



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I545134 B

(45)公告日：中華民國 105 (2016) 年 08 月 11 日

(21)申請案號：100138137

(22)申請日：中華民國 100 (2011) 年 10 月 20 日

(51)Int. Cl. : C07K5/027 (2006.01) A61K39/395 (2006.01)
 A61K47/48 (2006.01) A61K45/06 (2006.01)
 A61P35/00 (2006.01) A61P35/02 (2006.01)

(30)優先權：2010/10/22 美國 61/405,767
 2011/02/23 美國 61/445,785

(71)申請人：西雅圖遺傳學公司 (美國) SEATTLE GENETICS, INC. (US)
 美國

(72)發明人：路易斯 提姆帝 S LEWIS, TIMOTHY S. (US)；羅 智良 LAW, CHE-LEUNG
 (US)；邁爾雀恩 茱莉 A MCEARCHERN, JULIE A. (US)

(74)代理人：陳長文

(56)參考文獻：

WO 2009/048967A1

Johnston PB. et al., A phase II trial of the oral mTOR inhibitor everolimus in relapsed Hodgkin lymphoma, Am. J. Hematol. 85:320-324, 2010.

Jona A. et al., Novel treatment strategies for patients with relapsed classical Hodgkin lymphoma, Blood Rev. 2010 November; 24 (6): 233-238, Publish Online: September 10, 2010.

Gerber HP. et al., Potent antitumor activity of the anti-CD19 auristatin antibody drug conjugate hBU23-vcMMAE against rituximab-sensitive and -resistant lymphomas, Blood, 30 April 2009, volume 113, number 18.

審查人員：蔡付樺

申請專利範圍項數：28 項 圖式數：8 共 121 頁

(54)名稱

以奧裡斯他汀 (AURISTATIN) 為主之抗體藥物結合物及 PI3K-AKT mTOR 路徑抑制劑間的協同功效

SYNERGISTIC EFFECTS BETWEEN AURISTATIN-BASED ANTIBODY DRUG CONJUGATES AND INHIBITORS OF THE PI3K-AKT MTOR PATHWAY

(57)摘要

本發明係關於治療癌症之方法，其包含向有需要之個體投與以奧裡斯他汀 (auristatin) 為主之抗體藥物結合物及 PI3K-AKT-mTOR 路徑抑制劑。

The present invention is directed to methods for treating cancer comprising administering to a subject in need thereof an auristatin-based antibody drug conjugate and an inhibitor of the PI3K-AKT-mTOR pathway.

指定代表圖：

符號簡單說明：
(無元件符號說明)

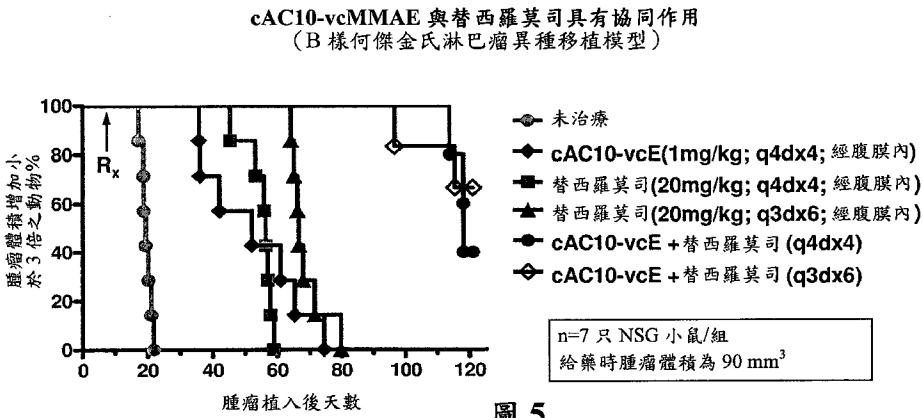


圖 5

特徵化學式：

發明專利說明書

公告本

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號：| 00138137,

C07K 5/027 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

※ 申請日：(00.10.20)

※IPC 分類：A61K 47/48 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 35/02 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

以奧裡斯他汀(AURISTATIN)為主之抗體藥物結合物及PI3K-AKT

mTOR路徑抑制劑間的協同功效

SYNERGISTIC EFFECTS BETWEEN AURISTATIN-BASED

ANTIBODY DRUG CONJUGATES AND INHIBITORS OF THE PI3K-

AKT mTOR PATHWAY

二、中文發明摘要：

本發明係關於治療癌症之方法，其包含向有需要之個體投與以奧裡斯他汀(auristatin)為主之抗體藥物結合物及PI3K-AKT-mTOR路徑抑制劑。

三、英文發明摘要：

The present invention is directed to methods for treating cancer comprising administering to a subject in need thereof an auristatin-based antibody drug conjugate and an inhibitor of the PI3K-AKT-mTOR pathway.

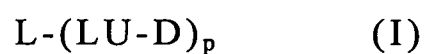
四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第 (5) 圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

(無元件符號說明)

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：



六、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本文提供醫藥組合物及其在治療癌症中之用途。特定而言，本文所述方法及組合物部分地基於以下發現，以奧裡斯他汀(auristatin)為主之抗體藥物結合物及PI3K-AKT-mTOR路徑抑制劑協同作用以殺死腫瘤細胞及/或抑制腫瘤細胞增殖。

本發明主張2010年10月22日申請之美國臨時申請案第61/405,767號及2011年2月23日申請之美國臨時申請案第61/445,785號之權益，該等案件中每一者之全部內容出於所有目的以引用方式併入本文中。

【發明內容】

本發明尤其提供治療癌症且尤其顯示PI3K-AKT-mTOR路徑上調之癌症之方法。在一個態樣中，該等方法包含向有需要之個體投與治療有效量之以奧裡斯他汀為主之藥物結合物及PI3K-AKT-mTOR路徑抑制劑之步驟。在一些實施例中，投與以奧裡斯他汀為主之藥物結合物及PI3K-AKT-mTOR路徑抑制劑在癌症治療上提供協同功效。在一些實施例中，投與以奧裡斯他汀為主之藥物結合物及PI3K-AKT-mTOR路徑抑制劑在殺死腫瘤細胞及/或抑制腫瘤細胞增殖上提供協同功效。

【實施方式】

定義及縮寫

除非另有定義，否則本文所用所有技術及科學術語皆具

有與熟習與所述方法及組合物有關之技術者所通常理解之含義相同之含義。除非另有說明，否則本文所用以下術語及片語具有賦予其之含義。

除非另有說明，否則術語「烷基」係指具有約1個至約20個碳原子(以及其中碳原子之範圍及具體數目的所有組合及次組合)之飽和直鏈或具支鏈烴，其中約1個至約8個碳原子較佳。烷基之實例係甲基、乙基、正丙基、異丙基、正丁基、異丁基、第二丁基、第三丁基、正戊基、2-戊基、3-戊基、2-甲基-2-丁基、正己基、正庚基、正辛基、正壬基、正癸基、3-甲基-2-丁基、3-甲基-1-丁基、2-甲基-1-丁基、1-己基、2-己基、3-己基、2-甲基-2-戊基、3-甲基-2-戊基、4-甲基-2-戊基、3-甲基-3-戊基、2-甲基-3-戊基、2,3-二甲基-2-丁基及3,3-二甲基-2-丁基。

無論單獨或作為另一基團之一部分，烷基皆可以「經取代」提及。經取代烷基係經一或多個基團、較佳1至3個基團(及選自鹵素之任何其他取代基)取代之烷基，該等基團包括(但不限於)-鹵素、-O-(C₁-C₈烷基)、-O-(C₂-C₈烯基)、-O-(C₂-C₈炔基)、-芳基、-C(O)R'、-OC(O)R'、-C(O)OR'、-C(O)NH₂、-C(O)NHR'、-C(O)N(R')₂、-NHC(O)R'、-SR'、-SO₃R'、-S(O)₂R'、-S(O)R'、-OH、=O、-N₃、-NH₂、-NH(R')、-N(R')₂及-CN，其中各R'獨立地選自-H、-C₁-C₈烷基、-C₂-C₈烯基、-C₂-C₈炔基或-芳基，且其中該-O-(C₁-C₈烷基)、-O-(C₂-C₈烯基)、-O-(C₂-C₈炔基)、-芳基、-C₁-C₈烷基、-C₂-C₈烯基及-C₂-C₈炔基可視情況經一或多個包括(但不限於)以

下之基團進一步取代： $-C_1-C_8$ 烷基、 $-C_2-C_8$ 烯基、 $-C_2-C_8$ 炔基、-鹵素、 $-O-(C_1-C_8$ 烷基)、 $-O-(C_2-C_8$ 烯基)、 $-O-(C_2-C_8$ 炔基)、-芳基、 $-C(O)R''$ 、 $-OC(O)R''$ 、 $-C(O)OR''$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-C(O)NHR''$ 、 $-C(O)N(R'')_2$ 、 $-NHC(O)R''$ 、 $-SR''$ 、 $-SO_3R''$ 、 $-S(O)_2R''$ 、 $-S(O)R''$ 、 $-OH$ 、 $-N_3$ 、 $-NH_2$ 、 $-NH(R'')$ 、 $-N(R'')_2$ 及 $-CN$ ，其中各 R'' 獨立地選自 $-H$ 、 $-C_1-C_8$ 烷基、 $-C_2-C_8$ 烯基、 $-C_2-C_8$ 炔基或-芳基。

除非另有說明，否則術語「烯基」及「炔基」係指具有約2個至約20個碳原子(以及其中碳原子之範圍及具體數目的所有組合及次組合)之直鏈及具支鏈碳鏈，其中約2個至約8個碳原子較佳。烯基鏈在鏈中具有至少一個雙鍵，且炔基鏈在鏈中具有至少一個三鍵。烯基之實例包括(但不限於)乙烯或乙烯基、烯丙基、-1-丁烯基、-2-丁烯基、-異丁烯基、-1-戊烯基、-2-戊烯基、-3-甲基-1-丁烯基、-2-甲基-2-丁烯基及-2,3-二甲基-2-丁烯基。炔基之實例包括(但不限於)炔屬基團(acetylenic)、炔丙基、乙炔基、丙炔基、-1-丁炔基、-2-丁炔基、-1-戊炔基、-2-戊炔基及-3-甲基-1-丁炔基。

與烷基一樣，烯基及炔基可經取代。「經取代」烯基或炔基係經一或多個基團、較佳1至3個基團(及選自鹵素之任何其他取代基)取代之烯基或炔基，該等基團包括(但不限於)-鹵素、 $-O-(C_1-C_8$ 烷基)、 $-O-(C_2-C_8$ 烯基)、 $-O-(C_2-C_8$ 炔基)、-芳基、 $-C(O)R'$ 、 $-OC(O)R'$ 、 $-C(O)OR'$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-C(O)NHR'$ 、 $-C(O)N(R')_2$ 、 $-NHC(O)R'$ 、 $-SR'$ 、 $-SO_3R'$ 、

-S(O)₂R'、-S(O)R'、-OH、=O、-N₃、-NH₂、-NH(R')、-N(R')₂及-CN，其中各R'獨立地選自-H、-C₁-C₈烷基、-C₂-C₈烯基、-C₂-C₈炔基或-芳基，且其中該-O-(C₁-C₈烷基)、-O-(C₂-C₈烯基)、-O-(C₂-C₈炔基)、-芳基、-C₁-C₈烷基、-C₂-C₈烯基及-C₂-C₈炔基可視情況經一或多個包括(但不限於)以下之取代基進一步取代：-C₁-C₈烷基、-C₂-C₈烯基、-C₂-C₈炔基、-鹵素、-O-(C₁-C₈烷基)、-O-(C₂-C₈烯基)、-O-(C₂-C₈炔基)、-芳基、-C(O)R''、-OC(O)R''、-C(O)OR''、-C(O)NH₂、-C(O)NHR''、-C(O)N(R'')₂、-NHC(O)R''、-SR''、-SO₃R''、-S(O)₂R''、-S(O)R''、-OH、-N₃、-NH₂、-NH(R'')、-N(R'')₂及-CN，其中各R''獨立地選自-H、-C₁-C₈烷基、-C₂-C₈烯基、-C₂-C₈炔基或-芳基。

除非另有說明，否則術語「伸烷基」係指如下飽和具支鏈或直鏈烴基團：具有約1個至約20個碳原子(以及其中碳原子之範圍及具體數目的所有組合及次組合)，其中約1個至約8個碳原子較佳；且具有藉由自母體烷烴之相同或兩個不同碳原子移除兩個氫原子而得到之兩個單價基團中心。典型伸烷基包括(但不限於)亞甲基、伸乙基、伸丙基、伸丁基、伸戊基、伸己基、伸庚基、伸辛基、伸壬基、伸癸基、1,4-伸環己基及諸如此類。無論單獨或作為另一基團之一部分，伸烷基可視情況經一或多個基團、較佳1至3個基團(及選自鹵素之任何其他取代基)取代，該等基團包括(但不限於)-鹵素、-O-(C₁-C₈烷基)、-O-(C₂-C₈烯基)、-O-(C₂-C₈炔基)、-芳基、-C(O)R'、-OC(O)R'、-C(O)OR'

、 $-\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NHR}'$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}')_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{R}'$ 、 $-\text{SR}'$ 、 $-\text{SO}_3\text{R}'$ 、 $-\text{S}(\text{O})_2\text{R}'$ 、 $-\text{S}(\text{O})\text{R}'$ 、 $-\text{OH}$ 、 $=\text{O}$ 、 $-\text{N}_3$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{NH}(\text{R}')$ 、 $-\text{N}(\text{R}')_2$ 及 $-\text{CN}$ ，其中各 R' 獨立地選自 $-\text{H}$ 、 $-\text{C}_1\text{-C}_8$ 烷基、 $-\text{C}_2\text{-C}_8$ 烯基、 $-\text{C}_2\text{-C}_8$ 炔基或-芳基，且其中該 $-\text{O}-(\text{C}_1\text{-C}_8\text{烷基})$ 、 $-\text{O}-(\text{C}_2\text{-C}_8\text{烯基})$ 、 $-\text{O}-(\text{C}_2\text{-C}_8\text{炔基})$ 、-芳基、 $-\text{C}_1\text{-C}_8$ 烷基、 $-\text{C}_2\text{-C}_8$ 烯基及 $-\text{C}_2\text{-C}_8$ 炔基可視情況經一或多個包括(但不限於)以下之取代基進一步取代： $-\text{C}_1\text{-C}_8$ 烷基、 $-\text{C}_2\text{-C}_8$ 烯基、 $-\text{C}_2\text{-C}_8$ 炔基、-鹵素、 $-\text{O}-(\text{C}_1\text{-C}_8\text{烷基})$ 、 $-\text{O}-(\text{C}_2\text{-C}_8\text{烯基})$ 、 $-\text{O}-(\text{C}_2\text{-C}_8\text{炔基})$ 、-芳基、 $-\text{C}(\text{O})\text{R}''$ 、 $-\text{OC}(\text{O})\text{R}''$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{OR}''$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NH}_2$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NHR}''$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{N}(\text{R}'')_2$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{R}''$ 、 $-\text{SR}''$ 、 $-\text{SO}_3\text{R}''$ 、 $-\text{S}(\text{O})_2\text{R}''$ 、 $-\text{S}(\text{O})\text{R}''$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{N}_3$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{NH}(\text{R}'')$ 、 $-\text{N}(\text{R}'')_2$ 及 $-\text{CN}$ ，其中各 R'' 獨立地選自 $-\text{H}$ 、 $-\text{C}_1\text{-C}_8$ 烷基、 $-\text{C}_2\text{-C}_8$ 烯基、 $-\text{C}_2\text{-C}_8$ 炔基或-芳基。

除非另有說明，否則術語「伸烯基」係指含有至少一個碳碳雙鍵之視情況經取代之伸烷基。實例性伸烯基包括(例如)伸乙烯基($-\text{CH}=\text{CH}-$)及伸丙烯基($-\text{CH}=\text{CHCH}_2-$)。

除非另有說明，否則術語「伸炔基」係指含有至少一個碳碳三鍵之視情況經取代之伸烷基。實例性伸炔基包括(例如)伸乙炔基($-\text{C}\equiv\text{C}-$)、炔丙基($-\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{C}-$)及4-戊炔基($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{C}\equiv\text{CH}-$)。

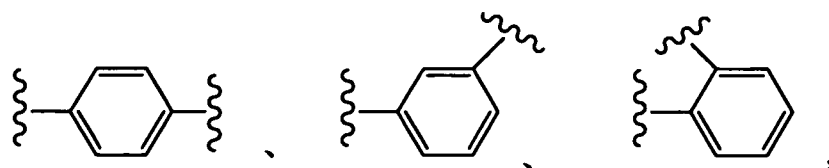
除非另有說明，否則術語「芳基」係指藉由自母體芳香族環系統之單一碳原子移除一個氫原子而得到之具有6個至20個碳原子(以及其中碳原子之範圍及具體數目的所有組合及次組合)之單價芳香族烴基團。一些芳基在實例性

結構中表示成「Ar」。典型芳基包括(但不限於)衍生自苯、經取代苯、苯基、萘、蒽、聯苯及諸如此類之基團。

無論單獨或作為另一基團之一部分，芳基可視情況經一或多個、較佳1至5個或甚至1至2個基團取代，該等基團包括(但不限於)-鹵素、 $-C_1-C_8$ 烷基、 $-C_2-C_8$ 烯基、 $-C_2-C_8$ 炔基、 $-O-(C_1-C_8$ 烷基)、 $-O-(C_2-C_8$ 烯基)、 $-O-(C_2-C_8$ 炔基)、-芳基、 $-C(O)R'$ 、 $-OC(O)R'$ 、 $-C(O)OR'$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-C(O)NHR'$ 、 $-C(O)N(R')_2$ 、 $-NHC(O)R'$ 、 $-SR'$ 、 $-SO_3R'$ 、 $-S(O)_2R'$ 、 $-S(O)R'$ 、 $-OH$ 、 $-NO_2$ 、 $-N_3$ 、 $-NH_2$ 、 $-NH(R')$ 、 $-N(R')_2$ 及 $-CN$ ，其中各 R' 獨立地選自 $-H$ 、 $-C_1-C_8$ 烷基、 $-C_2-C_8$ 烯基、 $-C_2-C_8$ 炔基或-芳基，且其中該 $-C_1-C_8$ 烷基、 $-C_2-C_8$ 烯基、 $-C_2-C_8$ 炔基、 $-O-(C_1-C_8$ 烷基)、 $-O-(C_2-C_8$ 烯基)、 $-O-(C_2-C_8$ 炔基)及-芳基可視情況經一或多個包括(但不限於)以下之取代基進一步取代： $-C_1-C_8$ 烷基、 $-C_2-C_8$ 烯基、 $-C_2-C_8$ 炔基、-鹵素、 $-O-(C_1-C_8$ 烷基)、 $-O-(C_2-C_8$ 烯基)、 $-O-(C_2-C_8$ 炔基)、-芳基、 $-C(O)R''$ 、 $-OC(O)R''$ 、 $-C(O)OR''$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-C(O)NHR''$ 、 $-C(O)N(R'')_2$ 、 $-NHC(O)R''$ 、 $-SR''$ 、 $-SO_3R''$ 、 $-S(O)_2R''$ 、 $-S(O)R''$ 、 $-OH$ 、 $-N_3$ 、 $-NH_2$ 、 $-NH(R'')$ 、 $-N(R'')_2$ 及 $-CN$ ，其中各 R'' 獨立地選自 $-H$ 、 $-C_1-C_8$ 烷基、 $-C_2-C_8$ 烯基、 $-C_2-C_8$ 炔基或-芳基。

除非另有說明，否則術語「伸芳基」係指視情況經取代之二價芳基(即，藉由自母體芳香族環系統之相同或兩個不同碳原子移除兩個氫原子而得到)，且可如以下結構中所示呈鄰位、間位或對位構型，其中以苯基作為實例性芳

基：



典型「 $-(C_1-C_8)$ 伸烷基)芳基」、「 $-(C_2-C_8)$ 伸烯基)芳基」及「 $-(C_2-C_8)$ 伸炔基)芳基」包括(但不限於)苄基、2-苯基乙烷-1-基、2-苯基乙烯-1-基、萘基甲基、2-萘基乙烷-1-基、2-萘基乙烯-1-基、萘并苄基、2-萘并苯基乙烷-1-基及諸如此類。

除非另有說明，否則術語「雜環」係指具有3至14個環原子(亦稱為環成員)且其中至少一個環中之至少一個環原子係選自N、O、P或S之雜原子(以及其中碳原子及雜原子之範圍及具體數目的所有組合及次組合)的單環狀、二環狀或多環狀環系統。該雜環可具有1至4個獨立地選自N、O、P或S之環雜原子。雜環中之一或多個N、C或S原子可經氧化。單環狀雜環較佳具有3至7個環成員(例如，2至6個碳原子及1至3個獨立地選自N、O、P或S之雜原子)，且二環狀雜環較佳具有5至10個環成員(例如，4至9個碳原子及1至3個獨立地選自N、O、P或S之雜原子)。包括雜原子之環可為芳香族或非芳香族環。除非另有說明，否則雜環可在任何雜原子或碳原子處附接至其側基，從而產生穩定結構。

雜環闡述於 Paquette，「Principles of Modern Heterocyclic Chemistry」(W.A. Benjamin, New York, 1968)，尤其第1、3、4、6、7及9章；「The Chemistry of

Heterocyclic Compounds, A series of Monographs」(John Wiley & Sons, New York, 1950年至今), 尤其第13、14、16、19及28卷; 及 *J. Am. Chem. Soc.* 82:5566 (1960)。

除非另有說明, 否則術語「雜環基」係指視情況經取代之二價(即, 藉由自母體雜環狀環系統之相同或兩個不同碳原子移除兩個氫原子而得到)的如上文所定義之雜環基團。

「雜環」基團之實例包括(例如且不加以限制)吡啶基、二氫吡啶基、四氫吡啶基(六氫吡啶基)、噻唑基、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、萘硫基、吲哚基、吲哚烯基、喹啉基、異喹啉基、苯并咪唑基、六氫吡啶基、4-六氫吡啶酮基、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、四氫吡喃基、雙-四氫吡喃基、四氫喹啉基、四氫異喹啉基、十氫喹啉基、八氫異喹啉基、氮呔基、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、吡喃基、異苯并呋喃基、苯并吡喃基、咕嗶基、啡噁噻基、2H-吡咯基、異噻唑基、異噁唑基、吡嗪基、嗒嗪基、中氮茛基、異吲哚基、3H-吲哚基、1H-吲唑基、嘌呤基、4H-喹嗪基、呋嗪基、萘啶基、喹喏啉基、喹唑啉基、呔啉基、喋啶基、4H-呋唑基、呋唑基、 β -呋啉基、啡啶基、吡啶基、嘧啶基、啡啉基、啡嗪基、啡噻嗪基、呋咕基、啡噁嗪基、異苯并二氫吡喃基、苯并二氫吡喃基、咪唑啶基、咪唑啉基、吡唑啶基、吡唑啉基、六

氫吡嗪基、二氫吲哚基、異二氫吲哚基、吡啶基、嗎啉基、噁唑啉基、苯并三唑基、苯并異噁唑基、羧吲哚基、苯并噁唑啉基及靛紅醯基(isatinoyl)。較佳「雜環」基團包括(但不限於)苯并呋喃基、苯并苯硫基、吲哚基、苯并吡唑基、香豆素基(coumarinyl)、異喹啉基、吡咯基、苯硫基、呋喃基、噻唑基、咪唑基、吡唑基、三唑基、喹啉基、嘧啶基、吡啶基、吡啶酮基、吡嗪基、嗒嗪基、異噻唑基、異噁唑基及四唑基。

無論單獨或作為另一基團之一部分，雜環基團可視情況經一或多個基團、較佳1至2個基團取代，該等基團包括(但不限於)-C₁-C₈烷基、-C₂-C₈烯基、-C₂-C₈炔基、-鹵素、-O-(C₁-C₈烷基)、-O-(C₂-C₈烯基)、-O-(C₂-C₈炔基)、-芳基、-C(O)R'、-OC(O)R'、-C(O)OR'、-C(O)NH₂、-C(O)NHR'、-C(O)N(R')₂、-NHC(O)R'、-SR'、-SO₃R'、-S(O)₂R'、-S(O)R'、-OH、-N₃、-NH₂、-NH(R')、-N(R')₂及-CN，其中各R'獨立地選自-H、-C₁-C₈烷基、-C₂-C₈烯基、-C₂-C₈炔基或-芳基，且其中該-O-(C₁-C₈烷基)、-O-(C₂-C₈烯基)、-O-(C₂-C₈炔基)、-C₁-C₈烷基、-C₂-C₈烯基、-C₂-C₈炔基及-芳基可視情況經一或多個包括(但不限於)以下之取代基進一步取代：-C₁-C₈烷基、-C₂-C₈烯基、-C₂-C₈炔基、-鹵素、-O-(C₁-C₈烷基)、-O-(C₂-C₈烯基)、-O-(C₂-C₈炔基)、-芳基、-C(O)R''、-OC(O)R''、-C(O)OR''、-C(O)NH₂、-C(O)NHR''、-C(O)N(R'')₂、-NHC(O)R''、-SR''、-SO₃R''、-S(O)₂R''、-S(O)R''、-OH、-N₃、-NH₂、

-NH(R'')、-N(R'')₂及-CN，其中各R''獨立地選自-H、-C₁-C₈烷基、-C₂-C₈烯基、-C₂-C₈炔基或芳基。

例如且不加以限制，碳鍵結之雜環可在以下位置鍵結：
吡啶之2、3、4、5或6位；嗒嗒之3、4、5或6位；嘧啶之2、4、5或6位；吡嗒之2、3、5或6位；呋喃、四氫呋喃、硫代呋喃、噻吩、吡咯或四氫吡咯之2、3、4或5位；噁唑、咪唑或噻唑之2、4或5位；異噁唑、吡唑或異噻唑之3、4或5位；氮丙啶之2或3位；氮雜環丁烷之2、3或4位；喹啉之2、3、4、5、6、7或8位；或異喹啉之1、3、4、5、6、7或8位。仍更通常地，碳鍵結之雜環包括2-吡啶基、3-吡啶基、4-吡啶基、5-吡啶基、6-吡啶基、3-嗒嗒基、4-嗒嗒基、5-嗒嗒基、6-嗒嗒基、2-嘧啶基、4-嘧啶基、5-嘧啶基、6-嘧啶基、2-吡嗒基、3-吡嗒基、5-吡嗒基、6-吡嗒基、2-噻唑基、4-噻唑基或5-噻唑基。

例如且不加以限制，氮鍵結之雜環可在以下位置鍵結：
氮丙啶、氮雜環丁烷、吡咯、吡咯啶、2-吡咯啉、3-吡咯啉、咪唑、咪唑啶、2-咪唑啉、3-咪唑啉、吡唑、吡唑啉、2-吡唑啉、3-吡唑啉、六氫吡啶、六氫吡嗒、吲哚、二氫吲哚或1H-吲哚之1位；異吲哚或異二氫吲哚之2位；嗎啉之4位；及呋唑或β-呋啉之9位。仍更通常地，氮鍵結之雜環包括1-氮丙啶基、1-氮雜環丁基、1-吡咯基、1-咪唑基、1-吡唑基及1-六氫吡啶基。

除非另有說明，否則術語「碳環」係指具有3至14個環原子(以及其中碳原子之範圍及具體數目的所有組合及次

組合)之飽和或不飽和的非芳香族單環狀、二環狀或多環狀環系統，其中所有環原子均為碳原子。單環狀碳環較佳具有3至6個環原子，仍更佳地具有5或6個環原子。二環狀碳環較佳具有7至12個環原子，例如，以二環[4,5]、[5,5]、[5,6]或[6,6]系統排列；或具有9或10個環原子，以二環[5,6]或[6,6]系統排列。術語「碳環」包括(例如)稠合至芳基環之單環狀碳環(例如，稠合至苯環之單環狀碳環)。碳環較佳具有3至8個碳環原子。

