



(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 I851580 B

(45)公告日：中華民國 113 (2024) 年 08 月 11 日

(21)申請案號：108121725 (22)申請日：中華民國 108 (2019) 年 06 月 21 日

(51)Int. Cl. : C07K7/08 (2006.01) A61K47/55 (2017.01)  
A61K47/65 (2017.01) A61P35/00 (2006.01)

(30)優先權：2018/06/22 英國 1810250.9  
2018/09/26 英國 1815684.4  
2018/11/13 英國 1818499.4  
2019/04/02 英國 1904632.5

(71)申請人：英商拜西可泰克斯有限公司 (英國) BICYCLETX LIMITED (GB)  
英國

(72)發明人：拜思維克 保羅 BESWICK, PAUL (GB)；陳 劉宏 CHEN, LIUHONG (GB)；摩  
德 吉馬 MUDD, GEMMA (GB)；帕克 彼得 PARK, PETER (GB)；范 麗特斯  
考特恩 凱特琳 VAN RIETSCHOTEN, KATERINE (GB)；雷茲比 麥可 RIGBY,  
MICHAEL (GB)

(74)代理人：吳冠賜；蘇建太

(56)參考文獻：  
WO 2012/164004A1 WO 2017/042210A1  
期刊 Challita-Eid et al., "Enfortumab Vedotin Antibody-Drug  
Conjugate Targeting Nectin-4 Is a Highly Potent Therapeutic Agent  
in Multiple Preclinical Cancer Models", Cancer Research, 2016, 76  
(10), pp 3003-3013.

審查人員：方冠岳

申請專利範圍項數：19 項 圖式數：34 共 244 頁

(54)名稱  
對 NECTIN-4 具有專一性之雙環胜肽配體

(57)摘要

本發明係關於一種與分子支架共價結合使得二或多個胜肽環介於與該支架的連接點之間的多肽。特定而言，本發明記載的胜肽為 Nectin-4 的高親和性結合劑。本發明另包括含有結合至一或多效應物及/或官能基的胜肽的藥物結合物、包括該胜肽配體或藥物結合物之醫藥組成物、以及該胜肽配體和藥物結合物用於預防、抑制或治療 Nectin-4 介導的疾病或病症之用途。

The present invention relates to polypeptides which are covalently bound to molecular scaffolds such that two or more peptide loops are subtended between attachment points to the scaffold. In particular, the invention describes peptides which are high affinity binders of Nectin-4. The invention also includes drug conjugates comprising said peptides, conjugated to one or more effector and/or functional groups, to pharmaceutical compositions comprising said peptide ligands and drug conjugates and to the use of said peptide ligands and drug conjugates in preventing, suppressing or treating a disease or disorder mediated by Nectin-4.

指定代表圖：

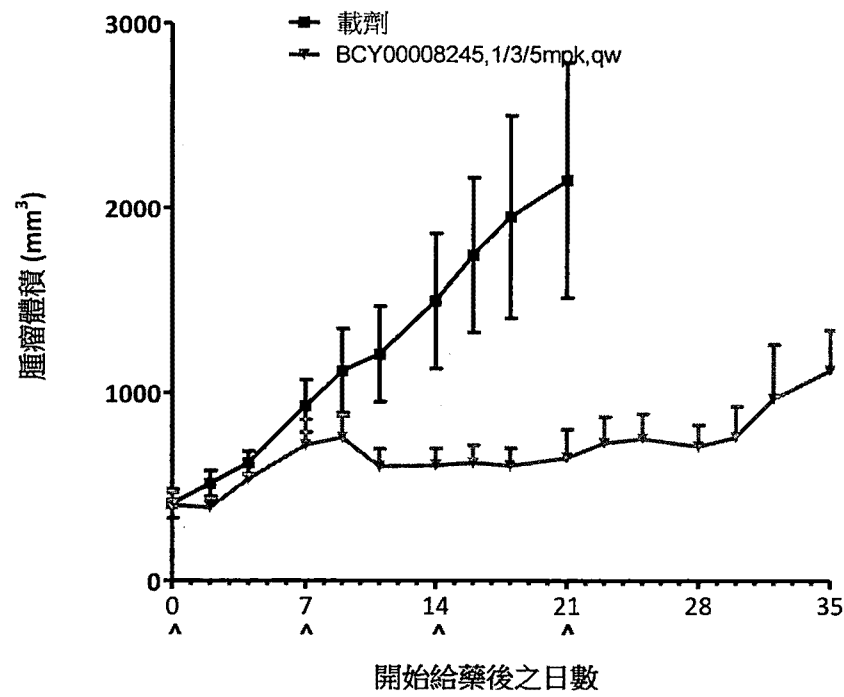


圖 1

I851580

## 【發明摘要】

【中文發明名稱】對 NECTIN-4 具有專一性之雙環胜肽配體

【英文發明名稱】BICYCLIC PEPTIDE LIGANDS SPECIFIC FOR NECTIN-4

【中文】本發明係關於一種與分子支架共價結合使得二或多個胜肽環介於與該支架的連接點之間的多肽。特定而言，本發明記載的胜肽為Nectin-4的高親和性結合劑。本發明另包括含有結合至一或多效應物及/或官能基的胜肽的藥物結合物、包括該胜肽配體或藥物結合物之醫藥組成物、以及該胜肽配體和藥物結合物用於預防、抑制或治療Nectin-4介導的疾病或病症之用途。

【英文】The present invention relates to polypeptides which are covalently bound to molecular scaffolds such that two or more peptide loops are subtended between attachment points to the scaffold. In particular, the invention describes peptides which are high affinity binders of Nectin-4. The invention also includes drug conjugates comprising said peptides, conjugated to one or more effector and/or functional groups, to pharmaceutical compositions comprising said peptide ligands and drug conjugates and to the use of said peptide ligands and drug conjugates in preventing, suppressing or treating a disease or disorder mediated by Nectin-4.

【指定代表圖】圖1

【代表圖之符號簡單說明】無

【特徵化學式】無

## 【發明說明書】

【中文發明名稱】對NECTIN-4具有專一性之雙環胜肽配體

【英文發明名稱】BICYCLIC PEPTIDE LIGANDS SPECIFIC FOR NECTIN-4

### 【技術領域】

【0001】 本發明係關於一種與分子支架共價結合使得二或多胜肽環介於支架連接點之間的多肽。特定而言，本發明揭示之胜肽為Nectin-4的高親和性結合劑。本發明另包括含有結合至一或多效應物及/或官能基之該胜肽的藥物結合物、包括該胜肽配體或藥物結合物之醫藥組成物、以及該胜肽配體和藥物結合物用於預防、抑制或治療Nectin-4介導的疾病或病症之用途。

### 【先前技術】

【0002】 環肽能夠以高親和性和標的專一性結合於標的蛋白，因此對於醫療的發展來說是具有吸引力的分子類別。事實上有數種環肽已成功用於臨床，例如抗菌胜肽萬古黴素、免疫抑制藥物環孢素、或抗癌藥物奧曲肽 (Driggers *et al.* (2008), Nat Rev Drug Discov 7 (7), 608-24)。其良好的結合特性係源自形成於胜肽和標的之間相對較大的交互作用表面以及降低的環狀結構構形可撓性。大環通常結合至數百平方埃(angstrom)之表面，例如環肽CXCR4拮抗劑CVX15(400 Å<sup>2</sup>; Wu *et al.* (2007), Science 330, 1066-71)、具有Arg-Gly-Asp模體結合至組合蛋白αVb3之環肽(355 Å<sup>2</sup>)(Xiong *et al.* (2002), Science 296 (5565), 151-5)、或結合至尿酸酶型血漿蛋白原活化因子的環肽抑制劑upain-1(603 Å<sup>2</sup>; Zhao *et al.* (2007), J Struct Biol 160 (1), 1-10)。

【0003】由於其環狀結構，大環胜肽相較於線狀胜肽具有較低可撓性，使得結合至標靶時熵損失較少，並產生較高的結合親和力。降低的可撓性亦產生鎖定的標靶專一性結構，相較於線狀胜肽具有增強的結合專一性。前述功效已藉由基質金屬蛋白酶8(MMP8)之有效選擇性抑制劑例示，其在環被打開時喪失對於其他MMP之選擇性(Cherney *et al.* (1998), J Med Chem 41 (11), 1749-51)。通過大環化所實現之較佳結合特性在具有不只一個肽環的多環胜肽中更加顯著，例如萬古黴素、乳酸鏈球菌素、和放線菌素。

【0004】多組研究團隊先前已將具有半胱胺酸殘基之多肽連接至合成的分子結構(Kemp and McNamara (1985), J. Org. Chem; Timmerman *et al.* (2005), ChemBioChem)。Meloan與其同事使用參(溴甲基)苯以及相關分子來將多個肽環快速且大量地環化至合成支架上以在結構上模擬蛋白表面(Timmerman *et al.* (2005), ChemBioChem)。製造候選藥物化合物之方法中該化合物藉由連接具有多肽之半胱胺酸與分子支架而產生，該分子支架例如TATA (1,1',1''-(1,3,5-三嗪烷-1,3,5-三基)三丙-2-烯-1-酮，Heinis *et al.* Angew Chem, Int Ed. 2014; 53:1602–1606)。

【0005】已經開發了基於噬菌體呈現之組合方法來產生和篩選針對目標標靶的大雙環胜肽庫(Heinis *et al.* (2009), Nat Chem Biol 5 (7), 502-7及WO 2009/098450)。簡而言之，將包括三半胱胺酸殘基以及二區域之6隨機胺基酸(Cys-(Xaa)6-Cys-(Xaa)6-Cys)的線狀胜肽之組合庫呈現於噬菌體上，並藉由共價連接半胱胺酸側鏈與小分子支架而環化。

## 【發明內容】

【0006】 本發明之第一實施態樣提供一種 Nectin-4 特用之胜肽配體，包括：一多肽，包括至少三半胱胺酸殘基，以至少二環狀序列分離；以及一分子支架，與該多肽之該些半胱胺酸殘基形成共價鍵，使得至少二多肽環形成於該分子支架上；其中該胜肽配體包括以下胺基酸序列：

$C_iP[1Nal][dD]C_{ii}M[HArg]DWSTP[HyP]WC_{iii}$  (SEQ ID NO: 1)；

其中 1 Nal 表示 1-萘基丙胺酸，HArg 表示高精胺酸，HyP 表示羥脯胺酸，

$C_i$ 、 $C_{ii}$ 、和  $C_{iii}$  分別表示第一、第二、和第三半胱胺酸殘基或其醫藥上可接受之鹽。

【0007】 本發明之另一實施態樣提供一種藥物結合物，包括結合至一或多效應物和/或官能基之本說明書定義之胜肽配體。

【0008】 本發明之另一實施態樣提供一種醫藥組成物，包括本說明書定義之胜肽配體或藥物結合物以及一或多醫藥上可接受之賦形劑。

【0009】 本發明之另一實施態樣提供一種本說明書定義之胜肽配體或藥物結合物用於預防、抑制或治療 Nectin-4 介導之疾病或病症之用途。

## 【圖式簡單說明】

### 【0010】

圖 1 和圖 2 為將 BCY8245 施用於具有 NCI-H292 異體移植之 BALB/c 雌性裸鼠後之腫瘤體積紀錄。

圖 3 和圖 4 為將 BCY8245 施用於具有 HT-1376 異體移植之 CB17-SCID 雌鼠後之腫瘤體積紀錄。

圖 5 為將 BCY8245 施用於具有 Panc2.13 異體移植之 Balb/c 雌性裸鼠後之腫瘤體積紀錄。

圖 6 為將 BCY8245 施用於具有 MDA-MB-468 異體移植之 Balb/c 雌性裸鼠後之腫瘤體積紀錄。

圖 7 為將 BCY8549 (以 BCY8245 作為對照)施用於具有 NCI-H292 異體移植之 Balb/c 雌性裸鼠後之腫瘤體積紀錄。

圖 8 為乳腺 (T-47D 和 MDA-MB-468) 中 Nectin-4 的圈選策略。

圖 9 為 NCI-H292 和 NCI-H322 中 Nectin-4 的圈選策略。

圖 10 和圖 11 分別為 NCI-H526 和 HT1080 中對於 Nectin-4 的圈選策略。

圖 12 至圖 16 分別為膀胱癌(HT1376；圖 12)、乳癌(MDA-MB-468；圖 13)、結腸直腸癌(HT-29；圖 14A 和 HCT-116；圖 14B))、肺癌(A549；圖 15A，NCI-H292；圖 15B，NCI-H358；圖 15C 和 NCI-526；圖 15D)和胰腺癌(Panc02.13；圖 16)中的 Nectin-4 圈選策略。

圖 17 為將 BCY8245 施用於具有 A549 異體移植之 Balb/c 雌性裸鼠後之腫瘤體積紀錄。

圖 18 為將 BCY8245 施用於具有 HCT116 異體移植之 Balb/c 雌性裸鼠後之腫瘤體積紀錄。

圖 19 為將 BCY8245 施用於具有 HT-1376 異體移植之 CB17-SCID 雌鼠後之腫瘤體積紀錄。

圖 20 為將 BCY8245 施用於具有 MDA-MB-468 異體移植之 Balb/c 雌性裸鼠後之腫瘤體積紀錄。

圖 21 為將 BCY8245 施用於具有 NCI-H292 異體移植之 Balb/c 雌性裸鼠後之腫瘤體積紀錄。

圖 22 為將 BCY8245 施用於具有 NCI-H526 異體移植之 Balb/c 雌性裸鼠後之腫瘤體積紀錄。

圖 23 為將 BCY8245 施用於具有 Panc2.13 異體移植之 Balb/c 雌性裸鼠後之腫瘤體積紀錄。

圖 24 為將 BCY8245 或 BCY8245 與 BCY8234 一起施用於具有 MDA-MB-468 異體移植之 Balb/c 雌性裸鼠後之腫瘤體積紀錄。

圖 25 為單獨施用 BCY8245 或將 BCY8245 與 BCY8234 一起施用於具有 MDA-MB-468 異種移植物之 Balb/c 雌性裸鼠後之腫瘤體積紀錄。

圖 26 至圖 31 為 n Lu-01-0412, LU-01-0007、CTG-1771、CTG-1171、CTG-1106 和 CTG-0896 PDX 異種移植物中的腫瘤體積紀錄。

圖 32 顯示 BT8009(即 BCY8245)功效與 CDX/PDX 異種移植物表達相關。具有很少/沒有 Nectin-4 表達的異種移植物表現出降低的腫瘤生長速率。表達 Nectin-4 的異種移植物表現出腫瘤消退。此分析包含了 PDX 和 CDX 模型，且數值係整理自多個報告。

圖 33 顯示 MDA-MB-468 細胞表達 Nectin-4 且顯示 MMAE 於腫瘤中延長滯留。

圖 34 為 MDA-MB-468 細胞株的 HCS-數據分析。

## 【實施方式】

【0011】於一實施例，胜肽配體  
C<sub>i</sub>P[1Nal][dD]C<sub>ii</sub>M[HArg]DWSTP[HyP]WC<sub>iii</sub> (SEQ ID NO: 1)包括一胺基酸序列，  
該胺基酸序列係選自：

[B-Ala][Sar10]-(SEQ ID NO: 1) (以下稱為 BCY8234)；

Ac-[B-Ala][Sar<sub>5</sub>]- (SEQ ID NO: 1) (以下稱為 BCY8122)；

Ac-(SEQ ID NO: 1) (以下稱為 BCY8126)；

(SEQ ID NO: 1) (以下稱為 BCY8116)；

螢光素-(SEQ ID NO: 1) (以下稱為 BCY8205)；以及

[PYA][B-Ala][Sar10]-(SEQ ID NO: 1) (以下稱為 BCY8846)。

【0012】於另一實施例，胜肽配體  
C<sub>i</sub>P[1Nal][dD]C<sub>ii</sub>M[HArg]DWSTP[HyP]WC<sub>iii</sub> (SEQ ID NO: 1)包括一胺基酸序列，  
該胺基酸序列係選自：

B-Ala][Sar10]-(SEQ ID NO: 1) (以下稱為 BCY8234)；

Ac-[B-Ala][Sar<sub>5</sub>]- (SEQ ID NO: 1) (以下稱為 BCY8122)；

Ac-(SEQ ID NO: 1) (以下稱為 BCY8126)；

(SEQ ID NO: 1) (以下稱為 BCY8116)；以及

螢光素-(SEQ ID NO: 1) (以下稱為 BCY8205)。

【0013】於另一實施例，胜肽配體  
C<sub>i</sub>P[1Nal][dD]C<sub>ii</sub>M[HArg]DWSTP[HyP]WC<sub>iii</sub> (SEQ ID NO: 1) 包括一胺基酸序列，  
該胺基酸序列係選自：

Ac-[B-Ala][Sar<sub>5</sub>]- (SEQ ID NO: 1) (以下稱為 BCY8122)；

Ac-(SEQ ID NO: 1) (以下稱為 BCY8126)；以及

(SEQ ID NO: 1) (以下稱為 BCY8116)。

【0014】 本文表 2 所示的數據證實，本實施例的胜肽配體對於人類 Nectin-4 表現出優異的結合水平，如 SPR 結合數據所證明的。

【0015】 於 另 一 實 施 例 ， 胜 肽 配 體  $C_iP[1Nal][dD]C_{ii}M[HAArg]DWSTP[HyP]WC_{iii}$  (SEQ ID NO: 1) 包括一胺基酸序列，該胺基酸序列係選自：

Ac-[B-Ala][Sar<sub>5</sub>]- (SEQ ID NO: 1) (以下稱為 BCY8122)；以及

Ac- (SEQ ID NO: 1) (以下稱為 BCY8126)。

【0016】 本文表 1 所示之數據證實，本實施例之該胜肽配體對於人類 Nectin-4 表現出優異的結合水平，如競爭性結合實驗數據之結合數據所證明的。

【0017】 於 另 一 實 施 例 ， 胜 肽 配 體  $C_iP[1Nal][dD]C_{ii}M[HAArg]DWSTP[HyP]WC_{iii}$  (SEQ ID NO: 1) 包括一胺基酸序列，該胺基酸序列係選自：

[B-Ala][Sar<sub>10</sub>]- (SEQ ID NO: 1) (以下稱為 BCY8234)。

【0018】 本文表 3 所示之數據證實，當與胞殺劑結合時，本實施例的胜肽配體對於人類 Nectin-4 表現出優異的結合水平(< 10 nM)，如 SPR 結合數據所證明的。

【0019】 於一實施例，分子支架係為 1,1',1''-(1,3,5-三嗪烷-1,3,5-三基)三丙-2-烯-1-酮 (TATA) (1,1',1''-(1,3,5-triazinane-1,3,5-triyl)triprop-2-en-1-one (TATA))。

【0020】除非另有定義，否則本說明書中使用的所有技術和科學用語皆具有所屬技術領域中具有通常知識者通常所理解之意義，例如於胜肽化學、細胞培養、噬菌體顯示、核酸化學及生物化學等技術領域。分子生物學、遺傳學、和生物化學方法則使用標準技術(參見 Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed., 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY；Ausubel et al., *Short Protocols in Molecular Biology* (1999) 4<sup>th</sup> ed., John Wiley & Sons, Inc.)，包含於說明書作為參照。

【0021】命名

【0022】編號

【0023】當指稱本發明之胜肽中的胺基酸殘基位置時，由於半胱胺酸殘基( $C_i$ 、 $C_{ii}$ 、和  $C_{iii}$ )是不變的故將其編號省略，因此指稱本發明之胜肽中的胺基酸殘基之編號如下：

【0024】  $C_i$ -P<sub>1</sub>-[1Nal]<sub>2</sub>-[dD]<sub>3</sub>- $C_{ii}$ -M<sub>4</sub>-[HArg]<sub>5</sub>-D<sub>6</sub>-W<sub>7</sub>-S<sub>8</sub>-T<sub>9</sub>-P<sub>10</sub>-[HyP]<sub>11</sub>-W<sub>12</sub>- $C_{ii}$  (SEQ ID NO: 1)

【0025】為了說明起見，假定全部的雙環胜肽均藉由 1,1',1''-(1,3,5-三嗪烷-1,3,5-三基)三丙-2-烯-1-酮(TATA)環化，並產生三取代之結構。由 TATA 形成的環化發生於  $C_i$ 、 $C_{ii}$ 、和  $C_{iii}$ 。

【0026】分子式

【0027】將接至雙環核心序列的 N 或 C 端延伸增加至該序列的左側或右側，並以連號區隔。例如，可將 N 端的  $\beta$ Ala-Sar<sub>10</sub>-Ala 尾部表示為：

$\beta$ Ala-Sar<sub>10</sub>-A-(SEQ ID NO: X)。

【0028】反胜肽序列

【0029】有鑑於 Nair et al (2003) J Immunol 170(3), 1362-1373 的揭露，可知本說明書揭露之胜肽序列於反逆(retro-inverso)形式亦有功能。例如，序列反轉(即 N 端變為 C 端，反之亦然)，其立體化學亦如是反轉(即 D 型胺基酸變為 L 型胺基酸，反之亦然)。

#### 【0030】胜肽配體

【0031】如本說明書所指稱之胜肽配體是指與分子支架共價結合之胜肽。通常這種胜肽包括可與該支架形成共價鍵的二或多個反應基團(即半胱胺酸殘基)、以及被包圍在該些反應基團之間的一序列，該序列被稱為環序列，因為當該胜肽連結該支架時形成一環。在本案例中，該胜肽包括至少三個半胱胺酸殘基(本說明書稱為 C<sub>i</sub>、C<sub>ii</sub> 及 C<sub>iii</sub>)，並於該支架上形成至少二環。

#### 【0032】胜肽配體之優勢

【0033】本發明之雙環胜肽具有多項優勢，使其可作為適當的類藥物分子，用於注射、吸入、鼻腔、眼部、口服、或局部給藥。該些優勢包括：

- 物種交叉反應性：此為臨床前之藥效學和藥物動力學評估之一般需求；
- 蛋白酶穩定性：雙環胜肽配體理想上應對血漿蛋白酶、上皮(「膜錨定(membrane-anchored)」)蛋白酶、胃和腸道蛋白酶、肺表面蛋白酶、胞內蛋白酶等具有穩定性。蛋白酶穩定性可於不同物種之間維持，使得雙環領先候選物可於動物模型中發展出，亦可充滿信心地將其施用於人類；
- 理想的溶解度曲線：此為帶電和親水性比例相對於疏水性殘基和分子內/分子間氫鍵之函數，對於調劑和吸收的目的具有重要性；
- 於循環中具有適當的血漿半衰期：依據臨床用途和治療療程，可能須發展可在急性疾病管理環境中短時間暴露的雙環胜肽，或是發展在循環中具有延

長滯留的雙環胜肽，因此對於較慢性疾病狀態的管理是最佳的。其他驅動理想血漿半衰期的因素是持續暴露以實現最大治療效果之需求與藥劑持續暴露所伴隨的毒性之權衡；以及

- 選擇性：本發明之胜肽配體對於其他 nectin 具有良好選擇性。

**【0034】 醫藥上可接受之鹽類**

**【0035】** 習知技術者可知，本發明之範圍包含鹽類形式，指稱胜肽配體時包括該配體之鹽類。

**【0036】** 本發明之鹽類可藉由傳統化學方法自包含鹼或酸基團之母化合物合成，該方法例如 *Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use*, P. Heinrich Stahl (Editor), Camille G. Wermuth (Editor), ISBN: 3-90639-026-8, Hardcover, 388 pages, August 2002 所述。一般而言，該些鹽類可藉由將該些化合物之游離酸或鹼形式與適當的鹼或酸在水或有機溶劑或上述二者之混合物中反應而得。

**【0037】** 酸加成鹽(單或二鹽)可由多種酸形成，無機或有機均可。酸加成鹽的實例包括使用一酸所形成之單或二鹽、以及丙烯酸化胺基酸及陽離子交換樹脂，該酸係選自以下所構成之群組：乙酸(acetic)、2,2-二氯乙酸(2,2-dichloroacetic)、己二酸(adipic)、藻酸(alginic)、抗壞血酸(ascorbic，例如，L-抗壞血酸(L-ascorbic))、L-天冬氨酸(L-aspartic)、苯磺酸(benzenesulfonic)、苯甲酸(benzoic)、4-乙醯胺苯甲酸(4-acetamidobenzoic)、丁酸(butanoic)、(+)-樟腦酸((+)-camphoric)、樟腦磺酸(camphor-sulfonic)、(+)-(1S)-樟腦-10-磺酸((+)-(1S)-camphor-10-sulfonic)、癸酸(capric)、己酸(caproic)、辛酸(caprylic)、肉桂酸(cinnamic)、檸檬酸(citric)、環己烷氨基磺酸(cyclamic)、十二烷基硫酸

(dodecylsulfuric)、乙烷-1,2-二磺酸(ethane-1,2-disulfonic)、乙磺酸(ethanesulfonic)、2-羥基乙磺酸(2-hydroxyethanesulfonic)、甲酸(formic)、富馬酸(fumaric)、半乳糖二酸(galactaric)、龍膽酸(gentisic)、葡庚糖酸(glucoheptonic)、D-葡糖酸(D-gluconic)、葡糖醛酸(glucuronic)(例如, D-葡糖醛酸(D-glucuronic))、谷氨酸(glutamic)(例如, L-谷氨酸(L-glutamic))、 $\alpha$ -酮戊二酸( $\alpha$ -oxoglutaric)、乙醇酸(glycolic)、馬尿酸(hippuric)、氫鹵酸(例如, 氫溴酸(hydrobromic)、鹽酸、氫碘酸(hydriodic))、羥乙磺酸(isethionic)、乳酸(lactic)(例如(+)-L-乳酸((+)-L-lactic)、(±)-DL-乳酸((±)-DL-lactic))、乳糖酸(lactobionic)、馬來酸(maleic)、蘋果酸(malic)、(-)-L-蘋果酸((-)-L-malic)、丙二酸(malonic)、(±)-DL-扁桃酸((±)-DL-mandelic)、甲磺酸(methanesulfonic)、萘-2-磺酸(naphthalene-2-sulfonic)、萘-1,5-二磺酸(naphthalene-1,5-disulfonic)、1-羥基-2-萘酸(1-hydroxy-2-naphthoic)、菸鹼酸(nicotinic)、硝酸(nitric)、油酸(oleic)、乳清酸(orotic)、草酸(oxalic)、棕櫚酸(palmitic)、雙羥萘酸(pamoic)、磷酸(phosphoric)、丙酸(propionic)、丙酮酸(pyruvic)、L-焦谷氨酸(L-pyroglutamic)、水楊酸(salicylic)、4-氨基水楊酸(4-amino-salicylic)、癸二酸(sebacic)、硬脂酸(stearic)、琥珀酸(succinic)、硫酸(sulfuric)、單寧酸(tannic)、(+)-L-酒石酸((+)-L-tartaric)、硫氰酸(thiocyanic)、對甲苯磺酸(*p*-toluenesulfonic)、十一碳烯酸(undecylenic)及戊酸(valeric)。

【0038】 特定鹽類群組係由乙酸、鹽酸、氫碘酸(hydriodic)、磷酸(phosphoric)、硝酸(nitric)、硫酸(sulfuric)、檸檬酸(citric)、乳酸(lactic)、琥珀酸(succinic)、馬來酸(maleic)、蘋果酸(malic)、羥乙磺酸(isethionic)、富馬酸(fumaric)、苯磺酸(benzenesulfonic)、甲苯磺酸(toluenesulfonic)、硫酸、甲磺酸(methanesulfonic)(甲磺酸酯(mesylate))、乙磺酸(ethanesulfonic)、萘磺酸

(naphthalenesulfonic)、戊酸(valeric)、丙酸(propanoic)、丁酸(butanoic)、丙二酸(malonic)、葡糖醛酸(glucuronic)和乳糖酸(lactobionic)形成之鹽類所組成。一特定鹽係鹽酸鹽。另一特定鹽係乙酸鹽。

【0039】若化合物為陰離子或具有陰離子官能基(例如-COOH 可為-COO<sup>-</sup>)，則鹽可由一有機或無機鹼形成，而產生一適當陽離子。適當無機陽離子之實例包括(但不限於)：鹼金屬離子，如 Li<sup>+</sup>、Na<sup>+</sup>、和 K<sup>+</sup>，鹼土金屬離子，如 Ca<sup>2+</sup>和 Mg<sup>2+</sup>，和其他陽離子，如 Al<sup>3+</sup>或 Zn<sup>2+</sup>。適當有機陽離子之實例包括(但不限於)：胺離子(即 NH<sup>4+</sup>)和具取代基之胺離子(例如 NH<sub>3</sub>R<sup>+</sup>、NH<sub>2</sub>R<sub>2</sub><sup>+</sup>、NHR<sub>3</sub><sup>+</sup>、NR<sub>4</sub><sup>+</sup>)。適當具取代基之胺離子之實例係源自：甲胺(methylamine)、乙胺(ethylamine)、二乙胺(diethylamine)、丙胺(propylamine)、二環己胺(dicyclohexylamine)、三乙胺(triethylamine)、丁胺(butylamine)、乙二胺(ethylenediamine)、乙醇胺(ethanolamine)、二乙醇胺(diethanolamine)、哌嗪(piperazine)、苄胺(benzylamine)、苯基苄胺(phenylbenzylamine)、膽鹼(choline)、葡甲胺(meglumine)、氨基丁三醇(tromethamine)、以及胺基酸，如離胺酸(lysine)和精胺酸(arginine)。習知四級銨離子之實例為 N(CH<sub>3</sub>)<sub>4</sub><sup>+</sup>。

【0040】若本發明之胜肽包括一胺官能基，則可形成四級銨鹽，例如藉由習知技術者所知的方法與一烷化劑反應。該些四級銨化合物係落入本發明之範圍內。

【0041】修飾衍生物

【0042】習知技術者可知，在此所定義之胜肽配體的修飾衍生物也在本發明的範圍內。這種適合的修飾衍生物的實例包括選自下列修飾之一或多修飾：N

端和/或 C 端修飾；用一或多非自然胺基酸殘基取代一或多胺基酸殘基(例如用一或多電子等排的或等電子的胺基酸取代一或多極性胺基酸殘基；用其他非自然電子等排的或等電子的胺基酸取代一或多非極性胺基酸殘基)；添加間隔基團；用一或多抗氧化胺基酸殘基取代一或多氧化敏感胺基酸殘基；用丙胺酸取代一或多胺基酸殘基、用一或多 D-胺基酸殘基取代一或多 L-胺基酸殘基；雙環胜肽配體內一或多醯胺鍵的 N-烷基化；用替代鍵替換一或多胜肽鍵；胜肽主鏈長度修飾；用另一化學基團取代一或多胺基酸殘基的  $\alpha$ -碳上的氫，用適合的胺、硫醇、羧酸和苯酚反應試劑修飾如半胱胺酸、離胺酸、麩胺酸/天冬胺酸和酪胺酸之胺基酸以便官能化該胺基酸，以及引入適合官能化的正交反應性之胺基酸引入或取代，例如具有疊氮基或炔基之胺基酸，其分別用炔或疊氮基團官能化。

【0043】於一實施例，修飾的衍生物包含 N 端和/或 C 端修飾。於另一實施例中，該修飾的衍生物包括使用適當的胺基反應化學的 N 端修飾、和/或使用適當的羧基反應化學的 C 端修飾。於另一實施例，該 N 端或 C 端修飾包括添加效應物基團，該效應物基團包含但不限於胞殺劑、放射性螯合劑或發色團。

【0044】於另一實施例，修飾的衍生物包含 N 端修飾。於另一實施例，該 N 端修飾包括 N 端乙醯基。於該實施例，N 端半胱胺酸基團(本文中稱為 C<sub>i</sub> 的基團)在胜肽合成期間被乙酸酐或其他適當的試劑封端，從而產生 N 端乙醯化的分子。該實施例提供了以下優點：去除胺肽酶的潛在辨識點，並且避免了雙環胜肽的降解。

【0045】於另一實施例，N 修飾包括添加分子間隔基團，其促進效應物基團的結合和雙環胜肽對其目標的效力持續。

【0046】於另一實施例，修飾的衍生物包含 C 端修飾。於另一實施例，該 C 端修飾包括醯胺基團。於該實施例，C 端半胱胺酸基團(本文中稱為 C<sub>iii</sub> 的基團)在胜肽合成期間被合成為醯胺，從而產生 C 端醯胺化的分子。該實施例提供了以下優點：去除羧胺酶的潛在辨識點，並且降低了雙環胜肽的蛋白降解可能性。

【0047】於一實施例，修飾的衍生物包括用一或多非自然胺基酸殘基取代一或多胺基酸殘基。於該實施例，可選擇具有電子等排的/等電子的側鏈之非自然胺基酸，其既不被降解蛋白酶識別也不對標的效價有任何不利影響。

【0048】或者，可以使用具有受限胺基酸側鏈的非自然胺基酸，使得附近胜肽鍵的蛋白水解作用在構象上和空間上受到阻礙。特別地，這些涉及脯胺酸類似物、龐大的側鏈、C $\alpha$ -二取代的衍生物(例如，胺基異丁酸，Aib)和環胺基酸，一種簡單的衍生物是胺基-環丙基羧酸。

【0049】於一實施例，修飾的衍生物包括添加一間隔基團。於另一實施例，修飾的衍生物包括添加一間隔基團至 N 端半胱胺酸(C<sub>i</sub>)和/或 C 端半胱胺酸(C<sub>iii</sub>)。

【0050】於一實施例，修飾的衍生物包括用一或多氧化敏感胺基酸殘基取代一或多氧化敏感胺基酸殘基。

【0051】於一實施例，修飾的衍生物包括用一或多疏水性胺基酸殘基取代一或多帶電荷的胺基酸殘基。於另一實施例，修飾的衍生物包括用一或多帶電荷的胺基酸殘基取代一或多疏水性胺基酸殘基。帶電荷與疏水性胺基酸殘基的正確平衡是雙環胜肽配體的重要特徵。例如，疏水性胺基酸殘基影響血漿蛋白結合的程度，從而影響血漿中游離的可用部分的濃度，而帶電荷的胺基酸殘基(特別是精胺酸)可能影響胜肽與細胞表面上的磷脂膜的交互作用。上述兩者的組合

可能影響半衰期、分佈體積和胜肽藥物的暴露，並且可以根據臨床終點打造。此外，正確的組合以及正確的帶電荷相對於疏水性胺基酸殘基的數量可減少注射部位的刺激(如果已經皮下施用胜肽藥物)。

【0052】 於一實施例，修飾的衍生物包括用一或多 D-胺基酸殘基取代一或多 L-胺基酸殘基。該實施例據信可藉由立體阻礙及 D-胺基酸的傾向提高蛋白水解的穩定性，以穩定  $\beta$ -轉折結構(*Tugyi et al* (2005) PNAS, 102(2), 413–418)。

【0053】 於一實施例，修飾的衍生物包括除去任何胺基酸殘基和用丙胺酸取代。該實施例提供了去除潛在的蛋白水解攻擊位點的優點。

【0054】 需要注意的是，每個上述修飾係用於有意地改善胜肽的效價或是穩定性。另外，基於修飾的效價改善可藉由以下機制達成：

- 加入疏水性基團，利用疏水效應並降低脫落率，從而獲得更高的親和力；
- 加入利用長距離離子交互作用的帶電基團，使速度更快以及親合性更高(參見例如 Schreiber et al, Rapid, electrostatically assisted association of proteins (1996), Nature Struct. Biol. 3, 427-31)；以及
- 將額外的限制引入胜肽，例如藉由正確地限制胺基酸側鏈使得在與目標結合時的熵損失最小化、藉由限制主鏈的扭轉角使得在與目標結合時的熵損失最小化、以及為了相同的原因在分子中引入額外的環化。

(請見 Gentilucci et al, Curr. Pharmaceutical Design, (2010), 16, 3185-203, and Nestor et al, Curr. Medicinal Chem (2009), 16, 4399-418。)

【0055】 同位素變體

【0056】 本發明包括本發明之全部醫藥上可接受之(放射)同位素標定胜肽配體，其中一或多原子由具有相同原子序、但原子量或質量數不同於自然出現的原子量或質量數之原子取代；以及其中連接金屬螯合基團(即效應物)可保有相關(放射)同位素之本發明胜肽配體；以及其中特定官能基被相關(放射)同位素或同位素標定官能基共價取代之本發明胜肽配體。

【0057】 可適當包含於本發明之胜肽配體之同位素的實例包括氫的同位素，例如  $^2\text{H}$  (D)和  $^3\text{H}$  (T)；碳，例如  $^{11}\text{C}$ 、 $^{13}\text{C}$ 、和  $^{14}\text{C}$ ；氯，例如  $^{36}\text{Cl}$ ；氟，例如  $^{18}\text{F}$ ；碘，例如  $^{123}\text{I}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、和  $^{131}\text{I}$ ；氮，例如  $^{13}\text{N}$ 和  $^{15}\text{N}$ ；氧，例如  $^{15}\text{O}$ 、 $^{17}\text{O}$ 、和  $^{18}\text{O}$ ；磷，例如  $^{32}\text{P}$ ；硫，例如  $^{35}\text{S}$ ；銅，例如  $^{64}\text{Cu}$ ；鎵，例如  $^{67}\text{Ga}$  或  $^{68}\text{Ga}$ ；鉍，例如  $^{90}\text{Y}$ ；以及鐳，例如  $^{177}\text{Lu}$ ；以及鉍，例如  $^{213}\text{Bi}$ 。

【0058】 本發明之特定同位素標定胜肽配體，例如具有放射同位素，可用於藥物和/或組織基質分布研究，並用於臨床評估罹病組織存在/不存在 Nectin-4 標的。本發明之胜肽配體另可用於診斷用途，其可用於偵測或辨認標定分子和其他分子、胜肽、蛋白質、酵素、或受體所形成的複合物。偵測或辨認之方法可使用具有標記試劑之化合物，例如放射同位素、酵素、螢光物、發光物(例如發光醇(luminol)、發光醇衍生物、發光素(luciferin)、水母蛋白(aequorin)及螢光酵素(luciferase))等。由於可簡單地包含以及容易用於偵測手段，放射同位素氚，即  $^3\text{H}$  (T)，以及碳-14，即  $^{14}\text{C}$ ，特別適用於上述用途。

【0059】 由於較佳的代謝穩定性，較重同位素之取代，例如氘，即  $^2\text{H}$  (D)，可具有治療上的優勢，例如增加體內半衰期或降低需求劑量，因此較佳地可用於某些情況。

【0060】正子發射同位素之取代，例如  $^{11}\text{C}$ 、 $^{18}\text{F}$ 、 $^{15}\text{O}$ 、和  $^{13}\text{N}$ ，可用於正子發射斷層掃描(PET)，檢查標的所佔體積。

【0061】本發明之同位素標定胜肽配體一般可以習知技術者所知的傳統方法製備，或藉由與實施例相似之製程，使用適當同位素標定反應物取代先前所使用之無標定反應物。

【0062】分子支架

【0063】於一實施例，分子支架包括非芳香性分子支架。本說明書用語「非芳香性分子支架」指涉任何本說明書定義之分子支架，其不包含芳香(即非飽和)碳環或雜環系統。

【0064】非芳香性分子支架之適當實例揭露於 Heinis et al(2014) *Angewandte Chemie, International Edition* 53(6) 1602-1606。

【0065】如上述文件所述，該分子支架可為小分子，例如有機小分子。

【0066】於一實施例，該分子支架可為大分子。於一實施例，該分子支架可為胺基酸、核苷酸、或碳水化合物組成之大分子。

【0067】於一實施例，該分子支架包括可與多肽之官能基反應以形成共價鍵之反應基團。

【0068】該分子支架可包括與胜肽形成連結之化學基團，例如胺、硫醇、醇、酮、醛、腈、羧酸、酯、烯、炔、三氮化物(azides)、酸酐、琥珀醯亞胺(succinimides)、順丁烯二醯亞胺(maleimides)、烷基鹵化物、和醯基鹵化物。

【0069】包含  $\alpha\beta$  不飽和羰基之化合物之實例為 1,1',1''-(1,3,5-三嗪烷-1,3,5-三基)三丙-2-烯-1-酮(TATA)(*Angewandte Chemie, International Edition* (2014), 53(6), 1602-1606)。

【0070】 效應物和官能基

【0071】 本發明另一實施態樣提供一藥物結合物，包括結合至一或多效應物和/或官能基之本說明書所定義胜肽配體。

【0072】 效應物和/或官能基可連接至例如多肽之 N 端和/或 C 端、多肽中的胺基酸、或分子支架。

【0073】 適當效應物基團包括抗體和其部分或片段。例如，效應物基團可包括抗體輕鏈恆定區(CL)、抗體 CH1 重鏈域、抗體 CH2 重鏈域、抗體 CH3 重鏈域、或其任意組合，以及一或多恆定區域。效應物基團亦可包括抗體鉸鍊區(hinge region)(該區通常位於 IgG 分子的 CH1 和 CH2 域之間)。

【0074】 於本發明實施態樣之另一實施例，本發明之效應物基團為 IgG 分子的 Fc 區。較佳地，本發明之胜肽配體-效應物基團包括或組成自具有至少 1 日、至少 2 日、至少 3 日、至少 4 日、至少 5 日、至少 6 日、或至少 7 日之  $t_{1/2}$  半衰期之胜肽配體之 Fc 融合。更佳地，本發明之胜肽配體包括或組成自具有至少 1 日之  $t_{1/2}$  半衰期之胜肽配體之 Fc 融合。

【0075】 一般而言，官能基團包括結合基團、藥物、結合其他單元之反應基團、協助細胞吸收大環胜肽之官能基團、或類似物。

【0076】 胜肽透入細胞之能力可使胜肽有效地拮抗胞內標的。胜肽可穿透細胞抵達之標的包括轉錄因子、胞內訊息分子例如酪胺酸激酶、以及涉及細胞凋亡路徑之分子。可穿透細胞之官能基團包括胜肽或連接胜肽或分子支架之化學基團。前述胜肽例如源自 VP22、HIV-Tat、果蠅(Antennapedia)同源框(homeobox)蛋白，例如 Chen and Harrison, Biochemical Society Transactions (2007) Volume 35, part 4, p821；Gupta et al. in Advanced Drug Discovery Reviews (2004) Volume 57

9637 所揭示。可有效地穿透細胞膜的短胜肽之實例包括源自果蠅觸角足蛋白(Drosophila Antennapedia protein)的 16 胺基酸穿透肽(penetratin)(Derossi et al (1994) J Biol. Chem. Volume 269 p10444)、18 胺基酸「模式兩性(amphipathic)胜肽」(Oehlke et al (1998) Biochim Biophys Acts Volume 1414 p127)、和 HIV 之 TAT 蛋白之富含精胺酸區域。非胜肽之方法包括：使用小分子模擬物或 SMOC，可輕易連接至生物分子(Okuyama et al (2007) Nature Methods Volume 4 p153)。其他連接胍基團至分子的化學方法亦促進細胞穿透(Elson-Scwab et al (2007) J Biol Chem Volume 282 p13585)。小分子量之分子，例如類固醇，可連接至分子支架，以促進細胞吸收。

【0077】可連接至胜肽配體之官能基團之一類包括抗體和其結合片段，例如 Fab、Fv、或單域片段。特定而言，使用連接可增加胜肽配體之半衰期之蛋白質之抗體。

【0078】於一實施例，本發明之胜肽配體-效應物基團具有  $t_{1/2}$  半衰期選自至少 12 小時、至少 24 小時、至少 2 日、至少 3 日、至少 4 日、至少 5 日、至少 6 日、至少 7 日、至少 8 日、至少 9 日、至少 10 日、至少 11 日、至少 12 日、至少 13 日、至少 14 日、至少 15 日、或至少 20 日所構成之群組。較佳地，本發明之胜肽配體-效應物基團或組成物具有之  $t_{1/2}$  介於 12 至 60 小時。於另一實施例， $t_{1/2}$  係至少 1 日。於另一實施例， $t_{1/2}$  係介於 12 至 26 小時。

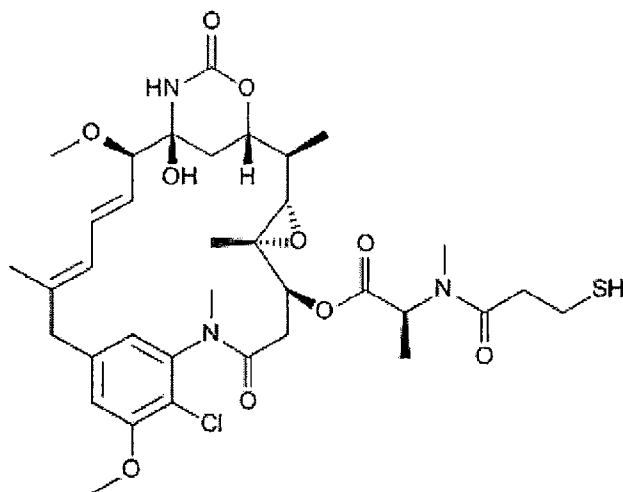
【0079】於本發明一特定實施例，該官能基團係選自金屬螯合物，適用於複合醫療相關金屬放射同位素。

【0080】可能之效應物基團另包括酵素，例如羧肽酶 G2，用於酵素/前驅藥物治療，其中胜肽配體取代 ADEPT 中的抗體。

【0081】於本發明一特定實施例，該官能基團係選自藥劑，例如癌症療法之胞殺劑。適當之實例包括：烷化劑如順鉑和卡鉑以及奧沙利鉑(oxaliplatin)、甲基二(氯乙基)胺(mechlorethamine)、環磷醯胺(cyclophosphamide)、苯丁酸氮芥(chlorambucil)、異環磷醯胺(ifosfamide)；抗代謝劑，包括嘌呤相似物硫唑嘌呤(azathioprine)和巯基嘌呤或嘧啶相似物；植物鹼類或萜類，包括長春花鹼(vinca alkaloids)如長春新鹼(vincristine)、長春鹼(vinblastine)、長春瑞濱(vinorelbine)、和長春地辛(vindesine)；鬼臼毒素及其衍生物依託泊苷(etoposide)和替尼泊苷(teniposide)；紫杉烷(taxane)，包括紫杉醇(原名 Taxol)；拓撲酶抑制劑，包括喜樹鹼(camptothecin)：愛萊諾迪肯(irinotecan)和托普樂肯(Topotecan)，以及第二型抑制劑，包括安吡啶(amsacrine)、依託泊苷(etoposide)、依託泊苷磷酸鹽(etoposide phosphate)、和替尼泊苷(teniposide)。其他藥劑可包括：腫瘤抗生素，包括免疫抑制劑放線菌素(dactinomycin)(用於腎臟移植)、多柔比星(doxorubicin)、表柔比星(epirubicin)、博來黴素(bleomycin)、刺孢黴素(calicheamycin)、和其他。

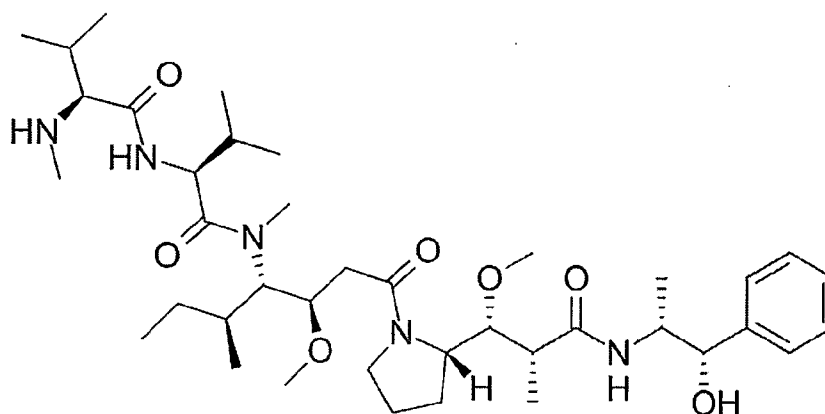
【0082】於本發明另一特定實施例，胞殺劑係選自類美登素(Maytansinoids)(例如 DM1)或單甲基奧里斯他汀(auristatin)(例如 MMAE)。

【0083】DM1 係一種胞殺劑，為包括硫醇之美登素(maytansine)衍生物並具有下列結構：



【0084】 本說明書表 3 中顯示了數據，其證明了胜肽配體結合至含有 DM1 的毒素的效果。

【0085】 單甲基奧里斯他汀 E (Monomethyl auristatin E (MMAE)) 係一種合成抗腫瘤劑並具有下列結構：



【0086】 本說明書在表 3 中列出了數據，其證明了胜肽配體結合至含有 MMAE 的毒素的效果。

【0087】 於本發明另一特定實施例，胞殺劑係選自單甲基奧里斯他汀 E (MMAE)。

【0088】於一實施例，該胞殺劑藉由一可裂解鍵連接二環肽，例如雙硫鍵或蛋白酶敏感鍵。於另一實施例，鄰接雙硫鍵之基團具有修飾，以控制雙硫鍵之阻礙，以及控制胞殺劑裂解率和伴隨之釋放。

【0089】已有公開文獻建立修飾雙硫鍵的還原易感性的方法，係藉由將立體阻礙引入雙硫鍵任一側(Kellogg et al (2011) Bioconjugate Chemistry, 22, 717)。較大程度的立體阻礙可降低胞內巯胺基硫以及胞外(系統性)還原劑造成還原的速率，因此無論於胞內或胞外均可降低釋放毒素的容易度。因此，可藉由小心選擇雙硫鍵任一側之阻礙度來達成循環中適當的雙硫鍵穩定性選擇(最小化毒素的不必要副作用)以及胞內環境的釋放效率(將療效最大化)。

【0090】藉由將一或多甲基引入分子構築體之靶向物(此處為雙環肽)或毒素側，可調整雙硫鍵任一側之阻礙。

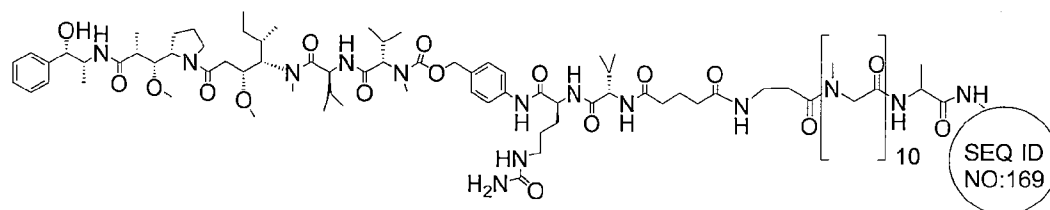
【0091】於一實施例，胞殺劑和連接子係選自 WO 2016/067035 所揭露之任意組合(其胞殺劑和連接子以引用方式併入本說明書中)。

【0092】於一實施例，在該胞殺劑和該雙環肽之間的連接子包含一或多胺基酸殘基。作為適當連接子的適當胺基酸殘基之實例包含 Ala、Cit、Lys、Trp 以及 Val。

【0093】於一實施例，胞殺劑係選自 MMAE，並且該藥物結合物更包括選自以下之連接子：-PABC-Cit-Val-戊二醯基-(-PABC-Cit-Val-Glutaryl-) 或 -PABC-環丁基-Ala-Cit-βAla- (-PABC-cyclobutyl-Ala-Cit-βAla-)，其中，PABC 表示對胺基苄基胺甲酸酯(p-aminobenzylcarbamate)。含有環丁基的連接子的全部細節可參見 Wei et al (2018) J. Med. Chem. 61, 989-1000。於另一實施例，胞殺劑係選自 MMAE，並且連接子為-PABC-Cit-Val-戊二醯基-。

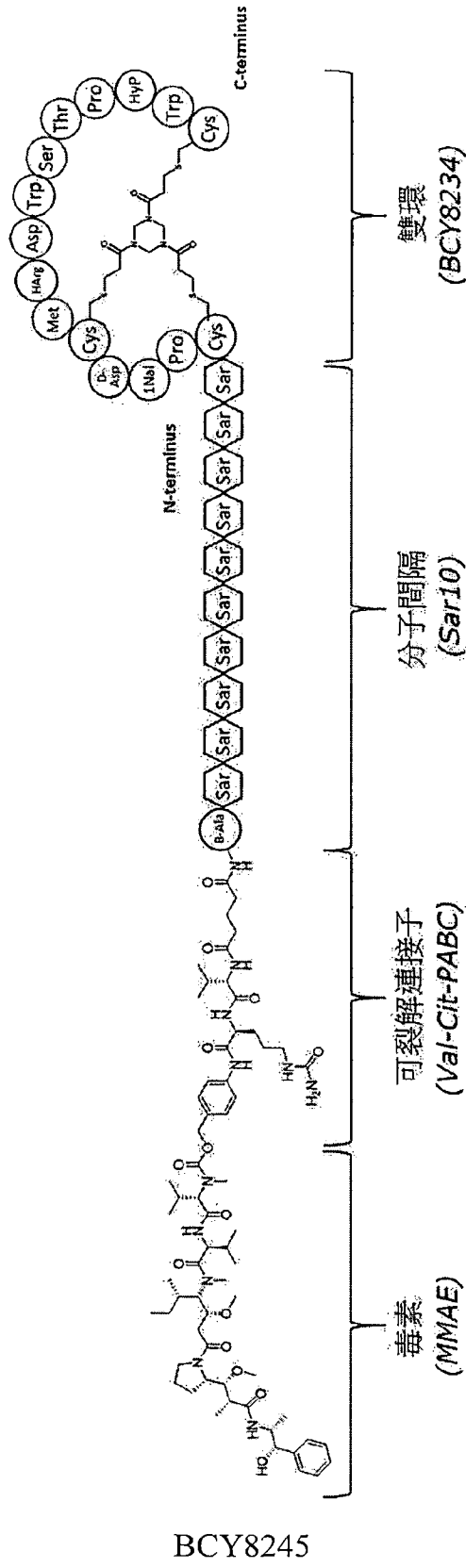
【0094】於另一實施例，胞殺劑係為 DM1，並且該藥物結合物更包括連接子 -SPDB-(SO<sub>3</sub>H)-，其中，SPDB 表示 N-琥珀醯亞胺基-3-(2-吡啶基二硫基)丙酸酯(N-succinimidyl 3-(2-pyridyldithio)propionate)。

【0095】於另一實施例，胞殺劑係為 MMAE，雙環肽係選自如本說明書所定義之 BCY8234，並且連接子係選自 -PABC-Cit-Val-戊二醯基-。該 BDC 在本說明書中稱為 BCY8245，並且示意性地表示為：



BCY8245

【0096】並且可更詳細地表示為：



【0097】如表 3 所示，本說明書提供之數據顯示，在 SPR 結合測定中 BCY8245 對人類 Nectin-4 具有優異的結合性。該 BDC 在如實施例 1 所示之非小細胞肺癌模型、如實施例 2 所示之膀胱癌模型、如實施例 3 所示之胰臟癌模型以及如實施例 4 所示之乳癌模型中也顯示出良好的抗腫瘤活性。

【0098】於另一實施例，胞殺劑係為 MMAE，雙環胜肽係選自如本說明書所定義之 BCY8234，且連接子係選自-PABC-環丁基-(B-Ala)-。在本說明書中，該 BDC 被稱為 BCY8549。本說明書提供的數據顯示在 SPR 結合測定中 BCY8549 對人類 Nectin-4 具有優異的結合性，如表 3 所示。

【0099】於另一實施例，雙環藥物結合物係選自 BCY8245 或 BCY8549。於另一實施例，雙環藥物結合物是 BCY8245。該藥物結合物 BCY8245 顯示出優異的劑量依賴性抗腫瘤活性，如本說明書之數據所示。

#### 【0100】 合成

【0101】本發明之胜肽可藉由標準技術來合成製備，而後與分子支架於體外反應。製備時可使用標準化學方法。其可快速大量製備可溶性材料，用於後續實驗或驗證。該些方法可使用傳統化學方法實施，例如文獻 Timmerman *et al* (supra)所揭示。

【0102】因此，本發明另關於如本說明書所述選擇之多肽或結合物之製備，其中該製備包括選擇性之其他步驟，如下文所述。於一實施例，該些步驟係用於化學合成所製造之多肽/結合物終端產物。

【0103】製備結合物或複合物時，目標多肽中的胺基酸殘基可選擇性地被取代。

【0104】可將胜肽延長以包括例如另一環，因此可引入多重專一性。

【0105】 可使用標準固相或液相化學方法，簡單地延伸 N 端或 C 端、或使用正交保護(Orthogonally protected)離胺酸(和類似物)於環內延伸，以延伸該胜肽。標準(生物)結合技術可用於引入活化或可活化之 N 或 C 端。或者，可藉由片段縮合(condensation)或自然化學連接(ligation)實施加成反應，例如文獻 Dawson *et al.* 1994. Synthesis of Proteins by Native Chemical Ligation. Science 266:776-779 所揭示，或藉由酵素實施加成反應，例如使用枯草連接酶(subtiligase)，如文獻 Chang *et al* Proc Natl Acad Sci U S A. 1994 Dec 20; 91(26):12544-8 或 Hikari *et al* Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters Volume 18, Issue 22, 15 November 2008, Pages 6000-6003 所述。

【0106】 或者，可另藉由雙硫鍵結合以延伸或修飾胜肽。其具有之優勢在於一旦位於細胞的還原環境中即可使第一和第二胜肽彼此分離。若是如此，可於化學合成第一胜肽時加入分子支架(例如 TATA)，使其與三半胱胺酸基團反應；另一半胱胺酸基團或硫醇可接著附加於該第一胜肽之 N 或 C 端，因此該半胱胺酸或硫醇僅與第二胜肽之自由半胱胺酸或硫醇反應，從而形成連結雙硫化物之雙環胜肽-胜肽結合物。

【0107】 相似技術可同樣應用於合成/耦合二雙環和雙專一性大環，具製造四專一性分子的潛力。

【0108】 再者，可以相同方法加成其他官能基或效應物基團，使用適當化學方法，於 N 或 C 端或藉側鏈耦合。於一實施例，該耦合係以不阻礙各反應物之活性的方式實施。

【0109】 醫藥組成物

【0110】 本發明另一實施態樣係提供一種醫藥組成物，包括本說明書定義之胜肽配體或藥物結合物以及一或多醫藥上可接受之賦形劑。

【0111】 一般而言，本發明之胜肽配體可以純化形式與藥理學上適當之賦形劑或載劑一併使用。該些賦形劑或載劑通常包括水性或醇類/水性溶液、乳化劑、或懸浮劑，包括鹽水和/或緩衝介質。腸道外載劑包括氯化鈉溶液、林格氏葡萄糖、葡萄糖和氯化鈉和乳酸化林格氏溶液。若有必要將多肽複合物保持於懸浮劑，可自增厚劑選擇適當生理可接受之佐劑，例如羧甲基纖維素、聚乙烯吡咯烷酮、明膠、和藻酸鹽。

【0112】 靜脈內載劑包括流體和營養補充液和電解質補充液，例如基於林格氏葡萄糖調製的。亦可存在防腐劑和其他添加物，例如抗微生物劑、抗氧化劑、螯合劑、和惰性氣體(Mack (1982) Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th Edition)。

【0113】 本發明之胜肽配體可用於分別給藥之組成物或與其他藥劑一併使用。該些藥劑可包括抗體、抗體片段、和多種免疫治療藥物，例如環孢素(cyclosporine)、胺甲喋呤(methotrexate)、阿德力黴素(adriamycin)、或順鉑以及免疫毒素。醫藥組成物可包括多種胞殺劑或其他藥劑與本發明之胜肽配體合併使用之「雞尾酒療法」，或經選擇之本發明之多肽組合，其具有不同專一性，例如使用不同標的配體選擇之多肽，於給藥前可混合或不混合之。

【0114】 本發明之醫藥組成物之給藥途徑可為任何習知技術者所知的途徑。用於治療時，本發明之胜肽配體可依據標準技術給予任何患者。可藉由任何適當模式給藥，包括腸道內、靜脈、肌內、腹腔內、透皮、肺途徑、或適當地藉由導管直接輸液。較佳地，本發明之醫藥組成物可藉由吸入給藥。給藥之

劑量和頻率係由醫師依據年齡、性別、患者病況、同時服用其他藥物、用藥禁忌、和其他參數而考量。

【0115】 本發明之胜肽配體可凍乾用於保存，並於使用前以適當載劑重構。此技術顯示為有效，並可使用習知的凍乾和重構技術。習知技術者可知，凍乾和重構可造成不同程度的活性喪失，而劑量可能必須上調作為補償。

【0116】 包括本發明之胜肽配體或其雞尾酒之組成物之給藥可用於預防或治療。於特定治療用途，用於完成經選擇之細胞族群之至少部分抑制、抑止、調節、消滅、或其他可測量參數的適當量係定義為「治療有效劑量」。達成此劑量之量將依據疾病嚴重度和患者自身免疫系統之一般狀態而定，但經選擇之胜肽配體一般介於每公斤體重 0.005 至 5.0 毫克(mg)，更常使用 0.05 至 2.0 mg/kg/劑之劑量。於預防用途，包括本發明之胜肽配體或其雞尾酒之組成物可以相似或較低劑量給藥。

