

或者，可藉由在含有用於可選標記(諸如胺基糖苷抗生素，例如康黴素(kanamycin)、新黴素或G418)之選擇劑的培養基中進行細胞生長來選擇經編碼抗體、野生型DHFR蛋白及另一可選標記(諸如胺基糖苷3'-磷酸轉移酶(APH))之DNA序列轉型或共轉型之宿主細胞(尤其含有內源性DHFR之野生型宿主)。參見美國專利第4,965,199號。

啟動子組份

表現及選殖載體通常含有由宿主有機體識別且可操作性連接至編碼所關注多肽(例如，抗體)之核酸的啟動子。已知真核細胞之啟動子序列。舉例而言，幾乎所有真核基因均具有位於轉錄起始位點上游約25至30個鹼基處的富AT區。另一序列測得自多種基因之轉錄起點上游的70至80個鹼基為CNCAAT區，其中N可為任何核苷酸。大部分真核基因之3'末端為AATAAA序列，其可為用於將聚A尾添加至編碼序列之3'末端的信號。在某些實施例中，任何或所有該等序列可經適當插入真核表現載體中。

自哺乳動物宿主細胞中載體之轉錄係(例如)藉由獲自病毒(諸如多瘤病毒、禽痘病毒、腺病毒(諸如腺病毒2)、牛乳頭狀瘤病毒、禽肉瘤病毒、細胞巨大病毒、反轉錄病毒、B型肝炎病毒及猿病毒40(SV40))基因組之啟動子；異源哺乳動物啟動子，例如肌動蛋白啟動子或免疫球蛋白啟動子；熱休克啟動子控制，其限制條件為該等啟動子與宿主細胞系統相容。

便利地獲得作為SV40限制片段之SV40病毒之早期及晚

期啟動子，其亦含有SV40病毒複製起點。便利地獲得作為HindIII E限制片段之人類細胞巨化病毒之即刻早期啟動子。使用牛乳頭狀瘤病毒作為載體於哺乳動物宿主中表現DNA之系統揭示於美國專利第4,419,446號中。對於此系統之修飾描述於美國專利第4,601,978號中。亦參見Reyes等人，Nature 297:598-601 (1982)，其描述在來自單純疱疹病毒之胸苷激酶啟動子之控制下人類 β -干擾素cDNA於小鼠細胞中之表現。或者，可將勞斯肉瘤病毒(Rous Sarcoma Virus)之長末端重複用作啟動子。

強化子元件組份

藉由更高級真核細胞轉錄編碼本發明之抗體的DNA通常係藉由將強化子序列插入載體中而增加。現已知來自哺乳動物基因(球蛋白、彈性蛋白酶、白蛋白、 α -胎蛋白及胰島素)之多種強化子序列。然而，吾人通常會使用來自真核細胞病毒之強化子。實例包括複製起點(bp 100-270)後側上之SV40強化子、細胞巨化病毒早期啟動子強化子、複製起點後側之多形瘤強化子及腺病毒強化子。亦參見描述用於活化真核啟動子之強化子組份的Yaniv, Nature 297:17-18(1982)。可將強化子剪接至載體中編碼抗體多肽之序列的5'或3'位置處，但其通常位於啟動子之5'位點處。

轉錄終止組份

用於真核宿主細胞中之表現載體亦可含有終止轉錄且穩定mRNA所必需之序列。該等序列通常可獲自真核或病毒DNA或cDNA之5'(及有時3')非轉譯區。該等區含有轉錄為

編碼抗體之mRNA之未經轉譯部分的多聚腺嘌呤化片段之核苷酸區段。一種有用之轉錄終止組份為牛生長激素多聚腺嘌呤化區。參見WO 94/11026及其中所揭示之表現載體。

宿主細胞之選擇及轉型

在本文中之載體中用於選殖或表現DNA之適合宿主細胞包括本文中所述之高級真核生物細胞，其包括脊椎動物宿主細胞。使脊椎動物細胞在培養物(組織培養物)中增殖已成為一種常規程序。有用之哺乳動物宿主細胞株之實例為經SV40轉型之猴腎CV1細胞株(COS-7、ATCC CRL 1651)；人類胚胎腎細胞株(經次選殖生長於懸浮培養物中之293或293細胞，Graham等人，J. Gen Virol. 36:59 (1977))；幼倉鼠腎細胞(BHK，ATCC CCL 10)；中國倉鼠卵巢細胞/-DHFR(CHO，Urlaub等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980))；小鼠塞托利細胞(sertoli cell)(TM4，Mather，Biol. Reprod. 23:243-251 (1980))；猴腎細胞(CV1 ATCC CCL 70)；美洲綠猴腎細胞(VERO-76、ATCC CRL-1587)；人類宮頸癌細胞(HELA、ATCC CCL 2)；犬科腎細胞(MDCK、ATCC CCL 34)；水牛鼠肝細胞(BRL 3A、ATCC CRL 1442)；人類肺細胞(W138、ATCC CCL 75)；人類肝細胞(Hep G2、HB 8065)；小鼠乳腺腫瘤(MMT 060562、ATCC CCL51)；TRI細胞(Mather等人，Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982))；MRC 5細胞；FS4細胞；及人類肝細胞瘤細胞株(Hep G2)。

用上述用於產生抗體之表現或選殖載體使宿主細胞轉型，並將其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。

培養宿主細胞

可將用於製備本發明之抗體之宿主細胞培養於多種培養基中。諸如Ham's F10(Sigma)、最低要求培養基((MEM), (Sigma)、RPMI-1640(Sigma)及杜貝卡氏經修飾依格培養基(Dulbecco's Modified Eagle's Medium)((DMEM), Sigma)之市售培養基適於培養宿主細胞)。另外，該等培養基之任一者描述於Ham等人，Meth. Enz. 58:44 (1979)；Barnes等人，Anal. Biochem. 102:255 (1980)；美國專利第4,767,704號；第4,657,866號；第4,927,762號；第4,560,655號；或第5,122,469號；WO 90/03430；WO 87/00195中；或美國專利Re. 30,985可用作宿主細胞之培養基。任何該等培養基均可視需要補充激素及/或其它生長因子(諸如胰島素、運鐵蛋白或表皮生長因子)、鹽(諸如氯化鈉、鈣、鎂及磷酸鹽)、緩衝液(諸如HEPES)、核苷酸(諸如腺苷及胸苷)、抗生素(諸如GENTAMYCIN™藥物)、示蹤元素(定義為通常以在微莫耳範圍內之最終濃度存在之無機化合物)及葡萄糖或等效能源。亦可包括熟習此項技術者會已知之適當濃度之任何其他補充。培養條件(諸如溫度、pH值及其類似條件)為經選定用於表現之宿主細胞先前所使用之彼等條件，且對一般熟練技工應為顯而易見的。

抗體之純化

當使用重組技術時，抗體可於細胞內產生或直接分泌於培養基中。若抗體於細胞內產生作為第一步驟，則(例如)可藉由離心或超濾來移除宿主細胞或已溶解片段之微粒碎片。若抗體分泌於培養基中，則首先可使用一市售蛋白濃縮過濾器(例如，一Amicon或Millipore Pellicon超濾裝置)來濃縮來自該等表現系統之上層清液。任何前述步驟中均可包括諸如PMSF之蛋白酶抑制劑以抑制蛋白水解，且可包括抗生素以阻止外來污染物之生長。

由細胞製備之抗體組合物可使用(例如)羧基磷灰石層析、凝膠電泳法、透析及親和層析來純化，其中親和層析為便利技術。蛋白A作為親和力配位體之適應性視抗體中存在之任何免疫球蛋白Fc域的種類及同型而定。可用蛋白A來純化基於人類 $\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ 或 $\gamma 4$ 重鏈之抗體(Lindmark等人，J. Immunol. Meth. 62:1-13 (1983))。推薦蛋白G用於所有小鼠同型及人類 $\gamma 3$ (Guss等人，EMBO J. 5:1567-1575 (1986))。親和力配位體所連接之基質可為瓊脂糖，但可用其他基質。諸如受控微孔玻璃或聚(苯乙烯二乙烯基)苯之機械穩定基質容許比瓊脂糖可達到更快之流動速率及更短之加工時間。若抗體包含CH3域，則Bakerbond ABX™樹脂(J. T. Baker, Phillipsburg, NJ)可用於純化。視待回收之抗體而定，亦可使用用於蛋白純化之其它技術，諸如離子交換管柱分餾、乙醇沈澱、逆相HPLC、矽石層析、陰離子或陽離子交換樹脂(諸如聚天冬胺酸管柱)上進行之肝素

SEPHAROSE™層析、層析聚焦、SDS-PAGE及硫酸銨沈澱。

在任何初步純化步驟後，包含所關注抗體及污染物之混合物可經受進一步純化，例如，藉由使用pH值介於約2.5-4.5之間的溶離緩衝液較佳在低鹽濃度(例如，約0-0.25 M鹽)下進行的低pH值疏水性相互作用層析進行純化。

一般而言，此項技術中已良好建立用於研究、測試及臨床用途中之用於製備抗體的各種方法，其與上述方法一致及/或熟習此項技術者認為其適用於所關注之特定抗體。

免疫接合物

本發明亦提供免疫接合物(可互換稱作"抗體-藥物接合物"或"ADC")，其包含與一或多種細胞毒性劑(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))接合之本發明之抗CD22抗體的任一者。

在某些實施例中，免疫接合物包含抗CD22抗體及化學治療劑或其他毒素。適用於產生免疫接合物之化學治療劑描述於本文中(例如，上文)。酶活性毒素及其片段亦可使用且描述於本文中。

在某些實施例中，免疫接合物包含抗CD22抗體及一或多種小分子毒素，其包括(但不限於)具有細胞毒性活性之諸如刺孢黴素、美登素類物、海兔毒素、奧利斯坦汀、單端孢菌毒素及CC1065之小分子藥物及該等藥物之衍生物。該等免疫接合物之實例更詳細地論述於下文中。

1. 例示性免疫接合物-抗體藥物接合物

本發明之免疫接合物(或"抗體-藥物接合物"("ADC"))可為下文之式I，其中抗CD22抗體係經由可選連接子(L)與一種或多種藥物部分(D)接合(亦即，共價連接)



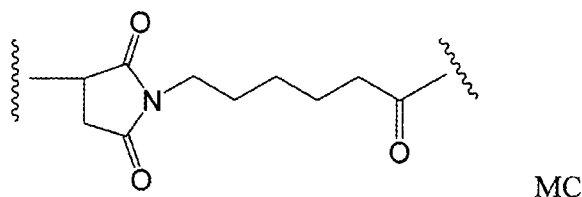
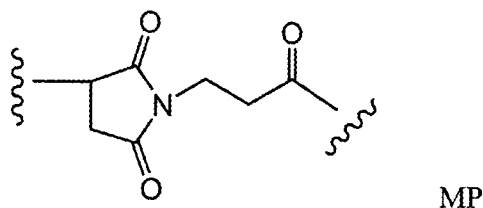
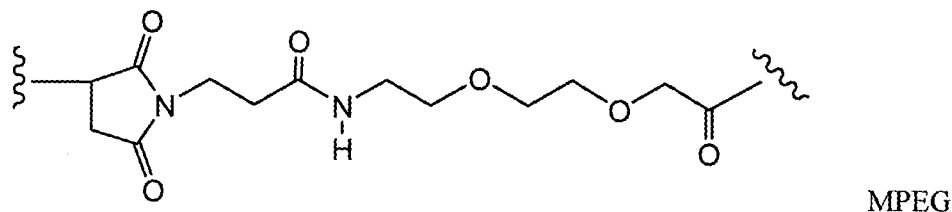
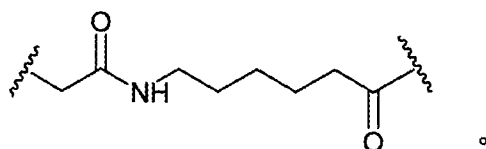
相應地，抗CD22抗體可直接或經由連接子與藥物接合。在式I中，p為每抗體藥物部分之平均數目，其可在(例如)每抗體約1個至約20個藥物部分之範圍內，且在某些實施例中，在每抗體1個至約8個藥物部分之範圍內。

例示性連接子

本文中揭示例示性連接子及藥物部分。連接子可包含一個或多個連接子組份。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"或"vc")、丙胺酸-苯丙胺酸("ala-phe")、對胺基苄氧羰基("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")。此項技術中已知各種連接子組份，其中一些描述於下。

連接子可為"可分裂連接子"，其便利細胞中藥物之釋放。舉例而言，可使用酸不穩定連接子(例如，脘)、蛋白酶敏感性(例如，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)。

在一些實施例中，連接子組份可包含將抗體與另一連接子組份或藥物部分連接之"伸展單元"。例示性伸展單元展示於下(其中波浪線指示與抗體共價連接之位點)：



在一些實施例中，連接子組份可包含胺基酸單元。在此實施例中，該胺基酸單元容許連接子由蛋白酶裂解，進而在暴露於細胞內蛋白酶(諸如溶酶體酶)後便利藥物自免疫接合物中釋放。參見(例如)Doronina等人(2003) Nat. Biotechnol. 21:778-784。例示性胺基酸單元包括(但不限於)二肽、三肽、四肽及五肽。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)；苯丙胺酸-離胺酸(fk或 phe-lys)；或N-甲基-纈胺酸-瓜胺酸

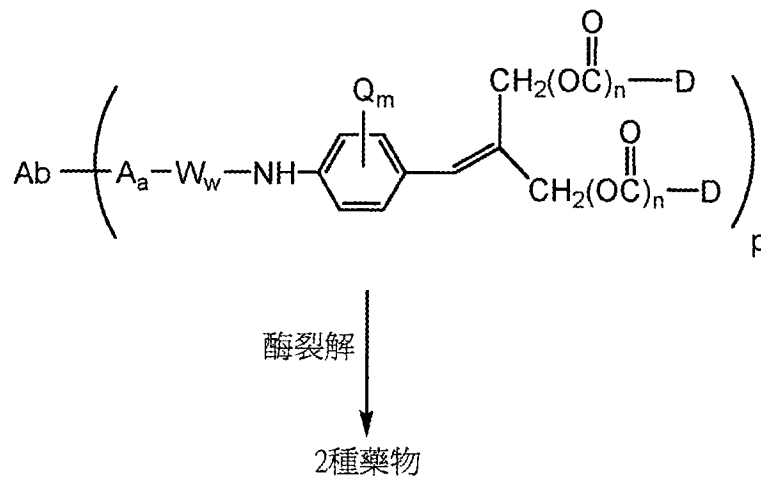
(Me-val-cit)。例示性三肽包括：甘胺酸-纈胺酸-瓜胺酸(gly-val-cit)及甘胺酸-甘胺酸-甘胺酸(gly-gly-gly)。胺基酸單元可包含彼等天然存在胺基酸殘基，以及少數胺基酸及非天然存在之胺基酸類似物，諸如瓜胺酸。胺基酸單元可經設計且優化其對於由特定酶(例如，與腫瘤相關之蛋白酶、組織蛋白酶B、C及D，或纖溶酶蛋白酶)酶裂解之選擇性。

在一些實施例中，連接子組份可包含直接或藉助於伸展單元及/或胺基酸單元將抗體與藥物部分連接之"間隔基"單元。間隔基單元可為"自供"或"非自供"。"非自供"間隔基單元為其中在ADC之酶(例如，蛋白水解)分裂後部分或所有間隔基單元保持與藥物部分結合之間隔基單元。非自供間隔基單元之實例包括(但不限於)甘胺酸間隔基單元及甘胺酸-甘胺酸間隔基單元。亦涵蓋易於發生序列特異性酶裂解之肽間隔基的其他組合。舉例而言，由與腫瘤細胞相關之蛋白酶進行之含有甘胺酸-甘胺酸間隔基單元的ADC之酶裂解會使得甘胺酸-甘胺酸-藥物部分自ADC之剩餘物中釋放。在一此實施例中，該甘胺酸-甘胺酸-藥物部分隨後在腫瘤細胞中經受一單獨水解步驟，因此使甘胺酸-甘胺酸間隔基單元自藥物部分裂解。

"自供"間隔基單元容許在不具有單獨水解步驟之情況下藥物部分之釋放。在某些實施例中，連接子之間隔基單元包含對胺基苄基單元。在一此實施例中，對胺基苄醇係經由醯胺鍵與胺基酸單元連接，且苄醇與細胞毒性劑之間產

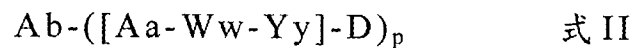
生胺基甲酸酯、胺基甲酸甲酯或碳酸酯。參見(例如)Hamann等人(2005) Expert Opin. Ther. Patents (2005) 15:1087-1103。在一實施例中，間隔基單元為對胺基苄氧羰基(PAB)。在某些實施例中，對胺基苄基單元之伸苯基部分係經Q_m取代，其中Q為-C₁-C₈烷基、-O-(C₁-C₈烷基)、-鹵素、-硝基或-氰基；且m為在0-4之範圍內之整數。自供間隔基單元之實例進一步包括(但不限於)與對胺基苄醇電子上類似之芳族化合物(參見(例如)US 2005/0256030 A1)，諸如2-胺基咪唑-5-甲醇衍生物(Hay等人(1999) Bioorg. Med. Chem. Lett. 9:2237)及鄰胺基苄基縮醛或對胺基苄基縮醛。可使用在醯胺鍵水解後經歷環化之間隔基，諸如經取代及未經取代之4-胺基丁醯胺(Rodrigues等人，Chemistry Biology, 1995, 2, 223)；適當經取代之雙環[2.2.1]及雙環[2.2.2]環系統(Storm等人，J. Amer. Chem. Soc., 1972, 94, 5815)；及2-胺基苯基丙醯胺(Amsberry等人，J. Org. Chem., 1990, 55, 5867)。在甘胺酸之α-位置處經取代之含胺藥物的消除(Kingsbury等人，J. Med. Chem., 1984, 27, 1447)亦為適用於ADC中之自供間隔基之實例。

在一實施例中，間隔基單元為如下所述之分枝雙(羥基甲基)苯乙烯(BHMS)單元，其可用於併入且釋放多種藥物。



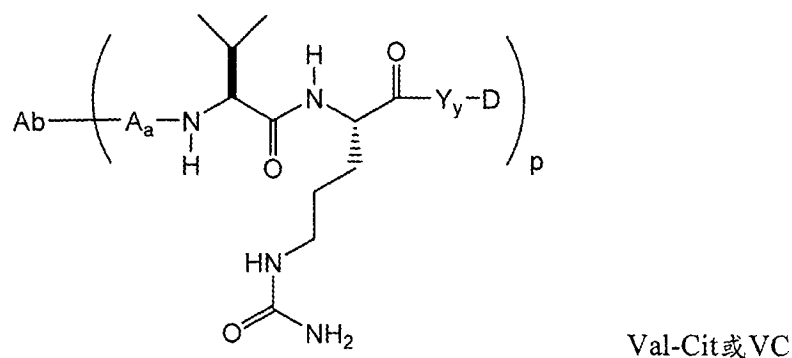
其中Q為 $-C_1-C_8$ 烷基、 $-O-(C_1-C_8$ 烷基)、-鹵素、-硝基或-氰基；m為在0-4之範圍內之整數；n為0或1；且p在1至約20之範圍內。

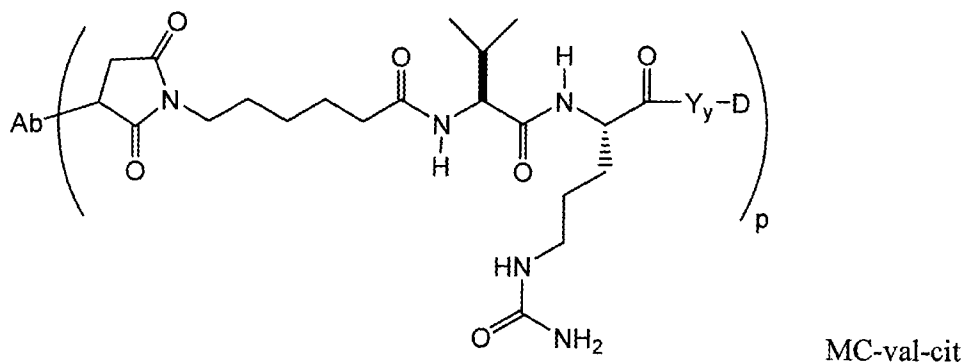
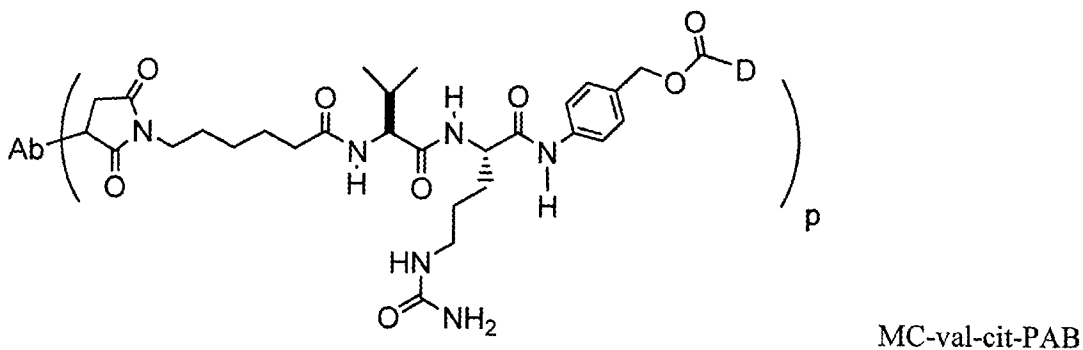
連接子可包含上述連接子組份之任一或多者。在某些實施例中，連接子係以以下ADC式II展示於括號中



其中A為伸展單元，且a為0至1之整數；W為胺基酸單元，且w為0至12之整數；Y為間隔基單元，且y為0、1或2；且Ab、D及p係如上文關於式I所定義。該等連接子之例示性實施例描述於US 20050238649 A1中，其係以引用的方式明確併入本文中。

例示性連接子組份及其組合展示於以下式II之ADC之上下文中：





包括伸展單元、間隔基及胺基酸單元之連接子組份可藉由此項技術中已知之方法來合成，諸如 US 2005-0238649 A1 中描述之彼等方法。

例示性藥物部分

美登素及美登素類物

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。美登素類物為藉由抑制微管蛋白聚合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號中。

美登素類物藥物部分為抗體-藥物接合物中有吸引力之藥物部分，因為其：(i)相對易於由醃酵或醃酵產物之化學修飾或衍生來製備；(ii)易於由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)可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已知的且可根據已知方法自天然來源分離或使用遺傳工程技術產生(參見Yu等人(2002) PNAS 99:7968-7973)。美登醇及美登醇類似物亦可根據已知方法來合成製備。

如本文中所揭示，美登素類物藥物部分之例示性實施例包括：DM1；DM3；及DM4。

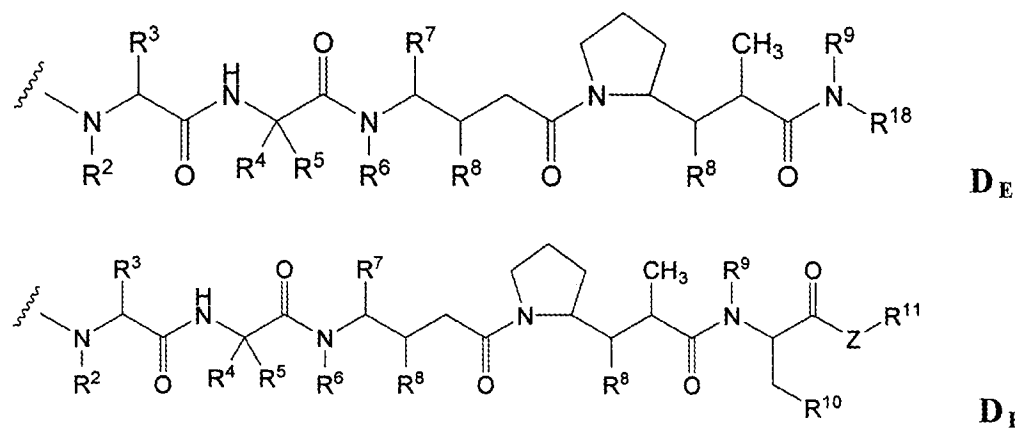
奧利斯坦汀及海兔毒素

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或衍生物(例如，奧利斯坦汀)接合之本發明之抗體(美國專利第5635483號；第5780588號)。已展示海兔毒素及奧利斯坦汀干擾微管動力學、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(美國專利第5663149號)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)末端與抗體連接(WO 02/088172)。

例示性奧利斯坦汀實施例包括N末端連接之單甲基奧利斯坦汀藥物部分DE及DF，其揭示於2004年3月28日提交之Senter等人，Proceedings of the American Association for Cancer Research，第45卷，文摘號623，其之揭示內容係以引用的方式全部明確併入本文中。

肽藥物部分可選自以下之式D_E及D_F：



其中D_E及D_F之波浪線指示抗體或抗體-連接子組份之共價連接位點，且在各位置獨立：

R²係選自H及C₁-C₈烷基；

R³係選自H、C₁-C₈烷基、C₃-C₈碳環、芳基、C₁-C₈烷基-芳基、C₁-C₈烷基-(C₃-C₈碳環)、C₃-C₈雜環及C₁-C₈烷基-(C₃-C₈雜環)；

R⁴係選自H、C₁-C₈烷基、C₃-C₈碳環、芳基、C₁-C₈烷基-芳基、C₁-C₈烷基-(C₃-C₈碳環)、C₃-C₈雜環及C₁-C₈烷基-

(C₃-C₈雜環)；

R⁵係選自H及甲基；

或R⁴及R⁵共同形成碳環環且具有式-(CR^aR^b)_n-，其中R^a及R^b係獨立地選自H、C₁-C₈烷基及C₃-C₈碳環且n係選自2、3、4、5及6；

R⁶係選自H及C₁-C₈烷基；

R⁷係選自H、C₁-C₈烷基、C₃-C₈碳環、芳基、C₁-C₈烷基-芳基、C₁-C₈烷基-(C₃-C₈碳環)、C₃-C₈雜環及C₁-C₈烷基-(C₃-C₈雜環)；

R⁸係各自獨立地選自H、OH、C₁-C₈烷基、C₃-C₈碳環及O-(C₁-C₈烷基)；

R⁹係選自H及C₁-C₈烷基；

R¹⁰係選自芳基或C₃-C₈雜環；

Z為O、S、NH或NR¹²，其中R¹²為C₁-C₈烷基；

R¹¹係選自H、C₁-C₂₀烷基、芳基、C₃-C₈雜環、-(R¹³O)_m-R¹⁴或-(R¹³O)_m-CH(R¹⁵)₂；

m為在1-1000之範圍內之整數；

R¹³為C₂-C₈烷基；

R¹⁴為H或C₁-C₈烷基；

R¹⁵之每一出現獨立地為H、COOH、-(CH₂)_n-N(R¹⁶)₂、-(CH₂)_n-SO₃H或-(CH₂)_n-SO₃-C₁-C₈烷基；

R¹⁶之每一出現獨立地為H、C₁-C₈烷基或-(CH₂)_n-COOH；

R¹⁸係選自-C(R⁸)₂-C(R⁸)₂-芳基、-C(R⁸)₂-C(R⁸)₂-(C₃-C₈雜

環)及 $-C(R^8)_2-C(R^8)_2-(C_3-C_8\text{碳環})$; 及

n 為在0至6之範圍內之整數。

在一實施例中， R^3 、 R^4 及 R^7 獨立地為異丙基或第二丁基且 R^5 為-H或甲基。在一例示性實施例中， R^3 及 R^4 各自為異丙基， R^5 為-H，且 R^7 為第二丁基。

在另一實施例中， R^2 及 R^6 各自為甲基，且 R^9 為-H。

在另一實施例中， R^8 之每一出現為 $-OCH_3$ 。

在一例示性實施例中， R^3 及 R^4 各自為異丙基， R^2 及 R^6 各自為甲基， R^5 為-H， R^7 為第二丁基， R^8 之每一出現為 $-OCH_3$ ，且 R^9 為-H。

在一實施例中， Z 為 $-O-$ 或 $-NH-$ 。

在一實施例中， R^{10} 為芳基。

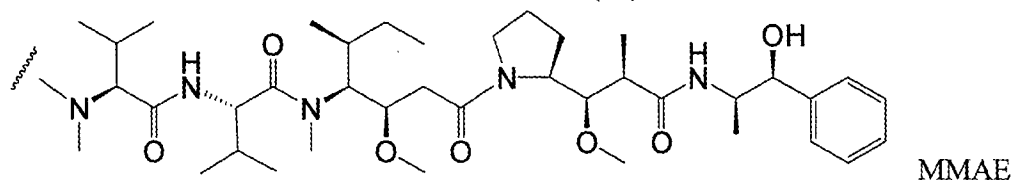
在一例示性實施例中， R^{10} 為-苯基。

在一例示性實施例中，當 Z 為 $-O-$ 時， R^{11} 為-H、甲基或第三丁基。

在一實施例中，當 Z 為 $-NH$ 時， R^{11} 為 $-CH(R^{15})_2$ ，其中 R^{15} 為 $-(CH_2)_n-N(R^{16})_2$ ，且 R^{16} 為 $-C_1-C_8$ 烷基或 $-(CH_2)_n-COOH$ 。

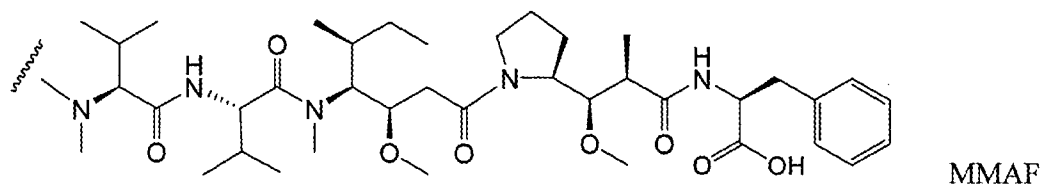
在另一實施例中，當 Z 為 $-NH$ 時， R^{11} 為 $-CH(R^{15})_2$ ，其中 R^{15} 為 $-(CH_2)_n-SO_3H$ 。

式 D_E 之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：

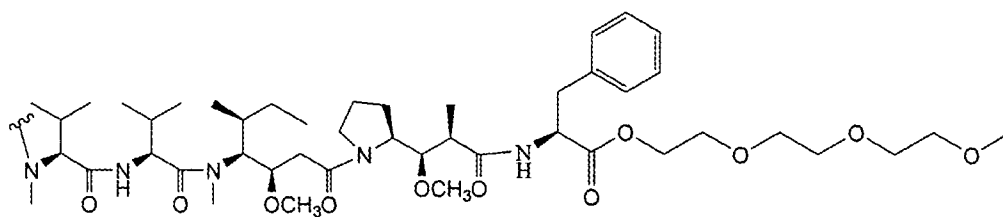
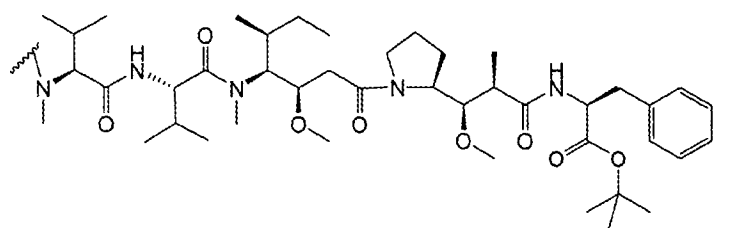
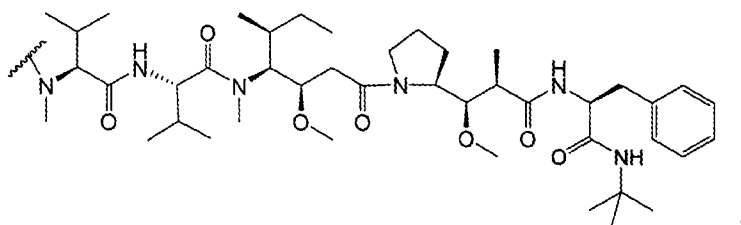
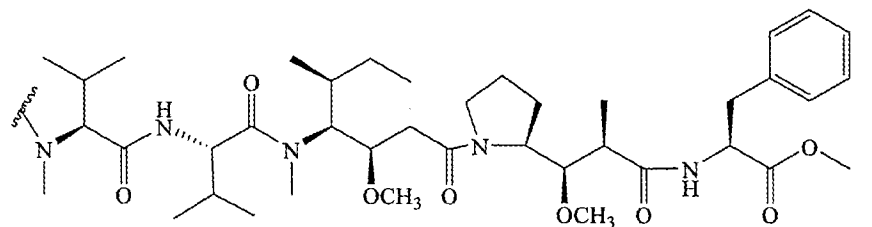


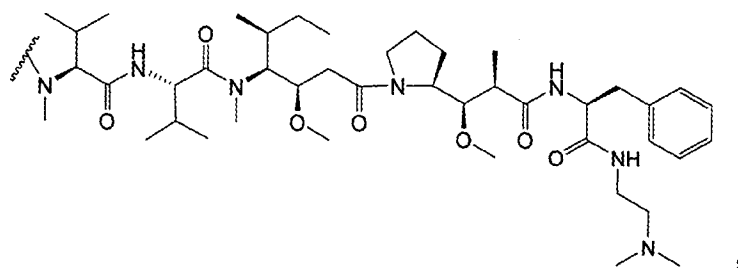
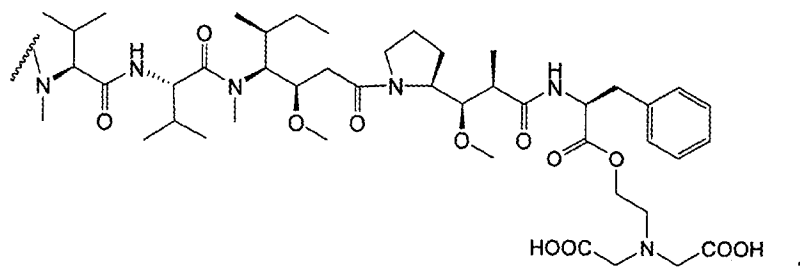
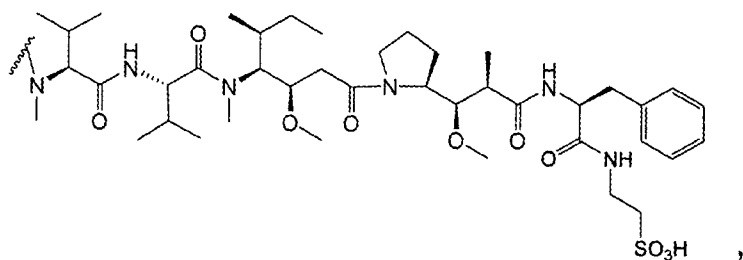
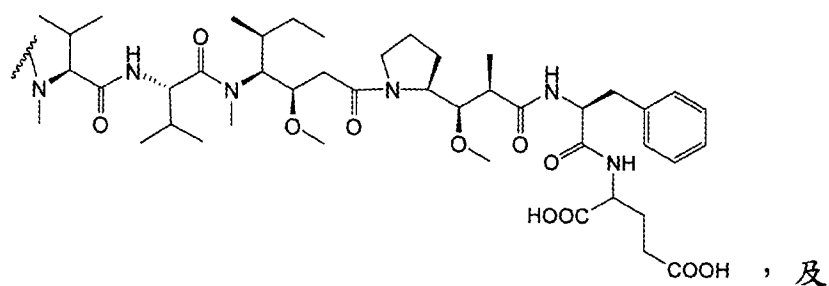
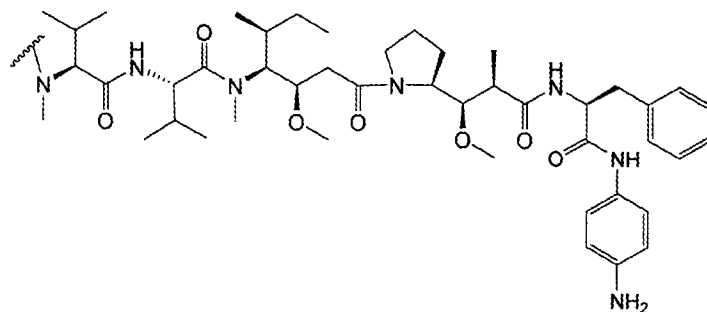
式 D_F 之例示性奧利斯坦汀實施例為MMAF，其中波浪線

指示與抗體-藥物接合物之連接子(L)之共價連接(參見US 2005/0238649及Doronina等人(2006) *Bioconjugate Chem.* 17:114-124)：



其他藥物部分包括以下MMAF衍生物，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：

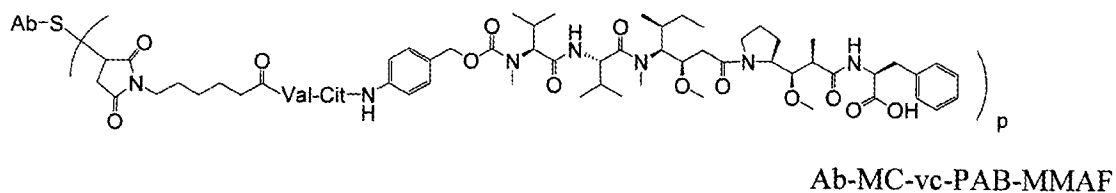
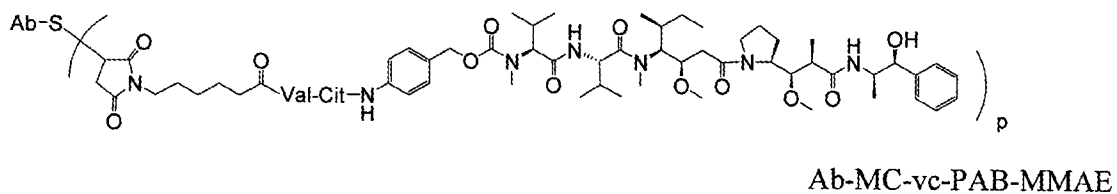
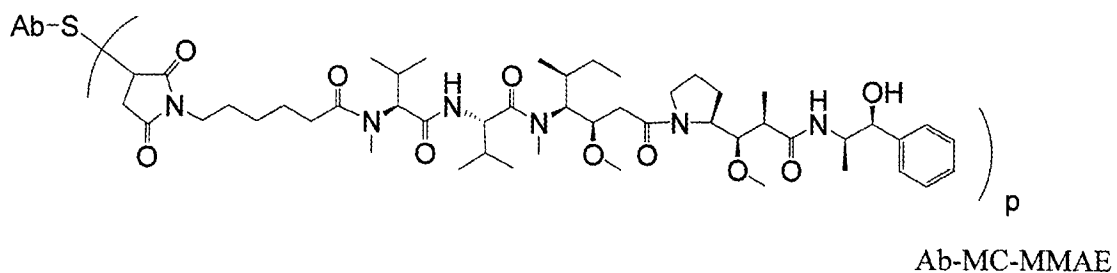
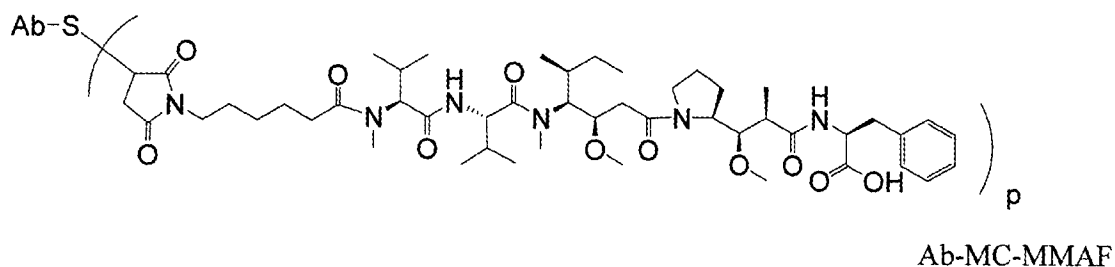




在一態樣中，如上所示之包括(但不限於)三乙二醇酯(TEG)之親水性基團可在 R^{11} 處與藥物部分連接。不受任何

特定理論限制，親水性基團有助於藥物部分之內化及非黏聚。

包含奧利斯坦汀/海兔毒素或其衍生物之式I之ADC的例示性實施例描述於US 2005-0238649 A1及Doronina等人(2006) Bioconjugate Chem. 17:114-124中，其係以引用的方式明確併入本文中。包含MMAE或MMAF及各種連接子組份之式I之ADC的例示性實施例具有以下結構及縮寫(其中"Ab"為抗體；p為1至約8，"Val-Cit"為纈胺酸-瓜胺酸二肽；且"S"為硫原子)：



包含MMAF及各種連接子組份之式I之ADC的例示性實施

例進一步包括 Ab-MC-PAB-MMAF 及 Ab-PAB-MMAF。有趣地，已展示包含藉由不可蛋白水解分裂之連接子與抗體連接之 MMAF 的免疫接合物具有與包含藉由可蛋白水解分裂連接子與抗體連接之 MMAF 的免疫接合物相當的活性。參見，Doronina 等人 (2006) *Bioconjugate Chem.* 17:114-124。在該等情況下，認為藥物釋放藉由細胞中抗體降解來實現。Id.

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(參見 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中之方法來製備: US 2005-0238649 A1; 美國專利第 5635483 號; 美國專利第 5780588 號; 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。

詳言之，式 D_F 之奧利斯坦汀/海兔毒素藥物部分(諸如 MMAF 及其衍生物)可使用 US 2005-0238649 A1 及 Doronina 等人 (2006) *Bioconjugate Chem.* 17:114-124 中描述之方法來製備。式 D_E 之奧利斯坦汀/海兔毒素藥物部分(諸如 MMAE 及其衍生物)可使用 Doronina 等人 (2003) *Nat.*

Biotech. 21:778-784中描述之方法來製備。藥物-連接子部分 MC-MMAF、MC-MMAE、MC-vc-PAB-MMAF及 MC-vc-PAB-MMAE可由常規方法(例如,如 Doronina 等人(2003) Nat. Biotech. 21:778-784及專利申請公開案第 US 2005/0238649 A1號中所述)便利地合成,且隨後與所關注之抗體接合。

藥物裝載

藥物裝載係由 p 表示且為式 I 之分子中每抗體之藥物部分的平均數目。藥物裝載可在每抗體 1 至 20 個藥物部分 (D) 之範圍內。式 I 之 ADC 包括與範圍為 1 至 20 個之藥物部分接合之抗體的集合。在由接合反應製備 ADC 時每抗體藥物部分之平均數目可藉由習知方法(諸如質譜、ELISA 檢定及 HPLC)來表徵。亦可測定以 p 計之 ADC 之定量分布。在一些情況下,自具有其他藥物裝載之 ADC 進行之其中 p 為確定值的均質 ADC 之分離、純化及表徵可藉由諸如逆相 HPLC 或電泳之方法達成。

對於一些抗體-藥物接合物而言, p 可由抗體上連接點之數目限制。舉例而言,當連接為半胱胺酸硫醇時,如在上文之例示性實施例中,抗體可僅具有一或若干半胱胺酸硫醇基團,或可僅具有一或若干足夠反應性硫醇基團,連接子可經由該等基團連接。在某些實施例中,較高藥物裝載(例如 $p > 5$)可造成凝集、不溶性、毒性或某些抗體-藥物接合物之細胞滲透性的損失。在某些實施例中,本發明之 ADC 之藥物裝載在 1 至約 8; 約 2 至約 6; 約 3 至約 5; 約 3 至

約 4；約 3.1 至約 3.9；約 3.2 至約 3.8；約 3.2 至約 3.7；約 3.2 至約 3.6；約 3.3 至約 3.8；或約 3.3 至約 3.7 之範圍內。實際上，已展示對於某些 ADC 而言，每抗體藥物部分之最佳比率可小於 8，且可為約 2 至約 5。參見 US 2005-0238649 A1(係以引用的方式全部併入本文中)。

在某些實施例中，少於理論最大值之藥物部分在接合反應期間與抗體接合。如下所述，抗體可含有(例如)不與藥物-連接子中間物或連接子試劑反應之離胺酸殘基。僅大部分反應性離胺酸基團可與胺-反應性連接子試劑反應。一般而言，抗體不含可與藥物部分連接之許多游離及反應性半胱胺酸硫醇基團；實際上抗體中之大部分半胱胺酸硫醇殘基以二硫橋鍵存在。在某些實施例中，抗體可在部分或完全還原條件下經諸如二硫蘇糖醇(DTT)或三羧基乙基膦(TCEP)之還原劑還原以產生反應性半胱胺酸硫醇基團。在某些實施例中，抗體經受變性條件以展現反應性親核基團(諸如離胺酸或半胱胺酸)。

ADC之裝載量(藥物/抗體比)可以不同方式控制，例如，藉由：(i)限制藥物-連接子中間物或連接子試劑相對於抗體之莫耳過量；(ii)限制接合反應時間或溫度；(iii)部分或限制半胱胺酸硫醇修飾之還原性條件；(iv)由重組技術設計抗體之胺基酸序列以使得半胱胺酸殘基之數目及位置經修飾以控制連接子-藥物連接之數目及/或位置(諸如如本文中所揭示製備及 WO 2006/034488(係以引用的方式全部併入本文中)中之 thioMab 或 thioFab)。

應瞭解若一個以上親核基團與藥物-連接子中間物或連接子試劑、接著藥物部分試劑反應，則所得產物為具有一或多個與抗體連接之藥物部分之分布的ADC化合物之混合物。每抗體之藥物之平均數目可藉由雙重ELISA抗體檢定由混合物計算，該檢定對抗體具有特異性且對藥物具有特異性。個別ADC分子可藉由質譜於混合物中鑑別且藉由HPLC(例如疏水性相互作用層析)分離(參見(例如)Hamblett, K.J.等人，"Effect of drug loading on the pharmacology, pharmacokinetics, and toxicity of an anti-CD30 antibody-drug conjugate"，文摘號624, American Association for Cancer Research, 2004 Annual Meeting, 2004年3月27-31日，Proceedings of the AACR, 第45卷，2004年3月；Alley, S.C.等人，"Controlling the location of drug attachment in antibody-drug conjugates"，文摘號627, American Association for Cancer Research, 2004 Annual Meeting, 2004年3月27-31日，Proceedings of the AACR, 第45卷，2004年3月)。在某些實施例中，可藉由電泳或層析將具有單一裝載值之均質ADC與接合混合物分離。

製備免疫接合物之某些方法

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經由共價鍵形成D-L，接著與抗體之親核基團

反應。經由後者之途徑製備式I之ADC之例示性方法描述於US 20050238649 A1中，其係以引用的方式明確併入本文中。

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，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)或三羧基乙基膦(TCEP)之還原劑處理以使得抗體經完全或部分還原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。或者，可經由離胺酸殘基之修飾，例如，藉由離胺酸殘基與2-亞胺硫脲(Traut氏試劑)之反應將氫硫基引入抗體中，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(例如，藉由製備包含一或多個非天然半胱胺酸胺基酸殘基之變異體抗體)將反應性硫醇基團引入抗體中。

本發明之抗體-藥物接合物亦可藉由抗體上之親電子基團(諸如醛或酮羧基)與連接子試劑或藥物上之親核基團之間反應來製備。連接子試劑上有用之親核基團包括(但不

限於)醯肼、肟、胺基、肼、硫半卡腓、肼羧酸酯及芳基醯肼。在一個實施例中，抗體經修飾以引入能夠與連接子試劑或藥物上之親核取代基反應的親電子部分。在另一個實施例中，糖基化抗體之糖可以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(Schiff)鹼基團可形成穩定鍵，或可以例如硼氫化物試劑還原以形成穩定胺鍵。在一個實施例中，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反應可在抗體中產生羰基(醛基及酮基)，其可與藥物上之適當基團反應(Hermanson, Bioconjugate Techniques)。在另一個實施例中，含有N端絲胺酸或蘇胺酸殘基之抗體可與偏過碘酸鈉反應，產生一種醛替代第一胺基酸(Geoghegan & Stroh, (1992) Bioconjugate Chem. 3:138-146; US 5362852)。此醛可與藥物部分或連接子親核劑反應。

藥物部分上之親核基團包括(但不限於)：胺、硫醇、羥基、醯肼、肟、肼、硫半卡腓、肼羧酸酯及芳基醯肼基團，能夠與包括下列之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：(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、羰基及順丁烯二醯亞胺基團。

本發明之化合物明確涵蓋(但不限於)以下列交聯試劑製備之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-乙烯基磺)苯甲酸酯)，其為市售可得(例如來自Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., U.S.A；參見2003-2004 Applications Handbook and Catalog，第467-498頁)。

包含抗體及細胞毒性劑之免疫接合物亦可使用下列多種雙官能蛋白偶合劑來製造：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)、亞胺硫堰(thiolane)(IT)、亞胺酸酯(imidoesters)(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-異硫氰酸基(cyanato)苄基-3-甲基二仲乙基三胺五乙酸(MX-DTPA)為一個用於接合放射性核苷酸與抗體之例示性螯合劑。參見WO 94/11026。

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。重組DNA分子可包含彼此相鄰或

由編碼連接子肽之區域分隔(其不破壞接合物之所需性質)的編碼接合物之抗體及細胞毒性部分之區域。

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)。

2. 例示性免疫接合物-Thio-抗體藥物接合物

製備經半胱胺酸改造之抗CD22抗體

編碼本發明之親本抗CD22抗體及經半胱胺酸改造之抗CD22抗體之胺基酸序列變異體的DNA係藉由多種方法來製備，其包括(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)；藉由先前製備之編碼多肽之DNA的定點(或寡核苷酸介導之)突變誘發(Carter (1985)等人，Nucleic Acids Res. 13:4431-4443；Ho等人(1989) Gene (Amst.) 77:51-59；Kunkel等人(1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:488；Liu等人(1998) J. Biol. Chem. 273:20252-20260)、PCR突變誘發(Higuchi, (1990)在PCR Protocols中，第177-183頁，Academic Press；Ito等人(1991) Gene 102:67-70；Bernhard等人(1994) Bioconjugate Chem. 5:126-132；及Vallette等人(1989) Nuc. Acids Res. 17:723-733)及盒式突變誘發(Wells等人(1985) Gene 34:315-323)來製備。突變誘發方案、套組及試劑為市售的，例如QuikChange®多定點突變誘發套組(Stratagene, La

Jolla, CA)。單一突變亦係由基於PCR之突變誘發使用雙鏈質體DNA作為模板藉由寡核苷酸定向突變誘發產生(Sambrook 及 Russel, (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 第3版; Zoller等人(1983) *Methods Enzymol.* 100:468-500; Zoller, M.J.及Smith, M. (1982) *Nucl. Acids Res.* 10:6487-6500)。重組抗體之變異體亦可藉由限制片段操縱或合成寡核苷酸之重疊延伸PCR來建構。誘變引子編碼半胱胺酸密碼子置換。標準突變誘發技術可用於產生編碼該等經突變半胱胺酸改造之抗體之DNA(Sambrook等人, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989; 及Ausubel等人, *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York, N.Y., 1993)。

噬菌體呈現技術(McCafferty等人(1990) *Nature* 348:552-553)可用於在活體外自未免疫供體之免疫球蛋白可變(V)域基因譜系產生抗CD22人類抗體及抗體片段。根據此技術, 抗體V域基因於框內選殖至絲狀噬菌體(諸如M13或fd)的主要或次要鞘蛋白基因內, 且呈現為噬菌體粒子表面上之功能性抗體片段。因為絲狀粒子含有噬菌體基因組之單鏈DNA複本, 所以基於抗體功能性特性之選擇亦引起編碼展示彼等特性之抗體之基因的選擇。因此, 噬菌體模擬B細胞之一些性質(Johnson等人(1993) *Current Opinion in Structural Biology* 3:564-571; Clackson等人(1991) *Nature*,

352:624-628 ; Marks 等人 (1991) J. Mol. Biol. 222:581-597 ; Griffith 等人 (1993) EMBO J. 12:725-734 ; US 5565332 ; US 5573905 ; US 5567610 ; US 5229275)。

抗CD22抗體可使用已知寡肽合成方法來化學合成或可使用重組技術來製備且純化。適當胺基酸序列或其部分可使用固相技術由直接肽合成產生 (Stewart 等人, **Solid-Phase Peptide Synthesis**, (1969)W.H. Freeman Co., San Francisco, CA ; Merrifield, (1963) J. Am. Chem. Soc., 85:2149-2154)。活體外蛋白合成可使用手動技術或自動控制來進行。自動固相合成可(例如)使用 t-BOC 或經 Fmoc 保護之胺基酸且使用製造商之指示使用一應用生物系統肽合成儀 (Applied Biosystems Peptide Synthesizer) (Foster City, CA) 來實現。抗CD22抗體或CD22多肽之各個部分可使用化學或酶方法分別化學合成且組合以產生所需抗CD22抗體或CD22多肽。

已研發出製備抗體片段之多種技術。傳統上, 該等片段係經由完整抗體之蛋白水解消化得到 (Morimoto 等人 (1992) Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117 ; 及 Brennan 等人 (1985) Science, 229:81), 或直接由重組宿主細胞產生。Fab、Fv 及 ScFv 抗CD22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 (1992) Bio/Technology

10:163-167)，或直接自重組宿主細胞培養物中分離。抗CD22抗體可為(scFv)單鏈Fv片段(WO 93/16185；US 5571894；US. 5587458)。抗CD22抗體片段亦可為"線性抗體"(US 5641870)。該等線性抗體片段可為單特異性或雙特異性的。

下文之描述主要係關於藉由以含有編碼抗CD22抗體之核酸之載體培養經轉化或轉染的細胞來製備抗CD22抗體。編碼抗CD22抗體之DNA可獲自由組織製備之cDNA庫，認為該組織具有抗CD22抗體mRNA且以可偵測含量表現其。因此，人類抗CD22抗體或CD22多肽DNA可便利地獲自由人類組織製備的cDNA庫。編碼抗CD22抗體之基因亦可獲自基因組庫或由已知合成程序(例如，自動核酸合成)獲得。

本發明之設計、選擇及製備方法使得對親電子官能基具有反應性之經半胱胺酸改造之抗CD22抗體成為可能。該等方法進一步使抗體接合物化合物(諸如在指定、經設計、選擇性位點處具有藥物分子之抗體-藥物接合物(ADC)化合物)成為可能。抗體表面上之反應性半胱胺酸殘基容許經由硫醇反應性基團(諸如順丁烯二醯亞胺或鹵乙醯基)特異性接合藥物部分。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)。可藉由標準Ellman檢定來評估蛋白質中游離硫醇之量。免疫球蛋白M為二硫化物鍵聯之五聚物之實例，而免疫球蛋白G為具有將亞單元結合起來之內部二硫橋鍵之蛋白的實例。在諸如此之蛋白中，需要以諸如二硫蘇糖醇(DTT)或硒醇之試劑還原二硫鍵(Singh等人(2002) *Anal. Biochem.* 304:147-156)以產生反應性游離硫醇。此方法可使得抗體三級結構及抗原結合特异性喪失。

Pheselector(用於選擇反應性硫醇之噬菌體ELISA)檢定容許偵測以ELISA噬菌體形式之抗體中反應性半胱胺酸基團之存在，藉此輔助設計經半胱胺酸改造之抗體(WO 2006/034488)。將該經半胱胺酸改造之抗體塗覆於孔表面上，接著以噬菌體粒子培養，添加經HRP標記之二級抗體，且進行吸光度偵測。呈現於噬菌體上之突變蛋白可以迅速、堅固及高產量方式篩檢。經半胱胺酸改造之抗體之庫可經製備且使用同一方法經受結合選擇以鑑別自抗體或其他蛋白之隨機蛋白-噬菌體庫併入之游離Cys的適當反應性位點。此技術包括使呈現於噬菌體上之半胱胺酸突變蛋白與亦具有硫醇反應性之親和力試劑或報導體基團反應。

PHSELECTOR檢定容許篩檢抗體中之反應性硫醇基團。由此方法來鑑別A121C變異體為例示性的。整個Fab分子可經有效搜索以鑑別更多具有反應性硫醇基團之ThioFab變異體。參數分數表面可接近性係用於確定且定

量溶劑對多肽中胺基酸殘基之可接近性。表面可接近性可表示為溶劑分子(例如水)可接觸之表面積($\text{\AA}^2$)。水之佔用空間近似為一1.4 $\text{\AA}$ 半徑之球體。軟體可免費獲得或可作為結晶學程式之CCP4 Suite經許可(CCP4, Daresbury Laboratory, Warrington, WA4 4AD, United Kingdom之秘書, 傳真:(+44) 1925 603825, 或藉由網路:www.ccp4.ac.uk/dist/html/INDEX.html), 其使用算法以計算具有已知x射線結晶學衍生之座標之蛋白的每一胺基酸之表面可接近性("The CCP4 Suite: Programs for Protein Crystallography" (1994) Acta. Cryst. D50:760-763)。進行表面可接近性計算之兩個例示性軟體模組為基於B. Lee及F. M. Richards (1971) J. Mol. Biol. 55:379-400之算法之"AREAIMOL"及"SURFACE"。AREAIMOL將蛋白之溶劑可接近表面定義為當其繞蛋白之凡得瓦爾(Van der Waals)表面旋轉時探針球體(表示一溶劑分子)之中心點。AREAIMOL藉由在每一原子周圍延伸之球體上產生表面點(以距原子中心等於原子與探針半徑之和的距離)且消除位於與鄰近原子相關之相等球體內之彼等表面點來計算溶劑可接近之表面積。AREAIMOL在PDB座標文件中測得原子之溶劑可接近面積, 且概述殘基、鏈及整個分子之可接近面積。個別原子之可接近面積(或面積差異)可讀取為假PDB輸出文件。AREAIMOL假定每一元素之單一半徑, 且僅識別有限數目之不同元素。

AREAIMOL及SURFACE報導絕對可接近性, 亦即平方埃($\text{\AA}$)之數目。分數表面可接近性係參照多肽內胺基酸相

關之標準狀態來計算。該參照狀態為三肽 Gly-X-Gly，其中X為所關注之胺基酸，且該參照狀態應為"延伸"構形，亦即如同 β 鏈中之彼等構形。延伸之構形最大化X之可接近性。將經計算可接近面積除以 Gly-X-Gly 三肽參照狀態之可接近面積且報導商，其為分數可接近性。可接近性百分比為分數可接近性乘以100。計算表面可接近性之另一例示性算法係基於程式 xsae(Broger, C., F. Hoffman-LaRoche, Basel)之 SOLV 模組，其根據多肽之X射線座標計算胺基酸殘基與水球之分數可接近性。可使用可用晶體結構資訊來計算抗體中每一胺基酸之分數表面可接近性(Eigenbrot等人(1993) J Mol Biol. 229:969-995)。

編碼經半胱胺酸改造之抗體之DNA易於使用習知程序來分離且測序(例如，藉由使用能夠與編碼鼠抗體之重鏈及輕鏈之基因特異性結合之寡核苷酸探針)。融合瘤細胞充當此DNA之來源。一旦經分離，即可將DNA置於表現載體中，隨後將其轉染入不另外產生抗體蛋白之宿主細胞(諸如大腸桿菌細胞、猿COS細胞、中國倉鼠卵巢(CHO)細胞或其他哺乳動物宿主細胞，諸如骨髓瘤細胞)中(US 5807715；US 2005/0048572；US 2004/0229310)，以在重組宿主細胞中獲得單株抗體之合成。

在設計及選擇後，具有經設計、高反應性未配對Cys殘基之經半胱胺酸改造之抗體(例如 ThioFab)可藉由以下步驟來產生：(i)表現於細菌(例如大腸桿菌)系統(Skerra等人(1993) Curr. Opinion in Immunol. 5:256-262；Plückthun

(1992) Immunol. Revs. 130:151-188)或哺乳動物細胞培養物系統(WO 01/00245)(例如中國倉鼠卵巢細胞(CHO))中；及(ii)使用常見蛋白純化技術來純化(Lowman等人(1991) J. Biol. Chem. 266(17):10982-10988)。

經設計Cys硫醇基團與親電子連接子試劑及藥物-連接子中間物反應以形成經半胱胺酸改造之抗體藥物接合物及其他經標記半胱胺酸改造之抗體。經半胱胺酸改造之抗體之Cys殘基與存在於親本抗體中之Cys殘基配對且形成鏈間及鏈內二硫鍵，其不具有任何反應性硫醇基團(除非經還原劑處理)且不與親電子連接子試劑或藥物-連接子中間物反應。新近經設計Cys殘基可保持未配對且能夠與親電子連接子試劑或藥物-連接子中間物(諸如藥物-順丁烯二醯亞胺)反應，亦即與其接合。例示性藥物-連接子中間物包括：MC-MMAE、MC-MMAF、MC-vc-PAB-MMAE及MC-vc-PAB-MMAF。重鏈及輕鏈之經設計Cys殘基之結構位置係根據依序編號系統來編號。此依序編號系統與起始於N末端之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)相關，其與Kabat編號流程(底列)之不同之處在於由a、b、c指示插入。使用Kabat編號系統，實際線性胺基酸序列可含有對應於縮短或插入可變域之FR或CDR中之少量或額外胺基酸。經半胱胺酸改造之重鏈變異體位點係藉由依序編號及Kabat編號流程來鑑別。

在一實施例中，經半胱胺酸改造之抗CD22抗體係藉由以下方法來製備，其包含：

(a)由半胱胺酸來置換親本抗CD22抗體之一或多個胺基酸殘基；且

(b)藉由使經半胱胺酸改造之抗體與硫醇反應性試劑反應來測定經半胱胺酸改造之抗CD22抗體之硫醇反應性。

經半胱胺酸改造之抗體與硫醇反應性試劑反應可比親本抗體與硫醇反應性試劑反應之反應性更強。

自由半胱胺酸胺基酸殘基可位於重鏈或輕鏈中，或位於恆定域或可變域中。抗體片段(例如Fab)亦可藉由置換抗體片段之胺基酸經設計具有一或多個半胱胺酸胺基酸，以形成經半胱胺酸改造之抗體片段。

本發明之另一實施例提供一種製備(製造)經半胱胺酸改造之抗CD22抗體的方法，其包含：

(a)將一或多種半胱胺酸胺基酸引入親本抗CD22抗體中以產生經半胱胺酸改造之抗CD22抗體；且

(b)以硫醇反應性試劑測定經半胱胺酸改造之抗體之硫醇反應性；

其中經半胱胺酸改造之抗體與硫醇反應性試劑反應比親本抗體與硫醇反應性試劑反應之反應性更強。

製備經半胱胺酸改造之抗體之方法的步驟(a)可包含：

(i)誘變編碼經半胱胺酸改造之抗體之核酸序列；

(ii)表現經半胱胺酸改造之抗體；且

(iii)分離且純化經半胱胺酸改造之抗體。

製備經半胱胺酸改造之抗體之方法的步驟(b)可包含在選自噬菌體或噬菌粒粒子之病毒粒子上表現經半胱胺酸改造之抗體。

製備經半胱胺酸改造之抗體之方法的步驟(b)亦可包含：

(i)使經半胱胺酸改造之抗體與硫醇-反應性親和力試劑反應以產生經親和力標記、半胱胺酸改造之抗體；且

(ii)量測經親和力標記、半胱胺酸改造之抗體與捕捉培養基之結合。

本發明之另一實施例為用高反應性、未配對半胱胺酸胺基酸篩檢經半胱胺酸改造之抗體之硫醇反應性的方法，其包含：

(a) 將一或多種半胱胺酸胺基酸引入親本抗體中以產生經半胱胺酸改造之抗體；

(b) 使經半胱胺酸改造之抗體與硫醇-反應性親和力試劑反應以產生經親和力標記、半胱胺酸改造之抗體；且

(c) 量測經親和力標記、半胱胺酸改造之抗體與捕捉培養基之結合；且

(d) 以硫醇反應性試劑測定經半胱胺酸改造之抗體之硫醇反應性。

篩檢經半胱胺酸改造之抗體之方法的步驟(a)可包含：

(i) 誘變編碼經半胱胺酸改造之抗體之核酸序列；

(ii) 表現經半胱胺酸改造之抗體；且

(iii) 分離且純化經半胱胺酸改造之抗體。

篩檢經半胱胺酸改造之抗體之方法的步驟(b)可包含在選自噬菌體或噬菌粒粒子之病毒粒子上表現經半胱胺酸改造之抗體。

篩檢經半胱胺酸改造之抗體之方法的步驟(b)亦可包含：

- (i) 使經半胱胺酸改造之抗體與硫醇-反應性親和力試劑反應以產生經親和力標記、半胱胺酸改造之抗體；且
- (ii) 量測經親和力標記、半胱胺酸改造之抗體與捕捉培養基之結合。

抗 CD22 10F4 IgG變異體之半胱胺酸改造

藉由本文中描述之半胱胺酸改造方法在重鏈118(EU編號)(等於依序編號之重鏈位置121)位點處將半胱胺酸引入全長、嵌合親本單株抗CD22抗體中。

親本抗體"std抗CD22 Hu 10F4v3 Fc"(重鏈序列：SEQ ID NO:88，輕鏈序列：SEQ ID NO:87，圖5B)經半胱胺酸改造以得到"A118C thio hu抗CD22 10F4v3"(重鏈序列：SEQ ID NO:92，輕鏈序列：SEQ ID NO:91，圖17)、"S400C thio hu抗CD22 10F4v3"(重鏈序列：SEQ ID NO:93，輕鏈序列：SEQ ID NO:91，圖17)或"V205C thio抗CD22 10F4v3"(重鏈序列：SEQ ID NO:88，輕鏈序列：SEQ ID NO:91，圖5B及圖17)。

該等經半胱胺酸改造之單株抗體藉由在含有1 mM半胱胺酸之培養基中瞬間醱酵而表現於CHO(中國倉鼠卵巢)細胞中。

經標記之半胱胺酸改造之抗CD22抗體

經半胱胺酸改造之抗CD22抗體可與硫醇反應性試劑位點特異性且有效地偶合。硫醇反應性試劑可為多官能連接子試劑、捕捉物，亦即親和力、標記試劑(例如生物素-連接子試劑)、偵測標記(例如螢光團試劑)、固相固定試劑(例如 SEPHAROSE™、聚苯乙烯或玻璃)，或藥物-連接子中間物。硫醇反應性試劑之一實例為N-乙基順丁烯二醯亞胺(NEM)。在一例示性實施例中，ThioFab與生物素-連接子試劑反應提供生物素化ThioFab，可根據其來偵測且量測經改造半胱胺酸殘基之存在及反應性。ThioFab與多官能連接子試劑反應提供具有官能化連接子之ThioFab，其可進一步與藥物部分試劑或其他標記反應。ThioFab與藥物-連接子中間物反應提供ThioFab藥物接合物。

本文中描述之例示性方法一般可經由本文中描述之設計應用及篩檢步驟應用於抗體之鑑別及製備，且更一般地可應用於其他蛋白。

此方法可應用於其他硫醇反應性試劑之接合，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. in Bioconjugate Techniques (1996) Academic Press, San Diego, 第40-55頁, 第643-671頁)。
硫醇反應性試劑可為藥物部分、螢光團(諸如如螢光素或若丹明之螢光染料)、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。

經半胱胺酸改造之抗CD22抗體的用途

經半胱胺酸改造之抗CD22抗體及其接合物可用作治療劑及/或診斷劑。本發明進一步提供預防、控制、治療或改善與B細胞相關之病症相關之一或多種症狀的方法。詳言之, 本發明提供預防、控制、治療或改善與細胞增生性病症相關之一或多種症狀的方法, 其中該等病症諸如癌症, 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。本發明進一步提供診斷CD22相關之病症或傾向於發展此病症的方法, 以及鑑別抗體及優先結合與B細胞相關之CD22多肽之抗體的抗原結合片段之方法。

本發明之另一實施例係針對經半胱胺酸改造之抗CD22抗體用於製備藥物的用途, 該藥物適用於治療回應B細胞相關之病症的病狀。

經半胱胺酸改造之抗體藥物接合物(Thio-抗體藥物接合物)

本發明之另一態樣為抗體-藥物接合物化合物，其包含經半胱胺酸改造之抗CD22抗體(Ab)及奧利斯坦汀藥物部分(D)，其中該經半胱胺酸改造之抗體係由連接子部分(L)經由一或多個自由半胱胺酸胺基酸與D連接；該化合物具有式I：



其中p為1、2、3或4；且其中經半胱胺酸改造之抗體係藉由一方法來製備，該方法包含由一或多個自由半胱胺酸胺基酸來置換一或多個親本抗CD22抗體之胺基酸殘基。

圖10展示經半胱胺酸改造之抗CD22抗體藥物接合物(ADC)之實施例，其中奧利斯坦汀藥物部分係與輕鏈(LC-ADC)；重鏈(HC-ADC)；及Fc區(Fc-ADC)中之經改造半胱胺酸基團連接。

經半胱胺酸改造之抗CD22抗體藥物接合物之潛在優勢包括改良之安全性(較大治療指數)；改良之PK參數；保持抗體鏈間二硫鍵，其可穩定接合物且保持其活性結合構形；限定藥物接合之位點；及自經半胱胺酸改造之抗體與藥物-連接子試劑接合製備經半胱胺酸改造之抗體藥物接合物產生更均質產物。

連接子

"連接子"、"連接子單元"或"連接"意謂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，連接子指定為L。"連接子"(L)為可用於將一或多個藥物部分(D)與抗體單元(Ab)連接以形成式I抗體-藥物接合物(ADC)的雙官能或多官能部分。抗體-藥物接合物(ADC)可使用具有結合藥物及抗體之反應性官能基之連接子來便利地製備。經半胱胺酸改造之抗體(Ab)之半胱胺酸硫醇可與連接子試劑、藥物部分或藥物-連接子中間物之親電子官能基形成鍵。

在一態樣中，連接子具有一反應性位點，其具有對抗體上存在之親核半胱胺酸具反應性之親電子基團。抗體之半胱胺酸硫醇與連接子上之親電子基團反應且與連接子形成共價鍵。有用之親電子基團包括(但不限於)順丁烯二醯亞胺基及鹵乙醯胺基。

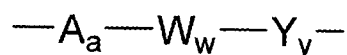
連接子包括二價基團(諸如烷二基、伸芳基、伸雜芳基)、部分(諸如： $-(\text{CR}_2)_n\text{O}(\text{CR}_2)_n-$)、烷氧基之重複單元(例如聚伸乙基氧基、PEG、聚亞甲基氧基)及烷胺基之重複單元(例如聚伸乙基胺基、Jeffamine™)；及二酸酯及醯胺，其包括琥珀酸酯、琥珀醯胺、二羥乙酸酯、丙二酸酯及己醯胺。

根據 Klussman 等人 (2004), Bioconjugate Chemistry 15(4):765-773 第 766 頁之接合方法且根據實例 x 之方案，經半胱胺酸改造之抗體與具有親電子官能基(諸如順丁烯二醯亞胺或 α -鹵羰基)之連接子試劑或藥物-連接子中間物反應。

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"或"vc")、丙胺酸-苯丙胺酸("ala-phe"或"af")、對胺基苄氧羰基("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")、(4-碘-乙醯基)胺基苯甲酸N-琥珀醯亞胺酯("SIAB")、作為一或多個重複單元之伸乙基氧基- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$ -"("EO"或"PEO")。額外連接子組份在此項技術中為已知的且一些描述於本文中。

在一實施例中，ADC之連接子L具有下式：



其中：

-A-為與抗體(Ab)之半胱胺酸硫醇共價連接之伸展單元；

a為0或1；

-W-各自獨立地為胺基酸單元；

w獨立地為在0至12之範圍內之整數；

-Y-為與藥物部分共價連接之間隔基單元；且

y為0、1或2。

伸展單元

存在時，伸展單元(-A-)能夠將抗體單元與胺基酸單元(-W-)連接。就此而論，抗體(Ab)具有可與伸展單元之官能基形成鍵之官能基。可天然或經由化學操作存在於抗體

上之有用官能基包括(但不限於)氫硫基(-SH)、胺基、羥基、羧基、碳水化合物之變旋異構羥基及羧基。在一態樣中，抗體官能基為氫硫基或胺基。氫硫基可藉由還原抗體之分子內二硫鍵來產生。或者，氫硫基可使用2-亞胺硫啉(Traut氏試劑)或另一產生氫硫基之試劑藉由抗體之離胺酸部分之胺基的反應來產生。在一實施例中，抗體(Ab)具有可與伸展單元之親電子官能基形成鍵的自由半胱胺酸硫醇基團。式I接合物之例示性伸展單元由式II及III描述，其中Ab-、-W-、-Y-、-D、w及y係如上所定義，且 R^{17} 為選自以下基團之二價基團： $(CH_2)_r$ 、 C_3 - C_8 碳環基、 $O-(CH_2)_r$ 、伸芳基、 $(CH_2)_r$ -伸芳基、-伸芳基- $(CH_2)_r$ -、 $(CH_2)_r$ -(C_3 - C_8 碳環基)、(C_3 - C_8 碳環基)- $(CH_2)_r$ 、 C_3 - C_8 雜環基、 $(CH_2)_r$ -(C_3 - C_8 雜環基)、-(C_3 - C_8 雜環基)- $(CH_2)_r$ -、- $(CH_2)_rC(O)NR^b(CH_2)_r$ -、- $(CH_2CH_2O)_r$ -、- $(CH_2CH_2O)_rCH_2$ -、- $(CH_2)_rC(O)NR^b(CH_2CH_2O)_r$ -、- $(CH_2)_rC(O)NR^b(CH_2CH_2O)_rCH_2$ -、- $(CH_2CH_2O)_rC(O)NR^b(CH_2CH_2O)_r$ -、- $(CH_2CH_2O)_rC(O)NR^b(CH_2CH_2O)_rCH_2$ -及- $(CH_2CH_2O)_rC(O)NR^b(CH_2)_r$ -；其中 R^b 為H、 C_1 - C_6 烷基、苯基或苄基；且r獨立地為在1-10之範圍內之整數。

伸芳基包括藉由自芳族環系統移除兩個氫原子獲得之具有6-20個碳原子之二價芳族烴基。典型伸芳基包括(但不限於)衍生自苯、經取代苯、萘、蒽、聯苯及其類似物之基團。

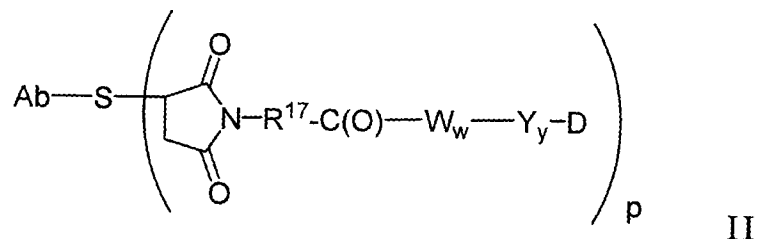
雜環基包括其中一或多個環原子為雜原子(例如氮、氧及硫)之環系統。雜環基包含1至20個碳原子及1至3個選自

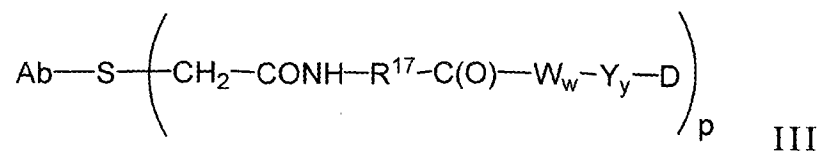
N、O、P及S之雜原子。雜環可為具有3至7個環成員(2至6個碳原子及1至3個選自N、O、P及S之雜原子)之單環或具有7至10個環成員(4至9個碳原子及1至3個選自N、O、P及S之雜原子)之雙環，例如：雙環[4,5]、[5,5]、[5,6]或[6,6]系統。雜環描述於Paquette, Leo A.; "Principles of Modern Heterocyclic Chemistry"(W.A. Benjamin, New York, 1968)，尤其第1章、第3章、第4章、第6章、第7章及第9章；"The Chemistry of Heterocyclic Compounds, A series 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、吲嗪基、異吲哚基、3H-吲哚基、1H-吲哚基、嘌呤基、4H-喹嗪基、吡嗪基、噻啶

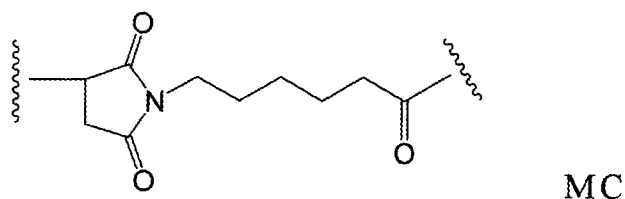
碳環基包括具有3至7個碳原子(作為單環)或7至12個碳原子(作為雙環)之飽和或不飽和環。單環狀碳環具有3至6個環原子，更通常具有5或6個環原子。雙環狀碳環具有7至12個環原子(例如排列為雙環[4,5]、[5,5]、[5,6]或[6,6]系統)，或9或10個環原子(排列為雙環[5,6]或[6,6]系統)。單環狀碳環之實例包括環丙基、環丁基、環戊基、1-環戊-1-烯基、1-環戊-2-烯基、1-環戊-3-烯基、環己基、1-環己-1-烯基、1-環己-2-烯基、1-環己-3-烯基、環庚基及環辛基。

自式I ADC之所有例示性實施例(諸如II-VI)應瞭解即使未明確指示，視經改造半胱胺酸殘基之數目而定，1至4個藥物部分係與抗體連接(p=1-4)。

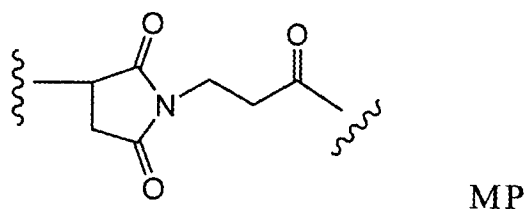




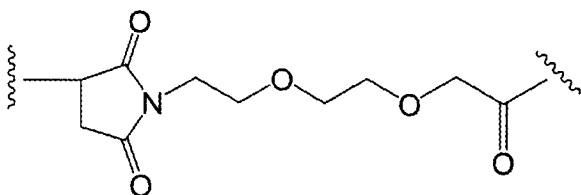
說明性式II伸展單元係衍生自順丁烯二醯亞胺基-己醯基(MC)，其中 R^{17} 為 $-(\text{CH}_2)_5-$ ：



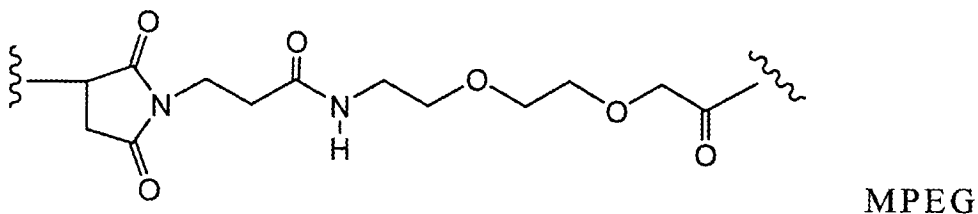
式II之說明性伸展單元係衍生自順丁烯二醯亞胺基-丙醯基(MP)，其中 R^{17} 為 $-(\text{CH}_2)_2-$ ：



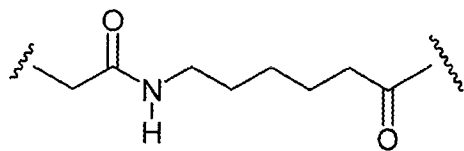
式II之另一說明性伸展單元，其中 R^{17} 為 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_r-\text{CH}_2-$ 且 r 為2：



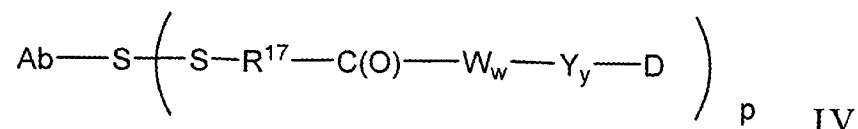
式II之另一說明性伸展單元，其中 R^{17} 為 $-(\text{CH}_2)_r\text{C}(\text{O})\text{NR}^b(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_r-\text{CH}_2-$ ，其中 R^b 為H且 r 各自為2：



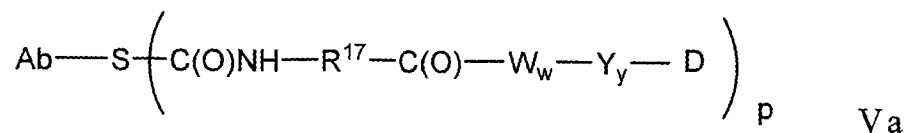
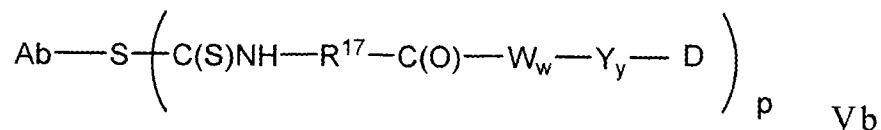
式III之說明性伸展單元，其中 R^{17} 為 $-(\text{CH}_2)_5-$ ：



在另一實施例中，伸展單元係經由抗體之經改造半胱胺酸硫原子與伸展單元之硫原子之間的二硫鍵與經半胱胺酸改造之抗CD22抗體連接。此實施例之代表性伸展單元係由式IV描述，其中 R^{17} 、Ab-、-W-、-Y-、-D、w及y係如上文所定義。



在另一實施例中，伸展單元之反應性基團含有可與抗體之自由半胱胺酸硫醇形成鍵的硫醇-反應性官能基。硫醇反應官能基之實例包括(但不限於)順丁烯二醯亞胺、 α -鹵乙醯基、活性酯(諸如琥珀醯亞胺酯、4-硝基苯酯、五氟苯酯、四氟苯酯)、酐、酸氯化物、磺醯氯、異氰酸酯及異硫氰酸酯。此實施例之代表性伸展單元係由式Va及Vb描述，其中 R^{17} 、Ab-、-W-、-Y-、-D、w及y係如上文所定義；



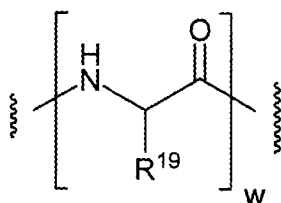
在另一實施例中，連接子可為經由分枝、多官能連接子部分將一種以上藥物部分與抗體共價連接之樹枝狀類型連

接子 (Sun 等人 (2002) *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 12:2213-2215 ; Sun 等人 (2003) *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 11:1761-1768 ; King (2002) *Tetrahedron Letters* 43:1987-1990)。樹枝狀連接子可增大藥物與抗體之莫耳比，亦即裝載量，其與ADC之效力相關。因此，若經半胱胺酸改造之抗體僅帶有一反應性半胱胺酸硫醇基團，則大量藥物部分可經由樹枝狀連接子連接。

胺基酸單元

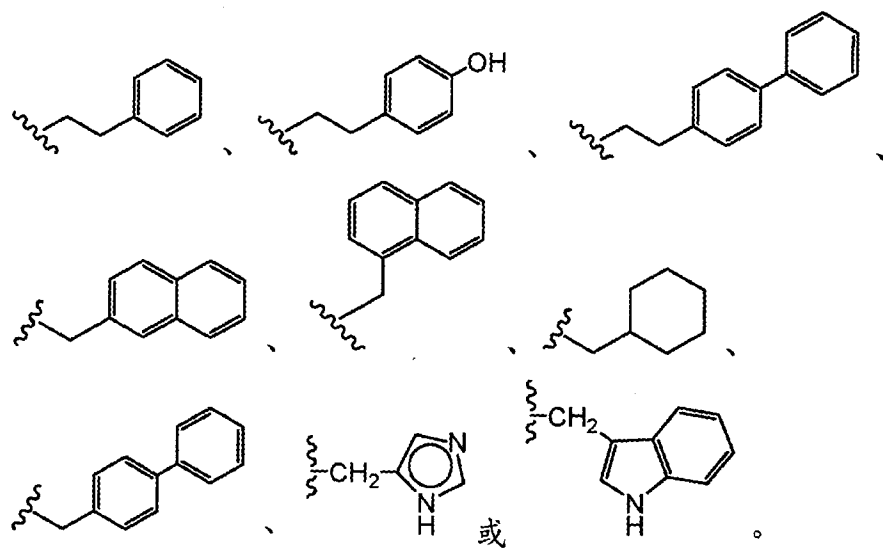
連接子可包含胺基酸殘基。胺基酸單元(-W_w-)(存在時)將抗體(Ab)與本發明之經半胱胺酸改造之抗體-藥物接合物(ADC)的藥物部分(D)連接。

-W_w-為二肽、三肽、四肽、五肽、六肽、七肽、八肽、九肽、十肽、十一肽或十二肽單元。包含胺基酸單元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。-W-單元各自獨立地具有以下方括號中指示之式，且w為在0至12之範圍內之整數：



其中R¹⁹為氫、甲基、異丙基、異丁基、第二丁基、苄基、對羥基苄基、-CH₂OH、-CH(OH)CH₃、-CH₂CH₂SCH₃

、 $-\text{CH}_2\text{CONH}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{COOH}$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ 、
 $-(\text{CH}_2)_3\text{NHC}(=\text{NH})\text{NH}_2$ 、 $-(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$ 、 $-(\text{CH}_2)_3\text{NHCOCH}_3$ 、
 $-(\text{CH}_2)_3\text{NHCHO}$ 、 $-(\text{CH}_2)_4\text{NHC}(=\text{NH})\text{NH}_2$ 、 $-(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$ 、
 $-(\text{CH}_2)_4\text{NHCOCH}_3$ 、 $-(\text{CH}_2)_4\text{NHCHO}$ 、 $-(\text{CH}_2)_3\text{NHCONH}_2$ 、
 $-(\text{CH}_2)_4\text{NHCONH}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{NH}_2$ 、2-吡啶基甲
 基-、3-吡啶基甲基-、4-吡啶基甲基-、苯基、環己基、



當 R^{19} 並非氫時， R^{19} 所連接之碳原子為對掌性的。 R^{19} 所連接之每一碳原子獨立地為(S)或(R)構型，或外消旋混合物。胺基酸單元因此可為對映異構純、外消旋或非對映異構。

例示性 $-\text{W}_w$ -胺基酸單元包括二肽、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。

胺基酸單元可由一或多種酶(包括與腫瘤相關之蛋白酶)酶裂解以釋放藥物部分(-D)，在一實施例中其在釋放後在活體內質子化以提供藥物(D)。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。

間隔基單元

當胺基酸單元存在時($w=1-12$)，間隔基單元(-Y_y-)(存在時)($y=1$ 或 2)將胺基酸單元(-W_w-)與藥物部分(D)連接。另一方面，當胺基酸單元不存在時，間隔基單元將伸展單元與藥物部分連接。當胺基酸單元與伸展單元均不存在時($w, y=0$)，間隔基單元亦將藥物部分與抗體單元連接。間隔基單元通常為兩類：自供及非自供。非自供間隔基單元為在胺基酸單元自抗體-藥物接合物或藥物部分-連接子分裂、尤其酶性分裂之後，其中部分或所有間隔基單元保持與藥物部分結合之間隔基單元。當含有甘胺酸-甘胺酸間隔基單元或甘胺酸間隔基單元之ADC經由與腫瘤細胞相關之蛋白酶、與癌症細胞相關之蛋白酶或與淋巴細胞相關之蛋白酶經歷酶性分裂時，甘胺酸-甘胺酸-藥物部分或甘胺酸-藥物部分係與Ab-A_a-W_w-分裂。在一實施例中，獨立水解反應發生於靶向細胞內，其使甘胺酸-藥物部分鍵斷裂且釋放藥物。

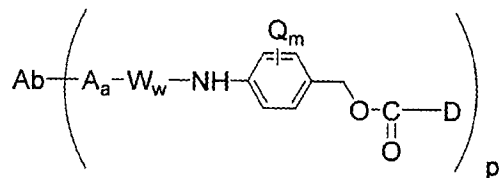
在另一實施例中，-Y_y-為對胺基苄基胺甲鹽基(PAB)單

元，其之伸苯基部分經 Q_m 取代，其中 Q 為 $-C_1-C_8$ 烷基、 $-O-(C_1-C_8$ 烷基)、 $-$ 鹵素、 $-$ 硝基或 $-$ 氰基；且 m 為在0-4之範圍內之整數。

非自供間隔基單元($-Y-$)之例示性實施例為： $-Gly-Gly-$ ； $-Gly-$ ； $-Ala-Phe-$ ； $-Val-Cit-$ 。

在一實施例中，提供藥物部分-連接子或ADC(其中不存在間隔基單元($y=0$))，或其醫藥學上可接受之鹽或溶劑合物。

或者，含有自供間隔基單元之ADC可釋放 $-D$ 。在一實施例中， $-Y-$ 為經由PAB基團之胺基氮原子與 $-W_w-$ 連接，且經由碳酸酯基、胺基甲酸酯基或醚基與 $-D$ 直接連接之PAB基團，其中該ADC具有例示性結構：

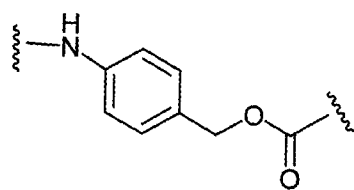


其中 Q 為 $-C_1-C_8$ 烷基、 $-O-(C_1-C_8$ 烷基)、 $-$ 鹵素、 $-$ 硝基或 $-$ 氰基； m 為在0-4之範圍內之整數；且 p 在1至4之範圍內。

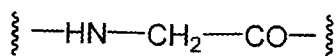
自供間隔基之其他實例包括(但不限於)與PAB基團電子上類似之芳族化合物，諸如2-胺基咪唑-5-甲醇衍生物(Hay等人(1999) Bioorg. Med. Chem. Lett. 9:2237)、雜環狀PAB類似物(US 2005/0256030)、 β -葡萄糖苷酸(WO 2007/011968)及鄰胺基苄基縮醛或對胺基苄基縮醛。可使用在醯胺鍵水解後經歷環化之間隔基，諸如經取代及未經取代之4-胺基丁醯胺(Rodrigues等人(1995) Chemistry Biology

2:223)；適當經取代之雙環[2.2.1]及雙環[2.2.2]環系統(Storm等人(1972) J. Amer. Chem. Soc. 94:5815)；及2-胺基苯基丙醯胺(Amsberry等人(1990) J. Org. Chem. 55:5867)。在甘胺酸處經取代之含胺藥物的消除(Kingsbury等人(1984) J. Med. Chem. 27:1447)亦為適用於ADC中之自供間隔基之實例。

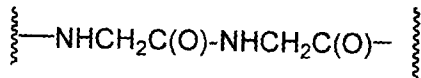
例示性間隔基單元(-Y_y-)係由式X-XII來表示：



X



XI



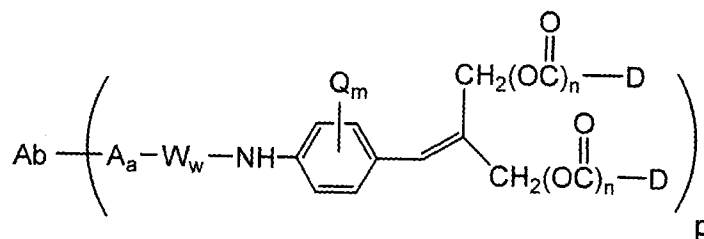
XII

樹枝狀連接子

在另一實施例中，連接子L可為經由分枝、多官能連接子部分將一種以上藥物部分與抗體共價連接之樹枝狀類型連接子(Sun等人(2002) Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 12:2213-2215；Sun等人(2003) Bioorganic & Medicinal Chemistry 11:1761-1768)。樹枝狀連接子可增大藥物與抗體之莫耳比，亦即裝載量，其與ADC之效力相關。因此，若經半胱胺酸改造之抗體僅帶有一反應性半胱胺酸硫醇基團，則大量藥物部分可經由樹枝狀連接子連接。分枝、樹枝狀連接子之例示性實施例包括2,6-雙(羥基

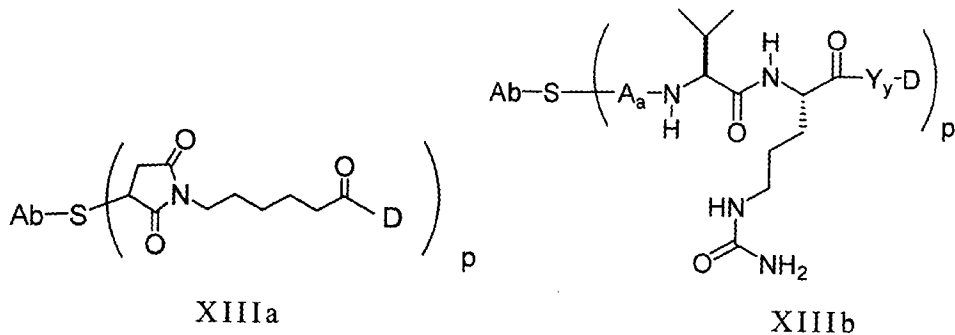
甲基)-對甲酚及2,4,6-參(羥基甲基)-酚樹狀體單元(WO 2004/01993 ; Szalai 等人(2003) J. Amer. Chem. Soc. 125:15688-15689 ; Shamis等人(2004) J. Amer. Chem. Soc. 126:1726-1731 ; Amir 等人(2003) Angew. Chem. Int. Ed. 42:4494-4499)。

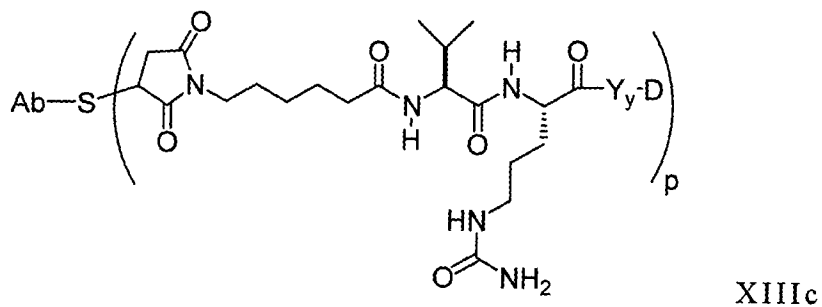
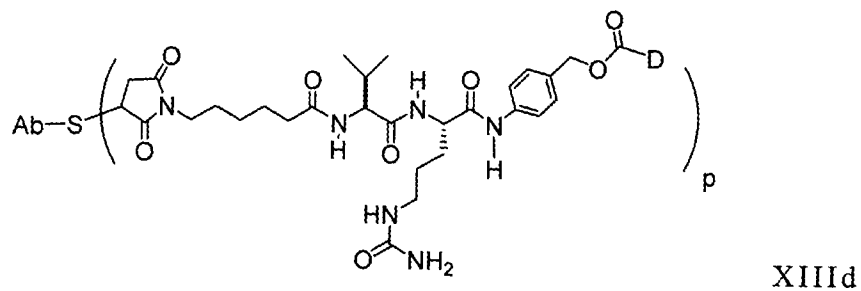
在一實施例中，間隔基單元為分枝雙(羥基甲基)苯乙烯(BHMS)，其可用於併入且釋放多種藥物，其具有以下結構：



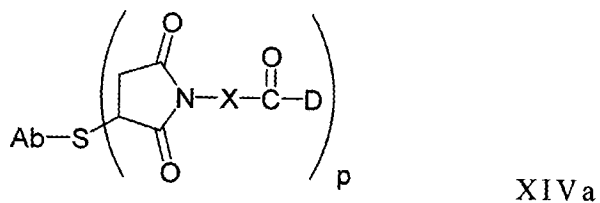
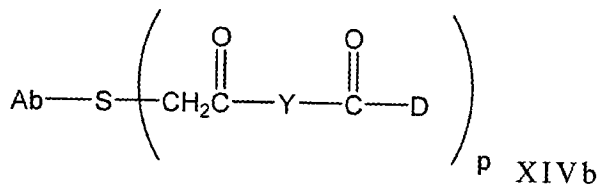
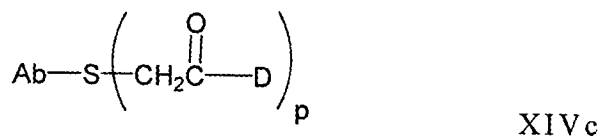
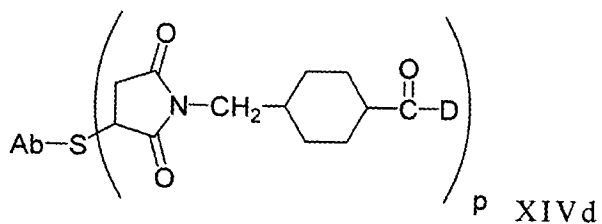
其包含2-(4-胺基亞苄基)丙烷-1,3-二醇樹狀體單元(WO 2004/043493 ; de Groot 等人(2003) Angew. Chem. Int. Ed. 42:4490-4494)，其中Q為-C₁-C₈烷基、-O-(C₁-C₈烷基)、-鹵素、-硝基或-氰基；m為在0-4之範圍內之整數；n為0或1；且p在1至4之範圍內。

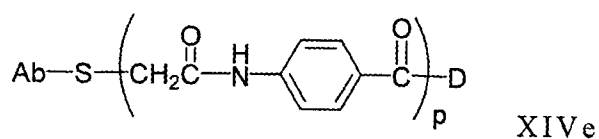
式I抗體-藥物接合物化合物之例示性實施例包括XIIIa(MC)、XIIIb(val-cit)、XIIIc(MC-val-cit)及XIIId(MC-val-cit-PAB)：



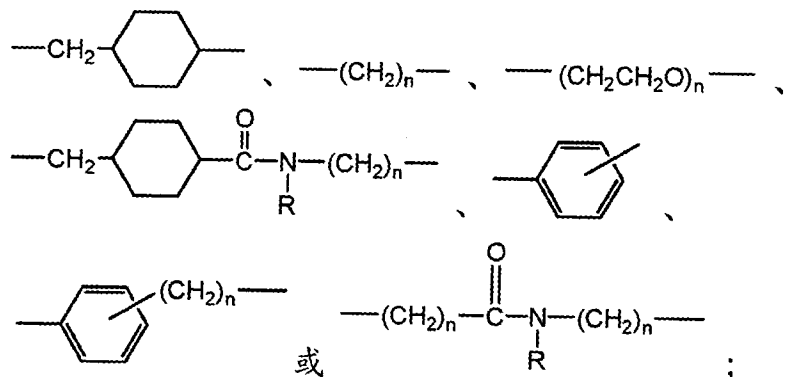


式 Ia 抗體-藥物接合物化合物之其他例示性實施例包括
XIVa-e :

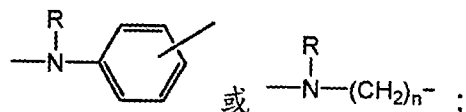




其中 X 為：



Y 為：



且 R 獨立地為 H 或 C₁-C₆ 烷基；且 n 為 1 至 12。

在另一實施例中，連接子具有反應性官能基，其具有對抗體上存在之親電子基團具反應性之親核基團。抗體上之有用親電子基團包括(但不限於)醛及酮羰基。連接子之親核基團之雜原子可與抗體上之親電子基團反應且與抗體單元形成共價鍵。連接子上之有用親核基團包括(但不限於)醯肼、肟、胺基、肼、硫半卡腓、肼羧酸酯及芳基醯肼。抗體上之親電子基團提供用於與連接子連接之便利位點。

通常，肽類型連接子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而製備。該等肽鍵可(例如)根據肽化學領域中熟知之液相合成方法(E. Schröder及K. Lübke (1965) "The Peptides", 第1卷, 第76-136頁, Academic

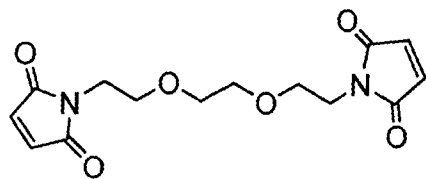
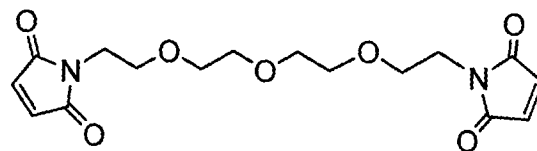
Press)來製備。連接子中間物可以包括間隔基、伸展單元及胺基酸單元之反應之任何組合或次序來裝配。間隔基、伸展單元及胺基酸單元可使用自然界中之親電子基團、親核基團或自由基之反應性官能基。反應性官能基包括(但不限於)羧基、羥基、對硝基苯基碳酸酯基、異硫氰酸酯基，及離去基(諸如O-甲磺醯基、O-甲苯磺醯基、-Cl、-Br、-I)；或順丁烯二醯亞胺。

在另一實施例中，連接子可經調節溶解性或反應性之基團取代。舉例而言，視用於製備ADC之合成路線而定，諸如磺酸酯基($-\text{SO}_3^-$)或銨基之帶電荷取代基可增大試劑之水溶性且促進連接子試劑與抗體或藥物部分之偶合反應，或促進具有D或D-L(藥物-連接子中間物)之Ab-L(抗體-連接子中間物)與Ab之偶合反應。

連接子試劑

抗體與奧利斯坦汀之接合物可使用多種雙官能連接子試劑製得，該等連接子試劑諸如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)。

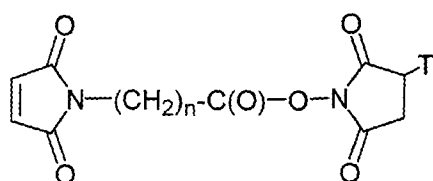
抗體藥物接合物亦可用以下連接子試劑來製備：BMPEO、BMPS、EMCS、GMBS、HBVS、LC-SMCC、MBS、MPBH、SBAP、SIA、SIAB、SMPB、SMPH、sulfo-EMCS、sulfo-GMBS、sulfo-KMUS、sulfo-MBS、sulfo-SIAB、sulfo-SMCC及sulfo-SMPB，及SVSB(琥珀醯亞胺基-(4-乙烯基碇)苯甲酸酯)，且包括雙順丁烯二醯亞胺試劑：DTME、BMB、BMDB、BMH、BMOE、BM(PEO)₃及BM(PEO)₄，其係購自Pierce Biotechnology, Inc., Customer Service Department, P.O. Box 117, Rockford, IL. 61105 U.S.A, U.S.A 1-800-874-3723，國際+815-968-0747。雙順丁烯二醯亞胺試劑容許以連續或同時方式將經半胱胺酸改造之抗體之硫醇基團與含硫醇之藥物部分、標記或連接子中間物連接。對經半胱胺酸改造之抗體、藥物部分、標記或連接子中間物之硫醇基團具有反應性之除順丁烯二醯亞胺之外的其他官能基包括碘乙醯胺、溴乙醯胺、乙烯基吡啶、二硫化物、吡啶基二硫化物、異氰酸酯及異硫氰酸酯。

BM(PEO)₃BM(PEO)₄

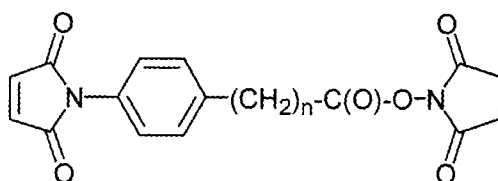
有用之連接子試劑亦可經由諸如Molecular Biosciences Inc.(Boulder, CO)之其他商業來源獲得，或根據以下文獻中描述之程序合成：Toki等人(2002) J. Org. Chem.

67:1866-1872 ; Walker, M.A. (1995) J. Org. Chem.
60:5352-5355 ; Frisch 等人 (1996) Bioconjugate Chem.
7:180-186 ; US 6214345 ; WO 02/088172 ; US 2003130189 ;
US 2003096743 ; WO 03/026577 ; WO 03/043583 ; 及 WO
04/032828 。

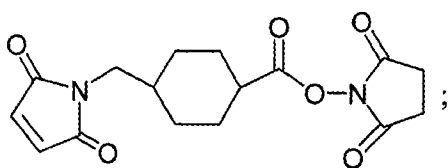
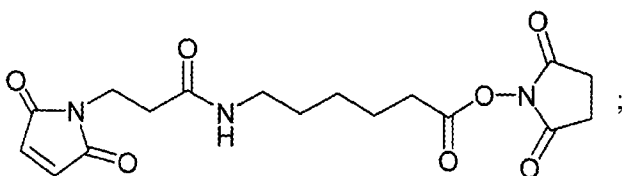
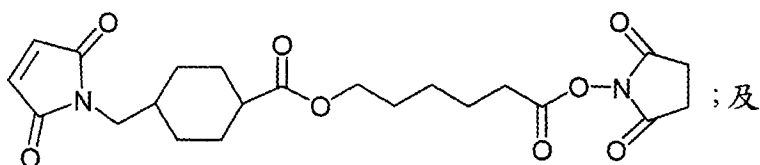
可藉由使以下連接子試劑與胺基酸單元之N末端反應將
式(IIIa)之伸展單元引入連接子中：

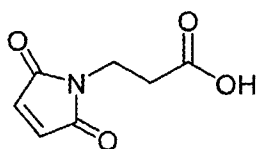


其中n為在1-10之範圍內之整數且T為-H或-SO₃Na；

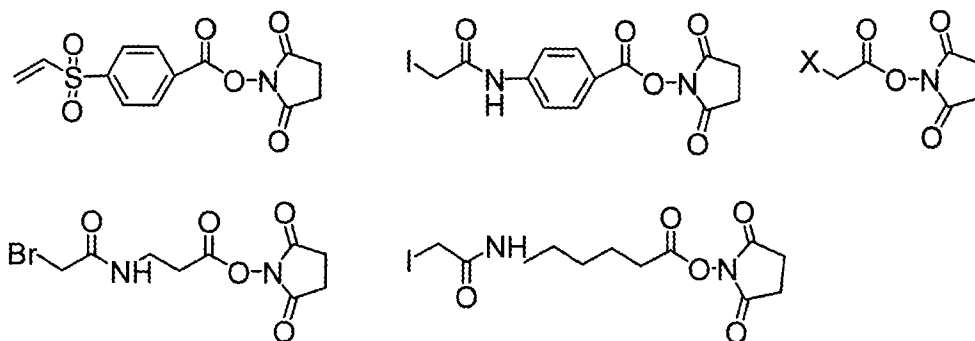


其中n為在0-3之範圍內之整數；



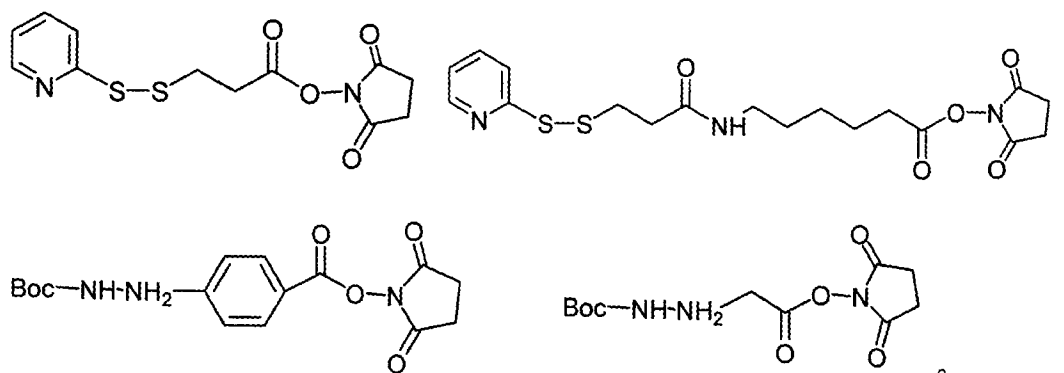


可藉由使以下雙官能試劑與胺基酸單元之N末端反應將伸展單元引入連接子中：

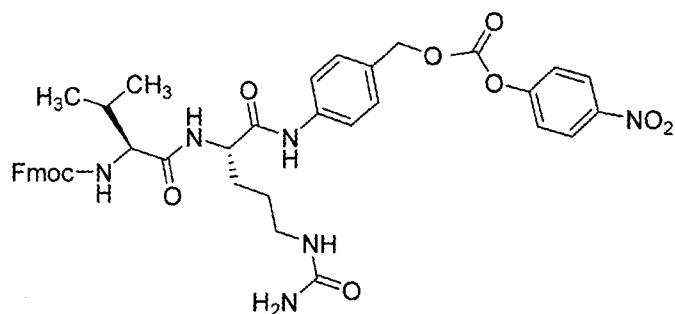


其中X為Br或I。

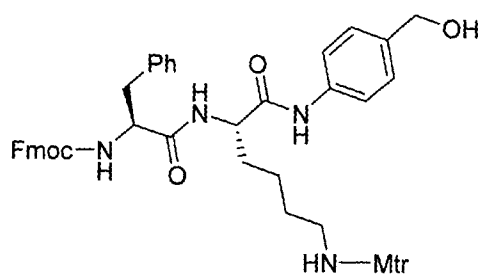
亦可藉由使以下雙官能試劑與胺基酸單元之N末端反應將式之伸展單元引入連接子中：



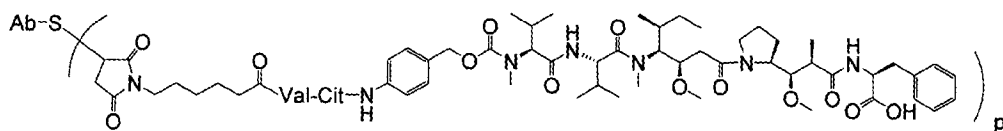
具有順丁烯二醯亞胺伸展單元及對胺基苄基胺甲醯基(PAB)自供間隔基之例示性纈胺酸-瓜胺酸(val-cit或vc)二肽連接子試劑具有以下結構：



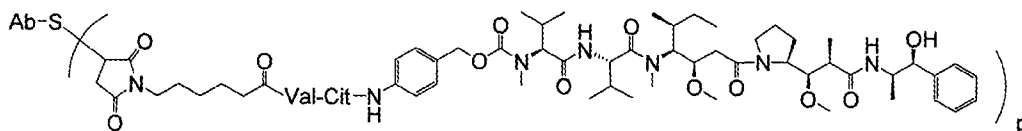
具有順丁烯二醯亞胺伸展單元及PAB自供間隔基單元之
例示性phe-lys(Mtr, 單4-甲氧基三苯甲基)二肽連接子試劑
可根據Dubowchik等人(1997) Tetrahedron Letters, 38:5257-
60來製備, 且其具有以下結構:



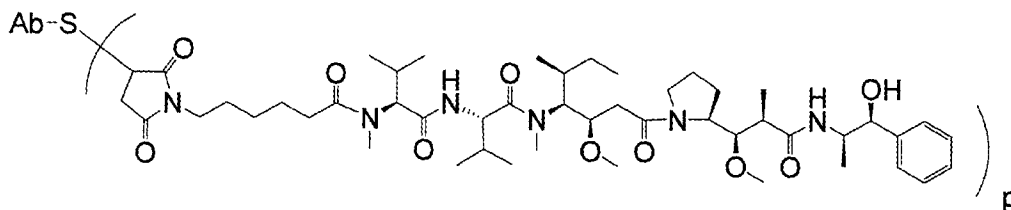
本發明之例示性抗體-藥物接合物化合物包括:



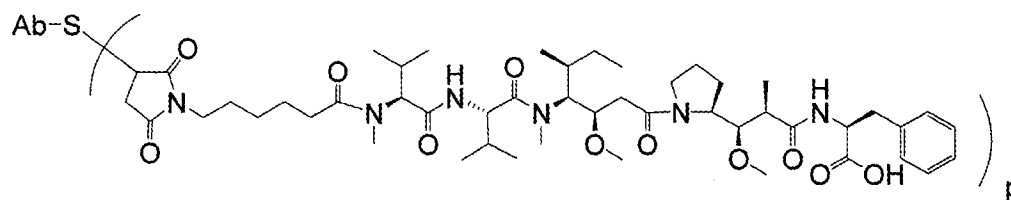
Ab-MC-vc-PAB-MMAF



Ab-MC-vc-PAB-MMAE



Ab-MC-MMAE



Ab-MC-MMAF

其中 Val 為纈氨酸；Cit 為瓜氨酸；p 為 1、2、3 或 4；且 Ab 為經半胱氨酸改造之抗 CD22 抗體。

製備經半胱氨酸改造之抗 CD22 抗體-藥物接合物

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) 經半胱氨酸改造之抗體之半胱氨酸基團與連接子試劑反應以經由共價鍵形成抗體-連接子中間物 Ab-L，接著與活化藥物部分 D 反應；及 (2) 藥物部分之親核基團與連接子試劑反應以經由共價鍵形成藥物-連接子中間物 D-L，接著與經半胱氨酸改造之抗體之半胱氨酸基團反應。接合方法 (1) 及 (2) 可與多種經半胱氨酸改造之抗體、藥物部分及連接子一起用於製備式 I 之抗體-藥物接合物。

抗體半胱氨酸硫醇基團為親核性且能夠與連接子試劑及藥物-連接子中間物上之親電子基團反應以形成共價鍵，該連接子試劑及藥物-連接子中間物包括：(i) 活性酯，諸如 NHS 酯、HOBt 酯、鹵甲酸酯及鹽基鹵；(ii) 烷基鹵及苄基鹵化物，諸如鹵乙鹽胺；(iii) 醛、酮、羧基及順丁烯二鹽亞胺基團；及 (iv) 二硫化物，其包括經由硫化物交換之吡啶基二硫化物。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、硫半卡肟、肼羧酸酯及芳基醯肼基團。

藉由以諸如 DTT(Cleland 試劑，二硫蘇糖醇)或 TCEP(參(2-羧基乙基)膦鹽酸鹽；Getz 等人(1999) Anal. Biochem，第 273:73-80 卷；Soltec Ventures, Beverly, MA)之還原劑處理，接著再氧化以再形成鏈間及鏈內二硫鍵可使經半胱胺酸改造之抗體具有與連接子試劑接合之反應性(實例 x)。舉例而言，表現於 CHO 細胞中之全長、經半胱胺酸改造之單株抗體(ThioMab)在 37°C 下經 50 倍過量之 TCEP 還原 3 小時以還原可在新近引入半胱胺酸殘基與培養基中存在之半胱胺酸之間形成的半胱胺酸加合物中之二硫鍵。將經還原 ThioMab 稀釋且負載於於 10 mM 乙酸鈉(pH 5)中之 HiTrap S 管柱上，且以含有 0.3 M 氯化鈉之 PBS 溶離。在室溫下在親本 Mab 中存在之半胱胺酸殘基與稀(200 nM)硫酸銅(CuSO₄)水溶液之間再建立二硫鍵隔夜。或者，脫氫抗壞血酸(DHAA)為在半胱胺酸加合物之還原性分裂之後再建立經半胱胺酸改造之抗體之鏈內二硫化物基團的有效氧化劑。可使用此項技術中已知之其他氧化劑(oxidant)(亦即氧化劑(oxidizing agent))及氧化條件。周圍空氣氧化亦為有效的。此溫和、部分再氧化步驟高保真性地有效形成鏈內二硫化物且保持新近引入半胱胺酸殘基之硫醇基團。添加、混合約 10 倍過量之藥物-連接子中間物(例如 MC-vc-PAB-MMAE)，且使其在室溫下靜置約 1 小時以實現接合且形成 10F4v3 抗 CD22 抗體-藥物接合物。將接合混合物經凝膠過

濾且負載且經由一HiTrap S管柱溶離以移除過量藥物-連接子中間物及其他雜質。

圖12展示製備自細胞接合培養物表現之經半胱胺酸改造之抗體的一般方法。當細胞培養基含有半胱胺酸時，二硫化物加合物可在新近引入之半胱胺酸胺基酸與來自培養基之半胱胺酸之間形成。如圖12中例示性ThioMab(左)中之圓形所述，該等半胱胺酸加合物應經還原以產生具有接合反應性之經半胱胺酸改造之抗體。半胱胺酸加合物大概以及各種鏈間二硫鍵經諸如TCEP之還原劑還原性分裂以得到抗體之還原形式。在部分氧化條件下藉由硫酸銅、DHAA或暴露於周圍氧中在配對半胱胺酸殘基之間再形成鏈間二硫鍵。新近引入、經改造且未配對半胱胺酸殘基保持可用於與連接子試劑或藥物-連接子中間物反應以形成本發明之抗體接合物。表現於哺乳動物細胞株中之ThioMab使得Cys加合物經由-S-S-鍵形成與經改造Cys外部接合。因此如實例x中所述將經純化ThioMab經還原及再氧化程序處理以產生反應性ThioMab。該等ThioMab係用於與含有細胞毒性藥物、螢光團及其他標記之順丁烯二醯亞胺接合。

篩檢方法

本發明之另一實施例係針對一種測定懷疑含有CD22多肽之樣品中該CD22多肽之存在的方法，其中該方法包含使該樣品暴露於經半胱胺酸改造之抗CD22抗體，或與CD22多肽結合之其抗體藥物接合物中，且測定經半胱胺

酸改造之抗CD22抗體或其抗體藥物接合物與樣品中CD22多肽之結合，其中該結合之存在指示樣品中存在CD22多肽。視情況，樣品可含有懷疑表現CD22多肽之細胞(其可為癌細胞)。該方法中使用之經半胱胺酸改造之抗CD22抗體或其抗體藥物接合物視情況可經偵測標記，附著於固體支撐物或其類似物上。

本發明之另一實施例係針對一種診斷一哺乳動物中腫瘤之存在的方法，其中該方法包含(a)使包含獲自該哺乳動物之組織細胞之測試樣品與經半胱胺酸改造之抗CD22抗體或與CD22多肽結合之其抗體藥物接合物接觸，及(b)偵測經半胱胺酸改造之抗CD22抗體或其抗體藥物接合物與該測試樣品中CD22多肽之間複合物的形成，其中該複合物的形成指示哺乳動物中存在腫瘤。視情況，經半胱胺酸改造之抗CD22抗體或其抗體藥物接合物經可偵測標記，附著於固體支撐物或其類似物上，及/或組織細胞之測試樣品係獲自懷疑具有癌性腫瘤之個體。

抗體-藥物接合物之代謝物

本文中描述之ADC化合物之活體內代謝產物亦處於本發明之範疇內，在一定程度上該等產物為新穎的且不比先前技術明顯。該等產物可來源於(例如)經投予化合物之氧化、還原、水解、醯胺化、酯化、酶性分裂及其類似反應。因此，本發明包括由一方法製備之新穎且不明顯化合物，該方法包含使本發明之化合物與一哺乳動物接觸足以產生其代謝產物之一段時期。

代謝產物通常係由以下步驟來鑑別：製備經放射性標記（例如 ^{14}C 或 ^3H ）ADC；將其以可偵測劑量（例如大於約 0.5 mg/kg）非經腸投予動物（諸如大鼠、小鼠、天竺鼠、猴）或人；容許足夠時間使代謝發生（通常約 30 秒至 30 小時）；且將其轉化產物與尿、血液或其他生物樣品分離。因為其經標記，所以該等產物易於分離（其他係藉由使用能夠與存活於代謝物中之抗原決定基結合之抗體來分離）。以習知方式（例如由 MS、LC/MS 或 NMR 分析）來測定代謝物結構。一般而言，代謝物之分析係以與熟習此項技術者熟知之習知藥物代謝研究相同的方法進行。只要轉化產物不另外在活體內出現，其即適用於治療給藥本發明之 ADC 化合物的診斷檢定。

醫藥調配物

投予抗體-藥物接合物(包括 Thio-抗體藥物接合物)

本發明之抗體-藥物接合物(ADC)(包括 thio-抗體藥物接合物(TDC))可由適於待治療之病狀之任何途徑投予。該 ADC 通常應經非經腸投藥，亦即輸液、皮下、肌肉內、靜脈內、皮內、鞘內及硬膜外投藥。

對於治療該等癌症而言，在一實施例中，抗體-藥物接合物係經由靜脈內輸液投予。經由輸液投予之劑量在每次給藥約 $1\text{ }\mu\text{g}/\text{m}^2$ 至約 $10,000\text{ }\mu\text{g}/\text{m}^2$ 之範圍內，通常為每週一次給藥，總共一次、兩次、三次或四次給藥。或者，劑量範圍為約 $1\text{ }\mu\text{g}/\text{m}^2$ 至約 $1000\text{ }\mu\text{g}/\text{m}^2$ 、約 $1\text{ }\mu\text{g}/\text{m}^2$ 至約 $800\text{ }\mu\text{g}/\text{m}^2$ 、約 $1\text{ }\mu\text{g}/\text{m}^2$ 至約 $600\text{ }\mu\text{g}/\text{m}^2$ 、約 $1\text{ }\mu\text{g}/\text{m}^2$ 至約 $400\text{ }\mu\text{g}/\text{m}^2$ 。

$\mu\text{g}/\text{m}^2$ 、約 10 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ 至約 500 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ 、約 10 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ 至約 300 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ 、約 10 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ 至約 200 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ ，及約 1 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ 至約 200 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ 。劑量可經每日一次、每週一次、每週多次，但小於每日一次、每月多次，但小於每日一次、每月多次，但小於每週一次、每月一次或間歇投予以減輕或緩和疾病症狀。可以所揭示之間隔之任一者持續投藥直至待治療之淋巴瘤、白血病之腫瘤或症狀消退。可在達成症狀消退或減輕後持續投藥，其中該消退或減輕係由該持續投藥延長。

本發明係提供一種減輕自體免疫疾病之方法，其包含向患有自體免疫疾病之患者投予治療有效量之前述實施例之任一者的人類化 10F4 抗體-藥物接合物。在較佳實施例中，抗體係經靜脈內或皮下投藥。抗體-藥物接合物係以在每次給藥約 1 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ 至約 100 mg/m^2 之範圍內之劑量經靜脈內投藥，且在一特定實施例中，劑量為 1 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ 至約 500 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ 。劑量可經每日一次、每週一次、每週多次，但小於每日一次、每月多次，但小於每日一次、每月多次，但小於每週一次、每月一次或間歇投予以減輕或緩和疾病症狀。可以所揭示之間隔之任一者持續投藥直至待治療之自體免疫疾病之症狀減輕或緩和。可在達成症狀減輕或緩和後持續投藥，其中該緩和或減輕係由該持續投藥延長。

本發明亦提供一種治療 B 細胞病症之方法，其包含向患有 B 細胞病症(諸如 B 細胞增生性病症(其包括(但不限於)淋巴瘤及白血病))或自體免疫疾病之患者投予治療有效量之前述實施例之任一者的人類化 10F4 抗體，該抗體未與細胞

毒性分子或可偵測分子接合。抗體通常應以約 $1 \mu\text{g}/\text{m}^2$ 至約 $1000 \text{ mg}/\text{m}^2$ 之劑量範圍投予。

在一態樣中，本發明進一步提供醫藥調配物，其包含至少一種本發明之抗CD22抗體及/或至少一種其免疫接合物及/或至少一種本發明之抗CD22抗體-藥物接合物。在一些實施例中，醫藥調配物包含1)抗CD22抗體及/或抗CD22抗體-藥物接合物及/或其免疫接合物，及2)醫藥學上可接受之載劑。在一些實施例中，醫藥調配物包含1)抗CD22抗體及/或其免疫接合物，及視情況，2)至少一種額外治療劑。

包含本發明之抗體或免疫接合物或本發明之抗體-藥物接合物之醫藥調配物係藉由將具有所需純度之抗體或抗體-藥物接合物與可選生理學上可接受之載劑、賦形劑或穩定劑(Remington's Pharmaceutical Sciences第16版，Osol, A.編(1980))混合經製備且以水溶液或凍乾或其他乾燥調配物之形式儲存。可接受之載劑、賦形劑或穩定劑在所用劑量及濃度下對接受者無毒，且包括緩衝液，諸如磷酸鹽、檸檬酸鹽、組胺酸及其它有機酸；抗氧化劑，包括抗壞血酸及甲硫胺酸；防腐劑(諸如十八烷基二甲基苄基氯化銨；氯化六羥季銨；氯化苯甲煙銨、苄索氯銨；酚、丁醇或苄醇；對羥基苯甲酸烷酯，諸如對羥基苯甲酸甲酯或對羥基苯甲酸丙酯；兒茶酚；間苯二酚；環己醇；3-戊醇；及間甲酚)；低分子量(少於約10個殘基)多肽；蛋白質，諸如血清白蛋白、明膠或免疫球蛋白；親水性聚合物，諸如聚乙烯吡咯啉酮；胺基酸，諸如甘胺酸、麩醯胺酸、天冬

醯胺酸、組胺酸、精胺酸或離胺酸；單醣、二醣及其它碳水化合物化合物，其包括葡萄糖、甘露糖或糊精；螯合劑，諸如EDTA；糖，諸如蔗糖、甘露糖醇、海藻糖或山梨糖醇；成鹽抗衡離子，諸如鈉離子；金屬錯合物(例如Zn-蛋白質錯合物)；及/或非離子界面活性劑，諸如TWEEN™、PLURONICS™或聚乙二醇(PEG)。用於活體內投藥之醫藥調配物通常為無菌的。此藉由經由無菌過濾膜過濾來容易地實現。

亦可將活性成份截留於(例如)藉由凝聚技術或界面聚合而製備之微膠囊(例如，分別為羥甲基纖維素或明膠-微膠囊及聚(甲基丙烯酸甲酯)微膠囊)、膠狀藥物遞送系統(例如，脂質體、白蛋白微球體、微乳液、奈米顆粒及奈米膠囊)或巨乳液中。該等技術揭示於Remington's Pharmaceutical Sciences第16版，Osol, A.編(1980)中。

亦可製備持續釋放製劑。持續釋放製劑之適當實例包括含有本發明之抗體或免疫接合物之固體疏水性聚合物的半滲透基質，該等基質為成形物品之形式，例如薄膜或微膠囊。持續釋放基質之實例包括聚酯、水凝膠(例如，聚(2-羥基乙基-甲基丙烯酸酯)或聚(乙烯醇))、聚乳酸交酯(美國專利第3,773,919號)、L-麩胺酸及 γ 乙基-L-麩胺酸酯之共聚物、不可降解乙烯-乙酸乙烯酯、可降解乳酸-乙醇酸共聚物(諸如LUPRON DEPOT™(由乳酸-乙醇酸共聚物及乙酸亮丙瑞林構成的可注射微球體))及聚-D-(-)-3-羥基丁酸。儘管聚合物(諸如乙烯-乙酸乙烯酯及乳酸-乙醇酸)使分子釋

放大於100天，但某些水凝膠釋放蛋白歷時更短時期。當經封裝抗體或免疫接合物在體內保持一段長時間時，其可因在37°C下暴露於濕氣中而變性或凝集，其導致生物活性喪失及免疫原性之可能改變。視所涉及之機制而定，可為穩定性而設計合理策略。舉例而言，若發現凝集機制為經由硫基-二硫化物互換形成分子間S-S鍵，則穩定化可藉由改質氫硫基殘基、自酸性溶液凍乾、控制水分含量、使用適當添加物且開發特定聚合物基質組合物而達成。

抗體-藥物接合物治療

其涵蓋本發明之抗體-藥物接合物(ADC)可用於治療多種疾病或病症，例如其特徵在於腫瘤抗原之過度表現。例示性病狀或高度增生性病症包括良性或惡性腫瘤；白血病及淋巴惡性疾病。其他病症包括神經元、神經膠、星形膠質細胞、下丘腦、腺、巨噬細胞、上皮、基質、囊胚腔、發炎性、血管生成及免疫(包括自體免疫)病症。

於動物模型及基於細胞之檢定中鑑別之ADC化合物可於生長腫瘤之高級靈長類動物及人類臨床試驗中進一步測試。人類臨床試驗可經設計以測試本發明之抗CD22單株抗體或免疫接合物在經受B細胞增生性病症之患者中的功效，其中該B細胞增生性病症包括(不加限制)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。臨床試驗可經設計以評估與已知治療方案(諸如涉及已知化學治療劑及/或細胞毒性劑之放射及/或化學療法)組合之ADC之功效。

一般而言，待治療之疾病或病症為高度增生性疾病，諸如B細胞增生性病症及/或B細胞癌症。本文中待治療之癌症之實例包括(但不限於)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)及套細胞淋巴瘤之B細胞增生性病症。

癌症可包含表現CD22之細胞，以使得本發明之ADC能夠與癌細胞結合。為測定癌症中之CD22表現，可用各種診斷/預後性檢定。在一實施例中，可由IHC來分析CD22過度表現。來自腫瘤活組織檢查之嵌入石蠟之組織部分可經受IHC檢定且符合關於染色程度之CD22蛋白染色強度標準，且其中研究腫瘤細胞之比例。

出於預防或治療疾病之目的，ADC之適當劑量應取決於如上所定義之待治療之疾病類型，疾病之嚴重性及過程，分子係出於預防抑或是治療之目的經投藥，先前之療法，患者之病史及對抗體之反應，及主治醫師之判斷。分子合適地一次或經一系列治療投予患者。視疾病之類型及嚴重性而定，無論(例如)藉由一或多次單獨投藥或藉由連續輸液，約1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 至15 mg/kg (例如0.1-20 mg/kg)之分子為向患

者投藥之初始候選劑量。視上文所提及之因素而定，典型每日劑量可在約 1 $\mu\text{g/kg}$ 至 100 mg/kg 或更高劑量之範圍內。待投予患者之 ADC 之例示性劑量在患者體重之約 0.1 mg/kg 至約 10 mg/kg 之範圍內。

對於在若干天或更長時間內重複投藥而言，視病狀而定，治療持續直至發生所需疾病症狀之抑制。例示性給藥方案包含投予約 4 mg/kg 之初始負載劑量之抗體，接著投予約 2 mg/kg 之每週維持劑量的抗 ErbB2 抗體。其他給藥方案可為有用的。藉由習知技術及檢定易於監測此療法之進展。

組合療法

本發明之抗體-藥物接合物 (ADC) 可組合於醫藥組合調配物中，或以組合療法組合於給藥方案中，其中第二化合物具有抗癌特性。醫藥組合調配物或給藥方案之該第二化合物較佳具有與該組合之 ADC 互補之活性以使得其不有害地彼此影響。

第二化合物可為化學治療劑、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。含有本發明之 ADC 之醫藥組合物亦可具有治療有效量之化學治療劑，諸如微管蛋白形成抑制劑、拓撲異構酶抑制劑或 DNA 黏合劑。

在一態樣中，第一化合物為本發明之抗 CD22 ADC 且第二化合物為抗 CD20 抗體 (裸抗體或 ADC)。在一實施例中，

第二化合物為抗CD20抗體利妥昔單抗(Rituxan®)或2H7(Genentech, Inc., South San Francisco, CA)。適用於具有本發明之抗CD22 ADC之組合免疫療法的另一抗體包括(不加限制)抗VEGF(例如, Avastin®)。

其他治療方案可與投予根據本發明鑑別之抗癌劑組合，其包括(不加限制)放射性療法及/或骨髓及周邊血液移植，及/或細胞毒性劑、化學治療劑或生長抑制劑。在該等實施例之一者中，化學治療劑為藥劑或藥劑組合，諸如，環磷醯胺、羥基道諾黴素、阿黴素(adriamycin)、多柔比星(doxorubicin)、長春新鹼(Oncovin™)、潑尼龍、CHOP、CVP或COP；或免疫治療劑，諸如抗CD20(例如，Rituxan®)或抗VEGF(例如，Avastin®)。組合療法可以同時或連續方案投予。當連續投藥時，組合可分兩次或兩次以上投藥進行投予。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，及以任意次序之連續投藥，其中較佳存在一段週期，此時兩種(或所有)活性劑同時發揮其生物活性。

在一實施例中，以ADC進行之治療包括本文中鑑別之抗癌劑與一或多種化學治療劑或生長抑制劑之組合投藥，其包括共同投予不同化學治療劑之混合液。化學治療劑包括紫杉烷(諸如紫杉醇及多烯紫杉醇)及/或蒽環黴素(anthracycline)抗生素。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"，(1992) M.C. Perry編，Williams & Wilkins, Baltimore, Md中。

上述共同投予藥劑之任一者之適合劑量為目前使用之彼等劑量且可歸因於新近鑑別藥劑及其他化學治療劑或治療之組合作用(協同作用)而降低。

組合療法可提供"協同作用"且證明為"協同的"，亦即當一起使用活性成份時達成之效應大於分別使用該等化合物產生之效應之和。當活性成份(1)於組合、單位劑量調配物中共同調配且同時投予或遞送；(2)以單獨調配物交替或平行遞送；或(3)由一些其他方案遞送時，可獲得協同效應。當以交替療法遞送時，當化合物經依序投予或遞送(例如藉由於單獨注射器中不同注射)時，可獲得協同效應，一般而言，在交替療法中，每一活性成份之有效劑量係依序(亦即連續)投予，而在組合療法中，兩種或兩種以上活性成份之有效劑量係共同投予。

抗體-藥物接合物之代謝物

本文中描述之ADC化合物之活體內代謝產物亦處於本發明之範疇內，在一定程度上該等產物為新穎的且不比先前技術明顯。該等產物可來源於(例如)經投予化合物之氧化、還原、水解、醯胺化、酯化、酶性分裂及其類似反應。因此，本發明包括由一方法製備之新穎且不明顯化合物，該方法包含使本發明之化合物與一哺乳動物接觸足以產生其代謝產物之一段時期。

代謝產物通常係由以下步驟來鑑別：製備經放射性標記

(例如 ^{14}C 或 ^3H)ADC；將其以可偵測劑量(例如大於約 0.5 mg/kg)非經腸投予動物(諸如大鼠、小鼠、天竺鼠、猴)或人；容許足夠時間使代謝發生(通常約 30 秒至 30 小時)；且將其轉化產物與尿、血液或其他生物樣品分離。因為其經標記，所以該等產物易於分離(其他係藉由使用能夠與存活於代謝物中之抗原決定基結合之抗體來分離)。以習知方式(例如由 MS、LC/MS 或 NMR 分析)來測定代謝物結構。一般而言，代謝物之分析係以與熟習此項技術者熟知之習知藥物代謝研究相同的方法進行。只要轉化產物不另外在活體內出現，其即適用於治療給藥本發明之 ADC 化合物的診斷檢定。

使用抗 CD22 抗體及免疫接合物之其他方法

診斷方法及偵測方法

在一態樣中，本發明之抗 CD22 抗體及免疫接合物適用於偵測生物樣品中 CD22 之存在。如本文中所使用之術語"偵測"涵蓋定量或定性偵測。在某些實施例中，生物樣品包含細胞或組織。在某些實施例中，該等組織包括相對於其他組織以較高含量表現 CD22 之正常及/或癌組織，例如，B 細胞及/或 B 細胞相關之組織。

在一態樣中，本發明提供一種偵測生物樣品中 CD22 之存在的方法。在某些實施例中，該方法包含在容許抗 CD22 抗體與 CD22 結合之條件下使該生物樣品與抗 CD22 抗體接觸，且偵測該抗 CD22 抗體與 CD22 之間是否形成複合物。

在一態樣中，本發明提供一種診斷與增加之CD22表現相關之病症的方法。在某些實施例中，該方法包含使測試細胞與抗CD22抗體接觸；藉由偵測抗CD22抗體與CD22之結合測定測試細胞之CD22之表現量(定量或定性)；且比較測試細胞之CD22之表現量與對照細胞(例如，與測試細胞相同組織來源之正常細胞或以相當於此正常細胞之量表現CD22之細胞)之CD22之表現量，其中與對照細胞相比測試細胞之較高CD22表現量指示存在與增加之CD22表現相關之病症。在某些實施例中，測試細胞係獲自懷疑患有與增加之CD22表現相關之病症的個體。在某些實施例中，病症為細胞增生性病症，諸如癌症或腫瘤。

可使用本發明之抗體診斷之例示性細胞增生性病症包括B細胞病症及/或B細胞增生性病症，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。

在某些實施例中，診斷或偵測方法(諸如上文中描述之彼等方法)包含偵測抗CD22抗體與CD22之結合，其中該CD22表現於細胞表面上或獲自於其表面上表現細胞之CD22之膜製劑中。在某些實施例中，該方法包含在容許抗CD22抗體與CD22結合之條件下使細胞與抗CD22抗體接觸，且偵測該抗CD22抗體與細胞表面上之CD22之間是否

形成複合物。用於偵測抗CD22抗體與於細胞表面上表現CD22之結合的例示性檢定為"FACS"檢定。

某些其他方法可用於偵測抗CD22抗體與CD22之結合。該等方法包括(但不限於)此項技術中熟知之抗原結合檢定，諸如西方墨點法、放射免疫檢定、ELISA(酶聯結免疫吸附劑檢定)、“夾層”免疫檢定、免疫沈澱檢定、螢光免疫檢定、蛋白A免疫檢定及免疫組織化學(IHC)。

在某些實施例中，抗CD22抗體經標記。標記包括(但不限於)直接偵測之標記或部分(諸如螢光、發色團、電子緻密、化學發光及放射性標記)，以及間接(例如，經由酶反應或分子相互作用)偵測之部分(諸如酶或配位體)。例示性標記包括(但不限於)放射性同位素 ^{32}P 、 ^{14}C 、 ^{125}I 、 ^3H 及 ^{131}I ；螢光團，諸如稀土螯合劑或螢光素及其衍生物；若丹明及其衍生物；丹醯基；傘酮；螢光素酶，例如，螢火蟲螢光素酶及細菌螢光素酶(美國專利第4,737,456號)；螢光素；2,3-二氫酞嗪二酮；辣根過氧化物酶(HRP)；鹼性磷酸酶； β -半乳糖酶；葡萄糖澱粉酶；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，其與使用過氧化氫以氧化染料前驅物之酶(諸如HRP、乳過氧化物酶或微過氧化物酶)偶合；生物素/抗生蛋白；自旋標記；噬菌體標記；穩定自由基及其類似物。

在某些實施例中，抗CD22抗體係固定於不溶性基質上。固定需要將抗CD22抗體與保持自由溶解之任何CD22

分離。此通常係藉由在檢定程序之前如藉由吸附至不溶於水之基質或表面上(Bennich等人, U.S. 3,720,760)或藉由共價偶合(例如, 使用戊二醛交聯)使抗CD22抗體不溶, 或在抗CD22抗體與CD22之間形成複合物後(例如)由免疫沈澱使抗CD22抗體不溶來實現。

診斷或偵測之上述實施例之任一者可使用本發明之免疫接合物替代抗CD22抗體或除抗CD22抗體之外使用本發明之免疫接合物來進行。

治療方法

本發明之抗體或免疫接合物可用於(例如)活體外、離體及活體內治療方法中。在一態樣中, 本發明提供在活體內或活體外抑制細胞生長或增殖的方法, 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抗CD22抗體或其免疫接合物中。"抑制細胞生長或增殖"意謂使細胞之生長或增殖降低至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或100%, 且包括減少細胞死亡。在某些實施例中, 細胞為腫瘤細胞。在某些實施例中, 細胞為B細胞。在某些實施例中, 細胞為(例如)如本文中所例示之異種移植物。

