.1 M aqueous sodium chloride, and analyzed by GPC (column; TOSOH TSK GelPW-4000XL, solvent; 0.1 M NaCl aqueous solution, flow rate; 0.8 ml/min). The result of the GPC analysis and an ultraviolet absorption spectrum (in 0.1 M Tris buffer, pH 9.0) of the product are shown in Figs. 7 and 10, respectively. The DX-8951 content in the product was and found as 3.7% (w/w) by quantitative analysis based on absorption spectrophotometry at 366 nm in 0.1 M Tris buffer containing 30% of acetonitrile (pH 10.0).

Example 8: Synthesis of 2-[2-(2-aminoethoxy)ethoxy]ethyl- β -D-2-amino-2-deoxygalactose

[0099] A solution of 2-[2-(2-azideethoxy)ethoxy]ethyl- β -D-2-acetylamino-2-deoxy-3,4,6-triacetylgalactose (2.64 g) synthesized by the method described in Japanese Patent Unexamined Publication (KOKAI) (Hei) No.5-202085/1993 dissolved in methanol (10 ml) was cooled on ice. The solution was added with a 28% sodium methoxide solution in methanol (0.64 ml), and the mixture was stirred for 5 hours under ice cooling. The reaction mixture was added with acetic acid (0.186 ml), and dried under reduced pressure. The residue was purified by silica gel column chromatography (eluate; dichloromethane:methanol = 9:1 solution) to obtain 2-[2-(2-azideethoxy)ethoxy]ethyl-β-D-2-amino-2-deoxygalactose (1.98 g).

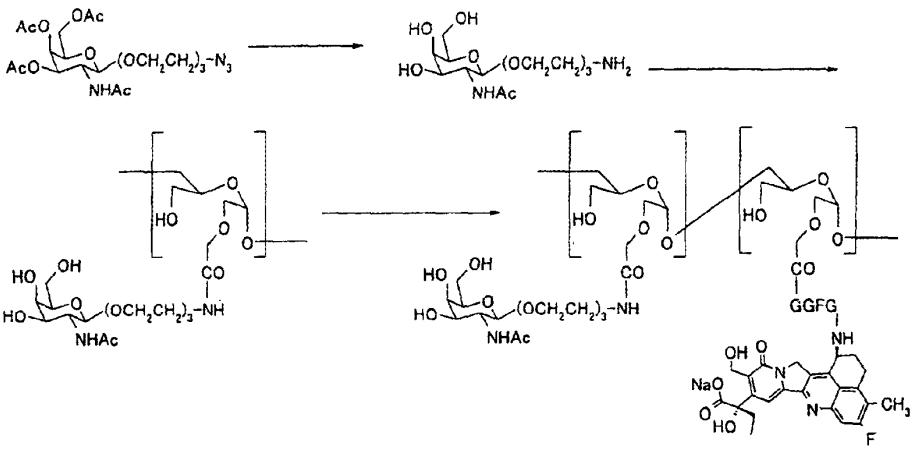
^{1}H-NMR(CD_3OD) δ : 4.44 (d, 1H, J=8.8Hz), 3.94-3.98 (m, 1H), 3.92 (dd, 1H, J=8.8, 10.7Hz), 3.83 (d, 1H, J= 2.9Hz), 3.62-3.79 (m, 11H), 3.58 (dd, 1H, J=3.4, 10.7Hz), 3.49 (dd, 1H, J=5.9, 6.3Hz), 3.39 (t, 2H, J=4.9Hz), 1.99 (s,3H)

[0100] A solution of the aforementioned 2-[2-(2-azideethoxy)ethoxy]ethyl-β -D-2-amino-2-deoxygalactose (640 mg) dissolved in ethanol (10 ml) was added with the Lindlar catalyst (430 mg), the mixture was subjected to catalytic reduction for 1.5 hours under hydrogen at ordinary pressure. The Lindlar catalyst (215 mg) was further added to the mixture, and the catalytic reduction was performed for 3.5 hours under hydrogen at ordinary pressure. The catalyst was removed by filtration, and the filtrate was dried under reduced pressure to obtain 2-[2-(2-aminoethoxy)ethoxy] ethyl-β-D-2-amino-2-deoxygalactose (601 mg).

^{1}H-NMR(CD_3OD) δ: 4.32 (d, 1H, J=7.5Hz), 3.80-3.91 (m, 2H), 3.30-3.75 (m, 14H), 2.73 (t, 2H, J=6.5Hz), 1.98(s,3H)

Example 9: Synthesis of N-acetylgalactosamine-modified CM-dextran polyalcohol-Gly-Gly-Phe-Gly-DX-8951

[0101]



[0102] The sodium salt of CM-dextran polyalcohol obtained in Example 7 (375 mg) was dissolved in water (10 ml), and added with a solution of 2-[2-(2-aminoethoxy)-ethoxy]ethyl- β -D-2-amino-2-deoxygalactose (300 mg) obtained in Example 8 dissolved in methanol (10 ml) and a solution of 1-hydroxybenzotriazole (120 mg) dissolved in methanol (10 ml). The resulting solution was adjusted to pH 7.0, and added with water-soluble carbodiimide hydrochloride (90 mg) 3 times every 2 hours. The mixture was stirred overnight, and subjected to ultrafiltration using a Biomax-50 membrane to remove low molecular weight fractions from the reaction mixture. The residual solution that did not pass through the membrane was lyophilized to obtain N-acetylgalactosamine-modified CM-dextran polyalcohol (443 mg). The N-acetylgalactosamine content of the product was determined as 1.6 per 10 saccharide residues by the Elson-Morgan method.

[0103] The resulting N-acetylgalactosamine-modified CM-dextran polyalcohol (200 mg) was dissolved in water (10 ml), and the solution was added with a solution of trifluoroacetic acid salt of Gly-Gly-Phe-Gly-DX-8951 (30 mg) dissolved in methanol (10 ml), and a solution of 1-hydroxybenzotriazole (30 mg) dissolved in methanol (10 ml). The solution was adjusted to pH 7.0, and added with water-soluble carbodiimide hydrochloride (10 mg) 3 times every 2 hours. The mixture was stirred for 2 hours, and adjusted to pH 8.5. Low molecular weight fractions in the reaction mixture was removed by ultrafiltration using a Biomax -50 membrane. The residual solution that did not pass through the membrane

was filtered through a Millipore filter (0.22 μm) and lyophilized to obtain the title compound (203 mg). The resulting product was dissolved in 0.1 M aqueous sodium chloride and then analyzed by GPC (column; TOSOH TSK Gel PW-6000XL, solvent; 0.1 M acetate buffer (pH 5.0) containing 20% of acetonitrile, flow rate; 0.8 ml/min). The result of the GPC analysis and an ultraviolet absorption spectrum of this compound (0.1 M Tris buffer (pH 10.0):acetonitrile = 7:3, 0.16 mg/ml) are shown in Figs. 8 and 11, respectively. The content of drug compound residue in the product was found as 4.6% (w/w) by quantitative analysis based on absorption spectrophotometry at 366 nm in 0.1 M Tris buffer (pH 10.0): acetonitrile = 7:3.

Example 10: Measurement of DX-8951 content in CM-Dex-PA-Gly-Gly-Phe-Gly-NH-Y'-CH_2-O-CO-DX-8951

[0104] 5 μl of a solution of CM-Dex-PA-Gly-Gly-Phe-Gly-NH-Y'-CH_2-O-CO-DX-8951 (Y' means p-phenylene group) prepared as 1 mg/ml in distilled water was added with 95 μl of a papain solution prepared as 2 mg/ml in Britton Robinson buffer (pH 6). The reaction mixture was incubated at 40°C for 4 hours, added with 100 μl of 0.5 N HCl solution containing 50% of acetonitrile, and content of the released hydrolysate [DX-8951] was determined by HPLC. For the HPLC analysis, a Symmetry C18 (4.6 × 100 mm; 3.5 μm, Watars Co.) column was used, and elution was performed with a 0.1% trifluoroacetic acid solution supplemented with an organic solvent (methanol:acetonitrile = 1:2) so as to be a gradient from 20 to 70% for 12 minutes, and the hydrolysate was detected by fluorescent spectroscopy (Ex. 375 nm and Em. 445 nm). As the result, DX-8951 was eluted at about 5.7 minutes. The DX-8951 content in the above DDS compound was calculated as 4.0% by using a calibration curve prepared with DX-8951. On the other hand, the DX-8951 content was calculated as 3.3% based on UV absorption of the aforementioned DDS compound by using a calibration curve prepared with DX-8951.

Example 11: Measurement of DX-8951 content in CM-Dex-PA-Gly-Gly-Gly-Phe-NH-Y'-CH_2-O-CO-DX-8951

[0105] 5 μl of a solution of CM-Dex-PA-Gly-Gly-Gly-Phe-NH-Y'-CH_2-O-CO-DX-8951 prepared as 1 mg/ml in distilled water was added with 95 μl of a solution of α -chymotrypsin prepared as 2 mg/ml in Britton Robinson buffer (pH 6). The reaction mixture was incubated at 40°C for 4 hours and then added with 100 μl of 0.5 N HCl solution containing 50% of acetonitrile, and the content of the released hydrolysate [DX-8951] was determined by HPLC. For the HPLC alnalysis, a Symmetry C18 (4.6 × 100 mm; 3.5 μm, Watars Co.) column was used, and elution was performed with a 0.1% trifluoroacetic acid solution supplemented with an organic solvent (methanol:acetonitrile = 1:2) so as to be a gradient from 20 to 70% for 12 minutes, and the hydrolysate was detected by fluorescent spectroscopy (Ex. 375 nm and Em. 445 nm). As a result, DX-8951 was eluted at about 5.7 minutes. The DX-8951 content in the above DDS compound was calculated as 2.5% by using a calibration curve prepared with DX-8951. On the other hand, the DX-8951 content was calculated as 1.7% based on UV absorption of the aforementioned DDS compound by using a calibration curve prepared with DX-8951.

Example 12: Measurement of DX-8951 content in CM-Dex-PA-Gly-Gly-Phe-Gly-NH-$(CH_2)_4$-CO-DX-8951

[0106] 5 μl of a solution of CM Dex-PA-Gly-Gly-Phe-Gly-NH-$(CH_2)_4$-CO-DX-8951 prepared as 100 μg/ml in distilled water was added with 95 μl of a papain solution prepared as 2 mg/ml in Britton Robinson buffer (pH 6). The reaction mixture was incubated at 40°C for 4 hours and then added with 100 μl of 0.5 N HCl solution containing 50% of acetonitrile, and the content of the released hydrolysate [NH_2-$(CH_2)_4$-CO-DX-8951] was determined by HPLC. For the HPLC analysis, a Symmetry C18 (4.6×100 mm; 3.5 μm, Watars Co.) column was used, and elution was performed with 0.1% trifluoroacetic acid solution containing 32% of organic solvent (methanol:acetonitrile = 1:2), and the hydrolysate was detected by fluorescent spectroscopy (Ex. 375 nm and Em. 445 nm). As a result, the NH_2-$(CH_2)_4$-CO-DX-8951 was eluted at about 5.3 minutes. The DX-8951 content in the above DDS compound was calculated as 3.0% by using a calibration curve prepared with NH_2-$(CH_2)_4$-CO-DX-8951. On the other hand, the DX-8951 content was calculated as 3.1% based on UV absorption of the aforementioned DDS compound by using a calibration curve prepared with DX-8951.