【0117】 包括本發明之胜肽配體之組成物可用於預防或治療，以協助改變、去活化、消滅、或移除哺乳類動物中經選擇之標的細胞族群。此外，本說明書所述之胜肽配體可用於體外或胞外選擇性地自異質細胞群之中消滅、消耗、或以其他方式有效地移除標的細胞族群。依據標準技術，哺乳類的血液可於體外結合經選擇之胜肽配體，從而不需要的細胞可被從血液中消滅或移除，並返回哺乳類動物。

【0118】 與一或多種其他治療劑共同給藥

【0119】 根據待治療的特定病症或疾病，通常用於治療該病症的其他治療劑也可存在於本發明的組成物中。因此，於一實施例，該藥物組成物更包含一

或多種治療劑。如本說明書所使用，通常用於治療特定疾病或病症的其他治療劑被稱為「適合所治療的疾病或病症」。

【0120】於一些實施例，本發明提供一種治療揭露的疾病或病症的方法，包括向有此需要的患者投予有效量的本說明書公開的化合物或其醫藥上可接受的鹽，並同時或依序共同施用有效量的一或多種其他治療劑，例如本說明所述的那些治療劑。於一些實施例，該方法包括共同施用一種其他治療劑。於一些實施例，該方法包括共同施用其他兩種治療劑。於一些實施例，所揭露的化合物和其他一或多治療劑的組合具有協同作用。

【0121】本發明之化合物還可以與已知的治療過程組合使用，例如激素或放射線的施用。於某些實施例，所提供的化合物係用作為放射增敏劑，尤其係用於治療對放射療法具有不良敏感性的腫瘤。

【0122】本發明的化合物可單獨施用或與一或多種其他治療性化合物共同給藥，可能的組合療法係採取固定組合的形式、本發明化合物和一或多種其他治療化合物交錯地或彼此獨立給予地施用、或固定組合和一或多種其他治療化合物的組合施用。除此之外或另外地，本發明之化合物可與化學療法、放射療法、免疫療法、光療法、外科手術或其組合結合使用以特別地施用於腫瘤治療。在其他治療策略的情況下，長期治療同樣可能是輔助治療，如上所述。其他可能的治療方法是在腫瘤消退後維持患者狀態的治療，甚至是化學預防治療，例如用於有風險的患者。

【0123】作為多次給藥方案的一部分，一或多種其他治療劑可與本發明之化合物或組成物分開施用。或者，一或多種其他治療劑可為單一劑型的一部分，其在單一組成物內與本發明之化合物混合。若以多次給藥方案施用，一或多種

其他治療劑和本發明之化合物或組成物可彼此同時、依次或在一段時間內施用，例如彼此在 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23 或 24 小時內。於一些實施例，一或多種其他治療劑和本發明之化合物或組成物以相隔大於 24 小時的多次給藥方案施用。

【0124】如本說明書所使用之術語「組合」或「組合的」是指本發明治療劑的同時或按順序給藥。舉例而言，本發明化合物可與一或多種其他治療劑同時或是按順序給藥，其可以是分離的單位劑型或是單一的單位劑型給藥。因此，本發明提供單一單位劑型，其包含本發明之化合物，一或多種其他治療劑和醫藥上可接受之載劑、佐劑或媒介物。

【0125】可和載劑材料結合以產生單一劑型之本發明化合物以及一或多種其他治療劑(在包括如上所述之其他治療劑的那些組成物中)的量將根據所治療的受試者而不同。和特定的管理方式。較佳地，為了給藥，本發明所調配之組成物中本發明化合物之劑量應在 0.01-100 毫克/公斤體重/天。

【0126】在包含一或多種其他治療劑的該些組成物中，該一或多種其他治療劑和本發明化合物可以協同作用。因此，在該些組成物中的一或多種其他治療劑的量可少於僅使用該治療劑的單藥治療所需的量。在該些組成物中，可施用劑量為 0.01-1,000 微克/公斤體重/天的一或多種其他治療劑。

【0127】本發明之組成物中存在的一或多種其他治療劑的量可少於該治療劑在組成物中作為唯一治療劑時通常的量。較佳地，在本發明公開的組成物中的一或多種其他治療劑的量約為在包含該治療劑作為唯一治療劑通常的量的 50%至 100%。於一些實施例，一或多種其他治療劑以通常施用該治療劑的量的約 50%、約 55%、約 60%、約 65%、約 70%、約 75%、約 80%、約 85%、約 90

或約 95%給藥。如本說明書用語「通常施用」是指根據每個 FDA 說明書提供的 FDA 批准的用於給藥的治療劑的量。

【0128】本發明化合物或其醫藥組成物也可加入至用於塗覆可植入醫療裝置的組成物中，該醫療裝置舉例而言可為假體、人工瓣膜、血管移植物、支架和導管。例如血管支架已被用於克服再狹窄(損傷後血管壁的再度狹窄)。然而，使用支架或其他可植入裝置的患者會有凝塊形成或血小板活化的風險。藉由預先用包含激酶抑制劑的醫藥上可接受的組成物塗覆於裝置上可避免這些不待見的反應。本發明另一實施例為塗覆本發明化合物之可植入裝置。

#### 【0129】其他治療劑之示例

【0130】於一些實施例，一或多種其他治療劑係為多聚 ADP 核糖聚合酶 (PARP) 抑制劑。於一些實施例，PARP 抑制劑係選自奧拉帕尼 (olaparib)(Lynparza®, AstraZeneca)、魯卡帕尼 (rucaparib) (Rubraca®, Clovis Oncology)、尼拉帕尼 (niraparib) (Zejula®, Tesaro)、拉唑帕尼 (talazoparib) (MDV3800/BMN 673/LT00673, Medivation/Pfizer/Biomarin)、維利帕尼 (veliparib) (ABT-888, AbbVie)以及 BGB-290 (BeiGene, Inc.)。

【0131】於一些實施例，一或多種其他治療劑係為組蛋白去乙醯酶(HDAC)抑制劑。於一些實施例，HDAC 抑制劑選自伏立諾他(vorinostat) (Zolinza®, Merck)、羅米地辛(romidepsin) (Istodax®, Celgene)、帕比司他(panobinostat) (Farydak®, Novartis)、貝利司他(belinostat) (Beleodaq®, Spectrum Pharmaceuticals)、恩替諾特(entinostat) (SNDX-275, Syndax Pharmaceuticals) (NCT00866333)以及西達本胺(chidamide) (Epidaza®, HBI-8000, Chipscreen Biosciences, China)。

【0132】於一些實施例，一或多種其他治療劑係為 CDK 抑制劑，例如 CDK4/CDK6 抑制劑。於一些實施例，CDK 4/6 抑制劑係選自(palbociclib) (Ibrance®, Pfizer)、瑞博西尼(ribociclib) (Kisqali®, Novartis)、玻瑪西林(abemaciclib) (Ly2835219, Eli Lilly)以及曲來西尼(trilaciclib) (G1T28, G1 Therapeutics)。

【0133】於一些實施例，一或多種其他治療劑係為磷脂肌醇-3-激酶(PI3K) 抑制劑。於一些實施例，PI3K 抑制劑係選自艾代拉利司(idelalisib) (Zydelig®, Gilead)、阿派裡斯(alpelisib) (BYL719, Novartis)、他賽裡斯(taselisib) (GDC-0032, Genentech/Roche)、匹替裡斯(pictilisib) (GDC-0941, Genentech/Roche)、庫盼裡斯(copanlisib) (BAY806946, Bayer)、杜維裡斯(duvelisib) (原 IPI-145, Infinity Pharmaceuticals)、PQR309 (Piquar Therapeutics, Switzerland)以及 TGR1202 (原 RP5230, TG Therapeutics)。

【0134】於一些實施例，一或多種其他治療劑係為鉑類治療劑 (platinum-based therapeutic)，也稱為鉑類(platins)。鉑類引起 DNA 的交聯，主要在快速繁殖細胞(例如癌細胞)中抑制 DNA 修復及/或 DNA 合成。於一些實施例，鉑類治療劑係選自順鉑(cisplatin) (Platinol®, Bristol-Myers Squibb)、卡鉑(carboplatin) (Paraplatin®, Bristol-Myers Squibb; 和 Teva; Pfizer)、奧沙利鉑(oxaliplatin) (Eloxitin® Sanofi-Aventis)、奈達鉑(nedaplatin) (Aqupla®, Shionogi)、吡鉑(picoplatin) (Poniard Pharmaceuticals)、以及賽特鉑(satraplatin) (JM-216, Agennix)。

【0135】於一些實施例，一或多種其他治療劑係為紫杉烷化合物，其引起細胞微管的破壞，而細胞微管對於細胞分裂是必需的。於一些實施例，紫杉烷化合物係選自紫杉醇(paclitaxel) (Taxol®, Bristol-Myers Squibb)、多西紫杉醇

(docetaxel) (Taxotere®, Sanofi-Aventis; Docefrez®, Sun Pharmaceutical)、白蛋白結合的紫杉醇(albumin-bound paclitaxel) (Abraxane®; Abraxis/Celgene)、卡巴他賽(cabazitaxel) (Jevtana®, Sanofi-Aventis) 以及 SID530 (SK Chemicals, Co.) (NCT00931008)。

【0136】 於一些實施例，一或多種其他治療劑係核苷抑制劑，或干擾正常 DNA 合成、蛋白質合成、細胞複製或抑制快速增生細胞的治療劑。

【0137】 於一些實施例，核苷抑制劑係選自曲貝替定(trabectedin)(脈烷化劑, Yondelis®, Janssen Oncology)、氮芥(mechlorethamine)(烷化劑, Valchlor®, Aktelion Pharmaceuticals)、長春新鹼(vincristine)(Oncovin®, Eli Lilly; Vincasar®, Teva Pharmaceuticals; Marqibo®, Talon Therapeutics)、帝盟多(temozolomide)(烷化劑 5-(3-甲基三氮雜-1-基)-咪唑-4-甲醯胺(MTIC)Temodar®的前驅藥, Merck)、阿糖胞苷注射劑(cytarabine injection) (ara-C, 抗代謝胞苷類似物, Pfizer)、洛莫司汀(lomustine) (烷化劑 CeeNU®, Bristol-Myers Squibb; Gleostine®, NextSource Biotechnology)、阿扎胞苷(azacitidine)(胞苷的嘧啶核苷類似物, Vidaza®, Celgene)、高三尖杉酯鹼(omacetaxine mepesuccinate)(Cephalotaxine ester)(蛋白質合成抑制劑, Synribo®; Teva Pharmaceuticals)、天門冬醯胺酶 *Erwinia chrysanthemi* (asparaginase *Erwinia chrysanthemi*) (用於消除天冬醯胺的酶, Elspar®, Lundbeck; Erwinaze®, EUSA Pharma)、甲磺酸艾瑞布林(eribulin mesylate)(微管抑制劑，微管蛋白類抗有絲分裂劑, Halaven®, Eisai)、卡巴他賽(cabazitaxel)(微管抑制劑，微管蛋白類抗有絲分裂, Jevtana®, Sanofi-Aventis)、capacetrine(胸苷酸合成酶抑制劑, Xeloda®, Genentech)、苯達莫司汀(bendamustine)(雙功能甲基二(氯乙基)胺衍生物，據信形成 DNA 股間交叉鏈結, Treanda®, Cephalon/Teva)、易莎平

(Ixabepilone)(Epothilone B 的半合成類似物，微管抑制劑，微管蛋白類抗有絲分裂劑，Ixempra®，Bristol-Myers Squibb)、奈拉濱(nelarabine)(去氧鳥苷類似物的前驅藥，核苷代謝抑制劑，Arranon®，Novartis)、克羅拉濱(clorafabine)(核糖核苷酸還原酶抑制劑的前驅藥，去氧胞苷的競爭性抑制劑，Clolar®，Sanofi-Aventis)以及曲氟尿苷與替普瑞新(trifluridine and tipiracil)(胸苷類核苷類似物和胸苷磷酸化酶抑制劑，Lonsurf®，Taiho Oncology)。

【0138】於一些實施例，一或多種其他治療劑係為激酶抑制劑或 VEGF-R 拮抗劑。適用於本發明認可的 VEGF 抑制劑和激酶抑制劑包括：貝伐單抗(bevacizumab)(Avastin®，Genentech/Roche)，抗 VEGF 單株抗體、雷莫司單抗(ramucirumab)(Cyramza®，Eli Lilly)、抗 VEGFR-2 抗體和 ziv-aflibercept(anti-VEGFR-2 antibody and ziv-aflibercept)，也稱為 VEGF Trap(Zaltrap®; Regeneron/Sanofi)。VEGFR 抑制劑，例如瑞格非尼(regorafenib)(Stivarga®，Bayer)、凡德他尼(vandetanib)(Caprelsa®，AstraZeneca)、阿西替尼(axitinib)(Inlyta®，Pfizer)、和樂伐替尼(lenvatinib)(Lenvima®，Eisai)；Raf 抑制劑，例如索拉非尼(sorafenib)(Nexavar®，Bayer AG 和 Onyx)、達拉菲尼(dabrafenib)(Tafinlar®，Novartis)和威羅菲尼(vemurafenib)(Zelboraf®，Genentech/Roche)；MEK 抑制劑，例如考比替尼(cobimetanib)(Cotellic®，Exelixis/Genentech/Roche)、曲美替尼(trametinib)(Mekinist®，Novartis)；Bcr-Abl 酪氨酸激酶抑制劑，例如伊馬替尼(imatinib)(Gleevec®，Novartis)、尼羅替尼(nilotinib)(Tasigna®，Novartis)、達沙替尼(dasatinib)(Sprycel®，BristolMyersSquibb)、博舒替尼(bosutinib)(Bosulif®，Pfizer)和普納替尼(ponatinib)(Inclusig®，Ariad Pharmaceuticals)；Her2 和 EGFR 抑制劑，如吉非替尼(gefitinib)(Iressa®，AstraZeneca)、厄洛替尼(erlotinib)(Tarceeva®，

Genentech/Roche/Astellas)、拉帕替尼(lapatinib)(Tykerb®, 諾華)、阿法替尼(afatinib)(Gilotrif®, Boehringer Ingelheim)、奧希替尼(osimertinib)(靶向活化的EGFR, Tagrisso®, AstraZeneca)和博瑞加替尼(brigatinib)(Alunbrig®, Ariad Pharmaceuticals); c-Met 和 VEGFR2 抑制劑, 例如卡博替尼(cabozanitinib)(Cometriq®, Exelexis); 和多激酶抑制劑, 如舒尼替尼(sunitinib)(Sutent®, Pfizer)、帕唑帕尼(pazopanib)(Votrient®, Novartis); ALK 抑制劑, 如克唑替尼(crizotinib)(Xalkori®, Pfizer); 色瑞替尼(ceritinib)(Zykadia®, Novartis)和阿雷替尼(alectinib)(Alecenza®, Genentech / Roche); 布魯頓氏酪氨酸激酶抑制劑 (Bruton's tyrosine kinase), 如依魯替尼(ibrutinib)(Imbruvica®, Pharmacyclics/Janssen); 和 Flt3 受體抑制劑, 如米哌妥林(midostaurin)(Rydapt®, Novartis)。

★【0139】其他正在開發中並可用於本發明的激酶抑制劑和 VEGF-R 拮抗劑包括: 替沃紫尼(tivozanib)(Aveo Pharmaceuticals)、瓦他拉尼(vatalanib)(Bayer/Novartis)、德立替尼(lucitanib)(Clovis Oncology)、多韋替尼(dovitinib)(TKI258, Novartis)、西奧羅尼(chiauanib)(Chipscreen Biosciences)、CEP-11981(Cephalon)、利尼伐尼(linifanib)(Abbott Laboratories)、來那替尼(neratinib)(HKI-272, Puma Biotechnology)、雷多替尼(radotinib)(Supect®, IY5511, Il-Yang Pharmaceuticals, S. Korea)、魯索利替尼(ruxolitinib)(Jakafi®, Incyte Corporation)、PTC299(PTC Therapeutics)、CP-547,632(Pfizer)、弗雷替尼(foretinib)(Exelexis, GlaxoSmithKline)、奎扎替尼(quizartinib)(Daiichi Sankyo)和莫特塞尼(motesanib)(Amgen/Takeda)。

【0140】 於一些實施例，一或多種其他治療劑係 mTOR 抑制劑，其抑制細胞增生、血管生成和葡萄糖攝取。於一些實施例，mTOR 抑制劑係依維莫司(everolimus)(Afinitor®，Novartis)、特適癌 temsirolimus(Torisel®，Pfizer)和西羅莫司(sirolimus)(Rapamune®，Pfizer)。

【0141】 於一些實施例，一或多種其他治療劑係蛋白酶體抑制劑。可用於本發明認可的蛋白酶體抑制劑包括硼替佐米(bortezomib)(Velcade®，Takeda)、卡非佐米(carfilzomib)(Kyprolis®，Amgen)和伊沙佐米(ixazomib)(Ninlaro®，Takeda)。

【0142】 於一些實施例，一或多種其他治療劑係生長因子拮抗劑，例如血小板衍生生長因子(PDGF)或表皮生長因子(EGF)或其受體(EGFR)的拮抗劑。可用於本發明認可的 PDGF 拮抗劑包括奧拉單抗(Lartruvo®；Eli Lilly)。可用於本發明認可的 EGFR 拮抗劑包括：西妥昔單抗(cetuximab)(Erbix®，Eli Lilly)、奈妥珠單抗(necitumumab)(Portrazza®，Eli Lilly)、帕尼單抗(panitumumab)(Vectibix®，Amgen)和奧希替尼(osimertinib)(靶向活化的 EGFR，Tagrisso®，AstraZeneca)。

【0143】 於一些實施例，一或多種其他治療劑係芳香酶抑制劑。在一些實施方案中，芳香酶抑制劑係選自：依西美坦(exemestane)(Amemasin®，Pfizer)、安那斯它佐(anastazole)(Arimidex®，AstraZeneca)和來曲唑(letrozole)(Femara®，Novartis)。

【0144】 於一些實施例，一或多種其他治療劑是刺蝟途徑(hedgehog pathway)的拮抗劑。可用於本發明認可的刺蝟途徑抑制劑包括：索尼得吉(sonidegib)(Odomzo®，Sun Pharmaceuticals)和維莫德吉(vismodegib)(Erivedge®，Genentech)，兩者皆用於治療基底細胞癌。

【0145】 於一些實施例，一或多種其他治療劑係葉酸抑制劑。可用於本發明認可的葉酸抑制劑包括培美曲塞(pemetrexed)(Alimta®，Eli Lilly)。

【0146】 於一些實施例，一或多種其他治療劑是CC趨化激素受體 4(CCR4)抑制劑。可用於本發明的正在研究的 CCR4 抑制劑包括莫迦木單抗(mogamulizumab)(Poteligeo，Kyowa Hakko Kirin，Japan)。

【0147】 於一些實施例，一或多種其他治療劑係異檸檬酸脫氫酶(IDH)抑制劑。可用於本發明的 IDH 抑制劑包括：AG120(Celgene；NCT02677922)、AG221(Celgene，NCT02677922；NCT02577406)、BAY1436032(Bayer，NCT02746081)、IDH305(Novartis，NCT02987010)。

【0148】 於一些實施例，一或多種其他治療劑係精胺酸酶抑制劑。可用於本發明的精胺酸酶抑制劑包括：AEB1102(聚乙二醇化重組精胺酸酶，Aeglea Biotherapeutics)，其正在急性骨髓性白血病和骨髓增生不良症候群(NCT02732184)和實體腫瘤(NCT02561234)的第一期臨床試驗中進行研究；以及CB-1158(Calithera Biosciences)。

【0149】 於一些實施例，一或多種其他治療劑係麩醯胺酸酶抑制劑。可用於本發明的研究的麩醯胺酸酶抑制劑包括CB-839(Calithera Biosciences)。

【0150】 於一些實施例，一或多種其他治療劑係結合腫瘤抗原的抗體，即，在腫瘤細胞的細胞表面上表現的蛋白質。可用於本發明認可的與腫瘤抗原結合的抗體包括：利妥昔單抗(rituximab)(Rituxan®，Genentech/BiogenIdec)、奧法木單抗(ofatumumab)(抗-CD20，Arzerra®，GlaxoSmithKline)、奧濱尤妥珠單抗(obinutuzumab)(抗-CD20，Gazyva®，Genentech)、替伊莫單抗(ibritumomab)(抗-CD20 和 Yttrium-90，Zevalin®，Spectrum Pharmaceuticals)、達雷木單抗

(daratumumab)(抗-CD38, Darzalex®, Janssen Biotech)、地努圖希單抗(dinutuximab)(抗醣脂 GD2, Unituxin®, United Therapeutics); 曲妥珠單抗(trastuzumab)(抗 HER2, Herceptin®, Genentech)、ado-trastuzumab emtansine(抗 HER2, 與 emtansine 融合, Kadcyla®, Genentech)、帕妥珠單抗(pertuzumab)(抗-HER2, Perjeta®, Genentech)和貝倫妥單抗維多汀(brentuximab vedotin)(抗-CD30-藥物結合物, Adcetris®, Seattle Genetics)。

【0151】於一些實施例，一或多種其他治療劑係拓撲異構酶抑制劑。可用於本發明認可的拓撲異構酶抑制劑包括：伊立替康(irinotecan)(Onivyde®, Merrimack Pharmaceuticals)、拓撲替康(topotecan)(Hycamtin®, GlaxoSmithKline)。可用於本發明的正在研究的拓撲異構酶抑制劑包括匹杉瓊(pixantrone)(Pixuvri®, CTI Biopharma)。

【0152】於一些實施例，一或多種其他治療劑係抗凋亡蛋白抑制劑，例如 BCL-2。可用於本發明認可的抗凋亡劑包括：維奈托克(venetoclax)(Venclexta®, AbbVie/Genentech)和布拿土摩單抗(blinatumomab)(Blincyto®, Amgen)。其他經過臨床試驗且可用於本發明的凋亡蛋白標靶治療劑包括：那托克斯(navitoclax)(ABT-263, Abbott)，BCL-2 抑制劑(NCT02079740)。

【0153】於一些實施例，一或多種其他治療劑係雄激素受體抑制劑。可用於本發明認可的雄激素受體抑制劑包括恩雜魯胺(enzalutamide)(Xtandi®, Astellas/Medivation)；認可的雄激素合成抑制劑包括阿比特龍(abiraterone)(Zytiga®, Centocor/Ortho)；認可的促性腺激素釋放激素(GnRH)受體拮抗劑(degaralix, Firmagon®, Ferring Pharmaceuticals)。

【0154】 於一些實施例，一或多種其他治療劑係選擇性雌激素受體調節劑 (SERM)，其干擾雌激素的合成或活性。可用於本發明認可的 SERM 包括雷洛昔芬(raloxifene)(Evista®，Eli Lilly)。

【0155】 於一些實施例，一或多種其他治療劑係骨吸收的抑制劑。被認可的抑制骨吸收治療藥物是迪諾塞麥(Denosumab)(Xgeva®，Amgen)，其為與 RANKL 結合的抗體，阻止 RANKL 與破骨細胞、破骨細胞先驅物以及類噬骨細胞表面的受體 RANK 結合，介導骨轉移的實體腫瘤的骨病理學。抑制骨吸收的其他認可的治療劑包括：雙膦酸鹽，例如唑來膦酸(Zometa®，Novartis)。

【0156】 於一些實施例，一或多種其他治療劑是兩種主要的 p53 抑制蛋白 MDMX 和 MDM2 相互作用的抑制劑。可用於本發明的正在研究的 p53 抑制蛋白的抑制劑包括 ALRN-6924(Aileron)，其為一種裝訂胜肽，等效地結合以及干擾 MDMX 和 MDM2 與 p53 的相互作用。ALRN-6924 目前正在治療 AML、晚期骨髓增生不良症候群(MDS)和外周 T 細胞淋巴瘤(PTCL)的臨床試驗中進行評估 (NCT02909972；NCT02264613)。

【0157】 於一些實施例，一或多種其他治療劑係轉化生長因子- $\beta$ (TGF- $\beta$  或 TGF $\beta$ )的抑制劑。可用於本發明的正在研究的 TGF- $\beta$  蛋白抑制劑包括 NIS793(Novartis)，其為一種抗-TGF- $\beta$  抗體，在臨床上被測試用於治療各種癌症，包括乳癌、肺癌、肝癌、結腸直腸癌、胰臟癌、前列腺癌和腎臟癌(NCT 02947165)。於一些實施例，TGF- $\beta$  蛋白的抑制劑為夫蘇木單抗抗(fresolimumab)(GC1008；Sanofi-Genzyme)，其正進行對黑色素瘤(NCT00923169)、腎臟癌(NCT00356460)和非小細胞肺癌(NCT02581787)的研究。另外，於一些實施例，其他治療劑係 TGF- $\beta$  捕捉劑，如 Connolly et al. (2012) Int'l J. Biological Sciences 8:964-978 所述。

目前用於治療實體腫瘤的臨床試驗中的治療化合物為 M7824(Merck KgaA - 舊稱為 MSB0011459X)，其為雙專一性、抗-PD-L1/TGF $\beta$  捕捉化合物(NCT02699515) 和(NCT02517398)。M7824由針對PD-L1的全人源IgG1抗體組成，其與作為TGF $\beta$  「捕捉劑」的TGF $\beta$ 的細胞外結構域融合。

【0158】於一些實施例，一或多種其他治療劑選自格萊莫單抗-單甲基奧利斯他丁(MMAE)(glembatumumab vedotin-monomethyl auristatin E)(Celldex)，一種與細胞毒性 MMAE 連接的抗-糖蛋白 NMB(gpNMB)抗體(CR011)。gpNMB 在不同腫瘤類型過度表現，且和癌細胞的轉移能力相關。

【0159】於一些實施例，一或多種其他治療劑係抗增生化合物。該些抗增殖化合物包括(但不限於)：芳香酶抑制劑；抗雌激素；拓撲異構酶 I 抑制劑；拓撲異構酶 II 抑制劑；微管活性化合物；烷化化合物；組蛋白去乙酰酶抑制劑；誘導細胞分化過程的化合物；環氧化酶抑制劑；MMP 抑制劑；mTOR 抑制劑；抗腫瘤抗代謝物；鉑類化合物；靶向/降低蛋白質或脂質激酶活性的化合物和其他抗血管生成化合物；靶向、降低或抑制蛋白質或脂質磷酸酶活性之化合物；性腺釋放素促效劑；抗雄激素；甲硫胺酸胺基肽酶抑制劑；基質金屬蛋白酶抑制劑；雙磷酸鹽類；生物反應調節劑；抗增生抗體；肝素酶抑制劑；Ras 致癌同功異型物之抑制劑；端粒酶抑制劑；蛋白酶體抑制劑；用於治療惡性血液病之化合物；靶向、降低或抑制 Flt-3 活性之化合物；Hsp90 抑制劑，例如來自 Conforma Therapeutics 的 17-AAG(17-烯丙基胺基格爾德黴素，NSC330507)、17-DMAG(17-二甲基胺基乙基胺基-17-去甲氧基-格爾德黴素，NSC707545)、IPI-504、CNF1010、CNF2024、CNF1010；替莫唑胺(Temodal®)；紡錘體驅動蛋白抑制劑，例如來自 GlaxoSmithKline 的 SB715992 或 SB743921，或來自 CombinatoRx 的噴他脒/氯丙

嗪(pentamidine/chlorpromazine)；MEK 抑制劑，例如來自 Array BioPharma 的 ARRY142886，來自 AstraZeneca 的 AZd6244，來自 Pfizer 的 PD181461 和甲醯四氫葉酸。

【0160】本說明書用語「芳香酶抑制劑」係關於一種抑制雌激素產生的化合物，例如，分別將基質雄烯二酮和睾固酮轉化為雌酮和雌二醇。該術語包括(但不限於)：類固醇，尤其是阿托斯汀(atamestane)，依西美坦(exemestane)和福美坦(formestane)，以及，特別是非類固醇，尤其是胺麩精(aminoglutethimide)，羅利米特(rogletethimide)，吡啶基乙醯亞胺(pyridoglutethimide)，特蘿斯坦尼(trilostane)，睾內酯(testolactone)，克多可那唑(ketkononazole)，伏氯唑(vorozole)，法偈唑(fadrozole)，阿那曲唑(anastrozole)和來曲唑(letrozole)。依西美坦(exemestane)以商品名 Aromasin™銷售。福美坦(formestane)以商品名 Lentaron™銷售。法偈唑(fadrozole)以商品名 Afema™銷售。阿那曲唑(anastrozole)以商品名 Arimidex™銷售。來曲唑(letrozole)以商品名 Femara™ 或 Femar™ 銷售。胺麩精(aminoglutethimide)以商品名 Orimeten™銷售。本發明中包括芳香酶抑制劑化學治療劑的組合對於荷爾蒙受體陽性癌症，例如乳癌，特別有用。

【0161】本說明書用語「抗雌激素」係關於一種在雌激素受體層級拮抗雌激素效果的化合物。該術語包括(但不限於)：他莫昔芬(tamoxifen)，氟維司群(fulvestrant)，雷洛昔芬(raloxifene)和鹽酸雷洛昔芬(raloxifene hydrochloride)。他莫昔芬(tamoxifen)以商品名 Nolvadex™銷售。雷鹽酸雷洛昔芬(raloxifene hydrochloride)以商品名 Evista™銷售。氟維司群(fulvestrant)以商品名 Faslodex™施用。本發明中包括抗雌激素化學治療劑的組合對於雌激素受體陽性癌症，例如乳癌，特別有用。

【0162】 本說明書用語「抗雄激素」係關於能夠抑制雄激素生物作用的任何物質，包括(但不限於)：比卡魯胺(bicalutamide)(Casodex™)。本說明書用語「性腺釋放素促效劑」包括(但不限於)：阿巴瑞克(abarelix)，戈舍瑞林(goserelin)和醋酸戈舍瑞林(goserelin acetate)。戈舍瑞林(goserelin)可以商品名 Zoladex™施用。

【0163】 本說明書用語「拓撲異構酶 I 抑制劑」包括(但不限於)拓撲替康(topotecan)，吉馬替康(gimatecan)，伊立替康(irinotecan)，喜樹鹼(camptothecin)及其類似物，9-硝基喜樹鹼(9-nitrocamptothecin)和大分子喜樹鹼結合物 PNU-166148。伊立替康(Irinotecan)舉例可以市售形式施用，例如商標 Camptosar™。拓撲替康(topotecan)以商品名 Hycamptin™銷售。

【0164】 本說明書用語「拓撲異構酶 II 抑制劑」包括(但不限於)：蔥環黴素，例如多魯必新(doxorubicin)(包括微脂體製劑，例如 Caelyx™)，道羅魯必新(daunorubicin)，丕魯必新(epirubicin)，達魯必新(idarubicin)和雷魯必新(nemorubicin)，蔥醌米托蔥醌(anthraquinones mitoxantrone)和洛索蔥醌(losoxantrone)，以及婆多非脫新脫婆咁(podophyllotoxines etoposide)及天婆咁(teniposide)。脫婆咁以商品名 Etopophos™銷售。天婆咁以商品名 VM 26-Bristol 銷售。多魯必新(doxorubicin)以商品名 Acriblastin™或 Adriamycin™銷售。丕魯必新(epirubicin)以商品名 Farmorubicin™銷售。達魯必新(idarubicin)以商品名 Zavedos™。米托蔥醌以商品名 Novantron 銷售。

【0165】 本說明書用語「微管活化劑」係關於微管安定化合物、微管解安定化合物以及微管蛋白聚合抑制劑，包括(但不限於)：紫杉烷類(taxanes)，如紫杉醇(paclitaxel)和多西紫杉醇(docetaxel)；長春花鹼類(vinca alkaloids)，如長春鹼(vinblastine)或硫酸鹽長春鹼(vinblastine sulfate)，長春新鹼(vincristine)或硫酸長

春新鹼(vincristine sulfate)，長春瑞濱(vinorelbine)；第柯多鄰(discodermolide)；秋水仙鹼(cochicine)和埃博黴素(epothilones)及其衍生物。紫杉醇(paclitaxel)以商品名 Taxol™銷售。多西紫杉醇(docetaxel)以商品名 Taxotere™銷售。硫酸鹽長春鹼(vinblastine sulfate)以商品名 Vinblastin R.P™銷售。硫酸長春新鹼(vincristine sulfate)以商品名 Farmistin™銷售。

【0166】本說明書用語「烷化劑」包括(但不限於)：環磷醯胺(cyclophosphamide)、異環磷醯胺(ifosfamide)、美法崙(melphalan)或亞硝基脲(BCNU 或 Gliadel)。環磷醯胺(cyclophosphamide)以商品名 Cyclostin™銷售。異環磷醯胺(ifosfamide)以商品名 Holoxan™銷售。

【0167】本說明書用語「組蛋白去乙醯酶抑制劑」或「HDAC 抑制劑」係關於抑制組蛋白去乙醯酶並具有抗增生活性的化合物。這包括(但不限於)辛二醯基苯胺異羟肟酸(SAHA)。

【0168】本說明書用語「抗腫瘤抗代謝物」包括(但不限於)5-氟尿嘧啶或 5-FU、卡培他濱(capecitabine)、吉西他濱(gemcitabine)、DNA 去甲基化合物，例如 5-氮雜胞苷(5-azacytidine)和地西他濱(decitabine)、胺甲喋呤(methotrexate)和依達曲沙(edatrexate)、和葉酸拮抗劑，例如培美曲塞(pemetrexed)。卡培他濱(capecitabine)以商品名 Xeloda™銷售。吉西他濱(gemcitabine)以商品名 Gemzar™銷售。

【0169】本說明書用語「鉑類化合物」包括(但不限於)：卡鉑(carboplatin)、順鉑(cis-platin)、和奧沙利鉑(oxaliplatin)。卡鉑(carboplatin)舉例可以其市售形式投藥，例如商標為 Carboplat™。奧沙利鉑(oxaliplatin)舉例可以其市售形式投藥，例如商標為 Eloxatin™。

【0170】 本說明書用語「靶向/降低蛋白質或脂質激酶活性；或蛋白質或脂質磷酸酶活性的化合物；或其他抗血管生成化合物」包括(但不限於)：蛋白質酪氨酸激酶和/或絲氨酸和/或蘇氨酸激酶抑制劑或脂質激酶抑制劑，例如：a)靶向、降低或抑制血小板衍生生長因子受體(PDGFR)活性的化合物，例如靶向、降低或抑制 PDGFR 活性的化合物，尤其是那些抑制 PDGF 受體的化合物，如 N-苯基-2-嘧啶-胺衍生物，如伊馬替尼，SU101，SU6668 和 GFB-111；b)靶向、降低或抑制纖維母細胞生長因子受體(FGFR)活性的化合物；c)靶向、降低或抑制胰島素樣生長因子受體 I(IGF-IR)活性的化合物，例如靶向、降低或抑制 IGF-IR 活性的化合物，尤其是抑制 IGF-I 受體的激酶活性的化合物，或是靶向 IGF-I 受體或其生長因子的細胞外結構域的抗體；d)靶向、降低或抑制 Trk 受體酪氨酸激酶家族活性的化合物或酪氨酸蛋白激酶(ephron) B4 抑制劑；e)靶向、降低或抑制 Axl 受體酪氨酸激酶家族活性的化合物；f)靶向、降低或抑制 Ret 受體酪氨酸激酶活性的化合物；g)靶向、降低或抑制 Kit/SCFR 受體酪氨酸激酶活性的化合物，例如伊馬替尼(imatinib)；h)靶向、降低或抑制 C-kit 受體酪氨酸激酶(其為 PDGFR 家族之一)活性的化合物，例如靶向、降低或抑制 c-Kit 受體酪氨酸激酶家族活性的化合物，尤其是抑制 c-Kit 受體的化合物，例如伊馬替尼(imatinib)；i)靶向、降低或抑制 c-Abl 家族成員、其基因融合產物(例如 BCR-Abl 激酶)和突變體活性的化合物，例如靶向降低或抑制 c-Abl 家族成員及其基因融合產物，如 N-苯基-2-嘧啶-胺衍生物，如伊馬替尼(imatinib)或尼羅替尼(nilotinib)(AMN107); PD180970；AG957；NSC 680410；PD173955；來自 ParkeDavis；或達沙替尼(dasatinib)(BMS-354825)；j)靶向、降低或抑制蛋白激酶 C(PKC)和 Raf 家族絲氨酸/蘇氨酸激酶成員，MEK、SRC、JAK/pan-JAK、FAK、PDK1、PKB/Akt、

Ras/MAPK、PI3K、SYK、TYK2、BTK 和 TEC 家族的成員，和/或細胞周期蛋白依賴型激酶(CDK)的成員，包括星形孢菌素衍生物，例如米哚妥林(midostaurin)；其他化合物的實例包括 UCN-01、沙芬戈(safingol)、BAY 43-9006、苔蘚抑素 1 (Bryostatin 1)、哌立福新(Perifosine)；伊莫福星(ilmofosine)；RO 318220 和 RO 320432；GO 6976；Isis 3521；LY333531/LY379196；異喹啉化合物；FTIs；PD184352 或 QAN697(P13K 抑制劑)或 AT7519(CDK 抑制劑)；k) 靶向、降低或抑制蛋白-酪胺酸激酶抑制劑活性之化合物，例如靶向、降低或抑制蛋白-酪胺酸激酶抑制劑活性之化合物，包括甲磺酸伊馬替尼(Gleevec™)或酪胺酸磷酸化抑制劑(tyrphostin)，例如酪胺酸磷酸化抑制劑 A23/RG-50810；AG 99；酪胺酸磷酸化抑制劑 AG 213；酪胺酸磷酸化抑制劑 AG 1748；酪胺酸磷酸化抑制劑 AG 490；酪胺酸磷酸化抑制劑 B44；酪胺酸磷酸化抑制劑 B44(+)對映異構體；酪胺酸磷酸化抑制劑 AG 555；AG 494；酪胺酸磷酸化抑制劑 AG 556、AG957 及阿當福斯丁(4-[[[(2,5-二羥基苯基)甲基]胺基]-苯甲酸金剛烷酯；NSC 680410，adaphostin)；l) 靶向、降低或抑制表皮生長因子家族受體酪胺酸激酶(呈同二聚體或雜二聚體形式之 EGFR1ErbB2、ErbB3、ErbB4)及其突變體活性之化合物，例如靶向、降低或抑制表皮生長因子受體家族活性之化合物，尤其抑制 EGF 受體酪胺酸激酶家族成員(如 EGF 受體、ErbB2、ErbB3 及 ErbB4)或結合於 EGF 或 EGF 相關配體之化合物、蛋白質或抗體，CP 358774，ZD 1839，ZM 105180；曲妥珠單抗(trastuzumab)(Herceptin™)、西妥昔單抗(cetuximab)(Erbix™)、易瑞沙(Iressa)、它賽瓦(Tarceva)、OSI-774、CI-1033、EKB-569、GW-2016、E1.1、E2.4、E2.5、E6.2、E6.4、E2.11、E6.3 或 E7.6.3 及 7H-吡咯并-[2,3-d]嘧啶衍生物；m) 靶向、降低或抑制 c-Met 受體活性之化合物，例如靶向、降低或抑制 c-Met 活性之化合

物，尤其抑制 c-Met 受體之激酶活性的化合物，或靶向 c-Met 之細胞外域或結合於 HGF 之抗體；n) 靶向、降低或抑制一或多種 JAK 家族成員 (JAK1/JAK2/JAK3/TYK2 及/或泛-JAK) 激酶活性之化合物，包括(但不限於)PRT-062070、SB-1578、巴西替尼(baricitinib)、帕里替尼(pacritinib)、莫羅替尼(momelotinib)、VX- 509、AZD-1480、TG-101348、托法替尼(tofacitinib)及魯索利替尼(ruxolitinib)；o) 靶向、降低或抑制 PI3 激酶(PI3K)激酶活性之化合物，包括(但不限於)ATU-027、SF-1126、DS-7423、PBI-05204、GSK-2126458、ZSTK-474、布帕里斯(buparlisib)、皮特里斯(pictrelisib)、PF-4691502、BYL-719、達托里斯(dactolisib)、XL-147、XL-765 及艾代拉利司(idelalisib)；及 p) 靶向、降低或抑制刺蝟因子蛋白(Hh)或平滑受體(SMO)路徑之訊號傳導作用之化合物，包括(但不限於)環巴胺(cyclopamine)、維莫德吉(vismodegib)、伊曲康唑(itraconazole)、埃莫德格(erismodegib)及 IPI-926(薩拉德格(saridegib))。

【0171】 本說明書用語「PI3K 抑制劑」包括(但不限於)具有針對磷脂酰肌醇-3-激酶家族中之一或多種酶的抑制活性之化合物，包括(但不限於)PI3K $\alpha$ 、PI3K $\gamma$ 、PI3K $\delta$ 、PI3K $\beta$ 、PI3K-C2 $\alpha$ 、PI3K-C2 $\beta$ 、PI3K-C2 $\gamma$ 、Vps34、p110- $\alpha$ 、p110- $\beta$ 、p110- $\gamma$ 、p110- $\delta$ 、p85- $\alpha$ 、p85- $\beta$ 、p55- $\gamma$ 、p150、p101 及 p87。適用於本發明中之 PI3K 抑制劑的實例包括(但不限於)ATU-027、SF-1126、DS-7423、PBI-05204、GSK-2126458、ZSTK-474、布帕里斯(buparlisib)、皮特里斯(pictrelisib)、PF-4691502、BYL-719、達托里斯(dactolisib)、XL-147、XL-765 及艾代拉利司(idelalisib)。

【0172】 本說明書用語「Bcl-2 抑制劑」包括(但不限於)對 B 細胞淋巴瘤 2 蛋白(Bcl-2)具有抑制活性的化合物，包括(但不限於)ABT-199、ABT-731、

ABT-737、變棉子酚 (apogossypol)、Ascenta 的泛-Bcl-2 抑制劑、薑黃素(及其類似物)、雙重 Bcl-2/Bcl-xL 抑制劑(Infinity Pharmaceuticals/Novartis Pharmaceuticals)、根納三思(Genasense)(G3139)、HA14-1(及其類似物；參見 WO 2008/118802)、那托克斯 (navitoclax)(及其類似物，參見 US 7,390,799)、NH-1(Shenayng Pharmaceutical University)、奧巴拉西 (obatoclax)(及其類似物，參見 WO 2004/106328)、S-001(Gloria Pharmaceuticals)、TW 系列化合物(Univ. of Michigan) 和維奈托克(venetoclax)。於一實施例，Bcl-2 抑制劑是小分子治療劑。在一些實施方案中，Bcl-2 抑制劑是擬胜肽藥物。

【0173】本說明書用語「BTK 抑制劑」包括(但不限於)具有針對布魯頓氏酪胺酸激酶(Bruton's Tyrosine Kinase, BTK)之抑制活性的化合物，包括(但不限於)AVL-292 及依魯替尼(ibrutinib)。

【0174】本說明書用語「SYK 抑制劑」包括(但不限於)具有針對脾臟酪胺酸激酶(SYK)之抑制活性的化合物，包括(但不限於)PRT-062070、R-343、R-333、Excellair、PRT-062607 及福他替尼(fostamatinib)。

【0175】BTK 抑制性化合物及可由該等化合物與本發明化合物之組合治療的病狀之其他實例可見於 WO2008/039218 及 WO2011/090760 中，該等專利以全文引用的方式併入本文中。

【0176】SYK 抑制性化合物及可由該等化合物與本發明化合物之組合治療的病狀之其他實例可見於 WO2003/063794、WO2005/007623 及 WO2006/078846 中，該等專利以全文引用的方式併入本文中。

【0177】PI3K 抑制性化合物及可由該等化合物與本發明化合物之組合治療的病狀之其他實例可見於 WO2004/019973、WO2004/089925、WO2007/016176、

US8,138,347 、 WO2002/088112 、 WO2007/084786 、 WO2007/129161 、 WO2006/122806、WO2005/113554 及 WO2007/044729 中，該等專利以全文引用的方式併入本文中。

【0178】 JAK 抑制性化合物及可由該等化合物與本發明化合物之組合治療的病狀之其他實例可見於 WO2009/114512、WO2008/109943、WO2007/053452、WO2000/142246 及 WO2007/070514 中，該等專利以全文引用的方式併入本文中。

【0179】 其他抗血管生成化合物包括對於其活性具有另一機制(例如與蛋白或脂質激酶抑制無關)的化合物，例如沙利度胺(thalidomide)(Thalomid™)及 TNP-470。

【0180】 適用於與本發明化合物組合使用之蛋白酶體抑制劑的實例包括(但不限於)硼替佐米(bortezomib)、雙硫侖(disulfiram)、表焙兒茶素-3-沒食子酸鹽(EGCG)、鹽孢醯胺 A(salinosporamide A)、卡非佐米(carfilzomib)、ONX-0912、CEP-18770 及 MLN9708。

【0181】 靶向、降低或抑制蛋白或脂質磷酸酶活性之化合物例如磷酸酶 1、磷酸酶 2A 或 CDC25 之抑制劑，例如岡田酸(okadaic acid)或其衍生物。

【0182】 誘導細胞分化過程之化合物包括(但不限於)視黃酸、 $\alpha$ -生育酚、 $\gamma$ -生育酚或  $\delta$ -生育酚或  $\alpha$ -生育三烯酚、 $\gamma$ -生育三烯酚或  $\delta$ -生育三烯酚。

【0183】 如說明書用語環加氧酶抑制劑包括(但不限於)Cox-2 抑制劑、5-烷基取代之 2-芳基胺基苯基乙酸及衍生物，例如塞內昔布(celecoxib)(Celebrex™)、羅非昔布(rofecoxib)(Vioxx™)、依託昔布(etoricoxib)、伐地昔布(valdecoxib)或 5-

烷基-2-芳基胺基苯基乙酸(例如 5-甲基-2-(2'-氯-6'-氟苯胺基)苯乙酸)、羅美昔布(lumiracoxib)。

【0184】 本說明書用語「雙膦酸鹽」包括(但不限於)依替酮酸(etridonic acid)、氯膦酸(clodronic acid)、替魯羅酸(tiludronic acid)、帕米膦酸(pamidronic acid)、阿侖膦酸(alendronic acid)、伊班膦酸(ibandronic acid)、利塞膦酸(risedronic acid)及唑來膦酸(zoledronic acid)。依替酮酸(etridonic acid)以商品名稱 Didronel™銷售。氯膦酸(clodronic acid)以商品名稱 Bonafos™銷售。替魯羅酸(tiludronic acid)以商品名稱 Skelid™銷售。帕米膦酸(pamidronic acid)以商品名稱 Aredia™銷售。阿侖膦酸(alendronic acid)以商品名稱 Fosamax™銷售。伊班膦酸(ibandronic acid)以商品名稱 Bondranat™銷售。利塞膦酸(risedronic acid)以商品名稱 Actonel™銷售。唑來膦酸(zoledronic acid)以商品名稱 Zometa™銷售。用語「mTOR 抑制劑」係關於抑制雷帕黴素(rapamycin)之哺乳動物目標(mTOR)且具有抗增生活性之化合物，例如西羅莫司(sirolimus)(Rapamune®)、依維莫司(everolimus)(Certican™)、CCI-779 及 ABT578。

【0185】 本說明書用語「肝素酶抑制劑」係指靶向、降低或抑制硫酸肝素降解之化合物。該用語包括(但不限於)PI-88。如本說明書所使用，用語「生物反應調節劑」係指淋巴因子或干擾素。

【0186】 本文用語「Ras 致癌同功異型物之抑制劑」(例如 H-Ras、K-Ras 或 N-Ras)係指靶向、降低或抑制 Ras 致癌活性之化合物；例如「法尼基轉移酶抑制劑」，如 L-744832、DK8G557 或 R115777(Zarnestra™)。本說明書用語「端粒酶抑制劑」係指靶向、降低或抑制端粒酶活性之化合物。靶向、降低或抑制

端粒酶活性之化合物尤其為抑制端粒酶受體之化合物，諸如端粒酶抑素(telomestatin)。

【0187】本說明書用語「甲硫胺酸胺基肽酶抑制劑」係指靶向、降低或抑制甲硫胺酸胺基肽酶活性之化合物。靶向、降低或抑制甲硫胺酸胺基肽酶活性之化合物包括(但不限於)苯胍麥(bengamide)或其衍生物。

【0188】本說明書用語「蛋白酶體抑制劑」係指靶向、降低或抑制蛋白酶體活性之化合物。靶向、降低或抑制蛋白酶體活性之化合物包括(但不限於)硼替佐米(Bortezomib)(Velcade™)及 MLN 341。

【0189】本說明書用語「基質金屬蛋白酶抑制劑」或(「MMP」抑制劑)包括(但不限於)膠原蛋白擬胜肽及非擬胜肽抑制劑、四環素衍生物，例如氫草醯胺酸酯擬胜肽抑制劑巴馬司他(batimastat)及其具有經口生物可用性之類似物馬立馬司他(marimastat)(BB-2516)、普馬司他(prinomastat)(AG3340)、美他司他(metastat)(NSC 683551)BMS-279251、BAY 12-9566、TAA211、MMI270B 或 AAJ996。

【0190】本說明書用語「用於治療惡性血液病之化合物」包括(但不限於)FMS 樣酪胺酸激酶抑制劑，其為靶向、降低或抑制 FMS 樣酪胺酸激酶受體(Flt-3R)活性之化合物；干擾素、1-β-D-阿糖呋喃胞嘧啶(ara-c)及白消安(busulfan)；及 ALK 抑制劑，其為靶向、降低或抑制間變性淋巴瘤激酶之化合物。

【0191】靶向、降低或抑制 FMS 樣酪胺酸激酶受體(Flt-3R)活性之化合物尤其為抑制 Flt-3R 受體激酶家族成員之化合物、蛋白質或抗體，例如 PKC412、米哌妥林(midostaurin)、星形孢菌素衍生物、SU11248 及 MLN518。

【0192】 本說明書用語「HSP90 抑制劑」包括(但不限於)靶向、降低或抑制 HSP90 固有 ATP 酶活性之化合物；經由泛素蛋白酶體路徑降解、靶向、降低或抑制 HSP90 客戶蛋白之化合物。靶向、降低或抑制 HSP90 固有 ATP 酶活性之化合物尤其為抑制 HSP90 之 ATP 酶活性的化合物、蛋白質或抗體，如 17-烯丙基胺基，17-去甲氧基格爾德黴素(17AAG)(一種格爾德黴素衍生物)；其他格爾德黴素相關化合物；根赤殼菌素(radicol)及 HDAC 抑制劑。

【0193】 本說明書用語「抗增生抗體」包括(但不限於)曲妥珠單抗(Herceptin™)、曲妥珠單抗-DM1、艾比特思(erbitux)、貝伐單抗(bevacizumab)(Avastin™)、利妥昔單抗(Rituxan®)、PRO64553(抗-CD40)及 2C4 抗體。抗體意謂完整單株抗體、多株抗體、由至少兩種完整抗體形成之多專一性抗體及抗體片段，只要其展現所需生物活性即可。

【0194】 對於急性骨髓白血病(AML)的治療，本發明化合物可與標準白血病療法組合使用，尤其與用於治療 AML 之療法組合使用。特別地，本發明化合物可與例如法尼基轉移酶抑制劑及/或適用於治療 AML 之其他藥物組合給藥，例如道羅魯必新(daunorubicin)、阿德力黴素(Adriamycin)、Ara-C、VP-16、替尼泊苷(Teniposide)、米托蒽醌(Mitoxantrone)、達魯必新(Idarubicin)、卡鉑(Carboplatinum)及 PKC412。

【0195】 其他抗白血病化合物舉例包括 Ara-C，一種嘧啶類似物，其為去氧胞苷之 2'- $\alpha$ -羥基核糖(阿拉伯糖)衍生物。亦包括次黃嘌呤、6-巰基嘌呤(6-MP)及磷酸氟達拉濱(fludarabine phosphate)之嘌呤類似物。靶向、降低或抑制組蛋白去乙酰酶(HDAC)抑制劑活性之化合物(例如丁酸鈉及辛二醯基苯胺氧肟酸(SAHA))抑制稱為組蛋白去乙酰酶之酶的活性。特定 HDAC 抑制劑包括 MS275、

SAHA、FK228(以前為 FR901228)、曲古菌素 A(Trichostatin A)及 US 6,552,065 中所揭示之化合物，包括(但不限於)N-羥基-3-[4-[[[2-(2-甲基-1H-吡啶-3-基)-乙基]-胺基]甲基]苯基]-2E-2-丙烯醯胺或其醫藥上可接受之鹽及 N-羥基-3-[4-[(2-羥基乙基){2-(1H-吡啶-3-基)乙基]-胺基]甲基]苯基]-2E-2-丙烯醯胺或其醫藥上可接受之鹽，尤其為乳酸鹽。如本說明書所使用，生長抑素(somatostatin)受體拮抗劑係指靶向、處理或抑制生長抑素受體之化合物，例如奧曲肽(octreotide)及 SOM230。腫瘤細胞破壞方法係指例如電離輻射之方法。上文及下文中所提及之用語「電離輻射」意謂以電磁射線(例如 X 射線及  $\gamma$  射線)或粒子(例如  $\alpha$  及  $\beta$  粒子)形式發生之電離輻射。電離輻射已於(但不限於)放射療法中提供且為此領域所習知。參見 Hellman, Principles of Radiation Therapy, Cancer, in Principles and Practice of Oncology, Devita *et al.*, Eds., 4<sup>th</sup> Edition, Vol. 1, pp. 248-275 (1993)。

【0196】 還包括 EDG 結合劑及核糖核苷酸還原酶抑制劑。本說明書用語「EDG 結合劑」係指一類調節淋巴細胞再循環之免疫抑制劑，例如 FTY720。用語「核糖核苷酸還原酶抑制劑」係指嘧啶或嘌呤核苷類似物，包括(但不限於)氟達拉濱及/或胞嘧啶阿拉伯糖苷(ara-C)、6-硫代鳥嘌呤、5-氟尿嘧啶、克拉屈濱(cladribine)、6-巰基嘌呤(尤其與針對 ALL 之 ara-C 組合)及/或噴司他丁(pentostatin)。核糖核苷酸還原酶抑制劑尤其係為羥基脲或 2-羥基-1H-異吡啶-1,3-二酮衍生物。

【0197】 尤其亦包括針對 VEGF 之彼等化合物、蛋白質或單株抗體，例如 1-(4-氯苯胺基)-4-(4-吡啶基甲基)酞嗪或其醫藥上可接受之鹽、1-(4-氯苯胺基)-4-(4-吡啶基甲基)酞嗪丁二酸鹽；Angiostatin™；Endostatin™；鄰胺基苯甲酸醯胺；ZD4190；ZD<sub>6</sub>474；SU5416；SU6668；貝伐單抗；或抗-VEGF 抗體或抗

VEGF 受體抗體(例如 rhuMAb 及 RHUFab)、VEGF 適體(如 Macugen)；FLT-4 抑制劑、FLT-3 抑制劑、VEGFR-2 IgG1 抗體、血管酶(Angiozyme)(RPI 4610)及貝伐單抗(Avastin™)。

【0198】 本說明書所使用之光動力學療法係指使用某些稱為感光化合物來治療或預防癌症之化學物質的療法。光動力學療法之實例包括用例如 Visudyne™及卟吩姆鈉(porfimer sodium)之化合物治療。

【0199】 本說明書所使用之血管生成抑制性類固醇(angiostatic steroid)係指阻斷或抑制血管生成之化合物，例如阿奈可他(anecortave)、曲安西龍(triamcinolone)、氫化可的松、11- $\alpha$ -表氫化皮質醇、皮甯酮(cortexolone)、17 $\alpha$ -羥基孕酮、皮質酮、去氧皮質酮、睪丸酮、雌酮及地塞米松。

【0200】 含有皮質類固醇之植入物係指例如氟輕鬆(flucinolone)及地塞米松之化合物。

【0201】 其他化學治療化合物包括(但不限於)：植物生物鹼、激素化合物及拮抗劑；生物反應調節劑，較佳為淋巴因子或干擾素；反義寡聚核苷酸或寡聚核苷酸衍生物；shRNA 或 siRNA；或混雜化合物或具有其他或未知作用機制之化合物。

【0202】 由代號、通用名或商品名識別的活性化合物的結構可摘自標準綱要「The Merck Index」的實際版本或來自資料庫，如國際專利(例如 IMS World Publications)。

【0203】 免疫腫瘤藥劑

【0204】 於一些實施例，一或多種其他治療劑係為免疫腫瘤藥劑。本說明書用語「免疫腫瘤藥劑」係指可有效增強、刺激及/或上調個體之免疫反應之藥

劑。於一實施例，本發明化合物與免疫腫瘤藥劑之投與在治療癌症方面具有協同作用。

【0205】 免疫腫瘤藥劑舉例可為小分子藥物、抗體或生物分子或小分子。生物學免疫腫瘤藥劑之實例包括(但不限於)：癌症疫苗、抗體及細胞激素。於一些實施例，該抗體為單株抗體。於一些實施例，該單株抗體為人源化或人類抗體。

【0206】 於一些實施例，該免疫腫瘤藥劑為(i)刺激(包括共同刺激)受體之促效劑或(ii)抑制(包括共同抑制) T 細胞之訊號的拮抗劑，兩者均導致抗原專一性 T 細胞反應放大。

【0207】 某些刺激及抑制分子為免疫球蛋白超家族(IgSF)之成員。結合至共同刺激或共同抑制受體之膜結合配體的一個重要家族為 B7 家族，其包括 B7-1、B7-2、B7-H1 (PD-L1)、B7-DC (PD-L2)、B7-H2 (ICOS-L)、B7-H3、B7-H4、B7-H5 (VISTA)及 B7-H6。結合至共同刺激或共同抑制受體之膜結合配體的另一家族為結合至同源 TNF 受體家族成員之分子的 TNF 家族，其包括 CD40 及 CD40L、OX-40、OX-40L、CD70、CD27L、CD30、CD30L、4-1BBL、CD137(4-1BB)、TRAIL/Apo2-L、TRAILR1/DR4、TRAILR2/DR5、TRAILR3、TRAILR4、OPG、RANK、RANKL、TWEAKR/Fn14、TWEAK、BAFFR、EDAR、XEDAR、TACI、APRIL、BCMA、LT $\beta$ R、LIGHT、DcR3、HVEM、VEGI/TL1A、TRAMP/DR3、EDAR、EDA1、XEDAR、EDA2、TNFR1、淋巴毒素  $\alpha$ /TNF $\beta$ 、TNFR2、TNF $\alpha$ 、LT $\beta$ R、淋巴毒素  $\alpha$  1 $\beta$ 2、FAS、FASL、RELT、DR6、TROY 和 NGFR。

【0208】 於一些實施例，免疫腫瘤藥劑是抑制 T 細胞活化的細胞激素(例如，IL-6、IL-10、TGF- $\beta$ 、VEGF 和其他免疫抑制細胞激素)或刺激 T 細胞活化的細胞激素，用於刺激免疫反應。

【0209】 於一些實施例，T 細胞反應可受本發明化合物與一免疫腫瘤藥劑之組合刺激。於一些實施例，免疫腫瘤藥劑是：(i)抑制 T 細胞活化之蛋白質的拮抗劑(例如，免疫檢查點抑制劑)，例如 CTLA-4、PD-1、PD-L1、PD-L2、LAG-3、TIM-3、半乳糖凝集素 9、CEACAM-1、BTLA、CD69、半乳糖凝集素-1、TIGIT、CD113、GPR56、VISTA、2B4、CD48、GARP、PD1H、LAIR1、TIM-1 及 TIM-4；或(ii)刺激 T 細胞活化之蛋白質的促效劑，例如 B7-1、B7-2、CD28、4-1BB (CD137)、4-1BBL、ICOS、ICOS-L、OX40、OX40L、GITR、GITRL、CD70、CD27、CD40、DR3 及 CD28H。

【0210】 於一些實施例，免疫腫瘤藥劑是 NK 細胞上之抑制受體的拮抗劑或 NK 細胞上之活化受體的促效劑。於一些實施例，免疫腫瘤藥劑是 KIR 之拮抗劑，例如利魯單抗(lirilumab)。

【0211】 於一些實施例，免疫腫瘤藥劑是抑制或消耗巨噬細胞或單核細胞之藥劑，包括(但不限於)CSF-1R 拮抗劑，例如 CSF-1R 拮抗劑抗體，包括 RG7155 (WO 2011/70024、WO 2011/107553、WO 2011/131407、WO 2013/87699、WO 2013/119716、WO 2013/132044)或 FPA-008 (WO 2011/140249；WO 2013169264；WO 2014/036357)。

【0212】 於一些實施例，免疫腫瘤藥劑係選自：結合陽性共同刺激受體之促效劑、減弱通過抑制受體之訊號傳遞之阻斷劑、拮抗劑及一或多種全身性增加抗腫瘤 T 細胞之頻率的藥劑、克服腫瘤微環境內不同免疫抑制路徑(例如，阻

斷抑制受體的參與(例如，PD-L1/PD-1 交互作用)、消耗或抑制 Treg (例如，使用抗-CD25 單株抗體(例如，達利珠單抗(daclizumab))或藉由體外抗-CD25 珠消耗)、抑制例如 IDO 之代謝酶、或逆轉/阻止 T 細胞能量或衰竭)之藥劑及在腫瘤位置觸發先天免疫活化及/或發炎之藥劑。