在一態樣中, 本發明之抗體或免疫接合物係用於治療或預防B細胞增生性病徵。在某些實施例中, 細胞增生性病徵係與增加之CD22表現及/或活性相關。舉例而言, 在某些實施例中, B細胞增生性病徵係與B細胞表面上增加之CD22表現相關。在某些實施例中, B細胞增生性病徵為腫

瘤或癌症。由本發明之抗體或免疫接合物治療之B細胞增生性病症的實例包括(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，本發明提供治療B細胞增生性病症之方法，其包含向個體投予有效量之抗CD22抗體或其免疫接合物。在某些實施例中，一種治療B細胞增生性病症之方法包含向個體投予有效量之醫藥調配物，其包含抗CD22抗體或抗CD22免疫接合物及視情況至少一種額外治療劑(諸如下文提供之彼等)。在某些實施例中，一種治療細胞增生性病症之方法包含向個體投予有效量之醫藥調配物，其包含1)包含抗CD22抗體及細胞毒性劑之免疫接合物；及視情況，2)至少一種額外治療劑，諸如下文提供之彼等。

在一態樣中，至少一些本發明之抗體或免疫接合物可與來自除人類之外之物種的CD22結合。因此，本發明之抗體或免疫接合物可用於(例如)在含有CD22之細胞培養物中、在具有與本發明之抗體或免疫接合物交叉反應之CD22的人類或其他哺乳動物(例如黑猩猩、狒狒、絨猿、獼猴及恆河猴、豬或小鼠)中結合CD22。在一實施例中，抗CD22抗體或免疫接合物可用於藉由使抗體或免疫接合物與CD22接觸以形成抗體或免疫接合物-抗原複合物以使得免疫接合物之經接合細胞毒素接近細胞內部來靶向B細

胞上之CD22。在一實施例中，CD22為人類CD22。

在一實施例中，抗CD22抗體或免疫接合物可用於一在患有與增加之CD22表現及/或活性相關之病症的個體中結合CD22之方法，該方法包含向該個體投予抗體或免疫接合物以使得個體中之CD22經結合。在一實施例中，該經結合抗體或免疫接合物係內化於表現CD22之B細胞中。在一實施例中，CD22為人類CD22，且個體為人類個體。或者，個體可為表現與抗CD22抗體結合之CD22之哺乳動物。此外個體可為CD22已引入其中之哺乳動物(例如，藉由投予CD22或藉由表現編碼CD22之轉殖基因)。

抗CD22抗體或免疫接合物可出於治療目的投予人類。此外，可出於獸醫目的將抗CD22抗體或免疫接合物投予表現與抗體交叉反應之CD22的非人類哺乳動物(例如，靈長類動物、豬、大鼠或小鼠)或將其作為人類疾病之動物模型。就後者而言，該等動物模型可適用於評估本發明之抗體或免疫接合物之治療功效(例如，投藥劑量及時程之測試)。

本發明之抗體或免疫接合物可單獨或與其它組合物組合用於療法中。舉例而言，本發明之抗體或免疫接合物可與至少一種額外治療劑及/或佐劑共同投予。在某些實施例中，額外治療劑為細胞毒性劑、化學治療劑或生長抑制劑。在該等實施例之一者中，化學治療劑為藥劑或藥劑組合，諸如，環磷醯胺、羥基道諾黴素、阿黴素(adriamycin)、多柔比星(doxorubicin)、長春新鹼(Oncovin™)、潑尼龍、

CHOP、CVP或COP；或免疫治療劑，諸如抗CD20(例如，Rituxan®)或抗VEGF(例如，Avastin®)，其中該組合療法適用於治療癌症及/或B細胞病症，諸如B細胞增生性病症，其包括淋巴瘤、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。

上文指出之該等組合療法涵蓋組合投藥(其中兩種或兩種以上治療劑包括於同一或單獨調配物中)，及單獨投藥，在此情況下，投予本發明之抗體或免疫接合物可發生於投予額外治療劑及/或佐劑之前、同時及/或之後。本發明之抗體或免疫接合物亦可與輻射療法組合使用。

本發明之抗體或免疫接合物(及任何額外治療劑或佐劑)可藉由任何適合方式投予，其包括非經腸、皮下、腹膜內、肺內及鼻內，且若有必要用於局部治療，則可於病灶內投藥。非經腸輸液包括肌肉內、靜脈內、動脈內、腹膜內或皮下投藥。另外，抗體或免疫接合物亦適於藉由脈動輸液(pulse infusion)、尤其以遞減劑量之抗體或免疫接合物投予。部分地視投藥之短期或長期性而定，可藉由任何適合途徑(例如，藉由注射，諸如靜脈內或皮下注射)給藥。

本發明之抗體或免疫接合物應以與良好醫藥規範相符之方式經調配、給藥及投藥。在此情形下需考慮之因素包括

待治療之特定病症、待治療之特定哺乳動物、個體患者之臨床病狀、病症之病因、藥劑之遞送位點、投藥方法、投藥時程及醫藥從業者已知之其它因素。抗體或免疫接合物並非必需但視情形與一或多種當前用於預防或治療所論及之病症之藥劑一起調配。該等其它藥劑之有效量視存在於調配物中之抗體或免疫接合物的量、病症或治療之類型及上文所論述之其它因素而定。該等藥劑通常係以與本文中所述相同之劑量及投藥途徑使用，或為本文中所述劑量之約1%至99%，或以經驗/臨床上所確定之任何適當劑量及任何適當途徑使用。

為預防或治療疾病，本發明之抗體或免疫接合物之適當劑量(當單獨使用或與一或多種其他額外治療劑(諸如化學治療劑)組合使用時)將視待治療之疾病類型、抗體或免疫接合物之類型、疾病之嚴重性及過程、是否出於預防或治療目的而投予抗體或免疫接合物、先前療法、患者臨床病史及對抗體或免疫接合物之反應及主治醫師之判斷而定。抗體或免疫接合物適於一次或經一系列治療投予患者。視疾病類型及嚴重性而定，約1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 至100 mg/kg (例如，0.1 mg/kg -20 mg/kg)之抗體或免疫接合物可為(例如)藉由一或多次單獨投藥或藉由連續輸液而投予患者之初始候選劑量。視上文所提及之因素而定，典型每日劑量可在約1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 至100 mg/kg 或更高劑量之範圍內。對於經若干天或更長時間重複投藥而言，視病狀而定，通常會持續治療直至出現對於疾病症狀之所需抑制。抗體或免疫接合物之一

例示性劑量應在約0.05 mg/kg至約10 mg/kg之範圍內。因此，約0.5 mg/kg、2.0 mg/kg、4.0 mg/kg或10 mg/kg之一或多種劑量(或其任何組合)之抗體或免疫接合物可投予患者。該等劑量可間歇投予，例如每週或每三週(例如，使得患者接收約兩個劑量至約二十個劑量或(例如)約六個劑量之抗體或免疫接合物)。可投予較高之初始負載劑量，接著一或多種較低劑量。例示性給藥方案包含投予約4 mg/kg之初始負載劑量之抗體，接著投予約2 mg/kg之每週維持劑量的抗體。然而，其它給藥方案亦可用。藉由習知技術及檢定易於監測此療法之進展。

檢定

本發明之抗CD22抗體及免疫接合物可由此項技術中已知之各種檢定來表徵其物理/化學性質及/或生物活性。

活性檢定

在一態樣中，提供用於鑑別具有生物活性之抗CD22抗體或其免疫接合物的檢定。生物活性可包括(例如)抑制細胞生長或增殖之能力(例如，"殺死細胞"活性)，或誘發細胞死亡(其包括漸進式細胞死亡(細胞凋亡))之能力。亦提供在活體內及/或活體外具有此生物活性之抗體或免疫接合物。

在某些實施例中，在活體外測試抗CD22抗體或其免疫接合物抑制細胞生長或增殖之能力。此項技術中熟知關於細胞生長或增殖之抑制作用的檢定。由本文中描述之"殺死細胞"檢定例示之關於細胞增殖之某些檢定量測細胞生

存力。一種此檢定為 CellTiter-Glo™ 發光細胞生存力檢定，其係購自 Promega (Madison, WI)。彼檢定根據存在之 ATP 之定量測定培養物中活細胞之數目，其為代謝活細胞之指示。參見 Crouch 等人 (1993) *J. Immunol. Meth.* 160:81-88，美國專利第 6602677 號。該檢定可以 96 孔或 384 孔形式進行，其使其可進行自動高產量篩檢 (HTS)。參見 Cree 等人 (1995) *AntiCancer Drugs* 6:398-404。檢定程序包括直接向培養細胞中添加單一試劑 (CellTiter-Glo® 試劑)。此引起細胞溶解及由螢光素酶反應產生之發光信號的產生。該發光信號與存在之 ATP 量成正比，該 ATP 量與培養物中存在之活細胞之數目直接成正比。資料可由照度計或 CCD 攝影機成像裝置記錄。發光輸出表示為相對光單位 (RLU)。

關於細胞增殖之另一檢定為 "MTT" 檢定，其為量測溴化 3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯基四唑鹽藉由粒線體還原酶氧化為甲臍之比色檢定。如 CellTiter-Glo™ 檢定一樣，此檢定指示細胞培養物中存在之代謝活性細胞的數目。參見 (例如) Mosmann (1983) *J. Immunol. Meth.* 65:55-63，及 Zhang 等人 (2005) *Cancer Res.* 65:3877-3882。

在一態樣中，在活體外測試抗 CD22 抗體誘發細胞死亡之能力。此項技術中熟知關於誘發細胞死亡之檢定。在一些實施例中，該等檢定量測 (例如) 如由碘化丙啶 (PI)、錐蟲藍 (參見 Moore 等人 (1995) *Cytotechnology*, 17:1-11) 或 7AAD 之吸收所指示之膜完整性的喪失。在一例示性 PI 吸收檢定中，細胞係培養於杜貝卡氏經修飾依格培養基 (D-

MEM)中：經10%熱滅活FBS(Hyclone)及2 mM L-麩醯胺酸補充之Ham's F-12(50:50)。因此，檢定係在不存在補體及免疫效應細胞之情況下進行。在100×20 mm盤中以每盤 3×10^6 之密度使細胞接種且使其附著隔夜。將培養基移除且以單獨之新鮮培養基或含有各種濃度之抗體或免疫接合物的培養基替代。將該等細胞培養3天之時期。處理之後，將單層以PBS洗滌且藉由胰蛋白酶化作用脫離。隨後將細胞在4℃下以1200 rpm離心5分鐘，將小球再懸浮於3 ml冷 Ca^{2+} 結合緩衝液(10 mM Hepes(pH 7.4)、140 mM NaCl、2.5 mM CaCl_2)中且等分入35 mm濾器封蓋之12×75 mm管(每管1 ml，每處理群3個管)中以移除細胞塊。管隨後接收PI(10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)。使用一FACSCAN™流式細胞儀及FACSCONVERT™ CellQuest軟體(Becton Dickinson)分析樣品。如由PI吸收所測定誘發統計學上顯著量之細胞死亡的抗體或免疫接合物因此經鑑別。

在一態樣中，在活體外測試抗CD22抗體或免疫接合物誘發細胞凋亡(漸進式細胞死亡)之能力。關於誘發細胞凋亡之抗體或免疫接合物的例示性檢定為膜聯蛋白(annexin)結合檢定。在一例示性annexin結合檢定中，細胞係於如前述段落中所論述之盤中培養且接種。將培養基移除且以單獨之新鮮培養基或含有0.001 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 至10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 之抗體或免疫接合物的培養基替代。在三天之培養時期後，將單層以PBS洗滌且藉由胰蛋白酶化作用脫離。隨後將細胞離心，再懸浮於 Ca^{2+} 結合緩衝液中，且等分入如前述段落中所論

述之管中。管隨後接收經標記 annexin(例如 annexin V-FITC)(1 $\mu\text{g/ml}$)。使用一 FACSCAN™ 流式細胞儀及 FACSCONVERT™ CellQuest 軟體(BD Biosciences)分析樣品。相對於對照物誘發統計學上顯著量之 annexin 結合的抗體或免疫接合物因此經鑑別。關於誘發細胞凋亡之抗體或免疫接合物之另一例示性檢定為用於偵測基因組 DNA 之核小體間降解的組蛋白 DNA ELISA 比色檢定。該檢定可使用(例如)細胞死亡偵測 ELISA 套組(Roche, Palo Alto, CA)進行。

適用於上述活體外檢定之任一者之細胞包括天然表現 CD22 或已經改造以表現 CD22 之細胞或細胞株。該等細胞包括相對於同一組織來源之正常細胞過度表現 CD22 之腫瘤細胞。該等細胞亦包括表現 CD22 之細胞株(包括腫瘤細胞株)及未正常表現 CD22 但已經編碼 CD22 之核酸轉染的細胞株。

在一態樣中，在活體內測試抗 CD22 抗體或其免疫接合物抑制細胞生長或增殖之能力。在某些實施例中，在活體內測試抗 CD22 抗體或其免疫接合物抑制腫瘤生長之能力。活體內模型系統(諸如異種移植物模型)可用於該測試。在一例示性異種移植物系統中，將人類腫瘤細胞引入經適當免疫折衷之非人類動物(例如，一 SCID 小鼠)中。將本發明之抗體或免疫接合物投予動物。量測抗體或免疫接合物抑制或降低腫瘤生長之能力。在上述異種移植物系統之某些實施例中，人類腫瘤細胞為來自人類患者之腫瘤細胞。

胞。用於製備異種移植物模型之該等細胞包括人類白血病及淋巴瘤細胞株，其包括(不加限制)BJAB-luc細胞(經螢光素酶報導體基因轉染之EBV陰性伯基特淋巴瘤細胞株)、Ramos細胞(ATCC, Manassas, VA, CRL-1923)、Raji細胞(ATCC, Manassas, VA, CCL-86)、SuDHL-4細胞(DSMZ, Braunschweig, Germany, AAC 495)、DoHH2細胞(參見Kluin-Neilemans, H.C.等人, Leukemia 5:221-224 (1991)及Kluin-Neilemans, H.C. 等人, Leukemia 8:1385-1391 (1994))、Granta-519細胞(參見Jadayel, D.M. 等人, Leukemia 11(1):64-72 (1997))。在某些實施例中，人類腫瘤細胞係藉由皮下注射或藉由移植入一適合位點(諸如一乳房脂肪墊)中而引入一經適當免疫折衷之非人類動物中。

結合檢定及其他檢定

在一態樣中，測試抗CD22抗體之抗原結合活性。舉例而言，在某些實施例中，測試抗CD22抗體與表現於細胞表面上之CD22結合之能力。一FACS檢定可用於此測試。

在一態樣中，競爭檢定可用於鑑別與鼠10F4.4.1抗體、人類化10F4v1抗體、人類化10F4v3抗體及/或鼠5E8.1.8抗體競爭結合CD22之單株抗體。在某些實施例中，此競爭抗體結合至由鼠10F4.4.1抗體、人類化10F4v1抗體、人類化10F4v3抗體及/或鼠5E8.1.8抗體結合之相同抗原決定基(例如，線性或構形抗原決定基)上。例示性競爭檢定包括(但不限於)常規檢定，諸如Harlow及Lane (1988)

Antibodies: A Laboratory Manual, 第14章 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY)中提供之彼等檢定。用於定位抗體所結合之抗原決定基之詳細例示性方法提供於Methods in Molecular Biology中Morris (1996) "Epitope Mapping Protocols," 第66卷 (Humana Press, Totowa, NJ)中。據稱若每一者阻止另一者之結合50%或更多, 則兩種抗體與相同抗原決定基結合。

在一例示性競爭檢定中, 經固定CD22係於溶液中培養, 該溶液包含與CD22結合之第一經標記抗體(例如, 鼠10F4.4.1抗體、人類化10F4v1抗體、人類化10F4v3抗體及/或鼠5E8.1.8抗體)及待測試其與該第一抗體競爭結合CD22之能力的第二未經標記抗體。該第二抗體可存在於融合瘤上層清液中。作為對照, 將經固定CD22培養於包含第一經標記抗體但不包含第二未經標記抗體之溶液中。在容許第一抗體與CD22結合之條件下培養後, 移除過量未結合抗體, 且量測與固定CD22相關之標記之量。若相對於對照樣品, 測試樣品中與固定CD22相關之標記之量大體上減少, 則其指示第二抗體與第一抗體競爭結合CD22。在某些實施例中, 固定CD22存在於細胞表面上或獲自於其表面上表現CD22之細胞之膜製劑中。

在一態樣中, 經純化抗CD22抗體可進一步藉由一系列檢定來表徵, 該等檢定包括(但不限於)N末端測序、胺基酸分析、不變性尺寸排阻高壓液相層析(non-denaturing size exclusion high pressure liquid chromatography)

(HPLC)、質譜、離子交換層析及木瓜酵素消化。

在一實施例中，本發明涵蓋一種已變化之抗體，其具有一些但並非所有效應功能，此使其成為其中抗體在活體內之半衰期為重要的而某些效應功能(諸如補體及ADCC)卻並非必需或有害之多種應用中合乎需要之候選抗體。在某些實施例中，量測抗體之Fc活性以確保僅所需特性得以保持。可進行活體外及/或活體內細胞毒性檢定以確定CDC及/或ADCC活性之降低/減小。舉例而言，可進行Fc受體(FcR)結合檢定以確保抗體缺乏FcγR結合(由此可能缺乏ADCC活性)，但仍保持FcRn結合能力。介導ADCC、NK細胞之初級細胞僅表現Fc(RIII，而單核細胞表現Fc(RI、Fc(RII及Fc(RIII。造血細胞上之FcR表現概述於Ravetch及Kinet, Annu. Rev. Immunol 9:457-92 (1991)第464頁表3中。評估所關注分子之ADCC活性之活體外檢定的實例描述於美國專利第5,500,362號或第5,821,337號中。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。或者或另外，所關注分子之ADCC活性可在活體內評估，例如，於諸如Clynes等人，PNAS (USA) 95:652-656 (1998)中揭示之動物模型中。亦可進行C1q結合檢定以確定抗體無法與C1q結合且因此缺乏CDC活性。為評估補體活化，可進行(例如)如Gazzano-Santoro等人，J. Immunol. Methods 202:163 (1996)中所述之CDC檢定。亦可使用此項技術中已知之方法進行FcRn結合及活體內清除/半衰期測定。

實例

以下為本發明之方法及組合物之實例。應瞭解可基於上文所提供之一般描述來實施各種其它實施例。

實例1：製備鼠抗人類CD22單株抗體

製備能夠特異性結合人類CD22之鼠單株抗體。於Ribi佐劑中以經純化缺乏域3及4之人類CD22 his-8標記之細胞外域(SEQ ID NO:30(ECD)加在C末端之序列GRAHHHHHHHH)或包含域1-7之CD22 his-8標記之細胞外域(SEQ ID NO:28(ECD)加上述His序列標記)對六週齡BALB/c母小鼠在其足墊內免疫。在初始免疫後一週及三週時以相同方式進行隨後注射。在最終注射三天後，將腹股溝及腿彎部淋巴結移除且彙集，且藉由使組織穿過鋼紗網來製得單一細胞懸浮液。以4:1比率將細胞與小鼠骨髓瘤(諸如P3X63-Ag8.653(ATCC CRL 1580))融合於含有50% w/v聚乙二醇4000之高葡萄糖(DMEM)中)。隨後將經融合細胞以每孔 2×10^5 之密度塗於96孔組織培養盤中。24小時後添加HAT選擇性培養基(次黃嘌呤/胺基喋呤/胸苷，Sigma, #H0262)。在融合15天後，使用酶聯結免疫吸附劑檢定(ELISA)對生長細胞之上層清液測試對人類CD22具特異性之抗體的存在。

根據展示抗體與人類CD22特異性結合之基於細胞之檢定及培養盤檢定選擇鼠抗人類CD22 10F4.4.1(mu 10F4)及5E8.1.8(mu 5E8)單株抗體用於進一步研究。該等檢定描述於以下段落中。

基於ELISA之檢定：根據ELISA進行之抗CD22抗體篩檢係如下進行，其中所有培養係在室溫下進行。將測試培養盤(Nunc Immunoplate)以於50 mM碳酸鈉緩衝液(pH 9.6)中之經純化CD22塗覆2小時，隨後以於經磷酸鹽緩衝之鹽水(PBS)中之0.5%牛血清白蛋白阻斷30分鐘，隨後以含有0.05% Tween 20(PBST)之PBS洗滌四次。添加測試抗體上層清液且在震盪下將其培養兩小時，隨後以PBST洗滌四次。藉由添加每孔100 μ l含有10 mg鄰伸苯基二胺二鹽酸鹽(Sigma, #P8287)之溶液及10 μ l於25 ml磷酸鹽檸檬酸鹽緩衝液(pH 5.0)中之30%過氧化氫溶液，且培養15分鐘來培育該等培養盤。藉由添加每孔100 μ l之2.5 M硫酸來終止反應。藉由在490 nm之吸光度下於一自動ELISA板讀取器中讀取培養盤來獲得資料。

實例2：用於分析抗人類CD22單株抗體(MAb)之基於FACS的檢定

在4°C下以於100 μ l FACS緩衝液(0.1 % BSA, 10 mM疊氮化鈉於PBS中, pH 7.4)中之抗CD22融合瘤上層清液將於其表面上表現人類CD22之CHO細胞培養30分鐘，接著以FACS緩衝液洗滌一次。藉由在4°C下以與山羊或兔抗小鼠IgG(Accurate Chem. Co., Westbury, NY)(對於鼠測試抗體而言)或山羊或兔抗人類IgG(對於人類化抗體而言)接合之多株FITC將抗體/細胞混合物之等分試樣培養30分鐘，接著以FACS緩衝液洗滌三次來測定抗CD22結合之量。

實例3：製備人類化抗CD22抗體

產生人類化10F4抗體，其中高變區(HVR)胺基酸殘基(可互換稱作互補判定區或CDR)係經由定點突變誘發(Kunkel等人，Methods Enzymol. (1987), 154:367-382)修飾以得到兩種變異體，人類化10F4v1及人類化10F4v2(在本文中亦分別被稱作"10F4v1"、"hu10F4v1"、"10F4v2"或"hu10F4v2")。在本文中揭示之一些研究中所使用之第三形式人類化10F4v3("10F4v3"或"hu10Fv3")具有與hu10F4v2之成熟蛋白相同之輕鏈及重鏈胺基酸序列，但在用於蛋白表現之載體中包含不同信號序列。

如本文中所揭示進行鼠10F4抗體之人類化。簡言之，將鼠10F4之輕鏈及重鏈之高變區選殖入經修飾一致框架序列中以產生圖2A及圖2B中所示之輕鏈及重鏈可變區胺基酸序列。可用作本發明之抗體之框架序列的替代性輕鏈及重鏈框架序列展示於圖3及圖4中。

大體上如Lee等人，*J. Mol. Biol.* 340:1073-93 (2004)中所述，在*phoA*啟動子之控制下具有兩個開放閱讀框架之單價Fab-g3呈現載體(pV0350-2B)噬菌粒係用於10F4抗體之人類化中。第一開放閱讀框架包含融合於受體輕鏈序列之VL及CH1域中之關於蛋白分泌之大腸桿菌熱穩定STII信號序列。第二開放閱讀框架包含融合於受體重鏈序列之VH及CH1域、接著截斷次要噬菌體鞘蛋白P3中的STII信號序列。

將來自鼠10F4之VH及VL域(分別為SEQ ID NO:89及SEQ ID NO:90)分別與人類亞群III一致VH(huIII)域(SEQ ID

NO:24)及人類一致 κ I(huK1)域(SEQ ID NO:25)比對。將鼠抗人類CD22 MA b 10F4之高變區之胺基酸序列(HVR, 在本文中可互換稱作互補判定區(CDR))插入如下一致框架序列中。將mu 10F4抗體之輕鏈HVR(HVR-L1(Kabat位置24-34)、HVR-L2(Kabat位置50-56)及HVR-L3(Kabat位置89-97))改造為人類 κ I(huKI)一致序列抗體框架以產生人類化10F4v1輕鏈(SEQ ID NO:17, 圖2B)。mu 10F4抗體之重鏈HVR(HVR-H1(Kabat位置26-35)、HVR-H2(Kabat位置49-65)及HVR-H3(Kabat位置95-102))經改造為經修飾人類亞群III(humIII)一致VH域, 其在三個位置: R71A、N73T及L78A處與humIII序列不同, 其係用於(參見Carter等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4285 (1992))產生人類化10F4v1重鏈可變區(SEQ ID NO:16, 圖2A)。對於每一高變區使用單獨寡核苷酸藉由Kunkel突變誘發來進行HVR之遺傳工程使其進入受體框架中。由標準DNA測序技術來測定每一純系之序列。圖2A及圖2B中展示之高變區及框架區係根據Kabat編號(Kabat等人(1991), 同上文)進行編號。對輕鏈及重鏈測序且huKI、humIII、鼠10F4、人類化10F4v1及人類化10F4v2之可變區(包括HVR及框架區(FR))之胺基酸序列展示於圖2A及圖2B中。人類化10F4v3抗體具有與10F4v2相同之胺基酸序列。

編碼抗體、抗體片段、VL域或VH域之胺基酸序列變異體的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、抗體片段、VL域或VH域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。舉例而言，對於使用Kunkel方法經變異體胺基酸取代之胺基酸而言，可藉由於VH及視情況於一或多種CDR中靶向VL可接近胺基酸位置來產生庫。參見(例如)Kunkel等人，Methods Enzymol. (1987), 154:367-382及其中之實例。隨機序列之產生亦描述於以下實例中。

寡核苷酸之序列包括本發明之多肽之CDR(HVR)或FR區中特定位置之一或多個指定密碼子組。密碼子組為用於編碼所需變異體胺基酸之一組不同核苷酸三重態序列。根據IUB碼，如下文所示，可使用符號來表示密碼子組以指示特定核苷酸或核苷酸之等莫耳混合物。

IUB碼

G 鳥嘌呤

A 腺嘌呤

T 胸嘧啶

C 胞嘧啶

R(A或G)

Y(C或T)

M(A或C)

K(G或T)

S(C或G)

W(A或T)

H(A 或 C 或 T)

B(C 或 G 或 T)

V(A 或 C 或 G)

D(A 或 G 或 T)

N(A 或 C 或 G 或 T)

舉例而言，在密碼子組 DVK 中，D 可為核苷酸 A 或 G 或 T；V 可為 A 或 G 或 C；且 K 可為 G 或 T。此密碼子組可表示 18 種不同密碼子且可編碼胺基酸 Ala、Trp、Tyr、Lys、Thr、Asn、Lys、Ser、Arg、Asp、Glu、Gly 及 Cys。

可使用標準方法來合成寡核苷酸或引子組。可(例如)藉由固相合成來合成一組寡核苷酸，其含有表示由密碼子組提供之核苷酸三重態之所有可能組合且應編碼所需胺基酸基團的序列。此項技術中熟知在特定位置具有選定核苷酸"簡并"之寡核苷酸的合成。具有特定密碼子組之該等核苷酸組可使用商業核酸合成器(獲自(例如)Applied Biosystems, Foster City, CA)來合成，或可購得(例如，自Life Technologies, Rockville, MD)。因此，具有特定密碼子組之一組經合成寡核苷酸通常應包括具有不同序列之複數個寡核苷酸，由密碼子組建立之差異在整個序列內。如根據本發明所使用，寡核苷酸具有容許可變域核酸模板雜交之序列且亦可包括用於選殖目的之限制酶位點。

在一方法中，編碼變異體胺基酸之核酸序列可由寡核苷酸介導之突變誘發來產生。如 Zoller 等人，1987, Nucleic Acids Res. 10:6487-6504 中所述，此項技術中熟知此技

術。簡言之，編碼變異體胺基酸之核酸序列係藉由將編碼所需密碼子組之寡核苷酸與DNA模板雜交而產生，其中該模板為單鏈形式之含有可變區核酸模板序列之質體。雜交後，DNA聚合酶係用於合成該模板之整個第二互補鏈，其因此應併入寡核苷酸引子中且應含有如由寡核苷酸組所提供之密碼子組。

一般而言，使用長度為至少25個核苷酸之寡核苷酸。最佳寡核苷酸應具有與編碼突變之核苷酸之任一側上的模板完全互補的12至15個核苷酸。此確保寡核苷酸會與單鏈DNA模板分子適當雜交。寡核苷酸易於使用此項技術中已知之技術(諸如由Crea等人，Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA, 75:5765 (1978)所述之技術)來合成。

DNA模板係由衍生自噬菌體M13載體之彼等載體(市售M13mp18及M13mp19載體為適合的)，或如Viera等人，Meth. Enzymol., 153:3 (1987)所述含有單鏈噬菌體複製起點的彼等載體來產生。因此，經突變之DNA可插入該等載體之一者中以產生單鏈模板。該單鏈模板之產生描述於上文Sambrook等人之4.21-4.41部分中。

為改變天然DNA序列，寡核苷酸係在適合雜交條件下與單鏈模板雜交。隨後使用寡核苷酸作為合成引子，添加DNA聚合酶(通常T7 DNA聚合酶或DNA聚合酶I之Klenow片段)以合成模板之互補鏈。如此形成異源雙鏈分子以使得一DNA鏈編碼基因1之突變形式，且另一鏈(原始模板)編碼基因1之天然、未改變序列。隨後將此異源雙鏈分子

轉化入適合宿主細胞(通常原核生物，諸如大腸桿菌 JM101)中。在使該等細胞生長之後，將其塗於瓊脂糖培養盤上且使用經³²-磷酸鹽放射性標記之寡核苷酸引子篩檢以鑑別含有突變DNA之菌落。

上文剛剛描述之方法可經修改以使得產生其中質體之兩個鏈均含有突變之同源雙鏈分子。該等修改如下：將單鏈寡核苷酸黏接至如上所述之單鏈模板上。將三種脫氧核糖核苷酸、脫氧核糖腺苷(dATP)、脫氧核糖鳥苷(dGTP)及脫氧核糖胸苷(dTT)之混合物與被稱作dCTP-(aS)之經修飾硫代脫氧核糖胞嘧啶(其可獲自Amersham)組合。將此混合物添加至模板-寡核苷酸複合物中。在將DNA聚合酶添加至此混合物中之後，產生除突變鹼基之外與模板相同之DNA鏈。另外，此新DNA鏈應含有dCTP-(aS)而非dCTP，其用於保護其不發生限制性核酸內切酶消化。在雙鏈異源雙鏈之模板鏈經適當限制酶切斷後，該模板鏈可晚於含有待誘變之位點之區域經ExoIII核酸酶或另一適當核酸酶消化。隨後終止反應以留下僅為部分單鏈之分子。隨後在所有四種脫氧核糖核苷酸三磷酸鹽、ATP及DNA連接酶存在下使用DNA聚合酶來形成完全雙鏈DNA同源雙鏈。此同源雙鏈分子隨後可轉化入適合宿主細胞中。

如先前所示，寡核苷酸組之序列足夠長以與模板核酸雜交且亦可(但非必需)含有限制位點。DNA模板可由來源於噬菌體M13載體或如Viera等人((1987) Meth. Enzymol., 153:3)所述之含有單鏈噬菌體複製起點之載體的彼等載體

產生。因此，待突變之DNA應插入該等載體之一者中以產生單鏈模板。該單鏈模板之產生描述於上文Sambrook等人之4.21-4.41部分中。

根據另一方法，可藉由提供上游及下游寡核苷酸組來產生庫，每一組具有複數個具有不同序列之寡核苷酸，該等不同序列係由在該等寡核苷酸之序列內提供之密碼子組建立。上游及下游寡核苷酸組以及可變域模板核酸序列可用於聚合酶鏈反應中以產生PCR產物之"庫"。因為該等PCR產物可使用已建立分子生物學技術與其他相關或不相關核酸序列(例如，病毒鞘蛋白及二聚化域)融合，所以其可被稱作"核酸盒"。

寡核苷酸組可用於使用可變域核酸模板序列作為模板以產生核酸盒之聚合酶鏈反應中。該可變域核酸模板序列可為含有靶向核酸序列(亦即，編碼為取代靶向之胺基酸之核酸序列)之重免疫球蛋白鏈的任何部分。可變區核酸模板序列為具有第一核酸鏈及互補第二核酸鏈之雙鏈DNA分子的一部分。可變域核酸模板序列含有至少一部分可變域且具有至少一個CDR。在一些情況下，可變域核酸模板序列含有一個以上CDR。可變域核酸模板序列之上游部分及下游部分可經靶向以與上游寡核苷酸組及下游寡核苷酸組之成員雜交。

上游引子組之第一寡核苷酸可與第一核酸鏈雜交且下游引子組之第二寡核苷酸可與第二核酸鏈雜交。寡核苷酸引子可包括一或多個密碼子組且經設計以與一部分可變區核

酸模板序列雜交。使用該等寡核苷酸可將兩個或兩個以上密碼子組在PCR之後引入PCR產物(亦即，核酸盒)中。與編碼抗體可變域之核酸序列區雜交的寡核苷酸引子包括編碼靶向胺基酸取代之CDR殘基的部分。

上游及下游寡核苷酸組亦可經合成以在寡核苷酸序列內包括限制位點。該等限制位點可有助於將核酸盒(亦即，PCR反應產物)插入具有額外抗體序列之表現載體中。在一實施例中，該等限制位點經設計以便利核酸盒之選殖而不引入外來核酸序列或移除原始CDR或框架核酸序列。

核酸盒可經選殖入用於表現一部分或整個含有經由PCR反應產生之靶向胺基酸取代之輕鏈或重鏈序列的任何適合載體中。根據本發明中詳述之方法，核酸盒經選殖入容許產生一部分或整個與病毒鞘蛋白之全部或一部分融合(亦即，產生融合蛋白)之輕鏈或重鏈序列的載體中且呈現於粒子或細胞之表面上。儘管若干類型之載體為可用的且可用於實施本發明，但噬菌粒載體為本文中使用的較佳載體，因為其可相對簡易地建構，且可易於擴增。噬菌粒載體通常含有多種組份，其包括啟動子、信號序列、表現型選擇基因、複製位點起點及一般技術者已知之其他必要組份。

當特定變異體胺基酸組合待表現時，核酸盒含有能夠編碼重鏈或輕鏈可變域之全部或一部分且能夠編碼變異體胺基酸組合的序列。為製備含有該等變異體胺基酸或變異體胺基酸之組合之抗體，如在庫中，核酸盒可插入含有額外

抗體序列之表現載體中，例如輕鏈及重鏈可變區之可變域或恆定域之全部或部分。該等額外抗體序列亦可與其他核酸序列(諸如編碼病毒鞘蛋白之序列)融合且因此容許產生融合蛋白。

實例4：可變區序列測定

鼠及人類化10F4單株抗體之核酸及胺基酸序列係經由標準程序來測定。使用RNeasy® Mini Kit(Qiagen, Germany)自產生小鼠抗人類CD22 10F4.4.1單株抗體之融合瘤細胞萃取全部RNA。使用具有簡并引子之RT-PCR擴增輕鏈可變域(VL)及重鏈可變域(VH)。正向引子對抗體之VL及VH域之N末端胺基酸序列具特異性。輕鏈及重鏈反向引子分別經設計以黏接至輕鏈恆定域(CL)及重鏈恆定域1(CH1)中之區域，其在物種之間為高保守性的。將擴增VH及VL選殖入pRK哺乳動物細胞表現載體中(Shields等人，J. Biol. Chem. 276:659-04 (2000))。使用常規測序方法來確定插入子之聚核苷酸序列。鼠嵌合10F4及人類化10F4v1及人類化10F4v2輕鏈及重鏈可變區之胺基酸序列展示於圖2A及圖2B中。

人類化10F4v1在HVR-L1位置28(N28)(SEQ ID NO:9)處經進一步修飾(參見圖2B)。在彼位置上之天冬醯胺酸殘基經纈胺酸殘基(N28V)置換以產生hu10F4v2及hu10F4v3變異體之HVR-L1(SEQ ID NO:10)，其展示改良之結合親和力。該等變異體包含成熟抗體之相同可變域及恆定域序列且不同之處僅在於在本發明之成熟抗體中未發現信號序

列。

在 hu10F4v1 之 HVR-L1 高變區 (參見圖 2B) 之胺基酸 Asn28(N28) 及 / 或 Asn30(N30) 之一者或兩者處產生額外胺基酸序列修飾。因為 N28 及 N30 為去胺作用之可能位點，所以在該等位點上測試到胺基酸變化。舉例而言，在位置 28(N28) 處之天冬醯胺酸或者經 A、Q、S、D、V 或 I 置換，且在位置 30(N30) 處之天冬醯胺酸或者經 A 或 Q 置換。根據本發明之 HVR-L1 域中之胺基酸序列變化以及藉由使用標準程序於一噬菌體 ELISA 檢定中之競爭分析測試之其結合親和力 (IC50) 提供於表 2 中。

表 2

hu 10F4v1 抗體之取代變異體

胺基酸變化於HVR-L1中圖2B	HVR-L1 SEQ ID NO	結合親和力(nM)
無變化(N28, N30)	9	8
N28A, N30	19	8
N28Q, N30	20	7.3
N28S, N30	21	12
N28D, N30	22	12
N28V, N30	10	7.3
N28I, N30	23	9.8
N28, N30A	32	7.7
N28, N30Q	33	10

為產生人類化 10F4 抗體之全長人類 IgG1 形式，重鏈及輕鏈分別經次選殖入前述 pRK 質體中 (Gorman, C.M. 等人 (1990), DNA Protein Eng. Tech. 2: 3)。適當重鏈及輕鏈質體 (視所需序列變化而定) 係使用高效程序 (Graham 等人，

同上文及Gorman, C.M., Science 221: 551)經共轉染入經腺病毒轉化之人類胚胎腎細胞株(稱作293)中(Graham, F.L.等人(1977), J. Gen. Virol. 36: 59)。將培養基變為不含血清且每日收集培養基多達5天。使用蛋白A-瓊脂糖CL-4B(Pharmacia)自彙集上層清液純化抗體。藉由G25凝膠過濾將溶離抗體緩衝交換入PBS中，使用一Centriprep-30或Centricon-100(Millipore)藉由超濾將其濃縮且儲存於4℃下。使用全IgG-結合ELISA測定抗體濃度。

根據本發明之例示性重鏈IgG1恆定域描述於圖5A中。一例示性人類輕鏈κ恆定域包含(例如)RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHDVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC(SEQ ID NO:37)。h10F4v2之全長胺基酸序列展示於圖5B中，其中輕鏈及重鏈之恆定區係由底線指示。h10F4v1、v2及v3抗體為IgG1同型。

表徵抗CD22抗體

實例5：抗原決定部位定位：

根據以下程序測定10F4.4.1及5E8.1.8抗體所結合之CD22之抗原決定基。主要CD22同功異型物(CD22β)之缺乏各種七個類免疫球蛋白域之CD22序列經選殖且轉化入細胞中以穩定表現。舉例而言，缺乏域1(Δ1)、域2(Δ2)或域3及4(Δ3,4)之CD22變異體經選殖、轉化入CHO細胞中，且表現於細胞上。對照細胞表現CD22β。使用Stratagene

QuikChange XL™試劑套組進行缺失。藉由胺基酸22-138之缺失來進行域1之缺失；藉由胺基酸139-242之缺失來進行域2之缺失；且缺失域3及4係用作次要同功異型物CD22α(胺基酸241-417之缺失)。所有胺基酸數目係指由Wilson, G.L.等人作出之全長前驅物CD22β之編號，(參見圖1，於Wilson, G.L.等人，J. Exp. Med. 173:137-146 (1991)中)。圖14為缺失域之圖。使用同型對照物藉由流式細胞儀測定結合。使用山羊抗小鼠IgG Alexa 488偵測10F4.4.1之結合。使用生物素化山羊抗小鼠IgG加抗生蛋白鏈菌素PE偵測5E8.1.8之結合。在不存在特定ECD域之情況下對鼠10F4.4.1或鼠5E8.1.8抗體之結合的有害影響指示抗體與彼等域結合。鼠10F4.4.1及5E8.1.8展示在該等條件下相同之結合特性。不與缺乏域1或域2之CD22結合，且與包含域1及2但缺乏域3及4之CD22結合。使用此方法，測定在自SEQ ID NO:27之胺基酸22至胺基酸240之序列內，10F4.4.1及5E8.1.8與人類CD22之域1及2結合(參見Wilson, G.L.等人(1991)，同上文)。

實例6：對可溶性抗原之結合親和力的表徵

使用一BIACORE® 3000系統(Biacore, Inc., Piscataway, NJ)藉由表面電漿共振量測來測定鼠及人類化10F4抗體對於可溶性CD22細胞外域(ECD)的結合親和力。簡言之，根據供應商之指示以*N*-乙基-*N'*-(3-二甲基胺基丙基)-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.)。以用10

mM 乙 酸 鈉 (pH 4.8) 稀 釋 至 5 $\mu\text{g/ml}$ 之 抗 CD22 IgG1 抗 體 10F4(鼠 或 人 類 化) 塗 覆 該 等 經 活 化 晶 片， 隨 後 以 每 分 鐘 5 μl 之 流 動 速 率 注 射 以 達 成 約 500 個 回 應 單 元 (RU) 之 偶 合 抗 體。 其 次， 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 30 μl 之 流 動 速 率 將 兩 倍 連 續 稀 釋 之 人 類 CD22- β -ECD-His 標 記 之 可 溶 性 抗 原 (約 500 nM 至 約 7.8 nM) 注 射 入 具 有 0.05% Tween 20 之 PBS 中。 使 用 一 簡 單 一 對 一 朗 繆 耳 結 合 模 型 (one-to-one Langmuir binding model) (BIAevaluation 軟 體 版 本 3.2) 來 計 算 締 合 速 率 (k_{on}) 及 解 離 速 率 (k_{off})。 以 比 率 $k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$ 來 計 算 平 衡 解 離 常 數 (Kd)。 抗 CD22 抗 體 RFB4 係 用 作 對 照 物 (Chemicon International, Inc., Temecula, CA, 目 錄 號 CBL147)。 此 實 驗 之 結 果 展 示 於 以 下 表 2 中。

表 2

對 可 溶 性 人 類 CD22 之 抗 CD22 結 合 親 和 力
(BIAcore® 分 析)

純系	$k_{\text{on}}/10^5$	$k_{\text{off}}/10^{-4}$	Kd(nM)
鼠10F4	0.19	2.8	15
嵌合10F4	0.26	4.2	16
人類化10F4v1	0.18	3.5	19
人類化10F4v2	0.32	2.5	7.8
對照物RFB4	0.33	1.4	4.2

實例 7：對細胞表面抗原之結合親和力的表徵

使用競爭檢定來研究鼠 10F4.4.1 及人類化 10F4v1 及 10F4v2 對於表現於 CHO 細胞表面上之人類及獼猴

(cyno)CD22的結合親和力。簡言之，CHO細胞穩定表現全長人類CD22(SEQ ID NO:27)或獼猴(cyno)CD22(SEQ ID NO:31)。抗CD22抗體(鼠或人類化10F4v1或v2)經Iodogen® [^{125} I]試劑碘化至約10 μ Ci/ μ g之特異活性。使用連續稀釋、未經標記之抗CD22抗體進行基於細胞之競爭性結合檢定。在4°C下使抗體與細胞結合4小時。根據利用一非線性曲線擬合程式進行之標準史卡查分析(Scatchard analysis)來測定抗體之結合親和力 K_D (參見(例如)Munson等人, Anal Biochem, 107: 220-239, 1980)。此實驗之結果展示於以下表3中。

表 3

對於人類及獼猴CD22之10F4 MAb結合親和力

抗體	人類CD22 K_D (nM)	獼猴CD22 K_D (nM)
Mu 10F4.4.1	2.4	2.3
Hu 10F4v1*	1.1、1.7	1.4、1.8
Hu 10F4v2	1.6	2.1

*重複檢定

結果指示鼠及人類化10F4與表現於CHO細胞表面上之人類及獼猴CD22結合具有約相等之親和力。

實例8：製備抗CD22抗體藥物接合物

抗CD22 ADC係藉由使抗CD22抗體RFB4、鼠5E8、鼠10F4、人類化10F4v1、人類化thioMAb 10F4v1(thio-10F4v1)、人類化10F4v2及人類化10F4v3與以下藥物-連接子部分：spp-DM1、smcc-DM1、MC-vc-PAB-MMAE；MC-

vc-PAB-MMAF；MC-MMAE及MC-MMAF接合來製備，其中藥物及連接子部分揭示於本文中以及2004年2月5日公開之WO 2004/010957及2005年9月9日公開之WO 2006/034488中(該等專利申請案之每一者係以引用的方式全部併入本文中)。在接合之前，根據WO 2004/010957中描述之方法使用標準方法以TCEP部分還原抗體。根據Doronina等人(2003) Nat. Biotechnol. 21:778-784及US 2005/0238649 A1中描述之方法使用標準方法將部分還原之抗體與上述藥物-連接子部分接合。簡言之，將部分還原之抗體與藥物連接子部分組合以容許該等部分與半胱胺酸殘基之接合。中止接合反應，且純化ADC。由HPLC測定每一ADC之藥物負載量(每抗體藥物部分之平均數目)。用於製備ADC之其他有用之連接子包括(不加限制)BMPEO、BMPS、EMCS、GMBS、HBVS、LC-SMCC、MBS、MPBH、SBAP、SIA、SIAB、SMPB、SMPH、sulfo-EMCS、sulfo-GMBS、sulfo-KMUS、sulfo-MBS、sulfo-SIAB、sulfo-SMCC，及sulfo-SMPB，及SVSB(琥珀醯亞胺基-(4-乙烯基磺)苯甲酸酯)，且包括雙順丁烯二醯亞胺試劑：DTME、BMB、BMDB、BMH、BMOE、BM(PEO)₃及BM(PEO)₄。

抗CD22 ADC亦係藉由接合至抗體之離胺酸殘基上來製備。使用(例如)如本文中所揭示之Traut氏試劑(Pierce Chemical Co.)將抗體之離胺酸轉變為氫硫基。所得氫硫基對用於製備ADC之連接子或連接子藥物分子具有反應性。或者，ADC係藉由使抗CD22抗體上之離胺酸與連接子

SPP(4-(2'-吡啶基二硫基)戊酸N-琥珀醯亞胺酯)反應來製備，其中該連接子可已連接至藥物分子上或可隨後與藥物分子(諸如美登素類物)反應。舉例而言，抗體係藉由與SPP反應，接著與如Wang, L.等人，Protein Science 14:2436-2446 (2005)中所揭示之f接合而經修飾，其中該文獻係以引用的方式全部併入本文中。抗CD22抗體上之離胺酸殘基亦可在pH 7-9下與連接子SMCC(Pierce Chemical Co.)反應以使得SMCC之胺-反應性N-羥基琥珀醯亞胺(NHS酯)與抗體形成穩定醯胺鍵。SMCC之氫硫基-反應性順丁烯二醯亞胺基係在pH 6.5-7.5下與DM1之氫硫基反應(參見Pierce Chemical Co., piercenet.com)以形成ADC。離胺酸或半胱胺酸殘基係與連接子-藥物反應以產生包含每抗體約1-8個連接子藥物分子或者每抗體1-6個、1-4個、1-3個或1-2個連接子藥物分子之平均藥物負載量的ADC。

ADC抗CD22(RFB4)-SMCC-DM1及抗GP120-SMCC-DM1係根據此方法來製備，其中RFB4-smcc-DM1係在低(1.95)、中等(3.7)及高(6.75)藥物負載量下製備。抗GP120-smcc-DM1係在高(6.1)藥物負載量下製備。如下文之實例9及表9中所示，展示該等ADC在活體內為有效的。

實例9：抗CD22抗體藥物接合物之功效

功效決定子之活體外研究。

測定淋巴瘤細胞株中之抗CD22 ADC(或TDC)功效決定子。已知表現於B細胞表面上之CD22在與其配位體或抗體結合後經內化(Sato, S.等人，Immunity 5:551-562 (1996))。

為測試CD22之B細胞表面表現量及/或CD22之內化是否以及如何影響功效，進行以下活體外研究。

人類CD22在多個淋巴瘤細胞株上之表面表現。將19個於其表面上表現不同量CD22之淋巴瘤細胞株培養且以對數相生長收集。將細胞再次懸浮於含有100 µg/ml每一正常小鼠IgG及正常人類IgG之FACS洗滌緩衝液(PBS；0.5%牛血清白蛋白；0.1%疊氮化鈉)中且保持於冰上。於冰上以抗 huCD22 APC(mIgG1，純系 RFB4，Southern Biotech #9361-11)或鼠IgG1 APC同型(BD Pharmingen #555751)將每100 µl約 1×10^6 個細胞染色30分鐘。將死細胞以7-AAD(BD Pharmingen #559925)染色。於一BD FacsCalibur™流式細胞儀上獲得資料且用FlowJo™軟體對其進行分析。藉由如上述培養淋巴瘤細胞，以對數相收集經培養細胞且於96孔板中以每孔90 µl培養基接種5,000細胞來測定 hu10F4v3-SMCC-DM1或每一游離藥物(DM1、MMAF或MMAE)之IC50測定。ADC及游離藥物在偵測範圍內經連續稀釋(ADC開始為300 µg/ml，或游離藥物開始為90 nM，且稀釋至大體上零檢定標靶)。將10 µl經稀釋ADC或游離藥物之等分試樣添加至含有細胞之複製孔中且在37°C下培養3天。向每一孔中添加100 µl CellTiter Glo™且將其培養30分鐘。偵測化學發光且使用Prism™軟體分析資料。結果展示於圖6A中，其中高表面CD22量與 hu10F4v3-SMCC-DM1之低IC50(較高功效)相關。圖6C指示在細胞對游離藥物之固有敏感性與ADC之IC50之間存在較強相關性。

hu10F4v3-SMCC-DM1之內化係由FACS檢定來測定。簡言之，在hu10F4v3-SMCC-DM1存在下藉由標準FACS技術以CD22-FITC(RFB4)對淋巴瘤細胞染色且將其於冰上培養20-30分鐘。在初始染色之後，為測定細胞表面上之CD22含量，將細胞以冷RPMI/10% FBS培養基洗滌且添加200 μ l預熱RPMI/10% FBS且在37°C下將其培養15分鐘。添加80 μ l染色緩衝液及20 μ l熱滅活正常小鼠血清(HI NMS)，接著於冰上培養15分鐘。添加抗DM1-Alexa-647，於冰上培養20-30分鐘且在FACS分析之前將細胞洗滌且以200 μ l PBS/1%聚甲醛固定。在初始染色之後，為測定CD22之表面及內部染色，將細胞以冷RPMI/10% FBS洗滌，添加預熱RPMI/10% FBS且在37°C下將該等細胞培養15分鐘。隨後將細胞以FACS洗滌液洗滌且在室溫下以Fix試劑A(Dako™ #k2311)固定15分鐘，且以Fix試劑B(Dako™)重複該步驟。添加染色緩衝液及HI NMS且於冰上將細胞混合物培養15分鐘。添加Fix試劑B，接著添加抗DM1-Alexa-647且在室溫下培養20-30分鐘。以FACS洗滌液洗滌細胞且將其固定於PBS/1%聚甲醛中。使用一BD FACS Calibur™流式細胞儀對每一細胞混合物(表面、表面內化後及內部染色)進行FACS分析且以FlowJo™軟體進行分析。結果展示於圖6B中，其中高內化DM1量與低IC50(高功效)相關；及圖6D中，其中內化DM1係由螢光顯微鏡呈現。

活體內功效研究

為測試毒素接合或未經接合抗CD22單株抗體在活體內

減小腫瘤體積之能力的功效，使用以下方案。

以 2×10^7 個人類B細胞淋巴瘤細胞株在側腹對各SCID小鼠皮下接種。該等人類細胞株包括人類伯基特淋巴瘤細胞株 Daudi、Ramos 及 Raji 細胞(獲自 American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA)，及包括 U-698-M 細胞及 Su-DHL-4 細胞之其他 B 細胞株(獲自 DSMZ, Braunschweig, Germany；Su-DHL-4 細胞係經螢光素酶報導體基因轉染)、DoHH2 細胞(Kluin-Neilemans, H.C. (1991)，同上文)及 Granta-519(套細胞淋巴瘤細胞，Jadayel, D.M. 等人，Leukemia 11(1):64-72 (1997))，及 BJAB-luc 細胞(表現報導體基因螢光素酶之 BJAB 人類 B 細胞類淋巴母細胞株)。當腫瘤達到介於 $100-200 \text{ mm}^3$ 之間之平均腫瘤體積時，將小鼠分組，且藉由靜脈內注射如以下表 4-16 中所示之毒素-接合抗體或未經接合抗體於第 0 天治療。

抗 CD22 美登素藥物接合物減小 B 細胞腫瘤體積

以每隻小鼠 0.2 ml 體積之 2×10^7 個 BJAB-luc 細胞在側腹對 65 隻 SCID 小鼠進行皮下注射。將細胞懸浮於 HBSS 中。當平均腫瘤尺寸達到 $100-200 \text{ mm}^3$ 時，將小鼠隨機分組為各 9 隻小鼠之四組且提供以下表 4 中指示之抗 CD22 抗體或對照抗體之單一靜脈內治療(經由尾部血管)。

表 4

活體內腫瘤體積減小

抗體投藥

經投予 之抗體	TI	PR	CR	劑量Ab (mg/kg)	劑量DM1 ($\mu\text{g}/\text{m}^2$)	藥物比率 (藥物部分/Ab)
抗Her2- smcc-DM1	9/9	0	0	4.2	200	3.2
mu10F4- smcc-DM1	9/9	2	0	3.0	200	4.6
hu10F4v2- smcc-DM1	9/9	0	0	3.4	200	4.0
hu10F4v1	9/9	0	0	3.4	---	---

"TI"-在每一組之最後時間點之腫瘤發生率；分子係指帶有腫瘤之動物之數目且分母係指動物總數。"PR"係指具有自其初始體積消退50-99%之腫瘤之動物的數目。"CR"係指獲得完全康復之動物之數目。

在抗體注射後對每一治療組之平均腫瘤體積監控32天。以測徑規進行腫瘤量測。藉由與對照物及未經接合抗體比較來測定毒素接合之抗CD22抗體之功效。結果展示於圖7A中。相對於未經接合抗CD22抗體及非特異性對照抗體而言，鼠及人類化10F4v1-smcc-DM1單株抗體顯著減緩腫瘤生長。

使用與上述相同之方案，藉由比較如以下表5中所示之毒素接合之人類化10F4v2與毒素接合之鼠及裸人類化抗體來進行檢定。

表 5

活體內腫瘤體積減小

抗體投藥

經投予 之抗體	TI	PR	CR	劑量Ab (mg/kg)	劑量DM1 ($\mu\text{g}/\text{m}^2$)	藥物比率 (藥物部分/Ab)
抗Her2- smcc-DM1	9/9	0	0	4.2	200	3.2
mu10F4- smcc-DM1	7/9	1	2	4.7	200	2.9
hu10F4v2- smcc-DM1	8/9	1	1	4.5	200	3.0
hu10F4v2	9/9	0	0	4.5	---	---

"TI"-在每一組之最後時間點之腫瘤發生率；分子係指研究組中帶有腫瘤之動物之數目且分母係指動物總數。"PR"係指具有自其初始體積消退50-99%之腫瘤之動物的數目。"CR"係指獲得完全康復之動物之數目。

在抗體注射後對每一治療組之平均腫瘤體積監控32天。以測徑規進行腫瘤量測。藉由與對照物及未經接合抗體比較來測定毒素接合之抗CD22抗體之功效。結果展示於圖7B中。相對於未經接合抗CD22抗體及非特異性對照抗體而言，鼠10F4-smcc-DM1及人類化10F4v2-smcc-DM1單株抗體顯著減緩腫瘤生長。

抗CD22抗體係根據本文中所揭示之接合方法經由spp連接子或smcc連接子與DM1接合。裸抗CD20抗體係用作陽性對照物且毒素接合物抗HER2-spp-DM1及抗HER2-smcc-

DM1係用作陰性對照物。以每隻小鼠0.2 ml體積之 2×10^7 個BJAB-luc細胞在側腹對80隻SCID小鼠進行皮下注射。將細胞懸浮於HBSS中。當平均腫瘤尺寸達到 $100-200 \text{ mm}^3$ 時，將小鼠隨機分組為各10隻小鼠之六組且進行測試或對照抗體之靜脈內注射。每一週重複一次給藥，總共三次給藥。參見表6。

表 6

活體內腫瘤體積減小

抗體投藥

經投予之抗體	劑量Ab(mg/kg)	劑量DM1($\mu\text{g}/\text{m}^2$)
抗Her2-spp-DM1 *	4	214
抗Her2-smcc-DM1 **	6.9	405
抗CD22-spp-DM1 *	5	214
抗CD22-spp-DM1	2.5	107
抗CD22-smcc-DM1 **	10	405
裸抗CD22	10	---

*匹配藥物負載量

**匹配藥物負載量

每週兩次監控平均腫瘤體積歷時3週且隨後每週一次其後共歷時8週。腫瘤體積隨時間之變化(圖7C)展示以 $214 \mu\text{g}/\text{m}^2$ 及 $107 \mu\text{g}/\text{m}^2$ DM1給藥之抗CD22-spp-DM1及以 $405 \mu\text{g}/\text{m}^2$ 給藥之抗CD22-smcc-DM1在BJAB-luc異種移植物腫瘤中展示強烈且可比較之抗腫瘤活性。所有抗CD22 ADC群展示完全反應。

抗CD22抗體RFB4、5E8及7A2係根據本文中所揭示之接

合方法經由smcc連接子與DM1接合。毒素接合物抗HER2-smcc-DM1(在本文中可互換稱作HER-smcc-DM1或HER2-smcc-DM1)係用作陰性對照物。

在SCID小鼠中研究該等抗體減小各種異種移植物中之腫瘤體積的能力。用於在小鼠中產生異種移植物腫瘤之人類B細胞淋巴瘤細胞株為Ramos細胞及BJAB-luc細胞。對於每一異種移植物而言，以每隻小鼠0.1 ml體積之 5×10^6 個人類B細胞淋巴瘤Ramos細胞在側腹對SCID小鼠進行皮下注射(或以0.2 ml之 2×10^7 個BJAB-luc細胞)。將細胞懸浮於HBSS中。當平均腫瘤尺寸達到100-200 mm³時，將小鼠隨機分為各8-10隻小鼠之組，且對每一小鼠提供測試或對照抗體之單一靜脈內注射。將每一組之DM1藥物裝載量標準化為200 µg/m²以提供投予DM1之劑量。每週兩次監控平均腫瘤體積歷時4週。結果展示於以下表7及表8中且分別繪製於圖8A及圖8B中。

表 7

活體內腫瘤體積減小，Ramos異種移植物

抗體投藥

經投予之抗體	劑量Ab(mg/kg)	劑量DM1(µg/m ²)
抗HER2-smcc-DM1	4.2	200
抗CD22(7A2)-smcc-DM1	3.8	200
抗CD22(5E8)-smcc-DM1	3.8	200
抗CD22(RFB4)-smcc-DM1	3.2	200

表 8

活體內腫瘤體積減小，BJAB-luc異種移植物

抗體投藥

經投予之抗體	劑量Ab (mg/kg)	劑量DM1 ($\mu\text{g}/\text{m}^2$)	藥物比率 (藥物部分/Ab)
抗HER2-smcc-DM1	4.2	200	3.2
抗CD22 (7A2)-smcc-DM1	3.8	200	3.6
抗CD22(5E8)-smcc-DM1	3.8	200	3.6
抗CD22(RFB4)-smcc-DM1	3.2	200	4.25

該等結果展示相對於對照抗體或裸抗CD22抗體，抗CD22-smcc-DM1抗體藥物接合物顯著減小Ramos及BJAB-luc異種移植物中之B細胞腫瘤體積。

研究抗體藥物負載量(在抗體群體中每一抗體所接合之藥物分子的平均數目)對於抗CD22-smcc-DM1抗體藥物接合物減小BJAB-luc SCID小鼠異種移植物中腫瘤體積之能力的影響。以每隻小鼠0.2 ml體積之 2×10^7 個BJAB-luc細胞在側腹對140隻SCID小鼠進行皮下注射。將細胞懸浮於HBSS中。當平均腫瘤尺寸達到100-200 mm^3 時，將小鼠隨機分組為各8-10隻小鼠之組，且對每一小鼠提供進行測試或對照抗體之單一靜脈內注射。將具有相對低、中等或高藥物負載量(分別為每一抗體1.95、3.7或6.75個接合DM1分子的平均藥物負載量)之抗CD22(RFB4)-smcc-DM1群體作為測試抗體投予。裸RFB4抗體及抗GP120-smcc-DM1(高藥物負載量)為對照物。抗體藥物接合物(測試及對照)之劑量經標準化為5 mg/kg蛋白量之劑量。連接子接合物與抗

體之連接係經由離胺酸殘基。參見表9。

表9

活體內腫瘤體積減小，BJAB-luc異種移植

抗CD22(RFB4)-smcc-DM1投藥

經投予之抗體	劑量Ab (mg/kg)	劑量DM1 ($\mu\text{g}/\text{m}^2$)	藥物比率 (藥物部分/Ab)
抗CD22(RFB4)(裸抗體)	10	--	--
抗CD22(RFB4)-smcc-DM1(低)	5	144	1.95
抗CD22(RFB4)-smcc-DM1(中等)	5	273	3.7
抗CD22(RFB4)-smcc-DM1(高)	5	497	6.75
抗GP120-smcc-DM1(高)	5	449	6.1

當以匹配蛋白量(5 mg/kg)給藥時，負載高藥物負載量(每抗體分子6.75個DM1分子)之抗CD22(RFB4)-smcc-DM1比具有3.7之中等負載量之抗體藥物接合物略微更能減小腫瘤體積，而具有低藥物負載量之抗體藥物接合物的影響與對照接合物或裸抗體無差別。結果繪製於圖9中。

抗CD22奧利斯坦汀藥物接合物減小B細胞腫瘤體積

研究抗CD22奧利斯坦汀MMAF藥物接合物對小鼠異種移植中腫瘤體積的影響。抗CD22(RFB4)及對照抗體抗GP120係根據本文中所揭示之方法經由MC-vcPAB連接子或MC連接子與MMAF接合。以每隻小鼠0.2 ml體積之 5×10^6 個Ramos細胞在側腹對SCID小鼠進行皮下注射。將細胞懸浮於HBSS中。當平均腫瘤尺寸達到100-200 mm^3

時，將小鼠隨機分為各8-10隻小鼠之組，且對每一小鼠提供測試或對照抗體之單一靜脈內注射。經投予小鼠之藥物劑量、藥物負載量(藥物比率)及抗體劑量展示於表10中。

表 10

活體內腫瘤體積減小，Ramos異種移植

抗CD22(RFB4) MMAF接合物投藥

經投予之抗體	劑量MMAF ($\mu\text{g}/\text{m}^2$)	劑量Ab (mg/kg)	藥物比率 (藥物部分/Ab)
抗CD22(RFB4)-MCvcPAB-MMAF	405	6.6	4.2
抗CD22(RFB4)-MC-MMAF	405	6.9	4.0
抗GP120-MCvcPAB-MMAF	405	5.8	4.8
抗GP120-MC-MMAF	405	5.9	4.7

抗CD22-MC-MMAF在Ramos RA1異種移植中展示與抗CD22-MC-vc-PAB-MMAF相當之活性。結果繪製於圖10中。

研究抗CD22奧利斯坦汀MMAE及DM1藥物接合物對小鼠異種移植中腫瘤體積之影響。抗CD22(RFB4)及對照抗體抗GP120係根據本文中所揭示之方法經由MC-vcPAB連接子或MC連接子與MMAE接合或經由smcc連接子與DM1接合。以每隻小鼠0.1 ml體積之 5×10^6 個Ramos細胞在側腹對SCID小鼠進行皮下注射。將細胞懸浮於HBSS中。投予PBS作為對照。當平均腫瘤尺寸達到100-200 mm^3 時，將小鼠隨機分為各8-10隻小鼠之組，且對每一小鼠提供測試或對照抗體之單一靜脈內注射。經投予小鼠之藥物劑量、藥

物負載量(藥物比率)及抗體劑量展示於表11中。

表 11

活體內腫瘤體積減小，Ramos異種移植
抗CD22(RFB4) MMAE及DM1接合物投藥

經投予之抗體	劑量MMAE或 DM1($\mu\text{g}/\text{m}^2$)	劑量Ab (mg/kg)	藥物比率 (藥物部分/Ab)
抗GP120-smcc-DM1	405	6.7	4.1
抗CD22(RFB4)-smcc-DM1	405	6.5	4.25
抗GP120-MCvcPAB- MMAE	405	6.0	4.7
抗CD22(RFB4)-MCvcPAB- MMAE	405	6.3	4.5
PBS	--	--	--

抗CD22-MCvcPAB-MMAE在Ramos RA1異種移植中展示有效抗腫瘤活性。與抗CD22-smcc-DM1相比，抗CD22-MCvcPAB-MMAE展示出色活性。ADC對照物抗GP120-MCvcPAB-MMAE未展示顯著活性。結果繪製於圖11中。

研究抗CD22奧利斯坦汀MMAF及DM1藥物接合物對小鼠異種移植中腫瘤體積之影響。抗CD22 hu10F4v2-MC-MMAF、hu10F4v2-smcc-DM1及thio-10F4v1-MC-MMAF經投予且比較對於腫瘤體積之影響。對照抗體為抗Her2-MC-MMAF及抗Her2-smcc-DM1。以每隻小鼠0.2 ml體積之 2×10^7 個BJAB-luc細胞在側腹對SCID小鼠進行皮下注射。將細胞懸浮於HBSS中。當平均腫瘤尺寸達到100-200 mm^3 時，將小鼠隨機分為各8-10隻小鼠之組，且對每一小鼠提

供測試或對照抗體之單一靜脈內注射。如本文中所揭示，"Thio"係指thioMab，其中連接子-藥物部分係經由抗體上之經半胱胺酸改造之位點與抗體接合。經投予小鼠之藥物劑量、藥物負載量(藥物比率)及抗體劑量展示於表12中。

表 12

活體內腫瘤體積減小，BJAB-luc異種移植植物

Hu10F4 MMAF及DM1接合物投藥

經投予之抗體	劑量MMAF或 DM1($\mu\text{g}/\text{m}^2$)	劑量Ab (mg/kg)	藥物比率 (藥物部分/Ab)
抗Her2-MC-MMAF	100	1.1	6.3
Hu10F4v2-MC-MMAF	100	2.0	3.4
Hu10F4v2-MC-MMAF	50	1.0	3.4
Thio-hu10F4v1-MC-MMAF	100	4.6	1.5
Thio-hu10F4v1-MC-MMAF	50	2.3	1.5
抗Her2-smcc-DM1	200	4.2	3.2
Hu10F4v2-smcc-DM1	200	4.5	3.0
Hu10F4v2-smcc-DM1	100	2.3	3.0

Hu10F4v2 ADC在BJAB-luc異種移植植物中展示有效抗腫瘤活性。結果繪製於圖12中。

使用於上述實驗中所揭示之程序，研究不同劑量之hu10F4v3-smcc-DM1及-MC-MMAF ADC在不同異種移植植物中之功效。如上文中所揭示來製備SuDHL4-luc之異種移植植物、DoHH2及Granta-519異種移植植物。當腫瘤尺寸達到100-200 mm^3 時，將小鼠隨機分為各8-10隻小鼠之組，且對每一小鼠提供測試或對照抗體之單一靜脈內注射。經投予小鼠之藥物劑量、藥物負載量(藥物比率)及抗體劑量展

示於表 13A-13C 中且結果展示於圖 13A-13C 中。

表 13A

活體內腫瘤體積減小，

Hu10F4v3 MMAF及DM1接合物投藥

在 SuDHL-4-luc 異種移植物中

經投予之抗體	劑量MMAF或 DM1($\mu\text{g}/\text{m}^2$)	劑量Ab (mg/kg)	藥物比率 (藥物/Ab)
抗Her2-smcc-DM1	600	11.9	3.3
Hu10F4v3-smcc-DM1	600	13.6	2.9
Hu10F4v3-smcc-DM1	300	6.8	2.9
抗Her2-MC-MMAF	600	9.9	4.0
Hu10F4v3-MC-MMAF	600	13.3	3.0
Hu10F4v3-MC-MMAF	300	6.6	3.0

表 13B

活體內腫瘤體積減小，

Hu10F4v3 MMAF及DM1接合物投藥

在 DoHH2 異種移植物中

經投予之抗體	劑量MMAF或 DM1($\mu\text{g}/\text{m}^2$)	劑量Ab (mg/kg)	藥物比率 (藥物/Ab)
抗Her2-smcc-DM1	600	11.9	3.3
Hu10F4v3-smcc-DM1	600	11.8	3.35
Hu10F4v3-smcc-DM1	300	5.9	3.35
抗Her2-MC-MMAF	600	9.9	4.0
Hu10F4v3-MC-MMAF	600	13.1	3.04
Hu10F4v3-MC-MMAF	300	6.6	3.04
裸hu10F4v3	--	13.1	--

表 13C

活體內腫瘤體積減小，

Hu10F4v3 MMAF及DM1接合物投藥

在 Granta-519異種移植物中

經投予之抗體	劑量MMAF或 DM1($\mu\text{g}/\text{m}^2$)	劑量Ab (mg/kg)	藥物比率 (藥物/Ab)
抗Her2-smcc-DM1	300	5.9	3.3
Hu10F4v3-smcc-DM1	300	5.9	3.35
Hu10F4v3-smcc-DM1	150	2.9	3.35
抗Her2-MC-MMAF	300	4.9	4.0
Hu10F4v3-MC-MMAF	300	6.6	3.04
Hu10F4v3-MC-MMAF	150	3.3	3.04
裸hu10F4v3	--	6.6	--

抗 CD22 hu10F4v3-smcc-DM1及 -MC-MMAF ADC在測試之所有異種移植物模型中展示有效腫瘤減小。

實例 10：製備經半胱胺酸改造之抗 CD22 抗體

如本文中所揭示進行製備經半胱胺酸改造之抗 CD22 抗體。藉由本文中揭示之方法誘變具有與 10F4v2 相同之可變區及恆定區序列(輕鏈，SEQ ID NO:87；及重鏈，SEQ ID NO:88，圖 5B)之編碼 10F4v3 抗體的 DNA 以修飾該輕鏈、該重鏈或該重鏈之 Fc 區。將編碼輕鏈之 DNA 誘變以在如圖 17A 中所示之輕鏈(人類化抗體 10F4v3 thiomab 之輕鏈 SEQ ID NO:91)中之 Kabat 位置 205(依序位置 210)處將半胱胺酸替代為纈胺酸。將編碼重鏈之 DNA 誘變以在如圖 17B 中所示之重鏈(人類化抗體 10F4v3 thiomab 之重鏈 SEQ ID

NO:92)中之EU位置118(依序位置121)處將半胱胺酸替代為丙胺酸。將Fc區誘變以在如圖17C中所示之重鏈Fc區(重鏈SEQ ID NO:93)中之EU位置400(依序位置403)處將半胱胺酸替代為絲胺酸。

藉由還原及再氧化製備用於接合之經半胱胺酸改造之抗CD22抗體

將表現於CHO細胞中之全長、經半胱胺酸改造之抗CD22單株抗體(ThioMab)在約pH 8.0下溶解於500 mM硼酸鈉及500 mM氯化鈉中且在37°C下以約50-100倍過量之1 mM TCEP(參(2-羧乙基)膦鹽酸鹽；Getz等人(1999) Anal. Biochem. Vol 273:73-80；Soltec Ventures, Beverly, MA)還原約1-2小時。將經還原ThioMab稀釋且負載於一於10 mM乙酸鈉(pH 5)中之HiTrap S管柱上，且以含有0.3 M氯化鈉之PBS溶離。將經溶離之還原ThioMab在pH 7下以2 mM脫氫抗壞血酸(dhAA)處理3小時，或在室溫下以2 mM硫酸銅(CuSO₄)水溶液處理隔夜。周圍空氣氧化亦可為有效的。藉由經Sephadex G25樹脂溶離交換緩衝液且以具有1 mM DTPA之PBS將其溶離。根據280 nm下溶液之吸光度來測定經還原抗體之濃度且藉由使硫醇與DTNB(Aldrich, Milwaukee, WI)反應並確定412 nm下之吸光度來確定硫醇濃度，藉此來檢核硫醇/Ab值。

實例11：藉由經半胱胺酸改造之抗CD22抗體與藥物-連接子中間物之接合來製備經半胱胺酸改造之抗CD22抗體藥物接合物

在實例10之還原及再氧化程序後，將經半胱胺酸改造之抗CD22抗體溶解於PBS(經磷酸鹽緩衝之鹽水)緩衝液中且於冰上冷凍。將具有硫醇-反應性官能基(諸如順丁烯二醯亞胺基)之相對於經改造半胱胺酸而言每抗體約1.5莫耳當量之奧利斯坦汀藥物連接子中間物(諸如MC-MMAE(順丁烯二醯亞胺基己醯基-單甲基奧利斯坦汀E)、MC-MMAF、MC-val-cit-PAB-MMAE或MC-val-cit-PAB-MMAF)溶解於DMSO中，稀釋於乙腈及水中，且添加至於PBS中之冷凍還原、再氧化抗體中。在約一小時後，添加過量順丁烯二醯亞胺以中止反應且對任何未反應抗體硫醇基團封端。藉由離心超濾濃縮反應混合物且將經半胱胺酸改造之抗CD22抗體藥物接合物藉由經由於PBS中之G25樹脂溶離而純化且去鹽，在無菌條件下經由0.2 μ m過濾器過濾，且冷凍儲存。

如下進行hu 10F4v3 HC(A118C) thiomab-BMPEO-DM1之製備。由雙順丁烯二醯亞胺基試劑BM(PEO)4(Pierce Chemical)對hu 10F4v3 HC(A118C) thiomab上之自由半胱胺酸進行修飾，在抗體表面上留下未反應之順丁烯二醯亞胺基。此係藉由以下步驟來實現：將BM(PEO)4溶解於50%乙醇/水混合物中至10 mM之濃度；且向濃度為約1.6 mg/ml(10微莫耳濃度)之於經磷酸鹽緩衝之鹽水中含有hu4D5Fabv8-(V110C) ThioFab之溶液中添加十倍莫耳過量之BM(PEO)4；且使其反應1小時。於具有150 mM NaCl緩衝液之30 mM檸檬酸鹽(pH 6)中藉由凝膠過濾(HiTrap

column, Pharmacia) 移除過量 BM(PEO)₄。將適當 10 倍莫耳過量之溶解於二甲基乙醯胺 (DMA) 中之 DM1 添加至 hu4D5Fabv8-(V110C) ThioFab-BMPEO 中間物中。亦可使用二甲基甲醯胺 (DMF) 以溶解藥物部分試劑。使反應混合物反應隔夜，隨後藉由凝膠過濾或透析入 PBS 中以移除未反應之藥物。於 PBS 中於 S200 管柱上凝膠過濾係用於移除高分子量聚集體且供應經純化之 hu 10F4v3 HC(A118C) thiomab-BMPEO-DM1。

由相同方案製備對照物 HC (A118C) MAb-MC-MMAF、對照物 HC ThioMAb-MC-MMAF、對照物 HC ThioMAb-MCvcPAB-MMAE 及對照物 HC ThioMab-BMPEO-DM1。

由上述程序製備且測試以下經半胱胺酸改造之抗 CD22 抗體藥物接合物：

由 A118C thio hu 10F4v3 與 MC-MMAF 接合得到之 thio hu thio-HC-10F4v3-MC-MMAF；

由 A118C thio hu 10F4v3 與 MC-val-cit-PAB-MMAE 接合得到之 thio hu thio-HC-10F4v3-MC-val-cit-PAB-MMAE；

由 A118C thio hu HC-10F4v3 與 bmpeo-DM1 接合得到之 thio hu HC-10F4v3-bmpeo-DM1；

由 V205C thio hu LC-10F4v3 與 MC-val-cit-PAB-MMAE 接合得到之 thio hu LC-10F4v3-MC-val-cit-PAB-MMAE；及

由 S400C thio hu Fc-10F4v3 與 MC-val-cit-PAB-MMAE 接合得到之 thio hu Fc-10F4v3-MC-val-cit-PAB-MMAE。

實例 12：經半胱胺酸改造之 ThioMAb 藥物接合物對細胞

表面抗原之結合親和力的表徵

藉由FACS分析來測定thio hu 10F4v3藥物接合物對表現於BJAB-lucs細胞上之CD22的結合親和力。簡言之，使於100 μ l中之約 1×10^6 個細胞與不同量之以下抗CD22 ThioMAb藥物接合物之一者接觸：thio hu LC(V205C) 10F4v3-MCvcPAB-MMAE、thio hu Fc(S400C) 10F4v3-MCvcPAB-MMAE、thio hu HC(A118C) 10F4v3-MCvcPAB-MMAE、thio hu HC(A118C) 10F4v3-MC-MMAF或thio hu HC(A118C) 10F4v3-BMPEO-DM1(分別參見圖18A-18E)。使用生物素化山羊抗huFc加抗生蛋白鏈菌素-PE偵測結合至細胞表面上之抗CD22抗體。圖18A-18E之圖指示抗原結合約與所測試之所有thiomab藥物接合物相同。

實例13：藉由抗CD22 ThioMAb藥物接合物來檢定活體內腫瘤體積減小

根據本文實例9中揭示之程序測試根據實例11製備之thiomab藥物接合物在異種移植物模型中減小B細胞腫瘤體積的能力。在第0天以以下表14中所示之劑量向具有Granta-519細胞異種移植物腫瘤之SCID小鼠中投予對照物及抗CD22人類化10F4v3 thiomab藥物接合物。該對照HC(A118C) thiomab為抗HER2 4D5抗體。

表 14

活體內腫瘤體積減小，

Thio Hu10F4v3 MMAE及MMAF接合物投藥

在Granta-519異種移植物中

經投予之抗體	劑量MMAF或 DM1($\mu\text{g}/\text{m}^2$)	劑量Ab (mg/kg)	藥物比率 (藥物/Ab)
Thio對照HC(A118C)-MC-MMAF	100	3.99	1.65
Thio對照HC(A118C)-MCvcPAB- MMAE	100	4.33	1.55
Thio 10F4v3-HC(A118C)-MC-MMAF	100	3.41	1.95
Thio 10F4v3-LC(V205C)-MCvcPAB- MMAE	100	4.23	1.6
Thio 10F4v3-HC(A118C)-MCvcPAB- MMAE	100	3.76	1.8
Thio 10F4v3-Fc(S400C)-MCvcPAB- MMAE	100	4.23	1.6

此實驗之結果展示於圖19中。以表14中所示之劑量投予 thio 10F4v3-LC-(V205C)-MCvcPAB-MMAE及 thio 10F4v3-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE thiomab藥物接合物在研究期間引起平均腫瘤體積之減小。

使用相同方案於CB17 SCID小鼠中之Granta-519異種移植植物中測試額外thiomab藥物接合物，但測試不同藥物劑量。對照抗體或對照thiomab為抗HER2 4D5抗體或HC(A118C) thiomab。結果展示於以下表15中。

表 15

活體內腫瘤體積減小，

Thio Hu10F4v3 MMAE、MMAF及DM1接合物投藥

在Granta-519異種移植植物中

經投予之抗體	劑量MMAF或 DM1($\mu\text{g}/\text{m}^2$)	劑量Ab (mg/kg)	藥物比率 (藥物/Ab)
10F4v3-MC-MMAF	150	3.2	3.1
Thio對照HC(A118C)-BMPEO- DM1	300	10.3	1.9
Thio 10F4v3-HC(A118C)-BMPEO- DM1	150	5.2	1.9
Thio 10F4v3-HC(A118C)-BMPEO- DM1	300	10.4	1.9
Thio對照HC(A118C)-MCvcPAB- MMAE	150	6.5	1.55
Thio 10F4v3-HC(A118C)- MCvcPAB-MMAE	150	5.3	1.9
Thio 10F4v3-HC(A118C)- MCvcPAB-MMAE	75	2.7	1.9
Thio對照HC(A118C)-MC-MMAF	150	5.2	1.9
Thio 10F4v3-HC(A118C)-MC- MMAF	150	5.1	1.95
Thio 10F4v3-HC(A118C)-MC- MMAF	75	2.6	1.95

此實驗之結果展示於圖20A中。以150 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ 及75 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ 投予thio 10F4v3-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE thiomab藥物接合物在研究期間引起平均腫瘤體積之減小。在相同研究中，對每一劑量組測定前7天中的體重變化百分比。圖20B中繪製之結果指示投予該等thiomab藥物接合物在此時期內未造成體重損失。

在類似研究中，使用與上述實例中所揭示相同之異種移植研究方案，改變TDC及投藥劑量，在CB17 SCID小鼠

之濾泡性淋巴瘤 DOHH2 異種移植物中研究 TDC 之功效。
TDC 及劑量展示於以下表 16 中。

表 16

活體內腫瘤體積減小，

Thio Hu10F4v3 MMAE、MMAF 及 DM1 接合物投藥

在 DOHH2 異種移植物中

經投予之抗體	劑量 MMAF 或 DM1($\mu\text{g}/\text{m}^2$)	劑量 Ab (mg/kg)	藥物比率 (藥物/Ab)
10F4v3-MC-MMAF	300	6.4	3.1
Thio 對照 HC(A118C)-BMPEO-DM1	600	21.9	1.79
Thio 10F4v3-HC(A118C)-BMPEO-DM1	600	20.8	1.9
Thio 10F4v3-HC(A118C)-BMPEO-DM1	300	10.4	1.9
Thio 對照 HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	600	26.0	1.55
Thio 10F4v3-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	600	21.4	1.9
Thio 10F4v3-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	300	10.7	1.9
Thio 對照 HC(A118C)-MC-MMAF	600	20.8	1.9
Thio 10F4v3-HC(A118C)-MC-MMAF	600	20.4	1.95
Thio 10F4v3-HC(A118C)-MC-MMAF	300	10.2	1.95

圖 20C 為繪製在經相同重鏈 A118C 抗 CD22 TDC 治療之 CB17 SCID 小鼠中在濾泡性淋巴瘤 DOHH2 異種移植物中平均腫瘤體積隨時間變化的圖，但為比表 16 中所示更高之劑量。在此研究中抗 CD22 10F4v3-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE TDC 似乎為最有效之測試劑。然而，在此實驗中在增加之劑量下，在抗 HER2-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE

對照物中注意到一些功效。此活性可能歸因於在循環中自ADC中釋放藥物。抗CD22 hu10F4-HC(A118C)-MC-MMAF及-BMPEO-DM1測試劑展示中間功效，且與該等連接子增加之穩定性相一致，未結合抗HER2對照物展示很小活性。圖20D為自DOHH2異種移植物研究之小鼠體重變化百分比之圖，其展示在該研究之前14天內無顯著體重變化。

實例14：在大鼠及獼猴中抗CD22藥物接合物之安全性

hu10F4抗CD22抗體與獼猴(cyno)CD22交叉反應具有與人類CD22相當之親和力。hu10F4抗CD22抗體不可與大鼠CD22交叉反應。因此，分別在大鼠及獼猴中評估抗CD22藥物接合物之標靶獨立性及標靶依賴性安全性及毒性。

大鼠中之安全性及毒性

關於大鼠中之安全性及毒性研究，進行兩個研究。在一研究中，在第1天以hu10F4v3-SMCC-DM1、-SPP-DM1、-MC-vc-PAB-MMAE或-MC-MMAF接合物對大鼠靜脈內給藥，其中該藥物係經由可分裂連接子(-vc-或-spp-)或不可分裂連接子(MC或SMCC(亦被稱作MCC))連接。投予媒劑作為對照物。在第5天收集血液樣品用於藥物動力學分析，且在第12天(在驗屍時)收集血液樣品。每週進行至少三次臨床觀測及體重記錄。監控血清AST(天冬胺酸胺基轉移酶)作為毒性之指示。在投予20 mg/kg hu10F4v3-vcMMAE及包含可分裂連接子之hu10F4v3-SPP-DM1之大鼠中，第5天時血清AST含量相對於第0天有所增加(圖21A)。在投予20 mg/kg hu10F4v3-MC-MMAF或hu10F4v3-

MCC-DM1之大鼠中，第5天時嗜中性白血球含量相對於第0天有所增加(不可分裂之連接子，圖21B)。在投予hu10F4v3-vc-MMAE或hu10F4v3-SPP-DM1之大鼠中，第5天時嗜中性白血球含量相對於第0天有所降低。在投予包含可分裂連接子之ADC之大鼠中增加之血清AST及減少之嗜中性白血球指示該等ADC毒性增大。

在相同大鼠研究中，在第1天時對每組六隻動物投予20 mg/kg、40 mg/kg或60 mg/kg hu10F4v3-MC-MMAF或hu10F4v3-SMCC-DM1且監控12天。在投予hu10F4v3-MC-MMAF之動物中，未觀測到以下指示：體重降低、血清肝酶增加、血小板減少或嗜中性白血球減少。在投予hu10F4v3-SMCC-DM1之大鼠中，在40 mg/kg及60 mg/kg之劑量下觀測到體重之可逆降低及血清肝酶之可逆增加，而在60 mg/kg劑量下觀測到嗜中性白血球之可逆減少及血小板之瞬間減少。

在獼猴中之安全性及毒性

為評估抗CD22 ADC在靈長類動物模型中之安全性及毒性，將30隻獼猴指派為以下治療組：媒劑對照組(6隻動物)；以2 mg/m²、4 mg/m²及6 mg/m²藥物劑量之劑量的hu10F4v3-SMCC-DM1(等於0 mg/kg、10 mg/kg、20 mg/kg及30 mg/kg抗體劑量；每劑量組4隻動物)；以2 mg/m²、4 mg/m²及6 mg/m²劑量之hu10F4v3-MC-MMAF(每劑量組4隻動物)。在第1天及第22天對動物靜脈內給藥。評估動物之體重變化、食物消耗及病理學指數。收集血液樣品且對其

檢定以評估毒性、藥效及抗藥物抗體效果。在第25天及第43天時各對每一組中之半數動物實施安樂死且收集組織樣品。

在任一ADC群中未觀測到顯著體重變化。根據相關技術中熟知之標準方法來檢定血清肝酶AST(天冬胺酸轉胺酶)、ALT(轉胺酶)及GGT(γ -麩胺醯轉胺酶)之含量。儘管在DM1組中評估ALT，而在MMAF組中評估AST及GGT，但在以30 mg/kg任一ADC投藥之動物中觀測到血清肝酶之可逆增加。在DM1組中在以20 mg/kg之劑量之4隻動物的兩者及以30 mg/kg之劑量之4隻動物的四者中，坐骨神經退化為最低限度至輕微的。在MMAF組中在以30 mg/kg之劑量之4隻動物的一者中坐骨神經退化為最低限度的。用顯微鏡觀測來自各種器官之組織。在30 mg/kg MMAF組中四隻動物之兩者具有未知意義之肺損傷，而在DM1組中未觀測到任一此動物。

藉由於在第0天及第22天對其投藥之獼猴中經43天量測血液中之CD20⁺細胞含量來測定由hu10F4v3-MC-MMAF及-SMCC-DM1 ADC造成之周邊B細胞減少。藉由使用經螢光標記之抗CD20抗體之FACS來檢定在研究期間週期性收集之血液。如圖22A(MMAF組)及圖22B(DM1組)中所示，抗CD22 MMAF及DM1 ADC耗盡獼猴周邊B細胞。如圖23A及圖23B中所示，對於其他淋巴細胞群體未觀測到MMAF或DM1 ADC之顯著影響，其中其展示在同一時期內CD4⁺細胞未顯著減少。

如圖 24A 及圖 24B 中之顯微照片所示，相對於對照物，在獼猴扁桃體樣品中 Hu10F4v3-SMCC-DM1 減少生髮中心 B 細胞。在圖 24A 中用圓形表示例示性生髮中心。如圖 24B 中所示，在 10 mg/kg 劑量下觀測到生髮中心 B 細胞之完全消蝕。在相同條件下投予 hu10F4v3-MC-MMAF ADC 後獲得相同結果。

以 10 mg/kg 給藥之 Hu10F4v3-MC-MMAF 自獼猴之脾濾泡生髮中心減少分裂之 B 細胞。參見圖 25A 中之圖及圖 25B 及 25C 中之組織顯微照片。當在相同條件下測試 hu10F4v3-SMCC-DM1 ADC 時獲得相同結果。在使用 Ki-67 染色之圖 25B 中生髮中心呈現為黑暗區域，且在圖 25D 中當以經可偵測標記之抗 IgD 染色時，生髮中心呈現為由黑暗區域環繞之未染色區域。歸因於由抗 10F4v3-MC-MMAF 造成之生髮中心 B 細胞減少之生髮中心損失展示於圖 25C 及圖 25E 中。因此，該等抗有絲分裂藥物對增生性 B 細胞群體具有影響。

以下融合瘤已由 American Type Culture Collection, PO Box 1549, Manassas, VA, 20108, USA (ATCC) 寄存：

細胞株	ATCC 寄存編號	寄存日期
融合瘤 10F4.4.1	PTA-7621	2006 年 5 月 26 日
融合瘤 5E8.1.8	PTA-7620	2006 年 5 月 26 日

該等寄存物係按照國際承認用於專利程序的微生物保存布達佩斯條約 (Budapest Treaty on the International

Recognition of the Deposit of Microorganisms for the Purpose of Patent Procedure)及其條例(布達佩斯條約)之規定製造。此確保活寄存物自寄存日期起維持30年。該等細胞株應按照布達佩斯條約之條款由ATCC有效製造，且經受Genentech, Inc.與ATCC之間的協議，其確保在有關美國專利發布後或在任何美國或外國專利申請案對公眾開放後(無論哪個首先出現)該等細胞株對於公眾之永久及自由可用性，且確保根據35 USC §122及依照其之委員規則(包括特別關於886 OG 638之37 CFR §1.14)由其授權之美國專利商標局委員(U.S. Commissioner of Patents and Trademarks)確定之一者對細胞株的可用性。

本申請案之受讓人已同意若當經寄存細胞株在適合條件下培養時丟失或破壞，則其應即時通知以相同細胞株樣品替代。經寄存細胞株之可用性不應理解為在違背由任何政府權威根據其專利法授予之權利的情況下實施本發明的許可。

儘管已出於清楚理解之目的以說明及實例之方式相當詳細地描述前述發明，但不應認為該等描述及實例限制本發明之範疇。本文中所引用之所有專利及科學文獻之解釋內容係以引用的方式全部明確併入本文中。

【圖式簡單說明】

圖1A-1D：圖1A為指示 β 同功異型物之細胞外域之七個類免疫球蛋白域的CD22之圖。 α 同功異型物缺乏域3及4。
"TM"係指跨膜域。圖1B描述CD22之 β 形式之胺基酸序列

(SEQ ID NO:27)。CD22之 α 形式缺乏以斜體展示之胺基酸(編碼細胞外域之域3及4)。蛋白質之成熟形式之細胞外域加底線(SEQ ID NO:28)。胺基酸1-21描述自成熟形式斷裂之信號序列。圖1C為CD22 α 之胺基酸序列(SEQ ID NO:29)。CD22 α 之ECD加底線(SEQ ID NO:30)。圖1D為來自獼猴(cyno)之CD22之胺基酸序列(SEQ ID NO:31)。獼猴CD22之前19個胺基酸為信號序列。

圖2A-2B：圖2A描述經人類化10F4形式1抗體(h10F4v1)比對且經人類亞群III序列比對之本發明之鼠10F4抗CD22抗體(m10F4)的重鏈可變區之胺基酸序列。HVR經方框框住(HVR-H1、HVR-H2、HVR-H3)。將HVR括在一起之序列為框架序列(FR-H1至FR-H4)。該等序列係根據Kabat編號進行編號。Kabat、Chothia及contact CDR指示在經框住之HVR周圍。圖2B描述經人類化10F4形式1抗體(h10F4v1)比對且經人類 κ I序列比對之本發明之鼠10F4抗CD22抗體(m10F4)的輕鏈可變區之胺基酸序列。人類化10F4抗體形式2及3(h10F4v2及h10F4v3)具有關於分泌成熟形式之相同胺基酸序列。在HVR-L1之胺基酸28(N28V)處，抗體h10F4v2及h10F4v3與h10F4v1不同。該等HVR經框住。FR-L1、FR-L2、FR-L3及FR-L4序列將HVR括在一起(HVR-L1、HVR-L2、HVR-L3)。該等序列係根據Kabat編號進行編號。Kabat、Chothia及contact CDR指示在經框住之HVR周圍。

圖3A及3B展示具有如下序列識別號之適用於實施本發

明之例示性受體人類重鏈可變區(VH)一致框架序列，其中FR SEQ ID NO係以FR-H1、FR-H2、FR-H3、FR-H4之次序列出：

人類 VH 亞群 I 一致框架 "A" 減去 Kabat CDR(SEQ ID NO:26、47、48、7)。

人類 VH 亞群 I 一致框架 "B"、"C" 及 "D" 減去延伸之高變區(SEQ ID NO:50、51、52、7；SEQ ID NO:50、51、52、7；及 SEQ ID NO:50、51、53、7)。

人類 VH 亞群 II 一致框架 "A" 減去 Kabat CDR(SEQ ID NO:54、55、56、7)。

人類 VH 亞群 II 一致框架 "B"、"C" 及 "D" 減去延伸之高變區(SEQ ID NO:57、58、56、7；SEQ ID NO:57、58、59、7；及 SEQ ID NO:57、58、60、7)。

人類 VH 亞群 III 一致框架 "A" 減去 Kabat CDR(SEQ ID NO:61、62、63、7)。

人類 VH 亞群 III 一致框架 "B"、"C" 及 "D" 減去延伸之高變區(SEQ ID NO:64、65、63、7；SEQ ID NO:64、65、66、7；及 SEQ ID NO:64、65、67、7)。

人類 VH 受體 1 框架 "A" 減去 Kabat CDR(SEQ ID NO:68、62、69、7)。

人類 VH 受體 1 框架 "B" 及 "C" 減去延伸之高變區(SEQ ID NO:64、65、69、7；及 SEQ ID NO:64、65、70、7)。

人類 VH 受體 2 框架 "A" 減去 Kabat CDR(SEQ ID NO:68、62、71、7)。

人類 VH 受體 2 框架 "B"、"C" 及 "D" 減去延伸之高變區 (SEQ ID NO:64、65、71、7；SEQ ID NO:64、65、72、7；及 SEQ ID NO:64、65、73、7)。

圖 4A 及 4B 展示適用於實施本發明之例示性受體人類輕鏈可變區 (VL) 一致框架序列，其具有如下序列識別號：

人類 VL κ 亞群 I-1 一致框架 ($\kappa v1-1$)：SEQ ID NO:74、75、76、77

人類 VL κ 亞群 I 一致框架 ($\kappa v1$)：SEQ ID NO:74、78、76、77

人類 VL κ 亞群 II 一致框架 ($\kappa v2$)：SEQ ID NO:49、79、80、77

人類 VL κ 亞群 III 一致框架 ($\kappa v3$)：SEQ ID NO:81、82、83、77

人類 VL κ 亞群 IV 一致框架 ($\kappa v4$)：SEQ ID NO:84、85、86、77

圖 5A 及 5B：圖 5A 描述天然序列人類 IgG Fc 區序列 humIgG1 (非 A 異型，SEQ ID NO:38；及 A 異型，其中 SEQ ID NO:38 內之胺基酸序列 SREEM 變為 SRDEL)、humIgG2 (SEQ ID NO:39)、humIgG3 (SEQ ID NO:40) 及 humIgG4 (SEQ ID NO:41) 之比對，其中該等序列之間之差異係以星號標註。序列上方之數字表示 EU 編號系統。亦展示一例示性 κ 恆定區。圖 5B 描述人類化抗 CD22 抗體 10F4v2、同型 IgG1 之輕鏈及重鏈之全長胺基酸序列 (可變區及恆定區)。加底線部分描述恆定域。

圖 6A-6D 展示量測淋巴瘤細胞株中 CD22 ADC 功效之各種決定子之檢定的結果。圖 6A 指示較高細胞表面 CD22 含量係與較低抗 CD22-MCC-DM1 IC50 (較高功效) 相關。圖 6B 指示抗 CD22-MCC-DM1 之增加之內化與較低之抗 CD22-MCC-DM1 IC50 相關。圖 6C 指示細胞對游離藥物之增加之固有敏感性與較低抗 CD22-MCC-DM1 IC50 相關。圖 6D 為展示在與細胞表面上之 CD22 結合後螢光標記抗 CD22 抗體之內化的顯微照片。

圖 7A-7C：圖 7A 為一異種移植物模型中活體內腫瘤體積縮減之圖，其展示向具有人類 B 細胞腫瘤之 SCID 小鼠投予抗 CD22 抗體 mu10F4-smcc-DM1 及 hu10F4v1-smcc-DM1 顯著減小腫瘤體積。藥物裝載為約 4 及 4.6，參看表 4。圖 7B 為一類似研究之圖，但藥物裝載略微較低，為約 2.9 及 3.0 (參看表 5)，且 mu10F4-smcc-DM1 及 hu10F4v2-smcc-DM1 功效係與對照抗體及未接合 mu10F4 進行比較。圖 7C 為一異種移植物模型中活體內腫瘤體積縮減之圖，其中抗 CD22-spp-DM1 係如表 6 中所示經投予。

圖 8A 及 8B：圖 8A 為一投予 Ramos 細胞異種移植物之抗 CD22 抗體 5E8.1.8-smcc-DM1 及 RFB4-smcc-DM1 之圖。圖 8B 為一投予 BJAB-luc 異種移植物之抗 CD22 抗體 5E8.1.8-smcc-DM1 及 RFB4-smcc-DM1 之圖。

圖 9 為一展示在投予低藥物裝載、中等藥物裝載及高藥物裝載之抗 CD22(RFB4)-smcc-DM1 之後，隨時間對腫瘤體積之相對影響的圖。

圖 10 為一展示在 Ramos 異種移植物中投予抗 CD22(RFB4)-MC-vcPAB-MMAF 或抗 CD22(RFB4)-MC-MMAF 之後，隨時間對腫瘤體積之相對影響的圖。

圖 11 為一展示在投予抗 CD22(RFB4)-smcc-DM1 或 -MCvcPAB-MMAE 之後，隨時間對腫瘤體積之相對影響的圖。

圖 12 為一展示在投予人類化抗 CD22 10F4 變異體作為如表 12 中所揭示之 MMAF 或 DM1 免疫接合物之後，隨時間對腫瘤體積之相對影響的圖。

圖 13A-13C 為展示在不同 B 細胞淋巴瘤異種移植物模型 SuDHL-4(圖 13A)、DoHH2(圖 13B)及 Granta-519(圖 13C)投予抗 CD22-smcc-DM1 或抗 CD22-MC-MMAF 之後，隨時間對腫瘤體積之相對影響的圖。

圖 14 展示如實例中所述缺失抗原決定部位定位之 CD22 域的圖。該等域編號為 1-7。"TM"係指跨膜域。

圖 15 展示經半胱胺酸改造之抗 CD22 抗體藥物接合物 (ADC) 之繪圖，其中藥物部分係連接於以下區中之經改造半胱胺酸基團上：輕鏈(LC-ADC)；重鏈(HC-ADC)；及 Fc 區(Fc-ADC)。

圖 16 展示以下步驟：(i)以還原劑 TCEP(參(2-羧乙基)膦鹽酸鹽)還原半胱胺酸二硫化物加合物及經半胱胺酸改造之抗 CD22 抗體(ThioMab)中之鏈間及鏈內二硫化物；(ii)以 dhAA(脫氫抗壞血酸)部分氧化(亦即再氧化)以再形成鏈間及鏈內二硫化物；及(iii)將再氧化抗體與藥物-連接子中間

物接合以形成經半胱胺酸改造之抗CD22抗體藥物接合物(ADC)。

圖17A-17C描述本發明之抗CD22經半胱胺酸改造之抗體的胺基酸序列，其中輕鏈或重鏈或Fc區經改變以在所選胺基酸位置處改造半胱胺酸。圖17A描述抗CD22 10F4變異體輕鏈之胺基酸序列，其中在Kabat位置205處之纈胺酸(依序位置纈胺酸210)經改變為半胱胺酸。圖17B描述抗CD22 10F4變異體重鏈之胺基酸序列，其中在EU位置118處之丙胺酸(依序位置丙胺酸121)經改變為半胱胺酸。圖17C描述抗CD22 10F4變異體Fc區之胺基酸序列，其中在EU位置400處之絲胺酸(依序位置絲胺酸403)經改變為半胱胺酸。在每一圖中，經改變之胺基酸以具有雙底線之粗體文字展示。單一底線指示恆定區。可變區無底線。

圖18A-18E為指示本發明之抗CD22 thiomab藥物接合物(TDC)結合至表現於BJAB-lucs細胞表面上之CD22之結合類似於LC、HC及Fc thiomab變異體以及所示不同藥物接合物的FACS圖。

圖19為一繪製經不同抗CD22 TDC治療之異種移植模型中平均腫瘤體積隨時間變化之圖，其由經改造半胱胺酸(LC、HC或Fc)之位置及/或由藥物接合物(MMAF或MMAE)改變，在研究期間經抗CD22 TDC 10F4-LC-V210C-MCvcPAB-MMAE及抗CD22 10F4-HC-A121C-MCvcPAB-MMAE治療之異種移植模型展示腫瘤體積減小。

圖20A為繪製在經與不同連接子藥物部分接合及/或以所

示不同劑量投予之重鏈 A118C 抗 CD22 TDC 治療之 CB17 SCID 小鼠中在人類套細胞淋巴瘤 Granta-519 異種移植物中平均腫瘤體積隨時間變化的圖。在此實驗中抗 CD22 10F4-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE TDC 似乎為最有效之測試劑。圖 20B 為繪製在經相同但更高劑量之重鏈 A118C 抗 CD22 TDC 治療之 CB17 SCID 小鼠中在濾泡性淋巴瘤 DOHH2 異種移植物中平均腫瘤體積隨時間變化的圖。在此實驗中抗 CD22 10F4-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE TDC 似乎為最有效之測試劑。圖 20C 為自 DOHH2 異種移植物研究之小鼠中體重變化百分比之圖，其展示在研究之前 14 天中體重無明顯變化。

圖 21A 及 21B 為展示在第 0 天及第 5 天血清 AST(天冬胺酸轉胺酶)(圖 21A)及血清嗜中性白血球(圖 21B)變化之條形圖，其中投予包含可裂解及不可裂解連接子之 ADC。

圖 22A 及 22B 為展示以 10 mg/kg、20 mg/kg 及 30 mg/kg 抗 CD22 MMAF(圖 22A)及抗 CD22 DM1(圖 22B)給藥之獼猴中周邊 B 細胞(CD20⁺細胞)之耗減的圖。

圖 23A 及 23B 為展示在 10 mg/kg、20 mg/kg 及 30 mg/kg 抗 CD22 MMAF(圖 23A)及抗 CD22 DM1(圖 23B)下 CD4⁺淋巴細胞無顯著變化的圖。

圖 24A 及 24B 展示獼猴扁桃體組織之組織學樣品，其中生髮中心 B 細胞之耗減(在媒劑對照中顯而易見(圖 24A))係於來自一以 10 mg/kg hu10F4v3-SMCC-DM1 給藥之動物之扁桃體樣品中耗減。

圖 25A 為組織樣品取自其用於研究之脾濾泡之區域的圖，其中其展示抗 CD22 ADC 共用獼猴靜止組織中之 B 細胞。獼猴脾濾泡生髮中心中之分裂細胞係於來自以 10 mg/kg hu10F4v3-MC-MMAF 給藥之動物之獼猴脾的分裂生髮細胞中耗減(圖 25B 及 25C)。在相同條件下未分裂天然 B 細胞未耗減(圖 25D 及 25E)。

序列表

<110> 美商建南德克公司

<120> 抗體及免疫接合物及其用途

<130> P2262R1

<140> 096119143

<141> 2007-05-29

<150> US 60/911,829

<151> 2007-04-13

<150> US 60/908,941

<151> 2007-03-29

<150> US 60/809,328

<151> 2006-05-30

<160> 93

<210> 1

<211> 25

<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

<223> 序列經合成

<400> 1

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
20 25

<210> 2

<211> 10

<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

<223> 序列經合成

<400> 2

Gly Tyr Glu Phe Ser Arg Ser Trp Met Asn
5 10

<210> 3

<211> 13

<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

<223> 序列經合成

<400> 3

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
5 10

<210> 4

<211> 18

<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

<223> 序列經合成

<400> 4

Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Ser Gly Lys
1 5 10 15

Phe Lys Gly

<210> 5

<211> 30
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 序列經合成

<400> 5
Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu
1 5 10 15
Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 6
<211> 11
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 序列經合成

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

<210> 7
<211> 11
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 序列經合成

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

<210> 8
<211> 23
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 序列經合成

<400> 8
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15
Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
20

<210> 9
<211> 16
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 序列經合成

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

<210> 10
<211> 16
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 序列經合成

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

Glu

<210> 11
<211> 15
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 序列經合成

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

<210> 12
<211> 7
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 序列經合成

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

<210> 13
<211> 32
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 序列經合成

<400> 13
Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
1 5 10 15
Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
20 25 30

Tyr Cys

<210> 14
<211> 9
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 序列經合成

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

<210> 15
<211> 10
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 序列經合成

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

<210> 16

<211> 120
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 序列經合成

<400> 16
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Glu Phe Ser
20 25 30
Arg Ser Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
35 40 45
Glu Trp Val Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr
50 55 60
Ser Gly Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser
65 70 75
Ser Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
80 85 90
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Ser Ser Trp Asp Trp
95 100 105
Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
110 115 120

<210> 17
<211> 113
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 序列經合成

<400> 17
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15
Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val
20 25 30
His Ser Asn Gly Asn Thr Phe Leu Glu Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
35 40 45
Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe
50 55 60
Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp
65 70 75
Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr
80 85 90
Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gln Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gln
95 100 105
Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
110

<210> 18
<211> 113
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 序列經合成

<400> 18
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val

1 5 10 15
Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val
20 25 30
His Ser Val Gly Asn Thr Phe Leu Glu Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
35 40 45
Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe
50 55 60
Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp
65 70 75
Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr
80 85 90
Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gln Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gln
95 100 105
Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
110

<210> 19
<211> 16
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 序列經合成

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

Glu

<210> 20
<211> 16
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 序列經合成

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

Glu

<210> 21
<211> 16
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 序列經合成

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

Glu

<210> 22
<211> 16
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 序列經合成

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

<210> 23
<211> 16
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 序列經合成

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

<210> 24
<211> 113
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 序列經合成

<400> 24
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
20 25 30
Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
35 40 45
Glu Trp Val Ser Val Ile Ser Gly Asp Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr
50 55 60
Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser
65 70 75
Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
80 85 90
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
95 100 105
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
110

<210> 25
<211> 107
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 序列經合成

<400> 25
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15
Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser
20 25 30
Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
35 40 45
Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser

50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
 65 70 75
 Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
 80 85 90
 Tyr Asn Ser Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
 95 100 105

Ile Lys

<210> 26
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> 人造序列

<220>
 <223> 序列經合成

<400> 26
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly
 1 5 10 15
 Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
 20 25 30

<210> 27
 <211> 847
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 27
 Met His Leu Leu Gly Pro Trp Leu Leu Leu Val Leu Glu Tyr
 1 5 10 15
 Leu Ala Phe Ser Asp Ser Ser Lys Trp Val Phe Glu His Pro Glu
 20 25 30
 Thr Leu Tyr Ala Trp Glu Gly Ala Cys Val Trp Ile Pro Cys Thr
 35 40 45
 Tyr Arg Ala Leu Asp Gly Asp Leu Glu Ser Phe Ile Leu Phe His
 50 55 60
 Asn Pro Glu Tyr Asn Lys Asn Thr Ser Lys Phe Asp Gly Thr Arg
 65 70 75
 Leu Tyr Glu Ser Thr Lys Asp Gly Lys Val Pro Ser Glu Gln Lys
 80 85 90
 Arg Val Gln Phe Leu Gly Asp Lys Asn Lys Asn Cys Thr Leu Ser
 95 100 105
 Ile His Pro Val His Leu Asn Asp Ser Gly Gln Leu Gly Leu Arg
 110 115 120
 Met Glu Ser Lys Thr Glu Lys Trp Met Glu Arg Ile His Leu Asn
 125 130 135
 Val Ser Glu Arg Pro Phe Pro Pro His Ile Gln Leu Pro Pro Glu
 140 145 150
 Ile Gln Glu Ser Gln Glu Val Thr Leu Thr Cys Leu Leu Asn Phe
 155 160 165
 Ser Cys Tyr Gly Tyr Pro Ile Gln Leu Gln Trp Leu Leu Glu Gly
 170 175 180
 Val Pro Met Arg Gln Ala Ala Val Thr Ser Thr Ser Leu Thr Ile
 185 190 195
 Lys Ser Val Phe Thr Arg Ser Glu Leu Lys Phe Ser Pro Gln Trp

200	205	210
Ser His His Gly Lys Ile Val Thr Cys	Gln Leu Gln Asp Ala Asp	
215	220	225
Gly Lys Phe Leu Ser Asn Asp Thr Val	Gln Leu Asn Val Lys His	
230	235	240
Thr Pro Lys Leu Glu Ile Lys Val Thr	Pro Ser Asp Ala Ile Val	
245	250	255
Arg Glu Gly Asp Ser Val Thr Met Thr	Cys Glu Val Ser Ser Ser	
260	265	270
Asn Pro Glu Tyr Thr Thr Val Ser Trp	Leu Lys Asp Gly Thr Ser	
275	280	285
Leu Lys Lys Gln Asn Thr Phe Thr Leu	Asn Leu Arg Glu Val Thr	
290	295	300
Lys Asp Gln Ser Gly Lys Tyr Cys Cys	Gln Val Ser Asn Asp Val	
305	310	315
Gly Pro Gly Arg Ser Glu Glu Val Phe	Leu Gln Val Gln Tyr Ala	
320	325	330
Pro Glu Pro Ser Thr Val Gln Ile Leu	His Ser Pro Ala Val Glu	
335	340	345
Gly Ser Gln Val Glu Phe Leu Cys Met	Ser Leu Ala Asn Pro Leu	
350	355	360
Pro Thr Asn Tyr Thr Trp Tyr His Asn	Gly Lys Glu Met Gln Gly	
365	370	375
Arg Thr Glu Glu Lys Val His Ile Pro	Lys Ile Leu Pro Trp His	
380	385	390
Ala Gly Thr Tyr Ser Cys Val Ala Glu	Asn Ile Leu Gly Thr Gly	
395	400	405
Gln Arg Gly Pro Gly Ala Glu Leu Asp	Val Gln Tyr Pro Pro Lys	
410	415	420
Lys Val Thr Thr Val Ile Gln Asn Pro	Met Pro Ile Arg Glu Gly	
425	430	435
Asp Thr Val Thr Leu Ser Cys Asn Tyr	Asn Ser Ser Asn Pro Ser	
440	445	450
Val Thr Arg Tyr Glu Trp Lys Pro His	Gly Ala Trp Glu Glu Pro	
455	460	465
Ser Leu Gly Val Leu Lys Ile Gln Asn	Val Gly Trp Asp Asn Thr	
470	475	480
Thr Ile Ala Cys Ala Arg Cys Asn Ser	Trp Cys Ser Trp Ala Ser	
485	490	495
Pro Val Ala Leu Asn Val Gln Tyr Ala	Pro Arg Asp Val Arg Val	
500	505	510
Arg Lys Ile Lys Pro Leu Ser Glu Ile	His Ser Gly Asn Ser Val	
515	520	525
Ser Leu Gln Cys Asp Phe Ser Ser Ser	His Pro Lys Glu Val Gln	
530	535	540
Phe Phe Trp Glu Lys Asn Gly Arg Leu	Leu Gly Lys Glu Ser Gln	
545	550	555
Leu Asn Phe Asp Ser Ile Ser Pro Glu	Asp Ala Gly Ser Tyr Ser	
560	565	570
Cys Trp Val Asn Asn Ser Ile Gly Gln Thr	Ala Ser Lys Ala Trp	

575	580	585
Thr Leu Glu Val	Leu Tyr Ala Pro Arg	Arg Leu Arg Val Ser Met
590	595	600
Ser Pro Gly Asp	Gln Val Met Glu Gly	Lys Ser Ala Thr Leu Thr
605	610	615
Cys Glu Ser Asp	Ala Asn Pro Pro Val	Ser His Tyr Thr Trp Phe
620	625	630
Asp Trp Asn Asn	Gln Ser Leu Pro His	His Ser Gln Lys Leu Arg
635	640	645
Leu Glu Pro Val	Lys Val Gln His Ser	Gly Ala Tyr Trp Cys Gln
650	655	660
Gly Thr Asn Ser	Val Gly Lys Gly Arg	Ser Pro Leu Ser Thr Leu
665	670	675
Thr Val Tyr Tyr	Ser Pro Glu Thr Ile	Gly Arg Arg Val Ala Val
680	685	690
Gly Leu Gly Ser	Cys Leu Ala Ile Leu	Ile Leu Ala Ile Cys Gly
695	700	705
Leu Lys Leu Gln	Arg Arg Trp Lys Arg	Thr Gln Ser Gln Gln Gly
710	715	720
Leu Gln Glu Asn	Ser Ser Gly Gln Ser	Phe Phe Val Arg Asn Lys
725	730	735
Lys Val Arg Arg	Ala Pro Leu Ser Glu	Gly Pro His Ser Leu Gly
740	745	750
Cys Tyr Asn Pro	Met Met Glu Asp Gly	Ile Ser Tyr Thr Thr Leu
755	760	765
Arg Phe Pro Glu	Met Asn Ile Pro Arg	Thr Gly Asp Ala Glu Ser
770	775	780
Ser Glu Met Gln	Arg Pro Pro Arg Thr	Cys Asp Asp Thr Val Thr
785	790	795
Tyr Ser Ala Leu	His Lys Arg Gln Val	Gly Asp Tyr Glu Asn Val
800	805	810
Ile Pro Asp Phe	Pro Glu Asp Glu Gly	Ile His Tyr Ser Glu Leu
815	820	825
Ile Gln Phe Gly	Val Gly Glu Arg Pro	Gln Ala Gln Glu Asn Val
830	835	840
Asp Tyr Val Ile	Leu Lys His	
845		

<210> 28
 <211> 660
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 28
 Ser Lys Trp Val Phe Glu His Pro Glu Thr Leu Tyr Ala Trp Glu
 1 5 10 15
 Gly Ala Cys Val Trp Ile Pro Cys Thr Tyr Arg Ala Leu Asp Gly
 20 25 30
 Asp Leu Glu Ser Phe Ile Leu Phe His Asn Pro Glu Tyr Asn Lys
 35 40 45
 Asn Thr Ser Lys Phe Asp Gly Thr Arg Leu Tyr Glu Ser Thr Lys
 50 55 60
 Asp Gly Lys Val Pro Ser Glu Gln Lys Arg Val Gln Phe Leu Gly

65	70	75
Asp Lys Asn Lys Asn Cys Thr Leu Ser	Ile His Pro Val His	Leu
80	85	90
Asn Asp Ser Gly Gln Leu Gly Leu Arg	Met Glu Ser Lys Thr	Glu
95	100	105
Lys Trp Met Glu Arg Ile His Leu Asn	Val Ser Glu Arg Pro	Phe
110	115	120
Pro Pro His Ile Gln Leu Pro Pro Glu	Ile Gln Glu Ser Gln	Glu
125	130	135
Val Thr Leu Thr Cys Leu Leu Asn Phe	Ser Cys Tyr Gly Tyr	Pro
140	145	150
Ile Gln Leu Gln Trp Leu Leu Glu Gly	Val Pro Met Arg Gln	Ala
155	160	165
Ala Val Thr Ser Thr Ser Leu Thr Ile	Lys Ser Val Phe Thr	Arg
170	175	180
Ser Glu Leu Lys Phe Ser Pro Gln Trp	Ser His His Gly Lys	Ile
185	190	195
Val Thr Cys Gln Leu Gln Asp Ala Asp	Gly Lys Phe Leu Ser	Asn
200	205	210
Asp Thr Val Gln Leu Asn Val Lys His	Thr Pro Lys Leu Glu	Ile
215	220	225
Lys Val Thr Pro Ser Asp Ala Ile Val	Arg Glu Gly Asp Ser	Val
230	235	240
Thr Met Thr Cys Glu Val Ser Ser Ser	Asn Pro Glu Tyr Thr	Thr
245	250	255
Val Ser Trp Leu Lys Asp Gly Thr Ser	Leu Lys Lys Gln Asn	Thr
260	265	270
Phe Thr Leu Asn Leu Arg Glu Val Thr	Lys Asp Gln Ser Gly	Lys
275	280	285
Tyr Cys Cys Gln Val Ser Asn Asp Val	Gly Pro Gly Arg Ser	Glu
290	295	300
Glu Val Phe Leu Gln Val Gln Tyr Ala	Pro Glu Pro Ser Thr	Val
305	310	315
Gln Ile Leu His Ser Pro Ala Val Glu	Gly Ser Gln Val Glu	Phe
320	325	330
Leu Cys Met Ser Leu Ala Asn Pro Leu	Pro Thr Asn Tyr Thr	Trp
335	340	345
Tyr His Asn Gly Lys Glu Met Gln Gly	Arg Thr Glu Glu Lys	Val
350	355	360
His Ile Pro Lys Ile Leu Pro Trp His	Ala Gly Thr Tyr Ser	Cys
365	370	375
Val Ala Glu Asn Ile Leu Gly Thr Gly	Gln Arg Gly Pro Gly	Ala
380	385	390
Glu Leu Asp Val Gln Tyr Pro Pro Lys	Lys Val Thr Thr Val	Ile
395	400	405
Gln Asn Pro Met Pro Ile Arg Glu Gly	Asp Thr Val Thr Leu	Ser
410	415	420
Cys Asn Tyr Asn Ser Ser Asn Pro Ser	Val Thr Arg Tyr Glu	Trp
425	430	435
Lys Pro His Gly Ala Trp Glu Glu Pro	Ser Leu Gly Val Leu	Lys

440	445	450
Ile Gln Asn Val Gly Trp Asp Asn Thr Thr	Ile Ala Cys Ala Arg	
455	460	465
Cys Asn Ser Trp Cys Ser Trp Ala Ser Pro	Val Ala Leu Asn Val	
470	475	480
Gln Tyr Ala Pro Arg Asp Val Arg Val Arg	Lys Ile Lys Pro Leu	
485	490	495
Ser Glu Ile His Ser Gly Asn Ser Val Ser	Leu Gln Cys Asp Phe	
500	505	510
Ser Ser Ser His Pro Lys Glu Val Gln Phe	Phe Trp Glu Lys Asn	
515	520	525
Gly Arg Leu Leu Gly Lys Glu Ser Gln Leu	Asn Phe Asp Ser Ile	
530	535	540
Ser Pro Glu Asp Ala Gly Ser Tyr Ser Cys	Trp Val Asn Asn Ser	
545	550	555
Ile Gly Gln Thr Ala Ser Lys Ala Trp Thr	Leu Glu Val Leu Tyr	
560	565	570
Ala Pro Arg Arg Leu Arg Val Ser Met Ser	Pro Gly Asp Gln Val	
575	580	585
Met Glu Gly Lys Ser Ala Thr Leu Thr Cys	Glu Ser Asp Ala Asn	
590	595	600
Pro Pro Val Ser His Tyr Thr Trp Phe Asp	Trp Asn Asn Gln Ser	
605	610	615
Leu Pro His His Ser Gln Lys Leu Arg Leu	Glu Pro Val Lys Val	
620	625	630
Gln His Ser Gly Ala Tyr Trp Cys Gln Gly	Thr Asn Ser Val Gly	
635	640	645
Lys Gly Arg Ser Pro Leu Ser Thr Leu Thr	Val Tyr Tyr Ser Pro	
650	655	660

<210> 29
 <211> 647
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 29
 Met His Leu Leu Gly Pro Trp Leu Leu Leu Leu Val Leu Glu Tyr
 1 5 10 15
 Leu Ala Phe Ser Asp Ser Ser Lys Trp Val Phe Glu His Pro Glu
 20 25 30
 Thr Leu Tyr Ala Trp Glu Gly Ala Cys Val Trp Ile Pro Cys Thr
 35 40 45
 Tyr Arg Ala Leu Asp Gly Asp Leu Glu Ser Phe Ile Leu Phe His
 50 55 60
 Asn Pro Glu Tyr Asn Lys Asn Thr Ser Lys Phe Asp Gly Thr Arg
 65 70 75
 Leu Tyr Glu Ser Thr Lys Asp Gly Lys Val Pro Ser Glu Gln Lys
 80 85 90
 Arg Val Gln Phe Leu Gly Asp Lys Asn Lys Asn Cys Thr Leu Ser
 95 100 105
 Ile His Pro Val His Leu Asn Asp Ser Gly Gln Leu Gly Leu Arg
 110 115 120
 Met Glu Ser Lys Thr Glu Lys Trp Met Glu Arg Ile His Leu Asn

125	130	135
Val Ser Glu Arg Pro Phe Pro Pro His	Ile Gln Leu Pro Pro Glu	
140	145	150
Ile Gln Glu Ser Gln Glu Val Thr Leu Thr Cys Leu Leu Asn Phe		
155	160	165
Ser Cys Tyr Gly Tyr Pro Ile Gln Leu Gln Trp Leu Leu Glu Gly		
170	175	180
Val Pro Met Arg Gln Ala Ala Val Thr Ser Thr Ser Leu Thr Ile		
185	190	195
Lys Ser Val Phe Thr Arg Ser Glu Leu Lys Phe Ser Pro Gln Trp		
200	205	210
Ser His His Gly Lys Ile Val Thr Cys Gln Leu Gln Asp Ala Asp		
215	220	225
Gly Lys Phe Leu Ser Asn Asp Thr Val Gln Leu Asn Val Lys His		
230	235	240
Pro Pro Lys Lys Val Thr Thr Val Ile Gln Asn Pro Met Pro Ile		
245	250	255
Arg Glu Gly Asp Thr Val Thr Leu Ser Cys Asn Tyr Asn Ser Ser		
260	265	270
Asn Pro Ser Val Thr Arg Tyr Glu Trp Lys Pro His Gly Ala Trp		
275	280	285
Glu Glu Pro Ser Leu Gly Val Leu Lys Ile Gln Asn Val Gly Trp		
290	295	300
Asp Asn Thr Thr Ile Ala Cys Ala Ala Cys Asn Ser Trp Cys Ser		
305	310	315
Trp Ala Ser Pro Val Ala Leu Asn Val Gln Tyr Ala Pro Arg Asp		
320	325	330
Val Arg Val Arg Lys Ile Lys Pro Leu Ser Glu Ile His Ser Gly		
335	340	345
Asn Ser Val Ser Leu Gln Cys Asp Phe Ser Ser Ser His Pro Lys		
350	355	360
Glu Val Gln Phe Phe Trp Glu Lys Asn Gly Arg Leu Leu Gly Lys		
365	370	375
Glu Ser Gln Leu Asn Phe Asp Ser Ile Ser Pro Glu Asp Ala Gly		
380	385	390
Ser Tyr Ser Cys Trp Val Asn Asn Ser Ile Gly Gln Thr Ala Ser		
395	400	405
Lys Ala Trp Thr Leu Glu Val Leu Tyr Ala Pro Arg Arg Leu Arg		
410	415	420
Val Ser Met Ser Pro Gly Asp Gln Val Met Glu Gly Lys Ser Ala		
425	430	435
Thr Leu Thr Cys Glu Ser Asp Ala Asn Pro Pro Val Ser His Tyr		
440	445	450
Thr Trp Phe Asp Trp Asn Asn Gln Ser Leu Pro Tyr His Ser Gln		
455	460	465
Lys Leu Arg Leu Glu Pro Val Lys Val Gln His Ser Gly Ala Tyr		
470	475	480
Trp Cys Gln Gly Thr Asn Ser Val Gly Lys Gly Arg Ser Pro Leu		
485	490	495
Ser Thr Leu Thr Val Tyr Tyr Ser Pro Glu Thr Ile Gly Arg Arg		

500 505 510
 Val Ala Val Gly Leu Gly Ser Cys Leu Ala Ile Leu Ile Leu Ala
 515 520 525
 Ile Cys Gly Leu Lys Leu Gln Arg Arg Trp Lys Arg Thr Gln Ser
 530 535 540
 Gln Gln Gly Leu Gln Glu Asn Ser Ser Gly Gln Ser Phe Phe Val
 545 550 555
 Arg Asn Lys Lys Val Arg Arg Ala Pro Leu Ser Glu Gly Pro His
 560 565 570
 Ser Leu Gly Cys Tyr Asn Pro Met Met Glu Asp Gly Ile Ser Tyr
 575 580 585
 Thr Thr Leu Arg Phe Pro Glu Met Asn Ile Pro Arg Thr Gly Asp
 590 595 600
 Ala Glu Ser Ser Glu Met Gln Arg Pro Pro Pro Asp Cys Asp Asp
 605 610 615
 Thr Val Thr Tyr Ser Ala Leu His Lys Arg Gln Val Gly Thr Met
 620 625 630
 Arg Thr Ser Phe Gln Ile Phe Gln Lys Met Arg Gly Phe Ile Thr
 635 640 645
 Gln Ser

<210> 30
 <211> 483
 <212> PRT
 <213> 黑猩猩

<400> 30
 Ser Lys Trp Val Phe Glu His Pro Glu Thr Leu Tyr Ala Trp Glu
 1 5 10 15
 Gly Ala Cys Val Trp Ile Pro Cys Thr Tyr Arg Ala Leu Asp Gly
 20 25 30
 Asp Leu Glu Ser Phe Ile Leu Phe His Asn Pro Glu Tyr Asn Lys
 35 40 45
 Asn Thr Ser Lys Phe Asp Gly Thr Arg Leu Tyr Glu Ser Thr Lys
 50 55 60
 Asp Gly Lys Val Pro Ser Glu Gln Lys Arg Val Gln Phe Leu Gly
 65 70 75
 Asp Lys Asn Lys Asn Cys Thr Leu Ser Ile His Pro Val His Leu
 80 85 90
 Asn Asp Ser Gly Gln Leu Gly Leu Arg Met Glu Ser Lys Thr Glu
 95 100 105
 Lys Trp Met Glu Arg Ile His Leu Asn Val Ser Glu Arg Pro Phe
 110 115 120
 Pro Pro His Ile Gln Leu Pro Pro Glu Ile Gln Glu Ser Gln Glu
 125 130 135
 Val Thr Leu Thr Cys Leu Leu Asn Phe Ser Cys Tyr Gly Tyr Pro
 140 145 150
 Ile Gln Leu Gln Trp Leu Leu Glu Gly Val Pro Met Arg Gln Ala
 155 160 165
 Ala Val Thr Ser Thr Ser Leu Thr Ile Lys Ser Val Phe Thr Arg
 170 175 180
 Ser Glu Leu Lys Phe Ser Pro Gln Trp Ser His His Gly Lys Ile

185	190	195
Val Thr Cys Gln	Leu Gln Asp Ala Asp Gly Lys Phe Leu Ser Asn	
200	205	210
Asp Thr Val Gln	Leu Asn Val Lys His Pro Pro Lys Lys Val Thr	
215	220	225
Thr Val Ile Gln	Asn Pro Met Pro Ile Arg Glu Gly Asp Thr Val	
230	235	240
Thr Leu Ser Cys	Asn Tyr Asn Ser Ser Asn Pro Ser Val Thr Arg	
245	250	255
Tyr Glu Trp Lys	Pro His Gly Ala Trp Glu Glu Pro Ser Leu Gly	
260	265	270
Val Leu Lys Ile	Gln Asn Val Gly Trp Asp Asn Thr Thr Ile Ala	
275	280	285
Cys Ala Ala Cys	Asn Ser Trp Cys Ser Trp Ala Ser Pro Val Ala	
290	295	300
Leu Asn Val Gln	Tyr Ala Pro Arg Asp Val Arg Val Arg Lys Ile	
305	310	315
Lys Pro Leu Ser	Glu Ile His Ser Gly Asn Ser Val Ser Leu Gln	
320	325	330
Cys Asp Phe Ser	Ser Ser His Pro Lys Glu Val Gln Phe Phe Trp	
335	340	345
Glu Lys Asn Gly	Arg Leu Leu Gly Lys Glu Ser Gln Leu Asn Phe	
350	355	360
Asp Ser Ile Ser	Pro Glu Asp Ala Gly Ser Tyr Ser Cys Trp Val	
365	370	375
Asn Asn Ser Ile	Gly Gln Thr Ala Ser Lys Ala Trp Thr Leu Glu	
380	385	390
Val Leu Tyr Ala	Pro Arg Arg Leu Arg Val Ser Met Ser Pro Gly	
395	400	405
Asp Gln Val Met	Glu Gly Lys Ser Ala Thr Leu Thr Cys Glu Ser	
410	415	420
Asp Ala Asn Pro	Pro Val Ser His Tyr Thr Trp Phe Asp Trp Asn	
425	430	435
Asn Gln Ser Leu	Pro Tyr His Ser Gln Lys Leu Arg Leu Glu Pro	
440	445	450
Val Lys Val Gln	His Ser Gly Ala Tyr Trp Cys Gln Gly Thr Asn	
455	460	465
Ser Val Gly Lys	Gly Arg Ser Pro Leu Ser Thr Leu Thr Val Tyr	
470	475	480

Tyr Ser Pro

<210> 31
 <211> 846
 <212> PRT
 <213> 黑猩猩

<400> 31
 Met His Leu Leu Gly Pro Trp Leu Leu Leu Glu Tyr Leu Ala
 1 5 10 15
 Phe Ser Asp Ser Ser Lys Trp Asn Ile Glu His Pro Gly Thr Ile
 20 25 30
 Tyr Ala Trp Glu Gly Ala Cys Ile Trp Val Pro Cys Thr Tyr Arg

35	40	45
Val Leu Asp Gly	Ala Leu Glu Thr Phe	Ile Leu Phe His Asn Pro
50	55	60
Glu Tyr Asn Gln	Asn Met Ser Lys Phe	Glu Gly Thr Arg Leu Tyr
65	70	75
Glu Ser Thr Lys	Asp Gly Lys Val Pro	Ser Gly Gln Lys Arg Val
80	85	90
Gln Phe Leu Gly	Asn Lys Ile Asn Asn	Asn Cys Thr Leu Ser Ile
95	100	105
His Pro Val His	Val Asn Asp Ser Gly	Gln Leu Gly Leu Arg Met
110	115	120
Val Ser Lys Thr	Glu Lys Trp Met Glu	Arg Ile His Leu Asn Val
125	130	135
Ser Glu Arg Pro	Phe Pro Pro Arg Ile	Gln Leu Pro Pro Lys Leu
140	145	150
Gln Glu Ser Gln	Glu Val Thr Leu Thr	Cys Leu Leu Asn Phe Ser
155	160	165
Cys Tyr Gly Tyr	Gln Ile Gln Leu Gln	Trp Leu Leu Glu Gly Ala
170	175	180
Pro Met Arg Gln	Ala Ala Val Thr Leu	Thr Ser Leu Ser Thr Lys
185	190	195
Ser Val Phe Thr	Arg Ser Glu Leu Lys	Phe Ser Pro Gln Trp Ser
200	205	210
His His Gly Lys	Ile Val Thr Cys Glu	Leu His Asp Val Asp Gly
215	220	225
Lys Val Leu Ser	Glu Asp Thr Val Gln	Leu Asn Val Lys His Thr
230	235	240
Pro Lys Leu Thr	Ile Glu Val Thr Pro	Asn Glu Thr Ile Val Arg
245	250	255
Lys Gly Asp Ser	Val Thr Met Thr Cys	Lys Val Asn Ser Ser Asn
260	265	270
Pro Glu Tyr Thr	Thr Val Ser Trp Leu	Lys Asp Asp Ile Pro Leu
275	280	285
Lys Glu Gln Asn	Thr Leu Met Leu Thr	Leu His Glu Val Thr Lys
290	295	300
Ser Gln Thr Gly	Thr Tyr Cys Cys Arg	Val Ser Asn Asp Val Gly
305	310	315
Pro Ala Thr Ser	Glu Lys Val Phe Leu	Gln Val Gln Tyr Ala Pro
320	325	330
Glu Pro Ser Arg	Val Gln Ile Ser Gln	Ser Pro Ala Val Glu Gly
335	340	345
Ser Glu Val Asn	Phe Leu Cys Ile Ser	Pro Ala Asn Pro Leu Pro
350	355	360
Thr Asn Tyr Thr	Trp Tyr His Asn Gly	Lys Glu Val Gln Gly Arg
365	370	375
Thr Glu Lys Gln	Phe Gln Ile Gln Lys	Ile Leu Pro Trp His Ala
380	385	390
Gly Thr Tyr Ser	Cys Val Ala Glu Asn	Ile Leu Gly Ile Gly Glu
395	400	405
Arg Gly Pro Gly	Thr Glu Leu Asp Val	Gln Tyr Pro Pro Lys Lys

410	415	420
Val Thr Met Val Ile Glu Asn Pro Thr	Pro Ile Arg Glu Gly Asp	
425	430	435
Thr Val Thr Leu Ser Cys Asn Tyr Ser	Ser Ser Asn Pro Ile Val	
440	445	450
Asn His Tyr Glu Trp Arg Pro Arg Gly	Ala Trp Glu Glu Pro Ser	
455	460	465
Leu Gly Val Leu Lys Ile Gln Asn Ile	Gly Trp Asn Asn Thr Ala	
470	475	480
Val Ala Cys Ala Ala Cys Asn Asn Trp	Cys Ser Trp Ala Ser Pro	
485	490	495
Val Thr Leu Asn Val Leu Tyr Ala Pro	Arg Gly Val Arg Val Arg	
500	505	510
Lys Ile Lys Pro Leu Ser Glu Ile His	Ser Gly Asn Leu Val Ser	
515	520	525
Leu Gln Cys Asp Phe Ser Ser Ser His	Pro Lys Glu Val Gln Phe	
530	535	540
Phe Trp Glu Lys Asn Gly Ser Leu Leu	Gly Lys Glu Ser Gln Leu	
545	550	555
Asn Phe Asp Ser Ile Ser Pro Glu Asp	Ala Gly Ser Tyr Ser Cys	
560	565	570
Trp Val Asn Asn Ser Ile Gly Gln Thr	Ala Ser Lys Ala Trp Thr	
575	580	585
Leu Glu Val Leu Tyr Ala Pro Arg Arg	Leu Arg Val Ser Met Ser	
590	595	600
Gln Gly Asn Gln Val Met Glu Gly Lys	Thr Ala Ile Leu Thr Cys	
605	610	615
Glu Ser Asp Ala Asn Pro Pro Val Tyr	Ser Tyr Ala Trp Phe Asp	
620	625	630
Trp Asn Asn Gln Ser Leu Pro Tyr Ser	Gly Arg Met Leu Arg Leu	
635	640	645
Glu Pro Val Lys Val Gln His Ser Gly	Ala Tyr Trp Cys Gln Gly	
650	655	660
Thr Asn Arg Val Gly Lys Gly His Ser	Pro Leu Ile Thr Leu Thr	
665	670	675
Val Tyr Tyr Ser Pro Glu Thr Ile Gly	Arg Arg Val Ala Val Gly	
680	685	690
Leu Gly Ser Cys Leu Ala Ile Leu Ile	Leu Ala Met Cys Gly Phe	
695	700	705
Lys Val Gln Arg Arg Trp Lys Arg Thr	Gln Ser Gln Gln Gly Leu	
710	715	720
Gln Glu Asn Ser Ser Gly Gln Ser Phe	Phe Val Arg Asn Lys Lys	
725	730	735
Val Arg Arg Thr Pro Leu Ser Glu Gly	Pro His Ser Leu Gly Cys	
740	745	750
Tyr Asn Pro Met Met Glu Asp Gly Ile	Ser Tyr Ala Thr Leu Arg	
755	760	765
Phe Pro Glu Thr Asn Thr Pro Arg Thr	Gly Asp Ala Glu Thr Ser	
770	775	780
Glu Leu Gln Arg Leu Pro Pro Asp Cys	Asp Asp Thr Val Thr Tyr	

785 790 795
 Ser Val Leu Gln Lys Arg Gln Val Gly Asp Tyr Glu Asn Val Ile
 800 805 810
 Pro Asp Phe Pro Glu Asp Glu Gly Ile His Tyr Ser Glu Leu Ile
 815 820 825
 Gln Phe Gly Phe Gly Glu Arg Pro Gln Ala Gln Glu Asn Val Asp
 830 835 840
 Tyr Val Ile Val Lys His
 845

<210> 32
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 人造序列

<220>
 <223> 序列經合成

<400> 32
 Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Ile Gly Ala Thr Phe Leu
 1 5 10 15
 Glu

<210> 33
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 人造序列

<220>
 <223> 序列經合成

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

<210> 34
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> 人造序列

<220>
 <223> 序列經合成

<400> 34
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly
 1 5 10 15
 Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Glu Phe Ser
 20 25 30
 Arg Ser Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Arg
 35 40 45
 Glu Trp Ile Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr
 50 55 60
 Ser Gly Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser
 65 70 75
 Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Val Asp
 80 85 90
 Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Asp Gly Ser Ser Trp Asp Trp
 95 100 105
 Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

110 115 120

<210> 35
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> 人造序列

<220>
 <223> 序列經合成

<400> 35
 Asp Ile Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu
 1 5 10 15
 Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val
 20 25 30
 His Ser Asn Gly Asn Thr Phe Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro
 35 40 45
 Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe
 50 55 60
 Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
 65 70 75
 Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val
 80 85 90
 Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gln Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly
 95 100 105
 Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 110

