

часть константной области иммуноглобулина (Fc), как правило, иммуноглобулина человека. Более подробное описание смотри Jones et al. (1986) Nature, 321:522-525; Riechmann et al. (1988) Nature 332:323-329; и Presta, (1992) Curr. Op. Struct. Biol., 2:593-596.

Гуманизированные антитела против ErbB2 включают huMAb4D5-1, huMAb4D5-2, huMAb4D5-3, huMAb4D5-4, huMAb4D5-5, huMAb4D5-6, huMAb4D5-7 и huMAb4D5-8 (ГЕРЦЕПТИН®, трастузумаб), как описано в табл.3 патента США № 5821337, приведенного в данный документ в качестве ссылки в полном объеме; гуманизированные антитела 520C9 (WO 93/21319) и 2C4.

«Выделенное» антитело представляет собой антитело, идентифицированное и выделенное и/или восстановленное из компонентов природного окружения. Загрязняющие компоненты природного окружения представляют собой вещества, препятствующие диагностическому или терапевтическому применению антитела и могут включать в себя ферменты, гормоны и другие белковые и небелковые растворенные вещества. Антитела можно очищать (1) до более чем 95% мас. антитела, например, по методу Лоури, или более чем 99% мас. (2) до степени, достаточной для получения по меньшей мере 15 остатков N-концевой или внутренней аминокислотной последовательности, используя белковый секвестер с вращающимися чашками, или (3) до гомогенности, используя SDS-PAGE в восстанавливающих или невосстанавливающих условиях с окрашиванием Кумаси синим или серебром. К выделенному антителу относится антитело *in situ* в рекомбинантных клетках, так как отсутствует по меньшей мере один компонент природного окружения антитела. Однако обычно выделенное антитело получают посредством по меньшей мере одной стадии очистки.

Антитело «связывающее» представляющий интерес антиген, например, антиген ErbB2, представляет собой антитело, способное связывать этот антиген с достаточной аффинностью так, чтобы это антитело можно было использовать для выявления клетки, экспрессирующей антиген. Когда антитело представляет собой антитело, связывающее ErbB2, то, как правило, оно предпочтительно связывает ErbB2, в отличие от других рецепторов ErbB, и может быть антителом, у которого отсутствует значительная перекрестная реактивность с другими белками, такими как EGFR, ErbB3 или ErbB4. В таких вариантах осуществления степень связывания антитела с белками, не являющимися ErbB2 (например, связывание клеточной поверхности с эндогенным рецептором), составляет меньше 10%, как, например, определяют анализом сортировки активированных флуоресценцией клеток (FACS) или радиоиммунопреципитацией (RIA). Иногда антитело против ErbB2 не обладает значительной перекрестной реактивностью с белком крысы *neu*, например, как описано Schechter et al. (1984) Nature 312:513 и Drebin et al. (1984) Nature, 312:545-548.

Антитело, которое «блокирует» активацию рецептора ErbB лигандом, снижает или предотвращает такую активацию, где антитело способно блокировать активацию рецептора ErbB лигандом значительно более эффективно, чем моноклональное антитело 4D5, например, приблизительно так же эффективно, как моноклональные антитела 7F3 или 2C4 или их Fab-фрагменты. Например, антитело, которое блокирует активацию рецептора ErbB лигандом, может представлять собой антитело, которое приблизительно на 50-100% более эффективно, блокирует формирование гетероолигомера, чем 4D5. Блокирование активации рецептора ErbB лигандом может происходить любыми способами, например, влияя на связывание лиганда с рецептором ErbB, образование комплекса ErbB, на тирозинкиназную активность рецептора ErbB в комплексе ErbB и/или на фосфорилирование тирозинкиназного остатка(ов) в рецепторе ErbB или рецептором ErbB.

Антитело с «биологическим свойством» указанного антитела, такого как моноклональное антитело, обозначенное 2C4 (OmniTag, Genentech, Inc.), представляет собой антитело, обладающее одним или несколькими биологическими свойствами этого антитела, которые отличают его от других антител, которые связывают тот же антиген (например, ErbB2). Например, антитело с биологическим свойством 2C4 может блокировать активацию HRG гетероолигомера ErbB, содержащего ErbB2 и ErbB3, ErbB1 или ErbB4; блокировать EGF, TGF- α , HB-EGF, эпирегулиновую и/или амфирегулиновую активацию рецептора ErbB, содержащего EGFR и ErbB2; блокировать опосредованную EGF, TGF- α и/или HRG активацию MAPK; и/или связывать на внеклеточном домене ErbB2 тот же эпитоп, который связывает 2C4 (например, которое блокирует связывание моноклонального антитела 2C4 с ErbB2).

Если не указано иначе, выражение «моноклональное антитело 2C4» относится к антителу, несущему антигенсвязывающие остатки антитела 2C4 мыши или антигенсвязывающие остатки, полученные из антитела 2C4 мыши, из примеров ниже. Например, моноклональное антитело 2C4 может представлять собой мышинное

моноклональное антитело 2C4 или его вариант, такое как гуманизированное антитело 2C4, несущее антигенсвязывающие аминокислотные остатки моноклонального антитела 2C4 мыши (WO 01/00245). Если не указано иначе, выражение «huMAb 2C4», используемое в настоящем документе, относится к антителу, содержащему последовательности вариабельного домена легкой цепи (VL) и вариабельного домена тяжелой цепи (VH) SEQ ID NO:3 и 4, соответственно, слитого с последовательностями константных областей тяжелых и легких цепей IgG1 человека (аллотип не-A), необязательно, экспрессируемых клетками яичника китайского хомяка (CHO) (WO 01/00245).

Если не указано иначе, термин «моноклональное антитело 4D5» относится к антителу, несущему антигенсвязывающие остатки антитела 4D5 мыши (ATCC CRL 10463). Например, моноклональное антитело 4D5 может представлять собой моноклональное антитело 4D5 мыши или его вариант, такой как гуманизированное антитело 4D5, несущее антигенсвязывающие аминокислотные остатки моноклонального антитела 4D5 мыши. Иллюстративные гуманизированные антитела 4D5 включают huMAb4D5-1, huMAb4D5-2, huMAb4D5-3, huMAb4D5-4, huMAb4D5-5, huMAb4D5-6, huMAb4D5-7 и huMAb4D5-8 (ГЕРЦЕПТИН®), как, например, в патенте США № 5821337.

«Ингибирующее рост средство» относится к соединению или композиции, ингибирующему рост клетки, например раковых клеток, экспрессирующих ErbB, *in vitro* или *in vivo*. Таким образом, ингибирующее рост средство может представлять собой средство, значительно снижающее долю клеток, экспрессирующих ErbB, в S-фазе. Примеры ингибирующих рост средств включают средства, блокирующие прохождение клеточного цикла (на любой стадии, кроме S-фазы), такие как средства, индуцирующие остановку клеточного цикла в G1 и в M-фазе (The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn and Israel, eds., глава 1, озаглавленная «Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs» под редакцией Murakami et al. (WB Saunders: Philadelphia, 1995), особенно стр. 13). Примеры «ингибирующих рост» антител представляют собой антитела, связывающиеся с ErbB2 и ингибирующие рост раковых клеток, сверхэкспрессирующих ErbB2. Ингибирующие рост антитела против ErbB2 могут ингибировать рост клеток опухоли молочной железы SK-BR-3 в клеточной культуре более чем на 20% или более чем на 50% (например, приблизительно от 50% до приблизительно 100%) при концентрации антитела приблизительно от 0,5 до 30 мкг/мл, где ингибирование роста определяют через шесть суток после воздействия антитела на клетки SK-BR-3 (патент США № 5677171).

Антитело, которое «индуцирует клеточную гибель», представляет собой антитело, являющееся причиной того, что жизнеспособные клетки становятся нежизнеспособными. Клетка, как правило, представляет собой клетку, экспрессирующую рецептор ErbB2, особенно клетку, сверхэкспрессирующую рецептор ErbB2. Клетка может представлять собой раковую клетку, например опухолевую клетку рака молочной железы, яичника, желудка, эндометрия, слюнной железы, легкого, почки, толстой кишки, щитовидной железы, поджелудочной железы или мочевого пузыря. *In vitro* клетка может представлять собой клетку SK-BR-3, BT474, Calu 3, MDA-MB-453, MDA-MB-361 или SKOV3. Клеточную гибель *in vitro* можно определять в отсутствие комплемента и эффекторных иммунных клеток для отличия гибели клеток, вызванной антитело-зависимой клеточной цитотоксичностью (ADCC) от гибели клеток, вызванной цитотоксичностью комплемента (CDC). Таким образом, анализ на клеточную гибель можно проводить с применением инактивированной нагреванием сыворотки (то есть в отсутствие комплемента) и в отсутствие эффекторных иммунных клеток. Для определения того, способно ли антитело индуцировать клеточную гибель можно оценивать нарушение целостности мембраны по захвату йодида пропидия (PI), трипанового синего (см. Moore et al. (1995) Cytotechnology, 17:1-11) или 7AAD по сравнению с необработанными клетками. Антитела, индуцирующие клеточную гибель, представляют собой антитела, которые индуцируют захват PI в анализе захвата PI клетками BT474 (см. ниже).

Антитело, «индуцирующее апоптоз», представляет собой антитело, индуцирующее программируемую клеточную гибель, что определяют по связыванию аннексина V, фрагментации ДНК, сморщиванию клетки, расширению эндоплазматического ретикулума, фрагментации клетки и/или образованию мембранных везикул (называемых апоптозными тельцами). Как правило, клетка представляет собой клетку, сверхэкспрессирующую рецептор ErbB2, включая опухолевую клетку, например, молочной железы, яичника, желудка, эндометрия, слюнной железы, легкого, почки, толстой кишки, щитовидной железы, поджелудочной железы или

мочевого пузыря. *In vitro* клетка может представлять собой клетку SK-BR-3, BT474, Calu 3, MDA-MB-453, MDA-MB-361 или SKOV3.

Термины «лечить» или «лечение» относятся как к терапевтическому лечению, так и к профилактическим или превентивным мерам, где у индивидуума необходимо предотвратить или замедлить (уменьшить) нежелательное физиологическое изменение или нарушение, такое как развитие или распространение злокачественной опухоли. Для целей настоящего изобретения благоприятные или желательные клинические результаты включают в качестве неограничивающих примеров частичное снижение симптомов, уменьшение распространения заболевания, стабилизирование (то есть отсутствие ухудшения) состояния заболевания, задержку или замедление прогрессирования заболевания, улучшение или облегчение состояния заболевания и ремиссию (частичную или полную). «Лечение» также может означать увеличение продолжительности жизни по сравнению с ожидаемой продолжительностью жизни в отсутствие лечения. Индивидуумы, нуждающиеся в лечении, включают тех больных с соответствующим состоянием или нарушением, а также индивидуумов, которые предрасположены к возникновению состояния или нарушения, или индивидуумов, у которых требуется профилактика соответствующего состояния или нарушения.

«Нарушение» представляет собой любое состояние, для которого было бы эффективно лечение по настоящему изобретению. Нарушение включает хронические и острые нарушения или заболевания, включающие в себя патологические состояния, которые предрасполагают к развитию к рассматриваемому заболеванию. Неограничивающие примеры нарушений, для которых в данном случае лечение могло бы иметь эффект, включают доброкачественные и злокачественные опухоли; лейкоэмические и лимфопатические злокачественные заболевания; в частности, рак молочной железы, яичника, желудка, эндометрия, слюнной железы, легкого, почки, толстой кишки, щитовидной железы, поджелудочной железы, предстательной железы или мочевого пузыря; нейрональные, глиальные, астроцитарные, гипоталамические нарушения и нарушения, связанные с другими железами, макрофагальные, эпителиальные, стромальные и бластные нарушения; и воспалительные, ангиогенные и иммунологические нарушения. Пример нарушения, для которого эффективно лечение по настоящему изобретению, представляет собой солидную злокачественную опухоль.

Термин «терапевтически эффективное количество» относится к количеству лекарственного средства, эффективному для лечения заболевания или нарушения у млекопитающего. В случае рака терапевтически эффективное количество лекарственного средства может: (i) уменьшать число раковых клеток; (ii) уменьшать размер опухоли, (iii) ингибировать, тормозить, до некоторой степени замедлять и предпочтительно останавливать, инфильтрацию раковых клеток в периферические органы; (iv) ингибировать (то есть до некоторой степени замедлять и предпочтительно останавливать) метастазирование опухоли; (v) ингибировать рост опухоли и/или (vi) до некоторой степени ослаблять один или несколько симптомов, связанных с раком. По степени предотвращения роста клеток и/или уничтожения существующих клеток лекарственное средство может быть цитостатическим и/или цитотоксическим. В моделях на животных эффективность можно оценивать физическими измерениями опухоли в период введения ADC и определенном частичной или полной ремиссии опухоли. Для терапии рака эффективность можно измерять, например, оценкой времени прогрессирования заболевания (TTP) и/или определенном процента отклика (RR).

Термин «биодоступность» относится к системной доступности (то есть уровням в крови/плазме) данного количества лекарственного средства, вводимого пациенту. Биодоступность представляет собой безусловный термин, означающий измерение времени (скорости) и общего количества (объема), которое лекарственное средство достигает в общей циркуляции при вводимой лекарственной форме.

Термины «рак» и «раковый» относятся к или ими обозначают физиологическое состояние млекопитающих, которое, как правило, характеризуется как нерегулярным клеточным ростом. «Опухоль» содержит одну или несколько злокачественных клеток. Неограничивающие примеры рака включают карциному, лимфому, бластому, саркому и лейкоэмические или лимфопатические злокачественные заболевания. Более конкретные примеры таких злокачественных опухолей включают плоскоклеточный рак (например, эпителиальный плоскоклеточный рак), рак легких, включая мелкоклеточный рак легких, немелкоклеточный рак легких («NSCLC»), 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, 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; ИHC). 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 ИHC, FISH, саузерн-блоттинг, ПЦР или описанными выше анализами *in vivo*. Также сверхэкспрессию рецептора ErbB можно исследовать, измеряя «слушающийся» 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 $1-2 \times 10^6$ 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+ ($1-2 \times 10^6$ 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 гормоннезависимых 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 гормонустойчивой 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}Co 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), сугент (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 липосульфан; азиридины, такие как бензодопа, карбоксон, метуредопа и уредопа; этиленимины и метиламеламины, включающие в себя алтеретамин, триэтиленмеламин, триэтиленфосфорамид, триэтиленфосфорамид и триметилмеламин; ацетогенины (особенно буллатин и буллатинон); камптотецин (включая синтетический аналог топотекан); бриостатин; каллистатин; CC-1065 (включая его адозелезиновые, карзелезиновые и бизелезиновые синтетические аналоги); криптофицины (особенно криптофицин I и криптофицин 8); доластатин; дуокармицин (включая синтетические аналог, KW-2189 и CB1-TM1); элеутеробин; панкреатистатин; саркодиктин; спонгистатин; азотистые нитриты, такие как хлорамбуцил, хлорнафазин, голофосфамид, эстрамустин, ифосфамид, мехлоретамин, гидрохлорид оксида мехлоретамина, мелфалан, новембихин, фенэстерин, преднимустин, трофосфамид, урациловый нитрит; производные нитрозомочевины, такие как кармустин, хлорозотоцин, фотемустин, ломустин, нимустин и ранимустин; антибиотики, такие как гликозидные антибиотики (например, калихимицин, особенно калихимицин гаммаII и калихимицин омегаII (Angew Chem Intl. Ed. Engl. (1994) 33:183-186); динемин, включая динемин А; бисфосфонаты, такие как хлоронат; эспермицин; а также хромофор неокарциностантин и родственные хромопротеиновые ендонуклеазные антибиотические хромофоры), аклациномизины, актиномицин, аутрамицин, азасерин, блеомицины, кантиномицин, карабицин, карминомицин, акрицинофиллин, хромомицины, дактиномицин, даунорубин, дезорубин, 6-диазо-5-оксо-L-норлейцин, доксорубин АДРИАМИЦИН (ADRIAMYCIN®) (включая морфолинодоксорубин, цианоморфолинодоксорубин, 2-пирролинодоксорубин и дезоксидоксорубин), эпирубин, эзрубин, идарубин, марцеломин, митомицины, такие как митомицин С, микофеноловую кислоту, ногаламицин, оливомизины, лепломизин, потфиромицин, пуромизин, квеламицин, родорубин, стрептогрин, стрептозоцин, теберцидин, убенимекс, зиностатин, зорубин; антиметаболиты, такие как метотрексат и 5-фторурацил (5-FU); аналоги фолиевой кислоты, такие как деноптерин, метотрексат, птероптерин, триметотрексат; аналоги пурина, такие как флударабин, 6-меркаптопурин, тиамиприн, тиногуанин, аналоги пиримидина, такие как анцитабин, азациитидин, 6-азауридин, кармофур, цитарабин, дидезокснурин, доксифлуридин, эноцитабин, флоксурин; андрогены, такие как калустерон, дромостанолон пропионат, эпитиостанол, мапистанолон, тестостерон; антиадреналовые средства, такие как аминоглютегид, митотан, трилостан; компенсаторы фолиевой кислоты, такие как фуролиновую кислоту; ацеллатон; альдофосфамид гликозид; аминоклевулиновую кислоту; енилурацил; амсакрин; бестрабуцил; бизантрин; эдотраксат; дефофамин; демсколин; диазиксон; элфортин; эллиптиум ацетат; эпотион; этоглюцид; нитрат галлия; гидроксимочевину; лентинан; лонидайнин; майтанзиноиды, такие как майтанзин и

анзамитоцины; митогуазон; митоксантрон; мопиданмол; нитраерин; пентостатин; фенамет; пирарубицин; лозоксантрон; подофилиновую кислоту; 2-этилгидразид; прокарбадин; полисахаридный комплекс PSK® (JHS Natural Products, Eugene, OR); разоксан; ризоксин; сизофиран; спирогерманий; тенуазоновую кислоту; триазиквон; 2,2',2"-трихлортриэтиламин; трихотесны (особенно токсин Т-2, верракурин А, роридин А и ангуидин); урстан; виндесин; дакарбазин; манномустин; митобронитол; митолактол; пипоброман; гацитозин; арабинозид («Ага-С»); циклофосфамид; тиотепа; таксонды, 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, Schaumburg, 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; теннипозид; эдатрексат; дауномицин; аминоптерин; кселода; ибандронат; CPT-11; ингибитор топоизомеразы RFS 2000; дифформетилорнитин (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, амноглютетимид, 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-диоксолоановый 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 ЛУРТТЕКАН (LURTOTECAN®); гнRH 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 MAб 579 (ATCC CRL HB 8506), MAб 455 (ATCC CRL HB8507), MAб 225 (ATCC CRL 8508), MAб 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 gefitinib (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)-7Н-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 (AstraZeneca); PTK-787 (Novartis/Schering AG); ингибиторы всех видов ErbB, такие как CI-1033 (Pfizer); аффинитак (ISIS 3521; Isis/Lilly); иматиниб 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 сосуда 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-метнионил гормон роста человека и бычий гормон роста; паратиреоидный гормон; тироксин; инсулин; проинсулин; релаксин; прорелаксин; гликопротеиновые гормоны, такие как фолликулстимулирующий гормон (FSH), тиреотропный гормон (TSH) и лютеинизирующий гормон (LH); фактор роста печени; фактор роста фибробластов; пролактин; плацентарный лактоген; фактор некроза опухоли- α и - β ; миеллерова ингибирующая субстанция; ассоциированный с мышинным гонадотропным пептид; ингибин; активин; фактор роста сосуда эндотелия; интергирин; 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-1 α , 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 феноксиацетамидами, или пролекарственные средства, содержащие необязательно замещенные фенилацетамидами, 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]-этанолдигидрофосфата, 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 Е; аскорбиновая кислота (витамин С); акцепторы свободных радикалов, такие как олеиновая 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); селеноорганические 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 C₁-C₁₈-углеводород, содержащий обычные, вторичные, третичные или циклические атомы углерода. Примеры алкильных радикалов включают C₁-C₈-углеводородные группы, в качестве неограничивающих примеров, такие как метильная (Me, -CH₃), этильная (Et, -CH₂CH₃), 1-пропильная (n-Pr, н-пропил, -CH₂CH₂CH₃), 2-пропильная (i-Pr, изопропил, -CH(CH₃)₂), 1-бутильная (n-Bu, н-бутил, -CH₂CH₂CH₂CH₃), 2-метил-1-пропильная (i-Bu, изобутил, -CH₂CH(CH₃)₂), 2-бутильная (s-Bu, втор-бутил, -CH(CH₃)CH₂CH₃), 2-метил-2-пропильная (t-Bu, трет-бутил, -C(CH₃)₃), 1-пентильная (н-пентил, -CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃), 2-пентильная (-CH(CH₃)CH₂CH₂CH₃), 3-пентил (-CH(CH₃)CH₂CH₂CH₂CH₃), 2-метил-2-бутильная (-C(CH₃)₂CH₂CH₃), 3-метил-2-бутильная (-CH(CH₃)CH(CH₃)CH₂CH₃), 3-метил-1-бутильная (-CH₂CH₂CH(CH₃)CH₃), 2-метил-1-бутильная (-CH₂CH(CH₃)CH₂CH₃), 1-гексильная (-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃), 2-гексильная (-CH(CH₃)CH₂CH₂CH₂CH₃), 3-гексильная (-CH(CH₃)CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃), 2-метил-2-пентильная (-C(CH₃)₂CH₂CH₂CH₃), 3-метил-2-пентильная (-CH(CH₃)CH(CH₃)CH₂CH₃), 4-метил-2-пентильная (-CH(CH₃)CH₂CH(CH₃)₂), 3-метил-3-пентильная (-C(CH₃)(CH₂CH₃)₂), 2-метил-3-пентильная (-CH(CH₂CH₃)CH(CH₃)₂), 2,3-диметил-2-бутильная (-C(CH₃)₂CH(CH₃)₂), 3,3-диметил-2-бутильная (-CH(CH₃)C(CH₃)₃).

«Алкенил» представляет собой C₂-C₁₈-углеводород, содержащий обычные, вторичные, третичные или циклические атомы углерода по меньшей мере с одной ненасыщенной связью, то есть двойной sp²-связью углерод-углерод. Примеры алкенильных радикалов включают C₂-C₈-углеводородные группы, в качестве

неограничивающих примеров, такие как этилен или винил ($-\text{CH}=\text{CH}_2$), аллил ($-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$), циклопентил ($-\text{C}_5\text{H}_7$) и 5-гексенил ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$).

«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 ($-\text{C}\equiv\text{CH}$) и пропаргиловая ($-\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$).

«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 ($-\text{CH}_2-$), 1,2-этиленовая ($-\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 1,3-пропиленовая ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 1,4-бутиленовая ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$) 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 ($-\text{C}\equiv\text{C}-$), пропаргиловую ($-\text{CH}_2\text{CHC}-$) и 4-пентиниловую ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{C}-$).

«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, нафтобензил, 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-бензимидазолметил, 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⁻, -NR₂, -NR₃, =NR, -CX₃, -CN, -OCN, -SCN, -N=C=O, -NCS, -NO, -NO₂, =N₂, -N₃, -NC(=O)R, -C(=O)R, -C(=O)NR₂, -SO₃⁻, -SO₃H, -S(=O)₂R, -OS(=O)₂OR, -S(=O)₂NR, -S(=O)R, -OP(=O)(OR)₂, -P(=O)(OR)₂, -PO₃⁻, -PO₃H₂, -C(=O)R, -C(=O)X, -C(=S)R, -CO₂R, -CO₂⁻, -C(=S)OR, -C(=O)SR, -C

(=S)SR, -C(=O)NR₂, -C(=S)NR₂, -C(=NR)NR₂, где каждый X независимо представляет собой галоген: F, Cl, Br или I; и каждый R независимо представляет собой H, C₁-C₁₈-алкил, C₆-C₂₀-арил, C₃-C₁₄-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 антигено к лекарственному веществу. В различных вариантах осуществления линкер указан как L. Линкеры включают бивалентный радикал, такой как алкилен, арилен, гетероарил, группы, такие как -(CR₂)_nO(CR₂)_n-, повторяющиеся единицы алкилокси (например, полиэтиленокси, PEG, полиметилэнокси) 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 реакционной способностью. 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 эквимольной 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 паноат (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.

КОНЬЮГАТЫ 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 майтаназонидным 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 майтаназонидное 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. Майтаназонидное 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 майтаназонидного лекарственного средства ADC можно окислять до сульфоновой или сульфоксидной группы. Протоны на атомах углерода, связанных с сульфеном 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:



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) BMPRIВ (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, NPT1b, 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 потенциалный 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 В-клетки фактора, рецептор BLYS 3, BR3, NP_443177.1);
- (27) CD22 (изоформа В-клеточного рецептора CD22-B, NP-001762.1);
- (28) CD79a (CD79A, CD79α, ассоциированный с иммуноглобулинами альфа, специфичный для В-клеток белок, ковалентно взаимодействующий с Ig бета (CD79B) и образующий комплекс на поверхности с молекулами IgM, переносит сигнал, вовлеченный в дифференцировку В-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 МНС класса II (антиген Ia), связывающая пептиды и представляющая их CD4+ Т-лимфоцитам, инвентарный номер Genbank NP_002111.1);
- (31) P2X5 (пуриnergический 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 В-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 В-клеток, потеря функции ассоциирована с увеличенной активностью

8383 of 10951

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

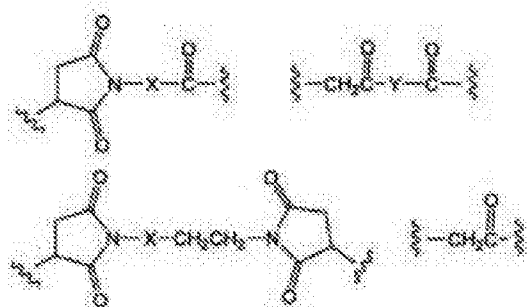
(34) FcRH1 (белок подобный рецептору Fc 1, предполагаемый рецептор домена Fc иммуноглобулинов, содержащий подобные Ig и ITAM домены типа C2, может играть роль в дифференцировке В-лимфоцитов, инвентарный номер Genbank NP_443170.1);

(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, инвентарный номер Genbank NP_112571.1); и

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

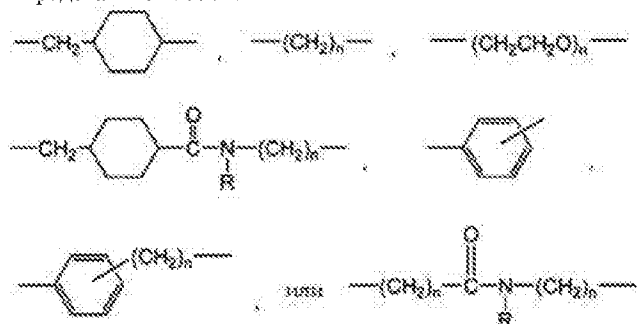
при условии, что антитело не представляет собой ТА.1.

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:

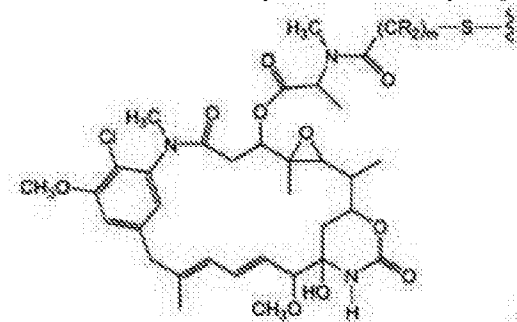


Y представляет собой



R независимо представляет собой H или C₁-C₆-алкил; а n равно от 1 до 12;

D представляет собой майтазиноидное лекарственное средство. Майтазиноиды включают в качестве неограничивающих примеров структуру:



где волнистая линия обозначает ковалентную связь с L;

R независимо представляет собой H или C₁-C₆-алкил; и

m равно 1, 2 или 3.

Соотношение лекарства и антитела или нагрузки лекарственным средством для соединений формулы 1 представлено посредством p. Значение нагрузки

лекарственным средством р 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 митотического 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 (ТАА), 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 (ТАА). 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 известен 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) BMPRIВ (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 у+), 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, NPTIb, 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 Nlog, 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, PCANAPI, 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, CRI, CRGF, CRIPTO, TDGF1, полученный из тератокарциномы фактор роста, инвентарный номер Genbank NP_003203 или NM_003212);

Ciccocioppa, 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, CD79 β , Igb (ассоциированный с иммуноглобулином бета), B29, инвентарный номер Genbank NM_000626 или I1038674);

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; AAN17023.1; BC017023_1

(20) IL20Rα (IL20Rα, 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, BEHAV, 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, Nek5, 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 В-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 В-клеток белок, ковалентно взаимодействующий с Ig бета (CD79B) и образующий комплекс на поверхности с молекулами IgM, переносит сигнал, вовлеченный в дифференцировку В-клеток)

ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ БЕЛКА Полная mrggpgv...dvglekp (1..226; 226 а./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 mnupltl...atslttf (1..372; 372 а./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 (пуриnergический 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 а./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 В-клеток CD72, Lyb-2)

ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ БЕЛКА Полная maaaity...tafrfpd (1..359; 359 а./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 В-клеток, потеря функции ассоциирована с увеличенной активностью заболевания у пациентов с системной красной волчанкой)

ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ БЕЛКА Полная mafdvsc.rwkyqhi (1..661; 661 а./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 γ1, предполагаемый рецептор домена Fc иммуноглобулинов, содержащий подобные Ig и ITAM домены типа C2, может играть роль в дифференцировке В-лимфоцитов, инвентарный номер Genbank NP_443170.1)

ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЬ БЕЛКА Полная mlprlli...vdyedam (1..429; 429 а./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 mllwvii.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..rastrii (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; Glynn-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 внутрибрюшинными (ip) инъекциями соответствующего антигена и адьюванта. Моноклональные антитела получают из группы, по существу, гомогенных антител, то есть индивидуальные антитела, составляющие группу, являющиеся 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 библиотек (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, трансформированные 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 1 описано получение иллюстративного гуманизированного антитела против ErbB2. Гуманизированное антитело 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 полный 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 В-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). См. 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(ами) 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; Trautnecker 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 переменными доменами можно легко получить рекомбинантной экспрессией нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептидные цепи антитела (патент США № 2002/0004586; WO 01/77342). Например, можно получать триспецифические антитела (Tutti 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 C-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 C-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 касетного 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, IgG₁, IgG₂, IgG₃ или IgG₄), 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 (Jefferis 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 НРАЕС-РАD, 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-гидроксидазы 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 майтанозином 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 несulfидных линкеров, (iii) они стабильны в плазме и (iv) эффективны против множества опухолевых клеточных линий.

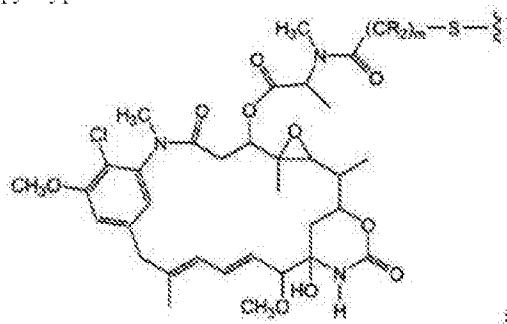
Майтаназиновые соединения, которые могут использоваться в качестве молекул майтаназоидных лекарственных средств, хорошо известны в данной области и их можно выделить известными способами из природных источников, получить способами генной инженерии (см. Yu et al. (2002) *PNAS* 99:7968-7973), или майтаназинол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

Иллюстративные молекулы майтаназоидных лекарственных средств включают молекулы с модифицированным ароматическим циклом, такие как C-19-дехлор (патент США № 4256746) (получаемые восстановлением ансамитоцина P2 с помощью алюмогидрида лития); C-20-гидрокси (или C-20-деметил) +/-C-19-дехлор (патенты США №№ 4361650 и 4307016) (получаемые путем деметилирования с применением *Streptomyces* или *Actinomyces* или дехлорирования с применением ЛАН) и C-20-деметокси, C-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 C-9-SH, получаемой реакцией майтаназинола с H_2S или P_2S_5 (патент США № 4424219); C-14-алкоксиметил (деметокси/ CH_2OR) (патент США № 4331598); C-14-гидроксиметил или ацилоксиметил (CH_2OH или CH_2OAc), получаемые из *Nocardia* (патент США № 4450254); C-15-гидрокси/ацилокси, получаемые преобразованием майтаназинола *Streptomyces* (патент США № 4364866); C-15-метокси, выделяемый из *Trewia nudiflora* (патент США № 4313946 и патент США № 4315929); C-18-N-деметил, получаемый деметилированием майтаназинола *Streptomyces* (патент США № 4362663 и патент США № 4322348) и 4,5-дезоксид, получаемый восстановлением майтаназинола трихлоридом титана/ЛАН (патент США № 4371533).

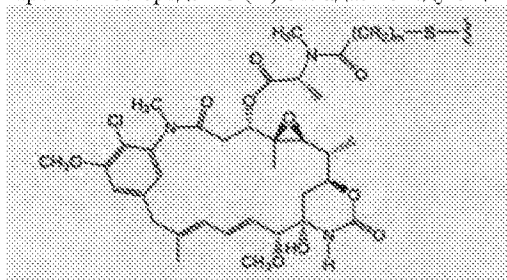
Ряд положений на майтаназиновых соединениях известны как подходящие в качестве положения для связывания, в зависимости от типа связи. Например, для образования сложноэфирной связи подходят все положения C-3 с гидроксильной группой, положения C-14, модифицированное гидроксиметилом, положения C-15 с гидроксильной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

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



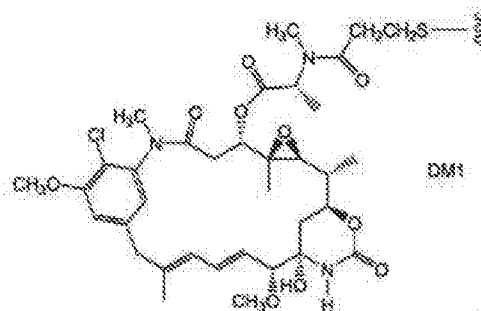
где волнистая линия указывает ковалентное связывание атома серы D с линкером (L) конъюгата антитело-лекарственное средство (ADC). R может независимо представлять собой H или C_1-C_6 -алкил. Алкиленовая цепь, присоединяющая амидную группу к атому серы, может представлять собой метил, этил или пропил, 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:

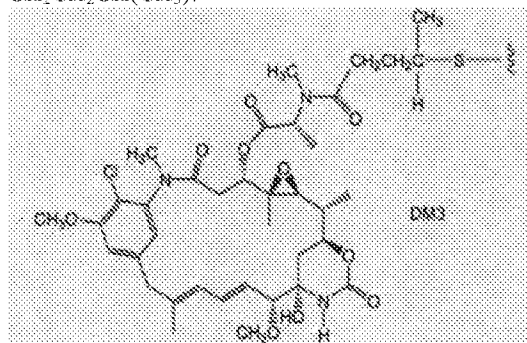


Варианты D включают:

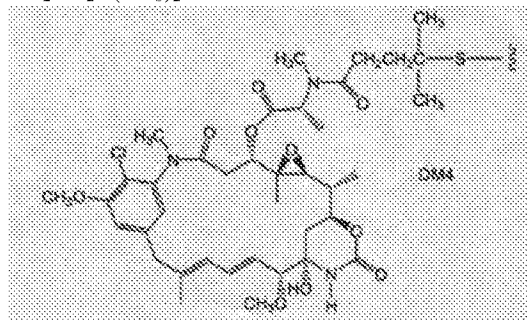
DM1 (N^2 -деацетил- N^2 -(3-меркапто-1-оксипропил)майтаназин), где $(CR_2)_m = CH_2CH_2$:



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

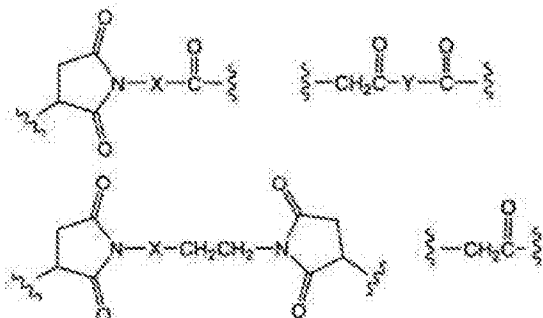
Линкер, L, связывает антитело с лекарственным веществом с помощью ковалентной связи(ей), не включающей дисульфидную группу. Линкер представляет собой бифункциональную или полифункциональную молекулу, которую можно использовать для связывания одной или нескольких молекул лекарственного вещества (D) с 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

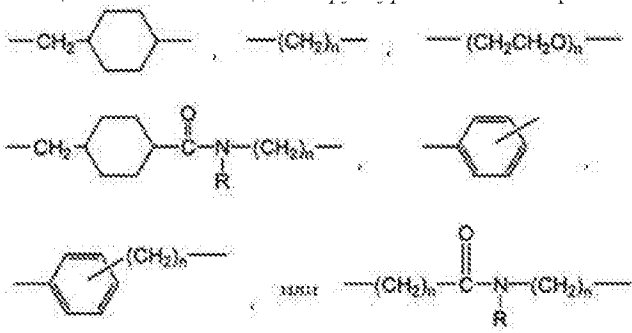
лекарственного средства; (iii) остается стабильным и неповрежденным, то есть не расщепляется, до тех пор, пока не осуществится доставка или транспортировка конъюгата к намеченному участку, и (iv) сохраняет цитотоксическое, уничтожающее клетки действие или цитостатическое действие майтазановидного лекарственного 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:



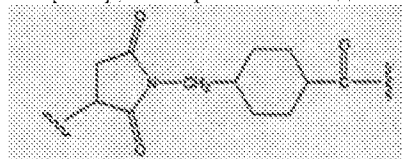
где волнистые линии указывают на ковалентную связь Ab и D в любой ориентации. X может обладать структурами в любой ориентации:



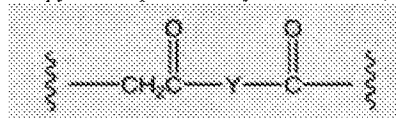
где R независимо представляет собой H или C₁-C₆-алкил; и n равно от 1 до 12. Y может обладать структурами в любой ориентации:



где R независимо представляет собой H или C₁-C₆-алкил; и n равно от 1 до 12. Например, линкер может обладать структурой, обозначенной как SMCC:

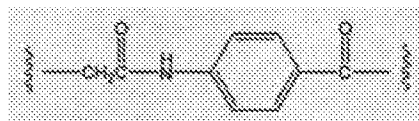


В другом варианте осуществления, линкер (L) обладает структурой:

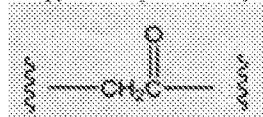


где волнистые линии указывают на ковалентную связь Ab и D в любой ориентации.

Например, линкер может обладать структурой, обозначенной как SLAB:



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

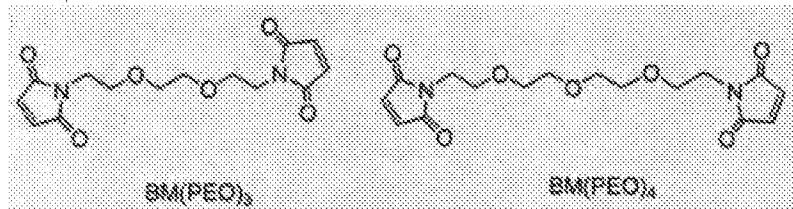


В другом варианте осуществления, линкер может быть замещен группами, модулирующими растворимость и реакционную способность. Например, сульфатный заместитель может увеличивать растворимость реагента в воде и облегчать реакцию присоединения линкерного реагента и антитела или молекулы лекарственного средства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

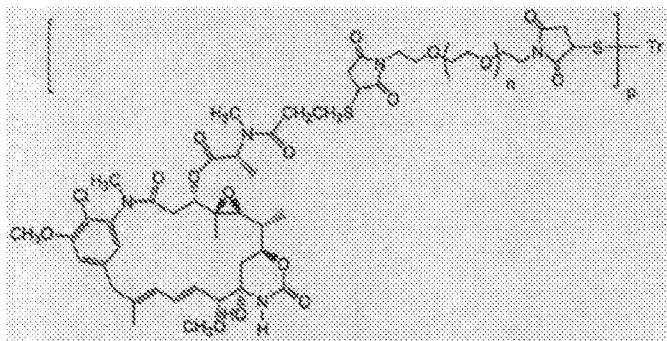
В другом варианте осуществления линкер обладает реакционноспособной функциональной группой, которая несет нуклеофильную группу, способную к реакции с электрофильной группой, находящейся на антителе. Подходящие электрофильные группы на антителе включают, но ими не ограничиваются, альдегидную и кетонную 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, амина, 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-fluorenylmethoxycarbonyl 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-малесимидные реагенты: DTME, BMB, BMDV, 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-малесимидные 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 малесимида, которые способны взаимодействовать с тиольной группой антитела, майтаназонидного лекарственного средства или линкерным промежуточным соединением включают йодоацетамид, бромацетамид, винилпирдин, дисульфид, пиридилдисульфид, изотиоцианат и изотиоцианат.



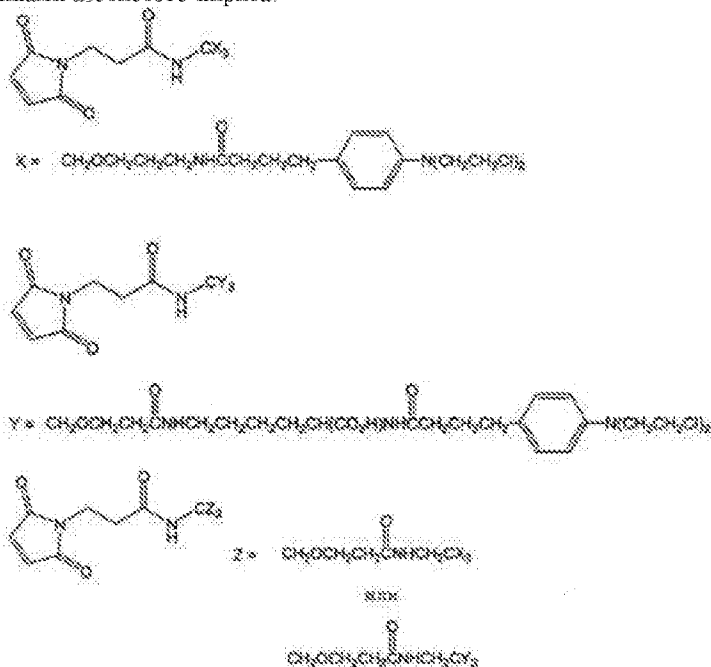
Иллюстративные конъюгаты антитело-лекарственное средство, где DM1 связано через линкер BMPEO с тиольной группой трастузумаба, обладают структурой:



Линкерные реагенты, которые могут использоваться, также можно получить 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 дивергентных линкерных реагентов позволяют конъюгировать до 9 нуклеофильных молекул реагента лекарственного средства посредством реакции с хлорэтильными функциональными группами азотистого нитрита:



Нагрузка лекарственным средством на формуле молекулы I представлена посредством р, 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 лизинные 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 дитиотритон (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

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 цистина, 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 маленимидные 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 Клеянда, дитиотреитол) 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 образовывать два реакционноспособных тиольных нуклеофила. Дополнительные нуклеофильные группы могут быть введены в антитела с помощью реакции лизина с 2-иминотиолоном (реагент Траута), что приводит к преобразованию амина 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 образовывать 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 галактозооксидазой 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.

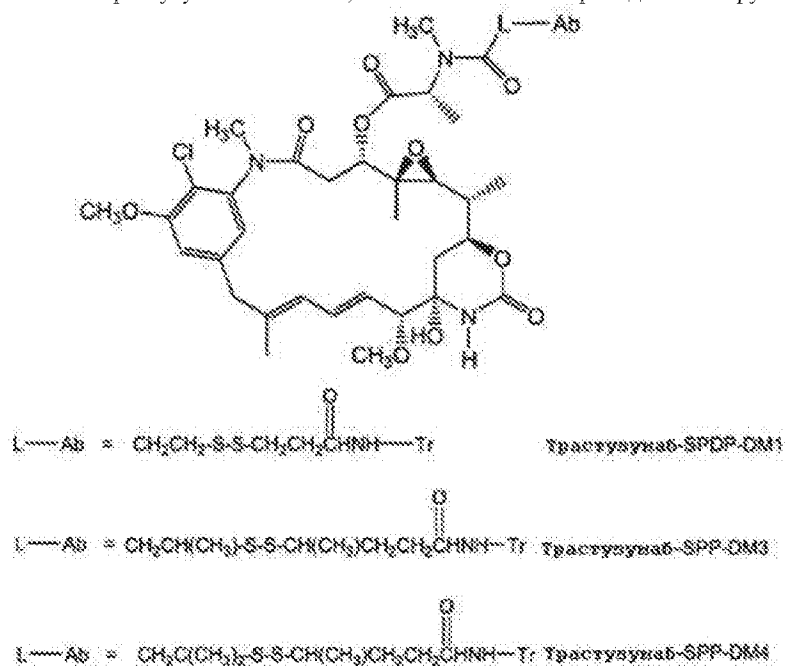
Подобным образом нуклеофильные группы молекулы лекарственного средства включают в качестве неограничивающих примеров: аминогруппу, тиольную, гидроксильную, гидразидную, оксимную, гидразиновую, тиосемикарбазоновую, гидразинкарбоксилатную и арилгидразидную группы, способные к взаимодействию с образованием 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 маленимидные группы.

Например, майтаназин можно преобразовывать в May-SSCH₃, 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

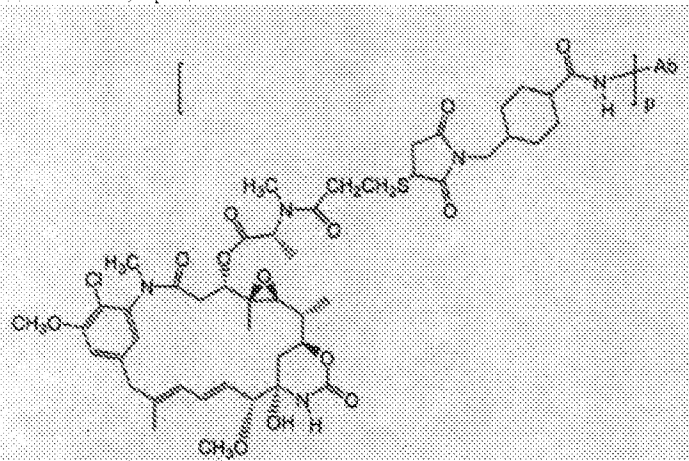
8402 of 10951

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:

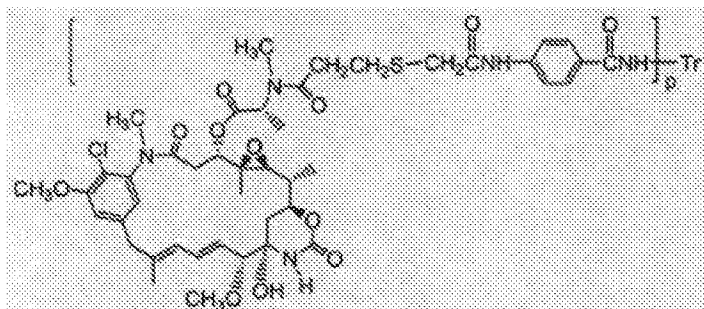
Конъюгаты антитело-лекарственное средство с дисульфидными (S-S) линкерами тестировали для сравнения с ADC без дисульфидных линкеров по изобретению. Трастузумаб-SPP-DM1 получали в соответствии с примером 3 (Ranson, M. and Sliwkowski M. (2002) Oncology 63 (suppl 1):17-24). Также тестировали дисульфидные 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 мйтаназоидное 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 воздействия 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 (а) 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 (а) 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 (а) 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 стимулированное лигандом фосфорилирование тирозина.

Другой вариант осуществления представляет собой способ скрининга, включающий (а) 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 (а) 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-луночной планшете. Моноклональные антитела против ErbB2 добавляют к каждой лунке и инкубируют в течение 30 минут. Затем добавляют меченный ^{125}I tHRG β 1₁₇₇₋₂₂₄ (25000 нмп./мин) и инкубацию продолжают в течение от 4 до 16 часов. Получают кривые доза-ответ и для представляющего интерес соединения рассчитывают значение IC₅₀.

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 β 1₁₇₇₋₂₄₄ 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 IC₅₀.

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 растут 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 $\times$ 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 монослой 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 Ca²⁺ (10 мМ Hepes, pH 7,4, 140 мМ NaCl, 2,5 мМ CaCl₂) и отбирают аликваты в покрытые 35 мм фильтром 12 $\times$ 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 монослой 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.

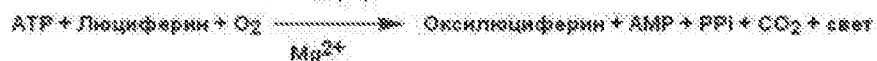
АНАЛИЗЫ ПРОЛИФЕРАЦИИ КЛЕТОК *IN VITRO*

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/луноку 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 люцинометра или устройства получения изображений с камерой CCD. Результат люминесценции представляют в виде относительных световых единиц (RLU), измеренных в течение времени.

Люцифераза



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 показали 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 (IC₅₀ 80 нг/мл) и 2H9-SMCC-DM1 (IC₅₀ 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 оставался 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 остались 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
--	--	---------

Параметр	трастузумаб-SPP-DM1	трастузумаб-SMCC-DM1
Vd (мл/кг)	41	41
Клиренс (мл/сутки/кг)	52	15
T S альфа	0,99	0,15
T S бета	0,7	0,85
T S гамма (сутки)	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 мышинной 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 псу, 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 опухоли 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 люцифразу 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 мышь	средняя нагрузка лекарственным средством (г)	MTD (сутки)
Tt-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 5X 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 антитела 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/м²) 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/м²) 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 средние (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 мышь	средняя нагрузка лекарственным средством (г)	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 антитела против CD19-SMCC-DM1 и антитела против CD22-SMCC-DM1 не продемонстрировали активности *in vivo* на модели ксенотрансплантата мышинной 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 мышинной 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 мышь	средняя нагрузка лекарственным средством (г)	MTD (сутки)
PBS (контрольный буфер)	-	-	-	3,5
антитело против GP120	-	3,2	-	3,5
SNS 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 мышшь. У мышей, которым вводили антитело против CD79b-SMCC-DM1, измеряли влияющие дозы на ответ. Группам из восьми мышей SCID с 20 миллионами ксенотрансплантированных опухолевых клеток Bjab-luc на мышшь 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 Аб/кг мыши.

Таблица			
ADC, Аб или контроль	мкг DM1/м ²	Аб мг/кг мыши	MTD (сутки)
Контрольный носитель (PBS)	-	-	8
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 мышинной 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	Аб мг/кг мыши	MTD при средней экспрессии (сутки)	MTD при высокой экспрессии (сутки)
PBS (контрольный носитель)	-	-	30	22
антитело против амброзия-SPP-DM1 мыши (отрицательный контроль)	373	6,68	18	22
антитело против амброзия-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 линий 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, зависящая 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 (γ-глутамилтрансфераза)

- Локализация: плазматическая мембрана клеток с высокой секреторной и всасывающей способностью; печень, почки, кишечник

- 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 трастузумаб-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 гематопозитические ткани находились в нормальных пределах.

Животные из группы 5, получавшие 50 мг/кг трастузумаб-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 трастузумаб-SPP-DM1 (группа 2). Приблизительно при той же дозе трастузумаб-SMCC-DM1 (группа 4, 22,3 мг/кг) продемонстрировал приблизительно 25% от уровня трастузумаб-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).

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 гематопозитических 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 трастузумаб-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/м² на 1-е сутки и 22 сутки. Группе 3 (4 субъекта) вводили трастузумаб-SMCC-DM1 при 7200 мкг/м² 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/м²; группа 3: 7200 мкг/м²). 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, внутрипухоловой 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; циклогексано-3-пентанол и м-крезол); низкомолекулярные (менее чем приблизительно 10 остатков) полипептиды; белки, такие как сычужочный 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 TWEENTM, PLURONICSTM 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]

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-гидроксиэтокс)тетрагидрофуран-2-ил]-2-(2-гидроксиэтокс)этокс]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 лекарственного средства 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 трастузумаб-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(метилметакрилатные) микрокапсулы, соответственно, в коллоидных системах доставки лекарственного средства (например, липосомы, микросферы альбумина, микроэмульсии, наночастицы и микрокапсулы) 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 матрицы твердых гидрофобных полимеров, содержащих ADC, где матрицы находятся в виде имеющих определенную форму продуктов, например в виде пленок или микрокапсул. Примеры матриц 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™ (инъекционные 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 мелкодисперсными твердыми носителями или с обоними, 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, полноксизетиленстеарат), продукт конденсации этиленоксида с алифатическим спиртом с длинной цепью (например, гептадекаэтиленоксикетанол), продукт конденсации этиленоксида с неполным эфиром многоатомного спирта, полученным из житной кислоты и гекситагидрида (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 назначенного 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 КОНЬЮГАТАМИ 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, лейкоэмические и лимфоидные злокачественные заболевания, другие нарушения, такие как нейрональные, глияльные, 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 РЕЦЕПТИНА 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 химиотерапевтические 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 лейкоэмические 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 ИНС, FISH и анализ «слушающих» 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 нуклеиновую кислоту. В одном из вариантов осуществления уровни лиганда ErbB в опухоли можно определять с применением иммуногистохимии (ИНС); 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 ИНС, например, с применением HERCEPTEST (Dako). Помещенные в парафин тканевые срезы биопсии опухоли можно подвергать анализу ИНС 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, Ill.) 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 реакции 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 мкг/кг (например, 0,1-20 мкг/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 мкг/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 мкг/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 мкг/кг, с последующей еженедельной поддерживающей дозой приблизительно 2 мкг/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 действий 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

майтаназонидным 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 отдельных 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 гормоннезависимый рак, пациента предварительно можно подвергнуть антигормональной терапии, а после того как рак станет гормоннезависимым, 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 КОНЬЮГАТОВ АНТИТЕЛО-ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО

Также данное изобретение относится к метаболитическим 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 ^3H) 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 «набору», 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 конъюгата 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 листовка-вкладыш 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 эффективным, 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 гормоннезависимой злокачественной опухоли, рака предстательной железы, рака толстой кишки или колоректального рака.

Готовое изделие может содержать (а) первый контейнер с содержащимся в нем соединением, где соединение содержит ADC по настоящему изобретению, где антитело из ADC представляет собой первое антитело, связывающееся 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 майтаназонидным 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 (BWI), 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/HER2-3₄₀₆ (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 mM 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

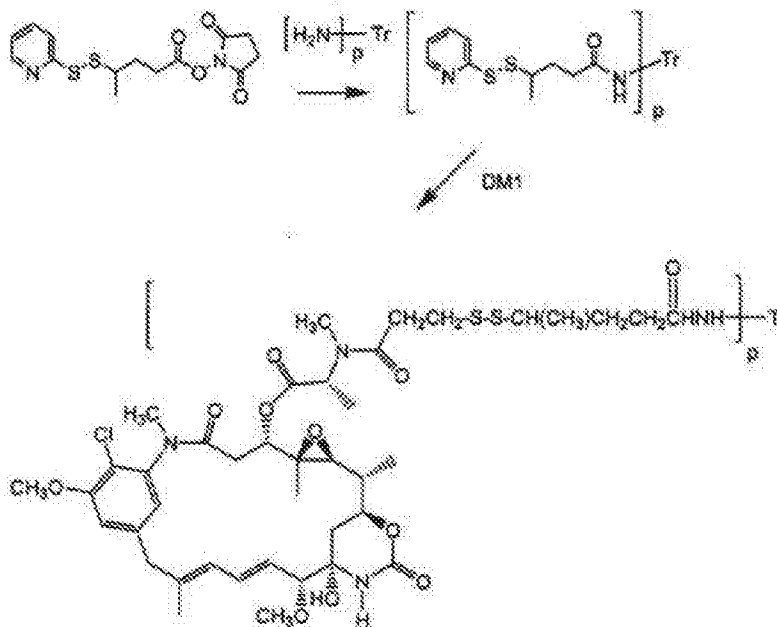
недели. На 9 и 13 неделю мышам внутрибрюшинно вводили мембранные экстракты ErbB2, очищенные на агглютининной пророщенной пшеницы (WGA)-сефарозе, вместе с антисывороткой, которая иммунопреципитирует меченный ^{32}P ErbB2. После этого внутривенно вводили инъекцию 0,1 мл препарата ErbB2 и спленоциты сливали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

Моноклональное антитело 4D5 мыши гуманизировали с применением стратегии «мутационеза 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 mM MES, 50 mM 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 mM. Фракции, содержащие антитело, объединяли, разводили до 10 мг/мл и подвергали диализу в буфер, содержащий 50 mM фосфата калия, 50 mM NaCl, 2 mM EDTA, pH 6,5.

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

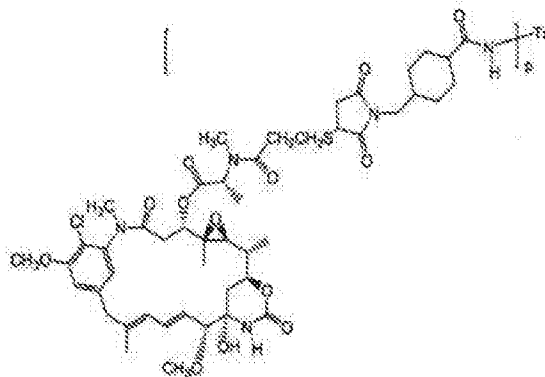


Очищенный трастузумаб модифицировали N-сукцинимидил-4-(2-пиридилтио)пентанатом, введя дитиопиридилные группы. Трастузумаб (376,0 мг, 8 мг/мл) в 44,7 мл 50 mM фосфатно-калийного буфера (pH 6,5), содержащего NaCl (50 mM) и EDTA (1 mM) обрабатывали SPP (5,3 молярных эквивалентов в 2,3 мл этаноле). После инкубации в течение 90 минут в атмосфере аргона при температуре окружающей среды реакционную смесь подвергали гель-фильтрации через колонку с Sephadex G25, уравновешенную 35 mM цитратом натрия, 154 mM NaCl, 2 mM 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-тиопиридиновых групп на антитело (p').

Трастузумаб-SPP-Py (337,0 мг, 9,5 мкмоль высвобождаемых 2-тиопиридиновых групп) разбавляли с применением приблизительно 35 mM цитратно-натриевого буфера, pH 6,5, до конечной концентрации 2,5 мг/мл. Затем к раствору антитела добавляли DM1 (N²'-деацетил-N²'-(3-меркапто-1-оксипропил)майтаназин), структура которого представлена на фиг.1 (1,7 эквивалентов, 16,1 мкмоль), в 3,0 mM 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 (р'), 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-маленимидометил) 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 реакцию смесь фильтровали через колонку с Sephadex G25, уравновешенную 50 мМ фосфат калия/50 мМ хлорида натрия/2 мМ EDTA, pH 6,5. Альтернативно реакцию смесь подвергали гель-фильтрации с 30 мМ цитрата и 150 мМ хлорида натрия при pH 6. Содержащие антитело фракции очищали и анализировали. Выход трастузумаб-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 реакцию смесь подвергали гель-фильтрации с 10 мМ сукцинатом и 150 мМ хлоридом натрия при pH 5. Отношение DM1/трастузумаб (р) составляло 3,1, измеряя при поглощении при 252 нм и при 280 нм. Отношение лекарственного средства к антителу (р) 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 NaP13b	NaP13b	5,9
2H9-SMCC-DM1	Маb 2H9	антитело против EphB2R	4,9
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 (изотипи mIgG1)	CD19	5,95

2H7-SMCC-DM1	антитело против CD20 (изотип mIgG2a)	CD20	2,44, 3,84 (две группы)
CD20 LC-SMCC-DM1	антитело против CD20 (фитуксан®)	CD20	
HB5-SMCC-DM1	антитело против CD21 (изотип mIgG2a)	CD21	4,95
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	5,90
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
8B9-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 FeRH1	FeRH1	4,20
7A2-SMCC-DM1	антитело против FeRH2	FeRH2	4,20, 3,95 (две группы)
7G7-SMCC-DM1	антитело против FeRH2	FeRH2	3,80
c11D6-SMCC-DM1	антитело против FeRH2	FeRH2	2,20
51505.111-SMCC-DM1	антитело против CXCR5	CXCR5	6,10
химерное антитело 12C7 Fe-SMCC-DM1	антитело против бревинки	бревинки	4,60
H2.PSCA hlog-SMCC-DM1	антитело против PSCA hlog	PSCA	3
H6.xPSCAhlog-SMCC-DM1	антитело против PSCA hlog	PSCA	2,6
xFeRH5.3909.7D11.1.1-SMCC-DM1	антитело против IRTA2	IRTA2	2,6
xFeRH5.7D11-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-ВМРЕО-DM1

Для конъюгации с чистейшим антителом можно восстанавливать таким восстановителем как дитиотреитол (ДТТ) или ТСЕР в присутствии EDTA. После инкубации в течение одного часа при 37°C, pH доводят приблизительно до 7 с помощью 100 мМ фосфата калия. Восстановленное антитело модифицируют бисмаленимидным реагентом ВМ(РЕО)4 (Pierce Chemical), удаляющим непрореагировавшие малесимидные группы на поверхности антитела. Модифицирование можно проводить, растворяя ВМ(РЕО)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-ВМРЕО. Избыток ВМ(РЕО)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-ВМРЕО. 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-ВМРЕО-DM1 использовали гель-фильтрацию на колонках S200 в PBS.

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

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

трастузумаб-BM(PEO)-DM1	трастузумаб (Германтин®)	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 уравнивали 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. Вазэктомизированных 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-маитаназонное 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/м², 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 трастузумаб-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: грудная кость, печень, почка, тимус, селезенка, толстый и тонкий кишечник. Экспериментальные группы были следующими:

Группа 1: Носитель (10 мМ суццинат натрия, 100 мг/мл сахара, 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/м² на сутки 1 и сутки 22.

Группа 3: (4 животные) получала трастузумаб-SMCC-DM1 7200 мкг/м² на сутки 22.

Дозы выражены в площади поверхности животного с тем, чтобы быть релевантными относительно других видов, то есть доза в мкг/м² 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 майтаназонидным лекарственным средствам, где соединение обладает формулой I:

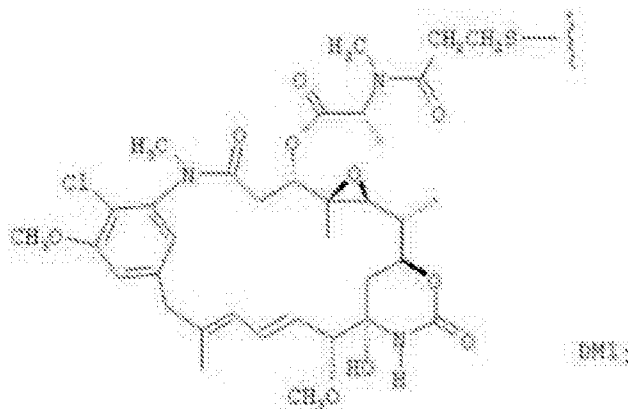


или его фармацевтически приемлемые соль или сольват,

где Ab представляет собой huMAb4D5-8 (трастузумаб);

L представляет собой сукцинимидил-4-(N-маленидометил)циклогексан-1-карбоксилат (SMCC) или BMPEO;

D представляет собой майтаназонидное лекарственное средство DM1 следующей структуры:



р 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 инъекционной 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, летрозолола, 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.

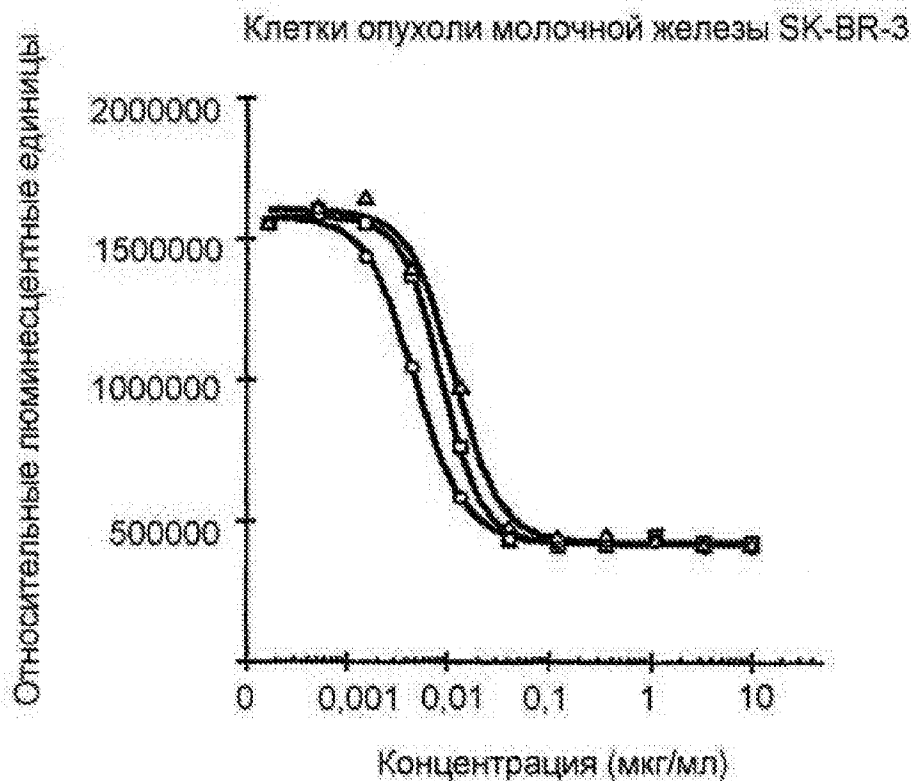
18. Готовое изделие по п.17, где указанная листовка-вкладыш этикетки указывает, что соединение можно применять для лечения злокачественной опухоли, характеризующейся сверхэкспрессией рецептора ErbB2.