Example 13: Measurement of DXR content in CM-Dex-PA-Gly-Gly-Phe-Gly-DXR (DXR: doxorubicin)

[0107] 10 μl of a solution of the DDS compound prepared as 1 mg/ml in distilled water was added with 190 μ l of a papain solution prepared as 2 mg/ml in Britton Robinson buffer (pH 6). The reaction mixture was incubated at 40°C for 2 hours, and added with 200 μl of acetonitrile, and the content of the released hydrolysate [DXR] was determined by HPLC. For the HPLC analysis, a Symmetry C18 (4.6×100 mm; 3.5 μm, Watars Co.) column was used, elution was performed with 0.1% trifluoroacetic acid solution containing 34% of organic solvent (methanol:acetonitrile = 1:2), and the hydrolysate was detected by fluorescent spectroscopy (Ex. 480 nm and Em. 590 nm). As a result, the DXR was

eluted at about 3.8 minutes. The DXR content in the above DDS compound was calculated as 5.3% by using a calibration curve prepared with DXR. On the other hand, the DXR content was calculated as 4.3% based on UV absorption of the aforementioned DDS compound by using a calibration curve prepared with DXR.

Example 14: Synthesis of CM-dextran polyalcohol-Gly-Gly-Phe-Gly-DXR

[0108] Sodium salt of carboxymethyldextran polyalcohol (30 mg) having an average molecular weight of 274K and a carboxymethylation degree (degree of substitution with carboxymethyl groups per constitutional saccharide residue) of 0.4, which was prepared according to the method described in Example 24 of WO97/46260, was dissolved in 0.05 M collidine-HCl buffer (2 ml) containing 50% of methanol. The solution was added with a solution of hydrochloride of Gly-Gly-Phe-Gly-DXR (4 mg) in methanol (400 μ l), which hydrochloride was prepared according to the method described in Example 43 of WO97/46260, and a solution of 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride (2.4 mg) in methanol (240 μl), and stirred for 2 hours. The solution was added with 30 ml of 3 M brine, and desalted by ultrafiltration using a Biomax-50K membrane. The residual solution that did not pass through the membrane was filtered by a Millipore filter (0.22 μm), and lyophilized to obtain the title compound (25 mg). The content of the drug compound residue in this compound was determined as 4.3% (w/w) by absorption spectrophotometry at 480 nm in PBS (pH 7.4).

Example 15: Synthesis of CM-Dex-PA-Gly-Gly-Phe-Gly-NH-$(CH_2)_4$-CO-DX-8951

[0109] Boc-Gly-Gly-Phe-Gly-OH (575 mg), HOSu (182 mg), and DCC (326 mg) were dissolved in DMF (20 ml), and the solution was stirred for 30 minutes. The resulting solution was added with a solution of p-toluenesulfonic acid salt of 5-aminopentanoic acid benzyl ester (500 mg) and triethylamine (0.184 ml) dissolved in DMF (10 ml), and the mixture was stirred at room temperature for three days. The reaction mixture was concentrated, and the residue was purified by column chromatography (CH_2Cl_2:MeOH = 20:1) to obtain 560 mg of Boc-Gly-Gly-Phe-Gly-NH-$(CH_2)_4$-COOBzl. The Boc-Gly-Gly-Phe-Gly-NH-$(CH_2)_4$-COOBzl (560 mg) was dissolved in methanol (60 ml) containing 50% of water, and the solution was added with 5% Pd-C (water content; 50%, 1.5 g) and stirred overnight under hydrogen at ordinary pressure. After the catalyst was removed from the reaction mixture by filtration, the mixture was concentrated to dryness to obtain 300 mg of Boc-Gly-Gly-Phe-Gly-NH-(CH2)4-COOH.

[0110] The Boc-Gly-Gly-Phe-Gly-NH-$(CH_2)_4$-COOH (300 mg), DCC (138 mg) and HOSu (77 mg) were dissolved in DMF, and the solution was stirred for 30 minutes. The resulting solution was added with a solution of DX-8951 (317 mg) and triethylamine (0.078 ml) dissolved in DMF, and the mixture was stirred at room temperature overnight. The reaction mixture was concentrated, and the resulting residue was purified by column chromatography (CH_2Cl_2:MeOH = 10:1) to obtain 400 mg of Boc-Gly-Gly-Phe-Gly-NH-$(CH_2)_4$-CO-DX-8951.

[0111] The Boc-Gly-Gly-Phe-Gly-NH-$(CH_2)_4$-CO-DX-8951 (300 mg) was dissolved in TFA (2 ml), and the solution was allowed to react for one hour, and then the reaction mixture was concentrated. The resulting residue was solidified by addition of ether, and the supernatant was removed. The solid mass was dried to obtain 250 mg of trifluoroacetic acid salt of H-Gly-Gly-Phe-Gly-NH-$(CH_2)_4$-CO-DX-8951.

^{1}H-NMR(DMSO-d_6): δ 8.45-8.55 (m, 2H), 8.28-8.35 (m, 2H), 7.95-8.10 (br, 2H), 7.79 (d, 1H, J=10.7Hz), 7.70-7.75 (m, 1H), 7.32 (s, 1H), 7.20-7.30 (m, 5H), 7.15-7.25 (m, 4H), 6.50-6.60 (br, 1H), 5.50-5.60 (m, 1H), 5.40-5.50 (m, 2H), 5.18 (s, 2H), 4.50-4.60 (m, 1H), 3.55-3.95 (m, 7H), 3.00-3.25 (m, 5H), 2.75-2.85 (m, 1H), 2.50 (s, 3H), 2.15-2.25 (m, 4H), 1.86-2.00 (m, 2H), 1.55-1.65 (m, 2H), 1.45-1.55 (m,2H), 0.88 (t, 3H, J=7.35Hz)

[0112] Triethylammonium salt of carboxymethyldextran polyalcohol (200 mg) having an average molecular weight of 337K and a carboxymethylation degree (degree of substitution with carboxymethyl groups per constitutional saccharide residue) of 0.4, which was prepared according to the method described in Example 24 of WO97/46260, was dissolved in DMF (10 ml). The above solution was added with a solution of trifluoroacetic acid salt of H-Gly-Gly-Phe-Gly-NH-$(CH_2)_4$-CO-DX-8951 (30 mg) and triethylamine (10 μl) in methanol (4 ml), further added with a solution of 1-ethoxycarbonyl-2-ethoxy-1,2-dihydroxyquinoline (200 mg) in methanol (3 ml), and stirred overnight at room temperature with light shielding. The reaction mixture was diluted with 3 M brine, and low molecular weight fractions were removed by an ultrafiltration membrane (50K), and the resulting residue was passed through a 0.22 μm filter and lyophilized to obtain 178 mg of the target compound.

Industrial Availability

[0113] The DDS compound of the present invention, which utilizes a carboxy(C_{1-4})-alkyldextran polyalcohol modified with a saccharide compound as a polymer carrier, has an extremely high organ selectivity, and is useful as a medicament that achieves excellent therapeutic effect. The method for measuring a DDS compound of the present invention can be utilized as an extremely useful method for clinical application of a DDS compound, because the method enables

accurate and simple determination of blood concentration of the DDS compound or the content of a residue of a drug compound introduced to the DDS compound.

Claims

1. A DDS compound which comprises a carboxy(C_{1-4})alkyldextran polyalcohol modified with a saccharide compound and a residue of drug compound bound to the carboxy(C_{1-4})alkyldextran polyalcohol.

2. The DDS compound according to claim 1, wherein the carboxy(C_{1-4})alkyldextran polyalcohol modified with a saccharide compound and the residue of drug compound are bound to each other by means of a spacer.

3. The DDS compound according to claim 2, wherein the spacer comprises one amino acid or 2 to 8 amino acids linked by peptide bond(s).

4. The DDS compound according to any one of claims 1 to 3, wherein the carboxy(C_{1-4})alkyldextran polyalcohol modified with a saccharide compound is formed by binding a saccharide compound and a carboxy(C_{1-4})alkyldextran polyalcohol by means of a linker.

5. The DDS compound according to claim 4, wherein the carboxy(C_{1-4})-alkyldextran polyalcohol modified with a saccharide compound has a cluster modification by saccharide compounds bound by means of a linker.

6. A DDS compound which is obtainable by binding a residue of a drug compound to a carboxy(C_{1-4})alkyldextran polyalcohol in which a part of carboxyl groups of the carboxy(C_{1-4})alkyl moiety are modified with a saccharide compound.

7. The DDS compound according to claim 6, which is obtainable by binding the carboxy(C_{1-4})alkyldextran polyalcohol and the residue of drug compound by means of a spacer.

8. The DDS compound according to claim 6 or 7, which is obtainable by binding the residue of drug compound to the carboxy(C_{1-4})alkyldextran polyalcohol which is produced by binding the saccharide compound or a linker bound with the saccharide compound to a part of carboxyl groups of the carboxy(C_{1-4})alkyl moiety of the carboxy(C_{1-4}) alkyldextran polyalcohol.

9. A DDS compound which is obtainable by modifying with a saccharide compound a carboxy(C_{1-4})alkyldextran polyalcohol in which a residue of a drug compound is bound to a part of carboxyl groups of the carboxy(C_{1-4})alkyl moiety by means of a spacer.

10. The DDS compound according to claim 9, which is obtainable by binding the carboxy(C_{1-4})alkyldextran polyalcohol and the saccharide compound by means of a linker.

11. The DDS compound according to claim 9 or 10, which is obtainable by modifying with a saccharide compound a carboxy(C_{1-4})alkyldextran polyalcohol produced by binding a residue of drug compound to a part of carboxyl groups of the carbogy(C_{1-4})alkyl moiety of the carboxy(C_{1-4})alkyldextran polyalcohol by means of a spacer comprising one amino acid or a spacer comprising 2 to 8 amino acids linked by peptide bond(s).

12. The DDS compounds according to any one of claims 1 to 11, wherein the saccharide compound is galactose or galactosamine, or a derivative thereof.

13. The DDS compounds according to any one of claims 1 to 12, wherein the saccharide compound is N-acetylgalactosamine,

14. The DDS compounds according to claim 12, wherein substitution degree of galactose or galactosamine or a derivative thereof, or clustered galactose or galactosamine or derivative thereof is 0.01-1.0 per saccharide residue of the carboxy(C_{1-4})alkyldextran polyalcohol.

15. The DDS compounds according to any one of claims 1 to 14, wherein the dextran polyalcohol that constitutes the carboxy(C_{1-4})alkyldextran polyalcohol is a dextran polyalcohol which is obtained by treating dextran under condi-

tions that enable substantially complete polyalcoholization.

16. The DDS compound according to any one of claims 1 to 15, wherein the carboxy(C_{1-4})alkyldextran polyalcohol is carboxymethyldextran polyalcohol.

17. The DDS compound according to any one of claims 1 to 16, wherein the drug compound is an antineoplastic agent or an anti-inflammatory agent.

18. The DDS compound according to claim 17, wherein the drug compound is an antineoplastic agent.

19. The DDS compound according to any one of claims 1 to 17, wherein the drug compound is (1S,9S)-1-amino-9-ethyl-5-fluoro-2,3-dihydro-9-hydroxy-4-methyl-1H,12H-benzo[de]pyrano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinoline-10,13(9H,15H)-dione.

20. The DDS compound according to claim 19, which is a medicament for treating liver cancer.

21. A carboxy(C_{1-4})alkyldextran polyalcohol for use in the manufacture of the DDS compound according to any one of claims 1 to 20.