<210> 36
 <211> 847
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 36
 Met His Leu Leu Gly Pro Trp Leu Leu Leu Leu Val Leu Glu Tyr
 1 5 10 15
 Leu Ala Phe Ser Asp Ser Ser Lys Trp Val Phe Glu His Pro Glu
 20 25 30
 Thr Leu Tyr Ala Trp Glu Gly Ala Cys Val Trp Ile Pro Cys Thr
 35 40 45
 Tyr Arg Ala Leu Asp Gly Asp Leu Glu Ser Phe Ile Leu Phe His
 50 55 60
 Asn Pro Glu Tyr Asn Lys Asn Thr Ser Lys Phe Asp Gly Thr Arg
 65 70 75
 Leu Tyr Glu Ser Thr Lys Asp Gly Lys Val Pro Ser Glu Gln Lys
 80 85 90
 Arg Val Gln Phe Leu Gly Asp Lys Asn Lys Asn Cys Thr Leu Ser
 95 100 105
 Ile His Pro Val His Leu Asn Asp Ser Gly Gln Leu Gly Leu Arg
 110 115 120
 Met Glu Ser Lys Thr Glu Lys Trp Met Glu Arg Ile His Leu Asn
 125 130 135
 Val Ser Glu Arg Pro Phe Pro Pro His Ile Gln Leu Pro Pro Glu
 140 145 150
 Ile Gln Glu Ser Gln Glu Val Thr Leu Thr Cys Leu Leu Asn Phe
 155 160 165
 Ser Cys Tyr Gly Tyr Pro Ile Gln Leu Gln Trp Leu Leu Glu Gly

170	175	180
Val Pro Met Arg Gln Ala Ala Val Thr Ser Thr Ser Leu Thr Ile		
185	190	195
Lys Ser Val Phe Thr Arg Ser Glu Leu Lys Phe Ser Pro Gln Trp		
200	205	210
Ser His His Gly Lys Ile Val Thr Cys Gln Leu Gln Asp Ala Asp		
215	220	225
Gly Lys Phe Leu Ser Asn Asp Thr Val Gln Leu Asn Val Lys His		
230	235	240
Thr Pro Lys Leu Glu Ile Lys Val Thr Pro Ser Asp Ala Ile Val		
245	250	255
Arg Glu Gly Asp Ser Val Thr Met Thr Cys Glu Val Ser Ser Ser		
260	265	270
Asn Pro Glu Tyr Thr Thr Val Ser Trp Leu Lys Asp Gly Thr Ser		
275	280	285
Leu Lys Lys Gln Asn Thr Phe Thr Leu Asn Leu Arg Glu Val Thr		
290	295	300
Lys Asp Gln Ser Gly Lys Tyr Cys Cys Gln Val Ser Asn Asp Val		
305	310	315
Gly Pro Gly Arg Ser Glu Glu Val Phe Leu Gln Val Gln Tyr Ala		
320	325	330
Pro Glu Pro Ser Thr Val Gln Ile Leu His Ser Pro Ala Val Glu		
335	340	345
Gly Ser Gln Val Glu Phe Leu Cys Met Ser Leu Ala Asn Pro Leu		
350	355	360
Pro Thr Asn Tyr Thr Trp Tyr His Asn Gly Lys Glu Met Gln Gly		
365	370	375
Arg Thr Glu Glu Lys Val His Ile Pro Lys Ile Leu Pro Trp His		
380	385	390
Ala Gly Thr Tyr Ser Cys Val Ala Glu Asn Ile Leu Gly Thr Gly		
395	400	405
Gln Arg Gly Pro Gly Ala Glu Leu Asp Val Gln Tyr Pro Pro Lys		
410	415	420
Lys Val Thr Thr Val Ile Gln Asn Pro Met Pro Ile Arg Glu Gly		
425	430	435
Asp Thr Val Thr Leu Ser Cys Asn Tyr Asn Ser Ser Asn Pro Ser		
440	445	450
Val Thr Arg Tyr Glu Trp Lys Pro His Gly Ala Trp Glu Glu Pro		
455	460	465
Ser Leu Gly Val Leu Lys Ile Gln Asn Val Gly Trp Asp Asn Thr		
470	475	480
Thr Ile Ala Cys Ala Arg Cys Asn Ser Trp Cys Ser Trp Ala Ser		
485	490	495
Pro Val Ala Leu Asn Val Gln Tyr Ala Pro Arg Asp Val Arg Val		
500	505	510
Arg Lys Ile Lys Pro Leu Ser Glu Ile His Ser Gly Asn Ser Val		
515	520	525
Ser Leu Gln Cys Asp Phe Ser Ser Ser His Pro Lys Glu Val Gln		
530	535	540
Phe Phe Trp Glu Lys Asn Gly Arg Leu Leu Gly Lys Glu Ser Gln		

545 550 555
 Leu Asn Phe Asp Ser Ile Ser Pro Glu Asp Ala Gly Ser Tyr Ser
 560 565 570
 Cys Trp Val Asn Asn Ser Ile Gly Gln Thr Ala Ser Lys Ala Trp
 575 580 585
 Thr Leu Glu Val Leu Tyr Ala Pro Arg Arg Leu Arg Val Ser Met
 590 595 600
 Ser Pro Gly Asp Gln Val Met Glu Gly Lys Ser Ala Thr Leu Thr
 605 610 615
 Cys Glu Ser Asp Ala Asn Pro Pro Val Ser His Tyr Thr Trp Phe
 620 625 630
 Asp Trp Asn Asn Gln Ser Leu Pro His His Ser Gln Lys Leu Arg
 635 640 645
 Leu Glu Pro Val Lys Val Gln His Ser Gly Ala Tyr Trp Cys Gln
 650 655 660
 Gly Thr Asn Ser Val Gly Lys Gly Arg Ser Pro Leu Ser Thr Leu
 665 670 675
 Thr Val Tyr Tyr Ser Pro Glu Thr Ile Gly Arg Arg Val Ala Val
 680 685 690
 Gly Leu Gly Ser Cys Leu Ala Ile Leu Ile Leu Ala Ile Cys Gly
 695 700 705
 Leu Lys Leu Gln Arg Arg Trp Lys Arg Thr Gln Ser Gln Gln Gly
 710 715 720
 Leu Gln Glu Asn Ser Ser Gly Gln Ser Phe Phe Val Arg Asn Lys
 725 730 735
 Lys Val Arg Arg Ala Pro Leu Ser Glu Gly Pro His Ser Leu Gly
 740 745 750
 Cys Tyr Asn Pro Met Met Glu Asp Gly Ile Ser Tyr Thr Thr Leu
 755 760 765
 Arg Phe Pro Glu Met Asn Ile Pro Arg Thr Gly Asp Ala Glu Ser
 770 775 780
 Ser Glu Met Gln Arg Pro Pro Arg Thr Cys Asp Asp Thr Val Thr
 785 790 795
 Tyr Ser Ala Leu His Lys Arg Gln Val Gly Asp Tyr Glu Asn Val
 800 805 810
 Ile Pro Asp Phe Pro Glu Asp Glu Gly Ile His Tyr Ser Glu Leu
 815 820 825
 Ile Gln Phe Gly Val Gly Glu Arg Pro Gln Ala Gln Glu Asn Val
 830 835 840
 Asp Tyr Val Ile Leu Lys His
 845

<210> 37
 <211> 42
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 37
 Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp
 1 5 10 15
 Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn
 20 25 30
 Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys

35

40

<210> 38
 <211> 218
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 38
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
 1 5 10 15
 Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
 20 25 30
 Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
 35 40 45
 Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 50 55 60
 Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 65 70 75
 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 80 85 90
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 95 100 105
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 110 115 120
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
 125 130 135
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 140 145 150
 Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 155 160 165
 Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 170 175 180
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser
 185 190 195
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 200 205 210
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 215

<210> 39
 <211> 217
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 39
 Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 1 5 10 15
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
 20 25 30
 Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe
 35 40 45
 Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 50 55 60
 Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val
 65 70 75
 Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys

	80		85		90
Cys Lys Val Ser	Asn Lys Gly Leu Pro	Ala Pro Ile Glu Lys	Thr		
	95		100		105
Ile Ser Lys Thr	Lys Gly Gln Pro Arg	Glu Pro Gln Val Tyr	Thr		
	110		115		120
Leu Pro Pro Ser	Arg Glu Glu Met Thr	Lys Asn Gln Val Ser	Leu		
	125		130		135
Thr Cys Leu Val	Lys Gly Phe Tyr Pro	Ser Asp Ile Ala Val	Glu		
	140		145		150
Trp Glu Ser Asn	Gly Gln Pro Glu Asn	Asn Tyr Lys Thr Thr	Pro		
	155		160		165
Pro Met Leu Asp	Ser Asp Gly Ser Phe	Phe Leu Tyr Ser Lys	Leu		
	170		175		180
Thr Val Asp Lys	Ser Arg Trp Gln Gln	Gly Asn Val Phe Ser	Cys		
	185		190		195
Ser Val Met His	Glu Ala Leu His Asn	His Tyr Thr Gln Lys	Ser		
	200		205		210
Leu Ser Leu Ser	Pro Gly Lys				
	215				

<210> 40
 <211> 217
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 40
 Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
 1 5 10 15
 Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
 20 25 30
 Thr Cys Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe
 35 40 45
 Lys Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 50 55 60
 Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val
 65 70 75
 Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
 80 85 90
 Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 95 100 105
 Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 110 115 120
 Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 125 130 135
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
 140 145 150
 Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Asn Thr Thr Pro
 155 160 165
 Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
 170 175 180
 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile Phe Ser Cys
 185 190 195
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln Lys Ser

200 205 210
 Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 215
 <210> 41
 <211> 218
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 41
 Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
 1 5 10 15
 Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val
 20 25 30
 Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln
 35 40 45
 Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 50 55 60
 Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
 65 70 75
 Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 80 85 90
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys
 95 100 105
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 110 115 120
 Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser
 125 130 135
 Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
 140 145 150
 Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 155 160 165
 Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg
 170 175 180
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
 185 190 195
 Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Thr Tyr Gln Lys
 200 205 210
 Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 215
 <210> 42
 <211> 30
 <212> PRT
 <213> 人造序列
 <220>
 <223> 序列經合成
 <400> 42
 Cys Asp Lys Thr His Thr Gly Gly Gly Ser Gln Arg Leu Met Glu
 1 5 10 15
 Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp Glu Asp Asp Phe
 20 25 30
 <210> 43
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> 人造序列

<220>
<223> 序列經合成

<400> 43
Gln Arg Leu Met Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu
1 5 10 15
Trp Glu Asp Asp Phe
20

<210> 44
<211> 20
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 序列經合成

<400> 44
Gln Arg Leu Ile Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu
1 5 10 15
Trp Glu Asp Asp Phe
20

<210> 45
<211> 18
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 序列經合成

<400> 45
Arg Leu Ile Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp
1 5 10 15
Glu Asp Asp

<210> 46
<211> 11
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 序列經合成

<400> 46
Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp
5 10

<210> 47
<211> 14
<212> PRT
<213> 智人

<400> 47
Trp Val Arg Arg Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly
5 10

<210> 48
<211> 32
<212> PRT
<213> 智人

<400> 48
Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met
1 5 10 15
Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30
Ala Arg

<210> 49
<211> 23
<212> PRT
<213> 智人

<400> 49
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro
1 5 10 15

Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys
20

<210> 50
<211> 25
<212> PRT
<213> 智人

<400> 50
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly
1 5 10 15

Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser
20 25

<210> 51
<211> 13
<212> PRT
<213> 智人

<400> 51
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
5 10

<210> 52
<211> 31
<212> PRT
<213> 智人

<400> 52
Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met
1 5 10 15

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

Ala

<210> 53
<211> 30
<212> PRT
<213> 智人

<400> 53
Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met
1 5 10 15

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

<210> 54
<211> 30
<212> PRT
<213> 智人

<400> 54
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser
1 5 10 15

Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Val Ser
20 25 30

<210> 55

<211> 14
<212> PRT
<213> 智人

<400> 55
Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
5 10

<210> 56
<211> 32
<212> PRT
<213> 智人

<400> 56
Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
1 5 10 15
Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

Ala Arg

<210> 57
<211> 25
<212> PRT
<213> 智人

<400> 57
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser
1 5 10 15
Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser
20 25

<210> 58
<211> 13
<212> PRT
<213> 智人

<400> 58
Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
5 10

<210> 59
<211> 31
<212> PRT
<213> 智人

<400> 59
Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
1 5 10 15
Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

Ala

<210> 60
<211> 30
<212> PRT
<213> 智人

<400> 60
Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
1 5 10 15
Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 61
<211> 30
<212> PRT
<213> 智人

<400> 61
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
20 25 30

<210> 62
<211> 14
<212> PRT
<213> 智人

<400> 62
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser
5 10

<210> 63
<211> 32
<212> PRT
<213> 智人

<400> 63
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
1 5 10 15
Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

Ala Arg

<210> 64
<211> 25
<212> PRT
<213> 智人

<400> 64
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
20 25

<210> 65
<211> 13
<212> PRT
<213> 智人

<400> 65
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
5 10

<210> 66
<211> 31
<212> PRT
<213> 智人

<400> 66
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
1 5 10 15
Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

Ala

<210> 67
<211> 30
<212> PRT
<213> 智人

<400> 67
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu

1 5 10 15
Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 68
<211> 30
<212> PRT
<213> 智人

<400> 68
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys
20 25 30

<210> 69
<211> 32
<212> PRT
<213> 智人

<400> 69
Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu
1 5 10 15
Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

Ser Arg

<210> 70
<211> 31
<212> PRT
<213> 智人

<400> 70
Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu
1 5 10 15
Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

Ser

<210> 71
<211> 32
<212> PRT
<213> 智人

<400> 71
Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu
1 5 10 15
Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

Ala Arg

<210> 72
<211> 31
<212> PRT
<213> 智人

<400> 72
Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu
1 5 10 15
Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

Ala

<210> 73
<211> 30
<212> PRT
<213> 智人

<400> 73
Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu
1 5 10 15
Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 74
<211> 23
<212> PRT
<213> 智人

<400> 74
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15
Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
20

<210> 75
<211> 15
<212> PRT
<213> 智人

<400> 75
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 76
<211> 32
<212> PRT
<213> 智人

<400> 76
Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
1 5 10 15
Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
20 25 30
Tyr Cys

<210> 77
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 77
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
5 10

<210> 78
<211> 14
<212> PRT
<213> 智人

<400> 78
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
5 10

<210> 79
<211> 15
<212> PRT
<213> 智人

<400> 79
Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr

1 5 10 15
<210> 80
<211> 32
<212> PRT
<213> 智人
<400> 80
Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
1 5 10 15
Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr
20 25 30
Tyr Cys
<210> 81
<211> 23
<212> PRT
<213> 智人
<400> 81
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro
1 5 10 15
Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys
20
<210> 82
<211> 15
<212> PRT
<213> 智人
<400> 82
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15
<210> 83
<211> 32
<212> PRT
<213> 智人
<400> 83
Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
1 5 10 15
Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr
20 25 30
Tyr Cys
<210> 84
<211> 23
<212> PRT
<213> 智人
<400> 84
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu
1 5 10 15
Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys
20
<210> 85
<211> 15
<212> PRT
<213> 智人
<400> 85
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15
<210> 86

<211> 32
<212> PRT
<213> 智人

<400> 86
Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
1 5 10 15
Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr
20 25 30

Tyr Cys

<210> 87
<211> 219
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 序列經合成

<400> 87
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15
Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val
20 25 30
His Ser Val Gly Asn Thr Phe Leu Glu Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
35 40 45
Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe
50 55 60
Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
65 70 75
Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr
80 85 90
Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gln Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gln
95 100 105
Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val
110 115 120
Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala
125 130 135
Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
140 145 150
Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
155 160 165
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
170 175 180
Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
185 190 195
Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val
200 205 210
Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
215

<210> 88
<211> 450
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 序列經合成

<400> 88
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Glu Phe Ser
 20 25 30
 Arg Ser Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 35 40 45
 Glu Trp Val Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr
 50 55 60
 Ser Gly Lys Phe Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser
 65 70 75
 Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 80 85 90
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Ser Ser Trp Asp Trp
 95 100 105
 Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 110 115 120
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser
 125 130 135
 Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys
 140 145 150
 Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
 155 160 165
 Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
 170 175 180
 Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
 185 190 195
 Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
 200 205 210
 Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 215 220 225
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 230 235 240
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 245 250 255
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 260 265 270
 His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 275 280 285
 Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
 290 295 300
 Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 305 310 315
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala
 320 325 330
 Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
 335 340 345
 Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 350 355 360
 Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe

	365		370		375
Tyr Pro Ser Asp	Ile Ala Val Glu Trp	Glu Ser Asn Gly Gln Pro			
	380		385		390
Glu Asn Asn Tyr	Lys Thr Thr Pro Pro	Val Leu Asp Ser Asp Gly			
	395		400		405
Ser Phe Phe Leu	Tyr Ser Lys Leu Thr	Val Asp Lys Ser Arg Trp			
	410		415		420
Gln Gln Gly Asn	Val Phe Ser Cys Ser	Val Met His Glu Ala Leu			
	425		430		435
His Asn His Tyr	Thr Gln Lys Ser Leu	Ser Leu Ser Pro Gly Lys			
	440		445		450

<210> 89

<211> 120

<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

<223> 序列經合成

<400> 89

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro	Glu Leu Val Lys Pro Gly
1	5 10 15
Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Glu Phe Ser	
20	25 30
Arg Ser Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Arg	
35	40 45
Glu Trp Ile Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr	
50	55 60
Ser Gly Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser	
65	70 75
Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Val Asp	
80	85 90
Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Asp Gly Ser Ser Trp Asp Trp	
95	100 105
Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser	
110	115 120

<210> 90

<211> 112

<212> PRT

<213> 人造序列

<220>

<223> 序列經合成

<400> 90

Asp Ile Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu
1 5 10 15
Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val
20 25 30
His Ser Asn Gly Asn Thr Phe Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro
35 40 45
Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe
50 55 60
Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
65 70 75
Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val

80 85 90
Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gln Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly
95 100 105
Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
110

<210> 91
<211> 219
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 序列經合成

<400> 91
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15
Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val
20 25 30
His Ser Val Gly Asn Thr Phe Leu Glu Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
35 40 45
Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe
50 55 60
Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp
65 70 75
Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr
80 85 90
Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gln Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gln
95 100 105
Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val
110 115 120
Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala
125 130 135
Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
140 145 150
Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
155 160 165
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
170 175 180
Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
185 190 195
Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Cys
200 205 210
Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
215

<210> 92
<211> 450
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 序列經合成

<400> 92
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15
Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Glu Phe Ser

20	25	30
Arg Ser Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu		
35	40	45
Glu Trp Val Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr		
50	55	60
Ser Gly Lys Phe Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser		
65	70	75
Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp		
80	85	90
Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Ser Ser Trp Asp Trp		
95	100	105
Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		
110	115	120
Cys Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser		
125	130	135
Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys		
140	145	150
Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala		
155	160	165
Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser		
170	175	180
Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser		
185	190	195
Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser		
200	205	210
Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys		
215	220	225
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly		
230	235	240
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met		
245	250	255
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser		
260	265	270
His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val		
275	280	285
Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn		
290	295	300
Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp		
305	310	315
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala		
320	325	330
Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln		
335	340	345
Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu		
350	355	360
Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe		
365	370	375
Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro		
380	385	390
Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly		

395	400	405
Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr	Val Asp Lys Ser Arg Trp	
410	415	420
Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser	Val Met His Glu Ala Leu	
425	430	435
His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu	Ser Leu Ser Pro Gly Lys	
440	445	450

<210> 93
 <211> 450
 <212> PRT
 <213> 人造序列

<220>
 <223> 序列經合成

<400> 93
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
 1 5 10 15
 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Glu Phe Ser
 20 25 30
 Arg Ser Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
 35 40 45
 Glu Trp Val Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr
 50 55 60
 Ser Gly Lys Phe Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser
 65 70 75
 Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
 80 85 90
 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Ser Ser Trp Asp Trp
 95 100 105
 Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 110 115 120
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser
 125 130 135
 Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys
 140 145 150
 Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
 155 160 165
 Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
 170 175 180
 Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
 185 190 195
 Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
 200 205 210
 Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 215 220 225
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
 230 235 240
 Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met
 245 250 255
 Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
 260 265 270
 His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val

275	280	285
Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn		
290	295	300
Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp		
305	310	315
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala		
320	325	330
Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln		
335	340	345
Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu		
350	355	360
Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe		
365	370	375
Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro		
380	385	390
Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Cys Asp Gly		
395	400	405
Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp		
410	415	420
Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu		
425	430	435
His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
440	445	450

十、申請專利範圍：

1. 一種與CD22結合之抗體，其中該抗體包含(a)HVR-L1，包含選自SEQ ID NO: 9、10、19-23、32及33之胺基酸序列，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
 - (5)包含SEQ ID NO:14之胺基酸序列之HVR-L3。
2. 如請求項1之抗體，其包括HVR-L1包含符合SEQ ID NO:10之一致序列之胺基酸序列。
3. 如請求項2之抗體，其進一步包括HVR-H1包含該SEQ ID NO:2之胺基酸序列；HVR-H2包含該SEQ ID NO:4之胺基酸序列；及HVR-H3包含該SEQ ID NO:6之胺基酸序列。
4. 如請求項1之抗體，其中該HVR-L1包含SEQ ID NO:9，且該抗體進一步包括HVR-H1包含該SEQ ID NO:2之胺基酸序列；HVR-H2包含該SEQ ID NO:4之胺基酸序列；及HVR-H3包含該SEQ ID NO:6之胺基酸序列。
5. 如請求項1之抗體，其中該HVR-L1包含SEQ ID NO:19，且該抗體進一步包括HVR-H1包含該SEQ ID NO:2之胺基酸序列；HVR-H2包含該SEQ ID NO:4之胺基酸序列；及HVR-H3包含該SEQ ID NO:6之胺基酸序列。
6. 如請求項1之抗體，其中該HVR-L1包含SEQ ID NO:20，

- 且該抗體進一步包括HVR-H1包含該SEQ ID NO:2之胺基酸序列；HVR-H2包含該SEQ ID NO:4之胺基酸序列；及HVR-H3包含該SEQ ID NO:6之胺基酸序列。
7. 如請求項1之抗體，其中該HVR-L1包含SEQ ID NO:21，且該抗體進一步包括HVR-H1包含該SEQ ID NO:2之胺基酸序列；HVR-H2包含該SEQ ID NO:4之胺基酸序列；及HVR-H3包含該SEQ ID NO:6之胺基酸序列。
8. 如請求項1之抗體，其中該HVR-L1包含SEQ ID NO:22，且該抗體進一步包括HVR-H1包含該SEQ ID NO:2之胺基酸序列；HVR-H2包含該SEQ ID NO:4之胺基酸序列；及HVR-H3包含該SEQ ID NO:6之胺基酸序列。
9. 如請求項1之抗體，其中該HVR-L1包含SEQ ID NO:23，且該抗體進一步包括HVR-H1包含該SEQ ID NO:2之胺基酸序列；HVR-H2包含該SEQ ID NO:4之胺基酸序列；及HVR-H3包含該SEQ ID NO:6之胺基酸序列。
10. 如請求項1之抗體，其中該HVR-L1包含SEQ ID NO:32，且該抗體進一步包括HVR-H1包含該SEQ ID NO:2之胺基酸序列；HVR-H2包含該SEQ ID NO:4之胺基酸序列；及HVR-H3包含該SEQ ID NO:6之胺基酸序列。
11. 如請求項1之抗體，其中該HVR-L1包含SEQ ID NO:33，且該抗體進一步包括HVR-H1包含該SEQ ID NO:2之胺基酸序列；HVR-H2包含該SEQ ID NO:4之胺基酸序列；及HVR-H3包含該SEQ ID NO:6之胺基酸序列。
12. 如請求項1之抗體，其進一步包含至少一種框架選自VH

亞群III一致框架及VL亞群I一致框架。

13. 如請求項1之抗體，其中該抗體包含一個重鏈可變域與選自SEQ ID NO:16之胺基酸序列具有至少90%序列一致性。
14. 如請求項1之抗體，其中該抗體包含一個輕鏈可變域與選自SEQ ID NO:17之胺基酸序列具有至少90%序列一致性。
15. 如請求項1之抗體，其中該抗體包含一個輕鏈可變域與選自SEQ ID NO:18之胺基酸序列具有至少90%序列一致性。
16. 如請求項1之抗體，其中該抗體包括一個重鏈可變域包含一個、兩個、三個或四個選自SEQ ID NO:1、3、5及7之框架胺基酸序列。
17. 如請求項1之抗體，其中該抗體包括一個輕鏈可變域包含一個、兩個、三個或四個選自SEQ ID NO:8、11、13及15之框架胺基酸序列。
18. 如請求項13之抗體，其進一步包含一個輕鏈可變域與選自SEQ ID NO:17之胺基酸序列具有至少90%序列一致性。
19. 如請求項13之抗體，其進一步包含一個輕鏈可變域與選自SEQ ID NO:18之胺基酸序列具有至少90%序列一致性。
20. 如請求項1之抗體，其中該抗體包含一個重鏈與選自SEQ ID NO:88之胺基酸序列具有至少90%序列一致性。

21. 如請求項1之抗體，其中該抗體包含一個輕鏈與選自SEQ ID NO:87之胺基酸序列具有至少90%序列一致性。
22. 如請求項1之抗體，其中該抗體包含一個重鏈具有該SEQ ID NO:88之胺基酸序列及一個輕鏈具有該SEQ ID NO:87之胺基酸序列。
23. 一種與CD22結合之抗體，其中該抗體包含一個重鏈可變域與SEQ ID NO:16之胺基酸序列具有至少90%序列一致性。
24. 如請求項23之抗體，其進一步包含一個輕鏈可變域與SEQ ID NO:17之胺基酸序列具有至少90%序列一致性。
25. 如請求項23之抗體，其進一步包含一個輕鏈可變域與SEQ ID NO:18之胺基酸序列具有至少90%序列一致性。
26. 如請求項1之抗體，其中該抗體包含一個、兩個、三個、四個、五個或六個HVR來自由融合瘤ATCC寄存編號PTA-7621(10F4.4.1)所產生之抗體。
27. 一種抗體，其包含一個、兩個、三個、四個、五個或六個HVR來自由融合瘤ATCC寄存編號PTA-7620(5E8. 1.8)所產生之抗體。
28. 如請求項1之抗體，其中該抗體經人類化。
29. 如請求項23之抗體，其中該抗體經人類化。
30. 如請求項1之抗體，其中該CD22為哺乳動物CD22。
31. 如請求項30之抗體，其中該CD22係選自齧齒動物CD22及靈長類動物CD22。
32. 如請求項31之抗體，其中該CD22為人類CD22。

33. 如請求項23之抗體，其中該CD22為哺乳動物CD22。
34. 如請求項33之抗體，其中該CD22係選自齧齒動物CD22及靈長類動物CD22。
35. 如請求項34之抗體，其中該CD22為人類CD22。
36. 一種編碼如請求項1之抗體之聚核苷酸。
37. 一種編碼如請求項23之抗體之聚核苷酸。
38. 一種載體，其包含如請求項36之聚核苷酸。
39. 一種載體，其包含如請求項37之聚核苷酸。
40. 一種宿主細胞，其包含如請求項38之載體。
41. 一種宿主細胞，其包含如請求項39之載體。
42. 如請求項40之宿主細胞，其中該宿主細胞為真核細胞。
43. 如請求項42之宿主細胞，其中該宿主細胞為CHO細胞。
44. 如請求項41之宿主細胞，其中該宿主細胞為真核細胞。
45. 如請求項44之宿主細胞，其中該宿主細胞為CHO細胞。
46. 一種製造抗CD22抗體之方法，其中該方法包含a)在適於表現編碼該抗體之聚核苷酸的條件下培養如請求項38之宿主細胞，及b)分離該抗體。
47. 一種製造抗CD22抗體之方法，其中該方法包含a)在適於表現編碼該抗體之聚核苷酸的條件下培養如請求項39之宿主細胞，及b)分離該抗體。
48. 如請求項28之抗體，其中該CD22係表現於細胞表面上。
49. 如請求項48之抗體，其中該細胞為B細胞。
50. 如請求項29之抗體，其中該CD22係表現於細胞表面上。
51. 如請求項50之抗體，其中該CD22為B細胞。

52. 如請求項1之抗體，其中該抗體與CD22之一個區域SEQ ID NO:27之胺基酸22-240內的一個抗原決定基(epitope)結合。
53. 如請求項23之抗體，其中該抗體與CD22之一個區域SEQ ID NO:27之胺基酸22-240內的一個抗原決定基結合。
54. 如請求項49之抗體，其中該B細胞係與B細胞增生性病變相關。
55. 如請求項54之抗體，其中該B細胞增生性病變為癌症。
56. 如請求項54之抗體，其中該B細胞增生性病變係選自淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤(non-Hogkins lymphoma)(NHL)、侵襲性NHL、復發性侵襲性NHL、復發性無痛性(indolent) 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(mantle cell)淋巴瘤。
57. 如請求項51之抗體，其中該B細胞係與B細胞增生性病變相關。
58. 如請求項57之抗體，其中該B細胞增生性病變為癌症。
59. 如請求項57之抗體，其中該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。

60. 如請求項1之抗體，其中該抗體為單株抗體。
61. 如請求項60之抗體，其中該抗體為抗體片段選自Fab、Fab'-SH、Fv、scFv或(Fab')₂片段。
62. 如請求項60之抗體，其中該抗體經人類化。
63. 如請求項60之抗體，其中該抗體為人類者。
64. 如請求項23之抗體，其中該抗體為單株抗體。
65. 如請求項64之抗體，其中該抗體為抗體片段選自Fab、Fab'-SH、Fv、scFv或(Fab')₂片段。
66. 如請求項64之抗體，其中該抗體經人類化。
67. 如請求項64之抗體，其中該抗體為人類者。
68. 如請求項1之抗體，其中該抗體結合至與選自以下之抗體結合之相同抗原決定基：ATCC PTA-7621(10F4.4.1)；ATCC PTA-7620 (5E8.1.8)；及包含SEQ ID NO:88之重鏈序列及SEQ ID NO:87之輕鏈序列的抗體。
69. 如請求項23之抗體，其中該抗體結合至與選自以下之抗體結合之相同抗原決定基：ATCC PTA-7621(10F4.4.1)；ATCC PTA-7620 (5E8.1.8)；及包含SEQ ID NO:88之重鏈序列及SEQ ID NO:87之輕鏈序列的抗體。
70. 一種偵測一個生物樣品中CD22存在的方法，該方法包含使該生物樣品與如請求項1之抗體在容許該抗體與CD22結合之條件下接觸，及偵測在該抗體與CD22之間是否形成複合物。
71. 如請求項70之方法，其中該生物樣品係來自一個懷疑患有B細胞增生性病徵之患者。

72. 如請求項71之方法，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。
73. 一種偵測一個生物樣品中CD22存在的方法，該方法包含使該生物樣品與如請求項23之抗體在容許該抗體與CD22結合之條件下接觸，及偵測在該抗體與CD22之間是否形成複合物。
74. 如請求項73之方法，其中該生物樣品係來自一個懷疑患有B細胞增生性病症之患者。
75. 如請求項74之方法，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。
76. 一種免疫接合物，其包含如請求項1之抗體與細胞毒性劑共價連接。
77. 一種免疫接合物，其包含如請求項23之抗體與細胞毒性劑共價連接。
78. 如請求項76之免疫接合物，其中該細胞毒性劑係選自毒素、化學治療劑、藥物部分、抗生素、放射活性同位素

及核分解(nucleolytic)酶。

79. 如請求項78之免疫接合物，該免疫接合物具有式Ab-(L-D)_p，其中：

(a) Ab為如請求項1之抗體；

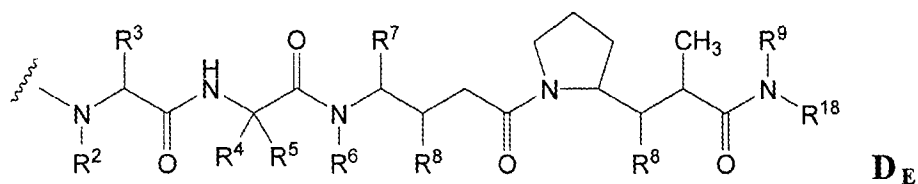
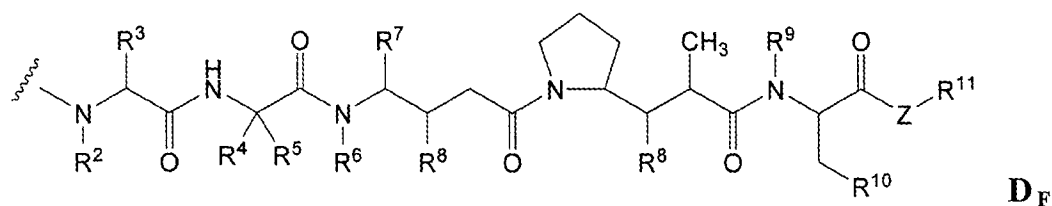
(b) L為連接子；

(c) D為藥物部分。

80. 如請求項79之免疫接合物，其中L係選自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)。

81. 如請求項79之免疫接合物，其中D係選自奧利斯坦汀(auristatin)及海兔毒素(dolastatin)。

82. 如請求項81之免疫接合物，其中D為式D_E或D_F之藥物部分：



其中 R^2 及 R^6 各自為甲基， R^3 及 R^4 各自為異丙基，

R^7 為第二丁基， R^8 各自獨立地選自 CH_3 、 $O-CH_3$ 、 OH 及 H ； R^9 為 H ； R^{10} 為芳基； Z 為 $-O-$ 或 $-NH-$ ； R^{11} 為 H 、 C_1-C_8 烷基或 $-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-O-(CH_2)_2-O-CH_3$ ； R^{18} 為 $-C(R^8)_2-C(R^8)_2-$ 芳基；及

(d) p 在約 1 至 8 之範圍內。

83. 如請求項 76 之免疫接合物，其具有活體外或活體內殺細胞活性。
84. 如請求項 79 之免疫接合物，其中該連接子係經由該抗體上之一個硫醇基團連接至該抗體上。
85. 如請求項 79 之免疫接合物，其中該連接子可由蛋白酶分裂。
86. 如請求項 80 之免疫接合物，其中該連接子包含 val-cit 二肽。
87. 如請求項 79 之免疫接合物，其中該連接子包含對-胺基苄基單元。
88. 如請求項 80 之免疫接合物，其中該連接子包含 6-順丁烯二醯亞胺基己醯基。
89. 如請求項 82 之免疫接合物，其中該藥物係選自 MMAE 及 MMAF。
90. 如請求項 89 之免疫接合物，其中該藥物為 MMAE。
91. 如請求項 89 之免疫接合物，其中該藥物為 MMAF。
92. 如請求項 77 之免疫接合物，其中該細胞毒性劑係選自毒素、化學治療劑、藥物部分、抗生素、放射活性同位素及核分解酶。

93. 如請求項92之免疫接合物，該免疫接合物具有式Ab-(L-D)p，其中：
- (a) Ab為如請求項23之抗體；
 - (b) L為連接子；
 - (c) D為藥物部分。
94. 如請求項93之免疫接合物，其中L係選自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)。
95. 如請求項93之免疫接合物，其中該連接子L可由蛋白酶分裂。
96. 如請求項94之免疫接合物，其中L包含val-cit二肽。
97. 如請求項93之免疫接合物，其中L包含對-胺基苄基單元。
98. 如請求項97之免疫接合物，其中該對-胺基苄基單元為對-胺基苄氧羰基(PAB)。
99. 如請求項94之免疫接合物，其中L包含6-順丁烯二醯亞胺基己醯基(MC)。
100. 如請求項94之免疫接合物，其中該連接子包含6-順丁烯二醯亞胺基己醯基及對-胺基苄氧羰基。
101. 如請求項79之免疫接合物，其中該免疫接合物具有式

Ab-(L-MMAE)p，

其中L為連接子，p在2至5之範圍內。

102. 如請求項101之免疫接合物，其中L包含val-cit。

103. 如請求項101之免疫接合物，其中L包含MC。

104. 如請求項101之免疫接合物，其中L包含PAB。

105. 如請求項101之免疫接合物，其中L包含MC-PAB。

106. 如請求項93之免疫接合物，其中該免疫接合物具有式

Ab-(L-MMAE)p，

其中L為連接子，p在2至5之範圍內。

107. 如請求項106之免疫接合物，其中L包含val-cit。

108. 如請求項106之免疫接合物，其中L包含MC。

109. 如請求項106之免疫接合物，其中L包含PAB。

110. 如請求項106之免疫接合物，其中L包含MC-PAB。

111. 如請求項79之免疫接合物，其中該免疫接合物具有式

Ab-(L-MMAF)p，

其中L為連接子，p在2至5之範圍內。

112. 如請求項111之免疫接合物，其中L包含val-cit。

113. 如請求項111之免疫接合物，其中L包含MC。

114. 如請求項111之免疫接合物，其中L包含PAB。

115. 如請求項111之免疫接合物，其中L包含MC-PAB。

116. 如請求項93之免疫接合物，其中該免疫接合物具有式

Ab-(L-MMAF)p，

其中L為連接子，p在2至5之範圍內。

117. 如請求項116之免疫接合物，其中L包含val-cit。

118. 如請求項116之免疫接合物，其中L包含MC。
119. 如請求項116之免疫接合物，其中L包含PAB。
120. 如請求項116之免疫接合物，其中L包含MC-PAB。
121. 如請求項79之免疫接合物，其中D為美登素類物(maytansinoid)。
122. 如請求項121之免疫接合物，其中D係選自DM1、DM3及DM4。
123. 如請求項121之免疫接合物，其具有活體外或活體內殺細胞活性。
124. 如請求項121之免疫接合物，其中該連接子係經由該抗體上之一個硫醇基團連接至該抗體上。
125. 如請求項121之免疫接合物，其中該連接子L係選自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)。
126. 如請求項122之免疫接合物，其中該藥物為DM1。
127. 如請求項122之免疫接合物，其中L包含SPP。
128. 如請求項122之免疫接合物，其中L包含SMCC。
129. 如請求項122之免疫接合物，其中p為2-4。
130. 如請求項122之免疫接合物，其中p為3-4。
131. 如請求項93之免疫接合物，其中D為美登素類物。
132. 如請求項131之免疫接合物，其中D係選自DM1、DM3及DM4。
133. 如請求項131之免疫接合物，其具有活體外或活體內殺細

胞活性。

134. 如請求項131之免疫接合物，其中該連接子係經由該抗體上之一個硫醇基團連接至該抗體上。

135. 如請求項131之免疫接合物，其中該連接子L係選自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)。

136. 如請求項132之免疫接合物，其中該藥物為DM1。

137. 如請求項136之免疫接合物，其中L包含SPP。

138. 如請求項136之免疫接合物，其中L包含SMCC。

139. 如請求項136之免疫接合物，其中p為2-4。

140. 如請求項136之免疫接合物，其中p為3-4。

141. 一種醫藥組合物，其包含如請求項79之免疫接合物及醫藥學上可接受之載劑。

142. 一種如請求項141之醫藥組合物用於製造藥物的用途，其中該藥物係用於治療B細胞增生性病徵。

143. 如請求項142之用途，其中該B細胞增生性病徵係選自淋巴瘤、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。

144. 一種醫藥組合物，其包含如請求項93之免疫接合物及醫藥學上可接受之載劑。

145. 一種如請求項144之醫藥組合物用於製造藥物的用途，
其中該藥物係用於治療B細胞增生性病徵。

146. 如請求項145之用途，其中該B細胞增生性病徵係選自淋巴瘤、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。

() 147. 一種醫藥組合物，其包含如請求項76、77、78及92之免疫接合物及醫藥學上可接受之載劑。

148. 一種如請求項147之醫藥組合物用於製造藥物的用途，
其中該藥物係用於治療B細胞增生性病徵。

() 149. 如請求項148之用途，其中該B細胞增生性病徵係選自淋巴瘤、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。

150. 一種抑制B細胞增殖之活體外方法，其包含使細胞暴露於如請求項79之免疫接合物在容許該免疫接合物與CD 22結合之條件下。

151. 如請求項150之方法，其中該B細胞增殖係與選自淋巴瘤、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)及套細胞淋巴瘤之病症相關。

152. 如請求項150之方法，其中該B細胞為異種移植物。

153. 一種如請求項79之免疫接合物用於製造抑制B細胞增殖之藥物的用途，其中該細胞係在容許該免疫接合物與CD22結合之條件下暴露於該藥物。

154. 如請求項1之抗體，其中該抗體為經半胱胺酸改造(engineered)之抗體，其包含一或多個自由半胱胺酸胺基酸具有硫醇反應性值在0.6至1.0之範圍內，其中該經半胱胺酸改造之抗體係藉由一種包含以半胱胺酸置換親本(parent)抗體之一或多個胺基酸殘基的方法來製備。

155. 如請求項154之抗體，其中該經半胱胺酸改造之抗體與硫基反應性試劑之反應性比該親本抗體強。

156. 如請求項154之抗體，其中該方法進一步包含藉由該經半胱胺酸改造之抗體與硫醇反應性試劑反應來測定該經半胱胺酸改造之抗體之硫醇反應性；

其中該經半胱胺酸改造之抗體與該硫醇反應性試劑之反應性比該親本抗體強。

157. 如請求項154之抗體，其中該一或多個自由半胱胺酸胺基酸殘基係位於輕鏈中。

158. 如請求項154之抗體，其中該抗體為一種包含該經半胱胺酸改造之抗體共價連接至細胞毒性劑之免疫接合物。

159. 如請求項158之抗體，其中該細胞毒性劑係選自毒素、

化學治療劑、藥物部分、抗生素、放射活性同位素及核分解酶。

160. 如請求項 154 之抗體，其中該抗體係共價連接至一個捕捉標記、偵測標記或固體支撐物。

161. 如請求項 160 之抗體，其中該抗體係共價連接至一個生物素捕捉標記上。

162. 如請求項 160 之抗體，其中該抗體係共價連接至一個螢光染料偵測標記上。

163. 如請求項 162 之抗體，其中該螢光染料係選自螢光素類、若丹明(rhodamine)類、丹醯基、麗絲胺(Lissamine)、花青素、藻紅蛋白、德州紅(Texas Red)及其類似物。

164. 如請求項 160 之抗體，其中該抗體係共價連接至一個放射性核種偵測標記上，該偵測標記選自 ^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 及 ^{213}Bi 。

165. 如請求項 160 之抗體，其中該抗體係由一個螯合配位體共價連接至一個偵測標記上。

166. 如請求項 165 之抗體，其中該螯合配位體係選自 DOTA、DOTP、DOTMA、DTPA 及 TETA。

167. 如請求項 23 之抗體，其中該抗體為經半胱胺酸改造之抗體，其包含一或多個自由半胱胺酸胺基酸具有硫醇反應性值在 0.6 至 1.0 之範圍內，其中該經半胱胺酸改造之抗體係藉由一種包含以半胱胺酸置換親本抗體之一或多個胺基酸殘基的方法來製備。

168. 如請求項167之抗體，其中該經半胱胺酸改造之抗體與
硫基反應性試劑之反應性比該親本抗體強。
169. 如請求項167之抗體，其中該方法進一步包含藉由該經
半胱胺酸改造之抗體與硫醇反應性試劑反應來測定該經
半胱胺酸改造之抗體之硫醇反應性；
其中該經半胱胺酸改造之抗體與該硫醇反應性試劑之
反應性比該親本抗體強。
170. 如請求項167之抗體，其中該一或多個自由半胱胺酸胺
基酸殘基係位於輕鏈中。
171. 如請求項167之抗體，其中該抗體為一種包含該經半胱
胺酸改造之抗體共價連接至細胞毒性劑之免疫接合物。
172. 如請求項171之抗體，其中該細胞毒性劑係選自毒素、
化學治療劑、藥物部分、抗生素、放射活性同位素及核
分解酶。
173. 如請求項167之抗體，其中該抗體係共價連接至一個捕
捉標記、偵測標記或固體支撐物上。
174. 如請求項173之抗體，其中該抗體係共價連接至一個生
物素捕捉標記上。
175. 如請求項173之抗體，其中該抗體係共價連接至一個螢
光染料偵測標記上。
176. 如請求項175之抗體，其中該螢光染料係選自螢光素
類、若丹明類、丹醯基、麗絲胺、花青素、藻紅蛋白、
德州紅及其類似物。
177. 如請求項173之抗體，其中該抗體係共價連接至一個放

射性核種偵測標記上，該偵測標記選自 ^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 及 ^{213}Bi 。

178. 如請求項177之抗體，其中該抗體係由一個螯合配位體共價連接至一個偵測標記上。

179. 如請求項178之抗體，其中該螯合配位體係選自DOTA、DOTP、DOTMA、DTPA及TETA。

180. 如請求項93之免疫接合物，其中該連接子係經由該抗體上之一個硫醇基團連接至該抗體上。

181. 如請求項1之抗體，其包含一種白蛋白結合肽。

182. 如請求項181之抗體，其中該白蛋白結合肽係選自SEQ ID NO:42-46。

183. 如請求項23之抗體，其包含一種白蛋白結合肽。

184. 如請求項183之抗體，其中該白蛋白結合肽係選自SEQ ID NO:42-46。

185. 如請求項1之抗體，其中該抗體進一步包含一個半胱胺酸在一或多個選自根據Kabat編號協定之輕鏈之15、43、110、144、168及205位置及根據EU編號協定之重鏈之41、88、115、118、120、171、172、282、375及400位置。

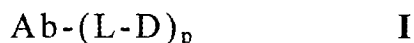
186. 如請求項185之抗體，其中半胱胺酸在該輕鏈之位置205。

187. 如請求項185之抗體，其中半胱胺酸在該重鏈之位置118。

188. 如請求項185之抗體，其中半胱胺酸在該重鏈之位置400。
189. 如請求項185之抗體，其中該抗體係選自單株抗體、雙特異性抗體、嵌合抗體、人類抗體及人類化抗體。
190. 如請求項185之抗體，其為抗體片段。
191. 如請求項190之抗體，其中該抗體片段為Fab片段。
192. 如請求項185之抗體，其係選自嵌合抗體、人類抗體或人類化抗體。
193. 如請求項185之抗體，其係於細菌中產生。
194. 如請求項185之抗體，其係於CHO細胞中產生。
195. 一種用於測定一個懷疑含有CD22蛋白之樣品中該CD22蛋白存在的方法，該方法包含使該樣品暴露於如請求項185之抗體中及測定該抗體與該樣品中該CD22蛋白之結合，其中該抗體與該蛋白之結合指示該樣品中存在該蛋白。
196. 如請求項195之方法，其中該樣品包含一種懷疑表現該CD22蛋白之細胞。
197. 如請求項195之方法，其中該細胞為B細胞。
198. 如請求項195之方法，其中該抗體係與一個選自螢光染料、放射性同位素、生物素或金屬錯合配位體之標記共價連接。
199. 一種醫藥調配物，其包含如請求項185之抗CD22抗體，及醫藥學上可接受之稀釋劑、載劑或賦形劑。
200. 如請求項185之抗體，其中該抗體係與奧利斯坦汀或美

登素類物藥物部分共價連接，藉以形成抗體-藥物接合物。

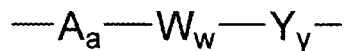
201. 一種抗體-藥物接合物，其包含如請求項1之抗體(Ab)，及奧利斯坦汀或美登素類物藥物部分(D)，其中該經半胱胺酸改造之抗體係藉由連接子部分(L)經由一或多個自由半胱胺酸胺基酸與D連接；該接合物具有式I：



其中p為1、2、3或4。

202. 如請求項201之抗體-藥物接合物，其中p為2。

203. 如請求項201之抗體-藥物接合物，其中L具有式：



其中：

A為一個伸展(strecher)單元，與該經半胱胺酸改造之抗體(Ab)之一個半胱胺酸硫醇共價連接；

a為0或1；

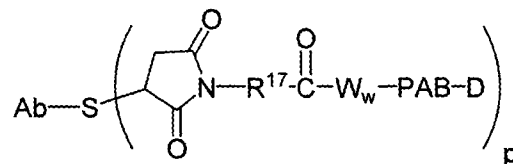
W各自獨立地為一個胺基酸單元；

w為一個在0至12之範圍內之整數；

Y為一個間隔基單元，與該藥物部分共價連接；及

y為0、1或2。

204. 如請求項203之抗體-藥物接合物，其具有式：



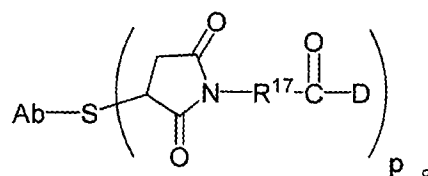
其中PAB為對-胺基苄基胺甲鹽基， R^{17} 為選自以下之

二價基團： $(\text{CH}_2)_r$ 、 C_3 - C_8 碳環基、 $\text{O}-(\text{CH}_2)_r$ 、伸芳基、 $(\text{CH}_2)_r$ -伸芳基、-伸芳基- $(\text{CH}_2)_r$ -、 $(\text{CH}_2)_r$ -(C_3 - C_8 碳環基)、(C_3 - C_8 碳環基)- $(\text{CH}_2)_r$ 、 C_3 - C_8 雜環基、 $(\text{CH}_2)_r$ -(C_3 - C_8 雜環基)、-(C_3 - C_8 雜環基)- $(\text{CH}_2)_r$ -、 $-(\text{CH}_2)_r\text{C}(\text{O})\text{NR}^b(\text{CH}_2)_r$ -、 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_r$ -、 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_r\text{CH}_2$ -、 $-(\text{CH}_2)_r\text{C}(\text{O})\text{NR}^b(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_r$ -、 $-(\text{CH}_2)_r\text{C}(\text{O})\text{NR}^b(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_r\text{CH}_2$ -、 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_r\text{C}(\text{O})\text{NR}^b(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_r$ -、 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_r\text{C}(\text{O})\text{NR}^b(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_r\text{CH}_2$ -及 $-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_r\text{C}(\text{O})\text{NR}^b(\text{CH}_2)_r$ -；其中 R^b 為 H 、 C_1 - C_6 烷基、苯基或苄基； r 獨立地為一個在1至10之範圍內之整數。

205. 如請求項203之抗體-藥物接合物，其中 W_w 為纈胺酸-瓜胺酸。

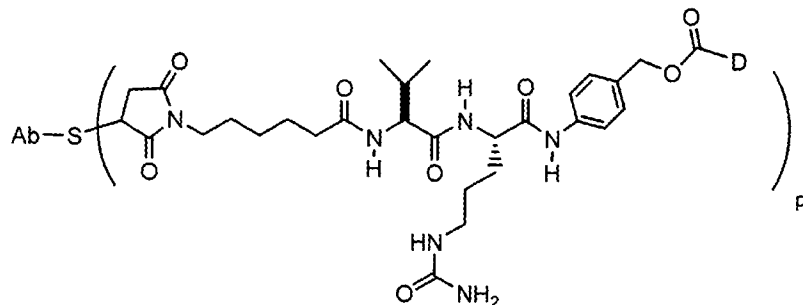
206. 如請求項203之抗體-藥物接合物，其中 R^{17} 為 $(\text{CH}_2)_5$ 或 $(\text{CH}_2)_2$ 。

207. 如請求項203之抗體-藥物接合物，其具有式：



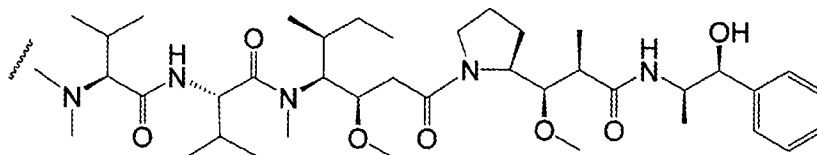
208. 如請求項207之抗體-藥物接合物，其中 R^{17} 為 $(\text{CH}_2)_5$ 或 $(\text{CH}_2)_2$ 。

209. 如請求項203之抗體-藥物接合物，其具有式：



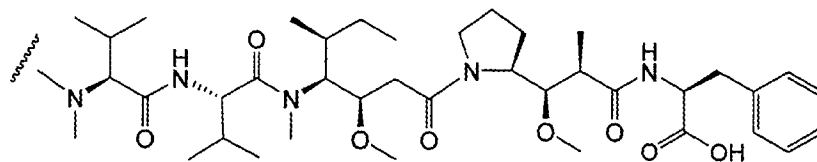
210. 如請求項 201 之抗體-藥物接合物，其中 L 為 SMCC、SPP 或 BMPEO。

211. 如請求項 201 之抗體-藥物接合物，其中 D 為 MMAE，其具有以下結構：



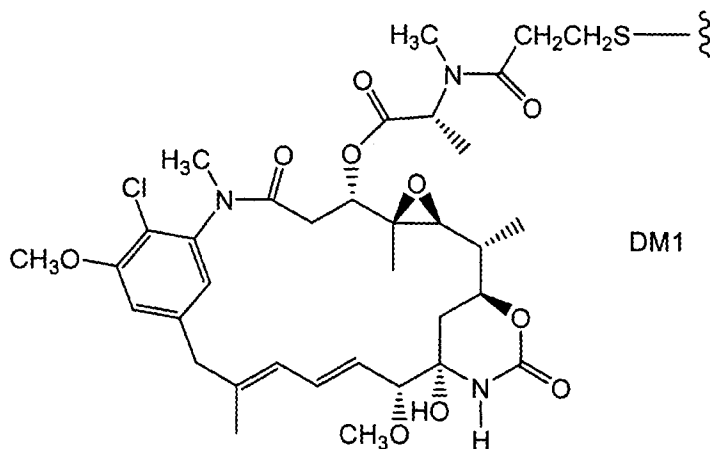
其中波浪線指示與該連接子 L 之連接位點。

212. 如請求項 201 之抗體-藥物接合物，其中 D 為 MMAF，其具有以下結構：



其中波浪線指示與該連接子 L 之連接位點。

213. 如請求項 201 之抗體-藥物接合物，其中 D 為 DM1，其具有以下結構：



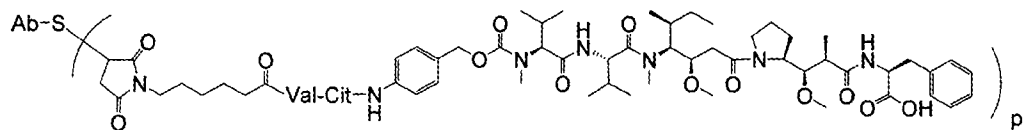
其中波浪線指示與該連接子 L 之連接位點。

214. 如請求項 201 之抗體-藥物接合物，其中該親本抗 CD22 抗體係選自單株抗體、雙特異性抗體、嵌合抗體、人類抗

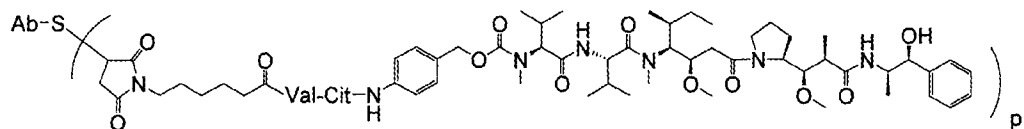
體、人類化抗體、及抗體片段。

215. 如請求項 201 之抗體-藥物接合物，其中該抗體片段為 Fab 片段。

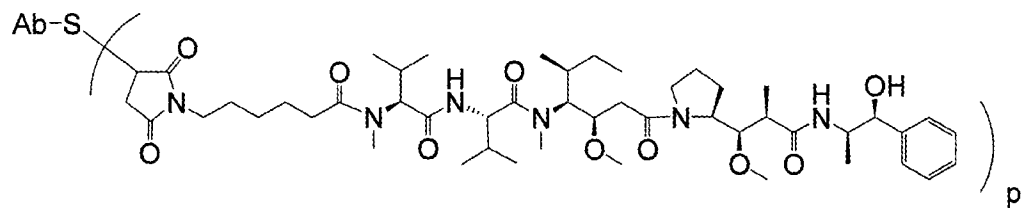
216. 一種抗體-藥物接合物，其選自以下結構：



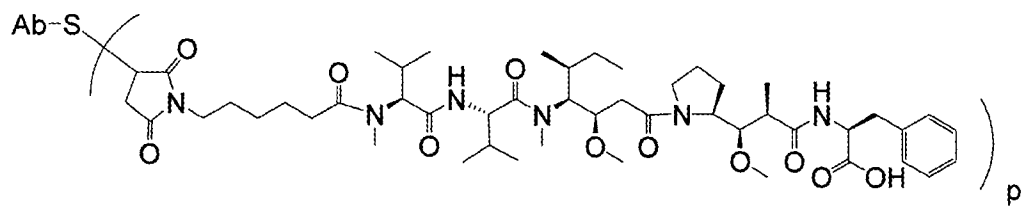
Ab-MC-vc-PAB-MMAF



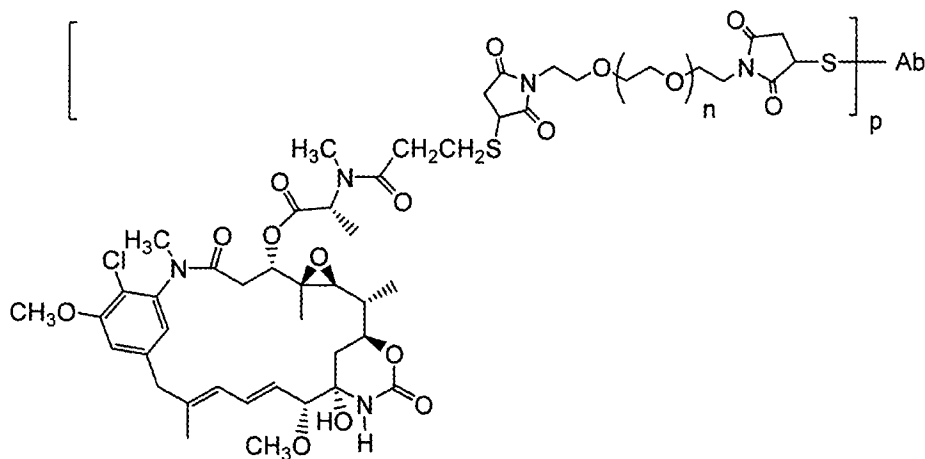
Ab-MC-vc-PAB-MMAE



Ab-MC-MMAE



Ab-MC-MMAF



Ab-BMPEO-DM1

其中 Val 為 纈 胺 酸 ； Cit 為 瓜 胺 酸 ； p 為 1、2、3 或 4 ； Ab 為 如 請 求 項 185 之 抗 CD22 抗 體 。

217. 如請求項 200 之抗體，其中該奧利斯坦汀為 MMAE 或 MMAF。

218. 如請求項201之抗體-藥物接合物，其中L為MC-val-cit-PAB或MC。

219. 一種用於偵測B細胞之檢定，其包含：

(a) 使細胞暴露於如請求項202之抗體-藥物接合物中；及

(b) 測定該抗體-藥物接合物與該等細胞結合之程度。

220. 一種用於抑制細胞增殖的方法，其包含以如請求項201之抗體-藥物接合物處理細胞培養基中之哺乳動物癌性B細胞，藉以抑制該等癌性B細胞之增殖。

221. 一種醫藥調配物，其包含如請求項201之抗體-藥物接合物，及醫藥學上可接受之稀釋劑、載劑或賦形劑。

222. 一種如請求項 221 之醫藥調配物用於製造藥物的用途，
其中該藥物係用於治療癌症。

223. 如請求項222之用途，其中該癌症係選自由以下組成之群：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。

224. 如請求項222之用途，其中患者係經投予一種細胞毒性劑與該抗體-藥物接合物化合物組合。

225. 一種製造物品，其包含

如請求項221之醫藥調配物；

一個容器；及

一封裝插頁或標籤，其指示該化合物可用於治療特徵為CD22多肽過度表現的癌症。

226. 如請求項225之製造物品，其中該癌症係選自由以下組成之群：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。

227. 一種用於製造抗體-藥物接合物化合物之方法，該化合物包含如請求項185之抗CD22抗體(Ab)及奧利斯坦汀或美登素類物藥物部分(D)，其中該抗體係藉由連接子部分(L)經由一或多個經改造之半胱胺酸胺基酸與D連接；該化合物具有式I：



其中 p 為 1、2、3 或 4；該方法包含以下步驟：

(a) 使該抗體之一個經改造之半胱胺酸基團與一種連接子試劑反應以形成抗體-連接子中間物 Ab-L；及

(b) 使 Ab-L 與一種活化之藥物部分 D 反應；藉以形成該抗體-藥物接合物；

或包含以下步驟：

(c) 使一種藥物部分之一個親核基團與一種連接子試劑反應以形成藥物-連接子中間物 D-L；及

(d) 使 D-L 與該抗體之一個經改造之半胱胺酸基團反應；藉以形成該抗體-藥物接合物。

228. 如請求項 227 之方法，其進一步包含在中國倉鼠卵巢 (CHO) 細胞中表現該抗體之步驟。

229. 如請求項 228 之方法，其進一步包含以一種還原劑處理該表現抗體之步驟。

230. 如請求項 229 之方法，其中該還原劑係選自 TCEP 及 DTT。

231. 如請求項 229 之方法，其進一步包含在以該還原劑處理後，以一種氧化劑處理該表現抗體之步驟。

232. 如請求項 231 之方法，其中該氧化劑係選自硫酸銅、脫氫抗壞血酸、及空氣。

233. 如請求項 185 之抗體，其中該抗體包含一個重鏈序列選自 SEQ ID NO:88、92 或 93 之任一者。

234. 如請求項 185 之抗體，其中該抗體包含一個輕鏈序列選

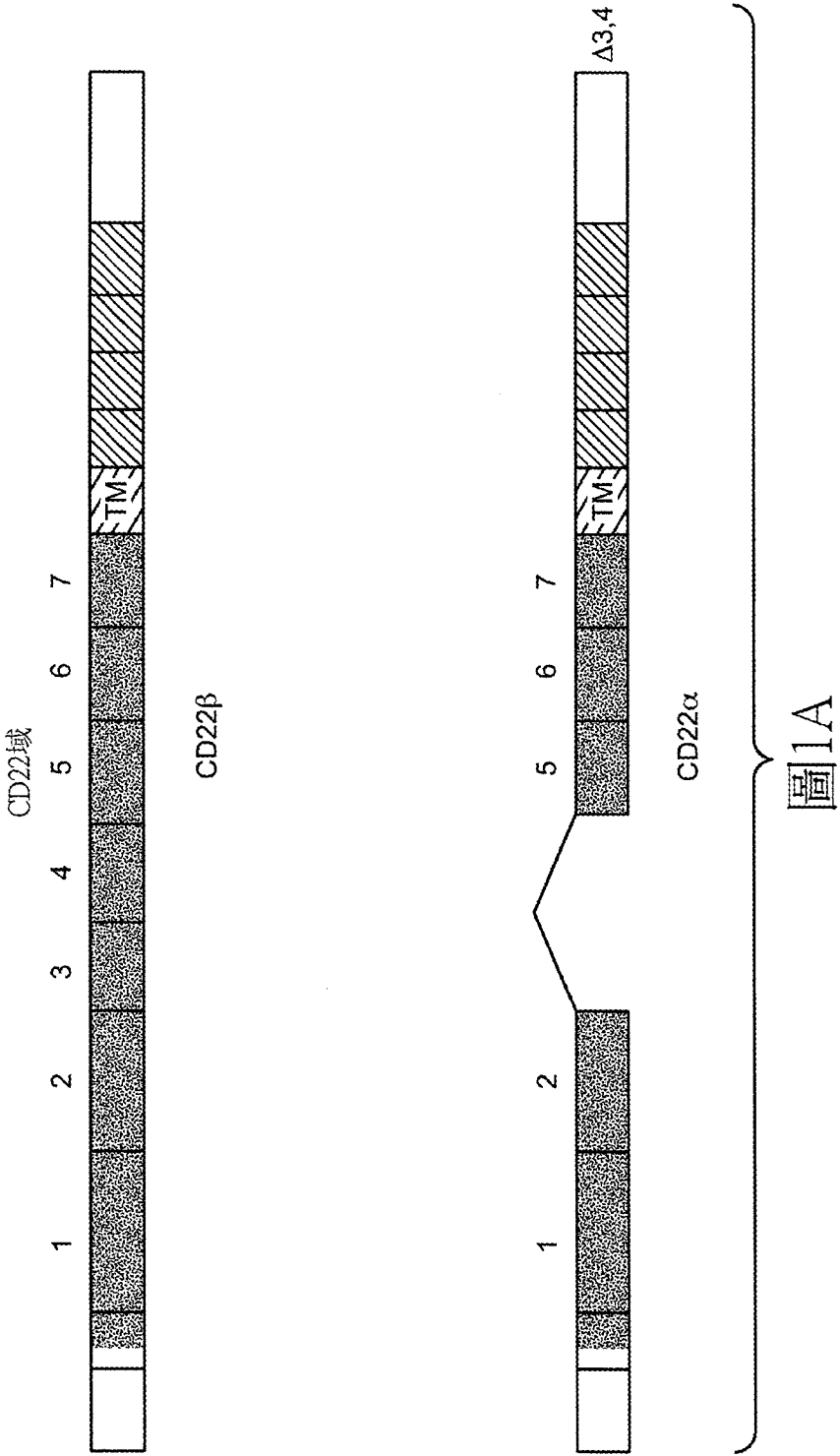
自 SEQ ID NO:87 或 91。

235. 如請求項 185 之抗體，其中該抗體包含 SEQ ID NO:87 之輕鏈序列及 SEQ ID NO:92 之重鏈序列。

236. 如請求項 185 之抗體，其中該抗體包含 SEQ ID NO:87 之輕鏈序列及 SEQ ID NO:93 之重鏈序列。

237. 如請求項 185 之抗體，其中該抗體包含 SEQ ID NO:91 之輕鏈序列及 SEQ ID NO:88 之重鏈序列。

十一、圖式：



1 mhl1gpwlll lvleylafsd sskwvfehpe tlyawegacv wipctyrald gdlesfilfh
 61 npeynkntsk fdgtrlyest kdgkvpseqk rvqflgdknk nctlsihpvh lndsgqlglr
 121 mesktekwme rihlnvserp fpphiqlppe iqesqevtlc cllnfscygy piqlqwlleg
 181 vpmrqaavts ts1tiksvft rselkfspqw shhgkivtcq lqdadgkfls ndtvqlnvkh
 241 tpkleikvtp sdaivregds vtmtcevsss npeyttvswl kdgtslkkqn tftlnlrevt
 301 kdqsgkyccq vsndvgpgrs eevflqvqya pepstvgilh spavegsqve flcmslanpl
 361 ptnytwyhng kemqgrteek vhipkilpwh agtyscvaen ilgtgqrgpg aeldvqyppk
 421 kvttviqnpm piregdtvtl scnyssnps vtryewkphg aweepslgvl kiqnvqwdnt
 481 tiacarcnsw cswaspvaln vqyaprdvr rkikplseih sgnsvglqcd fssshpkvq
 541 ffwekngrrll gkesqlnfdi ispedagsys cwnnsigqt askawtlevl yaprrlrsm
 601 spgdqvmegk satltcesda nppvshytwf dwnnqslphh sqklrlepvk vqhsqaywcq
 661 gtnsvgkgrs plstltvyys petigrrvav glgscilail laicglklqr rwkrtqsgqg
 721 lqenssgqsf fvrnkvrva plsegphslg cynpmmedgi syttlrpfem niprtgdaes
 781 semqrprtc ddtvtysalh krqvgdyenv ipdfpedegi hyseliqfgv gerpqagenv
 841 dyvilkh (SEQ ID NO: 27)

圖1B

1 mhl1gpwlll lvleylafsd sskwvfehpe tlyawegacv wipctyrald gdlesfilfh
 61 npeynkntsk fdgtrlyest kdgkvpseqk rvqflgdknk nctlsihpvh lndsgqlglr
 121 mesktekwme rihlnvserp fpphiqlppe iqesqevtlc cllnfscygy piqlqwlleg
 181 vpmrqaavts ts1tiksvft rselkfspqw shhgkivtcq lqdadgkfls ndtvqlnvkh
 241 ppkkvttviq npmpiregdt vt1scnyss npsvtryewk phgaweepsl gvlkiqnvqg
 301 dnttiacaac nswcswaspv alnvqyaprd vrvrkikpls eihsgnsvgl qcdfssshpk
 361 evqffwekng rllgkesqln fdispedag syscwnnsi gtaskawtl evlyaprrlr
 421 vmspgdqvm egksatltce sdanppvshy twfdwnnqsl pyhsqklrle pvkvqhsqay
 481 wcqgtnsvgk grsplstltv yyspetigrr vavglgscla ililaicglk lqrrwkrtqs
 541 qqqlqenssg qsffvrnkvr rraplsegph slgcynpmme dgisyttlrp pemniprtgd
 601 aessemqrpp pdcddvtys alhkrqvgtm rtsfqifqkm rgfitqs (SEQ ID NO:29)

圖1C

MHLLGPWLLLLLEYLAFSDS SKWNIEHPGTIYAWEGACIWPCTYRVLDGA
 LETFILFHNPEYNQNMSEFEGTRLYESTKDGKVPSEQKRVQFLGNKINNNC
 T1SIHPVHVNDSGQLGLRMVSKTEKWMERIHLNVSERPFPRIQLPPKLQE
 SQEVTTLTCLLNFSCYGYQIQQLQWLLEGAPMRQAAVTLTSLSTKSVFTRSEL
 KFSPQWSSHGKIIVTCELHDVDGKVLSEDTVQLNVKHTPKLTIEVTPNETIV
 RKGDSVTMTCKVNSSNPEYTTVSWLKDDIPLKEQNTLMLTLHEVTKSQTGT
 YCCRVSNNDVGPATSEKVFLQVQYAPEPSRVQISQSPAVEGSEVNFLCISPA
 NPLPTNYTWYHNGKEVQGRTEKQFQIQKILPWHAGTYSCVAENILGIGERG
 PGTELDVQYPPKKVTMVIENTPIREGDTVTLS1CNYS1SNPIVNHYEWRPR
 GAWEEPSLGVLKIQNIGWNNTAVACAACNNWCSWASPVT1NLVLYAPRGVRV
 RKIKPLSEIHS1NLVSLQCD1SSSHPKVQFFWEKNGSLLGKESQLNFD1I
 SPEDAGSYSCWNNSIGQTASKAWTLEVL1APRRLRVSM1SQGNQVMEGKTA
 1LTCE1DANPPV1SYAWFDWN1QSLPYSGRMLRLEPVKVQHS1GAYWCQGTN
 RVGKGHSPL1TLTVY1SPETIGRRVAVGLG1CLA1L1LAMCGFKVQRRWKR
 TQ1SQQLQENS1SGQSF1VRNKVRR1PLSEGPHSLG1CYNPM1MEDG1SYATL
 RFPETNT1PRTGDAETSELQRLPPDCDDTVTYSVLQKRQVGDYENVIPDFPE
 DEGIH1SELIQFGFGERPQAQENV1DVIVKH (SEQ ID NO:31)

圖1D

抗CD22 10F4 變異體之重鏈可變域序列比對

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	
humIII	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	S	S	Y	A	M	S	W	V	R	Q	A	
嵌合 10F4	Q	V	Q	L	Q	Q	S	G	P	E	L	V	K	P	G	A	S	V	K	I	S	C	K	A	S	G	Y	E	F	S	S	R	S	W	M	N	W	V	K	Q	R
h10F4.v1	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	Y	E	F	S	S	R	S	W	M	N	W	V	R	Q	A
h10F4.v2	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	Y	E	F	S	S	R	S	W	M	N	W	V	R	Q	A
	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	A	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78		
	Kabat - CDR H2																																								
	Chothia - CDR H2																																								
	Contact - CDR H2																																								
humIII	P	G	K	G	L	E	W	V	S	V	I	S	G	D	G	G	S	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	R	D	N	S	K	N	T	L		
嵌合 10F4	P	G	Q	G	R	E	W	I	G	R	I	Y	P	G	D	G	D	T	N	Y	S	G	K	F	K	G	K	A	T	L	T	A	D	K	S	S	T	A			
h10F4.v1	P	G	K	G	L	E	W	V	G	R	I	Y	P	G	D	G	D	T	N	Y	S	G	K	F	K	G	R	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	A		
h10F4.v2	P	G	K	G	L	E	W	V	G	R	I	Y	P	G	D	G	D	T	N	Y	S	G	K	F	K	G	R	F	T	I	S	A	D	T	S	K	N	T	A		
	79	80	81	82	A	B	C	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	A	B	C	101	102	103	104	105	106	107	108					
	Kabat - CDR H3																																								
	Chothia - CDR H3																																								
	Contact - CDR H3																																								
humIII	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	G	F	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S	SEQ ID NO:24						
嵌合 10F4	Y	M	Q	L	S	S	L	T	S	V	D	S	A	V	Y	F	C	A	R	D	G	S	S	W	D	W	Y	F	D	V	T	V	S	S	SEQ ID NO:34						
h10F4.v1	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	D	G	S	S	W	D	W	Y	F	D	V	T	V	S	S	SEQ ID NO:16						
h10F4.v2	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	R	D	G	S	S	W	D	W	Y	F	D	V	T	V	S	S	SEQ ID NO:16						

圖 2A

抗CD22 10F4變異體之輕鏈可變域序列比對

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	A	B	C	D	E	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37
Kabat - CDR L1																																									
Choithia - CDR L1																																									
Contact - CDR L1																																									

humKI	嵌合 10F4	h10F4.v1	h10F4.v2																																							
D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	S	I	V	H	S	N	G	N	T	F	L	E	W	Y	Q
D	I	L	M	T	Q	T	P	L	S	L	P	V	S	L	G	D	Q	A	S	I	S	I	C	R	S	Q	S	I	V	H	S	N	G	N	T	F	L	E	W	Y	Q	
D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	R	V	T	I	T	C	R	S	Q	S	I	V	H	S	N	G	N	T	F	L	E	W	Y	Q	
D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	R	V	T	I	T	C	R	S	Q	S	I	V	H	S	N	G	N	T	F	L	E	W	Y	Q	

38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
Kabat - CDR L2																																										
Choithia - CDR L2																																										
Contact - CDR L2																																										

humKI	嵌合 10F4	h10F4.v1	h10F4.v2																																								
Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	A	A	S	S	L	E	S	G	V	P	S	R	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P
Q	K	P	G	Q	S	P	K	L	L	I	Y	K	V	S	N	R	F	S	G	V	P	D	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	K	I	S	S	R	V	E	A
Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	K	V	S	N	R	F	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	
Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	K	V	S	N	R	F	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P	

81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107
Kabat - CDR L3																										
Choithia - CDR L3																										
Contact - CDR L3																										

humKI	嵌合 10F4	h10F4.v1	h10F4.v2																								
E	D	F	A	T	Y	Y	C	Q	Q	Y	N	S	L	P	W	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	SEQ ID NO:25
E	D	L	G	V	Y	Y	C	F	Q	G	S	Q	F	P	Y	T	F	G	G	T	K	V	E	I	K	SEQ ID NO:35	
E	D	F	A	T	Y	Y	C	F	Q	G	S	Q	F	P	Y	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	SEQ ID NO:17
E	D	F	A	T	Y	Y	C	F	Q	G	S	Q	F	P	Y	T	F	G	Q	G	T	K	V	E	I	K	SEQ ID NO:18

I	A	QVQLVQSGAEVKKPKPGASVKVSCKASGYTFT	-H1-	WVRQAPGQGLEWMG	-H2-	RVTIT
	B	QVQLVQSGAEVKKPKPGASVKVSCKAS	-H1-	WVRQAPGQGLEWM	-H2-	RVTIT
	C	QVQLVQSGAEVKKPKPGASVKVSCKAS	-H1-	WVRQAPGQGLEWM	-H2-	RVTIT
	D	QVQLVQSGAEVKKPKPGASVKVSCKAS	-H1-	WVRQAPGQGLEWM	-H2-	RVTIT
II	A	QVQLQESGGPGLVKPSTLSLTCTVSGGSVS	-H1-	WIRQPPGKGLEWIG	-H2-	RVTIS
	B	QVQLQESGGPGLVKPSTLSLTCTVS	-H1-	WIRQPPGKGLEWI	-H2-	RVTIS
	C	QVQLQESGGPGLVKPSTLSLTCTVS	-H1-	WIRQPPGKGLEWI	-H2-	RVTIS
	D	QVQLQESGGPGLVKPSTLSLTCTVS	-H1-	WIRQPPGKGLEWI	-H2-	RVTIS
III	A	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	-H1-	WVRQAPGKGLEWVS	-H2-	RFTIS
	B	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV	-H2-	RFTIS
	C	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV	-H2-	RFTIS
	D	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV	-H2-	RFTIS
受體 -1						
A	A	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIK	-H1-	WVRQAPGKGLEWVS	-H2-	RFTIS
	B	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV	-H2-	RFTIS
	C	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV	-H2-	RFTIS
	D	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV	-H2-	RFTIS
受體 -2						
A	A	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIK	-H1-	WVRQAPGKGLEWVS	-H2-	RFTIS
	B	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV	-H2-	RFTIS
	C	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV	-H2-	RFTIS
	D	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	-H1-	WVRQAPGKGLEWV	-H2-	RFTIS

圖3A

I	A	ADTSTSTAYMELSSLRS	EDTAVYYCAR	-H3-		WGQGT	LVTVSS	SEQ ID NOs.: 26, 47, 48, 7
	B	ADTSTSTAYMELSSLRS	EDTAVYYCAR	-H3-		WGQGT	LVTVSS	SEQ ID NOs.: 50, 51, 48, 7
	C	ADTSTSTAYMELSSLRS	EDTAVYYCA	-H3-		WGQGT	LVTVSS	SEQ ID NOs.: 50, 51, 52, 7
	D	ADTSTSTAYMELSSLRS	EDTAVYYC	-H3-		WGQGT	LVTVSS	SEQ ID NOs.: 50, 51, 53, 7
II	A	VDTSKNQFSLKLS	SVTAADTAVYYCAR	-H3-		WGQGT	LVTVSS	SEQ ID NOs.: 54, 55, 56, 7
	B	VDTSKNQFSLKLS	SVTAADTAVYYCAR	-H3-		WGQGT	LVTVSS	SEQ ID NOs.: 57, 58, 56, 7
	C	VDTSKNQFSLKLS	SVTAADTAVYYCA	-H3-		WGQGT	LVTVSS	SEQ ID NOs.: 57, 58, 59, 7
	D	VDTSKNQFSLKLS	SVTAADTAVYYC	-H3-		WGQGT	LVTVSS	SEQ ID NOs.: 57, 58, 60, 7
III	A	RDNSKNTLYLQMN	SLRAEDTAVYYCAR	-H3-		WGQGT	LVTVSS	SEQ ID NOs.: 61, 62, 63, 7
	B	RDNSKNTLYLQMN	SLRAEDTAVYYCAR	-H3-		WGQGT	LVTVSS	SEQ ID NOs.: 64, 65, 63, 7
	C	RDNSKNTLYLQMN	SLRAEDTAVYYCA	-H3-		WGQGT	LVTVSS	SEQ ID NOs.: 64, 65, 66, 7
	D	RDNSKNTLYLQMN	SLRAEDTAVYYC	-H3-		WGQGT	LVTVSS	SEQ ID NOs.: 64, 65, 67, 7
受體 - 1								
A	ADTSKNTAYLQMN	SLRAEDTAVYYCSR	-H3-		WGQGT	LVTVSS	SEQ ID NOs.: 68, 62, 69, 7	
	B	ADTSKNTAYLQMN	SLRAEDTAVYYCSR		-H3-	WGQGT	LVTVSS	SEQ ID NOs.: 64, 65, 69, 7
	C	ADTSKNTAYLQMN	SLRAEDTAVYYCS		-H3-	WGQGT	LVTVSS	SEQ ID NOs.: 64, 65, 70, 7
受體 - 2								
A	ADTSKNTAYLQMN	SLRAEDTAVYYCAR	-H3-		WGQGT	LVTVSS	SEQ ID NOs.: 68, 62, 71, 7	
	B	ADTSKNTAYLQMN	SLRAEDTAVYYCAR		-H3-	WGQGT	LVTVSS	SEQ ID NOs.: 64, 65, 71, 7
	C	ADTSKNTAYLQMN	SLRAEDTAVYYCA		-H3-	WGQGT	LVTVSS	SEQ ID NOs.: 64, 65, 72, 7
	D	ADTSKNTAYLQMN	SLRAEDTAVYYC		-H3-	WGQGT	LVTVSS	SEQ ID NOs.: 64, 65, 73, 7

3B

kv1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITC	-L1-	WYQKPKGAPKLLIY	-L2-	GVPSRFSGSGGTDFTLTISLIQP
kv1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITC	-L1-	WYQKPKGAPKLLI	-L2-	GVPSRFSGSGGTDFTLTISLIQP
kv2	DIVMTQSPSLSPVTPGEPASISC	-L1-	WYLQKPGQSPQLLIY	-L2-	GVPDFRFSGSGGTDFTLKISRVEA
kv3	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC	-L1-	WYQKPGQAPRLLIY	-L2-	GIPDRFSGSGGTDFTLTISRLEP
kv4	DIVMTQSPDLSAVSLGERATINC	-L1-	WYQKPGQPPKLLIY	-L2-	GVPDFRFSGSGGTDFTLTISLQA

圖4A

kv1	EDFATYYC	-L3-	FGQGTKVEIK	SEQ ID Nos.: 74, 75, 76, 77
kv1	EDFATYYC	-L3-	FGQGTKVEIK	SEQ ID Nos.: 74, 78, 76, 77
kv2	EDVGYYC	-L3-	FGQGTKVEIK	SEQ ID Nos.: 49, 79, 80, 77
kv3	EDFATYYC	-L3-	FGQGTKVEIK	SEQ ID Nos.: 81, 82, 83, 77
kv4	EDVATYYC	-L3-	FGQGTKVEIK	SEQ ID Nos.: 84, 85, 86, 77

圖4B

	230	240	250	260	270
humIgG1	PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV				
humIgG2	PAP-PVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYV				
humIgG3	PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYV				
humIgG4	PAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYV				
	****			*	* *
	280	290	300	310	320
humIgG1	DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP				
humIgG2	DGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP				
humIgG3	DGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP				
humIgG4	DGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLP				
		*	*	*	*
	330	340	350	360	370
humIgG1	APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV				
				D L	
humIgG2	APIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV				
humIgG3	APIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV				
humIgG4	SSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV				
	**	*		*	
	380	390	400	410	420
humIgG1	EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH				
humIgG2	EWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH				
humIgG3	EWESSGQPENNYNTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFSCSVMH				
humIgG4	EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMH				
	*	*	*	*	* *
	430	440			
humIgG1	EALHNHYTQKSLSLSPGK SEQ ID NO.: 38				
humIgG2	EALHNHYTQKSLSLSPGK SEQ ID NO.: 39				
humIgG3	EALHNRFTQKSLSLSPGK SEQ ID NO.: 40				
humIgG4	EALHNHYTQKSLSLSPGK SEQ ID NO.: 41				
	**		*		

Kappa輕鏈恆定區一致序列:

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK
VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKV
YACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC SEQ ID NO: 37

圖5A

抗CD22 h10F4v2輕鏈

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQSIVHSGVNTFLEWYQQKPGKAPKLLI
YKVSNRFGVPSRFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCFQGSQFPYTFGQG
TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL
QSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK
SFNRGEC (SEQ ID NO:87)

抗CD22 h10F4v2重鏈

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYEFSRSWMNWVRQAPGKGLEWVGRIYP
GDGDTNYSKGKFKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGSSWDWY
FDVWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV
SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT
KVDKKVEPKSCDKHTCTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN
GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL
VKGFIYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQOGN
VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:88)

圖5B

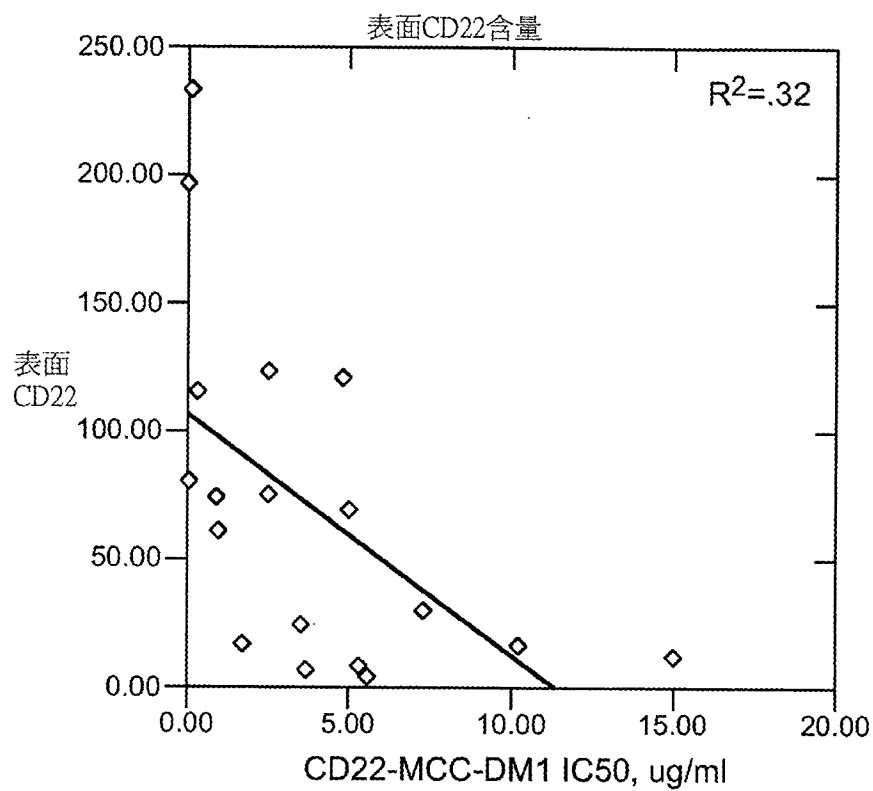


圖6A

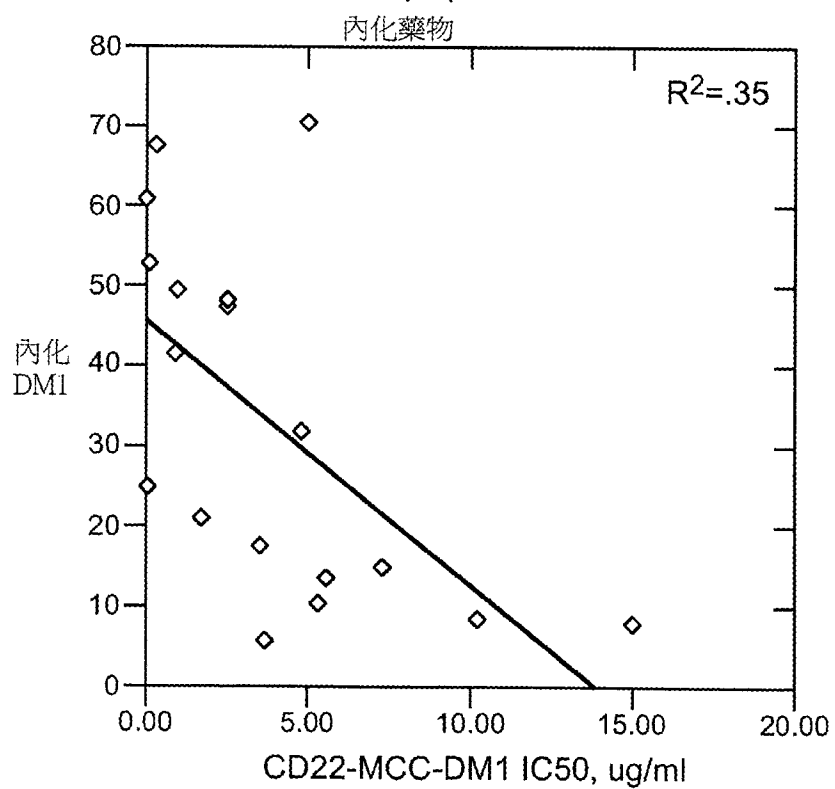


圖6B

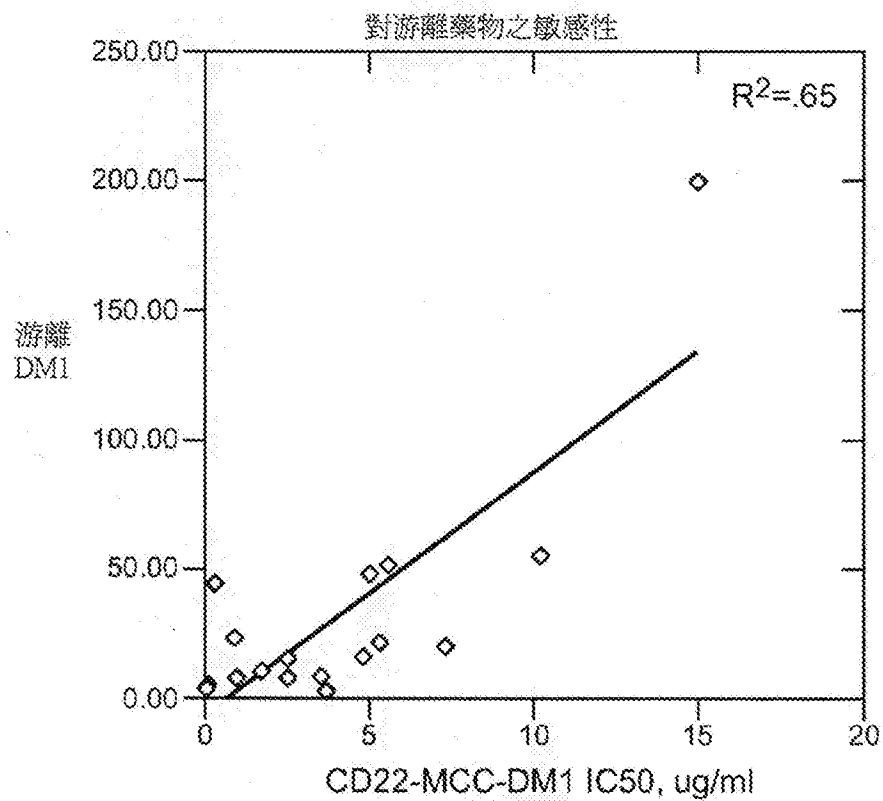


圖6C

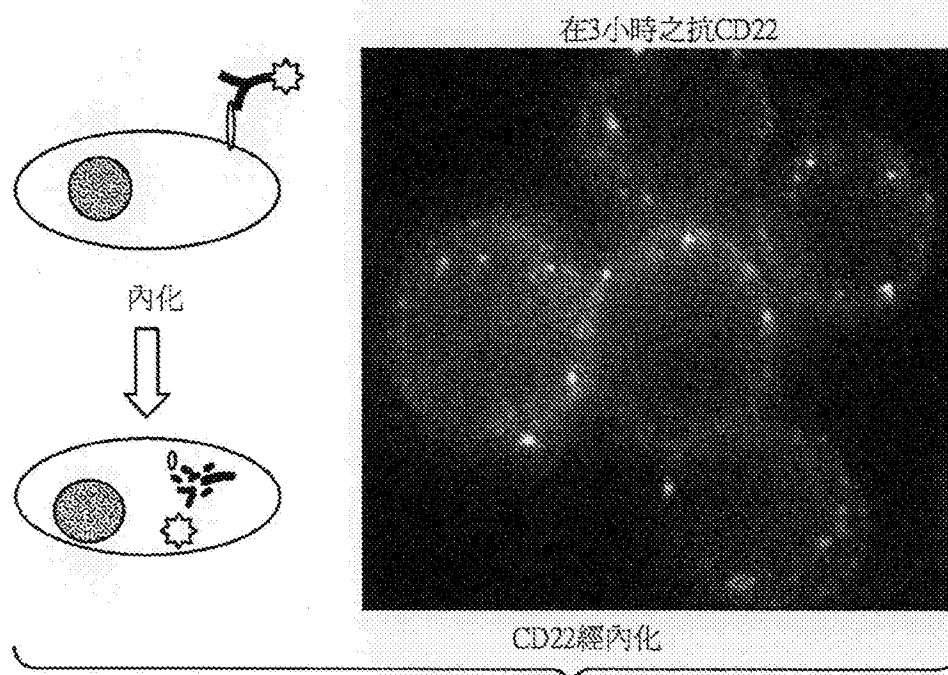
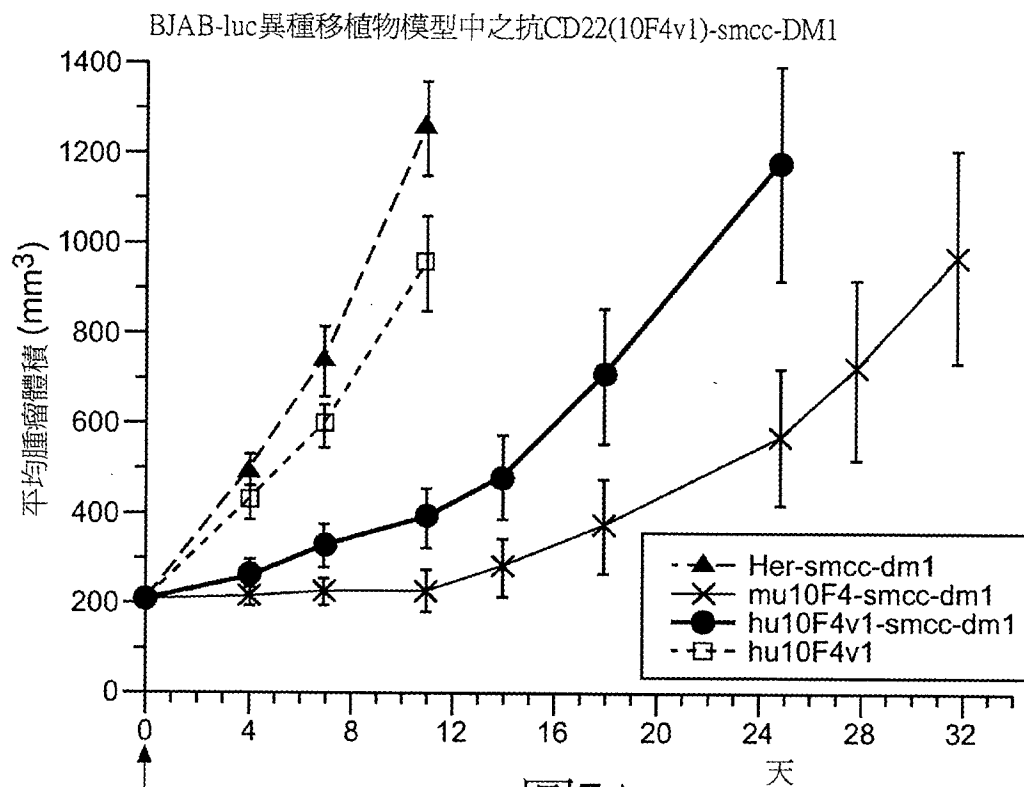
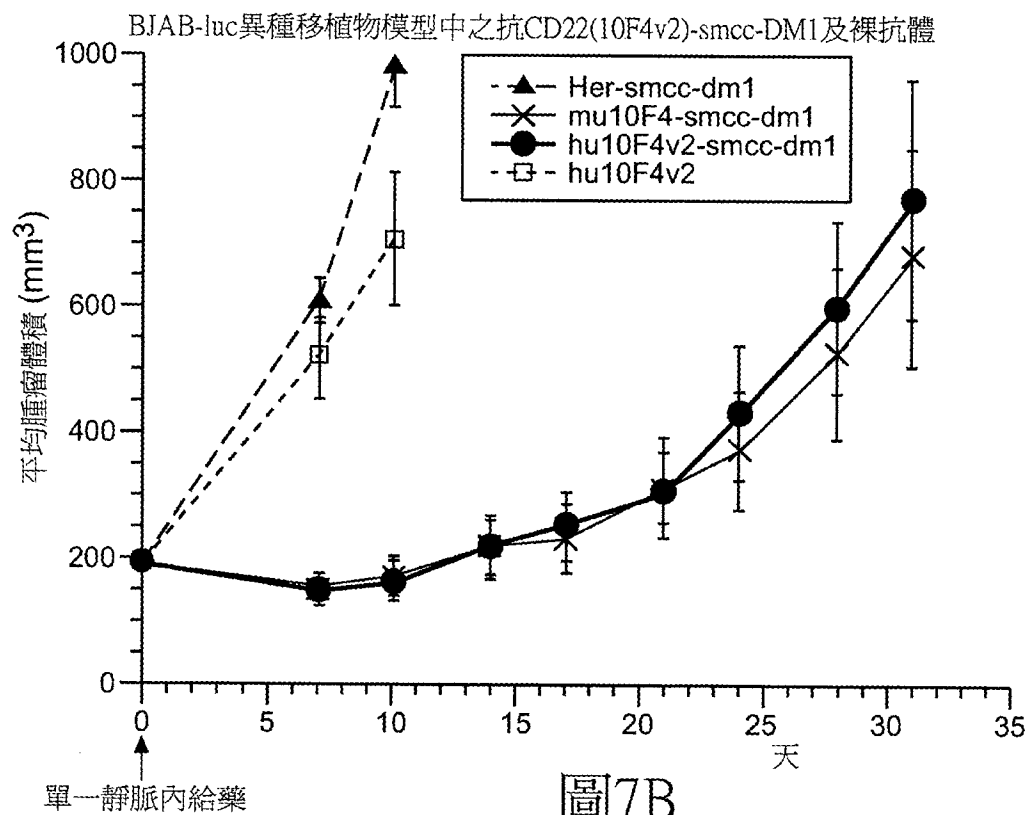
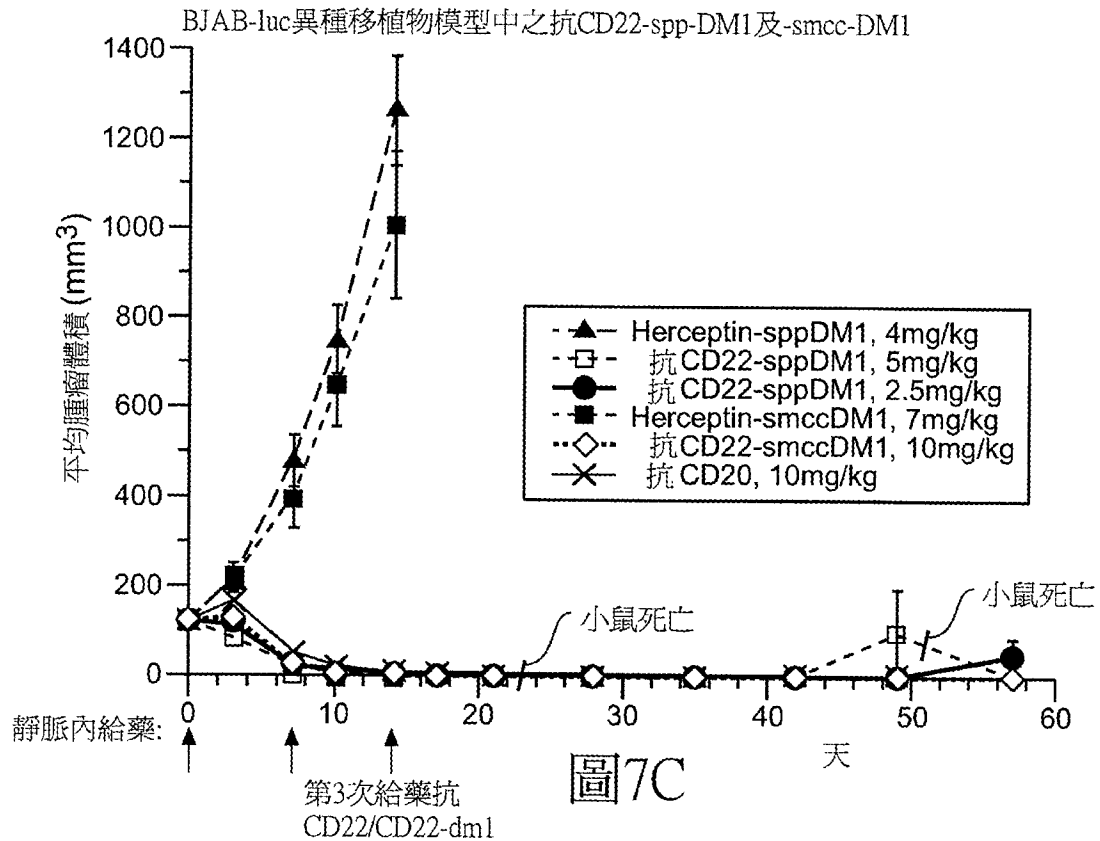
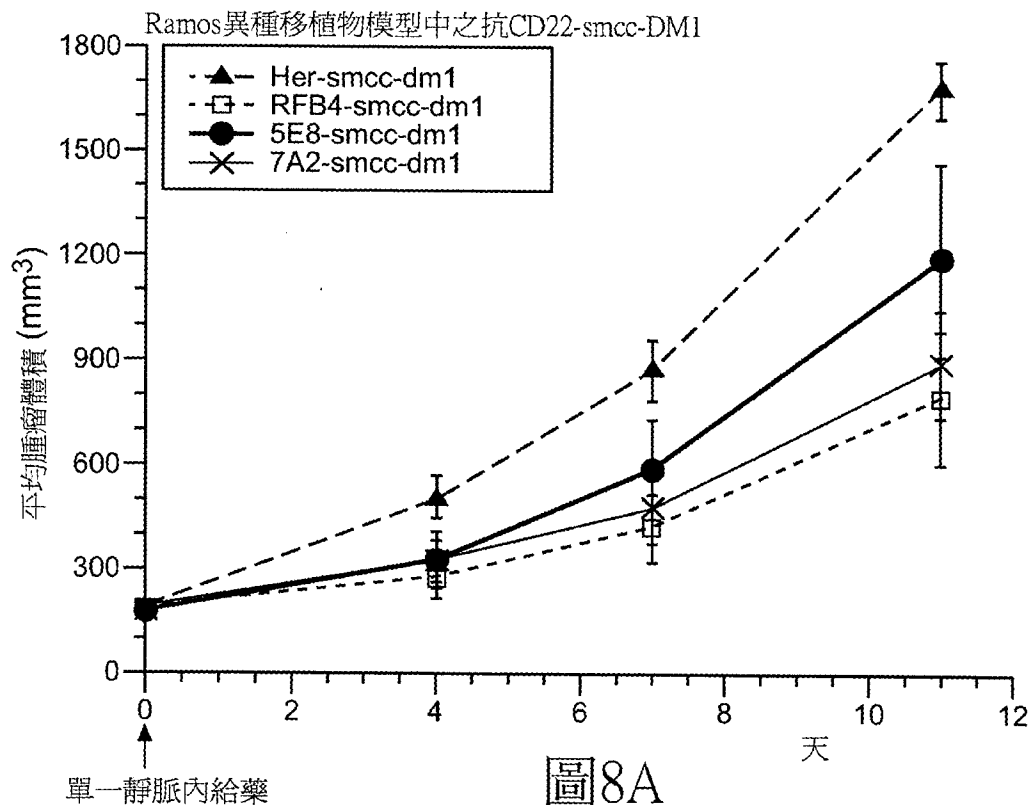
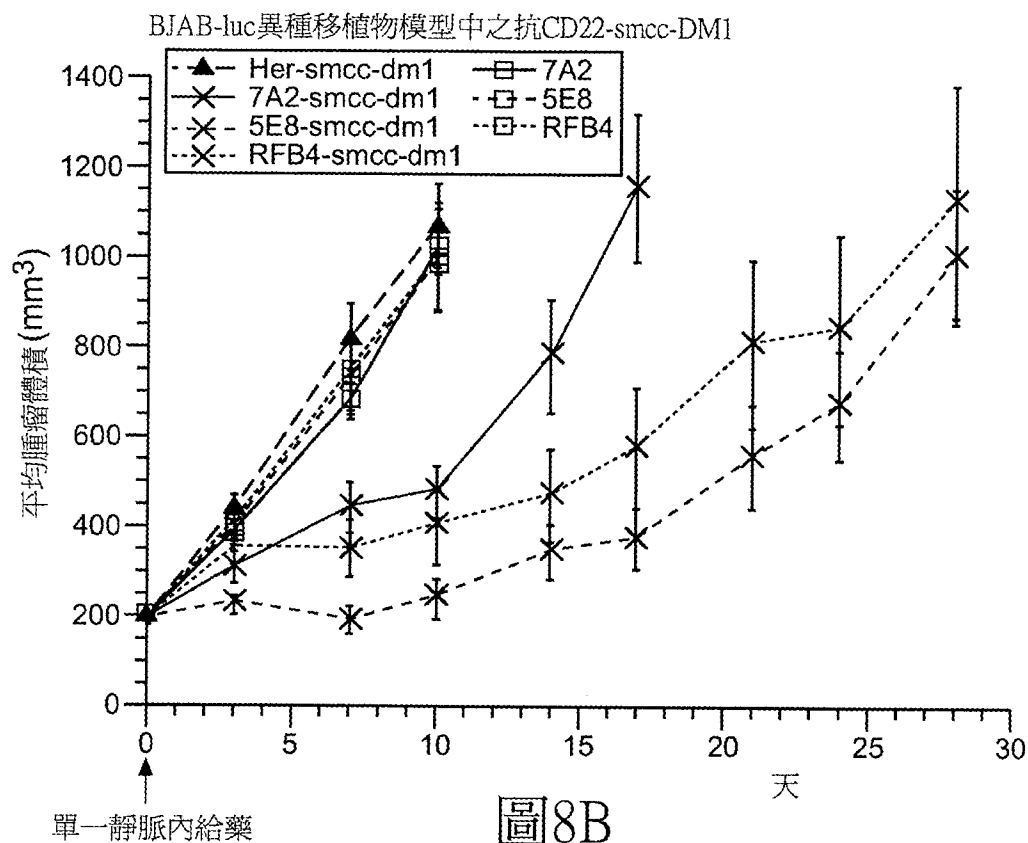
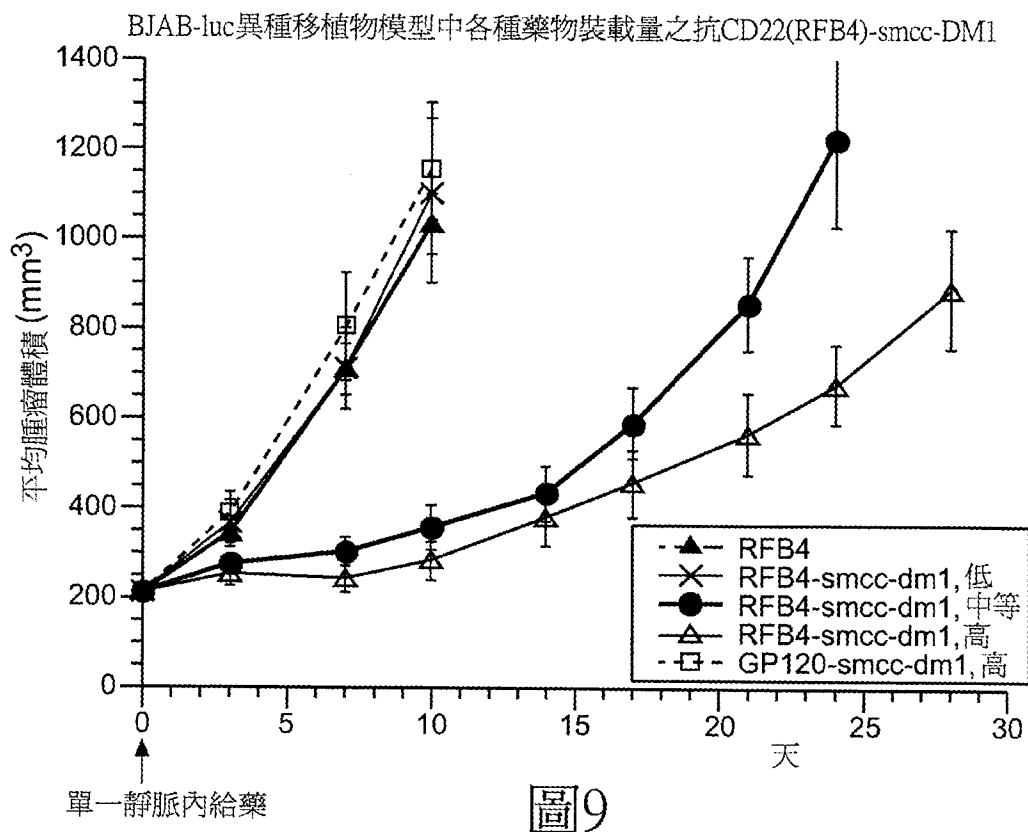
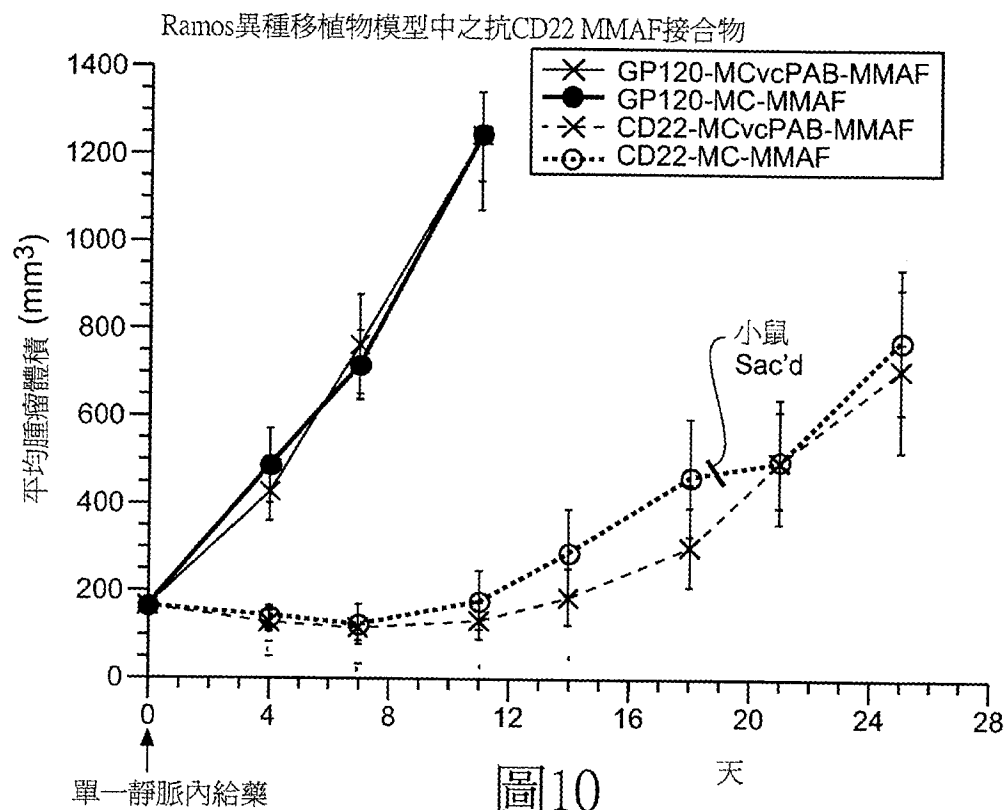
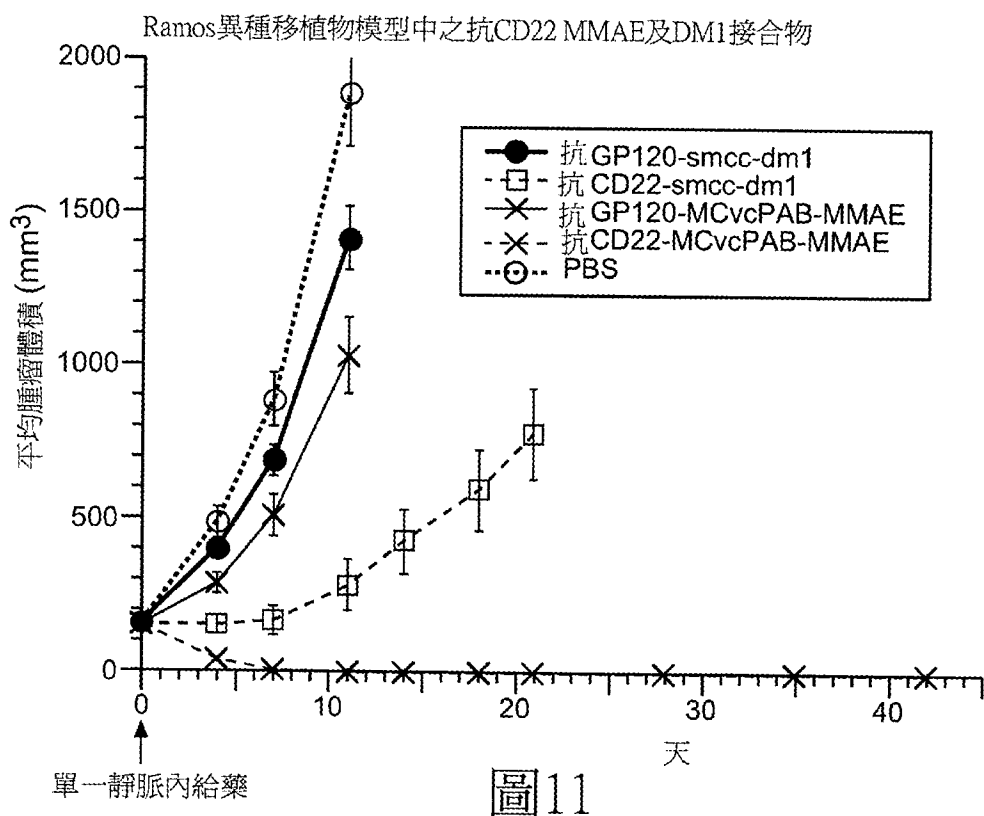


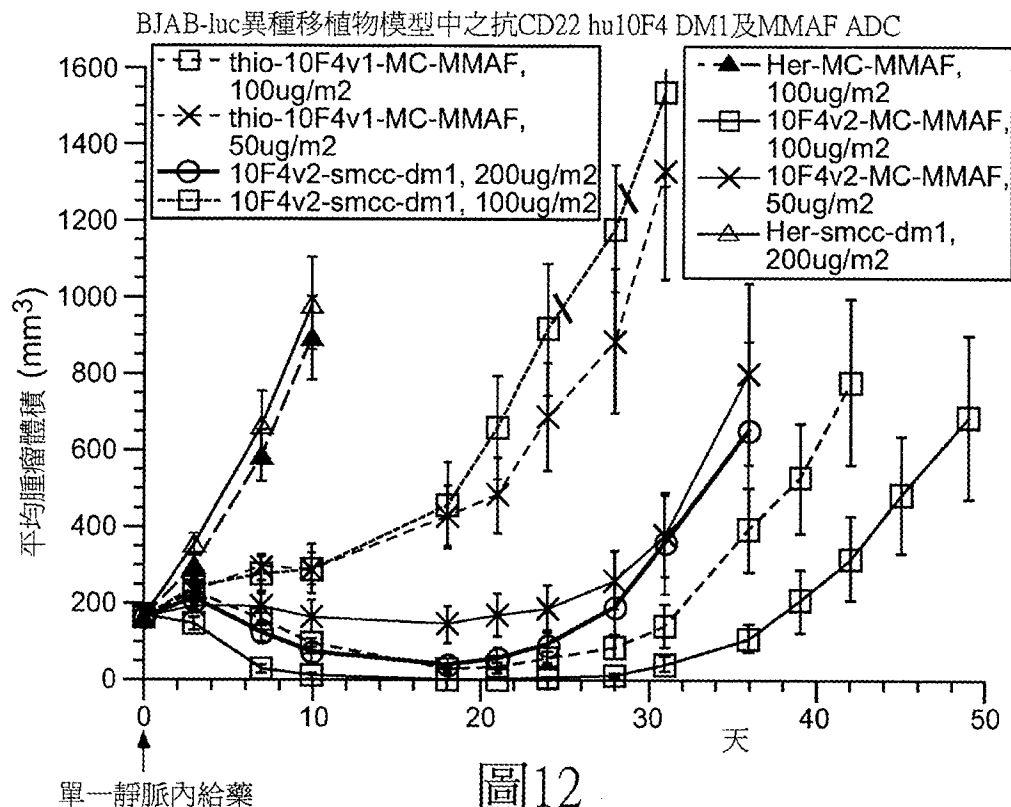
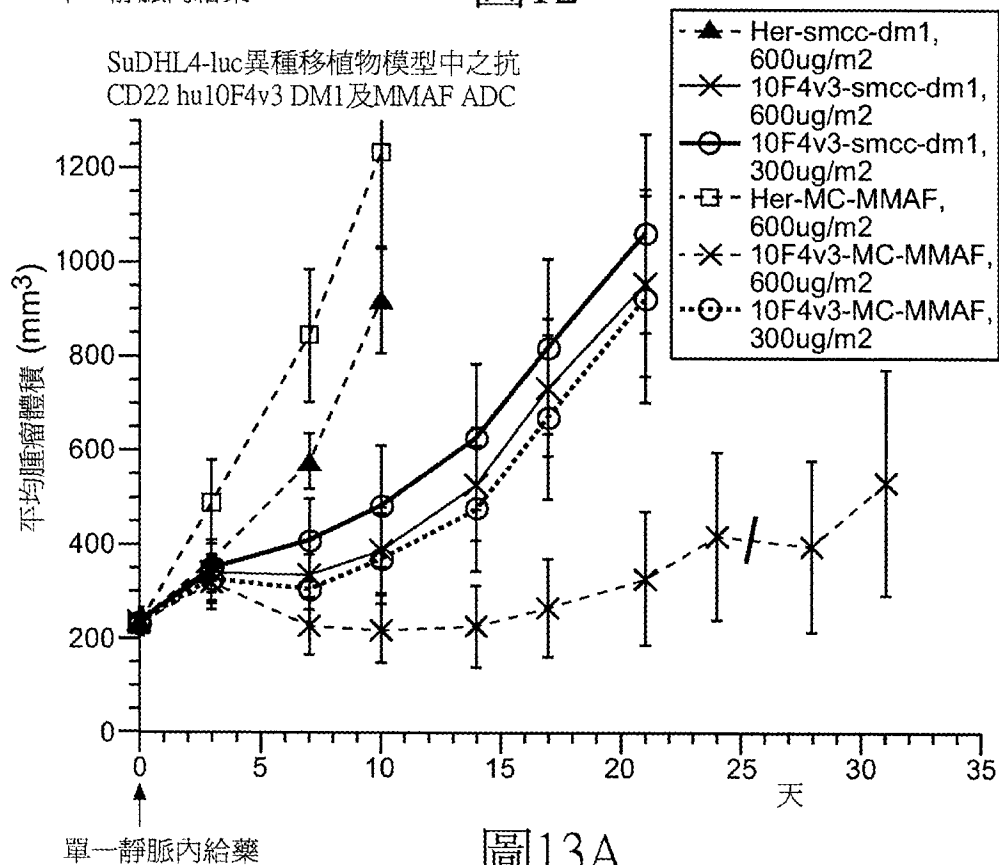
圖6D

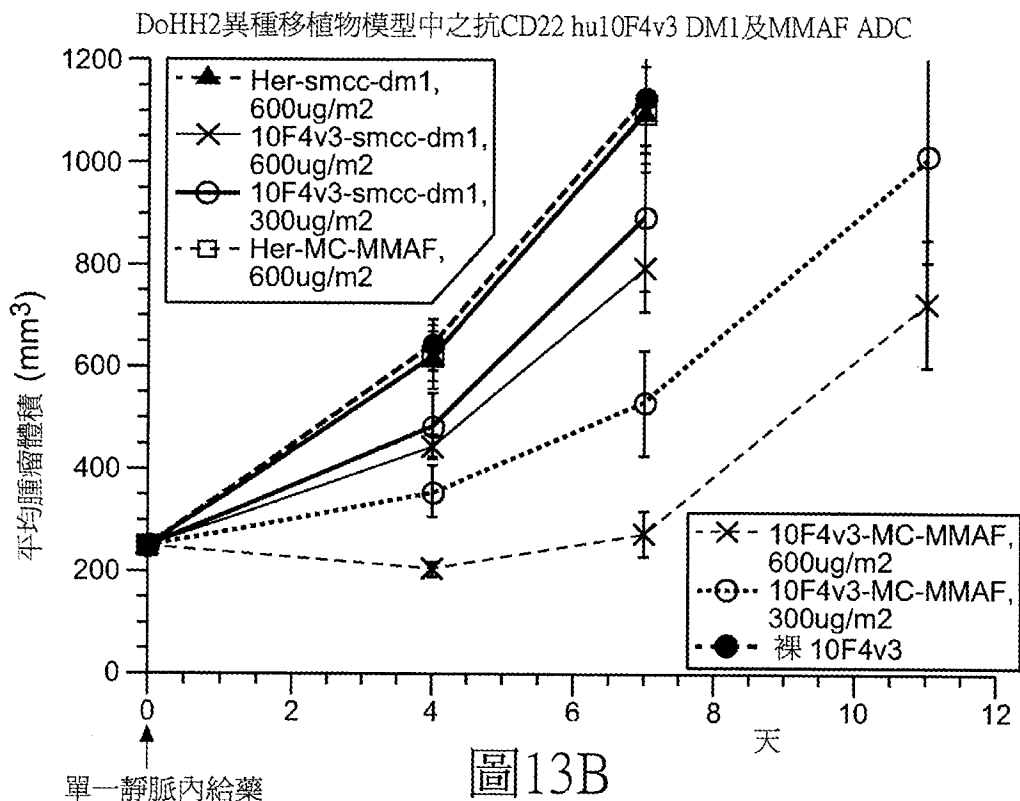
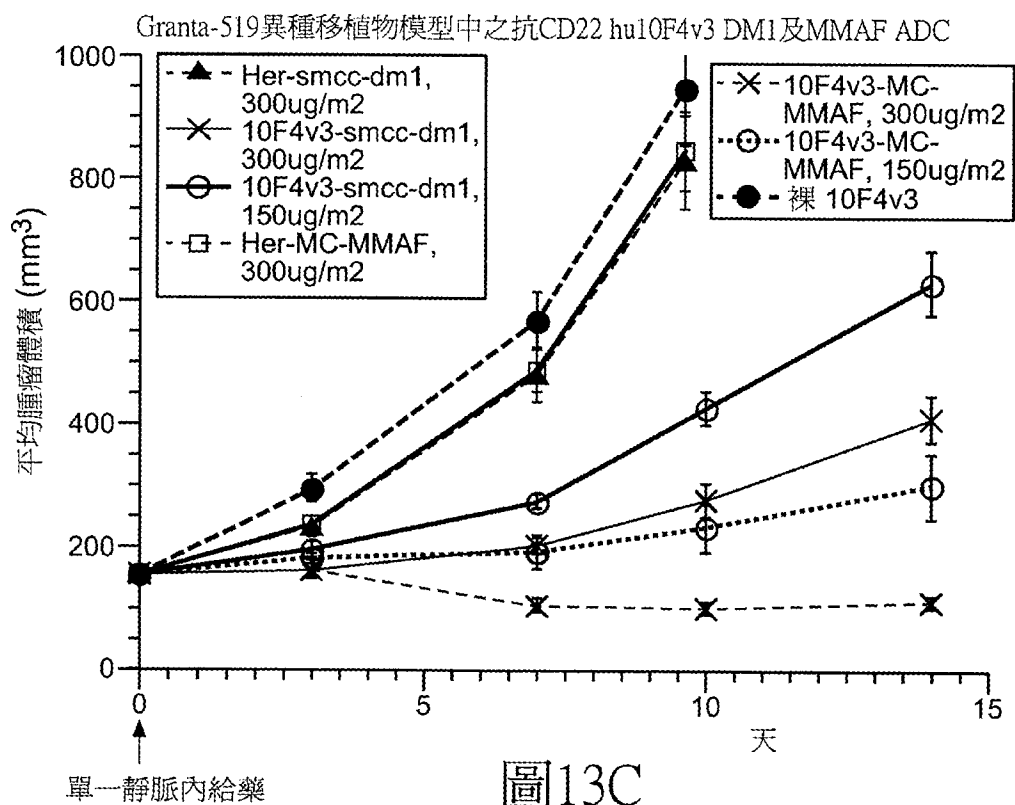


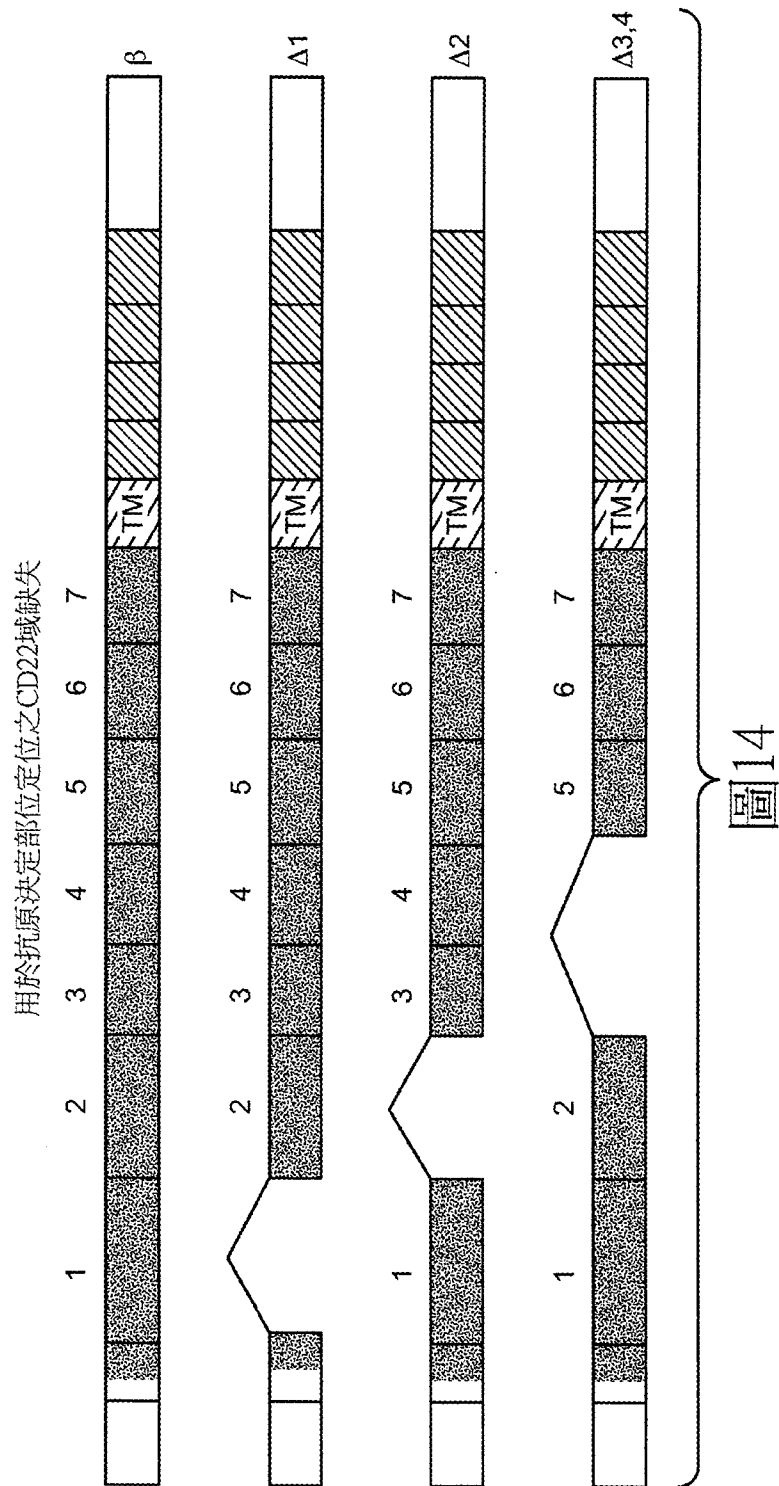


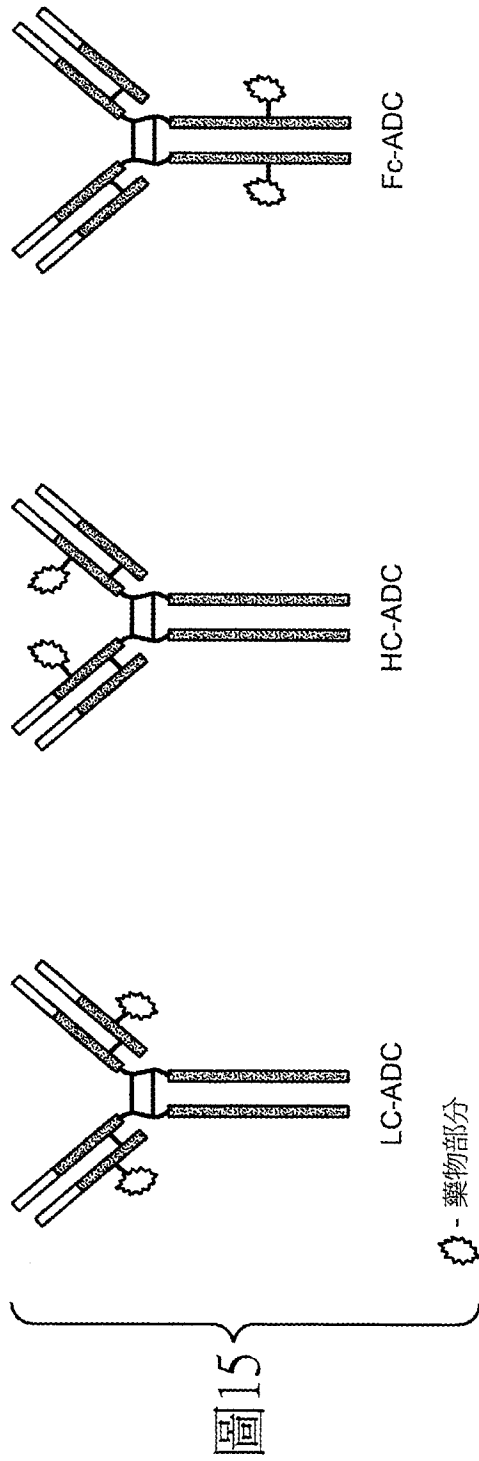
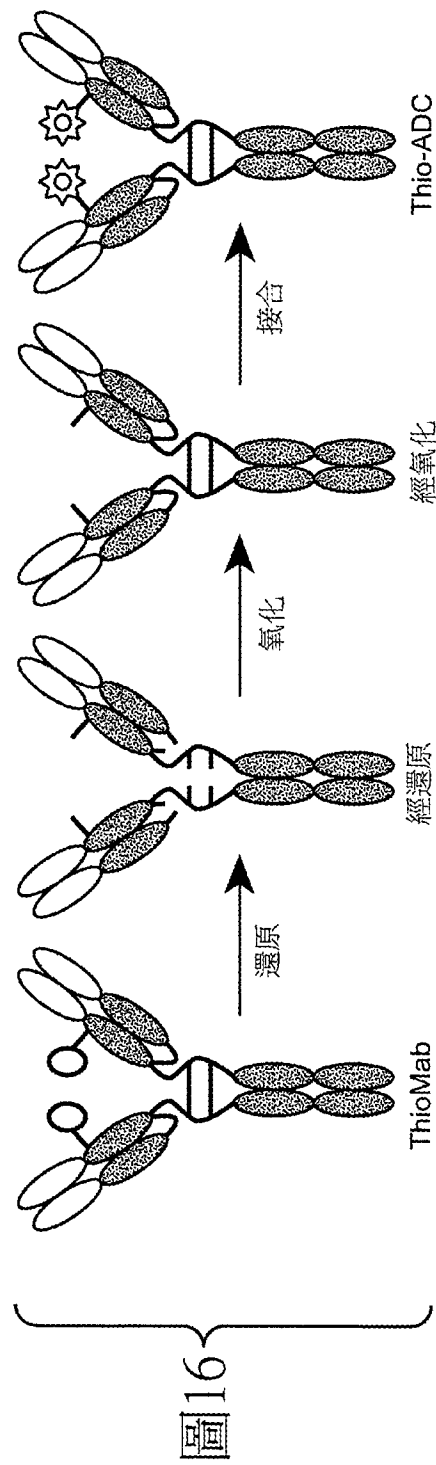












經抗CD22 V205C h10F4v3半胱胺酸改造之輕鏈

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQSIVHSGNTFLEWYQQKPGKAPKLLI
YKVSNRFSGVPSRFSGSGSDTFTLTITSSLPEDFATYYCFQGSQFPYTFGQG
TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL
QSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPCTK
SFNRGEC (SEQ ID NO:91)

圖17A

經抗CD22 A118C h10F4v3半胱胺酸改造之重鏈

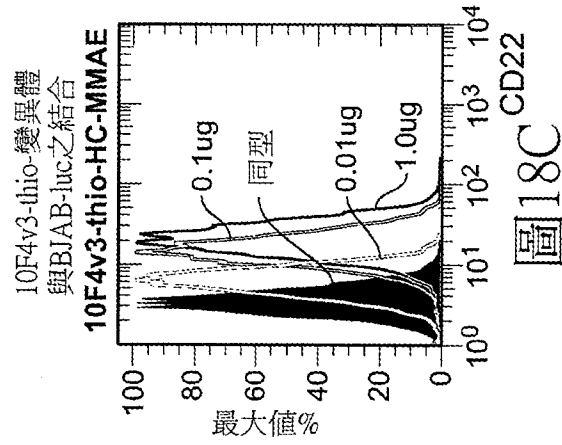
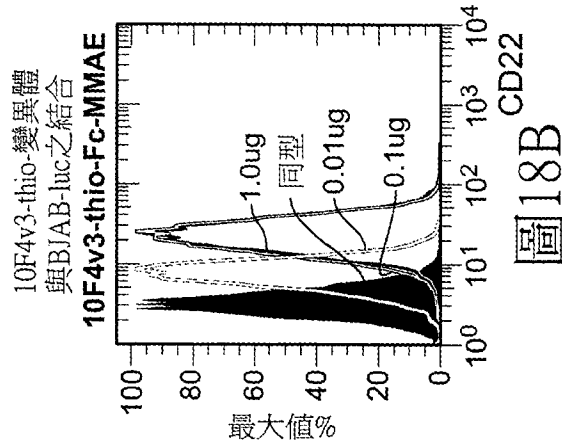
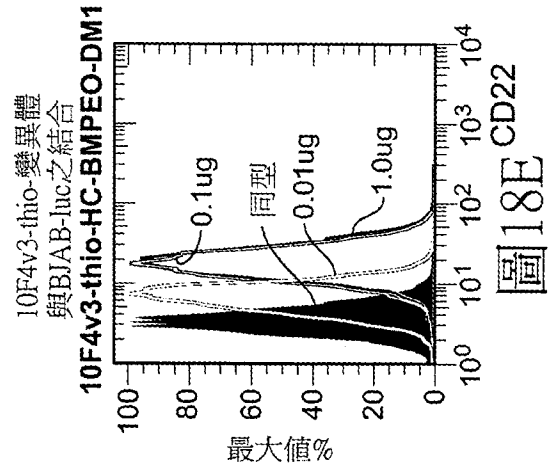
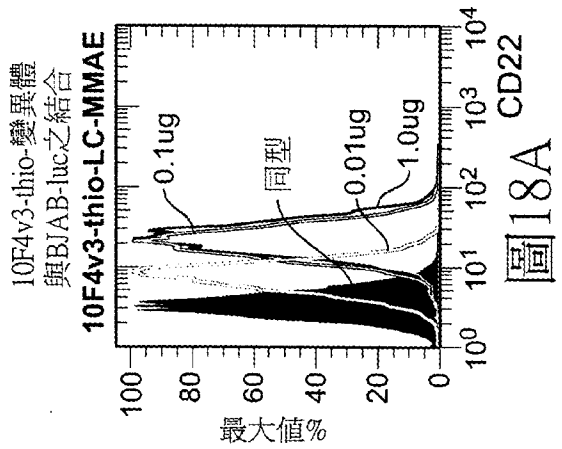
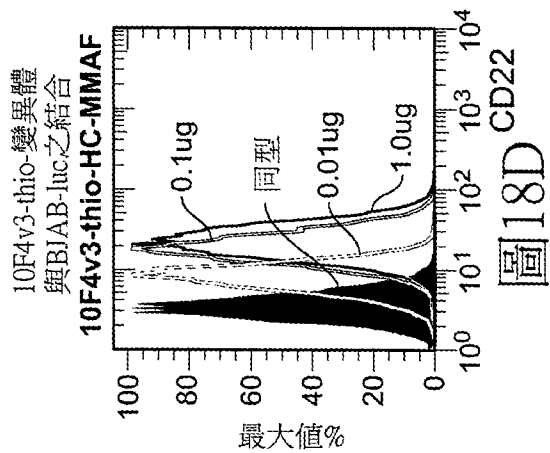
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYEFSSRWNNWVRQAPGKGLEWVGRIYP
GDGDTNYSKGKFKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGSSWDWY
FDVWGQGTLLVTVSSCSTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV
SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT
KVDKKVEPKSCDKHTCTPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN
GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL
VKGFPYSDIAVEWESNGOPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:92)

圖17B

經抗CD22 S400C h10F4v3半胱胺酸改造之Fc區

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYEFSSRWNNWVRQAPGKGLEWVGRIYP
GDGDTNYSKGKFKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARDGSSWDWY
FDVWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV
SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT
KVDKKVEPKSCDKHTCTPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN
GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL
VKGFPYSDIAVEWESNGOPENNYKTTTPVLDCDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:93)