無論單獨或作為另一基團之一部分，碳環基團可視情況經例如一或多個基團、較佳1或2個基團(及選自鹵素之任何其他取代基)取代，該等基團包括(但不限於)-鹵素、 $-C_1-C_8$ 烷基、 $-C_2-C_8$ 烯基、 $-C_2-C_8$ 炔基、 $-O-(C_1-C_8$ 烷基)、 $-O-(C_2-C_8$ 烯基)、 $-O-(C_2-C_8$ 炔基)、-芳基、 $-C(O)R'$ 、 $-OC(O)R'$ 、 $-C(O)OR'$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-C(O)NHR'$ 、 $-C(O)N(R')_2$ 、 $-NHC(O)R'$ 、 $-SR'$ 、 $-SO_3R'$ 、 $-S(O)_2R'$ 、 $-S(O)R'$ 、 $-OH$ 、 $=O$ 、 $-N_3$ 、 $-NH_2$ 、 $-NH(R')$ 、 $-N(R')_2$ 及 $-CN$ ，其中各 R' 獨立地選自 $-H$ 、 $-C_1-C_8$ 烷基、 $-C_2-C_8$ 烯基、 $-C_2-C_8$ 炔基或-芳基，且其中該 $-C_1-C_8$ 烷基、 $-C_2-C_8$ 烯基、 $-C_2-C_8$ 炔基、 $-O-(C_1-C_8$ 烷基)、 $-O-(C_2-C_8$ 烯基)、 $-O-(C_2-C_8$ 炔基)及-芳基可視情況經一或多個包括(但不限於)以下之取代基進一步取代： $-C_1-C_8$ 烷基、 $-C_2-C_8$ 烯基、 $-C_2-C_8$ 炔基、-鹵素、 $-O-(C_1-C_8$ 烷基)、 $-O-(C_2-C_8$ 烯基)、 $-O-(C_2-C_8$ 炔基)、-芳基、 $-C(O)R''$ 、 $-OC(O)R''$ 、 $-C(O)OR''$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-C(O)NHR''$ 、 $-C(O)N(R'')_2$ 、 $-NHC(O)R''$ 、 $-SR''$ 、 $-SO_3R''$ 、 $-S(O)_2R''$ 、 $-S(O)R''$ 、 $-OH$ 、 $-N_3$ 、 $-NH_2$ 、 $-NH(R'')$

、 $-N(R'')_2$ 及 $-CN$ ，其中各 R'' 獨立地選自 $-H$ 、 $-C_1-C_8$ 烷基、 $-C_2-C_8$ 烯基、 $-C_2-C_8$ 炔基或-芳基。單環狀碳環取代基之實例包括-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、-環辛基、-1,3-環己二烯基、-1,4-環己二烯基、-1,3-環庚二烯基、-1,3,5-環庚三烯基及-環辛二烯基。

無論單獨或作為另一基團之一部分使用，「碳環基」係指視情況經取代之二價(即，藉由自母體碳環系統之相同或兩個不同碳原子移除兩個氫原子而得到)的如上文所定義之碳環基團。

除非上下文另有說明，否則連字號(-)表示與懸垂分子(pendant molecule)的附接點。因此，術語「 $-(C_1-C_8$ 伸烷基)芳基」或「 $-C_1-C_8$ 伸烷基(芳基)」係指如下之如本文所定義之 C_1-C_8 伸烷基：伸烷基在該伸烷基之任一碳原子處附接至懸垂分子且鍵結至該伸烷基之碳原子之一個氫原子經如本文所定義之芳基替換。

當特定基團係「經取代」時，該基團可具有一或多個取代基、較佳地1至5個取代基、更佳地1至3個取代基、最佳地1至2個取代基，該等取代基獨立地選自取代基列表。然而，該基團通常可具有任何數量之選自鹵素之取代基。經取代基團係如此簡要地說明。

分子中特定位置上任何取代基或變量之定義意欲獨立於該分子中其他地方之定義。應理解，熟習此項技術者可選

擇本文所述化合物上之取代基及取代模式，以提供化學上穩定且可藉由業內已知技術以及彼等下文所述方法容易地合成的化合物。

本文所用之保護基團係指選擇性地阻斷(暫時地或永久地)多官能團化合物中之一個反應位點的基團。適用於本文所述化合物之羥基-保護基團係醫藥上可接受的，且可能需要或可不需要在投與個體後自母體化合物裂解以使化合物具有活性。在體內經由正常的代謝過程進行裂解。羥基保護基團已為熟習此項技術者所熟知，參見，PROTECTIVE GROUPS IN ORGANIC SYNTHESIS, T. W. Greene及P. G. M. Wuts(John Wiley & sons, 第3版)，該文獻之全部內容出於所有目的以引用方式併入本文中，且包括例如醚(例如，烷基醚及甲矽烷基醚，包括例如二烷基甲矽烷基醚、三烷基甲矽烷基醚、二烷基烷氧基甲矽烷基醚)、酯、碳酸酯、胺基甲酸酯、磺酸酯及磷酸酯保護基團。羥基保護基團之實例包括(但不限於)甲基醚；甲氧基甲基醚、甲基硫代甲基醚、(苯基二甲基甲矽烷基)甲氧基甲基醚、苄基氧基甲基醚、對-甲氧基苄基氧基甲基醚、對-硝基苄基氧基甲基醚、鄰-硝基苄基氧基甲基醚、(4-甲氧基苯氧基)甲基醚、愈創木酚甲基醚、第三丁氧基甲基醚、4-戊烯基氧基甲基醚、甲矽烷氧基甲基醚、2-甲氧基乙氧基甲基醚、2,2,2-三氯乙氧基甲基醚、雙(2-氯乙氧基)甲基醚、2-(三甲基甲矽烷基)乙氧基甲基醚、甲氧基甲基醚、四氫吡喃基醚、1-甲氧基環己基醚、4-甲氧基四氫硫

代吡喃基醚、4-甲氧基四氫硫代吡喃基醚S,S-二氧化物、1-[(2-氯-4-甲基)苯基]-4-甲氧基六氫吡啶-4-基醚、1-(2-氯苯基)-4-甲氧基六氫吡啶-4-基醚、1,4-二噁烷-2-基醚、四氫呋喃基醚、四氫硫代呋喃基醚；經取代乙基醚，例如1-乙氧基乙基醚、1-(2-氯乙氧基)乙基醚、1-[2-(三甲基甲矽烷基)乙氧基]乙基醚、1-甲基-1-甲氧基乙基醚、1-甲基-1-苄基氧基乙基醚、1-甲基-1-苄基氧基-2-氯乙基醚、1-甲基-1-苯氧基乙基醚；2-三甲基甲矽烷基醚、第三丁基醚、烯丙基醚、炔丙基醚、對-氯苯基醚、對-甲氧基苯基醚、苄基醚、對-甲氧基苄基醚、3,4-二甲氧基苄基醚、三甲基甲矽烷基醚、三乙基甲矽烷基醚、三丙基甲矽烷基醚、二甲基異丙基甲矽烷基醚、二乙基異丙基甲矽烷基醚、二甲基己基甲矽烷基醚、第三丁基二甲基甲矽烷基醚、二苯基甲基甲矽烷基醚、苯甲鹽基甲酸酯、乙酸酯、氯乙酸酯、二氯乙酸酯、三氯乙酸酯、三氟乙酸酯、甲氧基乙酸酯、三苯基甲氧基乙酸酯、苯基乙酸酯、苯甲酸酯、烷基甲基碳酸酯、烷基9-芡基甲基碳酸酯、烷基乙基碳酸酯、烷基2,2,2,-三氯乙基碳酸酯、1,1-二甲基-2,2,2-三氯乙基碳酸酯、烷基磺酸酯、甲烷磺酸酯、苄基磺酸酯、甲苯磺酸酯、亞甲基縮醛、亞乙基縮醛及第三丁基亞甲基縮酮。較佳保護基團由式-R、-Si(R)(R)(R)、-C(O)R、-C(O)OR、-C(O)NH(R)、-S(O)₂R、-S(O)₂OH、P(O)(OH)₂及-P(O)(OH)OR表示，其中R係C₁-C₂₀烷基、C₂-C₂₀烯基、C₂-C₂₀炔基、-C₁-C₂₀伸烷基(碳環)、-C₂-C₂₀伸烯基(碳環)、-C₂-C₂₀

伸炔基(碳環)、-C₆-C₁₀芳基、-C₁-C₂₀伸烷基(芳基)、-C₂-C₂₀伸烯基(芳基)、-C₂-C₂₀伸炔基(芳基)、-C₁-C₂₀伸烷基(雜環)、-C₂-C₂₀伸烯基(雜環)或-C₂-C₂₀伸炔基(雜環)，其中該等烷基、烯基、炔基、伸烷基、伸烯基、伸炔基、芳基、碳環及雜環基團無論單獨或作為另一基團之一部分皆視情況經取代。

縮寫「MMAE」係指單甲基奧裡斯他汀E。

縮寫「MMAF」係指D-纈胺酸(dovaline)-纈胺酸-D,L-異白胺酸(dolaisoleuine)-D,L-脯胺酸(dolaproine)-苯丙胺酸。

本文所用縮寫「cAC10-vcE」係指vc-MMAE(亦稱作mc-vc-MMAE)抗體藥物結合物，其中該抗體係嵌合AC10抗體。在實例性實施例中，嵌合AC10抗體具有重鏈可變區，其具有SEQ ID NO:1中所述之胺基酸序列；輕鏈可變區，其具有SEQ ID NO:2中所述之胺基酸序列；人類γI恆定區，其具有SEQ ID NO:11中所述之胺基酸序列；及人類κ恆定區，其具有SEQ ID NO:12中所述之胺基酸序列。實例性cAC10-vcE組合物具有每一抗體約3至約5個藥物之平均數且該等藥物經由硫醚鍵附接至該抗體。布吐西單抗維多汀(Brentuximab vedotin)係處於臨床試驗之cAC10-vcE結合物之USAN名稱(Seattle Genetics)。

縮寫「h1F6-mcF」係指mc-MMAF抗體藥物結合物，其中該抗體係人類化1F6抗體。在實例性實施例中，h1F6抗體具有重鏈可變區，其具有SEQ ID NO:5中所述之胺基酸序列；輕鏈可變區，其具有SEQ ID NO:6中所述之胺基酸

序列；人類 γ I恆定區，其具有SEQ ID NO:11中所述之胺基酸序列；及人類 κ 恆定區，其具有SEQ ID NO:12中所述之胺基酸序列。實例性h1F6-mcF組合物具有每一抗體約3至約5個藥物之平均數且該等藥物經由硫醚鍵附接至該抗體。SGN-75係處於臨床試驗之h1F6-mcF結合物(Seattle Genetics)。

縮寫「hBU12-mcF」係指mc-MMAF抗體藥物結合物，其中該抗體係人類化BU12抗體。在實例性實施例中，hBU12抗體具有重鏈可變區，其具有SEQ ID NO:9中所述之胺基酸序列；輕鏈可變區，其具有SEQ ID NO:10中所述之胺基酸序列；人類 γ I恆定區，其具有SEQ ID NO:11中所述之胺基酸序列；及人類 κ 恆定區，其具有SEQ ID NO:12中所述之胺基酸序列。實例性hBU12-mcF組合物具有每一抗體約3至約5個藥物之平均數且該等藥物經由硫醚鍵附接至該抗體。SGN-19A係處於臨床前計劃之hBU12-mcF結合物(Seattle Genetics)。

術語「特異性接合」意指接合劑(例如抗體)將以高選擇性方式與其相應抗原反應且不與眾多其他抗原反應。

本文所用術語「抑制劑」係指具有抑制靶多肽生物功能之能力的分子。術語「選擇性抑制」或「選擇性地抑制」係指藥劑經由與靶之直接或間接相互作用優先於脫靶信號傳導活性降低靶信號傳導活性之能力。

術語「抗體」係指(a) 免疫球蛋白多肽及免疫球蛋白多肽之免疫活性部分，即免疫球蛋白家族多肽或其片段，其

含有特異性接合特定抗原之抗原接合位點；或(b)此等特異性接合抗原之免疫球蛋白多肽或片段之保守取代衍生物。抗體片段之實例包括(但不限於)Fab、Fab'、F(ab')₂、Fd、Fv、scFv及scFv-Fc片段、雙鏈抗體、三鏈抗體、四鏈抗體、直鏈抗體、單鏈抗體及自抗體片段形成之其他多特異性抗體。(參見Holliger及Hudson, 2005, Nat. Biotechnol. 23:1126-1136。)免疫球蛋白分子可為任何類型(例如, IgG、IgE、IgM、IgD、IgA及IgY)、類別(例如, IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1及IgA2)或亞類之免疫球蛋白分子。術語免疫球蛋白內包括彼等在恆定區中具有修飾之免疫球蛋白分子, 包括與Fcγ受體相互作用之胺基酸殘基中之修飾(例如, 取代、缺失或添加)。抗體概述於(例如)Harlow及Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988)中。除非上下文明確顯示, 否則在提及抗體時, 亦包括抗體衍生物。

「抗體衍生物」意指如上文所定義藉由共價附接異質分子而修飾之抗體, 例如藉由附接異質多肽、或藉由不通常與抗體及諸如此類相關之糖基化、去糖基化、乙醯基化或磷酸化。

本文所述方法及組合物中所用抗體較佳為單株, 且可為多特異性人類、人類化或嵌合抗體、單鏈抗體、Fab片段、F(ab')₂片段、藉由Fab表現文庫產生之片段及上述中任一者之接合片段, 前提為其可直接或經由連接體間接結合至奧裡斯他汀藥物。

術語「單株抗體」(mAb)係指自實質上同質抗體群獲得之抗體；亦即，包含該群之個別抗體係相同的，只是可少量存在天然突變。單株抗體具有高特異性，係針對單抗原決定簇(亦稱為表位)。修飾語「單株」表示針對相同表位之實質上同質抗體群且不應視為需要藉由任一特定方法來產生抗體。單株抗體可藉由任一業內已知技術或方法製得；例如首先闡述於Kohler等人，1975, *Nature* 256:495中之雜交瘤方法或業內已知之重組DNA方法(例如，參見美國專利第4,816,567號)。在另一實例中，亦可使用Clackson等人，1991, *Nature* 352: 624-628及Marks等人，1991, *J. Mol. Biol.* 222:581-597中所述之技術自噬菌體抗體文庫分離單株抗體。相比之下，製備多株抗體中之抗體通常為異質免疫球蛋白同種型及/或類別群且亦展現多種表位特異性。

「細胞毒性功效」在涉及藥劑對細胞之功效時，意指對細胞之殺死。「細胞生長抑制功效」意指對細胞增殖之抑制。「細胞毒性劑」意指對細胞具有細胞毒性或細胞生長抑制功效，藉此分別清除細胞群內之細胞或抑制該等細胞生長之藥劑。

出於治療目的，術語「個體」或「患者」係指任何動物、尤其歸類為哺乳動物之動物，包括人類、馴養及農場動物及動物園、運動或寵物動物，例如狗、馬、貓、母牛及諸如此類。較佳地，個體係人類。

本文所用術語「治療」及「療法」及諸如此類係延緩、

終止或逆轉個體癌症之進展。治療可藉由腫瘤生長之抑制、腫瘤生長之停滯、原有腫瘤之消退或延長之存活來證明。

術語「治療有效量」或「有效量」係指一或多種本文所述藥物或組合物足以延緩、終止或逆轉個體癌症進展或延長患者存活之量。治療有效量可係指已顯示有效(例如)延緩疾病進展之靶血清濃度。當術語「治療有效量」用於指組合療法時，其係指藥劑組合一起使得組合功效誘發期望生物或醫學反應之量。端視擬治療之病況而定，可以習用方式量測效能。舉例而言，在腫瘤性疾病中，可藉由評估至疾病進展之時間(TTP)或確定反應速率(RR)來量測效能。

本文所用術語「醫藥上可接受的」意指已獲得聯邦或州政府管理機構批准或已列於美國藥典(U.S. Pharmacopeia)或其他公認藥典中可用於動物(且更特定而言用於人類)中。術語「醫藥上相容之成份」係指與藥劑或組合物一起投與之醫藥上可接受之稀釋劑、佐劑、賦形劑或媒劑。

抗體藥物結合物

本文所述方法涵蓋抗體藥物結合物在組合療法用於殺死腫瘤細胞及/或抑制腫瘤細胞增殖之用途。本文所述方法涵蓋抗體藥物結合物在組合療法中用於癌症治療之用途。抗體-藥物結合物包含作為配體單元之抗體及作為藥物單元之奧裡斯他汀。抗體係特異性接合癌細胞表面上之癌細胞抗原之抗體。抗體藥物結合物針對表現抗體特異性接合

之癌細胞抗原之細胞具有有效細胞毒性及/或細胞生長抑制活性。藥物單元經由連接體單元(-LU-)共價連接至抗體。

在一些實施例中，抗體藥物結合物具有下式：



或其醫藥上可接受之鹽；其中：

L係配體單元且係特異性接合癌細胞表面上之癌細胞抗原之抗體，

(LU-D)係連接體單元-藥物單元部分，其中：

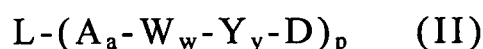
LU-係連接體單元，且

-D係針對靶細胞具有細胞生長抑制或細胞毒性活性之奧裡斯他汀藥物；且

p係1至20。

在一些實施例中，p介於1至10、1至9、1至8、1至7、1至6、1至5、1至4、1至3或1至2之間。在一些實施例中，p介於2至10、2至9、2至8、2至7、2至6、2至5、2至4或2至3之間。在其他實施例中，p係1、2、3、4、5或6。

在一些實施例中，抗體藥物結合物具有下式：



或其醫藥上可接受之鹽；

其中：

L係配體單元且係特異性接合癌細胞表面上之癌細胞抗原之抗體

-A_a-W_w-Y_y-係連接體單元(LU)，其中：

-A-係延伸體單元(Stretcher unit)，

a係0或1，

各-W-獨立地為胺基酸單元，

w係介於0至12間之整數，

-Y-係間隔體單元(例如，自脫落(self-immolative)間隔體單元)，

y係0、1或2；

-D係針對靶細胞具有細胞生長抑制或細胞毒性活性之奧裡斯他汀藥物單元；且

p係1至20。

在一些實施例中，a係0或1，w係0或1，且y係0、1或2。

在一些實施例中，a係0或1，w係0或1，且y係0或1。在一些實施例中，p介於1至10、1至9、1至8、1至7、1至6、1至5、1至4、1至3或1至2之間。在一些實施例中，p介於2至10、2至9、2至8、2至7、2至6、2至5、2至4或2至3之間。在其他實施例中，p係1、2、3、4、5或6。在一些實施例中，當w不為0時，y係1或2。在一些實施例中，當w係1至12時，y係1或2。在一些實施例中，w係2至12且y係1或2。在一些實施例中，a係1且w及y係0。

在包含複數種抗體藥物結合物之組合物中，p係每一配體之藥物分子的平均數，亦稱為平均載藥數。平均載藥數可介於每一配體1個至約20個藥物(D)之間。在一些實施例中，當p代表平均載藥數時，p係約1、約2、約3、約4、約5或約6。在較佳實施例中，當p代表平均載藥數時，p係約

2至約6或約3至約5。結合反應製備中每一配體之平均藥物數可藉由諸如質譜、ELISA分析及HPLC等習用手段來表徵。亦可測定抗體藥物結合物就p而言之定量分佈。在一些情形下，可藉由諸如反相HPLC或電泳等手段來達成p為一定值之同質抗體藥物結合物與具有其他載藥數之抗體藥物結合物的分離、純化及表徵。在實例性實施例中，p係2至約8。

抗體藥物結合物之產生可藉由熟習此項技術者所習知之任何技術來達成。簡言之，抗體藥物結合物包含作為配體單元之抗體、藥物及視情況將藥物與接合劑連接在一起之連接體。可利用諸多不同反應將藥物及/或連接體共價附接至抗體。此通常藉由使抗體分子之胺基酸殘基反應來達成，該等胺基酸殘基包括離胺酸之胺基團、麩胺酸及天冬胺酸之游離羧酸基團、半胱胺酸之巰基及芳香族胺基酸之各個部分。一種最常用之非特異性共價附接方法係實施碳化二亞胺反應以使化合物之羧基(或胺基)與抗體之胺基(或羧基)連接。另外，已使用諸如二醛或亞胺酸酯等雙官能劑來使化合物之胺基與抗體分子之胺基連接。亦可利用席夫鹼反應(Schiff base reaction)使藥物附接至接合劑。該方法涉及含有二醇或羥基之藥物的高碘酸鹽氧化，由此形成醛，其隨後與接合劑反應。經由與接合劑之胺基形成席夫鹼來進行附接。亦可使用異硫氰酸酯作為偶合劑將藥物共價附接至接合劑。其他技術為熟習此項技術者已知。

在某些實施例中，使中間體(其為連接體之前體)與藥物

在適當條件下反應。在某些實施例中，在藥物及/或中間體上使用反應基團。隨後使藥物與中間體間之反應產物(或衍生化藥物)與抗體在適當條件下反應。

連接體單元

通常，抗體藥物結合物在藥物單元與配體單元之間包含連接體區域。在一些實施例中，連接體在細胞內條件下可裂解，由此在細胞內環境中連接體裂解使得藥物單元自配體釋放。在再一些其他實施例中，連接體單元不可裂解且藉由例如抗體降解來釋放藥物。

在一些實施例中，連接體可由存在於細胞內環境中(例如，在溶酶體或核內體或胞膜窖內)之裂解劑裂解。連接體可為(例如)由包括(但不限於)溶酶體或核內體蛋白酶在內之細胞內肽酶或蛋白酶裂解之肽基連接體。在一些實施例中，肽基連接體長至少兩個胺基酸或長至少三個胺基酸。裂解劑可包括組織蛋白酶B及D及纖溶酶，已知所有此等裂解劑均使二肽藥物衍生物裂解，從而導致活性藥物在靶細胞內釋放(例如，參見Dubowchik及Walker，1999, *Pharm. Therapeutics* 83:67-123)。最典型者係可由存在於靶癌細胞中之酶裂解之肽基連接體。舉例而言，可使用可由硫醇依賴性蛋白酶組織蛋白酶-B(其於癌性組織中高度表現)裂解之肽基連接體(例如，Phe-Leu或Gly-Phe-Leu-Gly連接體)。該等連接體之其他實例闡述於(例如)美國專利第6,214,345號或美國專利第7,659,241號中，該等案件中每一者之全部內容出於所有目的以引用方式併入本文中。在一

具體實施例中，可由細胞內蛋白酶裂解之肽基連接體係Val-Cit連接體或Phe-Lys連接體(例如，參見美國專利第6,214,345號，其闡述使用val-cit連接體來合成多柔比星(doxorubicin))。利用治療劑之細胞內蛋白水解釋放之一個優點在於結合時藥劑通常經減毒且結合物之血清穩定性通常較高。

在再一些其他實施例中，連接體可在還原條件下裂解(例如，二硫化物連接體)。各種二硫化物連接體已為熟習此項技術者已知，包括(例如)彼等可使用SATA (N-琥珀醯亞胺基-S-乙醯基硫代乙酸酯)、SPDP (N-琥珀醯亞胺基-3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯)、SPDB (N-琥珀醯亞胺基-3-(2-吡啶基二硫代)丁酸酯)及SMPT (N-琥珀醯亞胺基-氧基羰基- α -甲基- α -(2-吡啶基-二硫代)甲苯)、SPDB及SMPT形成者(例如，參見Thorpe等人，1987, *Cancer Res.* 47:5924-5931；Wawrzynczak等人，In *Immunoconjugates: Antibody Conjugates in Radioimager and Therapy of Cancer*(C. W. Vogel編輯，Oxford U. Press, 1987)。亦參見美國專利第4,880,935號)。

在其他具體實施例中，連接體係丙二酸酯連接體(Johnson等人，1995, *Anticancer Res.* 15:1387-93)、馬來醯亞胺基苯甲醯基連接體(Lau等人，1995, *Bioorg-Med-Chem.* 3(10):1299-1304)或3'-N-醯胺類似物(Lau等人，1995, *Bioorg-Med-Chem.* 3(10):1305-12)。

在再一些其他實施例中，連接體單元不可裂解且藉由抗

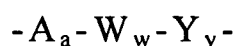
體降解來釋放藥物。(例如，參見美國專利第7,498,298號，其全部內容出於所有目的以引用方式併入本文中)。

在一個態樣中，連接體對細胞外環境實質上不敏感。在連接體情形下，本文所用之「對細胞外環境基本上不敏感」意指當抗體藥物結合物存在於細胞外環境中(例如，在血漿中)時，抗體藥物結合物試樣中不多於約20%、通常不多於約15%、更通常地不多於約10%且甚至更通常地不多於約5%、不多於約3%或不多於約1%的連接體裂解。可藉由例如將抗體藥物結合物與血漿一起培育預定時間段(例如，2、4、8、16或24小時)且隨後定量血漿中存在之游離藥物的量來確定連接體對細胞外環境是否實質上不敏感。

在其他非互斥實施例中，連接體促進細胞內化。在某些實施例中，當結合至治療劑時(即，在本文所述抗體藥物結合物之連接體-治療劑部分的背景下)，連接體促進細胞內化。在再一些其他實施例中，當結合至奧裡斯他汀化合物及抗體二者時，連接體促進細胞內化。

可用於本發明組合物及方法之實例性連接體單元、延伸體單元、胺基酸單元、自脫落間隔體單元及藥物單元之合成及結構闡述於WO 2004010957、美國公開案第20060074008號、美國公開案第20050238649號、美國公開案第20060024317號及美國公開案第20090010945號中(該等案件中每一者之全部內容出於所有目的以引用方式併入本文中)。

「連接體單元」(LU)係可用於將藥物單元與配體單元連接在一起以形成抗體藥物結合物之雙官能化合物。在一些實施例中，連接體單元具有下式：



其中：-A-係延伸體單元，

a係0或1，

各-W-獨立地為胺基酸單元，

w係介於0至12間之整數，

-Y-係間隔體單元(例如，自脫落間隔體單元)，且

y係0、1或2。

在一些實施例中，a係0或1，w係0或1，且y係0、1或2。

在一些實施例中，a係0或1，w係0或1，且y係0或1。在一些實施例中，當w係1至12時，y係1或2。在一些實施例中，w係2至12且y係1或2。在一些實施例中，a係1且w及y係0。

延伸體單元

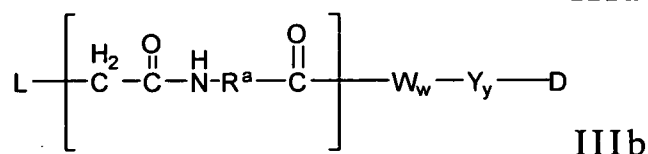
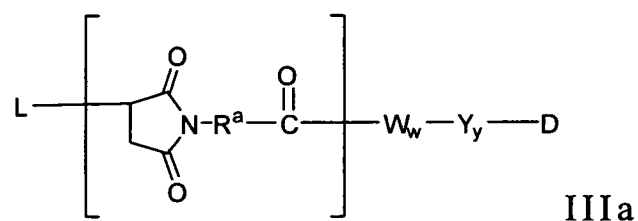
當存在時，延伸體單元(A)能夠使配體單元(例如，抗體)連接至胺基酸單元(-W-)(若存在)；連接至間隔體單元(-Y-)(若存在)；或連接至藥物單元(-D)。可天然或經由化學操作存在於抗體上之有用官能團包括(但不限於)巰基、胺基、羥基、碳水化合物之異頭羥基(anomeric hydroxyl group)、及羧基。適宜官能團係巰基及胺基。在一個實例中，巰基可藉由還原抗體之分子內二硫鍵來產生。在另一實施例中，巰基可藉由使抗體之離胺酸部分之胺基與2-亞