22. A carboxy(C_{1-4})alkyldextran polyalcohol modified with a saccharide compound.

23. A polymer carrier comprising a carboxy(C_{1-4})alkyldextran polyalcohol modified with a saccharide compound.

24. A method for measuring a DDS compound in which a polymer carrier and a residue of drug compound are bound to each other by means of a spacer comprising 2 to 8 amino acids linked by peptide bond(s), which comprises the steps of treating the DDS compound with a peptidase, and measuring the resulting hydrolysate.

25. The method according to claim 24, which is used for measurement of the DDS compound contained in a biological sample.

26. The method according to claim 24, which is used for measurement of content of the residue of a drug compound introduced to the DDS compound.

27. The method according to any one of claims 24 to 26, wherein the hydrolysate is the drug compound.

28. The method according to any one of claims 24 to 26, wherein the hydrolysate is a compound comprising the residue of drug compound bound with a part of the spacer.

29. The method according to claim 28, wherein the part of the spacer is one amino acid derived from the spacer.

30. The method according to any one of claims 24 to 29, wherein the polymer carrier is a polysaccharide derivative having carboxyl groups.

31. The method according to claim 30, wherein the polymer carrier is a carboxy(C_{1-4})alkyldextran polyalcohol.

32. The method according to any one of claims 24 to 31, wherein the drug compound introduced to the DDS compound is an antineoplastic agent or an anti-inflammatory agent.

33. The method according to any one of claims 24 to 32, wherein the spacer is a tetrapeptide represented by -Gly-Gly-Phe-Gly- from the N-terminal or a tetrapeptide represented by -Gly-Gly-Gly-Phe- from the N-terminal.

34. The method according to any one of claims 24 to 32, wherein the spacer is a group represented by -Gly-Gly-Phe-Gly-NH-Y'-CH_2-O-CO- from the N-terminal or a group represented by -Gly-Gly-Gly-Phe-NH-Y'-CH_2-O-CO- from the N-terminal wherein Y' represents p-phenylene group.

35. The method according to any one of claims 24 to 34, wherein the peptidase is α -chymotrypsin or papain.

36. The method according to any one of claims 24 to 35, wherein the drug compound is (1S,9S)-1-amino-9-ethyl-

5-fluoro-2,3-dihydro-9-hydroxy-4-methyl-1H,12H-benzo[de]pyrano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinoline-10,13(9H, 15H)-dione.

37. The method according to any one of claims 24 to 29, which is used for measurement of a DDS compound in which a carboxy(C_{1-4})alkyldextran polyalcohol and (1S,9S)-1-amino-9-ethyl-5-fluoro-2,3-dihydro-9-hydroxy-4-methyl-1H,12H-benzo[de]pyrano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinoline-10,13(9H,15H)-dione are bound to each other by means of a spacer comprising a tetrapeptide represented by -Gly-Gly-Phe-Gly- or a tetrapeptide represented by -Gly-Gly-Gly-Phe- from the N-terminal.

38. The method according to claim 37, wherein α-chymotrypsin or papain is used as the peptidase, and (1S,9S)-9-ethyl-5-fluoro-1-glycylamino-2,3-dihydro-9-hydroxy-4-methyl-lH,12H-benzo[de]pyrano[3',4':6,7]indolizino [1,2-b]quinoline-10,13(9H,15H)-dione is measured as the hydrolysate.

Fig. 1

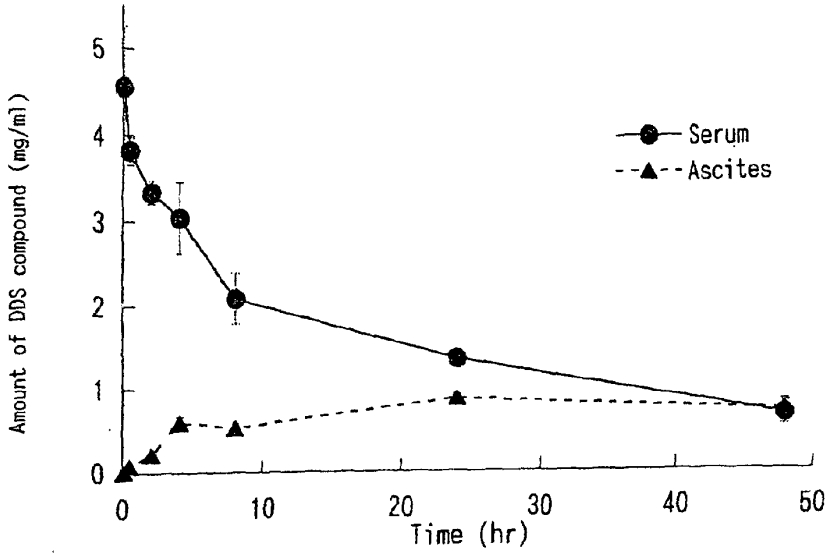

Amount of DDS compound (mg/ml)
0
1
2
3
4
5
0
10
20
30
40
50
Time (hr)
Serum
Ascites

Fig. 2

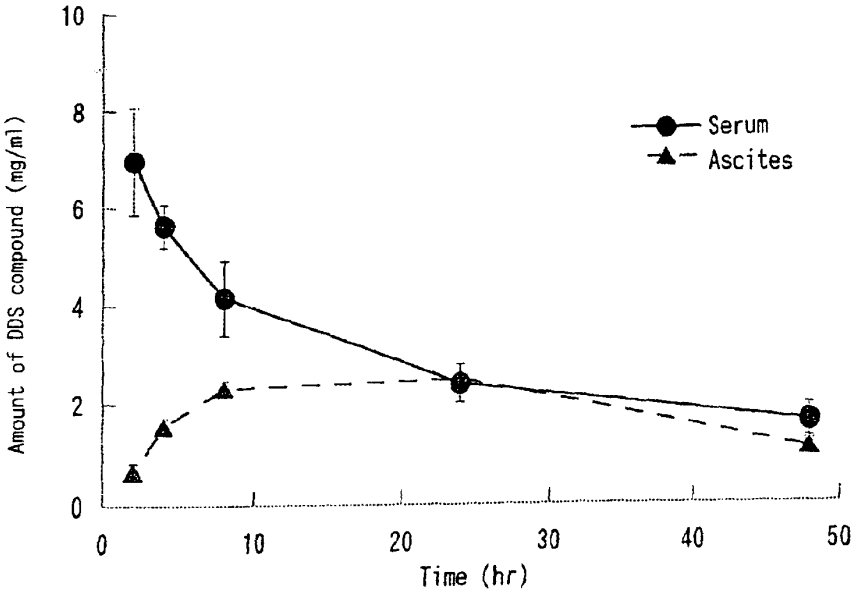

Amount of DDS compound (mg/ml)
0
2
4
6
8
10
0
10
20
30
40
50
Time (hr)
Serum
Ascites

Fig. 3

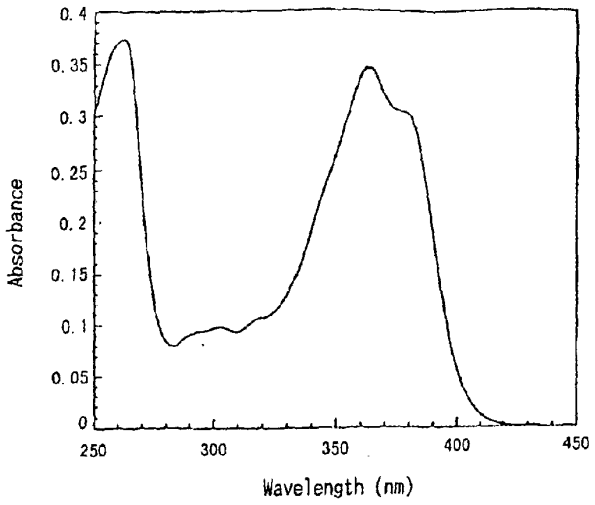

0.4
0.35
0.3
0.25
0.2
0.15
0.1
0.05
0
Absorbance
250
300
350
400
450
Wavelength (nm)

Fig. 4

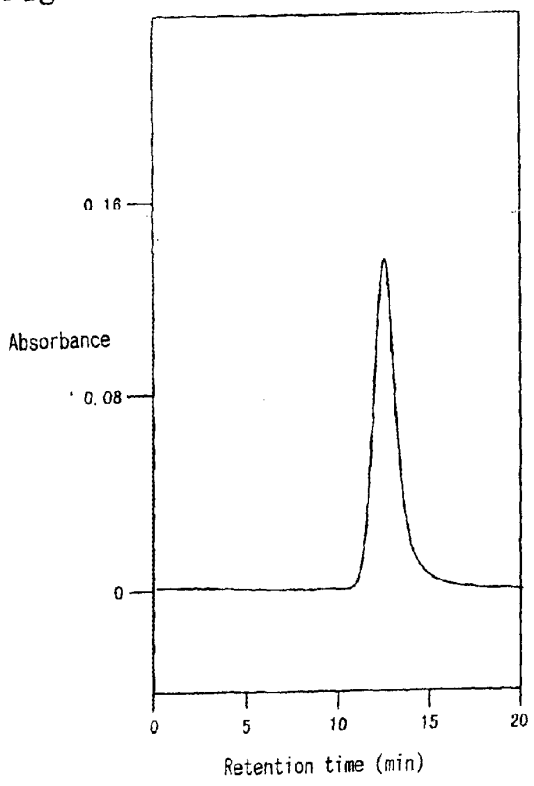
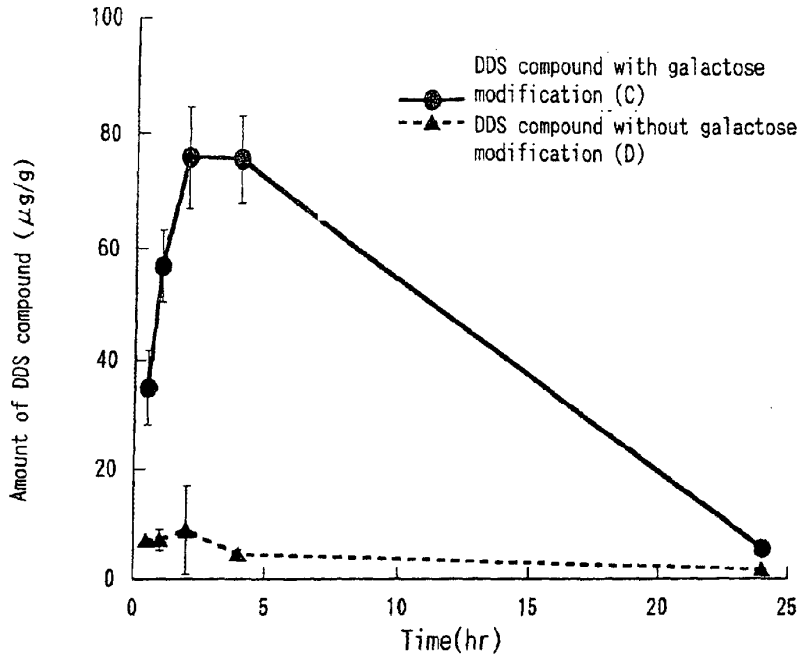

