пузыря, гепатому, рак молочной железы, рак толстой кишки, рак прямой кишки, колоректальный рак, эндометриальную или маточную карциному, карциному слюнной железы, рак почек, рак предстательной железы, рак вульвы, рак щитовидной железы, карциному печени, карциному ануса, карциному полового члена, а также рак головы и шеи.

«Рак с экспрессией ErbB» представляет собой опухоль с клетками, на поверхности которых представлен белок ErbB. «Рак с экспрессией ErbB2» представляет собой рак с клетками, на поверхности которых продуцируются достаточные уровни ErbB2, так что антитело к ErbB2 может связываться с ними и оказывать терапевтический эффект в отношении злокачественной опухоли.

Рак со «сверхэкспрессией» рецептора, например рецептора ErbB, представляет собой рак с достаточно высокими уровнями рецептора, такого как ErbB2, на поверхности его клеток по сравнению с незлокачественными клетками того же тканевого типа. Такая сверхэкспрессия может быть вызвана амплификацией гена или увеличенной транскрипцией или трансляцией. Сверхэкспрессия рецептора ErbB может быть определена в диагностическом или прогностическом анализе, оценивая увеличенные уровни белка ErbB на поверхности клетки (например, с помощью иммуногистохимического анализа; IHC). Альтернативно или дополнительно можно измерять уровни нуклеиновой кислоты, кодирующей ErbB, в клетке, например, с помощью флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH; см. WO 98/45479), способов саузерн-блоттинга или полимеразной цепной реакции (ПЦР), например количественной ПЦР в реальном времени (RT-PCR). Сверхэкспрессия лиганда ErbB может быть определена для диагностики, оценивая уровни лиганда (или кодирующей его нуклеиновой кислоты) у пациента, например в биопсии опухоли, или различными диагностическими анализами, такими как IHC, FISH, саузерн-блоттинг, ПЦР или описанными выше анализами *in vivo*. Также сверхэкспрессию рецептора ErbB можно исследовать, измеряя «слущивающийся» антиген (например, внеклеточный домен ErbB) в биологической жидкости, такой как сыворотка (см., например, патент США № 4933294; WO 91/05264; патент США № 5401638 и Sias et al. (1990) J. Immunol. Methods 132:73-80). Помимо указанных выше анализов специалистам в данной области доступны различные другие анализы *in vivo*. Например, можно воздействовать на клетки в организме пациента антителом, которое необязательно мечено детектируемой меткой, например радиоактивным изотопом, и у пациента можно оценивать связывание антитела с клетками, например, внешним сканированием радиоактивности или анализом биопсии, взятой у пациента, предварительно подвергнутого воздействию антитела.

Опухоли со сверхэкспрессией HER2 по иммуногистохимическим оценкам классифицируют в соответствии с количеством копий молекул HER2, экспрессирующихся на клетку, и их можно определить биохимически: 0=0-10000 копий/клетку, 1+=по меньшей мере, приблизительно 200000 копий/клетку, 2+=по меньшей мере, приблизительно 500000 копий/клетку, 3+=приблизительно $1-2\times10^6$ копий/клетку. Сверхэкспрессия HER2 на уровне 3+, приводящая к независимой от лиганда активации тирозинкиназы (Hudziak et al., (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:7159-7163), возникает приблизительно в 30% случаев рака молочной железы, и у этих пациентов интервал без рецидивов и общая продолжительность жизни уменьшена (Slamon et al. (1989) Science 244:707-712; Slamon et al. (1987) Science, 235:177-182). Напротив, рак "с отсутствием сверхэкспрессии рецептора ErbB2» представляет собой злокачественную опухоль, которая в диагностическом анализе по сравнению с незлокачественной клеткой того же тканевого типа не экспрессирует рецептор ErbB2 на уровнях, больших, чем нормальные. Моноклональное антитело мыши против HER2 ингибирует рост клеточных линий рака молочной железы со сверхэкспрессией HER2 на уровнях 2+ и 3+ ($1-2\times10^6$ рецепторов HER2 на клетку), но не проявляет активности в отношении клеток, экспрессирующих меньшие уровни HER2 (Lewis et al. (1993) Cancer Immunol. Immunother. 37:255-263). На основании этого наблюдения гуманизировали антитело 4D5 (huMAb4D5-8, rhuMAb HER2, патент США № 5821337; Carter et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 4285-4289) и оценивали у больных с раком молочной железы, опухоли которых сверхэкспрессировали HER2, но у которых наблюдали прогрессирование болезни после обычно химиотерапии (Cobleigh et al. (1999) J. Clin. Oncol. 17: 2639-2648). Опухоли у большинства пациентов в данном испытании экспрессировали HER2 на уровне 3+, но часть - на уровне 2+.

«Гормононезависимая» злокачественная опухоль представляет собой злокачественную опухоль, чей рост не зависит от присутствия гормона, связывающегося с рецептором, экспрессируемым раковыми клетками. Такие злокачественные опухоли не обнаруживают клинического регресса при проведении фармакологических или хирургических способов, уменьшающих концентрацию

гормонов в опухоли или вокруг нее. Примеры гормононезависимых злокачественных опухолей включают рак предстательной железы, независимый от андрогенов, рак эндометрия, независимый от андрогенов, рак молочной железы, независимый от эстрогенов, рак эндометрия и рак яичников. Такие злокачественные опухоли в начале своего развития могут быть гормонозависимыми и прогрессировать от гормоночувствительной стадии до гормоноустойчивой опухоли после антигормональной терапии.

Как используют в данном документе термин «цитотоксическое средство» относится к веществу, ингибирующему или предотвращающему функционирование клеток и/или вызывающему разрушение клеток. Термин охватывает радиоактивные изотопы (например, ^{211}At, ^{131}I, ^{125}I, ^{90}Y, ^{186}Re, ^{188}Re, ^{153}Sm, ^{212}Bi, ^{32}P, ^{60}C и радиоактивные изотопы Lu), химиотерапевтические средства и токсины, такие как низкомолекулярные токсины или ферментативно активные токсины бактериального, грибкового, растительного или животного происхождения, включая их синтетические аналоги и производные.

«Химиотерапевтическое средство» представляет собой химическое соединение, эффективное для лечения злокачественной опухоли. Примеры химиотерапевтических средств включают эрлотиниб (ТАРЦЕВА (TARCEVA®), Genentech/OSI Pharm.), бортезомиб (ВЕЛКЕЙД (VELCADE®), Millenium Pharm.), фулвестрант (ФАСЛОДЕКС (FASLODEX®), Astrazeneca), сутент (SU11248, Pfizer), летрозол (ФЕМАРА® (FEMARA®), Novartis), иматиниба мезилат (ГЛИВЕК® (GLEEVEC®), Novartis), PTK787/ZK 222584 (Novartis), оксалиплатин (Элоксатин (Eloxatin®), Sanofi), 5-FU (5-фторурацил), лейковорин, рапамицин (сиролимус, РАПАМУН (RAPAMUNE®), Wyeth), лапатиниб (GSK572016, GlaxoSmithKline), лонафарниб (SCH 66336), сорафениб (BAY43-9006, Bayer Labs.) и гефитиниб (ИРЕССА (IRESSA®), Astrazeneca), AG1478, AG1571 (SU 5271; Sugen), алкилирующие средства, такие как тиотепа и ЦИТОКСАН® (CYTOXAN®) циклофосфамид; алкилсульфонаты, такие как бусульфан, импросульфан и пипосульфан; азиридины, такие как бензодопа, карбоквон, метуредопа и уредопа; этиленимины и метиламеламины, включающие в себя альтретамин, триэтиленмеламин, триэтиленфосфорамид, триэтилентиофосфорамид и триметилмеламин; ацетогенины (особенно буллатацин и буллатацинон); камптотецин (включая синтетический аналог топотекан); бриостатин; каллистатин; CC-1065 (включая его адозелезиновые, карзелезиновые и бизелезиновые синтетические аналоги); криптофицины (особенно криптофицин 1 и криптофицин 8); доластатин; дуокармицин (включая синтетические аналог, KW-2189 и CB1-TM1); элеутеробин; панкратистатин; саркодиктин; спонгистатин; азотистые иприты, такие как хлорамбуцил, хлорнафазин, голофосфамид, эстрамустин, ифосфамид, мехлоретамин, гидрохлорид оксида мехлоретамина, мелфалан, новембихин, фенэстерин, преднимустин, трофосфамид, урациловый иприт; производные нитрозомочевины, такие как кармустин, хлорозотоцин, фотемустин, ломустин, нимустин и ранимнустин; антибиотики, такие как ендиеновые антибиотики (например, калихимицин, особенно калихимицин гамма1I и калихимицин омегаI1 (Angew Chem Intl. Ed. Engl. (1994) 33:183-186); динемицин, включая динемицин A; бисфосфонаты, такие как хлодронат; эсперамицин; а также хромофор неокарциностатин и родственные хромопротеиновые ендиеновые антибиотические хромофоры), аклациномизины, актиномицин, аутрамицин, азасерин, блеомицины, кактиномицин, карабицин, карминомицин, акрцинофилин, хромомицины, дактиномицин, даунорубицин, деторубицин, 6-диазо-5-оксо-L-норлейцин, доксорубицин АДРИАМИЦИН (ADRIAMYCIN®) (включая морфолинодоксорубицин, цианоморфолинодоксорубицин, 2-пирролинодоксорубицин и дезоксидоксорубицин), эпирубицин, эзорубицин, идарубицин, марцеломицин, митомицины, такие как митомицин C, микофеноловую кислоту, ногаламицин, оливомицины, пепломицин, потфиромицин, пуромицин, квеламицин, родорубицин, стрептонигрин, стрептозоцин, теберцидин, убенимекс, зиностатин, зорубицин; антиметаболиты, такие как метотрексат и 5-фторурацил (5-FU); аналоги фолиевой кислоты, такие как деноптерин, метотрексат, птероптерин, триметрексат; аналоги пурина, такие как флударабин, 6-меркаптопурин, тиамиприн, тиогуанин; аналоги пиримидина, такие как анцитабин, азацитидин, 6-азауридин, кармофур, цитарабин, дидезоксиуридин, доксифлуридин, эноцитабин, флоксуридин; андрогены, такие как калустерон, дромостанолона пропионат, эпитиостанол, мапистиостан, тестолактон; антиадреналовые средства, такие как аминоглутетимид, митотан, трилостан; компенсаторы фолиевой кислоты, такие как фролиновую кислоту; ацеглатон; альдофосфамид гликозид; аминолевулиновую кислоту; энилурацил; амсакрин; бестрабуцил; бизантрен; эдатраксат; дефофамин; демеколицин; диазиквон; эльфорнитин; эллиптиум ацетат; эпотилон; этоглюцид; нитрат галлия; гидроксимочевину; лентинан; лонидайнин; майтанзиноиды, такие как майтаназин и

анзамитоцины; митогуазон; митоксантрон; мопиданмол; нитраерин; пентостатин; фенамет; пирарубицин; лозоксантрон; подофилиновую кислоту; 2-этилгидразид; прокарбацин; полисахаридный комплекс PSK® (JHS Natural Products, Eugene, OR); разоксан; ризоксин; сизофиран; спирогерманий; тенуазоновую кислоту; триазиквон; 2,2',2"-трихлортриэтиламин; трихотецены (особенно токсин Т-2, верракурин А, роридин А и ангуидин); уретан; виндезин; дакарбазин; манномустин; митобронитол; митолактол; пипоброман; гацитозин; арабинозид («Ara-C»); циклофосфамид; тиотепа; таксоиды, например, паклитаксел ТАКСОЛ® (TAXOL®) (Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), АБРАКСАН (ABRAXANE™) без кремофора, препарат сконструированных на основе альбумина наночастиц паклитаксила (American Pharmaceutical Partners, Schaumberg, Illinois), и доцетаксел ТАКСОТЕР® (TAXOTERE®) (Rhone- Poulenc Rorer, Antony, France); хлоранбуцил; гемцитабин ГЕМЗАР® (GEMZAR®); 6-тиогуанин; меркаптопурин; метотрексат; аналоги платины, такие как цисплатин и карбоплатин; винбластин; платину; этопозид (VP-16); ифосфамид; митоксантрон; винкристин; винорелбин НАВЕЛЬБИН® (NAVELBINE®); новантрон; тенипозид; эдатрексат; дауномицин; аминоптерин; кселода; ибандронат; CPT-11; ингибитор топоизомеразы RFS 2000; дифторметилорнитин (DMFO); ретиноиды, такие как ретиноевая кислота; капецитабин и фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого из указанного выше.

Также определение «химиотерапевтическое средство» охватывает: (i) антигормональные средства, которые регулируют или ингибируют действие гормонов на опухоли, такие как антиэстрогены и селективные модуляторы рецепторов эстрогенов (SERM), включая, например, тамоксифен (включая тамоксифен НОЛВАДЕКС (NOLVADEX®)), ралоксифен, дролоксифен, 4-гидрокситамоксифен, триоксифен, кеоксифен, LY117018, онапристон и торемифен ФАРЕСТОН (FARESTON); (ii) ингибиторы ароматазы, ингибирующие фермент ароматазу, регулирующий образование эстрогенов в надпочечниках, такие как, например, 4(5)-имидазолы, аминоглутэтимид, мегестрол ацетат МЕГАЗА (MEGASE®), экземестан АРОМАЗИН® (AROMASIN®), форместан, фадрозол, ворозол РИВИЗОР (RIVISOR®), летрозол ФЕМАРА® (FEMARA®) и анастрозол (АРИМИДЕКС®); (iii) антиандрогены, такие как флутамид, нилутамид, бикалутамид, леупролид и гозерелин; а также троксацитабин (1,3-диоксолановый аналог нуклеозина цитозина); (iv) ингибиторы ароматазы; (v) ингибиторы протеинкиназы; (vi) ингибиторы липидкиназы; (vii) антисмысловые олигонуклеотиды, в частности те, которые ингибируют экспрессию генов в путях передачи сигнала, вовлеченных в амплификацию аномальных клеток, такие как, например, PKC-альфа, Ralf и H-Ras; (viii) рибозимы, такие как ингибитор экспрессии VEGF (например, рибозим АНГИОЗИМ (ANGIOZYME®)) и ингибитор экспрессии HER2; (ix) вакцины, такие как генотерапевтические вакцины, например, вакцина АЛЛОВЕКТИН (ALLOVECTIN®), вакцина ЛЕЙВЕКТИН (LEUVECTIN®) и вакцина ВАКСИД (VAXID®); rIL-2 ПРОЛЕЙКИН (PROLEUKIN®); ингибитор топоизомеразы I ЛУРТОТЕКАН (LURTOTECAN®); rmRH АБАРЕЛИКС (ABARELIX®); (x) антиангиогенные средства, такие как бевацизумаб (АВАСТИН® (AVASTIN®), Genentech) и (xi) фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого из указанного выше.

Ингибиторы протеинкиназ включают ингибиторы протеинкиназ, до некоторой степени ингибирующие тирозинкиназную активность тирозинкиназы, например рецептора ErbB. Примеры ингибиторов протеинкиназ включают направленные на EGFR лекарственные средства, такие как: (i) антитела, связывающиеся с EGFR, включающие в себя MAb 579 (ATCC CRL HB 8506), MAb 455 (ATCC CRL HB8507), MAb 225 (ATCC CRL 8508), MAb 528 (ATCC CRL 8509) (см. патент США № 4943533, Mendelsohn *et al.*) и их варианты, такие как химеризованное антитело 225 (C225 или цетуксимаб; ЭРБИТУКС (ERBITUX®), Imclone) и реконструированное человеческое антитело 225 (H225) (WO 96/40210, Imclone Systems Inc.); антитела, связывающие мутантный EGFR типа II (патент США № 5212290); гуманизированные и химерные антитела, связывающие EGFR (патент США № 5891996), и человеческие антитела, связывающие EGFR, такие как ABX-EGF (WO 98/50433); (ii) антитело к EGFR, конъюгированное с цитотоксическим средством (EP 659439A2), и связывающиеся с EGFR низкомолекулярные вещества, включающие в себя ZD1839 или гефитиниб (ИРЕССА (IRESSA™); Astra Zeneca), эрлотиниб HCl (CP-358774, ТАРЦЕВА (TARCEVA™); Genentech/OSI) и AG1478, AG1571 (SU 5271; Sugen), хиназолины, такие как PD 153035, 4-(3-хлоранилино)хиназолин, пиридопиримидины, пиримидопиримидины, пирролопиримидины, 4-(фениламино)-7H-пирроло[2,3-d] пиримидины, куркумин (диферулоилметан, 4,5-бис-(4-фторанилино)фталимид), тирфостины, содержащие нитротиофеновые молекулы; PD-0183805 (Warner-Lambert);

антисмысловые молекулы (например, молекулы, связывающие кодирующую ErbB нуклеиновую кислоту); хиноксалины (патент США № 5804396); трифостины (патент США № 5804396); ZD6474 (Astra Zeneca); PTK-787 (Novartis/Schering AG); ингибиторы всех видов ErbB, такие как CI-1033 (Pfizer); аффинитак (ISIS 3521; Isis/Lilly); иматиниба мезилат (Гливек; Novartis); PKI 166 (Novartis); GW2016 (Glaxo SmithKline); CI-1033 (Pfizer); EKB-569 (Wyeth); семаксаниб (Sugen); ZD6474 (AstraZeneca); PTK-787 (Novartis/Schering AG); INC-1C11 (Imclone) или, как описано в патенте США № 5804396; WO 99/09016 (American Cyanamid); WO 98/43960 (American Cyanamid); WO 97/38983 (Warner Lambert); WO 99/06378 (Warner Lambert); WO 99/06396 (Warner Lambert); WO 96/30347 (Pfizer, Inc); WO 96/33978 (Zeneca); WO 96/3397 (Zeneca) и WO 96/33980 (Zeneca).

«Антиангиогенное средство» относится к соединению, блокирующему или до некоторой степени препятствующему развитию кровеносных сосудов. Антиангиогенный фактор может быть, например, низкомолекулярным соединением или антителом, связывающимся с фактором роста или рецептором фактора роста, вовлеченным в активацию ангиогенеза. Иллюстративное антиангиогенное средство представляет собой антитело, связывающееся с фактором роста сосудистого эндотелия, такое как бевацизумаб (АВАСТИН® (AVASTIN®), Genentech).

Термин «цитокин» является общим термином для белков, высвобождаемых одной клеточной группой, действующих на другие клетки в качестве межклеточных медиаторов. Примерами таких цитокинов являются лимфокины, монокины и обычные пептидные гормоны. В число цитокинов входят гормон роста, такой как гормон роста человека, N-метионил гормон роста человека и бычий гормон роста; паратиреоидный гормон; тироксин; инсулин; проинсулин; релаксин; прорелаксин; гликопротеиновые гормоны, такие как фоликулстимулирующий гормон (FSH), тиреотропный гормон (TSH) и лютеинизирующий гормон (LH); фактор роста печени; фактор роста фибробластов; пролактин; плацентарный лактоген; фактор некроза опухоли-α и -β; мюллерова ингибирующая субстанция; ассоциированный с мышиным гонадотропином пептид; ингибин; активин; фактор роста сосудистого эндотелия; интегрин; тромбопоэтин (TPO); факторы роста нервов, такие как NGF-β; фактор роста тромбоцитов; трансформирующие факторы роста (TGF), такие как TGF-α и TGF-β; инсулиноподобный фактор роста-I и -II; эритропоэтин (EPO); остеоиндуктивные факторы; интерфероны, такие как интерферон-α, -β и -γ; колониестимулирующие факторы (CSF), такие как макрофагальный-CSF (M-CSF); гранулоцитарно-макрофагальный-CSF (GM-CSF) и гранулоцитарный-CSF (G-CSF); интерлейкины (IL), такие как IL-1, IL-1α, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12; фактор некроза опухоли, такой как TNF-α или TNF-β, и другие полипептидные факторы, включая LTF и лиганд kit (KL). Использующийся в данном документе термин цитокин включает белки из природных источников или из рекомбинантной клеточной культуры и биологически активные эквиваленты природных последовательностей цитокинов.

Использующийся в данной заявке термин «пролекарственное средство» относится к предшественнику или производному фармацевтически активного вещества, который менее цитотоксичен для опухолевых клеток по сравнению с исходным лекарственным средством и способен ферментативно активироваться или преобразоваться в более активную исходную форму. См., например, Wilman, «Prodrugs in Cancer Chemotherapy» Biochemical Society Transactions, 14, pp. 375-382, 615th Meeting Belfast (1986) и Stella et al., «Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery», Directed Drug Delivery, Borchardt et al. (ed.), pp. 247-267, Humana Press (1985). Пролекарственные средства по настоящему изобретению включают в качестве неограничивающих примеров пролекарственные средства, содержащие фосфаты, пролекарственные средства, содержащие тиофосфаты, пролекарственные средства, содержащие сульфаты, пролекарственные средства, содержащие пептиды, пролекарственные средства, модифицированные D-аминокислотами, гликозилированные пролекарственные средства, содержащие β-лактамы, пролекарственные средства, содержащие необязательно замещенные феноксиацетамиды, или пролекарственные средства, содержащие необязательно замещенные фенилацетамиды, пролекарственные средства с 5-фторцитозином или 5-фторуридином, которые можно преобразовывать в более активное цитотоксическое свободное лекарственное средство. Примеры цитотоксических лекарственных средств, которые можно преобразовывать в форму пролекарственного средства для применения по настоящему изобретению, включают в качестве неограничивающих примеров описанные выше химиотерапевтические средства.

«Липосома» представляет собой небольшую везикулу, состоящую из липидов различных типов, фосфолипидов и/или поверхностно-активного вещества, которая может использоваться для доставки лекарственного средства (такого как антитела

против ErbB2, описанные в данном документе и, необязательно, химиотерапевтическое средство) млекопитающему. Компоненты липосомы, как правило, упорядочены в структуру бислоя, сходны с расположением липидов в биологических мембранах.

Применяемый термин «листовка-вкладыш» относится к инструкциям, которые обычно включают в коммерческие упаковки терапевтических продуктов, инструкциям, которые содержат информацию о показаниях, применении, дозировке, введении, противопоказаниях и/или предостережениях, относящихся к применению таких терапевтических продуктов.

«Кардиопротектор» представляет собой соединение или композицию, предотвращающую или уменьшающую дисфункцию миокарда (то есть кардиомиопатию и/или застойную сердечную недостаточность), связанную с введением пациенту лекарственного средства, такого как антрациклиновый антибиотик и/или антитело против ErbB2. Например, кардиопротектор может блокировать или уменьшать кардиотоксический эффект, опосредованный свободными радикалами, и/или предотвращать или уменьшать повреждение при кислородном стрессе. Примеры кардиопротекторов, охватываемых настоящим определением, включают хелатирующее железо средство дексразоксан (ICRF-187) (Seifert et al., *The Annals of Pharmacotherapy*, 28:1063-1072 (1994)); средство, снижающее концентрацию липидов, и/или антиоксидант, такой как пробукол (Singal et al., *J. Mol. Cell Cardiol.*, 27:1055-1063 (1995)); амифостин (аминотиоловый эфир 2-[(3-аминопропил)амино]-этантиолдигидрофосфата, также называемый WR-2721, и его дефосфорилированная форма, захватываемая клетками, называемая WR-1065) и S-3-(3-метиламинопропиламино)-пропилфосфоротиоловая кислота (WR-151327), см. Green et al. (1994) Cancer Research, 54:738-741; дигоксин (Bristow, M.R. ed. (1980) *Drug-Induced Heart Disease*. New York: Elsevier 191-215); бета-блокаторы, такие как метопролол (Hjalmarson et al. (1994) Drugs 47:Suppl 4:31-9, и Shaddy et al. (1995) Am. Heart J., 129:197-9); витамин E; аскорбиновая кислота (витамин C); акцепторы свободных радикалов, такие как олеинолевая кислота, урсоловая кислота и N-ацетилцистеин (NAC); соединения-спиновые ловушки, такие как альфа-фенил-трет-бутилнитрон (PBN); (Paracchini et al. (1993) Anticancer Res., 13:1607-1612); селенорганические соединения, такие как P251 (Elbesen); и тому подобное.

Молекулы «выделенной» нуклеиновой кислоты представляют собой молекулы нуклеиновой кислоты, идентифицированной и отделенной по меньшей мере от одного вида загрязняющих молекул нуклеиновой кислоты, с которой она обычно связана в природном источнике нуклеиновой кислоты, кодирующей антитело. Выделенные молекулы нуклеиновой кислоты отличаются по форме и условиям, в которых они находятся в природе. Таким образом, выделенные молекулы нуклеиновой кислоты отличаются от молекул нуклеиновой кислоты в форме, в которой они существуют в природных клетках. Однако выделенные молекулы нуклеиновой кислоты включают молекулы нуклеиновой кислоты, содержащиеся в клетках, которые обычно экспрессируют антитело, где, например, молекулы нуклеиновой кислоты расположены на хромосоме в другом положении, чем в природных клетках.

«Алкил» представляет собой C_1-C_{18}-углеводород, содержащий обычные, вторичные, третичные или циклические атомы углерода. Примеры алкильных радикалов включают C_1-C_8-углеводородные группы, в качестве неограничивающих примеров, такие как метильная (Me, $-CH_3$), этильная (Et, $-CH_2CH_3$), 1-пропильная (n-Pr, н-пропил, $-CH_2CH_2CH_3$), 2-пропильная (i-Pr, изопропил, $-CH(CH_3)_2$), 1-бутильная (n-Bu, н-бутил, $-CH_2CH_2CH_2CH_3$), 2-метил-1-пропильная (i-Bu, изобутил, $-CH_2CH(CH_3)_2$), 2-бутильная (s-Bu, *втор*-бутил, $-CH(CH_3)CH_2CH_3$), 2-метил-2-пропильная (t-Bu, *трет*-бутил, $-C(CH_3)_3$), 1-пентильная (н-пентил, $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_3$), 2-пентильная ($-CH(CH_3)CH_2CH_2CH_3$), 3-пентил ($-CH(CH_2CH_3)_2$), 2-метил-2-бутильная ($-C(CH_3)_2CH_2CH_3$), 3-метил-2-бутильная ($-CH(CH_3)CH(CH_3)_2$), 3-метил-1-бутильная ($-CH_2CH_2CH(CH_3)_2$), 2-метил-1-бутильная ($-CH_2CH(CH_3)CH_2CH_3$), 1-гексильная ($-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_3$), 2-гексильная ($-CH(CH_3)CH_2CH_2CH_2CH_3$), 3-гексильная ($-CH(CH_2CH_3)(CH_2CH_2CH_3)$), 2-метил-2-пентильная ($-C(CH_3)_2CH_2CH_2CH_3$), 3-метил-2-пентильная ($-CH(CH_3)CH(CH_3)CH_2CH_3$), 4-метил-2-пентильная ($-CH(CH_3)CH_2CH(CH_3)_2$), 3-метил-3-пентильная ($-C(CH_3)(CH_2CH_3)_2$), 2-метил-3-пентильная ($-CH(CH_2CH_3)CH(CH_3)_2$), 2,3-диметил-2-бутильная ($-C(CH_3)_2CH(CH_3)_2$), 3,3-диметил-2-бутильная ($-CH(CH_3)C(CH_3)_3$.

«Алкенил» представляет собой C_2-C_{18}-углеводород, содержащий обычные, вторичные, третичные или циклические атомы углерода по меньшей мере с одной ненасыщенной связью, то есть двойной sp^2-связью углерод-углерод. Примеры алкенильных радикалов включают C_2-C_8-углеводородные группы, в качестве

OnCusp
Ex. 1002

неограничивающих примеров, такие как этилен или винил (-CH=CH_2), аллил (-CH_2CH=CH_2), циклопентил (-C_5H_7) и 5-гексенил (-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH$=CH_2).

«Алкинил» представляет собой C_2-C_{18}-углеводород, содержащий обычные, вторичные, третичные или циклические атомы углерода по меньшей мере с одной ненасыщенной связью, то есть тройной sp-связью углерод-углерод. Примеры алкинильных радикалов включают C_2-C_8-углеводородные группы, в качестве неограничивающих примеров, такие как ацетиленовая (-C≡CH) и пропаргиловая (-CH_2C≡CH).

«Алкилен» относится к насыщенным углеводородному радикалу, углеводородному радикалу с разветвленной или неразветвленной цепью или циклическому углеводородному радикалу из 1-18 атомов углерода и обладающему двумя одновалентными радикальными центрами, образуемыми удалением двух атомов водорода от одного или двух различных атомов углерода исходного алкана. Характерные алкиленовые радикалы включают C_1-C_8-углеводородные группы, в качестве неограничивающих примеров, такие как метиленовая (-CH_2-) 1,2-этиленовая (-CH_2CH_2-), 1,3-пропиленовая (-$CH_2CH_2CH_2$-), 1,4-бутиленовая (-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-) и тому подобное.

«Алкинилен» относится к ненасыщенным углеводородному радикалу, углеводородному радикалу с разветвленной или неразветвленной цепью или циклическому углеводородному радикалу из 2-18 атомов углерода и обладающему двумя одновалентными радикальными центрами, образуемыми удалением двух атомов водорода от одного или двух различных атомов углерода исходного алкина. Характерные алкиниленовые радикалы включают C_2-C_8-углеводородные группы, в качестве неограничивающих примеров, такие как ацетиленовую (-C≡C-), пропаргиловую (-CH_2CHC-) и 4-пентиниловую (-$CH_2CH_2CH_2$C≡C-).

«Арил», самостоятельно или в сочетании, означает одновалентный ароматический углеводородный радикал из 6-20 атомов углерода, получаемый удалением одного атома водорода от одного атома углерода исходной ароматической кольцевой системы. Арильный радикал может содержать одно, два или три кольца, где такие кольца могут быть соединены вместе в виде боковых заместителей, например бифенил, или могут являться конденсированными, например нафталин или антрацен. Некоторые арильные группы представлены в иллюстративных структурах как «Ar». Типичные арильные группы включают C_6-C_{12}-углеводородные группы, в качестве неограничивающих примеров, такие как радикалы, полученные из бензола, замещенного бензола, нафталина, антрацена, бифенила и тому подобное.

«Арилалкил» относится к ациклическому алкильному радикалу, в котором один из атомов азота, связанных с атомом углерода, обычно концевым или sp^3-атомом углерода, замещен арильным радикалом. Характерные арилалкильные группы включают в качестве неограничивающих примеров бензил, 2-фенилэтан-1-ил, 2-фенилэтен-1-ил, нафтилметил, 2-нафтилэтан-1-ил, 2-нафтилэтен-1-ил, нафтобенизл, 2-нафтофенилэтан-1-ил и тому подобное. Арилалкильная группа содержит от 6 до 20 атомов углерода, например алкильная группа, включающая в себя алкильную, алкенильную или алкинильную группы, из арилалкильной группы состоит из от 1 до 6 атомов углерода, а арильная группа состоит из от 5 до 14 атомов углерода.

«Гетероарилалкил» относится к ациклическому алкильному радикалу, в котором один из атомов водорода, связанный с атомом углерода, обычно концевым или sp^3-атомом углерода, замещен гетероарильным радикалом. Характерные гетероарилалкильные группы включают в качестве неограничивающих примеров 2-бензимидазолилметил, 2-фурилэтил и тому подобное. Гетероарилалкильная группа содержит от 6 до 20 атомов углерода, например алкильная группа, включающая в себя алкильную, алкенильную или алкинильную группы, гетероарилалкильной группы состоит из от 1 до 6 атомов углерода, а гетероарильная группа состоит из от 5 до 14 атомов углерода и от 1 до 3 гетероатомов выбраны из N, O, P и S. Гетероарильная группа гетероарилалкильной группы может представлять собой моноциклическую группу с количеством членов в кольце от 3 до 7 (от 2 до 6 атомов углерода) или бициклическую группу с количеством членов в кольцах от 7 до 10 (от 4 до 9 атомов углерода), и от 1 до 3 гетероатомов выбраны из N, O, P и S, например бициклическая [4,5], [5,5], [5,6] или [6,6] система.

Алкильная, алкиленовая, арильная, арилалкильная и гетероарилалкильная группы могут быть замещенными, где один или несколько атомов водорода, каждый независимо, замещены заместителем. Типичные заместители включают в качестве неограничивающих примеров -X, -R, -O^-, -OR, -SR, -S^-, -NR_2, -NR_3, =NR, -CX_3, -CN, -OCN, -SCN, -N=C=O, -NCS, -NO, -NO_2, =N_2, -N_3, -NC(=O)R, -C(=O)R, -C(=O)NR_2, -SO_3^-, -SO_3H, -S(=O)$_2$R, -OS(=O)$_2$OR, -S(=O)$_2$NR, -S(=O)R, -OP(=O)$(OR)_2$, -P(=O)$(OR)_2$, -PO_3^-, -PO_3H_2, -C(=O)R, -C(=O)X, -C(=S)R, -CO_2R, -CO_2^-, -C(=S)OR, -C(=O)SR, -C

(=S)SR, -C(=O)NR_2, -C(=S)NR_2, -C(=NR)NR_2, где каждый X независимо представляет собой галоген: F, Cl, Br или I; и каждый R независимо представляет собой H, C_1-C_{18}-алкил, C_6-C_{20}-арил, C_3-C_{14}-гетероцикл, защитную группу или пролекарственное вещество. Алкиленовые, алкениленовые и алкиниленовые группы, такие как описанные выше, также могут быть замещены аналогичным образом.

«Гетероарил», также называемый гетероциклом или гетероциклилом, относится к радикалу циклической системы, в котором один или несколько атомов кольца представляют собой гетероатом, например азот, кислород или серу. Гетероарильный радикал содержит от 5 до 14 атомов углерода и от 1 до 3 гетероатомов, выбранных из N, O, P и S. Гетероарил может представлять собой моноцикл с количеством членов в цикле от 3 до 7 (от 2 до 6 атомов углерода и от 1 до 3 гетероатомов, выбранных из N, O, P и S) или бициклическую систему с количеством членов в кольцах от 7 до 10 (от 4 до 9 атомов углерода и от 1 до 3 гетероатомов, выбранных из N, O, P и S), например бициклическая [4,5], [5,5], [5,6] или [6,6] система. Гетероарильные соединения описаны Paquette, Leo A.; «Principles of Modern Heterocyclic Chemistry» (W.A. Benjamin, New York, 1968), в частности, в главах 1, 3, 4, 6, 7 и 9; «The Chemistry of Heterocyclic Compounds, A series of Monographs» (John Wiley & Sons, New York, с 1950 до настоящего времени), в особенности в номерах 13, 14, 16, 19 и 28 и J. Am. Chem. Soc. (1960) 82:5566.

«Линкер» или «связь» означает химическую группу, содержащую ковалентную связь или цепочку атомов, ковалентно присоединяющую антитело к лекарственному веществу. В различных вариантах осуществления линкер указан как L. Линкеры включают бивалентный радикал, такой как алкилен, арилен, гетероарилен, группы, такие как -$(CR_2)_nO(CR_2)_n$-, повторяющиеся единицы алкилокси (например, полиэтиленокси, PEG, полиметиленокси) и алкиламино (например, полиэтиленамино, Jeffamine™) и сложные эфиры и амиды двухосновных кислот, включающих в себя сукцинат, сукцинамид, дигликолат, малонат и капроамид.

Термин «хиральный» относится к молекулам со свойством несовпадения со своим зеркальным отражением, тогда как термин «ахиральный» относится к молекулам, которые совпадают со своим зеркальным отражением.

Термин «стереоизомеры» относится к соединениям с одинаковым химическим составом, но отличающимся пространственным расположением атомов или групп.

«Диастереомер» относится к стереоизомеру с двумя или более центрами хиральности и чьи молекулы не являются зеркальными отражениями друг друга. Диастереомеры обладают различными физическими свойствами, например точками плавления, точками кипения, спектральными свойствами и реакционноспособностью. Смеси диастереомеров можно разделить посредством высокоразрешающих аналитических процедур, таких как электрофорез и хроматография.

«Энантиомеры» относятся к двум стереоизомерам соединения, не совпадающим с зеркальными отражениями друг друга.

Стереохимические определения и соглашения, используемые в данном документе, в основном соответствуют S. P. Parker, Ed., *McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms* (1984) McGraw-Hill Book Company, New York и Eliel, E. and Wilen, S., *Stereochemistry of Organic Compounds* (1994) John Wiley & Sons, Inc., New York. Многие органические соединения существуют в оптически активных формах, то есть они обладают способностью вращать плоскость плоскополяризованного света. В описании оптически активного соединения префиксы D и L или *R* и *S* применяют для обозначения абсолютной конфигурации молекулы относительно ее хирального центра(ов). Префиксы d и l или (+) и (-) используют для обозначения знака вращения соединением плоскополяризованного света, где (-) или l означает, что соединение является левовращающим. Соединение, которому предшествует (+) или d, является правовращающим. Для заданной химической структуры эти стереоизомеры являются идентичными за исключением того, что они являются зеркальными отражениями друг друга. Конкретный стереоизомер также можно назвать энантиомером, а смесь таких изомеров часто называют энантиомерной смесью. Смесь энантиомеров 50:50 называют рацемической смесью или рацематом, который образуется, когда в химической реакции или химическом процессе отсутствует стереоселекция или стереоспецифичность. Термины «рацемическая смесь» и «рацемат» относятся к эквимолярной смеси двух энантиомерных молекул, лишенной оптической активности.

Как используется в данном документе фраза «фармацевтически приемлемая соль» относится к фармацевтически приемлемым органическим или неорганическим солям ADC. Иллюстративные соли включают в качестве неограничивающих примеров, соли сульфат, цитрат, ацетат, оксалат, хлорид, бромид, иодид, нитрат, бисульфат, фосфат, кислый фосфат, изоникотинат, лактат, салицилат, кислый цитрат, тартрат, олеат, таннат, пантотенат, битартрат, аскорбат, сукцинат, малеат, гентизинат, фумарат,

глюконат, глюкоуронат, сахаринат, формат, бензоат, глутамат, метансульфонат, этансульфонат, бензолсульфонат, п-толуолсульфонат и памоат (то есть 1,1'-метилен-бис-(2-гидрокси-3-нафтоат)). Фармацевтически приемлемая соль может включать в себя введение другой молекулы, такой как ацетат-ион или сукцинат-ион или другой противоион. Противоион может представлять собой любую органическую или неорганическую группу, которая стабилизирует заряд исходного соединения. Кроме того, в структуре фармацевтически приемлемой соли может присутствовать более одного заряженного атома. В тех случаях, когда частью фармацевтически приемлемой соли являются несколько заряженных атомов, могут присутствовать несколько противоионов. Таким образом, в фармацевтически приемлемой соли могут присутствовать один или несколько заряженных атомов и/или один или несколько противоионов.

«Фармацевтически приемлемый сольват» относится к ассоциации одного или нескольких молекул растворителя и ADC. Примеры растворителей, образующих фармацевтически приемлемые сольваты, включают в качестве неограничивающих примеров воду, изопропанол, этанол, метанол, DMSO, этилацетат, уксусную кислоту и этаноламин.

КОНЪЮГАТЫ АНТИТЕЛО-ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО

Соединения по настоящему изобретению включают соединения с противоопухолевой активностью. Конкретно, соединения включают антитело, конъюгированное, то есть ковалентно присоединенное с помощью линкера, к лекарственному веществу, где лекарственное средство, если не конъюгировано с антителом, обладает цитотоксическим или цитостатическим действием. Таким образом, биологическая активность лекарственного вещества конъюгацией с антителом модулируется. Конъюгаты антитело-лекарственное средство (ADC) по изобретению могут селективно доставлять эффективную дозу цитотоксического средства к опухолевой ткани благодаря большей селективности, то есть эффект может быть достигнут при меньшей дозе.

В одном из вариантов осуществления увеличена биодоступность ADC или внутриклеточного метаболита ADC у млекопитающего по сравнению с одним соответствующим майтанзоидным соединением. Также увеличена биодоступность ADC или внутриклеточного метаболита ADC у млекопитающего по сравнению с одним соответствующим антителом (антитело ADC без лекарственного вещества или линкера).

В одном из вариантов осуществления майтанзоидное лекарственное средство ADC не отщепляется от антитела до тех пор, пока конъюгат антитело-лекарственное средство не свяжется с рецептором на клеточной поверхности или не попадет в клетку вместе с рецептором на клеточной поверхности, специфичным для антитела конъюгата антитело-лекарственное средство. Лекарственное вещество может отщепляться от антитела после того, как конъюгат антитело-лекарственное средство попадет в клетку. Майтанзоидное лекарственное средство у млекопитающих может внутриклеточно отщепляться от антитела соединения или становиться внутриклеточным метаболитом соединения под действием ферментов посредством гидролиза, окисления или другого механизма. Например, но не ограничивая изобретение конкретным механизмом действия, атом серы майтанзоидного лекарственного средства ADC можно окислять до сульфоновой или сульфоксидной группы. Протоны на атомах углерода, связанных с сульфоном или сульфоксидом, могут удаляться в условиях общего или ферментативного катализа внутри клетки и приводить к фрагментации посредством бета-отщепления, отщепляющего и отделяющего лекарственное вещество от антитела из ADC. Альтернативно сходные механизмы фрагментации/отщепления внутри клетки могут осуществлять другие удаляющие электроны группы, такие как амиды в линкере.

Конъюгаты антитело-лекарственное средство (ADC) могут быть представлены формулой I:

$$Ab-(L-D)_p \qquad I$$

или ее фармацевтически приемлемыми солью или сольватом, где

Ab представляет собой антитело, связывающееся с рецептором ErbB или связывающееся с одним или несколькими ассоциированными с опухолями антигенами или рецепторами на клеточной поверхности, выбранными из (1)-(36):

(1) BMPR1B (рецептор морфогенетического белка кости типа IB, инвентарный номер Genbank NM_001203);

(2) E16 (LAT1, SLC7A5, инвентарный номер Genbank NM_003486);

(3) STEAP1 (шестой трансмембранный антиген предстательной железы, инвентарный номер Genbank NM_012449);

(4) 0772P (CA125, MUC16, инвентарный номер Genbank AF361486);
(5) MPF (MPF, MSLN, SMR, потенцирующий фактор мегакариоцитов, мезотелин, инвентарный номер Genbank NM_005823);
(6) Napi3b (NAPI-3B, NPTIIb, SLC34A2, семейство растворимых носителей 34 (фосфат натрия), представитель 2, натрийзависимый переносчик фосфата 3b типа II, инвентарный номер Genbank NM_006424);
(7) Sema 5b (FLJ10372, KIAA1445, Mm.42015, SEMA5B, SEMAG, семафорин 5b Hlog, домен sema, семь тромбоспондиновых повторов (типа 1 и подобные типу 1), трансмембранный домен (TM) и короткий цитоплазматический домен, (семафорин) 5B, инвентарный номер Genbank AB040878);
(8) PSCA hlg (2700050C12Rik, C530008O16Rik, RIKEN кДНК 2700050C12, ген RIKEN кДНК 2700050C12, инвентарный номер Genbank AY358628);
(9) ETBR (рецептор эндотелина типа B, инвентарный номер Genbank AY275463);
(10) MSG783 (RNF124, гипотетический белок FLJ20315, инвентарный номер Genbank NM_017763);
(11) STEAP2 (HGNC_8639, IPCA-1, PCANAP1, STAMP1, STEAP2, STMP, ассоциированный со злокачественной опухолью предстательной железы ген 1, ассоциированный со злокачественной опухолью предстательной железы белок 1, шестой трансмембранный эпителиальный антиген предстательной железы 2, шестой трансмембранный эпителиальный белок предстательной железы, инвентарный номер Genbank AF455138);
(12) TrpM4 (BR22450, FLJ20041, TRPM4, TRPM4B, временный рецепторный потенциальный катионный канал, подсемейство M, представитель 4, инвентарный номер Genbank NM_017636);
(13) CRIPTO (CR, CR1, CRGF, CRIPTO, TDGF1, полученный из тератокарциномы фактор роста, инвентарный номер Genbank NP_003203 или NM_003212);
(14) CD21 (CR2 (рецептор комплемента 2) или C3DR (C3d/рецептор вируса Эпштейна-Барр) или Hs.73792, инвентарный номер Genbank M26004);
(15) CD79b (CD79B, CD79β, IGb (ассоциированный с иммуноглобулином бета), B29, инвентарный номер Genbank NM_000626);
(16) FcRH2 (IFGP4, IRTA4, SPAP1A (содержащий домен SH2 фосфатазный якорный белок 1a), SPAP1B, SPAP1C, инвентарный номер Genbank NM_030764);
(17) HER2 (инвентарный номер Genbank M11730);
(18) NCA (инвентарный номер Genbank M18728);
(19) MDP (инвентарный номер Genbank BC017023);
(20) IL20Rα (инвентарный номер Genbank AF184971);
(21) Бревикан (инвентарный номер Genbank AF229053);
(22) EphB2R (инвентарный номер Genbank NM_004442);
(23) ASLG659 (инвентарный номер Genbank AX092328);
(24) PSCA (инвентарный номер Genbank AJ297436);
(25) GEDA (инвентарный номер Genbank AY260763;
(26) BAFF-R (рецептор активирующего B-клетки фактора, рецептор BLyS 3, BR3, NP_443177.1);
(27) CD22 (изоформа B-клеточного рецептора CD22-B, NP-001762.1);
(28) CD79a (CD79A, CD79α, ассоциированный с иммуноглобулинами альфа, специфичный для B-клеток белок, ковалентно взаимодействующий с Ig бета (CD79B) и образующий комплекс на поверхности с молекулами IgM, переносит сигнал, вовлеченный в дифференцировку B-клеток, инвентарный номер Genbank NP_001774.1);
(29) CXCR5 (рецептор лимфомы Беркита 1, рецептор, связанный с G-белком, активирующийся хемокином CXCL13, действующий при миграции лимфоцита и в гуморальной защите, играющий роль в инфекции HIV-2 и, возможно, развитии СПИДа, лимфомы, миеломы и лейкоза, инвентарный номер Genbank NP_001707.1);
(30) HLA-DOB (бета-субъединица молекулы MHC класса II (антиген Ia), связывающая пептиды и представляющая их CD4+ T-лимфоцитам, инвентарный номер Genbank NP_002111.1);
(31) P2X5 (пуринергический рецепторный P2X лигандзависимый ионный канал 5, ионный канал, управляемый внеклеточной АТФ, может быть вовлечен в синаптическую передачу и нейрогенез, дефицит может вносить вклад в патофизиологию идиопатической нестабильности детрузора, инвентарный номер Genbank NP_002552.2);
(32) CD72 (антиген дифференцировки B-клеток CD72, Lyb-2, инвентарный номер Genbank NP_001773.1);
(33) LY64 (лимфоцитарный антиген 64 (RP105), мембранный белок семейства белков с богатыми лейцином повторами (LRR) типа I, регулирует активацию и апоптоз B-клеток, потеря функции ассоциирована с увеличенной активностью

заболевания у пациентов с системной красной волчанкой, инвентарный номер Genbank NP_005573.1);

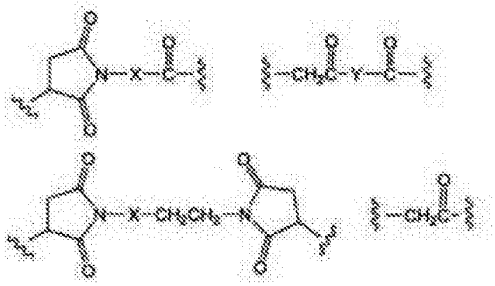
(34) FcRH1 (белок подобный рецептору Fc 1, предполагаемый рецептор домена Fc иммуноглобулинов, содержащий подобные Ig и ITAM домены типа C2, может играть роль в дифференцировке B-лимфоцитов, инвентарный номер Genbank NP_443170.1);

(35) IRTA2 (ассоциированный с транслокацией рецептор из иммуноглобулинового суперсемейства 2, предполагаемый иммунорецептор с возможной ролью в развитии B-клеток и лимфомагенезе; нарушение регуляции гена посредством транслокации происходит в некоторых B-клеточных злокачественных опухолях, инвентарный номер Genbank NP_112571.1); и

(36) TENB2 (возможный трансмембранный протеогликан, родственный семейству ростовых факторов EGF/хередулин и фоллистатину, инвентарный номер Genbank AF179274);

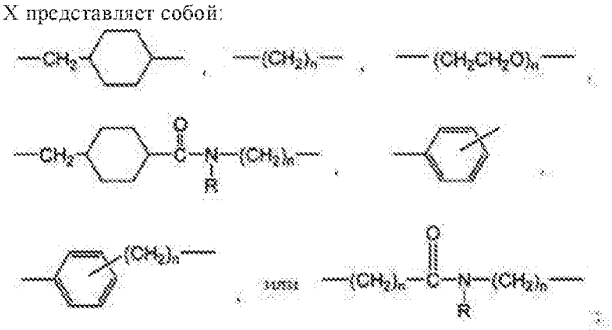
при условии, что антитело не представляет собой TA.1.

L не является дисульфидным линкером. L в качестве неограничивающих примеров включает структуры:



где волнистые линии указывают на ковалентные связи с Ab и D;

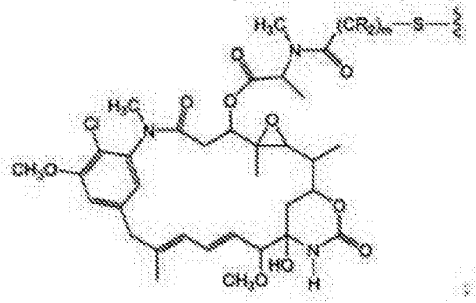
X представляет собой:



Y представляет собой

R независимо представляет собой H или C_1-C_6-алкил; а n равно от 1 до 12;

D представляет собой майтаназоидное лекарственное средство. Майтанзиноиды включают в качестве неограничивающих примеров структуру:



где волнистая линия обозначает ковалентную связь с L;

R независимо представляет собой H или C_1-C_6-алкил; и

m равно 1, 2 или 3.

Соотношение лекарства и антитела или нагрузки лекарственным средством для соединений формулы I представлено посредством p. Значение нагрузки

лекарственным средством p составляет от 1 до 8. Соединения формулы I включают все смеси по разному нагруженных и присоединенных конъюгатов антитело-лекарственное средство, где к антителу ковалентно присоединены 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 и 8 лекарственных групп.

В другом варианте осуществления Ab представляет собой антитело, связывающееся с одним или несколькими ассоциированными с опухолями антигенами или рецепторами на клеточной поверхности, выбранными из (1)-(16) и (18)-(36), то есть не с рецептором ErbB, включая HER2.

АНТИТЕЛА

Часть из молекулы антитела (Ab-) формулы I включает в свои рамки любую молекулу антитела, которая связывает или реактивно связывается, или образует комплексы с рецептором, антигеном или другими реактивными компонентами, связанными с данной группой клеток-мишеней. Антитело может представлять собой любую белковую или подобную белковой молекулу, которая связывается, образует комплексы или реагирует с компонентом клеточной группы, которую рассматривают для терапевтической или другой биологической модификации. В одном из аспектов молекула антитела действует для доставки майтаназоидного лекарственного средства к конкретной группе клеток-мишеней, с которыми молекула антитела реагирует. Такие антитела включают в качестве неограничивающих примеров белки большой молекулярной массы, такие как полноразмерные антитела и фрагменты антител.

Содержащие антитела конъюгаты антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению предпочтительно сохраняют антигенсвязывающую способность их природных эквивалентов дикого типа. Таким образом, антитела по настоящему изобретению способны связывать, предпочтительно специфически, антигены. Такие антигены включают, например, ассоциированные с опухолями антигены (TAA), рецепторные белки клеточной поверхности и другие молекулы клеточной поверхности, факторы, регулирующие жизнеспособность клеток, факторы, регулирующие клеточную пролиферацию, факторы, молекулы, связанные (например, известные или с предполагаемым функциональным вкладом) с развитием или дифференцировкой тканей, лимфокинами, цитокинами, молекулами, вовлеченными в регуляцию клеточного цикла, молекулами, вовлеченными в образование и развитие сосудов, и молекулы, связанные (например, известные или с предполагаемым функциональным вкладом) с ангиогенезом. Ассоциированный с опухолью антиген может представлять собой фактор кластерной дифференцировки (то есть CD-белок). Антиген, с которым способно связываться антитело по изобретению, может представлять собой представителя подмножества одной из указанных выше категорий, где другое подмножество(а) указанной категории содержит другие молекулы/антигены, которые обладают отличающейся характеристикой (по сравнению с представляющим интерес антигеном).

В одном из вариантов осуществления, антитело конъюгатов антитело-лекарственное средство (ADC) специфически связывается с рецептором, кодируемым геном ErbB. Антитело может специфически связываться с рецептором ErbB, выбранным из EGFR, HER2, HER3 и HER4. ADC может специфически связываться с внеклеточным доменом (ECD) рецептора HER2 и ингибировать рост опухолевых клеток, сверхэкспрессирующих рецептор HER2. Антитело ADC может представлять собой моноклональное антитело, например моноклональное антитело, химерное антитело или гуманизированное антитело. Гуманизированное антитело может представлять собой huMAb4D5-1, huMAb4D5-2, huMAb4D5-3, huMAb4D5-4, huMAb4D5-5, huMAb4D5-6, huMAb4D5-7 или huMAb4D5-8 (трастузумаб). Антитело может представлять собой фрагмент антитела, например Fab-фрагмент.

Антитела в конъюгатах антитело-лекарственное средство (ADC) формулы I, которые могут быть эффективны для лечения злокачественных опухолей, включают в качестве неограничивающих примеров антитела к рецепторам клеточной поверхности и ассоциированным с опухолями антигенам (TAA). Такие ассоциированные с опухолями антигены известны в данной области и могут быть получены для образования антител способами, известными в данной области, и информации, известной в данной области. Попытки исследователей обнаружить эффективные клеточные мишени для диагностики и лечения злокачественных опухолей были направлены на идентификацию трансмембранных или другим образом ассоциированных с опухолями полипептидов, специфически экспрессируемых на поверхности одного или нескольких конкретных типов клеток злокачественных опухолей по сравнению с одной или несколькими нормальными незлокачественными клетками. Часто экспрессия таких ассоциированных с опухолью полипептидов на поверхности клеток злокачественных опухолей выше, чем экспрессия на поверхности незлокачественных клеток. Идентификация таких ассоциированных с опухолью антигенных полипептидов клеточной поверхности дала возможность специфического

нацеливания на клетки злокачественных опухолей для разрушения с помощью способов лечения, основанных на антителах.

Примеры ТАА включают в качестве неограничивающих примеров перечисленные ниже антигены, ассоциированные с опухолями (1)-(36). Для удобства информация об этих антигенах, каждый из которых известны в данной области, перечислена ниже и включает название антигена, альтернативное название, инвентарный номер Genbank и первичную ссылку(и), в соответствии с правилами идентификации последовательностей нуклеиновых кислот и белков National Center for Biotechnology Information (NCBI). Последовательности нуклеиновых кислот и белков, соответствующие ТАА (1)-(36), представлены в общедоступных базах данных, таких как GenBank. Ассоциированные с опухолями антигены, являющиеся мишенью антител, включают все варианты аминокислотных последовательностей и изоформ, которые по меньшей мере приблизительно на 70%, 80%, 85%, 90% или 95% идентичны последовательности, идентифицированной в цитируемых ссылках, или которые обладают, по существу, такими же биологическими свойствами и характеристиками, что и ТАА с последовательностью, найденной в цитируемых ссылках. Например, ТАА с вариантной последовательностью, как правило, способно специфически связываться с антителом, специфически связывающимся с ТАА с соответствующей последовательностью в списке. Последовательности и описания ссылок, конкретно перечисленных в данном документе, приведены в качестве ссылки в полном объеме.

АССОЦИИРОВАННЫЕ С ОПУХОЛЯМИ АНТИГЕНЫ (1)-(36):

(1) BMPR1B (рецептор морфогенетического белка кости типа IB, инвентарный номер Genbank NM_001203);

ten Dijke, R. et al. Science 264 (5155):101-104 (1994), Oncogene 14 (11):1377-1382 (1997)); WO 2004063362 (пункт 2); WO 2003042661 (пункт 12); US 2003134790-A1 (страницы 38-39); WO 2002102235 (пункт 13; страница 296); WO 2003055443 (страница 91-92); WO 200299122 (пример 2; страница 528-530); WO 2003029421 (пункт 6); WO 2003024392 (пункт 2; фиг. 112); WO 200298358 (пункт 1; страница 183); WO 200254940 (страницы 100-101); WO 200259377(страницы 349-350); WO 200230268 (пункт 27; страница 376); WO 200148204 (пример; фиг. 4);

NP_001194 рецептор морфогенетического белка кости, тип IB /pid=NP_001194.1 -

Перекрестные ссылки: MIM:603248; NP_001194.1; AY065994

(2) E16 (LAT1, SLC7A5, инвентарный номер Genbank NM_003486);

Biochem. Biophys. Res. Commun. 255 (2), 283-288 (1999), Nature 395 (6699):288-291 (1998), Gaugitsch, H.W., et al. (1992) J. Biol. Chem. 267 (16):11267-11273); WO 2004048938 (пример 2); WO 2004032842 (пример IV); WO 2003042661 (пункт 12); WO 2003016475 (пункт 1); WO 200278524 (пример 2); WO 200299074 (пункт 19; страницы 127-129); WO 200286443 (пункт 27; страницы 222, 393); WO 2003003906 (пункт 10; страница 293); WO 200264798 (пункт 33; страницы 93-95); WO 200014228 (пункт 5; страницы 133-136); US2003224454 (фиг. 3); WO 2003025138 (пункт 12; страница 150); патент США № 20050107595; патент США № 20050106644;

NP_003477 семейство растворимых носителей 7 (катионный переносчик аминокислот, система y+), представитель 5 /pid=NP_003477.3 - Homo sapiens

Перекрестные ссылки: MIM:600182; NP_003477.3; NM_015923; NM_003486_1

(3) STEAP1 (шестой трансмембранный антиген предстательной железы, инвентарный номер Genbank NM_012449);

Cancer Res. 61 (15), 5857-5860 (2001), Hubert, R.S., et al. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96 (25):14523-14528); WO 2004065577 (пункт 6); WO 2004027049 (фиг. 1L); EP 1394274 (пример 11); WO 2004016225 (пункт 2); WO 2003042661 (пункт 12); US 2003157089 (пример 5); US 2003185830 (пример 5); US 2003064397 (фиг. 2); WO200289747 (пример 5; страницы 618-619); WO 2003022995 (пример 9; фиг. 13A, пример 53; страница 173, пример 2; фиг. 2A);

NP_036581 шестой трансмембранный антиген предстательной железы

Перекрестные ссылки: MIM:604415; NP_036581.1; NM_012449_1

(4) 0772P (CA125, MUC16, инвентарный номер Genbank AF361486)

J. Biol. Chem. 276 (29):27371-27375 (2001)); WO 2004045553 (пункт 14); WO 200292836 (пункт 6; фиг. 12); WO 200283866 (пункт 15; страница 116-121); US 2003124140 (пример 16); US 2003091580 (пункт 6); WO 200206317 (пункт 6; страницы 400-408);

Перекрестные ссылки: GI:34501467; AAK74120.3; AF361486_1

(5) MPF (MPF, MSLN, SMR, потенцирующий фактор мегакариоцитов, мезотелин, инвентарный номер Genbank NM_005823);

Yamaguchi, N., et al. Biol. Chem. 269 (2), 805-808 (1994), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96 (20):11531-11536 (1999), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93 (1):136-140 (1996), J. Biol. Chem. 270 (37):21984-21990 (1995)); WO 2003101283 (пункт 14); (WO 2002102235

(пункт 13; страницы 287-288); WO 2002101075 (пункт 4; страницы 308-309); WO 200271928 (страницы 320-321); WO 9410312 (страницы 52-57);

Перекрестные ссылки: MIM:601051; NP_005814.2; NM_005823_1

(6) Napi3b (NAPI-3B, NPTIIb, SLC34A2, семейство растворимых носителей 34 (фосфат натрия), представитель 2, натрийзависимый переносчик фосфата 3b типа II, инвентарный номер Genbank NM_006424);

J. Biol. Chem. 277 (22):19665-19672 (2002), Genomics 62 (2):281-284 (1999), Feild, J.A., et al. (1999) Biochem. Biophys. Res. Commun. 258 (3):578-582); WO 2004022778 (пункт 2); EP 1394274 (пример 11); WO 2002102235 (пункт 13; страница 326); EP 875569 (пункт 1; страницы 17-19); WO 200157188 (пункт 20; страница 329); WO2004032842 (пример IV); WO 200175177 (пункт 24; страницы 139-140);

Перекрестные ссылки: MIM:604217; NP_006415.1; NM_006424_1

(7) Sema 5b (FLJ10372, KIAA1445, Mm.42015, SEMA5B, SEMAG, семафорин 5b Hlog, домен sema, семь тромбоспондиновых повторов (типа 1 и подобные типу 1), трансмембранный домен (TM) и короткий цитоплазматический домен, (семафорин) 5B, инвентарный номер Genbank AB040878)

Nagase T., et al. (2000) DNA Res. 7 (2):143-150); WO 2004000997 (пункт 1); WO 2003003984 (пункт 1); WO 200206339 (пункт 1; страница 50); WO 200188133 (пункт 1; страницы 41-43, 48-58); WO 2003054152 (пункт 20); WO 2003101400 (пункт 11);

Доступ: Q9P283; EMBL; AB040878; BAA95969.1. Genew; HGNC:10737;

(8) PSCA hlg (2700050C12Rik, C530008O16Rik, RIKEN кДНК 2700050C12, ген RIKEN кДНК 2700050C12, инвентарный номер Genbank AY358628);

Ross et al. (2002) Cancer Res. 62:2546-2553; US 2003129192 (пункт 2); US 2004044180 (пункт 12); US 2004044179 (пункт 11); US 2003096961 (пункт 11); US 2003232056 (пример 5); WO 2003105758 (пункт 12); US 2003206918 (пример 5); EP 1347046 (пункт 1); WO 2003025148 (пункт 20);

Перекрестные ссылки: GI:37182378; AAQ88991.1; AY358628_1

(9) ETBR (рецептор эндотелина типа B, инвентарный номер Genbank AY275463);

Nakamuta M., et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. 177, 34-39, 1991; Ogawa Y., et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. 178, 248-255, 1991; Arai H., et al. Jpn. Circ. J. 56, 1303-1307, 1992; Arai H., et al. J. Biol. Chem. 268, 3463-3470, 1993; Sakamoto A., Yanagisawa M., et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. 178, 656-663, 1991; Elshourbagy N.A., et al. J. Biol. Chem. 268, 3873-3879, 1993; Haendler B., et al. J. Cardiovasc. Pharmacol. 20, s1-S4, 1992; Tsutsumi M., et al. Gene 228, 43-49, 1999; Strausberg R.L., et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 99, 16899-16903, 2002; Bourgeois C, et al. J. Clin. Endocrinol. Metab. 82, 3116-3123, 1997; Okamoto Y., et al. Biol. Chem. 272, 21589-21596, 1997; Verheij J.B., et al. Am. J. Med. Genet. 108, 223-225, 2002; Hofstra R.M.W., et al. Eur. J. Hum. Genet. 5, 180-185, 1997; Puffenberger E.G., et al. Cell 79, 1257-1266, 1994; Attie T., et al., Hum. Mol. Genet. 4, 2407-2409, 1995; Auricchio A., et al. Hum. Mol. Genet. 5:351-354, 1996; Amiel J., et al. Hum. Mol. Genet. 5, 355-357, 1996; Hofstra R.M.W., et al. Nat. Genet. 12, 445-447, 1996; Svensson P.J., et al. Hum. Genet. 103, 145-148, 1998; Fuchs S., et al. Mol. Med. 7, 115-124, 2001; Pingault V., et al. (2002) Hum. Genet. 111, 198-206; WO 2004045516 (пункт 1); WO 2004048938 (пример 2); WO 2004040000 (пункт 151); WO 2003087768 (пункт 1); WO 2003016475 (пункт 1); WO 2003016475 (пункт 1); WO 200261087 (фиг. 1); WO 2003016494 (фиг. 6); WO 2003025138 (пункт 12; страница 144); WO 200198351 (пункт 1; страницы 124-125); EP 522868 (пункт 8; фиг. 2); WO 200177172 (пункт 1; страницы 297-299); US 2003109676; US 6518404 (фиг. 3); US 5773223 (пункт 1a; кол. 31-34); WO 2004001004;

(10) MSG783 (RNF124, гипотетический белок FLJ20315, инвентарный номер Genbank NM_017763);

WO 2003104275 (пункт 1); WO 2004046342 (пример 2); WO 2003042661 (пункт 12); WO 2003083074 (пункт 14; страница 61); WO 2003018621 (пункт 1); WO 2003024392 (пункт 2; фиг. 93); WO 200166689 (пример 6);

Перекрестные ссылки: LocusID:54894; NP_060233.2; NM_017763_1

(11) STEAP2 (HGNC_8639, IPCA-1, PCANAP1, STAMP1, STEAP2, STMP, ассоциированный со злокачественной опухолью предстательной железы ген 1, ассоциированный со злокачественной опухолью предстательной железы белок 1, шестой трансмембранный эпителиальный антиген предстательной железы 2, шестой трансмембранный эпителиальный белок предстательной железы, инвентарный номер Genbank AF455138);

Lab. Invest. 82 (11):1573-1582 (2002)); WO 2003087306; US 2003064397 (пункт 1; фиг. 1); WO 200272596 (пункт 13; страницы 54-55); WO 200172962 (пункт 1; фиг. 4B); WO 2003104270 (пункт 11); WO 2003104270 (пункт 16); US 2004005598 (пункт 22); WO 2003042661 (пункт 12); US 2003060612 (пункт 12; фиг. 10); WO 200226822 (пункт 23; фиг. 2); WO 200216429 (пункт 12, фиг. 10);

Перекрестные ссылки: GI:22655488; AAN04080.1; AF455138_1

(12) TrpM4 (BR22450, FLJ20041, TRPM4, TRPM4B, временный рецепторный потенциальный катионный канал, подсемейство M, представитель 4, инвентарный номер Genbank NM_017636);

Xu, X.Z., et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98 (19):10692-10697 (2001), Cell 109 (3):397-407 (2002), J. Biol. Chem. 278 (33):30813-30820 (2003)); US 2003143557 (пункт 4); WO 200040614 (пункт 14; страница 100-103); WO 200210382 (пункт 1; фиг. 9A); WO 2003042661 (пункт 12); WO 200230268 (пункт 27; страница 391); US 2003219806 (пункт 4); WO 200162794 (пункт 14; фиг. 1A-D);

Перекрестные ссылки: MIM:606936; NP_060106.2; NM_017636_1

(13) CRIPTO (CR, CR1, CRGF, CRIPTO, TDGF1, полученный из тератокарциномы фактор роста, инвентарный номер Genbank NP_003203 или NM_003212);

Ciccodicola, A., et al. EMBO J. 8 (7): 1987-1991 (1989), Am. J. Hum. Genet. 49 (3):555-565 (1991)); US 2003224411 (пункт 1); WO 2003083041 (пример 1); WO 2003034984 (пункт 12); WO 200288170 (пункт 2; страницы 52-53); WO 2003024392 (пункт 2; фиг. 58); WO 200216413 (пункт 1; страницы 94-95, 105); WO 200222808 (пункт 2; фиг. 1); US 5854399 (пример 2; колонки 17-18); US 5792616 (фиг. 2);

Перекрестные ссылки: MIM:187395; NP_003203.1; NM_003212_1

(14) CD21 (CR2 (рецептор комплемента 2) или C3DR (C3d/рецептор вируса Эпштейна-Барр) или Hs.73792, инвентарный номер Genbank M26004);

Fujisaku et al. (1989) J. Biol. Chem. 264 (4):2118-2125); Weis J.J., et al. J. Exp. Med. 167, 1047-1066, 1988; Moore M., et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 9194-9198, 1987; Barel M., et al. Mol. Immunol. 35, 1025-1031, 1998; Weis J.J., et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 5639-5643, 1986; Sinha S.K., et al. (1993) J. Immunol. 150, 5311-5320; WO 2004045520 (пример 4); US 2004005538 (пример 1); WO 2003062401 (пункт 9); WO 2004045520 (пример 4); WO 9102536 (фиг. 9.1-9.9); WO 2004020595 (пункт 1);

Доступ: P20023; Q13866; Q14212; EMBL; M26004; AAA35786.1.

(15) CD79b (CD79B, CD79β, IGb (ассоциированный с иммуноглобулином бета), B29, инвентарный номер Genbank NM_000626 или 11038674);

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (2003) 100 (7):4126-4131, Blood (2002) 100 (9):3068-3076, Muller et al. (1992) Eur. J. Immunol. 22 (6):1621-1625); WO 2004016225 (пункт 2, фиг. 140); WO 2003087768, US 2004101874 (пункт 1, страница 102); WO 2003062401 (пункт 9); WO 200278524 (пример 2); US 2002150573 (пункт 5, страница 15); US 5644033; WO 2003048202 (пункт 1, страницы 306 и 309); WO 99/558658, US 6534482 (пункт 13, фиг. 17A/B); WO 200055351 (пункт 11, страницы 1145-1146);

Перекрестные ссылки: MIM:147245; NP_000617.1; NM_000626_1

(16) FcRH2 (IFGP4, IRTA4, SPAP1A (содержащий домен SH2 фосфатазный якорный белок 1a), SPAP1B, SPAP1C, инвентарные номера Genbank NM_030764, AY358130);

Genome Res. 13 (10):2265-2270 (2003), Immunogenetics 54 (2):87-95 (2002), Blood 99 (8):2662-2669 (2002), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98 (17):9772-9777 (2001), Xu, M.J., et al. (2001) Biochem. Biophys. Res. Commun. 280 (3):768-775; WO 2004016225 (пункт 2); WO 2003077836; WO 200138490 (пункт 5; фиг. 18D-1-18D-2); WO 2003097803 (пункт 12); WO 2003089624 (пункт 25);

Перекрестные ссылки: MIM:606509; NP_110391.2; NM_030764_1

(17) HER2 (ErbB2, инвентарный номер Genbank M11730)

Coussens L., et al. Science (1985) 230(4730):1132-1139); Yamamoto T., et al. Nature 319, 230-234, 1986; Semba K., et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 6497-6501, 1985; Swiercz J.M., et al. J. Cell Biol. 165, 869-880, 2004; Kuhns J.J., et al. J. Biol. Chem. 274, 36422-36427, 1999; Cho H.-S., et al. Nature 421, 756-760, 2003; Ehsani A., et al. (1993) Genomics 15, 426-429; WO 2004048938 (пример 2); WO 2004027049 (фиг. 11); WO 2004009622; WO 2003081210; WO 2003089904 (пункт 9); WO 2003016475 (пункт 1); US 2003118592; WO 2003008537 (пункт 1); WO 2003055439 (пункт 29; фиг. 1A-B); WO 2003025228 (пункт 37; фиг. 5C); WO 200222636 (пример 13; страницы 95-107); WO 200212341 (пункт 68; фиг. 7); WO 200213847 (страницы 71-74); WO 200214503 (страницы 114-117); WO 200153463 (пункт 2; страницы 41-46); WO 200141787 (страница 15); WO 200044899 (пункт 52; фиг. 7); WO 200020579 (пункт 3; фиг. 2); US 5869445 (пункт 3; Col 31-38); WO 9630514 (пункт 2; страницы 56-61); EP 1439393 (пункт 7); WO 2004043361 (пункт 7); WO 2004022709; WO 200100244 (пример 3; фиг. 4);

Доступ: P04626; EMBL; M11767; AAA35808.1. EMBL; M11761; AAA35808.1.

(18) NCA (CEACAM6, инвентарный номер Genbank M18728);

Barnett T., et al. Genomics 3, 59-66, 1988; Tawaragi Y., et al. Biochem. Biophys. Res. Commun. 150, 89-96, 1988; Strausberg R.L., et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99:16899-16903, 2002; WO 2004063709; EP 1439393 (пункт 7); WO 2004044178 (пример 4); WO 2004031238; WO 2003042661 (пункт 12); WO 200278524 (пример 2); WO 200286443 (пункт 27; страница 427); WO 200260317 (пункт 2);

Доступ: P40199; Q14920; EMBL; M29541; AAA59915.1. EMBL; M18728;

(19) MDP (DPEP1, инвентарный номер Genbank BC017023)

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99 (26):16899-16903 (2002)); WO 2003016475 (пункт 1); WO 200264798 (пункт 33; страницы 85-87); JP 05003790 (фиг. 6-8); WO 9946284 (фиг. 9);

Перекрестные ссылки: MIM:179780; AAH17023.1; BC017023_1

(20) IL20Rα (IL20Ra, ZCYTOR7, инвентарный номер Genbank AF184971);

Clark H.F., et al. Genome Res. 13, 2265-2270, 2003; Mungall A.J., et al. Nature 425, 805-811, 2003; Blumberg H., et al. Cell 104, 9-19, 2001; Dumoutier L., et al. J. Immunol. 167, 3545-3549, 2001; Parrish-Novak J., et al. J. Biol. Chem. 277, 47517-47523, 2002; Pletnev S., et al. (2003) Biochemistry 42:12617-12624; Sheikh F., et al. (2004) J. Immunol. 172, 2006-2010; EP 1394274 (пример 11); US 2004005320 (пример 5); WO 2003029262 (страницы 74-75); WO 2003002717 (пункт 2; страница 63); WO 200222153 (страницы 45-47); US 2002042366 (страницы 20-21); WO 200146261 (страницы 57-59); WO 200146232 (страницы 63-65); WO 9837193 (пункт 1; страницы 55-59);

Доступ: Q9UHF4; Q6UWA9; Q96SH8; EMBL; AF184971; AAF01320.1.

(21) Бревикан (BCAN, BEHAB, инвентарный номер Genbank AF229053)

Gary S.C., et al. Gene 256, 139-147, 2000; Clark H.F., et al. Genome Res. 13, 2265-2270, 2003; Strausberg R.L., et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99, 16899-16903, 2002; US 2003186372 (пункт 11); US 2003186373 (пункт 11); US 2003119131 (пункт 1; фиг. 52); US 2003119122 (пункт 1; фиг. 52); US 2003119126 (пункт 1); US 2003119121 (пункт 1; фиг. 52); US 2003119129 (пункт 1); US 2003119130 (пункт 1); US 2003119128 (пункт 1; фиг. 52); US 2003119125 (пункт 1); WO 2003016475 (пункт 1); WO 200202634 (пункт 1);

(22) EphB2R (DRT, ERK, Hek5, EPHT3, Tyro5, инвентарный номер Genbank NM_004442)

Chan, J. и Watt, V.M., Oncogene 6 (6), 1057-1061 (1991) Oncogene 10 (5):897-905 (1995), Annu. Rev. Neurosci. 21:309-345 (1998), Int. Rev. Cytol. 196:177-244 (2000)); WO 2003042661 (пункт 12); WO 200053216 (пункт 1; страница 41); WO 2004065576 (пункт 1); WO 2004020583 (пункт 9); WO 2003004529 (страницы 128-132); WO 200053216 (пункт 1; страница 42);

Перекрестные ссылки: MIM:600997; NP_004433.2; NM_004442_1

(23) ASLG659 (B7h, инвентарный номер Genbank AX092328)

US 20040101899 (пункт 2); WO 2003104399 (пункт 11); WO 2004000221 (фиг. 3); US 2003165504 (пункт 1); US 2003124140 (пример 2); US 2003065143 (фиг. 60); WO 2002102235 (пункт 13; страница 299); US 2003091580 (пример 2); WO 200210187 (пункт 6; фиг. 10); WO 200194641 (пункт 12; фиг. 7b); WO 200202624 (пункт 13; фиг. 1A-1B); US 2002034749 (пункт 54; страницы 45-46); WO 200206317 (пример 2; страница 320-321, пункт 34; страницы 321-322); WO 200271928 (страницы 468-469); WO 200202587 (пример 1; фиг. 1); WO 200140269 (пример 3; страницы 190-192); WO 200036107 (пример 2; страницы 205-207); WO 2004053079 (пункт 12); WO 2003004989 (пункт 1); WO 200271928 (страница 233-234, 452-453); WO0116318;

(24) PSCA (предшественник антигена стволовой клетки предстательной железы, инвентарный номер Genbank AJ297436)

Reiter R.E., et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95, 1735-1740, 1998; Gu Z., et al. Oncogene 19, 1288-1296, 2000; Biochem. Biophys. Res. Commun. (2000) 275(3):783-788; WO 2004022709; EP 1394274 (пример 11); US 2004018553 (пункт 17); WO 2003008537 (пункт 1); WO 200281646 (пункт 1; страница 164); WO 2003003906 (пункт 10; страница 288); WO 200140309 (пример 1; фиг. 17); US 2001055751 (пример 1; фиг. 1b); WO 200032752 (пункт 18; фиг. 1); WO 9851805 (пункт 17; страница 97); WO 9851824 (пункт 10; страница 94); WO 9840403 (пункт 2; фиг. 1B);

Доступ: O43653; EMBL; AF043498; AAC39607.1.

(25) GEDA (инвентарный номер Genbank AY260763);

белок подобный партнеру по слиянию AAP14954 липомы HMGIC /pid=AAP14954.1 - Homo sapiens; Вид: Homo sapiens (человек) WO 2003054152 (пункт 20); WO 2003000842 (пункт 1); WO 2003023013 (пример 3, пункт 20); US 2003194704 (пункт 45);

Перекрестные ссылки: GI:30102449; AAP14954.1; AY260763_1

(26) BAFF-R (рецептор активирующего В-клетки фактора, рецептор BLyS 3, BR3, инвентарный номер Genbank AF116456); рецептор BAFF /pid=NP_443177.1 - Homo sapiens

Thompson, J.S., et al. Science 293 (5537), 2108-2111 (2001); WO 2004058309; WO 2004011611; WO 2003045422 (пример; страницы 32-33); WO 2003014294 (пункт 35; фиг. 6B); WO 2003035846 (пункт 70; страница 615-616); WO 200294852 (Col 136-137); WO 200238766 (пункт 3; страница 133); WO 200224909 (пример 3; фиг. 3);

Перекрестные ссылки: MIM:606269; NP_443177.1; NM_052945_1; AF132600

(27) CD22 (изоформа B-клеточного рецептора CD22-B, BL-CAM, Lyb-8, Lyb8, SIGLEC-2, FLJ22814, инвентарный номер Genbank AK026467);

Wilson et al. (1991) J. Exp. Med. 173:137-146; WO 2003072036 (пункт 1; фиг. 1);

Перекрестные ссылки: MIM:107266; NP_001762.1; NM_001771_1

(28) CD79a (CD79A, CD79α, ассоциированный с иммуноглобулинами альфа, специфичный для B-клеток белок, ковалентно взаимодействующий с Ig бета (CD79B) и образующий комплекс на поверхности с молекулами IgM, переносит сигнал, вовлеченный в дифференцировку B-клеток)

ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ БЕЛКА Полная mpggpgv...dvqlekp (1..226; 226 a./к.), pI: 4.84, MW: 25028 TM: 2 [P] Хромосома генома: 19q13.2, инвентарный номер Genbank NP_001774.10)

WO 2003088808, US 20030228319; WO 2003062401 (пункт 9); US 2002150573 (пункт 4, страницы 13-14); WO 9958658 (пункт 13, фиг. 16); WO 9207574 (фиг. 1); US 5644033; Ha et al. (1992) J. Immunol. 148(5):1526-1531; Mueller et al. (1992) Eur. J. Biochem. 22:1621-1625; Hashimoto et al. (1994) Immunogenetics 40(4):287-295; Preud'homme et al. (1992) Clin. Exp. Immunol. 90(1):141-146; Yu et al. (1992) J. Immunol. 148(2) 633-637; Sakaguchi et al. (1988) EMBO J. 7(11):3457-3464;

(29) CXCR5 (рецептор лимфомы Беркита 1, рецептор, связанный с G-белком, активирующийся хемокином CXCL13, действующий при миграции лимфоцита и при гуморальной защите, играющий роль в инфекции HIV-2 и, возможно, в развитии СПИДа, лимфомы, миеломы и лейкоза)

ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ БЕЛКА Полная mnypltl..atslttf (1..372; 372 a./к.), pI: 8.54 MW: 41959 TM: 7 [P] Хромосома генома: 11q23.3, инвентарный номер Genbank NP_001707.1)

WO 2004040000; WO 2004015426; US 2003105292 (пример 2); US 6555339 (пример 2); WO 200261087 (фиг. 1); WO 200157188 (пункт 20, страница 269); WO 200172830 (страницы 12-13); WO 200022129 (пример 1, страницы 152-153, пример 2, страницы 254-256); WO 9928468 (пункт 1, страница 38); US 5440021 (пример 2, col 49-52); WO 9428931 (страницы 56-58); WO 9217497 (пункт 7, фиг. 5); Dobner et al. (1992) Eur. J. Immunol. 22:2795-2799; Barella et al. (1995) Biochem. J. 309:773-779;

(31) P2X5 (пуринергический рецепторный P2X лигандзависимый ионный канал 5, ионный канал, управляемый внеклеточной АТФ, может быть вовлечен в синаптическую передачу и нейрогенез, дефицит может вносить вклад в патофизиологию идиопатической нестабильности детрузора)

ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ БЕЛКА Полная mgqagck..lephrst (1..422; 422 a./к.), pI: 7.63, MW: 47206 TM: 1 [P] Хромосома генома: 17p13.3, инвентарный номер Genbank NP_002552.2)

Le et al. (1997) FEBS Lett. 418(1-2):195-199; WO 2004047749; WO 2003072035 (пункт 10); Touchman et al. (2000) Genome Res. 10:165-173; WO 200222660 (пункт 20); WO 2003093444 (пункт 1); WO 2003087768 (пункт 1); WO 2003029277 (страница 82);

(32) CD72 (антиген дифференцировки B-клеток CD72, Lyb-2)

ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ БЕЛКА Полная maeaity..tafrfpd (1..359; 359 a./к.), pI: 8.66, MW: 40225 TM: 1 [P] Хромосома генома: 9p13.3, инвентарный номер Genbank NP_001773.1)

WO 2004042346 (пункт 65); WO 2003026493 (страницы 51-52, 57-58); WO 200075655 (страницы 105-106); Von Hoegen et al. (1990) J. Immunol. 144(12):4870-4877; Strausberg et al. (2002) Proc. Natl. Acad. Sci USA 99:16899-16903;

(33) LY64 (лимфоцитарный антиген 64 (RP105), мембранный белок семейства белков с богатыми лейцином повторами (LRR) типа I, регулирует активацию и апоптоз B-клеток, потеря функции ассоциирована с увеличенной активностью заболевания у пациентов с системной красной волчанкой)

ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ БЕЛКА Полная mafdvsc.rwkyqhi (1..661; 661 a./к.), pI: 6.20, MW: 74147 TM: 1 [P] Хромосома генома: 5q12, инвентарный номер Genbank NP_005573.1)

US 2002193567; WO 9707198 (пункт 11, страницы 39-42); Miura et al. (1996) Genomics 38(3):299-304; Miura et al. (1998) Blood 92:2815-2822; WO 2003083047; WO 9744452 (пункт 8, страницы 57-61); WO 200012130 (страницы 24-26);

(34) FcRH1 (белок подобный рецептору Fc 1, предполагаемый рецептор домена Fc иммуноглобулинов, содержащий подобные Ig и ITAM домены типа C2, может играть роль в дифференцировке B-лимфоцитов, инвентарный номер Genbank NP_443170.1)

ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ БЕЛКА Полная mlprlll..vdyedam (1..429; 429 a./к.), pI: 5.28, MW: 46925 TM: 1 [P] Хромосома генома: 1q21-1q22, инвентарный номер Genbank NP_443170.1)

WO 2003077836; WO 200138490 (пункт 6, фиг. 18E-1-18-E-2); Davis et al. (2001) Proc. Natl. Acad. Sci USA 98(17):9772-9777; WO 2003089624 (пункт 8); EP 1347046 (пункт 1); WO 2003089624 (пункт 7);

(35) IRTA2 (ассоциированный с транслокацией рецептор из иммуноглобулинового суперсемейства 2, предполагаемый иммунорецептор с возможной ролью в развитии В-клеток и лимфомагенезе; нарушение регуляции гена посредством транслокации происходит в некоторых В-клеточных злокачественных опухолях) ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ БЕЛКА Полная mliwvil..assaphr (1..977; 977 а./к.), pI: 6.88 MW: 106468 TM: 1 [P] Хромосома генома: 1q21, инвентарный номер Genbank Человек:AF343662, AF343663, AF343664, AF343665, AF369794, AF397453, AK090423, AK090475, AL834187, AY358085; Мышь:AK089756, AY158090, AY506558; NP_112571.1

WO 2003024392 (пункт 2, фиг. 97); Nakayama et al. (2000) Biochem. Biophys. Res. Commun. 277(1):124-127; WO 2003077836; WO 200138490 (пункт 3, фиг. 18B-1-18B-2);

(36) TENB2 (возможный трансмембранный протеогликан, родственный семейству ростовых факторов EGF/херегулин и фоллистатину)

ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ БЕЛКА Полная mvlwesp..rastrli (1..374; 374 а./к., Доступ NCBI: AAD55776, AAF91397, AAG49451, NCBI RefSeq: NP_057276; NCBI Gene: 23671; OMTM: 605734; SwissProt Q9UIK5; инвентарный номер Genbank AF179274; AY358907, CAF85723, CQ782436

WO 2004074320 (SEQ ID NO 810); JP 2004113151 (SEQ ID NOS 2, 4, 8); WO 2003042661 (SEQ ID NO 580); WO 2003009814 (SEQ ID NO 411); EP 1295944 (страницы 69-70); WO 200230268 (страница 329); WO 200190304 (SEQ ID NO 2706); US 2004249130; US 2004022727; WO 2004063355; US 2004197325; US 2003232350; US 2004005563; US 2003124579; патент США № 6410506; US 66420061; Horie et al. (2000) Genomics 67:146-152; Uchida et al. (1999) Biochem. Biophys. Res. Commun. 266:593-602; Liang et al. (2000) Cancer Res. 60:4907-12; Glynne-Jones et al. (2001) Int J Cancer. Oct 15;94(2):178-84.

ПОЛУЧЕНИЕ АНТИТЕЛ

Для получения моноклональных антител (MAb) использовали различные способы. В гибридомной технологии, которая относится к клонированной клеточной линии, продуцирующей антитела одного типа, используют клетки различных видов, включая клетки мышей, хомяков, крыс и человека. В других способах получения MAb, включая химерные и гуманизированные антитела, используют генную инженерию, то есть технологию рекомбинантных ДНК.

Поликлональные антитела можно индуцировать множественными подкожными (sc) или внутрибрюшинным (ip) инъекциями соответствующего антигена и адъюванта. Моноклональные антитела получают из группы, по существу, гомогенных антител, то есть индивидуальные антитела, составляющие группу, являются идентичными, исключая возможные природные мутации, которые могут присутствовать в небольших количествах.

Также для получения человеческих моноклональных антител описаны клеточные линии человеческой миеломы и гетеромиеломы мыши-человека (Kozbor, (1984) J. Immunol., 133:3001 и Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)). Культуральную среду, в которой растут гибридомные клетки, оценивают на продукцию моноклональных антител против данного антигена. Специфичность связывания моноклональных антител, продуцируемых гибридомными клетками можно определять с помощью иммунопреципитации или с помощью анализа связывания *in vitro*, такого как радиоиммунологический анализ (RIA) или твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA). Аффинность связывания моноклонального антитела можно определять, например, анализом Скэтчарда, Munson et al. (1980) Anal. Biochem. 107:220.

Кодирующую моноклональные антитела ДНК легко выделить и секвенировать с помощью обычных процедур (например, с помощью олигонуклеотидных зондов, способных специфически связываться с генами, кодирующими тяжелые и легкие цепи антител мыши). Источником такой ДНК служат гибридомные клетки. После выделения ДНК можно помещать в экспрессирующие векторы, которые затем трансфицируют в клетки-хозяева, такие как клетки *E.coli*, обезьяньи клетки COS, клетки яичника китайского хомяка (CHO) или миеломные клетки, которые другим путем не продуцируют белок антитела, для обеспечения синтеза моноклональных антител в рекомбинантных клетках-хозяевах (патент США № 2005/0048572; патент США № 2004/0229310). Обзорные статьи о рекомбинантной экспрессии в бактериях ДНК, кодирующей антитело, включают Skerra et al. (1993) Curr. Opinion in Immunol. 5:256-262 и Plückthun (1992) Immunol. Revs. 130:151-188.

В дополнительном варианте осуществления моноклональные антитела или фрагменты антител можно выделять из фаговых библиотек антител, полученных способами, описанными McCafferty et al. (1990) Nature 348:552-554; Clackson et al. (1991) Nature 352:624-628; и в статье Marks et al. (1991) J. Mol. Biol., 222:581-597,

описано выделение антител мыши и человека, соответственно, с применением фаговых библиотек. В следующих публикациях описано получение высокоаффинных (диапазон нМ) антител человека посредством перестановки цепей (Marks et al. (1992) Bio/Technology 10:779-783), а также комбинационная инфекция и рекомбинация *in vivo*, как стратегия конструирования очень больших фаговых библиотеке (Waterhouse et al. (1993) Nuc. Acids. Res. 21:2265-2266). Таким образом, эти способы являются альтернативными традиционными способами гибридом моноклональных антител для выделения моноклональных антител.

ДНК также можно модифицировать, например, замещая кодирующими последовательностями константных доменов тяжелых человека и легких цепей гомологичных последовательностей мыши (патент США № 4816567); и Morrison et al. (1984) Proc. Natl Acad. Sci. USA 81:6851), или ковалентным связыванием с кодирующей последовательностью иммуноглобулина всей или части кодирующей последовательности полипептида, не являющегося иммуноглобулином.

Как правило, такими полипептидами, не являющимися иммуноглобулинами, замещают константные домены антитела или ими замещают вариабельные домены одного антигенсвязывающего участка антитела для получения химерного бивалентного антитела, содержащего один антигенсвязывающий участок со специфичностью к одному антигену и другой антигенсвязывающий участок со специфичностью к другому антигену.

Приведенное ниже описание является иллюстрацией способов получения антител (Ab), используемых в конъюгатах антитело-лекарственное средство (ADC) по настоящему изобретению. Получение антител представлено для антитела против ErbB2, но специалистам в данной области будет ясно, что подобным способом можно получать и модифицировать антитела против других представителей семейства рецепторов ErbB, а также против любого другого рецептора или ассоциированного с опухолью антигена или мишени.

Антиген ErbB2, используемый для получения антител, может представлять собой, например, растворимую форму внеклеточного домена ErbB2 или его часть, содержащую желательный эпитоп. Альтернативно, для получения антител можно использовать клетки, экспрессирующие на своей клеточной поверхности ErbB2, например, клетки NIH-3T3, трансобразованные для сверхэкспрессии ErbB2, или карциномную клеточную линию, такую как клетки SK-BR-3 (Stancovski et al. (1991) PNAS (USA) 88:8691-8695). Специалистам в данной области понятно, что для получения антител могут использоваться другие пригодные формы ErbB2.

В примере I описано получение иллюстративного гуманизированного антитела против ErbB2. Гуманизированное антителю может, например, содержать не являющиеся человеческими остатки гипервариабельной области, встроенные в вариабельный домен тяжелой цепи человека, и дополнительно может содержать замену в каркасной области (FR) в положении выбранном из группы, состоящей из 69H, 71H и 73H, используя систему нумерации вариабельных доменов установленную Kabat *et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991). В одном из вариантов осуществления гуманизированное антитело содержит замены в FR по двум или всем положениям 69H, 71H и 73H.

В качестве альтернативы гуманизированию можно получать антитела человека. Например, в настоящее время можно получать трансгенных животных (например, мышей), способных после иммунизации продуцировать полных набор человеческих антител в отсутствие эндогенной продукции иммуноглобулинов (Jakobovits et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551; Jakobovits et al. (1993) Nature 362:255-258; Bruggermann et al. (1993) Year in Immuno. 7:33; и патент США № 5591669; патент США № 5589369; патент США № 5545807).

Альтернативно, для получения антител человека и фрагментов антител *in vitro* из наборов генов вариабельных (V) доменов иммуноглобулинов от неиммунизированных доноров можно применять технологию фагового дисплея (McCafferty et al. (1990) Nature 348:552-553) (Johnson, Kevin S. и Chiswell, David J. (1993) *Current Opinion in Structural Biology* 3:564-571). Можно сконструировать набор генов V от неиммунизированных человеческих доноров и, в принципе, можно выделять антитела против разнообразного набора антигенов (включая собственные антигены) (Marks et al. (1991) J. Mol. Biol. 222:581-597; Griffith et al. (1993) EMBO J. 12:725-734; патент США № 5565332; патент США № 5573905). Антитела человека также можно получать из B-клеток, активированных *in vitro* (патент США № 5567610; патент США № 5229275). Антитела человека против ErbB2 описаны (патент США № 5772997 и WO 97/00271.

Для получения фрагментов антител разработаны различные способы. Как правило, такие фрагменты получают протеолитическим расщеплением интактных антител (см.

Morimoto et al. (1992) Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117 и Brennan et al. (1985) Science 229:81). Фрагменты антител также можно получать непосредственно с помощью рекомбинантных клеток-хозяев и фаговых библиотек антител, описанных выше. Фрагменты Fab'-SH можно восстанавливать непосредственно из *E.coli* и химически связывать с образованием фрагментов $F(ab')_2$ (Carter et al. (1992) Bio/Technology 10:163-167). Согласно еще одному подходу фрагменты $F(ab')_2$ можно выделять непосредственно из культуры рекомбинантных клеток-хозяев. Специалистам в данной области известны другие способы получения фрагментов антител. В других вариантах осуществления выбранное антитело представляет собой одноцепочечный фрагмент Fv (scFv). Смотри WO 93/16185; патент США № 5571894 и патент США № 5587458. Фрагмент антитела также может представлять собой «линейное антитело», например, как описано в патенте США № 5641870. Такие линейные фрагменты антител могут быть моноспецифическими или биспецифическими.

Биспецифические антитела со специфичностью связывания по меньшей мере к двум различным эпитопам (Millstein et al. (1983), Nature 305:537-539) могут связывать два различных эпитопа белка ErbB2. Другие такие антитела могут сочетать участок связывания ErbB2 с участком(амии) связывания EGFR, ErbB3 и/или ErbB4. Альтернативно, ветвь против ErbB2 можно сочетать с ветвью, связывающей стимулирующую молекулу на лейкоците, такую как молекула Т-клеточного рецептора (например, CD2 или CD3) или Fc-рецепторы для IgG (FcγR), такие как FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) и FcγRIII (CD16), с тем, чтобы сфокусировать механизмы клеточной защиты на экспрессирующей ErbB2 клетке. Биспецифические антитела также можно применять для локализации цитотоксических средств клеток, экспрессирующих ErbB2 (WO 96/16673; патент США № 5837234; WO 98/02463; патент США № 5821337). Способы очистки биспецифических антител описаны (WO 93/08829; Traunecker et al. (1991) EMBO J. 10:3655-3659; WO 94/04690; Suresh et al. (1986) *Methods in Enzymology* 121:210; патент США № 5731168). Биспецифические антитела можно получать с применением лейциновых застежек (Kostelny et al. (1992) J. Immunol, 148(5):1547-1553) и димеров одноцепочечных Fv (sFv) (Gruber et al. (1994) J. Immunol. 152:5368).

Также описаны способы получения биспецифических антител из фрагментов антител, например, химическое связывание, где интактные антитела протеолитически расщепляют с получением фрагментов $F(ab')_2$ (Brennan et al. (1985) Science 229:81). Для образования биспецифических антител из *E.coli* можно восстановить фрагменты Fab'-SH и химически связать (Shalaby et al. (1992) J. Exp. Med. 175:217-225). Альтернативный способ получения биспецифических фрагментов антител предоставляет технология «димерных антител» (Hollinger et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448).

В рамках настоящего изобретения предусмотрены антитела более чем с двумя валентностями. Поливалентные «осьминоговые» антитела с тремя и более антигенсвязывающими участками и двумя или более вариабельными доменами можно легко получить рекомбинантной экспрессией нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептидные цепи антитела (патент США № 2002/0004586; WO 01/77342). Например, можно получать триспецифические антитела (Tutt et al. (1991) J. Immunol. 147:60).

В рамках настоящего изобретения предусмотрена модификация(и) аминокислотной последовательности антител. Например, для повышения аффинности связывания и/или улучшения других биологических характеристик антитела могут быть получены мутанты и различные изоформы антител, связывающих ассоциированные с опухолями антигены. Варианты аминокислотных последовательностей антитела получают внесением соответствующих нуклеотидных замен в кодирующую антитело нуклеиновую кислоту или с помощью пептидного синтеза. Такие модификации, например, включают делеции остатков из аминокислотных последовательностей антитела, и/или вставки, и/или замены остатков. Для получения конечной конструкции можно производить любую комбинацию делеций, вставок и замен, при условии, что конечная конструкция будет обладать желательными свойствами. Замены аминокислот также могут изменять посттрансляционную модификацию антитела, например, изменение количества или положения участков гликозилирования.

Эффективным способом идентификации определенных остатков или областей антитела, которые являются предпочтительными участками мутагенеза, является «сканирующий аланином мутагенез» (Cunningham и Wells (1989) Science 244:1081-1085), где для оптимизации взаимодействия аминокислот с антигеном идентифицируют аминокислотный остаток или группу мишеневых остатков (например, заряженные остатки, такие как arg, asp, his, lys и glu) и заменяют

нейтральной и отрицательно заряженной аминокислотой, такой как аланин или полиаланин. Вставки включают в себя слияние с N- и/или С-концом аминокислотных последовательностей в диапазоне от одного остатка до полипептидов, содержащих сто или более остатков, а также вставки одного или несколько аминокислотных остатков внутрь последовательности. Примеры концевых вставок включают антитело против ErbB2 с N-концевым остатком метионина или антитело, слитое с цитотоксическим полипептидом. Другие варианты антитела против молекулы ErbB2 со вставками включают слияние N- или С-конца антитела против ErbB2 с ферментом (например, для ADEPT: Tietze et al. (2003) Current Pharm. Design 9:2155-2175) или полипептидом, увеличивающим время полужизни антитела в сыворотке, таким как альбуминсвязывающий пептид.

Связывание плазматических белков может быть эффективным способом улучшения фармакокинетических свойств быстро разрушающихся молекул. Альбумин является наиболее встречающимся белком плазмы. Связывающие сывороточный альбумин пептиды (ABP) могут изменять фармакодинамику слитых белков с активными доменами, включая изменение захвата тканями, проницаемости и диффузии. Эти фармакодинамические параметры можно модулировать посредством специфического отбора соответствующей пептидной последовательности, связывающей сывороточный альбумин (патент США № 20040001827). Ряд связывающих альбумин пептидов идентифицирован скринированием фагового дисплея (Dennis et al. (2002) «Albumin Binding As A General Strategy For Improving The Pharmacokinetics Of Proteins» J Biol Chem. 277:35035-35043; WO 01/45746). Соединения по изобретению включают последовательности ABP, указанные: (i) Dennis et al. (2002) J Biol Chem. 277:35035-35043 в таблицах III и IV, страница 35038; (ii) патент США № 20040001827, абзац [0076] SEQ ID NO: 9-22, и (iii) WO 01/45746, страницы 12-13, SEQ ID NO: z1-z14; и каждый из которых приведен в данный документ в качестве ссылки.

Аминокислотную последовательность, как правило, изменяют посредством изменения кодирующей ее последовательности нуклеиновой кислоты. Молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие варианты аминокислотных последовательностей антитела, получают множеством способов, известных в данной области способов. Эти способы включают в качестве неограничивающих примеров выделение из природного источника (в случае природных вариантов аминокислотных последовательностей) или получение посредством опосредованного олигонуклеотидами (или сайт-специфического) мутагенеза, мутагенеза на основе ПЦР и кассетного мутагенеза ранее полученного варианта или безвариантной версии антитела. Интересующие участки для замещающего мутагенеза включают гипервариабельные области, но можно также изменить FR.

Значительных изменений биологических свойств антитела достигают посредством выбора замен, которые значительно отличаются по их действию на поддержание (a) структуры полипептидного каркаса в области замены, например, конформации листа или спирали, (b) заряда или гидрофобности молекулы в участке-мишени или (c) объема боковой цепи. Природные остатки разделяют на группы на основе общих свойств боковых цепей:

(1) гидрофобные: норлейцин, met, ala, val, leu, ile;
(2) нейтральные гидрофильные: cys, ser, thr;
(3) кислые: asp, glu;
(4) основные: asn, gln, his, lys, arg;
(5) остатки, влияющие на ориентацию цепи: gly, pro; и
(6) ароматические: trp, tyr, phe.

Неконсервативные замены приводят к замене представителя одного из этих классов на представителя другого класса.

Также можно замещать любой цистеиновый остаток, не вовлеченный в поддержание правильной конформации антитела, как правило, на серин, для увеличения устойчивости молекулы к окислению и предотвращения образования аномальных перекрестных связей. С другой стороны, в антитело можно вводить цистеиновую связь(и) для увеличения стабильности (особенно, когда антитело представляет собой фрагмент антитела, такой как фрагмент Fv).

Для увеличения времени полужизни антитела в сыворотке в антитело (особенно в фрагмент антитела) можно ввести эпитоп связывания спасательного рецептора, например, как описано в патенте США № 5739277. Как используется в данном документе, термин «эпитоп связывания спасательного рецептора» относится к эпитопу Fc-области молекулы IgG (например, IgG_1, IgG_2, IgG_3 или IgG_4), ответственному за увеличение времени полужизни молекулы IgG из сыворотки *in vivo* (патент США № 2003/0190311, US 6821505; патент США № 6165745; патент

США № 5624821; патент США № 5648260; патент США № 6165745; патент США № 5834597).

К вариантам гликозилирования антител относятся варианты, в которых изменен профиль гликозилирования антитела. Под изменением подразумевают удаление одной или нескольких углеводных групп, найденных в антителе, добавление в антитело одной или нескольких углеводных групп, изменение структуры гликозилирования (профиля гликозилирования) или степени гликозилирования.

Антитела могут быть гликозилированы по консервативным положениям (N-связанное или O-связанное) в их константных областях (Hse et al. (1997) J. Biol. Chem. 272:9062-9070; Jefferis и Lund, (1997) Chem. Immunol. 65:111-128; Wright and Morrison, (1997) TibTECH 15:26-32). Олигосахаридные боковые цепи иммуноглобулинов влияют на функцию белков (Boyd et al. (1996) Mol. Immunol. 32:1311-1318; Wittwe и Howard, (1990) Biochem. 29:4175-4180) и межмолекулярное взаимодействие между частями гликопротеина, которое может влиять на конформацию и показанную трехмерную структуру поверхности гликопротеина (Hefferis и Lund, выше; Wyss and Wagner (1996) Current Opin. Biotech. 7:409-416). Олигосахариды также могут служить для нацеливания данного гликопротеина на определенные молекулы на основании специфических распознающих структур (Malhotra et al. (1995) Nature Med. 1:237-243; Umana et al. (1999) Nature Biotech. 17:176-180). Удаление олигосахаридов может оптимизировать связывание антигена и другие свойства антитела (Boyd et al. (1996) Mol. Immunol. 32:1311-1318).

Факторы, влияющие на гликозилирование в течение рекомбинантного получения антител, включают способ роста, состав среды, плотность культуры, насыщенность кислородом, pH, схемы очистки и тому подобное (патент США № 5047335; патент США № 5510261; патент США № 5278299). Гликозилирование или определенные типы гликозилирования могут быть ферментативно удалены из гликопротеина с помощью эндогликозидазы H (Endo H). Кроме того, рекомбинантную клетку-хозяина можно сконструировать генетически, например, сделать дефектной по процессингу определенных типов полисахаридов. Эти и другие способы хорошо известны в данной области.

Структуру гликозилирования антител можно легко проанализировать обычными способами анализа углеводов, включая хроматографию с лектинами, ЯМР, масс-спектрометрию, ВЭЖХ, GPC, анализ моносахаридного состава, последовательное ферментативное отщепление и HPAEC-PAD, в которых используют анионообменную хроматографию при высоком pH для разделения олигосахаридов по заряду. Способы выделения олигосахаридов для аналитических целей также хорошо известны и включают, но ими не ограничиваются, ферментативную обработку (обычно проводимую с применением пептид-N-гдикозидазы F/эндо-β-галактозидазы), элиминацию, используя сильное щелочное окружение для высвобождения преимущественно O-связанных структур, и химические способы с применением безводного гидразина для высвобождения и N- и O-связанных олигосахаридов.

МОЛЕКУЛЫ МАЙТАНАЗОИДНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Майтаназиновые соединения ингибируют клеточную пролиферацию, ингибируя образование микротрубочек в процессе митоза посредством ингибирования полимеризации белка микротрубочек, тубулина (Remillard et al. (1975) Science 189:1002-1005; патент США № 5208020). Майтаназин и майтанзиноиды являются высокоцитотоксическими, но их клиническое применение для лечения злокачественных опухолей сильно ограничено из-за тяжелых системных побочных эффектов, главным образом, связанных с их слабой селективностью в отношении опухолей. Клинические испытания с майтаназином были прекращены вследствие серьезных побочных эффектов на центральную нервную систему и желудочно-кишечный тракт (Issel et al. (1978) Can. Treatment. Rev. 5:199-207).

Молекулы майтаназоидных лекарственных средств могут быть эффективными молекулами лекарственных средств в конъюгатах антитело-лекарственное средство из-за того, что они: (i) относительно удобны для получения производных ферментативных продуктов путем ферментативной или химической модификации, (ii) их функциональные группы могут быть модифицированы для конъюгации с антителами посредством несульфидных линкеров, (iii) они стабильны в плазме и (iv) эффективны против множества опухолевых клеточных линий.

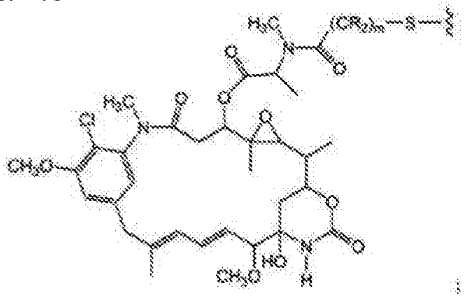
Майтаназиновые соединения, которые могут использоваться в качестве молекул майтаназоидных лекарственных средств, хорошо известны в данной области и их можно выделить известными способами из природных источников, получить способами генной инженерии (см. Yu et al. (2002) PNAS 99:7968-7973), или майтаназинол и аналоги майтаназинола известными способами получают синтетически.

Иллюстративные молекулы майтаназоидных лекарственных средств включают молекулы с модифицированным ароматическим циклом, такие как С-19-дехлор (патент США № 4256746) (получаемые восстановлением ансамитоцина Р2 с помощью алюмогидрида лития); С-20-гидрокси (или С-20-деметил) +/-С-19-дехлор (патенты США №№ 4361650 и 4307016) (получаемые путем деметилирования с применением *Streptomyces* или *Actinomyces* или дехлорирования с применением LAH) и С-20-деметокси, С-20-ацилокси (-OCOR), +/-дехлор (патент США № 4294757) (получаемые путем ацилирования с применением хлорангидридов) и молекулы с модификациями в других положениях.

Иллюстративные молекулы майтаназоидных лекарственных средств также включают молекулы с такими модификациями, как С-9-SH, получаемой реакцией майтаназинола с H_2S или P_2S_5 (патент США № 4424219); С-14-алкоксиметил (деметокси/CH_2OR) (патент США № 4331598); С-14-гидроксиметил или ацилоксиметил (CH_2OH или CH_2OAc), получаемые из *Nocardia* (патент США № 4450254); С-15-гидрокси/ацилокси, получаемые преобразованием майтаназинола *Streptomyces* (патент США № 4364866); С-15-метокси, выделяемый из *Trewia nudiflora* (патент США № 4313946 и патент США № 4315929); С-18-N-деметил, получаемый деметилированием майтаназинола *Streptomyces* (патент США № 4362663 и патент США № 4322348) и 4,5-дезокси, получаемый восстановлением майтаназинола трихлоридом титана/LAH (патент США № 4371533).

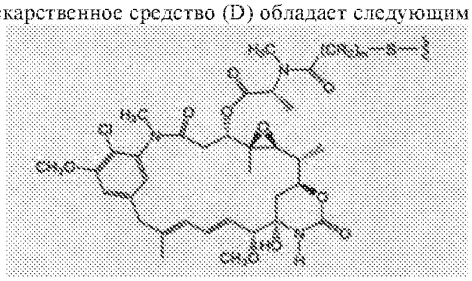
Ряд положений на майтаназиновых соединениях известны как подходящие в качестве положения для связывания, в зависимости от типа связи. Например, для образования сложноэфирной связи подходят все положения С-3 с гидроксильной группой, положения С-14, модифицированное гидроксиметилом, положения С-15 с гидроксильной группой и положения С-20 с гидроксильной группой.

Молекулы майтаназоидных лекарственных средств (D) включают молекулы со структурой:



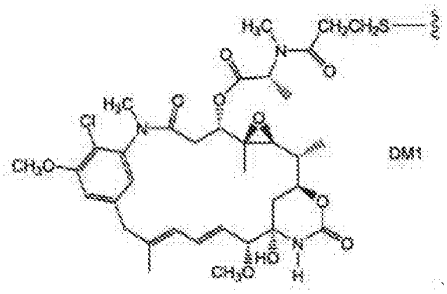
где волнистая линия указывает ковалентное связывание атома серы D с линкером (L) конъюгата антитело-лекарственное средство (ADC). R может независимо представлять собой H или C_1-C_6-алкил. Алкиленовая цепь, присоединяющая амидную группу к атому серы, может представлять собой метил, этил или пропил, то есть m равно 1, 2 или 3 (патенты США №№ 633410, 5208020, Chari et al. (1992) Cancer Res. 52:127-131; Liu et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci 93:8618-8623).

Настоящее изобретение охватывает все стереоизомеры майтаназоидного лекарственного средства, то есть любое сочетание *R*- и *S*-конфигураций хиральных атомов углерода D. В одном из вариантов осуществления майтаназоидное лекарственное средство (D) обладает следующим стереохимическим строением:

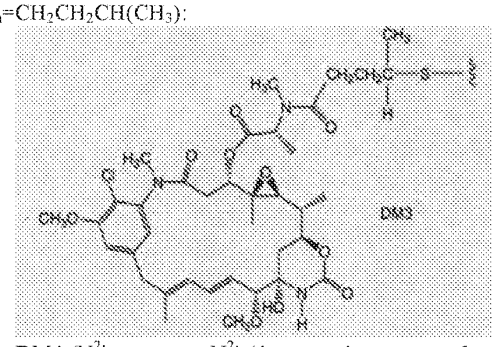


Варианты D включают:

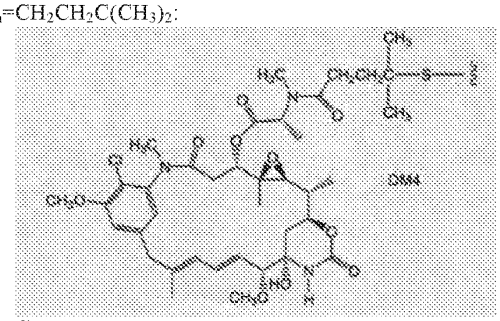
DM1 ($N^{2'}$-деацетил-$N^{2'}$-(3-меркапто-1-оксопропил)майтаназин), где $(CR_2)_m$=CH_2CH_2:



DM3 ($N^{2'}$-деацетил-$N^{2'}$-(4-меркапто-1-оксопентил)майтаназин), где $(CR_2)_m$=$CH_2CH_2CH(CH_3)$:



DM4 ($N^{2'}$-деацетил-$N^{2'}$-(4-метил-4-меркапто-1-оксопентил)-майтаназин), где $(CR_2)_m$=$CH_2CH_2C(CH_3)_2$:



Стерическое затруднение, создаваемое алкильными группами, такими как метильные группы, для атома углерода, расположенного рядом с атомом серы DM3 и DM4, могут влиять на скорость внутриклеточного расщепления ADC (патент США № 2004/0235840 A1). Таким образом, различные алкильные единицы $(CR_2)_m$ могут влиять на результативность, эффективность и безопасность/токсичность *in vitro* и *in vivo*.

ЛИНКЕРЫ

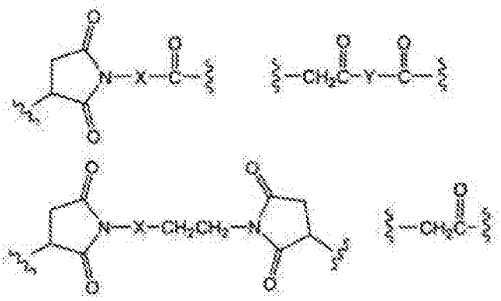
Линкер, L, связывает антитело с лекарственным веществом с помощью ковалентной связи(ей), не включающей дисульфидную группу. Линкер представляет собой бифункциональную или полифункциональную молекулу, которую можно использовать для связывания одной или нескольких молекул лекарственного вещества (D) с молекулой антитела (Ab) с образованием конъюгатов антитело-лекарственное средство (ADC) формулы I. Конъюгаты антитело-лекарственное средство (ADC) можно легко получить с применением линкера с реакционной способностью в отношении связывания с лекарственным средством и антителом. Тиольная группа цистеина или амина, например N-конец или боковая цепь аминокислоты, такой как лизин, антитела могут образовать связь с функциональной группой на линкерном реагенте, молекуле лекарственного вещества или реагенте лекарственное вещество-линкер.

Предпочтительно, линкеры стабильны вне клеток. Перед транспортировкой или доставкой в клетку конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC), предпочтительно, стабилен и остается интактным, то есть антитело остается связанным с молекулой лекарственного средства. Линкеры стабильны вне клетки-мишени и могут расщепляться с определенной эффективной скоростью внутри клетки. Эффективный линкер: (i) сохраняет свойства специфического связывания антитела; (ii) обеспечивает внутриклеточную доставку конъюгата или молекулы

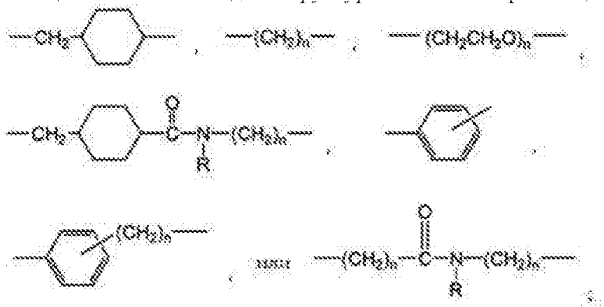
лекарственного средства; (iii) остается стабильным и неповрежденным, то есть не расщепляется, до тех пор, пока не осуществится доставка или транспортировка конъюгата к намеченному участку, и (iv) сохраняет цитотоксическое, уничтожающее клетки действие или цитостатическое действие майтаназоидного лекарственного средства. Стабильность ADC можно измерить стандартными аналитическими способами, такими как масс-спектрометрия, ВЭЖХ и способ разделения/анализа LC/MS.

Для ковалентного связывания антитела и молекулы лекарственного средства необходимо, чтобы у линкера были две реакционные функциональные группы, то есть он был бивалентным с точки зрения взаимодействия. Бивалентные линкерные реагенты, которые могут использоваться для присоединения двух или более функциональных или биологически активных молекул, таких как пептиды, нуклеиновые кислоты, лекарственные средства, токсины, антитела, гаптены и репортерные группы, хорошо известны, и способы, приводящие к получению конъюгатов, описаны (Hermanson, G.T. (1996) *Bioconjugate Techniques*; Academic Press: New York, p234-242).

Линкеры могут обладать структурами, выбранными из:



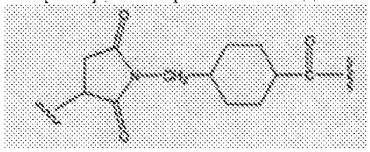
где волнистые линии указывают на ковалентную связь Ab и D в любой ориентации. X может обладать структурами в любой ориентации:



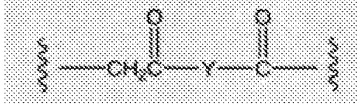
где R независимо представляет собой H или C_1-C_6-алкил; и n равно от 1 до 12. Y может обладать структурами в любой ориентации:

где R независимо представляет собой H или C_1-C_6-алкил; и n равно от 1 до 12.