圖17C



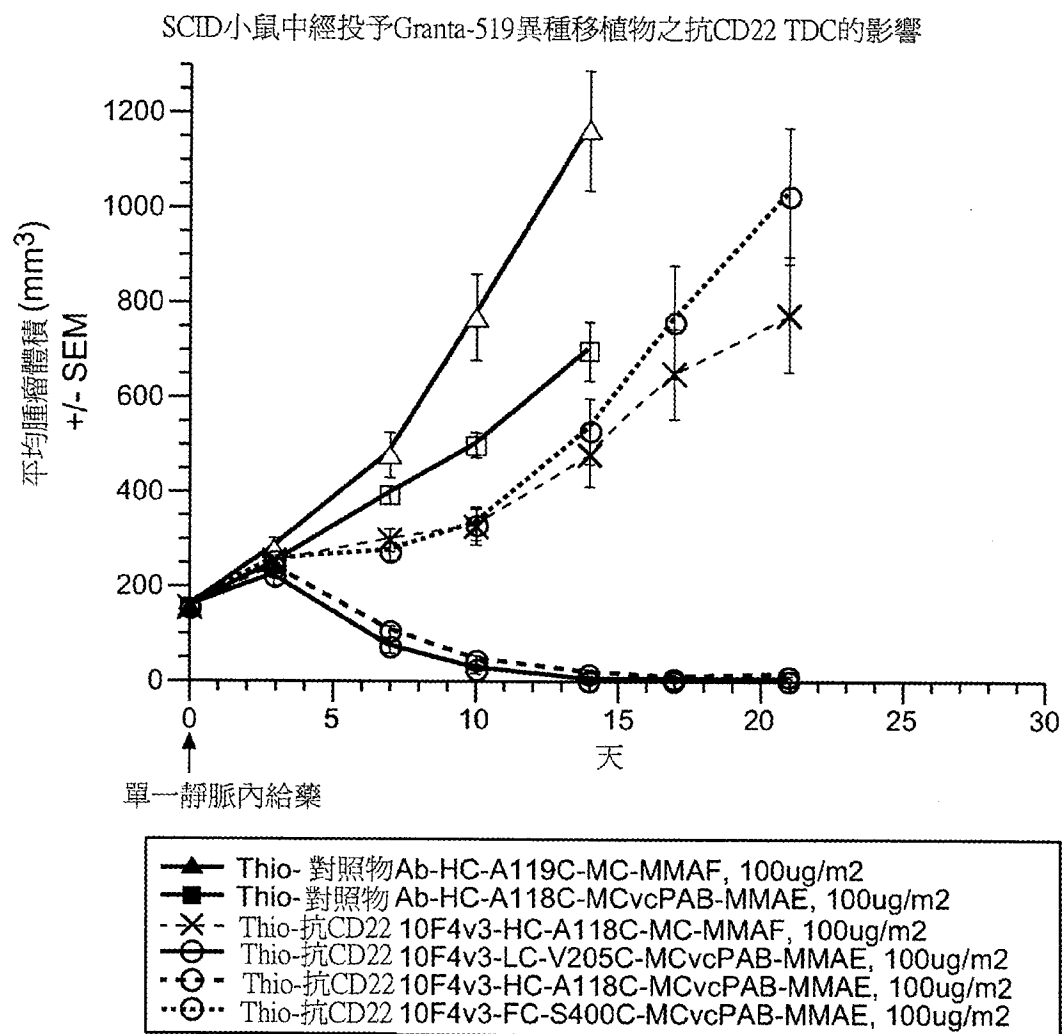
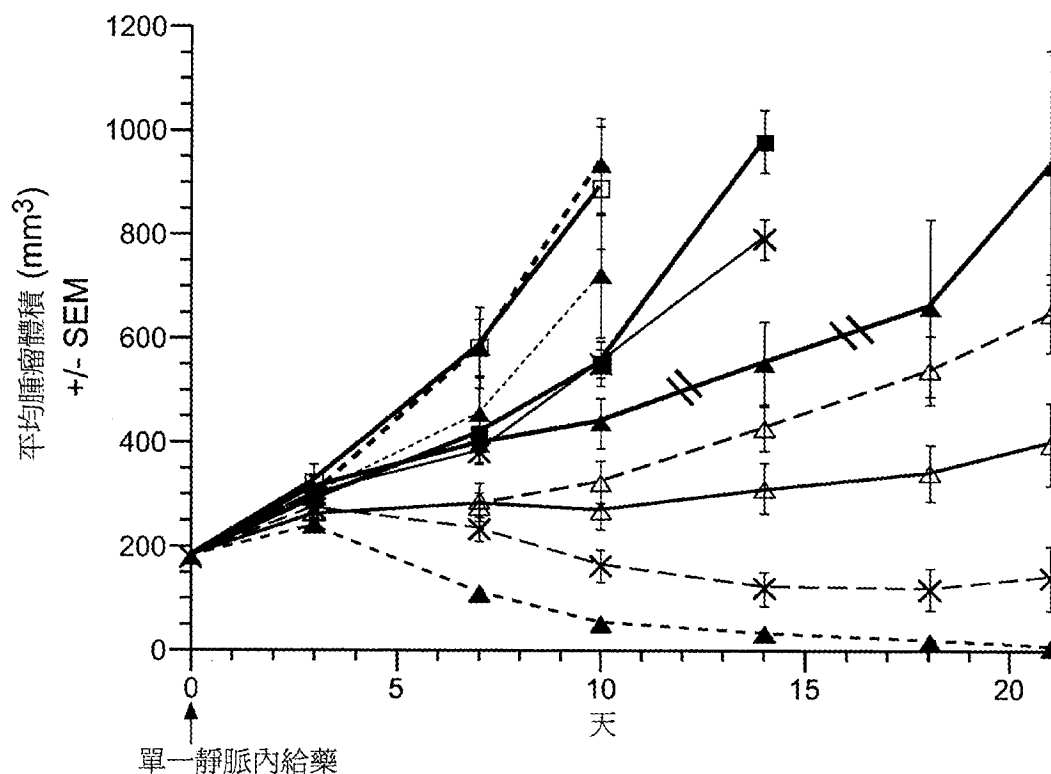


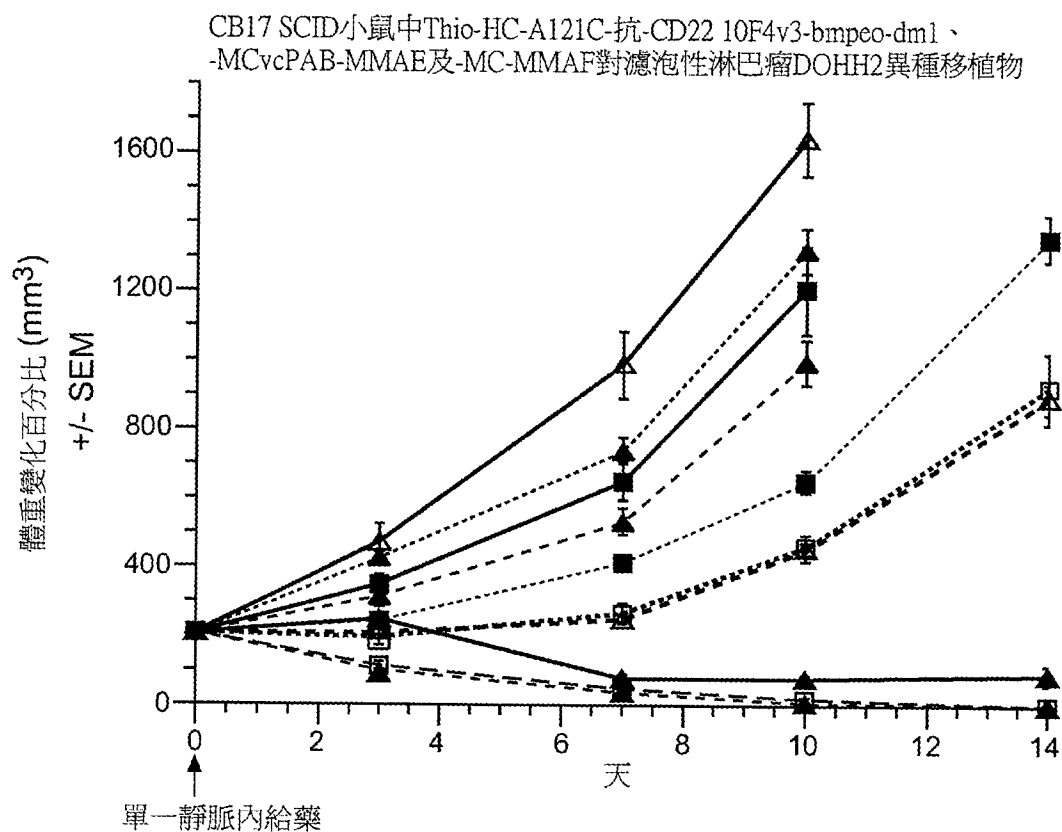
圖19

CB17 SCID小鼠中抗CD22 thio HC(A118C) 10F4v3-BMPEO-DM1、
-MCvcPAB-MMAE及-MC-MMAF對人類套細胞淋巴瘤Granta-519異種移植



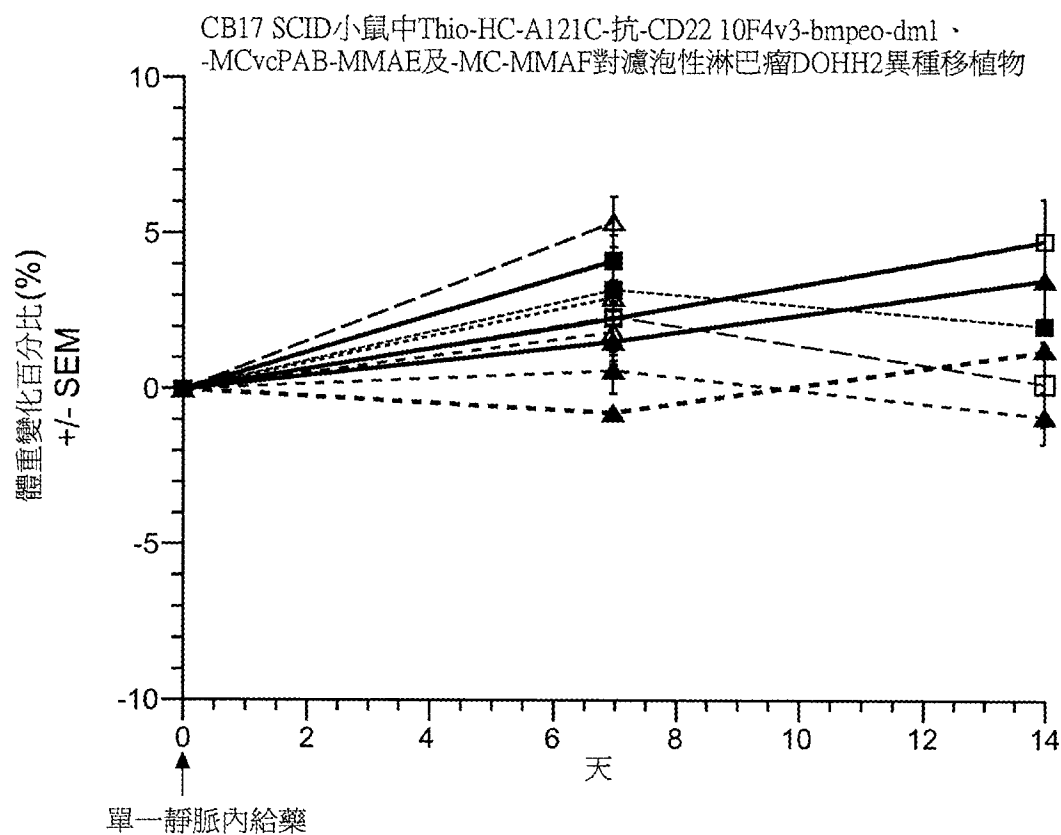
- △- 抗-CD22 10F4v3-MC-MMAF, 150 ug/m2
- Thio-HC(A118C) 對照物 Ab-bmpeo-dm1, 300 ug/m2
- ▲- Thio-HC- 抗-CD22 10F4v3-bmpeo-dm1, 150 ug/m2
- Thio-HC- 抗-CD22 10F4v3-bmpeo-dm1, 300 ug/m2
- ▲- Thio-HC(A118C) 對照物 Ab-MCvcPAB-MMAE, 150 ug/m2
- ▲- Thio-HC- 抗-CD22 10F4v3-MCvcPAB-MMAE, 150 ug/m2
- X- Thio-HC- 抗-CD22 10F4v3-MCvcPAB-MMAE, 75 ug/m2
- ▲- Thio-HC(A118C) 對照物 Ab-MC-MMAF, 150 ug/m2
- △- Thio-HC- 抗-CD22 10F4v3-MC-MMAF, 150 ug/m2
- X- Thio-HC- 抗-CD22 10F4v3-MC-MMAF, 75ug/m2

圖20A



- A- 抗-CD22 10F4v3-MC-MMAF, 300 ug/m2
- △-- B-Thio-HC- 抗-Her2 4D5-bmpeo-dm1, 600 ug/m2
- ▲-- C-Thio-HC- 抗-CD22 10F4v3-bmpeo-dm1, 600 ug/m2
- D-Thio-HC- 抗-CD22 10F4v3-bmpeo-dm1, 300 ug/m2
- ▲-- E-Thio-HC- 抗-Her2 4D5-MCvcPAB-MMAE, 600 ug/m2
- ▲-- F-Thio-HC- 抗-CD22 10F4v3-MCvcPAB-MMAE, 600 ug/m2
- G-Thio-HC- 抗-CD22 10F4v3-MCvcPAB-MMAE, 300 ug/m2
- ▲-- H-Thio-HC- 抗-Her2 4D5-MC-MMAF, 600 ug/m2
- △-- I-Thio-HC- 抗-CD22 10F4v3-MC-MMAF, 600 ug/m2
- J-Thio-HC- 抗-CD22 10F4v3-MC-MMAF, 300 ug/m2

圖20B



- A- 抗-CD22 10F4v3-MC-MMAF, 300 ug/m2
- △- B-Thio-HC- 抗-Her2 4D5-bmpeo-dm1, 600 ug/m2
- △- C-Thio-HC- 抗-CD22 10F4v3-bmpeo-dm1, 600 ug/m2
- D-Thio-HC- 抗-CD22 10F4v3-bmpeo-dm1, 300 ug/m2
- ▲— E-Thio-HC- 抗-Her2 4D5-MCvcPAB-MMAE, 600 ug/m2
- ▲- F-Thio-HC- 抗-CD22 10F4v3-MCvcPAB-MMAE, 600 ug/m2
- G-Thio-HC- 抗-CD22 10F4v3-MCvcPAB-MMAE, 300 ug/m2
- △- H-Thio-HC- 抗-Her2 4D5-MC-MMAF, 600 ug/m2
- ▲- I-Thio-HC- 抗-CD22 10F4v3-MC-MMAF, 600 ug/m2
- J-Thio-HC- 抗-CD22 10F4v3-MC-MMAF, 300 ug/m2

圖20C

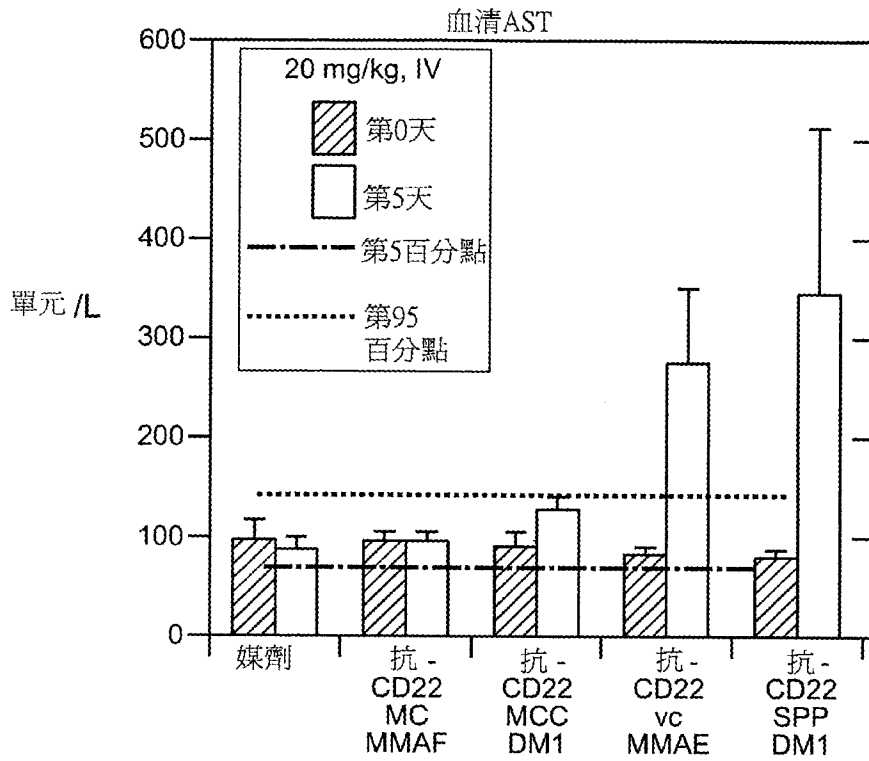


圖21A

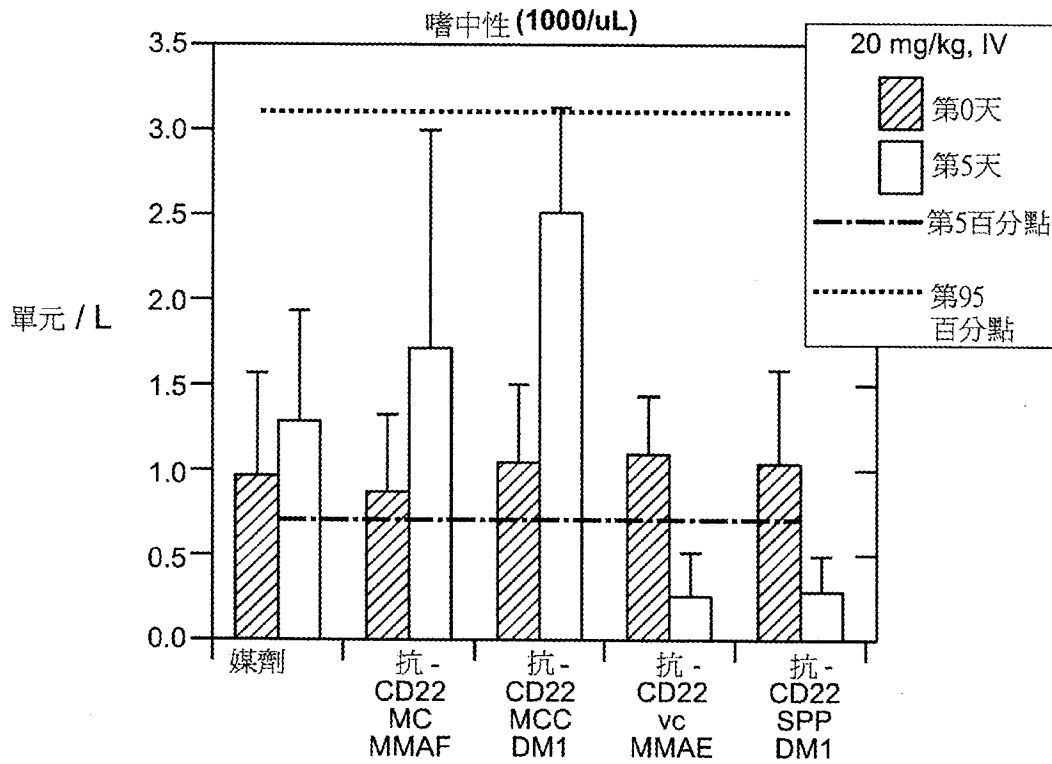


圖21B

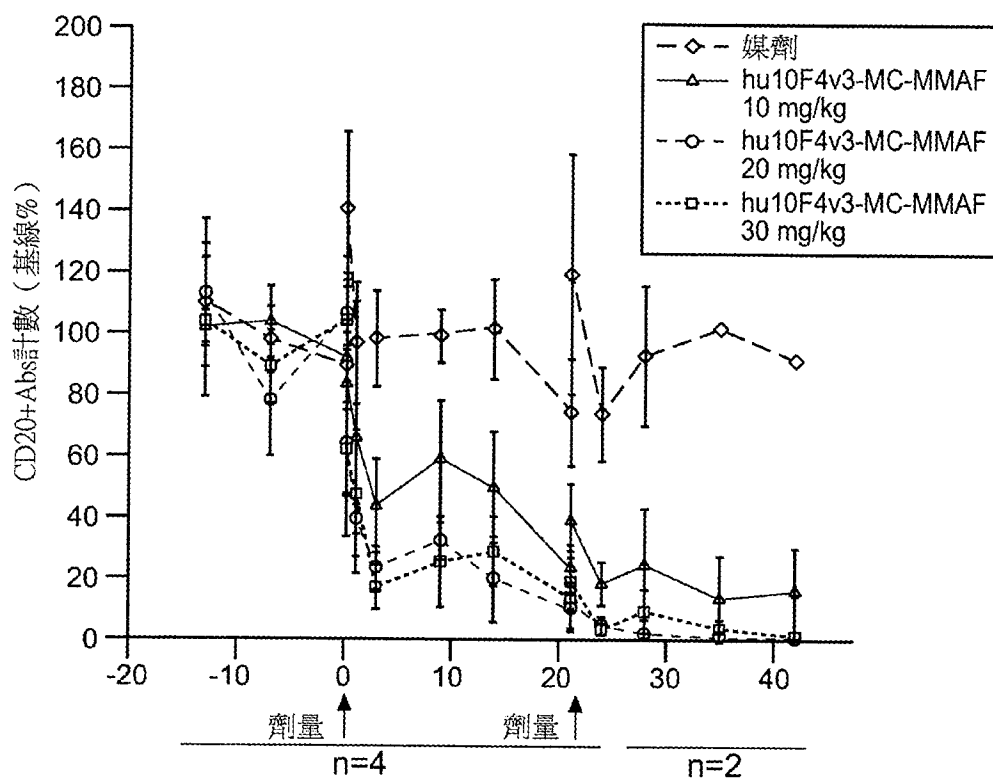


圖22A

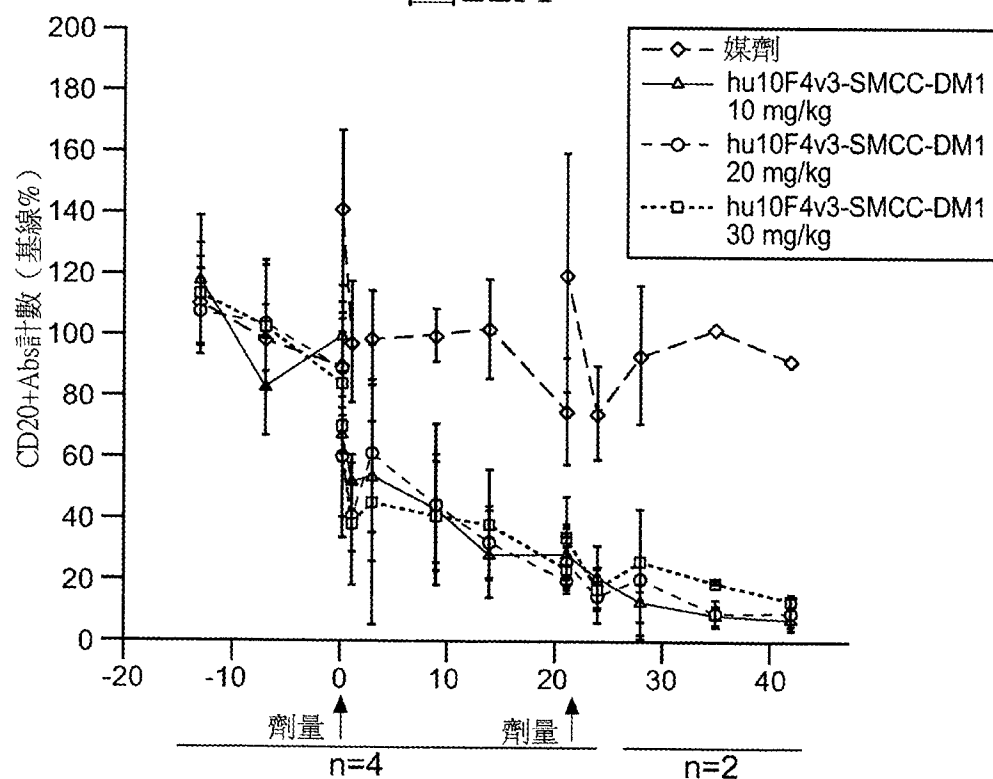


圖22B

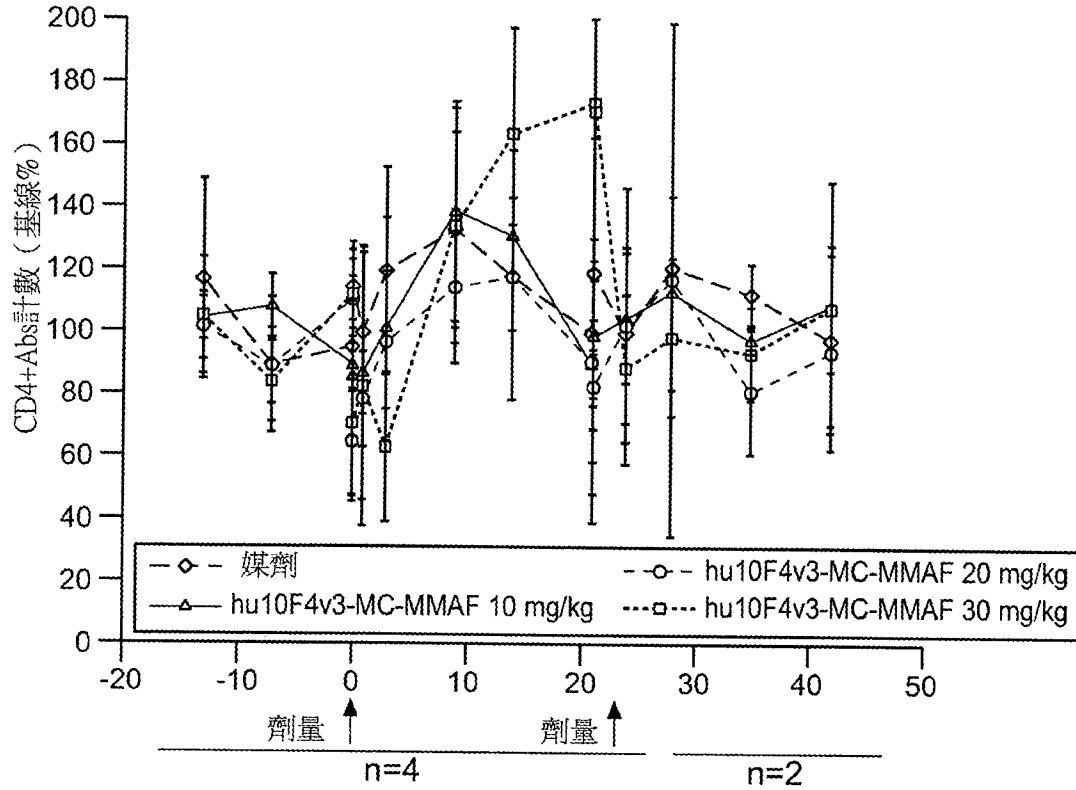


圖23A

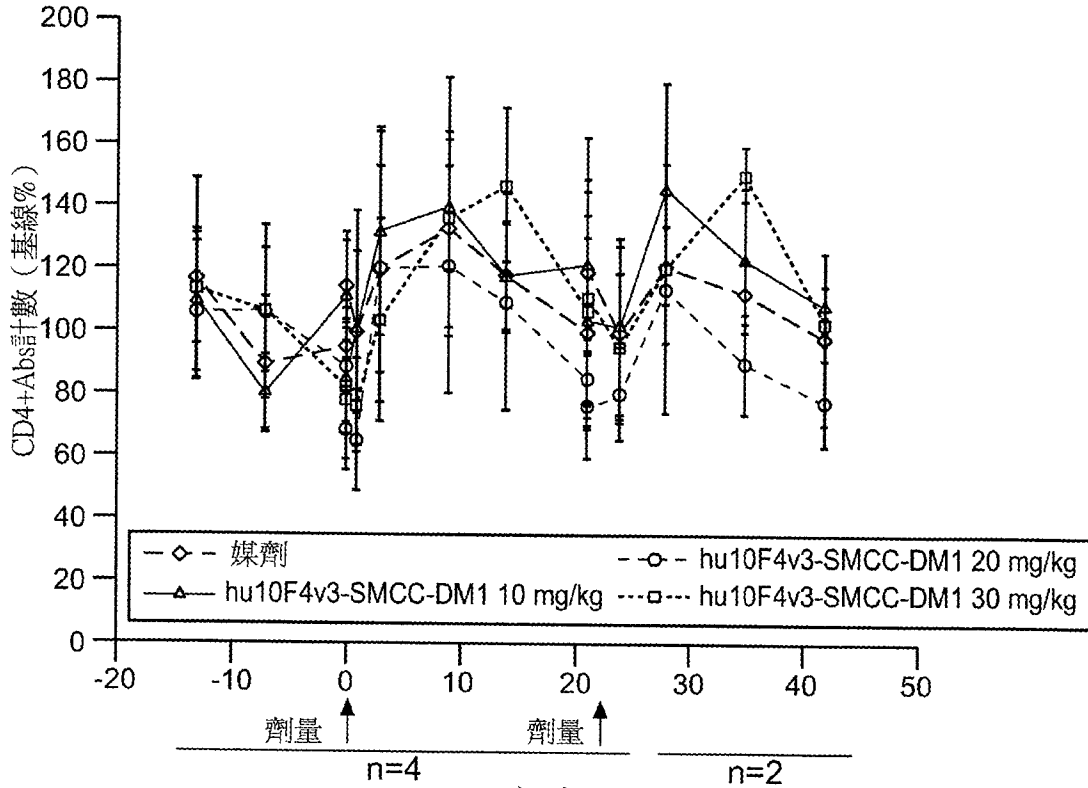


圖23B

媒劑對照物扁桃體

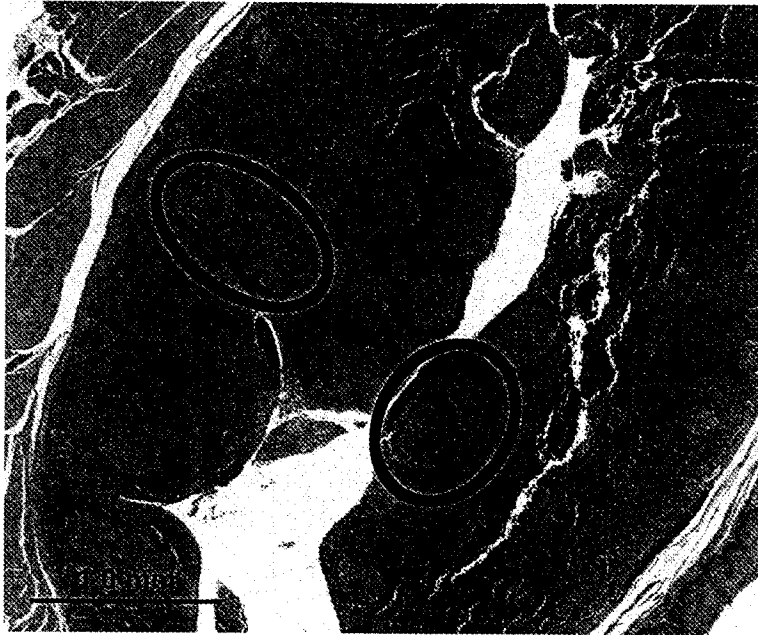


圖24A

hu10F4v3-SMCC-DM1扁桃體



圖24B

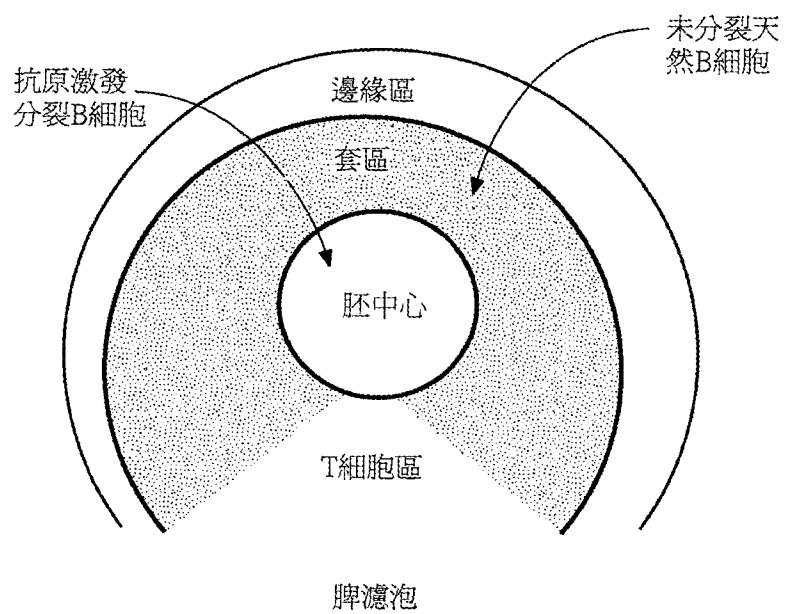
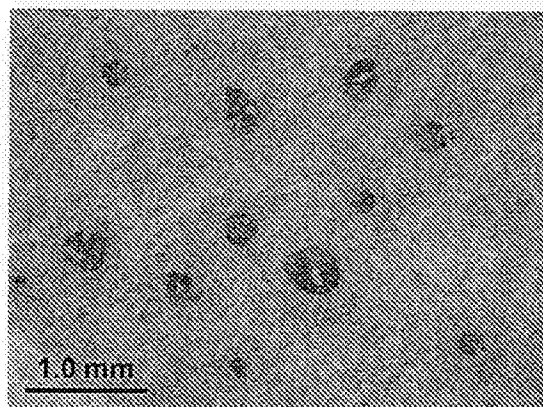


圖25A

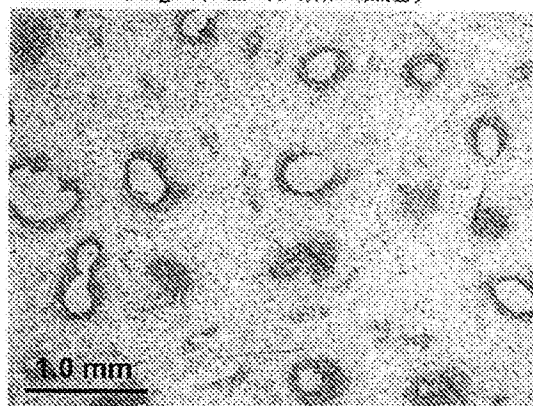
Ki-67染色 (分裂細胞)



媒劑

圖25B

抗IgD染色 (天然B細胞)



媒劑

圖25D

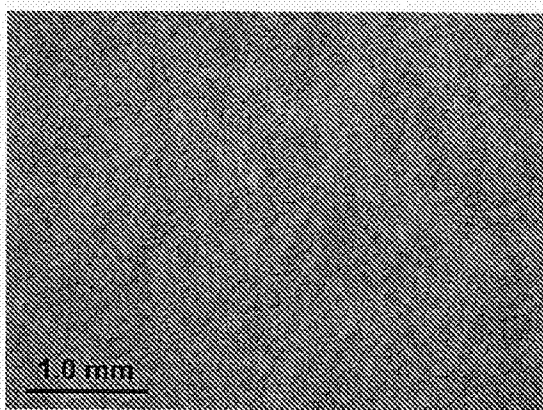
抗-CD22-MC-MMAF
(10 mg/kg)

圖25C

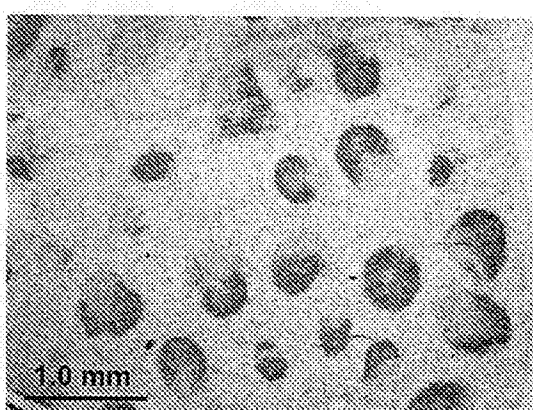
抗-CD22-MC-MMAF
(10 mg/kg)

圖25E



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類7 A61K 47/48, 47/30, 47/26, 31/47	A1	(11) 国際公開番号 WO00/25825 (43) 国際公開日 2000年5月11日(11.05.00)
(21) 国際出願番号 PCT/JP99/06016 (22) 国際出願日 1999年10月29日(29.10.99) (30) 優先権データ 特願平10/310130 1998年10月30日(30.10.98) JP 特願平10/329272 1998年11月19日(19.11.98) JP (71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 第一製薬株式会社 (DAIICHI PHARMACEUTICAL CO., LTD.)[JP/JP] 〒103-8234 東京都中央区日本橋3丁目14番10号 Tokyo, (JP) (72) 発明者 ; および (75) 発明者 / 出願人 (米国についてのみ) 洲崎 浩(SUSAKI, Hiroshi)[JP/JP] 井上和弘(INOUE, Kazuhiro)[JP/JP] 久我 洋(KUGA, Hiroshi)[JP/JP] 池田政浩(IKEDA, Masahiro)[JP/JP] 塩瀬能伸(SHIOSE, Yoshinobu)[JP/JP] 是永 博(KORENAGA, Hiroshi)[JP/JP] 〒134-8630 東京都江戸川区北葛西1丁目16番13号 第一製薬株式会社 東京研究開発センター内 Tokyo, (JP)		(74) 代理人 今村正純, 外(IMAMURA, Masazumi et al.) 〒104-0031 東京都中央区京橋1丁目5番5号 KRFビル5階 Tokyo, (JP) (81) 指定国 AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM) 添付公開書類 国際調査報告書
(54) Title: DDS COMPOUNDS AND METHOD FOR ASSAYING THE SAME (54) 発明の名称 DDS化合物及びその測定方法 (57) Abstract A method for assaying a DDS compound containing a saccharide compound-modified carboxy C _{1,4} alkyl dextran polyalcohol and a drug compound residue bonded to this carboxy C _{1,4} alkyl dextran polyalcohol, or a DDS compound wherein a polymer carrier is bonded to a drug compound residue via a spacer containing 2 to 8 amino acids bonded together via peptide bonds, which involves the step of assaying a hydrolysate obtained by treating the DDS compound with peptidase.		

(57)要約

糖化合物で修飾されたカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールと該カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールに結合した医薬化合物の残基とを含むDD S化合物、及びペプチド結合した2から8個のアミノ酸を含むスパーサーを介して高分子キャリアーと医薬化合物の残基とが結合したDD S化合物の測定方法であって、該DD S化合物をペプチダーゼで処理することにより得られる加水分解物を測定する工程を含む方法。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AL	アルバニア	EE	エストニア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LK	スリ・ランカ	SG	シンガポール
AU	オーストラリア	FR	フランス	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LS	レソト	SK	スロヴァキア
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BE	ベルギー	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	SZ	スワジランド
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MA	モロッコ	TD	チャード
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MC	モナコ	TG	トーゴ
BJ	ベナン	GN	ギニア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BR	ブラジル	GW	ギニア・ビサオ	MG	マダガスカル	TZ	タンザニア
BY	ベラルーシ	GR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TM	トルクメニスタン
CA	カナダ	HR	クロアチア		共和国	TR	トルコ
CF	中央アフリカ	HU	ハンガリー	ML	マリ	TT	トリニダード・トバゴ
CG	コンゴ	ID	インドネシア	MN	モンゴル	UA	ウクライナ
CH	スイス	IE	アイルランド	MR	モーリタニア	UG	ウガンダ
CI	コートジボアール	IL	イスラエル	MW	マラウイ	US	米国
CM	カメルーン	IN	インド	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
CN	中国	IS	アイスランド	NE	ニジェール	VN	ヴェトナム
CR	コスタ・リカ	IT	イタリア	NL	オランダ	YU	ユーゴスラビア
CY	キプロス	JP	日本	NO	ノルウェー	ZA	南アフリカ共和国
CZ	チェコ	KE	ケニア	NZ	ニュージーランド	ZW	ジンバブエ
DE	ドイツ	KG	キルギスタン	PL	ポーランド		
DK	デンマーク	KP	北朝鮮	PT	ポルトガル		
		KR	韓国	RO	ルーマニア		

WO 00/25825

PCT/JP99/06016

明 細 書

D D S 化合物及びその測定方法

技術分野

本発明は、糖化合物で修飾されたカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールと抗腫瘍剤などの医薬化合物とを結合させた D D S 化合物（D D S：ドラッグ・デリバリー・システム）に関するものである。また、本発明は、高分子キャリアーと抗腫瘍剤などの医薬化合物とを結合させた D D S 化合物の測定方法に関するものである。

背景技術

肺癌や消化器癌などの固形癌や白血病などの血液癌の治療に際して用いられる抗腫瘍剤は、静脈内投与や経口投与などの投与経路により全身的に投与された後、特定の腫瘍部位に移行して癌細胞の増殖を阻害ないし抑制することにより治療効果を発揮する。しかしながら、全身投与された抗腫瘍剤は、血中から肝臓・網内系臓器に速やかに取り込まれたり、あるいは速やかに尿中排泄されるために、血中濃度が低下して腫瘍部位への移行が十分でない場合がある。また、通常の抗腫瘍剤自体では腫瘍部位への移行選択性（腫瘍選択性）が低いために、抗腫瘍剤が全身の様々な細胞や組織に満遍なく分布してしまい、正常な細胞や組織に対しても細胞毒として作用するので、嘔吐、発熱、あるいは脱毛などの副作用を極めて高率に発生させるという問題がある。従って、抗腫瘍剤を効率的かつ選択的に腫瘍部位に移行させる手段の開発が求められている。

このような手段の一つとして、カルボキシル基を有する多糖化合物を高分子キャリアーとして用い、該高分子キャリアーに対して抗腫瘍剤を結合させて抗腫瘍剤の血中における消失を遅延させるとともに、癌組織への指向性を高める方法が提案されている。例えば、国際公開 W094/19376 号には、カルボキシル基を有す

WO 00/25825

PCT/JP99/06016

る多糖のカルボキシル基にペプチド鎖（アミノ酸数 1 から 8 ）が結合されており、さらにこのペプチド鎖を介してドキソルビシン、ダウノルビシン、マイトマイシン C、又はブレオマイシンなどを結合した D D S 化合物が開示されている。また、特公平 7-84481 号公報には、カルボキシメチル化されたマンノグルカン誘導体にシッフ塩基や酸アミド結合を介して上記の抗腫瘍剤を導入した D D S 化合物が開示されている。

これらの D D S 化合物（「薬物複合体」と呼ばれる場合もある）は、高分子キャリアーに結合された抗腫瘍剤を単独で用いた場合に比べてより優れた抗腫瘍効果を有するとともに、毒性・副作用が軽減されていることを特徴としている。本発明者らは、多糖化合物などの高分子キャリアーと抗腫瘍剤などの医薬化合物とを 1 から 8 個のアミノ酸からなるスペーサーを介して結合させることにより、抗腫瘍剤などの医薬化合物を目的組織に対して部位選択的に移行させることができる D D S 化合物を提供している（国際公開 W097/46260 号）。また、カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールが高分子キャリアーとして極めて優れた性質を有していることを見出し、カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールを高分子キャリアーとして含む D D S 化合物を提供した（上記国際公開）。

その他、ポリアルコール化多糖化合物を高分子キャリアーとして用いた D D S 化合物に関する技術については、「多糖－ペプチド－ドキソルビシン複合体に関する研究・多糖化合物の血中安定性と抗腫瘍効果の関係」（第 10 回日本 D D S 学会講演要旨集, 279, 1994）；「多糖－ペプチド－ドキソルビシン複合体に関する研究・体内動態と抗腫瘍効果」（第 9 回日本薬物動態学会年会講演要旨集, 292, 1994）；第 19 回研究開発動向セミナー（医薬品機構主催）要旨集, D-9, 1995；及び「多糖キャリアーによる腫瘍への薬物送達に関する研究」（第 12 回コロイド・界面技術シンポジウム, 日本化学会, 講演要旨集, 51, 1995）などの報告がある。

多糖化合物などの高分子キャリアーの臓器指向性を高める方法として、例えば、糖修飾ポリグルタミン酸誘導体（特開平 5-178986 号公報）、糖修飾ポリリジン誘導体（特開平 5-222187 号公報）、ポリ- ϵ -置換-L-リジンの D-ガラクトピラノシ

WO 00/25825

PCT/JP99/06016

ル-グルコン酸誘導体（特開平 7-70311 号公報）、糖修飾ポリ- ω -置換-L-グルタミン酸誘導体（特開平 7-228688 号公報）、リンカーを介して糖化合物を結合させた多糖化合物（特開平 8-85703 号公報）、及びグルコシル-蛋白誘導体（特開平 9-118699 号公報）などが知られている。しかしながら、従来、カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールを高分子キャリアーとして利用した D D S 化合物の臓器指向性を高める方法は報告されていない。

一方、高分子キャリアーと医薬化合物の残基とがオリゴペプチドを含むスペーサーを介して結合した D D S 化合物を臨床で使用する場合には、D D S 化合物自体の血中濃度を正確に測定することが必要であり、また、適正な投与量を決定したり、製品のロット差を検定するためには、D D S 化合物中に導入された抗腫瘍剤などの医薬化合物の残基の含有量を正確に測定する必要がある。従来、D D S 化合物の血中濃度の測定や D D S 化合物の医薬化合物の残基の含有量測定は、医薬化合物の発する蛍光や U V 吸収を指標にして、D D S 化合物より医薬化合物またはこれにスペーサーの一部が結合した化合物を切り離すことなく、D D S 化合物自体を直接測定することにより行われている。また、D D S 化合物自体の N M R 測定による方法や、D D S 化合物を酸処理して生じる分解物を測定する方法も提案されている。

しかしながら、医薬化合物が酸に対して不安定である場合には、酸処理等による分解物の定量法を利用することはできず、N M R 測定による定量は精度が低いという問題がある。また、D D S 化合物に存在する医薬化合物の残基の U V 吸収は、高分子キャリアーやペプチドスペーサーから受ける影響により、医薬化合物自体に比べて極大波長がシフトしたりモル吸光係数が変化している場合があるため、D D S 化合物中に導入された医薬化合物の残基の含有量を正確に測定することは一般に困難である。さらに、生体に投与された組織中の D D S 化合物を N M R 測定による方法や U V 吸収により定量することは極めて困難である。

WO 00/25825

PCT/JP99/06016

発明の開示

本発明の課題は、カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールを高分子キャリアーとして含むDDS化合物の臓器指向性(例えば肝臓への指向性など)を高める手段を提供し、上記の特徴を有するDDS化合物を提供することにある。

本発明の別の課題は、上記の特徴を有するDDS化合物の製造用原料として有用な多糖化合物を提供することにある。

本発明のさらに別の課題は、高分子キャリアーと医薬化合物の残基とがオリゴペプチドを含むスペーサーを介して結合したDDS化合物の測定方法を提供することにある。より具体的には、本発明の課題は、DDS化合物自体、又はDDS化合物中に導入された抗腫瘍剤などの医薬化合物の残基の含有量を正確に測定する方法を提供することにある。さらに具体的には、投与されたDDS化合物の血中濃度や組織内濃度を正確に定量することができ、あるいはDDS化合物に導入された医薬化合物の残基の含有量を正確に定量可能な測定方法を提供することが本発明の課題である。

本発明者らは上記の課題を解決すべく鋭意研究を行ったところ、糖化合物で修飾したカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールを高分子キャリアーとして用いると、極めて臓器指向性の高いDDS化合物を製造することができ、特にガラクトースを結合させたカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールを含むDDS化合物は優れた肝臓指向性を有していることを見出した。

また、本発明者らは、高分子キャリアーと医薬化合物の残基とがオリゴペプチドを含むスペーサーを介して結合したDDS化合物をペプチダーゼで処理し、得られた加水分解物を測定することによって、DDS化合物の血中濃度やDDS化合物に導入された医薬化合物の残基の含有量を正確に、かつ簡便に定量することができることを見出した。本発明は上記の知見を基にして完成されたものである。

すなわち本発明は、糖化合物で修飾されたカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールと該カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールに結合した医薬化合物の残基とを含むDDS化合物を提供するものである。

WO 00/25825

PCT/JP99/06016

この発明の好ましい態様によれば、糖化合物で修飾されたカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールと医薬化合物の残基とがスパーサーを介して結合した上記 D D S 化合物；スパーサーが 1 個のアミノ酸又はペプチド結合した 2 から 8 個のアミノ酸である上記 D D S 化合物；糖化合物で修飾されたカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールが、糖化合物とカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールとがリンカーを介して結合したものである上記 D D S 化合物；及び、糖化合物で修飾されたカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールがリンカーを介して糖化合物によりクラスター修飾されたものである上記 D D S 化合物が提供される。

また、本発明により、カルボキシ C_{1-4} アルキル部分の一部のカルボキシル基が糖化合物で修飾されたカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールに対して医薬化合物の残基を結合させることにより製造することができる D D S 化合物が提供される。

この発明の好ましい態様によれば、該カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールと医薬化合物の残基とをスパーサーを介して結合させることにより製造することができる上記 D D S 化合物；及び、カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールのカルボキシ C_{1-4} アルキル部分の一部のカルボキシル基に糖化合物又は糖化合物に結合したリンカーを結合させることにより製造された該カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールに対して医薬化合物の残基を結合させることにより製造することができる上記 D D S 化合物が提供される。

さらに、本発明により、カルボキシ C_{1-4} アルキル部分の一部のカルボキシル基に医薬化合物の残基がスパーサーを介して結合したカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールを糖化合物で修飾することにより製造することができる D D S 化合物が提供される。

この発明の好ましい態様によれば、該カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールと糖化合物とをリンカーを介して結合させることにより製造することができる上記 D D S 化合物；及び、カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリ

WO 00/25825

PCT/JP99/06016

アルコールのカルボキシ C_{1-4} アルキル部分の一部のカルボキシル基に 1 個のアミノ酸からなるスペーサー又はペプチド結合した 2 から 8 個のアミノ酸からなるスペーサーを介して医薬化合物の残基を結合させることにより製造された該カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールを糖化合物で修飾することにより製造することができる上記 D D S 化合物が提供される。

本発明のさらに好ましい態様によれば、糖化合物がガラクトース若しくはガラクトサミン又はそれらの誘導体である上記 D D S 化合物；カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールを構成するデキストランポリアルコールが、実質的に完全にポリアルコール化可能な条件下でデキストランを処理して得られたデキストランポリアルコールである上記 D D S 化合物；カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールがカルボキシメチルデキストランポリアルコールである上記 D D S 化合物；ガラクトース若しくはガラクトサミン又はそれらの誘導体、あるいはクラスター化されたガラクトース若しくはガラクトサミン又はそれらの誘導体の置換度がカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールの糖残基あたり 0.01~1.0 である上記 D D S 化合物；医薬化合物が抗腫瘍剤又は抗炎症剤である上記 D D S 化合物；医薬化合物が (1S, 9S)-1-アミノ-9-エチル-5-フルオロ-2,3-ジヒドロ-9-ハイドロキシ-4-メチル-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオンである上記 D D S 化合物；及び肝臓癌治療剤である上記 D D S 化合物が提供される。

別の観点からは、糖化合物で修飾されたカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコール；糖化合物で修飾されたカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールからなる高分子キャリアー；及び上記 D D S 化合物の製造に使用するための、糖化合物で修飾されたカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールが本発明により提供される。また、別の観点からは、上記 D D S 化合物の製造のための、糖化合物で修飾されたカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールの使用が提供される。

さらに別の観点からは、本発明により、ペプチド結合した 2 から 8 個のアミノ

WO 00/25825

PCT/JP99/06016

酸を含むスパーサーを介して高分子キャリアーと医薬化合物の残基とが結合した D D S 化合物の測定方法であって、該 D D S 化合物をペプチダーゼで処理することにより得られる加水分解物を測定する工程を含む方法が本発明により提供される。

この発明の好ましい態様によれば、生体試料中に含まれる該 D D S 化合物の濃度測定に用いる上記方法；該 D D S 化合物に導入された医薬化合物の残基の含有量を測定するために用いる上記方法；該加水分解物が医薬化合物である上記方法；該加水分解物が医薬化合物の残基にスパーサーの一部が結合した化合物である上記方法；及び、スパーサーの一部がスパーサー由来の 1 個のアミノ酸である上記方法が提供される。

上記発明のさらに好ましい態様によれば、該高分子キャリアーがカルボキシル基を有する高分子キャリアー、好ましくは多糖誘導体である上記方法；該高分子キャリアーがカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコール、好ましくはカルボキシメチルデキストランポリアルコールである上記方法；カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールを構成するデキストランポリアルコールが、実質的に完全にポリアルコール化可能な条件下でデキストランを処理して得られたデキストランポリアルコールであることを特徴とする上記方法；該高分子キャリアーが糖化合物で修飾されたものである上記方法；該 D D S 化合物中に導入された医薬化合物が抗腫瘍剤又は抗炎症剤である上記方法；スパーサーが N 末端側から -Gly-Gly-Phe-Gly- で表されるテトラペプチド又は N 末端側から -Gly-Gly-Gly-Phe- で表されるテトラペプチドである上記方法；スパーサーが N 末端側から -Gly-Gly-Phe-Gly-NH-Y'-CH₂-O-CO- で表される基又は N 末端側から -Gly-Gly-Gly-Phe-NH-Y'-CH₂-O-CO- で表される基（式中、Y' は p-フェニレン基を示す）である上記方法；ペプチダーゼが α -キモトリプシン又はパパインである上記方法；及び、医薬化合物が (1S,9S)-1-アミノ-9-エチル-5-フルオロ-2,3-ジヒドロ-9-ヒドロキシ-4-メチル-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオンである上記方法が提供される。

WO 00/25825

PCT/JP99/06016

上記発明の特に好ましい態様では、上記方法はN末端側から-Gly-Gly-Phe-Gly-で表されるテトラペプチド又はN末端側から-Gly-Gly-Gly-Phe-で表されるテトラペプチド含むスペーサーを介してカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールと(1S,9S)-1-アミノ-9-エチル-5-フルオロ-2,3-ジヒドロ-9-ヒドロキシ-4-メチル-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオンとが結合したDDS化合物の測定に用いることができ、ペプチダーゼとして α -キモトリプシンを用い、加水分解物として(1S,9S)-9-エチル-5-フルオロ-1-グリシルアミノ-2,3-ジヒドロ-9-ヒドロキシ-4-メチル-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオンを測定することにより、上記DDS化合物又は上記DDS化合物に導入された上記抗腫瘍剤の含有量を定量することができる。

図面の簡単な説明

第1図 本発明の方法(例4)で測定したDDS化合物の血中及び腹水中濃度を示した図である。

第2図 本発明の方法(例5)で測定したDDS化合物の血中及び腹水中濃度を示した図である。

第3図 糖化合物で修飾された高分子キャリアーを有する本発明のDDS化合物(例6)の紫外線吸収スペクトルを示す図である。

第4図 糖化合物で修飾された高分子キャリアーを有する本発明のDDS化合物(例6)のGPCチャートを示す図である。

第5図 例6で製造したDDS化合物((C)及び(D))の肝臓への集積性を示す図である。

第6図 本発明のDDS化合物(例6(D))の紫外線吸収スペクトルを示す図である。

第7図 本発明のDDS化合物(例7)の紫外線吸収スペクトルを示す図である。

第8図 本発明のDDS化合物(例9)の紫外線吸収スペクトルを示す図である。

WO 00/25825

PCT/JP99/06016

第 9 図 本発明の D D S 化合物（例 6 (D)）の GPC チャートを示す図である。

第 10 図 本発明の D D S 化合物（例 7）の GPC チャートを示す図である。

第 11 図 本発明の D D S 化合物（例 9）の GPC チャートを示す図である。

発明を実施するための最良の形態

本発明の D D S 化合物は、糖化合物で修飾されたカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールと該カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールに結合した医薬化合物の残基とを含むことを特徴としている。より具体的には、本発明の D D S 化合物は、(1) 糖化合物で修飾されたカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールと医薬化合物の残基とがスパーサーを介さずに結合している場合；及び(2) 糖化合物で修飾されたカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールと医薬化合物の残基とがスパーサーを介して結合している場合のいずれをも包含する。

糖化合物で修飾されたカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールと医薬化合物の残基とがスパーサーを介して結合している場合の例としては、例えば、カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールと医薬化合物の残基とが 1 個のアミノ酸からなるスパーサーで結合している場合、又はカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールと医薬化合物の残基とがペプチド結合した 2 から 8 個のアミノ酸からなるスパーサーを介して結合している場合や、ペプチド結合した 2 から 8 個のアミノ酸からなるオリゴペプチドに $-NH-Y-CO-$ [式中、Y は炭素数 1 から 8 個のアルキレン基又は $-C_6H_4-CH_2-O-$ ($-C_6H_4-$ はフェニレン基を示し、該フェニレン基は 1 又は 2 個以上の置換基を有していてもよく、好ましくは *p*-フェニレン基である) で表される基を示す] で表される連結基が結合したスパーサーを介して結合している場合などを挙げることができる。本明細書において用いられる「修飾」という用語は、糖化合物とカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールとが直接的に、又はリンカーを介して間接的に共有結合によって結合した状態を含めて最も広義に解釈すべきであり、いかなる意味において

WO 00/25825

PCT/JP99/06016

も限定的に解釈してはならない。

上記のDDS化合物に含まれる医薬化合物の残基は、例えば、抗腫瘍剤、抗炎症剤、抗菌剤などの医薬としてヒトを含む哺乳類の病気の治療及び／又は予防に用いられる医薬化合物の主要な部分構造を意味している。もっとも、該医薬化合物の用途は上記のものに限定されることはなく、医薬化合物としては、カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコール又はスペーサーとの結合に関与できる1又は2以上の反応性官能基（例えば、アミノ基、カルボキシ基、水酸基、チオール基、エステル基など）を有するものであればいかなるものを用いてもよい。医薬化合物の残基は、カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールのカルボキシ基、スペーサーに存在する反応性官能基（例えば、ペプチドスペーサーを用いる場合には、そのN末端アミノ基若しくはC末端カルボキシ基、又はスペーサーを構成するアミノ酸に存在する反応性官能基）に結合していてもよい。また、本明細書において医薬化合物という場合には、それ自体が医薬作用を有する化合物の主要構造をその部分構造として含み生体内で該化合物を再生することができるプロドラッグ化合物も含まれる。

上記発明において、医薬化合物の残基とは、カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコール又はスペーサーと医薬化合物の残基との結合が、医薬化合物中の反応性官能基とカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコール又はスペーサー中の反応性官能基との反応（例えば脱水縮合など）により形成されたと仮定した場合において、結合後の化合物中に存在する医薬化合物に由来する部分構造のことである。例えば、医薬化合物が $D-NH_2$, $D-COOH$, $D-COOR$, $D-OH$, $D-SH$, $D-CONH_2$, $D-NH-COOR$ (R は低級アルキル基等)で表される場合、医薬化合物の残基はそれぞれ $D-NH-$ ($D-NH-CO-Q$ など), $D-CO-$ ($D-CO-NH-Q$, $D-CO-O-Q$, $D-CO-S-Q$ など), $D-CO-$ ($D-CO-NH-Q$, $D-CO-O-Q$, $D-CO-S-Q$ など), $D-O-$ ($D-O-CO-Q$, $D-O-Q$ など), $D-S-$ ($D-S-CO-Q$, $D-S-Q$ など), $D-CONH-$ ($D-CO-NH-CO-Q$ など), $D-NH-CO-$ ($D-NH-CO-O-Q$, $D-NH-CO-NH-Q$ など) で表される（カッコ内はスペーサー又はカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールと医薬化合物の残基との結合を

WO 00/25825

PCT/JP99/06016

示し、Q はスペーサー及びカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールからそれぞれ反応性官能基及びカルボキシル基を除いた残りの部分構造を示す)。もっとも、スペーサー又はカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールと医薬化合物の残基との結合の種類は上記のものに限定されることはない。

医薬化合物の残基としては、例えば、ドキソルビシン、ダウノルビシン、マイトマイシンC、ブレオマイシン、シクロシチジン、ビンクリスチン、ビンブラスチン、メトトレキセート、白金系抗腫瘍剤（シスプラチン若しくはその誘導体）、タキソール若しくはその誘導体、カンプトテシン若しくはその誘導体（特開平6-87746号公報に記載された抗腫瘍剤、好ましくは請求項2に記載された(1S,9S)-1-アミノ-9-エチル-5-フルオロ-2,3-ジヒドロ-9-ヒドロキシ-4-メチル-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオン等）などの抗腫瘍剤の残基を好適に用いることができる。また、例えば、コハク酸ヒドロコルチゾン、コハク酸プレドニゾロンなどのステロイド系抗炎症剤、又はメフェナム酸、フルフェナム酸、ジクロフェナク、イブプロフェン、チノリジンなどの非ステロイド系抗炎症薬の残基も好適である。

医薬化合物の残基とカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールとを結合するスペーサーとして、1個のアミノ酸からなるスペーサー又はペプチド結合した2から8個のアミノ酸からなるスペーサーを用いる場合には、該スペーサーは、1個のアミノ酸の残基（アミノ酸のアミノ基及びカルボキシル基からそれぞれ1個の水素原子及び1個の水酸基を除いた残基を意味する）、又はペプチド結合した2ないし8個のアミノ酸からなるオリゴペプチドの残基（N末端のアミノ基及びC末端のカルボキシル基からそれぞれ1個の水素原子及び1個の水酸基を除いた残基を意味する）の形態を有している。

好ましいスペーサーは2から6個のアミノ酸からなるオリゴペプチドの残基である。スペーサーを構成するアミノ酸の種類は特に限定されないが、例えば、L-又はD-アミノ酸、好ましくはL-アミノ酸を用いることができ、 α -アミノ酸のほか、 β -アラニン、 ϵ -アミノカプロン酸、 γ -アミノ酪酸などを用いてもよい。

WO 00/25825

PCT/JP99/06016

このような α -アミノ酸以外のアミノ酸は、スパーサー中で多糖化合物に近接した位置に配置されることが好ましい。

例えばオリゴペプチドスパーサーを用いる場合の結合方向は特に限定されないが、一般的には、カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールのカルボキシル基にスパーサーのN末端を酸アミド結合によって結合し、医薬化合物のアミノ基にスパーサーのC末端を結合することできる。また、例えば、ペプチドスパーサーの構成単位としてリジン残基を含めておき、リジン残基の α -アミノ基及び ϵ -アミノ基をそれぞれ他のアミノ酸のカルボキシル基と酸アミド結合させると、ペプチドスパーサーの両末端がN末端になるので、医薬化合物のカルボキシル基を結合することが可能になる。さらに、スパーサー中に1個又は2個以上のジアミン化合物またはジカルボン酸化合物の残基（例えばエチレンジアミンなどのジアミンの残基やコハク酸などのジカルボン酸の残基など）を構成単位として含めておき、それぞれ両末端がN末端のスパーサー及び両末端がC末端のスパーサーを利用してもよい。

オリゴペプチドからなるスパーサーを用いる場合のアミノ酸配列は特に限定されないが、例えば、スパーサーが $-X-Z-$ で表されるジペプチドの残基（X は疎水性アミノ酸の残基を示し、Z は親水性アミノ酸の残基を示し、 $-X-Z-$ は疎水性アミノ酸(X)と親水性アミノ酸(Z) とがそれぞれN末端側及びC末端側となってペプチド結合したジペプチドのN末端のアミノ基及びC末端のカルボキシル基からそれぞれ1個の水素原子及び1個の水酸基を除いた残基を意味する）であるか、又は該ジペプチドの残基を部分ペプチド配列として含むスパーサーを好適に用いることができる。疎水性アミノ酸としては、例えば、フェニルアラニン、チロシン、ロイシンなどを用いることができ、親水性アミノ酸としては、例えば、グリシン、アラニンなどを用いることができる。スパーサーがこのようなジペプチド残基の繰り返し配列（例えば $-X-Z-X-Z-$ 、 $-X-Z-X-Z-X-Z-$ など）を有していてもよい。

このようなジペプチド構造を含むスパーサーを用いると、スパーサーがペプチダーゼが豊富であると考えられる腫瘍部位や炎症部位で加水分解され、当該部位

WO 00/25825

PCT/JP99/06016

において短時間に高濃度の医薬化合物が遊離する。従って、上記ジペプチドを含むスペーサーと医薬化合物とが結合して形成される部分構造は、本発明のD D S化合物の好ましい部分構造である。医薬化合物の残基として、濃度に依存型の抗腫瘍剤（例えば、ドキソルビシンなど）の残基を用いる場合には、-X-Z-で示される上記のジペプチド残基からなるスペーサー又は該ジペプチド残基を部分ペプチド配列として含むスペーサーを用いることが好ましい。

また、医薬化合物の残基として、一定の濃度以上で作用時間の持続を必要とする時間依存型の抗腫瘍剤を用いる場合にも、上記のスペーサーを用いることによって高い抗腫瘍効果を達成できる場合がある。このような抗腫瘍剤として、例えば、特開平 6-87746 号公報に記載された抗腫瘍剤、好ましくは請求項 2 に記載された抗腫瘍剤が挙げられる。一般的には、上記のスペーサーに限定されることなく、抗腫瘍剤の作用機構、体内動態や毒性発現の特徴、体内での抗腫瘍剤の遊離性などの観点から好ましいスペーサーを選択する必要がある。なお、一般的に、増殖の速い癌種に対しては、短時間に高濃度の医薬化合物を遊離することができる上記のスペーサーを選択することが好ましい。

スペーサーとして利用可能なオリゴペプチドの具体例を以下の表に示すが、D D S 化合物に必要な応じて用いられるスペーサーは以下のものに限定されることはなく、スペーサーを利用すべきか否かの選択、あるいはスペーサーを用いる場合にその種類の選択は、医薬化合物の至適な遊離速度を与えるように当業者が適宜なしうることはいうまでもない（表中、ペプチド配列は左側がN末端であり、C末端側に医薬化合物の残基が結合する。D-Phe は D-フェニルアラニン残基を示し、その他のアミノ酸は L-アミノ酸を示す。なお、遊離速度の大小はドキソルビシンを結合したD D S 化合物の Walker 256 担癌ラットに対する薬効の発現程度、またはWalker 256 担癌ラットの腫瘍部位における遊離ドキソルビシン濃度によって判定した。）。これらのスペーサーのうち、ドキソルビシンに対しては（N末端）-Gly-Gly-Phe-Gly-等の短時間に高濃度の医薬化合物を遊離することができるスペーサーを用いることが好ましい。

WO 00/25825

PCT/JP99/06016

表 1

(a) 遊離速度が大きいスペーサー

-Leu-Gly-

-Tyr-Gly-

-Phe-Gly-

-Gly-Phe-Gly-

-Gly-Gly-Phe-Gly-

-Gly-Phe-Gly-Gly-

-Phe-Gly-Gly-Gly-

-Phe-Phe-Gly-Gly-

-Gly-Gly-Gly-Phe-Gly-

(b) 遊離速度が比較的大きいスペーサー

-Gly-Gly-Phe-Phe-

-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-

(c) 遊離速度が比較的小さいスペーサー

-Phe-Phe-

-Ala-Gly-

-Pro-Gly-

-Gly-Gly-Gly-Phe-

(d) 遊離速度が小さいスペーサー

-Gly-

-D-Phe-Gly-

-Gly-Phe-

-Ser-Gly-

-Gly-Gly-

-Gly-Gly-Gly-

-Gly-Gly-Gly-Gly-

WO 00/25825

PCT/JP99/06016

本発明のDDS化合物は、高分子キャリアーとして、糖化合物で修飾されたカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールを有することを特徴としている。本発明のDDS化合物におけるカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールのポリアルコール化度は特に限定されないが、カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールを構成するデキストランポリアルコールが、実質的に完全にポリアルコール化可能な条件下においてデキストランを処理して得られたデキストランポリアルコールであることが好ましい。

カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールを製造するために用いるデキストランの種類は特に限定されず、 α -D-1,6-結合を任意の割合で含んでいてもよい。例えば、 α -D-1,6-結合の割合が 85%以上、90% 以上、又は 95% 以上のデキストランなどを用いることができる。デキストランの分子量は特に限定されないが、例えば 1,000 程度から 2,000,000 程度のもの、好ましくは 3,000 程度から 800,000 程度のものを用いることができる。カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールのカルボキシ C_{1-4} アルキル基を構成する C_{1-4} アルキルとしては、直鎖又は分枝鎖の C_{1-4} アルキル、具体的にはメチル基、エチル基、*n*-プロピル基、イソプロピル基、*n*-ブチル基、*sec*-ブチル基などを用いることができるが、好ましくはメチル基を用いることができる。

出発原料としてデキストランを用いる場合には、デキストランに大過剰の過ヨウ素酸ナトリウムと水素化ホウ素ナトリウムとを順次作用させてデキストランを実質的に完全にポリアルコール化したデキストランポリアルコールを製造することができる。もっとも、デキストランのポリアルコール化の方法は上記のものに限定されることはなく、当業者に利用可能なものであればいかなる方法を採用してもよい。カルボキシ C_{1-4} アルキル化は、例えば、デキストランポリアルコールの水酸基に対してクロル酢酸、ブロム酢酸、 α -クロルプロピオン酸、 α -メチルー α -クロルプロピオン酸、 β -クロルプロピオン酸、 α -メチルー β -クロルプロピオン酸、 α -クロル酪酸、 β -クロル酪酸、 γ -クロル酪酸などのハロゲン化 C_{1-4} アルキルカルボン酸、好ましくはクロル酢酸を反応させて水酸基を部

WO 00/25825

PCT/JP99/06016

分的又は完全にカルボキシ C_{1-4} アルキル化することにより行うことができる。

例えば、デキストランポリアルコールを反応に関与しない不活性溶媒(例えば、水、N,N-ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド等)に溶解し、塩基(例えば、水酸化ナトリウムや水酸化カリウム等)の存在下にハロゲン化 C_{1-4} アルキルカルボン酸またはその塩を添加し、氷冷下ないし 100 °C 程度の温度範囲で数分ないし数日間反応させればよい。カルボキシ C_{1-4} アルキル基の導入の程度は、例えば、カルボキシ C_{1-4} アルキル化の反応温度や試薬として用いるハロゲン化 C_{1-4} アルキルカルボン酸及び塩基の量を適宜選択することにより容易に調節可能であり、そのような手段は当業者に周知である。デキストランポリアルコールの糖残基に対するカルボキシ C_{1-4} アルキル化の程度は特に限定されないが、例えば、0.01 ~ 2.0 の範囲、好ましくは 0.1 ~ 1.0 の範囲である。

カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールを修飾する糖化合物の種類は特に限定されず、DDS 化合物が指向すべき臓器の種類や体内動態などの条件に応じて当業者が適宜選択可能である。糖化合物としては単糖類若しくはオリゴ糖類、又はそれらの誘導体のいずれを用いてもよい。また、糖化合物とカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールとの結合の種類は特に限定されない。糖化合物とカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールとが、例えば、0- α -グリコシド結合又は 0- β -グリコシド結合などにより直接結合していてもよく、あるいは適宜のリンカーを介して両者が結合していてもよい。本明細書において用いられる「リンカー」という用語は、糖化合物残基とカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールとの結合に用いられるいかなるものも包含するように、最も広義に解釈する必要がある。カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールに対する糖化合物の導入量(置換度)は特に限定されず、糖化合物の種類、所望の指向性の程度、医薬化合物の種類など種々の条件によって適宜選択可能であるが、一般的には、カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールの糖残基あたり 0.01-1.0 程度である。

リンカーを用いる場合、リンカーの種類は特に限定されないが、例えば、

WO 00/25825

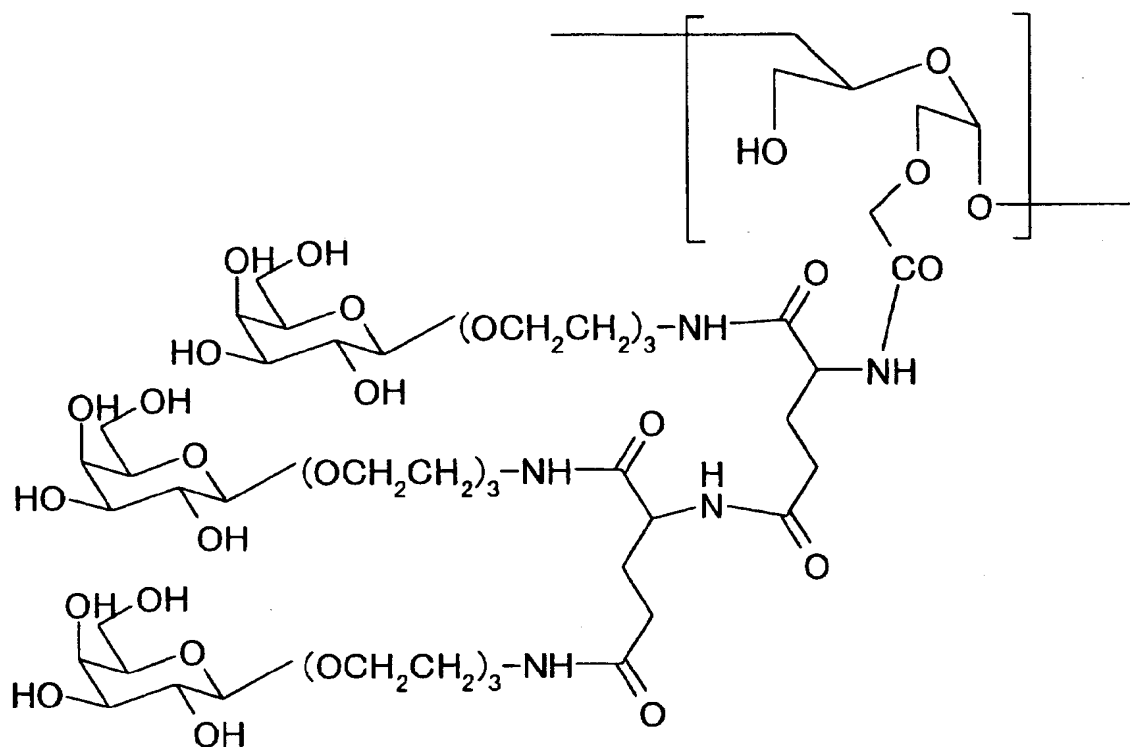
PCT/JP99/06016

$-O-(CH_2)_n-NH-$ (n は1から16の整数) 又は $-(O-CH_2CH_2)_m-NH-$ (m は1から10の整数) で表されるリンカーを利用することが好ましい。これらのリンカーのO末端又はN末端、好ましくはO末端を糖化合物にO- α -グリコシド結合又はO- β -グリコシド結合で結合し、他端をカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールのカルボキシル基とアミド結合又はエステル結合させることにより、カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールを糖化合物で修飾することが可能である。

また、いわゆるクラスター修飾に適するリンカーを用いることにより、クラスター修飾体を製造することもできる。クラスター修飾体は、カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールのカルボキシル基に対してクラスター修飾に適するリンカーを用いて糖化合物を房状に結合させた化合物であり、その具体的手段は、例えば、特許第2774417号明細書、特許第2774429号明細書、又はBiol. Pharm. Bull., 20, pp.259-266, 1997などに記載されている。クラスター修飾体は複数個の糖化合物を一定の空間内に配置するために、レセプターとの親和性が高まり、優れた臓器指向性を発揮できるという特徴がある。本発明のDDS化合物におけるクラスター修飾の一例を下記に示す(下記の構造式では、クラスター修飾されたカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコール分子の部分構造を示してあり、医薬化合物の残基は省略してある)。もっとも、本発明のDDS化合物に利用可能なクラスター修飾方法は下記の具体例に限定されることはなく、当業者が適宜の手段を選択できることは言うまでもない。

WO 00/25825

PCT/JP99/06016



単糖類としては、グルコース、フルクトース、マンノース、ガラクトース、ブコース、ノイラミン酸、ウロン酸などのヘキソース；ガラクトサミン、グルコサミンなどのヘキソサミン；リボース、デオキシリボース、アラビノース、キシロースなどのペントースなどを挙げることができる。これらの誘導体として、例えば、N-又はO-アシル誘導体、O-アルキル誘導体、硫酸エステル、リン酸エステルなどを用いてもよい。単糖類の誘導体として、より具体的には、N-アセチルノイラミン酸、N-アセチルガラクトサミン、N-アセチルグルコサミン、マンノース-6-リン酸、ガラクトース-3-リン酸、6-O-ベンゾイルグルコース、6-O-カルボキシメチル-N-アセチルグルコサミン、2-N-ベンジルグルコサミンなどを挙げることができる。オリゴ糖類としては、例えば、上記の単糖類又はそれらの誘導体から構成される直鎖状又は分枝鎖状のヘテロオリゴ糖又はホモオリゴ糖を用いることができる。より具体的には、シュークロース、シアリルルイスA、シアリルルイスX、ラクトース、マルトース、ルイスX、硫酸化ルイスXなどを用いることができる。

WO 00/25825

PCT/JP99/06016

これらのうち、肝臓指向性を高める糖化合物としては、ガラクトース若しくはガラクトサミン又はその誘導体、あるいはガラクトース又はN-アセチルガラクトサミンを非還元末端側に有するオリゴ糖（例えばラクトース）が好ましく、特にガラクトース又はN-アセチルガラクトサミンが好ましい。

本発明のDDS化合物の製造方法は特に限定されないが、以下に一般的な製造方法を示す。また、その一例を本明細書の実施例に具体的かつ詳細に示した。当業者は、下記の一般的説明及び実施例に記載された製造方法を参照しつつ、製造原料、反応試薬、及び反応条件などを適宜選択し、必要に応じてそれらの方法に修飾や改変を加えることにより、本発明に包含されるDDS化合物を容易に製造することが可能である。一般的には、カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールを適宜の方法に従って糖化合物で修飾し、該修飾体を医薬化合物の残基又は医薬化合物に結合したスペーサーと反応させることにより、本発明のDDS化合物を製造することができる。通常は、カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールをナトリウム塩又はカリウム塩などのアルカリ金属塩の形態の水溶液として調製し、糖化合物の修飾及び医薬化合物（又は医薬化合物に結合したスペーサー）との反応を水中、又は含水有機溶媒中で行うことができる。

あるいは、カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコール又は糖化合物で修飾されたカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールを有機アミン塩の形態に変換し、その後の反応を実質的に水を含まない有機溶媒中で行うことも可能である。有機アミンの塩としては、例えば、トリエチルアミン、トリメチルアミン、トリエタノールアミンなどの脂肪族アミン類の塩のほか、N-メチルピロリジン、N-メチルピペリジン、N-メチルモルホリン、ジメチルアミノピリジンなどの脂環式又は芳香族アミン類の塩、塩化テトラメチルアンモニウム、塩化テトラエチルアンモニウムなどの四級アンモニウム塩などを用いることができる。カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコール又は糖化合物で修飾されたカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールのナトリウム塩から有機アミンの塩への変換は、イオン交換樹脂などを用いて行うことができる。例えば、

WO 00/25825

PCT/JP99/06016

カルボキシメチルデキストランポリアルコール又はその糖化合物修飾体のナトリウム塩を水に溶解し、Bio-Rad AG50W-X2 (200-400 メッシュ、H⁺型) 樹脂を充填したカラムに付して水で溶出した後、トリエチルアミンなどの有機アミンを添加して凍結乾燥することができる。また、カルボキシメチルデキストランポリアルコール又はその糖化合物修飾体のナトリウム塩を水に溶解し、トリエチルアンモニウム型の樹脂を通過させることによって一工程で変換を行うことも可能である。

医薬化合物自体とカルボキシ C₁₋₄ アルキルデキストランポリアルコールのカルボキシル基との結合、又は医薬化合物を結合させたスペーサーとカルボキシ C₁₋₄ アルキルデキストランポリアルコールのカルボキシル基との結合は、一般的には、医薬化合物自体が有する反応性アミノ基又はスペーサーの反応性アミノ基（ペプチドスペーサーではN末端アミノ基など）とカルボキシ C₁₋₄ アルキルデキストランポリアルコールのカルボキシル基とを、酸アミド結合させればよい。もっとも、スペーサーとカルボキシ C₁₋₄ アルキルデキストランポリアルコールのカルボキシル基との結合は上記のものに限定されることはなく、他の化学結合や1又は2以上のスペーサーを利用した結合であってもよい。例えば、ペプチドスペーサーのC末端カルボキシル基又は医薬化合物のカルボキシル基とカルボキシ C₁₋₄ アルキルデキストランポリアルコールのカルボキシル基とにより酸無水物を形成させてもよく、また、エチレンジアミン等のジアミン化合物をスペーサーとして用いてそれぞれのカルボキシル基をジアミンの各アミノ基に酸アミド結合させてもよい。

医薬化合物自体が有する反応性アミノ基又はペプチドスペーサーのN末端アミノ基とカルボキシメチルデキストランポリアルコールのカルボキシル基とを酸アミド結合により結合させる場合には、ペプチド鎖の合成に用いる通常の脱水縮合剤、例えば、N,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC) のような N,N'-ジシクロアルキルカルボジイミド類、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド(EDAPC) 等のカルボジイミド誘導体、1-エトキシカルボニル-2-エトキシ-1,2-ジヒドロキシキノリン (EEDQ) などを用いることができる。この場合、必要に応じて 1-ヒドロキシベンゾトリアゾール(HOBT)のようなベンゾトリアゾ

WO 00/25825

PCT/JP99/06016

ール誘導体を加えてもよい。また、活性エステル法や酸ハライド法などにより反応を行ってもよい。

反応を非水系で行う場合の溶媒としては、実質的に水を含まない有機溶媒であって、反応種（糖化合物で修飾されたカルボキシメチルデキストランポリアルコールの有機アミンの塩及び医薬化合物又は医薬化合物を結合させたスペーサーなど）を溶解することができるものならばいかなるものを用いてもよい。例えば、N,N-ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド、アセトアミド、N-メチルピロリドン、スルホランなどを用いることが好適である。糖化合物で修飾されたカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールに導入される医薬化合物の残基の量は特に限定されないが、医薬化合物の残基の種類、並びにDDS化合物の体内動態、薬効、及び毒性などの観点から適宜選択すべきである。一般的には、0.1～30重量%、好ましくは2～15重量%程度の範囲を選択することができる。医薬化合物として特開平6-87746号公報の請求項2に記載された抗腫瘍剤を用いる場合の導入量は、例えば1～15重量%、好ましくは4～8重量%程度である。カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールに導入された医薬化合物の残基の割合は、例えば、吸光度分析などにより容易に決定することが可能である。

例えば、医薬化合物として特開平6-87746号公報の請求項2に記載された抗腫瘍剤を用いる場合、この医薬化合物は、酸性水性媒体中（例えばpH3程度）ではラクトン環を形成した化合物（閉環体）に平衡が偏り、一方、塩基性水性媒体中（例えばpH10程度）ではラクトン環が開環した化合物（開環体）に平衡が偏ることが知られている。このような閉環体及び開環体に対応する残基を導入したDDS化合物は同等の抗腫瘍効果を有しているが、糖化合物で修飾されたカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールと上記医薬化合物を結合させたスペーサー（例えばオリゴペプチドスペーサー）とを反応させる場合に開環型の反応種が反応系に存在すると、ラクトン環に由来するカルボキシル基とスペーサー由来のアミノ基との間で縮合反応が進行し、著しく反応収率が低下するだけでなく、目的とする均一なDDS化合物が得られない場合がある。このような副反応は、

WO 00/25825

PCT/JP99/06016

平衡が達成されない非水系において反応種として閉環体を用いることにより回避することができる。

本発明のD D S化合物は、医薬化合物の残基の種類（例えば、抗腫瘍剤または抗炎症剤などの医薬化合物の残基）に応じて、所望の医薬活性を腫瘍部位や炎症部位などの局所において特異的に発現させることができ、かつ、医薬化合物自体の有する毒性を低減できるという特徴を有する。また、本発明のD D S化合物は優れた血管透過性を有している。腫瘍部位や炎症部位ではプロテアーゼ（ペプチダーゼ）が発現されているため、オリゴペプチドからなるスペーサーを有するD D S化合物はスペーサー部分で容易に加水分解され、遊離した医薬化合物が細胞内に移行して薬効を発揮するか、または標的細胞の糖を認識するレセプターを介してD D S化合物が細胞内に取り込まれ、プロテアーゼにより遊離した薬物が薬効を発揮する。

また、カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールは生体内、例えば肝臓、脾臓、又は骨髄などで異物高分子として認識される程度が低い。このため、これらの臓器への移行性が低く、一方、糖化合物の種類に応じて対応の糖レセプターが豊富な臓器には高濃度で分布するという特徴がある。例えば、ガラクトースで修飾されたカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールを有する本発明のD D S化合物は、肝臓に対して優れた指向性を有している。従って、医薬化合物として抗腫瘍剤を結合したD D S化合物は、肝臓癌の治療に有用である。

本発明のD D S化合物を含む医薬は、通常、凍結乾燥品などの形態でバイアル等に充填することができ、用時溶解型の注射用または点滴用製剤等の非経口投与用製剤として臨床に提供されるが、このような医薬の製剤形態は上記態様に限定されることはない。上記製剤の製造には、例えば、溶解補助剤、pH 調節剤、安定化剤など当業界で利用可能な製剤用添加物を用いることができ、上記製剤は医薬組成物として調製することができる。上記医薬の投与量は特に限定されないが、通常は、医薬化合物の残基を構成する医薬化合物の投与量、D D S化合物中に導入された医薬化合物の残基の量、患者の状態や疾患の種類などを勘案して決定す

WO 00/25825

PCT/JP99/06016

べきである。例えば、特開平 6-87746 号公報の請求項 2 に記載された抗腫瘍剤の残基が約 6 重量% 程度の割合で導入された D D S 化合物を投与する場合には、非経口投与の場合には、一般に一日あたり体表面積 1 m^2 につき約 0.1~100 mg 程度、好ましくは約 1~30 mg の範囲で一回投与し、3~4 週毎に投与を繰り返すことが好ましい。

別の観点からは、本発明により、ペプチド結合した 2 から 8 個のアミノ酸を含むスペーサーを介して高分子キャリアーと医薬化合物の残基とが結合した D D S 化合物の測定方法であって、該 D D S 化合物をペプチダーゼで処理することにより得られる加水分解物を測定する工程を含む方法が本発明により提供される。

本明細書において用いられる「測定」という用語は、定量、定性などを目的として行われる測定を含めて、最も広義に解釈する必要があるが、好ましくは定量を意味している。本発明の測定方法の対象となる D D S 化合物は、ペプチド結合した 2 から 8 個のアミノ酸を含むスペーサーを介して高分子キャリアーと医薬化合物の残基とが結合した化合物であり、いかなる意味においても限定的に解釈してはならない。ペプチド結合した 2 から 8 個のアミノ酸を含むスペーサーとしては、ペプチド結合した 2 から 8 個のアミノ酸のみからなるスペーサーのほか、ペプチド結合した 2 から 8 個のアミノ酸からなるオリゴペプチドに $-\text{NH}-\text{Y}-\text{CO}-$ [式中、Y は炭素数 1 から 8 個のアルキレン基又は $-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}_2-\text{O}-$ ($-\text{C}_6\text{H}_4-$ はフェニレン基を示し、該フェニレン基は 1 又は 2 個以上の置換基を有していてもよく、好ましくは *p*-フェニレン基である) で表される基を示す] で表される連結基が結合したスペーサーなどを挙げることができる。本発明の測定方法は、例えば、血液や体液などの生体試料に含まれる D D S 化合物自体の濃度を測定するために用いることができる。また、本発明の方法は、D D S 化合物に導入された医薬化合物の残基の導入量（例えば、D D S 化合物全重量に対する医薬化合物の残基の重量% など）を測定するために用いることができる。

本発明の方法の測定対象である D D S 化合物に含まれる医薬化合物の残基の意味は上記に説明したものと同義であり、医薬化合物としては、スペーサーとの結

WO 00/25825

PCT/JP99/06016

合に関与できる 1 又は 2 以上の反応性官能基（例えば、アミノ基、カルボキシル基、水酸基、チオール基、エステル基など）を有するものであればいかなるものを用いてもよい。医薬化合物の残基は、スペーサーの N 末端アミノ基若しくは C 末端カルボキシル基、又はスペーサーを構成するアミノ酸に存在する反応性官能基に結合していてもよい。

医薬化合物の残基の具体例は、糖化合物で修飾されたカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールと医薬化合物の残基とがスペーサーを介して結合した上記 DDS 化合物について説明したとおりであり、好適に用いることができる医薬化合物の残基も同様である。

本発明の方法の測定対象である DDS 化合物に含まれる医薬化合物の残基の意味はスペーサーを介して高分子キャリアーと結合するが、好ましいスペーサーは、ペプチド結合した 2 から 8 個のアミノ酸からなるオリゴペプチドの残基、又はペプチド結合した 2 から 8 個のアミノ酸からなるオリゴペプチドに $-NH-Y'-CH_2-O-CO-$ （式中、 Y' は p-フェニレン基を示す）で表される連結基が結合したスペーサーであり、スペーサーを構成するアミノ酸の種類、スペーサーの結合方向、アミノ酸配列、具体例などは、糖化合物で修飾されたカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールと医薬化合物の残基とがオリゴペプチドスペーサーを介して結合した上記 DDS 化合物について説明したものと同様である。

本発明の方法の測定対象である DDS 化合物を構成する高分子キャリアーとしては、例えば、多糖誘導体のほか、合成高分子などを用いることができる。多糖誘導体及び合成高分子としては、生体に対して実質的に毒性を示さず、薬物担体として作用できるものであればいかなるものを用いてもよい。例えば、DDS 化合物の製造に従来より用いられている多糖誘導体及び合成高分子はいずれも高分子キャリアーとして利用可能である。例えば、カルボキシル基を有する多糖誘導体を好適に使用でき、ポリアルコール化多糖誘導体は特に好適に使用できる。また、合成高分子としては、例えば、ポリエチレングリコール類；ポリグルタミン酸、ポリアスパラギン酸、若しくはポリリジンなどのポリアミノ酸類；または

WO 00/25825

PCT/JP99/06016

N-(2-ヒドロキシプロピル)メタクリルアミド誘導体などのポリビニル化合物の誘導体を挙げることができる。

より具体的には、カルボキシル基を有する多糖誘導体としては、例えば、多糖類又はそれらを化学的若しくは生物学的に修飾した誘導体を用いることができ、好ましくは分子中にカルボキシル基を有するものを用いることができる。分子中にカルボキシル基を有する高分子キャリアーの例としては、ヒアルロン酸、ペクチン酸、アルギン酸、コンドロイチン、ヘパリンなどの多糖類のほか、プルラン、デキストラン、マンナン、キチン、イヌリン、レバン、キシラン、アラバン、マンノグルカン、キトサンなどの多糖の一部又は全部の水酸基に対してカルボキシル基を有する官能基を導入したものなどを用いることができる。例えば、水酸基をカルボキシ C_{1-4} アルキル化したものや、水酸基に多塩基酸の一のカルボキシル基をエステル結合させたものなどを好適に用いることができる。また、上記の多糖類をポリアルコール化した後に、カルボキシル基を有する官能基を導入したものを用いてもよい。

カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールを高分子キャリアーとして用いたDDS化合物は本発明の方法の特に好適な測定対象である。カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールのポリアルコール化度、製造に用いるデキストランの種類、及び製造方法などは、糖化合物で修飾されたカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールと医薬化合物の残基とがスペーサーを介して結合した上記DDS化合物について説明したものと同様である。

また、高分子キャリアーとして糖化合物で修飾された高分子キャリアーを用いたDDS化合物も本発明の測定方法の好適な対象である。例えば、糖化合物で修飾されたカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールなどを高分子キャリアーとして好適に用いることができる。高分子キャリアーを糖化合物で修飾する方法や糖化合物の種類などは、糖化合物で修飾された上記のカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールについて説明したものと同様である。

本発明の測定方法の対象は、いわゆるクラスター修飾に適するリンカーを用い

WO 00/25825

PCT/JP99/06016

て製造された D D S 化合物（いわゆるクラスター修飾体）であってもよい。クラスター修飾の概念は、糖化合物で修飾された上記のカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールについて説明したものと同様である。

本発明の方法は、上記の D D S 化合物を測定するにあたり、D D S 化合物にペプチダーゼを作用させて得られる加水分解物を測定することを特徴としている。ペプチダーゼとしては、D D S 化合物のスペーサーに含まれるオリゴペプチド部分（2 から 8 個のアミノ酸がペプチド結合したオリゴペプチド部分）を加水分解することができるものであれば、その種類は特に限定されない。例えば、スブチリシン、 α -キモトリプシン、タイプ IV コラゲナーゼ、ペプシン、サーモリシン、パパイン、エラスターゼなどを用いることができるが、これらのうち、 α -キモトリプシン又はパパインが好ましい。

加水分解物の種類は特に限定されないが、紫外線吸収スペクトル、蛍光スペクトルなどの通常の分光学的手法により検出可能であることが望ましい。通常は、加水分解物として、医薬化合物自体のほか、スペーサーの一部が残存して医薬化合物の残基に結合している化合物、例えばスペーサー由来の 1 個のアミノ酸が結合した医薬化合物、スペーサー由来の 2 から 8 個のアミノ酸からなるオリゴペプチドが結合した医薬化合物、又は $-NH-Y-CO-$ [式中、Y は炭素数 1 から 8 個のアルキレン基又は $-C_6H_4-CH_2-O-$ ($-C_6H_4-$ はフェニレン基を示し、該フェニレン基は 1 又は 2 個以上の置換基を有していてもよく、好ましくは *p*-フェニレン基である) で表される基を示す] で表される連結基を介してスペーサー由来の 1 個のアミノ酸若しくは上記オリゴペプチドが結合した医薬化合物などを測定することができる。また、上記の加水分解物においては、医薬化合物の反応性官能基の一部又は全部が加水分解を受けていてもよい。D D S 化合物の種類に応じて適宜のペプチダーゼを選択することにより、所望の加水分解物を測定することが可能になる。

測定のための試料としては、D D S 化合物を投与した動物（ヒトを含む）から分離された血液、リンパ液、唾液、尿、糞、摘出組織などの生体試料のほか、D D S 化合物の水溶液、又は実質的に酵素反応を阻害しない水性有機溶媒の溶液な

WO 00/25825

PCT/JP99/06016

どを用いることができる。各種のペプチダーゼについて好適な反応条件が当業界で知られており、当業者は、ペプチダーゼの種類に応じて適宜の反応条件、例えば、基質濃度、pH、緩衝液、反応温度、反応時間などを容易に選択することができる。通常は、上記の試料を必要に応じてホモジュネートや脱蛋白質などの前処理に付した後、DD S化合物が所望の基質濃度となるように希釈した反応液にペプチダーゼを添加し、DD S化合物が完全に加水分解されるまで反応を継続すればよい。

加水分解物を測定する方法は特に限定されないが、DD S化合物の定量、又は医薬化合物の導入量の定量を行う場合には、加水分解物の性質に応じて、紫外線吸収スペクトル測定、蛍光スペクトル測定など、通常の分光学的手法を単独で又は複数組み合わせる用いることが望ましい。また、高速液体クロマトグラフィーなどの分離操作を適宜組み合わせる測定を行ってもよい。予め測定系において検量線を作成することにより、精度よく定量を行うことが可能になる。なお、本明細書の実施例には、本発明の方法の代表例が具体的かつ詳細に説明されているので、当業者は、上記の一般的説明及び実施例の具体的説明に基づいて、必要に応じてそれらに適宜の改変ないし修飾を加えることにより、本発明の方法を容易に実施できる。

実施例

以下、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明の範囲は下記の実施例に限定されることはない。

例 1

高分子キャリアーであるカルボキシメチルデキストランポリアルコール（以下CM-Dex-PA 又は CM デキストランポリアルコールなどの略号を用いる場合がある）と抗腫瘍剤（特開平6-87746号公報の請求項2に記載された(1S,9S)-1-アミノ-9-エチル-5-フルオロ-2,3-ジヒドロ-9-ヒドロキシ-4-メチル-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオン：以下、

WO 00/25825

PCT/JP99/06016

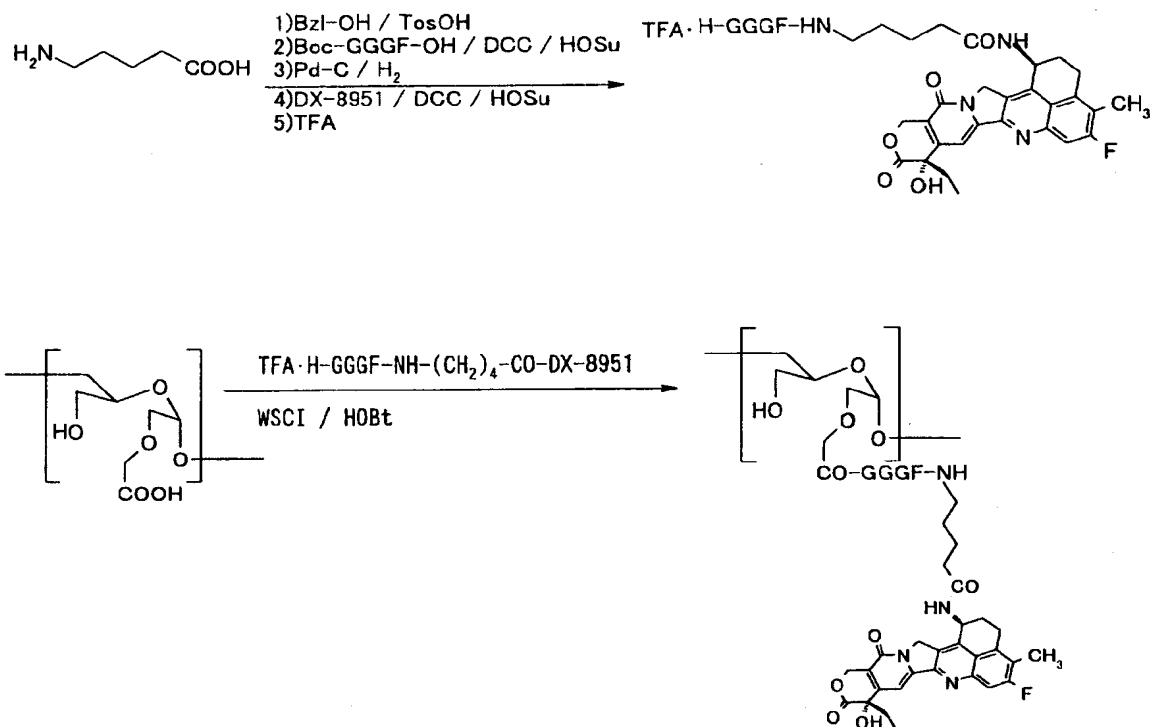
実施例において DX-8951 と略す。) とが、-Gly-Gly-Phe-Gly- (オリゴペプチドは N 末端側からの配列として示す。以下、同様である) からで表されるテトラペプチドスペーサーを介して結合した DDS 化合物(化合物 1)を、国際公開 W097/46260 号の実施例 15 に記載の方法に準じて製造した。CM-Dex-PA としては、平均分子量 228K、カルボキシメチル化度(構成糖残基あたりのカルボキシメチル基の置換度) 0.4 のものを用いた。

蒸留水にて 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に調製した上記 DDS 化合物 10 μl を 180 μl の Britton Robinson 緩衝液 (pH6.0) に添加し、さらに蒸留水で 10mg/ml に調製した α -キモトリプシン溶液を 10 μl 添加した。反応液を 40°C で 2 時間インキュベートした後、50% のアセトニトリルを含有した 0.5 N HCl 溶液を 200 μl 加え、遊離した加水分解物(スペーサー由来のグリシンが DX-8951 のアミノ基にペプチド結合した化合物: 国際公開 W097/46260 号の実施例 50 に記載の化合物、以下、G-DX-8951 と略す) を HPLC にて定量した。HPLC 測定は、Symmetry C18 (4.6 $\times$ 100 mm ; 3.5 μm , Waters 社) カラムを用い、有機溶媒(メタノール: アセトニトリル=1:2) を 36.5% 含有する 0.1M 酢酸ナトリウム(pH5.0)にて溶出を行い、蛍光スペクトル測定 (Ex. 375 nm 及び Em. 445 nm) により加水分解物を検出した。この結果、上記 DDS 化合物の DX-8951 含有量は 5.7% であった。一方、DX-8951 の UV 吸収 (366 nm) を指標とし、分光光度計を用いて上記 DDS 化合物の DX-8951 含有量を算出したところ 4.9% であった。

WO 00/25825

PCT/JP99/06016

例 2



CM-Dex-PAとDX-8951とが-Gly-Gly-Gly-Phe-NH-(CH₂)₄-CO-で表されるスパーサーを介して結合したDDS化合物(化合物2)を下記のようにして製造した。5-アミノペンタノイックアシッド(1.0 g)とp-トルエンスルホン酸(1.95 g)とベンジルアルコール(5 ml)をトルエン(50 ml)中、140℃でDean-Starkを用いて、生成する水を除去しながら5時間反応させた。反応液を濃縮し、得られた残さにエーテルを加えて固化した。得られた固体を濾過し、エーテルで洗浄して乾燥させ、5-アミノペンタノイックアシッドベンジルエステルのトシル酸塩を2.9g得た。

Boc-Gly-Gly-Gly-Phe-OH (575 mg)、HOSu (182 mg)、及びDCC (326 mg)をDMF (20 ml)に溶解し、30分間攪拌した。この溶液に5-アミノペンタノイックアシッドベンジルエステルのトシル酸塩 (500 mg)とトリエチルアミン (0.184 ml)をDMF (10 ml)に溶かした溶液を加え、室温で3日間攪拌した。反応液を濃縮し、残査をカラムクロマトグラフィー (CH₂Cl₂:MeOH=20:1)で精製し、Boc-Gly-Gly-Gly-Phe-NH-(CH₂)₄-COOBzlを380 mg得た (Bzlはベンジル基を示す)。Boc-Gly-Gly-Gly-

WO 00/25825

PCT/JP99/06016

Phe-NH-(CH₂)₄-COOBzl (380 mg) を 50% 含水メタノール (20 ml) に溶かし、5% Pd-C (50% 含水)(300 mg) を加え、水素常圧下、1 晩攪拌した。反応液中の触媒を濾去し、濃縮乾固し、Boc-Gly-Gly-Gly-Phe-NH-(CH₂)₄-COOH を 330 mg 得た。

Boc-Gly-Gly-Gly-Phe-NH-(CH₂)₄-COOH (150 mg) と DCC (70 mg) と HOSu (40 mg) を DMF に溶かし、30 分攪拌した。この溶液に、DX-8951 (160 mg) とトリエチルアミン (0.040 ml) を DMF に溶かした溶液を加え、室温で 1 晩攪拌した。反応液を濃縮し、得られた残査をカラムクロマトグラフィー (CH₂Cl₂:MeOH=20:1) で精製して、Boc-Gly-Gly-Gly-Phe-NH-(CH₂)₄-CO-DX-8951 を 110 mg 得た。Boc-Gly-Gly-Gly-Phe-NH-(CH₂)₄-CO-DX-8951 (110 mg) を TFA (2 ml) に溶かし、1 時間反応させた後、反応液を濃縮し、得られた残査にエーテルを加え固化させた。上澄みを除去し、固体を乾燥し、H-Gly-Gly-Gly-Phe-NH-(CH₂)₄-CO-DX-8951 のトリフルオロ酢酸塩を 100mg 得た。

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)

特開平 8-144421 号公報の実施例 13 に記載の方法に準じて製造した平均分子量 337K、カルボキシメチル化度 (構成糖残基あたりのカルボキシメチル基の置換度) 0.4 の CM-Dex-PA(350mg) を水 (10ml) に溶解した。この溶液に、H-Gly-Gly-Gly-Phe-NH-(CH₂)₄-CO-DX-8951 のトリフルオロ酢酸塩 (50 mg) をメタノール (10 ml) に溶かした溶液を加え、さらに、HOBt (7 mg) をメタノール (5 ml) に溶かした溶液を加えた。反応液の pH を 7.0 に調整して水溶性カルボジイミド (10mg) を加え、14 時間攪拌した。さらに、水溶性カルボジイミド (10mg) を加え、2 時間攪拌後に、水溶性カルボジイミド (10mg) を加え、2 時間攪拌した。反応液

WO 00/25825

PCT/JP99/06016

を超純水で希釈し、限外ろ過膜（50K）を用いて低分子を除去し、凍結乾燥し、得られた粉体を 3M 食塩水に溶かし、エタノールに滴下し、析出した固体を遠心分離によって分離した。上澄みを除去し、固体を再度水に溶解し、限外濾過膜（50K）で低分子を除去した後、 $0.22\mu\text{m}$ のフィルターを通して凍結乾燥し、目的物を 280mg 得た。

蒸留水にて 2.63 mg/ml に調製した上記 D D S 化合物の溶液 $10\mu\text{l}$ に Britton Robinson 緩衝液 (pH 6) にて 2 mg/ml に調製した α -キモトリプシン溶液、又は Tris-HCl (pH 9) にて 2 mg/ml に調製したサブチリシン A 溶液を $490\mu\text{l}$ 添加した。この反応液を 40°C で 2 時間インキュベートした後、50% のアセトニトリルを含有した 0.5 N HCl 溶液を $500\mu\text{l}$ 加え、遊離した加水分解物 $[\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_4-\text{CO}-\text{DX}-8951]$ を HPLC にて定量した。HPLC 測定は、Symmetry C18 ($4.6 \times 100\text{ mm}$; $3.5\mu\text{m}$, Waters 社) カラムを用い、有機溶媒（メタノール：アセトニトリル=1:2）を 32% 含有する 0.1% トリフルオロ酢酸溶液で溶出を行い、蛍光スペクトル測定 (Ex. 375 nm 及び Em. 445 nm) により加水分解物を検出した。この結果、 $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_4-\text{CO}-\text{DX}-8951$ は約 4.8 分に溶出された。 $\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_4-\text{CO}-\text{DX}-8951$ を検量線に用いて上記 D D S 化合物中の DX-8951 含有量を算出したところ 3.2% と算出された。一方、DX-8951 を検量線として上記 D D S 化合物の UV 吸収から DX-8951 含有量を算出した場合には 2.9% と算出された。

例 3

①サブチリシン A (0.1 M Tris-HCl pH 9.0) ② α -キモトリプシン (0.1 M Tris-HCl pH 8.0)、③サーモリシン (0.1 M Tris-HCl/1 mM CaCl_2 pH 9.0) を用いて、例 1 で製造した D D S 化合物（化合物 1）の DX-8951 含有量を測定した。各酵素用の緩衝液 $180\mu\text{l}$ に $400\mu\text{g/ml}$ に調製した化合物 1 を $10\mu\text{l}$ 添加した（最終濃度： $20\mu\text{g/ml}$ ）。この混合物に各緩衝液で 100 mg/ml に調製した各酵素を $10\mu\text{l}$ 添加した後（最終濃度： 5 mg/ml ）、 40°C で 3 時間反応させた。反応後、50% アセトニトリルを含有する 0.5 N HCl 溶液を $200\mu\text{l}$ 添加し、その $10\mu\text{l}$ を HPLC

WO 00/25825

PCT/JP99/06016

で分析した。Symmetry C18 (4.6×250 mm) カラムを用い、有機溶媒 (アセトニトリル：メタノール=2:1) を 31% 含有する 0.1 M AcONa 緩衝液 pH 5.0 で溶出した。蛍光スペクトル測定 (Ex. 375 nm 及び Em. 445 nm) により加水分解物を測定し、G-DX-8951、DX-8951、及び化合物 1 のスパーサー由来のフェニルアラニン-グリシンが結合した DX-8951 (FG-DX-8951) をそれぞれ 2 nmol/ml 含有する溶液を用いて作成した検量線により酵素反応溶液中の加水分解物を定量した。この結果、サブチリシン A と α -キモトリプシンは上記条件によりそれぞれ化合物 1 から G-DX-8951 を 100% 遊離した。また、サーモリシンは FG-DX-8951 を 100% 遊離した。

例 4

腹腔内にて継代維持した Meth A 細胞 (1×10^6 cells/mouse) を BALB/c(♂) マウスに腹腔内移植し、5 日後に化合物 1 (DX-8951 含有量 : 5.2%) を 10 及び 2.5 mg/kg (DX-8951 換算量) で腹腔内投与した。投与後、経時的 (2、4、8、24、及び 48 時間) に心採血し、10 分放置した後、12,000 rpm で 10 分間遠心分離して血清を得た。さらに、その時の癌性腹水を採取した。血清及び癌性腹水 25 μ l に 80% メタノール水を 100 μ l 添加した後、12,000 rpm で 5 分間遠心分離し、その上清の 25 μ l に 0.1 M Tris-HCl pH 8.5/0.1 M CaCl_2 を用いて 2 mg/ml に調製したサーモリシン溶液を 225 μ l 添加し、50°C で 1 時間反応した。その後、50% アセトニトリル含有 0.5 N HCl を 250 μ l 添加し、その 20 μ l を HPLC 分析した。カラムとして Symmetry C18 (4.6×100 mm) を用い、メタノールとアセトニトリルの混液 (1:2) を 41% 含む 0.1 M AcONa (pH 5) 溶液にて溶出し、蛍光スペクトル測定 (Ex. 375 nm、Em. 445 nm) により加水分解物を検出した。その結果、10 mg/kg 投与では、腹水中の化合物 1 の濃度は時間の経過とともに減少したが、血中濃度は投与後次第に上昇して 24 時間で最大値となり、その後、腹水濃度とほぼ同程度に推移した (図 1)。2.5 mg/kg 投与時の腹水及び血中濃度の推移は 10 mg/kg の場合と同様であった。

WO 00/25825

PCT/JP99/06016

例 5

腹腔内にて継代維持した Meth A 細胞 (1×10^6 cells/mouse) を BALB/c(♂) マウスに腹腔内移植し、5 日後に化合物 1 (DX-8951 含有量 : 6.6%) を 10 及び 2.5 mg/kg (DX-8951 換算量) で静脈内投与した (1 群 3 匹)。投与後、経時的 (5 分、30 分、2、4、8、24、及び 48 時間) に心採血し、10 分放置した後、12,000 rpm、10 分間遠心分離して血清を得た。さらに、その時の癌性腹水を採取した。血清及び癌性腹水 25 μ l に Britton Robinson Buffer (pH 6) を用いて 2 mg/ml に調製した α -キモトリプシン溶液を 225 μ l 添加し、40°C で 2 時間反応した。その後、50% アセトニトリル含有 0.5 N HCl を 250 μ l 添加し、12,000 rpm、5 分間遠心分離し、その上清の 10 μ l を HPLC 分析した。HPLC 分析で得られた G-DX-8951 濃度、及び用いた化合物 1 の DX-8951 含有量から推定される化合物 1 の濃度を算出した。HPLC 分析は例 4 の条件に従って行った。この結果、10 mg/kg 投与時には、血中の化合物 1 濃度は時間の経過とともに減少した。腹水での化合物 1 の濃度は投与後次第に上昇し、48 時間で血中濃度とほぼ同程度になった (図 2)。2.5 mg/kg 投与時における化合物 1 の腹水中及び血中の濃度推移は、10 mg/kg の場合と同様であった。

例 6

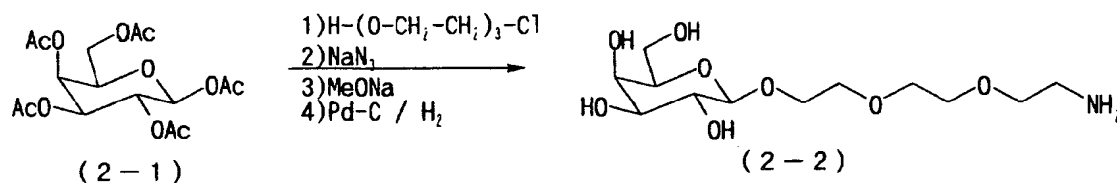
糖化合物で修飾された高分子キャリアーを有する DDS 化合物を以下のようにして製造した。下記のスキームにおいて、糖鎖の構成単位としてカルボキシメチル基が導入された 1 個又は 2 個の構成単位を例示的に記載したが、実施例に記載した DDS 化合物のカルボキシメチルデキストランポリアルコール部分は、上記構成単位の繰り返しによって構成されるものではないことを理解すべきである。また、カルボキシメチルデキストランポリアルコールのカルボキシメチル化度 (構成糖残基あたりのカルボキシメチル基の置換度) は、カルボキシメチルデキストランポリアルコールのナトリウム塩を遊離酸型に変換した後、0.1N 水酸化ナトリウム水溶液に溶解して 0.1N 塩酸で滴定することにより求めた。カルボキシメチ

WO 00/25825

PCT/JP99/06016

ルデキストランポリアルコールのナトリウム塩の水溶液を Bio-Rad AG50W-x 2(H⁺) カラムに付して通過液を凍結乾燥して試料として用いた。この試料を所定過剰量の 0.1N 水酸化ナトリウム水溶液に溶解し、フェノールフタレンを指示薬として 0.1N 塩酸で滴定した。試料の採取量を s(mg)、0.1N 水酸化ナトリウム水溶液の所定過剰量を a(ml)、0.1N 塩酸の滴定量を b(ml)とし、カルボキシメチル化度を $13.4(a-b)/[s-5.8(a-b)]$ の式により求めた。また、薬物の導入量(重量%)は、薬物の特性吸収を利用した吸光度分析(362 nm 付近)から求めた。さらに、ゲル濾過法は次の条件に従って行った(カラム: TSK gel G4000 PW_{XL}、溶離液: 0.1M NaCl、流速: 0.8 ml/min、カラム温度: 40°C)。

(A)化合物 2-2 の合成



化合物 2-1 (5.0 g) と 2-[2-(2-クロロエトキシ)エトキシ]エタノール(3.75 ml)をジクロロメタン(75 ml)に溶かし、3 フッ化ホウ素エーテル錯体(7.7 g)を加え、5 時間攪拌した。反応液をジクロロメタン(100 ml)で希釈し、有機層を水、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、食塩水で洗い、硫酸マグネシウムで乾燥し、硫酸マグネシウムを濾去した後、溶媒を留去し、得られた残渣をシリカゲルを用いるカラムクロマトグラフィー(ヘキサン:酢酸エチル 2:1)で精製し、クロル体を 3.3g 得た。得られたクロル体(3.3 g)と NaN₃(2.0 g)を DMF(15 ml)中で 60°C で 2 日間攪拌した。溶媒を留去し、酢酸エチルと水の混合液に溶かし、有機層を水洗し、硫酸マグネシウムで乾燥し、硫酸マグネシウムを濾去し、溶媒を留去し、アジド体を 2.8g 得た。

得られたアジド体(1.5 g)をメタノール(30 ml)に溶かし、溶液の pH が 10 になるまで、28% MeONa 含有メタノール溶液を加え、1 時間攪拌した。反応液に Dowex

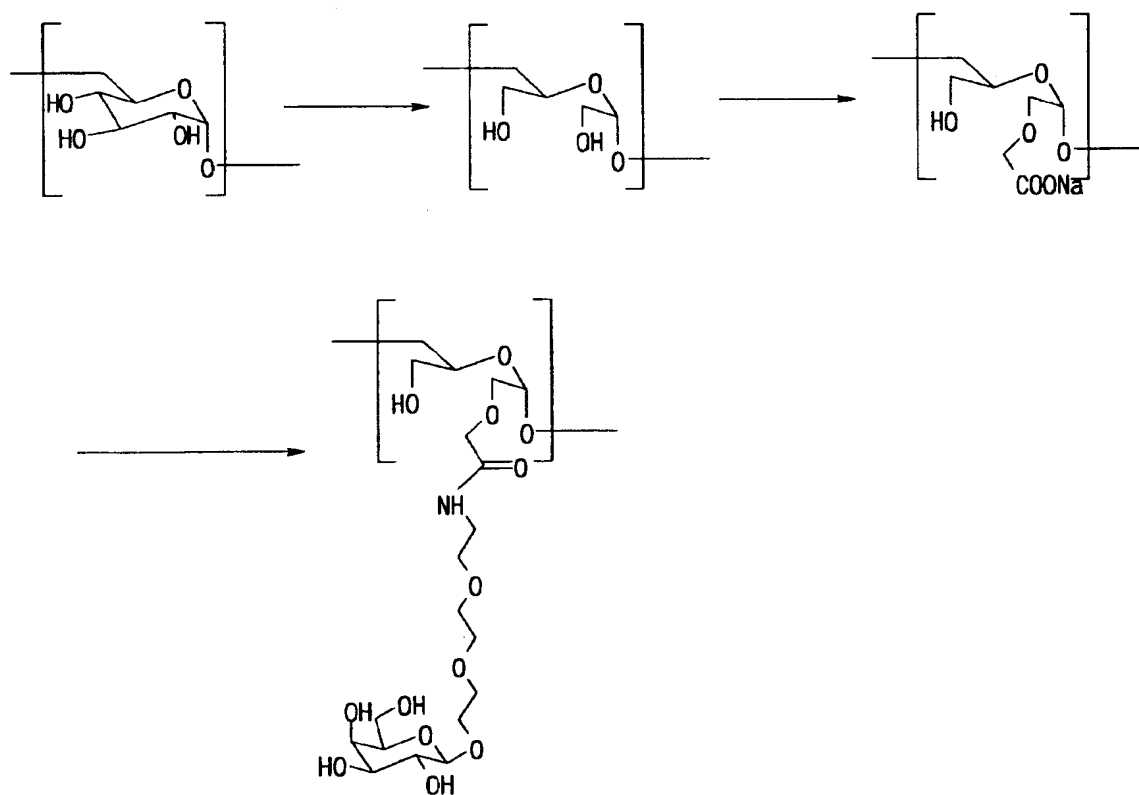
WO 00/25825

PCT/JP99/06016

50WX8(H⁺)を溶液の液性が中性になるまで加え、樹脂を濾去し、溶媒を留去した。得られた残渣をメタノール(50 ml)と水(10 ml)の混合液に溶かし、5%Pd-C(50%含水)(2.0 g)を加え、水素常圧下 1 晩撹拌した。触媒を濾去し、溶媒を留去し、化合物 2-2 を 1.2 g 得た。

¹H-NMR (DMSO-d₆): δ 4.20-4.30 (1H, br), 4.00-4.10 (1H, br), 3.80-3.85 (1H, br), 3.50-3.75 (14H, m), 2.75-2.90 (2H, m)

(B)ガラクトース修飾 CM デキストランポリアルコールの合成



デキストラン 4(フナコシ社製、平均分子量 4000-6000)(20 g)の 0.1M 酢酸緩衝液(pH5.5)(2000 ml)に、過ヨウ素酸ナトリウム(66.0 g)の水溶液(2000 ml)を加えた。遮光して 4℃で 10 日間撹拌後、エチレングリコール(14.0 ml)を加え、一晩撹拌した。反応液を氷冷下で 8M 水酸化ナトリウム水溶液を用いて pH を 7.5 に調整した後、水素化ホウ素ナトリウム(28 g)を加えた。溶解後、室温で一晩撹拌し

WO 00/25825

PCT/JP99/06016

た。氷冷して、酢酸で pH5.5 に調整し、4 °C で 1 時間攪拌した。氷冷下で 8M 水酸化ナトリウム水溶液を用いて pH を 7.5 に調整した。以上の行程を 2 回行い、得られた 2 つの水溶液を 1 つにまとめ、バイオマックス-3 膜(ミリポア社製)を用いた限外濾過法による低分子画分の除去を行ない残留溶液を得た。この残留溶液をバイオマックス-30 膜を通過させた。通過した溶液をバイオマックス-3 膜を用いた限外濾過法により脱塩した後、凍結乾燥して精製デキストランポリアルコール(12.0 g)を得た。この物質の分子量(ゲル濾過、プルラン標準)は、9K であった。

水酸化ナトリウム(39.3 g)を水(282 ml)に溶かして得られる水溶液に上記の精製デキストランポリアルコール(9.4 g)を加え、室温で溶解させた。この溶液に氷冷下でモノクロル酢酸(56.4 g)を加えて溶解させた後室温で 20 時間反応させた。この反応液を酢酸で pH を 8 に調整した後、バイオマックス-5 膜を用いた限外濾過法による低分子画分の除去を行なった。残留溶液を凍結乾燥して、カルボキシメチル(以下、CM と略す)デキストランポリアルコールのナトリウム塩(12 g)を得た。得られた CM デキストランポリアルコールのナトリウム塩(4.0 g)を、水酸化ナトリウム(17 g)を水(120 ml)に溶かして得られる水溶液に加え、室温で溶解させた。この溶液に氷冷下でモノクロル酢酸(24 g)を加えて溶解させた後室温で 20 時間反応させた。

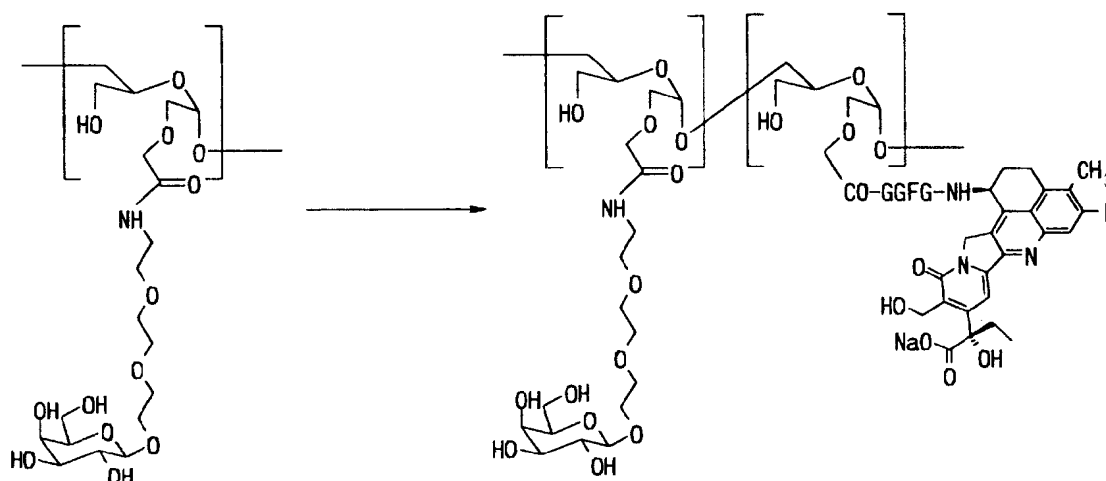
この反応液を酢酸で pH を 8 に調整した後、バイオマックス-5 膜を用いた限外濾過法による低分子画分の除去を行なった。残留溶液を凍結乾燥して、CM デキストランポリアルコールのナトリウム塩(4.0 g)を得た。この物質の分子量(ゲル濾過、プルラン標準)は、14K であり、糖残基あたりの CM 化度はアルカリ滴定から 0.7 であった。得られた CM デキストランポリアルコールのナトリウム塩(1.0 g)を水(100 ml)に溶解し、実施例 1 の化合物 2 - 2 (800 mg)のメタノール(100 ml)溶液を加えた。さらに、水溶性カルボジイミド塩酸塩(240 mg)を 2 時間おきに 3 回添加し、計 6 時間攪拌した。反応液中の溶媒を留去し、得られた油状物を水に溶解し、バイオマックス-3 を用いた限外濾過法により脱塩した。得られた水溶液を凍結乾燥し、標記化合物を 1.1 g 得た。本化合物中のガラクトース含有量をフ

WO 00/25825

PCT/JP99/06016

エノール-硫酸法により定量した結果、糖 10 残基当たり、1.0 の割合であった。

(C)ガラクトース修飾 CM デキストランポリアルコール-Gly-Gly-Phe-Gly-DX-8951
の合成



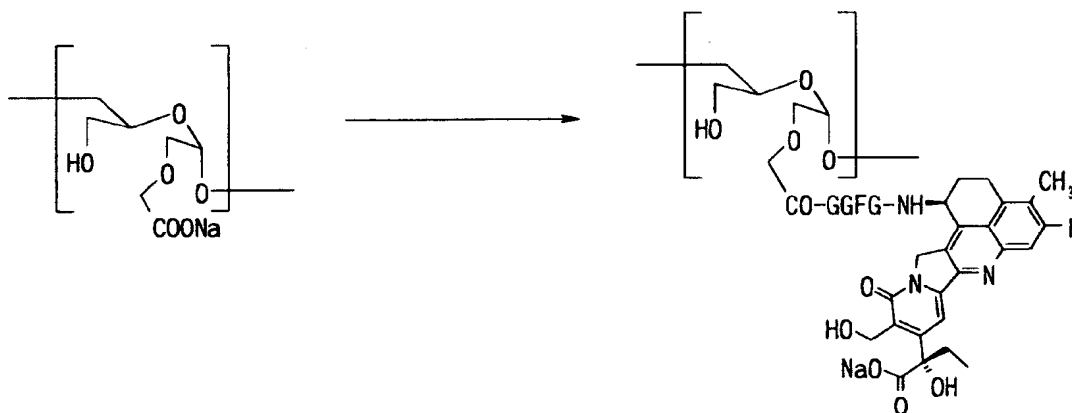
上記(B)で得られたガラクトース修飾 CM デキストランポリアルコールのナトリウム塩(1.0 g)を水(30 ml)に溶かし、Gly-Gly-Phe-Gly-DX-8951 のトリフルオロ酢酸塩 (150 mg)と 1-ヒドロキシベンゾトリアゾール(35 mg)のメタノール溶液 (40 ml)を加えた。溶液の pH を 7.0 とし、水溶性カルボジイミド塩酸塩(35 mg)を 2 時間ごとに、3 回加えた後、1 晩攪拌した。反応液中の溶媒を留去し、得られた残渣を 3M 塩化ナトリウム水溶液(20 ml)に溶かし、エタノール(100 ml)に滴下し、析出した沈殿を遠心分離(3500 rpm, 8 分)により集めた。この沈殿を水に溶かし、バイオマックス-3 膜を用いた限外濾過法により脱塩した。膜を透過しない残留溶液をミリポアフィルター(0.22 μ m)で濾過した後、凍結乾燥して標記化合物を 900mg 得た。本化合物を 0.1M 塩化ナトリウム水溶液に溶解後、GPC(カラム: 東ソーTSK Gel PW-4000XL、溶媒:0.1MNaCl 水溶液、流速:0.8ml/min)で分析した結果、及び本化合物の紫外線吸収スペクトル(pH9.0、0.1M トリス緩衝液中)をそれぞれ図 3 及び図 4 に示す。本化合物中の DX-8951 含有量を 30%アセトニトリルを含む 0.1 M トリス緩衝液 (pH 10.0) 中での 366 nm における吸光度に基づいて

WO 00/25825

PCT/JP99/06016

定量したところ、4.9% (W/W)であった。

(D)CM デキストランポリアルコール-Gly-Gly-Phe-Gly-DX-8951 の合成



上記(B)で得られた CM デキストランポリアルコールのナトリウム塩(2.0g)を水に溶解し、Dowex-50WX8(Et_3NH^+)を通し、CM デキストランポリアルコールのトリエチルアンモニウム塩(1.9 g)を得た。得られた CM デキストランポリアルコールのトリエチルアンモニウム塩(1.9 g)を 50%N,N-ジメチルホルムアミドを含む水溶液に溶解し、この溶液に、トリエチルアミン(0.112 ml)と Gly-Gly-Phe-Gly-DX-8951 のトリフルオロ酢酸塩 (350 mg) を含む N,N-ジメチルホルムアミド(10 ml)溶液、1-エトキシカルボニル-2-エトキシ-1,2-ジヒドロキシキノリン(1.9 g)を順次加え、室温で一晩攪拌しながら反応させた。反応液中の溶媒を留去し、得られた残渣を 3M 塩化ナトリウム水溶液(20 ml)に溶かし、エタノール(100 ml)に滴下し、析出した沈殿を遠心分離(3500 rpm)により集めた。この沈殿を水に溶かし、バイオマックス-3 膜を用いた限外濾過法により脱塩した。膜を透過しない残留溶液をミリポアフィルター(0.22 μm)で濾過した後、凍結乾燥して標記化合物を 1.4g 得た。本化合物を 0.1M 塩化ナトリウム水溶液に溶解後、GPC(カラム:東ソー TSK Gel PW-4000XL、溶媒:0.1MNaCl 水溶液、流速:0.8ml/min)で分析した結果、及び本化合物の紫外線吸収スペクトル(pH9.0、0.1M トリス緩衝液中)をそれぞれ図 6 及び図 9 に示す。本化合物中の DX-8951 含量を 30%アセトニトリルを含む 0.1 M トリ

WO 00/25825

PCT/JP99/06016

ス緩衝液 (pH 10.0) 中での 366 nm における吸光度に基づいて定量したところ、5.2% (W/W)であった。

(E) D D S 化合物の測定

上記(C)で得られたガラクトース修飾 D D S 化合物および対照として上記(D)の D D S 化合物を注射用蒸留水にて溶解し、DX-8951 に換算した濃度が 0.5 mg/ml となるように調製した。これらの D D S 化合物水溶液を C57BL/6 マウスに一群 5 匹として尾静脈内に投与した。投与量は DX-8951 換算で 5 mg/kg とした。投与後、経時的 (0.5, 1, 2, 4 および 24 時間) に肝臓を採取し、これらの D D S 化合物量を求めた。得られた肝臓の重量に対し水を 5 倍量添加し、ホモジナイズした。その溶液を 3000 rpm、10 分間遠心分離し、さらに、上清を 15,000 rpm、15 分間遠心分離した。得られた上清の 50 μ l に、pH6 の Britton-Robinson Buffer (B.R.B) により 2 mg/ml に調製した α -キモトリプシン溶液 450 μ l を添加し、40 $^{\circ}$ C で 2 時間反応した。その後、50% アセトニトリル含有 0.5 N HCl 溶液を 500 μ l 添加し、12,000 rpm、5 分間遠心分離し、その上清の 20 μ l を HPLC 分析し、遊離した G-DX8951 を定量することで D D S 化合物量を求めた。この時、投与に用いた各 D D S 化合物水溶液を、蒸留水により 50、10、2 μ g/ml に調製し、それぞれ 50 μ l を上述の方法により酵素処理して G-DX8951 を定量したものを検量線とした。

HPLC 分析条件

カラム : Symmetry C18 (4.6 $\times$ 100mm)

流速 : 1.0 ml/min

カラム温度 : 40 $^{\circ}$ C

検出波長 (蛍光) : Ex.375 nm、Em.445 nm

溶出液 : メタノール : アセトニトリル = 1 : 2 (29%) 0.1% TFA (71%)

結果を図 5 に示す。上記のガラクトース修飾 D D S 化合物は、対象の D D S 化合物 (上記(D)) に比べて高い肝臓集積性を示した。

WO 00/25825

PCT/JP99/06016

例7：ガラクトース修飾 CM デキストランポリアルコール-Gly-Gly-Phe-Gly-DX-8951 の合成

デキストラン T500(ファルマシア社製、分子量 500K)(50 g)の 0.1M 酢酸緩衝液 (pH5.5)(5000 ml)に、過ヨウ素酸ナトリウム(165.0 g)の水溶液(5000 ml)を加えた。遮光して 4℃で 10 日間攪拌した後、エチレングリコール(35.0 ml)を加え、一晩攪拌した。反応液を氷冷下で 8M 水酸化ナトリウム水溶液を用いて pH を 6.5 に調整した後、水素化ホウ素ナトリウム(70 g)を水(2000 ml)に懸濁させた液を加えた。溶解後、室温で一晩攪拌した。氷冷して、酢酸で pH5.5 に調整し、4℃で 1 時間攪拌した。氷冷下で 8M 水酸化ナトリウム水溶液を用いて pH を 7.5 に調整した。得られた水溶液をバイオマックス-50 膜を用いた限外濾過法による低分子画分の除去を行ない残留溶液を得た。この残留溶液を限外濾過膜(1000K、フィルトロン社製)を通過させた。通過した溶液をバイオマックス-50 膜を用いた限外濾過法により脱塩した後、凍結乾燥してデキストランポリアルコール(21.1 g)を得た。この物質の分子量(ゲル濾過、プルラン標準)は、128K であった。

水酸化ナトリウム(13.84 g)を水(150 ml)に溶かして得られる水溶液に上記で得たデキストランポリアルコール(5 g)を加え、室温で溶解させた。この溶液に氷冷下でモノクロル酢酸のナトリウム塩(61.6 g)を加えて溶解させた後室温で一晩反応させた。この反応液の pH を 8.5 に調整した後、バイオマックス-50 膜を用いた限外濾過法による低分子画分の除去を行なった。高分子画分を凍結乾燥して、CM デキストランポリアルコールのナトリウム塩(6.2 g)を得た。この物質の分子量(ゲル濾過、プルラン標準)は、428K であり、糖残基あたりの CM 化度はアルカリ滴定から 0.9 であった。得られた CM デキストランポリアルコールのナトリウム塩(500 mg)を水(50 ml)に溶解し、実施例 1 の化合物 2-2 (400 mg)のメタノール(20 ml)溶液と 1-ヒドロキシベンゾトリアゾール(160 mg)のメタノール(20 ml)溶液を加えた。さらに、水溶性カルボジイミド塩酸塩(120 mg)を 2 時間おきに 3 回添加し、計 6 時間攪拌した。反応液中の溶媒を留去し、得られた油状物を水に溶解し、

WO 00/25825

PCT/JP99/06016

バイオマックス-50 膜を用いた限外濾過法による低分子画分の除去を行なった。残留溶液を凍結乾燥し、目的物を 600 mg 得た。本化合物中のガラクトース含量をフェノール-硫酸法により定量した結果、糖 10 残基当たり、1.7 の割合であった。

得られたガラクトース修飾 CM デキストランポリアルコールのナトリウム塩 (200 mg) を水 (3 ml) に溶かし、Gly-Gly-Phe-Gly-DX-8951 のトリフルオロ酢酸塩 (27 mg) のメタノール溶液 (3 ml) と 1-ヒドロキシベンゾトリアゾール (7 mg) のメタノール溶液 (3 ml) を加えた。溶液の pH を 7.0 とし、水溶性カルボジイミド塩酸塩 (7 mg) を 2 時間ごとに、3 回加えた後、1 晩攪拌した。反応液中の溶媒を留去し、得られた残渣を 3M 塩化ナトリウム水溶液 (10 ml) に溶かし、エタノール (100 ml) に滴下し、析出した沈殿を遠心分離 (3500 rpm) により集めた。この沈殿を水に溶かし、バイオマックス-50 膜を用いた限外濾過法により脱塩した。膜を透過しない残留溶液をミリポアフィルター (0.22 μm) で濾過した後、凍結乾燥して標記化合物を 180 mg 得た。本化合物を 0.1M 塩化ナトリウム水溶液に溶解後、GPC (カラム: 東ソー TSK Gel PW-4000XL、溶媒: 0.1M NaCl 水溶液、流速: 0.8 ml/min) で分析した結果、及び本化合物の紫外線吸収スペクトル (pH 9.0、0.1M トリス緩衝液中) をそれぞれ図 7 及び図 10 に示す。本化合物中の DX-8951 含量を 30% アセトニトリルを含む 0.1 M トリス緩衝液 (pH 10.0) 中での 366 nm における吸光度に基づいて定量したところ、3.7% (W/W) であった。

例 8 : 2-[2-(2-アミノエトキシ)エトキシ]エチル- β -D-2-アミノ-2-デオキシガラクトースの合成

特開平 5-202085 号公報に記載の方法により合成した 2-[2-(2-アジドエトキシ)エトキシ]エチル- β -D-2-アセチルアミノ-2-デオキシ-3,4,6-トリアセチルガラクトース (2.64 g) をメタノール (10 ml) に溶解した溶液を氷冷した。この溶液にナトリウムメトキシドの 28% メタノール溶液 (0.64 ml) を加え、そのまま氷冷下で 5 時間攪拌した。反応液に酢酸 (0.186 ml) を加えた後、減圧乾固した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (溶出液: ジクロロメタン: メタノール = 9:1 溶

WO 00/25825

PCT/JP99/06016

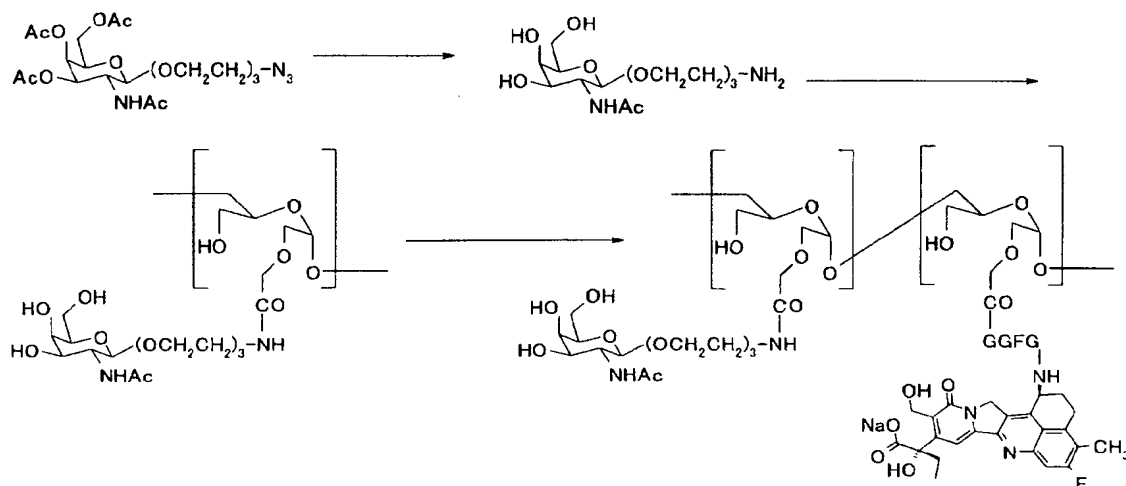
液) で精製して 2-[2-(2-アジドエトキシ)エトキシ]エチル- β -D-2-アミノ-2-デオキシガラクトース (1.98 g)を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD) δ : 4.44 (d, 1H, $J=8.8\text{Hz}$), 3.94-3.98 (m, 1H), 3.92 (dd, 1H, $J=8.8, 10.7\text{Hz}$), 3.83 (d, 1H, $J=2.9\text{Hz}$), 3.62-3.79 (m, 11H), 3.58 (dd, 1H, $J=3.4, 10.7\text{Hz}$), 3.49 (dd, 1H, $J=5.9, 6.3\text{Hz}$), 3.39 (t, 2H, $J=4.9\text{Hz}$), 1.99 (s, 3H).

上記の 2-[2-(2-アジドエトキシ)エトキシ]エチル- β -D-2-アミノ-2-デオキシガラクトース (640 mg)をエタノール(10 ml)に溶解した溶液にリンドラー触媒 (430 mg)を加え、常圧水素下 1.5 時間接触還元した。さらに、リンドラー触媒(215 mg)を加え、常圧水素下 3.5 時間接触還元した。触媒を濾去した後、濾液を減圧乾固して 2-[2-(2-アミノエトキシ)エトキシ]エチル- β -D-2-アミノ-2-デオキシガラクトース (601 mg)を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (CD_3OD) δ : 4.32 (d, 1H, $J=7.5\text{Hz}$), 3.80-3.91 (m, 2H), 3.30-3.75 (m, 14H), 2.73 (t, 2H, $J=6.5\text{Hz}$), 1.98 (s, 3H).