【0213】 於一些實施例，該免疫腫瘤藥劑為 CTLA-4 拮抗劑。於一些實施例，該 CTLA-4 拮抗劑是拮抗性 CTLA-4 抗體。於一些實施例，拮抗性 CTLA-4 抗體是 YERVOY (伊匹單抗(ipilimumab))或曲美單抗(tremelimumab)。

【0214】 於一些實施例，該免疫腫瘤藥劑為 PD-1 拮抗劑。於一些實施例，PD-1 拮抗劑是透過輸液投予。於一些實施例，該免疫腫瘤藥劑是抗體或其抗原結合部分，其專一性結合 Programmed Death-1(PD-1)受體並抑制 PD-1 活性。於一些實施例，PD-1 拮抗劑是拮抗性 PD-1 抗體。於一些實施例，該拮抗性 PD-1 抗體是 OPDIVO (尼沃單抗(nivolumab))、KEYTRUDA (派立珠單抗(pembrolizumab))、或 MEDI-0680 (AMP-514; WO 2012/145493)。於一些實施例，免疫腫瘤藥劑可為免疫腫瘤藥劑亦可包括皮立珠單抗(pidilizumab)(CT-011)。於一些實施例，免疫腫瘤藥劑是重組蛋白，該重組蛋白是由與 IgG1 之 Fc 部分融合的 PD-L2 之細胞外結構域(B7-DC)組成，稱為 AMP-224。

【0215】 於一些實施例，免疫腫瘤藥劑是 PD-L1 拮抗劑。於一些實施例，PD-L1 拮抗劑是拮抗性 PD-L1 抗體。於一些實施例，PD-L1 抗體是 MPDL3280A(RG7446; WO2010/077634)、德瓦魯單抗(durvalumab)(MEDI4736)、BMS-936559(WO 2007/005874)和 MSB0010718C(WO 2013/79174)。

【0216】 於一些實施例，該免疫腫瘤藥劑為LAG-3 拮抗劑。於一些實施例，LAG-3 拮抗劑是拮抗性 LAG-3 抗體。於一些實施例，LAG-3 抗體是 BMS-986016

(WO 2010/19570、WO 2014/08218)、或 IMP-731 或 IMP-321 (WO 2008/132601、WO 2009/44273)。

【0217】於一些實施例，免疫腫瘤藥劑為 CD137 (4-1BB)促效劑。於一些實施例，CD137 (4-1BB)促效劑為促效性 CD137 抗體。於一些實施例，CD137 抗體是烏洛單抗(urelumab)或 PF-05082566 (WO 2012/32433)。

【0218】於一些實施例，免疫腫瘤藥劑為 GITR 促效劑。於一些實施例，GITR 促效劑是促效性 GITR 抗體。於一些實施例，GITR 抗體是 BMS-986153、BMS-986156、TRX-518 (WO 2006/105021、WO 2009/009116)或 MK-4166 (WO11/028683)。

【0219】於一些實施例，免疫腫瘤藥劑為吡咯胺 2,3-雙加氧酶(IDO) 拮抗劑。於一些實施例，IDO 拮抗劑係選自：艾帕斯塔(epacadostat)(INCB024360，Incyte)、吡咯西莫(indoximod)(NLG-8189，NewLink Genetics Corporation)、Capmanitib(INC280，Novartis)、GDC-0919(Genentech/Roche)、PF-06840003(Pfizer)、BMS：F001287(Bristol-Myers Squibb)、Phy906/KD108(Phytoceutica)、一種分解犬尿胺酸的酶(Kynase，Kyn Therapeutics)和 NLG-919(WO 2009/73620、WO 2009/1156652、WO 2011/56652、WO 2012/142237)。

【0220】於一些實施例，免疫腫瘤藥劑為 OX40 促效劑。於一些實施例，OX40 促效劑是促效性 OX40 抗體。於一些實施例，OX40 抗體是 MEDI-6383 或 MEDI-6469。

【0221】於一些實施例，免疫腫瘤藥劑為 OX40L 拮抗劑。於一些實施例，OX40L 拮抗劑是拮抗性 OX40 抗體。於一些實施例，OX40L 拮抗劑是 RG-7888 (WO 2006/029879)。

【0222】 於一些實施例，免疫腫瘤藥劑為 CD40 促效劑。於一些實施例，CD40 促效劑是促效性 CD40 抗體。於一些實施例，免疫腫瘤藥劑是 CD40 拮抗劑。於一些實施例，CD40 拮抗劑是促效性 CD40 抗體。於一些實施例，CD40 抗體是魯卡木單抗(lucatumumab)或達西珠單抗(dacetuzumab)。

【0223】 於一些實施例，免疫腫瘤藥劑為 CD27 促效劑。於一些實施例，CD27 促效劑為促效性 CD27 抗體。於一些實施例，CD27 抗體是瓦利路單抗(varlilumab)。

【0224】 於一些實施例，免疫腫瘤藥劑為 MGA271 (至 B7H3) (WO 2011/109400)。

【0225】 於一些實施例，免疫腫瘤藥劑為阿巴伏單抗(abagovomab)、阿達木單抗(adecatumumab)、阿夫妥珠單抗(afutuzumab)、阿侖單抗(alemtuzumab)、麻安莫單抗(anatumomab mafenatox)、阿泊珠單抗(apolizumab)、阿特珠單抗(atezolimab)、艾維路單抗(avelumab)、布拿土摩單抗(blinatumomab)、BMS-936559、卡托莫西單抗(catumaxomab)、德瓦魯單抗(durvalumab)、艾帕斯塔(epacadostat)、依帕珠單抗(epratuzumab)、吲哚西莫(indoximod)、奧英妥珠單抗(inotuzumab ozogamicin)、伊特魯單抗(intelumumab)、伊匹單抗(ipilimumab)、伊薩土西單抗(isatuximab)、拉立珠單抗(lambrolizumab)、MED14736、MPDL3280A、尼沃單抗(nivolumab)、奧濱尤妥珠單抗(obinutuzumab)、奧卡拉珠單抗(ocaratuzumab)、奧法木單抗(ofatumumab)、奧拉他單抗(olatatumab)、派立珠單抗(pembrolizumab)、皮立珠單抗(pidilizumab)、利妥昔單抗(rituximab)、替西單抗(ticilimumab)、薩馬里珠單抗(samalizumab)或曲美單抗(tremelimumab)。

【0226】於一些實施例，免疫腫瘤藥劑為免疫刺激劑。舉例而言，阻斷 PD-1 及 PD-L1 抑制軸之抗體可釋放活化之腫瘤反應性 T 細胞且已在臨床試驗中顯示誘導耐久的抗腫瘤反應，增加腫瘤組織結構之數目，包括習知尚未認為對免疫療法敏感之一些腫瘤類型。參見例如 Okazaki, T. *et al.* (2013) *Nat. Immunol.* 14, 1212-1218; Zou *et al.* (2016) *Sci. Transl. Med.* 8。抗-PD-1 抗體尼沃單抗(Opdivo®，Bristol-Myers Squibb，亦稱為 ONO-4538、MDX1106 及 BMS-936558)已顯示提高在抗血管生成療法期間或之後經歷疾病進展之腎透明細胞癌(RCC)患者中的總存活率之潛能。

【0227】於一些實施例，免疫調節治療劑專一性誘發腫瘤細胞之細胞凋亡。經批准之可用於本發明中之免疫調節治療劑包括泊利度胺(pomalidomide)(Pomalyst®，Celgene)；來那度胺(lenalidomide)(Revlimid®，Celgene)；巨大戟醇甲基丁烯酸酯(ingenol mebutate)(Picato®，LEO Pharma)。

【0228】於一些實施例，免疫腫瘤藥劑為癌症疫苗。於一些實施例，癌症疫苗係選自：西普亮塞-T (sipuleucel-T) (Provenge®，Dendreon/Valeant Pharmaceuticals)，已批准其用於治療無症狀或最少症狀之轉移性去勢抗性(激素難治性)前列腺癌；以及拉赫塔里(talimogene laherparepvec)(Imlygic®，BioVex/Amgen，先前稱為 T-VEC)，一種批准用於治療黑色素瘤中不可切除之皮膚、皮下及結節病變的經基因修飾之溶瘤病毒療法。於一些實施例，免疫腫瘤藥劑係選自溶瘤病毒療法，諸如派沙德瓦(pexastimogene devacirepvec) (PexaVec/JX-594，SillaJen/以前為 Jennerex Biotherapeutics)，一種經工程改造以表現 GM-CSF 之缺乏胸苷激酶(TK-)之痘瘡病毒，針對肝細胞癌(NCT02562755)及黑色素瘤(NCT00429312)；派拉瑞(pelareorep) (Reolysin®，Oncolytics Biotech)，

一種呼吸道腸道孤兒病毒(里奧病毒(reovirus))變異體，其在大量癌症中之未 RAS 活化之細胞中不複製，該等癌症包括結腸直腸癌(NCT01622543)、前列腺癌(NCT01619813)、頭頸部鱗狀細胞癌(NCT01166542)、胰腺癌(NCT00998322)及非小細胞肺癌(NSCLC) (NCT 00861627)；安德土西(enadenotucirev) (NG-348，PsiOxus，以前稱為 ColoAd1)，一種經工程改造以表現對 T 細胞受體 CD3 蛋白質具有專一性之全長 CD80 及抗體片段的腺病毒，在卵巢癌(NCT02028117)、轉移性或晚期上皮腫瘤、諸如結腸直腸癌、膀胱癌、頭頸部鱗狀細胞癌及唾液腺癌(NCT02636036)中；ONCOS-102 (Targovax/以前為 Oncos)，一種經工程改造以表現 GM-CSF 之腺病毒，在黑色素瘤(NCT03003676)及腹膜疾病、結腸直腸癌或卵巢癌(NCT02963831)中；GL-ONC1 (GLV-1h68/GLV-1h153, Genelux GmbH)，經工程改造以表現  $\beta$ -半乳糖苷酶( $\beta$ -gal)/ $\beta$ -葡萄糖醛酸苷酶或  $\beta$ -gal/人類碘化鈉同向轉運蛋白(hNIS)之痘瘡病毒，分別在腹膜癌(NCT01443260)、輸卵管癌、卵巢癌(NCT 02759588)中研究；或 CG0070 (Cold Genesys)，一種經工程改造以表現 GM-CSF 之腺病毒，在膀胱癌(NCT02365818)中。

【0229】 在一些實施例中，免疫腫瘤藥劑係選自：JX-929 (SillaJen/以前為 Jennerex Biotherapeutics)，一種經工程改造以表現胞嘧啶脫胺酶之缺乏 TK 及痘瘡生長因子之痘瘡病毒，其能夠將前驅藥物 5-氟胞嘧啶轉化成細胞毒性藥物 5-氟尿嘧啶；TG01 及 TG02 (Targovax/以前為 Oncos)，靶向難以治療之 RAS 突變的基於胜肽之免疫治療劑；以及 TILT-123 (TILT Biotherapeutics)，一種經工程改造之腺病毒，其稱為：Ad5/3-E2F-delta24-hTNF $\alpha$ -IRES-hIL20；以及 VSV-GP (ViraTherapeutics)，一種經工程改造以表現淋巴球性脈絡叢腦膜炎病毒(LCMV)

之醣蛋白(GP)的水泡性口炎病毒(VSV)，其可進一步經工程改造以表現經設計以產生抗原專一性 CD8+T 細胞反應之抗原。

【0230】 於一些實施例，免疫腫瘤藥劑為經工程改造以表現嵌合抗原受體或 CAR 之 T 細胞。經工程改造以表現此類嵌合抗原受體之 T 細胞稱為 CAR-T 細胞。

【0231】 已構築如下 CAR，其由可來源於天然配體之結合域、來源於對細胞表面抗原具有專一性之單株抗體的單鏈可變片段(scFv)與作為 T 細胞受體(TCR)之功能末端的胞內域、諸如能夠在 T 淋巴細胞中產生活化信號之來自 TCR 之 CD3-zeta 信號傳導結構域融合組成。在抗原結合時，此類 CAR 連接至效應細胞中之內源性信號傳導路徑且產生類似於由 TCR 複合物引發之活化信號的活化信號。

【0232】 舉例而言，於一些實施例，CAR-T 細胞為美國專利 8,906,682 (以全文引用之方式併入本文中)中描述之 CAR-T 細胞之一，該專利揭示經工程改造以包含具有抗原結合域(諸如結合於 CD19 之結構域)之細胞外域與 T 細胞抗原受體複合物 zeta 鏈(諸如 CD3 zeta)之胞內信號傳導結構域融合的 CAR-T 細胞。當在 T 細胞中表現時，CAR 能夠基於抗原結合專一性重新引導抗原識別。在 CD19 之情況下，抗原在惡性 B 細胞上表現。目前超過 200 個在各種適應症中採用 CAR-T 之臨床試驗正在進展中。  
[<https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=chimeric+antigen+receptors&pg=1>]。

【0233】 於一些實施例，免疫刺激劑為視黃酸受體相關孤兒受體  $\gamma$  (ROR $\gamma$ ) 之活化劑。ROR $\gamma$ t 為一種在 CD4+ (Th17)及 CD8+ (Tc17) T 細胞之類型 17 效應亞群的分化及維持以及表現 IL-17 之先天性免疫細胞亞群(例如 NK 細胞)之分化中

起作用之轉錄因子。於一些實施例，ROR $\gamma$ t 之活化劑為 LYC-55716 (Lycera)，當前其正在用於治療實體腫瘤(NCT02929862)之臨床試驗中進行評估。

【0234】 於一些實施例，免疫刺激劑為 toll 樣受體(TLR)之促效劑或活化劑。合適之 TLR 活化劑包括 TLR9 之促效劑或活化劑，例如 SD-101 (Dynavax)。SD-101 為一種免疫刺激 CpG，研究其用於 B 細胞、濾泡性及其他淋巴瘤(NCT02254772)。可用於本發明中之 TLR8 之促效劑或活化劑包括莫托莫特(motolimod)(VTX-2337, VentiRx Pharmaceuticals)，正研究其用於頭頸部鱗狀細胞癌(NCT02124850)及卵巢癌(NCT02431559)。

【0235】 可用於本發明之其他免疫腫瘤藥劑包括烏洛單抗(urelumab) (BMS-663513, Bristol-Myers Squibb)，一種抗-CD137 單株抗體；瓦利路單抗(varlilumab)(CDX-1127, Celldex Therapeutics)，一種抗-CD27 單株抗體；BMS-986178 (Bristol-Myers Squibb)，一種抗-OX40 單株抗體；利魯單抗(lirilumab) (IPH2102/BMS-986015, Innate Pharma, Bristol-Myers Squibb)，一種抗-KIR 單株抗體；莫利珠單抗(monalizumab) (IPH2201, Innate Pharma, AstraZeneca)，一種抗-NKG2A 單株抗體；安利西單抗(andecaliximab) (GS-5745, Gilead Sciences)，一種抗-MMP9 抗體；MK-4166 (Merck & Co.)，以及一種抗-GITR 單株抗體。

【0236】 於一些實施例，免疫刺激劑係選自埃羅妥珠單抗(elotuzumab)、米伐木肽(mifamurtide)、toll 樣受體之促效劑或活化劑及 ROR $\gamma$ t 之活化劑。

【0237】 於一些實施例，免疫刺激治療劑為重組人類介白素 15 (rhIL-15)。rhIL-15 已在臨床中作為黑色素瘤及腎細胞癌(NCT01021059 及 NCT01369888)及白血病(NCT02689453)之療法進行測試。於一些實施例，免疫刺激劑為重組人類介白素 12 (rhIL-12)。於一些實施例，基於 IL-15 之免疫治療劑為雜二聚體 IL-15

(hetIL-15, Novartis/Admune), 一種由內源性 IL-15 之合成形式與可溶性 IL-15 結合蛋白 IL-15 受體  $\alpha$  鏈複合構成之融合複合物(IL15:sIL-15RA), 已在第一期臨床試驗中針對黑色素瘤、腎細胞癌、非小細胞肺癌及頭頸部鱗狀細胞癌 (NCT02452268) 進行測試。於一些實施例, 重組人類介白素 12 (rhIL-12) 為 NM-IL-12 (Neumedicines, Inc.)、NCT02544724 或 NCT02542124。

【0238】於一些實施例, 免疫腫瘤藥劑係選自 Jerry L. Adams 等人, 「Big opportunities for small molecules in immuno-oncology,」 Cancer Therapy 2015, 第 14 卷, 第 603-622 頁中所述之免疫腫瘤藥劑, 該文獻之內容以全文引用的方式併入本文中。於一些實施例, 免疫腫瘤藥劑係選自 Jerry L. Adams 等人之表 1 中所述之實例。於一些實施例, 免疫腫瘤藥劑為選自 Jerry L. Adams 等人之表 2 中列出之靶向免疫-腫瘤學標靶之小分子的靶向免疫-腫瘤學標靶之小分子。於一些實施例, 免疫腫瘤藥劑係選自 Jerry L. Adams 等人之表 2 中列出之小分子藥劑的小分子藥劑。

【0239】於一些實施例, 免疫腫瘤藥劑係選自 Peter L. Toogood 於「Small molecule immuno-oncology therapeutic agents,」 Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 2018, 第 28 卷, 第 319-329 頁中所述之小分子免疫腫瘤藥劑, 該文獻之內容以全文引用的方式併入本文中。於一些實施例, 免疫腫瘤藥劑為靶向如 Peter L. Toogood 所述路徑的藥劑。

【0240】於一些實施例, 免疫腫瘤藥劑係選自 Sandra L. Ross 等人於「Bispecific T cell engager (BiTE®) antibody constructs can mediate bystander tumor cell killing,」, PLoS ONE 12(8): e0183390 中所述之免疫腫瘤藥劑, 該文獻之內容以全文引用的方式併入本文中。於一些實施例, 免疫腫瘤藥劑為雙專一

性 T 細胞接合分子(engager)(BiTE®)抗體構築體。於一些實施例，雙專一性 T 細胞接合分子(BiTE®)抗體構築體為 CD19/CD3 雙專一性抗體構築體。於一些實施例，雙專一性 T 細胞接合分子(BiTE®)抗體構築體為 EGFR/CD3 雙專一性抗體構築體。於一些實施例，雙專一性 T 細胞接合分子(BiTE®)抗體構築體活化 T 細胞。於一些實施例，雙專一性 T 細胞接合分子(BiTE®)抗體構築體活化 T 細胞，從而釋放誘導旁觀者細胞(bystander cells)上的細胞間黏附分子 1 (ICAM-1)及 FAS 上調的細胞介素。於一些實施例，雙專一性 T 細胞接合分子(BiTE®)抗體構築體活化 T 細胞，從而造成誘導之旁觀者細胞溶解。於一些實施例，旁觀者細胞在實體腫瘤中。於一些實施例，溶解之旁觀者細胞接近 BiTE®活化之 T 細胞。於一些實施例，旁觀者細胞包含腫瘤相關抗原(tumor-associated surface antigen, TAA)陰性癌細胞。於一些實施例，旁觀者細胞包含 EGFR 陰性癌細胞。於一些實施例，免疫腫瘤藥劑為阻斷 PD-L1/PD1 軸及/或 CTLA4 之抗體。於一些實施例，免疫腫瘤藥劑為離體擴增之腫瘤浸潤性 T 細胞。於一些實施例，免疫腫瘤藥劑為將 T 細胞與腫瘤相關之表面抗原(TAA)直接連接的雙專一性抗體構築體或嵌合抗原受體(CAR)。

**【0241】** 示例性免疫檢查點抑制劑

**【0242】** 於一些實施例，該免疫腫瘤藥劑為如本說明書所述之一免疫檢查點抑制劑。

**【0243】** 本文用語「檢查點抑制劑」係關於一種用於避免癌細胞避開患者免疫系統的藥劑。抗腫瘤免疫顛覆的主要機制之一是「T 細胞衰竭」，其是由於長期暴露於抗原導致抑制受體上調所致。這些抑制受體作為免疫檢查點，以防止不受控制的免疫反應。

【0244】 PD-1 和共同抑制受體，例如細胞毒性 T 淋巴細胞抗原 4 (CTLA-4、B 和 T 淋巴細胞衰減劑 (BTLA；CD272)、T 細胞免疫球蛋白和黏蛋白結構域 3 (Tim-3)、淋巴細胞活化基因-3 (Lag-3；CD223) 等，常被稱為檢查點調節劑。它們作為分子的「守門人」，允許細胞外訊息以決定是否應繼續進行細胞週期進程和其他細胞內訊號傳遞。

【0245】 於一些實施例，免疫檢查點抑制劑是針對 PD-1 的抗體。PD-1 與細胞程序性死亡 1 受體 (PD-1) 結合，以防止該受體與抑制性配體 PDL-1 結合，從而無效化腫瘤抑制宿主的抗腫瘤免疫反應的能力。

【0246】 於一態樣，檢查點抑制劑是生物治療劑或小分子。於另一態樣，檢查點抑制劑是單株抗體，人源化抗體、完全人源抗體、融合蛋白或其組合。在另一態樣，所述檢查點抑制劑是抑制選自 CTLA-4 和 PDL1 和 PDL2 和 PD1 和 B7-H3 和 B7-H4 和 BTLA 和 HVEM 和 TIM3、GAL9、LAG3、VISTA、KIR、2B4、CD160、CGEN-15049、CHK 1、CHK2、A2aR、B-7 家族配體或其組合。於另一態樣，免疫檢查點抑制劑與檢查點蛋白質之配體相互作用，該配體選自 CTLA-4、PDL1、PDL2、PD1、B7-H3、B7-H4、BTLA、HVEM、TIM3、GAL9、LAG3、VISTA、KIR、2B4、CD160、CGEN-15049、CHK 1、CHK2、A2aR、B-7 家族配體或其組合。於一態樣，檢查點抑制劑是免疫刺激劑、T 細胞生長因子、介白素、抗體、疫苗或其組合。於另一態樣，介白素是 IL-7 或 IL-15。於一具體態樣，介白素是糖基化的 IL-7。於另一態樣，疫苗是樹突細胞 (DC) 疫苗。

【0247】 檢查點抑制劑包括任何可阻斷或抑制 (其在統計上有顯著性) 免疫系統中抑制性途徑的藥物。該等抑制劑可包括小分子抑制劑或可包括結合於及阻斷或抑制免疫檢查點受體之抗體或其抗原結合片段，或結合於及阻斷或抑制

免疫檢查點受體配位體之抗體。可被針對以阻斷或抑制之示意性免疫檢查點分子包括(但不限於)：CTLA-4、PDL1、PDL2、PD1、B7-H3、B7-H4、BTLA、HVEM、GAL9、LAG3、TIM3、VISTA、KIR、2B4(屬於分子之 CD2 家族且在所有 NK、 $\gamma\delta$  及記憶 CD8+ ( $\alpha\beta$ ) T 細胞上表現)、CD160 (亦稱為 BY55)、CGEN-15049、CHK 1 和 CHK2 激酶、A2aR 和各種 B-7 家族配體。B-7 家族配體包括(但不限於) B7-1、B7-2、B7-DC、B7-H1、B7-H2、B7-H3、B7-H4、B7-H5、B7-H6 和 B7-H7。檢查點抑制劑包括抗體或其抗原結合片段、其他結合蛋白、生物治療劑或小分子，可結合及阻斷或抑制一或多以下物質的活性：CTLA-4、PDL1、PDL2、PD1、BTLA、HVEM、TIM3、GAL9、LAG3、VISTA、KIR、2B4、CD 160 和 CGEN-15049。示例性免疫檢查點抑制劑包括曲美單抗(tremelimumab)(CTLA-4 阻斷抗體)、抗 OX40、PD-L1 單株抗體(Anti-B7-H1；MEDI4736)、MK-3475 (PD-1 阻斷劑)、尼沃單抗(nivolumab)(抗 PD1 抗體)、CT-011(抗 PD1 抗體)、BY55 monoclonal 抗體、AMP224 (anti-PDL1 抗體)、BMS-936559 (anti-PDL1 抗體)、MPLDL3280A(抗 PDL1 抗體)、MSB0010718C (抗 PDL1 抗體)、伊匹單抗(ipilimumab)(抗 CTLA-4 檢查點抑制劑)。檢查點蛋白配體包括(但不限於) PD-L1、PD-L2、B7-H3、B7-H4、CD28、CD86 和 TIM-3。

【0248】於一些實施例，免疫檢查點抑制劑係選自 PD-1 拮抗劑、PD-L1 拮抗劑和 CTLA-4 拮抗劑於一些實施例，檢查點抑制劑係選自由尼沃單抗(nivolumab)(Opdivo®)、伊匹單抗(ipilimumab)(Yervoy®)和派姆單抗(pembrolizumab)(Keytruda®)所組成之群組。於一些實施例，檢查點抑制劑係選自：尼沃單抗(抗 PD-1 抗體，Opdivo®, Bristol-Myers Squibb)；和派姆單抗(抗 PD-1 抗體，Keytruda®, Merck)；伊匹單抗(抗 CTLA-4 抗體，Yervoy®, Bristol-Myers

Squibb); 德瓦魯單抗(抗 PD-L1 抗體, Imfinzi®, AstraZeneca); 和阿特珠單抗 (atezolizumab)(抗 PD-L1 抗體, Tecentriq®, Genentech)。

【0249】於一些實施例, 檢查點抑制劑係選自由拉立珠單抗(MK-3475)、尼沃單抗(BMS-936558)、皮立珠單抗(CT-011)、AMP-224、MDX-1105、MEDI4736、MPDL3280A、BMS-936559、伊匹單抗、立魯單抗(lirilumab)、IPH2101、派立珠單抗(Keytruda®)、和曲美單抗所組成的群組。

【0250】於一些實施例, 免疫檢查點抑制劑為: REGN2810 (Regeneron), 其為一種抗 PD-1 抗體, 已在基底細胞癌 (NCT03132636)、NSCLC(NCT03088540)、皮膚鱗狀細胞癌 (NCT02760498)、淋巴瘤 (NCT02651662) 和黑色素瘤 (NCT03002376) 的患者中試驗; 皮立珠單抗(pidilizumab)(CureTech), 也稱為 CT-011, 其為一種與 PD-1 結合的抗體, 用於瀰漫性大型 B 細胞淋巴癌和多發性骨髓瘤的臨床試驗; 艾維路單抗(avelumab)(Bavencio®, Pfizer/Merck KGaA, 也稱為 MSB0010718C), 為一種全人源 IgG1 抗 PD-L1 抗體, 用在非小細胞肺癌、默克細胞癌、間皮瘤、實體腫瘤、腎臟癌、卵巢癌、膀胱癌、頭頸癌和胃癌的臨床試驗中; 或 PDR001 (Novartis), 其為一種與 PD-1 結合的抑制性抗體, 用於非小細胞肺癌、黑色素瘤、三陰性乳癌和晚期或轉移性實體腫瘤的臨床試驗中。曲美單抗(tremelimumab)(CP-675,206; AstraZeneca)是針對 CTLA-4 的全人源單株抗體, 已在臨床試驗中針對多種適應症進行了研究, 包括: 間皮瘤、結腸直腸癌、腎臟癌、乳癌、肺癌和非小細胞肺癌、胰臟導管腺癌、胰臟癌、生殖細胞癌、頭頸部鱗狀細胞癌、肝細胞癌、前列腺癌、子宮內膜癌、肝臟轉移癌、肝癌、大型 B 細胞淋巴瘤、卵巢癌、子宮頸癌、轉移性變性甲狀腺癌、泌尿上皮癌、輸卵管癌、多發性骨髓瘤、膀胱癌、軟組織肉瘤和黑色素瘤。

AGEN-1884(Agenus)是抗 CTLA4 抗體，正在對晚期實體腫瘤(NCT02694822)進行第一期臨床試驗。

【0251】於一些實施例，檢查點抑制劑是 T 細胞免疫球蛋白黏蛋白分子-3(TIM-3)的抑制劑。可用於本發明的 TIM-3 抑制劑包括 TSR-022、LY3321367 和 MBG453。TSR-022(Tesaro)是抗 TIM-3 抗體，正在實體腫瘤中進行研究(NCT02817633)。LY3321367(Eli Lilly)是抗 TIM-3 抗體，正在實體腫瘤中進行研究(NCT03099109)。MBG453(諾華公司)是抗 TIM-3 抗體，正在晚期惡性腫瘤中進行研究(NCT02608268)。

【0252】於一些實施例，檢查點抑制劑是具有 Ig 和 ITIM 結構域的 T 細胞免疫受體或 TIGIT(為某些 T 細胞和 NK 細胞上的免疫受體)的抑制劑。可用於本發明的 TIGIT 抑制劑包括 BMS-986207(Bristol-Myers Squibb)，其為一種抗 TIGIT 單株抗體(NCT02913313)；OMP-313M32(Oncomed)和抗 TIGIT 單株抗體(NCT03119428)。

【0253】於一些實施例，檢查點抑制劑是淋巴細胞活化基因 3(LAG-3)的抑制劑。可用於本發明的LAG-3抑制劑包括BMS-986016和REGN3767和IMP321。BLA-986016(Bristol-Myers Squibb)是一種抗 LAG-3 抗體，正在神經膠質母細胞瘤和神經膠肉瘤中研究(NCT02658981)。REGN3767(Regeneron)也是一種抗 LAG-3 抗體，且正在惡性腫瘤中研究中(NCT03005782)。IMP321(Immutep S.A.)是一種 LAG-3-Ig 融合蛋白，正在黑色素瘤(NCT02676869)、腺癌(NCT02614833)和轉移性乳癌(NCT00349934)中研究。

【0254】可用於本發明的檢查點抑制劑包括 OX40 促效劑。正在臨床試驗中研究的 OX40 促效劑包括：PF-04518600/PF-8600(Pfizer)，其為一種促效性抗

OX40 抗體，用於轉移性腎臟癌(NCT03092856)和晚期癌症及腫瘤(NCT02554812；NCT05082566)；GSK3174998(Merck)，其為一種促效性抗 OX40 抗體，正處於癌症第一期臨床試驗中(NCT02528357)；MEDI0562(Medimmune/AstraZeneca)，其為一種促效性抗 OX40 抗體，用於晚期實體腫瘤(NCT02318394 和 NCT02705482)；MEDI6469，其為一種促效性抗 OX40 抗體(Medimmune/AstraZeneca)，用於大腸癌(NCT02559024)、乳癌(NCT01862900)、頭頸癌(NCT02274155)和轉移性前列腺癌(NCT01303705)的患者；和 BMS-986178(Bristol-Myers Squibb)，其為一種促效性 OX40 抗體，用於晚期癌症(NCT02737475)。

【0255】可用於本發明的檢查點抑制劑包括 CD137(也稱為 4-1BB)促效劑。正在臨床試驗中研究的 CD137 促效劑包括：烏托米單抗(utomilumab)(PF-05082566，Pfizer)是一種促效性抗 CD137 抗體，用於瀰漫性大型 B 細胞淋巴瘤(NCT02951156)中以及晚期癌症和腫瘤(NCT02554812 和 NCT05082566)；屋洛單抗(urelumab)(BMS-663513，Bristol-Myers Squibb)，其為一種促效性抗 CD137 抗體，用於黑色素瘤和皮膚癌(NCT02652455)和神經膠質母細胞瘤和神經膠肉瘤(NCT02658981)。

【0256】可用於本發明的檢查點抑制劑包括 CD27 促效劑。正在臨床試驗研究的 CD27 促效劑包括：瓦利路單抗(varlilumab)(CDX-1127，Celldex Therapeutics)，其為一種促效性抗 CD27 抗體，用於鱗狀細胞癌和頭頸癌、卵巢癌、結腸癌、腎細胞癌和神經膠質母細胞瘤(NCT02335918)；淋巴瘤(NCT01460134)；以及神經膠質瘤和星狀細胞瘤(NCT02924038)。

【0257】 可用於本發明的檢查點抑制劑包括糖皮質激素誘導的腫瘤壞死因子受體(GITR)促效劑。正在臨床試驗研究的 GITR 促效劑包括：TRX518(Leap Therapeutics)，其為一種促效性抗 GITR 抗體，用於惡性黑色素瘤和其他惡性實體腫瘤(NCT01239134 和 NCT02628574)；GWN323(Novartis)，其為一種抗 GITR 的促效劑，用於實體腫瘤和淋巴瘤(NCT02740270)；INCAGN01876(Incyte/Agenus)，其為一種促效性抗 GITR 抗體，用於晚期癌症(NCT02697591 和 NCT03126110)；MK-4166 (Merck)，其為一種促效性抗 GITR 抗體，用於實體腫瘤(NCT02132754)；以及 MEDI1873 (Medimmune/AstraZeneca)，其為一種具有人 IgG1 Fc 結構域的促效性六聚體 GITR-配體分子，用於晚期人實體腫瘤(NCT02583165)。

【0258】 可用於本發明的檢查點抑制劑包括可誘導的 T 細胞共同刺激劑(ICOS，也稱為 CD278)促效劑。正在臨床試驗研究的 ICOS 促效劑包括：MEDI-570(Medimmune)，其為一種促效性抗 ICOS 抗體，用於淋巴瘤(NCT02520791)；GSK3359609 (Merck)，其為一種促效性抗 ICOS 抗體，處於第一期臨床試驗(NCT02723955)；以及 JTX-2011 (Jounce Therapeutics)，其為一種促效性抗 ICOS 抗體，處於第一期臨床試驗(NCT02904226)。

【0259】 可用於本發明的檢查點抑制劑包括殺傷細胞 IgG 樣受體(KIR)抑制劑。正在臨床試驗研究的 KIR 抑制劑包括：利魯單抗(lirilumab)(IPH2102/BMS-986015，Innate Pharma/Bristol-Myers Squibb)，其為一種抗 KIR 抗體，用於白血病(NCT01687387、NCT02399917、NCT02481297、NCT02599649)、多發性骨髓瘤(NCT02252263)和淋巴瘤(NCT01592370)；IPH2101 (1-7F9, Innate Pharma)用於骨髓瘤(NCT01222286 和 NCT01217203)；以及 IPH4102

(Innate Pharma)，其為一種抗 KIR 抗體，可與淋巴瘤中長細胞質尾巴的三個結構域(KIR3DL2)結合(NCT02593045)。

【0260】可用於本發明的檢查點抑制劑包括 CD47 和訊號調節蛋白  $\alpha$ (SIRPa)之間相互作用的 CD47 抑制劑。正在臨床試驗研究的 CD47/SIRPa 抑制劑包括：ALX-148(Alexo Therapeutics)，為一種 SIRPa 的拮抗性變體，其與 CD47 結合且阻止 CD47/SIRPa 介導的訊號傳導，正在第一期臨床試驗(NCT03013218)；TTI-621(SIRPa-Fc，Trillium Therapeutics)，其為一種可溶性重組融合蛋白，其係藉由 SIRPa 的 N 端 CD47 結合域與人 IgG1 的 Fc 結構域的連接而產生，TTI-621 透過結合人 CD47 而起作用並阻止其傳遞「別吃我」訊號給巨噬細胞，用於第一期臨床試驗(NCT02890368 和 NCT02663518)；CC-90002(Celgene)，其為一種抗 CD47 抗體，用於白血病(NCT02641002)；和 Hu5F9-G4(Forty Seven, Inc.)，用於結腸直腸腫瘤和實體腫瘤(NCT02953782)、急性髓細胞性白血病(NCT02678338)和淋巴瘤(NCT02953509)。

【0261】可用於本發明的檢查點抑制劑包括 CD73 抑制劑。正在臨床試驗研究的 CD73 抑制劑包括：MEDI9447 (Medimmune)，其為一種抗 CD73 抗體，用於實體腫瘤(NCT02503774)；以及 BMS-986179 (Bristol-Myers Squibb)，其為一種抗 CD73 抗體，用於實體腫瘤(NCT02754141)。

【0262】可用於本發明的檢查點抑制劑包括干擾素基因蛋白(STING，也稱為跨膜蛋白 173 或 TMEM173)的刺激劑的促效劑。正在臨床試驗研究的 STING 促效劑包括：MK-1454 (Merck)，其為一種促效性合成環狀二核苷酸，用於淋巴瘤(NCT03010176)；以及 ADU-S100 (MIW815, Aduro Biotech/Novartis)，其為一

種促效性合成環狀二核苷酸，處於第一期臨床試驗(NCT02675439 和 NCT03172936)。

【0263】 可用於本發明的檢查點抑制劑包括 CSF1R 抑制劑。正在臨床試驗研究的 CSF1R 抑制劑包括：培西達替尼(pexidartinib)(PLX3397, Plexxikon)，其為一種 CSF1R 小分子抑制劑，用於結腸直腸癌、胰臟癌、轉移性和晚期癌症(NCT02777710)和黑素瘤、非小細胞肺癌、鱗狀細胞癌頭頸癌、胃腸基質瘤(GIST)和卵巢癌(NCT02452424)；以及 IMC-CS4 (LY3022855, Lilly)，其為一種抗 CSF-1R 抗體，用於胰臟癌(NCT03153410)、黑素瘤(NCT03101254)和實體腫瘤(NCT02718911)；以及 BLZ945 (4-[2(((1R, 2R)-2-羥基環己基胺基-苯并噻唑-6-基氧基)-吡啶-2-羧酸甲醯胺, Novartis)，其為一種 CSF1R 的可口服抑制劑，用於晚期實體腫瘤(NCT02829723)。

【0264】 可用於本發明的檢查點抑制劑包括 NKG2A 受體抑制劑。正在臨床試驗研究的 NKG2A 受體抑制劑包括莫利珠單抗(monalizumab) (IPH2201, Innate Pharma)，其為一種抗 NKG2A 抗體，用於頭頸部腫瘤(NCT02643550)以及慢性淋巴細胞性白血病(NCT02557516)。

【0265】 於一些實施例，免疫檢查點抑制劑係選自尼沃單抗(nivolumab)、派立珠單抗(nivolumab)、伊匹單抗(ipilimumab)、艾維路單抗(avelumab)、德瓦魯單抗(durvalumab)、阿特珠單抗(atezolizumab)或皮立珠單抗(pidilizumab)。

【0266】 治療用途

【0267】 本發明之雙環胜肽具有作為 Nectin-4 結合劑的特定效用。

【0268】 Nectin-4 是一種表面分子，屬於蛋白質的 nectin 家族，其包含四個成員。Nectin 是細胞黏附分子，在發育和成年期間，在上皮、內皮、免疫和神

經細胞的各種生物學進程(例如極化、增生、分化和遷移)中扮演關鍵的角色。它們參與了人類的幾種病理進程。它們是小兒麻痺病毒、單純疱疹病毒和麻疹病毒的主要受體。當編碼 Nectin-1(PVRL1)或 Nectin-4(PVRL4)的基因發生突變會導致與其他異常相關的外胚層發育不良綜合症。Nectin-4 在胎兒發育過程中表現。在成人組織中，其表現比該家族其他成員的表現更受限制。Nectin-4 是一種與腫瘤相關的抗原，其分別存在於 50%的乳癌、49%的卵巢癌以及 86%的肺癌，主要是在預後不良的腫瘤上，而在相應的正常組織中並未檢測到其表現。在乳房腫瘤中，Nectin-4 主要在三陰性和 ERBB2+癌中表現。在患有這些癌症的患者血清中，檢測到可溶形式的 Nectin-4 與不良預後有關。血清 Nectin-4 含量在轉移進程中增加，在治療後降低。這些結果顯示，Nectin-4 可能是治療癌症的可靠靶標。因此，在現有技術中已經記載了幾種抗 Nectin-4 抗體。特定而言，Enfortumab Vedotin(ASG-22ME)是靶向 Nectin-4 的抗體-藥物結合物(ADC)，且目前已對於治療實體瘤患者進行了臨床研究。

【0269】根據本發明的方法選擇的多肽配體可用於體內治療和預防應用、體外和體內診斷應用、體外測定和試劑應用等。具有選擇的專一性水平的配體可用於以下應用：涉及需要在非人類動物中進行測試的應用，其需要交叉反應性、或診斷應用，其需要小心控制與同源物或旁系同源物的交叉反應性。於某些應用中，例如疫苗應用，可利用對預定範圍的抗原引起免疫反應的能力來針對特定疾病和病原體訂製疫苗。

【0270】對於哺乳動物給藥，較佳為至少具有 90 至 95%同質性的基本上純的胜肽配體，而對於藥物用途，尤其是在該哺乳動物為人類時，最佳為具有 98 至 99%或更高的同質性。一旦純化了所需的部分或同質性多肽，所選多肽可

用於診斷或治療(包括體外地)，或用於發展和執行測定程序、免疫螢光染色等 (Lefkovite and Pernis, (1979 and 1981) Immunological Methods, Volumes I and II, Academic Press, NY)。

【0271】根據本發明的另一態樣，提供如本文所定義之胜肽配體或藥物結合物，其用於預防、抑制或治療由 Nectin-4 介導的疾病或病症。

【0272】根據本發明的另一態樣，提供一種預防、抑制或治療由 Nectin-4 介導的疾病或病症的方法，其包括向需要其的患者施用如本說明書定義之胜肽配體的效應物基團和藥物結合物。

【0273】於一實施例，Nectin-4 為哺乳類 Nectin-4。於另一實施例，哺乳類 Nectin-4 為人類 Nectin-4。

【0274】於一實施例，由 Nectin-4 介導的疾病或病症選自病毒感染、外胚層發育不良綜合症和其他異常、乳癌、卵巢癌和肺癌、轉移性進程和實體腫瘤。

【0275】於另一實施例，由 Nectin-4 介導的疾病或病症係選自癌症。

【0276】可以治療(或抑制)的癌症(及其良性腫瘤)的舉例包括(但不限於)：上皮起源的腫瘤(腺瘤和各種類型的癌症，包括腺癌、鱗狀癌、移行細胞癌和其他癌症)，例如膀胱癌和泌尿道癌、乳癌、胃腸道(包括食道、胃、小腸、結腸、直腸和肛門)癌、肝癌(肝細胞癌)、膽囊癌和膽道系統癌、胰分泌腺癌、腎臟癌、肺癌(例如腺癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、支氣管肺泡癌和間皮瘤)、頭和頸癌(例如舌癌、頰腔癌、喉癌、咽癌、鼻咽癌、扁桃腺癌、唾液腺癌、鼻腔癌和鼻竇癌)、卵巢癌、輸卵管癌、腹膜癌、陰道癌、外陰癌、陰莖癌、子宮頸癌、子宮肌層癌、子宮內膜癌、甲狀腺(例如甲狀腺濾泡癌)癌、腎臟癌、前列腺癌、皮膚和附件癌(例如黑色素瘤、基底細胞癌、鱗狀細胞癌、角膜棘皮瘤、發育不

良痣)；血液惡性腫瘤(即白血病、淋巴瘤)和癌前血液疾病以及交界性腫瘤，包括血液惡性腫瘤和淋巴群系的相關病症(例如急性淋巴細胞性白血病[ALL]、慢性淋巴細胞性白血病[CLL]、B 細胞淋巴瘤，例如瀰漫性大型 B 細胞淋巴瘤[DLBCL]、濾泡性淋巴瘤、勃氏淋巴瘤(Burkitt's lymphoma)、被套細胞淋巴瘤、T 細胞淋巴瘤和白血病、自然殺傷性[NK]細胞淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤(Hodgkin's lymphomas)、毛細胞白血病、意義不明單株伽瑪球蛋白症、漿細胞瘤、多發性骨髓瘤和移植後的淋巴增生性疾病)、以及血液惡性腫瘤和骨髓群系的相關病症(例如急性骨髓性白血病(AML)、慢性粒細胞性白血病(CML)、慢性粒細胞性白血病(CMML)、嗜酸性粒細胞增多綜合症、骨髓增生性疾病，例如原發性多血症、原發性血小板增多症及原發性骨髓纖維化症、骨髓增生異常綜合症、骨髓增生不良症和前骨髓白血病)；間葉來源的腫瘤，例如軟組織肉瘤、骨或軟骨肉瘤，例如骨肉瘤、纖維肉瘤、軟骨肉瘤、橫紋肌肉瘤、平滑肌肉瘤、脂肉瘤、血管肉瘤、卡波西肉瘤、尤因肉瘤、滑膜肉瘤、上皮樣肉瘤、良性和惡性組織細胞瘤和隆突性皮膚纖維肉瘤；中樞或周圍神經系統的腫瘤(例如星狀細胞瘤、神經膠質瘤和神經膠質母細胞瘤、腦膜瘤、室管膜瘤、松果體瘤和神經鞘瘤)；內分泌腫瘤(例如垂體瘤、腎上腺腫瘤、胰島細胞瘤、甲狀旁腺腫瘤、類癌和甲狀腺髓樣癌)；眼和附件腫瘤(例如視網膜母細胞瘤)；生殖細胞和滋養細胞腫瘤(例如畸胎瘤、精原細胞瘤、惡性胚細胞瘤、葡萄胎和絨毛膜癌)；小兒和胚胎腫瘤(例如髓母細胞瘤、神經母細胞瘤、威爾姆斯腫瘤和原始神經外胚層腫瘤)；或是先天性或後天性使患者容易患惡性腫瘤的症候群(例如著色性乾皮病)。

【0277】於另一實施例，癌症係選自造血系統惡性腫瘤，例如選自：非霍奇金淋巴瘤(NHL)、勃氏(BL)、多發性骨髓瘤(MM)、B 慢性淋巴細胞性白血病

(B-CLL)、B 和 T 急性淋巴細胞白血病(ALL)、T 細胞淋巴瘤(TCL)、急性骨髓細胞白血病(AML)、毛細胞白血病(HCL)、霍奇金淋巴瘤(HL)和慢性骨髓細胞白血病(CML)。

【0278】 於另一實施例，癌症係選自肺癌(例如非小細胞肺癌)、膀胱癌、胰臟癌和乳癌。本說明書之實施例 1 至 5 列出了實驗數據，證明本發明所選之雙環藥物結合物在這些癌症模型中展現抗腫瘤活性。

【0279】 本說明書用語「預防」包括於疾病誘發前給予保護性組成物。「抑制」指涉於誘發事件後、疾病於臨床出現前給予該組成物。「治療」包括於疾病病徵出現後給予保護性組成物。

【0280】 可使用用於篩選胜肽配體預防或治療疾病之動物模式。本發明可利用動物模式系統，使人類和動物標的均可發展胜肽配體，並允許使用動物模式。

【0281】 此外，本文提供了數據，其證明了多種腫瘤類型的 Nectin-4 的複製數變異(CNV)與基因表現之間的關聯。因此，根據本發明的另一態樣，提供了一種預防、抑制或治療癌症的方法，該方法包括向有此需要的患者施用本文定義的胜肽配體的效應物基團和藥物結合物，其中所述患者被認定為具有增強的 Nectin-4 的複製數變異(CNV)。

【0282】 於一實施例，癌症係選自本文認定為具有增強的 Nectin-4 CNV 的癌症。於另一實施例，癌症係選自本文認定為具有增強的 Nectin-4 CNV 的癌症，即：乳癌、子宮癌、膀胱癌、肺腺癌、肺鱗狀癌、子宮頸癌、頭頸癌、胰臟癌、甲狀腺癌、結腸直腸癌、胸腺瘤、肉瘤，腎透明細胞癌(RCC)、前列腺癌和胃癌。

【0283】 藉由下列實施例進一步描述本發明。

## 【0284】 實施例

## 【0285】 縮寫

|             |                                                       |
|-------------|-------------------------------------------------------|
| 1,2,4-TriAz | 3-(1,2,4-三唑-1-基)-丙胺酸 (3-(1,2,4-Triazol-1-yl)-alanine) |
| 1Nal        | 1-萘基丙胺酸 (1-Naphthylalanine)                           |
| 2FuAla      | 2-呋喃丙胺酸 (2-Furylalanine)                              |
| 2MePhe      | 2-甲基-苯丙胺酸 (2-Methyl-Phenylalanine)                    |
| 2Nal        | 2-萘基丙胺酸 (2-Naphthylalanine)                           |
| 2Pal        | 2-吡啶基丙胺酸 (2-Pyridylalanine)                           |
| 3,3-DPA     | 3,3-二苯丙胺酸 (3,3-Diphenylalanine)                       |
| 3MePhe      | 3-甲基-苯丙胺酸 (3-Methyl-Phenylalanine)                    |
| 3Pal        | 3-吡啶丙胺酸 (3-Pyridylalanine)                            |
| 4,4-BPA     | 4,4-聯苯丙胺酸 (4,4-Biphenylalanine)                       |
| 4,4-DFP     | 4,4-二氟脯胺酸 (4,4-Difluoroproline)                       |
| 4MePhe      | 4-甲基-苯丙胺酸 (4-Methyl-Phenylalanine)                    |
| 4Pal        | 4-吡啶基丙胺酸 (4-Pyridylalanine)                           |
| 4ThiAz      | $\beta$ -(4-噻唑基)-丙胺酸 (Beta-(4-Thiazolyl)-Alanine)     |
| 5FTrp       | 5-氟-L-色胺酸 (5-Fluoro-L-tryptophan)                     |
| Agb         | 2-胺基-4-胍基丁酸 (2-Amino-4-guanidinobutyric acid)         |
| Aib         | 胺基異丁酸 (Aminoisobutyric acid)                          |
| AzaTrp      | 氮雜色胺酸 (Azatryptophan)                                 |
| Aze         | 氮雜環丁烷 (Azetidine)                                     |
| C5A         | 環戊基甘胺酸 (Cyclopentyl glycine)                          |

|          |                                            |
|----------|--------------------------------------------|
| Cha      | 3-環己基丙胺酸 (3-Cyclohexyl-alanine)            |
| Cpa      | 環丙基丙胺酸 (Cyclopropylalanine)                |
| Cya      | 半胱胺酸 (Cysteic acid)                        |
| DOPA     | 3,4-二羥基-苯丙胺酸 (3,4-Dihydroxy-phenylalanine) |
| HArg     | 高精胺酸 (HomoArginine)                        |
| HGln     | 高麩醯胺酸 (HomoGlutamine)                      |
| Hleu     | 高白胺酸 (HomeLeucine)                         |
| Hphe     | 高苯丙胺酸 (HomoPhenylalanine)                  |
| Hse(me)  | 高絲胺酸(甲基) (Homoserine(Me))                  |
| HSer     | 高絲胺酸 HomoSerine                            |
| HyP      | 羥脯胺酸 (Hydroxyproline)                      |
| Lys(Ac)  | 離胺酸(乙醯基) (Lysine(Acetyl))                  |
| Met(O2)  | 甲硫胺酸磺 (Methionine sulfone)                 |
| Nle      | 正白胺酸 (Norleucine)                          |
| Oic      | 八氫吲哚羧酸 (Octahydroindolecarboxylic acid)    |
| Oxa      | 噁唑烷-4-羧酸 (Oxazolidine-4-carboxylic acid)   |
| pCoPhe   | 對羧基苯丙胺酸 (para-Carboxy-Phenylalanine)       |
| PheOPhe  | 4-苯氧基-苯丙胺酸 (4-Phenoxy-phenylalanine)       |
| Phg      | 苯甘胺酸 (Phenylglycine)                       |
| Pip      | 哌啶酸 (Pipelicolic acid)                     |
| Pro(4NH) | 4-胺基脯胺酸 (4-Amino-Proline)                  |
| tBuAla   | 叔丁基丙胺酸 (t-Butyl-Alanine)                   |

|                       |                                                                         |
|-----------------------|-------------------------------------------------------------------------|
| TetraZ                | 四唑丙胺酸 (Tetrazole Alanine)                                               |
| Thi                   | 噻吩丙胺酸 (Thienyl-alanine)                                                 |
| THP(O)                | 四氫吡喃-4-丙酸 (Tetrahydropyran-4-propanoic acid)                            |
| THP(SO <sub>2</sub> ) | 二 氧 -4- 四 氫 硫 代 吡 喃 基 乙 酸<br>(Dioxo-4-tetrahydrothiopyranylacetic acid) |
| Trp(Me)               | 甲基色胺酸 (Methyl Trptophan)                                                |

**【0286】** 材料和方法

**【0287】** 胜肽合成

**【0288】** 基於 Fmoc 化學原理進行胜肽合成，使用 Peptide Instruments 生產的 Symphon 胜肽合成儀和 MultiSynTech 生產的 Syro II 胜肽合成儀。使用帶有適當的側鏈保護基的標準 Fmoc-胺基酸(Sigma，Merck)：在每種情況下均使用標準的耦合條件，然後使用標準方法去保護。

**【0289】** 或者，使用 HPLC 純化胜肽，並在分離後用 1,3,5-三丙烯醯基六氫-1,3,5-三嗪(TATA，Sigma)修飾。為此，將線性胜肽用 50:50 MeCN：H<sub>2</sub>O 稀釋至約 35 mL，加入約 500μL 的 100 mM TATA 乙腈溶液，並用 5 mL 的 1 M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 水溶液引發反應。在室溫下進行反應約 30 至 60 分鐘，並且一旦反應完成就凍乾(通過 MALDI 判斷)。一但完成，加入在 H<sub>2</sub>O 的 1ml 的 1M L-半胱胺酸鹽酸鹽單水合物(Sigma)，在室溫下反應約 60 分鐘，以淬滅任何過量的 TATA。在凍乾之後，如上所述純化經修飾的胜肽，同時用 Gemini C18 管柱(Phenomenex)代替 Luna C8，並將酸改為 0.1%三氟乙酸。將含有正確 TATA-修飾材料的純片段集中、凍乾並保存在-20°C 中。

**【0290】** 除非另有說明，所有胺基酸均以 L-構型使用。

【0291】 在某些情況下，在使用以下方法將胜肽與毒素的游離硫醇基耦合之前，先將胜肽轉化為活化的二硫化物；將在無水 DMSO(1.25 mol equiv)中的 4-甲基(琥珀醯亞胺基 4-(2-吡啶硫基)戊酸酯)(100 mM)溶液加到在無水 DMSO(1 mol equiv)中的胜肽(20mM)溶液中。該反應充分混合並且加入 DIPEA (20 mol equiv)。藉由 LC / MS 監測反應直至完成。

【0292】 雙環胜肽藥物結合物之製備

【0293】 BCY8549 之製備

分離條件：A 相：0.075 %TFA 在 H<sub>2</sub>O 中，B 相：MeCN

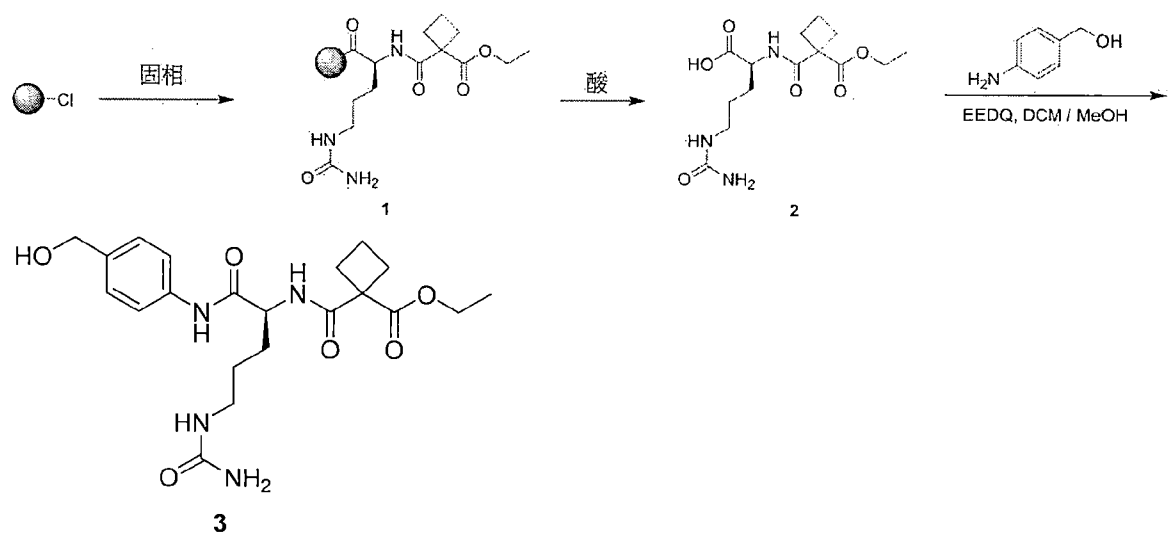
分離方法：18-48-55 min，RT = 53.5 min

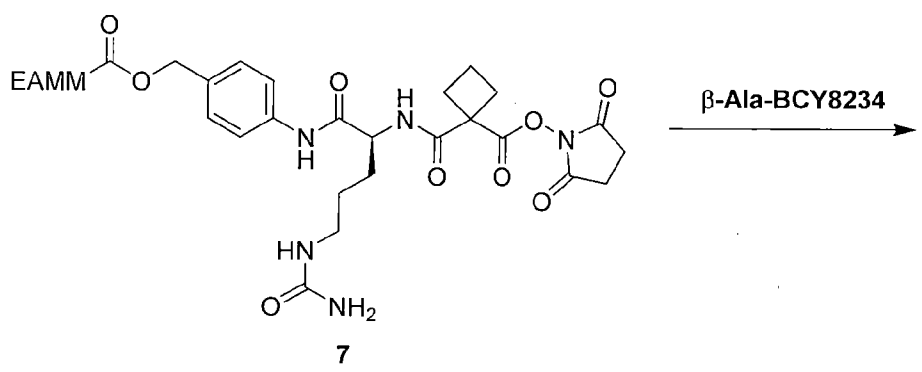
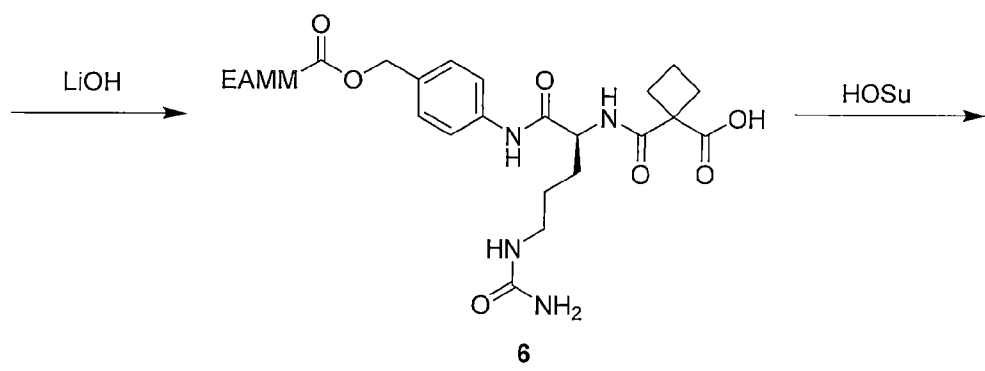
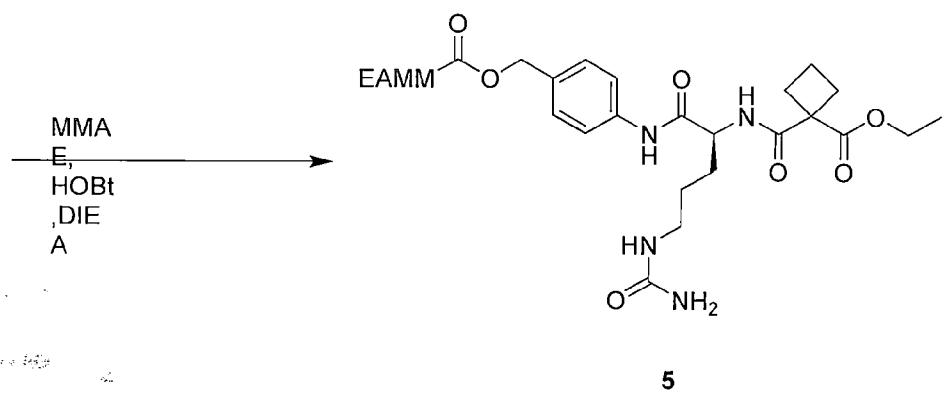
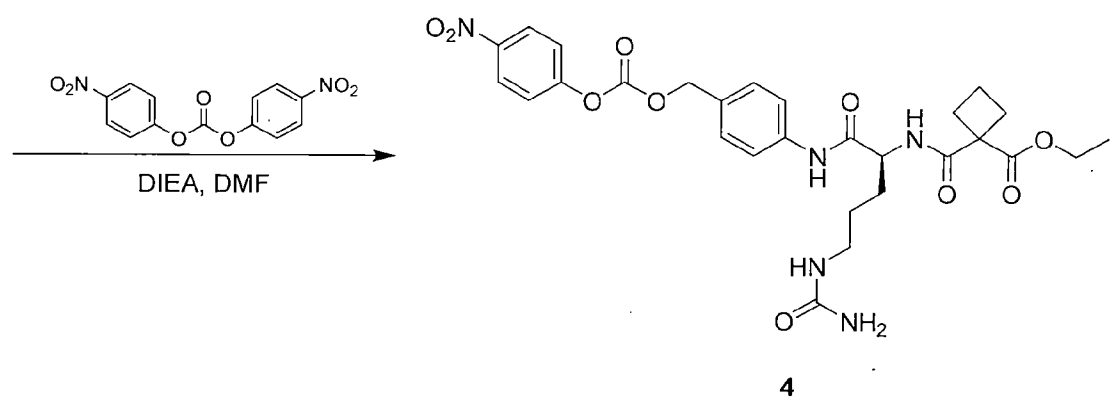
分離管柱：Luna 200\*25 mm 10μm，C18，110A 和 Gemin 150\* 30 mm，C18，5μm，110A，連接，50°C