Например, линкер может обладать структурой, обозначенной как SMCC:

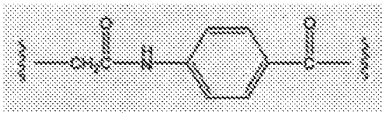


В другом варианте осуществления, линкер (L) обладает структурой:

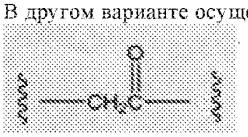


где волнистые линии указывают на ковалентную связь Ab и D в любой ориентации.

Например, линкер может обладать структурой, обозначенной как SLAB:



В другом варианте осуществления, линкер (L) обладает структурой:

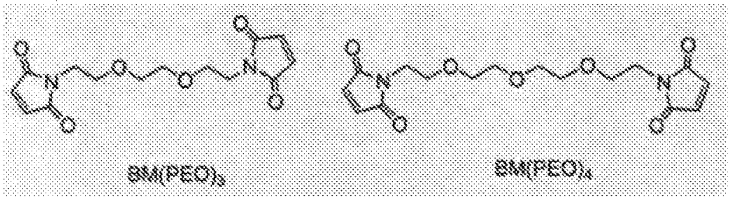


В другом варианте осуществления, линкер может быть замещен группами, модулирующими растворимость и реакционноспособность. Например, сульфонатный заместитель может увеличивать растворимость реагента в воде и облегчать реакцию присоединения линкерного реагента и антитела или молекулы лекарственного средства или облегчать реакцию связывания Ab-L с D или D-L с Ab, в зависимости от применяемого для получения ADC способа синтеза.

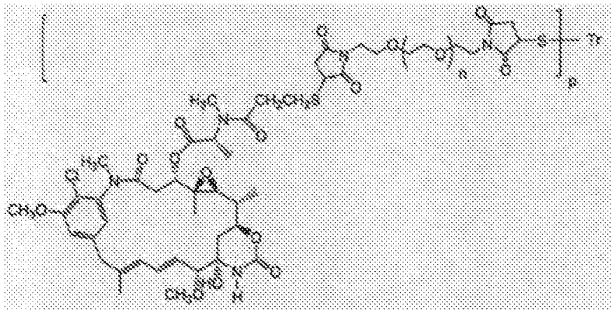
В другом варианте осуществления линкер обладает реакционноспособной функциональной группой, которая несет нуклеофильную группу, способную к реакции с электрофильной группой, находящейся на антителе. Подходящие электрофильные группы на антителе включают, но ими не ограничиваются, альдегидную и кетоновую карбонильные группы. Гетероатом нуклеофильной группы линкера может реагировать с электрофильной группой на антителе и образовать ковалентную связь с молекулой антитела. Подходящие нуклеофильные группы на линкере включают, но ими не ограничиваются, гидразид, оксим, амино, гидразин, тиосемикарбазон, гидразинкарбоксилат и арилгидразид. Электрофильная группа на антителе обеспечивает подходящий участок для присоединения линкера.

Линкеры могут быть пептидными и содержать одну или несколько аминокислотных единиц. Пептидные линкерные реагенты можно получать способами твердофазного или жидкофазного синтеза (E. Schröder and K. Lübke, *The Peptides*, volume 1, pp.76-136 (1965) Academic Press), которые хорошо известны в области пептидной химии, включая химические реакции с t-BOC (Geiser et al. «Automation of solid-phase peptide synthesis» *in Macromolecular Sequencing and Synthesis*, Alan R. Liss, Inc., 1988, pp. 199-218) и химические реакции с Fmoc/HBTU (Fields, G. and Noble, R. (1990) «Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluoroenylmethoxycarbonyl amino acids», Int. J. Peptide Protein Res. 35:161-214), на автоматическом синтезаторе, таком как Rainin Symphony Peptide Synthesizer (Protein Technologies, Inc., Tucson, AZ), или Model 433 (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Соединения, которые могут использоваться в качестве ADC, полученные с применением перекрестносшивающих реагентов включают, но ими не ограничиваются, BMPEO, BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, сульфо-EMCS, сульфо-GMBS, сульфо-KMUS, сульфо-MBS, сульфо-SIAB, сульфо-SMCC и сульфо-SMPB и SVSB (сукцинимидил-(4-винилсульфон)бензоат), включая бис-малеимидные реагенты: DTME, BMB, BMDB, BMH, BMOE, $BM(PEO)_3$ и $BM(PEO)_4$, коммерчески доступные от Pierce Biotechnology, Inc., Customer Service Department, P.O. Box 117, Rockford, IL. 61105 USA, USA 1-800-874-3723, International +815-968-0747. Смотри страницы 467-498, 2003-2004 Applications Handbook and Catalog. Бис-малеимидные реагенты обеспечивают связывание свободной тиольной группы цистеинового остатка антитела с содержащей тиол молекулой лекарственного средства, меткой или линкерным промежуточным соединением, последовательным или одновременным способом. Другие функциональные группы кроме малеимида, которые способны взаимодействовать с тиольной группой антитела, майтаназоидного лекарственного средства или линкерным промежуточным соединением включают йодоацетамид, бромацетамид, винилпиридин, дисульфид, пиридилдисульфид, изоцианат и изотиоцианат.



Иллюстративные конъюгаты антитело-лекарственное средство, где DM1 связано через линкер BMPEO с тиольной группой трастузумаба, обладают структурой:

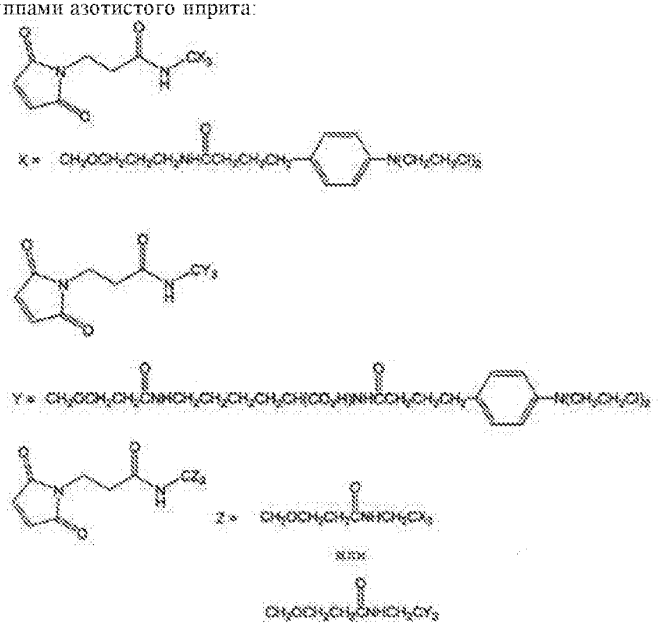


где Tr представляет собой трастузумаб; n равно 0, 1 или 2; а p равно 1, 2, 3 или 4.

Линкерные реагенты, которые могут использоваться, также можно получать из коммерческих источников, например, Molecular Biosciences Inc. (Boulder, CO) или синтезировать в соответствии со способами, описанными Toki et al. (2002) J. Org. Chem. 67:1866-1872; в патенте США № 6214345, выданном Firestone et al.; WO 02/088172; патенте США № 2003130189; патенте США № 2003096743; WO 03/026577; WO 03/043583 и WO 04/032828.

Линкер может представлять собой линкер ветвящегося типа для ковалентного связывания с антителом более чем одной молекулы лекарственного средства посредством разветвленной, полифункциональной линкерной молекулы (Sun et al. (2002) Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 12:2213-2215; Sun et al. (2003) Bioorganic & Medicinal Chemistry 11:1761-1768; King et al. (2002) Tetrahedron Letters 43:1987-1990). Ветвящиеся линкеры могут увеличивать молярное соотношение лекарственного средства и антитела, то есть нагрузку, которая связана с эффективностью ADC. Таким образом, когда антитело несет только одну реакционную тиольную группу цистеина, несколько молекул лекарственного средства можно присоединить посредством ветвящегося линкера.

Следующие иллюстративные варианты осуществления дендритных линкерных реагентов позволяют конъюгировать до 9 нуклеофильных молекул реагента лекарственного средства посредством реакции с хлорэтильными функциональными группами азотистого иприта:



НАГРУЗКА ЛЕКАРСТВЕННЫМ СРЕДСТВОМ

Нагрузка лекарственным средством на формуле молекулы I представлена посредством p, средним количеством молекул майтанзиноидных лекарственных средств на антитело. Нагрузка лекарственным средством может находиться в диапазоне от 1 до 8 молекул лекарственных средств (D) на антитело (Ab), то есть когда 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 и 8 молекул лекарственного средства ковалентно связаны с антителом. Композиции ADC формулы I включают наборы антител, конъюгированных с диапазоном молекул лекарственных средств от 1 до 8. Среднее

число молекул лекарственных средств на антитело в препаратах ADC после реакций конъюгации можно охарактеризовать обычными способами, такими как масс-спектрометрия, анализ ELISA, электрофорез и ВЭЖХ. Также можно определить количественное распределение ADC в единицах p. Посредством ELISA можно определить среднее значение p в конкретном препарате ADC (Hamblett et al. (2004) Clinical Cancer Res. 10:7063-7070; Sanderson et al. (2005) Clinical Cancer Res. 11:843-852). Однако распределение значений p (лекарственного средства) не различимо из-за связывания антиген-антитело и ограничения определения ELISA. Также анализ ELISA для детекции конъюгатов антитело-лекарственное средство не определяет место присоединения молекулы лекарственного средства к антителу, такого как фрагменты тяжелой цепи или фрагменты легкой цепи или конкретные аминокислотные остатки. В некоторых случаях разделение, очистку и характеристику гомогенного ADC, где p представляет собой определенное значение на основе ADC с другими нагрузками лекарственным средством, можно оценить такими способами, как ВЭЖХ с обратной фазой или электрофорез.

Для некоторых конъюгатов антитело-лекарственное средство p может быть ограничено количеством участков присоединения на антителе. Например, когда участок присоединения представляет собой тиол цистеина, как в иллюстративных вариантах осуществления выше, на антителе могут присутствовать только одна или несколько тиольных групп цистеина или могут присутствовать только одна или несколько достаточно реакционноспособных тиольных групп, посредством которых может быть присоединен линкер. Большая нагрузка лекарственным средством, например $p > 5$, может вызвать агрегацию, нерастворимость, токсичность или потерю проницаемости в клетки для определенных конъюгатов антитело-лекарственное средство.

Как правило, в течение реакции конъюгации с антителом конъюгирует меньше молекул лекарственного средства, чем теоретический максимум. Антитело может содержать, например, множество остатков лизина, которые не реагируют с промежуточным соединением лекарственное средство-линкер (D-L) или линкерным реагентом. Только наиболее реакционноспособные лизиновые группы могут реагировать с амин-реактивным линкерным реагентом. Также только наиболее реакционноспособные тиольные группы цистеинов могут реагировать с тиол-реактивным линкерным реагентом. Как правило, антитела не содержат свободных и реакционноспособных тиольных групп цистеинов, которые могут связываться с молекулой лекарственного средства, или содержат их в незначительном количестве. Большинство тиольных остатков цистеинов в антителах соединений существуют в виде дисульфидных мостиков и их необходимо восстановить восстановителем, таким как дитиотреитол (DTT) или TCEP, в частичных или полностью восстанавливающих условиях. Кроме того, антитело необходимо поместить в денатурирующие условия для открытия реакционноспособных нуклеофильных групп, таких как лизин или цистеин. Нагрузку (отношение лекарственное средство/антитело) ADC можно контролировать несколькими различными способами, включающими: (i) ограничение молярного избытка промежуточного соединения лекарственное средство-линкер (D-L) или линкерного реагента относительно антитела, (ii) ограничение времени или температуры реакции конъюгации и (iii) частичные или ограниченные восстанавливающие условия для модификации тиолов цистеинов.

Когда с промежуточным соединением лекарственное средство-линкер или линкерным реагентом с последующей молекулой реагента лекарственного вещества реагирует более чем одна нуклеофильная или электрофильная группа антитела, тогда получаемый продукт представляет собой смесь соединений ADC с распределением молекул лекарственного средства, присоединенных к антителу, например 1, 2, 3 и т.д. С помощью способов жидкостной хроматографии, таких как полимерная обратная фаза (PLRP) и гидрофобное взаимодействие (HIC), можно разделить соединения в смеси по значениям нагрузки лекарственным средством. Можно выделить препараты ADC с одним значением нагрузки лекарственным средством (p) («Effect of drug loading on the pharmacology, pharmacokinetics, and toxicity of an anti-CD30 antibody-drug conjugate», Hamblett, K.J., et al., Abstract No. 624, American Association for Cancer Research; 2004 Annual Meeting, March 27-31, 2004, Proceedings of the AACR, Volume 45, March 2004; «Controlling the Location of Drug Attachment in Antibody-Drug Conjugates», Alley, S.C., et al., Abstract No. 627, American Association for Cancer Research; 2004 Annual Meeting, March 27-31, 2004, Proceedings of the AACR, Volume 45, March 2004). Однако эти ADC с одинаковым значением нагрузки все еще могут оставаться гетерогенными смесями вследствие того, что молекулы лекарственного средства могут через линкер присоединяться по другим участкам антитела.

ПОЛУЧЕНИЕ КОНЪЮГАТОВ АНТИТЕЛО-ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО

OnCusp
Ex. 1002

ADC формулы I можно получать различными способами, применяя реакции органической химии, условия и реагенты, известные специалистам в данной области, включая: (1) реакцию нуклеофильной группы или электрофильной группы антитела с бивалентным линкерным реагентом с образованием посредством ковалентной связи промежуточного продукта антитело-линкер Ab-L с последующей реакцией с активированной молекулой лекарственного средства D; и (2) реакцию нуклеофильной группы или электрофильной группы молекулы лекарственного средства с линкерным реагентом с образованием посредством ковалентной связи промежуточного соединения лекарственное средство-линкер D-L с последующей реакцией с нуклеофильной группой или электрофильной группой антитела. Способы конъюгации (1) и (2) можно использовать для множества антител, молекул лекарственного средства и линкеров с получением конъюгатов антитело-лекарственное средство формулы I.

Нуклеофильные группы на антителах включают, но ими не ограничиваются: (i) N-концевые аминогруппы, (ii) аминогруппы боковых цепей, например лизина, (iii) тиольные группы боковых цепей, например цистеина, и (iv) гидроксильные группы или аминогруппы сахаров, если антитело гликозилировано. Амино, тиольные и гидроксильные группы являются нуклеофильными и способны взаимодействовать с образованием ковалентной связи с электрофильными группами линкерных молекул и линкерных реагентов, включая: (i) активные сложные эфиры, такие как сложные эфиры NHS, сложные эфиры HOBt, галогенформиаты и галогенангидриды; (ii) алкил и бензилгалогениды, такие как галогенацетамиды; (iii) альдегидные, кетоновые, карбоксильные и малеимидные группы. Определенные антитела несут межцепочечные дисульфиды, которые могут быть восстановленными, то есть цистеиновые мостики. Антитела можно сделать реакционноспособными для конъюгации с линкерными реагентами посредством обработки восстановителем, таким как DTT (реагент Кледанда, дитиотрентол) или TCEP (трис(2-карбоксиэтил) фосфингидрохлорид; Getz et al. (1999) Anal. Biochem. Vol 273:73-80; Soltec Ventures, Beverly, MA). Таким образом, каждый цистеиновый дисульфидный мостик теоретически будет образовать два реакционноспособных тиольных нуклеофила. Дополнительные нуклеофильные группы могут быть введены в антитела с помощью реакции лизинов с 2-иминотиоланом (реагент Траута), что приводит к преобразованию амино в тиол.

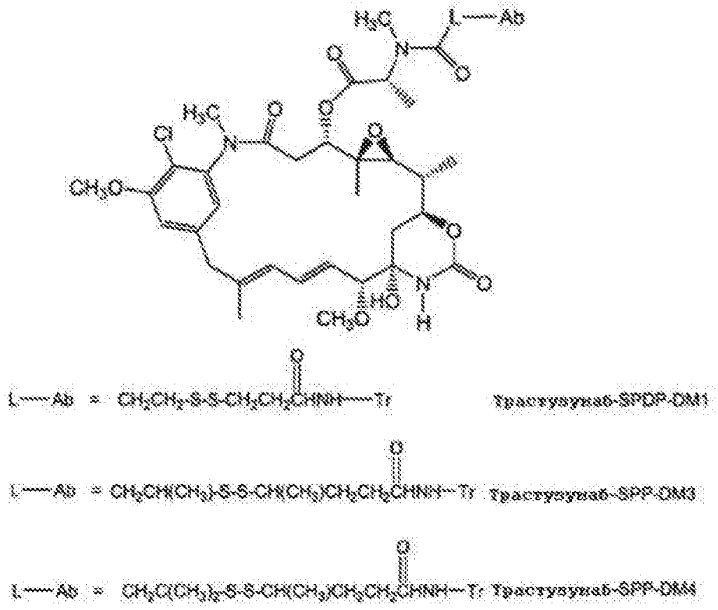
Конъюгаты антитело-лекарственное средство также можно получать посредством модификации антитела с введением электрофильных групп, которые могут реагировать с нуклеофильными заместителями на линкерном реагенте или лекарственном средстве. На гликозилированных антителах можно окислять сахара, например, с применением окисляющих реагентов периодатов, с образованием альдегидных или кетоновых групп, которые могут реагировать с аминогруппой линкерных реагентов или молекул лекарственного средства. Полученные иминовые группы оснований Шиффа могут образовать стабильную связь или их можно восстанавливать, например, борогидридными реагентами с образованием стабильных аминных связей. В одном из вариантов осуществления реакция углеводной части гликозилированного антитела с галактозоксидазой или метапериодатом натрия может приводить к образованию в белке карбонильных (альдегидной или кетоновой) групп, которые могут взаимодействовать с подходящей группой на лекарственном средстве (Hermanson, G.T. (1996) *Bioconjugate Techniques*; Academic Press: New York, p.234-242). В другом варианте осуществления белки, содержащие N-концевые остатки серина или треонина, могут реагировать с метапериодатом натрия, что приводит к образованию альдегида вместо первой аминокислоты (Geoghegan & Stroh, (1992) Bioconjugate Chem. 3:138-146; патент США № 5362852). Такой альдегид может взаимодействовать с молекулой лекарственного средства или линкерным нуклеофилом.

Подобным образом нуклеофильные группы молекулы лекарственного средства включают в качестве неограничивающих примеров: аминогруппу, тиольную, гидроксильную, гидразидную, оксимную, гидразиновую, тиосемикарбазоновую, гидразинкарбоксилатную и арилгидразидную группы, способные к взаимодействию с образованием ковалентных связей с электрофильными группами на линкерных молекулах и линкерных реагентах, включающими: (i) активные сложные эфиры, такие как сложные эфиры NHS, сложные эфиры HOBt, галогенформиаты и галогенангидриды; (ii) алкил- и бензилгалогениды, такие как галогенацетамиды; (iii) альдегидные, кетоновые, карбоксильные и малеимидные группы.

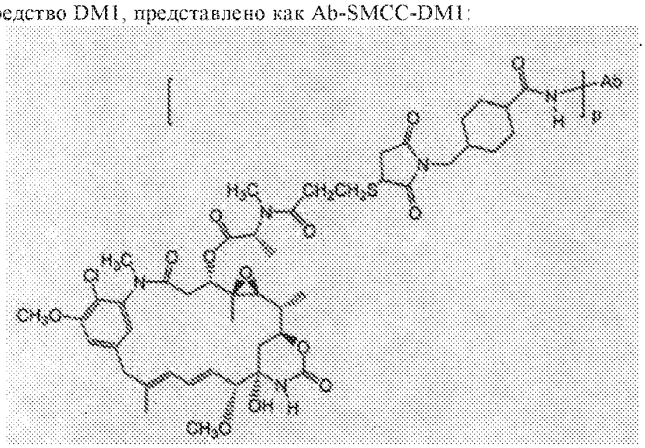
Например, майтаназин можно преобразовывать в May-SSCH$_3$, который может быть восстановлен до свободного тиола, May-SH, и взаимодействовать с модифицированным антителом (Chari et al. (1992) Cancer Research 52:127-131) с получением иммуноконъюгата майтаназоидное средство-антитело с дисульфидным

линкером. Конъюгаты антитело-майтаназоидное средство с дисульфидными линкерами описаны (WO 04/016801; патент США № 6884874; патент США № 2004/039176 A1; WO 03/068144; патент США № 2004/001838 A1; патент США № 6441163; патент США № 5208020; патент США № 5416064; WO 01/024763). Дисульфидный линкер SPP состоит из линкерного реагента N-сукцинимидил 4-(2-пиридилтио)пентаноата. Конъюгаты антитело-SPP-DM1 представлены структурой:

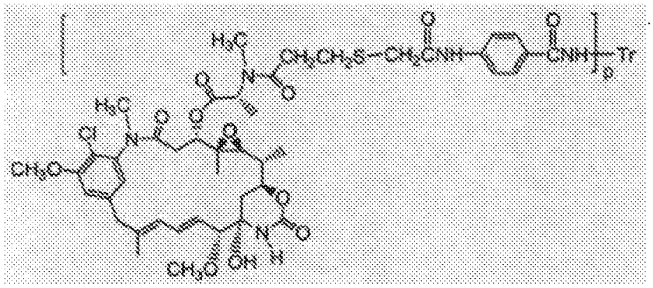
Конъюгаты антитело-лекарственное средство с дисульфидными (S-S) линкерами тестировали для сравнения с ADC без дисульфидных линкеров по изобретению. Трастузумаб-SPP-DM1 получали в соответствии с примером 3 (Ranson, M. and Sliwkowski M. (2002) Oncology 63 (suppl 1):17-24). Также тестировали дисульфидные конъюгаты антитело-лекарственное средство: трастузумаб-SPDP-DM1, трастузумаб-SPP-DM3 и трастузумаб-SPP-DM4, и они имеют ниже приведенные структуры:



ADC по изобретению включают линкеры SMCC, а майтаназоидное лекарственное средство DM1, представлено как Ab-SMCC-DM1:



В одном из вариантов осуществления Ab-SMCC-DM1 представляет собой трастузумаб-SMCC-DM1, где p равно 1, 2, 3 или 4 (Ab=трастузумаб, Tr, WO 2005/037992). В другом варианте осуществления ADC представляет собой трастузумаб-SIAB-DM1 (трастузумаб=Tr) со структурой:



СКРИНИНГ НА КОНЪЮГАТЫ АНТИТЕЛО-ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО (ADC), ПРОТИВ АНТИГЕНОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С ОПУХОЛЯМИ, И РЕЦЕПТОРОВ КЛЕТОЧНОЙ ПОВЕРХНОСТИ

Для скрининга конъюгатов антитело-лекарственное средство (ADC), которые, вероятно, могут использоваться в качестве профилактических или терапевтических средств для лечения заболеваний или нарушений со сверхэкспрессией антигенов, ассоциированных с опухолями, и рецепторов на клеточной поверхности, например HER2, особенно удобно использовать трансгенных животных и клеточные линии (патент США № 6632979). Скрининг на подходящие ADC может включать в себя введение трансгенному животному ADC-кандидата в диапазоне доз и определение в различные моменты времени воздействие ADC на оцениваемое заболевание или нарушение. Альтернативно или дополнительно, если возможно, лекарственное средство можно вводить до воздействия средства, индуцирующего заболевание, или одновременно с ним. ADC-кандидат можно скринировать серийно или индивидуально или одновременно в условиях средне- или высокопроизводительного скрининга. Скорость, с которой ADC можно скринировать на эффективность для профилактического или терапевтического лечения заболеваний или нарушений, ограничена только скоростью синтеза и методологией скринирования, включая детекцию/измерение/анализ данных.

Один из вариантов осуществления относится к способу скринирования, который включает (a) трансплантацию клеток стабильной клеточной линии рака молочной железы животному, не являющемуся человеком, (b) введение животному, не являющемуся человеком вероятного лекарственного средства ADC и (c) определение его способности ингибировать образование опухолей из трансплантированной клеточной линии. Изобретение также относится к способу скрининга ADC-кандидатов на способность оказывать лечебный эффект на заболевание или нарушение, отличающееся сверхэкспрессией рецепторного белка, включающему (a) контактирование клеток стабильной клеточной линии рака молочной железы с возможным лекарственным средством и (b) оценку способности ADC-кандидата ингибировать рост стабильной клеточной линии.

Один из вариантов осуществления относится к способу скрининга, который включает (a) контактирование клеток стабильной клеточной линии рака молочной железы с вероятным лекарственным средством ADC и (b) оценку способности ADC-кандидата блокировать активацию HER2 лигандом. В другом варианте осуществления оценивали способность ADC-кандидата блокировать связывание херегулина. В другом варианте осуществления оценивали способность ADC-кандидата блокировать стимулируемое лигандом фосфорилирование тирозина.

Другой вариант осуществления представляет собой способ скрининга, включающий (a) контактирование клеток стабильной клеточной линии рака молочной железы с вероятным лекарственным средством ADC и (b) оценку способности ADC-кандидата индуцировать гибель клеток. В одном из вариантов осуществления оценивали способность ADC-кандидата индуцировать апоптоз.

Другой вариант осуществления относится к способу скрининга, который включает (a) введение вероятного лекарственного средства ADC трансгенному не являющемуся человеком млекопитающему со сверхэкспрессией, например, клетками молочной железы, природного белка человека, например HER2 или его фрагмента, где такое трансгенное животное несет стабильно интегрированную в его геном последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующей природный белок человека или его фрагмент, с биологической активностью природного белка человека, функционально связанную с последовательностями, регулирующими транскрипцию, которые регулируют его экспрессию, и у которого развивается опухоль, например опухоль молочной железы, лечение антителами которой не эффективно или слабо эффективно, например, лечение антителом против HER2, или введение млекопитающему, не являющемуся человеком, с опухолью, трансплантированной от указанного трансгенного млекопитающего, не являющегося человеком; и (b) оценку

эффекта ADC-кандидата в отношении исследуемого заболевания или нарушения. Без ограничений заболевание или нарушение может представлять собой рак со сверхэкспрессирующей HER2, такой как рак молочной железы яичника, желудка, эндометрия, слюнной железы, легкого, почки, толстой кишки, щитовидной железы, поджелудочной железы или мочевого пузыря. Раком может быть рак молочной железы, экспрессирующий HER2 по меньшей мере в количестве приблизительно 500000 копий на клетку или по меньшей мере приблизительно 2000000 копий на клетку. Например, вероятное лекарственное средство ADC можно оценивать по способности индуцировать клеточную гибель и/или апоптоз, используя способы, хорошо известные в данной области и описанные в данном документе далее.

В одном из вариантов осуществления ADC-кандидат скринируют, вводя его трансгенному животному в различном диапазоне доз и оценивая физиологический ответ животного на соединения в динамике по времени. Введение может быть пероральным или посредством подходящей инъекции в зависимости от химической природы оцениваемого соединения. В некоторых случаях подходящим может быть введение соединения в сочетании с кофакторами, которые могли бы увеличить эффективность соединения. Если для скрининга соединения, которое может быть эффективно для лечения различных заболеваний, связанных со сверхэкспрессией определенных ассоциированных с опухолями антигенных белков или рецепторов клеточной поверхности, например со сверхэкспрессией HER2, применяют клеточные линии, полученные от исследуемых трансгенных животных, то тестируемые соединения в течение соответствующего времени добавляют к клеточной культуральной среде, и оценивают клеточный ответ на соединение в динамике по времени, используя соответствующие биохимические и/или гистологические способы анализа. В некоторых случаях подходящим может быть введение представляющего интерес соединения в культуральную среду в сочетании с кофакторами, которые могли бы увеличить эффективность соединения.

Таким образом, настоящее изобретение относится к способам идентификации ADC, специфической мишенью которых является сверхэкспрессированный белок HER2 и которые связывают этот белок, присутствие которого коррелирует с патологической функцией клеток и играет роль в патогенезе клеточной пролиферации и/или дифференцировке молочной железы, что является причиной развития рака молочной железы.

Для идентификации ADC, блокирующих активацию лигандов рецептора ErbB (например, ErbB2), можно определять способность соединения блокировать связывание лиганда ErbB с клетками, экспрессирующими рецептор ErbB (ErbB2) (например, в сочетании с другим рецептором ErbB, с которым представляющий интерес рецептор ErbB образует гетероолигомер ErbB). Например, клетки, выделенные из трансгенного животного, сверхэкспрессирующие HER2 и трансфицированные с тем, чтобы экспрессировать ещё один рецептор ErbB (с которым HER2 образует гетероолигомер), можно инкубировать, то есть культивировать, с ADC, а затем подвергать воздействию меченого лиганда ErbB. Затем можно оценивать способность соединения блокировать связывание лиганда с рецептором ErbB в гетероолигомере ErbB.

Например, ингибирующая активность ADC-кандидата в отношении связывания херегулина (HRG) с клеточными линиями рака молочной железы, сверхэкспрессирующими HER2 и полученными в данном документе из млекопитающих, не являющихся человеком (например, мышей), можно проводить с помощью монослойных культур на льду в 24-луночном планшете. Моноклональные антитела против ErbB2 добавляют к каждой лунке и инкубируют в течение 30 минут. Затем добавляют меченный ^{125}I rHRGβ1$_{177-224}$ (25000 имп./мин) и инкубацию продолжают в течение от 4 до 16 часов. Получают кривые доза-ответ и для представляющего интерес соединения рассчитывают значение IC_{50}.

Альтернативно или дополнительно, можно оценивать способность ADC блокировать лиганд-стимулируемое фосфорилирование тирозина рецептора ErbB, находящегося в гетероолигомере ErbB. Например, клеточные линии, полученные из трансгенных животных, как описано в данном документе, можно инкубировать с тестируемым ADC и затем оценивать на активность лиганд-зависимого фосфорилирования тирозина ErbB с применением моноклонального антитела против фосфотирозина (которое, необязательно, конъюгировано с визуализируемой меткой). Также для определения активации рецептора ErbB и блокирования этой активности соединением можно использовать анализ активации киназного рецептора, описанный в патенте США № 5766863.

В одном из вариантов осуществления можно проводить скрининг на ADC, который ингибирует стимуляцию фосфорилирования тирозина p180 в клетках MCF7 с помощью HRG, по существу, так, как описано ниже. Например, клеточную линию,

полученную от трансгенного по HER2 животного, помещают в 24-луночные планшеты и к каждой лунке добавляют соединение и инкубируют 30 минут при комнатной температуре; затем к каждой лунке добавляют $rHRG\beta1_{177-244}$ в конечной концентрации 0,2 нМ и инкубацию продолжают в течение приблизительно 8 минут. Из каждой лунки отсасывают среду и реакцию останавливают, добавляя 100 мкл буфера для образцов с SDS (5% SDS, 25 мМ DTT, и 25 мМ Tris-HCl, pH 6,8). Каждый образец (25 мкл) подвергают электрофорезу на градиентном геле 4-12% (Novex) и затем электрофоретически переносят на поливинилидендифторидную мембрану. Получают иммуноблоты с антителами против фосфотирозина (при концентрации 1 мкг/мл) и посредством отражательной денситометрии количественно определяют интенсивность преобладающей реагирующей полосы с M_r=180000. Альтернативным способом оценки ингибирования фосфорилирования рецептора является анализ KIRA (активация киназного рецептора) (Sadick et al. (1998) Jour. of Pharm. and Biomed. Anal. 1-9). В качестве положительного контроля в этом анализе можно использовать некоторые из хорошо изученных моноклональных антител против HER2, которые, как известно, ингибируют стимуляцию фосфорилирования тирозина p180 посредством HRG,. Получают кривую доза-ответ для ингибирования стимуляции фосфорилирования тирозина p180 посредством HRG, определенную отражательной денситометрией и для представляющего интерес соединения рассчитывают IC_{50}.

Также можно оценивать ингибирующие рост эффекты тестируемого ADC на клеточные линии, полученные от трансгенного по HER2 животного (Schaefer et al. (1997) Oncogene 15:1385-1394). В соответствии с этим анализом клетки обрабатывают тестируемым соединением в различных концентрациях в течение 4 суток и окрашивают кристаллическим фиолетовым или окислительно-восстановительным красителем Alamar Blue. Инкубация с соединением показывает ингибирующий рост эффект на эту клеточную линию подобно воздействию, демонстрируемому моноклональным антителом 2C4 на клетки MDA-MB-175 (Schaefer et al., выше). В дополнительном варианте осуществления экзогенный HRG изменяет значительно данное ингибирование.

Для идентификации ингибирующих рост соединений ADC, которые специфически направлены против HER2, можно проводить скрининг на ADC, которое ингибирует рост сверхэкспрессирующих HER2 раковых клеток, полученных от трансгенных животных (патент США № 5677171). В соответствии с этим анализом сверхэкспрессирующие HER2 клетки растят в среде смеси F12 и DMEM 1:1, дополненной 10% эмбриональной телячьей сывороткой, глутамином и пенициллином со стрептомицином. Эти клетки в количестве 20000 клеток вносят в 35-мм чашку для клеточной культуры (2 мл/35 мм чашку) и добавляют тестируемое соединение в разных концентрациях. Через шесть суток с помощью электронного счетчика клеток COULTER™ подсчитывают количество клеток по сравнению с необработанными клетками. Те ADC, которые ингибируют клеточный рост приблизительно на 20-100% или приблизительно на 50-100% могут быть выбраны в качестве ингибирующих рост соединений.

Для отбора ADC, индуцирующих клеточную гибель, можно оценивать нарушение целостности мембраны, на что указывает, например, захват PI, трипанового синего или 7AAD, по сравнению с контролем. Для анализа захвата PI используют клетки, выделенные из ткани опухоли молочной железы трансгенного животного. В соответствии с этим анализом клетки культивируют в модифицированной Дульбекко среде Игла (D-MEM): F-12 Хама (50:50), дополненной 10% ЭТС, инактивированной нагреванием, (Hyclone) и 2 мМ L-глутамином. Таким образом, анализ проводят в отсутствие комплемента и иммунных эффекторных клеток. Клетки высевают при плотности 3×10^6 на чашку в 100 × 20 мм чашки и оставляют на ночь для прикрепления. Затем среду удаляют и заменяют на свежую среду или свежую среду, содержащую различные концентрации соединения. Клетки инкубируют в течение 3 суток. После каждой обработки монослои отмывают PBS и проводят трипсинизацию для открепления клеток. Затем клетки центрифугируют при 1200 об/мин в течение 5 минут при 4°C, осадок ресуспендируют в 3 мл охлажденного буфера, связывающего Ca^{2+} (10 мМ Hepes, pH 7,4, 140 мМ NaCl, 2,5 мМ $CaCl_2$) и отбирают аликвоты в покрытые 35 мм фильтром 12 × 75 мм пробирки (1 мл на пробирку, 3 пробирки на обработанную группу) для удаления клеточных скоплений. Затем в пробирки вносят PI (10 мкг/мл). Затем образцы анализируют с помощью проточного цитометра FACSCAN™ и программного обеспечения FACSCONVERT™ CellQuest (Becton Dickinson). Те соединения, которые индуцируют статистически значимые уровни клеточной гибели, которые определяют посредством захвата PI, отбирают в качестве индуцирующих клеточную гибель соединений.

Для отбора соединений, индуцирующих апоптоз, проводят анализ связывания аннексина с применением клеток, полученных из ткани опухоли молочной железы

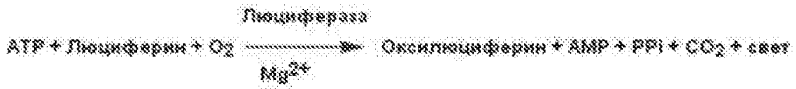
трансгенного животного. Клетки культивируют и высевают в чашки, как описано в предыдущем параграфе. Затем среду удаляют и заменяют на свежую среду или среду, содержащую 10 мкг/мл конъюгата антитело-лекарственное средство (ADC). После инкубации в течение трех суток монослои отмывают PBS и проводят трипсинизацию. Для открепления клеток затем клетки центрифугируют и ресуспендируют в связывающем Ca^{2+} буфере и отбирают аликвоты в пробирки, как описано выше для анализа клеточной гибели. Затем в пробирки добавляют меченный аннексин (например, аннексин V-FITC) (1 мкг/мл). Затем образцы анализируют с помощью проточного цитометра FACSCAN™ и программного обеспечения FACSCONVERT™ CellQuest (Becton Dickinson). Те соединения, которые индуцируют статистически значимые уровни связывания аннексина по сравнению с контролем, выбирают в качестве индуцирующих апоптоз соединений.

АНАЛИЗЫ ПРОЛИФЕРАЦИИ КЛЕТОК *IN VITRO*

Как правило, цитотоксическую или цитостатическую активность конъюгата антитело-лекарственное средство (ADC) измеряют следующим образом: на клетки млекопитающих с антигенами, ассоциированными с опухолями, или с рецепторными белками воздействуют антителом ADC в клеточной культуральной среде; культивируют клетки в течение приблизительно от 6 часов до приблизительно 5 суток; измеряют жизнеспособность клеток. Клеточные анализы *in vitro* применяют для измерения жизнеспособности, то есть пролиферации (IC_{50}), цитотоксичности (EC_{50}) и индукции апоптоза (активация каспазы) ADC.

Эффективность конъюгатов антитело-лекарственное средство *in vitro* измеряли с помощью анализа пролиферации клеток (фиг. 1-4). Анализ CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay представляет собой коммерчески доступный (Promega Corp., Madison, WI) способ гомогенного анализа на основе рекомбинантной экспрессии люциферазы *Coleoptera* (патент США № 5583024; патент США № 5674713; патент США № 5700670). В этом анализе пролиферации клеток определяют количество живых клеток в культуре на основании количественного определения присутствующей АТФ, индикатора метаболически активных клеток (Crouch et al. (1993) J. Immunol. Meth. 160:81-88; патент США № 6602677). Анализ CellTiter-Glo® Assay проводили в 96-луночном планшете, изменяя его для автоматизированного высокопроизводительного скрининга (HTS) (Cree et al. (1995) AntiCancer Drugs 6:398-404). Процедура гомогенного анализа включает добавление одного реагента (CellTiter-Glo® Reagent) непосредственно к клеткам, культивируемым в среде, дополненной сывороткой. Отмывка клеток, удаление среды и ряд стадий пипетирования не требуется. Система обнаруживает минимально 15 клеток/лунку в 384-луночном планшете через 10 минут после добавления реагента и смешивания.

Гомогенная форма «добавление-смешивание-измерение» приводит к лизису клеток и генерации люминесцентного сигнала, пропорционального количеству присутствующей АТФ. Количество АТФ прямо пропорционально количеству присутствующих в культуре клеток. В анализе CellTiter-Glo® Assay при люциферазной реакции образуется люминесцентный сигнал «типа свечения», который обладает временем полужизни, как правило, более пяти часов в зависимости от типа клеток и используемой среды. Живые клетки выражают в относительных люминесцентных единицах (RLU). Субстрат, люциферин жука, подвергают окислительному декарбоксилированию посредством рекомбинантной люциферазы светляка, что сопровождается преобразованием АТФ в АМФ и образованием фотонов. Повышенное время полужизни устраняет необходимость в использовании инъекторов реагента и обеспечивает гибкость в отношении непрерывного или группового способа обработки нескольких планшетов. Этот анализ пролиферации клеток можно использовать в различных многолуночных форматах, например 96- или 384-луночном формате. Данные можно записывать посредством люминометра или устройства получения изображений с камерой CCD. Результат люминесценции представляют в виде относительных световых единиц (RLU), измеренных в течение времени.



Антипролиферативные эффекты трех конъюгатов антитело-лекарственное средство измеряли с помощью клеточной пролиферации, указанного выше анализа гибели клеток *in vitro* относительно четырех различных клеточных линий опухоли молочной железы (фиг.1-4). На фиг.1 показаны измерения результативности при увеличивающихся концентрациях трастузумаба-SPP-DM1, трастузумаба-SPDP-DM1 и трастузумаба-SMCC-DM1 через 3 суток обработки клеток опухоли молочной железы SK-BR-3 (HER2 3+). На фиг.2 показаны измерения результативности при

увеличивающихся концентрациях трастузумаба-SPP-DM1, трастузумаба-SPDP-DM1 и трастузумаба-SMCC-DM1 через 3 суток обработки клеток опухоли молочной железы BT-474 (HER2 3+). На фиг.3 показаны измерения результативности при увеличивающихся концентрациях трастузумаба-SPP-DM1, трастузумаба-SPDP-DM1 и трастузумаба-SMCC-DM1 через 3 суток обработки клеток опухоли молочной железы MCF7 (низкое содержание HER2). На фиг.4 показаны измерения результативности при увеличивающихся концентрациях трастузумаба-SPP-DM1, трастузумаба-SPDP-DM1 и трастузумаба-SMCC-DM1 через 3 суток обработки клеток опухоли молочной железы MDA-MB-468 (отсутствие HER2).

Значения IC_{50} определяли для SK-BR-3 и BT-474, которые, как известно, сверхэкспрессируют белок рецептора HER2. Большинство конъюгатов трастузумаб-SPP-DM1 с 2,8 DM1 на молекулу трастузумаба (лекарственное средство/Ab) давало среднее значение IC_{50} в размере 14,4 мкг/мл с интервалом от 9,1 до 22,3 мкг/мл для 6 экспериментов по сравнению с клетками SK-BR-3, и среднее значение IC_{50} в размере 51,7 мкг/мл с интервалом от 28,7 до 63,1 мкг/мл для 4 экспериментов по сравнению с клетками BT-474. Большинство конъюгатов трастузумаб-SMCC-DM1 с 2,7 DM1 на молекулу трастузумаба (лекарственное средство/Ab) давало среднее значение IC_{50} в размере 15,2 мкг/мл с интервалом от 12,6 до 18,8 мкг/мл для 4 экспериментов по сравнению с клетками SK-BR-3 и среднее значение IC_{50} в размере 94,9 мкг/мл с интервалом от 75,2 до 114,6 мкг/мл для 2 экспериментов по сравнению с клетками BT-474. Конъюгаты были неактивны в отношении клеток MCF7 и MDA-MB-468, у которых отсутствует сверхэкспрессия HER2.

Конъюгат антитела против CD19-SMCC-DM1 продемонстрировал эффективное уничтожение клеток *in vitro* в отношении клеток Raji (IC_{50}=<0,25 мкг/мл), при этом "голое" антитело и контрольный ADC, трастузумаб-SMCC-DM1, не показали эффекта. Конъюгаты антитела против CD79a-SMCC-DM1 и антитела к CD79b-SMCC-DM1 продемонстрировали эффективное уничтожение клеток *in vitro* в отношении клеток Ramos (IC_{50}=<0,25 мкг/мл), при этом "голое" антитело и контрольный ADC, трастузумаб-SMCC-DM1 не показало эффекта.

На фиг.17 показан анализ пролиферации клеток *in vitro* (пример 5) с клетками HT1080EphB2 (C8), обработанными конъюгатами антитела против EphB2R 2H9-лекарственное средство: 2H9-SPP-DM1 (IC_{50} 80 нг/мл) и 2H9-SMCC-DM1 (IC_{50} 50 нг/мл).

СЫВОРОТОЧНЫЙ КЛИРЕНС И СТАБИЛЬНОСТЬ У МЫШЕЙ *IN VIVO*

Сывороточный клиренс и стабильность ADC исследовали у "голых" мышей без воздействия (без опухолей, привнесенных посредством экзогенных трансплантатов). На фиг.5 показан сывороточный клиренс трастузумаба-SMCC-DM1 по сравнению с трастузумабом-SPP-DM1 у "голых" мышей с врожденным отсутствием NK-клеток без опухолей, с измерением сывороточной концентрации конъюгата и общего антитела в шести временных точках в течение 7 суток. Различие в количестве общего антитела и ADC указывает на расщепление линкера и отделение антитела от его части DM1. Как показано, SMCC-связанный ADC оставались интактными *in vivo* более длительный срок, чем связанные SPP конъюгаты, на что указывает более высокая сывороточная концентрация конъюгированного антитела через семь суток.

На фиг.6 показана стабильность конъюгатов в динамике по времени у «голых» мышей без опухолей: трастузумаб-SPDP-DM1, трастузумаб-SPP-DM1, трастузумаб-SPP-DM3, трастузумаб-SPP-DM4 и трастузумаб-SMCC-DM1, с измерением сывороточной концентрации в шести временных точках в течение 7 суток. ADC с линкером SMCC были более стабильны *in vivo*, чем конъюгаты, связанные SPP или SPDP, хотя трастузумаб-SMCC-DM1 обладал сходной стабильностью, как и наиболее защищенный дисульфидный конъюгат, трастузумаб-SPP-DM4.

Показанные на фиг.5 и 6 эксперименты проводили на «голых» мышах без опухолей. Однако связанные SMCC конъюгаты у «голых» мышей с опухолями показали сходную увеличенную стабильность по сравнению со SPP-связанными конъюгатами. Как показано на фиг.7, в виде конъюгата оставалось приблизительно 72% исходного трастузумаб-SMCC-DM1 через 7 суток после обработки, тогда как ~10% исходного трастузумаб-SPP-DM1 оставались в виде конъюгата через 7 суток после обработки, что демонстрирует повышенную стабильность ферментативно не расщепляемых конъюгатов трастузумаб-SMCC-DM1 у «голых» мышей с опухолями.

СЫВОРОТОЧНЫЙ КЛИРЕНС И СТАБИЛЬНОСТЬ У КРЫС *IN VIVO*

На фиг.8 и 9 показана сравнительная стабильность и профили клиренса ADC с дисульфидным линкером (трастузумаб-SPP-DM1 и ADC с линкером, не являющимся дисульфидным (трастузумаб-SMCC-DM1) у крыс. Параметры исследования включали в себя:

Таблица

OnCusp
Ex. 1002

Параметр	трастузумаб-SPP-DM1	трастузумаб-SMCC-DM1
Vd (мл/кг)	41	41
Клиренс (мл/сутки/кг)	52	15
T S альфа	0,09	0,15
T S бета	0,7	0,85
T S гамма (суток)	2,6	5,5

ADC с линкером, не являющимся дисульфидным, трастузумаб-SMCC-DM1 (фиг.9) продемонстрировал лучшую стабильность в сыворотке крыс, чем ADC с дисульфидным линкером, трастузумаб-SPP-DM1 (фиг.8).

ЭФФЕКТИВНОСТЬ *IN VIVO*

Эффективность конъюгатов антитело-лекарственное средство по изобретению можно измерять *in vivo*, пересаживая аллотрансплантаты или ксенотрансплантаты из клеток злокачественных опухолей у грызунов и обрабатывая опухоли ADC. Результаты различались в зависимости от клеточной линии, специфичности связывания антитела ADC с рецепторами, присутствующими на раковых клетках, режима дозирования и других факторов. Эффективность *in vivo* ADC против HER2 измеряли посредством мышиной модели трансгенного эксплантата с высокой экспрессией HER2. Аллотрансплантат происходил от трансгенной мыши Fo5 mmtv, терапия герцептином которой была неэффективной или слабоэффективной. Субъектам однократно вводили ADC и проводили наблюдение в течение 3-6 недель для измерения времени удвоения опухоли, логарифма клеточной гибели и уменьшения опухоли. Последовательно проводили эксперименты доза-ответ и множественного дозирования.

Опухоли легко возникают у трансгенных мышей, экспрессирующих форму neu, активированную мутациями, гомолог HER2 крысы, но HER2, сверхэкспрессируемый при раке молочной железы, не является мутантным и образование опухоли у мышей, сверхэкспрессирующих немутантный HER2, менее устойчиво (Webster et al. (1994) Semin. Cancer Biol. 5:69-76).

Для улучшения образования опухоли с немутированным HER2, трансгенных мышей получали с помощью плазмиды с кДНК HER2, в которой был удален вышерасположенный ATG, находящийся в направлении 3'-5', для предотвращения трансляции с таких вышерасположенных кодонов ATG, которая могла бы уменьшить частоту инициации трансляции с аутентичных кодонов инициации HER2, расположенных в направлении 5'-3' (например, см. Child et al. (1999) J. Biol. Chem. 274: 24335-24341). Кроме того, на 5'-конце был добавлен химерный интрон, что также увеличивает уровень экспрессии, как было описано ранее (Neuberger and Williams (1988) Nucleic Acids Res. 16: 6713; Buchman and Berg (1988) Mol. Cell. Biol. 8:4395; Brinster et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:836). Химерный интрон получали из вектора Promega, экспрессирующего вектора млекопитающих pCI-neo (п.н. 890-1022). кДНК 3'-конца фланкировали экзонами человеческого гормона роста 4 и 5 и последовательностями полиаденилирования. Кроме того, использовали мышей FVB, так как эта линия более чувствительна к развитию опухолей. Для обеспечения тканеспецифической экспрессии HER2 в молочной железе использовали промотор MMTV-LTR. Для увеличения чувствительности к образованию опухолей млекопитающих держали на диете ATN 76A (Rao et al. (1997) Breast Cancer Res. and Treatment 45:149-158).

На фиг.10-13 показано, что ADC обладают сильной противоопухолевой активностью у аллотрансплантатах HER2-позитивных опухолей (Fo5), которые исходно возникали у трансгенных мышей MMTV-HER2. Только антитело (например, трастузумаб) в этой модели не обладало значимой противоопухолевой активностью (Erickson et al., патент США № 6632979). Как проиллюстрировано на фиг.10 и 11, рост опухолей при обработке ADC по сравнению с контрольным (носитель) уровнем роста замедлялся. Рост опухоли наиболее замедлялся при обработке конъюгатами трастузумаб-SMCC-DM1 и трастузумаб-SIAB-DM1. Как показано на фиг.10, 12 и 13, конъюгат трастузумаб-SMCC-DM1 больше замедлял рост опухоли, чем конъюгаты с линкерами SPP линкеры, то есть был более эффективным, что было измерено по времени удваивания опухолей у «голых» мышей или по логарифму гибели клеток, соответствующему показанным измерениям времени удваивания (фиг.13).

Эффективность *in vivo* ADC с антителом против CD22 измеряли на модели ксенотрансплантата опухоли мыши. Группам из восьми мышей SCID с 20 миллионами ксенотрансплантированных опухолевых клеток Bjab-luc (экспрессирующие люциферазу клетки BjaB) на мышь на 1-е сутки однократно вводили дозу (исключения отмечали) конъюгата антитело против CD22-лекарственное средство или "голого" антитела (пример 8).

Таблица

ADC или Ab	мкг DM1/м^2	Ab мг/ кг мыши	средняя нагрузка лекарственным средством (p)	MTD (сутки)
Tr-SMCC-DM1	200	4,2	3,2	3
7A2-SMCC-DM1	200	3,8	3,6	6
5E8-SMCC-DM1	200	3,8	3,6	10
RFB4-SMCC-DM1	200	3,2	4,25	18
RFB4-SMCC-DM1 (вводили 3X дозу на 1, 7, 14 сутки)	405	10	2,75	55
7A2	-	4	-	3
5E8	-	4	-	3
RFB4	-	4	-	3

Измеряли время удваивания размера опухоли (MTD, среднее время удваивания опухоли). Три "голых" антитела против CD22, по существу, продемонстрировали отсутствие эффективного действия по сравнению с неспецифически связанным ADC (трастузумаб-SMCC-DM1). Все соответствующие конъюгаты продемонстрировали эффект значительного замедления роста опухоли. Действие многократного введения дозы устанавливали с помощью RFB4-SMCC-DM1, где MTD для мышей с однократным введением дозы составляло 18 суток, тогда как MTD для мышей с трехкратным введением дозы, на 1, 7 и 14 сутки составляло 55 суток. Полное исчезновение опухоли происходило у всех 8 мышей в группе с трехкратным введением дозы. Другие конъюгаты антитело против CD22-SMCC-DM1, с антителами 12F7, 9A8, 8C9, 8G10, 3F11, 10D2, 6C9, 14D1 и 11H10, продемонстрировали уменьшение исходного объема опухоли или замедление роста опухоли относительно контроля (трастузумаб-SMCC-DM1) через 7 суток после введения первой дозы (400 мкг DM1/м^2) у мышей SCID с 20 миллионами ксенотрансплантированных опухолевых клеток Bjab-luc на мышь. Конъюгаты с антителом против CD22, RFB4-SMCC-DM1, 5E8-SMCC-DM1 и 7A2-SMCC-DM1 также были эффективны для замедления роста опухоли относительно контроля (трастузумаб-SMCC-DM1) через 11 суток после первой дозы (200 мкг DM1/м^2) у мышей SCID с 5 миллионами ксенотрансплантированных опухолевых клеток Ramos RA1 на мышь.

Конъюгат RFB4-SMCC-DM1 исследовали при трех различных нагрузках лекарственным средством в группах из десяти мышей с ксенотрансплантатами Bjab-luc (пример 8). Низко (1,95) и средне (3,7) нагруженные лекарственным средством конъюгаты продемонстрировали эффект значительного замедления опухолевого роста с MTD в размере приблизительно 15 суток. Высоко нагруженный (6,75) конъюгат не продемонстрировал эффект, значительно отличающийся от контрольного конъюгата GP120-SMCC-DM1 или "голого" антитела REB4.

Таблица

ADC с антителом к CD22 или Ab	мкг DM1/м^2	Ab мг/кг мыши	средняя нагрузка лекарственным средством (p)	MTD (сутки)
RFB4	-	10	-	3
RFB4-SMCC-DM1 (низко нагруженное)	144	5	1,95	15
RFB4-SMCC-DM1 (средне нагруженное)	273	5	3,7	15
RFB4-SMCC-DM1 (высоко нагруженное)	497	5	6,75	3
GP120-SMCC-DM1 (высоко нагруженное)	449	5	6,1	3

Конъюгаты антитело против CD19-SMCC-DM1 и антитело против CD22-SMCC-DM1 не продемонстрировали активности *in vivo* на модели ксенотрансплантата мышиной опухоли из клеток Raji. Другие конъюгаты с антителом против CD19 и антителом к CD22 могут обладать активностью *in vivo* для моделей опухолей с другими клетками злокачественных опухолей.

Эффективность ADC с антителом против CD79a (альфа) и антителом против CD79b (бета) *in vivo* измеряли на модели ксенотрансплантата мышиной опухоли. Группам из восьми мышей SCID с 20 миллионами ксенотрансплантированных опухолевых клеток Bjab-luc на мышь на 1-е сутки однократно вводили дозу образцов из таблицы ниже и после примера 8.

Таблица

ADC, Ab, или контроль	мкг DM1/м^2	Ab мг/кг мыши	средняя нагрузка лекарственным средством (p)	MTD (сутки)
PBS (контрольный буфер)	-	-	-	3,5
антитело против GP120	-	3,2	-	3,5
SN8 против CD79b	-	3,1	-	4
17A7 против CD79b	-	3,1	-	4
8H9 против CD79a	-	4,0	-	3
	200	3,2	4,2	3,5

антитело против GP120-SMCC-DM1				
SN8 против CD79b-SMCC-DM1	200	3,1	4,4	>7
17A7 против D79b-SMCC-DM1	200	3,1	4,4	>7
8H9 против D79a-SMCC-DM1	200	4,0	3,4	>7

Все конъюгаты SN8 против CD79b-SMCC-DM1, 17A7 против CD79b-SMCC-DM1 и 8H9 к CD79a-SMCC-DM1 продемонстрировали уменьшение исходного объема опухоли (среднее 160 мм^3) через 7 суток. В группах из 8 мышей конъюгат SN8 против CD79b-SMCC-DM1 приводил к частичной ремиссии (PR) у 4 животных и полной ремиссии (CR) у 2 животных. Конъюгат 17A7 против CD79b-SMCC-DM1 приводил к CR у 1 животного. Конъюгат 8H9 против CD79a-SMCC-DM1 приводил к PR у 2 животных и CR у 1 животного. Другие конъюгаты антитело против CD79b-SMCC-DM1, с антителами 2F2, 5C3, 7H7, 8D11, 15E4 и 16C11 продемонстрировали задержку роста опухоли или уменьшение исходного объема опухоли относительно контроля (трастузумаб-SMCC-DM1) через 8 суток после однократной дозы (192 мкг DM1/м^2) у мышей CB17 ICR SCID с 20 миллионами Bjab-luc ксенотрансплантированными опухолевыми клетками на мышь. У мышей, которым вводили антитело против CD79b-SMCC-DM1, измеряли влияние дозы на ответ. Группам из восьми мышей SCID с 20 миллионами ксенотрансплантированных опухолевых клеток Bjab-luc на мышь на сутки 1 вводили дозы образцов из таблицы ниже (пример 8). Антитело против CD79b-SMCC-DM1 вводили в дозе с уровнями 0,5, 2,0 и 3,64 мг Ab/кг мыши.

Таблица

ADC, Ab или контроль	мкг DM1/м^2	Ab мг/кг мыши	MTD (сутки)
Контрольный носитель (PBS)	-		4
Антитело к CD79b-SMCC-DM1	32	0,5	10
Антитело к CD79b-SMCC-DM1	130	2,0	35
Антитело к CD79b-SMCC-DM1	236	3,64	>70

Эффективность ADC с антителом против TENB2 *in vivo* измеряли на модели ксенотрансплантата мышиной опухоли. TENB2 представляет собой опухолевый антиген, для которого показано, что он почти исключительно экспрессируется в предстательной железе человека и сверхэкспрессируется в опухолях предстательной железы человека (Glynne-Jones et al. (2001) Int J Cancer. Oct 15;94(2):178-84). PC3-TVA-919cv1:5 представляет собой клеточную линию рака предстательной железы человека, экспрессирующую высокий уровень TENB2.

Таблица

ADC или контроль	мкг DM1/м^2	Ab мг/кг мыши	MTD при средней экспрессии (сутки)	MTD при высокой экспрессии (сутки)
PBS (контрольный носитель)	-	-	30	22
антитело против амброзии-SPP-DM1 мыши (отрицательный контроль)	373	6,68	18	22
антитело против амброзии-SMCC-DM1 мыши (отрицательный контроль)	373	9,34	14	18
антитело против TENB2:3146-SPP-DM1 мыши	373	7,34	58	35
антитело против TENB2:3146-SMCC-DM1 мыши	373	10,6	44	19
химерное антитело против TENB2-SPP-DM1	373	8,7	57	43
химерное антитело к TENB2-SMCC-DM1	373	7,63	43	22

Конъюгаты антитела против TENB2-DM1 мыши продемонстрировали противоопухолевое действие против опухолей PC3-TENB2 относительно отрицательного контроля и контрольного носителя. Конъюгат 10H1 против NaPi3b-SMCC-DM1 мыши не продемонстрировал действия против PC3-NaPi3b относительно отрицательного контроля и контрольного носителя. Другие варианты антител конъюгатов с антителами против NaPi3b могут обладать активностью *in vivo* против опухолей PC3-NaPi3b или клеточных линей других злокачественных опухолей.

ТОКСИЧНОСТЬ У КРЫС

Конъюгаты антитело-лекарственное средство и контроль без ADC, «носитель» оценивали на модели острой токсичности у крыс. Токсичность ADC исследовали с помощью обработки самок крыс Sprague-Dawley ADC и последующего наблюдения и анализа воздействий на различные органы. На основе наблюдений за общей массой (масса тела), клинических патологических параметров (химический состав сыворотки и гематология) и гистопатологии можно наблюдать токсичность ADC, характеризовать ее и измерять. Было обнаружено, что на уровнях эквивалентных доз трастузумаб-SMCC-DM1 вызывал меньшую острую токсичность, чем трастузумаб-SPP-DM1.

Клинический биохимический анализ, анализ сывороточных ферментов и гематологический анализ проводили на 3 и 5 сутки, завершая полным вскрытием трупа с гистопатологической оценкой. Показатели токсичности включали в себя клиническое наблюдение за потерей массы.

Полагают, что потеря массы или изменение массы у животных, получавших только носитель, у животных после введения дозы ADC, является видимым и общим индикатором системной и локальной токсичности. На фиг.14 показано изменение массы тела (в граммах) в течение 5 суток. У крыс, получавших дисульфидный ADC, трастузумаб-SPP-DM1, показана заметная, зависимая от дозы токсичность, выявляемая по летальности при более высокой дозе и снижению массы тела при более низкой дозе. В отличие от этого у крыс, получающих трастузумаб-SMCC-DM1, масса увеличилась при том, что у крыс, получавших меньшую дозу, наблюдали отсутствие снижения в скорости увеличения массы относительно получавших плацебо в виде носителя крыс. У крыс, получавших высокие дозы трастузумаб-SMCC-DM1, также происходило уменьшение массы по сравнению с введением свободного цитотоксина DM1

Гепатотоксичность измеряли по увеличенным уровням печеночных ферментов, увеличенному количеству фигур митоза или апоптоза и некрозу гепатоцитов. Гематолимфоидную токсичность наблюдали по уменьшению лейкоцитов, первичных гранулоцитов (нейтрофилов) и/или тромбоцитов и по вовлечению лимфоидных органов, то есть атрофии или апоптотической активности. Токсичность также регистрировали по очагам повреждения желудочно-кишечного тракта, таким как увеличенные количества фигур митоза и фигур апоптоза, и дегенеративному энтероколиту.

Исследуемые ферменты, указывающие на повреждение печени, включают:

AST (аспартатаминотрансферазу)

- Локализация: цитоплазма; печень, сердце, мышцы скелета, почки
- Отношение печень:плазма составляет 7000:1
- T1/2: 17 часов

ALT (аланинаминотрансфераза)

- Локализация: цитоплазма; печень, почки, сердце, мышцы скелета
- Отношение печень:плазма составляет 3000:1
- T1/2: 42 часа; суточное изменение

GGT (g-глутамилтрансфераза)

- Локализация: плазматическая мембрана клеток с высокой секреторной и всасывающей способностью; печень, почки, кишечники
- Слабый показатель повреждения печени; обычно увеличен при нарушениях желчного протока.

Ни один из трех ферментов, измеряемых выше, не является специфичным для печени. Обнаружено, что ADC по настоящему изобретению вызывают временное, умеренное увеличение печеночных ферментов ALT и AST, с временной ретикулоцитопенией (фиг.15). Значимых воздействий на гранулоциты или тромбоциты периферической крови не наблюдали (фиг.16).

На фиг.15 и 16 показано, что у крыс, которым вводили 22,3 мг/кг трастузумаба-SPP-DM1, (группа 2) наблюдали наиболее тяжелую клиническую токсичность в течение этих пяти суток исследования острой токсичности. У этих животных выявляли наиболее значительную потерю массы тела, увеличение в тестах функции печени, лейко- и тромбоцитопению и морфологические доказательства токсичности в отношении гематолимфоидных тканей. Степень токсичности была сходной со степенью токсичности, наблюдаемой в предыдущих исследованиях с применением дозы 25 мг/кг. В отличие от этого животные в группах 3 и 4, получавшие трастузумаб-SMCC-DM1 при 10 и 25 мг/кг, соответственно, не отличались от животных, которым вводили носитель, на основании данных клинической патологии и массы тела. Морфологически у этих животных наблюдали умеренно увеличенное количество фигур митоза в печени, однако периферические лимфоидные и гематопоэтические ткани находились в нормальных пределах.

Животные из группы 5, получавшие 50 мг/кг трастузумаба-SMCC-DM1, продемонстрировали признаки токсичности. Однако за исключением одного теста функции печени (ALT), острота токсичности была ниже, чем у животных получавших 50% от дозы того же лекарственного средства в виде трастузумаба-SPP-DM1 (группа 2). Приблизительно при той же дозе трастузумаб-SMCC-DM1 (группа 4, 22,3 мг/кг) продемонстрировал приблизительно 25% от уровня трастузумаба-SPP-DM1 (группа 2, 25 мг/кг). На сутки 5 этого исследования, у животных группы 5 наблюдали увеличение массы тела (после временной потери в течение суток 3 и 4), уменьшение сывороточного билирубина и повышение количества тромбоцитов (фиг.15).

OnCusp
Ex. 1002

Животные, получавшие свободное майтаназоидное средство DM1 (группа 6), продемонстрировали такой же профиль токсичности, что и животные, получавшие конъюгаты трастузумаба. Эта доза свободного DM1 соответствовала такому количеству вводимого лекарственного средства как доза 10 мг/кг трастузумаба-SPP-DM1 в предыдущих исследованиях. Степень токсичности у животных группы 6 была меньше, чем наблюдали у животных в группе 2, но больше, чем у животных, наблюдавшихся ранее, получавших 10 мг/кг трастузумаба-SPP-DM1. Восстановление происходило довольно быстро: у животных, получавших свободный майтаназин, на срезах селезенки были видны увеличенные количества незрелых гематопоэтических элементов; также было показано, что параметры LFT и клинические гематологические параметры нормализовались у животных в группе 6 на 5 сутки.

ТОКСИЧНОСТЬ/БЕЗОПАСНОСТЬ У ДЛИННОХВОСТЫХ МАКАК

Можно оценивать токсичность и безопасность ADC может быть оценена при введении длиннохвостым макакам. Исследование токсичности/безопасности конъюгата антитело-лекарственное средство, трастузумаб-SMCC-DM1, проводили на длиннохвостых макаках. Для оценки токсичности трастузумаба-SMCC-DM1, вводимого внутривенной инъекцией в увеличивающихся дозах, относительно контроля (носитель) исследовали три группы обезьян. Группе 1 (4 субъекта) вводили только носитель (PBS, pH 6,5, то есть состав без ADC) на 1 сутки и 22 сутки, с последующим вскрытием на 36 сутки. Группе 2 (4 субъекта) вводили трастузумаб-SMCC-DM1 4900 мкг/м^2 на 1-е сутки и 22 сутки. Группе 3 (4 субъекта) вводили трастузумаб-SMCC-DM1 при 7200 мкг/м^2 на 22 сутки.

Делали заключение о гепатотоксичности при измерении повышенных уровней печеночных ферментов из исследования токсичности у крыс. Длиннохвостым обезьянам вводили носитель (группа 1) и трастузумаб-SMCC-DM1 (группа 2: 4900 мкг/м^2; группа 3: 7200 мкг/м^2). У длиннохвостых обезьян, которым вводили трастузумаб-SMCC-DM1, измеряли печеночный фермент AST, количество тромбоцитов, белых клеток крови, общих нейтрофилов, красных клеток крови, ретикулоцитов и проводили сравнение 2 в/в режимов дозирования (пример 10).

ВВЕДЕНИЕ ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИХ СОСТАВОВ КОНЪЮГАТОВ АНТИТЕЛО-ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО

Терапевтические конъюгаты антитело-лекарственное средство (ADC) можно вводить любым способом, подходящим для состояния, на которое направлено лечение. Как правило, ADC вводят парентерально, то есть посредством инфузии, подкожной, внутримышечной, внутривенной, интрадермальной, интратекальной, болюсной, внутрипочечной инъекции или эпидурально (Shire et al. (2004) J. Pharm. Sciences 93(6):1390-1402). Фармацевтические композиции терапевтических конъюгатов антитело-лекарственное средство (ADC), как правило, получают для парентерального введения с фармацевтически приемлемым парентеральным носителем и в стандартной лекарственной форме для инъекции. Конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC) с желаемой степенью чистоты, необязательно, смешивают с фармацевтически приемлемыми разбавителями, носителями, эксципиентами или стабилизаторами в форме лиофилизированного композиции или водного раствора (Remington's Pharmaceutical Sciences (1980) 16th edition, Osol, A. Ed.).

Приемлемые парентеральные наполнители, разбавители, носители, эксципиенты и стабилизаторы являются нетоксическими для реципиентов при применяемых дозах и концентрациях и включают буферы, такие как фосфат, цитрат и другие органические кислоты; антиоксиданты, включающие аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (такие как хлорид октадецилдиметилбензиламмония; хлорид гексония; хлорид бензалкония, хлорид бензетония; фенол, бутиловый и бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен; катехин; резорцин; циклогексанол; 3-пентанол и м-крезол); низкомолекулярные (менее чем приблизительно 10 остатков) полипептиды; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включающие глюкозу, маннозу или декстрины; хелаторы, такие как EDTA; сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит; образующие соли противоионы, такие как натрий; комплексные соединения металлов (например, комплекс Zn-белок); и/или неионные поверхностно-активные вещества, такие как TWEEN™, PLURONICS™ или полиэтиленгликоль (PEG). Например, составы лиофилизированного антитела к ErbB2 описаны в WO 97/04801, явно включенном в данный документ в качестве ссылки. Иллюстративный состав ADC, такого как трастузумаб-SMCC-DM1, содержит приблизительно 100 мг/мл трегалозы (2-(гидроксиметил)-6-[3,4,5-тригидрокси-6-(гидроксиметил)тетрагидропиран-2-ил]

OnCusp
Ex. 1002

окси-тетрагидропиран-3,4,5-триола; $C_{12}H_{22}O_{11}$; CAS Number 99-20-7) и приблизительно 0,1% TWEEN™ 20 (полисорбат 20; 2-[2-[3,4-бис(2-гидроксиэтокси) тетрагидрофуран-2-ил]-2-(2-гидроксиэтокси)этокси]этиловый эфир додекановой кислоты; $C_{26}H_{50}O_{10}$; CAS Number 9005-64-5) приблизительно при pH 6.

Фармацевтические композиции терапевтического конъюгата антитело-лекарственное средство (ADC) могут содержать определенные количества непрореагировавших молекул лекарственного средства (D), промежуточных продуктов антитело-линкер (Ab-L), и/или промежуточного соединения лекарственное средство-линкер (D-L), как результат неполной очистки и отделения от избытка реагентов, загрязнений и субпродуктов в процессе получения ADC; или временного/температурного гидролиза или деградации при хранении большого количества ADC или составленной композиции ADC. Например, в композиции ADC, трастузумаб-SMCC-DM1, может содержаться обнаруживаемое количество свободного лекарственное средство DM1. Альтернативно или кроме того, в нем может содержаться обнаруживаемое количество промежуточного соединения лекарственное средство-линкер, DM1-SMCC. Альтернативно или кроме того, в нем может содержаться обнаруживаемое количество антитела трастузумаб. Иллюстративный состав трастузумаба-SMCC-DM1 может содержать до 10% молярного эквивалента DM1-SMCC. Неожиданно в анализе клеточной пролиферации *in vitro* (пример 5) было определено, что DM1-SMCC (IC_{50} 0,05 мкм) приблизительно в 20 раз менее эффективен для уничтожения клеток, чем свободное лекарственное средство DM1 (IC_{50} 0,0045 мкм) в отношении клеток рака молочной железы SK-BR-3 и BT-474.

Активные фармацевтические ингредиенты также можно помещать в микрокапсулы, полученные, например, способами коацервации или межфазной полимеризации, например, гидроксиметилцеллюлозные или желатиновые микрокапсулы и поли(метилметацилатные) микрокапсулы, соответственно, в коллоидных системах доставки лекарственного средства (например, липосомы, микросферы альбумина, микроэмульсии, наночастицы и нанокапсулы) или в микроэмульсиях. Такие способы описаны в Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980).

Можно получать препараты с замедленным высвобождением. Подходящие примеры препаратов с замедленным высвобождением включают полупроницаемые матриксы твердых гидрофобных полимеров, содержащих ADC, где матрицы находятся в виде имеющих определенную форму продуктов, например в виде пленок или микрокапсул. Примеры матриксов с замедленным высвобождением включают сложные полиэфиры, гидрогели (например, поли(2-гидроксиэтил-метакрилат) или поли(виниловый спирт)), полилактиды (патент США № 3773919), сополимеры L-глутаминовой кислоты и гамма-этил-L-глутамата, недеградируемый этиленвинилацетат, деградируемые сополимеры молочной кислоты и гликолевой кислоты, такие как LUPRON DEPOT™ (инъецируемые микросферы, состоящие из сополимера молочной кислоты и гликолевой кислоты и ацетата лейпролида) и поли-D-(-)-3-гидроксимасляную кислоту.

Композиции для введения *in vivo* должны быть стерильными, что легко осуществляется фильтрацией через стерильные фильтрационные мембраны.

Композиции включают композиции, пригодные для указанных выше способов введения. Композиции удобно получать в виде стандартной лекарственной формы и их можно получать любым хорошо известным в области фармации способом. Способы и композиции, как правило, представлены в *Remington's Pharmaceutical Sciences* (Mack Publishing Co., Easton, PA). Такие способы включают стадию объединения активного ингредиента с носителем, который содержит одно или несколько дополнительных ингредиентов. В основном композиции получают посредством однородного и тесного объединения активного ингредиента с жидкими носителями или мелкоизмельченными твердыми носителями или с обоими, а затем, если необходимо, придания продукту формы.

Водные суспензии содержат активные вещества (ADC) в смеси с эксципиентами, пригодными для получения водных суспензий. Такие эксципиенты включают суспендирующее средство, такое как карбоксиметилцеллюлоза натрия, кроскармеллоза, повидон, метилцеллюлоза, гидроксипропилметилцеллюлоза, альгинат натрия, поливинилпирролидон, трагакантовую камедь и гуммиарабик, и диспергирующие или увлажняющие средства, такие как природные фосфолипиды (например, лецитин), продукт конденсации алкиленоксида с жирной кислотой (например, полиоксиэтиленстеарат), продукт конденсации этиленоксида с алифатическим спиртом с длинной цепью (например, гептадекаэтиленоксицетанол), продукт конденсации этиленоксида с неполным эфиром многоатомного спирта, полученным из житной кислоты и гекситангидрида (например, моноолеат

полиоксиэтиленсорбитана). Водные суспензии также могут содержать один или несколько консервантов, таких как этил- или н-пропил или п-гидроксибензоат, один или несколько красителей, одну или несколько вкусовых добавок и одно или несколько подслащивающих веществ, таких как сахароза или сахарин.

Фармацевтические композиции ADC могут находиться в форме стерильного препарата для инъекции, такого как стерильная водная или масляная суспензия для инъекции. Суспензию можно получать способами, известными в данной области, используя такие подходящие диспергирующие или увлажняющие средства и суспендирующие средства, которые указаны выше. Стерильный препарат для инъекции также может представлять собой стерильный раствор для инъекции или суспензию в нетоксическом приемлемом для парентерального приема разбавителе или растворителе, такой как раствор в 1,3-бутан-диоле, или может быть получен в виде лиофилизированного порошка. Приемлемые наполнители и растворители, которые можно применять, включают воду, раствор Рингера и изотонический раствор хлорида натрия. Кроме того, если удобно, в качестве растворителей или суспендирующей среды можно применять стерильные жирные масла. Для этой цели можно применять любое безвкусное жирное масло, включая синтетические моно- или диглицериды. Кроме того, для получения препаратов для инъекции аналогично можно использовать жирные кислоты, такие как олеиновая кислота.

Количество активного ингредиента, которое можно комбинировать с веществом носителя для получения стандартной лекарственной формы будет изменяться в зависимости от хозяина, лечение которого осуществляют, и конкретного способа введения. Например, для того чтобы инфузия подходящего объема могла происходить при скорости приблизительно 30 мл/ч, водный раствор, предназначенный для внутривенного введения, может содержать приблизительно от 3 до 500 мкг активного ингредиента на миллилитр раствора. Подкожное (болюсное) введение можно проводить приблизительно при общем объеме 1,5 мл или менее и концентрации ADC приблизительно 100 мг на мл. Для ADC, которые необходимо вводить часто и длительно, можно применять подкожный способ, такой как посредством предварительно заполненного шприца или технологии автоинжекторного устройства.

В качестве общей схемы начальное фармацевтически эффективное количество ADC, вводимое на дозу, находится в диапазоне приблизительно 0,01-100 мг/кг, а именно приблизительно от 0,1 до 20 мг/кг массы тела пациента в сутки с обычным исходным диапазоном применяемого соединения от 0,3 до 15 мг/кг/сутки. Например, больным людям сначала можно назначать дозу приблизительно 1,5 мг ADC на кг массы тела пациента. Дозу можно увеличивать до максимальной переносимой дозы (MTD). Схема введения может быть предусмотрена на каждые 3 недели, но в соответствии с диагностированным состоянием или ответом схема может предусматривать более или менее частое введение. Дозу в течение курса лечения можно дополнительно регулировать с тем, чтобы она была на уровне или ниже MTD, которую можно безопасно вводить в течение нескольких циклов, например приблизительно 4 или более.

Композиции, подходящие для парентерального введения, включают водные и неводные стерильные растворы для инъекций, которые могут содержать антиоксиданты, буферы, бактериостатики и растворенные вещества, которые делают состав изотоническим с кровью намеченного реципиента, и водные и неводные стерильные суспензии, которые могут содержать суспендирующие средства и загустители.

Хотя пероральное введение белковых терапевтических средств, как правило, не является предпочтительным ввиду плохой биодоступности из-за ограниченного всасывания, гидролиза или денатурации в кишечнике, можно получать составы ADC, пригодные для перорального введения, в виде дискретных единиц, таких как капсулы, саше или таблетки, где каждая содержит заранее определенное количество ADC.

Композиции можно помещать в однодозовые или многодозовые контейнеры, например запаянные ампулы или флаконы, и можно хранить в высушенном замораживанием (лиофилизированном) состоянии, для которого требуется лишь добавление стерильного жидкого носителя, например воды для инъекций, непосредственно перед использованием. Приготовленные для немедленного приема растворы и суспензии получают из стерильных порошков, гранул и таблеток, такого типа, как описан ранее. Характерные составы для однократного дозирования содержат суточную дозу активного ингредиента или поддозу суточной единицы, или ее соответствующую часть.

Изобретение дополнительно относится к ветеринарным композициям, содержащим по меньшей мере один активный ингредиент, как определено выше, но вместе с

пригодным в ветеринарии носителем. Пригодные в ветеринарии носители представляют собой вещества, пригодные для введения композиции, и могут быть твердыми, жидкими или газообразными веществами, которые во всем остальном являются инертными или приемлемыми в области ветеринарии и сочетаются с активным ингредиентом. Данные ветеринарные композиции можно вводить парентерально, перорально или любым другим желаемым способом.

СПОСОБЫ ЛЕЧЕНИЯ КОНЪЮГАТАМИ АНТИТЕЛО-ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО

Предусмотрено, что конъюгаты антитело-лекарственное средство (ADC) по настоящему изобретению можно использовать для лечения различных заболеваний или нарушений, таких как рак и аутоиммунные состояния. Иллюстративные состояния или нарушения включают доброкачественные или злокачественные опухоли, лейкемические и лимфоидные злокачественные заболевания, другие нарушения, такие как нейрональные, глиальные, астроцитарные, гипоталамические нарушения и нарушения, связанные с другими железами, макрофагальные, эпителиальные, стромальные, бластные, воспалительные, ангиогенные и иммунологические нарушения. Злокачественная опухоль, чувствительная к лечению ADC, включает опухоли, которые характеризуются сверхэкспрессией определенных антигенов, ассоциированных с опухолями или рецепторов клеточной поверхности, например, HER2.

Соединения ADC, которые идентифицированы на животных моделях и в клеточных анализах, можно дополнительно тестировать на высших приматах с опухолями и в клинических испытаниях на людях. Клинические испытания на людях можно спроектировать подобно клиническим испытаниям тестирования эффективности моноклонального антитела против HER2 ГЕРЦЕПТИНА у пациентов со сверхэкспрессирующим HER2 метастазирующим раком молочной железы, которые получали продолжительное предварительное противоопухолевое лечение, как описано Baselga et al. (1996) J. Clin. Oncol. 14:737-744. Можно спроектировать клиническое испытание для оценки эффективности ADC в сочетании с известными терапевтическими воздействиями, такими как радиация и/или химиотерапия, включая известные химиотерапевтический и/или цитотоксические средства (Pegram et al. (1999) Oncogene 18:2241-2251).

Как правило, заболеванием или расстройством, для которого лечение может быть эффективно, является рак. Примеры рака, для которого лечение по настоящему изобретению может быть эффективно, включают, но ими не ограничиваются, карциному, лимфому, бластому, саркому и лейкемические или лимфоидные злокачественные заболевания. Конкретные примеры таких злокачественных опухолей включают плоскоклеточный рак (например, эпителиальный плоскоклеточный рак), рак легких, включая мелкоклеточный рак легких, немелкоклеточный рак легких, аденокарциному легких и плоскоклеточную карциному легкого, рак брюшины, гепатоцеллюлярный рак, рак желудка, включая рак желудочно-кишечного тракта, стромальную опухоль желудочно-кишечного тракта (GIST), рак поджелудочной железы, глиобластому, рак шейки матки, рак яичников, рак печени, рак мочевого пузыря, гепатому, рак молочной железы, рак толстой кишки, рак прямой кишки, колоректальный рак, карциному эндометрия или матки, карциному слюнной железы, рак почек, рак предстательной железы, рак вульвы, рак щитовидной железы, карциному печени, карциному ануса, карциному полового члена, а также рак головы и шеи.

Злокачественная опухоль для лечения в соответствии с данным документом может представлять собой опухоль, характеризующуюся избыточной активацией рецептора ErbB, например HER2. Такая избыточная активация может являться признаком сверхэкспрессии или повышенной продукции рецептора ErbB или лиганда ErbB. В одном из вариантов осуществления для определения того, характеризуется ли злокачественная опухоль у пациента избыточной активацией рецептора ErbB, проводят диагностический или прогностический анализ. Например, можно определить амплификацию гена ErbB и/или сверхэкспрессию рецептора ErbB в злокачественной опухоли. В данной области доступны различные анализы для определения такой амплификации/сверхэкспрессии и к ним относятся анализы IHC, FISH и анализ «слущивающихся» антигенов, описанные выше. Альтернативно или дополнительно известными способами можно определять уровни лиганда ErbB, такого как TGF-альфа, опухоли или ассоциированных с опухолью. С помощью таких анализов в образце для тестирования можно детектировать белок и/или кодирующую его нукленновую кислоту. В одном из вариантов осуществления уровни лиганда ErbB в опухоли можно определять с применением иммуногистохимии (IHC); см., например, Scher et al. (1995) Clin. Cancer Research 1:545-550. Альтернативно или дополнительно в образце для тестирования можно оценивать уровни нуклеиновой

кислоты, кодирующей лиганд ErbB; например, способами FISH, саузерн-блоттингом или ПЦР. В одном из вариантов осуществления сверхэкспрессию ErbB2 можно анализировать с помощью IHC, например, с применением HERCEPTEST (Dako). Помещенные в парафин тканевые срезы биопсии опухоли можно подвергать анализу IHC и сравнивать интенсивность окрашивания белка ErbB2 со следующими критериями: балл 0, окрашивания не наблюдается или окрашивание мембраны наблюдают менее чем у 10% опухолевых клеток; балл 1+, слабо/с трудом обнаруживаемое окрашивание мембран наблюдается более чем у 10% опухолевых клеток, только часть мембран клеток окрашена; балл 2+, полное окрашивание мембран от слабого до умеренного, наблюдается более чем у 10% опухолевых клеток; балл 3+, полное окрашивание мембран от умеренного до сильного наблюдается более чем у 10% опухолевых клеток. Опухоли с баллами 0 или 1+ при оценке сверхэкспрессии ErbB2 можно охарактеризовать как не обладающие сверхэкспрессией ErbB2, тогда как опухоли с баллами 2+ или 3+ можно охарактеризовать как сверхэкспрессирующие ErbB2.

Альтернативно или дополнительно на фиксированной формалином помещенной в парафин опухолевой ткани можно проводить анализы FISH, такие как INFORM™ (Ventana Co., Ariz.) или PATHVISION™ (Vysis, 111.) для определения степени (если есть) сверхэкспрессии ErbB2 в опухоли.

Кроме того, сверхэкспрессию или амплификацию рецептора ErbB или лиганда ErbB можно оценивать с применением диагностического анализа *in vivo*, например, посредством введения молекулы (такой как антитело), которая связывает молекулу для обнаружения и помечена детектируемой меткой (например, радиоактивным изотопом), и наружного сканирования пациента на локализацию метки.

Для профилактики или лечения заболевания соответствующая доза ADC будет зависеть от типа заболевания для лечения, как определено выше, тяжести и течения заболевания, вводится ли молекула для профилактических или терапевтических целей, предшествующей терапии, истории болезни пациента и ренакции на антитело и от решения лечащего врача. Таким образом, молекулу вводят пациенту однократно или в течение ряда курсов лечения. В зависимости от типа и тяжести заболевания исходная предположительная доза для введения пациенту составляет приблизительно от 1 мкг/кг до 15 мг/кг (например, 0,1-20 мг/кг) молекул, или в виде одного или нескольких отдельных введений, или посредством непрерывной инфузии. Обычная суточная доза может изменяться приблизительно от 1 мкг/кг до 100 мг/кг или более, в зависимости от указанных выше факторов. Характерная доза ADC для введения пациенту находится в диапазоне приблизительно от 0,1 до приблизительно 10 мг/кг массы пациента.

Для повторных введений в течение нескольких суток или более в зависимости от состояния лечение продолжают до тех пор, пока не произойдет желательного подавления симптомов заболевания. Характерный режим дозирования представляет собой введение начальной нагрузочной дозы приблизительно 4 мг/кг, с последующей еженедельной поддерживающей дозой приблизительно 2 мг/кг антитела к ErbB2. Могут использоваться другие режимы дозирования. Успехи такого лечения легко контролировать обычными способами и анализами.

КОМБИНИРОВАННОЕ ЛЕЧЕНИЕ

Конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC) можно комбинировать в фармацевтический комбинированный состав или в схеме дозирования в виде комбинированного лечения со вторым соединением с противоопухолевыми свойствами. Второе соединение фармацевтической комбинированной композиции или схемы дозирования обладает комплементарным к ADC из сочетания действием так, что они не оказывают неблагоприятного воздействия друг на друга.

Второе соединение может представлять собой химиотерапевтическое средство, цитотоксическое средство, цитокин, ингибирующее рост средство, антигормональное свойство, ингибитор ароматазы, ингибитор протеинкиназы, ингибитор липидкиназы, антиандрогенное средство, антисмысловой олигонуклеотид, рибозим, генотерапевтическую вакцину, антиангиогенное средство и/или кардиопротектор. Таким образом, такие молекулы находятся в композиции в таких количествах, которые эффективны для намеченной цели. Фармацевтическая композиция, содержащая ADC, также может содержать терапевтически эффективное количество химиотерапевтического средства, такого как ингибитор образования тубулина, ингибитор топоизомеразы или связывающее ДНК средство.

Альтернативно или дополнительно второе соединение может представлять собой антитело, связывающееся с ErbB2 и блокирующее активацию рецептора ErbB лигандом. Второе антитело может представлять собой моноклональное антитело 2C4 или гуманизированное 2C4 «Omnitarg» (WO 01/00245). Второе антитело может быть конъюгировано с цитотоксическим или химиотерапевтическим средством, например

майтаназоидным средством, ауристатином, калихимицином или молекулой 1,8-бис-нафталимида. Например, может быть желательным в одной композиции или схеме дозирования дополнительно предоставить антитела, связывающиеся с EGFR, ErbB2, ErbB3, ErbB4 или фактором эндотелия сосудов (VEGF).

С введением противоопухолевого средства, идентифицированного по данному изобретению, можно сочетать другие терапевтические схемы. Комбинированную терапию можно проводить в виде совместного или последовательного режима. При введении последовательно сочетание можно вводить с применением двух или более введений. Комбинированное введение включает совместное введение с использованием раздельных композиций в одном фармацевтическом составе и последовательное введение в любом порядке, где существует временной период, когда оба (или все) активные средства одновременно проявляют свою биологическую активность.

В одном из вариантов осуществления лечение ADC по настоящему изобретению включает комбинированное введение противоопухолевого средства, идентифицированного в данном документе, и одного или нескольких химиотерапевтических средств или ингибирующего рост средств, включая совместное введение смесей различных химиотерапевтических средств, необязательно, вместе с лечением антителом к ErbB2, таким как трастузумаб. Химиотерапевтические средства включают Эрлотиниб HCl (CP-358774, ТАРЦЕВА TARCEVA™; Genentech/OSI), таксаны (такие как паклитаксел и доксетаксел) и/или антрациклиновые антибиотики. Получение и режимы дозирования для таких химиотерапевтических средств можно применять по инструкциям производителя или как эмпирически определено лечащим врачом. Получение и схемы дозирования для такой химиотерапии также описаны в Chemotherapy Service Ed., M.C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, Md. (1992).

Противоопухолевое средство можно комбинировать с антигормональным соединением, например антиэстрогеновым соединением, таким как тамоксифен; антипрогестероновым соединением, таким как онапристон (EP 616812), или антиандрогенным соединением, таким как флутамид, в дозах, известных для таких молекул. Когда рак, на который направлено лечение, представляет собой гормононезависимый рак, пациента предварительно можно подвергнуть антигормональной терапии, а после того как рак станет гормононезависимым, пациенту можно вводить антитело против ErbB2 (и, необязательно, другие описанные в данном документе средства). Может быть полезным также совместно вводить пациенту кардиопротектор (для профилактики или уменьшения дисфункции миокарда, связанной с таким лечением) и один или несколько цитокинов. В дополнение к указанным выше режимам лечения пациента можно подвергнуть хирургическому удалению раковых клеток и/или радиационной терапии.

Подходящие дозы для любого из указанных выше совместно вводимых средств представляют собой дозы, используемые в настоящее время, и их можно уменьшать вследствие сочетанного действия (синергии) нового идентифицированного средства и других химиотерапевтических средств или способов лечения.

МЕТАБОЛИТЫ КОНЪЮГАТОВ АНТИТЕЛО-ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО

Также данное изобретение относится к метаболическим продуктам *in vivo* описанных в данном документе соединений ADC в том случае, когда такие продукты являются новыми и неочевидными из предшествующей области. Такие продукты могут образовываться вследствие окисления, восстановления, гидролиза, амидирования, этерификации, ферментативного расщепления и т.п. вводимого соединения. Таким образом, изобретение относится к новым и неочевидным соединениям, получаемым в процессе, включающем в себя нахождение соединения по изобретению у млекопитающего в период времени, достаточный для образования продукта его метаболизма.

Продукты метаболизма можно идентифицировать получением радиоактивно меченных (например, ^{14}C или ^{3}H) ADC, парентеральным их введением в обнаруживаемой дозе (например, большей чем приблизительно 0,5 мг/кг) животному, такому как крыса, мышь, морская свинка, обезьяна или человеку, отводя достаточное количество времени на метаболизм (обычно, приблизительно от 30 секунд до 30 часов) и выделяя продукты его превращения из мочи, крови или других биологических образцов. Эти продукты легко выделить, так как они помечены (другие выделяют с помощью антител, способных связывать эпитопы, оставшиеся в метаболите). Обычным способом, например, с помощью анализов MS, LC/MS или ЯМР, определяют структуры метаболитов. Обычно анализ метаболитов проводят таким же образом, как и обычные исследования метаболизма лекарственных средств, которые хорошо известны специалистам в данной области. Продукты конверсии,

если они не обнаруживаются *in vivo*, могут использоваться в диагностических анализах для определения терапевтической дозы соединений ADC.

Метаболиты включают продукты расщепления ADC *in vivo*, в которых происходит расщепление любой связи, присоединяющей молекулу лекарственного средства к антителу. Таким образом, результатом метаболического расщепления может являться "голое" антитело или фрагмент антитела. Метаболит антитела может быть связан с частью линкера или со всем линкером. В результате метаболического расщепления также могут образовываться молекулы лекарственного средства или его части. Метаболит молекулы лекарственного средства может быть связан с частью линкера или со всем линкером.

ГОТОВЫЕ ИЗДЕЛИЯ

Другой вариант осуществления относится к готовому изделию, или «набор», содержащий ADC и материалы, которые могут использоваться для лечения описанных выше заболеваний. Готовое изделие содержит контейнер и этикетку или листовку-вкладыш на контейнере или связанные с контейнером. Подходящие контейнеры включают, например, бутылки, флаконы, шприцы или блистерные упаковки. Контейнеры можно получать из различных материалов, таких как стекло или пластик. Контейнер может содержать композицию коньюгата антитело-лекарственное средство (ADC), которая эффективна для лечения состояния, и может иметь стерильное входное отверстие (например, контейнер может представлять собой резервуар для внутривенного раствора или флакон с пробкой, прокалываемые иглой для подкожной инъекции). По меньшей мере, одно активное средство в композиции представляет собой ADC. Этикетка или листовка-вкладыш указывает на то, что композиция применяется для лечения выбранного состояния, такого как рак. В одном из вариантов осуществления этикетка или листовки-вкладыши указывают на то, что композицию, содержащую антитело, связывающееся с ErbB2, можно использовать для лечения рака, экспрессирующего рецептор ErbB, выбранный из группы, содержащей рецептор эпидермального фактора роста (EGFR), ErbB2, ErbB3 и ErbB4. Кроме того, этикетка или листовка-вкладыш могут указывать на то, что пациентом, для которого лечение будет эффективно, является пациент, страдающий раком, отличающимся избыточной активацией рецептора ErbB, выбранного из EGFR, ErbB2, ErbB3 или ErbB4. Например, рак может представлять собой злокачественную опухоль, которая сверхэкспрессирует один из этих рецепторов и/или которая сверхэкспрессирует лиганд ErbB (такой, как TGF-α). Этикетка или листовка-вкладыш также могут указывать на то, что композицию можно использовать для лечения рака, где рак не характеризуется сверхэкспрессией рецептора ErbB2. В других вариантах осуществления, листовка-вкладыш может указывать на то, что композицию ADC также можно использовать для лечения гормононезависимой злокачественной опухоли, рака предстательной железы, рака толстой кишки или колоректального рака.

Готовое изделие может содержать (a) первый контейнер с содержащимся в нем соединением, где соединение содержит ADC по настоящему изобретению, где антитело из ADC представляет собой первое антитело, связывающее ErbB2 и ингибирующее рост раковых клеток, сверхэкспрессирующих ErbB2; и (b) второй контейнер с содержащимся в нем соединением, где соединение содержит второе антитело, связывающееся с ErbB2 и блокирующее активацию рецептора ErbB лигандом, или конъюгат этого второго антитела с майтаназоидным соединением. Готовое изделие в данном варианте осуществления может дополнительно содержать листовку-вкладыш, указывающую, что первое и второе соединения можно применять для лечения злокачественной опухоли. Альтернативно или дополнительно готовое изделие может содержать второй (или третий) контейнер, содержащий фармацевтически приемлемый буфер, такой как бактериостатическая вода для инъекций (BWFI), фосфатно-солевой буфер, раствор Рингера и раствор декстрозы. Он может дополнительно включать в себя другие материалы, желательные с коммерческой или потребительской точки зрения, включая другие буферы, разбавители, фильтры, иглы и шприцы.

ПРИМЕРЫ

Пример 1. Получение, характеристика и гуманизация моноклонального антитела 4D5 против ErbB2

Моноклональное антитело 4D5 мыши, которое специфически связывает внеклеточный домен ErbB2, получали, как описано Fendly et al. (1990) Cancer Research 50:1550-1558. Кратко, клетки NIH 3T3/HER2-3_{400} (экспрессирующие приблизительно 1×10^5 молекул ErbB2/клетку), полученных, как описано Hudziak et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 84:7158-7163, собирали с помощью фосфатно-солевого буфера (PBS), содержащего 25 мМ EDTA и использовали для иммунизации мышей BALB/c. Мышам внутривенно вводили 10^7 клеток в 0,5 мл PBS на 0, 2, 5 и 7

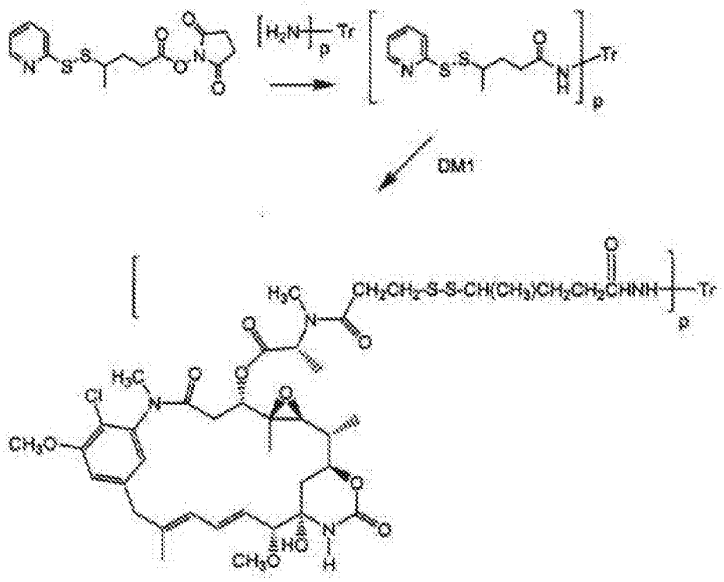
недели. На 9 и 13 неделю мышам внутрибрюшинно вводили мембранные экстракты ErbB2, очищенные на агглютинине пророщенной пшеницы (WGA)-сефарозе, вместе с антисывороткой, которая иммунопреципитирует меченный ^{32}P ErbB2. После этого внутривенно вводили инъекцию 0,1 мл препарата ErbB2 и спленоциты сливали с миеломной линией X63-Ag8.653 мыши. Супернатанты гибридомы скринировали на связывание ErbB2 посредством ELISA и радиоиммунопреципитации.

Моноклональное антитело 4D5 мыши гуманизировали с применением стратегии «мутагенеза на основе конверсии генов», как описано в патенте США № 5821337, полное описание которого приведено в данном документе в качестве ссылки в полном объеме. Гуманизированное моноклональное антитело 4D5, используемое в следующих экспериментах, обозначали как huMAb4D5-8. Это антитело представляет собой изотип IgG1.

Пример 2. Очистка трастузумаба

Один флакон, содержащий 440 мг ГЕРЦЕПТИНА® (антитело huMAb4D5-8, rhuMAb HER2, патент США № 5821337) растворяли в 50 мл буфера MES (25 мМ MES, 50 мМ NaCl, pH 5,6) и наносили на катионообменную колонку (сефароза S, 15 см × 1,7 см), уравновешенную тем же буфером. Затем колонку промывали тем же буфером (5 объемов колонки). Трастузумаб элюировали, повышая концентрацию NaCl в буфере до 200 мМ. Фракции, содержащие антитело, объединяли, разводили до 10 мг/мл и подвергали диализу в буфер, содержащий 50 мм фосфата калия, 50 мМ NaCl, 2 мМ EDTA, pH 6,5.

Пример 3. Получение конъюгатов антитело-лекарственное средство: трастузумаб-SPP-DM1:

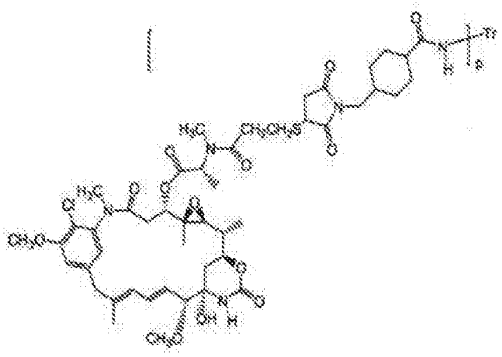


Очищенный трастузумаб модифицировали N-сукцинимидил-4-(2-пиридилтио) пентаноатом, введя дитиопиридильные группы. Трастузумаб (376,0 мг, 8 мг/мл) в 44,7 мл 50 мМ фосфатно-калийного буфера (pH 6,5), содержащего NaCl (50 мМ) и EDTA (1 мМ) обрабатывали SPP (5,3 молярных эквивалентов в 2,3 мл этаноле). После инкубации в течение 90 минут в атмосфере аргона при температуре окружающей среды реакционную смесь подвергали гель-фильтрации через колонку с Sephadex G25, уравновешенную 35 мМ цитратом натрия, 154 мМ NaCl, 2 мМ EDTA. Содержащие антитело фракции объединяли и анализировали. Степень модификации антитела определяли как описано выше. Выход модифицированного антитела (трастузумаб-SPP-Py) составлял 337 мг (89,7%) с 4,5 высвобождаемых связанных 2-тионпиридиновых групп на антитело (p').

Трастузумаб-SPP-Py (337,0 мг, 9,5 мкмоль высвобождаемых 2-тиопиридиновых групп) разбавляли с применением приблизительно 35 мМ цитратно-натриевого буфера, pH 6,5, до конечной концентрации 2,5 мг/мл. Затем к раствору антитела добавляли DM1 (N2'-деацетил-$N^{2'}$-(3-меркапто-1-оксопропил)майтаназин), структура которого представлена на фиг.1 (1,7 эквивалентов, 16,1 мкмоль), в 3,0 мМ диметилацетамиде (DMA, 3% об./об. в конечной реакционной смеси). Реакцию проводили при температуре окружающей среды в атмосфере аргона в течение 20 часов.

Реакционную смесь наносили на колонку для гель-фильтрации с Sephacryl S300 (5,0 см × 90,0 см, 1,77 л), уравновешенную 35 мМ цитратом натрия, 154 мМ NaCl, pH 6,5. Скорость потока составляла 5,0 мл/мин и собирали 65 фракции (20,0 мл каждая). Основной пик находился в районе фракции № 47 (фиг.3). Основной пик содержит мономерный трастузумаб-SPP-DM1, фракции 44-51 объединяли и анализировали. Количество молекул лекарственного средства DM1, связанных на молекулу антитела (p'), определяли измерением поглощения при 252 нм и 280 нм и обнаружили, что оно составляет 3,7 молекул лекарственного средства на молекулу антитела.

Пример 4. Получение конъюгатов антитело-лекарственное средство: трастузумаб-SMCC-DM1



Очищенный трастузумаб модифицировали (сукцинимидил-4-(N-малеимидометил) циклогексан-1-карбоксилат, SMCC, Pierce Biotechnology, Inc), внося линкер SMCC. Трастузумаб очищали от ГЕРЦЕПТИНА®, как в примере 2, и проводили замену буфера при 20 мг/мл в 50 мМ фосфата калия/50 мМ хлорида натрия/2 мМ EDTA, pH 6,5 с 7,5 до 10 молярных эквивалентов SMCC (20 мМ в DMSO или DMA (диметилацетамид), 6,7 мг/мл). После перемешивания в течение от 2 до 4 часов в атмосфере азота при температуре окружающей среды реакционную смесь фильтровали через колонку с Sephadex G25, уравновешенную 50 мМ фосфат калия/50 мМ хлорида натрия/2 мМ EDTA, pH 6,5. Альтернативно реакционную смесь подвергали гель-фильтрации с 30 мМ цитрата и 150 мМ хлорида натрия при pH 6. Содержащие антитело фракции очищали и анализировали. Выход трастузумаба-SMCC составлял 88%.

Промежуточное соединение лекарственное средство-линкер, трастузумаб-SMCC, полученное как указано выше, разбавляли 50 мМ фосфатом калия/50 мМ хлоридом натрия/2 мМ EDTA, pH 6,5, до конечной концентрации 10 мг/мл и подвергали реакции с 10 мМ раствором DM1 (1,7 эквивалентов на 5 SMCC/трастузумаб, 7,37 мг/мл) в диметилацетамиде. Реакционную смесь перемешивали при температуре окружающей среды в атмосфере аргона в течение от 4 до приблизительно 16 часов. Смесь после реакции конъюгации фильтровали через колонку для гель-фильтрации с Sephadex G25 (1,5 × 4,9 см) с 1 × PBS при pH 6,5. Альтернативно реакционную смесь подвергали гель-фильтрации с 10 мМ сукцинатом и 150 мМ хлоридом натрия при pH 5. Отношение DM1/трастузумаб (p) составляло 3,1, измеряя при поглощении при 252 нм и при 280 нм. Отношение лекарственного средства к антителу (p) можно также измерять посредством масс-спектрометрии. Конъюгацию также можно контролировать электрофорезом в полиакриламидном геле с SDS. Агрегацию можно оценить посредством рассеяния лазерного излучения.

Конъюгаты антитело-SMCC-DM1:

Следуя этому протоколу, получали другие конъюгаты антитело-лекарственное средство с линкером SMCC и молекулой лекарственного средства DM1, включающие:

Таблица

Конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC)	Антитело (Ab)	Антиген	Средняя нагрузка лекарственным средством (DM1/Ab)
10H-SMCC-DM1	10H1 (мышиное) против NaPi3b	NaPi3b	5,0
2H9-SMCC-DM1	Mab 2H9	антитело против EphB2R	4,0
антитело против амброзии-SMCC-DM1	антитело против амброзии		2,7
антитело против TENB2-SMCC-DM1	MAb мыши против TENB2-3416#2	TENB2	2,5
химерное антитело против TENB2 20D1 Fc-SMCC-DM1	Химерное человеческое и мышиное антитело против TENB2	TENB2	3,32
антитело против CD19-SMCC-DM1	антитело против CD19 (изотип mIgG1)	CD19	5,05

2H7-SMCC-DM1	антитело против CD20 (изотип mIgG2a)	CD20	2,44, 3,84 (две группы)
CD20 LC-SMCC-DM1	антитело против CD20 (ритуксан®)	CD20	
BB5-SMCC-DM1	антитело против CD21 (изотип mIgG2a)	CD21	4,05
RFB4-SMCC-DM1	антитело против CD22	CD22	1,95-6,75 (несколько групп)
Cy34.1.2-SMCC-DM1	антитело против CD22	CD22	2,70
12F7.1.5-SMCC-DM1	антитело против CD22	CD22	5,90
9A8.1.1-SMCC-DM1	антитело против CD22	CD22	5,00
8C9.1.2-SMCC-DM1	антитело против CD22	CD22	2,90
14B3.3.1-SMCC-DM1	антитело против CD22	CD22	5,20
8G10.4 2-SMCC-DM1	антитело против CD22	CD22	3,60
2B4.1.4-SMCC-DM1	антитело против CD22	CD22	5,20
7A2.4.1-SMCC-DM1	антитело против CD22	CD22	3,60
4H3.2.2-SMCC-DM1	антитело против CD22	CD22	3,60
5E8.1.8-SMCC-DM1	антитело против CD22	CD22	3,60
3F11.2.1-SMCC-DM1	антитело против CD22	CD22	4,50
6C9.1.3-SMCC-DM1	антитело против CD22	CD22	3,70
10D2.4.3-SMCC-DM1	антитело против CD22	CD22	3,65
10D6.8.1-SMCC-DM1	антитело против CD72	CD72	2,90
ZL7-SMCC-DM1	антитело против CD79a (альфа)	CD79a	3,60
5C3-SMCC-DM1	антитело против CD79a (альфа)	CD79a	1,85
6G1-SMCC-DM1	антитело против CD79a (альфа)	CD79a	3,50
7H7-SMCC-DM1	антитело против CD79a (альфа)	CD79a	3,25
8D11-SMCC-DM1	антитело против CD79a (альфа)	CD79a	3,60
8H9-SMCC-DM1	антитело против CD79a (альфа)	CD79a	3,40
11E5-SMCC-DM1	антитело против CD79a (альфа)	CD79a	3,60
15E4-SMCC-DM1	антитело против CD79a (альфа)	CD79a	3,25
16C11-SMCC-DM1	антитело против CD79a (альфа)	CD79a	2,50
2F2-SMCC-DM1	антитело против CD79b (бета)	CD79b	3,20
17A7-SMCC-DM1	антитело против CD79b (бета)	CD79b	4,40
SN8-SMCC-DM1	антитело против CD79b (бета)	CD79b	4,40, 0,80 (две группы)
1F9-SMCC-DM1	антитело против FcRH1	FcRH1	4,20
7A2-SMCC-DM1	антитело против FcRH2	FcRH2	4,20, 3,95 (две группы)
7G7-SMCC-DM1	антитело против FcRH2	FcRH2	3,80
c11D6-SMCC-DM1	антитело против FcRH2	FcRH2	2,20
51505.111-SMCC-DM1	антитело против CXCR5	CXCR5	6,10
химерное антитело 12C7 Fc-SMCC-DM1	антитело против бревикана	бревикан	4,60
H2:PSCA hIog-SMCC-DM1	антитело против PSCA hIog	PSCA	3
H6:xPSCAhIog-SMCC-DM1	антитело против PSCA hIog	PSCA	2,6
xFcRH5:3909 7D11.1.1-SMCC-DM1	антитело против IRTA2	IRTA2	2,6
xFCRH5.7D11-SMCC-DM1	антитело против IRTA2	IRTA2	4,4
11D10LC-SMCC-DM1	MAb мыши против CA 0772P	CA 0772P MUC16	
xNCALC-SMCC-DM1	MAb мыши против CEACAM6	CEACAM6 NCA	

Конъюгаты антитело-BMPEO-DM1

Для конъюгации с цистеином антитело можно восстанавливать таким восстановителем как дитиотрентол (DTT) или TCEP в присутствие EDTA. После инкубации в течение одного часа при 37°C, pH доводят приблизительно до 7 с помощью 100 мМ фосфата калия. Восстановленное антитело модифицируют бисмалеимидным реагентом BM(PEO)4 (Pierce Chemical), удаляющим непрореагировавшие малеимидные группы на поверхности антитела. Модифицирование можно проводить, растворяя BM(PEO)4 в 50% смеси этанол/вода до концентрации 10 мМ и добавляя десятикратного молярного избытка к раствору, содержащему антитело в фосфатно-солевом буфере при концентрации приблизительно 1,6 мг/мл (10 мкм) и оставлять реагировать в течение 1 часа с образованием Ab-BMPEO. Избыток BM(PEO)4 удаляют гель-фильтрацией (колонка HiTrap, Pharmacia) в 30 мМ цитрате, pH 6 с 150 мМ буфера NaCl. Приблизительно десятикратный молярный избыток DM1 растворяют в диметилацетамиде (DMA) и добавляют к промежуточному соединению Ab-BMPEO. Для растворения реагента молекул лекарственного средства также можно применять диметилформамид (DMF). Перед гель-фильтрацией или диализом в PBS для удаления непрореагировавшего DM1 смесь оставляют реагировать в течение ночи. Для удаления высокомолекулярных агрегатов и получения очищенного Ab-BMPEO-DM1 использовали гель-фильтрацию на колонках S200 в PBS.

Следуя этому протоколу, получали другие конъюгаты антитело-лекарственное средство с линкером BMPEO и молекулой лекарственного средства DM1, включая:

Таблица

Конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC)	антитело (Ab)	антител	средняя нагрузка лекарственным средством (DM1/Ab)

OnCusp
Ex. 1002

трастузумаб-BM(PEO)-DM1	трастузумаб (Герцептин®)	HER2	2,94
CD120-BMPEO4-DM1	MAb мыши против GP120	GP120	2
RFB4-BMPEO4-DM1	антитело против CD22	CD22	3,7 и 4,25 (две группы)

Пример 5. Анализ пролиферации клеток *in vitro*

Эффективность ADC измеряли в анализе пролиферации клеток, применяя следующий протокол (Promega Corp. Technical Bulletin TB288; Mendoza et al. (2002) Cancer Res. 62:5485-5488).

1. Аликвоту 100 мкл клеточной культур, содержащую приблизительно 10^4 клеток (SKBR-3, BT474, MCF7 или MDA-MB-468) в среде, вносили в каждую лунку 96-луночного планшета с непрозрачными стенками.

2. Получали контрольные лунки, содержащие среду и не содержащие клетки.

3. К экспериментальным лункам добавляли ADC и инкубировали в течение 3-5 суток.

4. Планшеты уравновешивали до клеточной температуры в течение приблизительно 30 минут.

5. В каждую лунку добавляли объем реагента CellTiter-Glo Reagent, равный объему находящейся в ней среды с клеточной культурой.

6. Содержимое перемешивали в течение 2 минут на орбитальной качалке для индукции лизиса клеток.

7. Планшет инкубировали при комнатной температуре в течение 10 минут для стабилизации люминесцентного сигнала.

8. Люминесцентный сигнал записывали и наносили на диаграммы в виде RLU=относительные люминесцентные единицы.

Пример 6. Сывороточный клиренс и стабильность у мышей

Исследовали «голых» мышей с врожденным отсутствием NK-клеток, которых не подвергали воздействию (без опухолей) в шести группах из четырех животных. На 0 сутки каждой мыши вводили однократную дозу 2 мг/кг ADC в 200 мкл водного носителя, за исключением группы с носителем, которой вводили только носитель. Посредством сердечной пункции при анестезии собирали кровь в каждую временную точку (5 минут, 1 час, 6 часов, 24 часа, 72 часов и 168 часов) после введения дозы. Выделяли сыворотки и измеряли содержание антитела и ADC.

Группа 1: Носитель (PBS, pH 6,5, без ADC)
Группа 2: Трастузумаб-SMCC-DM1
Группа 3: Трастузумаб-SPP-DM1
Группа 4: Трастузумаб-SPDP-DM1
Группа 5: Трастузумаб-SPP-DM3
Группа 6: Трастузумаб-SPP-DM4

Пример 7. Стабильность в сыворотке у крыс

Исследовали шесть групп дозирования с 6 крысами Sprague-Dawley (100-125 грамм каждая) на группу. На 0 сутки животным вводили однократную внутривенную дозу носителя 10 мг/кг трастузумаба-SPP-DM1 или 10 мг/кг трастузумаба-SMCC-DM1 в объеме дозы 10 мл/кг через латеральную хвостовую вену. Приблизительно 300 мкл цельной крови собирали в каждую временную точку: 0 (перед дозой), 10 и 30 минут; 1, 2, 4, 8, 24 и 36 часов и 2, 3, 4, 7, 14, 21, 28 суток после дозы.

Мыши с высокоэкспрессирующим HER2 трансгенным эксплантатом.

Животных, подходящих для трансгенных экспериментов, можно получить из стандартных коммерческих источников, таких как Taconic (Germantown, N.Y.). Подходят многие линии, но предпочтительными являются самки FVB из-за их высокой восприимчивости к образованию опухоли. Самцов FVB применяли для спаривания и вазэктомизированных племенных CD.1 применяли для стимуляции псевдобеременности. Вазэктомированных мышей можно получать у любого коммерческого поставщика. Основателей скрещивали либо с мышами FVB, либо с гетерозиготными мышами 129/BL6 x FVB p53. Мыши с гетерозиготностью по аллелям p53 применяли для потенциального увеличения образования опухолей. Однако было доказано, что это излишне. Таким образом, некоторые опухоли F1 являлись опухолями смешанных линий. Опухоли основателей были только FVB. Получили шесть основателей с некоторым развитием опухолей без потомства.

Животным с опухолями (аллотрансплантат, пересаженный от трансгенных мышей Fo5) вводили однократную инъекцию конъюгата трастузумаб-майтаназоидное средство DM1 (10 мг/кг/дозу) и объем опухоли оценивали в течение более 20 суток после инъекции.

Мыши SCID с ксенотрансплантатом от Bjab-luc.

Группам мышей SCID в количестве от восьми до десяти с 20 миллионами ксенотрансплантированными опухолевыми клетками Bjab-luc на мышь на сутки 1

вводили дозу конъюгата антитело-лекарственное средство или «голое» антитело. В группе из восьми мышей каждую тестировали с ADC с антителом против CD22, «голыми» антителами против CD22 и контролем. Контрольный ADC (трастузумаб-SMCC-DM1; нагрузка: DM1/трастузумаб=3,2) не является специфическим связывающим средством и его вводили в количестве 200 мкг DM1/м^2, 4,2 трастузумаб/кг/мышь, и он приводил к среднему времени удваивания опухоли приблизительно 3 суток. Конъюгаты с антителом к CD22 7A2-SMCC-DM1 (нагрузка: DM1/Ab=3,6), 5E8-SMCC-DM1 (нагрузка: DM1/Ab=3,6), и RFB4-SMCC-DM1 (нагрузка: DM1/Ab=4,3). Ненагруженные антитела, 7A2, 5E8 и RFB4 вводили в дозе 4 мг/кг/мышь.

Пример 9. Токсичность у крыс

Оценивали профиль острой токсичности трастузумаба-SPP-DM1 (дисульфидный линкер) по сравнению со свободным DM1 и трастузумабом-SMCC-DM1 (не дисульфидный линкер). Животным вводили инъекцию на 1 сутки, полные биохимические и гематологические профили получали на исходном уровне, на 3 сутки и на 5 сутки, а полную аутопсию проводили на 5 сутки, на трех случайных животных из каждой группы проводили обычный гистологический анализ для следующих тканей: грудинная кость, печень, почка, тимус, селезенка, толстый и тонкий кишечник. Экспериментальные группы были следующими:

Группа 1: Носитель (10 мМ сукцинат натрия, 100 мг/мл сахароза, 0,1% Tween 20, pH 5,0)

Группа 2: Трастузумаб-SPP-DM1, 22,3 мг/кг

Группа 3: Трастузумаб-SMCC-DM1, 10 мг/кг

Группа 4: Трастузумаб-SMCC-DM1, 25 мг/кг

Группа 5: Трастузумаб-SMCC-DM1, 50 мг/кг

Группа 6: Свободный DM1, 160 мкг/кг

Пример 10. Токсичность/безопасность у длиннохвостых макак

Исследовали три группы по четыре (2 самца, 2 самки), не обработанных *Macaca fascicularis* (длиннохвостых макака).