例 9 : N-アセチルガラクトサミン修飾 CM デキストランポリアルコール-Gly-Gly-Phe-Gly-DX-8951 の合成



WO 00/25825

PCT/JP99/06016

例 7 で得られた CM デキストランポリアルコールのナトリウム塩(375 mg)を水(10ml)に溶解し、例 8 で得られた 2-[2-(2-アミノエトキシ)エトキシ]エチル- β -D-2-アミノ-2-デオキシガラクトース (300 mg)をメタノール(10 ml) に溶解した溶液と 1-ヒドロキシベンゾトリアゾール(120 mg)をメタノール(10 ml) に溶解した溶液を加えた。溶液の pH を 7.0 にした後、水溶性カルボジイミド塩酸塩(90 mg)を 2 時間おきに 3 回添加した。一晩攪拌した後、反応液からバイオマックス-50 膜を用いた限外濾過法により低分子画分を除去した。膜を通過しない残留溶液を凍結乾燥し、N-アセチルガラクトサミン修飾 CM デキストランポリアルコール(443 mg)を得た。本化合物の N-アセチルガラクトサミン含量をエルソン-モルガン法で定量した結果、糖 10 残基あたり 1.6 の割合であった。

得られた N-アセチルガラクトサミン修飾 CM デキストランポリアルコール (200 mg) を水 (10 ml) に溶解し、Gly-Gly-Phe-Gly-DX-8951 のトリフロオロ酢酸塩 (30 mg) をメタノール(10 ml) に溶解した溶液、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール(30 mg)をメタノール(10 ml) に溶解した溶液を加えた。溶液の pH を 7.0 にした後、水溶性カルボジイミド塩酸塩(10 mg)を 2 時間おきに 3 回添加した。2 時間攪拌した後、pH を 8.5 にした。反応液からバイオマックス-50 膜を用いた限外濾過法により低分子画分を除去した。膜を通過しない残留溶液をミリポアフィルター(0.22 μ m)で濾過した後、凍結乾燥し、標記化合物(203 mg)を得た。本化合物を 0.1M 塩化ナトリウム水溶液に溶解後、GPC (カラム：東ソー TSK Gel PW-6000XL、溶媒：20%アセトニトリル含有 0.1M 酢酸緩衝液(pH5.0)、流速：0.8 ml/min) で分析した結果、及び本化合物の紫外線吸収スペクトル(0.1M トリス緩衝液(pH 10.0)：アセトニトリル=7:3 中, 0.16 mg/ ml)をそれぞれ図 8 および図 11 に示す。本化合物の医薬化合物の残基の含量を 0.1 M トリス緩衝液 (pH 10.0)：アセトニトリル=7:3 中での 366 nm における吸光度に基づいて定量したところ 4.6% (W/W)であった。

WO 00/25825

PCT/JP99/06016

例 10 : CM-Dex-PA-Gly-Gly-Phe-Gly-NH-Y'-CH₂-O-CO-DX-8951 中の DX-8951 含有量の測定

蒸留水にて 1 mg/ml に調製した CM-Dex-PA-Gly-Gly-Phe-Gly-NH-Y'-CH₂-O-CO-DX-8951 (Y' は p-フェニレン基を示す) の溶液 5 μ l に Britton Robinson 緩衝液 (pH 6) にて 2 mg/ml に調製したパパイン溶液を 95 μ l 添加した。この反応液を 40°C で 4 時間インキュベートした後、50% のアセトニトリルを含有した 0.5 N HCl 溶液を 100 μ l 加え、遊離した加水分解物 [DX-8951] を HPLC にて定量した。HPLC 測定は、Symmetry C18 (4.6 $\times$ 100 mm; 3.5 μ m, Waters 社) カラムを用い、有機溶媒 (メタノール : アセトニトリル = 1 : 2) が 12 分間に 20% から 70% となる 0.1% トリフルオロ酢酸溶液で溶出を行い、蛍光スペクトル測定 (Ex. 375nm および Em. 445nm) により加水分解物を検出した。この結果、DX-8951 は約 5.7 分に溶出された。DX-8951 を検量線に用いて上記 DDS 化合物中の DX-8951 含有量を算出したところ、4.0% と算出された。一方、DX-8951 を検量線として上記 DDS 化合物の UV 吸収から DX-8951 含有量を算出した場合には 3.3% と算出された。

例 11 : CM-Dex-PA-Gly-Gly-Gly-Phe-NH-Y'-CH₂-O-CO-DX-8951 中の DX-8951 含有量の測定

蒸留水にて 1 mg/ml に調製した CM-Dex-PA-Gly-Gly-Gly-Phe-NH-Y'-CH₂-O-CO-DX-8951 の溶液 5 μ l に Britton Robinson 緩衝液 (pH 6) にて 2 mg/ml に調製した α -キモトリプシン溶液を 95 μ l 添加した。この反応液を 40°C で 4 時間インキュベートした後、50% のアセトニトリルを含有した 0.5 N HCl 溶液を 100 μ l 加え、遊離した加水分解物 [DX-8951] を HPLC にて定量した。HPLC 測定は、Symmetry C18 (4.6 $\times$ 100 mm; 3.5 μ m, Waters 社) カラムを用い、有機溶媒 (メタノール : アセトニトリル = 1 : 2) が 12 分間に 20% から 70% となる 0.1% トリフルオロ酢酸溶液で溶出を行い、蛍光スペクトル測定 (Ex. 375nm および Em. 445nm) により加水分解物を検出した。この結果、DX-8951 は約 5.7 分に溶出された。DX-8951 を検量線に用いて上記 DDS 化合物中の DX-8951 含有量を算出したところ、2.5% と算出された。

WO 00/25825

PCT/JP99/06016

一方、DX-8951 を検量線として上記 DDS 化合物の UV 吸収から DX-8951 含有量を算出した場合には 1.7%と算出された。

例 12 : CM-Dex-PA-Gly-Gly-Phe-Gly-NH-(CH₂)₄-CO-DX-8951 中の DX-8951 含有量の測定

蒸留水にて 100 μ g/ml に調製した CM-Dex-PA-Gly-Gly-Phe-Gly-NH-(CH₂)₄-CO-DX-8951 の溶液 5 μ l に Britton Robinson 緩衝液 (pH 6) にて 2 mg/ml に調製したパパイン溶液を 95 μ l 添加した。この反応液を 40°C で 4 時間インキュベートした後、50%のアセトニトリルを含有した 0.5 N HCl 溶液を 100 μ l 加え、遊離した加水分解物[NH₂-(CH₂)₄-CO-DX-8951]を HPLC にて定量した。HPLC 測定は、Symmetry C18 (4.6x100 mm;3.5 μ m, Waters 社)カラムを用い、有機溶媒 (メタノール : アセトニトリル = 1 : 2) を 32%含有する 0.1%トリフルオロ酢酸溶液で溶出を行い、蛍光スペクトル測定 (Ex.375nm および Em.445nm) により加水分解物を検出した。この結果、DX-8951 は約 5.3 分に溶出された。NH₂-(CH₂)₄-CO-DX-8951 を検量線に用いて上記 DDS 化合物中の DX-8951 含有量を算出したところ、3.0%と算出された。一方、DX-8951 を検量線として上記 DDS 化合物の UV 吸収から DX-8951 含有量を算出した場合には 3.1%と算出された。

例 13 : CM-Dex-PA-Gly-Gly-Phe-Gly-DXR (DXR: ドキソルビシン) 中の DXR 含有量の測定

蒸留水にて 1 mg/ml に調製した DDS 化合物の溶液 10 μ l に Britton Robinson 緩衝液 (pH 6) にて 2 mg/ml に調製したパパイン溶液を 190 μ l 添加した。この反応液を 40°C で 2 時間インキュベートした後、アセトニトリルを 200 μ l 加え、遊離した加水分解物[DXR]を HPLC にて定量した。HPLC 測定は、Symmetry RP18 (4.6 $\times$ 100 mm;3.5 μ m, Waters 社)カラムを用い、有機溶媒 (メタノール : アセトニトリル = 1 : 2) を 34%含有する 0.1%トリフルオロ酢酸溶液で溶出を行い、蛍光スペクトル測定 (Ex.480nm および Em.590nm) により加水分解物を検出した。この結果、DXR は約 3.8 分に溶出された。DXR を検量線に用いて上記 DDS 化合物中の DXR 含

WO 00/25825

PCT/JP99/06016

有量を算出したところ、5.3%と算出された。一方、DXR を検量線として上記 DDS 化合物の UV 吸収から DXR 含有量を算出した場合には 4.3%と算出された。

例 14 : CM デキストランポリアルコール-Gly-Gly-Phe-Gly-DXR の合成

W097/46260 の実施例 24 に記載の方法に準じて製造した平均分子量 274K、カルボキシメチル化度（構成糖残基あたりのカルボキシメチル基の置換度）0.4 のカルボキシメチルデキストランポリアルコールのナトリウム塩(30 mg)を 50%メタノールを含有する 0.05 M コリジン-HCl 緩衝液(2 ml)に溶解させた。この溶液に W097/46260 の実施例 43 に記載の方法に準じて合成した Gly-Gly-Phe-Gly-DXR の塩酸塩(4 mg)を含むメタノール溶液(400 μ l)、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩(2.4 mg)を含むメタノール溶液(240 μ l)を加え、2 時間攪拌した。これに 3 M 食塩水 30 ml を加え、バイオマックス-50K 膜を用いた限外濾過法により脱塩した。膜を通過しない残留溶液をミリポアフィルター(0.22 μ m)で濾過した後、凍結乾燥して表記化合物(25 mg)を得た。本化合物の医薬化合物の残基の含量は、PBS(pH7.4)中での 480 nm における吸光度に基づいて定量したところ、4.3%(W/W)であった。

例 15 : CM-Dex-PA-Gly-Gly-Phe-Gly-NH-(CH₂)₄-CO-DX-8951 の合成

Boc-Gly-Gly-Phe-Gly-OH(575mg)、HOSu (182mg)と DCC (326mg)を DMF (20ml)に溶解し、30 分間攪拌した。ここに、5-アミノペンタノイックアシッドベンジルエステルのトシル酸塩(500 mg)とトリエチルアミン(0.184 ml)を DMF (10 ml)に溶かした溶液を加え、室温で 3 日間攪拌した。反応液を濃縮し、残査をカラムクロマトグラフィ(CH₂Cl₂:MeOH=20:1)で精製し、Boc-Gly-Gly-Phe-Gly-NH-(CH₂)₄-COOBzl を 560 mg 得た。Boc-Gly-Gly-Phe-Gly-NH-(CH₂)₄-COOBzl (560 mg)を 50%含水メタノール(60 ml)に溶かし、5%Pd-C(50%含水)(1.5 g)を加え、水素常圧下、1 晩攪拌した。反応液中の触媒を濾去し、濃縮乾固し、Boc-Gly-Gly-Phe-Gly-NH-(CH₂)₄-COOH を 300 mg 得た。

WO 00/25825

PCT/JP99/06016

Boc-Gly-Gly-Phe-Gly-NH-(CH₂)₄-COOH (300 mg)と DCC (138 mg)と HOSu (77 mg)を DMF に溶かし、30 分攪拌した。ここに、DX-8951(317mg)とトリエチルアミン(0.078ml)を DMF に溶かした溶液を加え、室温で 1 晩攪拌した。反応液を濃縮し、得られた残査をカラムクロマトグラフィー(CH₂Cl₂:MeOH=10:1)で精製して、Boc-Gly-Gly-Phe-Gly-NH-(CH₂)₄-CO-DX-8951 を 400 mg 得た。

Boc-Gly-Gly-Phe-Gly-NH-(CH₂)₄-CO-DX-8951(300mg)を TFA(2ml)に溶かし、1 時間反応させた後、反応液を濃縮した。得られた残査にエーテルを加え固化させ、上澄みを除去し、固体を乾燥して H-Gly-Gly-Phe-Gly-NH-(CH₂)₄-CO-DX-8951 のトリフルオロ酢酸塩を 250mg 得た。

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)

W097/46260 の実施例 24 に記載の方法に準じて製造した平均分子量 337K、カルボキシメチル化度（構成糖残基あたりのカルボキシメチル基の置換度）0.4 のカルボキシメチルデキストランポリアルコールのトリエチルアンモニウム塩(200 mg)を DMF(10 ml)に溶かした。ここに、H-Gly-Gly-Phe-Gly-NH-(CH₂)₄-CO-DX-8951 のトリフルオロ酢酸塩(30 mg)、トリエチルアミン(10 μl)を含むメタノール(4ml)溶液を加え、さらに、1-エトキシカルボニル-2-エトキシ-1,2-ジヒドロキシキノリン(200 mg)を含むメタノール(3 ml)溶液を加え、遮光下、室温で 1 晩攪拌した。反応液を 3M 食塩水で希釈し、限外濾過膜(50K)で低分子を除去し、0.22 μm のフィルターを通し、凍結乾燥して目的物を 178 mg 得た。

WO 00/25825

PCT/JP99/06016

産業上の利用可能性

糖化合物で修飾したカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールを高分子キャリアーとして用いた本発明のDDS化合物は、極めて臓器指向性が高く、優れた治療効果を発揮できる医薬として有用である。また、本発明のDDS化合物の測定方法は、DDS化合物の血中濃度やDDS化合物に導入された医薬化合物の残基の含有量を正確かつ簡便に定量することができるので、DDS化合物の臨床への適用に際して極めて有用な方法として利用できる。

WO 00/25825

PCT/JP99/06016

請求の範囲

1. 糖化合物で修飾されたカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールと該カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールに結合した医薬化合物の残基とを含むDDS化合物。
2. 糖化合物で修飾されたカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールと医薬化合物の残基とがスペーサーを介して結合した請求の範囲第1項に記載のDDS化合物。
3. スペーサーが1個のアミノ酸又はペプチド結合した2から8個のアミノ酸である請求の範囲第2項に記載のDDS化合物。
4. 糖化合物で修飾されたカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールが、糖化合物とカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールとがリンカーを介して結合したものである請求の範囲第1項ないし第3項のいずれか1項に記載のDDS化合物。
5. 糖化合物で修飾されたカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールがリンカーを介して糖化合物によりクラスター修飾されたものである請求の範囲第4項に記載のDDS化合物。
6. カルボキシ C_{1-4} アルキル部分の一部のカルボキシル基が糖化合物で修飾されたカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールに対して医薬化合物の残基を結合させることにより製造することができるDDS化合物。
7. 該カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールと医薬化合物の残基とをスペーサーを介して結合させることにより製造することができる請求の範囲第6項に記載のDDS化合物。
8. カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールのカルボキシ C_{1-4} アルキル部分の一部のカルボキシル基に糖化合物又は糖化合物に結合したリンカーを結合させることにより製造された該カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールに対して医薬化合物の残基を結合させることにより製造することができる

WO 00/25825

PCT/JP99/06016

る請求の範囲第 6 項又は第 7 項に記載の D D S 化合物。

9. カルボキシ C_{1-4} アルキル部分の一部のカルボキシル基に医薬化合物の残基がスペーサーを介して結合したカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールを糖化合物で修飾することにより製造することができる D D S 化合物。

10. 該カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールと糖化合物とをリンカーを介して結合させることにより製造することができる請求の範囲第 9 項に記載の D D S 化合物。

11. カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールのカルボキシ C_{1-4} アルキル部分の一部のカルボキシル基に 1 個のアミノ酸からなるスペーサー又はペプチド結合した 2 から 8 個のアミノ酸からなるスペーサーを介して医薬化合物の残基を結合させることにより製造された該カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールを糖化合物で修飾することにより製造することができる請求の範囲第 9 項又は第 10 項に記載の D D S 化合物。

12. 糖化合物がガラクトース若しくはガラクトサミン又はそれらの誘導体である請求の範囲第 1 項ないし第 11 項のいずれか 1 項に記載の D D S 化合物。

13. 糖化合物が N-アセチルガラクトサミンである請求の範囲第 1 項ないし第 12 項のいずれか 1 項に記載の D D S 化合物。

14. ガラクトース若しくはガラクトサミン又はそれらの誘導体、あるいはクラスター化されたガラクトース若しくはガラクトサミン又はそれらの誘導体の置換度がカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールの糖残基あたり 0.01~1.0 である請求の範囲第 12 項に記載の D D S 化合物。

15. カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールを構成するデキストランポリアルコールが、実質的に完全にポリアルコール化可能な条件下でデキストランを処理して得られたデキストランポリアルコールである請求の範囲第 1 項ないし第 14 項のいずれか 1 項に記載の D D S 化合物。

16. カルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールがカルボキシメチルデキストランポリアルコールである請求の範囲第 1 項ないし第 15 項のいずれか

WO 00/25825

PCT/JP99/06016

1 項に記載の D D S 化合物。

1 7 . 医薬化合物が抗腫瘍剤又は抗炎症剤である請求の範囲第 1 項ないし第 16 項のいずれか 1 項に記載の D D S 化合物。

1 8 . 医薬化合物が抗腫瘍剤である請求の範囲第 17 項に記載の D D S 化合物。

1 9 . 医薬化合物が(1*S*,9*S*)-1-アミノ-9-エチル-5-フルオロ-2,3-ジヒドロ-9-ハイドロキシ-4-メチル-1*H*,12*H*-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-*b*]キノリン-10,13(9*H*,15*H*)-ジオンである請求の範囲第 1 項ないし第 18 項のいずれか 1 項に記載の D D S 化合物。

2 0 . 肝臓癌治療剤である請求の範囲第 19 項に記載の D D S 化合物。

2 1 . 請求の範囲第 1 項ないし第 20 項のいずれか 1 項に記載の D D S 化合物の製造に使用するための糖化合物で修飾されたカルボキシ C₁₋₄ アルキルデキストランポリアルコール。

2 2 . 糖化合物で修飾されたカルボキシ C₁₋₄ アルキルデキストランポリアルコール。

2 3 . 糖化合物で修飾されたカルボキシ C₁₋₄ アルキルデキストランポリアルコールからなる高分子キャリアー。

2 4 . ペプチド結合した 2 から 8 個のアミノ酸を含むスペーサーを介して高分子キャリアーと医薬化合物の残基とが結合した D D S 化合物の測定方法であって、該 D D S 化合物をペプチダーゼで処理することにより得られる加水分解物を測定する工程を含む方法。

2 5 . 生体試料中に含まれる該 D D S 化合物の濃度測定に用いる請求の範囲第 24 項に記載の方法。

2 6 . 該 D D S 化合物に導入された医薬化合物の残基の含有量を測定するために用いる請求の範囲第 24 項に記載の方法。

2 7 . 該加水分解物が医薬化合物である請求の範囲第 24 項ないし第 26 項のいずれか 1 項に記載の方法。

2 8 . 該加水分解物が医薬化合物の残基にスペーサーの一部が結合した化合物で

WO 00/25825

PCT/JP99/06016

ある請求の範囲第 24 項ないし第 26 項のいずれか 1 項に記載の方法。

29. スペーサーの一部がスペーサー由来の 1 個のアミノ酸である請求の範囲第 28 項に記載の方法。

30. 該高分子キャリアーがカルボキシル基を有する多糖誘導体である請求の範囲第 24 項ないし第 29 項のいずれか 1 項に記載の方法。

31. 該高分子キャリアーがカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールである請求の範囲第 30 項に記載の方法。

32. 該 DDS 化合物中に導入された医薬化合物が抗腫瘍剤又は抗炎症剤である請求の範囲第 24 項ないし第 31 項のいずれか 1 項に記載の方法。

33. スペーサーが N 末端側から -Gly-Gly-Phe-Gly- で表されるテトラペプチド又は N 末端側から -Gly-Gly-Gly-Phe- で表されるテトラペプチドである請求の範囲第 24 項ないし第 32 項のいずれか 1 項に記載の方法。

34. スペーサーが N 末端側から -Gly-Gly-Phe-Gly-NH-Y'-CH₂-O-CO- で表される基又は N 末端側から -Gly-Gly-Gly-Phe-NH-Y'-CH₂-O-CO- で表される基（式中、Y' は p-フェニレン基を示す）である請求の範囲第 24 項ないし第 32 項のいずれか 1 項に記載の方法。

35. ペプチダーゼが α -キモトリプシン又はパパインである請求の範囲第 24 項ないし第 34 項のいずれか 1 項に記載の方法。

36. 医薬化合物が (1S,9S)-1-アミノ-9-エチル-5-フルオロ-2,3-ジヒドロ-9-ヒドロキシ-4-メチル-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオンである請求の範囲第 24 項ないし第 35 項のいずれか 1 項に記載の方法。

37. N 末端側から -Gly-Gly-Phe-Gly- で表されるテトラペプチド又は N 末端側から -Gly-Gly-Gly-Phe- で表されるテトラペプチド含むスペーサーを介してカルボキシ C_{1-4} アルキルデキストランポリアルコールと (1S,9S)-1-アミノ-9-エチル-5-フルオロ-2,3-ジヒドロ-9-ヒドロキシ-4-メチル-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオンとが結合した

WO 00/25825

PCT/JP99/06016

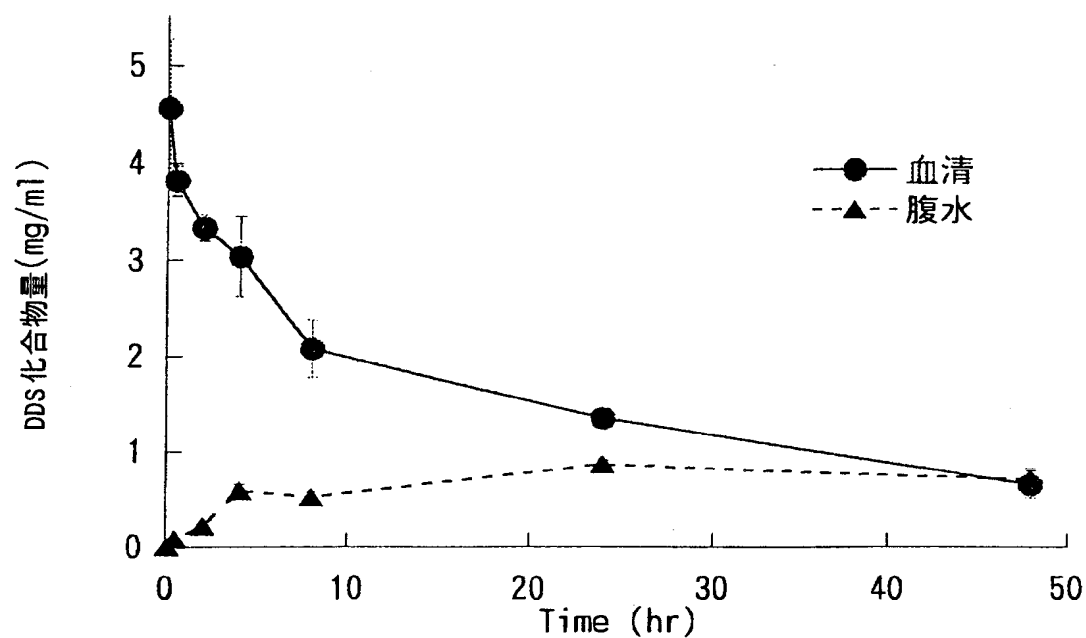
DDS化合物の測定に用いる請求の範囲第24項ないし第29項のいずれか1項に記載の方法。

38. ペプチダーゼとして α -キモトリプシン又はパパインを用い、加水分解物として(1S,9S)-9-エチル-5-フルオロ-1-グリシルアミノ-2,3-ジヒドロ-9-ヒドロキシ-4-メチル-1H,12H-ベンゾ[de]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオンを測定する請求の範囲第37項に記載の方法。

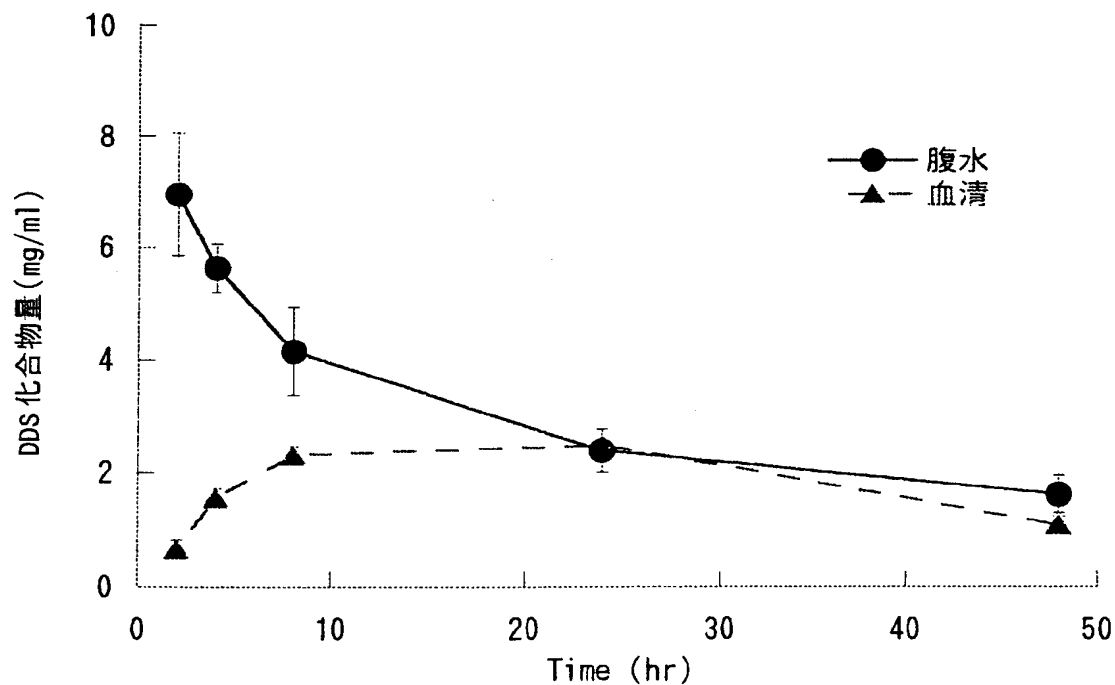
WO 00/25825

PCT/JP99/06016

第1図



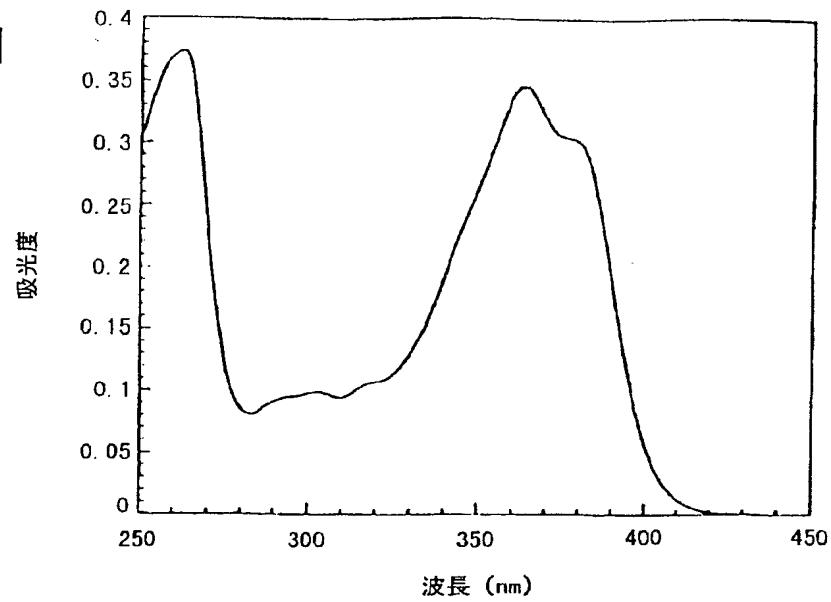
第2図



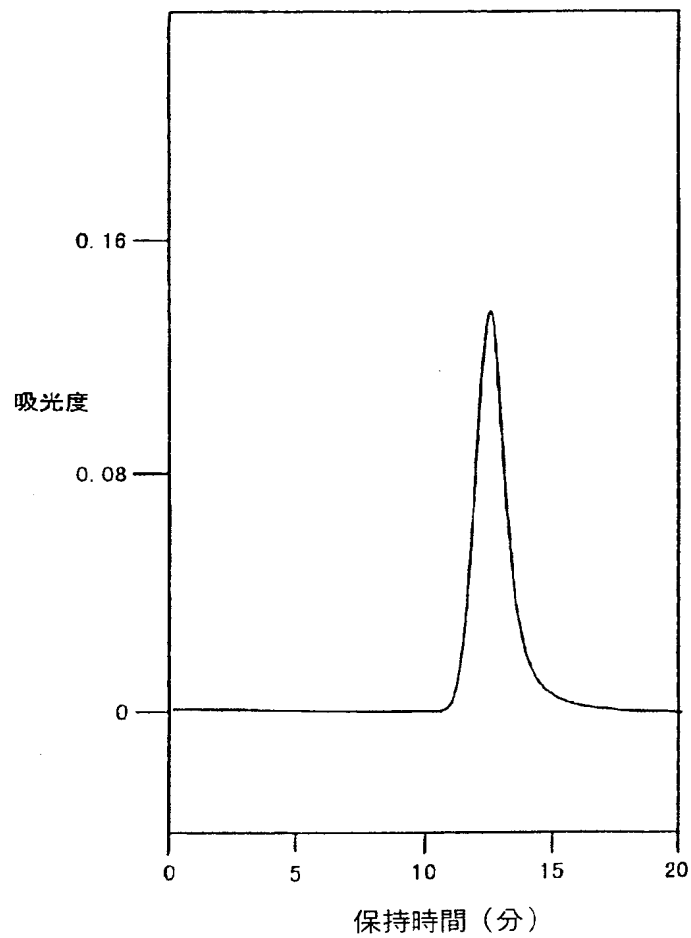
WO 00/25825

PCT/JP99/06016

第3図



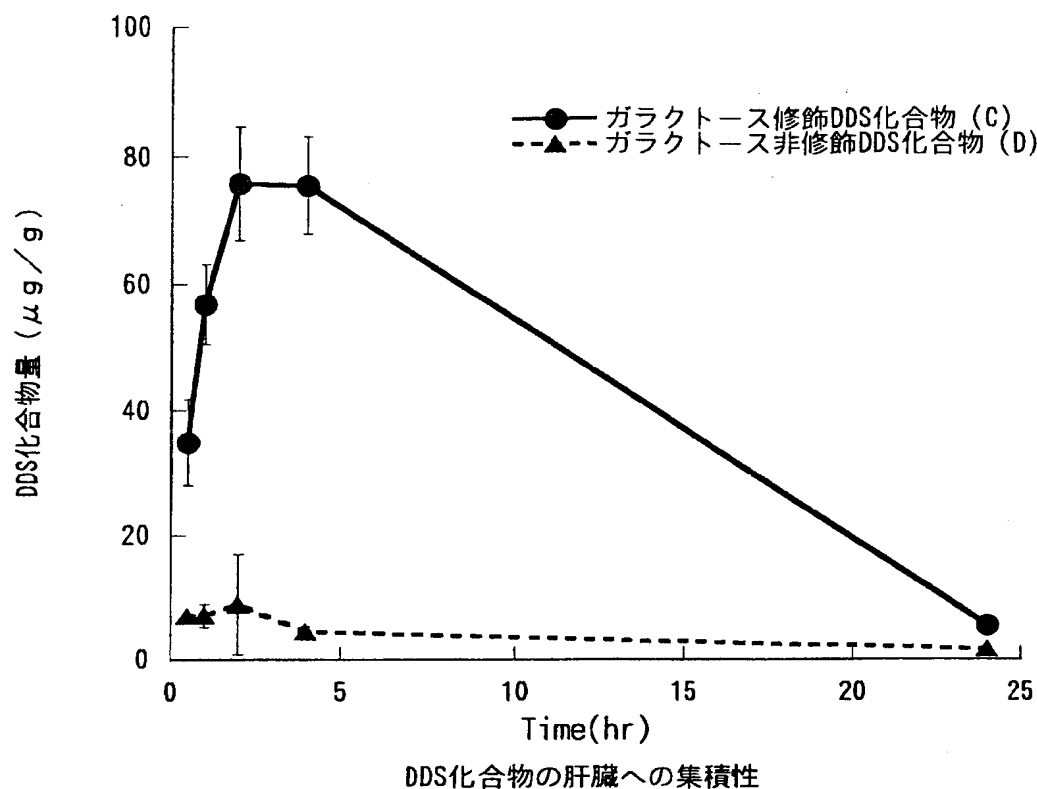
第4図



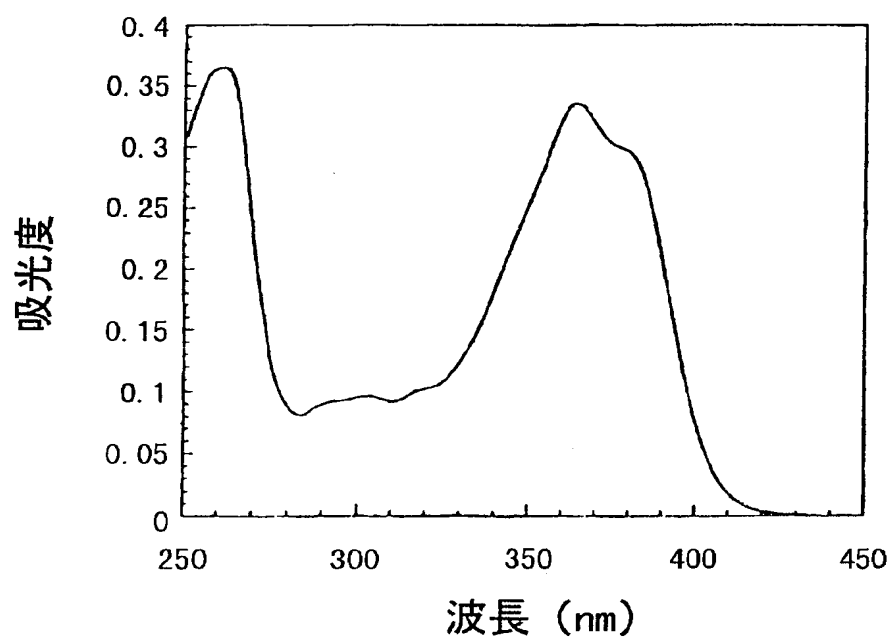
WO 00/25825

PCT/JP99/06016

第5図



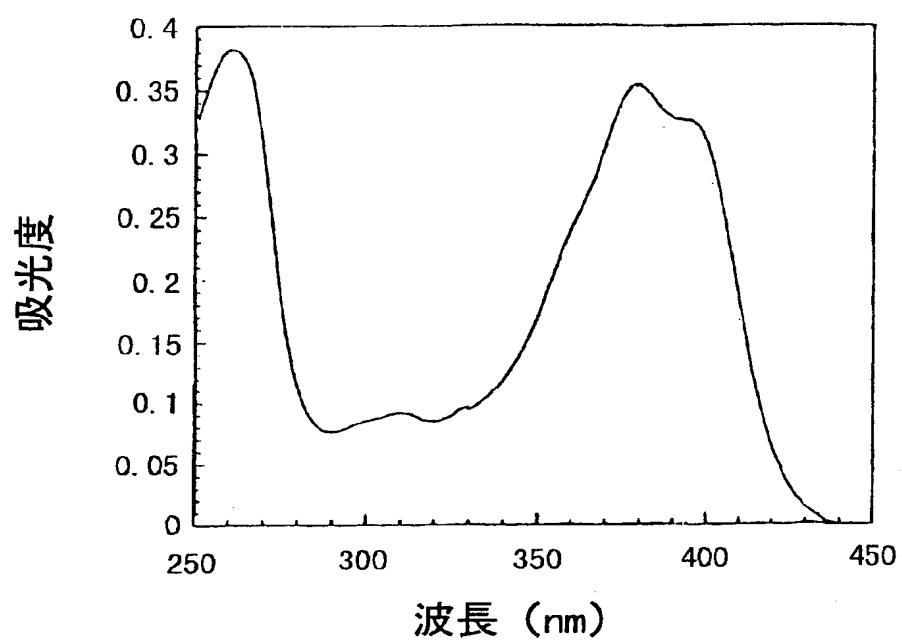
第6図



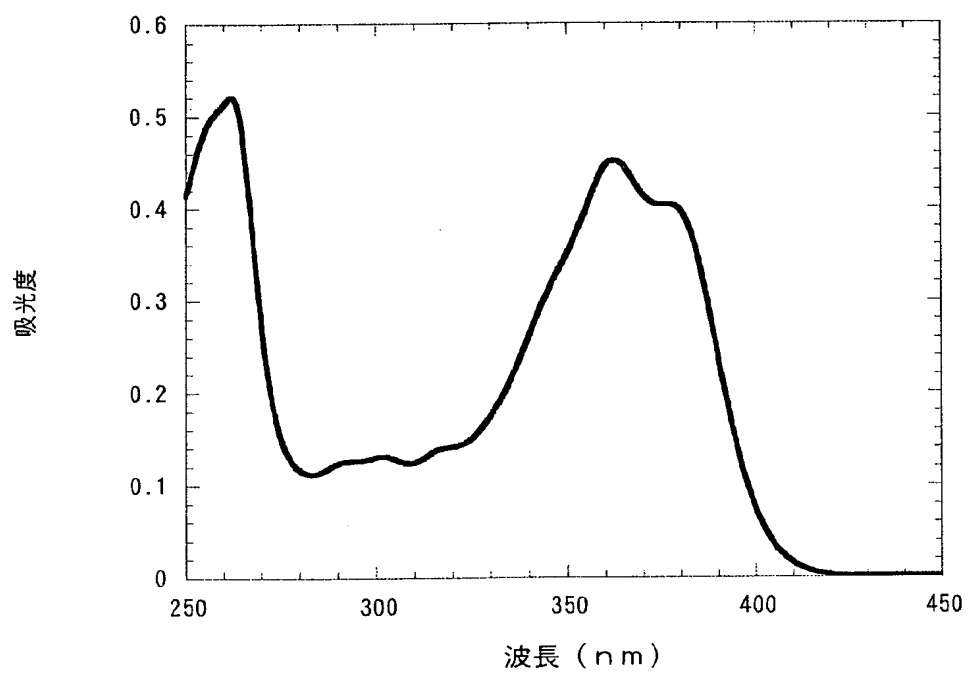
WO 00/25825

PCT/JP99/06016

第 7 図



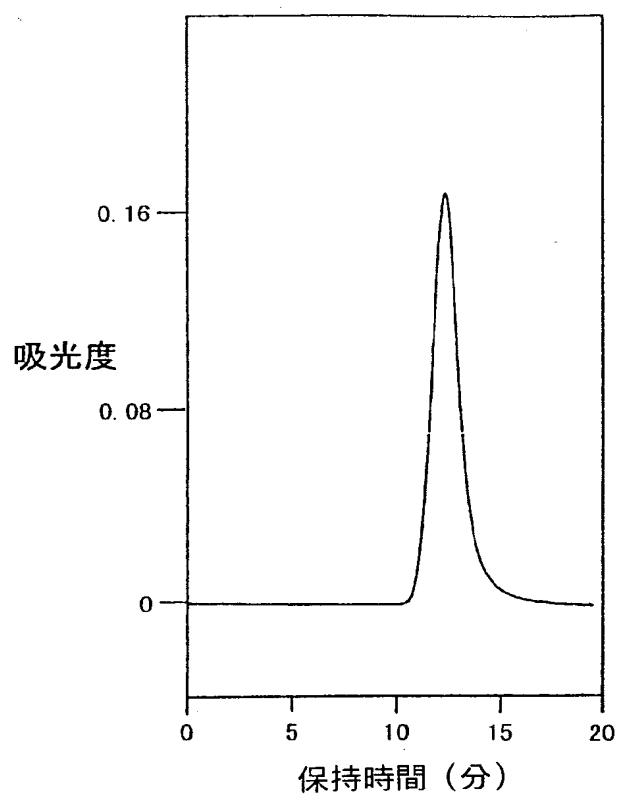
第 8 図



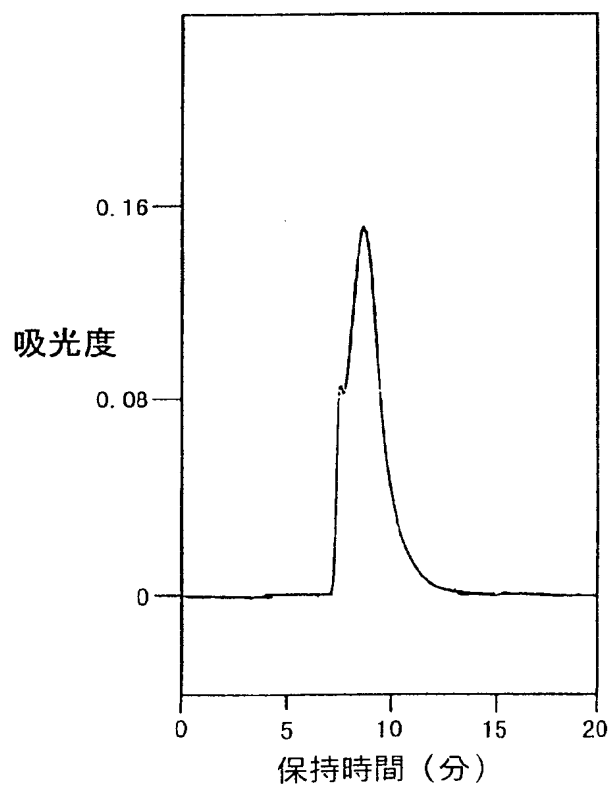
WO 00/25825

PCT/JP99/06016

第 9 図



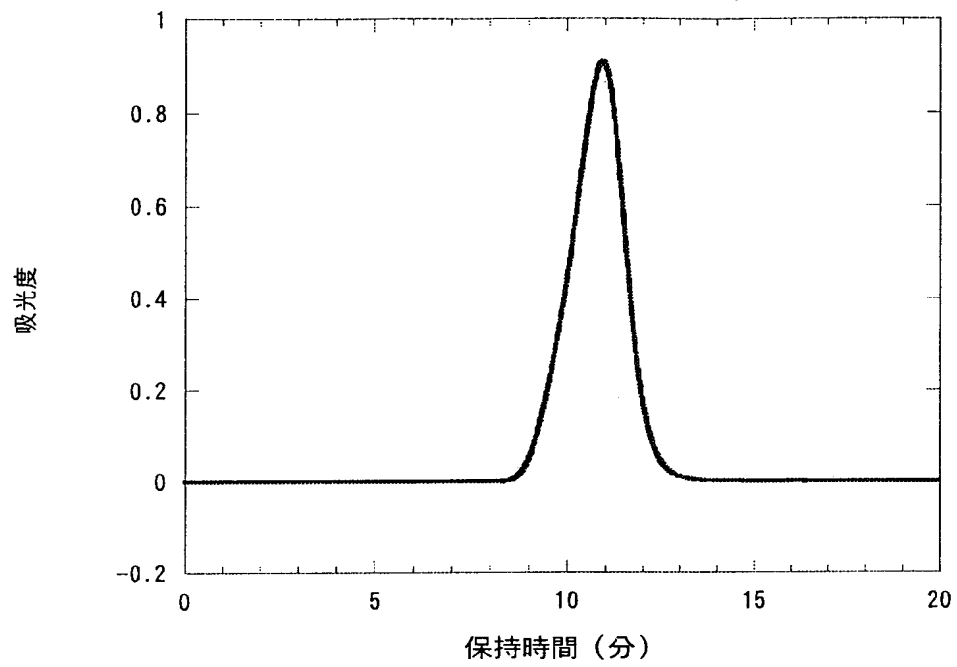
第 10 図



WO 00/25825

PCT/JP99/06016

第 1 1 図



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP99/06016

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl ⁷ A61K47/48, A61K47/30, A61K47/26, A61K31/47		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl ⁷ A61K47/48, A61K47/30, A61K47/26, A61K31/47		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CAPLUS (STN) REGISTRY (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO, 97/46260, A1 (Daiichi Pharmaceutical Co., Ltd.), 11 December, 1997 (11.12.97) & EP, 916348, A1	1-23, 31, 37, 38
Y	JP, 8-319317, A (Kanagawa Kagaku Gijutsu Academy), 03 December, 1996 (03.12.96), Par. Nos. [0005] to [0007] (Family: none)	1-23
X	EP, 712635, A1 (KURARAY CO LTD), 22 May, 1996 (22.05.96)	24-30, 32-35
Y	& JP, 8-024325, A & US, 5658592, A	31, 36-38
Y	JP, 6-87746, A (Daiichi Pharmaceutical Co., Ltd.), 29 March, 1994 (29.03.94) (Family: none)	36-38
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.		
* "A" "E" "L" "O" "P"	Special categories of cited documents: document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance earlier document but published on or after the international filing date document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 26 January, 2000 (26.01.00)		Date of mailing of the international search report 08 February, 2000 (08.02.00)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 99/06016

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl ⁷ A61K47/48, A61K47/30, A61K47/26, A61K31/47		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl ⁷ A61K47/48, A61K47/30, A61K47/26, A61K31/47		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) CAPLUS (STN) REGISTRY (STN)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	WO, 97/46260, A1 (第一製薬株式会社) 11. 12月. 1997 (11. 12. 97) & EP, 916348, A1	1-23, 31, 37, 38
Y	JP, 8-319317, A (財団法人 神奈川科学技術アカ デミー) 3. 12月. 1996 (03. 12. 96) 【0005】 - 【0007】 (ファミリーなし)	1-23
X	EP, 712635, A1 (KURARAY CO LTD) 22. 5月. 1996 (22. 05. 96)	24-30, 32-35
☒ C欄の続きにも文献が列举されている。 ☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 26. 01. 00	国際調査報告の発送日 08.02.00	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 吉住 和之 電話番号 03-3581-1101 内線 3491	4 P 9840

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 99/06016

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	& J P, 8-024325, A & US, 5658592, A	31, 36-38
Y	J P, 6-87746, A (第一製薬株式会社) 29. 3月. 1994 (29. 03. 94) (ファミリーなし)	36-38

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
4 January 2001 (04.01.2001)

PCT

(10) International Publication Number
WO 01/00244 A2(51) International Patent Classification⁷: **A61K 47/48**

(21) International Application Number: PCT/US00/17229

(22) International Filing Date: 23 June 2000 (23.06.2000)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/141,316 25 June 1999 (25.06.1999) US
60/189,844 16 March 2000 (16.03.2000) US(71) Applicant (*for all designated States except US*): **GENEN-TECH, INC.** [US/US]; 1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (*for US only*): **ERICKSON, Sharon** [US/US]; 970 Vista Road, Hillsborough, CA 94010 (US). **SCHWALL, Ralph** [US/US]; 400 Griffen Avenue, Pacifica, CA 94044 (US).(74) Agent: **ALTMAN, Daniel, E.**; Knobbe, Martens, Olson and Bear, LLP, 16th Floor, 620 Newport Center Drive, Newport Beach, CA 92660 (US).(81) Designated States (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, CZ (utility model), DE, DE (utility model), DK, DK (utility model), DM, DZ, EE, EE (utility model), ES, FI, FI (utility model), GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SK (utility model), SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.(84) Designated States (*regional*): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).**Published:**

— Without international search report and to be republished upon receipt of that report.

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: METHODS OF TREATMENT USING ANTI-ErbB ANTIBODY-MAYTANSINOID CONJUGATES

(57) Abstract: The application concerns methods of treatment using anti-ErbB receptor antibody-maytansinoid conjugates, and articles of manufacture suitable for use in such methods. In particular, the invention concerns ErbB receptor-directed cancer therapies, using anti-ErbB receptor antibody-maytansinoid conjugates.

**WO 01/00244 A2**

METHODS OF TREATMENT USING ANTI-ErbB ANTIBODY-MAYTANSINOID CONJUGATES

Background of the InventionField of the Invention

The present invention concerns methods of treatment, especially ErbB receptor-directed cancer therapies, using anti-ErbB receptor antibody-maytansinoid conjugates, and articles of manufacture suitable for use in such methods.

Description of the Related Art1. Maytansine and maytansinoids

Maytansine was first isolated from the east African shrub *Maytenus serrata* (U.S. Patent No. 3,896,111). Subsequently, it was discovered that certain microbes also produce maytansinoids, such as maytansinol and C-3 maytansinol esters (U.S. Patent No. 4,151,042). Synthetic maytansinol and maytansinol analogues are disclosed, for example, in U.S. Patent Nos. 4,137,230; 4,248,870; 4,256,746; 4,260,608; 4,265,814; 4,294,757; 4,307,016; 4,308,268; 4,308,269; 4,309,428; 4,313,946; 4,315,929; 4,317,821; 4,322,348; 4,331,598; 4,361,650; 4,364,866; 4,424,219; 4,450,254; 4,362,663; and 4,371,533, the disclosures of which are hereby expressly incorporated by reference.

Maytansine and maytansinoids are highly cytotoxic but their clinical use in cancer therapy has been greatly limited by their severe systemic side-effects primarily attributed to their poor selectivity for tumors. Clinical trials with maytansine had been discontinued due to serious adverse effects on the central nervous system and gastrointestinal system (Issel *et al.*, Can. Trtmnt. Rev. 5:199-207 [1978]).

2. The ErbB family of receptor tyrosine kinases and anti-ErbB antibodies

Members of the ErbB family of receptor tyrosine kinases are important mediators of cell growth, differentiation and survival. The receptor family includes four distinct members, including epidermal growth factor receptor (EGFR or ErbB1), HER2 (ErbB2 or p185^{neu}), HER3 (ErbB3) and HER4 (ErbB4 or tyro2). p185^{neu}, was originally identified as the product of the transforming gene from neuroblastomas of chemically treated rats. The activated form of the *neu* proto-oncogene results from a point mutation (valine to glutamic acid) in the transmembrane region of the encoded protein. Amplification of the human homolog of *neu* is observed in breast and ovarian cancers and correlates with a poor prognosis (Slamon *et al.*, *Science*, 235:177-182 (1987); Slamon *et al.*, *Science*, 244:707-712 (1989); and US Pat No. 4,968,603). To date, no point mutation analogous to that in the *neu* proto-oncogene has been reported for human tumors. Overexpression of ErbB2 (frequently but not uniformly due to gene amplification) has also been observed in other carcinomas including carcinomas of the stomach, endometrium, salivary gland, lung, kidney, colon, thyroid, pancreas and bladder. See, among others, King *et al.*, *Science*, 229:974 (1985); Yokota *et al.*, *Lancet*: 1:765-767 (1986); Fukushima *et al.*, *Mol Cell Biol.*, 6:955-958 (1986); Geurin *et al.*, *Oncogene Res.*, 3:21-31 (1988); Cohen *et al.*, *Oncogene*, 4:81-88 (1989); Yonemura *et al.*, *Cancer Res.*, 51:1034 (1991); Borst *et al.*, *Gynecol. Oncol.*, 38:364 (1990); Weiner *et al.*, *Cancer Res.*, 50:421-425 (1990); Kern *et al.*,

Cancer Res., 50:5184 (1990); Park *et al.*, *Cancer Res.*, 49:6605 (1989); Zhau *et al.*, *Mol. Carcinog.*, 3:354-357 (1990); Aasland *et al.* *Br. J. Cancer* 57:358-363 (1988); Williams *et al.* *Pathobiology* 59:46-52 (1991); and McCann *et al.*, *Cancer*, 65:88-92 (1990). ErbB2 may be overexpressed in prostate cancer (Gu *et al.* *Cancer Lett.* 99:185-9 (1996); Ross *et al.* *Hum. Pathol.* 28:827-33 (1997); Ross *et al.* *Cancer* 79:2162-70 (1997); and Sadasivan *et al.* *J. Urol.* 150:126-31 (1993)). A spliced form of erbB2 oncogen encoding a constitutively tyrosine phosphorylated ErbB2 receptor is disclosed in PCT publication WO 00/20579, published on April 13, 2000. The erbB2 protein encoded by the splice variant has an in frame deletion of 16 amino acids (CVDLQDKGCPAEQRAS), two of which are conserved cysteine residues.

Antibodies directed against the rat p185^{neu} and human ErbB2 protein products have been described. Drebin and colleagues have raised antibodies against the rat *neu* gene product, p185^{neu}. See, for example, Drebin *et al.*, *Cell* 41:695-706 (1985); Myers *et al.*, *Meth. Enzym.* 198:277-290 (1991); and W094/22478. Drebin *et al.* *Oncogene* 2:273-277 (1988) report that mixtures of antibodies reactive with two distinct regions of p185^{neu} result in synergistic anti-tumor effects on *neu*-transformed NIH-3T3 cells implanted into nude mice. See also U.S. Patent 5,824,311 issued October 20, 1998.

Other anti-ErbB2 antibodies with various properties have been described in Tagliabue *et al.* *Int. J. Cancer* 47:933-937 (1991); McKenzie *et al.* *Oncogene* 4:543-548 (1989); Maier *et al.* *Cancer Res.* 51:5361-5369 (1991); Bacus *et al.* *Molecular Carcinogenesis* 3:350-362 (1990); Stancovski *et al.* *PNAS (USA)* 88:8691-8695 (1991); Bacus *et al.* *Cancer Research* 52:2580-2589 (1992); Xu *et al.* *Int. J. Cancer* 53:401-408 (1993); W094/00136; Kasprzyk *et al.* *Cancer Research* 52:2771-2776 (1992); Hancock *et al.* *Cancer Res.* 51:4575-4580 (1991); Shawver *et al.* *Cancer Res.* 54:1367-1373 (1994); Arteaga *et al.* *Cancer Res.* 54:3758-3765 (1994); Harwerth *et al.* *J. Biol. Chem.* 267:15160-15167 (1992); U.S. Patent No. 5,783,186; and Klapper *et al.* *Oncogene* 14:2099-2109 (1997).

Hudziak *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 9(3): 1165-1172 (1989) describe the generation of a panel of anti-ErbB2 antibodies which were characterized using the human breast tumor cell line SK-BR-3. Relative cell proliferation of the SK-BR-3 cells following exposure to the antibodies was determined by crystal violet staining of the monolayers after 72 hours. Using this assay, maximum inhibition was obtained with the antibody called 4D5 which inhibited cellular proliferation by 56%. Other antibodies in the panel reduced cellular proliferation to a lesser extent in this assay. The antibody 4D5 was further found to sensitize ErbB2-overexpressing breast tumor cell lines to the cytotoxic effects of TNF-. See also U.S. Patent No. 5,677,171 issued October 14, 1997. The anti-ErbB2 antibodies discussed in Hudziak *et al.* are further characterized in Fendly *et al.* *Cancer Research* 50:1550-1558 (1990); Kotts *et al.* *In Vitro* 26(3):59A (1990); Sarup *et al.* *Growth Regulation* 1:72-82 (1991); Shepard *et al.* *J. Clin. Immunol.* 11(3):117-127 (1991); Kumar *et al.* *Mol. Cell. Biol.* 11(2):979-986 (1991); Lewis *et al.* *Cancer Immunol. Immunother.* 37:255-263 (1993); Pietras *et al.* *Oncogene* 9:1829-1838 (1994); Vitetta *et al.* *Cancer Research* 54:5301-5309 (1994); Sliwkowski *et al.* *J. Biol. Chem.* 269(20):14661-14665 (1994); Scott *et al.* *J. Biol. Chem.* 266:14300-5 (1991); D'souza *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91:7202-7206 (1994); Lewis *et al.* *Cancer Research* 56:1457-1465 (1996); and Schaefer *et al.* *Oncogene* 15:1385-1394 (1997).

The murine monoclonal anti-HER2 antibody inhibits the growth of breast cancer cell lines that overexpress HER2 at the 2+ and 3+ level, but has no activity on cells that express lower levels of HER2 (Lewis *et al.*, *Cancer Immunol. Immunother.* [1993]). Based on this observation, antibody 4D5 was humanized (Carter *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 4285-4289 [1992]). The humanized version designated HERCEPTIN® (huMAb4D5-8, rhuMAb HER2, U.S. Patent No. 5,821,337) was tested in breast cancer patients whose tumors overexpress HER2 but who had progressed after conventional chemotherapy (Baselga *et al.*, *J. Clin. Oncol.* 14:737-744 [1996]); Cobleigh *et al.*, *J. Clin. Oncol.* 17: 2639-2648 [1999]). Most patients in this trial expressed HER2 at the 3+ level, though a fraction was 2+ tumors. Remarkably, HERCEPTIN® induced clinical responses in 15% of patients (complete responses in 4% of patients, and partial responses in 11%) and the median duration of those responses was 9.1 months. HERCEPTIN® received marketing approval from the Food and Drug Administration September 25, 1998 for the treatment of patients with metastatic breast cancer whose tumors overexpress the ErbB2 protein.

Homology screening has resulted in the identification of two other ErbB receptor family members; ErbB3 (US Pat. Nos. 5,183,884 and 5,480,968 as well as Kraus *et al.* *PNAS (USA)* 86:9193-9197 (1989)) and ErbB4 (EP Pat Appln No 599,274; Plowman *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:1746-1750 (1993); and Plowman *et al.*, *Nature*, 366:473-475 (1993)). Both of these receptors display increased expression on at least some breast cancer cell lines.

3. Maytansinoid-antibody conjugates

In an attempt to improve their therapeutic index, maytansine and maytansinoids have been conjugated to antibodies specifically binding to tumor cell antigens. Immunoconjugates containing maytansinoids are disclosed, for example, in U.S. Patent Nos. 5,208,020; 5,416,064 and European Patent EP 0 425 235 B1, the disclosures of which are hereby expressly incorporated by reference. Liu *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:8618-8623 (1996) described immunoconjugates comprising a maytansinoid designated DM1 linked to the monoclonal antibody C242 directed against human colorectal cancer. The conjugate was found to be highly cytotoxic towards cultured colon cancer cells, and showed antitumor activity in an *in vivo* tumor growth assay. Chari *et al.* *Cancer Research* 52:127-131 (1992) describe immunoconjugates in which a maytansinoid was conjugated via a disulfide linker to the murine antibody A7 binding to an antigen on human colon cancer cell lines, or to another murine monoclonal antibody TA.1 that binds the HER-2/*neu* oncogene. The cytotoxicity of the TA.1-maytansinoid conjugate was tested *in vitro* on the human breast cancer cell line SK-BR-3, which expresses 3×10^5 HER-2 surface antigens per cell. The drug conjugate achieved a degree of cytotoxicity similar to the free maytansinoid drug, which could be increased by increasing the number of maytansinoid molecules per antibody molecule. The A7-maytansinoid conjugate showed low systemic cytotoxicity in mice.

Although HERCEPTIN® is a breakthrough in treating patients with ErbB2-overexpressing breast cancers that have received extensive prior anti-cancer therapy, generally approximately 85% of the patients in this population fail to respond, or respond only poorly, to HERCEPTIN® treatment, and in the clinical trial preceding marketing approval, the median time to disease progression in all treated patients was only 3.1 months. Therefore, there is a significant clinical need for developing further HER2-directed cancer therapies for those patients with HER2-overexpressing

tumors or other diseases associated with HER2 expression that do not respond, or respond poorly, to HERCEPTIN[®] treatment.

Summary of the Invention

5 The present invention is based on the unexpected experimental finding that HERCEPTIN[®]-maytansinoid conjugates are highly effective in the treatment of HER2 (ErbB2) overexpressing tumors that do not respond, or respond poorly, to HERCEPTIN[®] therapy.

10 In one aspect, the present invention concerns a method for the treatment of a tumor in a mammal, wherein the tumor is characterized by the overexpression of an ErbB receptor and does not respond or responds poorly to treatment with a monoclonal anti-ErbB antibody, comprising administering to the mammal a therapeutically effective amount of a conjugate of the anti-ErbB antibody with a maytansinoid.

15 In a preferred embodiment, the patient is human. In another preferred embodiment, the ErbB receptor is (human) ErbB2 (HER2). The method is not limited by the mechanism of action of the anti-ErbB antibody used. Thus, the anti-ErbB antibody may, for example, have growth inhibitory properties and/or may induce cell death and/or apoptosis. In a particularly preferred embodiment, the method concerns the treatment of cancer including, without limitation, breast, ovarian, stomach, endometrial, salivary gland, lung, kidney, colon, colorectal, thyroid, pancreatic, prostate and bladder cancer. Preferably the cancer is breast cancer, in particular, breast cancer which overexpresses ErbB2 at a 2+ level or above, more preferably at a 3+ level. A preferred group of antibodies has a biological characteristic of

20 a 4D5 monoclonal antibody, or binds essentially the same epitope as a 4D5 monoclonal antibody, a humanized form of the murine monoclonal antibody 4D5 (ATCC CRL 10463) being particularly preferred.

25 The maytansinoid used in the conjugates of the present invention may be maytansine or, preferably, maytansinol or a maytansinol ester. The antibody and maytansinoid may be conjugated by a bispecific chemical linker, such as N-succinimidyl-4-(2-pyridylthio)propanoate (SPDP) or N-succinimidyl-4-(2-pyridylthio)pentanoate (SPP). The linking group between the antibody and the maytansinoid may, for example, be a disulfide, thioether, acid labile, photolabile, peptidase labile, or esterase labile group.

30 In another aspect, the invention concerns an article of manufacture comprising a container and a composition contained therein, wherein the composition comprises an anti-ErbB antibody-maytansinoid conjugate, and further comprising a package insert or label indicating that the composition can be used to treat cancer characterized by overexpression of an ErbB receptor, preferably at a 2+ level or above.

Brief Description of the Drawings

Figure 1 shows the structure of the maytansinoid, designated "DM1."

Figure 2 illustrates the structure of a HERCEPTIN[®]-DM1 conjugate.

35 Figure 3 is the elution profile of HERCEPTIN[®]-DM1 conjugate on a Sephacryl S300 gel filtration column.

Figure 4 shows the nucleotide sequence of a HER2 transgene plasmid construct (SEQ ID NO: 1) directing the expression of native human HER2 (ErbB2) in the mammary gland of a transgenic mouse. The figure includes the nucleotide sequence of HER2 (ErbB2) cDNA insert (SEQ ID NO: 2) as well as the deduced amino acid sequence of HER2 (ErbB2) (SEQ ID NO: 3), including the signal sequence. Within SEQ ID NO: 3, residues from about 22 to about 645, inclusive represent the HER2 (ErbB2) extracellular domain.

Figure 5 illustrates the effect of HERCEPTIN[®]-DM1 on HER2-transgenic tumors. Two mm³ pieces of MMTV-HER2-transgenic tumors were transplanted into the mammary fat pad of FVB mice. When tumors reached 250 mm³, groups of 8 mice were injected i.v. on 5 consecutive days with a HERCEPTIN[®]-DM1 conjugate. Two other groups of mice were treated IP twice per week with 10 mg/kg of either HERCEPTIN[®] or RITUXAN[®].

Figure 6 shows the heavy chain variable region sequence of a humanized anti-HER2 antibody 2C4.

Figure 7 shows the light chain variable region sequence of a humanized anti-HER2 antibody 2C4.

Detailed Description of the Invention

1. Definitions

Unless defined otherwise, technical and scientific terms used herein have the same meaning as commonly understood by one of ordinary skill in the art to which this invention belongs. Singleton *et al.*, *Dictionary of Microbiology and Molecular Biology 2nd ed.*, J. Wiley & Sons (New York, NY 1994). One skilled in the art will recognize many methods and materials similar or equivalent to those described herein, which could be used in the practice of the present invention. Indeed, the present invention is in no way limited to the methods and materials described. For purposes of the present invention, the following terms are defined below.

An "ErbB receptor" or "ErbB" is a receptor protein tyrosine kinase which belongs to the ErbB receptor family and includes ErbB1 (EGFR), ErbB2 (HER2), ErbB3 (HER3) and ErbB4 (HER4) receptors and other members of this family to be identified in the future. The definition specifically includes ErbB receptors encoded by spliced forms of the corresponding erbB oncogens, including, without limitation, the deletion variant of ErbB2 disclosed in PCT publication No. WO 00/20579 (published on April 13, 2000). The ErbB receptor will generally comprise an extracellular domain, which may bind an ErbB ligand; a lipophilic transmembrane domain; a conserved intracellular tyrosine kinase domain; and a carboxyl-terminal signaling domain harboring several tyrosine residues which can be phosphorylated. The ErbB receptor may be a "native sequence" ErbB receptor or a functional derivative, such as an "amino acid sequence variant" thereof. Preferably the ErbB receptor is native sequence human ErbB receptor.

The terms "ErbB1", "epidermal growth factor receptor" and "EGFR" are used interchangeably herein and refer to native sequence EGFR as disclosed, for example, in Carpenter *et al. Ann. Rev. Biochem.* 56:881-914 (1987), including naturally occurring mutant forms thereof (*e.g.* a deletion mutant EGFR as in Humphrey *et al. PNAS (USA)* 87:4207-4211 (1990)), and its functional derivatives, such as amino acid sequence variants. *erbB1* refers to the gene encoding the EGFR protein product.

The expressions "ErbB2" and "HER2" are used interchangeably herein and refer to native sequence human HER2 protein described, for example, in Semba *et al., PNAS (USA)* 82:6497-6501 (1985) and Yamamoto *et al. Nature*

319:230-234 (1986) (Genebank accession number X03363), and functional derivatives, such as amino acid sequence variants thereof. The term *erbB2* refers to the gene encoding human HER2 and *neu* refers to the gene encoding rat p185^{neu}. Preferred HER2 is native sequence human HER2. Examples of antibodies which bind HER2 include MAb 4D5 (ATCC CRL 10463), 2C4 (ATCC HB-12697), 7F3 (ATCC HB-12216), and 7C2 (ATCC HB 12215) (see, US Patent No. 5,772,997; WD98/77797; and US Patent No. 5,840,525, expressly incorporated herein by reference). Humanized anti-HER2 antibodies include huMAb4D5-1, huMAb4D5-2, huMAb4D5-3, huMAb4D5-4, huMAb4D5-5, huMAb4D5-6, huMAb4D5-7 and huMAb4D5-8 (HERCEPTIN®) as described in Table 3 of U.S. Patent 5,821,337 expressly incorporated herein by reference; humanized 520C9 (WD93/21319). Human anti-HER2 antibodies are described in U.S. Patent No. 5,772,997 issued June 30, 1998 and WO 97/00271 published January 3, 1997.

"ErbB3" and "HER3" refer to the receptor polypeptide as disclosed, for example, in US Pat. Nos. 5,183,884 and 5,480,968 as well as Kraus *et al. PNAS (USA)* 86:9193-9197 (1989), and functional derivatives, including amino acid sequence variants thereof. Examples of antibodies which bind HER3 are described in US Patent No. 5,968,511 (Akita and Sliwkowski), *e.g.* the 8B8 antibody (ATCC HB 12070) or a humanized variant thereof.

The terms "ErbB4" and "HER4" herein refer to the receptor polypeptide as disclosed, for example, in EP Pat Appln No 599,274; Plowman *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:1746-1750 (1993); and Plowman *et al., Nature*, 366:473-475 (1993), and functional derivatives, including amino acid sequence variants thereof such as the HER4 isoforms disclosed in WD 99/19488.

A "native" or "native sequence" EGFR, HER2, HER3 or HER4 polypeptide may be isolated from nature, produced by techniques of recombinant DNA technology, chemically synthesized, or produced by any combinations of these or similar methods.

"Functional derivatives" include amino acid sequence variants, and covalent derivatives of the native polypeptides as long as they retain a qualitative biological activity of the corresponding native polypeptide. Amino acid sequence variants generally differ from a native sequence in the substitution, deletion and/or insertion of one or more amino acids anywhere within a native amino acid sequence. Deletional variants include fragments of the native polypeptides, and variants having N- and/or C-terminal truncations. Ordinarily, amino acid sequence variants will possess at least about 70% homology, preferably at least about 80%, more preferably at least about 90% homology with a native polypeptide.

"Homology" is defined as the percentage of residues in the amino acid sequence variant that are identical after aligning the sequences and introducing gaps, if necessary, to achieve the maximum percent homology. Methods and computer programs for the alignment are well known in the art. One such computer program is "Align 2", authored by Genentech, Inc., which was filed with user documentation in the United States Copyright Office, Washington, DC 20559, on December 10, 1991.

By "ErbB ligand" is meant a polypeptide which binds to and/or activates an ErbB receptor. The ErbB ligand of particular interest herein is a native sequence human ErbB ligand such as Epidermal Growth Factor (EGF) (Savage *et al., J. Biol. Chem.* 247:7612-7621 (1972)); Transforming Growth Factor alpha (TGF-alpha) (Marquardt *et al., Science*

223:1079-1082 (1984)); amphiregulin also known as schwannoma or keratinocyte autocrine growth factor (Shoyab *et al. Science* 243:1074-1076 (1989); Kimura *et al. Nature* 348:257-260 (1990); and Cook *et al. Mol. Cell. Biol.* 11:2547-2557 (1991)); betacellulin (Shing *et al., Science* 259:1604-1607 (1993); and Sasada *et al. Biochem. Biophys. Res. Commun.* 190:1173 (1993)); heparin-binding epidermal growth factor (HB-EGF) (Higashiyama *et al., Science* 251:936-939 (1991)); epiregulin (Toyoda *et al., J. Biol. Chem.* 270:7495-7500 (1995); and Komurasaki *et al. Oncogene* 15:2841-2848 (1997)), a heregulin (see below); neuregulin-2 (NRG-2) (Carraway *et al., Nature* 387:512-516 (1997)); neuregulin-3 (NRG-3) (Zhang *et al., Proc. Natl. Acad. Sci.* 94:9562-9567 (1997)); or cripto (CR-1) (Kannan *et al. J. Biol. Chem.* 272(6):3330-3335 (1997)). ErbB ligands which bind EGFR include EGF, TGF- α , amphiregulin, betacellulin, HB-EGF and epiregulin. ErbB ligands which bind HER3 include heregulins. ErbB ligands capable of binding HER4 include betacellulin, epiregulin, HB-EGF, NRG-2, NRG-3 and heregulins.

"Heregulin" (HRG) when used herein refers to a polypeptide which activates the ErbB2-ErbB3 and ErbB2-ErbB4 protein complexes (i.e. induces phosphorylation of tyrosine residues in the complex upon binding thereto). Various heregulin polypeptides encompassed by this term are disclosed in Holmes *et al., Science* 256:1205-1210 (1992); WO 92/20798; Wen *et al., Mol. Cell. Biol.* 14(3):1909-1919 (1994) and Marchionni *et al., Nature* 362:312-318 (1993), for example. The term includes biologically active fragments and/or variants of a naturally occurring HRG polypeptide, such as an EGF-like domain fragment thereof (e.g. HRG $\beta_{177-244}$).

An "ErbB hetero-oligomer" herein is a noncovalently associated oligomer comprising at least two different ErbB receptors. Such complexes may form when a cell expressing two or more ErbB receptors is exposed to an ErbB ligand and can be isolated by immunoprecipitation and analyzed by SDS-PAGE as described in Sliwkowski *et al., J. Biol. Chem.*, 269(20):14661-14665 (1994), for example. Examples of such ErbB hetero-oligomers include EGFR-HER2, HER2-HER3 and HER3-HER4 complexes. Moreover, the ErbB hetero-oligomer may comprise two or more HER2 receptors combined with a different ErbB receptor, such as HER3, HER4 or EGFR. Other proteins, such as a cytokine receptor subunit (e.g. gp130), may be included in the hetero-oligomer.

In the context of HER2 variants, such as HER2 fragments, the phrase "having the biological activity of a native human HER2" is used to refer to the qualitative ability of such fragments to induce tumor growth when overexpressed in an animal model (transgenic or non-transgenic) of the present invention.

"Tumor", as used herein, refers to all neoplastic cell growth and proliferation, whether malignant or benign, and all pre-cancerous and cancerous cells and tissues.

The terms "cancer" and "cancerous" refer to or describe the physiological condition in mammals that is typically characterized by unregulated cell growth. Examples of cancer include, but are not limited to, carcinoma, lymphoma, blastoma, sarcoma, and leukemia or lymphoid malignancies. More particular examples of such cancers include squamous cell cancer (e.g. epithelial squamous cell cancer), lung cancer including small-cell lung cancer, non-small cell lung cancer, adenocarcinoma of the lung and squamous carcinoma of the lung, cancer of the peritoneum, hepatocellular cancer, gastric or stomach cancer including gastrointestinal cancer, pancreatic cancer, glioblastoma, cervical cancer, ovarian cancer, liver cancer, bladder cancer, hepatoma, breast cancer, colon cancer, rectal cancer,

colorectal cancer, endometrial or uterine carcinoma, salivary gland carcinoma, kidney or renal cancer, prostate cancer, vulval cancer, thyroid cancer, hepatic carcinoma, anal carcinoma, penile carcinoma, as well as head and neck cancer.

5 A cancer which "overexpresses" an ErbB receptor is one which has significantly higher levels of an ErbB receptor, such as HER2, at the cell surface thereof, compared to a noncancerous cell of the same tissue type. Such overexpression may be caused by gene amplification or by increased transcription or translation. ErbB receptor overexpression may be determined in a diagnostic or prognostic assay by evaluating increased levels of the ErbB protein present on the surface of a cell (*e.g.* via an immunohistochemistry assay; IHC). Alternatively, or additionally, one may measure levels of ErbB-encoding nucleic acid in the cell, *e.g.* via fluorescent *in situ* hybridization (FISH; see
10 W098/45479 published October, 1998), Southern blotting, or polymerase chain reaction (PCR) techniques, such as real time quantitative PCR (RT-PCR). One may also study ErbB receptor overexpression by measuring shed antigen (*e.g.*, ErbB extracellular domain) in a biological fluid such as serum (see, *e.g.*, U.S. Patent No. 4,933,294 issued June 12, 1990; W091/05264 published April 18, 1991; U.S. Patent 5,401,638 issued March 28, 1995; and Sias *et al.* *J. Immunol. Methods* 132: 73-80 (1990)). Aside from the above assays, various *in vivo* assays are available to the
15 skilled practitioner. For example, one may expose cells within the body of the patient to an antibody which is optionally labeled with a detectable label, *e.g.* a radioactive isotope, and binding of the antibody to cells in the patient can be evaluated, *e.g.* by external scanning for radioactivity or by analyzing a biopsy taken from a patient previously exposed to the antibody.

The tumors overexpressing HER2 are rated by immunohistochemical scores corresponding to the number of
20 copies of HER2 molecules expressed per cell, and can be determined biochemically: 0 = 0-10,000 copies/cell, 1+ = at least about 200,000 copies/cell, 2+ = at least about 500,000 copies/cell, 3+ = at least about 2,000,000 copies/cell. Overexpression of HER2 at the 3+ level, which leads to ligand-independent activation of the tyrosine kinase (Hudziak *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 7159-7163 [1987]), occurs in approximately 30% of breast cancers, and in these patients, relapse-free survival and overall survival are diminished (Slamon *et al.*, *Science* 244:
25 707-712 [1989]; Slamon *et al.*, *Science* 235: 177-182 [1987]).

Conversely, a cancer which is "not characterized by overexpression of an ErbB receptor" is one which, in a diagnostic assay, does not express higher than normal levels of ErbB receptor compared to a noncancerous cell of the same tissue type.

A "hormone independent" cancer is one in which proliferation thereof is not dependent on the presence of a
30 hormone which binds to a receptor expressed by cells in the cancer. Such cancers do not undergo clinical regression upon administration of pharmacological or surgical strategies that reduce the hormone concentration in or near the tumor. Examples of hormone independent cancers include androgen independent prostate cancer, estrogen independent breast cancer, endometrial cancer and ovarian cancer. Such cancers may begin as hormone dependent tumors and progress from a hormone-sensitive stage to a hormone-refractory tumor following anti-hormonal therapy.

The term "antibody" herein is used in the broadest sense and specifically covers intact monoclonal antibodies, polyclonal antibodies, multispecific antibodies (*e.g.* bispecific antibodies) formed from at least two intact antibodies, and antibody fragments, so long as they exhibit the desired biological activity.

The term "monoclonal antibody" as used herein refers to an antibody obtained from a population of substantially homogeneous antibodies, *i.e.*, the individual antibodies comprising the population are identical except for possible naturally occurring mutations that may be present in minor amounts. Monoclonal antibodies are highly specific, being directed against a single antigenic site. Furthermore, in contrast to polyclonal antibody preparations which include different antibodies directed against different determinants (epitopes), each monoclonal antibody is directed against a single determinant on the antigen. In addition to their specificity, the monoclonal antibodies are advantageous in that they may be synthesized uncontaminated by other antibodies. The modifier "monoclonal" indicates the character of the antibody as being obtained from a substantially homogeneous population of antibodies, and is not to be construed as requiring production of the antibody by any particular method. For example, the monoclonal antibodies to be used in accordance with the present invention may be made by the hybridoma method first described by Kohler *et al.*, *Nature*, 256:495 (1975), or may be made by recombinant DNA methods (see, *e.g.*, U.S. Patent No. 4,816,567). The "monoclonal antibodies" may also be isolated from phage antibody libraries using the techniques described in Clackson *et al.*, *Nature*, 352:624-628 (1991) and Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991), for example.

The monoclonal antibodies herein specifically include "chimeric" antibodies in which a portion of the heavy and/or light chain is identical with or homologous to corresponding sequences in antibodies derived from a particular species or belonging to a particular antibody class or subclass, while the remainder of the chain(s) is identical with or homologous to corresponding sequences in antibodies derived from another species or belonging to another antibody class or subclass, as well as fragments of such antibodies, so long as they exhibit the desired biological activity (U.S. Patent No. 4,816,567; and Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984)). Chimeric antibodies of interest herein include primatized antibodies comprising variable domain antigen-binding sequences derived from a non-human primate (*e.g.* Old World Monkey, Ape etc) and human constant region sequences.

"Antibody fragments" comprise a portion of an intact antibody, preferably comprising the antigen-binding or variable region thereof. Examples of antibody fragments include Fab, Fab', F(ab')₂, and Fv fragments; diabodies; linear antibodies; single-chain antibody molecules; and multispecific antibodies formed from antibody fragment(s).

An "intact" antibody is one which comprises an antigen-binding variable region as well as a light chain constant domain (C_L) and heavy chain constant domains, C_H1, C_H2 and C_H3. The constant domains may be native sequence constant domains (*e.g.* human native sequence constant domains) or amino acid sequence variant thereof. Preferably, the intact antibody has one or more effector functions.

"Humanized" forms of non-human (*e.g.*, rodent) antibodies are chimeric antibodies that contain minimal sequence derived from non-human immunoglobulin. For the most part, humanized antibodies are human immunoglobulins (recipient antibody) in which residues from a hypervariable region of the recipient are replaced by residues from a hypervariable region of a non-human species (donor antibody) such as mouse, rat, rabbit or nonhuman

primate having the desired specificity, affinity, and capacity. In some instances, framework region (FR) residues of the human immunoglobulin are replaced by corresponding non-human residues. Furthermore, humanized antibodies may comprise residues that are not found in the recipient antibody or in the donor antibody. These modifications are made to further refine antibody performance. In general, the humanized antibody will comprise substantially all of at least one, and typically two, variable domains, in which all or substantially all of the hypervariable loops correspond to those of a non-human immunoglobulin and all or substantially all of the FRs are those of a human immunoglobulin sequence. The humanized antibody optionally also will comprise at least a portion of an immunoglobulin constant region (Fc), typically that of a human immunoglobulin. For further details, see Jones *et al.*, *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature* 332:323-329 (1988); and Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992).

Humanized anti-ErbB2 antibodies include huMAb4D5-1, huMAb4D5-2, huMAb4D5-3, huMAb4D5-4, huMAb4D5-5, huMAb4D5-6, huMAb4D5-7 and huMAb4D5-8 (HERCEPTIN[®]) as described in Table 3 of U.S. Patent 5,821,337 expressly incorporated herein by reference; humanized 520C9 (W093/21319) and humanized 2C4 antibodies as those shown in Figure 6.

Antibody "effector functions" refer to those biological activities attributable to the Fc region (a native sequence Fc region or amino acid sequence variant Fc region) of an antibody. Examples of antibody effector functions include C1q binding; complement dependent cytotoxicity; Fc receptor binding; antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC); phagocytosis; down regulation of cell surface receptors (*e.g.* B cell receptor; BCR), etc.

Depending on the amino acid sequence of the constant domain of their heavy chains, intact antibodies can be assigned to different "classes". There are five major classes of intact antibodies: IgA, IgD, IgE, IgG, and IgM, and several of these may be further divided into "subclasses" (isotypes), *e.g.*, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, and IgA2. The heavy-chain constant domains that correspond to the different classes of antibodies are called , , , , and , respectively. The subunit structures and three-dimensional configurations of different classes of immunoglobulins are well known.

"Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity" and "ADCC" refer to a cell-mediated reaction in which nonspecific cytotoxic cells that express Fc receptors (FcRs) (*e.g.* Natural Killer (NK) cells, neutrophils, and macrophages) recognize bound antibody on a target cell and subsequently cause lysis of the target cell. The primary cells for mediating ADCC, NK cells, express Fc RIII only, whereas monocytes express Fc RI, Fc RII and Fc RIII. FcR expression on hematopoietic cells is summarized in Table 3 on page 464 of Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9:457-92 (1991). To assess ADCC activity of a molecule of interest, an *in vitro* ADCC assay, such as that described in US Patent No. 5,500,362 or 5,821,337 may be performed. Useful effector cells for such assays include peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and Natural Killer (NK) cells. Alternatively, or additionally, ADCC activity of the molecule of interest may be *assessed in vivo*, *e.g.*, in a animal model such as that disclosed in Clynes *et al. PNAS (USA)* 95:652-656 (1998).

"Human effector cells" are leukocytes which express one or more FcRs and perform effector functions. Preferably, the cells express at least Fc RIII and perform ADCC effector function. Examples of human leukocytes

which mediate ADCC include peripheral blood mononuclear cells (PBMC), natural killer (NK) cells, monocytes, cytotoxic T cells and neutrophils; with PBMCs and NK cells being preferred. The effector cells may be isolated from a native source thereof, *e.g.* from blood or PBMCs as described herein.

The terms "Fc receptor" or "FcR" are used to describe a receptor that binds to the Fc region of an antibody.

5 The preferred FcR is a native sequence human FcR. Moreover, a preferred FcR is one which binds an IgG antibody (a gamma receptor) and includes receptors of the Fc RI, Fc RII, and Fc RIII subclasses, including allelic variants and alternatively spliced forms of these receptors. Fc RII receptors include Fc RIIA (an "activating receptor") and Fc RIIB (an "inhibiting receptor"), which have similar amino acid sequences that differ primarily in the cytoplasmic domains thereof. Activating receptor Fc RIIA contains an immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM) in its

10 cytoplasmic domain. Inhibiting receptor Fc RIIB contains an immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif (ITIM) in its cytoplasmic domain. (see review M. in Daëron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234 (1997)). FcRs are reviewed in Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-92 (1991); Capel *et al.*, *Immunomethods* 4:25-34 (1994); and de Haas *et al.*, *J. Lab. Clin. Med.* 126:330-41 (1995). Other FcRs, including those to be identified in the future, are encompassed by the term "FcR" herein. The term also includes the neonatal receptor, FcRn, which is responsible for

15 the transfer of maternal IgGs to the fetus (Guyer *et al.*, *J. Immunol.* 117:587 (1976) and Kim *et al.*, *J. Immunol.* 24:249 (1994)).

"Complement dependent cytotoxicity" or "CDC" refers to the ability of a molecule to lyse a target in the presence of complement. The complement activation pathway is initiated by the binding of the first component of the complement system (C1q) to a molecule (*e.g.* an antibody) complexed with a cognate antigen. To assess complement

20 activation, a CDC assay, *e.g.* as described in Gazzano-Santoro *et al.*, *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996), may be performed.

"Native antibodies" are usually heterotetrameric glycoproteins of about 150,000 daltons, composed of two identical light (L) chains and two identical heavy (H) chains. Each light chain is linked to a heavy chain by one covalent disulfide bond, while the number of disulfide linkages varies among the heavy chains of different immunoglobulin

25 isotypes. Each heavy and light chain also has regularly spaced intrachain disulfide bridges. Each heavy chain has at one end a variable domain (V_H) followed by a number of constant domains. Each light chain has a variable domain at one end (V_L) and a constant domain at its other end. The constant domain of the light chain is aligned with the first constant domain of the heavy chain, and the light-chain variable domain is aligned with the variable domain of the heavy chain. Particular amino acid residues are believed to form an interface between the light chain and heavy chain

30 variable domains.

The term "variable", as used in connection with antibodies, refers to the fact that certain portions of the antibody variable domains differ extensively in sequence among antibodies and are used in the binding and specificity of each particular antibody for its particular antigen. However, the variability is not evenly distributed throughout the variable domains of antibodies. It is concentrated in three segments called hypervariable regions both in the light

35 chain and the heavy chain variable domains. The more highly conserved portions of variable domains are called the

framework regions (FRs). The variable domains of native heavy and light chains each comprise four FRs, largely adopting a β -sheet configuration, connected by three hypervariable regions, which form loops connecting, and in some cases forming part of, the β -sheet structure. The hypervariable regions in each chain are held together in close proximity by the FRs and, with the hypervariable regions from the other chain, contribute to the formation of the antigen-binding site of antibodies (see Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). The constant domains are not involved directly in binding an antibody to an antigen, but exhibit various effector functions, such as participation of the antibody in antibody dependent cellular cytotoxicity (ADCC).

The term "hypervariable region" when used herein refers to the amino acid residues of an antibody which are responsible for antigen-binding. The hypervariable region generally comprises amino acid residues from a "complementarity determining region" or "CDR" (*e.g.* residues 24-34 (L1), 50-56 (L2) and 89-97 (L3) in the light chain variable domain and 31-35 (H1), 50-65 (H2) and 95-102 (H3) in the heavy chain variable domain; Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)) and/or those residues from a "hypervariable loop" (*e.g.* residues 26-32 (L1), 50-52 (L2) and 91-96 (L3) in the light chain variable domain and 26-32 (H1), 53-55 (H2) and 96-101 (H3) in the heavy chain variable domain; Chothia and Lesk *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)). "Framework Region" or "FR" residues are those variable domain residues other than the hypervariable region residues as herein defined.

An "isolated" antibody is one which has been identified and separated and/or recovered from a component of its natural environment. Contaminant components of its natural environment are materials which would interfere with diagnostic or therapeutic uses for the antibody, and may include enzymes, hormones, and other proteinaceous or nonproteinaceous solutes. In preferred embodiments, the antibody will be purified (1) to greater than 95% by weight of antibody as determined by the Lowry method, and most preferably more than 99% by weight, (2) to a degree sufficient to obtain at least 15 residues of N-terminal or internal amino acid sequence by use of a spinning cup sequenator, or (3) to homogeneity by SDS-PAGE under reducing or nonreducing conditions using Coomassie blue or, preferably, silver stain. Isolated antibody includes the antibody *in situ* within recombinant cells since at least one component of the antibody's natural environment will not be present. Ordinarily, however, isolated antibody will be prepared by at least one purification step.

An antibody "which binds" an antigen of interest, *e.g.* ErbB2 antigen, is one capable of binding that antigen with sufficient affinity such that the antibody is useful as a diagnostic and/or therapeutic agent in targeting a cell expressing the antigen and/or for targeted delivery of a cytotoxic or other chemotherapeutic agent, such as a maytansinoid. Where the antibody is one which binds ErbB2, it will usually preferentially bind ErbB2 as opposed to other ErbB receptors, and may be one which does not significantly cross-react with other proteins such as EGFR, ErbB3 or ErbB4. In such embodiments, the extent of binding of the antibody to these non-ErbB2 proteins (*e.g.*, cell surface binding to endogenous receptor) will be less than 10% as determined by fluorescence activated cell sorting (FACS) analysis or radioimmunoprecipitation (RIA). Sometimes, the anti-ErbB2 antibody will not significantly cross-

react with the rat *neu* protein, *e.g.*, as described in Schecter *et al. Nature* 312:513 (1984) and Drebin *et al., Nature* 312:545-548 (1984).

Unless indicated otherwise, the expressions "monoclonal antibody 4D5", and "4D5 monoclonal antibody" refer to an antibody that has antigen binding residues of, or derived from, the murine 4D5 antibody. For example, the monoclonal antibody 4D5 may be murine monoclonal antibody 4D5 (ATCC CRL 10463) or a variant thereof, such as humanized antibody 4D5, possessing antigen binding amino acid residues of murine monoclonal antibody 4D5. Exemplary humanized 4D5 antibodies include huMAb4D5-1, huMAb4D5-2, huMAb4D5-3, huMAb4D5-4, huMAb4D5-5, huMAb4D5-6, huMAb4D5-7 and huMAb4D5-8 (HERCEPTIN®) as in US Patent No. 5,821,337, with huMAb4D5-8 (HERCEPTIN®) being a preferred humanized 4D5 antibody.

An antibody having a "biological characteristic" of a designated antibody, such as the monoclonal antibody designated 4D5, is one which possesses one or more of the biological characteristics of that antibody which distinguish it from other antibodies that bind to the same antigen (*e.g.* ErbB2). For example, an antibody with a biological characteristic of 4D5 may show growth inhibitory effect on ErbB2 overexpressing cells in a manner that is dependent on the ErbB2 expression level and/or bind the same epitope in the extracellular domain of ErbB2 as that bound by 4D5 (*e.g.* which blocks binding of monoclonal antibody 4D5 to ErbB2).

A "growth inhibitory agent" when used herein refers to a compound or composition which inhibits growth of a cell, especially an ErbB expressing cancer cell either *in vitro* or *in vivo*. Thus, the growth inhibitory agent may be one which significantly reduces the percentage of ErbB expressing cells in S phase. Examples of growth inhibitory agents include agents that block cell cycle progression (at a place other than S phase), such as agents that induce G1 arrest and M-phase arrest. Classical M-phase blockers include the vincas (vincristine and vinblastine), taxanes, and topo II inhibitors such as doxorubicin, epirubicin, daunorubicin, etoposide, and bleomycin. Those agents that arrest G1 also spill over into S-phase arrest, for example, DNA alkylating agents such as tamoxifen, prednisone, dacarbazine, mechlorethamine, cisplatin, methotrexate, 5-fluorouracil, and ara-C. Further information can be found in *The Molecular Basis of Cancer*, Mendelsohn and Israel, eds., Chapter 1, entitled "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs" by Murakami *et al.* (WB Saunders: Philadelphia, 1995), especially p. 13.

Examples of "growth inhibitory" antibodies are those which bind to ErbB2 and inhibit the growth of cancer cells overexpressing ErbB2. Preferred growth inhibitory anti-ErbB2 antibodies inhibit growth of SK-BR-3 breast tumor cells in cell culture by greater than 20%, and preferably greater than 50% (*e.g.* from about 50% to about 100%) at an antibody concentration of about 0.5 to 30 g/ml, where the growth inhibition is determined six days after exposure of the SK-BR-3 cells to the antibody (see U.S. Patent No. 5,677,171 issued October 14, 1997). The SK-BR-3 cell growth inhibition assay is described in more detail in that patent and hereinbelow. The preferred growth inhibitory antibody is monoclonal antibody 4D5, *e.g.*, humanized 4D5.

A molecule (*e.g.* antibody) which "induces cell death" is one which causes a viable cell to become nonviable. The cell is generally one which expresses the ErbB2 receptor, especially where the cell overexpresses the ErbB2 receptor. Preferably, the cell is a cancer cell, *e.g.* a breast, ovarian, stomach, endometrial, salivary gland, lung, kidney,

colon, thyroid, pancreatic, prostate or bladder cancer cell. *In vitro*, the cell may be a SK-BR-3, BT474, Calu 3, MDA-MB-453, MDA-MB-361 or SKOV3 cell. Cell death *in vitro* may be determined in the absence of complement and immune effector cells to distinguish cell death induced by antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) or complement dependent cytotoxicity (CDC). Thus, the assay for cell death may be performed using heat inactivated serum (*i.e.* in the absence of complement) and in the absence of immune effector cells. To determine whether the molecule is able to induce cell death, loss of membrane integrity as evaluated by uptake of propidium iodide (PI), trypan blue (see Moore *et al. Cytotechnology* 17:1-11 (1995)) or 7AAD can be assessed relative to untreated cells. Preferred cell death-inducing antibodies are those which induce PI uptake in the PI uptake assay in BT474 cells. Examples of antibodies which induce cell death include anti-ErbB2 antibodies 7C2 and 7F3 (WO 98/17797, expressly incorporated herein by reference), including humanized and/or affinity matured variants thereof.

A molecule (e.g. antibody) which "induces apoptosis" is one which induces programmed cell death as determined by binding of annexin V, fragmentation of DNA, cell shrinkage, dilation of endoplasmic reticulum, cell fragmentation, and/or formation of membrane vesicles (called apoptotic bodies). The cell is usually one which overexpresses the ErbB2 receptor. Preferably the cell is a tumor cell, *e.g.* a breast, ovarian, stomach, endometrial, salivary gland, lung, kidney, colon, thyroid, pancreatic, prostate or bladder cancer cell. *In vitro*, the cell may be a SK-BR-3, BT474, Calu 3 cell, MDA-MB-453, MDA-MB-361 or SKOV3 cell. Various methods are available for evaluating the cellular events associated with apoptosis. For example, phosphatidyl serine (PS) translocation can be measured by annexin binding; DNA fragmentation can be evaluated through DNA laddering; and nuclear/chromatin condensation along with DNA fragmentation can be evaluated by any increase in hypodiploid cells. Preferably, the molecule which induces apoptosis is one which results in about 2 to 50 fold, preferably about 5 to 50 fold, and most preferably about 10 to 50 fold, induction of annexin binding relative to untreated cell in an annexin binding assay using BT474 cells. Sometimes the pro-apoptotic molecule will be one which further blocks ErbB ligand activation of an ErbB receptor. In other situations, the molecule is one which does not significantly block ErbB ligand activation of an ErbB receptor. Further, the molecule may induce apoptosis, without inducing a large reduction in the percent of cells in S phase (*e.g.* one which only induces about 0-10% reduction in the percent of these cells relative to control). Examples of antibodies which induce apoptosis include anti-ErbB2 antibodies 7C2 and 7F3 (WO 98/17797, expressly incorporated herein by reference), including humanized and/or affinity matured variants thereof.

An antibody which "blocks" ligand activation of an ErbB receptor is one which reduces or prevents such activation as hereinabove defined, wherein the antibody is able to block ligand activation of the ErbB receptor substantially more effectively than monoclonal antibody 4D5, *e.g.* about as effectively as monoclonal antibodies 7F3 or 2C4 or Fab fragments thereof and preferably about as effectively as monoclonal antibody 2C4 or a Fab fragment thereof. For example, the antibody that blocks ligand activation of an ErbB receptor may be one which is about 50-100% more effective than 4D5 at blocking formation of an ErbB hetero-oligomer. Blocking of ligand activation of an ErbB receptor can occur by any means, *e.g.* by interfering with: ligand binding to an ErbB receptor, ErbB complex formation, tyrosine kinase activity of an ErbB receptor in an ErbB complex and/or phosphorylation of tyrosine kinase

residue(s) in or by an ErbB receptor. Examples of antibodies which block ligand activation of an ErbB receptor include monoclonal antibodies 2C4 and 7F3 (which block HRG activation of ErbB2/ErbB3 and ErbB2/ErbB4 hetero-oligomers; and EGF, TGF- α , amphiregulin, HB-EGF and/or epiregulin activation of an EGFR/ErbB2 hetero-oligomer); and L26, L96 and L288 antibodies (Klapper *et al. Oncogene* 14:2099-2109 (1997)), which block EGF and NDF binding to T47D cells
5 which express EGFR, ErbB2, ErbB3 and ErbB4. Humanized and/or affinity matured variants these and other antibodies within the definition are specifically included.

The term "epitope" is used to refer to binding sites for (monoclonal or polyclonal) antibodies on protein antigens.

Antibodies that bind to a certain epitope are identified by "epitope mapping." There are many methods
10 known in the art for mapping and characterizing the location of epitopes on proteins, including solving the crystal structure of an antibody-antigen complex, competition assays, gene fragment expression assays, and synthetic peptide-based assays, as described, for example, in Chapter 11 of Harlow and Lane, *Using Antibodies*, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1999. Competition assays are discussed below. According to the gene fragment expression assays, the open reading frame encoding the protein is
15 fragmented either randomly or by specific genetic constructions and the reactivity of the expressed fragments of the protein with the antibody to be tested is determined. The gene fragments may, for example, be produced by PCR and then transcribed and translated into protein *in vitro*, in the presence of radioactive amino acids. The binding of the antibody to the radioactively labeled protein fragments is then determined by immunoprecipitation and gel electrophoresis. Certain epitopes can also be identified by using large libraries of random peptide sequences displayed
20 on the surface of phage particles (phage libraries). Alternatively, a defined library of overlapping peptide fragments can be tested for binding to the test antibody in simple binding assays. The latter approach is suitable to define linear epitopes of about 5 to 15 amino acids.

An antibody binds "essentially the same epitope" as a reference antibody, when the two antibodies recognize identical or sterically overlapping epitopes. The most widely used and rapid methods for determining
25 whether two epitopes bind to identical or sterically overlapping epitopes are competition assays, which can be configured in all number of different formats, using either labeled antigen or labeled antibody. Usually, the antigen is immobilized on a 96-well plate, and the ability of unlabeled antibodies to block the binding of labeled antibodies is measured using radioactive or enzyme labels.

The "epitope 4D5" is the region in the extracellular domain of ErbB2 to which the antibody 4D5 (ATCC CRL
30 10463) binds. This epitope is close to the transmembrane domain of ErbB2, and extends from about residue 519 to about residue 625, inclusive within the ErbB2 extracellular domain sequence included in SEQ ID NO: 3, Figure 4. To screen for antibodies which bind to the 4D5 epitope, a routine cross-blocking assay such as that described in Harlow and Lane, *supra*, can be performed. Alternatively, epitope mapping can be performed to assess whether the antibody binds to the 4D5 epitope of ErbB2 (*e.g.* any one or more residues in the region from about residue 529 to about
35 residue 625, inclusive in SEQ ID NO: 3).

The "epitope 3H4" is the region in the extracellular domain of ErbB2 to which the antibody 3H4 binds. This epitope includes residues from about 541 to about 599, inclusive, in the amino acid sequence of ErbB2 extracellular domain (see Figure 4 and SEQ ID NO: 3).

The "epitope 7C2/7F3" is the region at the N terminus of the extracellular domain of ErbB2 to which the 7C2 and/or 7F3 antibodies (each deposited with the ATCC, see below) bind. To screen for antibodies which bind to the 7C2/7F3 epitope, a routine cross-blocking assay such as that described in *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988), can be performed. Alternatively, epitope mapping can be performed to establish whether the antibody binds to the 7C2/7F3 epitope on ErbB2 (e.g. any one or more of residues in the region from about residue 22 to about residue 53 of ErbB2; see Figure 4, and SEQ ID NO: 3).

A tumor which "does not respond, or responds poorly, to treatment with a monoclonal anti-ErbB antibody" does not show statistically significant improvement in response to anti-ErbB antibody treatment when compared to no treatment or treatment with placebo in a recognized animal model or a human clinical trial, or which responds to initial treatment with anti-ErbB antibodies but grows as treatment is continued. A particularly suitable animal model for testing the efficacy of anti-ErbB antibodies is the transgenic animal model disclosed herein, and illustrated in Example 3.

The terms "treat" or "treatment" refer to both therapeutic treatment and prophylactic or preventative measures, wherein the object is to prevent or slow down (lessen) an undesired physiological change or disorder, such as the development or spread of cancer. For purposes of this invention, beneficial or desired clinical results include, but are not limited to, alleviation of symptoms, diminishment of extent of disease, stabilized (i.e., not worsening) state of disease, delay or slowing of disease progression, amelioration or palliation of the disease state, and remission (whether partial or total), whether detectable or undetectable. "Treatment" can also mean prolonging survival as compared to expected survival if not receiving treatment. Those in need of treatment include those already with the condition or disorder as well as those prone to have the condition or disorder or those in which the condition or disorder is to be prevented.

A "disorder" is any condition that would benefit from treatment of the present invention. This includes chronic and acute disorders or diseases including those pathological conditions which predispose the mammal to the disorder in question. Non-limiting examples of disorders to be treated herein include benign and malignant tumors; leukemias and lymphoid malignancies, in particular breast, ovarian, stomach, endometrial, salivary gland, lung, kidney, colon, thyroid, pancreatic, prostate or bladder cancer. A preferred disorder to be treated in accordance with the present invention is malignant tumor, such as breast cancer, that overexpresses an ErbB receptor (e.g. ErbB2 and/or EGFR), and does not respond or responds poorly to treatment with antibody to the receptor(s) that is/are overexpressed. A particularly preferred disorder is an ErbB2-overexpressing breast cancer that does not respond or responds poorly to HERCEPTIN® therapy.

The term "therapeutically effective amount" refers to an amount of a drug effective to treat a disease or disorder in a mammal. In the case of cancer, the therapeutically effective amount of the drug may reduce the number

of cancer cells; reduce the tumor size; inhibit (*i.e.*, slow to some extent and preferably stop) cancer cell infiltration into peripheral organs; inhibit (*i.e.*, slow to some extent and preferably stop) tumor metastasis; inhibit, to some extent, tumor growth; and/or relieve to some extent one or more of the symptoms associated with the cancer. To the extent the drug may prevent growth and/or kill existing cancer cells, it may be cytostatic and/or cytotoxic. For cancer therapy, efficacy can, for example, be measured by assessing the time to disease progression (TTP) and/or determining the response rate (RR).

The term "cytotoxic agent" as used herein refers to a substance that inhibits or prevents the function of cells and/or causes destruction of cells. The term is intended to include radioactive isotopes (*e.g.* At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³² and radioactive isotopes of Lu), chemotherapeutic agents, and toxins such as small molecule toxins or enzymatically active toxins of bacterial, fungal, plant or animal origin, including fragments and/or variants thereof.

A "chemotherapeutic agent" is a chemical compound useful in the treatment of cancer. Examples of chemotherapeutic agents include alkylating agents such as thiotepa and cyclophosphamide (CYTOXANTM); alkyl sulfonates such as busulfan, improsulfan and piposulfan; aziridines such as benzodopa, carboquone, meturedopa, and uredopa; ethylenimines and methylamelamines including altretamine, triethylenemelamine, trietylenephosphoramide, triethylenethiophosphoramide and trimethylolomelamine; nitrogen mustards such as chlorambucil, chlornaphazine, cholophosphamide, estramustine, ifosfamide, mechlorethamine, mechlorethamine oxide hydrochloride, melphalan, novembichin, phenesterine, prednimustine, trofosfamide, uracil mustard; nitrosureas such as carmustine, chlorozotocin, fotemustine, lomustine, nimustine, ranimustine; antibiotics such as aclacinomysins, actinomycin, authramycin, azaserine, bleomycins, cactinomycin, calicheamicin, carabycin, carminomycin, carzinophilin, chromomycins, dactinomycin, daunorubicin, detorubicin, 6-diazo-5-oxo-L-norleucine, doxorubicin, epirubicin, esorubicin, idarubicin, marcellomycin, mitomycins, mycophenolic acid, nogalamycin, olivomycins, peplomycin, potfiromycin, puromycin, quelamycin, rodorubicin, streptonigrin, streptozocin, tubercidin, ubenimex, zinostatin, zorubicin; anti-metabolites such as methotrexate and 5-fluorouracil (5-FU); folic acid analogues such as denopterin, methotrexate, pteropterin, trimetrexate; purine analogs such as fludarabine, 6-mercaptopurine, thiamiprine, thioguanine; pyrimidine analogs such as ancitabine, azacitidine, 6-azauridine, carmofur, cytarabine, dideoxyuridine, doxifluridine, enocitabine, floxuridine, 5-FU; androgens such as calusterone, dromostanolone propionate, epitiostanol, mepitiothane, testolactone; anti-adrenals such as aminoglutethimide, mitotane, trilostane; folic acid replenisher such as frolinic acid; aceglatone; aldophosphamide glycoside; aminolevulinic acid; amsacrine; bestabucil; bisantrene; edatraxate; defofamine; demecolcine; diaziquone; elfornithine; elliptinium acetate; etoglucid; gallium nitrate; hydroxyurea; lentinan; lonidamine; mitoguazone; mitoxantrone; mopidamol; nitracrine; pentostatin; phenamet; pirarubicin; podophyllinic acid; 2-ethylhydrazide; procarbazine; PSK; razoxane; sizofiran; spirogermanium; tenuazonic acid; triaziquone; 2, 2', 2' - trichlorotriethylamine; urethan; vindesine; dacarbazine; mannomustine; mitobronitol; mitolactol; pipobroman; gacytosine; arabinoside ("Ara-C"); cyclophosphamide; thiotepa; taxanes, *e.g.* paclitaxel (TAXOL[®], Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ) and doxetaxel (TAXOTERE[®], Rhône-Poulenc Rorer, Antony, France); chlorambucil;

gemcitabine; 6-thioguanine; mercaptopurine; methotrexate; platinum analogs such as cisplatin and carboplatin; vinblastine; platinum; etoposide (VP-16); ifosfamide; mitomycin C; mitoxantrone; vincristine; vinorelbine; navelbine; novantrone; teniposide; daunomycin; aminopterin; xeloda; ibandronate; CPT-11; topoisomerase inhibitor RFS 2000; difluoromethylornithine (DMFO); retinoic acid; esperamicins; capecitabine; and pharmaceutically acceptable salts, acids or derivatives of any of the above. Also included in this definition are anti-hormonal agents that act to regulate or inhibit hormone action on tumors such as anti-estrogens including for example tamoxifen, raloxifene, aromatase inhibiting 4(5)-imidazoles, 4-hydroxytamoxifen, trioxifene, keoxifene, LY117018, onapristone, and toremifene (Fareston); and anti-androgens such as flutamide, nilutamide, bicalutamide, leuprolide, and goserelin; and pharmaceutically acceptable salts, acids or derivatives of any of the above.

The term "prodrug" as used in this application refers to a precursor or derivative form of a pharmaceutically active substance that is less cytotoxic to tumor cells compared to the parent drug and is capable of being enzymatically activated or converted into the more active parent form. See, *e.g.*, Wilman, "Prodrugs in Cancer Chemotherapy" *Biochemical Society Transactions*, 14, pp. 375-382, 615th Meeting Belfast (1986) and Stella *et al.*, "Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery," *Directed Drug Delivery*, Borchardt *et al.*, (ed.), pp. 247-267, Humana Press (1985). The prodrugs of this invention include, but are not limited to, phosphate-containing prodrugs, thiophosphate-containing prodrugs, sulfate-containing prodrugs, peptide-containing prodrugs, D-amino acid-modified prodrugs, glycosylated prodrugs, -lactam-containing prodrugs, optionally substituted phenoxyacetamide-containing prodrugs or optionally substituted phenylacetamide-containing prodrugs, 5-fluorocytosine and other 5-fluorouridine prodrugs which can be converted into the more active cytotoxic free drug. Examples of cytotoxic drugs that can be derivatized into a prodrug form for use in this invention include, but are not limited to, those chemotherapeutic agents described above.

The term "nucleic acid" refers to polynucleotides such as deoxyribonucleic acid (DNA), and, where appropriate, ribonucleic acid (RNA). The term also includes, as equivalents, analogs of either DNA or RNA made from nucleotide analogs, and as applicable, single (sense or antisense) and double-stranded polynucleotides. An "isolated" nucleic acid molecule is a nucleic acid molecule that is identified and separated from at least one contaminant nucleic acid molecule with which it is ordinarily associated in the natural source of the nucleic acid. An isolated nucleic acid molecule is other than in the form or setting in which it is found in nature. Isolated nucleic acid molecules therefore are distinguished from the nucleic acid molecule as it exists in natural cells. However, an isolated nucleic acid molecule includes a nucleic acid molecule contained in cells that ordinarily express the antibody where, for example, the nucleic acid molecule is in a chromosomal location different from that of natural cells.

As used herein, the term "vector" refers to a nucleic acid molecule capable of transporting another nucleic acid to which it has been linked. The term "expression vector" includes plasmids, cosmids or phages capable of synthesizing the subject HER2 protein encoded by the respective recombinant gene carried by the vector. Preferred vectors are those capable of autonomous replication and/or expression of nucleic acids to which they are linked. In the

present specification, "plasmid" and "vector" are used interchangeably, as the plasmid is the most commonly used form of vector.

As used herein, the terms "transcriptional regulatory elements" and "transcriptional regulatory sequences" are used interchangeably and refer to nucleic acid, e.g. DNA sequences necessary for the expression of an operably
5 linked coding sequence in a particular host organism. The control sequences that are suitable for prokaryotes, for example, include a promoter, optionally an operator sequence, and a ribosome binding site. Eukaryotic cells are known to utilize promoters, enhancers, splicing signals and polyadenylation signals. These terms are intended to encompass all elements that promote or regulate transcription, including promoters, core elements required for basic interaction of RNA polymerase and transcription factors, upstream elements, enhancers, and response elements (Lewin, "Genes V"
10 (Oxford University Press, Oxford) pages 847-873). Reference herein to the transcriptional regulatory elements of a gene or class of gene includes both all or an intact region of the naturally occurring transcriptional regulatory elements and modified forms of the transcriptional regulatory elements of the gene or group of genes. Such modified forms include rearrangements of the elements, deletions of some elements or extraneous sequences, and insertion of heterologous elements. The modular nature of transcriptional regulatory elements and the absence of position-
15 dependence of the function of some regulatory elements such as enhancers make such modifications possible. Numerous techniques are available for dissecting the regulatory elements of genes to determine their location and function. Such information can be used to direct modification of the elements, if desired. It is preferred, however, that an intact region of the transcriptional regulatory elements of a gene be used.

The term "tissue-specific promoter" means a nucleotide sequence that serves as a promoter, i.e., regulates
20 expression of a selected DNA sequence operably linked to the promoter, and which effects expression of the selected DNA sequence in specific cells of a tissue, such as cells of a mammary gland. In an illustrative embodiment, gene constructs utilizing mammary gland-specific promoters can be used to preferentially direct expression of a HER2 protein or protein fragment in the mammary gland tissue.

Nucleic acid is "operably linked" when it is placed into a functional relationship with another nucleic acid
25 sequence. For example, DNA for a presequence or secretory leader is operably linked to DNA for a polypeptide if it is expressed as a preprotein that participates in the secretion of the polypeptide; a promoter or enhancer is operably linked to a coding sequence if it affects the transcription of the sequence; or a ribosome binding site is operably linked to a coding sequence if it is positioned so as to facilitate translation. Generally, "operably linked" means that the DNA sequences being linked are contiguous, and, in the case of a secretory leader, contiguous and in reading phase.
30 However, enhancers do not have to be contiguous. Linking is accomplished by ligation at convenient restriction sites. If such sites do not exist, the synthetic oligonucleotide adaptors or linkers are used in accordance with conventional practice.

The term "transfection" refers to the introduction of a nucleic acid, e.g., an expression vector, into a recipient cell by nucleic acid-mediated gene transfer. "Transformation", as used herein, refers to a process in which a

cell's genotype is changed as a result of the cellular uptake of exogenous DNA or RNA, and, for example, the transformed cell expresses a recombinant form of HER2.

As used herein, the term "transgene" refers to a nucleic acid sequence which is partly or entirely heterologous, i.e., foreign, to the transgenic animal or cell into which it is introduced, or, is homologous to an endogenous gene of the transgenic animal or cell into which it is introduced, but which is designed to be inserted, or is inserted, into the animal's genome in such a way as to alter the genome of the cell into which it is inserted (e.g., it is inserted at a location which differs from that of the natural gene or its insertion results in a knockout). A transgene can be operably linked to one or more transcriptional regulatory sequences and any other nucleic acid, such as introns, that may be necessary for optimal expression of a selected nucleic acid.

Accordingly, the term "transgene construct" refers to a nucleic acid which includes a transgene, and (optionally) such other nucleic acid sequences as transcriptionally regulatory sequence, polyadenylation sites, replication origins, marker genes, etc., which may be useful in the general manipulation of the transgene for insertion in the genome of a host organism.

The term "transgenic" is used herein as an adjective to describe the property, for example, of an animal or a construct, of harboring a transgene. For instance, as used herein, a "transgenic organism" is any animal, preferably a non-human mammal, in which one or more of the cells of the animal contain heterologous nucleic acid introduced by way of human intervention, such as by transgenic techniques well known in the art. The nucleic acid is introduced into the cell, directly or indirectly by introduction into a precursor of the cell, by way of deliberate genetic manipulation, such as by microinjection or by infection with a recombinant virus. The term genetic manipulation does not include classical cross-breeding, or in vitro fertilization, but rather is directed to the introduction of a recombinant DNA molecule. This molecule may be integrated within a chromosome, or it may be extrachromosomally replicating DNA. In the typical transgenic animals described herein, the transgene causes cells to express or overexpress a recombinant form of the subject HER2 proteins. The terms "founder line" and "founder animal" refer to those animals that are the mature product of the embryos to which the transgene was added, i.e., those animals that grew from the embryos into which DNA was inserted, and that were implanted into one or more surrogate hosts.

The terms "progeny" and "progeny of the transgenic animal" refer to any and all offspring of every generation subsequent to the originally transformed mammals. The term "non-human mammal" refers to all members of the class Mammalia except humans. "Mammal" refers to any animal classified as a mammal, including humans, domestic and farm animals, and zoo, sports, or pet animals, such as mouse, rat, rabbit, pig, sheep, goat, cattle and higher primates.

As used herein, the expressions "cell," "cell line," and "cell culture" are used interchangeably and all such designations include progeny. Thus, the words "transformants" and "transformed cells" include the primary subject cell and cultures derived therefrom without regard for the number of transfers. It is also understood that all progeny may not be precisely identical in DNA content, due to deliberate or inadvertent mutations. Mutant progeny that have

the same function or biological activity as screened for in the originally transformed cell are included. Where distinct designations are intended, it will be clear from the context.

A "liposome" is a small vesicle composed of various types of lipids, phospholipids and/or surfactant which is useful for delivery of a drug (such as the anti-ErbB2 antibodies disclosed herein and, optionally, a chemotherapeutic agent) to a mammal. The components of the liposome are commonly arranged in a bilayer formation, similar to the lipid arrangement of biological membranes.

The term "package insert" is used to refer to instructions customarily included in commercial packages of therapeutic products, that contain information about the indications, usage, dosage, administration, contraindications and/or warnings concerning the use of such therapeutic products.

A "cardioprotectant" is a compound or composition which prevents or reduces myocardial dysfunction (*i.e.* cardiomyopathy and/or congestive heart failure) associated with administration of a drug, such as an anti-ErbB antibody or its maytansinoid conjugate, to a patient. The cardioprotectant may, for example, block or reduce a free-radical-mediated cardiotoxic effect and/or prevent or reduce oxidative-stress injury. Examples of cardioprotectants encompassed by the present definition include the iron-chelating agent dexrazoxane (ICRF-187) (Seifert *et al. The Annals of Pharmacotherapy* 28:1063-1072 (1994)); a lipid-lowering agent and/or anti-oxidant such as probucol (Singal *et al. J. Mol. Cell Cardiol.* 27:1055-1063 (1995)); amifostine (aminothiols 2-[(3-aminopropyl)amino]ethanethiol-dihydrogen phosphate ester, also called WR-2721, and the dephosphorylated cellular uptake form thereof called WR-1065) and S-3-(3-methylaminopropylamino)propylphosphorothioic acid (WR-151327), see Green *et al. Cancer Research* 54:738-741 (1994); digoxin (Bristow, M.R. In: Bristow MR, ed. *Drug-Induced Heart Disease*. New York: Elsevier 191-215 (1980)); beta-blockers such as metoprolol (Hjalmarson *et al. Drugs* 47:Suppl 4:31-9 (1994); and Shaddy *et al. Am. Heart J.* 129:197-9 (1995)); vitamin E; ascorbic acid (vitamin C); free radical scavengers such as oleanolic acid, ursolic acid and N-acetylcysteine (NAC); spin trapping compounds such as alpha-phenyl-tert-butyl nitron (PBN); (Paracchini *et al., Anticancer Res.* 13:1607-1612 (1993)); selenoorganic compounds such as P251 (Elbesen); and the like.

2. Detailed Description

The present invention is based on results obtained in a novel murine HER2-transgenic tumor model in which HERCEPTIN[®] or the murine antibody 4D5 from which HERCEPTIN[®] was derived, had little effect on tumor growth. Using this model to test the efficacy of HERCEPTIN[®] and HERCEPTIN[®]-maytansinoid conjugates, it was surprisingly found that while the transplanted tumor obtained from such transgenic mice responded poorly to HERCEPTIN[®] treatment, the HERCEPTIN[®]-maytansinoid conjugates were highly efficacious.

Accordingly, the present invention is based on the use of anti-ErbB antibody-maytansinoid conjugates in the treatment of ErbB overexpressing tumors that do not respond well to anti-ErbB antibody and/or maytansinoid treatment.

A. Production of anti-ErbB antibodies

A description follows as to exemplary techniques for the production of the antibodies used in accordance with the present invention. The production of antibodies will be illustrated with reference to anti-ErbB2 antibodies but it will be apparent for those skilled in the art that antibodies to other members of the ErbB receptor family can be produced and modified in a similar manner.

5 The ErbB2 antigen to be used for production of antibodies may be, *e.g.*, a soluble form of the extracellular domain of ErbB2 or a portion thereof, containing the desired epitope. Alternatively, cells expressing ErbB2 at their cell surface (*e.g.* NIH-3T3 cells transformed to overexpress ErbB2; or a carcinoma cell line such as SK-BR-3 cells, see Stancovski *et al. PNAS (USA)* 88:8691-8695 (1991)) can be used to generate antibodies. Other forms of ErbB2 useful for generating antibodies will be apparent to those skilled in the art.

10 (i) *Polyclonal antibodies*

Polyclonal antibodies are preferably raised in animals by multiple subcutaneous (sc) or intraperitoneal (ip) injections of the relevant antigen and an adjuvant. It may be useful to conjugate the relevant antigen to a protein that is immunogenic in the species to be immunized, *e.g.*, keyhole limpet hemocyanin, serum albumin, bovine thyroglobulin, or soybean trypsin inhibitor using a bifunctional or derivatizing agent, for example, maleimidobenzoyl sulfosuccinimide ester (conjugation through cysteine residues), N-hydroxysuccinimide (through lysine residues), glutaraldehyde, succinic anhydride, SOCl₂, or R¹N=C=NR, where R and R¹ are different alkyl groups.

15 Animals are immunized against the antigen, immunogenic conjugates, or derivatives by combining, *e.g.*, 100 g or 5 g of the protein or conjugate (for rabbits or mice, respectively) with 3 volumes of Freund's complete adjuvant and injecting the solution intradermally at multiple sites. One month later the animals are boosted with 1/5 to 1/10 the original amount of peptide or conjugate in Freund's complete adjuvant by subcutaneous injection at multiple sites. Seven to 14 days later the animals are bled and the serum is assayed for antibody titer. Animals are boosted until the titer plateaus. Preferably, the animal is boosted with the conjugate of the same antigen, but conjugated to a different protein and/or through a different cross-linking reagent. Conjugates also can be made in recombinant cell culture as protein fusions. Also, aggregating agents such as alum are suitably used to enhance the immune response.

25 (ii) *Monoclonal antibodies*

Monoclonal antibodies are obtained from a population of substantially homogeneous antibodies, *i.e.*, the individual antibodies comprising the population are identical except for possible naturally occurring mutations that may be present in minor amounts. Thus, the modifier "monoclonal" indicates the character of the antibody as not being a mixture of discrete antibodies.

30 For example, the monoclonal antibodies may be made using the hybridoma method first described by Kohler *et al., Nature*, 256:495 (1975), or may be made by recombinant DNA methods (U.S. Patent No. 4,816,567).

In the hybridoma method, a mouse or other appropriate host animal, such as a hamster, is immunized as hereinabove described to elicit lymphocytes that produce or are capable of producing antibodies that will specifically bind to the protein used for immunization. Alternatively, lymphocytes may be immunized *in vitro*. Lymphocytes then

are fused with myeloma cells using a suitable fusing agent, such as polyethylene glycol, to form a hybridoma cell (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp.59-103 (Academic Press, 1986)).

The hybridoma cells thus prepared are seeded and grown in a suitable culture medium that preferably contains one or more substances that inhibit the growth or survival of the unfused, parental myeloma cells. For example, if the parental myeloma cells lack the enzyme hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase (HGPRT or HPRT), the culture medium for the hybridomas typically will include hypoxanthine, aminopterin, and thymidine (HAT medium), which substances prevent the growth of HGPRT-deficient cells.

Preferred myeloma cells are those that fuse efficiently, support stable high-level production of antibody by the selected antibody-producing cells, and are sensitive to a medium such as HAT medium. Among these, preferred myeloma cell lines are murine myeloma lines, such as those derived from MOPC-21 and MPC-11 mouse tumors available from the Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California USA, and SP-2 or X63-Ag8-653 cells available from the American Type Culture Collection, Rockville, Maryland USA. Human myeloma and mouse-human heteromyeloma cell lines also have been described for the production of human monoclonal antibodies (Kozbor, *J. Immunol.*, 133:3001 (1984); and Brodeur *et al.*, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)).

Culture medium in which hybridoma cells are growing is assayed for production of monoclonal antibodies directed against the antigen. Preferably, the binding specificity of monoclonal antibodies produced by hybridoma cells is determined by immunoprecipitation or by an *in vitro* binding assay, such as radioimmunoassay (RIA) or enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA).

The binding affinity of the monoclonal antibody can, for example, be determined by the Scatchard analysis of Munson *et al.*, *Anal. Biochem.*, 107:220 (1980).

After hybridoma cells are identified that produce antibodies of the desired specificity, affinity, and/or activity, the clones may be subcloned by limiting dilution procedures and grown by standard methods (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp.59-103 (Academic Press, 1986)). Suitable culture media for this purpose include, for example, D-MEM or RPMI-1640 medium. In addition, the hybridoma cells may be grown *in vivo* as ascites tumors in an animal.

The monoclonal antibodies secreted by the subclones are suitably separated from the culture medium, ascites fluid, or serum by conventional antibody purification procedures such as, for example, protein A-Sepharose, hydroxylapatite chromatography, gel electrophoresis, dialysis, or affinity chromatography.

DNA encoding the monoclonal antibodies is readily isolated and sequenced using conventional procedures (*e.g.*, by using oligonucleotide probes that are capable of binding specifically to genes encoding the heavy and light chains of murine antibodies). The hybridoma cells serve as a preferred source of such DNA. Once isolated, the DNA may be placed into expression vectors, which are then transfected into host cells such as *E. coli* cells, simian COS cells, Chinese Hamster Ovary (CHO) cells, or myeloma cells that do not otherwise produce antibody protein, to obtain the synthesis of monoclonal antibodies in the recombinant host cells. Review articles on recombinant expression in

bacteria of DNA encoding the antibody include Skerra *et al.*, *Curr. Opinion in Immunol.*, 5:256-262 (1993) and Plückthun, *Immunol. Revs.*, 130:151-188 (1992).

5 In a further embodiment, monoclonal antibodies or antibody fragments can be isolated from antibody phage libraries generated using the techniques described in McCafferty *et al.*, *Nature*, 348:552-554 (1990). Clackson *et al.*, *Nature*, 352:624-628 (1991) and Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991) describe the isolation of murine and human antibodies, respectively, using phage libraries. Subsequent publications describe the production of high affinity (nM range) human antibodies by chain shuffling (Marks *et al.*, *Bio/Technology*, 10:779-783 (1992)), as well as combinatorial infection and *in vivo* recombination as a strategy for constructing very large phage libraries (Waterhouse *et al.*, *Nuc. Acids. Res.*, 21:2265-2266 (1993)). Thus, these techniques are viable alternatives to traditional
10 monoclonal antibody hybridoma techniques for isolation of monoclonal antibodies.

The DNA also may be modified, for example, by substituting the coding sequence for human heavy chain and light chain constant domains in place of the homologous murine sequences (U.S. Patent No. 4,816,567; and Morrison, *et al.*, *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 81:6851 (1984)), or by covalently joining to the immunoglobulin coding sequence all or part of the coding sequence for a non-immunoglobulin polypeptide.

15 Typically such non-immunoglobulin polypeptides are substituted for the constant domains of an antibody, or they are substituted for the variable domains of one antigen-combining site of an antibody to create a chimeric bivalent antibody comprising one antigen-combining site having specificity for an antigen and another antigen-combining site having specificity for a different antigen.

(iii) *Humanized antibodies*

20 Methods for humanizing non-human antibodies have been described in the art. Preferably, a humanized antibody has one or more amino acid residues introduced into it from a source which is non-human. These non-human amino acid residues are often referred to as "import" residues, which are typically taken from an "import" variable domain. Humanization can be essentially performed following the method of Winter and co-workers (Jones *et al.*, *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature*, 332:323-327 (1988); Verhoeven *et al.*, *Science*, 239:1534-
25 1536 (1988)), by substituting hypervariable region sequences for the corresponding sequences of a human antibody. Accordingly, such "humanized" antibodies are chimeric antibodies (U.S. Patent No. 4,816,567) wherein substantially less than an intact human variable domain has been substituted by the corresponding sequence from a non-human species. In practice, humanized antibodies are typically human antibodies in which some hypervariable region residues and possibly some FR residues are substituted by residues from analogous sites in rodent antibodies.

30 The choice of human variable domains, both light and heavy, to be used in making the humanized antibodies is very important to reduce antigenicity. According to the so-called "best-fit" method, the sequence of the variable domain of a rodent antibody is screened against the entire library of known human variable-domain sequences. The human sequence which is closest to that of the rodent is then accepted as the human framework region (FR) for the humanized antibody (Sims *et al.*, *J. Immunol.*, 151:2296 (1993); Chothia *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 196:901 (1987)).

35 Another method uses a particular framework region derived from the consensus sequence of all human antibodies of a

particular subgroup of light or heavy chains. The same framework may be used for several different humanized antibodies (Carter *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); Presta *et al.*, *J. Immunol.*, 151:2623 (1993)).

It is further important that antibodies be humanized with retention of high affinity for the antigen and other favorable biological properties. To achieve this goal, according to a preferred method, humanized antibodies are prepared by a process of analysis of the parental sequences and various conceptual humanized products using three-dimensional models of the parental and humanized sequences. Three-dimensional immunoglobulin models are commonly available and are familiar to those skilled in the art. Computer programs are available which illustrate and display probable three-dimensional conformational structures of selected candidate immunoglobulin sequences. Inspection of these displays permits analysis of the likely role of the residues in the functioning of the candidate immunoglobulin sequence, *i.e.*, the analysis of residues that influence the ability of the candidate immunoglobulin to bind its antigen. In this way, FR residues can be selected and combined from the recipient and import sequences so that the desired antibody characteristic, such as increased affinity for the target antigen(s), is achieved. In general, the hypervariable region residues are directly and most substantially involved in influencing antigen binding.

Example 1 below describes production of an exemplary humanized anti-ErbB2 antibody. The humanized antibody herein may, for example, comprise nonhuman hypervariable region residues incorporated into a human variable heavy domain and may further comprise a framework region (FR) substitution at a position selected from the group consisting of 69H, 71H and 73H utilizing the variable domain numbering system set forth in Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991). In one embodiment, the humanized antibody comprises FR substitutions at two or all of positions 69H, 71H and 73H.

Various forms of the humanized antibody are contemplated. For example, the humanized antibody may be an antibody fragment, such as a Fab. Alternatively, the humanized antibody may be an intact antibody, such as an intact IgG1 antibody.

(iv) *Human antibodies*

As an alternative to humanization, human antibodies can be generated. For example, it is now possible to produce transgenic animals (*e.g.*, mice) that are capable, upon immunization, of producing a full repertoire of human antibodies in the absence of endogenous immunoglobulin production. For example, it has been described that the homozygous deletion of the antibody heavy-chain joining region (J_H) gene in chimeric and germ-line mutant mice results in complete inhibition of endogenous antibody production. Transfer of the human germ-line immunoglobulin gene array in such germ-line mutant mice will result in the production of human antibodies upon antigen challenge. See, *e.g.*, Jakobovits *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:2551 (1993); Jakobovits *et al.*, *Nature*, 362:255-258 (1993); Bruggermann *et al.*, *Year in Immuno.*, 7:33 (1993); and U.S. Patent Nos. 5,591,669, 5,589,369 and 5,545,807.

Alternatively, phage display technology (McCafferty *et al.*, *Nature* 348:552-553 (1990)) can be used to produce human antibodies and antibody fragments *in vitro*, from immunoglobulin variable (V) domain gene repertoires from unimmunized donors. According to this technique, antibody V domain genes are cloned in-frame into either a

major or minor coat protein gene of a filamentous bacteriophage, such as M13 or fd, and displayed as functional antibody fragments on the surface of the phage particle. Because the filamentous particle contains a single-stranded DNA copy of the phage genome, selections based on the functional properties of the antibody also result in selection of the gene encoding the antibody exhibiting those properties. Thus, the phage mimics some of the properties of the B-cell. Phage display can be performed in a variety of formats; for their review see, *e.g.*, Johnson, Kevin S. and Chiswell, David J., *Current Opinion in Structural Biology* 3:564-571 (1993). Several sources of V-gene segments can be used for phage display. Clackson *et al.*, *Nature*, 352:624-628 (1991) isolated a diverse array of anti-oxazolone antibodies from a small random combinatorial library of V genes derived from the spleens of immunized mice. A repertoire of V genes from unimmunized human donors can be constructed and antibodies to a diverse array of antigens (including self-antigens) can be isolated essentially following the techniques described by Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1991), or Griffith *et al.*, *EMBO J.* 12:725-734 (1993). See, also, U.S. Patent Nos. 5,565,332 and 5,573,905.

As discussed above, human antibodies may also be generated by *in vitro* activated B cells (see U.S. Patents 5,567,610 and 5,229,275). Human anti-ErbB2 antibodies are described in U.S. Patent No. 5,772,997 issued June 30, 1998 and WO 97/00271 published January 3, 1997.

(v) *Antibody fragments*

Various techniques have been developed for the production of antibody fragments. Traditionally, these fragments were derived via proteolytic digestion of intact antibodies (see, *e.g.*, Morimoto *et al.*, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117 (1992); and Brennan *et al.*, *Science*, 229:81 (1985)). However, these fragments can now be produced directly by recombinant host cells. For example, the antibody fragments can be isolated from the antibody phage libraries discussed above. Alternatively, Fab'-SH fragments can be directly recovered from *E. coli* and chemically coupled to form F(ab')₂ fragments (Carter *et al.*, *Bio/Technology* 10:163-167 (1992)). According to another approach, F(ab')₂ fragments can be isolated directly from recombinant host cell culture. Other techniques for the production of antibody fragments will be apparent to the skilled practitioner. In other embodiments, the antibody of choice is a single chain Fv fragment (scFv). See WO 93/16185; U.S. Patent No. 5,571,894; and U.S. Patent No. 5,587,458. The antibody fragment may also be a "linear antibody", *e.g.*, as described in U.S. Patent 5,641,870 for example. Such linear antibody fragments may be monospecific or bispecific.

(vi) *Bispecific antibodies*

Bispecific antibodies are antibodies that have binding specificities for at least two different epitopes. Exemplary bispecific antibodies may bind to two different epitopes of the ErbB2 protein. Other such antibodies may combine an ErbB2 binding site with binding site(s) for EGFR, ErbB3 and/or ErbB4. Alternatively, an anti-ErbB2 arm may be combined with an arm which binds to a triggering molecule on a leukocyte such as a T-cell receptor molecule (*e.g.* CD2 or CD3), or Fc receptors for IgG (Fc R), such as Fc RI (CD64), Fc RII (CD32) and Fc RIII (CD16) so as to focus cellular defense mechanisms to the ErbB2-expressing cell. Bispecific antibodies may also be used to localize

cytotoxic agents to cells which express ErbB2. WO 96/16673 describes a bispecific anti-ErbB2/anti-Fc RIII antibody and U.S. Patent No. 5,837,234 discloses a bispecific anti-ErbB2/anti-Fc RI antibody. A bispecific anti-ErbB2/Fc antibody is shown in W098/02463. U.S. Patent No. 5,821,337 teaches a bispecific anti-ErbB2/anti-CD3 antibody.

5 Methods for making bispecific antibodies are known in the art. Traditional production of full length bispecific antibodies is based on the coexpression of two immunoglobulin heavy chain-light chain pairs, where the two chains have different specificities (Millstein *et al.*, *Nature*, 305:537-539 (1983)). Because of the random assortment of immunoglobulin heavy and light chains, these hybridomas (quadromas) produce a potential mixture of 10 different antibody molecules, of which only one has the correct bispecific structure. Purification of the correct molecule, which is usually done by affinity chromatography steps, is rather cumbersome, and the product yields are low. Similar
10 procedures are disclosed in WO 93/08829, and in Traunecker *et al.*, *EMBO J.*, 10:3655-3659 (1991). According to a different approach, antibody variable domains with the desired binding specificities (antibody-antigen combining sites) are fused to immunoglobulin constant domain sequences. The fusion preferably is with an immunoglobulin heavy chain constant domain, comprising at least part of the hinge, CH2, and CH3 regions. It is preferred to have the first heavy-chain constant region (CH1) containing the site necessary for light chain binding, present in at least one of the
15 fusions. DNAs encoding the immunoglobulin heavy chain fusions and, if desired, the immunoglobulin light chain, are inserted into separate expression vectors, and are co-transfected into a suitable host organism. This provides for great flexibility in adjusting the mutual proportions of the three polypeptide fragments in embodiments when unequal ratios of the three polypeptide chains used in the construction provide the optimum yields. It is, however, possible to insert the coding sequences for two or all three polypeptide chains in one expression vector when the expression of at
20 least two polypeptide chains in equal ratios results in high yields or when the ratios are of no particular significance.

In a preferred embodiment of this approach, the bispecific antibodies are composed of a hybrid immunoglobulin heavy chain with a first binding specificity in one arm, and a hybrid immunoglobulin heavy chain-light chain pair (providing a second binding specificity) in the other arm. It was found that this asymmetric structure facilitates the separation of the desired bispecific compound from unwanted immunoglobulin chain combinations, as
25 the presence of an immunoglobulin light chain in only one half of the bispecific molecule provides for a facile way of separation. This approach is disclosed in WO 94/04690. For further details of generating bispecific antibodies see, for example, Suresh *et al.*, *Methods in Enzymology*, 121:210 (1986).

According to another approach described in U.S. Patent No. 5,731,168, the interface between a pair of antibody molecules can be engineered to maximize the percentage of heterodimers which are recovered from
30 recombinant cell culture. The preferred interface comprises at least a part of the C_H3 domain of an antibody constant domain. In this method, one or more small amino acid side chains from the interface of the first antibody molecule are replaced with larger side chains (*e.g.* tyrosine or tryptophan). Compensatory "cavities" of identical or similar size to the large side chain(s) are created on the interface of the second antibody molecule by replacing large amino acid side chains with smaller ones (*e.g.* alanine or threonine). This provides a mechanism for increasing the yield of the
35 heterodimer over other unwanted end-products such as homodimers.

Techniques for generating bispecific antibodies from antibody fragments have also been described in the literature. For example, bispecific antibodies can be prepared using chemical linkage. Brennan *et al.*, *Science*, 229: 81 (1985) describe a procedure wherein intact antibodies are proteolytically cleaved to generate F(ab')₂ fragments. These fragments are reduced in the presence of the dithiol complexing agent sodium arsenite to stabilize vicinal dithiols and prevent intermolecular disulfide formation. The Fab' fragments generated are then converted to thionitrobenzoate (TNB) derivatives. One of the Fab'-TNB derivatives is then reconverted to the Fab'-thiol by reduction with mercaptoethylamine and is mixed with an equimolar amount of the other Fab'-TNB derivative to form the bispecific antibody. The bispecific antibodies produced can be used as agents for the selective immobilization of enzymes.

Recent progress has facilitated the direct recovery of Fab'-SH fragments from *E. coli*, which can be chemically coupled to form bispecific antibodies. Shalaby *et al.*, *J. Exp. Med.*, 175: 217-225 (1992) describe the production of a fully humanized bispecific antibody F(ab')₂ molecule. Each Fab' fragment was separately secreted from *E. coli* and subjected to directed chemical coupling *in vitro* to form the bispecific antibody. The bispecific antibody thus formed was able to bind to cells overexpressing the ErbB2 receptor and normal human T cells, as well as trigger the lytic activity of human cytotoxic lymphocytes against human breast tumor targets.

Various techniques for making and isolating bispecific antibody fragments directly from recombinant cell culture have also been described. For example, bispecific antibodies have been produced using leucine zippers. Kostelny *et al.*, *J. Immunol.*, 148(5):1547-1553 (1992). The leucine zipper peptides from the Fos and Jun proteins were linked to the Fab' portions of two different antibodies by gene fusion. The antibody homodimers were reduced at the hinge region to form monomers and then re-oxidized to form the antibody heterodimers. This method can also be utilized for the production of antibody homodimers. The "diabody" technology described by Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993) has provided an alternative mechanism for making bispecific antibody fragments. The fragments comprise a heavy-chain variable domain (V_H) connected to a light-chain variable domain (V_L) by a linker which is too short to allow pairing between the two domains on the same chain. Accordingly, the V_H and V_L domains of one fragment are forced to pair with the complementary V_L and V_H domains of another fragment, thereby forming two antigen-binding sites. Another strategy for making bispecific antibody fragments by the use of single-chain Fv (sFv) dimers has also been reported. See Gruber *et al.*, *J. Immunol.*, 152:5368 (1994).

Antibodies with more than two valencies are contemplated. For example, trispecific antibodies can be prepared. Tutt *et al.* *J. Immunol.* 147: 60 (1991).

(vii) Other amino acid sequence modifications

Amino acid sequence modification(s) of the anti-ErbB2 antibodies described herein are contemplated. For example, it may be desirable to improve the binding affinity and/or other biological properties of the antibody. Amino acid sequence variants of the anti-ErbB2 antibody are prepared by introducing appropriate nucleotide changes into the anti-ErbB2 antibody nucleic acid, or by peptide synthesis. Such modifications include, for example, deletions from, and/or insertions into and/or substitutions of, residues within the amino acid sequences of the anti-ErbB2 antibody.

Any combination of deletion, insertion, and substitution is made to arrive at the final construct, provided that the final construct possesses the desired characteristics. The amino acid changes also may alter post-translational processes of the anti-ErbB2 antibody, such as changing the number or position of glycosylation sites.

5 A useful method for identification of certain residues or regions of the anti-ErbB2 antibody that are preferred locations for mutagenesis is called "alanine scanning mutagenesis" as described by Cunningham and Wells *Science*, 244:1081-1085 (1989). Here, a residue or group of target residues are identified (*e.g.*, charged residues such as arg, asp, his, lys, and glu) and replaced by a neutral or negatively charged amino acid (most preferably alanine or polyalanine) to affect the interaction of the amino acids with ErbB2 antigen. Those amino acid locations demonstrating functional sensitivity to the substitutions then are refined by introducing further or other variants at, or
10 for, the sites of substitution. Thus, while the site for introducing an amino acid sequence variation is predetermined, the nature of the mutation *per se* need not be predetermined. For example, to analyze the performance of a mutation at a given site, ala scanning or random mutagenesis is conducted at the target codon or region and the expressed anti-ErbB2 antibody variants are screened for the desired activity.