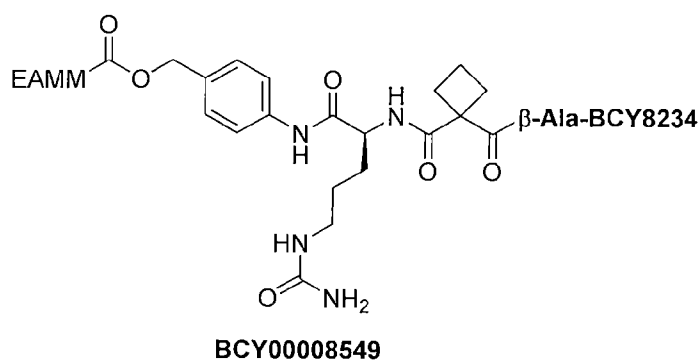
溶解方式：DMF

分離純度：95 %

藉由固相合成法以合成 BCY8234。







【0294】 化合物 2 之製備

【0295】 使用標準 Fmoc 化學合成胜肽。

- 1) 將 DCM 加入裝有 CTC 樹脂(5 mmol, 4.3 g, 1.17 mmol/g)和 Fmoc-Cit-OH(2.0 g, 5 mmol, 1.0 eq)的容器中，並用 N<sub>2</sub> 起泡。
- 2) 滴加 DIEA(4.0 eq)並混合 2 小時。
- 3) 加入 MeOH(5 mL)並混合 30 分鐘。
- 4) 瀝乾水分並用 DMF 洗滌 5 次。
- 5) 加入 20 %哌啶/DMF，並反應 30 分鐘。
- 6) 瀝乾水分並用 DMF 洗滌 5 次。
- 7) 加入 Fmoc-胺基酸溶液並混合 30 秒，然後加入活化緩衝液，N<sub>2</sub> 起泡約 1 小時。
- 8) 重複上述步驟 4 至 7，以耦合以下胺基酸。

【0296】 註解：

| # | 材料                    | 耦合劑                          |
|---|-----------------------|------------------------------|
| 1 | Fmoc-Cit-OH (1.0 eq)  | DIEA (4.0 eq)                |
| 2 | 1-乙氧基羰基環丁烷羧酸 (3.0 eq) | HATU(2.85 eq) 和 DIEA(6.0 eq) |

【0297】 將在 DMF 中的 20%哌啶用於 Fmoc 去保護 30 分鐘。通過茚三酮試驗監測耦合反應，並且用 DMF 洗滌樹脂 5 次。

【0298】 胜肽切割和純化：

- 1) 在室溫下，將切割緩衝液(20%TFIP/80%DCM)加入裝有側鏈保護的胜肽的燒瓶中，攪拌 1 小時兩次。
- 2) 過濾並收集濾液。
- 3) 濃縮以除去溶劑。
- 4) 凍乾粗胜肽以得到最終產物(1.4g，85.0 %產率)。

【0299】 化合物 3 之製備

【0300】 於化合物 2(1.65 g，5.01 mmol，1.0 eq)在 DCM(30 mL)和 MeOH(15 mL)中的溶液中加入 EEDQ(2.48 g，10.02 mmol，2.0eq)和(4-胺基苯基)甲醇(740.37 mg，6.01mmol，1.2 eq)。將混合物在 15 °C 下攪拌 16 小時。LC-MS 顯示化合物 2 被完全消耗，並且檢測到一個具有所需 m/z 的主峰。TLC 指示了化合物 2 被完全消耗並且形成許多新斑點。將反應混合物減壓濃縮以除去溶劑，得到殘餘物。藉由快速管柱層析(ISCO®； 80S epaFlash®Silica Flash Column，洗脫液：0~15 DCM/MeOH 梯度@ 60 mL/min)純化殘餘物。得到為黃色固體的化合物 3(1.3 g，2.99 mmol，產率 59.72 %)。

**【0301】 化合物 4 之製備**

**【0302】** 於化合物 3(1.3 g, 2.99 mmol, 1.0 eq)在 DMF(10 mL)中的溶液中加入 DIEA(2.32 g, 17.95 mmol, 3.13 mL, 6.0 eq)和碳酸二(4-硝基苯基)酯(3.64 g, 11.97 mmol, 4.0 eq)。將混合物在 15°C 下攪拌 1 小時。LC-MS 顯示化合物 3 被完全消耗, 並且檢測到一個具有所需 m/z 的主峰。殘餘物通過製備型 HPLC 純化(中性條件)。得到為黃色固體的化合物 4(1.0 g, 1.67 mmol, 55.74 %產率)。

**【0303】 化合物5之製備**

**【0304】** 於化合物5(250.53 mg, 417.84  $\mu$ mol, 1.5 eq)在DMF(5 mL)中的溶液中加入HOBt(56.46 mg, 417.84  $\mu$ mol, 1.5 eq)和DIEA(108.01 mg, 835.68  $\mu$ mol, 145.56  $\mu$ L, 3.0 eq)、MMAE(0.200 g, 278.56  $\mu$ mol, 1.0 eq)。將混合物在35°C下攪拌12小時。LC-MS顯示MMAE已完全耗盡, 並且檢測到一個具有所需m/z的主峰。通過製備型HPLC(中性條件)直接純化反應。得到為黃色固體的化合物5(0.180 g, 152.74  $\mu$ mol, 產率54.83 %)。

**【0305】 化合物6之製備**

**【0306】** 於化合物5(0.170g, 144.26  $\mu$ mol, 1.0 eq)在THF(5mL)和H<sub>2</sub>O(5mL)中的溶液中加入LiOH.H<sub>2</sub>O(12.11 mg, 288.51  $\mu$ mol, 2.0 eq)。將混合物在15°C下攪拌1小時。LC-MS顯示化合物5被完全耗盡, 並且檢測到一個具有所需m/z的主峰。減壓除去AcOH和THF使用的調整的PH = 7, 得到殘餘物。通過製備型HPLC(中性條件)純化殘餘物。得到為黃色固體的化合物6(0.185g, 粗產物)。

**【0307】 BCY8549之製備**

**【0308】** 於化合物6(0.100 g, 86.93  $\mu$ mol, 1.0 eq)在DMA(4 mL)中的溶液中加入HOSu(10.00 mg, 86.93  $\mu$ mol, 1.0 eq)和EDCI(16.66 mg, 86.93  $\mu$ mol, 1.0 eq)。

在NHS酯形成後，加入β-Ala-BCY8234(525.98 mg，173.85 μmol，2.0 eq)和 DIEA(33.70 mg，260.78 μmol，45.42 μL，3.0 eq)。將混合物在15℃下攪拌4小時。LC-MS顯示化合物6被完全耗盡，並且檢測到一個具有所需m/z的主峰。通過製備型HPLC(TFA條件)直接純化反應，得到為白色固體的化合物BCY8549(0.0528 g，12.15 μmol，產率13.98%，純度95.70%)。滯留時間= 11.48 min。發現質量= 1386.4(M/3+H)。

【0309】BCY8245 之製備

分離條件：A 相：0.075 %TFA 在 H<sub>2</sub>O 中，B 相：MeCN

分離方法：18-48-55 min，RT=53.5 min

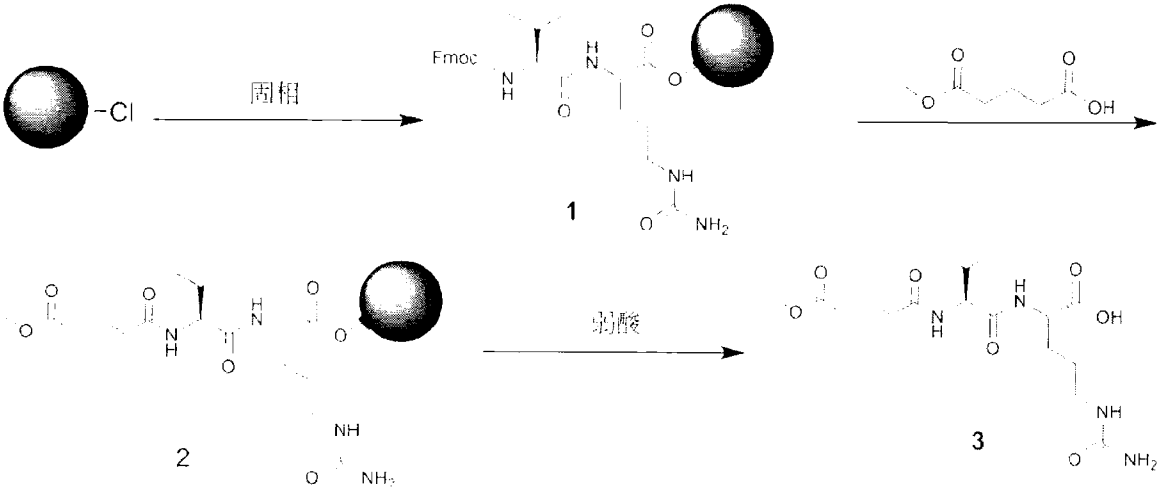
分離管柱：Luna 200\*25 mm 10um，C18，110A 和 Gemin150\*30mm，C18，5um，110A，連接，50℃

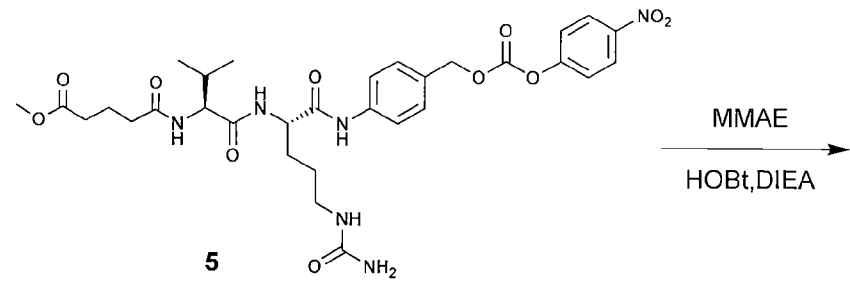
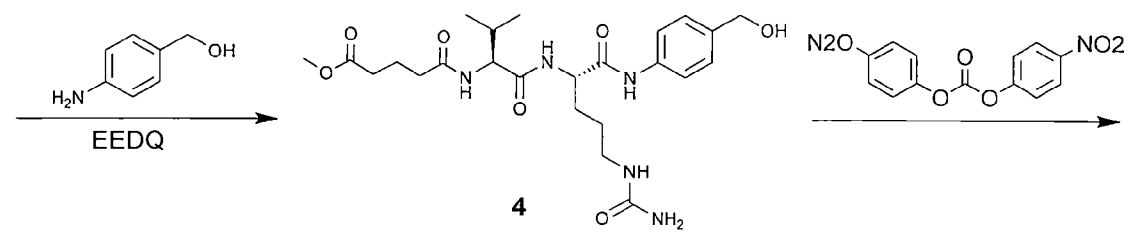
溶解方式：DMF

分離純度：95%

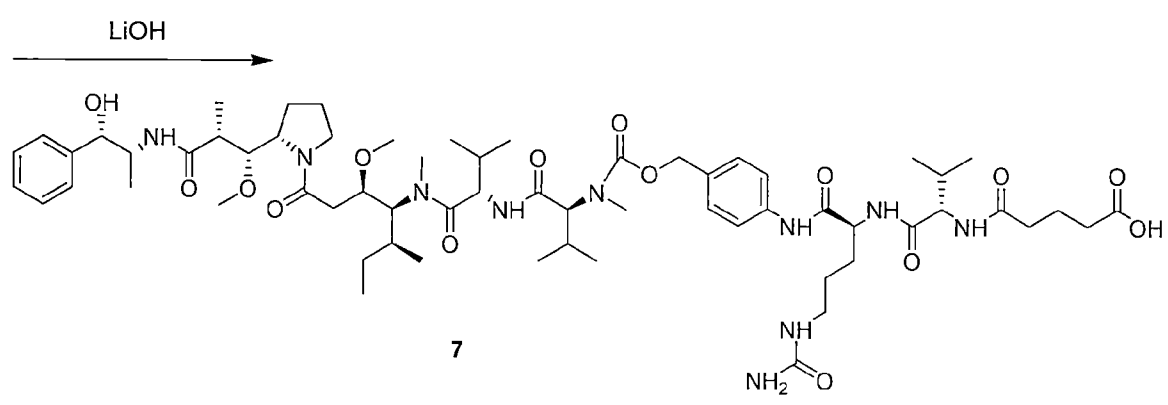
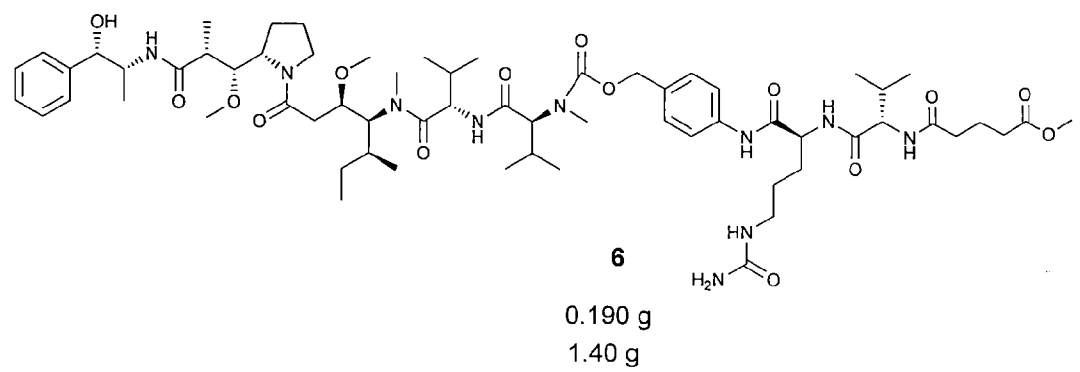
藉由固相合成法合成 BCY8234。

【0310】BCY8245 之反應機制如下：

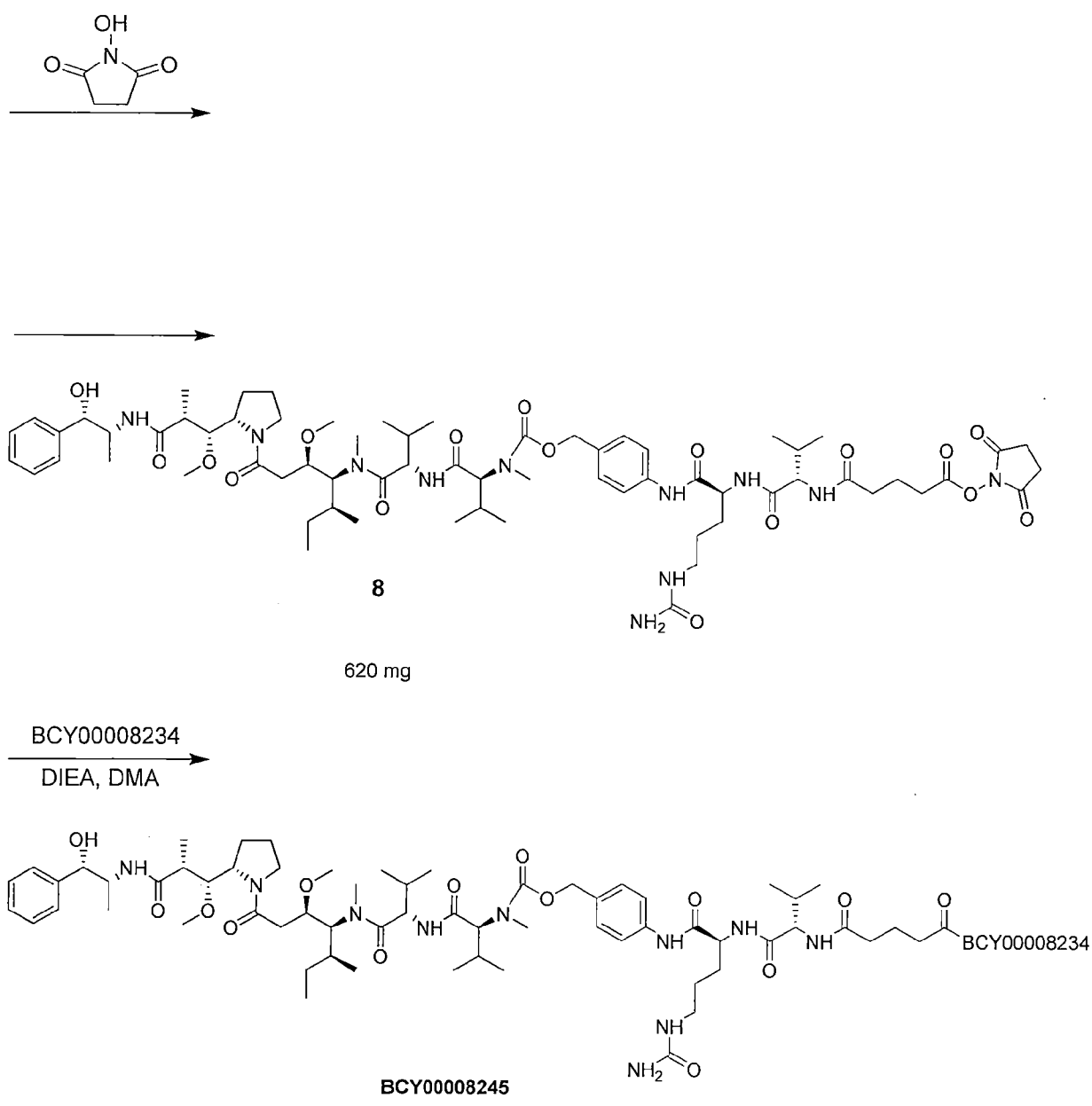




250 mg  
2.06 g



770 mg



- 【0311】 化合物 3 之製備
- 【0312】 藉由固相法合成化合物 3。
- 【0313】 化合物4之製備
- 【0314】 於化合物3(1.3 g, 3.23 mmol, 1.0 eq)在DCM(10 mL)和MeOH(5 mL)的溶液中加入EEDQ(1.60 g, 6.46 mmol, 2.0 eq)和(4-胺基苯基)甲醇(517.16 mg, 4.20 mmol, 1.3 eq)。將混合物在20℃下攪拌16小時。LC-MS顯示化合物3被完全

耗盡，並且檢測到一個具有所需 $m/z$ 的主峰。減壓除去溶劑。藉由快速管柱層析 (ISCO®; 40 g SepaFlash® Silica Flash Column, 洗脫液: 0~15% DCM/MeOH 梯度 @ 40 mL/min) 以純化殘餘物。得到為黃色固體的化合物4 (0.950 g, 1.87 mmol, 57.94%產率)。

**【0315】 化合物5之製備**

**【0316】** 於化合物4 (0.950 g, 1.87 mmol, 1.0 eq) 在DMF (5 mL) 中的溶液中加入DIEA (1.21 g, 9.36 mmol, 1.63 mL, 5.0 eq) 和碳酸二(4-硝基苯基)酯 (2.28 g, 7.49 mmol, 4.0 eq)。將混合物在20°C下攪拌1小時。LC-MS顯示化合物4被完全耗盡，並且檢測到一個具有所需 $m/z$ 的主峰。通過製備型HPLC (中性條件) 直接純化反應。得到為白色固體的化合物5 (0.400 g, 594.64  $\mu$ mol, 產率31.77%)。

**【0317】 化合物6之製備**

**【0318】** 於化合物5 (0.200 g, 297.32  $\mu$ mol, 1.0 eq) 在DMF (5 mL) 中的溶液中加入HOBt (52.23 mg, 386.51  $\mu$ mol, 1.3 eq) 和DIEA (115.28 mg, 891.95  $\mu$ mol, 155.36  $\mu$ L, 3.0 eq)、MMAE (192.12 mg, 267.59  $\mu$ mol, 0.9 eq)。將混合物在20°C下攪拌16小時。LC-MS顯示化合物5被完全耗盡，並且檢測到一個具有所需 $m/z$ 的主峰。通過製備型HPLC (中性條件) 直接純化反應。得到為白色固體的化合物6 (0.160 g, 127.84  $\mu$ mol, 產率43.00%)。

**【0319】 化合物7之製備**

**【0320】** 於化合物6 (0.160 g, 127.84  $\mu$ mol, 1.0 eq) 在THF (3 mL) 和H<sub>2</sub>O (3 mL) 中的溶液中加入LiOH·H<sub>2</sub>O (26.82 mg, 639.21  $\mu$ mol, 5.0 eq)。將混合物在20°C下攪拌1小時。LC-MS顯示化合物6被完全耗盡，並且檢測到一個具有所需 $m/z$ 的主

峰。減壓除去THF，並藉由AcOH調節pH=7，將混合物凍乾。得到為白色固體的化合物7(0.130 g，105.05  $\mu$ mol，產率82.17%)。

#### 【0321】 化合物8之製備

【0322】 於化合物7(36.27 mg，315.15  $\mu$ mol，3.0 eq)在DMA(6 mL)和DCM(2 mL)中的溶液中加入EDCI(60.41 mg，315.15  $\mu$ mol，3.0 eq)。將混合物在15°C下攪拌3小時LC-MS顯示化合物7被完全耗盡，並且檢測到一個具有所需m/z的主峰。減壓除去DCM。藉由製備型HPLC(中性條件)直接純化反應。得到為白色固體的化合物8(0.095 g，71.18  $\mu$ mol，產率67.76%)。

#### 【0323】 BCY8245之製備

【0324】 於BCY8234(66.41 mg，22.48  $\mu$ mol，1.0 eq)在DMA(4 mL)中的溶液中添加DIEA(8.72 mg，67.44  $\mu$ mol，11.75  $\mu$ L，3.0 eq)和化合物8(0.030 g，22.48  $\mu$ mol，1.0 eq)。將混合物在20°C下攪拌16小時。LC-MS顯示BCY8234已完全耗盡，並檢測到一個具有所需m/z或所需質量的主峰。藉由製備型HPLC(TFA條件)直接純化反應。得到為白色固體的化合物BCY8245(0.0427 g，10.16  $\mu$ mol，收率45.19%，純度99.30%)。滯留時間= 11.7 min。發現質量=1043.9(M/4+H)。

#### 【0325】 生物數據

#### 【0326】 Nectin-4 直接結合試驗

【0327】 根據 WO 2016/067035 揭露的方法，使用螢光極化試驗測定本發明之胜肽對人類 Nectin-4(Ki)的親和力。具有螢光標記(螢光素(SIGMA)或 Alexa Fluor488™(Fisher Scientific))之本發明胜肽以 2.5nM 稀釋於含有 0.01% tween 20 之 PBS 或含有 100mM NaCl 和 0.01% tween 的 50mM HEPES(pH 7.4)(均稱之為試驗緩衝液)。將其混合溶於相同試驗緩衝液之蛋白滴定，於黑色壁底低結合低體

積 384 孔盤中獲得總體積 25μL 的 1nM 胜肽，通常為 5μL 試驗緩衝液，10μL 蛋白以及 10μL 螢光胜肽。二序列稀釋其中之一用於獲得 12 不同濃度，高濃度範圍自 500nM 作為高親和力結合物至 10μM 作為低親和力結合物和選擇性試驗。使用備有「FP 485 520 520」光學模組的 BMG PHERAstar FS 測量，其發出 485nm 光波，以及於 520nm 偵測平行和垂直發光。PHERAstar FS 設定於 25°C 並每孔洞 200 次發光，以及定位延遲 0.1 秒，各孔洞以 5 至 10 分鐘間隔測量 60 分鐘。60 分鐘結束後，以用於分析的獲得物判斷各追蹤物，其中孔洞內不含蛋白質。使用 Systat Sigmaplot(12.0 版)分析數據。mP 值帶入使用者定義之二次方程式，產生 Kd 值：

$$f = y_{min} + (y_{max} - y_{min}) / \text{Lig} * ((x + \text{Lig} + K_d) / 2 - \sqrt{(((x + \text{Lig} + K_d) / 2)^2 - (\text{Lig} * x))})$$

。「Lig」為使用追蹤物之濃度定義值。

【0328】 Nectin-4 競爭結合試驗

【0329】將不具有螢光標記之胜肽與 ACPFGCHTDWSWPIWCA-Sar6-K(Fl) (SEQ ID NO: 2)進行競爭試驗，且(Kd= 5 nM-使用上述方法確定)。將胜肽適當稀釋於如直接結合試驗所述的試驗緩衝液並含有 5%DMSO，再序列稀釋 1/2 倍。將 5 μL 稀釋後的胜肽加入培養盤中再加入 10μL 人類 Nectin-4，再加入 10μL 螢光胜肽。使用與直接結合試驗相同方法測量，但獲得物於第一次測量之前判斷。使用 Systat Sigmaplot(12.0 版)分析數據，其中 mP 值帶入使用者定義之三次方程式，以產生 Ki 值：

$$f = y_{min} + (y_{max} - y_{min}) / \text{Lig} * ((\text{Lig} * ((2 * ((K_{lig} + K_{comp} + \text{Lig} + \text{Comp} - \text{Prot} * c)^2 - 3 * (K_{comp} * (\text{Lig} - \text{Prot} * c) + K_{lig} * (\text{Comp} - \text{Prot} * c) + K_{lig} * K_{comp}))^{0.5} * \cos(\arccos(S((-2 * (K_{lig} + K_{comp} + \text{Lig} + \text{Comp} - \text{Prot} * c)^3 + 9 * (K_{lig} + K_{comp} + \text{Lig} + \text{Comp} - \text{Prot} * c) * (K_{comp} * (\text{Lig} - \text{Prot} * c) + K_{lig} * (\text{Comp} - \text{Prot} * c) + K_{lig} * K_{comp}) - 27 * (-1 * K_{lig} * K_c$$

$$\frac{\text{omp*Prot*c)}}{(2*(((\text{Klig+Kcomp+Lig+Comp-Prot*c})^2-3*(\text{Kcomp*(Lig-Prot*c)+Klig*(Comp-Prot*c)+Klig*Kcomp}))^3)^{0.5}))/3))-(\text{Klig+Kcomp+Lig+Comp-Prot*c}))/((3*\text{Klig})+((2*((\text{Klig+Kcomp+Lig+Comp-Prot*c})^2-3*(\text{Kcomp*(Lig-Prot*c)+Klig*(Comp-Prot*c)+Klig*Kcomp}))^3)^{0.5}*\text{COS}(\text{ARCCOS}((-2*(\text{Klig+Kcomp+Lig+Comp-Prot*c})^3+9*(\text{Klig+Kcomp+Lig+Comp-Prot*c})*(\text{Kcomp*(Lig-Prot*c)+Klig*(Comp-Prot*c)+Klig*Kcomp})-27*(-1*\text{Klig*Kcomp*Prot*c}))/2*(((\text{Klig+Kcomp+Lig+Comp-Prot*c})^2-3*(\text{Kcomp*(Lig-Prot*c)+Klig*(Comp-Prot*c)+Klig*Kcomp}))^3)^{0.5}))/3))-(\text{Klig+Kcomp+Lig+Comp-Prot*c}))))。$$

【0330】 「Lig」、「Klig」、和「Prot」全部為定義值，係分別關於：螢光胜肽濃度、螢光胜肽 Kd 值、和 Nectin 濃度。

【0331】 Nectin-4 Biacore SPR 結合試驗

【0332】 進行 Biacore 實驗以決定與人類 Necin-4 蛋白(得自 Charles River)結合的單體胜肽之  $k_a$  ( $M^{-1}s^{-1}$ )、 $k_d$  ( $s^{-1}$ )、 $K_D$  (nM)值。

【0333】 將具有 gp67 訊息序列和 C 端 FLAG 標記的人類 Nectin-4(殘基 Gly32-Ser349；NCBI RefSeq：NP\_112178.2)轉殖到 pFastbac-1 和桿狀病毒中，該桿狀病毒使用標準 Bac-to-Bac™過程(Life Technologies)製備。在 27°C 的 Excell-420 培養基(Sigma)中  $1 \times 10^6 ml^{-1}$  的 Sf21 細胞以 MOI 為 2 用 P1 病毒原液感染，並在 72 小時收集上清液。在 4°C 下，用在 PBS 中洗滌的抗-FLAG M2 親和洋菜樹脂(Sigma)將上清液分批結合 1 小時，用在 PBS 中洗滌的抗-FLAG M2 親和洋菜樹脂(Sigma)在 4°C 下將上清液分批結合 1 小時，然後將樹脂轉移到管柱並用 PBS 充分洗滌。用 100  $\mu g/ml$  FLAG 胜肽沖提蛋白質。將沖提的蛋白質濃縮至 2 ml，並在 PBS 中以 1 ml/min 的速度上樣至 S-200 Superdex 管柱(GE Healthcare)。收集 2 ml 的片段，並將含有 Nectin-4 蛋白的片段濃縮至 16 mg/ml。

【0334】根據廠商建議的實驗流程，使用 EZ-Link™ Sulfo-NHS-LC-LC-Biotin 試劑(Thermo Fisher)在 PBS 中將蛋白質隨機生物素化。使用旋轉柱將蛋白質廣泛脫鹽，以將未耦合的生物素除至 PBS 中。

【0335】為分析胜肽之結合，使用 Biacore 300 分析儀和 CM5 晶片(Healthcare)。使用標準胺耦合化學方法，於電泳緩衝液 HBS-N(10 mM HEPES、0.15 M NaCl、pH 7.4)將鏈親和素固定於晶片上。簡而言之，羧甲基右旋糖酐表面之活化係使用注射 7 分鐘的 1:1 比例之 0.4 M 1-乙基-3-(3-二甲基胺丙基)碳二亞胺鹽酸鹽(EDC)/0.1 M 的 N-羥琥珀醯亞胺(NHS)，流速為 10  $\mu$ l/min。為捕捉鏈親和素，蛋白質稀釋於為 0.2 mg/ml 之 10 mM 乙酸钠溶液(pH 4.5)，以及注射 120  $\mu$ l 於活化晶片表面並捕捉。活化基團以 7 分鐘注射之 1 M 乙醇胺(pH 8.5)阻斷，捕捉 1200-1800 RU 的生物素化之 Nectin-4。再改用 PBS/0.05% Tween 20 的緩衝液，並在緩衝液中製備胜肽的序列稀釋，DMSO 的最終濃度為 0.5%。再進行 6 次 2 倍稀釋，胜肽濃度最大值為 100nM。SPR 分析執行於 25°C，流速 50  $\mu$ l/min，60 秒連接和 400-1200 秒分離，具體取決於各個胜肽。數據以 DMSO 排除體積效應校正。全部數據雙重參照空白注射，以及對比表面使用標準程序方法，並且數據處理和動態帶入執行於 Scrubber 軟體(2.0c 版)(BioLogic Software)。數據帶入樣本 1：1 結合模組，適當時用於大量傳輸效應。

【0336】上述 Nectin-4 結合試驗中測試了本發明的某些胜肽配體，結果示於表 1：

【0337】 表 1：本發明所選定之胜肽配體的競爭結合數據

| 雙環編號    | K <sub>i</sub> (μM) | 實驗次數 |
|---------|---------------------|------|
| BCY8122 | 0.003               | 2    |
| BCY8126 | 0.0027              | 6    |

【0338】 上述 SPR 試驗中測試了本發明的某些胜肽配體，結果示於表 2：

【0339】 表 2：本發明所選定之胜肽配體的 SPR 數據

| 雙環編號    | 人類 SPR<br>K <sub>d</sub> (nM) | n |
|---------|-------------------------------|---|
| BCY8122 | 0.89                          | 1 |
| BCY8126 | 1.07                          | 4 |
| BCY8116 | 0.372                         | 1 |

n = 平均實驗次數

【0340】 將本發明的某些雙環胜肽結合至胞殺劑並在上述 SPR 試驗中進行測試，結果示於表 3：

【0341】 表 3：本發明所選定之 BDC 的 SPR 數據

| 雙環藥物<br>結合物<br>(BDC)編號 | 胜肽                                   | 人類 SPR K <sub>d</sub><br>(nM) |
|------------------------|--------------------------------------|-------------------------------|
| BCY8245                | MMAE-PABC-Cit-Val-Glutaryl-BCY8234   | 5.12 (n = 4)                  |
| BCY8549                | MMAE-PABC-cyclobutyl-(B-Ala)-BCY8234 | 1.44 (n = 1)                  |

【0342】 體內研究

【0343】 在實施例 1 至 5 及 9 中，每個研究使用下列方法：

【0344】 測試和正對照組藥物

| 編號      | 物理描述 | 分子量     | 純度     | 儲存條件         |
|---------|------|---------|--------|--------------|
| BCY8245 | 凍乾粉末 | 4173.85 | 99.60% | 儲存於<br>-80°C |
| BCY8549 | 凍乾粉末 | 4157.81 | 95.70% | 儲存於<br>-80°C |

【0345】 實驗方法和流程

【0346】 (i) 觀察

【0347】 實施例中處理、飼養、和治療動物之全部流程依據 WuXi AppTec 的機構動物飼養和使用委員會(IACUC)所公布的準則進行，以及按照實驗動物飼養評估和認證協會(AAALAC)的指導。於日常監測中，每日檢查動物腫瘤生長和治療對於一般行為之影響，例如行動力、飲食及飲水(僅目視)、體重增減、眼/毛光澤、和其他不正常影響，如實驗方法所述。依據各組動物數紀錄死亡和臨床徵兆。

【0348】 (ii) 腫瘤測量及終點

【0349】 主要終點係觀察腫瘤的生長是否可被延緩或小鼠是否可被治癒。每周 3 次使用卡尺測量腫瘤二維體積，該體積以  $\text{mm}^3$  使用下列方程式表示： $V = 0.5 a \times b^2$ ，其中 a 和 b 分別係腫瘤之長和短直徑。而後腫瘤體積用於計算 T/C 值。該 T/C 值(百分比)係抗腫瘤功效之指標；T 和 C 分別係一給定日期之治療組和對照組之平均體積。

【0350】 以下列方程式計算各組 TGI： $\text{TGI}(\%) = [1 - (T_i - T_0) / (V_i - V_0)] \times 100$ ； $T_i$  係給定日期之治療組之平均腫瘤體積， $T_0$  係治療始日之治療組之平均腫瘤體積， $V_i$  係在與  $T_i$  同日之載劑對照組之平均腫瘤體積，以及  $V_0$  係治療始日之載劑對照組之平均腫瘤體積。

【0351】 (iii) 統計分析

【0352】 提供各組於各時間點之腫瘤體積的統計摘要，包括平均值和平均值標準差(SEM)。

【0353】 以最終給藥後最佳療效時點所獲得的數據進行各組之間腫瘤體積差異之統計分析。

【0354】 執行單因子獨立變異數分析(one-way ANOVA)比較各組腫瘤，以及當取得顯著 F 檢驗統計(治療變異和誤差變異之比例)時，各組之間的比較以 Games-Howell 檢定執行。全部數據使用 GraphPad Prism 5.0 分析。P < 0.05 為具有顯著差異。

【0355】 實施例 1：BCY8245 治療 NCI-H292 異體移植(非小細胞肺癌(NSCLC)模式)Balb/c 裸鼠之體內功效

【0356】 1. 研究目的

【0357】 本研究之目的係評估 BCY8245 治療 NCI-H292 異體移植 Balb/c 裸鼠之體內抗腫瘤功效。

【0358】 2. 實驗設計

| 組別 | 治療      | n | 劑量<br>(mg/kg) | 藥劑體積<br>(μl/g) | 給藥途<br>徑 | 時程  |
|----|---------|---|---------------|----------------|----------|-----|
| 1  | 載劑      | 3 | --            | 10             | iv       | biw |
| 2  | BCY8245 | 3 | 1/3/5         | 10             | iv       | qw  |
| 3  | BCY8245 | 3 | 3 mg/kg       | 10             | iv       | qw  |
| 4  | BCY8245 | 3 | 3 mg/kg       | 10             | iv       | biw |
| 5  | BCY8245 | 3 | 5 mg/kg       | 10             | iv       | qw  |

註解：n：動物數量；給藥量：根據體重調整給藥量(10 μl/g)。

【0359】 3. 材料

【0360】 3.1 動物和飼養條件

**【0361】 3.1.1. 動物**

物種：Mus Musculus

品系：Balb/c 裸鼠

年齡：6-8 周

性別：雌性

體重：18-22 g

動物數量：用於 BCY8245 及備用之小鼠為 18 隻

動物供應商：Shanghai LC Laboratory Animal Co., LTD.

**【0362】 3.1.2. 飼養條件**

小鼠存於各自之通氣籠內，每籠 3 隻，恆溫以及恆濕。

溫度：20~26℃

濕度：40-70%

鼠籠：聚碳酸酯製造。尺寸為 300 mm x 180 mm x 150 mm。墊料為玉米芯，每周更換 2 次。

食物：研究期間動物可自由取得輻射消毒之乾燥顆粒食物。

飲水：動物可自由取得消毒過的飲用水。

鼠籠辨識：各籠的辨識包括下列資訊：動物數、性別、品系、收貨日、治療、研究編號、組別編號、和治療始日。

動物辨識：動物均標記耳碼。

**【0363】 3.2 測試和正對照組藥物**

**【0364】 4. 實驗方法和步驟**

**【0365】 4.1 細胞培養**

【0366】 腫瘤細胞 NCI-H292 於 37℃ 以及 5% CO<sub>2</sub> 環境下培養於包含 10% 熱滅活小牛血清的培養基。腫瘤細胞每周 2 次進行繼代培養。收取指數成長期的細胞，並用於腫瘤接種之計算。

【0367】 4.2 腫瘤接種

【0368】 各小鼠於右腹皮下接種在0.2 ml的PBS中的NCI-H292 (10 x 10<sup>6</sup>)腫瘤細胞並待其發展。隨機分組該些動物，當平均腫瘤體積約為158-406 mm<sup>3</sup>時開始治療。各組中試驗藥物之給藥和動物數量揭示於下列實驗設計表。

【0369】 4.3 製備試驗藥物配方

| 試驗藥物    | 濃 度<br>(mg/ml) | 配方                                           |
|---------|----------------|----------------------------------------------|
| 載劑      | -              | 25 mM 組胺酸(pH 7)，10%蔗糖                        |
| BCY8245 | 1              | 1.61 mg 的 BCY8245 溶於 1.604 ml 的緩衝液(載劑)       |
|         | 0.1            | 90 µl 的 1 mg/ml BCY8245 稀釋於 810 µl 的緩衝液(載劑)  |
|         | 0.3            | 270 µl 的 1 mg/ml BCY8245 稀釋於 630 µl 的緩衝液(載劑) |
|         | 0.5            | 450 µl 的 1 mg/ml BCY8245 稀釋於 450 µl 的緩衝液(載劑) |

| 試驗藥物    | 濃 度<br>(mg/ml) | 配方                                         |
|---------|----------------|--------------------------------------------|
| 載劑      | -              | 25 mM 組胺酸(pH 7)，10%蔗糖                      |
| BCY8245 | 1              | 10.56 mg 的 BCY8245 溶於 10.518 ml 的組胺酸緩衝液    |
| BCY8245 | 0.5            | 400 µl 的 1 mg/ml BCY8245 稀釋於 400 µl 組胺酸緩衝液 |
| BCY8245 | 0.3            | 240 µl 的 1 mg/ml BCY8245 稀釋於 560 µl 組胺酸緩衝液 |

【0370】 4.4 樣本收集

【0371】 在研究結束時，在最後一次給藥後 5 分鐘、15 分鐘、30 分鐘、60 分鐘和 120 分鐘收集血漿。

【0372】 5. 結果

【0373】 5.1 腫瘤生長曲線

【0374】 圖 1 和圖 2 顯示腫瘤生長曲線。

【0375】 5.2 腫瘤體積紀錄

【0376】 下表顯示帶有 NCI-H292 異體移植之 Balb/c 雌性裸鼠隨時間的平均腫瘤體積：

【0377】 表 4：腫瘤體積對應時間之記錄

| 治療                           | 0          | 2          | 4          | 7           | 9            | 11           | 14           | 16           |
|------------------------------|------------|------------|------------|-------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| 載劑, qw                       | 410±7<br>7 | 516±6<br>9 | 627±<br>61 | 931±<br>141 | 1118±<br>225 | 1208±<br>257 | 1495±<br>365 | 1743<br>±419 |
| BCY8245,<br>1/3/5 mpk,<br>qw | 404±6<br>5 | 391±4<br>2 | 542±14     | 721±<br>136 | 762±1<br>15  | 607±9<br>5   | 614±8<br>9   | 626±9<br>3   |

| 治療                           | 18           | 21           | 23          | 25          | 28          | 30          | 32          | 35           |
|------------------------------|--------------|--------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|--------------|
| 載劑, qw                       | 1950±<br>551 | 2149±<br>639 |             |             |             |             |             |              |
| BCY8245,<br>1/3/5 mpk,<br>qw | 611±9<br>3   | 654±1<br>52  | 732±13<br>9 | 755±<br>132 | 713±1<br>14 | 762±1<br>65 | 968±2<br>90 | 1119±<br>216 |

【0378】 表 5：腫瘤體積對應時間之記錄

| 治療                     | 治療起始後之天數 |        |        |        |        |        |        |
|------------------------|----------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
|                        | 0        | 2      | 4      | 7      | 9      | 11     | 14     |
| 載劑, qw                 | 161±2    | 270±14 | 357±14 | 448±17 | 570±16 | 720±36 | 948±61 |
| BCY8245,<br>3 mpk, qw  | 160±5    | 220±11 | 266±15 | 218±23 | 167±10 | 161±36 | 149±43 |
| BCY8245,<br>3 mpk, biw | 162±13   | 243±19 | 211±12 | 101±11 | 100±8  | 87±7   | 65±3   |
| BCY8245,<br>5 mpk, qw  | 160±9    | 176±7  | 191±3  | 105±8  | 82±3   | 91±14  | 83±8   |

【0379】 5.3 腫瘤生長抑制之分析

【0380】 根據治療起始後第 14 日測量的腫瘤體積，計算 BCY8245 對於 NCI-H292 異體移植模式的腫瘤生長抑制率。

【0381】 表 6：腫瘤生長抑制之分析

| 治療                        | 腫 瘤 體 積<br>(mm <sup>3</sup> ) <sup>a</sup> | T/C <sup>b</sup><br>(%) | TGI<br>(%) | <i>P</i> 值 ,與載劑比較 |
|---------------------------|--------------------------------------------|-------------------------|------------|-------------------|
| 載劑, qw                    | 2149±639                                   | --                      | --         | --                |
| BCY8245,<br>1/3/5 mpk, qw | 654±152                                    | 30.4                    | 85.7       | <i>p</i> <0.05    |

a. 平均值 ± SEM

b. 將治療組的組平均腫瘤體積除以對照組的組平均腫瘤體積，計算腫瘤生長抑制(T/C)

【0382】 表 7: 腫瘤生長抑制之分析

| 治療                     | 腫 瘤 體 積<br>(mm <sup>3</sup> ) <sup>a</sup> | T/C <sup>b</sup><br>(%) | TGI<br>(%) | P 值，與載劑<br>比較   |
|------------------------|--------------------------------------------|-------------------------|------------|-----------------|
| 載劑, qw                 | 948±61                                     | --                      | --         | --              |
| BCY8245,<br>3 mpk, qw  | 149±43                                     | 15.8                    | 101.4      | <i>p</i> <0.001 |
| BCY8245,<br>3 mpk, biw | 65±3                                       | 6.9                     | 112.2      | <i>p</i> <0.001 |
| BCY8245,<br>5 mpk, qw  | 83±8                                       | 8.8                     | 109.8      | <i>p</i> <0.001 |

- a. 平均值± SEM
- b. 將治療組的組平均腫瘤體積除以對照組的組平均腫瘤體積，計算腫瘤生長抑制(T/C)

【0383】 6. 結果和討論

【0384】 本實施例評估 BCY8245 對於 NCI-H292 異體移植模式之治療功效。

將全部組別於多個時間點測量之腫瘤體積顯示於圖 1 和圖 2 以及表 4 至表 7。

【0385】 給予載劑治療之小鼠之平均腫瘤體積於第 14 日達到 879 mm<sup>3</sup>。

【0386】 BCY8245 於 1 mg/kg 並未產生明顯的抗腫瘤活性，從第 7 天開始將劑量增加至 3 mg/kg 後，試驗藥物出現明顯的抗腫瘤活性，但是在第 21 天時，當劑量增加至 5 mg/kg 時，療效並沒有進一步提高。在本實施例中，所有治療動物在給藥治療期間均出現持續的體重減輕，這可能是因為腫瘤負荷和試驗藥物的毒性所導致。

【0387】 BCY8245 於 3 mg/kg, qw (TV=149 mm<sup>3</sup>, TGI=101.4%, *p*<0.001)，3 mg/kg, biw (TV=65 mm<sup>3</sup>, TGI=112.2%, *p*<0.001)以及 5 mg/kg, qw (TV=83 mm<sup>3</sup>, TGI=109.8%, *p*<0.001) 產生顯著的抗腫瘤活性。

【0388】 實施例 2：BCY7825、BCY8245、BCY8253、BCY8254 及 BCY8255 治療 HT-1376 異體移植(膀胱癌模式) CB17-SCID 小鼠之體內功效試驗

【0389】 1. 研究目的

【0390】 本研究之目的係評估試驗藥物治療 HT-1376 異體移植 CB17-SCID 小鼠之體內抗腫瘤功效。

【0391】 2. 實驗設計

| 組別 | 治療      | n | 劑量<br>(mg/kg)    | 藥劑體積<br>(μl/g) | 給藥途徑 | 時程  |
|----|---------|---|------------------|----------------|------|-----|
| 1  | 載劑      | 3 | --               | 10             | iv   | qw  |
| 2  | BCY8245 | 3 | 1/3 <sup>a</sup> | 10             | iv   | qw  |
| 3  | 載劑      | 5 | --               | 10             | iv   | qw  |
| 4  | BCY8245 | 3 | 3 mg/kg          | 10             | iv   | qw  |
| 5  | BCY8245 | 3 | 3 mg/kg          | 10             | iv   | biw |
| 6  | BCY8245 | 3 | 5 mg/kg          | 10             | iv   | qw  |

<sup>a</sup> 第一周為 1 mg/kg，接下來 2 週為 3 mg/kg

【0392】 3. 材料

【0393】 3.1 動物和飼養條件

【0394】 3.1.1. 動物

物種：Mus Musculus

品系：CB17-SCID

年齡：6-8 周

性別：雌性

體重：18-22 g

動物數量：包含備用小鼠為 21-41 隻

動物供應商：Shanghai LC Laboratory Animal Co., LTD.

**【0395】 3.1.2. 飼養條件**

小鼠存於各自之通氣籠內，每籠 3-5 隻，恆溫以及恆濕。

溫度：20~26 °C

濕度：40-70%

鼠籠：聚碳酸酯製造。尺寸為 300 mm x 180 mm x 150 mm。墊料為玉米芯，每周更換 2 次。

食物：研究期間動物可自由取得輻射消毒之乾燥顆粒食物。

飲水：動物可自由取得消毒過的飲用水。

鼠籠辨識：各籠的辨識包括下列資訊：動物數、性別、品系、收貨日、治療、研究編號、組別編號、和治療始日。

動物辨識：動物均標記耳碼。

**【0396】 4. 實驗方法和步驟**

**【0397】 4.1 細胞培養**

**【0398】** 腫瘤細胞 HT-1376 於 37°C 以及 5% CO<sub>2</sub> 環境下單層培養於包含 10% 熱滅活小牛血清的 EMEM 培養基。腫瘤細胞每周用胰蛋白-EDTA 進行 2 次繼代培養。收取指數成長期的細胞，用於腫瘤接種之計算以接種腫瘤。

**【0399】 4.2 腫瘤接種**

**【0400】** 各小鼠於右腹皮下接種 HT-1376 腫瘤細胞( $5 \times 10^6$ )並待其發展，該些腫瘤細胞係在 0.2 ml 含有基質膠(1:1)的 PBS 中。當平均腫瘤體積約為 153-164 mm<sup>3</sup>時隨機分組該些動物。各組中試驗藥物之給藥和動物數量揭示於下列實驗設計表。

【0401】 4.3 製備試驗藥物配方

| 試驗藥物    | 濃 度<br>(mg/ml) | 配 方                                              |
|---------|----------------|--------------------------------------------------|
| 載劑      | -              | 25 mM 組胺酸(pH 7)，10%蔗糖                            |
| BCY8245 | 0.1            | 90 µl 的 1 mg/ml BCY8245 稀釋於 810 µl 的緩衝液<br>(載劑)  |
| BCY8245 | 0.3            | 270 µl 的 1 mg/ml BCY8245 稀釋於 630 µl 的緩衝液<br>(載劑) |

| 試驗藥物    | 濃 度<br>(mg/ml) | 配 方                                            |
|---------|----------------|------------------------------------------------|
| 載劑      | -              | 25 mM 組胺酸(pH 7)，10%蔗糖                          |
| BCY8245 | 0.5            | 400 µl 的 1 mg/ml BCY8245 稀釋於 400 µl 組胺酸緩<br>衝液 |
| BCY8245 | 0.3            | 240 µl 的 1 mg/ml BCY8245 稀釋於 560 µl 組胺酸緩<br>衝液 |

【0402】 4.4 樣本收集

【0403】 在研究結束時，在最後一次給藥後 5 分鐘、15 分鐘、30 分鐘、60 分鐘和 120 分鐘收集第 2 組的血漿。在最後一次給藥後 5 分鐘、15 分鐘、30 分鐘、60 分鐘和 120 分鐘收集第 6 組的血漿。在最後一次給藥後 2 小時收集第 4 組和第 5 組的腫瘤。

【0404】 5. 結果

【0405】 5.1 腫瘤生長曲線

【0406】 圖 3 和圖 4 顯示腫瘤生長曲線。

【0407】 5.2 腫瘤體積紀錄

【0408】 表 8 和 9 顯示帶有 HT-1376 異體移植之 CB17-SCID 雌性小鼠隨時  
間的平均腫瘤體積

【0409】表 8：腫瘤體積對應時間之記錄

| 組別 | 治療                      | 治療起始後之天數 |        |        |        |        |        |        |        |        |        |
|----|-------------------------|----------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
|    |                         | 0        | 2      | 4      | 7      | 9      | 11     | 14     | 16     | 18     | 21     |
| 1  | 載劑, qw                  | 168±37   | 220±47 | 274±56 | 391±73 | 442±75 | 503±82 | 576±84 | 649±81 | 801±84 | 884±81 |
| 2  | BCY8245,<br>1/3 mpk, qw | 164±16   | 184±12 | 206±14 | 265±21 | 291±10 | 281±28 | 335±16 | 354±11 | 309±19 | 347±14 |

【0410】 表 9：腫瘤體積對應時間之記錄

| 組別 | 治療                     | 治療起始後之天數 |        |        |        |        |        |         |
|----|------------------------|----------|--------|--------|--------|--------|--------|---------|
|    |                        | 0        | 2      | 5      | 7      | 9      | 12     | 14      |
| 3  | 載劑, qw                 | 153±16   | 266±30 | 398±41 | 529±56 | 721±76 | 908±91 | 1069±90 |
| 4  | BCY8245,<br>3 mpk, qw  | 153±26   | 254±53 | 298±69 | 398±61 | 468±73 | 502±67 | 603±76  |
| 5  | BCY8245,<br>3 mpk, biw | 154±30   | 248±58 | 203±15 | 273±45 | 356±50 | 391±53 | 407±53  |
| 6  | BCY8245,<br>5 mpk, qw  | 153±15   | 237±41 | 228±36 | 317±31 | 394±20 | 438±31 | 465±33  |

【0411】 5.3 腫瘤生長抑制之分析

【0412】 根據治療起始後第 21 日測量的腫瘤體積，計算試驗藥物對於 HT-1376 異體移植模式的腫瘤生長抑制率。

【0413】 表 10：腫瘤生長抑制之分析

| 組別 | 治療                    | 腫 瘤 體 積<br>(mm <sup>3</sup> ) <sup>a</sup> | T/C <sup>b</sup><br>(%) | TGI<br>(%) | P 值，與載劑<br>比較   |
|----|-----------------------|--------------------------------------------|-------------------------|------------|-----------------|
| 1  | 載劑, qw                | 884±81                                     | --                      | --         | --              |
| 2  | BCY8245,<br>3 mpk, qw | 347±14                                     | 39.2                    | 74.5       | <i>p</i> <0.001 |

- a. 平均值 ± SEM
- b. 將治療組的組平均腫瘤體積除以對照組的組平均腫瘤體積，計算腫瘤生長抑制(T/C)

【0414】 表 11: 腫瘤生長抑制之分析

| 組別 | 治療                     | 腫 瘤 體 積<br>(mm <sup>3</sup> ) <sup>a</sup> | T/C <sup>b</sup><br>(%) | TGI<br>(%) | P 值，與載劑<br>比較   |
|----|------------------------|--------------------------------------------|-------------------------|------------|-----------------|
| 3  | 載劑, qw                 | 1069±90                                    | --                      | --         | --              |
| 4  | BCY8245,<br>3 mpk, qw  | 603±76                                     | 56.4                    | 50.9       | <i>p</i> <0.01  |
| 5  | BCY8245,<br>3 mpk, biw | 407±53                                     | 38.1                    | 72.3       | <i>p</i> <0.001 |
| 6  | BCY8245,<br>5 mpk, qw  | 465±33                                     | 43.5                    | 66.0       | <i>p</i> <0.001 |

a. 平均值± SEM

b. 將治療組的組平均腫瘤體積除以對照組的組平均腫瘤體積，計算腫瘤生長抑制(T/C)

【0415】 6. 結果和討論

【0416】 第 1 組和第 2 組

【0417】 本實施例評估試驗藥物對於 HT-1376 異體移植模式之治療功效。

將全部組別於多個時間點測量之腫瘤體積顯示於圖 3 以及表 8 和表 10。

【0418】 給予載劑治療之小鼠之平均腫瘤體積於第 21 日達到 884 mm<sup>3</sup>。

BCY8245 於 1 mg/kg 產生些微的抗腫瘤活性，並且從第 7 天起劑量增至 3 mg/kg 後被發現有更好的療效。

【0419】 在本實施例中，用 3mg/kg 試驗藥物的有些治療動物出現 10% 的體重減輕。

【0420】 第 3-6 組

【0421】 本實施例評估試驗藥物對於 HT-1376 異體移植模式之治療功效。  
將全部組別於多個時間點測量之腫瘤體積顯示於圖 4 以及表 9 和表 11。

【0422】 BCY8245 於 3 mg/kg, qw (TV=603 mm<sup>3</sup>, TGI=50.9%, p<0.01)、3 mg/kg, biw (TV=407 mm<sup>3</sup>, TGI=72.3%, p<0.001) 和 5 mg/kg, qw (TV=465 mm<sup>3</sup>, TGI=66.0%, p<0.001)產生顯著抗腫瘤活性。

【0423】 在本實施例中，BCY8245 於 5 mg/kg 造成治療過程中出現 10% 的動物體重減輕。

【0424】 實施例 3：BCY8245 治療 Panc2.13 異體移植(胰臟癌模式) Balb/c 裸鼠之體內功效

【0425】 1. 研究目的

【0426】 本研究之目的係評估試驗藥物治療 Panc2.13 異體移植 Balb/c 裸鼠之體內抗腫瘤功效。

【0427】 2. 實驗設計

| 組別 | 治療      | n | 劑量<br>(mg/kg) | 藥劑體積<br>(μl/g) | 給藥途徑 | 時程  |
|----|---------|---|---------------|----------------|------|-----|
| 1  | 載劑      | 5 | --            | 10             | iv   | qw  |
| 2  | BCY8245 | 3 | 3 mg/kg       | 10             | iv   | qw  |
| 3  | BCY8245 | 3 | 3 mg/kg       | 10             | iv   | biw |
| 4  | BCY8245 | 3 | 5 mg/kg       | 10             | iv   | qw  |

【0428】 3. 材料

【0429】 3.1 動物和飼養條件

【0430】 3.1.1. 動物

物種：Mus Musculus

品系：Balb/c 裸鼠

年齡：6-8 周

性別：雌性

體重：18-22 g

動物數量：包含備用小鼠為 41 隻

動物供應商：Shanghai LC Laboratory Animal Co., LTD.

#### 【0431】 3.1.2. 飼養條件

小鼠存於各自之通氣籠內，每籠 3 或 5 隻，恆溫以及恆濕。

溫度：20~26 °C

濕度：40-70%

鼠籠：聚碳酸酯製造。尺寸為 300 mm x 180 mm x 150 mm。墊料為玉米芯，每周更換 2 次。

食物：研究期間動物可自由取得輻射消毒之乾燥顆粒食物。

飲水：動物可自由取得消毒過的飲用水。

鼠籠辨識：各籠的辨識包括下列資訊：動物數、性別、品系、收貨日、治療、研究編號、組別編號、和治療始日。

動物辨識：動物均標記耳碼。

#### 【0432】 4. 實驗方法和步驟

##### 【0433】 4.1 細胞培養

【0434】 腫瘤細胞 Panc2.13 於 37°C 以及 5% CO<sub>2</sub> 環境下培養於包含 15% 熱滅活小牛血清和 10 units/ml 人類重組胰島素的 RMPI1640 培養基。腫瘤細胞每周進行 2 次繼代培養。收取指數成長期的細胞，用於腫瘤接種之計算以接種腫瘤。

【0435】 4.2 腫瘤接種

【0436】 各小鼠於右腹皮下接種 Panc2.13 腫瘤細胞( $5 \times 10^6$ )並待其發展，該些腫瘤細胞係在 0.2 ml 含有基質膠(1：1)的 PBS 中。當平均腫瘤體積約為 149 mm<sup>3</sup>時隨機分組這 41 隻動物。各組中試驗藥物之給藥和動物數量揭示於下列實驗設計表。

【0437】 4.3 製備試驗藥物配方

| 試驗藥物    | 濃 度<br>(mg/ml) | 配 方                                        |
|---------|----------------|--------------------------------------------|
| 載劑      | -              | 25 mM 組胺酸(pH 7)，10%蔗糖                      |
| BCY8245 | 0.5            | 400 µl 的 1 mg/ml BCY8245 稀釋於 400 µl 組胺酸緩衝液 |
| BCY8245 | 0.3            | 240 µl 的 1 mg/ml BCY8245 稀釋於 560 µl 組胺酸緩衝液 |

【0438】 4.4 樣本收集

【0439】 在研究結束時，在最後一次給藥後 2 小時收集所有組別的腫瘤。

【0440】 5. 結果

【0441】 5.1 腫瘤生長曲線

【0442】 圖 5 顯示腫瘤生長曲線。

【0443】 5.2 腫瘤體積紀錄

【0444】 表 12 顯示帶有 Panc2.13 異體移植之 Balb/c 雌性裸鼠隨時間的平均腫瘤體積。

【0445】 表 12：腫瘤體積對應時間之記錄

| 組別 | 治療                     | 治療起始後之天數 |        |        |        |        |        |        |
|----|------------------------|----------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
|    |                        | 0        | 2      | 4      | 7      | 9      | 11     | 14     |
| 1  | 載劑, qw                 | 149±12   | 202±12 | 240±9  | 321±17 | 410±27 | 479±32 | 545±17 |
| 2  | BCY8245,<br>3 mpk, qw  | 149±34   | 160±33 | 191±39 | 215±53 | 242±62 | 259±59 | 271±54 |
| 3  | BCY8245,<br>3 mpk, biw | 148±46   | 170±38 | 204±57 | 216±56 | 236±59 | 241±60 | 231±57 |
| 4  | BCY8245,<br>5 mpk, qw  | 149±18   | 180±11 | 231±33 | 242±34 | 248±40 | 231±37 | 238±40 |

【0446】 5.3 腫瘤生長抑制之分析

【0447】 根據治療起始後第 14 日測量的腫瘤體積，計算試驗藥物對於 Panc2.13 異體移植模式的腫瘤生長抑制率。

【0448】 表 13：腫瘤生長抑制之分析

| 組別 | 治療                     | 腫 瘤 體 積<br>(mm <sup>3</sup> ) <sup>a</sup> | T/C <sup>b</sup><br>(%) | TGI<br>(%) | <i>P</i> 值，與載劑<br>比較 |
|----|------------------------|--------------------------------------------|-------------------------|------------|----------------------|
| 1  | 載劑, qw                 | 545±17                                     | --                      | --         | --                   |
| 2  | BCY8245,<br>3 mpk, qw  | 271±54                                     | 49.6                    | 69.2       | <i>p</i> <0.01       |
| 3  | BCY8245,<br>3 mpk, biw | 231±57                                     | 42.3                    | 79.1       | <i>p</i> <0.001      |
| 4  | BCY8245,<br>5 mpk, qw  | 238±40                                     | 43.6                    | 77.5       | <i>p</i> <0.001      |

a. 平均值 ± SEM

b. 將治療組的組平均腫瘤體積除以對照組的組平均腫瘤體積，計算腫瘤生長抑制(T/C)

【0449】 6. 結果和討論

【0450】 本實施例評估試驗藥物對於 Panc2.13 異體移植模式之治療功效。將全部組別於多個時間點測量之腫瘤體積顯示於圖 5 以及表 12 和表 13。

【0451】 BCY8245 於 3 mg/kg, qw (TV=271 mm<sup>3</sup>, TGI=69.2%, p<0.01)、3 mg/kg, biw (TV=231 mm<sup>3</sup>, TGI=79.1%, p<0.001)和 5 mg/kg, qw (TV=238 mm<sup>3</sup>, TGI=77.5%, p<0.001)產生顯著抗腫瘤活性。

【0452】 實施例 4：BCY8245 治療 MDA-MB-468 異體移植(乳癌模式) Balb/c 裸鼠之體內功效

【0453】 1. 研究目的

【0454】 本研究之目的係評估 BCY8245 治療 MDA-MB-468 異體移植 Balb/c 裸鼠之體內抗腫瘤功效。

【0455】 2. 實驗設計

| 組別 | 治療      | n | 劑量<br>(mg/kg) | 藥劑體積<br>(μl/g) | 給藥途徑 | 時程  |
|----|---------|---|---------------|----------------|------|-----|
| 1  | 載劑      | 5 | --            | 10             | iv   | qw  |
| 2  | BCY8245 | 3 | 3 mg/kg       | 10             | iv   | qw  |
| 3  | BCY8245 | 3 | 3 mg/kg       | 10             | iv   | biw |
| 4  | BCY8245 | 3 | 5 mg/kg       | 10             | iv   | qw  |

【0456】 3. 材料

【0457】 3.1 動物和飼養條件

【0458】 3.1.1. 動物

物種：Mus Musculus

品系：Balb/c 裸鼠

年齡：6-8 周

性別：雌性

體重：18-22 g

動物數量：包含備用小鼠為 41 隻

動物供應商：Shanghai LC Laboratory Animal Co., LTD.