Группа 1: (4 животных) получали только носитель (PBS, pH 6,5, то есть состав без ADC) на сутки 1 и сутки 22, с последующим вскрытием на сутки 36.

Группа 2: (4 животные) получала трастузумаб-SMCC-DM1 4900 мкг/м^2 на сутки 1 и сутки 22.

Группа 3: (4 животные) получала трастузумаб-SMCC-DM1 7200 мкг/м^2 на сутки 22.

Дозы выражены в площади поверхности животного с тем, чтобы быть релевантными относительно других видов, то есть доза в мкг/м^2 не зависит от вида и, таким образом, сравнима между видами. Составы трастузумаб-SMCC-DM1 для исследований группы 2 и группы 3 содержали PBS, 5,4 мМ фосфат натрия, 4,2 мМ фосфат калия, 140 мМ хлорид натрия, pH 6,5.

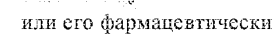
Кровь для гематологического анализа собирали до первого введения дозы (период сбора) и на сутки 3, 7, 11 и 14 после первой дозы (группы 1 и 2) и на сутки 3, 7, 11, 14 и 21 после второй дозы (группы 1, 2 и 3). Подсчитывали количество эритроцитов (RBC)

и тромбоцитов (PLT) способом светорассеяния. Количество лейкоцитов (WBC) подсчитывали способом пероксидаза/базофил. Количество ретикулоцитов подсчитывали способом светорассеяния с катионным красителем. Количество клеток подсчитывали на устройстве Advia 120. ALT (аланинаминотрансферазу) и AST (аспарагинаминотрансферазу) измеряли в Ед/л с помощью UV/NADH; способа IFCC на устройстве Olympus AU400 и с тестов применением Total Ab ELISA-ECD/GxhuFc-HRP. Conj. Ab ELISA-xDM1/ECD-Bio/SA-HRP.

Все патенты, патентные заявки и ссылки, цитируемые в настоящем описании, приведены в качестве ссылки в полном объеме.

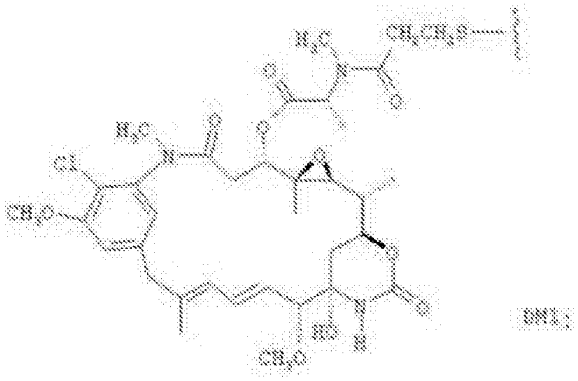
Формула изобретения

1. Соединение-конъюгат антитело-лекарственное средство, содержащее антитело, ковалентно присоединенное с помощью линкера к одному или нескольким майтаназоидным лекарственным средствам, где соединение обладает формулой I:



I

или его фармацевтически приемлемые соль или сольват,
где Ab представляет собой huMAb4D5-8 (трастузумаб);
L представляет собой сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат (SMCC) или BMPEO;
D представляет собой майтаназоидное лекарственное средство DM1 следующей структуры:



p равно от 1 до 8.

2. Соединение-конъюгат антитело-лекарственное средство по п.1, где антитело специфически связывается с рецептором HER2.

3. Соединение-конъюгат антитело-лекарственное средство по п.1, которое специфически связывается с внеклеточным доменом рецептора HER2 и ингибирует рост опухолевых клеток, сверхэкспрессирующих рецептор HER2.

4. Соединение-конъюгат антитело-лекарственное средство по п.1, где антитело присоединено к линкеру через тиол цистеина антитела.

5. Фармацевтическая композиция, содержащая соединение-конъюгат антитело-лекарственное средство по п.1, или его фармацевтически приемлемую соль, и фармацевтически приемлемые разбавитель, носитель или эксципиент.

6. Способ лечения злокачественной опухоли, включающий введение пациенту композиции соединения-конъюгата антитело-лекарственное средство по п.1 и фармацевтически приемлемых разбавителя, носителя или эксципиента.

7. Способ по п.6, где злокачественная опухоль выбрана из опухолей, сверхэкспрессирующих рецептор HER.

8. Способ по п.7, где злокачественная опухоль представляет собой рак молочной железы, сверхэкспрессирующий ErbB2 на уровне 2+ или более.

9. Способ по п.6, где вводимое пациенту количество соединения-конъюгата антитело-лекарственное средство находится в диапазоне приблизительно от 0,1 до приблизительно 10 мг/кг массы тела пациента на дозу.

10. Способ по п.6, где конъюгат антитело-лекарственное средство вводят приблизительно с трехнедельными интервалами.

11. Способ по п.6, где конъюгат антитело-лекарственное средство вводят инфузией.

12. Способ по п.6, где конъюгат антитело-лекарственное средство смешивают с фармацевтически приемлемым парентеральным носителем.

13. Способ по п.12, где конъюгат антитело-лекарственное средство входит в состав стандартной лекарственной инъецируемой формы.

14. Способ по п.13, где конъюгат антитело-лекарственное средство вводят внутривенно.

15. Способ по п.6, где пациенту вводят второе антитело, которое выбрано из моноклонального антитела 2C4, гуманизированного антитела 2C4 и бевацизумаба в сочетании с соединением-конъюгатом антитело-лекарственное средство.

16. Способ по п.6, где в сочетании с соединением-конъюгатом антитело-лекарственное средство пациенту вводят химиотерапевтическое средство, где химиотерапевтическое средство выбрано из эрлотиниба, бортезомиба, фулвестранта, сутента, летрозола, иматиниба мезилата, PTK787/ZK 222584, оксалиплатина, 5-FU, лейковорина, рапамицина, лапатиниба, лонафарниба, сорафениба и гефитиниба.

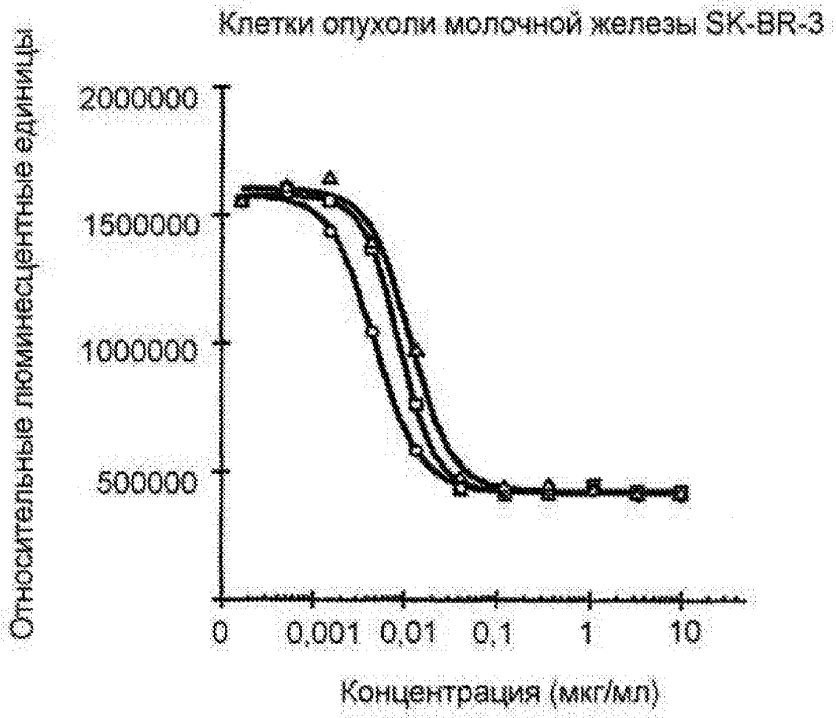
17. Готовое изделие, содержащее
соединение-конъюгат антитело-лекарственное средство по п.1;
контейнер и
листовку-вкладыш или этикетку, указывающие, что соединение можно применять для лечения злокачественной опухоли.

18. Готовое изделие по п.17, где указанная листовка-вкладыш этикетки указывает, что соединение можно применять для лечения злокачественной опухоли, характеризующейся сверхэкспрессией рецептора ErbB2.

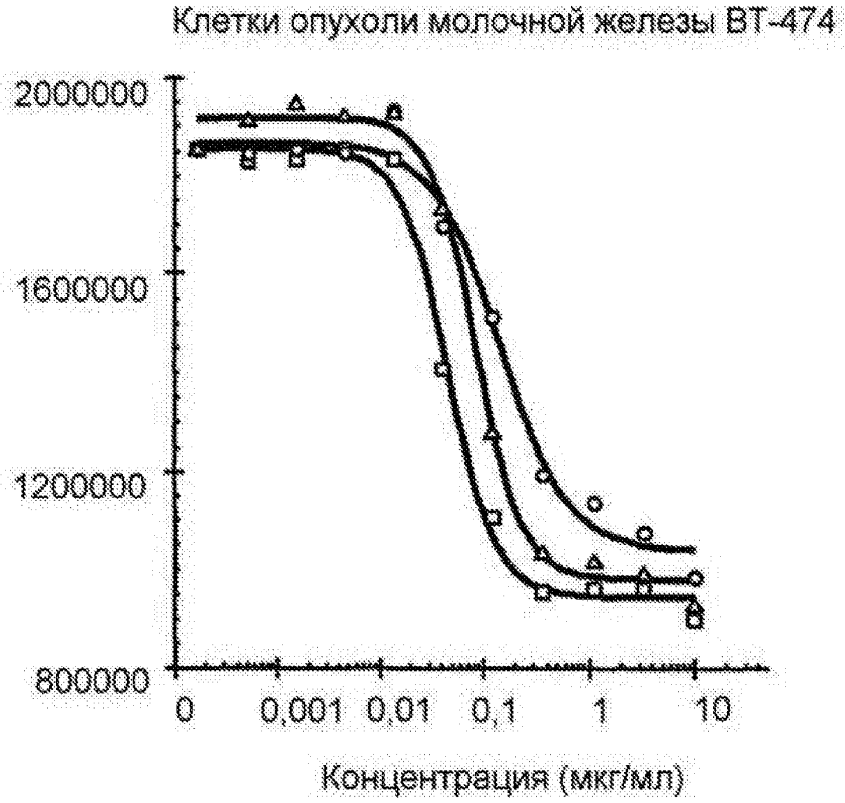
19. Готовое изделие по п.18, где злокачественная опухоль представляет собой рак молочной железы.

20. Способ получения соединения-конъюгата антитело-лекарственное средство по п.1, где способ включает:

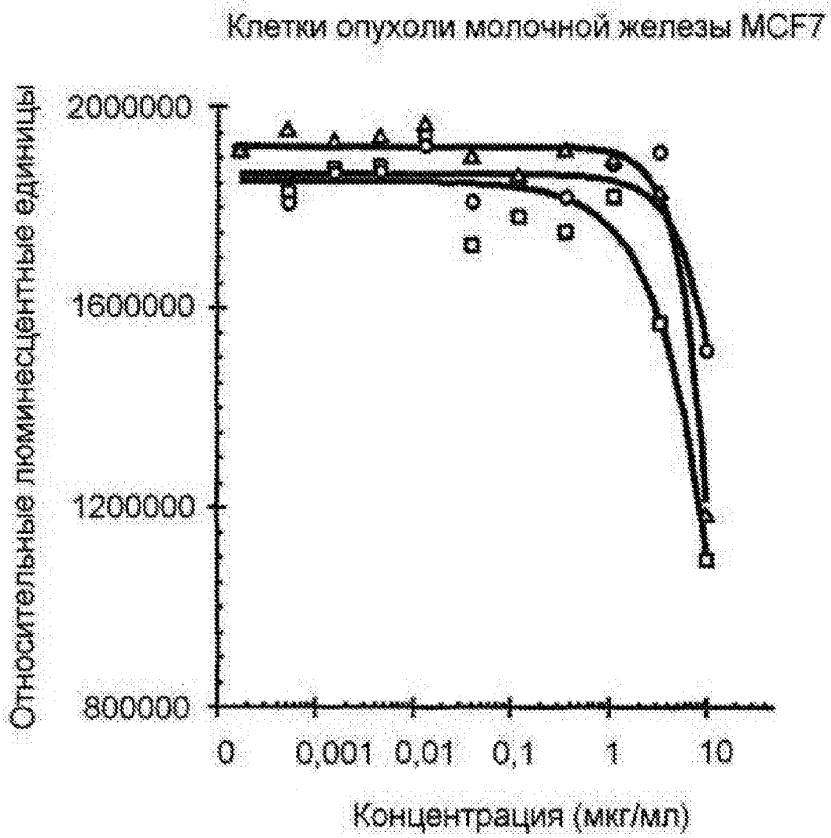
проведение реакции Ab с линкерным реагентом с образованием промежуточного продукта антитело-линкер Ab-L, а затем проведения реакции Ab-L с молекулой лекарственного средства D с образованием конъюгата антитело-лекарственное средство; или проведение реакции молекулы лекарственного средства D с линкерным реагент с образованием промежуточного соединения лекарственное средство-линкер D-L, а затем проведение реакции D-L с Ab с образованием конъюгата антитело-лекарственное средство.



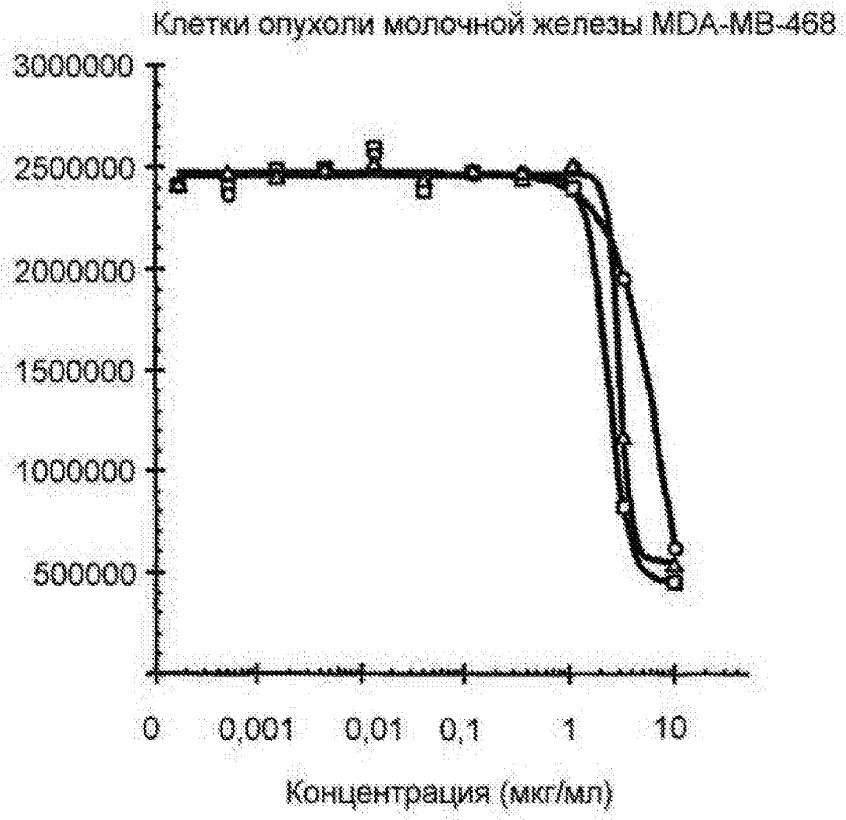
Фиг.1


Клетки опухоли молочной железы ВТ-474
2000000
1600000
1200000
800000
0
0,001
0,01
0,1
1
10
Концентрация (мкг/мл)

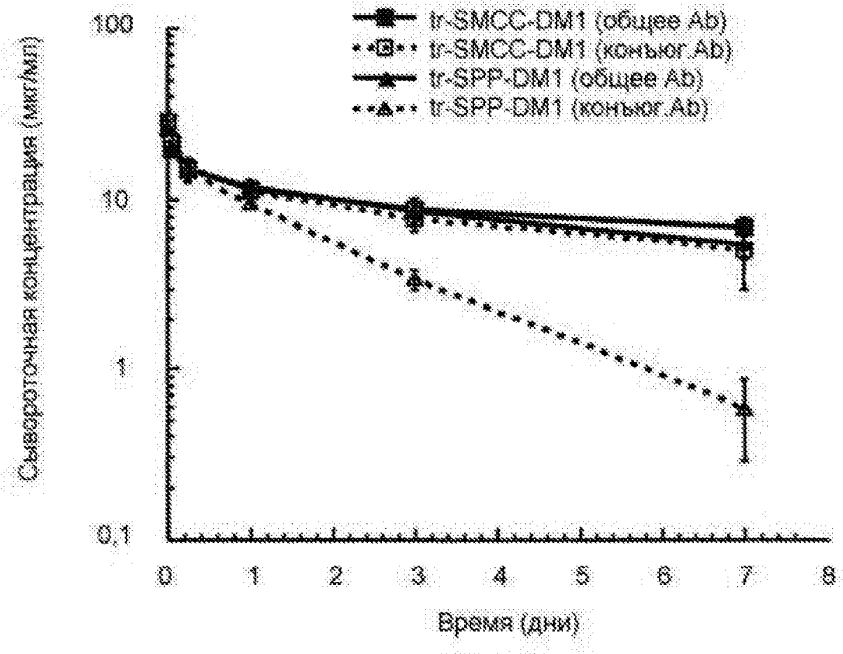
Фиг.2


Клетки опухоли молочной железы MCF7
Относительные люминесцентные единицы
2000000
1600000
1200000
800000
0
0,001
0,01
0,1
1
10
Концентрация (мкг/мл)

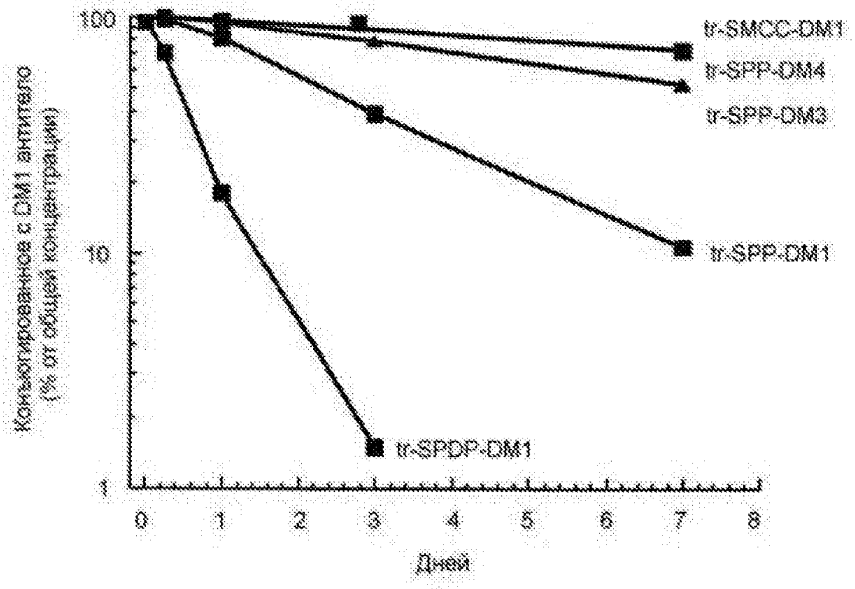
Фиг.3


Клетки опухоли молочной железы MDA-MB-468
3000000
2500000
2000000
1500000
1000000
500000
0
0,001
0,01
0,1
1
10
Концентрация (мкг/мл)

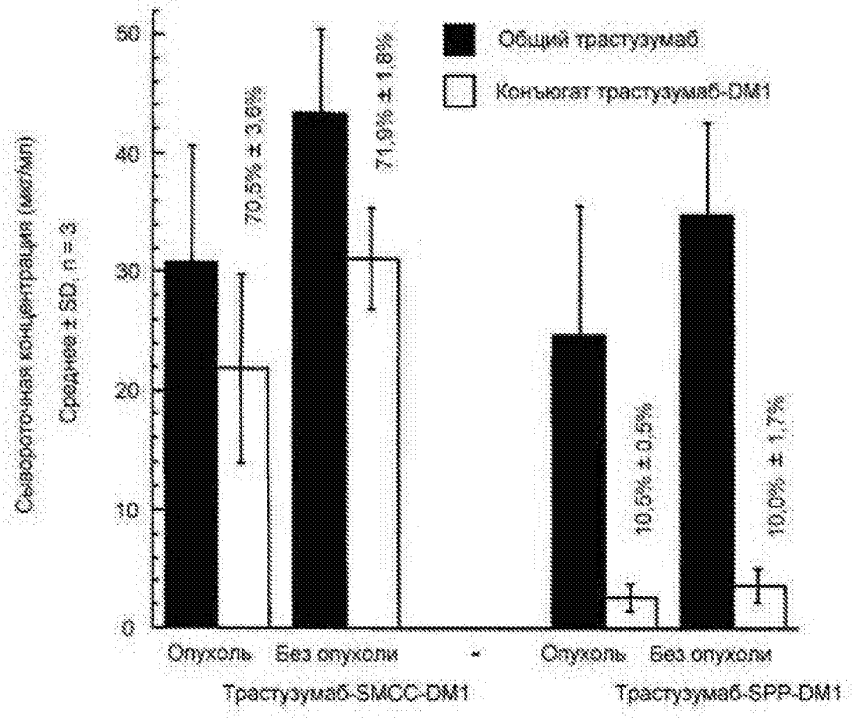
Фиг.4


tr-SMCC-DM1 (общее Ab)
tr-SMCC-DM1 (коньюг.Ab)
tr-SPP-DM1 (общее Ab)
tr-SPP-DM1 (коньюг.Ab)
Сывороточная концентрация (мкг/мл)
100
10
1
0,1
0
1
2
3
4
5
6
7
8
Время (дни)

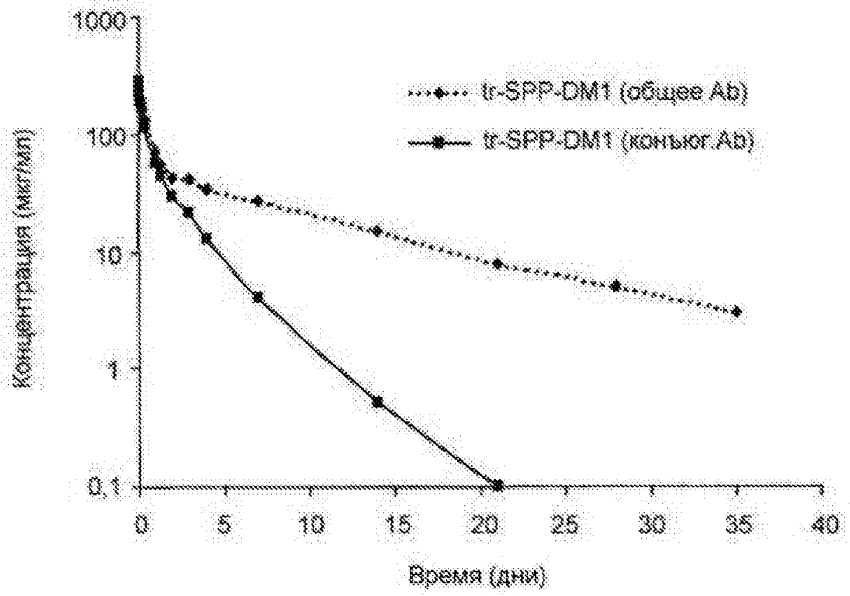
Фиг.5


Конъюгированное с DM1 антитело
(% от общей концентрации)
100
10
1
0
1
2
3
4
5
6
7
8
Дней
tr-SMCC-DM1
tr-SPP-DM4
tr-SPP-DM3
tr-SPP-DM1
tr-SPDP-DM1

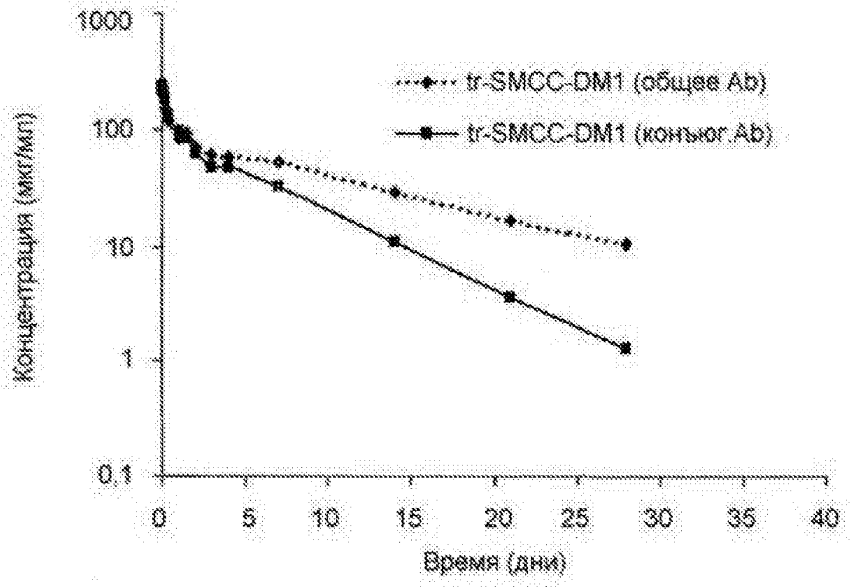
Фиг.6


Общий трастузумаб
Конъюгат трастузумаб-DM1
Сывороточная концентрация (мкг/мл)
Среднее ± SD, n = 3
70,5% ± 3,6%
71,9% ± 1,8%
10,8% ± 0,5%
10,0% ± 1,7%
0
10
20
30
40
50
Опухоль
Без опухоли
Опухоль
Без опухоли
Трастузумаб-SMCC-DM1
Трастузумаб-SPP-DM1

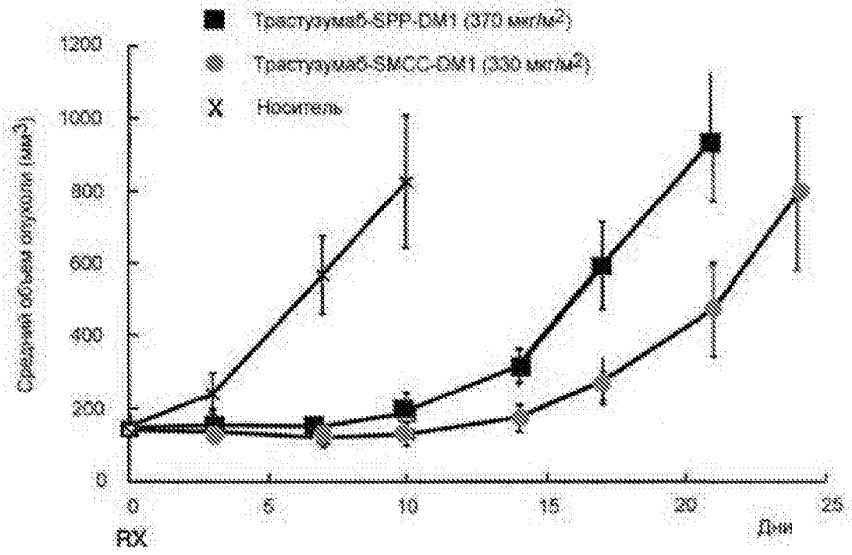
Фиг.7


1000
100
10
1
0,1
Концентрация (мкг/мл)
tr-SPP-DM1 (общее Ab)
tr-SPP-DM1 (конъюг.Ab)
0
5
10
15
20
25
30
35
40
Время (дни)

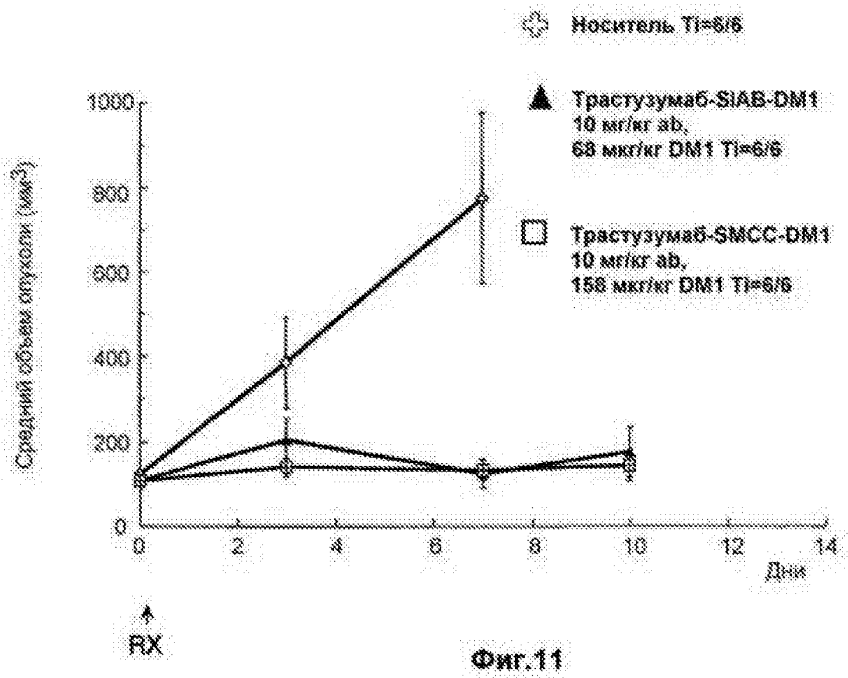
Фиг.8


1000
100
10
1
0,1
Концентрация (мкг/мл)
tr-SMCC-DM1 (общее Ab)
tr-SMCC-DM1 (конъюг.Ab)
0
5
10
15
20
25
30
35
40
Время (дни)

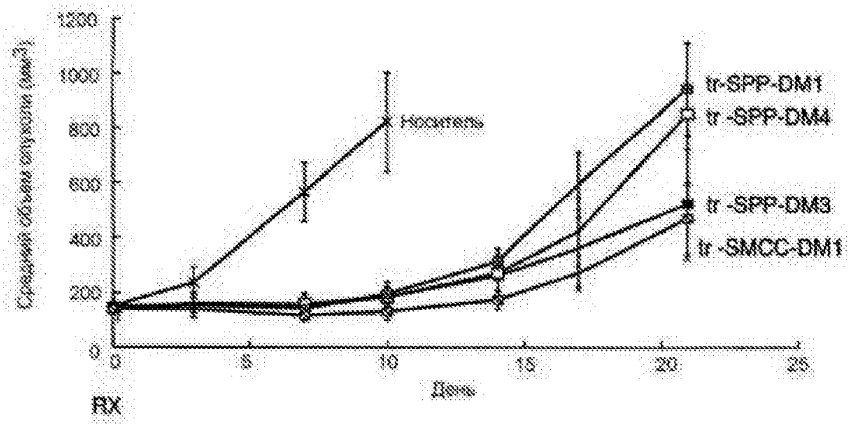
Фиг.9


Трастузумаб-SPP-DM1 (370 мкг/м²)
Трастузумаб-SMCC-DM1 (330 мкг/м²)
Носитель
Средний объем опухоли (мм³)
1200
1000
800
600
400
200
0
0
5
10
15
20
25
Дни
RX

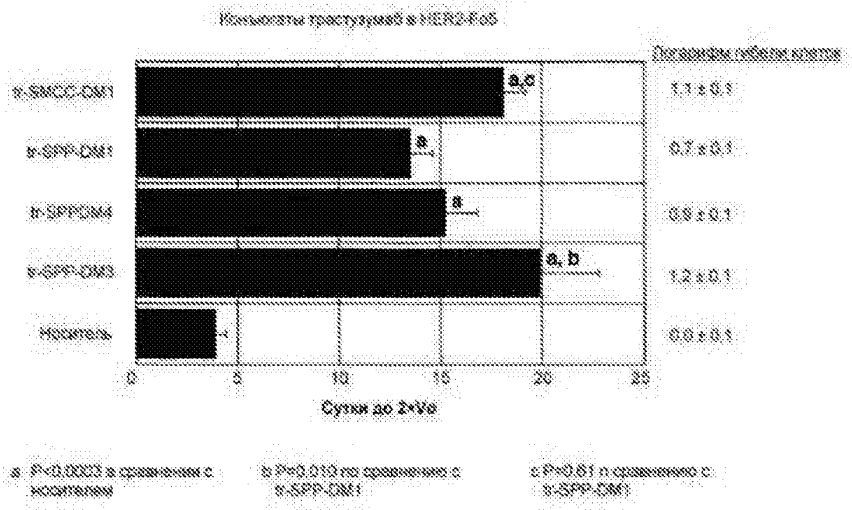
Фиг.10


Носитель Ti=6/6
Трастузумаб-SIAB-DM1
10 мг/кг ab,
68 мкг/кг DM1 Ti=6/6
Трастузумаб-SMCC-DM1
10 мг/кг ab,
158 мкг/кг DM1 Ti=6/6
Средний объем опухоли (мм³)
1000
800
600
400
200
0
0
2
4
6
8
10
12
14
Дни
RX

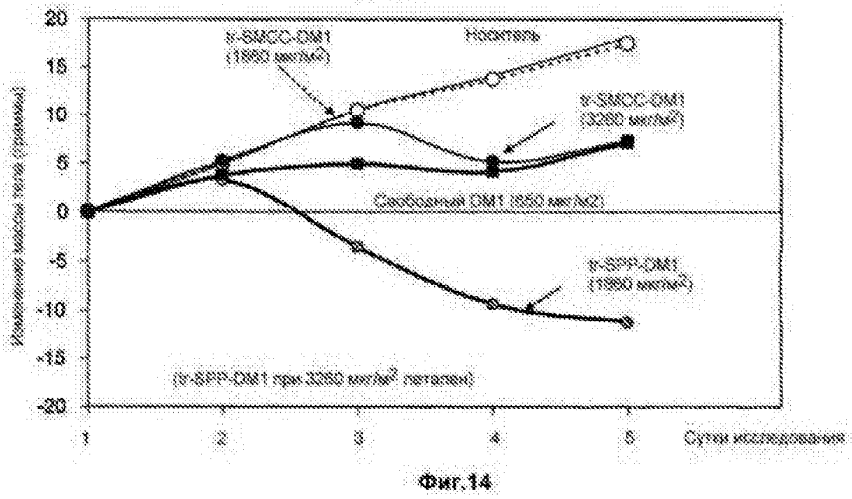
Фиг.11



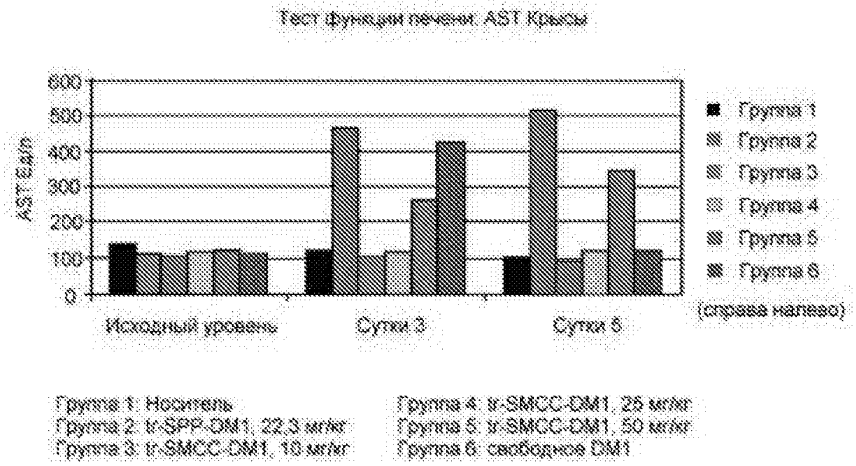
Фиг.12



Фиг.13

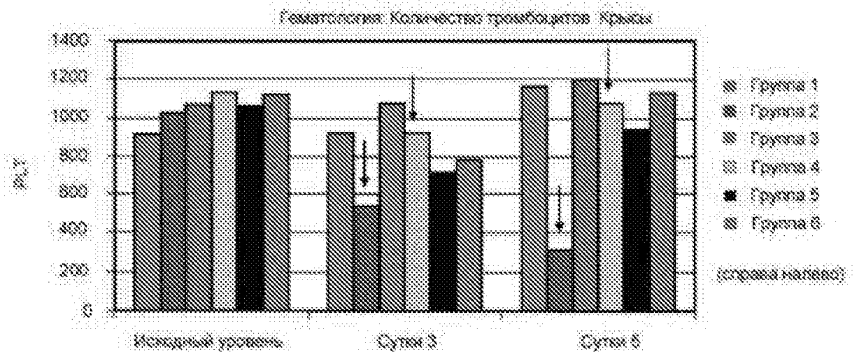


Фиг.14



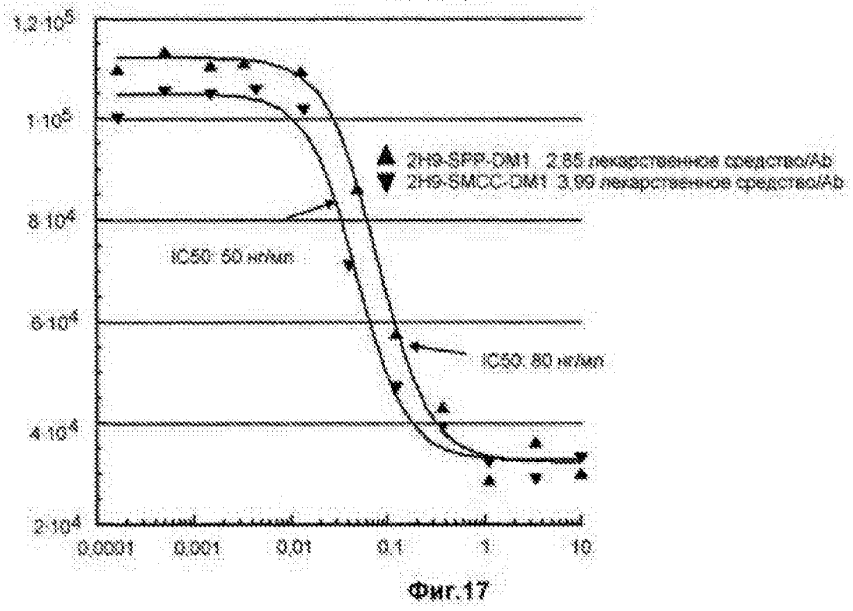
Группа 1: Носитель
Группа 2: tr-SPP-DM1, 22,3 мг/кг
Группа 3: tr-SMCC-DM1, 10 мг/кг
Группа 4: tr-SMCC-DM1, 25 мг/кг
Группа 5: tr-SMCC-DM1, 50 мг/кг
Группа 6: свободное DM1

Фиг.15



Группа 1: Носитель
Группа 2: tr-SPP-DM1, 22,3 мг/кг
Группа 3: tr-SMCC-DM1, 10 мг/кг
Группа 4: tr-SMCC-DM1, 25 мг/кг
Группа 5: tr-SMCC-DM1, 50 мг/кг
Группа 6: свободное DM1

Фиг.16



Фиг.17

ИЗВЕЩЕНИЯ

TH4A Переиздание описаний изобретений к патентам

Причина переиздания: **Коррекция в текстах формулы и описания изобретения**

Дата публикации: 20.06.2015

RZ4A Другие изменения, относящиеся к зарегистрированным изобретениям

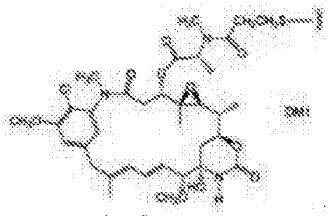
Основание:

Заявление патентообладателя от 29.04.2015.

Изменения:

Продление срока действия исключительного права на изобретение по дополнительному патенту с 01.06.2025 по 31.10.2029. Номер и дата регистрации первого разрешения на применение продукта ЛП-002692 от 31.10.2014. Выдача дополнительного патента № 2404810 на изобретение с формулой:

1. Соединение-конъюгат антитело-лекарственное средство, содержащее антитело, ковалентно присоединенное с помощью линкера к одному или нескольким майтанзоидным лекарственным средствам, где соединение обладает формулой I: Ab – (L – D), или его фармацевтически приемлемые соль или сольват, где Ab представляет собой huMAb4D5-8 (трастузумаб);
L представляет собой сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат (SMCC) или BMPEO; D представляет собой майтанзоидное лекарственное средство DM1 следующей структуры:



p равно от 1 до 8.
2. Соединение-конъюгат антитело-лекарственное средство по п.1, где антитело специфически связывается с рецептором HER2.
3. Соединение-конъюгат антитело-лекарственное средство по п.1, которое специфически связывается с внеклеточным доменом рецептора HER2 и ингибирует рост опухолевых клеток, сверхэкспрессирующих рецептор HER2.
4. Фармацевтическая композиция, содержащая соединение-конъюгат антитело-лекарственное средство по п.1, или его фармацевтически приемлемую соль, и фармацевтически приемлемые разбавитель, носитель или эксципиент.
5. Готовое изделие, содержащее соединение-конъюгат антитело-лекарственное средство по п.1, контейнер и листовку-вкладыш или этикетку, указывающие, что соединение можно применять для лечения злокачественной опухоли.
6. Готовое изделие по п.5, где указанная листовка-вкладыш этикетки указывает, что соединение можно применять для лечения злокачественной опухоли, характеризующейся сверхэкспрессией рецептора ErbB2.
7. Готовое изделие по п.6, где злокачественная опухоль представляет собой рак молочной железы.

Дата внесения записи в Государственный реестр: **26.11.2015**

Дата публикации: 20.12.2015

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

(19) **RU** (11) **2 450 008** (13) **C2**

(51) МПК
C07D 491/22 (2006.01)
A61K 31/4741 (2006.01)
A61K 31/4745 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: **2009102243/04, 13.07.2007**

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
13.07.2007

Приоритет(ы):
(30) Конвенционный приоритет:
26.07.2006 IT MI2006A001473

(43) Дата публикации заявки: **27.07.2010** Бюл. № 21

(45) Опубликовано: **10.05.2012** Бюл. № **13**

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **US 5972955 A, 26.10.1999. RU 2004109163 A, 10.10.2005. RU 2190613 C2, 20.12.1999. RU 08117449 A, 10.09.2000.**

(85) Дата начала рассмотрения заявки PCT на национальной фазе: **23.01.2009**

(86) Заявка PCT:
EP 2007/006243 (13.07.2007)

(87) Публикация заявки PCT:
WO 2008/011994 (31.01.2008)

Адрес для переписки:
129090, Москва, ул. Б. Спасская, 25, стр.3, ООО "Юридическая фирма Городисский и Партнеры", пат.пов. Е.Е.Назиной

(72) Автор(ы):
ФОНТАНА Габриеле (IT),
БОМБАРДЕЛЛИ Эцио (IT),
МАНДЗОТТИ Карла (IT),
БАТТАЛЬЯ Артуро (IT),
САМОРИ Кристиан (IT)

(73) Патентообладатель(и):
ИНДЕНА С.П.А. (IT)

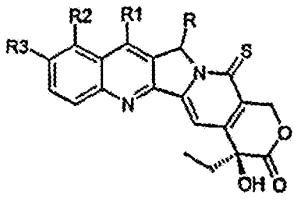
RU 2450008 C2

RU 2450008 C2

(54) ПРОИЗВОДНЫЕ КАМПТОТЕЦИНА С ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТЬЮ

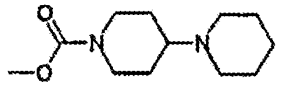
(57) Реферат:

Изобретение относится к новым 5-замещенным производным тиокамптотецина общей формулы I:



(I)

где R представляет собой водород, -N3; R1 представляет собой водород, этил, группу -CH=N-O-C(CH$_3$)$_3$; R2 представляет собой водород, -CH$_2$N(CH$_3$)$_2$; R3 представляет собой водород, гидроксил, группу



;

их фармацевтически приемлемым солям, энантиомерам, диастереомерам и соответствующим смесям, обладающим противоопухолевой активностью, способам их получения, их применению в качестве противоопухолевых лекарственных средств и

фармацевтическим композициям, на основе соединений формулы I. 7 н. и 3 з.п. ф-лы, 3 табл., 34 пр.

RU 2450008 C2

RU 2450008 C2

RUSSIAN FEDERATION

FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) **RU** (11) **2 450 008** (13) **C2**

(51) Int. Cl.
C07D 491/22 (2006.01)
A61K 31/4741 (2006.01)
A61K 31/4745 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21)(22) Application: **2009102243/04, 13.07.2007**

(24) Effective date for property rights:
13.07.2007

Priority:
(30) Convention priority:
26.07.2006 IT MI2006A001473

(43) Application published: **27.07.2010** Bull. 21

(45) Date of publication: **10.05.2012 Bull. 13**

(85) Commencement of national phase: **23.01.2009**

(86) PCT application:
EP 2007/006243 (13.07.2007)

(87) PCT publication:
WO 2008/011994 (31.01.2008)

Mail address:
129090, Moskva, ul. B. Spasskaja, 25, str.3, OOO "Juridicheskaja firma Gorodisskij i Partnery", pat.pov. E.E.Nazinoj

(72) Inventor(s):
FONTANA Gabriele (IT),
BOMBARDELLI Ehtsio (IT),
MANDZOTTI Karla (IT),
BATTAL'Ja Arturo (IT),
SAMORI Kristian (IT)

(73) Proprietor(s):
INDENA S.P.A. (IT)

RU 2450008 C2

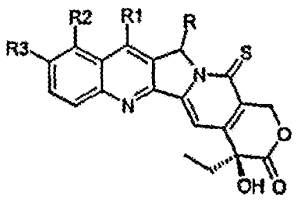
RU 2450008 C2

(54) CAMPTOTHECIN DERIVATIVES WITH ANTICANCER ACTIVITY

(57) Abstract:

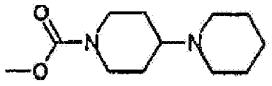
FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention refers to new 5-substituted derivatives of thiocamptothecin of general formula I:



, wherein:

(I)

R represents hydrogen, -N3; R1 hydrogen, ethyl, group -CH=N-O-C$(CH_3)_3$; R2 represents hydrogen, -$CH_2N(CH_3)_2$; R3 represents hydrogen, hydroxyl, group  , to their pharmaceutically acceptable salts, enantiomers, diastereoisomers and related mixtures.

EFFECT: higher anticancer activity of the compound.

10 cl, 3 tbl, 34 ex

Настоящее изобретение относится к новым производным камптотецина, обладающим противоопухолевой активностью, способу их получения, их применению в качестве противоопухолевых лекарственных средств и фармацевтическим композициям, содержащим их.

ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ НАСТОЯЩЕГО ИЗОБРЕТЕНИЯ

Камптотецин представляет собой алкалоид, экстрагированный из Camptotheca acuminate (Nyssaceae), который впервые описали Wall и Wani в 1966 г. (J. Am. Chem. Soc. 1966, 88, 3888-3890). Камптотецин, хоть он и наделен широким спектром противоопухолевой активности, особенно против опухоли толстой кишки и других солидных опухолей и лейкемий, не применяют в терапии из-за его высокой токсичности, которая, в частности, проявляется в форме геморрагического цистита, желудочно-кишечной токсичности и миелосупрессии.

Для того чтобы получить соединения, обладающие низкой токсичностью и высокой растворимостью, синтезировали ряд аналогов камптотецина. В настоящее время в клинической практике применяют два препарата, а именно CPT-11 и топотекан. Другие производные, такие как белотекан, рубитекан, эксатекан, гиматекан, пегамотекан, луртотекан, каренитецин, афелетекан, гомокамптотецин, дифломотекан и многие другие, проходят клинические испытания. Соединение CPT-11 представляет собой высокорастворимое пролекарство для 10-гидрокси-7-этилкамптотецина (общеизвестного как SN-38), одобренное для лечения многих солидных опухолей и асцитов (колоректальных, кожных, желудочных, легочных, шейки матки, яичников, неходжкинской лимфомы).

Топотекан является растворимым в физиологическом растворе соединением, активным против опухолей легкого, желудка, печени, яичника, молочной железы, предстательной железы, пищевода, прямой кишки, сарком мягких тканей, головы и шеи, глиобластомы, хронических и острых миелоцитарных лейкемий. Топотекан оказывает, однако, существенные побочные действия, такие как нейтропения и тромбоцитопения.

Луртотекан представляет собой более растворимое производное, обладающее активностью в опухолях шеи, яичника, молочной железы, колоректальной и легочной микроцитомы. Однако луртотекан также обладает кровяной токсичностью.

Рубитекан представляет собой пролекарство для орального применения, эффективное против опухолей поджелудочной железы, яичника и молочной железы.

Камптотецин и его аналоги, также как и все ингибиторы топоизомеразы I, эффективны против опухолей, устойчивых к обычным лекарствам, включая ингибиторы топоизомеразы II; поддерживают высокий уровень топоизомеразы во время всего клеточного цикла; не вызывают мультилекарственную резистентность (Pgo или MRP) или нейтрализацию метаболизма, опосредованного данным ферментом.

Сейчас исследования фокусируются на новых ингибиторах топоизомеразы I, обладающих меньшей токсичностью, чем лекарства, применяемые в настоящее время.

Производные камптотецина с раскрытым кольцом демонстрируют высокое связывание с белками (в частности, с альбумином) и низкое распространение в опухолевых тканях. Вследствие этого продукт аккумулируется в организме, а воздействие на опухоли недостаточно.

Напротив, высокая липофильность лактоновой формы способствует адгезии производных камптотецина на клеточных мембранах, особенно на эритроцитах, влияя на коэффициент распределения между тканью и плазмой. По этой причине

исследования фокусируются на двух альтернативных подходах: a) конструирование продуктов со слабым связыванием с белком, при этом с хорошей растворимостью; b) конструирование высокоактивных продуктов, имеющих терапевтический эффект даже в чрезвычайно низких дозах.

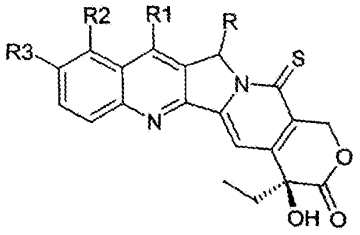
Модификации в положениях 7, 9, 10 и 11, как правило, оказываются вполне допустимыми, поскольку не влияют на стабильность тройного комплекса ДНК, топоизомеразы I и камптотецина, образование которого обуславливает противоопухолевую активность соединений.

Продукты с конфигурацией 20R оказываются или неактивными, или гораздо менее активными, чем продукты с конфигурацией 20S, которая совпадает с природной конфигурацией.

Как правило, модификации в положении 5 считаются неблагоприятными для образования тройного комплекса, тогда как о модификациях в пиридоновых кольцах D и E сообщают, что они губительны для активности продукта.

РАСКРЫТИЕ НАСТОЯЩЕГО ИЗОБРЕТЕНИЯ

В первом аспекте настоящее изобретение относится к производным камптотецина общей формулы I:



(I)

где

R представляет собой F, Cl, Br, I, -N3, NH2, -NR'R", -COOR', -CONR'R", -NHR'"-NR'R", где R', R" и R'" могут представлять собой H, алкил, арил, арилалкил, ацил, алкоксикарбонил, арилоксикарбонил;

R1 представляет собой алкил, аминоалкил, гидроксиалкил, нитрил, алкоксимино, арилоксимино, силилалкил;

R2 представляет собой водород, гидроксил, алкокси, аминоалкил;

R3 представляет собой водород, необязательно замещенный гидроксил, алкокси, аминоалкил,

где алкильные, ацильные, алкокси, аминоалкильные или алкоксимино группы могут содержать от 1 до 8, предпочтительно от 1 до 4 атомов углерода, в прямой или разветвленной цепи, и арильная и арилокси группы могут содержать от 5 до 10 атомов углерода;

их фармацевтически приемлемым солям, изомерам, энантиомерам, диастереомерам и соответствующим смесям.

Соединения настоящего изобретения демонстрируют слабое связывание с белком и обладают хорошей растворимостью и высокой активностью даже в очень низких дозах.

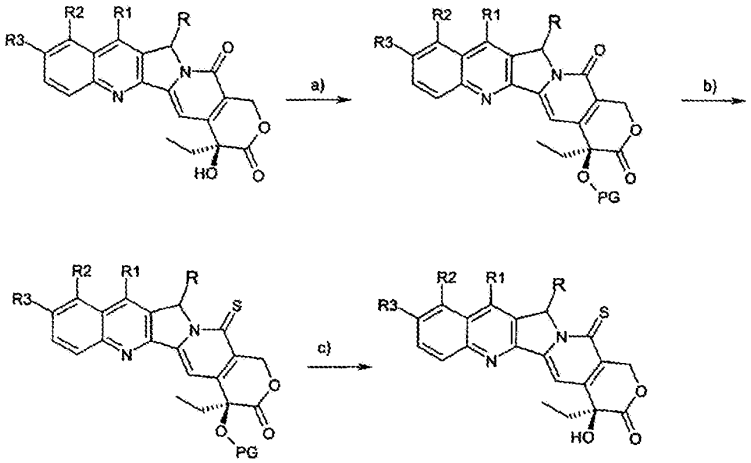
Предпочтительный синтетический способ получения соединения настоящего изобретения показан на схеме I, где:

a) - защита гидроксигрупп предшественника;

b) - превращение пиридонового кольца в тиопиридоновое кольцо;

c) - удаление защитных групп.

Схема I



На схеме I R, R1, R2 и R3 имеют значения, описанные выше, и PG представляет собой гидрокси-защитную группу.

Предшественники могут быть коммерчески доступными или получены, как описано в литературе. Для получения продуктов, модифицированных в 5 положении, можно применять способ, описанный на схеме II, который включает:

a) - защиту гидроксигрупп предшественника;

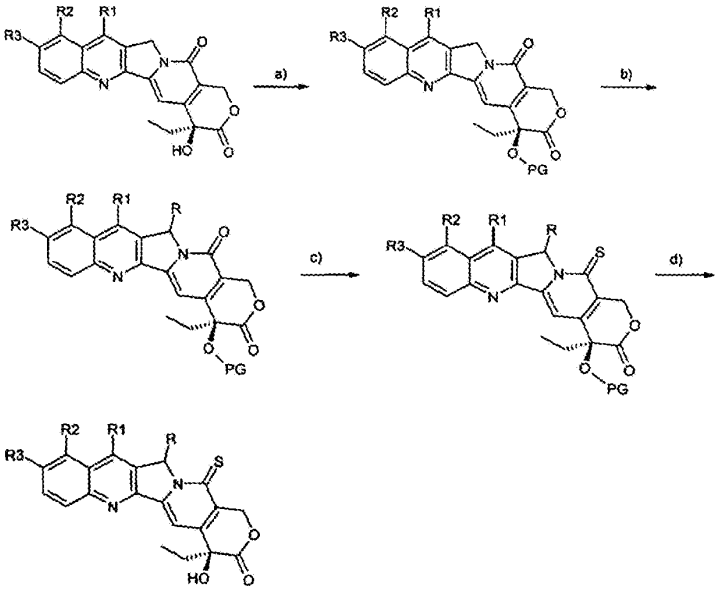
b) - модификацию в 5 положении посредством образования карбаниона и реакции с электрофильным реагентом;

c) - трансформацию карбонила 16a в тиокарбонил;

d) - снятие защиты с гидроксигрупп;

в котором стадии b) и c) могут быть проведены в обратном порядке.

Схема II



На схеме II R, R1, R2 и R3 имеют значения, описанные выше, и PG представляет собой OH-защитную группу.

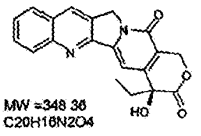
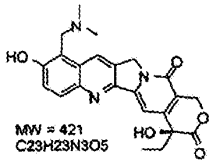
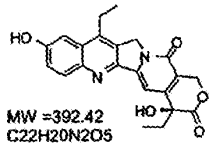
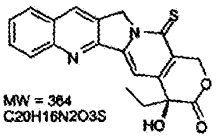
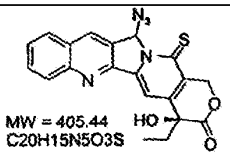
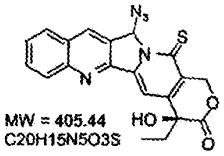
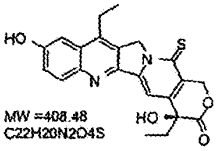
Образование карбаниона в 5 положении можно получить, обрабатывая предшественик сильным органическим основанием, предпочтительно LiHMDS.

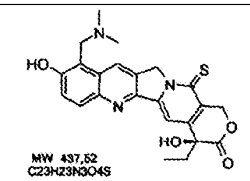
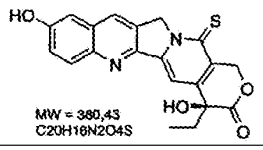
Карбанион реагирует ***in situ*** с электрофилом, таким как источник галогена, азадикарбоксилат, изоцианат, хлоркарбонильное производное, тозилазид.

Превращение пиридонового кольца в тиопиридоновое кольцо можно получить при помощи реакции с 2,4-бис(4-метоксифенил)-1,2,3,4-дитиафосфетан-2,4-дисульфидом (обычно известным как реагент Лаусона) (Cava P.M. et al., Tetrahedron 1985, 41, 5061; Cherkasov RA et al., Tetrahedron 1985 41, 2567; Ghattas AAG et al., Sulfur Lett. 1982, 1, 69; Yde B et al., Tetrahedron 1984, 40. 2047) или с эквивалентным реагентом. Предпочтительным является реагент Лаусона.

В качестве гидрокси-защитных групп предпочтительны силилы и карбаматы или их комбинации.

Соединения по настоящему изобретению были подвергнуты анализу на цитотоксичность на широком спектре опухолевых клеток. В качестве примера приведены данные по цитотоксичности на клеточной линии NCI-H460 (рак NSCL), касающиеся двух соединений формулы (I), с использованием камптотецина и препаратов Топотекан и SN-38 в качестве контроля:

Название	Формула	NCI-H460 IC50 (мкг/мл) Количество клеток
Камптотецин	 MW =348.36 C20H16N2O4	0,115±0,0174
Топотекан	 MW = 421 C23H23N3O5	0,63±0,44
SN38	 MW =392.42 C22H20N2O5	0,0865±0,0049
IDN 6070 (тиокамптотецин)	 MW = 364 C20H16N2O3S	0,05±0,021
IDN 6092	 MW = 405.44 C20H15N5O3S	0,3±0,07
IDN 6093	 MW = 405.44 C20H15N5O3S	0,72±0,2
IDN 6156 Тио-SN38	 MW =408.48 C22H20N2O4S	0,0095±0,0007

IDN 6180 Тиотопотекан		0,115±0,021
IDN 6181 10-гидрокситиокамптотецин		0,035±0,011

Анализ цитотоксичности показал, что серосодержащие производные камптотецина в среднем в 10 раз более активны, чем несеросодержащие аналоги.

Наиболее активные соединения были определены в анализе расщепления ДНК путем измерения активной концентрации и стойкости повреждения (см. раздел 'Примеры'). Производные формулы (I) неожиданно продемонстрировали более высокую стойкость блокирования репликации ДНК, чем используемые в качестве контроля стандарты (в частности топотекан и камптотецин), при этом сохраняя эффективную цитотоксическую активность.

Более того, серосодержащие производные оказались более активными, чем несеросодержащие аналоги также и в данном случае, поскольку они индуцировали повреждение ДНК в более низких концентрациях, и оно сохранялось дольше.

Соединение тио-SN38 (IDN6156) трансформировали в тио-CPT11 (тиоиринотекан) в соответствии со способом превращения SN38 в CPT11 (иринотекан), описанным в литературе. Полученное в результате соединение тиоиринотекан сравнили in vivo с близким несеросодержащим аналогом в клиническом применении (CPT11) на модели опухоли легкого, высокочувствительной к стандартному контролю.

Данные, приведенные в следующей таблице, показывают, что серосодержащее соединение тио-CPT11 активнее, чем несеросодержащий аналог CPT11, поскольку сохраняет тот же уровень эффективности при лучших переносимости и терапевтическом индексе.

Препарат[a]	Доза (мг/кг на инъекцию)	TWI%[b]	LCK[c] (0,5 г)	Max[d] BWL%	Tox/Tot[e]
CPT11	50	91	1,8	15	0/5
тио-CPT11	10	94	2,3	9	0/5

В другом аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей соединение формулы (I) вместе с фармацевтически приемлемыми носителями и эксципиентами. Фармацевтические формы, подходящие для орального или парентерального введения соединений (I) могут быть твердыми, предпочтительно капсулы, таблетки и гранулы, или жидкими, предпочтительно инъецируемые или инфузионные растворы.

Подходящим образом составленные в композицию соединения по настоящему изобретению могут применяться для лечения солидных опухолей и лейкемий, в частности опухолей легкого, яичника, молочной железы, желудка, печени, предстательной железы, сарком мягких тканей, головы и шеи, пищевода, поджелудочной железы, толстой кишки, прямой кишки, глиобластомы, хронических и острых миелоцитарных лейкемий.

ПРИМЕРЫ

Пример I - 20-OTES-камптотецин

Камптотецин (0,100 г, 0,287 ммоль) суспендируют в безводном диметилформамиде (3 мл) в инертной атмосфере, и к полученной в результате суспензии добавляют имидазол (0,980 г, 1,44 ммоль). Смесь перемешивают в течение 10 минут, затем триэтилсилилхлорид (TES-Cl) (0,193 мл, 1,15 ммоль) добавляют туда по каплям, после чего добавляют 4-диметиламинопиридин (DMAP) (0,040 г, 0,287 ммоль). Через 46 часов реакционную смесь выпаривают в вакууме, (по ТСХ контролируют полное исчезновение реагента, элюент CH_2Cl_2/MeOH = 30/1). Затем твердое вещество повторно растворяют в CH_2Cl_2 и промывают с помощью H_2O и насыщенного NH_4Cl. Водную фазу экстрагируют с помощью CH_2Cl_2 (2×10 мл). Органические фазы объединяют и сушат над Na_2SO_4, фильтруют и концентрируют в вакууме с получением таким образом искомого продукта (0,133 г, 0,287 ммоль) в виде светло-желтого твердого вещества.

^{1}H ЯМР ($CDCl_3$, 400 МГц) δ 8,37 (с, 1H, Ar, H-7), 8,25 (д, 1H, J=8,4 Гц, Ar), 7,92 (д, 1H, J=8,0 Гц, Ar), 7,82 (т, 1H, J=8,0 Гц, Ar), 7,65 (т, 1H, J=8,4 Гц, Ar), 7,57 (с, 1H, H-14), 5,67 (д, 1H, J=16,4 Гц, H-17), 5,29 (с, 2H, H-5), 5,25 (д, 1H, J=16,4 Гц, H-17), 2,00-1,84 (м, 2H, H-19), 1,03-0,93 (м, 12H), 0,80-0,71 (м, 6H). ^{13}C ЯМР ($CDCl_3$, 100 МГц) δ 171,7, 157,6, 152,5, 151,5, 149,0, 145,9, 130,9, 130,4, 130,0, 128,4, 128,1, 128,0, 127,9, 118,9, 94,4, 75,3, 66,0, 50,0, 33,2, 7,9, 7,2, 6,4.

Пример II - 20-OTES-тиокамптотецин

Камптотецин 20-OTES (0,664 г, 1,44 ммоль), растворяют в безводном ксилоле (20 мл) при перемешивании в инертной атмосфере. Затем добавляют реагент Лаусона (LR) (0,523 г, 1,29 ммоль) и нагревают реакцию до 90°C. Реакционную смесь подвергают реакции в течение 18 часов при 90°C, контролируя при помощи ТСХ исчезновение реагента (гексан/AcOEt = 1/1). Растворитель выпаривают в вакууме и остаток очищают флеш-хроматографией (SiO_2, гексан/AcOEt=4/1, затем 7/2) с получением таким образом искомого продукта (0,578 г, 1,21 ммоль, 84%) в виде ярко-желтого твердого вещества.

^{1}H ЯМР ($CDCl_3$, 400 МГц) δ 8,46 (с, 1H, Ar, H-7) 8,29 (д, 1H, J=8,4 Гц, Ar), 8,03 (с, 1H, H-14), 7,97 (д, 1H, J=8,4 Гц, Ar), 7,86 (т, 1H, J=21,8 Гц, Ar), 7,69 (т, 1H, J=8,4 Гц, Ar), 6,15 (д, 1H, J=16,9 Гц, H-17), 5,62 (д, 1H, J=21,0 Гц, H-5), 5,57 (д, 1H, J=21,0 Гц, H-5), 5,34 (д, 1H, J=16,9 Гц, H-17), 1,94 (д, 1H, J=7,6 Гц, H-19), 1,90 (д, 1H, J=7,6 Гц, H-19), 1,05-0,91 (м, 12H), 0,82-0,71 (м, 6H). ^{13}C ЯМР ($CDCl_3$, 100 МГц) δ 172,3, 171,5, 151,9, 149,1, 148,3, 147,2, 130,8, 130,6, 130,6, 130,1, 128,3, 128,2, 128,2, 128,0, 104,5, 75,0, 68,8, 56,3, 33,5, 7,7, 7,2, 6,4.

Пример III - получение тиокамптотецина (IDN 6070)

20-OTES тиокамптотецин (0,150 г, 0,314 ммоль) растворяют в безводном ТГФ (10 мл) при перемешивании в инертной атмосфере, затем добавляют туда по каплям $Et_3N{\bullet}3HF$ (0,140 мл, 0,816 ммоль). Реакционную смесь подвергают реакции в течение 48 часов при комнатной температуре, контролируя при помощи ТСХ исчезновение реагента (гексан/AcOEt = 1/1). Растворитель выпаривают в вакууме и остаток очищают флеш-хроматографией (SiO_2, гексан/AcOEt=2/1, затем 1/1) с получением таким образом искомого продукта (0,112 г, 0,307 ммоль, 98%) в виде ярко-желтого твердого вещества.

^{1}H ЯМР ($CDCl_3$, 400 МГц) δ 8,46 (с, 1H, Ar, H-7), 8,27 (д, 1H, J=8,4 Гц, Ar), 8,13 (с, 1H, H-14), 7,97 (д, 1H, J=8,4 Гц, Ar), 7,86 (т, 1H, J=21,8 Гц, Ar), 7,70 (т, 1H, J=8,4 Гц, Ar), 6,25 (д, 1H, J=16,9 Гц, H-17), 5,62 (д, 1H, J=21,0 Гц, H-5), 5,58 (д, 1H, J=21,0 Гц, H-5), 5,37 (д,

1H, J=16,9 Гц, H-17), 3,80 (с, 1H, OH), 1,90 (кв, 2H, H-19), 1,03 (т, 3H, J=7,2 Гц, Me). ^{13}C ЯМР ($CDCl_3$, 100 МГц) δ 173,5, 172,6, 151,8, 149,1, 148,7, 145,5, 130,9, 130,8, 130,5, 129,9, 128,3 (2 C), 128,2, 128,0, 104,3, 72,3, 69,2, 56,3, 32,0, 7,8.

Пример IV - 20-OTES SN-38

SN-38 (0,100 г, 0,255 ммоль) суспендируют в безводном диметилформамиде (5 мл), в инертной атмосфере, и к полученной в результате суспензии добавляют имидазол (0,087 г, 1,28 ммоль). Смесь перемешивают в течение 10 минут, затем добавляют туда по каплям триэтилсилилхлорид (TES-Cl) (0,171 мл, 1,02 ммоль), после чего добавляют 4-диметиламинопиридин (DMAP) (0,031 г, 0,255 ммоль). Через 52 часа реакционную смесь выпаривают в вакууме, контролируя при помощи ТСХ (CH_2Cl_2/MeOH=10/1) полное исчезновение реагента. Затем твердое вещество повторно растворяют в CH_2Cl_2 и промывают с помощью H_2O и насыщенного NH_4Cl. Водную фазу экстрагируют с помощью CH_2Cl_2 (2×10 мл). Органические фазы объединяют и сушат над Na_2SO_4, фильтруют и концентрируют в вакууме с получением таким образом искомого продукта (0,121 г, 0,240 ммоль, 94%) в виде светло-желтого твердого вещества.

^{1}H ЯМР ($CDCl_3$, 400 МГц) δ 9,26 (уш. с, 1H, OH), 8,14 (д, 1H, J=9,2 Гц, Ar, H-12), 7,58 (с, 1H, H-14), 7,49 (дд, 1H, J_1=9,2 Гц J_2=2,2 Гц, H-11), 7,46 (д, 1H, J=2,2 Гц, H-9), 5,70 (д, 1H, J=16,5 Гц, H-17), 5,28 (д, 1H, J=16,5 Гц, H-17), 5,23 (с, 2H, H-5), 3,05 (кв, 2H, J=7,5 Гц), 1,97-1,81 (м, 2H, H-19), 1,32 (т, 3H, J=7,5 Гц, Me), 0,98-0,88 (м, 12H), 0,77-0,68 (м, 6H). ^{13}C ЯМР ($CDCl_3$, 100 МГц) δ 172,1, 157,9, 156,6, 152,1, 149,0, 146,7, 144,6, 143,6, 131,9, 128,7, 126,9, 122,8, 117,9, 105,5, 98,5, 75,4, 65,9, 49,5, 32,9, 23,2, 13,5, 7,8, 7,2, 6,4.

Пример V - 10-OTBDMS-20-OTES SN-38

20-OTES SN-38 (0,121 г, 0,240 ммоль) растворяют в безводной смеси CH_2Cl_2/ТГФ = 1:1 (8 мл) в инертной атмосфере. Добавляют туда имидазол (0,081 г, 1,20 ммоль) после чего, через 10 минут, добавляют трет-бутилдиметилсилилхлорид (TBDMS-Cl), (0,144 мг, 0,957 ммоль), затем 4-диметиламинопиридин (DMAP) (0,029 г, 0,240 ммоль). Через 18 часов реакционную смесь выпаривают в вакууме, контролируя при помощи ТСХ (гексан/AcOEt = 1/1) исчезновение реагента. Затем твердое вещество повторно растворяют в CH_2Cl_2 и промывают с помощью H_2O и насыщенного NH_4Cl. Водную фазу экстрагируют с помощью CH_2Cl_2 (2×10 мл), и органические фазы объединяют, сушат над Na_2SO_4, фильтруют и концентрируют в вакууме. Остаток очищают флеш-хроматографией (SiO_2, гексан/AcOEt = 1/1) с получением таким образом искомого продукта (0,127 г, 0,205 ммоль, 85%) в виде светло-желтого твердого вещества.

^{1}H ЯМР ($CDCl_3$, 400 МГц) δ 8,14 (д, 1H, J=8,8 Гц, Ar, H-12), 7,49 (с, 1H, H-14), 7,40 (д, 1H, J=2,2 Гц, H-9), 7,38 (дд, 1H, J_1=8,8 Гц J_2=2,5 Гц, H-11), 5,67 (д, 1H, J=16,5 Гц, H-17), 5,25 (д, 1H, J=16,5 Гц, H-17), 5,23 (с, 2H, H-5), 3,11 (кв, 2H, J=7,6 Гц), 1,99-1,82 (м, 2H, H-19), 1,38 (т, 3H, J=7,6 Гц, Me), 1,04 (с, 9H), 1,00-0,92 (м, 12H), 0,78-0,69 (м, 6H), 0,30 (с, 6H). ^{13}C ЯМР ($CDCl_3$, 100 МГц) δ 171,9, 157,7, 155,1, 151,5, 150,1, 146,8, 145,6, 143,5, 132,2, 128,2, 126,9, 125,9, 118,0, 110,5, 97,7, 75,4, 66,0, 49,3, 33,2, 25,6, 23,1, 18,3, 13,7, 7,9, 7,2, 6,4, -4,3.

Пример VI - 10-OTBDMS 20-OTES тио-SN-38

SN-38 10-OTBDMS 20-OTES (0,127 г, 0,205 ммоль) растворяют в безводном ксилоле (6 мл) при перемешивании в инертной атмосфере. Затем добавляют реагент Лаусона (LR) (0,075 г, 0,184 ммоль) и нагревают реакцию до 90°C. Реакционную смесь подвергают реакции в течение 23 часов при 90°C, контролируя при помощи ТСХ (гексан/AcOEt=2/1) исчезновение реагента. Растворитель выпаривают в вакууме и

остаток очищают флеш-хроматографией (SiO_2, гексан/AcOEt=5/1) с получением таким образом искомого продукта (0,042 г, 0,066 ммоль, 32%) в виде ярко-желтого твердого вещества.

^{1}H ЯМР ($CDCl_3$, 400 МГц) δ 8,17 (д, 1H, J=8,9 Гц, Ar, H-12), 7,96 (с, 1H, H-14), 7,43 (д, 1H, J=2,6 Гц, H-9), 7,41 (дд, 1H, J_1=8,8 Гц J_2=2,6 Гц, H-11), 6,16 (д, 1H, J=17,1 Гц, H-17), 5,56 (д, 1H, J=20,0 Гц, H-5), 5,50 (д, 1H, J=20,0 Гц, H-5), 5,33 (д, 1H, J=16,5 Гц, H-17), 3,18 (кв, 2H, J=7,6 Гц), 1,91 (кв, 2H, J=7,4 Гц, H-19), 1,41 (т, 3H, J=7,6 Гц, Me), 1,05 (с, 9H), 1,03-0,92 (м, 12H), 0,81-0,72 (м, 6H), 0,31 (с, 6H). ^{13}C ЯМР ($CDCl_3$, 100 МГц) δ 172,1, 171,5, 155,4, 149,4, 149,3, 147,4, 145,7, 143,6, 132,4, 129,9, 128,5, 126,5, 126,2, 110,5, 104,1, 75,0, 68,8, 55,8, 33,5, 25,7, 23,2, 18,4, 13,9, 7,8, 7,2, 6,5, -4,3.

Пример VII - 20-OTES тио-SN-38

10-OTBDMS 20-OTES тио-SN-38 (0,042 г, 0,066 ммоль) растворяют в безводном ТГФ (4 мл) при перемешивании в инертной атмосфере, затем добавляют туда по каплям $Et_3N{\bullet}3HF$ (0,013 мл, 0,080 ммоль). Реакционную смесь подвергают реакции в течение 3 часов при комнатной температуре, контролируя при помощи ТСХ исчезновение реагента (гексан/AcOEt=2/1). Растворитель выпаривают в вакууме и остаток очищают флеш-хроматографией (SiO_2, гексан/AcOEt=2/1, затем 1/1) с получением таким образом искомого продукта (0,034 г, 0,065 ммоль, 99%) в виде ярко-желтого твердого вещества.

^{1}H ЯМР ($CDCl_3$, 400 МГц) δ 8,19 (д, 1H, J=9,2 Гц, Ar, H-12), 7,96 (с, 1H, H-14), 7,44 (дд, 1H, J_1=8,8 Гц J_2=2,6 Гц, H-11), 7,43 (д, 1H, J=2,6 Гц, H-9), 6,16 (д, 1H, J=17,1 Гц, H-17), 6,02 (уш. с, 1H, OH), 5,55 (д, 1H, J=19,7 Гц, H-5), 5,49 (д, 1H, J=19,7 Гц, H-5), 5,33 (д, 1H, J=16,9 Гц, H-17), 3,16 (кв, 2H, J=7,8 Гц), 1,91 (кв, 2H, J=7,6 Гц, H-19), 1,39 (т, 3H, J=7,9 Гц, Me), 1,03-0,92 (м, 12H), 0,81-0,72 (м, 6H). ^{13}C ЯМР ($CDCl_3$, 100 МГц) δ 172,0, 171,7, 155,6, 149,1, 149,0, 147,3, 145,2, 143,7, 132,5, 130,0, 128,7, 126,7, 122,4, 105,5, 104,2, 75,1, 68,9, 55,8, 33,5, 23,1, 13,7, 7,7, 7,2, 6,4.

Пример VIII - ТиоSN-38 (IDN 6156)

20-OTES ТиоSN-38 (0,034 г, 0,065 ммоль) растворяют в безводном ТГФ (4 мл) при перемешивании в инертной атмосфере, затем добавляют туда по каплям $Et_3N{\bullet}3HF$ (0,025 мл, 0,150 ммоль). Реакционную смесь подвергают реакции в течение 40 часов при комнатной температуре, контролируя при помощи ТСХ исчезновение реагента (гексан/AcOEt = 1/1). Растворитель выпаривают в вакууме и остаток очищают флеш-хроматографией (SiO_2, гексан/AcOEt = 1/3) с получением таким образом искомого продукта (0,026 г, 0,064 ммоль, 98%) в виде ярко-желтого твердого вещества.

^{1}H ЯМР (ТГФ-d_8, 400 МГц) δ 9,23 (уш. с, 1H, OH), 8,06 (д, 1H, J=9,2 Гц, Ar, H-12), 7,88 (с, 1H, H-14), 7,41 (д, 1H, J=2,8 Гц, H-9), 7,38 (дд, 1H, J_1=9,2 Гц J_2=2,8 Гц, H-11), 6,08 (д, 1H, J=17,2 Гц, H-17), 5,67 (уш. с, 1H, OH), 5,50 (с, 2H, H-5), 5,33 (д, 1H, J=16,8 Гц, H-17), 3,22 (кв, 2H, J=7,8 Гц), 1,90 (кв, 2H, J=7,6 Гц, H-19), 1,42 (т, 3H, J=7,6 Гц, Me), 0,97 (т, 3H, J=7,6 Гц, Me). ^{13}C ЯМР (ТГФ-d_8, 100 МГц) δ 173,0, 172,1, 157,5, 149,6, 149,2, 146,1, 145,0, 142,6, 132,3, 130,1, 128,9, 127,6, 122,3, 104,9, 102,3, 72,3, 68,5, 55,8, 31,7, 22,7, 13,1, 7,3.

Пример IX - 20-OTES топотекан

Топотекан (0,100 г, 0,238 ммоль) суспендируют в безводном диметилформамиде (5 мл) в инертной атмосфере и к полученной в результате суспензии добавляют имидазол (0,081 г, 1,19 ммоль). Смесь перемешивают в течение 10 минут, затем добавляют туда по каплям триэтилсилилхлорид (TES-Cl) (0,160 мл, 0,952 ммоль), после чего добавляют 4-диметиламинопиридин (DMAP) (0,029 г, 0,238 ммоль). Через 52 часа

реакционную смесь выпаривают в вакууме, контролируя при помощи ТСХ (CH_2Cl_2/MeOH=10/1) полное исчезновение реагента. Затем твердое вещество повторно растворяют в $CHCl_3$ и H_2O и насыщенном NH_4Cl, водную фазу экстрагируют с помощью $CHCl_3$ (2×15 мл). Органические фазы объединяют и сушат над Na_2SO_4, фильтруют и концентрируют в вакууме с получением таким образом искомого продукта (0,120 г, 0,224 ммоль, 94%) в виде светло-желтого твердого вещества.

^{1}H ЯМР ($CDCl_3$, 400 МГц) δ 9,65 (уш. с, 1H), 8,26 (с, 1H, Ar, H-7), 8,14 (д, 1H, J=8,8 Гц, Ar, H-12), 7,80 (д, 1H, J=8,8 Гц, Ar, H-11), 7,58 (с, 1H, H-14), 5,67 (д, 1H, J=16,5 Гц, H-17), 5,25 (д, 1H, J=16,5 Гц, H-17), 5,20 (с, 2H, H-5), 4,71 (с, 2H), 2,81 (с, 6H, 2 Me), 1,97-1,81 (м, 2H, H-19), 0,98-0,88 (м, 12H), 0,77-0,68 (м, 6H). ^{13}C ЯМР ($CDCl_3$, 100 МГц) δ 172,1, 157,9, 156,6, 152,1, 150,8, 146,8, 144,3, 134,3, 131,2 129,9, 127,9, 123,0, 118,9, 110,1, 98,5, 75,4, 65,9, 51,1, 50,0, 43,1, 32,9, 7,8, 7,2, 6,4.

Пример X - 10-OTBDMS 20-OTES топотекан

20-OTES топотекан (0,120 г, 0,224 ммоль) растворяют в безводной смеси CH_2Cl_2/ТГФ=1:1 (8 мл) в инертной атмосфере. Добавляют имидазол (0,076 г, 112 ммоль), после чего, через 10 минут, трет-бутилдиметилсилилхлорид (TBDMS-Cl) (0,135 мг, 0,896 ммоль), затем 4-диметиламинопиридин (DMAP) (0,027 г, 0,224 ммоль). Через 21 час реакционную смесь выпаривают в вакууме, контролируя при помощи ТСХ (гексан/AcOEt = 1/1) исчезновение реагента. Затем твердое вещество повторно растворяют в $CHCl_3$ и H_2O и насыщенном NH_4Cl, водную фазу экстрагируют с помощью $CHCl_3$ (2×15 мл). Органические фазы объединяют и сушат над Na_2SO_4, фильтруют и концентрируют в вакууме. Остаток очищают флеш-хроматографией (SiO_2, гексан/AcOEt = 1/1) с получением таким образом искомого продукта (0,116 г, 0,179 ммоль, 80%) в виде светло-желтого твердого вещества.

^{1}H ЯМР ($CDCl_3$, 400 МГц) δ 8,26 (с, 1H, Ar, H-7), 8,14 (д, 1H, J=8,8 Гц, Ar, H-12), 7,81 (д, 1H, J=8,8 Гц, Ar, H-11), 7,59 (с, 1H, H-14), 5,64 (д, 1H, J=16,5 Гц, H-17), 5,22 (д, 1H, J=16,5 Гц, H-17), 5,19 (с, 2H, H-5), 4,71 (с, 2H), 2,81 (с, 6H, 2 Me), 1,97-1,81 (м, 2H, H-19), 1,04 (с, 9H), 0,98-0,88 (м, 12H), 0,77-0,68 (м, 6H), 0,30 (с, 6H). ^{13}C ЯМР ($CDCl_3$, 100 МГц) δ 171,7, 157,7, 155,1, 151,5, 150,0, 146,8, 144,3, 134,3, 131,2, 129,9, 127,9, 123,0, 118,9, 110,1, 98,5, 75,4, 65,9, 51,1, 50,0, 43,9, 32,9, 25,6, 18,3, 7,8, 7,2, 6,4, -4,3.

Пример XI - 10-OTBDMS 20-OTES тиотопотекан

10-OTBDMS 20-OTES топотекан (0,116 г, 0,179 ммоль) растворяют в безводном ксилоле (6 мл) при перемешивании в инертной атмосфере. Затем добавляют реагент Лаусона (LR) (0,065 г, 0,161 ммоль) и нагревают реакцию до 90°C. Реакционную смесь подвергают реакции в течение 23 часов при 90°C, контролируя при помощи ТСХ (гексан/AcOEt=2/1) исчезновение реагента. Растворитель выпаривают в вакууме и остаток очищают флеш-хроматографией (SiO_2, гексан/AcOEt=5/1) с получением таким образом искомого продукта (0,047 г, 0,072 ммоль, 40%) в виде ярко-желтого твердого вещества.

^{1}H ЯМР ($CDCl_3$, 400 МГц) δ 8,35 (с, 1H, Ar, H-7), 8,17 (д, 1H, J=8,8 Гц, Ar, H-12), 7,96 (с, 1H, H-14), 7,85 (д, 1H, J=8,8 Гц, Ar, H-11), 6,16 (д, 1H, J=16,5 Гц, H-17), 5,52 (д, 1H, J=21,0 Гц, H-5), 5,48 (д, 1H, J=21,0 Гц, H-5), 5,33 (д, 1H, J=16,5 Гц, H-17), 4,73 (с, 2H), 2,81 (с, 6H, 2 Me), 1,92 (кв, 2H, J=7,6 Гц, H-19), 1,04 (с, 9H), 0,98-0,88 (м, 12H), 0,77-0,68 (м, 6H), 0,30 (с, 6H). ^{13}C ЯМР ($CDCl_3$, 100 МГц) δ 172,5, 171,5, 155,1, 149,9, 149,4, 147,2, 144,3, 134,3, 132,1, 129,9, 127,9, 126,5, 123,0, 110,1, 104,2, 75,4, 67,9, 55,1, 50,0, 43,9, 32,9, 25,6, 18,3, 7,8, 7,2, 6,4, -4,3.

Пример XII - 20-OTES тиотопотекан

10-OTBDMS 20-OTES тиотопотекан (0,047 г, 0,072 ммоль) растворяют в безводном ТГФ (4 мл) при перемешивании в инертной атмосфере, затем добавляют туда по каплям $Et_3N \bullet 3HF$ (0,014 мл, 0,086 ммоль). Реакционную смесь подвергают реакции в течение 4 часов при комнатной температуре, контролируя при помощи ТСХ исчезновение реагента (гексан/AcOEt=2/1). Растворитель выпаривают в вакууме, и остаток очищают флеш-хроматографией (SiO_2, гексан/AcOEt=2/1, затем 1/1) с получением таким образом искомого продукта (0,039 г, 0,071 ммоль, 99%) в виде ярко-желтого твердого вещества.

^{1}H ЯМР ($CDCl_3$, 400 МГц) δ 8,36 (с, 1H, Ar, H-7), 8,17 (д, 1H, J=8,8 Гц, Ar, H-12), 7,96 (с, 1H, H-14), 7,85 (д, 1H, J=8,8 Гц, Ar, H-11), 6,16 (д, 1H, J=16,5 Гц, H-17), 6,02 (уш. с, 1H, OH), 5,52 (д, 1H, J=21,0 Гц, H-5), 5,48 (д, 1H, J=21,0 Гц, H-5), 5,33 (д, 1H, J=16,5 Гц, H-17), 4,73 (с, 2 H), 2,81 (с, 6H, 2 Me), 1,92 (кв, 2H, J=7,2 Гц, H-19), 0,98-0,88 (м, 12H), 0,77-0,68 (м, 6H). ^{13}C ЯМР ($CDCl_3$, 100 МГц) δ 172,5, 171,5, 155,1, 149,9, 149,4, 147,2, 144,3, 134,3, 132,1, 129,9, 127,9, 126,5, 123,0, 110,1, 104,2, 75,4, 67,9, 55,1, 50,0, 43,9, 32,9, 7,8, 7,2, 6,4.

Пример XIII - Тиотопотекан (IDN 6180)

Тиотопотекан 10-OH 20-OTES (0,039 г, 0,071 ммоль) растворяют в безводном ТГФ (4 мл) при перемешивании в инертной атмосфере, затем добавляют туда по каплям $Et_3N \bullet 3HF$ (0,026 мл, 0,163 ммоль). Реакционную смесь подвергают реакции в течение 40 часов при комнатной температуре, контролируя при помощи ТСХ исчезновение реагента (гексан/AcOEt = 1/2). Растворитель выпаривают в вакууме и остаток очищают флеш-хроматографией (SiO_2, гексан/AcOEt = 1/3) с получением таким образом искомого продукта (0,030 г, 0,069 ммоль, 98%) в виде ярко-желтого твердого вещества.

^{1}H ЯМР ($CDCl_3$, 400 МГц) δ 8,36 (с, 1H, Ar, H-7), 8,17 (д, 1H, J=8,8 Гц, Ar, H-12), 7,96 (с, 1H, H-14), 7,85 (д, 1H, J=8,8 Гц, Ar, H-11), 6,16 (д, 1H, J=16,5 Гц, H-17), 6,02 (уш. с, 1H, OH), 5,52 (д, 1H, J=21,0 Гц, H-5), 5,48 (д, 1H, J=21,0 Гц, H-5), 5,33 (д, 1H, J=16,5 Гц, H-17), 4,73 (с, 2 H), 3,84 (уш. с, 1H, OH), 2,81 (с, 6H, 2 Me), 1,92 (кв, 2H, J=7,6 Гц H-19), 1,03 (т, 3H, J=7,6 Гц, Me). ^{13}C ЯМР ($CDCl_3$, 100 МГц) δ 172,5, 171,5, 155,1, 149,9, 149,4, 147,2, 144,3, 134,3, 132,1, 129,9, 127,9, 126,5, 123,0, 110,1, 104,2, 72,4, 67,9, 55,1, 50,0, 43,9, 32,9, 7,8.

Пример XIV - Получение 20-OTES 10-гидроксикамптотецина

10-Гидроксикамптотецин (0,100 г, 0,275 ммоль) суспендируют в безводном диметилформамиде (5 мл) в инертной атмосфере и к полученной в результате суспензии добавляют имидазол (0,225 г, 3,31 ммоль). Смесь перемешивают в течение 10 минут, затем добавляют туда по каплям триэтилсилилхлорид (TES-Cl) (0,460 мл, 275 ммоль), после чего добавляют 4-диметиламинопиридин (DMAP) (0,068 г, 0,550 ммоль). Через 24 часа реакционную смесь выпаривают в вакууме, контролируя при помощи ТСХ полное исчезновение реагента (CH_2Cl_2/MeOH=20/1). Затем твердое вещество повторно растворяют в CH_2Cl_2 и промывают с помощью H_2O и насыщенного NH_4Cl. Водную фазу экстрагируют с помощью CH_2Cl_2 (2×10 мл). Органические фазы объединяют, сушат над Na_2SO_4, фильтруют и концентрируют в вакууме с получением таким образом искомого продукта (0,124 г, 0,259 ммоль, 94%) в виде светло-желтого твердого вещества.

^{1}H ЯМР ($CDCl_3$ + 5% CD_3OD, 400 МГц) δ 8,10 (с, 1H, Ar, H-7), 8,05 (д, 1H, J=9,2 Гц, Ar), 7,50 (с, 1H, H-14), 7,39 (дд, 1H, J_1=9,2 Гц J_2=2,4 Гц, H-11), 7,11 (д, 1H, J=2,2 Гц, H-9), 5,60 (д, 1H, J=16,4 Гц, H-17), 5,21 (д, 1H, J=16,4 Гц, H-17), 5,15 (с, 2H, H-5), 1,97-1,81 (м,

2H, H-19), 0,98-0,88 (м, 12H), 0,76-0,68 (м, 6H). ^{13}C ЯМР ($CDCl_3$ + 5% CD_3OD, 100 МГц) δ 172,2, 157,8, 156,7, 151,8, 149,2, 146,1, 144,1, 130,9, 129,8, 129,0, 128,6, 123,2, 117,8, 108,8, 98,1, 75,4, 65,8, 50,0, 32,9, 7,7, 7,1, 6,3.

Пример XV - 10-OTBDMS-20-OTES камптотецин

10-Гидрокси-20-OTES-камптотецин (0,105 г, 0,219 ммоль) растворяют в безводной смеси CH_2Cl_2/ТГФ=1:1 (4 мл) и в инертной атмосфере. Добавляют имидазол (0,097 г, 1,42 ммоль), после чего, через 10 минут, добавляют трет-бутилдиметилсилилхлорид (TBDMS-Cl) (0,164 мг, 1,10 ммоль), затем 4-диметиламинопиридин (DMAP) (0,040 г, 0,329 ммоль). Через 18 часов реакционную смесь выпаривают в вакууме, контролируя при помощи ТСХ полное исчезновение реагента (циклогексан/AcOEt = 1/3). Затем твердое вещество повторно растворяют в CH_2Cl_2 и промывают с помощью H_2O и насыщенного NH_4Cl, водную фазу экстрагируют с помощью CH_2Cl_2 (2×10 мл). Органические фазы объединяют, сушат над Na_2SO_4, фильтруют и концентрируют в вакууме. Остаток очищают флеш-хроматографией (SiO_2, циклогексан/AcOEt = 1/3) с получением таким образом искомого продукта (0,117 г, 0,197 ммоль, 90%) в виде светло-желтого твердого вещества.

^{1}H ЯМР ($CDCl_3$, 400 МГц) δ 8,22 (с, 1H, Ar, H-7), 8,13 (д, 1H, J=9,2 Гц, Ar, H-12), 7,51 (с, 1H, H-14), 7,39 (дд, 1H, J_1=9,2 Гц J_2=2,8 Гц, H-11), 7,22 (д, 1H, J=2,8 Гц, H-9), 5,66 (д, 1H, J=16,5 Гц, H-17), 5,25 (с, 2H, H-5), 5,24 (д, 1H, J=16,5 Гц, H-17), 1,99-1,82 (м, 2H, H-19), 1,03 (с, 9H), 1,00-0,92 (м, 12H), 0,78-0,69 (м, 6H), 0,29 (с, 6H). ^{13}C ЯМР ($CDCl_3$, 100 МГц) δ 172,0, 157,7, 155,1, 151,5, 150,6, 146,1, 145,1, 131,4, 129,4, 129,3, 128,7, 126,7, 118,3, 114,5, 97,7, 75,3, 66,0, 49,9, 33,1, 25,6, 18,3, 7,9, 7,2, 6,4, -4,3.

Пример XVI - 10-OTBDMS-20-OTES тиокамптотецин

10-OTBDMS 20-OTES камптотецин (0,350 г, 0,589 ммоль) растворяют в безводном ксилоле (10 мл) при перемешивании в инертной атмосфере. Затем добавляют реагент Лаусона (LR), (0,590 г, 147 ммоль) и нагревают реакцию до 90°C. Реакционную смесь подвергают реакции в течение 18 часов при 95°C, контролируя при помощи ТСХ исчезновение реагента (циклогексан/AcOEt = 1/1). Растворитель выпаривают в вакууме и остаток очищают флеш-хроматографией (SiO_2, циклогексан/AcOEt=4/1) с получением таким образом искомого продукта (0,323 г, 0,530 ммоль, 90%) в виде ярко-желтого твердого вещества.

^{1}H ЯМР ($CDCl_3$, 400 МГц) δ 8,28 (с, 1H, Ar, H-7), 8,16 (д, 1H, J=8,8 Гц, Ar, H-12), 7,97 (с, 1H, H-14), 7,40 (дд, 1H, J_1=9,2 Гц J_2=2,8 Гц, H-11), 7,26 (д, 1H, J=2,8 Гц, H-9), 6,15 (д, 1H, J=16,8 Гц, H-17), 5,58 (д, 1H, J=20,0 Гц, H-5), 5,53 (д, 1H, J=20,0 Гц, H-5), 5,33 (д, 1H, J= 16,8 Гц, H-17), 1,91 (кв, 2H, J=7,4 Гц, H-19), 1,04 (с, 9H), 1,02-0,92 (м, 12H), 0,82-0,72 (м, 6H), 0,30 (с, 6H). ^{13}C ЯМР ($CDCl_3$, 100 МГц) δ 172,1, 171,5, 155,5, 149,8, 148,6, 147,3, 145,3, 131,5, 130,1, 129,8, 129,1, 128,3, 127,0, 114,5, 104,0, 75,0, 68,8, 56,3, 33,5, 25,6, 18,3, 7,8, 7,2, 6,4, -4,3.

Пример XVII - Получение 10-гидрокситиокамптотецина (IDN 6181)

Тиокамптотецин 10-OTBDMS 20-OTES (0,320 г, 0,524 ммоль) растворяют в безводном ТГФ (8 мл) при перемешивании в инертной атмосфере, затем добавляют туда по каплям $Et_3N{\bullet}3HF$ (0,670 мл, 4,19 ммоль). Реакционную смесь подвергают реакции в течение 20 часов при комнатной температуре, контролируя при помощи ТСХ исчезновение реагента (CH_2Cl_2/MeOH=25/1). Растворитель выпаривают в вакууме и остаток очищают флеш-хроматографией (SiO_2, CH_2Cl_2/MeOH=25/1, затем 20/1) с получением таким образом искомого продукта (0,189 г, 0,498 ммоль, 95%) в виде ярко-

желтого твердого вещества.

^{1}H ЯМР (ТГФ-d_8, 400 МГц) δ 9,20 (уш. с, 1H, OH), 8,37 (с, 1H, Ar, H-7), 8,05 (д, 1H, J= 9,2 Гц, Ar, H-12), 7,89 (с, 1H, H-14), 7,39 (дд, 1H, J_1=9,2 Гц J_2=2,8 Гц, H-11), 7,22 (д, 1H, J= 2,8 Гц, H-9), 6,07 (д, 1H, J=17,2 Гц, H-17), 5,70 (уш. с, 1H, OH), 5,47 (с, 2H, H-5), 5,33 (д, 1H, J=16,8 Гц, H-17), 1,89 (кв, 2H, J=7,6 Гц, H-19), 0,97 (т, 3H, J=7,6 Гц, Me). ^{13}C ЯМР (ТГФ-d_8, 100 МГц) δ 173,0, 172,1, 157,4, 149,7, 149,0, 146,1, 144,5, 131,3, 130,5, 130,2, 129,7, 128,6, 123,0, 108,9, 102,3, 72,3, 68,5, 56,5, 31,7, 7,3.

Пример XVIII - Гидрохлорид тиотопотекана (IDN 6180)

10-Гидрокситиокамптотецин (0,150 г, 0,421 ммоль) растворяют в смеси безводного CH_2Cl_2 (3,5 мл) и н-пропанола (1,8 мл) при перемешивании в инертной атмосфере. Затем добавляют туда по каплям бис(диметиламино)метан (0,092 г, 0,905 ммоль). Реакционную смесь подвергают реакции в течение 4 часов при комнатной температуре, контролируя при помощи ТСХ исчезновение реагента (CH_2Cl_2/MeOH= 25/1). Через приблизительно 5 часов добавляют смесь 0,125 г концентрированной HCl в 1 мл н-пропанола, и смесь реагирует в течение еще 16 часов. Продукт фильтруют и многократно промывают CH_2Cl_2 и Et_2O с получением таким образом искомого продукта (0,168 г, 0,370 ммоль, 88%) в виде красно-оранжевого твердого вещества.

^{1}H ЯМР (DMSO-d_6, 400 МГц) δ 11,51 (уш. с, 1H, OH), 9,78 (уш. с, 1H, OH), 9,06 (с, 1H, Ar, H-7), 8,21 (д, 1H, J=8,8 Гц, Ar), 7,76 (с, 1H, H-14), 7,72 (д, 1H, J 8,8 Гц, Ar), 5,91 (д, 1H, J=16,4 Гц, H-17), 5,50 (д, 1H, J=16,4 Гц, H-17), 5,49 (с, 2H, H-5), 4,73 (с, 1H, CH_2NMe_2), 4,72 (с, 1H, CH_2NMe_2), 2,83 (с, 3H, Me), 2,82 (с, 3H, Me), 1,87 (кв, 2H, J=7,6 Гц, H-19), 0,85 (т, 3H, J=7,6 Гц, Me). ^{13}C ЯМР (DMSO-d_6, 100 МГц) δ 172,7, 172,1, 158,8, 149,6, 148,8, 147,0, 144,2, 133,7, 130,6, 130,6, 129,9, 127,5, 123,2, 109,1, 103,6, 72,8, 68,6, 57,4, 51,1, 43,1, 31,2, 8,3.

Пример XIX - 5-F-20-OTES-камптотецин

Камптотецин 20-OTES (0,100 г, 0,216 ммоль) растворяют в безводном ТГФ (6 мл) при перемешивании в инертной атмосфере, затем охлаждают до температуры -78°C и добавляют туда по каплям 1,0 М раствор LiHMDS в ТГФ (0,260 мл, 0,260 ммоль). Через 20 минут добавляют NFSI (0,089 г, 0,281 ммоль) в безводном ТГФ (2 мл). После 2 часов при -78°C температуре позволяют подняться до 25°C и контролируют исчезновение реагента при помощи ТСХ (гексан/AcOEt = 1/2). Наблюдают образование двух диастереомеров. После 3 часов при комнатной температуре реакцию прерывают добавлением насыщенного NH_4Cl. Водную фазу экстрагируют с помощью CH_2Cl_2 (3×15 мл) и органические фазы объединяют, сушат над Na_2SO_4, фильтруют и концентрируют в вакууме. Остаток очищают флеш-хроматографией (SiO_2, гексан/AcOEt=3/1, затем 2/1 и в конце 1/1), получая таким образом смесь двух изомеров (0,101 г, 0,210 ммоль, 97%) (отношение изомеров 1:1) в виде светло-желтого твердого вещества. Два изомера разделяют последующей хроматографией. В порядке элюирования:

Первый диастереомер: ^{1}H ЯМР ($CDCl_3$, 400 МГц) δ 8,52 (с, 1H, Ar, H-7), 8,25 (д, 1H, J= 8,4 Гц, Ar), 7,96 (д, 1H, J=8,4 Гц, Ar), 7,87 (т, 1H, J=8,4 Гц, Ar), 7,69 (т, 1H, J=8,4 Гц, Ar), 7,47 (д, 1H, $^1J_{HF}$=61,2 Гц, H-5), 7,45 (с, 1H, H-14), 5,62 (д, 1H, J=16,8 Гц, H-17), 5,22 (д, 1H, J=16,8 Гц, H-17), 2,02-1,84 (м, 2H, H-19), 1,03-0,93 (м, 12H), 0,80-0,71 (м, 6H). ^{13}C ЯМР ($CDCl_3$, 100 МГц) δ 171,4, 157,5, 152,3, 151,1, 150,2 (д, J=1,5 Гц), 150,3 (д, J=1,5 Гц), 143,6 (д, J=5,3 Гц), 133,7, 131,7, 130,2, 128,9, 128,4, 127,9 (д, J=15,0 Гц), 126,3 (д, J=15,0 Гц), 121,8, 98,9, 93,8 (д, $^1J_{CF}$=213,2 Гц, C-5), 75,1, 65,7, 33,1, 7,8, 7,2, 6,4.

Второй диастереомер: ^{1}H ЯМР ($CDCl_3$, 400 МГц) δ 8,51 (с, 1H, Ar, H-7), 8,25 (д, 1H, J= 8,4 Гц, Ar), 7,96 (д, 1H, J=8,4 Гц, Ar), 7,87 (т, 1H, J=8,4 Гц, Ar), 7,68 (т, 1H, J=8,4 Гц, Ar), 7,51 (д, 1H, $^1J_{HF}$=60,8 Гц, H-5), 7,42 (с, 1H, H-14), 5,62 (д, 1H, J=17,2 Гц, H-17), 5,20 (д, 1H, J=17,2 Гц, H-17), 2,02-1,82 (м, 2H, H-19), 1,04-0,93 (м, 12H), 0,80-0,71 (м, 6H). ^{13}C ЯМР ($CDCl_3$, 100 МГц) δ 171,2, 157,8, 152,5, 151,2, 150,3, 143,7, 133,7 (д, J=2,4 Гц), 131,7, 130,2, 128,9, 128,3, 127,9 (д, J=2,3 Гц), 126,3 (д, J=16,7 Гц), 121,8 (д, J=1,5 Гц), 99,0. 93,8 (д, $^1J_{CF}$=214,8 Гц, C-5), 75,0, 65,8, 33,3, 7,9, 7,1, 6,4.

Пример XX - Получение первого диастереомера 5-F-20-OH-камптотецина

Первый диастереомер 5-F-20-OTES-камптотецина (0,025 г, 0,052 ммоль) растворяют в безводном ТГФ (5 мл) при перемешивании в инертной атмосфере. Затем добавляют туда по каплям Et_3N•3HF (0,060 мл, 0,368 ммоль). Реакционную смесь подвергают реакции в течение 28 часов при комнатной температуре, контролируя при помощи ТСХ исчезновение реагента (гексан/AcOEt = 1/2). Растворитель выпаривают в вакууме, и остаток хроматографируют (SiO_2, гексан/AcOEt = 1/1) с получением таким образом искомого продукта (0,019 г, 0,051 ммоль, 98%) в виде светло-желтого твердого вещества.

^{1}H ЯМР ($CDCl_3$, 400 МГц) δ 8,52 (с, 1H, Ar, H-7), 8,25 (д, 1H, J=8,4 Гц, Ar), 7,96 (д, 1H, J=8,4 Гц, Ar), 7,87 (т, 1H, J=8,4 Гц, Ar), 7,69 (т, 1H, J=8,4 Гц, Ar), 7,59 (с, 1H, H-14), 7,46 (д, 1H, $^1J_{HF}$=61,2 Гц, H-5), 5,69 (д, 1H, J=16,8 Гц, H-17), 5,26 (д, 1H, J=16,8 Гц, H-17), 3,87 (уш. с, 1H, OH), 2,01-1,81 (м, 2H, H-19), 1,05 (т, 3H, J=7,6 Гц, Me). ^{13}C ЯМР ($CDCl_3$, 100 МГц) δ 173,5, 157,6, 151,1, 151,0, 150,2, 144,1, 133,9, 131,9, 130,0, 129,0, 128,5, 127,8, 126,4, 121,7, 98,8, 93,8 (д, $^1J_{CF}$=214,0 Гц, C-5), 72,5, 66,0, 31,5, 7,8.

Пример XXI - Получение второго диастереомера 5-F-20-OH-камптотецина

Второй диастереомер 5-F-20-OTES-камптотецина (0,025 г, 0,052 ммоль) растворяют в безводном ТГФ (5 мл) при перемешивании в инертной атмосфере, затем добавляют туда по каплям Et_3N•3HF (0,060 мл, 0,368 ммоль). Реакционную смесь подвергают реакции в течение 28 часов при комнатной температуре, контролируя при помощи ТСХ исчезновение реагента (гексан/AcOEt = 1/2). Растворитель выпаривают в вакууме и остаток хроматографируют (SiO_2, гексан/AcOEt = 1/1) с получением таким образом искомого продукта (0,018 г, 0,050 ммоль, 97%) в виде светло-желтого твердого вещества.

^{1}H ЯМР ($CDCl_3$, 400 МГц) δ 8,52 (с, 1H, Ar, H-7), 8,24 (д, 1H, J=8,4 Гц, Ar), 7,96 (д, 1H, J=8,4 Гц, Ar), 7,88 (т, 1H, J=8,4 Гц, Ar), 7,69 (т, 1H, J=8,4 Гц, Ar), 7,56 (с, 1H, H-14), 7,51 (д, 1H, $^1J_{HF}$=60,4 Гц, H-5), 5,69 (д, 1H, J=16,4 Гц, H-17), 5,25 (д, 1H, J=16,4 Гц, H-17), 3,87 (уш. с, 1H, OH), 1,98-1,78 (м, 2H, H-19), 1,04 (т, 3H, J=7,6 Гц, Me). ^{13}C ЯМР ($CDCl_3$, 100 МГц) δ 173,3, 157,7, 151,2, 151,2, 150,2, 144,2, 133,8, 131,9, 130,0, 129,0, 128,5, 127,8, 126,4, 121,6, 98,9, 93,7 (д, $^1J_{CF}$=214,0 Гц, C-5), 72,5, 66,1, 31,6, 7,8.

Пример XXII - получение 5-N3-20-OTES-камптотецина

Камптотецин 20-OTES (0,100 г, 0,216 ммоль) растворяют в безводном ТГФ (6 мл) при перемешивании в инертной атмосфере, затем охлаждают до температуры -78°C и добавляют туда по каплям 1,0 М раствор LiHMDS в ТГФ (0,260 мл, 0,260 ммоль). Через 20 минут добавляют тозилазид (TsN_3) (0,055 г, 0,281 ммоль) в безводном ТГФ (2 мл). После 2 часов при -78°C температуре позволяют подняться до 25°C и контролируют исчезновение реагента при помощи ТСХ (гексан/AcOEt=2/1). Наблюдают образование двух диастереомеров. После 2 часов 30 минут при комнатной температуре реакцию прерывают добавлением насыщенного NH_4Cl.

Водную фазу экстрагируют с помощью CH_2Cl_2 (3×15 мл) и органические фазы объединяют, сушат над Na_2SO_4, фильтруют и концентрируют в вакууме. Остаток, содержащий два дастереомера, очищают флеш-хроматографией (SiO_2, гексан/AcOEt= 3/1, затем 2/1 и в конце 1/1), получая таким образом (0,106 г, 0,210 ммоль, 97%) смеси двух изомеров (отношение изомеров 1:1) в виде светло-желтого твердого вещества. Два изомера разделяют последующей хроматографией. В порядке элюирования:

Первый диастереомер: ^{1}H ЯМР ($CDCl_3$, 400 МГц) δ 8,45 (с, 1H, Ar, H-7), 8,25 (д, 1H, J= 8,4 Гц, Ar), 7,95 (д, 1H, J=8,4 Гц, Ar), 7,86 (т, 1H, J=8,4 Гц, Ar), 7,68 (т, 1H, J=8,4 Гц, Ar), 7,49 (с, 1H, H-14), 6,97 (с, 1H, H-5), 5,65 (д, 1H, J=16,8 Гц, H-17), 5,26 (д, 1H, J=16,8 Гц, H-17), 2,01-1,84 (м, 2H, H-19), 1,03-0,94 (м, 12H), 0,80-0,71 (м, 6H). ^{13}C ЯМР ($CDCl_3$, 100 МГц) δ 171,6, 158,3, 152,2, 150,8, 150,0, 144,0, 132,9, 131,4, 130,1, 128,6, 128,3, 128,2, 128,1, 120,8, 98,7, 75,4, 75,2, 65,7, 33,1, 7,9, 7,2, 6,4.

Второй диастереомер: ^{1}H ЯМР ($CDCl_3$, 400 МГц) δ 8,45 (с, 1H, Ar, H-7), 8,24 (д, 1H, J= 8,4 Гц, Ar), 7,95 (д, 1H, J=8,4 Гц, Ar), 7,86 (т, 1H, J=8,4 Гц, Ar), 7,68 (т, 1H, J=8,4 Гц, Ar), 7,46 (с, 1H, H-14), 6,99 (с, 1H, H-5), 5,66 (д, 1H, J=16,8 Гц, H-17), 5,22 (д, 1H, J=16,8 Гц, H-17), 2,02-1,84 (м, 2H, H-19), 1,03-0,94 (м, 12H), 0,80-0,71 (м, 6H). ^{13}C ЯМР ($CDCl_3$, 100 МГц) δ 171,4, 158,4, 152,3, 150,9, 150,0, 144,0, 132,9, 131,4, 130,1, 128,6, 128,3, 128,2, 128,1, 120,8, 98,7, 75,3, 75,1, 65,8, 33,3, 7,9, 7,2, 6,4.

Пример XXIII - Получение первого диастереомера 5-N3-20-OH-камптотецина

Диастереомер 1 5-N3-20-OTES-камптотецина (0,070 г, 0,139 ммоль) растворяют в безводном ТГФ (6 мл) при перемешивании в инертной атмосфере, затем добавляют туда по каплям $Et_3N{\bullet}3HF$ (0,170 мл, 1016 ммоль). Реакционную смесь подвергают реакции в течение 26 часов при комнатной температуре, контролируя при помощи ТСХ исчезновение реагента (гексан/AcOEt = 1/1). Растворитель выпаривают в вакууме и остаток очищают флеш-хроматографией (SiO_2, гексан/AcOEt = 1/1) с получением таким образом искомого продукта (0,053 г, 0,136 ммоль, 98%) в виде светло-желтого твердого вещества.

^{1}H ЯМР ($CDCl_3$, 400 МГц) δ 8,44 (с, 1H, Ar, H-7), 8,24 (д, 1H, J=8,4 Гц, Ar), 7,93 (д, 1H, J=8,4 Гц, Ar), 7,85 (т, 1H, J=8,4 Гц, Ar), 7,67 (т, 1H, J=8,4 Гц, Ar), 7,63 (с, 1H, H-14), 6,97 (с, 1H, H-5), 5,70 (д, 1H, J=16,8 Гц, H-17), 5,29 (д, 1H, J=16,8 Гц, H-17), 3,99 (уш. с, 1H, OH), 2,00-1,84 (м, 2H, H-19), 1,04 (т, 3H, J=7,6 Гц, Me). ^{13}C ЯМР ($CDCl_3$, 100 МГц) δ 173,6, 158,3, 150,8, 150,7, 149,8, 144,4, 133,1, 131,5, 129,9, 128,6, 128,3, 128,3, 128,1, 120,6, 98,6, 75,4, 72,7, 66,0, 31,5, 7,8.

Пример XXIV - Получение второго диастереомера 5-N3-камптотецина

Диастереомер 2 5-N3-20-OTES-камптотецина (0,055 г, 0,109 ммоль) растворяют в безводном ТГФ (6 мл) при перемешивании в инертной атмосфере, затем добавляют туда по каплям $Et_3N{\bullet}3HF$ (0,135 мл, 0,820 ммоль). Реакционную смесь подвергают реакции в течение 26 часов при комнатной температуре, контролируя исчезновение исходного реагента при помощи ТСХ (гексан/AcOEt = 1/1). Растворитель выпаривают в вакууме и остаток очищают флеш-хроматографией (SiO_2, гексан/AcOEt = 1/1) с получением таким образом искомого продукта (0,042 г, 0,107 ммоль, 98%) в виде светло-желтого твердого вещества.

^{1}H ЯМР ($CDCl_3$, 400 МГц) δ 8,45 (с, 1H, Ar, H-7), 8,23 (д, 1H, J=8,4 Гц, Ar), 7,95 (д, 1H, J=8,4 Гц, Ar), 7,85 (т, 1H, J=8,4 Гц, Ar), 7,68 (т, 1H, J=8,4 Гц, Ar), 7,60 (с, 1H, H-14), 7,00 (с, 1H, H-5), 5,74 (д, 1H, J=16,8 Гц, H-17), 5,28 (д, 1H, J=16,8 Гц, H-17), 3,86 (уш. с, 1H, OH), 1,98-1,82 (м, 2H, H-19), 1,04 (т, 3H, J=7,6 Гц, Me). ^{13}C ЯМР ($CDCl_3$, 100 МГц) δ 173,4, 158,4, 150,9, 150,7, 149,8, 144,5, 133,0, 131,5, 129,9, 128,6, 128,4, 128,3, 128,1,

120,6, 98,6, 75,3, 72,6, 66,1, 31,6, 7,8.

Пример XXV - Получение 5-NH_2-камптотецина

Диастереомер 2 5-N3-20-OH-камптотецина (0,050 г, 0,129 ммоль) растворяют в смеси безводного ТГФ (1,5 мл) и безводного MeOH (6 мл) при перемешивании в инертной атмосфере, затем добавляют Pd/C (14 мг ~10%) и проводят два цикла в вакууме/H_2 (балонное давление H_2). Реакционную смесь подвергают реакции в течение 3 часов при комнатной температуре, контролируя при помощи ТСХ (гексан/AcOEt = 1/3) исчезновение реагента, затем фильтруют через целит и промывают с помощью CH_2Cl_2 (2×15 мл). Растворитель выпаривают в вакууме. ^{1}H ЯМР спектроскопия реакционного материала показала наличие искомого продукта в виде смеси 1:1 двух эпимеров по положению C5. Флеш-хроматография (SiO_2, CH_2Cl_2/MeOH = 35/1, затем 25/1) позволяет разделить смесь двух диастереомеров (0,046 г, 0,126 ммоль, 98%).

^{1}H ЯМР ($CDCl_3$, 400 МГц) δ 8,48 (с, 1H, Ar, H-7), 8,22-8,17 (м, 1H, Ar), 7,95-7,90 (м, 1H, Ar), 7,85-7,78 (м, 1H, Ar), 7,68-7,60 (м, 1H, Ar), 7,58 (с, 0,5H, H-14), 7,54 (с, 0,5H, H-14) 6,50 (с, 0,5H, H-5), 6,47 (с, 0,5H, H-5), 5,74-5,64 (м, 1H, H-17), 5,28-5,22 (м, 1H, H-17), 4,00-2,40 (уш. с, 3H, OH+NH_2), 1,98-1,82 (м, 2H, H-19), 1,07-1,01 (м, 3H, Me). ^{13}C ЯМР ($CDCl_3$, 100 МГц) δ 173,8 (2 C), 158,5 (2 C), 151,2 (2 C), 150,4 (2 C), 149,7 (2 C), 144,5 (2 C), 132,7 (2 C), 131,0 (2 C), 129,8 (2 C), 128,5 (2 C), 128,3 (2 C), 128,0 (2 C), 127,8 (2 C), 120,2 (2 C), 113,8 (2 C), 97,7 (2 C), 72,7 (2 C), 66,3, 66,0, 31,5 (2 C), 7,8, 7,8.