胺基硫啉(Traut試劑)或其他巰基產生試劑反應來產生。在某些實施例中，抗體係重組抗體，且經改造以帶有一或多個離胺酸。在某些其他實施例中，重組抗體經改造以帶有額外巰基，例如，額外半胱胺酸。

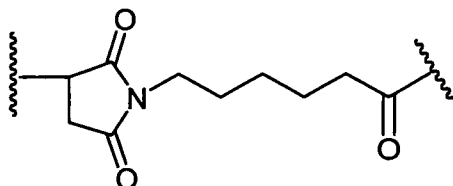
在一個實施例中，延伸體單元與配體單元之硫原子形成鍵。硫原子可衍生自配體之巰基。該實施例之代表性延伸體單元繪示於式IIIa及IIIb之方括號內，其中L-、-W-、-Y-、-D、w及y如上文所定義，且R^a選自-C₁-C₁₀伸烷基-、-C₂-C₁₀伸烯基-、-C₂-C₁₀伸炔基-、-碳環基-、-O-(C₁-C₈伸烷基)-、-O-(C₂-C₈伸烯基)-、-O-(C₂-C₈伸炔基)-、-伸芳基-、-C₁-C₁₀伸烷基-伸芳基-、-C₂-C₁₀伸烯基-伸芳基-、-C₂-C₁₀伸炔基-伸芳基-、-伸芳基-C₁-C₁₀伸烷基-、-伸芳基-C₂-C₁₀伸烯基-、-伸芳基-C₂-C₁₀伸炔基-、-C₁-C₁₀伸烷基-(碳環基)-、-C₂-C₁₀伸烯基-(碳環基)-、-C₂-C₁₀伸炔基-(碳環基)-、-(碳環基)-C₁-C₁₀伸烷基-、-(碳環基)-C₂-C₁₀伸烯基-、-(碳環基)-C₂-C₁₀伸炔基-、雜環基-、-C₁-C₁₀伸烷基-(雜環基)-、-C₂-C₁₀伸烯基-(雜環基)-、-C₂-C₁₀伸炔基-(雜環基)-、-(雜環基)-C₁-C₁₀伸烷基-、-(雜環基)-C₂-C₁₀伸烯基-、-(雜環基)-C₂-C₁₀伸炔基-、-(CH₂CH₂O)_r-或-(CH₂CH₂O)_r-CH₂-，且r係介於1至10間之整數，其中該等烷基、烯基、炔基、伸烷基、伸烯基、伸炔基、芳基、碳環、碳環基、雜環基及伸芳基無論單獨或作為另一基團之一部分皆視情況經取代。在一些實施例中，該等烷基、烯基、炔基、伸烷基、伸烯基、伸炔基、芳基、碳環、碳

環基、雜環基及伸芳基無論單獨或作為另一基團之一部分均未經取代。在一些實施例中， R^a 選自 $-C_1-C_{10}$ 伸烷基-、-碳環基-、 $-O-(C_1-C_8 \text{伸烷基})-$ 、-伸芳基-、 $-C_1-C_{10}$ 伸烷基-伸芳基-、-伸芳基- $-C_1-C_{10}$ 伸烷基-、 $-C_1-C_{10}$ 伸烷基-(碳環基)-、-(碳環基)- $-C_1-C_{10}$ 伸烷基-、 $-C_3-C_8$ 雜環基-、 $-C_1-C_{10}$ 伸烷基-(雜環基)-、-(雜環基)- $-C_1-C_{10}$ 伸烷基-、 $-(CH_2CH_2O)_r-$ 及 $-(CH_2CH_2O)_r-CH_2-$ ；且 r 係介於 1 至 10 間之整數，其中該等伸烷基未經取代且其餘基團視情況經取代。

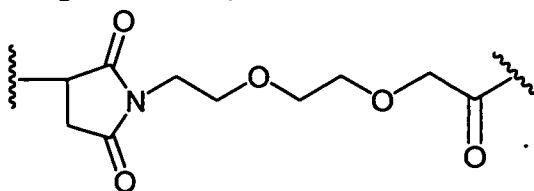
自所有實例性實施例可以瞭解到，即使未明確指出，1 至 20 個藥物部分或藥物-連接體部分可連接至配體 ($p=1-20$)。



例示性延伸體單元係具有式 IIIa 者，其中 R^a 為 $-(CH_2)_5-$ ：

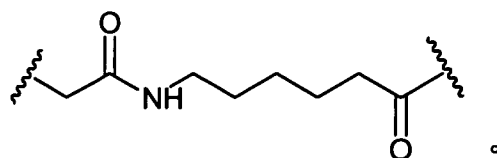


另一例示性延伸體單元係具有式 IIIa 者，其中 R^a 為 $-(CH_2CH_2O)_r-CH_2-$ ；且 r 為 2：

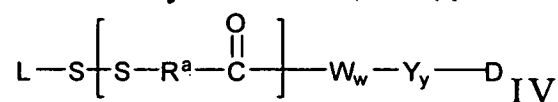


例示性延伸體單元係具有式 IIIa 者，其中 R^a 為 - 伸芳基 - 或伸芳基 - C_1 - C_{10} 伸烷基 -。在一些實施例中，芳基係未經取代之苯基。

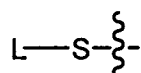
又一例示性延伸體單元係具有式 IIIb 者，其中 R^a 為 $-(CH_2)_5-$ ：



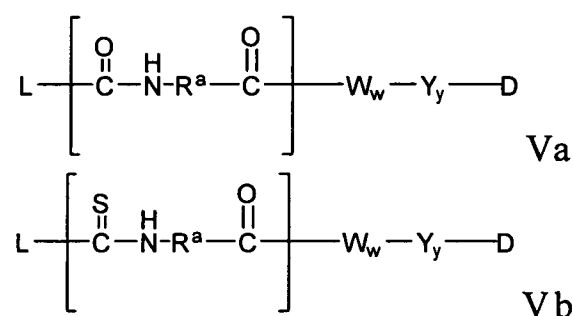
在某些實施例中，延伸體單元經由配體單元之硫原子與延伸體單元之硫原子間之二硫鍵連接至配體單元。該實施例之代表性延伸體單元繪示於式 IV 之方括號內，其中 R^a 、L-、-W-、-Y-、-D、w 及 y 如上文所定義。



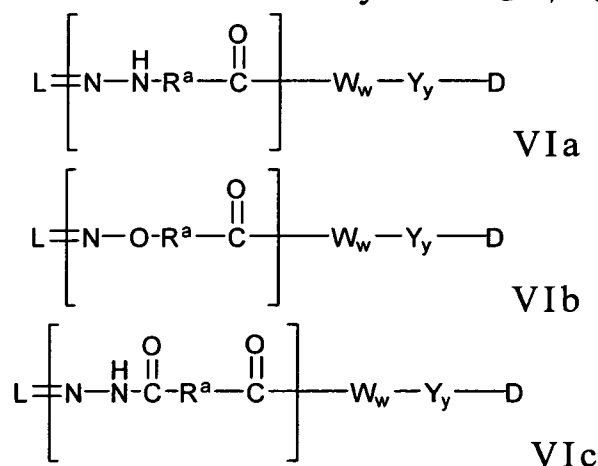
應注意，除非上下文另有說明，否則在通篇本申請案中下式中之 S 部分係指配體單元之硫原子。



在再一些其他實施例中，在附接至 L 之前，延伸體含有可與配體之一級或二級胺基形成鍵之反應位點。該等反應位點之實例包括(但不限於)活性酯，例如琥珀醯亞胺酯、4-硝基苯基酯、五氟苯基酯、四氟苯基酯、酸酐、醯氯、磺醯氯、異氰酸酯及異硫氰酸酯。該實施例之代表性延伸體單元繪示於式 Va 及 Vb 之方括號內，其中 $-R^a$ 、L-、-W-、-Y-、-D、w 及 y 如上文所定義。



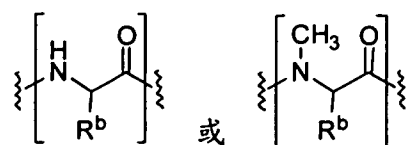
在一些實施例中，延伸體含有對可存在於配體上之經修飾碳水化合物之(-CHO)基團具有反應性的反應位點。舉例而言，可使用諸如高碘酸鈉等試劑將碳水化合物適度氧化，且可使經氧化碳水化合物之所得(-CHO)單元與含有諸如醯肼、肼、一級或二級胺、肼、硫代半卡巴肼、肼羧酸酯及芳基醯肼等官能團之延伸體(例如 Kaneko 等人，1991, *Bioconjugate Chem.* 2:133-41 闡述者)縮合。該實施例之代表性延伸體單元繪示於式 VIa、VIb 及 VIc 之方括號內，其中 -R^a-、L-、-W-、-Y-、-D、w 及 y 如上文所定義。



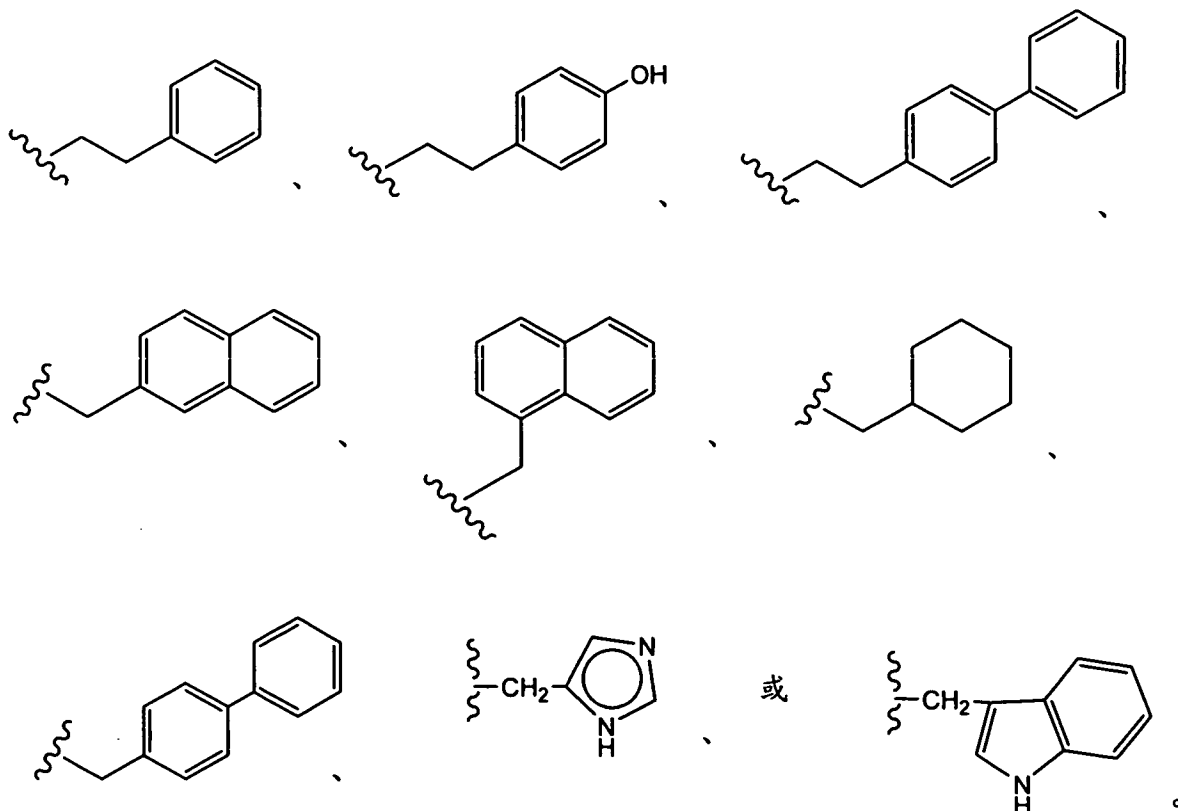
胺基酸單元

胺基酸單元(-W-)(存在時)將延伸體單元連接至間隔體單元(若存在間隔體單元)，將延伸體單元連接至藥物部分(若不存在間隔體單元)，且將配體單元連接至藥物單元(若不存在延伸體單元及間隔體單元)。

W_w -可為(例如)單肽、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。各-W-單元獨立地具有下文方括號中所示之式，且w係介於0至12間之整數：

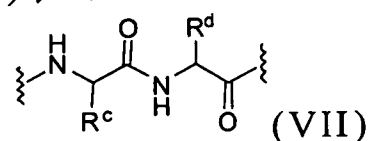


其中 R^b 係氫、甲基、異丙基、異丁基、第二丁基、苄基、對-羥基苄基、 $-\text{CH}_2\text{OH}$ 、 $-\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SCH}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{CONH}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{COOH}$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CONH}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ 、 $-(\text{CH}_2)_3\text{NHC}(=\text{NH})\text{NH}_2$ 、 $-(\text{CH}_2)_3\text{NH}_2$ 、 $-(\text{CH}_2)_3\text{NHCOCH}_3$ 、 $-(\text{CH}_2)_3\text{NHCHO}$ 、 $-(\text{CH}_2)_4\text{NHC}(=\text{NH})\text{NH}_2$ 、 $-(\text{CH}_2)_4\text{NH}_2$ 、 $-(\text{CH}_2)_4\text{NHCOCH}_3$ 、 $-(\text{CH}_2)_4\text{NHCHO}$ 、 $-(\text{CH}_2)_3\text{NHCONH}_2$ 、 $-(\text{CH}_2)_4\text{NHCONH}_2$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{NH}_2$ 、2-吡啶基甲基-、3-吡啶基甲基-、4-吡啶基甲基-、苄基、環己基、

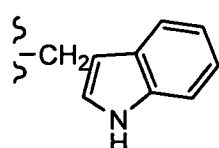


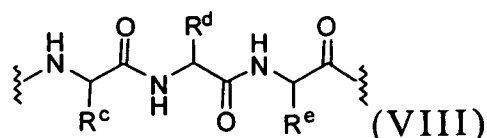
在一些實施例中，胺基酸單元可由一或多種酶(包括癌症或腫瘤相關蛋白酶)酶促裂解，以釋出藥物單元(-D)，在一個實施例中其在釋放以提供藥物(D)後於活體內被質子化。

在某些實施例中，胺基酸單元可包含天然胺基酸。在其他實施例中，胺基酸單元可包含非天然胺基酸。例示性 W_w 單元由式(VII)-(IX)表示：



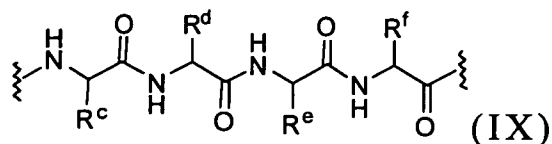
其中 R^c 及 R^d 如下：

R^c	R^d
苄基	$(CH_2)_4NH_2$ ；
甲基	$(CH_2)_4NH_2$ ；
異丙基	$(CH_2)_4NH_2$ ；
異丙基	$(CH_2)_3NHCONH_2$ ；
苄基	$(CH_2)_3NHCONH_2$ ；
異丁基	$(CH_2)_3NHCONH_2$ ；
第二丁基	$(CH_2)_3NHCONH_2$ ；
	$(CH_2)_3NHCONH_2$ ；
苄基	甲基；
苄基	$(CH_2)_3NHC(=NH)NH_2$ ；



其中 R^c 、 R^d 及 R^e 如下：

R^c	R^d	R^e
苄基	苄基	$(CH_2)_4NH_2$ ；
異丙基	苄基	$(CH_2)_4NH_2$ ；及
H	苄基	$(CH_2)_4NH_2$ ；



其中 R^c 、 R^d 、 R^e 及 R^f 如下：

R^c	R^d	R^e	R^f
H	苄基	異丁基	H；及
甲基	異丁基	甲基	異丁基。

實例性胺基酸單元包括(但不限於)其中如下之式 VII 單元： R^c 係苄基且 R^d 係 $-(CH_2)_4NH_2$ ； R^c 係異丙基且 R^d 係 $-(CH_2)_4NH_2$ ；或 R^c 係異丙基且 R^d 係 $-(CH_2)_3NHCONH_2$ 。另一實例性胺基酸單元係其中如下之式 VIII 單元： R^c 係苄基， R^d 係苄基且 R^e 係 $-(CH_2)_4NH_2$ 。

可設計有用之 $-W_w$ -單元並在由特定酶(例如，腫瘤相關蛋白酶)酶促裂解之選擇性方面進行最優化。在一個實施例中， $-W_w$ -單元係由組織蛋白酶 B、C 及 D 或纖溶酶蛋白酶催化裂解者。

在一個實施例中， $-W_w$ -係二肽、三肽、四肽或五肽。當 R^b 、 R^c 、 R^d 、 R^e 或 R^f 不為氫時，附接 R^b 、 R^c 、 R^d 、 R^e 或 R^f 之碳原子具有對掌性。

附接 R^b 、 R^c 、 R^d 、 R^e 或 R^f 之各碳原子獨立地呈 (S) 或 (R)

構型。

在胺基酸單元之一個態樣中，胺基酸單元係纈胺酸-瓜胺酸(vc或val-cit)。在另一態樣中，胺基酸單元係苯丙胺酸-離胺酸(即，fk)。在胺基酸單元之再一態樣中，胺基酸單元係N-甲基纈胺酸-瓜胺酸。在再一態樣中，胺基酸單元係5-胺基戊酸、高苯丙胺酸離胺酸、四異喹啉羧酸酯離胺酸、環己基丙胺酸離胺酸、六氫異煙酸離胺酸、 β -丙胺酸離胺酸、甘胺酸絲胺酸纈胺酸麩醯胺酸及六氫異煙酸。

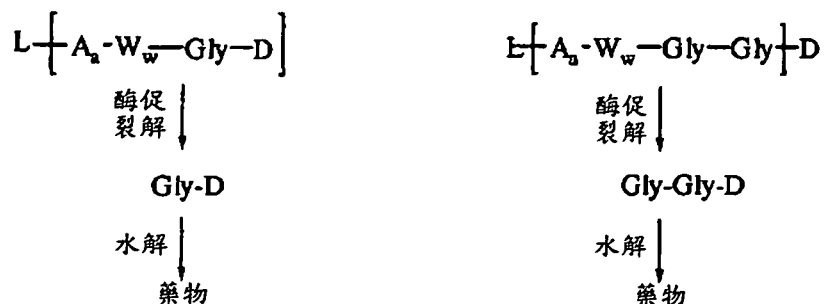
間隔體單元

當存在胺基酸單元時，間隔體單元(-Y-)(存在時)將胺基酸單元連接至藥物單元。或者，當不存在胺基酸單元時，間隔體單元將延伸體單元連接至藥物單元。當胺基酸單元與延伸體單元二者均不存在時，間隔體單元亦將藥物單元連接至配體單元。

間隔體單元具有兩種一般類型：非自脫落或自脫落。非自脫落間隔體單元係其中間隔體單元之一部分或全部在胺基酸單元自抗體藥物結合物裂解(尤其酶促裂解)後仍保持結合至藥物部分的間隔體單元。非自脫落間隔體單元之實例包括(但不限於)(甘胺酸-甘胺酸)間隔體單元及甘胺酸間隔體單元(二者均繪示於反應圖1中)(下文)。當含有甘胺酸-甘胺酸間隔體單元或甘胺酸間隔體單元之結合物經歷經由酶(例如，腫瘤細胞相關蛋白酶、癌細胞相關蛋白酶或淋巴細胞相關蛋白酶)之酶促裂解時，甘胺酸-甘胺酸-藥物部分或甘胺酸-藥物部分自L-Aa-Ww-裂解。在一個實施

例中，在靶細胞內發生獨立的水解反應，使甘胺酸-藥物部分鍵裂解並釋出藥物。

反應圖 1



在一些實施例中，非自脫落間隔體單元(-Y-)係-Gly-。
 在一些實施例中，非自脫落間隔體單元(-Y-)係-Gly-Gly-。

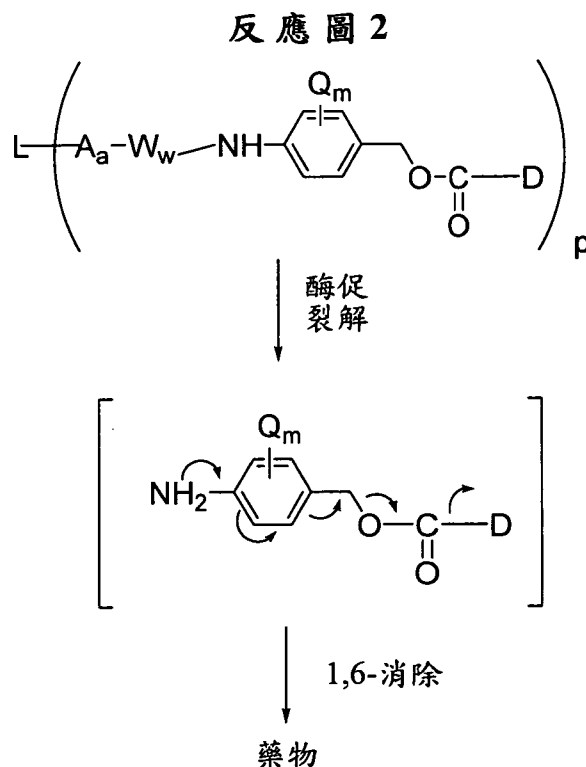
在一個實施例中，提供不存在間隔體單元(y=0)之藥物-連接體結合物或其醫藥上可接受之鹽。

或者，含有自脫落間隔體單元之結合物可釋放-D。本文所用術語「自脫落間隔體」係指能夠將兩個隔開之化學部分共價連接在一起成為穩定的由三部分組成的分子之雙官能化學部分。若其與第一部分之鍵裂解，其將自發地與第二化學部分分開。

在一些實施例中，-Y_y-係對-胺基苄基醇(PAB)單元(參見反應圖2及3)，其伸苯基部分經Q_m取代，其中Q係-C₁-C₈烷基、-C₂-C₈烯基、-C₂-C₈炔基、-O-(C₁-C₈烷基)、-O-(C₂-C₈烯基)、-O-(C₂-C₈炔基)、-鹵素、-硝基或-氰基；且m係介於0至4間之整數。烷基、烯基及炔基無論單獨或作為另一基團之一部分均可視情況經取代。

在一些實施例中，-Y-係PAB基團，其經由PAB基團之胺

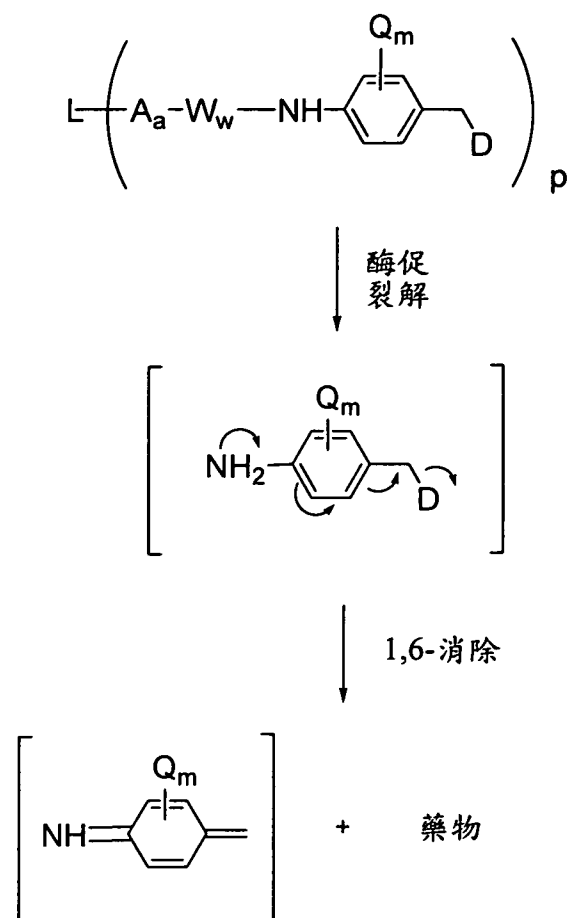
基氮原子連接至 $-W_w$ -且經由碳酸酯、胺基甲酸酯或醚基團直接連接至 $-D$ 。不欲受限於任何特定理論或機制，反應圖2繪示經由胺基甲酸酯或碳酸酯基團直接附接至 $-D$ 之PAB基團之可能的藥物釋放機制，如Toki等人，2002, *J. Org. Chem.* 67:1866-1872所述。



在反應圖2中，Q係 $-C_1-C_8$ 烷基、 $-C_2-C_8$ 烯基、 $-C_2-C_8$ 炔基、 $-O-(C_1-C_8$ 烷基)、 $-O-(C_2-C_8$ 烯基)、 $-O-(C_2-C_8$ 炔基)、-鹵素、-硝基或-氰基；m係介於0至4間之整數；且p介於1至約20之間。烷基、烯基及炔基無論單獨或作為另一基團之一部分均可視情況經取代。

不欲受限於任何特定理論或機制，反應圖3繪示經由醚或胺鍵結直接附接至 $-D$ 之PAB基團之可能的藥物釋放機制，其中D包括氧或氮基團(其為藥物單元之一部分)。

反應圖 3



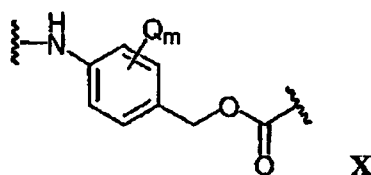
在反應圖3中，Q係-C₁-C₈烷基、-C₂-C₈烯基、-C₂-C₈炔基、-O-(C₁-C₈烷基)、-O-(C₂-C₈烯基)、-O-(C₂-C₈炔基)、-鹵素、-硝基或-氰基；m係介於0至4間之整數；且p介於1至約20之間。烷基、烯基及炔基無論單獨或作為另一基團之一部分均可視情況經取代。

自脫落間隔體之其他實例包括(但不限於)在電子學上與PAB基團類似之芳香族化合物，例如2-胺基咪唑-5-甲醇衍生物(Hay等人，1999, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 9:2237)及鄰或對-胺基苄基縮醛。可使用在醯胺鍵水解後經歷環化之間隔體，例如經取代及未經取代之4-胺基丁酸醯胺(Rodrigues等人，1995, *Chemistry Biology* 2:223)、經適當

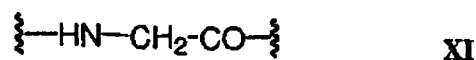
取代之二環[2.2.1]及二環[2.2.2]環系統(Storm等人, 1972, *J. Amer. Chem. Soc.* 94:5815)及2-胺基苯基丙酸醯胺(Amsberry等人, 1990, *J. Org. Chem.* 55:5867)。在甘胺酸之 α -位置經取代之含胺藥物之消去(Kingsbury等人, 1984, *J. Med. Chem.* 27:1447)亦為自脫落間隔體之實例。

在一些實施例中, -D部分相同。在再一實施例中, -D部分不同。

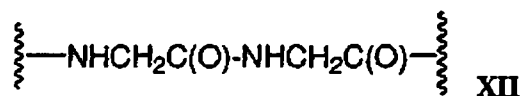
在一個態樣中, 間隔體單元(-Y_y-)由式(X)-(XII)表示:



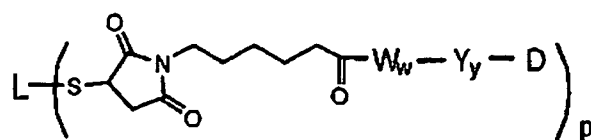
其中Q係-C₁-C₈烷基、-C₂-C₈烯基、-C₂-C₈炔基、-O-(C₁-C₈烷基)、-O-(C₂-C₈烯基)、-O-(C₂-C₈炔基)、-鹵素、-硝基或-氰基; 且m係介於0至4間之整數。烷基、烯基及炔基無論單獨或作為另一基團之一部分均可視情況經取代。



及



在所選實施例之一群組中, 式I及II之結合物係:



其中 A_a 、 W_w 、 Y_y 、 D 及 L 具有本文所提供之含義。在某些實施例中， w 及 y 各自為0、1或2(較佳當 w 係1或2時， y 係1或2)。

藥物單元

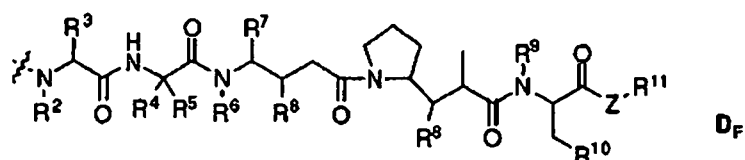
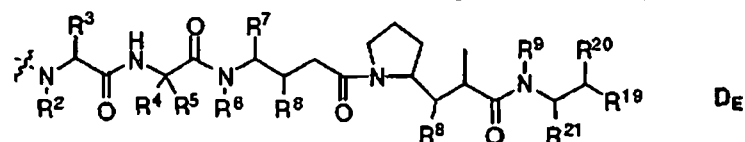
抗體藥物接合物之藥物單元係奧裡斯他汀，例如奧裡斯他汀E(業內亦稱為多拉斯他汀-10 (dolastatin-10)之衍生物)或其衍生物。奧裡斯他汀可為(例如)由奧裡斯他汀E與酮酸之間形成之酯。舉例而言，可使奧裡斯他汀E與對乙醯基苯甲酸或苯甲醯基戊酸反應以分別產生AEB及AEVB。其他典型奧裡斯他汀包括AFP、MMAF及MMAE。實例性奧裡斯他汀之合成及結構闡述於美國專利申請公開案第2003-0083263號、第2005-0238649號及第2005-0009751號；國際專利公開案第WO 04/010957號、國際專利公開案第WO 02/088172號及美國專利第6,323,315號；第6,239,104號；第6,034,065號；第5,780,588號；第5,665,860號；第5,663,149號；第5,635,483號；第5,599,902號；第5,554,725號；第5,530,097號；第5,521,284號；第5,504,191號；第5,410,024號；第5,138,036號；第5,076,973號；第4,986,988號；第4,978,744號；第4,879,278號；第4,816,444號；及第4,486,414號中，各文件之全部內容出於所有目的以引用方式併入本文中。

已顯示奧裡斯他汀會干擾微管動力學及核及細胞分裂，且具有抗癌活性。本發明之奧裡斯他汀接合微管蛋白，且

可對期望細胞系施加細胞毒性或細胞生長抑制功效。業內已知諸多可用於確定奧裡斯他汀或所得抗體-藥物結合物是否對期望細胞系施加細胞生長抑制或細胞毒性功效之不同分析。

用於確定化合物是否接合微管蛋白之方法為業內已知。例如，參見 Muller 等人，*Anal. Chem* 2006, 78, 4390-4397；Hamel 等人，*Molecular Pharmacology*, 1995 47: 965-976；及 Hamel 等人，*The Journal of Biological Chemistry*, 1990 265:28, 17141-17149。出於本發明目的，可確定化合物與微管蛋白之相對親和性。本發明之一些較佳奧裡斯他汀結合微管蛋白之親和性介於 MMAE 對微管蛋白之結合親和性之 1/10 (較弱親和性) 至 MMAE 對微管蛋白之結合親和性之 10 倍、20 倍或甚至 100 倍 (較高親和性) 範圍內。

在一些實施例中，-D 係式 D_E 或 D_F 之奧裡斯他汀：



或其醫藥上可接受之鹽形式；其中，在每一位置上獨立地：

波形線表示鍵；

R^2 係 $-C_1-C_{20}$ 烷基、 $-C_2-C_{20}$ 烯基或 $-C_2-C_{20}$ 炔基；

R^3 係 $-H$ 、 $-C_1-C_{20}$ 烷基、 $-C_2-C_{20}$ 烯基、 $-C_2-C_{20}$ 炔基、碳環、 $-C_1-C_{20}$ 伸烷基(碳環)、 $-C_2-C_{20}$ 伸烯基(碳環)、 $-C_2-C_{20}$ 伸炔基(碳環)、 $-$ 芳基、 $-C_1-C_{20}$ 伸烷基(芳基)、 $-C_2-C_{20}$ 伸烯基(芳基)、 $-C_2-C_{20}$ 伸炔基(芳基)、 $-$ 雜環、 $-C_1-C_{20}$ 伸烷基(雜環)、 $-C_2-C_{20}$ 伸烯基(雜環)或 $-C_2-C_{20}$ 伸炔基(雜環)；

R^4 係 $-H$ 、 $-C_1-C_{20}$ 烷基、 $-C_2-C_{20}$ 烯基、 $-C_2-C_{20}$ 炔基、碳環、 $-C_1-C_{20}$ 伸烷基(碳環)、 $-C_2-C_{20}$ 伸烯基(碳環)、 $-C_2-C_{20}$ 伸炔基(碳環)、 $-$ 芳基、 $-C_1-C_{20}$ 伸烷基(芳基)、 $-C_2-C_{20}$ 伸烯基(芳基)、 $-C_2-C_{20}$ 伸炔基(芳基)、 $-$ 雜環、 $-C_1-C_{20}$ 伸烷基(雜環)、 $-C_2-C_{20}$ 伸烯基(雜環)或 $-C_2-C_{20}$ 伸炔基(雜環)；

R^5 係 $-H$ 或 $-C_1-C_8$ 烷基；

或者 R^4 與 R^5 一起形成碳環且具有式 $-(CR^aR^b)_s-$ ，其中 R^a 及 R^b 獨立地為 $-H$ 、 $-C_1-C_{20}$ 烷基、 $-C_2-C_{20}$ 烯基、 $-C_2-C_{20}$ 炔基或 $-$ 碳環，且 s 係 2、3、4、5 或 6，

R^6 係 $-H$ 、 $-C_1-C_{20}$ 烷基、 $-C_2-C_{20}$ 烯基或 $-C_2-C_{20}$ 炔基；

R^7 係 $-H$ 、 $-C_1-C_{20}$ 烷基、 $-C_2-C_{20}$ 烯基、 $-C_2-C_{20}$ 炔基、 $-$ 碳環、 $-C_1-C_{20}$ 伸烷基(碳環)、 $-C_2-C_{20}$ 伸烯基(碳環)、 $-C_2-C_{20}$ 伸炔基(碳環)、 $-$ 芳基、 $-C_1-C_{20}$ 伸烷基(芳基)、 $-C_2-C_{20}$ 伸烯基(芳基)、 $-C_2-C_{20}$ 伸炔基(芳基)、 $-$ 雜環、 $-C_1-C_{20}$ 伸烷基(雜環)、 $-C_2-C_{20}$ 伸烯基(雜環)或 $-C_2-C_{20}$ 伸炔基(雜環)；

各 R^8 獨立地為 $-H$ 、 $-OH$ 、 $-C_1-C_{20}$ 烷基、 $-C_2-C_{20}$ 烯基、 $-C_2-C_{20}$ 炔基、 $-O-(C_1-C_{20}$ 烷基)、 $-O-(C_2-C_{20}$ 烯基)、 $-O-(C_1-C_{20}$ 炔基) 或 -碳環；

R^9 係 $-H$ 、 $-C_1-C_{20}$ 烷基、 $-C_2-C_{20}$ 烯基或 $-C_2-C_{20}$ 炔基；

R^{19} 係 -芳基、-雜環或 -碳環；

R^{20} 係 $-H$ 、 $-C_1-C_{20}$ 烷基、 $-C_2-C_{20}$ 烯基、 $-C_2-C_{20}$ 炔基、-碳環、 $-O-(C_1-C_{20}$ 烷基)、 $-O-(C_2-C_{20}$ 烯基)、 $-O-(C_2-C_{20}$ 炔基) 或 OR^{18} ，其中 R^{18} 係 $-H$ 、羥基保護基團，或在 OR^{18} 表示 $=O$ 之情形下係直接鍵；

R^{21} 係 $-H$ 、 $-C_1-C_{20}$ 烷基、 $-C_2-C_{20}$ 烯基或 $-C_2-C_{20}$ 炔基、-芳基、-雜環或 -碳環；

R^{10} 係 -芳基或 -雜環；

Z 係 $-O-$ 、 $-S-$ 、 $-NH-$ 或 $-NR^{12}-$ ，其中 R^{12} 係 $-C_1-C_{20}$ 烷基、 $-C_2-C_{20}$ 烯基或 $-C_2-C_{20}$ 炔基；

R^{11} 係 $-H$ 、 $-C_1-C_{20}$ 烷基、 $-C_2-C_{20}$ 烯基、 $-C_2-C_{20}$ 炔基、-芳基、-雜環、 $-(R^{13}O)_m-R^{14}$ 或 $-(R^{13}O)_m-CH(R^{15})_2$ ；

m 係介於 0 至 1000 間之整數；

R^{13} 係 $-C_2-C_{20}$ 伸烷基、 $-C_2-C_{20}$ 伸烯基或 $-C_2-C_{20}$ 伸炔基；

R^{14} 係 $-H$ 、 $-C_1-C_{20}$ 烷基、 $-C_2-C_{20}$ 烯基或 $-C_2-C_{20}$ 炔基；

R^{15} 在每次出現時獨立地為 $-H$ 、 $-COOH$ 、 $-(CH_2)_n-N(R^{16})_2$ 、 $-(CH_2)_n-SO_3H$ 、 $-(CH_2)_n-SO_3-C_1-C_{20}$ 烷基、 $-(CH_2)_n-SO_3-C_2-C_{20}$ 烯基或 $-(CH_2)_n-SO_3-C_2-C_{20}$ 炔基；

R^{16} 在每次出現時獨立地為 $-H$ 、 $-C_1-C_{20}$ 烷基、 $-C_2-C_{20}$ 烯基、 $-C_2-C_{20}$ 炔基或 $-(CH_2)_n-COOH$ ；且

n 係介於 0 至 6 間之整數；其中該等烷基、烯基、炔基、伸烷基、伸烯基、伸炔基、芳基、碳環及雜環基團無論單獨或作為另一基團之一部分皆視情況經取代。

式 D_E 之奧裡斯他汀包括該等烷基、烯基、炔基、伸烷基、伸烯基、伸炔基、芳基、碳環及雜環基團未經取代者。

式 D_E 之奧裡斯他汀包括 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 及 R^9 基團未經取代且 R^{19} 、 R^{20} 及 R^{21} 基團視情況如本文所述經取代者。

式 D_E 之奧裡斯他汀包括如下者：

R^2 係 $-C_1-C_8$ 烷基；

R^3 、 R^4 及 R^7 獨立地選自 $-H$ 、 $-C_1-C_{20}$ 烷基、 $-C_2-C_{20}$ 烯基、 $-C_2-C_{20}$ 炔基、單環狀 C_3-C_6 碳環、 $-C_1-C_{20}$ 伸烷基(單環狀 C_3-C_6 碳環)、 $-C_2-C_{20}$ 伸烯基(單環狀 C_3-C_6 碳環)、 $-C_2-C_{20}$ 伸炔基(單環狀 C_3-C_6 碳環)、 $-C_6-C_{10}$ 芳基、 $-C_1-C_{20}$ 伸烷基(C_6-C_{10} 芳基)、 $-C_2-C_{20}$ 伸烯基(C_6-C_{10} 芳基)、 $-C_2-C_{20}$ 伸炔基(C_6-C_{10} 芳基)、 $-$ 雜環、 $-C_1-C_{20}$ 伸烷基(雜環)、 $-C_2-C_{20}$ 伸烯基(雜環)或 $-C_2-C_{20}$ 伸炔基(雜環)；其中該等烷基、烯基、炔基、伸烷基、伸烯基、伸炔基、碳環、芳基及雜環基團視情況經取代；

R^5 係 $-$ 氫；

R^6 係 $-C_1-C_8$ 烷基；

各 R^8 獨立地選自 $-OH$ 、 $-O-(C_1-C_{20} \text{ 烷基})$ 、 $-O-(C_2-C_{20} \text{ 烯基})$ 或 $-O-(C_2-C_{20} \text{ 炔基})$ ，其中該等烷基、烯基及炔基視情況

經取代；

R^9 係 -氫或 $-C_1-C_8$ 烷基；

R^{19} 係視情況經取代之苯基；

R^{20} 係 OR^{18} ；其中 R^{18} 係 H、羥基保護基團，或在 OR^{18} 表示 $=O$ 之情形下係直接鍵；

R^{21} 選自 $-H$ 、 $-C_1-C_{20}$ 烷基、 $-C_2-C_{20}$ 烯基、 $-C_2-C_{20}$ 炔基或 -碳環；其中該等烷基、烯基、炔基及碳環基團視情況經取代；或其醫藥上可接受之鹽形式。

式 D_E 之奧裡斯他汀包括如下者：

R^2 係甲基；

R^3 係 $-H$ 、 $-C_1-C_8$ 烷基、 $-C_2-C_8$ 烯基或 $-C_2-C_8$ 炔基，其中該等烷基、烯基及炔基視情況經取代；

R^4 係 $-H$ 、 $-C_1-C_8$ 烷基、 $-C_2-C_8$ 烯基、 $-C_2-C_8$ 炔基、單環狀 C_3-C_6 碳環、 $-C_6-C_{10}$ 芳基、 $-C_1-C_8$ 伸烷基 (C_6-C_{10} 芳基)、 $-C_2-C_8$ 伸烯基 (C_6-C_{10} 芳基)、 $-C_2-C_8$ 伸炔基 (C_6-C_{10} 芳基)、 $-C_1-C_8$ 伸烷基 (單環狀 C_3-C_6 碳環)、 $-C_2-C_8$ 伸烯基 (單環狀 C_3-C_6 碳環)、 $-C_2-C_8$ 伸炔基 (單環狀 C_3-C_6 碳環)；其中該等烷基、烯基、炔基、伸烷基、伸烯基、伸炔基、芳基及碳環基團無論單獨或作為另一基團之一部分皆視情況經取代；

R^5 係 H； R^6 係甲基；

R^7 係 $-C_1-C_8$ 烷基、 $-C_2-C_8$ 烯基或 $-C_2-C_8$ 炔基；

各 R^8 係甲氧基；

R^9 係 -氫或 $-C_1-C_8$ 烷基；

R^{19} 係苯基；

R^{20} 係 OR^{18} ；其中 R^{18} 係 -H、羥基保護基團，或在 OR^{18} 表示 =O 之情形下係直接鍵；

R^{21} 係甲基；或其醫藥上可接受之鹽形式。

式 D_E 之奧裡斯他汀包括如下者：

R^2 係甲基； R^3 係 H 或 C_1-C_3 烷基； R^4 係 C_1-C_5 烷基； R^5 係 H； R^6 係甲基； R^7 係異丙基或第二丁基； R^8 係甲氧基； R^9 係氫或 C_1-C_8 烷基； R^{19} 係苯基； R^{20} 係 OR^{18} ；其中 R^{18} 係 H、羥基保護基團，或在 OR^{18} 表示 =O 之情形下係直接鍵；且 R^{21} 係甲基；或其醫藥上可接受之鹽形式。

式 D_E 之奧裡斯他汀包括如下者：

R^2 係甲基或 C_1-C_3 烷基； R^3 係 H 或 C_1-C_3 烷基； R^4 係 C_1-C_5 烷基； R^5 係 H； R^6 係 C_1-C_3 烷基； R^7 係 C_1-C_5 烷基； R^8 係 C_1-C_3 烷氧基； R^9 係氫或 C_1-C_8 烷基； R^{19} 係苯基； R^{20} 係 OR^{18} ；其中 R^{18} 係 H、羥基保護基團，或在 OR^{18} 表示 =O 之情形下係直接鍵；且 R^{21} 係 C_1-C_3 烷基；或其醫藥上可接受之鹽形式。

式 D_F 之奧裡斯他汀包括如下者：

R^2 係甲基；

R^3 、 R^4 及 R^7 獨立地選自 -H、 $-C_1-C_{20}$ 烷基、 $-C_2-C_{20}$ 烯基、 $-C_2-C_{20}$ 炔基、單環狀 C_3-C_6 碳環、 $-C_1-C_{20}$ 伸烷基(單環狀 C_3-C_6 碳環)、 $-C_2-C_{20}$ 伸烯基(單環狀 C_3-C_6 碳環)、 $-C_2-C_{20}$ 伸炔基(單環狀 C_3-C_6 碳環)、 $-C_6-C_{10}$ 芳基、 $-C_1-C_{20}$ 伸烷基(C_6-C_{10} 芳基)、 $-C_2-C_{20}$ 伸烯基(C_6-C_{10} 芳基)、 $-C_2-C_{20}$ 伸炔基

(C₆-C₁₀芳基)、-雜環、-C₁-C₂₀伸烷基(雜環)、-C₂-C₂₀伸烯基(雜環)或-C₂-C₂₀伸炔基(雜環)；其中該等烷基、烯基、炔基、伸烷基、伸烯基、伸炔基、碳環、芳基及雜環基團無論單獨或作為另一基團之一部分皆視情況經取代；

R⁵係-H；

R⁶係甲基；

各R⁸係甲氧基；

R⁹係-H、-C₁-C₂₀烷基、-C₂-C₂₀烯基或-C₂-C₂₀炔基；其中該等烷基、烯基及炔基視情況經取代；

R¹⁰係視情況經取代之芳基或視情況經取代之雜環；

Z係-O-、-S-、-NH-或-NR¹²-，其中R¹²係-C₁-C₂₀烷基、-C₂-C₂₀烯基或-C₂-C₂₀炔基，其各自視情況經取代；

R¹¹係-H、-C₁-C₂₀烷基、-C₂-C₂₀烯基、-C₂-C₂₀炔基、-芳基、-雜環、-(R¹³O)_m-R¹⁴或-(R¹³O)_m-CH(R¹⁵)₂，其中該等烷基、烯基、炔基、芳基及雜環基團視情況經取代；

m係介於0至1000間之整數；

R¹³係-C₂-C₂₀伸烷基、-C₂-C₂₀伸烯基或-C₂-C₂₀伸炔基，其各自視情況經取代；

R¹⁴係-H、-C₁-C₂₀烷基、-C₂-C₂₀烯基或-C₂-C₂₀炔基，其中該等烷基、烯基及炔基視情況經取代；

R¹⁵在每次出現時獨立地為-H、-COOH、-(CH₂)_n-N(R¹⁶)₂、-(CH₂)_n-SO₃H、-(CH₂)_n-SO₃-C₁-C₂₀烷基、-(CH₂)_n-SO₃-C₂-C₂₀烯基或-(CH₂)_n-SO₃-C₂-C₂₀炔基，其中該等烷基、烯基及炔基視情況經取代；

R^{16} 在每次出現時獨立地為 $-H$ 、 $-C_1-C_{20}$ 烷基、 $-C_2-C_{20}$ 烯基、 $-C_2-C_{20}$ 炔基或 $-(CH_2)_n-COOH$ ，其中該等烷基、烯基及炔基視情況經取代；

n 係介於0至6間之整數；或其醫藥上可接受之鹽形式。

在某些該等實施例中， R^{10} 係視情況經取代之苯基；

式 D_F 之奧裡斯他汀包括 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^8 及 R^9 基團未經取代且 R^{10} 及 R^{11} 基團如本文所述者。

式 D_F 之奧裡斯他汀包括該等烷基、烯基、炔基、伸烷基、伸烯基、伸炔基、芳基、碳環及雜環基團未經取代者。

式 D_F 之奧裡斯他汀包括如下者：

R^2 係 C_1-C_3 烷基； R^3 係 H 或 C_1-C_3 烷基； R^4 係 C_1-C_5 烷基； R^5 係 H ； R^6 係 C_1-C_3 烷基； R^7 係 C_1-C_5 烷基； R^8 係 C_1-C_3 烷氧基； R^9 係氫或 C_1-C_8 烷基；

R^{10} 係視情況經取代之苯基； Z 係 O 、 S 或 NH ；且 R^{11} 如本文所定義；或其醫藥上可接受之鹽形式。

式 D_F 之奧裡斯他汀包括如下者：

R^2 係甲基； R^3 係 H 或 C_1-C_3 烷基； R^4 係 C_1-C_5 烷基； R^5 係 H ； R^6 係甲基； R^7 係異丙基或第二丁基； R^8 係甲氧基； R^9 係氫或 C_1-C_8 烷基；

R^{10} 係視情況經取代之苯基； Z 係 O 、 S 或 NH ；且 R^{11} 如本文所定義；或其醫藥上可接受之鹽形式。

式 D_F 之奧裡斯他汀包括如下者：

R^2 係甲基； R^3 係 H 或 C_1-C_3 烷基； R^4 係 C_1-C_5 烷基； R^5 係

H； R^6 係甲基； R^7 係異丙基或第二丁基； R^8 係甲氧基； R^9 係氫或 C_1 - C_8 烷基； R^{10} 係苯基；且Z係O或NH且 R^{11} 如本文所定義，較佳為氫；或其醫藥上可接受之鹽形式。

式 D_F 之奧裡斯他汀包括如下者：

R^2 係 C_1 - C_3 烷基； R^3 係H或 C_1 - C_3 烷基； R^4 係 C_1 - C_5 烷基； R^5 係H； R^6 係 C_1 - C_3 烷基； R^7 係 C_1 - C_5 烷基； R^8 係 C_1 - C_3 烷氧基； R^9 係氫或 C_1 - C_8 烷基；

R^{10} 係苯基；且Z係O或NH且 R^{11} 係如本文所定義，較佳為氫；或其醫藥上可接受之鹽形式。

式 D_E 或 D_F 之奧裡斯他汀包括如下者： R^3 、 R^4 及 R^7 獨立地為異丙基或第二丁基且 R^5 係-H。在一實例性實施例中， R^3 及 R^4 各自為異丙基， R^5 係H，且 R^7 係第二丁基。其餘取代基如本文所定義。

式 D_E 或 D_F 之奧裡斯他汀包括如下者： R^2 及 R^6 各自為甲基，且 R^9 係H。其餘取代基如本文所定義。

式 D_E 或 D_F 之奧裡斯他汀包括 R^8 在每次出現時為 $-OCH_3$ 者。其餘取代基如本文所定義。

式 D_E 或 D_F 之奧裡斯他汀包括如下者： R^3 及 R^4 各自為異丙基， R^2 及 R^6 各自為甲基， R^5 係H， R^7 係第二丁基， R^8 在每次出現時為 $-OCH_3$ ，且 R^9 係H。其餘取代基如本文所定義。

式 D_F 之奧裡斯他汀包括Z係-O-或-NH-者。其餘取代基如本文所定義。

式 D_F 之奧裡斯他汀包括 R^{10} 係芳基者。其餘取代基如本

文所定義。

式D_F之奧裡斯他汀包括R¹⁰係-苯基者。其餘取代基如本文所定義。

式D_F之奧裡斯他汀包括Z係-O-且R¹¹係H、甲基或第三丁基者。其餘取代基如本文所定義。

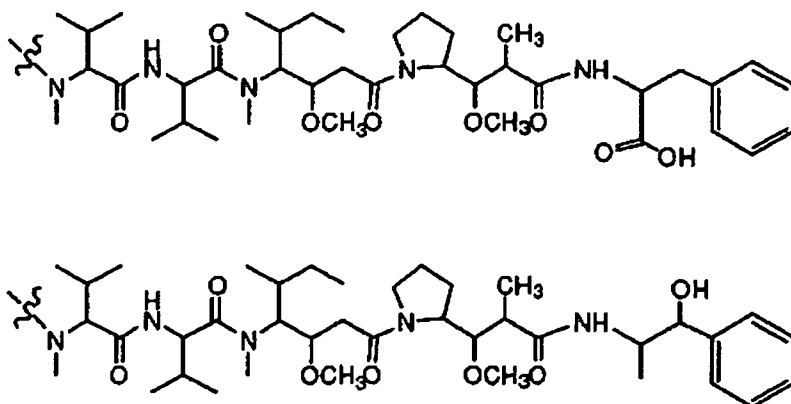
式D_F之奧裡斯他汀包括如下者：當Z係-NH時，R¹¹係-(R¹³O)_m-CH(R¹⁵)₂，其中R¹⁵係-(CH₂)_n-N(R¹⁶)₂，且R¹⁶係-C₁-C₈烷基或-(CH₂)_n-COOH。其餘取代基如本文所定義。

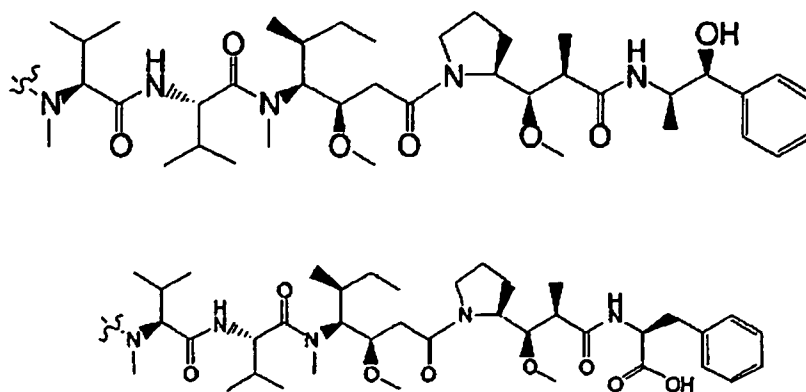
式D_F之奧裡斯他汀包括如下者：當Z係-NH時，R¹¹係-(R¹³O)_m-CH(R¹⁵)₂，其中R¹⁵係H或-(CH₂)_n-SO₃H。其餘取代基如本文所定義。

在較佳實施例中，當D係式D_E之奧裡斯他汀時，w係介於1至12、較佳2至12間之整數，y係1或2，且a係1或2，較佳為1。

在一些實施例中，當D係式D_F之奧裡斯他汀時，a係1且w及y係0。

例示性藥物單元(-D)包括具有以下結構之藥物單元：

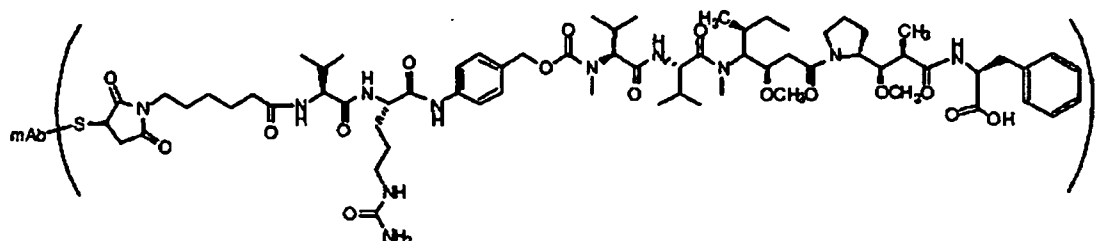




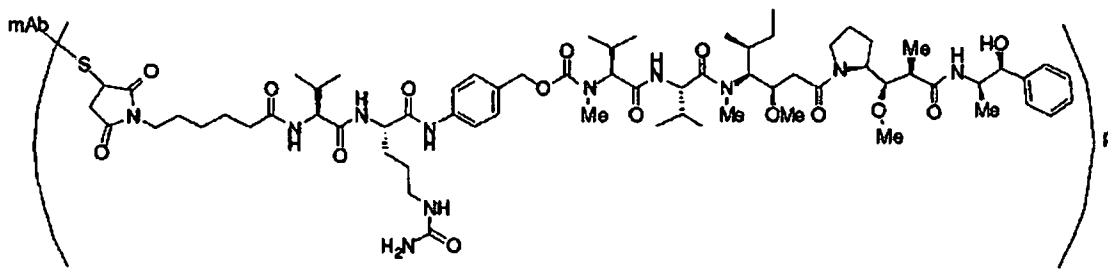
或其醫藥上可接受之鹽或溶劑合物。

在一個態樣中，可使親水性基團(例如但不限於三乙二醇酯(TEG))在R¹¹處附接至藥物單元。不欲受限於理論，親水性基團有助於藥物單元之內化及不聚結。

實例性抗體藥物結合物具有以下結構，其中「mAb」表示單株抗體且S係抗體之硫原子。在一個態樣中，硫原子係來自半胱胺酸殘基之硫原子。在一實施例中，半胱胺酸殘基係經還原鏈間硫醇之半胱胺酸殘基。在另一態樣中，胱胺酸殘基係引入抗體中之半胱胺酸殘基。下標p係1至約20之整數且較佳為1至約5。在實施例中，其中p代表包含複數種抗體藥物結合物之組合物中每一配體之平均藥物分子數，p較佳為約2至約6或約3至約5。