Amino acid sequence insertions include amino- and/or carboxyl-terminal fusions ranging in length from one
15 residue to polypeptides containing a hundred or more residues, as well as intrasequence insertions of single or multiple amino acid residues. Examples of terminal insertions include an anti-ErbB2 antibody with an N-terminal methionyl residue or the antibody fused to a cytotoxic polypeptide. Other insertional variants of the anti-ErbB2 antibody molecule include the fusion to the N- or C-terminus of the anti-ErbB2 antibody to an enzyme (*e.g.* for ADEPT) or a polypeptide which increases the serum half-life of the antibody.

20 Another type of variant is an amino acid substitution variant. These variants have at least one amino acid residue in the anti-ErbB2 antibody molecule replaced by a different residue. The sites of greatest interest for substitutional mutagenesis include the hypervariable regions, but FR alterations are also contemplated. Conservative substitutions are shown in Table 1 under the heading of "preferred substitutions". If such substitutions result in a change in biological activity, then more substantial changes, denominated "exemplary substitutions" in Table 1, or as
25 further described below in reference to amino acid classes, may be introduced and the products screened.

Table 1

Original Residue	Exemplary Substitutions	Preferred Substitutions
Ala (A)	val; leu; ile	val
Arg (R)	lys; gln; asn	lys
Asn (N)	gln; his; asp, lys; arg	gln
Asp (D)	glu; asn	glu
Cys (C)	ser; ala	ser
Gln (Q)	asn; glu	asn
Glu (E)	asp; gln	asp
Gly (G)	Ala	ala
His (H)	asn; gln; lys; arg	arg
Ile (I)	leu; val; met; ala; phe; norleucine	leu
Leu (L)	norleucine; ile; val; met; ala; phe	ile
Lys (K)	arg; gln; asn	arg
Met (M)	leu; phe; ile	leu
Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr	tyr
Pro (P)	Ala	ala
Ser (S)	Thr	thr
Thr (T)	Ser	ser
Trp (W)	tyr; phe	tyr
Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	phe

Val (V)	ile; leu; met; phe; ala; norleucine	leu
---------	--	-----

Substantial modifications in the biological properties of the antibody are accomplished by selecting substitutions that differ significantly in their effect on maintaining (a) the structure of the polypeptide backbone in the area of the substitution, for example, as a sheet or helical conformation, (b) the charge or hydrophobicity of the molecule at the target site, or (c) the bulk of the side chain. Naturally occurring residues are divided into groups based on common side-chain properties:

- (1) hydrophobic: norleucine, met, ala, val, leu, ile;
- (2) neutral hydrophilic: cys, ser, thr;
- (3) acidic: asp, glu;
- (4) basic: asn, gln, his, lys, arg;
- (5) residues that influence chain orientation: gly, pro; and
- (6) aromatic: trp, tyr, phe.

Non-conservative substitutions will entail exchanging a member of one of these classes for another class.

Any cysteine residue not involved in maintaining the proper conformation of the anti-ErbB2 antibody also may be substituted, generally with serine, to improve the oxidative stability of the molecule and prevent aberrant crosslinking. Conversely, cysteine bond(s) may be added to the antibody to improve its stability (particularly where the antibody is an antibody fragment such as an Fv fragment).

A particularly preferred type of substitutional variant involves substituting one or more hypervariable region residues of a parent antibody (*e.g.* a humanized or human antibody). Generally, the resulting variant(s) selected for further development will have improved biological properties relative to the parent antibody from which they are generated. A convenient way for generating such substitutional variants involves affinity maturation using phage display. Briefly, several hypervariable region sites (*e.g.* 6-7 sites) are mutated to generate all possible amino substitutions at each site. The antibody variants thus generated are displayed in a monovalent fashion from filamentous phage particles as fusions to the gene III product of M13 packaged within each particle. The phage-displayed variants are then screened for their biological activity (*e.g.* binding affinity) as herein disclosed. In order to identify candidate hypervariable region sites for modification, alanine scanning mutagenesis can be performed to identify hypervariable region residues contributing significantly to antigen binding. Alternatively, or additionally, it may be beneficial to analyze a crystal structure of the antigen-antibody complex to identify contact points between the antibody and human ErbB2. Such contact residues and neighboring residues are candidates for substitution according to the techniques elaborated herein. Once such variants are generated, the panel of variants is subjected to screening as described herein and antibodies with superior properties in one or more relevant assays may be selected for further development.

It may be desirable to modify the antibody of the invention with respect to effector function, *e.g.* so as to enhance antigen-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) and/or complement dependent cytotoxicity (CDC) of the antibody. This may be achieved by introducing one or more amino acid substitutions in an Fc region of the antibody. Alternatively or additionally, cysteine residue(s) may be introduced in the Fc region, thereby allowing interchain
5 disulfide bond formation in this region. The homodimeric antibody thus generated may have improved internalization capability and/or increased complement-mediated cell killing and antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC). See Caron *et al.*, *J. Exp Med.* 176:1191-1195 (1992) and Shopes, B. *J. Immunol.* 148:2918-2922 (1992). Homodimeric antibodies with enhanced anti-tumor activity may also be prepared using heterobifunctional cross-linkers as described in Wolff *et al. Cancer Research* 53:2560-2565 (1993). Alternatively, an antibody can be engineered which has dual
10 Fc regions and may thereby have enhanced complement lysis and ADCC capabilities. See Stevenson *et al. Anti-Cancer Drug Design* 3:219-230 (1989).

To increase the serum half life of the antibody, one may incorporate a salvage receptor binding epitope into the antibody (especially an antibody fragment) as described in U.S. Patent 5,739,277, for example. As used herein, the term "salvage receptor binding epitope" refers to an epitope of the Fc region of an IgG molecule (*e.g.*, IgG₁, IgG₂,
15 IgG₃, or IgG₄) that is responsible for increasing the *in vivo* serum half-life of the IgG molecule.

(viii) Glycosylation Variants

Antibodies are glycosylated at conserved positions in their constant regions (Jefferis and Lund, Chem. Immunol. 65:111-128 [1997]; Wright and Morrison, TibTECH 15:26-32 [1997]). The oligosaccharide side chains of the immunoglobulins affect the protein's function (Boyd *et al.*, Mol. Immunol. 32:1311-1318 [1996]; Wittwe and
20 Howard, Biochem. 29:4175-4180 [1990]), and the intramolecular interaction between portions of the glycoprotein which can affect the conformation and presented three-dimensional surface of the glycoprotein (Hefferis and Lund, *supra*; Wyss and Wagner, Current Opin. Biotech. 7:409-416 [1996]). Oligosaccharides may also serve to target a given glycoprotein to certain molecules based upon specific recognition structures. For example, it has been reported that in agalactosylated IgG, the oligosaccharide moiety 'flips' out of the inter-CH2 space and terminal N-
25 acetylglucosamine residues become available to bind mannose binding protein (Malhotra *et al.*, Nature Med. 1:237-243 [1995]). Removal by glycopeptidase of the oligosaccharides from CAMPATH-1H (a recombinant humanized murine monoclonal IgG1 antibody which recognizes the CDw52 antigen of human lymphocytes) produced in Chinese Hamster Ovary (CHO) cells resulted in a complete reduction in complement mediated lysis (CMCL) (Boyd *et al.*, Mol. Immunol. 32:1311-1318 [1996]), while selective removal of sialic acid residues using neuraminidase resulted in no
30 loss of DMCL. Glycosylation of antibodies has also been reported to affect antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC). In particular, CHO cells with tetracycline-regulated expression of $\beta(1,4)$ -N-acetylglucosaminyltransferase III (GnTIII), a glycosyltransferase catalyzing formation of bisecting GlcNAc, was reported to have improved ADCC activity (Umana *et al.*, Mature Biotech. 17:176-180 [1999]).

Glycosylation of antibodies is typically either N-linked or O-linked. N-linked refers to the attachment of the
35 carbohydrate moiety to the side chain of an asparagine residue. The tripeptide sequences asparagine-X-serine and

asparagine-X-threonine, where X is any amino acid except proline, are the recognition sequences for enzymatic attachment of the carbohydrate moiety to the asparagine side chain. Thus, the presence of either of these tripeptide sequences in a polypeptide creates a potential glycosylation site. O-linked glycosylation refers to the attachment of one of the sugars N-aceylgalactosamine, galactose, or xylose to a hydroxyamino acid, most commonly serine or threonine, although 5-hydroxyproline or 5-hydroxylysine may also be used.

Glycosylation variants of antibodies are variants in which the glycosylation pattern of an antibody is altered. By altering is meant deleting one or more carbohydrate moieties found in the antibody, adding one or more carbohydrate moieties to the antibody, changing the composition of glycosylation (glycosylation pattern), the extent of glycosylation, etc.

Addition of glycosylation sites to the antibody is conveniently accomplished by altering the amino acid sequence such that it contains one or more of the above-described tripeptide sequences (for N-linked glycosylation sites). The alteration may also be made by the addition of, or substitution by, one or more serine or threonine residues to the sequence of the original antibody (for O-linked glycosylation sites). Similarly, removal of glycosylation sites can be accomplished by amino acid alteration within the native glycosylation sites of the antibody.

The amino acid sequence is usually altered by altering the underlying nucleic acid sequence. Nucleic acid molecules encoding amino acid sequence variants of the anti-ErbB2 antibody are prepared by a variety of methods known in the art. These methods include, but are not limited to, isolation from a natural source (in the case of naturally occurring amino acid sequence variants) or preparation by oligonucleotide-mediated (or site-directed) mutagenesis, PCR mutagenesis, and cassette mutagenesis of an earlier prepared variant or a non-variant version of the anti-ErbB2 antibody.

The glycosylation (including glycosylation pattern) of antibodies may also be altered without altering the amino acid sequence or the underlying nucleotide sequence. Glycosylation largely depends on the host cell used to express the antibody. Since the cell type used for expression of recombinant glycoproteins, e.g. antibodies, as potential therapeutics is rarely the native cell, significant variations in the glycosylation pattern of the antibodies can be expected (see, e.g. Hse *et al.*, J. Biol. Chem. 272:9062-9070 [1997]). In addition to the choice of host cells, factors which affect glycosylation during recombinant production of antibodies include growth mode, media formulation, culture density, oxygenation, pH, purification schemes and the like. Various methods have been proposed to alter the glycosylation pattern achieved in a particular host organism including introducing or overexpressing certain enzymes involved in oligosaccharide production (U. S. Patent Nos. 5,047,335; 5,510,261 and 5,278,299). Glycosylation, or certain types of glycosylation, can be enzymatically removed from the glycoprotein, for example using endoglycosidase H (Endo H). In addition, the recombinant host cell can be genetically engineered, e.g. make defective in processing certain types of polysaccharides. These and similar techniques are well known in the art.

The glycosylation structure of antibodies can be readily analyzed by conventional techniques of carbohydrate analysis, including lectin chromatography, NMR, Mass spectrometry, HPLC, GPC, monosaccharide

compositional analysis, sequential enzymatic digestion, and HPAEC-PAD, which uses high pH anion exchange chromatography to separate oligosaccharides based on charge. Methods for releasing oligosaccharides for analytical purposes are also known, and include, without limitation, enzymatic treatment (commonly performed using peptide-N-glycosidase F/endo- β -galactosidase), elimination using harsh alkaline environment to release mainly O-linked structures, and chemical methods using anhydrous hydrazine to release both N- and O-linked oligosaccharides.

(viii) *Screening for antibodies with the desired properties*

Techniques for generating antibodies have been described above. One may further select antibodies with certain biological characteristics, as desired.

For example, to identify growth inhibitory anti-ErbB2 antibodies, one may screen for antibodies which inhibit the growth of cancer cells which overexpress ErbB2. In one embodiment, the growth inhibitory antibody of choice is able to inhibit growth of SK-BR-3 cells in cell culture by about 20-100% and preferably by about 50-100% at an antibody concentration of about 0.5 to 30 g/ml. To identify such antibodies, the SK-BR-3 assay described in U.S. Patent No. 5,677,171 can be performed. According to this assay, SK-BR-3 cells are grown in a 1:1 mixture of F12 and DMEM medium supplemented with 10% fetal bovine serum, glutamine and penicillin streptomycin. The SK-BR-3 cells are plated at 20,000 cells in a 35mm cell culture dish (2mls/35mm dish). 0.5 to 30 g/ml of the anti-ErbB2 antibody is added per dish. After six days, the number of cells, compared to untreated cells are counted using an electronic COULTER cell counter. Those antibodies which inhibit growth of the SK-BR-3 cells by about 20-100% or about 50-100% may be selected as growth inhibitory antibodies.

To select for antibodies which induce cell death, loss of membrane integrity as indicated by, *e.g.*, PI, trypan blue or 7AAD uptake may be assessed relative to control. The preferred assay is the PI uptake assay using BT474 cells. According to this assay, BT474 cells (which can be obtained from the American Type Culture Collection (Rockville, MD)) are cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM):Ham's F-12 (50:50) supplemented with 10% heat-inactivated FBS (Hyclone) and 2 mM L-glutamine. (Thus, the assay is performed in the absence of complement and immune effector cells). The BT474 cells are seeded at a density of 3×10^6 per dish in 100 x 20 mm dishes and allowed to attach overnight. The medium is then removed and replaced with fresh medium alone or medium containing 10 g/ml of the appropriate monoclonal antibody. The cells are incubated for a 3 day time period. Following each treatment, monolayers are washed with PBS and detached by trypsinization. Cells are then centrifuged at 1200rpm for 5 minutes at 4°C, the pellet resuspended in 3 ml ice cold Ca^{2+} binding buffer (10 mM Hepes, pH 7.4, 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl_2) and aliquoted into 35 mm strainer-capped 12 x 75 tubes (1ml per tube, 3 tubes per treatment group) for removal of cell clumps. Tubes then receive PI (10 g/ml). Samples may be analyzed using a FACSCAN flow cytometer and FACSCONVERT CellQuest software (Becton Dickinson). Those antibodies which induce statistically significant levels of cell death as determined by PI uptake may be selected as cell death-inducing antibodies.

In order to select for antibodies which induce apoptosis, an annexin binding assay using BT474 cells is available. The BT474 cells are cultured and seeded in dishes as discussed in the preceding paragraph. The medium is

then removed and replaced with fresh medium alone or medium containing 10 g/ml of the monoclonal antibody. Following a three day incubation period, monolayers are washed with PBS and detached by trypsinization. Cells are then centrifuged, resuspended in Ca^{2+} binding buffer and aliquoted into tubes as discussed above for the cell death assay. Tubes then receive labeled annexin (*e.g.* annexin V-FTIC) (1 g/ml). Samples may be analyzed using a
5 FACSCAN flow cytometer and FACSCONVERT CellQuest software (Becton Dickinson). Those antibodies which induce statistically significant levels of annexin binding relative to control are selected as apoptosis-inducing antibodies.

In addition to the annexin binding assay, a DNA staining assay using BT474 cells is available. In order to perform this assay, BT474 cells which have been treated with the antibody of interest as described in the preceding
10 two paragraphs are incubated with 9 g/ml HOECHST 33342 for 2 hr at 37°C, then analyzed on an EPICS ELITE flow cytometer (Coulter Corporation) using MODFIT LT software (Verity Software House). Antibodies which induce a change in the percentage of apoptotic cells which is 2 fold or greater (and preferably 3 fold or greater) than untreated cells (up to 100% apoptotic cells) may be selected as pro-apoptotic antibodies using this assay.

To identify an antibody which blocks ligand activation of an ErbB receptor, the ability of the antibody to
15 block ErbB ligand binding to cells expressing the ErbB receptor (*e.g.* in conjugation with another ErbB receptor with which the ErbB receptor of interest forms an ErbB hetero-oligomer) may be determined. For example, cells naturally expressing, or transfected to express, ErbB receptors of the ErbB hetero-oligomer may be incubated with the antibody and then exposed to labeled ErbB ligand. The ability of the anti-ErbB2 antibody to block ligand binding to the ErbB receptor in the ErbB hetero-oligomer may then be evaluated.

For example, inhibition of HRG binding to MCF7 breast tumor cell lines by anti-ErbB2 antibodies may be
20 performed using monolayer MCF7 cultures on ice in a 24-well-plate format essentially as described in Example 1 below. Anti-ErbB2 monoclonal antibodies may be added to each well and incubated for 30 minutes. ^{125}I -labeled rHRG 1₁₇₇₋₂₂₄ (25 pm) may then be added, and the incubation may be continued for 4 to 16 hours. Dose response curves may be prepared and an IC_{50} value may be calculated for the antibody of interest. In one embodiment, the
25 antibody which blocks ligand activation of an ErbB receptor will have an IC_{50} for inhibiting HRG binding to MCF7 cells in this assay of about 50nM or less, more preferably 10nM or less. Where the antibody is an antibody fragment such as a Fab fragment, the IC_{50} for inhibiting HRG binding to MCF7 cells in this assay may, for example, be about 100nM or less, more preferably 50nM or less.

Alternatively, or additionally, the ability of the anti-ErbB2 antibody to block ErbB ligand-stimulated tyrosine
30 phosphorylation of an ErbB receptor present in an ErbB hetero-oligomer may be assessed. For example, cells endogenously expressing the ErbB receptors or transfected to expressed them may be incubated with the antibody and then assayed for ErbB ligand-dependent tyrosine phosphorylation activity using an anti-phosphotyrosine monoclonal (which is optionally conjugated with a detectable label). The kinase receptor activation assay described in
U.S. Patent No. 5,766,863 is also available for determining ErbB receptor activation and blocking of that activity by
35 an antibody.

In one embodiment, one may screen for an antibody which inhibits HRG stimulation of p180 tyrosine phosphorylation in MCF7 cells. For example, the MCF7 cells may be plated in 24-well plates and monoclonal antibodies to ErbB2 may be added to each well and incubated for 30 minutes at room temperature; then rHRG 1₁₇₇₋₂₄₄ may be added to each well to a final concentration of 0.2 nM, and the incubation may be continued for 8 minutes.

5 Media may be aspirated from each well, and reactions may be stopped by the addition of 100 μ l of SDS sample buffer (5% SDS, 25 mM DTT, and 25 mM Tris-HCl, pH 6.8). Each sample (25 μ l) may be electrophoresed on a 4-12% gradient gel (Novex) and then electrophoretically transferred to polyvinylidene difluoride membrane. Antiphosphotyrosine (at 1 μ g/ml) immunoblots may be developed, and the intensity of the predominant reactive band at M_r ~ 180,000 may be quantified by reflectance densitometry. The antibody selected will preferably significantly inhibit
10 HRG stimulation of p180 tyrosine phosphorylation to about 0-35% of control in this assay. A dose-response curve for inhibition of HRG stimulation of p180 tyrosine phosphorylation as determined by reflectance densitometry may be prepared and an IC₅₀ for the antibody of interest may be calculated. In one embodiment, the antibody which blocks ligand activation of an ErbB receptor will have an IC₅₀ for inhibiting HRG stimulation of p180 tyrosine phosphorylation in this assay of about 50nM or less, more preferably 10nM or less. Where the antibody is an antibody fragment such
15 as a Fab fragment, the IC₅₀ for inhibiting HRG stimulation of p180 tyrosine phosphorylation in this assay may, for example, be about 100nM or less, more preferably 50nM or less.

One may also assess the growth inhibitory effects of the antibody on MDA-MB-175 cells, *e.g.*, essentially as described in Schaefer *et al. Oncogene* 15:1385-1394 (1997). According to this assay, MDA-MB-175 cells may
20 be treated with an anti-ErbB2 monoclonal antibody (10 μ g/ml) for 4 days and stained with crystal violet. Incubation with an anti-ErbB2 antibody may show a growth inhibitory effect on this cell line similar to that displayed by monoclonal antibody 2C4. In a further embodiment, exogenous HRG will not significantly reverse this inhibition. Preferably, the antibody will be able to inhibit cell proliferation of MDA-MB-175 cells to a greater extent than monoclonal antibody 4D5 (and optionally to a greater extent than monoclonal antibody 7F3), both in the presence and absence of exogenous HRG.

25 In one embodiment, the anti-ErbB2 antibody of interest may block heregulin dependent association of ErbB2 with ErbB3 in both MCF7 and SK-BR-3 cells as determined in a co-immunoprecipitation experiment substantially more effectively than monoclonal antibody 4D5, and preferably substantially more effectively than monoclonal antibody 7F3.

To screen for antibodies which bind to an epitope on ErbB2 bound by an antibody of interest, a routine cross-
30 blocking assay such as that described in *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988), can be performed. Alternatively, or additionally, epitope mapping can be performed by methods known in the art (see, *e.g.* Figs. 1A and 1B herein).

The results obtained in the cell-based assays described above can then be followed by testing in animal, *e.g.* murine, models, and human clinical trials. In particular, the inability or limited ability of an antibody to treat ErbB2

overexpressing tumors can be demonstrated in the transgenic mouse model disclosed in the present application as described in the Examples below.

C. Anti-ErbB antibody-maytansinoid conjugates (immunoconjugates)

5 Anti-ErbB antibody-maytansinoid conjugates are prepared by chemically linking an anti-ErbB antibody to a maytansinoid molecule without significantly diminishing the biological activity of either the antibody or the maytansinoid molecule. Maytansinoids are well known in the art and can be synthesized by known techniques or isolated from natural sources. Suitable maytansinoids are disclosed, for example, in U.S. Patent No. 5,208,020 and in the other patents and nonpatent publications referred to hereinabove. Preferred maytansinoids are maytansinol and
10 maytansinol analogues modified in the aromatic ring or at other positions of the maytansinol molecule, such as various maytansinol esters.

There are many linking groups known in the art for making antibody-maytansinoid conjugates, including, for example, those disclosed in U.S. Patent No. 5,208,020 or EP Patent 0 425 235 B1, and Chari *et al. Cancer Research* 52: 127-131 (1992). The linking groups include disulfide groups, thioether groups, acid labile groups, photolabile
15 groups, peptidase labile groups, or esterase labile groups, as disclosed in the above-identified patents, disulfide and thioether groups being preferred.

Conjugates of the antibody and maytansinoid may be made using a variety of bifunctional protein coupling agents such as N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithio) propionate (SPDP), succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl) cyclohexane-1-carboxylate, iminothiolane (IT), bifunctional derivatives of imidoesters (such as dimethyl adipimidate HCL), active
20 esters (such as disuccinimidyl suberate), aldehydes (such as glutaraldehyde), bis-azido compounds (such as bis (p-azidobenzoyl) hexanediamine), bis-diazonium derivatives (such as bis-(p-diazoniumbenzoyl)-ethylenediamine), diisocyanates (such as tolyene 2,6-diisocyanate), and bis-active fluorine compounds (such as 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzene). Particularly preferred coupling agents include N-succinimidyl-3-(2-pyridyldithio) propionate (SPDP) (Carlsson *et al., Biochem. J.* 173:723-737 [1978]) and N-succinimidyl-4-(2-pyridylthio)pentanoate (SPP) to provide for
25 a disulfide linkage.

The linker may be attached to the maytansinoid molecule at various positions, depending on the type of the link. For example, an ester linkage may be formed at the C-3 position having a hydroxyl group, the C-14 position modified with hydroxymethyl, the C-15 position modified with a hydroxyl group, and the C-20 position having a hydroxyl group using conventional coupling techniques. In a preferred embodiment, the linkage is formed at the C-3
30 position of maytansinol or a maytansinol analogue.

D. Pharmaceutical formulations

Therapeutic formulations of the antibody-maytansinoid conjugates used in accordance with the present invention are prepared for storage by mixing an antibody having the desired degree of purity with optional
35 pharmaceutically acceptable carriers, excipients or stabilizers (*Remington's Pharmaceutical Sciences* 16th edition,

Osol, A. Ed. (1980)), in the form of lyophilized formulations or aqueous solutions. Acceptable carriers, excipients, or stabilizers are nontoxic to recipients at the dosages and concentrations employed, and include buffers such as phosphate, citrate, and other organic acids; antioxidants including ascorbic acid and methionine; preservatives (such as octadecyldimethylbenzyl ammonium chloride; hexamethonium chloride; benzalkonium chloride, benzethonium chloride; phenol, butyl or benzyl alcohol; alkyl parabens such as methyl or propyl paraben; catechol; resorcinol; cyclohexanol; 3-pentanol; and m-cresol); low molecular weight (less than about 10 residues) polypeptides; proteins, such as serum albumin, gelatin, or immunoglobulins; hydrophilic polymers such as polyvinylpyrrolidone; amino acids such as glycine, glutamine, asparagine, histidine, arginine, or lysine; monosaccharides, disaccharides, and other carbohydrates including glucose, mannose, or dextrans; chelating agents such as EDTA; sugars such as sucrose, mannitol, trehalose or sorbitol; salt-forming counter-ions such as sodium; metal complexes (*e.g.* Zn-protein complexes); and/or non-ionic surfactants such as TWEEN, PLURONICS or polyethylene glycol (PEG). Preferred lyophilized anti-ErbB2 antibody formulations are described in WO 97/04801, expressly incorporated herein by reference.

The formulation herein may also contain more than one active compound as necessary for the particular indication being treated, preferably those with complementary activities that do not adversely affect each other. For example, it may be desirable to further provide antibodies or antibody-maytansinoid conjugates which bind to EGFR, ErbB2 (*e.g.* an antibody which binds a different epitope on ErbB2), ErbB3, ErbB4, or vascular endothelial factor (VEGF) in the one formulation. Alternatively, or additionally, the composition may further comprise a chemotherapeutic agent, cytotoxic agent, cytokine, growth inhibitory agent, anti-hormonal agent, and/or cardioprotectant. Such molecules are suitably present in combination in amounts that are effective for the purpose intended.

The active ingredients may also be entrapped in microcapsules prepared, for example, by coacervation techniques or by interfacial polymerization, for example, hydroxymethylcellulose or gelatin-microcapsules and poly-(methylmethacrylate) microcapsules, respectively, in colloidal drug delivery systems (for example, liposomes, albumin microspheres, microemulsions, nano-particles and nanocapsules) or in macroemulsions. Such techniques are disclosed in *Remington's Pharmaceutical Sciences* 16th edition, Osol, A. Ed. (1980).

Sustained-release preparations may be prepared. Suitable examples of sustained-release preparations include semipermeable matrices of solid hydrophobic polymers containing the antibody, which matrices are in the form of shaped articles, *e.g.* films, or microcapsules. Examples of sustained-release matrices include polyesters, hydrogels (for example, poly(2-hydroxyethyl-methacrylate), or poly(vinylalcohol)), polylactides (U.S. Pat. No. 3,773,919), copolymers of L-glutamic acid and ethyl-L-glutamate, non-degradable ethylene-vinyl acetate, degradable lactic acid-glycolic acid copolymers such as the LUPRON DEPOT (injectable microspheres composed of lactic acid-glycolic acid copolymer and leuprolide acetate), and poly-D-(-)-3-hydroxybutyric acid.

The formulations to be used for *in vivo* administration must be sterile. This is readily accomplished by filtration through sterile filtration membranes.

35 E. Treatment with the anti-ErbB2 antibody-maytansinoid conjugates

It is contemplated that, according to the present invention, the anti-ErbB2 antibody-maytansinoid conjugates may be used to treat various diseases or disorders. Exemplary conditions or disorders include benign or malignant tumors; leukemias and lymphoid malignancies; other disorders such as neuronal, glial, astrocytal, hypothalamic, glandular, macrophagal, epithelial, stromal, blastocoelic, inflammatory, angiogenic and immunologic disorders.

5 Generally, the disease or disorder to be treated is cancer. Examples of cancer to be treated herein include, but are not limited to, carcinoma, lymphoma, blastoma, sarcoma, and leukemia or lymphoid malignancies. More particular examples of such cancers include squamous cell cancer (*e.g.* epithelial squamous cell cancer), lung cancer including small-cell lung cancer, non-small cell lung cancer, adenocarcinoma of the lung and squamous carcinoma of the lung, cancer of the peritoneum, hepatocellular cancer, gastric or stomach cancer including gastrointestinal cancer, 10 pancreatic cancer, glioblastoma, cervical cancer, ovarian cancer, liver cancer, bladder cancer, hepatoma, breast cancer, colon cancer, rectal cancer, colorectal cancer, endometrial or uterine carcinoma, salivary gland carcinoma, kidney or renal cancer, prostate cancer, vulval cancer, thyroid cancer, hepatic carcinoma, anal carcinoma, penile carcinoma, as well as head and neck cancer.

 The cancer will comprise ErbB-expressing cells, such that an anti-ErbB antibody herein is able to bind to the cancer, and will be typically characterized by overexpression of the ErbB receptor. In a preferred embodiment, the 15 cancer comprises ErbB2-expressing cells, even more preferably, cells which are characterized by overexpression of the ErbB2 receptor. To determine ErbB, *e.g.* ErbB2 expression in the cancer, various diagnostic/prognostic assays are available. In one embodiment, ErbB2 overexpression may be analyzed by IHC, *e.g.* using the HERCEPTEST® (Dako). Paraffin embedded tissue sections from a tumor biopsy may be subjected to the IHC assay and accorded a ErbB2 20 protein staining intensity criteria as follows:

Score 0

no staining is observed or membrane staining is observed in less than 10% of tumor cells.

Score 1+

25 a faint/barely perceptible membrane staining is detected in more than 10% of the tumor cells. The cells are only stained in part of their membrane.

Score 2+

a weak to moderate complete membrane staining is observed in more than 10% of the tumor cells.

Score 3+

a moderate to strong complete membrane staining is observed in more than 10% of the tumor cells.

30 Those tumors with 0 or 1+ scores for ErbB2 overexpression assessment may be characterized as not overexpressing ErbB2, whereas those tumors with 2+ or 3+ scores may be characterized as overexpressing ErbB2.

 Alternatively, or additionally, FISH assays such as the INFORM (sold by Ventana, Arizona) or PATHVISION (Vysis, Illinois) may be carried out on formalin-fixed, paraffin-embedded tumor tissue to determine the extent (if any) of ErbB2 overexpression in the tumor.

In one embodiment, the cancer will be one which expresses (and may overexpress) EGFR. Examples of cancers which may express/overexpress EGFR include squamous cell cancer (*e.g.* epithelial squamous cell cancer), lung cancer including small-cell lung cancer, non-small cell lung cancer, adenocarcinoma of the lung and squamous carcinoma of the lung, cancer of the peritoneum, hepatocellular cancer, gastric or stomach cancer including
5 gastrointestinal cancer, pancreatic cancer, glioblastoma, cervical cancer, ovarian cancer, liver cancer, bladder cancer, hepatoma, breast cancer, colon cancer, rectal cancer, colorectal cancer, endometrial or uterine carcinoma, salivary gland carcinoma, kidney or renal cancer, prostate cancer, vulval cancer, thyroid cancer, hepatic carcinoma, anal carcinoma, penile carcinoma, as well as head and neck cancer.

Preferably, the immunoconjugates of the present invention and/or ErbB, *e.g.* ErbB2 or EGFR protein to which
10 they are bound are internalized by the cell, resulting in increased therapeutic efficacy of the immunoconjugate in killing the cancer cell to which they bind. In a preferred embodiment, the cytotoxic agent (maytansinoid) targets or interferes with nucleic acid in the cancer cell.

The treatment of the present invention targets ErbB overexpressing tumors that do not respond, or respond poorly, to treatment with an unconjugated anti-Erb antibody. Such patients might have received prior treatment with
15 an anti-Erb antibody not conjugated to a maytansinoid moiety, where the prior treatment either did not result in significant improvement, or resulted in transient response. Prior treatment of any particular patient with an unconjugated anti-ErbB antibody is, however, not a prerequisite of identifying patients who are candidates for treatment in accordance with the present invention. An ordinary skilled physician can readily identify patients who are expected to benefit from treatment with the immunoconjugates of the present invention based on publicly
20 available clinical data his or her own experience. Treatment of mammals, and in particular human patients, with or without prior treatment with an (unconjugated) anti-ErbB antibody is specifically within the scope of the present invention.

The anti-ErbB antibody-maytansinoid conjugates are administered to a mammal, preferably to a human patient in accord with known methods, such as intravenous administration, *e.g.*, as a bolus or by continuous infusion
25 over a period of time, by intramuscular, intraperitoneal, intracerebrospinal, subcutaneous, intra-articular, intrasynovial, intrathecal, oral, topical, or inhalation routes. Intravenous or subcutaneous administration of the antibody is preferred.

Other therapeutic regimens may be combined with the administration of the anti-ErbB antibody-maytansinoid conjugates. The combined administration includes coadministration, using separate formulations or a single pharmaceutical formulation, and consecutive administration in either order, wherein preferably there is a time period
30 while both (or all) active agents simultaneously exert their biological activities.

In one preferred embodiment, the patient is treated with two or more different anti-ErbB antibodies, at least one of which is in the form of a maytansinoid conjugate. For example, the patient may be treated with a first anti-ErbB2 antibody-maytansinoid conjugate in which the antibody is growth inhibitory (*e.g.* HERCEPTIN®), and a second anti-ErbB2 antibody or antibody-immunoconjugate, *e.g.* an antibody-maytansinoid conjugate which blocks ligand
35 activation of an ErbB receptor (*e.g.* 2C4 or a humanized and/or affinity matured variant thereof) or induces apoptosis

of an ErbB2-overexpressing cell (*e.g.* 7C2, 7F3 or humanized variants thereof). In another embodiment, the treatment involves the administration of antibodies that specifically bind two or more different ErbB receptors, such as, for example, ErbB2 and EGFR receptors, where at least one of the anti-ErbB antibodies is administered as a maytansinoid conjugate. Preferably such combined therapy results in a synergistic therapeutic effect.

5 It may also be desirable to combine administration of the anti-ErbB antibody-maytansinoid conjugates, with administration of an antibody directed against another tumor-associated antigen, which is not member of the ErbB family of receptors. The other antibody in this case may, for example, bind to vascular endothelial growth factor (VEGF), and may be in the form of a maytansinoid conjugate, or another immunoconjugate.

10 In one embodiment, the treatment of the present invention involves the combined administration of an anti-ErbB2 antibody-maytansinoid conjugate (or conjugates) and one or more chemotherapeutic agents or growth inhibitory agents, including coadministration of cocktails of different chemotherapeutic agents. Preferred chemotherapeutic agents include taxanes (such as paclitaxel and doxorubicin) and/or anthracycline antibiotics. Preparation and dosing schedules for such chemotherapeutic agents may be used according to manufacturers' instructions or as determined empirically by the skilled practitioner. Preparation and dosing schedules for such chemotherapy are also described in
15 Chemotherapy Service Ed., M.C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1992).

20 The antibody-maytansinoid conjugates may be combined with an anti-hormonal compound; *e.g.*, an anti-estrogen compound such as tamoxifen; an anti-progesterone such as onapristone (see, EP 616 812); or an anti-androgen such as flutamide, in dosages known for such molecules. Where the cancer to be treated is hormone independent cancer, the patient may previously have been subjected to anti-hormonal therapy and, after the cancer becomes hormone independent, the anti-ErbB2 antibody (and optionally other agents as described herein) may be administered to the patient.

25 Sometimes, it may be beneficial to also coadminister a cardioprotectant (to prevent or reduce myocardial dysfunction associated with the therapy) or one or more cytokines to the patient. In addition to the above therapeutic regimes, the patient may be subjected to surgical removal of cancer cells and/or radiation therapy.

30 Suitable dosages for any of the above coadministered agents are those presently used and may be lowered due to the combined action (synergy) of the agent and anti-ErbB2 antibody.

35 For the prevention or treatment of disease, the appropriate dosage of antibody-maytansinoid conjugates will depend on the type of disease to be treated, as defined above, the severity and course of the disease, whether the antibody is administered for preventive or therapeutic purposes, previous therapy, the patient's clinical history and response to the antibody, and the discretion of the attending physician. The antibody-maytansinoid conjugate is suitably administered to the patient at one time or over a series of treatments. Depending on the type and severity of the disease, about 1 g/kg to 15 mg/kg (*e.g.* 0.1-20mg/kg) of antibody-maytansinoid conjugate is an initial candidate dosage for administration to the patient, whether, for example, by one or more separate administrations, or by continuous infusion. A typical daily dosage might range from about 1 g/kg to 100 mg/kg or more, depending on the factors mentioned above. For repeated administrations over several days or longer, depending on the condition, the

treatment is sustained until a desired suppression of disease symptoms occurs. A preferred dosing regimen comprises administering an initial loading dose of about 4 mg/kg, followed by a weekly maintenance dose of about 2 mg/kg of the anti-ErbB2 antibody-maytansinoid conjugate. However, other dosage regimens may be useful. The progress of this therapy is easily monitored by conventional techniques and assays.

5

F. Articles of Manufacture

In another embodiment of the invention, an article of manufacture containing materials useful for the treatment of the disorders described above is provided. The article of manufacture comprises a container and a label or package insert on or associated with the container. Suitable containers include, for example, bottles, vials, 10 syringes, etc. The containers may be formed from a variety of materials such as glass or plastic. The container holds a composition which is effective for treating the condition and may have a sterile access port (for example the container may be an intravenous solution bag or a vial having a stopper pierceable by a hypodermic injection needle). At least one active agent in the composition is an anti-ErbB2 antibody-maytansinoid conjugate. The label or package insert indicates that the composition is used for treating the condition of choice, such as cancer. In one embodiment, 15 the label or package insert indicates that the composition comprising the antibody which binds ErbB2 can be used to treat cancer which expresses an ErbB receptor selected from the group consisting of epidermal growth factor receptor (EGFR), ErbB2, ErbB3 and ErbB4, preferably EGFR. In addition, the label or package insert may indicate that the patient to be treated is one having cancer characterized by excessive activation of an ErbB receptor selected from EGFR, ErbB2, ErbB3 or ErbB4. For example, the cancer may be one which overexpresses one of these receptors 20 and/or which overexpresses an ErbB ligand (such as TGF- β). The label or package insert may also indicate that the composition can be used to treat cancer, wherein the cancer is not characterized by overexpression of the ErbB2 receptor. For example, whereas the present package insert for HERCEPTIN[®] indicates that the antibody is used to treat patients with metastatic breast cancer whose tumors overexpress the ErbB2 protein, the package insert herein may indicate that the antibody or composition is used to treat cancer that does not respond, or respond poorly, to 25 treatment with HERCEPTIN[®]. In other embodiments, the package insert may indicate that the antibody-maytansinoid conjugate or composition can be used also to treat hormone independent cancer, prostate cancer, colon cancer or colorectal cancer. Moreover, the article of manufacture may comprise (a) a first container with a composition contained therein, wherein the composition comprises a maytansinoid conjugate of a first antibody which binds ErbB2 and inhibits growth of cancer cells which overexpress ErbB2; and (b) a second container with a composition contained 30 therein, wherein the composition comprises a second antibody which binds ErbB2 and blocks ligand activation of an ErbB receptor, or a conjugate of this second antibody with a maytansinoid. The article of manufacture in this embodiment of the invention may further comprises a package insert indicating that the first and second compositions can be used to treat cancer. Alternatively, or additionally, the article of manufacture may further comprise a second (or third) container comprising a pharmaceutically-acceptable buffer, such as bacteriostatic water for injection (BWI),

phosphate-buffered saline, Ringer's solution and dextrose solution. It may further include other materials desirable from a commercial and user standpoint, including other buffers, diluents, filters, needles, and syringes.

Further details of the invention are illustrated in the following non-limiting examples.

5

Example 1

Production, Characterization and Humanization of Anti-ErbB2 Monoclonal Antibody 4D5

The murine monoclonal antibody 4D5 which specifically binds the extracellular domain of ErbB2 was produced as described in Fendly *et al.*, *Cancer Research* 50:1550-1558 (1990). Briefly, NIH 3T3/HER2-3₄₀₀ cells (expressing approximately 1×10^5 ErbB2 molecules/cell) produced as described in Hudziak *et al* *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 84:7158-7163 (1987) were harvested with phosphate buffered saline (PBS) containing 25mM EDTA and used to immunize BALB/c mice. The mice were given injections i.p. of 10^7 cells in 0.5ml PBS on weeks 0, 2, 5 and 7. The mice with antisera that immunoprecipitated ³²P-labeled ErbB2 were given i.p. injections of a wheat germ agglutinin-Sephadex (WGA) purified ErbB2 membrane extract on weeks 9 and 13. This was followed by an i.v. injection of 0.1 ml of the ErbB2 preparation and the splenocytes were fused with mouse myeloma line X63-Ag8.653. Hybridoma supernatants were screened for ErbB2-binding by ELISA and radioimmunoprecipitation.

15

Epitope mapping and characterization

The ErbB2 epitope bound by monoclonal antibody 4D5 was determined by competitive binding analysis (Fendly *et al. Cancer Research* 50:1550 -1558 (1990)). Cross-blocking studies were done by direct fluorescence on intact cells using the PANDEX™ Screen Machine to quantitate fluorescence. The monoclonal antibody was conjugated with fluorescein isothiocyanate (FITC), using established procedures (Wofsy *et al. Selected Methods in Cellular Immunology*, p. 287, Mishel and Schiigi (eds.) San Francisco: W.J. Freeman Co. (1980)). Confluent monolayers of NIH 3T3/HER2-3₄₀₀ cells were trypsinized, washed once, and resuspended at 1.75×10^6 cell/ml in cold PBS containing 0.5% bovine serum albumin (BSA) and 0.1% NaN₃. A final concentration of 1% latex particles (IDC, Portland, OR) was added to reduce clogging of the PANDEX™ plate membranes. Cells in suspension, 20 μ l, and 20 μ l of purified monoclonal antibodies (100 μ g/ml to 0.1 μ g/ml) were added to the PANDEX™ plate wells and incubated on ice for 30 minutes. A predetermined dilution of the FITC-labeled monoclonal antibody in 20 μ l was added to each well, incubated for 30 minutes, washed, and the fluorescence was quantitated by the PANDEX™. Monoclonal antibodies were considered to share an epitope if each blocked binding of the other by 50% or greater in comparison to an irrelevant monoclonal antibody control. In this experiment, monoclonal antibody 4D5 was assigned epitope I (amino acid residues from about 529 to about 625, inclusive within the ErbB2 extracellular domain (see SEQ ID NO: 3)).

30

The growth inhibitory characteristics of monoclonal antibody 4D5 were evaluated using the breast tumor cell line, SK-BR-3 (see Hudziak *et al. Molec. Cell. Biol.* 9(3):1165-1172 (1989)). Briefly, SK-BR-3 cells were detached by using 0.25% (vol/vol) trypsin and suspended in complete medium at a density of 4×10^5 cells per ml. Aliquots of 100 μ l (4×10^4 cells) were plated into 96-well microdilution plates, the cells were allowed to adhere, and 100 μ l of media alone or media containing monoclonal antibody (final concentration 5 μ g/ml) was then added. After 72 hours,

35

plates were washed twice with PBS (pH 7.5), stained with crystal violet (0.5% in methanol), and analyzed for relative cell proliferation as described in Sugarman *et al. Science* 230:943-945 (1985). Monoclonal antibody 4D5 inhibited SK-BR-3 relative cell proliferation by about 56%.

Monoclonal antibody 4D5 was also evaluated for its ability to inhibit HRG-stimulated tyrosine phosphorylation of proteins in the M_r 180,000 range from whole-cell lysates of MCF7 cells (Lewis *et al. Cancer Research* 56:1457-1465 (1996)). MCF7 cells are reported to express all known ErbB receptors, but at relatively low levels. Since ErbB2, ErbB3, and ErbB4 have nearly identical molecular sizes, it is not possible to discern which protein is becoming tyrosine phosphorylated when whole-cell lysates are evaluated by Western blot analysis. However, these cells are ideal for HRG tyrosine phosphorylation assays because under the assay conditions used, in the absence of exogenously added HRG, they exhibit low to undetectable levels of tyrosine phosphorylation proteins in the M_r 180,000 range.

MCF7 cells were plated in 24-well plates and monoclonal antibodies to ErbB2 were added to each well and incubated for 30 minutes at room temperature; then rHRG 1₁₇₇₋₂₄₄ was added to each well to a final concentration of 0.2 nM, and the incubation was continued for 8 minutes. Media was carefully aspirated from each well, and reactions were stopped by the addition of 100 μ l of SDS sample buffer (5% SDS, 25 mM DTT, and 25 mM Tris-HCl, pH 6.8). Each sample (25 μ l) was electrophoresed on a 4-12% gradient gel (Novex) and then electrophoretically transferred to polyvinylidene difluoride membrane. Antiphosphotyrosine (4G10, from UBI, used at 1 μ g/ml) immunoblots were developed, and the intensity of the predominant reactive band at M_r 180,000 was quantified by reflectance densitometry, as described previously (Holmes *et al. Science* 256:1205-1210 (1992); Sliwkowski *et al. J. Biol. Chem.* 269:14661-14665 (1994))

Monoclonal antibody 4D5 significantly inhibited the generation of a HRG-induced tyrosine phosphorylation signal at M_r 180,000. In the absence of HRG, but was unable to stimulate tyrosine phosphorylation of proteins in the M_r 180,000 range. Also, this antibody does not cross-react with EGFR (Fendly *et al. Cancer Research* 50:1550-1558 (1990)), ErbB3, or ErbB4. Monoclonal antibody 4D5 was able to block HRG stimulation of tyrosine phosphorylation by 50%.

The growth inhibitory effect of monoclonal antibody 4D5 on MDA-MB-175 and SK-BR-3 cells in the presence or absence of exogenous rHRG 1 was assessed (Schaefer *et al. Oncogene* 15:1385-1394 (1997)). ErbB2 levels in MDA-MB-175 cells are 4-6 times higher than the level found in normal breast epithelial cells and the ErbB2-ErbB4 receptor is constitutively tyrosine phosphorylated in MDA-MB-175 cells. Monoclonal antibody 4D5 was able to inhibit cell proliferation of MDA-MB-175 cells, both in the presence and absence of exogenous HRG. Inhibition of cell proliferation by 4D5 is dependent on the ErbB2 expression level (Lewis *et al. Cancer Immunol. Immunother.* 37:255-263 (1993)). A maximum inhibition of 66% in SK-BR-3 cells could be detected. However this effect could be overcome by exogenous HRG.

Humanization

The murine monoclonal antibody 4D5 was humanized, using a novel "gene conversion mutagenesis" strategy, as described in U.S. Patent No. 5,821,337, the entire disclosure of which is hereby expressly incorporated by reference. The humanized monoclonal antibody 4D5 used in the following experiments is designated huMAb4D5-8. This antibody is of IgG1 isotype.

5

Example 2

HERCEPTIN[®]-DM1 conjugates

1. Purification of HERCEPTIN[®]

HERCEPTIN[®] (huMAb4D5-8, rhuMAb HER2, U.S. Patent No. 5,821,337) (1 vial containing 440 mg antibody) was dissolved in 50 mL MES buffer (25 mM MES, 50 mM NaCl, pH 5.6). The sample was loaded on a cation exchange column (Sephacrose S, 15 cm x 1.7 cm) that had been equilibrated in the same buffer. The column was then washed with the same buffer (5 column volumes). HERCEPTIN[®] was eluted by raising the NaCl concentration of the buffer to 200 mM. Fractions containing the antibody were pooled, diluted to 10 mg/mL, and dialyzed into a buffer containing 50 mM potassium phosphate, 50 mM NaCl, 2 mM EDTA, pH 6.5.

15

2. Modification of HERCEPTIN[®] with SPP

The purified HERCEPTIN[®] antibody was modified with N-succinimidyl-4-(2-pyridylthio)pentanoate (SPP) to introduce dithiopyridyl groups. The antibody (376.0 mg, 8 mg/mL) in 44.7 mL of 50 mM potassium phosphate buffer (pH 6.5) containing NaCl (50 mM) and EDTA (1 mM) was treated with SPP (5.3 molar equivalents in 2.3 mL ethanol). After incubation for 90 minutes under argon at ambient temperature, the reaction mixture was gel filtered through a Sephadex G25 column equilibrated with 35 mM sodium citrate, 154 mM NaCl, 2 mM EDTA. Antibody containing fractions were pooled and assayed. The degree of modification of the antibody was determined as described above. Recovery of the modified antibody (HERCEPTIN[®]-SPP-Py) was 337 mg (89.7%) with 4.5 releasable 2-thiopyridine groups linked per antibody.

20

3. Conjugation of HERCEPTIN[®]-SPP-Py with DM1

The modified antibody (337.0 mg, 9.5 μ mol of releasable 2-thiopyridine groups) was diluted with the above 35 mM sodium citrate buffer, pH 6.5, to a final concentration of 2.5 mg/mL. DM1 (the structure of which is shown in Figure 1) (1.7 equivalents, 16.1 μ mol) in 3.0 mM dimethylacetamide (DMA, 3% v/v in the final reaction mixture) was then added to the antibody solution. The reaction proceeded at ambient temperature under argon for 20 hours. The structure of HERCEPTIN[®]-DM1 conjugates is illustrated in Figure 2.

25

The reaction was loaded on a Sephacryl S300 gel filtration column (5.0 cm x 90.0 cm, 1.77 L) equilibrated with 35 mM sodium citrate, 154 mM NaCl, pH 6.5. The flow rate was 5.0 mL/min and 65 fractions (20.0 mL each) were collected. A major peak centered around fraction No. 47 (Figure 3). The major peak comprises monomeric HERCEPTIN[®]-DM1. Fractions 44-51 were pooled and assayed. The number of DM1 drug molecules linked per

30

antibody molecule was determined by measuring the absorbance at 252 nm and 280 nm, and found to be 3.7 drug molecules per antibody molecule.

Example 3

Transgenic Animals

5

In order to improve the clinical activity of HERCEPTIN[®], a transgenic HER2 mouse model was developed in which novel HER2-directed therapies could be tested preclinically. Tumors arise readily in transgenic mice that express a mutationally activated form of *neu*, the rat homolog of HER2, but the HER2 that is overexpressed in breast cancers is not mutated and tumor formation is much less robust in transgenic mice that overexpress nonmutated HER2 (Webster *et al.*, *Semin. Cancer Biol.* 5: 69-76 [1994]). To improve tumor formation with nonmutated HER2, a strategy was used to further enhance overexpression of nonmutated HER2 in a transgenic mouse.

10

Any promoter that promotes expression of HER2 in epithelial cells in the mouse mammary gland can be used in the disclosed constructs. Many of the milk protein genes are transcribed by promoter/enhancer elements that are specifically active in mammary glands. Milk protein genes include those genes encoding caseins (α -S₁ and β), β -lactoglobulin, α -lactalbumin, and whey acidic protein. The ovine β -lactoglobulin promoter is well characterized and widely used in the art (Whitelaw *et al.*, *Biochem J.* 286: 31-39, [1992]). However, similar fragments of promoter DNA from other species are also suitable. A preferred promoter is the promoter derived from the Long Terminal Repeat (LTR) of the Mouse Mammary Tumor Virus (MMTV). A HER2 transgene construct of the present invention was generated using the MMTV LTR promoter.

15

To improve tumor formation with nonmutated HER2, we have made transgenic mice using a HER2 cDNA plasmid in which an upstream ATG was deleted in order to prevent initiation of translation at such upstream ATG codons, which would otherwise reduce the frequency of translation initiation from the downstream authentic initiation codon of HER2 (for example, see Child *et al.*, *J. Biol. Chem.* 274: 24335-24341 [1999]). Additionally, a chimeric intron was added to the 5' end, which should also enhance the level of expression as reported earlier (Neuberger and Williams, *Nucleic Acids Res.* 16: 6713 [1988]; Buchman and Berg, *Mol. Cell. Biol.* 8: 4395 [1988]; Brinster *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 836 [1988]). The chimeric intron was derived from a Promega vector, pCI-neo mammalian expression vector (bp 890-1022). The cDNA 3'-end is flanked by human growth hormone exons 4 and 5, and polyadenylation sequences. Moreover, FVB mice were used because this strain is more susceptible to tumor development. The promoter from MMTV-LTR was used to ensure tissue-specific HER2 expression in the mammary gland. Animals were fed the AIN 76A diet in order to increase susceptibility to tumor formation (Rao *et al.*, *Breast Cancer Res. and Treatment* 45: 149-158 [1997]). The nucleotides sequence of this transgene plasmid construct (SEQ ID NO: 1) is shown in Figure 4.

20

25

30

Animals suitable for transgenic experiments can be obtained from standard commercial sources such as Taconic (Germantown, N.Y.). Many strains are suitable, but FVB female mice are preferred because of their higher susceptibility to tumor formation. FVB males were used for mating and vasectomized CD.1 studs were used to

35

stimulate pseudopregnancy. Vasectomized mice can be obtained from any commercial supplier. Founders were bred with either FVB mice or with 129/BL6 x FVB p53 heterozygous mice. The mice with heterozygosity at p53 allele were used to potentially increase tumor formation. However, this has proven unnecessary. Therefore, some F1 tumors are of mixed strain. Founder tumors are FVB only. Six founders were obtained with some developing tumors without having
5 litters.

Example 4

HER2 transgenic mouse as a tumor model to evaluate HER2-directed therapies

Mammary gland biopsies of one founder transgenic mouse made as described in Example 3, showed 3+
10 expression of HER2, as determined by immunohistochemical staining, at about 2 months of age. The amount of HER2 extracellular domain (ECD) shed into serum was measured and found to be about 1.2 ng/ml (Huang et al., *supra*). This mouse subsequently developed a mammary tumor at 5 months of age, after bearing 4 litters. The tumor was surgically resected under aseptic conditions and minced into small pieces, 2 mm³, which were then transplanted into the mammary fat pad of wild-type FVB female mice. Tumors developed in 22 of 31 recipient mice, with a latency of 5
15 weeks. With subsequent passage, tumors developed with shorter latency and grew more rapidly, and tumor incidence increased to > 95% of recipients. HER2 expression, as determined by immunohistochemical staining, was 3+ but heterogeneous in the primary tumor, but became uniformly 3+ after the first passage.

Treatment of tumor-bearing mice with HERCEPTIN[®] or 4D5, the murine antibody from which humanized HERCEPTIN[®] was derived, had only a modest effect on the growth of the transplanted tumors (Figure 5). HER2
20 expression was 3+ in tumors that grew during HERCEPTIN[®] or 4D5 therapy, indicating that there was no selection of HER2-negative tumors. Moreover, cy3-HERCEPTIN[®] was detected decorating tumor cells after injection into tumor-bearing mice, indicating that the lack of efficacy was not due to failure of the antibody to access the tumor.

Based on the persistent expression of HER2 and the failure of this tumor model to respond to HERCEPTIN[®], a novel approach was tested, using HERCEPTIN[®] conjugated to maytansinoid DM1 as described in Example 3. Figure
25 5 shows that the HERCEPTIN[®]-DM1 conjugate has dramatic anti-tumor activity in this model. RITUXAN[®], an unrelated anti-CD20 monoclonal antibody, was used as a negative control for these studies. There was little response to HERCEPTIN[®] compared to the control antibody, RITUXAN[®], but there was striking anti-tumor activity of the maytansinoid conjugate of HERCEPTIN[®]. As shown in Figure 5, all of the mice treated with HERCEPTIN[®] -
maytansinoid showed striking shrinkage of their tumors, though none of the tumors disappeared. After approximately
30 4 weeks, tumors began to regrow. Five animals were sacrificed at this time. Their tumors were found to express HER2 at 3+ levels. Thus, there was no selection for HER2-negative tumors. Based on this observation, the remaining 3 mice were treated with HERCEPTIN[®]-maytansinoid for 5 consecutive days. The tumors again regressed in response to the treatment.

All references cited through the specification, and the references cited therein, are hereby expressly incorporated by reference.

Deposit of Biological Material

The following hybridoma cell lines have been deposited with the American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, USA (ATCC):

	Antibody Designation	ATCC No.	Deposit Date
5	7C2	ATCC HB-12215	October 17, 1996
	7F3	ATCC HB-12216	October 17, 1996
10	4D5	ATCC CRL 10463	May 24, 1990
	2C4	ATCC HB-12697	April 8, 1999

This deposit was made under the provisions of the Budapest Treaty on the International Recognition of the Deposit of Microorganisms for the Purpose of Patent Procedure and the Regulations thereunder (Budapest Treaty).

This assures maintenance of viable cultures for 30 years from the date of the deposit. The organisms will be made available by ATCC under the terms of the Budapest Treaty, and subject to an agreement between Genentech, Inc. and ATCC, which assures permanent and unrestricted availability of the progeny of the cultures to the public upon issuance of the pertinent U.S. patent or upon laying open to the public of any U.S. or foreign patent application, whichever comes first, and assures availability of the progeny to one determined by the U.S. Commissioner of Patents and Trademarks to be entitled thereto according to 35 USC §122 and the Commissioner's rules pursuant thereto (including 37 CFR §1.12 with particular reference to 886 OG 638).

In respect of those designations in which a European patent is sought, a sample of the deposited microorganism will be made available until the publication of the mention of the grant of the European patent or until the date on which the application has been refused or withdrawn or is deemed to be withdrawn, only by the issue of such a sample to an expert nominated by the person requesting the sample. (Rule 28(4) EPC)

The assignee of the present application has agreed that if the cultures on deposit should die or be lost or destroyed when cultivated under suitable conditions, they will be promptly replaced on notification with a viable specimen of the same culture. Availability of the deposited strain is not to be construed as a license to practice the invention in contravention of the rights granted under the authority of any government in accordance with its patent laws.

The foregoing written specification is considered to be sufficient to enable one skilled in the art to practice the invention. The present invention is not to be limited in scope by the constructs deposited, since the deposited embodiments are intended to illustrate only certain aspects of the invention and any constructs that are functionally equivalent are within the scope of this invention. The deposit of material herein does not constitute an admission that the written description herein contained is inadequate to enable the practice of any aspect of the invention, including

the best mode thereof, nor is it to be construed as limiting the scope of the claims to the specific illustrations that they represent. Indeed, various modifications of the invention in addition to those shown and described herein will become apparent to those skilled in the art from the foregoing description and fall within the scope of the appended claims.

- 5 It is understood that the application of the teachings of the present invention to a specific problem or situation will be within the capabilities of one having ordinary skill in the art in light of the teachings contained herein. Examples of the products of the present invention and representative processes for their isolation, use, and manufacture appear below, but should not be construed to limit the invention.

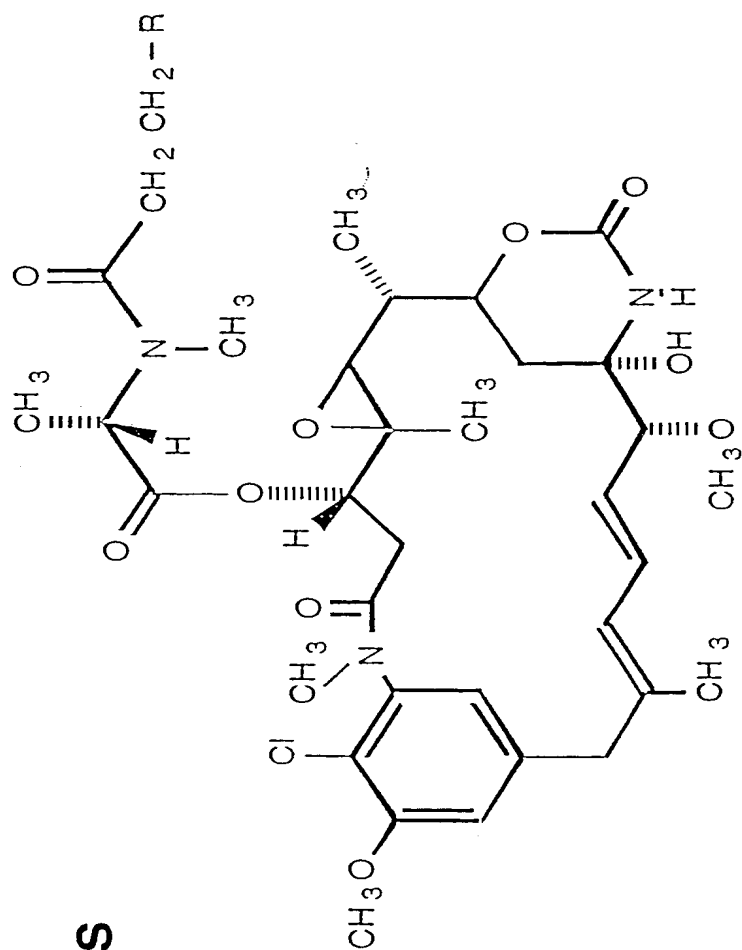
What is claimed is:

1. A method for the treatment of a tumor in a mammal, wherein the tumor is characterized by the overexpression of an ErbB receptor and does not respond, or responds poorly, to treatment with an anti-ErbB antibody, comprising administering to the mammal a therapeutically effective amount of a conjugate of the anti-ErbB antibody with a maytansinoid.
5
2. The method of claim 1 wherein the mammal is human.
3. The method of claim 2 wherein the ErbB receptor is selected from the group consisting of ErbB1 (EGFR), ErbB2 (HER2), ErbB3 (HER3) and ErbB4 (HER4).
10
4. The method of claim 3 wherein the anti-ErbB antibody is a growth inhibitory antibody.
5. The method of claim 3 wherein the anti-ErbB antibody induces cell death.
15
6. The method of claim 3 wherein the anti-ErbB antibody induces apoptosis.
7. The method of claim 3 wherein the antibody is an anti-ErbB2 antibody.
- 20 8. The method of claim 7 wherein the tumor is cancer.
9. The method of claim 8 wherein the cancer is selected from the group consisting of breast, ovarian, stomach, endometrial, salivary gland, lung, kidney, colon, colorectal, thyroid, pancreatic, prostate and bladder cancer.
- 25 10. The method of claim 9 wherein the cancer is breast cancer.
11. The method of claim 10 wherein the breast cancer overexpresses ErbB2 at a 2+ level or more.
12. The method of claim 11 wherein the breast cancer overexpresses ErbB2 at a 3+ level.
30
13. The method of claim 12 wherein the antibody has a biological characteristic of a 4D5 monoclonal antibody.
14. The method of claim 13 wherein the antibody binds essentially the same epitope as a 4D5
35 monoclonal antibody.

15. The method of claim 13 wherein the antibody is the monoclonal antibody 4D5 (ATCC CRL 10463).
16. The method of claim 13 wherein the antibody is humanized.
- 5 17. The method of claim 16 wherein the antibody is selected from the group consisting of humanized antibodies huMAb4D5-1, huMAb4D5-2, huMAb4D5-3, huMAb4D5-4, huMAb4D5-5, huMAb4D5-6, huMAb4D5-7 and huMAb4D5-8 (HERCEPTIN®).
- 10 18. The method of claim 17 wherein the antibody is humanized antibody huMAb4D5-8 (HERCEPTIN®).
19. The method of claim 3 wherein the antibody is an antibody fragment.
20. The method of claim 19 wherein the antibody fragment is a Fab fragment.
- 15 21. The method of claim 3 wherein the maytansinoid is maytansine.
22. The method of claim 3 wherein the maytansinoid is maytansinol.
- 20 23. The method of claim 3 wherein the maytansinoid is a maytansinol ester.
24. The method of claim 23 wherein the maytansinoid is a C-3 ester of maytansinol.
25. The method of claim 24 wherein the maytansinoid is DM1 shown in Figure 1.
- 25 26. The method of claim 3 wherein the antibody and maytansinoid are conjugated by a bispecific chemical linker.
27. The method of claim 26 wherein said chemical linker is N-succinimidyl-4-(2-pyridylthio)propanoate (SPDP) or N-succinimidyl-4-(2-pyridylthio)pentanoate (SPP).
- 30 28. The method of claim 3 wherein the antibody and maytansinoid are conjugated by a linking group selected from the group consisting of a disulfide, thioether, acid labile, photolabile, peptidase labile, and esterase labile group.

29. The method of claim 28 wherein the linking group is a disulfide or a thioether group.
30. The method of claim 29 wherein the linking group is a disulfide group.
- 5 31. The method of claim 3 wherein the conjugate comprises 1 to about 10 maytansinoid molecules per antibody molecule.
32. The method of claim 31 wherein the conjugate comprises from about 3 to about 5 maytansinoid molecules per antibody molecule.
- 10 33. The method of claim 7 further comprising the administration of a second antibody which binds ErbB2 and blocks ligand activation of an ErbB receptor.
34. The method of claim 33 wherein the second antibody comprises monoclonal antibody 2C4 or
15 humanized 2C4.
35. The method of claim 33 wherein said second antibody is conjugated with a cytotoxic agent.
36. The method of claim 35 wherein the cytotoxic agent is a maytansinoid.
- 20 37. An article of manufacture comprising a container and a composition contained therein, wherein the composition comprises an anti-ErbB antibody-maytansinoid conjugate, and further comprising a package insert or label indicating that the composition can be used to treat cancer characterized by the overexpression of an ErbB receptor.
- 25 38. The article of manufacture of claim 37 wherein said package insert or label indicates that the composition can be used to treat cancer characterized by the overexpression of an ErbB2 receptor.
39. The article of manufacture of claim 38 wherein the cancer is breast cancer.
- 30 40. The article of manufacture of claim 38 wherein the cancer is characterized by the overexpression of an ErbB2 receptor at a 2+ level or above.
41. The article of manufacture of claim 40 wherein the cancer is characterized by the overexpression of an ErbB2 receptor at a 3+ level.

35



Maytansinoids
(DM1)

FIGURE 1

FIG. 1

FIGURE 2

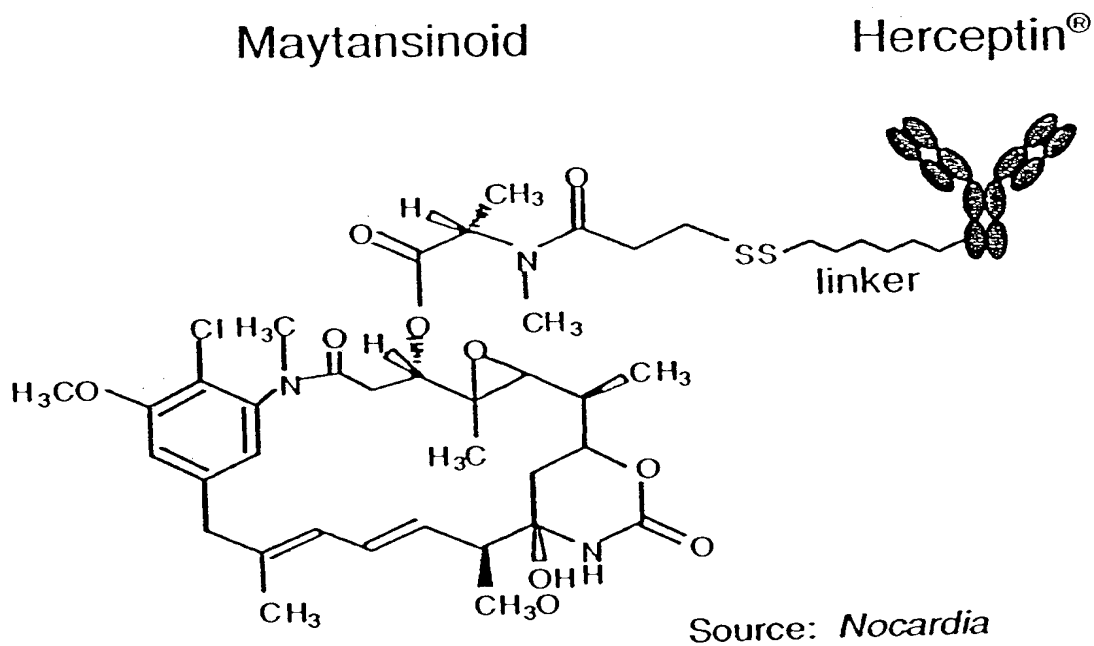
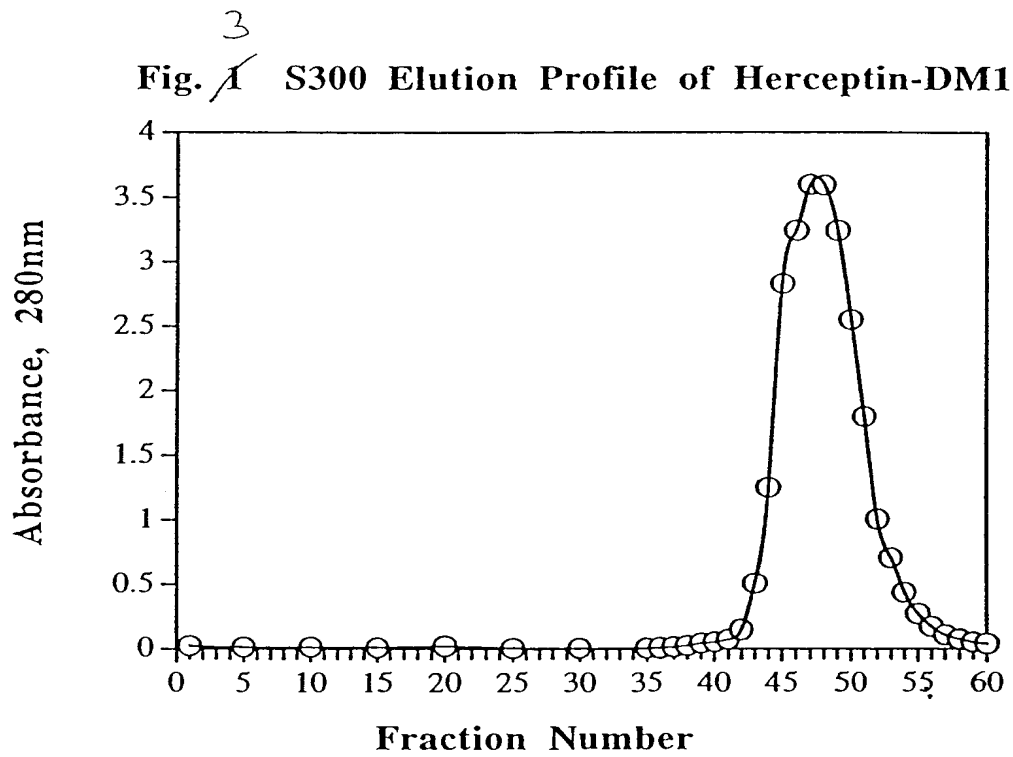


FIG 2



8

FIG. 3

3/39

FIG. 4

4/39

5/39

6/39

bsmAI
esp3I
foKI bsmBI bsrBI tsp45I
bstF5I aciI maelII
hphI
mnlI
1201 AAGATATATAA AGAGTGCTGA TTTTTCAGT AAACCTGCAA CAGTCCTAAC ATTCACTCT TGTGCTTTG TGTCTGTTCC CCATCCCGTC TCCGCTCGTC
TTCTATATTT TCTCAGGACT AAAAAGTCA TTTGAACGTT GTCAGATTG TAAGTGGAGA ACACACAAC ACAGACAAGC GGTAGGGCAG AGCGAGCAG

sau3AI
alwI
mspI cac8I bclI
hpaII rmaI tflI
scrFI maeI hinfI
ncII mboI/ndeII thal clal/bsp106 notI
dsav dpmII aluI fnuDII/mvni fnu4HI/bsol scfI
cauII nheI bstUI taqI cac8I cfri tru9I
ecoO109I/draII bssKI cac8I bsh1236I aluI aciI acII pstI
mnlI bsmFI aciI bsaJI dpmI bfaI nruI bspDI hindIII bsiEI msel bsgI mnlI
1301 ACTTATCCTT CACTTTCCAG AGGTCCCCC CGCAGACCCC GGATCGCTAG CTGCGAATC GATAAGCTTG CGCCGCTTA ACTGCAGAAG TTGTCGCTGA
TGAATAGGAA GTGAAGGTC TCCCAGGGGG CGGTCTGGGG CCTAGCGATC GAGCGCTTAG CTATTGCAAC GCCGGCGAAT TGACGTCTTC AACAGCACT
^start of BS intron insert at Cla
^bp820 in pCI
^start of BS insert at HindIII

bsrI
tspRI bspMI
maelII
1401 GGCACCTGGC AGGTAAGTAT CAAGGTTTACA AGACAGGTTT AAGGAGACCA ATAGAACTG GGCTTGTCGA GACAGAGAAG ACTCTTGGT TTCTGATAGG
CCGTGACCG TCCATTCATA GTTCCAATGT TCTGTCCAAA TTCCTCTGGT TATCTTTGAC CGAAGCAGCT CTGTCTCTTC TGAGAACGCA AAGACTATCC
^start of chimeric intron at pCI 857

pleI
hinfI
mboII
bpuAI
bsmAI
taqI
bsrI
bsrI
nlaIV
hgiCI
bani
bbsI
TTCTGATAGG

fnu4HI/bsoFI
mcrI
eagI/xmaIII/ecI XI
eaeI
cfrI
notI
fnu4HI/bsoFI
tru9I haeIII/palI tsp50
mseI bsiEI hindIII eorI
alul smlI acil acil alul taqI
tsp509I afII/bfrI cac8I eorV apoI
TTCATTACA GGTCTTAAGC GGCGCAAGC TTGATATCGA
AAGTTAATGT CGAGAAATCG CCGCGCTTCG AACTATAGCT
^end of chimeric intron at PCI 989
end of BS insert at HindIII^

1501 CACCTATTGG TCTTACTGAC ATCCACTTTG CTTTCTCTC CACAGGTGC CACTCCACAG GTGTCCACAG GTGTCCACAG GGAAGAGAG TAGTGAAAC
GTGGATAACC AGAATGACTG
fokI
bstF5I
scrFI
ncil
mspi
hpall
dsav
caulI
bssKI
bsaJI sau3AI
xmaI/pspAI
smaI mboI/ndeII sau3AI
scrFI dpnII mboI/ndeII
ncil dpnI
tsei dsav alwI rmaI alwI
fnu4HI/bsoFI
bbVI caulI nlaIV maeI nlaIV
scfI bssKI bstYI/xhoII bstYI/xhoII tsp509I
pstI bsaJI bamHI bfaI bamHI eorI
bsgI avai alwI speI alwI apoI
1601 ATTCTGTCAG CCGGGGGGAT CCACTAGTGG ATCCAAAGAA TTCAAAGC GTGTCCACAG GTGTCCACAG GTGTCCACAG GTGTCCACAG GTGTCCACAG GTGTCCACAG
TAAGGACGTC GGGCCCCCTA GGTGATCACC TAGGTTTCTT AAGTTTTCG AAGCTCCC GCGCGGGGCG CCGGGGTGGG GAGCGTCGTG GGGCGGGGGG
^end of BS intron insert at spe
^start of human HER2 from BS at xhoI

9/39

10/39

hinPI
 hhai/cfoI
 thai
 fnuDI/mbvI
 bstUI
 mwoI bsh1236I mspi
 hpaII mwoI
 cfr10I/bsrFI
 2301 GCCTGCCACC CCTGTTCTCC GATGTGTAAG GGCTCCCGCT GCTGGGGAGA GAGTTCTGAG GATTGTGAGA GCCTGACGCG CACTGTCTCT GCCCGTGGCT
 CGACGGTGG GGACAAGAGG CTACACATTC CCGACGGCGA CGACCCCTCT CTCAGACATC CTAACATGCT CGGACTGCGC GTGACAGACA CGGCCACCGA
 191 A C H P C S P M C K G S R C W G E S S E D C Q S L T R T V C A G G C
 sau96I
 nlaIV
 haeIII/palI
 sau96I
 pspOMI/bsp120I
 tsei
 mwoI
 hgiJII
 mspi
 hpaII
 naeI/ngoMI bmyI
 cfr10I/bsrFI asuI
 cac8I
 bsnI
 bssKI
 apyI
 mwoI cac8I mnlI
 2401 GTGCCCCGTG CAAAGGCCA CTGCCACTG ACTGCTGCCA TGACGAGTGT GCTGCCGGCT GCACGGGCC CAAAGCACTCT GACTGCTGG CCTGCCTCCA
 CACGGCGAC GTTCCCGGT GACGGGTGAC TGACACCGGT ACTGTCACA CGACGGCGA CGTCCCGGG GTTCGTGAGA CTGACGGACC GGACGGAGGT
 225 A R C K G P L P T D C C H E Q C A A G C T G P K H S D C L A C L H

bstEII
 scrFI
 mvaI
 ecorII
 dsav
 bstNI
 tseI
 fnu4HI/bsaFI
 bbvI
 aluI
 tspRI
 sfanI
 2501 CTTCAACAC AGTGGCATCT GTGAGCTGCA CTGCCAGCC CTGGTCACCT ACAACACAGA CACGTTTCAG TCATGCCCA ATCCCAGGG CCGGTATACA
 GAAGTTGGTG TCACCGTAGA CACTCGACGT GACGGGTGG GACCACTGGA TGTGTGTCT GTGCAAACTC AGGTACGGGT TAGGGCTCCC GGCATATGT
 258 F N H S G I C E L H C P A L V T Y N T D T F E S M P N P E G R Y T
 cac8I
 hinPI
 hhaI/cfoI
 nlaIV
 nari
 kasi
 hinII/acyI
 hgiCI
 haeII aluI
 ehei pvuII
 banI mspAII/nspBII
 ahaII/bsaHI
 maeIII
 2601 TTCCGGCCCA GCTGTGTGAC TGCCGTGCCC TACAACTACC TTCTACGGA CGTGGGATCC TGCACCCCTCG TCTGCCCTCG GCACAACCAA GAGGTGACAG
 AAGCCGGGT CGACACACTG ACGGACAGGG ATGTTGATGG AAAGATGCT GCACCCTAGG ACGTGGGAGC AGACGGGGA CGTGTGGTT CTCCACTGTC
 291 F G A S C V T 'A C P Y N Y L S T D V G S C T L V C P L H N Q E V T A
 hgiAI/aspHI
 bsp1286
 bsiHKA
 bmyI
 hphI
 bsrI
 2701 CAGAGGATGG AACACAGCGG TGTGAGAAGT GCACAAGCC CTGTGCCCGA GTGTGCTATG GTCTGGGCAT TGAGCACTTG CGAGAGGTGA GGGCAGTTAC
 GTCTCCTACC TTGTGTCGCC ACACCTTTCA CGTCGTTCCG GACACGGCT CACACGATAC CAGACCCGTA CCTCGTGAAC GCTCTCCACT CCGTCAATG
 325 E D G T Q R C E K C S K P C A R V C Y G L G M E H L R E V R A V T

13/39

144/39

15/39

16/39

17/39

sau96I
 scrFI
 avall
 mval
 asul
 ppuMI
 ecoRII
 dsav
 scrFI
 mval
 acII
 bstNI
 fnuDII/mvni hgiJII alwNI
 bstUI bssKI ecoRII
 bsh1236I bsaJI dsav
 sacII/sstII bsp1286 eco0109I/draII
 mspAII/nspBII bmyI bstNI
 kspI apyI nlaIV alw26I/bsmAI
 dsal hinII/acyI bssKI
 bsaJI hgaI banII apyI
 acII ahaII/bsaHI bsaJI bspMI
 CGGGAACCG CGGAGCGCT GGGTCCCAG GACCTGCTGA
 CGCCTTTGG CGCCTCGGA CCCGAGGGTC CTGGACGACT
 4101 ACATCCACGG TGCAGCTGGT GACACAGCTT ATGCCCTATG GCTGCTCTT AGACCATGTC CGGGAACCG CGGAGCGCT GGGTCCCAG GACCTGCTGA
 TGTAGTGCC ACGTCGACCA CTGTGTCGAA TAGGGATAC CGACGAGAA TCTGGTACAG GCCTTTTGG CGCCTCGGA CCCGAGGGTC CTGGACGACT
 791 T S T V Q L V T Q L M P Y G C L L D H V R E N R G R L G S Q D L L N

mnII

bpmI/gsuI

scrFI

mval

ecoRII

dsav

bstNI

styI foki aluI

bsaJI bstF5I

apyl

bsaJI bstF5I

apyl

bsaJI bstF5I

apyl

bsaJI bstF5I

apyl

bsaJI bstF5I

apyl

bsaJI bstF5I

apyl

bsaJI bstF5I

apyl

bsaJI bstF5I

apyl

bsaJI bstF5I

apyl

bsaJI bstF5I

apyl

bsaJI bstF5I

apyl

bsaJI bstF5I

apyl

bsaJI bstF5I

apyl

bsaJI bstF5I

bsrBI

acII

fnu4HI/bsoFI

haeIII/palI

eaeI

tail

maeII

bsmFI cfrI

bsmFI cfrI

bsmFI cfrI

bsmFI cfrI

bsmFI cfrI

bsmFI cfrI

bsmFI cfrI

bsmFI cfrI

bsmFI cfrI

bsmFI cfrI

bsmFI cfrI

bsmFI cfrI

bsmFI cfrI

bsmFI cfrI

bsmFI cfrI

bsmFI cfrI

bsmFI cfrI

bsmFI cfrI

bsmFI cfrI

bsmFI cfrI

bsmFI cfrI

bsmFI cfrI

bsmFI cfrI

bsmFI cfrI

bsmFI cfrI

fnu4HI/bsoFI

rsal

rsal

rsal

rsal

rsal

rsal

rsal

rsal

rsal

rsal

rsal

rsal

rsal

rsal

rsal

rsal

rsal

rsal

rsal

rsal

rsal

rsal

rsal

rsal

rsal

rsal

rsal

rsal

styI foki aluI

bsaJI bstF5I

apyl

bsaJI bstF5I

apyl

bsaJI bstF5I

apyl

bsaJI bstF5I

apyl

bsaJI bstF5I

apyl

bsaJI bstF5I

apyl

bsaJI bstF5I

apyl

bsaJI bstF5I

apyl

bsaJI bstF5I

apyl

bsaJI bstF5I

apyl

bsaJI bstF5I

apyl

bsaJI bstF5I

apyl

bsaJI bstF5I

apyl

bsaJI bstF5I

apyl

fnu4HI/bsoFI

rsal

rsal

rsal

rsal

rsal

rsal

rsal

rsal

rsal

rsal

rsal

rsal

rsal

rsal

rsal

rsal

rsal

rsal

rsal

rsal

rsal

rsal

rsal

rsal

rsal

rsal

rsal

rsal

styI foki aluI

bsaJI bstF5I

apyl

bsaJI bstF5I

apyl

bsaJI bstF5I

apyl

bsaJI bstF5I

apyl

bsaJI bstF5I

apyl

bsaJI bstF5I

apyl

bsaJI bstF5I

apyl

bsaJI bstF5I

apyl

bsaJI bstF5I

apyl

bsaJI bstF5I

apyl

bsaJI bstF5I

apyl

bsaJI bstF5I

apyl

bsaJI bstF5I

apyl

bsaJI bstF5I

apyl

fnu4HI/bsoFI

rsal

rsal

rsal

rsal

rsal

rsal

rsal

rsal

rsal

rsal

rsal

rsal

rsal

rsal

rsal

rsal

rsal

rsal

rsal

rsal

rsal

rsal

rsal

rsal

rsal

rsal

rsal

rsal

styI foki aluI

bsaJI bstF5I

apyl

bsaJI bstF5I

apyl

bsaJI bstF5I

apyl

bsaJI bstF5I

apyl

bsaJI bstF5I

apyl

bsaJI bstF5I

apyl

bsaJI bstF5I

apyl

bsaJI bstF5I

apyl

bsaJI bstF5I

apyl

bsaJI bstF5I

apyl

bsaJI bstF5I

apyl

bsaJI bstF5I

apyl

bsaJI bstF5I

apyl

bsaJI bstF5I

apyl

fnu4HI/bsoFI

rsal

rsal

rsal

rsal

rsal

rsal

rsal

rsal

rsal

rsal

rsal

rsal

rsal

rsal

rsal

rsal

rsal

rsal

rsal

rsal

rsal

rsal

rsal

rsal

rsal

rsal

rsal

rsal

styI foki aluI

bsaJI bstF5I

apyl

bsaJI bstF5I

apyl

bsaJI bstF5I

apyl

bsaJI bstF5I

apyl

bsaJI bstF5I

apyl

bsaJI bstF5I

apyl

bsaJI bstF5I

apyl

bsaJI bstF5I

apyl

bsaJI bstF5I

```
mspI
hpaII
naeI/hgoMI
cfr10I/bsrFI
cac8I
pleI
hinfi
bpmI/gsuI
4401 CTGGAGTCCA TTCTCCGCCG GCGGTTACCC CACCAGAGTG ATGTGTGGAG TTATGGTGTG ACTGTGTGGG AGCTGATGAC TTTTGGGGCC AAACCTTACG
GACCTCAGGT AAGAGGGCGC CGCCCAAGTGG GTGGTCTCAC TACACACCTC TACACACACC TGACACACCC TCGACTACTG AAAACCCCGG TTGGAATGC
891 L E S I L R R R R F T H Q S D V W S Y G V T V W E L M T F G A K P Y D

haeIII/palI
sau96I
asuI
nlaIV
bslI
tsp45I
maeIII
aluI

scrFI
nciI
mspI
hpaII
dsav
cauII
bssKI
xmaI/pspAI
bslI smaI
sau3AI scrFI
mboI/ndeII
dpnII nciI
dpnI dsav sau3AI
alwI cauII mboI/ndeII
nlaIV bssKI dpnII
bstYI/xhoII dpnI
bamHI bsaJI alwI bspMI
alwI avai bstYI/xhoII
4501 ATGGATCCC AGCCCGGAG ATCCCTGACC TGCTGGAAAA GGGGAGCGG CTGCCCCAGC CCCCCATCTG CACCATTGAT GTCTACATGA TCATGGTCAA
TACCTAGG TCGGGCCCTC TAGGGACTGG AGACCTTTT CCCCCTCGCC GACGGGTGG GGGGGTAGAC GTGGTAACTA CAGATGTACT AGTACCAGTT
925 G I P A R E I P D L L E K G E R L P Q P P I C T I D V Y M I M V K

sau3AI
mboI/ndeII
dpnII
dpnI
bclI
nlaIII
accI mslI nlaIII
```

19/39

sau96I
 sauDI
 scrFI
 mvaI nlaIV
 ecoRII
 dsav avall
 bstNI
 bssKI
 bsaJI
 apyI asuI
 haeIII/palI
 mscI/balI
 haeI ppuMI
 haeI nlaIV
 haeII
 hinPI
 hhaI/cfoI
 bslI
 foki
 bstF5I
 4601 ATGTTGGATG ATTGACTCTG AATGTCGGCC AAGATTCCGG GAGTTGGTGT CTGAATTCTC CCGCATGGCC AGGACCCCC AGCCTTTGT GGTCAATCCAG
 TACAACCTAC TAACTGAGAC TTACAGCCGG TTCTAAGGCC CTCACCCACA GACTTAAGAG GCGTACCGG TCCCTGGGG TCGGAAACA CCAGTAGGTC
 958 C W M I D S E C R P R F R E L V S E F S R M A R D P Q R F V V I Q
 sau96I
 haeIII/palI
 eaeI
 cfri
 hinfi
 pleI
 hinfi
 4701 AATGAGGACT TGGGCCAGC CAGTCCCTTG GACAGCACCT TCTACCGCTC ACTGCTGGAG GACGATGACA TGGGGACCT GGTGGATGCT GAGGAGTATC
 TTAACCTGA ACCCGGTCG GTCAGGGAC CTGCTGTTGA AGATGGCGAG TGACGACCTC CTGCTACTGT ACCCCCTGGA CCACCTACGA CTCCTCATAG
 991 N E D L G P A S P L D S T F Y R S L L E D D D M G D L V D A E E Y L
 scrFI
 mvaI
 ecoRII
 dsav
 bstNI
 bssKI
 apyI
 sexAI
 sau96I
 avall
 ppuMI
 nlaIV
 sfaNI
 eco0109I/draII
 mnlI
 bsmFI
 foki ddei
 nlaIII asuI
 bstF5I bseRI
 mnlI
 apal
 bstXI styI
 bsrI bsaJI
 4701 AATGAGGACT TGGGCCAGC CAGTCCCTTG GACAGCACCT TCTACCGCTC ACTGCTGGAG GACGATGACA TGGGGACCT GGTGGATGCT GAGGAGTATC
 TTAACCTGA ACCCGGTCG GTCAGGGAC CTGCTGTTGA AGATGGCGAG TGACGACCTC CTGCTACTGT ACCCCCTGGA CCACCTACGA CTCCTCATAG
 991 N E D L G P A S P L D S T F Y R S L L E D D D M G D L V D A E E Y L

21/39

22/39

23/39

24/35

```

mspI      mboII
hpaiI
scrFI
nciI
dsav
cauII
bssKI
bslI
tseI bslI
fnu4HI/bsoFI
mboII bsaJI bsrI bglII scfI taqI
mnII mboII bsaJI bsrI bglII scfI taqI
5701 AGGACCTAGA GGAAGGCATC CAAACGCTGA TGGGGAGGCT GGAAGATGGC AGCCCCCGA CTGGGCAGAT CTTCAGCAG ACCTACAGCA AGTTCGACAC
TCCTGGATCT CCTTCGGTAG GTTGGGACT ACCCTCCGA CCTTCTACCG TCGGGGGCCT GACCCGTCTA GAAGTTGCTC TGGATGCTCGT TCAAGCTGTG
^end of ex 4/ start ex 5

rmaI
maeI
bfai
sau96I
avaII
asuI
ppuMI mnII foki bstrFI
eco0109I/draII sfaNI
5801 AAACCTACAC AACGATGACG CACTACTCAA GAACCTACGG CTGCTCTACT GCTTCAGGAA GGACATGGAC AAGGTCGAGA CATTCTGCG CATCGTGCAG
TTTGAGTGTG TTGCTACTGC GTGATGAGTT CTTGATGCCC GACGAGATGA CGAAGTCCTT CCTGTACCTG TTCCAGCTCT GTAAGGACGC GTAGCAGTC

tseI      tth111I/aspl
fnu4HI/bsoFI pflFI bsmAI
bbvI      nlaIII taqI
eco57I     avilI/fspI tspRI

mslI      hgaI
5801 AAACCTACAC AACGATGACG CACTACTCAA GAACCTACGG CTGCTCTACT GCTTCAGGAA GGACATGGAC AAGGTCGAGA CATTCTGCG CATCGTGCAG
TTTGAGTGTG TTGCTACTGC GTGATGAGTT CTTGATGCCC GACGAGATGA CGAAGTCCTT CCTGTACCTG TTCCAGCTCT GTAAGGACGC GTAGCAGTC

sfaNI
mwol
hinPI
hhaI/cfoI
mstI

```

```

scrFI
ncII
mspI
hpaII
dsav
xmaI/pspAI
smaI
scrFI
ncII
dsav
cauII
bssKI
tseI cauII
fnu4HI/bsoFI
bbvI bssKI
alul
pvuII
tseI
mwoI
fnu4HI/bsoFI
mspAI/nspBII
alul
bbsBI
bslI
acII
fnu4HI/bsoFI
bbvI
5901 TGCCGCTCTG TGGAGGGCAG CTGTGGCTTC TAGCTCCCGG GGTGGCATCC CTGTGACCCC TCCCCAGTGC CTCTCTGTC CCTGGAAGTT GCCACTCCAG
ACGGCGAGAC ACCTCCCGTC GACACCGAAG ATCGACGGGC CCACCGTAGG GACACTGGGG AGGGGTACCG GAGAGGACCG
^end of spe-sma pBK-CMV/hgh insert to replace intron
^TG PCR 3' primer

rmaI
maeI
bfaI
truu9I
mseI
tsp509I
sfanI
ahdI/eam1105I
sspl
mnlI
6001 TGCCCCACCAG CCTTGTCTTA ATAAATTAAG GTTGCAATCAT TTTGTCTGAC TAGGTGTCCT TCTATAATAT TATGGGGTGG AGGGGGTGG TATGGAGCAA
ACGGGTGGTC GGAACAGGAT TATTTTAATT CAACGTACTA AAACAGACTG ATCCACAGGA AGATATTATA ATACCCACC TCCCCCACC ATACCTCGTT
^end of hgh exon5

```

24/39

27/39

28/39

29/39

6901 CGGTAATACG GTATCCACA GAATCAGGGG ATAACGCAGG AAACAACATG TGAGCAAAAG GCCAGCAAA CGTAAAAAGG CGCGTTGCT
GCCATTATGC CAATAGGTGT CTTAGTCCC CTATGGTCC TTTCTTGTAC ACTCGTTTC CGTCTTTT CGGTCTTG GCATTTTCC GCGCAACGA

7001 GCGGTTTTT CATAGGCTCC GCGCCCTGA CGAGCATCAC AAAATCGAC GCTCAAGTCA GAGTGGCGA AACCCGACAG GACTATAAAG ATACGAGCGG
CCGCAAAAAG GTATCCGAG CGGGGGACT GCTGTAGTG TTTTGTAGTG CGATTCAGT CTTCCAGCGT TTGGGTGTC CTGATATTTC TATGGTCCGC

7101 TTTCCCTCG GAAGTCCCT CGTGGCTCT CTTGTTCGA CCTGTCCGCT TACCGGATAC CTGTCCGCT TTCTCCCTTC GGAAGCGTG CGGCTTCTC
AAAGGGGAC CTTGAGGGA GCACCGGAGA GGACAAGCT GGAAGGCT GGAAGGCGA ATGGCTATG GACAGGCGA AAGAGGGAAG CCTTCGCAC CGCGAAAGAG

7201 AATGCTCAG CTGTAGGTAT CTCAGTTCG TGTAGGTGCT TCGCTCCAG CTGGGCTGTG TGCACGAACC CCGCGTTCAG CCGACCGCT CGGCTTATC
TTACGAGTGC GACATCCATA GAGTCAAGCC ACATCCAGCA AGCAGGTTG GACCCGACAC ACGTGCTTG GGGCAAGTC GGGCTGGGA CGCGAATAG

6901 CGGTAATACG GTATCCACA GAATCAGGGG ATAACGCAGG AAACAACATG TGAGCAAAAG GCCAGCAAA CGTAAAAAGG CGCGTTGCT
GCCATTATGC CAATAGGTGT CTTAGTCCC CTATGGTCC TTTCTTGTAC ACTCGTTTC CGTCTTTT CGGTCTTG GCATTTTCC GCGCAACGA

7001 GCGGTTTTT CATAGGCTCC GCGCCCTGA CGAGCATCAC AAAATCGAC GCTCAAGTCA GAGTGGCGA AACCCGACAG GACTATAAAG ATACGAGCGG
CCGCAAAAAG GTATCCGAG CGGGGGACT GCTGTAGTG TTTTGTAGTG CGATTCAGT CTTCCAGCGT TTGGGTGTC CTGATATTTC TATGGTCCGC

7101 TTTCCCTCG GAAGTCCCT CGTGGCTCT CTTGTTCGA CCTGTCCGCT TACCGGATAC CTGTCCGCT TTCTCCCTTC GGAAGCGTG CGGCTTCTC
AAAGGGGAC CTTGAGGGA GCACCGGAGA GGACAAGCT GGAAGGCT GGAAGGCGA ATGGCTATG GACAGGCGA AAGAGGGAAG CCTTCGCAC CGCGAAAGAG

7201 AATGCTCAG CTGTAGGTAT CTCAGTTCG TGTAGGTGCT TCGCTCCAG CTGGGCTGTG TGCACGAACC CCGCGTTCAG CCGACCGCT CGGCTTATC
TTACGAGTGC GACATCCATA GAGTCAAGCC ACATCCAGCA AGCAGGTTG GACCCGACAC ACGTGCTTG GGGCAAGTC GGGCTGGGA CGCGAATAG

30/39

alwNI
 alw26I/bsmAI
 tseI
 fnu4HI/bsoFI
 bbvI
 tseI bsrI
 bsrI fnu4HI/bsoFI maeIII
 tspRI bbvI tspRI
 maeIII
 pleI dsav
 hinfi cauII
 smlI bssKI
 maeIII
 CGGTAACTAT CGTCTTGAGT CCAACCCGGT AAGACACGAC TTATCGGCAC TGGCAGCAGC CACTGGTAAAC AGGATTAGCA GAGCGAGGTA TGTAGGCGGT
 7301
 GCCATTGATA GCAGAACTCA GGTGGGCCA TTCTGTGCTG AATAGCGTG ACGTGGTGC GTGACCAATG TCCTAATCGT CTGGCTCCAT ACATCGGCCA
 bslI rnaI
 haeIII/palI maeI
 haeI bfaI
 scfI
 7401 GCTACAGAGT TCTTGAAGTG GTGGCCTAAC TAGGGCTACA CTAGAAGGAC AGTATTGGT ATCTGGCGTC TGCTGAAGCC AGTTACCTTC GGAAGAAAGAG
 CGATGTCTCA AGAAGTTCAC CACCGATTG ATGCGGATG GATCTTCTG TCATAAACCA TAGACGCGAG ACAGCTTCGG TCAATGGAAG CCTTTTCTC
 mspI
 hpaII
 sau3AI
 mboI/ndeII
 dpnII
 dpnI
 aluI alwI
 mspAII/nspBII
 acII acII
 7501 TTGGTAGCTC TTGATCCGGC AAACAAACCA CCGCTGGTAG CGGTGGTTTT TTTGTTTGA AGCAGCAGAT TAGCGCGAGA AAAAAAGGAT CTCAAGAAGA
 AACCATCGAG AACTAGGCG TTTGTTTGGT GCGACCATC GCCACCAAAA AAACAAACGT TCGTGTCTA ATGGCGGTCT TTTTTCCTA GAGTCTTCT
 sau3AI mboI/r
 mboI/ndeII dpnII
 dpnI
 alwI
 bstVI/xhoII bstVI/>
 bstUI
 cac8I mwoI bsh1236I
 alwI smlI mboII
 sau3AI
 mboI/ndeII
 dpnI
 mboI/ndeII alwI
 dpnII rnaI
 dpnI maeI
 bstVI/xhoII bstVI/xhoII
 alwI hphI bfaI
 AAGGATCTT CACCTAGATC
 7601 TCCTTTGATC TTTTCTACGG GGTCTGACGC TCAGTGAAC GAAAACTCAC GTTAAGGAT TTTGTCTATG AGATTATCAA AAAGGATCTT CACCTAGATC
 AGGAAACTAG AAAAGATGCC CCAGACTGCG AGTACCTTG CTTTGTAGTG CAATTCCCTA AAACAGTAC TCATAATAGT TTTCTAGAA GTGATCTAG

tru9I nlaIV
 tsp509I hgiCI
 tru9I mnlI
 msel tspRI bani ddel
 ahaIII/draI maeIII maeIII
 7701 CTTTAAATT AAAAATGAAG TTTTAAATCA ATCTAAAGTA TATATGAGTA AACTTGGTCT GACAGTTACC AATGCTTAAT CAGTGAGGCA CCTATCTCAG
 GAAATTTAA TTTTACTTC AAAATTTAGT TAGATTTTCAT ATATACTCAT TTGAACCAGA CTGTCAATGG TTACGAATTA GTCACCTCGT GGATAGAGTC
 sau3AI bsrI tsel
 mboI/ndelI sau96I fnu4HI/bsoFI
 dpnII nlaIV bbvI
 dpnI foki haeIII/palI
 bstF5I ahdr/eam1105I mnlI asuI tspRI bsrDI
 7801 CGATCTGTCT ATTTCGTTC TCCATAGTTC CCGTACTCCC CGTCGTGTAG ATAACTACGA TACGGGAGGG CTTACCATCT GGCCCCAGTG CTGCAATGAT
 GCTAGACAGA TAAACCAAGT AGGTATCAAC GGAAGTGGGG GCAGCACATC TATTGATGCT ATGCCCTCCC GAATGGTGA CCGGGGTCAC GACGTACTA
 bsmAI
 bsaI
 thal
 fnuDII/mvnI mspI haeIII/palI sau96I foki
 bstUI hpaII mwoI hgiCI
 bsh1236I cfr10I/bsrFI bgII sau96I hinPI avaiI mnlI
 aciI hphI nlaIV cac8I hpaII asuI hhaI/cfoI asuI aciI bstF
 7901 ACCGCGAGAC CCACGCTCAC CGGCTCCAGA TTTATCAGCA ATAAACAGC CAGCGGAAG GCGCGAGGCC AGAGTGTGTC CTGCAACTTT ATCCGCTCC
 TGGCGTCTG GGTGCGAGTG GCCGAGGTCT AATAGTCTT TATTGCTCG GTCGGCTTC CCGGCTCGG TCTTACCAG GACGTTGAAA TAGGGGAGG
 scrFI
 ncII
 mspI
 hpaII
 tsp509I dsav rnaI
 tru9I cauII maeI
 msel bssKI bfaI
 bsrI aseI/asnI/vsPI aluI
 8001 ATCCAGTCTA TTAATTGTTG CCGGGAAGCT AGAGTAAGTA GTTCGCCAGT TAATAGTTTG CGCAACGTTG TTGCCATTGC TGCTGGCATC GTGGTGTAC
 TAGGTACAGT AATTAACAAC GGCCCTTCA TCTCATTCTA CAAGCGGTCA ATTATCAAC GCGTTGCAAC AACGGTAACG ACGACCGTAG CACCACAGTG
 tail
 psp1406I
 hinPI maeII
 hhaI/cfoI
 mstI acII
 aviII/fspi
 bsrDI cac8I
 mwoI bbvI sfaNI
 tsp45I maeIII
 TGCTGGCATC GTGGTGTAC

33/39

34/39

35/39


```
scrFI  
mvaI  
ecoRII  
dsaV  
bstNI  
bssKI  
bsaJI  
apyI  
tseI  
fnu4HI/bsaFI tru9I  
bbvI  
mseI  
maeIII  
9201 GTGCTGCAAG GCGATTAAAGT TGGGTAACGC CAGGTTTTTC CCACTCACGA CGTTGTAAAA CGACGGCCAG TGCC  
CAGCAGCTTC CGCTAATTCA ACCCATTTGG GTCCCAAAG GGTCAAGTGT GCAACATTTT GCTGCCGGTC ACGG  
tspRI  
bsrI  
haeIII/palI  
eaeI  
cfrI  
tail  
tsp45I  
maeIII  
bsrI  
maeII
```

5
FIGURE A

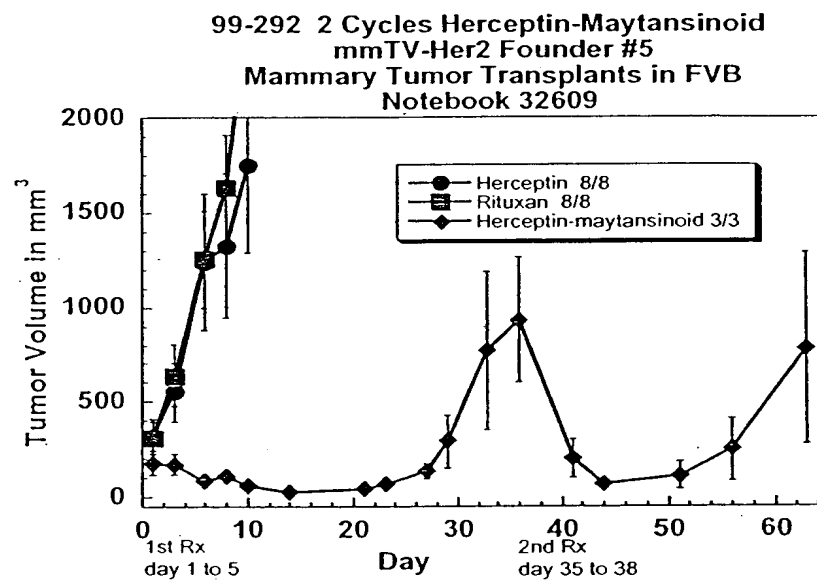


FIG. 5

Variable Heavy Domain

		10	20	30	40
2C4	EVQLQQSGPELVKPGTSVKISCKAS	[GFTFTDYM]	WVKQS		
	** ** *	** ** *	** *		
574	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	[GFTFTDYM]	WVRQA		
		** ** *			
hum III	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	[GFTFSSYAMS]	WVRQA		
		50 a	60	70	80
2C4	HGKSLEWIG	[DVNPNSGGSIYNQRFKG]	KASLTVDRSSRIVYM		
	* * *		** * **** *		
574	PGKGLEWVA	[DVNPNSGGSIYNQRFKG]	RFTLSVDRSKNTLYL		
		***** ** *	* * *		
hum III	PGKGLEWVA	[VISGDGGSTYYADSVKG]	RFTISRDNKNTLYL		
	abc	90	100ab	110	
2C4	ELRSLTFEDTAVYYCAR	[NLGPSFYFDY]	WGQGTTTLTVSS		
	*** **		**		
574	QMNSLRAEDTAVYYCAR	[NLGPSFYFDY]	WGQGLVTVSS		

hum III	QMNSLRAEDTAVYYCAR	[GRVGYSLYDY]	WGQGLVTVSS		

FIG. 6

Variable Light Domain

	10	20	30	40
2C4	DTVMTQSHKIMSTSVGDRVSITC	[KASQDV SIGVA]	WYQQR	P
	** ***** *			*
574	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	[KASQDV SIGVA]	WYQQK	P
		* ** ***		
hum κI	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	[RASQSI SNYLA]	WYQQK	P
	50	60	70	80
2C4	GQSPKLLIY [SASYRYT]	GVPDRFTGSGSGTDFTFTISSVQA		
	** *	* *	* *	*
574	GKAPKLLIY [SASYRYT]	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQP		
	* *****			
hum κI	GKAPKLLIY [AASSLES]	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQP		
	90	100		
2C4	EDLAVYYC [QQYYIYPYT]	FGGGTKLEIKRT		
	* *	* *		
574	EDFATYYC [QQYYIYPYT]	FGQGTKVEIKRT		
	*** *			
hum κI	EDFATYYC [QQYNSLPWT]	FGQGTKVEIKRT		

FIG. 7

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局(43) 国際公開日
2002 年 1 月 3 日 (03.01.2002)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 02/00734 A1

- (51) 国際特許分類⁷: C08B 37/02, C07D 491/22, A61K 47/48, 31/4745, 47/36, A61P 35/00
- (21) 国際出願番号: PCT/JP01/05498
- (22) 国際出願日: 2001 年 6 月 27 日 (27.06.2001)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願2000-195919 2000 年 6 月 29 日 (29.06.2000) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 第一製薬株式会社 (DAIICHI PHARMACEUTICAL CO., LTD.) [JP/JP]; 〒103-8234 東京都中央区日本橋3丁目14番10号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 井村明弘 (IMURA, Akihiro) [JP/JP]. 野口 滋 (NOGUCHI, Shigeru) [JP/JP]. 山口達也 (YAMAGUCHI, Tatsuya) [JP/JP]. 八木 努 (YAGI, Tsutomu) [JP/JP]. 川邊武史 (KAWABE, Takefumi) [JP/JP]; 〒134-8630 東京都江戸川区北葛西1丁目16番13号 第一製薬株式会社 東京研究開発センター内 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 今村正純, 外(IMAMURA, Masazumi et al.); 〒104-0031 東京都中央区京橋1丁目8番7号 京橋日殖ビル8階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: DDS COMPOUND AND PROCESS FOR THE PREPARATION THEREOF

(54) 発明の名称: DDS化合物及びその製造方法

(57) Abstract: A DDS compound which comprises (1S,9S)-1-amino-9-ethyl -5-fluoro-2,3-dihydro-9-hydroxy-4-methyl-1H,12H-benzo[de]- pyrano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinoline-10,13(9H,15H)- dione as the drug compound and carboxymethyldextran polyalcohol and in which the 1-position amino group of the former is bonded to the carboxyl groups of the latter through a spacer consisting of either one amino acid or 2 to 8 amino acids bonded by peptide linkages, characterized in that the amount of the drug compound residue introduced is 3.2 to 8.4 wt% and that the carboxymethyldextran polyalcohol has an average molecular weight of 240,000 to 480,000 and a degree of carboxymethylation of 0.14 to 0.47. A process for the preparation of the DDS compound which comprises the step of adding an aqueous solution of sodium periodate to an aqueous solution of dextran at a temperature of 4°C ± 2°C to oxidize the dextran, and then adding the resulting reaction fluid to an aqueous solution of sodium borohydride at a temperature of 15°C or below to thereby obtain dextran polyalcohol.

[続葉有]

WO 02/00734 A1

WO 02/00734 A1



(57) 要約:

医薬化合物として（1 S， 9 S）－1－アミノ－9－エチル－5－フルオロー 2， 3－ジヒドロ－9－ヒドロキシ－4－メチル－1 H， 1 2 H－ベンゾ [d e] ピラノ [3'， 4' : 6， 7] インドリジノ [1， 2－b] キノリン－1 0， 1 3（9 H， 1 5 H）－ジオンの1－位のアミノ基とカルボキシメチルデキストランポリアルコールのカルボキシル基とが1個のアミノ酸又はペプチド結合した2～8個のアミノ酸からなるスペーサーを介して結合したDDS化合物において、医薬化合物残基の導入量が3. 2～8. 4重量%の範囲であり、カルボキシメチルデキストランポリアルコールの平均分子量が2 4 0， 0 0 0～4 8 0， 0 0 0の範囲、カルボキシメチル化度が0. 1 4～0. 4 7の範囲であることを特徴とするDDS化合物、及びデキストランを含む水溶液に4℃±2℃の温度で過ヨウ素酸ナトリウムを含む水溶液を添加してデキストランを酸化した後、得られた反応液を1 5℃以下の温度で水素化ホウ素ナトリウムを含む水溶液に添加してデキストランポリアルコールを得る工程などを含む該DDS化合物の製造方法。

明 細 書

D D S 化合物及びその製造方法

技術分野

本発明は、カルボキシメチルデキストランをポリアルコール化した多糖誘導体と医薬化合物とを結合させたドラッグデリバリーシステム化合物（以下、「D D S 化合物」という。）及びその製造方法に関する。

背景技術

肺癌や消化器癌などの固形癌や白血病などの血液癌の治療に際して用いられる抗腫瘍剤は、静脈内投与や経口投与などの投与経路により全身的に投与された後、特定の腫瘍部位に移行して癌細胞の増殖を阻害ないし抑制することにより治療効果を発揮する。しかしながら、全身投与された抗腫瘍剤は、血中から肝臓、細網内皮系臓器に速やかに取り込まれたり、あるいは速やかに尿中排泄されるために、血中濃度が低下して腫瘍部位への移行が制限される場合がある。また、通常の抗腫瘍剤自体の腫瘍部位への移行選択性（腫瘍選択性）が低いために、抗腫瘍剤が全身の様々な細胞や組織に広く分布してしまい、正常な細胞や組織に対しても細胞毒として作用し、下痢、発熱、嘔吐、あるいは脱毛などの副作用をきわめて高率に発生させるという問題がある。従って、抗腫瘍剤を効率的かつ選択的に腫瘍部位に移行させる手段の開発が求められている。

このような手段の一つとして、多糖誘導体を薬物担体として用い、該多糖誘導体に対して抗腫瘍剤を結合させて抗腫瘍剤の血中における消失を遅延させるとともに、癌組織への指向性を高める方法が提案されている。カルボキシル基を有する多糖のカルボキシル基にペプチド鎖を介して薬剤を結合させたもの（国際公開 WO 94/19376 号）、カルボキシメチル化されたマンノグルカン誘導体にシッフ塩基やアミド結合を介して薬剤を導入したもの（特公平 7-84481 号）、

WO 02/00734

PCT/JP01/05498

ポリアルコール化多糖誘導体を薬物担体として用い、ペプチド鎖を介して、さらにはペプチド鎖及びパラアミノベンジルオキシカルボニル基を介して薬剤を結合させたもの（国際公開WO 99/61061号）等が開示されている。

多糖誘導体を薬物担体として用いたDDS化合物のうち、カルボキシメチルデキストランをポリアルコール化した多糖誘導体を薬物担体として用い、ペプチド鎖を介して医薬化合物残基を結合したDDS化合物は、腫瘍選択性が特に優れており、抗腫瘍剤としての開発が期待されている。なかでも、医薬化合物残基として（1S, 9S）-1-アミノ-9-エチル-5-フルオロ-2, 3-ジヒドロ-9-ヒドロキシ-4-メチル-1H, 12H-ベンゾ[d,e]ピラノ[3', 4': 6, 7]インドリジノ[1, 2-b]キノリン-10, 13(9H, 15H)-ジオンを結合させた該DDS化合物は、優れた腫瘍選択性及び抗腫瘍活性を発揮でき、臨床上的有用性が期待できるDDS化合物である。

もっとも、本発明者らの研究によれば、医薬化合物残基として（1S, 9S）-1-アミノ-9-エチル-5-フルオロ-2, 3-ジヒドロ-9-ヒドロキシ-4-メチル-1H, 12H-ベンゾ[d,e]ピラノ[3', 4': 6, 7]インドリジノ[1, 2-b]キノリン-10, 13(9H, 15H)-ジオンをカルボキシメチルデキストランをポリアルコール化した多糖誘導体に対してペプチドスパーサーを介して結合させた上記DDS化合物は、薬物担体である高分子キャリアー部分の分子量、カルボキシメチル化度、及び上記医薬化合物残基の導入量の変化により安全性及び薬効域が大きく変動することが明らかとなった。この理由から、上記DDS化合物において、高い安全性と広い薬効域を与える特定のDDS化合物を選択することが望まれる。

また、本発明者らは、カルボキシメチルデキストランポリアルコールの製造において、デキストランポリアルコールの製造時の発熱により高分子キャリアーの低分子化が生じ、さらにデキストランポリアルコールをカルボキシメチル化する際の発熱によりカルボキシメチル化度を十分に制御できず、一定品質の高分子キャリアーを製造できないという問題に直面していた。また、上記の医薬化合物と

WO 02/00734

PCT/JP01/05498

ペプチドスペーサーとを結合させる工程、及びペプチドスペーサーを介して医薬化合物を高分子キャリアーに結合させる工程においても、従来の方法では目的物の分離や精製が必要になるために作業が煩雑で、目的物の収率が低く良好な品質の製品を提供できないという問題があり、それらを解決する必要に迫られていた。

発明の開示

従って、本発明の目的は、上記DDS化合物において、薬物担体である高分子キャリアー部分の分子量、カルボキシメチル化度、及び上記医薬化合物残基の導入量を選択し、高い安全性と広い薬効域を有する上記DDS化合物を提供することにある。また、本発明の別の目的は、上記の特定のDDS化合物を高品質に、かつ効率的に高収率で製造でき、工業化に適した方法を提供することにある。

本発明者らは上記の課題を解決すべく鋭意努力し、上記DDS化合物において高い安全性及び広い薬効域を有する化合物を選択することに成功した。より具体的には、薬物担体である高分子キャリアー部分の分子量、カルボキシメチル化度、及び上記医薬化合物残基の導入量についての最適化を行い、特定の条件を満たす化合物が高い安全性と広い薬効域を有することを見出した。また、上記の特定のDDS化合物を製造するにあたり、反応温度を制御するための手段、反応の進行をモニターするための手段、及び反応試薬などを選択することにより、目的のDDS化合物を一定品質で、かつ効率的に製造できることを見出した。本発明はこれらの知見を基にして完成されたものである。

すなわち、本発明は、(1S, 9S) - 1-アミノ-9-エチル-5-フルオロ-2, 3-ジヒドロ-9-ヒドロキシ-4-メチル-1H, 12H-ベンゾ[d,e]ピラノ[3', 4': 6, 7]インドリジノ[1, 2-b]キノリン-10, 13(9H, 15H)-ジオンの1-位のアミノ基とカルボキシメチルデキストランポリアルコールのカルボキシル基とが1個のアミノ酸又はペプチド結合した2~8個のアミノ酸からなるスペーサーを介して結合したDDS化合物において、(1) (1S, 9S) - 1-アミノ-9-エチル-5-フルオロ-2, 3-ジヒ

WO 02/00734

PCT/JP01/05498

ドロー 9-ヒドロキシ-4-メチル-1H, 12H-ベンゾ[d,e]ピラノ[3', 4' : 6, 7] インドリジノ [1, 2-b] キノリン-10, 13 (9H, 15H) -ジオンの残基の導入量が DDS 化合物全重量に対して 3.2~8.4 重量% の範囲であり、

(2) 上記カルボキシメチルデキストランポリアルコールのプルラン標準重量平均分子量が 240, 000~480, 000 の範囲であり、かつ

(3) 上記カルボキシメチルデキストランポリアルコールのカルボキシメチル化度が 0.23~0.47 の範囲である

ことを特徴とする DDS 化合物を提供するものである。

また、(1S, 9S) -1-アミノ-9-エチル-5-フルオロ-2, 3-ジヒドロ-9-ヒドロキシ-4-メチル-1H, 12H-ベンゾ[d,e]ピラノ[3', 4' : 6, 7] インドリジノ [1, 2-b] キノリン-10, 13 (9H, 15H) -ジオンの 1-位のアミノ基とカルボキシメチルデキストランポリアルコールのカルボキシル基とが 1 個のアミノ酸又はペプチド結合した 2~8 個のアミノ酸からなるスペーサーを介して結合した DDS 化合物において、

(1) (1S, 9S) -1-アミノ-9-エチル-5-フルオロ-2, 3-ジヒドロ-9-ヒドロキシ-4-メチル-1H, 12H-ベンゾ[d,e]ピラノ[3', 4' : 6, 7] インドリジノ [1, 2-b] キノリン-10, 13 (9H, 15H) -ジオンの残基の導入量が DDS 化合物全重量に対して 3.2~8.4 重量% の範囲であり、

(2) 上記カルボキシメチルデキストランポリアルコールのプルラン標準重量平均分子量が 240, 000~480, 000 の範囲であり、かつ

(3) 上記カルボキシメチルデキストランポリアルコールのカルボキシメチル化度が 0.14~0.47 の範囲である

ことを特徴とする DDS 化合物も本発明により提供される。これらの DDS 化合物において、標準物質を分解法又は NMR 法により測定することにより得られる検量線を用いてキャピラリー電気泳動法により上記のカルボキシメチルデキスト

WO 02/00734

PCT/JP01/05498

ランポリアルコールのカルボキシメチル化度を測定した上記DDS化合物も本発明により提供される。

さらに、本発明により、上記DDS化合物を含む医薬及び上記DDS化合物を含む抗腫瘍剤、並びに、上記医薬の製造のための上記DDS化合物の使用及び悪性腫瘍の治療方法であって、上記DDS化合物の治療有効量をヒトを含む哺乳類動物に投与する工程を含む方法が提供される。

別の観点からは、本発明により上記DDS化合物の製造方法が提供される。本発明の方法は、上記DDS化合物の製造方法であって、下記の工程：

(A) デキストランを含む水溶液に $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ の温度で過ヨウ素酸ナトリウムを含む水溶液を添加してデキストランを酸化した後、得られた反応液を 15°C 以下の温度で水素化ホウ素ナトリウムを含む水溶液に添加してデキストランポリアルコールを得る工程；

(B) デキストランポリアルコールにモノクロロ酢酸ナトリウムを反応させてカルボキシメチルデキストランポリアルコールを製造する工程であって、カルボキシメチル化の反応終点をキャピラリー電気泳動法により決定することを特徴とする工程；

(C) (1S, 9S) - 1 - アミノ - 9 - エチル - 5 - フルオロ - 2, 3 - ジヒドロ - 9 - ヒドロキシ - 4 - メチル - 1H, 12H - ベンゾ[d,e]ピラノ[3', 4' : 6, 7] インドリジノ[1, 2-b] キノリン - 10, 13 (9H, 15H) - ジオンの1位のアミノ基と、 α - アミノ基がtert - ブトキシカルボニル基で保護された1個のアミノ酸の α - カルボキシル基又はN末端がtert - ブトキシカルボニル基で保護された2～8個のアミノ酸からなるオリゴペプチドのC末端カルボキシル基とを縮合する工程であって、縮合剤として1 - エチル - 3 - (ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド又はその塩を用いることを特徴とする工程；及び

(D) (1S, 9S) - 1 - アミノ - 9 - エチル - 5 - フルオロ - 2, 3 - ジヒドロ - 9 - ヒドロキシ - 4 - メチル - 1H, 12H - ベンゾ[d,e]ピラノ[3',

WO 02/00734

PCT/JP01/05498

4' : 6, 7] インドリジノ [1, 2-b] キノリン-10, 13 (9H, 15H) -ジオンの1位のアミノ基と、 α -アミノ基がtert-ブトキシカルボニル基で保護された1個のアミノ酸の α -カルボキシル基又はN末端がtert-ブトキシカルボニル基で保護された2~8個のアミノ酸からなるオリゴペプチドのC末端カルボキシル基とを縮合した縮合体からtert-ブトキシカルボニル基を除去して得られる脱保護体と、カルボキシメチルデキストランポリアルコールとを縮合する工程であって、縮合剤として1-エチル-3-(ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド又はその塩を用いることを特徴とする工程からなる群から選ばれる1以上の工程を含んでいる。

本発明の好ましい方法は、上記(A)から(D)の工程から選ばれる2以上の工程を含み、さらに好ましい方法は上記(A)から(D)の工程から選ばれる3以上の工程を含み、特に好ましい方法は、上記(A)から(D)の全ての工程を含む。また、工程(D)において縮合反応の終点を高速液体クロマトグラフィーにより決定することが好ましい態様として提供される。

さらに本発明により、上記のDDS化合物の製造に用いるためのプルラン標準重量平均分子量が240,000~480,000の範囲であり、カルボキシメチル化度が0.23~0.47の範囲であるカルボキシメチルデキストランポリアルコール、上記のDDS化合物の製造に用いるためのプルラン標準重量平均分子量が240,000~480,000の範囲であり、カルボキシメチル化度が0.14~0.47の範囲であるカルボキシメチルデキストランポリアルコール、及び上記のカルボキシメチルデキストランポリアルコールのカルボキシメチル化度が、分解法又はNMR法で得られた検量線を用いてキャピラリー電気泳動法により測定したカルボキシメチル化度であるカルボキシメチルデキストランポリアルコールが提供される。

また、上記DDS化合物の製造のための上記カルボキシメチルデキストランポリアルコールの使用が本発明により提供される。

さらに、上記カルボキシメチルデキストランポリアルコールの製造方法であっ

WO 02/00734

PCT/JP01/05498

て、

(A) デキストランを含む水溶液に $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ の温度で過ヨウ素酸ナトリウムを含む水溶液を添加してデキストランを酸化した後、得られた反応液を 15°C 以下の温度で水素化ホウ素ナトリウムを含む水溶液に添加してデキストランポリアルコールを得る工程；及び

(B) 上記工程 (A) で得られたデキストランポリアルコールにモノクロ酢酸ナトリウムを反応させてカルボキシメチルデキストランポリアルコールを製造する工程であって、カルボキシメチル化の反応終点をキャピラリー電気泳動法により決定することを特徴とする工程を含む方法が提供される。

発明を実施するための最良の形態

日本国特願 2000-195919 号 (2000 年 6 月 29 日出願) の全ての開示を参照として本明細書の開示に含める。

本発明の DDS 化合物は、(1S, 9S)-1-アミノ-9-エチル-5-フルオロ-2, 3-ジヒドロ-9-ヒドロキシ-4-メチル-1H, 12H-ベンゾ [d,e] ピラノ [3', 4' : 6, 7] インドリジノ [1, 2-b] キノリン-10, 13 (9H, 15H)-ジオン (以下、本明細書において「医薬化合物」という場合がある。) の 1-位の アミノ基とカルボキシメチルデキストランポリアルコールのカルボキシル基とが 1 個のアミノ酸又はペプチド結合した 2~8 個のアミノ酸からなるスペーサーを介して結合した DDS 化合物において、

(1) 上記医薬化合物の残基の導入量が DDS 化合物全重量に対して 3.2~8.4 重量%、好ましくは 5.6~7.6 重量%の範囲であり、

(2) 上記カルボキシメチルデキストランポリアルコールのプルラン標準重量平均分子量が 240,000~480,000 の範囲であり、かつ

(3) 上記カルボキシメチルデキストランポリアルコールのカルボキシメチル化度が 0.23~0.47 の範囲である

ことを特徴としている。

また、本発明により提供される他のDDS化合物は、(1S, 9S) - 1 - アミノ - 9 - エチル - 5 - フルオロ - 2, 3 - ジヒドロ - 9 - ヒドロキシ - 4 - メチル - 1H, 12H - ベンゾ [d e] ピラノ [3', 4' : 6, 7] インドリジノ [1, 2 - b] キノリン - 10, 13 (9H, 15H) - ジオン (以下、本明細書において「医薬化合物」という場合がある。) の1 - 位のアミノ基とカルボキシメチルデキストランポリアルコールのカルボキシル基とが1個のアミノ酸又はペプチド結合した2～8個のアミノ酸からなるスペーサーを介して結合したDDS化合物において、

(1) 上記医薬化合物の残基の導入量がDDS化合物全重量に対して3.2～8.4重量%、好ましくは5.6～7.6重量%の範囲であり、

(2) 上記カルボキシメチルデキストランポリアルコールのプルラン標準重量平均分子量が240,000～480,000の範囲であり、かつ

(3) 上記カルボキシメチルデキストランポリアルコールのカルボキシメチル化度が0.14～0.47の範囲である

ことを特徴としている。

本明細書において、「～」で表示される数値範囲は、下限及び上限の数値を含む範囲である。

(1S, 9S) - 1 - アミノ - 9 - エチル - 5 - フルオロ - 2, 3 - ジヒドロ - 9 - ヒドロキシ - 4 - メチル - 1H, 12H - ベンゾ [d e] ピラノ [3', 4' : 6, 7] インドリジノ [1, 2 - b] キノリン - 10, 13 (9H, 15H) - ジオンの1 - 位のアミノ基とカルボキシメチルデキストランポリアルコールのカルボキシル基とが1個のアミノ酸又はペプチド結合した2～8個のアミノ酸からなるスペーサーを介して結合した薬物複合体は、国際公開WO 97/46260に開示されているが、上記の特定のDDS化合物は開示されていない。

本発明のDDS化合物において、薬物担体として機能するカルボキシメチルデキストランポリアルコールの重量平均分子量は、240,000～480,000

WO 02/00734

PCT/JP01/05498

0 の範囲である。カルボキシメチルデキストランポリアルコールのプルラン標準重量平均分子量は当業者に周知の方法に従って測定可能であるが、例えば、ゲル濾過クロマトグラフィー法に従ってプルランを標準として測定することができる。標準とするプルランは S h o d e x 社等から購入することができる。また、カルボキシメチルデキストランポリアルコールのカルボキシメチル化度は 0. 1 4 ~ 0. 4 7 の範囲又は 0. 2 3 ~ 0. 4 7 の範囲である。

カルボキシメチルデキストランポリアルコールのカルボキシメチル化度は、当業者に周知の方法に従って測定可能であるが、例えば、キャピラリー電気泳動法に従って測定することができる。キャピラリー電気泳動法によりカルボキシメチルデキストランポリアルコールのカルボキシメチル化度の測定するにあたり、標準物質を用いて求めた検量線を用いることができる。標準物質としては、カルボキシメチル基の導入量が異なる数種のカルボキシメチルデキストランポリアルコールを調製して用いることができる。検量線は、例えば分解法又は NMR 法のいずれかの方法により得ることができるが、分解法と NMR 法とでは、同一の標準物質について異なるカルボキシメチル化度の測定値を与える場合がある。一般的に、NMR 法によるカルボキシメチル化度の測定値は分解法による測定値に比べて 0. 0 9 程度低くなる傾向がある。従って、NMR 法で作成した検量線を用いる場合には、カルボキシメチル化度が 0. 1 4 ~ 0. 3 8 の範囲であることが望ましい。

分解法では、カルボキシメチルデキストランポリアルコールの酸加水分解によりそれぞれ定量的に生成するグリセロール (G l r)、グリコールアルデヒド (G A)、カルボキシメチルグリセロール (CM-G l r)、及びカルボキシメチルグリコールアルデヒド (CM-G A) を定量する。加水分解物中のグリセロールは塩基性条件下で高速液体クロマトグラフィーにより直接定量することができ、グリコールアルデヒドはアルデヒド標識化試薬であるダンシルヒドラジンと反応させた後、反応生成物を高速液体クロマトグラフィーに付することにより定量できる。カルボキシメチルグリセロールとカルボキシメチルグリコールアルデヒドについ

WO 02/00734

PCT/JP01/05498

ては、カルボキシメチルグリコールアルデヒドのアルデヒドを還元してカルボキシメチルエチレングリコール (CM-EG) に変換した後、それぞれカルボン酸の蛍光標識化試薬である 9-アンスリル-ジメタンと反応させ、反応生成物を高速液体クロマトグラフィーに付することにより定量できる。カルボキシメチル化度は下記の式： $\text{CM-Gl r} / (\text{Gl r} + \text{CM-Gl r}) + \text{CM-EG} / (\text{GA} + \text{CM-EG})$ から計算することができる。

NMR法では、カルボキシメチル基の導入量が異なる数種のカルボキシメチルデキストランポリアルコールを標準物質として用い、それらの ^{13}C -NMRを測定する。各標準物質のカルボキシメチルデキストランポリアルコールのC-1位及びC-5位、並びにカルボキシメチル基が側鎖部分に結合しているC-1位及びC-5位の4つのシグナルの面積強度を算出し、C-1位及びC-5位の面積強度合計のうち、カルボキシメチル基が側鎖部分に結合しているC-1位及びC-5位の面積強度が占める割合により、各カルボキシメチルデキストランポリアルコールのカルボキシメチル化度を求める。

本発明のDDS化合物を構成するスペーサーとしては、1個のアミノ酸残基を含むスペーサー又はペプチド結合した2から8個のアミノ酸残基で構成されるオリゴペプチド残基を含むスペーサーを用いることができる。該スペーサーは、1個のアミノ酸の残基（アミノ酸のアミノ基及びカルボキシル基からそれぞれ1個の水素原子及び1個の水酸基を除いた残基を意味する）、又はペプチド結合した2ないし8個のアミノ酸残基を含むオリゴペプチドの残基（N末端のアミノ基及びC末端のカルボキシル基からそれぞれ1個の水素原子及び1個の水酸基を除いた残基を意味する）の形態を有しており、C末端（1個のアミノ酸を含むスペーサーの場合には α -カルボキシル基）で(1S, 9S)-1-アミノ-9-エチル-5-フルオロ-2, 3-ジヒドロ-9-ヒドロキシ-4-メチル-1H, 12H-ベンゾ[d,e]ピラノ[3', 4': 6, 7]インドリジノ[1, 2-b]キノリン-10, 13(9H, 15H)-ジオンの1位のアミノ基にペプチド結合する。

好ましいスペーサーは2から6個のアミノ酸残基で構成されるオリゴペプチド残基を含むスペーサーである。スペーサーを構成するアミノ酸の種類は特に限定されないが、例えば、L-又はD-アミノ酸、好ましくはL-アミノ酸を用いることができ、 α -アミノ酸のほか、 β -アラニン、 ϵ -アミノカプロン酸、 γ -アミノ酪酸などを用いてもよい。このような α -アミノ酸以外のアミノ酸は、スペーサー中で薬物担体に近接した位置に配置されることが好ましい。

オリゴペプチド残基を含むスペーサーを用いる場合のアミノ酸配列は特に限定されないが、例えば、スペーサーが-X-Z-で表されるジペプチドの残基（Xは疎水性アミノ酸の残基を示し、Zは親水性アミノ酸の残基を示し、-X-Z-は疎水性アミノ酸（X）と親水性アミノ酸（Z）とがそれぞれN末端側及びC末端側となってペプチド結合したジペプチドのN末端のアミノ基及びC末端のカルボキシル基からそれぞれ1個の水素原子及び1個の水酸基を除いた残基を意味する）であるか、又は該ジペプチドの残基を部分ペプチド配列として含むスペーサーを好適に用いることができる。疎水性アミノ酸としては、例えば、フェニルアラニン、チロシン、ロイシンなどを用いることができ、親水性アミノ酸としては、例えば、グリシン、アラニンなどを用いることができる。スペーサーがこのようなジペプチド残基の繰り返し配列（例えば-X-Z-X-Z-、-X-Z-X-Z-X-Z-など）を有していてもよい。

このようなジペプチド構造を含むスペーサーを用いると、スペーサーがペプチダーゼが豊富であると考えられる腫瘍部位や炎症部位で加水分解され、当該部位において短時間に高濃度の医薬化合物が遊離するので、上記ジペプチドを含むスペーサーと医薬化合物とが結合して形成される部分構造は、本発明のDDS化合物の好ましい部分構造である。

スペーサーとして利用可能なオリゴペプチド残基の具体例を以下の表に示すが、本発明のDDS化合物に用いられるスペーサーは以下のものに限定されることはなく、スペーサー種類の選択は、医薬化合物の至適な遊離速度を与えるように当業者が適宜なしうることはいうまでもない（ペプチド配列は左側がN末端であり、

WO 02/00734

PCT/JP01/05498

C末端（1個のアミノ酸を含むスペーサーの場合には α -カルボキシル基）で（1S, 9S）-1-アミノ-9-エチル-5-フルオロ-2, 3-ジヒドロ-9-ヒドロキシ-4-メチル-1H, 12H-ベンゾ[d,e]ピラノ[3', 4': 6, 7]インドリジノ[1, 2-b]キノリン-10, 13（9H, 15H）-ジオンの1位のアミノ基にペプチド結合する）。D-PheはD-フェニルアラニン残基を示し、その他のアミノ酸はL-アミノ酸を示す。なお、遊離速度の大小はドキソルビシンを結合したDDS化合物のWalker 256 担癌ラットに対する薬効の発現の程度、又はWalker 256 担癌ラットの腫瘍部位における遊離ドキソルビシン濃度によって判定した。）。これらのうち、本発明のDDS化合物では、スペーサーとして-Gly-Gly-Phe-Gly-を用いることが特に好ましい。

（a）遊離速度が大きいスペーサー

-Leu-Gly-
 -Tyr-Gly-
 -Phe-Gly-
 -Gly-Phe-Gly-
 -Gly-Gly-Phe-Gly-
 -Gly-Phe-Gly-Gly-
 -Phe-Gly-Gly-Gly-
 -Phe-Phe-Gly-Gly-
 -Gly-Gly-Gly-Phe-Gly-

（b）遊離速度が比較的大きいスペーサー

-Gly-Gly-Phe-Phe-
 -Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-

（c）遊離速度が比較的小さいスペーサー

-Phe-Phe-

WO 02/00734

PCT/JP01/05498

-A l a -G l y -

-P r o -G l y -

-G l y -G l y -G l y -P h e -

(d) 遊離速度が小さいスペーサー

-G l y -

-D -P h e -G l y -

-G l y -P h e -

-S e r -G l y -

-G l y -G l y -

-G l y -G l y -G l y -

-G l y -G l y -G l y -G l y -

(1 S, 9 S) -1-アミノ-9-エチル-5-フルオロ-2, 3-ジヒドロ-9-ヒドロキシ-4-メチル-1H, 12H-ベンゾ [d e] ピラノ [3', 4' : 6, 7] インドリジノ [1, 2-b] キノリン-10, 13 (9H, 15H) -ジオンは、特開平5-59061号公報に記載の方法により合成できる。本発明のDDS化合物における上記医薬化合物の残基の導入量は、DDS化合物の重量に対して3.2~8.4重量%であり、好ましくは5.6~7.6重量%である。上記医薬化合物の導入量は、例えば、吸光度分析により当業者が容易に確認できる。

本発明のDDS化合物は、所望の抗腫瘍活性を腫瘍部位特異的に発現でき、かつ、高い安全性を保持した抗腫瘍剤として用いることができる。本発明のDDS化合物を含む医薬は、通常、凍結乾燥品などの形態でバイアル等に充填することができ、用時溶解型の注射用又は点滴用製剤等の非経口投与用製剤として臨床に提供されるが、本発明の医薬の製剤形態は上記態様に限定されることはない。上記製剤の製造には、例えば、溶解補助剤、pH調整剤、安定化剤などの当業界で利用可能な製剤用添加物を用いることができる。本発明の医薬の投与量は特に限

WO 02/00734

PCT/JP01/05498

定されないが、一日あたり体表面積 1 m^2 につき約 $1 \sim 500 \text{ mg}$ 程度、好ましくは約 $10 \sim 100 \text{ mg}$ の範囲で一日一回投与し、 $3 \sim 4$ 週毎に繰り返すことが好ましい。

本発明のDDS化合物の製造法は特に限定されないが、本発明により提供される上記の製造方法により好適に製造することができる。本発明の方法は、上記の工程 (A) から (D) のいずれか1工程、又は2以上の工程を組み合わせ含み、最も好ましくは (A) から (D) の工程をすべて含む。以下、本発明の最も好ましい形態として、(A) から (D) の工程をすべて含む方法について説明するが、本発明の範囲はこの好ましい形態に限定されることはない。

本発明の好ましい方法は、

(A) デキストランを含む水溶液に $4^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ の温度で過ヨウ素酸ナトリウムを含む水溶液を添加してデキストランを酸化した後、得られた反応液を 15°C 以下の温度で水素化ホウ素ナトリウムを含む水溶液に添加してデキストランポリアルコールを得る工程；

(B) 上記工程 (A) で得られたデキストランポリアルコールにモノクロロ酢酸ナトリウムを反応させてカルボキシメチルデキストランポリアルコールを製造する工程であって、カルボキシメチル化の反応終点をキャピラリー電気泳動法により決定することを特徴とする工程；

(C) (1S, 9S) -1-アミノ-9-エチル-5-フルオロ-2, 3-ジヒドロ-9-ヒドロキシ-4-メチル-1H, 12H-ベンゾ[d,e]ピラノ[3', 4': 6, 7]インドリジノ[1, 2-b]キノリン-10, 13 (9H, 15H) -ジオンの1位のアミノ基と、 α -アミノ基がtert-ブトキシカルボニル基で保護された1個のアミノ酸の α -カルボキシ基又はN末端がtert-ブトキシカルボニル基で保護された2~8個のアミノ酸からなるオリゴペプチドのC末端カルボキシ基とを縮合する工程であって、縮合剤として1-エチル-3-(ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド又はその塩を用いることを特徴とする工程；及び

(D) 上記工程 (C) で得られた縮合体から *tert*-ブトキシカルボニル基を除去して得られる脱保護体と、工程 (B) で得られたカルボキシメチルデキストランポリアルコールとを縮合する工程であって、縮合剤として 1-エチル-3-(ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド又はその塩を用いることを特徴とする工程を含んでいる。