Пример XXVI - 5-ди-т-бутоксикарбонилгидразино-20-OTES-камптотецин

Камптотецин 20-OTES (0,100 г, 0,216 ммоль) растворяют в безводном ТГФ (6 мл) при перемешивании в инертной атмосфере, затем охлаждают до температуры -78°C и добавляют туда по каплям 1,0 M раствор LiHMDS в ТГФ (0,281 мл, 0,281 ммоль). Через 20 минут добавляют ди-трет-бутилазодикарбоксилат (DTBAC) (0,075 г, 0,324 ммоль) в безводном ТГФ (2 мл). После 4 часов при -78°C контролируют исчезновение реагента при помощи ТСХ (гексан/AcOEt = 3/1). Наблюдают образование двух диастереомеров. Реакцию прерывают добавлением насыщенного NH_4Cl. Водную фазу экстрагируют с помощью CH_2Cl_2 (3×15 мл) и органические фазы объединяют, сушат над Na_2SO_4, фильтруют и концентрируют в вакууме. Остаток очищают флеш-хроматографией (SiO_2, гексан/AcOEt = 3/1) с получением таким образом смеси двух изомеров (0,145 г, 0,210 ммоль, 97%). Два изомера разделяют последующей хроматографией. В порядке элюирования:

Первый диастереомер: ^{1}H ЯМР ($CDCl_3$, 400 МГц) δ 8,80 (уш. с, 1H, Ar), 8,23 (д, 1H, J= 8,4 Гц, Ar), 8,01 (уш. д, 1H, Ar), 7,90-7,71 (м, 2H, Ar), 7,70-7,45 (м, 2H, Ar+H-14), 6,52 (уш. с, 1H, H-5), 5,61 (д, 1H, J=16,8 Гц, H-17), 5,23 (д, 1H, J=16,8 Гц, H-17), 2,03-1,81 (м, 2H, H-19), 1,79-1,08 (уш. с, 18H), 1,06-0,92 (м, 12H), 0,80-0,70 (м, 6H). ^{13}C ЯМР ($CDCl_3$, 100 МГц) δ 171,7, 157,8, 155,5, 155,5, 152,0, 152,0, 151,2, 149,4, 145,0, 132,1, 130,6, 130,0, 128,7, 128,4, 127,9, 119,9, 98,2, 82,7, 81,5, 79,7, 75,2, 65,7, 33,2, 28,3, 27,6, 7,7, 7,2, 6,4.

Второй диастереомер: ^{1}H ЯМР ($CDCl_3$, 400 МГц) δ 8,79 (уш. с, 1H, Ar), 8,23 (д, 1H, J= 8,4 Гц, Ar), 8,01 (уш. д, 1H, Ar), 7,85-7,76 (м, 2H, Ar), 7,65 (уш. т, 1H, J=8,4 Гц, Ar), 7,52 (с, 1H, H-14), 6,54 (уш. с, 1H, H-5), 5,61 (д, 1H, J=16,8 Гц, H-17), 5,22 (д, 1H, J=16,8 Гц, H-17), 2,03-1,82 (м, 2H, H-19), 1,76-1,08 (уш. с, 18H), 1,04-0,92 (м, 12H), 0,80-0,70 (м, 6H). ^{13}C ЯМР ($CDCl_3$, 100 МГц) δ 171,5, 157,9, 155,5, 155,5, 152,3, 152,0, 151,2, 149,4, 145,1, 132,1, 130,6, 130,0, 128,7, 128,4, 127,9, 119,9, 98,2, 82,9, 81,5, 79,6, 75,2, 65,8, 33,3, 28,3, 27,4, 7,8, 7,2, 6,4.

Пример XXVII - Получение первого диастереомера 5-ди-т-бутоксикарбонилгидразино-20-OH-камптотецина

Первый диастереомер 5-ди-т-бутоксикарбонилгидразино-20-OTES-камптотецина (0,050 г, 0,072 ммоль) растворяют в безводном ТГФ (4 мл) при перемешивании в инертной атмосфере, затем добавляют туда по каплям $Et_3N \bullet 3HF$ (0,088 мл, 0,542 ммоль). Реакционную смесь подвергают реакции в течение 35 часов при комнатной температуре, контролируя при помощи ТСХ исчезновение реагента (гексан/AcOEt = 3/2). Растворитель выпаривают в вакууме и остаток очищают флеш-хроматографией (SiO_2, гексан/AcOEt = 3/2), с получением таким образом искомого соединения (0,041 г, 0,071 ммоль, 98%) в виде светло-желтого твердого вещества.

Затем продукт очищают путем кристаллизации из CH_2Cl_2/пентан = 1/50.

^{1}H ЯМР ($CDCl_3$, 400 МГц) δ 8,77 (уш. с, 1H, Ar), 8,16 (уш. д, 1H, J=8,0 Гц, Ar), 7,97 (уш. с, 1H, Ar), 7,86-7,50 (м, 4 H, Ar), 6,51 (уш. с, 1H, H-5), 5,66 (д, 1H, J =16,4 Гц, H-17), 5,24 (д, 1H, J=16,4 Гц, H-17), 3,86 (уш. с, 1H, OH), 2,00-1,80 (м, 2H, H-19), 1,79-1,13 (уш. с, 18 H), 1,03 (т, 3H, J=7,6 Гц, Me). ^{13}C ЯМР ($CDCl_3$, 100 МГц) δ 173,7, 157,9, 155,5, 155,5, 152,1, 151,3, 150,7, 149,6, 145,7, 132,3, 130,7, 129,9, 128,7, 127,9, 127,6, 120,0, 97,9, 82,8, 81,6, 79,7, 72,7, 66,1, 31,8, 28,3, 27,7, 7,7.

Пример XXVIII - получение второго диастереомера 5-ди-т-бутоксикарбонилгидразино-20-OH-камптотецина

Второй диастереомер 5-ди-т-бутоксикарбонилгидразино-20-OTES-камптотецина (0,050 г, 0,072 ммоль) растворяют в безводном ТГФ (45 мл) при перемешивании в инертной атмосфере, затем добавляют туда по каплям $Et_3N \bullet 3HF$ (0,088 мл, 0,542 ммоль). Реакционную смесь подвергают реакции в течение 35 часов при комнатной температуре, контролируя при помощи ТСХ исчезновение реагента (гексан/AcOEt = 3/2). Растворитель выпаривают в вакууме и остаток очищают флеш-хроматографией (SiO_2, гексан/AcOEt = 3/2) с получением таким образом искомого соединения (0,040 г, 0,069 ммоль, 96%) в виде светло-желтого твердого вещества.

Затем продукт очищают путем кристаллизации из CH_2Cl_2/пентан = 1/50.

^{1}H ЯМР ($CDCl_3$, 400 МГц) δ 8,79 (уш. с, 1H, Ar), 8,22 (уш. д, 1H, J=8,4 Гц, Ar), 7,99 (уш. с, 1H, Ar), 7,88-7,50 (м, 4H, Ar), 6,53 (уш. с, 1H, H-5), 5,65 (д, 1H, J=16,4 Гц, H-17), 5,26 (д, 1H, J=16,4 Гц, H-17), 3,80 (уш. с, 1H, OH), 2,00-1,80 (м, 2H, H-19), 1,79-1,13 (уш. с, 18H), 1,03 (т, 3H, J=7,2 Гц, Me). ^{13}C ЯМР ($CDCl_3$, 100 МГц) δ 173,6, 157,9, 155,4, 155,4, 152,1, 151,3, 150,8, 149,5, 145,6, 132,3, 130,8, 129,8, 128,7, 127,9, 127,8, 119,8, 98,0, 83,0, 81,5, 79,7, 72,7, 66,3, 31,8, 28,3, 27,7, 7,8.

Пример XXIX - Получение 5-дибензилоксикарбонилгидразино-20-OTES-камптотецина

Камптотецин 20-OTES (0,100 г, 0,216 ммоль) растворяют в безводном ТГФ (6 мл) при перемешивании в инертной атмосфере, затем охлаждают до температуры -78°C и добавляют туда по каплям 1,0 М раствор LiHMDS в ТГФ (0,281 мл, 0,281 ммоль). Через 20 минут добавляют дибензилазодикарбоксилат (0,097 г, 0,324 ммоль) в безводном ТГФ (2 мл). После 3 часов при -78°C температуре позволяют подняться до 25°C и контролируют исчезновение реагента при помощи ТСХ (гексан/AcOEt = 3/1). Наблюдают образование двух диастереомеров. После 90 минут при комнатной температуре реакцию прерывают добавлением насыщенного NH_4Cl. Водную фазу экстрагируют с помощью CH_2Cl_2 (3×15 мл) и органические фазы объединяют, сушат над Na_2SO_4, фильтруют и концентрируют в вакууме. Остаток очищают флеш-хроматографией (SiO_2, гексан/AcOEt = 4/1, затем 7/2) с получением таким образом светло-желтого твердого вещества (0,161 г, 0,212 ммоль, 98%). Два изомера разделяют последующей хроматографией. В порядке элюирования:

Первый диастереомер: ^{1}H ЯМР ($CDCl_3$, 400 МГц) δ 8,70 (уш. с, 1H, Ar), 8,39 (уш. с. 1H, Ar), 8,22 (уш. д, 1H, J=7,6 Гц, Ar), 7,95 (уш. д, 1H, J=7,6 Гц, Ar), 7,83 (уш. т, 1H, J=7,6 Гц, Ar), 7,65 (уш. т, 1H, J=7,6 Гц, Ar), 7,64-7,00 (м, 11H, Ar+H-14), 6,49 (уш. с, 1H, H-5), 5,57 (д, 1H, J=16,4 Гц, H-17), 5,47-4,44 (м, 5H), 1,98-1,82 (м, 2H, H-19), 1,02-0,89 (м, 12H), 0,80-0,70 (м, 6H). ^{13}C ЯМР ($CDCl_3$, 100 МГц) δ 171,6, 158,0, 156,3, 156,3, 153,0, 152,2, 151,0, 149,6, 144,8, 135,3, 132,1, 130,6, 130,0, 128,6-127,8 (11 C), 119,9, 98,4, 79,5, 75,2, 68,4, 67,9, 65,6, 33,0, 7,9, 7,2, 6,4.

Второй диастереомер: ^{1}H ЯМР ($CDCl_3$, 400 МГц) δ 8,85 (уш. с, 1H, Ar), 8,58 (уш. с. 1H, Ar), 8,20 (уш. с, 1H, Ar), 7,93 (уш. с, Ar), 7,81 (уш. т, 1H, J=7,6 Гц, Ar), 7,63 (уш. т, 1H, J=7,6 Гц, Ar), 7,56-6,90 (м, 11H, Ar + H-14), 6,52 (уш. с, 1H, H-5), 5,55 (д, 1H, J=16,8 Гц, H-17), 5,44-4,71 (м, 5H), 1,98-1,80 (м, 2H, H-19), 1,05-0,90 (м, 12H), 0,81-0,70 (м, 6H). ^{13}C ЯМР ($CDCl_3$, 100 МГц) δ 171,5, 157,9, 156,4, 156,4, 152,9, 152,4, 150,9, 149,4, 144,8, 135,3, 132,1, 130,6, 129,9, 128,6-127,8 (11 C), 119,9, 98,5, 79,3, 75,2, 68,4, 67,8, 65,6, 32,9, 7,8, 7,2, 6,4.

Пример XXX - Получение первого диастереомера 5-дибензилоксикарбонилгидразино-20-OH-камптотецина

Первый диастереомер 5-дибензилоксикарбонилгидразино-20-OTES-камптотецина (0,140 г, 0,184 ммоль) растворяют в безводном ТГФ (6 мл) при перемешивании в инертной атмосфере, затем добавляют туда по каплям $Et_3N{\bullet}3HF$ (0,225 мл, 1380 ммоль). Реакционную смесь подвергают реакции в течение 52 часов при комнатной температуре, контролируя при помощи ТСХ исчезновение реагента (гексан/AcOEt = 1/3). Растворитель выпаривают в вакууме и остаток очищают флеш-хроматографией (SiO_2, гексан/AcOEt = 1/1, затем 2/3) с получением таким образом (0,113 г, 0,175 ммоль, 95%) в виде светло-желтого твердого вещества. Затем продукт очищают кристаллизацией из CH_2Cl_2/пентан = 1/50.

^{1}H ЯМР ($CDCl_3$, 400 МГц) δ 8,67 (уш. с, 1H, Ar), 8,39 (уш. с. 1H, Ar), 8,12 (уш. д, 1H, J= 7,6 Гц, Ar), 7,95 (уш. с, 1H, Ar), 7,74 (уш. т, 1H, J=7,6 Гц, Ar), 7,65-6,66 (м, 12H, Ar+H-14), 6,48 (уш. с, 1H, H-5), 5,55 (д, 1H, J=16,0 Гц, H-17), 5,42-4,44 (м, 5H), 3,86 (уш. с, 1H, OH), 1,92-1,72 (м, 2H, H-19), 0,95 (т, 3H, J=7,6 Гц, Me). ^{13}C ЯМР ($CDCl_3$, 100 МГц) δ 173,5, 158,0, 156,2, 156,0, 153,0, 150,9, 150,9, 149,5, 145,3, 135,4, 132,2, 130,7, 129,8, 128,7-127,8 (11 C), 119,9, 98,2, 79,6, 72,7, 68,5, 68,0, 65,9, 31,6, 7,8.

Пример XXXI - Получение второго диастереомера 5-дибензилоксикарбонилгидразино-20-OH-камптотецина

Второй диастереомер 5-дибензилоксикарбонилгидразино-20-OTES-камптотецина (0,140 г, 0,184 ммоль) растворяют в безводном ТГФ (6 мл) при перемешивании в инертной атмосфере, затем добавляют туда по каплям $Et_3N{\bullet}3HF$ (0,150 мл, 0,921 ммоль). Реакционную смесь подвергают реакции в течение 55 часов при комнатной температуре, контролируя при помощи ТСХ исчезновение реагента (гексан/AcOEt = 3/2). Растворитель выпаривают в вакууме, и остаток очищают флеш-хроматографией (SiO_2, гексан/AcOEt = 1/1), получая таким образом искомое соединение (0,113 г, 0,175 ммоль, 95%) в виде светло-желтого твердого вещества. Затем продукт очищают путем кристаллизации из CH_2Cl_2/пентан = 1/50.

^{1}H ЯМР ($CDCl_3$, 400 МГц) δ 8,71 (уш. с, 1H, Ar), 8,34 (уш. с. 1H, Ar), 8,18 (уш. с, 1H, Ar), 7,94 (уш. с, 1H, Ar), 7,79 (уш. т, 1H, J=7,6 Гц, Ar), 7,70-6,70 (м, 12H, Ar+H-14), 6,52 (уш. с, 1H, H-5), 5,53 (д, 1H, J=16,4 Гц, H-17), 5,44-4,48 (м, 5H), 3,87 (уш. с, 1H, OH), 1,90-1,70 (м, 2H, H-19), 0,99 (т, 3H, J=7,6 Гц, Me). ^{13}C ЯМР ($CDCl_3$, 100 МГц) δ 173,4, 158,0, 156,3, 156,1, 153,0, 151,0, 150,9, 149,6, 145,3, 135,5, 132,3, 130,8, 129,8, 128,7, 127,8 (11

C), 119,8, 98,4, 79,5, 72,7, 68,5, 67,8, 66,0, 31,6, 7,7.

Пример XXXII - Получение 20-OTES-гиматекана

Гиматекан (0,040 г, 0,089 ммоль) растворяют в безводном диметилформамиде (4 мл) в инертной атмосфере и добавляют имидазол (0,030 г, 0,445 ммоль). Смесь перемешивают в течение 10 минут, затем добавляют туда по каплям триэтилсилилхлорид (TES-Cl) (0,060 мл, 0,358 ммоль), после чего добавляют 4-диметиламинопиридин (DMAP) (0,011 г, 0,089 ммоль). Через 75 часов реакционную смесь выпаривают в вакууме, контролируя при помощи ТСХ (гексан/AcOEt = 1/1) полное исчезновение реагента. Затем твердое вещество повторно растворяют в CH_2Cl_2 и H_2O и насыщенном NH_4Cl, водную фазу экстрагируют с помощью CH_2Cl_2 (3×10 мл). Остаток очищают флеш-хроматографией (SiO_2, гексан/AcOEt = 1/1) с получением таким образом искомого продукта (0,048 г, 0,085 ммоль, 95%) в виде желтого твердого вещества (смесь E/Z=70130).

^{1}H ЯМР ($CDCl_3$, 400 МГц) δ 9,02 (с, 1H, CH=N E) 8,29 (д, 1H, J=8,42 Гц, Ar, H-12E + H-12Z), 8,23 (д, 1H, J=7,6 Гц, H-9E), 8,00 (с, 1H, CH=N Z), 7,99 (д, 1H, J=7,6 Гц, H-9Z), 7,83 (т, 1H, J=7,4 Гц, H-11E + H-11Z), 7,68 (т, 1H, J=7,4 Гц, H-10E + H-10Z), 7,57 (с, 1H, H-14E + H-14Z, 5,67 (д, 1H, J=16,4 Гц, H-17E + H-17Z), 5,43 (с, 2H, H-5E), 5,26 (д, 1H, J=16,4 Гц, H-17E), 5,25 (д, 1H, J=16,4 Гц, H-17Z), 5,20 (с, 2H, H-5Z), 2,00-1,84 (м, 2H, H-19E + H-19Z), 1,50 (с, 9H, o^{t}BuE), 1,35 (S, 9H, O^{t}BUZ), 1,02-0,94 (м, 12H, E+Z), 0,80-0,70 (м, 6H, E+Z).

^{13}ЯМР ($CDCl_3$, 100 МГц) δ 171,9 (E+Z, C-21), 157,5 (E+Z, C-16a), 152,5 (E), 152,3 (Z), 151,3 (E+Z), 149,7 (E), 149,0 (Z), 145,7 (E+Z), 142,2 (CH=N E), 139,4 (CH=N Z), 132,9 (E), 132,1 (Z), 130,9 (E, CH, Ar), 130,6 (Z, CH, Ar), 130,3 (Z, CH; Ar), 130,1 (E, CH, Ar), 128,1 (E+ Z, CH, Ar), 125,6 (Z), 125,4 (E), 124,7 (Z, CH, Ar), 122,8 (E, CH, Ar), 119,1 (Z), 118,9 (E), 98,3 (Z, C-14), 98,1 (E, C-14), 81,4 (E, $OC(CH_3)_3$), 81,2 (Z, $OC(CH_3)_3$), 75,3 (E+ Z, C-20), 66,0 (E+ Z, C-17), 52,7 (E, C-5), 51,2 (Z, C-5), 33,3 (E, C-19), 33,2 (Z, C-19), 27,6 ($OC(CH_3)_3$ E), 27,5 ($OC(CH_3)_3$ Z), 7,9 (E+Z C-18), 7,2 (E+Z), 6,4 (E+Z).

Пример XXXIII - Получение 20-OTES-тиогиматекана

Гиматекан 20-OTES (0,080 г, 0,143 ммоль) растворяют в безводном ксилоле (6 мл) при перемешивании и инертной атмосфере. Затем добавляют реагент Лаусона (LR) (0,087 г, 0,214 ммоль) и нагревают реакцию до 90°C. Реакционную смесь подвергают реакции в течение 18 часов при 90°C, контролируя при помощи ТСХ (гексан/AcOEt = 3/1) исчезновение реагента. Растворитель выпаривают в вакууме и остаток очищают флеш-хроматографией (SiO_2, гексан/AcOEt = 4/1) с получением таким образом искомого продукта (0,060 г, 0,102 ммоль, 71%) в виде ярко-желтого твердого вещества.

^{1}H ЯМР ($CDCl_3$, 400 МГц) δ 9,06 (с, 1H, CH=M E) 8,33 (д, 1H, J=8,4 Гц, Ar, H-12E), 8,27 (д, 1H, J=7,6 Гц, H-9E), 8,02 (с, 1H, H-14E), 7,87 (т, 1H, J=7,4 Гц, H-11E), 7,73 (т, 1H, J= 7,4 Гц, H-10E), 7,57 (с, 1H, H-14E + H-14Z), 6,18 (д, 1H, J=17,2 Гц, H-17E), 5,73 (с, 2H, H-5E), 5,35 (д, 1H, J=17,2 Гц, H-17E), 1,93 (кв, 2H, J=7,2 Гц, H-19E), 1,55 (с, 9H, O^{t}BUE), 1,06-0,92 (м, 12H, E), 0,82-0,72 (м, 6H, E). ^{13}C ЯМР ($CDCl_3$, 100 МГц) δ 172,4, 171,5, 151,8, 149,8, 148,0, 146,9, 141,9, 132,3, 131,0, 130,7, 130,3, 128,4, 125,6, 125,1, 122,9, 104,3, 81,8, 75,0, 68,9, 59,2, 33,6, 27,6, 7,8, 7,2, 6,5.

Пример XXXIV - получение тиогиматекана

Тиогиматекан 20-OTES (0,060 г, 0,104 ммоль) растворяют в безводном ТГФ (8 мл) при перемешивании в инертной атмосфере, затем добавляют туда по каплям $Et_3N{\bullet}3HF$ (0,127 мл, 0,780 ммоль). Реакционную смесь подвергают реакции в течение 18 часов при комнатной температуре, контролируя при помощи ТСХ (CH_2CL_2/MeOH = 25/1) исчезновение реагента. Растворитель выпаривают в вакууме и остаток очищают флеш-

хроматографией (SiO_2, гексан/AcOEt = 211) с получением таким образом искомого продукта (0,048 г, 0,102 ммоль, 95%) в виде ярко-желтого твердого вещества.

^{1}H ЯМР ($CDCl_3$, 400 МГц) δ 9,02 (с, 1H, CH=ME) 8,28 (д, 1H, J=8,42 Гц, Ar, H-12E + H-12Z), 8,23 (д, 1H, J=7,6 Гц, H-9E), 8,09 (уш. с, 1H, H-14E + H-14Z), 8,08 (с, 1H, CH=NZ), 8,04 (д, 1H, J=7,6 Гц, H-9Z), 7,85 (т, 1H, J=7,4 Гц, H-11E + H-11Z), 7,70 (т, 1H, J=7,4 Гц, H-10E + H-10Z), 6,26 (д, 1H, J=16,8 Гц, H-17E), 6,24 (д, 1H, J=16,8 Гц, H-17Z), 5,67 (с, 2H, H-5E), 5,51 (с, 2H, H-5Z), 5,37 (д, 1H, J=16,4 Гц, H-17E+ H-17Z), 3,87 (уш. с, 1H, OH), 1,89 (кв, 2H, H-19E + H-19Z), 1,55 (с, 9H, O^{t}BuZ), 1,42 (с, 9H, O^{t}BuZ), 1,03 (т, 3H, J=7,2 Гц, H-18 Z), 1,02 (т, 3H, J=7,2 Гц, H-18 E). ^{13}C ЯМР ($CDCl_3$, 100 МГц) δ 173,5, 172,5, 151,7, 149,7, 148,4, 145,2, 141,9 (CH=NE), 139,0 (CH=NZ), 132,3, 130,8, 130,6, 130,5, 128,5, 125,5, 125,0, 122,9, 104,0, 81,8, 72,3, 69,3, 59,2, 32,1, 27,6, 7,7.

Пример XXXV - Анализ ингибирования роста клеток

H460 клетки из человеческой крупноклеточной опухоли легкого культивировали в среде RPMI-1640, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки. Чувствительность клеток определяли при помощи анализа ингибирования роста клеток после 1 или 72 часов воздействия препарата. Клетки в логарифмической фазе роста собрали и засевали в двух параллелях в 6-луночном планшете. Через двадцать четыре часа после посева клетки подвергали воздействию препаратов и подсчитывали с помощью счетчика Культера через 72 часа после воздействия препаратов для определения IC_{50}. IC_{50} определяют как концентрацию, ингибирующую рост клеток на 50% по сравнению с ростом в необработанном контроле.

Пример XXXVI - Анализ топоизомераза-I-зависимого разрыва ДНК

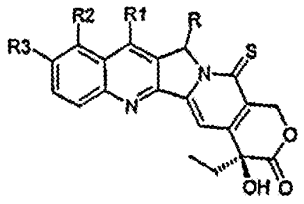
Разрывы ДНК определяли при помощи очищенного геля 751-bp BamHI-EcoRI ДНК SV40 (Beretta GL, Binaschi M, Zagni AND, Capuani L, Capranico G. Tethering a type IB topoisomerase to a DNA site by enzyme fusion to a heterologous site-selective DNA-binding protein domain. Cancer Res 1999; 59:3689-97). Фрагменты ДНК помечали только по 3'. Реакцию разрыва ДНК (20000 имп./мин/образец) проводили в 20 мл смеси 10 мМ Трис-HCl (pH 7,6), 150 мМ KCl, 5 мМ MgCb, 15 мкг/мл БСА, 0,1 мМ тиотреитола и человеческого рекомбинантного фермента (top1 полной длины) в течение 30 минут при 37°C. Реакцию блокировали при помощи 0,5% ДСН и 0,3 мг/мл протеиназы K в течение 45 минут при 42°C. Стойкость повреждения ДНК определяли в различные моменты, добавляя 0,6 M NaCl, после 30 минут инкубации с 10 мкМ препарата. После осаждения ДНК ресуспендировали в денатурирующем буфере (80% формамид, 10 мМ NaOH, 0,01 M ЭДТА и 1 мг/мл красителя) перед посевом в денатурирующем геле (7% полиакриламид в TBE буфере). Все показатели разрыва ДНК измеряли с помощью Phospholmager model 425 (Molecular Dynamics) (Dallavalle S, Ferrari A, Biasotti B, et al., Novel 7-oxyiminomethyl camptothecin derivatives with potent in vitro and in vivo antitumor activity. J Med Chem 2001; 44:3264-74).

Стойкость повреждения ДНК (%)

Соединение	Время (мин)			
	0	1	5	10
Топотекан	100	65	20	10
Камптотецин	100	58	23	20
SN-38	100	60	33	28
IDN 6070	100	33	10	10
IDN 6181	100	88	50	22
IDN 6156	100	100	80	60
IDN 6092	100	35	18	15

Формула изобретения

1. Соединения общей формулы I:



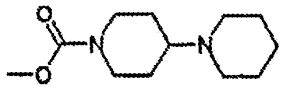
(I)

где R представляет собой водород, -N3;

R1 представляет собой водород, этил, группу -CH=N-O-C(CH_3)$_3$;

R2 представляет собой водород, -$CH_2N(CH_3)_2$;

R3 представляет собой водород, гидроксилгруппу



;

их фармацевтически приемлемые соли, энантиомеры, диастереомеры и соответствующие смеси.

2. Соединение, выбранное из группы, состоящей из:

a) тиокамптотецина;

c) тиоSN38;

d) тиотопотекана;

e) тиоиринотекана;

f) тиогиматекана.

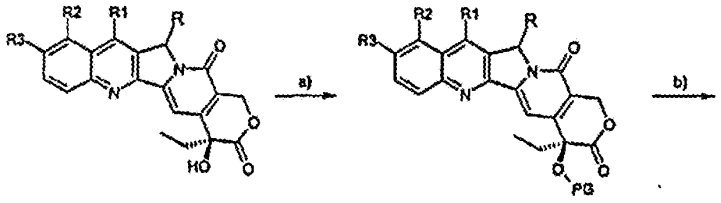
3. Способ получения соединений формулы (I), включающий стадии, показанные на схеме I, где:

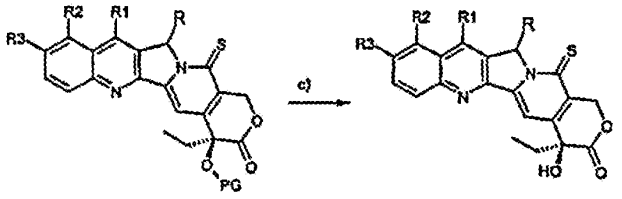
a) защита гидроксигрупп предшественника;

b) превращение пиридонового кольца в тиопиридоновое кольцо;

c) удаление защитных групп;

Схема I





где R, R1, R2 имеют значения указанные в п.1, R3 представляет собой водород или

гидроксил, необязательно защищенный группой -$Si(CH_3)_2C(CH_3)_3$ и PG представляет собой OH-защитную группу, которая представляет собой -$Si(CH_3)_3$.

4. Способ получения соединений формулы (I), включающий стадии, показанные на схеме II, где:

a) защита гидроксигрупп предшественника;

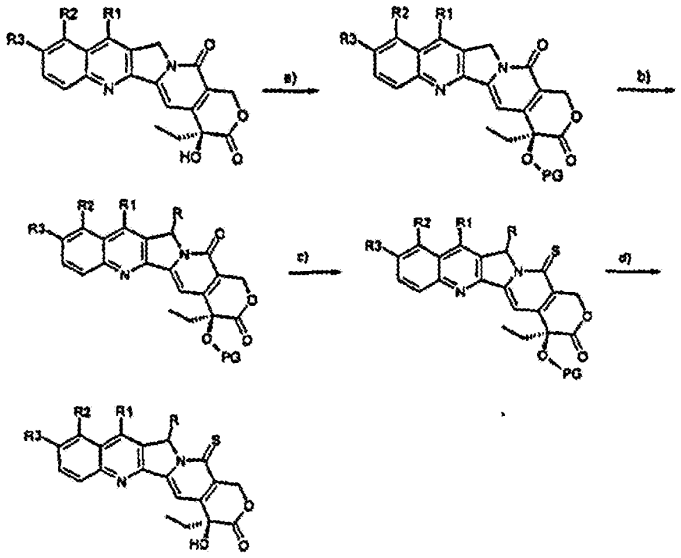
b) модификация в 5 положении посредством образования карбаниона и реакции с электрофильным реагентом;

c) трансформация карбонила 16a в тиокарбонил;

d) снятие защиты с гидроксигрупп;

в котором стадии b) и c) могут проводиться в обратном порядке:

Схема II



где R, R1, R2 и R3 имеют значения, указанные в п.3.

5. Фармацевтическая композиция, обладающая противоопухолевой активностью, содержащая соединение формулы (I) вместе с фармацевтически приемлемыми носителями и эксципиентами.

6. Фармацевтическая композиция, обладающая противоопухолевой активностью, содержащая соединение по п.2 вместе с фармацевтически приемлемыми носителями и эксципиентами.

7. Фармацевтическая композиция по пп.5 и 6 в форме, подходящей для орального или парентерального введения.

8. Применение соединения по пп.1 и 2 или композиции по пп.5-7 для получения лекарственного препарата для лечения опухолей.

9. Применение по п.8, где указанный препарат применяют для лечения солидных опухолей и лейкемий.

10. Применение по п.9, где солидные опухоли и лейкемии выбирают из опухолей легкого, яичников, молочной железы, желудка, печени, предстательной железы, сарком мягких тканей, пищевода, поджелудочной железы, головы и шеи, глиобластомы, хронических и острых миелоцитарных лейкемий.

Espacenet
Patent search

Deutsch English Français
Contact
Change country

About Espacenet Other EPO online services
Search Results My patents list (0) Query history Settings Help

EP1155702 (A1)
Bibliographic data
Description
Claims
Mosaics
Original document
Cited documents
Citing documents
INPADOC legal status
INPADOC patent family

Quick help

- What is meant by high quality text as facsimile?
- What does A1, A2, A3 and B stand for after a European publication number?
- What happens if I click on "In my patents list"?
- What happens if I click on the "Register" button?
- Why are some sidebar options deactivated for certain documents?
- How can I bookmark this page?
- Why does a list of documents with the heading "Also published as" sometimes appear, and what are these documents?
- Why do I sometimes find the abstract of a corresponding document?
- What happens if I click on the red "patent translate" button?
- What is Global Dossier?

Bibliographic data: EP1155702 (A1) — 2001-11-21

In my patents list EP Register Report data error Print

DDS COMPOUNDS AND METHOD FOR ASSAYING THE SAME

Page bookmark	EP1155702 (A1) - DDS COMPOUNDS AND METHOD FOR ASSAYING THE SAME
Inventor(s):	SUSAKI HIROSHI [JP]; INOUE KAZUHIRO [JP]; KUGA HIROSHI [JP]; IKEDA MASAHIRO [JP]; SHIOSE YOSHINOBU [JP]; KORENAGA HIROSHI [JP] ±
Applicant(s):	DAIICHI SEIYAKU CO [JP] ±
Classification:	- international: ***A61K31/4745; A61K47/48; C08B37/02;*** (IPC1-7): A61K31/4745; A61K47/48; C07D491/22; C08B37/00; C08B37/02
	- cooperative: A61K31/4745; A61K47/4823; A61K47/48336; C08B37/0021
Application number:	EP19990952805 19991029 Global Dossier
Priority number(s):	WO1999JP06016 19991029 ; JP19980310130 19981030 ; JP19980329272 19981119
Also published as:	EP1155702 (A4) → AU6488099 (A) AU765409 (B2) → BR9915198 (A) CA2348931 (A1) → more

Abstract of EP1155702 (A1)

Translate this text into
Select language
Machine Translation

A DDS compound comprising a carboxy(C1-4)alkyldextran polyalcohol modified with a saccharide compound and a residue of drug compound bound to the carboxy(C1-4)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.

I232930

附件二

申請日期	88 10 30
案號	91113738
類別	G01N 21/50

公告本

A4
C4

A61K 47/48, 47/30
49/14

（以上各欄由本局填註）

發明 ~~新型~~ 專利說明書

一、發明 ~~新型~~ 名稱	中文	藥物輸導系統(DDS)化合物之測定方法
	英文	METHOD FOR MEASURING DRUG DELIVERY SYSTEM COMPOUND (DDS)
二、發明 ~~創作~~ 人	姓名	1. 洲崎浩　2. 井上和泓 3. 久我洋　4. 池田政浩 5. 鹽瀨能伸(塩瀨能伸)　6. 是永博
	國籍	日本國
	住、居所	1.2.3.4.5.6. 地址同 日本國東京都江戶川區北葛西 1 丁目 16 番 13 號 第一製藥股份有限公司東京研究開發中心內
三、申請人	姓名(名稱)	第一製藥股份有限公司
	國籍	日本國
	住、居所(事務所)	日本國東京都中央區日本橋 3 丁目 14 番 10 號
	代表人姓名	森田清

004780

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

裝 訂 線

I232930

（由本局填寫）

承辦人代碼：	
大　　類：	
IPC 分類：	

A6
B6

本案已向：

日本 國（地區）申請專利，申請日期：　　案號：　　，☑有 ☐無主張優先權

1998 年 10 月 30 日 特願平 10-310130 (主張優先權)

1998 年 11 月 19 日 特願平 10-329272 (主張優先權)

有關微生物已寄存於：　　，寄存日期：　　，寄存號碼：

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄）

裝

訂

線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

004782

I232930

A7
B7

五、發明說明（ 1 ）

[發明技術領域]

本發明係有關被糖化合物修飾之羧基 C_{1-4} 烷基葡聚糖多醇與抗腫瘍劑等醫藥化合物結合之 DDS 化合物(DDS：藥物輸導系統)。又，本發明亦有關高分子載體與抗腫瘍劑等醫藥化合物結合之 DDS 化合物之測定方法。

[發明技術背景]

於治療肺癌或消化道癌等固形癌或白血病等血癌時所使用之抗腫瘍劑，經由靜脈注射或口服全身投予後移動至特定之腫瘍部位，阻礙甚至抑制癌細胞之增殖，發揮治療效果。但是，全身投予之抗腫瘍劑會迅速從血中進入肝臟・內臟器，或是迅速從尿中排泄，血中濃度低，不能充分移動至腫瘍部位。又，一般之抗腫瘍劑本身對於向腫瘍部位移動之選擇性(腫瘍選擇性)低，抗腫瘍劑會分布於全身各細胞或組織，將正常細胞或組織當作毒細胞作用，導至有嘔吐、發熱或掉髮等副作用之發生率非常高之問題。因此，期待開發抗腫瘍劑可有效且具選擇性地向腫瘍部位移動之方法。

該等方法之一有提案為使用具有羧基之多糖化合物作為高分子載體，將抗腫瘍劑與該高分子載體結合，可延長抗腫瘍劑在血中消失之時間，同時可提高向癌組織移動之指向性之方法。例如於國際公開 WO94/19376 號揭示有將具有羧基之多糖之羧基與肽鍵(胺基酸數從 1 至 8)結合，再經由該肽鍵與得索魯必信(doxorubicin)、柔紅黴素(daunorubicin)、絲裂黴素 C(mitomycin C)或滿黴素

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

004783

A7
B7

五、發明說明（ 2 ）

(pleomycin)等結合之DDS化合物。又於特公平7-84481號公報揭示有於被羧甲基化之甘露葡聚糖衍生物，經由席夫鹼或醯胺鍵，導入上述抗腫瘍劑之DDS化合物。

該等DDS化合物(有時亦稱為「藥物複合體」)之特徵為和單獨使用與高分子載體結合之抗腫瘍劑相比較，其抗腫瘍效果優越且可減輕毒性・副作用。本發明人等提供一種將多糖化合物等高分子載體與抗腫瘍劑等醫藥化合物經由由1至8個胺基酸組成之間隔基結合，可使抗腫瘍劑等醫藥化合物對目的組織作部位選擇性移動之DDS化合物(國際公開WO97/46260號)。又，發現羧基C_{1-4}烷基葡聚糖多醇作為高分子載體具有極優越之性質而提供含有以羧基C_{1-4}烷基葡聚糖多醇作為高分子載體之DDS化合物(上述國際公開)。

關於使用多醇化多糖化合物作為高分子載體之DDS化合物之技術有「關於多糖-肽-得索魯必信複合體之研究・多糖化合物在血中之安定性與抗腫瘍效果之關係」(第10次日本DDS學會演講摘要集，279,1994)；「關於多糖-肽-得索魯必信複合體之研究・體內動態及抗腫瘍效果」(第9次日本藥物動態學會年會演講摘要集，292,1994)；第19次研究開發動向研討會(醫藥品機構主辦)摘要集，D-9,1995；及「關於經由多糖載體將藥物送達腫瘍部位之研究」(第12次膠體・界面技術研討會，日本化學會，演講摘要集，51,1995)等之報告。

有關提高多糖化合物等高分子載體之臟器指向性之方

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

004784

A7
B7

五、發明說明（ 3 ）

法已知有例如糖修飾聚谷胺酸衍生物(特開平 5-178986 號公報)、糖修飾聚賴胺酸衍生物(特開平 5-222187 號公報)、聚-ε-取代-L-賴胺酸之 D-半乳糖吡喃糖基-葡糖酸衍生物(特開平 7-70311 號公報)、糖修飾聚-ω-取代-L-谷胺酸衍生物(特開平 7-228688 號公報)、經由連結基(linker)與糖化合物結合之多糖化合物(特開平 8-85703 號公報)及葡萄基-蛋白衍生物(特開平 9-118699 號公報)等。但是，以往對於利用羧基 C_{1-4} 烷基聚糖多醇作為高分子載體之 DDS 化合物提高其臟器指向性之方法並無報告。

另一方面，在臨床上使用高分子載體與醫藥化合物之殘基經由含有低聚肽之間隔基結合之 DDS 化合物時，需正確測定 DDS 化合物本身在血中之濃度，又，為了決定適當之投予量及檢定製品批號差，需正確測定 DDS 化合物中所導入抗腫瘍劑等醫藥化合物殘基之含量。以往測定 DDS 化合物之血中濃度或測定 DDS 化合物之醫藥化合物殘基之含量為以醫藥化合物所發出之螢光或 UV 吸收作指標，不將醫藥化合物或醫藥化物與間隔基一部分結合之化合物從 DDS 化合物切離，而是直接測定 DDS 化合物本身來進行。亦有提案經由測定 DDS 化合物本身 NMR 之方法或將 DDS 化合物經過酸處理，測定所生成之分解物之方法。

但是，醫藥化合物對酸不安定時，有不能利用經由酸處理分解物之定量法及經由 NMR 測定之定量精確度低之問題。又，由於 DDS 化合物中醫藥化合物殘基之 UV 吸收會受高分子載體或肽間隔基影響，導至與醫藥化合物本身

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準 (CNS)A4 規格 (210×297 公釐)

084785

OnCusp
Ex. 1002

五、發明說明（ 4 ）

相較，其極大波長會移動且莫耳吸光係數會變化，所以在正確測定 DDS 化合物中所導入醫藥化合物殘基之含量時有困難。又，生體內投予，在組織中之 DDS 化合物經由 NMR 測定之方法或經由 UV 吸收作定量都有困難。

[發明揭示]

本發明之目的係提供可提高含有以羧基 C_{1-4} 烷基葡聚糖多醇作為高分子載體之 DDS 化合物之臟器指向性(例如向肝臟之指向性等)之方法及提供具有上述特徵之 DDS 化合物。

本發明之另一目的係提供可作為製造具有上述特徵之 DDS 化合物之原料之多糖化合物。

本發明之另一目的係提供將高分子載體與醫藥化合物之殘基經由含有低聚肽之間隔基結合之 DDS 化合物之測定方法。具體而言，本發明之目的為提供正確測定 DDS 化合物本身或 DDS 化合物中所導入之抗腫瘍劑等醫藥化合物殘基之含量之方法。更具體而言，本發明之目的為提供可正確定量所投予 DDS 化合物之血中濃度、組織內濃度或可正確定量 DDS 化合物中所導入醫藥化合物殘基之含量之測定方法。

本發明人等為了解決如述之目的，經過不斷地深入研究而發現，若將被糖化合物修飾之羧基 C_{1-4} 烷基葡聚糖多醇作為高分子載體使用，可製造臟器指向性極高之 DDS 化合物，尤其是含有與半乳糖結合之羧基 C_{1-4} 烷基葡聚糖多醇之 DDS 化合物具有優越之肝臟指向性。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

OnCusp
Ex. 1002

A7
B7

五、發明說明（ 5 ）

本發明人等在將高分子載體與醫藥化合物殘基經由含有低聚肽之間隔基結合之DDS化合物用肽酶處理，測定所獲得之水解物時發現，DDS化合物之血中濃度或DDS化合物中所導入醫藥化合物殘基之含量可正確且簡單地定量。本發明以上述之見解為基礎而完成此一發明。

亦即，本發明係提供含有被糖化合物修飾之羧基C_{1-4}烷基葡聚糖多醇及與該羧基C_{1-4}烷基葡聚糖多醇結合之醫藥化合物殘基之DDS化合物。

根據本發明之理想樣態可提供被糖化合物修飾之羧基C_{1-4}烷基葡聚糖多醇與醫藥化合物殘基經由間隔基結合之上述DDS化合物；間隔基為1個胺基酸或是與肽結合之2至8個胺基酸之上述DDS化合物；被糖化合物修飾之羧基C_{1-4}烷基葡聚糖多醇為糖化合物與羧基C_{1-4}烷基葡聚糖多醇經由連結基結合之上述DDS化合物；及被糖化合物修飾之羧基C_{1-4}烷基葡聚糖多醇經由連結基，經由糖化合物組群修飾之上述DDS化合物。

又，本發明可提供經由將羧基C_{1-4}烷基部分之一部分羧基用糖化合物修飾之羧基C_{1-4}烷基葡聚糖多醇與醫藥化合物之殘基結合可製造DDS化合物。

根據本發明之理想樣態可提供將該羧基C_{1-4}烷基葡聚糖多醇與醫藥化物之殘基經由間隔基結合，可製造上述之DDS化合物；及將羧基C_{1-4}烷基葡聚糖多醇之羧基C_{1-4}烷基部分之一部分羧基與糖化合物或結合有糖化合物之連結基結合所製造之該羧基C_{1-4}烷基葡聚糖多醇與醫藥化合物

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製
004787

五、發明說明（ 6 ）

之殘基結合，可製造上述之 DDS 化合物。

又，根據本發明可提供將羧基 C_{1-4} 烷基部分之一部分羧基與醫藥化合物之殘基經由間隔基結合之羧基 C_{1-4} 烷基葡聚糖多醇用糖化合物修飾，可製造 DDS 化合物。

根據本發明之理想樣態可提供將該羧基 C_{1-4} 烷基葡聚糖多醇與糖化合物經由連結基結合，可製造上述之 DDS 化合物；及將羧基 C_{1-4} 烷基葡聚糖多醇之羧基 C_{1-4} 烷基部分之一部分羧基經由由 1 個胺基酸所成之間隔基或經由與肽結合之 2 至 8 個胺基酸所成之間隔基與醫藥化合物之殘基結合所製造之該羧基 C_{1-4} 烷基葡聚糖多醇以糖化合物修飾，可製造上述之 DDS 化合物。

根據本發明更理想之樣態可提供糖化合物為半乳糖、半乳糖胺或其衍生物之上述 DDS 化合物；構成羧基 C_{1-4} 烷基葡聚糖多醇之葡聚糖多醇為在實質上可完全多醇化之條件下處理葡聚糖所獲得之葡聚糖多醇之上述 DDS 化合物；羧基 C_{1-4} 烷基葡聚糖多醇為羧甲基葡聚糖多醇之上述 DDS 化合物；半乳糖、半乳糖胺或其衍生物或組群化之半乳糖、半乳糖胺或其衍生物之取代度對於羧基 C_{1-4} 烷基葡聚糖多醇之糖殘基為 0.01 至 1.0 之上述 DDS 化合物；醫藥化合物為抗腫瘍劑或消炎劑之上述 DDS 化合物；醫藥化合物為(1S,9S)-1-胺基-9-乙基-5-氟-2,3-二氫-9-羥基-4-甲基-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4'：6,7]吲哚啉并[1,2-b]喹啉-10,13(9H,15H)-二酮之上述 DDS 化合物及肝癌治療劑之上述 DDS 化合物。

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

004788

本紙張尺度適用中國國家標準 (CNS)A4 規格 (210 × 297 公釐)

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線

A7
B7

五、發明說明（ 7 ）

從另一觀點而言，本發明可提供被糖化合物修飾之羧基 C_{1-4} 烷基葡聚糖多醇；由被糖化合物修飾之羧基 C_{1-4} 烷基葡聚糖多醇所成之高分子載體；及製造上述 DDS 化合物所使用之被糖化合物修飾之羧基 C_{1-4} 烷基葡聚糖多醇。

又，從另一觀點而言，係提供一種用以製造上述 DDS 化合物之經糖化合物修飾之羧基 C_{1-4} 烷基葡聚糖多醇。

再從其他觀點而言，本發明可提供經由含有與肽結合之 2 至 8 個胺基酸之間隔基使高分子載體與醫藥化合物之殘基結合之 DDS 化合物之測定方法，包括測定該 DDS 化合物經由肽酶處理所獲得之水解物步驟之方法。

根據本發明之理想樣態可提供測定生體試樣中所含有該 DDS 化合物濃度所使用之上述方法；為了測定該 DDS 化合物中所導入醫藥化合物殘基之含量所使用之上述方法；該水解物為醫藥化合物之上述方法；該水解物為醫藥化合物之殘基與間隔基之一部分結合之化合物之上述方法；及間隔基之一部分為間隔基來源之 1 個胺基酸之上述方法。

根據上述發明更理想之樣態可提供該高分子載體為具有羧基之高分子載體，較好為多糖衍生物之上述方法；該高分子載體為羧基 C_{1-4} 烷基葡聚糖多醇，較好為羧甲基葡聚糖多醇之上述方法；以構成羧基 C_{1-4} 烷基葡聚糖多醇之葡聚糖多醇為在實質上可完全多醇化之條件下處理葡聚糖所獲得之葡聚糖多醇為特徵之上述方法；該高分子載體為被糖化合物修飾者之上述方法；該 DDS 化合物中所導入之

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

A7
B7

五、發明說明（ 8 ）

醫藥化合物為抗腫瘍劑或消炎劑之上述方法；間隔基為從N末端起為-Gly-Gly-Phe-Gly-所示之四肽或從N末端起為-Gly-Gly-Gly-Phe所示之四肽之上述方法；間隔基為從N末端起為-Gly-Gly-Phe-Gly-NH-Y'-CH_2-O-CO-所示之基或從N末端起為-Gly-Gly-Gly-Phe-NH-Y'-CH_2-O-CO-所示之基(式中，Y'為對-伸苯基)之上述方法；肽酶為α-胰凝乳蛋白酶或木瓜酶之上述方法；及醫藥化合物為(1S,9S)-1-胺基-9-乙基-5-氟-2,3-二氫-9-羥基-4-甲基-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4'：6,7]吲哚啉并[1,2-b]喹啉-10,13(9H,15H)-二酮之上述方法。

上述發明特別理想之樣態為上述方法可用於測定經由含有從N末端起為-Gly-Gly-Phe-Gly-所示之四肽或從N末端起為-Gly-Gly-Gly-Phe-所示之四肽之間隔基將羧基C_{1-4}烷基葡聚糖多醇與(1S,9S)-1-胺基-9-乙基-5-氟-2,3-二氫-9-羥基-4-甲基-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4'：6,7]吲哚啉并[1,2-b]喹啉-10,13(9H,15H)-二酮結合之DDS化合物，經由使用α-胰凝乳蛋白酶作為肽酶，測定作為水解物之(1S,9S)-9-乙基-5-氟-1-甘氨醯胺基-2,3-二氫-9-羥基-4-甲基-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4'：6,7]吲哚啉并[1,2-b]喹啉-10,13(9H,15H)-二酮，可定量上述DDS化合物或上述DDS化合物中所導入之上述抗腫瘍劑之含量。

[圖式簡單說明]

第1圖為用本發明方法(實例4)測定之DDS化合物之血中及腹水中濃度。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

004790

A7
B7

五、發明說明（ 9 ）

第 2 圖為用本發明方法(實例 5)測定之 DDS 化合物之血中及腹水中濃度。

第 3 圖為具有被糖化合物修飾之高分子載體之本發明 DDS 化合物(實例 6)之紫外線吸收光譜。

第 4 圖為具有被糖化合物修飾之高分子載體之本發明 DDS 化合物(實例 6)之 GPC 圖。

第 5 圖為實例 6 所製造之 DDS 化合物((C)及(D))於肝臟之集積性。

第 6 圖為本發明 DDS 化合物(實例 6(D))之紫外線吸收光譜。

第 7 圖為本發明 DDS 化合物(實例 7)之紫外線吸收光譜。

第 8 圖為本發明 DDS 化合物(實例 9)之紫外線吸收光譜。

第 9 圖為本發明 DDS 化合物(實例 6(D))之 GPC 圖。

第 10 圖為本發明 DDS 化合物(實例 7)之 GPC 圖。

第 11 圖為本發明 DDS 化合物(實例 9)之 GPC 圖。

[實施本發明之最佳形態]

本發明之 DDS 化合物之特徵為含有被糖化合物修飾之羧基 C_{1-4} 烷基葡聚糖多醇及與該羧基 C_{1-4} 烷基葡聚糖多醇結合之醫藥化合物殘基。更具體而言，本發明之 DDS 化合物包括(1)被糖化合物修飾之羧基 C_{1-4} 烷基葡聚糖多醇與醫藥化合物之殘基不經由間隔基結合及(2)被糖化合物修飾之羧基 C_{1-4} 烷基葡聚糖多醇與醫藥化合物之殘基經由

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

004791

五、發明說明（ 10 ）

間隔基結合之任何一種情況。

有關被糖化合物修飾之羧基 C_{1-4} 烷基葡聚糖多醇與醫藥化合物之殘基經由間隔基結合之情況可列舉如羧基 C_{1-4} 烷基葡聚糖多醇與醫藥化合物之殘基經由由 1 個胺基酸所成之間隔基結合、羧基 C_{1-4} 烷基葡聚糖多醇與醫藥化合物之殘基經由與肽結合之 2 至 8 個胺基酸所成之間隔基結合或是由與肽結合之 2 至 8 個胺基酸所成之低聚肽經由與-NH-Y-CO-[式中，Y 為碳原子數為 1 至 8 之伸烷基或-C_6H_4-CH_2-O-(-C_6H_4-為伸苯基，該伸苯基可具有 1 個或 2 個以上之取代基，較好為對-伸苯基)所示之基]所示之連結基結合之間隔基結合。本說明書中所使用之「修飾」一詞為包括將糖化合物與羧基 C_{1-4} 烷基葡聚糖多醇直接或經由連結基間接地以共價鍵結合之狀態最廣義之解釋，對於其意義無法作限制性解釋。

上述 DDS 化合物所含有之醫藥化合物之殘基其意義為以例如抗腫瘍劑、消炎劑、抗菌劑等作為醫藥，治療及/或預防包括人類之哺乳類疾病所使用之醫藥化合物主要之部分構造。又，該醫藥化合物之用途並不只限於上述者，醫藥化合物只要具有可參予與羧基 C_{1-4} 烷基葡聚糖多醇或間隔基結合之 1 或 2 個以上之反應性官能基(例如胺基、羧基、羥基、巯基、酯基等)均可使用。醫藥化合物之殘基亦可與羧基 C_{1-4} 烷基葡聚糖多醇之羧基、存在於間隔基之反應性官能基(例如使用肽間隔基時，存在於其 N 末端胺基、C 末端羧基或構成間隔基之胺基酸之反應性官能基)結

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

五、發明說明（ 11 ）

合。本說明書中之醫藥化合物亦包括本身具有醫藥作用之化合物之主要構造作為其部分構造，在生體內該化合物可再生之前驅藥物化合物。

上述發明中，醫藥化合物之殘基假設為經由羧基 C_{1-4} 烷基葡聚糖多醇或間隔基與醫藥化合物之殘基結合，或是為經由醫藥化合物中之反應性官能基與羧基 C_{1-4} 烷基葡聚糖多醇或間隔基中之反應性官能基之反應(例如脫水縮合)形成時，為存在於結合後之化合物中醫藥化合物來源之部分構造。例如醫藥化合物為 D-NH_2,D-COOH,D-COOR,D-OH,D-SH,D-$CONH_2$,D-NH-COOR(R 為低級烷基等)，則醫藥化合物之殘基分別為 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)
(括符內表示間隔基或羧基 C_{1-4} 烷基葡聚糖多醇與醫藥化合之殘基結合，Q 為從間隔基及羧基 C_{1-4} 烷基葡聚糖多醇中除去各個反應性官能基及羧基所剩餘之部分構造)。間隔基或羧基 C_{1-4} 烷基葡聚糖多醇與醫藥化合物之殘基結合之種類並不只限於上述者。

醫藥化合之殘基可使用例如得索魯必信、柔紅黴素、絲裂黴素 C、滿黴素、環胞啶(cyclocytidine)、長春新鹼(vincristine)、長春鹼(vinblastine)、甲基蝶啶胺(methotrexate)、鉑類抗腫瘍劑(順氯氨鉑(cisplatin)或其衍

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準 (CNS)A4 規格 (210 × 297 公釐)
004793

五、發明說明（ 12 ）

生物）、塔奇索(taxol)或其衍生物、喜樹鹼(camptothecin)或其衍生物(特開平 6-87746 號公報所揭示之抗腫瘍劑，較好為申請專利範圍第 2 項之(1S,9S)-1-胺基-9-乙基-5-氟-2,3-二氫-9-羥基-4-甲基-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲哚啡并[1,2-b]喹啉-10,13(9H,15H)-二酮)等之抗腫瘍劑之殘基較適當。又，亦可使用琥珀酸氫化可體松(hydrocortisone succinate)、琥珀酸氫化潑尼松(prednisolone succinate)等類固醇類消炎劑或甲滅酸(mefenamicacid)、氟滅酸(flufenamic acid)、待可菲諾(diclofenac)、依普芬(ibuprofen)、蒂諾利定(tinoridine)等非類固醇類消炎藥之殘基。

有關醫藥化合物之殘基與羧基 C_{1-4} 烷基葡聚糖多醇結合之間隔基，使用由 1 個胺基酸所成之間隔基或由與肽結合之 2 至 8 個胺基酸所成之間隔基時，該間隔基為 1 個胺基酸之殘基(其意指從胺基酸之胺基及羧基分別除去 1 個氫原子及 1 個羥基之殘基)及與肽結合之 2 至 8 個胺基酸所成之低聚肽之殘基(其意指從 N 末端之胺基及 C 端之羧基分別除去 1 個氫原子及 1 個羥基之殘基)之形態。

較理想之間隔基為由 2 至 6 個胺基酸所成之低聚肽之殘基。構成間隔基之胺基酸種類並無特別限制，可使用例如 L-或 D-胺基酸，較好使用 L-胺基酸。除了 α-胺基酸之外亦可使用 β-丙胺酸、ε-胺基己酸、γ-胺基丁酸等。此等 α-胺基酸以外之胺基酸在間隔基中較好配置在接近多糖化合物之位置。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

OnCusp
Ex. 1002

五、發明說明（ 13 ）

使用低聚肽間隔基時之結合方向並無特別限制，一般羧基 C_{1-4} 烷基葡聚糖多醇之羧基在間隔基 N 末端經由醯胺鍵結合，醫藥化合物之胺基可結合在間隔基之 C 末端。又，例如作為肽間隔基構成單位之含有賴胺酸殘基時，賴胺酸殘基之 α-胺基及 ε-胺基若分別與其他胺基酸之羧基結合成醯胺，則由於肽間隔基之兩末端成為 N 末端，而可和醫藥化合物之羧基結合。間隔基中以含有 1 個或 2 個以上之二胺化合物或二羧酸化合物之殘基(例如乙二胺等二胺之殘基或琥珀酸等之二羧酸之殘基)作為構成單位，則兩末端可分別利用 N 末端之間隔基及 C 末端之間隔基。

使用由低聚肽所成之間隔基時，其胺基酸之配置並無特別限制，可使用間隔基為-X-Z-所示之二肽殘基(X 為疏水性胺基酸之殘基，Z 為親水性胺基酸之殘基，-X-Z-為疏水性胺基酸(X)及親水性胺基酸(Z)分別從由與 N 末端及 C 末端組成之肽結合之二肽 N 末端之胺基及 C 末端之羧基分別除去 1 個氫原子及 1 個羥基之殘基)或是含有該二肽之殘基作為部分肽配置之間隔基較適當。疏水性胺基酸可使用苯基丙胺酸、酪胺酸、白胺酸等，親水性胺基酸可使用甘胺酸、丙胺酸等。間隔基亦可具有該二肽殘基之重覆配置(例如-X-Z-X-Z-,-X-Z-X-Z-X-Z-等)。

若使用該等含有二肽構造之間隔基，則可斷定間隔基之肽酶豐富，在腫瘍部位或發炎部位水解，該等部位在短時間即有高濃度之醫藥化合物游離。所以，含有上述二肽之間隔基與醫藥化合物結合所形成之部分構造為本發明

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

A7
B7

五、發明說明（ 14 ）

DDS化合物理想之部分構造。醫藥化合物之殘基使用濃度依賴型之抗腫瘍劑(例如得索魯必信等)之殘基時，以使用由上述-X-Z-所示之二肽殘基組成之間隔基或是含有該二肽之殘基作為部分肽配置之間隔基較理想。

醫藥化合物之殘基使用必需在一定之濃度以上持續作用時間之時間依賴型抗腫瘍劑時，經由使用上述之間隔基，可達到高抗腫瘍效果。有關該等抗腫瘍劑可列舉例如特開平6-87746號公報揭示之抗腫瘍劑，較好為申請專利範圍第2項之抗腫瘍劑。一般對於上述之間隔基並無限制，有必要選擇由抗腫瘍之作用機轉、體內動態或發現毒性之特徵、抗腫瘍劑在體內之游離性等觀點而言較理想之間隔基。又，一般對於增殖速度快之癌類，以選擇在短時間內可游離高濃度醫藥化合物之上述間隔基較理想。

可利用作為間隔基之低聚肽之具體例如下所示，但DDS化合物因需要而使用之間隔基並不只限於以下所示者，選擇是否需利用間隔基或是使用間隔基時選擇其種類，只要能付予醫藥化合物適當之游離速度，業者可適當選擇(表中，肽配置左側為N末端，C末端與醫藥化合物之殘基結合。D-Phe為D-苯基丙胺酸殘基，其他之胺基酸為L-胺基酸。又，游離速度之大小根據對於結合有得索魯必信之DDS化合物之Walker 256擔癌老鼠藥效發現之程度或是在Walker 256擔癌老鼠腫瘍部位游離得索魯必信之濃度來判定)。該等間隔基中，對於得索魯必信以使用(N末端)-Gly-Gly-Phe-Gly-等短時間可游離高濃度醫藥化合物

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

五、發明說明（ 15 ）

之間隔基較理想。

表 1

(a)游離速度大之間隔基

-白胺酸-甘胺酸-

-酪胺酸-甘胺酸-

-苯基丙胺酸-甘胺酸-

-甘胺酸-苯基丙胺酸-甘胺酸

-甘胺酸-甘胺酸-苯基丙胺酸-甘胺酸-

-甘胺酸-苯基丙胺酸-甘胺酸-甘胺酸-

-苯基丙胺酸-甘胺酸-甘胺酸-甘胺酸-

-苯基丙胺酸-苯基丙胺酸-甘胺酸-甘胺酸

-甘胺酸-甘胺酸-甘胺酸-苯基丙胺酸-甘胺酸-

(b)游離速度較大之間隔基

-甘胺酸-甘胺酸-苯基丙胺酸-苯基丙胺酸-

-甘胺酸-甘胺酸-甘胺酸-甘胺酸-甘胺酸-甘胺酸-

(c)游離速度較小之間隔基

-苯基丙胺酸-苯基丙胺酸-

-丙胺酸-甘胺酸-

-脯胺酸-甘胺酸-

-甘胺酸-甘胺酸-甘胺酸-苯基丙胺酸-

(d)游離速度小之間隔基

-甘胺酸-

-D-苯基丙胺酸-甘胺酸-

-甘胺酸-苯基丙胺酸-

004797

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

五、發明說明（ 16 ）

-絲胺酸-甘胺酸-

-甘胺酸-甘胺酸-

-甘胺酸-甘胺酸-甘胺酸-

-甘胺酸-甘胺酸-甘胺酸-甘胺酸-

本發明之DDS化合物之特徵為具有被糖化合物修飾之羧基C_{1-4}烷基葡聚糖多醇之高分子載體。本發明DDS化合物中之羧基C_{1-4}烷基葡聚糖多醇之多醇化度雖無特別限制，但是構成羧基C_{1-4}烷基葡聚糖多醇之葡聚糖多醇以在實質上可完全多醇化之條件下處理葡聚糖所獲得之葡聚糖多醇較理想。

為了製造羧基C_{1-4}烷基葡聚糖多醇所使用葡聚糖之種類並無特別限制，α-D-1,6-鍵亦可以任意比例含有例如可使用α-D-1,6鍵之比率在85%以上、90%以上或95%以上之葡聚糖。葡聚糖之分子量並無特別限制，以使用約1,000至2,000,000者，較好使用約3,000至800,000者。有關構成羧基C_{1-4}烷基葡聚糖多醇之羧基C_{1-4}烷基之C_{1-4}烷基可使用直鏈或支鏈之C_{1-4}烷基，具體而言，可使用甲基、乙基、正丙基、異丙基、正丁基、第二丁基等，以使用甲基較理想。

使用葡聚糖作為起始原料時，將葡聚糖與大為過量之高碘酸鈉及硼氫化鈉依序作用，可製造葡聚糖實質上完全多醇化之葡聚糖多醇。葡聚醇多醇化之方法並不只限於以上所述者，可採業者可利用之任何一種方法。羧基C_{1-4}烷基化可由將葡聚糖多醇之羥基與氯乙酸、溴乙酸、α-氯丙

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

五、發明說明（ 17 ）

酸、α-甲基-α-氯丙酸、β-氯丙酸、α-甲基-β-氯丙酸、α-氯丁酸、β-氯丁酸、γ-氯丁酸等鹵化 C_{1-4} 烷基羧酸，較好與氯乙酸反應，將羥基部分或全部羧基 C_{1-4} 烷基化來進行。

例如，將葡聚糖多醇溶解於不參與反應之惰性溶劑(例如水、N,N-二甲基甲醯胺、二甲亞碸等)中，在鹼(例如氫氧化鈉或氫氧化鉀)存在下加入鹵化 C_{1-4} 烷基羧酸或其鹽類，在冰冷下至約 100℃之溫度範圍反應數分鐘至數日即可。羧基 C_{1-4} 烷基導入之程度由適當選擇羧基 C_{1-4} 烷基化反應之溫度或作為試藥使用之鹵化 C_{1-4} 烷基羧酸及鹼之量可容易調整，該等方法為業者悉知。對於葡聚糖多醇之糖殘基羧基 C_{1-4} 烷基化之程度並無特別限制，例如可在 0.01 至 2.0 之範圍，較好在 0.1 至 1.0 之範圍。

修飾羧基 C_{1-4} 烷基葡聚糖多醇之糖化合物之種類並無特別限制，因應 DDS 化合物所指向臟器之種類或體內動態等條件，業者可作適當之選擇。有關糖化合物可使用單糖類、寡糖類或其衍生物之任何一種。糖化合物與羧基 C_{1-4} 烷基葡聚糖多醇結合之種類並無特別限制。糖化合物與羧基 C_{1-4} 烷基葡聚糖多醇可經由例如 O-α-糖苷鍵或 O-β-糖苷鍵直接鍵結，亦可經由適當之連結基鍵結兩者。本說明書中所使用之「連結基」亦包括於糖化合物殘基與羧基 C_{1-4} 烷基葡聚糖多醇之鍵結中所使用之任何一種基，需作最廣義之解釋。對於羧基 C_{1-4} 烷基葡聚糖多醇糖化合物之導入量(取代程度)並無特別限制，可根據糖化合物種類、

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

004799

本紙張尺度適用中國國家標準 (CNS)A4 規格 (210 × 297 公釐)

五、發明說明（ 18 ）

所希望之指向性程度、醫藥化合物種類等種種條件作適當選擇，一般每羧基 C_{1-4} 烷基葡聚糖多醇之糖殘基為約 0.01 至 1.0。

使用連結基時，對於連結基之種類並無特別限制，以利用例如 -O-(CH_2)n-NH-(n 為 1 至 16 之整數)或 -(O-CH_2CH_2)m-NH-(m 為 1 至 10 之整數)所示之連結基較理想。可經由將該等連結基之 O 末端或 N 末端，較好 O 末端以 O-α-糖苷鍵或 O-β-糖苷鍵與糖化合物結合，另一端將羧基 C_{1-4} 烷基葡聚糖多醇之羧基與醯胺基或酯結合，將羧基 C_{1-4} 烷基葡聚糖多醇用糖化合物修飾。

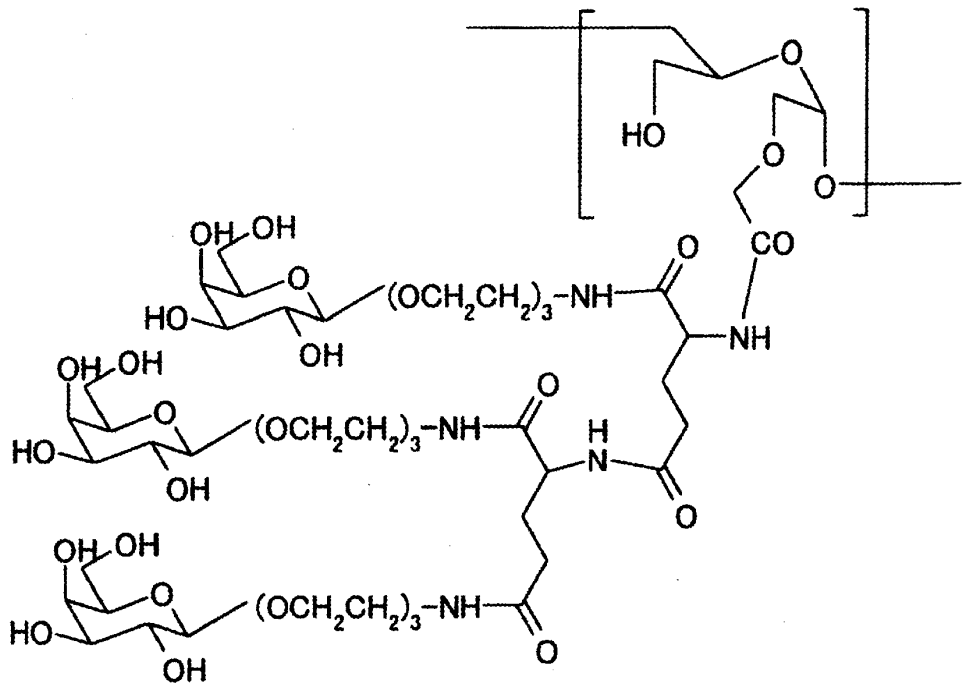
經由使用適於組群修飾之連結基亦可製造組群修飾體。組群修飾體為對於羧基 C_{1-4} 烷基葡聚糖多醇之羧基，使用適於組群修飾之連結基將糖化合物以房狀結合之化合物，其具體方法揭示於特許第 2774417 號說明書、特許第 2774429 號說明書或 Biol.Pharm.Bull.,20,pp.259-266，1977 等。由於將組群修飾體複數個糖化合物配置於一定空間內，所以具有與接受體親和性高，可發揮優越之臟器指向性特徵。本發明 DDS 化合物中組群修飾之一例如下所述(下述構造式為被組群修飾之羧基 C_{1-4} 烷基葡聚糖多醇分子之部分構造，醫藥化合物之殘基省略)。本發明 DDS 化合物中可利用之組群修飾方法並不只限於下述具體例，業者可選擇適當方法。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

I232930

A7
B7

五、發明說明（ 19 ）



單糖類可列舉葡萄糖、果糖、甘露糖、半乳糖、岩藻糖、神經胺酸、糖醛酸等六碳糖；半乳糖胺、葡糖胺等六碳糖胺；核糖、脫氧核酸、阿拉伯糖、木糖等五碳糖。該等衍生物可使用 N-或 O-醯基衍生物、O-烷基衍生物、硫酸酯、磷酸酯等。單糖類之衍生物更具體而言可列舉 N-乙醯基神經胺酸、N-乙醯基半乳糖胺、N-乙醯基葡糖胺、甘露糖-6-磷酸、半乳糖-3-磷酸、6-O-苯醯基葡萄糖、6-O-羧甲基-N-乙醯基葡糖胺、2-N-苯醯基葡糖胺等。寡聚糖類可使用例如由上述單糖類或其衍生物所構成之直鏈或支鏈狀之雜寡聚糖或均寡聚糖。更具體而言，可使用蔗糖、二烯丙基路易士 A、二烯丙基路易士 X、乳糖、麥芽糖、路易士 X、硫酸化路易士 X 等。其中，作為提高肝臟指向性

004801

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

OnCusp
Ex. 1002

A7
B7

五、發明說明（ 20 ）

之糖化合物，較好使用半乳糖、半乳糖胺或其衍生物，或於非還原末端側具有半乳糖或N-乙醯基半乳糖胺之寡聚糖(例如乳糖)，又以半乳糖或N-乙醯基半乳糖胺較理想。

本發明DDS化合物之製造方法並無特別限制，以下為一般之製造方法。以本說明書實施例中之一例具體且詳細揭示。業者們一邊參照下述之一般性說明及實施例所揭示之製造方法一邊選擇適當之製造原料、反應試藥及反應條件，必要時將該等方法加以修飾或改變，可容易地製造本發明所包含之DDS化合物。一般將羥基C_{1-4}烷基葡聚糖多醇依照適當之方法用糖化合物修飾，經由該修飾體與和醫藥化合物之殘基或與醫藥化合物結合之間隔基進行反應可製造本發明之DDS化合物。一般可將羧基C_{1-4}烷基葡聚糖多醇調製成鈉鹽或鉀鹽等鹼金屬鹽形態之水溶液，在水中或含水有機溶劑中進行糖化合物之修飾及與醫藥化合物(或與醫藥化合物結合之間隔基)之反應。

亦可將羧基C_{1-4}烷基葡聚糖多醇或被糖化合物修飾之羧基C_{1-4}烷基葡聚糖多醇轉換成有機胺鹽形態，其後之反應在實質上不含水之有機溶劑中進行。有機胺鹽除了例如三乙胺、三甲胺、三乙醇胺等脂肪族胺類之鹽之外，可使用N-甲基吡咯烷、N-甲基　啶、N-甲基嗎啉、二甲胺基吡啶等脂環式或芳族胺類之鹽、氯化四甲銨、氯化四乙銨等四級銨鹽等。將羧基C_{1-4}烷基葡聚糖多醇或被糖化合物修飾之羧基C_{1-4}烷基葡聚糖多醇之鈉鹽轉換為有機胺鹽，可使用離子交換樹脂等進行。例如可將羧甲基葡聚糖多醇或

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

A7
B7

五、發明說明（ 21 ）

其糖化合物修飾體之鈉鹽溶解於水，附著於充填有 Bio-Rad AG50W-X2(200-500 網目、H^+型)樹脂之管柱，用水溶出後加入三乙胺等有機胺，凍結乾燥。亦可將羧甲基葡聚糖多醇或其糖化合物修飾體之鈉鹽溶解於水，經由通過三乙銨型樹脂進行轉換。

醫藥化合物本身與羧基 C_{1-4} 烷基葡聚糖多醇之羧基結合，或將與醫藥化合物結合之間隔基與羧基 C_{1-4} 烷基葡聚糖多醇之羧基之結合，一般只要將醫藥化合物本身具有之反應性胺基或間隔基之反應性胺基(於肽間隔基為 N 末端胺基等)與羧基 C_{1-4} 烷基葡聚糖多醇之羧基結合成醯胺即可。間隔基與羧基 C_{1-4} 烷基葡聚糖多醇之羧基之結合並不只限於上述者，亦可為其他之化學結合或利用 1 或 2 個以上之間隔基結合。例如可經由肽間隔基之 C 末端羧基或醫藥化合物之羧基與羧基 C_{1-4} 烷基葡聚糖多醇之羧基形成酸酐，亦可使用乙二胺等二胺化合物作為間隔基，將各個羧基與二胺之各胺基結合為醯胺。

於醫藥化合物本身具有之反應性胺基或肽間隔基之 N 末端胺基與羧甲基葡聚糖多醇之羧基結合為醯胺時，可使用合成肽鏈所使用之一般脫水縮合劑，如 N,N'-二環己基碳化二亞胺(DCC)之 N,N'-二環烷基碳化二亞胺類、1-乙基-3-(3-二甲胺基丙基)碳化二亞胺(EDAPC)等碳化二亞胺衍生物、1-乙氧羰基-2-乙氧基-1,2-二羥基喹啉(EEDQ)等。此時，必要時亦可加入如 1-羥基苯并三唑(HOBT)之苯并三唑衍生物。又，亦可經由活性酯法或酸鹵化物法等進行反應。

004803

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

線

A7
B7

五、發明說明（ 22 ）

有關在非水系下進行反應時之溶劑，只要是實質上不含水之有機溶劑，可溶解反應物種(被糖化合物修飾之羧甲基葡聚糖多醇之有機胺鹽及醫藥化合物或與醫藥化合物結合之間隔基等)之溶劑均可使用。以使用例如 N,N-二甲基甲醯胺、二甲亞碸、乙醯胺、N-甲基吡咯烷、環丁碸等較理想。對於被糖化合物修飾之羧基 C_{1-4} 烷基葡聚糖多醇中導入之醫藥化合物殘基之量並無特別限制，可從醫藥化合物殘基之種類及 DDS 化合物之體內動態、藥效及毒性等觀點作適當之選擇，一般可選擇在 0.1 至 30 重量%，較好在約 2 至 15 重量%之範圍。使用特開平 6-87746 號公報中申請專利範圍第 2 項之抗腫瘍劑作為醫藥化合物時之導入量為例如 1 至 15 重量%，較好為約 4 至 8 重量%。羧基 C_{1-4} 烷基葡聚糖多醇中導入之醫藥化合物殘基之比率經由吸光度分析等可容易地決定。

例如使用特開平 6-87746 號公報中申請專利範圍第 2 項之抗腫瘍劑作為醫藥化合物時，已知該醫藥化合物在酸性水性介質中(例如 pH 值約為 3)時平衡會偏向形成內酯環之化合物(閉環體)，另一方面，在鹼性水性介質中(例如 pH 值約為 10)時平衡會偏向內酯環開環之化合物(開環體)。雖然對應該等閉環體及開環體之殘基所導入之 DDS 化合物具有相同之抗腫瘍效果，但是，在被糖化合物修飾之羧基 C_{1-4} 烷基葡聚糖多醇和與上述醫藥化合物結合之間隔基(例如低聚肽間隔基)進行反應時在反應系中若有開環型之反應物種存在，則來自內酯環之羧基及來自間隔基之胺基

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

OnCusp
Ex. 1002

A7
B7

五、發明說明（ 23 ）

之間會進行縮合反應，不只會顯著降低反應收率，還不能獲得均一之 DDS 化合物。該等副反應可由在不能達成平衡之非水系中使用閉環體作為反應物種來回避。

本發明之 DDS 化合物具有因應醫藥化合物殘基之種類(例如抗腫瘍劑或消炎劑等醫藥化合物之殘基)，在腫瘍部位或炎症部位等局部地方可發現特異性之所期待之醫藥活性，且可減低醫藥化合物本身所具有之毒性之特徵。又，本發明之 DDS 化合物具有優越之血管透過性。由於在腫瘍部位或炎症部位發現有蛋白酶(肽酶)，具有由低聚肽所成之間隔基之 DDS 化合物，其間隔基部分可容易地被水解，所游離之醫藥化合物向細胞內移行發揮藥效，又經由辨識目標細胞之糖之接受器使 DDS 化合物進入細胞內，經由蛋白酶游離之藥物發揮藥效。

又，羧基 C_{1-4} 烷基葡聚糖多醇在生體內，例如在肝臟、脾臟或骨髓等被認為是異物高分子化合物之程度低，所以向臟器之移行性低，另一方面，因應糖化合物之種類所對應之糖接受器具有在大部分臟器以高濃度分布之特徵，例如具有被半乳糖修飾之羧基 C_{1-4} 烷基葡聚糖多醇之本發明 DDS 化合物對於肝臟具有優越之指向性。因此，與作為醫藥化合物之腫瘍劑結合之 DDS 化合物可用於治療肝癌。

含有本發明 DDS 化合物之醫藥一般可以凍結乾燥品等形態充填於小瓶中，作成使用時溶解型之注射用或點滴用製劑等非經口投予用製劑提供於臨床使用，該等醫藥製劑形態不只限於上述之樣態。於製造上述之製劑時可使用

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

五、發明說明（ 24 ）

溶解補助劑、pH 調節劑、安定劑等業者可利用之製劑用添加物，上述製劑可調製成醫藥組成物。上述醫藥之投予量並無特別限制，一般斟酌構成醫藥化合物殘基之醫藥化合物之投予量、DDS 化合物中所導入之醫藥化合物殘基之量、病患之狀態或疾病種類而決定。例如投予以約 6 重量%之比率導入特開平 6-87746 號公報申請專利範圍第 2 項之抗腫瘍劑殘基之 DDS 化合物時，於非經口投予，一般每日以每體表面積 $1m^2$ 在約 0.1 至 100mg，較好在約 1 至 30mg 之範圍投予一次，每 3 至 4 週反覆投予較理想。

從其他之觀點而言，本發明提供經由含有與肽結合之 2 至 8 個胺基酸之間隔基將高分子載體及醫藥化合物之殘基結合之 DDS 化合物之測定方法，包括將該 DDS 化合物經由肽酶處理所獲得之水解物之測定步驟之方法。

本說明書所使用之「測定」包括以定量、定性為目的所進行之測定，需要更廣義之解釋，較理想之意義為定量。作為本發明測定方法之對象之 DDS 化合物為經由含有與肽結合之 2 至 8 個胺基酸之間隔基，將高分子載體與醫藥化合物之殘基結合之 DDS 化合物，任何意義均不能作限制性之解釋。有關含有與肽結合之 2 至 8 個胺基酸之間隔基，除了只由與肽結合之 2 至 8 個胺基酸所成之間隔基之外，可列舉將由與肽結合之 2 至 8 個胺基酸所成之低聚肽與-NH-Y-CO-[式中，Y 為碳原子數 1 至 8 之伸烷基或 -C_6H_4-CH_2-O-(-C_6H_4-為伸苯基，該伸苯基亦可具有 1 或 2 個以上之取代基，較好為對-伸苯基)所示之基]所示之連結

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

004806

五、發明說明（ 25 ）

基結合之間隔基。本發明之測定方法可用於測定血液或體液等生體試料中所含 DDS 化合物本身之濃度。又，本發明之方法亦可用於測定 DDS 化合物中所導入醫藥化合物殘基之導入量(例如對於 DDS 化合物總重量，醫藥化合物殘基之重量%等)。

本發明測定方法之測定對象 DDS 化合物中所含有醫藥化合物之殘基，其意義與上述者同意義。有關醫藥化合物只要具有能參與和間隔基結合之 1 或 2 以上之反應性官能基(例如胺基、羧基、羥基、巯基、酯基等)者均可使用。醫藥化合物之殘基亦可與間隔基之 N 末端胺基或 C 末端羧基或是存在於構成間隔基之胺基酸之反應性官能基結合。

醫藥化合物殘基之具體例為如對於將被糖化合物修飾之羧基 C_{1-4} 烷基葡聚糖多醇與醫藥化合物之殘基經由間隔基結合之上述 DDS 化合物所作之說明，可使用之醫藥化合物之殘基亦相同。

本發明測定方法之測定對象 DDS 化合物中所含有醫藥化合物殘基之意義為經由間隔基與高分子載體結合，較理想之間隔基為由與肽結合之 2 至 8 個胺基酸所成之低聚肽之殘基或是將與肽結合之 2 至 8 個胺基酸所成之低聚肽與 -NH-Y'-CH_2-O-CO-(式中，Y'為對-伸苯基)所示之連結基結合之間隔基。構成間隔基之胺基酸種類、間隔基結合方向、胺基酸為列、具體例等與對於將被糖化合物修飾之羧基 C_{1-4} 烷基葡聚糖多醇與醫藥化合物之殘基經由低聚肽間隔基結合之上述 DDS 化合物所說明者相同。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準 (CNS)A4 規格 (210 × 297 公釐)

OnCusp
Ex. 1002

A7
B7

五、發明說明（ 26 ）

構成本發明測定方法之測定對象 DDS 化合物之高分子載體，除了多糖衍生物之外還可使用合成高分子化合物等。多糖衍生物及合成高分子化合物，只要對生體實質上未顯示毒性，可作為藥物載體作用者均可使用。例如以往製造 DDS 化合物所使用之多糖衍生物及合成高分子化合物均可利用作為高分子載體。例如具有羧基之多糖衍生物適合使用，以多醇化多糖衍生物特別適合使用。有關合成高分子化合物可列舉如聚乙二醇類；聚谷胺酸、聚天冬胺酸或聚賴胺酸等聚胺基酸類；或 N-(2-羥丙基)甲基丙烯醯胺衍生物等聚乙烯化合物之衍生物。

更具體而言，具有羧基之多糖衍生物可使用如多糖類或是將多糖類作化學或生物學上之修飾之衍生物，較好使用分子中具有羧基者。分子中具有羧基之高分子載體之例子除了透明質酸、果膠酸、炔羧酸、軟骨素、肝素等多糖類之外，還可使用將李聚糖、葡聚糖、甘露聚糖、殼多糖、菊粉、果聚糖、木聚糖、阿拉伯聚糖、甘露葡聚糖、殼聚糖等多糖之一部分或全部之羥基導入具有羧基之官能基者。較好使用將羥基進行羧基 C_{1-4} 烷基化之化合物或是將羥基與多元酸之一個羧基結合成酯之化合物。又，亦可使用將上述之多糖類多醇化後再導入具有羧基之官能基之化合物。

使用羧基 C_{1-4} 烷基葡聚糖多醇作為高分子載體之 DDS 化合物為本發明測定方法中特別理想之測定對象。羧基 C_{1-4} 烷基葡聚糖多醇之多醇化度、製造時使用之葡聚糖種

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

A7
B7

五、發明說明（ 27 ）

類及製造方法等與在對於將被糖化合物修飾之羧基 C_{1-4} 烷基葡聚糖多醇與醫藥化合物之殘基經由間隔基結合之 DDS 化合物所作之說明者相同。

使用被糖化合物修飾之高分子載體作為高分子載體之 DDS 化合物亦為本發明測定方法中理想之對象。例如被糖化合物修飾之羧基 C_{1-4} 烷基葡聚糖多醇適合作為高分子載體使用。將高分子載體用糖化合物修飾之方法或糖化合物之種類等與對於被糖化合物修飾之上述羧基 C_{1-4} 烷基葡聚糖多醇所作之說明者相同。

本發明測定方法之對象只要是使用適合於組群修飾之連結基所製造之 DDS 化合物(亦即組群修飾體)即可。組群修飾之概念與對於被糖化合物修飾之上述羧基 C_{1-4} 烷基葡聚糖多醇所作之說明者相同。

本發明之測定方法具有可準確測定上述之 DDS 化合物及可測定將 DDS 化合物經由肽酶作用所獲得之水解物之特徵。有關肽酶，只要能將 DDS 化合物之間隔基所含有之低聚肽部分(與肽結合之 2 至 8 個胺基酸之低聚肽部分)水解者即可，對於該種類並無特別限制，可使用例如枯草溶菌素、α-胰凝乳蛋白酶、第Ⅳ型膠原酶、胃蛋白酶、熱溶解素、木瓜酶、彈素蛋白酶(elastase)等，其中以α-胰凝乳蛋白酶或木瓜酶較理想。

水解物之種類並無特別限制，以可經由紫外線吸收光譜、螢光光譜等一般光譜學之方法檢出者較理想。一般，水解物除了可測定醫藥化合物本身之外還可測定間隔基之

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準 (CNS)A4 規格 (210 × 297 公釐)

004809

五、發明說明（ 28 ）

一部分結合有殘存之醫藥化合物殘基之化合物，例如與來自間隔基之1個胺基酸結合之醫藥化合物、與來自間隔基之由2至8個胺基酸所成之低聚肽結合之醫藥化合物或是經由-NH-Y-CO-[式中，Y為碳原子數1至8之伸烷基或-C_6H_4-CH_2-O-(-C_6H_4-為伸苯基，該伸苯基可具有1個或2個以上之取代基，較好為對-伸苯基)所示之基]所示之連結基與來自間隔基之1個胺基酸或上述低聚肽結合之醫藥化合物。於上述之水解物中，醫藥化合物之反應性官能基之一部分或全部亦可被水解。對應DDS化合物之種類，經由選擇適當之肽酶，使能測定所期待之水解物。

有關測定用之試樣，除了可使用從投予DDS化合物之動物(包括人類)分離出來之血液、淋巴液、唾液、尿液、糞便、所取出之組織等生體試樣之外，還可使用DDS化合物之水溶液或實質上不會阻礙酵素反應之水性有機溶劑之溶液。業者已知各種肽酶之適當反應條件，對應肽酶之種類，業者可容易地選擇適當之反應條件，例如基質濃度、pH值、緩衝液、反應溫度、反應時間等。一般，上述之試樣必要時可先作均漿或脫蛋白質等前處理之後，於稀釋至DDS化合物所期待之基質濃度之反應液中加入肽酶，進行反應至DDS化合物完全被水解為止即可。

水解物之測定方法並無特別限制，進行DDS化合物之定量或醫藥化合物導入量之定量時，對應水解物之性質以紫外線吸收光譜測定、螢光光譜測定等一般之光譜學方法單獨或複數組合使用較理想。又，亦可將高速液體層析法

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

004810

五、發明說明（ 29 ）

等分離操作適當組合進行測定。於預先測定系中，經由作成校正曲線，可很精確地進行定量。本說明書中之實施例以本發明測定方法之代表例作具體且詳細之說明，業者可根據上述一般之說明及實施例之具體說明，必要時作適當之改變或加以修飾，可容易地實施本發明之測定方法。

[實施例]

以下以實施例對本發明作更詳細之說明，但本發明並不只限於這些實施例。

實例 1

根據國際公開 WO97/46260 號實施例 15 所揭示之方法製造將作為高分子載體之羧甲基葡聚糖多醇(以下亦略稱為 CM-Dex-PA 或 CM 葡聚糖多醇)與抗腫瘍劑(特開平 6-87746 號公報申請專利範圍第 2 項之(1S,9S)-1-胺基-9-乙基-5-氟-2,3-二氫-9-羥基-4-甲基-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4'：6,7]吲哚啉并[1,2-b]喹啉-10,13(9H,15H)-二酮：以下於實施例中簡稱為 DX-8951)經由-Gly-Gly-Phe-Gly-(低聚肽從 N 末端之配列，以下亦相同)所示之四肽間隔基結合之 DDS 化合物(化合物 1)。有關 CM-Dex-PA，使用平均分子量為 228K、羧甲基化度(每個構成糖殘基之羧甲基之取代度)為 0.4 者。

於用蒸餾水調製成 400μg/ml 之上述 DDS 化合物 10μl 中加入 180μl 之普利通羅賓松(Britton Robinson)緩衝液(pH 6.0)，再加入用蒸餾水調製成 10mg/ml 之 α-胰凝乳蛋白酶溶液 10μl。反應液在 40℃ 培育 2 小時後加入含

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準 (CNS)A4 規格 (210 × 297 公釐)

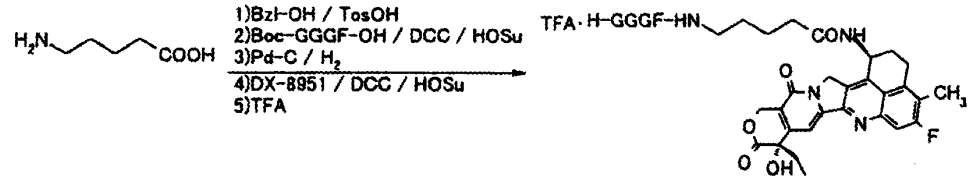
I232930

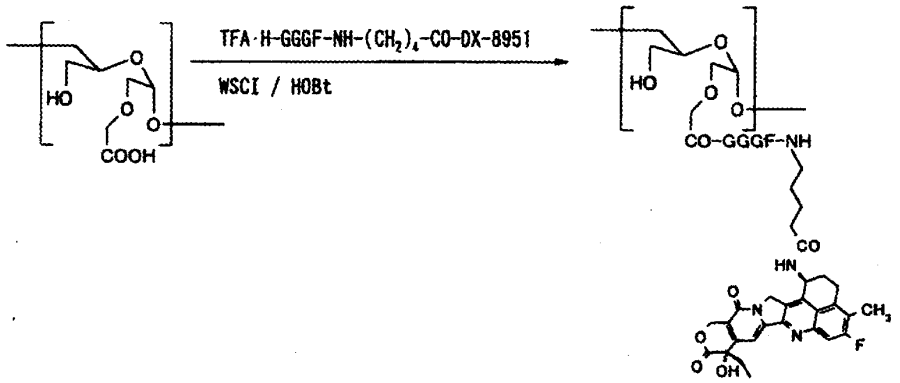
A7
B7

五、發明說明（ 30 ）

有 50%乙腈之 0.5N HCl 溶液 200μl，游離之水解物(來自間隔基之甘胺酸為 DX-8951 之胺基酸結合有肽之化合物：國際公開 WO97/46260 號實施例 50 之化合物，以下簡稱為 G-DX-8951)用 HPLC 定量。HPLC 之測定為使用對稱(Symmetry) C18(4.6x 100mm；3.5μm，瓦特(Waters)公司)管柱，用含有 36.5%有機溶劑(甲醇：乙腈＝1：2)之 0.1M 乙酸鈉(pH5.0)進行溶出，經由螢光光譜測定(Ex.375nm 及 Em.445nm)檢出水解物。其結果，上述 DDS 化合物之 DX-8951 含量為 5.7%。另一方面，以 DX-8951 之 UV 吸收(366nm)作為指標，使用分光光度計計算出上述 DDS 化合物之 DX-8951 含量為 4.9%。

實例 2





（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

A7
B7

五、發明說明（ 31 ）

CM-Dex-PA 與 DX-8951 經由-Gly-Gly-Gly-Phe-NH-$(CH_2)_4$-CO-所示之間隔基結合之 DDS 化合物(化合物 2)可依照下述方法製造。將 5-胺基戊酸(1.0g)、對-甲苯磺酸(1.95g)及苯甲醇(5ml)於甲苯(50ml)中，在 140℃用 Dean-Stark 邊除去所生成之水邊進行反應 5 小時。將反應液濃縮，在所獲得之殘渣中加入乙醚使固化。將所獲得之固體過濾，用乙醚洗淨、乾燥，獲得 5-胺基戊酸苯甲酸酯之甲苯磺醯酸鹽 2.9g。

將 Boc-Gly-Gly-Gly-Phe-OH(575mg)、HOSu(182mg)及 DCC(326mg)溶解於 DMF(20ml)，攪拌 30 分鐘。於該溶液中加入將 5-胺基戊酸苯甲酸酯之甲苯磺醯酸鹽(500mg)及三乙胺(0.184ml)溶解於 DMF(10ml)之溶液，在室溫下攪拌 3 天。將反應液濃縮，殘渣用管柱層析法(CH_2Cl_2：MeOH＝20：1)精製，獲得 Boc-Gly-Gly-Gly-Phe-NH-$(CH_2)_4$-COOBzl 380mg(Bzl 為苄基)。將 Boc-Gly-Gly-Gly-Phe-NH-$(CH_2)_4$-COOBzl(380mg)溶解於 50%之含水甲醇(20ml)，加入 5%鈀-碳(Pd-C)(含水 50%)(300mg)，在氫常壓下攪拌 1 小時。過濾除去反應液中之催化劑，濃縮乾固，獲得 Boc-Gly-Gly-Gly-Phe-NH-$(CH_2)_4$-COOH 330mg。

將 Boc-Gly-Gly-Gly-Phe-NH-$(CH_2)_4$-COOH(150mg)、DCC(70mg)及 HOSu(40mg)溶解於 DMF 中，攪拌 30 分鐘。於該溶液中加入將 DX-8951(160mg)及三乙胺(0.040ml)溶解於 DMF 之溶液，在室溫下攪拌 1 晚。將反應液濃縮，殘渣用管柱層析法(CH_2Cl_2：MeOH＝20：1)精製，獲得

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

A7
B7

五、發明說明（ 32 ）

Boc-Gly-Gly-Gly-Phe-NH-$(CH_2)_4$-CO-DX-8951110mg。將 Boc-Gly-Gly-Gly-Phe-NH-$(CH_2)_4$-CO-DX-8951(110mg)溶解於 TFA(2ml)，進行反應 1 小時後將反應液濃縮，所獲得之殘渣加入乙醚使固化。除去上澄液，將固體乾燥，獲得 H-Gly-Gly-Gly-Phe-NH-$(CH_2)_4$-CO-DX-8951 之三氟乙酸鹽 100mg。

^{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)

將根據國際公開 WO97/46260 號公報實施例 13 之方法製造之平均分子量為 337K、羧甲基化度(每個構成糖殘基之羧甲基取代度)為 0.4 之 CM-Dex-PA(350mg)溶解於水(10ml)中。於該溶液加入將 H-Gly-Gly-Gly-Phe-NH-$(CH_2)_4$-CO-DX-8951 之三氟乙酸鹽(50mg)溶解於甲醇(10ml)之溶液，再加入將 HOBt(7mg)溶解於甲醇(5ml)之溶液。將反應液之 pH 值調整為 7，加入水溶性碳化二亞胺(10mg)，攪拌 14 小時後再加入水溶性碳化二亞胺(10mg)，攪拌 2 小時後再加入水溶性碳化二亞胺(10mg)，再攪拌 2 小時。反應液用超純水稀釋，用超濾膜(50K)除去低分子化合物，凍結乾燥，將所獲得之粉狀體溶解於 3M 食鹽水，滴下乙醇，所析出之固體經由離心分離法分離。除去上澄液，固

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準 (CNS)A4 規格 (210 × 297 公釐)

I232930

A7
B7

五、發明說明（ 33 ）

體再次用水溶解，用超濾膜(50K)除去低分子化合物後通過0.22μm之過濾器，凍結乾燥，獲得目的物280mg。

於用蒸餾水調製成2.63mg/ml之上述DDS化合物溶液10μl中加入用普利通羅賓松緩衝液(pH6)調製成2mg/ml之α-胰凝乳蛋白酶液溶液或用Tris-HCl(pH 9)調製成2mg/ml之枯草溶菌素A溶液490μl。反應液在40℃培育2小時後加入含有50%乙腈之0.5N HCl溶液500μl，游離之水解物[NH_2-$(CH_2)_4$-CO-DX-8951]用HPLC定量。HPLC之測定為使用對稱C18(4.6x 100mm；3.5μm，瓦特公司)管柱，用含有32%有機溶劑(甲醇：乙腈＝1：2)之0.1%三氟乙酸溶液進行溶出，經由螢光光譜測定(Ex.375nm及Em.445nm)檢出水解物。其結果為NH_2-$(CH_2)_4$-CO-DX-8951約4.8分鐘溶出。將NH_2-$(CH_2)_4$-CO-DX-8951用校正曲線計算上述DDS化合物中DX-8951之含有量為3.2%。另一方面，以DX-8951作為校正曲線，由上述DDS化合物之UV吸收可算出DX-8951含有量為2.9%。

實例3

用①枯草溶菌素A(0.1M Tris-HCl pH 9.0)②α-胰凝乳蛋白酶(0.1M Tris-HCl pH 8.0)、③熱溶解素(0.1M Tris-HCl/1mM $CaCl_2$ pH9.0)測定實例1所製造之DDS化合物(化合物1)之DX-8951含量。於各酵素用之緩衝液180μl中加入10μl調製成400μg/ml之化合物1(終濃度:20μg/ml)。於該混合物中加入用各緩衝液調製成100mg/ml之各酵素10μl後(終濃度：5mg/ml)在40℃反應3小時。反應後加

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

五、發明說明（ 34 ）

入含有 50%乙腈之 0.5N HCl 溶液 200μl，取 10μl 用 HPLC 進行分析。用對稱 C18(4.6x 250mm)管柱，用含有 31%有機溶劑(乙腈：甲醇＝2：1)之 0.1M AcONa 緩衝液(pH5.0)溶出。經由螢光光譜測定(Ex.375nm 及 Em.445nm)測定水解物，經由使用分別含有 G-DX-8951、DX-8951 及與來自化合物 1 間隔基之苯基丙胺酸-甘胺酸結合之 DX-8951 (FG-DX-8951)2nmol/ml 之溶液所作成之校正曲線定量酵素反應溶液中之水解物。其結果，枯草溶菌素 A 及α-胰凝乳蛋白酶根據上述之條件，各自從化合物 1 游離出 100%之 G-DX-8951。又，熱溶解素游離出 100%之 FG-DX-8951。

實例 4

將於腹腔內繼代維持之 Meth A 細胞(1x 10^6細胞/老鼠)移殖至 BALB/c(雄性)老鼠之腹腔內，5 日後於腹腔內投予化合物 1(DX-8951 含量：5.2%)10 及 2.5mg/kg(DX-8951 換算量)。投予後經時(2、4、8、24 及 48 小時)從心臟採血，放置 10 分鐘後以 12,000rpm 進行離心分離 10 分鐘，獲得血清。採取當時之癌性腹水。於血清及癌性腹水 25μl 中加入 80%甲醇水 100μl 後以 12,000rpm 進行離心分離 5 分鐘，取上澄液 25μl 加入用 0.1M Tris-HCl pH8.5/0.1M $CaCl_2$ 調製成 2mg/ml 之熱溶解素溶液 225μl，在 50℃進行反應 1 小時後加入含有 50%乙腈之 0.5N HCl 250μl，取 20μl 進行 HPLC 分析。使用對稱 C18(4.6x 100mm)管柱，用含有 41%甲醇及乙腈混合液(1：2)之 0.1M AcONa(pH5)溶液溶出，經由螢光光譜測定(Ex.375nm、

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

五、發明說明（ 35 ）

Em.445nm)檢出水解物。其結果，於投予 10mg/kg，腹水中化合物 1 之濃度會隨著時間之經過而減少，但是血中濃度於投予後漸漸上昇，於 24 小時達到最大值後與腹水濃度幾乎相同之程度推移(第 1 圖)。投予 2.5mg/kg 時腹水及血中濃度之推移與 10mg/kg 時相同。

實例 5

將於腹腔內繼代維持之 Meth A 細胞(1× 10^6細胞/老鼠)移殖至 BALB/c(雄性)老鼠之腹腔內，5 日後於靜脈內投予化合物 1(DX-8951 含量：6.6%)10 及 2.5mg/kg(DX-8951 換算量)(1 組 3 隻)。投予後經時(5 分鐘、30 分鐘、2、4、8、24 及 48 小時)從心臟採血，放置 10 分鐘後以 12,000rpm 進行離心分離 10 分鐘，獲得血清。採取當時之癌性腹水。於血清及癌性腹水 25μl 中加入用普利通羅賓松緩衝液(pH6)調製成 2mg/ml 之 α-胰凝乳蛋白酶溶液 225μl，於 40℃ 進行反應 2 小時後加入含有 50%乙腈之 0.5N HCl 250μl，以 12,000rpm 進行離心分離 5 分鐘，取上澄液 10μl 進行 HPLC 分析。計算 HPLC 分析所獲得之 G-DX-8951 濃度及由所使用之化合物 1 之 DX-8951 含量推定化合物 1 之濃度。HPLC 分析根據實例 4 之條件進行。結果，投予 10mg/kg 時，血中化合物 1 之濃度會隨著時間之經過而減少。腹水中之化合物 1 濃度於投予後漸漸上昇，於 48 小時成為與血中濃度幾乎相同之程度(第 2 圖)。投予 2.5mg/kg 時化合物 1 之腹水中及血中濃度之推移與 10mg/kg 時相同。

實例 6

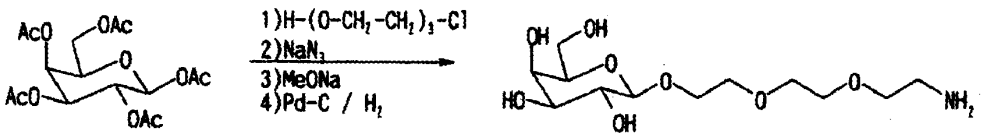
（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

A7
B7

五、發明說明（ 36 ）

依照下列之方法製造具有被糖化合物修飾之高分子載體之 DDS 化合物。於下述之流程中作為糖鏈構成單位之羧甲基以所導入 1 個或 2 個之構成單位為例子，實施例中所陳述之 DDS 化合之羧甲基葡聚糖多醇部分可認為是由重覆上述構成單位所構成者。又，羧甲基葡聚糖多醇之羧甲基化度(每個構成糖殘基之羧甲基取代度)可經由將羧甲基葡聚糖多醇之鈉鹽轉換成游離酸型後溶解於 0.1N 氫氧化鈉水溶液，用 0.1 鹽酸滴定求得。將羧甲基葡聚糖多醇之鈉鹽水溶液附著於 Bio-Rad AG50W-x2(H^+)管柱，將通過液凍結乾燥，作為試樣使用。將該試樣溶解於既定過剩量之 0.1N 氫氧化鈉水溶液，以酚酞作為指示藥，用 0.1N 鹽酸滴定。試樣之採取量以 s(mg)，0.1N 氫氧化鈉水溶液之既定過剩量以 a(ml)、0.1N 鹽酸之滴定量以 b(ml)表示，以 13.4(a-b)/[s-5.8(a-b)]之公式算出羧甲基化度。藥物之導入量(重量%)可利用藥物之特性吸收，經由吸光度分析(362nm 附近)算出。又，凝膠過濾法可依照以下之條件進行(管柱：TSK gel G4000 PW_{XL}、洗提液：0.1M NaCl、流速：0.8ml/min、管柱溫度：40℃)。

(A)化合物 2-2 之合成



(2－1)　　(2－2)

將化合物 2-1(5.0g)及 2-[2-(2-氯乙氧基)乙氧基]乙醇(3.75ml)溶解於二氯甲烷(75ml)，加入三氟化硼乙醚錯合物

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
訂
線

五、發明說明（ 37 ）

(7.7g)，攪拌 5 小時。反應液用二氯甲烷(100ml)稀釋，有機層用水、飽和碳酸氫鈉水溶液、食鹽水洗淨，用硫酸鎂乾燥，過濾除去硫酸鎂後蒸餾除去溶劑，所獲得之殘渣用矽膠柱層析法(己烷：乙酸乙酯＝2：1)精製，獲得氣體 3.3g。將所獲得之氣體(3.3g)與 NaN_3(2.0g)在 DMF(15ml)中，於 60℃攪拌 2 日。蒸餾除去溶劑，溶解於乙酸乙酯及水之混合液，有機層用水洗淨，用硫酸鎂乾燥，過濾除去硫酸鎂，蒸餾除去溶劑，獲得疊氮體 2.8g。

將所獲得之疊氮體(1.5g)溶解於甲醇(30ml)，加入含有 28%MeONa 之甲醇溶液至使溶液之 pH 值為 10，攪拌 1 小時。於反應液中加入 Dowex 50WX8(H^+)至溶液之液性成為中性為止，過濾除去樹脂，蒸餾除去溶劑。將所獲得之殘渣溶解於甲醇(50ml)與水(10ml)之混合液中，加入 5%鈀-碳(含水 50%)(2.0g)，在氫常壓下攪拌 1 晚。過濾除去催化劑，蒸餾除去溶劑，獲得 1.2g 化合物 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)半乳糖修飾 CM 葡聚糖多醇之合成

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

線

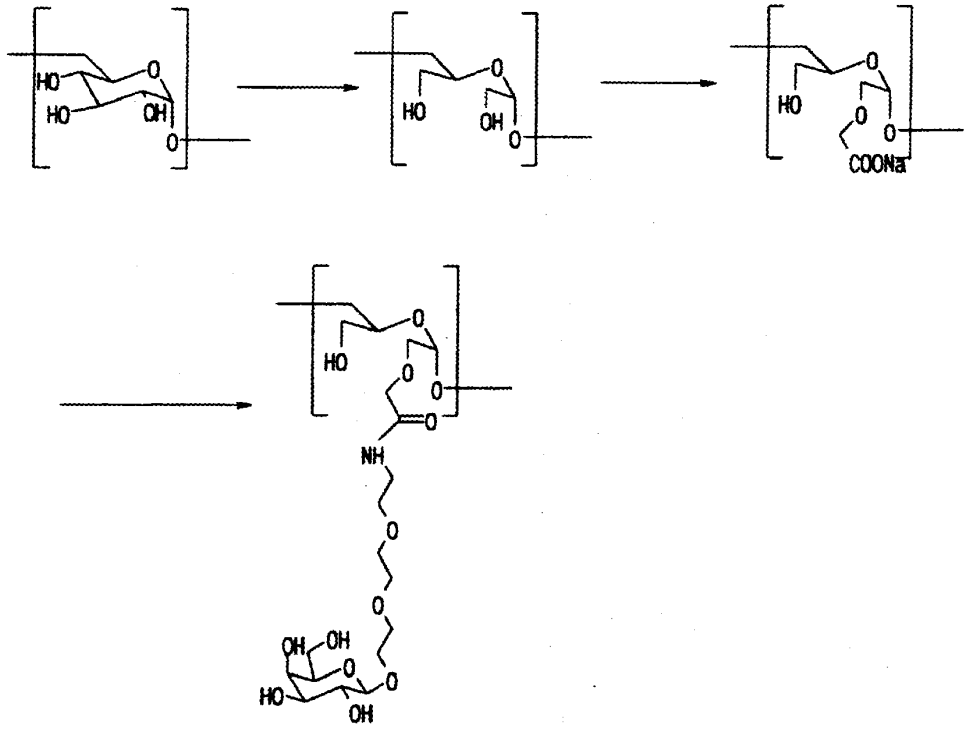
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準 (CNS)A4 規格 (210 × 297 公釐)

OnCusp
Ex. 1002

A7
B7

五、發明說明（ 38 ）



於葡聚糖 4(佛南可喜公司製造、平均分子量為 4000-6000)(20g)之 0.1M 乙酸緩衝液(pH5.5)(2000ml)中加入高碘酸鈉(66.0g)之水溶液(2000ml)。避光，於 4℃攪拌 10 日後加入乙二醇(14.0ml)，攪拌 1 晚。將反應液於冰冷下用 8M 氫氧化鈉水溶液將 pH 值調整為 7.5 後加入硼氫化鈉(28g)。溶解後在室溫下攪拌 1 晚。於冰冷下用乙酸將 pH 值調整為 5.5，於 4℃攪拌 1 小時。在冰冷下用 8M 氫氧化鈉水溶液將 pH 值調整為 7.5。將以上之過程反覆進行 2 次，所獲得之 2 個水溶液匯集成 1 個，經由用 Biomax-3 膜(Millpore 公司製造)之超濾法除去低分子部分，獲得殘留溶液。將該殘留溶液通過 Biomax-30 膜。將通過之溶液用 Biomax-3 膜，經由超濾法脫鹽後凍結乾燥，獲得精製葡

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
訂
線

A7
B7

五、發明說明（ 39 ）

聚糖多醇(12.0g)。該物質之分子量(凝膠過濾、普朗標準)為 9K。

於將氫氧化鈉(39.3g)溶解於水(282ml)所獲得之水溶液中加入上述之精製葡聚糖多醇(9.4g)，在室溫下溶解。該溶液在冰冷下加入單氯乙酸(56.4g)使溶解後，在室溫進行反應 20 小時。將該反應液用乙酸將 pH 值調整為 8 之後經由用 Biomax-5 膜之超濾法除去低分子部分。將殘留溶液凍結乾燥，獲得羧甲基(以下簡稱為 CM)葡聚糖多醇之鈉鹽(12g)。所獲得之 CM 葡聚糖多醇之鈉鹽(4.0g)加入將氫氧化鈉(17g)溶解於水(120ml)所獲得之水溶液中，在室溫下溶解。該溶液在冰冷下加入單氯乙酸(24g)溶解後，在室溫下進行反應 20 小時。

該反應液用乙酸將 pH 值調整為 8 之後經由用 Biomax-5 膜之超濾法除去低分子部分。將殘留溶液凍結乾燥，獲得 CM 葡聚糖多醇之鈉鹽(4.0g)。該物質之分子量(凝膠過濾、普朗標準)為 14K，每個糖殘基之 CM 化度經由鹼滴定為 0.7。將所獲得之 CM 葡聚糖多醇之鈉鹽(1.0g)溶解於水(100ml)中，加入實例 1 之化合物 2-2(800mg)之甲醇(100ml)溶液。再每 2 小時加入水溶性碳化二亞胺鹽酸鹽(240mg)，共加入 3 次，共攪拌 6 小時。蒸餾除去反應液中之溶劑。將所獲得之油狀物溶解於水，經由用 Biomax-3 膜之超濾法脫鹽。將所獲得之水溶液凍結乾燥，獲得標記化合物 1.1g。本化合物中半乳糖之含量經由苯酚-硫酸法定量之結果，每個糖 10 殘基之比率為 1.0。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

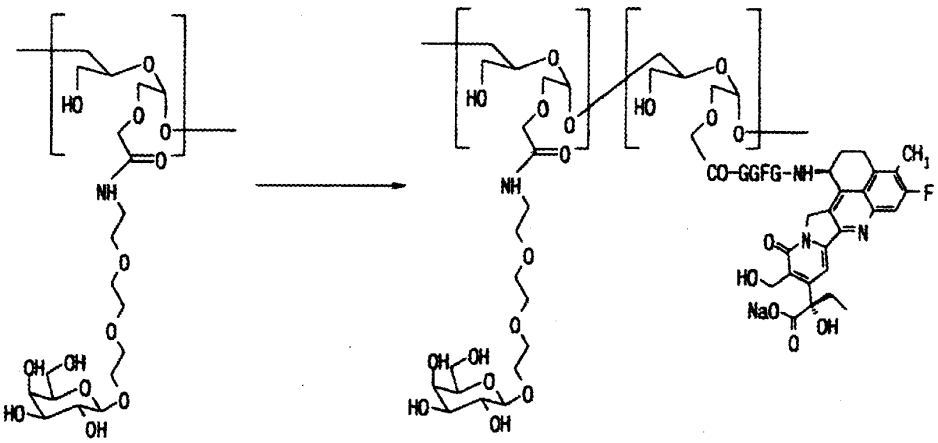
線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

OnCusp
Ex. 1002

五、發明說明（ 40 ）

(C)半乳糖修飾 CM 葡聚糖多醇-Gly-Gly-Phe-Gly-DX-8951 之合成



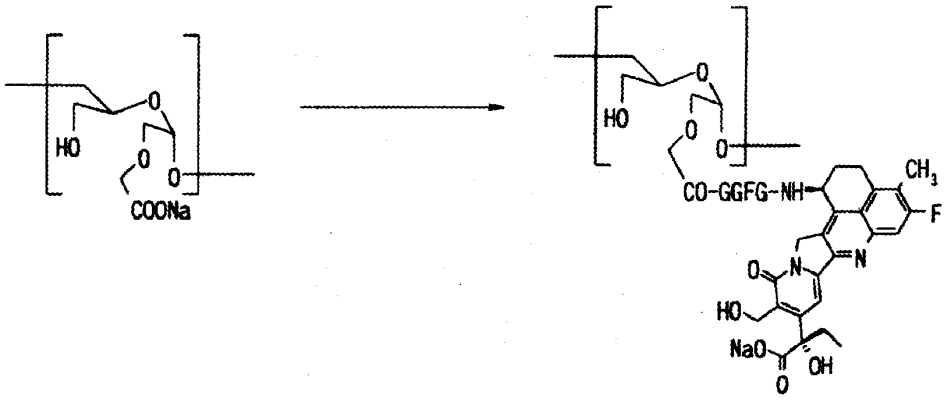
將上述(B)所獲得之半乳糖修飾 CM 葡聚糖多醇之鈉鹽(1.0g)溶解於水(30ml)，加入 Gly-Gly-Phe-Gly-DX-8951 之三氟乙酸鹽(150mg)及 1-羥基苯并三唑(35mg)之甲醇溶液(40ml)。將溶液之 pH 值調整為 7.0，每 2 小時加入水溶性碳化二亞胺鹽酸鹽(35mg)，加入 3 次後攪拌 1 晚。蒸餾除去反應液中之溶劑，將所獲得之殘渣溶解於 3M 氯化鈉水溶液(20ml)，滴加乙醇(100ml)，經由離心分離(3500rpm，8 分鐘)收集所析出之沉澱。將該沉澱溶解於水，經由用 Biomax-3 膜之超濾法脫鹽。將不能透過膜之殘留溶液用微孔過濾器(0.22μm)過濾後凍結乾燥，獲得標記化合物 900mg。將本化物溶解於 0.1M 氯化鈉水溶液後用 GPC(管柱：東索-TSK Gel PW-4000XL，溶劑：0.1M NaCl 水溶液，流速：0.8ml/min)分析，其結果及本化合物之紫外線吸收光譜(pH9.0、0.1M Tris 緩衝液中)分別如第 3 圖

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

五、發明說明（ 41 ）

及第 4 圖所示。本化合物中之 DX-8951 含量根據在含有 30%乙腈之 0.1M Tris 緩衝液(pH10.0)中，於 366nm 之吸光度進行定量時為 4.9%(w/w)。

(D)CM 葡聚糖多醇-Gly-Gly-Phe-Gly-DX-8951 之合成



將上述(B)所獲得之 CM 葡聚糖多醇之鈉鹽(2.0g)溶解於水，通過 Dowex-50WX8(Et_3NH^+)，獲得 CM 葡聚糖多醇之三乙銨鹽(1.9g)。將所獲得之 CM 葡聚糖多醇之三乙銨鹽(1.9g)溶於含有 50%N,N-二甲基甲醯胺之水溶液，於該溶液依次加入三乙胺(0.112ml)、含有 Gly-Gly-Phe-Gly-DX-8951 之三氟乙酸鹽(350mg)之 N,N-二甲基甲醯胺(10ml)溶液及 1-乙氧羰基-2-乙氧基-1,2-二羥基喹啉(1.9g)，在室溫下邊攪拌邊進行反應。蒸餾除去反應液中之溶劑，將所獲得之殘渣溶解於 3M 氯化鈉水溶液(20ml)，滴加乙醇(100ml)，經由離心分離(3500rpm，8 分鐘)收集所析出之沉澱。將該沉澱溶解於水，經由用 Biomax-3 膜之超濾法脫鹽。將不能透過膜之殘留溶液用微孔過濾器(0.22μm)過濾後凍結乾燥，獲得標記化合物 1.4g。將本化物溶解於 0.1M

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

004823

A7
B7

五、發明說明（ 42 ）

氯化鈉水溶液後用 GPC(管柱：東索-TSK Gel PW-4000XL，溶劑：0.1M NaCl 水溶液，流速：0.8ml/min)分析，其結果及本化合物之紫外線吸收光譜(pH9.0、0.1M Tris 緩衝液中)分別如第 6 圖及第 9 圖所示。本化合物中之 DX-8951 含量根據在含有 30%乙腈之 0.1M Tris 緩衝液(pH10.0)中，於 366nm 之吸光度進行定量時為 5.2%(w/w)。

(E)DDS 化合物之測定

將上述(C)所獲得之半乳糖修飾 DDS 化合物及作為對照組之上述(D)所獲得之 DDS 化合物溶解於注射用蒸餾水，調製使換算為 DX-8951 之濃度為 0.5mg/ml。在 C57BL/6 老鼠一群 5 隻之尾靜脈內投予該等 DDS 化合物水溶液。投予量以 DX-8951 換算為 5mg/kg。投予後經時(0.5、1、2、4 及 24 小時)採取肝臟，計算該等 DDS 化合物之量。添加所獲得之肝臟重量 5 倍量之水，使均質化。該溶液以 3000rpm 離心分離 10 分鐘，上澄液更以 15,000rpm 離心分離 15 分鐘。所獲得之上澄液 50μl 加入經由普利通-羅賓松緩衝液(B.R.B)調製成 2mg/ml 之 α-胰凝乳蛋白酶溶液 450μl，於 40℃反應 2 小時之後加入含有 50%乙腈之 0.5N HCl 溶液 500μl，以 12,000rpm 離心分離 5 分鐘，取上澄液 20μl 進行 HPLC 分析，以定量所游離之 G-DX8951 計算 DDS 化合物之量。此時，將投予所使用之各 DDS 化合物水溶液用蒸餾水調製成 50、10、2μl/ml，各取 50μl，根據上述之方法作酵素處理，進行定量之 G-DX8951 作為校正曲線。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

A7
B7

五、發明說明（ 43 ）

HPLC 分析條件

管　　柱：對稱 C18(4.6× 100mm)

流　　速：1.0ml/min

管柱溫度：40℃

檢出波長(螢光)：Ex.375nm、Em.445nm

溶 出 液：甲醇：乙腈＝1：2(29%) 0.1%TFA(71%)

結果如第 5 圖所示。上述半乳糖修飾 DDS 化合物比對照之 DDS 化合物(上述(D))呈現較高之肝臟集積性。

實例 7：半乳糖修飾 CM 葡聚糖多醇-Gly-Gly-Phe-Gly-DX-8951 之合成

於葡聚糖 T500(法瑪西亞公司製造、分子量為 500K)(50g)之 0.1M 乙酸緩衝液(pH5.5)(5000ml)中加入高碘酸鈉(165.0g)之水溶液(5000ml)。避光，於 4℃攪拌 10 日後加入乙二醇(35.0ml)，攪拌 1 晚。將反應液於冰冷下用 8M 氫氧化鈉水溶液將 pH 值調整為 6.5 後加入懸濁於水(2000ml)之硼氫化鈉(70g)液。溶解後在室溫下攪拌 1 晚。於冰冷下用乙酸將 pH 值調整為 5.5，在 4℃攪拌 1 小時。在冰冷下用 8M 氫氧化鈉水溶液將 pH 值調整為 7.5。所獲得之水溶液經由 Biomax-50 膜之超濾法除去低分子部分，獲得殘留溶液。將該殘留溶液通過超濾膜(1000K、佛得龍公司製造)。將通過之溶液經由 Biomax-50 膜之超濾法脫鹽後凍結乾燥，獲得葡聚糖多醇(21.1g)。該物質之分子量(凝膠過濾、普朗標準)為 128K。

於將氫氧化鈉(13.84g)溶解於水(150ml)所獲得之水溶

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
裝
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準 (CNS)A4 規格 (210×297 公釐)

A7
B7

五、發明說明（ 44 ）

液中加入上述所獲得之葡聚糖多醇(5g)，在室溫下溶解。該溶液在冰冷下加入單氯乙酸之鈉鹽(61.6g)，溶解後在室溫下反應 1 晚。將該反應液之 pH 值調整為 8.5 後經由 Biomax-50 膜之超濾法除去低分子部分。將高分子部分凍結乾燥，獲得 CM 葡聚糖多醇之鈉鹽(6.2g)。該物質之分子量(凝膠過濾、普朗標準)為 428K，每個糖殘基之 CM 化度經由鹼滴定為 0.9。所獲得之 CM 葡聚糖多醇之鈉鹽(500mg)溶解於水(50ml)，加入實例 1 之化合物 2-2(400mg)之甲醇(20ml)溶液及 1-羥基苯并三唑(160mg)之甲醇(20ml)溶液。更於每 2 小時加入水溶性碳化二亞胺鹽酸鹽(120mg)，共加入 3 次，共攪拌 6 小時。蒸餾除去反應液中之溶劑，將所獲得之油狀物溶解於水，經由用 Biomax-50 膜之超濾法除去低分子部分。將殘留溶液凍結乾燥，獲得目的物 600mg。本化合物中半乳糖之含量經由苯酚-硫酸法定量之結果，每個糖 10 殘基之比率為 1.7。

將所獲得之半乳糖修飾 CM 葡聚糖多醇之鈉鹽(200mg)溶解於水(3ml)，加入 Gly-Gly-Phe-Gly-DX-8951 之三氟乙酸鹽(27mg)之甲醇溶液(3ml)及 1-羥基苯并三唑(7mg)之甲醇溶液(3ml)。將溶液之 pH 值調整為 7.0，每 2 小時加入水溶性碳化二亞胺鹽酸鹽(7mg)，加入 3 次後攪拌 1 晚。蒸餾除去反應液中之溶劑，所獲得之殘渣溶解於 3M 氯化鈉水溶液(10ml)，滴加乙醇(100ml)，經由離心分離(3500rpm)收集所析出之沉澱。將該沉澱溶解於水，經由 Biomax-50 膜之超濾法脫鹽。將不能透過膜之殘留溶液用微孔過濾器

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

OnCusp
Ex. 1002

五、發明說明（ 45 ）

(0.22μm)過濾後凍結乾燥，獲得標記化合物180mg。將本化物溶解於0.1M氯化鈉水溶液後用GPC(管柱：東索-TSK Gel PW-4000XL，溶劑：0.1M NaCl水溶液，流速：0.8ml/min)分析，其結果及本化合物之紫外線吸收光譜(pH9.0、0.1M Tris緩衝液中)分別如第7圖及第10圖所示。本化合物中之DX-8951含量根據在含有30%乙腈之0.1M Tris緩衝液(pH10.0)中，於366nm之吸光度進行定量時為3.7%(w/w)。

實例8：2-[2-(2-胺基乙氧基)乙氧基]乙基-β-D-2-胺基-2-脫氧半乳糖之合成

將根據特開平5-202085號公報之方法合成之2-[2-(疊氮基乙氧基)乙氧基]乙基-β-D-2-乙醯胺基-2-脫氧-3,4,6-三乙醯基半乳糖(2.64g)溶解於甲醇(10ml)之溶液冷卻。於該溶液中加入乙醇鈉之28%甲醇溶液(0.64ml)，在冰冷下攪拌5小時。反應液加入乙酸(0.186ml)後減壓乾固，殘渣用矽膠管柱層析法(溶出液：二氯甲烷：甲醇＝9：1溶液)精製，獲得2-[2-(2-疊氮基乙氧基)乙氧基]乙基-β-D-2-胺基-2-脫氧半乳糖(1.98g)。

^{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).