**【0459】 3.1.2. 飼養條件**

小鼠存於各自之通氣籠內，每籠 3 或 5 隻，恆溫以及恆濕。

溫度：20~26 °C

濕度：40-70%

鼠籠：聚碳酸酯製造。尺寸為 300 mm x 180 mm x 150 mm。墊料為玉米芯，

每周更換 2 次。

食物：研究期間動物可自由取得輻射消毒之乾燥顆粒食物。

飲水：動物可自由取得消毒過的飲用水。

鼠籠辨識：各籠的辨識辨識包括下列資訊：動物數、性別、品系、收貨日、

治療、研究編號、組別編號、和治療始日。

動物辨識：動物均標記耳碼。

**【0460】 4. 實驗方法和步驟**

**【0461】 4.1 細胞培養**

**【0462】** 腫瘤細胞 Panc2.13 於 37°C 以及 5% CO<sub>2</sub> 環境下培養於包含 10% 熱滅活小牛血清的 Leibovitz's L-15 培養基。腫瘤細胞每周進行 2 次繼代培養。收取指數成長期的細胞，用於腫瘤接種之計算以接種腫瘤。

【0463】 4.2 腫瘤接種

【0464】 各小鼠於右腹皮下接種 MDA-MB-468 腫瘤細胞( $10 \times 10^6$ )並待其發展，該些腫瘤細胞係在 0.2 ml 含有 50%基質膠的 PBS 中。當平均腫瘤體積約為 196 mm<sup>3</sup> 時隨機分組這 41 隻動物。各組中試驗藥物之給藥和動物數量揭示於下列實驗設計表。

【0465】 4.3 製備試驗藥物配方

| 試驗藥物    | 濃 度<br>(mg/ml) | 配 方                                        |
|---------|----------------|--------------------------------------------|
| 載劑      | -              | 25 mM 組胺酸(pH 7)，10%蔗糖                      |
| BCY8245 | 1              | 10.56 mg 的 BCY8245 溶解於 10.518 ml 組胺酸緩衝液    |
| BCY8245 | 0.5            | 400 µl 的 1 mg/ml BCY8245 稀釋於 400 µl 組胺酸緩衝液 |
| BCY8245 | 0.3            | 240 µl 的 1 mg/ml BCY8245 稀釋於 560 µl 組胺酸緩衝液 |

【0466】 4.4 樣本收集

【0467】 在研究的第 21 天，在最後一次給藥後 5 分鐘、15 分鐘、30 分鐘、60 分鐘和 120 分鐘收集第 2 組的血漿。在最後一次給藥後 2 小時收集第 1 組和第 3 組的腫瘤。第 4 組中的動物在不進行任何給藥的情況下繼續運行 21 天，並且在第 42 天收集這些組別的腫瘤。

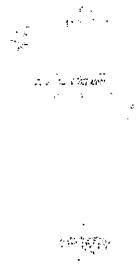
【0468】 5. 結果

【0469】 5.1 腫瘤生長曲線

【0470】 圖 6 顯示腫瘤生長曲線。

【0471】 5.2 腫瘤體積紀錄

【0472】 表 14 和表 15 顯示帶有 MDA-MB-468 異體移植之 Balb/c 雌性裸鼠隨時間的平均腫瘤體積



【0473】表 14：腫瘤體積對應時間之記錄 (第 0 天至第 21 天)

| 組別 | 治療                     | 治療起始後之天數 |        |        |        |        |        |        |        |        |        |
|----|------------------------|----------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
|    |                        | 0        | 2      | 4      | 7      | 9      | 11     | 14     | 16     | 18     | 21     |
| 1  | 載劑, qw                 | 199±6    | 217±9  | 235±15 | 274±14 | 291±14 | 314±20 | 348±24 | 374±33 | 398±39 | 447±39 |
| 2  | BCY8245,<br>3 mpk, qw  | 194±12   | 192±26 | 184±20 | 131±20 | 113±17 | 104±13 | 94±25  | 81±23  | 87±23  | 85±31  |
| 3  | BCY8245,<br>3 mpk, biw | 195±33   | 193±27 | 154±20 | 103±20 | 83±16  | 67±14  | 49±11  | 45±14  | 32±12  | 22±4   |
| 4  | BCY8245,<br>5 mpk, qw  | 199±28   | 193±11 | 135±4  | 98±5   | 58±5   | 49±5   | 47±2   | 37±4   | 35±3   | 29±3   |

【0474】表 15：腫瘤體積對應時間之記錄 (第 23 天至第 42 天)

| 組別 | 治療                    | 治療起始後之天數 |      |      |      |      |      |      |  |  |  |
|----|-----------------------|----------|------|------|------|------|------|------|--|--|--|
|    |                       | 23       | 25   | 28   | 32   | 35   | 39   | 42   |  |  |  |
| 4  | BCY8245,<br>5 mpk, qw | 35±5     | 48±5 | 37±7 | 28±6 | 24±4 | 28±6 | 26±6 |  |  |  |

【0475】 5.3 腫瘤生長抑制之分析

【0476】 根據治療起始後第 21 日測量的腫瘤體積，計算試驗藥物對於 MDA-MB-468 異體移植模式的腫瘤生長抑制率。

【0477】 表 16：腫瘤生長抑制之分析

| 組別 | 治療                     | 腫瘤體積<br>(mm <sup>3</sup> ) <sup>a</sup> | T/C <sup>b</sup><br>(%) | TGI<br>(%) | P 值，與<br>載劑比較   |
|----|------------------------|-----------------------------------------|-------------------------|------------|-----------------|
| 1  | Vehicle, qw            | 447±39                                  | --                      | --         | --              |
| 2  | BCY8245.<br>3 mpk, qw  | 85±31                                   | 18.9                    | 144.2      | <i>p</i> <0.001 |
| 3  | BCY8245.<br>3 mpk, biw | 22±4                                    | 4.9                     | 169.8      | <i>p</i> <0.001 |
| 4  | BCY8245.<br>【0478】     | 29±3                                    | 6.6                     | 168.4      | <i>p</i> <0.001 |

a. 平均值 ± SEM

b. 將治療組的組平均腫瘤體積除以對照組的組平均腫瘤體積，計算腫瘤生長抑制(T/C)

【0479】 6. 結果和討論

【0480】 本實施例評估試驗藥物對於MDA-MB-468 異體移植模式之治療功效。將全部組別於多個時間點測量之腫瘤體積顯示於圖 6 以及表 14 至表 16。

【0481】 BCY8245 於 3 mg/kg, qw (TV=85 mm<sup>3</sup>, TGI=144.2%, *p*<0.001)、3 mg/kg, biw (TV=22 mm<sup>3</sup>, TGI=169.8%, *p*<0.001)和 5 mg/kg, qw (TV=29 mm<sup>3</sup>, TGI=168.4%, *p*<0.001)時產生顯著抗腫瘤活性，其有劑量依賴性或劑量-頻率依賴性。

【0482】 從第 21 天起暫停 5 mg/kg組的給藥，在另外 3 週的監測時間表中，未見腫瘤有任何復發。

【0483】 實施例 5：BCY8549 治療NCI-H292 異體移植(非小細胞肺癌(NSCLC)模式) Balb/c裸鼠之體內功效

【0484】 1. 研究目的

【0485】 本研究之目的係評估BCY8549 治療NCI-H292 異體移植Balb/c裸鼠之體內抗腫瘤功效。

【0486】 2. 實驗設計

| 組別 | 治療      | n | 劑量<br>(mg/kg ) | 藥劑體積<br>( $\mu$ l/g) | 給藥途徑 | 時程 |
|----|---------|---|----------------|----------------------|------|----|
| 1  | 載劑      | 4 | --             | 10                   | iv   | qw |
| 2  | BCY8549 | 3 | 3              | 10                   | iv   | qw |

【0487】 3. 材料

【0488】 3.1 動物和飼養條件

【0489】 3.1.1. 動物

物種：Mus Musculus

品系：Balb/c 裸鼠

年齡：6-8 周

性別：雌性

體重：18-22 g

動物數量：包含備用小鼠為 43 隻

動物供應商：Shanghai Lingchang Biotechnology Experimental Animal Co. Ltd

**【0490】 3.1.2. 飼養條件**

小鼠存於各自之通氣籠內，每籠 3 或 4 隻，恆溫以及恆濕。

溫度：20~26℃

濕度：40-70%

鼠籠：聚碳酸酯製造。尺寸為 300 mm x 180 mm x 150 mm。墊料為玉米芯，每周更換 2 次。

食物：研究期間動物可自由取得輻射消毒之乾燥顆粒食物。

飲水：動物可自由取得消毒過的飲用水。

鼠籠辨識：各籠的辨識辨識包括下列資訊：動物數、性別、品系、收貨日、治療、研究編號、組別編號、和治療始日。

動物辨識：動物均標記耳碼。

**【0491】 4. 實驗方法和步驟****【0492】 4.1 細胞培養**

**【0493】** 腫瘤細胞NCI-H292 於 37℃ 以及 5% CO<sub>2</sub> 環境下離體單層培養於包含 10%熱滅活小牛血清的RPMI-1640 培養基。腫瘤細胞每周用胰蛋白-EDTA 進行 2 次繼代培養。收取指數成長期的細胞，用於腫瘤接種之計算以接種腫瘤。

**【0494】 4.2 腫瘤接種**

**【0495】** 各小鼠於右腹皮下接種NCI-H292 腫瘤細胞( $10 \times 10^6$ )並待其發展，該些腫瘤細胞係在 0.2 ml的PBS中。當平均腫瘤體積約為 168 mm<sup>3</sup>時隨機分組這 43 隻動物。各組中試驗藥物之給藥和動物數量顯示於下列實驗設計表。

**【0496】 製備試驗藥物配方'**

| 試驗藥物    | 濃 度<br>(mg/ml) | 配方                                        |
|---------|----------------|-------------------------------------------|
| 載劑      | --             | 25 mM 組胺酸(pH 7)，10%蔗糖                     |
| BCY8549 | 1              | 2 mg 的 BCY854 溶解於 1914 µl 載劑緩衝液           |
| BCY8549 | 0.3            | 240 µl 的 1 mg/ml BCY8549 稀釋於 560 µl 載劑緩衝液 |

【0497】 4.4 樣本收集

【0498】 在研究結束時，在最後一次給藥後 5 分鐘、15 分鐘、30 分鐘、1 小時和 2 小時收集第 2 組的血漿。

【0499】 5. 結果

【0500】 5.1 腫瘤生長曲線

【0501】 圖 7 顯示腫瘤生長曲線。

【0502】 5.2 腫瘤體積紀錄

【0503】 表 17 顯示帶有NCI-H292 異體移植之Balb/c雌性裸鼠隨時間的平均腫瘤體積。

【0504】 表 17：腫瘤體積對應時間之記錄

| 組<br>別 | 治療                    | 治療起始後之天數 |        |        |        |        |         |         |
|--------|-----------------------|----------|--------|--------|--------|--------|---------|---------|
|        |                       | 0        | 2      | 4      | 7      | 9      | 11      | 14      |
| 1      | 載劑, qw                | 168±16   | 297±48 | 362±58 | 460±62 | 548±69 | 697±102 | 843±152 |
| 2      | BCY8549,<br>3 mpk, qw | 168±30   | 187±36 | 164±31 | 205±50 | 234±57 | 240±98  | 251±66  |
| 3      | BCY8550,<br>3 mpk, qw | 167±18   | 208±21 | 237±16 | 324±35 | 421±35 | 489±44  | 545±77  |
| 4      | BCY8783,<br>3 mpk, qw | 167±28   | 182±27 | 161±40 | 137±19 | 135±22 | 97±20   | 97±19   |

|   |                       |        |        |        |        |       |       |      |
|---|-----------------------|--------|--------|--------|--------|-------|-------|------|
| 5 | BCY8784,<br>3 mpk, qw | 167±36 | 165±28 | 111±19 | 121±12 | 123±8 | 99±10 | 94±7 |
|---|-----------------------|--------|--------|--------|--------|-------|-------|------|

【0505】 5.3 腫瘤生長抑制之分析

【0506】 根據治療起始後第 14 日測量的腫瘤體積，計算試驗藥物對於 NCI-H292 異體移植模式的腫瘤生長抑制率。

【0507】 表 18：腫瘤生長抑制之分析

| 組別 | 治療                    | 腫瘤體積<br>(mm <sup>3</sup> ) <sup>a</sup> | T/C <sup>b</sup><br>(%) | TGI<br>(%) | P 值    |
|----|-----------------------|-----------------------------------------|-------------------------|------------|--------|
| 1  | 載劑, qw                | 843±152                                 | --                      | --         | --     |
| 2  | BCY8549,<br>3 mpk, qw | 251±66                                  | 29.8                    | 87.7       | p<0.05 |

- a. 平均值 ± SEM
- b. 將治療組的組平均腫瘤體積除以對照組的組平均腫瘤體積，計算腫瘤生長抑制(T/C)

【0508】 6. 結果和討論

【0509】 本實施例評估該等BCY試驗藥物對於NCI-H292 異體移植模式之治療功效。將全部組別於多個時間點測量之腫瘤體積顯示於圖 7 以及表 17 和表 18。

【0510】 給予載劑治療之小鼠之平均腫瘤體積於第 14 日達到 843 mm3。BCY8549 於 3 mg/kg時出現顯著抗腫瘤活性。在本研究中，所有的小鼠皆良好地維持了體重。

【0511】 實施例 6：研究複製數變異(CNV) 與多種腫瘤類型的Nectin-4 基因表現量之間的關聯

【0512】 方法

【0513】 1. 選擇cBioPortal(<http://www.cbioportal.org/>)中所有研究並搜尋 NECTIN4。

- (a) 移除暫時研究
- (b) 不選擇重疊樣本的研究，以防止樣本偏差(基於cBioPortal上的警告)-如果可以選擇，始終保留PanCancer研究
- (c) 選擇用於分析之研究(表 19)

【0514】 表 19：cBioPortal的統計分析以及實驗單元

| 實驗名稱                                         | 單元                                                     |
|----------------------------------------------|--------------------------------------------------------|
| 乳癌 (METABRIC, Nature 2012 & Nat Commun 2016) | mRNA 表現(微陣列)                                           |
| 侵襲性乳癌 (TCGA, PanCancer Atlas)                | 從 Illumina HiSeq_RNASeqV2 syn4976369 標準化/合併的 mRNA 表現批次 |
| 子宮體內膜癌 (TCGA, PanCancer Atlas)               | 從 Illumina HiSeq_RNASeqV2 syn4976369 標準化/合併的 mRNA 表現批次 |
| 膀胱尿道上皮癌 (TCGA, PanCancer Atlas)              | RSEM(從 Illumina HiSeq_RNASeqV2 標準化的批次)                 |
| 肺腺癌 (TCGA, PanCancer Atlas)                  | mRNA 表現，RSEM (從 Illumina HiSeq_RNASeqV2 標準化的批次)        |
| 子宮頸鱗狀細胞癌 (TCGA, PanCancer Atlas)             | RSEM(從 Illumina HiSeq_RNASeqV2 標準化的批次)                 |

|                                 |                                                        |
|---------------------------------|--------------------------------------------------------|
| 肺鱗狀細胞癌 (TCGA, PanCancer Atlas)  | 從 Illumina HiSeq_RNASeqV2 syn4976369 標準化/合併的 mRNA 表現批次 |
| 頭頸鱗狀細胞癌 (TCGA, PanCancer Atlas) | mRNA 表現，RSEM (從 Illumina HiSeq_RNASeqV2 標準化的批次)        |
| 胰臟腺癌 (TCGA, PanCancer Atlas)    | 從 Illumina HiSeq_RNASeqV2 syn4976369 標準化/合併的 mRNA 表現批次 |
| 甲狀腺癌 (TCGA, PanCancer Atlas)    | 從 Illumina HiSeq_RNASeqV2 syn4976369 標準化/合併的 mRNA 表現批次 |
| 結腸腺癌 (TCGA, PanCancer Atlas)    | RSEM (從 Illumina HiSeq_RNASeqV2 標準化的批次)                |
| 胸腺瘤 (TCGA, PanCancer Atlas)     | 從 Illumina HiSeq_RNASeqV2 syn4976369 標準化/合併的 mRNA 表現批次 |
| 肉瘤 (TCGA, PanCancer Atlas)      | 從 Illumina HiSeq_RNASeqV2 syn4976369 標準化/合併的 mRNA 表現批次 |
| 胃腺癌 (TCGA, PanCancer Atlas)     | 從 Illumina HiSeq_RNASeqV2 syn4976369 標準化/合併的 mRNA 表現批次 |
| 前列腺腺癌 (TCGA, PanCancer Atlas)   | mRNA 表現，RSEM (從 Illumina HiSeq_RNASeqV2 標準化的批次)        |

|                                                                  |                                                        |
|------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------|
| 腎臟難染腺瘤 (TCGA, PanCancer Atlas)                                   | mRNA 表現，RSEM (從 Illumina HiSeq_RNASeqV2 標準化的批次)        |
| 直腸腺癌 (TCGA, PanCancer Atlas)                                     | 從 Illumina HiSeq_RNASeqV2 syn4976369 標準化/合併的 mRNA 表現批次 |
| 轉移性前列腺癌，SU2C/PCF Dream Team (Robinson <i>et al.</i> , Cell 2015) | mRNA 表現/捕捉(RNA Seq RPKM)                               |
| 嗜鉻細胞瘤和副神經節瘤 (TCGA, PanCancer Atlas)                              | 從 Illumina HiSeq_RNASeqV2 syn4976369 標準化/合併的 mRNA 表現批次 |
| 腎臟透明細胞癌 (TCGA, PanCancer Atlas)                                  | mRNA 表現，RSEM (從 Illumina HiSeq_RNASeqV2 標準化的批次)        |
| 前列腺腺癌 (Fred Hutchinson CRC, Nat Med 2016)                        | mRNA 表現                                                |
| 結腸直腸腺癌 (TCGA, Nature 2012)                                       | RNA Seq RPKM                                           |
| 卵巢漿液囊腺癌 (TCGA, PanCancer Atlas)                                  | 從 Illumina HiSeq_RNASeqV2 syn4976369 標準化/合併的 mRNA 表現批次 |
| 腎臟乳突細胞癌 (TCGA, PanCancer Atlas)                                  | mRNA 表現，RSEM (從 Illumina HiSeq_RNASeqV2 標準化的批次)        |
| 腦低級別膠質瘤 (TCGA, PanCancer Atlas)                                  | RSEM (從 Illumina HiSeq_RNASeqV2 標準化的批次)                |

|                                     |                                                        |
|-------------------------------------|--------------------------------------------------------|
| 食道腺癌 (TCGA, PanCancer Atlas)        | RSEM (從 Illumina HiSeq_RNASeqV2 標準化的批次)                |
| 腎上腺皮質癌 (TCGA, PanCancer Atlas)      | RSEM (從 Illumina HiSeq_RNASeqV2 標準化的批次)                |
| 多形神經膠胚細胞瘤 (TCGA, PanCancer Atlas)   | mRNA 表現，RSEM (從 Illumina HiSeq_RNASeqV2 標準化的批次)        |
| 前列腺腺癌 (MSKCC, Cancer Cell 2010)     | mRNA 表現                                                |
| 子宮癌肉瘤 (TCGA, PanCancer Atlas)       | 從 Illumina HiSeq_RNASeqV2 syn4976369 標準化/合併的 mRNA 表現批次 |
| 急性骨髓性白血病 (TCGA, PanCancer Atlas)    | mRNA 表現，RSEM (從 Illumina HiSeq_RNASeqV2 標準化的批次)        |
| 皮膚黑色素瘤 (TCGA, PanCancer Atlas)      | 從 Illumina HiSeq_RNASeqV2 syn4976369 標準化/合併的 mRNA 表現批次 |
| 中皮瘤 (TCGA, PanCancer Atlas)         | 從 Illumina HiSeq_RNASeqV2 syn4976369 標準化/合併的 mRNA 表現批次 |
| 膽管癌 (TCGA, PanCancer Atlas)         | RSEM (從 Illumina HiSeq_RNASeqV2 標準化的批次)                |
| 小兒急性淋巴白血病 - 二期 (TARGET, 2018)       | NECTIN4：mRNA 表現 (RNA-Seq RPKM)                         |
| 瀰漫大 B 細胞淋巴瘤 (TCGA, PanCancer Atlas) | mRNA 表現，RSEM (從 Illumina HiSeq_RNASeqV2 標準化的批次)        |

|                                      |                                                            |
|--------------------------------------|------------------------------------------------------------|
| 細胞株資料庫 (Novartis/Broad, Nature 2012) | mRNA 表現(微陣列)                                               |
| 葡萄膜黑色素瘤 (TCGA, PanCancer Atlas)      | 從 Illumina HiSeq_RNASeqV2 syn4976369 標準化/合併的 mRNA 表現批次     |
| 小兒威爾姆氏瘤 (TARGET, 2018)               | NECTIN4 : mRNA 表現 (RNA-Seq RPKM)                           |
| 睪丸生殖細胞瘤 (TCGA, PanCancer Atlas)      | 從 Illumina HiSeq_RNASeqV2 syn4976369 標準化/合併的 mRNA 表現批次     |
| 肝細胞癌 (TCGA, PanCancer Atlas)         | NECTIN4 : mRNA 表現, RSEM (從 Illumina HiSeq_RNASeqV2 標準化的批次) |

【0515】 2. cBioPortal輸出的CNV和RNA表現量數據

【0516】 3. 檢測CNV是否與Nectin-4 之mRNA表現量具有統計學上顯著相關(不應用log2)

(a) 於GraphPad Prism (7.04)以及R/R studio執行非參數Kruskal-Wallis 檢定(顯著性臨界值： $p<0.01$ )

(i) GraphPad Prism：設定表格，執行無配對之非參數檢定，不預設高斯分佈

(ii) R使用的包裹

- 1. XLConnect
- 2. Dplyr

### 3. Kruskal-Wallis秩和檢定：Kruskal.test.

【0517】 4. 於R/Rstudio使用鄧恩檢定調整多重比較(包括全部可能比較，即使組別 $n=1$ )(顯著性臨界值： $p<0.025$ )

【0518】 (a) 鄧恩多重比較法=“bonferonni”

【0519】 結果

【0520】 結果顯示於下表 20。在報導Nectin-4 的腫瘤CNV和mRNA基因表現資料的 41 個公開TCGA資料組中，有許多跡象表明，報導的病例中Nectin-4 複製數增加(2-3 複製數)或擴增(>3 複製數)。另外，不同病例已被證明具有淺度缺失(shallow-deletion) (<2 複製數)，但對於包含深度缺失(>1 複製數喪失或Nectin-4 雙對偶基因喪失)的腫瘤的報導則較不常見。最常檢測到擴增的適應症為乳癌(10-22%)、膀胱癌(20%)、肺癌(5-7%)和肝細胞癌(8%)。最常檢測到複製數喪失的適應症為腎臟難染腺瘤(77%)、腎臟透明細胞癌(RCC)(6.5%)、肉瘤(10%)、結腸癌(10%)、頭頸癌(7%)和肺鱗狀癌。這些資料表明在腫瘤適應症內和之間存在一定範圍的CNV，並且在不同適應症之間存在多種複製數模式。

【0521】 除了TCGA資料組內的CNV外，每個適應症的Nectin-4 mRNA中位表現量涵蓋約  $2^{10}$  範圍。因此，鑒於Nectin-4 mRNA表現量的範圍和在腫瘤類型之間和內部觀察到的CNV，進行統計檢定以辨別在單獨TCGA資料組/適應症中Nectin-4 mRNA量與Nectin-4 CNV之間的潛在關係。各適應症之腫瘤分類為下列五種類別其中之一：

a) 深度缺失；

b) 淺度缺失；

c) 二倍體；

d) 增加；或

e) 擴增。

【0522】而後執行Kruskall-Wallis檢定，偵測各組mRNA表現量分布是否具有差異( $P < 0.01$ )。針對 $P < 0.01$ 的TCGA數據組別以及辨識哪一組與其他不同，藉由計算Z-統計以及調整計算P值(Bonferroni)而執行事後檢定(post-hoc testing)。為簡單解釋，檢閱配對比較和各適應症二倍體(儘管計算了所有成對的P值)。18/41 的TCGA實驗中，針對增加相對於二倍體及/或擴增相對於二倍體，具有 $<0.01$ 的Kruskall-Wallis p值和 $<0.025$ 的Bonferroni p值，顯示Nectin-4 mRNA表現量的增加與Nectin-4 複製數的增加有關。這 18 項實驗中代表了 14 種獨立的腫瘤組織學：

乳癌、子宮癌、膀胱癌、肺腺癌、肺鱗狀癌、子宮頸癌、頭頸癌、胰臟癌、甲狀腺癌、結腸直腸癌、胸腺瘤、肉瘤、腎透明細胞癌(RCC)和胃癌。

【0523】此外，有 6 項實驗mRNA的減少與複製數的喪失有關。這 6 項實驗中的 4 項實驗不僅顯示了CNV喪失和表現量減少之間的關聯，也報導了CNV的增加與高表現量有關：

胃癌、肺鱗狀癌、結腸癌和甲狀腺癌。

【0524】而腎臟難染腺瘤和前列腺癌這兩種適應症被報導維和CNV喪失及低轉錄本豐度有關。此外，還有一項單獨的前列腺癌研究(Metastatic Prostate Cancer, SU2C/PCF Dream Team (Robinson et al., Cell 2015))顯示複製數的增加與高表現量(相對於二倍體)相關。

【0525】這些被觀察到與mRNA表現量相關的腫瘤CNV減少和增加可能代表了在觀察到這些關聯的適應症中Nectin-4 腫瘤蛋白表現量背後的機制。顯然

地，仍有適應症不如預期，其CNV似乎對mRNA表現量沒有影響，該適應症舉例為肝細胞癌。已經證明，使用本發明某些Nectin-4 雙環藥物結合物的體內臨床前療效與Nectin-4 蛋白表現量相關，其藉由IHC測定。因此，如果腫瘤Nectin-4 的CNV與mRNA含量相關並且預測蛋白質表現量，則具有複製數增加(增加或擴增)的腫瘤的病患更有可能對本發明的Nectin-4 雙環藥物結合物有反應。如果可以辨別出對Nectin-4 具有增加的CNV的患者，那麼該資訊可用在選擇用本發明的Nectin-4 雙環藥物結合物治療的患者。

【0526】 表 20：複製數變異(CNV)與Nectin-4 基因表現量間之關聯研究結果

|                                                               |                                                                      | 樣本數/組(n=X) |           |          |     |     |                          | Kruskal-Wallis<br>檢定 |                    | 配對比較，Z 統計檢定(調整 p<br>值)，Bonferonni |                                |                               |  |  |
|---------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|------------|-----------|----------|-----|-----|--------------------------|----------------------|--------------------|-----------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|--|--|
| 實驗名稱                                                          | 單元                                                                   | 深度<br>缺失   | 淺 度<br>缺失 | 二 倍<br>體 | 增 加 | 擴增  | Kruska<br>l-wallis<br>統計 | P 值                  | 深度缺<br>失 - 二<br>倍體 | 二倍體<br>- 淺度<br>缺失                 | 二 倍<br>體 - 增<br>加              | 擴增 -<br>二 倍<br>體              |  |  |
| 乳 癌<br>(METABRI<br>C, Nature<br>2012 & Nat<br>Commun<br>2016) | mRNA 表現<br>(微陣列)                                                     | 0          | 11        | 745      | 706 | 404 | 380.4                    | <<br>2.2e-1<br>6     | N/A                | 0.56878<br>2<br>(1.0000<br>)      | -11.89<br>096<br>(0.000<br>0)* | 18.850<br>85<br>(0.000<br>0)* |  |  |
|                                                               | 從 Illumina<br>HiSeq_RNAS<br>eqV2<br>syn4976369<br>標準化/合併<br>的 mRNA 表 | 0          | 13        | 244      | 640 | 97  | 219.5                    | <<br>2.2e-1<br>6     | N/A                | 1.18608<br>9<br>(0.7068<br>)      | -12.30<br>176<br>(0.000<br>0)* | 12.074<br>32<br>(0.000<br>0)* |  |  |

|                                               | 現批次                                                                         |   |    |     |     |    |        |                  |     |  |  |                              |                                |  |                               |  |  |
|-----------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|---|----|-----|-----|----|--------|------------------|-----|--|--|------------------------------|--------------------------------|--|-------------------------------|--|--|
| 子宮體內膜<br>癌 (TCGA,<br>PanCancer<br>Atlas)      | 從 Illumina<br>HiSeq_RNAS<br>eqV2<br>syn4976369<br>標準化/合併<br>的 mRNA 表<br>現批次 | 0 | 5  | 274 | 210 | 18 | 76.392 | <<br>2.2e-1<br>6 | N/A |  |  | 1.13085<br>4<br>(0.7743<br>) | -7.274<br>308<br>(0.000<br>0)* |  | 5.6012<br>60<br>(0.000<br>0)* |  |  |
| 膀胱尿道上<br>皮 癌<br>(TCGA,<br>PanCancer<br>Atlas) | RSEM( 從<br>Illumina<br>HiSeq_RNAS<br>eqV2 標準化<br>的批次)                       | 0 | 16 | 171 | 145 | 70 | 67.078 | 1.80E-<br>14     | N/A |  |  | 0.06090<br>7<br>(1.0000<br>) | -3.323<br>839<br>(0.002<br>7)* |  | 8.0542<br>69<br>(0.000<br>0)* |  |  |
| 肺 腺 癌<br>(TCGA,<br>PanCancer<br>Atlas)        | mRNA 表<br>現·RSEM(從<br>Illumina                                              | 0 | 9  | 129 | 332 | 33 | 59.578 | 7.24E-<br>13     | N/A |  |  | 0.23720<br>0<br>(1.0000      | -6.244<br>156<br>(0.000        |  | 6.2472<br>28<br>(0.000        |  |  |

| Atlas)                                         | HiSeq_RNAS<br>eqV2 標準化<br>的批次)                                              |   |    |     |     |    |        |              |     |  |  |  | )                              | 0)*                                   | 0)*                           |
|------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|---|----|-----|-----|----|--------|--------------|-----|--|--|--|--------------------------------|---------------------------------------|-------------------------------|
| 子宮頸鱗狀<br>細胞 癌<br>(TCGA,<br>PanCancer<br>Atlas) | RSEM ( 從<br>Illumina<br>HiSeq_RNAS<br>eqV2 標準化<br>的批次)                      | 0 | 7  | 115 | 147 | 6  | 51.372 | 4.08E-<br>11 | N/A |  |  |  | 1.09374<br>9<br>(0.8222<br>)   | -6.170<br>067<br>(0.000<br>0)*<br>4)* | 3.8152<br>96<br>(0.000<br>0)* |
| 肺鱗狀細胞<br>癌 (TCGA,<br>PanCancer<br>Atlas)       | 從 Illumina<br>HiSeq_RNAS<br>eqV2<br>syn4976369<br>標準化/合併<br>的 mRNA 表<br>現批次 | 0 | 22 | 199 | 222 | 23 | 42.128 | 3.77E-<br>09 | N/A |  |  |  | 2.81975<br>9<br>(0.0144<br>)*) | -3.034<br>709<br>(0.007<br>2)*<br>0)* | 4.8606<br>29<br>(0.000<br>0)* |
| 頭頸鱗狀細<br>胞 癌<br>(TCGA,                         | mRNA 表<br>現, RSEM (從<br>Illumina                                            | 0 | 32 | 330 | 122 | 4  | 37.81  | 3.10E-<br>08 | N/A |  |  |  | 1.73686<br>7                   | -4.848<br>550                         | 3.0330<br>83                  |

|                              |                                                          |   |   |     |    |   |        |          |     |  |  |                      |                       |                      |
|------------------------------|----------------------------------------------------------|---|---|-----|----|---|--------|----------|-----|--|--|----------------------|-----------------------|----------------------|
| PanCancer Atlas)             | HiSeq_RNAS eqV2 標準化的批次)                                  |   |   |     |    |   |        |          |     |  |  | (0.2472 )            | (0.000 0)*            | (0.007 3)*           |
| 胰臟腺癌 (TCGA, PanCancer Atlas) | 從 Illumina HiSeq_RNAS eqV2 syn4976369 標準化/合併的 mRNA 表 現批次 | 0 | 7 | 105 | 50 | 6 | 36.863 | 4.92E-08 | N/A |  |  | 1.33319 3 (0.5474 )  | -4.388 701 (0.000 0)* | 4.1664 01 (0.000 1)* |
|                              |                                                          |   |   |     |    |   |        |          |     |  |  |                      |                       |                      |
| 甲狀腺癌 (TCGA, PanCancer Atlas) | 從 Illumina HiSeq_RNAS eqV2 syn4976369 標準化/合併的 mRNA 表 現批次 | 0 | 3 | 451 | 26 | 0 | 31.882 | 1.19E-07 | N/A |  |  | 2.48672 4 (0.0193 )* | -5.021 279 (0.000 0)* | N/A                  |
|                              |                                                          |   |   |     |    |   |        |          |     |  |  |                      |                       |                      |

|                                       |                                                                             |   |    |     |    |    |        |              |     |                                |                                |                               |
|---------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|---|----|-----|----|----|--------|--------------|-----|--------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|
| 結腸腺癌<br>(TCGA,<br>PanCancer<br>Atlas) | RSEM ( 從<br>Illumina<br>HiSeq_RNAS<br>eqV2 標準化<br>的批次)                      | 0 | 40 | 266 | 80 | 2  | 31.309 | 7.32E-<br>07 | N/A | 3.81162<br>1<br>(0.0004<br>)*) | -2.987<br>223<br>(0.008<br>4)* | 1.7595<br>08<br>(0.235<br>5)  |
| 胸腺瘤<br>(TCGA,<br>PanCancer<br>Atlas)  | 從 Illumina<br>HiSeq_RNAS<br>eqV2<br>syn4976369<br>標準化/合併<br>的 mRNA 表<br>現批次 | 0 | 0  | 95  | 22 | 2  | 26.213 | 2.03E-<br>06 | N/A | N/A                            | -4.962<br>115<br>(0.000<br>0)* | 1.5675<br>41<br>(0.175<br>5)  |
| 肉瘤<br>(TCGA,<br>PanCancer<br>Atlas)   | 從 Illumina<br>HiSeq_RNAS<br>eqV2<br>syn4976369<br>標準化/合併<br>的 mRNA 表        | 0 | 22 | 120 | 74 | 14 | 26.831 | 6.39E-<br>06 | N/A | -0.4108<br>50<br>(1.0000<br>)  | -4.582<br>047<br>(0.000<br>0)* | 3.1062<br>62<br>(0.005<br>7)* |

|                                        | 現批次                                                                         |   |    |     |     |   |        |               |                               |                                    |                                |                               |  |  |  |  |  |
|----------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|---|----|-----|-----|---|--------|---------------|-------------------------------|------------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|--|--|--|--|--|
| 胃 腺 癌<br>(TCGA,<br>PanCancer<br>Atlas) | 從 Illumina<br>HiSeq_RNAS<br>eqV2<br>syn4976369<br>標準化/合併<br>的 mRNA 表<br>現批次 | 0 | 11 | 253 | 134 | 9 | 19.096 | 0.0002<br>611 | N/A                           | 2.83565<br>8<br>(0.0137<br>)<br>)* | -2.921<br>683<br>(0.010<br>4)* | -0.265<br>333<br>(1.000<br>0) |  |  |  |  |  |
|                                        |                                                                             |   |    |     |     |   |        |               |                               |                                    |                                |                               |  |  |  |  |  |
| 前列腺腺癌<br>(TCGA,<br>PanCancer<br>Atlas) | mRNA 表<br>現, RSEM (從<br>Illumina<br>HiSeq_RNAS<br>eqV2 標準化<br>的批次)          | 3 | 15 | 437 | 29  | 3 | 19.125 | 0.0007<br>426 | -2.5327<br>34<br>(0.0566<br>) | 3.20276<br>4<br>(0.0068<br>)<br>)* | -1.351<br>661<br>(0.882<br>4)  | 0.5091<br>51<br>(1.000<br>0)  |  |  |  |  |  |
|                                        |                                                                             |   |    |     |     |   |        |               |                               |                                    |                                |                               |  |  |  |  |  |
| 腎臟難染腺<br>瘤 (TCGA,                      | mRNA 表<br>現, RSEM (從                                                        | 0 | 50 | 14  | 1   | 0 | 13.851 | 0.0009<br>823 | N/A                           | 3.60973                            | -0.058                         | N/A                           |  |  |  |  |  |

|                                                          |                                                         |   |    |    |    |   |        |              |     |  |                               |                                      |                               |
|----------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|---|----|----|----|---|--------|--------------|-----|--|-------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------|
| PanCancer Atlas)                                         | Illumina HiSeq_RNAS eqV2 標準化的批次)                        |   |    |    |    |   |        |              |     |  | 5<br>(0.0005)*<br>0)          | 395<br>(1.000<br>0)                  |                               |
| 直腸腺癌 (TCGA, PanCancer Atlas)                             | 從 Illumina HiSeq_RNAS eqV2 syn4976369 標準化/合併的 mRNA 表現批次 | 0 | 11 | 91 | 33 | 1 | 14.056 | 0.0028<br>3  | N/A |  | 1.05076<br>0<br>(0.8801)<br>) | -2.951<br>363<br>(0.009<br>5)*<br>1) | 1.8095<br>06<br>(0.211<br>)   |
| 轉移性前列腺癌，SU2C/PCF Dream Team (Robinson et al., Cell 2015) | mRNA 表現/捕捉 (RNA Seq RPKM)                               | 0 | 3  | 75 | 37 | 2 | 12.336 | 0.0063<br>17 | N/A |  | 0.04005<br>8<br>(1.0000<br>)  | -3.420<br>479<br>(0.001<br>9)*<br>0) | -0.362<br>109<br>(1.000<br>0) |

|                                                       |                                                                             |   |    |     |    |   |        |              |     |                                            |                                           |                                    |
|-------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|---|----|-----|----|---|--------|--------------|-----|--------------------------------------------|-------------------------------------------|------------------------------------|
| 嗜鉻細胞瘤<br>和副神經節<br>瘤 (TCGA,<br>PanCancer<br>Atlas)     | 從 Illumina<br>HiSeq_RNAS<br>eqV2<br>syn4976369<br>標準化/合併<br>的 mRNA 表<br>現批次 | 0 | 14 | 123 | 19 | 5 | 11.573 | 0.0089<br>98 | N/A | -1.2713<br>08<br>(0.6109<br>)<br>1)        | -2.597<br>791<br>(0.028<br>)<br>1)        | 2.2019<br>70<br>(0.083<br>)<br>0)  |
| 腎臟透明細<br>胞 癌<br>(TCGA,<br>PanCancer<br>Atlas)         | mRNA 表<br>現·RSEM (從<br>Illumina<br>HiSeq_RNAS<br>eqV2 標準化<br>的批次)           | 0 | 22 | 297 | 32 | 1 | 11.314 | 0.0101<br>4  | N/A | -0.7483<br>80<br>(1.0000<br>)<br>2)*<br>9) | -2.996<br>852<br>(0.008<br>)<br>2)*<br>9) | 1.5024<br>64<br>(0.398<br>)<br>9)  |
| 前列腺腺癌<br>(Fred<br>Hutchinson<br>CRC, Nat<br>Med 2016) | mRNA 表現                                                                     | 0 | 1  | 59  | 66 | 7 | 9.8842 | 0.0195<br>8  | N/A | 0.67773<br>7<br>(1.0000<br>)<br>)          | -0.409<br>530<br>(1.000<br>)<br>0)        | 3.0287<br>93<br>(0.007<br>)<br>4)* |

|                                 |                                                                             |   |    |     |     |   |        |             |                              |                               |                               |                              |
|---------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|---|----|-----|-----|---|--------|-------------|------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|------------------------------|
| 結腸直腸腺癌 (TCGA, Nature 2012)      | RNA Seq<br>RPKM                                                             | 0 | 4  | 153 | 34  | 2 | 9.4054 | 0.02        | N/A                          | 0.06289<br>4<br>(1.0000<br>)  | -1.860<br>678<br>(0.188<br>4) | 2.5146<br>53<br>(0.035<br>7) |
| 卵巢漿液囊腺癌 (TCGA, PanCancer Atlas) | 從 Illumina<br>HiSeq_RNAS<br>eqV2<br>syn4976369<br>標準化/合併<br>的 mRNA 表<br>現批次 | 0 | 7  | 75  | 117 | 2 | 9.3101 | 0.0254<br>4 | N/A                          | 1.58903<br>5<br>(0.3362<br>)  | -2.168<br>253<br>(0.090<br>4) | 0.0627<br>06<br>(1.000<br>0) |
| 腎臟乳突細胞癌 (TCGA, PanCancer Atlas) | mRNA 表<br>現, RSEM (從<br>Illumina<br>HiSeq_RNAS<br>eqV2 標準化<br>的批次)          | 1 | 19 | 239 | 15  | 0 | 9.1134 | 0.0278<br>2 | 1.60776<br>4<br>(0.3237<br>) | -0.5699<br>38<br>(1.0000<br>) | -2.552<br>083<br>(0.032<br>1) | N/A                          |

|                                               |                                                        |   |    |     |    |   |        |        |     |                              |                               |                              |
|-----------------------------------------------|--------------------------------------------------------|---|----|-----|----|---|--------|--------|-----|------------------------------|-------------------------------|------------------------------|
| 腦低級別膠<br>質 瘤<br>(TCGA,<br>PanCancer<br>Atlas) | RSEM ( 從<br>Illumina<br>HiSeq_RNAS<br>eqV2 標準化<br>的批次) | 0 | 11 | 462 | 32 | 2 | 4.769  | 0.1895 | N/A | 0.46246<br>2<br>(1.0000<br>) | -1.718<br>955<br>(0.256<br>9) | 1.2619<br>60<br>(0.620<br>9) |
| 食道腺 癌<br>(TCGA,<br>PanCancer<br>Atlas)        | RSEM ( 從<br>Illumina<br>HiSeq_RNAS<br>eqV2 標準化<br>的批次) | 0 | 8  | 78  | 86 | 9 | 4.267  | 0.234  | N/A | 0.74744<br>1<br>(1.0000<br>) | -0.768<br>855<br>(1.000<br>0) | 1.7569<br>11<br>(0.236<br>8) |
| 腎上腺皮質<br>癌 (TCGA,<br>PanCancer<br>Atlas)      | RSEM ( 從<br>Illumina<br>HiSeq_RNAS<br>eqV2 標準化<br>的批次) | 0 | 9  | 54  | 11 | 2 | 4.0298 | 0.2583 | N/A | 0.15728<br>1<br>(1.0000<br>) | -0.131<br>234<br>(1.000<br>0) | 1.9848<br>00<br>(0.141<br>5) |
| 多形神經膠<br>胚 細 胞 瘤<br>(TCGA,                    | mRNA 表<br>現·RSEM(從<br>Illumina                         | 0 | 3  | 115 | 27 | 0 | 2.6252 | 0.2691 | N/A | 0.18019<br>4                 | -1.593<br>755                 | N/A                          |

|                                 |                                              |   |   |     |    |   |         |        |     |  |  |  |                     |                      |                     |
|---------------------------------|----------------------------------------------|---|---|-----|----|---|---------|--------|-----|--|--|--|---------------------|----------------------|---------------------|
| PanCancer Atlas)                | HiSeq_RNAS eqV2 標準化的批次)                      |   |   |     |    |   |         |        |     |  |  |  | (1.0000 )           | (0.166 5)            |                     |
| 前列腺腺癌 (MSKCC, Cancer Cell 2010) | mRNA 表現                                      | 0 | 3 | 78  | 4  | 0 | 2.181   | 0.3361 | N/A |  |  |  | 1.42320 6 (0.2320 ) | 0.4544 33 (0.974 3)  | N/A                 |
|                                 | 從 Illumina                                   | 0 | 4 | 14  | 37 | 1 | 3.308   | 0.3465 | N/A |  |  |  | 0.10428 5 (1.0000 ) | -0.539 065 (1.000 0) | 1.7643 53 (0.233 0) |
|                                 | HiSeq_RNAS eqV2 syn4976369 標準化/合併的 mRNA 表現批次 |   |   |     |    |   |         |        |     |  |  |  |                     |                      |                     |
| 子宮癌肉瘤 (TCGA, PanCancer Atlas)   | mRNA 表現                                      | 0 | 0 | 163 | 2  | 0 | 0.82638 | 0.3633 | N/A |  |  |  | N/A                 | 0.9090 52 (0.181     | N/A                 |
| 急性骨髓性白血 病 (TCGA,                | mRNA 表現, RSEM (從 Illumina                    |   |   |     |    |   |         |        |     |  |  |  |                     |                      |                     |

[illegible]

|                                            |                                                   |   |   |    |    |   |        |        |     |                        |                                         |                         |
|--------------------------------------------|---------------------------------------------------|---|---|----|----|---|--------|--------|-----|------------------------|-----------------------------------------|-------------------------|
| 膽管癌<br>(TCGA, PanCancer Atlas)             | RSEM (從 Illumina HiSeq_RNAS eqV2 標準化的批次)          | 0 | 0 | 13 | 18 | 5 | 1.3058 | 0.5205 | N/A | N/A                    | -0.653 55<br>051 (0.393 4)<br>(0.770 6) | 1.1210                  |
| 小兒急性淋<br>巴白血病 -<br>二期<br>(TARGET, 2018)    | NECTIN4 : mRNA 表現 (RNA-Seq RPKM)                  | 0 | 4 | 66 | 10 | 1 | 2.2337 | 0.5253 | N/A | 0.13339 9<br>(1.0000 ) | -0.504 875<br>(1.000 0)                 | -1.375 728<br>(0.506 7) |
| 瀰漫大 B 細<br>胞淋巴瘤<br>(TCGA, PanCancer Atlas) | mRNA 表現, RSEM (從 Illumina HiSeq_RNAS eqV2 標準化的批次) | 0 | 2 | 25 | 9  | 1 | 1.4939 | 0.6837 | N/A | 0.37464 2<br>(1.0000 ) | 1.1703 26<br>(0.725 6)                  | -0.405 844<br>(1.000 0) |

|                                             |                                                                             |   |     |     |     |    |              |        |                               |                              |                               |                               |
|---------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------|---|-----|-----|-----|----|--------------|--------|-------------------------------|------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| 細胞株資料<br>庫<br>(Novartis/Broad, Nature 2012) | mRNA 表現<br>(微陣列)                                                            | 1 | 112 | 396 | 319 | 49 | 1.9013       | 0.7539 | -0.3982<br>04<br>(1.0000<br>) | 0.56242<br>7<br>(1.0000<br>) | -0.847<br>920<br>(1.000<br>0) | -0.379<br>251<br>(1.000<br>0) |
| 葡萄膜黑色素<br>素瘤(TCGA,<br>PanCancer<br>Atlas)   | 從 Illumina<br>HiSeq_RNAS<br>eqV2<br>syn4976369<br>標準化/合併<br>的 mRNA 表<br>現批次 | 0 | 0   | 72  | 8   | 0  | 0.06791<br>4 | 0.7944 | N/A                           | N/A                          | -0.260<br>603<br>(0.397<br>2) | N/A                           |
| 小兒威爾姆<br>氏<br>(TARGET,<br>2018)             | NECTIN4 :<br>mRNA 表現<br>(RNA-Seq<br>RPKM)                                   | 0 | 1   | 50  | 46  | 4  | 0.78538      | 0.853  | N/A                           | 0.16502<br>1<br>(1.0000<br>) | -0.815<br>915<br>(1.000<br>0) | -0.090<br>701<br>(1.000<br>0) |

|                                   |                                                                 |   |   |    |     |    |         |        |     |                               |                              |                              |
|-----------------------------------|-----------------------------------------------------------------|---|---|----|-----|----|---------|--------|-----|-------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| 睪丸生殖細胞<br>(TCGA, PanCancer Atlas) | 從 Illumina HiSeq_RNAS eqV2 syn4976369 標準化/合併的 mRNA 表<br>現批次     | 0 | 1 | 76 | 67  | 0  | 0.14279 | 0.9311 | N/A | -0.3669<br>69<br>(1.0000<br>) | 0.0612<br>16<br>(1.000<br>0) | N/A                          |
| 肝細胞癌<br>(TCGA, PanCancer Atlas)   | NECTIN4 : mRNA 表<br>現, RSEM (從 Illumina HiSeq_RNAS eqV2 標準化的批次) | 0 | 1 | 89 | 224 | 34 | 0.2908  | 0.9618 | N/A | 0.08241<br>8<br>(1.0000<br>)  | 0.1889<br>61<br>(1.000<br>0) | 0.3633<br>41<br>(1.000<br>0) |

【0527】 實施例7：Nectin-4在6個細胞株中的表現分析

【0528】 1. 研究目的

【0529】 本研究之目的係藉由流式細胞儀分析法評估Nectin-4在6個細胞株中的表現，包括2種乳癌細胞株(T-47D、MDA-MB-468)、3種肺癌細胞株(NCI-H292、NCI-H322、NCI-H526)和1種纖維肉瘤細胞株(HT-1080)。

【0530】 2.平台設計

【0531】 針對在T-47D、MDA-MB-468、NCI-H292、NCI-H322 和HT-1080 中的FCM平台。

| 螢光染劑 | 空白 | 同種型   | 平台       |
|------|----|-------|----------|
| PE   | -  | 同種型對照 | Nectin-4 |

【0532】 NCI-H526的平台

| 螢光染劑  | 空白    | 同種型   | 平台       |
|-------|-------|-------|----------|
| PE    | -     | 同種型對照 | Nectin-4 |
| BV421 | 活/死細胞 | 活/死細胞 | 活/死細胞    |

【0533】 3. 材料

【0534】 3.1 樣本

【0535】 細胞株列表

| 項目 | 細胞株   | 癌症種類 | 廠商               | 培養特徵 | 培養基                                       |
|----|-------|------|------------------|------|-------------------------------------------|
| 1  | T-47D | 乳癌   | ATCC-HT<br>B-133 | 附著型  | RPMI-1640+0.2<br>Units/ml 牛胰島素<br>+10%FBS |

|   |            |      |                 |         |                                         |
|---|------------|------|-----------------|---------|-----------------------------------------|
| 2 | MDA-MB-468 | 乳癌   | ATCC-HT B-132   | 附著型     | Leibovitz's L-15+10%FBS                 |
| 3 | NCI-H292   | 肺癌   | 91091815        | 附著型     | RPMI-1640+10% FBS                       |
| 4 | NCI-H322   | 肺癌   | 95111734        | 附著型     | RPMI-1640+2mM 麩醯胺酸+10% FBS              |
| 5 | NCI-H526   | 肺癌   | CRL-5811        | 圓形懸浮細胞簇 | RPMI-1640+10% FBS                       |
| 6 | HT1080     | 纖維肉瘤 | ECACC-8 5111505 | 附著型     | EMEM+2mM 麩醯胺酸+1% 非必需胺基酸 (NEAA)+10% FFBS |

【0536】 3.2 試劑

【0537】 流式細胞儀分析法之抗體及試劑盒

| 螢光染劑 | 標記             | 貨號       | 廠商  | 備註                   |
|------|----------------|----------|-----|----------------------|
| PE   | Nectin-4       | FAB2659P | R&D | AAAO0217021          |
| PE   | 同種型對照<br>IgG2b | IC0041P  | R&D | 來自<br>BICY-20161117A |

DPBS (Corning-21-031-CV)  
染色緩衝液 (eBioscience-00-4222)  
固定緩衝液 (BD-554655)

【0538】 3.3. 儀器

Eppendorf Centrifuge 5810R  
BD FACS Canto Flow Cytometer (BD)

【0539】 4. 實驗方法和步驟

【0540】 4.1 樣本收集

【0541】 收取指數成長期的細胞，用血球計和 Trypan blue staining 計算細胞數。在 4°C 以 400Xg 離心細胞 5 分鐘，用染色緩衝液洗滌細胞兩次，然後將細胞懸浮在染色緩衝液中至  $1 \times 10^7/\text{mL}$ 。

【0542】 4.2 抗體染色

- 1)將100  $\mu\text{L}$ 細胞懸浮液均分到96孔V盤的每一孔中。
- 2)將同種型對照或抗體添加到懸浮細胞中，並在黑暗中於4 °C培養30分鐘。
- 3)藉由在4 °C下以400 X g離心5分鐘以洗滌細胞2次，然後除去上清液。
- 4)用100  $\mu\text{L}$ 固定緩衝液重新懸浮細胞，並於4 °C在黑暗中培養30分鐘。
- 5)在4°C下以300 X g離心5分鐘以洗滌細胞2次並除去上清液
- 6)在400  $\mu\text{L}$ 染色緩衝液中重新懸浮細胞。
- 7)使用FlowJo V10軟體分析FACS數據。

【0543】 4.3. 數據分析

【0544】 藉由Flowjo V10軟體和Graphpad Prism或Excel軟體分析所有FACS數據。

【0545】 5. 結果

【0546】 5.1平台之圈選策略

【0547】 圖8至圖11顯示Nectin-4之圈選策略。

【0548】 5.2. 數據分析

【0549】 5.2.1細胞株之存活率

【0550】 以下為細胞株之存活率。

| 編號 | 細胞株        | 癌症種類 | 存活率  | 存活的細胞/百萬 |
|----|------------|------|------|----------|
| 1  | T-47D      | 乳癌   | 98.1 | 8.6      |
| 2  | MDA-MB-468 | 乳癌   | 98.7 | 5.3      |
| 3  | NCI-H292   | 肺癌   | 98.7 | 10.4     |
| 4  | NCI-H322   | 肺癌   | 98.5 | 6.6      |
| 5  | NCI-H526   | 肺癌   | 79.9 | 4.0      |
| 6  | HT1080     | 纖維肉瘤 | 98.0 | 14.7     |

【0551】 5.2.2. Nectin-4在細胞株中的陽性表現

【0552】 Nectin-4在6個細胞株中的陽性表現和MFI如下所列。

| 編號 | 細胞株        | Nectin-4 | MFI-同種型 | MFI-平台 |
|----|------------|----------|---------|--------|
| 1  | T-47D      | 99.0 %   | 132     | 1808   |
| 2  | MDA-MB-468 | 99.0 %   | 184     | 2324   |
| 3  | NCI-H292   | 97.9 %   | 180     | 729    |
| 4  | NCI-H322   | 99.1 %   | 145     | 1655   |
| 5  | NCI-H526   | 0.21%    | 104     | 91.3   |
| 6  | HT1080     | 1.53 %   | 134     | 134    |

【0553】 6.討論

【0554】 Nectin-4在乳癌T-47D(99.0%)、MDA-MB-468(99.0%)和肺癌NCI-H292(97.9%)、NCI-H322(99.1%)中具有高表現量。在NCI-H526和HT-1080中，未發現Nectin-4的表現。

【0555】 實施例8：利用流式細胞儀分析Nectin-4在9個CDX細胞株中的表現

【0556】 1. 研究目的

【0557】 本研究之目的係評估Nectin-4 (PVRL-4)在9個細胞株中的表面表現量，包括1個乳癌細胞株(MDA-MB-468)、4個肺癌細胞株(NCI-H292、NCI-H358、NCI-H526、A549)、1個胰臟癌細胞株(Panc02.13)、2個結腸直腸癌細胞株(HCT-116、HT-29)以及1個膀胱癌細胞株(HT1376)。

【0558】 2.平台設計

【0559】 針對在9個細胞株中的FCM平台。

| 螢光染劑  | 空白    | 同種型         | 平台       |
|-------|-------|-------------|----------|
| PE    | -     | 同種型對照 IgG2b | Nectin-4 |
| BV421 | 死/活細胞 | 活/死細胞       | 活/死細胞    |

【0560】 3. 材料

【0561】 3.1 樣本

【0562】 細胞株列表

| 項目 | 細胞株        | 癌症種類  | 廠商             | 培養特徵 | 培養基                     |
|----|------------|-------|----------------|------|-------------------------|
| 1  | HT1376     | 膀胱癌   | ATCC-CRL-1472  | 附著型  | EMEM + 10% FBS          |
| 2  | MDA-MB-468 | 乳癌    | ATCC-HTB-132   | 附著型  | Leibovitz's L-15+10%FBS |
| 3  | HCT-116    | 結腸直腸癌 | ATCC-CCL-247   | 附著型  | RPMI 1640 + 10% FBS     |
| 4  | HT-29      | 結腸直腸癌 | ATCC-HTB-38    | 附著型  | McCoy's 5a + 10% FBS    |
| 5  | A549       | 肺癌    | ATCC-CCL-185   | 附著型  | F-12K + 10% FBS         |
| 6  | NCI-H292   | 肺癌    | ECACC-91091815 | 懸浮型  | RPMI 1640 + 10% FBS     |

|   |           |     |                |     |                                       |
|---|-----------|-----|----------------|-----|---------------------------------------|
| 7 | NCI-H358  | 肺癌  | ECACC-95111733 | 附著型 | RPMI 1640 + 10%<br>FBS                |
| 8 | NCI-526   | 肺癌  | ATCC-CRL-5811  | 附著型 | RPMI 1640 + 10%<br>FBS                |
| 9 | Panc02.13 | 胰臟癌 | ATCC-CRL-2554  | 附著型 | RPMI-1640+15%<br>FBS+5ug/ml 人類胰<br>島素 |

【0563】 3.2 試劑

- 1) DPBS (Corning, 21-031-CV )
- 2) Trypsin 0.25% (Invitrogen- 25200072)
- 3) 染色緩衝液(eBioscience, 00-4222)
- 4) 固定緩衝液r (BD, 554655)
- 5) 抗體

| 螢光染劑  | 標記       | 貨號       | 廠商         | 備註          |
|-------|----------|----------|------------|-------------|
| PE    | Nectin-4 | FAB2659P | R&D        | AAAO0217021 |
| PE    | 鼠 IgG2b  | IC0041P  | R&D        |             |
| BV421 | 活/死細胞    | L34964   | Invitrogen | -           |

【0564】 3.3. 儀器

Eppendorf Centrifuge 5810R  
BD FACS Canto Flow Cytometer (BD)

【0565】 4. 實驗方法和步驟

【0566】 4.1細胞培養

【0567】 細胞解凍

- 1)用70%酒精清潔冷凍小瓶，然後在37 °C水浴槽中快速解凍。

2)以約1000 rpm離心細胞懸浮液5分鐘，除去上清液，並向燒瓶中加入預熱的培養基。

3)在37°C、5 %CO<sub>2</sub>培養箱中培養。

#### 【0568】 細胞繼代

1)在37°C水浴槽中加熱培養基和胰蛋白酶。

2)除去培養基，並用DPBS沖洗細胞層。

3)於燒瓶中加入5 mL 0.25%胰蛋白酶溶液，並用5 mL培養基稀釋胰蛋白酶。

4)以1000 rpm離心細胞懸浮液5分鐘。

5)加入15 mL新鮮培養基，輕輕地攪動以重新懸浮細胞。

6)於新的培養瓶中添加適當的細胞懸浮液。

7)在37°C、5% CO<sub>2</sub>培養箱中培養。

#### 【0569】 4.2 樣本收集

【0570】 收取指數成長期的細胞，用血球計和Trypan blue staining計算細胞數。在4°C以400Xg離心細胞5分鐘，用染色緩衝液洗滌細胞兩次，然後將細胞懸浮在染色緩衝液中至 $5 \times 10^6$ /mL。

#### 【0571】 4.3 抗體染色

【0572】 將100  $\mu$ L細胞懸浮液均分到96孔V盤的每一孔中。將同種型對照或抗體添加到懸浮細胞中，並在黑暗中於4 °C培養30分鐘。藉由在4 °C下以400×g離心5分鐘以洗滌細胞2次，然後除去上清液。在300  $\mu$ L染色緩衝液中重新懸浮細胞。使用FlowJo V10軟體分析FACS數據。