工程 (A) は、デキストランからデキストランポリアルコールを得る工程である。出発原料であるデキストランの種類は特に限定されず、 α -D-1, 6-結合を任意に含んでいてもよい。例えば、 α -D-1, 6-結合の割合が、85%以上、90%以上、又は95%以上のデキストランなどを用いることができる。原料として用いるデキストランとしては、デキストラン T500 (ファルマシア社製) 等の分子量が500, 000程度のものが好ましい。得られるデキストランポリアルコールのポリアルコール化度は特に限定されないが、実質的に完全にポリアルコール化可能な条件下においてデキストランを処理することが好ましい。

上記過ヨウ素酸ナトリウムを用いた酸化反応において、反応時の温度上昇により、デキストランポリアルコールの低分子化が生じる場合があるが、本発明の方法では、この低分子化を抑制するために、デキストランを含む水溶液中に $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ の温度で過ヨウ素酸ナトリウムを含む水溶液を添加することを特徴としている。デキストランを含む水溶液は、例えば緩衝剤を含んでいてもよい。過ヨウ素酸ナトリウムを含む水溶液を添加する際には、反応液の温度上昇が生じないように添加速度を制御することが望ましく、部分的な温度上昇を避けるために適宜の攪拌を行うことが望ましい。反応は数日から20日程度、通常は10日程度で完了する。反応液中のデキストランの濃度は、例えば、反応液1リットルあたり数グラムから100グラム程度、好ましくは1リットルあたり10グラム程度である。

反応の完了後、必要に応じて得られた反応液にエチレングリコールなどを加えて過剰の過酸を消費させ、さらに必要に応じて反応液の pH を中性付近 (例えば

WO 02/00734

PCT/JP01/05498

pH 6.5程度)に調節した後、この反応液を15℃以下の温度で水素化ホウ素ナトリウムを含む水溶液に添加して還元を行う。還元反応に際しても、反応時の温度上昇によりデキストランポリアルコールの低分子化が生じる場合があるが、本発明の方法では、この低分子化を抑制するために上記の酸化反応の反応液を水素化ホウ素ナトリウムを含む水溶液に15℃以下の温度で添加することを特徴としている。添加速度は、反応液の温度上昇が生じないように制御することが望ましく、部分的な温度上昇を避けるために適宜の攪拌を行うことが望ましい。一般的には、添加後に反応混合物を氷冷温度で維持することにより、反応は数時間から数日、好ましくは1日程度で完了する。

得られた反応液から、所望の分子量を有するデキストランポリアルコールを分画し、次工程(B)の原料として用いることが望ましい。例えば、限外濾過膜を用いて低分子量及び高分子量の分画を除去することが望ましく、さらに必要に応じて脱塩及び濃縮などの工程を付加してもよい。脱塩及び濃縮も限外濾過膜を用いて行うことができる。

工程(B)は、上記工程(A)で得られたデキストランポリアルコールをカルボキシメチル化して、重量平均分子量(プルラン標準)が240,000~480,000のカルボキシメチルデキストランポリアルコールを製造する工程である。デキストランポリアルコールのカルボキシメチル化は、例えば、デキストランポリアルコールの水酸基に対してクロル酢酸、ブロム酢酸などのハロゲン化酢酸又はその塩、好ましくはモノクロル酢酸のナトリウム塩を反応させて、デキストランポリアルコールの水酸基を部分的にカルボキシメチル化することにより行うことができる。例えば、デキストランポリアルコールを反応に関与しない不活性溶媒(例えば、水、N,N-ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド等)に溶解し、塩基(例えば、水酸化ナトリウムや水酸化カリウム等)の存在下に、ハロゲン化酢酸又はハロゲン化酢酸の塩を添加し、氷冷下ないし100℃の温度範囲で数分ないし数日間反応させればよい。好ましくは、20℃で数時間から1日程度反応させることができる。反応後、限外濾過膜を用いて低分子量及び高分子

WO 02/00734

PCT/JP01/05498

量の分画を除去することが望ましく、さらに必要に応じて限外濾過膜を用いた脱塩及び濃縮などの工程を付加してもよい。

カルボキシメチルデキストランポリアルコールのカルボキシメチル化度は、カルボキシメチル化の反応温度や試薬として用いるハロゲン化酢酸又はその塩の添加量等によりある程度の制御が可能であるが、本発明の方法では、より厳密にカルボキシメチル化の程度を0.14～0.47又は0.23～0.47の範囲内になるように制御するため、カルボキシメチル化の反応終点をキャピラリー電気泳動法により決定することを特徴としている。

キャピラリー電気泳動 (capillary electrophoresis, CE) は、通常、内径100 μ m以下の熔融シリカ製のキャピラリー内で電気泳動を行う方法である (例えば、馬場嘉信、ぶんせき、342, 1995などを参照のこと)。キャピラリー電気泳動には、キャピラリーゾーン電気泳動 (CZE)、導電クロマトグラフィー (EKC)、キャピラリーゲル電気泳動 (CGE) など数種の分離モードが提案されているが、本発明の方法にはこれらの分離モードのいずれを用いてもよい。好ましくは、キャピラリーゾーン電気泳動を用いることができ、キャピラリー内にリン酸、クエン酸、ホウ酸などの緩衝液を満たして分離を行うことができる。この方法により、単位分子量あたりの電荷を正確に測定することができ、上記反応液中の試料のカルボキシメチル化度を短時間に、かつ高感度に測定できる。その方法の詳細を本明細書の実施例に具体的に示したので、当業者は、上記の刊行物の一般的な説明及びその他の刊行物を参照しつつ、本明細書の実施例に記載された具体的方法に従って、必要に応じてそれらを適宜修飾ないし改変することにより、カルボキシメチル化の反応終点 (カルボキシメチル化度が0.14～0.47又は0.23～0.47の範囲) を容易かつ正確に確認することが可能である。

すでに説明したとおり、キャピラリー電気泳動法によりカルボキシメチルデキストランポリアルコールのカルボキシメチル化度の測定するにあたり、標準物質を用いて求めた検量線を採用することができる。検量線は、例えば分解法又はN

WO 02/00734

PCT/JP01/05498

MR法のいずれかの方法により得ることができるが、分解法とNMR法とでは、同一の標準物質について異なるカルボキシメチル化度の測定値を与える場合がある。一般的に、NMR法によるカルボキシメチル化度の測定値は分解法による測定値に比べて0.09程度低くなる傾向がある。従って、NMR法で作成した検量線を用いる場合には、カルボキシメチル化度が0.14～0.38の範囲であることが望ましい。

工程(C)は、(1S, 9S) - 1-アミノ-9-エチル-5-フルオロ-2, 3-ジヒドロ-9-ヒドロキシ-4-メチル-1H, 12H-ベンゾ [d e] ピラノ [3', 4' : 6, 7] インドリジノ [1, 2-b] キノリン-10, 13 (9H, 15H) - ジオンの1位のアミノ基を、スペーサーとして利用するオリゴペプチドのC末端カルボキシル基 (1個のアミノ酸を用いる場合には α -カルボキシル基) と縮合する工程である。スペーサーとして利用する上記オリゴペプチド又はアミノ酸は、この反応に供するためにそれぞれN末端アミノ基又は α -アミノ基をtert-ブトキシカルボニル基で保護しておく必要があるが、その手段は当業者に周知かつ慣用されている。

本発明の方法では、上記の縮合反応を行うにあたり、縮合剤として1-エチル-3- (ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド (EPC I) 又はその塩、好ましくは1-エチル-3- (ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド塩酸塩を用いることを特徴としている。上記の縮合剤を用いると、N, N' - ジシクロヘキシルカルボジイミド (DCC) のようなN, N' - ジシクロアルキルカルボジイミド類を縮合剤として用いる場合に比べて、反応操作を簡略化でき、反応時間も大幅に短縮できる。より具体的には、縮合剤除去のための遠心分離及びカラム操作を回避でき、反応時間もDCCを用いた場合の約1/5程度に短縮可能である。基質濃度もDCCを用いる場合に比べて約5倍増加させることができる。特に、工業化を志向した大量合成系において、試薬削減、時間短縮等により大幅なコストダウンを図ることが可能である。

上記反応は、縮合剤としてEPC I 又はその塩を用いる以外は、通常の縮合剤

WO 02/00734

PCT/JP01/05498

を用いたペプチド結合形成のための縮合反応と同様に行うことができる。上記医薬化合物に対して *tert*-ブトキシカルボニル化アミノ酸又は *tert*-ブトキシカルボニル化オリゴペプチドを 1～1.5 当量程度用い、ジメチルホルムアミドなどの不活性溶媒中で反応を行うことができる。反応は、一般的に室温下で数時間から 1 日程度、好ましくは室温下に 3 時間程度で終了する。反応液中の医薬化合物の濃度は特に限定されないが、通常は 1 リットルあたり 50～200 グラム程度、好ましくは 1 リットルあたり 100～150 グラム程度である。

工程 (D) は、上記工程 (C) で得られた縮合体から *tert*-ブトキシカルボニル基を除去して得られる脱保護体と、工程 (B) で得られたカルボキシメチルデキストランポリアルコールとを縮合する工程である。*tert*-ブトキシカルボニル基を除去する方法は当業者に周知かつ慣用されているが、例えば、トリフルオロ酢酸で処理する方法が好ましい。脱保護体を精製する場合には、例えば、イソプロピルエーテルなどによる洗浄を行うことができる。

本発明の方法では、医薬化合物が結合したスペーサーの N 末端アミノ基 (1 個のアミノ酸をスペーサーとして用いる場合には α -アミノ酸) とカルボキシメチルデキストランポリアルコールのカルボキシ基とを結合させるにあたり、縮合剤として 1-エチル-3-(ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド (EPC I) 又はその塩、好ましくは 1-エチル-3-(ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド塩酸塩を用いることを特徴としている。上記の縮合剤を用いると、N, N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド (DCC) のような N, N'-ジシクロアルキルカルボジイミド類を縮合剤として用いる場合に比べて、縮合剤除去のための遠心分離及びカラム操作を回避でき、反応時間も大幅な短縮が可能であることから、工業化を志向した大量合成系において大幅なコストダウンを図ることが可能である。上記反応の終点は、HPLC により決定するとよい。

上記反応は、縮合剤として EPC I を用いる以外は、通常の縮合剤を用いたペプチド結合形成のための縮合反応と同様に行うことができる。カルボキシメチルデキストランポリアルコール 1 重量部に対して医薬化合物を結合したアミノ酸又

WO 02/00734

PCT/JP01/05498

はオリゴペプチドを0.1～0.2重量部程度用い、含水メタノールなどの不活性溶媒中で反応を行うことができる。反応は、一般的に室温下で数時間から1日程度、好ましくは室温下に2～3時間程度で終了する。

なお、本発明の方法の具体例が本明細書の実施例に示されているので、当業者は、上記の一般的な説明及び実施例の具体的説明を参照しつつ、必要に応じて適宜の修飾ないし改変を加えて、本発明の方法を行うことができる。また、反応温度や反応時間、試薬の濃度などは当業者が本発明の範囲内で適宜選択可能であることは言うまでもない。

本発明のDDS化合物を含む医薬は、通常、凍結乾燥品などの形態でバイアル等に充填することができ、用時溶解型の注射用または点滴用製剤等の非経口投与用製剤として、腫瘍治療のための医薬として臨床に提供される。本発明のDDS化合物の腫瘍治療のための医薬としての使用に関して国際公開WO 97/46260号の開示を参照として本明細書の開示に含める。もともと、本発明の医薬の製剤形態は上記態様に限定されることはなく、上記医薬の製造には、例えば、溶解補助剤、pH調節剤、安定化剤など当業界で利用可能な製剤用添加物を用いることができる。上記医薬の投与量は特に限定されないが、通常は一日あたり体表面積1m²につき約0.1～100mg程度、好ましくは約1～30mgの範囲で非経口的に一回投与し、3～4週毎に投与を繰り返すことが好ましい。

実施例

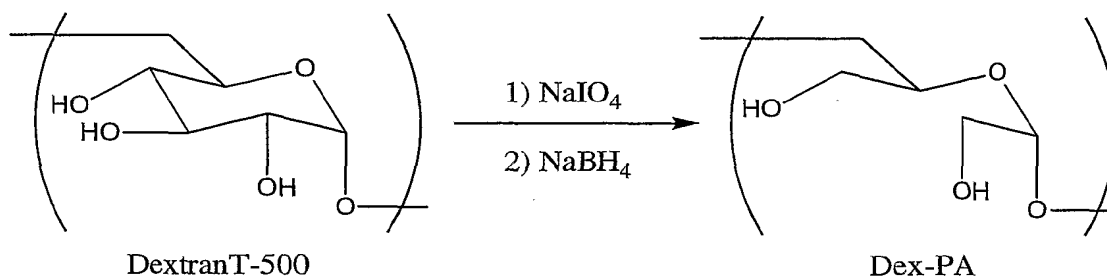
以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明の範囲は下記の実施例に限定されることはない。なお、実施例中、(1S, 9S)-1-アミノ-9-エチル-5-フルオロ-2,3-ジヒドロ-9-ヒドロキシ-4-メチル-1H,12H-ベンゾ[d,e]ピラノ[3',4':6,7]インドリジノ[1,2-b]キノリン-10,13(9H,15H)-ジオンを「医薬化合物A」と呼ぶ場合があり、「Gly-Gly-Phe-Gly」はグリシルーグリシルーフェニルアラニルーグリシン又はその残基を意味する。また、試験例にお

WO 02/00734

PCT/JP01/05498

いて用いたDDS化合物は、上記の医薬化合物とカルボキシメチルデキストランポリアルコールとがテトラペプチドスペーサー (G l y - G l y - P h e - G l y) を介して結合したDDS化合物であり、異なるカルボキシメチル化度及び分子量の異なる高分子キャリアーを有するように調製した。

例1：デキストランポリアルコール (D e x - P A) の合成



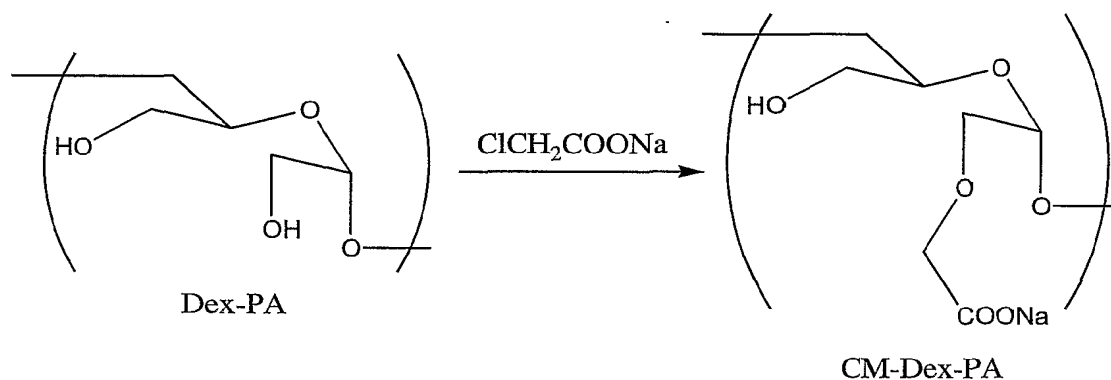
デキストラン-T500 (ファルマシア社製、300 g) を pH 5.5 に調整した 0.2 M 酢酸緩衝液 (15 l)、NaIO₄ (990 g) を純水 (15 l) に溶解し、低温室 (約 4℃) で一晩放置した。翌日、デキストラン-T500 の溶液 (3.5℃) に NaIO₄ 溶液 (3.5℃) を温度上昇 (7.0℃以下) が起らないように徐々に注ぎ、注入後そのまま低温室で攪拌 (100 rpm) した。10 日間攪拌後、エチレングリコール (210 ml) を加えて 2 時間攪拌して過酸の消失を Peroxid 試験紙で確認した後、10% NaOH を用いて反応液を pH 6.5 に調整した。続いて、この反応液を氷冷下で NaBH₄ 溶液 (420 g、12 l) に滴下した。この時、系内温度が 15℃ を超えないようにし、3 時間かけて滴下した。その後、反応混合物を低温室で一晩攪拌し、翌日、酢酸により pH 5.5 に調整した後、さらに 1 時間攪拌して 10% NaOH で pH を 7.0 とした。得られた反応液をポール・フィルトロンの限外濾過膜 (1000 k) で処理して、微粒子及び高分子画分の除去を行った。さらにミリポアの限外濾過膜 (50 k) で脱塩 (純水 90~100 l 程度を使用) 及び濃縮を行い、HPLC でモニターしながら 1997 ml まで濃縮した。この一部 (1 ml × 3) をサ

WO 02/00734

PCT/JP01/05498

ンプリングし凍結乾燥した結果、60.1mgであったため、収量は120gと算出された。

例2：カルボキシメチルデキストランポリアルコール（CM-Dex-PA）の合成



(A) カルボキシメチルデキストランポリアルコール（CM-Dex-PA）の合成

NaOH（193g）を純水（1537ml）に溶解し、液温を25℃に保ちつつデキストランポリアルコール水溶液を加え、系内温度を25℃に保ちながら攪拌した。この混合物にモノクロロ酢酸ナトリウムを徐々に加え、同温度で15時間攪拌した。反応の終点をキャピラリー電気泳動法にて確認後、酢酸でpH8.0程度に調整し、限外濾過を行った。最初に1000kの膜で高分子を排除し、次に50kの膜で低分子（試薬及び塩）を排除して濃縮した。その際、低分子の除去状況は随時HPLCで把握し、低分子がほぼ除去されたことを確認して限外濾過を終了した。カルボキシメチルデキストランポリアルコール溶液を3770mlまで濃縮し、その1mlを凍結乾燥したところ32.1mgであったため、収量は121gと算出された。

(B) キャピラリー電気泳動によるカルボキシメチル化度の測定—その1

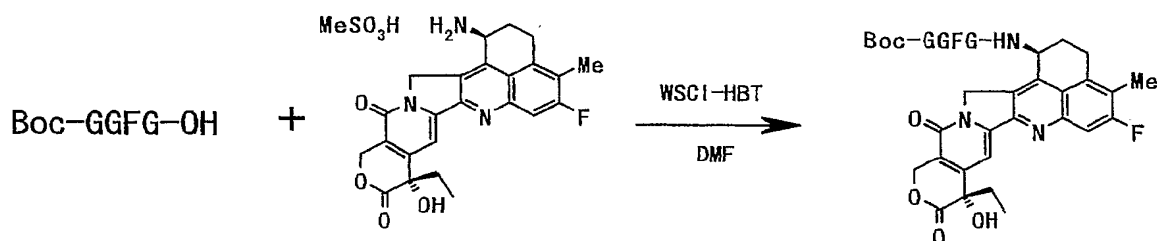
キャピラリー電気泳動は、検出器としてフォトダイオードアレイ190nm—

WO 02/00734

PCT/JP01/05498

300 nm (検出 195 nm)、キャピラリーとしてヒューズドシリカ製内径 75 μ m、有効長 500 mm、全長 670 mm のものを用い、泳動液には 20 mM 四ホウ酸ナトリウム水溶液を用いた。試料は 0.02% アジ化ナトリウム水溶液で 2 mg/ml に調製した。試料として反応時間 19 時間、19.5 時間、及び 20 時間の 3 ロットを用いた。検量線は、分解法によりカルボキシメチル化度が 0.22、0.42、及び 0.62 と確認された 3 種類のカルボキシメチルデキストランポリアルコールを標準物質として用いて作成した。それぞれの保持時間 (分) は 4.496、5.442、及び 6.600 であった。試料の保持時間 (分) は 5.325、5.400、及び 5.446 であった。この結果から、それぞれの試料のカルボキシメチル化度は 0.38、0.40、及び 0.41 と求められた。

例 3 : t e r t -ブトキシカルボニル (B o c) -G l y -G l y -P h e -G l y -医薬化合物 A の合成



医薬化合物 A・メタンスルホン酸塩 (80 g) と t e r t -ブトキシカルボニル-G l y -G l y -P h e -G l y -O H (68 g) を N, N-ジメチルホルムアミド (1200 ml) に懸濁した。氷冷攪拌下、トリエチルアミン (48 ml)、1-エチル-3-(ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド塩酸塩 (E P C I・H C l、29.6 g)、ヒドロキシベンゾトリアゾール (H B T、20.8 g) を加え、室温で攪拌した。反応の終点を H P L C で確認後、氷冷攪拌下、反応液に水 (800 ml) を内温が 20℃以下に保たれるよう 30 分間で滴下し、

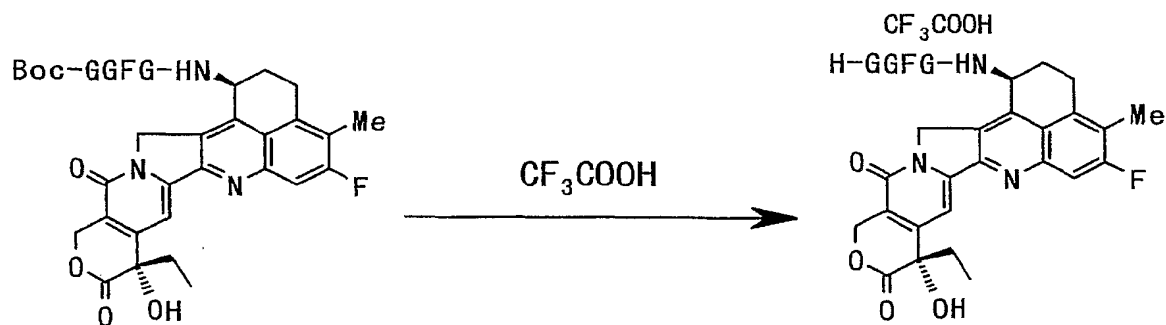
WO 02/00734

PCT/JP01/05498

結晶を析出させた。その後、さらに水（1200 ml）を滴下した。つぎに、酢酸により溶液の pH を 7 に調整した。析出した固体を濾過し水洗し、得られた結晶を減圧下乾燥して表題の化合物（120.4 g、定量的）を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 /TMS) δ (ppm) : 0.97 (3H, m), 1.11 (2H, d, $J=6.3\text{ Hz}$), 1.41 (9H, s), 1.91 (2H, m), 2.05 (1H, m), 2.33 (4H, m), 2.95–3.10 (4H, m), 3.58–3.72 (2H, m), 3.8 (1H, m), 4.03 (1H, m), 4.34 (1H, m), 4.74 (1H, m), 5.13 (1H, m), 5.33 (1H, m), 5.58 (2H, m), 7.18 (5H, m), 7.49 (2H, m)

例 4 : H-G l y -G l y -P h e -G l y -医薬化合物 A・トリフルオロ酢酸塩の合成



上記の例 3 で得た t e r t -ブトキシカルボニル-G l y -G l y -P h e -G l y -医薬化合物 A（120 g）にトリフルオロ酢酸（360 ml）を氷冷下滴下した。t e r t -ブトキシカルボニル-G l y -G l y -P h e -G l y -医薬化合物 A を完全に溶解した後、HPLC で脱 t e r t -ブトキシカルボニル反応の終了を確認した。この反応液にメタノール（360 ml）及びイソプロピルエーテル（720 ml）を内温が 0℃～15℃の間となるように滴下した。析出した結晶を濾取して酢酸エチル（500 ml）で 3 回洗浄し、得られた結晶

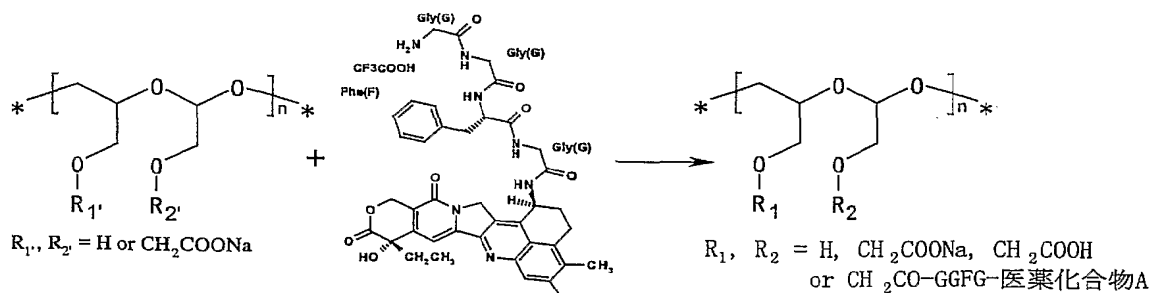
WO 02/00734

PCT/JP01/05498

を、内温 50℃以下で 20%含水メタノール (400 ml) に溶解し、その後、酢酸エチル (400 ml) 次いでイソプロピルエーテル (800 ml) を加えて再結晶した。この結晶を濾取して含水メタノール (400 ml) に溶解し、活性炭 (4.4 g) を加えて脱色処理を行なった。上記溶液を濾過し、濾液に酢酸エチル (400 ml)、次いでイソプロピルエーテル (800 ml) を 55℃以下で加えて再結晶した。濾過した結晶を減圧下乾燥し、H-Gly-Gly-Ph-e-Gly-医薬化合物A (111.8 g、医薬化合物Aから換算して 90%) を得た。

$^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 /TMS) δ (ppm) : 0.87 (3H, m), 1.87 (2H, m), 2.17 (2H, m), 2.37 (3H, m), 2.74 (1H, m), 3.00 (1H, m), 3.16 (1H, m), 3.58 (2H, s), 3.65–3.91 (4H, m), 4.48 (1H, m), 5.2 (2H, s), 5.39 (2H, m), 5.58 (1H, m), 6.53 (1H, s), 7.21 (5H, m), 7.75 (1H, d, $J=10.9\text{ Hz}$), 8.06 (2H, s), 8.28 (1H, d, $J=8.2\text{ Hz}$), 8.49 (1H, m), 8.52 (1H, m)

例 5 : 本発明の DDS 化合物の合成



カルボキシメチルデキストランポリアルコール (800 g) を含む水溶液にカ

WO 02/00734

PCT/JP01/05498

ルボキシメチルデキストランポリアルコール水溶液分と合わせて 3 2 1 となるように純水を加え、さらにメタノール (6 0 1) を加えた。この混合液に例 4 で得た H-G l y-G l y-P h e-G l y-医薬化合物 A (1 3 3 g) とヒドロキシベンゾトリアゾール (2 3. 4 g) を溶解した 2 0 % 含水メタノール (4 1) を添加した。1-エチル-3-(ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド塩酸塩 (3 3. 1 g) を加え、1 N N a O H にて p H を 6. 8 ~ 7. 2 に調整した。この混合物を室温 (2 3 °C ± 5 °C) で、2 ~ 3 時間反応させた。さらに 1-エチル-3-(ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド塩酸塩 (8. 1 g) を添加し、1 N H C l にて p H を 6. 8 ~ 7. 2 に調整し、引続き 2 ~ 3 時間程度反応させた。さらに 1-エチル-3-(ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド塩酸塩 (5. 6 g) を添加し、1 N H C l にて p H を 6. 8 ~ 7. 2 に調整し、引続き 1 時間程度反応させた。反応終了後、1 N N a O H にて反応液の p H を 8. 7 ~ 9. 2 に調整し、1 0 °C 以下で保存した。その後、限外濾過膜 (5 0 k) にて溶液を脱塩及び濃縮した。次にメンブランフィルターで精密濾過し、得られた溶液を凍結乾燥し、本発明の D D S 化合物 (8 8 0 g) を得た。

例 6 : デキストランポリアルコールの低分子化における反応温度の影響 (酸化反応)

基質濃度 1 %、2 0 g スケールで例 1 に従いデキストランの酸化反応を行った。反応温度を 4、8、1 2、1 5 °C に設定し、反応時間を変化させた時の生成体のゲル濾過クロマトグラフィーにおける保持時間を測定した。表 1 に示すように、反応温度 1 2 °C 及び 1 5 °C の場合には、6 日目には低分子化による明らかな保持時間の遅れが確認された。8 °C においても、1 0 日目には、明らかな保持時間の遅れが確認できた。

表 1

反応温度/時間	3日間	6日間	10日間
4℃	10.46分	10.44分	10.53分
8℃	10.52分	10.63分	10.83分
12℃	10.45分	10.63分	—
15℃	10.59分	10.92分	—

例 7 : デキストランポリアルコールの低分子化における反応温度の影響 (酸化反応)

例 6 の結果に基づき、さらに温度範囲を細かく設定 (4℃、1℃、6.5℃) して同様の実験を行った。表 2 に示すように、すべての温度範囲において、低分子化が起こることなく反応は進行したが、1℃で反応させた場合には、反応系中の塩の析出が多くなった。以上の結果から、この反応の温度の安全域は 2～6℃と判断された。

表 2

反応温度/時間	3日間	6日間	10日間
4℃	10.40分	10.39分	10.49分
1℃	10.42分	10.39分	10.45分
6.5℃	10.40分	10.36分	10.39分

例 8 : デキストランポリアルコールの低分子化における反応温度の影響 (還元反応)

例 1 に従い、デキストランの酸化反応に引き続く還元反応を行った。反応温度を 10、15、20、30℃に設定し、12～24 時間反応させた後、生成体のゲル濾過クロマトグラフィーにおける保持時間を測定した。表 3 に示すように、反応温度が 15℃を超えると明らかな低分子化が認められた。

WO 02/00734

PCT/JP01/05498

表 3

反応温度	ゲル濾過クロマトグラフィーによる判定
10℃	低分子化なし
15℃	若干の低分子化
20℃	低分子化
30℃	顕著な低分子化

例 9 : カルボキシメチル化度の測定方法の違いによる DDS 化合物のカルボキシメチル化度の測定値変動

3 種類のカルボキシメチルデキストランポリアルコールを標準物質として用いて分解法及び NMR 法により検量線を作成した。この検量線を用いて例 2 (B) と同様にして、DDS 化合物 (3 ロット) のカルボキシメチル化度を測定した。結果を以下に示す。NMR で求めた検量線を用いると、いずれのロットについてもカルボキシメチル化度の測定値が分解法で求めた場合よりも 0.09 減少していた。

表 4 標準物質 (カルボキシメチルデキストランポリアルコール) のカルボキシメチル化度

	標準物質 No. 1	標準物質 No. 2	標準物質 No. 3
分解法	0.333	0.439	0.584
NMR 法	0.248	0.360	0.523

表 5 DDS 化合物のカルボキシメチル化度

	ロット 1	ロット 2	ロット 3
分解法	0.36	0.37	0.37
NMR 法	0.27	0.28	0.28
差異	$\Delta 0.09$	$\Delta 0.09$	$\Delta 0.09$

WO 02/00734

PCT/JP01/05498

以下、試験例を示すが、試験例中に示したカルボキシメチル化度は分解法により求めた値である。

試験例 1

(A) 方法

動物は6週齢の雄のBALB/cマウス(日本S L C株式会社)を市販の飼料及び水を自由に摂取させ、1週間の馴化後に試験に供した。腫瘍細胞はマウス腫瘍細胞Me t h A線維肉腫を同系マウスであるBALB/cの腹腔内にて1週間毎に継代維持した。エンドトキシン濃度50 p g / m l以下のハンス培地(HBSS、G i b c o - B R L)を用いてマウスの腹腔内より腫瘍細胞を採取し、数回の遠心操作(約600 r p m、5-10分、4℃)で洗浄した後、HBSS培地に浮遊して $1 \times 10^6 / 0.1 \text{ ml}$ / マウスの割合でマウスの腹腔内に移植した。

抗腫瘍試験では、Me t h A細胞を $1 \times 10^6 / 0.1 \text{ ml}$ / マウスの割合でマウスの右鼠径部に皮下移植し(d a y 0)、移植後7又は12日にノギスで測定した腫瘍の長径(L)及び短径(W)から算出した推定腫瘍重量($ETW = L \times W^2 / 2 \text{ mg}$)の群平均が約100 mgになるようにマウスを6又は7匹に群分けし、検体を単回あるいは4日毎4回の用法で静脈内投与した。マウスを腫瘍移植後21日又は26日に頸椎脱臼により屠殺し、腫瘍を摘出してその重量を測定した。腫瘍増殖抑制効果(IR)は、 $IR = (1 - TW_t / TW_c) \times 100$ (%)の式を用いて腫瘍重量値から算出した(TW_t、TW_cはそれぞれ検体投与群及び対照群の平均腫瘍重量)。IRが58%以上の場合に抗腫瘍効果を有効と判断した。対照群と検体投与群の腫瘍重量の有意差検定はダネット法により行った。

さらに、検体の副作用の強さを評価するために、体重減少率(BWL)及び使用マウス数に対する毒性死したマウス数との比(D/U)を毒性パラメーターとして設定した。BWLは $BWL = (1 - BW_n / BW_s) \times 100$ (%)の式を

WO 02/00734

PCT/JP01/05498

用い、投与開始時におけるマウスの平均体重 (BW_s) 及び n 日目のマウスの平均体重 (BW_n) より算出した。この BWL の最大値を BWL_{max} とした。ただし、投与開始日に比較し体重減少が認められない場合は BWL_{max} を 0 以下 (< 0) として示した。なお、検体は日本薬局方注射用生理食塩水に溶解し、投与液量 10 又は 20 ml / kg にて静脈内投与した。

(B) 結果

カルボキシメチルデキストランポリアルコールの分子量が 48,000～457,000 である DDS 化合物 (カルボキシメチル化度 0.37～0.46、薬物導用量 4.6～6.4 重量%) について単回投与での試験を行ったところ、カルボキシメチルデキストランポリアルコールの分子量が 200,000～300,000 では、低用量で安定して 58% 以上の有意な抗腫瘍効果が確認されたが、分子量が 200,000 未満では最小有効量が増大した。また、分子量が 50,000 未満の場合には、毒性及び抗腫瘍効果が減弱し、尿排泄を受けているものと考えられた。したがってカルボキシメチルデキストランポリアルコールの分子量が 200,000 以上であれば、低用量でも安定した抗腫瘍効果を得ることができると結論された。一方、カルボキシメチルデキストランポリアルコールの分子量が 500,000 を超えると、粘性のために物理的傷害に対する安定性が悪いなどの問題が生じた。これらの結果から、DDS 化合物におけるカルボキシメチルデキストランポリアルコールの分子量は 50,000～500,000 の範囲であることが必要であり、所望の抗腫瘍効果を達成し、かつ安定な製品を製造するためにはカルボキシメチルデキストランポリアルコールのプルラン標準重量平均分子量が 240,000～480,000 の範囲であることが望ましいと結論された。

試験例 2

7 週齢の BALB / c 系雄マウス 69 匹 (日本エスエルシー株式会社) を 1 週間馴化し、1 群 5 匹としてカルボキシメチル化度の異なる DDS 化合物 (薬物導

WO 02/00734

PCT/JP01/05498

入量 5.3～6.3 重量%、分子量 270,000～330,000) を投与した。投与時の平均体重は 21.1 から 25.4 g であった。動物は、室温 (23 ± 2℃)、湿度 (55 ± 20%)、照明時間 12 時間 (8:00～20:00) に設定された室内でアルミ製ケージに 5 匹ずつ収容し、市販の固形飼料 (F2、船橋農場製) 及び塩素添加上水道水を自由に摂取させて飼育した。DDS 化合物は日本薬局方生理食塩水に溶解し、1.02～1.36 mg/ml の濃度として 1 ml/kg の液量で尾静脈内に投与した。

動物の症状を 1 日 1 回、投与日を含めて 15 日間観察し、投与前並びに投与後 3、7、10、及び 14 日に体重を測定した。死亡例は死亡発見後速やかに剖検し、生存例は投与後 14 日にエーテル麻酔下に腹大動脈切断により放血屠殺し、全身諸臓器を肉眼的に観察した。体重データは群平均値 ± 標準偏差を算出し、その後、有意水準 5% で統計学的解析を行った。その結果、カルボキシメチル化度が 0.38、0.43、及び 0.47 の DDS 化合物の最大耐用量 (MTD) はそれぞれ 11.7、11.7、及び 10.3 mg/kg であり、カルボキシメチル化度が 0.43 を上回ると毒性が強くなる傾向が示唆された。また、カルボキシメチル化度が 0.53 の DDS 化合物を用いて同様に毒性を評価したところ、10 mg/kg 投与群で 6 匹中 3 匹が死亡し、体重減少及び致死毒性が顕著に増強された。一方、カルボキシメチル化度が 0.23 の DDS 化合物の MTD はカルボキシメチル化度が 0.38 の DDS 化合物と同等であった。従って、安全性の面から DDS 化合物のカルボキシメチル化度は 0.23～0.47 の範囲が好ましいと結論された。

試験例 3

上記試験例 2 と同様にして、医薬化合物残基の導入量が 3.2～15 重量% の DDS 化合物 (カルボキシメチル化度 0.37～0.40、分子量 260,000～320,000) について抗腫瘍試験を実施した。この結果、1.25 mg/kg 投与群では導入率 3.2～7.3 重量% の範囲で IR 80% 以上と薬効が

WO 02/00734

PCT/JP01/05498

認められたものの、導入率が8.4重量%を上回ると（～15%の範囲まで）薬効がこれらよりも明らかに低下する傾向が認められた。また、導入率8.4重量%を上回る場合には、2.5又は5 mg/kg投与群において他の複合体と同等の薬効を示したものの、10 mg/kg投与群において致死毒性の増強が認められた。これらの結果から、所望の抗腫瘍効果を達成し、安全性の高いDDS化合物を提供するためには、医薬化合物残基の導入量を3.2～8.4重量%の範囲とすることが望ましいと結論された。

産業上の利用可能性

本発明のDDS化合物は高い安全性と広い薬効域を有しており、抗腫瘍剤として臨床上極めて有用である。また、本発明の方法は、上記DDS化合物を高品質に、かつ効率的に高収率で製造でき、工業化に適している。

請求の範囲

1. (1S, 9S) - 1-アミノ-9-エチル-5-フルオロ-2, 3-ジヒドロ-9-ヒドロキシ-4-メチル-1H, 12H-ベンゾ[d,e]ピラノ[3', 4': 6, 7]インドリジノ[1, 2-b]キノリン-10, 13(9H, 15H)-ジオンの1-位のアミノ基とカルボキシメチルデキストランポリアルコールのカルボキシル基とが1個のアミノ酸又はペプチド結合した2~8個のアミノ酸からなるスペーサーを介して結合したDDS化合物において、

(1) (1S, 9S) - 1-アミノ-9-エチル-5-フルオロ-2, 3-ジヒドロ-9-ヒドロキシ-4-メチル-1H, 12H-ベンゾ[d,e]ピラノ[3', 4': 6, 7]インドリジノ[1, 2-b]キノリン-10, 13(9H, 15H)-ジオンの残基の導入量がDDS化合物全重量に対して3.2~8.4重量%の範囲であり、

(2) 上記カルボキシメチルデキストランポリアルコールのプルラン標準重量平均分子量が240, 000~480, 000の範囲であり、かつ

(3) 上記カルボキシメチルデキストランポリアルコールのカルボキシメチル化度が0.23~0.47の範囲である

ことを特徴とするDDS化合物。

2. (1S, 9S) - 1-アミノ-9-エチル-5-フルオロ-2, 3-ジヒドロ-9-ヒドロキシ-4-メチル-1H, 12H-ベンゾ[d,e]ピラノ[3', 4': 6, 7]インドリジノ[1, 2-b]キノリン-10, 13(9H, 15H)-ジオンの1-位のアミノ基とカルボキシメチルデキストランポリアルコールのカルボキシル基とが1個のアミノ酸又はペプチド結合した2~8個のアミノ酸からなるスペーサーを介して結合したDDS化合物において、

(1) (1S, 9S) - 1-アミノ-9-エチル-5-フルオロ-2, 3-ジヒドロ-9-ヒドロキシ-4-メチル-1H, 12H-ベンゾ[d,e]ピラノ[3', 4': 6, 7]インドリジノ[1, 2-b]キノリン-10, 13(9H, 15H)-ジオンの残基の導入量がDDS化合物全重量に対して3.2~8.4重量%の範囲であり、

WO 02/00734

PCT/JP01/05498

H) ージオンの残基の導入量がDDS化合物全重量に対して3.2～8.4重量%の範囲であり、

(2) 上記カルボキシメチルデキストランポリアルコールのプルラン標準重量平均分子量が240,000～480,000の範囲であり、かつ

(3) 上記カルボキシメチルデキストランポリアルコールのカルボキシメチル化度が0.14～0.47の範囲である

ことを特徴とするDDS化合物。

3. (1S, 9S)ー1ーアミノー9ーエチルー5ーフルオロー2, 3ージヒドロー9ーヒドロキシー4ーメチルー1H, 12Hーベンゾ[d e]ピラノ[3', 4' : 6, 7] インドリジノ[1, 2ーb] キノリンー10, 13 (9H, 15H)ージオンの1ー位のアミノ基とカルボキシメチルデキストランポリアルコールのカルボキシル基とが1個のアミノ酸又はペプチド結合した2～8個のアミノ酸からなるスペーサーを介して結合したDDS化合物において、

(1) (1S, 9S)ー1ーアミノー9ーエチルー5ーフルオロー2, 3ージヒドロー9ーヒドロキシー4ーメチルー1H, 12Hーベンゾ[d e]ピラノ[3', 4' : 6, 7] インドリジノ[1, 2ーb] キノリンー10, 13 (9H, 15H)ージオンの残基の導入量がDDS化合物全重量に対して3.2～8.4重量%の範囲であり、

(2) 上記カルボキシメチルデキストランポリアルコールのプルラン標準重量平均分子量が240,000～480,000の範囲であり、かつ

(3) 上記カルボキシメチルデキストランポリアルコールのカルボキシメチル化度が0.14～0.38の範囲である

ことを特徴とするDDS化合物。

4. 上記(3)におけるカルボキシメチル化度が、標準物質であるカルボキシメチルデキストランポリアルコールを分解法又はNMR法で測定することにより得られる検量線を用いてキャピラリー電気泳動法により測定されたカルボキシメチル化度である請求の範囲第1項ないし第3項のいずれか1項に記載のDDS化合

WO 02/00734

PCT/JP01/05498

物。

5. 上記（3）におけるカルボキシメチル化度が、標準物質であるカルボキシメチルデキストランポリアルコールを分解法で測定することにより得られる検量線を用いてキャピラリー電気泳動法により測定されたカルボキシメチル化度である請求の範囲第1項に記載のDDS化合物。

6. 上記（3）におけるカルボキシメチル化度が、標準物質であるカルボキシメチルデキストランポリアルコールをNMR法で測定することにより得られる検量線を用いてキャピラリー電気泳動法により測定されたカルボキシメチル化度である請求の範囲第3項に記載のDDS化合物。

7. 請求の範囲第1項ないし第6項のいずれか1項に記載のDDS化合物を含む抗腫瘍剤。

8. 請求の範囲第1項ないし第6項のいずれか1項に記載のDDS化合物の製造方法であって、下記の工程：

（A）デキストランを含む水溶液に $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ の温度で過ヨウ素酸ナトリウムを含む水溶液を添加してデキストランを酸化した後、得られた反応液を 15°C 以下の温度で水素化ホウ素ナトリウムを含む水溶液に添加してデキストランポリアルコールを得る工程；

（B）デキストランポリアルコールにモノクロロ酢酸ナトリウムを反応させてカルボキシメチルデキストランポリアルコールを製造する工程であって、カルボキシメチル化の反応終点をキャピラリー電気泳動法により決定することを特徴とする工程；

（C）（1S, 9S）-1-アミノ-9-エチル-5-フルオロ-2, 3-ジヒドロ-9-ヒドロキシ-4-メチル-1H, 12H-ベンゾ[d,e]ピラノ[3', 4': 6, 7]インドリジノ[1, 2-b]キノリン-10, 13（9H, 15H）-ジオンの1位のアミノ基と、 α -アミノ基がtert-ブトキシカルボニル基で保護された1個のアミノ酸の α -カルボキシル基又はN末端がtert-ブトキシカルボニル基で保護された2～8個のアミノ酸からなるオリゴペプチド

WO 02/00734

PCT/JP01/05498

のC末端カルボキシル基とを縮合する工程であって、縮合剤として1-エチル-3-(ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド又はその塩を用いることを特徴とする工程；及び

(D) (1S, 9S)-1-アミノ-9-エチル-5-フルオロ-2, 3-ジヒドロ-9-ヒドロキシ-4-メチル-1H, 12H-ベンゾ[d,e]ピラノ[3', 4': 6, 7]インドリジノ[1, 2-b]キノリン-10, 13(9H, 15H)-ジオンの1位のアミノ基と、 α -アミノ基がtert-ブトキシカルボニル基で保護された1個のアミノ酸の α -カルボキシル基又はN末端がtert-ブトキシカルボニル基で保護された2～8個のアミノ酸からなるオリゴペプチドのC末端カルボキシル基とを縮合した縮合体からtert-ブトキシカルボニル基を除去して得られる脱保護体と、カルボキシメチルデキストランポリアルコールとを縮合する工程であって、縮合剤として1-エチル-3-(ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド又はその塩を用いることを特徴とする工程

からなる群から選ばれる1以上の工程を含む方法。

9. 請求の範囲第1項ないし第6項のいずれか1項に記載のDDS化合物の製造方法であって、下記の工程：

(A) デキストランを含む水溶液に4℃±2℃の温度で過ヨウ素酸ナトリウムを含む水溶液を添加してデキストランを酸化した後、得られた反応液を15℃以下の温度で水素化ホウ素ナトリウムを含む水溶液に添加してデキストランポリアルコールを得る工程；

(B) 上記工程(A)で得られたデキストランポリアルコールにモノクロロ酢酸ナトリウムを反応させてカルボキシメチルデキストランポリアルコールを製造する工程であって、カルボキシメチル化の反応終点をキャピラリー電気泳動法により決定することを特徴とする工程；

(C) (1S, 9S)-1-アミノ-9-エチル-5-フルオロ-2, 3-ジヒドロ-9-ヒドロキシ-4-メチル-1H, 12H-ベンゾ[d,e]ピラノ[3', 4': 6, 7]インドリジノ[1, 2-b]キノリン-10, 13(9H, 15H)-ジオンの1位のアミノ基と、 α -アミノ基がtert-ブトキシカルボニル基で保護された1個のアミノ酸の α -カルボキシル基又はN末端がtert-ブトキシカルボニル基で保護された2～8個のアミノ酸からなるオリゴペプチドのC末端カルボキシル基とを縮合した縮合体からtert-ブトキシカルボニル基を除去して得られる脱保護体と、カルボキシメチルデキストランポリアルコールとを縮合する工程であって、縮合剤として1-エチル-3-(ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド又はその塩を用いることを特徴とする工程

WO 02/00734

PCT/JP01/05498

H) ージオンの1位のアミノ基と、 α -アミノ基がtert-ブトキシカルボニル基で保護された1個のアミノ酸の α -カルボキシ基又はN末端がtert-ブトキシカルボニル基で保護された2～8個のアミノ酸からなるオリゴペプチドのC末端カルボキシ基とを縮合する工程であって、縮合剤として1-エチル-3-(ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド又はその塩を用いることを特徴とする工程；及び

(D) 上記工程(C)で得られた縮合体からtert-ブトキシカルボニル基を除去して得られる脱保護体と、カルボキシメチルデキストランポリアルコールとを縮合する工程であって、縮合剤として1-エチル-3-(ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド又はその塩を用いることを特徴とする工程を含む方法。

10. 請求の範囲第1項ないし第6項のいずれか1項に記載のDDS化合物の製造に用いるためのプルラン標準重量平均分子量が240,000～480,000の範囲であり、カルボキシメチル化度が0.23～0.47の範囲であるカルボキシメチルデキストランポリアルコール。

11. 請求の範囲第1項ないし第6項のいずれか1項に記載のDDS化合物の製造に用いるためのプルラン標準重量平均分子量が240,000～480,000の範囲であり、カルボキシメチル化度が0.14～0.47の範囲であるカルボキシメチルデキストランポリアルコール。

12. 請求の範囲第1項ないし第6項のいずれか1項に記載のDDS化合物の製造に用いるためのプルラン標準重量平均分子量が240,000～480,000の範囲であり、カルボキシメチル化度が0.14～0.38の範囲であるカルボキシメチルデキストランポリアルコール。

13. 上記カルボキシメチル化度が、標準物質であるカルボキシメチルデキストランポリアルコールを分解法又はNMR法で測定することにより得られる検量線を用いてキャピラリー電気泳動により測定されたカルボキシメチル化度である請求の範囲第10項ないし第12項のいずれか1項に記載のカルボキシメチルデキ

ストランポリアルコール。

14. 上記カルボキシメチル化度が、標準物質であるカルボキシメチルデキストランポリアルコールを分解法で測定することにより得られる検量線を用いてキャピラリー電気泳動により測定されたカルボキシメチル化度である請求の範囲第10項に記載のカルボキシメチルデキストランポリアルコール。

15. 上記カルボキシメチル化度が、標準物質であるカルボキシメチルデキストランポリアルコールをNMR法で測定することにより得られる検量線を用いてキャピラリー電気泳動により測定されたカルボキシメチル化度である請求の範囲第12項に記載のカルボキシメチルデキストランポリアルコール。

16. 請求の範囲第10項ないし第15項のいずれか1項に記載のカルボキシメチルデキストランポリアルコールの製造方法であって、

(A) デキストランを含む水溶液に $4^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ の温度で過ヨウ素酸ナトリウムを含む水溶液を添加してデキストランを酸化した後、得られた反応液を 15°C 以下の温度で水素化ホウ素ナトリウムを含む水溶液に添加してデキストランポリアルコールを得る工程；及び

(B) 上記工程(A)で得られたデキストランポリアルコールにモノクロロ酢酸ナトリウムを反応させてカルボキシメチルデキストランポリアルコールを製造する工程であって、カルボキシメチル化の反応終点をキャピラリー電気泳動法により決定することを特徴とする工程を含む方法。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP01/05498

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl ⁷ C08B37/02, C07D491/22, A61K47/48, A61K31/4745, A61K47/36, A61P35/00								
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC								
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl ⁷ C08B37/02, C07D491/22, A61K47/48, A61K31/4745, A61K47/36, A61P35/00								
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched								
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CA (STN), REGISTRY (STN), WPIDS (STN)								
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category*</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>WO 97/46260 A (Daiichi Pharmaceutical Co., Ltd., et al.), 11 December, 1997 (11.12.97), & EP 916348 A</td> <td>1-16</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	WO 97/46260 A (Daiichi Pharmaceutical Co., Ltd., et al.), 11 December, 1997 (11.12.97), & EP 916348 A	1-16
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.						
X	WO 97/46260 A (Daiichi Pharmaceutical Co., Ltd., et al.), 11 December, 1997 (11.12.97), & EP 916348 A	1-16						
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.								
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family							
Date of the actual completion of the international search 31 July, 2001 (31.07.01)		Date of mailing of the international search report 14 August, 2001 (14.08.01)						
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer						
Facsimile No.		Telephone No.						

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JPO1/05498

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int cl⁷ C08B37/02, C07D491/22, A61K47/48, A61K31/4745, A61K47/36, A61P35/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int cl⁷ C08B37/02, C07D491/22, A61K47/48, A61K31/4745, A61K47/36, A61P35/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA (STN), REGISTRY (STN), WPIDS (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO 97/46260 A (第一製薬株式会社ほか) 11. 12 月. 1997 (11. 12. 97) & EP 916348 A	1-16

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

31. 07. 01

国際調査報告の発送日

14.08.01

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

内藤 伸一



4P

8615

電話番号 03-3581-1101 内線 3492

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
20 February 2003 (20.02.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/013602 A1(51) International Patent Classification⁷: **A61K 39/395**,
47/48, G01N 33/577, 33/574, A61P 35/00, G01N 33/50,
C12N 5/20, C07K 16/28

(21) International Application Number: PCT/EP02/08938

(22) International Filing Date: 9 August 2002 (09.08.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
01 119 260.6 9 August 2001 (09.08.2001) EP(71) Applicant (for all designated States except US): **MAX-
PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG
DER WISSENSCHAFTEN E.V.** [DE/DE]; Hofgarten-
strasse 8, 80539 München (DE).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): **ULLRICH,
Axel** [DE/DE]; Brunnstrasse 5, 80331 München (DE).
HTUN-VAN DER HORST, Edward [DE/DE]; Blumen-
strasse 23, 80331 München (DE).(74) Agents: **WEICKMANN & WEICKMANN** et al.; Post-
fach 860 820, 81635 München (DE).(81) Designated States (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG,
SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.(84) Designated States (*regional*): ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,
ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK,
TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).**Declaration under Rule 4.17:**— *of inventorship (Rule 4.17(iv)) for US only***Published:**— *with international search report*
— *with (an) indication(s) in relation to deposited biological
material furnished under Rule 13bis separately from the
description**For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.*

(54) Title: INHIBITORS OF HER3 ACTIVITY

(57) Abstract: The present invention relates to a pharmaceutical composition comprising as an active agent an inhibitor of HER3 activity, particularly an anti-HER3- antibody. Further, the use of this composition for the diagnosis, prevention or treatment of hyperproliferative diseases, particularly tumor diseases is disclosed.

**WO 03/013602 A1**

- 1 -

Inhibitors of HER3 activity

Description

5

The present invention relates to a pharmaceutical composition comprising as an active agent an inhibitor of HER3 activity, particularly an anti-HER3-antibody. Further, the use of this composition for the diagnosis, prevention or treatment of hyperproliferative diseases, particularly tumor diseases is disclosed.

10

Protein tyrosine kinases are known to be enzymes, which mediate signal transduction processes that regulate cell growth and differentiation. Receptor protein tyrosine kinases act via ligand-stimulated tyrosine phosphorylation of substrates. HER3 (also called ErbB3) is a member of the epidermal growth factor receptor (EGFR) subfamily of receptor protein tyrosine kinases (Plowman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87 (1990), 4905-4909; Kraus et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86 (1989), 9193-9197 and Kraus et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90 (1993), 2900-2904).

20

HER3 has been found to be overexpressed in several types of cancer such as breast, gastrointestinal and pancreatic cancers. When HER3 is co-expressed with HER2, another member of the EGFR subfamily of receptor protein tyrosine kinases, an active heterodimeric signalling complex is formed.

25

A monoclonal antibody against HER3 (Rajkumar et al., Br. J. Cancer 70 (1994), 459-456) had an agonistic effect on the anchorage-independent growth of cell lines expressing HER3. On the other hand, anti-HER3 antibodies described in U.S. patent 5,968,511 (corresponding to WO 97/35885) are reported to reduce Heregulin-induced formation of

30

- 2 -

HER2/HER3 heterodimers. Such an activity, however, is only demonstrated for an antibody which increases Heregulin binding to HER3. Thus, it is not clear which type of anti-HER3-antibody - if any - has potential of being used for therapeutic applications.

5

Vadlamudi et al. (Oncogenes 18 (1999), 305-314) describe the regulation of the cyclooxygenase (COX-2) pathway by the HER2 receptor. It was found that a specific inhibitor of COX-2 can suppress the mitogenic and invasive action of colorectal cancer cells. Further, it was found that incubation with a monoclonal anti-HER3 antibody leads to a reduction in the levels HER2/HER3 heterodimers, but results in an only partial reduction of COX-2 expression.

WO 00/31048 discloses a quinazoline derivative which acts as an inhibitor of receptor tyrosine kinases such as EGFR, HER2 and HER4. An inhibition of HER3 is however not disclosed.

WO 00/78347 discloses methods for arresting or inhibiting cell growth, comprising preventing or reducing ErbB-2/ErbB-3 heterodimer formation. For example, the agent may be a combination of an anti-HER2 extracellular domain antibody and an anti-HER3 antibody, e.g. the HER3 antibody H3.105.5 purchased from Neomarkers. It is however not clear which type of anti-HER3 antibody is required to obtain desirable therapeutic effects.

US-patent 5,804,396 describes a method for identifying an agent for treatment of a proliferative disorder, comprising the steps of assaying a potential agent for activity in inhibition of signal transduction by a HER2/HER3 or HER2/HER4 or HER3/HER4 heterodimer. Specific HER3 inhibitors are not disclosed.

30

We compared the biological properties of Herceptin, an agonistic monoclonal antibody against HER2 with anti-HER3-antibodies, namely (i) α -

- 3 -

HER3-ECD, a murine monoclonal antibody IgG1, Upstate Biotechnology, Cat.No.# 05-471, directed against the Heregulin binding site of HER3, (ii) antibody 1B4C3 from our laboratory and (iii) antibody 2D102 also from our laboratory, in invasive breast cancer cell lines MCR-7 (DKFZ Heidelberg),
5 MDA-MB-468 (ATCC HTB-132) and MDA-MB231 (ATCC HTB-26) expressing different HER2:HER3 ratios. We provide evidence that pretreating the breast cancer cell lines with anti-HER3-antibody prior to α/β -Heregulin (α/β -HRG) stimulation diminished the HER2/HER3 tyrosine phosphorylation content in contrast to Herceptin. In addition, anti-HER3-
10 antibody abrogated HER2/HER3 heterodimerization and also reduced the complex formation of the p85 subunit of PI_3 -kinase and the adaptor protein SHC with HER3, resulting in decreased PI_3 -kinase and c-jun-terminal kinase activity (JNK), respectively. In comparison to Herceptin, anti-HER3-antibody was also capable of downregulating extracellular signal-regulated
15 kinase 2 (ERK2) after α/β -HRG stimulation. Furthermore, we demonstrate a significant reduction of the migratory and proliferative property of the breast cancer cell lines after pretreatment with anti-HER3-antibody. Our data clearly show that an anti-HER3-antibody is more potent in diminishing signal transduction processes after HRG stimulation than Herceptin.
20 Furthermore, in specific cancer types, e.g. melanoma, anti-HER3 antibodies are effective in reducing migratory and proliferative properties while anti-HER2 antibodies do not show any significant effect at all. These data demonstrate the great potential of anti-HER3 antibodies or other HER3 inhibitors for the therapy of breast cancer and other malignancies
25 characterized by hypersignalling through HER3 and its heterodimerization partners.

Thus, the present invention relates to a pharmaceutical composition comprising as an active agent a specific type of inhibitor of HER3 activity
30 and pharmaceutically acceptable carriers, diluents and/or adjuvants. The HER3 inhibitor of the invention is characterized in that binding of the inhibitor to HER3 reduces HER3 mediated signal transduction. In one

- 4 -

embodiment a reduction of HER3 mediated signal transduction may be caused by a downregulation of HER3 resulting in an at least partial disappearance of HER3 molecules from the cell surface. In a further embodiment of the invention the reduction of HER3 mediated signal transduction may be caused by a stabilization of HER3 on the cell surface in a substantially inactive form, i.e. a form which exhibits a lower signal transduction compared to the non-stabilized form.

The inhibitor of the invention may influence the binding of Heregulin to HER3, particularly by decreasing the binding of Heregulin to HER3. In other embodiments, however, the inhibitor may not compete with the binding of Heregulin to HER3.

In a preferred embodiment the inhibitor is an anti-HER3-antibody. Preferably, the antibody is directed against the extracellular domain of HER3. It should be noted, however, that also other HER3 inhibitors, particularly low molecular weight inhibitors, e.g. peptides or organic compounds may be used.

According to the invention, the term "antibody" covers monoclonal antibodies, polyclonal antibodies, multispecific antibodies (e.g. bispecific antibodies) formed from at least two antibodies and antibody fragments as long as they exhibit the desired activity.

The antibody may be a monoclonal antibody which may be obtained by the hybridoma method as described by Köhler et al. (Nature 256 (1975), 495) or by recombinant DNA methods (cf. e.g. U.S. Patent 4,816,567). Monoclonal antibodies may also be isolated from phage antibody libraries using techniques described in Clackson et al. (Nature 352 (1991), 624-628) and Marks et al. (J.Mol.Biol.222 (1991), 581-597). The antibody may be an IgM, IgG, e.g. IgG1, IgG2, IgG3 or IgG4.

- 5 -

Antibody fragments comprise a portion of an antibody, generally the antigen binding or variable region of the intact antibody. Examples of antibody fragments include Fab, Fab', F(ab')₂ and Fv fragments, diabodies, single chain antibody molecules and multispecific antibody fragments.

5

Particularly, the antibody may be a recombinant antibody or antibody fragment, more particularly selected from chimeric antibodies or fragments thereof (Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81 (1984), 6851-6855), humanized antibodies (Jones et al., Nature 321 (1986), 522-525; 10 Riechmann et al., Nature 332 (1988), 323-329 and Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2 (1992), 593-596), single chain Fv antibodies (Plückthun in: The Pharmacology of Monoclonal Antibodies 113, Rosenberg and Moore, EDS, Springer Verlag, N.Y. (1994), pp. 269-315) and diabodies (Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90 (1993), 6444-6448).

15

In an especially preferred embodiment the antibody is selected from antibodies 1B4C3 (IgG2a) and 2D1D12 (IgG1) produced by the hybridoma cell lines DSM ACC 2527 or DSM ACC 2517, fragments thereof or recombinant derivatives thereof. 1B4C3 is an antibody which leads to 20 internalization of HER3 and 2D1D12 is an antibody which leads to stabilization of HER3. Further preferred are antibodies, e.g. chimeric or humanized antibodies or fragments thereof, which have substantially the same biological activity (e.g. as described in the Examples) compared to the antibodies produced by the deposited hybridoma cell lines, for example, 25 by binding to the same epitope on HER3. The hybridoma cell line DSM ACC 2517 was deposited under the Budapest Treaty for the Deposit of Microorganisms on July 24, 2001 at Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Mascheroder Weg 1b, 38124 Braunschweig, Germany. The hybridoma cell line DSM ACC 2527 30 producing the antibody 1B4C3 was deposited on August 07, 2001 at DSMZ.

- 6 -

The antibody of the invention may be coupled to a labelling group, particularly for diagnostic applications. Examples for suitable labelling groups such as radioactive groups, fluorescent groups or other labelling groups are known in the art. Further, particularly for therapeutic applications, the antibody may be coupled to an effector group, e.g. a cytotoxic group such as a radioactive group, a toxin or another effector group as known in the art.

In a further preferred embodiment, the inhibitor may be selected from non-antibody derived binding proteins such as fibronectin type III domains or anticalins (Skerra, "Engineered protein scaffolds for molecular recognition", J. Mol. Recog. 13 (2000), 167-187 and references cited therein).

Further, the present application relates to the use of an inhibitor of HER3 activity, wherein binding of said inhibitor to HER3 reduces HER3 mediated signal transduction, for the manufacture of an agent for the diagnosis, prevention and/or treatment of hyperproliferative diseases, particularly tumor diseases such as breast cancer, gastrointestinal cancer, pancreas cancer, prostate cancer, glioma, melanoma or other HER3 expressing or overexpressing cancers or formation of tumor metastases. The disease may be associated with increased HER3 signal transduction and may be associated with concomittant HER2 expression or lack of HER2 expression. Particularly the disease is associated with increased HER3 phosphorylation and/or increased HER2/HER3 heterodimerization and/or increased PI_3 kinase activity and/or increased c-jun terminal kinase activity and/or AKT activity and/or increased ERK2 activity and/or PYK2 activity.

Surprisingly it was found that the HER3 inhibitor of the invention, particularly an anti-HER3-antibody, shows a significantly higher efficiency in diminishing signal transduction processes than a HER2 inhibitor such as Herceptin. Particularly, in melanoma cells, the anti-HER3-antibody was

- 7 -

effective, while Herceptin did not show a significant effect, even though HER2 was expressed by the melanoma cells.

Preferably, the HER3 inhibitor of the invention exhibits at least one of the following characteristics:

- decreasing the association of Heregulin (p85) with transactivated HER3, preferably substantially completely inhibiting the binding of p85 with HER3,
- inhibiting the binding of GRB2 to HER2, the binding of HER2 to HER3 and/or the association of GRB2 with SHC,
- inhibiting receptor tyrosin phosphorylation,
- inhibiting AKT phosphorylation,
- decreasing tumor invasiveness, particularly in breast cancer and melanoma,
- inhibiting PYK2 tyrosine phosphorylation and
- inhibiting ERK2 phosphorylation.

Further, the invention relates to a method for diagnosing, preventing or treating a hyperproliferative disease, particularly a tumor disease, comprising administering a subject in need thereof, e.g. a human, an effective amount of an inhibitor of HER3 activity, wherein binding of said inhibitor to HER3 reduces HER3 mediated signal transduction.

The HER3 inhibitor, particularly the anti-HER3-antibody may be formulated by mixing the active agent with physiologically acceptable carriers, diluents and/or adjuvants, e.g. in the form of lyophilized formulations, aqueous solutions, dispersions or solid preparations such as tablets, dragees or capsules as described in Remington's Pharmaceutical Sciences.

The formulation may also contain more than one active compound, e.g. inhibitors of other receptor protein tyrosine kinases such as EGFR, HER2,

- 8 -

HER4 or vascular endothelial factor (VEGF). Alternatively or additionally, the composition may comprise a cytotoxic agent such as doxorubicin, cis-platin or carboplatin, or a cytokine.

5 The inhibitor of the invention is also suitable for diagnostic applications, e.g. in order to determine the expression and/or activity of HER3 on target cells. Such a diagnostic application may be carried out according to known procedures.

10 Depending on the type and severity of the disease to be treated, about 1 $\mu\text{g/kg}$ to 15 mg/kg of antibody may be administered to a human patient, e.g. by one or more separate administrations or by continuous infusion. A typical daily dosage might range from about 1 $\mu\text{g/kg}$ to about 100 mg/kg or more, depending on the factors mentioned above. For repeated
15 administrations over several days or longer, depending on the condition to be treated, the treatment is sustained until a desired suppression of disease symptoms occurs.

Further, the present invention shall be explained by the following figures
20 and examples:

Examples

25 1. Monoclonal antibody $\alpha\text{-HER3}^{\text{ECD}}$ decreases receptor tyrosine phosphorylation of HER3 and HER2

The breast cancer cell lines MCF-7 (DKFZ - Heidelberg), MDA-MB-468 (ATCC HTB-132) and MDA-MB-231 (ATCC HTB-26) were chosen on the basis of their different ratios of HER2:HER3 and their inherent migratory
30 properties with MDA-MB-231 being the most invasive cell line. In order to assess the functional role of $\alpha\text{-HER3}^{\text{ECD}}$ (Upstate Biotechnology, Cat. # 05-471) in comparison to trastuzumab (Herceptin), we pretreated the cells

- 9 -

with α -HER3^{ECD} and HC, respectively, prior to Heregulin (HRG) stimulation, performed receptor-immunoprecipitation experiments and probed with an anti-phosphotyrosine antibody (PY) (Figure 1). Our data show that pretreatment with α -HER3^{ECD} substantially decreased the tyrosine phosphorylation content of HER3 and HER2 after α -HRG stimulation in MCF-7 (Figure 1a) and MDA-MB-231 (Figure 1c), but conversely increased HER3 tyrosine phosphorylation in MDA-MB-468 (Figure 1b). The association between HER2 and HER3 was even enhanced with α -HER3^{ECD}, although the content of tyrosyl-phosphorylated receptors was dramatically reduced (Figure 1 a, b middle upper panel lanes 4 and 8). In contrast, HC upregulated receptor tyrosyl-phosphorylation and promoted association of HER3 and HER2 in the presence or absence of HRG in all cell lines (Figure 1a, b, c upper panel lanes 3, 7, 11 and 15). In the case of MDA-MB-486 cells, which are insensitive to α -HRG, β -HRG was used as stimulus.

15

2. α -HER3^{ECD} abrogates association of SHC and PI₃-K with HER3 and of GRB2 with HER2

We subsequently asked whether α -HER3^{ECD} has an effect on the known substrates of HER3, namely SHC and phosphatidyl-3-OH-kinase (PI₃-K), which are effector proteins responsible for MAPK cascade activation and lipid signalling, respectively. Therefore, we immunoprecipitated SHC and PI₃-K under the experimental conditions described above and assessed the tyrosine phosphorylation of these effectors. As shown in Figure 2, α -HER3^{ECD} significantly decreased the tyrosine phosphorylation of SHC in the cell lines MCF-7 and MDA-MB-486 (Figure 2a, b compare lane 13 with 16). Interestingly, the association of SHC was attenuated in MCF-7 cells, whereas in MDA-MB-486, α -HER3^{ECD} lead to increased binding of HER3 with SHC. The immunoprecipitates of the regulatory subunit of PI₃-K yielded essentially similar results. The binding of tyrosine-phosphorylated HER3 to PI₃-K was abrogated in MCF-7, while an increase was observed in

30

- 10 -

MDA-MB-486 (Figure 1b, 2b). However, pretreatment with α -HER3^{ECD} in MDA-MB-486 cells lead to increased binding of SHC and PI₃-K to HER3, whereas HC again showed crosslinking properties in all cell lines. Since SHC associates with the adaptor molecule GRB2 after HRG stimulation, we explored the effect of the reduced tyrosyl-phosphorylation of SHC by measuring GRB2 binding (Figure 2c). Therefore we performed GST-pulldown assays in MCF-7 cells using GST-GRB2 fusions and the same experimental design as before. Indeed, the reduced tyrosyl-phosphorylation of SHC resulted in strongly decreased binding of GRB2 to SHC (Figure 2c lower panel, compare lanes 5 and 8), and a complete inhibition of its association with HER2 (Figure 2c middle panel, compare lanes 5 and 8). These data clearly show that α -HER3^{ECD} inhibits SHC and PI₃-K binding to HER3 in MCF-7, but conversely in MDA-MB-486 both proteins associated with HER3 regardless of the phosphorylation status of HER3.

3. α -HER3^{ECD} downregulates JNK1 and PI₃-K activity

The adaptor protein SHC mediates MAPK signalling pathways downstream of growth-factor receptors, activating ERK2 and JNK, respectively. To investigate the effect of α -HER3^{ECD} on ERK2 and JNK, we performed MAPK kinase assays under the same experimental conditions in MCF-7 and MB-468 (Figure 3). We observed a strong decrease of JNK activity in all cell lines, but an equivalent effect of HC on JNK was only detectable in MCF-7 (Figure 3a). ERK2 activity was only slightly but significantly decreased through α -HER3^{ECD}, whereas HC had no effect on ERK2 activity (data not shown). Since an involvement of PI₃-K in carcinoma invasion has recently been demonstrated, we investigated the inhibitory properties of α -HER3^{ECD} on PI₃-K activity and carried out PI₃-K assays (Figure 3). In MCF-7 and MDA-MB-486 PI₃-K activity was strongly reduced in comparison to HRG-treated cells (Figure 3a, b). In MDA-MB-486 HC possessed an even greater effect on PI₃-K activity than α -HER3^{ECD}. These data suggest that α -HER3^{ECD}

- 11 -

downregulates JNK and PI₃-K activity, respectively, in MCF-7 and MDA-MB-486 cells.

5 **4. α -HER3^{ECD} enhances endocytotic downregulation of HER3**

HER2 and HER3 are endocytosed and recycled after HRG stimulation. We were interested in establishing whether α -HER3^{ECD}-mediated inhibition of HER3 tyrosyl-phosphorylation originates from accelerated endocytosis. To gain insight, we performed a time course with MCF-7 cells in the absence or presence of α -HER3^{ECD} or HRG, respectively, and stimulated subsequently with HRG (Figure 4). HER3 was then immunoprecipitated after biotinylation of the membrane proteins. We observed that HER3 is endocytosed rapidly after pretreatment with α -HER3^{ECD} (Figure 4b upper panel). Applying HRG to the cells had the same effect, with the difference that after two hours HER3 was exported back to the membrane and after three hours it was endocytosed again. As a control, whole cell lysates (WCL) were probed with PY (Figure 4b lower panel). In comparison to HRG-treated cells where the content of tyrosyl-phosphorylated protein was diminished after three hours, accelerated endocytosis of HER3 occurred after one hour of pretreatment with α -HER3^{ECD}. To compare α -HER3^{ECD} with HC we performed the same experiment with HC and immunoprecipitated HER2 (Figure 4a upper panel). Strikingly, HER2 was not endocytosed after pretreatment with HC at any time point, whereas HRG lead to rapid endocytosis. When endocytosed receptors and whole cell lysates, probed with anti-phosphotyrosine (PY) are compared, it clearly appears that the phosphotyrosine content decreased with α -HER3^{ECD}, but not with HC (Figure 4b lower panel). Our data indicate that α -HER3^{ECD} downregulates HER3 rapidly through accelerated endocytosis, thus rendering the cell insensitive to HRG stimulation.

- 12 -

5. α -HER3^{ECD} inhibits migratory and proliferative properties of breast cancer cell lines

In order to assess the biological function of α -HER3^{ECD} on the migratory and proliferative properties of breast cancer cells, we performed BrdU-incorporation assays in the presence or absence of α -HER3^{ECD} and stimulated with HRG. Pretreatment with α -HER3^{ECD} decreased proliferation by 28.7% $\pm$ 6.18% and 21.1% $\pm$ 7.62% in MCF-7 and MDA-MB-486, respectively. The observed inhibition in proliferation correlated with the ERK2 assays, whereas HC had no effect in these cell lines (data not shown). Furthermore, to investigate the effect of α -HER3^{ECD} on the migratory properties of breast cancer cells, we conducted chemotaxis experiments with MCF-7 and MDA-MB-486 in the presence or absence of α -HER3^{ECD}. We observed a strong decrease in migration of 59.1% (P=0.018) and 55.4% (P=0.00005) in MCF-7 and MDA-MB-486, respectively. In addition, migration could also be inhibited in MDA-MB231 by 35%, but with a lesser significance (P=0.06). Our data clearly show an inhibitory effect of α -HER3^{ECD} on proliferation and migration in MCF-7 and MDA-468.

20

6. Generation of monoclonal antibodies against HER3

We generated then murine monoclonal antibodies against the extracellular domain of HER3, immunizing Balb/c mice with a human recombinant fusion protein of the extracellular part of HER3 and a C-terminal His-Tag (HER3-6xHis-CT). The immunogen was obtained by transfection, selection with G418 and stable expression of the construct in HEK293 cells; the cell culture supernatant of the clone with the highest expression level was collected and the protein purified after ammonium sulfate precipitation, dialysis and subsequent metal ion affinity chromatography (Ni-NTA). Quality assurance was accomplished by Western blotting (data not

30

- 13 -

shown). Immunization was performed by intraperitoneal injection with 22 μ g of HER3-6xHis-CT according to the manufacturer's protocol (Qiagen ImmunEasy Mouse Adjuvant). Hybridoma cell lines producing monoclonal antibodies were generated using standard methods.

5

7. Monoclonal antibodies against HER3 preferentially bind to its protein backbone and have different effects on the endocytic processes of HER3

10 We identified by FACS analysis three monoclonal antibodies recognizing specifically native HER3 on the cell surface of MCF-7 cells (data not shown). 1B4C2 and 1B4C3 are IgG2a isotype antibodies, whereas 2D1D12 is an IgG1 isotype antibody. No cross-reactivity with the other members of the EGFR family was detected (data not shown). We then wanted to
15 determine whether the antibodies bind to glycosylated structures or to the protein backbone of HER3 and which consequences this would have on the endocytic regulation of the receptor. Therefore we pretreated MCF-7 cells in the presence or absence with the antibiotic Tunicamycin for 16 h, which is known to prevent N-linked glycosylation of cell surface proteins. After
20 lysing the cells we immunoprecipitated HER3 with the monoclonal antibodies 2F12 (directed against the intracellular part of HER3), α -HER3^{ECD} (extracellular part of HER3), 1B4C2, 1B4C3 and 2D1D12. Our data show that α -HER3^{ECD}, 1B4C3 and 2D1D12 all bind preferentially to the protein backbone of HER3, whereas 1B4C3 also has an affinity to glycosylated
25 forms of HER3 (Figure 6A).

To investigate the effect of 1B4C3 and 2D1D12 on the endocytic processes of HER3, we performed a time-course experiment, wherein MCF-7 cells were incubated for various time periods with 1B4C3 or 2D1D12,
30 respectively. The cell surface proteins were biotinylated, precipitated with an antibody against the intracellular domain of HER3 and probed against streptavidin. We observed that 1B4C3 accelerates the endocytosis of HER3

- 14 -

similarly to α -HER3^{ECD}, whereas 2D1D12 stabilized and therefore accumulated HER3 on the cell surface (Figure 6B).

8. Monoclonal antibodies 1B4C3 and 2D1D12 inhibit downstream signals of HER3 and HER2

We then asked whether 1B4C3 and 2D1D12 could inhibit tyrosine phosphorylation of HER2 and of the HER3 substrate SHC. Since GRB2 binds to HRG-stimulated HER2 and transmits in the same way as SHC mitogenic signals to the MAPK pathway, we immunoprecipitated SHC and in parallel performed a GST-GRB2 pulldown in MCF-7 cells untreated or pretreated with the antibodies and subsequently stimulated with HRG (Figure 6C). This experiment shows that both antibodies inhibit tyrosine phosphorylation of SHC and the association of GRB2 with SHC. Furthermore, the antibodies inhibit the association of SHC with HER3 and the heterodimerization between HER2 and HER3. These data show that downstream signalling is inhibited by 1B4C3 and 2D1D12, albeit with 2D1D12 having an even stronger inhibitory effect than 1B4C3.

9. Monoclonal antibody 2D1D12 inhibits proliferation of breast cancer cell lines MDA-MB-435S, ZR-75-1 and melanoma cell line Mel Gerlach

We next set out to explore the biological activity of 1B4C3 and 2D1D12 in the two breast cancer cell lines MDA-MB-435S (ATCC HTB-129), ZR-75-1 (ATCC CRL-1500) and the melanoma cell line Mel Gerlach (Klinikum Großhadern, Munich). We have chosen the cell lines due to their tumorigenicity in nude mice and their high HER3 expression level. It should be noted that melanoma cells overexpress HER3, since HER3 is critical in the development of melanocytes as well as oligodendrocytes. To test our hypothesis that 1B4C3 and 2D1D12 abrogate mitogenic signals and consequently the proliferative properties of cancer cells, we performed

- 15 -

BrdU-incorporation assays in the presence or absence of the antibodies (Figure 7). Proliferation was strongly reduced in all cell lines by 2D1D12, whereas 1B4C3 had only an inhibitory effect in Mel Gerlach. Taken together, our data constitute the first evidence that monoclonal antibodies
5 against HER3 could be potentially regarded as new therapeutic weapons against cancer.

The hybridoma cell lines producing antibodies 1B4C3 and 2D1D12 were deposited on August 07, 2001 and July 24, 2001, respectively, at DSMZ.

10

10. Effect of HER3 antibodies on signal transduction

10.1. Methods

15 MDA-MB-435S were obtained from ATCC (HTB-129) and Mel-Juso were obtained from Cell Lines Service (CLS) (0282-HU). GST-p85 (a.a 333-430) was obtained from Santa Cruz. GST-GRB2 was purified as described previously. Phospho-AKT (P-Ser 473) was from New England Biolabs (NEB). HER2 antibody was purified as described from the hybridoma
20 culture supernatant (ATCC CRL-10463). For GST-pull-down assays 1.25 μ g bait protein was used. BrdU-Incorporation and invasion assays were performed as previously described. All experiments were performed at least two times.

25 10.2. Results and Discussion

In order to examine the surface expression of HER2 and HER3 receptors in MDA-MB-435S and Mel-Juso, we additionally determined their expression level by FACS analysis (Fig. 8A, B). We observed HER2 and HER3
30 expression in these cell lines and went on to dissect the molecular mechanism by which HER3 antibodies act on Heregulin (HRG) mediated signal transduction. Therefore, we performed GST-pull-down assays in the

- 16 -

human breast carcinoma cell line MDA-MB-435S and melanoma cell line Mel-Juso (Fig. 8). Quiescent cells were pretreated with HER3 antibodies 1B4C3, 2D1D12, the control anti-HER2 antibody and with PI(3)K inhibitor LY294002 and were subsequently stimulated with β -HRG. After cell lysis, protein levels were normalized and since HER3 has six potential p85 binding sites a GST-pull-down assay with GST-p85 (a.a. 333-430) as bait was performed. Western blot against phosphotyrosine (PY), reveals that anti-HER2 and 1B4C3 equally decrease p85 association with transactivated HER3, while LY294002 (negative control) has no inhibitory effect on p85 binding in MDA-MB-435S (Fig. 8C). However, 2D1D12 almost completely abrogates binding of p85 with HER3 in MDA-MB-435S (Fig. 8C).

In the human melanoma cell line Mel-Juso 1B4C3 and 2D1D12 equally decrease p85 association with HER3, while anti-HER2 exhibits a more pronounced decrease in receptor association of p85 (Fig. 8D). Again, LY294002 showed no inhibitory effect on p85 binding (Fig. 8D). Moreover, we observed some prominent tyrosine phosphorylated bands in the phosphotyrosine blot at 125kDa and 66kDa in MDA-MD-435S and only a major band at 125kDa in Mel-Juso. It is known that PI(3)K associates physically with focal adhesion kinase (FAK) and therefore we reprobated the blot with FAK antibodies (Fig. 8C, D lower panels). Our data show that in both cell lines only 2D1D12 and the PI(3)K inhibitor LY294002 abolished FAK association with p85. Reprobing the blot with HER2 and HER3 antibodies confirmed the diminished amount of captured HER3 and its reduced heterodimerization with HER2 (Fig. 8C, D middle panels). Taken together, our data indicate that although HER3 and HER2 antibodies decrease receptor tyrosine phosphorylation levels, they are capable of modulating different responses at the secondary level of receptor-associated effector proteins.

30

Since GRB2 only binds directly to HER2 and indirectly over SHC for HER3, we performed additional GST-pull-down experiment with GST-GRB2 as bait

- 17 -

under identical experimental conditions and human tumor cell lines as above (Fig. 9A, B). We observed that 1B4C3 and 2D1D12 diminished receptor tyrosine phosphorylation between 160 and 185kDa, whereas LY294002 had no inhibitory effect (Fig. 9A, B upper panel). However, pretreatment of the cells with anti-HER2 antibodies lead to increased tyrosine phosphorylation of the receptors, which could be further potentiated with β -HRG. Reprobing with HER2, HER3 and SHC antibodies show that 1B4C3 and 2D1D12 substantially inhibit GRB2 binding with HER2 and its indirect association with HER3 (Fig. 9A, B middle panels), as well as its association with SHC in both cell lines (Fig. 9A, B lower panels). On the other hand, anti-HER2 antibodies increased GRB2 binding to HER2 and SHC.

To gain more insight into antibody-mediated downstream signaling, we also analysed whole cell lysates (WCL) of the experiments described above (Fig. 10). When we looked at the phosphoprotein content of total cellular protein we observed that in both cell lines anti-HER2 constitutively activated the receptors, whereas 1B4C3 and 2D1D12 inhibited tyrosine phosphorylation of the receptors (Fig. 10A upper panel). Again LY294002 had no effect.

It is well established that HRG activates the mitogen-activated protein kinases (MAPK) pathway, leading to cell proliferation, cell survival and enhanced transcription of various genes. To examine the effect of HER2 and HER3 antibodies on HRG-induced MAPK activation, immunoblots of MDA-MB435S and Mel-Juso whole cell extracts were probed with phospho-ERK (T202/Y204) antibodies (Fig. 10). Phosphorylation of the MAPK ERK1/2 (p44/p42) showed, that despite activating the receptor, anti-HER2 slightly decreased ERK1 phosphorylation, whereas 1B4C3 and 2D1D12 had no inhibitory effect on ERK1 phosphorylation (Fig. 10A middle panel). Further reprobing the blot confirmed equal amounts of loaded protein (Fig. 10A lower panel).

- 18 -

Furthermore, we investigated the activation status of AKT, which is a downstream target of PI(3)K and has an important role in cell survival. We observed that anti-HER2, 1B4C3 and 2D1D12 markedly inhibited AKT phosphorylation in Mel-Juso melanoma cells (Fig. 10B upper panel). In
5 MDA-MB-435S breast cancer cells both HER2 and HER3 antibodies significantly decreased AKT phosphorylation (Fig. 10C). LY294002 served as the positive control. This observation is of major importance, since breast cancer patients with markedly increased expression of activated AKT are more prone to relapse with distant metastasis resulting in poor
10 clinical outcome (Perez-Tenorio G et al. British Journal of Cancer, 86, 540-545 (2002)).

**Monoclonal antibodies 1B4C3 and 2D1D12 inhibit proliferation and migration of breast cancer cell lines MDA-MB-435S and melanoma cell line
15 Mel-Juso**

To evaluate the inhibitory function of 1B4C3 and 2D1D12 on cell cycle progression and tumor invasion, we performed BrdU-Incorporation and invasion assays (Fig. 11).

20 We saw a robust decrease in β -HRG stimulated BrdU-incorporation in MDA-MB-435S and Mel-Juso cells pretreated with 2D1D12 (Fig. 11A). Invasion assays revealed that anti-HER3 antibodies 2D1D12 and 1B4C3 substantially decreased invasiveness of MDA-MB-435S breast cancer and
25 Mel-Juso melanoma cells. Surprisingly HER2 antibody 4D5 only showed an inhibition in MDA-MB-435S but not in the melanoma cell line Mel-Juso although the receptor is expressed at the cell surface (Fig. 11B, C and Fig. 8A, B). Our results suggest the use of anti-HER3 antibodies for the treatment of breast cancer and melanoma.

30

- 19 -

Monoclonal antibody 2D1d12 inhibits Heregulin-stimulated phosphorylation of PYK2

We previously demonstrated that the intracellular tyrosine kinase PYK2
5 associates with and is phosphorylated by HER3, suggesting that PYK2
functions as a mediator of HER3 activities. Consistent with this,
dominant-negative PYK2 inhibited HRG-mediated invasion of glioma cells.
Therefore, we wanted to explore the effect of anti-HER3 antibodies on
HRG-induced PYK2 tyrosine phosphorylation. We pretreated quiescent
10 SF767 human glioma cells with anti-HER2, 1B4C3 and 2D1D12 and
subsequently stimulated the cells with α -HRG. After lysis and normalising
for equal protein amounts, we immunoprecipitated PYK2 and blotted
against phosphotyrosine (PY). We observed that whereas anti-HER2 and
1B4C3 had no inhibitory effect on tyrosine phosphorylation of PYK2,
15 2D1D12 markedly decreased PYK2 tyrosine phosphorylation (Fig. 12A).
Thus, anti-HER3 antibodies are effective in inhibiting HRG-induced tyrosine
phosphorylation of PYK2.

By probing immunoblots of WCL with phospho-ERK antibodies we
20 observed that pretreating the cells with anti-HER2, 1B4C3 and 2D1D12
inhibited α -HRG activated ERK2 phosphorylation (Fig. 12B middle panel).
Reprobing with ERK antibodies confirmed equal amount of loaded protein
(Fig. 12B lower panel). Again, our data show that HER3 antibodies
downregulate HRG-mediated signaling events in MDA-MB-435S, Mel-Juso
25 and SF767. Furthermore, our analysis suggests that antibodies directed
against ectodomains of HER2 and HER3 modulate differential signaling,
leading to distinct responses of downstream effector proteins.

- 20 -

Claims

1. A pharmaceutical composition comprising as an active agent an
5 inhibitor of HER3 activity and pharmaceutically acceptable carriers,
diluent and/or adjuvants, wherein binding of said inhibitor to HER3
reduces HER3 mediated signal transduction.
2. The composition of claim 1, wherein said reduction of signal
10 transduction is caused by a down-regulation of HER3.
3. The composition of claim 1, wherein said reduction of signal
transduction is caused by a stabilization of HER3 in a substantially
inactive form.
15
4. The composition of any one of claims 1-3, wherein the inhibitor
does not compete with the binding of Heregulin to HER3.
5. The composition of any one of claims 1-4, wherein said inhibitor is
20 an anti-HER3-antibody.
6. The composition of claim 5, wherein said antibody is a monoclonal
antibody or a fragment thereof.
- 25 7. The composition of claim 5, wherein said antibody is a recombinant
antibody or antibody fragment.
8. The composition of claim 7, wherein said recombinant antibody or
antibody fragment is selected from chimerized antibodies, humanized
30 antibodies, single chain antibodies and fragments thereof.

- 21 -

9. The composition of claims 5-8, wherein said antibody is coupled to a labelling group or an effector group.
- 5 10. The composition of claims 5-9, wherein the antibody is selected from antibodies 1B4C3 and 2D1D12 produced by hybridoma cell lines DSM ACC 2527 or DSM ACC 2517, fragments thereof or recombinant derivatives thereof.
- 10 11. The composition of any one of claims 1-10 comprising a further active agent.
12. The composition of any one of claims 1-11 for diagnostic applications.
- 15 13. The composition of any one of claims 1-11 for therapeutic applications.
- 20 14. Use of an inhibitor of HER3 activity defined as in any one of claims 1-10 for the manufacture of an agent for the diagnosis, prevention or treatment of hyperproliferative diseases, particularly tumour diseases.
15. The use of claim 14 wherein said inhibitor is an anti-HER3 antibody.
- 25 16. The use of claim 15, wherein the antibody is selected from antibodies 1B4C3 and 2D1D12 produced by hybridoma cell lines DSM ACC 2527 or DSM ACC 2517, fragments thereof or recombinant derivatives thereof.

- 22 -

17. The use of any one of claims 14-16 for the diagnosis, prevention or treatment of breast cancer, gastrointestinal cancer, pancreas cancer, prostate cancer, glioma, melanoma or formation of tumor metastases.
- 5
18. The use of any one of claims 14-17, wherein said disease is associated with increased HER3 phosphorylation.
19. The use of any one of claims 14-18, wherein said disease is associated with increased HER2/HER3 heterodimerization.
- 10
20. The use of any one of claims 14-19, wherein said disease is associated with an increased activity of PI_3 -kinase, c-jun-terminal kinase, AKT, ERK2 and/or PYK2.
- 15
21. A method for diagnosing, preventing or treating a hyperproliferative disease, particularly a tumour disease comprising administering a subject in need thereof an effective amount of an inhibitor of HER3 activity defined as in any one of claims 1-10.
- 20
22. The method of claim 21, wherein said inhibitor is an anti-HER3-antibody. -
23. The method of claim 22, wherein the antibody is selected from antibodies 1B4C3 and 2D1D12 produced by hybridoma cell lines DSM ACC 2527 or DSM ACC 2517, fragments thereof or recombinant derivatives thereof.
- 25
24. The method of any one of claims 21-23, wherein said subject is a human.
- 30

- 23 -

25. A method for identifying a novel agent for diagnosing, preventing or treating a hyperproliferative disease, particularly a tumour disease comprising assaying if a candidate compound is capable of inhibiting HER3 activity, wherein binding of said inhibitor to HER3 reduces HER3 mediated signal transduction.
26. The method of claim 25, wherein an HER3 inhibitor or a compound derived therefrom is formulated as a pharmaceutical composition.
27. Hybridoma cell line DSM ACC 2517 and cell line derived therefrom.
28. Hybridoma cell line DSM ACC 2527 and cell line derived therefrom.
29. Antibody produced by a cell line of claim 27 or 28.

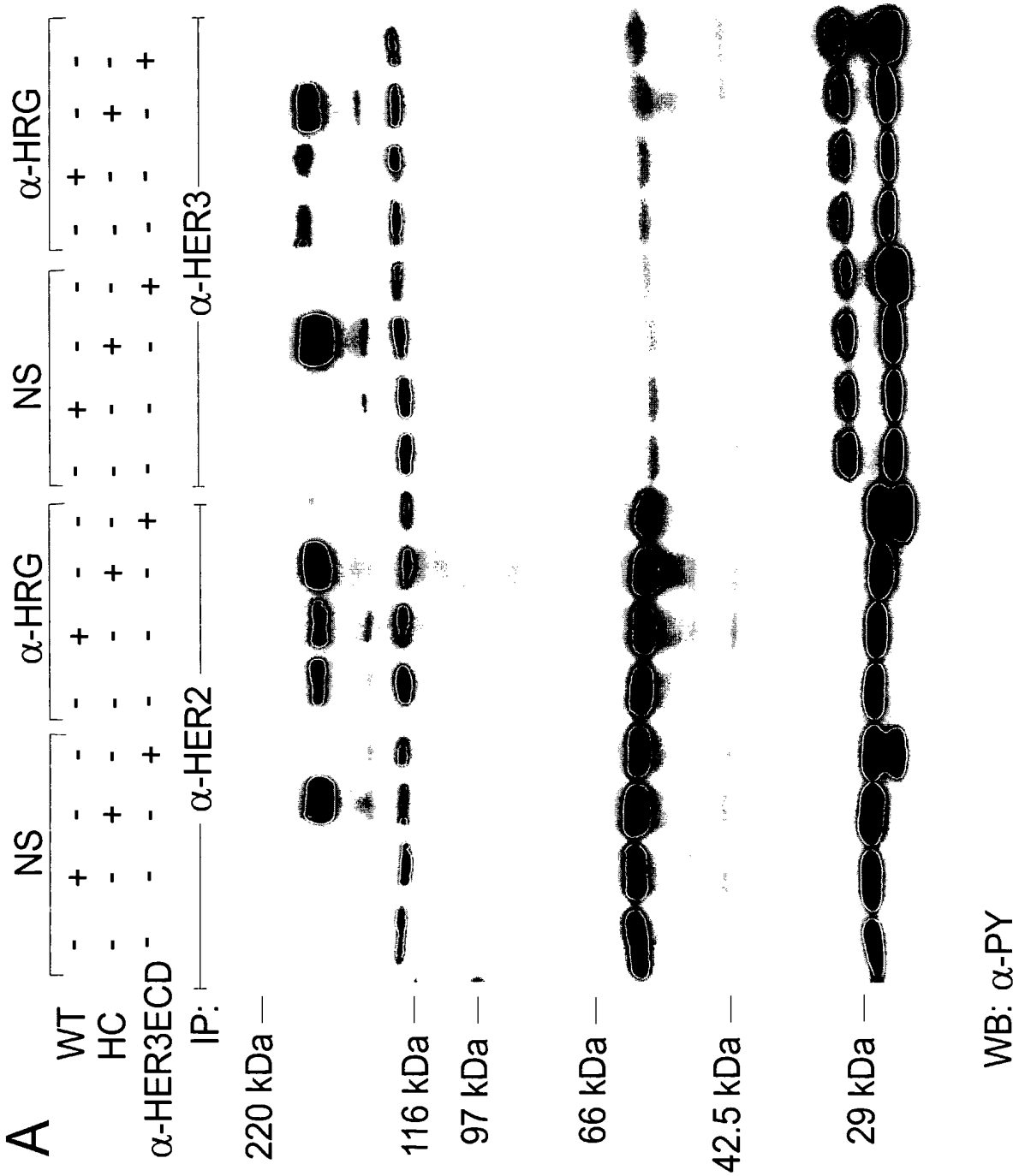


Figure 1
Htun van der Horst et al.

2/43

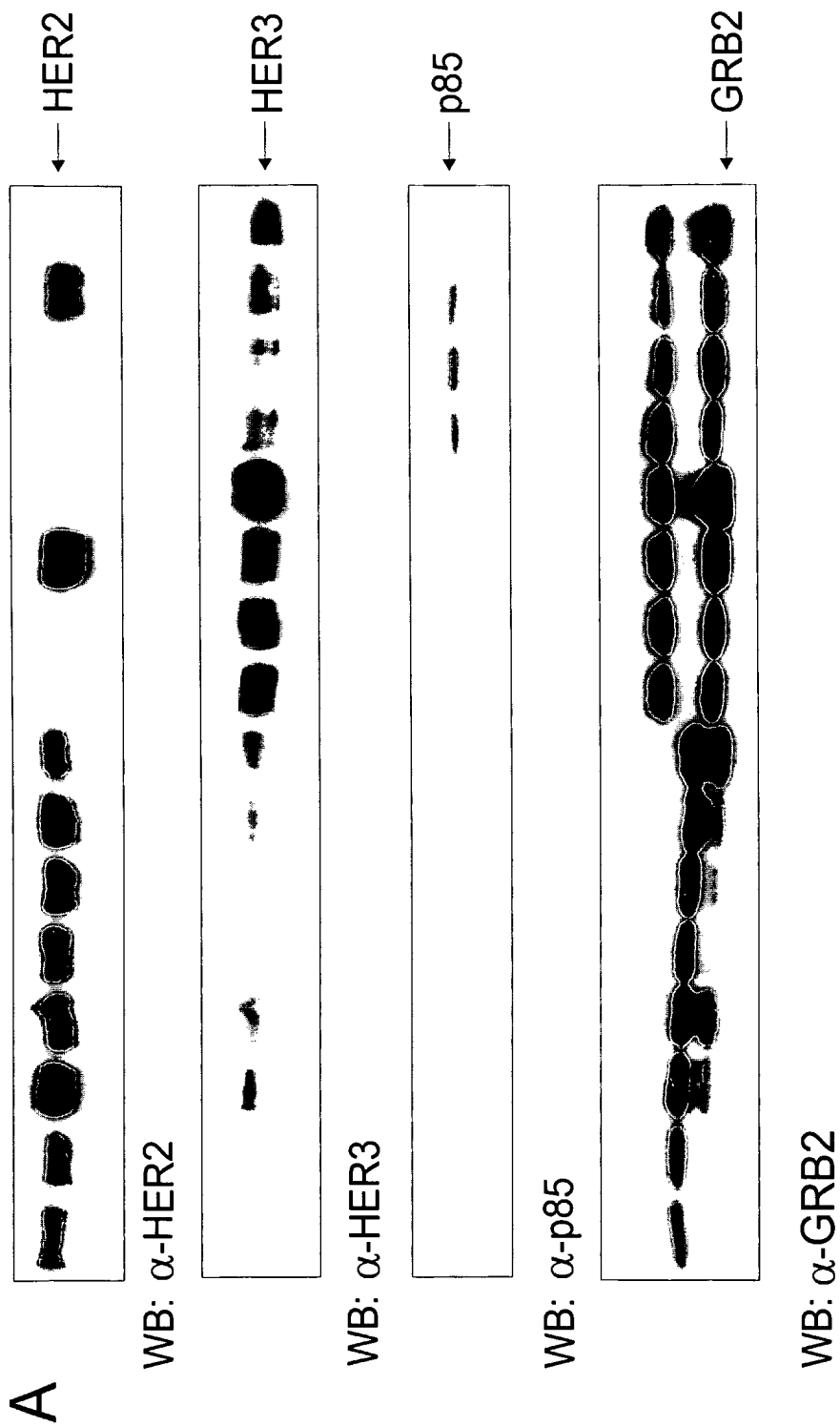


Figure 1
Htun-van der Horst et al.

3/43

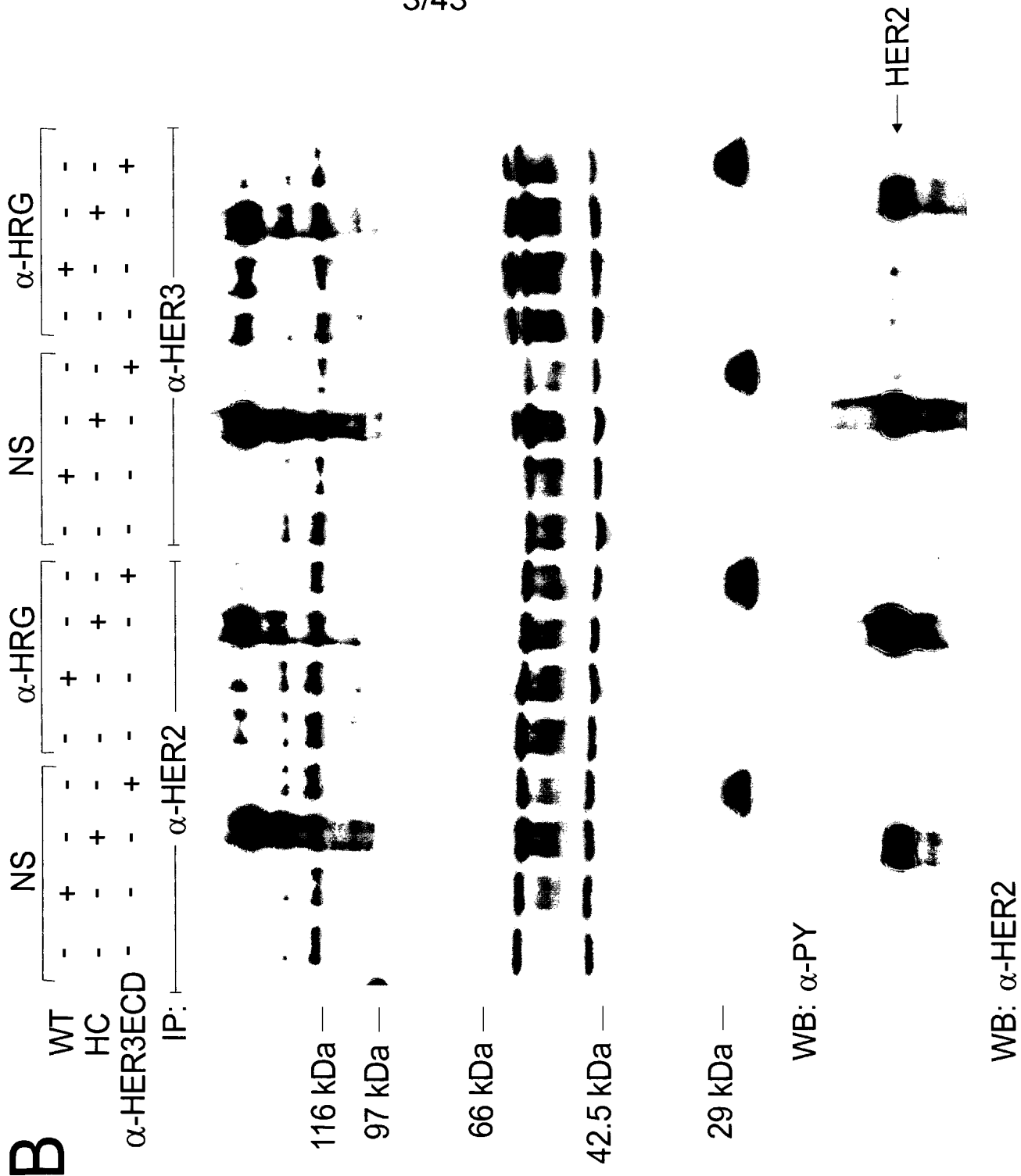


Figure1
Htun-van der Horst et al.

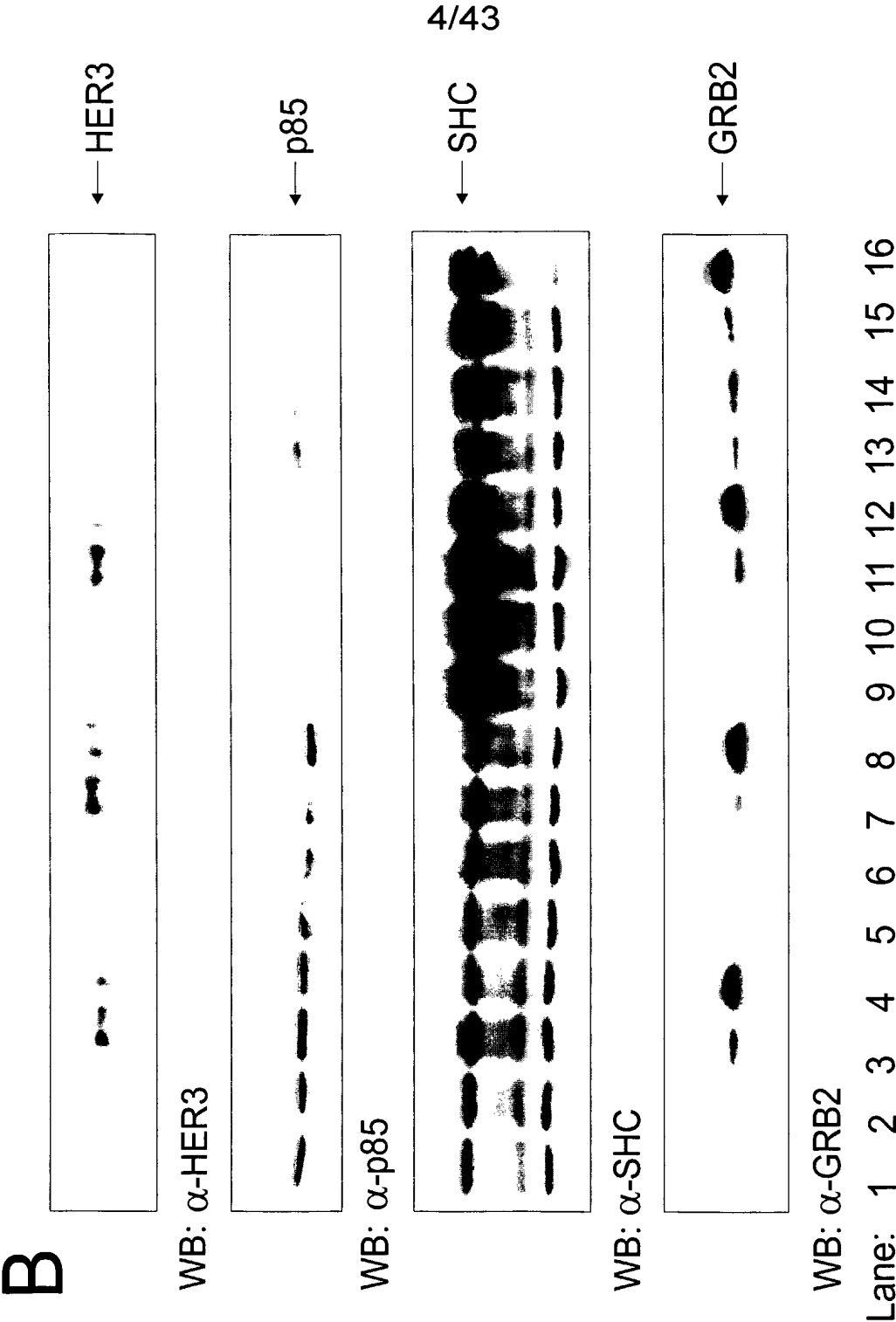


Figure1
Htun-van der Horst et al.

5/43

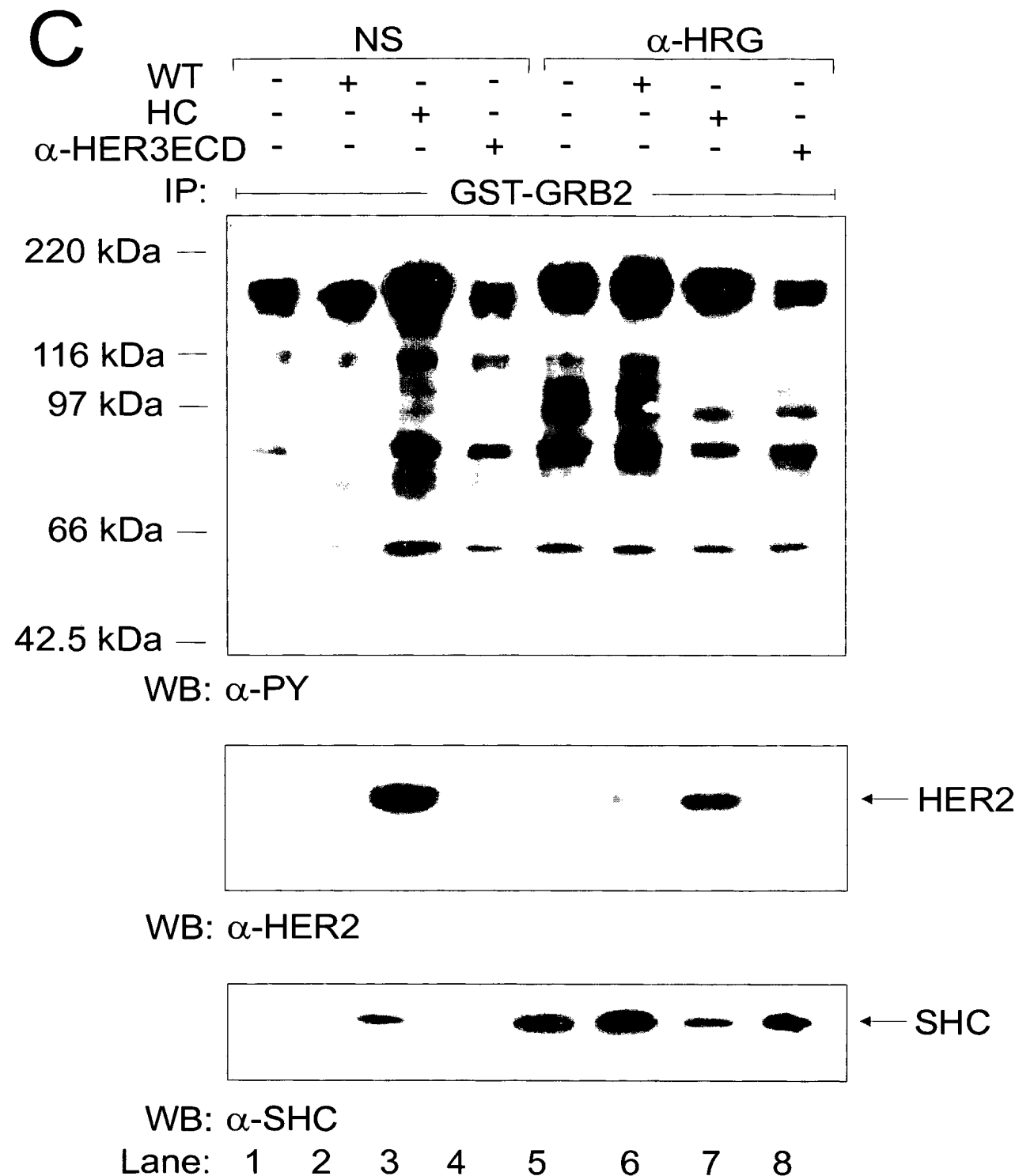


Figure 1
Htun-van der Horst et al.

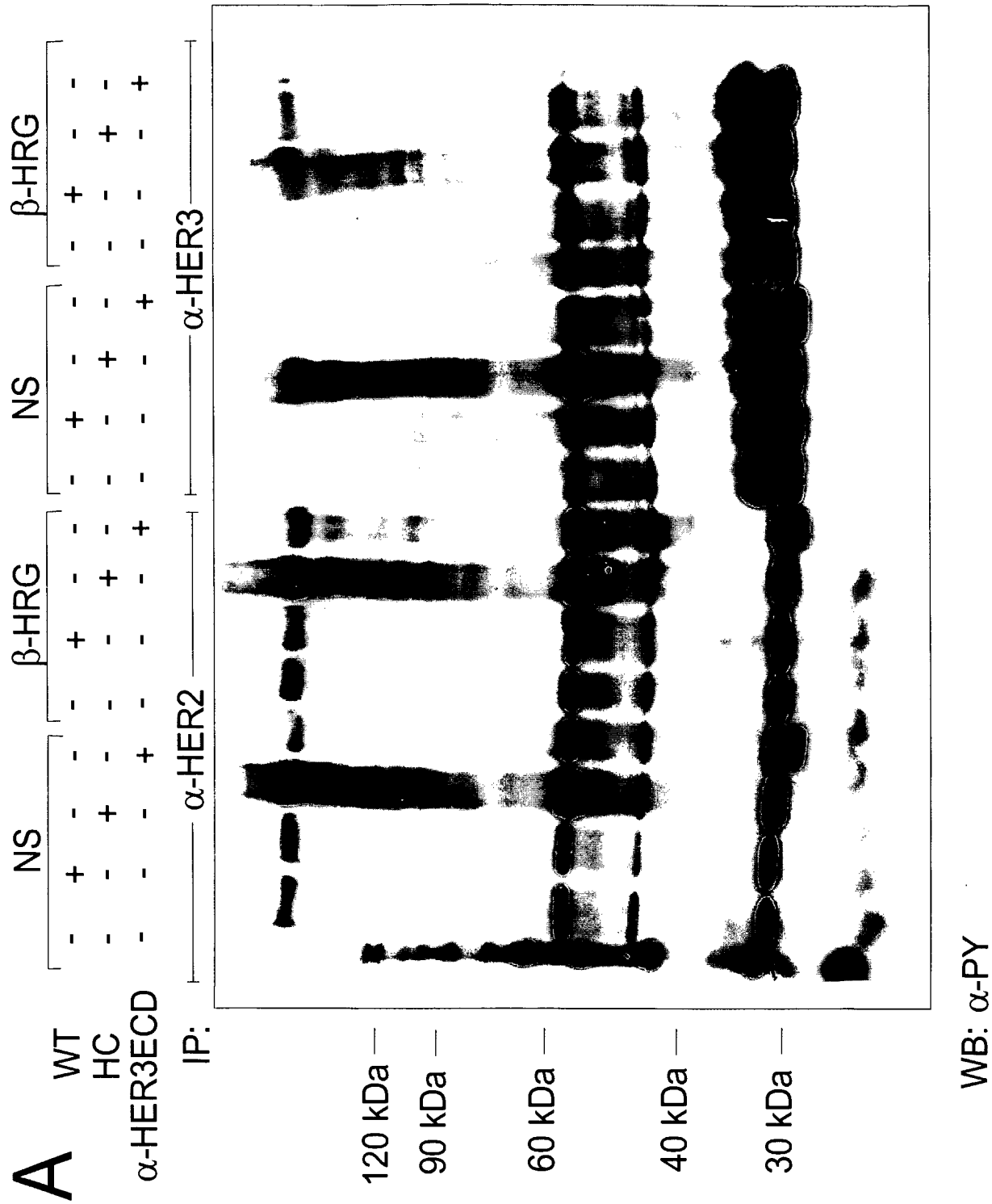
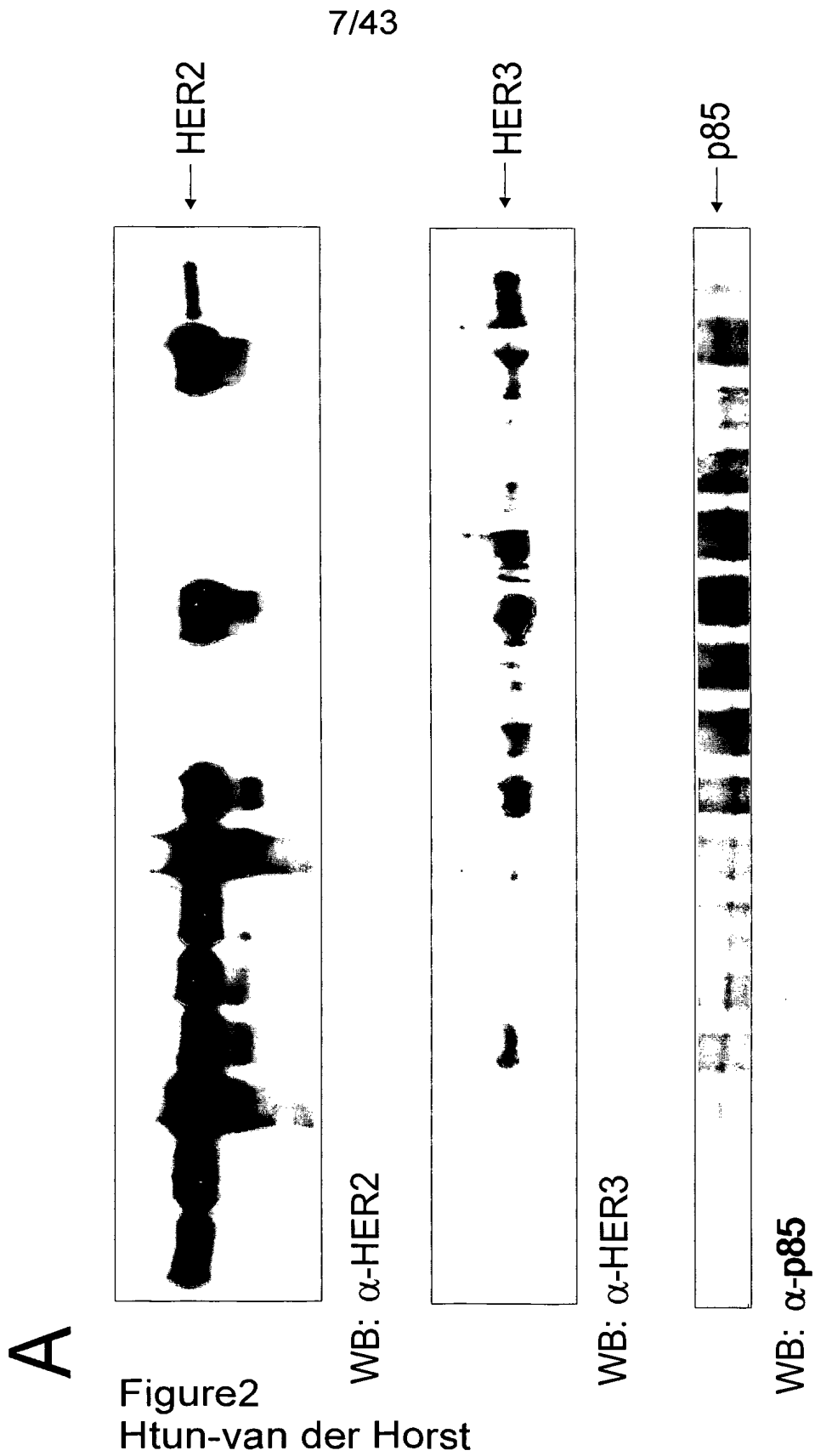


Figure2
Htun-van der Horst



A

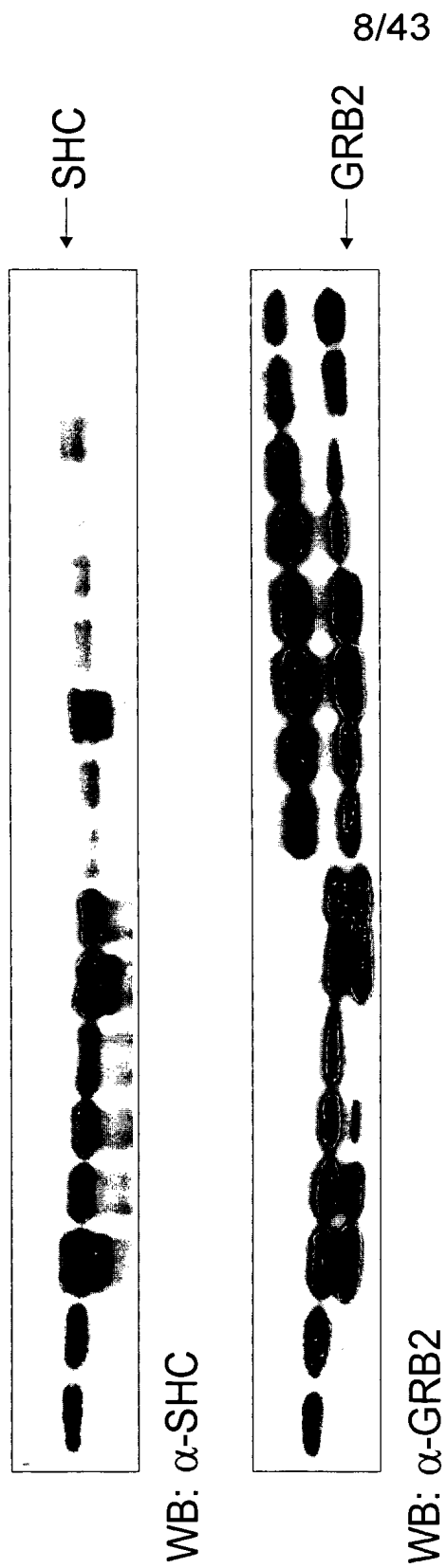


Figure2
Htun-van der Horst

9/43

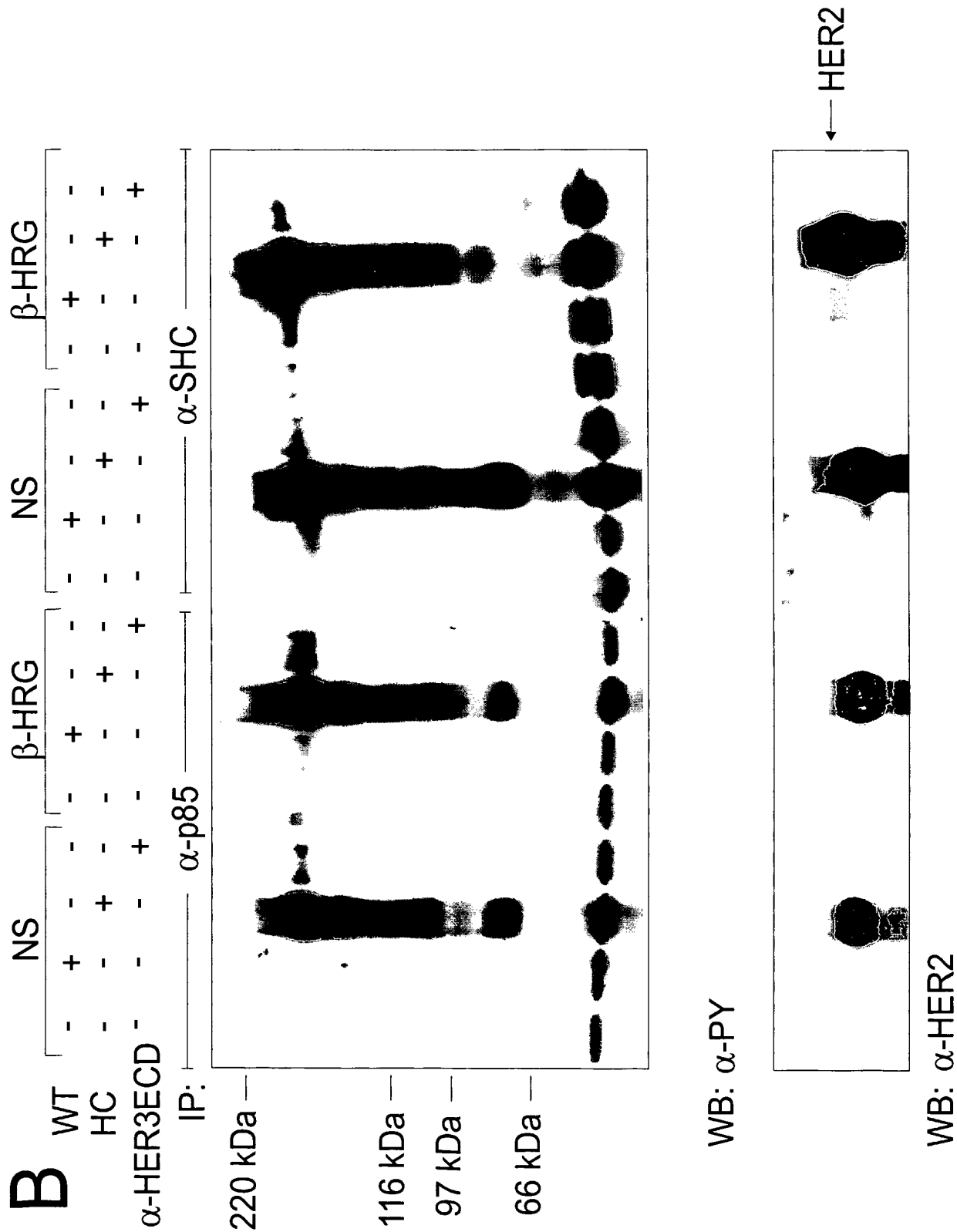


Figure 2
Htun-van der Horst et al.

B

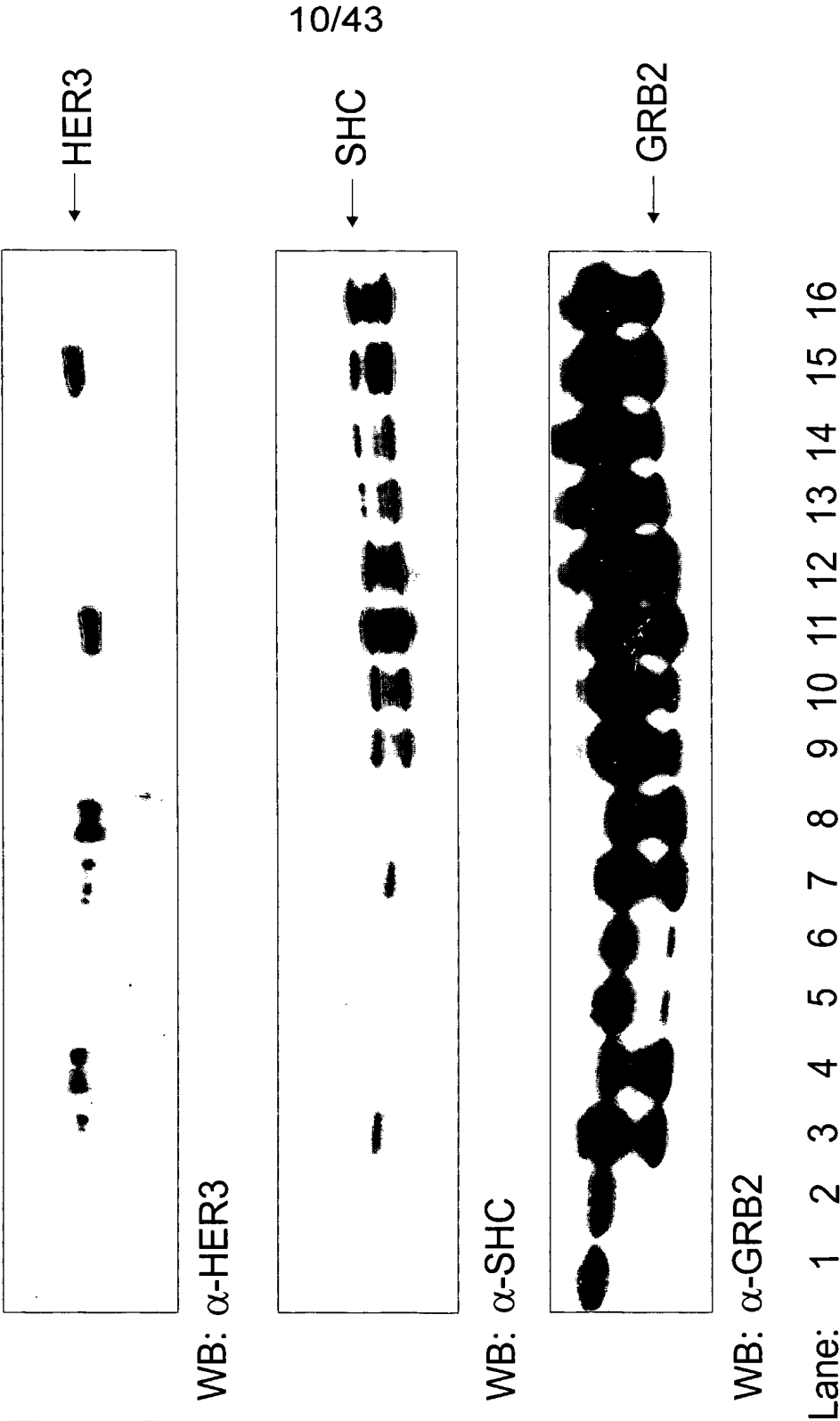


Figure 2
Htun-van der Horst et al.

11/43

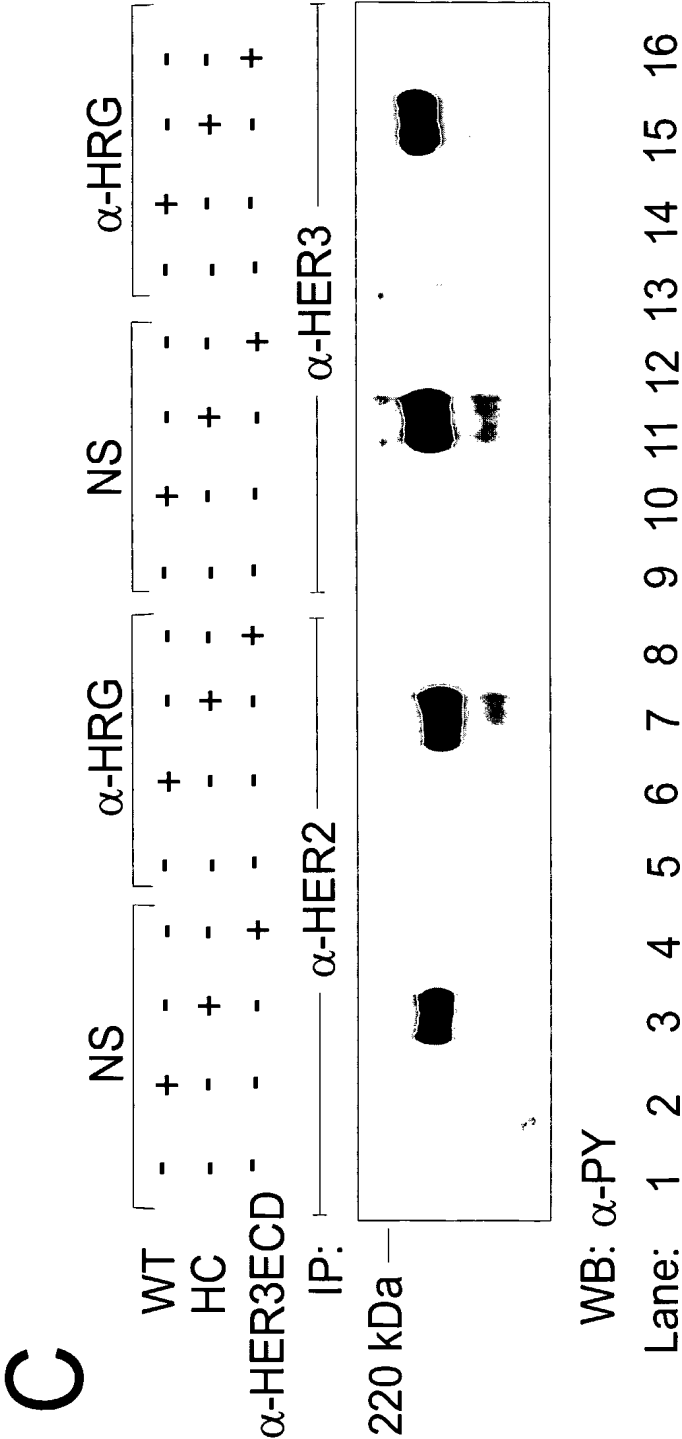


Figure 2
Htun-van der Horst et al.

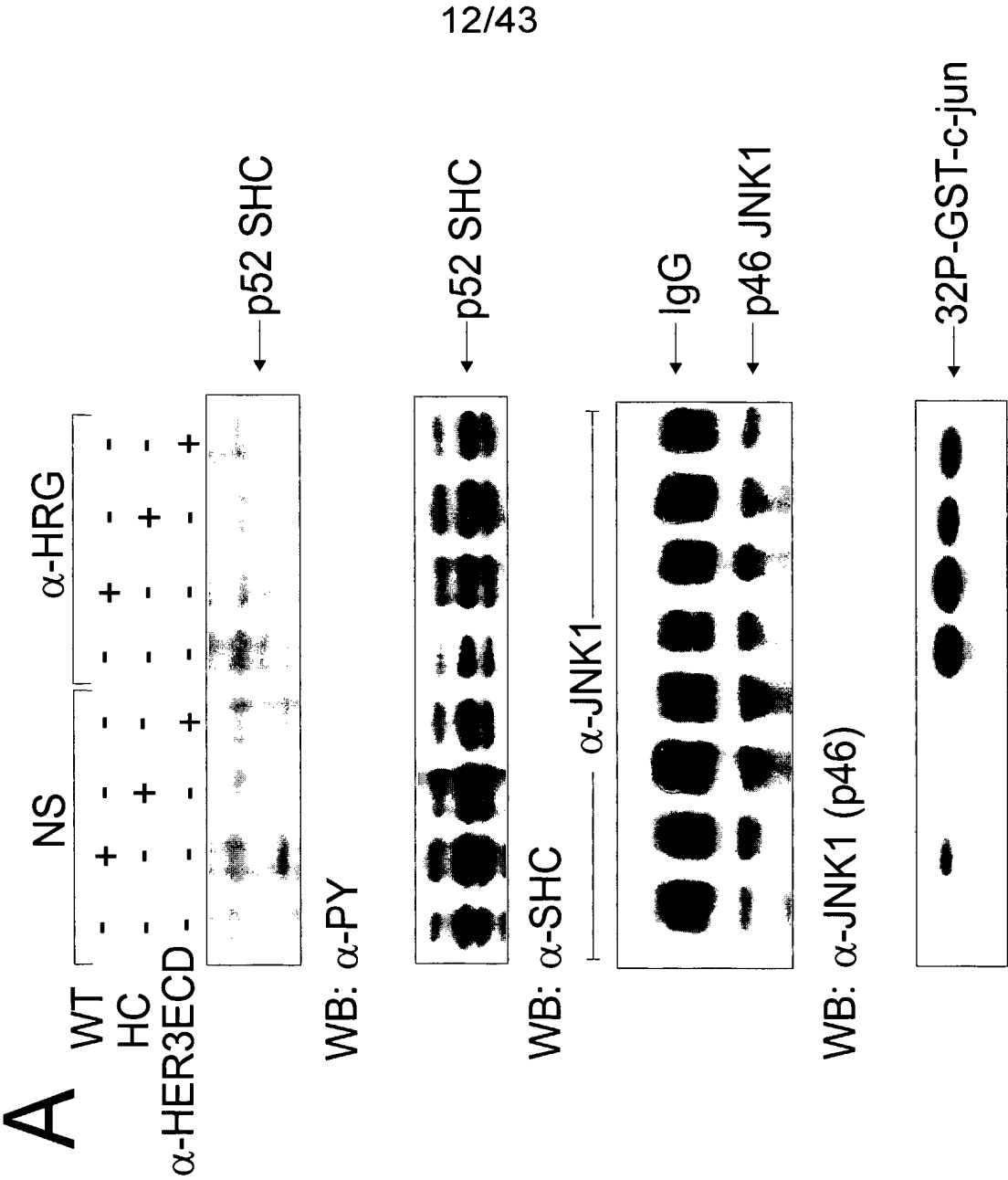


Figure 3
Htun-van der Horst et al.

13/43

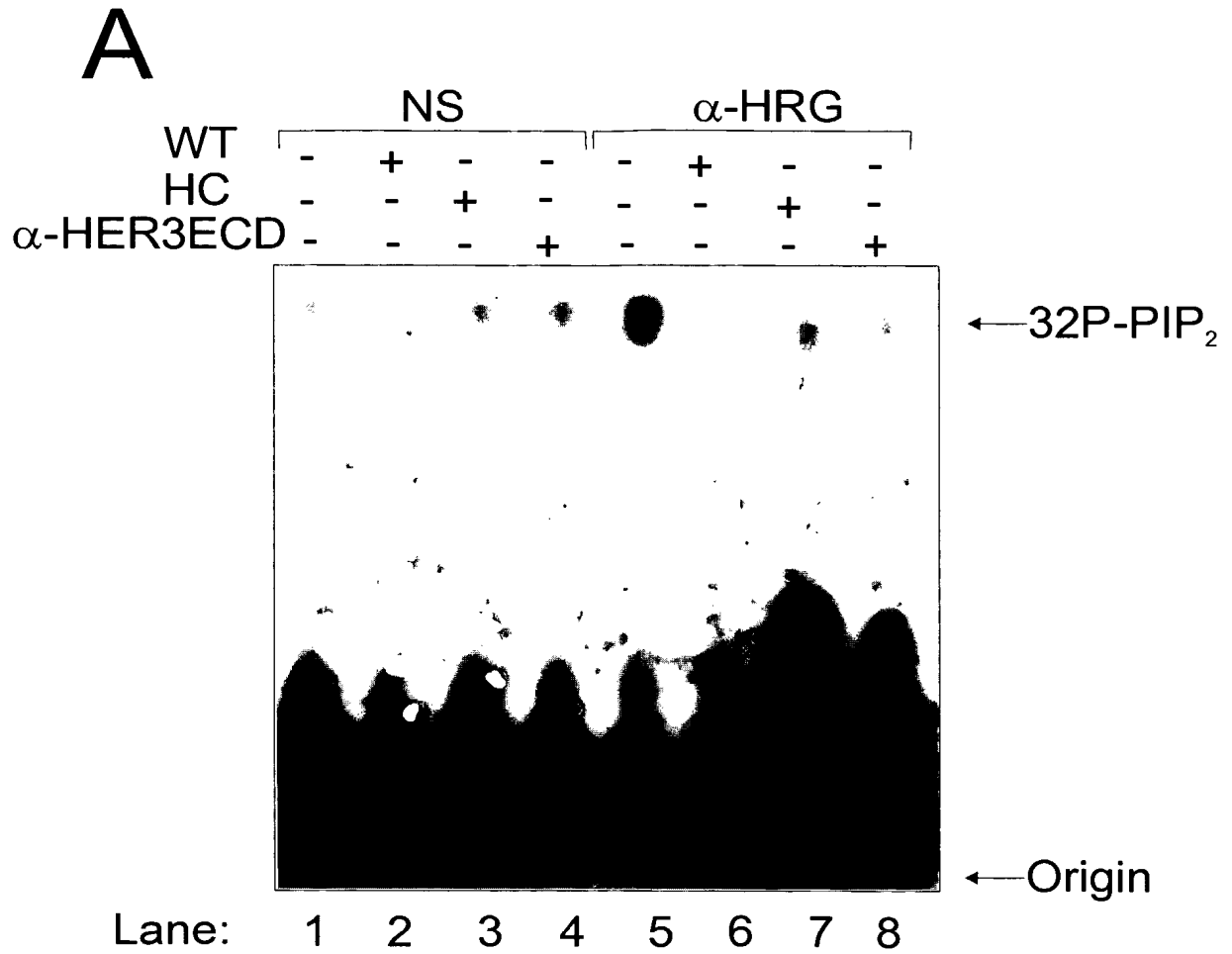


Figure 3
Htun-van der Horst et al.