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:

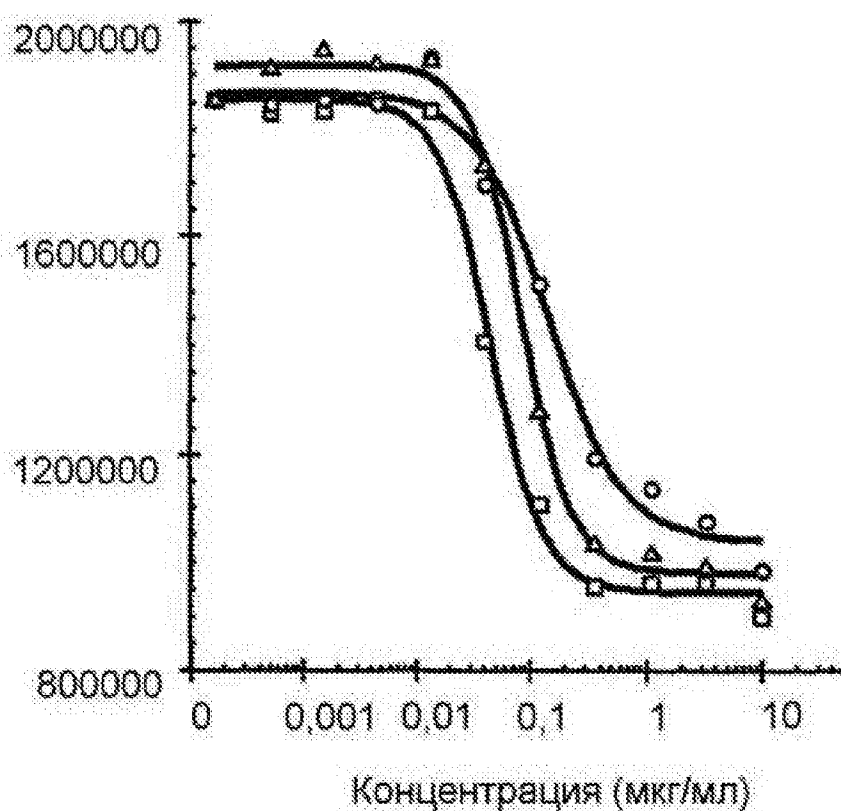
8425 of 10951

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.



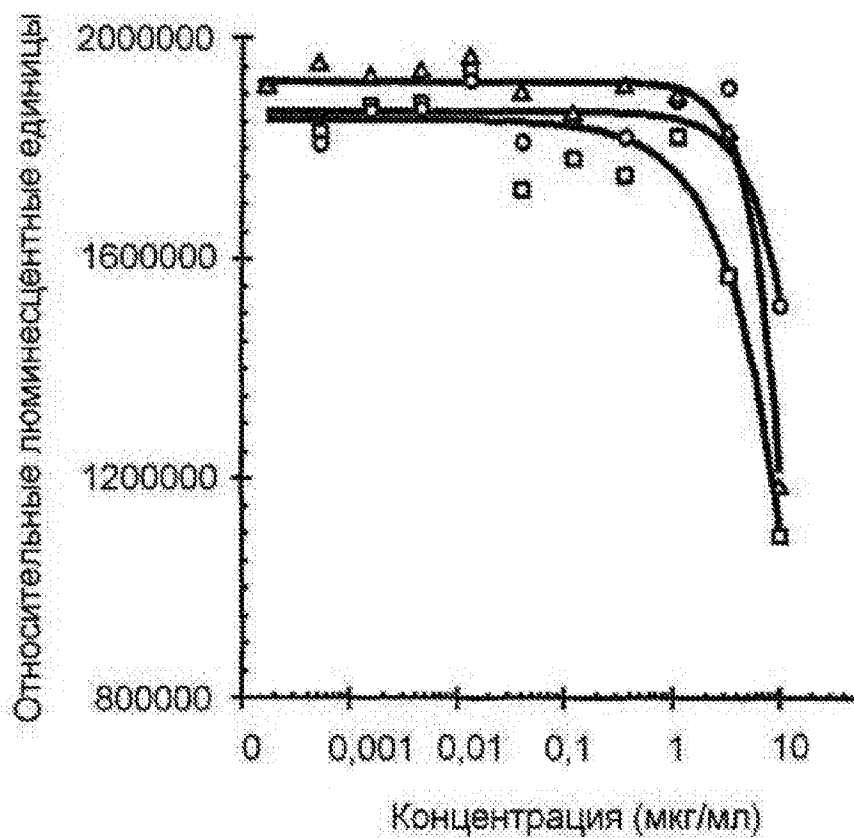
Фиг.1

Клетки опухоли молочной железы BT-474

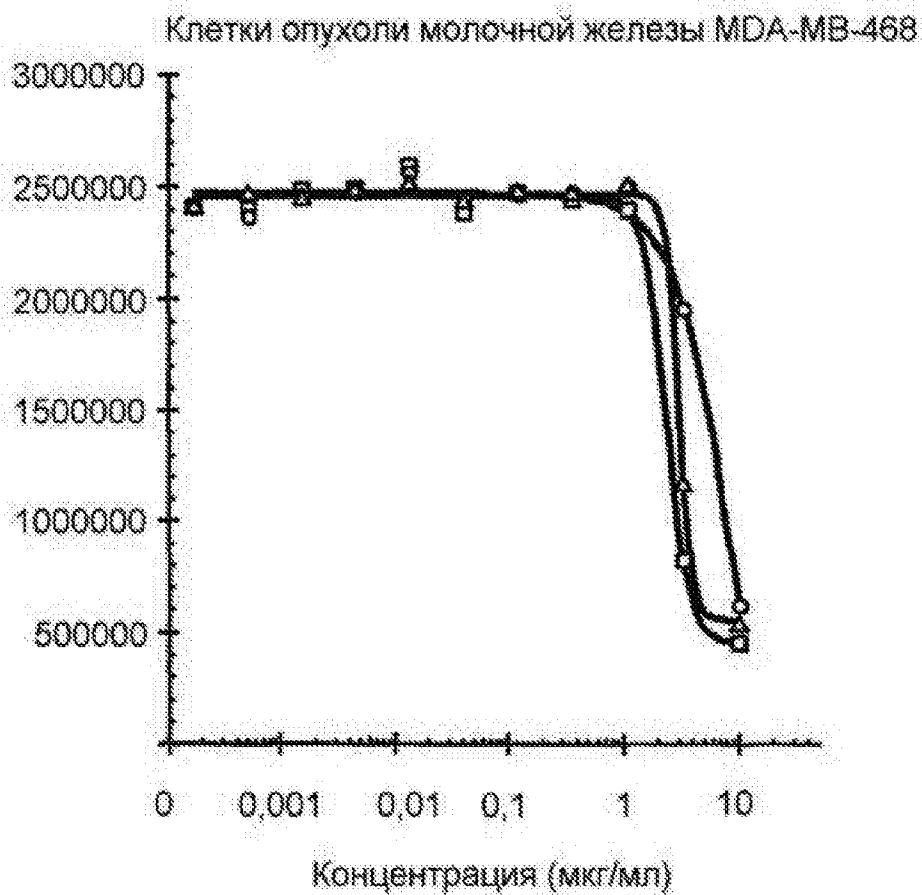


Фиг.2

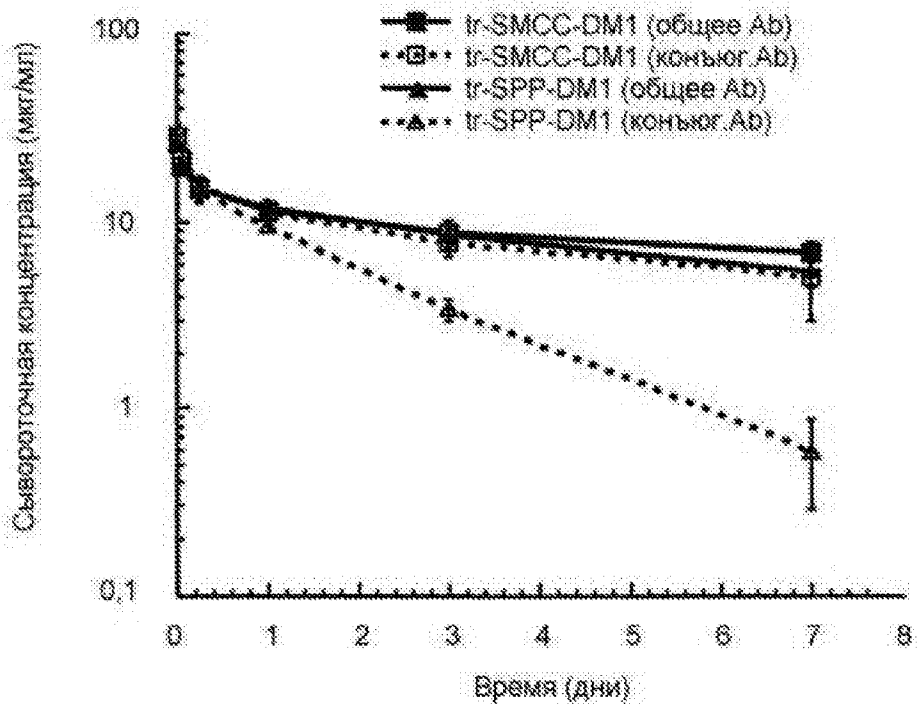
Клетки опухоли молочной железы MCF7



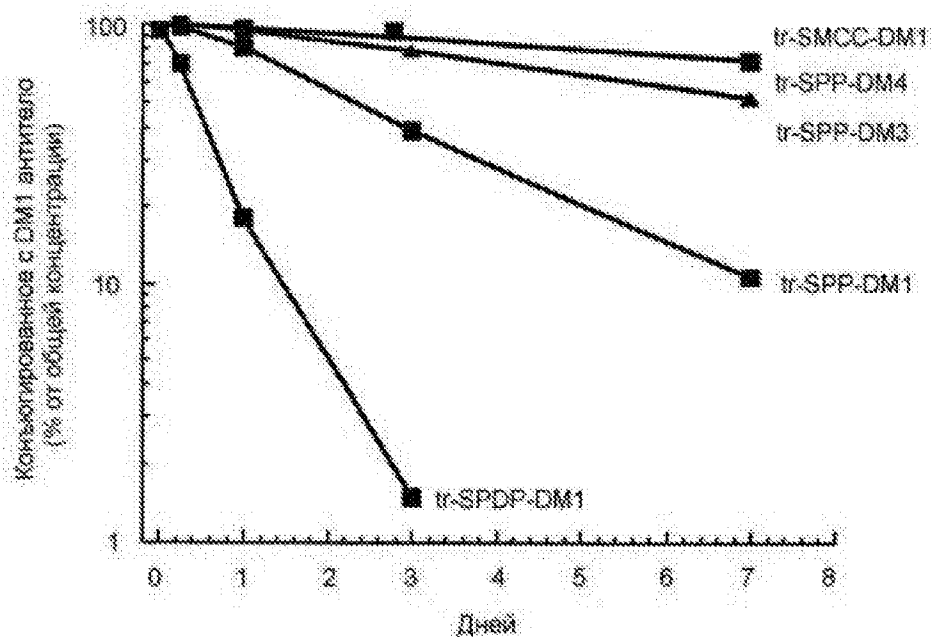
Фиг.3



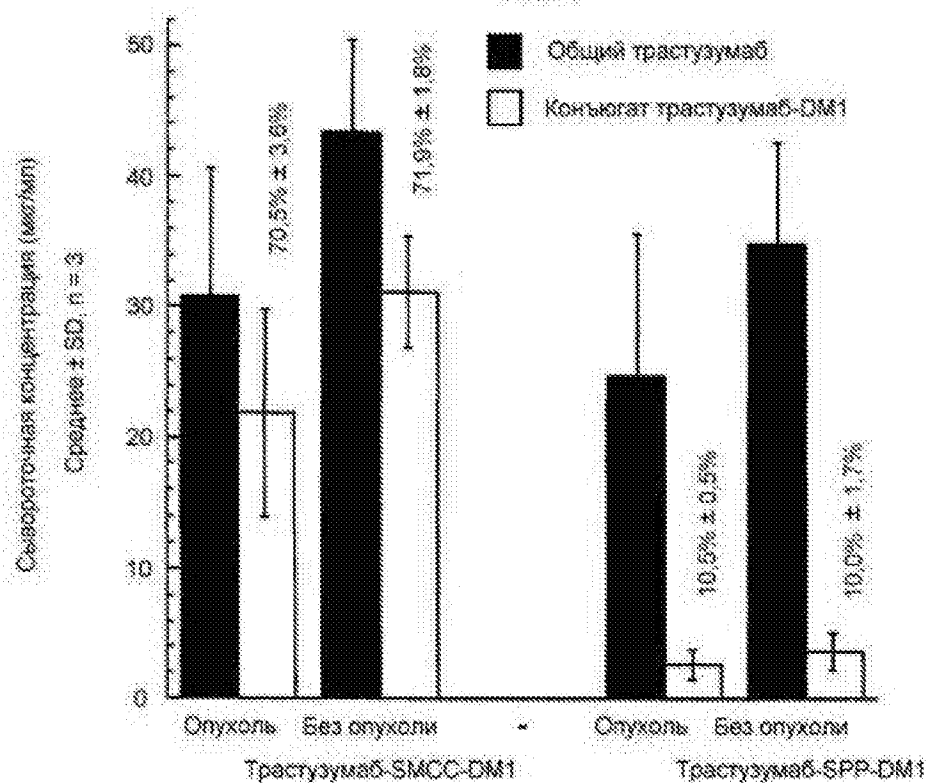
Фиг.4



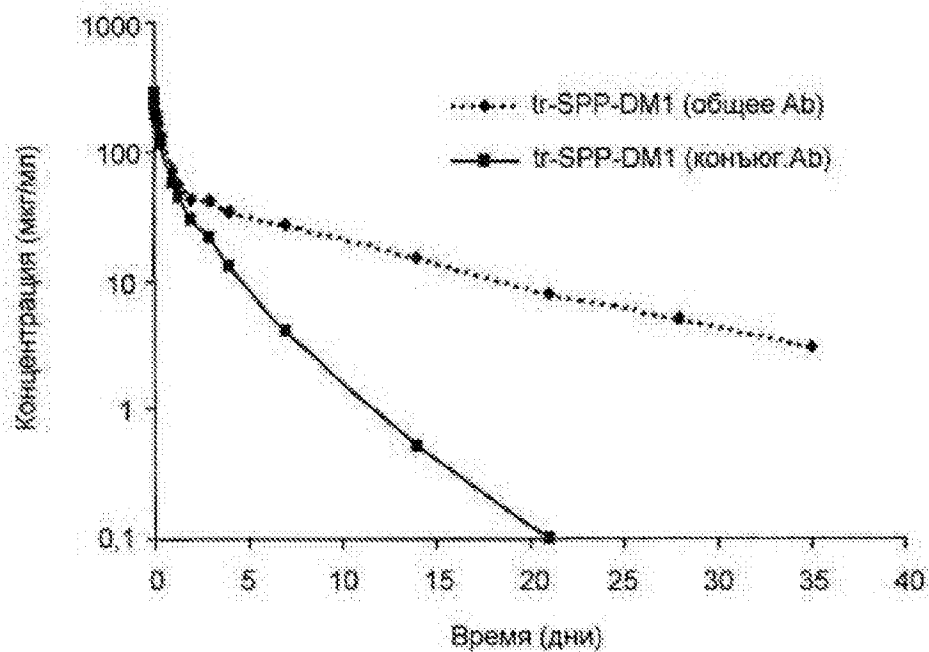
Фиг.5



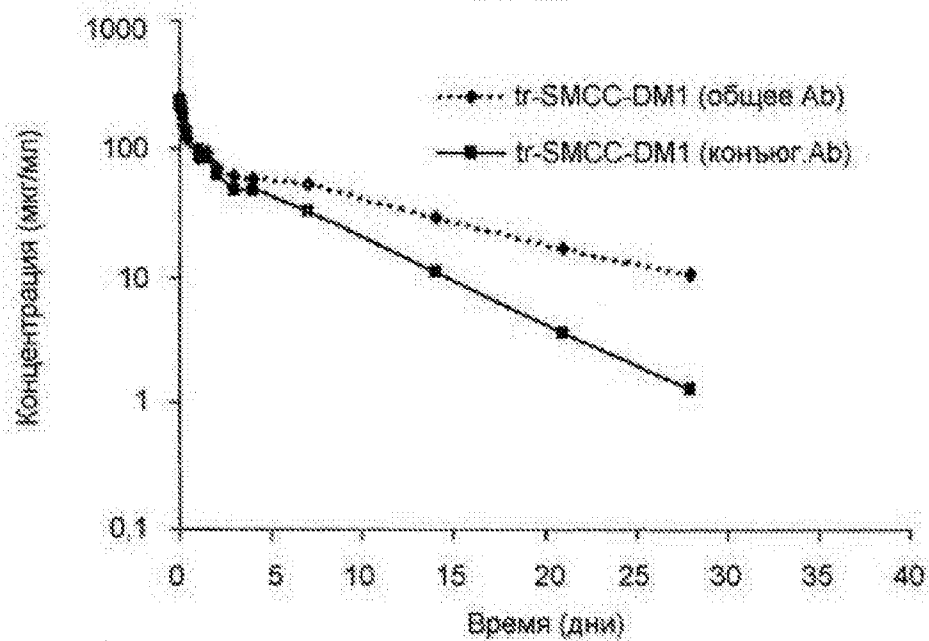
Фиг.6



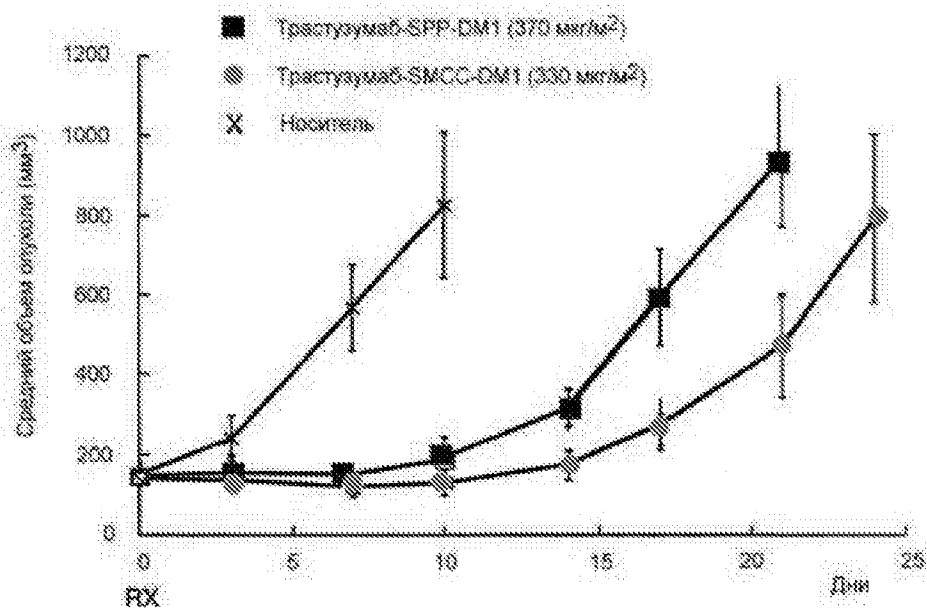
Фиг.7



Фиг.8

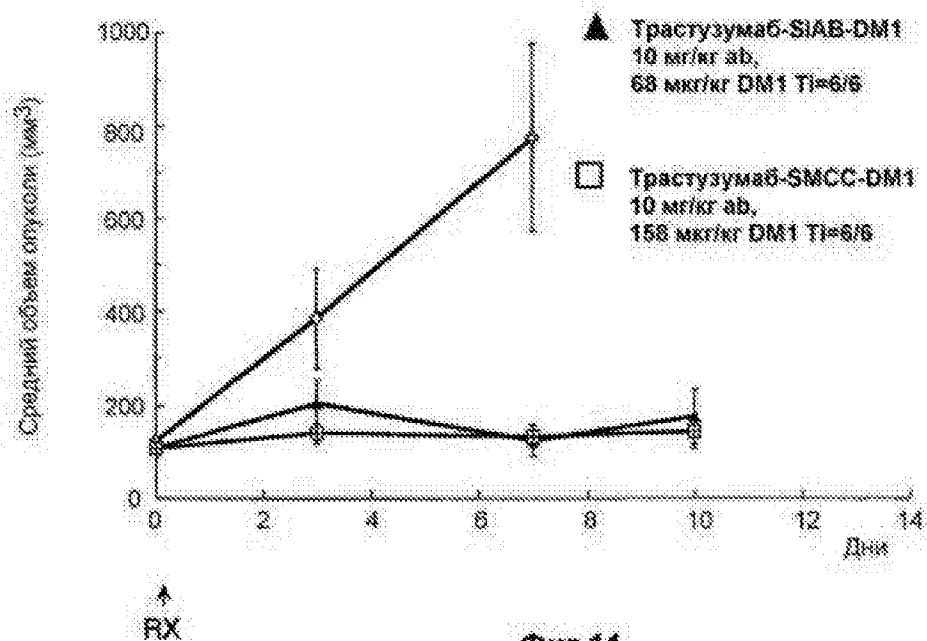


Фиг.9



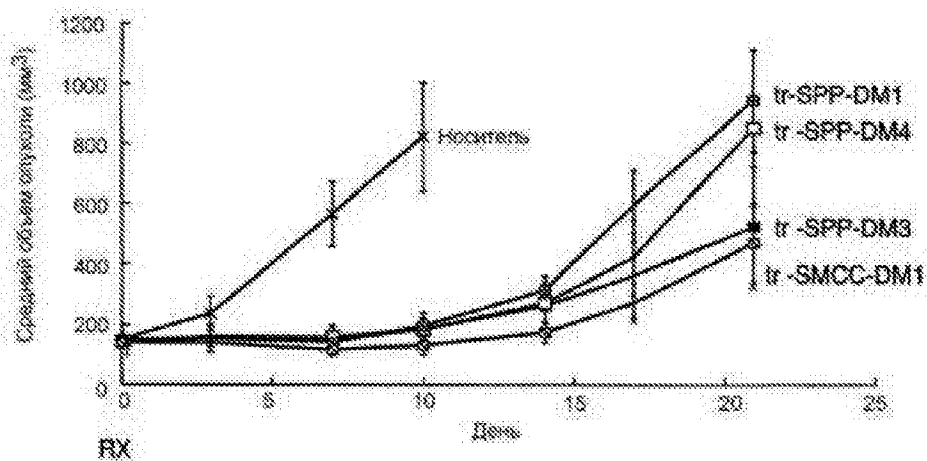
Фиг.10

⊕ Носитель T1=6/6



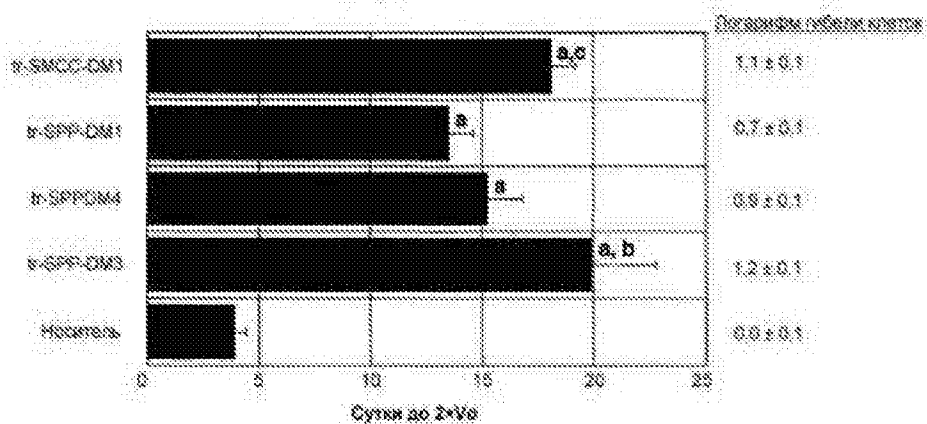
Фиг.11

8432 of 10951



Фиг.12

Концентрация тростузумаба в HER2-ЕrbB

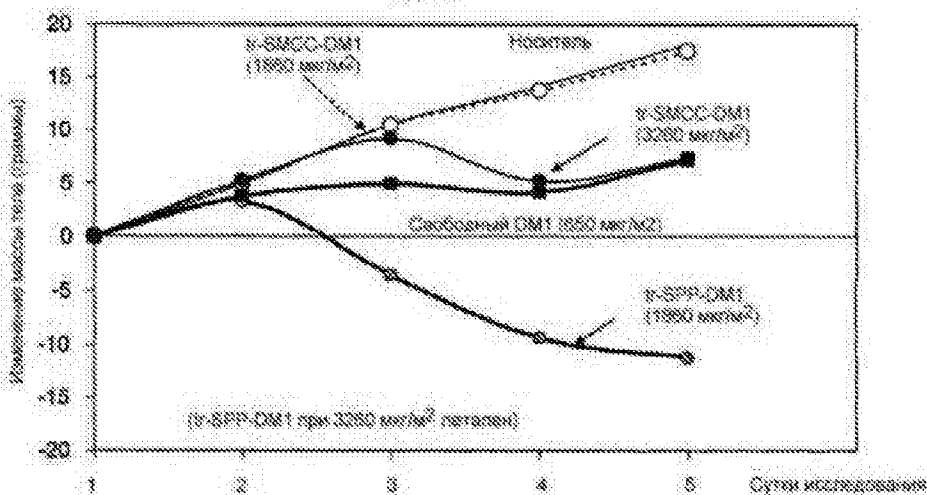


a: $P < 0.0003$ в сравнении с носителем

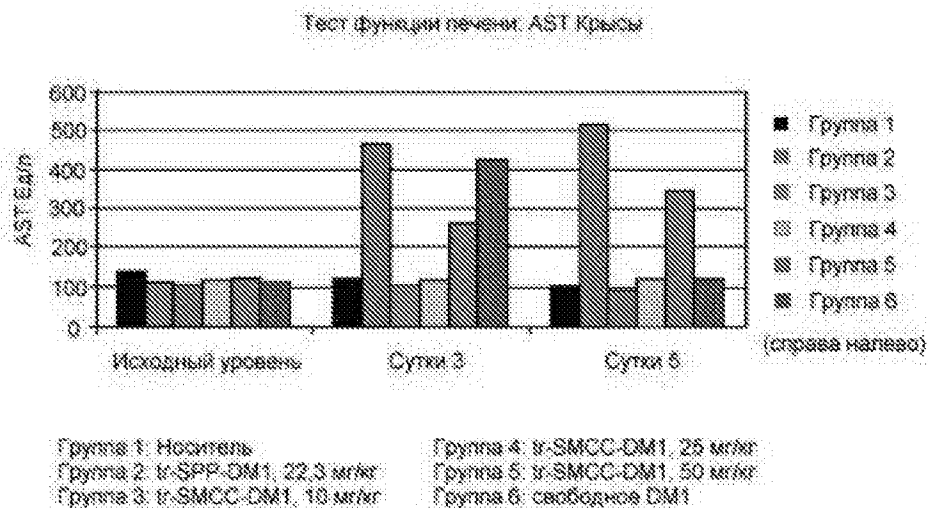
b: $P = 0.019$ по сравнению с tr-SPP-DM1

c: $P = 0.61$ в сравнении с tr-SPP-DM1

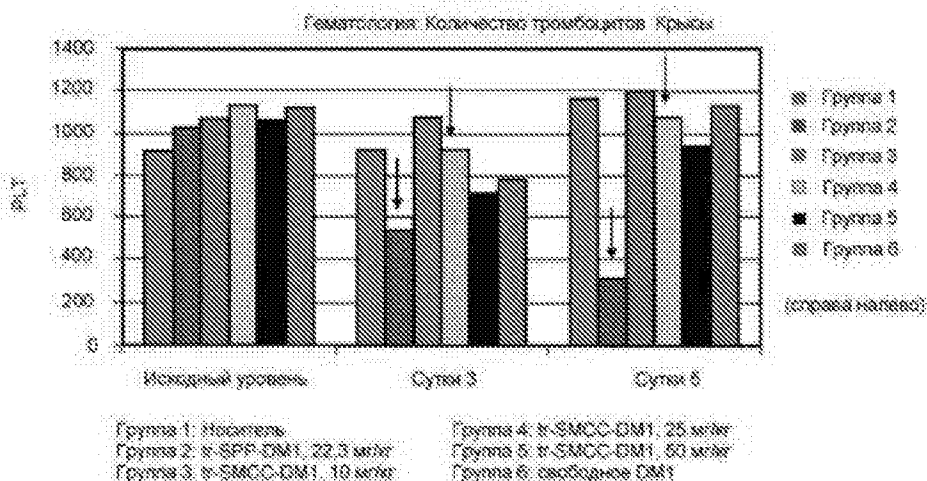
Фиг.13



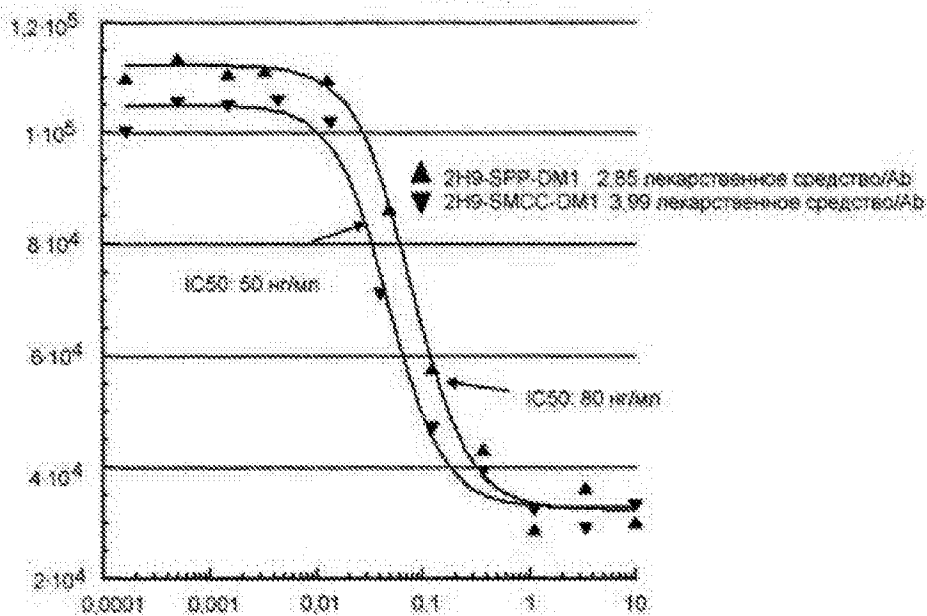
Фиг.14



Фиг.15



Фиг.16



Фиг.17

ТН4А Перездание описаний изобретений к патентам

Причина перездания: Коррекция в текстах формулы и описания изобретения

Дата публикации: 20.06.2015

RZ4A Другие изменения, относящиеся к зарегистрированным изобретениям

Основание:

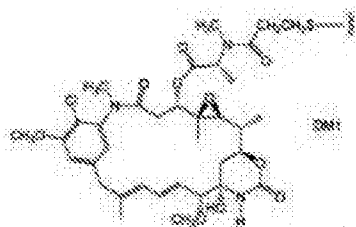
Заявление патентообладателя от 29.04.2015.

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 майтапазидным 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 майтапазидное лекарственное средство DM1 следующей структуры:



r 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 РСТ на
национальной фазе: **23.01.2009**(86) Заявка РСТ:
EP 2007/006243 (13.07.2007)(87) Публикация заявки РСТ:
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)

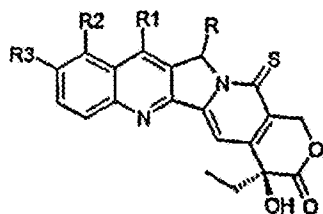
RU 2 450 008 C2

RU 2 450 008 C2

(54) ПРОИЗВОДНЫЕ КАМПОТЕЦИНА С ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТЬЮ

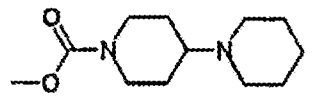
(57) Реферат:

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



(I)

где R представляет собой водород, -N3; R1

представляет собой водород, этил, группу -CH=N-O-C(CH₃)₃; R2 представляет собой водород, -CH₂N(CH₃)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

R U 2 4 5 0 0 0 8 C 2

R U 2 4 5 0 0 0 8 C 2

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)**

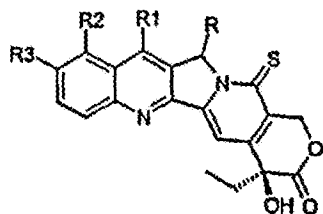
(73) Proprietor(s):

INDENA S.P.A. (IT)(54) **CAMPTOTHECIN DERIVATIVES WITH ANTICANCER ACTIVITY**

(57) Abstract:

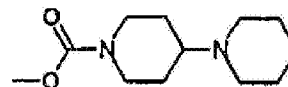
FIELD: medicine.

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



(I)

, wherein:

R represents hydrogen, -N₃; R1 hydrogen, ethyl, group -CH=N-O-C(CH₃)₃; R2 represents hydrogen, -CH₂N(CH₃)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

RU 2 450 008 C2

RU 2 450 008 C2

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.

5 ПРЕДПОСЫЛКИ СОЗДАНИЯ НАСТОЯЩЕГО ИЗОБРЕТЕНИЯ

Камптотецин представляет собой алкалоид, экстрагированный из *Camptotheca acuminata* (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
10 противоопухолевой активности, особенно против опухоли толстой кишки и других солидных опухолей и лейкозиев, 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
15 растворимостью, синтезировали ряд аналогов камптотецина. В настоящее время в клинической практике применяют два препарата, а именно СРТ-11 и топотекан. Другие производные, такие как белотекан, рубитекан, эксатекан, гиматекан, пегамотекан, луртотекан, каренитецин, афелетекан, гомокамптотецин, дифломотекан
20 и многие другие, проходят клинические испытания. Соединение СРТ-11 представляет собой высокорастворимое пролекарство для 10-гидрокси-7-этилкамптотецина (общезвестного 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
25 шеи, глиобластомы, хронических и острых миелоцитарных лейкозиев. 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.

35 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
40 ингибиторы топоизомеразы II; поддерживают высокий уровень топоизомеразы во время всего клеточного цикла; не вызывают мультилекарственную резистентность (Рго 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
50 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: а) конструирование продуктов со слабым связыванием с белком, при этом с хорошей растворимостью; б) конструирование высокоактивных продуктов, имеющих терапевтический эффект даже в чрезвычайно низких дозах.

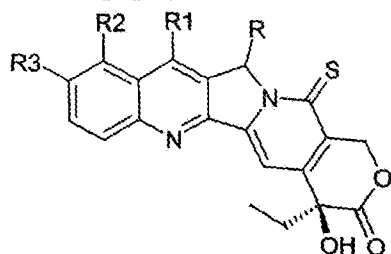
Модификации в положениях 7, 9, 10 и 11, как правило, оказываются вполне допустимыми, поскольку не влияют на стабильность тройного комплекса ДНК, топоизомеразы I и камптотецина, образование которого обуславливает противоопухолевую активность соединений.

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, ариалкил, 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;

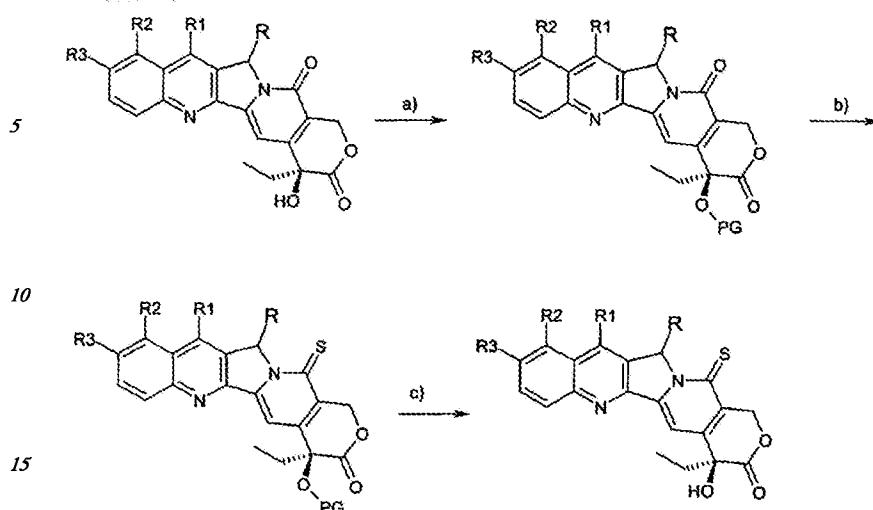
их фармацевтически приемлемым солям, изомерам, энантиомерам, диастереомерам и соответствующим смесям.

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:

- защита гидроксигрупп предшественника;
- превращение пиридонового кольца в тиопиридоновое кольцо;
- удаление защитных групп.

Схема I

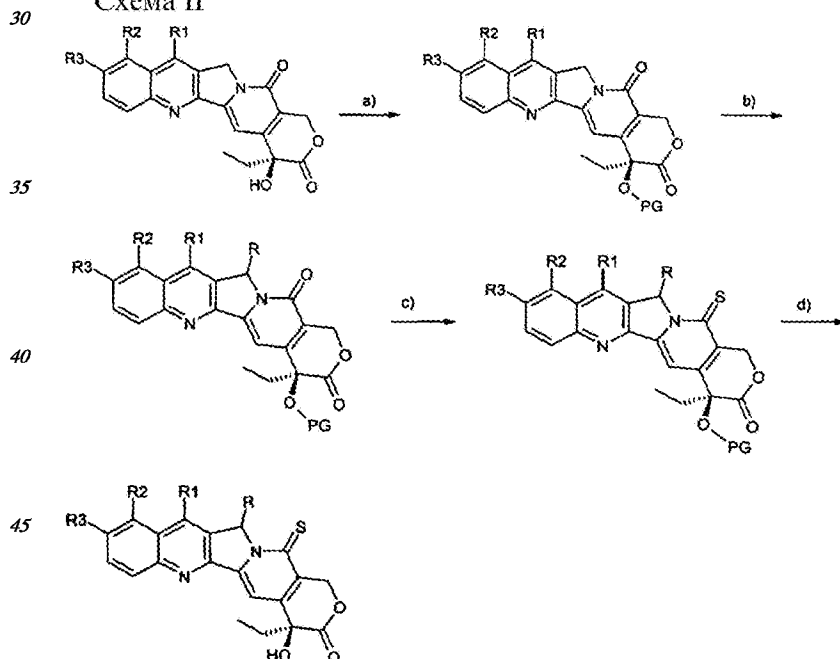


На схеме I R, R1, R2 и R3 имеют значения, описанные выше, и PG представляет собой гидрокси-защитную группу.

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 предшественник сильным органическим основанием, предпочтительно LiHMDS.

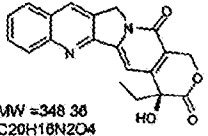
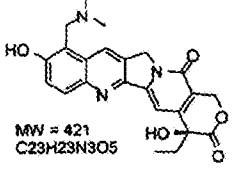
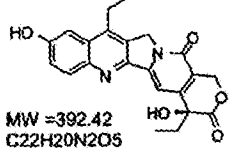
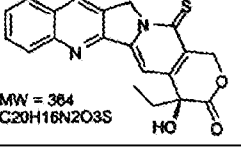
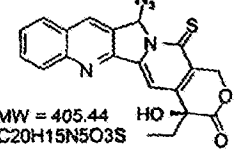
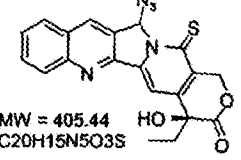
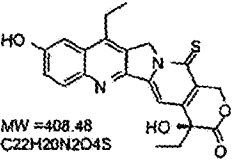
Карбанион реагирует *in situ* с электрофилом, таким как источник галогена, азидакарбонилат, изоцианат, хлоркарбонильное производное, тозилатид.

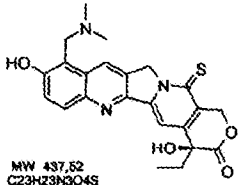
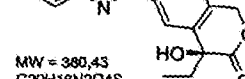
Преобразование пиридинового кольца в тиопиридиновое кольцо можно получить при помощи реакции с 2,4-бис(4-метоксифенил)-1,2,3,4-дитиафосфетан-2,4-дисульфидом (обычно известным как реагент Лаусона) (Cava P.M. et al., Tetrahedron 1985, 41, 5061; Cherkasov RA et al., Tetrahedron 1985 41, 2567; Ghattas AAG 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 IC ₅₀ (мкг/мл) Количество клеток
Камптотецин	 MW = 348.38 C ₂₀ H ₁₆ N ₂ O ₄	0,115±0,0174
Топотекан	 MW = 421 C ₂₃ H ₂₃ N ₃ O ₅	0,63±0,44
SN38	 MW = 392.42 C ₂₂ H ₂₀ N ₂ O ₅	0,0865±0,0049
IDN 6070 (тиокамптотецин)	 MW = 364 C ₂₀ H ₁₆ N ₂ O ₃ S	0,05±0,021
IDN 6092	 MW = 405.44 C ₂₀ H ₁₅ N ₅ O ₃ S	0,3±0,07
IDN 6093	 MW = 405.44 C ₂₀ H ₁₅ N ₅ O ₃ S	0,72±0,2
IDN 6156 Тио-SN38	 MW = 408.48 C ₂₂ H ₂₀ N ₂ O ₄ S	0,0095±0,0007

5	<p>IDN 6180 Тиотопотекан</p>	 <p>MW 437,52 C₂₃H₂₃N₃O₄S</p>	<p>0,115±0,021</p>
10	<p>IDN 6181 10-гидрокситиокампитотетин</p>	 <p>MW = 380,43 C₂₀H₁₈N₂O₄S</p>	<p>0,035±0,011</p>

Анализ цитотоксичности показал, что серосодержащие производные кампитотетина 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 кампитотетин), 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.

35	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 инъекционные или инфузионные растворы.

Подходящим образом составленные в композицию соединения по настоящему изобретению могут применяться для лечения солидных опухолей и лейкозиев, 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 лейкозиев.

ПРИМЕРЫ

Пример I - 20-OTES-камптотетин

Камптотетин (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 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH} = 30/1$). 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.

^1H 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-тиокамптотетин

Камптотетин 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/АсОEt = 1/1). Растворитель выпаривают в вакууме и остаток очищают флеш-хроматографией (SiO_2 , гексан/АсОEt=4/1, затем 7/2) с получением таким образом искомого продукта (0,578 г, 1,21 ммоль, 84%) в виде ярко-желтого твердого вещества.

^1H 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 тиокамптотетина (IDN 6070)

20-OTES тиокамптотетин (0,150 г, 0,314 ммоль) растворяют в безводном ТГФ (10 мл) при перемешивании в инертной атмосфере, затем добавляют туда по каплям $\text{Et}_3\text{N} \cdot 3\text{HF}$ (0,140 мл, 0,816 ммоль). Реакционную смесь подвергают реакции в течение 48 часов при комнатной температуре, контролируя при помощи ТСХ исчезновение реагента (гексан/АсОEt = 1/1). Растворитель выпаривают в вакууме и остаток очищают флеш-хроматографией (SiO_2 , гексан/АсОEt=2/1, затем 1/1) с получением таким образом искомого продукта (0,112 г, 0,307 ммоль, 98%) в виде ярко-желтого твердого вещества.

^1H 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

5 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
10 чего добавляют 4-диметиламинопиридин (DMAP) (0,031 г, 0,255 ммоль). Через 52 часа реакционную смесь выпаривают в вакууме, контролируя при помощи ТСХ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}=10/1$) полное исчезновение реагента. Затем твердое вещество повторно растворяют в CH_2Cl_2 и промывают с помощью H_2O и насыщенного NH_4Cl . Водную
15 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.

^1H 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
20 (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,
25 131,9, 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 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{ТГФ} = 1:$
1 (8 мл) в инертной атмосфере. Добавляют туда имидазол (0,081 г, 1,20 ммоль) после
30 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/ $\text{AcOEt} = 1/1$) исчезновение реагента. Затем твердое вещество повторно растворяют в CH_2Cl_2 и промывают с помощью H_2O и насыщенного NH_4Cl . Водную
35 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/ $\text{AcOEt} = 1/1$) с получением таким образом искомого продукта (0,127 г, 0,205 ммоль, 85%) в виде светло-желтого твердого вещества.

^1H 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,
40 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,
45 132,2, 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 тию-SN-38

SN-38 10-OTBDMS 20-OTES (0,127 г, 0,205 ммоль) растворяют в безводном
50 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/ $\text{AcOEt}=2/1$) 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.

¹H 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). ¹³C 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 $\text{Et}_3\text{N} \cdot 3\text{HF}$ (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.

¹H 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). ¹³C 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 $\text{Et}_3\text{N} \cdot 3\text{HF}$ (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.

¹H 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). ¹³C 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 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}=10/1$) 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.

^1H 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 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{ТГФ}=1:1$ (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/АсОEt = 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/АсОEt = 1/1) с получением таким образом искомого продукта (0,116 г, 0,179 ммоль, 80%) в виде светло-желтого твердого вещества.

^1H 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/АсОEt=2/1) исчезновение реагента. Растворитель выпаривают в вакууме и остаток очищают флеш-хроматографией (SiO_2 , гексан/АсОEt=5/1) с получением таким образом искомого продукта (0,047 г, 0,072 ммоль, 40%) в виде ярко-желтого твердого вещества.

^1H 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 $\text{Et}_3\text{N} \cdot 3\text{HF}$ (0,014 мл, 0,086 ммоль). Реакционную смесь подвергают реакции в течение 4 часов при комнатной температуре, контролируя при помощи ТСХ

5 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.

10 ^1H 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

15 (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-ОН 20-OTES (0,039 г, 0,071 ммоль) растворяют в безводном ТГФ (4 мл) при перемешивании в инертной атмосфере, затем добавляют туда по каплям $\text{Et}_3\text{N} \cdot 3\text{HF}$ (0,026 мл, 0,163 ммоль). Реакционную смесь подвергают реакции в течение 40 часов при комнатной температуре, контролируя при помощи ТСХ

20 исчезновение реагента (гексан/ AcOEt = 1/2). Растворитель выпаривают в вакууме и остаток очищают флеш-хроматографией (SiO_2 , гексан/ AcOEt = 1/3) с получением

25 таким образом искомого продукта (0,030 г, 0,069 ммоль, 98%) в виде ярко-желтого твердого вещества.

^1H 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,

35 32,9, 7,8.

Пример XIV - Получение 20-OTES 10-гидроксикамптотетина

10-Гидроксикамптотетин (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

40 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 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ =20/1). Затем твердое

45 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 $\times$ 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

50 виде светло-желтого твердого вещества.

^1H 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 ($\text{CDCl}_3 + 5\% \text{CD}_3\text{OD}$, 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.

5 Пример XV - 10-OTBDMS-20-OTES камптотетин

10-Гидроксид-20-OTES-камптотетин (0,105 г, 0,219 ммоль) растворяют в безводной смеси $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{ТГФ}=1:1$ (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/АсОEt = 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/АсОEt = 1/3) с получением таким образом искомого продукта (0,117 г, 0,197 ммоль, 90%) в виде светло-желтого твердого вещества.

20 ^1H 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, J₁=9,2 Гц J₂=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 тиокамптотетин

10-OTBDMS 20-OTES камптотетин (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/АсОEt = 1/1). Растворитель выпаривают в вакууме и остаток очищают флеш-хроматографией (SiO_2 , циклогексан/АсОEt=4/1) с получением таким образом искомого продукта (0,323 г, 0,530 ммоль, 90%) в виде ярко-желтого твердого вещества.

40 ^1H 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, J₁=9,2 Гц J₂=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.

45 Пример XVII - Получение 10-гидрокситиокамптотетина (IDN 6181)

Тиокамптотетин 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 $\text{Et}_3\text{N} \cdot 3\text{HF}$ (0,670 мл, 4,19 ммоль). Реакционную смесь подвергают реакции в течение 20 часов при комнатной температуре, контролируя при помощи ТСХ исчезновение реагента ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}=25/1$). Растворитель выпаривают в вакууме и остаток очищают флеш-хроматографией (SiO_2 , $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}=25/1$, затем 20/1) с получением таким образом искомого продукта (0,189 г, 0,498 ммоль, 95%) в виде ярко-

желтого твердого вещества.

¹H ЯМР (ТГФ-d₈, 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, J₁=9,2 Гц J₂=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). ¹³C ЯМР (ТГФ-d₈, 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-Гидрокситиокамптотексин (0,150 г, 0,421 ммоль) растворяют в смеси безводного CH₂Cl₂ (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 (CH₂Cl₂/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 CH₂Cl₂ и Et₂O с получением таким образом искомого продукта (0,168 г, 0,370 ммоль, 88%) в виде красно-оранжевого твердого вещества.

¹H ЯМР (DMSO-d₆, 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, CH₂NMe₂), 4,72 (с, 1H, CH₂NMe₂), 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). ¹³C ЯМР (DMSO-d₆, 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-камптотексин

Камптотексин 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 NH₄Cl. Водную фазу экстрагируют с помощью CH₂Cl₂ (3×15 мл) и органические фазы объединяют, сушат над Na₂SO₄, фильтруют и концентрируют в вакууме. Остаток очищают флеш-хроматографией (SiO₂, 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: ¹H ЯМР (CDCl₃, 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). ¹³C ЯМР (CDCl₃, 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: ^1H 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, $^1J_{\text{HF}}=60,8$ 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, $^1J_{\text{CF}}=214,8$ Гц, C-5), 75,0, 65,8, 33,3, 7,9, 7,1, 6,4.

10 Пример XX - Получение первого диастереомера 5-F-20-ОН-камптотетина

Первый диастереомер 5-F-20-OTES-камптотетина (0,025 г, 0,052 ммоль) растворяют в безводном ТГФ (5 мл) при перемешивании в инертной атмосфере. Затем добавляют туда по каплям $\text{Et}_3\text{N} \cdot 3\text{HF}$ (0,060 мл, 0,368 ммоль). Реакционную смесь подвергают реакции в течение 28 часов при комнатной температуре, контролируя при помощи

15 ТСХ исчезновение реагента (гексан/АсОEt = 1/2). Растворитель выпаривают в вакууме, и остаток хроматографируют (SiO_2 , гексан/АсОEt = 1/1) с получением таким образом искомого продукта (0,019 г, 0,051 ммоль, 98%) в виде светло-желтого твердого вещества.

20 ^1H 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, $^1J_{\text{HF}}=61,2$ 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,

25 126,4, 121,7, 98,8, 93,8 (д, $^1J_{\text{CF}}=214,0$ Гц, C-5), 72,5, 66,0, 31,5, 7,8.

Пример XXI - Получение второго диастереомера 5-F-20-ОН-камптотетина

Второй диастереомер 5-F-20-OTES-камптотетина (0,025 г, 0,052 ммоль) растворяют в безводном ТГФ (5 мл) при перемешивании в инертной атмосфере, затем добавляют

30 туда по каплям $\text{Et}_3\text{N} \cdot 3\text{HF}$ (0,060 мл, 0,368 ммоль). Реакционную смесь подвергают реакции в течение 28 часов при комнатной температуре, контролируя при помощи ТСХ исчезновение реагента (гексан/АсОEt = 1/2). Растворитель выпаривают в вакууме и остаток хроматографируют (SiO_2 , гексан/АсОEt = 1/1) с получением таким образом

35 искомого продукта (0,018 г, 0,050 ммоль, 97%) в виде светло-желтого твердого вещества.

^1H 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, $^1J_{\text{HF}}=60,4$ 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,

40 126,4, 121,6, 98,9, 93,7 (д, $^1J_{\text{CF}}=214,0$ Гц, C-5), 72,5, 66,1, 31,6, 7,8.

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

45 Камптотетин 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

50 мл). После 2 часов при -78°C температуре позволяют подняться до 25°C и контролируют исчезновение реагента при помощи ТСХ (гексан/АсОEt=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 диастереомера, очищают флеш-хроматографией (SiO_2 , гексан/АсОEt=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: ^1H 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: ^1H 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-ОН-камптотетина

Диастереомер 1 5-N3-20-OTES-камптотетина (0,070 г, 0,139 ммоль) растворяют в безводном ТГФ (6 мл) при перемешивании в инертной атмосфере, затем добавляют туда по каплям $\text{Et}_3\text{N} \cdot 3\text{HF}$ (0,170 мл, 1016 ммоль). Реакционную смесь подвергают реакции в течение 26 часов при комнатной температуре, контролируя при помощи ТСХ исчезновение реагента (гексан/АсОEt = 1/1). Растворитель выпаривают в вакууме и остаток очищают флеш-хроматографией (SiO_2 , гексан/АсОEt = 1/1) с получением таким образом искомого продукта (0,053 г, 0,136 ммоль, 98%) в виде светло-желтого твердого вещества.

^1H 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-камптотетина

Диастереомер 2 5-N3-20-OTES-камптотетина (0,055 г, 0,109 ммоль) растворяют в безводном ТГФ (6 мл) при перемешивании в инертной атмосфере, затем добавляют туда по каплям $\text{Et}_3\text{N} \cdot 3\text{HF}$ (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/АсОEt = 1/1). Растворитель выпаривают в вакууме и остаток очищают флеш-хроматографией (SiO_2 , гексан/АсОEt = 1/1) с получением таким образом искомого продукта (0,042 г, 0,107 ммоль, 98%) в виде светло-желтого твердого вещества.

^1H 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-NH₂-камптотецина

Диастереомер 2 5-N3-20-ОН-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/H₂ (баллонное давление H₂). 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 CH₂Cl₂ (2×15 мл). Растворитель выпаривают в вакууме. ¹H ЯМР спектроскопия реакционного материала показала наличие искомого продукта в виде смеси 1:1 двух эимеров по положению C5. Флеш-хроматография (SiO₂, CH₂Cl₂/MeOH = 35/1, затем 25/1) позволяет разделить смесь двух диастереомеров (0,046 г, 0,126 ммоль, 98%). ¹H ЯМР (CDCl₃, 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+NH₂), 1,98-1,82 (м, 2H, H-19), 1,07-1,01 (м, 3H, Me). ¹³C ЯМР (CDCl₃, 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 М раствор LiHMDS в ТГФ (0,281 мл, 0,281 ммоль). Через 20 минут добавляют ди-трет-бутилазодикарбоксилат (ДТВАС) (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 NH₄Cl. Водную фазу экстрагируют с помощью CH₂Cl₂ (3×15 мл) и органические фазы объединяют, сушат над Na₂SO₄, фильтруют и концентрируют в вакууме. Остаток очищают флеш-хроматографией (SiO₂, 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: ¹H ЯМР (CDCl₃, 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). ¹³C ЯМР (CDCl₃, 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: ¹H ЯМР (CDCl₃, 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). ¹³C ЯМР (CDCl₃, 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-ОН-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 Et₃N•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/АсОEt = 3/2). Растворитель выпаривают в вакууме и остаток очищают флеш-хроматографией (SiO₂, гексан/АсОEt = 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 CH₂Cl₂/пентан = 1/50.

¹H ЯМР (CDCl₃, 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). ¹³C ЯМР (CDCl₃, 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-ОН-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 Et₃N•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/АсОEt = 3/2). Растворитель выпаривают в вакууме и остаток очищают флеш-хроматографией (SiO₂, гексан/АсОEt = 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 CH₂Cl₂/пентан = 1/50.

¹H ЯМР (CDCl₃, 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). ¹³C ЯМР (CDCl₃, 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

Камптотетин 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/АсОEt = 3/1). Наблюдают образование двух диастереомеров. После 90 минут при комнатной температуре реакцию прерывают добавлением насыщенного NH₄Cl. Водную фазу экстрагируют с помощью CH₂Cl₂ (3×15 мл) и органические фазы объединяют, сушат над Na₂SO₄, фильтруют и концентрируют в вакууме. Остаток очищают флеш-хроматографией (SiO₂, гексан/АсОEt = 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: ^1H 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: ^1H 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-дibenзилоксикарбонилгидразино-20-ОН-камптотетина

Первый диастереомер 5-дibenзилоксикарбонилгидразино-20-OTES-камптотетина (0,140 г, 0,184 ммоль) растворяют в безводном ТГФ (6 мл) при перемешивании в инертной атмосфере, затем добавляют туда по каплям $\text{Et}_3\text{N} \cdot 3\text{HF}$ (0,225 мл, 1380 ммоль). Реакционную смесь подвергают реакции в течение 52 часов при комнатной температуре, контролируя при помощи ТСХ исчезновение реагента (гексан/АсОEt = 1/3). Растворитель выпаривают в вакууме и остаток очищают флеш-хроматографией (SiO_2 , гексан/АсОEt = 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.

^1H 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-дibenзилоксикарбонилгидразино-20-ОН-камптотетина

Второй диастереомер 5-дibenзилоксикарбонилгидразино-20-OTES-камптотетина (0,140 г, 0,184 ммоль) растворяют в безводном ТГФ (6 мл) при перемешивании в инертной атмосфере, затем добавляют туда по каплям $\text{Et}_3\text{N} \cdot 3\text{HF}$ (0,150 мл, 0,921 ммоль). Реакционную смесь подвергают реакции в течение 55 часов при комнатной температуре, контролируя при помощи ТСХ исчезновение реагента (гексан/АсОEt = 3/2). Растворитель выпаривают в вакууме, и остаток очищают флеш-хроматографией (SiO_2 , гексан/АсОEt = 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.

^1H 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

С), 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
5 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/АсОEt = 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/АсОEt = 1/1) с получением таким образом искомого продукта (0,048 г, 0,085 ммоль, 95%) в виде желтого твердого
10 вещества (смесь E/Z=70/130).

^1H 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^tBuE), 1,35 (с, 9H, O^tBUZ), 1,02-0,94 (м, 12H, E+Z), 0,80-0,70 (м, 6H, E+Z).
20 ^{13}C 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, $\text{OC}(\text{CH}_3)_3$), 81,2 (Z, $\text{OC}(\text{CH}_3)_3$), 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(CH₃)₃ E), 27,5 (OC(CH₃)₃ Z), 7,9 (E+Z C-18), 7,2 (E+Z), 6,4 (E+Z).
25

30 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
35 реакции в течение 18 часов при 90°C, контролируя при помощи ТСХ (гексан/АсОEt = 3/1) исчезновение реагента. Растворитель выпаривают в вакууме и остаток очищают флеш-хроматографией (SiO_2 , гексан/АсОEt = 4/1) с получением таким образом искомого продукта (0,060 г, 0,102 ммоль, 71%) в виде ярко-желтого твердого вещества.

^1H 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^tBUE), 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,
40 149,8, 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 $\text{Et}_3\text{N} \cdot 3\text{HF}$
50 (0,127 мл, 0,780 ммоль). Реакционную смесь подвергают реакции в течение 18 часов при комнатной температуре, контролируя при помощи ТСХ ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ = 25/1) исчезновение реагента. Растворитель выпаривают в вакууме и остаток очищают флеш-

хроматографией (SiO₂, гексан/AcOEt = 211) с получением таким образом искомого продукта (0,048 г, 0,102 ммоль, 95%) в виде ярко-желтого твердого вещества.

¹H ЯМР (CDCl₃, 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^tBuZ), 1,42 (с, 9H, O^tBuZ), 1,03 (т, 3H, J=7,2 Гц, H-18 Z), 1,02 (т, 3H, J=7,2 Гц, H-18 E). ¹³C ЯМР (CDCl₃, 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

Н460 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 засеивали в двух параллелях в 6-луночной 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 IC₅₀. IC₅₀ определяют как концентрацию, ингибирующую рост клеток на 50% по сравнению с ростом в необработанном контроле.

Пример XXXVI - Анализ топоизомеразы-I-зависимого разрыва ДНК

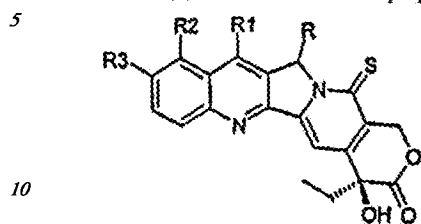
Разрывы ДНК определяли при помощи очищенного геля 751-bp BamHI-EcoRI ДНК SV40 (Beretta GL, Binaschi M, Zagni AND, Capuani L, Capranico G. Tethering a type IB topoisomerase to a DNA site by enzyme fusion to a heterologous site-selective DNA-binding protein domain. Cancer Res 1999; 59:3689-97). Фрагменты ДНК помечали только по 3'. Реакцию разрыва ДНК (20000 имп./мин/образец) проводили в 20 мл смеси 10 mM Трис-HCl (pH 7,6), 150 mM KCl, 5 mM MgCb, 15 мкг/мл БСА, 0,1 mM 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 К 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 mM 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 PhosphorImager 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:

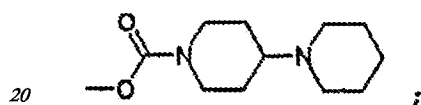


(I)

где R представляет собой водород, -N3;

R1 представляет собой водород, этил, группу $-\text{CH}=\text{N}-\text{O}-\text{C}(\text{CH}_3)_3$;R2 представляет собой водород, $-\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$;

R3 представляет собой водород, гидроксилгруппу



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

2. Соединение, выбранное из группы, состоящей из:

а) тиокамптогесина;

с) тиоSN38;

d) тиотопотекана;

е) тиоиринотекана;

f) тиогиматекана.

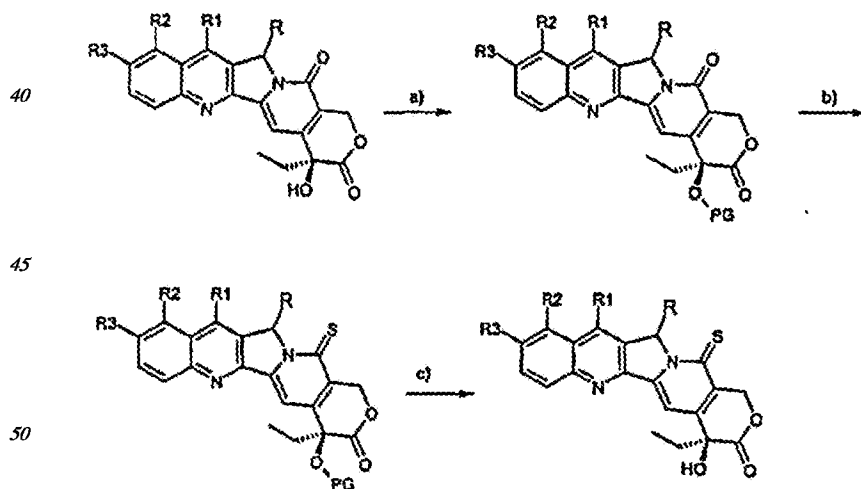
3. Способ получения соединений формулы (I), включающий стадии, показанные на схеме I, где:

а) защита гидроксигрупп предшественника;

b) превращение пиридинового кольца в тиопиридиновое кольцо;

с) удаление защитных групп;

Схема I



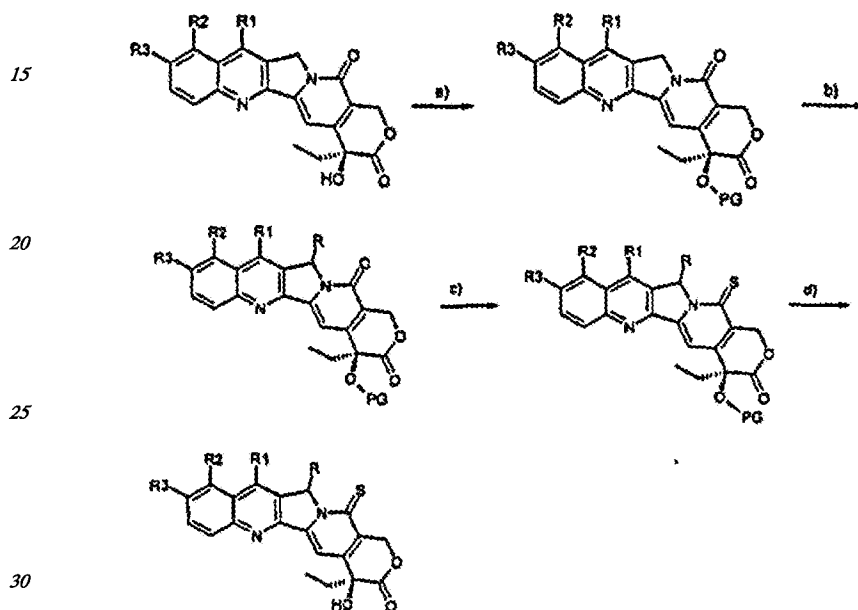
где R, R1, R2 имеют значения указанные в п.1, R3 представляет собой водород или

гидроксил, необязательно защищенный группой $-\text{Si}(\text{CH}_3)_2\text{C}(\text{CH}_3)_3$ и PG представляет собой OH-защитную группу, которая представляет собой $-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$.