#### 【0573】 4.4. 數據分析

【0574】 藉由Flowjo V10軟體和Graphpad Prism或Excel軟體分析所有FACS數據。

【0575】 5. 結果

【0576】 5.1平台之圈選策略

【0577】 圖12-圖16顯示Nectin-4之圈選策略。

【0578】 5.2. 數據分析

【0579】 Nectin-4在9個細胞株中的陽性表現和MFI如下所列。

| 編號 | 細胞株        | Nectin-4 | MFI-同種型 | MFI-平台 |
|----|------------|----------|---------|--------|
| 1  | HT1376     | 92.4 %   | 36.2    | 803    |
| 2  | MDA-MB-468 | 97.1 %   | 28.9    | 460    |
| 3  | HCT-116    | 1.85 %   | 14.5    | 15.6   |
| 4  | HT-29      | 40.0 %   | 20.5    | 88.3   |
| 5  | A549       | 1.07%    | 20.5    | 21.6   |
| 6  | NCI-H292   | 71.1 %   | 22.9    | 149    |
| 7  | NCI-H358   | 90.1 %   | 26.5    | 361    |
| 8  | NCI-526    | 1.22 %   | 8.33    | 12.1   |
| 9  | Panc02.13  | 51.9 %   | 36.2    | 128    |

【0580】 6. 討論

【0581】 Nectin-4在膀胱癌HT-1376(92.4%)、乳癌MDA-MB-468(97.1%)和肺癌NCI-H358(90.1%)中具有高表現量。在HT-29(40.0%)、NCI-H292(71.1%)和Panc02.13(51.9%)中發現Nectin-4的中等表現量。在HCT-116，A549和NCI-526中，未發現Nectin-4的表現。將依據此數據選擇功效研究之模式。

【0582】 實施例 9：體內功效之研究

【0583】 實施例 9.1：試驗藥物治療A549異體移植Balb/c裸鼠之體內功效

【0584】 1. 研究目的

【0585】 本研究之目的係評估試驗藥物治療A549異體移植Balb/c裸鼠之體內抗腫瘤功效。

【0586】 2. 實驗設計

| 組別 | 治療      | n | 劑量<br>(mg/kg) | 藥劑體積<br>( $\mu$ l/g) | 給藥途徑 | 時程  |
|----|---------|---|---------------|----------------------|------|-----|
| 1  | 載劑      | 5 | --            | 10                   | iv   | qw  |
| 2  | BCY8245 | 3 | 3 mg/kg       | 10                   | iv   | qw  |
| 3  | BCY8245 | 3 | 3 mg/kg       | 10                   | iv   | biw |
| 4  | BCY8245 | 3 | 5 mg/kg       | 10                   | iv   | qw  |

【0587】 3. 材料

【0588】 3.1動物和飼養條件

【0589】 3.1.1. 動物

物種：Mus Musculus

品系：Balb/c 裸鼠

年齡：6-8周

性別：雌性

體重：18-22 g

動物數量：包含備用小鼠為41隻

【0590】 3.1.2. 飼養條件

小鼠存於各自之通氣籠內，每籠3或5隻，恆溫以及恆濕。

溫度：20~26℃

濕度：40-70%

鼠籠：聚碳酸酯製造。尺寸為300 mm x 180 mm x 150 mm。墊料為玉米芯，每周更換2次。

食物：研究期間動物可自由取得輻射消毒之乾燥顆粒食物。

飲水：動物可自由取得消毒過的飲用水。

鼠籠辨識：各籠的辨識辨識包括下列資訊：動物數、性別、品系、收貨日、治療、研究編號、組別編號、和治療始日。

動物辨識：動物均標記耳碼。

#### 【0591】 4. 實驗方法和步驟

##### 【0592】 4.1細胞培養

【0593】 腫瘤細胞A549於37°C 以及5% CO<sub>2</sub>環境下單層培養於包含10%熱滅活小牛血清的F-12K培養基。腫瘤細胞每周用胰蛋白-EDTA進行2次繼代培養。收取指數成長期的細胞，用於腫瘤接種之計算以接種腫瘤。

##### 【0594】 4.2 腫瘤接種

【0595】 各小鼠於右腹皮下接種A549腫瘤細胞( $5 \times 10^6$ )並待其發展，該些腫瘤細胞係在0.2 ml的PBS中。當平均腫瘤體積約為158 mm<sup>3</sup>時隨機分組這41隻動物。各組中試驗藥物之給藥和動物數量顯示於下列實驗設計表。

【0596】 4.3製備試驗藥物配方

| 試驗藥物    | 濃 度<br>(mg/ml) | 配 方                                        |
|---------|----------------|--------------------------------------------|
| 載劑      | -              | 25 mM 組胺酸(pH 7)，10%蔗糖                      |
| BCY8245 | 0.5            | 400 µl 的 1 mg/ml BCY8245 稀釋於 400 µl 組胺酸緩衝液 |
| BCY8245 | 0.3            | 240 µl 的 1 mg/ml BCY8245 稀釋於 560 µl 組胺酸緩衝液 |

【0597】 4.4 樣本收集

【0598】 在研究結束時，在最後一次給藥後2小時收集所有組別的腫瘤。

【0599】 5. 結果

【0600】 5.1 腫瘤生長曲線

【0601】 圖17顯示腫瘤生長曲線。

【0602】 5.2腫瘤體積紀錄

【0603】 表21顯示帶有A549異體移植之Balb/c雌性裸鼠隨時間的平均腫瘤體積。

【0604】 表21：腫瘤體積對應時間之記錄

| 組別 | 治療                     | 治療起始後之天數 |        |        |        |        |        |        |
|----|------------------------|----------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
|    |                        | 0        | 2      | 5      | 7      | 9      | 12     | 14     |
| 1  | 載劑, qw                 | 158±13   | 235±24 | 278±26 | 346±39 | 387±35 | 471±45 | 568±49 |
| 2  | BCY8245,<br>3 mpk, qw  | 157±10   | 208±15 | 197±25 | 257±40 | 293±41 | 341±54 | 356±53 |
| 3  | BCY8245,<br>3 mpk, biw | 157±14   | 183±27 | 158±16 | 184±6  | 182±8  | 190±15 | 194±27 |
| 4  | BCY8245,<br>5 mpk, qw  | 157±14   | 179±22 | 147±10 | 172±23 | 173±24 | 204±36 | 228±33 |

【0605】 5.3腫瘤生長抑制之分析

【0606】 根據治療起始後第14日測量的腫瘤體積，計算試驗藥物對於A549異體移植模式的腫瘤生長抑制率。

【0607】 表22：腫瘤生長抑制之分析

| 組別 | 治療                     | 腫 瘤 體 積<br>(mm <sup>3</sup> ) <sup>a</sup> | T/C <sup>b</sup><br>(%) | TGI<br>(%) | <i>P</i> 值，與載劑<br>比較 |
|----|------------------------|--------------------------------------------|-------------------------|------------|----------------------|
| 1  | 載劑, qw                 | 568±49                                     | --                      | --         | --                   |
| 2  | BCY8245,<br>3 mpk, qw  | 356±53                                     | 62.8                    | 51.4       | <i>p</i> <0.05       |
| 3  | BCY8245,<br>3 mpk, biw | 194±27                                     | 34.2                    | 90.8       | <i>p</i> <0.001      |
| 4  | BCY8245,<br>5 mpk, qw  | 228±33                                     | 40.2                    | 82.6       | <i>p</i> <0.001      |

a. 平均值 ± SEM

b. 將治療組的組平均腫瘤體積除以對照組的組平均腫瘤體積，以計算腫瘤生長抑制率(T/C)

【0608】 6. 結果和討論

【0609】 本實施例評估試驗藥物對於A549異體移植模式之治療功效。將全部組別於多個時間點測量之腫瘤體積顯示於圖17以及表21和表22。

【0610】 給予載劑治療之小鼠之平均腫瘤體積於第 14 日達到 568 mm<sup>3</sup>。BCY8245 於 3 mg/kg, qw (TV=356 mm<sup>3</sup>, TGI=51.4%, *p*<0.05)、3 mg/kg, biw (TV=194 mm<sup>3</sup>, TGI=90.8%, *p*<0.01)和 5 mg/kg, qw (TV=228 mm<sup>3</sup>, TGI=82.6%, *p*<0.001)產生顯著抗腫瘤活性，其有劑量依賴性或劑量-頻率依賴性。

【0611】 BCY8245組別中的良好地動物維持體重。該細胞株在FACS研究中顯示了Nectin-4的最低表現量，腫瘤生長受到BCY8245的抑制，但腫瘤並未消退，強調了最佳療效的目標驅動要求。

【0612】 實施例 9.2：試驗藥物治療HCT116異體移植Balb/c裸鼠之體內功效

【0613】 1. 研究目的

【0614】 本研究之目的係評估試驗藥物治療HCT116異體移植Balb/c裸鼠之體內抗腫瘤功效。

【0615】 2. 實驗設計

| 組別 | 治療      | n | 劑量<br>(mg/kg) | 藥劑體積<br>(μl/g) | 給藥途徑 | 時程  |
|----|---------|---|---------------|----------------|------|-----|
| 1  | 載劑      | 5 | --            | 10             | iv   | qw  |
| 2  | BCY8245 | 3 | 3             | 10             | iv   | qw  |
| 3  | BCY8245 | 3 | 3             | 10             | iv   | biw |
| 4  | BCY8245 | 3 | 5             | 10             | iv   | qw  |

【0616】 3. 材料

【0617】 3.1動物和飼養條件

【0618】 3.1.1. 動物

物種：Mus Musculus

品系：Balb/c 裸鼠

年齡：6-8周

性別：雌性

體重：18-22 g

動物數量：包含備用小鼠為41隻

【0619】 3.1.2. 飼養條件

小鼠存於各自之通氣籠內，每籠3或5隻，恆溫以及恆濕。

溫度：20~26 °C

濕度：40-70%

鼠籠：聚碳酸酯製造。尺寸為300 mm x 180 mm x 150 mm。墊料為玉米芯，每周更換2次。

食物：研究期間動物可自由取得輻射消毒之乾燥顆粒食物。

飲水：動物可自由取得消毒過的飲用水。

鼠籠辨識：各籠的辨識辨識包括下列資訊：動物數、性別、品系、收貨日、治療、研究編號、組別編號、和治療始日。

動物辨識：動物均標記耳碼。

【0620】 4. 實驗方法和步驟

【0621】 4.1細胞培養

【0622】 HCT116細胞於37℃以及5% CO<sub>2</sub>環境下培養於包含10%熱滅活小牛血清的培養基。腫瘤細胞每周進行2次繼代培養。收取指數成長期的細胞，用於腫瘤接種之計算以接種腫瘤。

【0623】 4.2 腫瘤接種

【0624】 各小鼠於右腹皮下接種HCT116腫瘤細胞( $5.0 \times 10^6$ )並待其發展，該些腫瘤細胞係在0.2 ml的PBS中。當平均腫瘤體積約為166 mm<sup>3</sup>時隨機分組這41隻動物。各組中試驗藥物之給藥和動物數量顯示於下列實驗設計表。

【0625】 4.3 製備試驗藥物配方

| 試驗藥物    | 濃 度<br>(mg/ml) | 配 方                                        |
|---------|----------------|--------------------------------------------|
| 載劑      | -              | 25 mM 組胺酸(pH 7)，10%蔗糖                      |
| BCY8245 | 0.5            | 400 µl 的 1 mg/ml BCY8245 稀釋於 400 µl 組胺酸緩衝液 |
| BCY8245 | 0.3            | 240 µl 的 1 mg/ml BCY8245 稀釋於 560 µl 組胺酸緩衝液 |

【0626】 4.4 樣本收集

【0627】 在第14天研究結束時，收集第1組和第2組的腫瘤以進行FFPE。至於第4組，在給藥後的5分鐘、15分鐘、30分鐘、60分鐘和120分鐘後收集血漿，並且也收集其腫瘤以及存放於-80℃。

【0628】 5. 結果

【0629】 5.1 腫瘤生長曲線

【0630】 圖18顯示腫瘤生長曲線。

【0631】 5.2 腫瘤體積紀錄

【0632】 表23顯示帶有HCT116異體移植之Balb/c雌性裸鼠隨時間的平均腫瘤體積。

【0633】 表23：腫瘤體積對應時間之記錄

| 組別 | 治療                     | 治療起始後之天數 |        |        |        |        |        |        |
|----|------------------------|----------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
|    |                        | 0        | 2      | 4      | 7      | 9      | 12     | 14     |
| 1  | 載劑,<br>qw              | 166±12   | 219±21 | 323±29 | 397±28 | 488±36 | 630±49 | 769±71 |
| 2  | BCY8245,<br>3 mpk, qw  | 167±11   | 209±13 | 227±17 | 269±33 | 324±39 | 348±27 | 425±28 |
| 3  | BCY8245,<br>3 mpk, biw | 166±18   | 229±40 | 215±42 | 213±49 | 213±48 | 206±55 | 197±50 |
| 4  | BCY8245,<br>5 mpk, qw  | 166±35   | 201±42 | 176±15 | 183±17 | 170±16 | 125±18 | 134±12 |

【0634】 5.3腫瘤生長抑制之分析

【0635】 根據治療起始後第14日測量的腫瘤體積，計算試驗藥物對於HCT116異體移植模式的腫瘤生長抑制率。

【0636】 表24：腫瘤生長抑制之分析

| 組別 | 治療                     | 腫瘤體積<br>(mm <sup>3</sup> ) <sup>a</sup> | T/C <sup>b</sup> (%) | TGI (%) | <i>P</i> 值      |
|----|------------------------|-----------------------------------------|----------------------|---------|-----------------|
| 1  | Vehicle,<br>qw         | 769±71                                  | --                   | --      | --              |
| 2  | BCY8245,<br>3 mpk, qw  | 425±28                                  | 55.2                 | 57.1    | <i>p</i> <0.001 |
| 3  | BCY8245,<br>3 mpk, biw | 197±50                                  | 25.6                 | 94.9    | <i>p</i> <0.001 |
| 4  | BCY8245,<br>5 mpk, qw  | 134±12                                  | 17.4                 | 105.2   | <i>p</i> <0.001 |

a. 平均值 ± SEM；b. 將治療組的組平均腫瘤體積除以對照組的組平均腫瘤體積，計算腫瘤生長抑制(T/C)

【0637】 6. 結果和討論

【0638】 本實施例評估試驗藥物對於HCT116異體移植模式之治療功效。將全部組別於多個時間點測量之腫瘤體積顯示於圖18以及表23和表24。

【0639】 給予載劑治療之小鼠之平均腫瘤體積於第14日達到769 mm<sup>3</sup>。BCY8245於3 mg/kg, qw (TV=425mm<sup>3</sup>, TGI=57.1%, *p*<0.001)、3 mg/kg, biw (TV=197 mm<sup>3</sup>, TGI=94.9%, *p*<0.001) 和5 mg/kg, qw (TV=134 mm<sup>3</sup>, TGI=105.2%, *p*<0.001)產生顯著抗腫瘤活性，其有劑量依賴性或劑量-頻率依賴性。

【0640】 在本實施例中，所有在5 mg/kg qw組別中的動物平均減少了10 % 的體重。

【0641】 該細胞株在FACS研究中顯示了Nectin-4的最低表現量，強調了最佳療效的目標驅動要求。

【0642】 實施例 9.3：試驗藥物治療HT-1376異體移植CB17-SCID小鼠之體內功效

【0643】 1. 研究目的

【0644】 本研究之目的係評估試驗藥物治療HT-1376異體移植CB17-SCID小鼠之體內抗腫瘤功效。

【0645】 2. 實驗設計

| 組別 | 治療      | n | 劑量<br>(mg/kg) | 藥劑體積<br>(μl/g) | 給藥途<br>徑 | 時程  |
|----|---------|---|---------------|----------------|----------|-----|
| 1  | 載劑      | 5 | --            | 10             | iv       | qw  |
| 2  | BCY8245 | 3 | 3 mg/kg       | 10             | iv       | qw  |
| 3  | BCY8245 | 3 | 3 mg/kg       | 10             | iv       | biw |
| 4  | BCY8245 | 3 | 5 mg/kg       | 10             | iv       | qw  |

【0646】 3. 材料

【0647】 3.1動物和飼養條件

【0648】 3.1.1. 動物

物種：Mus Musculus

品系：CB17-SCID

年齡：6-8周

性別：雌性

體重：18-22 g

動物數量：包含備用小鼠為41隻

【0649】 3.1.2. 飼養條件

小鼠存於各自之通氣籠內，每籠3或5隻，恆溫以及恆濕。

溫度：20~26 °C

濕度：40-70%

鼠籠：聚碳酸酯製造。尺寸為300 mm x 180 mm x 150 mm。墊料為玉米芯，每周更換2次。

食物：研究期間動物可自由取得輻射消毒之乾燥顆粒食物。

飲水：動物可自由取得消毒過的飲用水。

鼠籠辨識：各籠的辨識包括下列資訊：動物數、性別、品系、收貨日、治療、研究編號、組別編號、和治療始日。

動物辨識：動物均標記耳碼。

#### 【0650】 4. 實驗方法和步驟

##### 【0651】 4.1細胞培養

【0652】 HT-1376腫瘤細胞於37°C 以及5% CO<sub>2</sub>環境下培養於包含10%熱滅活小牛血清的EMEM培養基。腫瘤細胞每周進行2次繼代培養。收取指數成長期的細胞，用於腫瘤接種之計算以接種腫瘤。

##### 【0653】 4.2 腫瘤接種

【0654】 各小鼠於右腹皮下接種HT-1376腫瘤細胞( $5 \times 10^6$ )並待其發展，這些腫瘤細胞係在含有基質膠(1:1)的0.2 ml的PBS中。當平均腫瘤體積約為153 mm<sup>3</sup>時隨機分組這41隻動物。各組中試驗藥物之給藥和動物數量顯示於下列實驗設計表。

【0655】 4.3 製備試驗藥物配方

| 試驗藥物    | 濃 度<br>(mg/ml) | 配 方                                                  |
|---------|----------------|------------------------------------------------------|
| 載劑      | -              | 25 mM 組胺酸(pH 7)，10%蔗糖                                |
| BCY8245 | 0.5            | 400 $\mu$ l 的 1 mg/ml BCY8245 稀釋於 400 $\mu$ l 組胺酸緩衝液 |
| BCY8245 | 0.3            | 240 $\mu$ l 的 1 mg/ml BCY8245 稀釋於 560 $\mu$ l 組胺酸緩衝液 |

【0656】 4.4 樣本收集

【0657】 在研究結束時，在最後一次給藥後5分鐘、15分鐘、30分鐘、60分鐘和120分鐘後收集第4組的血漿。在最後一次給藥後2小時收集第4組的腫瘤。在最後一次給藥後2小時收集第1、2和3組的腫瘤。

【0658】 5. 結果

【0659】 5.1 腫瘤生長曲線

【0660】 圖19顯示腫瘤生長曲線。

【0661】 5.2腫瘤體積紀錄

【0662】 表25顯示帶有HT-1376異體移植之雌性CB17-SCID小鼠隨時間的平均腫瘤體積。

【0663】 表25：腫瘤體積對應時間之記錄

| 組別 | 治療                     | 治療起始後之天數 |        |        |        |        |        |         |
|----|------------------------|----------|--------|--------|--------|--------|--------|---------|
|    |                        | 0        | 2      | 5      | 7      | 9      | 12     | 14      |
| 1  | 載劑, qw                 | 153±16   | 266±30 | 398±41 | 529±56 | 721±76 | 908±91 | 1069±90 |
| 2  | BCY8245,<br>3 mpk, qw  | 153±26   | 254±53 | 298±69 | 398±61 | 468±73 | 502±67 | 603±76  |
| 3  | BCY8245,<br>3 mpk, biw | 154±30   | 248±58 | 203±15 | 273±45 | 356±50 | 391±53 | 407±53  |
| 4  | BCY8245,<br>5 mpk, qw  | 153±15   | 237±41 | 228±36 | 317±31 | 394±20 | 438±31 | 465±33  |

【0664】 5.3腫瘤生長抑制之分析

【0665】 根據治療起始後第14日測量的腫瘤體積，計算試驗藥物對於HT-1376異體移植模式的腫瘤生長抑制率。

【0666】 表26：腫瘤生長抑制之分析

| 組別 | 治療                     | 腫瘤體積<br>(mm <sup>3</sup> ) <sup>a</sup> | T/C <sup>b</sup><br>(%) | TGI<br>(%) | P 值，與載劑<br>比較   |
|----|------------------------|-----------------------------------------|-------------------------|------------|-----------------|
| 1  | Vehicle, qw            | 1069±90                                 | --                      | --         | --              |
| 2  | BCY8245,<br>3 mpk, qw  | 603±76                                  | 56.4                    | 50.9       | <i>p</i> <0.01  |
| 3  | BCY8245,<br>3 mpk, biw | 407±53                                  | 38.1                    | 72.3       | <i>p</i> <0.001 |
| 4  | BCY8245,<br>5 mpk, qw  | 465±33                                  | 43.5                    | 66.0       | <i>p</i> <0.001 |

a. 平均值 ± SEM

b. 將治療組的組平均腫瘤體積除以對照組的組平均腫瘤體積，計算腫瘤生長抑制(T/C)

【0667】 6.結果和討論

【0668】 本實施例評估試驗藥物對於HT-1376異體移植模式之治療功效。  
將全部組別於多個時間點測量之腫瘤體積顯示於圖19以及表25和表26。

【0669】 給予載劑治療之小鼠之平均腫瘤體積於第14日達到1069 mm<sup>3</sup>。  
BCY8245於 3 mg/kg, qw (TV=603 mm<sup>3</sup>, TGI=50.9%, p<0.01)、 3 mg/kg, biw (TV=407 mm<sup>3</sup>, TGI=72.3%, p<0.001)和5 mg/kg, qw (TV=465 mm<sup>3</sup>, TGI=66.0%, p<0.001) 產生顯著抗腫瘤活性。在此研究中，BCY8245於5 mg/kg qw導致動物體重  
在治療過程中減少了超過 10%。

【0670】 實施例 9.4：試驗藥物治療MDA-MB-468異體移植Balb/c裸鼠之體內功效

【0671】 1. 研究目的

【0672】 本研究之目的係評估試驗藥物治療MDA-MB-468異體移植Balb/c裸鼠之體內抗腫瘤功效。

【0673】 2. 實驗設計

| 組別 | 治療      | n | 劑量<br>(mg/kg) | 藥劑體積<br>(µl/g) | 給藥途<br>徑 | 時程  |
|----|---------|---|---------------|----------------|----------|-----|
| 1  | 載劑      | 5 | --            | 10             | iv       | qw  |
| 2  | BCY8245 | 3 | 3 mg/kg       | 10             | iv       | qw  |
| 3  | BCY8245 | 3 | 3 mg/kg       | 10             | iv       | biw |
| 4  | BCY8245 | 3 | 5 mg/kg       | 10             | iv       | qw  |

【0674】 3. 材料

【0675】 3.1動物和飼養條件

【0676】 3.1.1. 動物

物種：Mus Musculus

品系：Balb/c裸鼠

年齡：6-8周

性別：雌性

體重：18-22 g

動物數量：包含備用小鼠為41隻

**【0677】 3.1.2. 飼養條件**

小鼠存於各自之通氣籠內，每籠3或5隻，恆溫以及恆濕。

溫度：20~26 °C

濕度：40-70%

鼠籠：聚碳酸酯製造。尺寸為300 mm x 180 mm x 150 mm。墊料為玉米芯，每周更換2次。

食物：研究期間動物可自由取得輻射消毒之乾燥顆粒食物。

飲水：動物可自由取得消毒過的飲用水。

鼠籠辨識：各籠的辨識包括下列資訊：動物數、性別、品系、收貨日、治療、研究編號、組別編號、和治療始日。

動物辨識：動物均標記耳碼。

**【0678】 4. 實驗方法和步驟**

**【0679】 4.1細胞培養**

**【0680】** HT-1376腫瘤細胞於37°C 以及5% CO<sub>2</sub>環境下培養於包含10%熱滅活小牛血清的Leibovitz's L-15培養基。腫瘤細胞每周進行2次繼代培養。收取指數成長期的細胞，用於腫瘤接種之計算以接種腫瘤。

**【0681】 4.2 腫瘤接種**

【0682】 各小鼠於右腹皮下接種MDA-MB-468腫瘤細胞( $10 \times 10^6$ )並待其發展，該些腫瘤細胞係在含有基50%基質膠的0.2 ml的PBS中。當平均腫瘤體積約為 $196 \text{ mm}^3$ 時隨機分組這41隻動物。各組中試驗藥物之給藥和動物數量顯示於下列實驗設計表。

【0683】 4.3 製備試驗藥物配方

| 試驗藥物    | 濃 度<br>(mg/ml) | 配 方                                                              |
|---------|----------------|------------------------------------------------------------------|
| 載劑      | -              | 25 mM 組胺酸(pH 7)，10%蔗糖                                            |
| BCY8245 | 1              | 10.56 mg 的 BCY8245 溶解於 10.518 ml 組胺酸緩衝液                          |
| BCY8245 | 0.5            | 400 $\mu\text{l}$ 的 1 mg/ml BCY8245 稀釋於 400 $\mu\text{l}$ 組胺酸緩衝液 |
| BCY8245 | 0.3            | 240 $\mu\text{l}$ 的 1 mg/ml BCY8245 稀釋於 560 $\mu\text{l}$ 組胺酸緩衝液 |

【0684】 4.4 樣本收集

【0685】 在第21天時，在最後一次給藥後5分鐘、15分鐘、30分鐘、60分鐘和120分鐘後收集第2組的血漿。在最後一次給藥後2小時收集第1和3組的腫瘤。第4組中的動物在不進行任何給藥的情況下繼續運行21天，並且在第42天收集這些組別的腫瘤。

【0686】 5. 結果

【0687】 5.1 腫瘤生長曲線

【0688】 圖20顯示腫瘤生長曲線。

【0689】 5.2腫瘤體積紀錄

【0690】 表27和28顯示帶有MDA-MB-468異體移植之Balb/c雌性裸鼠隨時間的平均腫瘤體積。

【0691】 5.3腫瘤生長抑制之分析

【0692】 根據治療起始後第 21 日測量的腫瘤體積，計算試驗藥物對於 MDA-MB-468 異體移植模式的腫瘤生長抑制率。

【0693】表 27：腫瘤體積對應時間之記錄 (第 0 天至第 21 天)

| 組別 | 治療                     | 治療起始後之天數 |        |        |        |        |        |        |        |        |        |
|----|------------------------|----------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
|    |                        | 0        | 2      | 4      | 7      | 9      | 11     | 14     | 16     | 18     | 21     |
| 1  | 載劑, qw                 | 199±6    | 217±9  | 235±15 | 274±14 | 291±14 | 314±20 | 348±24 | 374±33 | 398±39 | 447±39 |
| 2  | BCY8245,<br>3 mpk, qw  | 194±12   | 192±26 | 184±20 | 131±20 | 113±17 | 104±13 | 94±25  | 81±23  | 87±23  | 85±31  |
| 3  | BCY8245,<br>3 mpk, biw | 195±33   | 193±27 | 154±20 | 103±20 | 83±16  | 67±14  | 49±11  | 45±14  | 32±12  | 22±4   |
| 4  | BCY8245,<br>5 mpk, qw  | 199±28   | 193±11 | 135±4  | 98±5   | 58±5   | 49±5   | 47±2   | 37±4   | 35±3   | 29±3   |

【0694】 表 28：腫瘤體積對應時間之記錄(第 23 天至第 42 天)

| 組<br>別 | 治療               | 治療起始後之天數 |      |      |      |      |      |      |
|--------|------------------|----------|------|------|------|------|------|------|
|        |                  | 23       | 25   | 28   | 32   | 35   | 39   | 42   |
|        | BCY8245,         |          |      |      |      |      |      |      |
| 4      | <u>5 mpk, qw</u> | 35±5     | 48±5 | 37±7 | 28±6 | 24±4 | 28±6 | 26±6 |

【0695】 表 29：腫瘤生長抑制之分析

| 組<br>別 | 治療                     | 腫 瘤 體<br>積<br>(mm <sup>3</sup> ) <sup>a</sup> | T/C <sup>b</sup><br>(%) | TGI<br>(%) | <i>P</i> 值，與<br>載劑比較 |
|--------|------------------------|-----------------------------------------------|-------------------------|------------|----------------------|
| 1      | Vehicle, qw            | 447±39                                        | --                      | --         | --                   |
| 2      | BCY8245.<br>3 mpk, qw  | 85±31                                         | 18.9                    | 144.2      | <i>p</i> <0.001      |
| 3      | BCY8245.<br>3 mpk, biw | 22±4                                          | 4.9                     | 169.8      | <i>p</i> <0.001      |
| 4      | BCY8245.<br>5 mpk, qw  | 29±3                                          | 6.6                     | 168.4      | <i>p</i> <0.001      |

- a. 平均值 ± SEM
- b. 將治療組的組平均腫瘤體積除以對照組的組平均腫瘤體積，計算腫瘤生長抑制(T/C)

【0696】 6. 結果和討論

【0697】 本實施例評估試驗藥物對於 MDA-MB-468 異體移植模式之治療功效。將全部組別於多個時間點測量之腫瘤體積顯示於圖 20 以及表 27 至表 29。

【0698】 給予載劑治療之小鼠之平均腫瘤體積於第 21 日達到 447 mm<sup>3</sup>。BCY8245 於 3 mg/kg, qw (TV=85 mm<sup>3</sup>, TGI=144.2%, *p*<0.001)、3 mg/kg, biw (TV=22 mm<sup>3</sup>, TGI=169.8%, *p*<0.001) 和 5 mg/kg, qw (TV=29 mm<sup>3</sup>, TGI=168.4%, *p*<0.001)產生顯著的抗腫瘤活性，其有劑量依賴性或劑量-頻率依賴性。

【0699】 從第 21 天起暫停 5 mg/kg 組的給藥，在額外 3 週的監測中，腫瘤未見任何復發。該細胞株在 FACS 研究中顯示了 Nectin-4 的高表現量，BCY8245 造成了腫瘤的消退，強調了最佳療效的目標驅動特性。

【0700】 實施例 9.5：試驗藥物治療 NCI-H292 異體移植 Balb/c 裸鼠之體內功效

【0701】 1. 研究目的

【0702】 本研究之目的係評估試驗藥物治療 NCI-H292 異體移植 Balb/c 裸鼠之體內抗腫瘤功效。

【0703】 2. 實驗設計

| 組別 | 治療      | n | 劑量<br>(mg/kg) | 藥劑體積<br>(μl/g) | 給藥途<br>徑 | 時程  |
|----|---------|---|---------------|----------------|----------|-----|
| 1  | 載劑      | 5 | --            | 10             | iv       | qw  |
| 2  | BCY8245 | 3 | 3 mg/kg       | 10             | iv       | qw  |
| 3  | BCY8245 | 3 | 3 mg/kg       | 10             | iv       | biw |
| 4  | BCY8245 | 3 | 5 mg/kg       | 10             | iv       | qw  |

【0704】 3. 材料

【0705】 3.1 動物和飼養條件

【0706】 3.1.1. 動物

物種：Mus Musculus

品系：Balb/c 裸鼠

年齡：6-8 周

性別：雌性

體重：18-22 g

動物數量：包含備用小鼠為 41 隻

**【0707】 3.1.2. 飼養條件**

小鼠存於各自之通氣籠內，每籠 3 或 5 隻，恆溫以及恆濕。

溫度：20~26 °C

濕度：40-70%

鼠籠：聚碳酸酯製造。尺寸為 300 mm x 180 mm x 150 mm。墊料為玉米芯，每周更換 2 次。

食物：研究期間動物可自由取得輻射消毒之乾燥顆粒食物。

飲水：動物可自由取得消毒過的飲用水。

鼠籠辨識：各籠的辨識辨識包括下列資訊：動物數、性別、品系、收貨日、治療、研究編號、組別編號、和治療始日。

動物辨識：動物均標記耳碼。

**【0708】 4. 實驗方法和步驟**

**【0709】 4.1 細胞培養**

**【0710】** NCI-H292 腫瘤細胞於 37°C 以及 5% CO<sub>2</sub> 環境下離體單層培養於包含 10%熱滅活小牛血清的 RPMI-1640 培養基。腫瘤細胞用胰蛋白-EDTA 處理每周進行 2 次繼代培養。收取指數成長期的細胞，用於腫瘤接種之計算以接種腫瘤。

**【0711】 4.2 腫瘤接種**

【0712】 各小鼠於右腹皮下接種 NCI-H292 腫瘤細胞( $10 \times 10^6$ )並待其發展，該些腫瘤細胞係在 0.2 ml 的 PBS 中。當平均腫瘤體積約為  $162 \text{ mm}^3$  時隨機分組這 41 隻動物。各組中試驗藥物之給藥和動物數量顯示於下列實驗設計表。

【0713】 4.3 製備試驗藥物配方

| 試驗藥物    | 濃 度<br>(mg/ml) | 配 方                                                              |
|---------|----------------|------------------------------------------------------------------|
| 載劑      | -              | 25 mM 組胺酸(pH 7)，10%蔗糖                                            |
| BCY8245 | 1              | 10.56 mg 的 BCY8245 溶解於 10.518 ml 組胺酸緩衝液                          |
| BCY8245 | 0.5            | 400 $\mu\text{l}$ 的 1 mg/ml BCY8245 稀釋於 400 $\mu\text{l}$ 組胺酸緩衝液 |
| BCY8245 | 0.3            | 240 $\mu\text{l}$ 的 1 mg/ml BCY8245 稀釋於 560 $\mu\text{l}$ 組胺酸緩衝液 |

【0714】 4.4 樣本收集

【0715】 在實驗結束時，在最後一次給藥後 2 小時收集所有組別的腫瘤。

【0716】 5. 結果

【0717】 5.1 腫瘤生長曲線

【0718】 圖 21 顯示腫瘤生長曲線。

【0719】 5.2 腫瘤體積紀錄

【0720】 表 30 顯示帶有 NCI-H292 異體移植之 Balb/c 雌性裸鼠隨時間的平均腫瘤體積。

【0721】 表 30：腫瘤體積對應時間之記錄

| 組別 | 治療                  | 治療起始後之天數   |       |       |       |       |       |       |
|----|---------------------|------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|    |                     | 0          | 2     | 4     | 7     | 9     | 11    | 14    |
| 1  | 載劑, qw              | 161±2      | 270±1 | 357±1 | 448±1 | 570±1 | 720±3 | 948±6 |
|    |                     |            | 4     | 4     | 7     | 6     | 6     | 1     |
| 2  | BCY8245, 3 mpk, qw  | 160±5      | 220±1 | 266±1 | 218±2 | 167±1 | 161±3 | 149±4 |
|    |                     |            | 1     | 5     | 3     | 0     | 6     | 3     |
| 3  | BCY8245, 3 mpk, biw | 162±1<br>3 | 243±1 | 211±1 | 101±1 | 100±8 | 87±7  | 65±3  |
|    |                     |            | 9     | 2     | 1     |       |       |       |
| 4  | BCY8245, 5 mpk, qw  | 160±9      | 176±7 | 191±3 | 105±8 | 82±3  | 91±14 | 83±8  |

【0722】 5.3 腫瘤生長抑制之分析

【0723】 根據治療起始後第 14 日測量的腫瘤體積，計算試驗藥物對於 NCI-H292 異體移植模式的腫瘤生長抑制率。

【0724】 表 31：腫瘤生長抑制之分析

| 組別 | 治療                  | 腫瘤體積<br>(mm <sup>3</sup> ) <sup>a</sup> | T/C <sup>b</sup><br>(%) | TGI<br>(%) | P 值，與載劑<br>比較   |
|----|---------------------|-----------------------------------------|-------------------------|------------|-----------------|
| 1  | 載劑, qw              | 948±61                                  | --                      | --         | --              |
| 2  | BCY8245, 3 mpk, qw  | 149±43                                  | 15.8                    | 101.4      | <i>p</i> <0.001 |
| 3  | BCY8245, 3 mpk, biw | 65±3                                    | 6.9                     | 112.2      | <i>p</i> <0.001 |
| 4  | BCY8245, 5 mpk, qw  | 83±8                                    | 8.8                     | 109.8      | <i>p</i> <0.001 |

a. 平均值 ± SEM

b. 將治療組的組平均腫瘤體積除以對照組的組平均腫瘤體積，計算腫瘤生長抑制(T/C)

【0725】 6. 結果和討論

【0726】 本實施例評估試驗藥物對於 NCI-H292 異體移植模式之治療功效。將全部組別於多個時間點測量之腫瘤體積顯示於圖 21 以及表 30 和表 31。

【0727】 給予載劑治療之小鼠之平均腫瘤體積於第 14 日達到 948 mm<sup>3</sup>。BCY8245 於 3 mg/kg, qw (TV=149 mm<sup>3</sup>, TGI=101.4%,  $p<0.001$ )、3 mg/kg, biw (TV=65 mm<sup>3</sup>, TGI=112.2%,  $p<0.001$ ) 和 5 mg/kg, qw (TV=83 mm<sup>3</sup>, TGI=109.8%,  $p<0.001$ )產生顯著抗腫瘤活性。

【0728】 所有 3 mg/kg, qw、3 mg/kg, biw 和 5 mg/kg, qw 的試驗藥物組別均顯示出相當的抗腫瘤活性，當增加劑量或劑量頻率時，療效沒有進一步提高。

【0729】 在此實施例中，所有組別的動物均良好地維持體重。

【0730】 該細胞株在 FACS 研究中顯示了 Nectin-4 的高表現量，BCY8245 造成了腫瘤的消退，強調了最佳療效的目標驅動。

【0731】 實施例 9.6：試驗藥物治療 NCI-H526 異體移植 Balb/c 裸鼠之體內功效

【0732】 1. 研究目的

【0733】 本研究之目的係評估試驗藥物治療 NCI-H526 異體移植 Balb/c 裸鼠之體內抗腫瘤功效。

【0734】 2. 實驗設計

| 組別 | 治療      | n | 劑量<br>(mg/kg) | 藥劑體積<br>(µl/g) | 給藥途<br>徑 | 時程  |
|----|---------|---|---------------|----------------|----------|-----|
| 1  | 載劑      | 3 | --            | 10             | iv       | qw  |
| 2  | BCY8245 | 3 | 3             | 10             | iv       | qw  |
| 3  | BCY8245 | 3 | 3             | 10             | iv       | biw |
| 4  | BCY8245 | 3 | 5             | 10             | iv       | qw  |

【0735】 3. 材料

【0736】 3.1 動物和飼養條件

【0737】 3.1.1. 動物

物種：Mus Musculus

品系：Balb/c 裸鼠

年齡：6-8 周

性別：雌性

體重：18-22 g

動物數量：包含備用小鼠為 21 隻

【0738】 3.1.2. 飼養條件

小鼠存於各自之通氣籠內，每籠 3 或 5 隻，恆溫以及恆濕。

溫度：20~26℃

濕度：40-70%

鼠籠：聚碳酸酯製造。尺寸為 300 mm x 180 mm x 150 mm。墊料為玉米芯，每周更換 2 次。

食物：研究期間動物可自由取得輻射消毒之乾燥顆粒食物。

飲水：動物可自由取得消毒過的飲用水。

鼠籠辨識：各籠的辨識辨識包括下列資訊：動物數、性別、品系、收貨日、治療、研究編號、組別編號、和治療始日。

動物辨識：動物均標記耳碼。

【0739】 4. 實驗方法和步驟

【0740】 4.1 細胞培養

【0741】 NCI-H526 腫瘤細胞於 37°C 以及 5% CO<sub>2</sub> 環境下培養於包含 10%熱滅活小牛血清的培養基。腫瘤細胞每周進行 2 次繼代培養。收取指數成長期的細胞，用於腫瘤接種之計算以接種腫瘤。

【0742】 4.2 腫瘤接種

【0743】 各小鼠於右腹皮下接種 NCI-H526 腫瘤細胞( $5.0 \times 10^6$ )並待其發展，該些腫瘤細胞係在 0.2 ml 的 PBS 中。當平均腫瘤體積約為 181 mm<sup>3</sup> 時隨機分組這 21 隻動物。各組中試驗藥物之給藥和動物數量顯示於下列實驗設計表。

【0744】 4.3 製備試驗藥物配方

| 試驗藥物    | 濃 度<br>(mg/ml) | 配方                                         |
|---------|----------------|--------------------------------------------|
| 載劑      | -              | 25 mM 組胺酸(pH 7)，10%蔗糖                      |
| BCY8245 | 0.5            | 400 µl 的 1 mg/ml BCY8245 稀釋於 400 µl 組胺酸緩衝液 |
| BCY8245 | 0.3            | 240 µl 的 1 mg/ml BCY8245 稀釋於 560 µl 組胺酸緩衝液 |

【0745】 4.4 樣本收集

【0746】 在第 14 天實驗結束時，收集所有組別的腫瘤以進行 FFPE。

【0747】 5. 結果

【0748】 5.1 腫瘤生長曲線

【0749】 圖 22 顯示腫瘤生長曲線。

【0750】 5.2 腫瘤體積紀錄

【0751】 表 32 顯示帶有 NCI-H526 異體移植之 Balb/c 雌性裸鼠隨時間的平均腫瘤體積。

【0752】 表 32：腫瘤體積對應時間之記錄

| 組別      | 治療           | 治療起始後之天數 |       |       |        |        |        |        |
|---------|--------------|----------|-------|-------|--------|--------|--------|--------|
|         |              | 0        | 2     | 4     | 7      | 9      | 12     | 14     |
| 1       | 載劑, qw       | 181±3    | 262±5 | 431±9 | 563±72 | 729±11 | 1076±1 | 1365±2 |
|         |              | 2        | 6     | 0     |        | 5      | 55     | 08     |
| BCY8245 |              |          |       |       |        |        |        |        |
| 2       | , 3 mpk, qw  | 180±3    | 256±5 | 403±7 | 545±68 | 657±83 | 1019±1 | 1205±7 |
|         |              | 2        | 1     | 2     |        |        | 55     | 9      |
| BCY8245 |              |          |       |       |        |        |        |        |
| 3       | , 3 mpk, biw | 182±4    | 232±4 | 308±7 | 440±11 | 530±12 | 810±19 | 1109±2 |
|         |              | 3        | 9     | 9     | 2      | 1      | 7      | 50     |
| BCY8245 |              |          |       |       |        |        |        |        |
| 4       | , 5 mpk, qw  | 180±5    | 209±6 | 236±7 | 383±11 | 375±11 | 365±79 | 476±10 |
|         |              | 2        | 6     | 2     | 9      | 5      |        | 3      |

【0753】 5.3 腫瘤生長抑制之分析

【0754】 根據治療起始後第 14 日測量的腫瘤體積，計算試驗藥物對於 NCI-H526 異體移植模式的腫瘤生長抑制率。

【0755】 表 33：腫瘤生長抑制之分析

| 組別 | 治療                     | 腫 瘤 體 積<br>(mm <sup>3</sup> ) <sup>a</sup> | T/C <sup>b</sup> (%) | TGI<br>(%) | <i>P</i> 值      |
|----|------------------------|--------------------------------------------|----------------------|------------|-----------------|
| 1  | 載劑, qw                 | 1365±208                                   | --                   | --         | --              |
| 2  | BCY8245,<br>3 mpk, qw  | 1205±79                                    | 88.3                 | 13.4       | <i>p</i> > 0.05 |
| 3  | BCY8245,<br>3 mpk, biw | 1109±250                                   | 81.3                 | 21.6       | <i>p</i> > 0.05 |
| 4  | BCY8245,<br>5 mpk, qw  | 476±103                                    | 34.9                 | 75.0       | <i>p</i> < 0.01 |

a. 平均值 ± SEM

b. 將治療組的組平均腫瘤體積除以對照組的組平均腫瘤體積，計算腫瘤生長抑制(T/C)

【0756】 6. 結果和討論

【0757】 本實施例評估試驗藥物對於 NCI-H526 異體移植模式之治療功效。將全部組別於多個時間點測量之腫瘤體積顯示於圖 22 以及表 32 和表 33。

【0758】 給予載劑治療之小鼠之平均腫瘤體積於第 14 日達到 1365<sup>3</sup>。BCY8245 於 3 mg/kg, qw (TV=1205 mm<sup>3</sup>, TGI=13.4%, *p* > 0.05) 和 3 mg/kg, biw (TV=1109 mm<sup>3</sup>, TGI=21.6%, *p* > 0.05) 出現些微的抗腫瘤活性，BCY8245 於 5 mg/kg, qw (TV=476 mm<sup>3</sup>, TGI=75.0%, *p* < 0.01)出現顯著的抗腫瘤活性。在此實施例中，BCY8245 於 5 mg/kg biw 導致動物減少了超過 10%的體重。該細胞株在 FACS 研究中顯示了 Nectin-4 的最低表現量，腫瘤生長受到 BCY8245 的抑制，但腫瘤並未消退，強調了最佳療效的目標驅動要求。

【0759】 實施例 9.7：試驗藥物治療 Panc2.13 異體移植 Balb/c 裸鼠之體內功效

【0760】 1. 研究目的

【0761】 本研究之目的係評估試驗藥物治療 Panc2.13 異體移植 Balb/c 裸鼠之體內抗腫瘤功效。

【0762】 2. 實驗設計

| 組別 | 治療      | n | 劑量<br>(mg/kg) | 藥劑體積<br>(μl/g) | 給藥途徑 | 時程  |
|----|---------|---|---------------|----------------|------|-----|
| 1  | 載劑      | 5 | --            | 10             | iv   | qw  |
| 2  | BCY8245 | 3 | 3 mg/kg       | 10             | iv   | qw  |
| 3  | BCY8245 | 3 | 3 mg/kg       | 10             | iv   | biw |
| 4  | BCY8245 | 3 | 5 mg/kg       | 10             | iv   | qw  |

【0763】 3. 材料

【0764】 3.1 動物和飼養條件

【0765】 3.1.1. 動物

物種：Mus Musculus

品系：Balb/c 裸鼠

年齡：6-8 周

性別：雌性

體重：18-22 g

動物數量：包含備用小鼠為 41 隻

【0766】 3.1.2. 飼養條件

小鼠存於各自之通氣籠內，每籠 3 或 5 隻，恆溫以及恆濕。

溫度：20~26 °C

濕度：40-70%

鼠籠：聚碳酸酯製造。尺寸為 300 mm x 180 mm x 150 mm。墊料為玉米芯，每周更換 2 次。

食物：研究期間動物可自由取得輻射消毒之乾燥顆粒食物。

飲水：動物可自由取得消毒過的飲用水。

鼠籠辨識：各籠的辨識辨識包括下列資訊：動物數、性別、品系、收貨日、治療、研究編號、組別編號、和治療始日。

動物辨識：動物均標記耳碼。

#### 【0767】 4. 實驗方法和步驟

##### 【0768】 4.1 細胞培養

【0769】 Panc2.13 腫瘤細胞於 37°C 以及 5% CO<sub>2</sub> 環境下培養於包含 15%熱滅活小牛血清和 10 units/ml 人類重組胰島素的 RPMI1640 培養基。腫瘤細胞每周進行 2 次繼代培養。收取指數成長期的細胞，用於腫瘤接種之計算以接種腫瘤。

##### 【0770】 4.2 腫瘤接種

【0771】 各小鼠於右腹皮下接種 Panc2.13 腫瘤細胞( $5 \times 10^6$ )並待其發展，該些腫瘤細胞係在含有基質膠(1:1)的 0.2 ml 的 PBS 中。當平均腫瘤體積約為 149 mm<sup>3</sup>時隨機分組這 41 隻動物。各組中試驗藥物之給藥和動物數量顯示於下列實驗設計表。

【0772】 4.3 製備試驗藥物配方

| 試驗藥物    | 濃 度<br>(mg/ml) | 配 方                                        |
|---------|----------------|--------------------------------------------|
| 載劑      | -              | 25 mM 組胺酸(pH 7)，10%蔗糖                      |
| BCY8245 | 0.5            | 400 µl 的 1 mg/ml BCY8245 稀釋於 400 µl 組胺酸緩衝液 |
| BCY8245 | 0.3            | 240 µl 的 1 mg/ml BCY8245 稀釋於 560 µl 組胺酸緩衝液 |

【0773】 4.4 樣本收集

【0774】 在實驗結束時，在最後一次給藥後 2 小時後收集所有組別的腫瘤。

【0775】 5. 結果

【0776】 5.1 腫瘤生長曲線

【0777】 圖 23 顯示腫瘤生長曲線。

【0778】 5.2 腫瘤體積紀錄

【0779】 表 34 顯示帶有 Panc2.13 異體移植之 Balb/c 雌性裸鼠隨時間的平均腫瘤體積。

【0780】 表 34：腫瘤體積對應時間之記錄

| 組別 | 治療                  | 治療起始後之天數 |       |       |       |       |       |       |
|----|---------------------|----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|    |                     | 0        | 2     | 4     | 7     | 9     | 11    | 14    |
| 1  | 載劑, qw              | 149±1    | 202±1 |       | 321±1 | 410±2 | 479±3 | 545±1 |
|    |                     | 2        | 2     | 240±9 | 7     | 7     | 2     | 7     |
| 2  | BCY8245, 3 mpk, qw  | 149±3    | 160±3 | 191±3 | 215±5 | 242±6 | 259±5 | 271±5 |
|    |                     | 4        | 3     | 9     | 3     | 2     | 9     | 4     |
| 3  | BCY8245, 3 mpk, biw | 148±4    | 170±3 | 204±5 | 216±5 | 236±5 | 241±6 | 231±5 |
|    |                     | 6        | 8     | 7     | 6     | 9     | 0     | 7     |
| 4  | BCY8245, 5 mpk, qw  | 149±1    | 180±1 | 231±3 | 242±3 | 248±4 | 231±3 | 238±4 |
|    |                     | 8        | 1     | 3     | 4     | 0     | 7     | 0     |

【0781】 5.3 腫瘤生長抑制之分析

【0782】 根據治療起始後第 14 日測量的腫瘤體積，計算試驗藥物對於 Panc2.13 異體移植模式的腫瘤生長抑制率。

【0783】 表 35：腫瘤生長抑制之分析

| 組別 | 治療                  | 腫瘤體積<br>(mm <sup>3</sup> ) <sup>a</sup> | T/C <sup>b</sup><br>(%) | TGI<br>(%) | P 值，與載劑<br>比較   |
|----|---------------------|-----------------------------------------|-------------------------|------------|-----------------|
| 1  | 載劑, qw              | 545±17                                  | --                      | --         | --              |
| 2  | BCY8245, 3 mpk, qw  | 271±54                                  | 49.6                    | 69.2       | <i>p</i> <0.01  |
| 3  | BCY8245, 3 mpk, biw | 231±57                                  | 42.3                    | 79.1       | <i>p</i> <0.001 |
| 4  | BCY8245, 5 mpk, qw  | 238±40                                  | 43.6                    | 77.5       | <i>p</i> <0.001 |

a. 平均值 ± SEM

b. 將治療組的組平均腫瘤體積除以對照組的組平均腫瘤體積，計算腫瘤生長抑制(T/C)

【0784】 6. 結果和討論

【0785】 本實施例評估試驗藥物對於 Panc2.13 異體移植模式之治療功效。將全部組別於多個時間點測量之腫瘤體積顯示於圖 23 以及表 34 和表 35。

【0786】 給予載劑治療之小鼠之平均腫瘤體積於第 14 日達到 545 mm<sup>3</sup>。BCY8245 於 3 mg/kg, qw (TV=271 mm<sup>3</sup>, TGI=69.2%,  $p<0.01$ )、3 mg/kg, biw (TV=231 mm<sup>3</sup>, TGI=79.1%,  $p<0.001$ ) 和 5 mg/kg, qw (TV=238 mm<sup>3</sup>, TGI=77.5%,  $p<0.001$ )產生顯著抗腫瘤活性。在此實施例中，在所有的 5 mg/kg qw 組別中的動物體重平均減少了 15%。該細胞株在 FACS 研究中顯示了 Nectin-4 的中等表現量，腫瘤生長受到 BCY8245 的抑制，但腫瘤並未消退。

【0787】 實施例 9.8：試驗藥物治療 MDA-MB-468 異體移植 Balb/c 裸鼠之體內功效

【0788】 1. 研究目的

【0789】 本研究之目的係評估 BCY8245 以及 BCY8245 與 BCY8234 的組合使用對於治療 MDA-MB-468 異體移植 Balb/c 裸鼠之體內抗腫瘤功效，以確定靶向結合在最佳功效中所起的作用。

【0790】 2. 實驗設計

| 組別 | 治療              | 劑量<br>(mg/kg) | N | 給藥途徑 | 時程      |
|----|-----------------|---------------|---|------|---------|
| 1  | 載劑              | --            | 4 | i.v. | Qw, 3 周 |
| 2  | BCY8245         | 0.3           | 4 | i.v. | Qw, 3 周 |
| 3  | BCY8245         | 1             | 4 | i.v. | Qw, 3 周 |
| 4  | BCY8245         | 3             | 4 | i.v. | Qw, 3 周 |
| 5  | BCY8245+BCY8234 | 1+300         | 4 | i.v. | Qw, 3 周 |
| 6  | BCY8245+BCY8234 | 3+300         | 4 | i.v. | Qw, 3 周 |

註：N 為在每組中動物的數目

【0791】 3. 材料

【0792】 3.1 動物和飼養條件

【0793】 3.1.1. 動物

物種：Mus Musculus

品系：Balb/c 裸鼠

年齡：6-8 周

性別：雌性

體重：18-22 g

動物數量：包含備用小鼠為 36 隻

【0794】 3.1.2. 飼養條件

小鼠存於各自之通氣籠內，每籠 4 隻，恆溫以及恆濕。

溫度：20~26 °C

濕度：40-70%

鼠籠：聚碳酸酯製造。尺寸為 300 mm x 180 mm x 150 mm。墊料為玉米芯，每周更換 2 次。

食物：研究期間動物可自由取得輻射消毒之乾燥顆粒食物。

飲水：動物可自由取得消毒過的飲用水。

鼠籠辨識：各籠的辨識辨識包括下列資訊：動物數、性別、品系、收貨日、治療、研究編號、組別編號、和治療始日。

動物辨識：動物均標記耳碼。

#### 【0795】 4. 實驗方法和步驟

##### 【0796】 4.1 細胞培養

【0797】 腫瘤細胞於 37°C 以及 0% CO<sub>2</sub> 環境下培養於包含 10% 熱滅活小牛血清的 Leibovitz's L-15 培養基。腫瘤細胞每周進行 2 次繼代培養。收取指數成長期的細胞，用於腫瘤接種之計算以接種腫瘤。

##### 【0798】 4.2 腫瘤接種

【0799】 各小鼠於右腹皮下接種 MDA-MB-468 腫瘤細胞( $10 \times 10^6$ )並待其發展，該些腫瘤細胞係在含有 50% 基質膠的 0.2 ml 的 PBS 中。當平均腫瘤體積約為 186 mm<sup>3</sup> 時隨機分組這 36 隻動物。各組中試驗藥物之給藥和動物數量顯示於下列實驗設計表。

##### 【0800】 4.3 製備試驗藥物配方

| 試驗藥物    | 純度     | 濃 度<br>(mg/ml) | 配 方                                         |
|---------|--------|----------------|---------------------------------------------|
| 載劑      | -      | -              | 25 mM 組胺酸(pH 7)，10%蔗糖                       |
| BCY8245 | 99.4%  | 1              | 5.0 mg 的 BCY8245 溶解於 4.97 ml 組胺酸緩衝液         |
|         |        | 0.03           | 36 µl 的 1 mg/ml BCY8245 稀釋於 1164 µl 組胺酸緩衝液  |
|         |        | 0.1            | 120 µl 的 1 mg/ml BCY8245 稀釋於 1080 µl 組胺酸緩衝液 |
|         |        | 0.3            | 360 µl 的 1 mg/ml BCY8245 稀釋於 840 µl 組胺酸緩衝液  |
| BCY8234 | 98.10% | 30             | 147 mg 的 BCY8234 溶解於 4.807 ml 組胺酸緩衝液        |

【0801】 4.4 樣本收集

【0802】 在第 21 天時，收集第 5 和 6 組的腫瘤以進行 FFPE。在實驗結束時，收集第 3 組的腫瘤以進行 FFPE。

【0803】 5. 結果

【0804】 5.1 腫瘤生長曲線

【0805】 圖 24 顯示腫瘤生長曲線。

【0806】 5.2 腫瘤體積紀錄

【0807】 表 36 至 38 顯示帶有 MDA-MB-468 異體移植之 Balb/c 雌性裸鼠隨時間的平均腫瘤體積。

【0808】 5.3 腫瘤生長抑制之分析

【0809】 根據治療起始後第 21 日測量的腫瘤體積，計算試驗藥物對於 MDA-MB-468 異體移植模式的腫瘤生長抑制率。

【0810】 6. 結果和討論

【0811】 本實施例評估試驗藥物對於 MDA-MB-468 異體移植模式之治療功效。將全部組別於多個時間點測量之腫瘤體積顯示於圖 24 以及表 36 至表 39。

【0812】 給予載劑治療之小鼠之平均腫瘤體積於第 21 日達到  $420 \text{ mm}^3$ 。BCY8245 於  $1 \text{ mg/kg}$ , qw ( $\text{TV}=204 \text{ mm}^3$ ,  $\text{TGI}=92.1\%$ ,  $p<0.001$ )、 $3 \text{ mg/kg}$ , qw ( $\text{TV}=27 \text{ mm}^3$ ,  $\text{TGI}=164.9\%$ ,  $p<0.001$ )產生顯著抗腫瘤活性，其具有劑量依賴性。BCY8245 於  $0.3 \text{ mg/kg}$  qw 或 biw 並未出現任何抗腫瘤活性。

【0813】 BCY8245 於  $1 \text{ mg/kg}$ , qw 和  $3 \text{ mg/kg}$ , qw 並與 BCY8234(無毒素的同源肽)於  $300 \text{ mg/kg}$ , qw 一起使用，產生顯著抗腫瘤活性( $\text{TV}=242 \text{ mm}^3$ ,  $\text{TGI}=75.4\%$ ,  $p<0.01$ )。當與單獨使用 BCY8245 進行比較時， $300 \text{ mg/kg}$  的 BCY8234 拮抗  $3 \text{ mg/kg}$  的 BCY8245 的抗腫瘤活性( $p < 0.001$ )。透過競爭性無毒素胜肽降低功效證實了靶向結合對於最佳療效的重要性。在接下來的監測過程中，以 BCY8245  $1 \text{ mg/kg}$  qw 治療的小鼠顯示出明顯的腫瘤復發，而以 BCY8245  $3 \text{ mg/kg}$  qw 治療的小鼠沒有顯示出腫瘤復發。

【0814】表 36：腫瘤體積對應時間之記錄 (第 0 天至第 21 天)

| 組別 | 治療                               | 治療起始後之天數 |        |        |        |        |        |        |        |        |        |
|----|----------------------------------|----------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
|    |                                  | 0        | 2      | 4      | 7      | 9      | 11     | 14     | 16     | 18     | 21     |
| 1  | 載劑, qw                           | 182±15   | 196±18 | 217±18 | 260±15 | 283±19 | 302±26 | 335±27 | 362±28 | 386±31 | 420±37 |
| 2  | BCY8245<br>0.3 mpk, qw           | 188±21   | 189±19 | 211±21 | 235±28 | 252±25 | 253±33 | 275±26 | 277±27 | 295±26 | 300±27 |
| 3  | BCY8245<br>1 mpk, qw             | 185±21   | 187±22 | 183±22 | 190±28 | 205±29 | 195±27 | 201±25 | 197±22 | 218±24 | 204±19 |
| 4  | BCY8245<br>3 mpk, qw             | 181±14   | 171±17 | 163±10 | 141±21 | 113±16 | 92±5   | 66±4   | 58±2   | 41±2   | 27±1   |
| 5  | BCY8245+BCY8234<br>1+300 mpk, qw | 184±15   | 189±22 | 194±28 | 212±30 | 221±34 | 221±39 | 223±36 | 211±38 | 221±51 | 242±67 |
| 6  | BCY8245+BCY8234<br>3+300 mpk, qw | 184±16   | 178±57 | 193±36 | 197±46 | 179±44 | 138±41 | 137±32 | 114±24 | 110±24 | 99±18  |

【0815】 表 37：腫瘤體積對應時間之記錄 (第 23 天至第 32 天)

| 組別 | 治療          | 治療起始後之天數 |        |        |        |        |
|----|-------------|----------|--------|--------|--------|--------|
|    |             | 23       | 25     | 28     | 30     | 32     |
| 1  | 載劑, qw      | 434±35   | 460±38 | 504±32 | 535±46 | 548±51 |
|    | BCY8245     |          |        |        |        |        |
| 2  | 0.3 mpk, qw | 284±14   | 268±10 | 254±15 | 240±21 | 241±32 |
|    | BCY8245     |          |        |        |        |        |
| 3  | 1 mpk, qw   | 200±16   | 199±13 | 210±6  | 221±14 | 239±16 |
|    | BCY8245     |          |        |        |        |        |
| 4  | 3 mpk, qw   | 22±3     | 19±3   | 20±3   | 15±2   | 15±1   |
|    | BCY8245     |          |        |        |        |        |