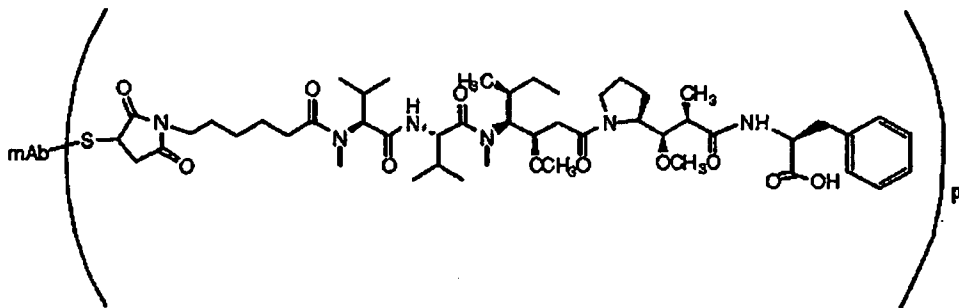


L-mc-vc-MMAF



L-mc-vc-MMAE (vcE 或 vcMMAE)

或



L-mc-MMAF (mcF 或 mcMMAF)

或其醫藥上可接受之鹽形式。

配體單元

在本發明中，抗體藥物結合物中之配體單元(例如，抗體)特異性接合癌細胞表面上之癌細胞抗原。

在實例性實施例中，抗體將特異性接合癌細胞表面上之癌細胞抗原，該癌細胞顯示PI3K-AKT-mTOR路徑上調，包括PI3K/AKT mTOR路徑之組成型活化。在一個態樣中，抗體藥物結合物經由內化展現細胞毒性活性。

配體單元(L)具有至少一個可與連接體單元之官能團形成鍵之官能團。可天然、經由化學操作或經由改造存在於配體單元上之有用官能團包括(但不限於)巯基(-SH)、胺基、羥基、羧基、碳水化合物之異頭羥基、及羧基。在一些實施例中，配體單元官能團係巯基。巯基通常為溶劑可

及巯基，例如半胱胺酸殘基上之溶劑可及巯基。巯基可藉由還原配體之分子內或分子間二硫鍵來產生。巯基亦可藉由使用2-亞胺基硫嘧啶(Traut試劑)或另一巯基產生試劑使配體離胺酸部分之胺基反應來產生。

在一些實施例中，藉由(例如)胺基酸取代將一或多個巯基改造至配體單元中。舉例而言，可將巯基引入配體單元中。在一些實施例中，藉由絲胺酸或蘇胺酸至半胱胺酸殘基之胺基酸取代及/或藉由向配體單元中添加半胱胺酸殘基(經改造半胱胺酸殘基)來引入巯基。在一些實施例中，半胱胺酸殘基係內部半胱胺酸殘基，即，不位於配體部分之N-端或C-端。

為控制附接至配體單元之藥物或連接體單元-藥物單元之數量，可藉由胺基酸取代來消除一或多個半胱胺酸殘基。舉例而言，可藉由半胱胺酸至絲胺酸殘基之胺基酸取代來減少免疫球蛋白鉸鏈區中溶劑可及半胱胺酸殘基之數量。

在一些實施例中，配體單元含有1、2、3、4、5、6、7或8個溶劑可及半胱胺酸殘基。在一些實施例中，配體單元含有2或4個溶劑可及半胱胺酸殘基。

本文所述方法及組合物中所用抗體較佳為單株，且可為多特異性人類、人類化或嵌合抗體、單鏈抗體、Fab片段、F(ab')片段、藉由Fab表現文庫產生之片段及上述中任一者之接合片段，前提為其可直接或經由連接體間接結合至奧裡斯他汀藥物。通常，抗體係具有源自鼠類單株抗體

之可變區及人類免疫球蛋白恆定區的人類抗體、人類化抗體或嵌合抗體。在一些實施例中，抗體可為齧齒類動物（例如，小鼠及大鼠）、驢、綿羊、兔、山羊、豚鼠、駱駝、馬或雞。

抗體可具有單特異性、二特異性、三特異性或更大之多特異性。多特異性抗體可對不同靶抗原之不同表位具有特異性或可對相同靶抗原上之不同表位具有特異性。（例如，參見 WO 93/17715；WO 92/08802；WO 91/00360；WO 92/05793；Tutt等人，1991, *J. Immunol.* 147:60-69；美國專利第 4,474,893 號、第 4,714,681 號、第 4,925,648 號、第 5,573,920 號及第 5,601,819 號；Kostelny 等人，1992, *J. Immunol.* 148:1547-1553。）

抗體亦可依照其與靶抗原之以下接合親和性來描述： 10^{-7} M、 5×10^{-8} M、 10^{-8} M、 5×10^{-9} M、 10^{-9} M、 5×10^{-10} M、 10^{-10} M、 5×10^{-11} M、 10^{-11} M、 5×10^{-12} M、 10^{-12} M、 5×10^{-13} M、 10^{-13} M、 5×10^{-14} M、 10^{-14} M、 5×10^{-15} M 或 10^{-15} M。

在一些實施例中，抗體係嵌合抗體。嵌合抗體係抗體之不同部分源自不同動物物種之分子，例如具有源自鼠類單株抗體之可變區及人類免疫球蛋白恆定區之抗體。產生嵌合抗體之方法為業內已知。（例如，參見 Morrison, *Science*, 1985, 229:1202；Oi 等人，1986, *BioTechniques* 4:214；Gillies 等人，1989, *J. Immunol. Methods* 125:191-202；美國專利第 5,807,715 號；第 4,816,567 號及第 4,816,397 號。）

在一些實施例中，抗體可為人類化抗體，包括覆蓋抗體 (veneered antibody)。人類化抗體係接合期望抗原且具有一或多個來自非人類物種之互補決定區(CDR)及來自人類免疫球蛋白分子之框架及恆定區的抗體分子。通常，可用來自CDR供體抗體之相應殘基取代人類框架區中之框架殘基以改變或較佳改良抗原接合。藉由業內已知方法來鑑別該等框架取代，例如藉由對CDR與框架殘基之相互作用建模以鑑別對於抗原接合關重要之框架殘基及進行序列比較以鑑別在特定位置之異常框架殘基。(例如，參見Queen等人，美國專利第5,585,089號；Riechmann等人，1988, *Nature* 332:323。)

抗體亦可為人類抗體。人類抗體可藉由多種業內已知方法製得，例如使用源自人類免疫球蛋白序列之抗體文庫之噬菌體展示方法。例如，參見美國專利第4,444,887號及第4,716,111號；WO 98/46645、WO 98/50433、WO 98/24893、WO 98/16654、WO 96/34096、WO 96/33735及WO 91/10741。

抗體之實例包括彼等特異性接合藉由癌症表現之抗原者，該癌症顯示PI3K-AKT-mTOR路徑上調，包括PI3K/AKT mTOR路徑之組成型活化。在實例性實施例中，抗體可接合CD19、CD30或CD70抗原。

實例性抗體包括(例如)鼠類AC10(抗CD30)、鼠類1F6(抗CD70)及鼠類BU12(抗CD19)抗體之嵌合或人類化形式。鼠類AC10抗體具有含有SEQ ID NO:1中所述胺基酸序列之重

鏈可變區及含有SEQ ID NO:2中所述胺基酸序列之輕鏈可變區。鼠類1F6抗體具有含有SEQ ID NO:3中所述胺基酸序列之重鏈可變區及含有SEQ ID NO:4中所述胺基酸序列之輕鏈可變區。鼠類BU12抗體具有含有SEQ ID NO:7中所述胺基酸序列之重鏈可變區及含有SEQ ID NO:8中所述胺基酸序列之輕鏈可變區。該等抗體進一步闡述於美國專利第7,090,843號；及美國公開案第20090148942號及第20090136526號中，該等案件之全部內容出於所有目的以引用方式併入本文中。

在實例性實施例中，抗體係小鼠抗體之嵌合或人類化形式，其具有(i) 含有SEQ ID NO:1中所述胺基酸序列之重鏈可變區及含有SEQ ID NO:2中所述胺基酸序列之輕鏈可變區；(ii) 含有SEQ ID NO:3中所述胺基酸序列之重鏈可變區及含有SEQ ID NO:4中所述胺基酸序列之輕鏈可變區；或(iii) 含有SEQ ID NO:7中所述胺基酸序列之重鏈可變區及含有SEQ ID NO:8中胺基酸序列之輕鏈可變區。在實例性實施例中，此一抗體進一步包含SEQ ID NO:11中所述人類 γ I恆定區之胺基酸序列或SEQ ID NO:11之胺基酸1至329及SEQ ID NO:12中所述人類 κ 恆定區之胺基酸序列。

在實例性實施例中，抗體係嵌合AC10抗體，其具有含有SEQ ID NO:1中所述胺基酸序列之重鏈可變區及含有SEQ ID NO:2中所述胺基酸序列之輕鏈可變區。在實例性實施例中，此一抗體進一步包含SEQ ID NO:11中所述人類 γ I恆定區之胺基酸序列或SEQ ID NO:11之胺基酸1至329及

SEQ ID NO:12中所述人類 κ 恆定區之胺基酸序列。

在實例性實施例中，抗體係人類化h1F6抗體，其具有含有SEQ ID NO:5中所述胺基酸序列之重鏈可變區及含有SEQ ID NO:6中所述胺基酸序列之輕鏈可變區。在實例性實施例中，此一抗體進一步包含SEQ ID NO:11中所述人類 γ I恆定區之胺基酸序列或SEQ ID NO:11之胺基酸1至329及SEQ ID NO:12中所述人類 κ 恆定區之胺基酸序列。

在實例性實施例中，抗體係人類化hBU12抗體，其具有含有SEQ ID NO:9中所述胺基酸序列之重鏈可變區及含有SEQ ID NO:10中所述胺基酸序列之輕鏈可變區。在實例性實施例中，此一抗體進一步包含SEQ ID NO:11中所述人類 γ I恆定區之胺基酸序列或SEQ ID NO:11之胺基酸1至329及SEQ ID NO:12中所述人類 κ 恆定區之胺基酸序列。

可藉由習用方法分析抗體與靶抗原之特異性接合，該等方法係(例如)競爭性及非競爭性免疫分析系統，其中使用諸如以下等技術：西方墨點(Western blot)、放射免疫分析、ELISA(酶聯免疫吸附分析)、「三明治(sandwich)」免疫分析、免疫沉澱分析、免疫放射量測分析、螢光免疫分析、蛋白A免疫分析及流式細胞術。(例如，參見Ausubel等人編輯，*Short Protocols in Molecular Biology*(John Wiley & Sons公司，New York，第4版，1999)；Harlow及Lane，*Using Antibodies: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1999。))

此外，抗體與靶抗原之接合親和性及抗體-抗原相互作用之解離速率可藉由表面電漿共振、使用經標記抗體之競爭FACS或其他競爭性接合分析來測定。

抗體可根據抗體類型藉由標準程序自靶抗原之含抗原片段製得(例如，參見Kohler, 等人，*Nature*, 256:495, (1975)；Harlow及Lane，*Antibodies, A Laboratory Manual* (C.S.H.P., NY, 1988)；Queen等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:10029-10033 (1989)及WO 90/07861；Dower等人，WO 91/17271及McCafferty等人，WO 92/01047(該等案件中之每一者出於所有目的以引用方式併入本文中)。

對抗體藥物結合物之細胞毒性分析

已知確定藥物或抗體藥物結合物是否對細胞施加細胞生長抑制及/或細胞毒性功效之方法。通常，抗體藥物結合物之細胞毒性或細胞生長抑制活性可藉由以下來量測：使表現靶蛋白之細胞暴露於存於細胞培養基中之抗體藥物結合物；將細胞培養約6小時至約5天之時段；及量測細胞生存力。可利用基於細胞之活體外分析來量測生存力(增殖)、抗體藥物結合物之細胞毒性及對細胞凋亡之誘導(半胱天冬酶激活)。

可利用胸苷納入分析來測定抗體藥物結合物是否施加細胞生長抑制功效。舉例而言，可將以5,000個細胞/孔之密度平鋪於96孔板中之表現靶抗原之癌細胞培養72小時時段，並在72小時時段之最後8小時期間暴露於0.5 μCi ^3H -胸苷。在存在及不存在抗體藥物結合物下量測 ^3H -胸苷至

培養物中之細胞的納入。

測定細胞毒性時，可量測壞死或細胞凋亡(程式性細胞死亡)。壞死通常伴隨質膜通透性增加；細胞腫脹；及質膜破裂。細胞凋亡之特徵通常在於膜起泡、細胞質濃縮及內源內切核酸酶激活。對癌細胞之該等功效中任一者的確定皆表明抗體藥物結合物可用於治療癌症。

細胞生存力可藉由測定細胞中諸如中性紅、錐蟲藍或 ALAMAR™ 藍等染料之攝取來量測(例如，參見 Page 等人，1993, *Intl. J. Oncology* 3:473-476)。在此一分析中，在含有染料之培養基中培育細胞，洗滌細胞，並藉由分光光度法來量測剩餘染料，剩餘染料反映細胞之染料攝取。蛋白質結合染料磺醯羅丹明 B (sulforhodamine B) (SRB) 亦可用於量測細胞毒性(Skehan 等人，1990, *J. Natl. Cancer Inst.* 82:1107-12)。

或者，在藉由檢測活(而非死亡)細胞之哺乳動物細胞存活及增殖之定量比色分析中使用四唑鹽(例如 MTT)(例如，參見 Mosmann, 1983, *J. Immunol. Methods* 65:55-63)。

可藉由量測(例如)DNA 斷裂來定量細胞凋亡。可利用用於 DNA 斷裂之定量活體外測定之市售光度測定方法。此等分析之實例包括 TUNEL(其檢測斷裂 DNA 中標記核苷酸之納入)及基於 ELISA 之分析，其闡述於 *Biochemica*, 1999，第 2 期，第 34-37 頁(Roche Molecular Biochemicals)中。

亦可藉由量測細胞之形態變化來測定細胞凋亡。舉例而言，與壞死一樣，質膜完整性之喪失可藉由量測某些染料

(例如，螢光染料，例如，吖啶橙或溴化乙錠)之攝取來確定。Duke及Cohen，*Current Protocols in Immunology* (Coligan等人編輯，1992，第3.17.1-3.17.16頁)已闡述量測凋亡細胞數量之方法。亦可用DNA染料(例如，吖啶橙、溴化乙錠或碘化丙錠)標記細胞，並針對染色質濃縮及沿內層核膜之著邊(margination)觀察細胞。可進行量測以確定細胞凋亡之其他形態變化包括(例如)細胞質濃縮、膜起泡增加及細胞皺縮。

可在培養物之附著及「漂浮」兩個部分中量測凋亡細胞之存在。舉例而言，可藉由移除上清液，使附著細胞胰蛋白酶化，在離心洗滌步驟(例如，在2000 rpm下10分鐘)之後組合製備品及檢測細胞凋亡(例如，藉由量測DNA斷裂)來收集該兩個部分。(例如，參見Piazza等人，1995, *Cancer Research* 55:3110-16)。

可在動物模型中測試或驗證抗體藥物結合物之功效。熟習此項技術者已知諸多確定之癌症動物模型，可使用其中之任一者來分析抗體藥物結合物之效能。此等模型之非限制性實例闡述於下文中。此外，可藉由將人類腫瘤細胞系植入適當的免疫缺陷齧齒類動物品系(例如，無胸腺裸小鼠或SCID小鼠)中來創建用以檢測抗體藥物結合物之活體內功效的小動物模型。

PI3K-AKT-mTOR路徑抑制劑

mTOR以兩種複合物類型存在，即含有raptor亞單位之mTORC1及含有rictor之mTORC2。如業內已知，「rictor」

係指具有人類基因座5p13.1之細胞生長調節蛋白。該等複合物以不同方式調節且具有不同受質譜。

mTORC2通常對雷帕黴素(rapamycin)及選擇性抑制劑不敏感。認為mTORC2係藉由將諸如Akt等一些AGC激酶之C末端疏水性基序磷酸化來調節生長因子信號傳導。在許多細胞背景下，Akt之S473位點之磷酸化需要mTORC2。因此，Akt部分地控制mTORC1活性，而mTORC2部分地控制Akt本身。

磷脂醯肌醇3-激酶(PI3K)之生長因子刺激藉由磷酸化兩個關鍵位點S473及T308來活化Akt。已報導，Akt之完全活化需要S473與T308活性二者皆磷酸化。Akt以許多方式促進細胞存活及增殖，包括抑制細胞凋亡、促進葡萄糖攝取及調節細胞代謝。在Akt上之兩個磷酸化位點中，人們相信由PDK1所調介T308處之活化環磷酸化係激酶活性必不可少的，同時S473處之疏水性基序磷酸化增強Akt激酶活性。S473處之AKT磷酸化可用作PI3K/AKT mTOR路徑之組成型活化之標記物。在一些態樣中，S473與T308二者處之AKT磷酸化用作PI3K/AKT mTOR路徑之組成型活化之標記物。

mTOR抑制劑

本發明中所用mTOR抑制劑在與以奧裡斯他汀為主之抗體-藥物結合物一起用於組合療法物中時可提供協同功效，以用於治療癌症，用於殺死腫瘤細胞及/或用於抑制腫瘤細胞增殖。

本文所用術語「mTOR抑制劑」係指抑制mTOR蛋白之至少一種活性之化合物或配體，該活性係(例如)對絲胺酸/蘇胺酸蛋白激酶至少一種受質(例如，p70S6激酶1、4E-BP1、AKT/PKB及eEF2)之活性。

本發明mTOR抑制劑能夠直接結合mTORC1、mTORC2或mTORC1與mTORC2二者並藉由結合mTORC1及/或mTORC2來抑制mTORC1、mTORC2或mTORC1與mTORC2二者。

用於本發明中之一類mTOR抑制劑係活性位點抑制劑。該等抑制劑係接合mTOR之ATP接合位點(亦稱作ATP接合袋)並抑制mTORC1與mTORC2二者之催化活性的mTOR抑制劑。因此，在一個態樣中，用於本發明中之mTOR抑制劑與ATP競爭與mTORC1及/或mTORC2上之ATP接合位點接合。業內已知用於確定化合物是否與ATP競爭之實例性分析。一種此類分析提供於實例12中。

用於本發明中之一類活性位點抑制劑係雙特異性抑制劑，此乃因其靶向並直接抑制PI3K與mTOR二者。雙特異性抑制劑接合mTOR及PI3K二者之ATP接合位點。此等抑制劑之實例包括渥曼青黴素(wortmannin)、LY294002、PI-103 (Cayman chemical)、SF1126 (Semafore)、BGT226 (Novartis)、XL765 (Exelixis)及NVP-BEZ235 (Novartis)。(Liu等人，Nature Review, 8, 627-644, 2009)。在一些態樣中，雙特異性抑制劑可為咪唑并喹啉(例如，咪唑并[4,5-c]喹啉衍生物)。業內已知確定用於化合物是否接合及/

或抑制PI3K及/或mTOR之實例性分析。一種此類分析提供於實例12中。

用於本發明中之另一類活性位點抑制劑係選擇性mTOR抑制劑。相對於一或多種類型I磷脂酰肌醇3-激酶，此類mTOR抑制劑選擇性地抑制mTORC1及mTORC2活性。類型I磷脂酰肌醇3-激酶可選自(例如)PI3激酶 α 、PI3激酶 β 、PI3激酶 γ 或PI3激酶 δ 。該等活性位點抑制劑接合mTOR而非PI3K之活性位點。此等抑制劑之實例包括Torin1(Guertin及Sabatini)、PP242(2-(4-胺基-1-異丙基-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-3-基)-1H-吡啶-5-醇)、PP30、Ku-0063794、WAY-600(Wyeth)、WAY-687(Wyeth)、WAY-354(Wyeth)及AZD8055(Sparks及Guertin, Oncogene, 29, 2733-2744, 2010, Liu等人, Nature Review, 8, 627-644, 2009)。在一些態樣中，mTor抑制劑可為吡唑并嘧啶。業內已知確定mTOR抑制劑之選擇性之方法。一種此類分析提供於實例12中。

在一個態樣中，選擇性mTOR抑制劑或者可理解為指展現對mTORC1及/或mTORC2之50%抑制濃度(IC₅₀)為該抑制劑對至少一種、兩種、三種或更多種類型I PI3-激酶之IC₅₀之至少1/10、至少1/20、至少1/50、至少1/100、至少1/1000或更小的藥劑。

在一些實施例中，選擇性mTOR抑制劑或者可理解為指展現對mTORC1及/或mTORC2之50%抑制濃度(IC₅₀)為該抑制劑對所有類型I PI3-激酶之IC₅₀之至少1/10、至少1/20、至少1/50、至少1/100、至少1/1000或更小的藥劑。

在再一態樣中，選擇性 mTOR 抑制劑可理解為指展現對 mTOR 之 50% 抑制濃度 (IC₅₀) 為該抑制劑對一或多種蛋白激酶之 IC₅₀ 之至少 1/10、至少 1/20、至少 1/50、至少 1/100、至少 1/1000 或更小的化合物。

用於本發明中之另一類 mTOR 抑制劑在本文中稱為「雷帕黴素類似物 (rapalog)」。本文所用術語「雷帕黴素類似物」係指特異性接合 mTOR FRB 結構域 (FKBP 雷帕黴素接合結構域)，在結構上與雷帕黴素有關且保持 mTOR 抑制性質之化合物。術語雷帕黴素類似物不包括雷帕黴素。雷帕黴素類似物包括雷帕黴素之酯、醚、肟、胺及羥胺、以及雷帕黴素核心結構上之官能團已藉由 (例如) 還原或氧化修飾之化合物。亦認為此等化合物之醫藥上可接受之鹽為雷帕黴素衍生物。在一些實施例中，雷帕黴素類似物 (例如雷帕黴素) 相對於 mTORC2 選擇性地抑制 mTORC1。用於本發明中之實例性雷帕黴素類似物包括 (例如) 替西羅莫司 (temsirolimus) (CC1779)、依維莫司 (everolimus) (RAD001)、地磷莫司 (deforolimus) (AP23573)、AZD8055 (AstraZeneca) 及 OSI-027 (OSI)。業內已知用於確定化合物是否接合 mTOR FRB 結構域之實例性分析。例如，參見 Chen 等人，(1995) PNAS 第 92 卷第 4947-4951 頁。

用於本發明中之另一 mTOR 抑制劑係雷帕黴素 (西羅莫司 (sirolimus))。

任一 mTOR 抑制劑 (包括任一類別之上述 mTOR 抑制劑) 可與本發明之以奧裡斯他汀為主之抗體藥物結合物組合使

用。在一些實施例中，本發明中所用 mTOR 抑制劑不為雷帕黴素(西羅莫司)。

在一個態樣中，用於本發明中之實例性 mTOR 抑制劑以下列之 IC₅₀(抑制 50% 活性之濃度)抑制 mTORC1、mTORC2 或 mTORC1 與 mTORC2 二者：約 200 nM 或更小、較佳約 100 nM 或更低小、甚至更佳約 60 nM 或更小、約 25 nM、約 10 nM、約 5 nM、約 1 nM、100 pM、50 pM、25 pM、10 pM、1 pM 或更小。在一個態樣中，用於本發明中之 mTOR 抑制劑以約 2 nM 至約 100 nm、更佳約 2 nM 至約 50 nM、甚至更佳約 2 nM 至約 15 nM 之 IC₅₀ 抑制 mTORC1、mTORC2 或 mTORC1 與 mTORC2 二者。

在一個態樣中，用於本發明中之實例性 mTOR 抑制劑以下列之 IC₅₀(抑制 50% 活性之濃度)抑制 P13K 及 mTORC1 或 mTORC2 或 mTORC1 與 mTORC2 二者及 P13K：約 200 nM 或更小、較佳約 100 nm 或更小、甚至更佳約 60 nM 或更小、約 25 nM、約 10 nM、約 5 nM、約 1 nM、100 pM、50 pM、25 pM、10 pM、1 pM 或更小。在一個態樣中，用於本發明中之 mTOR 抑制劑以約 2 nM 至約 100 nm、更佳約 2 nM 至約 50 nM、甚至更佳約 2 nM 至約 15 nM 之 IC₅₀ 抑制 P13K 及 mTORC1 或 mTORC2 或 mTORC1 與 mTORC2 二者及 P13K。

IC₅₀ 測定可使用任一業內已知習用技術來達成。舉例而言，IC₅₀ 可藉由在多種濃度之所研究抑制劑存在下量測給定酶之活性來測定。然後將酶活性之實驗獲得值相對於所用抑制劑濃度繪成曲線。抑制劑顯示 50% 酶活性(與不存在

任何抑制劑時之活性相比)之濃度視為「IC50」值。類似地，其他抑制濃度可經由對活性之適當測定來界定。

已顯示mTOR對生理受質蛋白(p70 S6核糖體蛋白激酶I (p70S6K1)及e1F4E結合蛋白1 (4EBP1))表現強健且特異之催化活性，如在西方墨點法中藉由磷光體特異性抗體所量測。在一個態樣中，IC50測定可藉由量測諸如p70S6K1及4EBP1等受質蛋白之磷酸化程度來達成。舉例而言，可在以下條件下使細胞與所研究抑制劑接觸：通常會產生mTOR受質p70S6K1及4EBP1之磷酸化。然後，可藉由各種業內已知方法(包括固定或溶解)來製備細胞，並分析mTOR受質之磷酸化程度。可使用任何業內已知方法來分析磷酸化程度，該等方法包括(但不限於)使用對擬經由免疫印跡法或流式細胞術分析之受質之磷酸化形式具有特異性之抗體。

mTORC1 及 / 或 mTORC2 活性之抑制可藉由PI3K/Akt/mTOR路徑之信號轉導減少來確定。可利用眾多種讀出值來確定此信號傳導路徑之輸出之減少。一些非限制性實例性讀出值包括(1) Akt於包括(但不限於)S473及T308在內之殘基處之磷酸化減少；(2) Akt之活化減少，如藉由(例如)Akt受質(包括(但不限於)FoxO1/O3a T24/32、GSK3 α/β ；S21/9及TSC2 T1462；之磷酸化減少所證明；(3) mTOR下游之信號傳導分子(包括(但不限於)核糖體S6 S240/244、70S6K T389及4EBP1 T37/46)之磷酸化減少；及(4)癌細胞增殖之抑制。

用於確定mTORC1及/或mTORC2之選擇性抑制的基於細胞之分析可呈多種形式。此通常可取決於所調查生物活性及/信號轉導讀出值。舉例而言，藥劑抑制mTORC1及/或mTORC2將下游受質磷酸化之能力可藉由不同類型之業內已知激酶分析來確定。代表性分析包括(但不限於)用識別磷酸化蛋白之抗體(例如抗磷酸酪胺酸、抗胺酸絲胺酸或抗磷酸蘇胺酸抗體)來實施免疫印跡法及免疫沉澱。或者，可使用特異性識別激酶受質之特定磷酸化形式之抗體(例如抗磷酸AKT S473或抗磷酸AKT T308)。另外，可藉由高通量化學發光分析來檢測激酶活性。在另一態樣中，可使用單細胞分析(例如phosflow實驗中所述流式細胞術)來量測混合細胞群中多個下游mTOR受質之磷酸化。