0.16
Absorbance
0.08
0
0
5
10
15
20
Retention time (min)

Fig. 5



Accumulation of DDS compound in liver

Fig. 6

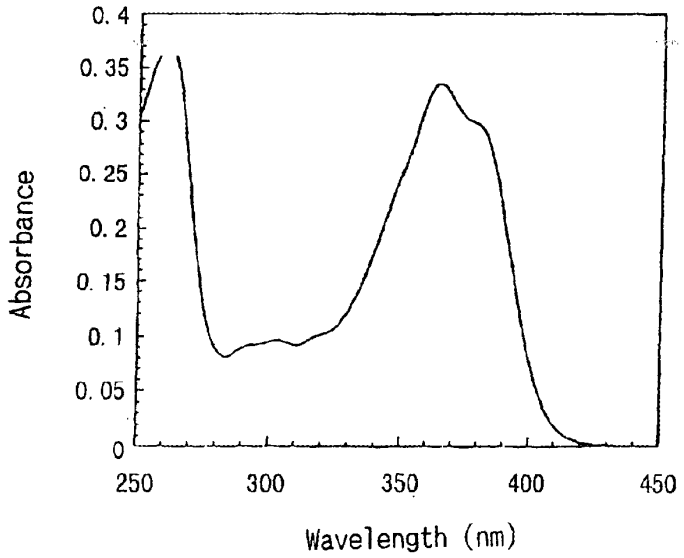


Fig. 7

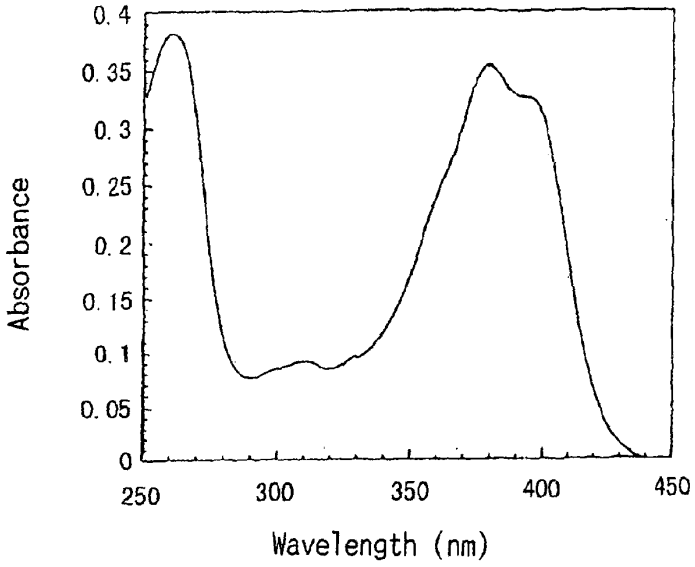

0.4
0.35
0.3
0.25
0.2
0.15
0.1
0.05
0
Absorbance
250
300
350
400
450
Wavelength (nm)

Fig. 8

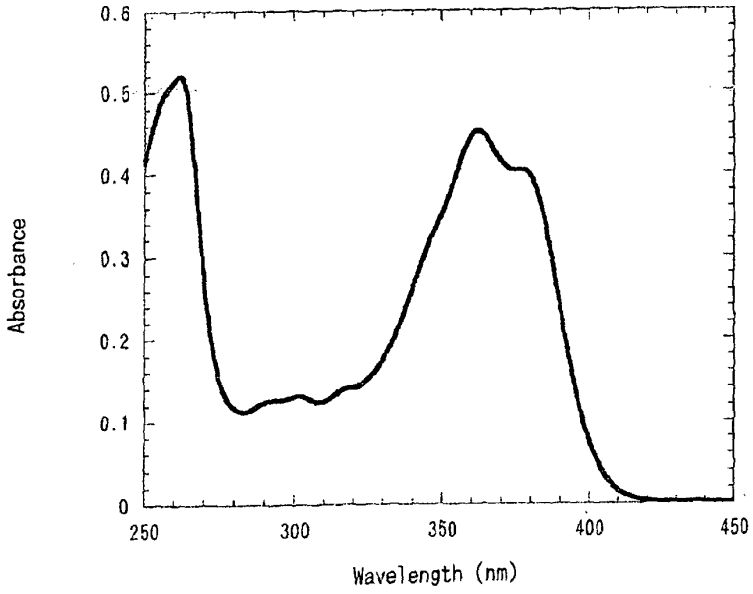

0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
Absorbance
250
300
350
400
450
Wavelength (nm)

Fig. 9

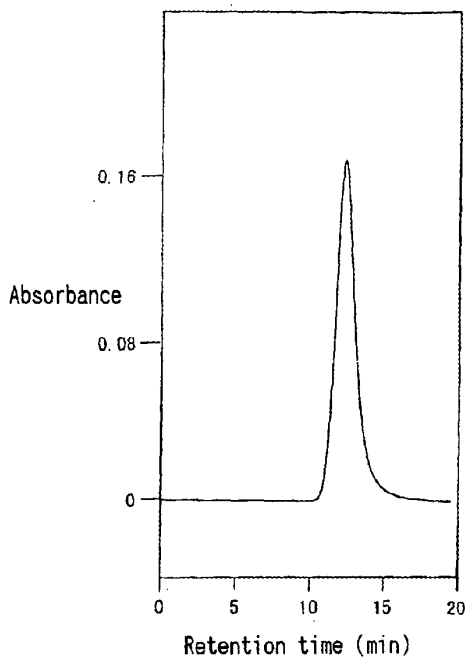

0.16
Absorbance
0.08
0
0
5
10
15
20
Retention time (min)

Fig. 10

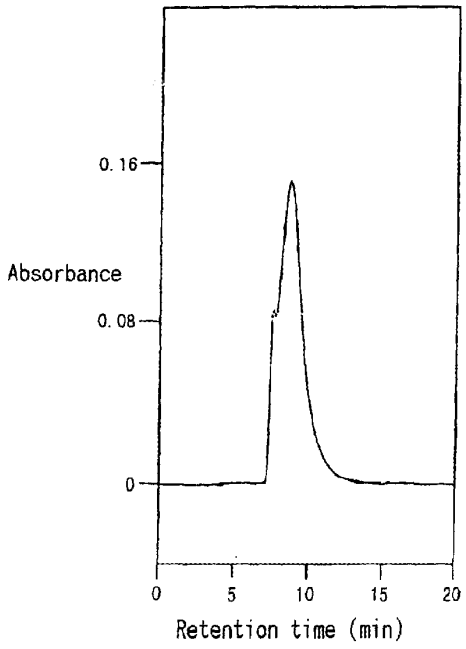
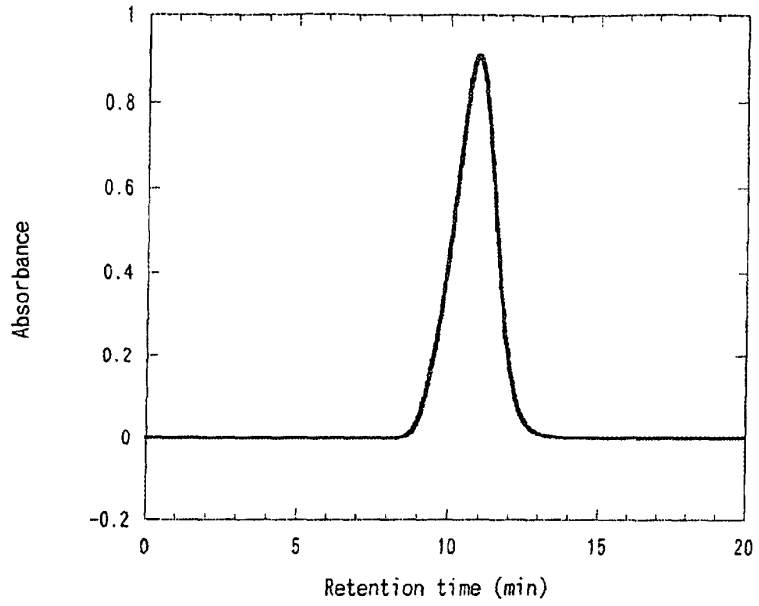

0.16
Absorbance
0.08
0
0
5
10
15
20
Retention time (min)

Fig. 11



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP99/06016

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl[7] A61K47/48, A61K47/30, A61K47/26, A61K31/47

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl[7] A61K47/48, A61K47/30, A61K47/26, A61K31/47

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
CAPLUS (STN)
REGISTRY (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO, 97/46260, A1 (Daiichi Pharmaceutical Co., Ltd.), 11 December, 1997 (11.12.97) & EP, 916348, A1	1-23,31,37,38
Y	JP, 8-319317, A (Kanagawa Kagaku Gijutsu Academy), 03 December, 1996 (03.12.96), Par. Nos. [0005] to [0007] (Family: none)	1-23
X Y	EP, 712635, A1 (KURARAY CO LTD), 22 May, 1996 (22.05.96) & JP, 8-024325, A & US, 5658592, A	24-30,32-35 31,36-38
Y	JP, 6-87746, A (Daiichi Pharmaceutical Co., Ltd.), 29 March, 1994 (29.03.94) (Family: none)	36-38

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
26 January, 2000 (26.01.00)	08 February, 2000 (08.02.00)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

(19) Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets

(11) EP 2 594 589 A1

(12) EUROPEAN PATENT APPLICATION
published in accordance with Art. 153(4) EPC

(43) Date of publication:
22.05.2013 Bulletin 2013/21

(21) Application number: **11792536.2**

(22) Date of filing: **09.06.2011**

(51) Int Cl.:
C07K 16/28 *(2006.01)* ***A61K 39/395*** *(2006.01)*
A61K 45/00 *(2006.01)* ***C12N 5/10*** *(2006.01)*
C12N 15/09 *(2006.01)* ***C12P 21/08*** *(2006.01)*

(86) International application number:
PCT/JP2011/063294

(87) International publication number:
WO 2011/155579 (15.12.2011 Gazette 2011/50)

(84) Designated Contracting States:
AL AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MK MT NL NO PL PT RO RS SE SI SK SM TR

(30) Priority: **10.06.2010 US 353430 P**

(71) Applicants:
- **Sapporo Medical University**
  Hokkaido 060-0061 (JP)
- **Kyowa Hakko Kirin Co., Ltd.**
  Tokyo 100-8185 (JP)

(72) Inventors:
- **YAMAGUCHI, Miki**
  Sapporo-shi
  Hokkaido 060-8556 (JP)
- **KATO, Kazunori**
  Sapporo-shi
  Hokkaido 060-8556 (JP)
- **HAMADA, Hirofumi**
  Sapporo-shi
  Hokkaido 060-8556 (JP)
- **NAKAMURA, Kazuyasu**
  Tokyo 100-8185 (JP)
- **SUGIMOTO, Yoshiyuki**
  Tokyo 100-8185 (JP)
- **KUBOTA, Tsuguo**
  Tokyo 100-8185 (JP)
- **IKEDA, Masahiro**
  Tokyo 100-8185 (JP)

(74) Representative: **HOFFMANN EITLE**
Patent- und Rechtsanwälte
Arabellastrasse 4
81925 München (DE)

(54) **ANTI-Trop-2 ANTIBODY**

(57) The present invention relates to a monoclonal antibody or an antibody fragment thereof, which binds to the extracellular region of human Trop-2 with high affinity and exhibits high ADCC activity and high antitumor activity; a hybridoma which produces the antibody; a DNA which encodes the antibody; a vector which comprises the DNA; a transformant obtainable by introducing the vector; a process for producing an antibody or an antibody fragment thereof using the hybridoma or the transformant; and a therapeutic agent or a diagnostic agent using the antibody fragment thereof.