於將上述之2-[2-(2-疊氮基乙氧基)乙氧基]乙基-β-D-2-胺基-2-脫氧半乳糖(640mg)溶解於乙醇(10ml)之溶液中加入林德拉(Lindlar)催化劑(430mg)，在氫常壓下進行催化還原1.5小時。再加入林德拉催化劑(215mg)，再於氫常

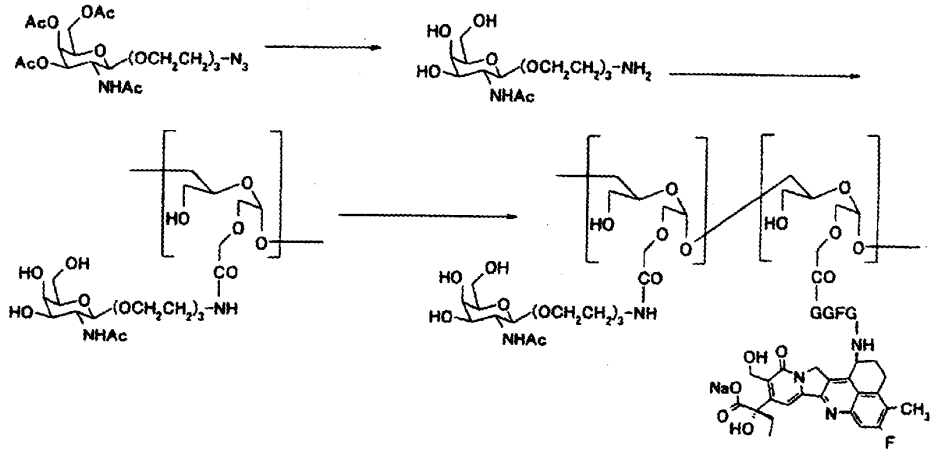
（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

五、發明說明（ 46 ）

壓下進行催化還原 3.5 小時。過濾除去催化劑後將濾液減壓乾固，獲得 2-[2-(2-胺基乙氧基)乙氧基]乙基-β-D-2-胺基-2-脫氧半乳糖(601mg)。

^{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).

實例 9：N-乙醯基半乳糖胺修飾 CM 葡聚糖多醇-Gly-Gly-Phe-Gly-DX-8951 之合成



將實例 7 所獲得之 CM 葡聚糖多醇之鈉鹽(375mg)溶解於水(10ml)，加入將實例 8 所獲得之 2-[2-(2-胺基乙氧基)乙氧基]乙基-β-D-2-胺基-2-脫氧半乳糖(300mg)溶解於甲醇(10ml)之溶液及將 1-羥基苯并三唑(120mg)溶解於甲醇(10ml)之溶液。將溶液之 pH 值調整 7.0 後每 2 小時加入水溶性碳化二亞胺鹽酸鹽(90mg)，共加入 3 次。攪拌 1 晚後經由 Biomax-50 膜之超濾法從反應液中除去低分子部分。將不能透過膜之殘留溶液凍結乾燥，獲得 N-乙醯基半乳糖胺修飾 CM 葡聚糖多醇(443mg)。本化合物之 N-乙醯基半

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）
訂
線
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

A7
B7

五、發明說明（ 47 ）

乳糖胺含量用埃爾森-摩根胺基糖分析法定量之結果，每糖10殘基之比率為1.6。

將所獲得之N-乙醯基半乳糖胺修飾CM葡聚糖多醇(200mg)溶解於水(10ml)，加入將Gly-Gly-Phe-Gly-DX-8951之三氟乙酸鹽(30mg)溶解於甲醇(10ml)之溶液及將1-羥基苯并三唑(30mg)溶解於甲醇(10ml)之溶液。將溶液之pH值調整為7.0後每2小時加入水溶性碳化二亞胺鹽酸鹽(10mg)，共加入3次。攪拌2小時後將pH值調整為8.5。經由Biomax-50膜之超濾法從反應液中除去低分子部分。將不能透過膜之殘留溶液用微孔過濾器(0.22μm)過濾後凍結乾燥，獲得標記化合物(203mg)。將本化物溶解於0.1M氯化鈉水溶液後用GPC(管柱：東索-TSK Gel PW-6000XL，溶劑：含有20%乙腈之0.1M乙酸緩衝液(pH5.0)、流速：0.8ml/min)分析，其結果及本化合物之紫外線吸收光譜(0.1M Tris緩衝液(pH10.0)：乙腈＝7：3中，0.16mg/ml)分別如第8圖及第11圖所示。本化合物中醫藥化合物殘基之含量根據在0.1M Tris緩衝液(pH10.0)：乙腈＝7：3中，於366nm之吸光度進行定量時為4.6%(w/w)。

實例10：CM-Dex-PA-Gly-Gly-Phe-Gly-NH-Y'-CH_2-O-CO-DX-8951中DX-8951含量之測定

於用蒸餾水調製成1mg/ml之CM-Dex-PA-Gly-Gly-Phe-Gly-NH-Y'-CH_2-O-CO-DX-8951(Y'為對-伸苯基)之溶液5μl中加入用普利通-羅賓松緩衝液(pH6)調製成2mg/ml之木瓜酶溶液95μl。反應液在40℃培育4小時後

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

裝 訂 線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4規格(210×297公釐)

A7
B7

五、發明說明（ 48 ）

加入含有 50%乙腈之 0.5N HCl 溶液 100μl，游離之水解物[DX-8951]用 HPLC 定量。HPLC 之測定為使用對稱 C18(4.6 × 100mm；3.5μm，瓦特公司)管柱，有機溶劑(甲醇：乙腈＝1：2)用 0.1%三氟乙酸溶液於 12 分鐘內由 20%至 70%進行溶出，經由螢光光譜測定(Ex.375nm 及 Em.445nm)檢出水解物。其結果為 DX-8951 於約 5.7 分鐘溶出。將 DX-8951 用校正曲線計算上述 DDS 化合物中 DX-8951 之含量為 4.0%。另一方面，以 DX-8951 作為校正曲線，由上述 DDS 化合物之 UV 吸收算出 DX-8951 之含量為 3.3%。

實例 11：CM-Dex-PA-Gly-Gly-Gly-Phe-NH-Y'-CH_2-O-CO-DX-8951 中 DX-8951 含量之測定

於用蒸餾水調製成 1mg/ml 之 CM-Dex-PA-Gly-Gly-Gly-Phe-NH-Y'-CH_2-O-CO-DX-8951 之溶液 5μl 中加入用普利通-羅賓松緩衝液(pH6.0)調製成 2mg/ml 之 α-胰凝乳蛋白酶溶液 95μl。反應液在 40℃培育 4 小時後加入含有 50%乙腈之 0.5N HCl 溶液 100μl，游離之水解物[DX-8951]用 HPLC 定量。HPLC 之測定為使用對稱 C18(4.6× 100mm；3.5μm，瓦特公司)柱，有機溶劑(甲醇：乙腈＝1：2)用 0.1%三氟乙酸溶液於 12 分鐘內由 20%至 70%進行溶出，經由螢光光譜測定(Ex.375nm 及 Em.445nm)檢出水解物。其結果為 DX-8951 於約 5.7 分鐘溶出。將 DX-8951 用校正曲線計算上述 DDS 化合物中 DX-8951 之含量為 2.5%。另一方面，以 DX-8951 作為校正曲線，由上述 DDS 化合物之 UV 吸收算出 DX-8951 之含量為 1.7%。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

OnCusp
Ex. 1002

A7
B7

五、發明說明（ 49 ）

實例 12：CM-Dex-PA-Gly-Gly-Phe-Gly-NH-$(CH_2)_4$-CO-DX-8951 中 DX-8951 含量之測定

於用蒸餾水調製成 100μg/ml 之 CM-Dex-PA-Gly-Gly-Phe-Gly-NH-$(CH_2)_4$-CO-DX-8951 之溶液 5μl 中加入用普利通-羅賓松緩衝液(pH6)調製成 2mg/ml 之木瓜酶溶液 95μl。反應液在 40℃培育 4 小時後加入含有 50%乙腈之 0.5N HCl 溶液 100μl，游離之水解物[NH_2-$(CH_2)_4$-CO-DX-8951]用 HPLC 定量。HPLC 之測定為使用對稱 C18(4.6 x 100mm；3.5μm，瓦特公司)管柱，用含有 32%有機溶劑(甲醇：乙腈＝1：2)之 0.1%三氟乙酸溶液進行溶出，經由螢光光譜測定(Ex.375nm 及 Em.445nm)檢出水解物。其結果為 DX-8951 於約 5.3 分鐘溶出。將 NH_2-$(CH_2)_4$-CO-DX-8951 用校正曲線計算上述 DDS 化合物中 DX-8951 之含量為 3.0%。另一方面，以 DX-8951 作為校正曲線，由上述 DDS 化合物之 UV 吸收算出 DX-8951 之含量為 3.1%。

實例 13：CM-Dex-PA-Gly-Gly-Phe-Gly-DXR(DXR：得索魯必信)中 DXR 含量之測定

於用蒸餾水調製成 1mg/ml 之 DDS 化合物之溶液 10μl 中加入用普利通-羅賓松緩衝液(pH6.0)調製成 2mg/ml 之木瓜酶溶液 190μl。反應液在 40℃培育 2 小時後加入乙腈 200μl，游離之水解物[DXR]用 HPLC 定量。HPLC 之測定為使用對稱 RP18(4.6x 100mm；3.5μm，瓦特公司)管柱，用含有 34%有機溶劑(甲醇：乙腈＝1：2)之 0.1%三氟乙酸溶液進行溶出，經由螢光光譜測定(Ex.480nm 及 Em.590nm)

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

五、發明說明（ 50 ）

檢出水解物。其結果為DXR於約3.8分鐘溶出。將DXR用校正曲線計算上述DDS化合物中DXR之含量為5.3%。另一方面，以DXR作為校正曲線，由上述DDS化合物之UV吸收算出DXR之含量為4.3%。

實例14：CM葡聚糖多醇-Gly-Gly-Phe-Gly-DXR之合成

將根據WO97/46260實施例24之方法製造之平均子量為274K，羧甲基化度(每個構成糖殘基之羧甲基取代度)為0.4之羧甲基葡聚糖多醇之鈉鹽(30mg)溶解於含有50%甲醇之0.05M可立丁(collidine)-HCl緩衝液(2ml)。於該溶液中加入含有根據WO97/46260實施例43之方法合成之Gly-Gly-Phe-Gly-DXR鹽酸鹽(4mg)之甲醇溶液(400μl)及含有1-乙基-3-(3-二甲胺基丙基)碳化二亞胺鹽酸鹽(2.4mg)之甲醇溶液(240μl)，攪拌2小時後加入3M食鹽水30ml，經由Biomax-50膜之超濾法脫鹽。將不能透過膜之殘留溶液用微孔過濾器(0.22μm)過濾後凍結乾燥，獲得標記化合物(25mg)。本化合物中醫藥化合物殘基之含量根據在PBS(pH7.4)中，於480nm之吸光度進行定量時為4.3%(w/w)。

實例15：CM-Dex-PA-Gly-Gly-Phe-Gly-NH-$(CH_2)_4$-CO-DX-8951之合成

將Boc-Gly-Gly-Phe-Gly-OH(575mg)、HOSu(182mg)及DCC(326mg)溶解於DMF(20ml)中，攪拌30分鐘。加入將5-胺基戊酸苯甲酸酯之甲苯磺醯酸鹽(500mg)及三乙胺(0.184ml)溶解於DMF(10ml)之溶液，在室溫下攪拌3天。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

五、發明說明（ 51 ）

將反應液濃縮，殘渣用管柱層析法(CH_2Cl_2：MeOH＝20：1)精製，獲得 Boc-Gly-Gly-Phe-Gly-NH-$(CH_2)_4$-COOBzl 560mg。將 Boc-Gly-Gly-Phe-Gly-NH-$(CH_2)_4$-COOBzl (560mg)溶解於 50%含水甲醇(60ml)，加入 5%鈀-碳(含水 50%)(1.5g)，在氫常壓下攪拌 1 晚。過濾除去反應液中之催化劑，濃縮乾固，獲得 Boc-Gly-Gly-Phe-Gly-NH-$(CH_2)_4$-COOH 300mg。

將 Boc-Gly-Gly-Phe-Gly-NH-$(CH_2)_4$-COOH(300mg)、DCC(138mg)及 HOSu(77mg)溶解於 DMF 中，攪拌 30 分鐘。於該溶液中加入將 DX-8951(317mg)及三乙胺(0.078ml)溶解於 DMF 之溶液，在室溫下攪拌 1 晚。將反應液濃縮，所獲得之殘渣用管柱層析法(CH_2Cl_2：MeOH＝10：1)精製，獲得 Boc-Gly-Gly-Phe-Gly-NH-$(CH_2)_4$-CO-DX-8951400mg。

將 Boc-Gly-Gly-Phe-Gly-NH-$(CH_2)_4$-CO-DX-8951(300mg)溶解於 TFA(2ml)，進行反應 1 小時後將反應液濃縮，所獲得之殘渣加入乙醚使固化。除去上澄液，將固體乾燥，獲得 H-Gly-Gly-Phe-Gly-NH-$(CH_2)_4$-CO-DX-8951 之三氟乙酸鹽 250mg。

^{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)

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準(CNS)A4 規格(210×297 公釐)

A7
B7

五、發明說明（ 52 ）

將根據 WO97/46260 實施例 24 之方法製造之平均分子量為 337K、羧甲基化度(每個構成殘基之羧甲基取代度)為 0.4 之羧甲基葡聚糖多醇之三乙銨鹽(200mg)溶解於 DMF(10ml)。加入 H-Gly-Gly-Phe-Gly-NH-$(CH_2)_4$-CO-DX-8951 之三氟乙酸鹽(30mg)、含有三乙胺(10μl)之甲醇(4ml)溶液，再加入含有 1-乙氧羰基-2-乙氧基-1,2-二羥基喹啉(200mg)之甲醇(3ml)溶液。避光，於室溫攪拌 1 晚。反應液用 3M 食鹽水稀釋，用超濾膜(50K)除去低分子化合物，通過 0.22μm 之過濾器，凍結乾燥，獲得目的物 178mg。

[產業上之利用可能性]

本發明之 DDS 化合物使用被糖化合物修飾之羧基 C_{1-4} 烷基葡聚糖多醇作為高分子載體，臟器之指向性非常高，作為醫藥使用可發揮優越之治療效果。又，本發明 DDS 化合物之測定方法，由於可正確且簡單地定量 DDS 化合物之血中濃度或 DDS 化合物中所導入之醫藥化合物殘基之含量，所以在將 DDS 化合物於臨床上使用時為極有用之方法而利用。

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

本紙張尺度適用中國國家標準 (CNS)A4 規格 (210 × 297 公釐)

I232930

A5
B5

四、中文發明摘要（發明之名稱：藥物輸導系統(DDS)化合物之測定方法）

本發明係有關含有被糖化合物修飾之羧基 C_{1-4} 烷基葡聚糖多醇及與該羧基 C_{1-4} 烷基葡聚糖多醇結合之醫藥化合物殘基之 DDS 化合物，經由含有與肽結合之 2 至 8 個胺基酸之間隔基(spacer)將高分子載體與醫藥化合物之殘基結合之 DDS 化合物之測定方法，亦包括將該 DDS 化合物經由肽酶處理所獲得之水解物之測定方法。

英文發明摘要（發明之名稱：METHOD FOR MEASURING DRUG DELIVERY SYSTEM COMPOUND(DDS)）

A method for measuring a drug delivery system compound (DDS) is presented. The DDS compound contains a carboxy C_{1-4} alkyldextranpolyalcohol modified with a sugar compound, and a residual group of the pharmaceutical compound bonded to the carboxy C_{1-4} alkyldextranpolyalcohol. This invention also provides a DDS compound which contains a high molecule bonded to a residual group of a pharmaceutical compound through a spacer containing 2 to 8 amino acid that are peptide bonded.

The method includes the step of measuring the hydrolyte obtained by treating the DDS compound with peptidase.

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄）

裝

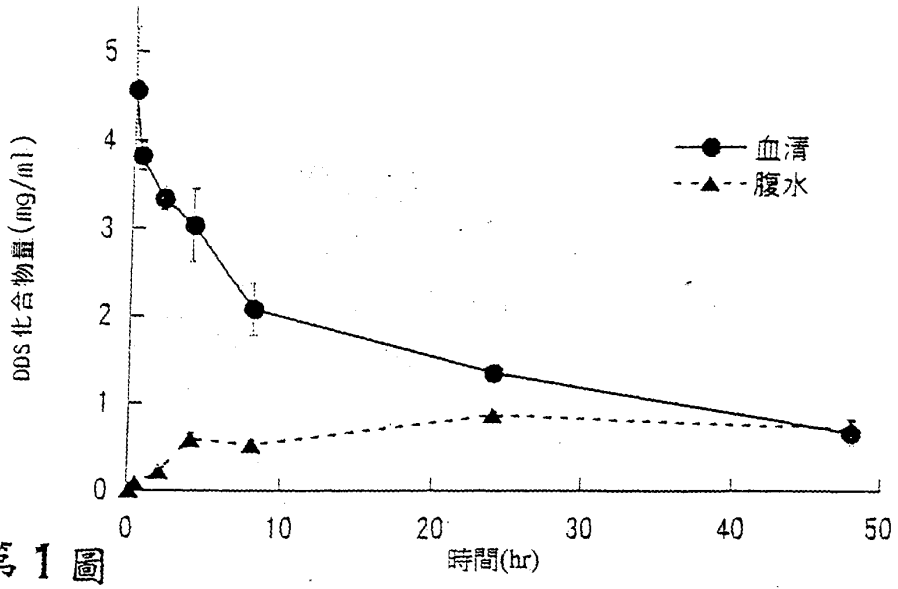
訂

線

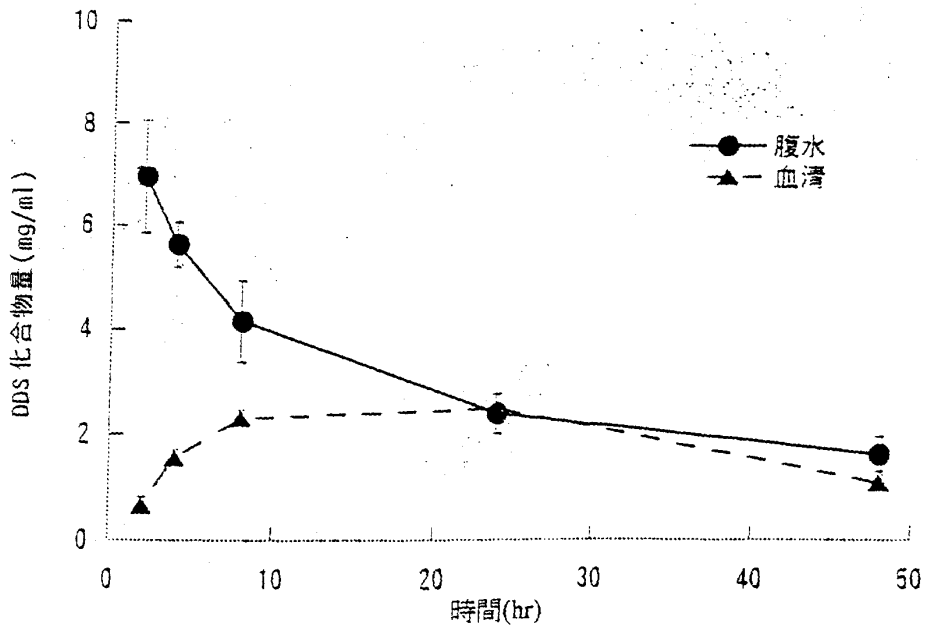
經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

004701

I232930

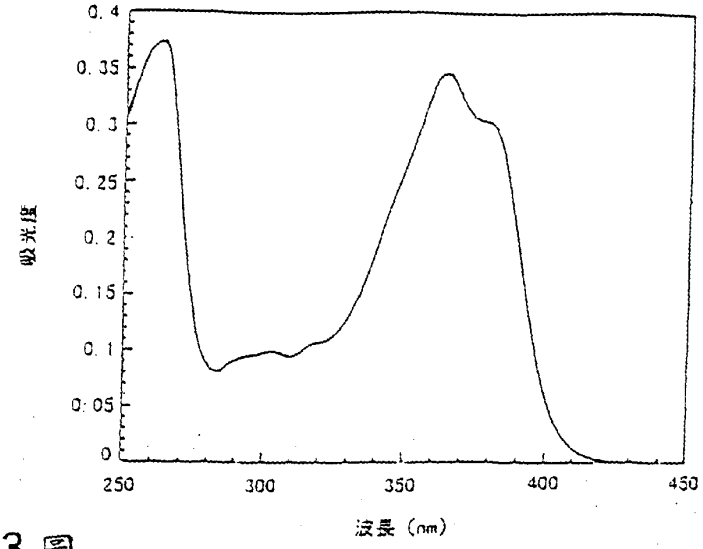


第 1 圖

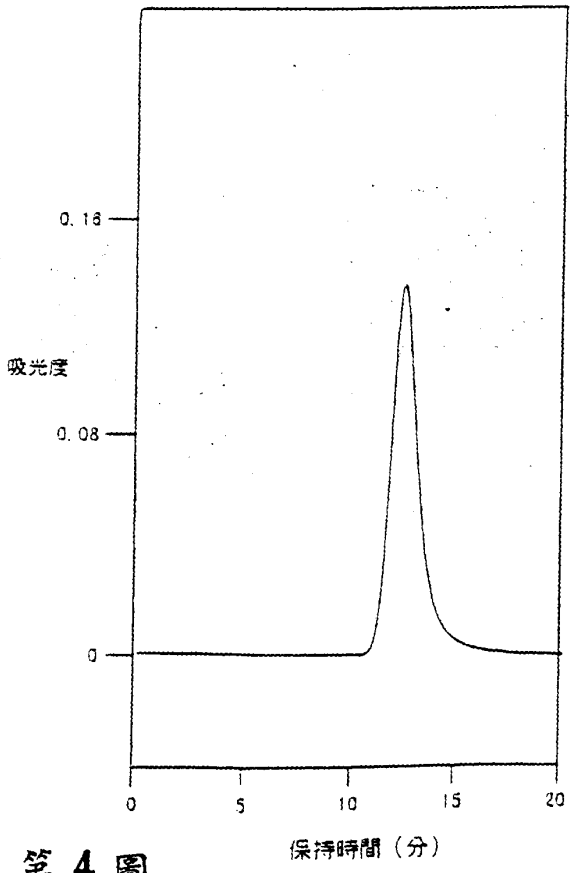


第 2 圖

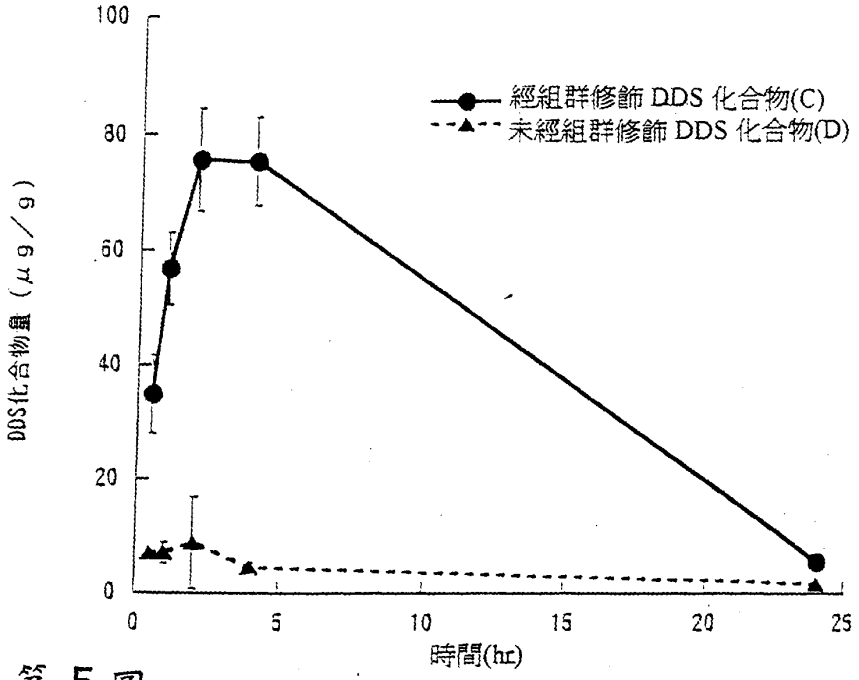
I232930



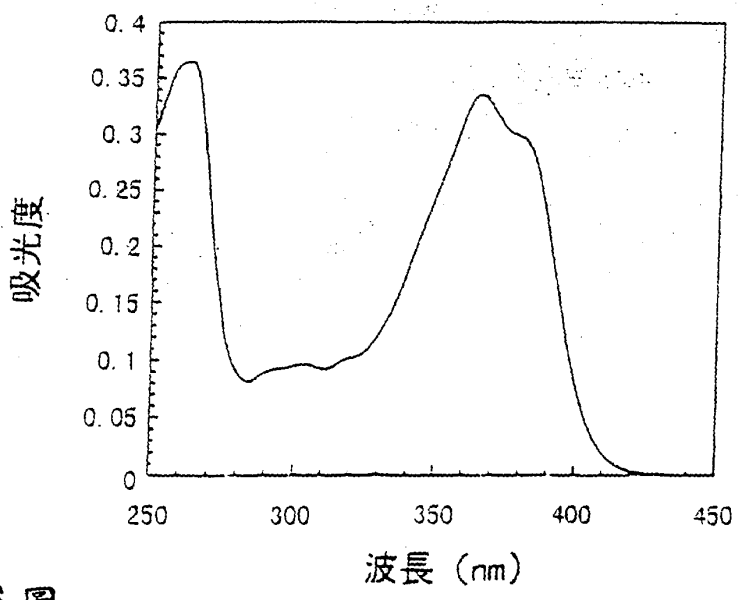
第 3 圖



第 4 圖

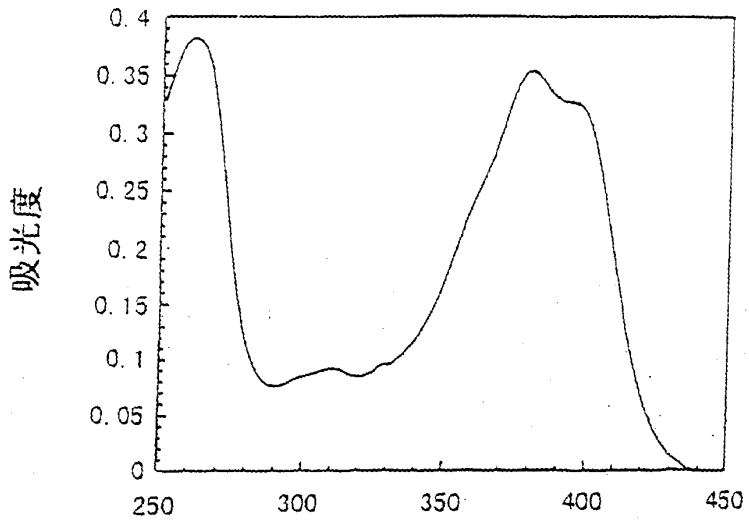


第 5 圖　DDS 化合物對肝臟之集積性

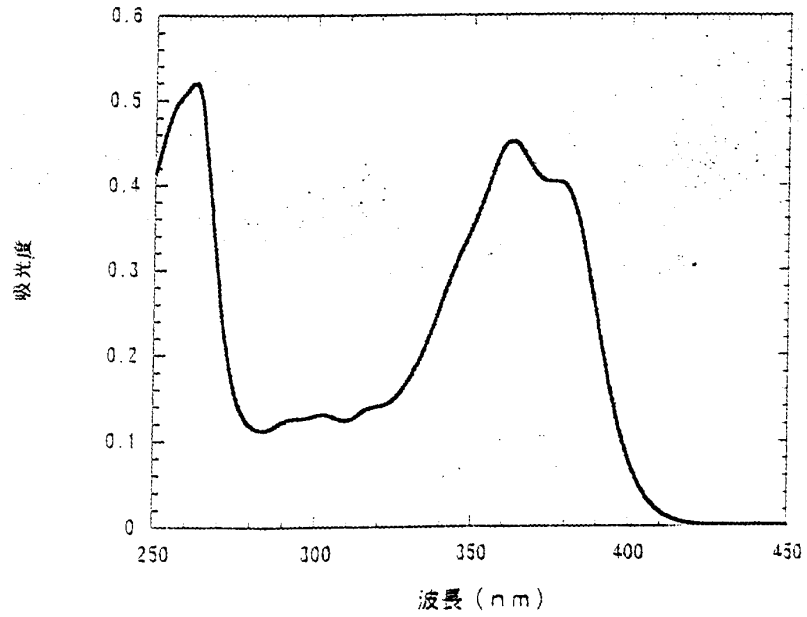


第 6 圖

OnCusp
Ex. 1002

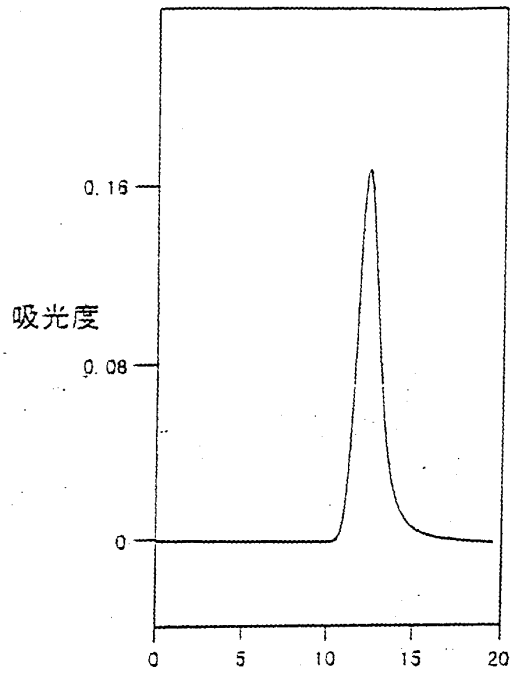


第 7 圖

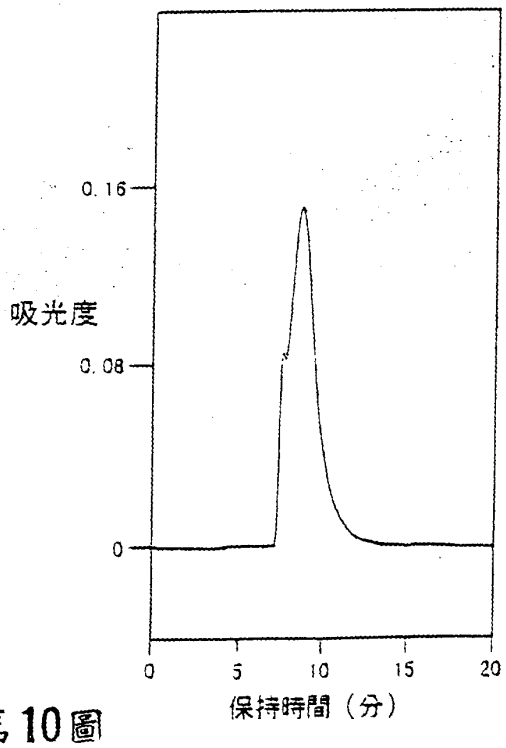


第 8 圖

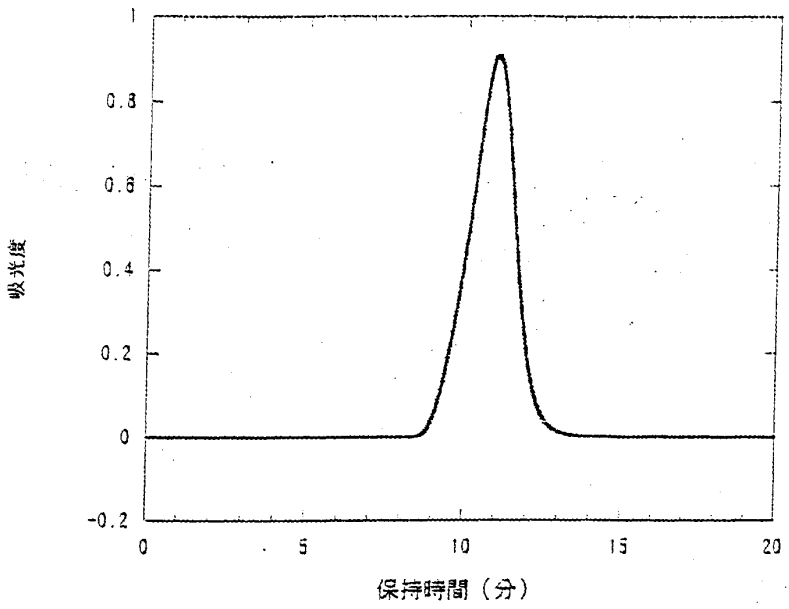
OnCusp
Ex. 1002



第 9 圖



第 10 圖



第11圖

I232930

公告本

93年8月20日 修正補充

附件2

第 91113738 號專利申請案

申請專利範圍修正本

(93 年 8 月 20 日)

1. 一種測定方法，係測定以含有與肽結合之 2 至 8 個胺基酸之間隔基結合高分子載體與醫藥化合物之殘基的 DDS 化合物之方法，包括添加緩衝液將 DDS 化合物調整為 0.1 至 5mg/ml，並以肽酶處理，所獲得之水解物藉由適當組合 HPLC 分離操作與紫外線吸收光譜或以螢光光譜測定之步驟者。

2. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其中，該方法為用於測定生體試樣中所含 DDS 化合物之濃度者。

3. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其中，該方法為用於測定該 DDS 化合物中所導入之醫藥化合物殘基之含量者。

4. 如申請專利範圍第 1 項至第 3 項任一項之方法，其中，該水解物為醫藥化合物者。

5. 如申請專利範圍第 1 項至第 3 項任一項之方法，其中該水解物為醫藥化合物之殘基與間隔基之一部分結合之化合物者。

6. 如申請專利範圍第 5 項之方法，其中該間隔基之一部分為間隔基來源之 1 個胺基酸者。

7. 如申請專利範圍第 1 項至第 3 項任一項之方法，其中該高分子載體為具有羧基之多糖衍生物者。

8. 如申請專利範圍第 7 項之方法，其中，該高分子載體為

經濟部中央標準局員工福利委員會印製

羧基 C_{1-4} 烷基葡聚糖多醇者。

9. 如申請專利範圍第 1 項至第 3 項任一項之方法，其中該 DDS 化合物所導入之醫藥化合物為抗腫瘍劑或消炎劑者。

10. 如申請專利範圍第 1 項至第 3 項任一項之方法，其中該間隔基從 N 末端起為-Gly-Gly-Phe-Gly-之四肽或從 N 末端起為-Gly-Gly-Gly-Phe 之四肽者。

11. 如申請專利範圍第 1 項至第 3 項任一項之方法，其中該間隔基為從 N 末端起為-Gly-Gly-Phe-Gly-NH-Y'-CH_2-O-CO-所示之基或從 N 末端起為-Gly-Gly-Gly-Phe-NH-Y'-CH_2-O-CO-所示之基(式中，Y'為對-伸苯基)者。

12. 如申請專利範圍第 1 項至第 3 項任一項之方法，其中，該肽酶為 α-胰凝乳蛋白酶或木瓜酶者。

13. 如申請專利範圍第 1 項至第 3 項任一項之方法，其中，該醫藥化合物為(1S,9S)-1-胺基-9-乙基-5-氟-2,3-二氫-9-羥基-4-甲基-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4'：6,7]吲哚啡并[1,2-b]喹啉-10,13(9H,15H)-二酮者。

14. 如申請專利範圍第 1 項至第 3 項任一項之方法，其中，該方法為用於測定經由含有從 N 末端起為-Gly-Gly-Phe-Gly-所示之四肽或從 N 末端起為-Gly-Gly-Gly-Phe-所示之四肽之間隔基將羧基 C_{1-4} 烷基葡聚糖多醇與(1S,9S)-1-胺基-9-乙基-5-氟-2,3-二氫-9-羥基-4-甲基-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4'：6,7]吲哚啡并[1,2-b]喹啉-10,13(9H,15H)-二酮結合之 DDS 化合物者。

經濟部中央標準局員工福利委員會印製

15.如申請專利範圍第14項之方法，其中，該方法為使用α-胰凝乳蛋白酶或木瓜酶作為肽酶，測定作為水解物之(1S,9S)-9-乙基-5-氟-1-甘胺醯胺-2,3-二氫-9-羥基-4-甲基-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4'：6,7]吲哚啉并[1,2-b]喹啉-10,13(9H,15H)-二酮者。

經濟部中央標準局員工福利委員會印製

OnCusp
Ex. 1002

世界知的所有権機関
国際事務局

PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類7
A61K 47/48, 47/30, 47/26, 31/47

A1

(11) 国際公開番号 WO00/25825

(43) 国際公開日 2000年5月11日(11.05.00)

(21) 国際出願番号 PCT/JP99/06016

(22) 国際出願日 1999年10月29日(29.10.99)

(30) 優先権データ
特願平10/310130 1998年10月30日(30.10.98) JP
特願平10/329272 1998年11月19日(19.11.98) JP

(71) 出願人（米国を除くすべての指定国について）
第一製薬株式会社
(DAIICHI PHARMACEUTICAL CO., LTD.)[JP/JP]
〒103-8234 東京都中央区日本橋3丁目14番10号 Tokyo, (JP)
(72) 発明者；および
(75) 発明者／出願人（米国についてのみ）
洲崎 浩(SUSAKI, Hiroshi)[JP/JP]
井上和泓(INOUE, Kazuhiro)[JP/JP]
久我 洋(KUGA, Hiroshi)[JP/JP]
池田政浩(IKEDA, Masahiro)[JP/JP]
塩瀬能伸(SHIOSE, Yoshinobu)[JP/JP]
是永 博(KORENAGA, Hiroshi)[JP/JP]
〒134-8630 東京都江戸川区北葛西1丁目16番13号
第一製薬株式会社 東京研究開発センター内 Tokyo, (JP)

(74) 代理人
今村正純, 外(IMAMURA, Masazumi et al.)
〒104-0031 東京都中央区京橋1丁目5番5号
KRFビル5階 Tokyo, (JP)

(81) 指定国 AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM)

添付公開書類
国際調査報告書

(54)Title: **DDS COMPOUNDS AND METHOD FOR ASSAYING THE SAME**

(54)発明の名称 DDS化合物及びその測定方法

(57) Abstract

A method for assaying a DDS compound containing a saccharide compound-modified carboxy C_{1-4} alkyldextran polyalcohol and a drug compound residue bonded to this carboxy C_{1-4} alkyldextran polyalcohol, or a DDS compound wherein a polymer carrier is bonded to a drug compound residue via a spacer containing 2 to 8 amino acids bonded together via peptide bonds, which involves the step of assaying a hydrolysate obtained by treating the DDS compound with peptidase.

OnCusp
Ex. 1002

(57)要約

糖化合物で修飾されたカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールと該カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールに結合した医薬化合物の残基とを含むＤＤＳ化合物、及びペプチド結合した２から８個のアミノ酸を含むスペーサーを介して高分子キャリアーと医薬化合物の残基とが結合したＤＤＳ化合物の測定方法であって、該ＤＤＳ化合物をペプチダーゼで処理することにより得られる加水分解物を測定する工程を含む方法。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE アラブ首長国連邦
AL アルバニア
AM アルメニア
AT オーストリア
AU オーストラリア
AZ アゼルバイジャン
BA ボズニア・ヘルツェゴビナ
BB バルバドス
BE ベルギー
BF ブルギナ・ファソ
BG ブルガリア
BJ ベナン
BR ブラジル
BY ベラルーシ
CA カナダ
CF 中央アフリカ
CG コンゴー
CH スイス
CI コートジボアール
CM カメルーン
CN 中国
CR コスタ・リカ
CU キューバ
CY キプロス
CZ チェッコ
DE ドイツ
DK デンマーク
DM ドミニカ
EE エストニア
ES スペイン
FI フィンランド
FR フランス
GA ガボン
GB 英国
GD グレナダ
GE グルジア
GH ガーナ
GM ガンビア
GN ギニア
GW ギニア・ビサオ
GR ギリシャ
HR クロアチア
HU ハンガリー
ID インドネシア
IE アイルランド
IL イスラエル
IN インド
IS アイスランド
IT イタリア
JP 日本
KE ケニア
KG キルギスタン
KP 北朝鮮
KR 韓国
KZ カザフスタン
LC セントルシア
LI リヒテンシュタイン
LK スリ・ランカ
LR リベリア
LS レソト
LT リトアニア
LU ルクセンブルグ
LV ラトヴィア
MA モロッコ
MC モナコ
MD モルドヴァ
MG マダガスカル
MK マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国
ML マリ
MN モンゴル
MR モーリタニア
MW マラウイ
MX メキシコ
NE ニジェール
NL オランダ
NO ノールウェー
NZ ニュー・ジーランド
PL ポーランド
PT ポルトガル
RO ルーマニア
RU ロシア
SD スーダン
SE スウェーデン
SG シンガポール
SI スロヴェニア
SK スロヴァキア
SL シエラ・レオネ
SN セネガル
SZ スワジランド
TD チャード
TG トーゴー
TJ タジキスタン
TZ タンザニア
TM トルクメニスタン
TR トルコ
TT トリニダッド・トバゴ
UA ウクライナ
UG ウガンダ
US 米国
UZ ウズベキスタン
VN ヴィェトナム
YU ユーゴースラビア
ZA 南アフリカ共和国
ZW ジンバブエ

WO 00/25825 PCT/JP99/06016

明 細 書

ＤＤＳ化合物及びその測定方法

技術分野

本発明は、糖化合物で修飾されたカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールと抗腫瘍剤などの医薬化合物とを結合させたＤＤＳ化合物（ＤＤＳ：ドラッグ・デリバリ・システム）に関するものである。また、本発明は、高分子キャリアーと抗腫瘍剤などの医薬化合物とを結合させたＤＤＳ化合物の測定方法に関するものである。

背景技術

肺癌や消化器癌などの固形癌や白血病などの血液癌の治療に際して用いられる抗腫瘍剤は、静脈内投与や経口投与などの投与経路により全身的に投与された後、特定の腫瘍部位に移行して癌細胞の増殖を阻害ないし抑制することにより治療効果を発揮する。しかしながら、全身投与された抗腫瘍剤は、血中から肝臓・網内系臓器に速やかに取り込まれたり、あるいは速やかに尿中排泄されるために、血中濃度が低下して腫瘍部位への移行が十分でない場合がある。また、通常の抗腫瘍剤自体では腫瘍部位への移行選択性（腫瘍選択性）が低いために、抗腫瘍剤が全身の様々な細胞や組織に満遍なく分布してしまい、正常な細胞や組織に対しても細胞毒として作用するので、嘔吐、発熱、あるいは脱毛などの副作用を極めて高率に発生させるという問題がある。従って、抗腫瘍剤を効率的かつ選択的に腫瘍部位に移行させる手段の開発が求められている。

このような手段の一つとして、カルボキシル基を有する多糖化合物を高分子キャリアーとして用い、該高分子キャリアーに対して抗腫瘍剤を結合させて抗腫瘍剤の血中における消失を遅延させるとともに、癌組織への指向性を高める方法が提案されている。例えば、国際公開 WO94/19376 号には、カルボキシル基を有す

る多糖のカルボキシル基にペプチド鎖（アミノ酸数１から８)が結合されており、さらにこのペプチド鎖を介してドキソルビシン、ダウノルビシン、マイトマイシンC、又はブレオマイシンなどを結合したＤＤＳ化合物が開示されている。また、特公平 7-84481 号公報には、カルボキシメチル化されたマンノグルカン誘導体にシッフ塩基や酸アミド結合を介して上記の抗腫瘍剤を導入したＤＤＳ化合物が開示されている。

これらのＤＤＳ化合物（「薬物複合体」と呼ばれる場合もある）は、高分子キャリアーに結合された抗腫瘍剤を単独で用いた場合に比べてより優れた抗腫瘍効果を有するとともに、毒性・副作用が軽減されていることを特徴としている。本発明者らは、多糖化合物などの高分子キャリアーと抗腫瘍剤などの医薬化合物とを１から８個のアミノ酸からなるスペーサーを介して結合させることにより、抗腫瘍剤などの医薬化合物を目的組織に対して部位選択的に移行させることができるＤＤＳ化合物を提供している（国際公開 WO97/46260 号)。また、カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールが高分子キャリアーとして極めて優れた性質を有していることを見出し、カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールを高分子キャリアーとして含むＤＤＳ化合物を提供した（上記国際公開)。

その他、ポリアルコール化多糖化合物を高分子キャリアーとして用いたＤＤＳ化合物に関する技術については、「多糖－ペプチド－ドキソルビシン複合体に関する研究・多糖化合物の血中安定性と抗腫瘍効果の関係」(第 10 回日本ＤＤＳ学会講演要旨集, 279, 1994)；「多糖－ペプチド－ドキソルビシン複合体に関する研究・体内動態と抗腫瘍効果」(第９回日本薬物動態学会年会講演要旨集，292, 1994)；第 19 回研究開発動向セミナー（医薬品機構主催）要旨集, D-9, 1995；及び「多糖キャリアーによる腫瘍への薬物送達に関する研究」(第 12 回コロイド・界面技術シンポジウム，日本化学会，講演要旨集, 51, 1995) などの報告がある。

多糖化合物などの高分子キャリアーの臓器指向性を高める方法として、例えば、糖修飾ポリグルタミン酸誘導体（特開平 5-178986 号公報)、糖修飾ポリリジン誘導体（特開平 5-222187 号公報)、ポリ-ε-置換-L-リジンの D-ガラクトピラノシ

ル-グルコン酸誘導体（特開平 7-70311 号公報）、糖修飾ポリ-ω-置換-L-グルタミン酸誘導体（特開平 7-228688 号公報）、リンカーを介して糖化合物を結合させた多糖化合物（特開平 8-85703 号公報）、及びグルコシル-蛋白誘導体（特開平 9-118699 号公報）などが知られている。しかしながら、従来、カルボキシC_{1-4}アルキルデキストランポリアルコールを高分子キャリアーとして利用したＤＤＳ化合物の臓器指向性を高める方法は報告されていない。

一方、高分子キャリアーと医薬化合物の残基とがオリゴペプチドを含むスペーサーを介して結合したＤＤＳ化合物を臨床で使用する場合には、ＤＤＳ化合物自体の血中濃度を正確に測定することが必要であり、また、適正な投与量を決定したり、製品のロット差を検定するためには、ＤＤＳ化合物中に導入された抗腫瘍剤などの医薬化合物の残基の含有量を正確に測定する必要がある。従来、ＤＤＳ化合物の血中濃度の測定やＤＤＳ化合物の医薬化合物の残基の含有量測定は、医薬化合物の発する蛍光やＵＶ吸収を指標にして、ＤＤＳ化合物より医薬化合物またはこれにスペーサーの一部が結合した化合物を切り離すことなく、ＤＤＳ化合物自体を直接測定することにより行われている。また、ＤＤＳ化合物自体のＮＭＲ測定による方法や、ＤＤＳ化合物を酸処理して生じる分解物を測定する方法も提案されている。

しかしながら、医薬化合物が酸に対して不安定である場合には、酸処理等による分解物の定量法を利用することはできず、ＮＭＲ測定による定量は精度が低いという問題がある。また、ＤＤＳ化合物に存在する医薬化合物の残基のＵＶ吸収は、高分子キャリアーやペプチドスペーサーから受ける影響により、医薬化合物自体に比べて極大波長がシフトしたりモル吸光係数が変化している場合があるため、ＤＤＳ化合物中に導入された医薬化合物の残基の含有量を正確に測定することは一般に困難である。さらに、生体に投与された組織中のＤＤＳ化合物をＮＭＲ測定による方法やＵＶ吸収により定量することは極めて困難である。

発明の開示

本発明の課題は、カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールを高分子キャリアーとして含むＤＤＳ化合物の臓器指向性(例えば肝臓への指向性など)を高める手段を提供し、上記の特徴を有するＤＤＳ化合物を提供することにある。

本発明の別の課題は、上記の特徴を有するＤＤＳ化合物の製造用原料として有用な多糖化合物を提供することにある。

本発明のさらに別の課題は、高分子キャリアーと医薬化合物の残基とがオリゴペプチドを含むスペーサーを介して結合したＤＤＳ化合物の測定方法を提供することにある。より具体的には、本発明の課題は、ＤＤＳ化合物自体、又はＤＤＳ化合物中に導入された抗腫瘍剤などの医薬化合物の残基の含有量を正確に測定する方法を提供することにある。さらに具体的には、投与されたＤＤＳ化合物の血中濃度や組織内濃度を正確に定量することができ、あるいはＤＤＳ化合物に導入された医薬化合物の残基の含有量を正確に定量可能な測定方法を提供することが本発明の課題である。

本発明者らは上記の課題を解決すべく鋭意研究を行ったところ、糖化合物で修飾したカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールを高分子キャリアーとして用いると、極めて臓器指向性の高いＤＤＳ化合物を製造することができ、特にガラクトースを結合させたカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールを含むＤＤＳ化合物は優れた肝臓指向性を有していることを見出した。

また、本発明者らは、高分子キャリアーと医薬化合物の残基とがオリゴペプチドを含むスペーサーを介して結合したＤＤＳ化合物をペプチダーゼで処理し、得られた加水分解物を測定することによって、ＤＤＳ化合物の血中濃度やＤＤＳ化合物に導入された医薬化合物の残基の含有量を正確に、かつ簡便に定量することができることを見出した。本発明は上記の知見を基にして完成されたものである。

すなわち本発明は、糖化合物で修飾されたカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールと該カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールに結合した医薬化合物の残基とを含むＤＤＳ化合物を提供するものである。

この発明の好ましい態様によれば、糖化合物で修飾されたカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールと医薬化合物の残基とがスペーサーを介して結合した上記ＤＤＳ化合物；スペーサーが１個のアミノ酸又はペプチド結合した２から８個のアミノ酸である上記ＤＤＳ化合物；糖化合物で修飾されたカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールが、糖化合物とカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールとがリンカーを介して結合したものである上記ＤＤＳ化合物；及び、糖化合物で修飾されたカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールがリンカーを介して糖化合物によりクラスター修飾されたものである上記ＤＤＳ化合物が提供される。

また、本発明により、カルボキシ C_{1-4} アルキル部分の一部のカルボキシル基が糖化合物で修飾されたカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールに対して医薬化合物の残基を結合させることにより製造することができるＤＤＳ化合物が提供される。

この発明の好ましい態様によれば、該カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールと医薬化合物の残基とをスペーサーを介して結合させることにより製造することができる上記ＤＤＳ化合物；及び、カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールのカルボキシ C_{1-4} アルキル部分の一部のカルボキシル基に糖化合物又は糖化合物に結合したリンカーを結合させることにより製造された該カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールに対して医薬化合物の残基を結合させることにより製造することができる上記ＤＤＳ化合物が提供される。

さらに、本発明により、カルボキシ C_{1-4} アルキル部分の一部のカルボキシル基に医薬化合物の残基がスペーサーを介して結合したカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールを糖化合物で修飾することにより製造することができるＤＤＳ化合物が提供される。

この発明の好ましい態様によれば、該カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールと糖化合物とをリンカーを介して結合させることにより製造することができる上記ＤＤＳ化合物；及び、カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリ

アルコールのカルボキシ C_{1-4} アルキル部分の一部のカルボキシル基に１個のアミノ酸からなるスペーサー又はペプチド結合した２から８個のアミノ酸からなるスペーサーを介して医薬化合物の残基を結合させることにより製造された該カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールを糖化合物で修飾することにより製造することができる上記ＤＤＳ化合物が提供される。

本発明のさらに好ましい態様によれば、糖化合物がガラクトース若しくはガラクトサミン又はそれらの誘導体である上記ＤＤＳ化合物；カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールを構成するデキストランポリアルコールが、実質的に完全にポリアルコール化可能な条件下でデキストランを処理して得られたデキストランポリアルコールである上記ＤＤＳ化合物；カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールがカルボキシメチルデキストランポリアルコールである上記ＤＤＳ化合物;ガラクトース若しくはガラクトサミン又はそれらの誘導体、あるいはクラスター化されたガラクトース若しくはガラクトサミン又はそれらの誘導体の置換度がカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールの糖残基あたり 0.01～1.0 である上記ＤＤＳ化合物；医薬化合物が抗腫瘍剤又は抗炎症剤である上記ＤＤＳ化合物；医薬化合物が(1S,9S)-1-アミノ-9-エチル-5-フルオロ-2,3-ジヒドロ-9-ハイドロキシ-4-メチル-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオンである上記ＤＤＳ化合物；及び肝臓癌治療剤である上記ＤＤＳ化合物が提供される。

別の観点からは、糖化合物で修飾されたカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコール；糖化合物で修飾されたカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールからなる高分子キャリアー；及び上記ＤＤＳ化合物の製造に使用するための、糖化合物で修飾されたカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールが本発明により提供される。また、別の観点からは、上記ＤＤＳ化合物の製造のための、糖化合物で修飾されたカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールの使用が提供される。

さらに別の観点からは、本発明により、ペプチド結合した２から８個のアミノ

酸を含むスペーサーを介して高分子キャリアーと医薬化合物の残基とが結合したＤＤＳ化合物の測定方法であって、該ＤＤＳ化合物をペプチダーゼで処理することにより得られる加水分解物を測定する工程を含む方法が本発明により提供される。

この発明の好ましい態様によれば、生体試料中に含まれる該ＤＤＳ化合物の濃度測定に用いる上記方法；該ＤＤＳ化合物に導入された医薬化合物の残基の含有量を測定するために用いる上記方法；該加水分解物が医薬化合物である上記方法；該加水分解物が医薬化合物の残基にスペーサーの一部が結合した化合物である上記方法；及び、スペーサーの一部がスペーサー由来の１個のアミノ酸である上記方法が提供される。

上記発明のさらに好ましい態様によれば、該高分子キャリアーがカルボキシル基を有する高分子キャリアー、好ましくは多糖誘導体である上記方法；該高分子キャリアーがカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコール、好ましくはカルボキシメチルデキストランポリアルコールである上記方法；カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールを構成するデキストランポリアルコールが、実質的に完全にポリアルコール化可能な条件下でデキストランを処理して得られたデキストランポリアルコールであることを特徴とする上記方法；該高分子キャリアーが糖化合物で修飾されたものである上記方法；該ＤＤＳ化合物中に導入された医薬化合物が抗腫瘍剤又は抗炎症剤である上記方法；スペーサーがＮ末端側から-Gly-Gly-Phe-Gly-で表されるテトラペプチド又はＮ末端側から-Gly-Gly-Gly-Phe-で表されるテトラペプチドである上記方法;スペーサーがＮ末端側から-Gly-Gly-Phe-Gly-NH-Y'-CH_2-O-CO-で表される基又はＮ末端側から-Gly-Gly-Gly-Phe-NH-Y'-CH_2-O-CO-で表される基（式中、Y'は ｐ－フェニレン基を示す）である上記方法；ペプチダーゼがα－キモトリプシン又はパパインである上記方法；及び、医薬化合物が（1S,9S)-1-アミノ-9-エチル-5-フルオロ-2,3-ジヒドロ-9-ハイドロキシ-4-メチル-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオンである上記方法が提供される。

上記発明の特に好ましい態様では、上記方法はＮ末端側から-Gly-Gly-Phe-Gly-で表されるテトラペプチド又はＮ末端側から-Gly-Gly-Gly-Phe-で表されるテトラペプチド含むスペーサーを介してカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールと(1S,9S)-1-アミノ-9-エチル-5-フルオロ-2,3-ジヒドロ-9-ハイドロキシ-4-メチル-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオンとが結合したＤＤＳ化合物の測定に用いることができ、ペプチダーゼとしてα－キモトリプシンを用い、加水分解物として（1S,9S)-9-エチル-5-フルオロ-1-グリシルアミノ-2,3-ジヒドロ-9-ハイドロキシ-4-メチル-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオンを測定することにより、上記ＤＤＳ化合物又は上記ＤＤＳ化合物に導入された上記抗腫瘍剤の含有量を定量することができる。

図面の簡単な説明

第１図　本発明の方法（例４）で測定したＤＤＳ化合物の血中及び腹水中濃度を示した図である。

第２図　本発明の方法（例５）で測定したＤＤＳ化合物の血中及び腹水中濃度を示した図である。

第３図　糖化合物で修飾された高分子キャリアーを有する本発明のＤＤＳ化合物（例６）の紫外線吸収スペクトルを示す図である。

第４図　糖化合物で修飾された高分子キャリアーを有する本発明のＤＤＳ化合物（例６）のGPCチャートを示す図である。

第５図　例６で製造したＤＤＳ化合物（(C)及び(D)）の肝臓への集積性を示す図である。

第６図　本発明のＤＤＳ化合物(例６(D))の紫外線吸収スペクトルを示す図である。

第７図　本発明のＤＤＳ化合物(例７)の紫外線吸収スペクトルを示す図である。

第８図　本発明のＤＤＳ化合物(例９)の紫外線吸収スペクトルを示す図である。

第９図　本発明のＤＤＳ化合物（例６(D)）のGPCチャートを示す図である。
第10図　本発明のＤＤＳ化合物（例７）のGPCチャートを示す図である。
第11図　本発明のＤＤＳ化合物（例９）のGPCチャートを示す図である。

発明を実施するための最良の形態

本発明のＤＤＳ化合物は、糖化合物で修飾されたカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールと該カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールに結合した医薬化合物の残基とを含むことを特徴としている。より具体的には、本発明のＤＤＳ化合物は、(1) 糖化合物で修飾されたカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールと医薬化合物の残基とがスペーサーを介さずに結合している場合；及び(2) 糖化合物で修飾されたカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールと医薬化合物の残基とがスペーサーを介して結合している場合のいずれをも包含する。

糖化合物で修飾されたカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールと医薬化合物の残基とがスペーサーを介して結合している場合の例としては、例えば、カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールと医薬化合物の残基とが１個のアミノ酸からなるスペーサーで結合している場合、又はカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールと医薬化合物の残基とがペプチド結合した２から８個のアミノ酸からなるスペーサーを介して結合している場合や、ペプチド結合した２から８個のアミノ酸からなるオリゴペプチドに-NH-Y-CO-［式中、Yは炭素数１から８個のアルキレン基又は$-C_6H_4-CH_2-O-$（$-C_6H_4-$はフェニレン基を示し、該フェニレン基は１又は２個以上の置換基を有していてもよく、好ましくはp－フェニレン基である）で表される基を示す］で表される連結基が結合したスペーサーを介して結合している場合などを挙げることができる。本明細書において用いられる「修飾」という用語は、糖化合物とカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールとが直接的に、又はリンカーを介して間接的に共有結合によって結合した状態を含めて最も広義に解釈すべきであり、いかなる意味において

も限定的に解釈してはならない。

上記のＤＤＳ化合物に含まれる医薬化合物の残基は、例えば、抗腫瘍剤、抗炎症剤、抗菌剤などの医薬としてヒトを含む哺乳類の病気の治療及び／又は予防に用いられる医薬化合物の主要な部分構造を意味している。もっとも、該医薬化合物の用途は上記のものに限定されることはなく、医薬化合物としては、カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコール又はスペーサーとの結合に関与できる１又は２以上の反応性官能基（例えば、アミノ基、カルボキシル基、水酸基、チオール基、エステル基など）を有するものであればいかなるものを用いてもよい。医薬化合物の残基は、カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールのカルボキシル基、スペーサーに存在する反応性官能基（例えば、ペプチドスペーサーを用いる場合には、そのＮ末端アミノ基若しくはＣ末端カルボキシル基、又はスペーサーを構成するアミノ酸に存在する反応性官能基）に結合していてもよい。また、本明細書において医薬化合物という場合には、それ自体が医薬作用を有する化合物の主要構造をその部分構造として含み生体内で該化合物を再生することができるプロドラッグ化合物も含まれる。

上記発明において、医薬化合物の残基とは、カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコール又はスペーサーと医薬化合物の残基との結合が、医薬化合物中の反応性官能基とカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコール又はスペーサー中の反応性官能基との反応（例えば脱水縮合など）により形成されたと仮定した場合において、結合後の化合物中に存在する医薬化合物に由来する部分構造のことである。例えば、医薬化合物が D-NH_2, D-COOH, D-COOR, D-OH, D-SH, D-$CONH_2$, D-NH-COOR (R は低級アルキル基等)で表される場合、医薬化合物の残基はそれぞれ D-NH-(D-NH-CO-Q など), D-CO-(D-CO-NH-Q, D-CO-O-Q, D-CO-S-Q など), D-CO-(D-CO-NH-Q, D-CO-O-Q, D-CO-S-Q など), D-O-(D-O-CO-Q, D-O-Q など), D-S-(D-S-CO-Q, D-S-Q など), D-CONH-(D-CO-NH-CO-Q など), D-NH-CO-(D-NH-CO-O-Q, D-NH-CO-NH-Q など）で表される（カッコ内はスペーサー又はカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールと医薬化合物の残基との結合を

示し、Q はスペーサー及びカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールからそれぞれ反応性官能基及びカルボキシル基を除いた残りの部分構造を示す)。もっとも、スペーサー又はカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールと医薬化合物の残基との結合の種類は上記のものに限定されることはない。

医薬化合物の残基としては、例えば、ドキソルビシン、ダウノルビシン、マイトマイシンC、ブレオマイシン、シクロシチジン、ビンクリスチン、ビンブラスチン、メトトレキセート、白金系抗腫瘍剤（シスプラチン若しくはその誘導体)、タキソール若しくはその誘導体、カンプトテシン若しくはその誘導体（特開平6-87746 号公報に記載された抗腫瘍剤、好ましくは請求項２に記載された(1S,9S)-1- アミノ-9- エチル-5- フルオロ-2,3- ジヒドロ-9- ハイドロキシ-4- メチル-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7] インドリジノ[1,2-b] キノリン-10,13(9H,15H)- ジオン等) などの抗腫瘍剤の残基を好適に用いることができる。また、例えば、コハク酸ヒドロコルチゾン、コハク酸プレドニゾロンなどのステロイド系抗炎症剤、又はメフェナム酸、フルフェナム酸、ジクロフェナク、イブプロフェン、チノリジンなどの非ステロイド系抗炎症薬の残基も好適である。

医薬化合物の残基とカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールとを結合するスペーサーとして、１個のアミノ酸からなるスペーサー又はペプチド結合した２から８個のアミノ酸からなるスペーサーを用いる場合には、該スペーサーは、１個のアミノ酸の残基（アミノ酸のアミノ基及びカルボキシル基からそれぞれ１個の水素原子及び１個の水酸基を除いた残基を意味する)、又はペプチド結合した２ないし８個のアミノ酸からなるオリゴペプチドの残基（N末端のアミノ基及びC末端のカルボキシル基からそれぞれ１個の水素原子及び１個の水酸基を除いた残基を意味する）の形態を有している。

好ましいスペーサーは２から６個のアミノ酸からなるオリゴペプチドの残基である。スペーサーを構成するアミノ酸の種類は特に限定されないが、例えば、L-又はD-アミノ酸、好ましくはL-アミノ酸を用いることができ、α－アミノ酸のほか、β－アラニン、ε－アミノカプロン酸、γ－アミノ酪酸などを用いてもよい。

このようなα－アミノ酸以外のアミノ酸は、スペーサー中で多糖化合物に近接した位置に配置されることが好ましい。

例えばオリゴペプチドスペーサーを用いる場合の結合方向は特に限定されないが、一般的には、カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールのカルボキシル基にスペーサーのＮ末端を酸アミド結合によって結合し、医薬化合物のアミノ基にスペーサーのＣ末端を結合することできる。また、例えば、ペプチドスペーサの構成単位としてリジン残基を含めておき、リジン残基のα－アミノ基及びε－アミノ基をそれぞれ他のアミノ酸のカルボキシル基と酸アミド結合させると、ペプチドスペーサーの両末端がＮ末端になるので、医薬化合物のカルボキシル基を結合することが可能になる。さらに、スペーサー中に１個又は２個以上のジアミン化合物またはジカルボン酸化合物の残基（例えばエチレンジアミンなどのジアミンの残基やコハク酸などのジカルボン酸の残基など）を構成単位として含めておき、それぞれ両末端がＮ末端のスペーサー及び両末端がＣ末端のスペーサーを利用してもよい。

オリゴペプチドからなるスペーサーを用いる場合のアミノ酸配列は特に限定されないが、例えば、スペーサーが -X-Z-で表されるジペプチドの残基（X は疎水性アミノ酸の残基を示し、Z は親水性アミノ酸の残基を示し、-X-Z-は疎水性アミノ酸(X)と親水性アミノ酸(Z) とがそれぞれＮ末端側及びＣ末端側となってペプチド結合したジペプチドのＮ末端のアミノ基及びＣ末端のカルボキシル基からそれぞれ１個の水素原子及び１個の水酸基を除いた残基を意味する）であるか、又は該ジペプチドの残基を部分ペプチド配列として含むスペーサーを好適に用いることができる。疎水性アミノ酸としては、例えば、フェニルアラニン、チロシン、ロイシンなどを用いることができ、親水性アミノ酸としては、例えば、グリシン、アラニンなどを用いることができる。スペーサーがこのようなジペプチド残基の繰り返し配列（例えば-X-Z-X-Z-，-X-Z-X-Z-X-Z-など）を有していてもよい。

このようなジペプチド構造を含むスペーサーを用いると、スペーサーがペプチダーゼが豊富であると考えられる腫瘍部位や炎症部位で加水分解され、当該部位

において短時間に高濃度の医薬化合物が遊離する。従って、上記ジペプチドを含むスペーサーと医薬化合物とが結合して形成される部分構造は、本発明のＤＤＳ化合物の好ましい部分構造である。医薬化合物の残基として、濃度に依存型の抗腫瘍剤（例えば、ドキソルビシンなど）の残基を用いる場合には、-X-Z-で示される上記のジペプチド残基からなるスペーサー又は該ジペプチド残基を部分ペプチド配列として含むスペーサーを用いることが好ましい。

また、医薬化合物の残基として、一定の濃度以上で作用時間の持続を必要とする時間依存型の抗腫瘍剤を用いる場合にも、上記のスペーサーを用いることによって高い抗腫瘍効果を達成できる場合がある。このような抗腫瘍剤として、例えば、特開平6-87746号公報に記載された抗腫瘍剤、好ましくは請求項２に記載された抗腫瘍剤が挙げられる。一般的には、上記のスペーサーに限定されることなく、抗腫瘍剤の作用機構、体内動態や毒性発現の特徴、体内での抗腫瘍剤の遊離性などの観点から好ましいスペーサーを選択する必要がある。なお、一般的に、増殖の速い癌種に対しては、短時間に高濃度の医薬化合物を遊離することができる上記のスペーサーを選択することが好ましい。

スペーサーとして利用可能なオリゴペプチドの具体例を以下の表に示すが、ＤＤＳ化合物に必要に応じて用いられるスペーサーは以下のものに限定されることはなく、スペーサーを利用すべきか否かの選択、あるいはスペーサーを用いる場合にその種類の選択は、医薬化合物の至適な遊離速度を与えるように当業者が適宜なしうることはいうまでもない（表中、ペプチド配列は左側がＮ末端であり、Ｃ末端側に医薬化合物の残基が結合する。D-Pheは D-フェニルアラニン残基を示し、その他のアミノ酸はL-アミノ酸を示す。なお、遊離速度の大小はドキソルビシンを結合したＤＤＳ化合物の Walker 256 担癌ラットに対する薬効の発現程度、またはWalker 256担癌ラットの腫瘍部位における遊離ドキソルビシン濃度によって判定した。）。これらのスペーサーのうち、ドキソルビシンに対しては（N 末端）-Gly-Gly-Phe-Gly-等の短時間に高濃度の医薬化合物を遊離することができるスペーサーを用いることが好ましい。

表 1

(a) 遊離速度が大きいスペーサー

-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) 遊離速度が比較的大きいスペーサー

-Gly-Gly-Phe-Phe-

-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-

(c) 遊離速度が比較的小さいスペーサー

-Phe-Phe-

-Ala-Gly-

-Pro-Gly-

-Gly-Gly-Gly-Phe-

(d) 遊離速度が小さいスペーサー

-Gly-

-D-Phe-Gly-

-Gly-Phe-

-Ser-Gly-

-Gly-Gly-

-Gly-Gly-Gly-

-Gly-Gly-Gly-Gly-

本発明のＤＤＳ化合物は、高分子キャリアーとして、糖化合物で修飾されたカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールを有することを特徴としている。本発明のＤＤＳ化合物におけるカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールのポリアルコール化度は特に限定されないが、カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールを構成するデキストランポリアルコールが、実質的に完全にポリアルコール化可能な条件下においてデキストランを処理して得られたデキストランポリアルコールであることが好ましい。

カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールを製造するために用いるデキストランの種類は特に限定されず、α-D-1,6-結合を任意の割合で含んでいてもよい。例えば、α-D-1,6-結合の割合が 85%以上、90% 以上、又は 95% 以上のデキストランなどを用いることができる。デキストランの分子量は特に限定されないが、例えば 1,000 程度から 2,000,000 程度のもの、好ましくは 3,000 程度から 800,000 程度のものを用いることができる。カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールのカルボキシ C_{1-4} アルキル基を構成する C_{1-4} アルキルとしては、直鎖又は分枝鎖の C_{1-4} アルキル、具体的にはメチル基、エチル基、n-プロピル基、イソプロピル基、n-ブチル基、sec-ブチル基などを用いることができるが、好ましくはメチル基を用いることができる。

出発原料としてデキストランを用いる場合には、デキストランに大過剰の過ヨウ素酸ナトリウムと水素化ホウ素ナトリウムとを順次作用させてデキストランを実質的に完全にポリアルコール化したデキストランポリアルコールを製造することができる。もっとも、デキストランのポリアルコール化の方法は上記のものに限定されることはなく、当業者に利用可能なものであればいかなる方法を採用してもよい。カルボキシ C_{1-4} アルキル化は、例えば、デキストランポリアルコールの水酸基に対してクロル酢酸、ブロム酢酸、α－クロルプロピオン酸、α－メチル－α－クロルプロピオン酸、β－クロルプロピオン酸、α－メチル－β－クロルプロピオン酸、α－クロル酪酸、β－クロル酪酸、γ－クロル酪酸などのハロゲン化 C_{1-4} アルキルカルボン酸、好ましくはクロル酢酸を反応させて水酸基を部

分的又は完全にカルボキシ C_{1-4} アルキル化することにより行うことができる。

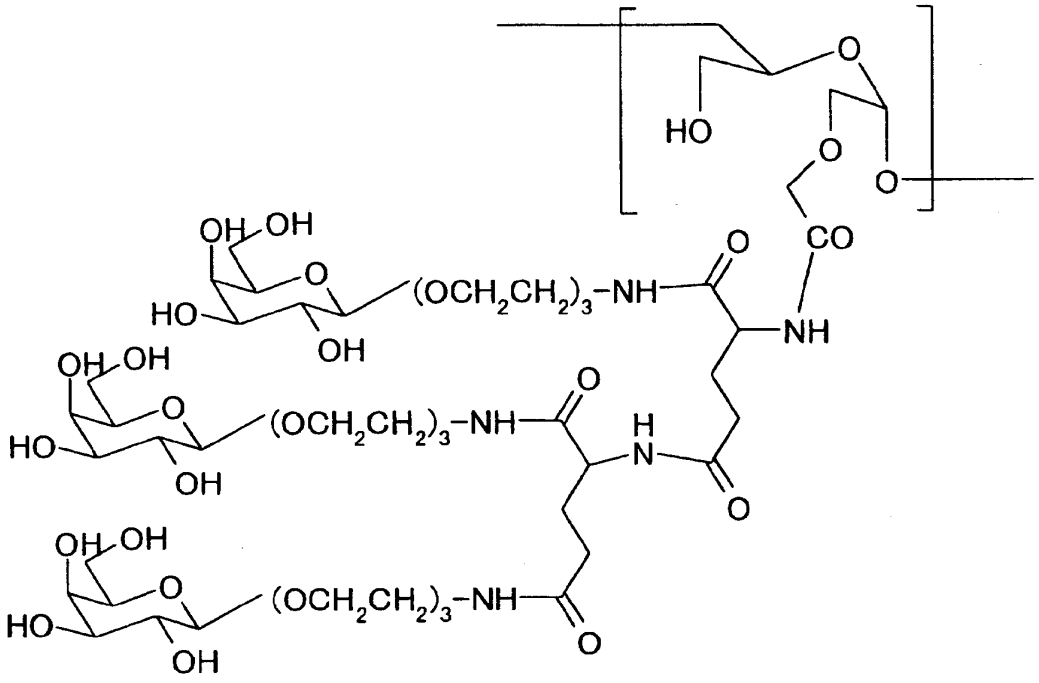
例えば、デキストランポリアルコールを反応に関与しない不活性溶媒(例えば、水、N,N-ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド等）に溶解し、塩基（例えば、水酸化ナトリウムや水酸化カリウム等）の存在下にハロゲン化 C_{1-4} アルキルカルボン酸またはその塩を添加し、氷冷下ないし100℃程度の温度範囲で数分ないし数日間反応させればよい。カルボキシ C_{1-4} アルキル基の導入の程度は、例えば、カルボキシ C_{1-4} アルキル化の反応温度や試薬として用いるハロゲン化 C_{1-4} アルキルカルボン酸及び塩基の量を適宜選択することにより容易に調節可能であり、そのような手段は当業者に周知である。デキストランポリアルコールの糖残基に対するカルボキシ C_{1-4} アルキル化の程度は特に限定されないが、例えば、0.01～2.0の範囲、好ましくは0.1～1.0の範囲である。

カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールを修飾する糖化合物の種類は特に限定されず、ＤＤＳ化合物が指向すべき臓器の種類や体内動態などの条件に応じて当業者が適宜選択可能である。糖化合物としては単糖類若しくはオリゴ糖類、又はそれらの誘導体のいずれを用いてもよい。また、糖化合物とカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールとの結合の種類は特に限定されない。糖化合物とカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールとが、例えば、O-α-グリコシド結合又はO-β-グリコシド結合などにより直接結合していてもよく、あるいは適宜のリンカーを介して両者が結合していてもよい。本明細書において用いられる「リンカー」という用語は、糖化合物残基とカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールとの結合に用いられるいかなるものも包含するように、最も広義に解釈する必要がある。カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールに対する糖化合物の導入量（置換度）は特に限定されず、糖化合物の種類、所望の指向性の程度、医薬化合物の種類など種々の条件によって適宜選択可能であるが、一般的には、カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールの糖残基あたり0.01-1.0程度である。

リンカーを用いる場合、リンカーの種類は特に限定されないが、例えば、

-O-$(CH_2)_n$-NH-（nは1から16の整数）又は-(O-$CH_2CH_2)_m$-NH-（mは1から10の整数）で表されるリンカーを利用することが好ましい。これらのリンカーの0末端又はN末端、好ましくは0末端を糖化合物に0-α-グリコシド結合又は0-β-グリコシド結合で結合し、他端をカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールのカルボキシル基とアミド結合又はエステル結合させることにより、カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールを糖化合物で修飾することが可能である。

また、いわゆるクラスター修飾に適するリンカーを用いることにより、クラスター修飾体を製造することもできる。クラスター修飾体は、カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールのカルボキシル基に対してクラスター修飾に適するリンカーを用いて糖化合物を房状に結合させた化合物であり、その具体的手段は、例えば、特許第2774417号明細書、特許第2774429号明細書、又はBiol. Pharm. Bull., 20, pp.259-266, 1997 などに記載されている。クラスター修飾体は複数個の糖化合物を一定の空間内に配置するために、レセプターとの親和性が高まり、優れた臓器指向性を発揮できるという特徴がある。本発明のＤＤＳ化合物におけるクラスター修飾の一例を下記に示す（下記の構造式では、クラスター修飾されたカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコール分子の部分構造を示してあり、医薬化合物の残基は省略してある）。もっとも、本発明のＤＤＳ化合物に利用可能なクラスター修飾方法は下記の具体例に限定されることはなく、当業者が適宜の手段を選択できることは言うまでもない。



単糖類としては、グルコース、フルクトース、マンノース、ガラクトース、フコース、ノイラミン酸、ウロン酸などのヘキソース；ガラクトサミン、グルコサミンなどのヘキソサミン；リボース、デオキシリボース、アラビノース、キシロースなどのペントースなどを挙げることができる。これらの誘導体として、例えば、N-又はO-アシル誘導体、O-アルキル誘導体、硫酸エステル、リン酸エステルなどを用いてもよい。単糖類の誘導体として、より具体的には、N-アセチルノイラミン酸、N-アセチルガラクトサミン、N-アセチルグルコサミン、マンノース-6-リン酸、ガラクトース-3-リン酸、6-O-ベンゾイルグルコース、6-O-カルボキシメチル-N-アセチルグルコサミン、2-N-ベンジルグルコサミンなどを挙げることができる。オリゴ糖類としては、例えば、上記の単糖類又はそれらの誘導体から構成される直鎖状又は分枝鎖状のヘテロオリゴ糖又はホモオリゴ糖を用いることができる。より具体的には、シュークロース、シアリルルイスA、シアリルルイスX、ラクトース、マルトース、ルイスX、硫酸化ルイスXなどを用いることができる。

これらのうち、肝臓指向性を高める糖化合物としては、ガラクトース若しくはガラクトサミン又はその誘導体、あるいはガラクトース又はN-アセチルガラクトサミンを非還元末端側に有するオリゴ糖（例えばラクトース）が好ましく、特にガラクトース又はN-アセチルガラクトサミンが好ましい。

本発明のＤＤＳ化合物の製造方法は特に限定されないが、以下に一般的な製造方法を示す。また、その一例を本明細書の実施例に具体的かつ詳細に示した。当業者は、下記の一般的説明及び実施例に記載された製造方法を参照しつつ、製造原料、反応試薬、及び反応条件などを適宜選択し、必要に応じてそれらの方法に修飾や改変を加えることにより、本発明に包含されるＤＤＳ化合物を容易に製造することが可能である。一般的には、カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールを適宜の方法に従って糖化合物で修飾し、該修飾体を医薬化合物の残基又は医薬化合物に結合したスペーサーと反応させることにより、本発明のＤＤＳ化合物を製造することができる。通常は、カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールをナトリウム塩又はカリウム塩などのアルカリ金属塩の形態の水溶液として調製し、糖化合物の修飾及び医薬化合物（又は医薬化合物に結合したスペーサー）との反応を水中、又は含水有機溶媒中で行うことができる。

あるいは、カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコール又は糖化合物で修飾されたカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールを有機アミン塩の形態に変換し、その後の反応を実質的に水を含まない有機溶媒中で行うことも可能である。有機アミンの塩としては、例えば、トリエチルアミン、トリメチルアミン、トリエタノールアミンなどの脂肪族アミン類の塩のほか、N-メチルピロリジン、N-メチルピペリジン、N-メチルモルホリン、ジメチルアミノピリジンなどの脂環式又は芳香族アミン類の塩、塩化テトラメチルアンモニウム、塩化テトラエチルアンモニウムなどの四級アンモニウム塩などを用いることができる。カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコール又は糖化合物で修飾されたカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールのナトリウム塩から有機アミンの塩への変換は、イオン交換樹脂などを用いて行うことができる。例えば、

カルボキシメチルデキストランポリアルコール又はその糖化合物修飾体のナトリウム塩を水に溶解し、Bio-Rad AG50W-X2 (200-400 メッシュ、H^+型) 樹脂を充填したカラムに付して水で溶出した後、トリエチルアミンなどの有機アミンを添加して凍結乾燥することができる。また、カルボキシメチルデキストランポリアルコール又はその糖化合物修飾体のナトリウム塩を水に溶解し、トリエチルアンモニウム型の樹脂を通過させることによって一工程で変換を行うことも可能である。

医薬化合物自体とカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールのカルボキシル基との結合、又は医薬化合物を結合させたスペーサーとカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールのカルボキシル基との結合は、一般的には、医薬化合物自体が有する反応性アミノ基又はスペーサーの反応性アミノ基 (ペプチドスペーサーではN末端アミノ基など) とカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールのカルボキシル基とを、酸アミド結合させればよい。もっとも、スペーサーとカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールのカルボキシル基との結合は上記のものに限定されることはなく、他の化学結合や１又は２以上のスペーサーを利用した結合であってもよい。例えば、ペプチドスペーサーのC末端カルボキシル基又は医薬化合物のカルボキシル基とカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールのカルボキシル基とにより酸無水物を形成させてもよく、また、エチレンジアミン等のジアミン化合物をスペーサーとして用いてそれぞれのカルボキシル基をジアミンの各アミノ基に酸アミド結合させてもよい。

医薬化合物自体が有する反応性アミノ基又はペプチドスペーサーのN末端アミノ基とカルボキシメチルデキストランポリアルコールのカルボキシル基とを酸アミド結合により結合させる場合には、ペプチド鎖の合成に用いる通常の脱水縮合剤、例えば、N,N'- ジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC) のような N,N'-ジシクロアルキルカルボジイミド類、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド(EDAPC) 等のカルボジイミド誘導体、1-エトキシカルボニル-2- エトキシ-1,2- ジヒドロキシキノリン (EEDQ) などを用いることができる。この場合、必要に応じて 1-ヒドロキシベンゾトリアゾール(HOBT)のようなベンゾトリアゾ

ール誘導体を加えてもよい。また、活性エステル法や酸ハライド法などにより反応を行ってもよい。

反応を非水系で行う場合の溶媒としては、実質的に水を含まない有機溶媒であって、反応種（糖化合物で修飾されたカルボキシメチルデキストランポリアルコールの有機アミンの塩及び医薬化合物又は医薬化合物を結合させたスペーサーなど）を溶解することができるものならばいかなるものを用いてもよい。例えば、N,N-ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド、アセトアミド、N-メチルピロリドン、スルホランなどを用いることが好適である。糖化合物で修飾されたカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールに導入される医薬化合物の残基の量は特に限定されないが、医薬化合物の残基の種類、並びにＤＤＳ化合物の体内動態、薬効、及び毒性などの観点から適宜選択すべきである。一般的には、0.1 ～30 重量%、好ましくは 2～15 重量%程度の範囲を選択することができる。医薬化合物として特開平 6-87746 号公報の請求項２に記載された抗腫瘍剤を用いる場合の導入量は、例えば 1～15 重量%、好ましくは 4～8 重量%程度である。カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールに導入された医薬化合物の残基の割合は、例えば、吸光度分析などにより容易に決定することが可能である。

例えば、医薬化合物として特開平 6-87746 号公報の請求項２に記載された抗腫瘍剤を用いる場合、この医薬化合物は、酸性水性媒体中（例えば pH3 程度）ではラクトン環を形成した化合物（閉環体）に平衡が偏り、一方、塩基性水性媒体中（例えば pH10 程度）ではラクトン環が開環した化合物（開環体）に平衡が偏ることが知られている。このような閉環体及び開環体に対応する残基を導入したＤＤＳ化合物は同等の抗腫瘍効果を有しているが、糖化合物で修飾されたカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールと上記医薬化合物を結合させたスペーサー（例えばオリゴペプチドスペーサー）とを反応させる場合に開環型の反応種が反応系に存在すると、ラクトン環に由来するカルボキシル基とスペーサー由来のアミノ基との間で縮合反応が進行し、著しく反応収率が低下するだけでなく、目的とする均一なＤＤＳ化合物が得られない場合がある。このような副反応は、

平衡が達成されない非水系において反応種として閉環体を用いることにより回避することができる。

本発明のＤＤＳ化合物は、医薬化合物の残基の種類（例えば、抗腫瘍剤または抗炎症剤などの医薬化合物の残基）に応じて、所望の医薬活性を腫瘍部位や炎症部位などの局所において特異的に発現させることができ、かつ、医薬化合物自体の有する毒性を低減できるという特徴を有する。また、本発明のＤＤＳ化合物は優れた血管透過性を有している。腫瘍部位や炎症部位ではプロテアーゼ（ペプチダーゼ）が発現されているため、オリゴペプチドからなるスペーサーを有するＤＤＳ化合物はスペーサー部分で容易に加水分解され、遊離した医薬化合物が細胞内に移行して薬効を発揮するか、または標的細胞の糖を認識するレセプターを介してＤＤＳ化合物が細胞内に取り込まれ、プロテアーゼにより遊離した薬物が薬効を発揮する。

また、カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールは生体内、例えば肝臓、脾臓、又は骨髄などで異物高分子として認識される程度が低い。このため、これらの臓器への移行性が低く、一方、糖化合物の種類に応じて対応の糖レセプターが豊富な臓器には高濃度で分布するという特徴がある。例えば、ガラクトースで修飾されたカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールを有する本発明のＤＤＳ化合物は、肝臓に対して優れた指向性を有している。従って、医薬化合物として抗腫瘍剤を結合したＤＤＳ化合物は、肝臓癌の治療に有用である。

本発明のＤＤＳ化合物を含む医薬は、通常、凍結乾燥品などの形態でバイアル等に充填することができ、用時溶解型の注射用または点滴用製剤等の非経口投与用製剤として臨床に提供されるが、このような医薬の製剤形態は上記態様に限定されることはない。上記製剤の製造には、例えば、溶解補助剤、pH 調節剤、安定化剤など当業界で利用可能な製剤用添加物を用いることができ、上記製剤は医薬組成物として調製することができる。上記医薬の投与量は特に限定されないが、通常は、医薬化合物の残基を構成する医薬化合物の投与量、ＤＤＳ化合物中に導入された医薬化合物の残基の量、患者の状態や疾患の種類などを勘案して決定す

べきである。例えば、特開平 6-87746 号公報の請求項２に記載された抗腫瘍剤の残基が約６重量％ 程度の割合で導入されたＤＤＳ化合物を投与する場合には、非経口投与の場合には、一般に一日あたり体表面積 1 m^2 につき約 0.1～100 mg 程度、好ましくは約 1～30 mg の範囲で一回投与し、3～4 週毎に投与を繰り返すことが好ましい。

別の観点からは、本発明により、ペプチド結合した２から８個のアミノ酸を含むスペーサーを介して高分子キャリアーと医薬化合物の残基とが結合したＤＤＳ化合物の測定方法であって、該ＤＤＳ化合物をペプチダーゼで処理することにより得られる加水分解物を測定する工程を含む方法が本発明により提供される。

本明細書において用いられる「測定」という用語は、定量、定性などを目的として行われる測定を含めて、最も広義に解釈する必要があるが、好ましくは定量を意味している。本発明の測定方法の対象となるＤＤＳ化合物は、ペプチド結合した２から８個のアミノ酸を含むスペーサーを介して高分子キャリアーと医薬化合物の残基とが結合した化合物であり、いかなる意味においても限定的に解釈してはならない。ペプチド結合した２から８個のアミノ酸を含むスペーサーとしては、ペプチド結合した２から８個のアミノ酸のみからなるスペーサのほか、ペプチド結合した２から８個のアミノ酸からなるオリゴペプチドに-NH-Y-CO-［式中、Y は炭素数１から８個のアルキレン基又は$-C_6H_4-CH_2-O-$（$-C_6H_4-$はフェニレン基を示し、該フェニレン基は１又は２個以上の置換基を有していてもよく、好ましくは p－フェニレン基である）で表される基を示す］で表される連結基が結合したスペーサーなどを挙げることができる。本発明の測定方法は、例えば、血液や体液などの生体試料に含まれるＤＤＳ化合物自体の濃度を測定するために用いることができる。また、本発明の方法は、ＤＤＳ化合物に導入された医薬化合物の残基の導入量（例えば、ＤＤＳ化合物全重量に対する医薬化合物の残基の重量％など）を測定するために用いることができる。

本発明の方法の測定対象であるＤＤＳ化合物に含まれる医薬化合物の残基の意味は上記に説明したものと同義であり、医薬化合物としては、スペーサーとの結

合に関与できる１又は２以上の反応性官能基（例えば、アミノ基、カルボキシル基、水酸基、チオール基、エステル基など）を有するものであればいかなるものを用いてもよい。医薬化合物の残基は、スペーサーのＮ末端アミノ基若しくはＣ末端カルボキシル基、又はスペーサーを構成するアミノ酸に存在する反応性官能基に結合していてもよい。

医薬化合物の残基の具体例は、糖化合物で修飾されたカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールと医薬化合物の残基とがスペーサーを介して結合した上記ＤＤＳ化合物について説明したとおりであり、好適に用いることができる医薬化合物の残基も同様である。

本発明の方法の測定対象であるＤＤＳ化合物に含まれる医薬化合物の残基の意味はスペーサーを介して高分子キャリアーと結合するが、好ましいスペーサーは、ペプチド結合した２から８個のアミノ酸からなるオリゴペプチドの残基、又はペプチド結合した２から８個のアミノ酸からなるオリゴペプチドに -NH-Y'-CH_2-O-CO-（式中、Y'はｐ－フェニレン基を示す）で表される連結基が結合したスペーサーであり、スペーサーを構成するアミノ酸の種類、スペーサーの結合方向、アミノ酸配列、具体例などは、糖化合物で修飾されたカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールと医薬化合物の残基とがオリゴペプチドスペーサーを介して結合した上記ＤＤＳ化合物について説明したものと同様である。

本発明の方法の測定対象であるＤＤＳ化合物を構成する高分子キャリアーとしては、例えば、多糖誘導体のほか、合成高分子などを用いることができる。多糖誘導体及び合成高分子としては、生体に対して実質的に毒性を示さず、薬物担体として作用できるものであればいかなるものを用いてもよい。例えば、ＤＤＳ化合物の製造に従来より用いられている多糖誘導体及び合成高分子はいずれも高分子キャリアーとして利用可能である。例えば、カルボキシル基を有する多糖誘導体を好適に使用でき、ポリアルコール化多糖誘導体は特に好適に使用できる。また、合成高分子としては、例えば、ポリエチレングリコール類；ポリグルタミン酸、ポリアスパラギン酸、若しくはポリリジンなどのポリアミノ酸類；または

N-(2-ヒドロキシプロピル)メタクリルアミド誘導体などのポリビニル化合物の誘導体を挙げることができる。

より具体的には、カルボキシル基を有する多糖誘導体としては、例えば、多糖類又はそれらを化学的若しくは生物学的に修飾した誘導体を用いることができ、好ましくは分子中にカルボキシル基を有するものを用いることができる。分子中にカルボキシル基を有する高分子キャリアーの例としては、ヒアルロン酸、ペクチン酸、アルギン酸、コンドロイチン、ヘパリンなどの多糖類のほか、プルラン、デキストラン、マンナン、キチン、イヌリン、レバン、キシラン、アラバン、マンノグルカン、キトサンなどの多糖の一部又は全部の水酸基に対してカルボキシル基を有する官能基を導入したものなどを用いることができる。例えば、水酸基をカルボキシ C_{1-4} アルキル化したものや、水酸基に多塩基酸の一のカルボキシル基をエステル結合させたものなどを好適に用いることができる。また、上記の多糖類をポリアルコール化した後に、カルボキシル基を有する官能基を導入したものを用いてもよい。

カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールを高分子キャリアーとして用いたＤＤＳ化合物は本発明の方法の特に好適な測定対象である。カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールのポリアルコール化度、製造に用いるデキストランの種類、及び製造方法などは、糖化合物で修飾されたカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールと医薬化合物の残基とがスペーサーを介して結合した上記ＤＤＳ化合物について説明したものと同様である。

また、高分子キャリアーとして糖化合物で修飾された高分子キャリアーを用いたＤＤＳ化合物も本発明の測定方法の好適な対象である。例えば、糖化合物で修飾されたカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールなどを高分子キャリアーとして好適に用いることができる。高分子キャリアーを糖化合物で修飾する方法や糖化合物の種類などは、糖化合物で修飾された上記のカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールについて説明したものと同様である。

本発明の測定方法の対象は、いわゆるクラスター修飾に適するリンカーを用い

て製造されたＤＤＳ化合物（いわゆるクラスター修飾体）であってもよい。クラスター修飾の概念は、糖化合物で修飾された上記のカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールについて説明したものと同様である。

本発明の方法は、上記のＤＤＳ化合物を測定するにあたり、ＤＤＳ化合物にペプチダーゼを作用させて得られる加水分解物を測定することを特徴としている。ペプチダーゼとしては、ＤＤＳ化合物のスペーサーに含まれるオリゴペプチド部分（２から８個のアミノ酸がペプチド結合したオリゴペプチド部分）を加水分解することができるものであれば、その種類は特に限定されない。例えば、スブチリシン、α-キモトリプシン、タイプ IV コラゲナーゼ、ペプシン、サーモリシン、パパイン、エラスターゼなどを用いることができるが、これらのうち、α-キモトリプシン又はパパインが好ましい。

加水分解物の種類は特に限定されないが、紫外線吸収スペクトル、蛍光スペクトルなどの通常の分光学的手法により検出可能であることが望ましい。通常は、加水分解物として、医薬化合物自体のほか、スペーサーの一部が残存して医薬化合物の残基に結合している化合物、例えばスペーサー由来の１個のアミノ酸が結合した医薬化合物、スペーサー由来の２から８個のアミノ酸からなるオリゴペプチドが結合した医薬化合物、又は-NH-Y-CO-［式中、Ｙは炭素数１から８個のアルキレン基又は-C_6H_4-CH_2-O-（-C_6H_4-はフェニレン基を示し、該フェニレン基は１又は２個以上の置換基を有していてもよく、好ましくは ｐ－フェニレン基である）で表される基を示す］で表される連結基を介してスペーサー由来の１個のアミノ酸若しくは上記オリゴペプチドが結合した医薬化合物などを測定することができる。また、上記の加水分解物においては、医薬化合物の反応性官能基の一部又は全部が加水分解を受けていてもよい。ＤＤＳ化合物の種類に応じて適宜のペプチダーゼを選択することにより、所望の加水分解物を測定することが可能になる。

測定のための試料としては、ＤＤＳ化合物を投与した動物（ヒトを含む）から分離された血液、リンパ液、唾液、尿、糞、摘出組織などの生体試料のほか、ＤＤＳ化合物の水溶液、又は実質的に酵素反応を阻害しない水性有機溶媒の溶液な

どを用いることができる。各種のペプチダーゼについて好適な反応条件が当業界で知られており、当業者は、ペプチダーゼの種類に応じて適宜の反応条件、例えば、基質濃度、ｐＨ、緩衝液、反応温度、反応時間などを容易に選択することができる。通常は、上記の試料を必要に応じてホモジュネートや脱蛋白質などの前処理に付した後、ＤＤＳ化合物が所望の基質濃度となるように希釈した反応液にペプチダーゼを添加し、ＤＤＳ化合物が完全に加水分解されるまで反応を継続すればよい。

加水分解物を測定する方法は特に限定されないが、ＤＤＳ化合物の定量、又は医薬化合物の導入量の定量を行う場合には、加水分解物の性質に応じて、紫外線吸収スペクトル測定、蛍光スペクトル測定など、通常の分光学的手法を単独で又は複数組み合わせて用いることが望ましい。また、高速液体クロマトグラフィーなどの分離操作を適宜組み合わせて測定を行ってもよい。予め測定系において検量線を作成することにより、精度よく定量を行うことが可能になる。なお、本明細書の実施例には、本発明の方法の代表例が具体的かつ詳細に説明されているので、当業者は、上記の一般的説明及び実施例の具体的説明に基づいて、必要に応じてそれらに適宜の改変ないし修飾を加えることにより、本発明の方法を容易に実施できる。

実施例

以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明の範囲は下記の実施例に限定されることはない。

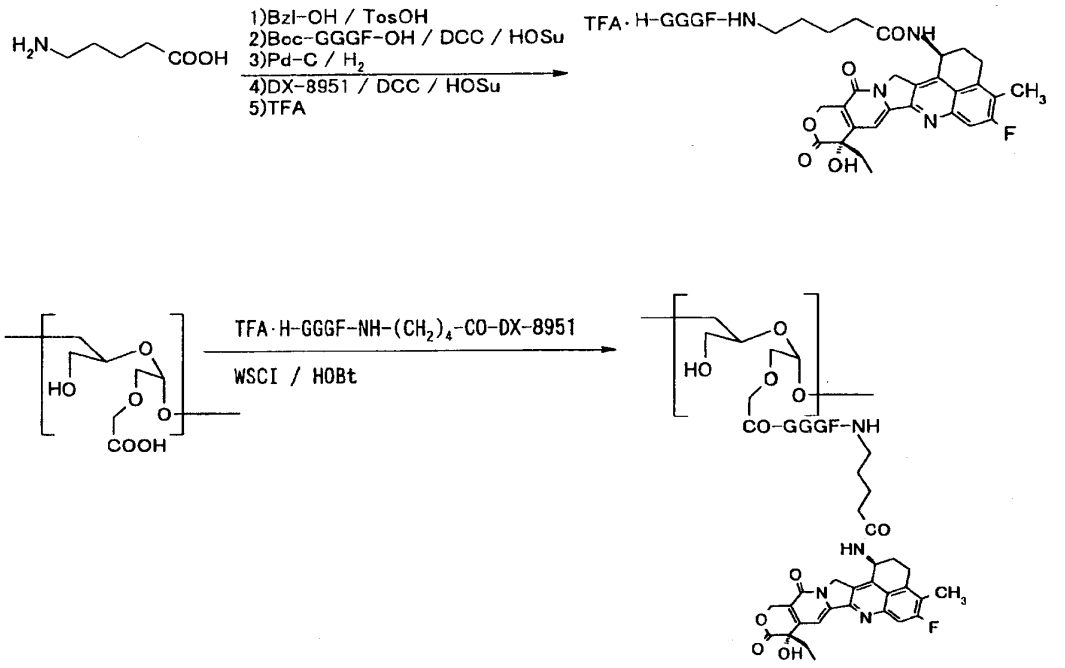
例１

高分子キャリアーであるカルボキシメチルデキストランポリアルコール（以下CM-Dex-PA又はCMデキストランポリアルコールなどの略号を用いる場合がある）と抗腫瘍剤(特開平6-87746号公報の請求項２に記載された(1S,9S)-1-アミノ-9-エチル-5-フルオロ-2,3-ジヒドロ-9-ハイドロキシ-4-メチル-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオン：以下、

実施例においてDX-8951と略す。）とが、-Gly-Gly-Phe-Gly-（オリゴペプチドはN末端側からの配列として示す。以下、同様である）からで表されるテトラペプチドスペーサーを介して結合したＤＤＳ化合物(化合物１)を、国際公開WO97/46260号の実施例15に記載の方法に準じて製造した。CM-Dex-PAとしては、平均分子量228K、カルボキシメチル化度（構成糖残基あたりのカルボキシメチル基の置換度）0.4のものを用いた。

蒸留水にて400 μg/mlに調製した上記ＤＤＳ化合物10μlを180μlのBritton Robinson緩衝液（pH6.0）に添加し、さらに蒸留水で10mg/mlに調製したα-キモトリプシン溶液を10 μl添加した。反応液を40℃で２時間インキュベートした後、50%のアセトニトリルを含有した0.5 N HCl溶液を200 μl加え、遊離した加水分解物（スペーサー由来のグリシンがDX-8951のアミノ基にペプチド結合した化合物：国際公開WO97/46260号の実施例50に記載の化合物、以下、G-DX-8951と略す）をHPLCにて定量した。HPLC測定は、Symmetry C18 (4.6×100 mm；3.5 μm, Watars社）カラムを用い、有機溶媒（メタノール：アセトニトリル=1：2）を36.5%含有する0.1M酢酸ナトリウム(pH5.0)にて溶出を行い、蛍光スペクトル測定（Ex.375 nm及びEm.445 nm）により加水分解物を検出した。この結果、上記DDS化合物のDX-8951含有量は5.7%であった。一方、DX-8951のUV吸収（366 nm）を指標とし、分光光度計を用いて上記DDS化合物のDX-8951含有量を算出したところ4.9%であった。

例２



CM-Dex-PAとDX-8951とが-Gly-Gly-Gly-Phe-NH-$(CH_2)_4$-CO-で表されるスペーサーを介して結合したＤＤＳ化合物（化合物２）を下記のようにして製造した。５－アミノペンタノイックアシッド(1.0 g)と p-トルエンスルホン酸(1.95 g)とベンジルアルコール(5 ml)をトルエン(50 ml)中、140℃で Dean-Stark を用いて、生成する水を除去しながら５時間反応させた。反応液を濃縮し、得られた残さにエーテルを加えて固化した。得られた固体を濾過し、エーテルで洗浄して乾燥させ、５－アミノペンタノイックアシッドベンジルエステルのトシル酸塩を 2.9g 得た。

Boc-Gly-Gly-Gly-Phe-OH (575 mg)、HOSu (182 mg)、及び DCC (326 mg)を DMF (20 ml)に溶解し、30 分間攪拌した。この溶液に 5-アミノペンタノイックアシッドベンジルエステルのトシル酸塩 (500 mg)とトリエチルアミン (0.184 ml)を DMF (10 ml)に溶かした溶液を加え、室温で３日間攪拌した。反応液を濃縮し、残査をカラムクロマトグラフィー (CH_2Cl_2:MeOH=20:1)で精製し、Boc-Gly-Gly-Gly-Phe-NH-$(CH_2)_4$-COOBzl を 380 mg 得た (Bzl はベンジル基を示す)。 Boc-Gly-Gly-Gly-

Phe-NH-$(CH_2)_4$-COOBzl (380 mg)を 50% 含水メタノール (20 ml) に溶かし、5% Pd-C (50% 含水)(300 mg)を加え、水素常圧下、1晩撹拌した。反応液中の触媒を濾去し、濃縮乾固し、Boc-Gly-Gly-Gly-Phe-NH-$(CH_2)_4$-COOH を 330 mg 得た。

Boc-Gly-Gly-Gly-Phe-NH-$(CH_2)_4$-COOH (150 mg) と DCC (70 mg) と HOSu (40 mg) を DMF に溶かし、30 分撹拌した。この溶液に、DX-8951 (160 mg) とトリエチルアミン (0.040 ml) を DMF に溶かした溶液を加え、室温で 1 晩撹拌した。反応液を濃縮し、得られた残査をカラムクロマトグラフィー (CH_2Cl_2:MeOH=20:1) で精製して、Boc-Gly-Gly-Gly-Phe-NH-$(CH_2)_4$-CO-DX-8951 を 110 mg 得た。Boc-Gly-Gly-Gly-Phe-NH-$(CH_2)_4$-CO-DX-8951 (110 mg) を TFA (2 ml) に溶かし、1時間反応させた後、反応液を濃縮し、得られた残査にエーテルを加え固化させた。上澄みを除去し、固体を乾燥し、H-Gly-Gly-Gly-Phe-NH-$(CH_2)_4$-CO-DX-8951 のトリフルオロ酢酸塩を 100mg 得た。

^{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)

特開平 8-144421 号公報の実施例 13 に記載の方法に準じて製造した平均分子量 337K、カルボキシメチル化度 (構成糖残基あたりのカルボキシメチル基の置換度) 0.4 の CM-Dex-PA(350mg) を水 (10ml) に溶解した。この溶液に、H-Gly-Gly-Gly-Phe-NH-$(CH_2)_4$-CO-DX-8951 のトリフルオロ酢酸塩 (50 mg) をメタノール (10 ml) に溶かした溶液を加え、さらに、HOBt (7 mg) をメタノール (5 ml) に溶かした溶液を加えた。反応液の pH を 7.0 に調整して水溶性カルボジイミド (10mg)を加え、14 時間撹拌した。さらに、水溶性カルボジイミド(10mg)を加え、2 時間撹拌後に、水溶性カルボジイミド(10mg)を加え、2時間撹拌した。反応液

を超純水で希釈し、限外ろ過膜（50K）を用いて低分子を除去し、凍結乾燥し、得られた粉体を3M食塩水に溶かし、エタノールに滴下し、析出した固体を遠心分離によって分離した。上澄みを除去し、固体を再度水に溶解し、限外濾過膜（50K）で低分子を除去した後、0.22μmのフィルターを通して凍結乾燥し、目的物を280mg得た。

蒸留水にて 2.63 mg/ml に調製した上記ＤＤＳ化合物の溶液10μl に Britton Robinson 緩衝液（pH 6）にて 2 mg/ml に調製した α-キモトリプシン溶液、又はTris-HCl（pH 9）にて 2 mg/ml に調製したサブチリシンＡ溶液を 490μl 添加した。この反応液を 40℃ で２時間インキュベートした後、50% のアセトニトリルを含有した 0.5 N HCl 溶液を 500μl 加え、遊離した加水分解物[NH_2-(CH_2)$_4$-CO-DX-8951]を HPLC にて定量した。HPLC 測定は、Symmetry C18（4.6×100 mm；3.5 μm, Watars 社）カラムを用い、有機溶媒（メタノール：アセトニトリル=1：2）を 32% 含有する 0.1% トリフルオロ酢酸溶液で溶出を行い、蛍光スペクトル測定（Ex.375 nm 及び Em.445 nm）により加水分解物を検出した。この結果、NH_2-(CH_2)$_4$-CO-DX-8951 は約4.8分に溶出された。NH_2-(CH_2)$_4$-CO-DX-8951 を検量線に用いて上記ＤＤＳ化合物中のDX-8951含有量を算出したところ3.2%と算出された。一方、DX-8951 を検量線として上記ＤＤＳ化合物のＵＶ吸収からDX-8951含有量を算出した場合には2.9%と算出された。

例３

①サブチリシンＡ（0.1 M Tris-HCl pH 9.0）②α-キモトリプシン（0.1 M Tris-HCl pH 8.0)、③サーモリシン(0.1 M Tris-HCl/1 mM $CaCl_2$ pH 9.0)を用いて、例１で製造したＤＤＳ化合物（化合物１）のDX-8951含有量を測定した。各酵素用の緩衝液180 μl に 400 μg/ml に調製した化合物１を 10μl 添加した(最終濃度：20 μg/ml)。この混合物に各緩衝液で100 mg/ml に調製した各酵素を 10μl 添加した後（最終濃度：5 mg/ml)、40℃で３時間反応させた。反応後、50% アセトニトリルを含有する 0.5 N HCl 溶液を200μl 添加し、その 10μl を HPLC

で分析した。Symmetry C18 (4.6×250 mm) カラムを用い、有機溶媒 (アセトニトリル：メタノール=2:1) を 31% 含有する 0.1 M AcONa 緩衝液 pH 5.0 で溶出した。蛍光スペクトル測定 (Ex.375 nm 及び Em. 445 nm) により加水分解物を測定し、G-DX-8951、DX-8951、及び化合物 1 のスペーサー由来のフェニルアラニン-グリシンが結合した DX-8951 (FG-DX-8951)をそれぞれ 2 nmol/ml 含有する溶液を用いて作成した検量線により酵素反応溶液中の加水分解物を定量した。この結果、サブチリシンＡとα-キモトリプシンは上記条件によりそれぞれ化合物 1 から G-DX-8951 を 100% 遊離した。また、サーモリシンは FG-DX-8951 を 100%遊離した。

例 4

腹腔内にて継代維持した Meth A 細胞 (1×10^6 cells/mouse) を BALB/c(♂)マウスに腹腔内移植し、5 日後に化合物 1 (DX-8951 含有量：5.2%) を 10 及び 2.5 mg/kg (DX-8951 換算量) で腹腔内投与した。投与後、経時的 (2、4、8、24、及び 48 時間) に心採血し、10 分放置した後、12,000 rpm で 10 分間遠心分離して血清を得た。さらに、その時の癌性腹水を採取した。血清及び癌性腹水 25 μl に 80% メタノール水を 100 μl 添加した後、12,000 rpm で 5 分間遠心分離し、その上清の 25 μl に 0.1 M Tris-HCl pH 8.5/0.1 M $CaCl_2$ を用いて 2 mg/ml に調製したサーモリシン溶液を 225 μl 添加し、50°C で 1 時間反応した。その後、50% アセトニトリル含有 0.5 N HCl を 250 μl 添加し、その 20 μl を HPLC 分析した。カラムとして Symmetry C18 (4.6×100 mm) を用い、メタノールとアセトニトリルの混液 (1：2) を 41% 含む 0.1 M AcONa (pH 5) 溶液にて溶出し、蛍光スペクトル測定 (Ex.375 nm、Em.445 nm) により加水分解物を検出した。その結果、10 mg/kg 投与では、腹水中の化合物 1 の濃度は時間の経過とともに減少したが、血中濃度は投与後次第に上昇して 24 時間で最大値となり、その後、腹水濃度とほぼ同程度に推移した (図 1)。2.5 mg/kg 投与時の腹水及び血中濃度の推移は 10 mg/kg の場合と同様であった。