對mTORC1及/或mTORC2及/或P13K之抑制功效可藉由細胞集落形成分析或其他形式之細胞增殖分析來確定。業內可獲取眾多細胞增殖分析，且其中許多可以套組形式獲取。細胞增殖分析之非限制性實例包括用於氘標記之胸苷攝取分析之測試、BrdU(5'-溴-2'-去氧尿苷)攝取(由Calibiochem出售之套組)、MTS攝取(由Promega出售之套組)、MTT攝取(由Cayman Chemical出售之套組)、CyQUANT®染料攝取(由Invitrogen出售)。

細胞凋亡及細胞週期停滯分析可利用本文所例示之任何方法以及其他業內已知方法來實施。已設計出許多不同方法來檢測細胞凋亡。

可使用解離增強之鏽系元素螢光免疫分析及Toral-Barz

等人，Biochemical and Biophysical Research Communications, 332 (2005), 304-310 中所述之分析來確定化合物是否為 mTOR 抑制劑。

PI3K 抑制劑

本發明中所用 PI3K 抑制劑在與以奧裡斯他汀為主之抗體-藥物結合物一起用於組合療法中時可提供協同功效。

本文所用術語「PI3K 抑制劑」係指接合 PI3K 並抑制其至少一種活性之化合物或配體。PI3K 蛋白可劃分為 3 類，即 1 類 PI3K、2 類 PI3K 及 3 類 PI3K。1 類 PI3K 以異源二聚體形式存在，該等異源二聚體由 4 個 p110 催化亞單位 (p110 α 、p110 β 、p110 δ 及 p110 γ) 中之一者及兩個調節亞單位家族中之一者組成。本發明 PI3K 抑制劑較佳靶向 1 類 PI3K 抑制劑。在一個態樣中，PI3K 抑制劑可展示對 1 類 PI3K 抑制劑之一或多種亞型之選擇性 (即，對 p110 α 、p110 β 、p110 δ 及 p110 γ 或 p110 α 、p110 β 、p110 δ 及 p110 γ 中之一或多者之選擇性)。在另一態樣中，PI3K 抑制劑可不展示亞型選擇性。在一個態樣中，PI3K 抑制劑可與 ATP 競爭與 PI3K 催化結構域接合。

PI3K 抑制劑可 (例如) 靶向 PI3K 以及 PI3K-AKT-mTOR 路徑中之其他蛋白。靶向 mTOR 與 PI3K 二者之 PI3K 抑制劑可稱為 mTOR 抑制劑或 PI3K 抑制劑。僅靶向 PI3K 之 PI3K 抑制劑可稱為選擇性 PI3K 抑制劑。在一個態樣中，選擇性 PI3K 抑制劑可理解為指展現對 PI3K 之 50% 抑制濃度為該抑制劑對 mTOR 及 / 或路徑中之其他蛋白之 IC₅₀ 之至少 1/10、至少

1/20、至少 1/30、至少 1/50 倍、至少 1/100、至少 1/1000 或更小的藥劑。

在一個態樣中，用於本發明中之實例性 PI3K 抑制劑以下列之 IC₅₀ (抑制 50% 活性之濃度) 抑制 PI3K：約 200 nM 或更小、較佳約 100 nM 或更低小、甚至更佳約 60 nM 或更小、約 25 nM、約 10 nM、約 5 nM、約 1 nM、100 pM、50 pM、25 pM、10 pM、1 pM 或更小。在一個態樣中，用於本發明中之 PI3K 抑制劑以約 2 nM 至約 100 nM、更佳約 2 nM 至約 50 nM、甚至更佳約 2 nM 至約 15 nM 之 IC₅₀ 抑制 PI3K。

與以奧裡斯他汀為主之抗體-藥物結合物組合使用之 PI3K 抑制劑之實例包括 (例如) BKM120 (1 類 P13K 抑制劑，Novartis)、XL147 (1 類 P13K 抑制劑，Exelixis)、GDC0941 (1 類 P13K 抑制劑，Genentech)、GSK1059615 (pan-P13K 抑制劑，GlaxoSmithKline)、PX-866 (1 類 P13K 抑制劑；p110 α 、p110 β 及 p110 γ 亞型，Oncothyreon) 及 CAL-101 (1 類 P13K 抑制劑；p110 δ 亞型，Calistoga)。

AKT 抑制劑

本發明中所用 AKT 抑制劑在與以奧裡斯他汀為主之抗體-藥物結合物一起用於組合療法中時可提供協同功效。

本文所用術語「AKT 抑制劑」係指接合 AKT 並抑制其至少一種活性之化合物或配體。將 AKT 抑制劑分組為若干類別，包括基於脂質之抑制劑 (例如，靶向 AKT 之普列克受質蛋白 (pleckstrin) 同源結構域從而防止 AKT 定位至質膜之抑制劑)、ATP 競爭性抑制劑及變構性抑制劑。在一個態樣

中，AKT抑制劑藉由接合AKT催化位點起作用。在一個態樣中，Akt抑制劑藉由抑制諸如mTOR等下游AKT靶磷酸化起作用。

AKT抑制劑可靶向所有三種AKT亞型(AKT1、AKT2、AKT3)或可具有亞型選擇性且僅靶向AKT亞型中之一或兩者。AKT抑制劑可(例如)靶向AKT以及PI3K-AKT-mTOR路徑中之其他蛋白。僅靶向AKT之AKT抑制劑可稱為選擇性AKT抑制劑。在一個態樣中，選擇性AKT抑制劑可理解為指展現對AKT之50%抑制濃度為該抑制劑對路徑中之其他蛋白之IC₅₀之至少1/10、至少1/20、至少1/30、至少1/50倍、至少1/100、至少1/1000或更小的藥劑。

在一個態樣中，用於本發明中之實例性AKT抑制劑以下列之IC₅₀(抑制50%活性之濃度)抑制AKT：約200 nM或更小、較佳約100 nm或更低小、甚至更佳約60 nM或更小、約25 nM、約10 nM、約5 nM、約1 nM、100 pM、50 pM、25 pM、10 pM、1 pM或更小。在一個態樣中，用於本發明中之AKT抑制劑以約2 nM至約100 nm、更佳約2 nM至約50 nM、甚至更佳約2 nM至約15 nM之IC₅₀抑制AKT。

與以奧裡斯他汀為主之抗體-藥物結合物組合使用之AKT抑制劑之實例包括(例如)哌立福辛(perifosine)(Keryx)、MK2206 (Merck)、VQD-002 (VioQuest)、XL418 (Exelixis)及PX316 (PROLX Pharmaceuticals)。

癌症

本發明方法涵蓋向個體投與組合療法用於癌症治療。在

實例性實施例中，擬藉由本發明治療之癌症顯示PI3K-AKT-mTOR路徑上調。

本發明方法涵蓋向個體投與組合療法用於癌症治療。在實例性實施例中，擬藉由本發明治療之癌症顯示PI3K-AKT-mTOR路徑上調。

PI3K-AKT-mTOR路徑上調可藉由PI3K/Akt/mTOR路徑之信號轉導增加來確定。可利用眾多種讀出值來確定此信號傳導路徑之輸出之增加。一些非限制性實例性讀出值包括(1) Akt於包括(但不限於)S473及T308在內之殘基處之磷酸化增加；(2) Akt之活化增加，如藉由Akt受質(包括(但不限於)Fox01/O3a T24/32、GSK3 α/β ；S21/9及TSC2 T1462)之磷酸化減少所證明；及(3) mTOR下游之信號傳導分子(包括(但不限於)核糖體S6 S240/244、70S6K T389及4EBP1 T37/46)之磷酸化增加。

因此，在一個態樣中，擬藉由本方法治療之癌症係PI3K/AKT mTOR路徑經組成型地活化者，如藉由存在磷酸化AKT (pAKT)且尤其AKT在兩個關鍵位點S473及T308中之至少一者處且較佳在兩個位點處之磷酸化所證實。在一個態樣中，與非癌性組織相比，癌性組織可具有升高程度之pAKT。

在另一態樣中，擬藉由本方法治療之癌症係PI3K/AKT mTOR路徑經上調者，如藉由存在磷酸化p70 S6核糖體蛋白激酶I (p70S6K1)、磷酸化S6核糖體蛋白及/或e1F4E結合蛋白1所證實。在一個態樣中，與非癌性組織相比，癌性

組織可具有升高程度之p70S6K1及/或磷酸-e1F4E結合蛋白1。

先前已於許多癌症中報導pAKT之存在。此等癌症包括血液惡性病。因此，在一些實施例中，本文所述方法用於治療血液惡性病。在一個態樣中，血液惡性病係淋巴瘤。在一個態樣中，血液惡性病係B細胞淋巴瘤。在另一實施例中，血液惡性病係T細胞淋巴瘤。特定淋巴瘤之實例包括何傑金氏淋巴瘤(Hodgkin lymphoma)及非何傑金氏淋巴瘤(NHL)。NHL之實例包括(例如)外套細胞淋巴瘤、退行發育性大細胞淋巴瘤、皮膚T細胞淋巴瘤、外周T細胞淋巴瘤、瀰漫性大B細胞淋巴瘤、伯基特淋巴瘤(Burkitt lymphoma)及濾泡性淋巴瘤。在另一實施例中，血液惡性病係白血病，例如急性淋巴母細胞性白血病或慢性淋巴球性白血病。

先前已於許多實體瘤中報導pAKT之存在，該等實體瘤包括(例如)結腸直腸癌、腎癌、胃癌、前列腺癌、甲狀腺癌、子宮內膜癌、肺癌、腦癌及乳癌。因此，在一些實施例中，本文所述方法用於治療實體瘤。可藉由該等方法治療之實體瘤之實例包括(例如)結腸直腸癌、腎癌、胃癌、前列腺癌、甲狀腺癌、子宮內膜癌、肺癌、腦癌及乳癌。在一個態樣中，癌症係腎細胞癌。

本發明涵蓋治療特徵在於存在pAKT之癌症之組合療法。舉例而言，在一些實施例中，可藉由本發明治療之血液惡性病、淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤(Hogkin lymphoma)、

NHL或白血病可表現磷酸化AKT。類似地，在一些實施例中，以下實體瘤可表現磷酸化AKT：結腸直腸癌、腎癌、胃癌、前列腺癌、甲狀腺癌、子宮內膜癌、肺癌、腦癌或乳癌。表現可為在細胞質或細胞核中進行。在一個態樣中，表現實質上在細胞質中進行。在另一態樣中，表現實質上在細胞核中進行。在另一態樣中，表現在細胞質及細胞核中進行。

本發明涵蓋治療特徵在於存在p70 S6核糖體蛋白激酶I (p70S6K1)及/或e1F4E結合蛋白1之磷酸化之癌症的組合療法。舉例而言，在一些實施例中，可藉由本發明治療之血液惡性病、淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤或NHL可表現磷酸化p70 S6核糖體蛋白激酶I (p70S6K1)及/或e1F4E結合蛋白1。類似地，在一些實施例中，以下實體瘤可表現磷酸化p70 S6核糖體蛋白激酶I (p70S6K1)及/或e1F4E(磷酸-e1F4E結合蛋白1)：結腸直腸癌、腎癌、胃癌、前列腺癌、甲狀腺癌、子宮內膜癌、肺癌、腦癌或乳癌。

在一些實施例中，癌症可具有高pAKT表現。在實例性實施例中，高pAKT表現係指p-AKT+細胞/mm²腫瘤面積大於約25個細胞/mm²、大於50個細胞/mm²或甚至大於100個細胞/mm²之中值數量。通常使用免疫組織化學技術來實施pAKT+細胞量之測定。

可使用組合療法利用以奧裡斯他汀為主之抗體藥物結合物及mTOR抑制劑(包括任一類別之本文所述mTOR抑制劑及任一本文所述以奧裡斯他汀為主之抗體藥物結合物)來

治療任一本文所述癌症。以奧裡斯他汀為主之抗體藥物結合物之抗體組份可特異性接合擬治療癌細胞表面上表現之癌細胞抗原。

在一些實施例中，癌症可為表現CD30抗原者且以奧裡斯他汀為主之抗體藥物結合物可為特異性接合CD30抗原者(舉例而言，抗體組份係抗CD30抗體、較佳抗CD30單株抗體)。以奧裡斯他汀為主之抗體藥物結合物在接合抗原後可內化至發揮其功效之癌細胞中。在一個態樣中，表現CD30抗原之癌症表現pAKT(於S473及T308上磷酸化之AKT)。在一個態樣中，癌症可具有高pAKT表現。癌症可為(例如)血液惡性病，包括(例如)B細胞或T細胞淋巴瘤或白血病。在一些實施例中，癌症係何傑金氏淋巴瘤、外套細胞淋巴瘤、瀰漫性大B細胞淋巴瘤、慢性淋巴球性白血病、急性淋巴母細胞性白血病、皮膚T細胞淋巴瘤、外周T細胞淋巴瘤或本文所述其他表現CD30之癌症中之任一者，包括實體瘤。因此，本方法之組合療法可包括投與抗CD30之以奧裡斯他汀為主之抗體藥物結合物與PI3K-AKT-mTOR路徑抑制劑，用於治療表現CD30之癌症(例如，B細胞或T細胞淋巴瘤、何傑金氏淋巴瘤、NHL、白血病或實體瘤)。在一些態樣中，抑制劑可為mTOR抑制劑、PI3K抑制劑或AKT抑制劑。在一個態樣中，mTOR抑制劑可為活性位點抑制劑，包括(例如)雙特異性抑制劑，例如渥曼青黴素、LY294002、PI-103、BGT226、SF1126、XL765及NVP-BEZ235(Liu 等人，Nature Review, 8, 627-644,

2009)；或選擇性 mTOR 抑制劑，包括(例如)Torin1、PP242、PP30、Ku-0063794、WAY-600、WAY-687、WAY-354及AZD8055。在其他態樣中，mTOR抑制劑可為雷帕黴素類似物，包括(例如)替西羅莫司(CC1779)、依維莫司(RAD001)及地磷莫司(AP23573)。在一個態樣中，抑制劑可為AKT抑制劑，包括(例如)哌立福辛、MK2206、VQD-002、XL418及PX316。在另一態樣中，抑制劑可為PI3K抑制劑，包括(例如)BKM120、XL147、GDC0941、GSK1059615、PX-866或CAL-101。

在一些實施例中，癌症可為表現CD70抗原者且以奧裡斯他汀為主之抗體藥物結合物可為特異性接合CD70抗原者(舉例而言，抗體組份係抗CD70抗體、較佳抗CD70單株抗體)。以奧裡斯他汀為主之抗體藥物結合物在接合抗原後可內化至發揮其功效之癌細胞中。在一個態樣中，表現CD70抗原之癌症表現pAKT(於S473及T308上磷酸化之AKT)。在一個態樣中，癌症可具有高pAKT表現。癌症可為(例如)血液惡性病，包括(例如)B細胞或T細胞淋巴瘤或白血病。在一些實施例中，癌症係非何傑金氏淋巴瘤，包括本文所述NHL中之任一者(例如，外套細胞淋巴瘤及瀰漫性大B細胞淋巴瘤)。在一些實施例中，癌症係實體瘤，包括(例如)腎細胞癌。在一些實施例中，癌症係白血病，包括(例如)慢性淋巴球性白血病或急性淋巴母細胞性白血病。因此，本方法之組合療法可包括投與抗CD70之以奧裡斯他汀為主之抗體藥物結合物與PI3K-AKT-mTOR路徑

抑制劑，用於治療表現CD70之癌症(例如，B細胞或T細胞淋巴瘤、白血病、NHL或包括腎細胞癌之實體瘤)。在一些態樣中，抑制劑可為mTOR抑制劑、PI3K抑制劑或AKT抑制劑。在一些態樣中，mTOR抑制劑可為活性位點抑制劑，包括(例如)雙特異性抑制劑，例如渥曼青黴素、LY294002、PI-103、BGT226、SF1126、XL765及NVP-BEZ235(Liu等人，Nature Review, 8, 627-644, 2009)；或選擇性mTOR抑制劑，包括(例如)Torin1、PP242、PP30、Ku-0063794、WAY-600、WAY-687、WAY-354及AZD8055。在其他態樣中，mTOR抑制劑可為雷帕黴素類似物，包括(例如)替西羅莫司(CC1779)、依維莫司(RAD001)及地磷莫司(AP23573)。在一個態樣中，抑制劑可為AKT抑制劑，包括(例如)哌立福辛、MK2206、VQD-002、XL418及PX316。在另一態樣中，抑制劑可為PI3K抑制劑，包括(例如)BKM120、XL147、GDC0941、GSK1059615、PX-866或CAL-101。

在一些實施例中，癌症可為表現CD19抗原者且以奧裡斯他汀為主之抗體藥物結合物可為特異性接合CD19抗原者(舉例而言，抗體組份係抗CD19抗體、較佳抗CD19單株抗體)。以奧裡斯他汀為主之抗體藥物結合物在接合抗原後可內化至發揮其功效之癌細胞中。在一個態樣中，表現CD19抗原之癌症表現pAKT(於S473及T308上磷酸化之AKT)。在一個態樣中，癌症可具有高pAKT表現。癌症可為(例如)血液惡性病，包括(例如)B細胞淋巴瘤或白血病。

在一些實施例中，癌症係非何傑金氏淋巴瘤，包括本文所述NHL中之任一者(例如，外套細胞淋巴瘤及瀰漫性大B細胞淋巴瘤)。在一些實施例中，癌症係白血病，包括(例如)慢性淋巴球性白血病或急性淋巴母細胞性白血病。因此，本方法之組合療法可包括投與抗CD19之以奧裡斯他汀為主之抗體藥物結合物與PI3K-AKT-mTOR路徑抑制劑，用於治療表現CD19之癌症(例如，B細胞淋巴瘤、白血病或NHL)。在一些態樣中，抑制劑可為mTOR抑制劑、PI3K抑制劑或AKT抑制劑。在一些態樣中，mTOR抑制劑可為活性位點抑制劑，包括(例如)雙特異性抑制劑，例如渥曼青黴素、LY294002、PI-103、BGT226、SF1126、XL765及NVP-BEZ235(Liu等人，Nature Review, 8, 627-644, 2009)；或選擇性mTOR抑制劑，包括(例如)Torin1、PP242、PP30、Ku-0063794、WAY-600、WAY-687、WAY-354及AZD8055。在其他態樣中，mTOR抑制劑可為雷帕黴素類似物，包括(例如)替西羅莫司(CC1779)、依維莫司(RAD001)及地磷莫司(AP23573)。在一個態樣中，抑制劑可為AKT抑制劑，包括(例如)哌立福辛、MK2206、VQD-002、XL418及PX316。在另一態樣中，抑制劑可為PI3K抑制劑，包括(例如)BKM120、XL147、GDC0941、GSK1059615、PX-866或CAL-101。

在組合療法中與mTOR抑制劑一起使用之抗CD30、抗CD19或抗CD70之以奧裡斯他汀為主之抗體藥物結合物可具有本文針對以奧裡斯他汀為主之抗體藥物結合物所提供

結構中之任一者。在一個態樣中，抗CD30、CD19或抗CD70之以奧裡斯他汀為主之抗體藥物結合物經由連接體結合至奧裡斯他汀MMAE或MMAF。抗CD30、抗CD19或抗CD70之以奧裡斯他汀為主之抗體藥物結合物可為(例如)抗CD30、抗CD19或抗CD70之vcMMAE或mcF抗體藥物結合物(例如，cAC10-vcE、h1F6-mcF或hBU12-mcF)。在一個態樣中，包含抗CD30、抗CD19或抗CD70 vcMMAE或mcF抗體藥物結合物之組合物具有每一抗體約2至約6或約3至約5個藥物之平均數。在一個態樣中，每一藥物經由還原鏈間二硫鍵之半胱胺酸殘基之硫原子附接至抗體。在另一態樣中，每一藥物經由所引入半胱胺酸殘基之硫原子附接至抗體。較佳地，將半胱胺酸殘基引入抗體之CH₂區中。

組合療法

已發現，利用以奧裡斯他汀為主之抗體藥物結合物及PI3K-AKT-mTOR路徑抑制劑之組合療法可提供協同功效。

本文所用術語「協同作用」或「協同功效」在結合對藥劑組合效能之說明使用時，意指該組合之任一測量功效皆大於自個別藥劑之功效總和預測之功效。

兩種化合物之協同作用可藉由使用活體外方法來確定。舉例而言，每一藥物組合之協同作用、加和性或拮抗作用可使用Chou-Talalay中值功效公式來確定：

$$D=D_m[f_a/(1-f_a)]^{1/m} \quad \text{中值功效公式}$$

(D)係藥物劑量。 (D_m) 係表示效能之中值功效劑量。此係藉由中值功效曲線之x截距來確定。 (f_a) 係受劑量影響之分率。 (f_u) 係未受影響之分率 $(1-f_a)$ 。 (m) 係表示劑量功效曲線之彎曲度(形狀)之指數。其係藉由中值功效曲線之斜率來確定。線性相關係數「 r 」應大於或等於0.90。藥物濃度單位為任意單位。組合指數(CI)值 <0.9 表示協同作用，CI值0.9-1.1表示加和性，且CI值 >1.1 表示拮抗作用。

在測定活體內協同作用之一個實例中，自供體動物收穫腫瘤，將其分離，計數，且隨後注射回宿主小鼠中。然後通常於一些稍晚時間點藉由腹膜內、靜脈內注射或藉由經口途徑投與抗癌組合，並測定腫瘤生長速率及/或存活率，與未治療對照及僅暴露於一種療法之對照相比。通常測量生長於動物前脇腹(front flank)腫瘤之生長速率，其中將腫瘤寬度之垂直直徑轉化為總腫瘤質量或體積之估計值。然後將達到預定質量之時間(例如腫瘤增至三倍之時間)與對照動物之等腫瘤生長所需時間比較。若用組合療法治療之動物達到預定質量之時間大於用療法「A」治療之動物與用療法「B」治療之動物達到預定質量之時間(即單獨各療法)相加所獲得之值，則可認為組合療法提供協同功效。在另一實例中，用組合療法治療之動物達到預定質量之時間可能不大於自用療法「A」治療之動物與用療法「B」治療之動物達到預定質量之時間相加所獲得之值；然而，該組合之另一測量功效大於個別藥劑之功效總和所預測之功效足以將組合療法鑑別/確定為協同作用。

舉例而言，若用組合療法治療之動物之持久或完全反應次數大於各單獨治療組中持久或完全反應次數之總和，則組合療法提供協同功效。持久反應(DR)定義為動物中不存在可觸得之腫瘤。

通常，以奧裡斯他汀為主之結合物及PI3K-AKT-mTOR路徑抑制劑有效治療癌症之量可藉由標準臨床技術確定。另外，可視情況採用活體外分析來幫助鑑別最佳劑量範圍。擬用於調配物中之精確劑量亦視投與途徑及惡性病之階段而定，且應根據執業醫師之判斷及各患者之情況決定。可自活體外或動物模型測試系統獲得之劑量-反應曲線外推有效劑量。

舉例而言，在確定兩種或更多種組份間之協同相互作用時，該功效之最佳範圍及各組份達成該功效之絕對劑量範圍可藉由向需要治療之患者投與不同w/w比率範圍及劑量之組份測量。在一個物種中觀察到協同作用可預示在用以測量協同功效之其他物種及動物模型中存在該功效，且此等研究之結果可用於藉由應用藥物動力學及藥效學方法來預測其他物種中所需之有效劑量及血漿濃度範圍以及絕對劑量及血漿濃度。

在一些實施例中，兩種藥物PI3K-AKT-mTOR路徑抑制劑及以奧裡斯他汀為主之抗體藥物結合物可以其各別最大耐受劑量(MTD)投與個體。MTD對應於可給予而無不可接受之副作用之醫藥最高劑量。確定MTD屬於此項技術範圍。在一些態樣中，以奧裡斯他汀為主之抗體藥物結合物

可以其MTD提供且mTOR抑制劑可以50%-100% MTD、較佳以50%至90% MTD給予。或者，mTOR抑制劑可以50%-100%、較佳以50%至90% MTD給予且以奧裡斯他汀為主之抗體藥物結合物可以50%-100% MTD、較佳以50%至90% MTD給予。在一些態樣中，以奧裡斯他汀為主之抗體藥物結合物及mTOR抑制劑二者可以60%至90% MTD給予。在某些態樣中，藉由給予比MTD減低劑量之mTOR抑制劑與以奧裡斯他汀為主之抗體藥物結合物組合，可降低與治療相關之毒性(即不利作用)。在一個實例中，在治療表現CD70之癌症之方法中，以奧裡斯他汀為主之抗體藥物結合物可以其MTD提供且PI3K-AKT-mTOR路徑抑制劑可以50%至90%MTD或甚至以30%至75%MTD給予。在一個態樣中，PI3K-AKT-mTOR路徑抑制劑可以50%至90% MTD或甚至以30%至75% MTD給予且抗CD70奧裡斯他汀藥物結合物(例如h1F6-mcF)可以0.5 mg/kg/劑量、0.8 mg/kg/劑量、1 mg/kg/劑量、1.5 mg/kg/劑量、2 mg/kg/劑量、2.5 mg/kg/劑量、3 mg/kg/劑量、4.5 mg/kg/劑量或6 mg/kg/劑量(例如，每3週1 mg/kg、1.5 mg/kg、2 mg/kg、2.5 mg/kg、3 mg/kg、4.5 mg/kg或6 mg/kg)給予。

mTOR抑制劑、PI3K抑制劑及AKT抑制劑當前係以經口劑型及以靜脈內形式二者提供。在一個實例性實施例中，基於用替西羅莫司獲得之結果，mTOR抑制劑可以靜脈內輸注劑量提供。在一個態樣中，劑量可介於(例如)約0.1 mg/m²與100 mg/m²之間，其中介於約2.5 mg/m²與70 mg/m²

之間較佳。當前，mTOR抑制劑替西羅莫司係以每週輸注25 mg至50 mg(通常為25 mg)之劑量投與用於腎細胞癌治療。在另一實例性實施例中，基於用依維莫司獲得之結果，mTOR抑制劑可以經口形式提供。在一個態樣中，劑量可介於約1 mg/天至約50 mg/天之間，其中約2.5 mg/天至20 mg/天較佳。當前，mTOR抑制劑依維莫司係以約2.5 mg/天至20 mg/天(通常為10 mg)之每天劑量經口投與用於腎細胞癌治療。

以奧裡斯他汀為主之抗體藥物結合物之劑量通常可介於約0.5 mg/kg個體體重/劑量與約15 mg/kg個體體重/劑量之間。在一些實施例中，劑量可介於約0.5 mg/kg/劑量至約10 mg/kg/劑量之間或介於約1 mg/kg/劑量至約7 mg/kg/劑量之間。在特定實施例中，劑量可為約0.8 mg/kg個體體重、約1.0 mg/kg、約1.2 mg/kg、約1.8 mg/kg、約2.0 mg/kg、約2.7 mg/kg、約3 mg/kg、約3.6 mg/kg、約4.5 mg/kg或約6 mg/kg。

本發明所用組合方案可同時給予或可以順序方案給予，其中PI3K-AKT-mTOR路徑抑制劑係在治療過程期間於與以奧裡斯他汀為主之抗體藥物結合物不同之時間給予。在一個態樣中，PI3K-AKT-mTOR路徑抑制劑係在藥物結合物之前提供。在另一態樣中，PI3K-AKT-mTOR路徑抑制劑係在藥物結合物之後提供。此時間差可介於在兩種藥劑投與間數分鐘、小時、天或週之間。因此，術語組合未必意指同時或作為單一劑量投與，而是在期望治療時段期間

投與每一組份。在一些方法中，各別藥劑之投與足夠接近，從而使得在某段時間內該等藥劑以可檢測量同時存在於所治療患者中，例如，mTOR抑制劑與以奧裡斯他汀為主之抗體藥物結合物二者在血液(例如，血清或血漿)中皆可檢測到。可藉由不同途徑投與藥劑。作為典型的化學治療方案，化學治療過程可稍後重複數週，且對兩種藥劑之投與而言可遵循相同時間安排，或可基於患者反應進行修改。作為典型的化學治療，治療醫師基於多種因素密切監測劑量方案，該等因素包括疾病嚴重程度、對疾病之反應、任何治療相關性毒性、年齡、患者健康狀況及其他伴隨病症或治療。