EP 2 594 589 A1

Description

Technical Field

[0001] The present invention relates to a monoclonal antibody or an antibody fragment thereof, which binds to the extracellular region of human Trop-2 with high affinity and exhibits high antibody-dependent cellular cytotoxicity (hereinafter referred to as "ADCC activity") and high antitumor activity; a hybridoma which produces the antibody; a DNA which encodes the antibody; a vector which comprises the DNA; a transformant obtainable by introducing the vector; a process for producing an antibody or an antibody fragment thereof using the hybridoma or the transformant; and a therapeutic agent or a diagnostic agent using the antibody or the antibody fragment thereof.

Background Art

[0002] Trop-2 is also known as Tumor associated calcium signal transducer 2 (TACSTD2), GA733-1, gp50 and T16 and is a type I transmembrane protein comprising 323 amino acids. Trop-2 was found as a protein recognized by monoclonal antibodies 162-25.3 and 162-46.2 which react with human trophoblast cells (Non-patent Literature 1).

[0003] The gene of Trop-2 was cloned in 1989 (Non-patent Literature 2). DNA sequences, amino acid sequences and three-dimensional structures of Trop-2 are disclosed in a public database and therefore can be referred to accession numbers such as NP_002344 and NM_002353 (NCBI). The amino acid sequence of Trop-2 comprises a signal sequence consisting of N-terminal 26 amino acids, an extracellular region of 248 amino acids, a transmembrane domain consisting of 23 amino acids and an intracellular domain consisting of 26 amino acids. Although the theoretically calculated molecular weight of Trop-2 is 35 kDa, it is known that the actual molecular weight of Trop-2 increased by 10 kDa or so due to the addition of sugar chains.

[0004] Since Trop-2 has the same number and location of cysteine residues as the family molecule, EpCAM (also known as Trop-1), their structures are estimated to be similar to each other (Non-patent Literature 2). The extracellular region of EpCAM comprises three domains: two cysteine-rich domains at the N-terminus and one cysteine-poor domain at the C terminus (Non-patent Literature 15). Regarding EpCAM, it is known that first domain from the N-terminus is involved in the mutual adhesion of EpCAMs between cells and second domain is involved in the interaction of EpCAMs on the same cell membrane (Non-patent Literature 15).

[0005] Trop-2 has been known to be expressed on a variety of cancers and the correlation of Trop-2 expression with poor prognosis has also been reported (Non-patent Literatures 3 to 9). Also, the involvement of Trop-2 in anchorage-independent growth was reported in colon cancer (Non-patent Literature 10). It has been reported that the expression of Trop-2 in normal tissues are limited to epithelial cells in several tissues.

[0006] Since 162-25.3 and 162-46.2 were reported, several monoclonal antibodies against Trop-2 have been established (Non-patent Literatures 11 to 13; Patent Literatures 1 to 3). Some anti-Trop-2 monoclonal antibodies such as 77220 are commercially available as reagents. Some of these established anti-Trop-2 monoclonal antibodies are being under investigation for treating cancers.

[0007] Since one of anti-Trop-2 monoclonal antibodies, BR110 (Patent Literature 1), is known to bind to Trop-2 on the cell surface and internalize within the cells, a cytotoxic drug-conjugated antibody was examined and reported. It was disclosed that the above conjugate shows cellular cytotoxicity for cancer cell lines such as H2987, H3396, H3619 and MCF-7.

[0008] Since RS7 (Patent Literature 2; Non-patent Literatures 11, 14 and 16), one of anti-Trop-2 monoclonal antibodies, binds to Trop-2 on the cell surface and internalizes within the cells, the example of cytotoxic drug-conjugated antibody has been reported. It has been disclosed that the conjugate of the humanized antibody hRS7 of the above antibody with a radioactive isotope (^{131}I, ^{131}I-IMR-R4) shows antitumor activity in a xenograft model of human cancer cell using a breast cancer cell line.

[0009] Anti-Trop-2 monoclonal antibodies, AR47A6.4.2 (Patent Literature 3) and AR52A301.5 (Patent Literature 4) are antibodies which specifically injure Trop-2-expressing cancer cell as a target cell to exhibit effects. Patent Literatures 3 and 4 disclose that these antibodies kill cancer cells directly.

[0010] It has also been disclosed that huAR47A6.4.2 (Patent Literature 5) which is the humanized antibody of AR47A6.4.2 inhibits the activation of intracellular extracellular-signal regulated kinase (ERK). Patent Literature 5 discloses that huAR47A6.4.2 showed complement-dependent cytotoxicity (hereinafter referred to as "CDC activity") on Trop-2-positive human cell lines when rabbit serum having a high complement titer was used.

[Citation List]

[Patent Literature]

[0011]

[Patent Literature 1] WO97/14796
[Patent Literature 2] WO2003/074566
[Patent Literature 3] WO2007/095748
[Patent Literature 4] WO2007/095749
[Patent Literature 5] WO2008/144891

[Non-patent Literature]

[0012]

[Non-patent Literature 1] Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 8, 5147 (1981)
[Non-patent Literature 2] Int. J. Cancer, 62, 610 (1995)
[Non-patent Literature 3] Mod. Pathol., 21, 186 (2008)
[Non-patent Literature 4] Clin. Cancer Res., 12, 3057 (2006)
[Non-patent Literature 5] Br. J. Cancer, 99, 1290 (2008)
[Non-patent Literature 6] J. Clin. Pathol., 62, 152 (2009)
[Non-patent Literature 7] Eur. J. Cancer, 46, 944 (2010)
[Non-patent Literature 8] Cancer Res., 62, 5325 (2002)
[Non-patent Literature 9] Lab. Invest. 84, 320 (2004)
[Non-patent Literature 10] Mol. Cancer Ther., 7, 280 (2008)
[Non-patent Literature 11] Int. J. Cancer, 39, 297 (1987)
[Non-patent Literature 12] Cancer Res., 50, 1330 (1990)
[Non-patent Literature 13] Hybridoma, 11, 539 (1992)
[Non-patent Literature 14] Breast Cancer Res. Treat., 84, 173, (2004)
[Non-patent Literature 15] Mol. Cell. Biol., 21, 2570 (2001)
[Non-patent Literature 16] Clin. Cancer Res., 17, 3157 (2011)

Disclosure of Invention

Problems to be Solved by the Invention

[0013] However, BR110 disclosed in Patent Literature 1 has no cellular cytotoxicity when it is not conjugated with a cytotoxic drug. In addition, when RS7 disclosed in Patent Literature 2 and Non-patent Literatures 11, 14 and 16 is not conjugated with a cytotoxic drug, it has no cellular cytotoxicity. There is no report on ADCC activity of huAR47A6.4.2 disclosed in Patent Literature 5.

[0014] In addition, there is no report on an anti-Trop-2 monoclonal antibody which binds to the extracellular region of human Trop-2 with high affinity. An anti-Trop-2 monoclonal antibody which binds to the extracellular region of human Trop-2 is thought to have high ADCC activity and antitumor activity for human Trop-2 positive human cell lines.

[0015] Therefore, the present invention has been made in an effort to a monoclonal antibody or an antibody fragment thereof, which binds to the extracellular region of human Trop-2 with high affinity; a hybridoma which produces the antibody; a DNA which encodes the antibody; a vector which comprises the DNA; a transformant obtainable by introducing the vector; a process for producing an antibody or an antibody fragment thereof using the hybridoma or the transformant; or a therapeutic agent or a diagnostic agent using the antibody or the antibody fragment thereof.

Means for Solving the Problems

[0016] The present invention relates to the followings.

1. A monoclonal antibody or an antibody fragment thereof against human Trop-2, which binds to at least domain I in an extracellular region of human Trop-2.
2. The monoclonal antibody or the antibody fragment thereof described in the above 1, which binds to at least one amino acid in amino acids at positions 34 to 72 in the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:1.

3. The monoclonal antibody or the antibody fragment thereof described in the above 1 or 2, which has a dissociation constant (K_D) of 5×10^{-10}M or less against an antigen of an antibody.
4. The monoclonal antibody or the antibody fragment thereof described in the above any one of 1 to 3, which has high ADCC activity and antitumor activity.
5. The monoclonal antibody or the antibody fragment thereof described in the above any one of 1 to 4, wherein complementary determining regions (hereinafter referred as "CDR") 1 to 3 of a heavy chain (hereinafter referred as "H chain") of the antibody comprise the amino acid sequences represented by SEQ ID NOs:13 to 15, respectively; and CDR1 to 3 of a light chain (hereinafter referred as "L chain") of the antibody comprise the amino acid sequences represented by SEQ ID NOs:16 to 18, respectively.
6. A monoclonal antibody or an antibody fragment thereof, which binds to an epitope which is the same as an epitope in an extracellular region of Trop-2 to which a monoclonal antibody comprising an H chain variable region (hereinafter referred to as "VH") comprising the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:10 and an L chain variable region (hereinafter referred to as "VL") comprising the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:12 binds.
7. A monoclonal antibody or an antibody fragment thereof, which binds to an extracellular region of Trop-2 while competing with the antibody described in the above 5 or 6.
8. The monoclonal antibody or the antibody fragment thereof described in any one of the above 1 to 7, which is a recombinant antibody.
9. The monoclonal antibody or the antibody fragment thereof described in the above 8, which is a recombinant antibody selected from a human chimeric antibody, a humanized antibody and a human antibody.
10. The monoclonal antibody or the antibody fragment thereof described in the above 9, which is a humanized antibody and comprises the following (a) VH and (b) VL:

(a) VH which comprises the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:24 or an amino acid sequence in which at least one modification in amino acid modifications for substituting Ala at position 9 with Pro, Lys at position 12 with Val, Val at position 20 with Ile, Arg at position 38 with Lys, Met at position 48 with Ile, Arg at position 67 with Lys, Val at position 68 with Ala, Ile at position 70 with Leu, Tyr at position 95 with Phe and Val at position 112 with Leu is introduced in the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:24,
(b) VL which comprises the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:26 or an amino acid sequence in which at least one modification in amino acid modifications for substituting Leu at position 15 with Ala, Ala at position 19 with Val, Ile at position 21 with Met and Leu at position 84 with Val is introduced in the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:26.

11. The monoclonal antibody or the antibody fragment thereof described in the above 10, which is selected from the following (1) to (5):

(1) a humanized antibody which comprises at least one of VH of the antibody comprising the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:28 and VL of the antibody comprising the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:26,
(2) a humanized antibody which comprises at least one of VH of the antibody comprising the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:30 and VL of the antibody comprising the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:26,
(3) a humanized antibody which comprises at least one of VH of the antibody comprising the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:32 and VL of the antibody comprising the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:26,
(4) a humanized antibody which comprises at least one of VH of the antibody comprising the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:34 and VL of the antibody comprising the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:36,
(5) a humanized antibody which comprises at least one of VH of the antibody comprising the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:34 and VL of the antibody comprising the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:38.

12. The antibody fragment described in any one of the above 1 to 11, which is an antibody fragment selected from Fab, Fab', $F(ab')_2$, a single chain antibody (scFv), a dimerized V region (diabody), a disulfide stabilized V region (dsFv) and a peptide comprising CDR.
13. A DNA which encodes the monoclonal antibody or the antibody fragment described in any one of the above 1 to 12.
14. A recombinant vector comprising the DNA described in the above 13.
15. A transformant obtainable by introducing the recombinant vector described in the above 14 into a host cell.
16. A process for producing the monoclonal antibody or the antibody fragment thereof described in any one of the

above 1 to 12, which comprises culturing the transformant described in the above 14 in a medium to thereby form and accumulate the antibody or the antibody fragment thereof described in any one of the above 1 to 12 in culture, and recovering the antibody or the antibody fragment thereof from the culture.