例5

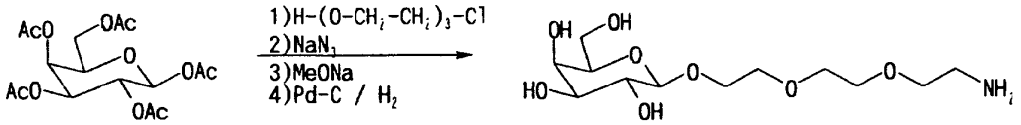
腹腔内にて継代維持した Meth A 細胞（1×10^6 cells/mouse）を BALB/c(♂) マウスに腹腔内移植し、5 日後に化合物 1(DX-8951 含有量：6.6%) を 10 及び 2.5 mg/kg(DX-8951 換算量) で静脈内投与した（1群3匹)。投与後、経時的（5分、30分、2、4、8、24、及び48時間) に心採血し、10分放置した後、12,000 rpm、10分間遠心分離して血清を得た。さらに、その時の癌性腹水を採取した。血清及び癌性腹水 25μl に Britton Robinson Buffer (pH 6) を用いて 2 mg/ml に調製したα-キモトリプシン溶液を 225 μl 添加し、40℃ で2時間反応した。その後、50% アセトニトリル含有 0.5 N HCl を 250 μl 添加し、12,000 rpm、5 分間遠心分離し、その上清の 10 μl を HPLC 分析した。HPLC 分析で得られた G-DX-8951 濃度、及び用いた化合物1の DX-8951 含有量から推定される化合物1の濃度を算出した。HPLC 分析は例4の条件に従って行った。この結果、10 mg/kg 投与時には、血中の化合物1濃度は時間の経過とともに減少した。腹水での化合物1の濃度は投与後次第に上昇し、48 時間で血中濃度とほぼ同程度になった（図2)。2.5 mg/kg 投与時における化合物1の腹水中及び血中の濃度推移は、10 mg/kg の場合と同様であった。

例6

糖化合物で修飾された高分子キャリアーを有するＤＤＳ化合物を以下のようにして製造した。下記のスキームにおいて、糖鎖の構成単位としてカルボキシメチル基が導入された1個又は2個の構成単位を例示的に記載したが、実施例に記載したＤＤＳ化合物のカルボキシメチルデキストランポリアルコール部分は、上記構成単位の繰り返しによって構成されるものではないことを理解すべきである。また、カルボキシメチルデキストランポリアルコールのカルボキシメチル化度(構成糖残基あたりのカルボキシメチル基の置換度）は、カルボキシメチルデキストランポリアルコールのナトリウム塩を遊離酸型に変換した後、0.1N 水酸化ナトリウム水溶液に溶解して 0.1N 塩酸で滴定することにより求めた。カルボキシメチ

ルデキストランポリアルコールのナトリウム塩の水溶液を Bio-Rad AG50W-x 2(H^+) カラムに付して通過液を凍結乾燥して試料として用いた。この試料を所定過剰量の 0.1N 水酸化ナトリウム水溶液に溶解し、フェノールフタレンを指示薬として 0.1N 塩酸で滴定した。試料の採取量を s(mg)、 0.1N 水酸化ナトリウム水溶液の所定過剰量を a(ml)、 0.1N 塩酸の滴定量を b(ml)とし、カルボキシメチル化度を 13.4(a-b)/[s-5.8(a-b)] の式により求めた。また、薬物の導入量（重量%）は、薬物の特性吸収を利用した吸光度分析（362 nm 付近）から求めた。さらに、ゲル濾過法は次の条件に従って行った（カラム：TSK gel G4000 PW_{XL}、溶離液： 0.1M NaCl、流速：0.8 ml/min、カラム温度：40℃)。

(A)化合物２－２の合成



（２－１） （２－２）

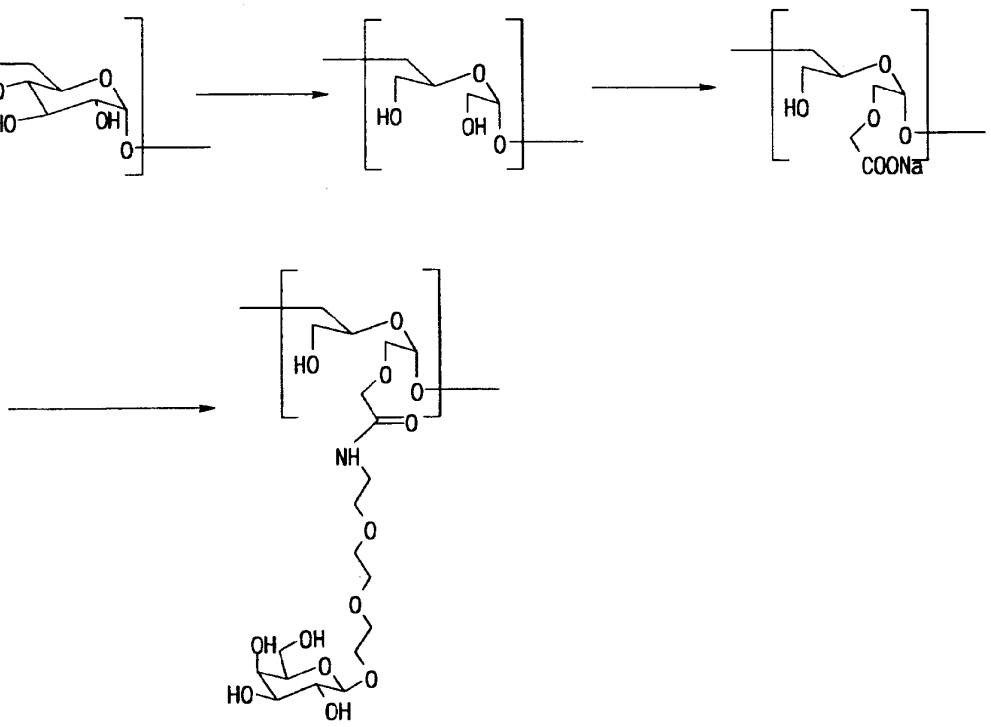
化合物２－１(5.0 g)と 2-[2-(2-クロロエトキシ)エトキシ]エタノール(3.75 ml)をジクロロメタン(75 ml)に溶かし、３フッ化ホウ素エーテル錯体(7.7 g)を加え、５時間撹拌した。反応液をジクロロメタン(100 ml)で希釈し、有機層を水、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、食塩水で洗い、硫酸マグネシウムで乾燥し、硫酸マグネシウムを濾去した後、溶媒を留去し、得られた残渣をシリカゲルを用いるカラムクロマトグラフィー(ヘキサン:酢酸エチル 2:1)で精製し、クロル体を 3.3g 得た。得られたクロル体(3.3 g)と NaN_3(2.0 g)を DMF(15 ml)中で 60℃で２日間撹拌した。溶媒を留去し、酢酸エチルと水の混合液に溶かし、有機層を水洗し、硫酸マグネシウムで乾燥し、硫酸マグネシウムを濾去し、溶媒を留去し、アジド体を 2.8g 得た。

得られたアジド体(1.5 g)をメタノール(30 ml)に溶かし、溶液の pH が 10 になるまで、28% MeONa 含有メタノール溶液を加え、１時間撹拌した。反応液に Dowex

50WX8(H^+)を溶液の液性が中性になるまで加え、樹脂を濾去し、溶媒を留去した。得られた残渣をメタノール(50 ml)と水(10 ml)の混合液に溶かし、5%Pd-C(50%含水)(2.0 g)を加え、水素常圧下1晩撹拌した。触媒を濾去し、溶媒を留去し、化合物2－2を1.2 g得た。

^{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)ガラクトース修飾CMデキストランポリアルコールの合成



デキストラン4(フナコシ社製、平均分子量4000-6000)(20 g)の0.1M酢酸緩衝液(pH5.5)(2000 ml)に、過ヨウ素酸ナトリウム(66.0 g)の水溶液(2000 ml)を加えた。遮光して4℃で10日間撹拌後、エチレングリコール(14.0 ml)を加え、一晩撹拌した。反応液を氷冷下で8M水酸化ナトリウム水溶液を用いてpHを7.5に調整した後、水素化ホウ素ナトリウム(28 g)を加えた。溶解後、室温で一晩撹拌し

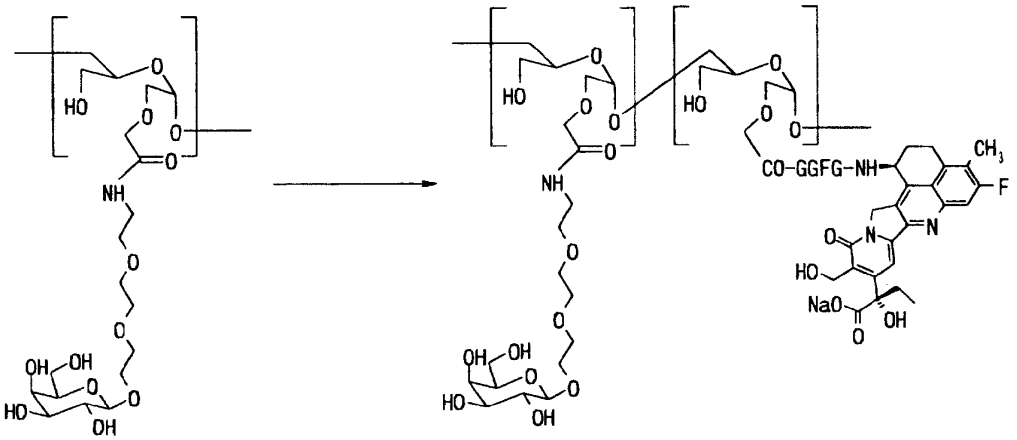
た。氷冷して、酢酸でpH5.5に調整し、4℃で1時間撹拌した。氷冷下で8M水酸化ナトリウム水溶液を用いてpHを7.5に調整した。以上の行程を2回行い、得られた2つの水溶液を1つにまとめ、バイオマックス-3膜(ミリポア社製)を用いた限外濾過法による低分子画分の除去を行ない残留溶液を得た。この残留溶液をバイオマックス-30膜を通過させた。通過した溶液をバイオマックス-3膜を用いた限外濾過法により脱塩した後、凍結乾燥して精製デキストランポリアルコール(12.0 g)を得た。この物質の分子量(ゲル濾過、プルラン標準)は、9Kであった。

水酸化ナトリウム(39.3 g)を水(282 ml)に溶かして得られる水溶液に上記の精製デキストランポリアルコール(9.4 g)を加え、室温で溶解させた。この溶液に氷冷下でモノクロル酢酸(56.4 g)を加えて溶解させた後室温で20時間反応させた。この反応液を酢酸でpHを8に調整した後、バイオマックス-5膜を用いた限外濾過法による低分子画分の除去を行なった。残留溶液を凍結乾燥して、カルボキシメチル（以下、CMと略す）デキストランポリアルコールのナトリウム塩(12 g)を得た。得られたCMデキストランポリアルコールのナトリウム塩(4.0 g)を、水酸化ナトリウム(17 g)を水(120 ml)に溶かして得られる水溶液に加え、室温で溶解させた。この溶液に氷冷下でモノクロル酢酸(24 g)を加えて溶解させた後室温で20時間反応させた。

この反応液を酢酸でpHを8に調整した後、バイオマックス-5膜を用いた限外濾過法による低分子画分の除去を行なった。残留溶液を凍結乾燥して、CMデキストランポリアルコールのナトリウム塩(4.0 g)を得た。この物質の分子量(ゲル濾過、プルラン標準)は、14Kであり、糖残基あたりのCM化度はアルカリ滴定から0.7であった。得られたCMデキストランポリアルコールのナトリウム塩(1.0 g)を水(100 ml)に溶解し、実施例1の化合物2－2(800 mg)のメタノール(100 ml)溶液を加えた。さらに、水溶性カルボジイミド塩酸塩(240 mg)を2時間おきに3回添加し、計6時間撹拌した。反応液中の溶媒を留去し、得られた油状物を水に溶解し、バイオマックス-3を用いた限外濾過法により脱塩した。得られた水溶液を凍結乾燥し、標記化合物を1.1 g得た。本化合物中のガラクトース含有量をフ

ェノール-硫酸法により定量した結果、糖10残基当たり、1.0の割合であった。

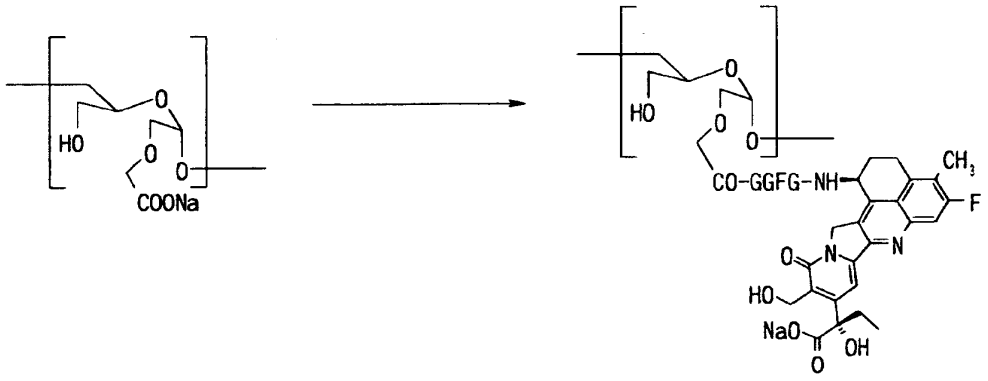
(C)ガラクトース修飾CMデキストランポリアルコール-Gly-Gly-Phe-Gly-DX-8951の合成



上記(B)で得られたガラクトース修飾CMデキストランポリアルコールのナトリウム塩(1.0 g)を水(30 ml)に溶かし、Gly-Gly-Phe-Gly-DX-8951 のトリフルオロ酢酸塩 (150 mg)と 1-ヒドロキシベンゾトリアゾール(35 mg)のメタノール溶液(40 ml)を加えた。溶液の pH を 7.0 とし、水溶性カルボジイミド塩酸塩(35 mg)を２時間ごとに、３回加えた後、１晩撹拌した。反応液中の溶媒を留去し、得られた残渣を3M塩化ナトリウム水溶液(20 ml)に溶かし、エタノール(100 ml)に滴下し、析出した沈殿を遠心分離(3500 rpm, 8 分)により集めた。この沈殿を水に溶かし、バイオマックス-3膜を用いた限外濾過法により脱塩した。膜を透過しない残留溶液をミリポアフィルター(0.22μm)で濾過した後、凍結乾燥して標記化合物を 900mg 得た。本化合物を 0.1M 塩化ナトリウム水溶液に溶解後、GPC(カラム:東ソーTSK Gel PW-4000XL、溶媒:0.1MNaCl 水溶液、流速:0.8ml/min)で分析した結果、及び本化合物の紫外線吸収スペクトル(pH9.0、0.1M トリス緩衝液中)をそれぞれ図３及び図４に示す。本化合物中の DX-8951 含有量を 30%アセトニトリルを含む 0.1 M トリス緩衝液 (pH 10.0) 中での 366 nm における吸光度に基づいて

定量したところ、4.9% (W/W)であった。

(D)CMデキストランポリアルコール-Gly-Gly-Phe-Gly-DX-8951の合成



上記(B)で得られたCMデキストランポリアルコールのナトリウム塩(2.0g)を水に溶解し、Dowex-50WX8(Et_3NH^+)を通し、CMデキストランポリアルコールのトリエチルアンモニウム塩(1.9 g)を得た。得られたCMデキストランポリアルコールのトリエチルアンモニウム塩(1.9 g)を50%N,N-ジメチルホルムアミドを含む水溶液に溶解し、この溶液に、トリエチルアミン(0.112 ml)とGly-Gly-Phe-Gly-DX-8951のトリフルオロ酢酸塩 (350 mg) を含むN,N-ジメチルホルムアミド(10 ml)溶液、1-エトキシカルボニル-2-エトキシ-1,2-ジヒドロキシキノリン(1.9 g)を順次加え、室温で一晩撹拌しながら反応させた。反応液中の溶媒を留去し、得られた残渣を3M塩化ナトリウム水溶液(20 ml)に溶かし、エタノール(100 ml)に滴下し、析出した沈殿を遠心分離(3500 rpm)により集めた。この沈殿を水に溶かし、バイオマックス-3膜を用いた限外濾過法により脱塩した。膜を透過しない残留溶液をミリポアフィルター(0.22 μm)で濾過した後、凍結乾燥して標記化合物を 1.4g得た。本化合物を0.1M塩化ナトリウム水溶液に溶解後、GPC(カラム:東ソーTSK Gel PW-4000XL、溶媒:0.1MNaCl 水溶液、流速:0.8ml/min)で分析した結果、及び本化合物の紫外線吸収スペクトル(pH9.0、0.1M トリス緩衝液中)をそれぞれ図6及び図9に示す。本化合物中のDX-8951含量を30%アセトニトリルを含む0.1 M トリ

ス緩衝液（pH 10.0）中での 366 nm における吸光度に基づいて定量したところ、5.2% (W/W)であった。

(E)ＤＤＳ化合物の測定

上記(C)で得られたガラクトース修飾ＤＤＳ化合物および対照として上記(D)のＤＤＳ化合物を注射用蒸留水にて溶解し、DX-8951 に換算した濃度が 0.5 mg/ml となるように調製した。これらのＤＤＳ化合物水溶液を C57BL/6 マウスに一群 5 匹として尾静脈内に投与した。投与量は DX-8951 換算で 5 mg/kg とした。投与後、経時的（0.5, 1, 2, 4 および 24 時間）に肝臓を採取し、これらのＤＤＳ化合物量を求めた。得られた肝臓の重量に対し水を５倍量添加し、ホモジナイズした。その溶液を 3000 rpm、10 分間遠心分離し、さらに、上清を 15,000 rpm、15 分間遠心分離した。得られた上清の 50 μl に、pH6 の Britton-Robinson Buffer (B.R.B) により 2 mg/ml に調製した α-キモトリプシン溶液 450 μl を添加し、40 ℃ で２時間反応した。その後、50% アセトニトリル含有 0.5 N HCl 溶液を 500 μl 添加し、12,000 rpm、5 分間遠心分離し、その上清の 20 μl を HPLC 分析し、遊離した G-DX8951 を定量することでＤＤＳ化合物量を求めた。この時、投与に用いた各ＤＤＳ化合物水溶液を、蒸留水により 50、10、2 μg/ml に調製し、それぞれ 50 μl を上述の方法により酵素処理して G-DX8951 を定量したものを検量線とした。

HPLC 分析条件

カラム：Symmetry C18 (4.6×100mm)

流速：1.0 ml/min

カラム温度：40℃

検出波長（蛍光）：Ex.375 nm、Em.445 nm

溶出液：メタノール：アセトニトリル = 1 : 2 (29%) 0.1% TFA (71%)

結果を図５に示す。上記のガラクトース修飾ＤＤＳ化合物は、対象のＤＤＳ化合物（上記(D)）に比べて高い肝臓集積性を示した。

例７：ガラクトース修飾 CM デキストランポリアルコール-Gly-Gly-Phe-Gly-DX-8951 の合成

デキストラン T500(ファルマシア社製、分子量 500K)(50 g)の 0.1M 酢酸緩衝液(pH5.5)(5000 ml)に、過ヨウ素酸ナトリウム(165.0 g)の水溶液(5000 ml)を加えた。遮光して４℃で 10 日間撹拌した後、エチレングリコール(35.0 ml)を加え、一晩撹拌した。反応液を氷冷下で 8M 水酸化ナトリウム水溶液を用いて pH を 6.5 に調整した後、水素化ホウ素ナトリウム(70 g)を水(2000 ml)に懸濁させた液を加えた。溶解後、室温で一晩撹拌した。氷冷して、酢酸で pH5.5 に調整し、４℃で 1 時間撹拌した。氷冷下で 8M 水酸化ナトリウム水溶液を用いて pH を 7.5 に調整した。得られた水溶液をバイオマックス-50 膜を用いた限外濾過法による低分子画分の除去を行ない残留溶液を得た。この残留溶液を限外濾過膜(1000K、フィルトロン社製)を通過させた。通過した溶液をバイオマックス-50 膜を用いた限外濾過法により脱塩した後、凍結乾燥してデキストランポリアルコール(21.1 g)を得た。この物質の分子量(ゲル濾過、プルラン標準)は、128K であった。

水酸化ナトリウム(13.84 g)を水(150 ml)に溶かして得られる水溶液に上記で得たデキストランポリアルコール(5 g)を加え、室温で溶解させた。この溶液に氷冷下でモノクロル酢酸のナトリウム塩(61.6 g)を加えて溶解させた後室温で一晩反応させた。この反応液の pH を 8.5 に調整した後、バイオマックス-50 膜を用いた限外濾過法による低分子画分の除去を行なった。高分子画分を凍結乾燥して、CM デキストランポリアルコールのナトリウム塩(6.2 g)を得た。この物質の分子量(ゲル濾過、プルラン標準)は、428K であり、糖残基あたりの CM 化度はアルカリ滴定から 0.9 であった。得られた CM デキストランポリアルコールのナトリウム塩(500 mg)を水(50 ml)に溶解し、実施例１の化合物２－２(400 mg)のメタノール(20 ml)溶液と 1-ヒドロキシベンゾトリアゾール(160 mg)のメタノール(20 ml)溶液を加えた。さらに、水溶性カルボジイミド塩酸塩(120 mg)を 2 時間おきに３回添加し、計６時間撹拌した。反応液中の溶媒を留去し、得られた油状物を水に溶解し、

バイオマックス-50 膜を用いた限外濾過法による低分子画分の除去を行なった。残留溶液を凍結乾燥し、目的物を 600 mg 得た。本化合物中のガラクトース含量をフェノール-硫酸法により定量した結果、糖 10 残基当たり、1.7 の割合であった。

得られたガラクトース修飾 CM デキストランポリアルコールのナトリウム塩(200 mg)を水(3 ml)に溶かし、Gly-Gly-Phe-Gly-DX-8951 のトリフルオロ酢酸塩(27 mg)のメタノール溶液(3 ml)と 1-ヒドロキシベンゾトリアゾール(7mg)のメタノール溶液(3 ml)を加えた。溶液の pH を 7.0 とし、水溶性カルボジイミド塩酸塩(7 mg)を 2 時間ごとに、3 回加えた後、1 晩撹拌した。反応液中の溶媒を留去し、得られた残渣を 3M 塩化ナトリウム水溶液(10 ml)に溶かし、エタノール(100 ml)に滴下し、析出した沈殿を遠心分離(3500 rpm)により集めた。この沈殿を水に溶かし、バイオマックス-50 膜を用いた限外濾過法により脱塩した。膜を透過しない残留溶液をミリポアフィルター(0.22 μm)で濾過した後、凍結乾燥して標記化合物を 180 mg 得た。本化合物を 0.1M 塩化ナトリウム水溶液に溶解後、GPC(カラム:東ソーTSK Gel PW-4000XL、溶媒:0.1MNaCl 水溶液、流速:0.8 ml/min)で分析した結果、及び本化合物の紫外線吸収スペクトル(pH9.0、0.1M トリス緩衝液中)をそれぞれ図 7 及び図 10 に示す。本化合物中の DX-8951 含量を 30%アセトニトリルを含む 0.1 M トリス緩衝液 (pH 10.0) 中での 366 nm における吸光度に基づいて定量したところ、3.7% (W/W)であった。

例 8 : 2-[2-(2-アミノエトキシ)エトキシ]エチル-β-D-2-アミノ-2-デオキシガラクトースの合成

特開平 5-202085 号公報に記載の方法により合成した 2-[2-(2-アジドエトキシ)エトキシ]エチル-β-D-2-アセチルアミノ-2-デオキシ-3,4,6-トリアセチルガラクトース (2.64 g)をメタノール(10 ml)に溶解した溶液を氷冷した。この溶液にナトリウムメトキシドの 28%メタノール溶液(0.64 ml)を加え、そのまま氷冷下で 5 時間撹拌した。反応液に酢酸(0.186 ml)を加えた後、減圧乾固した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(溶出液:ジクロロメタン:メタノール=9:1 溶

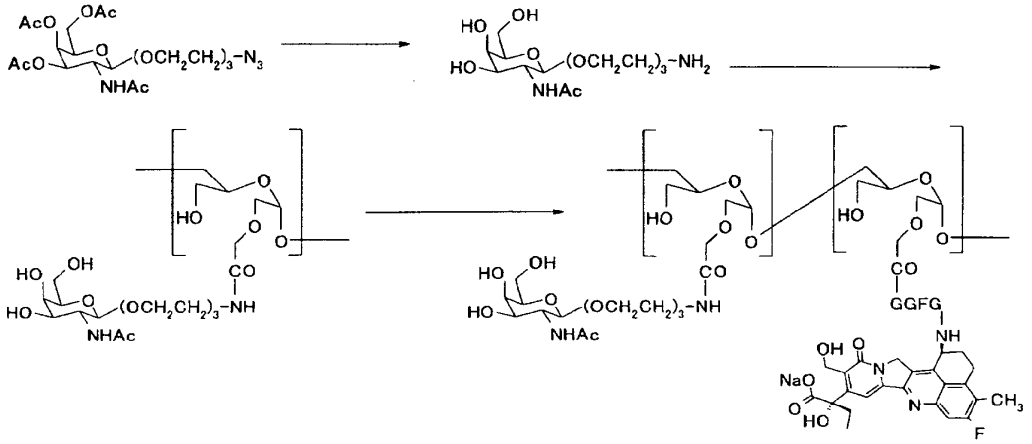
液）で精製して 2-[2-(2-アジドエトキシ)エトキシ]エチル-β-D-2-アミノ-2-デオキシガラクトース（1.98 g)を得た。

^{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).

上記の 2-[2-(2-アジドエトキシ)エトキシ]エチル-β-D-2-アミノ-2-デオキシガラクトース（640 mg)をエタノール(10 ml)に溶解した溶液にリンドラー触媒(430 mg)を加え、常圧水素下 1.5 時間接触還元した。さらに、リンドラー触媒(215 mg)を加え、常圧水素下 3.5 時間接触還元した。触媒を濾去した後、濾液を減圧乾固して 2-[2-(2-アミノエトキシ)エトキシ]エチル-β-D-2-アミノ-2-デオキシガラクトース（601 mg)を得た。

^{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).

例９：N-アセチルガラクトサミン修飾 CM デキストランポリアルコール-Gly-Gly-Phe-Gly-DX-8951 の合成



例７で得られた CM デキストランポリアルコールのナトリウム塩(375 mg)を水(10ml)に溶解し、例８で得られた 2-[2-(2-アミノエトキシ)エトキシ]エチル-β-D-2-アミノ-2-デオキシガラクトース (300 mg)をメタノール(10 ml) に溶解した溶液と 1-ヒドロキシベンゾトリアゾール(120 mg)をメタノール(10 ml) に溶解した溶液を加えた。溶液の pH を 7.0 にした後、水溶性カルボジイミド塩酸塩(90 mg)を２時間おきに３回添加した。一晩撹拌した後、反応液からバイオマックス-50 膜を用いた限外濾過法により低分子画分を除去した。膜を通過しない残留溶液を凍結乾燥し、N-アセチルガラクトサミン修飾 CM デキストランポリアルコール(443 mg)を得た。本化合物の N-アセチルガラクトサミン含量をエルソンーモルガン法で定量した結果、糖 10 残基あたり 1.6 の割合であった。

得られたN-アセチルガラクトサミン修飾CMデキストランポリアルコール (200 mg) を水 (10 ml)に溶解し、Gly-Gly-Phe-Gly-DX-8951 のトリフロオロ酢酸塩 (30 mg)をメタノール(10 ml) に溶解した溶液、１－ヒドロキシベンゾトリアゾール(30 mg)をメタノール(10 ml) に溶解した溶液を加えた。溶液の pH を 7.0 にした後、水溶性カルボジイミド塩酸塩(10 mg)を２時間おきに３回添加した。２時間撹拌した後、pH を 8.5 にした。反応液からバイオマックス-50 膜を用いた限外濾過法により低分子画分を除去した。膜を通過しない残留溶液をミリポアフィルター(0.22 μm)で濾過した後、凍結乾燥し、標記化合物(203 mg)を得た。本化合物を 0.1M 塩化ナトリウム水溶液に溶解後、GPC (カラム：東ソー TSK Gel PW-6000XL、溶媒：20%アセトニトリル含有 0.1M 酢酸緩衝液(pH5.0)、流速：0.8 ml/min) で分析した結果、及び本化合物の紫外線吸収スペクトル(0.1M トリス緩衝液(pH 10.0)：アセトニトリル＝7:3 中, 0.16 mg/ ml)をそれぞれ図８および図 11 に示す。本化合物の医薬化合物の残基の含量を 0.1 M トリス緩衝液 (pH 10.0)：アセトニトリル＝7:3 中での 366 nm における吸光度に基づいて定量したところ 4.6% (W/W)であった。

OnCusp
Ex. 1002

例 10：CM-Dex-PA-Gly-Gly-Phe-Gly-NH-Y'-CH_2-O-CO-DX-8951 中の DX-8951 含有量の測定

蒸留水にて 1 mg/ml に調製した CM-Dex-PA-Gly-Gly-Phe-Gly-NH-Y'-CH_2-O-CO-DX-8951（Y'は p－フェニレン基を示す）の溶液 5μl に Britton Robinson 緩衝液（pH 6）にて 2 mg/ml に調製したパパイン溶液を 95μl 添加した。この反応液を 40℃で 4 時間インキュベートした後、50%のアセトニトリルを含有した 0.5 N HCl 溶液を 100μl 加え、遊離した加水分解物[DX-8951]を HPLC にて定量した。HPLC 測定は、Symmetry C18（4.6×100 mm;3.5μm, Waters 社)カラムを用い、有機溶媒（メタノール：アセトニトリル＝１：２）が 12 分間に 20%から 70%となる 0.1%トリフルオロ酢酸溶液で溶出を行い、蛍光スペクトル測定（Ex.375nm および Em.445nm）により加水分解物を検出した。この結果、DX-8951 は約 5.7 分に溶出された。DX-8951 を検量線に用いて上記 DDS 化合物中の DX-8951 含有量を算出したところ、4.0%と算出された。一方、DX-8951 を検量線として上記 DDS 化合物の UV 吸収から DX-8951 含有量を算出した場合には 3.3%と算出された。

例 11：CM-Dex-PA-Gly-Gly-Gly-Phe-NH-Y'-CH_2-O-CO-DX-8951 中の DX-8951 含有量の測定

蒸留水にて 1 mg/ml に調製した CM-Dex-PA-Gly-Gly-Gly-Phe-NH-Y'-CH_2-O-CO-DX-8951 の溶液 5μl に Britton Robinson 緩衝液（pH 6）にて 2 mg/ml に調製したα-キモトリプシン溶液を 95μl 添加した。この反応液を 40℃で 4 時間インキュベートした後、50%のアセトニトリルを含有した 0.5 N HCl 溶液を 100μl 加え、遊離した加水分解物[DX-8951]を HPLC にて定量した。HPLC 測定は、Symmetry C18（4.6×100 mm;3.5μm, Waters 社)カラムを用い、有機溶媒（メタノール：アセトニトリル＝１：２）が 12 分間に 20%から 70%となる 0.1%トリフルオロ酢酸溶液で溶出を行い、蛍光スペクトル測定（Ex.375nm および Em.445nm）により加水分解物を検出した。この結果、DX-8951 は約 5.7 分に溶出された。DX-8951 を検量線に用いて上記 DDS 化合物中の DX-8951 含有量を算出したところ、2.5%と算出された。

一方、DX-8951 を検量線として上記 DDS 化合物の UV 吸収から DX-8951 含有量を算出した場合には 1.7%と算出された。

例 12：CM-Dex-PA-Gly-Gly-Phe-Gly-NH-$(CH_2)_4$-CO-DX-8951 中の DX-8951 含有量の測定

蒸留水にて 100μg/ml に調製した CM-Dex-PA-Gly-Gly-Phe-Gly-NH-$(CH_2)_4$-CO-DX-8951 の溶液 5μl に Britton Robinson 緩衝液（pH 6）にて 2 mg/ml に調製したパパイン溶液を 95μl 添加した。この反応液を 40℃で 4 時間インキュベートした後、50%のアセトニトリルを含有した 0.5 N HCl 溶液を 100μl 加え、遊離した加水分解物[NH_2-$(CH_2)_4$-CO-DX-8951]を HPLC にて定量した。HPLC 測定は、Symmetry C18 (4.6x100 mm;3.5μm, Waters 社)カラムを用い、有機溶媒（メタノール：アセトニトリル＝1：2)を 32%含有する 0.1%トリフルオロ酢酸溶液で溶出を行い、蛍光スペクトル測定（Ex.375nm および Em.445nm）により加水分解物を検出した。この結果、DX-8951 は約 5.3 分に溶出された。 NH_2-$(CH_2)_4$-CO-DX-8951 を検量線に用いて上記DDS化合物中のDX-8951含有量を算出したところ、3.0%と算出された。一方、DX-8951 を検量線として上記 DDS 化合物の UV 吸収から DX-8951 含有量を算出した場合には 3.1%と算出された。

例 13：CM-Dex-PA-Gly-Gly-Phe-Gly-DXR（DXR:ドキソルビシン）中の DXR 含有量の測定

蒸留水にて 1 mg/ml に調製した DDS 化合物の溶液 10μl に Britton Robinson 緩衝液（pH 6）にて 2 mg/ml に調製したパパイン溶液を 190μl 添加した。この反応液を 40℃で 2 時間インキュベートした後、アセトニトリルを 200μl 加え、遊離した加水分解物[DXR]を HPLC にて定量した。HPLC 測定は、Symmetry RP18 (4.6×100 mm;3.5μm, Waters 社)カラムを用い、有機溶媒（メタノール：アセトニトリル＝1：2）を 34%含有する 0.1%トリフルオロ酢酸溶液で溶出を行い、蛍光スペクトル測定(Ex.480nm および Em.590nm)により加水分解物を検出した。この結果、DXR は約 3.8 分に溶出された。 DXR を検量線に用いて上記 DDS 化合物中の DXR 含

有量を算出したところ、5.3%と算出された。一方、DXR を検量線として上記 DDS 化合物の UV 吸収から DXR 含有量を算出した場合には 4.3%と算出された。

例 14：CM デキストランポリアルコール-Gly-Gly-Phe-Gly-DXR の合成

WO97/46260 の実施例 24 に記載の方法に準じて製造した平均分子量 274K、カルボキシメチル化度（構成糖残基あたりのカルボキシメチル基の置換度）0.4 のカルボキシメチルデキストランポリアルコールのナトリウム塩(30 mg)を 50%メタノールを含有する 0.05 M コリジン-HCl 緩衝液(2 ml)に溶解させた。この溶液に WO97/46260 の実施例 43 に記載の方法に準じて合成した Gly-Gly-Phe-Gly-DXR の塩酸塩(4 mg)を含むメタノール溶液(400μl)、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩(2.4 mg)を含むメタノール溶液(240μl)を加え、2 時間撹拌した。これに 3 M 食塩水 30 ml を加え、バイオマックス-50K 膜を用いた限外濾過法により脱塩した。膜を通過しない残留溶液をミリポアフィルター(0.22μm)で濾過した後、凍結乾燥して表記化合物(25 mg)を得た。本化合物の医薬化合物の残基の含量は、PBS(pH7.4)中での 480 nm における吸光度に基づいて定量したところ、4.3%(W/W)であった。

例 15：CM-Dex-PA-Gly-Gly-Phe-Gly-NH-$(CH_2)_4$-CO-DX-8951 の合成

Boc-Gly-Gly-Phe-Gly-OH(575mg)、HOSu (182mg)と DCC (326mg)を DMF (20ml)に溶解し、30 分間撹拌した。ここに、5-アミノペンタノイックアシッドベンジルエステルのトシル酸塩(500 mg)とトリエチルアミン(0.184 ml)を DMF (10 ml)に溶かした溶液を加え、室温で 3 日間撹拌した。反応液を濃縮し、残査をカラムクロマトグラフィ(CH_2Cl_2:MeOH=20:1)で精製し、Boc-Gly-Gly-Phe-Gly-NH-$(CH_2)_4$-COOBzl を 560 mg 得た。 Boc-Gly-Gly-Phe-Gly-NH-$(CH_2)_4$-COOBzl (560 mg)を 50%含水メタノール(60 ml)に溶かし、5%Pd-C(50%含水)(1.5 g)を加え、水素常圧下、1 晩撹拌した。反応液中の触媒を濾去し、濃縮乾固し、Boc-Gly-Gly-Phe-Gly-NH-$(CH_2)_4$-COOH を 300 mg 得た。

Boc-Gly-Gly-Phe-Gly-NH-$(CH_2)_4$-COOH (300 mg)とDCC (138 mg)とHOSu (77 mg)をDMFに溶かし、30分撹拌した。ここに、DX-8951(317mg)とトリエチルアミン(0.078ml)をDMFに溶かした溶液を加え、室温で1晩撹拌した。反応液を濃縮し、得られた残査をカラムクロマトグラフィー(CH_2Cl_2:MeOH=10:1)で精製して、Boc-Gly-Gly-Phe-Gly-NH-$(CH_2)_4$-CO-DX-8951を400 mg得た。

Boc-Gly-Gly-Phe-Gly-NH-$(CH_2)_4$-CO-DX-8951(300mg)をTFA(2ml)に溶かし、1時間反応させた後、反応液を濃縮した。得られた残査にエーテルを加え固化させ、上澄みを除去し、固体を乾燥してH-Gly-Gly-Phe-Gly-NH-$(CH_2)_4$-CO-DX-8951のトリフルオロ酢酸塩を250mg得た。

^{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)

WO97/46260の実施例24に記載の方法に準じて製造した平均分子量337K、カルボキシメチル化度（構成糖残基あたりのカルボキシメチル基の置換度）0.4のカルボキシメチルデキストランポリアルコールのトリエチルアンモニウム塩(200 mg)をDMF(10 ml)に溶かした。ここに、H-Gly-Gly-Phe-Gly-NH-$(CH_2)_4$-CO-DX-8951のトリフルオロ酢酸塩(30 mg)、トリエチルアミン(10μl)を含むメタノール(4ml)溶液を加え、さらに、1-エトキシカルボニル-2-エトキシ-1,2-ジヒドロキシキノリン(200 mg)を含むメタノール(3 ml)溶液を加え、遮光下、室温で1晩撹拌した。反応液を3M食塩水で希釈し、限外濾過膜(50K)で低分子を除去し、0.22μmのフィルターを通し、凍結乾燥して目的物を178 mg得た。

産業上の利用可能性

糖化合物で修飾したカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールを高分子キャリアーとして用いた本発明のＤＤＳ化合物は、極めて臓器指向性が高く、優れた治療効果を発揮できる医薬として有用である。また、本発明のＤＤＳ化合物の測定方法は、ＤＤＳ化合物の血中濃度やＤＤＳ化合物に導入された医薬化合物の残基の含有量を正確かつ簡便に定量することができるので、ＤＤＳ化合物の臨床への適用に際して極めて有用な方法として利用できる。

OnCusp
Ex. 1002

請 求 の 範 囲

1．糖化合物で修飾されたカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールと該カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールに結合した医薬化合物の残基とを含むＤＤＳ化合物。

2．糖化合物で修飾されたカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールと医薬化合物の残基とがスペーサーを介して結合した請求の範囲第１項に記載のＤＤＳ化合物。

3．スペーサーが１個のアミノ酸又はペプチド結合した２から８個のアミノ酸である請求の範囲第２項に記載のＤＤＳ化合物。

4．糖化合物で修飾されたカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールが、糖化合物とカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールとがリンカーを介して結合したものである請求の範囲第１項ないし第３項のいずれか１項に記載のＤＤＳ化合物。

5．糖化合物で修飾されたカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールがリンカーを介して糖化合物によりクラスター修飾されたものである請求の範囲第４項に記載のＤＤＳ化合物。

6．カルボキシ C_{1-4} アルキル部分の一部のカルボキシル基が糖化合物で修飾されたカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールに対して医薬化合物の残基を結合させることにより製造することができるＤＤＳ化合物。

7．該カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールと医薬化合物の残基とをスペーサーを介して結合させることにより製造することができる請求の範囲第６項に記載のＤＤＳ化合物。

8．カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールのカルボキシ C_{1-4} アルキル部分の一部のカルボキシル基に糖化合物又は糖化合物に結合したリンカーを結合させることにより製造された該カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールに対して医薬化合物の残基を結合させることにより製造することができ

る請求の範囲第６項又は第７項に記載のＤＤＳ化合物。

９．カルボキシ C_{1-4} アルキル部分の一部のカルボキシル基に医薬化合物の残基がスペーサーを介して結合したカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールを糖化合物で修飾することにより製造することができるＤＤＳ化合物。

１０．該カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールと糖化合物とをリンカーを介して結合させることにより製造することができる請求の範囲第９項に記載のＤＤＳ化合物。

１１．カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールのカルボキシ C_{1-4} アルキル部分の一部のカルボキシル基に１個のアミノ酸からなるスペーサー又はペプチド結合した２から８個のアミノ酸からなるスペーサーを介して医薬化合物の残基を結合させることにより製造された該カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールを糖化合物で修飾することにより製造することができる請求の範囲第９項又は第10項に記載のＤＤＳ化合物。

１２．糖化合物がガラクトース若しくはガラクトサミン又はそれらの誘導体である請求の範囲第１項ないし第11項のいずれか１項に記載のＤＤＳ化合物。

１３．糖化合物がＮ－アセチルガラクトサミンである請求の範囲第１項ないし第12項のいずれか１項に記載のＤＤＳ化合物。

１４．ガラクトース若しくはガラクトサミン又はそれらの誘導体、あるいはクラスター化されたガラクトース若しくはガラクトサミン又はそれらの誘導体の置換度がカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールの糖残基あたり 0.01～1.0である請求の範囲第12項に記載のＤＤＳ化合物。

１５．カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールを構成するデキストランポリアルコールが、実質的に完全にポリアルコール化可能な条件下でデキストランを処理して得られたデキストランポリアルコールである請求の範囲第１項ないし第14項のいずれか１項に記載のＤＤＳ化合物。

１６．カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールがカルボキシメチルデキストランポリアルコールである請求の範囲第１項ないし第 15 項のいずれか

1項に記載のＤＤＳ化合物。

１７．医薬化合物が抗腫瘍剤又は抗炎症剤である請求の範囲第１項ないし第 16 項のいずれか１項に記載のＤＤＳ化合物。

１８．医薬化合物が抗腫瘍剤である請求の範囲第 17 項に記載のＤＤＳ化合物。

１９．医薬化合物が(1S,9S)-1-アミノ-9-エチル-5-フルオロ-2,3-ジヒドロ-9-ハイドロキシ-4-メチル-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオンである請求の範囲第１項ないし第 18 項のいずれか１項に記載のＤＤＳ化合物。

２０．肝臓癌治療剤である請求の範囲第 19 項に記載のＤＤＳ化合物。

２１.請求の範囲第１項ないし第 20 項のいずれか１項に記載のＤＤＳ化合物の製造に使用するための糖化合物で修飾されたカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコール。

２２．糖化合物で修飾されたカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコール。

２３．糖化合物で修飾されたカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールからなる高分子キャリアー。

２４．ペプチド結合した２から８個のアミノ酸を含むスペーサーを介して高分子キャリアーと医薬化合物の残基とが結合したＤＤＳ化合物の測定方法であって、該ＤＤＳ化合物をペプチダーゼで処理することにより得られる加水分解物を測定する工程を含む方法。

２５．生体試料中に含まれる該ＤＤＳ化合物の濃度測定に用いる請求の範囲第 24 項に記載の方法。

２６．該ＤＤＳ化合物に導入された医薬化合物の残基の含有量を測定するために用いる請求の範囲第 24 項に記載の方法。

２７．該加水分解物が医薬化合物である請求の範囲第 24 項ないし第 26 項のいずれか１項に記載の方法。

２８．該加水分解物が医薬化合物の残基にスペーサーの一部が結合した化合物で

ある請求の範囲第24項ないし第26項のいずれか1項に記載の方法。

２９．スペーサーの一部がスペーサー由来の１個のアミノ酸である請求の範囲第28項に記載の方法。

３０．該高分子キャリアーがカルボキシル基を有する多糖誘導体である請求の範囲第24項ないし第29項のいずれか1項に記載の方法。

３１．該高分子キャリアーがカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールである請求の範囲第30項に記載の方法。

３２．該ＤＤＳ化合物中に導入された医薬化合物が抗腫瘍剤又は抗炎症剤である請求の範囲第24項ないし第31項のいずれか1項に記載の方法。

３３．スペーサーがＮ末端側から-Gly-Gly-Phe-Gly-で表されるテトラペプチド又はＮ末端側から-Gly-Gly-Gly-Phe-で表されるテトラペプチドである請求の範囲第24項ないし第32項のいずれか1項に記載の方法。

３４．スペーサーがＮ末端側から-Gly-Gly-Phe-Gly-NH-Y'-CH_2-O-CO-で表される基又はＮ末端側から-Gly-Gly-Gly-Phe-NH-Y'-CH_2-O-CO-で表される基（式中、Y'はｐ－フェニレン基を示す）である請求の範囲第24項ないし第32項のいずれか１項に記載の方法。

３５．ペプチダーゼがα－キモトリプシン又はパパインである請求の範囲第24項ないし第34項のいずれか1項に記載の方法。

３６．医薬化合物が（1S,9S)-1-アミノ-9-エチル-5-フルオロ-2,3-ジヒドロ-9-ハイドロキシ-4-メチル-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオンである請求の範囲第24項ないし第35項のいずれか1項に記載の方法。

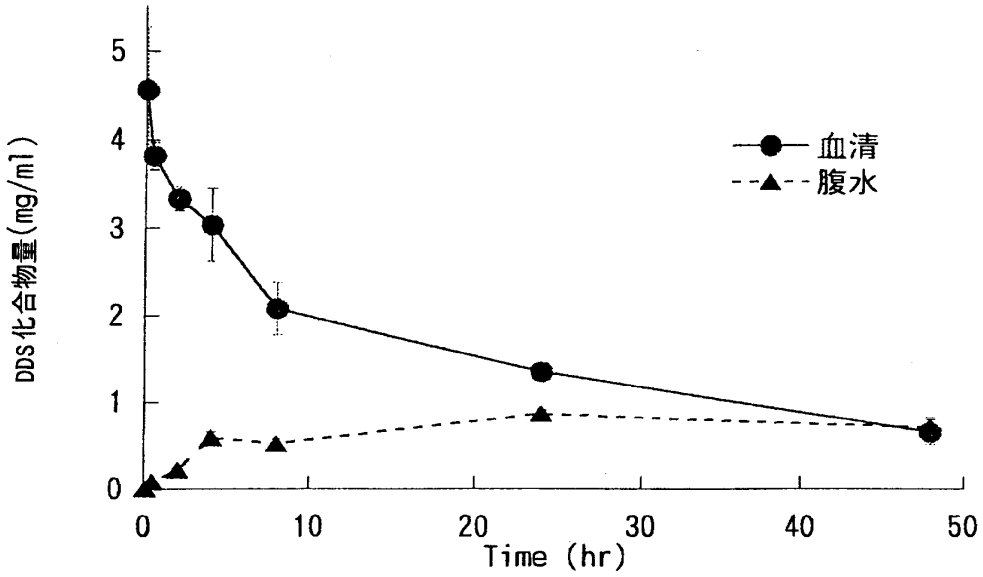
３７．Ｎ末端側から-Gly-Gly-Phe-Gly-で表されるテトラペプチド又はＮ末端側から-Gly-Gly-Gly-Phe-で表されるテトラペプチド含むスペーサーを介してカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールと(1S,9S)-1-アミノ-9-エチル-5-フルオロ-2,3-ジヒドロ-9-ハイドロキシ-4-メチル-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオンとが結合した

OnCusp
Ex. 1002

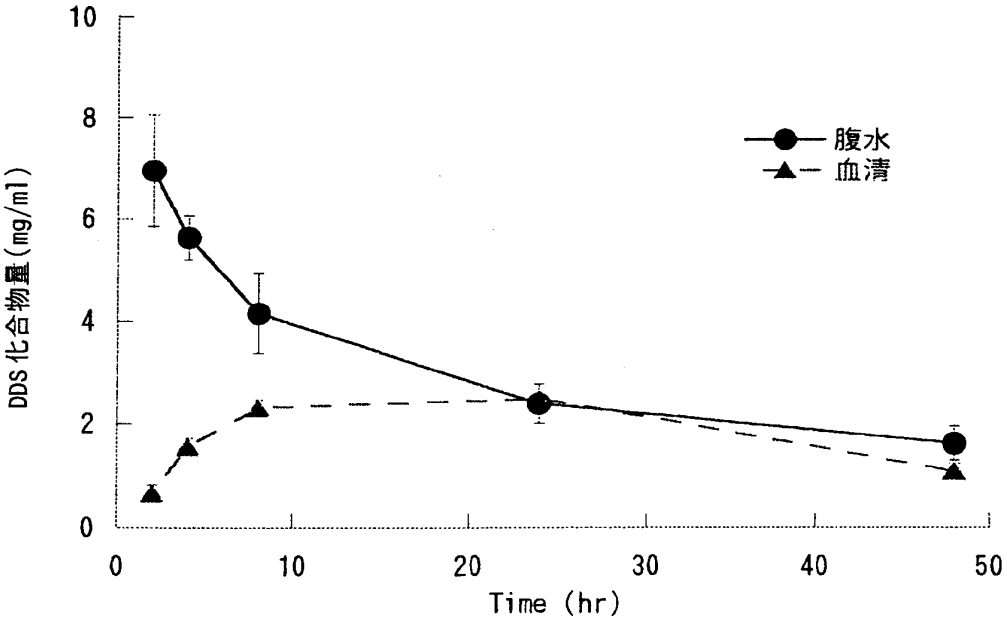
ＤＤＳ化合物の測定に用いる請求の範囲第24項ないし第29項のいずれか1項に記載の方法。

３８．ペプチダーゼとしてα－キモトリプシン又はパパインを用い、加水分解物として（1S,9S)-9-エチル-5-フルオロ-1-グリシルアミノ-2,3-ジヒドロ-9-ハイドロキシ-4-メチル-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオンを測定する請求の範囲第37項に記載の方法。

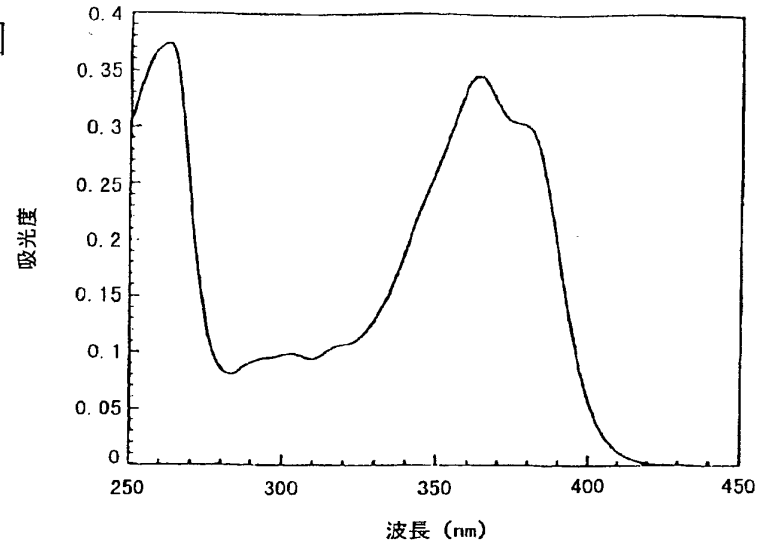
第１図


DDS化合物量(mg/ml)
0
1
2
3
4
5
0
10
20
30
40
50
Time (hr)
血清
腹水

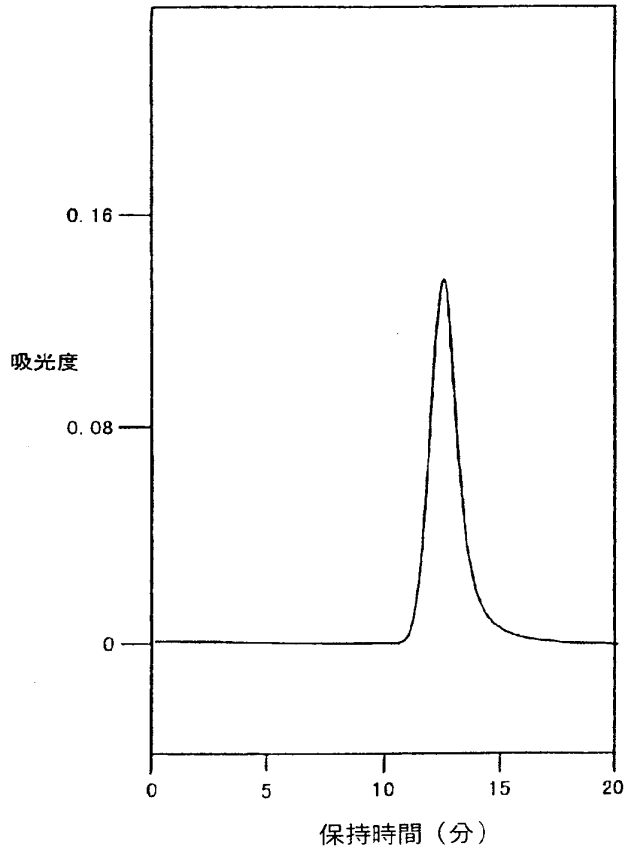
第２図


DDS化合物量(mg/ml)
0
2
4
6
8
10
0
10
20
30
40
50
Time (hr)
腹水
血清

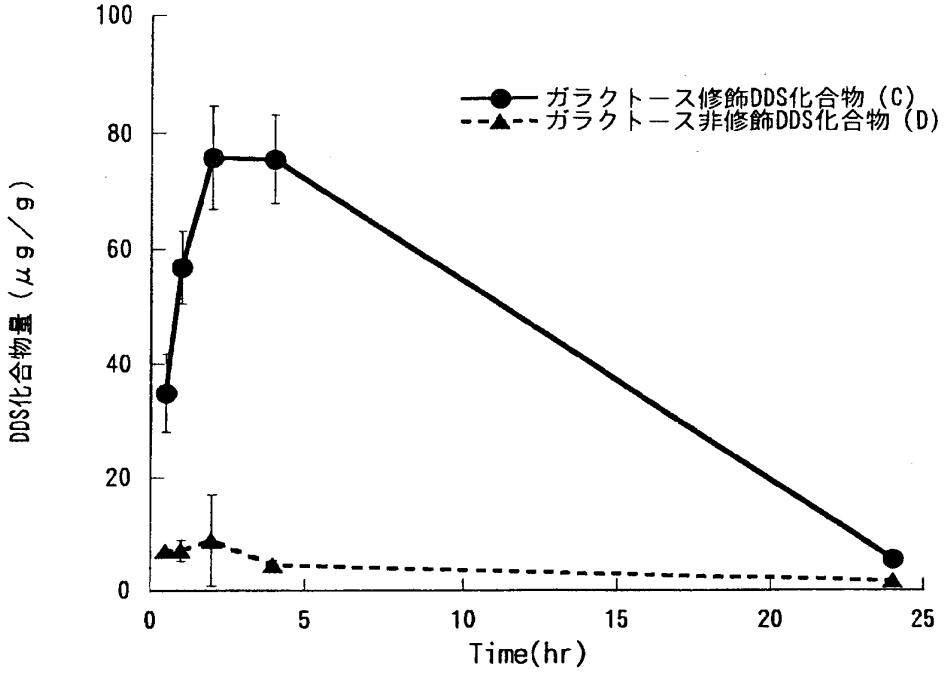
第３図


0.4
0.35
0.3
0.25
0.2
0.15
0.1
0.05
0
吸光度
250
300
350
400
450
波長（nm）

第４図

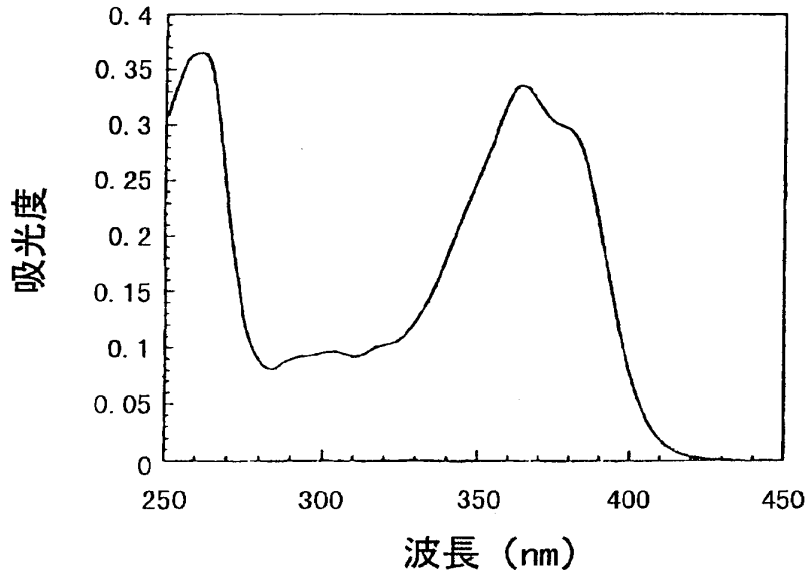

0.16
吸光度
0.08
0
0
5
10
15
20
保持時間（分）

第５図

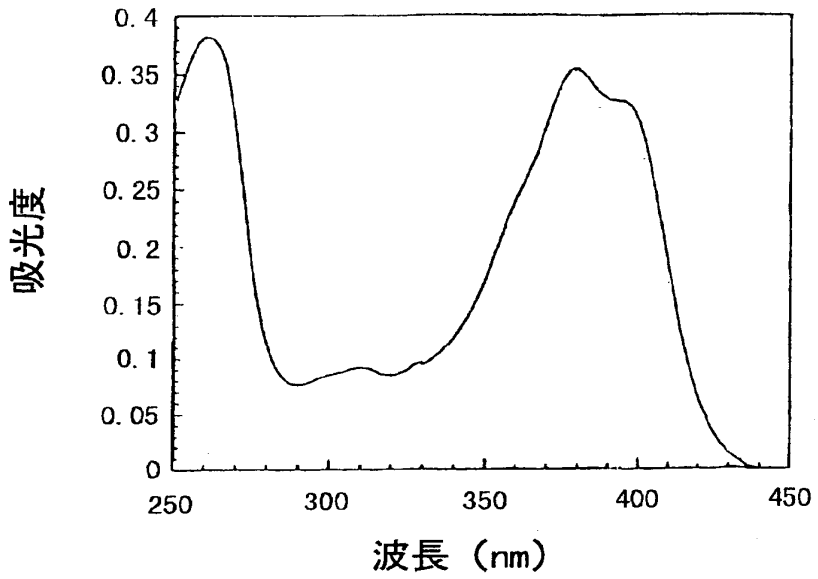


DDS化合物の肝臓への集積性

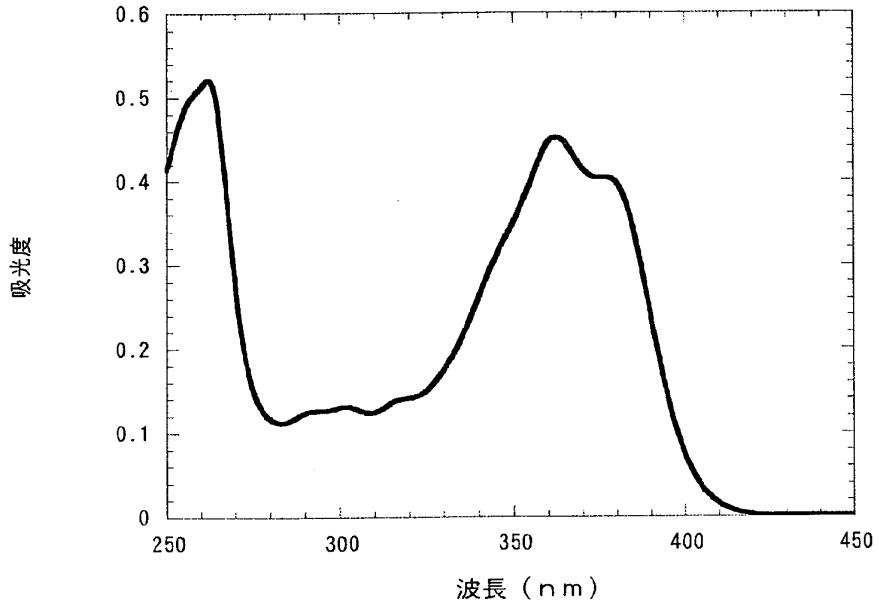
第６図



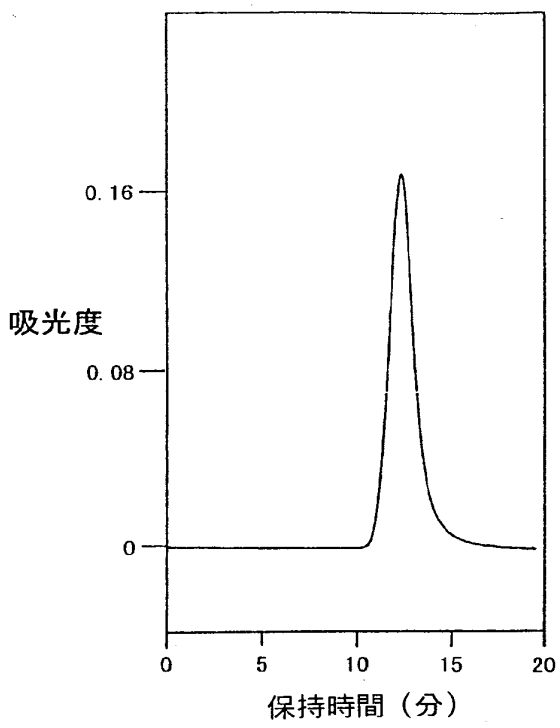
第７図


0.4
0.35
0.3
0.25
0.2
0.15
0.1
0.05
0
吸光度
250
300
350
400
450
波長（nm）

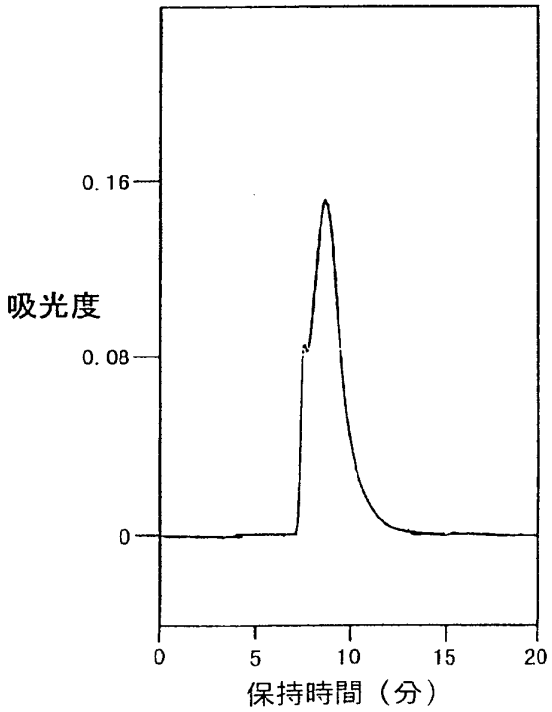
第８図


0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
吸光度
250
300
350
400
450
波長（ｎｍ）

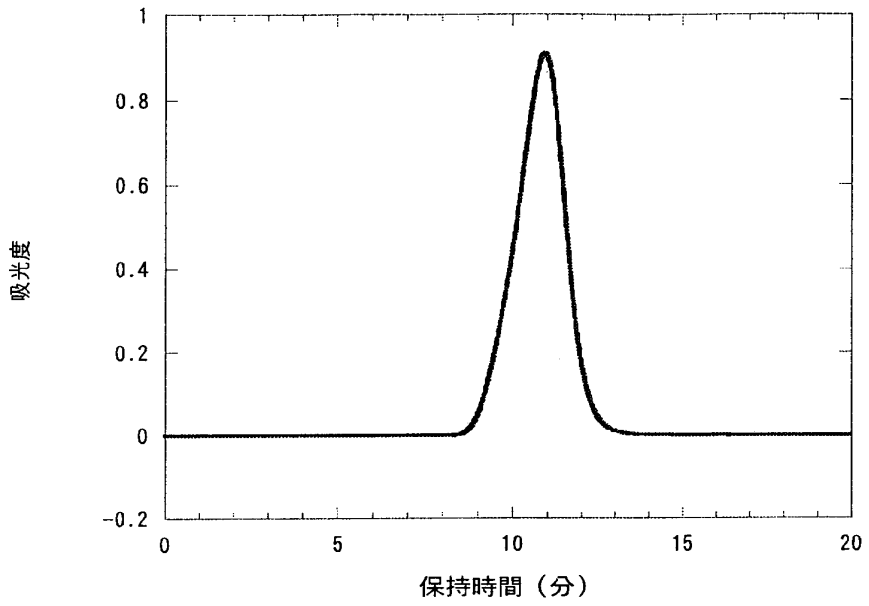
第９図



第１０図



第１１図



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 Facsimile No.	Authorized officer Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

国際調査報告	国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ９９／０６０１６

A.　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））
Ｉｎｔ．Ｃｌ⁷　Ａ６１Ｋ４７／４８，Ａ６１Ｋ４７／３０，Ａ６１Ｋ４７／２６，Ａ６１Ｋ３１／４７

B.　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））
Ｉｎｔ．Ｃｌ⁷　Ａ６１Ｋ４７／４８，Ａ６１Ｋ４７／３０，Ａ６１Ｋ４７／２６，Ａ６１Ｋ３１／４７

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）
ＣＡＰＬＵＳ（ＳＴＮ）
ＲＥＧＩＳＴＲＹ（ＳＴＮ）

C.　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求の範囲の番号
Ｙ	ＷＯ，９７／４６２６０，Ａ１（第一製薬株式会社） １１．１２月．１９９７（１１．１２．９７） ＆　ＥＰ，９１６３４８，Ａ１	1-23,,31,37,38
Ｙ	ＪＰ，８－３１９３１７，Ａ　（財団法人　神奈川科学技術アカデミー） ３．１２月．１９９６（０３．１２．９６） 【０００５】－【０００７】（ファミリーなし）	1-23
Ｘ	ＥＰ，７１２６３５，Ａ１（ＫＵＲＡＲＡＹ　ＣＯ　ＬＴＤ） ２２．５月．１９９６（２２．０５．９６）	24-30,32-35

☒ Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。　☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊　引用文献のカテゴリー
「Ａ」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「Ｅ」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「Ｌ」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「Ｏ」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「Ｐ」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
「Ｔ」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「Ｘ」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Ｙ」特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「＆」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
２６．０１．００	０８.０２.００

国際調査機関の名称及びあて先	特許庁審査官（権限のある職員）	４Ｐ	９８４０
日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ） 郵便番号１００－８９１５ 東京都千代田区霞が関三丁目４番３号	吉住　和之		
	電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４９１		

様式ＰＣＴ／ＩＳＡ／２１０（第２ページ）（１９９８年７月）

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ９９／０６０１６

Ｃ（続き）．　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求の範囲の番号
Ｙ	＆　ＪＰ，８－０２４３２５，Ａ　＆　ＵＳ，５６５８５９２，Ａ	31, 36-38
Ｙ	ＪＰ，６－８７７４６，Ａ　（第一製薬株式会社） ２９．３月．１９９４（２９．０３．９４） （ファミリーなし）	36-38

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
4 January 2001 (04.01.2001)

PCT

(10) International Publication Number
WO 01/00244 A2

(51) International Patent Classification[7]: A61K 47/48

(21) International Application Number: PCT/US00/17229

(22) International Filing Date: 23 June 2000 (23.06.2000)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/141,316 25 June 1999 (25.06.1999) US
60/189,844 16 March 2000 (16.03.2000) US

(71) Applicant *(for all designated States except US)*: **GENENTECH, INC.** [US/US]; 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080 (US).

(72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants *(for US only)*: **ERICKSON, Sharon** [US/US]; 970 Vista Road, Hillsborough, CA 94010 (US). **SCHWALL, Ralph** [US/US]; 400 Griffen Avenue, Pacifica, CA 94044 (US).

(74) Agent: **ALTMAN, Daniel, E.**; Knobbe, Martens, Olson and Bear, LLP, 16th Floor, 620 Newport Center Drive, Newport Beach, CA 92660 (US).

(81) Designated States *(national)*: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, CZ (utility model), DE, DE (utility model), DK, DK (utility model), DM, DZ, EE, EE (utility model), ES, FI, FI (utility model), GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SK (utility model), SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Designated States *(regional)*: ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:
— *Without international search report and to be republished upon receipt of that report.*

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 01/00244 A2

(54) Title: METHODS OF TREATMENT USING ANTI-ErbB ANTIBODY-MAYTANSINOID CONJUGATES

(57) Abstract: The application concerns methods of treatment using anti-ErbB receptor antibody-maytansinoid conjugates, and articles of manufacture suitable for use in such methods. In particular, the invention concerns ErbB receptor-directed cancer therapies, using anti-ErbB receptor antibody-maytansinoid conjugates.

METHODS OF TREATMENT USING ANTI-ErbB ANTIBODY-MAYTANSINOID CONJUGATES

Background of the Invention

Field of the Invention

The present invention concerns methods of treatment, especially ErbB receptor-directed cancer therapies, using anti-ErbB receptor antibody-maytansinoid conjugates, and articles of manufacture suitable for use in such methods.

Description of the Related Art

1. Maytansine and maytansinoids

Maytansine was first isolated from the east African shrub *Maytenus serrata* (U.S. Patent No. 3,896,111). Subsequently, it was discovered that certain microbes also produce maytansinoids, such as maytansinol and C-3 maytansinol esters (U.S. Patent No. 4,151,042). Synthetic maytansinol and maytansinol analogues are disclosed, for example, in U.S. Patent Nos. 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; and 4,371,533, the disclosures of which are hereby expressly incorporated by reference.

Maytansine and maytansinoids are highly cytotoxic but their clinical use in cancer therapy has been greatly limited by their severe systemic side-effects primarily attributed to their poor selectivity for tumors. Clinical trials with maytansine had been discontinued due to serious adverse effects on the central nervous system and gastrointestinal system (Issel *et al.,* Can. Trtmnt. Rev. 5:199-207 [1978]).

2. The ErbB family of receptor tyrosine kinases and anti-ErbB antibodies

Members of the ErbB family of receptor tyrosine kinases are important mediators of cell growth, differentiation and survival. The receptor family includes four distinct members, including epidermal growth factor receptor (EGFR or ErbB1), HER2 (ErbB2 or $p185^{neu}$), HER3 (ErbB3) and HER4 (ErbB4 or tyro2).

$p185^{neu}$, was originally identified as the product of the transforming gene from neuroblastomas of chemically treated rats. The activated form of the *neu* proto-oncogene results from a point mutation (valine to glutamic acid) in the transmembrane region of the encoded protein. Amplification of the human homolog of *neu* is observed in breast and ovarian cancers and correlates with a poor prognosis (Slamon *et al., Science*, 235:177-182 (1987); Slamon *et al., Science*, 244:707-712 (1989); and US Pat No. 4,968,603). To date, no point mutation analogous to that in the *neu* proto-oncogene has been reported for human tumors. Overexpression of ErbB2 (frequently but not uniformly due to gene amplification) has also been observed in other carcinomas including carcinomas of the stomach, endometrium, salivary gland, lung, kidney, colon, thyroid, pancreas and bladder. See, among others, King *et al., Science*, 229:974 (1985); Yokota *et al., Lancet*: 1:765-767 (1986); Fukushigi *et al., Mol Cell Biol.*, 6:955-958 (1986); Geurin *et al., Oncogene Res.*, 3:21-31 (1988); Cohen *et al., Oncogene*, 4:81-88 (1989); Yonemura *et al., Cancer Res.*, 51:1034 (1991); Borst *et al., Gynecol. Oncol.,* 38:364 (1990); Weiner *et al., Cancer Res.*, 50:421-425 (1990); Kern *et al.,*

Cancer Res., 50:5184 (1990); Park *et al.*, *Cancer Res.*, 49:6605 (1989); Zhau *et al.*, *Mol. Carcinog.*, 3:354-357 (1990); Aasland *et al. Br. J. Cancer* 57:358-363 (1988); Williams *et al. Pathobiology* 59:46-52 (1991); and McCann *et al.*, *Cancer*, 65:88-92 (1990). ErbB2 may be overexpressed in prostate cancer (Gu *et al. Cancer Lett.* 99:185-9 (1996); Ross *et al. Hum. Pathol.* 28:827-33 (1997); Ross *et al. Cancer* 79:2162-70 (1997); and Sadasivan *et al. J. Urol.* 150:126-31 (1993)). A spliced form of erbB2 oncogen encoding a constitutively tyrosine phosphorylated ErbB2 receptor is disclosed in PCT publication WO 00/20579, published on April 13, 2000. The erbB2 protein encoded by the splice variant has an in frame deletion of 16 amino acids (CVDLODKGCPAEQRAS), two of which are conserved cysteine residues.

Antibodies directed against the rat $p185^{neu}$ and human ErbB2 protein products have been described. Drebin and colleagues have raised antibodies against the rat *neu* gene product, $p185^{neu}$. See, for example, Drebin *et al., Cell* 41:695-706 (1985); Myers *et al.*, *Meth. Enzym.* 198:277-290 (1991); and WO94/22478. Drebin *et al. Oncogene* 2:273-277 (1988) report that mixtures of antibodies reactive with two distinct regions of $p185^{neu}$ result in synergistic anti-tumor effects on *neu*-transformed NIH-3T3 cells implanted into nude mice. See also U.S. Patent 5,824,311 issued October 20, 1998.

Other anti-ErbB2 antibodies with various properties have been described in Tagliabue *et al. Int. J. Cancer* 47:933-937 (1991); McKenzie *et al. Oncogene* 4:543-548 (1989); Maier *et al. Cancer Res.* 51:5361-5369 (1991); Bacus *et al. Molecular Carcinogenesis* 3:350-362 (1990); Stancovski *et al. PNAS (USA)* 88:8691-8695 (1991); Bacus *et al. Cancer Research* 52:2580-2589 (1992); Xu *et al. Int. J. Cancer* 53:401-408 (1993); WO94/00136; Kasprzyk *et al. Cancer Research* 52:2771-2776 (1992);Hancock *et al. Cancer Res.* 51:4575-4580 (1991); Shawver *et al. Cancer Res.* 54:1367-1373 (1994); Arteaga *et al. Cancer Res.* 54:3758-3765 (1994); Harwerth *et al. J. Biol. Chem.* 267:15160-15167 (1992); U.S. Patent No. 5,783,186; and Klapper *et al. Oncogene* 14:2099-2109 (1997).

Hudziak *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 9(3): 1165-1172 (1989) describe the generation of a panel of anti-ErbB2 antibodies which were characterized using the human breast tumor cell line SK-BR-3. Relative cell proliferation of the SK-BR-3 cells following exposure to the antibodies was determined by crystal violet staining of the monolayers after 72 hours. Using this assay, maximum inhibition was obtained with the antibody called 4D5 which inhibited cellular proliferation by 56%. Other antibodies in the panel reduced cellular proliferation to a lesser extent in this assay. The antibody 4D5 was further found to sensitize ErbB2-overexpressing breast tumor cell lines to the cytotoxic effects of TNF- . See also U.S. Patent No. 5,677,171 issued October 14, 1997. The anti-ErbB2 antibodies discussed in Hudziak *et al.* are further characterized in Fendly *et al. Cancer Research* 50:1550-1558 (1990); Kotts *et al. In Vitro* 26(3):59A (1990); Sarup *et al. Growth Regulation* 1:72-82 (1991); Shepard *et al. J. Clin. Immunol.* 11(3):117-127 (1991); Kumar *et al. Mol. Cell. Biol.* 11(2):979-986 (1991); Lewis *et al. Cancer Immunol. Immunother.* 37:255-263 (1993); Pietras *et al. Oncogene* 9:1829-1838 (1994); Vitetta *et al. Cancer Research* 54:5301-5309 (1994); Sliwkowski *et al. J. Biol. Chem.* 269(20):14661-14665 (1994); Scott *et al. J. Biol. Chem.* 266:14300-5 (1991); D'souza *et al. Proc. Natl. Acad. Sci.* 91:7202-7206 (1994); Lewis *et al. Cancer Research* 56:1457-1465 (1996); and Schaefer *et al. Oncogene* 15:1385-1394 (1997).

The murine monoclonal anti-HER2 antibody inhibits the growth of breast cancer cell lines that overexpress HER2 at the 2+ and 3+ level, but has no activity on cells that express lower levels of HER2 (Lewis *et al., Cancer Immunol. Immunother.* [1993]). Based on this observation, antibody 4D5 was humanized (Carter *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 4285-4289 [1992]). The humanized version designated HERCEPTIN® (huMAb4D5-8, rhuMAb HER2, U.S. Patent No. 5,821,337) was tested in breast cancer patients whose tumors overexpress HER2 but who had progressed after conventional chemotherapy (Baselga *et al., J. Clin. Oncol.* 14:737-744 [1996]); Cobleigh *et al., J. Clin. Oncol.* 17: 2639-2648 [1999]). Most patients in this trial expressed HER2 at the 3+ level, though a fraction was 2+ tumors. Remarkably, HERCEPTIN® induced clinical responses in 15% of patients (complete responses in 4% of patients, and partial responses in 11%) and the median duration of those responses was 9.1 months. HERCEPTIN® received marketing approval from the Food and Drug Administration September 25, 1998 for the treatment of patients with metastatic breast cancer whose tumors overexpress the ErbB2 protein.

Homology screening has resulted in the identification of two other ErbB receptor family members; ErbB3 (US Pat. Nos. 5,183,884 and 5,480,968 as well as Kraus *et al. PNAS (USA)* 86:9193-9197 (1989)) and ErbB4 (EP Pat Appln No 599,274; Plowman *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:1746-1750 (1993); and Plowman *et al., Nature*, 366:473-475 (1993)). Both of these receptors display increased expression on at least some breast cancer cell lines.

3. Maytansinoid-antibody conjugates

In an attempt to improve their therapeutic index, maytansine and maytansinoids have been conjugated to antibodies specifically binding to tumor cell antigens. Immunoconjugates containing maytansinoids are disclosed, for example, in U.S. Patent Nos. 5,208,020; 5,416,064 and European Patent EP 0 425 235 B1, the disclosures of which are hereby expressly incorporated by reference. Liu *et al.,* Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623 (1996) described immunoconjugates comprising a maytansinoid designated DM1 linked to the monoclonal antibody C242 directed against human colorectal cancer. The conjugate was found to be highly cytotoxic towards cultured colon cancer cells, and showed antitumor activity in an *in vivo* tumor growth assay. Chari *et al.* Cancer Research 52:127-131 (1992) describe immunoconjugates in which a maytansinoid was conjugated via a disulfide linker to the murine antibody A7 binding to an antigen on human colon cancer cell lines, or to another murine monoclonal antibody TA.1 that binds the HER-2/*neu* oncogene. The cytotoxicity of the TA.1-maytansonoid conjugate was tested *in vitro* on the human breast cancer cell line SK-BR-3, which expresses 3 x 10^5 HER-2 surface antigens per cell. The drug conjugate achieved a degree of cytotoxicity similar to the free maytansonid drug, which could be increased by increasing the number of maytansinoid molecules per antibody molecule. The A7-maytansinoid conjugate showed low systemic cytotoxicity in mice.

Although HERCEPTIN® is a breakthrough in treating patients with ErbB2-overexpressing breast cancers that have received extensive prior anti-cancer therapy, generally approximately 85% of the patients in this population fail to respond, or respond only poorly, to HERCEPTIN® treatment, and in the clinical trial preceding marketing approval, the median time to disease progression in all treated patients was only 3.1 months. Therefore, there is a significant clinical need for developing further HER2-directed cancer therapies for those patients with HER2-overexpressing

tumors or other diseases associated with HER2 expression that do not respond, or respond poorly, to HERCEPTIN® treatment.

Summary of the Invention

The present invention is based on the unexpected experimental finding that HERCEPTIN®-maytansinoid conjugates are highly effective in the treatment of HER2 (ErbB2) overexpressing tumors that do not respond, or respond poorly, to HERCEPTIN® therapy.

In one aspect, the present invention concerns a method for the treatment of a tumor in a mammal, wherein the tumor is characterized by the overexpression of an ErbB receptor and does not respond or responds poorly to treatment with a monoclonal anti-ErbB antibody, comprising administering to the mammal a therapeutically effective amount of a conjugate of the anti-ErbB antibody with a maytansinoid.

In a preferred embodiment, the patient is human. In another preferred embodiment, the ErbB receptor is (human) ErbB2 (HER2). The method is not limited by the mechanism of action of the anti-ErbB antibody used. Thus, the anti-ErbB antiody may, for example, have growth inhibitory properties and/or may induce cell death and/or apoptosis. In a particularly preferred embodiment, the method concerns the treatment of cancer including, without limitation, breast, ovarian, stomach, endometrial, salivary gland, lung, kidney, colon, colorectal, thyroid, pancreatic, prostate and bladder cancer. Preferably the cancer is breast cancer, in particular, breast cancer which overexpresses ErbB2 at a 2+ level or above, more preferably at a 3+ level. A preferred group of antibodies has a biological characteristic of a 4D5 monoclonal antibody, or binds essentially the same epitope as a 4D5 monoclonal antibody, a humanized form of the murine monoclonal antibody 4D5 (ATCC CRL 10463) being particularly preferred.

The maytansinoid used in the conjugates of the present invention may be maytansine or, preferably, maytansinol or a maytansinol ester. The antibody and maytansinoid may be conjugated by a bispecific chemical linker, such as N-succinimidyl-4-(2-pyridylthio)propanoate (SPDP) or N-succinimidyl-4-(2-pyridylthio)pentanoate (SPP). The linking group between the antibody and the maytansinoid may, for example, be a disulfide, thioether, acid labile, photolabile, peptidase labile, or esterase labile group.

In another aspect, the invention concerns an article of manufacture comprising a container and a composition contained therein, wherein the composition comprises an anti-ErbB antibody-maytansinoid conjugate, and further comprising a package insert or label indicating that the composition can be used to treat cancer characterized by overexpression of an ErbB receptor, preferably at a 2+ level or above.

Brief Desctiption of the Drawings

Figure 1 shows the structure of the maytansinoid, designated "DM1."

Figure 2 illustrates the structure of a HERCEPTIN®-DM1 conjugate.

Figure 3 is the elution profile of HERCEPTIN®-DM1 conjugate on a Sephacryl S300 gel filtration column.

Figure 4 shows the nucleotide sequence of a HER2 transgene plasmid construct (SEQ ID NO: 1) directing the expression of native human HER2 (ErbB2) in the mammary gland of a transgenic mouse. The figure includes the nucleotide sequence of HER2 (ErbB2) cDNA insert (SEQ ID NO: 2) as well as the deduced amino acid sequence of HER2 (ErbB2) (SEQ ID NO: 3), including the signal sequence. Within SEQ ID NO: 3, residues from about 22 to about 645, inclusive represent the HER2 (ErbB2) extracellular domain.

Figure 5 illustrates the effect of HERCEPTIN®-DM1 on HER2-transgenic tumors. Two mm^3 pieces of MMTV-HER2-transgenic tumors were transplanted into the mammary fat pad of FVB mice. When tumors reached 250 mm^3, groups of 8 mice were injected i.v. on 5 consecutive days with a HERCEPTIN®-DM1 conjugate. Two other groups of mice were treated IP twice per week with 10 mg/kg of either HERCEPTIN® or RITUXAN®.

Figure 6 shows the heavy chain variable region sequence of a humanized anti-HER2 antibody 2C4.

Figure 7 shows the light chain variable region sequence of a humanized anti-HER2 antibody 2C4.

Detailed Description of the Invention

1. Definitions

Unless defined otherwise, technical and scientific terms used herein have the same meaning as commonly understood by one of ordinary skill in the art to which this invention belongs. Singleton *et al.*, *Dictionary of Microbiology and Molecular Biology 2nd ed.*, J. Wiley & Sons (New York, NY 1994). One skilled in the art will recognize many methods and materials similar or equivalent to those described herein, which could be used in the practice of the present invention. Indeed, the present invention is in no way limited to the methods and materials described. For purposes of the present invention, the following terms are defined below.

An "ErbB receptor" or "ErbB" is a receptor protein tyrosine kinase which belongs to the ErbB receptor family and includes ErbB1 (EGFR), ErbB2 (HER2), ErbB3 (HER3) and ErbB4 (HER4) receptors and other members of this family to be identified in the future. The definition specifically includes ErbB receptors encoded by spliced forms of the corresponding erbB oncogens, including, without limitation, the deletion variant of ErbB2 disclosed in PCT publication No. WO 00/20579 (published on April 13, 2000). The ErbB receptor will generally comprise an extracellular domain, which may bind an ErbB ligand; a lipophilic transmembrane domain; a conserved intracellular tyrosine kinase domain; and a carboxyl-terminal signaling domain harboring several tyrosine residues which can be phosphorylated. The ErbB receptor may be a "native sequence" ErbB receptor or a functional derivative, such as an "amino acid sequence variant" thereof. Preferably the ErbB receptor is native sequence human ErbB receptor.

The terms "ErbB1", "epidermal growth factor receptor" and "EGFR" are used interchangeably herein and refer to native sequence EGFR as disclosed, for example, in Carpenter *et al. Ann. Rev. Biochem.* 56:881-914 (1987), including naturally occurring mutant forms thereof (*e.g.* a deletion mutant EGFR as in Humphrey *et al. PNAS (USA)* 87:4207-4211 (1990)), and its functional derivatives, such as amino acid sequence variants. *erb*B1 refers to the gene encoding the EGFR protein product.

The expressions "ErbB2" and "HER2" are used interchangeably herein and refer to native sequence human HER2 protein described, for example, in Semba *et al.*, *PNAS (USA)* 82:6497-6501 (1985) and Yamamoto *et al. Nature*

319:230-234 (1986) (Genebank accession number X03363), and functional derivatives, such as amino acid sequnce variants thereof. The term *erb*B2 refers to the gene encoding human HER2 and *neu* refers to the gene encoding rat p185^{neu}. Preferred HER2 is native sequence human HER2. Examples of antibodies which bind HER2 include MAbs 4D5 (ATCC CRL 10463), 2C4 (ATCC HB-12697), 7F3 (ATCC HB-12216), and 7C2 (ATCC HB 12215) (see, US Patent No. 5,772,997; WD98/77797; and US Patent No. 5,840,525, expressly incorporated herein by reference). Humanized anti-HER2 antibodies include huMAb4D5-1, huMAb4D5-2, huMAb4D5-3, huMAb4D5-4, huMAb4D5-5, huMAb4D5-6, huMAb4D5-7 and huMAb4D5-8 (HERCEPTIN®) as described in Table 3 of U.S. Patent 5,821,337 expressly incorporated herein by reference; humanized 520C9 (WD93/21319). Human anti-HER2 antibodies are described in U.S. Patent No. 5,772,997 issued June 30, 1998 and WO 97/00271 published January 3, 1997.

"ErbB3" and "HER3" refer to the receptor polypeptide as disclosed, for example, in US Pat. Nos. 5,183,884 and 5,480,968 as well as Kraus *et al. PNAS (USA)* 86:9193-9197 (1989), and functional derivatives, including amino acid sequence variants thereof. Examples of antibodies which bind HER3 are described in US Patent No. 5,968,511 (Akita and Sliwkowski), *e.g.* the 8B8 antibody (ATCC HB 12070) or a humanized variant thereof.

The terms "ErbB4" and "HER4" herein refer to the receptor polypeptide as disclosed, for example, in EP Pat Appln No 599,274; Plowman *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:1746-1750 (1993); and Plowman *et al., Nature*, 366:473-475 (1993), and functional derivatives, including amino acid sequence variants thereof such as the HER4 isoforms disclosed in WD 99/19488.

A "native" or "native sequence" EGFR, HER2, HER3 or HER4 polypeptide may be isolated from nature, produced by techniques of recombinant DNA technology, chemically synthesized, or produced by any combinations of these or similar methods.

"Functional derivatives" include amino acid sequence variants, and covalent derivatives of the native polypeptides as long as they retain a qualitative biological activity of the corresponding native polypeptide. Amino acid sequence variants generally differ from a native sequence in the substitution, deletion and/or insertion of one or more amino acids anywhere within a native amino acid sequence. Deletional variants include fragments of the native polypeptides, and variants having N- and/or C-terminal truncations. Drdinarily, amino acid sequence variants will possess at least about 70% homology, preferably at least about 80%, more preferably at least about 90% homology with a native polypeptide.

"Homology" is defined as the percentage of residues in the amino acid sequence variant that are identical after aligning the sequences and introducing gaps, if necessary, to achieve the maximum percent homology. Methods and computer programs for the alignment are well known in the art. One such computer program is "Align 2", authored by Genentech, Inc., which was filed with user documentation in the United States Copyright Dffice, Washington, DC 20559, on December 10, 1991.

By "ErbB ligand" is meant a polypeptide which binds to and/or activates an ErbB receptor. The ErbB ligand of particular interest herein is a native sequence human ErbB ligand such as Epidermal Growth Factor (EGF) (Savage *et al., J. Biol. Chem.* 247:7612-7621 (1972)); Tansforming Growth Factor alpha (TGF-alpha) (Marquardt *et al., Science*

223:1079-1082 (1984)); amphiregulin also known as schwanoma or keratinocyte autocrine growth factor (Shoyab *et al. Science* 243:1074-1076 (1989); Kimura *et al. Nature* 348:257-260 (1990); and Cook *et al. Mol. Cell. Biol.* 11:2547-2557 (1991)); betacellulin (Shing *et al., Science* 259:1604-1607 (1993); and Sasada *et al. Biochem. Biophys. Res. Commun.* 190:1173 (1993)); heparin-binding epidermal growth factor (HB-EGF) (Higashiyama *et al., Science* 251:936-939 (1991)); epiregulin (Toyoda *et al., J. Biol. Chem.* 270:7495-7500 (1995); and Komurasaki *et al. Oncogene* 15:2841-2848 (1997)), a heregulin (see below); neuregulin-2 (NRG-2) (Carraway *et al., Nature* 387:512-516 (1997)); neuregulin-3 (NRG-3) (Zhang *et al., Proc. Natl. Acad. Sci.* 94:9562-9567 (1997)); or cripto (CR-1) (Kannan *et al. J. Biol. Chem.* 272(6):3330-3335 (1997)). ErbB ligands which bind EGFR include EGF, TGF-alpha, amphiregulin, betacellulin, HB-EGF and epiregulin. ErbB ligands which bind HER3 include heregulins. ErbB ligands capable of binding HER4 include betacellulin, epiregulin, HB-EGF, NRG-2, NRG-3 and heregulins.

"Heregulin" (HRG) when used herein refers to a polypeptide which activates the ErbB2-ErbB3 and ErbB2-ErbB4 protein complexes (i.e. induces phosphorylation of tyrosine residues in the complex upon binding thereto). Various heregulin polypeptides encompassed by this term are disclosed in Holmes *et al., Science* 256:1205-1210 (1992); WO 92/20798; Wen *et al., Mol. Cell. Biol.* 14(3):1909-1919 (1994) and Marchionni *et al., Nature* 362:312-318 (1993), for example. The term includes biologically active fragments and/or variants of a naturally occurring HRG polypeptide, such as an EGF-like domain fragment thereof (e.g. $HRG\beta_{177-244}$).

An "ErbB hetero-oligomer" herein is a noncovalently associated oligomer comprising at least two different ErbB receptors. Such complexes may form when a cell expressing two or more ErbB receptors is exposed to an ErbB ligand and can be isolated by immunoprecipitation and analyzed by SDS-PAGE as described in Sliwkowski *et al., J. Biol. Chem.*, 269(20):14661-14665 (1994), for example. Examples of such ErbB hetero-oligomers include EGFR-HER2, HER2-HER3 and HER3-HER4 complexes. Moreover, the ErbB hetero-oligomer may comprise two or more HER2 receptors combined with a different ErbB receptor, such as HER3, HER4 or EGFR. Other proteins, such as a cytokine receptor subunit (*e.g.* gp130), may be included in the hetero-oligomer.

In the context of HER2 variants, such as HER2 fragments, the phrase "having the biological activity of a native human HER2" is used to refer to the qualitative ability of such fragments to induce tumor growth when overexpressed in an animal model (transgenic or non-transgenic) of the present invention.

"Tumor", as used herein, refers to all neoplastic cell growth and proliferation, whether malignant or benign, and all pre-cancerous and cancerous cells and tissues.

The terms "cancer" and "cancerous" refer to or describe the physiological condition in mammals that is typically characterized by unregulated cell growth. Examples of cancer include, but are not limited to, carcinoma, lymphoma, blastoma, sarcoma, and leukemia or lymphoid malignancies. More particular examples of such cancers include squamous cell cancer (*e.g.* epithelial squamous cell cancer), lung cancer including small-cell lung cancer, non-small cell lung cancer, adenocarcinoma of the lung and squamous carcinoma of the lung, cancer of the peritoneum, hepatocellular cancer, gastric or stomach cancer including gastrointestinal cancer, pancreatic cancer, glioblastoma, cervical cancer, ovarian cancer, liver cancer, bladder cancer, hepatoma, breast cancer, colon cancer, rectal cancer,

colorectal cancer, endometrial or uterine carcinoma, salivary gland carcinoma, kidney or renal cancer, prostate cancer, vulval cancer, thyroid cancer, hepatic carcinoma, anal carcinoma, penile carcinoma, as well as head and neck cancer.

A cancer which "overexpresses" an ErbB receptor is one which has significantly higher levels of an ErbB receptor, such as HER2, at the cell surface thereof, compared to a noncancerous cell of the same tissue type. Such overexpression may be caused by gene amplification or by increased transcription or translation. ErbB receptor overexpression may be determined in a diagnostic or prognostic assay by evaluating increased levels of the ErbB protein present on the surface of a cell (*e.g.* via an immunohistochemistry assay; IHC). Alternatively, or additionally, one may measure levels of ErbB-encoding nucleic acid in the cell, *e.g.* via fluorescent *in situ* hybridization (FISH; see WO98/45479 published October, 1998), Southern blotting, or polymerase chain reaction (PCR) techniques, such as real time quantitative PCR (RT-PCR). One may also study ErbB receptor overexpression by measuring shed antigen (*e.g.*, ErbB extracellular domain) in a biological fluid such as serum (see, *e.g.*, U.S. Patent No. 4,933,294 issued June 12, 1990; WO91/05264 published April 18, 1991; U.S. Patent 5,401,638 issued March 28, 1995; and Sias *et al. J. Immunol. Methods* 132: 73-80 (1990)). Aside from the above assays, various *in vivo* assays are available to the skilled practitioner. For example, one may expose cells within the body of the patient to an antibody which is optionally labeled with a detectable label, *e.g.* a radioactive isotope, and binding of the antibody to cells in the patient can be evaluated, *e.g.* by external scanning for radioactivity or by analyzing a biopsy taken from a patient previously exposed to the antibody.

The tumors overexpressing HER2 are rated by immunohistochemical scores corresponding to the number of copies of HER2 molecules expressed per cell, and can been determined biochemically: 0 = 0-10,000 copies/cell, 1+ = at least about 200,000 copies/cell, 2+ = at least about 500,000 copies/cell, 3+ = at least about 2,000,000 copies/cell. Overexpression of HER2 at the 3+ level, which leads to ligand-independent activation of the tyrosine kinase (Hudziak *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 7159-7163 [1987]), occurs in approximately 30% of breast cancers, and in these patients, relapse-free survival and overall survival are diminished (Slamon *et al., Science* 244: 707-712 [1989]; Slamon *et al., Science* 235: 177-182 [1987]).

Conversely, a cancer which is "not characterized by overexpression of an ErbB receptor" is one which, in a diagnostic assay, does not express higher than normal levels of ErbB receptor compared to a noncancerous cell of the same tissue type.

A "hormone independent" cancer is one in which proliferation thereof is not dependent on the presence of a hormone which binds to a receptor expressed by cells in the cancer. Such cancers do not undergo clinical regression upon administration of pharmacological or surgical strategies that reduce the hormone concentration in or near the tumor. Examples of hormone independent cancers include androgen independent prostate cancer, estrogen independent breast cancer, endometrial cancer and ovarian cancer. Such cancers may begin as hormone dependent tumors and progress from a hormone-sensitive stage to a hormone-refractory tumor following anti-hormonal therapy.

The term "antibody" herein is used in the broadest sense and specifically covers intact monoclonal antibodies, polyclonal antibodies, multispecific antibodies (*e.g.* bispecific antibodies) formed from at least two intact antibodies, and antibody fragments, so long as they exhibit the desired biological activity.

The term "monoclonal antibody" as used herein refers to an antibody obtained from a population of substantially homogeneous antibodies, *i.e.*, the individual antibodies comprising the population are identical except for possible naturally occurring mutations that may be present in minor amounts. Monoclonal antibodies are highly specific, being directed against a single antigenic site. Furthermore, in contrast to polyclonal antibody preparations which include different antibodies directed against different determinants (epitopes), each monoclonal antibody is directed against a single determinant on the antigen. In addition to their specificity, the monoclonal antibodies are advantageous in that they may be synthesized uncontaminated by other antibodies. The modifier "monoclonal" indicates the character of the antibody as being obtained from a substantially homogeneous population of antibodies, and is not to be construed as requiring production of the antibody by any particular method. For example, the monoclonal antibodies to be used in accordance with the present invention may be made by the hybridoma method first described by Kohler *et al., Nature*, 256:495 (1975), or may be made by recombinant DNA methods (see, *e.g.*, U.S. Patent No. 4,816,567). The "monoclonal antibodies" may also be isolated from phage antibody libraries using the techniques described in Clackson *et al., Nature,* 352:624-628 (1991) and Marks *et al., J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991), for example.

The monoclonal antibodies herein specifically include "chimeric" antibodies in which a portion of the heavy and/or light chain is identical with or homologous to corresponding sequences in antibodies derived from a particular species or belonging to a particular antibody class or subclass, while the remainder of the chain(s) is identical with or homologous to corresponding sequences in antibodies derived from another species or belonging to another antibody class or subclass, as well as fragments of such antibodies, so long as they exhibit the desired biological activity (U.S. Patent No. 4,816,567; and Morrison *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984)). Chimeric antibodies of interest herein include primatized antibodies comprising variable domain antigen-binding sequences derived from a non-human primate (*e.g.* Old World Monkey, Ape etc) and human constant region sequences.

"Antibody fragments" comprise a portion of an intact antibody, preferably comprising the antigen-binding or variable region thereof. Examples of antibody fragments include Fab, Fab', $F(ab')_2$, and Fv fragments; diabodies; linear antibodies; single-chain antibody molecules; and multispecific antibodies formed from antibody fragment(s).

An "intact" antibody is one which comprises an antigen-binding variable region as well as a light chain constant domain (C_L) and heavy chain constant domains, C_H1, C_H2 and C_H3. The constant domains may be native sequence constant domains (*e.g.* human native sequence constant domains) or amino acid sequence variant thereof. Preferably, the intact antibody has one or more effector functions.

"Humanized" forms of non-human (*e.g.,* rodent) antibodies are chimeric antibodies that contain minimal sequence derived from non-human immunoglobulin. For the most part, humanized antibodies are human immunoglobulins (recipient antibody) in which residues from a hypervariable region of the recipient are replaced by residues from a hypervariable region of a non-human species (donor antibody) such as mouse, rat, rabbit or nonhuman

primate having the desired specificity, affinity, and capacity. In some instances, framework region (FR) residues of the human immunoglobulin are replaced by corresponding non-human residues. Furthermore, humanized antibodies may comprise residues that are not found in the recipient antibody or in the donor antibody. These modifications are made to further refine antibody performance. In general, the humanized antibody will comprise substantially all of at least one, and typically two, variable domains, in which all or substantially all of the hypervariable loops correspond to those of a non-human immunoglobulin and all or substantially all of the FRs are those of a human immunoglobulin sequence. The humanized antibody optionally also will comprise at least a portion of an immunoglobulin constant region (Fc), typically that of a human immunoglobulin. For further details, see Jones *et al., Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann *et al., Nature* 332:323-329 (1988); and Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992).

Humanized anti-ErbB2 antibodies include huMAb4D5-1, huMAb4D5-2, huMAb4D5-3, huMAb4D5-4, huMAb4D5-5, huMAb4D5-6, huMAb4D5-7 and huMAb4D5-8 (HERCEPTIN®) as described in Table 3 of U.S. Patent 5,821,337 expressly incorporated herein by reference; humanized 520C9 (WO93/21319) and humanized 2C4 antibodies as those shown in Figure 6.

Antibody "effector functions" refer to those biological activities attributable to the Fc region (a native sequence Fc region or amino acid sequence variant Fc region) of an antibody. Examples of antibody effector functions include C1q binding; complement dependent cytotoxicity; Fc receptor binding; antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC); phagocytosis; down regulation of cell surface receptors (*e.g.* B cell receptor; BCR), etc.

Depending on the amino acid sequence of the constant domain of their heavy chains, intact antibodies can be assigned to different "classes". There are five major classes of intact antibodies: IgA, IgD, IgE, IgG, and IgM, and several of these may be further divided into "subclasses" (isotypes), *e.g.*, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, and IgA2. The heavy-chain constant domains that correspond to the different classes of antibodies are called , , , , and , respectively. The subunit structures and three-dimensional configurations of different classes of immunoglobulins are well known.

"Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity" and "ADCC" refer to a cell-mediated reaction in which nonspecific cytotoxic cells that express Fc receptors (FcRs) (*e.g.* Natural Killer (NK) cells, neutrophils, and macrophages) recognize bound antibody on a target cell and subsequently cause lysis of the target cell. The primary cells for mediating ADCC, NK cells, express Fc RIII only, whereas monocytes express Fc RI, Fc RII and Fc RIII. FcR expression on hematopoietic cells in summarized is Table 3 on page 464 of Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9:457-92 (1991). To assess ADCC activity of a molecule of interest, an *in vitro* ADCC assay, such as that described in US Patent No. 5,500,362 or 5,821,337 may be performed. Useful effector cells for such assays include peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and Natural Killer (NK) cells. Alternatively, or additionally, ADCC activity of the molecule of interest may be *assessed in vivo*, *e.g.*, in a animal model such as that disclosed in Clynes *et al. PNAS (USA)* 95:652-656 (1998).

"Human effector cells" are leukocytes which express one or more FcRs and perform effector functions. Preferably, the cells express at least Fc RIII and perform ADCC effector function. Examples of human leukocytes

which mediate ADCC include peripheral blood mononuclear cells (PBMC), natural killer (NK) cells, monocytes, cytotoxic T cells and neutrophils; with PBMCs and NK cells being preferred. The effector cells may be isolated from a native source thereof, *e.g.* from blood or PBMCs as described herein.

The terms "Fc receptor" or "FcR" are used to describe a receptor that binds to the Fc region of an antibody. The preferred FcR is a native sequence human FcR. Moreover, a preferred FcR is one which binds an IgG antibody (a gamma receptor) and includes receptors of the Fc RI, Fc RII, and Fc RIII subclasses, including allelic variants and alternatively spliced forms of these receptors. Fc RII receptors include Fc RIIA (an "activating receptor") and Fc RIIB (an "inhibiting receptor"), which have similar amino acid sequences that differ primarily in the cytoplasmic domains thereof. Activating receptor Fc RIIA contains an immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM) in its cytoplasmic domain. Inhibiting receptor Fc RIIB contains an immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif (ITIM) in its cytoplasmic domain. (see review M. in Daëron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234 (1997)). FcRs are reviewed in Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9:457-92 (1991); Capel *et al., Immunomethods* 4:25-34 (1994); and de Haas *et al., J. Lab. Clin. Med.* 126:330-41 (1995). Other FcRs, including those to be identified in the future, are encompassed by the term "FcR" herein. The term also includes the neonatal receptor, FcRn, which is responsible for the transfer of maternal IgGs to the fetus (Guyer *et al., J. Immunol.* 117:587 (1976) and Kim *et al., J. Immunol.* 24:249 (1994)).

"Complement dependent cytotoxicity" or "CDC" refers to the ability of a molecule to lyse a target in the presence of complement. The complement activation pathway is initiated by the binding of the first component of the complement system (C1q) to a molecule (*e.g.* an antibody) complexed with a cognate antigen. To assess complement activation, a CDC assay, *e.g.* as described in Gazzano-Santoro *et al., J. Immunol. Methods* 202:163 (1996), may be performed.

"Native antibodies" are usually heterotetrameric glycoproteins of about 150,000 daltons, composed of two identical light (L) chains and two identical heavy (H) chains. Each light chain is linked to a heavy chain by one covalent disulfide bond, while the number of disulfide linkages varies among the heavy chains of different immunoglobulin isotypes. Each heavy and light chain also has regularly spaced intrachain disulfide bridges. Each heavy chain has at one end a variable domain (V_H) followed by a number of constant domains. Each light chain has a variable domain at one end (V_L) and a constant domain at its other end. The constant domain of the light chain is aligned with the first constant domain of the heavy chain, and the light-chain variable domain is aligned with the variable domain of the heavy chain. Particular amino acid residues are believed to form an interface between the light chain and heavy chain variable domains.

The term "variable", as used in connection with antibodies, refers to the fact that certain portions of the antibody variable domains differ extensively in sequence among antibodies and are used in the binding and specificity of each particular antibody for its particular antigen. However, the variability is not evenly distributed throughout the variable domains of antibodies. It is concentrated in three segments called hypervariable regions both in the light chain and the heavy chain variable domains. The more highly conserved portions of variable domains are called the

framework regions (FRs). The variable domains of native heavy and light chains each comprise four FRs, largely adopting a -sheet configuration, connected by three hypervariable regions, which form loops connecting, and in some cases forming part of, the -sheet structure. The hypervariable regions in each chain are held together in close proximity by the FRs and, with the hypervariable regions from the other chain, contribute to the formation of the antigen-binding site of antibodies (see Kabat *et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). The constant domains are not involved directly in binding an antibody to an antigen, but exhibit various effector functions, such as participation of the antibody in antibody dependent cellular cytotoxicity (ADCC).

The term "hypervariable region" when used herein refers to the amino acid residues of an antibody which are responsible for antigen-binding. The hypervariable region generally comprises amino acid residues from a "complementarity determining region" or "CDR" (*e.g.* residues 24-34 (L1), 50-56 (L2) and 89-97 (L3) in the light chain variable domain and 31-35 (H1), 50-65 (H2) and 95-102 (H3) in the heavy chain variable domain; Kabat *et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)) and/or those residues from a "hypervariable loop" (*e.g.* residues 26-32 (L1), 50-52 (L2) and 91-96 (L3) in the light chain variable domain and 26-32 (H1), 53-55 (H2) and 96-101 (H3) in the heavy chain variable domain; Chothia and Lesk *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)). "Framework Region" or "FR" residues are those variable domain residues other than the hypervariable region residues as herein defined.

An "isolated" antibody is one which has been identified and separated and/or recovered from a component of its natural environment. Contaminant components of its natural environment are materials which would interfere with diagnostic or therapeutic uses for the antibody, and may include enzymes, hormones, and other proteinaceous or nonproteinaceous solutes. In preferred embodiments, the antibody will be purified (1) to greater than 95% by weight of antibody as determined by the Lowry method, and most preferably more than 99% by weight, (2) to a degree sufficient to obtain at least 15 residues of N-terminal or internal amino acid sequence by use of a spinning cup sequenator, or (3) to homogeneity by SDS-PAGE under reducing or nonreducing conditions using Coomassie blue or, preferably, silver stain. Isolated antibody includes the antibody *in situ* within recombinant cells since at least one component of the antibody's natural environment will not be present. Ordinarily, however, isolated antibody will be prepared by at least one purification step.

An antibody "which binds" an antigen of interest, *e.g.* ErbB2 antigen, is one capable of binding that antigen with sufficient affinity such that the antibody is useful as a diagnostic and/or therapeutic agent in targeting a cell expressing the antigen and/or for targeted delivery of a cytotoxic or other chemotherapeutic agent, such as a maytansinoid. Where the antibody is one which binds ErbB2, it will usually preferentially bind ErbB2 as opposed to other ErbB receptors, and may be one which does not significantly cross-react with other proteins such as EGFR, ErbB3 or ErbB4. In such embodiments, the extent of binding of the antibody to these non-ErbB2 proteins (*e.g.,* cell surface binding to endogenous receptor) will be less than 10% as determined by fluorescence activated cell sorting (FACS) analysis or radioimmunoprecipitation (RIA). Sometimes, the anti-ErbB2 antibody will not significantly cross-

react with the rat *neu* protein, *e.g.*, as described in Schecter *et al. Nature* 312:513 (1984) and Drebin *et al., Nature* 312:545-548 (1984).

Unless indicated otherwise, the expressions "monoclonal antibody 4D5", and "4D5 monoclonal antibody" refer to an antibody that has antigen binding residues of, or derived from, the murine 4D5 antibody. For example, the monoclonal antibody 4D5 may be murine monoclonal antibody 4D5 (ATCC CRL 10463) or a variant thereof, such as humanized antibody 4D5, possessing antigen binding amino acid residues of murine monoclonal antibody 4D5. Exemplary humanized 4D5 antibodies include huMAb4D5-1, huMAb4D5-2, huMAb4D5-3, huMAb4D5-4, huMAb4D5-5, huMAb4D5-6, huMAb4D5-7 and huMAb4D5-8 (HERCEPTIN®) as in US Patent No. 5,821,337, with huMAb4D5-8 (HERCEPTIN®) being a preferred humanized 4D5 antibody.

An antibody having a "biological characteristic" of a designated antibody, such as the monoclonal antibody designated 4D5, is one which possesses one or more of the biological characteristics of that antibody which distinguish it from other antibodies that bind to the same antigen (*e.g.* ErbB2). For example, an antibody with a biological characteristic of 4D5 may show growth inhibitory effect on ErbB2 overexpressing cells in a manner that is dependent on the ErbB2 expression level and/or bind the same epitope in the extracellular domain of ErbB2 as that bound by 4D5 (*e.g.* which blocks binding of monoclonal antibody 4D5 to ErbB2).

A "growth inhibitory agent" when used herein refers to a compound or composition which inhibits growth of a cell, especially an ErbB expressing cancer cell either *in vitro* or *in vivo.* Thus, the growth inhibitory agent may be one which significantly reduces the percentage of ErbB expressing cells in S phase. Examples of growth inhibitory agents include agents that block cell cycle progression (at a place other than S phase), such as agents that induce G1 arrest and M-phase arrest. Classical M-phase blockers include the vincas (vincristine and vinblastine), taxanes, and topo II inhibitors such as doxorubicin, epirubicin, daunorubicin, etoposide, and bleomycin. Those agents that arrest G1 also spill over into S-phase arrest, for example, DNA alkylating agents such as tamoxifen, prednisone, dacarbazine, mechlorethamine, cisplatin, methotrexate, 5-fluorouracil, and ara-C. Further information can be found in *The Molecular Basis of Cancer*, Mendelsohn and Israel, eds., Chapter 1, entitled "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs" by Murakami *et al.* (WB Saunders: Philadelphia, 1995), especially p. 13.

Examples of "growth inhibitory" antibodies are those which bind to ErbB2 and inhibit the growth of cancer cells overexpressing ErbB2. Preferred growth inhibitory anti-ErbB2 antibodies inhibit growth of SK-BR-3 breast tumor cells in cell culture by greater than 20%, and preferably greater than 50% (*e.g.* from about 50% to about 100%) at an antibody concentration of about 0.5 to 30 g/ml, where the growth inhibition is determined six days after exposure of the SK-BR-3 cells to the antibody (see U.S. Patent No. 5,677,171 issued October 14, 1997). The SK-BR-3 cell growth inhibition assay is described in more detail in that patent and hereinbelow. The preferred growth inhibitory antibody is monoclonal antibody 4D5, *e.g.*, humanized 4D5.

A molecule (e.g. antibody) which "induces cell death" is one which causes a viable cell to become nonviable. The cell is generally one which expresses the ErbB2 receptor, especially where the cell overexpresses the ErbB2 receptor. Preferably, the cell is a cancer cell, *e.g.* a breast, ovarian, stomach, endometrial, salivary gland, lung, kidney,

colon, thyroid, pancreatic, prostate or bladder cancer cell. *In vitro*, the cell may be a SK-BR-3, BT474, Calu 3, MDA-MB-453, MDA-MB-361 or SKOV3 cell. Cell death *in vitro* may be determined in the absence of complement and immune effector cells to distinguish cell death induced by antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) or complement dependent cytotoxicity (CDC). Thus, the assay for cell death may be performed using heat inactivated serum (*i.e.* in the absence of complement) and in the absence of immune effector cells. To determine whether the molecule is able to induce cell death, loss of membrane integrity as evaluated by uptake of propidium iodide (PI), trypan blue (see Moore *et al. Cytotechnology* 17:1-11 (1995)) or 7AAD can be assessed relative to untreated cells. Preferred cell death-inducing antibodies are those which induce PI uptake in the PI uptake assay in BT474 cells. Examples of antibodies which induce cell death include anti-ErbB2 antibodies 7C2 and 7F3 (WO 98/17797, expressly incorporated herein by reference), including humanized and/or affinity matured variants thereof.

A molecule (e.g. antibody) which "induces apoptosis" is one which induces programmed cell death as determined by binding of annexin V, fragmentation of DNA, cell shrinkage, dilation of endoplasmic reticulum, cell fragmentation, and/or formation of membrane vesicles (called apoptotic bodies). The cell is usually one which overexpresses the ErbB2 receptor. Preferably the cell is a tumor cell, *e.g.* a breast, ovarian, stomach, endometrial, salivary gland, lung, kidney, colon, thyroid, pancreatic, prostate or bladder cancer cell. *In vitro*, the cell may be a SK-BR-3, BT474, Calu 3 cell, MDA-MB-453, MDA-MB-361 or SKOV3 cell. Various methods are available for evaluating the cellular events associated with apoptosis. For example, phosphatidyl serine (PS) translocation can be measured by annexin binding; DNA fragmentation can be evaluated through DNA laddering; and nuclear/chromatin condensation along with DNA fragmentation can be evaluated by any increase in hypodiploid cells. Preferably, the molecule which induces apoptosis is one which results in about 2 to 50 fold, preferably about 5 to 50 fold, and most preferably about 10 to 50 fold, induction of annexin binding relative to untreated cell in an annexin binding assay using BT474 cells. Sometimes the pro-apoptotic molecule will be one which further blocks ErbB ligand activation of an ErbB receptor. In other situations, the molecule is one which does not significantly block ErbB ligand activation of an ErbB receptor. Further, the molecule may induce apoptosis, without inducing a large reduction in the percent of cells in S phase (*e.g.* one which only induces about 0-10% reduction in the percent of these cells relative to control). Examples of antibodies which induce apoptosis include anti-ErbB2 antibodies 7C2 and 7F3 (WO 98/17797, expressly incorporated herein by reference), including humanized and/or affinity matured variants thereof.

An antibody which "blocks" ligand activation of an ErbB receptor is one which reduces or prevents such activation as hereinabove defined, wherein the antibody is able to block ligand activation of the ErbB receptor substantially more effectively than monoclonal antibody 4D5, *e.g.* about as effectively as monoclonal antibodies 7F3 or 2C4 or Fab fragments thereof and preferably about as effectively as monoclonal antibody 2C4 or a Fab fragment thereof. For example, the antibody that blocks ligand activation of an ErbB receptor may be one which is about 50-100% more effective than 4D5 at blocking formation of an ErbB hetero-oligomer. Blocking of ligand activation of an ErbB receptor can occur by any means, *e.g.* by interfering with: ligand binding to an ErbB receptor, ErbB complex formation, tyrosine kinase activity of an ErbB receptor in an ErbB complex and/or phosphorylation of tyrosine kinase

residue(s) in or by an ErbB receptor. Examples of antibodies which block ligand activation of an ErbB receptor include monoclonal antibodies 2C4 and 7F3 (which block HRG activation of ErbB2/ErbB3 and ErbB2/ErbB4 hetero-oligomers; and EGF, TGF- , amphiregulin, HB-EGF and/or epiregulin activation of an EGFR/ErbB2 hetero-oligomer); and L26, L96 and L288 antibodies (Klapper *et al. Oncogene* 14:2099-2109 (1997)), which block EGF and NDF binding to T47D cells which express EGFR, ErbB2, ErbB3 and ErbB4. Humanized and/or affinity matured variants these and other antibodies within the definition are specifically included.