本發明涵蓋在治療週期期間投與一次抗體-藥物結合物化合物之治療方案。舉例而言，在一些實施例中，可在21天治療週期之第1天投與抗體-藥物結合物。在一些此等實施例中，投與患者之抗體-藥物結合物化合物之劑量通常可為(例如)在治療週期內0.8 mg/kg至8 mg/kg個體體重、較佳在治療週期內約1.5 mg/kg至約7 mg/kg、約1.5 mg/kg至約6 mg/kg、約1.5 mg/kg至約2.2 mg/kg或1 mg/kg至約3 mg/kg。

本發明涵蓋在治療週期期間投與一次以上抗體-藥物結合物化合物之治療計劃。舉例而言，在一些實施例中，可在28天週期內連續3週每週一次投與抗體-藥物結合物化合物。舉例而言，在一些實施例中，可在每28天治療週期之第1天、第8天及第15天投與抗體-藥物結合物化合物。在

一些此等實施例中，投與患者之抗體-藥物結合物化合物之劑量可為在治療週期內0.8 mg/kg至8 mg/kg個體體重、較佳在治療週期內約1.5 mg/kg至約7 mg/kg、約1.5 mg/kg至約6 mg/kg、約1.5 mg/kg至約2.2 mg/kg或1 mg/kg至約3 mg/kg。

在一個態樣中，對於表現CD30之造血性癌症(例如何傑金氏淋巴瘤或ALCL)之治療而言，每週以約1 mg/kg之劑量或每3週以約1.8 mg/kg之劑量投與以奧裡斯他汀為主之抗體藥物結合物。

在一個態樣中，對於表現CD70之癌症(例如，NHL或腎細胞癌)之治療而言，每3週以約0.5 mg/kg、1 mg/kg、1.5 mg/kg、1.8 mg/kg、2 mg/kg、2.5 mg/kg、3 mg/kg、4.5 mg/kg、6 mg/kg或8 mg/kg之劑量投與以奧裡斯他汀為主之抗體藥物結合物。

在某些實例性實施例中，藉由輸注投與以奧裡斯他汀為主之抗體藥物結合物與PI3K-AKT-mTOR路徑抑制劑二者。在一個態樣中，藉由靜脈內(例如，輸注)或經口投與來投與PI3K-AKT-mTOR路徑抑制劑。

可以組合物(包括包含一或多種醫藥上相容之成份之醫藥組合物)形式投與以奧裡斯他汀為主之抗體-藥物結合物及PI3K-AKT-mTOR路徑抑制劑。舉例而言，醫藥組合物通常包括一或多種醫藥載劑(例如，無菌液體，例如水及油，油包括石油、動物油、植物油或合成來源之油，例如花生油、大豆油、礦物油、芝麻油及諸如此類)。當靜脈

內投與醫藥組合物時，水係更典型之載劑。亦可採用鹽水溶液及水性右旋糖及甘油溶液作為液體載劑，尤其對於可注射溶液而言。適宜醫藥賦形劑為熟習此項技術者已知。若需要，該組合物亦可含有少量潤濕劑或乳化劑或pH緩衝劑。適宜醫藥載劑之實例闡述於 E.W. Martin 之「Remington's Pharmaceutical Sciences」中。調配物與投與方式相對應。

在典型實施例中，將醫藥組合物按照常規程序調配成適於靜脈內投與至人類之醫藥組合物。通常，用於靜脈內投與之組合物係存於無菌等滲水性緩衝液中之溶液。需要時，該藥品亦可包括增溶劑及局部麻醉劑(例如利多卡因(lignocaine))以減輕注射部位之疼痛。通常，該等成份可單獨地或混合在一起以單位劑型提供，例如，作為凍乾粉末或不含水之濃縮物存於諸如安瓿或藥囊等標明活性劑之量的密封容器中。當擬藉由輸注投與藥品時，其可使用(例如)含有無菌醫藥級水或鹽水之輸注瓶來分配。當藉由注射投與藥品時，可提供(例如)注射用無菌水或鹽水的安瓿以便在投與之前混合各成份。

在某些實施例中，PI3K-AKT-mTOR路徑抑制劑可呈適於經口投與之形式，例如呈丸劑、膠囊、溶液或懸浮液之形式。此等調配物可根據任何用於產生經口調配物之業內已知方法製備，且可含有一或多種試劑，包括甜味劑、矯味劑、著色劑及防腐劑。若呈錠劑形式，則組合物可包含錠劑賦形劑，例如填充劑或稀釋劑(例如，碳酸鈣或碳酸

鈉、磷酸鈣或磷酸鈉)、崩解劑(玉米澱粉或海藻酸)、黏合劑(例如，澱粉、明膠或阿拉伯膠(acacia))、滑動劑、潤滑劑(例如，硬脂酸鎂、硬脂酸或滑石粉)、抗黏著劑、矯味劑或著色劑。

本發明係進一步闡述於以下實例中，該等實例並不意欲限制本發明範圍。

實例

提供實例以有助於進一步理解本發明。所用特定材料、方案及條件意欲進一步說明本發明且不應視為限制其合理範圍。

實例 1

細胞系培養

在 Roswell Park Memorial Institute 培養基 (RPMI) 1640+10% 胎牛血清 (FBS) 中培養 786-O 細胞。在 McCoy's 5A 培養基 +10% FBS 中培養 Caki-1 細胞。在 McCoy's 5A 培養基 +2% FBS 中培養 Caki-2 細胞。在 37°C 及 5% CO₂ 下培養所有 786-O、Caki-1 及 Caki-2 細胞 (腎細胞癌細胞系)。在 RPMI 1640+20% FBS 中培養 L540cy 細胞。在 RPMI 1640+10% FBS 中培養 L428 細胞。L540cy 及 L428 細胞系係何傑金氏淋巴瘤細胞系。在 RPMI 1640+10% FBS 中培養 Karpas-299 細胞。Karpas-299 細胞系係退行發育性大細胞淋巴瘤細胞 (ALCL) 系。在 RPMI 1640+10% FBS 中培養 HT 細胞。Raji 4RH 細胞 (純系 -11) 係來自 Francisco J. Hernandez-Ilizaliturri 之贈品且在 RPMI 1640+10% FBS 中培

養。HT及Raji 4RH細胞系係非何傑金氏淋巴瘤細胞系。在RPMI-1640+10% FBS中培養Jeko-1細胞。Jeko-1細胞系係外套細胞淋巴瘤細胞系。

實例2

測試奧裡斯他汀ADC或游離奧裡斯他汀及mTOR路徑抑制劑組合之活體外方法

將細胞平鋪於每孔100 μ L生長培養基中並置於側面為黑色且底部透明之96孔板中。接下來，製備小分子抑制劑及抗體藥物結合物之4X濃度工作母液，且隨後以2倍連續稀釋液滴定，以產生10點劑量曲線。對於單藥物條件而言，將50 μ L小分子抑制劑或ADC或游離奧裡斯他汀與50 μ L培養基添加至一式四份之各孔中，以產生每孔200 μ L之最終體積。對於組合條件而言，將50 μ L小分子抑制劑及50 μ L ADC或游離奧裡斯他汀稀釋液添加至一式四份之細胞(覆蓋每一藥物：高至低之劑量滴定)中，以產生每孔200 μ L之最終體積。在37°C、5% CO₂下將經處理細胞培育96小時。藉由與100 μ L Cell Titer Glo (Promega)溶液一起培育1小時來量測細胞毒性，且隨後在Fusion HT板讀數器(Perkin Elmer)上量測發光。用Excel (Microsoft)及GraphPad (Prism)處理數據以產生劑量反應曲線並計算每一劑量濃度之受影響分率(f_a)。然後使用CalcuSyn (Biosoft)軟體並使用Chou-Talalay中值功效公式來確定每一藥物組合之協同作用、加和性或拮抗作用：

$$D=D_m[f_a/(1-f_a)]^{1/m} \quad \text{中值功效公式}$$

(D)係藥物劑量。(D_m)係表示效能之中值功效劑量。此係藉由中值功效曲線之x截距來確定。(f_a)係受劑量影響之分率。(f_u)係未受影響之分率(1-f_a)。(m)係表示劑量功效曲線之彎曲度(形狀)之指數。其係藉由中值功效曲線之斜率來確定。線性相關係數「r」應大於或等於0.90。藥物濃度單位為任意單位。

組合指數(CI)值<0.9表示協同作用，CI值0.9-1.1表示加和性，且CI值>1.1表示拮抗作用。表4顯示對應於協同作用、加和性及拮抗作用之CI值。

表 4

組合指數(CI)	說明
<0.1	極強協同作用
0.1-0.3	強協同作用
0.3-0.7	協同作用
0.7-0.85	中等協同作用
0.85-0.90	微小協同作用
0.90-1.10	接近加和性
1.10-1.20	微小拮抗作用
1.20-1.45	中等拮抗作用
1.45-3.3	拮抗作用
3.3-10	強拮抗作用
>10	極強拮抗作用

除非另有說明，否則於分開日期重複每一組合研究，且總共n=3次，並報告平均組合指數值及標準誤差平均值(sem)。

實例 3

進行 ELISA 分析以測試藥物效能

將細胞以 2.5×10^5 個細胞/孔平鋪於兩個 6 孔板(每一細胞系)中之 4.5 mL 生長培養基中。以 10X 濃度製備替西羅莫司(Wyeth, Madison, New Jersey)之工作母液，且隨後以 2 倍連續稀釋液滴定，從而產生 10 點劑量曲線。將替西羅莫司(0.5 mL)添加至細胞中，其中最終濃度等於上文活體外組合研究中所用者。在 37°C 、5% CO_2 下將經處理細胞培育 24 小時。收集細胞沉澱物，且用提供於 PathScan 磷酸-S6 核糖體蛋白(Ser235/236)三明治 ELISA 套組(Cell Signaling, Beverly, Massachusetts)中之溶解緩衝液與完整微型無 EDTA 蛋白酶抑制劑(Roche Diagnostics, Mannheim, Germany)製備溶解物。測定蛋白濃度並將每份試樣 10 μg 總蛋白提取物加載至 ELISA 板上且根據說明書進行處理。使用 HT Fusion (Perkin Elmer) 對各板進行讀數。實施 ELISA 以檢測下列組合研究中所用濃度之替西羅莫司存在下之磷酸-S6 磷酸化量。

實例 4

PI3K-AKT-mTOR 信號傳導路徑組份之西方墨點法

用於量測 PI3K-AKT-mTOR 信號傳導之一級抗體係抗人類磷酸-AKT (Ser 473)(純系：193H12)、抗人類 AKT、抗人類磷酸-4E-BP1 (Thr37/46)、抗人類 4E-BP1、抗人類磷酸-S6 核糖體蛋白(Ser235/236)(純系：2F9)及抗人類 S6 核糖體蛋白(純系：54D2)(Cell Signaling; Beverly, Massachusetts)。

所用二級抗體係過氧化物酶-AffiniPure F(ab')₂片段山羊抗兔IgG(具有F(ab')₂片段特異性)及過氧化物酶-AffiniPure F(ab')₂片段山羊抗小鼠IgG(具有Fcγ片段特異性)(Jackson ImmunoResearch, West Grove, Pennsylvania)。使用SuperSignal West Pico Luminol Enhancer Solution (Thermo Scientific; Rockford, Illinois)化學發光受質進行西方墨點且在暴露至膜下後進行觀察。

實例5

利用雷帕黴素類似物對腎細胞癌進行組合治療

在RCC細胞系中產生ADC h1F6-mcF、替西羅莫司、西羅莫司、依維莫司、h1F6-mcF+替西羅莫司、h1F6-mcF+西羅莫司及h1F6-mcF+依維莫司之劑量反應曲線。在RCC細胞系786-O及Caki-2中，除對於生長於具有低FBS之培養基之Caki-2細胞系外，單獨替西羅莫司及西羅莫司不為有效細胞毒性藥物。然而，替西羅莫司與西羅莫司二者皆可增強h1F6-mcF之細胞毒性。

計算h1F6-mcF+替西羅莫司、h1F6-mcF+替西羅莫司及h1F6-mcF+依維莫司在如上文所述786-O細胞系中之CI。圖2顯示單獨h1F6-mcF及MMAE與雷帕黴素類似物替西羅莫司、西羅莫司及依維莫司在786-O細胞系中具有協同作用。

亦計算h1F6-mcF+替西羅莫司及h1F6-mcF+替西羅莫司在如上文所述Caki-1細胞系中之CI。圖3顯示單獨h1F6-mcF及MMAE與雷帕黴素類似物替西羅莫司及西羅莫司在

Caki-1細胞系中具有協同作用。

顯示h1F6-mcF與西羅莫司、替西羅莫司及依維莫司具有協同作用之結果匯總於表5中。

表 5

細胞系	治療	實驗號	平均CI值 (ED50、ED75、ED90)
786-O	h1F6-mcF+ 西羅莫司	n=3	0.65、0.51、0.52
	h1F6-mcF+ 替西羅莫司	n=3	0.41、0.36、0.55
	h1F6-mcF+ 依維莫司	n=3	0.45、0.47、0.59
	MMAE+ 西羅莫司	n=3	0.51、0.48、0.59
	MMAE+ 替西羅莫司	n=3	0.43、0.38、0.58
Caki-1	h1F6-mcF+ 西羅莫司	n=3	0.63、0.55、0.54
	h1F6-mcF+ 替西羅莫司	n=3	0.37、0.41、0.78
	MMAE+ 西羅莫司	n=3	0.65、0.64、0.70
	MMAE+ 替西羅莫司	n=3	0.36、0.40、0.80
Caki-2	h1F6-mcF+ 西羅莫司	n=3	0.31、0.53、1.33
	h1F6-mcF+ 替西羅莫司	n=3	0.11、0.19、0.75
	MMAE+ 西羅莫司	n=3	0.38、0.57、1.06
	MMAE+ 替西羅莫司	n=3	0.28、0.51、1.20

實例 6

利用雷帕黴素類似物對何傑金氏淋巴瘤及ALCL中進行組合治療

計算 cAC10-vcE+替西羅莫司、MMAE+替西羅莫司及 cAC10-vcE+依維莫司在如上文所述 L540cy 細胞系中之 CI。計算 cAC10-vcE+替西羅莫司、MMAE+替西羅莫司及 cAC10-vcE+西羅莫司在如上文所述 Karpas 299 細胞系中之 CI。圖 4 顯示 cAC10-vcE 及 MMAE 與雷帕黴素類似物替西羅莫司及西羅莫司具有協同作用。

顯示 cAC10-vcE 與西羅莫司、依維莫司及替西羅莫司具有協同作用之結果匯總於表 6 中。

表 6

細胞系	治療	實驗號	平均CI值 (ED50、ED75、ED90)
L540cy (T樣HL)	cAC10-vcE+替西羅莫司	n=3	0.66、0.50、0.51
	MMAE+ 替西羅莫司	n=3	0.49、0.37、0.40
L540cy (T樣HL)	cAC10-vcE+ 依維莫司	n=2	0.31、0.28、0.38
L428* (B樣HL)	MMAE+ 替西羅莫司	n=3	0.89、0.70、0.56
Karpas-299 (ALCL)	cAC10-vcE+ 替西羅莫司	n=3	0.42、0.52、0.82
	MMAE+ 替西羅莫司	n=3	0.45、0.47、0.59
Karpas-299 (ALCL)	cAC10-vcE+ 西羅莫司	n=3	0.45、0.47、0.59

*cAC10-vcE 對 L428 細胞系不顯示活體外細胞毒性，因

此不可能進行組合研究。

實例 7

利用 cAC10-vcE 及替西羅莫司對 B 樣何傑金氏淋巴瘤進行活體內組合治療

使用鼠類異種移植模型來測試對 B 樣何傑金氏淋巴瘤進行之活體內組合治療。將 L428 細胞植入 NOD-SCID- γ 小鼠 (The Jackson Laboratory) 中以產生腫瘤。使腫瘤生長至平均為 90 mm³，隨後分選為 7 只小鼠之群組。不對小鼠治療，用替西羅莫司 (20 mg/kg) 治療，用 cAC10-vcE (1.0 mg/kg) 治療或用 cAC10-vcE 及替西羅莫司治療。q4dx4 經腹膜內投與 cAC10-vcE。q4dx4 經腹膜內或 q3dx6 經腹膜內投與替西羅莫司。在組合治療中，在替西羅莫司前 2 天給予 cAC10-vcE。在初始給予後 120 天內定期量測腫瘤體積。將數據繪製為卡-梅氏曲線 (Kaplan-Meier plot)，其顯示腫瘤增至三倍之速率。使用對數秩測試計算 P 值以驗證統計學顯著性。如在圖 5 中可以發現，cAC10-vcE 與替西羅莫司具有顯著優於任一單獨治療之抗腫瘤活性 (P 值 = 0.0011，藉由對數秩測試)。

表 7

治療	增至三倍體積之中值天數	組合對單一藥劑 (P 值)
未治療	19	
cAC10-vcE	52	p=0.001
替西羅莫司	56	p=0.001
cAC10-vcE+替西羅莫司	118	

實例 8

利用 cAC10-vcE 及依維莫司對 B 樣何傑金氏淋巴瘤進行活體內組合治療

使用鼠類異種移植模型來測試對 B 樣何傑金氏淋巴瘤進行之活體內組合治療。將 L428 細胞植入 NOD-SCID- γ 小鼠 (The Jackson Laboratory) 中以產生腫瘤。使腫瘤生長至平均為 90 mm³，隨後分選為 10 只小鼠之群組。不對小鼠治療，用依維莫司 (15 mg/kg) 治療，用 cAC10 (1 mg/kg) 治療，用 cAC10-vcE (1.0 mg/kg) 治療，用 cAC10 及依維莫司治療，或用 cAC10-vcE 及依維莫司治療。q4dx4 經腹膜內投與 cAC10-vcE 及 cAC10。q1dx14 經口投與依維莫司。在第 61 天，cAC10-vcE 及依維莫司組合治療組具有 10/10 完全反應且 cAC10-vcE 及依維莫司單一治療組不具有完全反應。

實例 9

利用雷帕黴素類似物對非何傑金氏淋巴瘤進行組合治療

計算 hBU12-mcF+替西羅莫司及 hBU12-mcF+西羅莫司在如上文所述 HT 細胞系中之 CI。圖 6 顯示 hBU12-mcF 與雷帕黴素類似物替西羅莫司及西羅莫司在 HT 細胞系中具有協同作用。

顯示 hBU12-mcF 與西羅莫司、替西羅莫司及依維莫司具有協同作用之結果匯總於表 8 中。

表 8

細胞系	治療	實驗 號	平均CI值 (ED50、ED75、ED90)
HT	hBU12-mcF+替西羅莫司	n=3	0.71、0.66、0.64
	hBU12-mcF+西羅莫司	n=3	0.77、0.68、0.60
	hBU12-mcF+依維莫司	n=2	0.54、0.55、0.65
Jeko-1	h1F6-mcF+依維莫司	n=3	0.91、0.69、0.54

實例 10

利用雙特異性PI3K-mTOR抑制劑及選擇性mTor抑制劑進行組合治療

計算 h1F6-mcF+BEZ235 在 786-O 細胞、Caki-1 細胞、Jeko-1 細胞及 Raji-4RH-11 細胞中之 CI；cAC10-vcE+BEZ235 及 cAC10-vcE+PP242 在 L540cy (HL) 細胞中之 CI；cAC10-vcE+BEZ235 在 Karpas-299 細胞中之 CI；hBU12-mcF+BEZ235 在 HT 細胞中之 CI 及 h1F6-mcF+PP242 在 Jeko-1 細胞中之 CI，如上文所述。圖 8 顯示 NVP-BEZ235 與奧裡斯他汀 ADC(例如雷帕黴素類似物替西羅莫司及西羅莫司)在多個細胞系中具有協同作用。RCC 及 NHL 細胞系(尤其在 ED₉₀ 下)顯示較低 CI 值，此表明較大協同作用。

顯示 NVP-BEZ235 及 PP242 與奧裡斯他汀 ADC 具有協同作用之結果匯總於表 9 中。

表 9

細胞系	治療	實驗號	平均CI值 (ED50、ED75、ED90)
786-O	h1F6-mcF+BEZ235	n=3	0.78、0.63、0.52
Caki-1	h1F6-mcF+BEZ235	n=3	0.75、0.68、0.64
L540cy	cAC10-vcE+BEZ235	n=3	0.68、0.56、0.47
	cAC10-vcE+PP242	n=2	0.74、0.76、0.79
	MMAE+BEZ235	n=3	0.91、0.75、0.63
L428	MMAE+BEZ235	n=3	0.62、0.59、0.56
Karpas-299	cAC10-vcE+BEZ235	n=2	0.81、0.79、0.78
Raji-4RH-11	h1F6-mcF+BEZ235	n=3	0.91、0.71、0.58
HT	hBU12-mcF+BEZ235	n=3	0.59、0.40、0.30
Jeko-1	h1F6-mcF+PP242	n=3	0.91、0.76、0.66
Jeko-1	h1F6-mcF+BEZ235	n=3	0.72、0.55、0.42

實例 11

利用 P13K 及 AKT 抑制劑進行組合治療

計算 h1F6-mcF+MK-2206 在 Jeko-1 細胞中之 CI 及 hBU12-mcF 及 XL147 在 HT 細胞中之 CI。

顯示 P13K 及 AKT 抑制劑與奧裡斯他汀 ADC 具有協同作用之結果匯總於表 10 中。

表 10

細胞系	治療	實驗號	平均CI值 (ED50、ED75、ED90)
Jeko-1	h1F6-mcF+MK2206	n=3	0.69、0.54、0.44
HT	hBU12-mcF+XL147	n=1	1.08、0.36、0.12
HT	hBU12-mcF+MK-2206	n=3	1.3、0.95、0.75
HT	hBU12-mcF+BKM-120	n=3	0.74、0.75、0.79

實例 12

實例性分析

確定化合物是否抑制PI3K之實例性分析提供於Knight等人(2006) Cell, 第125卷, 第733-747頁中, 該文獻之全部內容以引用方式併入本文中。簡言之, 使用用於脂質激酶活性之標準TLC分析或高通量膜捕獲分析來量測IC₅₀值。藉由製備含有激酶、抑制劑(2% DMSO最終濃度)、緩衝液(25 mM HEPES, pH 7.4, 10 mM MgCl₂)及剛經超聲處理之磷脂酰肌醇(100 µg/ml)之反應混合物來實施激酶反應。藉由添加含有10 µCi γ-³²P-ATP之ATP至10 µM或100 µM之最終濃度來起始反應。使反應在室溫下進行20分鐘。對於TLC分析而言, 藉由依次添加105 µl 1N HCl及160 µl CHCl₃:MeOH (1:1)來終止反應。對二相混合物實施渦旋, 短暫地離心, 並使用預先塗佈有CHCl₃之凝膠加載移液管尖端將有機相轉移至新管中。將此提取物點漬於TLC板上並在正丙醇:1 M乙酸之65:35溶液中顯影3至4小時。將TLC板乾燥, 暴露至磷光成像儀螢幕(phosphorimager screen) (Storm, Amersham)且實施量化。對於每一化合物而言, 通常以10至12種抑制劑濃度量測激酶活性, 該等濃度代表自最高測試濃度(100 µM)之兩倍稀釋液。

確定激酶選擇性(mTORC1/2)之實例性分析如下。為確定激酶抑制劑之選擇性, 針對一大組純化蛋白激酶於活體外(在10 µM ATP存在下)以比IC₅₀值高100倍之濃度測試化合物對mTOR之抑制(Feldman等人(2009) PLOS

Biology, 第7(2)卷第371-383頁)。約100倍或更高之IC₅₀值差(對於mTOR對其他激酶)顯示選擇性。每一激酶具有獨特的蛋白或脂質受質。

確定化合物是否與ATP競爭接合之實例性分析利用米凱利斯-門頓動力學(Michaelis-Menten kinetics)來確定化合物使激酶活性降低,但其可藉由增加受質濃度(ATP)來克服。納入激酶受質(蛋白或肽)中之經放射標記之ATP (32P-ATP)量係激酶分析之讀取值。對化合物進行滴定可降低32P-ATP納入受質中之量。僅當化合物為ATP競爭性化合物時,增加ATP存於分析中之量可克服化合物之效能。

【圖式簡單說明】

圖1及1A顯示磷酸-AKT、AKT、磷酸-S6、S6、磷酸-4E-BP1、4E-BP1、PTEN及β-肌動蛋白在所選癌細胞系中之含量。

圖2顯示在有效劑量50、有效劑量75及有效劑量90下計算之h1F6-mcF+替西羅莫司、h1F6-mcF+西羅莫司、MMAE+替西羅莫司以及MMAE+西羅莫司在786-O (RCC)細胞系中之組合指數(CI)。

圖3顯示在有效劑量50、有效劑量75及有效劑量90下計算之h1F6-mcF+替西羅莫司、h1F6-mcF+西羅莫司、MMAE+替西羅莫司及MMAE+西羅莫司在Caki-1 (RCC)細胞系中之CI。

圖4顯示在有效劑量50、有效劑量75及有效劑量90下計算之cAC10-vcMMAE+替西羅莫司在L540cy(T細胞樣HL)細胞系中之CI。

胞系中之CI以及cAC10-vcMMAE+替西羅莫司及cAC10-vcMMAE+西羅莫司在Karpas-299 (ALCL)細胞系中之CI。

圖5顯示，cAC10-vcMMAE與替西羅莫司在B樣HL鼠類異種移植模型中協同延遲活體內腫瘤生長。

圖6顯示，cAC10-vcMMAE與依維莫司在B樣HL鼠類異種移植模型中協同延遲活體內腫瘤生長。

圖7顯示在有效劑量50、有效劑量75及有效劑量90下計算之hBU12-mcF+替西羅莫司及hBU12-mcF+西羅莫司在HT (NHL)細胞系中之CI。

圖8顯示在有效劑量50、有效劑量75及有效劑量90下計算之h1F6-mcF+BEZ235在786-O (RCC)細胞系中之CI、h1F6-mcF+BEZ235在Caki-1 (RCC)細胞系中之CI、cAC10-vcMMAE+BEZ235在L540cy (HL)細胞系中之CI及hBU12-mcF+BEZ235在HT (NHL)細胞系中之CI。

序列表

<110> 美商西雅圖遺傳學公司

<120> 以奧裡斯他汀為主之抗體藥物結合物及 PI3K-AKT mTOR 路徑抑制劑間的協同功效

<130> 1000-01212PC

<140> 100138137

<141> 2011-10-20

<150> US 61/405,767

<151> 2010-10-22

<150> US 61/445,785

<151> 2011-02-23

<160> 12

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 117

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 1

Gln Ile Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Val Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

Tyr Ile Thr Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Asn Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Phe
65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Asn Tyr Gly Asn Tyr Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln
100 105 110

Val Thr Val Ser Ala
115

<210> 2

<211> 111

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 2

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

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

Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

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

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
65 70 75 80

Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
85 90 95

Glu Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 3
<211> 118
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 3

Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15

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

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

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

Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Tyr Gly Asp Tyr Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Ser Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 4
<211> 112
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 4

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser
20 25 30

Gly Tyr Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

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

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
65 70 75 80

Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg
85 90 95

Glu Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105 110

<210> 5
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人類化鼠類序列

<400> 5

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

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

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

Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Tyr Gly Asp Tyr Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 6
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人類化鼠類序列

<400> 6

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Lys Ser Val Ser Thr Ser
20 25 30

Gly Tyr Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

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

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80

Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg
85 90 95

Glu Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105 110

<210> 7
<211> 120
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 7

Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln Pro Ser Gln
1 5 10 15

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

Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ala
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Ser Asn Gln Val
65 70 75 80