【0816】表 38：腫瘤體積對應時間之記錄 (第 35 天至第 91 天)

| 天數 | 第 1 組，載<br>劑，qw，<br>於 PG-D32 給<br>藥 BCY8245<br>5 mpk | 第 2 組，<br>BCY8245，<br>0.3 mpk，<br>qw | 第 3 組<br>BCY8245，<br>1 mpk，qw | 第 4 組，<br>BCY8245，<br>3 mpk，qw |
|----|------------------------------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|
| 35 | 455±81                                               | 237±33                               | 255±15                        | 19±2                           |
| 37 | 373±92                                               | 246±40                               | 292±19                        | 16±2                           |
| 39 | 247±48                                               | 248±37                               | 304±36                        | 14±1                           |
| 42 | 134±18                                               | 245±48                               | 314±42                        | 14±2                           |
| 44 | 108±3                                                | 251±48                               | 327±42                        | 18±4                           |
| 46 | 79±3                                                 | 248±61                               | 342±55                        | 19±4                           |
| 49 | 63±8                                                 | 250±65                               | 356±59                        | 20±4                           |
| 51 | 62±5                                                 | 264±68                               | 374±71                        | 18±5                           |
| 53 | 53±12                                                | 268±81                               | 381±87                        | 22±4                           |
| 56 | 52±13                                                | 271±87                               | 416±104                       | 21±4                           |
| 58 | 58±0                                                 | 267±95                               | 433±113                       | 20±5                           |
| 60 | 61±7                                                 | 270±108                              | 464±119                       | 18±6                           |
| 64 | 71±23                                                | 276±132                              | 532±154                       | 23±6                           |
| 67 | 66±14                                                | 269±137                              | 550±162                       | 23±5                           |
| 71 | 73±5                                                 | 280±155                              | 565±170                       | 24±7                           |
| 74 | 82±4                                                 | 295±167                              | 594±173                       | 27±8                           |
| 78 | 90±8                                                 | 313±194                              | 612±195                       | 23±6                           |
| 81 | 104±17                                               | 291±192                              | 639±206                       | 27±8                           |
| 84 | 110±1                                                | 301±194                              | 695±234                       | 34±7                           |
| 88 | 106±7                                                | 277±194                              | 743±236                       | 32±7                           |
| 91 | 110±3                                                | 293±209                              | 771±240                       | 26±6                           |

【0817】 表 39：腫瘤生長抑制之分析

| 組別 | 治療                               | 腫瘤體積<br>(mm <sup>3</sup> ) <sup>a</sup> | T/C <sup>b</sup><br>(%) | TGI<br>(%) | 組合使用，與<br><i>P</i> 值，與載劑比較 |                 |
|----|----------------------------------|-----------------------------------------|-------------------------|------------|----------------------------|-----------------|
|    |                                  |                                         |                         |            | BCY8245<br>比較              |                 |
| 1  | 載劑, qw                           | 420±37                                  | --                      | --         | --                         | --              |
| 2  | BCY8245<br>0.3 mpk, qw           | 300±27                                  | 71.4                    | 52.7       | <i>p</i> >0.05             |                 |
| 3  | BCY8245<br>1 mpk, qw             | 204±19                                  | 48.6                    | 92.1       | <i>p</i> <0.001            |                 |
| 4  | BCY8245<br>3 mpk, qw             | 27±1                                    | 6.5                     | 164.9      | <i>p</i> <0.001            |                 |
| 5  | BCY8245+BCY8234<br>1+300 mpk, qw | 242±67                                  | 57.8                    | 75.4       | <i>p</i> <0.01             | <i>p</i> >0.05  |
| 6  | BCY8245+BCY8234<br>3+300 mpk, qw | 99±18                                   | 23.5                    | 135.9      | <i>p</i> <0.001            | <i>P</i> <0.001 |

a. 平均值 ± SEM

b. 將治療組的組平均腫瘤體積除以對照組的組平均腫瘤體積，以計算腫瘤生長抑制率(T/C)

【0818】 實施例 9.9：試驗藥物治療 MDA-MB-468 異體移植 Balb/c 裸鼠之體內功效

【0819】 1. 研究目的

【0820】 本研究之目的係評估 BCY8245 或與 BCY8234 的組合使用對於治療 MDA-MB-468 異體移植 Balb/c 裸鼠之體內抗腫瘤功效。

【0821】 2. 實驗設計

| 組別 | 治療                  | 劑量<br>(mg/kg) | N | 給藥途徑 | 時程      |
|----|---------------------|---------------|---|------|---------|
| 1  | 載劑                  | --            | 5 | i.v. | Qw, 3 周 |
| 2  | BCY8245             | 1             | 5 | i.v. | Qw, 3 周 |
| 3  | BCY8245             | 3             | 5 | i.v. | Qw, 3 周 |
| 4  | BCY8245+<br>BCY8234 | 3+300<br>=300 | 5 | i.v. | Qw, 3 周 |

註：N 為在每組中動物的數目

【0822】 3. 材料

【0823】 3.1 動物和飼養條件

【0824】 3.1.1. 動物

物種：Mus Musculus

品系：Balb/c 裸鼠

年齡：6-8 周

性別：雌性

體重：18-22 g

動物數量：包含備用小鼠為 20 隻

3.1.2. 飼養條件

小鼠存於各自之通氣籠內，每籠 5 隻，恆溫以及恆濕。

溫度：20~26 °C

濕度：40-70%

鼠籠：聚碳酸酯製造。尺寸為 300 mm x 180 mm x 150 mm。墊料為玉米芯，  
每周更換 2 次。

食物：研究期間動物可自由取得輻射消毒之乾燥顆粒食物。

飲水：動物可自由取得消毒過的飲用水。

鼠籠辨識：各籠的辨識包括下列資訊：動物數、性別、品系、收貨日、治療、研究編號、組別編號、和治療始日。

動物辨識：動物均標記耳碼。

#### 【0825】 4. 實驗方法和步驟

##### 【0826】 4.1 細胞培養

【0827】 腫瘤細胞於 37°C 以及 0% CO<sub>2</sub> 環境下培養於包含 10% 熱滅活小牛血清的 Leibovitz's L-15 培養基。腫瘤細胞每周進行 2 次繼代培養。收取指數成長期的細胞，用於腫瘤接種之計算以接種腫瘤。

##### 【0828】 4.2 腫瘤接種

【0829】 各小鼠於右腹皮下接種 MDA-MB-468 腫瘤細胞( $10 \times 10^6$ )並待其發展，該些腫瘤細胞係在含有 50% 基質膠的 0.2 ml 的 PBS 中。當平均腫瘤體積約為 464 mm<sup>3</sup> 時隨機分組這 20 隻動物。各組中試驗藥物之給藥和動物數量顯示於下列實驗設計表。

##### 【0830】 4.3 製備試驗藥物配方

| 試驗藥物                       | 純度     | 濃 度<br>(mg/ml) | 配 方                                         |
|----------------------------|--------|----------------|---------------------------------------------|
| 載劑                         | -      | -              | 25 mM 組胺酸(pH 7) , 10%蔗糖                     |
| BCY8245                    | 99.7%  | 1              | 5.0 mg 的 BCY8245 溶解於 4.985 ml 組胺酸緩衝液        |
|                            |        | 0.1            | 140 µl 的 1 mg/ml BCY8245 稀釋於 1260 µl 組胺酸緩衝液 |
|                            |        | 0.3            | 420 µl 的 1 mg/ml BCY8245 稀釋於 980 µl 組胺酸緩衝液  |
| BCY8234                    | 98.10% | 30             | 147 mg 的 BCY8234 溶解於 4.807 ml 組胺酸緩衝液        |
| 1. 25 mM 組胺酸(pH 7) , 10%蔗糖 |        |                |                                             |

【0831】 4.4 樣本收集

【0832】 在實驗結束時，收集第 3 組的腫瘤以進行 FFPE。

【0833】 5. 結果

【0834】 5.1 腫瘤生長曲線

【0835】 圖 25 顯示腫瘤生長曲線。

【0836】 5.2 腫瘤體積紀錄

【0837】 表 40 至 42 顯示帶有 MDA-MB-468 異體移植之 Balb/c 雌性裸鼠隨時間的平均腫瘤體積。

【0838】 5.3 腫瘤生長抑制之分析

【0839】 根據治療起始後第 28 日測量的腫瘤體積，計算試驗藥物對於 MDA-MB-468 異體移植模式的腫瘤生長抑制率。

【0840】 6. 結果和討論

【0841】 本實施例評估試驗藥物對於 MDA-MB-468 異體移植模式之治療功效。將全部組別於多個時間點測量之腫瘤體積顯示於圖 25 以及表 40 至表 43。

【0842】 故意選用較之前大的初始腫瘤尺寸以確定 BCY8245 是否可在較大尺寸的腫瘤中展示出療效。給予載劑治療之小鼠之平均腫瘤體積於第 28 日達到  $773 \text{ mm}^3$ 。在第 28 天時，BCY8245 於  $1 \text{ mg/kg, qw}$  ( $\text{TV}=384 \text{ mm}^3$ ,  $\text{TGI}=126.6\%$ ,  $p<0.001$ ) 和  $3 \text{ mg/kg, qw}$  ( $\text{TV}=50 \text{ mm}^3$ ,  $\text{TGI}=234.6\%$ ,  $p<0.001$ ) 產生顯著抗腫瘤活性，其具有劑量依賴性。其中，用 BCY8245 ( $3 \text{ mg/kg qw}$ ) 治療的小鼠在停止治療後出現一些腫瘤復發，從第 76 天開始的給藥對於腫瘤的完全消退並沒有效果。

【0843】 在第 28 天時，BCY8245 ( $3 \text{ mg/kg, qw}$ ) 和 BCY8234 ( $300 \text{ mg/kg, qw}$ ) 的組合使用產生顯著的抗腫瘤活性 ( $\text{TV}=55 \text{ mm}^3$ ,  $\text{TGI}=234.0\%$ ,  $p<0.001$ )，並且在整個監測過程中並未出現任何腫瘤復發。

【0844】 在接下來的 3 周，用  $10 \text{ mg/kg}$  Nectin-4 ADC 或  $5 \text{ mg/kg}$  BCY8245 治療的載劑組的小鼠，以及於 PG-D28 用  $5 \text{ mg/kg}$  BCY8245 治療的第 2 組 (BCY8245,  $1 \text{ mpk, qw}$ ) 的小鼠顯示出有效的腫瘤消退，之後，在沒有投藥的接下來 4 周出現腫瘤再次生長。

【0845】 BCY8245 在先前給予載劑的組別中對於約  $450 \text{ mm}^3$  能夠造成腫瘤消退，且在大約  $770 \text{ mm}^3$  的初始腫瘤中也能夠造成腫瘤消退。

【0846】表 40：腫瘤體積對應時間之記錄 (第 0 天至第 28 天)

| 組<br>別 | 治 療                                | 治療起始後之天數 |        |             |             |             |             |             |             |             |             |             |             |             |
|--------|------------------------------------|----------|--------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
|        |                                    | 0        | 2      | 5           | 7           | 9           | 12          | 14          | 16          | 19          | 21          | 23          | 26          | 28          |
| 1      | 載劑, qw                             | 466±89   | 494±94 | 529<br>±106 | 548<br>±109 | 574<br>±117 | 602<br>±130 | 632<br>±133 | 659<br>±129 | 686<br>±133 | 706<br>±145 | 741<br>±148 | 769<br>±157 | 773<br>±155 |
| 2      | BCY8245<br>1mpk, qw                | 466±22   | 480±24 | 453<br>±29  | 474<br>±25  | 446<br>±31  | 461<br>±34  | 460<br>±28  | 433<br>±37  | 412<br>±32  | 430<br>±32  | 421<br>±34  | 382<br>±37  | 384<br>±41  |
| 3      | BCY8245<br>3 mpk, qw               | 464±28   | 451±24 | 388<br>±25  | 333<br>±30  | 284<br>±26  | 168<br>±24  | 129<br>±20  | 93<br>±23   | 83<br>±17   | 71<br>±19   | 60<br>±17   | 49<br>±17   | 50<br>±17   |
| 4      | BCY8245+BCY8234<br>(3+300) mpk, qw | 467±45   | 457±46 | 401<br>±47  | 389<br>±42  | 309<br>±25  | 205<br>±9   | 150<br>±9   | 125<br>±5   | 95±3        | 90±5        | 78±5        | 66±4        | 55±5        |

【0847】 表 41：腫瘤體積對應時間之記錄 (第 30 天至第 75 天)

| 治療起<br>始後之<br>天數 | 第 1 組，載<br>劑，qw，<br>於 PG-D28 給<br>藥 BCY8245<br>(5 mpk) | 第 2 組，<br>BCY8245<br>(1mpk) 於<br>PG-D28 改為<br>5mpk | 第 3 組，<br>BCY8245，<br>3mpk，qw | 第 4 組，<br>BCY8245+BCY8234<br>3+300 mpk，qw |
|------------------|--------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|-------------------------------|-------------------------------------------|
|                  |                                                        |                                                    |                               |                                           |
| 30               | 625±27                                                 | 351±42                                             | 44±18                         | 49±8                                      |
| 33               | 477±31                                                 | 213±29                                             | 43±20                         | 33±10                                     |
| 35               | 405±65                                                 | 151±18                                             | 44±20                         | 31±10                                     |
| 37               | 237±36                                                 | 98±16                                              | 50±24                         | 31±10                                     |
| 40               | 148±33                                                 | 89±17                                              | 55±29                         | 36±14                                     |
| 42               | 142±33                                                 | 95±16                                              | 66±32                         | 40±13                                     |
| 44               | 132±69                                                 | 103±20                                             | 71±33                         | 35±11                                     |
| 48               | 146±100                                                | 106±21                                             | 80±36                         | 43±14                                     |
| 51               | 171±122                                                | 103±21                                             | 91±43                         | 45±18                                     |
| 55               | 227±166                                                | 104±20                                             | 108±53                        | 42±13                                     |
| 56               | 264±182                                                | 120±23                                             | 125±58                        | 43±12                                     |
| 62               | 288±206                                                | 145±29                                             | 146±70                        | 40±12                                     |
| 65               | 316±212                                                | 163±31                                             | 147±74                        | 41±14                                     |
| 68               | 347±215                                                | 173±32                                             | 155±81                        | 46±13                                     |
| 72               | 368±242                                                | 180±36                                             | 170±89                        | 45±20                                     |
| 75               | 385±245                                                | 196±40                                             | 223±115                       | 43±19                                     |

【0848】 表 42：腫瘤體積對應時間之記錄 (第 79 天至第 103 天)

| 組<br>別 | 治療     | 治療起始後之天數 |       |       |       |       |       |       |       |
|--------|--------|----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|        |        | 79       | 82    | 86    | 89    | 93    | 96    | 100   | 103   |
| 3      | BCY824 |          |       |       |       |       |       |       |       |
|        | 5      | 221±1    | 198±1 | 185±1 | 180±1 | 155±9 | 166±9 | 221±1 | 250±1 |
|        | 3 mpk, | 18       | 07    | 05    | 02    | 1     | 5     | 19    | 25    |
|        | qw     |          |       |       |       |       |       |       |       |

【0849】 表 43：腫瘤生長抑制之分析

| 組別 | 治療                               | 腫 瘤 體<br>積<br>(mm <sup>3</sup> ) <sup>a</sup> | T/C <sup>b</sup><br>(%) | TGI<br>(%) | P 值，與<br>載 劑 比<br>較 |
|----|----------------------------------|-----------------------------------------------|-------------------------|------------|---------------------|
| 1  | Vehicle, qw                      | 773±155                                       | --                      | --         | --                  |
| 2  | BCY8245<br>1mpk, qw              | 384±41                                        | 49.7                    | 126.6      | <i>p</i> <0.001     |
| 3  | BCY8245<br>3 mpk, qw             | 50±17                                         | 6.4                     | 234.6      | <i>p</i> <0.001     |
| 4  | BCY8245+BCY8234<br>3+300 mpk, qw | 55±5                                          | 7.1                     | 234.0      | <i>p</i> <0.001     |

a. 平均值 ± SEM

b. 將治療組的組平均腫瘤體積除以對照組的組平均腫瘤體積，計算腫瘤生長抑制(T/C)

【0850】 實施例 10：體內PK研究。

【0851】 對MDA-MB-468 異種移植動物注射 3 mg/kg的BCY8245(BT8009)。

在各時間點，對動物實施安樂死，取血漿和腫瘤並速凍。分析樣本的MMAE。

BT8009 (BCY8245)的血漿水平來自歷史PK研究。圖 33 顯示血漿中MMAE的濃

度、腫瘤中的MMAE以及血漿中的BT8009 的濃度。MMAE在腫瘤中的滯留時間比血漿中更久，這支持了全身暴露顯著低於腫瘤暴露的假設。

【0852】 實施例 11：HCS測定

【0853】 HCS測定係用於Nectin-4 BDC結合研究。將細胞與試驗劑一起培養，然後洗滌。藉由針對MMAE的螢光抗體進行檢測。MDA-MB-468 細胞顯示中度的Nectin-4 表現量，其中 20000 個細胞顯示出最佳圖像。NCI-H292 細胞在該測定法中顯示低表現，即使在 20000 細胞中，MMAE的檢測也很差。圖 34 和表 44 顯示MDA-MB-468 細胞株中的HCS數據。

【0854】 表 44

| 試驗物          | 最大螢光強度 | Kd (nM) | 歷史 Kd (nM) |
|--------------|--------|---------|------------|
| Nectin-4 ADC | 33.63  | 0.2     | 0.28±0.07  |
| BCY8245      | 13.34  | 3.52    | 5.18       |
| MMAE         | 2.95   | >10000  | >10000     |

【0855】 Nectin-4 ADC和BCY8245 滯留在細胞上並與膜染色劑共定位。BCY8781 和MMAE顯示出最小的滯留。MDA-MB-468 細胞株上所有化合物的Kd與歷史資料一致。Nectin-4 ADC在MDA-MB-468 細胞株上顯示出可檢測的結合親和力。BCY8425 顯示一位數的奈米莫耳親和力，其Bmax低於Nectin-4 ADC。最大螢光強度降低是因為Nectin-4 ADC的MMAE與藥物的比例為 4，而BCY8245 的MMAE與藥物的比例為 1。BCY8781 對MDA-MB-468 細胞株的結合親和力很弱，而MMAE對在MDA-MB-468 細胞株上沒有可檢測的結合親和力。

【0856】 實施例 12: BCY8245 治療兩種PDX模式之體內功效

【0857】 目的

【0858】 評估BCY8245 在非小鱗狀細胞癌和腺癌(均為非小細胞癌)的PDX模式中的療效。

【0859】 動物

物種：Mus Musculus

品系：Balb/c裸鼠

年齡：6-8 周

性別：雌性

體重：18-22

【0860】 試驗藥物

BCY8245 和Nectin-4 ADC 或BCY8781

【0861】 研究前的動物

【0862】 各小鼠於右腹皮下接種LU-01-0007 或LU-01-0412 腫瘤片段(約 30 mm<sup>3</sup>)以發展腫瘤。當平均腫瘤體積達到 161 mm<sup>3</sup> (LU-01-0007)或 147 mm<sup>3</sup> (LU-01-0412)時隨機分組這 20 隻動物。

【0863】 日常測量和終點

【0864】 每天檢查動物的腫瘤生長和治療對正常行為的任何影響，例如活動能力、食物和水的消耗(僅通過觀察)、體重增加/減少、眼睛/頭髮黯淡以及任何實驗方法敘述的其他異常影響。根據每個子集中的動物數量記錄死亡和觀察到的臨床症狀。

【0865】 主要終點為觀察是否可延緩腫瘤生長或可以治癒小鼠。使用卡尺每週測量腫瘤體積的二維尺寸三次，並使用以下公式表示體積(mm<sup>3</sup>)： $V = 0.5 \times a \times b^2$ ，其中a和b分別是腫瘤的長徑和短徑。然後將腫瘤大小用於T/C值的計算。T/C

值(以百分比表示)是抗腫瘤效力的指標；T和C分別是在指定天數的治療組和對照組的平均體積。

【0866】 使用以下公式計算各組的TGI： $TGI(\%) = [1 - (T_i - T_0) / (V_i - V_0)] \times 100$ ； $T_i$ 是治療組在指定日期的平均腫瘤體積， $T_0$ 是治療組在治療起始當天的平均腫瘤體積， $V_i$ 是載劑對照組在跟 $T_i$ 同日的平均腫瘤體積，以及 $V_0$ 是載劑組在治療起始當天的平均腫瘤體積。

【0867】 圖 26 和 27 顯示了這些研究的結果。

【0868】 Lu-01-0412 (圖 26)：BCY8245 在此PDX模式中產生具有劑量相關性的功效，其中，於 1 mg/kg qw時腫瘤生長速率下降，但於 3 mg/kg qw時腫瘤消退至基準線。在停止給藥後(第 21 天)，到研究開始後的 105 天，有 5/6 動物沒有出現腫瘤再生長。出現再生長的單一動物對 3 mg/kg BCY8245 有反應，並顯示腫瘤恢復消退至基準線。非結合BDC之 BCY8781 以 3 mg/kg的劑量具有穩定的疾病狀態，並且在停止給藥後腫瘤以與載劑治療組相同的速率迅速生長，強調了Nectin-4 的結合為這些藥物帶來功效的增強。大型腫瘤(載劑治療組)對於單獨給藥BCY8245 或 BCY8781 有所反應而產生消退。

【0869】 LU-01-0007 (圖 27)：BCY8245 產生具有劑量相關性的功效，於 1 mg/kg qw產生穩定的疾病，於 3 mg/kg產生完全消退。劑量必須維持至第 56 天才能達到完全消退(停止給藥時)。該組中沒有腫瘤再生長(後者在研究開始後一直保持到 126 天)。Nectin-4 ADC的功效相似。1 mg/kg疾病穩定組對劑量增加(3 和 5 mg/kg)有反應，表示低劑量的BCY8245 不會導致抗藥性的發展。

【0870】 實施例 13: BCY8245 對免疫功能受損小鼠中人類乳癌、食道癌和膀胱癌的低傳代次數PDX模式之體內功效評估

**【0871】 目的**

**【0872】** 評估在免疫功能受損小鼠的人類乳癌、食道癌和膀胱癌的低傳代次數腫瘤異體移植模型中雙環肽藥劑的抗腫瘤活性。

物種：小鼠

品系：Athymic Nude-Foxn1nu (免疫功能受損的)

來源：Envigo: Indianapolis, Indiana

性別：雌性

開始給藥的目標年齡：至少 6-8 周

開始給藥的目標體重：至少 18 克

適應期：3 天

**【0873】 實驗設計**

**【0874】** 研究前的動物：當夠多的儲備動物到達  $1.0 - 1.5 \text{ cm}^3$  時，收集腫瘤以重新植入研究前的動物中。研究前的動物將單側植入從儲備動物身上收集的腫瘤片段。各動物植入特定繼代批次並進行記錄。

**【0875】** 研究動物：在植入後七至十天開始記錄每個實驗的研究前腫瘤體積。當平均腫瘤體積達到  $150-300 \text{ mm}^3$  時，將根據腫瘤體積將動物分為治療組或對照組以用於給藥，給藥是從第 0 天開始。

**【0876】 試驗藥物**

**【0877】** BCY8245 和 Nectin-4 抗體藥物結合物係與載劑對照組比較。可能包括標準治療劑 Docetaxel。所有藥劑需要透過靜脈途徑給藥每周一次(qw)，劑量如圖所示。

**【0878】 日常測量**

【0879】 功效腫瘤體積：每周測量腫瘤體積兩次。在研究到達終點的當天收集最終腫瘤體積。如果可能的話，若發現動物垂死則收集最終腫瘤體積。

【0880】 功效動物體重：每周測量體重兩次。在研究到達終點的當天收集最終腫瘤體重，或是，若發現動物垂死則收集最終腫瘤體積，如果可能的話。與第 0 天相比，體重減輕 $\geq 10\%$ 的動物將提供DietGel®隨意餵養。若任何動物連續 7 天體重減輕 $>20\%$ ，或如果與第 0 天相比小鼠體重減輕超過 30%，將被視為垂死以及安樂死。

#### 【0881】 數據分析

【0882】 藥劑毒性：從第 0 天開始，每天觀察動物，且每周使用數字秤稱重兩次；將記錄每組的數據，包括單一和平均克重(Mean We $\pm$ SEM)，相對於第 0 天的平均體重變化百分比(%vD0)，並在研究完成時繪製%vD0。每天記錄動物死亡，並根據體重減輕和肉眼觀察確定其為與藥物有關的(D)、與技術有關的(T)、與腫瘤有關的(B)或未知的(U)；單一藥劑或組合使用的組別中，若平均%vD0  $> 20\%$ 及/或 $> 10\%$ 死亡率，則將被視為高於評估方案中該治療的最大耐受劑量(MTD)。研究結束時報導每個治療組的最大平均%vD0(體重最低點)。

【0883】 腫瘤生長抑制-從第 0 天開始，每周用數字卡尺測量腫瘤大小兩次，並記錄每組的數據，包括單一和平均腫瘤體積(Mean TV  $\pm$  SEM)；使用公式(1)計算腫瘤體積：TV = 寬度<sup>2</sup> x 長度 x 0.52。研究完成後，各治療組(T)相對於對照組(C)的腫瘤生長抑制率(%TGI)的計算和報告將透過初始(i)和最終(f)腫瘤量測使用公式(2)計算而得： $\%TGI = 1 - (Tf - Ti) / (Cf - Ci)$ 。若單一小鼠連續兩次測量到的腫瘤體積小於等於在第 0 天測量到的 30%，則將被視為部分有效者(PR)。若單一小鼠缺少明顯腫瘤(連續兩次測量為 0.00 mm<sup>3</sup>)，則將被視為完全有效者(CR)；

一直持續到研究完成的CR則被視為無腫瘤倖存者(TFS)。載劑治療組別的腫瘤倍增時間(DT)可藉由公式 $DT = (Df - Di) * \log 2 / (\log TVf - \log TVi)$ 得到，其中，D=Day (天)以及TV = Tumor Volume (腫瘤體積)。本研究中收集的所有數據均以電子方式進行管理，並儲存在備用伺服器系統上。

【0884】 圖 28 至圖 31 顯示了這些研究結果。

【0885】 在代表膀胱癌(CTG-1771)、雌激素和黃體素陰性Her2 陽性乳癌(CTG-1171)、三陰性乳癌(CTG-1106)和食道癌(CTG-0896)的四個低傳代次數PDX模式中測試了BCY8245)。在所有這些模型中，BCY8245 均顯示出出色的功效，可引起腫瘤消退，並且這四個中的三個達到完全消退至基準線。在所有情況下功效均與ADC相當，並且優於或等於Docetaxel SOC。在所有模式中，BCY8245 的耐受性均優於Docetaxel。

【符號說明】

【0886】 無

【生物材料寄存】

【0887】 無

【序列表】

- <110> 英商拜西可泰克斯有限公司
- <120> 對 NECTIN-4 具有專一性之雙環胜肽配體
- <130> BIC-C-P2584TW
- <150> GB 1810250.9
- <151> 2018-06-22
- <150> GB 1815684.4
- <151> 2018-09-26
- <150> GB 1818499.4
- <151> 2018-11-13
- <150> GB 1904632.5
- <151> 2019-04-02
- <160> 2
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 15
- <212> PRT
- <213> Artificial Sequence
- <220>
- <223> Synthetic
- <220>
- <221> Xaa
- <222> (3) .. (3)
- <223> 1-Nal
- <220>
- <221> Xaa
- <222> (4) .. (4)
- <223> dD

<220>  
<221> Xaa  
<222> (7)..(7)  
<223> HArg

<220>  
<221> Xaa  
<222> (13)..(13)  
<223> HyP

<400> 1

Cys Pro Xaa Xaa Cys Met Xaa Asp Trp Ser Thr Pro Xaa Trp Cys  
1 5 10 15

<210> 2  
<211> 18  
<212> PRT  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Synthetic

<220>  
<221> Xaa  
<222> (18)..(18)  
<223> Sar6-K(Fl)

<400> 2

Ala Cys Pro Phe Gly Cys His Thr Asp Trp Ser Trp Pro Ile Trp Cys  
1 5 10 15

Ala Xaa

## 【發明申請專利範圍】

【第1項】一種對 Nectin-4 具有專一性之胜肽配體，包括：一多肽，包括至少三半胱胺酸殘基，該至少三半胱胺酸殘基被至少二環狀序列分隔；以及一分子支架，該分子支架與該多肽之該些半胱胺酸殘基形成共價鍵，使得至少二多肽環形成於該分子支架上；其中該胜肽配體包括以下胺基酸序列：

C<sub>i</sub>P[1Nal][dD]C<sub>ii</sub>M[HArg]DWSTP[HyP]WC<sub>iii</sub> (SEQ ID NO: 1)；

其中 1 Nal 表示 1-萘基丙胺酸，dD 表示 D-天冬氨酸，HArg 表示高精胺酸，HyP 表示經脯胺酸，C<sub>i</sub>、C<sub>ii</sub>、和 C<sub>iii</sub> 分別表示第一、第二、和第三半胱胺酸殘基或其醫藥上可接受之鹽。

【第2項】如申請專利範圍第 1 項所述之胜肽配體，包括一胺基酸序列，該胺基酸序列係選自：

[B-Ala][Sar10]-(SEQ ID NO: 1) (以下稱為 BCY8234)；

Ac-[B-Ala][Sar<sub>5</sub>]- (SEQ ID NO: 1) (以下稱為 BCY8122)；

Ac-(SEQ ID NO: 1) (以下稱為 BCY8126)；

(SEQ ID NO: 1) (以下稱為 BCY8116)；

螢光素-(SEQ ID NO: 1) (以下稱為 BCY8205)；以及

[PYA][B-Ala][Sar10]-(SEQ ID NO: 1) (以下稱為 BCY8846)。

【第3項】如申請專利範圍第 1 項或第 2 項所述之胜肽配體，包括一胺基酸序列，該胺基酸序列係選自：

[B-Ala][Sar10]-(SEQ ID NO: 1) (以下稱為 BCY8234)；

Ac-[B-Ala][Sar<sub>5</sub>]- (SEQ ID NO: 1) (以下稱為 BCY8122)；

Ac-(SEQ ID NO: 1) (以下稱為 BCY8126)；

(SEQ ID NO: 1) (以下稱為 BCY8116)；以及

螢光素-(SEQ ID NO: 1) (以下稱為 BCY8205)。

【第4項】 如申請專利範圍第 1 項或第 2 項所述之胜肽配體，包括一胺基酸序列，該胺基酸序列係選自：

Ac-[B-Ala][Sar<sub>5</sub>](SEQ ID NO: 1) (以下稱為 BCY8122)；

Ac-(SEQ ID NO: 1) (以下稱為 BCY8126)；以及

(SEQ ID NO: 1) (以下稱為 BCY8116)。

【第5項】 如申請專利範圍第 1 項或第 2 項所述之胜肽配體，包括一胺基酸序列，該胺基酸序列係選自：

Ac-[B-Ala][Sar<sub>5</sub>](SEQ ID NO: 1) (以下稱為 BCY8122)；以及

Ac-(SEQ ID NO: 1) (以下稱為 BCY8126)。

【第6項】 如申請專利範圍第 1 項或第 2 項所述之胜肽配體，包括一胺基酸序列，該胺基酸序列係選自：

[B-Ala][Sar<sub>10</sub>](SEQ ID NO: 1) (以下稱為 BCY8234)。

【第7項】 如申請專利範圍第 1 項或第 2 項所述之胜肽配體，其中該分子支架係選自 1,1',1''-(1,3,5-三嗪烷-1,3,5-三基)三丙-2-烯-1-酮(TATA)。

【第8項】 如申請專利範圍第1項或第2項所述之胜肽配體，其中該醫藥上可接受之鹽係選自游離酸或鈉鹽、鉀鹽、鈣鹽、鉍鹽。

【第9項】 如申請專利範圍第1項或第2項所述之胜肽配體，其中該Nectin-4係人類Nectin-4。

【第10項】 一種藥物結合物，包括結合至一或多效應物及/或官能基之如申請專利範圍第1至9項中任一項所述之一胜肽配體。

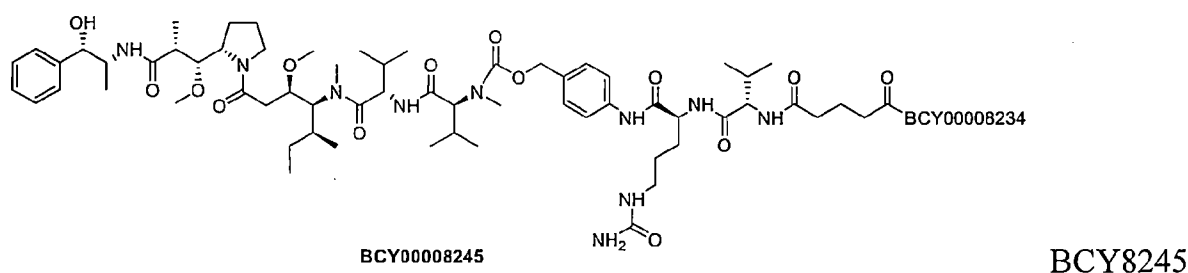
【第11項】如申請專利範圍第10項所述之藥物結合物，其係結合至一或多胞殺劑。

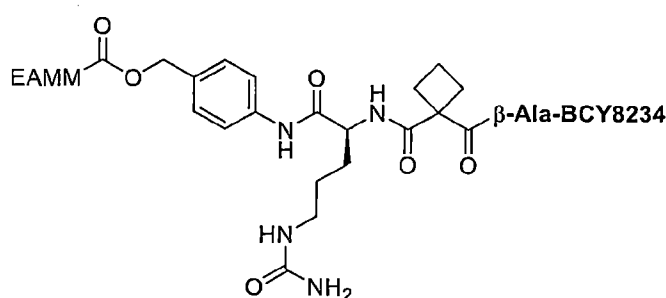
【第12項】如申請專利範圍第11項所述之藥物結合物，其中該胞殺劑係選自 MMAE或DM1。

【第13項】如申請專利範圍第 12 項所述之藥物結合物，其中該胞殺劑係 MMAE，並且該藥物結合物更包括選自以下之一連接子：-PABC-Cit-Val-戊二醯基 - (-PABC-Cit-Val-Glutaryl-) 或 -PABC- 環丁基 -Ala-Cit-βAla- (-PABC-cyclobutyl-Ala-Cit-βAla-)，其中 PABC 表示對胺基苄基胺甲酸酯 (p-aminobenzylcarbamate)。

【第14項】如申請專利範圍第 12 項所述之藥物結合物，其中該胞殺劑係 DM1，並且該藥物結合物更包括一連接子 -SPDB-(SO<sub>3</sub>H)-，其中 SPDB 表示 N-琥珀醯亞胺基-3-(2-吡啶基二硫基)丙酸酯 (N-succinimidyl 3-(2-pyridyldithio)propionate)。

【第15項】如申請專利範圍第 10 項所述之藥物結合物，其係選自：





或

BCY00008549

BCY8549，其中 BCY8234 為

[B-Ala][Sar10]-(SEQ ID NO:1)。

【第16項】一種醫藥組成物，包括申請專利範圍第 1 至 9 項中任一項所述之胜肽配體或申請專利範圍第 10 至 15 項中任一項所述之藥物結合物、以及一或多，醫藥上可接受之賦形劑。

【第17項】如申請專利範圍第 16 項所述之醫藥組成物，更包括一或多治療劑。

【第18項】如申請專利範圍第 10 至 15 項中任一項所述之藥物結合物，其係用於預防、抑制或治療由 Nectin-4 介導之疾病或病症。

【第19項】一種如申請專利範圍第 10 至 15 項中任一項所述之藥物結合物在製備用於預防、抑制或治療癌症之藥物之用途，其中該癌症具有增強的 Nectin-4 複製數變異(CNV)。

【發明圖式】

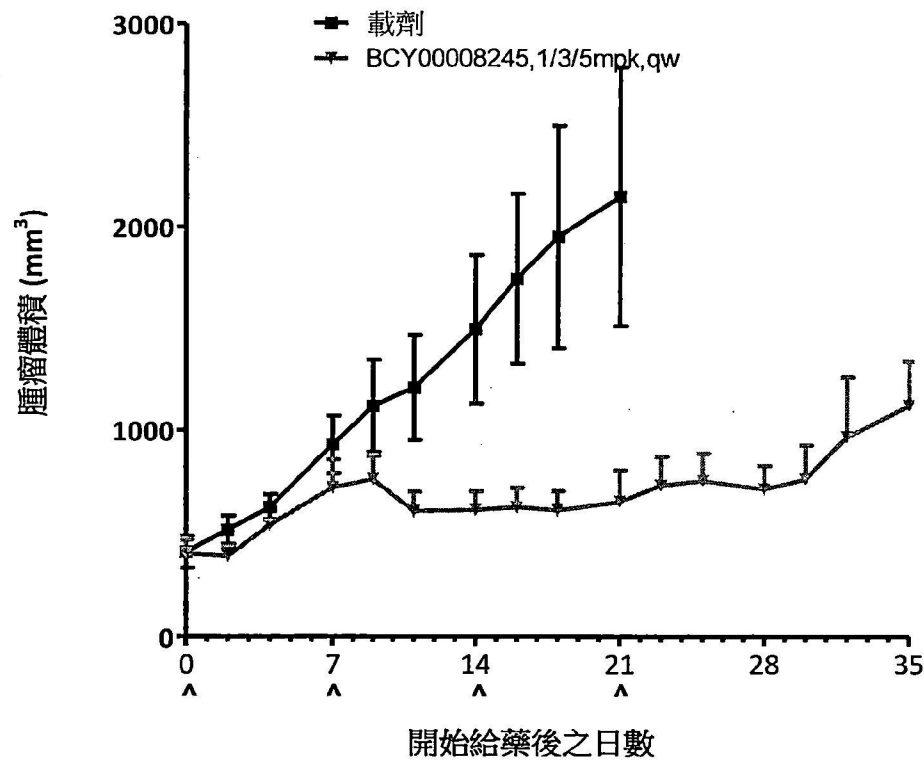


圖 1

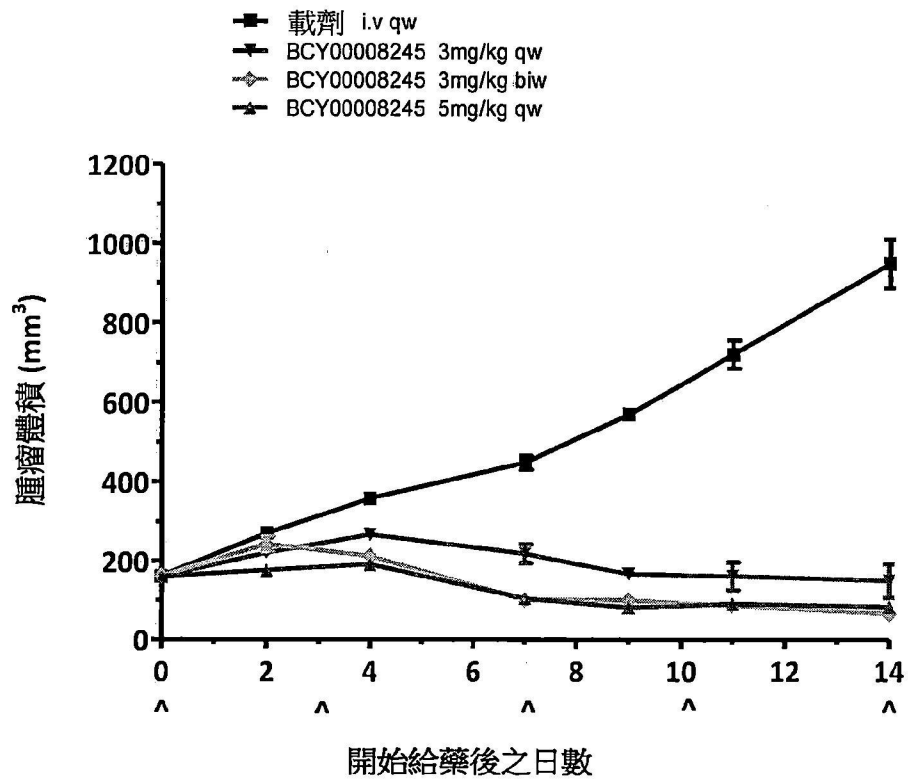


圖 2

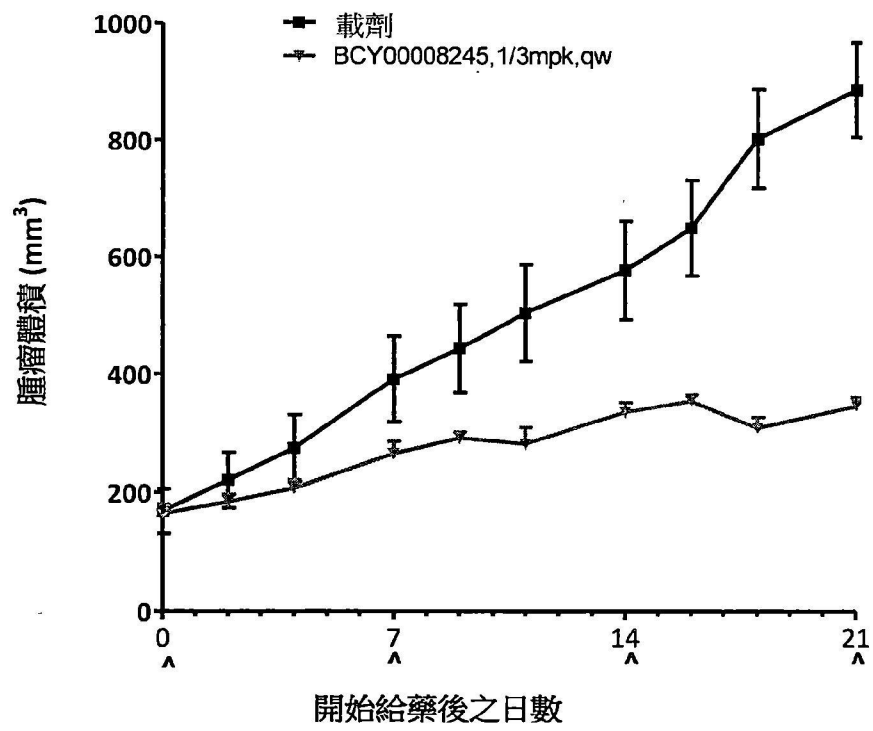


圖 3

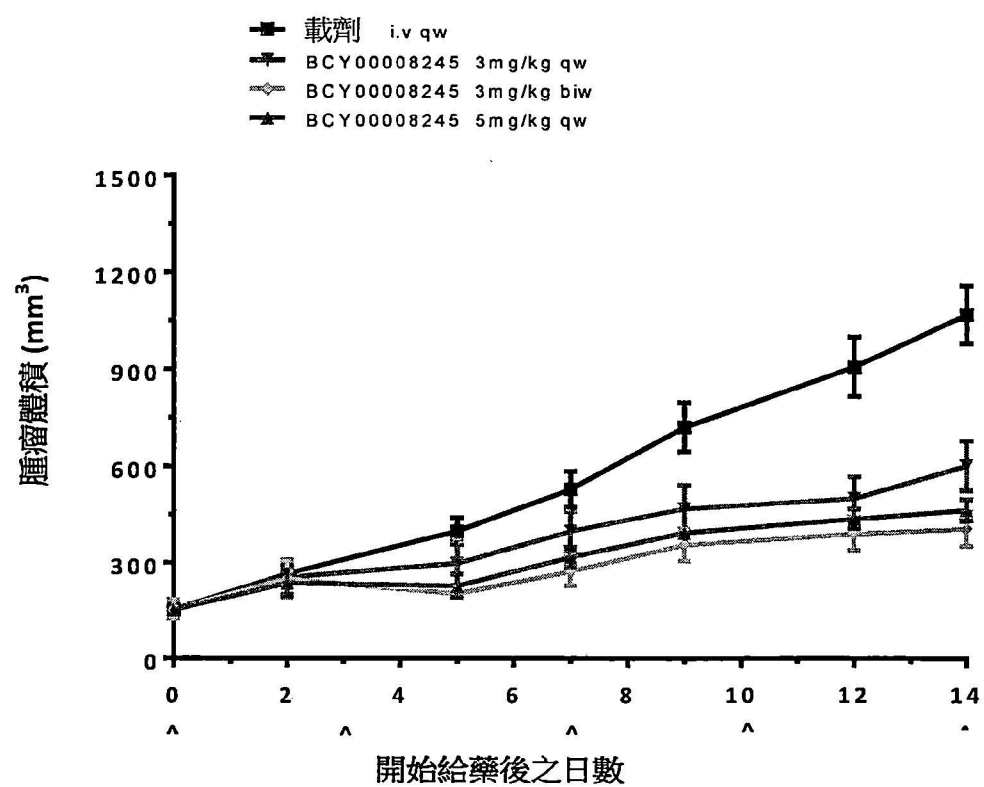


圖 4

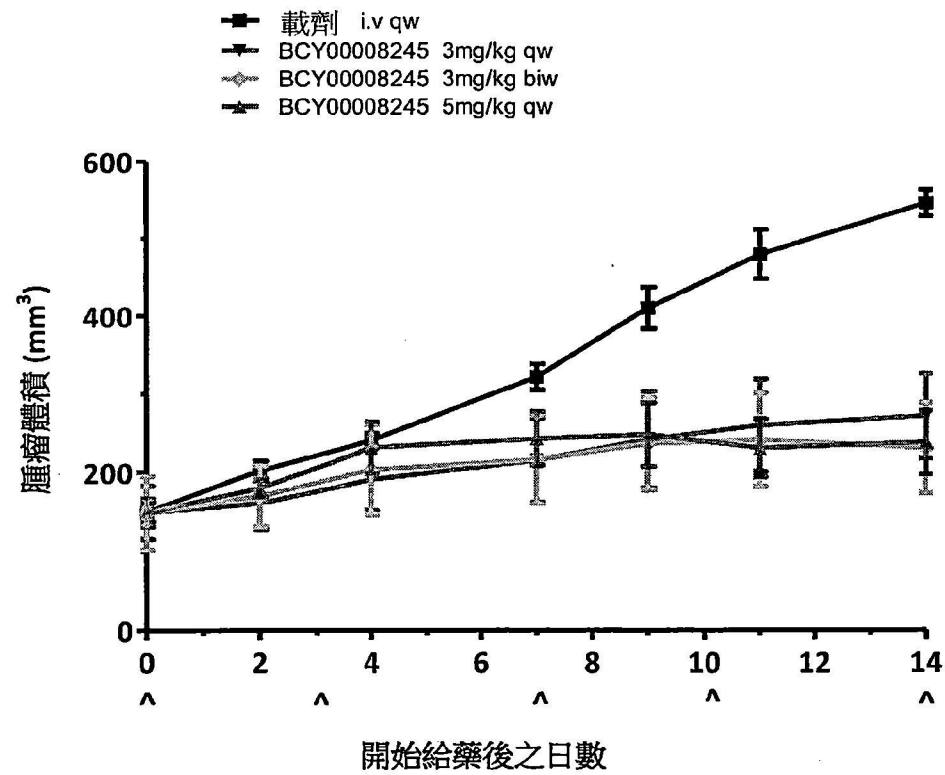


圖 5

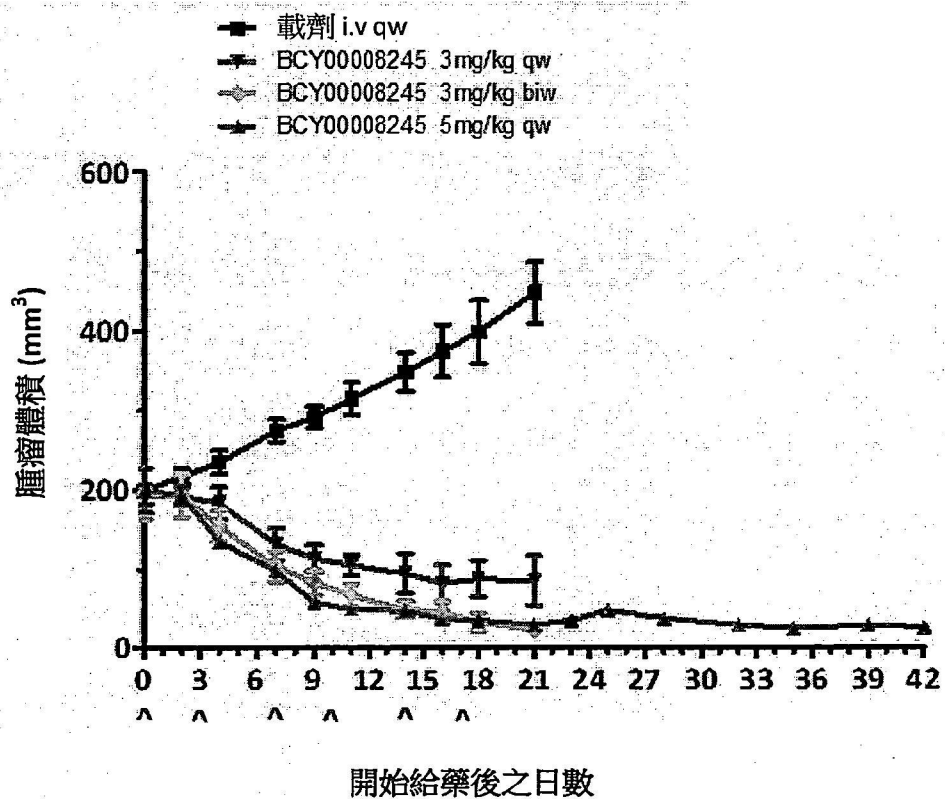


圖 6

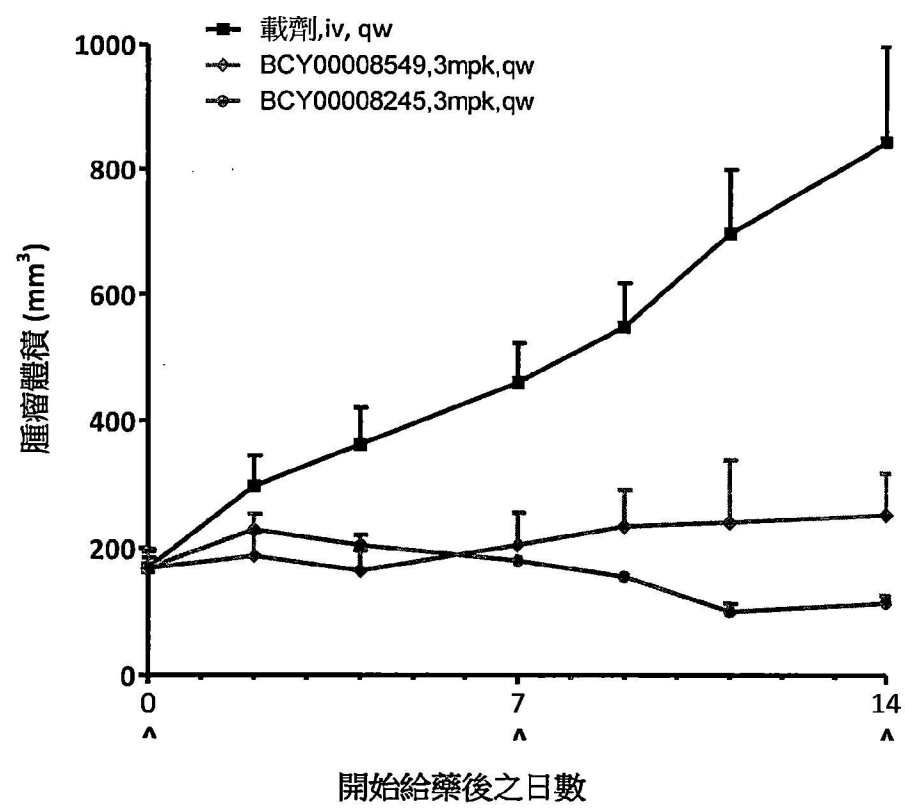
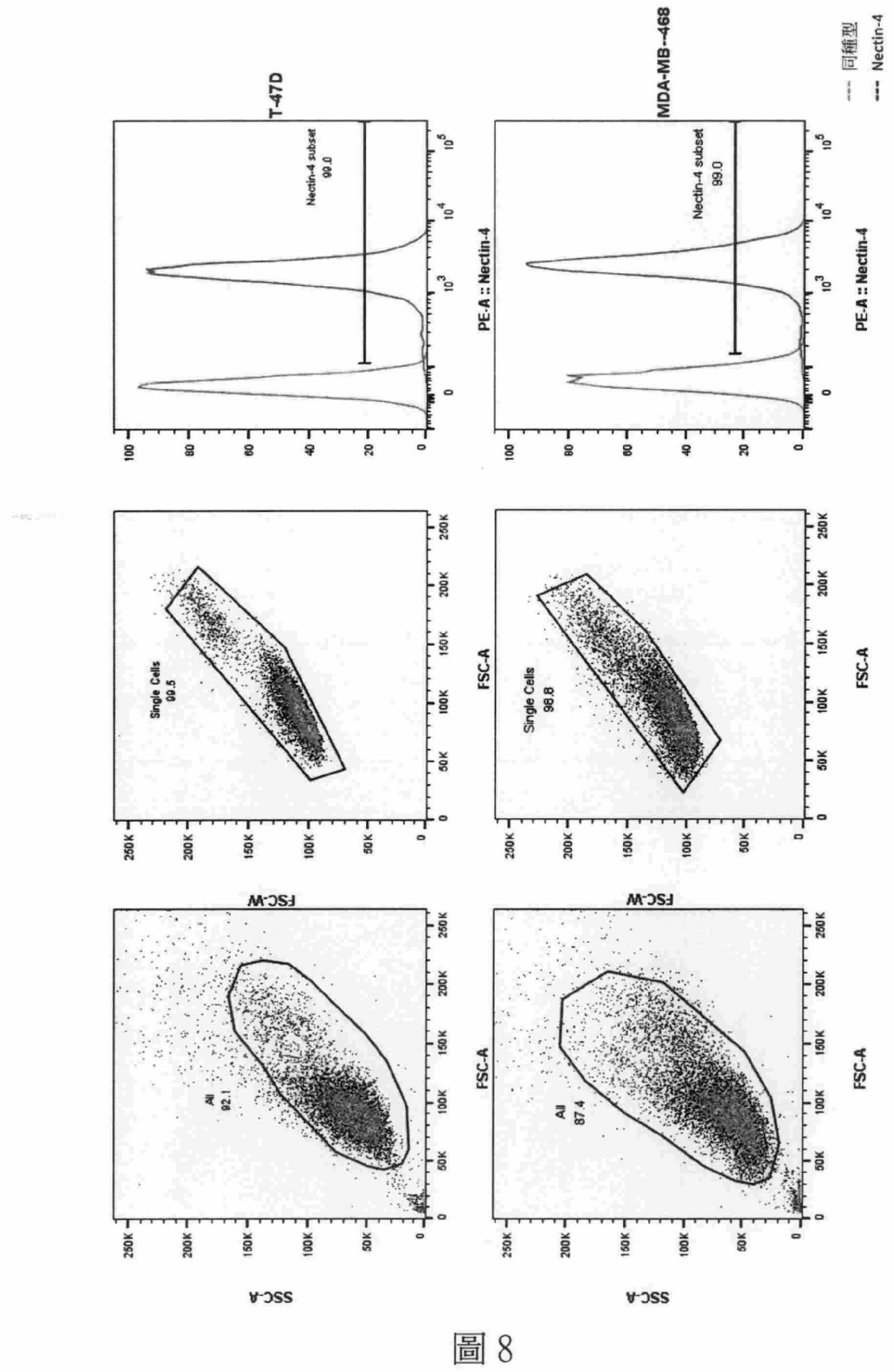