The term "epitope" is used to refer to binding sites for (monoclonal or polyclonal) antibodies on protein antigens.

Antibodies that bind to a certain epitope are identified by "epitope mapping." There are many methods known in the art for mapping and characterizing the location of epitopes on proteins, including solving the crystal structure of an antibody-antigen complex, competition assays, gene fragment expression assays, and synthetic peptide-based assays, as described, for example, in Chapter 11 of Harlow and Lane, Using Antibodies, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1999. Competition assays are discussed below. According to the gene fragment expression assays, the open reading frame encoding the protein is fragmented either randomly or by specific genetic constructions and the reactivity of the expressed fragments of the protein with the antibody to be tested is determined. The gene fragments may, for example, be produced by PCR and then transcribed and translated into protein *in vitro*, in the presence of radioactive amino acids. The binding of the antibody to the radioactively labeled protein fragments is then determined by immunoprecipitation and gel electrophoresis. Certain epitopes can also be identified by using large libraries of random peptide sequences displayed on the surface of phage particles (phage libraries). Alternatively, a defined library of overlapping peptide fragments can be tested for binding to the test antibody in simple binding assays. The latter approach is suitable to define linear epitopes of about 5 to 15 amino acids.

An antibody binds "essentially the same epitope" as a reference antibody, when the two antibodies recognize identical or sterically overlapping epitopes. The most widely used and rapid methods for determining whether two epitopes bind to identical or sterically overlapping epitopes are competition assays, which can be configured in all number of different formats, using either labeled antigen or labeled antibody. Usually, the antigen is immobilized on a 96-well plate, and the ability of unlabeled antibodies to block the binding of labeled antibodies is measured using radioactive or enzyme labels.

The "epitope 4D5" is the region in the extracellular domain of ErbB2 to which the antibody 4D5 (ATCC CRL 10463) binds. This epitope is close to the transmembrane domain of ErbB2, and extends from about residue 519 to about residue 625, inclusive within the ErbB2 extracellular domain sequence included in SEQ ID NO: 3, Figure 4. To screen for antibodies which bind to the 4D5 epitope, a routine cross-blocking assay such as that described in Harlow and Lane, *supra*, can be performed. Alternatively, epitope mapping can be performed to assess whether the antibody binds to the 4D5 epitope of ErbB2 (*e.g.* any one or more residues in the region from about residue 529 to about residue 625, inclusive in SEQ ID NO: 3).

The "epitope 3H4" is the region in the extracellular domain of ErbB2 to which the antibody 3H4 binds. This epitope includes residues from about 541 to about 599, inclusive, in the amino acid sequence of ErbB2 extracellular domain (see Figure 4 and SEQ ID NO: 3).

The "epitope 7C2/7F3" is the region at the N terminus of the extracellular domain of ErbB2 to which the 7C2 and/or 7F3 antibodies (each deposited with the ATCC, see below) bind. To screen for antibodies which bind to the 7C2/7F3 epitope, a routine cross-blocking assay such as that described in *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988), can be performed. Alternatively, epitope mapping can be performed to establish whether the antibody binds to the 7C2/7F3 epitope on ErbB2 (*e.g.* any one or more of residues in the region from about residue 22 to about residue 53 of ErbB2; see Figure 4, and SEQ ID NO: 3).

A tumor which "does not respond, or responds poorly, to treatment with a monoclonal anti-ErbB antibody" does not show statistically significant improvement in response to anti-ErbB antibody treatment when compared to no treatment or treatment with placebo in a recognized animal model or a human clinical trial, or which responds to initial treatment with anti-ErbB antibodies but grows as treatment is continued. A particularly suitable animal model for testing the efficacy of anti-ErbB antibodies is the transgenic animal model disclosed herein, and illustrated in Example 3.

The terms "treat" or "treatment" refer to both therapeutic treatment and prophylactic or preventative measures, wherein the object is to prevent or slow down (lessen) an undesired physiological change or disorder, such as the development or spread of cancer. For purposes of this invention, beneficial or desired clinical results include, but are not limited to, alleviation of symptoms, diminishment of extent of disease, stabilized (i.e., not worsening) state of disease, delay or slowing of disease progression, amelioration or palliation of the disease state, and remission (whether partial or total), whether detectable or undetectable. "Treatment" can also mean prolonging survival as compared to expected survival if not receiving treatment. Those in need of treatment include those already with the condition or disorder as well as those prone to have the condition or disorder or those in which the condition or disorder is to be prevented.

A "disorder" is any condition that would benefit from treatment of the present invention. This includes chronic and acute disorders or diseases including those pathological conditions which predispose the mammal to the disorder in question. Non-limiting examples of disorders to be treated herein include benign and malignant tumors; leukemias and lymphoid malignancies, in particular breast, ovarian, stomach, endometrial, salivary gland, lung, kidney, colon, thyroid, pancreatic, prostate or bladder cancer. A preferred disorder to be treated in accordance with the present invention is malignant tumor, such as breast cancer, that overexpresses an ErbB receptor (e.g. ErbB2 and/or EGFR), and does not respond or responds poorly to treatment with antibody to the receptor(s) that is/are overexpressed. A particularly preferred disorder is an ErbB2-overexpressing breast cancer that does not respond or responds poorly to HERCEPTIN® therapy.

The term "therapeutically effective amount" refers to an amount of a drug effective to treat a disease or disorder in a mammal. In the case of cancer, the therapeutically effective amount of the drug may reduce the number

of cancer cells; reduce the tumor size; inhibit (*i.e.*, slow to some extent and preferably stop) cancer cell infiltration into peripheral organs; inhibit (*i.e.*, slow to some extent and preferably stop) tumor metastasis; inhibit, to some extent, tumor growth; and/or relieve to some extent one or more of the symptoms associated with the cancer. To the extent the drug may prevent growth and/or kill existing cancer cells, it may be cytostatic and/or cytotoxic. For cancer therapy, efficacy can, for example, be measured by assessing the time to disease progression (TTP) and/or determining the response rate (RR).

The term "cytotoxic agent" as used herein refers to a substance that inhibits or prevents the function of cells and/or causes destruction of cells. The term is intended to include radioactive isotopes (*e.g.* At^{211}, I^{131}, I^{125}, Y^{90}, Re^{186}, Re^{188}, Sm^{153}, Bi^{212}, P^{32} and radioactive isotopes of Lu), chemotherapeutic agents, and toxins such as small molecule toxins or enzymatically active toxins of bacterial, fungal, plant or animal origin, including fragments and/or variants thereof.

A "chemotherapeutic agent" is a chemical compound useful in the treatment of cancer. Examples of chemotherapeutic agents include alkylating agents such as thiotepa and cyclosphosphamide (CYTOXAN™); alkyl sulfonates such as busulfan, improsulfan and piposulfan; aziridines such as benzodopa, carboquone, meturedopa, and uredopa; ethylenimines and methylamelamines including altretamine, triethylenemelamine, trietylenephosphoramide, triethylenethiophosphaoramide and trimethylolomelamine; nitrogen mustards such as chlorambucil, chlornaphazine, cholophosphamide, estramustine, ifosfamide, mechlorethamine, mechlorethamine oxide hydrochloride, melphalan, novembichin, phenesterine, prednimustine, trofosfamide, uracil mustard; nitrosureas such as carmustine, chlorozotocin, fotemustine, lomustine, nimustine, ranimustine; antibiotics such as aclacinomysins, actinomycin, authramycin, azaserine, bleomycins, cactinomycin, calicheamicin, carabicin, carminomycin, carzinophilin, chromomycins, dactinomycin, daunorubicin, detorubicin, 6-diazo-5-oxo-L-norleucine, doxorubicin, epirubicin, esorubicin, idarubicin, marcellomycin, mitomycins, mycophenolic acid, nogalamycin, olivomycins, peplomycin, potfiromycin, puromycin, quelamycin, rodorubicin, streptonigrin, streptozocin, tubercidin, ubenimex, zinostatin, zorubicin; anti-metabolites such as methotrexate and 5-fluorouracil (5-FU); folic acid analogues such as denopterin, methotrexate, pteropterin, trimetrexate; purine analogs such as fludarabine, 6-mercaptopurine, thiamiprine, thioguanine; pyrimidine analogs such as ancitabine, azacitidine, 6-azauridine, carmofur, cytarabine, dideoxyuridine, doxifluridine, enocitabine, floxuridine, 5-FU; androgens such as calusterone, dromostanolone propionate, epitiostanol, mepitiostane, testolactone; anti-adrenals such as aminoglutethimide, mitotane, trilostane; folic acid replenisher such as frolinic acid; aceglatone; aldophosphamide glycoside; aminolevulinic acid; amsacrine; bestrabucil; bisantrene; edatraxate; defofamine; demecolcine; diaziquone; elfornithine; elliptinium acetate; etoglucid; gallium nitrate; hydroxyurea; lentinan; lonidamine; mitoguazone; mitoxantrone; mopidamol; nitracrine; pentostatin; phenamet; pirarubicin; podophyllinic acid; 2-ethylhydrazide; procarbazine; PSK ; razoxane; sizofiran; spirogermanium; tenuazonic acid; triaziquone; 2, 2',2' - trichlorotriethylamine; urethan; vindesine; dacarbazine; mannomustine; mitobronitol; mitolactol; pipobroman; gacytosine; arabinoside ("Ara-C"); cyclophosphamide; thiotepa; taxanes, *e.g.* paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ) and doxetaxel (TAXOTERE®, Rhône-Poulenc Rorer, Antony, France); chlorambucil;

gemcitabine; 6-thioguanine; mercaptopurine; methotrexate; platinum analogs such as cisplatin and carboplatin; vinblastine; platinum; etoposide (VP-16); ifosfamide; mitomycin C; mitoxantrone; vincristine; vinorelbine; navelbine; novantrone; teniposide; daunomycin; aminopterin; xeloda; ibandronate; CPT-11; topoisomerase inhibitor RFS 2000; difluoromethylornithine (DMFO); retinoic acid; esperamicins; capecitabine; and pharmaceutically acceptable salts, acids or derivatives of any of the above. Also included in this definition are anti-hormonal agents that act to regulate or inhibit hormone action on tumors such as anti-estrogens including for example tamoxifen, raloxifene, aromatase inhibiting 4(5)-imidazoles, 4-hydroxytamoxifen, trioxifene, keoxifene, LY117018, onapristone, and toremifene (Fareston); and anti-androgens such as flutamide, nilutamide, bicalutamide, leuprolide, and goserelin; and pharmaceutically acceptable salts, acids or derivatives of any of the above.

The term "prodrug" as used in this application refers to a precursor or derivative form of a pharmaceutically active substance that is less cytotoxic to tumor cells compared to the parent drug and is capable of being enzymatically activated or converted into the more active parent form. See, *e.g.*, Wilman, "Prodrugs in Cancer Chemotherapy" *Biochemical Society Transactions*, 14, pp. 375-382, 615th Meeting Belfast (1986) and Stella *et al.*, "Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery," *Directed Drug Delivery*, Borchardt *et al.*, (ed.), pp. 247-267, Humana Press (1985). The prodrugs of this invention include, but are not limited to, phosphate-containing prodrugs, thiophosphate-containing prodrugs, sulfate-containing prodrugs, peptide-containing prodrugs, D-amino acid-modified prodrugs, glycosylated prodrugs, -lactam-containing prodrugs, optionally substituted phenoxyacetamide-containing prodrugs or optionally substituted phenylacetamide-containing prodrugs, 5-fluorocytosine and other 5-fluorouridine prodrugs which can be converted into the more active cytotoxic free drug. Examples of cytotoxic drugs that can be derivatized into a prodrug form for use in this invention include, but are not limited to, those chemotherapeutic agents described above.

The term "nucleic acid" refers to polynucleotides such as deoxyribonucleic acid (DNA), and, where appropriate, ribonucleic acid (RNA). The term also includes, as equivalents, analogs of either DNA or RNA made from nucleotide analogs, and as applicable, single (sense or antisense) and double-stranded polynucleotides. An "isolated" nucleic acid molecule is a nucleic acid molecule that is identified and separated from at least one contaminant nucleic acid molecule with which it is ordinarily associated in the natural source of the nucleic acid. An isolated nucleic acid molecule is other than in the form or setting in which it is found in nature. Isolated nucleic acid molecules therefore are distinguished from the nucleic acid molecule as it exists in natural cells. However, an isolated nucleic acid molecule includes a nucleic acid molecule contained in cells that ordinarily express the antibody where, for example, the nucleic acid molecule is in a chromosomal location different from that of natural cells.

As used herein, the term "vector" refers to a nucleic acid molecule capable of transporting another nucleic acid to which it has been linked. The term "expression vector" includes plasmids, cosmids or phages capable of synthesizing the subject HER2 protein encoded by the respective recombinant gene carried by the vector. Preferred vectors are those capable of autonomous replication and/expression of nucleic acids to which they are linked. In the

present specification, "plasmid" and "vector" are used interchangeably, as the plasmid is the most commonly used form of vector.

As used herein, the terms "transcriptional regulatory elements" and "transcriptional regulatory sequences" are used interchangeably and refer to nucleic acid, e.g. DNA sequences necessary for the expression of an operably linked coding sequence in a particular host organism. The control sequences that are suitable for prokaryotes, for example, include a promoter, optionally an operator sequence, and a ribosome binding site. Eukaryotic cells are known to utilize promoters, enhancers, splicing signals and polyadenylation signals. These terms are intended to encompass all elements that promote or regulate transcription, including promoters, core elements required for basic interaction of RNA polymerase and transcription factors, upstream elements, enhancers, and response elements (Lewin, "Genes V" (Oxford University Press, Oxford) pages 847-873). Reference herein to the transcriptional regulatory elements of a gene or class of gene includes both all or an intact region of the naturally occurring transcriptional regulatory elements and modified forms of the transcriptional regulatory elements of the gene or group of genes. Such modified forms include rearrangements of the elements, deletions of some elements or extraneous sequences, and insertion of heterologous elements. The modular nature of transcriptional regulatory elements and the absence of position-dependence of the function of some regulatory elements such as enhancers make such modifications possible. Numerous techniques are available for dissecting the regulatory elements of genes to determine their location and function. Such information can be used to direct modification of the elements, if desired. It is preferred, however, that an intact region of the transcriptional regulatory elements of a gene be used.

The term "tissue-specific promoter" means a nucleotide sequence that serves as a promoter, i.e., regulates expression of a selected DNA sequence operably linked to the promoter, and which effects expression of the selected DNA sequence in specific cells of a tissue, such as cells of a mammary gland. In an illustrative embodiment, gene constructs utilizing mammary gland-specific promoters can be used to preferentially direct expression of a HER2 protein or protein fragment in the mammary gland tissue.

Nucleic acid is "operably linked" when it is placed into a functional relationship with another nucleic acid sequence. For example, DNA for a presequence or secretory leader is operably linked to DNA for a polypeptide if it is expressed as a preprotein that participates in the secretion of the polypeptide; a promoter or enhancer is operably linked to a coding sequence if it affects the transcription of the sequence; or a ribosome binding site is operably linked to a coding sequence if it is positioned so as to facilitate translation. Generally, "operably linked" means that the DNA sequences being linked are contiguous, and, in the case of a secretory leader, contiguous and in reading phase. However, enhancers do not have to be contiguous. Linking is accomplished by ligation at convenient restriction sites. If such sites do not exist, the synthetic oligonucleotide adaptors or linkers are used in accordance with conventional practice.

The term "transfection" refers to the introduction of a nucleic acid, e.g., an expression vector, into a recipient cell by nucleic acid-mediated gene transfer. "Transformation", as used herein, refers to a process in which a

cell's genotype is changed as a result of the cellular uptake of exogenous DNA or RNA, and, for example, the transformed cell expresses a recombinant form of HER2.

As used herein, the term "transgene" refers to a nucleic acid sequence which is partly or entirely heterologous, i.e., foreign, to the transgenic animal or cell into which it is introduced, or, is homologous to an endogenous gene of the transgenic animal or cell into which it is introduced, but which is designed to be inserted, or is inserted, into the animal's genome in such a way as to alter the genome of the cell into which it is inserted (e.g., it is inserted at a location which differs from that of the natural gene or its insertion results in a knockout). A transgene can be operably linked to one or more transcriptional regulatory sequences and any other nucleic acid, such as introns, that may be necessary for optimal expression of a selected nucleic acid.

Accordingly, the term "transgene construct" refers to a nucleic acid which includes a transgene, and (optionally) such other nucleic acid sequences as transcriptionally regulatory sequence, polyadenylation sites, replication origins, marker genes, etc., which may be useful in the general manipulation of the transgene for insertion in the genome of a host organism.

The term "transgenic" is used herein as an adjective to describe the property, for example, of an animal or a construct, of harboring a transgene. For instance, as used herein, a "transgenic organism" is any animal, preferably a non-human mammal, in which one or more of the cells of the animal contain heterologous nucleic acid introduced by way of human intervention, such as by trangenic techniques well known in the art. The nucleic acid is introduced into the cell, directly or indirectly by introduction into a precursor of the cell, by way of deliberate genetic manipulation, such as by microinjection or by infection with a recombinant virus. The term genetic manipulation does not include classical cross-breeding, or in vitro fertilization, but rather is directed to the introduction of a recombinant DNA molecule. This molecule may be integrated within a chromosome, or it may be extrachromosomally replicating DNA. In the typical transgenic animals described herein, the transgene causes cells to express or overexpress a recombinant form of the subject HER2 proteins. The terms "founder line" and "founder animal" refer to those animals that are the mature product of the embryos to which the transgene was added, i.e., those animals that grew from the embryos into which DNA was inserted, and that were implanted into one or more surrogate hosts.

The terms "progeny" and "progeny of the transgenic animal" refer to any and all offspring of every generation subsequent to the originally transformed mammals. The term "non-human mammal" refers to all members of the class Mammalia except humans. "Mammal" refers to any animal classified as a mammal, including humans, domestic and farm animals, and zoo, sports, or pet animals, such as mouse, rat, rabbit, pig, sheep, goat, cattle and higher primates.

As used herein, the expressions "cell," "cell line," and "cell culture" are used interchangeably and all such designations include progeny. Thus, the words "transformants" and "transformed cells" include the primary subject cell and cultures derived therefrom without regard for the number of transfers. It is also understood that all progeny may not be precisely identical in DNA content, due to deliberate or inadvertent mutations. Mutant progeny that have

the same function or biological activity as screened for in the originally transformed cell are included. Where distinct designations are intended, it will be clear from the context.

A "liposome" is a small vesicle composed of various types of lipids, phospholipids and/or surfactant which is useful for delivery of a drug (such as the anti-ErbB2 antibodies disclosed herein and, optionally, a chemotherapeutic agent) to a mammal. The components of the liposome are commonly arranged in a bilayer formation, similar to the lipid arrangement of biological membranes.

The term "package insert" is used to refer to instructions customarily included in commercial packages of therapeutic products, that contain information about the indications, usage, dosage, administration, contraindications and/or warnings concerning the use of such therapeutic products.

A "cardioprotectant" is a compound or composition which prevents or reduces myocardial dysfunction (*i.e.* cardiomyopathy and/or congestive heart failure) associated with administration of a drug, such as an anti-ErbB antibody or its maytansinoid conjugate, to a patient. The cardioprotectant may, for example, block or reduce a free-radical-mediated cardiotoxic effect and/or prevent or reduce oxidative-stress injury. Examples of cardioprotectants encompassed by the present definition include the iron-chelating agent dexrazoxane (ICRF-187) (Seifert *et al. The Annals of Pharmacotherapy* 28:1063-1072 (1994)); a lipid-lowering agent and/or anti-oxidant such as probucol (Singal *et al. J. Mol. Cell Cardiol.* 27:1055-1063 (1995)); amifostine (aminothiol 2-[(3-aminopropyl)amino]ethanethiol-dihydrogen phosphate ester, also called WR-2721, and the dephosphorylated cellular uptake form thereof called WR-1065) and *S*-3-(3-methylaminopropylamino)propylphosphorothioic acid (WR-151327), see Green *et al. Cancer Research* 54:738-741 (1994); digoxin (Bristow, M.R. In: Bristow MR, ed. *Drug-Induced Heart Disease*. New York: Elsevier 191-215 (1980)); beta-blockers such as metoprolol (Hjalmarson *et al. Drugs* 47:Suppl 4:31-9 (1994); and Shaddy *et al. Am. Heart J.* 129:197-9 (1995)); vitamin E; ascorbic acid (vitamin C); free radical scavengers such as oleanolic acid, ursolic acid and N-acetylcysteine (NAC); spin trapping compounds such as alpha-phenyl-tert-butyl nitrone (PBN); (Paracchini *et al., Anticancer Res.* 13:1607-1612 (1993)); selenoorganic compounds such as P251 (Elbesen); and the like.

2. Detailed Description

The present invention is based on results obtained in a novel murine HER2-transgenic tumor model in which HERCEPTIN® or the murine antibody 4D5 from which HERCEPTIN® was derived, had little effect on tumor growth. Using this model to test the efficacy of HERCEPTIN® and HERCEPTIN®-maytansinoid conjugates, it was surprisingly found that while the transplanted tumor obtained from such transgenic mice responded poorly to HERCEPTIN® treatment, the HERCEPTIN®-maytansinoid conjugates were highly efficacious.

Accordingly, the present invention is based on the use of anti-ErbB antibody-maytansinoid conjugates in the treatment of ErbB overexpressing tumors that do not respond well to anti-ErbB antibody and/or maytansinoid treatment.

A. Production of anti-ErbB antibodies

A description follows as to exemplary techniques for the production of the antibodies used in accordance with the present invention. The production of antibodies will be illustrated with reference to anti-ErbB2 antibodies but it will be apparent for those skilled in the art that antibodies to other members of the ErbB receptor family can be produced and modified in a similar manner.

The ErbB2 antigen to be used for production of antibodies may be, *e.g.*, a soluble form of the extracellular domain of ErbB2 or a portion thereof, containing the desired epitope. Alternatively, cells expressing ErbB2 at their cell surface (*e.g.* NIH-3T3 cells transformed to overexpress ErbB2; or a carcinoma cell line such as SK-BR-3 cells, see Stancovski *et al. PNAS (USA)* 88:8691-8695 (1991)) can be used to generate antibodies. Other forms of ErbB2 useful for generating antibodies will be apparent to those skilled in the art.

(i) Polyclonal antibodies

Polyclonal antibodies are preferably raised in animals by multiple subcutaneous (sc) or intraperitoneal (ip) injections of the relevant antigen and an adjuvant. It may be useful to conjugate the relevant antigen to a protein that is immunogenic in the species to be immunized, *e.g.*, keyhole limpet hemocyanin, serum albumin, bovine thyroglobulin, or soybean trypsin inhibitor using a bifunctional or derivatizing agent, for example, maleimidobenzoyl sulfosuccinimide ester (conjugation through cysteine residues), N-hydroxysuccinimide (through lysine residues), glutaraldehyde, succinic anhydride, $SOCl_2$, or $R^1N=C=NR$, where R and R^1 are different alkyl groups.

Animals are immunized against the antigen, immunogenic conjugates, or derivatives by combining, *e.g.*, 100 g or 5 g of the protein or conjugate (for rabbits or mice, respectively) with 3 volumes of Freund's complete adjuvant and injecting the solution intradermally at multiple sites. One month later the animals are boosted with 1/5 to 1/10 the original amount of peptide or conjugate in Freund's complete adjuvant by subcutaneous injection at multiple sites. Seven to 14 days later the animals are bled and the serum is assayed for antibody titer. Animals are boosted until the titer plateaus. Preferably, the animal is boosted with the conjugate of the same antigen, but conjugated to a different protein and/or through a different cross-linking reagent. Conjugates also can be made in recombinant cell culture as protein fusions. Also, aggregating agents such as alum are suitably used to enhance the immune response.

(ii) Monoclonal antibodies

Monoclonal antibodies are obtained from a population of substantially homogeneous antibodies, *i.e.*, the individual antibodies comprising the population are identical except for possible naturally occurring mutations that may be present in minor amounts. Thus, the modifier "monoclonal" indicates the character of the antibody as not being a mixture of discrete antibodies.

For example, the monoclonal antibodies may be made using the hybridoma method first described by Kohler *et al., Nature,* 256:495 (1975), or may be made by recombinant DNA methods (U.S. Patent No. 4,816,567).

In the hybridoma method, a mouse or other appropriate host animal, such as a hamster, is immunized as hereinabove described to elicit lymphocytes that produce or are capable of producing antibodies that will specifically bind to the protein used for immunization. Alternatively, lymphocytes may be immunized *in vitro*. Lymphocytes then

are fused with myeloma cells using a suitable fusing agent, such as polyethylene glycol, to form a hybridoma cell (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp.59-103 (Academic Press, 1986)).

The hybridoma cells thus prepared are seeded and grown in a suitable culture medium that preferably contains one or more substances that inhibit the growth or survival of the unfused, parental myeloma cells. For example, if the parental myeloma cells lack the enzyme hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (HGPRT or HPRT), the culture medium for the hybridomas typically will include hypoxanthine, aminopterin, and thymidine (HAT medium), which substances prevent the growth of HGPRT-deficient cells.

Preferred myeloma cells are those that fuse efficiently, support stable high-level production of antibody by the selected antibody-producing cells, and are sensitive to a medium such as HAT medium. Among these, preferred myeloma cell lines are murine myeloma lines, such as those derived from MOPC-21 and MPC-11 mouse tumors available from the Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California USA, and SP-2 or X63-Ag8-653 cells available from the American Type Culture Collection, Rockville, Maryland USA. Human myeloma and mouse-human heteromyeloma cell lines also have been described for the production of human monoclonal antibodies (Kozbor, *J. Immunol.*, 133:3001 (1984); and Brodeur *et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)).

Culture medium in which hybridoma cells are growing is assayed for production of monoclonal antibodies directed against the antigen. Preferably, the binding specificity of monoclonal antibodies produced by hybridoma cells is determined by immunoprecipitation or by an *in vitro* binding assay, such as radioimmunoassay (RIA) or enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA).

The binding affinity of the monoclonal antibody can, for example, be determined by the Scatchard analysis of Munson *et al., Anal. Biochem.*, 107:220 (1980).

After hybridoma cells are identified that produce antibodies of the desired specificity, affinity, and/or activity, the clones may be subcloned by limiting dilution procedures and grown by standard methods (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp.59-103 (Academic Press, 1986)). Suitable culture media for this purpose include, for example, D-MEM or RPMI-1640 medium. In addition, the hybridoma cells may be grown *in vivo* as ascites tumors in an animal.

The monoclonal antibodies secreted by the subclones are suitably separated from the culture medium, ascites fluid, or serum by conventional antibody purification procedures such as, for example, protein A-Sepharose, hydroxylapatite chromatography, gel electrophoresis, dialysis, or affinity chromatography.

DNA encoding the monoclonal antibodies is readily isolated and sequenced using conventional procedures (*e.g.*, by using oligonucleotide probes that are capable of binding specifically to genes encoding the heavy and light chains of murine antibodies). The hybridoma cells serve as a preferred source of such DNA. Once isolated, the DNA may be placed into expression vectors, which are then transfected into host cells such as *E. coli* cells, simian COS cells, Chinese Hamster Ovary (CHO) cells, or myeloma cells that do not otherwise produce antibody protein, to obtain the synthesis of monoclonal antibodies in the recombinant host cells. Review articles on recombinant expression in

bacteria of DNA encoding the antibody include Skerra *et al., Curr. Opinion in Immunol.*, 5:256-262 (1993) and Plückthun, *Immunol. Revs.*, 130:151-188 (1992).

In a further embodiment, monoclonal antibodies or antibody fragments can be isolated from antibody phage libraries generated using the techniques described in McCafferty *et al., Nature*, 348:552-554 (1990). Clackson *et al., Nature*, 352:624-628 (1991) and Marks *et al., J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991) describe the isolation of murine and human antibodies, respectively, using phage libraries. Subsequent publications describe the production of high affinity (nM range) human antibodies by chain shuffling (Marks *et al., Bio/Technology*, 10:779-783 (1992)), as well as combinatorial infection and *in vivo* recombination as a strategy for constructing very large phage libraries (Waterhouse *et al., Nuc. Acids. Res.*, 21:2265-2266 (1993)). Thus, these techniques are viable alternatives to traditional monoclonal antibody hybridoma techniques for isolation of monoclonal antibodies.

The DNA also may be modified, for example, by substituting the coding sequence for human heavy chain and light chain constant domains in place of the homologous murine sequences (U.S. Patent No. 4,816,567; and Morrison, *et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 81:6851 (1984)), or by covalently joining to the immunoglobulin coding sequence all or part of the coding sequence for a non-immunoglobulin polypeptide.

Typically such non-immunoglobulin polypeptides are substituted for the constant domains of an antibody, or they are substituted for the variable domains of one antigen-combining site of an antibody to create a chimeric bivalent antibody comprising one antigen-combining site having specificity for an antigen and another antigen-combining site having specificity for a different antigen.

(iii) Humanized antibodies

Methods for humanizing non-human antibodies have been described in the art. Preferably, a humanized antibody has one or more amino acid residues introduced into it from a source which is non-human. These non-human amino acid residues are often referred to as "import" residues, which are typically taken from an "import" variable domain. Humanization can be essentially performed following the method of Winter and co-workers (Jones *et al., Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann *et al., Nature*, 332:323-327 (1988); Verhoeyen *et al., Science*, 239:1534-1536 (1988)), by substituting hypervariable region sequences for the corresponding sequences of a human antibody. Accordingly, such "humanized" antibodies are chimeric antibodies (U.S. Patent No. 4,816,567) wherein substantially less than an intact human variable domain has been substituted by the corresponding sequence from a non-human species. In practice, humanized antibodies are typically human antibodies in which some hypervariable region residues and possibly some FR residues are substituted by residues from analogous sites in rodent antibodies.

The choice of human variable domains, both light and heavy, to be used in making the humanized antibodies is very important to reduce antigenicity. According to the so-called "best-fit" method, the sequence of the variable domain of a rodent antibody is screened against the entire library of known human variable-domain sequences. The human sequence which is closest to that of the rodent is then accepted as the human framework region (FR) for the humanized antibody (Sims *et al., J. Immunol.*, 151:2296 (1993); Chothia *et al., J. Mol. Biol.*, 196:901 (1987)). Another method uses a particular framework region derived from the consensus sequence of all human antibodies of a

particular subgroup of light or heavy chains. The same framework may be used for several different humanized antibodies (Carter *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); Presta *et al., J. Immunol.*, 151:2623 (1993)).

It is further important that antibodies be humanized with retention of high affinity for the antigen and other favorable biological properties. To achieve this goal, according to a preferred method, humanized antibodies are prepared by a process of analysis of the parental sequences and various conceptual humanized products using three-dimensional models of the parental and humanized sequences. Three-dimensional immunoglobulin models are commonly available and are familiar to those skilled in the art. Computer programs are available which illustrate and display probable three-dimensional conformational structures of selected candidate immunoglobulin sequences. Inspection of these displays permits analysis of the likely role of the residues in the functioning of the candidate immunoglobulin sequence, *i.e.*, the analysis of residues that influence the ability of the candidate immunoglobulin to bind its antigen. In this way, FR residues can be selected and combined from the recipient and import sequences so that the desired antibody characteristic, such as increased affinity for the target antigen(s), is achieved. In general, the hypervariable region residues are directly and most substantially involved in influencing antigen binding.

Example 1 below describes production of an exemplary humanized anti-ErbB2 antibody. The humanized antibody herein may, for example, comprise nonhuman hypervariable region residues incorporated into a human variable heavy domain and may further comprise a framework region (FR) substitution at a position selected from the group consisting of 69H, 71H and 73H utilizing the variable domain numbering system set forth in Kabat *et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991). In one embodiment, the humanized antibody comprises FR substitutions at two or all of positions 69H, 71H and 73H.

Various forms of the humanized antibody are contemplated. For example, the humanized antibody may be an antibody fragment, such as a Fab. Alternatively, the humanized antibody may be an intact antibody, such as an intact IgG1 antibody.

(iv) Human antibodies

As an alternative to humanization, human antibodies can be generated. For example, it is now possible to produce transgenic animals (*e.g.*, mice) that are capable, upon immunization, of producing a full repertoire of human antibodies in the absence of endogenous immunoglobulin production. For example, it has been described that the homozygous deletion of the antibody heavy-chain joining region (J_H) gene in chimeric and germ-line mutant mice results in complete inhibition of endogenous antibody production. Transfer of the human germ-line immunoglobulin gene array in such germ-line mutant mice will result in the production of human antibodies upon antigen challenge. See, *e.g.*, Jakobovits *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:2551 (1993); Jakobovits *et al., Nature*, 362:255-258 (1993); Bruggermann *et al., Year in Immuno.*, 7:33 (1993); and U.S. Patent Nos. 5,591,669, 5,589,369 and 5,545,807.

Alternatively, phage display technology (McCafferty *et al., Nature* 348:552-553 (1990)) can be used to produce human antibodies and antibody fragments *in vitro*, from immunoglobulin variable (V) domain gene repertoires from unimmunized donors. According to this technique, antibody V domain genes are cloned in-frame into either a

major or minor coat protein gene of a filamentous bacteriophage, such as M13 or fd, and displayed as functional antibody fragments on the surface of the phage particle. Because the filamentous particle contains a single-stranded DNA copy of the phage genome, selections based on the functional properties of the antibody also result in selection of the gene encoding the antibody exhibiting those properties. Thus, the phage mimics some of the properties of the B-cell. Phage display can be performed in a variety of formats; for their review see, *e.g.*, Johnson, Kevin S. and Chiswell, David J., *Current Opinion in Structural Biology* 3:564-571 (1993). Several sources of V-gene segments can be used for phage display. Clackson *et al.*, *Nature*, 352:624-628 (1991) isolated a diverse array of anti-oxazolone antibodies from a small random combinatorial library of V genes derived from the spleens of immunized mice. A repertoire of V genes from unimmunized human donors can be constructed and antibodies to a diverse array of antigens (including self-antigens) can be isolated essentially following the techniques described by Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1991), or Griffith *et al.*, *EMBO J.* 12:725-734 (1993). See, also, U.S. Patent Nos. 5,565,332 and 5,573,905.

As discussed above, human antibodies may also be generated by *in vitro* activated B cells (see U.S. Patents 5,567,610 and 5,229,275).

Human anti-ErbB2 antibodies are described in U.S. Patent No. 5,772,997 issued June 30, 1998 and WO 97/00271 published January 3, 1997.

(v) Antibody fragments

Various techniques have been developed for the production of antibody fragments. Traditionally, these fragments were derived via proteolytic digestion of intact antibodies (see, *e.g.*, Morimoto *et al.* , *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117 (1992); and Brennan *et al.*, *Science*, 229:81 (1985)). However, these fragments can now be produced directly by recombinant host cells. For example, the antibody fragments can be isolated from the antibody phage libraries discussed above. Alternatively, Fab'-SH fragments can be directly recovered from *E. coli* and chemically coupled to form $F(ab')_2$ fragments (Carter *et al.*, Bio/Technology 10:163-167 (1992)). According to another approach, $F(ab')_2$ fragments can be isolated directly from recombinant host cell culture. Other techniques for the production of antibody fragments will be apparent to the skilled practitioner. In other embodiments, the antibody of choice is a single chain Fv fragment (scFv). See WO 93/16185; U.S. Patent No. 5,571,894; and U.S. Patent No. 5,587,458. The antibody fragment may also be a "linear antibody", *e.g.*, as described in U.S. Patent 5,641,870 for example. Such linear antibody fragments may be monospecific or bispecific.

(vi) Bispecific antibodies

Bispecific antibodies are antibodies that have binding specificities for at least two different epitopes. Exemplary bispecific antibodies may bind to two different epitopes of the ErbB2 protein. Other such antibodies may combine an ErbB2 binding site with binding site(s) for EGFR, ErbB3 and/or ErbB4. Alternatively, an anti-ErbB2 arm may be combined with an arm which binds to a triggering molecule on a leukocyte such as a T-cell receptor molecule (*e.g.* CD2 or CD3), or Fc receptors for IgG (Fc R), such as Fc RI (CD64), Fc RII (CD32) and Fc RIII (CD16) so as to focus cellular defense mechanisms to the ErbB2-expressing cell. Bispecific antibodies may also be used to localize

cytotoxic agents to cells which express ErbB2. WO 96/16673 describes a bispecific anti-ErbB2/anti-Fc RIII antibody and U.S. Patent No. 5,837,234 discloses a bispecific anti-ErbB2/anti-Fc RI antibody. A bispecific anti-ErbB2/Fc antibody is shown in WO98/02463. U.S. Patent No. 5,821,337 teaches a bispecific anti-ErbB2/anti-CD3 antibody.

Methods for making bispecific antibodies are known in the art. Traditional production of full length bispecific antibodies is based on the coexpression of two immunoglobulin heavy chain-light chain pairs, where the two chains have different specificities (Millstein *et al., Nature*, 305:537-539 (1983)). Because of the random assortment of immunoglobulin heavy and light chains, these hybridomas (quadromas) produce a potential mixture of 10 different antibody molecules, of which only one has the correct bispecific structure. Purification of the correct molecule, which is usually done by affinity chromatography steps, is rather cumbersome, and the product yields are low. Similar procedures are disclosed in WO 93/08829, and in Traunecker *et al., EMBO J.*, 10:3655-3659 (1991). According to a different approach, antibody variable domains with the desired binding specificities (antibody-antigen combining sites) are fused to immunoglobulin constant domain sequences. The fusion preferably is with an immunoglobulin heavy chain constant domain, comprising at least part of the hinge, CH2, and CH3 regions. It is preferred to have the first heavy-chain constant region (CH1) containing the site necessary for light chain binding, present in at least one of the fusions. DNAs encoding the immunoglobulin heavy chain fusions and, if desired, the immunoglobulin light chain, are inserted into separate expression vectors, and are co-transfected into a suitable host organism. This provides for great flexibility in adjusting the mutual proportions of the three polypeptide fragments in embodiments when unequal ratios of the three polypeptide chains used in the construction provide the optimum yields. It is, however, possible to insert the coding sequences for two or all three polypeptide chains in one expression vector when the expression of at least two polypeptide chains in equal ratios results in high yields or when the ratios are of no particular significance.

In a preferred embodiment of this approach, the bispecific antibodies are composed of a hybrid immunoglobulin heavy chain with a first binding specificity in one arm, and a hybrid immunoglobulin heavy chain-light chain pair (providing a second binding specificity) in the other arm. It was found that this asymmetric structure facilitates the separation of the desired bispecific compound from unwanted immunoglobulin chain combinations, as the presence of an immunoglobulin light chain in only one half of the bispecific molecule provides for a facile way of separation. This approach is disclosed in WO 94/04690. For further details of generating bispecific antibodies see, for example, Suresh *et al., Methods in Enzymology*, 121:210 (1986).

According to another approach described in U.S. Patent No. 5,731,168, the interface between a pair of antibody molecules can be engineered to maximize the percentage of heterodimers which are recovered from recombinant cell culture. The preferred interface comprises at least a part of the C_H3 domain of an antibody constant domain. In this method, one or more small amino acid side chains from the interface of the first antibody molecule are replaced with larger side chains (*e.g.* tyrosine or tryptophan). Compensatory "cavities" of identical or similar size to the large side chain(s) are created on the interface of the second antibody molecule by replacing large amino acid side chains with smaller ones (*e.g.* alanine or threonine). This provides a mechanism for increasing the yield of the heterodimer over other unwanted end-products such as homodimers.

Techniques for generating bispecific antibodies from antibody fragments have also been described in the literature. For example, bispecific antibodies can be prepared using chemical linkage. Brennan *et al., Science*, 229: 81 (1985) describe a procedure wherein intact antibodies are proteolytically cleaved to generate $F(ab')_2$ fragments. These fragments are reduced in the presence of the dithiol complexing agent sodium arsenite to stabilize vicinal dithiols and prevent intermolecular disulfide formation. The Fab' fragments generated are then converted to thionitrobenzoate (TNB) derivatives. One of the Fab'-TNB derivatives is then reconverted to the Fab'-thiol by reduction with mercaptoethylamine and is mixed with an equimolar amount of the other Fab'-TNB derivative to form the bispecific antibody. The bispecific antibodies produced can be used as agents for the selective immobilization of enzymes.

Recent progress has facilitated the direct recovery of Fab'-SH fragments from *E. coli,* which can be chemically coupled to form bispecific antibodies. Shalaby *et al., J. Exp. Med.*, 175: 217-225 (1992) describe the production of a fully humanized bispecific antibody $F(ab')_2$ molecule. Each Fab' fragment was separately secreted from *E. coli* and subjected to directed chemical coupling *in vitro* to form the bispecific antibody. The bispecific antibody thus formed was able to bind to cells overexpressing the ErbB2 receptor and normal human T cells, as well as trigger the lytic activity of human cytotoxic lymphocytes against human breast tumor targets.

Various techniques for making and isolating bispecific antibody fragments directly from recombinant cell culture have also been described. For example, bispecific antibodies have been produced using leucine zippers. Kostelny *et al., J. Immunol.*, 148(5):1547-1553 (1992). The leucine zipper peptides from the Fos and Jun proteins were linked to the Fab' portions of two different antibodies by gene fusion. The antibody homodimers were reduced at the hinge region to form monomers and then re-oxidized to form the antibody heterodimers. This method can also be utilized for the production of antibody homodimers. The "diabody" technology described by Hollinger *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993) has provided an alternative mechanism for making bispecific antibody fragments. The fragments comprise a heavy-chain variable domain (V_H) connected to a light-chain variable domain (V_L) by a linker which is too short to allow pairing between the two domains on the same chain. Accordingly, the V_H and V_L domains of one fragment are forced to pair with the complementary V_L and V_H domains of another fragment, thereby forming two antigen-binding sites. Another strategy for making bispecific antibody fragments by the use of single-chain Fv (sFv) dimers has also been reported. See Gruber *et al., J. Immunol.*, 152:5368 (1994).

Antibodies with more than two valencies are contemplated. For example, trispecific antibodies can be prepared. Tutt *et al. J. Immunol.* 147: 60 (1991).

(vii) Other amino acid sequence modifications

Amino acid sequence modification(s) of the anti-ErbB2 antibodies described herein are contemplated. For example, it may be desirable to improve the binding affinity and/or other biological properties of the antibody. Amino acid sequence variants of the anti-ErbB2 antibody are prepared by introducing appropriate nucleotide changes into the anti-ErbB2 antibody nucleic acid, or by peptide synthesis. Such modifications include, for example, deletions from, and/or insertions into and/or substitutions of, residues within the amino acid sequences of the anti-ErbB2 antibody.

Any combination of deletion, insertion, and substitution is made to arrive at the final construct, provided that the final construct possesses the desired characteristics. The amino acid changes also may alter post-translational processes of the anti-ErbB2 antibody, such as changing the number or position of glycosylation sites.

A useful method for identification of certain residues or regions of the anti-ErbB2 antibody that are preferred locations for mutagenesis is called "alanine scanning mutagenesis" as described by Cunningham and Wells *Science*, 244:1081-1085 (1989). Here, a residue or group of target residues are identified (*e.g.*, charged residues such as arg, asp, his, lys, and glu) and replaced by a neutral or negatively charged amino acid (most preferably alanine or polyalanine) to affect the interaction of the amino acids with ErbB2 antigen. Those amino acid locations demonstrating functional sensitivity to the substitutions then are refined by introducing further or other variants at, or for, the sites of substitution. Thus, while the site for introducing an amino acid sequence variation is predetermined, the nature of the mutation *per se* need not be predetermined. For example, to analyze the performance of a mutation at a given site, ala scanning or random mutagenesis is conducted at the target codon or region and the expressed anti-ErbB2 antibody variants are screened for the desired activity.

Amino acid sequence insertions include amino- and/or carboxyl-terminal fusions ranging in length from one residue to polypeptides containing a hundred or more residues, as well as intrasequence insertions of single or multiple amino acid residues. Examples of terminal insertions include an anti-ErbB2 antibody with an N-terminal methionyl residue or the antibody fused to a cytotoxic polypeptide. Other insertional variants of the anti-ErbB2 antibody molecule include the fusion to the N- or C-terminus of the anti-ErbB2 antibody to an enzyme (*e.g.* for ADEPT) or a polypeptide which increases the serum half-life of the antibody.

Another type of variant is an amino acid substitution variant. These variants have at least one amino acid residue in the anti-ErbB2 antibody molecule replaced by a different residue. The sites of greatest interest for substitutional mutagenesis include the hypervariable regions, but FR alterations are also contemplated. Conservative substitutions are shown in Table 1 under the heading of "preferred substitutions". If such substitutions result in a change in biological activity, then more substantial changes, denominated "exemplary substitutions" in Table 1, or as further described below in reference to amino acid classes, may be introduced and the products screened.

Table 1

Original Residue	Exemplary Substitutions	Preferred Substitutions
Ala (A)	val; leu; ile	val
Arg (R)	lys; gln; asn	lys
Asn (N)	gln; his; asp, lys; arg	gln
Asp (D)	glu; asn	glu
Cys (C)	ser; ala	ser
Gln (Q)	asn; glu	asn
Glu (E)	asp; gln	asp
Gly (G)	Ala	ala
His (H)	asn; gln; lys; arg	arg
Ile (I)	leu; val; met; ala; phe; norleucine	leu
Leu (L)	norleucine; ile; val; met; ala; phe	ile
Lys (K)	arg; gln; asn	arg
Met (M)	leu; phe; ile	leu
Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr	tyr
Pro (P)	Ala	ala
Ser (S)	Thr	thr
Thr (T)	Ser	ser
Trp (W)	tyr; phe	tyr
Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	phe

Val (V)	ile; leu; met; phe; ala; norleucine	leu

Substantial modifications in the biological properties of the antibody are accomplished by selecting substitutions that differ significantly in their effect on maintaining (a) the structure of the polypeptide backbone in the area of the substitution, for example, as a sheet or helical conformation, (b) the charge or hydrophobicity of the molecule at the target site, or (c) the bulk of the side chain. Naturally occurring residues are divided into groups based on common side-chain properties:

(1) hydrophobic: norleucine, met, ala, val, leu, ile;

(2) neutral hydrophilic: cys, ser, thr;

(3) acidic: asp, glu;

(4) basic: asn, gln, his, lys, arg;

(5) residues that influence chain orientation: gly, pro; and

(6) aromatic: trp, tyr, phe.

Non-conservative substitutions will entail exchanging a member of one of these classes for another class.

Any cysteine residue not involved in maintaining the proper conformation of the anti-ErbB2 antibody also may be substituted, generally with serine, to improve the oxidative stability of the molecule and prevent aberrant crosslinking. Conversely, cysteine bond(s) may be added to the antibody to improve its stability (particularly where the antibody is an antibody fragment such as an Fv fragment).

A particularly preferred type of substitutional variant involves substituting one or more hypervariable region residues of a parent antibody (*e.g.* a humanized or human antibody). Generally, the resulting variant(s) selected for further development will have improved biological properties relative to the parent antibody from which they are generated. A convenient way for generating such substitutional variants involves affinity maturation using phage display. Briefly, several hypervariable region sites (*e.g.* 6-7 sites) are mutated to generate all possible amino substitutions at each site. The antibody variants thus generated are displayed in a monovalent fashion from filamentous phage particles as fusions to the gene III product of M13 packaged within each particle. The phage-displayed variants are then screened for their biological activity (*e.g.* binding affinity) as herein disclosed. In order to identify candidate hypervariable region sites for modification, alanine scanning mutagenesis can be performed to identify hypervariable region residues contributing significantly to antigen binding. Alternatively, or additionally, it may be beneficial to analyze a crystal structure of the antigen-antibody complex to identify contact points between the antibody and human ErbB2. Such contact residues and neighboring residues are candidates for substitution according to the techniques elaborated herein. Once such variants are generated, the panel of variants is subjected to screening as described herein and antibodies with superior properties in one or more relevant assays may be selected for further development.

It may be desirable to modify the antibody of the invention with respect to effector function, *e.g.* so as to enhance antigen-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) and/or complement dependent cytotoxicity (CDC) of the antibody. This may be achieved by introducing one or more amino acid substitutions in an Fc region of the antibody. Alternatively or additionally, cysteine residue(s) may be introduced in the Fc region, thereby allowing interchain disulfide bond formation in this region. The homodimeric antibody thus generated may have improved internalization capability and/or increased complement-mediated cell killing and antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC). See Caron *et al.*, *J. Exp Med.* 176:1191-1195 (1992) and Shopes, B. *J. Immunol.* 148:2918-2922 (1992). Homodimeric antibodies with enhanced anti-tumor activity may also be prepared using heterobifunctional cross-linkers as described in Wolff *et al. Cancer Research* 53:2560-2565 (1993). Alternatively, an antibody can be engineered which has dual Fc regions and may thereby have enhanced complement lysis and ADCC capabilities. See Stevenson *et al. Anti-Cancer Drug Design* 3:219-230 (1989).

To increase the serum half life of the antibody, one may incorporate a salvage receptor binding epitope into the antibody (especially an antibody fragment) as described in U.S. Patent 5,739,277, for example. As used herein, the term "salvage receptor binding epitope" refers to an epitope of the Fc region of an IgG molecule (*e.g.*, IgG_1, IgG_2, IgG_3, or IgG_4) that is responsible for increasing the *in vivo* serum half-life of the IgG molecule.

(viii) Glycosylation Variants

Antibodies are glycosylated at conserved positions in their constant regions (Jefferis and Lund, Chem. Immunol. 65:111-128 [1997]; Wright and Morrison, TibTECH 15:26-32 [1997]). The oligosaccharide side chains of the immunoglobulins affect the protein's function (Boyd *et al.*, Mol. Immunol. 32:1311-1318 [1996]; Wittwe and Howard, Biochem. 29:4175-4180 [1990]), and the intramolecular interaction between portions of the glycoprotein which can affect the conformation and presented three-dimensional surface of the glycoprotein (Hefferis and Lund, *supra*; Wyss and Wagner, Current Opin. Biotech. 7:409-416 [1996]). Oligosaccharides may also serve to target a given glycoprotein to certain molecules based upon specific recognition structures. For example, it has been reported that in agalactosylated IgG, the oligosaccharide moiety 'flips' out of the inter-CH2 space and terminal N-acetylglucosamine residues become available to bind mannose binding protein (Malhotra *et al.*, Nature Med. 1:237-243 [1995]). Removal by glycopeptidase of the oligosaccharides from CAMPATH-1H (a recombinant humanized murine monoclonal IgG1 antibody which recognizes the CDw52 antigen of human lymphocytes) produced in Chinese Hamster Ovary (CHO) cells resulted in a complete reduction in complement mediated lysis (CMCL) (Boyd *et al.*, Mol. Immunol. 32:1311-1318 [1996]), while selective removal of sialic acid residues using neuraminidase resulted in no loss of DMCL. Glycosylation of antibodies has also been reported to affect antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC). In particular, CHO cells with tetracycline-regulated expression of β(1,4)-N-acetylglucosaminyltransferase III (GnTIII), a glycosyltransferase catalyzing formation of bisecting GlcNAc, was reported to have improved ADCC activity (Umana *et al.*, Mature Biotech. 17:176-180 [1999]).

Glycosylation of antibodies is typically either N-linked or O-linked. N-linked refers to the attachment of the carbohydrate moiety to the side chain of an asparagine residue. The tripeptide sequences asparagine-X-serine and

asparagine-X-threonine, where X is any amino acid except proline, are the recognition sequences for enzymatic attachment of the carbohydrate moiety to the asparagine side chain. Thus, the presence of either of these tripeptide sequences in a polypeptide creates a potential glycosylation site. O-linked glycosylation refers to the attachment of one of the sugars N-aceylgalactosamine, galactose, or xylose to a hydroxyamino acid, most commonly serine or threonine, although 5-hydroxyproline or 5-hydroxylysine may also be used.

Glycosylation variants of antibodies are variants in which the glycosylation pattern of an antibody is altered. By altering is meant deleting one or more carbohydrate moieties found in the antibody, adding one or more carbohydrate moieties to the antibody, changing the composition of glycosylation (glycosylation pattern), the extent of glycosylation, etc.

Addition of glycosylation sites to the antibody is conveniently accomplished by altering the amino acid sequence such that it contains one or more of the above-described tripeptide sequences (for N-linked glycosylation sites). The alteration may also be made by the addition of, or substitution by, one or more serine or threonine residues to the sequence of the original antibody (for O-linked glycosylation sites). Similarly, removal of glycosylation sites can be accomplished by amino acid alteration within the native glycosylation sites of the antibody.

The amino acid sequence is usually altered by altering the underlying nucleic acid sequence. Nucleic acid molecules encoding amino acid sequence variants of the anti-ErbB2 antibody are prepared by a variety of methods known in the art. These methods include, but are not limited to, isolation from a natural source (in the case of naturally occurring amino acid sequence variants) or preparation by oligonucleotide-mediated (or site-directed) mutagenesis, PCR mutagenesis, and cassette mutagenesis of an earlier prepared variant or a non-variant version of the anti-ErbB2 antibody.

The glycosylation (including glycosylation pattern) of antibodies may also be altered without altering the amino acid sequence or the underlying nucleotide sequence. Glycosylation largely depends on the host cell used to express the antibody. Since the cell type used for expression of recombinant glycoproteins, e.g. antibodies, as potential therapeutics is rarely the native cell, significant variations in the glycosylation pattern of the antibodies can be expected (see, e.g. Hse *et al.,* J. Biol. Chem. 272:9062-9070 [1997]). In addition to the choice of host cells, factors which affect glycosylation during recombinant production of antibodies include growth mode, media formulation, culture density, oxygenation, pH, purification schemes and the like. Various methods have been proposed to alter the glycosylation pattern achieved in a particular host organism including introducing or overexpressing certain enzymes involved in oligosaccharide production (U. S. Patent Nos. 5,047,335; 5,510,261 and 5.278,299). Glycosylation, or certain types of glycosylation, can be enzymatically removed from the glycoprotein, for example using endoglycosidase H (Endo H). In addition, the recombinant host cell can be genetically engineered, e.g. make defective in processing certain types of polysaccharides. These and similar techniques are well known in the art.

The glycosylation structure of antibodies can be readily analyzed by conventional techniques of carbohydrate analysis, including lectin chromatography, NMR, Mass spectrometry, HPLC, GPC, monosaccharide

compositional analysis, sequential enzymatic digestion, and HPAEC-PAD, which uses high pH anion exchange chromatography to separate oligosaccharides based on charge. Methods for releasing oligosaccharides for analytical purposes are also known, and include, without limitation, enzymatic treatment (commonly performed using peptide-N-glycosidase F/endo-β-galactosidase), elimination using harsh alkaline environment to release mainly O-linked structures, and chemical methods using anhydrous hydrazine to release both N- and O-linked oligosaccharides.

(viii) Screening for antibodies with the desired properties

Techniques for generating antibodies have been described above. One may further select antibodies with certain biological characteristics, as desired.

For example, to identify growth inhibitory anti-ErbB2 antibodies, one may screen for antibodies which inhibit the growth of cancer cells which overexpress ErbB2. In one embodiment, the growth inhibitory antibody of choice is able to inhibit growth of SK-BR-3 cells in cell culture by about 20-100% and preferably by about 50-100% at an antibody concentration of about 0.5 to 30 g/ml. To identify such antibodies, the SK-BR-3 assay described in U.S. Patent No. 5,677,171 can be performed. According to this assay, SK-BR-3 cells are grown in a 1:1 mixture of F12 and DMEM medium supplemented with 10% fetal bovine serum, glutamine and penicillin streptomycin. The SK-BR-3 cells are plated at 20,000 cells in a 35mm cell culture dish (2mls/35mm dish). 0.5 to 30 g/ml of the anti-ErbB2 antibody is added per dish. After six days, the number of cells, compared to untreated cells are counted using an electronic COULTER cell counter. Those antibodies which inhibit growth of the SK-BR-3 cells by about 20-100% or about 50-100% may be selected as growth inhibitory antibodies.

To select for antibodies which induce cell death, loss of membrane integrity as indicated by, *e.g.*, PI, trypan blue or 7AAD uptake may be assessed relative to control. The preferred assay is the PI uptake assay using BT474 cells. According to this assay, BT474 cells (which can be obtained from the American Type Culture Collection (Rockville, MD)) are cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM):Ham's F-12 (50:50) supplemented with 10% heat-inactivated FBS (Hyclone) and 2 mM L-glutamine. (Thus, the assay is performed in the absence of complement and immune effector cells). The BT474 cells are seeded at a density of 3×10^6 per dish in 100 x 20 mm dishes and allowed to attach overnight. The medium is then removed and replaced with fresh medium alone or medium containing 10 g/ml of the appropriate monoclonal antibody. The cells are incubated for a 3 day time period. Following each treatment, monolayers are washed with PBS and detached by trypsinization. Cells are then centrifuged at 1200rpm for 5 minutes at 4^0C, the pellet resuspended in 3 ml ice cold Ca^{2+} binding buffer (10 mM Hepes, pH 7.4, 140 mM NaCl, 2.5 mM $CaCl_2$) and aliquoted into 35 mm strainer-capped 12 x 75 tubes (1ml per tube, 3 tubes per treatment group) for removal of cell clumps. Tubes then receive PI (10 g/ml). Samples may be analyzed using a FACSCAN flow cytometer and FACSCONVERT CellQuest software (Becton Dickinson). Those antibodies which induce statistically significant levels of cell death as determined by PI uptake may be selected as cell death-inducing antibodies.

In order to select for antibodies which induce apoptosis, an annexin binding assay using BT474 cells is available. The BT474 cells are cultured and seeded in dishes as discussed in the preceding paragraph. The medium is

then removed and replaced with fresh medium alone or medium containing 10 g/ml of the monoclonal antibody. Following a three day incubation period, monolayers are washed with PBS and detached by trypsinization. Cells are then centrifuged, resuspended in Ca^{2+} binding buffer and aliquoted into tubes as discussed above for the cell death assay. Tubes then receive labeled annexin (*e.g.* annexin V-FTIC) (1 g/ml). Samples may be analyzed using a FACSCAN flow cytometer and FACSCONVERT CellQuest software (Becton Dickinson). Those antibodies which induce statistically significant levels of annexin binding relative to control are selected as apoptosis-inducing antibodies.

In addition to the annexin binding assay, a DNA staining assay using BT474 cells is available. In order to perform this assay, BT474 cells which have been treated with the antibody of interest as described in the preceding two paragraphs are incubated with 9 g/ml HOECHST 33342 for 2 hr at 37°C, then analyzed on an EPICS ELITE flow cytometer (Coulter Corporation) using MODFIT LT software (Verity Software House). Antibodies which induce a change in the percentage of apoptotic cells which is 2 fold or greater (and preferably 3 fold or greater) than untreated cells (up to 100% apoptotic cells) may be selected as pro-apoptotic antibodies using this assay.

To identify an antibody which blocks ligand activation of an ErbB receptor, the ability of the antibody to block ErbB ligand binding to cells expressing the ErbB receptor (*e.g.* in conjugation with another ErbB receptor with which the ErbB receptor of interest forms an ErbB hetero-oligomer) may be determined. For example, cells naturally expressing, or transfected to express, ErbB receptors of the ErbB hetero-oligomer may be incubated with the antibody and then exposed to labeled ErbB ligand. The ability of the anti-ErbB2 antibody to block ligand binding to the ErbB receptor in the ErbB hetero-oligomer may then be evaluated.

For example, inhibition of HRG binding to MCF7 breast tumor cell lines by anti-ErbB2 antibodies may be performed using monolayer MCF7 cultures on ice in a 24-well-plate format essentially as described in Example 1 below. Anti-ErbB2 monoclonal antibodies may be added to each well and incubated for 30 minutes. ^{125}I-labeled rHRG $1_{177\text{-}224}$ (25 pm) may then be added, and the incubation may be continued for 4 to 16 hours. Dose response curves may be prepared and an IC_{50} value may be calculated for the antibody of interest. In one embodiment, the antibody which blocks ligand activation of an ErbB receptor will have an IC_{50} for inhibiting HRG binding to MCF7 cells in this assay of about 50nM or less, more preferably 10nM or less. Where the antibody is an antibody fragment such as a Fab fragment, the IC_{50} for inhibiting HRG binding to MCF7 cells in this assay may, for example, be about 100nM or less, more preferably 50nM or less.

Alternatively, or additionally, the ability of the anti-ErbB2 antibody to block ErbB ligand-stimulated tyrosine phosphorylation of an ErbB receptor present in an ErbB hetero-oligomer may be assessed. For example, cells endogenously expressing the ErbB receptors or transfected to expressed them may be incubated with the antibody and then assayed for ErbB ligand-dependent tyrosine phosphorylation activity using an anti-phosphotyrosine monoclonal (which is optionally conjugated with a detectable label). The kinase receptor activation assay described in U.S. Patent No. 5,766,863 is also available for determining ErbB receptor activation and blocking of that activity by an antibody.

In one embodiment, one may screen for an antibody which inhibits HRG stimulation of p180 tyrosine phosphorylation in MCF7 cells. For example, the MCF7 cells may be plated in 24-well plates and monoclonal antibodies to ErbB2 may be added to each well and incubated for 30 minutes at room temperature; then rHRG $1_{177-244}$ may be added to each well to a final concentration of 0.2 nM, and the incubation may be continued for 8 minutes. Media may be aspirated from each well, and reactions may be stopped by the addition of 100 l of SDS sample buffer (5% SDS, 25 mM DTT, and 25 mM Tris-HCl, pH 6.8). Each sample (25 l) may be electrophoresed on a 4-12% gradient gel (Novex) and then electrophoretically transferred to polyvinylidene difluoride membrane. Antiphosphotyrosine (at 1 g/ml) immunoblots may be developed, and the intensity of the predominant reactive band at M_r ~180,000 may be quantified by reflectance densitometry. The antibody selected will preferably significantly inhibit HRG stimulation of p180 tyrosine phosphorylation to about 0-35% of control in this assay. A dose-response curve for inhibition of HRG stimulation of p180 tyrosine phosphorylation as determined by reflectance densitometry may be prepared and an IC_{50} for the antibody of interest may be calculated. In one embodiment, the antibody which blocks ligand activation of an ErbB receptor will have an IC_{50} for inhibiting HRG stimulation of p180 tyrosine phosphorylation in this assay of about 50nM or less, more preferably 10nM or less. Where the antibody is an antibody fragment such as a Fab fragment, the IC_{50} for inhibiting HRG stimulation of p180 tyrosine phosphorylation in this assay may, for example, be about 100nM or less, more preferably 50nM or less.

One may also assess the growth inhibitory effects of the antibody on MDA-MB-175 cells, *e.g*, essentially as described in Schaefer *et al. Oncogene* 15:1385-1394 (1997). According to this assay, MDA-MB-175 cells may treated with an anti-ErbB2 monoclonal antibody (10 g/mL) for 4 days and stained with crystal violet. Incubation with an anti-ErbB2 antibody may show a growth inhibitory effect on this cell line similar to that displayed by monoclonal antibody 2C4. In a further embodiment, exogenous HRG will not significantly reverse this inhibition. Preferably, the antibody will be able to inhibit cell proliferation of MDA-MB-175 cells to a greater extent than monoclonal antibody 4D5 (and optionally to a greater extent than monoclonal antibody 7F3), both in the presence and absence of exogenous HRG.

In one embodiment, the anti-ErbB2 antibody of interest may block heregulin dependent association of ErbB2 with ErbB3 in both MCF7 and SK-BR-3 cells as determined in a co-immunoprecipitation experiment substantially more effectively than monoclonal antibody 4D5, and preferably substantially more effectively than monoclonal antibody 7F3.

To screen for antibodies which bind to an epitope on ErbB2 bound by an antibody of interest, a routine cross-blocking assay such as that described in *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988), can be performed. Alternatively, or additionally, epitope mapping can be performed by methods known in the art (see, *e.g.* Figs. 1A and 1B herein).

The results obtained in the cell-based assays described above can then be followed by testing in animal, e.g. murine, models, and human clinical trials. In particular, the inability or limited ability of an antibody to treat ErbB2

overexpressing tumors can be demonstrated in the transgenic mouse model disclosed in the present application as described in the Examples below.

C. Anti-ErbB antibody-maytansinoid conjugates (immunoconjugates)

Anti-ErbB antibody-maytansinoid conjugates are prepared by chemically linking an anti-ErbB antibody to a maytansinoid molecule without significantly diminishing the biological activity of either the antibody or the maytansinoid molecule. Maytansinoids are well known in the art and can be synthesized by known techniques or isolated from natural sources. Suitable maytansinoids are disclosed, for example, in U.S. Patent No. 5,208,020 and in the other patents and nonpatent publications referred to hereinabove. Preferred maytansinoids are maytansinol and maytansinol analogues modified in the aromatic ring or at other positions of the maytansinol molecule, such as various maytansinol esters.

There are many linking groups known in the art for making antibody-maytansinoid conjugates, including, for example, those disclosed in U.S. Patent No. 5,208,020 or EP Patent 0 425 235 B1, and Chari *et al. Cancer Research* 52: 127-131 (1992). The linking groups include disufide groups, thioether groups, acid labile groups, photolabile groups, peptidase labile groups, or esterase labile groups, as disclosed in the above-identified patents, disulfide and thioether groups being preferred.

Conjugates of the antibody and maytansinoid may be made using a variety of bifunctional protein coupling agents such as N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithio) propionate (SPDP), succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl) cyclohexane-1-carboxylate, iminothiolane (IT), bifunctional derivatives of imidoesters (such as dimethyl adipimidate HCL), active esters (such as disuccinimidyl suberate), aldehydes (such as glutareldehyde), bis-azido compounds (such as bis (p-azidobenzoyl) hexanediamine), bis-diazonium derivatives (such as bis-(p-diazoniumbenzoyl)-ethylenediamine), diisocyanates (such as tolyene 2,6-diisocyanate), and bis-active fluorine compounds (such as 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzene). Particularly preferred coupling agents include N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithio) propionate (SPDP) (Carlsson *et al., Biochem. J.* 173:723-737 [1978]) and N-succinimidyl-4-(2-pyridylthio)pentanoate (SPP) to provide for a disulfide linkage.

The linker may be attached to the maytansinoid molecule at various positions, depending on the type of the link. For example, an ester linkage may be formed at the C-3 position having a hydroxyl group, the C-14 position modified with hyrdoxymethyl, the C-15 position modified with a hydroxyl group, and the C-20 position having a hydroxyl group using conventional coupling techniques. In a preferred embodiment, the linkage is formed at the C-3 position of maytansinol or a maytansinol analogue.

D. Pharmaceutical formulations

Therapeutic formulations of the antibody-maytansinoid conjugates used in accordance with the present invention are prepared for storage by mixing an antibody having the desired degree of purity with optional pharmaceutically acceptable carriers, excipients or stabilizers (*Remington's Pharmaceutical Sciences* 16th edition,

Osol, A. Ed. (1980)), in the form of lyophilized formulations or aqueous solutions. Acceptable carriers, excipients, or stabilizers are nontoxic to recipients at the dosages and concentrations employed, and include buffers such as phosphate, citrate, and other organic acids; antioxidants including ascorbic acid and methionine; preservatives (such as octadecyldimethylbenzyl ammonium chloride; hexamethonium chloride; benzalkonium chloride, benzethonium chloride; phenol, butyl or benzyl alcohol; alkyl parabens such as methyl or propyl paraben; catechol; resorcinol; cyclohexanol; 3-pentanol; and m-cresol); low molecular weight (less than about 10 residues) polypeptides; proteins, such as serum albumin, gelatin, or immunoglobulins; hydrophilic polymers such as polyvinylpyrrolidone; amino acids such as glycine, glutamine, asparagine, histidine, arginine, or lysine; monosaccharides, disaccharides, and other carbohydrates including glucose, mannose, or dextrins; chelating agents such as EDTA; sugars such as sucrose, mannitol, trehalose or sorbitol; salt-forming counter-ions such as sodium; metal complexes (*e.g.* Zn-protein complexes); and/or non-ionic surfactants such as TWEEN , PLURONICS or polyethylene glycol (PEG). Preferred lyophilized anti-ErbB2 antibody formulations are described in WO 97/04801, expressly incorporated herein by reference.

The formulation herein may also contain more than one active compound as necessary for the particular indication being treated, preferably those with complementary activities that do not adversely affect each other. For example, it may be desirable to further provide antibodies or antibody-maytansinoid conjugates which bind to EGFR, ErbB2 (*e.g.* an antibody which binds a different epitope on ErbB2), ErbB3, ErbB4, or vascular endothelial factor (VEGF) in the one formulation. Alternatively, or additionally, the composition may further comprise a chemotherapeutic agent, cytotoxic agent, cytokine, growth inhibitory agent, anti-hormonal agent, and/or cardioprotectant. Such molecules are suitably present in combination in amounts that are effective for the purpose intended.

The active ingredients may also be entrapped in microcapsules prepared, for example, by coacervation techniques or by interfacial polymerization, for example, hydroxymethylcellulose or gelatin-microcapsules and poly-(methylmethacylate) microcapsules, respectively, in colloidal drug delivery systems (for example, liposomes, albumin microspheres, microemulsions, nano-particles and nanocapsules) or in macroemulsions. Such techniques are disclosed in *Remington's Pharmaceutical Sciences* 16th edition, Osol, A. Ed. (1980).

Sustained-release preparations may be prepared. Suitable examples of sustained-release preparations include semipermeable matrices of solid hydrophobic polymers containing the antibody, which matrices are in the form of shaped articles, *e.g.* films, or microcapsules. Examples of sustained-release matrices include polyesters, hydrogels (for example, poly(2-hydroxyethyl-methacrylate), or poly(vinylalcohol)), polylactides (U.S. Pat. No. 3,773,919), copolymers of L-glutamic acid and ethyl-L-glutamate, non-degradable ethylene-vinyl acetate, degradable lactic acid-glycolic acid copolymers such as the LUPRON DEPOT (injectable microspheres composed of lactic acid-glycolic acid copolymer and leuprolide acetate), and poly-D-(-)-3-hydroxybutyric acid.

The formulations to be used for *in vivo* administration must be sterile. This is readily accomplished by filtration through sterile filtration membranes.

E. Treatment with the anti-ErbB2 antibody-maytansinoid conjugates

It is contemplated that, according to the present invention, the anti-ErbB2 antibody-maytansinoid conjugates may be used to treat various diseases or disorders. Exemplary conditions or disorders include benign or malignant tumors; leukemias and lymphoid malignancies; other disorders such as neuronal, glial, astrocytal, hypothalamic, glandular, macrophagal, epithelial, stromal, blastocoelic, inflammatory, angiogenic and immunologic disorders.

Generally, the disease or disorder to be treated is cancer. Examples of cancer to be treated herein include, but are not limited to, carcinoma, lymphoma, blastoma, sarcoma, and leukemia or lymphoid malignancies. More particular examples of such cancers include squamous cell cancer (*e.g.* epithelial squamous cell cancer), lung cancer including small-cell lung cancer, non-small cell lung cancer, adenocarcinoma of the lung and squamous carcinoma of the lung, cancer of the peritoneum, hepatocellular cancer, gastric or stomach cancer including gastrointestinal cancer, pancreatic cancer, glioblastoma, cervical cancer, ovarian cancer, liver cancer, bladder cancer, hepatoma, breast cancer, colon cancer, rectal cancer, colorectal cancer, endometrial or uterine carcinoma, salivary gland carcinoma, kidney or renal cancer, prostate cancer, vulval cancer, thyroid cancer, hepatic carcinoma, anal carcinoma, penile carcinoma, as well as head and neck cancer.

The cancer will comprise ErbB-expressing cells, such that an anti-ErbB antibody herein is able to bind to the cancer, and will be typically characterized by overexpression of the ErbB receptor. In a preferred embodiment, the cancer comprises ErbB2-expressing cells, even more preferably, cells which are characterized by overexpression of the ErbB2 receptor. To determine ErbB, e.g. ErbB2 expression in the cancer, various diagnostic/prognostic assays are available. In one embodiment, ErbB2 overexpression may be analyzed by IHC, *e.g.* using the HERCEPTEST® (Dako). Parrafin embedded tissue sections from a tumor biopsy may be subjected to the IHC assay and accorded a ErbB2 protein staining intensity criteria as follows:

Score 0

no staining is observed or membrane staining is observed in less than 10% of tumor cells.

Score 1+

a faint/barely perceptible membrane staining is detected in more than 10% of the tumor cells. The cells are only stained in part of their membrane.

Score 2+

a weak to moderate complete membrane staining is observed in more than 10% of the tumor cells.

Score 3+

a moderate to strong complete membrane staining is observed in more than 10% of the tumor cells.

Those tumors with 0 or 1+ scores for ErbB2 overexpression assessment may be characterized as not overexpressing ErbB2, whereas those tumors with 2+ or 3+ scores may be characterized as overexpressing ErbB2.

Alternatively, or additionally, FISH assays such as the INFORM (sold by Ventana, Arizona) or PATHVISION (Vysis, Illinois) may be carried out on formalin-fixed, paraffin-embedded tumor tissue to determine the extent (if any) of ErbB2 overexpression in the tumor.

In one embodiment, the cancer will be one which expresses (and may overexpress) EGFR. Examples of cancers which may express/overexpress EGFR include squamous cell cancer (*e.g.* epithelial squamous cell cancer), lung cancer including small-cell lung cancer, non-small cell lung cancer, adenocarcinoma of the lung and squamous carcinoma of the lung, cancer of the peritoneum, hepatocellular cancer, gastric or stomach cancer including gastrointestinal cancer, pancreatic cancer, glioblastoma, cervical cancer, ovarian cancer, liver cancer, bladder cancer, hepatoma, breast cancer, colon cancer, rectal cancer, colorectal cancer, endometrial or uterine carcinoma, salivary gland carcinoma, kidney or renal cancer, prostate cancer, vulval cancer, thyroid cancer, hepatic carcinoma, anal carcinoma, penile carcinoma, as well as head and neck cancer.

Preferably, the immunoconjugates of the present invention and/or ErbB, e.g. ErbB2 or EGFR protein to which they are bound are internalized by the cell, resulting in increased therapeutic efficacy of the immunoconjugate in killing the cancer cell to which they bind. In a preferred embodiment, the cytotoxic agent (maytansinoid) targets or interferes with nucleic acid in the cancer cell.

The treatment of the present invention targets ErbB overexpressing tumors that do not respond, or respond poorly, to treatment with an unconjugated anti-ErB antibody. Such patients might have received prior treatment with an anti-ErB antibody not conjugated to a maytansinoid moiety, where the prior treatment either did not result in significant improvement, or resulted in transient response. Prior treatment of any particular patient with an unconjugated anti-ErbB antibody is, however, not a prerequisite of identifying patients who are candidates for treatment in accordance with the present invention. An ordinary skilled physician can readily identify patients who are expected to benefit from treatment with the immunoconjugates of the present invention based on publicly available clinical data his or her own experience. Treatment of mammals, and in particular human patients, with or without prior treatment with an (unconjugated) anti-ErbB antibody is specifically within the scope of the present invention.

The anti-ErbB antibody-maytansinoid conjugates are administered to a mammal, preferably to a human patient in accord with known methods, such as intravenous administration, *e.g.*, as a bolus or by continuous infusion over a period of time, by intramuscular, intraperitoneal, intracerobrospinal, subcutaneous, intra-articular, intrasynovial, intrathecal, oral, topical, or inhalation routes. Intravenous or subcutaneous administration of the antibody is preferred.

Other therapeutic regimens may be combined with the administration of the anti-ErbB antibody-maytansinoid conjugates. The combined administration includes coadministration, using separate formulations or a single pharmaceutical formulation, and consecutive administration in either order, wherein preferably there is a time period while both (or all) active agents simultaneously exert their biological activities.

In one preferred embodiment, the patient is treated with two or more different anti-ErbB antibodies, at least one of which is in the form of a maytansinoid conjugate. For example, the patient may be treated with a first anti-ErbB2 antibody-maytansinoid conjugate in which the antibody is growth inhibitory (*e.g.* HERCEPTIN®), and a second anti-ErbB2 antibody or antibody-immunoconjugate, e.g. an antibody-maytansinoid conjugate which blocks ligand activation of an ErbB receptor (e.g. 2C4 or a humanized and/or affinity matured variant thereof) or induces apoptosis

of an ErbB2-overexpressing cell (*e.g.* 7C2, 7F3 or humanized variants thereof). In another embodiment, the treatment involves the administration of antibodies that specifically bind two or more different ErbB receptors, such as, for example, ErbB2 and EGFR receptors, where at least one of the anti-ErbB antibodies is administered as a maytansinoid conjugate. Preferably such combined therapy results in a synergistic therapeutic effect.

It may also be desirable to combine administration of the anti-ErbB antibody-maytansinoid conjugates, with administration of an antibody directed against another tumor-associated antigen, which is not member of the ErbB family of receptors. The other antibody in this case may, for example, bind to vascular endothelial growth factor (VEGF), and may be in the form of a maytansinoid conjugate, or another immunoconjugate.

In one embodiment, the treatment of the present invention involves the combined administration of an anti-ErbB2 antibody-maytansinoid conjugate (or conjugates) and one or more chemotherapeutic agents or growth inhibitory agents, including coadministration of cocktails of different chemotherapeutic agents. Preferred chemotherapeutic agents include taxanes (such as paclitaxel and doxetaxel) and/or anthracycline antibiotics. Preparation and dosing schedules for such chemotherapeutic agents may be used according to manufacturers' instructions or as determined empirically by the skilled practitioner. Preparation and dosing schedules for such chemotherapy are also described in Chemotherapy Service Ed., M.C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1992).

The antibody-maytansinoid conjugates may be combined with an anti-hormonal compound; *e.g.*, an anti-estrogen compound such as tamoxifen; an anti-progesterone such as onapristone (see, EP 616 812); or an anti-androgen such as flutamide, in dosages known for such molecules. Where the cancer to be treated is hormone independent cancer, the patient may previously have been subjected to anti-hormonal therapy and, after the cancer becomes hormone independent, the anti-ErbB2 antibody (and optionally other agents as described herein) may be administered to the patient.

Sometimes, it may be beneficial to also coadminister a cardioprotectant (to prevent or reduce myocardial dysfunction associated with the therapy) or one or more cytokines to the patient. In addition to the above therapeutic regimes, the patient may be subjected to surgical removal of cancer cells and/or radiation therapy.

Suitable dosages for any of the above coadministered agents are those presently used and may be lowered due to the combined action (synergy) of the agent and anti-ErbB2 antibody.

For the prevention or treatment of disease, the appropriate dosage of antibody-maytansinoid conjugates will depend on the type of disease to be treated, as defined above, the severity and course of the disease, whether the antibody is administered for preventive or therapeutic purposes, previous therapy, the patient's clinical history and response to the antibody, and the discretion of the attending physician. The antibody-maytansinoid conjugate is suitably administered to the patient at one time or over a series of treatments. Depending on the type and severity of the disease, about 1 g/kg to 15 mg/kg (*e.g.* 0.1-20mg/kg) of antibody-maytansinoid conjugate is an initial candidate dosage for administration to the patient, whether, for example, by one or more separate administrations, or by continuous infusion. A typical daily dosage might range from about 1 g/kg to 100 mg/kg or more, depending on the factors mentioned above. For repeated administrations over several days or longer, depending on the condition, the

treatment is sustained until a desired suppression of disease symptoms occurs. A preferred dosing regimen comprises administering an initial loading dose of about 4 mg/kg, followed by a weekly maintenance dose of about 2 mg/kg of the anti-ErbB2 antibody-maytansinoid conjugate. However, other dosage regimens may be useful. The progress of this therapy is easily monitored by conventional techniques and assays.

F. Articles of Manufacture

In another embodiment of the invention, an article of manufacture containing materials useful for the treatment of the disorders described above is provided. The article of manufacture comprises a container and a label or package insert on or associated with the container. Suitable containers include, for example, bottles, vials, syringes, etc. The containers may be formed from a variety of materials such as glass or plastic. The container holds a composition which is effective for treating the condition and may have a sterile access port (for example the container may be an intravenous solution bag or a vial having a stopper pierceable by a hypodermic injection needle). At least one active agent in the composition is an anti-ErbB2 antibody-maytansinoid conjugate. The label or package insert indicates that the composition is used for treating the condition of choice, such as cancer. In one embodiment, the label or package inserts indicates that the composition comprising the antibody which binds ErbB2 can be used to treat cancer which expresses an ErbB receptor selected from the group consisting of epidermal growth factor receptor (EGFR), ErbB2, ErbB3 and ErbB4, preferably EGFR. In addition, the label or package insert may indicate that the patient to be treated is one having cancer characterized by excessive activation of an ErbB receptor selected from EGFR, ErbB2, ErbB3 or ErbB4. For example, the cancer may be one which overexpresses one of these receptors and/or which overexpresses an ErbB ligand (such as TGF-). The label or package insert may also indicate that the composition can be used to treat cancer, wherein the cancer is not characterized by overexpression of the ErbB2 receptor. For example, whereas the present package insert for HERCEPTIN® indicates that the antibody is used to treat patients with metastatic breast cancer whose tumors overexpress the ErbB2 protein, the package insert herein may indicate that the antibody or composition is used to treat cancer that does not respond, or respond poorly, to treatment with HERCEPTIN®. In other embodiments, the package insert may indicate that the antibody-maytansinoid conjugate or composition can be used also to treat hormone independent cancer, prostate cancer, colon cancer or colorectal cancer. Moreover, the article of manufacture may comprise (a) a first container with a composition contained therein, wherein the composition comprises a maytansinoid conjugate of a first antibody which binds ErbB2 and inhibits growth of cancer cells which overexpress ErbB2; and (b) a second container with a composition contained therein, wherein the composition comprises a second antibody which binds ErbB2 and blocks ligand activation of an ErbB receptor, or a conjugate of this second antibody with a maytansinoid. The article of manufacture in this embodiment of the invention may further comprises a package insert indicating that the first and second compositions can be used to treat cancer. Alternatively, or additionally, the article of manufacture may further comprise a second (or third) container comprising a pharmaceutically-acceptable buffer, such as bacteriostatic water for injection (BWFI),

phosphate-buffered saline, Ringer's solution and dextrose solution. It may further include other materials desirable from a commercial and user standpoint, including other buffers, diluents, filters, needles, and syringes.

Further details of the invention are illustrated in the following non-limiting examples.

Example 1

Production, Characterization and Humanization of Anti-ErbB2 Monoclonal Antibody 4D5

The murine monoclonal antibody 4D5 which specifically binds the extracellular domain of ErbB2 was produced as described in Fendly *et al., Cancer Research* 50:1550-1558 (1990). Briefly, NIH 3T3/HER2-3_{400} cells (expressing approximately 1 x 10^5 ErbB2 molecules/cell) produced as described in Hudziak *et al Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 84:7158-7163 (1987) were harvested with phosphate buffered saline (PBS) containing 25mM EDTA and used to immunize BALB/c mice. The mice were given injections i.p. of 10^7 cells in 0.5ml PBS on weeks 0, 2, 5 and 7. The mice with antisera that immunoprecipitated ^{32}P-labeled ErbB2 were given i.p. injections of a wheat germ agglutinin-Sepharose (WGA) purified ErbB2 membrane extract on weeks 9 and 13. This was followed by an i.v. injection of 0.1 ml of the ErbB2 preparation and the splenocytes were fused with mouse myeloma line X63-Ag8.653. Hybridoma supernatants were screened for ErbB2-binding by ELISA and radioimmunoprecipitation.

Epitope mapping and characterization

The ErbB2 epitope bound by monoclonal antibody 4D5 was determined by competitive binding analysis (Fendly *et al. Cancer Research* 50:1550 -1558 (1990)). Cross-blocking studies were done by direct fluorescence on intact cells using the PANDEX™ Screen Machine to quantitate fluorescence. The monoclonal antibody was conjugated with fluorescein isothiocyanate (FITC), using established procedures (Wofsy *et al. Selected Methods in Cellular Immunology*, p. 287, Mishel and Schiigi (eds.) San Francisco: W.J. Freeman Co. (1980)). Confluent monolayers of NIH 3T3/HER2-3_{400} cells were trypsinized, washed once, and resuspended at 1.75 x 10^6 cell/ml in cold PBS containing 0.5% bovine serum albumin (BSA) and 0.1% NaN_3. A final concentration of 1% latex particles (IDC, Portland, OR) was added to reduce clogging of the PANDEX™ plate membranes. Cells in suspension, 20 l, and 20 l of purified monoclonal antibodies (100 g/ml to 0.1 g/ml) were added to the PANDEX™ plate wells and incubated on ice for 30 minutes. A predetermined dilution of the FITC-labeled monoclonal antibody in 20 l was added to each well, incubated for 30 minutes, washed, and the fluorescence was quantitated by the PANDEX™. Monoclonal antibodies were considered to share an epitope if each blocked binding of the other by 50% or greater in comparison to an irrelevant monoclonal antibody control. In this experiment, monoclonal antibody 4D5 was assigned epitope I (amino acid residues from about 529 to about 625, inclusive within the ErbB2 extracellular domain (see SEQ ID NO: 3).

The growth inhibitory characteristics of monoclonal antibody 4D5 were evaluated using the breast tumor cell line, SK-BR-3 (see Hudziak *et al. Molec. Cell. Biol.* 9(3):1165-1172 (1989)). Briefly, SK-BR-3 cells were detached by using 0.25% (vol/vol) trypsin and suspended in complete medium at a density of 4 x 10^5 cells per ml. Aliquots of 100 l (4 x 10^4 cells) were plated into 96-well microdilution plates, the cells were allowed to adhere, and 100 l of media alone or media containing monoclonal antibody (final concentration 5 g/ml) was then added. After 72 hours,

plates were washed twice with PBS (pH 7.5), stained with crystal violet (0.5% in methanol), and analyzed for relative cell proliferation as described in Sugarman *et al. Science* 230:943-945 (1985). Monoclonal antibody 4D5 inhibited SK-BR-3 relative cell proliferation by about 56%.

Monoclonal antibody 4D5 was also evaluated for its ability to inhibit HRG-stimulated tyrosine phosphorylation of proteins in the M_r 180,000 range from whole-cell lysates of MCF7 cells (Lewis *et al. Cancer Research* 56:1457-1465 (1996)). MCF7 cells are reported to express all known ErbB receptors, but at relatively low levels. Since ErbB2, ErbB3, and ErbB4 have nearly identical molecular sizes, it is not possible to discern which protein is becoming tyrosine phosphorylated when whole-cell lysates are evaluated by Western blot analysis. However, these cells are ideal for HRG tyrosine phosphorylation assays because under the assay conditions used, in the absence of exogenously added HRG, they exhibit low to undetectable levels of tyrosine phosphorylation proteins in the M_r 180,000 range.

MCF7 cells were plated in 24-well plates and monoclonal antibodies to ErbB2 were added to each well and incubated for 30 minutes at room temperature; then rHRG $1_{177-244}$ was added to each well to a final concentration of 0.2 nM, and the incubation was continued for 8 minutes. Media was carefully aspirated from each well, and reactions were stopped by the addition of 100 l of SDS sample buffer (5% SDS, 25 mM DTT, and 25 mM Tris-HCl, pH 6.8). Each sample (25 l) was electrophoresed on a 4-12% gradient gel (Novex) and then electrophoretically transferred to polyvinylidene difluoride membrane. Antiphosphotyrosine (4G10, from UBI, used at 1 g/ml) immunoblots were developed, and the intensity of the predominant reactive band at M_r 180,000 was quantified by reflectance densitometry, as described previously (Holmes *et al. Science* 256:1205-1210 (1992); Sliwkowski *et al. J. Biol. Chem.* 269:14661-14665 (1994))

Monoclonal antibody 4D5 significantly inhibited the generation of a HRG-induced tyrosine phosphorylation signal at M_r 180,000. In the absence of HRG, but was unable to stimulate tyrosine phosphorylation of proteins in the M_r 180,000 range. Also, this antibody does not cross-react with EGFR (Fendly *et al. Cancer Research* 50:1550-1558 (1990)), ErbB3, or ErbB4. Monoclonal antibody 4D5 was able to block HRG stimulation of tyrosine phosphorylation by 50%.

The growth inhibitory effect of monoclonal antibody 4D5 on MDA-MB-175 and SK-BR-3 cells in the presence or absence of exogenous rHRG 1 was assessed /Schaefer *et al. Oncogene* 15:1385-1394 (1997)). ErbB2 levels in MDA-MB-175 cells are 4-6 times higher than the level found in normal breast epithelial cells and the ErbB2-ErbB4 receptor is constitutively tyrosine phosphorylated in MDA-MB-175 cells. Monoclonal antibody 4D5 was able to inhibit cell proliferation of MDA-MB-175 cells, both in the presence and absence of exogenous HRG. Inhibition of cell proliferation by 4D5 is dependent on the ErbB2 expression level (Lewis *et al. Cancer Immunol. Immunother.* 37:255-263 (1993)). A maximum inhibition of 66% in SK-BR-3 cells could be detected. However this effect could be overcome by exogenous HRG.

Humanization

The murine monoclonal antibody 4D5 was humanized, using a novel "gene conversion mutagenesis" strategy, as described in U.S. Patent No. 5,821,337, the entire disclosure of which is hereby expressly incorporated by reference. The humanized monoclonal antibody 4D5 used in the following experiments is designated huMAb4D5-8. This antibody is of IgG1 isotype.

Example 2

HERCEPTIN®-DM1 conjugates

1. Purification of HERCEPTIN®

HERCEPTIN® (huMAb4D5-8, rhuMAb HER2, U.S. Patent No. 5,821,337) (1 vial containing 440 mg antibody) was dissolved in 50 mL MES buffer (25 mM MES, 50 mM NaCl, pH 5.6). The sample was loaded on a cation exchange column (Sepharose S, 15 cm x 1.7 cm) that had been equilibrated in the same buffer. The column was then washed with the same buffer (5 column volumes). HERCEPTIN® was eluted by raising the NaCl concentration of the buffer to 200 mM. Fractions containing the antibody were pooled, diluted to 10 mg/mL, and dialyzed into a buffer containing 50 mm potassium phosphate, 50 mM NaCl, 2 mM EDTA, pH 6.5.

2. Modification of HERCEPTIN® with SPP

The purified HERCEPTIN® antibody was modified with N-succinimidyl-4-(2-pyridylthio)pentanoate (SPP) to introduce dithiopyridyl groups. The antibody (376.0 mg, 8 mg/mL) in 44.7 mL of 50 mM potassium phosphate buffer (pH 6.5) containing NaCl (50 mM) and EDTA (1 mM) was treated with SPP (5.3 molar equivalents in 2.3 mL ethanol). After incubation for 90 minutes under argon at ambient temperature, the reaction mixture was gel filtered through a Sephadex G25 column equilibrated with 35 mM sodium citrate, 154 mM NaCl, 2 mM EDTA. Antibody containing fractions were pooled and assayed. The degree of modification of the antibody was determined as described above. Recovery of the modified antibody (HERCEPTIN®-SPP-Py) was 337 mg (89.7%) with 4.5 releasable 2-thiopyridine groups linked per antibody.

3. Conjugation of HERCEPTIN®-SPP-Py with DM1

The modified antibody (337.0 mg, 9.5 μmols of releasable 2-thiopyridine groups) was diluted with the above 35 mM sodium citrate buffer, pH 6.5, to a final concentration of 2.5 mg/mL. DM1 (the structure of which is shown in Figure 1) (1.7 equivalents, 16.1 μmols) in 3.0 mM dimethylacetamide (DMA, 3% v/v in the final reaction mixture) was then added to the antibody solution. The reaction proceeded at ambient temperature under argon for 20 hours. The structure of HERCEPTIN®-DM1 conjugates is illustrated in Figure 2.

The reaction was loaded on a Sephacryl S300 gel filtration column (5.0 cm x 90.0 cm, 1.77 L) equilibrated with 35 mM sodium citrate, 154 mM NaCl, pH 6.5. The flow rate was 5.0 mL/min and 65 fractions (20.0 mL each) were collected. A major peak centered around fraction No. 47 (Figure 3). The major peak comprises monomeric HERCEPTIN®-DM1. Fractions 44-51 were pooled and assayed. The number of DM1 drug molecules linked per

antibody molecule was determined by measuring the absorbance at 252 nm and 280 nm, and found to be 3.7 drug molecules per antibody molecule.

Example 3

Transgenic Animals

In order to improve the clinical activity of HERCEPTIN®, a transgenic HER2 mouse model was developed in which novel HER2-directed therapies could be tested preclinically. Tumors arise readily in transgenic mice that express a mutationally activated form of *neu*, the rat homolog of HER2, but the HER2 that is overexpressed in breast cancers is not mutated and tumor formation is much less robust in transgenic mice that overexpress nonmutated HER2 (Webster *et al., Semin. Cancer Biol.* 5: 69-76 [1994]). To improve tumor formation with nonmutated HER2, a strategy was used to further enhance overexpression of nonmutated HER2 in a transgenic mouse.

Any promoter that promotes expression of HER2 in epithelial cells in the mouse mammary gland can be used in the disclosed constructs. Many of the milk protein genes are transcribed by promoter/enhancer elements that are specifically active in mammary glands. Milk protein genes include those genes encoding caseins (α-S_1 and β), β-lactoglobulin, α-lactalbumin, and whey acidic protein. The ovine β-lactoglobulin promoter is well characterized and widely used in the art (Whitelaw *et al., Biochem J.* 286: 31-39, [1992]). However, similar fragments of promoter DNA from other species are also suitable. A preferred promoter is the promoter derived from the Long Terminal Repeat (LTR) of the Mouse Mammary Tumor Virus (MMTV). A HER2 transgene construct of the present invention was generated using the MMTV LTR promoter.

To improve tumor formation with nonmutated HER2, we have made transgenic mice using a HER2 cDNA plasmid in which an upstream ATG was deleted in order to prevent initiation of translation at such upstream ATG codons, which would otherwise reduce the frequency of translation initiation from the downstream authentic initiation codon of HER2 (for example, see Child *et al., J. Biol. Chem.* 274: 24335-24341 [1999]). Additionally, a chimeric intron was added to the 5' end, which should also enhance the level of expression as reported earlier (Neuberger and Williams, *Nucleic Acids Res.* 16: 6713 [1988]; Buchman and Berg, *Mol. Cell. Biol.* 8: 4395 [1988]; Brinster *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 836 [1988]). The chimeric intron was derived from a Promega vector, pCI-neo mammalian expression vector (bp 890-1022). The cDNA 3'-end is flanked by human growth hormone exons 4 and 5, and polyadenylation sequences. Moreover, FVB mice were used because this strain is more susceptible to tumor development. The promoter from MMTV-LTR was used to ensure tissue-specific HER2 expression in the mammary gland. Animals were fed the AIN 76A diet in order to increase susceptibility to tumor formation (Rao *et al., Breast Cancer Res. and Treatment* 45: 149-158 [1997]). The nucleotides sequence of this transgene plasmid construct (SEQ ID NO: 1) is shown in Figure 4.

Animals suitable for transgenic experiments can be obtained from standard commercial sources such as Taconic (Germantown, N.Y.). Many strains are suitable, but FVB female mice are preferred because of their higher susceptibility to tumor formation. FVB males were used for mating and vasectomized CD.1 studs were used to

stimulate pseudopregnancy. Vasectomized mice can be obtained from any commercial supplier. Founders were bred with either FVB mice or with 129/BL6 x FVB p53 heterozygous mice. The mice with heterozygosity at p53 allele were used to potentially increase tumor formation. However, this has proven unecessary. Therefore, some F1 tumors are of mixed strain. Founder tumors are FVB only. Six founders were obtained with some developing tumors without having litters.

Example 4

HER2 transgenic mouse as a tumor model to evaluate HER2-directed therapies

Mammary gland biopsies of one founder transgenic mouse made as described in Example 3, showed 3+ expression of HER2, as determined by immunohistochemical staining, at about 2 months of age. The amount of HER2 extracellular domain (ECD) shed into serum was measured and found to be about 1.2 ng/ml (Huang et al., *supra*). This mouse subsequently developed a mammary tumor at 5 months of age, after bearing 4 litters. The tumor was surgically resected under aseptic conditions and minced into small pieces, 2 mm^3, which were then transplanted into the mammary fat pad of wild-type FVB female mice. Tumors developed in 22 of 31 recipient mice, with a latency of 5 weeks. With subsequent passage, tumors developed with shorter latency and grew more rapidly, and tumor incidence increased to $>95\%$ of recipients. HER2 expression, as determined by immunohistochemical staining, was 3+ but heterogeneous in the primary tumor, but became uniformly 3+ after the first passage.

Treatment of tumor-bearing mice with HERCEPTIN® or 4D5, the murine antibody from which humanized HERCEPTIN® was derived, had only a modest effect on the growth of the transplanted tumors (Figure 5). HER2 expression was 3+ in tumors that grew during HERCEPTIN® or 4D5 therapy, indicating that there was no selection of HER2-negative tumors. Moreover, cy3-HERCEPTIN® was detected decorating tumor cells after injection into tumor-bearing mice, indicating that the lack of efficacy was not due to failure of the antibody to access the tumor.

Based on the persistent expression of HER2 and the failure of this tumor model to respond to HERCEPTIN®, a novel approach was tested, using HERCEPTIN® conjugated to maytansinoid DM1 as described in Example 3. Figure 5 shows that the HERCEPTIN® -DM1 conjugate has dramatic anti-tumor activity in this model. RITUXAN®, an unrelated anti-CD20 monoclonal antibody, was used as a negative control for these studies. There was little response to HERCEPTIN® compared to the control antibody, RITUXAN® , but there was striking anti-tumor activity of the maytansinoid conjugate of HERCEPTIN®. As shown in Figure 5, all of the mice treated with HERCEPTIN® -maytansinoid showed striking shrinkage of their tumors, though none of the tumors disappeared. After approximately 4 weeks, tumors began to regrow. Five animals were sacrificed at this time. Their tumors were found to express HER2 at 3+ levels. Thus, there was no selection for HER2-negative tumors. Based on this observation, the remaining 3 mice were treated with HERCEPTIN®-maytansinoid for 5 consecutive days. The tumors again regressed in response to the treatment.

All references cited throught the specification, and the references cited therein, are hereby expressly incorporated by reference.

Deposit of Biological Material

The following hybridoma cell lines have been deposited with the American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, USA (ATCC):

Antibody Designation	ATCC No.	Deposit Date
7C2	ATCC HB-12215	October 17, 1996
7F3	ATCC HB-12216	October 17, 1996
4D5	ATCC CRL 10463	May 24, 1990
2C4	ATCC HB-12697	April 8, 1999

This deposit was made under the provisions of the Budapest Treaty on the International Recognition of the Deposit of Microorganisms for the Purpose of Patent Procedure and the Regulations thereunder (Budapest Treaty). This assures maintenance of viable cultures for 30 years from the date of the deposit. The organisms will be made available by ATCC under the terms of the Budapest Treaty, and subject to an agreement between Genentech, Inc. and ATCC, which assures permanent and unrestricted availability of the progeny of the cultures to the public upon issuance of the pertinent U.S. patent or upon laying open to the public of any U.S. or foreign patent application, whichever comes first, and assures availability of the progeny to one determined by the U.S. Commissioner of Patents and Trademarks to be entitled thereto according to 35 USC §122 and the Commissioner's rules pursuant thereto (including 37 CFR §1.12 with particular reference to 886 OG 638).

In respect of those designations in which a European patent is sought, a sample of the deposited microorganism will be made available until the publication of the mention of the grant of the European patent or until the date on which the application has been refused or withdrawn or is deemed to be withdrawn, only by the issue of such a sample to an expert nominated by the person requesting the sample. (Rule 28(4) EPC)

The assignee of the present application has agreed that if the cultures on deposit should die or be lost or destroyed when cultivated under suitable conditions, they will be promptly replaced on notification with a viable specimen of the same culture. Availability of the deposited strain is not to be construed as a license to practice the invention in contravention of the rights granted under the authority of any government in accordance with its patent laws.

The foregoing written specification is considered to be sufficient to enable one skilled in the art to practice the invention. The present invention is not to be limited in scope by the constructs deposited, since the deposited embodiments are intended to illustrate only certain aspects of the invention and any constructs that are functionally equivalent are within the scope of this invention. The deposit of material herein does not constitute an admission that the written description herein contained is inadequate to enable the practice of any aspect of the invention, including

the best mode thereof, nor is it to be construed as limiting the scope of the claims to the specific illustrations that they represent. Indeed, various modifications of the invention in addition to those shown and described herein will become apparent to those skilled in the art from the foregoing description and fall within the scope of the appended claims.

It is understood that the application of the teachings of the present invention to a specific problem or situation will be within the capabilities of one having ordinary skill in the art in light of the teachings contained herein. Examples of the products of the present invention and representative processes for their isolation, use, and manufacture appear below, but should not be construed to limit the invention.

What is claimed is:

1. A method for the treatment of a tumor in a mammal, wherein the tumor is characterized by the overexpression of an ErbB receptor and does not respond, or responds poorly, to treatment with an anti-ErbB antibody, comprising administering to the mammal a therapeutically effective amount of a conjugate of the anti-ErbB antibody with a maytansinoid.

2. The method of claim 1 wherein the mammal is human.

3. The method of claim 2 wherein the ErbB receptor is selected from the group consisting of ErbB1 (EGFR), ErbB2 (HER2), ErbB3 (HER3) and ErbB4 (HER4).

4. The method of claim 3 wherein the anti-ErbB antibody is a growth inhibitory antibody.

5. The method of claim 3 wherein the anti-ErbB antibody induces cell death.

6. The method of claim 3 wherein the anti-ErbB antibody induces apoptosis.

7. The method of claim 3 wherein the antibody is an anti-ErbB2 antibody.

8. The method of claim 7 wherein the tumor is cancer.

9. The method of claim 8 wherein the cancer is selected from the group consisting of breast, ovarian, stomach, endometrial, salivary gland, lung, kidney, colon, colorectal, thyroid, pancreatic, prostate and bladder cancer.

10. The method of claim 9 wherein the cancer is breast cancer.

11. The method of claim 10 wherein the breast cancer overexpresses ErbB2 at a 2+ level or more.

12. The method of claim 11 wherein the breast cancer overexpresses ErbB2 at a 3+ level.

13. The method of claim 12 wherein the antibody has a biological characteristic of a 4D5 monoclonal antibody.

14. The method of claim 13 wherein the antibody binds essentially the same epitope as a 4D5 monoclonal antibody.

15. The method of claim 13 wherein the antibody is the monoclonal antibody 4D5 (ATCC CRL 10463).

16. The method of claim 13 wherein the antibody is humanized.

17. The method of claim 16 wherein the antibody is selected from the group consisting of humanized antibodies huMAb4D5-1, huMAb4D5-2, huMAb4D5-3, huMAb4D5-4, huMAb4D5-5, huMAb4D5-6, huMAb4D5-7 and huMAb4D5-8 (HERCEPTIN®).

18. The method of claim 17 wherein the antibody is humanized antibody huMAb4D5-8 (HERCEPTIN®).

19. The method of claim 3 wherein the antibody is an antibody fragment.

20. The method of claim 19 wherein the antibody fragment is a Fab fragment.

21. The method of claim 3 wherein the maytansinoid is maytansine.

22. The method of claim 3 wherein the maytansinoid is maytansinol.

23. The method of claim 3 wherein the maytansinoid is a maytansinol ester.

24. The method of claim 23 wherein the maytansinoid is a C-3 ester of maytansinol.

25. The method of claim 24 wherein the maytansioid is DM1 shown in Figure 1.

26. The method of claim 3 wherein the antibody and maytansinoid are conjugated by a bispecific chemical linker.

27. The method of claim 26 wherein said chemical linker is N-succinimidyl-4-(2-pyridylthio)propanoate (SPDP) or N-succinimidyl-4-(2-pyridylthio)pentanoate (SPP).

28. The method of claim 3 wherein the antibody and maytansinoid are conjugated by a linking group selected from the group consisting of a disulfide, thioether, acid labile, photolabile, peptidase labile, and esterase labile group.

29. The method of claim 28 wherein the linking group is a disulfide or a thioether group.

30. The method of claim 29 wherein the linking group is a disulfide group.

31. The method of claim 3 wherein the conjugate comprises 1 to about 10 maytansinoid molecules per antibody molecule.

32. The method of claim 31 wherein the conjugate comprises from about 3 to about 5 maytansinoid molecules per antibody molecule.

33. The method of claim 7 further comprising the administration of a second antibody which binds ErbB2 and blocks ligand activation of an ErbB receptor.

34. The method of claim 33 wherein the second antibody comprises monoclonal antibody 2C4 or humanized 2C4.

35. The method of claim 33 wherein said second antibody is conjugated with a cytotoxic agent.

36. The method of claim 35 wherein the cytotoxic agent is a maytansinoid.

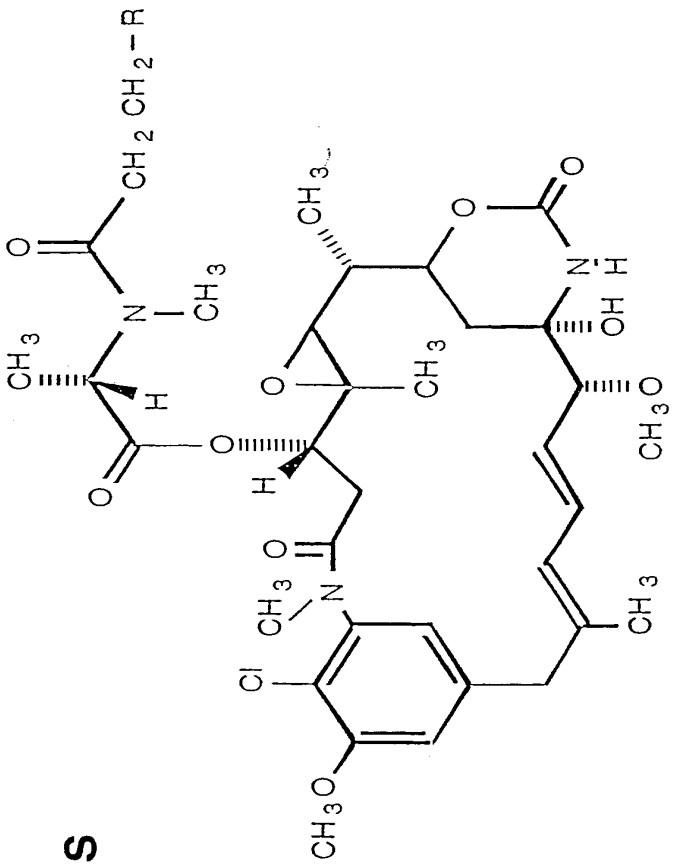
37. An article of manufacture comprising a container and a composition contained therein, wherein the composition comprises an anti-ErbB antibody-maytansinoid conjugate, and further comprising a package insert or label indicating that the composition can be used to treat cancer characterized by the overexpression of an ErbB receptor.

38. The article of manufacture of claim 37 wherein said package insert of label indicates that the composition can be used to treat cancer characterized by the overexpression of an ErbB2 receptor.

39. The article of manufacture of claim 38 wherein the cancer is breast cancer.

40. The article of manufacture of claim 38 wherein the cancer is characterized by the overexpression of an ErbB2 receptor at a 2+ level or above.

41. The article of manufacture of claim 40 wherein the cancer is characterized by the overexpression of an ErbB2 receptor at a 3+ level.