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 лейкозиев.

10. Применение по п.9, где солидные опухоли и лейкозиев 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 лейкозиев.

Refine search: → Results → EP1155702 (A1)

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; A61K47/48338; C08B37/0021

Application number:

EP19990952805 19991029 ⓘ Global Dossier

Priority number(s):

WQ1999JP06016 19991029 ; JP19980310139 19981030 ; JP19980329272 19981119

Also published as:

🔍 EP1155702 (A4) → AU6488098 (A) 🔍 AU765409 (B2) → BR9915198 (A) 🔍 CA2348931 (A1) → more

Abstract of EP1155702 (A1)

Translate this text into ⓘ

Select language

 powered by EPO and Google

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.

公告本

申請日期	88 10 30
案 號	91113738
類 別	G01N 21/50

A61K 47/48, 47/50
6/26

(以上各欄由本局填註)

發明專利說明書

一、發明名稱	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
三、申請人	住、居所	1. 2. 3. 4. 5. 6. 地址同 日本國東京都江戸川區北葛西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
	姓 名 (名稱)	第一製藥股份有限公司
三、申請人	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
三、申請人	代 表 人 姓 名	森田清
	代 表 人 姓 名	森田清

004780

裝

訂

線

(由本局填寫)

承辦人代碼：
大 類：
I P C 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)

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝

有關微生物已寄存於： 寄存日期： 寄存號碼：

訂

線

經濟部智慧財產局員工消費合作社印製

004782

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 C₁₋₄ 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)

訂
線

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，經由席夫碱或醯胺鍵，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 C₁₋₄ 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 C₁₋₄ 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

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)及葡萄糖-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合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

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)

訂
線

I232930⁵¹

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合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)

訂

線

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]吡啶并[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。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

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)

訂
線

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'-CH₂-O-CO- 所示之基或從 N 末端起為 -Gly-Gly-Gly-Phe-NH-Y'-CH₂-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 C₁₋₄ 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-甘氨酸胺基-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)

訂
線

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)

訂線

I232930⁵¹

A7

B7

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 -C₆H₄-CH₂-O-(-C₆H₄-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、巰基、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)

訂

線

I232930⁵¹

A7

B7

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)、長春新碱(vincristine)、長春碱(vinblastine)、甲基蝶啶胺(methotrexate)、鉑類抗腫瘍劑(順氯氬鉑(cisplatin)或其衍

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明 (12)

生物)、塔奇索(taxol)或其衍生物、喜樹碱(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]吡啶并[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(mefenamic acid)、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 C₁₋₄ 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)

訂
線

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)

訂線

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)

訂
線

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)

訂
線

I232930⁵¹A7
B7

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。葡聚糖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)

訂
線

004798

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、二甲亞碲等)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°C 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)

訂
線

I232930⁵¹

A7

B7

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。

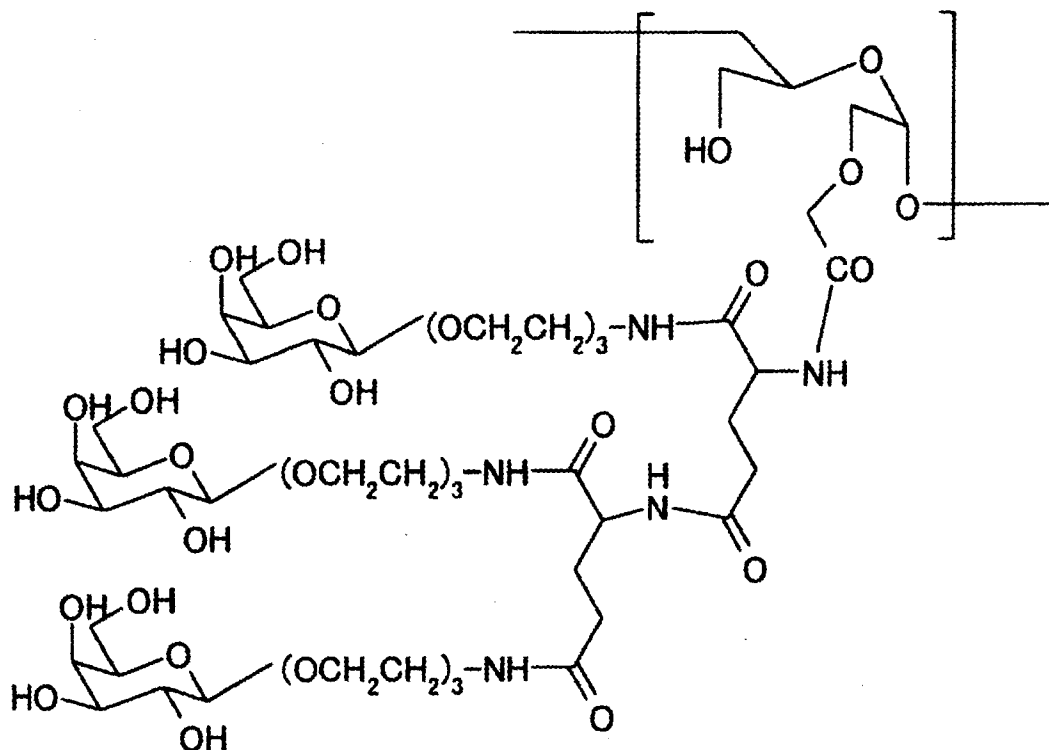
使用連結基時，對於連結基之種類並無特別限制，以利用例如 $-O-(CH_2)_n-NH-$ (n 為 1 至 16 之整數) 或 $-(O-CH_2CH_2)_m-NH-$ (m 為 1 至 10 之整數) 所示之連結基較理想。可經由將該等連結基之 O 末端或 N 末端，較好 O 末端以 O- α -糖苷鍵或 O- β -糖苷鍵與糖化合物結合，另一端將羧基 C_{1-4} 烷基葡聚糖多醇之羧基與鹽胺基或酯結合，將羧基 C_{1-4} 烷基葡聚糖多醇用糖化合物修飾。

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)

訂
線

五、發明說明 (19)



(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

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、脫氧核糖、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

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-甲基吡啶、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。例如可將羧基 C_{1-4} 烷基葡聚糖多醇或

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂
線

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，經由通過三乙胺型樹脂進行轉換。

醫藥化合物本身與羧基 C₁₋₄ 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 C₁₋₄ 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 C₁₋₄ 烷基葡聚糖多醇之羧基結合成鹽胺即可。間隔基與羧基 C₁₋₄ 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 C₁₋₄ 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鹽胺。

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鹽胺時，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。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

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、二甲亞砷、乙醯胺、N-甲基吡咯烷、環丁酮等較理想。對於被糖化合物修飾之羧基 C₁₋₄ 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 C₁₋₄ 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 C₁₋₄ 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)

訂

線

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)

訂

線

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 $\text{C}_6\text{H}_4\text{-CH}_2\text{-O-(-C}_6\text{H}_4\text{-}$ 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)

訂

線

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、巰基、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 C₁₋₄ 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'-CH₂-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 C₁₋₄ 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

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)甲基丙烯鹽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)

訂

線

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

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 $\text{-C}_6\text{H}_4\text{-CH}_2\text{-O-}$ ($\text{-C}_6\text{H}_4\text{-}$ 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

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]吡啶并[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 400 μ g/ml 之上述 DDS 化合物 10 μ l 中加入 180 μ l 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 10 μ l。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)

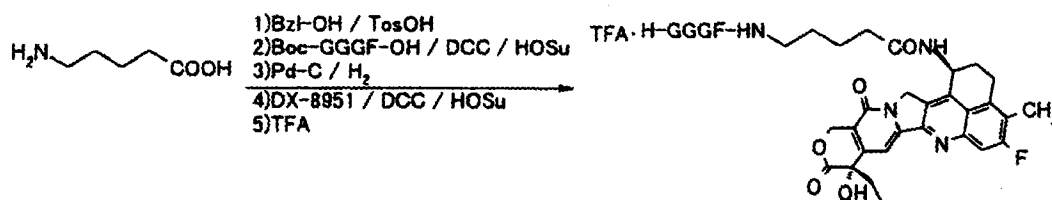
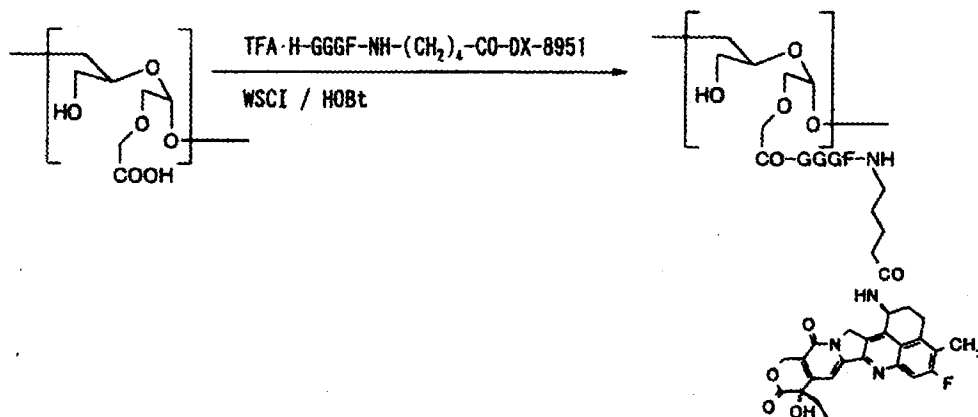
訂

線

五、發明說明 (30)

有 50% 乙腈之 0.5N HCl 溶液 200 μ l，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(4.6 $\times$ 100mm；3.5 μ m，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 乙酸钠(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)

訂

線

五、發明說明 (31)

CM-Dex-PA 與 DX-8951 經由 -Gly-Gly-Gly-Phe-NH-(CH₂)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(CH₂Cl₂:MeOH = 20:1)精製，獲得 Boc-Gly-Gly-Gly-Phe-NH-(CH₂)₄-COOBzl 380mg(Bzl 為苄基)。將 Boc-Gly-Gly-Gly-Phe-NH-(CH₂)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-(CH₂)₄-COOH 330mg。

將 Boc-Gly-Gly-Gly-Phe-NH-(CH₂)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(CH₂Cl₂: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

五、發明說明 (32)

Boc-Gly-Gly-Gly-Phe-NH-(CH₂)₄-CO-DX-8951 110mg。將 Boc-Gly-Gly-Gly-Phe-NH-(CH₂)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-(CH₂)₄-CO-DX-8951 之三氟乙酸鹽 100mg。

¹H-NMR (DMSO-d₆): 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-(CH₂)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

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 0.22 μ m 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 10 μ l 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 490 μ l。反應液在 40°C 培育 2 小時後加入含有 50%乙腈之 0.5N HCl 溶液 500 μ l，游離之水解物[NH₂-(CH₂)₄-CO-DX-8951]用 HPLC 定量。HPLC 之測定為使用對稱 C18(4.6×100mm；3.5 μ m，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 NH₂-(CH₂)₄-CO-DX-8951 約 4.8 分鐘溶出。將 NH₂-(CH₂)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)② α -胰凝乳蛋白酶(0.1M Tris-HCl pH 8.0)、③熱溶解素(0.1M Tris-HCl/1mM CaCl₂ 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 180 μ l 中加入 10 μ l 調製成 400 μ g/ml 之化合物 1(終濃度：20 μ g/ml)。於該混合物中加入用各緩衝液調製成 100mg/ml 之各酵素 10 μ l 後(終濃度：5mg/ml)在 40°C 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)

訂
線

五、發明說明 (34)

入含有 50% 乙腈之 0.5N HCl 溶液 200 μ l，取 10 μ l 用 HPLC 進行分析。用對稱 C18(4.6 $\times$ 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(1×10^6 細胞/老鼠)移植至 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 25 μ l 中加入 80% 甲醇水 100 μ l 後以 12,000rpm 進行離心分離 5 分鐘，取上澄液 25 μ l 加入用 0.1M Tris-HCl pH8.5/0.1M CaCl₂ 調製成 2mg/ml 之熱溶解素溶液 225 μ l，在 50 $^{\circ}$ C 進行反應 1 小時後加入含有 50% 乙腈之 0.5N HCl 250 μ l，取 20 μ l 進行 HPLC 分析。使用對稱 C18(4.6 $\times$ 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

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)移植至 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 25 μ l 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 225 μ l，於 40°C 進行反應 2 小時後加入含有 50%乙腈之 0.5N HCl 250 μ l，以 12,000rpm 進行離心分離 5 分鐘，取上澄液 10 μ l 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

004817

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)

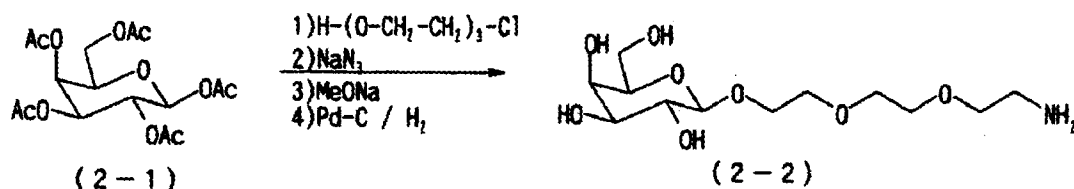
訂

線

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 化合物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



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)，加入三氯化硼乙醚錯合物

(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。

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO}-d_6$): 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)

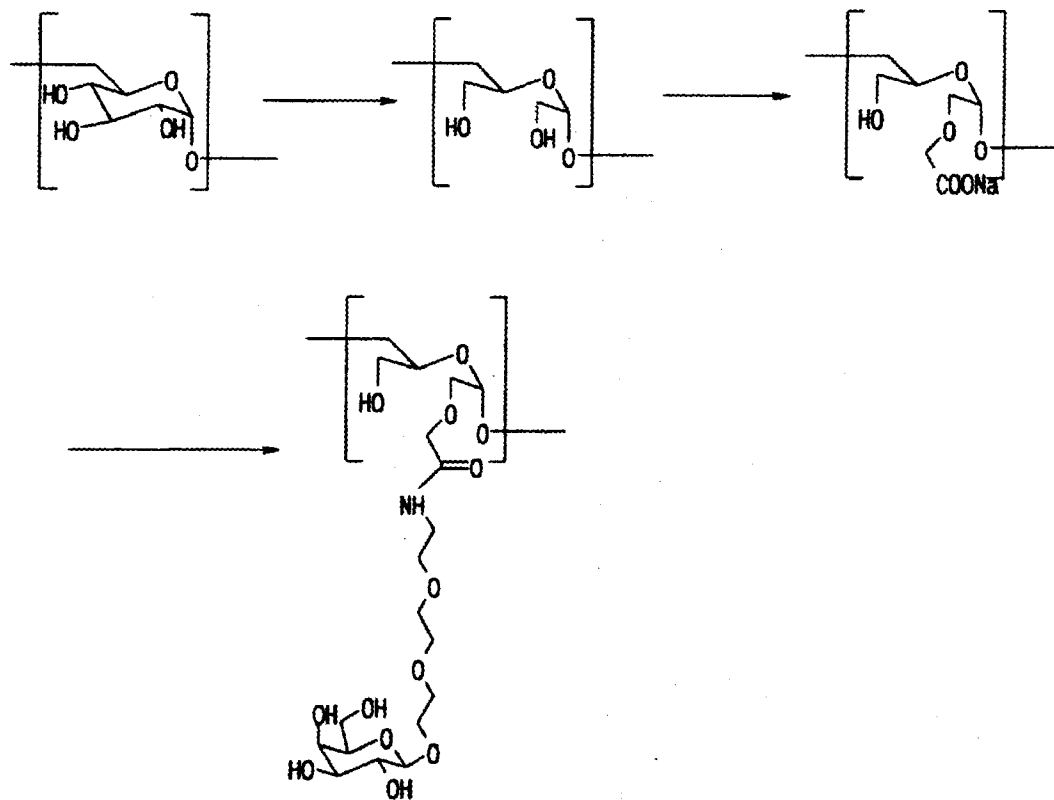
(B)半乳糖修飾 CM 葡聚糖多醇之合成

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明 (38)



(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

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

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。

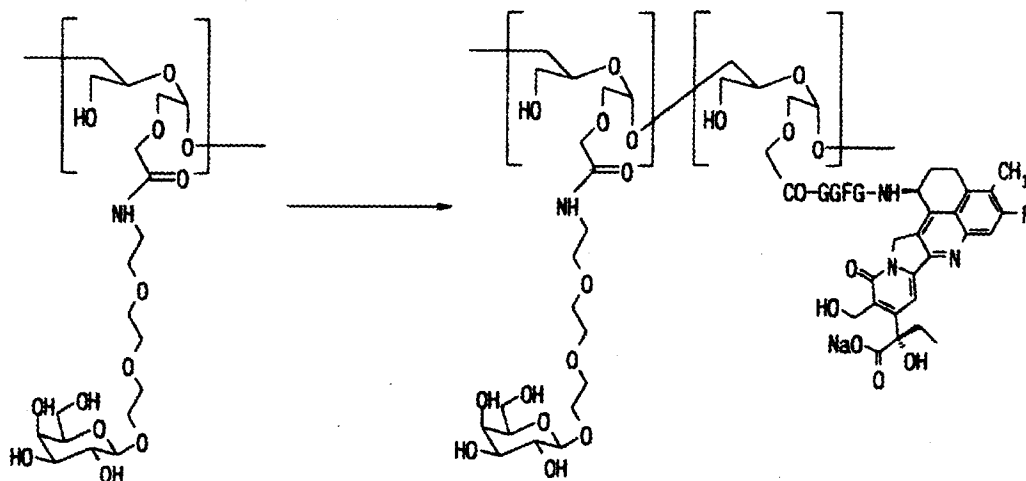
(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

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(0.22 μ m)過濾後凍結乾燥，獲得標記化合物 900mg。將本化合物溶解於 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)

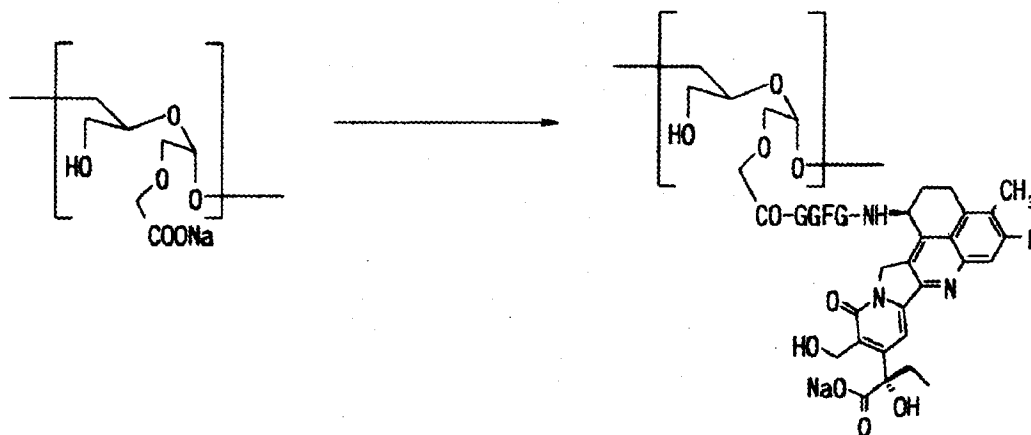
訂

線

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 (Et₃NH⁺)，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 (0.22 μm) 過濾後凍結乾燥，獲得標記化合物 1.4g。將本化合物溶解於 0.1M

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

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 50 μ l 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 450 μ l，於 40°C 反應 2 小時之後加入含有 50%乙腈之 0.5N HCl 溶液 500 μ l，以 12,000rpm 離心分離 5 分鐘，取上澄液 20 μ l 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、2 μ l/ml，各取 50 μ l，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)

訂

線

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)

訂

線

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)

訂

線

五、發明說明 (45)

(0.22 μ m)過濾後凍結乾燥，獲得標記化合物 180mg。將本化合物溶解於 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-氨基乙氧基)乙氧基]乙基- β -D-2-氨基-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-乙醯氨基-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-氨基-2-脫氧半乳糖(1.98g)。

$^1\text{H-NMR}$ (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-氨基-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

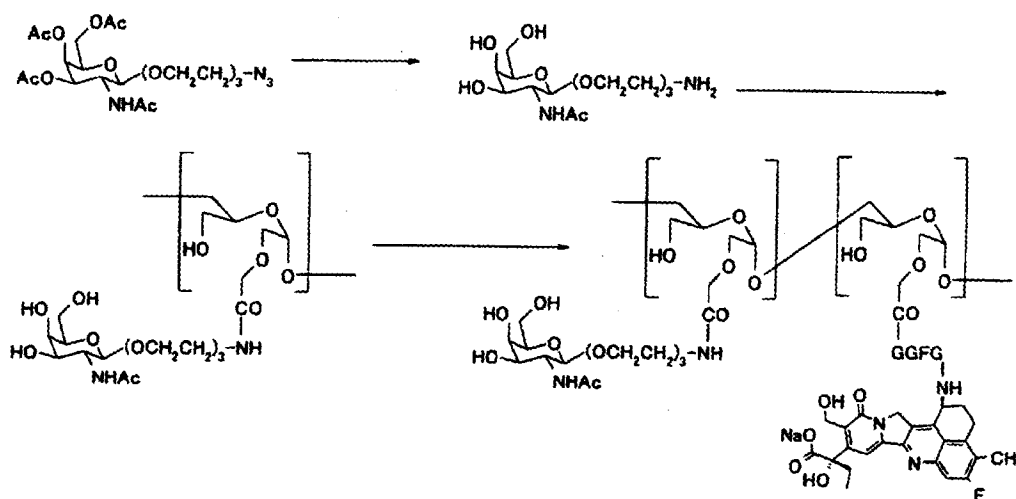
線

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)。

¹H-NMR (CD₃OD) 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

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 (0.22 μ m) 過濾後凍結乾燥，獲得標記化合物 (203mg)。將本化合物溶解於 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'-CH₂-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'-CH₂-O-CO-DX-8951 (Y' 為對-伸苯基) 之溶液 5 μ l 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 95 μ l。反應液在 40°C 培育 4 小時後

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明 (48)

加入含有 50% 乙腈之 0.5N HCl 溶液 100 μ l, 游離之水解物 [DX-8951] 用 HPLC 定量。HPLC 之測定為使用對稱 C18(4.6 $\times$ 100mm; 3.5 μ m, 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'-CH₂-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'-CH₂-O-CO-DX-8951 之溶液 5 μ l 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 95 μ l。反應液在 40°C 培育 4 小時後加入含有 50% 乙腈之 0.5N HCl 溶液 100 μ l, 游離之水解物 [DX-8951] 用 HPLC 定量。HPLC 之測定為使用對稱 C18(4.6 $\times$ 100mm; 3.5 μ m, 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

五、發明說明 (49)

實例 12：CM-Dex-PA-Gly-Gly-Phe-Gly-NH-(CH₂)₄-CO-

DX-8951 中 DX-8951 含量之測定

於用蒸餾水調製成 100 μ g/ml 之 CM-Dex-PA-Gly-Gly-Phe-Gly-NH-(CH₂)₄-CO-DX-8951 之溶液 5 μ l 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 95 μ l。反應液在 40℃ 培育 4 小時後加入含有 50% 乙腈之 0.5N HCl 溶液 100 μ l，游離之水解物[NH₂-(CH₂)₄-CO-DX-8951]用 HPLC 定量。HPLC 之測定為使用對稱 C18(4.6 $\times$ 100mm；3.5 μ m，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 NH₂-(CH₂)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 10 μ l 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 190 μ l。反應液在 40℃ 培育 2 小時後加入乙腈 200 μ l，游離之水解物[DXR]用 HPLC 定量。HPLC 之測定為使用對稱 RP18(4.6 $\times$ 100mm；3.5 μ m，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

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 之方法製造之平均分子量為 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(400 μ l)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(240 μ l)，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(0.22 μ m)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-(CH₂)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

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- $(\text{CH}_2)_4$ -COOBzl 560mg。將 Boc-Gly-Gly-Phe-Gly-NH- $(\text{CH}_2)_4$ -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- $(\text{CH}_2)_4$ -COOH 300mg。

將 Boc-Gly-Gly-Phe-Gly-NH- $(\text{CH}_2)_4$ -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- $(\text{CH}_2)_4$ -CO-DX-8951400mg。

將 Boc-Gly-Gly-Phe-Gly-NH- $(\text{CH}_2)_4$ -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- $(\text{CH}_2)_4$ -CO-DX-8951 之三氟乙酸鹽 250mg。

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6): δ 8.45-8.55 (m, 2H), 8.28-8.35(m, 2H), 7.95-8.10 (br, 2H), 7.79 (d, 1H, $J=10.7\text{Hz}$), 7.70-7.75 (m, 1H), 7.32 (s, 1H), 7.20-7.30 (m, 5H), 7.15-7.25 (m, 4H), 6.50-6.60 (br, 1H), 5.50-5.60 (m, 1H), 5.40-5.50 (m, 2H), 5.18 (s, 2H), 4.50-4.60 (m, 1H), 3.55-3.95 (m, 7H), 3.00-3.25 (m, 5H), 2.75-2.85 (m, 1H), 2.50 (s, 3H), 2.15-2.25 (m, 4H), 1.86-2.00 (m, 2H), 1.55-1.65(m, 2H), 1.45-1.55(m, 2H), 0.88 (t, 3H, $J=7.35\text{Hz}$)

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

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-(CH₂)₄-CO-DX-8951 之三氟乙酸鹽(30mg)、含有三乙胺(10 μ l)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 0.22 μ m 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 C₁₋₄ 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

I232930⁵¹A5
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。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝

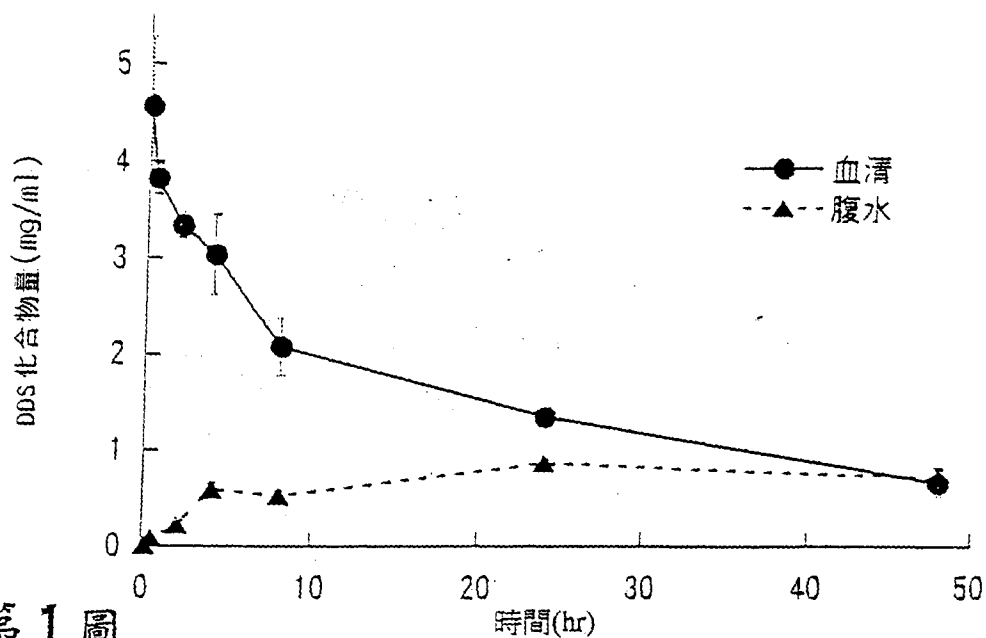
英文發明摘要（發明之名稱：METHOD FOR MEASURING DRUG DELIVERY SYSTEM COMPOUND (DDS)）

A method for measuring a drug delivery system compound (DDS) is presented. The DDS compound contains a carboxy C_{1-4} alkyl dextranpolyalcohol modified with a sugar compound, and a residual group of the pharmaceutical compound bonded to the carboxy C_{1-4} alkyl dextranpolyalcohol. 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.

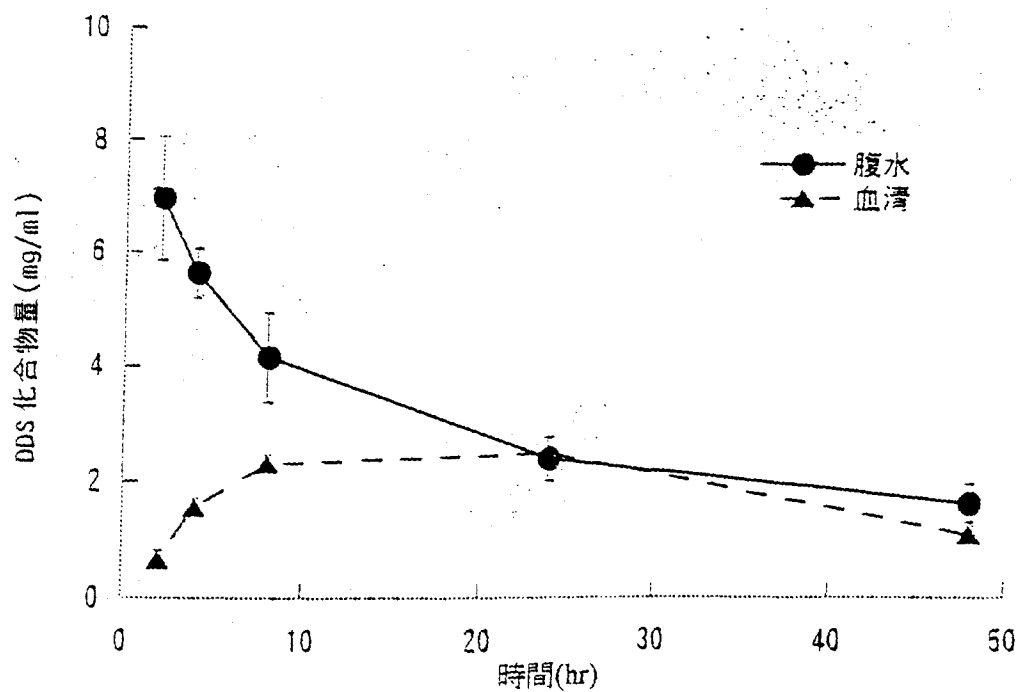
The method includes the step of measuring the hydrolyte obtained by treating the DDS compound with peptidase.

訂

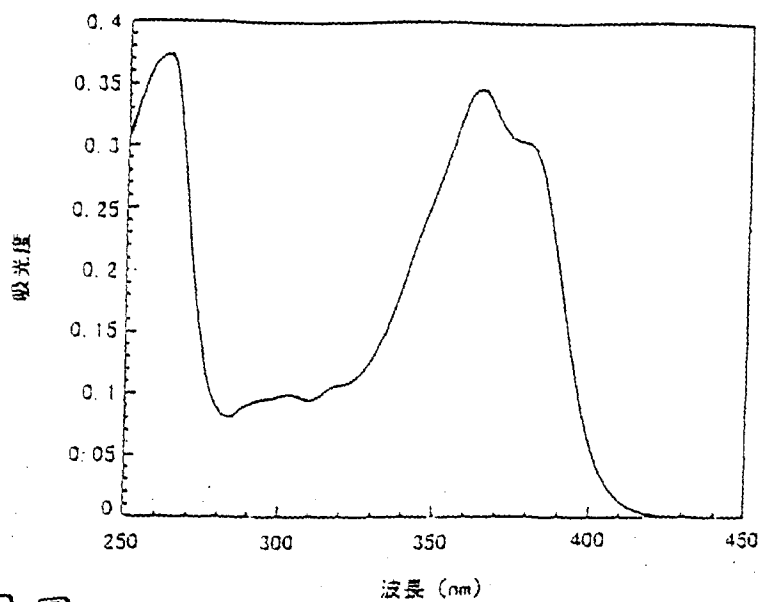
線



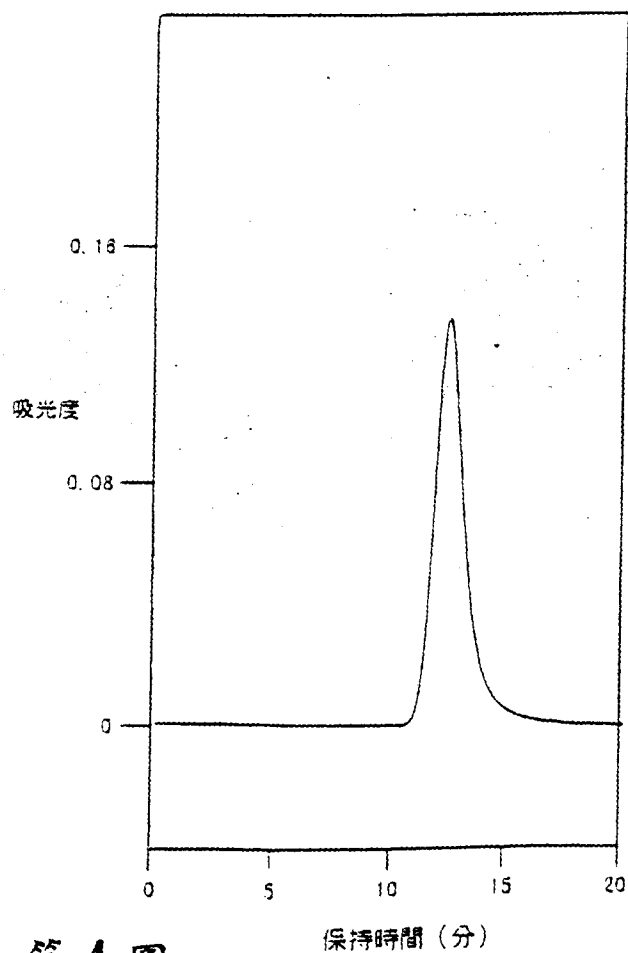
第 1 圖



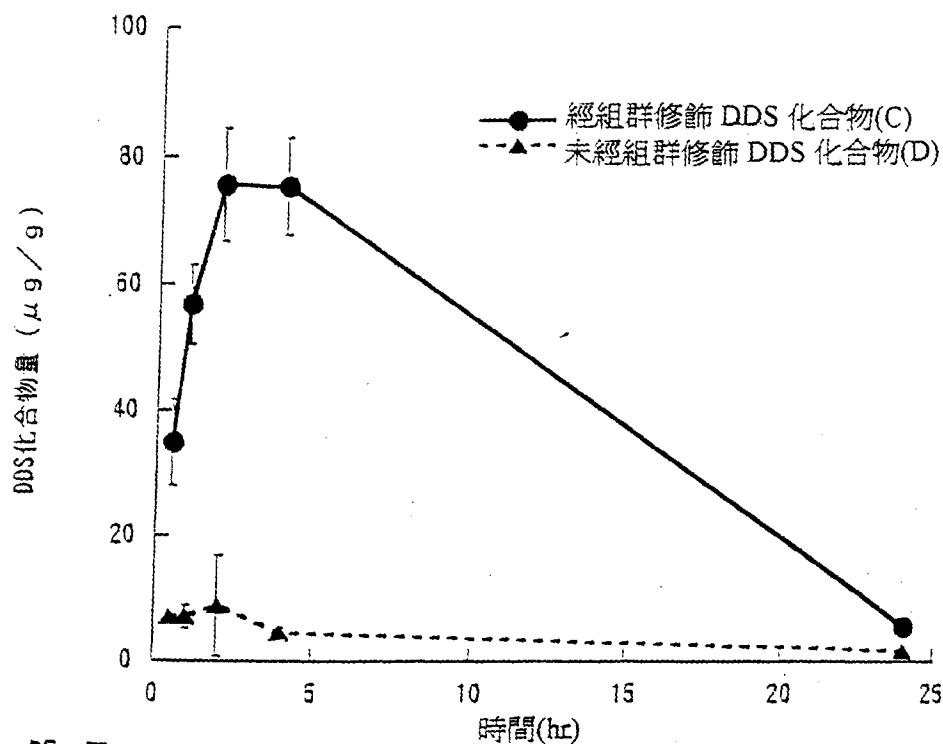
第 2 圖



第 3 圖

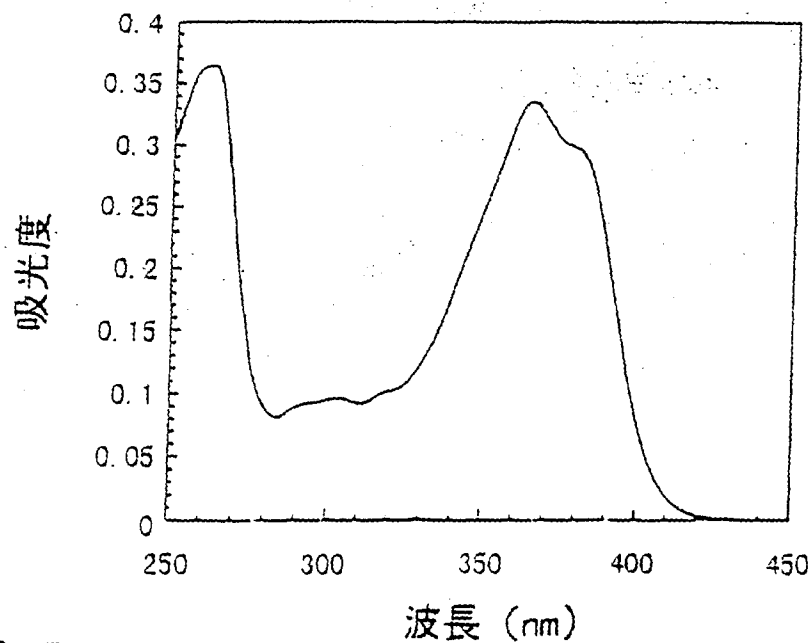


第 4 圖

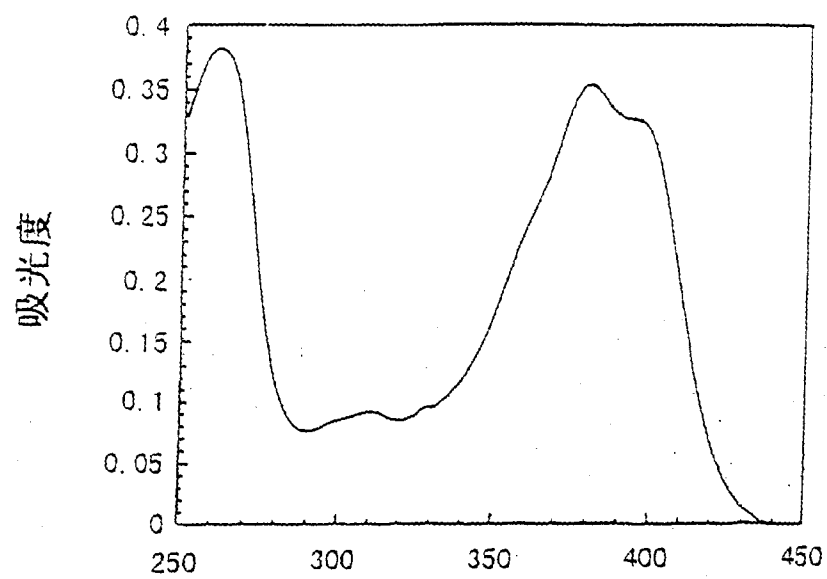


第 5 圖

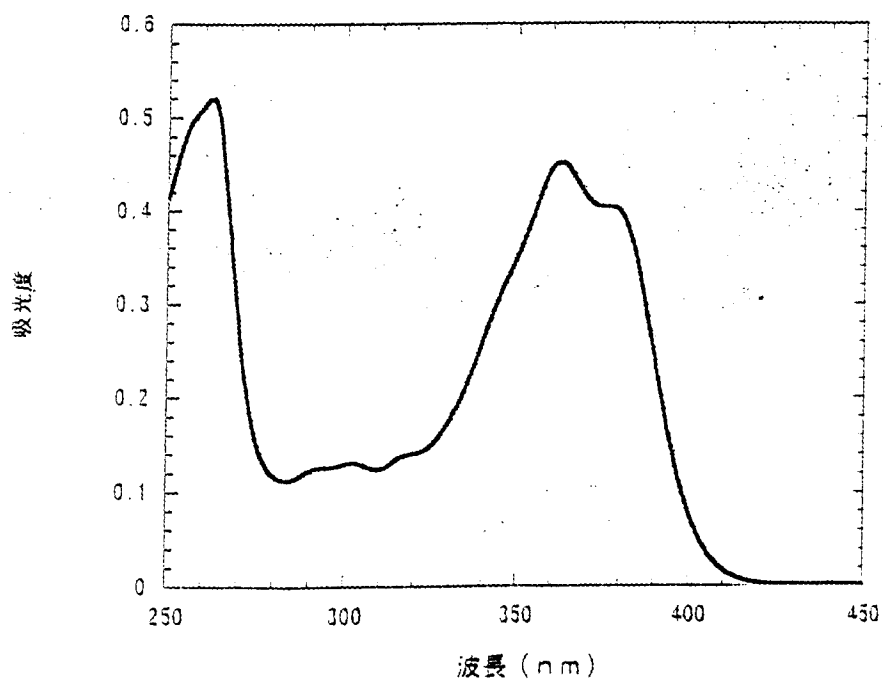
DDS 化合物對肝臟之集積性



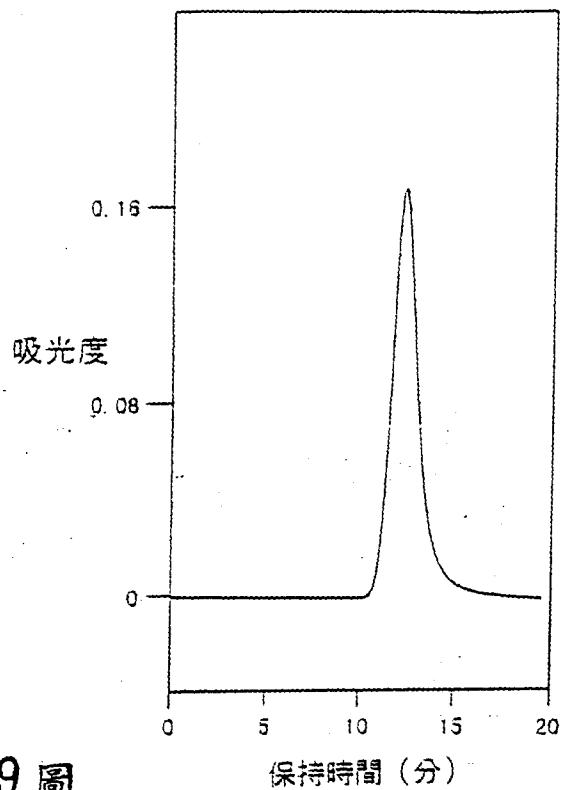
第 6 圖



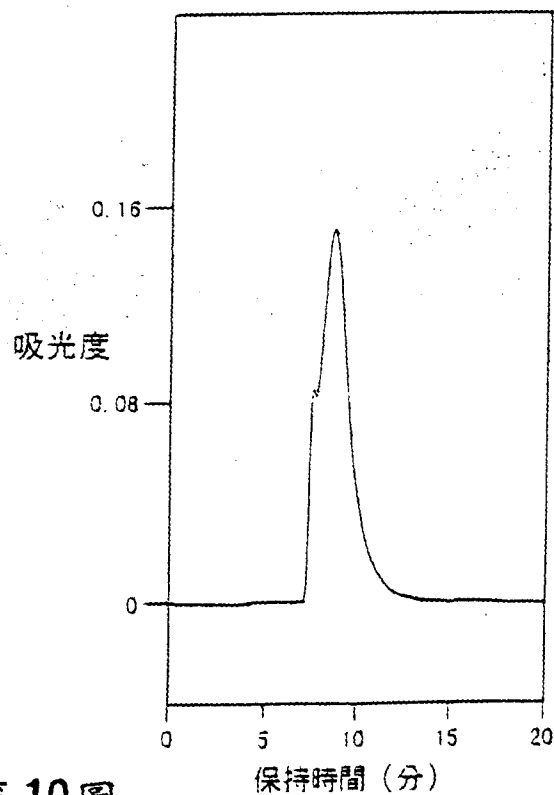
第 7 圖 波長 (nm)



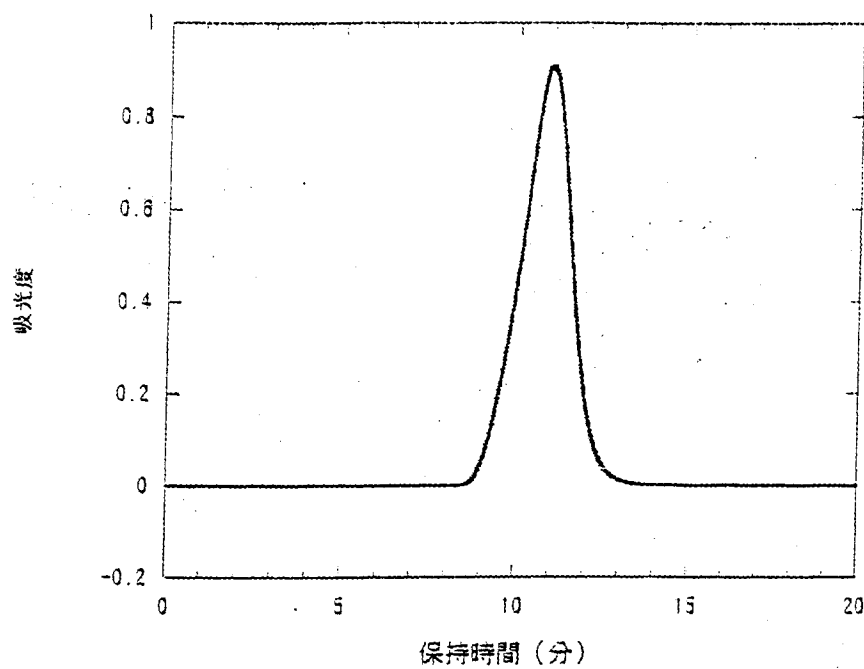
第 8 圖



第 9 圖



第 10 圖



第11圖

公告本

修正
補充
93年8月20日
B3

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)

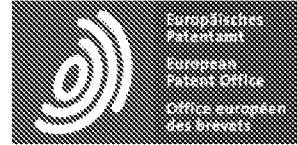
1. 一種測定方法，係測定以含有與肽結合之 2 至 8 個胺基酸之間隔基結合高分子載體與醫藥化合物之殘基的 DDS 化合物之方法，包括添加緩衝液將 DDS 化合物調整為 0.1 至 5mg/ml，並以肽酶處理，所獲得之水解物藉由適當組合 HPLC 分離操作與紫外線吸收光譜或以螢光光譜測定之步驟者。
2. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其中，該方法為用於測定生體試樣中所含 DDS 化合物之濃度者。
3. 如申請專利範圍第 1 項之方法，其中，該方法為用於測定該 DDS 化合物中所導入之醫藥化合物殘基之含量者。
4. 如申請專利範圍第 1 項至第 3 項任一項之方法，其中，該水解物為醫藥化合物者。
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

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'-CH₂-O-CO- 所示之基或從 N 末端起為 -Gly-Gly-Gly-Phe-NH-Y'-CH₂-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]吲哚啉并[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]吲哚啉并[1,2-b]喹啉-10,13(9H,15H)-二酮結合之 DDS 化合物者。

H3

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-甘胺鹽胺-2,3-二氫-9-羥基-4-甲基-1H,12H-苯并[de]吡喃并[3',4':6,7]吲哚并[1,2-b]喹啉-10,13(9H,15H)-二酮者。



[About Espacenet](#) [Other EPO online services](#) ▼

[Search](#) [Result list](#) [My patents list \(0\)](#) [Query history](#) [Settings](#) [Help](#)

Refine search: → [Results](#) → US2008050310 (A1)

US2008050310 (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: US2008050310 (A1) — 2008-02-28

★ In my patents list

📄 Report data error

🖨️ Print

ANTIBODIES AND IMMUNOCONJUGATES AND USES THEREFOR

Page bookmark

US2008050310 (A1) - ANTIBODIES AND IMMUNOCONJUGATES AND USES THEREFOR

Inventor(s):

EBENS ALLEN J JR [US]; GRAY ALANE M [US]; LIANG WEI-CHING [US]; WU YAN [US]; YU SHANG-FAN [US] ±

Applicant(s):

GENENTECH INC [US] ±

Classification:

- international: A61K31/345; A61K39/00; A61K9/00; A61P7/00; B65D81/24; C07H21/00; C07H21/02; C07K16/00; C07K16/42; C12N15/00; C12N15/09; C12N5/00; C12N5/06; C12P21/08; G01N33/53; G01N33/563; G01N33/566

- cooperative: A61K39/39558; A61K45/06; A61K47/48384; A61K47/48561; A61K47/48584; C07K16/2803; C07K16/2896; C07K16/3061; C07K2317/24; C07K2317/56; C07K2317/77; C07K2317/92

Application number:

US20070754899 20070529

🌐 Global Dossier

Priority number(s):

US20070754899 20070529 ; WO2007US69889 20070529 ; US20070911829P 20070413 ; US20070908941P 20070329 ; US20080809328P 20060530

Also published as:

📄 AR060978 (A1)

📄 AU2007266521 (A1)

📄 AU2007266521 (B2)

📄 AU2007266521 (C1)

📄 AU2010241411 (A1)

→ [more](#)

Abstract of US2008050310 (A1)

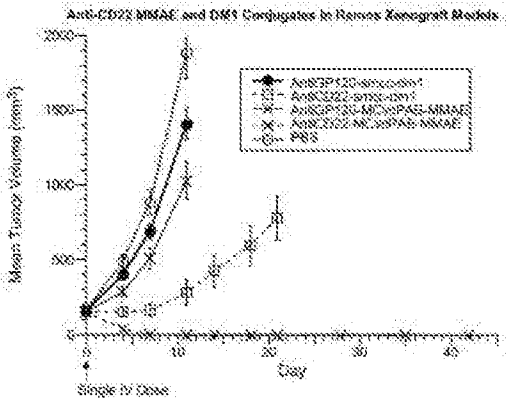
Translate this text into

📄

Select language

📄 patenttranslate powered by EPO and Google

Anti-CD22 antibodies and immunoconjugates thereof are provided. Methods of using anti-CD22 antibodies and immunoconjugates thereof are provided.



發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：96119143

※申請日期：96.5.29

※IPC 分類：C07K

C07K 16/28

A61K 39/395

A61K 47/48

A61K 51/10

一、發明名稱：(中文/英文)

抗體及免疫接合物及其用途

ANTIBODIES AND IMMUNOCONJUGATES AND USES THEREFOR

二、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

美商建南德克公司

GENENTECH, INC.

代表人：(中文/英文)

提摩西 R 史瓦茲

SCHWARTZ, TIMOTHY R.

住居所或營業所地址：(中文/英文)

美國加州舊金山市DNA路1號

1 DNA WAY, SOUTH SAN FRANCISCO, CA 94080-4990, U.S.A.

國籍：(中文/英文)

美國 U.S.A.

三、發明人：（共 5 人）

姓 名：（中文/英文）

1. 艾倫 J 艾班斯 二世
EBENS, ALLEN J. JR.
2. 艾蓮 M 葛雷
GRAY, ALANE M.
3. 梁偉慶
LIANG, WEI CHING
4. 彥 吳
WU, YAN
5. 于尚凡
YU, SHANG-FAN

國 籍：（中文/英文）

1. 美國 U.S.A.
2. 美國 U.S.A.
3. 中華民國 TAIWAN
4. 美國 U.S.A.
5. 中華民國 TAIWAN

四、聲明事項：

☐ 主張專利法第二十二條第二項 ☐ 第一款或 ☐ 第二款規定之事實，其事實發生日期為： 年 月 日。

☒ 申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號 順序註記】

☒ 有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1. 美國；2006年05月30日；60/809,328
2. 美國；2007年03月29日；60/908,941
3. 美國；2007年04月13日；60/911,829

☐ 無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

- 1.
- 2.

☐ 主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

☒ 主張專利法第三十條生物材料：

☒ 須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

1. 食品工業發展研究所；96年08月16日；BCRC 960310
2. 食品工業發展研究所；96年08月16日；BCRC 960311

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

1. 美國；American Type Culture Collection (ATCC)；2006年05月26日；PTA-7620; PTA-7621

☐ 不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

五、中文發明摘要：

本發明提供抗CD22抗體及其免疫接合物。本發明提供使用抗CD22抗體及其免疫接合物之方法。

六、英文發明摘要：

Anti-CD22 antibodies and immunoconjugates thereof are provided. Methods of using anti-CD22 antibodies and immunoconjugates thereof are provided.

七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第(10)圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

(無元件符號說明)

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

Ab-(L-D)p

九、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於抗CD22抗體其免疫接合物。本發明進一步係關於使用抗CD22抗體及其免疫接合物之方法。

【先前技術】

淋巴細胞為在造血過程期間於骨髓中產生之眾多類型之白血細胞的一者。存在兩種主要之淋巴細胞群體：B淋巴細胞(B細胞)及T淋巴細胞(T細胞)。本文中特定關注之淋巴細胞為B細胞。

B細胞在骨髓內成熟且離開表現其細胞表面上結合抗原之抗體的骨髓。當未處理B細胞首先遭遇其膜結合抗體對其具有特異性之抗原時，該細胞開始迅速分裂且其後代分化為記憶B細胞及被稱作"漿細胞"的效應細胞。記憶B細胞具有較長壽命且以與原始母細胞相同的特異性持續表現膜結合抗體。漿細胞不產生膜結合抗體，而產生以可經分泌之形式的抗體。經分泌抗體為體液免疫之主要效應分子。

B細胞相關之病症包括(但不限於)惡性淋巴瘤(非霍奇金氏淋巴瘤(Non-Hodgkin's Lymphoma)，NHL)、多發性骨髓瘤及慢性淋巴球性白血病(CLL，B細胞白血病(CD5+B淋巴細胞))。非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)(主要由B淋巴細胞引起之癌症之異源群)表示所有新近診斷之癌症的約4%(Jemal, A.等人，CA-Cancer J Clin, 52: 23-47, (2002))。侵襲性NHL包含約30-40%之成人NHL(Harris, N.L.等人，Hematol. J. 1:53-66 (2001))且包括瀰漫性大B細胞淋巴瘤(DLBCL)、

套細胞淋巴瘤(MCL)、外周T細胞淋巴瘤及多形性大細胞淋巴瘤。前線組合化學療法治癒少於一半之患有侵襲性NHL之患者，及大多數患者最終死於其疾病(Fisher, R.I. Semin. Oncol. 27(增刊12): 2-8 (2000))。

B細胞相關之病症亦包括自體免疫疾病。自體免疫疾病仍然為人類之臨床重要疾病。其名稱暗示，自體免疫疾病經由身體之自身免疫系統起作用。儘管個別類型之自體免疫疾病之病理機制不同，但一通用機制包括某些抗體(本文中稱作自反應性抗體或自體抗體)與身體之內源性蛋白的結合。醫師及科學家已鑑別多於70種臨床上不同之自體免疫疾病，其包括類風濕性關節炎、多發性硬化症、血管炎、免疫介導之糖尿病，及狼瘡，諸如全身性紅斑狼瘡。儘管許多自體免疫疾病為罕見的(共侵襲少於200,000個體)，但該等疾病折磨數百萬美國人(估計人口之5%)，其中女性不成比例地受到大多數疾病之侵襲。該等疾病之慢性本質造成巨大的社會及經濟負擔。

靶向B細胞表面抗原之細胞毒性劑為與B細胞相關之癌症療法的重要焦點。一種此B細胞表面抗原為CD20。利妥昔單抗(Rituximab)(利妥昔單抗(Rituxan)；Genentech, Inc.(South San Francisco, CA)及IDEC Pharmaceutical Corp.(San Diego, CA))(嵌合(小鼠/人)抗CD20單株抗體)為由美國食品及藥物管理局(United States Food and Drug Administration)批准用於治療復發性或難治性低級或濾泡性NHL的第一種治療抗體(Leonard, J.P.等人，Clin. Canc.