17. A reagent for detecting or measuring human Trop-2, which comprises the monoclonal antibody or the antibody fragment thereof described in any one of the above 1 to 12.

18. A diagnostic agent for a disease relating to human Trop-2-positive cells, which comprises the monoclonal antibody or the antibody fragment thereof described in any one of the above 1 to 12 as an active ingredient.

19. The diagnostic agent described in the above 18, wherein the disease relating to human Trop-2-positive cells is a cancer.

20. A therapeutic agent for a disease relating to human Trop-2-positive cells, which comprises the monoclonal antibody or the antibody fragment thereof described in any one of the above 1 to 12 as an active ingredient.

21. The therapeutic agent described in the above 20, wherein the disease relating to human Trop-2-positive cells is a cancer.

22. A method for diagnosing a disease relating to human Trop-2-positive cells, which comprises using the monoclonal antibody or the antibody fragment thereof described in any one of the above 1 to 12 to detect or measure human Trop-2-positive cells.

23. A method for diagnosing a disease relating to human Trop-2-positive cells, which comprises using the monoclonal antibody or the antibody fragment thereof described in any one of the above 1 to 12 to detect or measure human Trop-2.

24. The diagnosing method described in the above 22 or 23, wherein the disease relating to human Trop-2-positive cells is a cancer.

25. Use of the monoclonal antibody or the antibody fragment thereof described in any one of the above 1 to 12 for manufacture of a diagnostic agent for a disease relating to human Trop-2-positive cells.

26. The use of the monoclonal antibody or the antibody fragment thereof described in the above 25, wherein the disease relating to human Trop-2-positive cells is a cancer.

27. Use of the monoclonal antibody or the antibody fragment thereof described in any one of the above 1 to 12 for manufacture of a therapeutic agent for a disease relating to human Trop-2-positive cells.

28. The use of the monoclonal antibody or the antibody fragment thereof described in the above 27, wherein the disease relating to human Trop-2-positive cells is a cancer.

Effects of Invention

[0017] A monoclonal antibody or an antibody fragment thereof against human Trop-2 in the present invention can recognize specifically at least domain I in the extracellular region of human Trop-2 and bind to the extracellular region with high affinity. Accordingly, a monoclonal antibody or an antibody fragment thereof in the present invention can have high ADCC activity and antitumor activity on human Trop-2-positive cells. Therefore, a monoclonal antibody or an antibody fragment thereof against human Trop-2 in the present invention is very useful for the treatment and diagnosis of diseases relating to human Trop-2-positive cells.

[0018] The present invention can provide a hybridoma which produces the antibody; a DNA which encodes the antibody; a vector which comprises the DNA; a transformant obtainable by introducing the vector; a process for producing an antibody or an antibody fragment thereof using the hybridoma or the transformant; and a therapeutic agent or a diagnostic agent using the antibody or the antibody fragment thereof.

Brief Description of the Drawings

[0019]

[Fig. 1(a)] to [Fig. 1(d)] Fig. 1(a) shows results obtained by analyzing the reactivity of KM4097 to human pancreatic carcinoma cell line BxPC-3 using FCM. Fig. 1(b) shows results obtained by analyzing the reactivity of KM4097 to human ovarian cancer cell line CaOV-3 using FCM. Fig. 1(c) shows results obtained by analyzing the reactivity of KM4097 to human breast cancer cell line MCF-7 using FCM. Fig. 1(d) shows results obtained by analyzing the reactivity of KM4097 to human colon cancer cell line Colo205 using FCM. In Fig. 1(a) to Fig. 1(d), the black area represents histograms when 10 μg/ml of KM4097 was added and the white area represents histograms when a negative control antibody was used.

[Fig. 2] Fig. 2 shows results obtained by analyzing the antagonism of an anti-Trop-2 mouse monoclonal antibody for the binding of cAR47A6.4.2 to human pancreatic carcinoma cell line BxPC-3 using FCM. The abscissa shows the concentration of each antibody and the ordinate shows the MFI value which represents the binding of cAR47A6.4.2. ● represents the MFI value in the coexistence of KM4097 and □ represents the MFI value in the

coexistence of 77220.

[Fig. 3] Fig. 3 shows results obtained by analyzing the antagonism of cAR47A6.4.2 for the binding of each anti-Trop-2 mouse monoclonal antibody to human pancreatic carcinoma cell line BxPC-3 using FCM. The abscissa shows the concentration of cAR47A6.4.2 and the ordinate shows the MFI value which represents the binding of each competitive antibody. ● represents the MFI value in the coexistence of KM4097 and □ represents the MFI value in the coexistence of 77220.

[Fig. 4] Fig. 4 shows obtained by analyzing the antagonism of an anti-Trop-2 monoclonal antibody for the binding of KM4097 to recombinant Trop-2 using binding ELISA. The abscissa shows the concentration of each antibody and the ordinate shows binding rate (%) of KM4097. ■ represents the binding rate (%) of KM4097 in the coexistence of cAR47A6.4.2 and □ represents the binding rate (%) of KM4097 in the coexistence of 77220.

[Fig. 5] Fig. 5 shows results obtained by analyzing the antagonism of an anti-Trop-2 monoclonal antibody for the binding of 77220 to recombinant Trop-2 using binding ELISA. The abscissa shows the concentration of each antibody and the ordinate shows binding rate (%) of 77220. ●, ■ and Δ represent the binding rate (%) of 77220 in the coexistence of KM4097, cAR47A6.4.2 and MOv16, respectively.

[Fig. 6(a)] and [Fig. 6(b)] Fig. 6(a) and Fig. 6(b) show antibody-dependent cell cytotoxicity (ADCC activity) of an anti-Trop-2 antibody for human breast cancer cell line MCF-7 cells. Fig. 6(a) shows the result of donor 1 and Fig. 6(b) shows the result of donor 2. The abscissa shows the concentration of each antibody and the ordinate shows cellular cytotoxicity rate (%). ● and ◇ represent KM4590 and cAR47A6.4.2, respectively. The results are expressed as a mean value ± standard error of three wells. * means significantly different ($p<0.05$) from cAR47A6.4.2 according to Student's t-test.

[Fig. 7(a)] and [Fig. 7(b)] Fig. 7(a) and Fig.7(b) show antibody-dependent cell cytotoxicity (ADCC activity) of an anti-Trop-2 antibody for human colon cancer cell line Colo205 cells. Fig. 7(a) shows the result of donor 1 and Fig. 7(b) shows the result of donor 2. The abscissa shows the concentration of each antibody and the ordinate shows cellular cytotoxicity rate (%). ● and ◇ represent KM4590 and cAR47A6.4.2, respectively. The results are expressed as a mean value ± standard error of three wells. * means significantly different ($p < 0.05$) from cAR47A6.4.2 according to Student's t-test.

[Fig. 8(a)] and [Fig. 8(b)] Fig. 8(a) and Fig. 8(b) show antibody-dependent cell cytotoxicity (ADCC activity) of an anti-Trop-2 antibody for human breast cancer cell line MCF-7 cells. Fig. 8(a) shows the result of donor 1 and Fig. 8(b) shows the result of donor 2. The abscissa shows the concentration of each antibody and the ordinate shows cellular cytotoxicity rate (%). ● and ○ represent KM4590 and KM4591, respectively. The results are shown as a mean value ± standard error of three wells.

[Fig. 9(a)] and [Fig. 9(b)] Fig. 9 (a) and 9 (b) show antibody-dependent cell cytotoxicity (ADCC activity) for human colon cancer cell line Colo205 cells. Fig. 9 (a) shows the result of donor 1 and Fig. 9 (b) shows the result of donor 2. The abscissa shows the concentration of each antibody and the ordinate shows cellular cytotoxicity rate (%). ● and ○ represent KM4590 and KM4591, respectively. The results are expressed shown as a mean value ± standard error of three wells.

[Fig. 10] Fig. 10 shows antitumor effects of an anti-Trop-2 chimeric antibody on a human pancreatic carcinoma cell line BxPC-3 xenograft mouse. The ordinate shows tumor volume and the abscissa shows the number of days after cell plantation. ○, ■ and ● represent the PBS administration group, the cAR47A6.4.2-P administration group and the KM4591 administration group, respectively. The results are shown as a mean value ± standard error of six animals. * means that the KM4591 administration group is significantly different ($p<0.05$) from the PBS administration group according to Student's t-test. # means that the cAR47A6.4.2-P administration group is significantly different ($p<0.05$) from the PBS administration group according to Student's t-test.

[Fig. 11] Fig. 11 shows antitumor effects of an anti-Trop-2 chimeric antibody on a human colon cancer cell line Colo205 xenograft mouse. The ordinate shows tumor volume and the abscissa shows the number of days after cell transplantation. ○, ■ and ● represent the PBS administration group, the cAR47A6.4.2-P administration group and the KM4591 administration group, respectively. The results are shown as a mean value ± standard error of five animals. *, ** and *** mean that the KM4591 administration group is significantly different ($p<0.05$, $p<0.01$ and $p<0.001$, respectively) from the PBS administration group according to Student's t-test. # means that the cAR47A6.4.2-P administration group is significantly different ($p<0.05$) from the PBS administration group according to Student's t-test.

[Fig. 12] Fig. 12 shows amino acid sequences of HV0, HV2, HV3a, HV3b, HV4, HV5a, HV5b, HV5c, HV6, HV8, HV9 and HV10 which are an H chain variable regions of designed KM4097 humanized antibody.

[Fig. 13] Fig. 13 shows amino acid sequences of LV0, LV2, LV3a, LV3b and LV4, which are an L chain variable regions of designed KM4097 humanized antibody.

[Fig. 14(a)] to [Fig.14(f)] Fig. 14(a) to Fig. 14(f) show results obtained by analyzing the antagonism of KM4590 or cAR47A6.4.2 for the binding of each anti-Trop-2 mouse monoclonal antibody to recombinant Trop-2 using binding ELISA. The abscissa shows the concentration of each chimeric antibody and the ordinate shows binding rate (%)

of each mouse monoclonal antibody. ● represents the binding rate (%) of mouse monoclonal antibody in the coexistence of cAR47A6.4.2 and ○ represents the binding rate (%) of mouse monoclonal antibody in the coexistence KM4590.

[Fig. 15] Fig. 15 shows schematic view of structures of Trop-2/FLAG/Fc, Mutant A, Mutant B and Mutant C.

[Fig. 16(a)] to [Fig. 16(c)] Fig. 16(a) to 16(c) show results obtained by reacting KM4590 (Fig. 16(a)), cAR47A6.4.2 (Fig. 16(b)), or anti-IgG (Anti-Fc) (Fig. 16(c)) with Trop-2 extracellular region proteins or the domain deletion mutant by Western blotting. Lanes 1, 2, 3 and 4 represent Trop-2/FLAG/Fc, Mutant A, Mutant B and Mutant C, respectively.

[Fig. 17(a)] and [Fig. 17(b)] Fig. 17(a) and Fig. 17(b) show results obtained by comparing the reactivity of KM4590 or cAR47A6.4.2 to Trop-2/FLAG/Fc with or without reducing treatment by Western blotting. Fig. 17(a) shows results obtained by reacting KM4590 or cAR47A6.4.2 with Trop-2/FLAG/Fc under non-reducing conditions and reducing conditions. Fig. 17(b) shows results obtained by detaching an antibody from each PDVF membrane of Fig. 17(a) and reacting the antibody with anti-human IgG (Anti-Fc). In both figures, lanes 1 and 2 represent Trop-2/FLAG/Fc under non-reducing conditions and Trop-2/FLAG/Fc under reducing conditions, respectively.