Phe Leu Lys Ile Ala Ser Val Asp Thr Ala Asp Thr Ala Ala Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Met Glu Leu Trp Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 8
<211> 107
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 8

Glu Asn Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Ser Thr Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr
35 40 45

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Gly Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Asn Ser His Phe Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
65 70 75 80

Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Val Tyr Pro Phe Thr
85 90 95

Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 9
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人類化鼠類序列

<400> 9

Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1 5 10 15

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

Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln His Pro Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Ile Gly His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Arg Tyr Asn Pro Ala
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
65 70 75 80

Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Met Glu Leu Trp Ser Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 10
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人類化鼠類序列

<400> 10

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

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

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
35 40 45

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu
65 70 75 80

Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Val Tyr Pro Phe Thr
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 11
<211> 330
<212> PRT
<213> 智人

<400> 11

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

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

225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270

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

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

$\langle 210 \rangle$	12
$\langle 211 \rangle$	106
$\langle 212 \rangle$	PRT
$\langle 213 \rangle$	智人

<400> 12

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
1 5 10 15

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

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
35 40 45

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
50 55 60

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
65 70 75 80

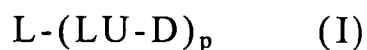
His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
85 90 95

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

七、申請專利範圍：

1. 一種以奧裡斯他汀(auristatin)為主之抗體藥物結合物之用途，其係用於製備與結合至mTOR之抑制劑併用治療癌症之醫藥品，其中該癌症細胞表現結合至該結合物之抗體時可內化的抗原，且該細胞之特徵在於PI3K-AKT-mTOR路徑之組成型活化。
2. 如前述請求項1之用途，其中該結合至mTOR之抑制劑係活性位點mTOR抑制劑。
3. 如請求項2之用途，其中該活性位點mTOR抑制劑係PI3K及mTORC1/2之雙特異性抑制劑。
4. 如請求項3之用途，其中該PI3K及mTORC1/2之雙特異性抑制劑係NVP-BEZ235。
5. 如請求項2之用途，其中該活性位點mTOR抑制劑係選擇性mTOR抑制劑。
6. 如請求項5之用途，其中該選擇性mTOR抑制劑係PP242。
7. 如請求項1之用途，其中該結合至mTOR之抑制劑係非活性位點mTOR抑制劑。
8. 如請求項7之用途，其中該非活性位點mTOR抑制劑係雷帕黴素類似物(rapalog)。
9. 如請求項8之用途，其中該雷帕黴素類似物係西羅莫司(sirrolimus)、替西羅莫司(temsirolimus)、依維莫司(everolimus)或地磷莫司(deforolimus)。
10. 如請求項1之用途，其中該以奧裡斯他汀為主之抗體藥

物結合物具有下式：



或其醫藥上可接受之鹽；

其中：

L係特異性結合癌細胞表面上之癌細胞抗原之抗體；及

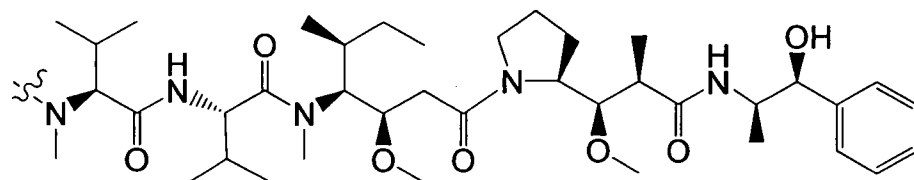
(LU-D)係連接體單元-藥物單元部分，其中：

LU-係連接體單元，及

-D係針對靶細胞具有細胞生長抑制或細胞毒性活性之奧裡斯他汀；及

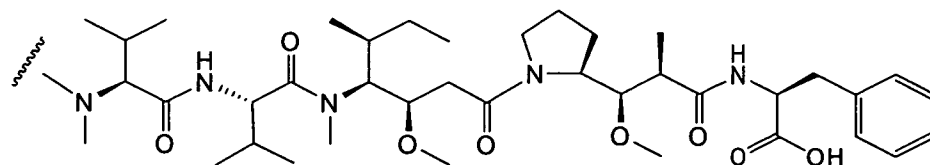
p係1至20。

11. 如請求項10之用途，其中該奧裡斯他汀具有下式：



或其醫藥上可接受之鹽形式。

12. 如請求項10之用途，其中該奧裡斯他汀具有下式：



或其醫藥上可接受之鹽形式。

13. 如請求項10之用途，其中該以奧裡斯他汀為主之抗體藥物結合物具有下式：

19. 如請求項1之用途，其中該癌症表現CD30抗原，且該以奧裡斯他汀為主之抗體藥物結合物係以奧裡斯他汀為主之抗CD30抗體藥物結合物。
20. 如請求項19之用途，其中該癌症係何傑金氏淋巴瘤。
21. 如請求項20之用途，其中該以奧裡斯他汀為主之抗體藥物結合物係cAC10-vcE抗體藥物結合物。
22. 如請求項21之用途，其中該cAC10-vcE抗體藥物結合物係布吐西單抗維多汀(brentuximab vedotin)。
23. 如請求項1之用途，其中該癌症表現CD19抗原，且該以奧裡斯他汀為主之抗體藥物結合物係抗以奧裡斯他汀為主之CD19抗體藥物結合物。
24. 如請求項23之用途，其中該癌症係非何傑金氏淋巴瘤(NHL)。
25. 如請求項24之用途，其中該癌症係外套細胞淋巴瘤或瀰漫性大B細胞淋巴瘤。
26. 如請求項23之用途，其中該癌症係慢性淋巴球性白血病或急性淋巴母細胞性白血病。
27. 如請求項23之用途，其中該以奧裡斯他汀為主之抗體藥物結合物係hBU12-mcF。
28. 如請求項27之用途，其中該hBU12-mcF結合物係SGN-19A。

h1F6-mcF 及 MMAE 與雷帕微素類似物組合具有協同作用
786-O RCC 細胞系(n=3)

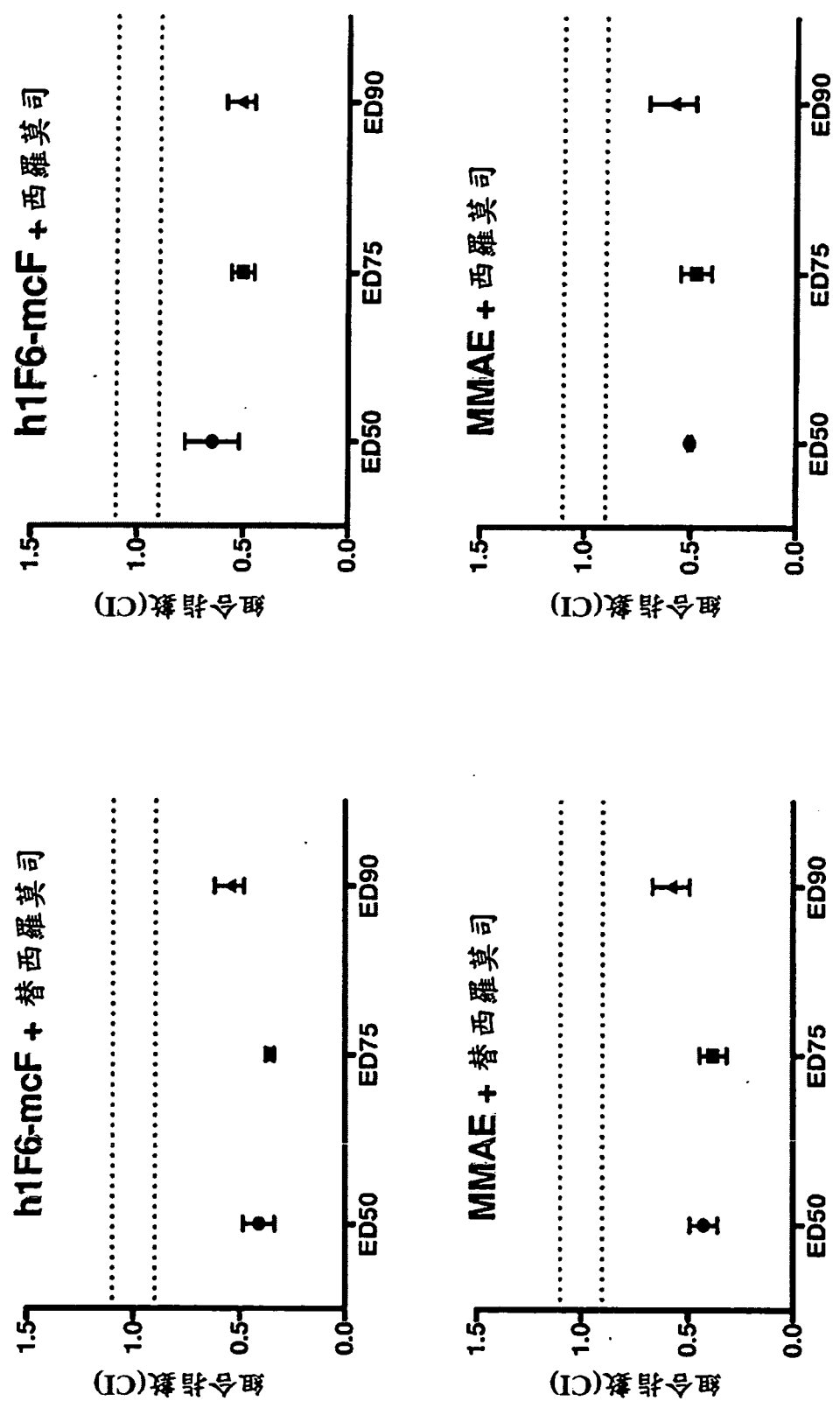


圖 2

h1F6-mcF 及 MMAE 與雷帕黴素類似物組合具有協同作用
Caki-1 RCC 細胞系(n=3)

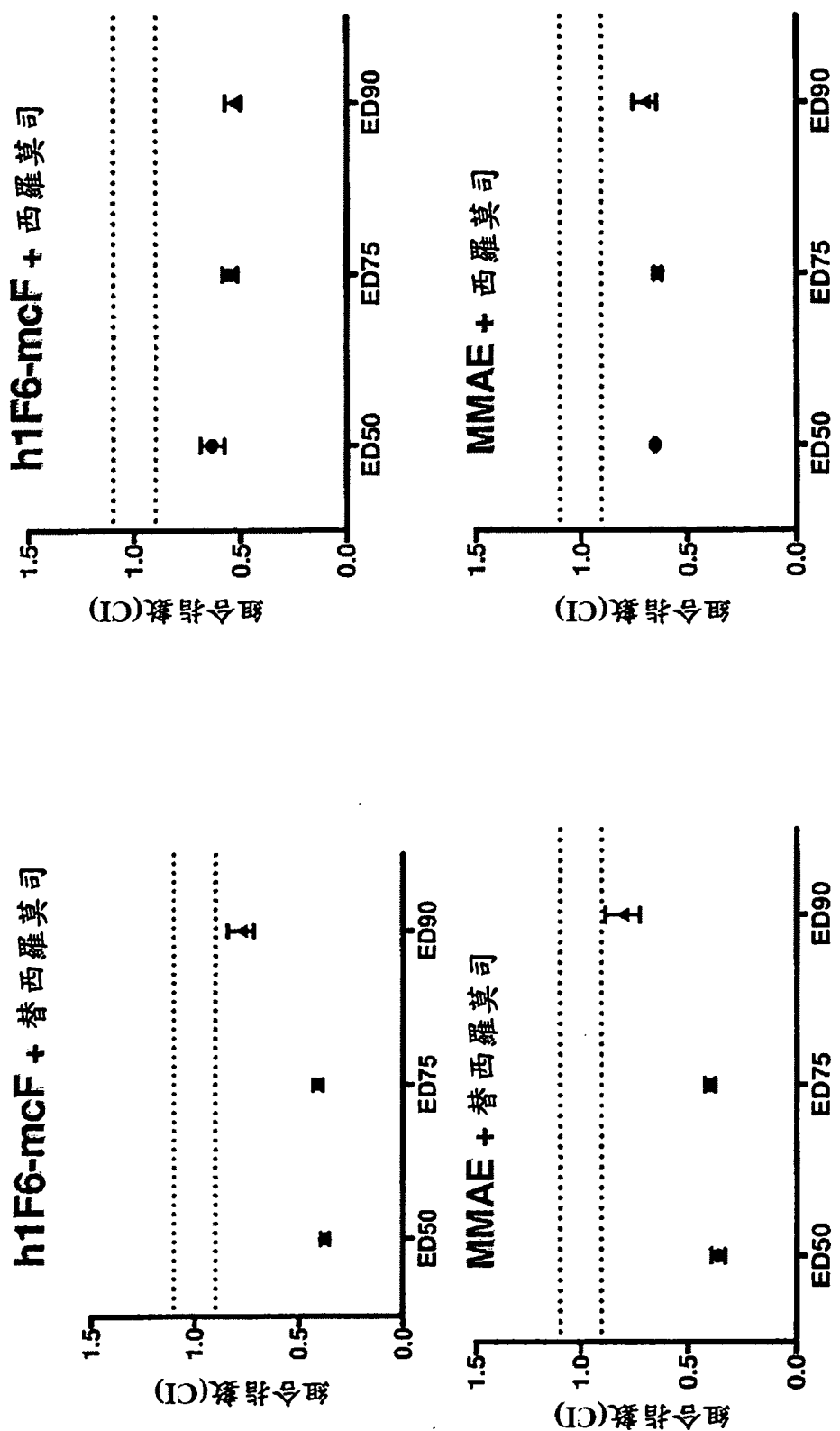
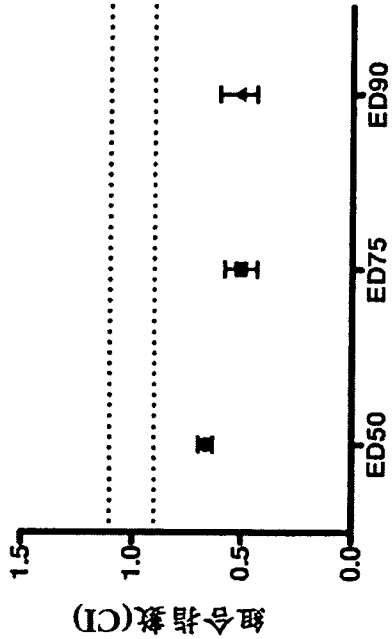


圖 3

**cAC10-vcE 與雷帕黴素類似物組合對活體
外 HL 及 ALCL 細胞具有協同作用**

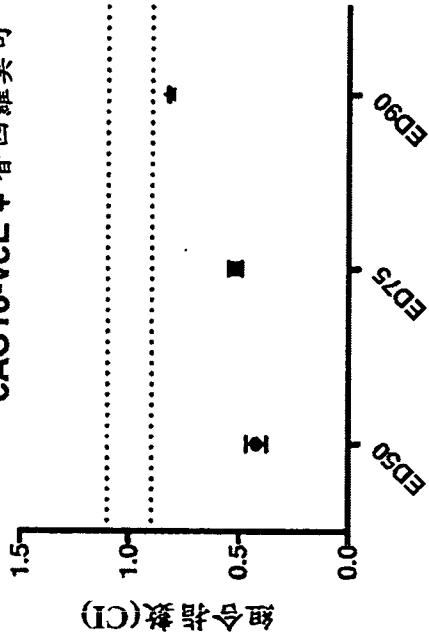
cAC10-vcE + 替西羅莫司



<0.9 = 協同作用
0.9-1.1 = 加和性
>1.1 = 拮抗作用

L540cy
(T 樣 HL)

cAC10-vcE + 替西羅莫司



Karpas-299
(ALCL)

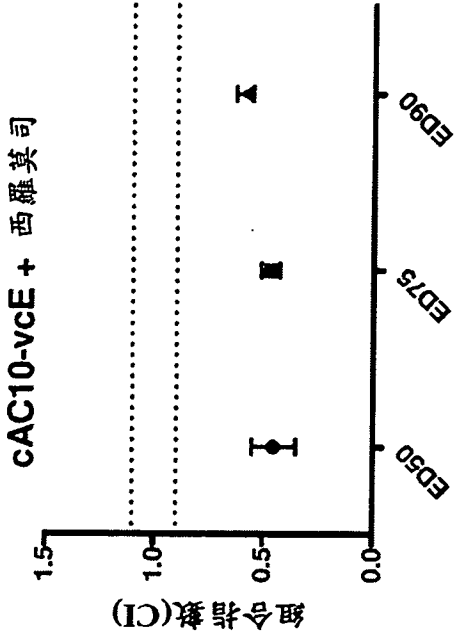


圖 4

cAC10-vcMMAE 與替西羅莫司具有協同作用
(B 樣何傑金氏淋巴瘤異種移植模型)

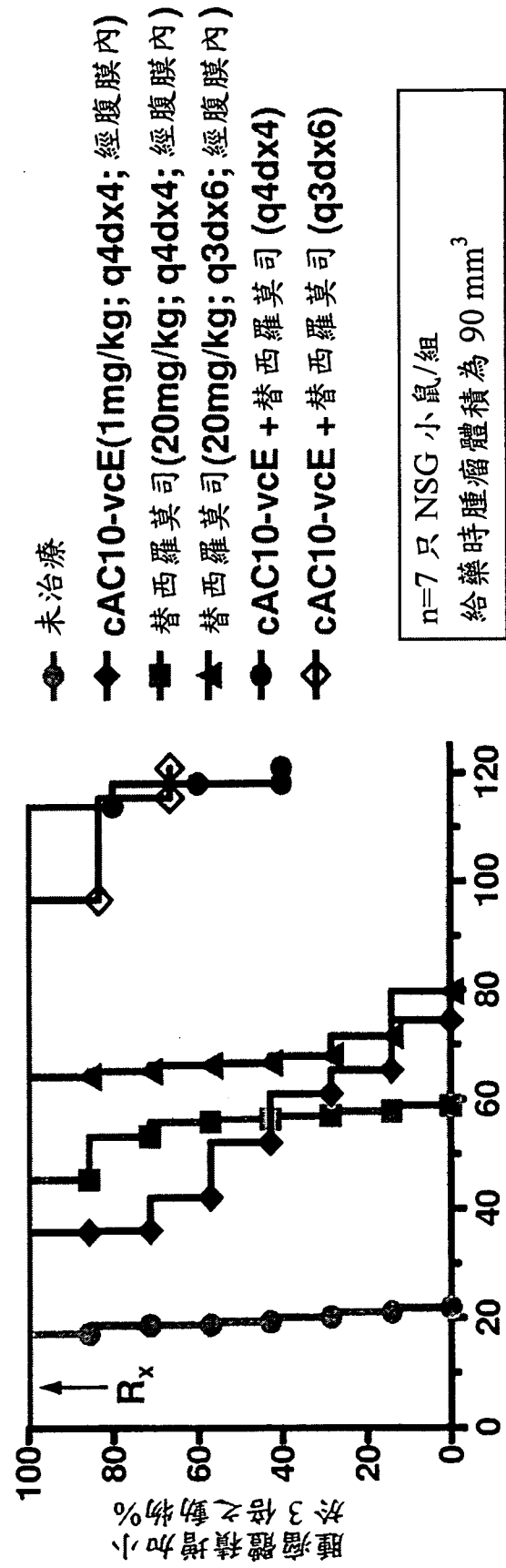


圖 5

cAC10-vcMMAE 與依維莫司具有協同作用
(L428 B 樣何傑金氏淋巴瘤異種移植模型)

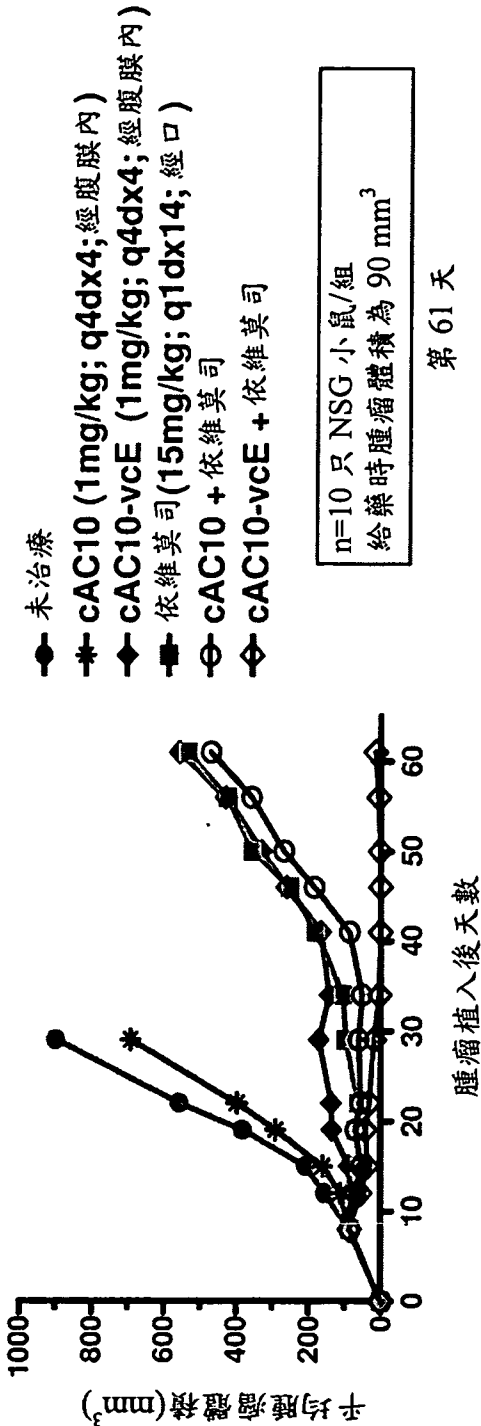


圖 6

hBU12-mcF 與雷帕黴素類似物組合對
CD19⁺細胞系 HT 具有協同作用

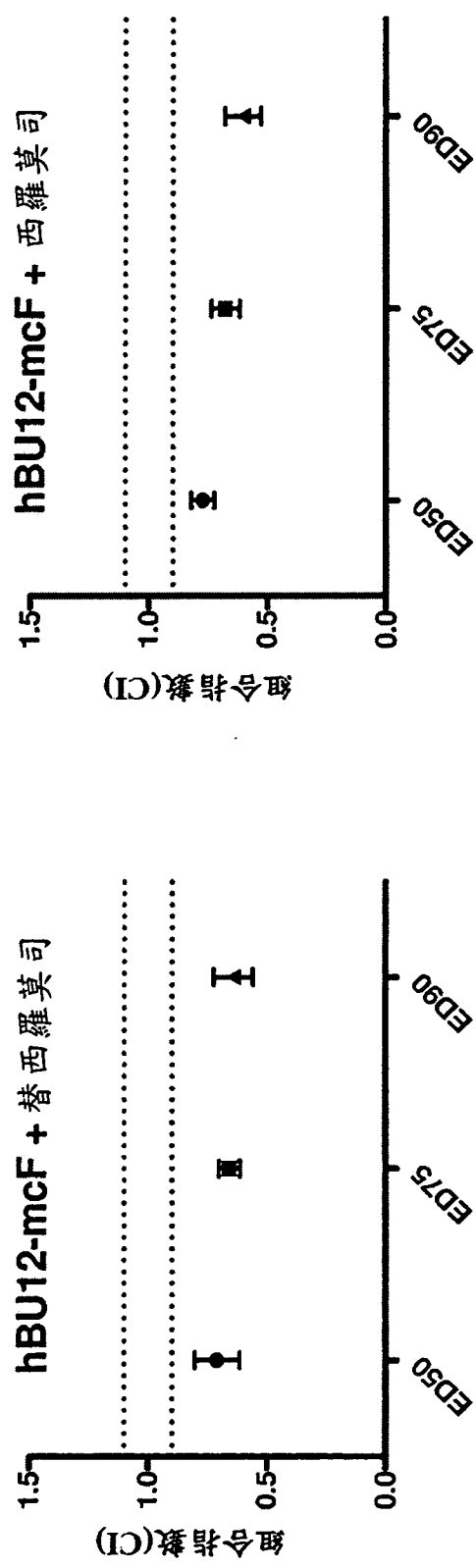


圖 7

NVP-BEZ235 與奧裡斯他汀 ADC 具有協同作用

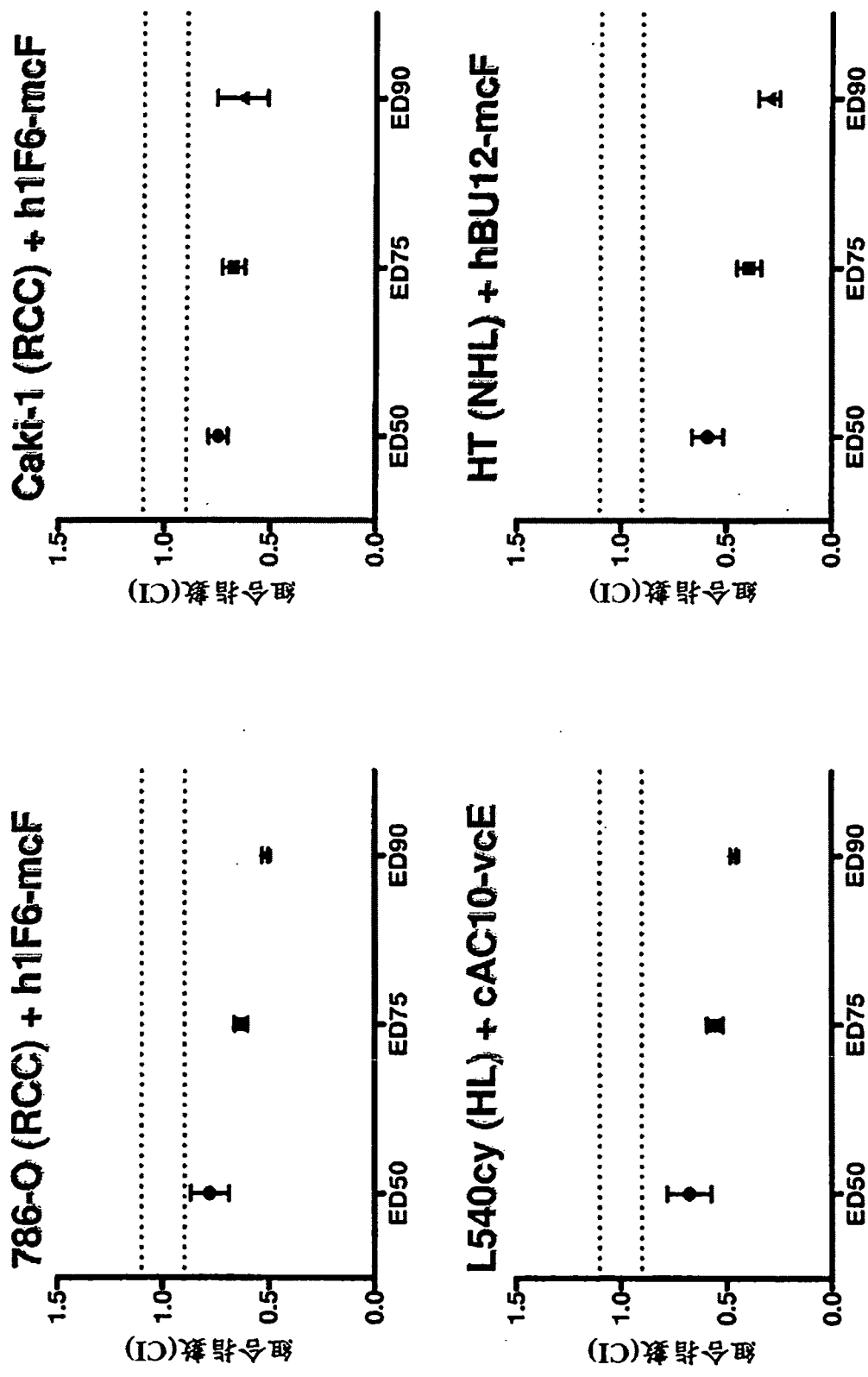


圖 8