Res. 10:5327-5334 (2004))。

其他B細胞抗原(諸如CD19、CD22及CD52)表示潛在用於治療淋巴瘤之治療目標(Grillo-Lopez A.J.等人, Curr Pharm Biotechnol, 2:301-11, (2001))。CD22為僅在分化之成熟階段表現於B細胞表面上之135-kDa B細胞-限制性唾液酸糖蛋白(Dorken, B.等人, J. Immunol. 136:4470-4479 (1986))。人類中CD22之主要形式為CD22 β , 其在細胞外域中含有七個免疫球蛋白總科域(圖1)(Wilson, G.L.等人, J. Exp. Med. 173:137-146 (1991))。變異體形式CD22 α 缺乏免疫球蛋白總科域3及4(Stamenkovic, I.及Seed, B., Nature 345:74-77 (1990))。與人類CD22結合之配位體已展示與免疫球蛋白總科域1及2(亦被稱作抗原決定基1及2)相關(Engel, P.等人, J. Exp. Med. 181:1581-1586, 1995)。

在B細胞NHL中, CD22表現在侵襲性及無痛性群體中分別在91%至99%之範圍內(Cesano, A.等人, Blood 100:350a (2002))。CD22可充當B細胞活化複合物之組份(Sato, S.等人, Semin. Immunol. 10:287-296 (1998))且作為黏著分子(Engel, P.等人, J. Immunol. 150:4719-4732 (1993))。CD22不足之小鼠之B細胞具有較短壽命及增強之細胞凋亡, 其暗示此抗原在B細胞存活中之關鍵作用(Otipoby, K.L.等人, Nature (Lond) 384:634-637 (1996))。在與其天然配位體或抗體結合後, CD22迅速內化, 其在原發性B細胞中提供有效協同刺激信號且在贅生性B細胞中提供促凋亡信號(Sato, S.等人, Immunity 5:551-562 (1996))。

抗CD22抗體已經研究作為B細胞癌症及其他B細胞增生性疾病之潛在療法。該等抗CD22抗體包括RFB4(Mansfield, E.等人, Blood 90:2020-2026 (1997))、CMC-544(DiJoseph, J.F., Blood 103:1807-1814 (2004))及LL2(Pawlak-Byczkowska, E.J.等人, Cancer Res. 49:4568-4577 (1989))。該LL2抗體(以前被稱作HPB-2)為針對CD22抗原之IgG2a小鼠單株抗體(Pawlak-Byczkowska, E.J.等人(1989), 同上文)。活體外免疫組織學評估證實LL2抗體與經測試之51個B細胞NHL樣品中50個樣品的反應性, 但與其他惡性疾病或正常非淋巴組織無反應性(Pawlak-Byczkowska (1989), 同上文; Stein, R.等人, Cancer Immunol. Immunother. 37:293-298 (1993))。

抗體-藥物接合物用於局部遞送細胞毒性劑或細胞生長抑制劑(亦即在治療癌症中殺死或抑制腫瘤細胞之藥物)的用途(Syrigos及Epenetos (1999) Anticancer Research 19:605-614; Niculescu-Duvaz及Springer (1997) Adv. Drg Del. Rev. 26:151-172; 美國專利4975278)容許藥物部分向腫瘤之靶向遞送, 且在其中細胞內積聚, 其中該等未結合藥物劑之全身性投予可對正常細胞以及尋求待消除之腫瘤細胞產生不可接受之毒性程度(Baldwin等人(1986) Lancet pp.(1986年3月15日):603-05; Thorpe, (1985) "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy:A Review", 在 Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications中, A. Pinchera等人(編), 第475-506

頁)。因此，尋求最大效用及最小毒性。多株抗體與單株抗體已經報導適用於該等策略中(Rowland等人(1986) *Cancer Immunol. Immunother.*, 21:183-87)。用於該等方法中之藥物包括道諾黴素(daunomycin)、多柔比星(doxorubicin)、甲胺喋呤(methotrexate)及長春地辛(vindesine)(Rowland等人, *Cancer Immunol. Immunother.* 21:183-87 (1986))。抗體-毒素接合物中使用之毒素包括細菌毒素，諸如白喉毒素；植物毒素，諸如蓖麻毒素；小分子毒素，諸如格爾德黴素(geldanamycin)(Kerr等人(1997) *Bioconjugate Chem.* 8(6):781-784；Mandler等人(2000) *Journal of the Nat. Cancer Inst.* 92(19):1573-1581；Mandler等人(2000) *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 10:1025-1028；Mandler等人(2002) *Bioconjugate Chem.* 13:786-791)、美登素類物(maytansinoid)(EP 1391213；Liu等人(1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:8618-8623)，以及刺孢黴素(calicheamicin)(Lode等人(1998) *Cancer Res.* 58:2928；Hinman等人(1993) *Cancer Res.* 53:3336-3342)。該等毒素可由包括微管蛋白結合、DNA結合或拓撲異構酶抑制作用之機制來實現其細胞毒性及細胞生長抑制效應(Meyer, D.L.及Senter, P.D. "Recent Advances in Antibody Drug Conjugates for Cancer Therapy" in *Annual Reports in Medicinal Chemistry*, 第38卷(2003)第23章, 229-237)。一些細胞毒性藥物當與大抗體或蛋白受體配位體接合時傾向於不具活性或具有較低活性。

ZEVALIN®(替伊莫單抗(ibratumomab tiuxetan), Biogen/Idex)為抗體-放射性同位素接合物,其係由針對見於正常及惡性B淋巴細胞表面上之CD20抗原的鼠IgG1 κ 單株抗體及由硫脲連接子-螯合劑結合之 ^{111}In 或 ^{90}Y 放射性同位素組成(Wiseman等人(2000) Eur. Jour. Nucl. Med. 27(7):766-77; Wiseman等人(2002) Blood 99(12):4336-42; Witzig等人(2002) J. Clin. Oncol. 20(10):2453-63; Witzig等人(2002) J. Clin. Oncol. 20(15):3262-69)。儘管ZEVALIN具有對抗B細胞非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)之活性,但投藥在大多數患者中引起嚴重且長期之血球減少。由連接至刺孢黴素之hu CD33抗體組成之抗體藥物接合物MYLOTARG™(吉妥單抗(gemtuzumab ozogamicin), Wyeth Pharmaceuticals)於2000年經批准藉由注射來治療急性骨髓白血病(Drugs of the Future (2000) 25(7):686; 美國專利第4970198號; 第5079233號; 第5585089號; 第5606040號; 第5693762號; 第5739116號; 第5767285號; 第5773001號)。由經由二硫化物連接子SPP連接至美登素類物藥物部分DM1之huC242抗體組成的抗體藥物接合物康圖單抗美坦辛(Cantuzumab mertansine)(Immunogen, Inc.)經開發用於治療表現CanAg抗原之癌症,諸如結腸癌、胰腺癌、胃癌及其他癌症。由連接至美登素類物藥物部分DM1之抗前列腺特異性膜抗原(PSMA)單株抗體組成之抗體藥物接合物MLN-2740(Millennium Pharm., BZL Biologics, Immunogen Inc.)係處於對前列腺腫瘤之可能治療的開發中。相同美登

素類物藥物部分DM1係經由非二硫化物連接子SMCC連接至小鼠鼠單株抗體TA.1上 (Chari 等人 (1992) *Cancer Research* 52:127-131)。報導此接合物比相應二硫化物連接子接合物之效力低200倍。其中認為該SMCC連接子為"非可斷裂的"。

若干短肽化合物已自海洋軟體動物截尾海兔(*Dolabella auricularia*)分離，且發現具有生物活性(Pettit等人(1993) *Tetrahedron* 49:9151；Nakamura等人(1995) *Tetrahedron Letters* 36:5059-5062；Sone等人(1995) *Journal Org Chem.* 60:4474)。該等化合物之類似物亦經製備，且發現一些具有生物活性(關於綜述，參見Pettit等人(1998) *Anti-Cancer Drug Design* 13:243-277)。舉例而言，奧利斯坦汀E(auristatin E)(US 5635483)為海洋天然產物海兔毒素10(Dolastatin 10)之合成類似物，其為藉由結合至與抗癌藥物長春新鹼(vincristine)相同之微管蛋白上之位點來抑制微管蛋白聚合之試劑(G. R. Pettit, (1997) *Prog. Chem. Org. Nat. Prod.* 70:1-79)。海兔毒素10、奧利斯坦汀PE及奧利斯坦汀E為具有四個胺基酸之線性肽，該三者對海兔毒素種類之化合物及C末端醯胺為獨特的。

海兔毒素之合成類似物奧利斯坦汀肽、奧利斯坦汀E(AE)及單甲基奧利斯坦汀(MMAE)經接合至：(i)嵌合單株抗體cBR96(對癌上之路易斯Y(Lewis Y)具特異性)；(ii)cAC10，其對血液惡性疾病上之CD30具特異性(Klussman等人(2004), *Bioconjugate Chemistry* 15(4): 765-

773 ; Doronina 等人 (2003) Nature Biotechnology 21(7):778-784) ; "Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands" ; Francisco 等人 (2003) Blood 102(4):1458-1465 ; US 2004/0018194 ; (iii) 抗 CD20 抗體 , 諸如用於治療表現 CD20 之癌症及免疫病症的 Rituxan® (利妥昔單抗) (WO 04/032828) ; (iv) 用於治療結腸直腸癌症之抗 EphB2 抗體 2H9 及抗 IL-8 (Mao 等人 (2004) Cancer Research 64(3):781-788) ; (v) E-選擇素抗體 (Bhaskar 等人 (2003) Cancer Res. 63:6387-6394) ; 及 (vi) 其他抗 CD30 抗體 (WO 03/043583) 。單甲基奧利斯坦汀 (MMAE) 亦已接合至 2H9 (抵抗 EphB2R 之抗體 , 其為具有小鼠與人類之間之密切同源性之 1 型 TM 酪胺酸激酶受體) 上 , 且過度表現於結腸直腸癌細胞中 (Mao 等人 (2004) Cancer Res. 64:781-788) 。

報導單甲基奧利斯坦汀 MMAF (在 C 末端處具有苯丙胺酸之奧利斯坦汀 E (MMAE) 之變異體) (US 5767237 ; US 6124431) 比 MMAE 效力低 , 但當接合至單株抗體時效力更大 (Senter 等人 , Proceedings for the American Association for Cancer Research , 第 45 卷 , 文摘號 623 , 提交於 2004 年 3 月 28 日) 。奧利斯坦汀 F 苯二胺 (AFP) (MMAE 之苯丙胺酸變異體) 係經由苯二胺間隔基由 1F6 之 C 末端連接至抗 CD70 mAb , 1F6 上 (Law 等人 , Proceedings of the American Association for Cancer Research 第 45 卷 , 文摘號 625 , 提交於 2004 年 3 月 28 日) 。

抗CD22抗體-毒素接合物亦經研究作為潛在之治療化合物。舉例而言，先前報導描述針對抗CD22之含有蓖麻毒素A鏈之免疫毒素作為潛在抗癌劑(May, R.D.等人，Chemical Abstracts 106(21):168656x 第35-36頁(1987)；Ghetie, M.A.等人，Cancer Research 48:2610-2617 (1988)；及Amlot, P.L.等人，Blood 82(9):2624-2633 (1993))。若毒素為放射性同位素，則LL2之人類化(CDR接枝)IgG1形式易普拉單抗(Epratuzumab)已展示關於放射性免疫接合物之治療活性的證據(Juweid, M.E.等人，Clin. Cancer Res. 5(增刊10):3292s-3303s (1999)；Griffiths, G.L.等人，J. Nucl. Med. 44:77-84 (2003)；Linden, O.等人，Clin. Cancer Res. 5(增刊10):3287s-3291s (1999))。

此項技術中存在對於用於治療各種與B細胞相關之癌症(諸如淋巴瘤(諸如非霍奇金氏淋巴瘤)及其他B細胞增生性病變)之額外藥物的需求。關於此目的尤其有用之藥物包括B細胞靶向之抗CD22抗體-藥物接合物，其具有顯著較低毒性，但仍具有有效治療功效。本發明提出該等及其他限制及過去之問題。

本申請案中任何參照案之引用並非承認該參照案為本申請案之先前技術。本文中引用之所有參照案(包括專利、專利申請案及公開案)係以引用的方式全部併入本文中。

【發明內容】

本發明提供抗CD22抗體及使用該抗CD22抗體之方法。

在一態樣中，提供一種與CD22結合之抗體，其中該抗

體包含至少一種、兩種、三種、四種、五種或六種HVR，
其係選自：

- (1)包含SEQ ID NO:2之胺基酸序列之HVR-H1；
- (2)包含SEQ ID NO:4之胺基酸序列之HVR-H2；
- (3)包含SEQ ID NO:6之胺基酸序列之HVR-H3；
- (4)包含SEQ ID NO:10之胺基酸序列之HVR-L1；
- (5)包含SEQ ID NO:12之胺基酸序列之HVR-L2；及
- (6)包含SEQ ID NO:14之胺基酸序列之HVR-L3。

在另一態樣中，與CD22結合之抗體包含(a)包含SEQ ID
NO:10之胺基酸序列之HVR-L1，及(b)至少一種、兩種、
三種、四種或五種HVR，其係選自：

- (1)包含SEQ ID NO:2之胺基酸序列之HVR-H1；
- (2)包含SEQ ID NO:4之胺基酸序列之HVR-H2；
- (3)包含SEQ ID NO:6之胺基酸序列之HVR-H3；
- (4)包含SEQ ID NO:12之胺基酸序列之HVR-L2；及
- (6)包含SEQ ID NO:14之胺基酸序列之HVR-L3。

在另一態樣中，與CD22結合之抗體包含(a)包含SEQ ID
NO:9之胺基酸序列之HVR-L1，及(b)至少一種、兩種、三
種、四種或五種HVR，其係選自：

- (1)包含SEQ ID NO:2之胺基酸序列之HVR-H1；
- (2)包含SEQ ID NO:4之胺基酸序列之HVR-H2；
- (3)包含SEQ ID NO:6之胺基酸序列之HVR-H3
- (4)包含SEQ ID NO:12之胺基酸序列之HVR-L2；及
- (6)包含SEQ ID NO:14之胺基酸序列之HVR-L3。

在另一態樣中，與CD22結合之抗體包含(a)包含SEQ ID NO:6之胺基酸序列之HVR-H3，及(b)至少一種、兩種、三種、四種或五種HVR，其係選自：

- (1)包含SEQ ID NO:2之胺基酸序列之HVR-H1；
- (2)包含SEQ ID NO:4之胺基酸序列之HVR-H2；
- (3)包含SEQ ID NO:9之胺基酸序列之HVR-L1；
- (4)包含SEQ ID NO:12之胺基酸序列之HVR-L2；及
- (5)包含SEQ ID NO:14之胺基酸序列之HVR-L3。

在另一態樣中，與CD22結合之抗體包含(a)包含SEQ ID NO:6之胺基酸序列之HVR-H3及(b)至少一種、兩種、三種、四種或五種HVR，其係選自：

- (1)包含SEQ ID NO:2之胺基酸序列之HVR-H1；
- (2)包含SEQ ID NO:4之胺基酸序列之HVR-H2；
- (3)包含SEQ ID NO:10之胺基酸序列之HVR-L1；
- (4)包含SEQ ID NO:12之胺基酸序列之HVR-L2；及
- (5)包含SEQ ID NO:14之胺基酸序列之HVR-L3。

在一實施例中，抗體包括包含SEQ ID NO:10之胺基酸序列之HVR-L1。在一實施例中，抗體進一步包括包含SEQ ID NO:2之胺基酸序列之HVR-H1及包含SEQ ID NO:4之胺基酸序列之HVR-H2。在一實施例中，抗體進一步包括包含SEQ ID NO:12之胺基酸序列之HVR-L2及包含SEQ ID NO:14之胺基酸序列之HVR-L3。

在某些實施例中，上述抗體之任一者進一步包含選自VH亞群III一致框架及VL亞群I一致框架之至少一個框架。

在一態樣中，提供一種與CD22結合之抗體，其中該抗體包含與SEQ ID NO:16之胺基酸序列具有至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列一致性的重鏈可變域。在一實施例中，抗體包含SEQ ID NO:16之重鏈可變域。

在一態樣中，抗體進一步包含與SEQ ID NO:17之胺基酸序列具有至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列一致性的輕鏈可變域。在一實施例中，抗體包含SEQ ID NO:17之輕鏈可變域。

在一態樣中，抗體進一步包含與SEQ ID NO:18之胺基酸序列具有至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列一致性的輕鏈可變域。在一實施例中，抗體包含SEQ ID NO:18之輕鏈可變域。

在一實施例中，抗體包含與SEQ ID NO:16之胺基酸序列具有至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列一致性的重鏈可變域及與SEQ ID NO:17之胺基酸序列具有至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列一致性的輕鏈可變域。在一實施例中，抗體包含與SEQ ID NO:16之胺基酸序列具有至少

90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99% 或 100% 序列一致性的重鏈可變域及與 SEQ ID NO:18 之胺基酸序列具有至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99% 或 100% 序列一致性的輕鏈可變域。在一實施例中，重鏈可變域包含 SEQ ID NO:16 之胺基酸序列，且輕鏈可變域包含 SEQ ID NO:17 之胺基酸序列。在一實施例中，重鏈可變域包含 SEQ ID NO:16 之胺基酸序列，且輕鏈可變域包含 SEQ ID NO:18 之胺基酸序列。

在某些實施例中，提供一種編碼上述抗體之任一者的聚核苷酸。在一實施例中，提供一種包含該聚核苷酸的載體。在一實施例中，提供一種包含該載體之宿主細胞。在一實施例中，該宿主細胞為真核細胞。在一實施例中，宿主細胞為中國倉鼠卵巢(CHO)細胞。在一實施例中，提供一種製造抗 CD22 抗體的方法，其中該方法包含在適於表現編碼抗體之聚核苷酸的條件下培養宿主細胞，且分離該抗體。

在一態樣中，提供一種表現於細胞表面上之與 CD22 結合之抗體。在一實施例中，抗體在包含域 1 或域 2 或域 1 及域 2 之人類或小鼠 CD22 之區域內與抗原決定基結合。在一實施例中，細胞為哺乳動物細胞。在一實施例中，細胞為人類細胞。在一實施例中，細胞為癌細胞。在一實施例中，細胞為 B 細胞。在一實施例中，癌細胞為 B 細胞。

在某些實施例中，上述抗體之任一者為單株抗體。在一實施例中，抗體為選自 Fab、Fab'-SH、Fv、scFv 或 (Fab')₂ 片段之抗體片段。在一實施例中，抗體經人類化。在一實施例中，抗體為人。

在一態樣中，提供一種偵測一生物樣品中 CD22 之存在的方法，該方法包含在容許抗體與 CD22 結合之條件下使該生物樣品與上述抗體之任一者接觸，且偵測該抗體與 CD22 之間是否形成複合物。在一實施例中，生物樣品包含 B 細胞。在一實施例中，生物樣品來自經受或懷疑經受 B 細胞病症及/或 B 細胞增生性病症之哺乳動物，其中該等病症包括(但不限於)淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)、侵襲性 NHL、復發性侵襲性 NHL、復發性無痛性 NHL、難治性 NHL、難治性無痛性 NHL、慢性淋巴球性白血病(CLL)、小淋巴球性淋巴瘤、白血病、毛細胞白血病(HCL)、急性淋巴球性白血病(ALL)及套細胞淋巴瘤。

在一態樣中，提供一種診斷與增加之 CD22 表現相關之細胞增生性病症的方法，該方法包含使測試細胞與上述抗體之任一者接觸；藉由偵測抗體與 CD22 之結合來測定 CD22 之表現量；且比較測試細胞之 CD22 之表現量與對照細胞之 CD22 之表現量，與對照細胞相比測試細胞之更高 CD22 表現量指示存在與增加之 CD22 表現相關之細胞增生性病症。在一實施例中，該測試細胞為來自懷疑患有細胞增生性病症(諸如 B 細胞增生性病症)之患者的細胞。在一實施例中，該細胞增生性病症係選自 B 細胞病症，其包括

(但不限於)淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)、侵襲性 NHL、復發性侵襲性 NHL、復發性無痛性 NHL、難治性 NHL、難治性無痛性 NHL、慢性淋巴球性白血病(CLL)、小淋巴球性淋巴瘤、白血病、毛細胞白血病(HCL)、急性淋巴球性白血病(ALL)及套細胞淋巴瘤。在一實施例中，該方法包含測定測試細胞表面上之 CD22 表現量且比較測試細胞表面上之 CD22 表現量與對照細胞表面上之 CD22 表現量。

在一態樣中，提供一種診斷與表現 CD22 之細胞(諸如 B 細胞)增加相關之細胞增生性病徵的方法，該方法包含使一生物樣品中之測試細胞與上述抗體之任一者接觸；藉由偵測抗體與 CD22 之結合來測定該樣品中與測試細胞結合之抗體的含量；且比較一對照樣品中與細胞結合之抗體的含量，其中結合抗體之含量經標準化至測試樣品及對照樣品中表現 CD22 之細胞之數目，且其中與對照樣品相比測試樣品中更高之結合抗體含量指示存在與表現 CD22 之細胞相關之細胞增生性病徵。

在一態樣中，一種偵測血液或血清中可溶性 CD22 的方法，該方法包含使來自懷疑經受 B 細胞增生性病徵之哺乳動物之血液或血清的測試樣品與本發明之抗 CD22 抗體接觸且偵測相對於來自正常哺乳動物之血液或血清之對照樣品，測試樣品中可溶性 CD22 的增加。在一實施例中，該偵測方法適用作診斷與哺乳動物之血液或血清中可溶性 CD22 之增加相關之 B 細胞增生性病徵的方法。

在一態樣中，本發明之抗體包括經半胱胺酸改造之抗體，其中親本抗體之一或多種胺基酸經如 WO 2006/034488 (以引用的方式全部併入本文中)中所揭示之自由半胱胺酸胺基酸置換。抗 CD22 抗體之任何形式可經如此改造，亦即突變。舉例而言，親本 Fab 抗體片段可經改造以形成經半胱胺酸改造之 Fab，其在本文中被稱作 "ThioFab"。類似地，親本單株抗體可經改造以形成 "ThioMab"。應瞭解單位點突變在 ThioFab 中產生單一經改造之半胱胺酸殘基，而歸因於 IgG 抗體之二聚特性，單位點突變在 ThioMab 中產生兩個經改造之半胱胺酸殘基。本發明之經半胱胺酸改造之抗 CD22 抗體包括單株抗體、人類化或嵌合單株抗體，及抗體、融合多肽及優先結合與細胞相關之 CD22 多肽之類似物的抗原結合片段。經半胱胺酸改造之抗體可或者包含在抗體或 Fab 中在本文中揭示之位置處包含半胱胺酸的抗體，其是由序列設計及/或抗體之選擇產生，而未必改變親本抗體，諸如藉由噬菌體呈現抗體設計及選擇或經由輕鏈及/或重鏈框架序列及恆定區之重新設計。經半胱胺酸改造之抗體包含具有在 0.6 至 1.0；0.7 至 1.0 或 0.8 至 1.0 之範圍內之硫醇反應性值之一或多種自由半胱胺酸胺基酸。自由半胱胺酸胺基酸為半胱胺酸殘基，其已經改造進入親本抗體中且並非二硫橋鍵之部分。經半胱胺酸改造之抗體適用於經由(例如)順丁烯二醯亞胺或鹵乙醯基在經改造半胱胺酸之位點處連接細胞毒性及/或成像化合物。與蛋白質中之任何其他胺基酸官能基(諸如離胺酸殘基之胺基或 N

末端胺基)相比，Cys殘基之硫醇官能基與順丁烯二醯亞胺基團之親核反應性高約1000倍。碘乙醯基及順丁烯二醯亞胺試劑中之硫醇特異性官能基可與胺基反應，但需要較高pH值(>9.0)及較長反應時間(Garman, 1997, Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach, Academic Press, London)。

在一實施例中，本發明之經半胱胺酸改造之抗CD22抗體包含在以下位置之任一者處經改造之半胱胺酸，其中該位置為輕鏈中根據Kabat等人之數字(參見Kabat等人(1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD)及重鏈中根據EU編號之數字(其包括Fc區)(參見Kabat等人(1991)，同上文)，其中在圖17A中概況描述之輕鏈恆定區開始於位置108處(Kabat編號)且在圖17B及17C中概況描述之重鏈恆定區開始於位置118處(EU編號)。位置亦可由圖17A-17C中所示之其在全長輕鏈或重鏈之胺基酸之連續編號中的位置來提及。根據本發明之一實施例，抗CD22抗體包含在LC-V205C(Kabat編號：Val 205；連續編號210，在圖17A中在彼位置處經改造為Cys)處經改造之半胱胺酸。在圖17A中輕鏈中之經改造半胱胺酸以粗體、雙底線文字展示。根據一實施例，抗CD22抗體包含在HC-A118C(EU編號：Ala 118；連續編號121，在圖17B中在彼位置處經改造為Cys)處經改造之半胱胺酸。在圖17B中重鏈中之經改造半胱胺酸以粗體、雙底線文字

展示。根據一實施例，抗CD22抗體包含在Fc-S400C(EU編號：Ser 400；連續編號403，在圖17C中在彼位置處經改造為Cys)處經改造之半胱胺酸。在圖17C中重鏈之Fc區中之經改造半胱胺酸以粗體、雙底線文字展示。在其他實施例中，重鏈(包括Fc區)之經改造半胱胺酸在以下位置(根據EU編號)之任一者處：41、88、116、118、120、171、282、375或400。因此，對於本發明之親本抗CD22抗體而言在該等位置處胺基酸中之變化為：A41C、A88C、S116C、A118C、T120C、A171C、V282C、S375C或S400C。在其他實施例中，輕鏈之經改造半胱胺酸在以下位置(根據Kabat編號)之任一者處：15、43、110、144、168、205。因此，對於本發明之親本抗CD22抗體而言在該等位置處胺基酸中之變化為：V15C、A43C、V110C、A144C、S168C或V205C。

經半胱胺酸改造之抗CD22抗體包含一或多種自由半胱胺酸胺基酸，其中該經半胱胺酸改造之抗CD22抗體與CD22多肽結合，且係由一包含以半胱胺酸置換親本抗CD22抗體之一或多個胺基酸殘基之方法來製備，其中該親本抗體包含選自以下序列之至少一種HVR序列：

- (a) HVR-L1序列RSSQSIVHSNGNTFLE(SEQ ID NO:9)或序列RSSQSIVHSVGNTFLE(SEQ ID NO:10)(圖2B)；
- (b) HVR-L2序列KVSNRFS SEQ ID NO:12(圖2B)；
- (c) HVR-L3序列FQGSQFPYT(SEQ ID NO:14)(圖2B)；
- (d) HVR-H1序列GYEFSRSWMN(SEQ ID NO:2)(圖2A)；

(e) HVR-H2 序 列 GRIYPGDGDTNYSKGKFKG(SEQ ID NO:4(圖 2A)；及

(f) HVR-H3 序 列 DGSSWDWYFDV(SEQ ID NO:6)(圖 2A)。

在某一態樣中，本發明涉及一種經半胱胺酸改造之抗 CD22 抗體，其包含與如本文中所揭示之具有全長胺基酸序列之經半胱胺酸改造的抗體或如本文中所揭示之缺乏信號肽之經半胱胺酸改造的抗體胺基酸序列具有至少約 80% 胺基酸序列一致性，或者至少約 81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 胺基酸序列一致性的胺基酸序列。

在另一態樣中，本發明涉及一種經分離之半胱胺酸改造的抗 CD22 抗體，其包含由與 DNA 分子之互補序列雜交之核苷酸序列編碼的胺基酸序列，其中該 DNA 分子編碼：(a) 如本文中所揭示之具有全長胺基酸序列之經半胱胺酸改造的抗體，(b) 如本文中所揭示之缺乏信號肽之經半胱胺酸改造的抗體胺基酸序列，(c) 如本文中所揭示之具有或不具有信號肽之經跨膜半胱胺酸改造的抗體蛋白之細胞外域，(d) 由本文中揭示之核酸序列之任一者編碼的胺基酸序列或 (e) 如本文中所揭示之經全長半胱胺酸改造之抗體胺基酸序列的任何其他特異性限定片段。

在一特定態樣中，本發明提供一種經分離之半胱胺酸改造之抗 CD22 抗體，其不具有 N 末端信號序列及 / 或不啟始

甲硫胺酸且係由如本文中所述之編碼此胺基酸序列之核苷酸序列來編碼。本文中亦描述用於製備經分離之半胱胺酸改造之抗CD22抗體的方法，其中彼等方法包含培養包含載體之宿主細胞，該方法包含在適於經半胱胺酸改造之抗體表現的條件下適當編碼核酸分子且自細胞培養物回收經半胱胺酸改造之抗體。

本發明之另一態樣提供一種經分離之半胱胺酸改造之抗CD22抗體，其經跨膜域缺失或跨膜域非活化。本文中亦描述用於製備經分離之半胱胺酸改造之抗CD22抗體的方法，其中彼等方法包含培養包含載體之宿主細胞，該方法包含在適於經半胱胺酸改造之抗體表現的條件下適當編碼核酸分子且自細胞培養物回收經半胱胺酸改造之抗體。

在其他實施例中，本發明提供經分離之抗CD22嵌合半胱胺酸改造之抗體，其包含融合於異種(非-CD22)多肽之本文中所述之經半胱胺酸改造的抗體之任一者。該等嵌合分子之實例包含融合於異種多肽之本文中所述之經半胱胺酸改造的抗體之任一者，諸如，抗原決定基標記物序列或免疫球蛋白之Fc區。

經半胱胺酸改造之抗CD22抗體可為單株抗體、抗體片段、嵌合抗體、人類化抗體、單鏈抗體或競爭性抑制抗CD22多肽抗體與其各別抗原性抗原決定基之結合的抗體。本發明之抗體視情況可接合至生長抑制劑或細胞毒性劑(諸如毒素，其包括(例如)奧利斯坦汀、抗生素、放射性同位素、核分解酶或其類似物)上。本發明之抗體視情況

可於CHO細胞或細菌細胞中產生且較佳抑制其所結合之細胞之生長或增殖或誘發該細胞之死亡。出於診斷目的，本發明之抗體可經可偵測標記，連接至固體支撐物或其類似物上。

在本發明之其他實施例中，本發明提供包含編碼本文中描述之抗CD22抗體及抗CD22經半胱胺酸改造之抗體之任一者的DNA之載體。亦提供包含任何此載體之宿主細胞。舉例而言，該等宿主細胞可為CHO細胞、大腸桿菌(*E. coli*)細胞或酵母細胞。進一步提供一種用於製備本文中描述之多肽之任一者的方法且該方法包含在適於表現所需多肽之條件下培養宿主細胞且自細胞培養物回收所需多肽。

經半胱胺酸改造之抗體可適用於治療癌症且包括對細胞表面及跨膜受體及與腫瘤相關之抗原(TAA)具特異性的抗體。該等抗體可以裸抗體(未與藥物或標記部分接合)或抗體-藥物接合物(ADC)形式使用。本發明之經半胱胺酸改造之抗體可位點特異性且有效地與硫醇反應性試劑結合。該硫醇反應性試劑可為多官能連接子試劑、捕獲標記試劑、螢光團試劑或藥物-連接子中間物。經半胱胺酸改造之抗體可以可偵測標記標記，固定於固相載體上及/或與藥物部分接合。硫醇反應性可概括為其中具有反應性半胱胺酸胺基酸之胺基酸之取代可在以下範圍內進行的任何抗體，其中輕鏈在選自胺基酸範圍之以下範圍內：L-10至L-20；L-38至L-48；L-105至L-115；L-139至L-149；L-163至L-173；且重鏈在選自胺基酸範圍之以下範圍內：H-35至H-

45；H-83至H-93；H-114至H-127；及H-170至H-184，且Fc區在選自H-268至H-291；H-319至H-344；H-370至H-380；及H-395至H-405之範圍內，其中胺基酸位置之編號如WO 2006034488中所述開始於Kabat編號系統(Kabat等人(1991)Sequences of Proteins of Immunological Interest，第5版，Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD)之位置1處且其後依序延伸。硫醇反應性亦可概括為抗體之某些域，諸如輕鏈恆定域(CL)及重鏈恆定域CH1、CH2及CH3。產生0.6及更高之硫醇反應性值之半胱胺酸置換可分別在完整抗體IgA、IgD、IgE、IgG及IgM之重鏈恆定域 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 及 μ 中進行，其中該等抗體包括IgG子類：IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA及IgA2。該等抗體及其用途揭示於WO 2006/034488中。

本發明之經半胱胺酸改造之抗體較佳保持其野生型、親本抗體對應物之抗原結合能力。因此，經半胱胺酸改造之抗體能夠與抗原結合，較佳特異性結合。該等抗原包括(例如)與腫瘤相關之抗原(TAA)、細胞表面受體蛋白及其他細胞表面分子、跨膜蛋白、信號轉導蛋白、細胞存活調節因子、細胞增殖調節因子、與組織發展或分化相關(例如，已知或懷疑功能上有助於組織發展或分化)之分子、淋巴因子、細胞激素、細胞週期調節中涉及之分子、血管發生中涉及之分子及與血管生成相關(例如，已知或懷疑功能上有助於血管生成)之分子。與腫瘤相關之抗原可為叢集性分化因子(亦即，CD蛋白，其包括(但不限於)CD22)。

本發明之經半胱胺酸改造之抗CD22抗體保持其親本抗CD22抗體對應物之抗原結合能力。因此，本發明之經半胱胺酸改造之抗CD22抗體能夠與CD22抗原(包括人類抗CD22同功異型物 β 及/或 α)結合，較佳特異性結合，其包括當該等抗原表現於細胞(其包括(不加限制)B細胞)表面上時。

本發明之抗體可與其他硫醇反應性劑接合，其中反應性基團為(例如)順丁烯二醯亞胺、碘乙醯胺、吡啶基二硫化物或其他硫醇反應性接合搭配物(Haugland, 2003, Molecular Probes Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, Molecular Probes, Inc.; Brinkley, 1992, Bioconjugate Chem. 3:2; Garman, 1997, Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach, Academic Press, London; Means (1990) Bioconjugate Chem. 1:2; Hermanson, G.在Bioconjugate Techniques (1996) Academic Press, San Diego, 第40-55頁、第643-671頁中)。該搭配物可為細胞毒性劑(例如諸如多柔比星或百日咳毒素之毒素)、螢光團(諸如螢光染料，如螢光素或若丹明(rhodamine))、用於成像之螯合劑或放射性治療金屬、肽基或非肽基標記或偵測標記，或清除改質劑(諸如聚乙二醇之各種異構體、與第三組份結合之肽，或另一碳水化合物或親脂劑)。

在一態樣中，本發明之抗體可與任何標記部分接合，其可經由反應性部分、活化部分或反應性半胱胺酸硫醇基團

與抗體共價連接(Singh等人(2002) Anal. Biochem. 304:147-15 ; Harlow E.及 Lane, D. (1999) Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Springs Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY ; Lundblad R.L. (1991) Chemical Reagents for Protein Modification, 第2版, CRC Press, Boca Raton, FL)。該經連接標記可用於：(i)提供可偵測信號；(ii)與第二標記相互作用以改變由第一或第二標記提供之可偵測信號，例如提供FRET(螢光共振能量轉移)；(iii)穩定與抗原或配位體之相互作用或增大與抗原或配位體之結合親和力；(iv)藉由電荷、疏水性、形狀或其他物理參數來影響遷移率，例如電泳遷移率或細胞滲透率，或(v)提供捕獲部分以調節配位體親和性、抗體/抗原結合，或離子錯合。

經標記半胱胺酸改造之抗體可適用於診斷檢定，例如，用於偵測所關注之抗原在特異性細胞、組織或血清中之表現。對於診斷應用而言，抗體通常應以可偵測部分標記。眾多標記為可用的，其通常可分為以下種類：

放射性同位素(放射性核種)，諸如 ^3H 、 ^{11}C 、 ^{14}C 、 ^{18}F 、 ^{32}P 、 ^{35}S 、 ^{64}Cu 、 ^{68}Ga 、 ^{86}Y 、 ^{99}Tc 、 ^{111}In 、 ^{123}I 、 ^{124}I 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{133}Xe 、 ^{177}Lu 、 ^{211}At 或 ^{213}Bi 。經放射性同位素標記之抗體適用於受體靶向成像實驗中。使用 Current Protocols in Immunology, 第1卷及第2卷, Coligen等人編, Wiley-Interscience, New York, NY, Pubs. (1991)中描述之技術，抗體可以結合、螯合或另外錯合放射性同位素

金屬之配位體試劑標記，其中該試劑與抗體之經改造半胱胺酸硫醇具有反應性。可與金屬離子錯合之螯合配位體包括 DOTA、DOTP、DOTMA、DTPA 及 TETA (Macrocyclics, Dallas, TX)。放射性核種可經由與本發明之抗體-藥物接合物錯合來靶向 (Wu 等人 (2005) *Nature Biotechnology* 23(9):1137-1146)。

諸如 DOTA-順丁烯二醯亞胺 (4-順丁烯二醯亞胺丁醯胺苄基-DOTA) 之連接子試劑可遵循 Axworthy 等人 (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97(4):1802-1807 之程序，藉由胺基苄基-DOTA 與經異丙基氯甲酸酯 (Aldrich) 活化之 4-順丁烯二醯亞胺丁酸 (Fluka) 之反應來製備。DOTA-順丁烯二醯亞胺試劑與經半胱胺酸改造之抗體之自由半胱胺酸胺基酸反應且在抗體上提供金屬錯合配位體 (Lewis 等人 (1998) *Bioconj. Chem.* 9:72-86)。螯合連接子標記試劑 (諸如 DOTA-NHS (1,4,7,10-四氮雜環十二烷-1,4,7,10-四乙酸單 (N-羥基琥珀醯亞胺酯)) 為市售的 (Macrocyclics, Dallas, TX)。以經放射性核種標記之抗體成像之受體靶向可藉由偵測且定量腫瘤組織中抗體之累進積聚來提供路徑活化之標記 (Albert 等人 (1998) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 8:1207-1210)。在溶酶體降解之後，經接合放射性金屬可保留在細胞內。

適用作用於成像實驗之抗體標記之金屬螯合複合物經揭示：US 5342606；US 5428155；US 5316757；US 5480990；US 5462725；US 5428139；US 5385893；US

5739294 ; US 5750660 ; US 5834456 ; Hnatowich 等人 (1983) J. Immunol. Methods 65:147-157 ; Meares 等人 (1984) Anal. Biochem. 142:68-78 ; Mirzadeh 等人 (1990) Bioconjugate Chem. 1:59-65 ; Meares 等人 (1990) J. Cancer 1990, Suppl. 10:21-26 ; Izard 等人 (1992) Bioconjugate Chem. 3:346-350 ; Nikula 等人 (1995) Nucl. Med. Biol. 22:387-90 ; Camera 等人 (1993) Nucl. Med. Biol. 20:955-62 ; Kukis 等人 (1998) J. Nucl. Med. 39:2105-2110 ; Verel 等人 (2003) J. Nucl. Med. 44:1663-1670 ; Camera 等人 (1994) J. Nucl. Med. 21:640-646 ; Ruegg 等人 (1990) Cancer Res. 50:4221-4226 ; Verel 等人 (2003) J. Nucl. Med. 44:1663-1670 ; Lee 等人 (2001) Cancer Res. 61:4474-4482 ; Mitchell, 等人 (2003) J. Nucl. Med. 44:1105-1112 ; Kobayashi 等人 (1999) Bioconjugate Chem. 10:103-111 ; Miederer 等人 (2004) J. Nucl. Med. 45:129-137 ; DeNardo 等人 (1998) Clinical Cancer Research 4:2483-90 ; Blend 等人 (2003) Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals 18:355-363 ; Nikula 等人 (1999) J. Nucl. Med. 40:166-76 ; Kobayashi 等人 (1998) J. Nucl. Med. 39:829-36 ; Mardirossian 等人 (1993) Nucl. Med. Biol. 20:65-74 ; Roselli 等人 (1999) Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals, 14:209-20。

(b) 螢光標記，諸如稀土螯合劑(鎔螯合劑)，螢光素種類包括 FITC、5-羧基螢光素、6-羧基螢光素；若丹明類型包

括 TAMRA；丹醯基；麗絲胺(Lissamine)；花青素；藻紅蛋白；德州紅(Texas Red)；及其類似物。該等螢光標記可使用(例如)Current Protocols in Immunology(同上文)中揭示之技術與抗體接合。螢光染料及螢光標記試劑包括自Invitrogen/Molecular Probes(Eugene, OR) 及 Pierce Biotechnology, Inc.(Rockford, IL)市售之彼等螢光染料及螢光標記試劑。

(c)各種酶底物標記為可用的或經揭示(US 4275149)。酶通常催化可使用各種技術量測之發色底物之化學變化。舉例而言，酶可催化底物中之顏色變化，其可經分光光度測定進行量測。或者，酶可改變底物之螢光或化學發光。用於量化螢光變化之技術揭示於上文中。化學發光底物變得以化學反應電子激發且可隨後發射可量測(例如，使用一化學照度計)之光或向螢光受體供應能量。酶標記之實例包括螢光素酶(例如，螢火蟲螢光素酶及細菌螢光素酶；US 4737456)、蟲螢光素、2,3-二氫酞嗪二酮、蘋果酸脫氫酶、尿素酶、過氧化酶(諸如辣根過氧化酶(HRP))、鹼性磷酸酯酶(AP)、 β -半乳糖苷酶、葡糖澱粉酶、溶菌酶、醣氧化酶(例如，葡萄糖氧化酶、半乳糖氧化酶及葡萄糖-6-磷酸鹽脫氫酶)、雜環氧化酶(諸如尿酸酶及黃嘌呤氧化酶)、乳過氧化酶、微過氧化酶及其類似酶。用於接合酶與抗體之技術描述於O'Sullivan等人(1981) "Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for use in Enzyme Immunoassay"，於Methods in Enzym.(J. Langone

及 H. Van Vunakis 編)，Academic Press, New York, 73:147-166 中。

酶-底物組合之實例包括(例如)：

(i) 具有過氧化氫酶作為底物之辣根過氧化酶(HRP)，其中該過氧化氫酶氧化染料前驅物(例如，鄰苯二胺(OPD)或 3,3',5,5'-四甲基聯苯胺鹽酸鹽(TMB))；

(ii) 具有磷酸對硝基苯酯作為發色底物之鹼性磷酸酯酶(AP)；及

(iii) 具有發色底物(例如，對硝基苯基- β -D-半乳糖苷酶)或螢光底物 4-香豆素- β -D-半乳糖苷酶之 β -D-半乳糖苷酶(β -D-Gal)。

眾多其他酶-底物組合對於熟習此項技術者為可用的。關於一般概述，參見 US 4275149 及 US 4318980。

標記可與胺基酸側鏈、經活化胺基酸側鏈、經半胱胺酸改造之抗體及其類似物間接接合。舉例而言，抗體可與生物素及上述可與抗生蛋白或抗生蛋白鏈菌素接合之三種寬泛種類之標記的任一者接合，或反之亦然。生物素與抗生蛋白鏈菌素選擇性結合且因此，標記可以此間接方式與抗體接合。或者，為達成標記與多肽變異體之間接接合，多肽變異體與小半抗原(例如，地高辛(digoxin))接合且不同類型之上述標記之一者與抗半抗原多肽變異體(例如，抗地高辛抗體)接合。因此，可達成標記與多肽變異體之間接接合(Hermanson, G. (1996) 在 Bioconjugate Techniques Academic Press, San Diego 中)。

本發明之抗體可用於任何已知檢定方法中，諸如 ELISA、競爭性結合檢定、直接及間接夾心檢定，及免疫沈澱檢定(Zola, (1987) *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, 第147-158頁, CRC Press, Inc.)。

偵測標記可用於定域、呈現且定量結合或識別事件。本發明之經標記抗體可偵測細胞表面受體。可偵測標記抗體之另一用途為基於珠粒之免疫捕捉方法，其包含使珠粒與螢光標記抗體接合且在結合配位體之後偵測螢光信號。類似結合偵測方法利用表面電漿共振 (SPR) 效應以量測且偵測抗體-抗原相互作用。

偵測標記(諸如螢光染料及化學發光染料)(Briggs等人 (1997) "Synthesis of Functionalised Fluorescent Dyes and Their Coupling to Amines and Amino Acids," *J. Chem. Soc., Perkin-Trans. 1*:1051-1058)提供可偵測信號且通常可用於標記抗體，其較佳具有以下性質：(i)經標記抗體應產生具有低背景之極高信號以使得可在不含細胞與基於細胞之檢定中靈敏地偵測少量抗體；且(ii)經標記抗體應為光穩定的以使得可觀測、監控且記錄螢光信號，而無顯著光致漂白。對於涉及經標記抗體與膜或細胞表面(尤其活細胞)之細胞表面結合的應用而言，標記較佳(iii)具有良好水溶性以達成有效接合物濃度及偵測敏感性且(iv)對活細胞為無毒的以便不破壞該等細胞之正常代謝過程或造成過早細胞死亡。

細胞螢光強度之直接量化及螢光標記事件(例如肽-染料

接合物之細胞表面結合)之列舉可於一系統(FMAT® 8100 HTS System, Applied Biosystems, Foster City, Calif.)上進行，該系統自動混合且讀取具有活細胞或珠粒之非放射性檢定(Miraglia, "Homogeneous cell-and bead-based assays for high throughput screening using fluorometric microvolume assay technology", (1999) J. of Biomolecular Screening 4:193-204)。經標記抗體之用途亦包括細胞表面受體結合檢定、免疫捕捉檢定、螢光聯結免疫吸附劑檢定(FLISA)、卡斯蛋白酶-分裂(Zheng, "Caspase-3 controls both cytoplasmic and nuclear events associated with Fas-mediated apoptosis in vivo", (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:618-23 ; US 6372907)、細胞凋亡(Vermes, "A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V" (1995) J. Immunol. Methods 184:39-51)及細胞毒性檢定。螢光計微體積檢定技術可用於識別靶向細胞表面之分子之上調或下調(Swartzman, "A homogeneous and multiplexed immunoassay for high-throughput screening using fluorometric microvolume assay technology", (1999) Anal. Biochem. 271:143-51)。

藉由生物醫學及分子成像之各種方法及技術，本發明之經標記抗體適用作成像生物標記及探針，其中該等方法及技術諸如：(i)MRI(磁性共振成像)；(ii)微CT(電腦化斷層

攝影法)；(iii)SPECT(單光子發射電腦斷層攝影法)；(iv)PET(正電子發射斷層攝影法)Chen 等人(2004) Bioconjugate Chem. 15:41-49；(v)生物發光；(vi)螢光；及(vii)超音。免疫閃爍攝影法為一成像程序，其中經放射性物質標記之抗體經投予動物或人類患者且對其中抗體定域之體內之位點拍照片(US 6528624)。成像生物標記可經客觀量測且評估為正常生理過程、病原過程或對治療干預之藥理學反應之指示劑。生物標記可為若干類型：0型為疾病之天然歷史標記且與已知臨床因子縱向相關，例如類風濕性關節炎中滑膜炎之MRI評估；I型標記根據作用機制捕捉干預之影響，即使該機制可不與臨床結果相關；II型標記充當其中改變或信號來自其之替代端點，該生物標記預測臨床益處以"確認"靶向反應，諸如由CT量測類風濕性關節炎中之骨侵蝕。成像生物標記因此可提供關於以下方面之藥效(PD)治療資訊：(i)靶向蛋白之表現，(ii)治療劑與靶向蛋白之結合，亦即選擇率，及(iii)清除與半衰期藥物動力學資料。相對於基於實驗室之生物標記，活體內成像生物標記之優點包括：非侵襲性治療、可量化、整體評估、重複給藥及評估(亦即多個時間點)，及臨床前(小動物)至臨床(人類)結果之潛在可傳遞作用。對於一些應用而言，生物成像取代或最小化臨床前研究中動物實驗之數目。

熟知肽標記方法。參見 Haugland, 2003, Molecular Probes Handbook of Fluorescent Probes and Research

Chemicals, Molecular Probes, Inc. ; Brinkley, 1992, Bioconjugate Chem. 3:2 ; Garman, (1997) Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach, Academic Press, London ; Means (1990) Bioconjugate Chem. 1:2 ; Glazer 等人 (1975) Chemical Modification of Proteins. Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology (T. S. Work and E. Work, Eds.) American Elsevier Publishing Co., New York ; Lundblad, R. L. 及 Noyes, C. M. (1984) Chemical Reagents for Protein Modification, 第I卷及第II卷, CRC Press, New York ; Pfleiderer, G. (1985) "Chemical Modification of Proteins", Modern Methods in Protein Chemistry, H. Tschesche 編, Walter DeGruyter, Berlin and New York ; 及 (Wong (1991) Chemistry of Protein Conjugation and Cross-linking, CRC Press, Boca Raton, Fla.) ; De Leon-Rodriguez 等人 (2004) Chem. Eur. J. 10:1149-1155 ; Lewis 等人 (2001) Bioconjugate Chem. 12:320-324 ; Li 等人 (2002) Bioconjugate Chem. 13:110-115 ; Mier 等人 (2005) Bioconjugate Chem. 16:240-237。

經足夠接近之兩個部分(螢光報導體及猝滅劑)標記之肽及蛋白經歷螢光共振能量轉移(FRET)。報導體基團通常為由某個波長下之光激發且向受體或猝滅劑、基團轉移能量之螢光染料，其中發射之適當斯托克位移(Stokes shift)在最大亮度下。螢光染料包括具有延伸之芳香性之分子，諸如螢光素及若丹明，及其衍生物。螢光報導體可在完整肽

中由猝滅劑部分部分地或顯著地猝滅。在肽由肽酶或蛋白酶分裂後，可量測螢光之可偵測增加(Knight, C. (1995) "Fluorimetric Assays of Proteolytic Enzymes", Methods in Enzymology, Academic Press, 248:18-34)。

本發明之經標記抗體亦可用作親和性純化劑。在此方法中，使用此項技術中熟知之方法，將經標記抗體固定於諸如 Sephadex 樹脂或濾紙之固相上。使經固定抗體與含有待純化之抗原之樣品接觸，且其後以會移除除待純化之抗原之外的該樣品中大體上所有物質的適合溶劑洗滌載體，其中該抗原係與固定多肽變異體結合。最終，以會自多肽變異體釋放抗原之另一適合溶劑(諸如甘胺酸緩衝液，pH 5.0)洗滌載體。

標記試劑通常帶有反應性官能基，其可(i)與經半胱胺酸改造之抗體之半胱胺酸硫醇直接反應以形成經標記抗體，(ii)與連接子試劑反應以形成連接子-標記中間物，或(iii)與連接子抗體反應以形成經標記抗體。標記試劑之反應性官能基包括：順丁烯二醯亞胺、鹵乙醯基、碘乙醯胺琥珀醯亞胺酯(例如 NHS、N-羥基琥珀醯亞胺)、異硫氰酸酯、磺醯氯、2,6-二氯三嗪基、五氟苯酯及胺基磷酸酯，但亦可使用其他官能基。

一例示性反應性官能基為可偵測標記(例如生物素或螢光染料)之羧基取代基之 N-羥基琥珀醯亞胺酯(NHS)。標記之 NHS 酯可經預成形、分離、純化及/或表徵，或其可原位成形且與抗體之親核基團反應。通常，標記之羧基形式係

藉由與碳化二醯亞胺試劑(例如二環己基碳化二醯亞胺、二異丙基碳化二醯亞胺)或錄試劑(例如TSTU(四氟硼酸O-(N-琥珀醯亞胺基)-N,N,N',N'-四甲錄)、HBTU(六氟磷酸(O-苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲錄)或HATU(六氟磷酸O-(7-氮雜苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲錄))、活化劑(諸如1-羥基苯并三唑(HOBT)及N-羥基琥珀醯亞胺)之一些組合反應來活化以得到標記之NHS酯。在某些情況下，標記及抗體可由標記之原位活化及與抗體之反應來偶合以在一步驟中形成標記-抗體接合物。其他活化及偶合試劑包括TBTU(六氟磷酸2-(1H-苯并三唑-1-基)-1,1,3,3-四甲錄)、TFFH(2-氟-六氟磷酸N,N',N'',N'''-四甲錄)、PyBOP(六氟磷酸苯并三唑-1-基-氧基-參-吡咯啉-鎂)、EEDQ(2-乙氧基-1-乙氧基羰基-1,2-二氫-喹啉)、DCC(二環己基碳化二醯亞胺)；DIPCDI(二異丙基碳化二醯亞胺)、MSNT(1-(均三甲苯-2-磺醯基)-3-硝基-1H-1,2,4-三唑)，及芳基磺醯基鹵化物，例如三異丙基苯磺醯氯。

本發明之白蛋白結合肽-Fab化合物：

在一態樣中，本發明之抗體係融合於白蛋白結合蛋白上。血漿-蛋白結合可為改良短期分子之藥物動力性質之有效方式。白蛋白為血漿中最豐富之蛋白。血清白蛋白結合肽(ABP)可改變融合活性域蛋白之藥效，其包括改變組織吸收、滲透及擴散。該等藥效參數可由適當血清白蛋白結合肽序列(US 20040001827)之特異性選擇來調節。藉由噬菌體呈現篩檢來鑑別一系列白蛋白結合肽(Dennis等人。

(2002) "Albumin Binding As A General Strategy For Improving The Pharmacokinetics Of Proteins" J Biol Chem. 277:35035-35043 ; WO 01/45746)。本發明之化合物包括 ABP 序列，其係由以下文獻教示：(i)Dennis 等人(2002) J Biol Chem. 277:35035-35043 在表 III 及表 IV 處，第 35038 頁；(ii)US 20040001827 在 [0076] SEQ ID NOS: 9-22 處；及 (iii)WO 01/45746 在第 12-13 頁，所有該等文獻係以引用的方式併入本文中。白蛋白結合(ABP)-Fab 係以 1:1 化學計量比(1 ABP/1 Fab)將白蛋白結合肽融合於 Fab 重鏈之 C 末端來改造。展示該等 ABP-Fab 與白蛋白之締合使兔及小鼠中抗體之半衰期增加大於 25 倍。上述反應性 Cys 殘基因此可經引入該等 ABP-Fab 中且用於與細胞毒性藥物位點特異性接合，接著進行活體內動物研究。

例示性白蛋白結合肽序列包括(但不限於)SEQ ID NOS:42-46 中列出之胺基酸序列：

CDKTHHTGGGSQRLMEDICLPRWGCLWEDDF	SEQ ID NO:42
QRLMEDICLPRWGCLWEDDF	SEQ ID NO:43
QRLIEDICLPRWGCLWEDDF	SEQ ID NO:44
RLIEDICLPRWGCLWEDD	SEQ ID NO:45
DICLPRWGCLW	SEQ ID NO:46

抗體-藥物接合物

在另一態樣中，本發明提供免疫接合物或抗體-藥物接合物(ADC)，其包含與細胞毒性劑(諸如化學治療劑、藥物、生長抑制劑、毒素(例如，細菌、真菌、植物或動物

來源之酶活性毒素，或其片段)或放射性同位素(亦即，放射接合物))接合之抗體。在另一態樣中，本發明進一步提供使用該等免疫接合物之方法。在一態樣中，免疫接合物包含與細胞毒性劑或可偵測劑共價連接之上述抗CD22抗體之任一者。

抗體-藥物接合物用於局部遞送細胞毒性劑或細胞生長抑制劑(亦即在治療癌症中殺死或抑制腫瘤細胞之藥物)的用途(Syrigos及Epenetos (1999) *Anticancer Research* 19:605-614; Niculescu-Duvaz及Springer (1997) *Adv. Drg Del. Rev.* 26:151-172; 美國專利4,975,278)容許藥物部分向腫瘤之靶向遞送，且在其中細胞內積聚，其中該等未結合藥物劑之全身性投予可對正常細胞以及尋求待消除之腫瘤細胞產生不可接受之毒性程度(Baldwin等人(1986) *Lancet* pp.(1986年3月15日):603-05; Thorpe, (1985) "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy:A Review"，在 *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications* 中，A. Pinchera等人(編)，第475-506頁)。因此，尋求最大效用及最小毒性。多株抗體與單株抗體已經報導適用於該等策略中(Rowland等人(1986) *Cancer Immunol. Immunother.*, 21:183-87)。用於該等方法中之藥物包括道諾黴素、多柔比星、甲胺喋呤及長春地辛(Rowland等人(1986)同上文)。抗體-毒素接合物中使用之毒素包括細菌毒素，諸如白喉毒素；植物毒素，諸如蓖麻毒素；小分子毒素，諸如格爾德黴素

(Mandler 等人 (2000) *Jour. of the Nat. Cancer Inst.* 92(19):1573-1581 ; Mandler等人(2000) *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 10:1025-1028 ; Mandler 等人 (2002) *Bioconjugate Chem.* 13:786-791) 、美登素類物 (EP 1391213 ; Liu 等人 (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:8618-8623) , 及刺孢黴素 (Lode 等人 (1998) *Cancer Res.* 58:2928 ; Hinman 等人 (1993) *Cancer Res.* 53:3336-3342) 。該等毒素可由包括微管蛋白結合、DNA結合或拓撲異構酶抑制作用之機制來實現其細胞毒性及細胞生長抑制效應。一些細胞毒性藥物當與大抗體或蛋白受體配位體接合時傾向於不具活性或具有較低活性。

ZEVALIN®(替伊莫單抗, Biogen/Idex)為抗體-放射性同位素接合物, 其係由針對見於正常及惡性B淋巴細胞表面上之CD20抗原的鼠IgG1 κ 單株抗體及由硫脲連接子-螯合劑結合之¹¹¹In或⁹⁰Y放射性同位素組成(Wiseman等人(2000) *Eur. Jour. Nucl. Med.* 27(7):766-77 ; Wiseman等人(2002) *Blood* 99(12):4336-42 ; Witzig等人(2002) *J. Clin. Oncol.* 20(10):2453-63 ; Witzig 等人 (2002) *J. Clin. Oncol.* 20(15):3262-69) 。儘管ZEVALIN具有對抗B細胞非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)之活性, 但投藥在大多數患者中引起嚴重且長期之血球減少。由連接至刺孢黴素之hu CD33抗體組成之抗體藥物接合物MYLOTARG™(吉妥單抗, Wyeth Pharmaceuticals)於2000年經批准藉由注射來治療急性骨髓白血病(*Drugs of the Future* (2000) 25(7):686 ; 美國專利第

4970198號；第5079233號；第5585089號；第5606040號；第5693762號；第5739116號；第5767285號；第5773001號)。由經由二硫化物連接子SPP連接至美登素類物藥物部分DM1之huC242抗體組成的抗體藥物接合物康圖單抗美坦辛(Immunogen, Inc.)發展進入用於治療表現CanAg之癌症(諸如結腸癌、胰腺癌、胃癌及其他癌症)之II階段試驗中。由連接至美登素類物藥物部分DM1之抗前列腺特異性膜抗原(PSMA)單株抗體組成之抗體藥物接合物MLN-2740(Millennium Pharm., BZL Biologics, Immunogen Inc.)係處於對前列腺腫瘤之可能治療的開發中。將奧利斯坦汀肽、奧利斯坦汀E(AE)及單甲基奧利斯坦汀(MMAE)(海兔毒素之合成類似物)與嵌合單株抗體cBR96(對癌上之路易斯Y具特異性)及cAC10(對血液惡性疾病上之CD30具特異性)結合(Doronina 等人(2003) Nature Biotechnology 21(7):778-784)且用於治療開發中。

可用於產生免疫接合物之化學治療劑描述於本文中。可使用之酶活性毒素及其片段包括白喉A鏈、白喉毒素之非結合活性片段、外毒素A鏈(來自綠膿桿菌(*Pseudomonas aeruginosa*))、蓖麻毒素A鏈、相思子毒素A鏈、蒴藋根毒蛋白(modeccin)A鏈、帚麴菌素(α -sarcin)、桐油樹蛋白(*Aleurites fordii* protein)、康乃馨蛋白(dianthin protein)、垂商陸蛋白(*Phytolaca americana* protein)(PAPI、PAPII及PAP-S)、苦瓜(*Momordica charantia*)抑制劑、麻楓樹蛋白(curcin)、巴豆素(crotonin)、肥皂草(*Saponaire officinalis*)

抑制劑、天堂果蛋白(gelolin)、有絲分裂素(mitogellin)、侷限麴菌素(restrictocin)、酚黴素(phenomycin)、伊諾黴素(enomycin)及黴菌毒素(tricothecene)。參見(例如)1993年10月28日公開之WO 93/21232。多種放射性核種可用於產生放射性接合抗體。實例包括 ^{212}Bi 、 ^{131}I 、 ^{131}In 、 ^{90}Y 及 ^{186}Re 。抗體與細胞毒性劑之接合物係使用多種雙官能蛋白偶合劑來製造，該等蛋白偶合劑諸如N-琥珀醯亞胺基-3-(2-吡啶基二硫醇)丙酸酯(SPDP)、亞胺硫脲(IT)、亞胺酸酯(諸如己二亞胺酸二甲酯鹽酸鹽)之雙官能衍生物、活性酯(諸如辛二酸二琥珀醯亞胺酯)、醛類(諸如戊二醛)、雙-疊氮基化合物(諸如雙(對疊氮基苯甲醯基)己二胺)、雙-重氮鹽衍生物(諸如雙-(對重氮苯甲醯基)-乙二胺)、二異氰酸酯(諸如甲苯2,6-二異氰酸酯)及雙活性氟化合物(諸如1,5-二氟-2,4-二硝基苯)。舉例而言，蓖麻毒素免疫毒素可如Vitetta等人(1987) Science, 238:1098中所述來製備。經碳-14-標記之1-異硫氰酸基苄基-3-甲基二仲乙基三胺五乙酸(MX-DTPA)為用於接合放射性核苷酸與抗體(WO 94/11026)之例示性螯合劑。

本文中亦涵蓋抗體與一或多種小分子毒素(諸如刺孢黴素、美登素類物、海兔毒素、奧利斯坦汀、單端孢菌毒素(tricothecene)及CC1065，及具有毒素活性之該等毒素之衍生物)的接合物。

美登素及美登素類物(maytansinoids)

在一些實施例中，免疫接合物包含與一或多個美登素類

物分子接合之本發明之抗體(全長或片段)。

美登素類物為藉由抑制微管蛋白聚合而起作用之有絲分裂抑制劑。美登素首先係自東非灌木齒葉美登木(east African shrub *Maytenus serrata*)分離(美國專利第3896111號)。隨後，發現某些微生物類亦產生美登素類物，諸如美登醇及C-3美登醇酯(美國專利第4,151,042號)。合成美登醇及其衍生物及類似物揭示於(例如)美國專利第4,137,230號；第4,248,870號；第4,256,746號；第4,260,608號；第4,265,814號；第4,294,757號；第4,307,016號；第4,308,268號；第4,308,269號；第4,309,428號；第4,313,946號；第4,315,929號；第4,317,821號；第4,322,348號；第4,331,598號；第4,361,650號；第4,364,866號；第4,424,219號；第4,450,254號；第4,362,663號；及第4,371,533號。

美登素類物藥物部分為抗體藥物接合物中吸引人之藥物部分，因為其：(i)相對易於由醃酵產物之醃酵或化學修飾、衍生來製備，(ii)可以適於經由非二硫化物連接子與抗體接合之官能基衍生，(iii)在血漿中穩定，且(iv)有效抗多種腫瘤細胞株。

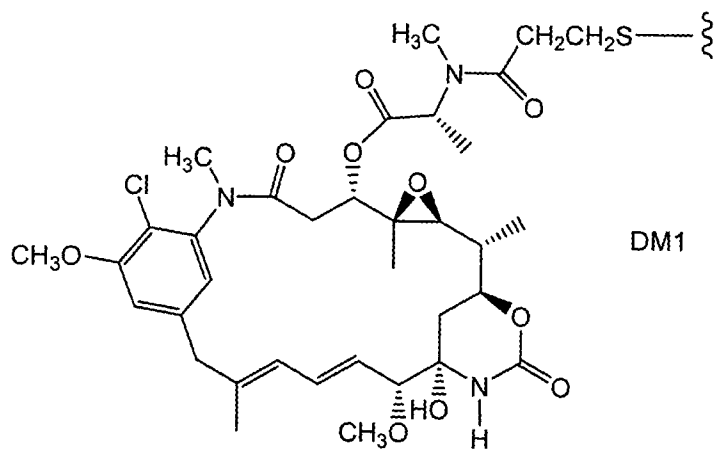
適用作美登素類物藥物部分之美登素化合物在此項技術中為熟知的，且可根據已知方法自天然來源分離，使用遺傳工程技術製備(參見Yu等人(2002) PNAS 99:7968-7973)，或美登醇及美登醇類似物係根據已知方法來合成製備。

例示性美登素類物藥物部分包括具有經修飾芳環之彼等

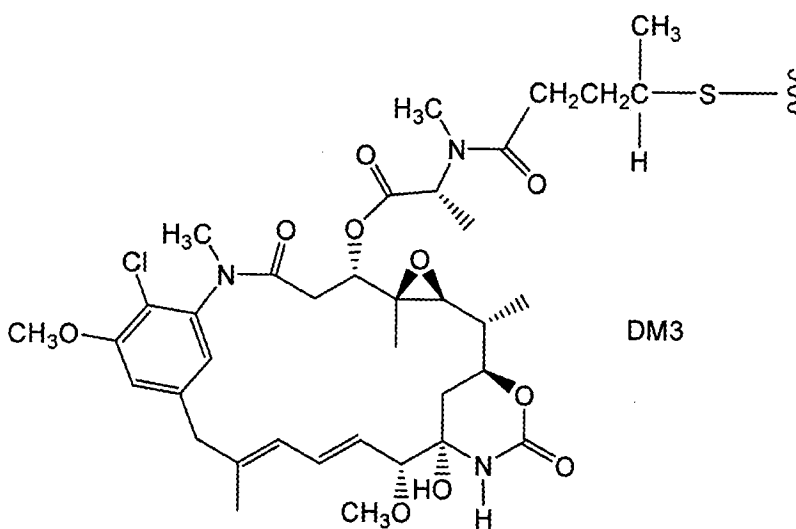
藥物部分，諸如：C-19-去氯(US 4256746)(藉由胺沙托辛(ansamycin)P2之氫化鋰鋁還原來製備)；C-20-羥基(或C-20-去甲基)+/-C-19-去氯(美國專利第4361650號及第4307016號)(藉由使用鏈黴菌(*Streptomyces*)或放線菌(*Actinomyces*)之去甲基作用或使用LAH之去氯作用來製備)；及C-20-去甲氧基、C-20-醯氧基(-OCOR)、+/-去氯(美國專利第4,294,757號)(藉由使用醯基氯之醯化來製備)，及在其他位置處具有修飾之彼等藥物部分。

例示性美登素類物藥物部分亦包括具有修飾之彼等藥物部分，諸如：C-9-SH(US 4424219)(藉由美登醇與 H_2S 或 P_2S_5 反應來製備)；C-14-烷氧基甲基(去甲氧基/ CH_2OR)(US 4331598)；C-14-羥基甲基或醯氧基甲基(CH_2OH 或 CH_2OAc)(US 4450254)(由*Nocardia*製備)；C-15-羥基/醯氧基(US 4364866)(由鏈黴菌藉由美登醇之轉化來製備)；C-15-甲氧基(美國專利第4313946號及第4315929號)(自*Trewia nudiflora*分離)；C-18-N-去甲基(美國專利第4362663號及第4322348號)(由鏈黴菌藉由美登醇之去甲基作用來製備)；及4,5-去氧基(US 4371533)(藉由美登醇之三氯化鈦/LAH還原來製備)。

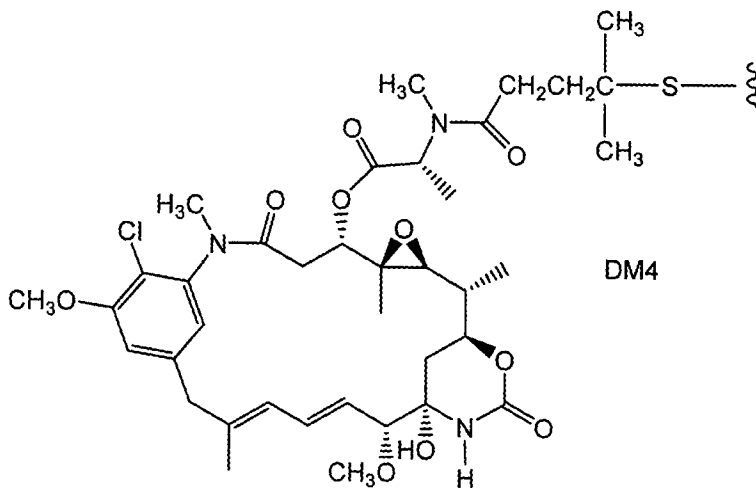
美登素類物藥物部分之例示性實施例包括：DM1；DM3；及DM4，其具有以下結構：



DM1



DM3



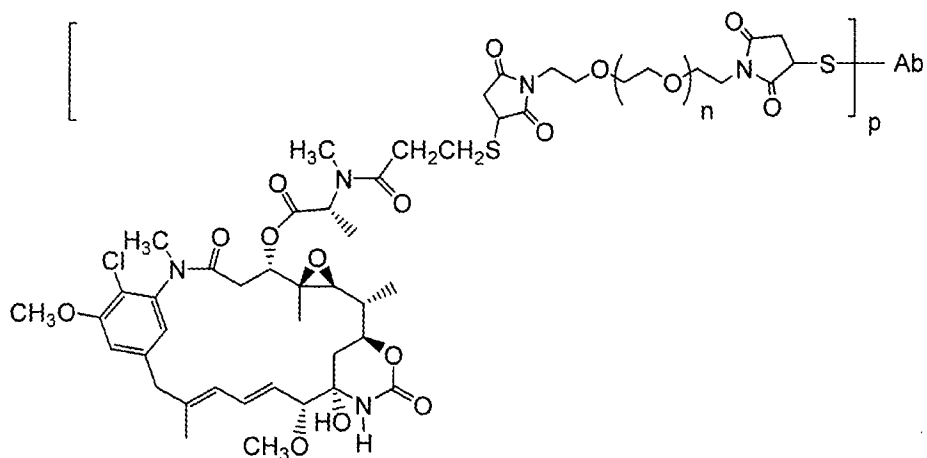
DM4

其中波浪線指示藥物之硫原子與抗體藥物接合物之連接子(L)之共價連接。已報導藉由 SMCC 連接至 DM1 之

其他例示性美登素類物抗體藥物接合物具有以下結構及縮寫，(其中Ab為抗體且p為1至約8)：



121073.doc



其中Ab為抗體；n為0、1或2；且p為1、2、3或4。

含有美登素類物之免疫接合物、製造其之方法，及其治療用途揭示於(例如)美國專利第5,208,020號；第5,416,064號；第6,441,163號及歐洲專利EP 0 425 235 B1中，其之揭示內容因此係以引用的方式明確併入本文中。Liu等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623 (1996)描述包含連接至針對人類結腸直腸癌之單株抗體C242之美登素類物(稱為DM1)的免疫接合物。已發現接合物對於所培養之結腸癌細胞具有高細胞毒性，且其在活體內腫瘤生長檢定中展示抗腫瘤活性。Chari等人，Cancer Research 52:127-131 (1992)描述免疫接合物，其中美登素類物係經由二硫化物連接子與結合至人類結腸癌細胞株上之抗原的鼠抗體A7接合，或與結合HER-2/neu致癌基因之另一鼠單株抗體TA.1結合。於每個細胞表現 3×10^5 個HER-2表面抗原之人類乳癌細胞株SK-BR-3上活體外測試TA.1-美登素類物接合物的細胞毒性。藥物接合物達成與游離美登素類物藥物類似之細胞毒性程度，該細胞毒性程度可藉由增加每個抗體分子之美登素類物分子之數目而增加。A7-美登素類物接合物在

小鼠中展示低全身性細胞毒性。

抗CD22抗體-美登素類物接合物係藉由將抗體與美登素類物分子化學連接而不伴有抗體或美登素類物分子之生物活性的顯著減低來製備。參見(例如)美國專利第5,208,020號(該專利之揭示內容係以引用的方式明確併入本文中)。平均每個抗體分子結合3-4個美登素類物分子已展示增強靶向細胞的細胞毒性之效用，而對抗體之功能或溶解性並無不利影響，儘管預期在使用裸抗體時甚至一分子毒素/抗體即可增強細胞毒性。美登素類物在此項技術中為熟知的且可藉由已知技術或自天然來源分離來合成。適當美登素類物揭示於(例如)美國專利第5,208,020號及上文提及之其他專利及非專利公開案中。較佳美登素類物為美登醇及在美登醇分子之芳環或其他位置處經修飾的美登醇類似物，諸如各種美登醇酯。

存在許多此項技術中已知之連接基團用於製造抗體-美登素類物接合物，其包括(例如)美國專利第5208020號、第6441163號或歐洲專利0 425 235 B1、Chari等人，Cancer Research 52:127-131 (1992)，及US 2005/0169933 A1中揭示之彼等連接基團，該等文獻之揭示內容係以引用的方式明確併入本文中。包含連接子組份SMCC之抗體-美登素類物接合物可根據2005年5月31日申請之美國專利申請案第11/141344號"Antibody Drug Conjugates and Methods"中所述來製備。如上述專利中所揭示，連接基包括二硫化物基團、硫醚基團、酸不穩定基團、光不穩定基團、肽酶不穩