[Fig. 18] Fig. 18 shows results obtained by quantifying the signal intensity of three types of bands (the upper and lower bands in non-reducing conditions and a band in reducing conditions) on each PDVF membrane and calculating the ratio of the signal intensity quantified when KM4590 or cAR47A6.4.2 reacts to the signal intensity quantified when an anti-Fc reacts.

[Fig. 19(a)] and [Fig. 19(b)] Fig. 19(a) and Fig. 19(b) show the ADCC activity for human Trop-2-expressing CHO cells. The abscissa shows the concentration of each antibody and the ordinate shows the cellular cytotoxicity rate (%). Fig. 19(a) shows the result of donor 1 and Fig. 19(b) shows the result of donor 2. ◇ represents HV3aLV0, ● represents HV4LV0 and □ represents KM4591. The results are expressed as a mean value ± standard error of three wells.

Embodiments for Carrying Out the Invention

[0020] The present invention relates to a monoclonal antibody against human Trop-2, which specifically binds to the extracellular region of human Trop-2 (hereinafter referred to as "a monoclonal antibody of the present invention") or an antibody fragment thereof. Since the monoclonal antibody of the present invention binds to the extracellular region of human Trop-2 with high affinity, it has high ADCC activity and antitumor activity.

[0021] The human Trop-2 of the present invention include a polypeptide comprising the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:1 or NCBI Accession No. P_002344; a polypeptide comprising an amino acid sequence in which at least one amino acid is deleted, substituted or added in the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:1 or NCBI Accession No. NP_002344, and having a function of Trop-2; a polypeptide comprising an amino acid sequence having at least 60% homology, preferably at least 80% homology, more preferably at least 90% homology, and most preferably at least 95% homology, with the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:1 or NCBI Accession No. NP_002344, and having a function of Trop-2; and the like.

[0022] The polypeptide comprising an amino acid sequence wherein one or more amino acid residue(s) is/are deleted, substituted and/or added in the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:1 or NCBI Accession No. NP_002344 can be obtained, for example, by introducing a site-directed mutation into DNA encoding the polypeptide comprising the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:1 by site-directed mutagenesis described in Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1989), Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley & Sons, 1987-1997), Nucleic Acids Research, 10, 6487 (1982), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 6409 (1982), Gene, 34, 315 (1985), Nucleic Acids Research, 13, 4431 (1985), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 488 (1985), or the like.

[0023] The number of amino acid residues which are deleted, substituted or added is not particularly limited, and the number is preferably, 1 to dozens, such as 1 to 20, and more preferably 1 to several, such as 1 to 5.

[0024] As a gene which encodes human Trop-2 antibody, examples include the nucleotide sequence represented by SEQ ID NO:2 or NCBI Accession No. NM_002353. Examples also include a nucleotide sequence comprising a gene in which at least one nucleotide is deleted, substituted or added in the nucleotide sequence represented by SEQ ID NO: 2 or NCBI Accession No. NM_002353 and comprising a DNA encoding a polypeptide having a function of Trop-2; a gene comprising an nucleotide sequence having at least 60% homology, preferably at least 80% homology, more preferably at least 90% homology, and most preferably at least 95% homology, with the nucleotide sequence represented by SEQ ID NO:2 or NCBI Accession No. NM_002353 and comprising a DNA encoding a polypeptide having a function of Trop-2; a gene which hybridizes with the DNA consisting of the nucleotide sequence represented by SEQ ID NO:2 or NCBI Accession No. NM_002353 under stringent conditions and encodes a polypeptide having a function of Trop-2; and the like.

[0025] The DNA which hybridizes under stringent conditions refers to a DNA which is obtained by colony hybridization, plaque hybridization, Southern hybridization or the like using a DNA consisting of the nucleotide sequence represented by SEQ ID NO:2 or NCBI Accession No. NM_002353 as a probe.

[0026] A specific example of such DNA is a DNA which can be identified by performing hybridization [Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Lab. Press (1989), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987-1997); DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach, Second Edition, Oxford University (1995)] at 65°C in the presence of 0.7 to 1.0 mol/l sodium chloride using a filter with colony- or plaque-derived DNA immobilized thereon, and then washing the filter at 65°C with a 0.1 to 2-fold concentration SSC solution (1-fold concentration SSC solution: 150 mmol/l sodium chloride and 15 mmol/l sodium citrate).

[0027] Specifically, the DNA capable of hybridization under stringent conditions includes DNA having at least 60% or more homology, preferably 80% or more homology, more preferably 90% or more homology, and most preferably 95% or more homology with the nucleotide sequence represented by SEQ ID NO:2 or NCBI Accession No. NM_002353.

[0028] In the nucleotide sequence of the gene encoding a protein of a eukaryote, genetic polymorphism is often recognized. The Trop-2 gene used in the present invention also includes a gene in which small modification is generated in the nucleotide sequence by such polymorphism.

[0029] The number of the homology described in the present invention may be a number calculated by using a homology search program known by the skilled person, unless otherwise indicated. Regarding the nucleotide sequence, the number may be calculated by using a default parameter in BLAST [J. Mol. Biol., 215, 403 (1990)] or the like, and regarding the amino acid sequence, the number may be calculated by using a default parameter in BLAST2 [Nucleic Acids Res., 25, 33 89 (1997); Genome Res., 7, 649 (1997); http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Education/BLASTinfo/information3.html] or the like.

[0030] As the default parameter, G (Cost to open gap) is 5 for the nucleotide sequence and 11 for the amino acid sequence; -E (Cost to extend gap) is 2 for the nucleotide sequence and 1 for the amino acid sequence; -q (Penalty for nucleotide mismatch) is -3; -r (reward for nucleotide match) is; -e (expect value) is 10; -W (wordsize) is 11 residues for the nucleotide sequence and 3 residues for the amino acid sequence; -y (Dropoff (X) for blast extensions in bits) is 20 for blastn and 7 for a program other than blastn; -X (X dropoff value for gapped alignment in bits) is 15; and -Z (final X dropoff value for gapped alignment in bits) is 50 for blastn and 25 for a program other than blastn (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/html/blastcgihelp.html).

[0031] The polypeptide comprising a partial sequence of the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:1 or NCBI Accession No. NP_002344 can be prepared according to a method known by the skilled person. For example, it can be prepared by deleting a part of DNA encoding the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:1 and culturing a transformant into which an expression vector containing the DNA is introduced.

[0032] Also, based on the thus prepared polypeptide or DNA, a polypeptide comprising an amino acid sequence in which one or more amino acid(s) is/are deleted, substituted or added in a partial sequence of the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:1 or NCBI Accession No. NP_002344 can be prepared in the same manner as described above.

[0033] The polypeptide comprising the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:1 or NCBI Accession No. NP_002344; or the polypeptide comprising an amino acid sequence in which at least one amino acid is deleted, substituted or added in the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:1 or NCBI Accession No. NP_002344 can also be produced by a chemical synthesis method such as fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc) method or t-butyloxycarbonyl (t-Boc) method.

[0034] The extracellular region of human Trop-2 of the present invention includes, for example, regions predicted by using the amino acid sequence of the polypeptide represented by SEQ ID NO:1 with conventionally known transmembrane region prediction program SOSUI (http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/SOSUI/SOSUI_submit.), prediction program TMHMM ver. 2 (http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/) or ExPASy Proteomics Server (http://Ca.expasy.org/). Examples of the extracellular region include regions corresponding to position 274 from N-terminus of the extracellular region predicted by SOSUI.

[0035] The extracellular region of human Trop-2 of the present invention is not limited, so long as it has a structure equivalent to the possible structure naturally formed by the extracellular region of Trop-2 comprising the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:1 or NCBI Accession No. NP_002344. The possible structure naturally formed by the extracellular region of Trop-2 means a native conformation of Trop-2 expressing on a cell.

[0036] In the present invention, the extracellular region of human Trop-2 is divided into three groups and these are called as domains I, II, and III starting from the N-terminus. Namely, in the extracellular region of human Trop-2, domains which have a homology with two cysteine-rich domains in the extracellular region of EpCAM are called by domains I and II from the N-terminal and a cysteine-poor domain at the C-terminal is called as domain III. Specifically, in the amino acid sequence of human Trop-2 represented by SEQ ID NO:1, domain I corresponds to positions 34 to 72, domain II corresponds to positions 73 to 145 and domain III corresponds to position 146 to 274. The monoclonal antibody or antibody fragment thereof of the present invention binds to at least domain I in the extracellular region of human Trop-2.

[0037] Binding of the antibody or antibody fragment of the present invention to the extracellular region of human Trop-2 can be confirmed by a method in which the binding ability of a cell expressing a specified antigen and an antibody for the specific antigen is confirmed, for example, by a conventionally known immunological immunological detection method

such as a radioimmuno assay using a solid phase sandwich method and the like and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), preferably a fluorescent cell staining method or the like.

[0038] Specific examples include a fluorescent antibody staining method using an FMAT8100HTS System (manufactured by Applied Biosystems) [Cancer Immunol. Immunother., 36, 373 (1993)] or the like, a fluorescent cell staining method using flow cytometry, surface plasmon resonance using a Biacore System (manufactured by GE Healthcare) or the like, and the like.

[0039] Furthermore, a known immunological detection methods [Monoclonal Antibodies - Principles and practice, Third edition, Academic Press (1996), Antibodies - A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988), Monoclonal Antibody Experimental Manual, Kodan-sha Scientific (1987)] and the like can be combined to confirm the binding.

[0040] The cell expressing human Trop-2 may be any cell, so long as it expresses the Trop-2, and examples include a cell which is naturally present in the human body, a cell line established from the cell which is naturally present in the human body, a cell obtained by gene recombination technique and the like.

[0041] The cell which is naturally present in the human body includes a cell expressing the polypeptide in the body of a cancer patient, such as a cell expressing human Trop-2 among tumor cells obtained by biopsy or the like.

[0042] Example of a cell line established from the cell which is naturally present in the human body include a cell line expressing the Trop-2, among cell lines prepared by establishing the Trop-2-expressing cells obtained from the above cancer patients, and examples include human pancreas cancer cell line BxPC-3 (ATCC Accession No: CRL-1687), human breast cancer cell line MCF-7 (ATCC Accession No: HTB-22), which are established from a human cell and the like.

[0043] Specific examples of the cell obtained by gene recombination techniques may include a human Trop-2-expressing cell obtained by introducing an expression vector comprising a human Trop-2-encoding cDNA into an insect cell, an animal cell or the like, and the like.

[0044] The monoclonal antibody of the present invention is preferably an antibody which binds to Trop-2 with high affinity. Examples of the antibody which binds to Trop-2 with high affinity include an antibody which has sufficient affinity as a therapeutic antibody and which has a dissociation constant (hereinafter referred to as K_D) against Trop-2 of preferably 1×10^{-9} M or less, more preferably 7×10^{-10} M or less, furthermore preferably 5×10^{-10} M or less, and especially preferably 1×10^{-10} M or less.