14/43

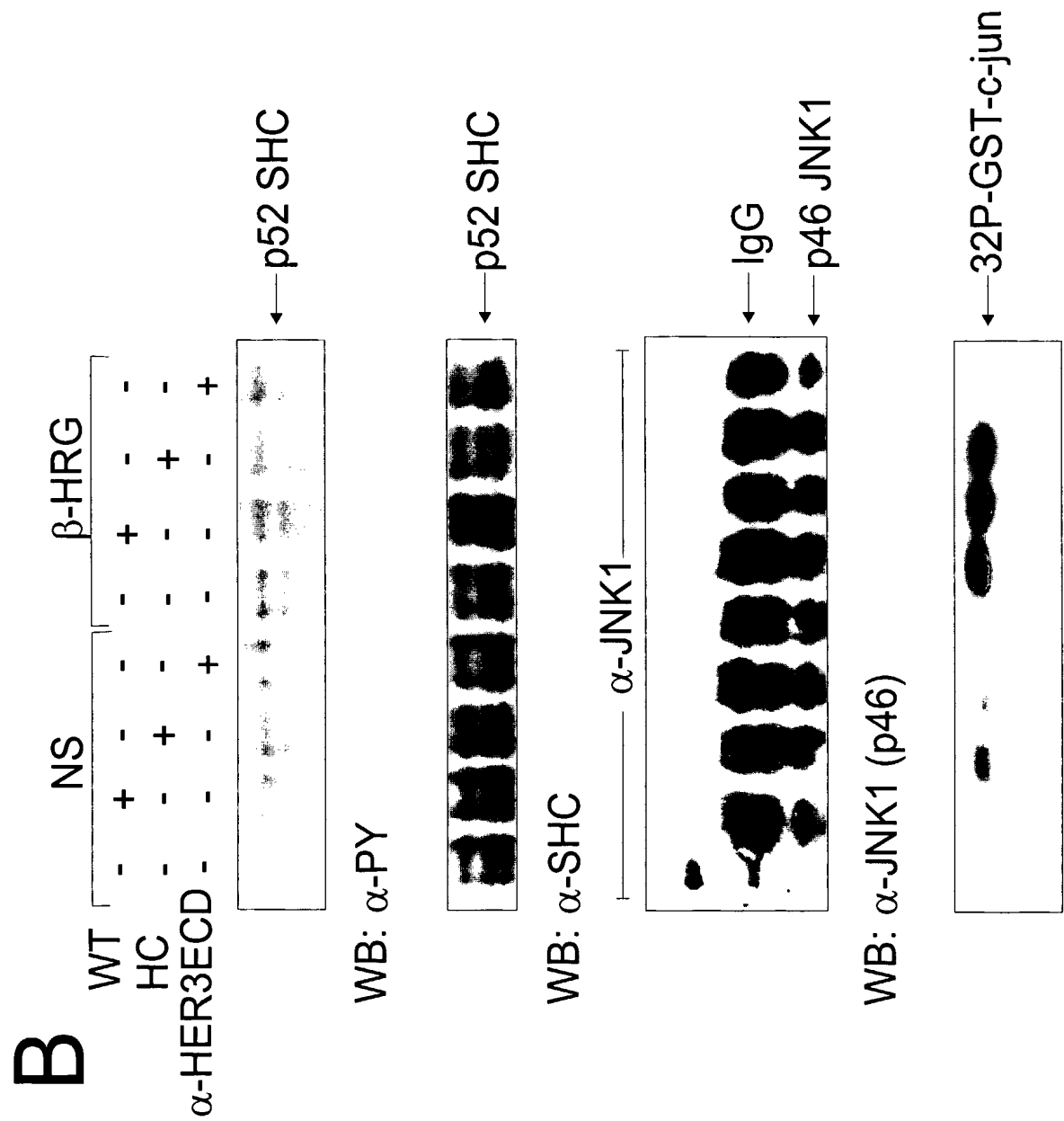


Figure 3
Htun-van der Horst et al.

15/43

B

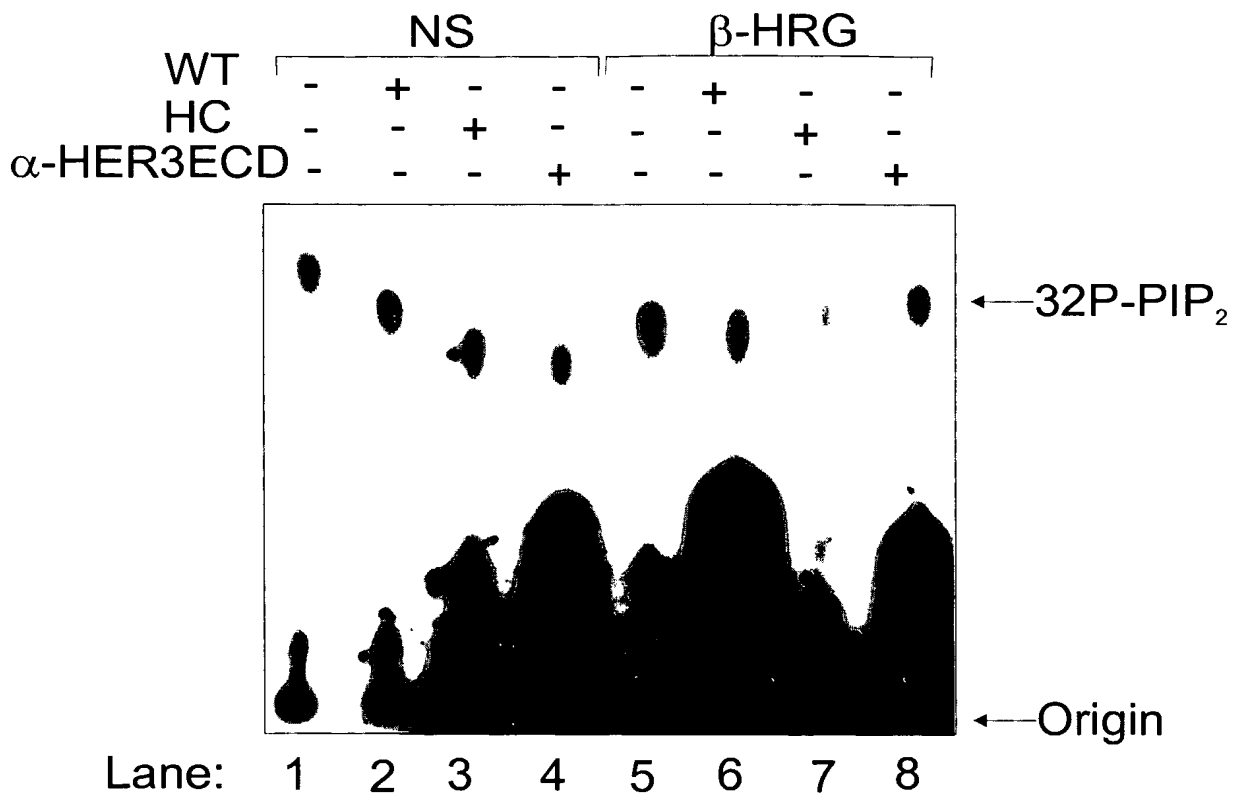


Figure 3
Htun-van der Horst et al.

16/43

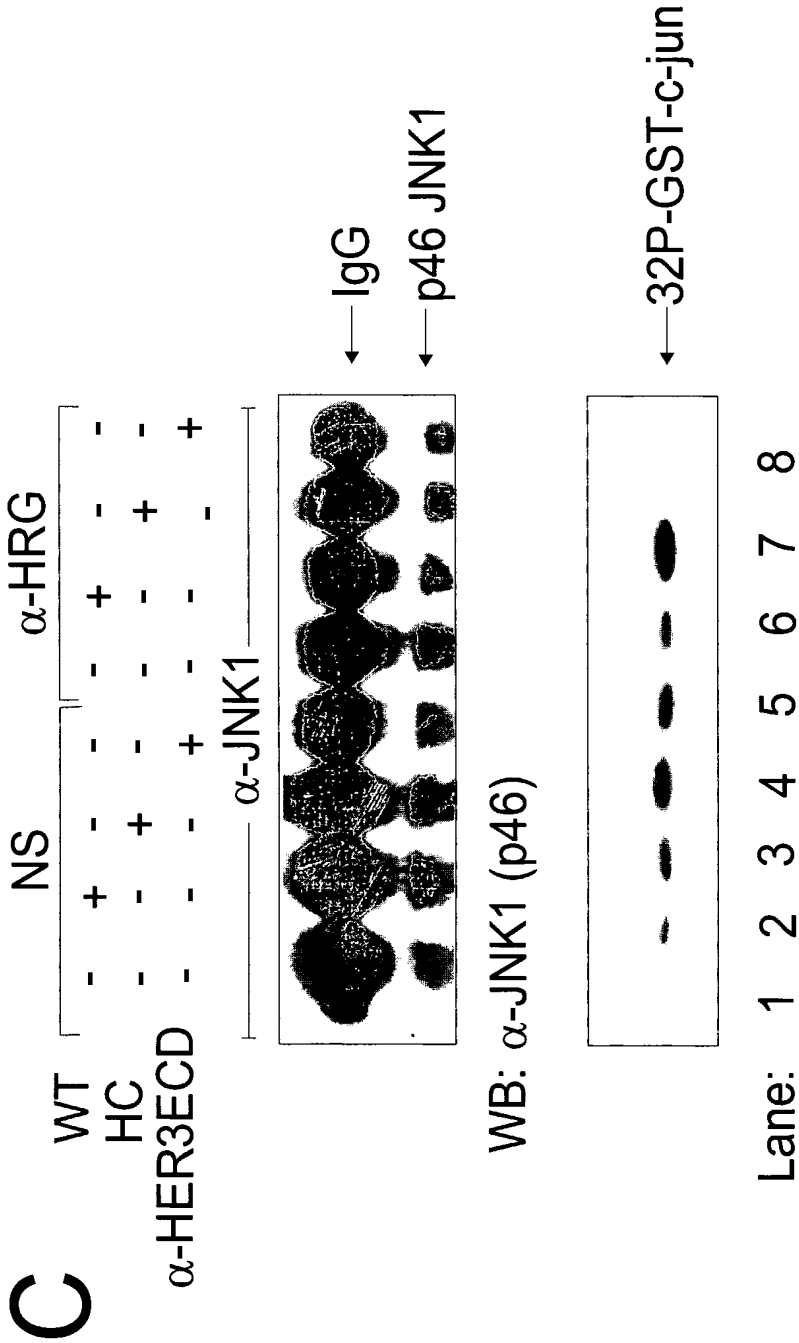


Figure 3
Htun-van der Horst et al.

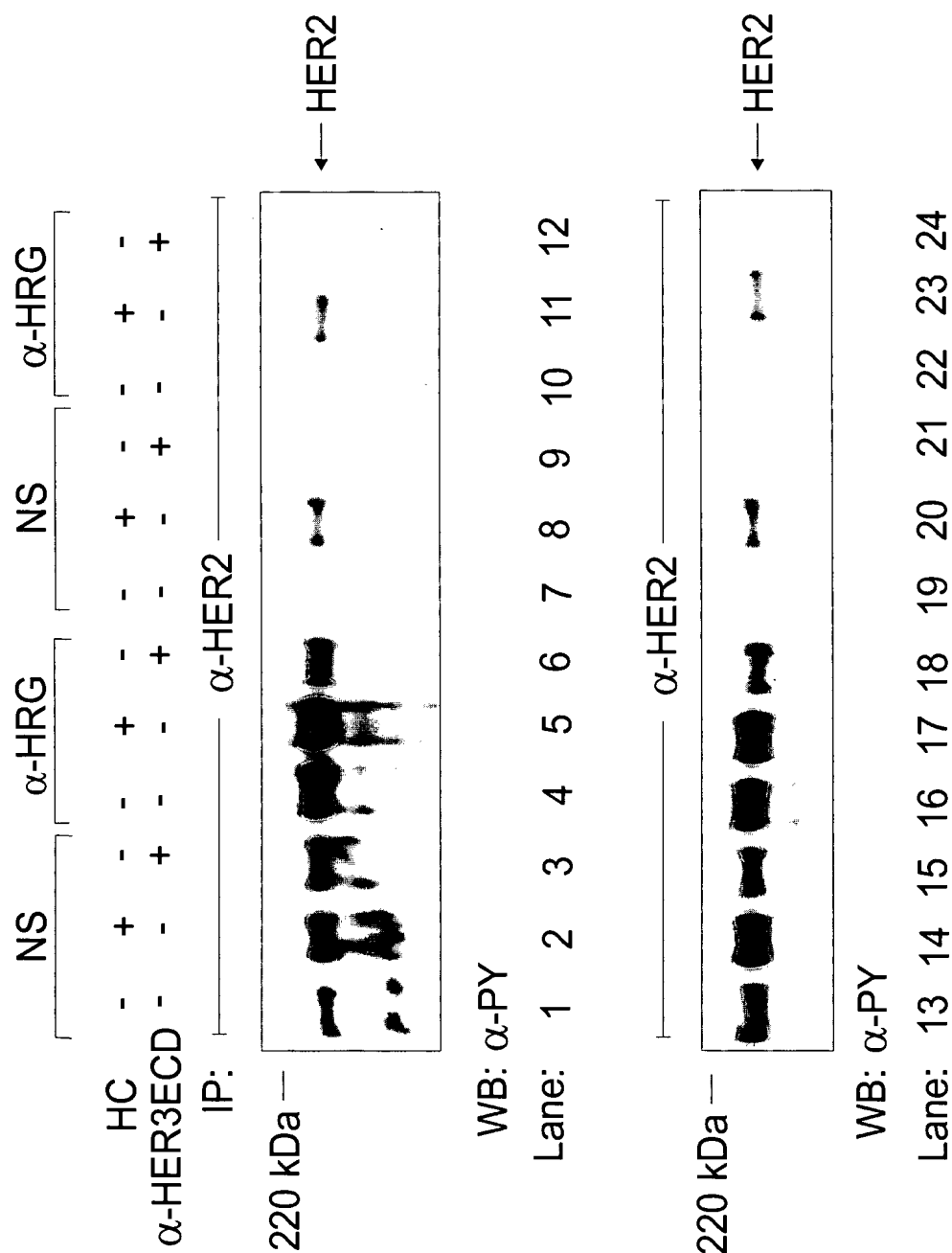


Figure 4
Htun-van der Horst et al.

Figure 4
Htun-van der Horst et al.

19/43

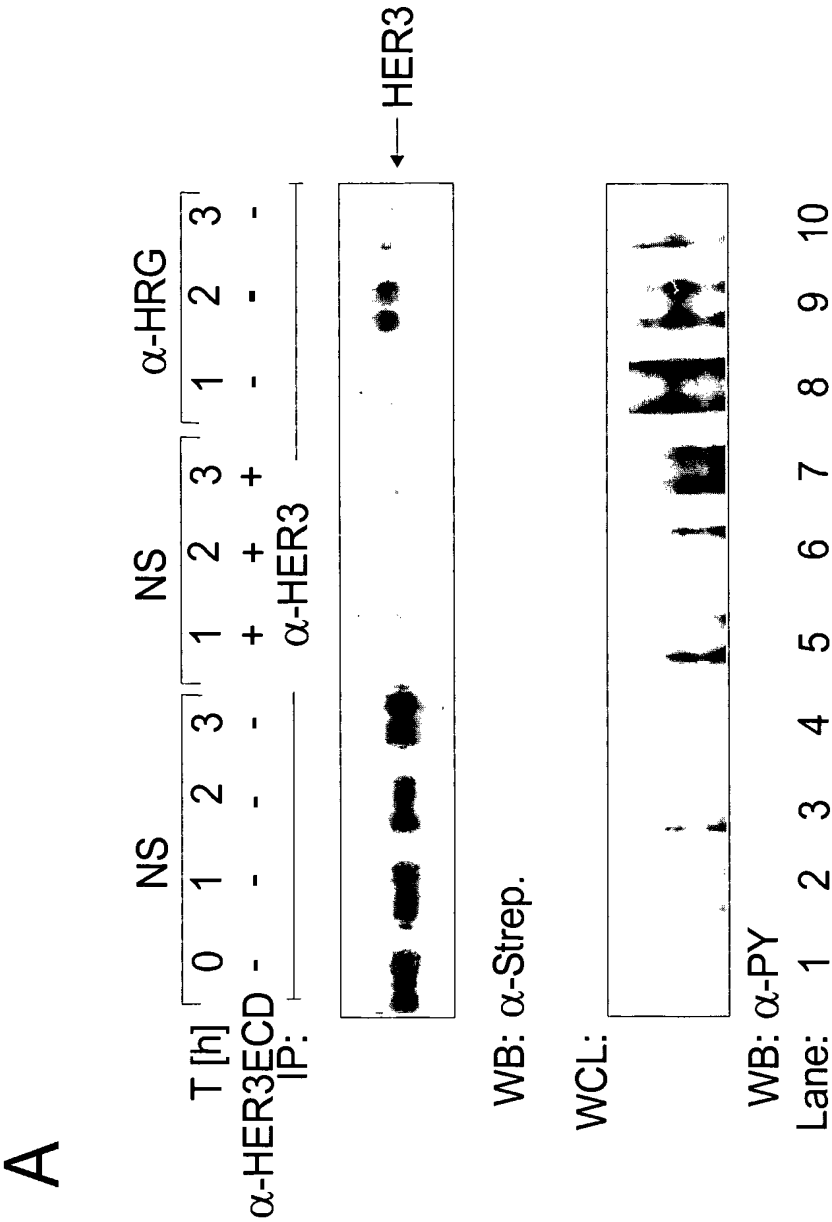


Figure 5
Htun-van der Horst et al.

20/43

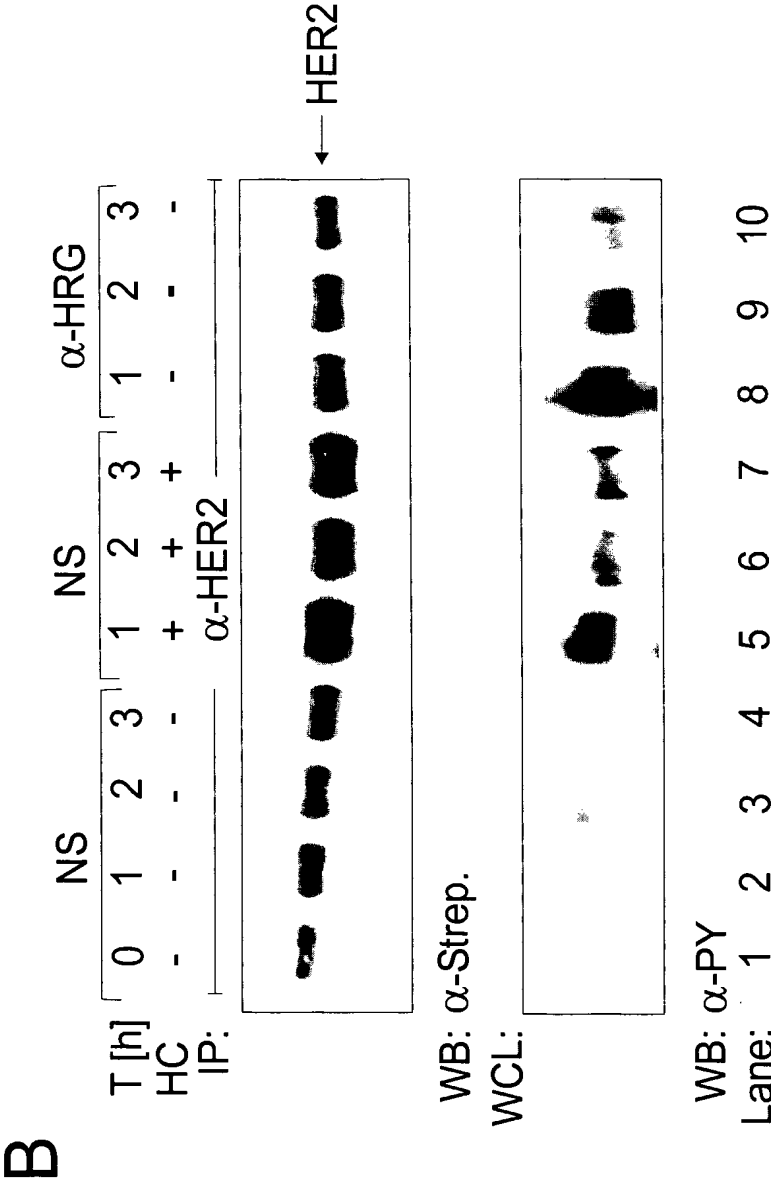
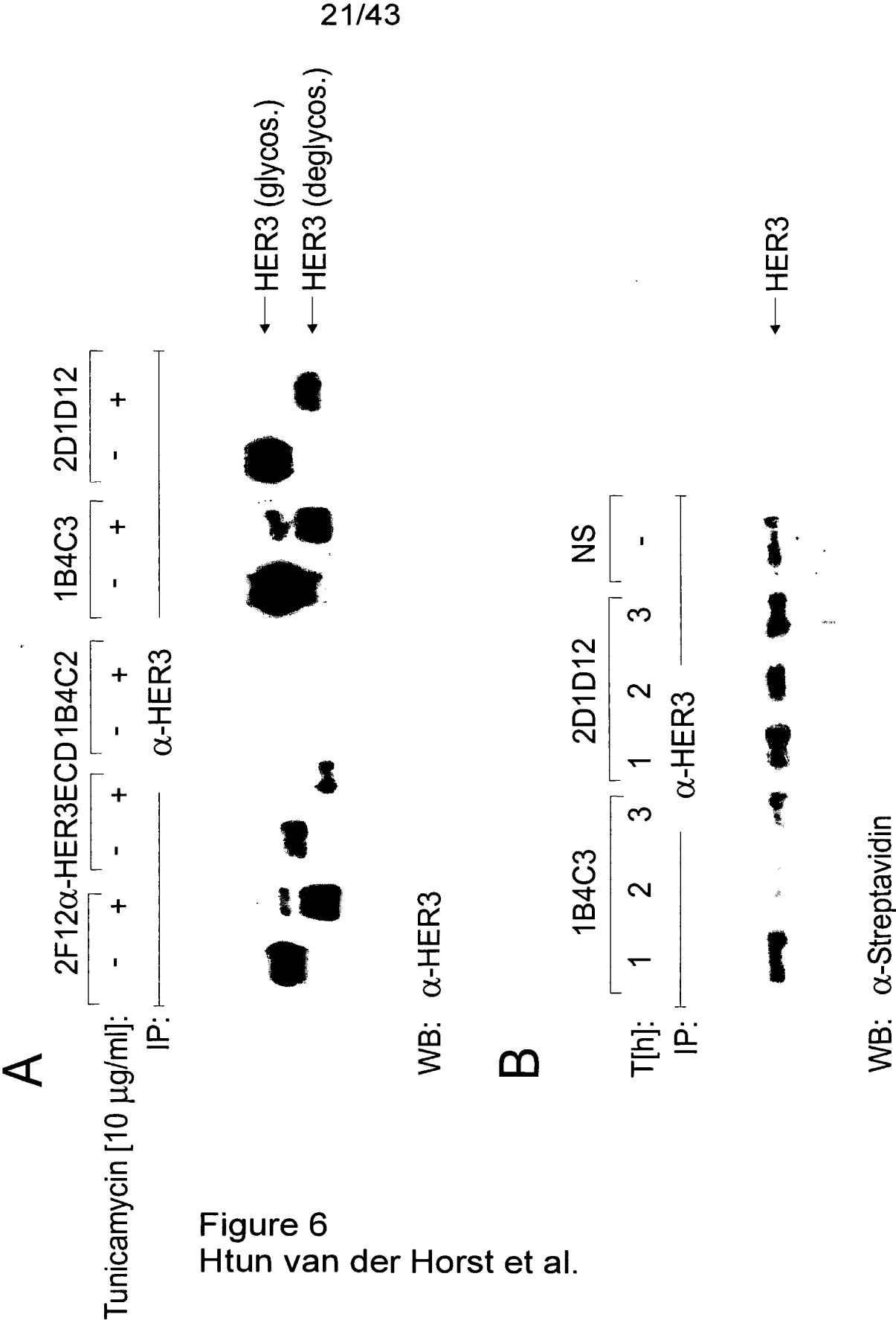


Figure 5
Htun-van der Horst et al.



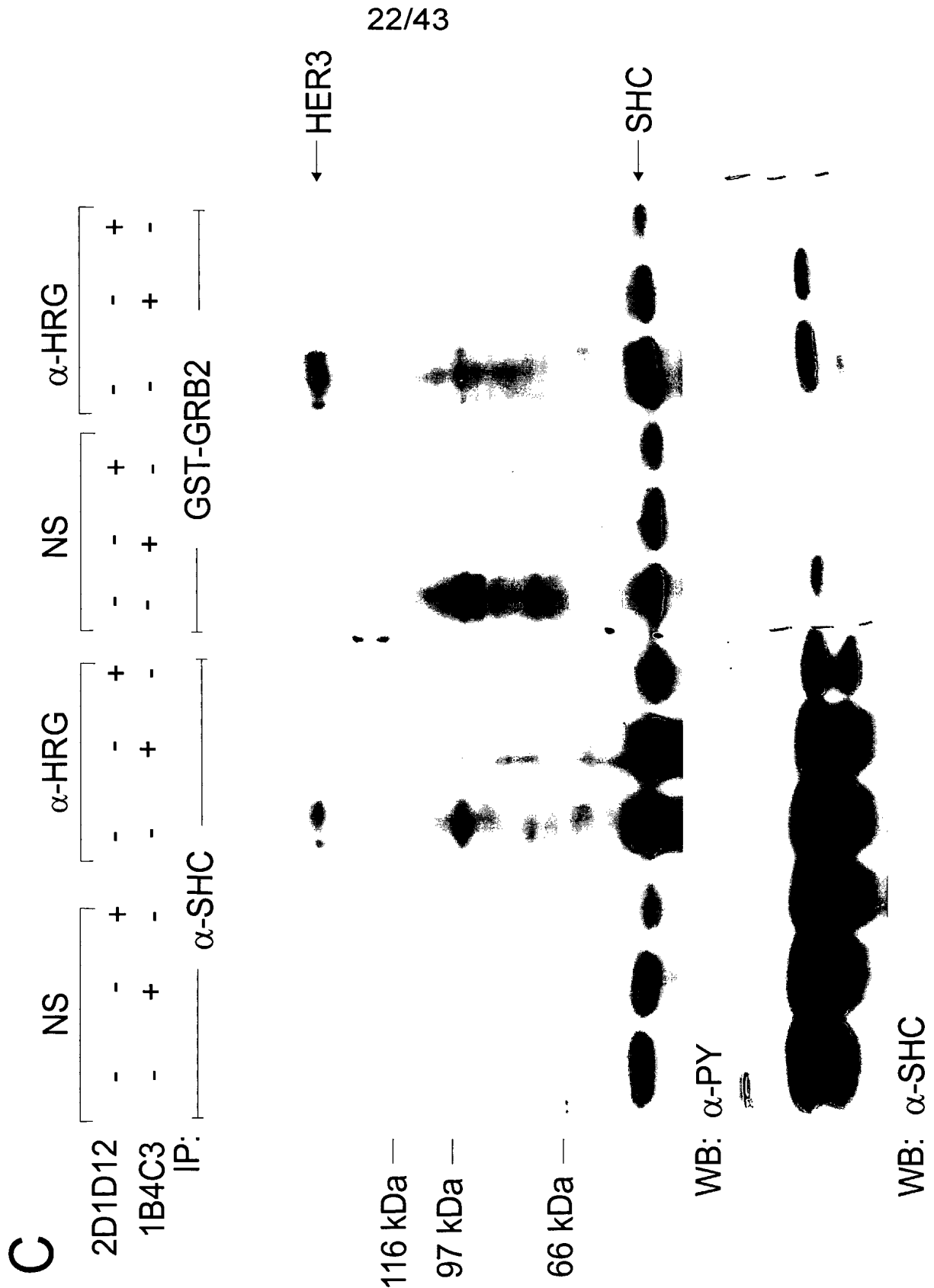


Figure 6
Htun van der Horst et al.

23/43

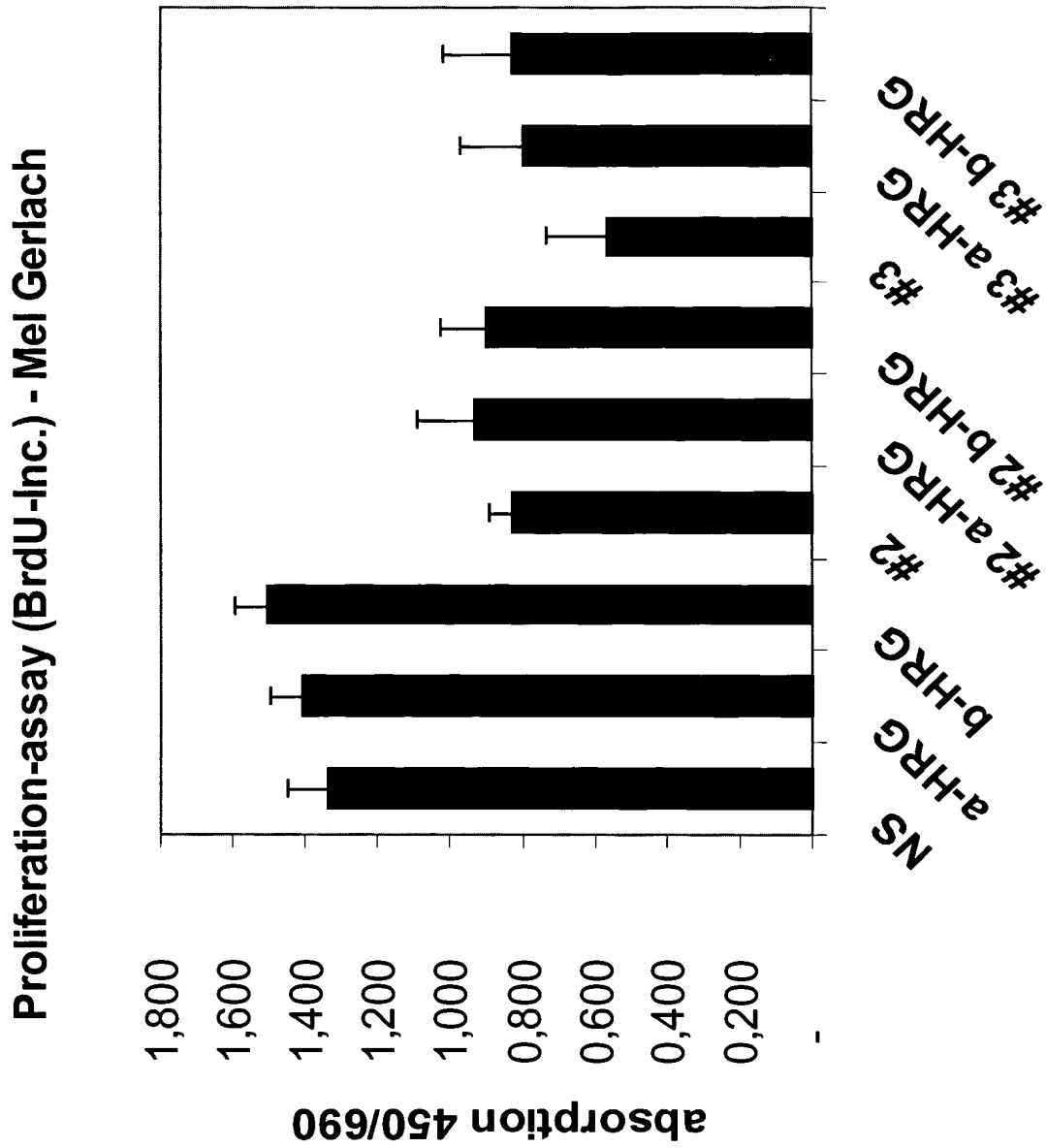


Figure 7
Htun van der Horst et al.

24/43

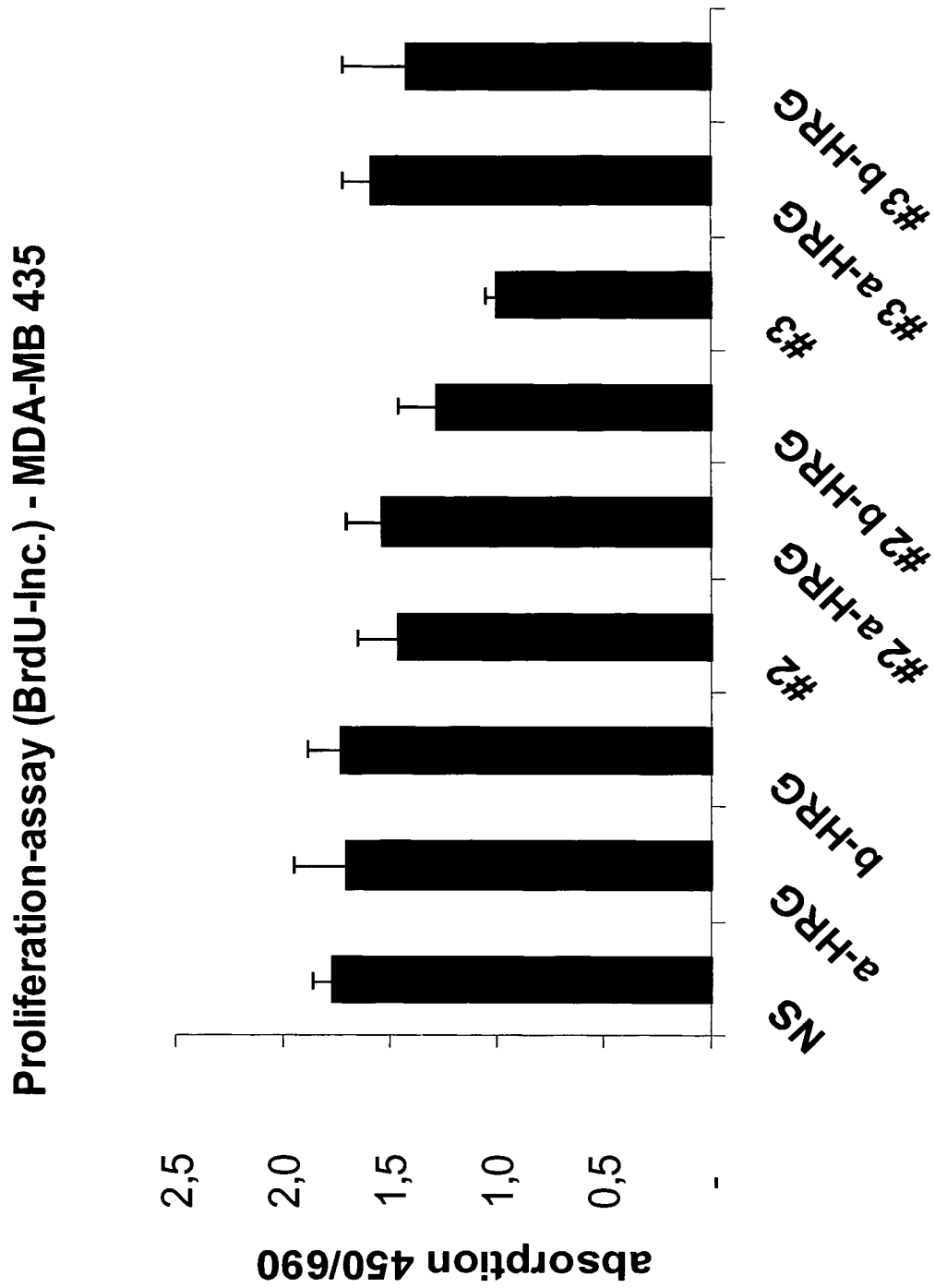


Figure 7
Htun van der Horst et al.

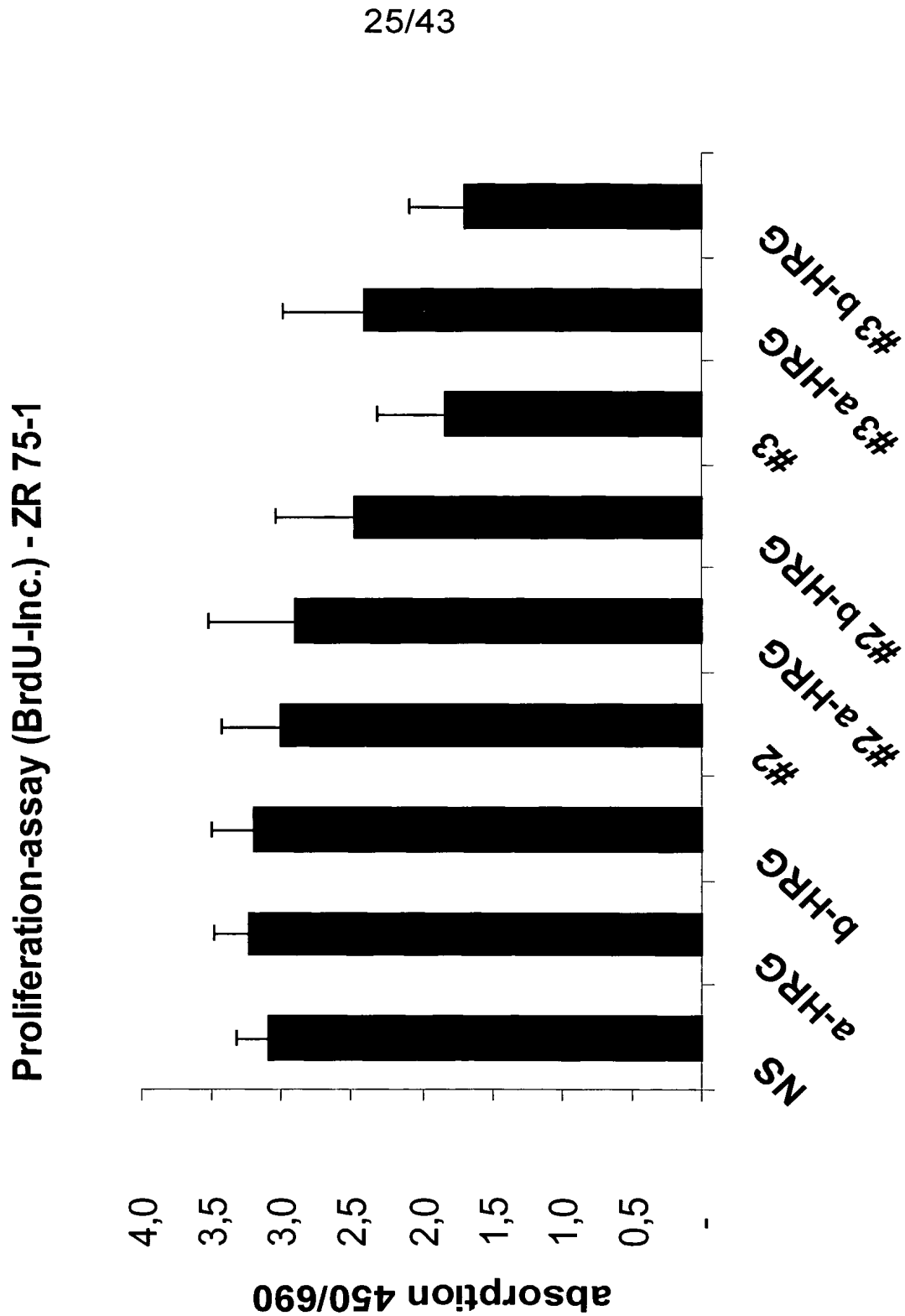
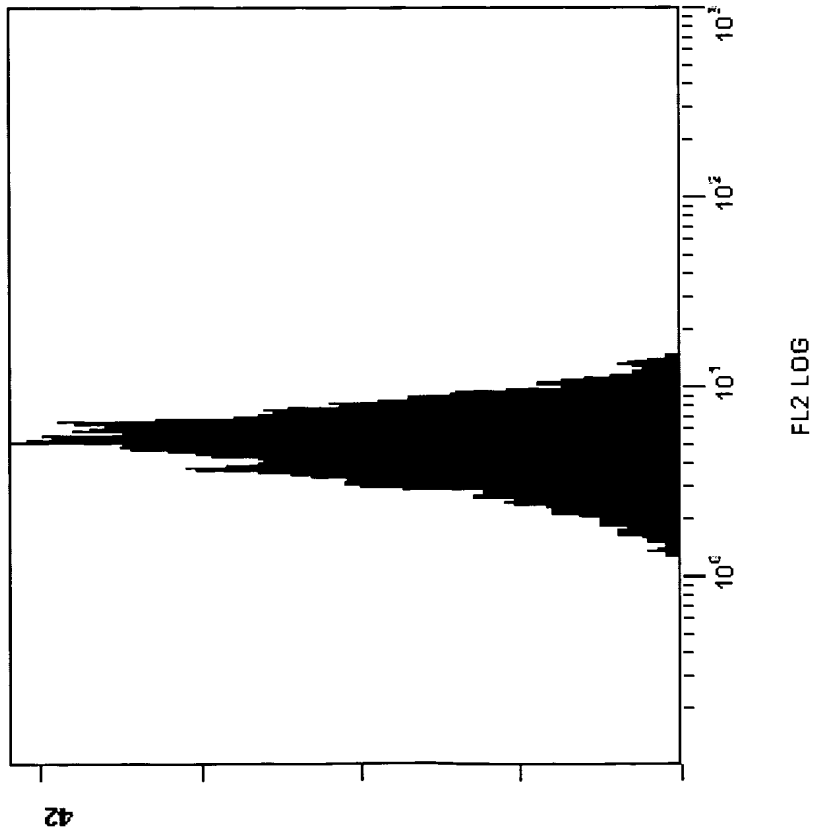


Figure 7
Htun van der Horst et al.

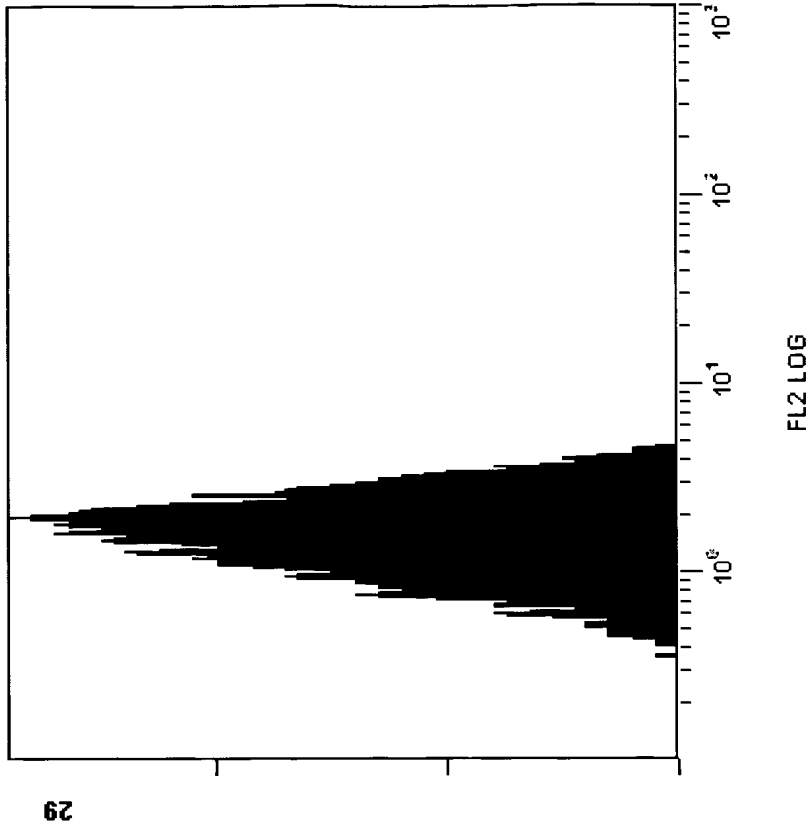
A

(F4) [A] 2002-05-02 003.LMD : FL2 LOG - ADC



B

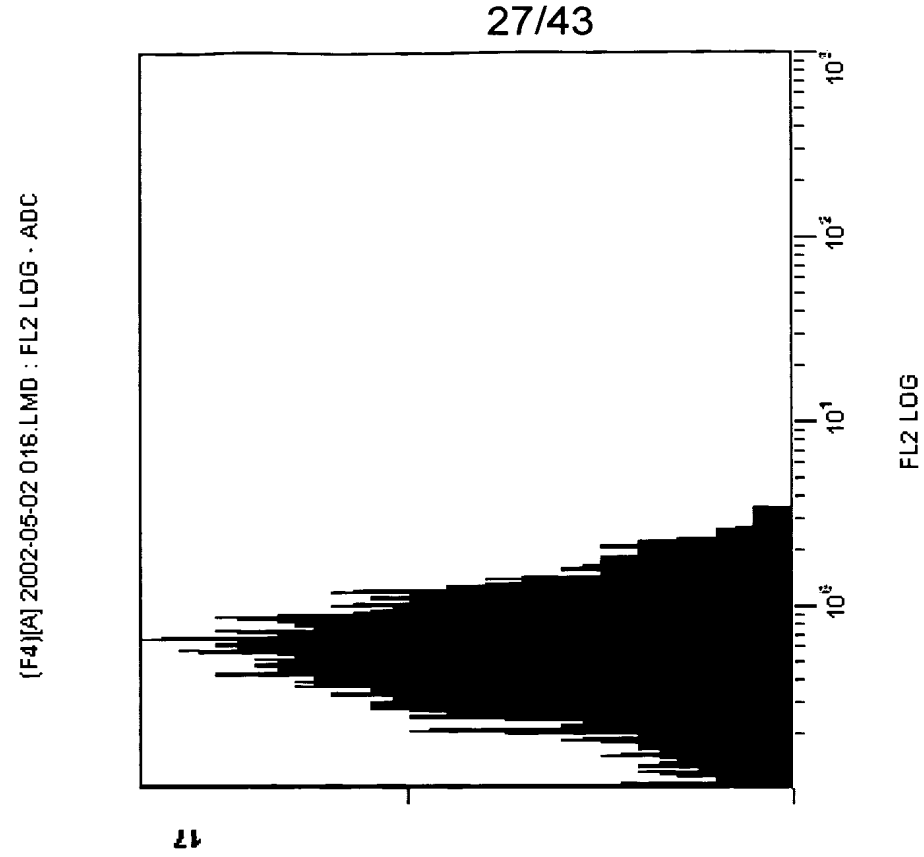
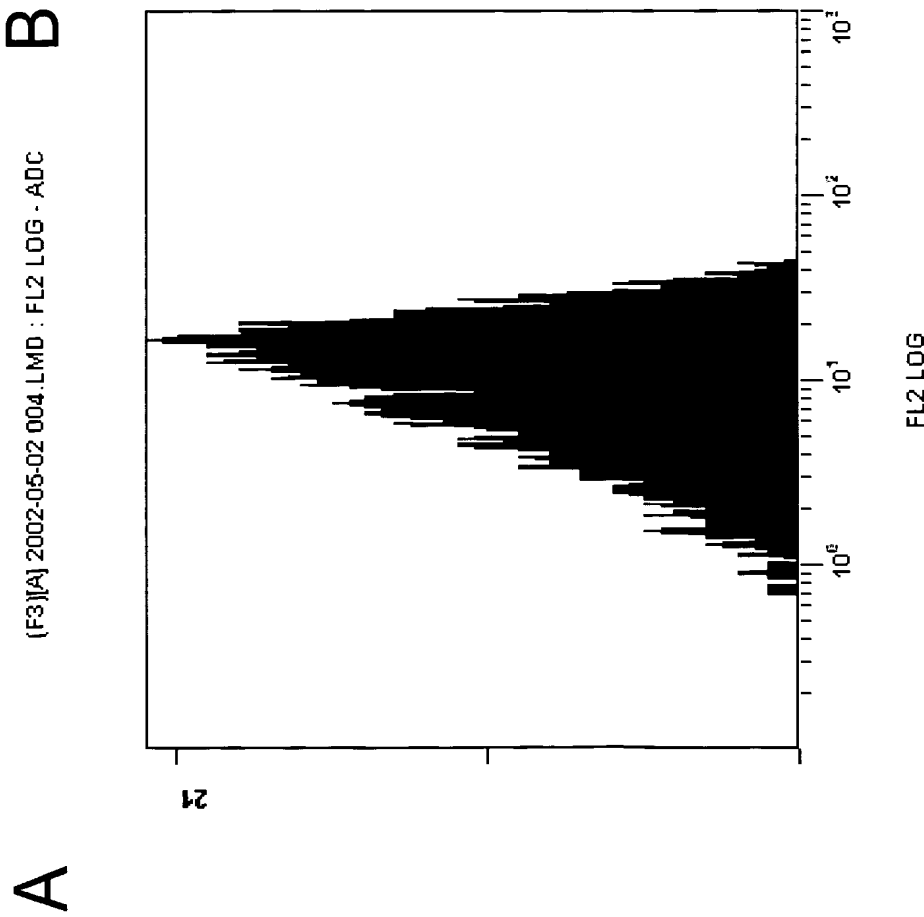
(F3) [A] 2002-05-02 015.LMD : FL2 LOG - ADC



26/43

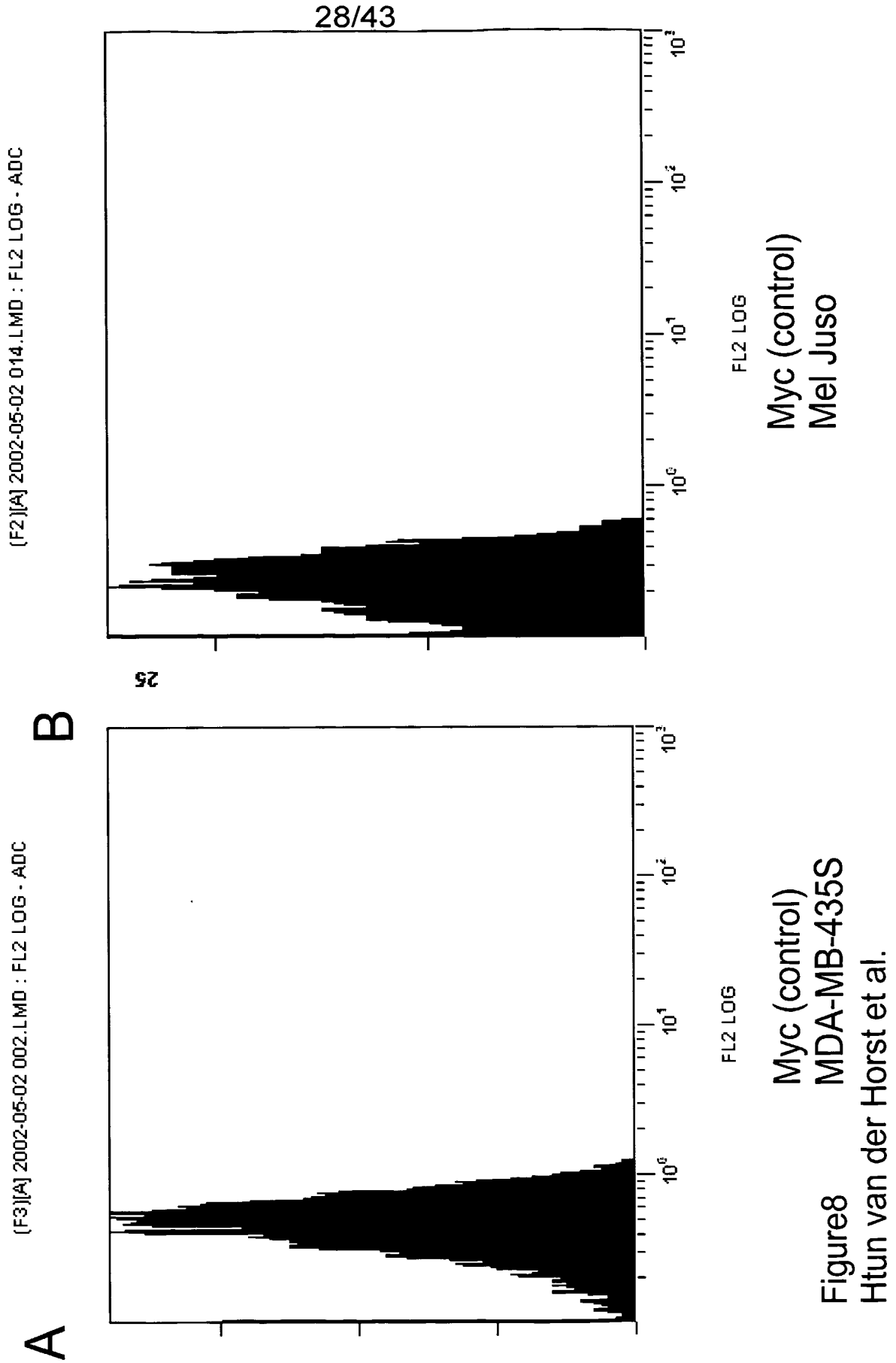
HER2
MDA-MB-435S
Htun van der Horst et al.

HER2
Mel Juso



HER3
Mel Juso

HER3
MDA-MB-435S
Figure8
Htun van der Horst et al.



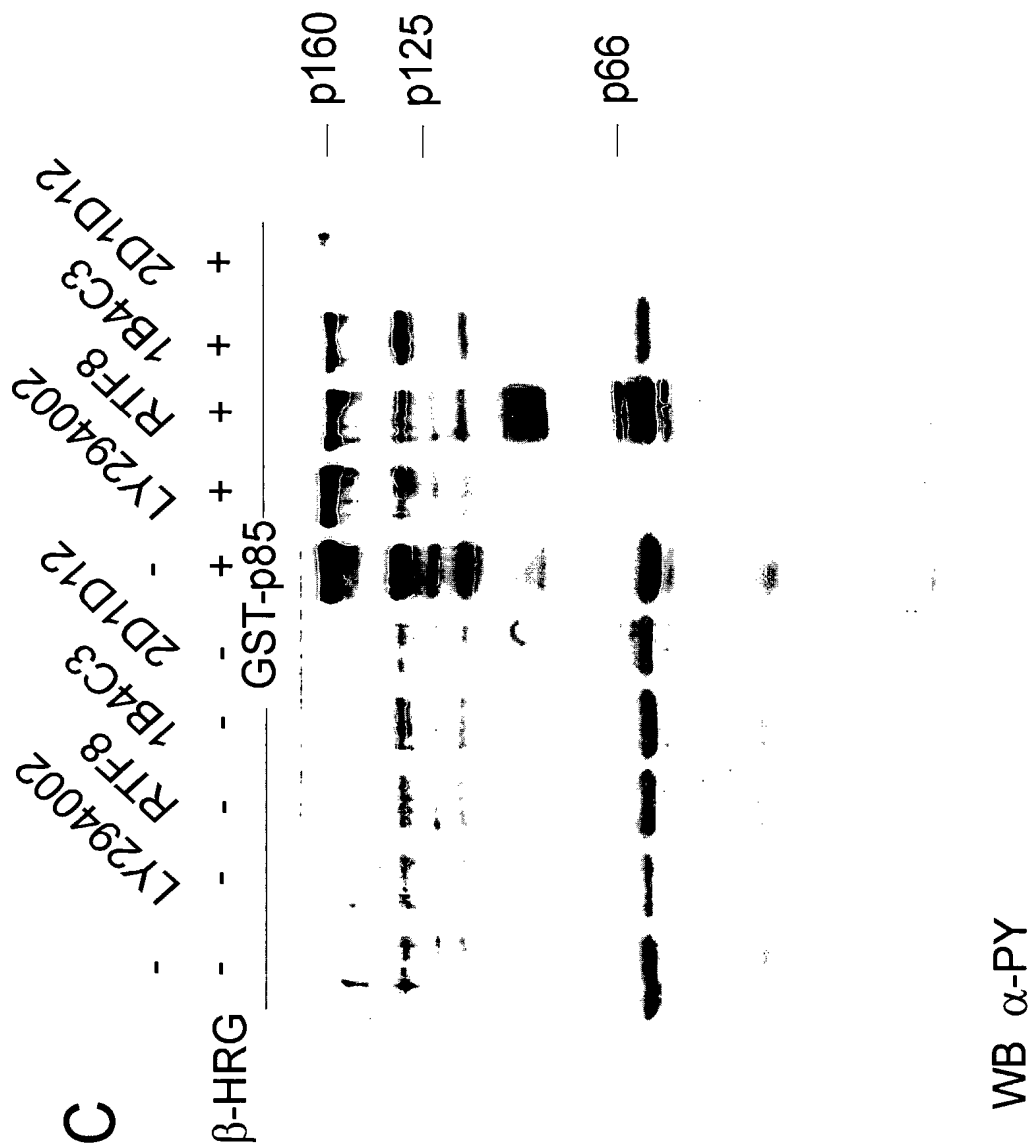


Figure 8
Supplementary Data
Htun van der Horst et al.

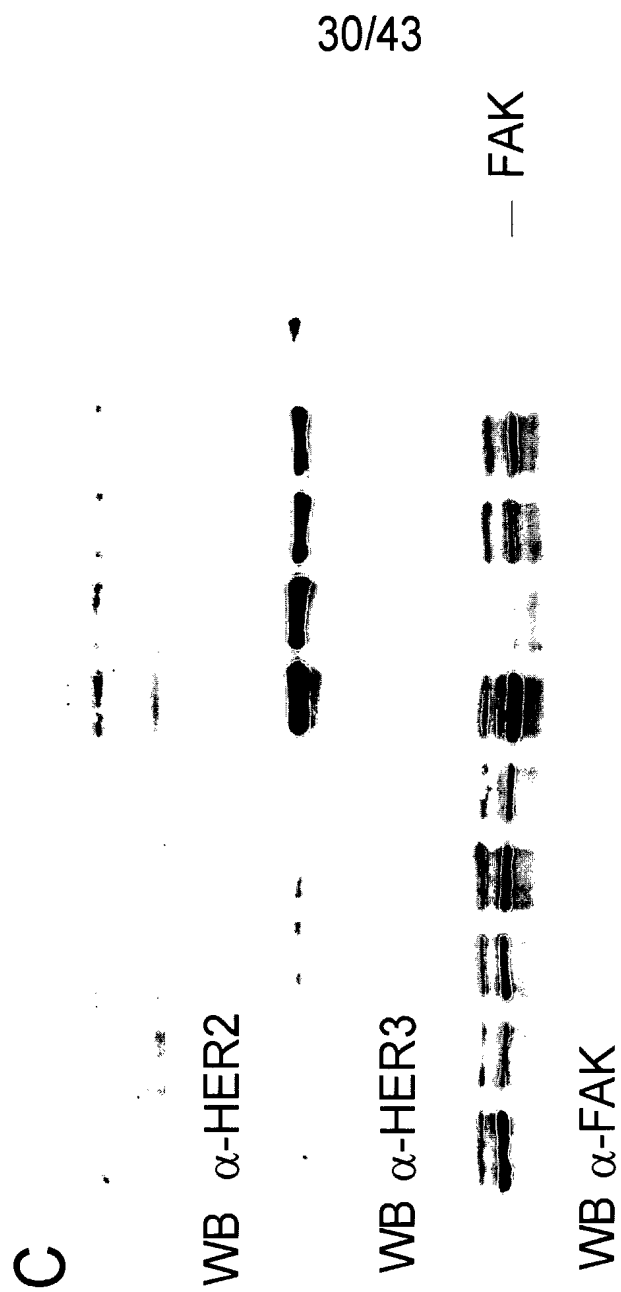


Figure 8
Supplementary Data
Htun van der Horst et al.

31/43

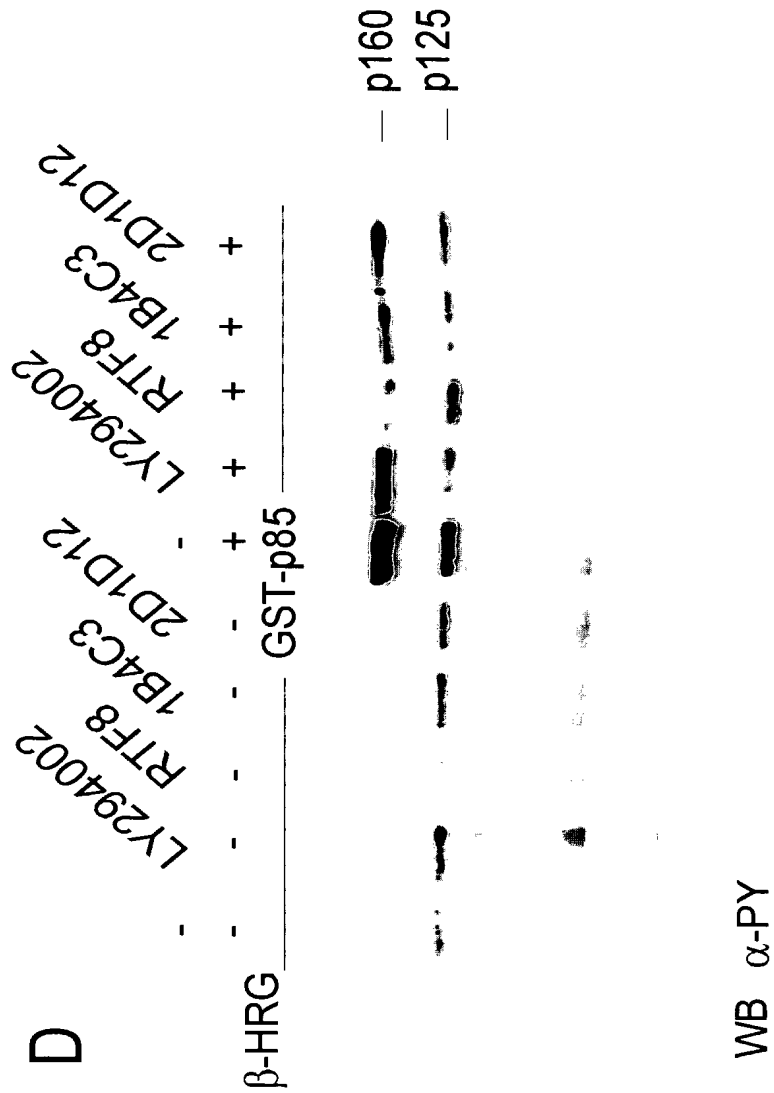


Figure 8
Supplementary Data
Htun van der Horst et al.

32/43



Figure 8
Supplementary Data
Htun van der Horst et al.

33/43

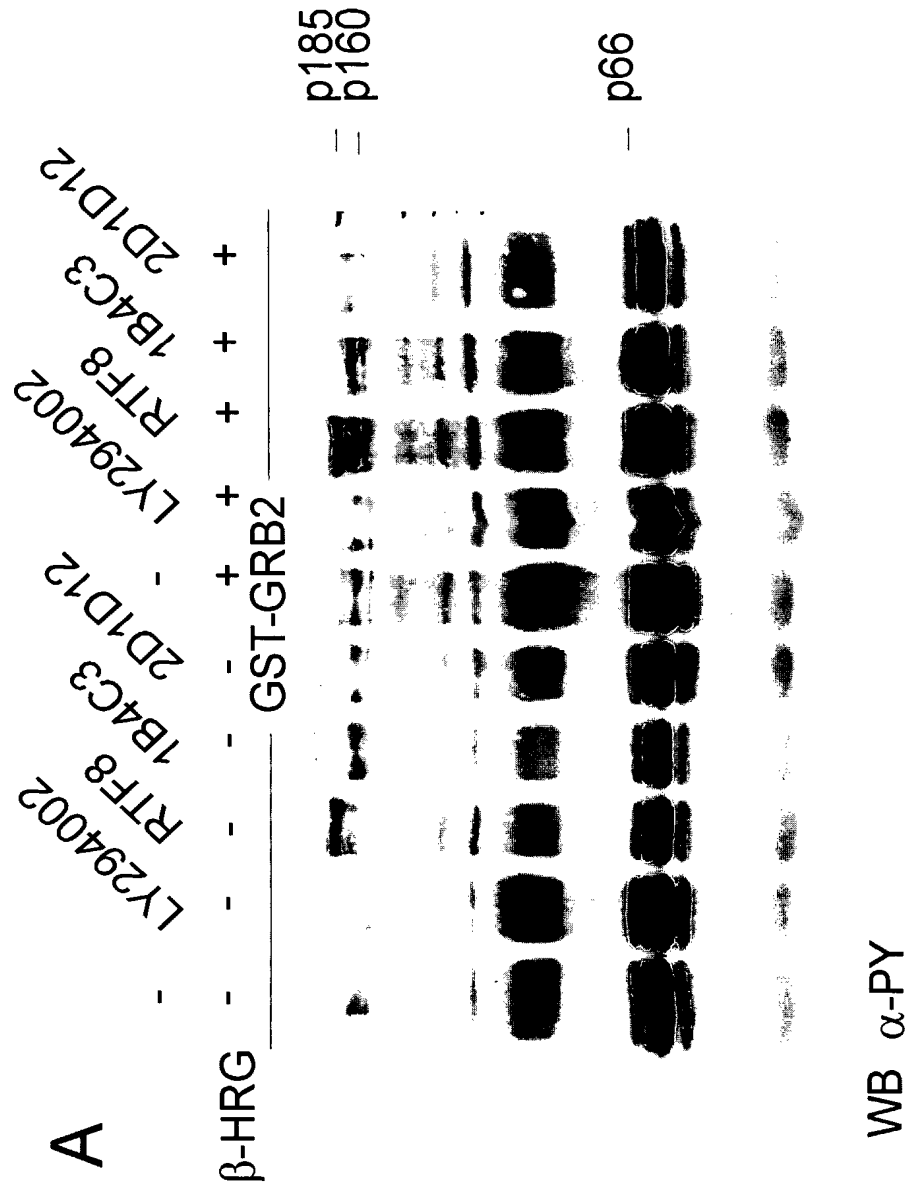


Figure 9
Supplementary Data
Htun van der Horst et al.

34/43

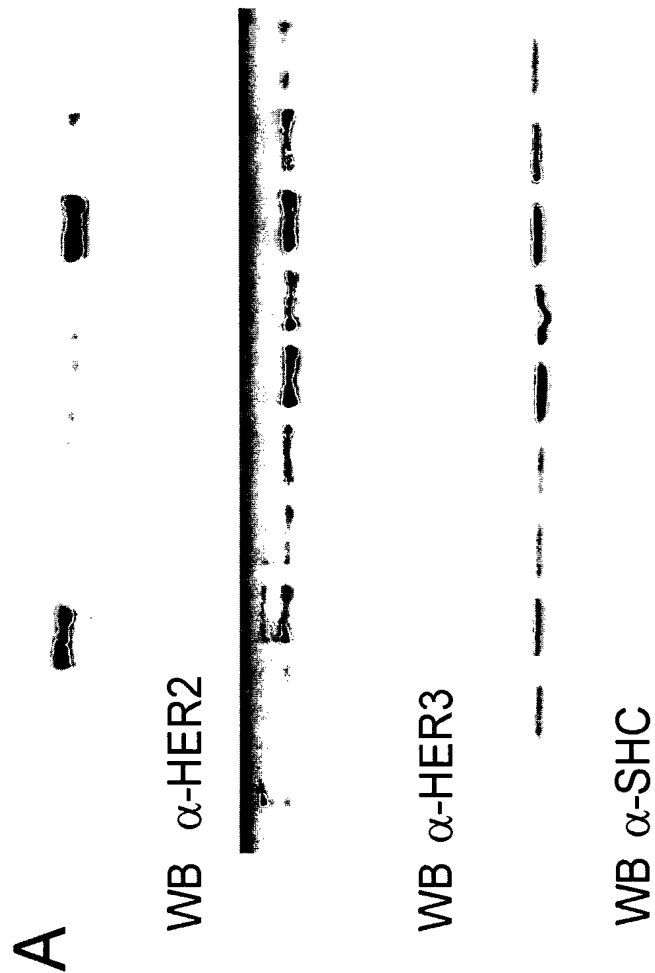


Figure 9
Supplementary Data
Htun van der Horst et al.

35/43

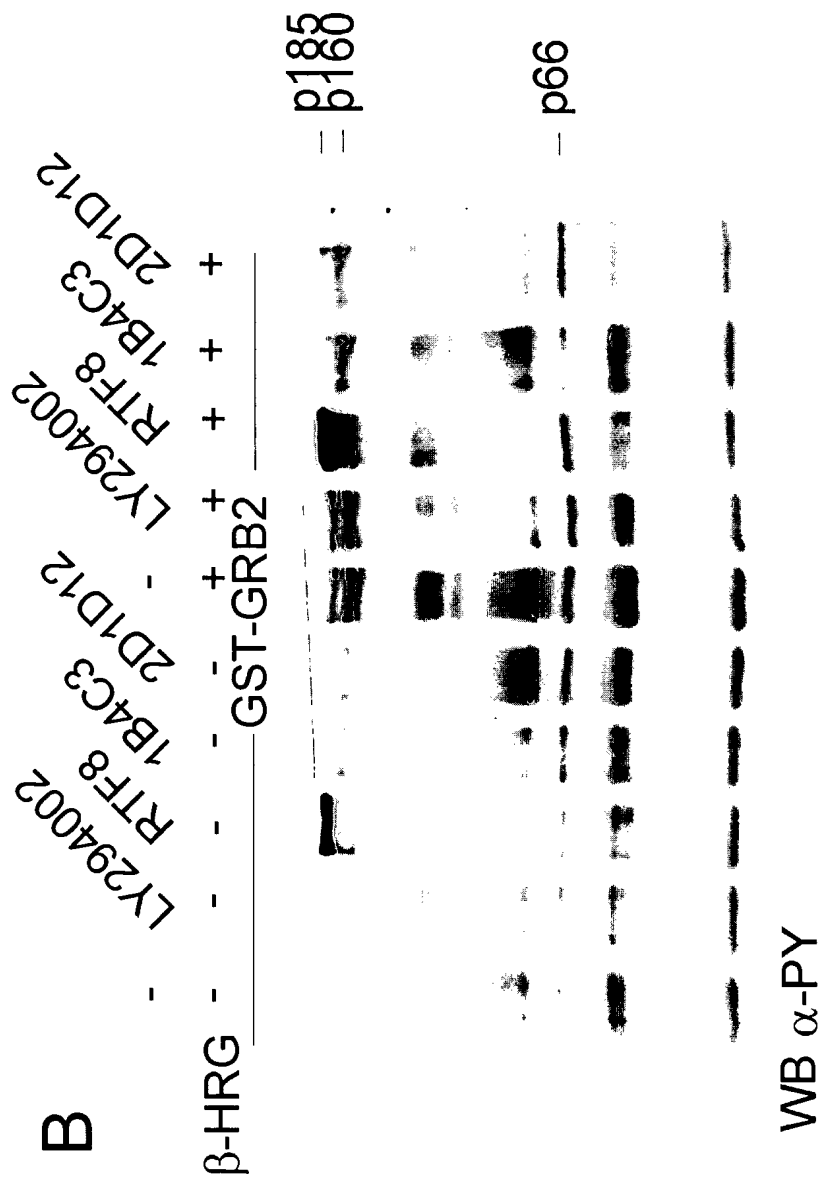


Figure 9
Supplementary Data
Htun van der Horst et al.

36/43

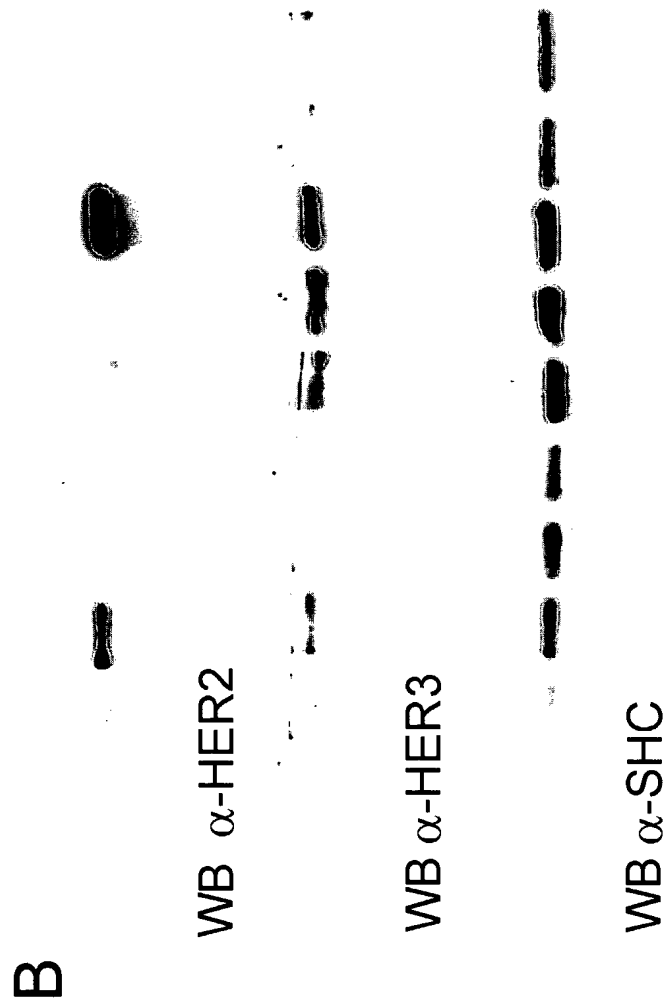


Figure 9
Supplementary Data
Htun van der Horst et al.

37/43

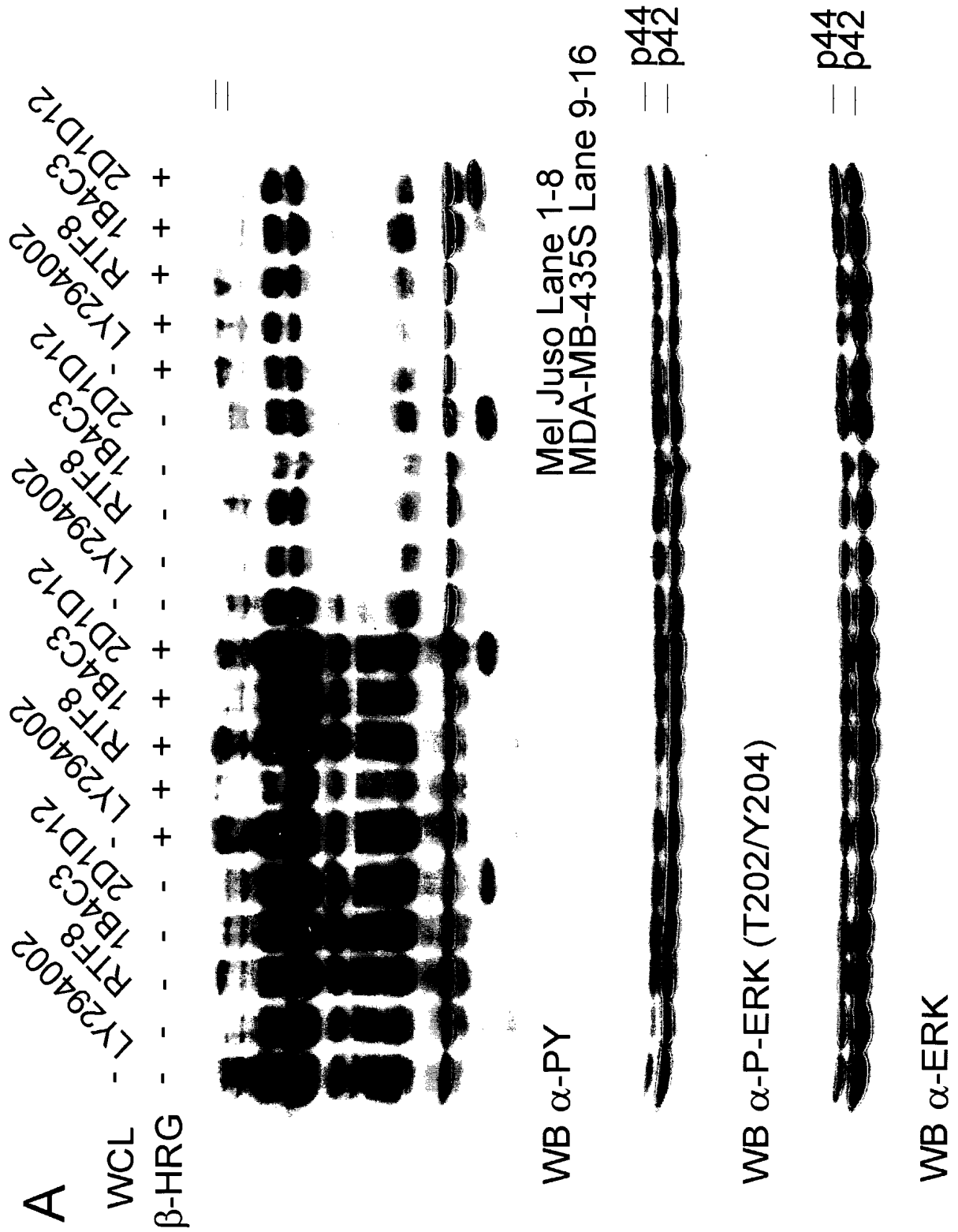
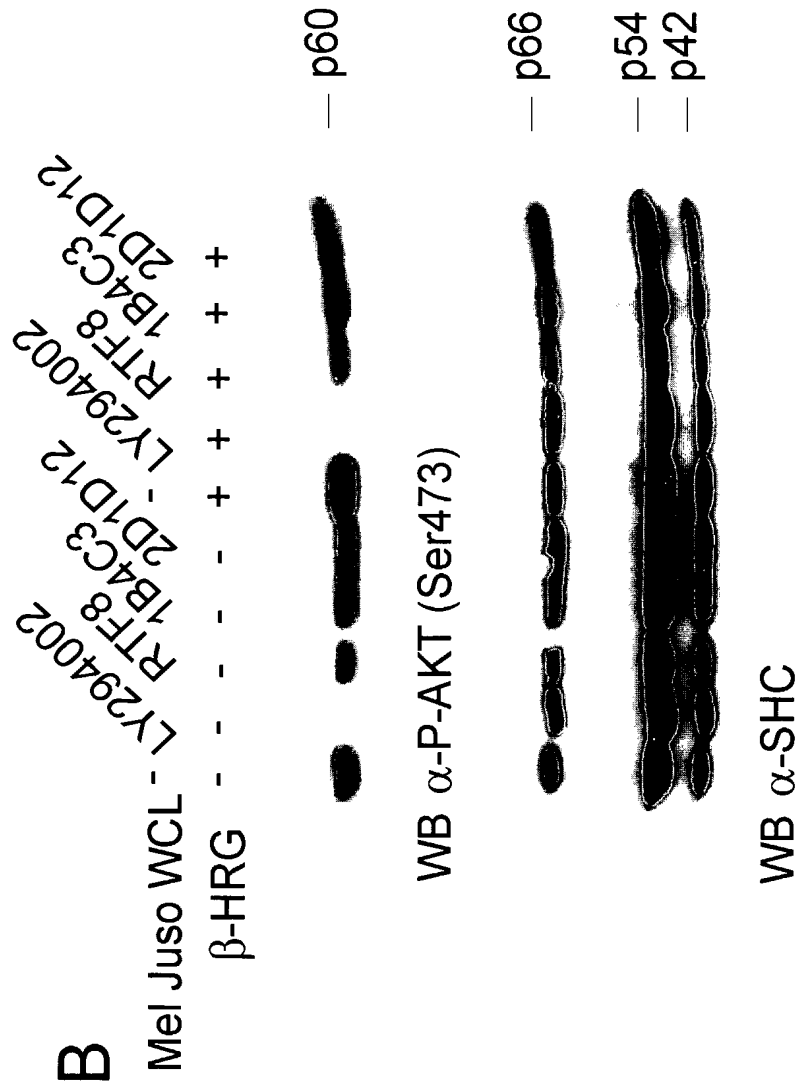


Figure 10
Supplementary Data
Htun van der Horst et al.



39/43

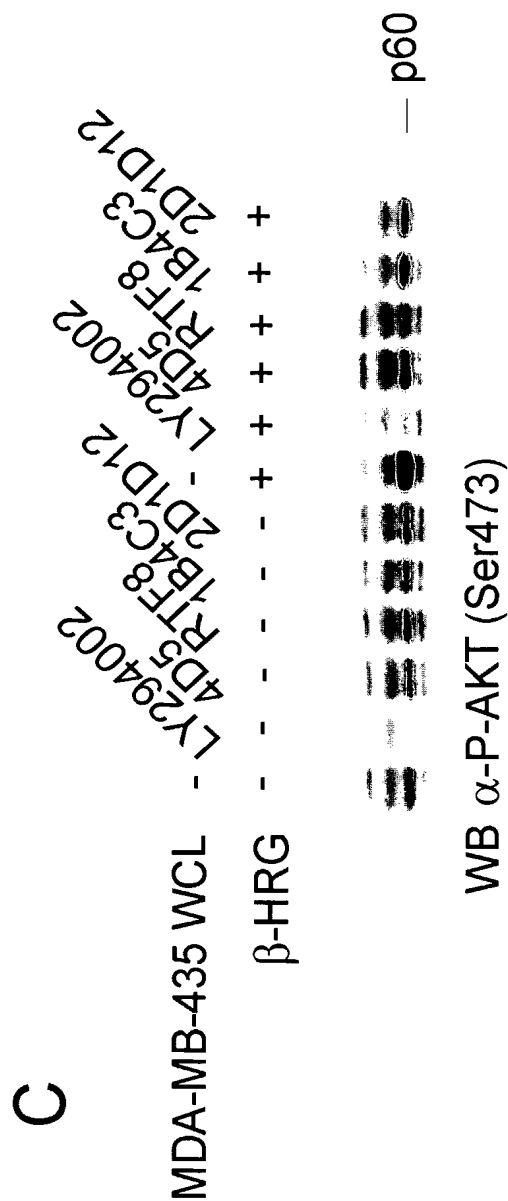


Figure 10
Supplementary Data
Htun van der Horst et al.

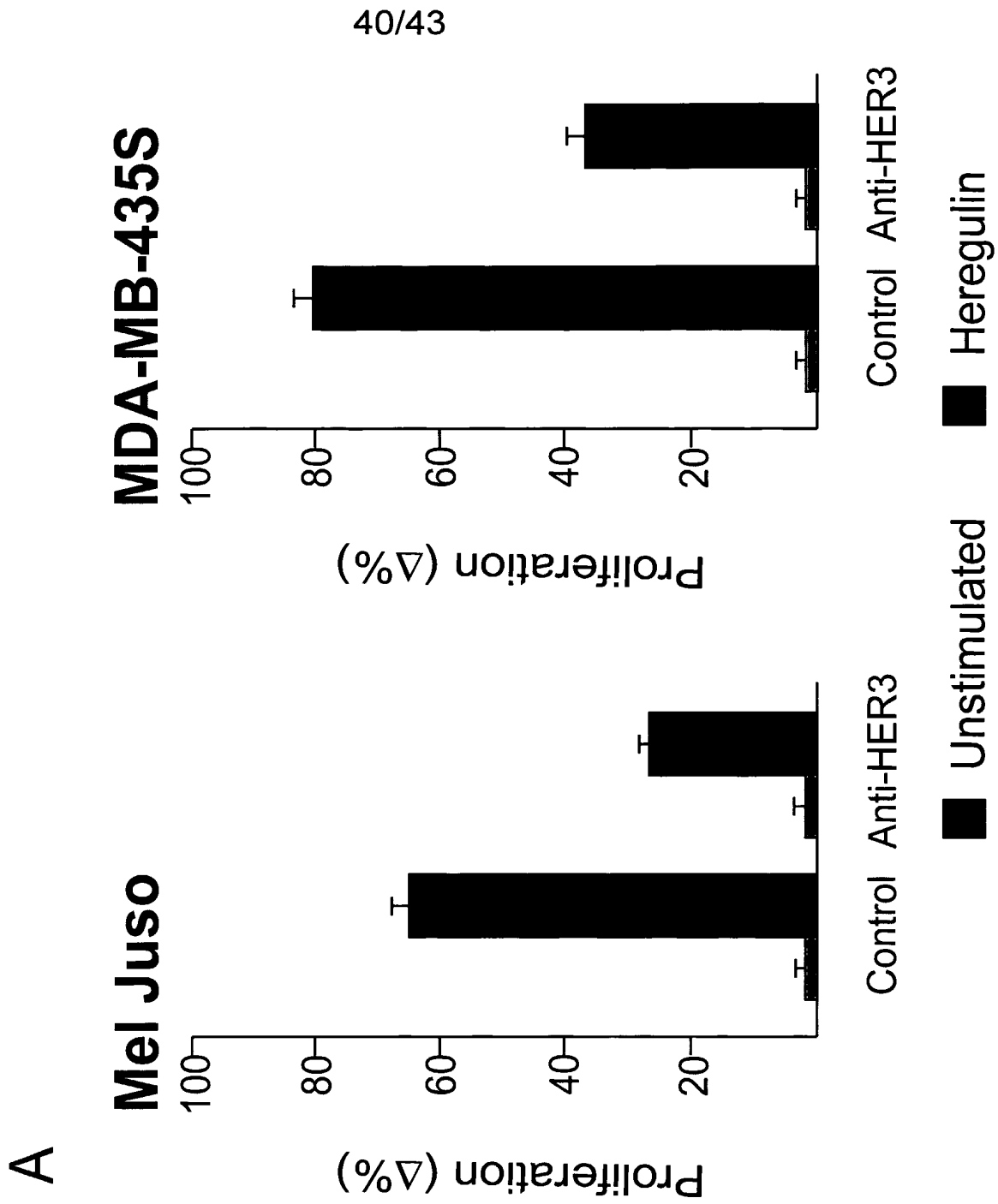


Figure 11
Supplementay Data
Htun van der Horst et al.

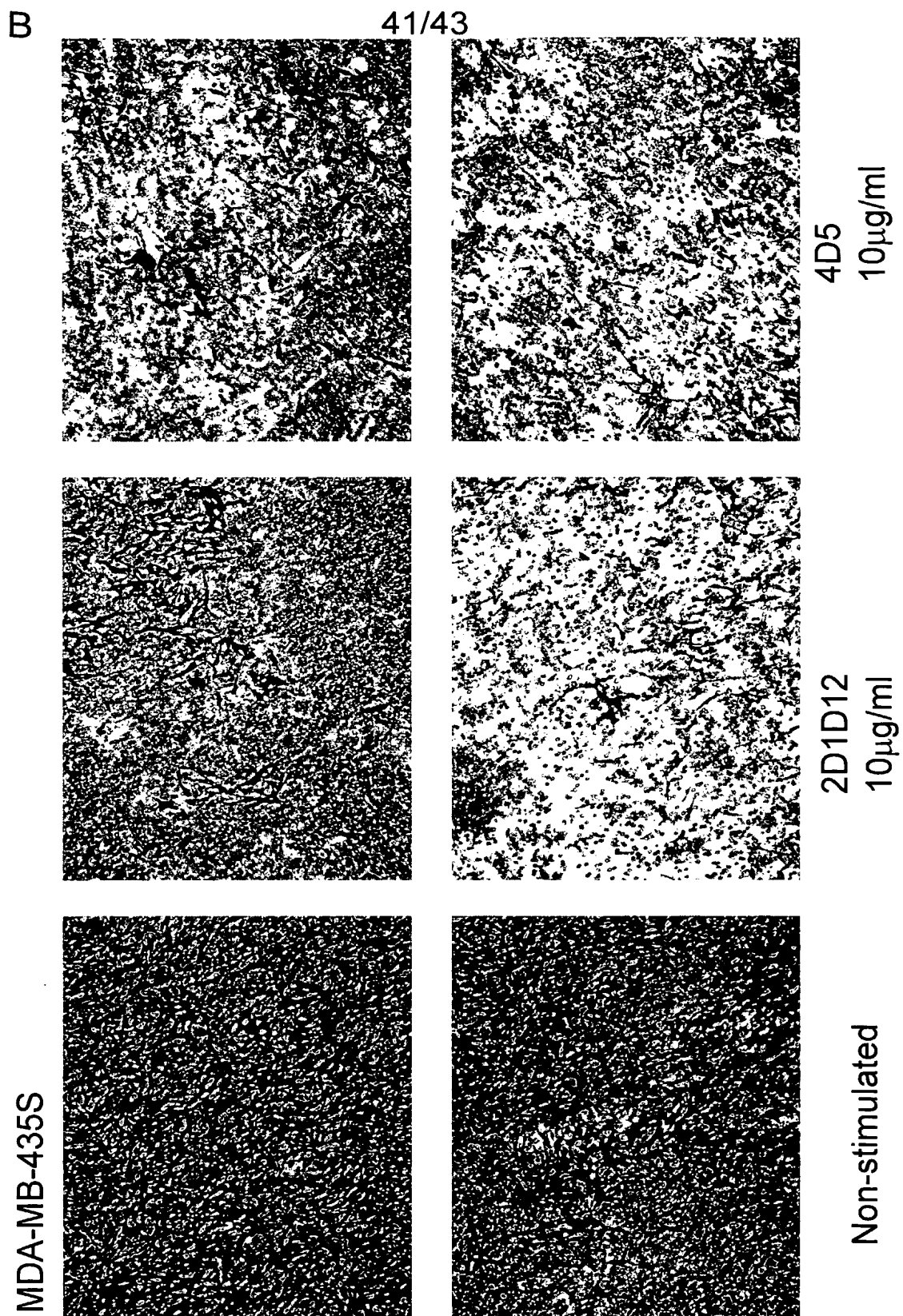


Figure11
Supplementary Data
Htun van der Horst et al.

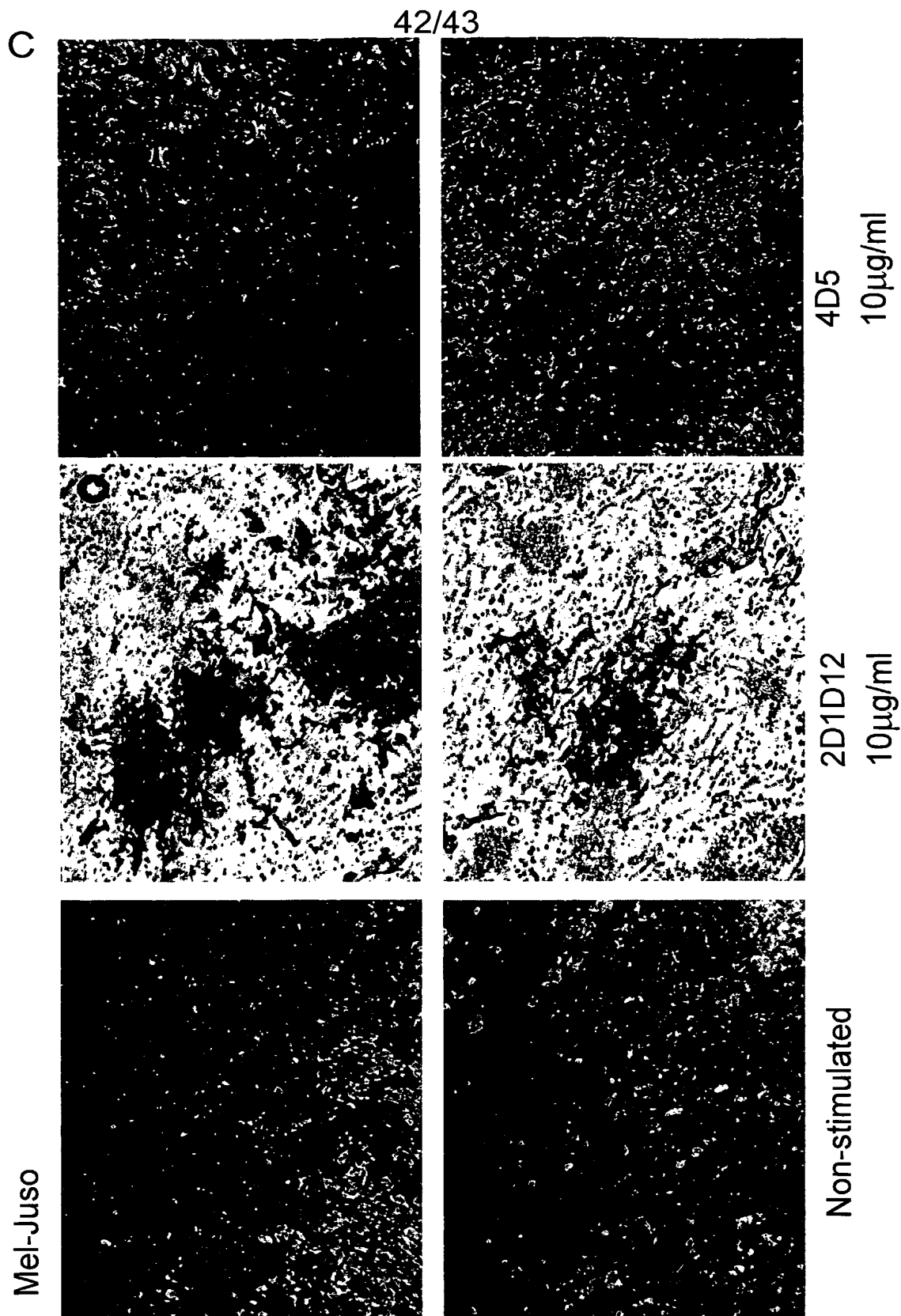


Figure11
Supplementary Data
Htun van der Horst et al.

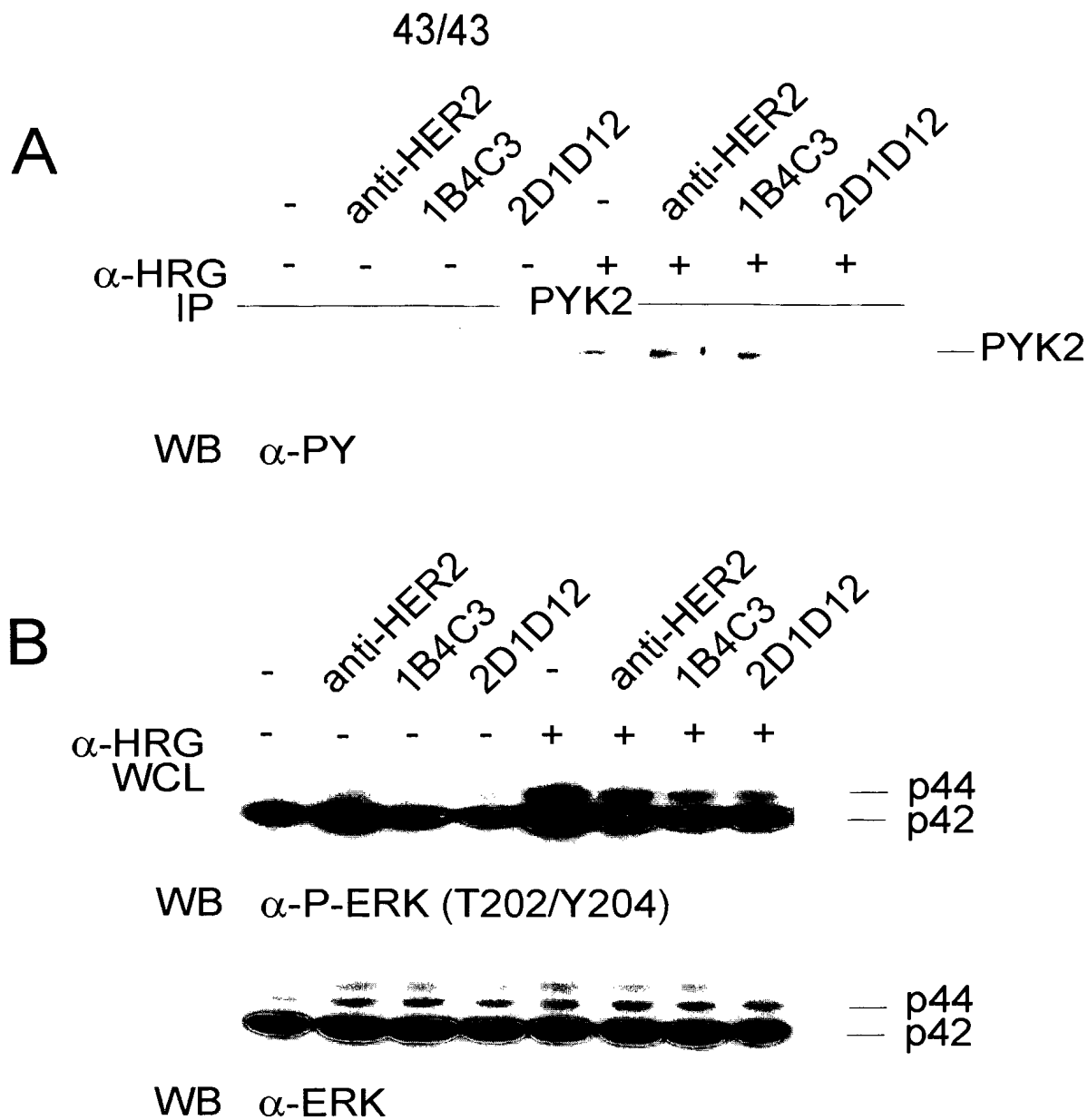


Figure 12
Supplementary Data
Htun van der Horst et al.

INTERNATIONALES FORMBLATT

Max-Planck-Institut
für Biochemie
Am Klopferspitz 18 a

82152 Martinsried

EMPFANGSBESTÄTIGUNG BEI ERSTHINTERLEGUNG,
ausgestellt gemäß Regel 7.1 von der unten angegebenen
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

I. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS	
Vom HINTERLEGER zugeteiltes Bezugszeichen: 2D1D12	Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE zugeteilte EINGANGSNUMMER: DSM ACC2517
II. WISSENSCHAFTLICHE BESCHREIBUNG UND/ODER VORGESCHLAGENE TAXONOMISCHE BEZEICHNUNG	
<p>Mit dem unter I. bezeichneten Mikroorganismus wurde</p> <p>(X) eine wissenschaftliche Beschreibung () eine vorgeschlagene taxonomische Bezeichnung</p> <p>eingereicht. (Zutreffendes ankreuzen).</p>	
III. EINGANG UND ANNAHME	
Diese internationale Hinterlegungsstelle nimmt den unter I bezeichneten Mikroorganismus an, der bei ihr am 2001-07-24 (Datum der Ersthinterlegung) ¹ eingegangen ist.	
IV. EINGANG DES ANTRAGS AUF UMWANDLUNG	
Der unter I bezeichnete Mikroorganismus ist bei dieser Internationalen Hinterlegungsstelle am eingegangen (Datum der Ersthinterlegung) und ein Antrag auf Umwandlung dieser Ersthinterlegung in eine Hinterlegung gemäß Budapester Vertrag ist am eingegangen (Datum des Eingangs des Antrags auf Umwandlung).	
V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE	
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Anschrift: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten:  Datum: 2001-07-31

¹ Falls Regel 6.4 Buchstabe d zutrifft, ist dies der Zeitpunkt, zu dem der Status einer internationalen Hinterlegungsstelle erworben worden ist.

INTERNATIONALES FORMBLATT

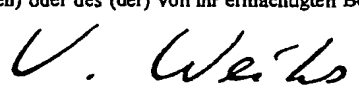
Max-Planck-Institut
für Biochemie
Am Klopferspitz 18 a

82152 Martinsried

LEBENSFÄHIGKEITSBESCHEINIGUNG

ausgestellt gemäß Regel 10.2 von der unten angegebenen

INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

I. HINTERLEGER	II. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS
Name: Max-Planck-Institut für Biochemie Anschrift: Am Klopferspitz 18 a 82152 Martinsried	Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE zugeteilte EINGANGSNUMMER: DSM ACC2517 Datum der Hinterlegung oder Weiterleitung ¹ : 2001-07-24
III. LEBENSFÄHIGKEITSBESCHEINIGUNG	
Die Lebensfähigkeit des unter II genannten Mikroorganismus ist am 2001-07-24 ² geprüft worden. Zu diesem Zeitpunkt war der Mikroorganismus ☒ lebensfähig ☐ nicht mehr lebensfähig	
IV. BEDINGUNGEN, UNTER DENEN DIE LEBENSFÄHIGKEITSPRÜFUNG DURCHGEFÜHRT WORDEN IST ³	
V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE	
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Anschrift: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten:  Datum: 2001-07-31

¹ Angabe des Datums der Ersthinterlegung. Wenn eine erneute Hinterlegung oder eine Weiterleitung vorgenommen worden ist, Angabe des Datums der jeweils letzten erneuten Hinterlegung oder Weiterleitung.

² In den in Regel 10.2 Buchstabe a Ziffer ii und iii vorgesehenen Fällen Angabe der letzten Lebensfähigkeitsprüfung.

³ Zutreffendes ankreuzen.

⁴ Ausfüllen, wenn die Angaben beantragt worden sind und wenn die Ergebnisse der Prüfung negativ waren.

INTERNATIONALES FORMBLATT

Max-Planck-Institut
für Biochemie
Am Klopferspitz 18A
82152 Martinsried

EMPFANGSBESTÄTIGUNG BEI ERSTHINTERLEGUNG,
ausgestellt gemäß Regel 7.1 von der unten angegebenen
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

I. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS	
Vom HINTERLEGER zugeteiltes Bezugszeichen: 1B4C3	Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE zugeteilte EINGANGSNUMMER: DSM ACC2527
II. WISSENSCHAFTLICHE BESCHREIBUNG UND/ODER VORGESCHLAGENE TAXONOMISCHE BEZEICHNUNG	
<p>Mit dem unter I. bezeichneten Mikroorganismus wurde</p> <p>☒ (X) eine wissenschaftliche Beschreibung ☐ () eine vorgeschlagene taxonomische Bezeichnung</p> <p>eingereicht. (Zutreffendes ankreuzen).</p>	
III. EINGANG UND ANNAHME	
Diese internationale Hinterlegungsstelle nimmt den unter I bezeichneten Mikroorganismus an, der bei ihr am 2001-09-04 (Datum der Ersthinterlegung) ¹ eingegangen ist.	
IV. EINGANG DES ANTRAGS AUF UMWANDLUNG	
Der unter I bezeichnete Mikroorganismus ist bei dieser Internationalen Hinterlegungsstelle am eingegangen (Datum der Ersthinterlegung) und ein Antrag auf Umwandlung dieser Ersthinterlegung in eine Hinterlegung gemäß Budapest Vertrag ist am eingegangen (Datum des Eingangs des Antrags auf Umwandlung).	
V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE	
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Anschrift: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten:  Datum: 2001-09-11

¹ Falls Regel 6.4 Buchstabe d zutrifft, ist dies der Zeitpunkt, zu dem der Status einer internationalen Hinterlegungsstelle erworben worden ist.

INTERNATIONALES FORMBLATT

Max-Planck-Institut
für Biochemie
Am Klopferspitz 18A
82152 Martinsried

LEBENSFÄHIGKEITSBESCHEINIGUNG

ausgestellt gemäß Regel 10.2 von der unten angegebenen
INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE

I. HINTERLEGER	II. KENNZEICHNUNG DES MIKROORGANISMUS
Name: Max-Planck-Institut für Biochemie Anschrift: Am Klopferspitz 18A 82152 Martinsried	Von der INTERNATIONALEN HINTERLEGUNGSSTELLE zugeteilte EINGANGSNUMMER: DSM ACC2527 Datum der Hinterlegung oder Weiterleitung ¹ : 2001-09-04
III. LEBENSFÄHIGKEITSBESCHEINIGUNG	
Die Lebensfähigkeit des unter II genannten Mikroorganismus ist am 2001-09-04 ² geprüft worden. Zu diesem Zeitpunkt war der Mikroorganismus ☒ lebensfähig ☐ nicht mehr lebensfähig	
IV. BEDINGUNGEN, UNTER DENEN DIE LEBENSFÄHIGKEITSPRÜFUNG DURCHGEFÜHRT WORDEN IST ⁴	
V. INTERNATIONALE HINTERLEGUNGSSTELLE	
Name: DSMZ-DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN GmbH Anschrift: Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig	Unterschrift(en) der zur Vertretung der internationalen Hinterlegungsstelle befugten Person(en) oder des (der) von ihr ermächtigten Bediensteten:  Datum: 2001-09-11

¹ Angabe des Datums der Ersthinterlegung. Wenn eine erneute Hinterlegung oder eine Weiterleitung vorgenommen worden ist, Angabe des Datums der jeweils letzten erneuten Hinterlegung oder Weiterleitung.

² In den in Regel 10.2 Buchstabe a Ziffer ii und iii vorgesehenen Fällen Angabe der letzten Lebensfähigkeitsprüfung.

³ Zutreffendes ankreuzen.

⁴ Ausfüllen, wenn die Angaben beantragt worden sind und wenn die Ergebnisse der Prüfung negativ waren.

International Application No

PCT/EP 02/08938

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 A61K39/395 A61K47/48 G01N33/577 G01N33/574 A61P35/00
 G01N33/50 C12N5/20 C07K16/28

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

BIOSIS, EMBASE, WPI Data, PAJ, EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>R. VADLAMUDI ET AL.: "Regulation of cyclooxygenase-2 pathway by HER2 receptor." ONCOGENE, vol. 18, no. 2, 14 January 1999 (1999-01-14), pages 305-314, XP001030629 Basingstoke, GB abstract page 307, left-hand column, line 19 . -right-hand column, line 12 page 307, right-hand column, line 36 -page 309, left-hand column, line 11 page 312, left-hand column, line 2 - line 38 page 312, right-hand column, line 3 - line 26</p> <p style="text-align: center;">--- -/--</p>	<p>1, 2, 5-9, 11-15, 17-22, 24-26</p>



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- * & * document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

29 October 2002

Date of mailing of the international search report

06/11/2002

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Nooij, F

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 00 31048 A (WARNER-LAMBERT COMPANY) 2 June 2000 (2000-06-02) claims ----	1, 4, 13, 14, 17, 18, 20, 21, 24-26
X	WO 97 35885 A (GENENTECH, INC.) 2 October 1997 (1997-10-02) cited in the application page 28, line 27 -page 29, line 24 example claims ----	1, 4-8, 12-15, 17-22, 24-26
X	WO 00 78347 A (THE VICTOR CHANG CARDIAC RESEARCH INSTITUTE) 28 December 2000 (2000-12-28) claims page 16, line 25 - line 29 ----	1, 5-8, 11-15, 17-22, 24-26
X	US 5 804 396 A (PLOWMAN) 8 September 1998 (1998-09-08) claims ----	25, 26
A	D. BAECKSTRÖM ET AL.: "Morphogenetic and proliferative responses to heregulin of mammary epithelial cells in vitro are dependent on HER2 and HER3 and differ from the responses to HER2 homodimerisation or hepatocyte growth factor." INTERNATIONAL JOURNAL OF ONCOLOGY, vol. 16, no. 6, June 2000 (2000-06), pages 1081-1090, XP001030626 Greece page 1084, right-hand column, line 4 - line 28 ----	1-27, 29
A	D. TODD ET AL.: "Ionizing radiation stimulates existing signal transduction pathways involving the activation of epidermal growth factor receptor and erbB-3, and changes of intracellular calcium in A431 human squamous carcinoma cells." JOURNAL OF RECEPTOR AND SIGNAL TRANSDUCTION RESEARCH, vol. 19, no. 6, November 1999 (1999-11), pages 885-908, XP001030590 USA page 897, line 15 - line 18 ----	1-27, 29
A	US 5 480 968 A (KRAUS ET AL.) 2 January 1996 (1996-01-02) column 9, line 59 -column 11, line 52 ----	1-27, 29
	--- -/--	

International Application No

PCT/EP 02/08938

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	T. RAJKUMAR ET AL.: "A monoclonal antibody to the human c-erbB3 protein stimulates the anchorage-independent growth of breast cancer cell lines." BRITISH JOURNAL OF CANCER, vol. 70, 1994, pages 459-465, XP000676619 GB cited in the application abstract discussion ---	1-27,29
T	US 6 277 640 B1 (BENNETT ET AL.) 21 August 2001 (2001-08-21) examples claims -----	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP 02/08938**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/EP 02 08938

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.1

Although claims 21-24 (partially) are directed to a method of treatment of the human/animal body, and although claims 21-24 (partially) are directed to a diagnostic method practised on the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 02/08938

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0031048	A	02-06-2000	AU 6261299 A	13-06-2000
			BG 105608 A	31-01-2002
			BR 9915487 A	31-07-2001
			CN 1330642 T	09-01-2002
			CZ 20011759 A3	16-01-2002
			EP 1131304 A1	12-09-2001
			HU 0104211 A2	29-05-2002
			JP 2002530386 T	17-09-2002
			NO 20012465 A	13-07-2001
			PL 347717 A1	22-04-2002
			SK 6572001 A3	05-02-2002
			WO 0031048 A1	02-06-2000
			US 6344455 B1	05-02-2002
WO 9735885	A	02-10-1997	AU 727082 B2	30-11-2000
			AU 2071197 A	17-10-1997
			BR 9708343 A	03-08-1999
			CA 2246429 A1	02-10-1997
			CN 1214695 A	21-04-1999
			EP 0896586 A1	17-02-1999
			JP 2000508526 T	11-07-2000
			NZ 331360 A	27-03-2000
			WO 9735885 A1	02-10-1997
			ZA 9702554 A	25-09-1998
WO 0078347	A	28-12-2000	WO 0078347 A1	28-12-2000
			AU 5199900 A	09-01-2001
			EP 1187634 A1	20-03-2002
US 5804396	A	08-09-1998	NONE	
US 5480968	A	02-01-1996	US 5183884 A	02-02-1993
			US 5820859 A	13-10-1998
			US 5916755 A	29-06-1999
			AT 163970 T	15-03-1998
			AU 654805 B2	24-11-1994
			AU 6889991 A	26-06-1991
			DE 69032133 D1	16-04-1998
			DE 69032133 T2	02-07-1998
			DK 502927 T3	02-06-1998
			EP 0502927 A1	16-09-1992
			ES 2113877 T3	16-05-1998
			JP 6503467 T	21-04-1994
			JP 3196079 B2	06-08-2001
			JP 2001299373 A	30-10-2001
			WO 9108214 A1	13-06-1991
US 6277640	B1	21-08-2001	AU 7700301 A	13-02-2002
			WO 0210409 A1	07-02-2002

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
27 February 2003 (27.02.2003)

PCT

(10) International Publication Number
WO 03/015826 A1(51) International Patent Classification⁷: **A61K 47/48**,
A61P 35/04

(21) International Application Number: PCT/JP02/08309

(22) International Filing Date: 16 August 2002 (16.08.2002)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
2001-249717 21 August 2001 (21.08.2001) JP(71) Applicant: **TANABE SEIYAKU CO., LTD.** [JP/JP];
2-10, Dosho-machi 3-chome, Chuo-ku, Osaka-shi, Osaka
541-8505 (JP).(72) Inventors: **KAWAGUCHI, Takayuki**; 24-5-2005, Ki-
taotsuka 2-chome, Toshima-ku, Tokyo 170-0004 (JP).
OKUNO, Satoshi; 8-5-18, Waseda, Misato-shi, Saitama
341-0018 (JP). **YANO, Toshiro**; 1-5-302, Fujishirodai
1-chome, Suita-shi, Osaka 565-0873 (JP).(74) Agents: **AOYAMA, Tamotsu** et al.; Aoyama & Partners,
IMP Building, 3-7, Shiromi 1-chome, Chuo-ku, Osaka-shi,
Osaka 540-0001 (JP).(81) Designated States (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH,
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KR, KZ, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,
MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI,
SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VC, VN,
YU, ZA, ZM, ZW.(84) Designated States (*regional*): ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,
ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK,
TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).**Published:**

— with international search report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS COMPRISING POLYSACCHARIDE CONJUGATES FOR INHIBITING THE METASTASIS OR PREVENTING THE RECURRENCE OF MALIGNANT TUMOR

(57) Abstract: A pharmaceutical composition for inhibiting the metastasis or preventing the recurrence of a malignant tumor, which comprises as the active ingredient a polysaccharide derivative comprising a polysaccharide having a carboxyl group bound to an active substance having an anti-tumor activity via an amino acid or a peptide consisting of 2 to 8 amino acids which are the same or different, or a salt thereof. Preferred active substances are camptothecin derivatives.



WO 03/015826 A1

DESCRIPTION

PHARMACEUTICAL COMPOSITIONS COMPRISING POLYSACCHARIDE CONJUGATES FOR
INHIBITING THE METASTASIS OR PREVENTING THE RECURRENCE OF MALIGNANT TUMOR

5

TECHNICAL FIELD

The present invention relates to a pharmaceutical composition for inhibiting the metastasis or preventing the recurrence of a malignant tumor. More particularly, the present invention relates to a pharmaceutical composition for inhibiting the metastasis or preventing the recurrence of a malignant tumor, which comprises as the active ingredient a polysaccharide derivative comprising a polysaccharide having a carboxyl group bound to an active substance having an anti-tumor activity, for example, a camptothecin derivative of the formula (I) or (II) as mentioned below, via an amino acid or a peptide consisting of 2 to 8 amino acids which are the same or different, or a salt thereof.

20

BACKGROUND ART

Malignant tumors are one of the main causes of death in the developed countries, and the majority of malignant tumors related deaths are due to metastasis into distant organs or recurrence accompanied by metastasis to distant

25

organs after a topical therapy. The metastasis to distant organs may be caused by hematogenous metastasis or lymphogenous metastasis, and it is known that a patient having lymphogenous metastasis has a high risk of

5 recurrence of a malignant tumor after topical therapy. The main organs of recurrence are brain, lung, liver, and bone. Especially, a tumor in digestive apparatus, for example, colon cancer from which a large number of patients are suffered, may often invade and spread to the liver, and a
10 breast cancer and a lung cancer as well often invade and spread to the liver. Further, a lymphoma and a lymphatic leukemia may spread mainly to the lymph system, and it has been reported that the metastasis to liver was observed in high rate by autopsy.

15 In order to inhibit the recurrence including the metastasis to distant organs such a metastasis to the liver and to prolong life, a chemotherapy, etc. is employed as a supportive care after a topical therapy, but the chemotherapy has a potent toxicity and cannot be used for
20 chronic administration. In addition, it has scarcely been reported that the lifetime is more prolonged by a supportive care of chemotherapy than a topical therapy alone. For example, in the trials of post-surgery chemotherapy for the patient who is the subject of surgery
25 of advanced gastric cancer, one of the cancers of digestive

organs, clinical tests of various agents for anti-malignant tumors have been tried, but any therapeutic method exhibiting a remarkably better survival rate than a surgery alone has not been established yet.

5 Under these circumstances, it has been desired to find a new agent effective in inhibiting recurrence or in prolonging life after topical therapy, which is applicable to the lymph node and the distant organs of metastasis with little side effects, and is suitable for chronic
10 administration.

 On the other hand, WO 94/19376, WO 97/46260, WO 97/38727, JP-A-10-72467 and JP-A-10-95802 disclose a polysaccharide derivative comprising a polysaccharide bound to an active substance having an anti-tumor activity via an
15 amino acid or a peptide.

 However, these publications disclose the use of these polysaccharides in the treatment of cancers by accumulating at the tumor site and killing the tumor cells, but never indicate activities of inhibiting metastasis or preventing
20 recurrence of a malignant tumor.

DISCLOSURE OF INVENTION

 An object of the present invention is to provide a novel pharmaceutical composition for inhibiting the
25 metastasis or preventing the recurrences of a malignant

tumor.

The present inventors have intensively studied, and have found that a polysaccharide derivative comprising a polysaccharide having a carboxyl group bound to an active
5 substance having an anti-tumor activity via an amino acid or a peptide exhibits an excellent effect in the inhibition of metastasis and/or prevention of recurrence of a malignant tumor, and have accomplished the present invention. That is, the present invention relates to
10 pharmaceutical composition for inhibiting the metastasis or preventing the recurrence of a malignant tumor, which comprises as the active ingredient a polysaccharide derivative comprising a polysaccharide having a carboxyl group bound to an active substance having an anti-tumor
15 activity via an amino acid or a peptide consisting of 2 to 8 amino acids which are the same or different, or a salt thereof.

BRIEF DESCRIPTION OF DRAWINGS

20 Fig 1 shows the lapsed days after implantation of tumor and the number of survived animals in M 5076 liver metastatic models.

BEST MODE FOR CARRYING OUT THE INVENTION

25 The polysaccharide having a carboxyl group of the

present invention includes the same ones as those disclosed in the above mentioned WO 94/19376 and WO 97/46260, and includes polysaccharide having originally carboxyl groups in the structure thereof (e.g., hyaluronic acid, pectic acid, alginic acid, chondroitin, heparin, etc.), and polysaccharides having originally no carboxyl group (e.g., pullulan, dextran, mannan, chitin, mannoglucan, chitosan, etc.) but being introduced thereto carboxyl groups, and polysaccharides having originally no carboxyl group in the structure thereof but being introduced thereto carboxyl groups after polyalcohol formation (e.g., polysaccharide polyalcohol having a carboxyl group).

The polysaccharide having originally no carboxyl group but being introduced thereto a carboxyl group means ones that are prepared by substituting a hydrogen atom of a part or all of hydroxyl groups of polysaccharides having originally no carboxyl group with a carboxy-C₁₋₄ alkyl group.

In the present invention, the polysaccharide having a polysaccharide includes one that are prepared by treating a polysaccharide originally having no carboxyl group with a reducing agent, and then followed by substituting a hydrogen atom of a part or all of hydroxyl groups of the resultant with a carboxy-C₁₋₄ alkyl group.

The polysaccharide polyalcohol having a carboxyl group includes, for example, a carboxy-C₁₋₄ alkyl-polysaccharide

polyalcohol which is prepared by treating a polysaccharide originally having no carboxyl group successively with sodium periodate and sodium borohydride by the method disclosed in WO 97/46260 to give a polysaccharide polyalcohol, which is further treated with a halogenated C₁₋₄ alkylcarboxylic acid.

The alkyl moiety of the carboxyl-C₁₋₄ alkyl group which substitutes a hydrogen atom of the hydroxyl groups of the above polysaccharide (including a polysaccharide polyalcohol) may be either a straight chain alkyl group or a branched chain alkyl group.

Preferable carboxy-C₁₋₄ alkyl group is, for example, carboxymethyl group, 1-carboxyethyl group, 3-carboxypropyl group, 1-methyl-3-carboxypropyl group, 2-methyl-3-carboxypropyl group, 4-carboxybutyl group, etc., and carboxymethyl group is more preferable.

In the present invention, the polysaccharide having a carboxyl group is preferably carboxy-C₁₋₄ alkyl dextran or carboxy-C₁₋₄ alkyl dextran polyalcohol, and carboxyl-C₁₋₄ alkyl dextran is especially preferable.

The degree of polyalcohol formation (by the successive oxidation with sodium periodate and reduction with sodium borohydride) in the step of preparing the carboxy-C₁₋₄ alkyl-polysaccharide polyalcohol as mentioned above is not specified, but the intermediate polysaccharide polyalcohol

is preferably one being obtained by treating a polysaccharide under possible conditions for substantially almost completely forming polyalcohol.

Moreover, in the present invention, the polysaccharide having a carboxyl group is preferably carboxymethylated dextran or carboxymethylated dextran polyalcohol, and among these polysaccharides, particularly dextran having an average molecular weight of 20,000 to 500,000 is more preferable, and dextran having an average molecular weight of 50,000 to 350,000 is most preferable (said average molecular weight being determined by Gel permeation chromatography (GPC) method, Shinseikagaku, Jikken Koza, vol. 20, p. 7, Tokyo-Kagaku-Dojin, November 5, 1991).

When introducing a carboxylalkyl group into polysaccharides, the degree of the introduction thereof is expressed by "degree of substitution" which is defined by a number of carboxylalkyl groups (including groups of peptide chain being introduced by these groups) per a sugar residue. That is expressed by the following equation.

$$\text{Degree of Substitution} = \frac{\text{Number of carboxyalkyl groups in the molecule}}{\text{Total number of sugar residues in the molecule}}$$

When the carboxylalkyl group is carboxymethyl group, the degree of substitution is occasionally expressed by the degree of carboxymethylation (CM-degree).

When the polysaccharide is dextran, the degree of substitution thereof is preferably in the range of 0.3 to 0.8. When the polysaccharide is dextran polyalcohol, the degree of substitution is preferably in the range of 0.3 to 0.5.

The amino acid or peptide of the present invention plays a role of spacer existing between a polysaccharide having a carboxyl group and an active substance having an anti-tumor activity, and the amino acid or amino acid forming said peptide includes both natural amino acids and synthetic amino acid (including D-amino acids, L-amino acids, a mixture thereof), and also includes either neutral amino acids, basic amino acids or acidic amino acids. Moreover, the amino acid of the present invention may be not only α -amino acid but also β -amino acids, γ -amino acids, ϵ -amino acids, etc.

Examples of the amino acids are glycine, α -alanine, β -alanine, valine, leucine, isoleucine, serine, threonine, cysteine, methionine, aspartic acid, glutamic acid, lysine, citrulline, arginine, phenylalanine, tyrosine, histidine, tryptophan, proline, hydroxyproline, γ -aminobutyric acid, ϵ -aminocaproic acid, etc.

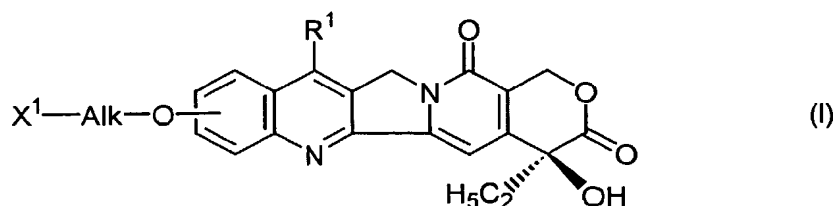
The peptide of the present invention includes ones consisting of 2 to 8 amino acids, preferably 2 to 5 amino acids, which are the same or different. Examples of the

peptides are glycyl-glycyl-L- or D-phenylalanyl-glycine, glycyl-glycine, glycyl-glycyl-glycine, glycyl-glycyl-glycyl-glycine, glycyl-glycyl-glycyl-glycyl-glycine, L- or D-phenylalanyl-glycine, L- or D-tyrosyl-glycine, L- or D-leucyl-glycine, L- or D-phenylalanyl-citrulline and L- or D-valyl-citrullin (the N-terminus of these peptides is introduced onto the carboxyl group of a polysaccharide).

Among these peptides, glycyl-glycyl-L- or D-phenylalanyl-glycine, glycyl-glycine, glycyl-glycyl-glycine, glycyl-glycyl-glycyl-glycine, glycyl-glycyl-glycyl-glycyl-glycine, and L- or D-phenylalanyl-glycine are preferable.

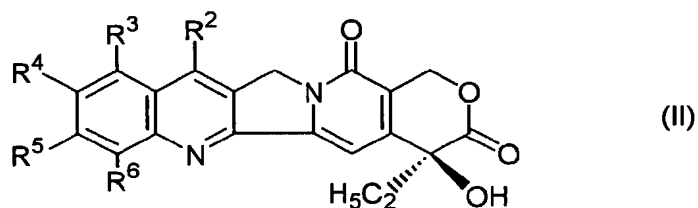
The active substance having an anti-tumor activity of the present invention may include various compounds being known as an anti-tumor agent, and may be either cytotoxic agents or cytostatic agents. The cytotoxic agent is preferably camptothecin derivatives and taxane derivatives, and the cytostatic agent is preferably angiogenesis inhibitors, EGF receptor inhibitors. More preferably, the cytotoxic agent is camptothecin derivatives, and the cytostatic agent is angiogenesis inhibitors.

Examples of camptothecin derivatives are compounds disclosed in JP-A-10-72467 of the formula (I):



wherein R¹ is a substituted or unsubstituted lower alkyl group, X¹ is a group of the formula: -NHR² (R² is a hydrogen atom or a lower alkyl group) and Alk is a straight chain or
 5 branched chain C₁₋₆ alkylene group having optionally an oxygen atom in the chain thereof. Among them, preferable compound is 10-(3'-aminopropoxy)-7-ethyl-(20S)-camptothecin.

Other examples of camptothecin derivatives are
 10 compounds disclosed in JP-A-10-95802 of the formula (II):



wherein two groups of R² to R⁶ being adjacent each other combine to form a lower alkylene group, and one of the carbon atoms of said lower alkylene group is substituted by
 15 an amino group, and the remaining three groups of R² to R⁶ are a hydrogen atom, a lower alkyl group or a halogen atom. Among them, preferable compound is (1S, 9S)-1-amino-9-ethyl-5-fluoro-2,3-dihydro-9-hydroxy-4-methyl-1H,12H-benzo[de]pyrano[3',4':6,7]indolidino[1,2-b]quinoline-

10,13(9H,15H)-dione, etc.

Examples of taxane derivatives are Taxol, Taxotere, 13-[(2'R,3'R)-3'-N-t-butyloxycarbonyl-3'-cyclopropyl]-10-deacetyl-baccatin III, etc.

5 In the active ingredient of the present invention, the ratio of the polysaccharide and the active substance having an anti-tumor activity may be selected according to the kinds of the polysaccharide to be used, but when the polysaccharide is dextran or dextran polyalcohol, then the
10 content of the active substance having an anti-tumor activity is preferable in the range of 0.1 to 20 % by weight, more preferably in the range of 2 to 10 % by weight, based on the whole weight of the active ingredient.

 Among the active ingredients of the present invention,
15 preferable ones are polysaccharide derivatives or a salt thereof wherein an amino acid or a peptide consisting of 2 to 8 amino acids which are the same or different are introduced into a part or all of the carboxyl groups of the polysaccharide having a carboxyl group through an acid-
20 amide bond, and the remaining part or all of the amino groups or carboxyl groups which do not participate in the binding to the carboxyl groups of the above peptide are bound to the carboxyl groups, amino groups or hydroxyl groups of the active substance having an anti-tumor
25 activity through an acid-amide bond or ester bond.

Especially preferable active ingredient is a polysaccharide derivative, wherein the polysaccharide having an carboxyl group is carboxymethylated dextran, the active substance having an anti-tumor activity is 10-(3'-aminopropoxy)-7-ethyl-(20S)-camptothecin, and the peptide is glycyl-glycyl-glycine, or a salt thereof. Especially preferable one is a polysaccharide derivative wherein the polysaccharide having a carboxyl group is carboxymethylated dextran having an average molecular weight of 60,000 to 200,000, and the degree of carboxymethylation thereof is in the range of 0.3 to 0.8, or a salt thereof.

Other preferable active ingredient is a polysaccharide derivative wherein the polysaccharide having a carboxyl group is a carboxy-C₁₋₄ alkyl dextran polyalcohol, the active substance having an anti-tumor activity is (1S, 9S)-1-amino-9-ethyl-5-fluoro-2,3-dihydro-9-hydroxy-4-methyl-1H,12H-benzo[de]pyrano[3',4':6,7]indolidino[1,2-b]-quinoline-10,13(9H,15H)-dione, and the peptide is glycyl-glycyl-L- or D-phenylalanyl-glycine, or a salt thereof, and especially preferable ones are a polysaccharide derivative or a salt thereof wherein the polysaccharide having a carboxyl group is carboxy-C₁₋₄ alkyl dextran polyalcohol having an average molecular weight of 200,000 to 400,000, and the degree of the substitution thereof is in the range of 0.3 to 0.5.

The polysaccharide derivative or a salt thereof of the active ingredient of the present invention may be prepared according to the methods disclosed in WO 94/19376, WO 97/46260, WO 97/38727, JP-A-10-72467, and JP-A-10-95802.

5 The pharmaceutical composition of the present invention may highly accumulate at the site such as lymph node or the liver to which cancers may spread, can release an active substance at an appropriate rate so that the active substance hardly affects on the normal cells and
10 suppressively acts on the growth of tumor cells, and hence, the pharmaceutical composition of the present invention is useful in the inhibition of metastasis or prevention of reoccurrence of a malignant tumor. Especially, the pharmaceutical composition of the present invention is
15 useful in the inhibition of lymph node metastasis or liver metastasis, particularly useful in the inhibition of lymph node metastasis. Further, among lymph node metastasis, the present pharmaceutical composition is useful in the inhibition of metastasis in lymph node from the colon, or
20 metastasis in lymph node from the lung.

 In addition, the present pharmaceutical composition may exhibit its effects not only before the onset of metastasis but also after the onset of metastasis. Therefore, the present pharmaceutical composition is also
25 useful in the inhibition of metastasis or prevention of

reoccurrence of a malignant tumor after a topical therapy (e.g., surgery, radiation therapy, thermotherapy, cryotherapy, laser burning therapy, etc.). Moreover, the present pharmaceutical composition is also suitable for
5 repetitive dosing for long time, and can be employed together with a topical therapy.

The present pharmaceutical composition is preferably administered parenterally (e.g., intravenous injection), and is usually administered in the form of a liquid
10 preparation such as solution, suspension, emulsion, etc.

The present pharmaceutical composition is preferably formulated in the form of an injection or drip infusion by using distilled water for injection, physiological saline solution, aqueous glucose solution.

15 The dosage of the present pharmaceutical composition may vary according to the administration methods, age, weight or conditions of the patients, etc., but it is usually in the range of 0.002 to 50 mg/kg, more preferably in the range of 0.01 to 5 mg/kg, in single dose, converted
20 into an amount of the active substance.

In the present specification, the lower alkyl group and the lower alkylene group may be ones having 1 to 6 carbon atoms, preferably ones having 1 to 4 carbon atoms, and the halogen atom is fluorine atom, chlorine atom,
25 bromine atom, iodine atom, etc.

EXPERIMENTS

Experiment 1 (M 5076 liver metastatic models)

One million of M 5076 cells (mouse ovarian sarcoma cells) were implanted into BDF1 male mice (5-weeks old, 8
5 animals per group) at the tail vein. A test compound
(Compound A; the compound obtained in Preparation 1 as
described below and Irinotecan (CPT-11)) was dissolved in a
physiological saline solution, and each amount as indicated
in Table 1 as mentioned below was administered
10 intravenously to the mice on the 4th, 8th and 12th day
after the implantation, and the mice were observed for 120
days after the implantation of tumor. In the control group
(untreated with test compound), only a physiological saline
solution was administered. The survival time (days) was
15 measured in both the test compound-treated groups and the
control group, and the prolongation rate of survival was
calculated according to the following equation. The
results are shown in Table 1 and Fig. 1.

$$\text{Prolongation rate of survival} = \left(\frac{\text{Survival days in the test compound-treated group}}{\text{Survival days in the control group}} - 1 \right) \times 100$$

Table 1

	Dose (mg/kg)	Survival days	Standard error	Prolon- gation rate of survival (%)
Control		15.00	1.24	-
Compound A	12.5	37.57	5.27	150.5
	25	43.13	5.98	187.5
	50	48.71	5.33	224.8
Irinotecan	80	22.50	0.5	50.0

As is shown in Table 1, the compound obtained in
Preparation 1 as mentioned below (Compound A) exhibited an
excellent activity of prolonging lifetime in M5076 liver
metastatic models. Meanwhile, Irinotecan is not known as
an agent for inhibiting the metastasis or preventing the
reoccurrence of a malignant tumor, but it was merely tested
as a drug of camptothecin derivatives.

Experiment 2 (HT-29 metastatic models)

A segment (2 mm²) of HT-29 cells (human colon cancer)
was implanted into the vermiform appendix of 100NCr nu/nu
female mice (5 to 6 weeks old, 10 animals per group). A
test compound (Compound A; the compound obtained in
Preparation 1 as mentioned below, Compound B; the compound
obtained in Preparation 4 as mentioned below, and

Irinotecan (CPT-11) was dissolved in a physiological saline solution, and each amount as indicated in Table 2 as mentioned below was administered intravenously to the mice on the 15th, 19th, 23rd and 25th day after the implantation of tumor. On the other hand, in the control group (untreated with test compound), only a physiological saline solution was administered. The presence or absence of the metastasis of each organ was checked on the 84th day after the implantation of tumor. The results are shown in the following Table 2.

WO 03/015826

PCT/JP02/08309

18

Table 2

Group	number of animals	Lymph node		Liver		Lung		Other organs***		Number of animals with metastasis	
		MI*	P**	MI*	P**	MI*	P**	MI*	P**	MI*	P**
Compound A (40 mg/kg) ****	10	0	<0.01	0	1.0	0	0.21	0	1.0	0	<0.01
Compound A (20 mg/kg) ****	10	1	<0.01	0	1.0	1	0.58	0	1.0	2	<0.01
Compound A (10 mg/kg) ****	10	8	1.0	0	1.0	2	1.0	0	1.0	8	1.0
Compound A (5 mg/kg) ****	10	6	0.3	0	1.0	1	0.58	2	1.0	6	0.30
Compound B (5 mg/kg) *****	10	0	<0.01	0	1.0	0	0.21	0	1.0	0	<0.01
Compound B (2.5 mg/kg) *****	10	6	0.30	1	1.0	1	0.58	1	1.0	6	0.3
Irinotecan (40 mg/kg)	10	7	0.58	0	1.0	1	0.58	1	1.0	7	0.58
Irinotecan (20 mg/kg)	10	9	1.0	2	1.0	2	1.0	0	1.0	9	1.0
Control	10	9	-	1	-	3	-	1	-	9	-

*: MI means Metastatic Incidence

**: P means standard derivation, where all treated groups compared to Control by Fischer exact test.

***: Including Diaphragm, Abdominal cavity and Thoracic cavity.

****: Dosage converted into 10-(3'-aminopropoxy)-7-ethyl-(20S)-camptothecin

*****: Dosage converted into (1S, 9S)-1-amino-9-ethyl-5-fluoro-2,3-dihydro-9-hydroxy-4-methyl-

1H,12H-benzo[de]pyrano[3',4':6,7]indolizino[1,2-b]quinoline-10,13(9H,15H)-dione

Experiment 3 (HT-29 metastatic models)

A segment (2 mm²) of HT-29 cells (human colon cancer) was implanted into the vermiform appendix of 100NCR nu/nu female mice (5 to 6 weeks old, 10 animals per group).

5 Since the lymph node metastasis was observed on the 49th day after the implantation of tumor, a test compound (Compound A; the compound obtained in Preparation 1 as mentioned below, and Irinotecan (CPT-11)) was dissolved in a physiological saline solution, and each amount as
10 indicated in Table 3 as mentioned below was administered intravenously to the mice on the 51st, 55th, 59th, and 63rd day after the implantation of tumor. On the other hand, in the control group (untreated with test compound), only a physiological saline solution was administered. The
15 presence or absence of the metastasis of each organ was checked on the 84th day after the implantation of tumor. The results are shown in the following Table 3.

WO 03/015826

PCT/JP02/08309

20

Table 3

Group	Number of animals	Lymph node		Liver		Lung		Other organs***		Number of animals with metastasis
		MI*	P**	MI*	P**	MI*	P**	MI*	P**	
Compound A (40 mg/kg) ****	10	0	<0.01	0	1.0	0	0.21	2	1.0	2 <0.01
Compound A (20 mg/kg) ****	10	2	<0.01	0	1.0	0	0.21	1	1.0	3 <0.01
Irinotecan (40 mg/kg)	10	8	1.0	1	1.0	0	0.21	1	1.0	8 1.0
Control	10	9	-	1	-	3	-	1	-	9 -

*: MI means Metastatic Incidence

**: P means standard derivation, where all treated groups compared to Control by Fischer exact test.

***: Including Diaphragm, Abdominal cavity and Thoracic cavity.

****: Dosage converted into 10-(3'-aminopropoxy)-7-ethyl-(20S)-camptothecin

Experiment 4 (H460 metastatic models)

A segment (2 mm²) of H460 cells (human lung cancer) was implanted into the left lung of 100NCr nu/nu female mice (5 to 6 weeks old, 10 animals per group). Since the
5 metastasis was observed on the 14th day after the implantation of tumor in another control group, a test compound (Compound A; the compound obtained in Preparation 1 as mentioned below, Compound B; the compound obtained in Preparation 4 as mentioned below, and Irinotecan (CPT-11))
10 was dissolved in a physiological saline solution, and each amount as indicated in Table 4 as mentioned below was administered intravenously to the mice on the 14th, 18th, 22nd and 26th day after the implantation of tumor. On the other hand, in the control group (untreated with test
15 compound), only a physiological saline solution was administered. The presence or absence of the metastasis of each organ was checked on the 36th day after the implantation of tumor. The results are shown in the following Table 4.

Table 4

Group	number of animals	Lymph node		Liver		Lung		Number of animals with metastasis	
		MI*	P**	MI*	P**	MI*	P**	P**	P**
Compound A (40 mg/kg) ****	10	1	<0.01	0	1.0	0	0.54	1	<0.01
Compound A (20 mg/kg) ****	10	2	0.05	0	1.0	2	0.58	3	0.245
Compound A (10 mg/kg) ****	10	1	<0.01	0	1.0	0	0.54	1	0.02
Compound A (5 mg/kg) ****	10	2	0.05	0	1.0	1	1.0	2	0.06
Compound B (5 mg/kg) ****	10	2	0.05	0	1.0	1	1.0	2	0.06
Compound B (2.5 mg/kg) ****	10	1	<0.01	0	1.0	0	0.54	1	0.02
Irinotecan (40 mg/kg)	10	0	<0.01	0	1.0	1	1.0	1	0.02
Irinotecan (80 mg/kg)	10	2	0.05	0	1.0	0	0.54	2	0.06
Control	20	13	-	0	-	2	-	12	

*: MI means Metastatic Incidence

**: P means standard derivation, where all treated groups compared to Control by Fischer exact test.

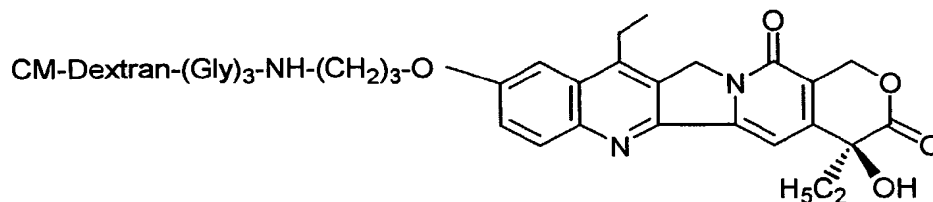
****: Dosage converted into 10-(3'-aminopropoxy)-7-ethyl-(20S)-camptothecin

*****: Dosage converted into (1S, 9S)-1-amino-9-ethyl-5-fluoro-2,3-dihydro-9-hydroxy-4-methyl-1H,12H-benzo[de]pyrano[3',4':6,7]indolidino[1,2-b]quinoline-10,13(9H,15H)-dione

PREPARATIONS

Preparation 1

Preparation of CM-dextran-7-ethyl-10-[3'-(glycyl-glycyl-glycylamino)propyloxy]-(20S)-camptothecin:



(CM-Dextran means carboxymethyldextran, hereinafter, the same)

(1) 10-(3'-Aminopropyloxy)-7-ethyl-(20S)-camptothecin hydrochloride (500 mg) was dissolved in acetonitrile (25 ml), and thereto were successively added t-butoxycarbonyl glycyl-glycyl-glycine (345 mg), N-methylmorpholine (121 mg), N-hydroxybenzotriazole (161 mg) and 1-(3-dimethylamino-propyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride (228 mg), and the mixture was stirred overnight. The precipitated product was collected by filtration, purified by silica gel column chromatography to give pale yellow foamy powder, which was recrystallized from n-propanol to give 7-ethyl-10-[3'-(t-butoxycarbonyl-glycyl-glycyl-glycylamino)propyloxy]-(20S)-camptothecin (663 mg) as colorless crystals.

M.p.: 157-159°C.

(2) 7-Ethyl-10-[3'-(t-butoxycarbonyl-glycyl-glycyl-glycylamino)propyloxy]-(20S)-camptothecin (3.86 g) was