定基團或酯酶不穩定基團。額外連接基團已於本文中描述且例示說明。

抗體與美登素類物之接合物可使用多種雙官能蛋白偶合劑製得，該等蛋白偶合劑諸如N-琥珀醯亞胺基-3-(2-吡啶基二硫基)丙酸酯(SPDP)、琥珀醯亞胺基-4-(N-順丁烯二醯亞胺基甲基)環己烷-1-羧酸酯(SMCC)、亞胺硫脲(IT)、亞胺酸酯(諸如己二亞胺酸二甲酯鹽酸鹽)之雙官能衍生物、活性酯(諸如辛二酸二琥珀醯亞胺酯)、醛類(諸如戊二醛)、雙-疊氮基化合物(諸如雙(對疊氮基苯甲醯基)己二胺)、雙-重氮鹽衍生物(諸如雙-(對重氮鹽苯甲醯基)-乙二胺)、二異氰酸酯(諸如甲苯2,6-二異氰酸酯)及雙活性氟化合物(諸如1,5-二氟-2,4-二硝基苯)。尤其較佳之偶合劑包括N-琥珀醯亞胺基-3-(2-吡啶基二硫基)丙酸酯(SPDP)(Carlsson等人, Biochem. J. 173:723-737 (1978))及N-琥珀醯亞胺基-4-(2-吡啶基硫基)戊酸酯(SPP)以提供二硫鍵。

可視連接類型將連接子連接於美登素類物分子之各種位置處。舉例而言，可使用習知偶合技術藉由與羥基反應形成酯鍵。反應可發生於具有羥基之C-3位置、經羥甲基修飾之C-14位置、經羥基修飾之C-15位置及具有羥基之C-20位置處。在一較佳實施例中，鍵係形成於美登醇或美登醇類似物之C-3位置處。

在一實施例中，本發明之抗體之任一者(全長或片段)係與一或多個美登素類物分子接合。在免疫接合物之一實施例中，細胞毒性劑D為美登素類物DM1。在免疫接合物之

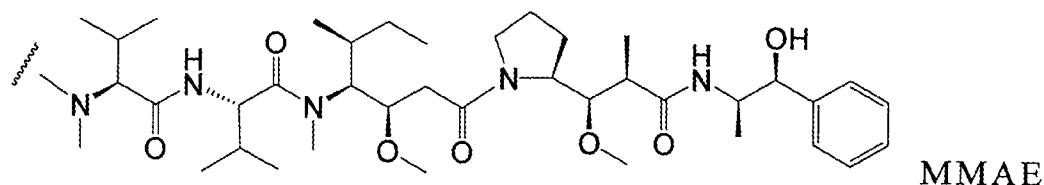
一實施例中，連接子為SMCC。在一實施例中，抗體-連接子-藥物接合物為如本文中所揭示之抗CD22抗體，DM1細胞毒性劑係經由SMCC連接子共價連接至該抗CD22抗體。

奧利斯坦汀及海兔毒素

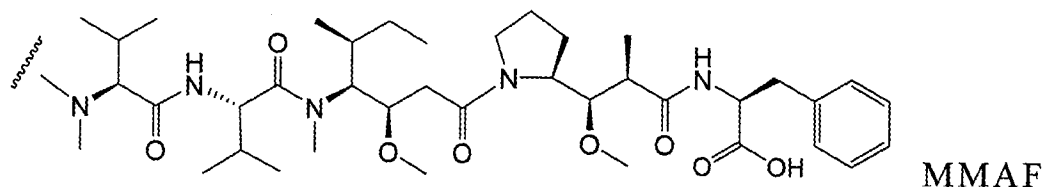
在一些實施例中，免疫接合物包含與海兔毒素或海兔毒素肽類似物及衍生物、奧利斯坦汀接合之本發明之抗體(美國專利第5635483號；第5780588號)。海兔毒素及奧利斯坦汀已展示干涉微管動力學、GTP水解及核及細胞分裂(Woyke等人(2001) *Antimicrob. Agents and Chemother.* 45(12):3580-3584)且具有抗癌(US 5663149)及抗真菌活性(Pettit等人(1998) *Antimicrob. Agents Chemother.* 42:2961-2965)。海兔毒素或奧利斯坦汀藥物部分可經由肽藥物部分之N(胺基)末端或C(羧基)末端連接至抗體上(WO 02/088172)。

例示性奧利斯坦汀實施例包括連接單甲基奧利斯坦汀藥物部分DE及DF之N末端，其揭示於"Senter等人，*Proceedings of the American Association for Cancer Research*，第45卷，文摘號623，提交於2004年3月28日"中，該文獻之揭示內容係以引用的方式明確併入本文中。

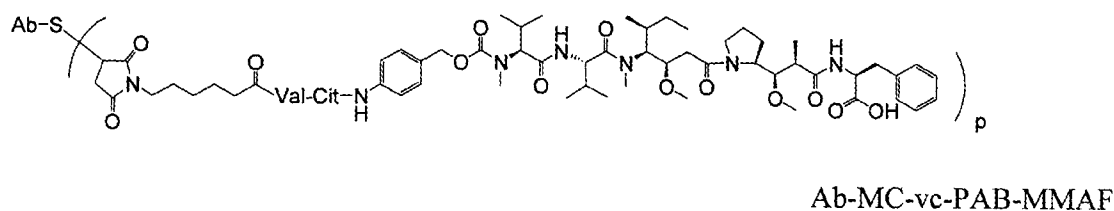
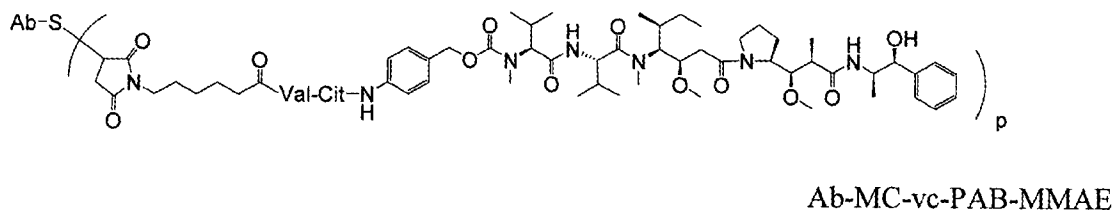
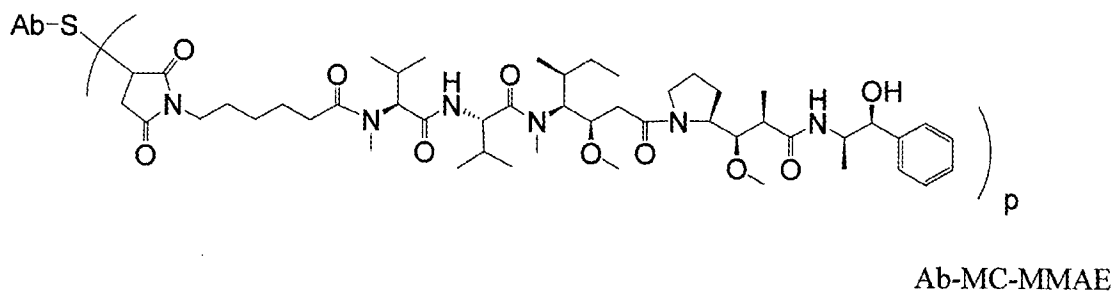
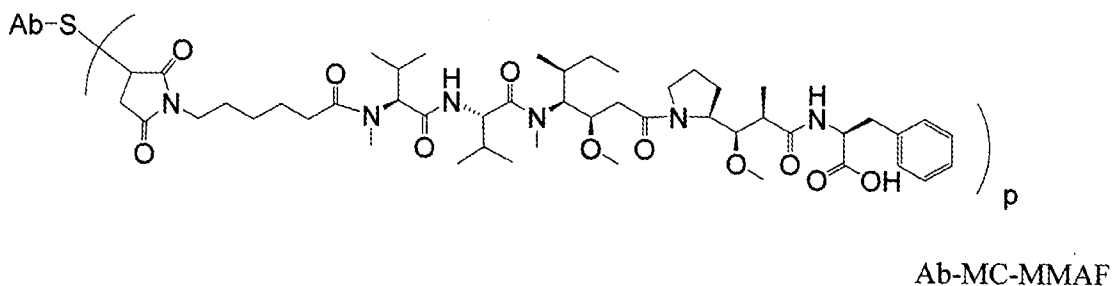
一例示性奧利斯坦汀實施例為MMAE(其中波浪線指示與抗體藥物接合物之連接子(L)之共價連接)。



另一例示性奧利斯坦汀實施例為MMAF，(其中波浪線指示與抗體藥物接合物之連接子(L)之共價連接)(US 2005/0238649)：



包含MMAE或MMAF及各種連接子組份(在本文中進一步描述)之其他例示性實施例具有以下結構及縮寫(其中Ab意謂抗體且p為1至約8)：



通常，基於肽之藥物部分可藉由在兩個或兩個以上胺基酸及/或肽片段之間形成肽鍵來製備。該等肽鍵可(例如)根據肽化學領域中熟知之液相合成方法(參看E. Schröder及K. Lübke, "The Peptides", 第1卷, 第76-136頁, 1965, Academic Press)來製備。奧利斯坦汀/海兔毒素藥物部分可根據以下文獻之方法來製備: US 5635483; US 5780588; Pettit等人(1989) J. Am. Chem. Soc. 111:5463-5465; Pettit等人(1998) Anti-Cancer Drug Design 13:243-277; Pettit, G.R.等人, Synthesis, 1996, 719-725; Pettit等人(1996) J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1 5:859-863; 及Doronina (2003) Nat Biotechnol 21(7):778-784。

刺孢黴素

在其他實施例中，免疫接合物包含與一或多個刺孢黴素分子接合之本發明之抗體。抗生素之刺孢黴素家族能夠在亞皮莫耳濃度下產生雙鏈DNA斷裂。對於製備刺孢黴素家族之接合物而言，參見美國專利第5,712,374號、第5,714,586號、第5,739,116號、第5,767,285號、第5,770,701號、第5,770,710號、第5,773,001號、第5,877,296號(均歸屬於American Cyanamid Company)。可使用之刺孢黴素之結構類似物包括(但不限於) γ_1^I 、 α_2^I 、 α_3^I 、N-乙醯基- γ_1^I 、PSAG及 θ_1^I (Hinman等人, Cancer Research 53:3336-3342 (1993); Lode等人, Cancer Research 58:2925-2928 (1998) 及歸屬於American Cyanamid之上述美國專利)。可與抗體接合之另一抗腫瘤藥物為QFA，其為抗葉酸劑。刺孢黴素

與QFA皆具有細胞內作用位點且不易於跨過質膜。因此，該等藥劑經由抗體介導之內化作用進行細胞吸收極大增強其細胞毒性作用。

其他細胞毒性劑

可與本發明之抗體接合之其他抗腫瘤劑包括BCNU、鏈脲佐菌素(streptozotycin)、長春新鹼及5-氟尿嘧啶(美國專利第5,053,394號、第5,770,710號中所述之共同稱為LL-E33288複合物的藥劑家族)，以及埃斯波黴素(esperamicin)(美國專利5,877,296)。

可使用之酶活性毒素及其片段包括白喉A鏈、白喉毒素之非結合活性片段、外毒素A鏈(來自綠膿桿菌)、蓖麻毒素A鏈、相思子毒素A鏈、葫蘆根毒蛋白A鏈、帚麴菌素、桐油樹蛋白、康乃馨蛋白、垂商陸蛋白(PAPI、PAPII及PAP-S)、苦瓜抑制劑、麻楓樹蛋白、巴豆素、肥皂草(saponaire officinalis)抑制劑、天堂果蛋白、有絲分裂素、侷限麴菌素、酚黴素、伊諾黴素及黴菌毒素。參見(例如)1993年10月28日公開之WO 93/21232。

本發明進一步涵蓋抗體與具有核分解活性之化合物(例如，核糖核酸酶或DNA內切酶，諸如脫氧核糖核酸酶；DNase)之間所形成的免疫接合物。

為選擇性破壞腫瘤，抗體可包含高放射性原子。多種放射性同位素可用於產生放射接合之抗體。實例包括At²¹¹、I¹³¹、I¹²⁵、Y⁹⁰、Re¹⁸⁶、Re¹⁸⁸、Sm¹⁵³、Bi²¹²、P³²、Pb²¹²及Lu之放射性同位素。當將接合物用於偵測時，其可包含

用於閃爍攝影研究之放射性原子，例如 $\text{tc}^{99\text{m}}$ 或 I^{123} ；或用於核磁共振(NMR)成像(亦稱作磁共振成像，mri)之自旋標記，諸如碘-123(此外)、碘-131、銻-111、氟-19、碳-13、氮-15、氧-17、鈷、鎂或鐵。

可以已知方式將放射性標記或其他標記併入接合物中。舉例而言，肽可經生物合成或可藉由使用適當胺基酸前驅物由化學胺基酸合成(其涉及(例如)以氟-19替代氫)來合成。諸如 $\text{tc}^{99\text{m}}$ 或 I^{123} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 及 In^{111} 之標記可經由肽中之半胱胺酸殘基連接。釷-90可經由離胺酸殘基連接。可使用 IODOGEN 方法(Fraker 等人(1978) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 80: 49-57) 併入碘-123。"Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy" (Chatal, CRC Press 1989)詳細地描述其他方法。

抗體與細胞毒性劑之接合物可使用多種雙官能蛋白偶合劑製得，該等蛋白偶合劑諸如 N-琥珀醯亞胺基-3-(2-吡啶基二硫基)丙酸酯(SPDP)、琥珀醯亞胺基-4-(N-順丁烯二醯亞胺基甲基)環己烷-1-羧酸酯(SMCC)、亞胺硫脲(IT)、亞胺酸酯(諸如己二亞胺酸二甲酯鹽酸鹽)之雙官能衍生物、活性酯(諸如辛二酸二琥珀醯亞胺酯)、醛類(諸如戊二醛)、雙-疊氮基化合物(諸如雙(對疊氮基苯甲醯基)己二胺)、雙-重氮鹽衍生物(諸如雙-(對重氮苯甲醯基)-乙二胺)、二異氰酸酯(諸如甲苯 2,6-二異氰酸酯)及雙活性氟化合物(諸如 1,5-二氟-2,4-二硝基苯)。舉例而言，蓖麻毒素免疫毒素可如 Vitetta 等人，*Science*, 238: 1098 (1987)中所

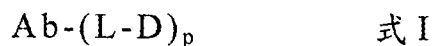
述來製備。碳14標記之1-異硫代氰基苄基-3-甲基二伸乙基三胺五乙酸(MX-DTPA)為用於使放射性核苷酸與抗體接合之例示性螯合劑。參見WO 94/11026。連接子可為促進細胞中之細胞毒性藥物釋放的"可裂解連接子"。舉例而言，可使用酸不穩定連接子、肽酶敏感性連接子、光不穩定連接子、二甲基連接子或含二硫化物之連接子(Chari等人，Cancer Research 52:127-131 (1992)；美國專利第5,208,020號)。

本發明之化合物明確涵蓋(但不限於)由以下交叉連接子試劑製備之ADC：BMPS、EMCS、GMBS、HBVS、LC-SMCC、MBS、MPBH、SBAP、SIA、SIAB、SMCC、SMPB、SMPH、sulfo-EMCS、sulfo-GMBS、sulfo-KMUS、sulfo-MBS、sulfo-SIAB、sulfo-SMCC及sulfo-SMPB，及SVSB(琥珀醯亞胺基-(4-乙烯基苄)苯甲酸酯)，其為市售的(例如，來自Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., U.S.A)。參見2003-2004 Applications Handbook and Catalog，第467-498頁。

製備抗體藥物接合物：

在本發明之抗體藥物接合物(ADC)中，抗體(Ab)係經由連接子(L)與一或多個藥物部分(D)接合，例如每個抗體約1至約20個藥物部分。式I之ADC可使用熟習此項技術者已知之有機化學反應、條件及試劑，藉由若干途徑來製備，其包括：(1)抗體之親核基團與二價連接子試劑反應以經由共價鍵形成Ab-L，接著與藥物部分D反應；及(2)藥物部分

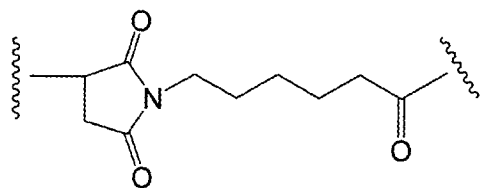
之親核基團與二價連接子試劑反應以經由共價鍵形成D-L，接著與抗體之親核基團反應。用於製備ADC之額外方法描述於本文中。



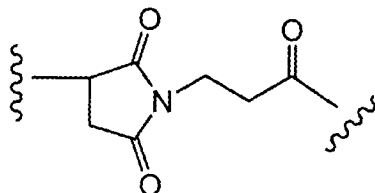
連接子可由一或多種連接子組份組成。例示性連接子組份包括6-順丁烯二醯亞胺基己醯基("MC")、順丁烯二醯亞胺基丙醯基("MP")、纈胺酸-瓜胺酸("val-cit")、丙胺酸-苯丙胺酸("ala-phe")、對胺基苄氧基羰基("PAB")、4-(2-吡啶基硫基)戊酸N-琥珀醯亞胺酯("SPP")、4-(N-順丁烯二醯亞胺基甲基)環己烷-1羧酸N-琥珀醯亞胺酯("SMCC")及(4-碘-乙醯基)胺基苯甲酸N-琥珀醯亞胺酯("SIAB")。額外連接子組份在此項技術為已知的且一些描述於本文中。

在一些實施例中，連接子可包含胺基酸殘基。例示性胺基酸連接子組份包括二肽、三肽、四肽或五肽。例示性二肽包括：纈胺酸-瓜胺酸(vc或val-cit)、丙胺酸-苯丙胺酸(af或ala-phe)。例示性三肽包括：甘胺酸-纈胺酸-瓜胺酸(gly-val-cit)及甘胺酸-甘胺酸-甘胺酸(gly-gly-gly)。包含胺基酸連接子組份之胺基酸殘基包括彼等天然存在者，以及少數胺基酸及非天然存在之胺基酸類似物，諸如瓜胺酸。胺基酸連接子組份可經設計且藉由特定酶(例如，與腫瘤相關之蛋白酶、組織蛋白酶B、C及D，或纖溶酶蛋白酶)使其對於酶裂解之選擇率最佳化。

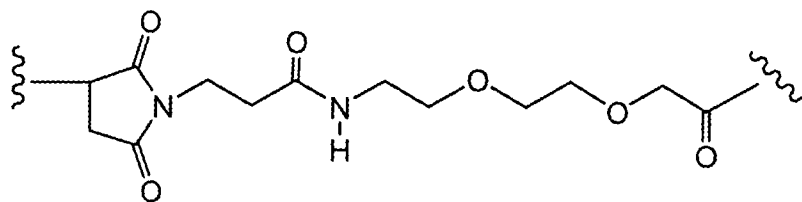
例示性連接子組份之結構展示於下文中(其中波浪線指示與ADC之其他組份共價連接之位點)：



MC

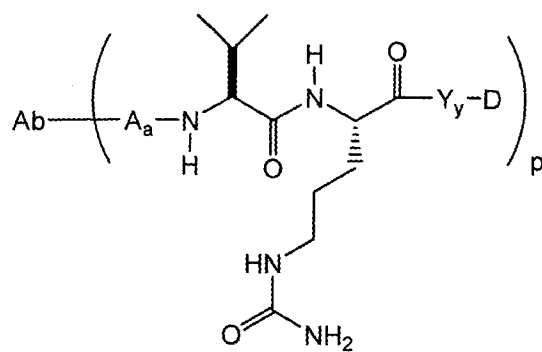


MP

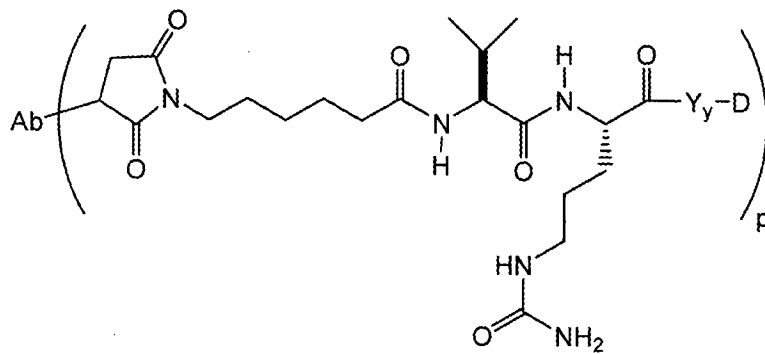


MPEG

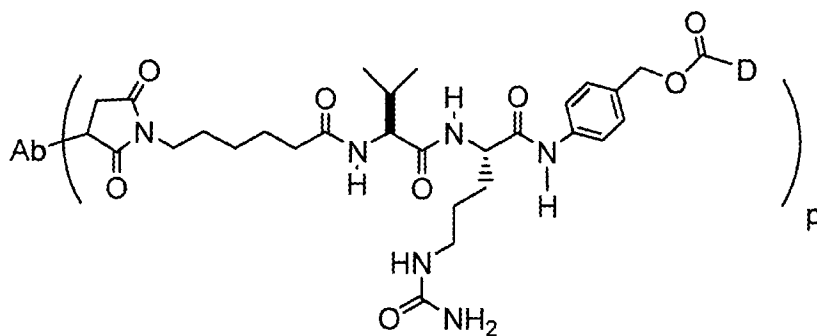
額外例示性連接子組份及縮寫包括(其中抗體(Ab)及連接子經描述，且p為1至約8)：



Val-cit



MC-val-cit



MC-val-cit-PAB

抗體上之親核基團包括(但不限於)：(i)N末端胺基，(ii)側鏈胺基，例如離胺酸，(iii)側鏈硫醇基團，例如半胱胺酸，及(iv)糖羥基或胺基，其中該抗體經糖基化。胺、硫醇及羥基為親核的且能夠與連接子部分及連接子試劑上之親電子基團反應以形成共價鍵，該等連接子部分及連接子試劑包括：(i)活性酯，諸如NHS酯、HOBt酯、鹵甲酸酯及醯基鹵；(ii)烷基鹵及苄基鹵化物，諸如鹵乙醯胺；(iii)醛、酮、羧基及順丁烯二醯亞胺基團。某些抗體具有可還原之鏈內二硫化物，亦即半胱胺酸橋。可藉由以諸如DTT(二硫蘇糖醇)之還原劑處理而使抗體具有與連接子試劑接合之反應性。因此，理論上每一半胱胺酸橋應形成兩個反應性硫醇親核試劑。可經由離胺酸與2-亞胺硫脲(Traut氏試劑)之反應將額外親核基團引入抗體中，從而使胺轉化為硫醇。可藉由引入一個、兩個、三個、四個或四個以上半胱胺酸殘基將反應性硫醇基團引入抗體(或其片段)中(例如，製備包含一或多個非天然半胱胺酸胺基酸殘基之突變體抗體)。

本發明之抗體藥物接合物亦可藉由修飾抗體以引入可與連接子試劑或藥物上之親核取代基反應之親電子部分來製

備。糖基化抗體之糖可經(例如)過碘酸鹽氧化試劑氧化以形成醛或酮基，其可與連接子試劑或藥物部分之胺基反應。所得亞胺希夫鹼(Schiff base)基團可形成穩定鍵，或可經(例如)硼氫化物試劑還原以形成穩定胺鍵。在一實施例中，糖基化抗體之碳水化合物部分與半乳糖氧化酶或偏過碘酸鈉之反應可在蛋白中產生可與藥物上之適當基團反應的羰基(醛基及酮基)(Hermanson, Bioconjugate Techniques)。在另一實施例中，含有N末端絲胺酸或蘇胺酸殘基之蛋白可與偏過碘酸鈉反應，其使得產生醛替代第一胺基酸(Geoghegan & Stroh, (1992) Bioconjugate Chem. 3:138-146; US 5362852)。此醛可與藥物部分或連接子親核試劑反應。

同樣，藥物部分上之親核基團包括(但不限於)：能夠與連接子部分及連接子試劑上之親電子基團反應以形成共價鍵之胺、硫醇、羥基、醯肼、肟、肼、硫半卡脎(thiosemicarbazone)、肼羧酸酯及芳基醯肼基團，該等連接子部分及連接子試劑包括：(i)活性酯，諸如NHS酯、HOBt酯、鹵甲酸酯及醯基鹵；(ii)烷基鹵及苄基鹵化物，諸如鹵乙醯胺；(iii)醛、酮、羧基及順丁烯二醯亞胺基團。

在另一態樣中，抗體具有可經化學修飾以引入一或多個氫硫基之一或多個離胺酸殘基。該抗體單元經由氫硫基之硫原子與連接子單元鍵結。可用於修飾離胺酸之試劑包括(但不限於)S-乙醯基硫乙酸N-琥珀醯亞胺酯(SATA)及2-亞

胺硫嘧啶鹽酸鹽 (Traut氏試劑)。

在另一實施例中，抗體可具有可經化學修飾以具有一或多個氫硫基之一或多個碳水化合物基團。如本文中所揭示，該抗體單元經由氫硫基之硫原子與連接子單元(諸如 Stretcher 單元)鍵結。

在另一實施例中，抗體可具有一或多個碳水化合物基團，其可經氧化以提供醛基(-CHO)(參見(例如)Laguzza 等人，J. Med. Chem. 1989, 32(3), 548-55)。相應醛可與 Stretcher 上之反應性位點形成鍵。可與抗體上之羰基反應之 Stretcher 上的反應性位點包括(但不限於)肼及羥胺。用於連接或締合藥物單元之關於蛋白質修飾之其他方案描述於 Coligan 等人，Current Protocols in Protein Science，第2卷，John Wiley & Sons (2002)中，其係以引用的方式併入本文中。

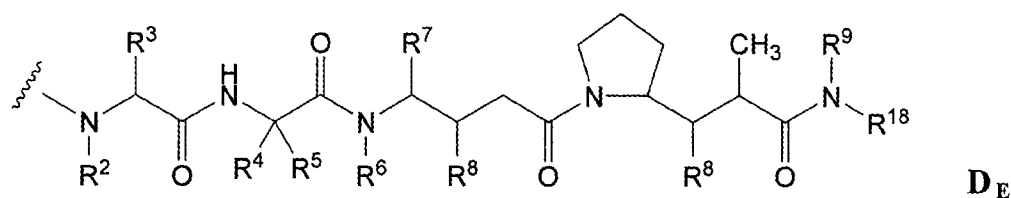
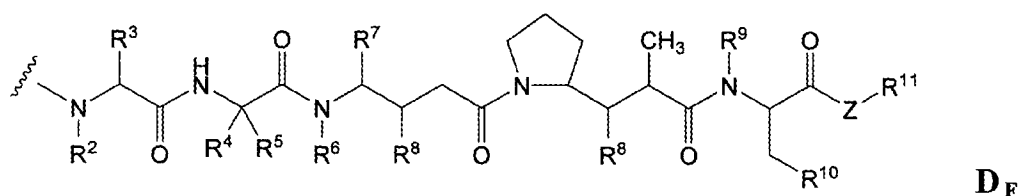
用於接合連接子-藥物部分與細胞靶向蛋白(諸如抗體、免疫球蛋白或其片段)之方法見於(例如)US 5,208,020；US 6,441,163；WO 2005037992；WO 2005081711；及 WO 2006/034488 中，所有該等文獻係以引用的方式全部明確併入本文中。

或者，包含抗體及細胞毒性劑之融合蛋白可(例如)藉由重組技術或肽合成製得。DNA 之長度可包含編碼彼此相鄰或由編碼連接子肽之區域分隔(該分隔不破壞接合物之所需性質)之接合物的兩個部分之各別區域。

在另一實施例中，抗體可與"受體"(諸如抗生蛋白鏈菌

素)接合以用於腫瘤預靶向中，其中將抗體-受體接合物投予患者，接著使用清除劑自循環中移除未結合之接合物，且隨後投予與細胞毒性劑(例如，放射性核苷酸)接合之"配位體"(例如，抗生蛋白)。

在免疫接合物之一實施例中，細胞毒性劑D為式D_E或D_F之奧利斯坦汀



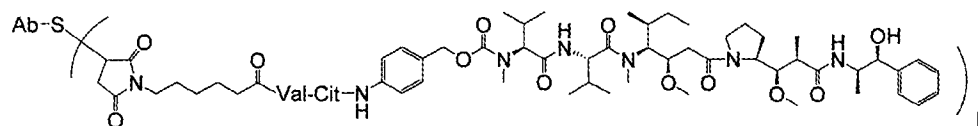
且其中R²與R⁶各自為甲基，R³與R⁴各自為異丙基，R⁷為第二丁基，R⁸各自獨立地選自CH₃、O-CH₃、OH及H；R⁹為H；R¹⁰為芳基；Z為-O-或-NH-；R¹¹為H、C₁-C₈烷基，或-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-CH₃；且R¹⁸為-C(R⁸)₂-C(R⁸)₂-芳基；且

(d) p在約1至8之範圍內。

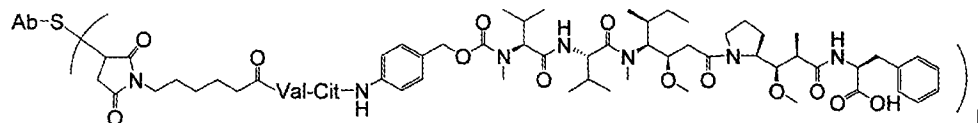
以下實施例進一步提供上述免疫接合物之任一者。在一實施例中，免疫接合物具有活體外或活體內殺細胞活性。在一實施例中，連接子係經由抗體上之硫醇基連接至抗體上。在一實施例中，連接子可由蛋白酶裂解。在一實施例中，連接子包含val-cit二肽。在一實施例中，連接子包含對胺基苄基單元。在一實施例中，該對胺基苄基單元係置

於藥物與連接子中之蛋白酶裂解位點之間。在一實施例中，對胺基苄基單元為對胺基苄氧基羰基(PAB)。在一實施例中，連接子包含6-順丁烯二醯亞胺基己醯基。在一實施例中，6-順丁烯二醯亞胺基己醯基置於抗體與連接子中之蛋白酶裂解位點之間。上述實施例可單獨或與另一實施例任意組合存在。

在一實施例中，藥物係選自MMAE及MMAF。在一實施例中，免疫接合物具有式



其中Ab為上述抗CD22抗體之任一者，S為硫原子，且p在2至5之範圍內。在一實施例中，免疫接合物具有式



其中Ab為上述抗CD22抗體之任一者，S為硫原子，且p在約1至約6、約2至約5、約2至約6、約2至約4、約2至約3、約3至約4、約3至約5、約3至約6，或約4至約6之範圍內。

標記抗體成像方法：

在本發明之另一實施例中，經半胱胺酸改造之抗體可經具有用於具有診斷、藥效及治療應用之成像實驗之放射性核種、螢光染料、生物發光引發物質部分、化學發光引發物質部分、酶及其他偵測標記的半胱胺酸硫醇標記。一般

而言，經標記之經半胱胺酸改造之抗體(亦即"生物標記"或"探針")係藉由注射、灌注或口服攝取投予活有機體(例如人類、齧齒動物或其他小動物)、灌注器官或組織樣品。隨時間過程偵測探針之分布且由影像來表示。

製造物品：

在本發明之另一實施例中，提供一種含有用於治療上述病症之物質的製造物品或"套組"。該製造物品包含一容器及一插入於該容器上或與該容器相關聯之標籤或封裝說明書。適合容器包括(例如)瓶、小瓶、注射器、發泡包裝等。該等容器可由多種材料(諸如玻璃或塑膠)成形。容器保持可有效治療病狀之抗體-藥物接合物(ADC)組合物且可具有一無菌入口(例如該容器可為具有一可由一皮下注射針刺穿之塞之靜脈內溶液袋或小瓶)。組合物中之至少一活性劑為ADC。標籤或內頁說明書指示該組合物係用於治療所選病狀，諸如癌症。另外或其他，製造物品可進一步包含一第二(或第三)容器，該容器包含醫藥學上可接受之緩衝劑，諸如用於注射之抑菌水(BWFI)、硫酸鹽緩衝之鹽水、林格氏溶液(Ringer's solution)及右旋糖溶液。其可進一步包括自商業及使用者之立場需要之其他物質，該等物質包括其他緩衝劑、稀釋劑、過濾器、針及注射器。

醫藥組合物：

在一態樣中，提供一種醫藥組合物，其包含上述免疫接合物之任一者及醫藥學上可接受之載劑。在一態樣中，提供一種治療B細胞增生性病狀之方法，其中該方法包含向

個體投予醫藥組合物。在一實施例中，該B細胞增生性病
症係選自淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)、侵襲性
NHL、復發性侵襲性NHL、復發性無痛性NHL、難治性
NHL、難治性無痛性NHL、慢性淋巴球性白血病(CLL)、
小淋巴球性淋巴瘤、白血病、毛細胞白血病(HCL)、急性
淋巴球性白血病(ALL)及套細胞淋巴瘤。在一實施例中，
該細胞增生性病症與細胞表面上增加之CD22表現相關。

在一態樣中，提供一種抑制細胞增殖之方法，其中該方
法包含在容許免疫接合物與CD22結合之條件下使細胞暴
露於上述免疫接合物之任一者中。在一實施例中，B細胞
為腫瘤細胞。在一實施例中，該腫瘤細胞為經受或懷疑經
受B細胞增生性病症之哺乳動物之B細胞，其中該B細胞增
生性病症係選自淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)、侵襲
性NHL、復發性侵襲性NHL、復發性無痛性NHL、難治性
NHL、難治性無痛性NHL、慢性淋巴球性白血病(CLL)、
小淋巴球性淋巴瘤、白血病、毛細胞白血病(HCL)、急性
淋巴球性白血病(ALL)及套細胞淋巴瘤，該細胞為異種移
植物。在一實施例中，該暴露在活體外發生。在一實施例
中，該暴露在活體內發生。

在一態樣中，提供一種使用本發明之抗CD22抗體之方
法以檢定一經受白血病或淋巴瘤之哺乳動物中之血清可溶
性CD22以診斷B細胞白血病或B細胞淋巴瘤，其量測該疾
病之臨床進展或衰退，或評估腫瘤負擔或復發。使用抗
CD22 RFB4抗體PE38(綠膿桿菌外毒素A片段38)毒素接合

物(參見Kreitman, R.J.等人, NEJM 345:241-247 (2001))之該等方法揭示於US 20050244828(Kreitman, R.J.等人, 其之全部內容係以引用的方式併入本文中)中。

【實施方式】

本發明提供與CD22結合之經分離抗體。進一步提供包含抗CD22抗體的免疫接合物。進一步提供經半胱胺酸改造之抗CD22抗體及其免疫接合物。本發明之抗體及免疫接合物適用於(例如)診斷或治療與改變之表現(例如, 增加之CD22表現)相關的病症。在某些實施例中, 本發明之抗體或免疫接合物適於診斷或治療細胞增生性病症, 諸如腫瘤或癌症。在某些實施例中, 本發明之抗體或免疫接合物適於偵測CD22, 例如, 表現於細胞表面上之CD22。

提供編碼抗CD22抗體之聚核苷酸。提供包含編碼抗CD22抗體之聚核苷酸的載體, 且提供包含該等載體之宿主細胞。亦提供包括包含本發明之聚核苷酸、抗CD22抗體或免疫接合物之任一者或多者之醫藥調配物的組合物。

通用技術

本文中描述或參考之技術及程序一般為吾人充分瞭解且常使用熟習此項技術者習知之方法來使用, 諸如以下文獻中描述之廣泛利用之方法: Sambrook等人, **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**第3版(2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; **Current Protocols in Molecular Biology** (F. M. Ausubel等人編, (2003)); 系列**Methods in Enzymology** (Academic

Press, Inc.): **Per 2: A Practical Approach** (M. J. MacPherson, B. D. Hames 及 G. R. Taylor 編 , (1995)), Harlow 及 Lane 編 , (1988) **Antibodies, A Laboratory Manual, and Animal Cell Culture** (R. I. Freshney 編 , (1987)) ; **Oligonucleotide Synthesis** (M. J. Gait 編 , 1984) ; **Methods in Molecular Biology**, Humana Press ; **Cell Biology: A Laboratory Notebook** (J. E. Cellis 編 , 1998) Academic Press ; **Animal Cell Culture** (R. I. Freshney) 編 , (1987) ; **Introduction to Cell and Tissue Culture** (J. P. Mather 及 P. E. Roberts, 1998) Plenum Press ; **Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures** (A. Doyle, J. B. Griffiths 及 D. G. Newell 編 , 1993-8) J. Wiley and Sons ; **Handbook of Experimental Immunology** (D. M. Weir 及 C. C. Blackwell 編) ; **Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells** (J. M. Miller 及 M. P. Calos 編 , 1987) ; **PCR: The Polymerase Chain Reaction**, (Mullis 等人 編 , 1994) ; **Current Protocols in Immunology** (J. E. Coligan 等人 編 , 1991) ; **Short Protocols in Molecular Biology** (Wiley 及 Sons, 1999) ; **Immunobiology** (C. A. Janeway 及 P. Travers, 1997) ; **Antibodies** (P. Finch, 1997) ; **Antibodies: A Practical Approach** (D. Catty. 編 , IRL Press, 1988-1989) ; **Monoclonal Antibodies: A Practical Approach** (P. Shepherd 及 C. Dean 編 , Oxford University Press, 2000) ; **Using Antibodies: A Laboratory**

Manual (E. Harlow 及 D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999)); **The Antibodies** (M. Zanetti 及 J. D. Capra 編, Harwood Academic Publishers, 1995); 及 **Cancer: Principles and Practice of Oncology** (V. T. DeVita 等人 編, J. B. Lippincott Company, 1993)。

定義及縮寫

定義

"經分離"抗體為已經識別且自其天然環境之組份中分離及/或回收的抗體。其天然環境之污染物組份為會干擾該抗體之研究、診斷或治療用途的物質，且可包括酶、激素及其他蛋白或非蛋白溶質。在一些實施例中，如由(例如) Lowry 方法所測定，抗體(1)經純化至大於抗體之95重量%，且在一些實施例中，經純化至大於99重量%；(2)藉由使用(例如)一自旋杯式序列分析儀經純化至足以獲得N末端或內部胺基酸序列之至少15個殘基的程度，或(3)在還原性或非還原性條件下使用(例如)庫馬斯藍(Coomassie blue)或銀染色經純化至均質(根據SDS-PAGE)。因為抗體天然環境之至少一種組份將不存在，所以經分離之抗體包括在重組細胞內之原位抗體。然而，經分離抗體通常將藉由至少一個純化步驟來製備。

"經分離"核酸分子為(例如)在其天然環境中自其通常締合之至少一種其他核酸分子分離的核酸分子。經分離核酸分子進一步包括包含於通常表現核酸分子之細胞中之核酸分子，但該核酸分子存在於染色體外或與其天然染色體位

置不同之染色體位置處。

"經純化"意謂分子係以包含其之樣品之至少95重量%或至少98重量%的濃度存在於樣品中。

如本文中所使用，術語"大體上類似"或"大體上相同"表示兩個數值之間足夠高程度的相似性(例如，一數值與本發明之抗體相關而另一數值與參考/比較抗體相關)，以使得熟習此項技術者會認為在藉由該等值(例如Kd值)所量測之生物特徵之範圍內兩值之間的差異具有很小或沒有生物學及/或統計學意義。隨參考/比較值而變化的該兩個值之間的差異(例如)小於約50%、小於約40%、小於約30%、小於約20%及/或小於約10%。

如本文中所使用，短語"大體上降低"或"大體上不同"表示兩個數值(通常一數值與一分子相關且另一數值與參考/比較分子相關)之間具有足夠高程度的差異，以使得熟習此項技術者會認為在藉由該等值(例如，Kd值)所量測之生物特徵之範圍內該兩個值之間的差異具有統計學意義。隨參考分子/比較分子之值而變化的該兩個值之間的差異(例如)大於約10%、大於約20%、大於約30%、大於約40%及/或大於約50%。

如本文中所使用，術語"載體"意欲指能夠轉運其所連接之另一核酸分子之核酸分子。一類載體為"質體"，其係指其中可連接額外DNA區段之環形雙鏈DNA。另一類載體為噬菌體載體。另一類載體為病毒載體，其中額外DNA區段可連接至該病毒基因組中。某些載體能夠在其經引入之宿

主細胞中自主複製(例如，具有複製之細菌起源之細菌載體及游離型哺乳動物載體)。其它載體(例如，非游離型哺乳動物載體)可在引入該宿主細胞之後整合至宿主細胞之基因組中，且進而連同宿主基因組一起經複製。此外，某些載體能夠指導其可操作性連接之基因之表現。該等載體在本文中稱作"重組表現載體"(或僅"表現載體")。一般而言，用於重組DNA技術中之表現載體常為質體之形式。在本說明書中，"質體"與"載體"可互換使用，因為質體為最常用之載體形式。

如本文中可互換使用之"聚核苷酸"或"核酸"係指任何長度之核苷酸之聚合物，且包括DNA及RNA。該等核苷酸可為脫氧核糖核苷酸、核糖核苷酸、經修飾核苷酸或鹼基，及/或其類似物，或可藉由DNA或RNA聚合酶或藉由合成反應併入聚合物中之任何基質。聚核苷酸可包含經修飾核苷酸，諸如甲基化核苷酸及其類似物。存在時，可在組裝聚合物之前或之後進行核苷酸結構之修飾。核苷酸序列可由非核苷酸組份中斷。聚核苷酸可包含在合成之後進行之修飾，諸如與標記接合。其他類型之修飾包括(例如)"帽子"；一或多個天然存在核苷酸經類似物取代；核苷酸間修飾，諸如具有不帶電荷之鍵者(例如，膦酸甲酯、磷酸三酯、磷醯胺酸、胺基甲酸酯等)及具有帶電荷之鍵者(例如硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯等)、含有附屬部分者(諸如蛋白(例如，核酸酶、毒素、抗體、信號肽、ply-L-離胺酸等))、具有插層劑者(例如吡啶、補骨脂素等)、含有螯合

劑者(例如金屬、放射性金屬、硼、氧化性金屬等)、含有烷化劑者、具有經修飾之鍵者(例如 α 變旋異構核酸等);以及聚核苷酸之未經修飾形式。此外,通常存在於糖中之任何羥基均可經(例如)膦酸酯基、磷酸酯基置換,經標準保護基團保護,或經活化以製備與額外核苷酸連接之額外鍵,或可與固體或半固體支撐物接合。5'及3'末端OH可經磷酸化或經胺或具有1至20個碳原子之有機封端基團部分取代。其他羥基亦可衍生為標準保護基團。聚核苷酸亦可含有此項技術中通常已知之核糖或脫氧核糖之類似形式,包括(例如)2'-O-甲基-、2'-O-烯丙基-、2'-氟-或2'-疊氮基-核糖、碳環糖類似物、 α -變旋異構糖、差向異構糖(諸如阿拉伯糖、木糖或來蘇糖(lyxose))、哌喃糖、呋喃糖、景天庚酮糖、非環狀類似物及基本核苷類似物(諸如甲基核糖苷)。一或多種磷酸二酯鍵可經替代連接基團置換。該等替代連接基團包括(但不限於)其中磷酸酯經P(O)S("硫代酯")、P(S)S("二硫代酯")、(O)NR₂("鹽胺化物")、P(O)R、P(O)OR'、CO或CH₂("甲縮醛")置換之實施例,其中R或R'各自獨立地為H或視情形含有醚(-O-)鍵之經取代或未經取代烷基(1-20個C)、芳基、烯基、環烷基、環烯基或芳烷基(araldyl)。聚核苷酸中之所有鍵無需相同。前述描述適用於本文所提及之所有聚核苷酸,其包括RNA及DNA。

如本文中所使用之"寡核苷酸"通常係指長度通常(但非必需)小於約200個核苷酸之短的、通常為單鏈、通常合成之聚核苷酸。術語"寡核苷酸"及"聚核苷酸"並不相互排除。

上文關於聚核苷酸之描述同樣且完全適用於寡核苷酸。

關於參考多肽序列之"胺基酸序列一致性百分比(%)"經定義為在比對序列且(若需要)引入缺口後(以達成最大序列一致性百分比且不將任何保守性取代視作序列一致性之部分)，與參考多肽序列中胺基酸殘基相同之候選序列中胺基酸殘基的百分比。為測定胺基酸序列一致性百分比之目的的比對可以此項技術內之多種方式達成，例如使用公用電腦軟體，諸如BLAST、BLAST-2、ALIGN或Megalign (DNASTAR)軟體。熟習此項技術者可測定用於比對序列之適當參數，其包括為獲得所比較之序列之全長的最大比對所需之任何算法。然而，出於本文中之目的，胺基酸序列一致性%值係使用序列比較電腦程式ALIGN-2產生。該ALIGN-2序列比較電腦程式之作者為Genentech, Inc.，且原始碼已以使用者文件向美國版權局(U.S. Copyright Office), Washington D.C., 20559申請，其中其係以美國版權註冊號TXU510087註冊。ALIGN-2程式係公開獲自Genentech, Inc., South San Francisco, California，或可由原始碼編譯。ALIGN-2程式應經編譯用於一UNIX操作系統上，較佳數位UNIX V4.0D。所有序列比較參數均由ALIGN-2程式設定且並未改變。

在其中ALIGN-2用於胺基酸序列比較之情況下，給定胺基酸序列A與給定胺基酸序列B之胺基酸序列一致性%(其或者可表示為具有或包含與給定胺基酸序列B具有某%胺基酸序列一致性的給定胺基酸序列A)計算如下：

100乘以分數X/Y

其中X為在A與B之彼程式比對中由序列比對程式ALIGN-2記為相同匹配之胺基酸殘基的數目，且其中Y為B中胺基酸殘基之總數。應瞭解在胺基酸序列A之長度不等於胺基酸序列B之長度時，A與B之胺基酸序列一致性%應不等於B與A之胺基酸序列一致性%。除非另外特定說明，否則本文中所有胺基酸序列一致性%值係使用ALIGN-2電腦程式如前一段落中所述來獲得。

本文中"B細胞表面標記"或"B細胞表面抗原"為可以與其結合之拮抗劑靶向之表現於B細胞表面上的抗原，其中該拮抗劑包括(但不限於)B細胞表面抗原或能夠拮抗配位體與天然存在B細胞抗原之結合之B細胞表面抗原的可溶形式之抗體。例示性B細胞表面標記包括CD10、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD24、CD37、CD40、CD53、CD72、CD73、CD74、CDw75、CDw76、CD77、CDw78、CD79a、CD79b、CD80、CD81、CD82、CD83、CDw84、CD85及CD86白血球表面標記(關於描述，參見The Leukocyte Antigen Facts Book，第2版，1997，Barclay等人編，Academic Press, Harcourt Brace & Co., New York)。其他B細胞表面標記包括RP105、FcRH2、B細胞CR2、CCR6、P2X5、HLA-DOB、CXCR5、FCER2、BR3、BAFF、BLyS、Btig、NAG14、SLGC16270、FcRH1、IRTA2、ATWD578、FcRH3、IRTA1、FcRH6、BCMA及239287。與哺乳動物之其他非B細胞組織相比，

特別關注之B細胞表面標記優先表現於B細胞上且可表現於前驅B細胞與成熟B細胞上。

如本文中所使用，術語"CD22"係指來自任何脊椎動物(除非另外指示，否則其包括哺乳動物，諸如靈長類動物(例如人類、獼猴(cyno))及齧齒動物(例如，小鼠及大鼠))來源之任何天然CD22。該術語涵蓋"全長"、未經處理之CD22以及由在細胞中處理產生之任何形式之CD22。該術語亦涵蓋CD22之天然存在變異體，例如，剪接變異體、對偶基因變異體及同功異型物。CD22之主要同功異型物(CD22 β)包含847個胺基酸及細胞外域中之七個類免疫球蛋白區(參見Wilson, G.L.等人, J. Exp. Med. 173:137-146 (1991))。次要同功異型物CD22 α 包含647個胺基酸且在細胞外域中缺乏類免疫球蛋白域3及4(參見Stamenkovic, I.及Seed, B., Nature 345:74-77(1990)及Wilson等人(1991)，同上文)。CD22 β 之胺基酸序列描述於圖1B中，其中加底線部分為細胞外域(ECD)且斜體部分指示自CD22 α 細胞外域序列失去之胺基酸。圖1C描述CD22 α 之胺基酸序列，其中ECD加底線。胺基酸1至胺基酸21之胺基酸序列表示自蛋白質之成熟形式分裂之信號序列。在一實施例中，CD22表現於細胞表面上，諸如正常B細胞或腫瘤B細胞表面上。圖1D描述來自獼猴之CD22之胺基酸序列。

"抗體"(Ab)及"免疫球蛋白"(Ig)為具有類似結構特徵之糖蛋白。儘管抗體顯示與特異性抗原之結合特異性，但免疫球蛋白包括通常缺乏抗原特異性之抗體與其他類抗體分

子。後一種多肽係(例如)由淋巴系統以低含量產生且由骨髓瘤以增加之含量產生。

術語"抗體"及"免疫球蛋白"就最廣泛之含義而言可互換使用，且包括單株抗體(例如，全長或完整單株抗體)、多株抗體、單價抗體、多價抗體、多特異性抗體(例如，雙特異性抗體，只要其展現所需生物學活性即可)，且亦可包括某些抗體片段(如本文中更詳細地描述)。抗體可為嵌合抗體、人類抗體、人類化抗體及/或親和力成熟抗體。

術語"抗CD22抗體"或"與CD22結合之抗體"係指能夠在足夠親和力下結合CD22以使得抗體適用作靶向CD22之診斷劑及/或治療劑的抗體。抗CD22抗體與無關之非CD22蛋白之結合程度較佳小於如由(例如)一放射免疫測定(RIA)所量測之抗體與CD22之結合的約10%。在某些實施例中，與CD22結合之抗體具有 $\leq 1 \mu\text{M}$ 、 $\leq 100 \text{ nM}$ 、 $\leq 10 \text{ nM}$ 、 $\leq 1 \text{ nM}$ 或 $\leq 0.1 \text{ nM}$ 的解離常數(Kd)。在某些實施例中，抗CD22抗體與保留於來自不同物種之CD22內之CD22的抗原決定基結合。

抗體之"可變區"或"可變域"係指該抗體之重鏈或輕鏈之胺基末端域。重鏈之可變域可被稱作"VH"。輕鏈之可變域可被稱作"VL"。該等域通常為抗體之最可變部分且含有抗原結合位點。

術語"可變"係指抗體間可變域之某些部分的序列廣泛不同且該等部分用於各特定抗體對其特定抗原之結合及特異性。然而，該可變性並非均勻分布於抗體之整個可變域

上。其集中於被稱作互補判定區(CDR)或輕鏈與重鏈可變域兩者中之高變區(HVR)的三個區段。可變域之更高度保守部分稱作框架區(FR)。天然重鏈及輕鏈之可變域各包含四個FR區，FR區很大程度上採用 β 片層組態，其藉由3個形成環連接且在某些情況下形成部分 β 片層結構的CDR來連接。各鏈中之CDR係由FR區以緊密接近之方式固持在一起，且來自其他鏈之CDR有助於形成抗體之抗原結合位點(參看Kabat等人，*Sequences of Proteins of Immunological Interest*，第五版，National Institute of Health, Bethesda, MD (1991))。恆定域不直接包括於抗體與抗原之結合中，但顯示各種效應物功能，例如使抗體具有抗體依賴性細胞毒性。

來自任何脊椎動物物種之抗體(免疫球蛋白)之"輕鏈"基於其恆定域之胺基酸序列可歸類為兩種明顯不同類型(稱作 κ 及 λ)之一者。

視其重鏈之恆定域之胺基酸序列而定，可將抗體(免疫球蛋白)分為不同種類。存在五種主要種類之免疫球蛋白：IgA、IgD、IgE、IgG及IgM，且若干該等種類可進一步分為亞類(同型)，例如，IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁及IgA₂。對應於不同種類之免疫球蛋白的重鏈恆定域分別被稱作 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 及 μ 。不同種類之免疫球蛋白之亞單位結構及三維組態為熟知的且通常描述於(例如)Abbas等人，*Cellular and Mol. Immunology*，第4版(2000)中。抗體可為藉由抗體與一或多個其他蛋白或肽共價或非共價締合

所形成之較大融合分子的部分。

術語"全長抗體"、"完整抗體"及"整個抗體"在本文中可互換使用，其係指呈其大體上完整形式之抗體，而並非如下文所定義之抗體片段。該等術語尤其係指具有含有Fc區之重鏈的抗體。

"抗體片段"僅包含完整抗體的一部分，其中該部分保留當存在於完整抗體中時通常與彼部分相關的至少一種且多達大部分或所有功能。在一實施例中，抗體片段包含完整抗體之抗原結合位點且因此保留結合抗原之能力。在另一實施例中，抗體片段(例如包含Fc區者)保留當存在於完整抗體中時通常與Fc區相關之至少一種生物功能，諸如FcRn結合、抗體半衰期調節、ADCC功能及補體結合。在一實施例中，抗體片段為具有大體上與完整抗體類似之活體內半衰期的單價抗體。舉例而言，此抗體片段可包含於與能夠賦予該片段以活體內穩定性之Fc序列連接的抗原結合臂上。

由木瓜酵素消化抗體產生各具有單一抗原結合位點之兩個相同的抗原結合片段(被稱為"Fab"片段)，及殘餘"Fc"片段，其名稱反映其易於結晶之能力。胃蛋白酶處理產生具有兩個抗原組合位點且仍能夠交聯抗原之F(ab')₂片段。

"Fv"為含有完整抗原結合位點之最小抗體片段。在一實施例中，兩鏈Fv種類係由緊密、非共價締合之一重鏈可變域及一輕鏈可變域之二聚體組成。在單鏈Fv(scFv)種類中，一重鏈可變域與一輕鏈可變域可藉由可撓性肽連接子

共價連接，以使得輕鏈與重鏈可以與兩鏈Fv種類中的結構類似之"二聚"結構締合。各可變域之三個CDR在此組態中相互作用以界定VH-VL二聚體表面上之抗原結合位點。總之，六個CDR賦予抗體以抗原結合特異性。然而，甚至單一可變域(或半數僅包含三個抗原特異性CDR的Fv)亦具有識別且結合抗原之能力，儘管其與抗原之結合親和力比整個結合位點之親和力低。

Fab片段含有重鏈可變域及輕鏈可變域且亦含有輕鏈恆定域及第一重鏈恆定域(CH1)。Fab'片段藉由在重鏈CH1域之羧基末端添加一些包括來自抗體鉸鏈區之一或多個半胱胺酸的殘基而與Fab片段不同。Fab'-SH為本文中關於其中恆定域之半胱胺酸殘基具有游離硫醇基之Fab'的名稱。F(ab')₂抗體片段最初以Fab'片段對之形式產生，其間具有鉸鏈半胱胺酸。亦已知抗體片段之其他化學偶合。

"單鏈Fv"或"scFv"抗體片段包含抗體之VH域及VL域，其中該等域存在於單一多肽鏈中。通常，scFv多肽進一步包含介於VH域與VL域之間的多肽連接子，其使得scFv能夠形成抗原結合所需之結構。關於scFv之概述，參見Pluckthun，於The Pharmacology of Monoclonal Antibodies，第113卷，Rosenburg及Moore編，Springer-Verlag，New York，第269-315頁(1994)中。

術語"雙功能抗體"係指具有兩個抗原結合位點之小抗體片段，該等片段包含連接至同一多肽鏈(VH-VL)內之輕鏈可變域(VL)的重鏈可變域(VH)。藉由使用過短而使得同一

鏈上之兩個域之間無法配對的连接子，迫使該等域與另一鏈之互補域配對且產生兩個抗原結合位點。雙功能抗體可為二價或雙特異性的。雙功能抗體更完全地描述於(例如) EP 404,097；WO 93/1161；Hudson等人(2003) Nat. Med. 9:129-134；及Hollinger等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448 (1993)中。三功能抗體及四功能抗體亦描述於Hudson等人(2003) Nat. Med. 9:129-134中。

如本文中所使用之術語"單株抗體"係指自大體上同種抗體的群體(意即構成群體之個別抗體除可少量存在之可能突變(例如，天然存在突變)之外為相同的)獲得之抗體。因此，修飾語"單株"指示抗體並非作為離散抗體之混合物的特性。在某些實施例中，此單株抗體通常包括包含結合標靶之多肽序列的抗體，其中該標靶結合多肽序列係藉由包括自複數個多肽序列選擇單一標靶結合多肽序列的方法來獲得。舉例而言，選擇過程可為自複數個純系選擇唯一純系，諸如一池融合瘤純系、噬菌體純系或重組DNA純系。應瞭解可進一步改變所選標靶結合序列以(例如)改良對標靶之親和力，人類化該標靶結合序列，改良其在細胞培養中之產量，降低其在活體內之免疫原性，產生多特異性抗體等，且包含已改變之標靶結合序列的抗體亦為本發明之單株抗體。與通常包括針對不同決定子(抗原決定基)之不同抗體的多株抗體製劑相比，單株抗體製劑之各單株抗體係針對抗原上之單一決定子。除其特異性之外，單株抗體製劑之優勢在於其通常未受其他免疫球蛋白污染。

修飾語"單株"指示抗體獲自大體上同種抗體群體的特性，且不應理解為要求由任何特殊方法來製造該抗體。舉例而言，根據本發明待使用之單株抗體可由若干技術製造，該等技術包括(例如)融合瘤法(例如，Kohler等人，Nature, 256: 495 (1975)；Harlow等人，Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 第2版, 1988)；Hammerling等人，在 Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas 563-681(Elsevier, N.Y., 1981)中)；重組DNA法(參見(例如)美國專利第4,816,567號)；噬菌體呈現技術(參見(例如)Clackson等人，Nature, 352: 624-628 (1991)；Marks等人，J. Mol. Biol. 222: 581-597 (1992)；Sidhu等人，J. Mol. Biol. 338(2): 299-310 (2004)；Lee等人，J. Mol. Biol. 340(5): 1073-1093 (2004)；Fellouse, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101(34): 12467-12472 (2004)；及Lee等人，J. Immunol. Methods 284(1-2): 119-132(2004))；及在動物中產生具有部分或全部編碼人類免疫球蛋白序列之人類免疫球蛋白部位或基因之人類抗體或類人類抗體的技術(參見(例如)WO 98/24893；WO 96/34096；WO 96/33735；WO 91/10741；Jakobovits等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 2551 (1993)；Jakobovits等人，Nature 362: 255-258 (1993)；Bruggemann等人，Year in Immunol. 7:33 (1993)；美國專利第5,545,807號；第5,545,806號；第5,569,825號；第5,625,126號；第5,633,425號；第5,661,016號；Marks等

人，Bio. Technology 10: 779-783 (1992)；Lonberg等人，Nature 368: 856-859 (1994)；Morrison, Nature 368: 812-813 (1994)；Fishwild等人，Nature Biotechnol. 14: 845-851 (1996)；Neuberger, Nature Biotechnol. 14: 826 (1996)及Lonberg及Huszar, Intern. Rev. Immunol. 13: 65-93 (1995))。

本文中之單株抗體特定包括"嵌合"抗體，其中一部分重鏈及/或輕鏈與來源於特定物種或屬於特定抗體種類或亞類之抗體中的相應序列相同或同源，而該(該等)鏈之其餘部分與來源於另一物種或屬於另一抗體種類或亞類之抗體中的相應序列相同或同源；以及該等抗體之片段，只要其展現所需生物學活性即可(美國專利第4,816,567號；及Morrison等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855 (1984))。

"人類化"形式之非人類(例如鼠)抗體為含有來源於非人類免疫球蛋白之最小序列的嵌合抗體。在一實施例中，人類化抗體為人類免疫球蛋白(受體抗體)，其中來自受體高變區之殘基經具有所需特異性、親和性及/或能力之來自非人類物種(供體抗體)(諸如小鼠、大鼠、兔或非人類靈長類動物)之高變區的殘基置換。在某些情況下，人類免疫球蛋白之框架區(FR)殘基經相應非人類殘基置換。此外，人類化抗體可包含未見於受體抗體或供體抗體中之殘基。可進行該等修飾以進一步改進抗體效能。一般而言，人類化抗體應包含至少一個且通常兩個可變域之大體上所有序

列，其中所有或大體上所有高變環與非人類免疫球蛋白之彼等相對應，且所有或大體上所有FR為人類免疫球蛋白序列之彼等序列。人類化抗體視情況亦應包含至少一部分免疫球蛋白恆定區(Fc)，其通常為人類免疫球蛋白之恆定區。其他細節參見 Jones 等人，Nature 321:522-525 (1986)；Riechmann 等人，Nature 332:323-329 (1988)；及 Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992)。亦參見以下概述文章及其中引用之文獻：Vaswani及Hamilton, Ann. Allergy, Asthma & Immunol. 1:105-115 (1998)；Harris, Biochem. Soc. Transactions 23:1035-1038 (1995)；Hurle及Gross, Curr. Op. Biotech. 5:428-433 (1994)。

"人類抗體"為具有與由人類產生及/或已使用如本文中所揭示之用於製造人類抗體之任何技術製得的抗體之胺基酸序列相應之胺基酸序列的抗體。此關於人類抗體之定義特定排除包含非人類抗原結合殘基之人類化抗體。

術語"高變區"、"HVR"或"HV"在本文中使用時係指序列高變且/或形成結構上界定之環的抗體可變域之區域。一般而言，抗體包含六個高變區；三個在VH(H1、H2、H3)中，且三個在VL(L1、L2、L3)中。在天然抗體中，H3及L3顯示六個高變區之最大差異，且尤其咸信H3在賦予抗體優良特異性中起獨特作用。Xu等人.(2000) Immunity 13:37-45；Johnson及Wu (2003)在Methods in Molecular Biology 248:1-25(Lo編，Human Press, Totowa, NJ)中。實際上，僅由重鏈組成之天然存在駱駝種系抗體在不存在輕

鏈之情況下為官能性且穩定的。Hamers-Casterman等人。(1993) Nature 363:446-448；Sheriff等人。(1996) Nature Struct. Biol. 3:733-736。

本文中使用的且涵蓋許多關於高變區之描繪。Kabat互補判定區(CDR)係基於序列變異性且最常使用(Kabat等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991))。而Chothia指出結構環之位置(Chothia及Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987))。AbM高變區表示Kabat CDR與Chothia結構環之間的折衷, 且由Oxford Molecular之AbM抗體模型化軟體使用。"接觸"高變區係基於對可用複合晶體結構之分析。來自該等高變區中之每一者之殘基如下所示。

Loop	Kabat	AbM	Chothia	Contact
----	-----	---	-----	-----
L1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55
L3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B
(Kabat編號)				
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35
(Chothia編號)				
H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

高變區可包含"延伸之高變區"，如下：VL中之24-36或24-34(L1)、46-56或50-56(L2)及89-97或89-96(L3)及VH中之26-35(H1)、50-65或49-65(H2)及93-102、94-102或95-102(H3)。可變域殘基係根據Kabat等人(同上文)關於該等定義中之每一者編號。本發明之抗CD22 10F4抗體之HVR-H1及HVR-H2高變區為使用Kabat編號之H26-H35及H49-H65。

"框架"或"FR"殘基為除如本文中所定義之高變區殘基之外的彼等可變域殘基。

術語"如Kabat中之可變域殘基編號"或"如Kabat中之胺基酸位置編號"及其變化形式係指用於Kabat等人，Sequences of Proteins of Immunological Interest，第5版，Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)中編譯抗體之重鏈可變域或輕鏈可變域的編號系統。使用此編號系統，實際線性胺基酸序列可含有與可變域之FR或HVR的縮短或插入其中相對應之較少或額外胺基酸。舉例而言，重鏈可變域可在H2之殘基52後包括單一胺基酸插入(根據Kabat之殘基52a)且在重鏈FR殘基82後插入殘基(例如根據Kabat之殘基82a、82b及82c等)。對於給定抗體，殘基之Kabat編號可藉由將抗體序列之同源性區域與"標準"Kabat編號序列比對來確定。

"自由半胱胺酸胺基酸"係指經改造進入親本抗體中之半胱胺酸胺基酸殘基具有硫醇官能基(-SH)，且未經配對(或相反)為分子內或分子間二硫橋鍵之部分。

術語"硫醇反應性值"為自由半胱胺酸胺基酸之反應性之定量表徵。硫醇反應性值為經半胱胺酸改造之抗體中與硫醇反應性試劑反應且轉變為1之最大值之自由半胱胺酸胺基酸的百分比。舉例而言，經半胱胺酸改造之抗體上之自由半胱胺酸胺基酸以100%產率與硫醇反應性試劑(諸如生物素-順丁烯二醯亞胺試劑)反應以形成經生物素標記之抗體，其具有1.0之硫醇反應性值。經改造進入相同或不同親本抗體中之另一半胱胺酸胺基酸以80%產率與硫醇反應性試劑反應，其具有0.8之硫醇反應性值。經改造進入相同或不同親本抗體中之另一半胱胺酸胺基酸完全不能與硫醇反應性試劑反應，其具有0之硫醇反應性值。特定半胱胺酸之硫醇反應性值之測定可藉由ELISA檢定、質譜、液相層析、自動放射照相術或其他定量分析測試進行。容許捕捉經半胱胺酸改造之抗體並比較且定量半胱胺酸反應性的硫醇反應性試劑包括生物素-PEO-順丁烯二醯亞胺((+)-生物素基-3-順丁烯二醯亞胺基丙醯胺基-3,6-二氧雜辛二胺，Oda等人(2001) Nature Biotechnology 19:379-382, Pierce Biotechnology, Inc.)、生物素-BMCC、PEO-碘乙醯基生物素、碘乙醯基-LC-生物素及生物素-HPDP(Pierce Biotechnology, Inc.)，及N α -(3-順丁烯二醯亞胺基丙醯基)生物胞素(MPB, Molecular Probes, Eugene, OR)。經結合生物素、雙官能及多官能連接子試劑之其他商業來源包括Molecular Probes, Eugene, OR及Sigma, St. Louis, MO。