Maytansinoids
(DM1)

FIGURE 1

FIG. 1

FIGURE ~~3~~ 2

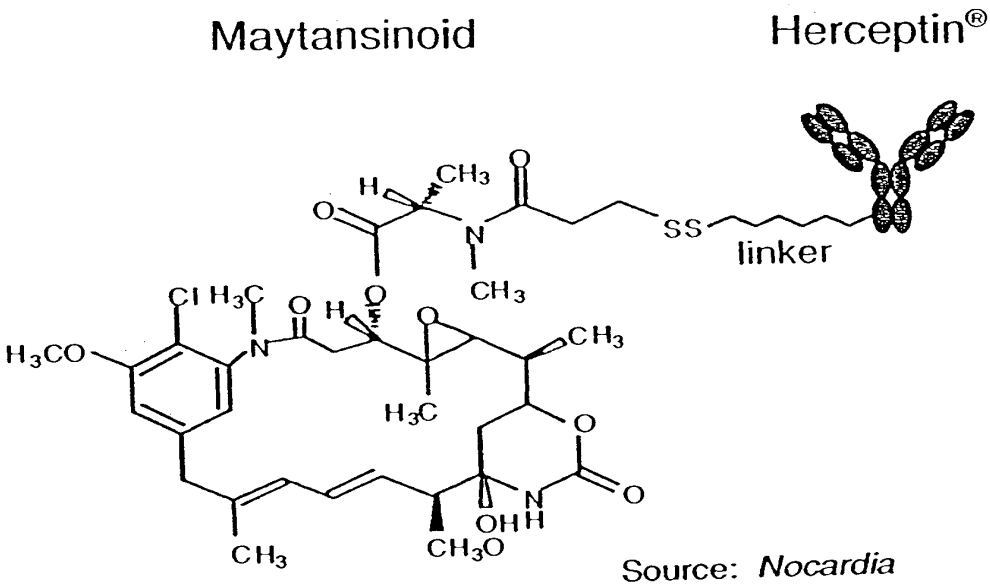


FIG 2

3

Fig. 1 S300 Elution Profile of Herceptin-DM1

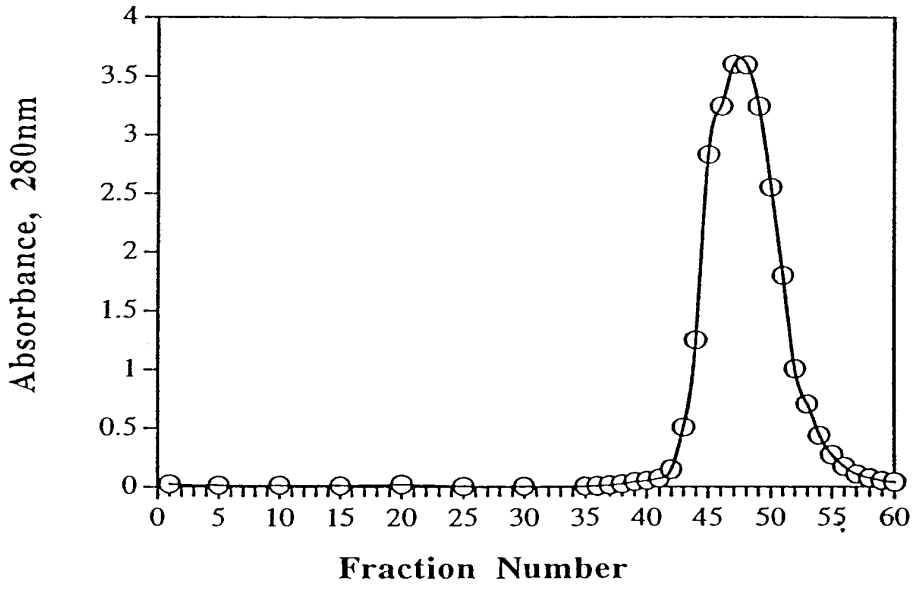


FIG. 3

3/39

FIGURE 4

FIG. 4

4/39

```
                                                
```

```
                                                
```

```
                                                
```

```
                                                
```

```
                    sau96I                                                                                                  hgiAI/aspHI
                    avaII                                                                                                nlaIV    bsp1286
                    asuI                                                                                               mspI      bsiHKAI
                   nlaIV                                                                                              hpaII    cac8I
                 scrFI            nlaIII                                  nlaIV                                    scrFI   thaI
                 nciI            styI                                    hgiJII                                    nciI    fnuDII/mvnI
                 mspI            ncoI                                    bsp1286                                   dsaV    bstUI  mslI
        mnlI     hpaII           dsaI                          mspAlI/nspBII   mnlI                                cauII   bsh1236I
      mwoI       dsaV        nlaIV          fnu4HI/bsoFI aciI   bmyI   bseRI                                      bssKI  aciI bmyI
    hinPI        cauII      mspI  bstXI   cac8I  haeIII/palI      banII mnlI                                      bsaJI  fnu4HI/bsoFI
    hhaI/cfoI    bssKI      hpaII bsaJI  aluI aciI       fnu4HI/bsoFI bseRI       mnlI
1701 GCGCCCTCCC AGCCGGGTCC AGCCGGAGCC ATGGAGCTGG CGGCCTTGTG CCGCTGGGGG CTCCTCCTCG CCCTCTTGCC CCCCGGAGCC GCGAGCACCC
     CGCGGGAGGG TCGGCCCAGG TCGGCCTCGG TACCTCGACC GCCGGAACAC GGCGACCCCC GAGGAGGAGC GGGAGAACGG GGGGCCTCGG CGCTCGTGGG
   1                                M  E  L  A   A  L  C   R  W  G   L  L  L  A   L  L  P   P  G  A   A  S  T  Q

                                                                                                                  scrFI
                                                                                                                  mvaI
             mspI                                                                                        scrFI    ecoRII
            cfr10I/bsrFI                                                  scrFI                          mvaI     dsaV
        hgiAI/aspHI                fnu4HI/bsoFI                          mvaI                           ecoRII   bstNI
        bsp1286                    aciI                                  ecoRII                         dsaV     bssKI
        bsiHKAI   mslI          tseI                        bsmAI         dsaV                           bstNI    apyI
        bmyI hpaII              fnu4HI/bsoFI                bsaI          bstNI  nlaIII        mnlI  bssKI tseI
        apaLI/snoI             aluI                  bsmFI               bssKI nspHI          ecoNI bsaJI fnu4HI/bsoFI
        alw44I/snoI     nlaIII bbvI  nlaIV    bsrI  avaI                apyI  nspI   aciI    bslI  apyI  bbvI
1801 AAGTGTGCAC CGGCACAGAC ATGAAGCTGC GGCTCCCTGC CAGTCCCGAG ACCCACCTGG ACATGCTCCG CCACCTCTAC CAGGGCTGCC AGGTGGTGCA
     TTCACACGTG GCCGTGTCTG TACTTCGACG CCGAGGGACG GTCAGGGCTC TGGGTGGACC TGTACGAGGC GGTGGAGATG GTCCCGACGG TCCACCACGT
  25  V  C  T   G  T  D   M  K  L  R   L  P  A   S  P  E   T  H  L  D   M  L  R   H  L  Y   Q  G  C  Q   V  V  Q

                                                                                  mnlI
          scrFI                                                              scrFI                hgiAI/aspHI
          mvaI                                                               mvaI                 bsp1286
          ecoRII                                              scfI           ecoRII               bsiHKAI
          dsaV                                                pstI           dsaV                 bmyI
          bstNI                                               bsgI           bstNI              taiI
          bssKI                                              sse8387I        bssKI              maeII
          apyI     hphI   bspMI          cac8I                sbfI    ecoRV apyI              bsaAI
1901 GGGAAACCTG GAACTCACCT ACCTGCCCAC CAATGCCAGC CTGTCCTTCC TGCAGGATAT CCAGGAGGTG CAGGGCTACG TGCTCATCGC TCACAACCAA
     CCCTTTGGAC CTTGAGTGGA TGGACGGGTG GTTACGGTCG GACAGGAAGG ACGTCCTATA GGTCCTCCAC GTCCCGATGC ACGAGTAGCG AGTGTTGGTT
  58  G  N  L   E  L  T  Y   L  P  T   N  A  S   L  S  F  L   Q  D  I   Q  E  V   Q  G  Y  V   L  I  A   H  N  Q
```

```
                                                                                                                  haeIII/palI
                                                                                                                 eaeI
                                                                                                                 cfrI
                        alwNI                                                                                 scrFI
                bsmFI   alw26I/bsmAI                                                                          mvaI
               sau96I   mwoI                                                                                  ecoRII
               nlaIV    bstAPI                                                                                dsaV
               avaII   scfI       mwoI                                                                        bstNI
               asuI    pstI     tseI            nlaIV                                                        bssKI      rmaI
              ppuMI    bsgI     fnu4HI/bsoFI    hgiCI                                                        apyI       maeI       bsmAI mspA1I/nspB
            bspMI    tspRI      bbvI            banI                                                         bsaJI      bfaI       bsaI  aciI
        mnlI eco0109I/draII mnlI  aciI        mnlI      aluI     mnlI                                       bsaJI      bfaI       bsaI  aciI
2001 GTGAGGCAGG TCCCACTGCA GAGGCTGCGG ATTGTGCGAG GCACCCAGCT CTTTGAGGAC AACTATGCCC TGGCCGTGCT AGACAATGGA GACCCGCTGA
     CACTCCGTCC AGGGTGACGT CTCCGACGCC TAACACGCTC CGTGGGTCGA GAAACTCCTG TTGATACGGG ACCGGCACGA TCTGTTACCT CTGGGCGACT
  91 V  R  Q  V   P  L  Q   R  L  R   I  V  R  G   T  Q  L   F  E  D   N  Y  A  L   A  V  L   D  N  G   D  P  L  N

                                    scrFI                 tseI
                                    mvaI                  fnu4HI/bsoFI
                                    ecoRII                bbvI
                                    dsaV                scfI     taqI
                                mnlI bstNI              pstI    sfuI              sau3AI                    mspA1I/ns
                              haeIII/palI    cac8I      bsgI    bstBI             mboI/ndeII             sau3AI
                    tsp45I  sau96I  bssKI  haeIII/palI tseI     bsiCI             dpnII                  mboI/ndeII
                    maeIII  asuI    apyI  stuI         fnu4HI/bsoFI               dpnI                   dpnII
                 ecoNI     nlaIV   bsaJI mnlI    mwoI  bbvI     asuII           bstYI/xhoII              dpnI    nlaIV
                 bs1I      eco0109I/draII haeI   aciI aluI   aluI       mnlI    bglII         mnlI       alwI  aciI
2101 ACAATACCAC CCCTGTCACA GGGGCCTCCC CAGGAGGCCT GCGGGAGCTG CAGCTTCGAA GCCTCACAGA GATCTTGAAA GGAGGGGTCT TGATCCAGCG
     TGTTATGGTG GGGACAGTGT CCCCGGAGGG GTCCTCCGGA CGCCCTCGAC GTCGAAGCTT CGGAGTGTCT CTAGAACTTT CCTCCCCAGA ACTAGGTCGC
 125  N  T  T   P  V  T   G  A  S  P   G  G  L   R  E  L   Q  L  R  S   L  T  E   I  L  K   G  G  V  L   I  Q  R

                        scrFI
                        mvaI
                        ecoRII                                                                                  haeI
                        dsaV                                                  cac8I                                 sau96
                        bstNI                                                 aluI                          bsrBI   asuI
                        bssKI                                                pvuII                          bslI
              aluI      apyI                        mboII                   mspA1I/nspBII tspRI            aciI avaI
2201 GAACCCCCAG CTCTGCTACC AGGACACGAT TTTGTGGAAG GACATCTTCC ACAAGAACAA CCAGCTGGCT CTCACACTGA TAGACACCAA CCGCTCTCGG
     CTTGGGGGTC GAGACGATGG TCCTGTGCTA AAACACCTTC CTGTAGAAGG TGTTCTTGTT GGTCGACCGA GAGTGTGACT ATCTGTGGTT GGCGAGAGCC
 158  N  P  Q   L  C  Y  Q   D  T  I   L  W  K   D  I  F  H   K  N  N   Q  L  A   L  T  L  I   D  T  N   R  S  R
```

10/39

```
                                                
```

```
                                                  bstEII
                                              scrFI
                                              mvaI                                                  bstZ17I
                                              ecoRII                                              mspI
                                              dsaV                                            sau96I bst1107I
                              tseI            bstNI                                         mnlI  hpaII
                              fnu4HI/bsoFI    bssKI hphI              taiI                  bslI haeIII/palI
                              bbvI            apyI tsp45I             maeII pleI            bsaJI cfr10I/bsrFI
            tspRI sfaNI     aluI tspRI bslI bsaJI maeIII          aflIII   hinfI nlaIII     avaI asuI   accI
2501 CTTCAACCAC AGTGGCATCT GTGAGCTGCA CTGCCCAGCC CTGGTCACCT ACAACACAGA CACGTTTGAG TCCATGCCCA ATCCCGAGGG CCGGTATACA
     GAAGTTGGTG TCACCGTAGA CACTCGACGT GACGGGTCGG GACCAGTGGA TGTTGTGTCT GTGCAAACTC AGGTACGGGT TAGGGCTCCC GGCCATATGT
 258  F  N  H   S  G  I  C   E  L  H   C  P  A   L  V  T  Y   N  T  D   T  F  E   S  M  P  N   P  E  G   R  Y  T

          cac8I
        hinPI
        hhaI/cfoI
       nlaIV                                                  sau3AI
       narI                                                   mboI/ndeII
       kasI                                                   dpnII
       hinlI/acyI                                             dpnI
       hgiCI                                                  alwI
       haeII aluI     ahdI/eam1105I                           nlaIV                                  tsp45I
       eheI pvuII   tsp45I                                    bstYI/xhoII                            maeIII
       banI mspA1I/nspBII                              taiI  bamHI                                  hphI
       ahaII/bsaHI  maeIII     bsmFI         bslI       maeII alwI        mnlI                      mnlI
2601 TTCGGCGCCA GCTGTGTGAC TGCCTGTCCC TACAACTACC TTTCTACGGA CGTGGGATCC TGCACCCTCG TCTGCCCCCT GCACAACCAA GAGGTGACAG
     AAGCCGCGGT CGACACACTG ACGGACAGGG ATGTTGATGG AAAGATGCCT GCACCCTAGG ACGTGGGAGC AGACGGGGGA CGTGTTGGTT CTCCACTGTC
 291 F  G  A  S   C  V  T   A  C  P   Y  N  Y  L   S  T  D   V  G  S   C  T  L  V   C  P  L   H  N  Q   E  V  T  A

                                                                                  hgiAI/aspHI
                                        cac8I                                     bsp1286
        fokI         aciI            tseI           avaI                          bsiHKAI
        bstF5I     mspA1I/nspBII     fnu4HI/bsoFI bsp1286                         bmyI          hphI          bsrI
       mnlI       ms1I               bbvI         bmyI                       nlaIII          mnlI mnlI    maeIII
2701 CAGAGGATGG AACACAGCGG TGTGAGAAGT GCAGCAAGCC CTGTGCCCGA GTGTGCTATG GTCTGGGCAT GGAGCACTTG CGAGAGGTGA GGGCAGTTAC
     GTCTCCTACC TTGTGTCGCC ACACTCTTCA CGTCGTTCGG GACACGGGCT CACACGATAC CAGACCCGTA CCTCGTGAAC GCTCTCCACT CCCGTCAATG
 325   E  D  G   T  Q  R   C  E  K  C   S  K  P   C  A  R   V  C  Y  G   L  G  M   E  H  L   R  E  V  R   A  V  T
```

12/39

```
                                                
```

sau96I
avaII
asuI
nlaIV
scrFI
draIII mvaI
mwoI bsp1286 bsmFI
bstAPI bmyI ecoRII
hgiAI/aspHI dsaV
bsp1286 nlaIV bstNI
bsiHKAI hgiCI bssKI
bmyI banI bsaJI
apaLI/snoI apyI
alw44I/snoI bsaJI aluI nlaIV aciI
mnlI
sau96I fokI
haeIII/palI
asuI bstF5I
mnlI
ddeI bsrI tspRI bsrI mnlI
3101 ACTGAGGGAA CTGGGCAGTG GACTGGCCCT CATCCACCAT AACACCCACC TCTGCTTCGT GCACACGGTG CCCTGGGACC AGCTCTTTCG GAACCCGCAC
TGACTCCCTT GACCCGTCAC CTGACCGGGA GTAGGTGGTA TTGTGGGTGG AGACGAAGCA CGTGTGCCAC GGGACCCTGG TCGAGAAAGC CTTGGGCGTG
458 L R E L G S G L A L I H H N T H L C F V H T V P W D Q L F R N P H
haeIII/palI
scrFI
mvaI
ecoRII
dsaV
bstNI
bssKI
apyI
haeIII/palI
sau96I
asuI haeI aluI hinPI bmyI
eco0109I/draII pvuII hhaI/cfoI
mnlI mwoI cac8I mspA1I/nspBII mnlI tspRI
aluI tspRI cfr10I/bsrFI
3201 CAAGCTCTGC TCCACACTGC CAACCGGCCA GAGGACGAGT GTGTGGGCGA GGGCTGGCC TGCCACCAGC TGTGCGCCCG AGGGCACTGC TGGGGTCCAG
GTTCGAGACG AGGTGTGACG GTTGGCCGGT CTCCTGCTCA CACACCCGCT CCCGGACCGG ACGGTGGTCG ACACGCGGGC TCCCGTGACG ACCCCAGGTC
491 Q A L L H T A N R P E D E C V G E G L A C H Q L C A R G H C W G P G
sequence change from Coussens to Yamamoto^
sau96
pspON
nlaIV
hgiJI
bspl2
bmyI
banI

```
                                                  scrFI
                                                  mvaI
                                                  ecoRII
                                                  dsaV                                                  scrFI
                                                  bstNI                                                 mvaI
                          tseI                    bssKI                                                 ecoRII            scrFI
                          fnu4HI/bsoFI            apyI                                  scfI            dsaV              mvaI
                          bbvI                  mwoI                                    pstI    nlaIV   bstNI             ecoRII
        draIII          scfI                    haeIII/palI                             bsgI   hgiJII   bssKI             dsaV
    sau96I  tspRI       pstI                    sau96I                                rsaI     bsp1286 bsaJI             bstNI
    haeIII/palI         bsgI   bsrI             asuI                    bsmI          csp6I    bmyI    apyI              bssKI
    asuI   bsrI    hincII/hindII               nlaIV                  mnlI           scaI     banII   bsaJI          bsmI apyI
3301 GGCCCACCCA GTGTGTCAAC TGCAGCCAGT TCCTTCGGGG CCAGGAGTGC GTGGAGGAAT GCCGAGTACT GCAGGGGCTC CCCAGGGAGT ATGTGAATGC
     CCGGGTGGGT CACACAGTTG ACGTCGGTCA AGGAAGCCCC GGTCCTCACG CACCTCCTTA CGGCTCATGA CGTCCCCGAG GGGTCCCTCA TACACTTACG
 525  P  T  Q   C  V  N   C  S  Q  F   L  R  G   Q  E  C   V  E  E  C   R  V  L   Q  G  L   P  R  E  Y   V  N  A

                                                                                  mspI
        tspRI                                                                     hpaII
       mwoI                                                  tsp45I             bsaWI         tspRI
       bstAPI                                                maeIII           sau96I         pflMI          bsp1286
    alwNI                                                 tspRI              avaII          bsrI      haeIII/palI
    alw26I/bsmAI              ddeI         bslI         ddeI                asuI  mnlI      bslI      haeI  bmyI bslI
3401 CAGGCACTGT TTGCCGTGCC ACCCTGAGTG TCAGCCCCAG AATGGCTCAG TGACCTGTTT TGGACCGGAG GCTGACCAGT GTGTGGCCTG TGCCCACTAT
     GTCCGTGACA AACGGCACGG TGGGACTCAC AGTCGGGGTC TTACCGAGTC ACTGGACAAA ACCTGGCCTC CGACTGGTCA CACACCGGAC ACGGGTGATA
 558  R  H  C   L  P  C  H   P  E  C   Q  P  Q   N  G  S  V   T  C  F   G  P  E   A  D  Q  C   V  A  C   A  H  Y

                                tseI
                                mwoI                                                                                mwoI
          mnlI                  fnu4HI/bsoFI                                                                      nlaIII
      sau96I                  mspA1I/nspBII                                                                       sphI
      nlaIV                   aciI                                                                                nspHI
      avaII                 cac8I                                                                                 nspI
      asuI                 sau96I                                          nlaIII                          mnlI   cac8I
     ppuMI                 haeIII/palI    aciI                            nspHI                          mnlI    hinPI cac8I
     eco0109I/draII  mwoI asuI bbvI    mspA1I/nspBII       mnlI          nspI                           bseRI   hhaI/cfoI
3501 AAGGACCCTC CCTTCTGCGT GGCCCGCTGC CCCAGCGGTG TGAAACCTGA CCTCTCCTAC ATGCCCATCT GGAAGTTTCC AGATGAGGAG GGCGCATGCC
     TTCCTGGGAG GGAAGACGCA CCGGGCGACG GGGTCGCCAC ACTTTGGACT GGAGAGGATG TACGGGTAGA CCTTCAAAGG TCTACTCCTC CCGCGTACGG
 591 K  D  P  P   F  C  V   A  R  C   P  S  G  V   K  P  D   L  S  Y   M  P  I  W   K  F  P   D  E  E   G  A  C  Q
```

15/39

```
                                                
```

```
                                                
```

```
                                                
```

```
                                                
```

```
                                                
```

```
                                                
```

```
                                                
```

```
                                                
```

```
                                                
```

```
                                                
```

```
                                                
```

```
                                                
```

```
      scrFI
      mvaI
      ecoRII
      dsaV
      bstNI
      bssKI
      apyI
      haeIII/palI                                                
```

```
                                                
```

```
                                                
```

```
                                                
```

```
                                                
```

```
                                                
```

```
      hgiAI/aspHI
      bsp1286          eco57I
      bsiHKAI          mboII
      bmyI             sau3AI
      apaLI/snoI       mboI/ndeII
       alw44I/snoI     dpnII          sfaNI          hphI                hphI                                                  aciI
          bssSI        dpnI                    hphI                                                                  fnu4HI/bsoFI
8501  CACTCGTGCA CCCAACTGAT CTTCAGCATC TTTTACTTTC ACCAGCGTTT CTGGGTGAGC AAAAACAGGA AGGCAAAATG CCGCAAAAAA GGGAATAAGG
        GTGAGCACGT GGGTTGACTA GAAGTCGTAG AAAATGAAAG TGGTCGCAAA GACCCACTCG TTTTTGTCCT TCCGTTTTAC GGCGTTTTTT CCCTTATTCC

                                                                                                  nlaIII
                                                                                          rcaI    bciVI
                                                                                        bspHI aciI
                                                                                  bsmAI  bsrBI
                                                                  mboII    sspI
          msiI                                                   earI/ksp632I
8601  GCGACACGGA AATGTTGAAT ACTCATACTC TTCCTTTTTC AATATTATTG AAGCATTTAT CAGGGTTATT GTCTCATGAG CGGATACATA TTTGAATGTA
        CGCTGTGCCT TTACAACTTA TGAGTATGAG AAGGAAAAAG TTATAATAAC TTCGTAAATA GTCCCAATAA CAGAGTACTC GCCTATGTAT AAACTTACAT

                                                  hinPI
                                                  thaI
                                                  fnuDII/mvnI                 taiI
                                                  bstUI                       maeII
                                                  bsh1236I                    hinlI/acyI                 nlaIII
                                                    aciI                      ahaII/bsaHI       rcaI     tru9I
                                                 nlaIV hhaI/cfoI              aatII ddeI        bspHI    mseI
8701  TTTAGAAAAA TAAACAAATA GGGGTTCCGC GCACATTTCC CCGAAAAGTG CCACCTGACG TCTAAGAAAC CATTATTATC ATGACATTAA CCTATAAAAA
        AAATCTTTTT ATTTGTTTAT CCCCAAGCGG CGTGTAAAGG GGCTTTTCAC GGTGGACTGC AGATTCTTTG GTAATAATAG TACTGTAATT GGATATTTTT

                                                                    thaI
                                                                    fnuDII/mvnI                                    mspI
                                                                    bstUI                                          scrFI
                                                                    bsh1236I                                       nciI esp3I
                                                                    hinPI                                          dsaV bsmBI
                                                                    thaI                                         tseI  cauII
                                                  sau96I    mboII                                              fnu4HI/bsoFI
                                                  haeIII/palI                 fnuDII/mvnI                    nlaIII    bssKI
                                                  eco0109I/draII              bstUI                        nspHI  alwI hpaII     tsp45I
                                                  mnlI      bpuAI             bsh1236I      hphI    mnlI   nspI bbvI  bslI bsmAI maeIII
                                                bssSI asuI  bbsI          mnlI hhaI/cfoI hphI
8801  TAGGCGTATC ACGAGGCCCT TTCGTCTTCA AGAATACTGC CTCGCGCGTT TCGGTGATGA CGGTGAAAAC CTCTGACACA TGCAGCTCCC GGAGACGGTC
        ATCCGCATAG TGCTCCGGGA AAGCAGAAGT TCTTATGACG GAGCGCGCAA AGCCACTACT GCCACTTTTG GAGACTGTGT ACGTCGAGGG CCTCTGCCAG
```

```
                scrFI                                                
```

```
                                                
```

5

FIGURE 1

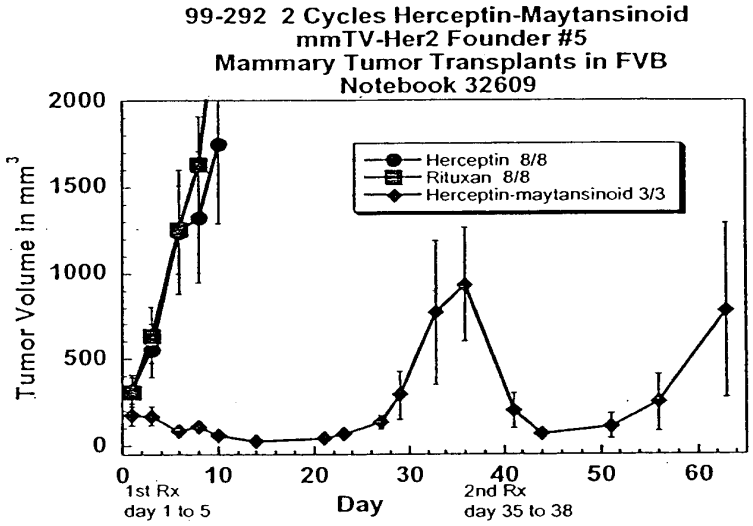


FIG. 5

Variable Heavy Domain

```
                    10          20          30          40
2C4       EVQLQQSGPELVKPGTSVKISCKAS [GFTFTDYTMD] WVKQS
              **  **  *  * ***  *                  * *
574       EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS [GFTFTDYTMD] WVRQA
                                       ** * *
hum III   EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS [GFTFSSYAMS] WVRQA

                   50  a       60          70          80
2C4       HGKSLEWIG [DVNPNSGGSIYNQRFKG] KASLTVDRSSRIVYM
          *  *   **                     *** *    **** *
574       PGKGLEWVA [DVNPNSGGSIYNQRFKG] RFTLSVDRSKNTLYL
                     ****** *** ****       * * *
hum III   PGKGLEWVA [VISGDGGSTYYADSVKG] RFTISRDNSKNTLYL

            abc       90          100ab         110
2C4       ELRSLTFEDTAVYYCAR [NLGPSFYFDY] WGQGTTLTVSS
          ***  **                          **
574       QMNSLRAEDTAVYYCAR [NLGPSFYFDY] WGQGTLVTVSS
                             ********
hum III   QMNSLRAEDTAVYYCAR [GRVGYSLYDY] WGQGTLVTVSS
```

FIG. 6

Variable Light Domain

```
                  10          20          30          40
2C4       DTVMTQSHKIMSTSVGDRVSITC [KASQDVSIGVA] WYQQRP
           **    **** *       *                     *
574       DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC [KASQDVSIGVA] WYQQKP
                                   *    ** ***
hum κI    DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC [RASQSISNYLA] WYQQKP

                  50          60          70          80
2C4       GQSPKLLIY [SASYRYT] GVPDRFTGSGSGTDFTFTISSVQA
           **                   *  *           *    * *
574       GKAPKLLIY [SASYRYT] GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP
                     * *****
hum κI    GKAPKLLIY [AASSLES] GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP

                  90          100
2C4       EDLAVYYC [QQYYIYPYT] FGGGTKLEIKRT
            * *                  *   *
574       EDFATYYC [QQYYIYPYT] FGQGTKVEIKRT
                       *** *
hum κI    EDFATYYC [QQYNSLPWT] FGQGTKVEIKRT
```

FIG. 7

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2002 年1 月3 日 (03.01.2002)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 02/00734 A1

(51) 国際特許分類[7]: C08B 37/02, C07D 491/22, A61K 47/48, 31/4745, 47/36, A61P 35/00

(21) 国際出願番号: PCT/JP01/05498

(22) 国際出願日: 2001 年6 月27 日 (27.06.2001)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願2000-195919 2000 年6 月29 日 (29.06.2000) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 第一製薬株式会社 (DAIICHI PHARMACEUTICAL CO., LTD.) [JP/JP]; 〒103-8234 東京都中央区日本橋3丁目14番10号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 井村明弘 (IMURA, Akihiro) [JP/JP]. 野口 滋 (NOGUCHI, Shigeru) [JP/JP]. 山口達也 (YAMAGUCHI, Tatsuya) [JP/JP]. 八木 努 (YAGI, Tsutomu) [JP/JP]. 川邉武史 (KAWABE, Takefumi) [JP/JP]; 〒134-8630 東京都江戸川区北葛西1丁目16番13号 第一製薬株式会社 東京研究開発センター内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 今村正純, 外(IMAMURA, Masazumi et al.); 〒104-0031 東京都中央区京橋1丁目8番7号 京橋日殖ビル8階 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

２文字コード及び他の略語については、定期発行される各*PCT*ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

WO 02/00734 A1

(54) Title: DDS COMPOUND AND PROCESS FOR THE PREPARATION THEREOF

(54) 発明の名称: DDS化合物及びその製造方法

(57) Abstract: A DDS compound which comprises (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 as the drug compound and carboxymethyldextran polyalcohol and in which the 1-position amino group of the former is bonded to the carboxyl groups of the latter through a spacer consisting of either one amino acid or 2 to 8 amino acids bonded by peptide linkages, characterized in that the amount of the drug compound residue introduced is 3.2 to 8.4 wt% and that the carboxymethyldextran polyalcohol has an average molecular weight of 240,000 to 480,000 and a degree of carboxymethylation of 0.14 to 0.47. A process for the preparation of the DDS compound which comprises the step of adding an aqueous solution of sodium periodate to an aqueous solution of dextran at a temperature of 4°C ± 2°C to oxidize the dextran, and then adding the resulting reaction fluid to an aqueous solution of sodium borohydride at a temperature of 15°C or below to thereby obtain dextran polyalcohol.

[続葉有]

WO 02/00734 A1

(57) 要約:

医薬化合物として（１Ｓ，９Ｓ）－１－アミノ－９－エチル－５－フルオロ－２，３－ジヒドロ－９－ヒドロキシ－４－メチル－１Ｈ，１２Ｈ－ベンゾ［ｄｅ］ピラノ［３’，４’：６，７］インドリジノ［１，２－ｂ］キノリン－１０，１３（９Ｈ，１５Ｈ）－ジオンの１－位のアミノ基とカルボキシメチルデキストランポリアルコールのカルボキシル基とが１個のアミノ酸又はペプチド結合した２～８個のアミノ酸からなるスペーサーを介して結合したＤＤＳ化合物において、医薬化合物残基の導入量が３．２～８．４重量％の範囲であり、カルボキシメチルデキストランポリアルコールの平均分子量が２４０，０００～４８０，０００の範囲、カルボキシメチル化度が０．１４～０．４７の範囲であることを特徴とするＤＤＳ化合物、及びデキストランを含む水溶液に４℃±２℃の温度で過ヨウ素酸ナトリウムを含む水溶液を添加してデキストランを酸化した後、得られた反応液を１５℃以下の温度で水素化ホウ素ナトリウムを含む水溶液に添加してデキストランポリアルコールを得る工程などを含む該ＤＤＳ化合物の製造方法。

WO 02/00734 PCT/JP01/05498

明 細 書

ＤＤＳ化合物及びその製造方法

技術分野

本発明は、カルボキシメチルデキストランをポリアルコール化した多糖誘導体と医薬化合物とを結合させたドラッグデリバリーシステム化合物（以下、「ＤＤＳ化合物」という。）及びその製造方法に関する。

背景技術

肺癌や消化器癌などの固形癌や白血病などの血液癌の治療に際して用いられる抗腫瘍剤は、静脈内投与や経口投与などの投与経路により全身的に投与された後、特定の腫瘍部位に移行して癌細胞の増殖を阻害ないし抑制することにより治療効果を発揮する。しかしながら、全身投与された抗腫瘍剤は、血中から肝臓、細網内皮系臓器に速やかに取り込まれたり、あるいは速やかに尿中排泄されるために、血中濃度が低下して腫瘍部位への移行が制限される場合がある。また、通常の抗腫瘍剤自体の腫瘍部位への移行選択性（腫瘍選択性）が低いために、抗腫瘍剤が全身の様々な細胞や組織に広く分布してしまい、正常な細胞や組織に対しても細胞毒として作用し、下痢、発熱、嘔吐、あるいは脱毛などの副作用をきわめて高率に発生させるという問題がある。従って、抗腫瘍剤を効率的かつ選択的に腫瘍部位に移行させる手段の開発が求められている。

このような手段の一つとして、多糖誘導体を薬物担体として用い、該多糖誘導体に対して抗腫瘍剤を結合させて抗腫瘍剤の血中における消失を遅延させるとともに、癌組織への指向性を高める方法が提案されている。カルボキシル基を有する多糖のカルボキシル基にペプチド鎖を介して薬剤を結合させたもの（国際公開ＷＯ９４／１９３７６号）、カルボキシメチル化されたマンノグルカン誘導体にシッフ塩基やアミド結合を介して薬剤を導入したもの（特公平７－８４４８１号）、

ポリアルコール化多糖誘導体を薬物担体として用い、ペプチド鎖を介して、さらにはペプチド鎖及びパラアミノベンジルオキシカルボニル基を介して薬剤を結合させたもの（国際公開ＷＯ９９／６１０６１号）等が開示されている。

多糖誘導体を薬物担体として用いたＤＤＳ化合物のうち、カルボキシメチルデキストランをポリアルコール化した多糖誘導体を薬物担体として用い、ペプチド鎖を介して医薬化合物残基を結合したＤＤＳ化合物は、腫瘍選択性が特に優れており、抗腫瘍剤としての開発が期待されている。なかでも、医薬化合物残基として（１Ｓ，９Ｓ）－１－アミノ－９－エチル－５－フルオロ－２，３－ジヒドロ－９－ヒドロキシ－４－メチル－１Ｈ，１２Ｈ－ベンゾ［ｄｅ］ピラノ［３’，４’：６，７］インドリジノ［１，２－ｂ］キノリン－１０，１３（９Ｈ，１５Ｈ）－ジオンを結合させた該ＤＤＳ化合物は、優れた腫瘍選択性及び抗腫瘍活性を発揮でき、臨床上の有用性が期待できるＤＤＳ化合物である。

もっとも、本発明者らの研究によれば、医薬化合物残基として（１Ｓ，９Ｓ）－１－アミノ－９－エチル－５－フルオロ－２，３－ジヒドロ－９－ヒドロキシ－４－メチル－１Ｈ，１２Ｈ－ベンゾ［ｄｅ］ピラノ［３’，４’：６，７］インドリジノ［１，２－ｂ］キノリン－１０，１３（９Ｈ，１５Ｈ）－ジオンをカルボキシメチルデキストランをポリアルコール化した多糖誘導体に対してペプチドスペーサーを介して結合させた上記ＤＤＳ化合物は、薬物担体である高分子キャリアー部分の分子量、カルボキシメチル化度、及び上記医薬化合物残基の導入量の変化により安全性及び薬効域が大きく変動することが明らかとなった。この理由から、上記ＤＤＳ化合物において、高い安全性と広い薬効域を与える特定のＤＤＳ化合物を選択することが望まれる。

また、本発明者らは、カルボキシメチルデキストランポリアルコールの製造において、デキストランポリアルコールの製造時の発熱により高分子キャリアーの低分子化が生じ、さらにデキストランポリアルコールをカルボキシメチル化する際の発熱によりカルボキシメチル化度を十分に制御できず、一定品質の高分子キャリアーを製造できないという問題に直面していた。また、上記の医薬化合物と

ペプチドスペーサーとを結合させる工程、及びペプチドスペーサを介して医薬化合物を高分子キャリアーに結合させる工程においても、従来の方法では目的物の分離や精製が必要になるために作業が煩雑で、目的物の収率が低く良好な品質の製品を提供できないという問題があり、それらを解決する必要に迫られていた。

発明の開示

従って、本発明の目的は、上記ＤＤＳ化合物において、薬物担体である高分子キャリアー部分の分子量、カルボキシメチル化度、及び上記医薬化合物残基の導入量を選択し、高い安全性と広い薬効域を有する上記ＤＤＳ化合物を提供することにある。また、本発明の別の目的は、上記の特定のＤＤＳ化合物を高品質に、かつ効率的に高収率で製造でき、工業化に適した方法を提供することにある。

本発明者らは上記の課題を解決すべく鋭意努力し、上記ＤＤＳ化合物において高い安全性及び広い薬効域を有する化合物を選択することに成功した。より具体的には、薬物担体である高分子キャリアー部分の分子量、カルボキシメチル化度、及び上記医薬化合物残基の導入量についての最適化を行い、特定の条件を満たす化合物が高い安全性と広い薬効域を有することを見出した。また、上記の特定のＤＤＳ化合物を製造するにあたり、反応温度を制御するための手段、反応の進行をモニターするための手段、及び反応試薬などを選択することにより、目的のＤＤＳ化合物を一定品質で、かつ効率的に製造できることを見出した。本発明はこれらの知見を基にして完成されたものである。

すなわち、本発明は、（１Ｓ，９Ｓ）－１－アミノ－９－エチル－５－フルオロ－２，３－ジヒドロ－９－ヒドロキシ－４－メチル－１Ｈ，１２Ｈ－ベンゾ［ｄｅ］ピラノ［３’，４’：６，７］インドリジノ［１，２－ｂ］キノリン－１０，１３（９Ｈ，１５Ｈ）－ジオンの１－位のアミノ基とカルボキシメチルデキストランポリアルコールのカルボキシル基とが１個のアミノ酸又はペプチド結合した２～８個のアミノ酸からなるスペーサーを介して結合したＤＤＳ化合物において、（１）（１Ｓ，９Ｓ）－１－アミノ－９－エチル－５－フルオロ－２，３－ジヒ

ドロー９－ヒドロキシー４－メチルー１Ｈ，１２Ｈ－ベンゾ［ｄｅ］ピラノ［３’，４’：６，７］インドリジノ［１，２－ｂ］キノリン－１０，１３（９Ｈ，１５Ｈ）－ジオンの残基の導入量がＤＤＳ化合物全重量に対して３．２～８．４重量％の範囲であり、

（２）上記カルボキシメチルデキストランポリアルコールのプルラン標準重量平均分子量が２４０，０００～４８０，０００の範囲であり、かつ

（３）上記カルボキシメチルデキストランポリアルコールのカルボキシメチル化度が０．２３～０．４７の範囲である

ことを特徴とするＤＤＳ化合物を提供するものである。

また、（１Ｓ，９Ｓ）－１－アミノ－９－エチル－５－フルオロ－２，３－ジヒドロ－９－ヒドロキシー４－メチルー１Ｈ，１２Ｈ－ベンゾ［ｄｅ］ピラノ［３’，４’：６，７］インドリジノ［１，２－ｂ］キノリン－１０，１３（９Ｈ，１５Ｈ）－ジオンの１－位のアミノ基とカルボキシメチルデキストランポリアルコールのカルボキシル基とが１個のアミノ酸又はペプチド結合した２～８個のアミノ酸からなるスペーサーを介して結合したＤＤＳ化合物において、

（１）（１Ｓ，９Ｓ）－１－アミノ－９－エチル－５－フルオロ－２，３－ジヒドロ－９－ヒドロキシー４－メチルー１Ｈ，１２Ｈ－ベンゾ［ｄｅ］ピラノ［３’，４’：６，７］インドリジノ［１，２－ｂ］キノリン－１０，１３（９Ｈ，１５Ｈ）－ジオンの残基の導入量がＤＤＳ化合物全重量に対して３．２～８．４重量％の範囲であり、

（２）上記カルボキシメチルデキストランポリアルコールのプルラン標準重量平均分子量が２４０，０００～４８０，０００の範囲であり、かつ

（３）上記カルボキシメチルデキストランポリアルコールのカルボキシメチル化度が０．１４～０．４７の範囲である

ことを特徴とするＤＤＳ化合物も本発明により提供される。これらのＤＤＳ化合物において、標準物質を分解法又はＮＭＲ法により測定することにより得られる検量線を用いてキャピラリー電気泳動法により上記のカルボキシメチルデキスト

ランポリアルコールのカルボキシメチル化度を測定した上記ＤＤＳ化合物も本発明により提供される。

さらに、本発明により、上記ＤＤＳ化合物を含む医薬及び上記ＤＤＳ化合物を含む抗腫瘍剤、並びに、上記医薬の製造のための上記ＤＤＳ化合物の使用及び悪性腫瘍の治療方法であって、上記ＤＤＳ化合物の治療有効量をヒトを含む哺乳類動物に投与する工程を含む方法が提供される。

別の観点からは、本発明により上記ＤＤＳ化合物の製造方法が提供される。本発明の方法は、上記ＤＤＳ化合物の製造方法であって、下記の工程：

（Ａ）デキストランを含む水溶液に４℃±２℃の温度で過ヨウ素酸ナトリウムを含む水溶液を添加してデキストランを酸化した後、得られた反応液を１５℃以下の温度で水素化ホウ素ナトリウムを含む水溶液に添加してデキストランポリアルコールを得る工程；

（Ｂ）デキストランポリアルコールにモノクロロ酢酸ナトリウムを反応させてカルボキシメチルデキストランポリアルコールを製造する工程であって、カルボキシメチル化の反応終点をキャピラリー電気泳動法により決定することを特徴とする工程；

（Ｃ）（１Ｓ，９Ｓ）－１－アミノ－９－エチル－５－フルオロ－２，３－ジヒドロ－９－ヒドロキシ－４－メチル－１Ｈ，１２Ｈ－ベンゾ［ｄｅ］ピラノ［３’，４’：６，７］インドリジノ［１，２－ｂ］キノリン－１０，１３（９Ｈ，１５Ｈ）－ジオンの１位のアミノ基と、α－アミノ基がｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル基で保護された１個のアミノ酸のα－カルボキシル基又はＮ末端がｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル基で保護された２～８個のアミノ酸からなるオリゴペプチドのＣ末端カルボキシル基とを縮合する工程であって、縮合剤として１－エチル－３－（ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド又はその塩を用いることを特徴とする工程；及び

（Ｄ）（１Ｓ，９Ｓ）－１－アミノ－９－エチル－５－フルオロ－２，３－ジヒドロ－９－ヒドロキシ－４－メチル－１Ｈ，１２Ｈ－ベンゾ［ｄｅ］ピラノ［３’，

４’：６，７］インドリジノ［１，２－ｂ］キノリン－１０，１３（９Ｈ，１５Ｈ）－ジオンの１位のアミノ基と、α－アミノ基がｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル基で保護された１個のアミノ酸のα－カルボキシル基又はＮ末端がｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル基で保護された２～８個のアミノ酸からなるオリゴペプチドのＣ末端カルボキシル基とを縮合した縮合体からｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル基を除去して得られる脱保護体と、カルボキシメチルデキストランポリアルコールとを縮合する工程であって、縮合剤として１－エチル－３－（ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド又はその塩を用いることを特徴とする工程

からなる群から選ばれる１以上の工程を含んでいる。

本発明の好ましい方法は、上記（Ａ）から（Ｄ）の工程から選ばれる２以上の工程を含み、さらに好ましい方法は上記（Ａ）から（Ｄ）の工程から選ばれる３以上の工程を含み、特に好ましい方法は、上記（Ａ）から（Ｄ）の全ての工程を含む。また、工程（Ｄ）において縮合反応の終点を高速液体クロマトグラフィーにより決定することが好ましい態様として提供される。

さらに本発明により、上記のＤＤＳ化合物の製造に用いるためのプルラン標準重量平均分子量が２４０，０００～４８０，０００の範囲であり、カルボキシメチル化度が０．２３～０．４７の範囲であるカルボキシメチルデキストランポリアルコール、上記のＤＤＳ化合物の製造に用いるためのプルラン標準重量平均分子量が２４０，０００～４８０，０００の範囲であり、カルボキシメチル化度が０．１４～０．４７の範囲であるカルボキシメチルデキストランポリアルコール、及び上記のカルボキシメチルデキストランポリアルコールのカルボキシメチル化度が、分解法又はＮＭＲ法で得られた検量線を用いてキャピラリー電気泳動法により測定したカルボキシメチル化度であるカルボキシメチルデキストランポリアルコールが提供される。

また、上記ＤＤＳ化合物の製造のための上記カルボキシメチルデキストランポリアルコールの使用が本発明により提供される。

さらに、上記カルボキシメチルデキストランポリアルコールの製造方法であっ

て、

（Ａ）デキストランを含む水溶液に４℃±２℃の温度で過ヨウ素酸ナトリウムを含む水溶液を添加してデキストランを酸化した後、得られた反応液を１５℃以下の温度で水素化ホウ素ナトリウムを含む水溶液に添加してデキストランポリアルコールを得る工程；及び

（Ｂ）上記工程（Ａ）で得られたデキストランポリアルコールにモノクロロ酢酸ナトリウムを反応させてカルボキシメチルデキストランポリアルコールを製造する工程であって、カルボキシメチル化の反応終点をキャピラリー電気泳動法により決定することを特徴とする工程

を含む方法が提供される。

発明を実施するための最良の形態

日本国特願２０００－１９５９１９号（２０００年６月２９日出願）の全ての開示を参照として本明細書の開示に含める。

本発明のＤＤＳ化合物は、（１Ｓ，９Ｓ）－１－アミノ－９－エチル－５－フルオロ－２，３－ジヒドロ－９－ヒドロキシ－４－メチル－１Ｈ，１２Ｈ－ベンゾ［ｄｅ］ピラノ［３’，４’：６，７］インドリジノ［１，２－ｂ］キノリン－１０，１３（９Ｈ，１５Ｈ）－ジオン（以下、本明細書において「医薬化合物」という場合がある。）の１－位のアミノ基とカルボキシメチルデキストランポリアルコールのカルボキシル基とが１個のアミノ酸又はペプチド結合した２～８個のアミノ酸からなるスペーサーを介して結合したＤＤＳ化合物において、

（１）上記医薬化合物の残基の導入量がＤＤＳ化合物全重量に対して３．２～８．４重量%、好ましくは５．６～７．６重量%の範囲であり、

（２）上記カルボキシメチルデキストランポリアルコールのプルラン標準重量平均分子量が２４０，０００～４８０，０００の範囲であり、かつ

（３）上記カルボキシメチルデキストランポリアルコールのカルボキシメチル化度が０．２３～０．４７の範囲である

ことを特徴としている。

また、本発明により提供される他のＤＤＳ化合物は、（１Ｓ，９Ｓ）－１－アミノ－９－エチル－５－フルオロ－２，３－ジヒドロ－９－ヒドロキシ－４－メチル－１Ｈ，１２Ｈ－ベンゾ［ｄｅ］ピラノ［３’，４’：６，７］インドリジノ［１，２－ｂ］キノリン－１０，１３（９Ｈ，１５Ｈ）－ジオン（以下、本明細書において「医薬化合物」という場合がある。）の１－位のアミノ基とカルボキシメチルデキストランポリアルコールのカルボキシル基とが１個のアミノ酸又はペプチド結合した２～８個のアミノ酸からなるスペーサーを介して結合したＤＤＳ化合物において、

（１）上記医薬化合物の残基の導入量がＤＤＳ化合物全重量に対して３．２～８．４重量%、好ましくは５．６～７．６重量%の範囲であり、

（２）上記カルボキシメチルデキストランポリアルコールのプルラン標準重量平均分子量が２４０，０００～４８０，０００の範囲であり、かつ

（３）上記カルボキシメチルデキストランポリアルコールのカルボキシメチル化度が０．１４～０．４７の範囲である

ことを特徴としている。

本明細書において、「～」で表示される数値範囲は、下限及び上限の数値を含む範囲である。

（１Ｓ，９Ｓ）－１－アミノ－９－エチル－５－フルオロ－２，３－ジヒドロ－９－ヒドロキシ－４－メチル－１Ｈ，１２Ｈ－ベンゾ［ｄｅ］ピラノ［３’，４’：６，７］インドリジノ［１，２－ｂ］キノリン－１０，１３（９Ｈ，１５Ｈ）－ジオンの１－位のアミノ基とカルボキシメチルデキストランポリアルコールのカルボキシル基とが１個のアミノ酸又はペプチド結合した２～８個のアミノ酸からなるスペーサーを介して結合した薬物複合体は、国際公開ＷＯ９７／４６２６０に開示されているが、上記の特定のＤＤＳ化合物は開示されていない。

本発明のＤＤＳ化合物において、薬物担体として機能するカルボキシメチルデキストランポリアルコールの重量平均分子量は、２４０，０００～４８０，００

０の範囲である。カルボキシメチルデキストランポリアルコールのプルラン標準重量平均分子量は当業者に周知の方法に従って測定可能であるが、例えば、ゲル濾過クロマトグラフィー法に従ってプルランを標準として測定することができる。標準とするプルランはＳｈｏｄｅｘ社等から購入することができる。また、カルボキシメチルデキストランポリアルコールのカルボキシメチル化度は０．１４～０．４７の範囲又は０．２３～０．４７の範囲である。

カルボキシメチルデキストランポリアルコールのカルボキシメチル化度は、当業者に周知の方法に従って測定可能であるが、例えば、キャピラリー電気泳動法に従って測定することができる。キャピラリー電気泳動法によりカルボキシメチルデキストランポリアルコールのカルボキシメチル化度の測定するにあたり、標準物質を用いて求めた検量線を用いることができる。標準物質としては、カルボキシメチル基の導入量が異なる数種のカルボキシメチルデキストランポリアルコールを調製して用いることができる。検量線は、例えば分解法又はＮＭＲ法のいずれかの方法により得ることができるが、分解法とＮＭＲ法とでは、同一の標準物質について異なるカルボキシメチル化度の測定値を与える場合がある。一般的に、ＮＭＲ法によるカルボキシメチル化度の測定値は分解法による測定値に比べて０．０９程度低くなる傾向がある。従って、ＮＭＲ法で作成した検量線を用いる場合には、カルボキシメチル化度が０．１４～０．３８の範囲であることが望ましい。

分解法では、カルボキシメチルデキストランポリアルコールの酸加水分解によりそれぞれ定量的に生成するグリセロール（Ｇｌｒ）、グリコールアルデヒド（ＧＡ）、カルボキシメチルグリセロール（ＣＭ-Ｇｌｒ）、及びカルボキシメチルグリコールアルデヒド（ＣＭ-ＧＡ）を定量する。加水分解物中のグリセロールは塩基性条件下で高速液体クロマトグラフィーにより直接定量することができ、グリコールアルデヒドはアルデヒド標識化試薬であるダンシルヒドラジンと反応させた後、反応生成物を高速液体クロマトグラフィーに付することにより定量できる。カルボキシメチルグリセロールとカルボキシメチルグリコールアルデヒドについ

ては、カルボキシメチルグリコールアルデヒドのアルデヒドを還元してカルボキシメチルエチレングリコール（ＣＭ-ＥＧ）に変換した後、それぞれカルボン酸の蛍光標識化試薬である９－アンスリルージアゾメタンと反応させ、反応生成物を高速液体クロマトグラフィーに付することにより定量できる。カルボキシメチル化度は下記の式：ＣＭ-Ｇｌｒ／（Ｇｌｒ＋ＣＭ-Ｇｌｒ）＋ＣＭ-ＥＧ／（ＧＡ＋ＣＭ-ＥＧ）から計算することができる。

ＮＭＲ法では、カルボキシメチル基の導入量が異なる数種のカルボキシメチルデキストランポリアルコールを標準物質として用い、それらの^{13}Ｃ－ＮＭＲを測定する。各標準物質のカルボキシメチルデキストランポリアルコールのＣ－１位及びＣ－５位、並びにカルボキシメチル基が側鎖部分に結合しているＣ－１位及びＣ－５位の４つのシグナルの面積強度を算出し、Ｃ－１位及びＣ－５位の面積強度合計のうち、カルボキシメチル基が側鎖部分に結合しているＣ－１位及びＣ－５位の面積強度が占める割合により、各カルボキシメチルデキストランポリアルコールのカルボキシメチル化度を求める。

本発明のＤＤＳ化合物を構成するスペーサーとしては、１個のアミノ酸残基を含むスペーサー又はペプチド結合した２から８個のアミノ酸残基で構成されるオリゴペプチド残基を含むスペーサーを用いることができる。該スペーサーは、１個のアミノ酸の残基（アミノ酸のアミノ基及びカルボキシル基からそれぞれ１個の水素原子及び１個の水酸基を除いた残基を意味する）、又はペプチド結合した２ないし８個のアミノ酸残基を含むオリゴペプチドの残基（Ｎ末端のアミノ基及びＣ末端のカルボキシル基からそれぞれ１個の水素原子及び１個の水酸基を除いた残基を意味する）の形態を有しており、Ｃ末端（１個のアミノ酸を含むスペーサーの場合にはα－カルボキシル基）で（１Ｓ，９Ｓ）－１－アミノ－９－エチル－５－フルオロ－２，３－ジヒドロ－９－ヒドロキシ－４－メチル－１Ｈ，１２Ｈ－ベンゾ［ｄｅ］ピラノ［３’，４’：６，７］インドリジノ［１，２－ｂ］キノリン－１０，１３（９Ｈ，１５Ｈ）－ジオンの１位のアミノ基にペプチド結合する。

好ましいスペーサーは２から６個のアミノ酸残基で構成されるオリゴペプチド残基を含むスペーサーである。スペーサーを構成するアミノ酸の種類は特に限定されないが、例えば、Ｌ－又はＤ－アミノ酸、好ましくはＬ－アミノ酸を用いることができ、α－アミノ酸のほか、β－アラニン、ε－アミノカプロン酸、γ－アミノ酪酸などを用いてもよい。このようなα－アミノ酸以外のアミノ酸は、スペーサー中で薬物担体に近接した位置に配置されることが好ましい。

オリゴペプチド残基を含むスペーサーを用いる場合のアミノ酸配列は特に限定されないが、例えば、スペーサーが－Ｘ－Ｚ－で表されるジペプチドの残基（Ｘは疎水性アミノ酸の残基を示し、Ｚは親水性アミノ酸の残基を示し、－Ｘ－Ｚ－は疎水性アミノ酸（Ｘ）と親水性アミノ酸（Ｚ）とがそれぞれＮ末端側及びＣ末端側となってペプチド結合したジペプチドのＮ末端のアミノ基及びＣ末端のカルボキシル基からそれぞれ１個の水素原子及び１個の水酸基を除いた残基を意味する）であるか、又は該ジペプチドの残基を部分ペプチド配列として含むスペーサーを好適に用いることができる。疎水性アミノ酸としては、例えば、フェニルアラニン、チロシン、ロイシンなどを用いることができ、親水性アミノ酸としては、例えば、グリシン、アラニンなどを用いることができる。スペーサーがこのようなジペプチド残基の繰り返し配列（例えば－Ｘ－Ｚ－Ｘ－Ｚ－，－Ｘ－Ｚ－Ｘ－Ｚ－Ｘ－Ｚ－など）を有していてもよい。

このようなジペプチド構造を含むスペーサーを用いると、スペーサーがペプチダーゼが豊富であると考えられる腫瘍部位や炎症部位で加水分解され、当該部位において短時間に高濃度の医薬化合物が遊離するので、上記ジペプチドを含むスペーサーと医薬化合物とが結合して形成される部分構造は、本発明のＤＤＳ化合物の好ましい部分構造である。

スペーサーとして利用可能なオリゴペプチド残基の具体例を以下の表に示すが、本発明のＤＤＳ化合物に用いられるスペーサーは以下のものに限定されることはなく、スペーサー種類の選択は、医薬化合物の至適な遊離速度を与えるように当業者が適宜なしうることはいうまでもない(ペプチド配列は左側がＮ末端であり、

Ｃ末端（１個のアミノ酸を含むスペーサーの場合にはα－カルボキシル基）で（１Ｓ，９Ｓ）－１－アミノ－９－エチル－５－フルオロ－２，３－ジヒドロ－９－ヒドロキシ－４－メチル－１Ｈ，１２Ｈ－ベンゾ［ｄｅ］ピラノ［３’，４’：６，７］インドリジノ［１，２－ｂ］キノリン－１０，１３（９Ｈ，１５Ｈ）－ジオンの１位のアミノ基にペプチド結合する）。Ｄ－ＰｈｅはＤ－フェニルアラニン残基を示し、その他のアミノ酸はＬ－アミノ酸を示す。なお、遊離速度の大小はドキソルビシンを結合したＤＤＳ化合物のＷａｌｋｅｒ２５６担癌ラットに対する薬効の発現の程度、又はＷａｌｋｅｒ２５６担癌ラットの腫瘍部位における遊離ドキソルビシン濃度によって判定した。）。これらのうち、本発明のＤＤＳ化合物では、スペーサーとして－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｐｈｅ－Ｇｌｙ－を用いることが特に好ましい。

（ａ）遊離速度が大きいスペーサー

－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）遊離速度が比較的大きいスペーサー

－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｐｈｅ－Ｐｈｅ－

－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－

（ｃ）遊離速度が比較的小さいスペーサー

－Ｐｈｅ－Ｐｈｅ－

－Ａｌａ－Ｇｌｙ－

－Ｐｒｏ－Ｇｌｙ－

－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｐｈｅ－

（ｄ）遊離速度が小さいスペーサー

－Ｇｌｙ－

－Ｄ－Ｐｈｅ－Ｇｌｙ－

－Ｇｌｙ－Ｐｈｅ－

－Ｓｅｒ－Ｇｌｙ－

－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－

－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－

－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－

（１Ｓ，９Ｓ）－１－アミノ－９－エチル－５－フルオロ－２，３－ジヒドロ－９－ヒドロキシ－４－メチル－１Ｈ，１２Ｈ－ベンゾ［ｄｅ］ピラノ［３’，４’：６，７］インドリジノ［１，２－ｂ］キノリン－１０，１３（９Ｈ，１５Ｈ）－ジオンは、特開平５－５９０６１号公報に記載の方法により合成できる。本発明のＤＤＳ化合物における上記医薬化合物の残基の導入量は、ＤＤＳ化合物の重量に対して３．２～８．４重量％であり、好ましくは５．６～７．６重量％である。上記医薬化合物の導入量は、例えば、吸光度分析により当業者が容易に確認できる。

本発明のＤＤＳ化合物は、所望の抗腫瘍活性を腫瘍部位特異的に発現でき、かつ、高い安全性を保持した抗腫瘍剤として用いることができる。本発明のＤＤＳ化合物を含む医薬は、通常、凍結乾燥品などの形態でバイアル等に充填することができ、用時溶解型の注射用又は点滴用製剤等の非経口投与用製剤として臨床に提供されるが、本発明の医薬の製剤形態は上記態様に限定されることはない。上記製剤の製造には、例えば、溶解補助剤、ｐＨ調整剤、安定化剤などの当業界で利用可能な製剤用添加物を用いることができる。本発明の医薬の投与量は特に限

定されないが、一日あたり体表面積１ｍ^{2}につき約１～５００ｍｇ程度、好ましくは約１０～１００ｍｇの範囲で一日一回投与し、３～４週毎に繰り返すことが好ましい。

本発明のＤＤＳ化合物の製造法は特に限定されないが、本発明により提供される上記の製造方法により好適に製造することができる。本発明の方法は、上記の工程（Ａ）から（Ｄ）のいずれか１工程、又は２以上の工程を組み合わせて含み、最も好ましくは（Ａ）から（Ｄ）の工程をすべて含む。以下、本発明の最も好ましい形態として、（Ａ）から（Ｄ）の工程をすべて含む方法について説明するが、本発明の範囲はこの好ましい形態に限定されることはない。

本発明の好ましい方法は、

（Ａ）デキストランを含む水溶液に４℃±２℃の温度で過ヨウ素酸ナトリウムを含む水溶液を添加してデキストランを酸化した後、得られた反応液を１５℃以下の温度で水素化ホウ素ナトリウムを含む水溶液に添加してデキストランポリアルコールを得る工程；

（Ｂ）上記工程（Ａ）で得られたデキストランポリアルコールにモノクロロ酢酸ナトリウムを反応させてカルボキシメチルデキストランポリアルコールを製造する工程であって、カルボキシメチル化の反応終点をキャピラリー電気泳動法により決定することを特徴とする工程；

（Ｃ）（１Ｓ，９Ｓ）－１－アミノ－９－エチル－５－フルオロ－２，３－ジヒドロ－９－ヒドロキシ－４－メチル－１Ｈ，１２Ｈ－ベンゾ［ｄｅ］ピラノ［３’，４’：６，７］インドリジノ［１，２－ｂ］キノリン－１０，１３（９Ｈ，１５Ｈ）－ジオンの１位のアミノ基と、α－アミノ基がｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル基で保護された１個のアミノ酸のα－カルボキシル基又はＮ末端がｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル基で保護された２～８個のアミノ酸からなるオリゴペプチドのＣ末端カルボキシル基とを縮合する工程であって、縮合剤として１－エチル－３－（ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド又はその塩を用いることを特徴とする工程；及び

（Ｄ）上記工程（Ｃ）で得られた縮合体からｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル基を除去して得られる脱保護体と、工程（Ｂ）で得られたカルボキシメチルデキストランポリアルコールとを縮合する工程であって、縮合剤として１－エチル－３－（ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド又はその塩を用いることを特徴とする工程

を含んでいる。

工程（Ａ）は、デキストランからデキストランポリアルコールを得る工程である。出発原料であるデキストランの種類は特に限定されず、α－Ｄ－１，６－結合を任意に含んでいてもよい。例えば、α－Ｄ－１，６－結合の割合が、８５％以上、９０％以上、又は９５％以上のデキストランなどを用いることができる。原料として用いるデキストランとしては、デキストランＴ５００（ファルマシア社製）等の分子量が５００，０００程度のものが好ましい。得られるデキストランポリアルコールのポリアルコール化度は特に限定されないが、実質的に完全にポリアルコール化可能な条件下においてデキストランを処理することが好ましい。

上記過ヨウ素酸ナトリウムを用いた酸化反応において、反応時の温度上昇により、テキストランポリアルコールの低分子化が生じる場合があるが、本発明の方法では、この低分子化を抑制するために、デキストランを含む水溶液中に４℃±２℃の温度で過ヨウ素酸ナトリウムを含む水溶液を添加することを特徴としている。デキストランを含む水溶液は、例えば緩衝剤を含んでいてもよい。過ヨウ素酸ナトリウムを含む水溶液を添加する際には、反応液の温度上昇が生じないように添加速度を制御することが望ましく、部分的な温度上昇を避けるために適宜の攪拌を行うことが望ましい。反応は数日から２０日程度、通常は１０日程度で完了する。反応液中のデキストランの濃度は、例えば、反応液１リットルあたり数グラムから１００グラム程度、好ましくは１リットルあたり１０グラム程度である。

反応の完了後、必要に応じて得られた反応液にエチレングリコールなどを加えて過剰の過酸を消費させ、さらに必要に応じて反応液のｐＨを中性付近（例えば

ｐＨ６．５程度）に調節した後、この反応液を１５℃以下の温度で水素化ホウ素ナトリウムを含む水溶液に添加して還元を行う。還元反応に際しても、反応時の温度上昇によりデキストランポリアルコールの低分子化が生じる場合があるが、本発明の方法では、この低分子化を抑制するために上記の酸化反応の反応液を水素化ホウ素ナトリウムを含む水溶液に１５℃以下の温度で添加することを特徴としている。添加速度は、反応液の温度上昇が生じないように制御することが望ましく、部分的な温度上昇を避けるために適宜の攪拌を行うことが望ましい。一般的には、添加後に反応混合物を氷冷温度で維持することにより、反応は数時間から数日、好ましくは１日程度で完了する。

得られた反応液から、所望の分子量を有するデキストランポリアルコールを分画し、次工程（Ｂ）の原料として用いることが望ましい。例えば、限外濾過膜を用いて低分子量及び高分子量の分画を除去することが望ましく、さらに必要に応じて脱塩及び濃縮などの工程を付加してもよい。脱塩及び濃縮も限外濾過膜を用いて行うことができる。

工程（Ｂ）は、上記工程（Ａ）で得られたデキストランポリアルコールをカルボキシメチル化して、重量平均分子量（プルラン標準）が２４０，０００～４８０，０００のカルボキシメチルデキストランポリアルコールを製造する工程である。デキストランポリアルコールのカルボキシメチル化は、例えば、デキストランポリアルコールの水酸基に対してクロル酢酸、ブロム酢酸などのハロゲン化酢酸又はその塩、好ましくはモノクロル酢酸のナトリウム塩を反応させて、デキストランポリアルコールの水酸基を部分的にカルボキシメチル化することにより行うことができる。例えば、デキストランポリアルコールを反応に関与しない不活性溶媒（例えば、水、N,N-ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド等）に溶解し、塩基（例えば、水酸化ナトリウムや水酸化カリウム等）の存在下に、ハロゲン化酢酸又はハロゲン化酢酸の塩を添加し、氷冷下ないし１００℃の温度範囲で数分ないし数日間反応させればよい。好ましくは、２０℃で数時間から１日程度反応させることができる。反応後、限外濾過膜を用いて低分子量及び高分子

量の分画を除去することが望ましく、さらに必要に応じて限外濾過膜を用いた脱塩及び濃縮などの工程を付加してもよい。

カルボキシメチルデキストランポリアルコールのカルボキシメチル化度は、カルボキシメチル化の反応温度や試薬として用いるハロゲン化酢酸又はその塩の添加量等によりある程度の制御が可能であるが、本発明の方法では、より厳密にカルボキシメチル化の程度を０．１４～０．４７又は０．２３～０．４７の範囲内になるように制御するため、カルボキシメチル化の反応終点をキャピラリー電気泳動法により決定することを特徴としている。

キャピラリー電気泳動（ｃａｐｉｌｌａｒｙ　ｅｌｅｃｔｒｏｐｈｏｒｅｓｉｓ，ＣＥ）は、通常、内径１００μｍ以下の溶融シリカ製のキャピラリー内で電気泳動を行う方法である（例えば、馬場嘉信、ぶんせき，３４２，１９９５などを参照のこと）。キャピラリー電気泳動には、キャピラリーゾーン電気泳動（ＣＺＥ）、導電クロマトグラフィー（ＥＫＣ）、キャピラリーゲル電気泳動（ＣＧＥ）など数種の分離モードが提案されているが、本発明の方法にはこれらの分離モードのいずれを用いてもよい。好ましくは、キャピラリーゾーン電気泳動を用いることができ、キャピラリー内にリン酸、クエン酸、ホウ酸などの緩衝液を満たして分離を行うことができる。この方法により、単位分子量あたりの電荷を正確に測定することができ、上記反応液中の試料のカルボキシメチル化度を短時間に、かつ高感度に測定できる。その方法の詳細を本明細書の実施例に具体的に示したので、当業者は、上記の刊行物の一般的な説明及びその他の刊行物を参照しつつ、本明細書の実施例に記載された具体的方法に従って、必要に応じてそれらを適宜修飾ないし改変することにより、カルボキシメチル化の反応終点（カルボキシメチル化度が０．１４～０．４７又は０．２３～０．４７の範囲）を容易かつ正確に確認することが可能である。

すでに説明したとおり、キャピラリー電気泳動法によりカルボキシメチルデキストランポリアルコールのカルボキシメチル化度の測定するにあたり、標準物質を用いて求めた検量線を採用することができる。検量線は、例えば分解法又はＮ

ＭＲ法のいずれかの方法により得ることができるが、分解法とＮＭＲ法とでは、同一の標準物質について異なるカルボキシメチル化度の測定値を与える場合がある。一般的に、ＮＭＲ法によるカルボキシメチル化度の測定値は分解法による測定値に比べて０．０９程度低くなる傾向がある。従って、ＮＭＲ法で作成した検量線を用いる場合には、カルボキシメチル化度が０．１４～０．３８の範囲であることが望ましい。

工程（Ｃ）は、（１Ｓ，９Ｓ）－１－アミノ－９－エチル－５－フルオロ－２，３－ジヒドロ－９－ヒドロキシ－４－メチル－１Ｈ，１２Ｈ－ベンゾ［ｄｅ］ピラノ［３’，４’：６，７］インドリジノ［１，２－ｂ］キノリン－１０，１３（９Ｈ，１５Ｈ）－ジオンの１位のアミノ基を、スペーサーとして利用するオリゴペプチドのＣ末端カルボキシル基（１個のアミノ酸を用いる場合にはα－カルボキシル基）と縮合する工程である。スペーサーとして利用する上記オリゴペプチド又はアミノ酸は、この反応に供するためにそれぞれＮ末端アミノ基又はα－アミノ基をｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル基で保護しておく必要があるが、その手段は当業者に周知かつ慣用されている。

本発明の方法では、上記の縮合反応を行うにあたり、縮合剤として１－エチル－３－（ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド（ＥＰＣＩ）又はその塩、好ましくは１－エチル－３－（ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド塩酸塩を用いることを特徴としている。上記の縮合剤を用いると、Ｎ，Ｎ’－ジシクロヘキシルカルボジイミド（ＤＣＣ）のようなＮ，Ｎ’－ジシクロアルキルカルボジイミド類を縮合剤として用いる場合に比べて、反応操作を簡略化でき、反応時間も大幅に短縮できる。より具体的には、縮合剤除去のための遠心分離及びカラム操作を回避でき、反応時間もＤＣＣを用いた場合の約１／５程度に短縮可能である。基質濃度もＤＣＣを用いる場合に比べて約５倍増加させることができる。特に、工業化を志向した大量合成系において、試薬削減、時間短縮等により大幅なコストダウンを図ることが可能である。

上記反応は、縮合剤としてＥＰＣＩ又はその塩を用いる以外は、通常の縮合剤

を用いたペプチド結合形成のための縮合反応と同様に行うことができる。上記医薬化合物に対してｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル化アミノ酸又はｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル化オリゴペプチドを１～１．５当量程度用い、ジメチルホルムアミドなどの不活性溶媒中で反応を行うことができる。反応は、一般的に室温下で数時間から１日程度、好ましくは室温下に３時間程度で終了する。反応液中の医薬化合物の濃度は特に限定されないが、通常は１リットルあたり５０～２００グラム程度、好ましくは１リットルあたり１００～１５０グラム程度である。

工程（Ｄ）は、上記工程（Ｃ）で得られた縮合体からｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル基を除去して得られる脱保護体と、工程（Ｂ）で得られたカルボキシメチルデキストランポリアルコールとを縮合する工程である。ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル基を除去する方法は当業者に周知かつ慣用されているが、例えば、トリフルオロ酢酸で処理する方法が好ましい。脱保護体を精製する場合には、例えば、イソプロピルエーテルなどによる洗浄を行うことができる。

本発明の方法では、医薬化合物が結合したスペーサーのＮ末端アミノ基（１個のアミノ酸をスペーサーとして用いる場合にはα－アミノ酸）とカルボキシメチルデキストランポリアルコールのカルボキシル基とを結合させるにあたり、縮合剤として１－エチル－３－（ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド（ＥＰＣＩ）又はその塩、好ましくは１－エチル－３－（ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド塩酸塩を用いることを特徴としている。上記の縮合剤を用いると、Ｎ，Ｎ’－ジシクロヘキシルカルボジイミド（ＤＣＣ）のようなＮ，Ｎ’－ジシクロアルキルカルボジイミド類を縮合剤として用いる場合に比べて、縮合剤除去のための遠心分離及びカラム操作を回避でき、反応時間も大幅な短縮が可能であることから、工業化を志向した大量合成系において大幅なコストダウンを図ることが可能である。上記反応の終点は、ＨＰＬＣにより決定するとよい。

上記反応は、縮合剤としてＥＰＣＩを用いる以外は、通常の縮合剤を用いたペプチド結合形成のための縮合反応と同様に行うことができる。カルボキシメチルデキストランポリアルコール１重量部に対して医薬化合物を結合したアミノ酸又

はオリゴペプチドを０．１～０．２重量部程度用い、含水メタノールなどの不活性溶媒中で反応を行うことができる。反応は、一般的に室温下で数時間から１日程度、好ましくは室温下に２～３時間程度で終了する。

なお、本発明の方法の具体例が本明細書の実施例に示されているので、当業者は、上記の一般的な説明及び実施例の具体的説明を参照しつつ、必要に応じて適宜の修飾ないし改変を加えて、本発明の方法を行うことができる。また、反応温度や反応時間、試薬の濃度などは当業者が本発明の範囲内で適宜選択可能であることは言うまでもない。

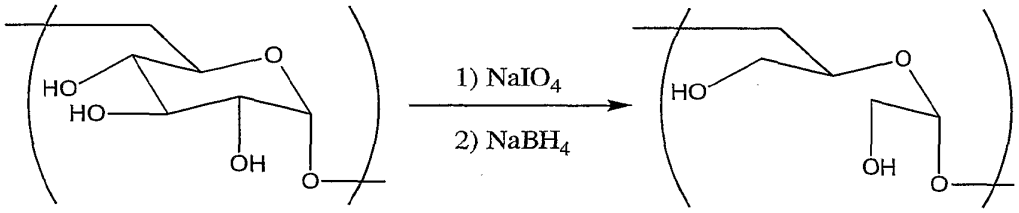
本発明のＤＤＳ化合物を含む医薬は、通常、凍結乾燥品などの形態でバイアル等に充填することができ、用時溶解型の注射用または点滴用製剤等の非経口投与用製剤として、腫瘍治療のための医薬として臨床に提供される。本発明のＤＤＳ化合物の腫瘍治療のための医薬としての使用に関して国際公開ＷＯ９７／４６２６０号の開示を参照として本明細書の開示に含める。もっとも、本発明の医薬の製剤形態は上記態様に限定されることはなく、上記医薬の製造には、例えば、溶解補助剤、ｐＨ調節剤、安定化剤など当業界で利用可能な製剤用添加物を用いることができる。上記医薬の投与量は特に限定されないが、通常は一日あたり体表面積１m^2につき約０．１～１００ｍｇ程度、好ましくは約１～３０ｍｇの範囲で非経口的に一回投与し、３～４週毎に投与を繰り返すことが好ましい。

実施例

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明の範囲は下記の実施例に限定されることはない。なお、実施例中、（１Ｓ，９Ｓ）－１－アミノ－９－エチル－５－フルオロ－２，３－ジヒドロ－９－ヒドロキシ－４－メチル－１Ｈ，１２Ｈ－ベンゾ［ｄｅ］ピラノ［３’，４’：６，７］インドリジノ［１，２－ｂ］キノリン－１０，１３（９Ｈ，１５Ｈ）－ジオンを「医薬化合物Ａ」と呼ぶ場合があり、「Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｐｈｅ－Ｇｌｙ」はグリシル－グリシル－フェニルアラニル－グリシン又はその残基を意味する。また、試験例にお

いて用いたＤＤＳ化合物は、上記の医薬化合物とカルボキシメチルデキストランポリアルコールとがテトラペプチドスペーサー（Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｐｈｅ－Ｇｌｙ）を介して結合したＤＤＳ化合物であり、異なるカルボキシメチル化度及び分子量の異なる高分子キャリアーを有するように調製した。

例１：デキストランポリアルコール（Ｄｅｘ－ＰＡ）の合成

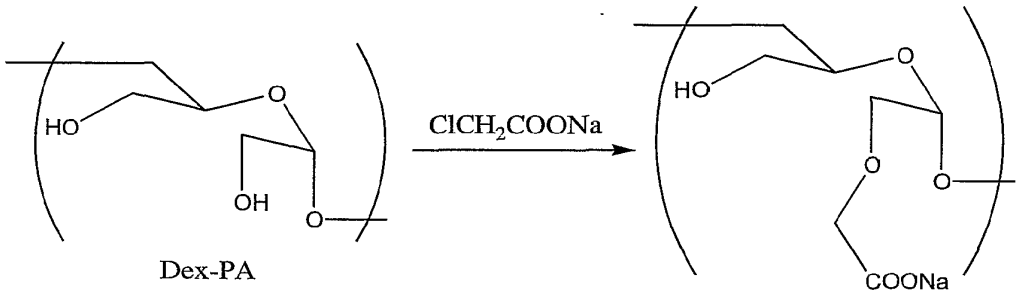


DextranT-500 Dex-PA

デキストラン－Ｔ５００（ファルマシア社製、３００ｇ）をｐＨ　５．５に調整した０．２M酢酸緩衝液（１５ｌ）、ＮａＩＯ$_4$（９９０ｇ）を純水（１５ｌ）に溶解し、低温室（約４℃）で一晩放置した。翌日、デキストラン－Ｔ５００の溶液（３．５℃）にＮａＩＯ$_4$溶液（３．５℃）を温度上昇（７．０℃以下）が起らないように徐々に注ぎ、注入後そのまま低温室で攪拌（１００ｒｐｍ）した。１０日間攪拌後、エチレングリコール（２１０ｍｌ）を加えて２時間攪拌して過酸の消失をＰｅｒｏｘｉｄ試験紙で確認した後、１０％ＮａＯＨを用いて反応液をｐＨ６．５に調整した。続いて、この反応液を氷冷下でＮａＢＨ$_4$溶液（４２０ｇ、１２ｌ）に滴下した。この時、系内温度が１５℃を超えないようにし、３時間かけて滴下した。その後、反応混合物を低温室で一晩攪拌し、翌日、酢酸によりｐＨ５．５に調整した後、さらに１時間攪拌して１０％ＮａＯＨでｐＨを７．０とした。得られた反応液をポール・フィルトロンの限外濾過膜（１０００ｋ）で処理して、微粒子及び高分子画分の除去を行った。さらにミリポアの限外濾過膜（５０ｋ）で脱塩（純水９０～１００ｌ程度を使用）及び濃縮を行い、ＨＰＬＣでモニターしながら１９９７ｍｌまで濃縮した。この一部（１ｍｌ×３）をサ

ンプリングし凍結乾燥した結果、６０．１ｍｇであったため、収量は１２０ｇと算出された。

例２：カルボキシメチルデキストランポリアルコール（ＣＭ－Ｄｅｘ－ＰＡ）の合成



Dex-PA

CM-Dex-PA

（Ａ）カルボキシメチルデキストランポリアルコール（ＣＭ－Ｄｅｘ－ＰＡ）の合成

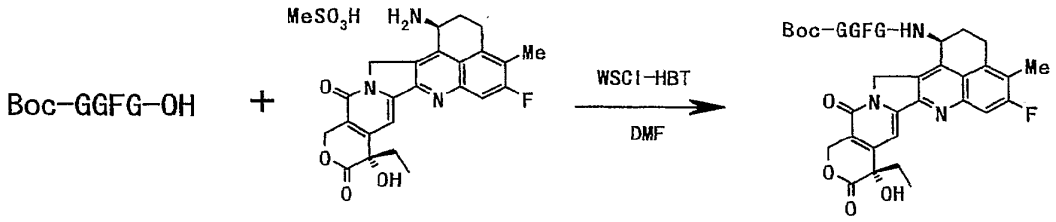
ＮａＯＨ（１９３ｇ）を純水（１５３７ｍｌ）に溶解し、液温を２５℃に保ちつつデキストランポリアルコール水溶液を加え、系内温度を２５℃に保ちながら攪拌した。この混合物にモノクロロ酢酸ナトリウムを徐々に加え、同温度で１５時間攪拌した。反応の終点をキャピラリー電気泳動法にて確認後、酢酸でｐＨ８．０程度に調整し、限外濾過を行った。最初に１０００ｋの膜で高分子を排除し、次に５０ｋの膜で低分子（試薬及び塩）を排除して濃縮した。その際、低分子の除去状況は随時ＨＰＬＣで把握し、低分子がほぼ除去されたことを確認して限外濾過を終了した。カルボキシメチルデキストランポリアルコール溶液を３７７０ｍｌまで濃縮し、その１ｍｌを凍結乾燥したところ３２．１ｍｇであったため、収量は１２１ｇと算出された。

（Ｂ）キャピラリー電気泳動によるカルボキシメチル化度の測定－その１

キャピラリー電気泳動は、検出器としてフォトダイオードアレイ１９０ｎｍ－

３００ｎｍ（検出１９５ｎｍ）、キャピラリーとしてヒューズドシリカ製内径７５μｍ、有効長５００ｍｍ、全長６７０ｍｍのものを用い、泳動液には２０ｍＭ四ホウ酸ナトリウム水溶液を用いた。試料は０．０２％アジ化ナトリウム水溶液で２ｍｇ／ｍｌに調製した。試料として反応時間１９時間、１９．５時間、及び２０時間の３ロットを用いた。検量線は、分解法によりカルボキシメチル化度が０．２２、０．４２、及び０．６２と確認された３種類のカルボキシメチルデキストランポリアルコールを標準物質として用いて作成した。それぞれの保持時間（分）は４．４９６、５．４４２、及び６．６００であった。試料の保持時間（分）は５．３２５、５．４００、及び５．４４６であった。この結果から、それぞれの試料のカルボキシメチル化度は０．３８、０．４０、及び０．４１と求められた。

例３：ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル（Ｂｏｃ）－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｐｈｅ－Ｇｌｙ－医薬化合物Ａの合成

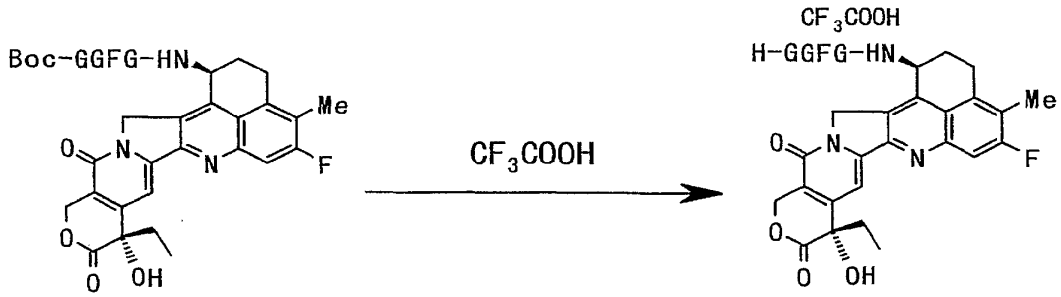


医薬化合物Ａ・メタンスルホン酸塩（８０ｇ）とｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｐｈｅ－Ｇｌｙ－ＯＨ（６８ｇ）をＮ，Ｎ－ジメチルホルムアミド（１２００ｍｌ）に懸濁した。氷冷攪拌下、トリエチルアミン（４８ｍｌ）、１－エチル－３－（ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド塩酸塩（ＥＰＣＩ・ＨＣｌ、２９．６ｇ）、ヒドロキシベンゾトリアゾール（ＨＢＴ、２０．８ｇ）を加え、室温で攪拌した。反応の終点をＨＰＬＣで確認後、氷冷攪拌下、反応液に水（８００ｍｌ）を内温が２０℃以下に保たれるよう３０分間で滴下し、

結晶を析出させた。その後、さらに水（１２００ｍｌ）を滴下した。つぎに、酢酸により溶液のｐＨを７に調整した。析出した固体を濾過し水洗し、得られた結晶を減圧下乾燥して表題の化合物（１２０．４ｇ、定量的）を得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（ＤＭＳＯ－ｄ$_6$/ＴＭＳ）　δ（ｐｐｍ）：０．９７（３Ｈ，ｍ），１．１１（２Ｈ，ｄ，Ｊ＝６．３Ｈｚ），１．４１（９Ｈ，ｓ），１．９１（２Ｈ，ｍ），２．０５（１Ｈ，ｍ），２．３３（４Ｈ，ｍ），２．９５－３．１０（４Ｈ，ｍ），３．５８－３．７２（２Ｈ，ｍ），３．８（１Ｈ，ｍ），４．０３（１Ｈ，ｍ），４．３４（１Ｈ，ｍ），４．７４（１Ｈ，ｍ），５．１３（１Ｈ，ｍ），５．３３（１Ｈ，ｍ），５．５８（２Ｈ，ｍ），７．１８（５Ｈ，ｍ），７．４９（２Ｈ，ｍ）

例４：Ｈ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｐｈｅ－Ｇｌｙ－医薬化合物Ａ・トリフルオロ酢酸塩の合成

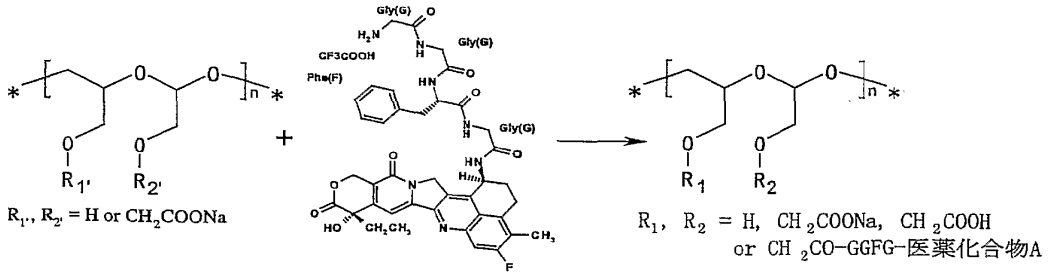


上記の例３で得たｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｐｈｅ－Ｇｌｙ－医薬化合物Ａ（１２０ｇ）にトリフルオロ酢酸（３６０ｍｌ）を氷冷下滴下した。ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｐｈｅ－Ｇｌｙ－医薬化合物Ａを完全に溶解した後、ＨＰＬＣで脱ｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル反応の終了を確認した。この反応液にメタノール（３６０ｍｌ）及びイソプロピルエーテル（７２０ｍｌ）を内温が０℃～１５℃の間となるように滴下した。析出した結晶を濾取して酢酸エチル（５００ｍｌ）で３回洗浄し、得られた結晶

を、内温５０℃以下で２０％含水メタノール（４００ｍｌ）に溶解し、その後、酢酸エチル（４００ｍｌ）次いでイソプロピルエーテル（８００ｍｌ）を加えて再結晶した。この結晶を濾取して含水メタノール（４００ｍｌ）に溶解し、活性炭（４．４ｇ）を加えて脱色処理を行なった。上記溶液を濾過し、濾液に酢酸エチル（４００ｍｌ）、次いでイソプロピルエーテル（８００ｍｌ）を５５℃以下で加えて再結晶した。濾過した結晶を減圧下乾燥し、Ｈ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｐｈｅ－Ｇｌｙ－医薬化合物Ａ（１１１．８ｇ、医薬化合物Ａから換算して９０％）を得た。

^{1}Ｈ－ＮＭＲ（ＤＭＳＯ－ｄ$_{6}$/ＴＭＳ）　δ（ｐｐｍ）：０．８７（３Ｈ，ｍ），１．８７（２Ｈ，ｍ），２．１７（２Ｈ，ｍ），２．３７（３Ｈ，ｍ），２．７４（１Ｈ，ｍ），３．００（１Ｈ，ｍ），３．１６（１Ｈ，ｍ），３．５８（２Ｈ，ｓ），３．６５－３．９１（４Ｈ，ｍ），４．４８（１Ｈ，ｍ），５．２（２Ｈ，ｓ），５．３９（２Ｈ，ｍ），５．５８（１Ｈ，ｍ），６．５３（１Ｈ，ｓ），７．２１（５Ｈ，ｍ），７．７５（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝１０．９Ｈｚ），８．０６（２Ｈ，ｓ），８．２８（１Ｈ，ｄ，Ｊ＝８．２Ｈｚ），８．４９（１Ｈ，ｍ），８．５２（１Ｈ，ｍ）

例５：本発明のＤＤＳ化合物の合成



カルボキシメチルデキストランポリアルコール（８００ｇ）を含む水溶液にカ

ルボキシメチルデキストランポリアルコール水溶液分と合わせて３２１となるように純水を加え、さらにメタノール（６０１）を加えた。この混合液に例４で得たＨ－Ｇｌｙ－Ｇｌｙ－Ｐｈｅ－Ｇｌｙ－医薬化合物Ａ（１３３ｇ）とヒドロキシベンゾトリアゾール（２３．４ｇ）を溶解した２０％含水メタノール（４１）を添加した。１－エチル－３－（ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド塩酸塩（３３．１ｇ）を加え、１Ｎ ＮａＯＨにてｐＨを６．８～７．２に調整した。この混合物を室温（２３℃±５℃）で、２～３時間反応させた。さらに１－エチル－３－（ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド塩酸塩（８．１ｇ）を添加し、１Ｎ ＨＣｌにてｐＨを６．８～７．２に調整し、引続き２～３時間程度反応させた。さらに１－エチル－３－（ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド塩酸塩（５．６ｇ）を添加し、１Ｎ ＨＣｌにてｐＨを６．８～７．２に調整し、引続き１時間程度反応させた。反応終了後、１Ｎ ＮａＯＨにて反応液のｐＨを８．７～９．２に調整し、１０℃以下で保存した。その後、限外濾過膜（５０ｋ）にて溶液を脱塩及び濃縮した。次にメンブランフィルターで精密濾過し、得られた溶液を凍結乾燥し、本発明のＤＤＳ化合物（８８０ｇ）を得た。

例６：デキストランポリアルコールの低分子化における反応温度の影響（酸化反応）

基質濃度１％、２０ｇスケールで例１に従いデキストランの酸化反応を行った。反応温度を４、８、１２、１５℃に設定し、反応時間を変化させた時の生成体のゲル濾過クロマトグラフィーにおける保持時間を測定した。表１に示すように、反応温度１２℃及び１５℃の場合には、６日目には低分子化による明らかな保持時間の遅れが確認された。８℃においても、１０日目には、明らかな保持時間の遅れが確認できた。

表１

反応温度/時間	3日間	6日間	10日間
4℃	10.46分	10.44分	10.53分
8℃	10.52分	10.63分	10.83分
12℃	10.45分	10.63分	—
15℃	10.59分	10.92分	—

例７：デキストランポリアルコールの低分子化における反応温度の影響（酸化反応）

例６の結果に基づき、さらに温度範囲を細かく設定（４℃、１℃、６．５℃）して同様の実験を行った。表２に示すように、すべての温度範囲において、低分子化が起こることなく反応は進行したが、１℃で反応させた場合には、反応系中の塩の析出が多くなった。以上の結果から、この反応の温度の安全域は２～６℃と判断された。

表２

反応温度/時間	3日間	6日間	10日間
4℃	10.40分	10.39分	10.49分
1℃	10.42分	10.39分	10.45分
6．5℃	10.40分	10.36分	10.39分

例８：デキストランポリアルコールの低分子化における反応温度の影響（還元反応）

例１に従い、デキストランの酸化反応に引き続く還元反応を行った。反応温度を１０、１５、２０、３０℃に設定し、１２～２４時間反応させた後、生成体のゲル濾過クロマトグラフィーにおける保持時間を測定した。表３に示すように、反応温度が１５℃を超えると明らかな低分子化が認められた。

表３

反応温度	ゲル濾過クロマトグラフィーによる判定
１０℃	低分子化なし
１５℃	若干の低分子化
２０℃	低分子化
３０℃	顕著な低分子化

例９：カルボキシメチル化度の測定方法の違いによるＤＤＳ化合物のカルボキシメチル化度の測定値変動

３種類のカルボキシメチルデキストランポリアルコールを標準物質として用いて分解法及びＮＭＲ法により検量線を作成した。この検量線を用いて例２（Ｂ）と同様にして、ＤＤＳ化合物（３ロット）のカルボキシメチル化度を測定した。結果を以下に示す。ＮＭＲで求めた検量線を用いると、いずれのロットについてもカルボキシメチル化度の測定値が分解法で求めた場合よりも０．０９減少していた。

表４　標準物質（カルボキシメチルデキストランポリアルコール）のカルボキシメチル化度

	標準物質Ｎｏ．１	標準物質Ｎｏ．２	標準物質Ｎｏ．３
分解法	０．３３３	０．４３９	０．５８４
ＮＭＲ法	０．２４８	０．３６０	０．５２３

表５　ＤＤＳ化合物のカルボシキメチル化度

	ロット１	ロット２	ロット３
分解法	０．３６	０．３７	０．３７
ＮＭＲ法	０．２７	０．２８	０．２８
差異	Δ０．０９	Δ０．０９	Δ０．０９

以下、試験例を示すが、試験例中に示したカルボキシメチル化度は分解法により求めた値である。

試験例１

（Ａ）方法

動物は６週齢の雄のＢＡＬＢ／ｃマウス（日本ＳＬＣ株式会社）を市販の飼料及び水を自由に摂取させ、１週間の馴化後に試験に供した。腫瘍細胞はマウス腫瘍細胞Ｍｅｔｈ Ａ線維肉腫を同系マウスであるＢＡＬＢ／ｃの腹腔内にて１週間毎に継代維持した。エンドトキシン濃度５０ｐｇ／ｍｌ以下のハンクス培地（ＨＢＳＳ、Ｇｉｂｃｏ－ＢＲＬ）を用いてマウスの腹腔内より腫瘍細胞を採取し、数回の遠心操作（約６００ｒｐｍ、５－１０分、４℃）で洗浄した後、ＨＢＳＳ培地に浮遊して1×10^{6}／０．１ｍｌ／マウスの割合でマウスの腹腔内に移植した。

抗腫瘍試験では、Ｍｅｔｈ Ａ細胞を1×10^{6}／０．１ｍｌ／マウスの割合でマウスの右鼠径部に皮下移植し（ｄａｙ０）、移植後７又は１２日にノギスで測定した腫瘍の長径（Ｌ）及び短径（Ｗ）から算出した推定腫瘍重量（ＥＴＷ＝$L\times W^{2}$／２ｍｇ）の群平均が約１００ｍｇになるようにマウスを６又は７匹に群分けし、検体を単回あるいは４日毎４回の用法で静脈内投与した。マウスを腫瘍移植後２１日又は２６日に頚椎脱臼により屠殺し、腫瘍を摘出してその重量を測定した。腫瘍増殖抑制効果（ＩＲ）は、ＩＲ＝（１－ＴＷｔ／ＴＷｃ）×１００（％）の式を用いて腫瘍重量値から算出した（ＴＷｔ、ＴＷｃはそれぞれ検体投与群及び対照群の平均腫瘍重量）。ＩＲが５８％以上の場合に抗腫瘍効果を有効と判断した。対照群と検体投与群の腫瘍重量の有意差検定はダネット法により行った。

さらに、検体の副作用の強さを評価するために、体重減少率（ＢＷＬ）及び使用マウス数に対する毒性死したマウス数との比（Ｄ／Ｕ）を毒性パラメーターとして設定した。ＢＷＬはＢＷＬ＝（１－ＢＷｎ／ＢＷｓ）×１００（％）の式を

用い、投与開始時におけるマウスの平均体重（ＢＷｓ）及びｎ日目のマウスの平均体重（ＢＷｎ）より算出した。このＢＷＬの最大値をBWL_{max}とした。ただし、投与開始日に比較し体重減少が認められない場合はBWL_{max}を０以下（＜０）として示した。なお、検体は日本薬局方注射用生理食塩水に溶解し、投与液量１０又は２０ｍｌ／ｋｇにて静脈内投与した。

（Ｂ）結果

カルボキシメチルデキストランポリアルコールの分子量が４８，０００～４５７，０００であるＤＤＳ化合物（カルボキシメチル化度０．３７～０．４６、薬物導入量４．６～６．４重量%）について単回投与での試験を行ったところ、カルボキシメチルデキストランポリアルコールの分子量が２００，０００～３００，０００では、低用量で安定して５８%以上の有意な抗腫瘍効果が確認されたが、分子量が２００，０００未満では最小有効量が増大した。また、分子量が５０，０００未満の場合には、毒性及び抗腫瘍効果が減弱し、尿排泄を受けているものと考えられた。したがってカルボキシメチルデキストランポリアルコールの分子量が２００，０００以上であれば、低用量でも安定した抗腫瘍効果を得ることができると結論された。一方、カルボキシメチルデキストランポリアルコールの分子量が５００，０００を超えると、粘性のために物理的傷害に対する安定性が悪いなどの問題が生じた。これらの結果から、ＤＤＳ化合物におけるカルボキシメチルデキストランポリアルコールの分子量は５０，０００～５００，０００の範囲であることが必要であり、所望の抗腫瘍効果を達成し、かつ安定な製品を製造するためにはカルボキシメチルデキストランポリアルコールのプルラン標準重量平均分子量が２４０，０００～４８０，０００の範囲であることが望ましいと結論された。

試験例２

７週齢のＢＡＬＢ／ｃ系雄マウス６９匹（日本エスエルシー株式会社）を１週間馴化し、１群５匹としてカルボキシメチル化度の異なるＤＤＳ化合物（薬物導

入量５．３～６．３重量%、分子量２７０，０００～３３０，０００）を投与した。投与時の平均体重は２１．１から２５．４ｇであった。動物は、室温（２３±２℃）、湿度（５５±２０%）、照明時間１２時間（８：００～２０：００）に設定された室内でアルミ製ケージに５匹ずつ収容し、市販の固形飼料（Ｆ２、船橋農場製）及び塩素添加上水道水を自由に摂取させて飼育した。ＤＤＳ化合物は日本薬局方生理食塩水に溶解し、１．０２～１．３６ｍｇ／ｍｌの濃度として１ｍｌ／ｋｇの液量で尾静脈内に投与した。

動物の症状を１日１回、投与日を含めて１５日間観察し、投与前並びに投与後３、７、１０、及び１４日に体重を測定した。死亡例は死亡発見後速やかに剖検し、生存例は投与後１４日にエーテル麻酔下に腹大動脈切断により放血屠殺し、全身諸臓器を肉眼的に観察した。体重データは群平均値±標準偏差を算出し、その後、有意水準５%で統計学的解析を行った。その結果、カルボキシメチル化度が０．３８、０．４３、及び０．４７のＤＤＳ化合物の最大耐用量（ＭＴＤ）はそれぞれ１１．７、１１．７、及び１０．３ｍｇ／ｋｇであり、カルボキシメチル化度が０．４３を上回ると毒性が強くなる傾向が示唆された。また、カルボキシメチル化度が０．５３のＤＤＳ化合物を用いて同様に毒性を評価したところ、１０ｍｇ／ｋｇ投与群で６匹中３匹が死亡し、体重減少及び致死毒性が顕著に増強された。一方、カルボキシメチル化度が０．２３のＤＤＳ化合物のＭＴＤはカルボキシメチル化度が０．３８のＤＤＳ化合物と同等であった。従って、安全性の面からＤＤＳ化合物のカルボキシメチル化度は０．２３～０．４７の範囲が好ましいと結論された。

試験例３

上記試験例２と同様にして、医薬化合物残基の導入量が３．２～１５重量%のＤＤＳ化合物（カルボキシメチル化度０．３７～０．４０、分子量２６０，０００～３２０，０００）について抗腫瘍試験を実施した。この結果、１．２５ｍｇ／ｋｇ投与群では導入率３．２～７．３重量%の範囲でＩＲ８０%以上と薬効が

認められたものの、導入率が８．４重量%を上回ると（～１５%の範囲まで）薬効がこれらよりも明らかに低下する傾向が認められた。また、導入率８．４重量%を上回る場合には、２．５又は５ｍｇ／ｋｇ投与群において他の複合体と同等の薬効を示したものの、１０ｍｇ／ｋｇ投与群において致死毒性の増強が認められた。これらの結果から、所望の抗腫瘍効果を達成し、安全性の高いＤＤＳ化合物を提供するためには、医薬化合物残基の導入量を３．２～８．４重量%の範囲とすることが望ましいと結論された。

産業上の利用可能性

本発明のＤＤＳ化合物は高い安全性と広い薬効域を有しており、抗腫瘍剤として臨床上極めて有用である。また、本発明の方法は、上記ＤＤＳ化合物を高品質に、かつ効率的に高収率で製造でき、工業化に適している。

請 求 の 範 囲

１．（１Ｓ，９Ｓ）－１－アミノ－９－エチル－５－フルオロ－２，３－ジヒドロ－９－ヒドロキシ－４－メチル－１Ｈ，１２Ｈ－ベンゾ［ｄｅ］ピラノ［３’，４’：６，７］インドリジノ［１，２－ｂ］キノリン－１０，１３（９Ｈ，１５Ｈ）－ジオンの１－位のアミノ基とカルボキシメチルデキストランポリアルコールのカルボキシル基とが１個のアミノ酸又はペプチド結合した２～８個のアミノ酸からなるスペーサーを介して結合したＤＤＳ化合物において、

（１）（１Ｓ，９Ｓ）－１－アミノ－９－エチル－５－フルオロ－２，３－ジヒドロ－９－ヒドロキシ－４－メチル－１Ｈ，１２Ｈ－ベンゾ［ｄｅ］ピラノ［３’，４’：６，７］インドリジノ［１，２－ｂ］キノリン－１０，１３（９Ｈ，１５Ｈ）－ジオンの残基の導入量がＤＤＳ化合物全重量に対して３．２～８．４重量％の範囲であり、

（２）上記カルボキシメチルデキストランポリアルコールのプルラン標準重量平均分子量が２４０，０００～４８０，０００の範囲であり、かつ

（３）上記カルボキシメチルデキストランポリアルコールのカルボキシメチル化度が０．２３～０．４７の範囲である

ことを特徴とするＤＤＳ化合物。

２．（１Ｓ，９Ｓ）－１－アミノ－９－エチル－５－フルオロ－２，３－ジヒドロ－９－ヒドロキシ－４－メチル－１Ｈ，１２Ｈ－ベンゾ［ｄｅ］ピラノ［３’，４’：６，７］インドリジノ［１，２－ｂ］キノリン－１０，１３（９Ｈ，１５Ｈ）－ジオンの１－位のアミノ基とカルボキシメチルデキストランポリアルコールのカルボキシル基とが１個のアミノ酸又はペプチド結合した２～８個のアミノ酸からなるスペーサーを介して結合したＤＤＳ化合物において、

（１）（１Ｓ，９Ｓ）－１－アミノ－９－エチル－５－フルオロ－２，３－ジヒドロ－９－ヒドロキシ－４－メチル－１Ｈ，１２Ｈ－ベンゾ［ｄｅ］ピラノ［３’，４’：６，７］インドリジノ［１，２－ｂ］キノリン－１０，１３（９Ｈ，１５

H)－ジオンの残基の導入量がＤＤＳ化合物全重量に対して３．２～８．４重量%の範囲であり、

（２）上記カルボキシメチルデキストランポリアルコールのプルラン標準重量平均分子量が２４０，０００～４８０，０００の範囲であり、かつ

（３）上記カルボキシメチルデキストランポリアルコールのカルボキシメチル化度が０．１４～０．４７の範囲である

ことを特徴とするＤＤＳ化合物。

３．（１Ｓ，９Ｓ）－１－アミノ－９－エチル－５－フルオロ－２，３－ジヒドロ－９－ヒドロキシ－４－メチル－１Ｈ，１２Ｈ－ベンゾ［ｄｅ］ピラノ［３’，４’：６，７］インドリジノ［１，２－ｂ］キノリン－１０，１３（９Ｈ，１５Ｈ)－ジオンの１－位のアミノ基とカルボキシメチルデキストランポリアルコールのカルボキシル基とが１個のアミノ酸又はペプチド結合した２～８個のアミノ酸からなるスペーサーを介して結合したＤＤＳ化合物において、

（１）（１Ｓ，９Ｓ）－１－アミノ－９－エチル－５－フルオロ－２，３－ジヒドロ－９－ヒドロキシ－４－メチル－１Ｈ，１２Ｈ－ベンゾ［ｄｅ］ピラノ［３’，４’：６，７］インドリジノ［１，２－ｂ］キノリン－１０，１３（９Ｈ，１５Ｈ)－ジオンの残基の導入量がＤＤＳ化合物全重量に対して３．２～８．４重量%の範囲であり、

（２）上記カルボキシメチルデキストランポリアルコールのプルラン標準重量平均分子量が２４０，０００～４８０，０００の範囲であり、かつ

（３）上記カルボキシメチルデキストランポリアルコールのカルボキシメチル化度が０．１４～０．３８の範囲である

ことを特徴とするＤＤＳ化合物。

４．上記（３）におけるカルボキシメチル化度が、標準物質であるカルボキシメチルデキストランポリアルコールを分解法又はＮＭＲ法で測定することにより得られる検量線を用いてキャピラリー電気泳動法により測定されたカルボキシメチル化度である請求の範囲第１項ないし第３項のいずれか１項に記載のＤＤＳ化合

物。

５．上記（３）におけるカルボキシメチル化度が、標準物質であるカルボキシメチルデキストランポリアルコールを分解法で測定することにより得られる検量線を用いてキャピラリー電気泳動法により測定されたカルボキシメチル化度である請求の範囲第１項に記載のＤＤＳ化合物。

６．上記（３）におけるカルボキシメチル化度が、標準物質であるカルボキシメチルデキストランポリアルコールをＮＭＲ法で測定することにより得られる検量線を用いてキャピラリー電気泳動法により測定されたカルボキシメチル化度である請求の範囲第３項に記載のＤＤＳ化合物。

７．請求の範囲第１項ないし第６項のいずれか１項に記載のＤＤＳ化合物を含む抗腫瘍剤。

８．請求の範囲第１項ないし第６項のいずれか１項に記載のＤＤＳ化合物の製造方法であって、下記の工程：

（Ａ）デキストランを含む水溶液に４℃±２℃の温度で過ヨウ素酸ナトリウムを含む水溶液を添加してデキストランを酸化した後、得られた反応液を１５℃以下の温度で水素化ホウ素ナトリウムを含む水溶液に添加してデキストランポリアルコールを得る工程；

（Ｂ）デキストランポリアルコールにモノクロロ酢酸ナトリウムを反応させてカルボキシメチルデキストランポリアルコールを製造する工程であって、カルボキシメチル化の反応終点をキャピラリー電気泳動法により決定することを特徴とする工程；

（Ｃ）（１Ｓ，９Ｓ）－１－アミノ－９－エチル－５－フルオロ－２，３－ジヒドロ－９－ヒドロキシ－４－メチル－１Ｈ，１２Ｈ－ベンゾ［ｄｅ］ピラノ［３’，４’：６，７］インドリジノ［１，２－ｂ］キノリン－１０，１３（９Ｈ，１５Ｈ）－ジオンの１位のアミノ基と、α－アミノ基がｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル基で保護された１個のアミノ酸のα－カルボキシル基又はＮ末端がｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル基で保護された２～８個のアミノ酸からなるオリゴペプチド

のＣ末端カルボキシル基とを縮合する工程であって、縮合剤として１－エチル－３－（ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド又はその塩を用いることを特徴とする工程；及び

（Ｄ）（１Ｓ，９Ｓ）－１－アミノ－９－エチル－５－フルオロ－２，３－ジヒドロ－９－ヒドロキシ－４－メチル－１Ｈ，１２Ｈ－ベンゾ［ｄｅ］ピラノ［３’，４’：６，７］インドリジノ［１，２－ｂ］キノリン－１０，１３（９Ｈ，１５Ｈ）－ジオンの１位のアミノ基と、α－アミノ基がｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル基で保護された１個のアミノ酸のα－カルボキシル基又はＮ末端がｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル基で保護された２～８個のアミノ酸からなるオリゴペプチドのＣ末端カルボキシル基とを縮合した縮合体からｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル基を除去して得られる脱保護体と、カルボキシメチルデキストランポリアルコールとを縮合する工程であって、縮合剤として１－エチル－３－（ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド又はその塩を用いることを特徴とする工程

からなる群から選ばれる１以上の工程を含む方法。

９．請求の範囲第１項ないし第６項のいずれか１項に記載のＤＤＳ化合物の製造方法であって、下記の工程：

（Ａ）デキストランを含む水溶液に４℃±２℃の温度で過ヨウ素酸ナトリウムを含む水溶液を添加してデキストランを酸化した後、得られた反応液を１５℃以下の温度で水素化ホウ素ナトリウムを含む水溶液に添加してデキストランポリアルコールを得る工程；

（Ｂ）上記工程（Ａ）で得られたデキストランポリアルコールにモノクロロ酢酸ナトリウムを反応させてカルボキシメチルデキストランポリアルコールを製造する工程であって、カルボキシメチル化の反応終点をキャピラリー電気泳動法により決定することを特徴とする工程；

（Ｃ）（１Ｓ，９Ｓ）－１－アミノ－９－エチル－５－フルオロ－２，３－ジヒドロ－９－ヒドロキシ－４－メチル－１Ｈ，１２Ｈ－ベンゾ［ｄｅ］ピラノ［３’，４’：６，７］インドリジノ［１，２－ｂ］キノリン－１０，１３（９Ｈ，１５

H）－ジオンの１位のアミノ基と、α－アミノ基がｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル基で保護された１個のアミノ酸のα－カルボキシル基又はＮ末端がｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル基で保護された２～８個のアミノ酸からなるオリゴペプチドのＣ末端カルボキシル基とを縮合する工程であって、縮合剤として１－エチル－３－（ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド又はその塩を用いることを特徴とする工程；及び

（Ｄ）上記工程（Ｃ）で得られた縮合体からｔｅｒｔ－ブトキシカルボニル基を除去して得られる脱保護体と、カルボキシメチルデキストランポリアルコールとを縮合する工程であって、縮合剤として１－エチル－３－（ジメチルアミノプロピル）カルボジイミド又はその塩を用いることを特徴とする工程

を含む方法。

１０．請求の範囲第１項ないし第６項のいずれか１項に記載のＤＤＳ化合物の製造に用いるためのプルラン標準重量平均分子量が２４０，０００～４８０，０００の範囲であり、カルボキシメチル化度が０．２３～０．４７の範囲であるカルボキシメチルデキストランポリアルコール。

１１．請求の範囲第１項ないし第６項のいずれか１項に記載のＤＤＳ化合物の製造に用いるためのプルラン標準重量平均分子量が２４０，０００～４８０，０００の範囲であり、カルボキシメチル化度が０．１４～０．４７の範囲であるカルボキシメチルデキストランポリアルコール。

１２．請求の範囲第１項ないし第６項のいずれか１項に記載のＤＤＳ化合物の製造に用いるためのプルラン標準重量平均分子量が２４０，０００～４８０，０００の範囲であり、カルボキシメチル化度が０．１４～０．３８の範囲であるカルボキシメチルデキストランポリアルコール。

１３．上記カルボキシメチル化度が、標準物質であるカルボキシメチルデキストランポリアルコールを分解法又はＮＭＲ法で測定することにより得られる検量線を用いてキャピラリー電気泳動により測定されたカルボキシメチル化度である請求の範囲第１０項ないし第１２項のいずれか１項に記載のカルボキシメチルデキ

ストランポリアルコール。

１４．上記カルボキシメチル化度が、標準物質であるカルボキシメチルデキストランポリアルコールを分解法で測定することにより得られる検量線を用いてキャピラリー電気泳動により測定されたカルボキシメチル化度である請求の範囲第１０項に記載のカルボキシメチルデキストランポリアルコール。

１５．上記カルボキシメチル化度が、標準物質であるカルボキシメチルデキストランポリアルコールをＮＭＲ法で測定することにより得られる検量線を用いてキャピラリー電気泳動により測定されたカルボキシメチル化度である請求の範囲第１２項に記載のカルボキシメチルデキストランポリアルコール。

１６．請求の範囲第１０項ないし第１５項のいずれか１項に記載のカルボキシメチルデキストランポリアルコールの製造方法であって、

（Ａ）デキストランを含む水溶液に４℃±２℃の温度で過ヨウ素酸ナトリウムを含む水溶液を添加してデキストランを酸化した後、得られた反応液を１５℃以下の温度で水素化ホウ素ナトリウムを含む水溶液に添加してデキストランポリアルコールを得る工程；及び

（Ｂ）上記工程（Ａ）で得られたデキストランポリアルコールにモノクロロ酢酸ナトリウムを反応させてカルボキシメチルデキストランポリアルコールを製造する工程であって、カルボキシメチル化の反応終点をキャピラリー電気泳動法により決定することを特徴とする工程

を含む方法。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP01/05498

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
Int.Cl[7] C08B37/02, C07D491/22, A61K47/48, A61K31/4745, A61K47/36, A61P35/00

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] C08B37/02, C07D491/22, A61K47/48, A61K31/4745, A61K47/36, A61P35/00

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)
CA (STN), REGISTRY (STN), WPIDS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 97/46260 A (Daiichi Pharmaceutical Co., Ltd., et al.), 11 December, 1997 (11.12.97), & EP 916348 A	1-16

☐ 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
31 July, 2001 (31.07.01)	14 August, 2001 (14.08.01)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

国際調査報告	国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ０１／０５４９８

A.　発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

Ｉｎｔ　ｃｌ[7]　Ｃ０８Ｂ３７／０２，Ｃ０７Ｄ４９１／２２，Ａ６１Ｋ４７／４８，Ａ６１Ｋ３１／４７４５，Ａ６１Ｋ４７／３６，Ａ６１Ｐ３５／００

B.　調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

Ｉｎｔ　ｃｌ[7]　Ｃ０８Ｂ３７／０２，Ｃ０７Ｄ４９１／２２，Ａ６１Ｋ４７／４８，Ａ６１Ｋ３１／４７４５，Ａ６１Ｋ４７／３６，Ａ６１Ｐ３５／００

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

ＣＡ（ＳＴＮ），ＲＥＧＩＳＴＲＹ（ＳＴＮ），ＷＰＩＤＳ（ＳＴＮ）

C.　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー＊	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求の範囲の番号
Ｘ	ＷＯ　９７／４６２６０　Ａ（第一製薬株式会社ほか）１１．１２月．１９９７（１１．１２．９７）　＆　ＥＰ　９１６３４８Ａ	１－１６

☐ Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。　　☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊　引用文献のカテゴリー
「Ａ」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「Ｅ」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「Ｌ」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「Ｏ」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「Ｐ」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
「Ｔ」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「Ｘ」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Ｙ」特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「＆」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
３１．０７．０１	14.08.01

国際調査機関の名称及びあて先	特許庁審査官（権限のある職員）		
日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ） 郵便番号１００－８９１５ 東京都千代田区霞が関三丁目４番３号	内藤　伸一	４Ｐ	８６１５
	電話番号　０３－３５８１－１１０１　内線　３４９２		

様式ＰＣＴ／ＩＳＡ／２１０（第２ページ）（１９９８年７月）

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
20 February 2003 (20.02.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/013602 A1

(51) International Patent Classification[7]: A61K 39/395, 47/48, G01N 33/577, 33/574, A61P 35/00, G01N 33/50, C12N 5/20, C07K 16/28

(21) International Application Number: PCT/EP02/08938

(22) International Filing Date: 9 August 2002 (09.08.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
01 119 260.6 9 August 2001 (09.08.2001) EP

(71) Applicant *(for all designated States except US)*: **MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V.** [DE/DE]; Hofgartenstrasse 8, 80539 München (DE).

(72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants *(for US only)*: **ULLRICH, Axel** [DE/DE]; Brunnstrasse 5, 80331 München (DE). **HTUN-VAN DER HORST, Edward** [DE/DE]; Blumenstrasse 23, 80331 München (DE).

(74) Agents: **WEICKMANN & WEICKMANN** et al.; Postfach 860 820, 81635 München (DE).

(81) Designated States *(national)*: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States *(regional)*: ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declaration under Rule 4.17:
— *of inventorship (Rule 4.17(iv)) for US only*

Published:
— *with international search report*
— *with (an) indication(s) in relation to deposited biological material furnished under Rule 13bis separately from the description*

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 03/013602 A1

(54) Title: INHIBITORS OF HER3 ACTIVITY

(57) Abstract: The present invention relates to a pharmaceutical composition comprising as an active agent an inhibitor of HER3 activity, particularly an anti-HER3- antibody. Further, the use of this composition for the diagnosis, prevention or treatment of hyperproliferative diseases, particularly tumor diseases is disclosed.

Inhibitors of HER3 activity

Description

The present invention relates to a pharmaceutical composition comprising as an active agent an inhibitor of HER3 activity, particularly an anti-HER3-antibody. Further, the use of this composition for the diagnosis, prevention or treatment of hyperproliferative diseases, particularly tumor diseases is disclosed.

Protein tyrosine kinases are known to be enzymes, which mediate signal transduction processes that regulate cell growth and differentiation. Receptor protein tyrosine kinases act via ligand-stimulated tyrosine phosphorylation of substrates. HER3 (also called ErbB3) is a member of the epidermal growth factor receptor (EGFR) subfamily of receptor protein tyrosine kinases (Plowman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87 (1990), 4905-4909; Kraus et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86 (1989), 9193-9197 and Kraus et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90 (1993), 2900-2904).

HER3 has been found to be overexpressed in several types of cancer such as breast, gastrointestinal and pancreatic cancers. When HER3 is co-expressed with HER2, another member of the EGFR subfamily of receptor protein tyrosine kinases, an active heterodimeric signalling complex is formed.

A monoclonal antibody against HER3 (Rajkumar et al., Br. J. Cancer 70 (1994), 459-456) had an agonistic effect on the anchorage-independent growth of cell lines expressing HER3. On the other hand, anti-HER3 antibodies described in U.S. patent 5,968,511 (corresponding to WO 97/35885) are reported to reduce Heregulin-induced formation of

HER2/HER3 heterodimers. Such an activity, however, is only demonstrated for an antibody which increases Heregulin binding to HER3. Thus, it is not clear which type of anti-HER3-antibody - if any - has potential of being used for therapeutic applications.

Vadlamudi et al. (Oncogenes 18 (1999), 305-314) describe the regulation of the cyclooxygenase (COX-2) pathway by the HER2 receptor. It was found that a specific inhibitor of COX-2 can suppress the mitogenic and invasive action of colorectal cancer cells. Further, it was found that incubation with a monoclonal anti-HER3 antibody leads to a reduction in the levels HER2/HER3 heterodimers, but results in an only partial reduction of COX-2 expression.

WO 00/31048 discloses a quinazoline derivative which acts as an inhibitor of receptor tyrosine kinases such as EGFR, HER2 and HER4. An inhibition of HER3 is however not disclosed.

WO 00/78347 discloses methods for arresting or inhibiting cell growth, comprising preventing or reducing ErbB-2/ErbB-3 heterodimer formation. For example, the agent may be a combination of an anti-HER2 extracellular domaine antibody and an anti-HER3 antibody, e.g. the HER3 antibody H3.105.5 purchased from Neomarkers. It is however not clear which type of anti-HER3 antibody is required to obtain desirable therapeutic effects.

US-patent 5,804,396 describes a method for identifying an agent for treatment of a proliferative disorder, comprising the steps of assaying a potential agent for activity in inhibition of signal transdcution by a HER2/HER3 or HER2/HER4 or HER3/HER4 heterodimer. Specific HER3 inhibitors are not dislcosed.

We compared the biological properties of Herceptin, an agonistic monoclonal antibody against HER2 with anti-HER3-antibodies, namely (i) α-

HER3-ECD, a murine monoclonal antibody IgG1, Upstate Biotechnology, Cat.No.# 05-471, directed against the Heregulin binding site of HER3, (ii) antibody 1B4C3 from our laboratory and (iii) antibody 2D102 also from our laboratory, in invasive breast cancer cell lines MCR-7 (DKFZ Heidelberg), MDA-MB-468 (ATCC HTB-132) and MDA-MB231 (ATCC HTB-26) expressing different HER2:HER3 ratios. We provide evidence that pretreating the breast cancer cell lines with anti-HER3-antibody prior to α/ß-Heregulin (α/ß-HRG) stimulation diminished the HER2/HER3 tyrosine phosphorylation content in contrast to Herceptin. In addition, anti-HER3-antibody abrogated HER2/HER3 heterodimerization and also reduced the complex formation of the p85 subunit of PI_3-kinase and the adaptor protein SHC with HER3, resulting in decreased PI_3-kinase and c-jun-terminal kinase activity (JNK), respectively. In comparison to Herceptin, anti-HER3-antibody was also capable of downregulating extracellular signal-regulated kinase 2 (ERK2) after α/ß-HRG stimulation. Furthermore, we demonstrate a significant reduction of the migratory and proliferative property of the breast cancer cell lines after pretreatment with anti-HER3-antibody. Our data clearly show that αn anti-HER3-antibody is more potent in diminishing signal transduction processes after HRG stimulation than Herceptin. Furthermore, in specific cancer types, e.g. melanoma, anti-HER3 antibodies are effective in reducing migratory and proliferative properties while anti-HER2 antibodies do not show any significant effect at all. These data demonstrate the great potential of anti-HER3 antibodies or other HER3 inhibitors for the therapy of breast cancer and other malignancies characterized by hypersignalling through HER3 and its heterodimerization partners.

Thus, the present invention relates to a pharmaceutical composition comprising as an active agent a specific type of inhibitor of HER3 activity and pharmaceutically acceptable carriers, diluents and/or adjuvants. The HER3 inhibitor of the invention is characterized in that binding of the inhibitor to HER3 reduces HER3 mediated signal transduction. In one

embodiment a reduction of HER3 mediated signal transduction may be caused by a downregulation of HER3 resulting in an at least partial disappearance of HER3 molecules from the cell surface. In a further embodiment of the invention the reduction of HER3 mediated signal transduction may be caused by a stabilization of HER3 on the cell surface in a substantially inactive form, i.e. a form which exhibits a lower signal transduction compared to the non-stabilized form.

The inhibitor of the invention may influence the binding of Heregulin to HER3, particularly by decreasing the binding of Heregulin to HER3. In other embodiments, however, the inhibitor may not compete with the binding of Heregulin to HER3.

In a preferred embodiment the inhibitor is an anti-HER3-antibody. Preferably, the antibody is directed against the extracellular domain of HER3. It should be noted, however, that also other HER3 inhibitors, particularly low molecular weight inhibitors, e.g. peptides or organic compounds may be used.

According to the invention, the term "antibody" covers monoclonal antibodies, polyclonal antibodies, multispecific antibodies (e.g. bispecific antibodies) formed from at least two antibodies and antibody fragments as long as they exhibit the desired activity.

The antibody may be a monoclonal antibody which may be obtained by the hybridoma method as described by Köhler et al. (Nature 256 (1975), 495) or by recombinant DNA methods (cf. e.g. U.S.Patent 4,816,567). Monoclonal antibodies may also be isolated from phage antibody libraries using techniques described in Clackson et al. (Nature 352 (1991), 624-628) and Marks et al. (J.Mol.Biol.222 (1991), 581-597). The antibody may be an IgM, IgG, e.g. IgG1, IgG2, IgG3 or IgG4.

Antibody fragments comprise a portion of an antibody, generally the antigen binding or variable region of the intact antibody. Examples of antibody fragments include Fab, Fab', $F(ab')_2$ and Fv fragments, diabodies, single chain antibody molecules and multispecific antibody fragments.

Particularly, the antibody may be a recombinant antibody or antibody fragment, more particularly selected from chimeric antibodies or fragments thereof (Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81 (1984), 6851-6855), humanized antibodies (Jones et al., Nature 321 (1986), 522-525; Riechmann et al., Nature 332 (1988), 323-329 and Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2 (1992), 593-596), single chain Fv antibodies (Plücktuhn in: The Pharmacology of Monoclonal Antibodies 113, Rosenburg and Moore, EDS, Springer Verlag, N.Y. (1994), pp. 269-315) and diabodies (Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90 (1993), 6444-6448).

In an especially preferred embodiment the antibody is selected from antibodies 1B4C3 (IgG2a) and 2D1D12 (IgG1) produced by the hybridoma cell lines DSM ACC 2527 or DSM ACC 2517, fragments thereof or recombinant derivatives thereof. 1B4C3 is an antibody which leads to internalization of HER3 and 2D1D12 is an antibody which leads to stabilization of HER3. Further preferred are antibodies, e.g. chimeric or humanized antibodies or fragments thereof, which have substantially the same biological activity (e.g. as described in the Examples) compared to the antibodies produced by the deposited hybridoma cell lines, for example, by binding to the same epitope on HER3. The hybridoma cell line DSM ACC 2517 was deposited under the Budapest Treaty for the Deposit of Microorganisms on July 24, 2001 at Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Mascheroder Weg 1b, 38124 Braunschweig, Germany. The hybridoma cell line DSM ACC 2527 producing the antibody 1B4C3 was deposited on August 07, 2001 at DSMZ.