[0045] By setting K_D at 1×10^{-9} M or less, the antibody can bind to the extracellular region of human Trop-2 with sufficient affinity as a therapeutic antibody and have high ADCC activity and antitumor activity. The dissociation constant K_D against Trop-2 can be calculated using such as Biacore T100 (manufactured by GE Healthcare) and specifically can be measured using the following method described in Examples. The monoclonal antibody of the present invention exhibits lower value than that of anti-Trop-2 antibody AR47A6.4.2 when this measuring method is applied.

[0046] The affinity is obtained through the analysis of chemical kinetics and, for example, can be calculated using such as Biacore T100 (manufactured by GE Healthcare).

[0047] In the present invention, when the dissociation is slow, the dissociation rate constant kd of an antibody calculated using Biacore T100 exhibits smaller value. The dissociation rate constant kd can be measured using Biacore T100 and then calculated by the attached software, Biacore T100 evaluation software (manufactured by GE Healthcare).

[0048] In addition, the monoclonal antibody of the present invention has preferably high ADCC activity and high antitumor activity and more preferably further has CDC activity.

[0049] In the present invention, an antibody having a high ADCC activity means an antibody which exhibits higher ADCC activity than anti-Trop-2 antibody AR47A6.4.2 when the ADCC activity of plural antibodies on a Trop-2-expressing cell are measured at the same time using a known method [Cancer Immunol. Immunother., 36, 373 (1993)].

[0050] In the present invention, an antibody having a high antitumor activity means an antibody which exhibits higher antitumor activity than anti-Trop-2 antibody AR47A6.4.2 when the antitumor activity of plural antibodies in a tumor-bearing animal model having a Trop-2-expressing cancer cell are measured at the same time. The antitumor activity can be measured using the following method described in Examples.

[0051] The monoclonal antibody of the present invention includes an antibody produced by a hybridoma and a recombinant antibody produced by a transformant transformed with an expression vector containing a gene encoding an antibody.

[0052] The monoclonal antibody is an antibody secreted by a single clone of antibody-producing cell, and recognizes only one epitope (also called antigen determinant) and has the uniformity in the amino acid sequence (primary structure).

[0053] Examples of the epitope include a single amino acid sequence, a three-dimensional structure comprising the amino acid sequence, a sugar chain-bound amino acid sequence, a three-dimensional structure comprising a sugar chain-bound amino acid sequence, and the like, recognized and bound by a monoclonal antibody.

[0054] The epitope which the monoclonal antibody of the present invention recognizes can be determined by carrying out an antibody binding assay using a mutant in which a part of domain of Trop-2 is deleted or is substituted with a domain derived from another protein.

[0055] The epitope recognized by the monoclonal antibody of the present invention has an amino acid sequence or a conformation different from that of anti-Trop-2 antibody AR47A6.4.2. It is disclosed that AR47A6.4.2 recognizes the

amino acid sequence at position 179 to 187 and the amino acid sequence at position 252 to 260 as an epitope and binds to them (WO2008/144891).

[0056] Examples of the monoclonal antibody of the present invention include a monoclonal antibody which binds to a site different from epitopes to which anti-Trop-2 antibody AR47A6.4.2 and 77220 binds, and the antibody fragment thereof.

[0057] Examples of the monoclonal antibody of the present invention include a monoclonal antibody in which CDR1, CDR2 and CDR3 of a heavy chain variable region (hereinafter referred to as VH) of the antibody comprise the amino acid sequences represented by SEQ ID NOs:13, 14 and 15, respectively, and CDR1, CDR2 and CDR3 of a light chain variable region (hereinafter referred to as VL) of the antibody comprise the amino acid sequences represented by SEQ ID NOs:16, 17 and 18, respectively.

[0058] In addition, more specific examples of the monoclonal antibody of the present invention include an antibody in which VH of the antibody comprises the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:10 and VL of the antibody comprises the amino acid sequence represented by SEQ ID No:12.

[0059] In addition, examples of the monoclonal antibody of the present invention include the above-described monoclonal antibody, a monoclonal antibody which binds to an epitope which is the same as an epitope in the extracellular region of Trop-2 to which the above-described monoclonal antibody binds, and the like. Specifically, examples include an antibody which recognizes at least domain I in the extracellular region of human Trop-2, and antibody fragment thereof.

[0060] The hybridoma can be prepared, for example, by preparing the above cell expressing Trop-2 as an antigen, inducing an antibody-producing cell having antigen specificity from an animal immunized with the antigen, and fusing the antigen-producing cell with a myeloma cell. The anti-Trop-2 antibody can be obtained by culturing the hybridoma or administering the hybridoma cell into an animal to cause ascites tumor in the animal and separating and purifying the culture or the ascites.

[0061] The animal immunized with an antigen may be any animal, so long as a hybridoma can be prepared, and mouse, rat, hamster, chicken, rabbit or the like is suitably used. Also, the antibody of the present invention includes an antibody produced by a hybridoma generated by obtaining an antibody producing cell from such an animal, in vitro immunizing by the cell and fusing the cell with a myeloma cell..

[0062] In the present invention, the recombinant antibody includes an antibody produced by gene recombination, such as a human chimeric antibody, a humanized antibody, a human antibody and an antibody fragment thereof. Among the recombinant antibodies, one having character of a common monoclonal antibody, low immunogenecity and prolonged half-life in blood is preferable as a therapeutic agent. Examples of the recombinant antibody include an antibody which is prepared by modifying the above monoclonal antibody of the present invention using a recombinant technique.

[0063] The human chimeric antibody is an antibody comprising VH and VL of an antibody of a non-human animal, and a heavy chain constant region (hereinafter referred to as CH) and a light chain constant region (hereinafter referred to as CL) of a human antibody. Specifically, the human chimeric antibody of the present invention can be produced by obtaining cDNAs encoding VH and VL from a hybridoma which produces a monoclonal antibody which specifically recognizes Trop-2 and binds to the extracellular region, inserting each of them into an expression vector for animal cell comprising DNAs encoding CH and CL of human antibody to thereby construct a expression vector of human chimeric antibody, and then introducing the vector into an animal cell to express the antibody.

[0064] As the CH of the human chimeric antibody, any CH can be used, so long as it belongs to human immunoglobulin (hereinafter referred to as "hIg"), and those belonging to the hIgG class are preferred, and any one of the subclasses belonging to the hIgG class, such as hIgG1, hIgG2, hIgG3 and hIgG4, can be used. As the CL of the human chimeric antibody, any CL can be used, so long as it belongs to the hIg class, and those belonging to κ class or λ class can be used.

[0065] Examples of the chimeric antibody of the present invention include a chimeric antibody in which VH of the antibody comprises the amino acid sequences represented by SEQ ID NO:10, and VL of the antibody comprises the amino acid sequences represented by SEQ ID NO:12.

[0066] In addition, examples of the chimeric antibody of the present invention include a chimeric antibody which binds to an extracellular region of Trop-2 while competing with the above chimeric antibody and a chimeric antibody which binds an epitope in an extracellular region of Trop-2 to which the above chimeric antibody binds.

[0067] A humanized antibody includes a humanized Complementarity Determining Region (hereinafter referred to as CDR) grafted antibody.

[0068] The humanized antibody of the present invention can be produced by constructing cDNAs encoding an antibody V region in which the amino acid sequences of CDRs of VH and VL of an antibody derived from a non-human animal produced by a hybridoma which produces a monoclonal antibody which specifically recognizes three-dimensional structure of Trop-2 and binds to the extracellular region are grafted into frameworks (hereinafter referred to as "FR") of VH and VL of a suitable human antibody, inserting each of them into an expression vector for animal cell comprising genes encoding CH and CL of a human antibody to thereby construct an expression vector of a humanized antibody, and introducing it into an animal cell to thereby express and produce the humanized antibody.

[0069] As the amino acid sequences of FRs of VH and VL of a humanized antibody, any amino acid sequences can

be used, so long as they are amino acid sequences of FRs of VH and VL, respectively, derived from a human antibody. Examples include amino acid sequences of FRs of VH and VL of human antibodies registered in database such as Protein Data Bank, common amino acid sequences of each sub group of FRs of VH and VL of human antibodies described in, for example, Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services (1991), and the like.

[0070] Example of a humanized antibody of the present invention includes a humanized antibody which comprises VH of the antibody wherein CDR1, CDR2, and CDR3 comprise the amino acid sequences represented by SEQ ID NO:13, 14, and 15, respectively; and comprises VL of the antibody wherein CDR1, CDR2, and CDR3 comprise the amino acid sequences represented by SEQ ID NO:16, 17, and 18, respectively.

[0071] Specific examples of a humanized antibody of the present invention include a humanized antibody which comprises at least one of (a) VH and (b) VL, and the like, and there is no limit on the number of modifications to be introduced:

(a) VH of the antibody which comprises the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:24 or an amino acid sequence in which at least one amino acid residue selected from Ala at position 9, Lys at position 12, Val at position 20, Arg at position 38, Met at position 48, Arg at position 67, Val at position 68, Ile at position 70, Tyr at position 95, and Val at position 112 in the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:24 is substituted with other amino acid residue,

(b) VL of the antibody which comprises the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:26 or an amino acid sequence in which at least one amino acid residue selected from Leu at position 15, Ala at position 19, Ile at position 21, and Leu at position 84 in the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:26 is substituted with other amino acid residue.

[0072] Regarding VH which is included in a humanized antibody of the present invention, the following (1) to (11) are preferable:

(1) VH which comprises an amino acid sequence in which Ala at position 9, Lys at position 12, Val at position 20, Arg at position 38, Met at position 48, Arg at position 67, Val at position 68, Ile at position 70, Tyr at position 95, and Val at position 112 in the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:24 are substituted with other amino acid residues,

(2) VH which comprises an amino acid sequence in which Ala at position 9, Lys at position 12, Val at position 20, Arg at position 38, Met at position 48, Arg at position 67, Val at position 68, Ile at position 70, and Tyr at position 95 in the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:24 are substituted with other amino acid residues,

(3) VH which comprises an amino acid sequence in which Ala at position 9, Val at position 20, Arg at position 38, Met at position 48, Arg at position 67, Val at position 68, Ile at position 70, and Tyr at position 95 in the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:24 are substituted with other amino acid residues,

(4) VH which comprises an amino acid sequence in which Ala at position 9, Arg at position 38, Met at position 48, Arg at position 67, Val at position 68, and Tyr at position 95 in the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:24 are substituted with other amino acid residues,

(5) VH which comprises an amino acid sequence in which Ala at position 9, Arg at position 67, Val at position 68, Ile at position 70, and Tyr at position 95 in the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:24 are substituted with other amino acid residues,

(6) VH which comprises an amino acid sequence in which Ala at position 9, Arg at position 38, Met at position 48, Arg at position 67, and Tyr at position 95 in the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:24 are substituted with other amino acid residues,

(7) VH which comprises an amino acid sequence in which Arg at position 38, Met at position 48, Arg at position 67, Val at position 68, and Tyr at position 95 in the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:24 are substituted with other amino acid residues,

(8) VH which comprises an amino acid sequence in which Ala at position 9, Arg at position 38, Met at position 48, and Tyr at position 95 in the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:24 are substituted with other amino acid residues,

(9) VH which comprises an amino acid sequence in which Ala at position 9, Arg at position 67, and Tyr at position 95 in the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:24 are substituted with other amino acid residues,

(10) VH which comprises an amino acid sequence in which Arg at position 38, Met at position 48, and Tyr at position 95 in the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:24 are substituted with other amino acid residues,

(11) VH which comprises an amino acid sequence in which Arg at position 38 and Met at position 48 in the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:24 are substituted with other amino acid residues.