"親本抗體"為包含一或多個胺基酸殘基經一或多個半胱

胺酸殘基置換之胺基酸序列的抗體。該親本抗體可包含天然或野生型序列。相對於抗體之其他天然、野生型或經修飾形式，親本抗體可具有預先存在之胺基酸序列修飾(諸如添加、缺失及/或取代)。親本抗體可針對所關注之靶向抗原，例如生物學上重要之多肽。亦涵蓋針對非多肽抗原之抗體(諸如與腫瘤相關之糖脂抗原；參見US 5091178)。

以下縮寫在本文中使用的且具有指示之定義：BME為β-巰基乙醇，Boc為N-(第三丁氧羰基)，cit為瓜胺酸(2-胺基-5-脲基戊酸)，dap為多拉普因(dolaproine)，DCC為1,3-二環己基碳化二醯亞胺，DCM為二氯甲烷，DEA為二乙胺，DEAD為偶氮二甲酸二乙酯，DEPC為磷醯基氯酸二乙酯，DIAD為偶氮二甲酸二異丙酯，DIEA為N,N-二異丙基乙胺，dil為多拉異白胺酸(dolaisoleucine)，DMA為二甲基乙醯胺，DMAP為4-二甲基胺基吡啶，DME為乙二醇二甲醚(或1,2-二甲氧基乙烷)，DMF為N,N-二甲基甲醯胺，DMSO為二甲亞砜，doe為dolaphenine(α-(噻唑基)苯乙基胺基)，dov為N,N-二甲基纈胺酸，DTNB為5,5'-二硫基雙(2-硝基苯甲酸)，DTPA為二伸乙基三胺五乙酸，DTT為二硫蘇糖醇，EDCI為1-(3-二甲基胺基丙基)-3-乙基碳化二醯亞胺鹽酸鹽，EEDQ為2-乙氧基-1-乙氧基羰基-1,2-二氫喹啉，ES-MS為電噴質譜分析，EtOAc為乙酸乙酯，Fmoc為N-(9-芴基甲氧基羰基)，gly為甘胺酸，HATU為六氟磷酸O-(7-氮雜苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲錄，HOBt為1-羥基苯并三唑，HPLC為高壓液相層析，ile為異白胺酸，lys為離胺

酸，MeCN(CH₃CN)為乙腈，MeOH為甲醇，Mtr為4-大茴香基二苯基甲基(或4-甲氧基三苯基甲基)，nor為(1S,2R)-(+)-去甲麻黃鹼，PAB為對胺基苄基胺甲鹽基，PBS為磷酸鹽緩衝之鹽水(pH 7)，PEG為聚乙二醇，Ph為苯基，Pnp為對硝基苯基，MC為6-順丁烯二鹽亞胺基己鹽基，phe為L-苯丙胺酸，PyBrop為溴基參吡咯啉基磷六氟磷酸鹽，SEC為尺寸排阻層析，Su為琥珀鹽亞胺，TFA為三氟乙酸，TLC為薄層層析，UV為紫外線，且val為纈胺酸。

"親和力成熟"之抗體為在其一或多個HVR中具有一或多種變化之抗體，與不具有彼等變化之親本抗體相比，該等變化使得抗體對抗原之親和性得以改良。在一實施例中，親和力成熟抗體對靶向抗原具有奈莫耳或甚至皮莫耳(picomolar)之親和力。親和力成熟抗體係藉由此項技術中已知之程序產生。Marks等人，Bio/Technology 10:779-783 (1992)描述由VH及VL域改組引起之親和力成熟。HVR及/或框架殘基之隨機突變係由以下文獻描述：Barbas等人，Proc Nat. Acad. Sci. USA 91:3809-3813 (1994)；Schier等人，Gene 169:147-155 (1995)；Yelton等人，J. Immunol. 155:1994-2004 (1995)；Jackson等人，J. Immunol. 154(7):3310-9 (1995)；及Hawkins等人，J. Mol. Biol. 226:889-896 (1992)。

"阻斷"抗體或"拮抗劑"抗體為抑制或降低其所結合之抗原之生物活性的抗體。某些阻斷抗體或拮抗劑抗體大體上或完全抑制抗原之生物活性。

如本文中所使用，"促效劑"抗體為模擬所關注多肽之至少一種功能活性的抗體。

抗體"效應功能"係指可歸因於抗體之Fc區(天然序列Fc區或胺基酸序列變異Fc區)之彼等生物活性，且其隨抗體同型而改變。抗體效應功能之實例包括：C1q結合及補體依賴性細胞毒性；Fc受體結合；抗體依賴性細胞介導之細胞毒性(ADCC)；吞噬作用；細胞表面受體(例如B細胞受體)之下調；及B細胞活化。

"Fc受體"或"FcR"描述與抗體之Fc區結合的受體。在一些實施例中，FcR為天然人類FcR。在一些實施例中，FcR為結合IgG抗體(γ 受體)者且包括Fc γ RI、Fc γ RII及Fc γ RIII亞類之受體，其包括對偶基因變異體及或者彼等受體之剪接形式。Fc γ RII受體包括Fc γ RIIA("活化受體")及Fc γ RIIB("抑制受體")，其具有不同之處主要在於其細胞質域的類似胺基酸序列。活化受體Fc γ RIIA在其細胞質域中含有基於免疫受體酪胺酸之活化基元(ITAM)。抑制受體Fc γ RIIB在其細胞質域中含有基於免疫受體酪胺酸之抑制基元(ITIM)。(參見Daëron, Annu. Rev. Immunol. 15:203-234 (1997))。FcR概述於Ravetch及Kinet, Annu. Rev. Immunol 9:457-92 (1991)；Capel等人，Immunomethods 4:25-34 (1994)；及de Haas等人，J. Lab. Clin. Med. 126:330-41 (1995)中。在本文中術語"FcR"涵蓋包括彼等欲在未來識別者之其他FcR。

術語"Fc受體"或"FcR"亦包括新生兒受體FcRn，其負責

將親本IgG轉移至胎兒(Guyer等人, J. Immunol. 117:587 (1976)及Kim等人, J. Immunol. 24:249 (1994))且調節免疫球蛋白之恆定性。量測與FcRn結合之方法為已知的(參見(例如)Ghetie 1997, Hinton 2004)。可於(例如)表現人類FcRn之轉殖基因小鼠或經轉染人類細胞株或投予Fc變異體多肽之靈長類動物中檢定人類FcRn高親和力結合多肽在活體內之人類FcRn結合及血清半衰期。

WO 00/42072(Presta)描述與FcR具有改良或減小之結合的抗體變異體。彼專利公開案之內容係特定地以引用的方式併入本文中。亦參見Shields等人, J. Biol. Chem. 9(2): 6591-6604 (2001)。

"人類效應細胞"為表現一或多種FcR且執行效應功能之白血球。在某些實施例中, 該等細胞表現至少FcγRIII且執行ADCC效應功能。介導ADCC之人類白血球之實例包括周邊血液單核細胞(PBMC)、自然殺手(NK)細胞、單核細胞、細胞毒性T細胞及嗜中性白血球。該等效應細胞可自天然來源(例如, 血液)分離。

"抗體依賴性細胞介導細胞毒性"或"ADCC"係指其中經分泌Ig結合至存在於某些細胞毒性細胞(例如自然殺手(NK)細胞、嗜中性白血球及巨噬細胞)上之Fc受體(FcR)上使得該等細胞毒性效應細胞與攜帶抗原之靶向細胞特異性結合且隨後以細胞毒素殺死靶向細胞的細胞毒性形式。介導ADCC、NK細胞之初級細胞僅表現FcγRIII, 然而單核細胞表現FcγRI、FcγRII及FcγRIII。關於造血細胞之FcR表現

概述於 Ravetch 及 Kinet, Annu. Rev. Immunol 9:457-92 (1991)第464頁表3中。為評估所關注分子之ADCC活性，可進行諸如美國專利第5,500,362號或第5,821,337號或 Presta美國專利第6,737,056號中所述之活體外ADCC檢定。用於該等檢定之有用效應細胞包括周邊血液單核細胞(PBMC)及自然殺手(NK)細胞。另外或其他，諸如 Clynes 等人，PNAS (USA) 95:652-656 (1998)中所揭示，可在活體內(例如，在一動物模型中)評估所關注分子之ADCC活性。

"補體依賴性細胞毒性"或"CDC"係指靶向細胞在補體存在下之溶解。經典補體路徑之活化係藉由將補體系統之第一組份(C1q)結合至與其同源抗原結合之抗體(適當亞類之抗體)而啟始。為評定補體活化，可例如按照 Gazzano-Santoro 等人，J. Immunol. Methods 202:163 (1996)中所述進行CDC檢定。

具有改變之Fc區胺基酸序列及增加或降低之C1q結合能力的多肽變異體描述於美國專利第6,194,551 B1號及WO 99/51642中。彼等專利公開案之內容係特定地以引用的方式併入本文中。亦參見 Idusogie 等人，J. Immunol. 164: 4178-4184 (2000)。

術語"包含Fc區之多肽"係指包含Fc區之多肽，諸如抗體或免疫黏附素。可(例如)在多肽純化期間或藉由重組設計編碼多肽之核酸來移除Fc區之C末端離胺酸(根據EU編號系統之殘基447)。因此，包含根據本發明之具有Fc區之多

肽的組合物可包含具有K447之多肽，其中所有K447經移除之多肽，或具有K447殘基之多肽與不具有K447殘基之多肽的混合物。

用於本文中之"受體人類框架"為包含來源於人類免疫球蛋白框架或人類一致框架之VL或VH框架之胺基酸序列的框架。"來源於"人類免疫球蛋白框架或人類一致框架之受體人類框架可包含其相同的胺基酸序列，或其可含有預先存在之胺基酸序列變化。在一些實施例中，預先存在之胺基酸變化的數目為10或更小，9或更小，8或更小，7或更小，6或更小，5或更小，4或更小，3或更小，或2或更小。若預先存在之胺基酸變化存在於VH中，則彼等變化較佳僅發生在71H、73H及78H之三個、兩個或一個位置處；舉例而言，在彼等位置處之胺基酸殘基可為71A、73T及/或78A。在一實施例中，VL受體人類框架與VL人類免疫球蛋白框架序列或人類一致框架序列之序列相同。

"人類一致框架"為在人類免疫球蛋白VL或VH框架序列之選擇中表示最普遍存在之胺基酸殘基的框架。一般而言，人類免疫球蛋白VL或VH序列係選自可變域序列之亞群。一般而言，序列之亞群為如Kabat等人，Sequences of Proteins of Immunological Interest，第5版，Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)中之亞群。在一實施例中，VL之亞群為如Kabat等人前述之亞群κ I。在一實施例中，VH之亞群為如Kabat等人前述之亞群III。

"VH亞群III一致框架"包含獲自Kabat等人前述之可變域重鏈亞群III之胺基酸序列的一致序列。在一實施例中，該VH亞群III一致框架胺基酸序列包含以下序列之每一者之至少一部分或全部：

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (FR-H1, SEQ ID NO:1)-HVR-H1-WVRQAPGKGLEWV (FR-H2, SEQ ID NO:3)-HVR-H2-RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC (FR-H3, SEQ ID NO:5)-HVR-H3-WGQGTLVTVSS (FR-H4, SEQ ID NO:7)。

"VL亞群I一致框架"包含獲自Kabat等人前述之可變域輕鏈κ亞群I之胺基酸序列的一致序列。在一實施例中，該VH亞群I一致框架胺基酸序列包含以下序列之每一者之至少一部分或全部：

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (FR-L1, SEQ ID NO:8)-HVR-L1-WYQQKPGKAPKLLIY (FR-L2, SEQ ID NO:11)-HVR-L2-GVPSRFGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC (FR-L3, SEQ ID NO:13)-HVR-L3-FGQGTKVEIK (FR-L4, SEQ ID NO:15)。

"分泌信號序列"或"信號序列"係指可用於指導所關注之新近合成蛋白質穿過細胞膜(通常為原核生物之內膜或內膜與外膜兩者)之編碼短信號肽的核酸序列。因而，所關注之蛋白質(諸如免疫球蛋白)輕鏈或重鏈多肽經分泌入原核宿主細胞之周質中或培養基中。由分泌信號序列編碼之信號肽可與宿主細胞為內源性的，或其可為外源性的，其

包括待表現之多肽原生之信號肽。分泌信號序列通常存在於待表現之多肽的胺基末端處，且通常自細胞質在多肽之生物合成與分泌期間酶性移除。因此，信號肽通常不存在於成熟蛋白產物中。

"結合親和力"通常係指分子(例如抗體)之單一結合位點與其結合搭配物(例如抗原)之間之非共價相互作用的總和強度。除非另外指示，否則如本文所使用之"結合親和力"係指反映結合對(例如，抗體與抗原)成員之間之1:1相互作用的內在結合親和力。分子X與其搭配物Y之親和力通常可由解離常數(Kd)表示。親和力可由此項技術中已知之常用方法(包括本文中所述之彼等方法)來量測。低親和力抗體通常與抗原緩慢結合且傾向於快速解離，而高親和力抗體通常與抗原結合較快且傾向於保持較長之結合。此項技術中已知量測結合親和力之多種方法，該等方法中之任一者均可用於本發明之目的。下文描述特定說明性實施例。

在一實施例中，藉由如以下檢定所述之用所關注抗體及其抗原之Fab形式進行之放射性標記抗原結合檢定(RIA)來量測根據本發明之"Kd"或"Kd值"。在存在連續滴定未經標記之抗原的情況下，使Fab與最小濃度的經(^{125}I)標記之抗原平衡，隨後以經抗Fab抗體塗覆的培養盤捕捉結合之抗原，藉此來量測Fab對抗原之溶液結合親和力(Chen等人(1999) J. Mol Biol 293:865-881)。為確立檢定條件，以於50 mM碳酸鈉(pH 9.6)中之5 $\mu\text{g/ml}$ 捕捉抗Fab抗體(Cappel Labs)塗覆微量滴定盤(Dynex)隔夜，且隨後在室溫(約

23°C)下用於PBS中之2%(w/v)牛血清白蛋白阻斷2至5小時。在無吸附劑之滴定盤(Nunc #269620)中，使100 pM或26 pM [^{125} I]抗原與連續稀釋之所關注Fab混合(例如，與Presta等人(1997) Cancer Res. 57:4593-4599中之抗VEGF抗體Fab-12之評定相符)。隨後將所關注之Fab培養隔夜；然而，培養可持續一段較長時期(例如約65小時)以確保達到平衡。此後，在室溫下將混合物轉移至捕捉培養盤(capture plate)中進行培養(例如，歷經1小時)。隨後移除溶液且以於PBS中之0.1% Tween-20洗滌該培養盤8次。當盤乾燥後，每孔添加150 μ l閃爍體(MicroScint-20; Packard)，且將盤於一Topcount γ 計數器(Packard)上計數10分鐘。選擇提供小於或等於20%最大結合之濃度的各Fab以用於競爭性結合檢定。

根據另一實施例，藉由在25°C下使用一BIAcoreTM-2000或一BIAcoreTM-3000(BIAcore, Inc., Piscataway, NJ)且使用表面電漿共振檢定以~10個反應單元(RU)之固定抗原CM5晶片來量測Kd或Kd值。簡言之，根據供應商之說明書以N-乙基-N'-(3-二甲基氨基丙基)-碳化二醯亞胺鹽酸鹽(EDC)及N-羥基琥珀醯亞胺(NHS)活化羧甲基化葡聚糖生物感應器晶片(CM5, BIAcore Inc.)。用10 mM乙酸鈉(pH 4.8)將抗原稀釋至5 μ g/ml(~0.2 μ M)，接著以每分鐘5 μ l之流動速率進行注射以達成約10個反應單元(RU)之偶合蛋白。在注射抗原後，注射1 M乙醇胺以阻斷未反應之基團。對於動力學量測而言，在25°C下以每分鐘約25 μ l之流

動速率將兩倍連續稀釋之Fab(0.78 nM至500 nM)注射於具有0.05% Tween 20(PBST)之PBS中。使用一簡單一對一朗繆耳結合模型(Langmuir binding model)(BIAcore評價軟體3.2版)藉由同時擬合締合及解離感應圖來計算締合速率(k_{on})及解離速率(k_{off})。以比率 k_{off}/k_{on} 來計算平衡解離常數(K_d)。參見(例如)Chen, Y.等人(1999) J. Mol. Biol. 293:865-881。若根據上述表面電漿共振檢定締合速率大於 $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ，則可在如由一光譜儀(諸如一裝備有流動塞之分光光度計(Aviv Instruments)或一具有經攪拌比色管之8000系列SLM-Aminco光譜光度計(ThermoSpectronic))量測之增大濃度的抗原存在下，藉由使用量測螢光發射強度之增加或降低的螢光猝滅技術(激發=295 nm；發射=340 nm，16 nm帶通)於25°C下測定於PBS中之20 nM抗抗原抗體(Fab形式)(pH 7.2)的締合速率。

根據本發明之"締合速率"或" k_{on} "亦可如上所述使用一BIAcoreTM-2000或一BIAcoreTM-3000系統(BIAcore, Inc., Piscataway, NJ)來測定。

"病症"為會受益於以本發明之物質/分子或方法治療之任何病狀或疾病。此包括慢性及急性病症，其包括使哺乳動物具有罹患所論述之病症之傾向的彼等病理病狀。本文中待治療之病症之非限制性實例包括癌症，諸如B細胞增生性病症及/或B細胞腫瘤，例如，淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)、侵襲性NHL、復發性侵襲性NHL、復發性無痛性NHL、難治性NHL、難治性無痛性NHL、慢性淋巴球性

白血病(CLL)、小淋巴球性淋巴瘤、白血病、毛細胞白血病(HCL)、急性淋巴球性白血病(ALL)及套細胞淋巴瘤。

術語"細胞增生性病變"及"增生性病變"係指與某種程度之異常細胞增殖相關之病變。在一實施例中，細胞增生性病變為癌症。

如本文中所使用之"腫瘤"係指所有贅生性細胞生長及增殖(無論惡性或良性)，及所有癌前及癌細胞及組織。如本文中所提及之術語"癌症"、"癌的"、"細胞增生性病變"、"增生性病變"及"腫瘤"並不相互排除。

術語"癌症"及"癌的"係指或描述哺乳動物之生理學病狀，其特徵通常在於不受調節之細胞生長/增殖。癌症之實例包括(但不限於)癌性B細胞增生性病變，B細胞增生性病變係選自淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)、侵襲性NHL、復發性侵襲性NHL、復發性無痛性NHL、難治性NHL、難治性無痛性NHL、慢性淋巴球性白血病(CLL)、小淋巴球性淋巴瘤、白血病、毛細胞白血病(HCL)、急性淋巴球性白血病(ALL)及套細胞淋巴瘤。其他癌症病狀包括(例如)癌瘤、淋巴瘤(例如，霍奇金氏淋巴瘤及非霍奇金氏淋巴瘤)、母細胞瘤、肉瘤及白血病。該等癌症之更特定實例包括鱗狀細胞癌(squamous cell cancer)、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺腺癌、肺鱗狀癌、腹膜癌、肝細胞癌、胃腸道癌、胰腺癌、神經膠母細胞瘤、宮頸癌、卵巢癌、肝癌(liver cancer)、膀胱癌、肝細胞瘤、乳癌、結腸癌、結腸直腸癌、子宮內膜或子宮癌、涎腺癌、腎癌、肝

癌 (liver cancer)、前列腺癌、外陰癌、甲狀腺癌、肝癌 (hepatic carcinoma)、白血病患者及其他淋巴增生性病變，及各種類型之頭頸癌。

本文中"B細胞惡性疾病"包括非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)，其包括低度惡性/濾泡性NHL、小淋巴球性(SL)NHL、中度惡性/濾泡性NHL、中度惡性彌漫性NHL、高度惡性免疫母細胞NHL、高度惡性淋巴母細胞NHL、高度惡性小無裂細胞NHL、腫塊性病變NHL、套細胞淋巴瘤、與AIDS相關之淋巴瘤，及瓦爾登斯特倫巨球蛋白血症(Waldenstrom's Macroglobulinemia)、非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)、淋巴細胞為主型霍奇金氏病(LPHD)、小淋巴球性淋巴瘤(SLL)、慢性淋巴球性白血病(CLL)、無痛性NHL(其包括復發性無痛性NHL及利妥昔單抗難治性無痛性NHL)；白血病患者，其包括急性淋巴母細胞白血病(ALL)、慢性淋巴球性白血病(CLL)、毛細胞白血病、慢性骨髓母細胞白血病；套細胞淋巴瘤；及其他血液科惡性疾病。該等惡性疾病可經針對B細胞表面標記(諸如CD22)之抗體來治療。本文中涵蓋藉由投予針對B細胞表面標記(諸如CD22)之抗體且包括投予未接合("裸")抗體或與如本文中所揭示之細胞毒性劑接合之抗體來治療的該等疾病。本文中亦涵蓋藉由組合療法來治療之該等疾病，該組合療法包括同時或連續投予與另一抗體或抗體藥物接合物、另一細胞毒性劑、輻射或其他治療組合之本發明之抗CD22抗體或抗CD22抗體藥物接合物。在本發明之例示性治療方法中，本發明之抗CD22抗

體係與抗CD20抗體、免疫球蛋白或其CD20結合片段組合一起或依序投予。抗CD20抗體可為裸抗體或抗體藥物接合物。在一組合療法之實施例中，抗CD22抗體為本發明之抗體且該抗CD20抗體為Rituxan®(利妥昔單抗)。

如本文中所使用，術語"非霍奇金氏淋巴瘤"或"NHL"係指除霍奇金氏淋巴瘤之外的淋巴系統癌症。通常可藉由在霍奇金氏淋巴瘤中存在Reed-Sternberg細胞且在非霍奇金氏淋巴瘤中不存在該等細胞來區分霍奇金氏淋巴瘤與非霍奇金氏淋巴瘤。本文中所使用之術語涵蓋之非霍奇金氏淋巴瘤的實例包括熟習此項技術者(例如，腫瘤學家或病理學家)根據此項技術中已知之分類流程會鑑別為此之任何非霍奇金氏淋巴瘤，該分類流程諸如 Color Atlas of Clinical Hematology(第3版)，A. Victor Hoffbrand及John E. Pettit(編)(Harcourt Publishers Ltd., 2000)中所述之修訂歐美淋巴瘤(REAL)流程。尤其參見圖11.57、11.58及11.59中之清單。更特定實例包括(但不限於)復發性或難治性NHL、前線低度惡性NHL、III/IV階段NHL、抗化學療法NHL、前驅B淋巴母細胞白血病及/或淋巴瘤、小淋巴球性淋巴瘤、B細胞慢性淋巴球性白血病及/或前淋巴球性白血病及/或小淋巴球性淋巴瘤、B細胞前淋巴球性淋巴瘤、免疫細胞瘤及/或淋巴漿細胞淋巴瘤、淋巴漿細胞淋巴瘤、邊緣區B細胞淋巴瘤、脾邊緣區淋巴瘤、結外邊緣區-MALT淋巴瘤、結邊緣區淋巴瘤、毛細胞白血病、血漿細胞瘤及/或漿細胞骨髓瘤、低度惡性/濾泡性淋巴瘤、中度

惡性/濾泡性NHL、套細胞淋巴瘤、濾泡中心淋巴瘤(濾泡性)、中度惡性彌漫性NHL、彌漫性大B細胞淋巴瘤、侵襲性NHL(其包括侵襲性前線NHL及侵襲性復發性NHL)、復發後或自體幹細胞移植難治癒之NHL、原發性縱隔大B細胞淋巴瘤、原發性滲出性淋巴瘤、高度惡性免疫母細胞NHL、高度惡性淋巴母細胞NHL、高度惡性小無裂細胞NHL、腫塊性病變NHL、伯基特淋巴瘤(Burkitt's lymphoma)、前驅(周邊)大顆粒淋巴球性白血病、蕁樣真菌病及/或Sezary症候群、皮膚(skin)(皮膚(cutaneous))淋巴瘤、多形性大細胞淋巴瘤、血管中心型淋巴瘤。

本文中之"自體免疫疾病"為由個體自身組織或器官產生且針對之疾病或病症，或其共分離系(co-segregate)或症狀或由其產生之病狀。在許多該等自體免疫及發炎性病症中，可存在許多臨床及實驗室標記，包括(但不限於)高加馬球蛋白血症、高含量自體抗體、抗原-抗體複合物於組織中沈積、受益於皮質類固醇或免疫抑制治療，且淋巴細胞於受影響之組織中聚集。並非對關於B細胞介導之自體免疫疾病之任一理論的限制，咸信B細胞經由大量機械路徑在人類自體免疫疾病中展示致病效應，該等機械路徑包括自體抗體產生、免疫複合物形成、樹枝狀及T-細胞活化、細胞激素合成、直接趨化因子釋放，且為異位新淋巴生成提供場所。在自體免疫疾病之病理學中，該等路徑之每一者可在不同程度上參與。

"自體免疫疾病"可為器官特異性疾病(亦即，免疫反應特

異性針對器官系統，諸如內分泌系統、造血系統、皮膚、心肺系統、胃腸及肝系統、腎系統、甲狀腺、耳、神經肌肉系統、中樞神經系統等)或可影響多個器官系統之全身性疾病(例如，全身性紅斑狼瘡(SLE)、類風濕性關節炎、多肌炎等)。較佳該等疾病包括自體免疫風濕病症(諸如，類風濕性關節炎、Sjögren症候群、硬皮病、狼瘡(諸如SLE及狼瘡腎炎)、多肌炎/皮肌炎、冷球蛋白血症、抗磷脂抗體症候群及牛皮癬性關節炎)、自體免疫胃腸及肝病(諸如，發炎性腸道疾病(例如，潰瘍性結腸炎及克隆氏病(Crohn's disease))、自體免疫胃炎及惡性貧血、自體免疫肝炎、原發性膽汁性肝硬化、原發性硬化性膽管炎及乳糜瀉)、血管炎(諸如，ANCA陰性血管炎及ANCA相關性血管炎，其包括徹奇-斯全司血管炎(Churg-Strauss vasculitis)、韋格納肉芽腫病(Wegener's granulomatosis)及顯微鏡下多血管炎)、自體免疫神經病症(諸如，多發性硬化症、眼陣攣-肌陣攣症候群、重症肌無力、視神經脊髓炎、帕金森氏病(Parkinson's disease)、阿茲海默氏病(Alzheimer's disease)及自體免疫多發性神經病)、腎病(諸如，絲球體腎炎、古柏氏症候群(Goodpasture's syndrome)及伯格病(Berger's disease))、自體免疫皮膚病症(諸如，牛皮癬、風疹、蕁麻疹、尋常天疱瘡、大皰性類天疱瘡及皮膚紅斑狼瘡)、血液科病症(諸如，血小板減少性紫癜、血栓性血小板減少性紫癜、輸血後紫癜及自體免疫溶血性貧血)、動脈粥樣硬化、葡萄膜炎、自體免疫聽力疾病(諸

如，內耳疾病及聽力損傷)、白塞氏病(Behcet's disease)、雷諾氏症候群(Raynaud's syndrome)、器官移植及自體免疫內分泌失調症(諸如，與糖尿病相關之自體免疫疾病，諸如胰島素依賴性糖尿病(IDDM)、艾迪森氏病(Addison's disease)及自體免疫甲狀腺病(例如，葛瑞夫茲氏病(Graves' disease)及甲狀腺炎))。更佳該等疾病包括(例如)類風濕性關節炎、潰瘍性結腸炎、ANCA相關之血管炎、狼瘡、多發性硬化症、Sjögren症候群、葛瑞夫茲氏病、IDDM、惡性貧血、甲狀腺炎及絲球體腎炎。

如本文中所定義之其他自體免疫疾病之特定實例(其在某些情況下涵蓋以上列舉之彼等疾病)包括(但不限於)關節炎(急性及慢性類風濕性關節炎，其包括幼年發作類風濕性關節炎及其他階段，諸如類風濕性滑膜炎、痛風或痛風性關節炎、急性免疫關節炎、慢性發炎性關節炎、退化性關節炎、II型膠原誘發之關節炎、傳染性關節炎、萊姆關節炎(Lyme arthritis)、增生性關節炎、牛皮癬性關節炎、史提爾氏病(Still's disease)、脊椎關節炎、骨關節炎、慢性漸進性關節炎、畸形性關節炎、慢性原發性多發性關節炎、反應性關節炎、更年期關節炎、雌激素缺乏性關節炎及強直性脊椎炎/類風濕性脊椎炎)、自體免疫淋巴增生性疾病、發炎性過度增生性皮膚病、牛皮癬(諸如斑塊牛皮癬、點狀牛皮癬、膿皰型牛皮癬及指甲牛皮癬)、異位性皮膚炎(包括異位性疾病，諸如枯草熱及Job症候群)、皮炎(其包括接觸性皮炎、慢性接觸性皮炎、剝落性皮炎、過

敏性皮炎、過敏性接觸性皮炎、蕁麻疹、疱疹樣皮炎、錢幣狀皮炎、脂溢性皮炎、非特異性皮炎、原發性刺激性接觸性皮炎及異位性皮炎)、x性聯遺傳高IgM症候群、過敏性眼內發炎疾病、風疹(諸如慢性過敏性風疹及慢性特發性風疹,其包括慢性自體免疫性風疹)、肌炎、多肌炎/皮肌炎、幼年型皮肌炎、中毒性表皮壞死溶解、硬皮病(包括全身性硬皮病)、硬化症(諸如全身性硬化症、多發性硬化症(MS)(諸如脊髓-視力MS、原發性進行性MS(PPMS)及復發型多發性MS(RRMS))、進行性全身性硬化症、動脈粥样硬化、動脈硬化、播散型硬化症、共濟失調性硬化症)、視神經脊髓炎(NMO)、發炎性腸道疾病(IBD)(例如,克隆氏病、自體免疫介導之胃腸疾病、胃腸炎症、結腸炎(諸如潰瘍性結腸炎(ulcerative colitis)、潰瘍性結腸炎(colitis ulcerosa)、顯微鏡下結腸炎、膠原性結腸炎、疣狀結腸炎、壞死性小腸結腸炎及透壁性結腸炎),及自體免疫發炎性腸道疾病)、腸道炎症、壞疽性膿皮病、結節性紅斑、原發性硬化性膽管炎、呼吸窘迫症候群(包括成人或急性呼吸窘迫症候群(ARDS))、腦膜炎、葡萄膜全部或部分發炎、虹膜炎、脈絡膜炎、自體免疫性血液病、移植物抗宿主病、血管性水腫(諸如遺傳性血管性水腫)、腦神經損傷(如在腦膜炎中)、妊娠疱疹、妊娠類天疱瘡、陰囊搔癢症、自體免疫性卵巢早衰、歸因於自體免疫病狀之突發性耳聾、IgE介導之疾病(諸如過敏症及過敏性及異位性鼻炎)、腦炎(諸如拉茲穆森腦炎(Rasmussen's encephalitis))

及邊緣性及/或腦幹腦炎)、葡萄膜炎(諸如前葡萄膜炎、急性前葡萄膜炎、肉芽腫性葡萄膜炎、非肉芽腫性葡萄膜炎、晶狀體抗原性葡萄膜炎、後葡萄膜炎,或自體免疫性葡萄膜炎)、具有及不具有腎病症候群之絲球體腎炎(GN)(諸如慢性或急性絲球體腎炎,諸如原發性GN、免疫介導之GN、膜性GN(膜性腎病)、特發性膜性GN或特發性膜性腎病、膜狀或膜性增生性GN(MPGN),其包括I型及II型及迅速進行性GN(RPGN)、增生性腎炎)、自體免疫性多腺體內分泌衰竭、龜頭炎(包括漿細胞性局限性龜頭炎)、龜頭包皮皮炎、環形離心性紅斑、持久性色素障礙性紅斑、多形性紅斑、環狀肉芽腫、光澤苔癬、慢性萎縮性苔癬樣皮炎、慢性單純性苔癬、小棘苔蘚、扁平苔癬、板層狀魚鱗病、表皮松解性角化過度症、癌前角化病、壞疽性膿皮病、過敏性病狀及反應、食物過敏、藥物過敏、昆蟲過敏、罕見過敏性病症(諸如肥大細胞增多症、過敏性反應)、濕疹(包括過敏性或異位性濕疹、皮膚缺乏性濕疹、出汗障礙性濕疹及水泡性掌蹠濕疹)、哮喘(諸如支氣管哮喘(asthma bronchiale)、支氣管哮喘(bronchial asthma)及自體免疫性哮喘)、涉及T細胞滲透及慢性發炎性反應之病狀、抗外來抗原(諸如懷孕期間之胎兒A-B-O血液群)之免疫反應、慢性肺發炎疾病、自體免疫性心肌炎、白血球黏著不足、狼瘡(其包括狼瘡腎炎、狼瘡腦炎、嬰兒狼瘡、非腎狼瘡、腎外狼瘡、盤狀狼瘡及盤狀紅斑狼瘡、脫髮狼瘡、SLE(諸如皮膚SLE或亞急性皮膚SLE)、新生兒狼瘡症

候群(NLE)及播散性紅斑狼瘡)、幼年發作(I型)糖尿病(其包括嬰兒IDDM、成年發作糖尿病(II型糖尿病)、自體免疫性糖尿病、特發性尿崩症、糖尿病性視網膜病、糖尿病性腎病、糖尿病性結腸炎、糖尿病性大動脈病症、與藉由細胞激素及T-淋巴細胞介導之急性及遲發性過敏反應相關的免疫反應、結核病、肉狀瘤病、肉芽腫病(包括淋巴瘤樣肉芽腫病、粒性白血球缺乏症)、血管炎(包括大血管血管炎), 諸如風濕性多肌痛及巨細胞(高安氏(Takayasu's))動脈炎); 中血管血管炎, 諸如川崎病(Kawasaki's disease)及多發性結節性動脈炎/結節性動脈周圍炎、免疫血管炎、CNS血管炎、皮膚血管炎、過敏性血管炎、壞死性血管炎(諸如類纖維蛋白壞死性血管炎及全身性壞死性血管炎)、ANCA陰性血管炎, 及ANCA相關血管炎(諸如徹奇-斯全司症候群(Churg-Strauss syndrome)(CSS)、韋格納肉芽腫病及顯微鏡下多血管炎)、顱動脈炎、再生障礙性貧血、自體免疫性再生障礙性貧血、庫姆陽性貧血(Coombs positive anemia)、先天性純紅血球再生障礙性貧血、溶血性貧血或免疫性溶血性貧血(包括自體免疫性溶血性貧血)(AIHA)、惡性貧血(pernicious anemia)(惡性貧血(anemia perniciososa))、艾迪森氏病、純紅血球貧血或發育不全(PRCA)、因子VIII不足、A型血友病、自體免疫性嗜中性球減少症、血球減少症(諸如泛血球減少症、白血球減少症)、涉及白血球血球滲出之疾病、CNS發炎性病變、阿茲海默氏病、帕金森氏病、多器官損傷症候群(諸如敗

血症、外傷或出血之彼等繼發症)、抗原-抗體複合物介導之疾病、抗腎小球基底膜疾病、抗磷脂抗體症候群、運動神經炎、過敏性神經炎、貝西氏病/症候群(Behçet's disease/syndrome)、凱瑟曼症候群(Castleman's syndrome)、古柏氏症候群、雷諾氏症候群、Sjögren症候群、史蒂芬-瓊森症候群(Stevens-Johnson syndrome)、類天疱瘡或天疱瘡(諸如大皰性類天疱瘡、癰痕(黏膜))類天疱瘡、皮膚類天疱瘡、尋常天疱瘡、副腫瘤性天疱瘡、落葉性天疱瘡、天疱瘡黏膜類天疱瘡及紅斑性天疱瘡、後天性大皰性表皮松解、眼睛炎症(較佳過敏性眼睛炎症(諸如過敏性結膜炎))、線性IgA大皰性疾病、自體免疫誘發之結膜炎、自體免疫多內分泌病、萊特爾氏病(Reiter's disease)或症候群、歸因於自體免疫病狀之熱損傷、子癰前症、免疫複合物病症(諸如免疫複合物性腎炎)、抗體介導之腎炎、神經發炎性病症、多發性神經病、慢性神經病(諸如IgM多發性神經病或IgM介導之神經病)、血小板減少症(例如,如由心肌梗塞患者所發展)(包括血栓性血小板減少性紫癰(TTP)、輸血後紫癰(PTP)、肝素誘發之血小板減少症及自體免疫或免疫介導之血小板減少症,其包括(例如)特發性血小板減少性紫癰(ITP)(包括慢性或急性ITP))、鞏膜炎(諸如特發性角膜鞏膜炎、表層鞏膜炎)、睪丸及卵巢之自體免疫疾病(包括自體免疫性睪丸炎及卵巢炎)、原發性甲狀腺功能低下、副甲狀腺機能減退症、自體免疫內分泌疾病(包括甲狀腺炎(諸如自體免疫甲狀腺炎、橋本氏病

(Hashimoto's disease)、慢性甲狀腺炎(橋本氏甲狀腺炎(Hashimoto's thyroiditis))、或亞急性甲狀腺炎)、自體免疫性甲狀腺病、特發性甲狀腺功能低下、格雷氏病(Grave's disease)、格雷氏眼病(Grave's eye disease)(眼病或與甲狀腺相關之眼病)、多腺症候群(諸如自體免疫多腺症候群, 例如, I型(或多腺內分泌病症候群))、副腫瘤症候群(包括神經副腫瘤症候群, 諸如 Lambert Eaton 肌無力症候群或 Eaton-Lambert 症候群、僵體症候群(stiff man syndrome)或僵人症候群(stiff-person syndrome)、腦脊髓炎(諸如過敏性腦脊髓炎及實驗性過敏性腦脊髓炎(EAE)、重症肌無力(諸如胸腺瘤相關之重症肌無力、小腦退化、神經肌強直、眼陣攣或眼陣攣-肌陣攣症候群(OMS)及感官神經病)、多灶性運動神經病、席漢氏症候群(sheehan's syndrome))、自體免疫性肝炎、慢性肝炎、狼瘡樣肝炎、巨細胞肝炎、慢性活動型肝炎或自體免疫慢性活動型肝炎、肺炎(諸如淋巴間質性肺炎(LIP)、阻塞性細支氣管炎(非移植)對 NSIP)、古立安-白瑞症候群(Guillain Barré syndrome)、伯格病(IgA 腎病)、特發性 IgA 腎病、線性 IgA 皮膚病、急性發熱性嗜中性皮膚病、角質層下膿皰性皮膚病、暫時性棘層松解性皮膚病、肝硬化症(諸如原發性膽汁性肝硬化及肺硬化)、自體免疫性腸病症候群、乳糜瀉、口炎性腹瀉(麩質性腸病)、難治性口炎性腹瀉、特發性口炎性腹瀉、冷球蛋白血症(諸如混合型冷球蛋白血症)、肌肉萎縮性側索硬化(ALS; 盧伽雷病(Lou Gehrig's disease))、冠狀動脈病、自

體免疫耳病(諸如自體免疫內耳疾病(AIED)、自體免疫聽力損失)、多軟骨炎(諸如難治性或復發或復發性多軟骨炎)、肺泡蛋白沈積症、角膜炎(諸如Cogan氏症候群/非梅毒性間質性角膜炎)、貝爾氏麻痺(Bell's palsy)、Sweet病/症候群、自體免疫性紅斑痤瘡、帶狀疱疹相關之疼痛、澱粉樣變性病、非癌性淋巴球增多症、原發性淋巴球增多症(其包括單株B細胞淋巴球增多症(例如, 良性單株丙種球蛋白症及未確定意義之單株丙種球蛋白病, MGUS))、周圍神經病、副腫瘤症候群、離子通道病(諸如癲癇症、偏頭痛、心律不整、肌肉病症、耳聾、失明、週期性麻痺及CNS之離子通道病)、自閉症、發炎性肌病變、局部或區段性或局部區段性腎絲球硬化症(FSGS)、內分泌眼病、葡萄膜視網膜炎、脈絡膜視網膜炎、自體免疫性肝病、肌肉纖維疼痛、多發性內分泌衰竭、施密特症候群(Schmidt's syndrome)、腎上腺炎、胃萎縮、初老期癡呆、脫髓鞘疾病(諸如自體免疫性脫髓鞘疾病及慢性發炎性脫髓鞘多發性神經病)、心肌梗塞後症候群(Dressler's syndrome)、斑禿、頭髮全禿、CREST症候群(石灰沈著症、雷諾氏現象(Raynaud's phenomenon)、食道蠕動異常、肢端硬化及毛細管擴張症)、男性及女性自體免疫性不孕症(例如, 歸因於抗精子抗體)、混合結締組織病、南美錐蟲病(Chagas' disease)、風濕熱(rheumatic fever)、反覆流產、農民肺、多形性紅斑、心切開術後症候群、庫欣氏症候群(Cushing's syndrome)、飼鳥者肺、過敏性肉芽腫性脈管

炎、良性淋巴球性脈管炎、阿爾波特氏症候群(Alport's syndrome)、肺泡炎(諸如過敏性肺泡炎及纖維化肺泡炎)、間質性肺病、輸血反應、麻瘋、瘧疾、寄生性疾病(諸如利什曼病(leishmaniasis)、錐體蟲病(kypanosomiasis)、血吸蟲病、蛔蟲症)、麴菌病、Sampter症候群、類風濕塵肺症候群(Caplan's syndrome)、登革熱、心內膜炎、心內膜心肌纖維化、彌漫性間質性肺纖維化、間質性肺纖維化、纖維性縱隔炎、肺纖維化、特發性肺纖維化、囊腫性纖維化、眼內炎、持久性隆起性紅斑、胎兒紅血球母細胞增多症、嗜酸性筋膜炎、蘇爾曼症候群(Shulman's syndrome)、費爾蒂症候群(Felty's syndrome)、絲蟲病、睫狀體炎(諸如慢性睫狀體炎、異色性睫狀體炎、虹膜睫狀體炎(急性或慢性)或Fuch睫狀體炎)、亨諾-絲奇恩賴紫癍(Henoch-Schonlein purpura)、人類免疫缺乏病毒(HIV)感染、SCID、後天性免疫不全症候群(AIDS)、埃可病毒(echovirus)感染、膿毒病(全身性發炎性反應症候群(SIRS))、內毒素血症、胰腺炎、橋本病甲亢(thyrotoxicosis)、小病毒感染、風疹病毒感染、疫苗接種後症候群、先天性風疹感染、E-B病毒感染(Epstein-Barr virus infection)、腮腺炎、埃文症候群(Evan's syndrome)、自體免疫性腺衰竭、西德納姆氏舞蹈病(Sydenham's chorea)、鏈球菌感染後腎炎、血栓閉塞性脈管炎(thromboangitis obliterans)、甲狀腺毒症、脊髓癱、脈絡膜炎、巨細胞多肌痛、慢性過敏性肺炎、結膜炎(諸如春季

結膜炎、乾燥性角膜結膜炎及流行性角膜結膜炎)、特發性腎臟症候群、輕微病變性腎病、良性家族性及局部缺血-再灌注損傷、移植器官再灌注、視網膜自體免疫疾病、關節炎症、支氣管炎、慢性阻塞性氣管/肺病、矽肺病、口瘡、口瘡性口炎、動脈硬化性病變(腦血管機能不全)(諸如動脈硬化性腦病及動脈硬化性視網膜病)、不形成精子症(aspermiogenesis)、自體免疫性溶血、伯克氏病(Boeck's disease)、冷球蛋白血症、掌腱膜攣縮症、晶狀體過敏性眼內炎、過敏性腸炎、麻瘋結節性紅斑、特發性面神經麻痺、慢性疲勞症候群、風濕熱(febris rheumatica)、哈麗二氏病(Hamman-Rich's disease)、知覺神經聽力損失、突發性血紅蛋白尿病、性腺機能減退、區域性回腸炎、白血球減少症、傳染性單核細胞增多症、橫斷性脊髓炎、原發性特發性黏液水腫、腎病、交感性眼炎(交感神經眼炎)、新生兒眼炎、視神經炎、肉芽腫性睪丸炎、胰腺炎、急性多神經根炎、壞疽性膿皮病、奎汶氏甲狀腺炎(Quervain's thyroiditis)、後天性脾萎縮、非惡性胸腺瘤、淋巴樣濾泡性胸腺炎、白斑病、中毒性休克症候群、食物中毒、涉及T細胞滲透之病狀、白血球黏著不足、與藉由細胞激素及T-淋巴細胞介導之急性及遲發性過敏反應相關之免疫反應、涉及白血球血球滲出之疾病、多發性器官損傷症候群、抗原-抗體複合物介導之疾病、抗腎小球基底膜疾病、自體免疫性多內分泌病、卵巢炎、原發性黏液水腫、自體免疫性萎縮性胃炎、風濕性疾病、混合結締

組織病、腎病症候群、胰島炎、多內分泌腺衰竭、自體免疫多腺症(包括I型多腺症、成人發作特發性副甲狀腺低能症(AOIH)、心肌症(諸如擴張型心肌症、後天性大皰性表皮松解(EBA))、血色素沈著症、心肌炎、腎病症候群、原發性硬化性膽管炎、化膿性的或非化膿性竇炎、急性或慢性竇炎、篩竇炎、額竇炎、上頷竇炎或蝶竇炎、過敏性竇炎、嗜伊紅血球相關之病症(諸如嗜伊紅血球增多症)、肺滲透嗜伊紅血球增多症、嗜伊紅血球增多肌痛症候群、呂弗勒氏症候群(Löffler's syndrome)、慢性嗜酸細胞性肺炎、熱帶肺嗜伊紅血球增多症、支氣管肺炎麴菌病、麴菌腫或含有嗜伊紅血球之肉芽瘤、過敏反應、脊椎關節病、血清反應陰性之脊椎關節炎、多內分泌腺自體免疫疾病、硬化性膽管炎、鞏膜、鞏膜外、慢性皮膚黏膜念珠菌症、布魯頓氏症候群(Bruton's syndrome)、嬰兒暫時性低丙種球蛋白血症、Wiskott-Aldrich症候群、共濟失調性毛細管擴張症候群、血管擴張、與膠原病相關之自體免疫病症、風濕病(諸如慢性關節風濕病)、淋巴腺炎、血壓反應降低、血管功能障礙、組織損傷、心血管局部缺血、痛覺過敏、腎局部缺血、大腦局部缺血及伴隨之血管形成疾病、過敏性過敏病症、血管球性腎炎、再灌注損傷、缺血性再灌注病症、心肌或其它組織之再灌注損傷、淋巴瘤性氣管支氣管炎、發炎性皮膚病、具有急性發炎性成份之皮膚病、多發性器官衰竭、大皰性疾病、腎皮質壞死、急性化膿性腦膜炎或其它中樞神經系統發炎性病症、眼睛及眼眶

發炎性病症、顆粒球輸血相關之症候群、細胞激素誘發之毒性、發作性睡病、急性嚴重炎症、慢性難醫治之炎症、腎盂炎、動脈內膜增生、消化性潰瘍、瓣炎及子宮內膜異位)。本文中涵蓋藉由投予與B細胞表面標記(諸如CD22)結合之抗體且包括投予未接合("裸")抗體或與如本文中所揭示之細胞毒性劑接合之抗體來治療的該等疾病。本文中亦涵蓋藉由組合療法來治療之該等疾病，該組合療法包括同時或連續投予與另一抗體或抗體藥物接合物、另一細胞毒性劑、輻射或其他治療組合之本發明之抗CD22抗體或抗CD22抗體藥物接合物。

如本文中所使用，"治療"係指試圖改變待治療個體或細胞之自然過程的臨床干預，且可用於預防或在臨床病理學過程中進行。所需之治療效果包括預防疾病發作或復發、減輕症狀、減少疾病之任何直接或間接病理性後果、預防轉移、降低疾病進展速率、改善或減緩疾病狀態、及緩解或改良之預後。在一些實施例中，本發明之抗體係用於延遲疾病或病症之發展或減緩疾病或病症之進展。

"個體"為脊椎動物。在某些實施例中，脊椎動物為哺乳動物。哺乳動物包括(但不限於)家畜(諸如母牛)、競技類動物(sport animals)、寵物(諸如貓、犬及馬)、靈長類動物、小鼠及大鼠。在某些實施例中，哺乳動物為人類。

"有效量"係指可有效達成所需治療或預防結果所需之劑量及時間之量。

本發明之物質/分子之"治療有效量"可根據諸如疾病狀

態、個體之年齡、性別及體重，及物質/分子在個體中引起所需反應之能力等因素而改變。治療有效量涵蓋治療有益之作用勝過物質/分子之任何有毒或有害作用的量。"預防有效量"係指可有效達成所需預防結果所需之劑量及時間之量。因為預防劑量係在疾病之前或疾病早期用於個體，所以預防有效量通常(但非必需)小於治療有效量。

如本文中使用的術語"細胞毒性劑"係指一種抑制或防止細胞功能及/或造成細胞死亡或破壞之物質。該術語意欲包括放射活性同位素(例如 At^{211} 、 I^{131} 、 I^{125} 、 Y^{90} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 、 Sm^{153} 、 Bi^{212} 、 P^{32} 、 Pb^{212} 及 Lu 之放射活性同位素)、化學治療劑(例如甲胺喋呤、阿黴素(adriamycin)、長春花生物鹼(vinca alkaloids)(長春新鹼(vincristine)、長春鹼(vinblastine)、依託泊苷(etoposide))、多柔比星(doxorubicin)、美法倫(melphalan)、絲裂黴素C(mitomycin C)、苯丁酸氮芥(chlorambucil)、道諾黴素(daunorubicin))，或其它插入劑、酶及其片段(諸如核分解酶)、抗生素，及毒素(諸如小分子毒素，或細菌、真菌、植物或動物來源之酶活性毒素，包括其片段及/或變異體)、毒素、生長抑制劑、藥物部分，及下文所揭示之各種抗腫瘤或抗癌劑。其它細胞毒性劑描述於下文中。殺腫瘤劑引起腫瘤細胞之破壞。

"毒素"為能夠對細胞之生長或增殖產生有害作用之任何物質。

"化學治療劑"為可用於治療癌症之化學化合物。化學治

療劑之實例包括烷基化劑，諸如噻替哌(thiotepa)及 CYTOXAN®環磷醯胺(cyclophosphamide)；磺酸烷酯，諸如硫酸布他卡因(busulfan)、英丙舒凡(improsulfan)及哌泊舒凡(piposulfan)；氮丙啶，諸如苯唑多巴(benzodopa)、卡巴醌(carboquone)、麥曲多巴(meturedopa)及尤利多巴(uredopa)；伸乙基亞胺及甲基三聚氰胺(methylamelamine)，包括六甲蜜胺(altretamine)、三伸乙基三聚氰胺、三伸乙基磷醯胺、三伸乙基硫代磷醯胺及三羥甲基三聚氰胺(trimethylolomelamine)；乙醯生(acetogenin)(尤其布拉他辛(bullatacin)及布拉他辛酮(bullatacinone))； δ -9-四氫大麻酚(曲大麻酚(dronabinol)，MARINOL®)； β -拉帕酮(beta-lapachone)；拉帕醇(lapachol)；秋水仙鹼(colchicine)；樺木酸(betulinic acid)；喜樹鹼(camptothecin)(包括合成類似物拓撲替康(topotecan)(HYCAMTIN®)、CPT-11(伊立替康(irinotecan)，CAMPTOSAR®)、乙醯喜樹鹼、斯可波萊辛(scopolectin)及9-胺基喜樹鹼)；苔蘚抑素(bryostatin)；克利他汀(callystatin)；CC-1065(包括其阿多來新(adozelesin)、卡折來新(carzelesin)及比折來新(bizelesin)合成類似物)；鬼臼毒素(podophyllotoxin)；足葉草酸(podophyllinic acid)；替尼泊甙(teniposide)；念珠藻環肽(cryptophycin)(尤其念珠藻環肽1及念珠藻環肽8)；海兔毒素；多卡黴素(duocarmycin)(包括合成類似物，KW-2189及CB1-TM1)；艾榴素(eleutherobin)；潘卡替他汀(pancratistatin)；沙科地辛(sarcodictyin)；斯潘他汀

(spongistatin)；氮芥子氣(nitrogen mustard)，諸如苯丁酸氮芥(chlorambucil)、萘氮芥(chlornaphazine)、鉻磷醯胺(cholophosphamide)、雌莫司汀(estramustine)、異環磷醯胺(ifosfamide)、氮芥(mechlorethamine)、氧化氮芥鹽酸鹽(mechlorethamine oxide hydrochloride)、美法侖、新恩比興(novembichin)、苯芥膽甾醇(phenesterine)、潑尼莫司汀(prednimustine)、曲磷胺(trofosfamide)、尿嘧啶芥子氣(uracil mustard)；硝基脲(nitrosurea)類，諸如卡莫司汀(carmustine)、氯脲黴素(chlorozotocin)、福莫司汀(fotemustine)、洛莫司汀(lomustine)、尼莫司汀(nimustine)及雷莫司汀(ranimustine)；抗生素類，諸如烯二炔抗生素(enediyne antibiotic)(例如，刺孢黴素，尤其刺孢黴素 γ II及刺孢黴素 ω II)(參看(例如)Agnew, Chem Intl. Ed. Engl., 33:183-186 (1994))；地尼黴素(dynemicin)，(包括地尼黴素A(dynemicin A)；伊斯帕黴素(esperamicin)；以及新製癌菌素發色團(neocarzinostatin chromophore)及相關色蛋白烯二炔抗生素發色團)，阿克萊諾黴素(aclacinomycin)、放線菌素(actinomycin)、奧瑟黴素(authramycin)、氮雜絲胺酸(azaserine)、博萊黴素(bleomycin)、放線菌素C(cactinomycin)、卡洛比星(carabycin)、洋紅黴素(carminomycin)、嗜癌菌素(carzinophilin)、色黴素(chromomycin)、放線菌素D(dactinomycin)、道諾黴素、地托比星(detorubicin)、6-重氮基-5-側氧基-L-甘白胺酸、ADRIAMYCIN®多柔比星(doxorubicin)(包括嗎啉基-多柔

比星、氟基嗎啉基-多柔比星、2-吡咯啉基-多柔比星及脫氧多柔比星(deoxydoxorubicin)、表柔比星(epirubicin)、依索比星(esorubicin)、伊達比星(idarubicin)、麻西羅黴素(marcellomycin)、絲裂黴素(諸如絲裂黴素C)、黴酚酸(mycophenolic acid)、諾拉黴素(nogalamycin)、橄欖黴素(olivomycin)、培洛黴素(peplomycin)、博替羅黴素(potfiromycin)、嘌呤黴素(puromycin)、奎拉黴素(quelamycin)、羅多比星(rodorubicin)、鏈黑黴素(streptonigrin)、鏈佐星(streptozocin)、殺結核菌素(tubercidin)、烏苯美司(ubenimex)、淨司他丁(zinostatin)、左柔比星(zorubicin)；抗代謝物，諸如甲胺喋呤及5-氟尿嘧啶(5-FU)；葉酸類似物，諸如迪諾特寧(denopterin)、甲胺喋呤、蝶羅呤(pteropterin)、三甲曲沙(trimetrexate)；嘌呤類似物，諸如氟達拉賓(fludarabine)、6-巯基嘌呤、硫咪嘌呤(thiamiprine)、硫鳥嘌呤(thioguanine)；嘧啶類似物，諸如安西他濱(ancitabine)、阿紫胞苷(azacitidine)、6-硫唑嘧啶、卡莫氟(carmofur)、阿糖胞苷(cytarabine)、雙脫氧尿苷(dideoxyuridine)、脫氧氟尿苷(doxifluridine)、依諾他濱(enocitabine)、氟尿苷(floxuridine)；雄激素，諸如卡普甾酮(calusterone)、丙酸屈他雄酮(dromostanolone propionate)、環硫雄醇(epitiostanol)、美雄烷(mepitiostane)、甾內酪(testolactone)；抗腎上腺素，諸如胺魯米特(aminoglutethimide)、米托坦(mitotane)、曲洛司坦(trilostane)；葉酸補充劑(folic acid

replenisher)，諸如夫羅林酸(frolic acid)；醋葡醛內酯(aceglatone)；醛磷醯胺糖苷(aldophosphamide glycoside)；胺基乙醯丙酸(aminolevulinic acid)；5-乙炔尿嘧啶(eniluracil)；安吡啶(amsacrine)；貝曲布辛(bestrabucil)；比生群(bisantrene)；伊達曲仙(edatraxate)；德弗法明(defofamine)；秋水仙胺(demecolcine)；地吡醯(diaziquone)；伊弗尼辛(elfornithine)；依利醋鉍(elliptinium acetate)；艾普塞隆(epothilone)；依託格魯(etoglucid)；硝酸鎂；羥基尿素；香菇多糖(lentinan)；洛尼達寧(lonidainine)；美登素類物，諸如美登素及安絲菌素(ansamitocin)；米托胍脲(mitoguazone)；米托蒽醯(mitoxantrone)；莫吡丹莫(mopidanmol)；尼曲伊寧(nitraerine)；噴司他丁(pentostatin)；蛋胺氮芥(phenamet)；比柔比星(pirarubicin)；洛索蒽醯(losoxantrone)；2-乙基醯肼；丙卡巴肼(procarbazine)；PSK®多醣複合物(JHS Natural Products, Eugene, OR)；雷佐生(razoxane)；根瘤菌素(rhizoxin)；西佐喃(sizofiran)；鍺螺胺(spirogermanium)；細交鏈孢菌酮酸(tenuazonic acid)；三亞胺醯(triaziquone)；2,2',2''-三氯三乙胺；單端孢徽烯族毒素(trichothecene)(尤其T-2毒素、弗納庫林A(verracurin A)、漆斑菌素A(roridin A)及胺癸吡(anguidine))；烏拉坦(urethan)；長春地辛(ELDISINE®、FILDESIN®)；達卡巴嗪(dacarbazine)；甘露莫司汀(mannomustine)；二溴甘露糖醇(mitobronitol)；二溴衛矛

醇 (mitolactol) ; 哌泊溴烷 (pipobroman) ; 瓜西托辛 (gacytosine) ; 阿糖苷 (arabinoside)("Ara-C") ; 噻替派 (thiotepa) ; 紫杉醇 (taxoid) 類 , 例如 TAXOL® 紫杉醇 (paclitaxel)(Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.)、ABRAXANE™ Cremophor-free、紫杉醇之白蛋白改造之奈米粒子調配物 (American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois) 及 TAXOTERE® 多西他賽 (doxetaxel) (Rhône-Poulenc Rorer, Antony, France) ; 氯萊布辛 (chloranbucil) ; 吉西他賓 (gemcitabine)(GEMZAR®) ; 6-硫鳥嘌呤 ; 巯基嘌呤 ; 甲胺嘌呤 ; 鉑類似物 , 諸如順鉑 (cisplatin) 及卡鉑 (carboplatin) ; 長春鹼 (VELBAN®) ; 鉑 ; 依託泊苷 (VP-16) ; 異環磷醯胺 ; 米托蒽醌 ; 長春新鹼 (ONCOVIN®) ; 奧賽力鉑 (oxaliplatin) ; 洛克沃新 (leucovorin) ; 長春瑞賓 (vinorelbine)(NAVELBINE®) ; 諾凡特龍 (novantrone) ; 依達曲沙 (edatrexate) ; 道諾黴素 ; 胺基嘌呤 (aminopterin) ; 伊班膦酸鹽 (ibandronate) ; 拓撲異構酶抑制劑 RFS 2000 ; 二氟甲基鳥胺酸 (difluoromethylornithine(DMFO)) ; 類視色素 (retinoid) , 諸如視黃酸 ; 卡西他賓 (capecitabine)(XELODA®) ; 上述物質中任一者之醫藥學上可接受之鹽、酸或衍生物 ; 以及兩種或兩種以上上述物質之組合 , 諸如 CHOP(環磷醯胺、多柔比星、長春新鹼及潑尼龍(prednisolone)之組合療法的縮寫) , 及 FOLFOX(具有與 5-FU 及洛克沃新組合之奧賽力鉑 (ELOXATIN™) 之治療方案的縮寫)。

此定義亦包括抗激素劑，其用於調節、降低、阻斷或抑制可促進癌症生長之激素的作用且其通常為全身性或整個身體治療之形式。其可為激素本身。實例包括抗雌激素及選擇性雌激素受體調節劑(SERM)，包括(例如)他莫昔芬(tamoxifen)(包括NOLVADEX®他莫昔芬)、EVISTA®雷諾昔芬(raloxifene)、屈洛昔芬(droloxifene)、4-羥基他莫昔芬、曲沃昔芬(trioxifene)、克沃昔芬(keoxifene)、LY117018、奧那司酮(onapristone)及FARESTON®托瑞米芬(toremifene)；抗孕酮；雌激素受體下調劑(ERD)；用於抑制或使卵巢停止工作之藥劑，例如，黃體生成激素釋放激素(LHRH)促效劑，諸如LUPRON®及ELIGARD®乙酸亮丙瑞林(leuprolide acetate)、乙酸戈舍瑞林(goserelin acetate)、乙酸布舍瑞林(buserelin acetate)及曲特瑞林(tripterelin)；其它抗雄激素劑，諸如氟他胺(flutamide)、尼魯胺(nilutamide)及比卡魯胺(bicalutamide)；及抑制調節腎上腺中雌激素產生之芳香酶的芳香酶抑制劑，諸如4(5)-咪唑、胺魯米特(aminoglutethimide)、MEGASE®乙酸甲地孕酮(megestrol acetate)、AROMASIN®依西美坦(exemestane)、弗米斯坦(formestane)、法屈唑(fadrozole)、RIVISOR®伏羅唑(vorozole)、FEMARA®來曲唑(letrozole)及ARIMIDEX®安美達錠(anastrozole)。另外，此化學治療劑定義包括雙膦酸鹽，諸如氯屈膦酸鹽(clodronate)(例如，BONEFOS®或OSTAC®)、DIDROCAL®依替膦酸鹽(etidronate)、NE-58095、ZOMETA®唑來膦酸/唑來膦酸鹽

(zoledronic acid/zoledronate)、FOSAMAX® 阿倫膦酸鹽 (alendronate)、AREDIA® 帕米膦酸鹽 (pamidronate)、SKELID® 替魯膦酸鹽 (tiludronate) 或 ACTONEL® 利塞膦酸鹽 (risedronate)；以及曲沙他濱 (troxacitabine) (1,3-二氧戊環胞嘧啶核苷類似物)；反義寡核苷酸，尤其抑制與異常細胞增殖關聯之信號傳輸路徑中之基因表現者，諸如 PKC- α 、Raf、H-Ras 及表皮生長因子受體 (EGF-R)；疫苗，諸如 THERATOPE® 疫苗及基因療法疫苗 (例如 ALLOVECTIN® 疫苗、LEUVECTIN® 疫苗及 VAXID® 疫苗)；LURTOTECAN® 拓撲異構酶 1 抑制劑；ABARELIX® rmRH；拉帕替尼二甲苯磺酸鹽 (lapatinib ditosylate) (ErbB-2 及 EGFR 雙重酪胺酸激酶小分子抑制劑，亦稱為 GW572016)；及上述物質中任一者之醫藥學上可接受之鹽、酸或衍生物。

本文使用之"生長抑制劑"係指抑制活體外或活體內之細胞 (諸如表現 CD22 之細胞) 生長之化合物或組合物。因此，生長抑制劑可為顯著降低 S 相之細胞 (諸如表現 CD22 之細胞) 百分比者。生長抑制劑之實例包括阻斷細胞週期進程 (在除 S 相之外的位置) 之藥劑，諸如誘導 G1 停滯及 M 相停滯之藥劑。經典 M 相阻斷劑包括長春蔓 (長春新鹼及長春鹼)、紫杉烷 (taxane) 及 II 型拓撲異構酶抑制劑，諸如多柔比星、表柔比星、道諾黴素、依託泊苷及博萊黴素。使 G1 停滯之彼等藥劑亦溢出進入 S 相停滯中，例如，DNA 烷基化劑，諸如他莫昔芬、潑尼松 (prednisone)、達卡巴嗪、氮芥、順鉑、甲胺喋呤、5-氟尿嘧啶及 ara-C。其他資訊可見

於The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn及Israel編，第1章，Murakami等人(WB Saunders: Philadelphia, 1995)之標題為"Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs"，尤其第13頁中。紫杉烷(紫杉醇及多烯紫杉醇(docetaxel))為均來源於紫杉樹之抗癌藥物。來源於歐洲紫杉之多烯紫杉醇(TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer)為紫杉醇(TAXOL®, Bristol-Myers Squibb)之半合成類似物。紫杉醇及多烯紫杉醇促進由微管蛋白二聚體組裝微管且藉由防止解聚合來穩定微管，其使得抑制細胞中之有絲分裂。

術語"細胞內代謝物"係指由關於抗體-藥物接合物(ADC)之代謝過程或細胞內反應產生之化合物。該代謝過程或反應可為酶性過程，諸如ADC之肽連接子的蛋白水解分裂，或諸如胺、酯或醯胺之官能基的水解。細胞內代謝物包括(但不限於)在進入、擴散、吸收或傳送進入細胞之後已經受細胞內分裂之抗體及游離藥物。

術語"細胞內地分裂"及"細胞內分裂"係指關於抗體-藥物接合物(ADC)之代謝過程或細胞內反應，藉此藥物部分(D)與抗體(Ab)之間之共價連接(亦即連接子)斷裂，其使得游離藥物與細胞內之抗體分離。因而ADC之分裂部分為細胞內代謝物。

術語"生物可用性"係指經投予患者之給定量之藥物之系統可用性(亦即，血液/血漿含量)。生物可用性為指示由投予劑型達到一般循環之藥物之時間(速率)與總量(程度)兩

者的量測之絕對術語。

術語"細胞毒性活性"係指抗體-藥物接合物或抗體-藥物接合物之細胞內代謝物的殺死細胞、抑制細胞生長或生長抑制作用。細胞毒性活性可以 IC_{50} 值來表示，其為在半數細胞存活時每單位體積之濃度(莫耳濃度或質量濃度)。

"烷基"為含有正常、第二、第三或環狀碳原子之C1-C18烴。實例為甲基(Me, $-CH_3$)、乙基(Et, $-CH_2CH_3$)、1-丙基(n-Pr, 正丙基, $-CH_2CH_2CH_3$)、2-丙基(i-Pr, 異丙基, $-CH(CH_3)_2$)、1-丁基(n-Bu, 正丁基, $-CH_2CH_2CH_2CH_3$)、2-甲基-1-丙基(i-Bu, 異丁基, $-CH_2CH(CH_3)_2$)、2-丁基(s-Bu, 第二丁基, $-CH(CH_3)CH_2CH_3$)、2-甲基-2-丙基(t-Bu, 第三丁基, $-C(CH_3)_3$)、1-戊基(正戊基, $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_3$)、2-戊基($-CH(CH_3)CH_2CH_2CH_3$)、3-戊基($-CH(CH_2CH_3)_2$)、2-甲基-2-丁基($-C(CH_3)_2CH_2CH_3$)、3-甲基-2-丁基($-CH(CH_3)CH(CH_3)_2$)、3-甲基-1-丁基($-CH_2CH_2CH(CH_3)_2$)、2-甲基-1-丁基($-CH_2CH(CH_3)CH_2CH_3$)、1-己基($-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_3$)、2-己基($-CH(CH_3)CH_2CH_2CH_2CH_3$)、3-己基($-CH(CH_2CH_3)(CH_2CH_2CH_3)$)、2-甲基-2-戊基($-C(CH_3)_2CH_2CH_2CH_3$)、3-甲基-2-戊基($-CH(CH_3)CH(CH_3)CH_2CH_3$)、4-甲基-2-戊基($-CH(CH_3)CH_2CH(CH_3)_2$)、3-甲基-3-戊基($-C(CH_3)(CH_2CH_3)_2$)、2-甲基-3-戊基($-CH(CH_2CH_3)CH(CH_3)_2$)、2,3-二甲基-2-丁基($-C(CH_3)_2CH(CH_3)_2$)、3,3-二甲基-2-丁基($-CH(CH_3)C(CH_3)_3$)。

如在本文中使用的術語"C₁-C₈烷基"係指具有1至8個碳原子之直鏈或支鏈、飽和或不飽和烴。代表性"C₁-C₈烷基"包

括(但不限於)-甲基、-乙基、-正丙基、-正丁基、-正戊基、-正己基、-正庚基、-正辛基、-正壬基及-正癸基；而支鏈 C_1-C_8 烷基包括(但不限於)-異丙基、-第二丁基、-異丁基、-第三丁基、-異戊基、2-甲基丁基，不飽和 C_1-C_8 烷基包括(但不限於)-乙烯基、-烯丙基、-1-丁烯基、-2-丁烯基、-異丁烯基、-1-戊烯基、-2-戊烯基、-3-甲基-1-丁烯基、-2-甲基-2-丁烯基、-2,3-二甲基-2-丁烯基、1-己基、2-己基、3-己基、-乙炔基、-丙炔基、-1-丁炔基、-2-丁炔基、-1-戊炔基、-2-戊炔基、-3-甲基-1-丁炔基。甲基、乙基、丙基、異丙基、正丁基、異丁基、第二丁基、第三丁基、正戊基、異戊基、新戊基、正己基、異己基、2-甲基戊基、3-甲基戊基、2,2-二甲基丁基、2,3-二甲基丁基、2,2-二甲基戊基、2,3-二甲基戊基、3,3-二甲基戊基、2,3,4-三甲基戊基、3-甲基己基、2,2-二甲基己基、2,4-二甲基己基、2,5-二甲基己基、3,5-二甲基己基、2,4-二甲基戊基、2-甲基庚基、3-甲基庚基、正庚基、異庚基、正辛基及異辛基。 C_1-C_8 烷基可未經取代或經一或多個基團取代，該等基團包括(但不限於)- C_1-C_8 烷基、-O-(C_1-C_8 烷基)、-芳基、-C(O)R'、-OC(O)R'、-C(O)OR'、-C(O)NH₂、-C(O)NHR'、-C(O)N(R')₂、-NHC(O)R'、-SO₃R'、-S(O)₂R'、-S(O)R'、-OH、-鹵素、-N₃、-NH₂、-NH(R')、-N(R')₂及-CN；其中R'各自獨立地選自H、 C_1-C_8 烷基及芳基。

"烯基"為具有至少一個不飽和位點(亦即碳-碳 sp^2 雙鍵)之含有正常、第二、第三或環狀碳原子的C₂-C₁₈烴。實例包

括(但不限於)：伸乙基或乙烯基($-\text{CH}=\text{CH}_2$)、烯丙基($-\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$)、環戊烯基($-\text{C}_5\text{H}_7$)及5-己烯基($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}=\text{CH}_2$)。

"炔基"為具有至少一個不飽和位點(亦即碳-碳sp參鍵)之含有正常、第二、第三或環狀碳原子的C2-C18烴。實例包括(但不限於)：乙炔基($-\text{C}\equiv\text{CH}$)及炔丙基($-\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}$)。

"伸烷基"係指具有1-18個碳原子且具有藉由自母體烷基之相同或兩個不同碳原子上移除兩個氫原子產生之兩個單價基團中心的飽和、支鏈或直鏈或環狀烴基。典型伸烷基包括(但不限於)：亞甲基($-\text{CH}_2-$)、1,2-乙基($-\text{CH}_2\text{CH}_2-$)、1,3-丙基($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$)、1,4-丁基($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$)及其類似基團。

"C₁-C₁₀伸烷基"為式 $-(\text{CH}_2)_{1-10}-$ 之直鏈、飽和烴基。C₁-C₁₀伸烷基之實例包括亞甲基、伸乙基、伸丙基、伸丁基、伸戊基、伸己基、伸庚基、伸辛基、伸壬基及伸癸基。

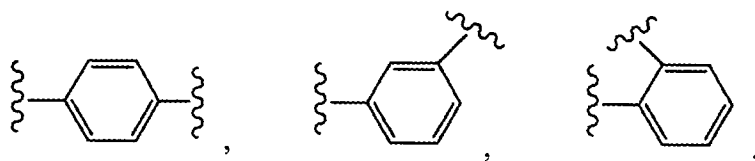
"伸烯基"係指具有2-18個碳原子且具有藉由自母體烯基之相同或兩個不同碳原子上移除兩個氫原子產生之兩個單價基團中心的不飽和、支鏈或直鏈或環狀烴基。典型伸烯基包括(但不限於)：1,2-伸乙基($-\text{CH}=\text{CH}-$)。

"伸炔基"係指具有2-18個碳原子且具有藉由自母體炔基之相同或兩個不同碳原子上移除兩個氫原子產生之兩個單價基團中心的不飽和、支鏈或直鏈或環狀烴基。典型伸炔基包括(但不限於)：乙炔基($-\text{C}\equiv\text{C}-$)、炔丙基($-\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{C}-$)及

4-戊炔基 ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{C}-$)。

"芳基"係指碳環狀芳族基團。芳基之實例包括(但不限於)苯基、萘基及蒽基。碳環狀芳族基團或雜環狀芳族基團可未經取代或經一或多個基團取代,該等基團包括(但不限於) $-\text{C}_1-\text{C}_8$ 烷基、 $-\text{O}-(\text{C}_1-\text{C}_8\text{烷基})$ 、-芳基、 $-\text{C}(\text{O})\text{R}'$ 、 $-\text{OC}(\text{O})\text{R}'$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{OR}'$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NHR}'$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}')_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{R}'$ 、 $-\text{S}(\text{O})_2\text{R}'$ 、 $-\text{S}(\text{O})\text{R}'$ 、 $-\text{OH}$ 、-鹵素、 $-\text{N}_3$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{NH}(\text{R}')$ 、 $-\text{N}(\text{R}')_2$ 及 $-\text{CN}$;其中 R' 各自獨立地選自 H 、 $-\text{C}_1-\text{C}_8$ 烷基及芳基。

"伸芳基"為具有兩個共價鍵且可為如以下結構中所示之鄰位、間位或對位構型之芳基:



其中苯基可未經取代或經至多四個基團取代,該等基團包括(但不限於) $-\text{C}_1-\text{C}_8$ 烷基、 $-\text{O}-(\text{C}_1-\text{C}_8\text{烷基})$ 、-芳基、 $-\text{C}(\text{O})\text{R}'$ 、 $-\text{OC}(\text{O})\text{R}'$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{OR}'$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NHR}'$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}')_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{R}'$ 、 $-\text{S}(\text{O})_2\text{R}'$ 、 $-\text{S}(\text{O})\text{R}'$ 、 $-\text{OH}$ 、-鹵素、 $-\text{N}_3$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{NH}(\text{R}')$ 、 $-\text{N}(\text{R}')_2$ 及 $-\text{CN}$;其中 R' 各自獨立地選自 H 、 $-\text{C}_1-\text{C}_8$ 烷基及芳基。

"芳烷基"係指其中與碳原子(通常末端或 sp^3 碳原子)鍵結之氫原子之一者經芳基置換的非環狀烷基。典型芳烷基包括(但不限於)苄基、2-苄基乙-1-基、2-苄基乙烯-1-基、萘基甲基、2-萘基乙-1-基、2-萘基乙烯-1-基、萘甲鹽苄基、

2-萘甲醯苯基乙-1-基及其類似基團。芳烷基含6至20個碳原子，例如芳烷基之烷基部分(包括烷基、烯基或炔基)為1至6個碳原子且芳基部分為5至14個碳原子。

"雜芳烷基"係指其中與碳原子(通常末端或 sp^3 碳原子)鍵結之氫原子之一者經雜芳基置換的非環狀烷基。典型雜芳烷基包括(但不限於)2-苯并咪唑基甲基、2-呋喃基乙基及其類似基團。雜芳烷基包含6至20個碳原子，例如雜芳烷基之烷基部分(包括烷基、烯基或炔基)為1至6個碳原子且雜芳基部分為5至14個碳原子及1至3個選自N、O、P及S之雜原子。雜芳烷基之雜芳基部分可為具有3至7個環成員之單環(2至6個碳原子)或具有7至10個環成員之雙環(4至9個碳原子及1至3個選自N、O、P及S之雜原子)，例如：雙環[4,5]、[5,5]、[5,6]或[6,6]系統。

"經取代烷基"、"經取代芳基"及"經取代芳烷基"分別意謂其中一或多個氫原子各自獨立地經取代基置換的烷基、芳基及芳烷基。典型取代基包括(但不限於)-X、-R、-O⁻、-OR、-SR、-S⁻、-NR₂、-NR₃、=NR、-CX₃、-CN、-OCN、-SCN、-N=C=O、-NCS、-NO、-NO₂、=N₂、-N₃、NC(=O)R、-C(=O)R、-C(=O)NR₂、-SO₃⁻、-SO₃H、-S(=O)₂R、-OS(=O)₂OR、-S(=O)₂NR、-S(=O)R、-OP(=O)(OR)₂、-P(=O)(OR)₂、-PO₃⁻、-PO₃H₂、-C(=O)R、-C(=O)X、-C(=S)R、-CO₂R、-CO₂⁻、-C(=S)OR、-C(=O)SR、-C(=S)SR、-C(=O)NR₂、-C(=S)NR₂、-C(=NR)NR₂，其中X各自獨立地為鹵素：F、Cl、Br或I；且R各自獨立地為-H、C₂-C₁₈烷

基、 C_6-C_{20} 芳基、 C_3-C_{14} 雜環、保護基或前藥部分。如上所述之伸烷基、伸烯基及伸炔基亦可類似經取代。

"雜芳基"及"雜環"係指其中一或多個環原子為雜原子(例如氮、氧及硫)之環系統。雜環基包含1至20個碳原子及1至3個選自N、O、P及S之雜原子。雜環可為具有3至7個環成員之單環(2至6個碳原子及1至3個選自N、O、P及S之雜原子)或具有7至10個環成員之雙環(4至9個碳原子及1至3個選自N、O、P及S之雜原子)，例如：雙環[4,5]、[5,5]、[5,6]或[6,6]系統。

雜環描述於Paquette, Leo A.; "Principles of Modern Heterocyclic Chemistry"(W.A. Benjamin, New York, 1968)，尤其第1章、第3章、第4章、第6章、第7章及第9章；"The Chemistry of Heterocyclic Compounds, A series of Monographs"(John Wiley & Sons, New York, 1950迄今)，尤其第13卷、第14卷、第16卷、第19卷及第28卷；及J. Am. Chem. Soc. (1960) 82:5566中。

雜環之實例包括(舉例而言且不加限制)：吡啶基、二氫吡啶基、四氫吡啶基(哌啶基)、噻唑基、四氫噻吩基、硫氧化之四氫噻吩基、嘧啶基、呋喃基、噻吩基、吡咯基、吡唑基、咪唑基、四唑基、苯并呋喃基、硫代萘基、吲哚基、吲哚烯基、喹啉基、異喹啉基、苯并咪唑基、哌啶基、4-哌啶酮基、吡咯啶基、2-吡咯啶酮基、吡咯啉基、四氫呋喃基、雙四氫呋喃基、四氫哌喃基、雙四氫哌喃基、四氫喹啉基、四氫異喹啉基、十氫喹啉基、八氫異喹

啉基、吡辛因基、三嗪基、6H-1,2,5-噻二嗪基、2H,6H-1,5,2-二噻嗪基、噻吩基、噻蒾基、哌喃基、異苯并呋喃基、吡烯基、吡基、啡噁噻基、2H-吡咯基、異噻唑基、異噁唑基、吡嗪基、噻嗪基、引嗪基、異引哌基、3H-引哌基、1H-引哌基、嘌呤基、4H-喹嗪基、吡嗪基、哌啶基、喹啉基、喹唑啉基、嘧啶基、喋啶基、4aH-吡啶基、吡啶基、 β -吡啶基、啡啶基、吡啶基、嘧啶基、啡啶基、啡嗪基、啡噻嗪基、呋吡基、啡噁嗪基、異吡基、吡基、咪唑啶基、咪唑啉基、吡啶基、吡啶基、哌嗪基、引哌基、異引哌基、哌啶基、嗎啉基、噁唑啶基、苯并三唑基、苯并異噁唑基、羧引哌基、苯并噁唑啉基及靛紅基(isatinoyl)。

舉例而言且不加限制，碳鍵結雜環係鍵結於吡啶之2、3、4、5或6位；噻嗪之3、4、5或6位；嘧啶之2、4、5或6位；吡嗪之2、3、5或6位；呋喃、四氫呋喃、硫代呋喃、噻吩、吡咯或四氫吡咯之2、3、4或5位；噁唑、咪唑或噻唑之2、4或5位；異噁唑、吡啶或異噻唑之3、4或5位；氮丙啶之2或3位；吡環丁烷之2、3或4位；喹啉之2、3、4、5、6、7或8位；或異喹啉之1、3、4、5、6、7或8位上。碳鍵結雜環更通常包括2-吡啶基、3-吡啶基、4-吡啶基、5-吡啶基、6-吡啶基、3-噻嗪基、4-噻嗪基、5-噻嗪基、6-噻嗪基、2-嘧啶基、4-嘧啶基、5-嘧啶基、6-嘧啶基、2-吡嗪基、3-吡嗪基、5-吡嗪基、6-吡嗪基、2-噻唑基、4-噻唑基或5-噻唑基。

舉例而言且不加限制，氮鍵結雜環係鍵結於氮丙啶、吡環丁烷、吡咯、吡咯啉、2-吡咯啉、3-吡咯啉、咪唑、咪唑啉、2-咪唑啉、3-咪唑啉、吡唑、吡唑啉、2-吡唑啉、3-吡唑啉、哌啶、哌嗪、吲哚、吲哚啉、1H-吲哚之1位；異吲哚或異吲哚啉之2位；嗎啉之4位；及呋唑或β呋啉之9位上。氮鍵結雜環更通常包括1-氮丙啶基、1-吡丁啶基、1-吡咯基、1-咪唑基、1-吡唑基及1-哌啶基。

"C₃-C₈雜環"係指其中環碳原子之一至四者獨立地經選自由O、S及N組成之群之雜原子置換的芳族或非芳族C₃-C₈碳環。C₃-C₈雜環之代表性實例包括(但不限於)苯并呋喃基、苯并噻吩、吲哚基、苯并吡唑基、香豆素基、異喹啉基、吡咯基、噻吩基、呋喃基、噻唑基、咪唑基、吡唑基、三唑基、喹啉基、嘧啶基、吡啶基、吡啶酮基、吡嗪基、噻嗪基、異噻唑基、異噁唑基及四唑基。C₃-C₈雜環可未經取代或經至多7個基團取代，該等基團包括(但不限於)-C₁-C₈烷基、-O-(C₁-C₈烷基)、-芳基、-C(O)R'、-OC(O)R'、-C(O)OR'、-C(O)NH₂、-C(O)NHR'、-C(O)N(R')₂、-NHC(O)R'、-S(O)₂R'、-S(O)R'、-OH、-鹵素、-N₃、-NH₂、-NH(R')、-N(R')₂及-CN；其中R'各自獨立地選自H、-C₁-C₈烷基及芳基。

"C₃-C₈雜環基"係指其中雜環基之氫原子之一者經一鍵置換的如上定義之C₃-C₈雜環基。C₃-C₈雜環基可未經取代或經至多6個基團取代，該等基團包括(但不限於)-C₁-C₈烷基、-O-(C₁-C₈烷基)、-芳基、-C(O)R'、-OC(O)R'、-C(O)OR'

、 $-\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NHR}'$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}')_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{R}'$ 、 $-\text{S}(\text{O})_2\text{R}'$ 、 $-\text{S}(\text{O})\text{R}'$ 、 $-\text{OH}$ 、-鹵素、 $-\text{N}_3$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{NH}(\text{R}')$ 、 $-\text{N}(\text{R}')_2$ 及 $-\text{CN}$ ；其中 R' 各自獨立地選自 H 、 $-\text{C}_1-\text{C}_8$ 烷基及芳基。

"碳環"意謂具有3至7個碳原子(作為單環)或7至12個碳原子(作為雙環)之飽和或不飽和環。單環狀碳環具有3至6個環原子，更通常5或6個環原子。雙環狀碳環具有7至12個環原子(例如排列為雙環[4,5]、[5,5]、[5,6]或[6,6]系統)，或9或10個環原子(排列為雙環[5,6]或[6,6]系統)。單環狀碳環之實例包括環丙基、環丁基、環戊基、1-環戊-1-烯基、1-環戊-2-烯基、1-環戊-3-烯基、環己基、1-環己-1-烯基、1-環己-2-烯基、1-環己-3-烯基、環庚基及環辛基。

" C_3-C_8 碳環"為3員、4員、5員、6員、7員或8員飽和或不飽和非芳族碳環狀環。代表性 C_3-C_8 碳環包括(但不限於)-環丙基、-環丁基、-環戊基、-環戊二烯基、-環己基、-環己烯基、-1,3-環己二烯基、-1,4-環己二烯基、-環庚基、-1,3-環庚二烯基、-1,3,5-環庚三烯基、-環辛基及-環辛二烯基。 C_3-C_8 碳環基團可未經取代或經一或多個基團取代，該等基團包括(但不限於)- C_1-C_8 烷基、 $-\text{O}-(\text{C}_1-\text{C}_8\text{烷基})$ 、-芳基、 $-\text{C}(\text{O})\text{R}'$ 、 $-\text{OC}(\text{O})\text{R}'$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{OR}'$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NHR}'$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}')_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{R}'$ 、 $-\text{S}(\text{O})_2\text{R}'$ 、 $-\text{S}(\text{O})\text{R}'$ 、 $-\text{OH}$ 、-鹵素、 $-\text{N}_3$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{NH}(\text{R}')$ 、 $-\text{N}(\text{R}')_2$ 及 $-\text{CN}$ ；其中 R' 各自獨立地選自 H 、 $-\text{C}_1-\text{C}_8$ 烷基及芳基。

" C_3-C_8 碳環基"係指碳環基團之氫原子之其中一者經一鍵置換的如上所定義之 C_3-C_8 碳環基團。

"連接子"係指包含將抗體與藥物部分共價連接之原子之共價鍵或鏈的化學部分。在各種實施例中，連接子包括二價基團(諸如烷二基、芳二基、雜芳二基)、部分(諸如： $-(\text{CR}_2)_n\text{O}(\text{CR}_2)_n-$)、烷氧基之重複單元(例如聚伸乙基氧基、PEG、聚亞甲基氧基)及烷胺基之重複單元(例如聚伸乙基胺基、Jeffamine™)；及二酸酯及醯胺，其包括琥珀酸酯、琥珀醯胺、二羥乙酸酯、丙二酸酯及己醯胺。

術語"對掌性"係指具有鏡像搭配物之不重疊性質之分子，而術語"非對掌性"係指在其鏡像搭配物上可重疊之分子。

術語"立體異構體"係指具有相同化學結構，但原子或基團空間排列不同之化合物。

"非對映異構體"係指具有兩個或兩個以上對掌性中心之立體異構體且其之分子並非彼此之鏡像。非對映異構體具有不同之物理性質，例如熔點、沸點、光譜性質及反應性。非對映異構體之混合物可在高離析分析程序(諸如電泳及層析法)下分離。

"對映異構體"係指為彼此之不重疊鏡像之化合物的兩種立體異構體。

本文中使用的立體化學定義及慣例通常遵循S. P. Parker編，McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms (1984) McGraw-Hill Book Company, New York；及 Eliel, E. 及 Wilen, S., Stereochemistry of Organic Compounds (1994) John Wiley & Sons, Inc., New York。許多有機化合物以光

學活性形式存在，亦即，其具有旋轉平面偏振光之平面的能力。在描述光學活性化合物時，字首D及L，或R及S係用於表示分子關於其對掌性中心之絕對構型。字首d及l或(+)及(-)係用於表示化合物使平面偏振光旋轉之符號，其中(-)或l意謂化合物為左旋。具有字首(+)或d之化合物為右旋。對於給定化學結構，除了該等立體異構體為彼此之鏡像之外，其為相同的。特定立體異構體亦可稱作對映異構體，且該等異構體之混合物通常被稱作對映異構混合物。對映異構體之50:50混合物被稱作外消旋混合物或外消旋體，在化學反應或過程中已無立體選擇或立體特異性時其可存在。術語"外消旋混合物"及"外消旋體"係指缺乏光學活性之兩種對映異構物質之等莫耳混合物。

"離去基"係指可經另一官能基取代之官能基。某些離去基在此項技術中為已知的，且實例包括(但不限於)鹵離子(例如，氯離子、溴離子、碘離子)、甲烷磺鹽基(甲磺鹽基)、對甲苯磺鹽基(甲苯磺鹽基)、三氟甲基磺鹽基(三氟甲磺酸酯基)及三氟甲基磺酸酯基。

縮寫

連接子組份：

MC=6-順丁烯二鹽亞胺基己鹽基

Val-Cit或"vc"=纈胺酸-瓜胺酸(蛋白酶可分裂連接子中之例示性二肽)

瓜胺酸=2-胺基-5-脲基戊酸

PAB=對胺基苄氧羰基("自供"連接子組份之實例)

Me-Val-Cit=N-甲基-纈胺酸-瓜胺酸(其中連接子肽鍵已經修飾以防止其由組織蛋白酶B分裂)

MC(PEG)6-OH=順丁烯二醯亞胺基己醯基-聚乙二醇(可與抗體半胱胺酸連接)。

SPP=N-琥珀醯亞胺基-4-(2-吡啶基硫基)戊酸酯

SPDP=丙酸N-琥珀醯亞胺基-3-(2-吡啶基二硫基)酯

SMCC=環己烷-1-羧酸琥珀醯亞胺基-4-(N-順丁烯二醯亞胺基甲基)酯

IT=亞胺硫脲

細胞毒性藥物：

MMAE=單甲基奧利斯坦汀E(MW 718)

MMAF=在藥物之C末端具有苯丙胺酸之奧利斯坦汀E(MMAE)的變異體(MW 731.5)

MMAF-DMAEA=在C-末端苯丙胺酸之醯胺鍵中具有DMAEA(二甲基胺基乙基胺)之MMAF(MW 801.5)

MMAF-TEG=具有酯化為苯丙胺酸之四乙二醇之MMAF

MMAF-NtBu=以醯胺形式連接至MMAF之C末端的N-第三丁基

DM1=N(2')-脫乙醯基-N(2')-(3-巰基-1-側氧基丙基)-美登素

DM3=N(2')-脫乙醯基-N2-(4-巰基-1-側氧基戊基)-美登素

DM4=N(2')-脫乙醯基-N2-(4-巰基-4-甲基-1-側氧基戊基)-美登素

其他縮寫如下：AE為奧利斯坦汀E，Boc為N-(第三丁氧

羰基)，cit為瓜胺酸，dap為多拉普因(dolaproine)，DCC為1,3-二環己基碳化二醯亞胺，DCM為二氯甲烷，DEA為二乙胺，DEAD為偶氮二甲酸二乙酯，DEPC為磷醯基氰酸二乙酯，DIAD為偶氮二甲酸二異丙酯，DIEA為N,N-二異丙基乙胺，dil為多拉異白胺酸(dolaisoleucine)，DMA為二甲基乙醯胺，DMAP為4-二甲基胺基吡啶，DME為乙二醇二甲醚(或1,2-二甲氧基乙烷)，DMF為N,N-二甲基甲醯胺，DMSO為二甲亞砜，doe為dolaphenine(α -(噻唑基)苯乙基胺基)，dov為N,N-二甲基纈胺酸，DTNB為5,5'-二硫基雙(2-硝基苯甲酸)，DTPA為二伸乙基三胺五乙酸，DTT為二硫蘇糖醇，EDCI為1-(3-二甲基胺基丙基)-3-乙基碳化二醯亞胺鹽酸鹽，EEDQ為2-乙氧基-1-乙氧基羰基-1,2-二氫喹啉，ES-MS為電噴質譜分析，EtOAc為乙酸乙酯，Fmoc為N-(9-芴基甲氧基羰基)，gly為甘胺酸，HATU為六氟磷酸O-(7-氮雜苯并三唑-1-基)-N,N,N',N'-四甲鎂，HOBt為1-羥基苯并三唑，HPLC為高壓液相層析，ile為異白胺酸，lys為離胺酸，MeCN(CH₃CN)為乙腈，MeOH為甲醇，Mtr為4-大茴香基二苯基甲基(或4-甲氧基三苯甲基)，nor為(1S, 2R)-(+)-去甲麻黃鹼，PBS為磷酸鹽緩衝之鹽水(pH 7.4)，PEG為聚乙二醇，Ph為苯基，Pnp為對硝基苯基，MC為6-順丁烯二醯亞胺基己醯基，phe為L-苯丙胺酸，PyBrop為溴基參吡咯啶基鎂六氟磷酸鹽，SEC為尺寸排阻層析，Su為琥珀醯亞胺，TFA為三氟乙酸，TLC為薄層層析，UV為紫外線，且val為纈胺酸。

組合物及製造該等組合物之方法

本發明提供與CD22結合之抗體。提供包含抗CD22抗體之免疫接合物。本發明之抗體及免疫接合物適用於(例如)診斷或治療與改變之表現(例如，增加之CD22表現)相關的病症。在某些實施例中，本發明之抗體或免疫接合物適用於診斷或治療細胞增生性病症，諸如癌症。

抗CD22抗體

在一態樣中，本發明提供與CD22結合之抗體。在一些實施例中，提供與人類及獼猴(cyno)CD22之成熟形式結合之抗體。在一此實施例中，人類CD22之成熟形式具有SEQ ID NO:27之胺基酸序列。成熟、主要人類同功異型物具有包含7個類Ig域之細胞外域及SEQ ID NO:28之胺基酸序列。在另一實施例中，缺乏細胞外域3及4之人類CD22之次要同功異型物具有SEQ ID NO: 29之胺基酸序列。次要同功異型物之細胞外域之胺基酸序列為SEQ ID NO:30。獼猴CD22具有SEQ ID NO:31之胺基酸序列。在一些實施例中，CD22之抗體與表現於細胞表面上之CD22之成熟形式結合。在一些實施例中，與表現於細胞表面上之CD22之成熟形式結合的抗體抑制細胞生長。在一些實施例中，抗CD22抗體與表現於細胞表面上之CD22之成熟形式結合且抑制細胞增殖。在某些實施例中，抗CD22抗體與表現於細胞表面上之CD22之成熟形式結合且誘發細胞死亡。在一些實施例中，抗CD22抗體與表現於癌細胞表面上之CD22之成熟形式結合。在一些實施例中，相對於同一組

織來源之正常細胞，抗CD22抗體與表現於癌細胞表面上之CD22之成熟形式結合。在一些實施例中，抗CD22抗體與細胞毒素或可偵測標記接合且在細胞表面上與CD22結合。在一些實施例中，抗體-毒素接合物抑制細胞生長。在一些實施例中，抗體-可偵測標記接合物使得在其表面上表現CD22之細胞在活體外或活體內可偵測。

在一態樣中，抗CD22抗體為單株抗體。在一態樣中，抗CD22抗體為抗體片段，例如，Fab、Fab'-SH、Fv、scFv或(Fab')₂片段。在一態樣中，抗CD22抗體為嵌合、人類化或人類抗體。在一態樣中，本文中描述之抗CD22抗體之任一者經純化。

本文中提供來源於噬菌體庫之例示性單株抗體。用於篩檢該庫之抗原為具有SEQ ID NO:28或SEQ ID NO:30之胺基酸序列(對應於CD22之細胞外域(ECD) β 及 α)之序列的多肽。由庫篩檢產生之抗體為親和力成熟的。

在一態樣中，提供用於與CD22結合之與鼠10F4.4.1、人類化10F4v1及v3及鼠5E8.1.8競爭的單株抗體。亦提供與鼠10F4.4.1、人類化10F4v1及v3及鼠5E8.1.8相同之抗原決定基結合的單株抗體。

在本發明之一態樣中，提供編碼抗CD22抗體之聚核苷酸。在某些實施例中，提供包含編碼抗CD22抗體之聚核苷酸的載體。在某些實施例中，提供包含該等載體之宿主細胞。在本發明之另一態樣中，提供包含抗CD22抗體或編碼抗CD22抗體之聚核苷酸的組合物。在某些實施例

中，本發明之組合物為用於治療細胞增生性病徵(諸如本文中列舉之彼等病徵)之醫藥調配物。

抗體投予及調配物

在一實施例中，本發明之抗CD22抗體或抗CD22抗體藥物接合物(包括(但不限於)本發明之抗CD22 thiomab藥物接合物)係與B細胞表面抗原之拮抗劑組合投予。與一或多種其他治療劑"組合"投藥包括同時(共同)投藥及以任何次序連續投藥。在一實施例中，投藥為連續或依序投藥。在另一實施例中，投藥為以同一調配物同時、共同或一起投藥。在一實施例中，B細胞表面抗原拮抗劑為其抗體或抗原結合片段。在一實施例中，B細胞表面拮抗劑為抗體藥物接合物。

本文中調配物可含有待治療之特定病徵所需之一種以上活性化合物，較佳具有不彼此不利影響之互補活性的彼等活性化合物。舉例而言，除抗CD22抗體、抗CD22抗體藥物接合物或CD22結合寡肽之外，另一抗體，例如與CD22多肽上之不同抗原決定基結合之第二抗CD22抗體，或與不同B細胞表面抗原結合之第二抗體，或諸如影響特定癌症之生長之生長因子的一些其他標靶之抗體，可需要包括於一調配物中。另外或其他，組合物可進一步包含化學治療劑、細胞毒性劑、細胞激素、生長抑制劑、抗激素劑及/或心臟保護劑。該等分子適合地以可有效用於意欲目的之量組合存在。

目前，視癌症之階段而定，癌症治療包括以下療法之一

種或組合：移除癌組織之手術、放射線療法及化學療法。在不耐受化學療法并之毒性及副作用之老年患者中及在其中放射線療法具有有限有效性之轉移性疾病中，抗CD22抗體、抗CD22抗體藥物接合物或寡肽療法可為尤其合意的。在疾病之初始診斷後或在復發期間，本發明之腫瘤靶向抗CD22抗體、抗CD22抗體藥物接合物或寡肽適用於減輕表現CD22之癌症。對於治療應用而言，抗CD22抗體、抗CD22抗體藥物接合物或寡肽可單獨或以與(例如)激素、抗血管生成劑或放射標記化合物或與手術、冷凍療法及/或放射線療法之組合療法使用。抗CD22抗體、抗CD22抗體藥物接合物或寡肽治療可連續、在習知療法之前或之後與其他形式之習知療法一起施用。在用於治療或減輕癌症之本發明之方法中，在以前述化學治療劑之一或多者治療的同時，癌症患者可經投予抗CD22抗體、抗CD22抗體藥物接合物或寡肽。抗CD22抗體、抗CD22抗體藥物接合物或寡肽應與治療有效劑量之化學治療劑一起投予。在另一實施例中，抗CD22抗體、抗CD22抗體藥物接合物或寡肽係與化學療法一起投予以增強化學治療劑之活性及功效。Physicians' Desk Reference(PDR)揭示已用於治療各種癌症之該等試劑之劑量。治療有效之該等前述化學治療藥物之給藥方案及劑量應視待治療之特定癌症、疾病之程度及熟習此項技術之醫師熟知之其他因素而定且可由醫師來確定。

在一特定實施例中，包含與細胞毒性劑接合之抗CD22

抗體、抗CD22抗體藥物接合物或寡肽的接合物經投予患者。與CD22蛋白結合之免疫接合物係由細胞內化，其使得免疫接合物殺死與其結合之癌症細胞的治療功效增大。在一實施例中，細胞毒性劑靶向或干擾癌細胞中之核酸。細胞毒性劑之實例經上文描述且包括奧利斯坦汀、美登素類物、刺孢黴素、核糖核酸酶及DNA核酸內切酶，或其生物活性衍生物。

抗CD22抗體、抗CD22抗體藥物接合物或寡肽或其毒素接合物係根據已知方法(諸如靜脈內投藥(例如，以單次輸液或經一段時期連續輸液之形式)，由肌肉內、腹膜內、腦脊髓內、皮下、關節內、滑液內、鞘內、口服、局部或吸入途徑)投予人類患者。抗體、抗CD22抗體藥物接合物或寡肽之靜脈內或皮下投藥為較佳的。

其他治療方案可與抗CD22抗體、抗CD22抗體藥物接合物或寡肽之投予組合。組合投藥包括使用單獨調配物或單一醫藥調配物之共同投藥，及以任一次序之連續投藥，其中較佳存在一段時期，此時兩種(或所有)活性劑同時發揮其生物活性。此組合療法較佳產生協同治療效果。

亦可需要將抗CD22抗體或抗體、抗CD22抗體藥物接合物或寡肽之投予與特定癌症相關之針對另一腫瘤抗原或B細胞表面抗原之抗體的投予組合。

在另一實施例中，本發明之治療性治療方法包括抗CD22抗體(或抗體)、抗CD22抗體藥物接合物(類)或寡肽(類)及一或多種化學治療劑或生長抑制劑之組合投予，其

包括共同投予不同化學治療劑之混合液。化學治療劑包括雌莫司汀磷酸鹽、潑尼莫司汀、順鉑、5-氟尿嘧啶、美法倫、環磷醯胺、羥基脲及羥基脲紫杉烷(諸如紫杉醇及多西他賽)及/或蒽環黴素抗生素，以及藥劑組合，諸如(但不限於)CHOP或FOLFOX。可根據製造商之指示或按照熟練行醫者經驗確定來使用該等化學治療劑之製劑及給藥時程。該化學療法之製劑及給藥時程亦描述於Chemotherapy Service, M.C. Perry編, Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1992)中。

抗體係藉由任何適當方式投予，包括非經腸、局部、皮下、腹膜內、肺內、鼻內及/或病灶內投藥。非經腸輸液包括肌肉內、靜脈內、動脈內、腹膜內或皮下投藥。亦涵蓋鞘內投藥(參見(例如)美國專利申請案第2002/0009444號, Grillo-Lopez, A, 關於CD20抗體之鞘內遞送)。較佳經靜脈內或皮下給藥。

第二藥物可與治療劑抗體或免疫黏附素之初始暴露及/或後來暴露一起投予，該組合投藥包括使用單獨調配物或單一醫藥調配物之共同投藥，及以任一次序之連續投藥，其中較佳存在一段時期，此時兩種(或所有)活性劑同時發揮其生物活性。

儘管治療劑抗CD22抗體、抗CD22抗體藥物接合物、免疫黏附素或其他生物劑可以單一藥劑形式投予以治療自體免疫疾病，但通常治療劑抗體或免疫黏附素應與一或多種第二藥物組合。舉例而言，對於RA及其他自體免疫疾病

而言，抗體、免疫黏附素或其他生物藥物較佳與以下各物組合：上文定義部分中列舉之免疫抑制劑、化學治療劑、BAFF拮抗劑、整合素拮抗劑或抗體及/或細胞激素之任一或多者；改善疾病之抗類風濕藥物(DMARD)之一或多者，諸如羥基氯喹、柳氮磺胺吡啶(sulfasalazine)、甲胺喋呤、來氟米特(leflunomide)、硫唑嘌呤、D-青黴胺、Gold(口服)、Gold(肌肉內)、二甲胺四環素、環孢黴素(cyclosporine)；葡萄球菌蛋白A免疫吸附；靜脈內免疫球蛋白(IVIG)；非類固醇消炎藥(NSAID)；糖皮質激素(例如經由關節注射)；皮質類固醇(例如甲潑尼龍及/或潑尼龍)；葉酸鹽；抗腫瘤壞死因子(TNF)拮抗劑，例如依那西普(etanercept)/ENBREL™、英利昔單抗(infliximab)/REMICADE™、D2E7(Knoll)或CDP-870(Celltech)；IL-1R拮抗劑(例如Kineret)；IL-10拮抗劑(例如Ilodecakin)；凝血調節劑(例如WinRho)；IL-6拮抗劑/抗TNF(CBP 1011)；CD40拮抗劑(例如IDEC 131)；Ig-Fc受體拮抗劑(MDX33)；免疫調節劑(例如撒利多胺(thalidomide)或ImmuDyn)；抗CD5抗體(例如H5g1.1)；巨噬細胞抑制劑(例如MDX 33)；協同刺激阻斷劑(例如BMS 188667或Tolerimab)；補體抑制劑(例如h5G1.1、3E10或抗衰變加速因子(DAF)抗體)；IL-2拮抗劑(zxSMART)；EGFR抑制劑(參見上文定義)；酪胺酸激酶抑制劑(參見上文定義)；抗血管生成劑(例如VEGF抗體，諸如貝法滋美(bevacizumab))；CD22抗體，諸如LL2或易普拉單抗(LYMPHOCIDE®；Immunomedics)(其

包括易普拉單抗 Y-90(Juweid 等人, Cancer Res 55(23 Suppl):5899s-5907s(1995)))、Abiogen 之 CD22 抗體 (Abiogen, Italy)、CMC 544(Wyeth/Celltech)、combotox (UT Southwestern)、BL22(NIH) 及 LympoScan Tc99 (Immunomedics); EpCAM 抗體, 諸如 17-1A(PANOREX®); Vv3 抗體 (例如 VITAXIN®; Medimmune); CD37 抗體, 諸如 TRU 016(Trubion); IL-21 抗體 (Zymogenetics/Novo Nordisk); 抗 B 細胞抗體 (Impheron); 靶向 B 細胞之 MAb(Immunogen/Aventis); 1D09C3(Morphosys/GPC); LymphoRad 131(HGS); Lym-1 抗體 Y-90(USC); LIF 226(Enhanced Lifesci.); BAFF 抗體 (例如, WO 03/33658); BAFF 受體抗體 (例如, WO 02/24909); BR3 抗體; Blys 抗體, 諸如貝利單抗 (belimumab); LYMPHOSCD22-B™; 抗 Lym-1 Oncolym(USC/Peregrine); ISF 154(UCSD/Roche/Tragen); gomilixima(Idec 152; Biogen Idec); IL-6 受體抗體, 諸如阿利珠單抗 (atlizumab)(ACTEMRA™; Chugai/Roche); IL-15 抗體, 諸如 HuMax-IL-15(Genmab/Amgen); 趨化因子受體抗體, 諸如 CCR2 抗體 (例如 MLN1202; Millienneum); 抗補體抗體, 諸如 C5 抗體 (例如艾庫珠單抗 (eculizumab), 5G1.1; Alexion); 人類免疫球蛋白之口服調配物 (例如 IgPO; 蛋白質療法); IL-12 抗體, 諸如 ABT-874(CAT/Abbott); 特奈裏單抗 (Teneliximab)(BMS-224818); B 細胞疫苗; DN-BAFF(Xencor); CRx-119(CombinatoRx); Amgen 之 BAFF

拮抗劑；Pentostatin(Pfizer)；IC-485(ICOS)；趨化因子拮抗劑，諸如T-487(Tularik)或Reticulose(AVR-118)；SCO-323(SCIOS)；整合素拮抗劑683699、Tanabe、NGD-2001-1(Neurogen)；SCIO-469(SCIOS)；BIRB-796(Boehringer Ingelheim)；VX702、VX850(Vertex)；白三烯素(Leukotriene) B-4拮抗劑(諸如amelubunt(N-(乙氧羰基)-4-[3-[4-[1-(4-羥苯基)-1-甲基乙基]苯氧基甲基]苄氧基]苯羧鹽亞胺鹽胺)、BIIL-284；BI)；微管調節劑(Paxceed；Angiotech)；蛋白酶抑制劑(MBS561392；BMS)；AGIX-4207(Atherogenics)；ISIS-104838(ISIS/Elan)；MFG-IRAP(Univ. Pitt.)；IL-1 Trap(RGN-303；Regeneron/Novartis)；奧瑞維金(oprelvekin)(Wyeth)；依維莫司(everolimus)(Certican；Novartis)；Amevive(Biogen Idec)；ORG-39141(Organon)；FK-506(Fujisawa)；及IL-2拮抗劑(tacrolimus；Fujisawa)。

例示性抗CD22抗體之詳細描述如下：

1. 抗CD22抗體之特定實施例

在一態樣中，本發明提供一種包含至少一種、兩種、三種、四種、五種或六種HVR之抗體，該等抗體係選自(a)包含SEQ ID NO:2之胺基酸序列之HVR-H1；(b)包含SEQ ID NO:4之胺基酸序列之HVR-H2；(c)包含選自SEQ ID NO:6之胺基酸序列之HVR-H3；(d)包含SEQ ID NO:9、10、19、20、21、22、23之任一者之胺基酸序列的HVR-L1；(e)包含SEQ ID NO:12之胺基酸序列之HVR-L2；及(f)包含選自SEQ ID NO:14之胺基酸序列的HVR-L3。

在一態樣中，本發明提供一種包含至少一種、至少兩種或所有三種VH HVR序列之抗CD22抗體，其中該等序列係選自：(a)包含SEQ ID NO:2之胺基酸序列之HVR-H1；(b)包含SEQ ID NO:4之胺基酸序列之HVR-H2；(c)包含選自SEQ ID NO:6之胺基酸序列之HVR-H3。在一態樣中，本發明提供一種包括包含SEQ ID NO:2之胺基酸序列之HVR-H1的抗CD22抗體。在一態樣中，本發明提供一種包括包含SEQ ID NO:4之胺基酸序列之HVR-H2的抗CD22抗體。在一態樣中，本發明提供一種包括包含選自SEQ ID NO:6之胺基酸序列之HVR-H3的抗CD22抗體。

在一態樣中，本發明提供一種包括包含選自SEQ ID NO:6之胺基酸序列之HVR-H3及包含選自SEQ ID NO:2之胺基酸序列之HVR-H1的抗CD22抗體。

在一態樣中，本發明提供一種包括包含選自SEQ ID NO:6之胺基酸序列之HVR-H3及包含選自SEQ ID NO:4之胺基酸序列之HVR-H2的抗CD22抗體。

在一態樣中，本發明提供一種包括包含SEQ ID NO:2之胺基酸序列之HVR-H1及包含SEQ ID NO:4之胺基酸序列之HVR-H2的抗CD22抗體。

在一態樣中，本發明提供一種包括包含SEQ ID NO:2之胺基酸序列之HVR-H1；包含SEQ ID NO:4之胺基酸序列之HVR-H2；及包含SEQ ID NO:6之胺基酸序列之HVR-H3的抗CD22抗體。

在一態樣中，本發明提供一種包含至少一種、至少兩種

或所有三種VL HVR序列之抗CD22抗體，其中該等序列係選自：(a)包含SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:10之胺基酸序列之HVR-L1；(b)包含SEQ ID NO:12之胺基酸序列之HVR-L2；及(c)包含選自SEQ ID NO:14之胺基酸序列之HVR-L3。在一態樣中，本發明提供一種包括包含選自SEQ ID NO:9之胺基酸序列之HVR-L1的抗CD22抗體。在一態樣中，本發明提供一種包括包含選自SEQ ID NO:10之胺基酸序列之HVR-L1的抗CD22抗體。在一態樣中，本發明提供一種包括包含選自SEQ ID NO:19-23之胺基酸序列之HVR-L1的抗CD22抗體。在一態樣中，HVR-L1包含SEQ ID NO:9之胺基酸序列，其中N28係由V置換(N28V胺基酸改變，其產生SEQ ID NO:10)。在一態樣中，HVR-L1包含SEQ ID NO:9之胺基酸序列，其中N28係由A置換(N28A胺基酸改變，其產生SEQ ID NO:19)。在一態樣中，HVR-L1包含SEQ ID NO:9之胺基酸序列，其中N28係由Q置換(N28Q胺基酸改變，其產生SEQ ID NO:20)。在一態樣中，HVR-L1包含SEQ ID NO:9之胺基酸序列，其中N28係由S置換(N28S胺基酸改變，其產生SEQ ID NO:21)。在一態樣中，HVR-L1包含SEQ ID NO:9之胺基酸序列，其中N28係由D置換(N28D胺基酸改變，其產生SEQ ID NO:22)。在一態樣中，HVR-L1包含SEQ ID NO:9之胺基酸序列，其中N28係由I置換(N28I胺基酸改變，其產生SEQ ID NO:23)。在一態樣中，本發明提供一種包括包含SEQ ID NO:9、10、19、20、21、22、23之胺基酸序列之任一者的HVR-

L1之抗CD22抗體。在一態樣中，HVR-L1為SEQ ID NO:9、10、19、20、21、22或23之任一者且在位置N30處之胺基酸(在位置30處之天冬醯胺酸)係由A置換(N30A胺基酸改變)。在一態樣中，HVR-L1為SEQ ID NO:9、10、19、20、21、22或23之任一者且在位置N30處之胺基酸(在位置30處之天冬醯胺酸)係由Q置換(N30Q胺基酸改變)。

在一態樣中，本發明提供一種抗CD22抗體，其包含(a)包含SEQ ID NO:6之胺基酸序列之HVR-H3及(b)包含SEQ ID NO:14之胺基酸序列之HVR-L3。在一些實施例中，CD22抗體進一步包含(a)包含SEQ ID NO:2之HVR-H1及包含SEQ ID NO:4之HVR-H2。

在一態樣中，本發明提供一種抗CD22抗體，其包含(a)包含SEQ ID NO:6之胺基酸序列之HVR-H3及(b)包含SEQ ID NO:12之胺基酸序列之HVR-L2。在一些實施例中，CD22抗體進一步包含(a)包含SEQ ID NO:2之HVR-H1及包含SEQ ID NO:4之HVR-H2。

在一態樣中，本發明提供一種抗CD22抗體，其包含(a)包含SEQ ID NO:6之胺基酸序列之HVR-H3及(b)包含選自SEQ ID NO:9、10、19、20、21、22及23之胺基酸序列之HVR-L1。在一些實施例中，CD22抗體進一步包含(a)包含SEQ ID NO:2之HVR-H1及包含SEQ ID NO:4之HVR-H2。在一些實施例中，SEQ ID NO:9、10、19、20、21、22或23之胺基酸序列包含N30A或N30Q胺基酸改變。在一些實施例中，CD22抗體進一步包括包含SEQ ID NO:12之胺基

酸序列之HVR-L2。在一些實施例中，CD22抗體進一步包括包含SEQ ID NO:14之胺基酸序列之HVR-L3。

在一態樣中，本發明提供一種抗CD22抗體，其包含：
(a)包含SEQ ID NO:2之胺基酸序列之HVR-H1；(b)包含SEQ ID NO:4之胺基酸序列之HVR-H2；(c)包含SEQ ID NO:6之胺基酸序列之HVR-H3；(d)包含選自SEQ ID NO:9、10、19、20、21、22、23之胺基酸序列之HVR-L1；(e)包含SEQ ID NO:12之胺基酸序列之HVR-L2；及包含SEQ ID NO:14之胺基酸序列之HVR-L3。在一些實施例中，本發明進一步提供選定為HVR-L1之胺基酸序列SEQ ID NO:9、10、19、20、21、22或23係藉由N30A或N30Q胺基酸改變來修飾。

在一態樣中，本發明提供一種包括包含SEQ ID NO:16之重鏈可變域之抗CD22抗體(參見圖2A，h10F4v1)。在一態樣中，本發明提供一種包括包含SEQ ID NO:17之輕鏈可變域之抗CD22抗體(參見圖2B，h10F4v1)。在一態樣中，本發明提供一種包括包含SEQ ID NO:18之輕鏈可變域之抗CD22抗體(參見圖2B，h10F4v3)。

在一態樣中，本發明提供一種包括包含SEQ ID NO:34之重鏈之抗CD22抗體(參見圖2A，m10F4)。在一態樣中，本發明提供一種包括包含SEQ ID NO:35之輕鏈之抗CD22抗體(參見圖2B，m10F4)。

在一態樣中，本發明提供一種包含1、2、3、4、5或6個藉由以ATCC沈積之融合瘤產生之抗體10F4.4.1的HVR序列

且具有寄存編號PTA-7621之抗CD22抗體。

在一態樣中，本發明提供一種包含1、2、3、4、5或6個藉由以ATCC沈積之融合瘤產生之抗體5E8.1.8的HVR序列且具有寄存編號PTA-7620之抗CD22抗體。

抗CD22抗體可包含任何適合框架可變域序列，其限制條件為抗體保持結合CD22之能力。舉例而言，在一些實施例中，本發明之抗CD22抗體包含人類亞群III重鏈框架一致序列。在該等抗體之一實施例中，重鏈框架一致序列包含在位置71、73及/或78處之取代。在該等抗體之一實施例中，位置71為A，位置73為T，及/或位置78為A。在一實施例中，該等抗體包含huMAb4D5-8之重鏈可變域框架序列，例如，SEQ ID NO:1、3、5、7(分別為FR-H1、FR-H2、FR-H3、FR-H4)。huMAb4D5-8在商業上稱作HERCEPTIN[®]抗HER2抗體，Genentech, Inc., South San Francisco, CA, USA；在美國專利第6,407,213號及第5,821,337號及Lee等人，J. Mol. Biol. (2004), 340(5):1073-93中亦提及。在一此實施例中，該等抗體進一步包含人類I輕鏈框架一致序列。在一此實施例中，該等抗體包含huMAb4D5-8之輕鏈可變域框架序列，例如SEQ ID NO:8、1、13、15(分別為FR-L1、FR-L2、FR-L3、FR-L4)。

在一實施例中，抗CD22抗體包括包含框架序列之重鏈可變域及高變區，其中該框架序列分別包含FR-H1-FR-H4序列SEQ ID NO:1、3、5及7；HVR H1包含SEQ ID NO:2之胺基酸序列；HVR-H2包含SEQ ID NO:4之胺基酸序列；且

HVR-H3包含選自SEQ ID NO:6之胺基酸序列。在一實施例中，抗CD22抗體包括包含框架序列之輕鏈可變域及高變區，其中該框架序列分別包含SEQ ID NO:8、11、13及15之FR-L1-FR-L4序列；HVR-L1包含選自SEQ ID NO:9、10、19、20、21、22及23之胺基酸序列，其中SEQ ID NO:9-10或19-23之任一者可包含N30A或N30Q胺基酸改變；HVR-L2包含SEQ ID NO:12之胺基酸序列；且HVR-L3包含SEQ ID NO:14之胺基酸序列。在該等抗體之一實施例中，重鏈可變域包含SEQ ID NO:16且輕鏈可變域包含SEQ ID NO:17或18。

在一些實施例中，本發明提供一種包含重鏈可變域之抗CD22抗體，其中該重鏈可變域包含與胺基酸序列SEQ ID NO:16具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性的胺基酸序列。在一些實施例中，相對於參照序列，具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性之胺基酸序列含有取代、插入或缺失，但包含彼胺基酸序列之抗體保持與CD22結合之能力。在一些實施例中，在序列SEQ ID NO:16中，總共1至10個胺基酸已經取代、插入或缺失。在一些實施例中，取代、插入或缺失發生於HVR外之區域中(亦即，在FR中)。在一些實施例中，抗CD22抗體包括包含選自SEQ ID NO:16之胺基酸序列之重鏈可變域。

在一些實施例中，本發明提供一種包含如下所述之重鏈

可變域之抗CD22抗體。

1 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val
Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
Gly Tyr Glu Phe Ser Arg Ser Trp Met Asn Trp Val Arg
Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Arg Ile
Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Ser Gly Lys Phe
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser
Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Ser Ser Trp
Asp Trp Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
Thr Val Ser Ser 113(SEQ ID NO:16)(HVR殘基加底
線)。

在一些實施例中，重鏈HVR及FR序列包含以下：

HVR-H1(Gly Tyr Glu Phe Ser Arg Ser Trp Met Asn, SEQ ID
NO:2)

HVR-H2(Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr
Ser Gly Lys Phe Lys Gly, SEQ ID NO:4)

HVR-H3(Asp Gly Ser Ser Trp Asp Try Tyr Phe Asp Tyr,
SEQ ID NO:6)

FR-H1(Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val
Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser, SEQ
ID NO:1)

FR-H2(Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
Val, SEQ ID NO:3)

FR-H3(Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr
Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala
Val Tyr Tyr Cys Ala Arg, SEQ ID NO:5)

FR-H4(Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser, SEQ
ID NO:7)

在一些實施例中，本發明提供一種包含如下所述之輕鏈
可變域之抗CD22抗體。

1 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala
Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser
Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Phe Leu Glu
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu
Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Ser
Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu
Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gln Phe Pro Tyr Thr Phe Gly
Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg 108(SEQ ID
NO:17)(HVR殘基加底線且位置N28為粗體類型)

或

1 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala
Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser
Gln Ser Ile Val His Ser Val Gly Asn Thr Phe Leu Glu
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu
Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Ser
Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu

Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gln Phe Pro Tyr Thr Phe Gly
Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg 108(SEQ ID
NO:18)(HVR殘基加底線且位置N28V為粗體類型)。

在一些實施例中，輕鏈HVR序列包含以下：

HVR-L1(Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn
Thr Phe Leu Glu, SEQ ID NO:9)

HVR-L1(Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Val Gly Asn
Thr Phe Leu Glu, SEQ ID NO:10)

HVR-L1(Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Ala Gly Asn
Thr Phe Leu Glu, SEQ ID NO:19)

HVR-L1(Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Gln Gly Asn
Thr Phe Leu Glu, SEQ ID NO:20)

HVR-L1(Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Ser Gly Asn
Thr Phe Leu Glu, SEQ ID NO:21)

HVR-L1(Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asp Gly Asn
Thr Phe Leu Glu, SEQ ID NO:22)

HVR-L1(Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Ile Gly Asn
Thr Phe Leu Glu, SEQ ID NO:23)

HVR-L1(Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Ile Gly Ala
Thr Phe Leu Glu, SEQ ID NO:32)

HVR-L1(Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Ile Gly Gln
Thr Phe Leu Glu, SEQ ID NO:33)

HVR-L2(Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser, SEQ ID NO:12)

HVR-L3(Phe Gln Gly Ser Gln Phe Pro Tyr Thr, SEQ ID NO:14)。

在一些實施例中，輕鏈FR序列包含以下：

FR-L1(Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys, SEQ ID NO:8)；

FR-L2(Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr, SEQ ID NO:11)；

FR-L3(Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys, SEQ ID NO:13)

FR-L4(Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg, SEQ ID NO:15)。

在一態樣中，本發明提供一種包含輕鏈可變域之抗CD22抗體，其中該輕鏈可變域包含與選自SEQ ID NO:17或18之胺基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性的胺基酸序列。在一些實施例中，相對於參照序列，具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性之胺基酸序列含有取代、添加或缺失，但包含彼胺基酸序列之抗體保持與CD22結合之能力。在一些實施例中，在選自SEQ ID NO:17或18之序列中，總共1至10個胺基酸已經取代、插入或缺失。在一些實施例中，取代、插入或缺失發生於HVR外之區域中(亦即，在FR中)。在一些實施例中，抗CD22抗體包括包含選自SEQ ID

NO:17或18之胺基酸序列之輕鏈可變域。

在一態樣中，本發明提供一種抗CD22抗體，其包含(a)包含與選自SEQ ID NO:16之胺基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性之胺基酸序列的重鏈可變域；及(b)包含與選自SEQ ID NO:17或18之胺基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性的輕鏈可變域。在一些實施例中，相對於參照序列，具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性之胺基酸序列含有取代、添加或缺失，但包含彼胺基酸序列之抗體保持與CD22結合之能力。在一些實施例中，在參照序列中，總共1至10個胺基酸已經取代、插入或缺失。在一些實施例中，取代、插入或缺失發生於HVR外之區域中(亦即，在FR中)。在一些實施例中，抗CD22抗體包括包含選自SEQ ID NO:16之胺基酸序列之重鏈可變域及包含選自SEQ ID NO:18之胺基酸序列之輕鏈可變域。

在一態樣中，本發明提供一種抗CD22抗體，其包含(a)選自圖2A中展示之彼等VH HVR之一種、兩種或三種VH HVR及/或(b)選自圖2B中展示之彼等VL HVR之一種、兩種或三種VL HVR。在一態樣中，本發明提供一種抗CD22抗體，其包含選自圖2A中展示之彼等重鏈可變域之重鏈可變域及選自圖2B中展示之彼等輕鏈可變域之輕鏈可變域。

在一態樣中，本發明之抗CD22抗體包含1、2、3、4、5

或6個藉由以ATCC沈積之融合瘤產生且具有寄存編號PTA-7620之5E8.1.8抗體的高變區。

2. 抗體片段

本發明涵蓋抗體片段。抗體片段可藉由傳統方式(諸如酶消化)或藉由重組技術產生。在某些情形下，使用抗體片段而非使用整個抗體具有優勢。較小尺寸之片段容許迅速清除，且可產生對實體腫瘤接近之改良。關於某些抗體片段之概述，參見Hudson等人(2003) Nat. Med. 9:129-134。

已開發各種技術用於製備抗體片段。傳統上，該等片段係經由完整抗體之蛋白水解消化產生(參見(例如)Morimoto等人，Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117 (1992)；及Brennan等人，Science, 229:81 (1985))。然而，現可藉由重組宿主細胞直接產生該等片段。Fab、Fv及ScFv抗體片段均可表現於大腸桿菌中且由大腸桿菌分泌，因而易於產生大量該等片段。可自上文所論述之抗體噬菌體庫中分離抗體片段。或者，可直接自大腸桿菌回收Fab'-SH片段且使其化學偶合以形成F(ab')₂片段(Carter等人，Bio/Technology 10:163-167 (1992))。根據另一方法，可直接自重組宿主細胞培養物中分離F(ab')₂片段。包含補救受體結合抗原決定基殘基之具有增加之活體內半衰期的Fab及F(ab')₂片段描述於美國專利第5,869,046號中。熟練技術者應顯而易見用於製備抗體片段之其他技術。在某些實施例中，抗體為單鏈Fv片段(scFv)。參見WO

93/16185；美國專利第5,571,894號；及第5,587,458號。Fv及scFv為具有缺乏恆定區之完整結合位點之唯一物質；因此，在活體內用途中，其可適用於降低之非特異性結合。可建構scFv融合蛋白以在scFv之胺基或羧基末端處產生效應蛋白之融合。參見Antibody Engineering，Borrebaeck編，同上文。抗體片段亦可為"線性抗體"，例如，如美國專利第5,641,870號中所述。該等線性抗體可為單特異性或雙特異性。

3. 人類化抗體

本發明涵蓋人類化抗體。此項技術中已知用於人類化非人類抗體之各種方法。舉例而言，人類化抗體可具有一或多個自非人類來源引入其中之胺基酸殘基。該等非人類胺基酸殘基通常被稱作"引入"殘基，其通常取自"引入"可變域。人類化本質上可藉由取代人類抗體之相應序列之高變區序列，遵循Winter及合作者之方法(Jones等人(1986) *Nature* 321:522-525；Riechmann等人(1988) *Nature* 332:323-327；Verhoeyen等人(1988) *Science* 239:1534-1536)來進行。因此，該等"人類化"抗體為嵌合抗體(美國專利第4,816,567號)，其中大體上小於完整人類可變域之序列已經來自非人類物種之相應序列取代。實際上，人類化抗體通常為其中一些高變區殘基及可能一些FR殘基經來自齧齒動物抗體中類似位點之殘基取代的人類抗體。

用於製造人類化抗體之人類可變域(輕鏈與重鏈兩者)之選擇對於降低抗原性而言可為重要的。根據所謂"最適合"

方法，針對全部已知人類可變域序列庫篩檢齧齒動物抗體之可變域序列。隨後將最接近齧齒動物之序列之人類序列理解為人類化抗體之人類框架(Sims等人(1993) *J. Immunol.* 151:2296；Chothia等人(1987) *J. Mol. Biol.* 196:901)。另一方法使用來源於特定輕鏈或重鏈亞群之所有人類抗體之一致序列的特定框架。相同框架可用於若干不同之人類化抗體(Carter等人(1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285；Presta等人(1993) *J. Immunol.*, 151:2623)。

另外，通常需要經人類化而保持對抗原之高親和力及其它有利生物學特性的抗體。為達成此目的，根據一方法，藉由使用親本序列及人類化序列之三維模型分析親本序列及各種概念上之人類化產物的方法來製備人類化抗體。三維免疫球蛋白模型通常為可用的且為熟習此項技術者所熟知。電腦程式為可用的，其說明且顯示所選候選免疫球蛋白序列之可能三維構形結構。該等顯示之檢查容許分析殘基在候選免疫球蛋白序列機能中之可能作用，意即分析影響候選免疫球蛋白與其抗原結合之能力的殘基。以此方式，可選擇FR殘基，且將FR殘基與受體組合且輸入序列中使得達成所需抗體特性(諸如增加之對該(等)靶向抗原之親和力)。通常，高變區殘基係直接且大體上涉及影響抗原結合。

4. 人類抗體

可藉由將選自人類來源之噬菌體呈現庫之Fv純系可變域序列與如上所述之已知人類恆定域序列組合來建構本發明

之人類抗CD22抗體。或者，可藉由融合瘤法來製造本發明之人類單株抗CD22抗體。用於製備人類單株抗體之人類骨髓瘤及小鼠-人類雜骨髓瘤細胞株已由以下文獻描述，例如，Kozbor J. Immunol., 133: 3001 (1984)；Brodeur等人，Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications，第51-63頁(Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)；及Boerner等人，J. Immunol., 147: 86 (1991)。

現在有可能產生經免疫化後能夠在不存在內源性免疫球蛋白產生之情況下產生人類抗體之完全譜系的轉殖基因動物(例如小鼠)。舉例而言，已描述嵌合及生殖系突變體小鼠中抗體重鏈連接區(JH)基因的純合子缺失導致對於內源性抗體產生之完全抑制。將人類生殖系免疫球蛋白基因陣列轉移至該等生殖系突變體小鼠中將會在抗原激發後引起人類抗體之產生。參見(例如)Jakobovits等人，Proc. Natl. Acad. Sci USA, 90:2551 (1993)；Jakobovits等人，Nature, 362: 255 (1993)；Bruggermann等人，Year in Immunol., 7: 33 (1993)。

亦可使用基因改組以自非人類(例如齧齒動物)抗體得到人類抗體，其中該人類抗體具有與初始非人類抗體相似之親和力及特異性。根據此方法(亦稱為"抗原決定基印記")，以人類V域基因譜系置換藉由如本文中所述之噬菌體呈現技術獲得的非人類抗體片段之重鏈或輕鏈可變區，從而產生非人類鏈/人類鏈scFv或Fab嵌合體之群體。以抗原進行

選擇導致非人類鏈/人類鏈嵌合 scFv 或 Fab 之分離，其中該人類鏈恢復在移除原代噬菌體呈現純系中之相應非人類鏈時損壞的抗原結合位點，亦即抗原決定基決定(印記)對於人類鏈搭配物之選擇。當重複該過程以置換剩餘非人類鏈時，獲得人類抗體(參見 1993 年 4 月 1 日公開之 PCT WO 93/06213)。與藉由 CDR 移植進行之非人類抗體之傳統人類化不同，此技術提供不具有非人類來源之 FR 或 CDR 殘基的完整人類抗體。

5. 雙特異性抗體

雙特異性抗體為對至少兩種不同抗原具有結合特異性之單株抗體。在某些實施例中，雙特異性抗體為人類或人類化抗體。在某些實施例中，該結合特異性之一者係對於 CD22 且另一者係對於任何其他抗原。在某些實施例中，雙特異性抗體可與 CD22 之兩種不同之抗原決定基結合。雙特異性抗體亦可用以將細胞毒性劑限定於表現 CD22 之細胞中。該等抗體具有一 CD22 結合臂及一結合細胞毒性劑(諸如，沙泊寧(saporin)、抗干擾素- α 、長春花生物鹼、蓖麻毒素 A 鏈、甲胺喋呤或放射性同位素半抗原)之臂。可製備呈全長抗體或抗體片段形式之雙特異性抗體(例如，F(ab')₂ 雙特異性抗體)。

此項技術中已知用於製造雙特異性抗體之方法。傳統上，雙特異性抗體之重組製備係基於兩個免疫球蛋白重鏈-輕鏈對之共表現，其中該兩個重鏈具有不同之特異性(Milstein 及 Cuello, Nature, 305: 537 (1983))。由於免疫球

蛋白重鏈及輕鏈之隨機分類，該等融合瘤(四體瘤(quadroma))產生10種不同抗體分子之潛在混合物，其中僅一種具有正確雙特異性結構。通常藉由親和層析步驟進行之恰當分子的純化相當繁瑣，且產物產率低。類似程序揭示於1993年5月13日公開之WO 93/08829及Traunecker等人，EMBO J., 10:3655 (1991)中。

根據不同方法，將具有所需結合特異性之抗體可變域(抗體-抗原結合位點)融合於免疫球蛋白恆定域序列中。融合(例如)係與包含鉸鏈區、CH2及CH3區之至少部分之免疫球蛋白重鏈恆定域一起進行的。在某些實施例中，含有輕鏈結合所必需之位點之第一重鏈恆定區(CH1)係存在於至少一種融合體中。將編碼免疫球蛋白重鏈融合體及(必要時)免疫球蛋白輕鏈之DNA插入獨立表現載體中，且使其共轉染至適當宿主有機體中。在建構時使用不等比率之三種多肽鏈來提供最佳產率之實施例中，此在三種多肽片段的相互比例之調節中提供極大靈活性。然而，當以相等比率之至少兩種多肽鏈表現產生高產率或當該等比率並非特別重要時，有可能將兩種或所有三種多肽鏈之編碼序列插入一表現載體中。

在此方法之一實施例中，雙特異性抗體係由一臂中具有第一結合特異性之雜交免疫球蛋白重鏈及另一臂中之雜交免疫球蛋白重鏈-輕鏈對(提供第二結合特異性)組成。已發現由於免疫球蛋白輕鏈僅存在於一半雙特異性分子中提供一簡便之分離方式，因此此不對稱結構會促進所需雙特異

性化合物與不需之免疫球蛋白鏈組合之分離。此方法揭示於WO 94/04690中。關於產生雙特異性抗體之其他細節，參見(例如)Suresh等人，Methods in Enzymology, 121:210 (1986)。

根據另一方法，可設計一對抗體分子之間之界面以使自重組細胞培養物回收之異二聚體的百分比最大化。該界面包含抗體恆定域之至少一部分C_H3域。以此方法，以較大側鏈(例如酪胺酸或色胺酸)置換來自第一抗體分子界面之一或多個小胺基酸側鏈。藉由用小胺基酸側鏈(例如丙胺酸或蘇胺酸)置換大胺基酸側鏈而於第二抗體分子之界面上產生具有與大側鏈相同或類似的尺寸之補償性"空穴"。此提供一種使異二聚體之產量增加超過其它不需之最終產物(諸如均二聚體)的機制。

雙特異性抗體包括交聯或"雜接合物"抗體。舉例而言，雜接合物中抗體之一者可與抗生蛋白偶合，其它抗體與生物素偶合。例如，已建議該等抗體將免疫系統細胞靶向不需之細胞(美國專利第4,676,980號)，且用於治療HIV感染(WO 91/00360、WO 92/00373及EP 03089)。可使用任何便利之交聯方法來製造雜接合物抗體。適合交聯劑在此項技術中為熟知的，且揭示於美國專利第4,676,980號以及大量交聯技術中。

自抗體片段產生雙特異性抗體的技術已描述於文獻中。舉例而言，可使用化學鍵來製備雙特異性抗體。Brennan等人，Science, 229:81 (1985)描述其中完整抗體經蛋白水

解分裂以產生 $F(ab')_2$ 片段之程序。在二硫醇錯合劑亞砷酸鈉存在下還原該等片段以穩定鄰近二硫醇且防止分子間二硫化物形成。隨後，將所產生之 Fab' 片段轉化為硫代硝基苯甲酸鹽(TNB)衍生物。隨後藉由用巰基乙胺還原將一種 Fab' -TNB衍生物再轉化為 Fab' -硫醇，且使其與等莫耳量之另一種 Fab' -TNB衍生物混合以形成雙特異性抗體。所產生之雙特異性抗體可用作用於選擇性固定酶之試劑。

近來之發展已促進自大腸桿菌直接回收 Fab' -SH片段，該等片段可經化學偶合以形成雙特異性抗體。Shalaby等人，*J. Exp. Med.*, 175:217-225 (1992)描述完全人類化雙特異性抗體 $F(ab')_2$ 分子之產生。各 Fab' 片段係由大腸桿菌單獨地分泌且經受活體外定向化學偶合以形成雙特異性抗體。因此所形成之雙特異性抗體能夠與過度表現HER2受體之細胞及正常人類T細胞結合，且亦觸發人類細胞毒性淋巴細胞對人類乳房腫瘤標靶之溶解活性。

亦已描述直接由重組細胞培養物製造且分離雙特異性抗體片段之各種技術。舉例而言，已使用白胺酸拉鏈(leucine zipper)製備雙特異性抗體。Kostelny等人，*J. Immunol.*, 148(5):1547-1553 (1992)。藉由基因融合將來自Fos及Jun蛋白之白胺酸拉鏈肽與兩種不同抗體之 Fab' 部分連接。在鉸鏈區還原抗體均二聚體以形成單體，且隨後使其再氧化以形成抗體異二聚體。此方法亦可用於產生抗體均二聚體。Hollinger等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993)所述之"雙功能抗體"技術已提供一種

用於製造雙特異性抗體片段之替代性機制。該等片段包含藉由連接子連接至輕鏈可變域(VL)上之重鏈可變域(VH)，該連接子過短而使得同一鏈上之兩個域之間無法配對。因此，迫使一個片段之VH及VL域與另一片段之互補VL及VH域配對，進而形成兩個抗原結合位點。亦已報導藉由使用單鏈Fv(sFv)二聚體來製造雙特異性抗體片段之另一種策略。參見Gruber等人，J. Immunol., 152:5368 (1994)。

涵蓋大於二價之抗體。舉例而言，可製備三特異性抗體。Tutt等人，J. Immunol. 147:60 (1991)。

6. 多價抗體

可藉由表現與抗體結合之抗原的細胞比二價抗體更快地內化(及/或異化)多價抗體。本發明之抗體可為具有三個或三個以上抗原結合位點之多價抗體(其與IgM種類之抗體不同)(例如四價抗體)，該等多價抗體可易於由編碼抗體多肽鏈之核酸的重組表現來製備。多價抗體可包含二聚化域及三個或三個以上抗原結合位點。在某些實施例中，該二聚化域包含一Fc區或一鉸鏈區(或由一Fc區或一鉸鏈區組成)。在此情形下，抗體將包含一Fc區及在該Fc區之胺基末端之三或三個以上抗原結合位點。在某些實施例中，多價抗體包含3個至約8個抗原結合位點(或由3個至約8個抗原結合位點組成)。在一此實施例中，多價抗體包含4個抗原結合位點(或由4個抗原結合位點組成)。多價抗體包含至少一個多肽鏈(例如，兩個多肽鏈)，其中該(等)多肽鏈包含兩個或兩個以上可變域。舉例而言，該(等)多肽鏈可

包含 VD1-(X1)_n-VD2-(X2)_n-Fc，其中 VD1 為一第一可變域，VD2 為一第二可變域，Fc 為 Fc 區之一多肽鏈，X1 及 X2 表示胺基酸或多肽，且 n 為 0 或 1。舉例而言，該(等)多肽鏈可包含：VH-CH1-可撓性連接子-VH-CH1-Fc 區鏈；或 VH-CH1-VH-CH1-Fc 區鏈。本文中多價抗體可進一步包含至少兩個(例如，四個)輕鏈可變域多肽。本文中多價抗體可(例如)包含約兩個至約八個輕鏈可變域多肽。本文中所涵蓋之輕鏈可變域多肽包含一輕鏈可變域且視情形進一步包含一 CL 域。

7. 單域抗體

在一些實施例中，本發明之抗體為單域抗體。單域抗體為包含抗體之重鏈可變域之全部或一部分或輕鏈可變域之全部或一部分的單一多肽鏈。在某些實施例中，單域抗體為人類單域抗體(Domantis, Inc., Waltham, MA；參見(例如)美國專利第 6,248,516 B1 號)。在一實施例中，單域抗體係由抗體之重鏈可變域之全部或一部分組成。

8. 抗體變異體

在一些實施例中，涵蓋本文所述之抗體的胺基酸序列修飾。舉例而言，可需要改良抗體之結合親和力及/或其它生物學特性。抗體之胺基酸序列變異體可藉由將適當變化引入編碼抗體之核苷酸序列中或藉由肽合成來製備。該等修飾包括(例如)在抗體之胺基酸序列內殘基之缺失及/或插入及/或取代。可進行缺失、插入及取代之任何組合以達成最終構築體，其限制條件為該最終構築體具有所需特

性。可在製造序列時將胺基酸變化引入標的抗體胺基酸序列中。

如Cunningham及Wells (1989) Science, 244:1081-1085所述，用於鑑別作為突變誘發之較佳位置之抗體的某些殘基或區域之有用方法被稱作"丙胺酸掃描突變誘發"。在本文中，殘基或靶向殘基之基團經鑑別(例如，帶電荷之殘基，諸如arg、asp、his、lys及glu)且由中性或帶負電荷之胺基酸(例如，丙胺酸或聚丙胺酸)置換以實現胺基酸與抗原之相互作用。隨後藉由在取代位點處引入另外或其它變異體或引入另外或其它變異體作為取代位點來改進證實對取代功能性敏感之彼等胺基酸位置。因此，儘管已預定引入胺基酸序列變化之位點，但突變本身之性質無需預定。舉例而言，為分析指定位點處突變之效能，在靶向密碼子或區域處進行ala掃描或隨機突變誘發，且對所表現之免疫球蛋白篩檢所需活性。

胺基酸序列插入包括長度在一個殘基至含有100或更多殘基之多肽範圍內的胺基及/或羧基末端融合，以及單一或多個胺基酸殘基之序列間插入。末端插入之實例包括具有N末端甲硫胺醯基殘基之抗體。抗體分子之其它插入變異體包括抗體之N末端或C末端與酶(例如，用於ADEPT)或多肽之融合，其增加抗體之血清半衰期。

在某些實施例中，本發明之抗體經改變以增大或減小抗體糖基化之程度。多肽之糖基化作用通常為N-連接型或O-連接型。N-連接型係指碳水化合物部分附著於天冬醯胺酸

殘基之側鏈上。三肽序列天冬醯胺酸-X-絲胺酸及天冬醯胺酸-X-蘇胺酸(其中X為除脯胺酸之外的任何胺基酸)為用於使碳水化合物部分酶連接至天冬醯胺酸側鏈之識別序列。因此，多肽中該等三肽序列之任一者之存在產生潛在之糖基化位點。O-連接糖基化係指糖N-乙醯基胺基半乳糖、半乳糖或木糖中之一者連接至羥胺酸上，最普遍為絲胺酸或蘇胺酸，儘管亦可使用5-羥基脯胺酸或5-羥基離胺酸。

藉由改變胺基酸序列以使得上述三肽序列之一或多者(關於N-連接糖基化位點)產生或移除可便利地實現抗體之糖基化位點之添加或缺失。該改變亦可藉由原始抗體之序列之一或多個絲胺酸或蘇胺酸殘基(關於O-連接糖基化位點)的添加、缺失或取代來進行。

若抗體包含Fc區，則可改變與其連接之碳水化合物。舉例而言，在美國專利申請案第US 2003/0157108(Presta, L.)號中描述具有與抗體之Fc區連接之缺少海藻糖的成熟碳水化合物結構之抗體。亦參見US 2004/0093621(Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd)。Jean-Mairet 等人之WO 2003/011878及Umana等人之美國專利第6,602,684號中提及在與抗體之Fc區連接之碳水化合物中具有平分N-乙醯半乳糖(GlcNAc)之抗體。Patel等人之WO 1997/30087中報導在與抗體之Fc區連接之寡糖中具有至少一個半乳糖殘基的抗體。亦參見關於具有與其Fc區連接之經改變碳水化合物之抗體的WO 1998/58964(Raju, S.)及WO 1999/22764(Raju,

S.)。亦參見關於具有經修飾糖基化之抗原結合分子之US 2005/0123546(Umana等人)。

在某些實施例中，糖基化變異體包含一Fc區，其中與該Fc區連接之碳水化合物結構缺少海藻糖。該等變異體具有改良之ADCC功能。視情況而言，Fc區進一步包含進一步改良ADCC之其中一或多個胺基酸取代，例如在Fc區之位置298、333及/或334處(殘基之Eu編號)之取代。與"海藻糖基化不足"或"海藻糖缺乏"抗體有關之公開案的實例包括：US 2003/0157108；WO 2000/61739；WO 2001/29246；US 2003/0115614；US 2002/0164328；US 2004/0093621；US 2004/0132140；US 2004/0110704；US 2004/0110282；US 2004/0109865；WO 2003/085119；WO 2003/084570；WO 2005/035586；WO 2005/035778；WO 2005/053742；Okazaki等人，J. Mol. Biol. 336:1239-1249 (2004)；Yamane-Ohnuki等人，Biotech. Bioeng. 87:614 (2004)。產生海藻糖基化不足抗體之細胞株之實例包括蛋白海藻糖基化不足之Lec13 CHO細胞(Ripka等人，Arch. Biochem. Biophys. 249:533-545 (1986)；美國專利申請案第US 2003/0157108 A1號，Presta, L；及WO 2004/056312 A1, Adams等人，尤其實例11)，及基因剔除細胞株，諸如 α -1,6-海藻糖基轉移酶基因、FUT8、基因剔除CHO細胞(Yamane-Ohnuki等人，Biotech. Bioeng. 87:614 (2004))。

在一實施例中，抗體經改變以改良其血清半衰期。例

如，如US 5739277中所述，為增加抗體之血清半衰期，吾人可將補救受體結合抗原決定基併入抗體(尤其抗體片段)中。如本文中所使用，術語"補救受體結合抗原決定基"係指負責增加IgG分子之活體內血清半衰期之IgG分子的Fc區之抗原決定基(例如，IgG1、IgG2、IgG3或IgG4)(US 2003/0190311；US 6821505；US 6165745；US 5624821；US 5648260；US 6165745；US 5834597)。

另一類變異體為胺基酸取代變異體。該等變異體在抗體分子中具有至少一個經不同殘基置換之胺基酸殘基。所關注之取代突變誘發位點包括高變區，但亦涵蓋FR改變。保守性取代物係以標題"較佳取代物"展示於表1中。若該等取代物產生生物活性之合意改變，則可引入於表1中命名為"例示性取代物"或下文中關於胺基酸種類之進一步描述的更多實質變化且篩檢產物。

表1

原始殘基	例示性取代物	較佳取代物
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 ; 甘白胺酸	Leu

原始殘基	例示性取代物	較佳取代物
Leu(L)	甘白胺酸；Ile；Val；Met；Ala；Phe	Ile
Lys(K)	Arg；Gln；Asn	Arg
Met(M)	Leu；Phe；Ile	Leu
Phe(F)	Trp；Leu；Val；Ile；Ala；Tyr	Tyr
Pro(P)	Ala	Ala
Ser(S)	Thr	Thr
Thr(T)	Val；Ser	Ser
Trp(W)	Tyr；Phe	Tyr
Tyr(Y)	Trp；Phe；Thr；Ser	Phe
Val(V)	Ile；Leu；Met；Phe；Ala；甘白胺酸	Leu

抗體生物特性之大體上修飾係藉由選擇對維持以下作用的影響顯著不同之取代而達成：(a)取代區域中的多肽骨架之結構，例如呈片狀或螺旋狀構形；(b)在靶向位點處分子之電荷或疏水性；或(c)側鏈體積。胺基酸可根據其側鏈性質之類似性來分組(在A. L. Lehninger, Biochemistry中，第2版，第73-75頁，Worth Publishers, New York (1975))：

(1)非極性：Ala(A)、Val(V)、Leu(L)、Ile(I)、Pro(P)、Phe(F)、Trp(W)、Met(M)

(2)不帶電極性：Gly(G)、Ser(S)、Thr(T)、Cys(C)、Tyr(Y)、Asn(N)、Gln(Q)

(3)酸性：Asp(D)、Glu(E)

(4)鹼性：Lys(K)、Arg(R)、His(H)

或者，天然存在殘基可根據常見側鏈性質分為以下群組：

(1)疏水性：甘白胺酸、Met、Ala、Val、Leu、Ile；

(2)中性親水性：Cys、Ser、Thr、Asn、Gln；

(3)酸性：Asp、Glu；

(4)鹼性：His、Lys、Arg；

(5)影響鏈取向之殘基：Gly、Pro；

(6)芳族：Trp、Tyr、Phe。

非保守性取代將需要該等種類中之一者之成員與另一種類交換。亦可將該等經取代殘基引入保守性取代位點或剩餘(非保守性)位點中。

一類取代變異體涉及取代親本抗體(例如，人類化抗體或人類抗體)之一或多個高變區殘基。一般而言，相對於自其產生之親本抗體，選擇用於進一步研發之所得變異體應具有改進(例如，改良)生物學特性。一用於產生該等取代變異體之便利方式涉及使用噬菌體呈現之親和力成熟。簡言之，使若干高變區位點(例如，6-7個位點)突變以於各位點處產生所有可能之胺基酸取代。當融合於包裝於各絲狀噬菌體顆粒內之至少部分噬菌體鞘蛋白(例如，M13之基因III產物)時，呈現由該等顆粒因此產生之抗體。隨後對噬菌體呈現變異體篩檢其生物活性(例如結合親和力)。為識別用於修飾之候選高變區位點，可進行掃描突變誘發(丙胺酸掃描)以鑑別顯著有助於抗原結合之高變區殘基。另外或其它，其可有益於分析抗原-抗體複合物之結晶結構以識別抗體與抗原之間的接觸點。該等接觸殘基及相鄰殘基為根據此項技術中已知之技術(包括本文中詳細描述者)之取代候選物。在產生該等變異體後，使用此項技術

中已知之技術(包括本文中所述者)使變異體群體經受篩檢，且可在一或多個相關檢定中選擇具有優良特性之抗體以用於進一步發展。

編碼抗體之胺基酸序列變異體之核酸分子係由此項技術中已知之多種方法來製備。該等方法包括(但不限於)自天然來源分離(在天然存在胺基酸序列變異體之情況下)或藉由早期製備之抗體之變異體或非變異體形式的寡核苷酸介導(或定點)突變誘發、PCR突變誘發及盒式突變誘發來製備。

可需要將一或多個胺基酸修飾引入本發明之抗體之Fc區中，進而產生Fc區變異體。該Fc區變異體可包含在一或多個胺基酸位置處(包括銕鏈半胱胺酸之位置)包含胺基酸修飾(例如，取代)之人類Fc區序列(例如，人類IgG1、IgG2、IgG3或IgG4 Fc區)。

根據此描述及此項技術之教示，預期在一些實施例中，與野生型對應物抗體相比，例如在Fc區中，本發明之抗體可包含一或多種變化。然而，該等抗體將保持與其野生型對應物相比治療效用所需之大體上相同特性。舉例而言，例如，如WO 99/51642中所述，認為某些改變可在Fc區中進行，其會產生改變(亦即，改良或減小)之C1q結合及/或補體依賴性細胞毒性(CDC)。亦參見關於Fc區變異體之其他實例之Duncan及Winter，Nature 322:738-40 (1988)；美國專利第5,648,260號；美國專利第5,624,821號；及WO 94/29351。WO 00/42072(Presta)及WO 2004/056312

(Lowman)描述具有與FcR改良或減小之結合之抗體變異體。該等專利公開案之內容係以引用的方式特定併入本文中。亦參見Shields等人，J. Biol. Chem. 9(2): 6591-6604 (2001)。具有增加之半衰期及改良之與新生兒Fc受體(FcRn)之結合的抗體描述於US 2005/0014934 A1(Hinton等人)中，其中該抗體負責將母體IgG轉移至胎兒中(Guyer等人，J. Immunol. 117:587 (1976)及Kim等人，J. Immunol. 24:249 (1994))。該等抗體包含一其中具有一或多個取代之Fc區，其改良Fc區與FcRn之結合。具有改變之Fc區胺基酸序列及增加或降低之C1q結合能力之多肽變異體描述於美國專利第6,194,551B1號、WO 99/51642中。彼等專利公開案之內容係以引用的方式特定併入本文中。亦參見Idusogie等人，J. Immunol. 164: 4178-4184 (2000)。

在一態樣中，本發明提供在包含Fc區之Fc多肽之界面中包含修飾之抗體，其中該等修飾便利及/或促進異二聚化。該等修飾包含將隆凸引入第一Fc多肽中且將空穴引入第二Fc多肽中，其中該隆凸可定位於該空穴中以促進第一與第二Fc多肽之複合。用於產生具有該等修飾之抗體的方法已為此項技術中所知，例如，如美國專利第5,731,168號中所述。

9. 抗體衍生物

本發明之抗體可經進一步修飾以含有此項技術中已知且易於獲得之額外非蛋白部分。較佳地，適用於抗體衍生作用之部分為水溶性聚合物。水溶性聚合物之非限制性實例

包括(但不限於)聚乙二醇(PEG)、乙二醇/丙二醇共聚物、羧甲基纖維素、葡聚糖、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯啉酮、聚-1,3-二氧戊環、聚-1,3,6-三噁烷、乙烯/順丁烯二酸酐共聚物、聚胺基酸(均聚物或無規共聚物)，及葡聚糖或聚(n-乙烯吡咯啉酮)聚乙二醇、丙二醇均聚物、聚氧化丙烯/氧化乙烯共聚物、聚乙氧基化多元醇(例如甘油)、聚乙烯醇及其混合物。歸因於其在水中之穩定性，在製造時聚乙二醇丙醛可具有優勢。聚合物可為任何分子量，且可為分枝或未分枝的。與抗體連接之聚合物之數目可改變，且若連接一個以上聚合物，則其可為相同或不同分子。一般而言，用於衍生作用之聚合物之數目及/或類型可基於包括(但不限於)待改良抗體之特殊特性或功能、抗體衍生物是否將用於指定條件下之療法中等考慮而確定。

在另一實施例中，提供可藉由曝露至輻射中而選擇性加熱之抗體與非蛋白部分之接合物。在一實施例中，該非蛋白部分為碳奈米管(Kam等人，Proc. Natl. Acad. Sci. 102:11600-11605 (2005))。輻射可具有任何波長，且包括(但不限於)對一般細胞無害之波長，但該波長將非蛋白部分加熱至殺死臨近抗體-非蛋白部分之細胞的溫度。

製造抗體之某些方法

1. 某些基於融合瘤之方法

本發明之抗CD22單株抗體可使用融合瘤方法(最初由Kohler等人，Nature, 256:495 (1975)描述)製得，或可藉由重組DNA方法製得(美國專利第4,816,567號)。

在融合瘤法中，使小鼠或其它適當宿主動物(諸如倉鼠)免疫以誘發淋巴細胞，該淋巴細胞產生或能夠產生將與用於免疫之蛋白特異性結合的抗體。CD22抗體通常藉由在動物體內多次皮下(sc)或腹膜內(ip)注射CD22及佐劑而產生。CD22可使用此項技術中熟知之方法來製備，其中一些係於本文進一步描述。舉例而言，CD22可經重組製備。在一實施例中，以含有融合於免疫球蛋白重鏈之Fc區之CD22的細胞外部分之CD22衍生物使動物免疫。在一實施例中，以CD22-IgG1融合蛋白使動物免疫。在一實施例中，以於具有單磷醯脂質A(MPL)/海藻糖二黴菌酸酯(TDM)(Ribi Immunochem. Research, Inc., Hamilton, MT)之溶液中之CD22的免疫原性衍生物使動物免疫，且在多個位點處皮內注射該溶液。兩週後激發動物。7至14天後對動物放血，且檢定血清之抗CD22效價。激發動物直至效價平穩。

或者，可使淋巴細胞於活體外免疫。隨後使用諸如聚乙二醇之適合融合劑將淋巴細胞與骨髓瘤細胞融合以形成融合瘤細胞(Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 第59-103頁(Academic Press, 1986))。

使如此製備之融合瘤細胞於適合培養基(例如，含有一或多種抑制未融合親本骨髓瘤細胞生長或存活之物質的培養基)中接種且生長。舉例而言，若親本骨髓瘤細胞缺少酶次黃嘌呤鳥嘌呤磷酸核糖轉移酶(HGPRT或HPRT)，則融合瘤培養基通常會包括次黃嘌呤、胺基嘌呤及胸苷

(HAT培養基)，該等物質阻礙HGPRT不足之細胞的成長。

在某些實施例中，骨髓瘤細胞為有效融合，藉由所選擇之產生抗體之細胞支持抗體之穩定高含量產生，且對諸如HAT培養基之培養基敏感的彼等骨髓瘤細胞。例示性骨髓瘤細胞包括(但不限於)鼠骨髓瘤株，諸如由獲自Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California USA之MOPC-21及MPC-11小鼠腫瘤及獲自American Type Culture Collection, Rockville, Maryland USA之SP-2或X63-Ag8-653細胞衍生的彼等骨髓瘤細胞。人類骨髓瘤及小鼠-人類雜骨髓瘤細胞株亦已經描述用於製備人類單株抗體(Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984); Brodeur等人, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, 第51-63頁(Marcel Dekker, Inc., New York, 1987))。

融合瘤細胞生長於其中之培養基經檢定用於製備與CD22結合之單株抗體。由融合瘤細胞產生之單株抗體之結合特異性較佳係藉由免疫沈澱或藉由活體外結合檢定(諸如放射免疫檢定(RIA)或酶聯結免疫吸附劑分析法(ELISA))來測定。單株抗體之結合親和力可(例如)由Munson等人, Anal. Biochem., 107:220 (1980)之Scatchard分析來測定。

當融合瘤細胞經鑑別產生所要特異性、親和性及/或活性之抗體後，可藉由限制性稀釋程序對純系進行次選殖且使其在標準方法下生長(Goding, Monoclonal Antibodies:

Principles and Practice，第 59-103 頁 (Academic Press, 1986))。用於此目的之適合培養基包括 (例如) D-MEM 或 RPMI-1640 培養基。另外，融合瘤細胞可作為動物體內之腹水性腫瘤於活體內生長。藉由習知免疫球蛋白純化程序 (諸如蛋白 A-Sepharose、羥基磷灰石層析、凝膠電泳、透析或親和層析) 將由次純系分泌之單株抗體與培養基、腹水液體或血清適當分離。

2. 某些庫篩檢方法

可藉由使用組合庫以篩檢具有所需活性之抗體來製備本發明之抗 CD22 抗體。舉例而言，此項技術中已知用於產生噬菌體呈現庫且篩檢具有所需結合特性之該等抗體庫的多種方法。該等方法通常描述於 Hoogenboom 等人 (2001) 在 *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 中 (O'Brien 等人編，Human Press, Totowa, NJ)，且在某些實施例中，描述於 Lee 等人 (2004) *J. Mol. Biol.* 340:1073-1093 中。

原則上，藉由篩檢呈現融合於噬菌體鞘蛋白中之抗體可變區之各種片段 (Fv) 的含有噬菌體之噬菌體庫來選擇合成抗體純系。該等噬菌體庫係藉由對所需抗原進行親和層析而篩選得到。表現能夠與所需抗原結合之 Fv 片段的純系係經抗原吸附，且因此與庫中之非結合性純系分離。隨後由抗原溶離結合純系，且可藉由額外之抗原吸附/溶離循環進一步富集該等結合純系。可藉由以下步驟獲得本發明之任何抗 CD22 抗體：設計適合抗原篩檢程序以選定所關注之噬菌體純系，接著使用 Kabat 等人，*Sequences of*

Proteins of Immunological Interest, 第五版, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), 第1-3卷中描述之來自所關注噬菌體純系之Fv序列及適合恆定區(Fc)序列來建構全長抗CD22抗體純系。

在某些實施例中, 抗體之抗原結合域係由約110個胺基酸之兩個可變(V)區形成, 該兩個可變區各來自輕鏈(VL)及重鏈(VH), 二者皆呈現三個高變環(HVR)或互補判定區(CDR)。如 Winter 等人, Ann. Rev. Immunol., 12:433-455 (1994)中所述, 可變域可於噬菌體上功能性地呈現為其中 VH 及 VL 經由短、可撓性肽共價連接之單鏈 Fv(ScFv) 片段, 或呈現為其中各自融合於恆定域且非共價相互作用之 Fab 片段。如本文中所使用, 編碼噬菌體純系之 scFv 及編碼噬菌體純系之 Fab 統稱為 "Fv 噬菌體純系" 或 "Fv 純系"。

可藉由聚合酶鏈反應(PCR)單獨地選殖 VH 及 VL 基因譜系且將其隨機重組於噬菌體庫中, 隨後可如 Winter 等人, Ann. Rev. Immunol., 12:433-455 (1994)中所述尋求該等噬菌體文庫之抗原結合純系。來自已免疫來源之庫無需建構融合瘤即提供對免疫原具高親和力之抗體。或者, 如 Griffiths 等人, EMBO J, 12:725-734 (1993)中所述, 可選殖天然譜系以在無任何免疫作用之情形下提供對抗各種非自體抗原以及自體抗原之人類抗體的單一來源。最終, 如 Hoogenboom 及 Winter, J. Mol. Biol., 227:381-388 (1992)中所述, 亦可藉由自幹細胞選殖未經重排之 V 基因片段且使用含有隨機序列之 PCR 引子來編碼高度可變之 CDR3 區且

實現活體外重排而合成性製得天然庫。

在某些實施例中，使用絲狀噬菌體以藉由融合於微量鞘蛋白 pIII 來呈現抗體片段。抗體片段可呈現為單鏈 Fv 片段，其中 VH 與 VL 域係藉由可撓性多肽間隔基連接於同一多肽鏈上，例如如 Marks 等人，J. Mol. Biol., 222:581-597(1991)中所述；或呈現為 Fab 片段，其中一鏈融合於 pIII 上且另一鏈分泌進入細菌性宿主細胞周質內，其中藉由置換野生型鞘蛋白之一部分組裝變得呈現於噬菌體表面上的 Fab 鞘蛋白結構，例如如 Hoogenboom 等人，Nucl. Acids Res., 19: 4133-4137(1991)中所述。

一般而言，編碼抗體基因片段之核酸係獲自收集自人類或動物之免疫細胞。若需要偏利於抗 CD22 純系之庫，則以 CD22 使受檢者免疫以產生抗體反應，且回收脾細胞及/或循環 B 細胞其它周邊血液淋巴細胞(PBL)用於庫建構。在一較佳實施例中，偏重於抗 CD22 純系之人類抗體基因片段庫可藉由在攜有功能性人類免疫球蛋白基因陣列(且缺乏功能性內源性抗體產生系統)之轉殖基因小鼠中產生抗 CD22 抗體反應以使得 CD22 免疫引起 B 細胞產生抗 CD22 之人類抗體來獲得。製造人類抗體之轉殖基因小鼠之產生描述於下文中。

可藉由用以分離表現 CD22 特異性膜結合抗體之 B 細胞之適合篩檢程序，例如藉由使用 CD22 親和層析法之細胞分離或將細胞吸附於螢光染料標記之 CD22 上，接著流式活化細胞檢選(FACS)而獲得抗 CD22 反應細胞群體之額外富

集。

或者，使用來自未經免疫供體之脾細胞及/或B細胞或其它PBL提供可能抗體譜系的更佳代表，且亦容許使用其中CD22不具有抗原性的任何動物(人類或非人類)物種來建構抗體庫。對於併入活體外抗體基因建構中之庫而言，收集來自受檢者之幹細胞以提供編碼未經重排之抗體基因區段的核酸。所關注免疫細胞可自多種動物物種獲得，諸如人類、小鼠、大鼠、兔類、狼(lupine)、犬科、貓科、豬、牛、馬及鳥類物種等。

自所關注之細胞回收編碼抗體可變基因區段(包括VH及VL區段)的核酸並使其擴增。在重排VH及VL基因庫之情況下，如Orlandi等人，Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 86: 3833-3837 (1989)中所述，所需DNA可藉由將基因組DNA或mRNA與淋巴細胞分離，接著與匹配重排VH及VL基因之5'及3'端之引子進行聚合酶鏈反應(PCR)來獲得，進而得到用於表現之多種V基因譜系。如Orlandi等人(1989)及Ward等人，Nature, 341: 544-546 (1989)中所述，V基因可自cDNA及基因組DNA擴增，其中在編碼成熟V-域之外顯子之5'端處之後置引子及前置因子基於J區段內。然而，關於自cDNA擴增，如Jones等人，Biotechnol., 9: 88-89 (1991)中所述，後置引子亦可基於前導外顯子中，且如Sastry等人，Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 86: 5728-5732 (1989)中所述，前置引子在恆定區內。為使互補最大化，如Orlandi等人(1989)或Sastry等人(1989)中所述，簡并可併

入引子中。在某些實施例中，例如如 Marks 等人，*J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991)之方法中所述或如 Orum 等人，*Nucleic Acids Res.*, 21: 4491-4498 (1993)之方法中所述，藉由使用靶向各 V 基因家族之 PCR 引子使庫多樣性最大化以擴增免疫細胞核酸樣品中存在之所有可用 VH 及 VL 排列。關於將擴增 DNA 選殖入表現載體中，稀有限制位點可在一端處作為標記物(如 Orlandi 等人(1989)中所述)或藉由以標記引子之進一步 PCR 擴增(如 Clackson 等人，*Nature*, 352: 624-628 (1991)中所述)引入 PCR 引子中。

合成性重排之 V 基因譜系可於活體外來源於 V 基因區段。大部分人類 VH 基因區段已經選殖並測序(報導於 Tomlinson 等人，*J. Mol. Biol.*, 227: 776-798 (1992)中)，且繪圖(報導於 Matsuda 等人，*Nature Genet.*, 3: 88-94 (1993)中)；如 Hoogenboom 及 Winter，*J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992)中所述，該等選殖區段(包括 H1 及 H2 環之所有主要構形)可用於產生具有編碼多種序列及長度之 H3 環之 PCR 引子的多種 VH 基因譜系。如 Barbas 等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 4457-4461 (1992)中所述，亦可得到其中所有序列多樣性集中於單一長度之長 H3 環的 VH 譜系。人類 V κ 及 V λ 區段已經選殖且測序(報導於 Williams 及 Winter，*Eur. J. Immunol.*, 23: 1456-1461 (1993)中)且可用於產生合成輕鏈譜系。基於 VH 及 VL 折疊及 L3 及 H3 長度之範圍的合成 V 基因譜系應編碼相當大結構多樣性的抗體。在擴增編碼 V 基因之 DNA 後，可根據 Hoogenboom 及 Winter，

J. Mol. Biol., 227:381-388 (1992)之方法於活體外重排生殖系V基因區段。

可藉由以若干方式將VH及VL基因譜系組合在一起而建構抗體片段之譜系。各譜系可於不同載體中產生，且該等載體在活體外重組(例如，如Hogrefe等人，Gene, 128: 119-126 (1993)中所述)，或藉由組合注射(例如，Waterhouse等人，Nucl. Acids Res., 21: 2265-2266 (1993)中所述之loxP系統)在活體內重組。活體內重組方法利用Fab片段之兩鏈性質來克服有關由大腸桿菌轉化效率強加之庫大小的局限。天然VH及VL譜系係經單獨選殖，一者選殖入噬菌粒(phagemid)中且另一者選殖入噬菌體載體中。隨後，藉由噬菌體感染含有噬菌粒之細菌而使兩種庫組合，以使得每一細胞含有不同組合且庫大小僅受所存在之細胞數目(約 10^{12} 個純系)限制。兩種載體皆含有活體內重組信號以使得VH及VL基因重組於單一複製子上且共同包裹於噬菌體病毒粒子中。該等巨型庫提供大量具有良好親和力(K_d^{-1} 為約 10^{-8} M)之不同抗體。

或者，譜系可依序選殖入同一載體中，例如如Barbas等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 7978-7982 (1991)中所述；或藉由PCR裝配在一起且隨後選殖，例如如Clackson等人，Nature, 352: 624-628 (1991)中所述。亦可使用PCR裝配來使VH及VL DNA與編碼可撓性肽間隔基之DNA連接在一起以形成單鏈Fv(scFv)譜系。在另一技術中，如Embleton等人，Nucl. Acids Res., 20:3831-3837 (1992)中所

述，使用"細胞內PCR裝配"以藉由PCR使VH及VL基因組合於淋巴細胞內且隨後選殖連接基因之譜系。

如 Winter 等人(1994)(同上文)所述，由天然庫產生之抗體(天然或合成)可具有適度親和力(K_d^{-1} 為約 10^6 至 10^7 M^{-1})，但亦可藉由建構次級庫且從中進行再選擇而於活體外模擬親和力成熟。舉例而言，可藉由使用 Hawkins 等人，J. Mol. Biol., 226: 889-896 (1992)之方法中或 Gram 等人，Proc. Natl. Acad. Sci USA, 89: 3576-3580 (1992)之方法中之易誤聚合酶(報導於 Leung 等人，Technique, 1: 11-15 (1989)中)在活體外隨機產生突變。另外，亦可(例如)用載運跨越所關注CDR之隨機序列的引子使用PCR在所選個別Fv純系中隨機突變一或多個CDR且篩檢具有較高親和力之純系，藉此進行親和力成熟。WO 9607754(於1996年3月14日公開)描述一種用於誘導免疫球蛋白輕鏈之互補判定區突變誘發以建立輕鏈基因庫的方法。另一有效方法係使藉由噬菌體呈現選擇之VH或VL域與獲自未經免疫之供體之天然存在V域變異體的譜系重組，且於若干回合的鏈改組中篩檢具有較高親和力者，如 Marks 等人，Biotechnol., 10:779-783 (1992)中所述。此技術容許具有約 10^{-9} M或更小之親和力之抗體及抗體片段的產生。

可由此項技術中已知之各種技術來實現庫之篩檢。舉例而言，CD22可用於塗覆吸附板之孔，其表現於附著於吸附板上之宿主細胞上或用於細胞分類中，或接合至生物素上以捕捉經抗生蛋白鏈菌素塗覆之珠粒，或用於篩選噬菌

體呈現庫之任何其他方法中。

在適用於使噬菌體粒子之至少一部分與吸附劑結合之條件下將噬菌體庫樣品與固定CD22接觸。通常，選定條件(包括pH值、離子強度、溫度及其類似條件)以模擬生理條件。將與固相結合之噬菌體洗滌且隨後由酸溶離，例如如Barbas等人，Proc. Natl. Acad. Sci USA, 88: 7978-7982 (1991)中所述；或由鹼溶離，例如如Marks等人，J. Mol. Biol., 222: 581-597 (1991)中所述；或藉由CD22抗原競爭溶離，例如以與Clackson等人，Nature, 352: 624-628 (1991)之抗原競爭方法類似之程序。噬菌體在單個選擇回合中可富集20-1,000倍。此外，富集之噬菌體可於細菌培養物中生長且經受其他回合之選擇。

選擇效率視許多因素而定，包括洗滌期間之解離動力學及單一噬菌體上之多個抗體片段是否能同時與抗原接合。可藉由使用短時間洗滌、多價噬菌體呈現及於固相中之高抗原塗覆密度而保留具有快速解離動力學(及弱結合親和力)之抗體。高密度不僅經由多價相互作用穩定噬菌體，且亦易使已解離之噬菌體再結合。可藉由使用長時間洗滌及單價噬菌體呈現(如Bass等人，Proteins, 8: 309-314 (1990)及WO 92/09690中所述)及低抗原塗覆密度(如Marks等人，Biotechnol., 10: 779-783 (1992)中所述)來促進具有慢解離動力學(及良好結合親和力)之抗體之選擇。

有可能在對CD22具有不同親和力之噬菌體抗體(即使具有略微不同之親和力)之間進行選擇。然而，所選抗體之

隨機突變(例如，如以一些親和力成熟技術進行的突變)可能產生多種突變體，其中大部分與抗原結合，且較少部分具有較高親和力。經由限制CD22，可淘汰稀有高親和力噬菌體。為保持所有較高親和力突變體，可將噬菌體以過量經生物素標記之CD22培養，但其中經生物素標記之CD22具有比CD22之標靶莫耳濃度親和力常數低之莫耳濃度的濃度。隨後可由經抗生蛋白鏈菌素塗覆之順磁珠粒捕捉高親和力結合之噬菌體。此"平衡捕捉"容許根據抗體之結合親和力選擇抗體，其中敏感性容許具有僅兩倍高之親和力的突變體純系與具有較低親和力之大量過量噬菌體分離。亦可操控用於洗滌與固相結合之噬菌體的條件以基於解離動力學相區分。

抗CD22純系可根據活性選擇。在某些實施例中，本發明提供與天然表現CD22之活細胞結合的抗CD22抗體。在一實施例中，本發明提供阻斷CD22配位體與CD22之間之結合但不阻斷CD22配位體與第二蛋白之間之結合的抗CD22抗體。對應於該等抗CD22抗體的Fv純系可藉由如下步驟選擇：(1)如上所述自噬菌體庫中分離抗CD22純系，且視情況藉由在適當細菌宿主中培養該群體來擴增噬菌體純系之分離群體；(2)針對分別需要阻斷活性及非阻斷活性來選擇CD22及第二蛋白；(3)將抗CD22噬菌體純系吸附於固定CD22上；(4)使用過量第二蛋白溶離可識別與第二蛋白之結合決定子重疊或共用之CD22結合決定子的任何不需純系；及(5)溶離步驟(4)之後仍保持吸附的純系。視情

況，可藉由將本文中所述之選擇程序重複一或多次而進一步富集具有所需阻斷/非阻斷特性之純系。

使用習知程序(例如藉由使用經設計以自融合瘤或噬菌體DNA模板特異性擴增所關注之重鏈及輕鏈編碼區的寡核苷酸引子)易於將編碼本發明之融合瘤衍生之單株抗體或噬菌體呈現Fv純系的DNA分離且測序。分離後可將DNA置於表現載體中，隨後將該等表現載體轉染至不會另外產生免疫球蛋白之宿主細胞(諸如大腸桿菌細胞、猿COS細胞、中國倉鼠卵巢(CHO)細胞或骨髓瘤細胞)中，以於重組宿主細胞中獲得所需單株抗體之合成。關於編碼抗體之DNA之細菌中重組表現之評論文章包括 Skerra 等人，Curr. Opinion in Immunol., 5: 256 (1993)及 Pluckthun, Immunol. Revs, 130: 151 (1992)。

編碼本發明之Fv純系之DNA可與編碼重鏈及/或輕鏈恆定區之已知DNA序列(例如適當DNA序列可獲自Kabat等人(同上文))組合以形成編碼全長或部分長度之重鏈及/或輕鏈的純系。應瞭解，為達成此目的可使用任何同型之恆定區(包括IgG、IgM、IgA、IgD及IgE恆定區)，且該等恆定區可獲自任何人類或動物物種。如本文中所使用之定義"嵌合"抗體及"雜交"抗體中包括來源於一動物(諸如人類)物種之可變域DNA且隨後融合於另一動物物種之恆定區DNA中以形成"雜交"編碼序列(全長重鏈及/或輕鏈)的Fv純系。在某些實施例中，來源於人類可變DNA之Fv純系係融合於人類恆定區DNA中以形成全長或部分長度之人類重鏈及/或

輕鏈的編碼序列。

編碼本發明之來源於融合瘤之抗CD22抗體的DNA亦可(例如)藉由用人類重鏈恆定域及輕鏈恆定域之編碼序列取代獲自融合瘤純系的同源鼠序列來經修飾(例如,用Morrison等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6851-6855 (1984)之方法)。可藉由共價連接至免疫球蛋白編碼序列全部或非免疫球蛋白多肽之編碼序列之部分來進一步修飾編碼融合瘤或Fv純系衍生之抗體或片段的DNA。以此方式,製備具有本發明之Fv純系或融合瘤純系衍生之抗體的結合特異性之"嵌合"或"雜交"抗體。

3. 載體、宿主細胞及重組方法

為重組產生本發明之抗體,將編碼該抗體之核酸分離且插入可複製載體中以用於進一步選殖(DNA之擴增)或表現。編碼該抗體之DNA易於分離,且易於使用習知程序(例如,藉由使用能夠與編碼該抗體之重鏈及輕鏈之基因特異性結合的寡核苷酸探針)來測序。多種載體均可用。載體之選擇部分地視所使用之宿主細胞而定。一般而言,宿主細胞為原核或真核(通常為哺乳動物)來源。應瞭解,為達成此目的可使用任何同型之恆定區(包括IgG、IgM、IgA、IgD及IgE恆定區),且該等恆定區可獲自任何人類或動物物種。

使用原核宿主細胞產生抗體:

載體建構

可使用標準重組技術獲得編碼本發明之抗體之多肽組份

的聚核苷酸序列。可自產生抗體之細胞(諸如融合瘤細胞)中分離所需聚核苷酸序列並進行測序。或者,可使用核苷酸合成器或PCR技術合成聚核苷酸。在獲得編碼多肽之序列後,將其插入能夠在原核宿主中複製並表現異源聚核苷酸之重組載體中。出於本發明之目的可使用可用且為此項技術中所知之多種載體。對於適當載體之選擇將主要視插入載體中之核酸分子的尺寸及經載體轉化之特定宿主細胞而定。各載體視其功能(異源聚核苷酸之擴增或表現,或二者)及其與其所滯留之特定宿主細胞的相容性而含有各種組份。載體組份通常包括(但不限於):複製起點、選擇標記基因、啟動子、核糖體結合位點(RBS)、信號序列、異源核酸插入子及轉錄終止序列。

一般而言,使用與該等宿主有關之含有複製子及來源於與宿主細胞相容之物種之控制序列的質體載體。該載體一般具有複製位點,以及能夠於經轉型細胞中提供表型選擇之標記序列。舉例而言,大腸桿菌通常使用pBR322(來源於大腸桿菌物質之質體)轉型。pBR322含有編碼安比西林(ampicillin)(Amp)及四環素(Tet)抗性之基因且因此提供易於識別經轉型細胞之方法。pBR322、其衍生物或其他微生物質體或噬菌體亦可含有或經修飾以含有啟動子,其可由微生物有機體用於表現內源性蛋白。用於表現特定抗體之pBR322衍生物之實例詳細描述於Carter等人,美國專利第5,648,237號中。

另外,與該等宿主有關之含有複製子及可與宿主微生物

相容之控制序列的噬菌體載體亦可用作轉化載體。舉例而言，諸如 λ GEM.TM.-11之噬菌體可用於製造可用於轉型易感宿主細胞(諸如大腸桿菌LE392)之重組載體。

本發明之表現載體可包含兩種或兩種以上編碼每一多肽組份之啟動子-順反子對。啟動子為位於調節其表現之順反子上游(5')之未經轉譯調節序列。原核啟動子通常分為兩類，亦即誘導型及組成型。誘導型啟動子為在其回應培養條件改變(例如養分之存在與否或溫度之改變)之控制下啟始順反子之轉錄量增加的啟動子。

大量由多種潛在宿主細胞所識別之啟動子已為吾人所熟知。藉由經由限制酶消化自源DNA移除所選擇之啟動子且將所分離之啟動子序列插入本發明之載體中可使該啟動子可操作性連接至編碼輕鏈或重鏈之順反子DNA上。天然啟動子序列與多種異源啟動子可用於引導靶向基因之擴增及/或表現。在一些實施例中，因與天然靶向多肽啟動子相比，異源啟動子通常容許所表現之靶向基因較快地轉錄且具有較高產量而得以利用。

適於與原核宿主一起使用之啟動子包括PhoA啟動子、 β -半乳糖苷酶及乳糖啟動子系統、色胺酸(trp)啟動子系統及雜合啟動子(諸如tac或trc啟動子)。然而，在細菌中起作用之其它啟動子(諸如其它已知之細菌或噬菌體啟動子)亦適用。其核苷酸序列已公開，藉此熟練工人能夠使用連接子或轉接器將其可操作性連接至編碼標靶輕鏈及重鏈之順反子上(Siebenlist等人(1980) Cell 20: 269)以提供任何所需限

制位點。

在本發明之一態樣中，重組載體內之每一順反子均包含引導所表現之多肽跨膜轉位之分泌型信號序列組份。一般而言，信號序列可為載體之組份，或其可為插入載體中之靶向多肽DNA的部分。出於本發明之目的選擇之信號序列應為由宿主細胞識別且加工(亦即，由信號肽酶裂解)者。對於不識別且加工異源多肽之天然信號序列的原核宿主細胞而言，信號序列係經(例如)選自由以下物質組成之群之原核信號序列取代：鹼性磷酸酶、青黴素酶(penicillinase)、Ipp或熱穩定腸毒素II(STII)前導序列、LamB、PhoE、PelB、OmpA及MBP。在本發明之一實施例中，用於表現系統之兩種順反子中之信號序列為STII信號序列或其變異體。

在另一態樣中，根據本發明之免疫球蛋白的製備可發生於宿主細胞之細胞質中，且因此無需每一順反子內均存在分泌型信號序列。就此點而言，免疫球蛋白之輕鏈及重鏈係在細胞質內經表現、折疊且組裝以形成功能性免疫球蛋白。某些宿主菌株(例如，大腸桿菌trxB-菌株)提供易於形成二硫鍵之細胞質條件，藉此容許適當折疊且組裝所表現之蛋白次單元。Proba及Pluckthun, Gene, 159:203 (1995)。

亦可藉由使用其中可調節所表現之多肽組份之數量比率以最大化所分泌及經適當組裝之本發明之抗體產量的表現系統來產生本發明之抗體。此調節至少部分係藉由同時調節多肽組份之轉譯強度來實現。

用於調節轉譯強度之一技術揭示於Simmons等人，美國

專利第 5,840,523 號中。其在順反子內利用轉譯起始區 (TIR) 之變異體。對於給定 TIR 而言，可產生具有多種轉譯強度之一系列胺基酸或核酸序列變異體，藉此提供一種用於關於特定鏈之所需表現量來調節此因素之便利方式。TIR 變異體可藉由習知突變誘發技術產生，其產生可改變胺基酸序列之密碼子改變。在某些實施例中，核苷酸序列之改變為沉默的。TIR 之變化可包括(例如) Shine-Dalgarno 序列之數目或間隔之變化，以及信號序列之變化。一種用於產生突變體信號序列之方法係在編碼序列之開始處產生 "密碼子庫 (codon bank)"，而不改變信號序列之胺基酸序列(亦即，改變為沉默的)。此可藉由改變每一密碼子之第三個核苷酸位置來實現；另外，一些胺基酸(諸如白胺酸、絲胺酸及精胺酸)具有多個第一及第二位置，此可增加用於製造該庫之複雜性。此突變誘發方法詳細描述於 Yansura 等人 (1992) METHODS: A Companion to Methods in Enzymol. 4:151-158 中。

在一實施例中，對於其中每一順反子產生具有多種 TIR 強度之一組載體。此有限組提供對於在各種 TIR 強度組合下每一鏈之表現量以及所需抗體產物之產量的比較。如 Simmons 等人，美國專利第 5,840,523 號中詳細描述，TIR 強度可藉由量化報導體基因之表現量來測定。根據轉譯強度比較，所需個別 TIR 經選定以組合於本發明之表現載體構築體中。

適於表現本發明之抗體之原核宿主細胞包括古細菌

(Archaeobacteria)及真細菌(Eubacteria)，諸如革蘭氏陰性(Gram-negative)或革蘭氏陽性有機體。有用細菌之實例包括埃希氏菌(*Escherichia*)(例如，大腸桿菌)、桿菌(*Bacilli*) (諸如枯草桿菌(*B. subtilis*))、腸內菌(*Enterobacteria*)、假單胞菌屬(*Pseudomonas species*)(例如綠膿桿菌)、鼠傷寒沙門桿菌(*Salmonella typhimurium*)、黏質沙雷氏菌(*Serratia marcescens*)、克雷伯氏菌(*Klebsiella*)、變形桿菌屬(*Proteus*)、志賀桿菌屬(*Shigella*)、根瘤菌(*Rhizobia*)、透明顫菌(*Vitreoscilla*)或副球菌(*Paracoccus*)。在一實施例中，使用革蘭氏陰性細胞。在一實施例中，大腸桿菌細胞係用作本發明之宿主。大腸桿菌菌株之實例包括菌株 W3110(Bachmann, Cellular and Molecular Biology, 第2卷(Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1987), 第1190-1219頁; ATCC Deposit第27,325號)及其衍生物，其包括具有基因型 W3110 Δ fhuA (Δ tonA) ptr3 lac Iq lacL8 Δ ompT Δ (nmpc-fepE) degP41 kanR之菌株33D3(美國專利第5,639,635)。其他菌株及其衍生物(諸如大腸桿菌294(ATCC 31,446)、大腸桿菌B、大腸桿菌 λ 1776(ATCC 31,537)及大腸桿菌RV308(ATCC 31,608))亦為適合的。該等實例為說明性而非限制性的。用於建構任何上述具有已定義基因型之細菌之衍生物的方法已為此項技術中已知，且描述於(例如)Bass等人，Proteins, 8:309-314 (1990)中。通常需要考慮複製子在細菌細胞中之可複製性來選擇適當細菌。舉例而言，當使用熟知質體(諸如 pBR322、

pBR325、pACYC177或pKN410)來供應複製子時，大腸桿菌、紅色桿菌屬(*Serratia*)或沙門氏菌(*Salmonella*)屬可適用作宿主。通常宿主細胞應分泌極少量蛋白水解酶，且可能需要將額外蛋白酶抑制劑併入細胞培養物中。

抗體製備

將宿主細胞以上述表現載體轉型且培養於經適當修飾之習知營養培養基中以用於誘導啟動子、選擇轉化株或擴增編碼所需序列之基因。

轉型意謂將DNA引入原核宿主中以使得DNA可作為染色體外成分或由染色體要素複製。視所使用之宿主細胞而定，使用適於該等細胞之標準技術進行轉型。使用氯化鈣進行之鈣處理通常用於含有大體上細胞壁障壁之細菌細胞。另一轉型方法使用聚乙二醇/DMSO。所使用之另一技術為電穿孔。

用於產生本發明之多肽之原核細胞係生長於此項技術中已知且適於培養所選擇之宿主細胞的培養基中。適合培養基之實例包括加有必需養分補充物之luria肉湯(LB)。在一些實施例中，培養基亦含有基於表現載體之建構而選擇之選擇劑，以選擇性地容許含有表現載體之原核細胞之生長。舉例而言，將安比西林添加至表現安比西林抗性基因之細胞的生長培養基中。

亦可包括單獨或作為與另一補充物或基質(諸如複合氮源)之混合物以適當濃度引入的除碳、氮及無機磷酸鹽來源之外的任何必需補充物。培養基視情況可含有一或多種

選自由以下物質組成之群的還原劑：麩胱甘肽、半胱胺酸、胱胺、硫乙醇酸酯、二硫赤藻糖醇及二硫蘇糖醇。

原核宿主細胞係在適合溫度下培養。在某些實施例中，對於大腸桿菌生長而言，生長溫度在約20°C至約39°C之範圍內；約25°C至約37°C之範圍內；或約30°C。主要視宿主有機體而定，培養基之pH值可為在約5至約9之範圍內之任何pH值。在某些實施例中，對於大腸桿菌而言，pH值為約6.8至約7.4，或約7.0。

若將誘導型啟動子用於本發明之表現載體中，則在適於活化啟動子之條件下誘導蛋白表現。在本發明之一態樣中，使用PhoA啟動子來控制多肽之轉錄。因此，將經轉型宿主細胞培養於磷酸鹽限制性培養基中用以誘導。在某些實施例中，該磷酸鹽限制性培養基為C.R.A.P培養基(參見(例如) Simmons等人，J. Immunol. Methods (2002), 263:133-147)。如此項技術中已知，可根據所使用之載體構築體來使用多種其它誘導子。

在一實施例中，將本發明之經表現多肽分泌入宿主細胞間質中且自其回收。蛋白回收通常涉及一般藉由如滲透壓衝擊、超音波處理或溶解之該等方式來分裂微生物。細胞經分裂後，可藉由離心或過濾來移除細胞碎片或整個細胞。可(例如)藉由親和樹脂層析來進一步純化蛋白。或者，可將蛋白轉運至培養基中並於其中進行分離。可將細胞自培養物中移出，並將培養物上層清液過濾且濃縮以進一步純化所產生之蛋白。可進一步分離所表現之多肽且使

用諸如聚丙烯醯胺凝膠電泳(PAGE)及西方墨點檢定之通常已知的方法加以識別。

在本發明之一態樣中，抗體製備係由醱酵法大量進行。各種大規模饋料分批醱酵程序可用於產生重組蛋白。大規模醱酵具有至少1,000公升之容量，且在某些實施例中為約1,000至100,000公升之容量。該等醱酵槽使用攪拌葉輪以分配氧及營養物，尤其葡萄糖(較佳碳/能源)。小規模醱酵通常係指在不大於約100公升之體積容量且可在約1公升至約100公升範圍內的醱酵槽中醱酵。

在醱酵過程中，通常在細胞已於適當條件下生長至所需密度(例如，OD550為約180至220)後啟始對蛋白表現之誘導，在此階段內細胞處於穩定期早期。如此項技術中已知且如上所述，可根據所使用之載體構築體來使用多種誘導子。可於誘導前使細胞生長較短時期。儘管可使用較長或較短之誘導時間，但細胞通常經誘導約12至50小時。

為改良本發明之多肽之產量及品質，可改變多種醱酵條件。舉例而言，為改良對於所分泌之抗體多肽之適當組裝及折疊，過度表現伴隨蛋白之額外載體可用於共轉型宿主原核細胞，其中該等伴隨蛋白諸如Dsb蛋白(DsbA、DsbB、DsbC、DsbD及/或DsbG)或FkpA(具有伴隨活性之肽基脯胺醯順反異構酶)。已證實伴隨蛋白會促進細菌宿主細胞中所產生之異源蛋白之適當折疊及溶解性。Chen等人(1999) J. Biol. Chem. 274:19601-19605；Georgiou等人，美國專利第6,083,715號；Georgiou等人，美國專利第

6,027,888號；Bothmann及Pluckthun (2000) J. Biol. Chem. 275:17100-17105；Ramm及Pluckthun (2000) J. Biol. Chem. 275:17106-17113；Arie等人(2001) Mol. Microbiol. 39:199-210。

為最小化經表現異源蛋白(尤其對於蛋白水解敏感者)之蛋白水解，缺失蛋白水解酶之某些宿主菌株可用於本發明。舉例而言，宿主細胞菌株可經修飾以實現編碼已知細菌蛋白酶(諸如蛋白酶III、OmpT、DegP、Tsp、蛋白酶I、蛋白酶Mi、蛋白酶V、蛋白酶VI及其組合)之基因的基因突變。一些缺乏大腸桿菌蛋白酶之菌株為可用的且描述於(例如)Joly等人(1998)，同上文；Georgiou等人，美國專利第5,264,365號；Georgiou等人，美國專利第5,508,192號；Hara等人，Microbial Drug Resistance, 2:63-72 (1996)中。

在一實施例中，將缺乏蛋白水解酶且經過度表現一或多種伴隨蛋白之質體轉型的大腸桿菌菌株用作本發明之表現系統中的宿主細胞。

抗體純化

在一實施例中，本文中所製備之抗體蛋白經進一步純化以獲得大體上均質之製劑以用於其它檢定及用途。可使用此項方法中已知之標準蛋白純化方法。以下程序為例示性適合純化程序：免疫親和性或離子交換管柱分餾、乙醇沈澱、逆相HPLC、矽石或陽離子交換樹脂(諸如DEAE)層析、層析聚焦、SDS-PAGE、硫酸銨沈澱及使用(例如)Sephadex G-75之凝膠過濾。

在一態樣中，將固定於固相上之蛋白A用於本發明之抗體產物的免疫親和純化。蛋白A為來自金黃色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 之41kD細胞壁蛋白，其以高親和力與抗體之Fc區結合。Lindmark等人(1983) *J. Immunol. Meth.* 62:1-13。蛋白A所固定之固相可為一包含一玻璃或矽石表面之管柱，或一受控孔玻璃管柱或一矽酸管柱。在一些應用中，管柱經諸如甘油之試劑塗覆以有可能防止污染物之非特異性附著。

作為純化之第一步驟，可將如上所述自細胞培養物衍生之製劑塗覆於固定蛋白A之固相上以容許所關注之抗體與蛋白A的特異性結合。隨後可將固相洗滌以移除與該固相非特異性結合之污染物。最後，藉由溶離自固相回收所關注之抗體。

使用真核宿主細胞產生抗體：

適用於真核宿主細胞之載體通常包括以下非限制性組份之一或多者：信號序列、複製起點、一或多個標記基因、強化子組份、啟動子及轉錄終止序列。

信號序列組份

適用於真核宿主細胞中之載體亦可含有在所關注成熟蛋白或多肽之N末端具有特定裂解位點的信號序列或其它多肽。所選擇之異源信號序列可為由宿主細胞識別且加工(亦即，由信號肽酶裂解)之異源信號序列。在哺乳動物細胞表現中，哺乳動物信號序列以及病毒分泌引導子(例如，單純疱疹gD信號)均可用。此前驅物區之DNA係於閱

讀框架內連接至編碼抗體之DNA上。

複製起點

通常，哺乳動物表現載體無需複製起點組份。舉例而言，由於SV40起點含有早期啟動子，故通常僅可使用該起點。

選擇基因組份

表現及選殖載體可含有選擇基因，亦稱為可選標記。典型選擇基因編碼蛋白，其(a)賦予對於抗生素或其它毒素(例如，安比西林、新黴素、甲胺喋呤或四環素)之抗性；(b)補充營養缺陷(若相關)；或(c)供應自複合培養基不可獲得之關鍵養分。

選擇流程之一實例利用藥物來停滯宿主細胞之生長。經異源基因成功轉型之彼等細胞產生賦予藥物抗性之蛋白且因此在選擇方案中存活。該等顯性選擇之實例使用藥物新黴素、黴酚酸及濕黴素(hygromycin)。

哺乳動物細胞之適合可選標記之另一實例係能識別可吸收抗體核酸之細胞者，諸如DHFR、胸苷激酶、金屬硫蛋白-I及金屬硫蛋白-II(較佳為靈長類動物金屬硫蛋白基因)、腺苷脫胺酶、鳥胺酸脫羧酶等。

舉例而言，在一些實施例中，首先藉由在含有甲胺喋呤(Mtx)(DHFR之競爭性拮抗劑)之培養基上培養所有轉化株來識別經DHFR選擇基因轉化之細胞。在一些實施例中，當使用野生型DHFR時，適當宿主細胞為缺乏DHFR活性之中國倉鼠卵巢(CHO)細胞株(例如ATCC CRL-9096)。