圖 7



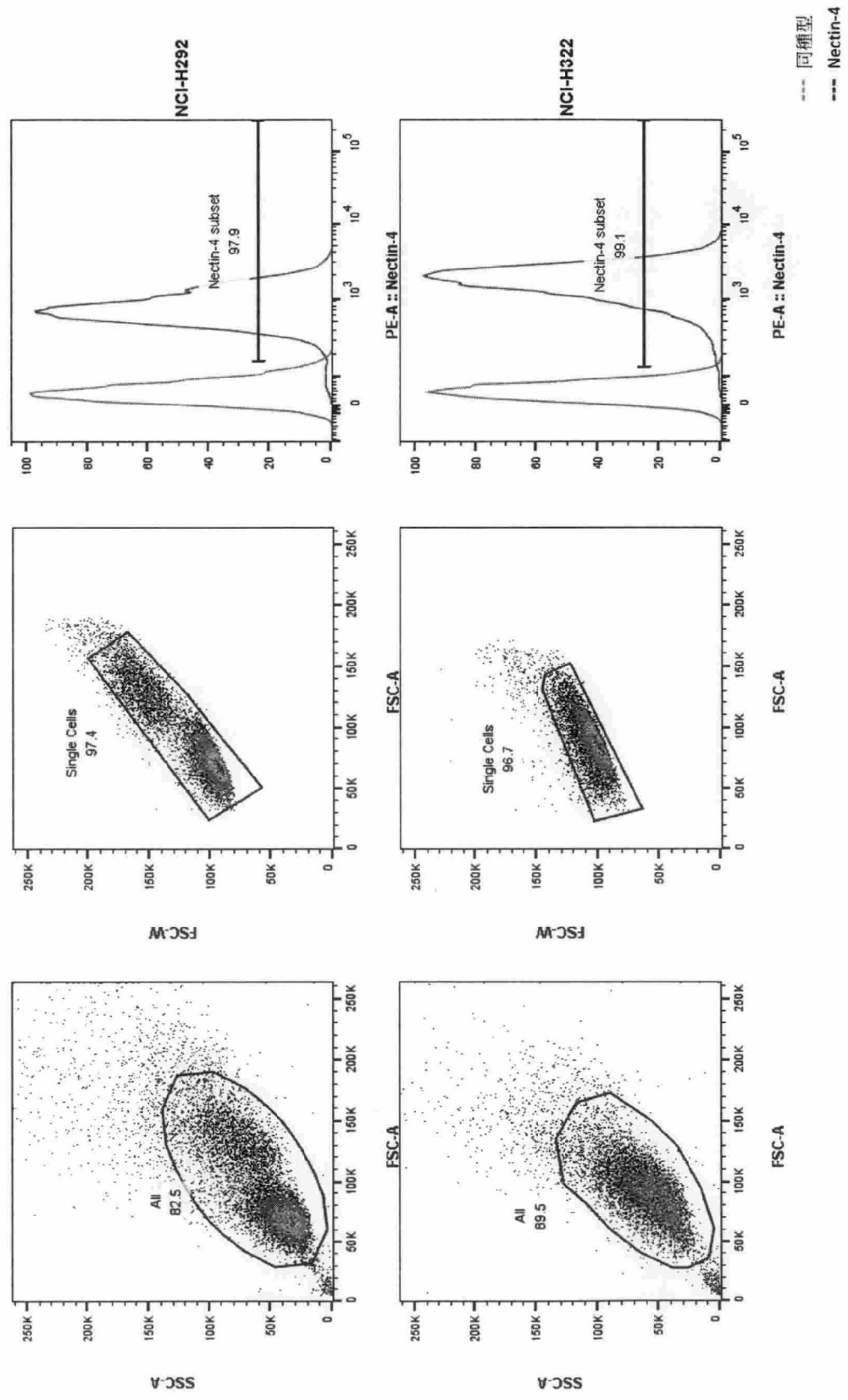


圖 6

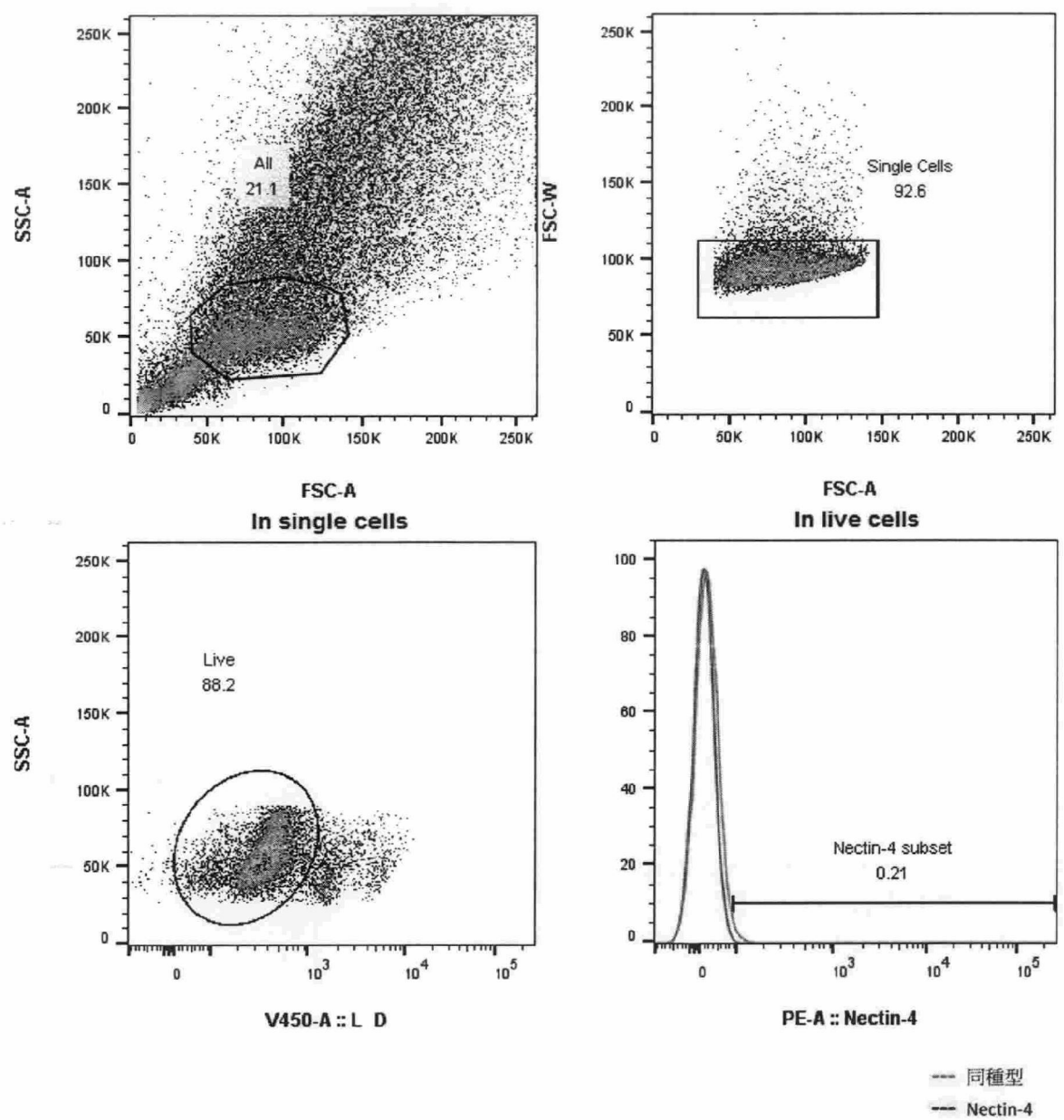


圖 10

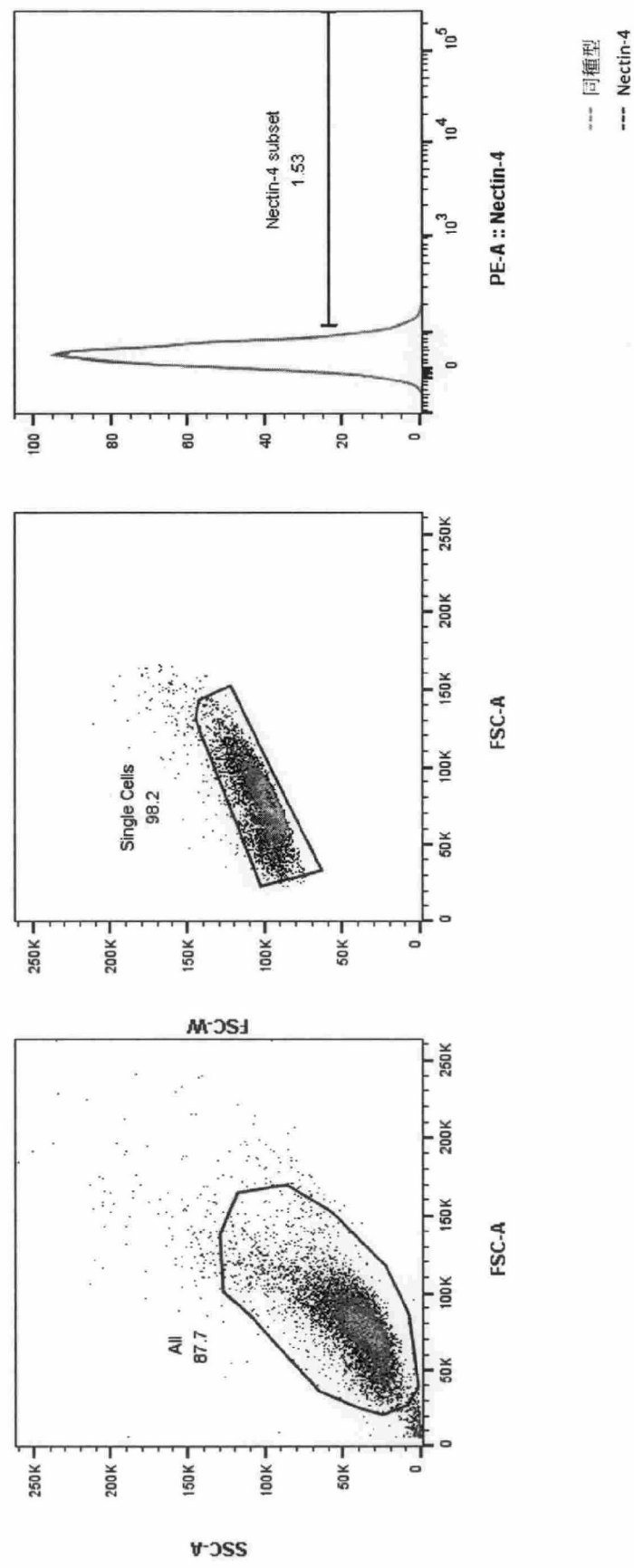


圖 11

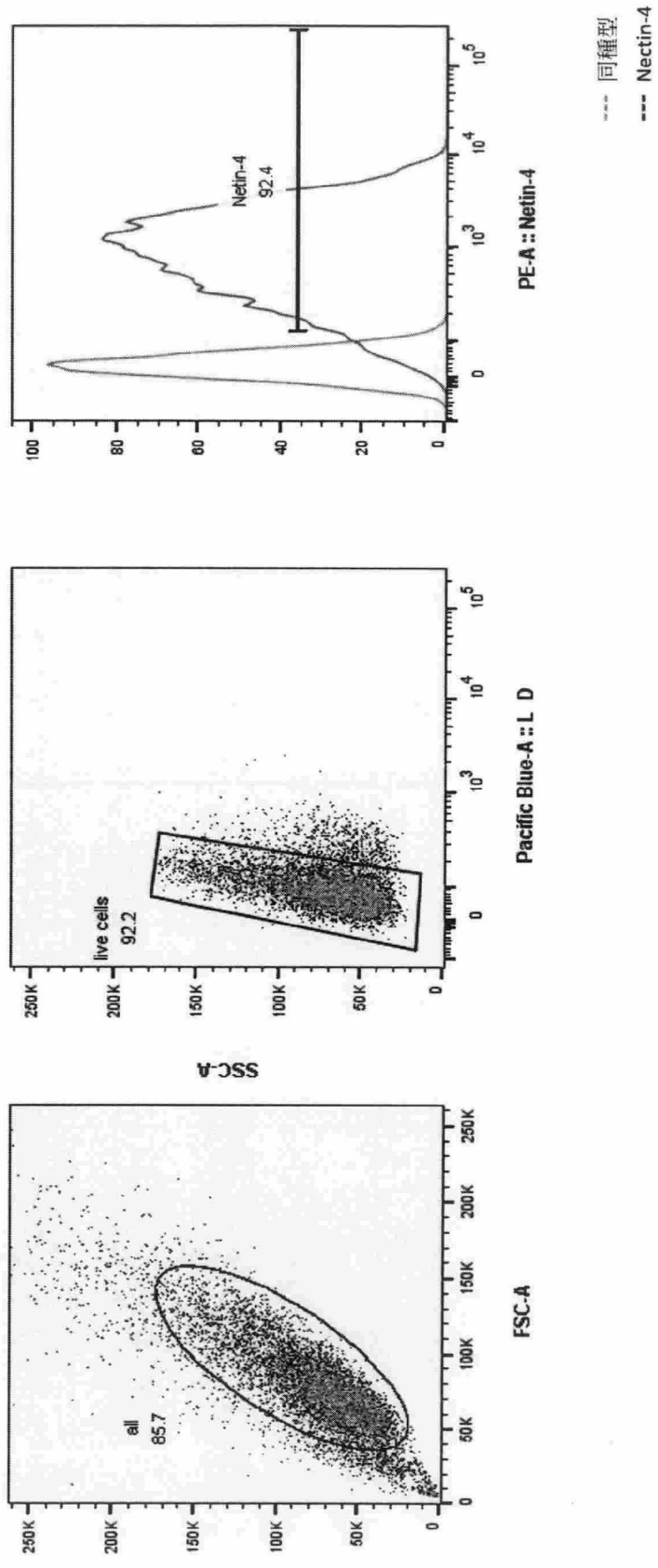


圖 12

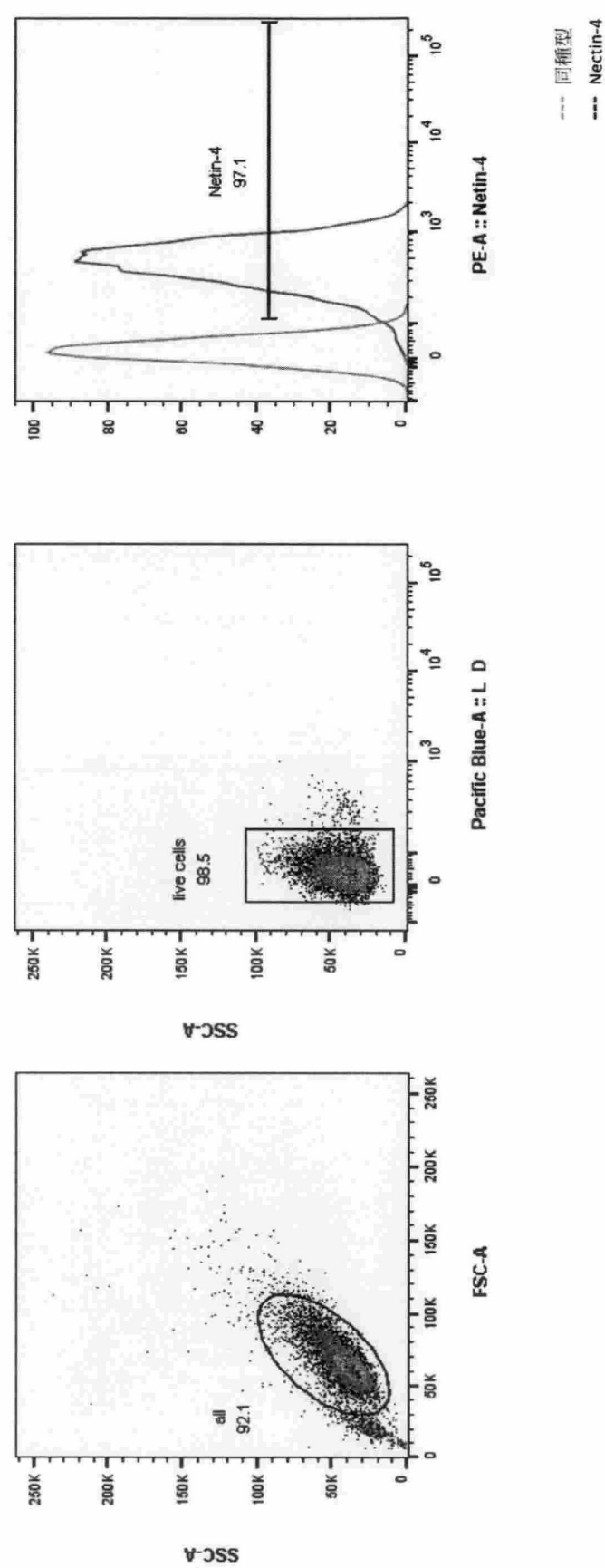


圖 13

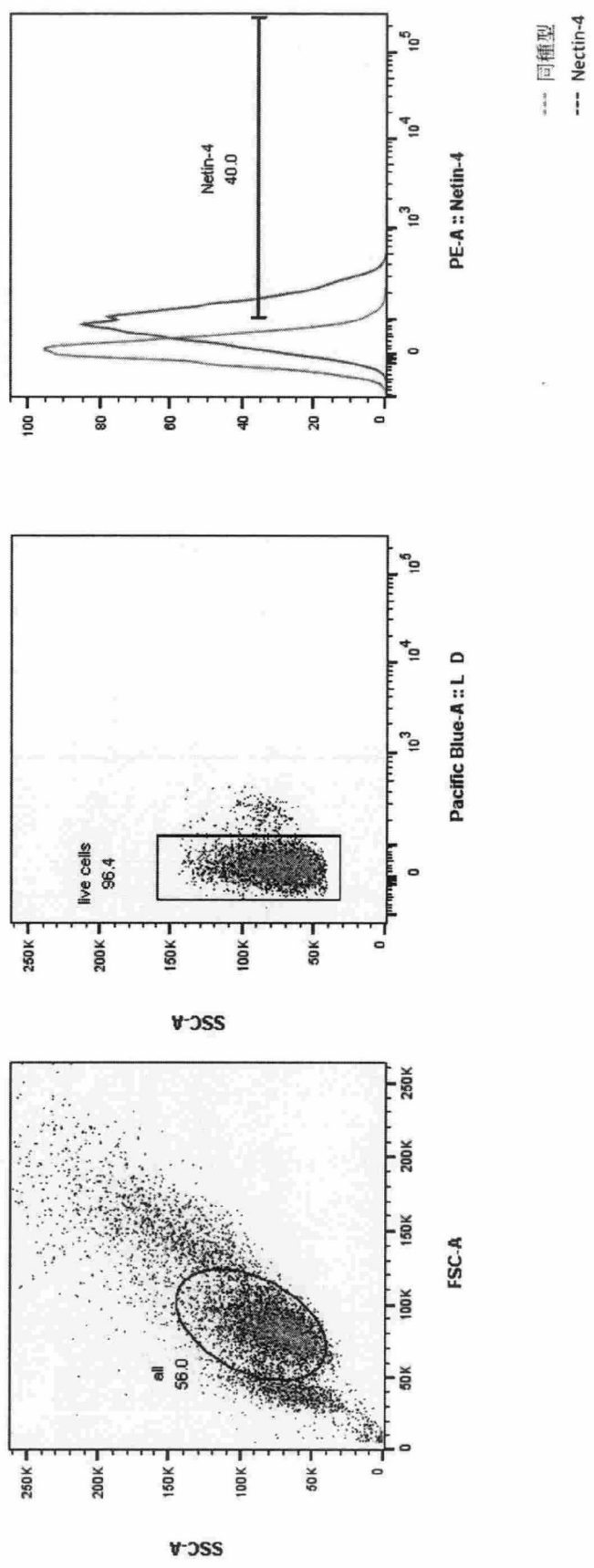


圖 14A

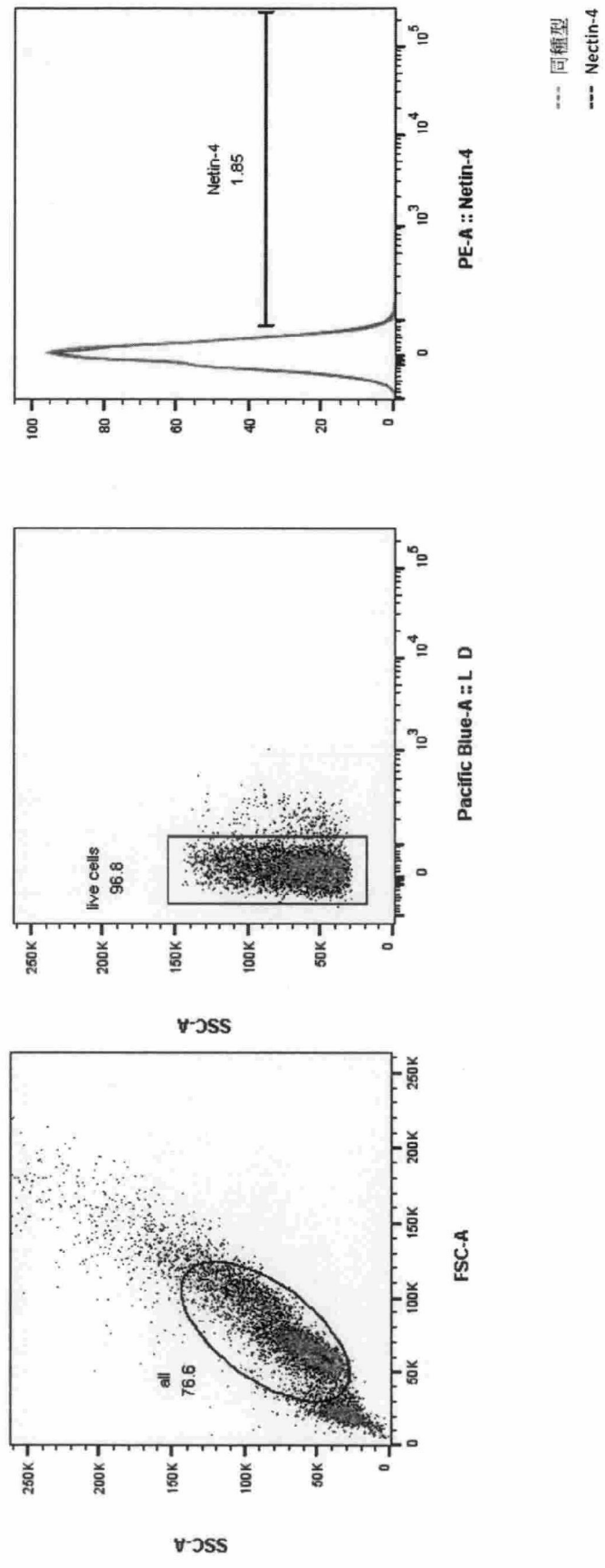


圖 14B

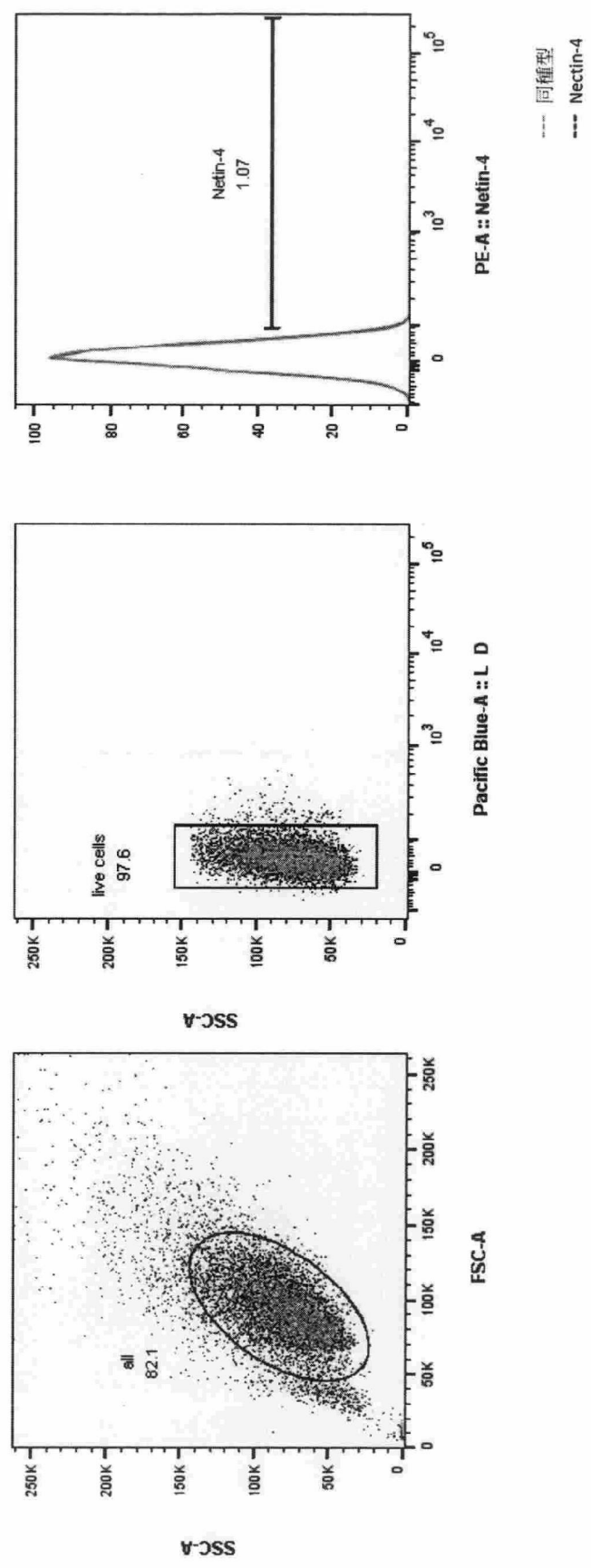


圖 15A

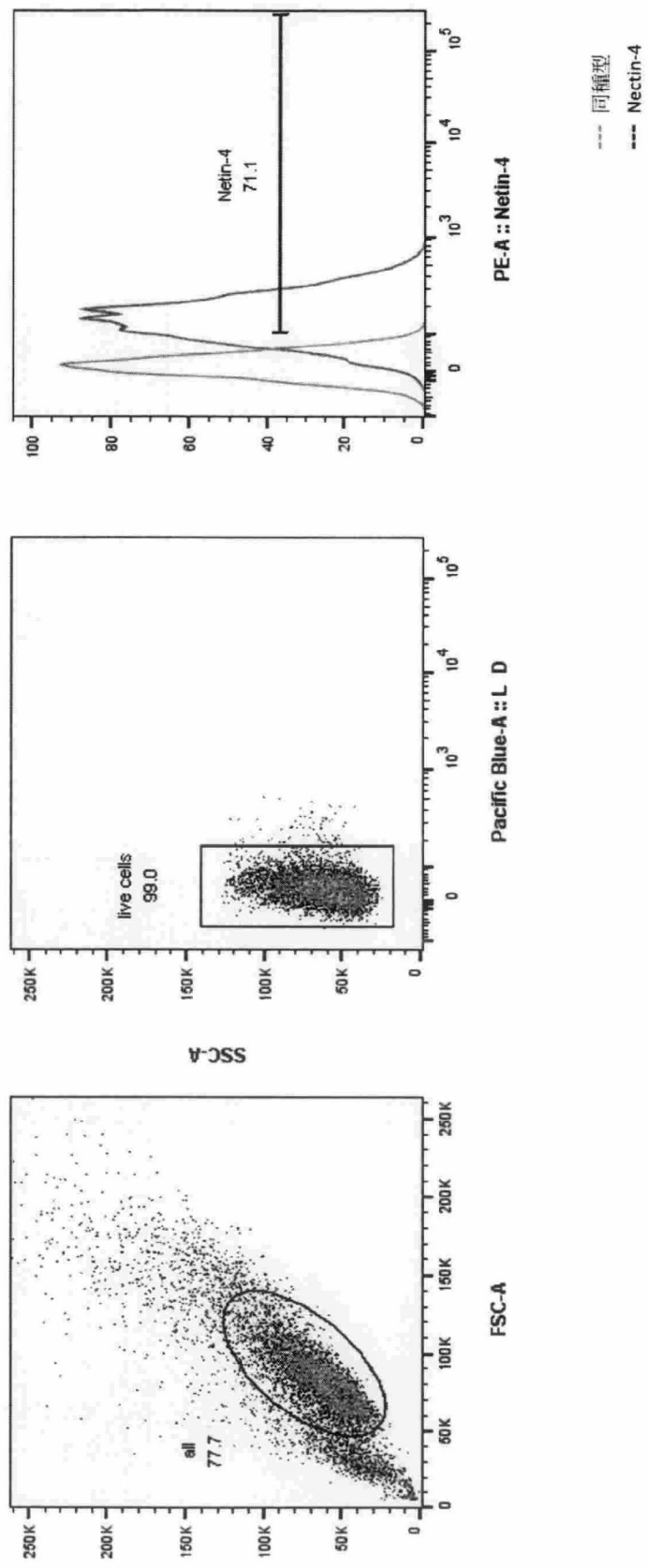


圖 15B

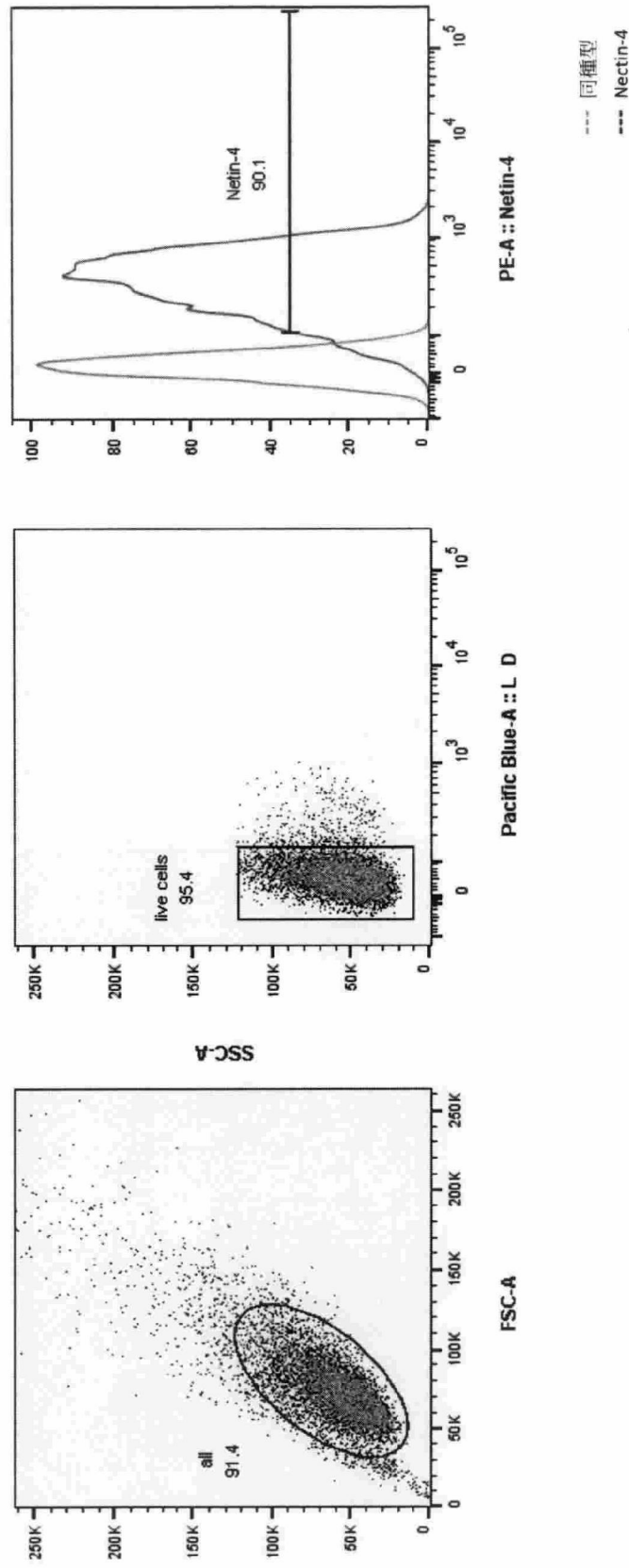


圖 15C

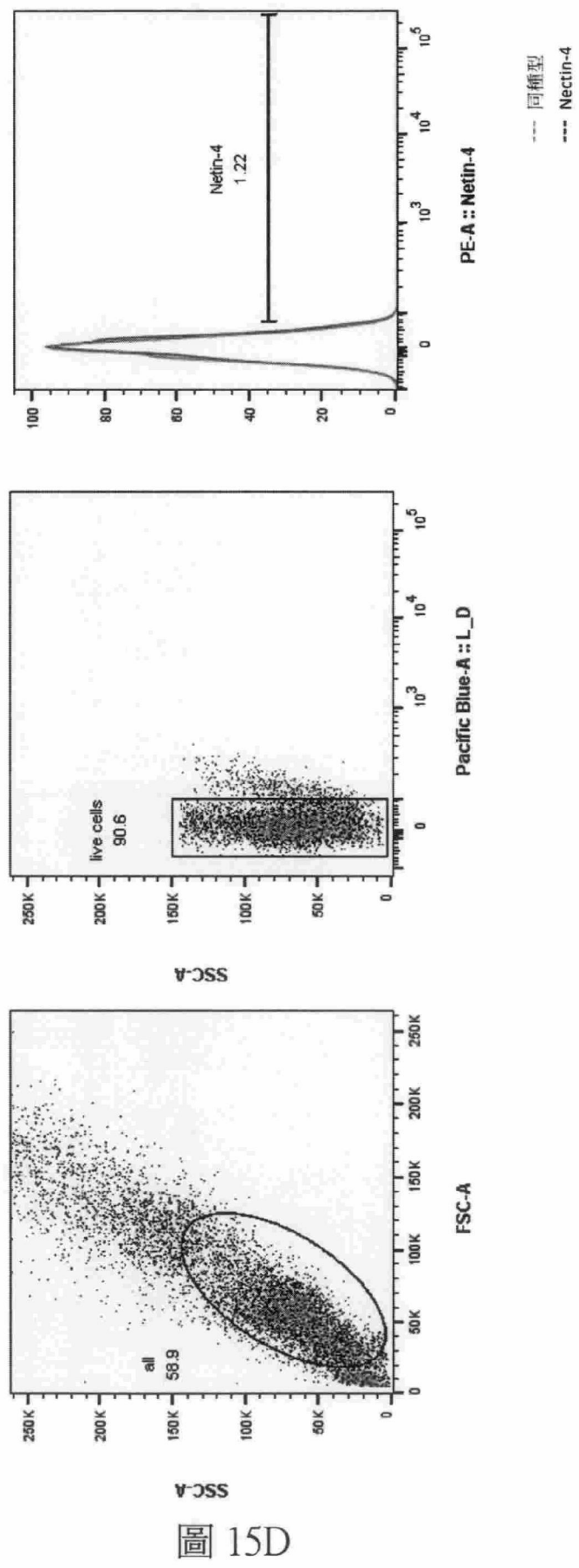


圖 15D

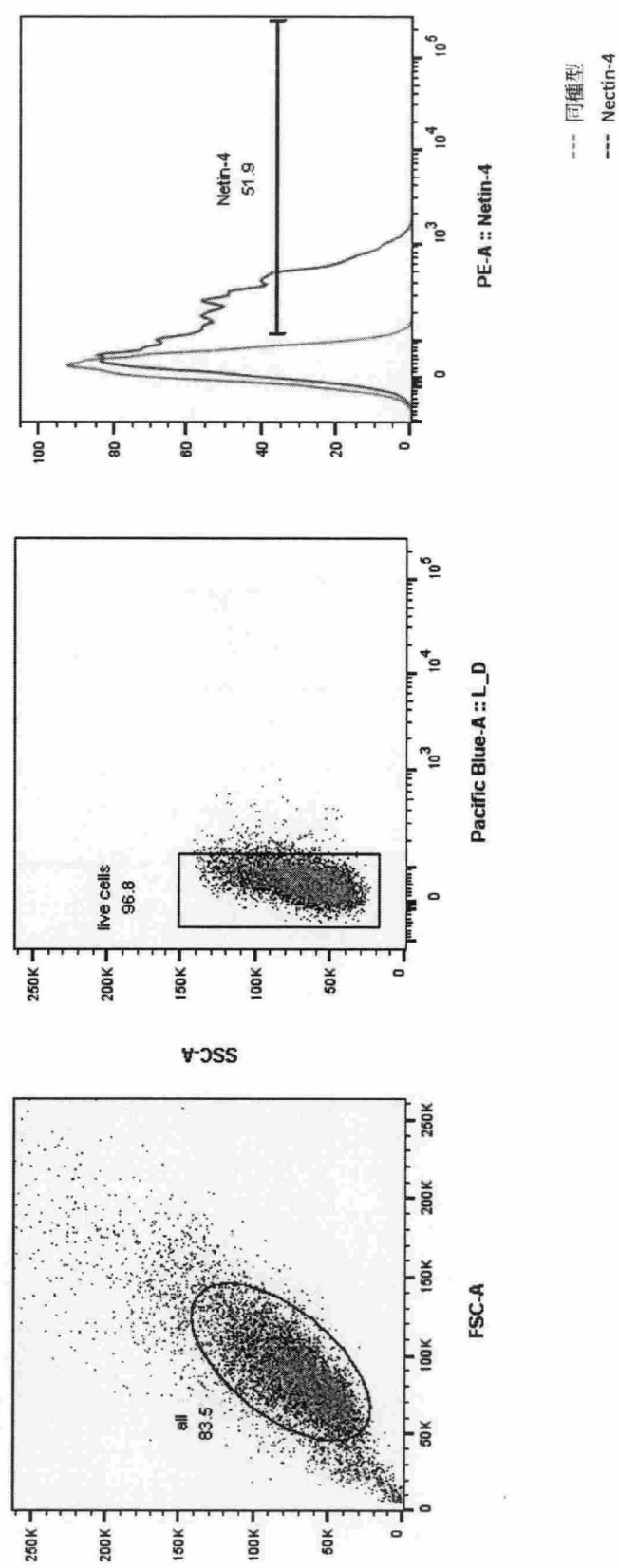


圖 16

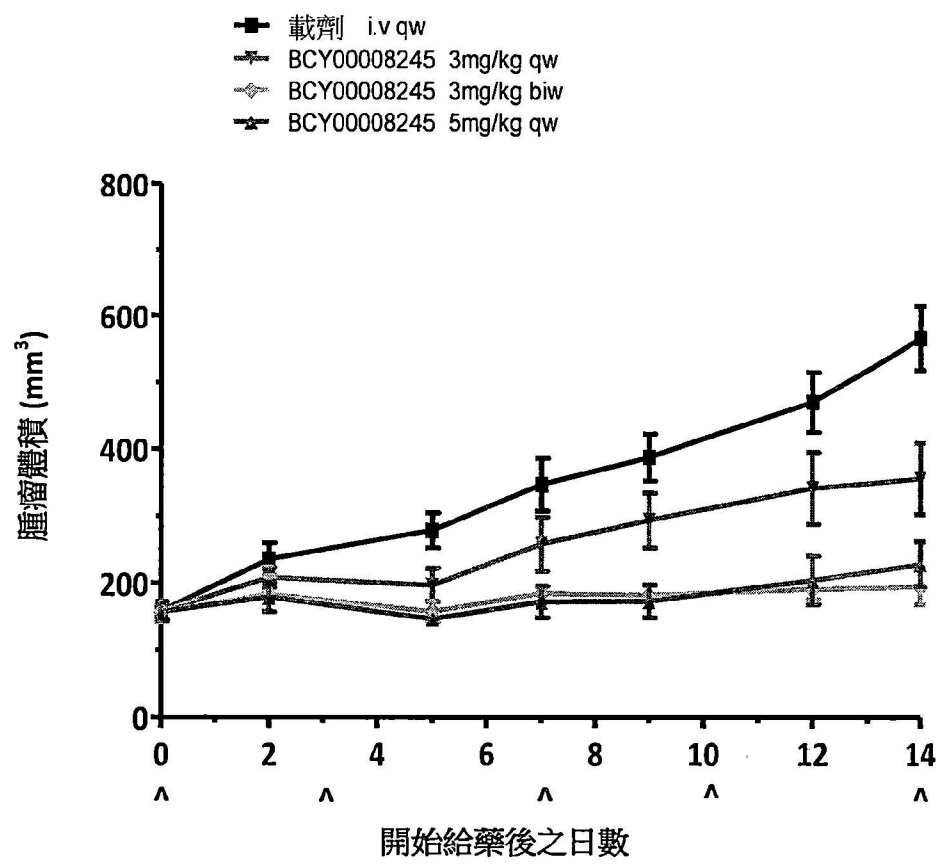


圖 17

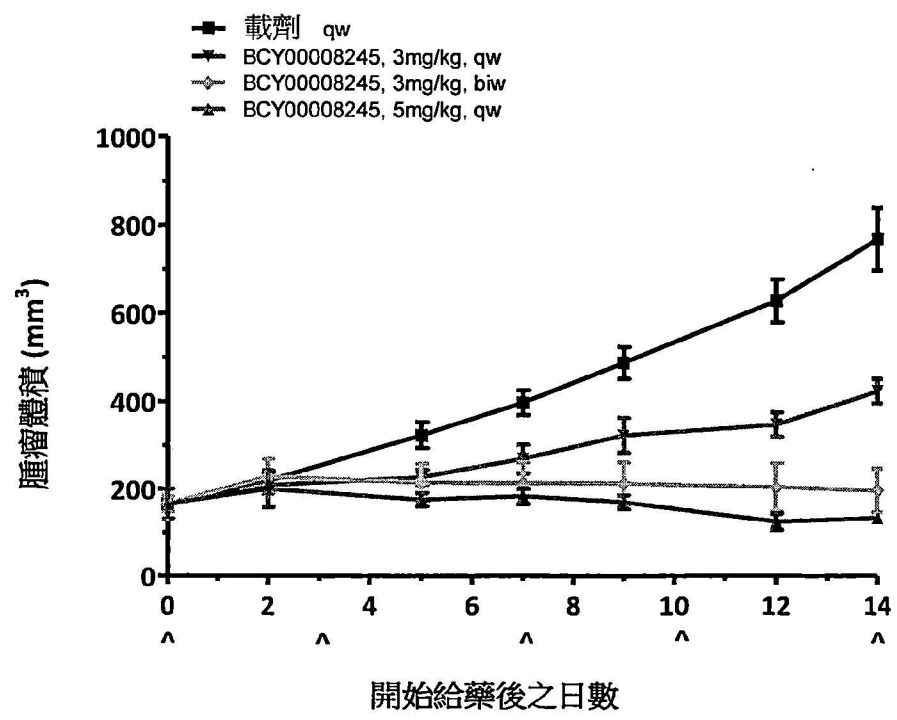


圖 18

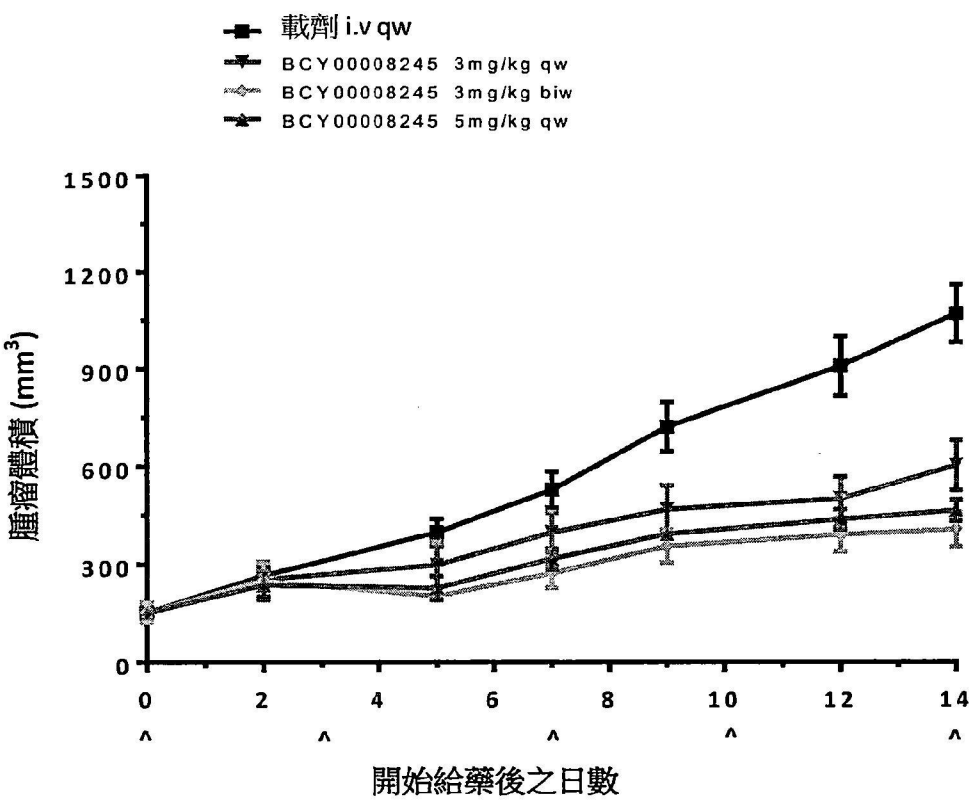


圖 19

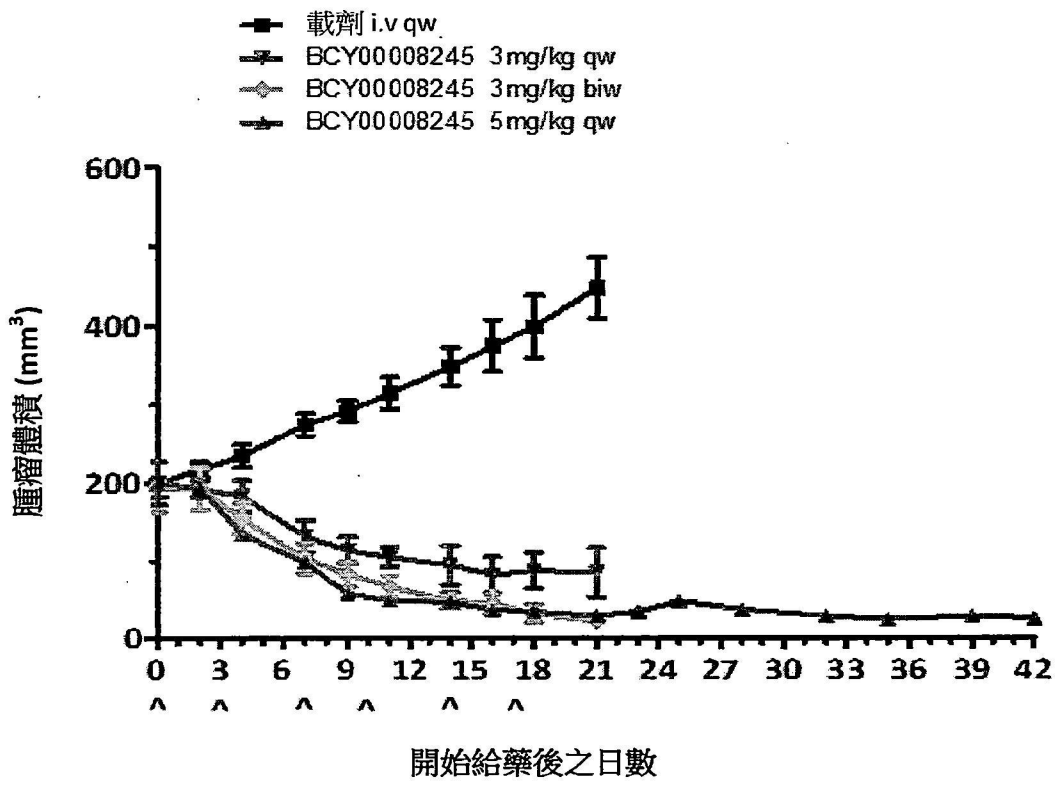


圖 20

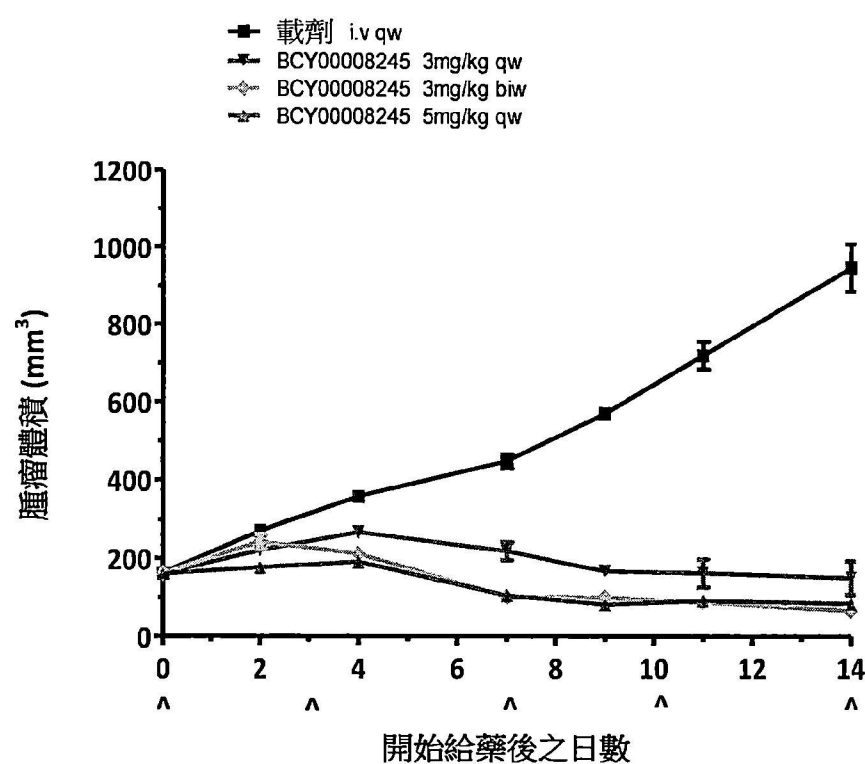


圖 21

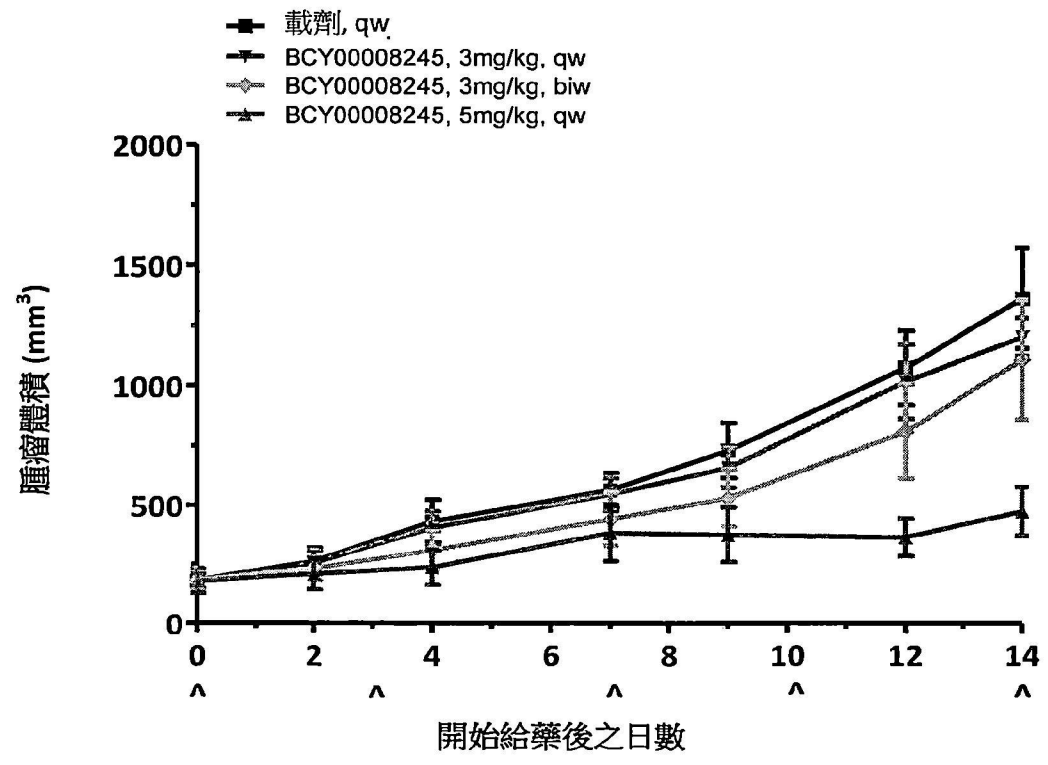


圖 22

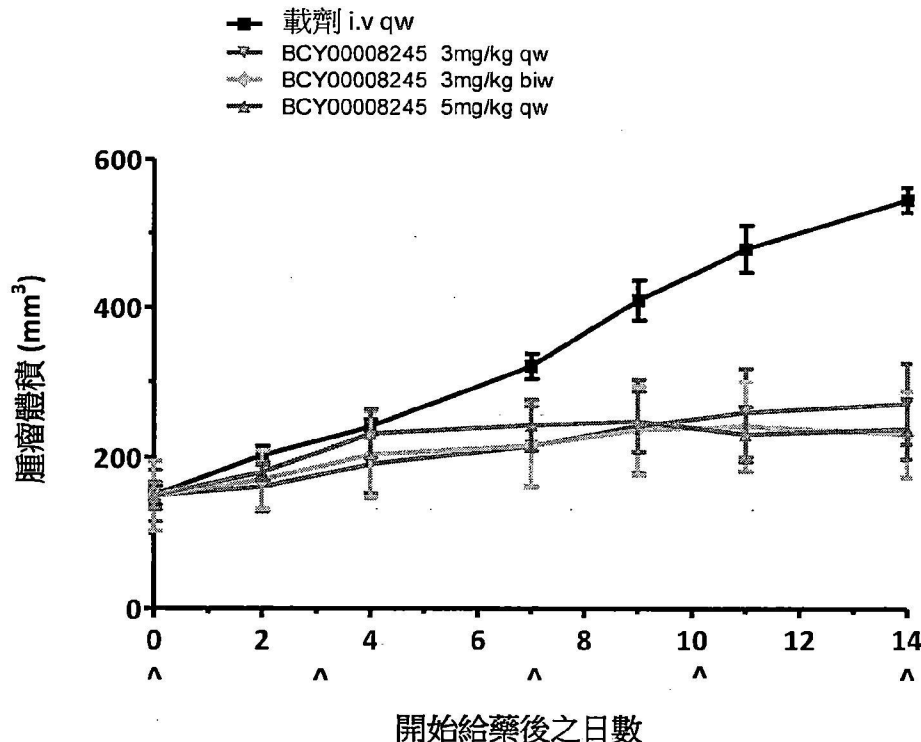


圖 23

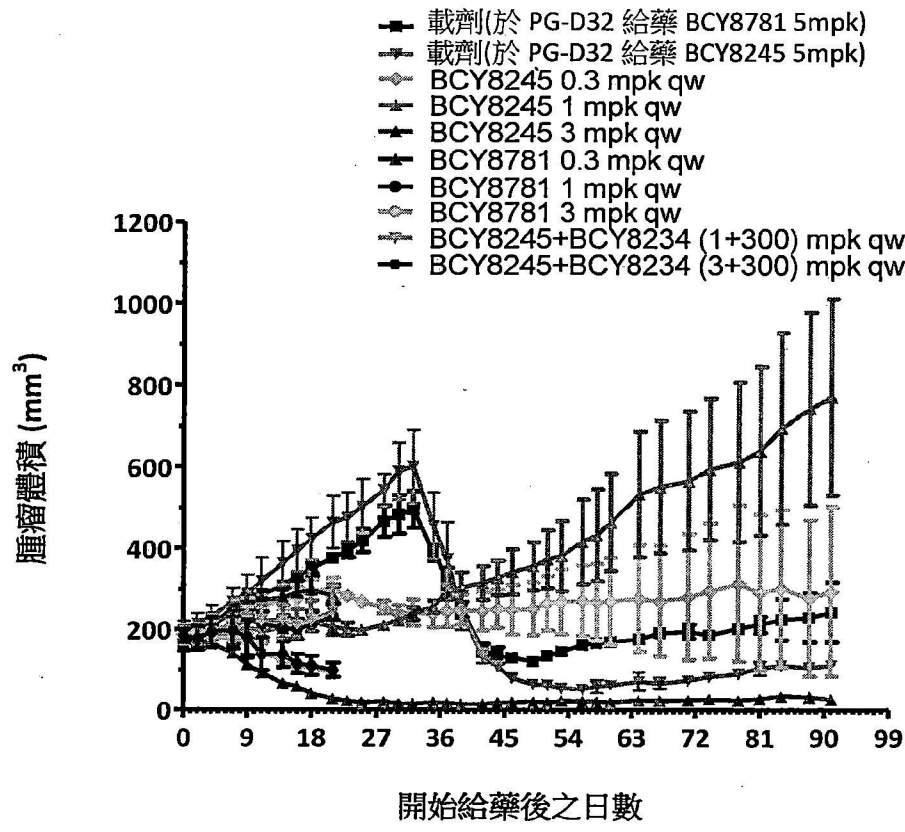


圖 24

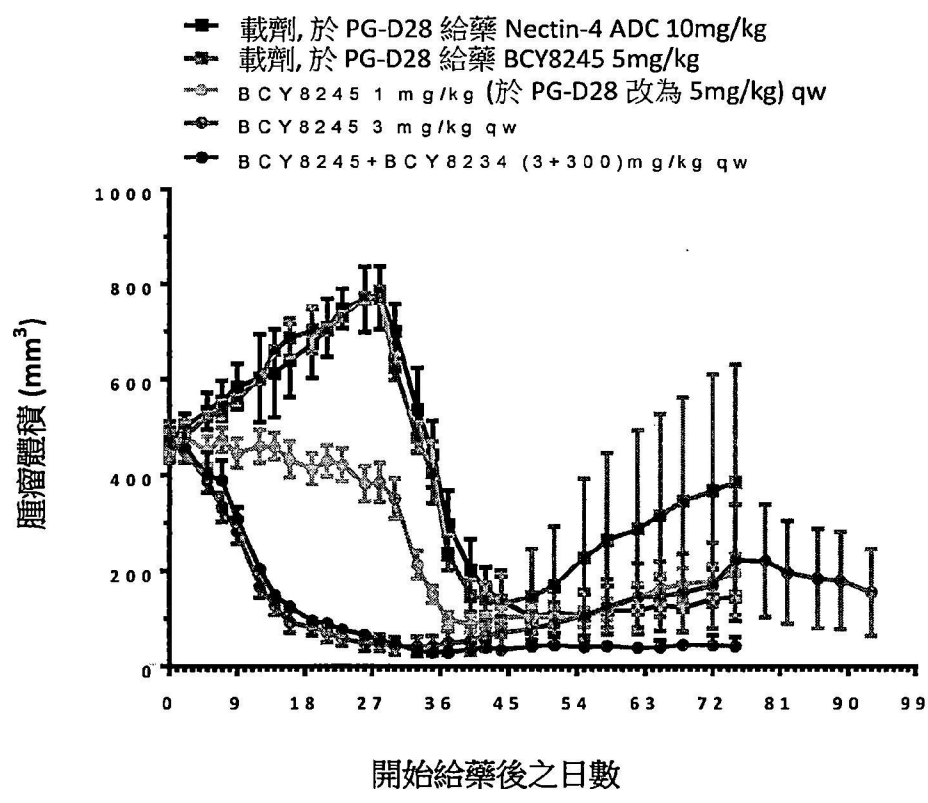


圖 25

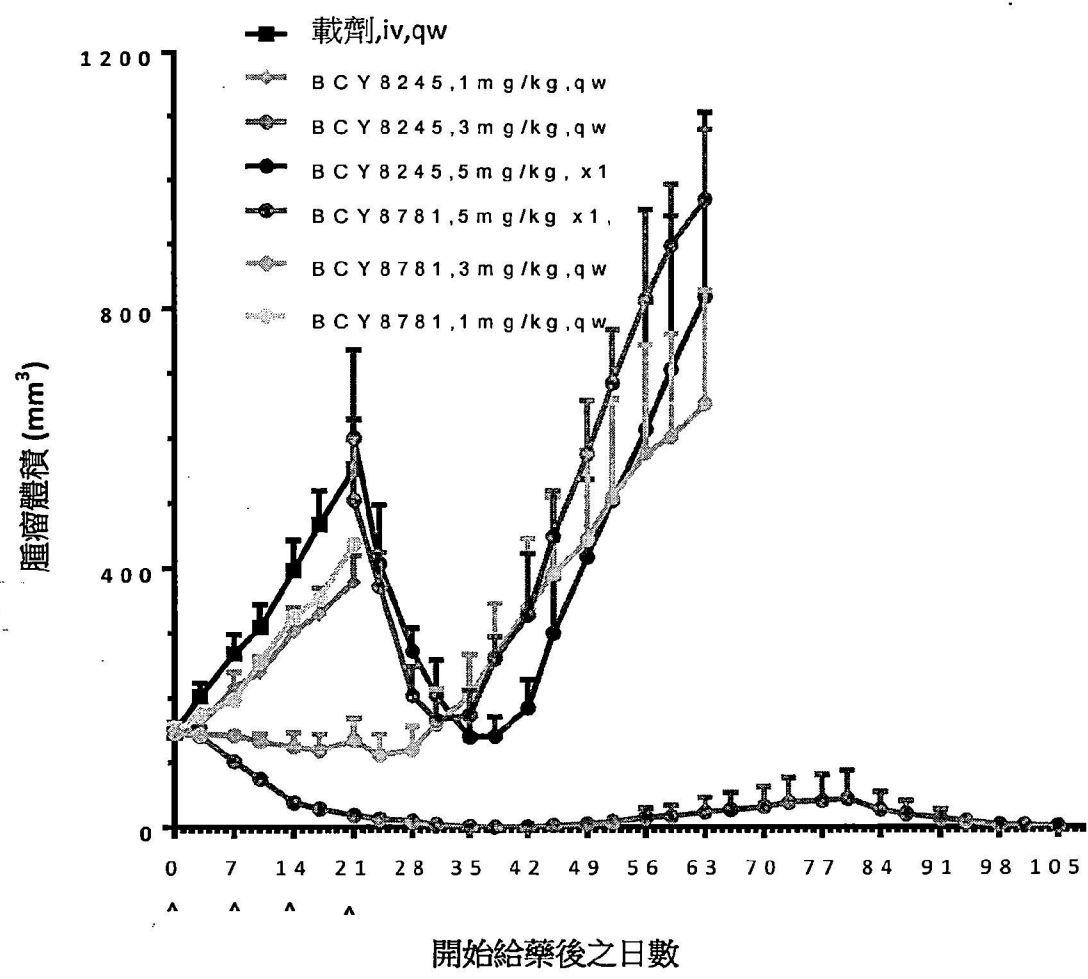


圖 26

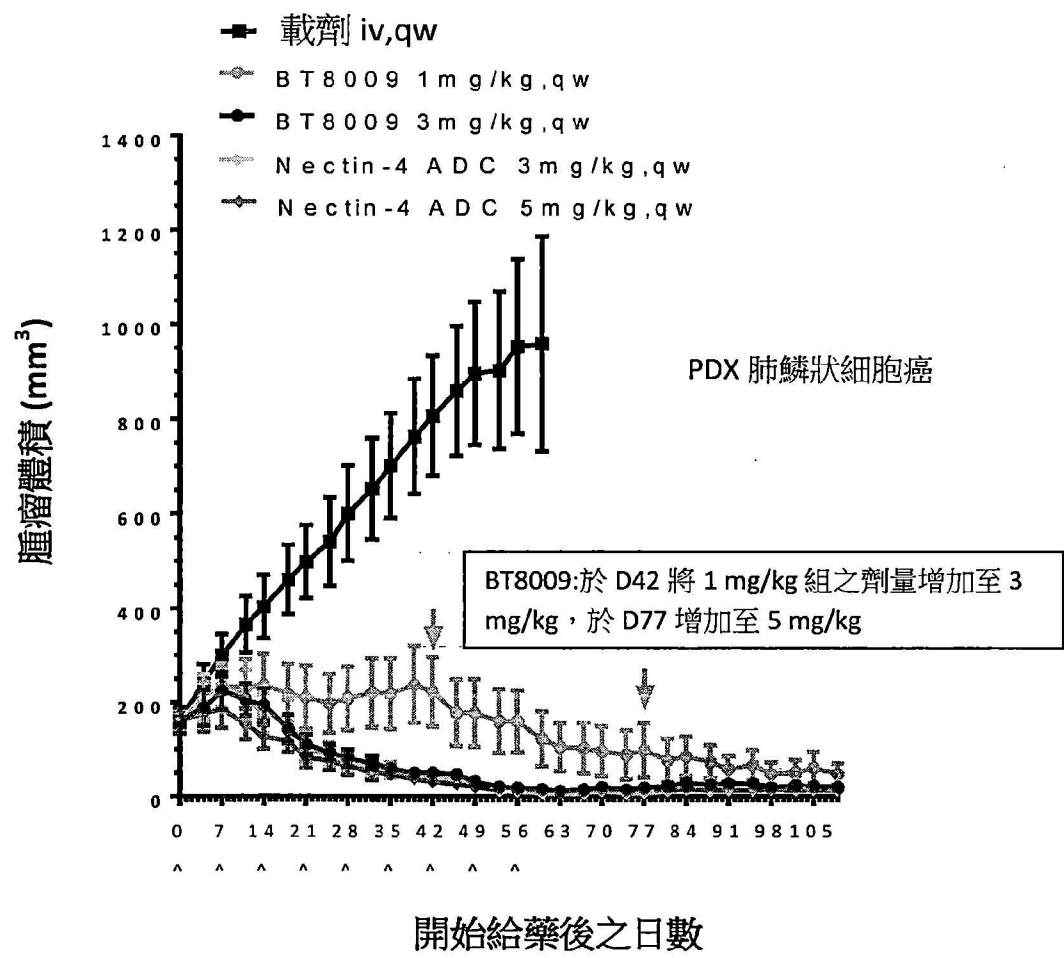
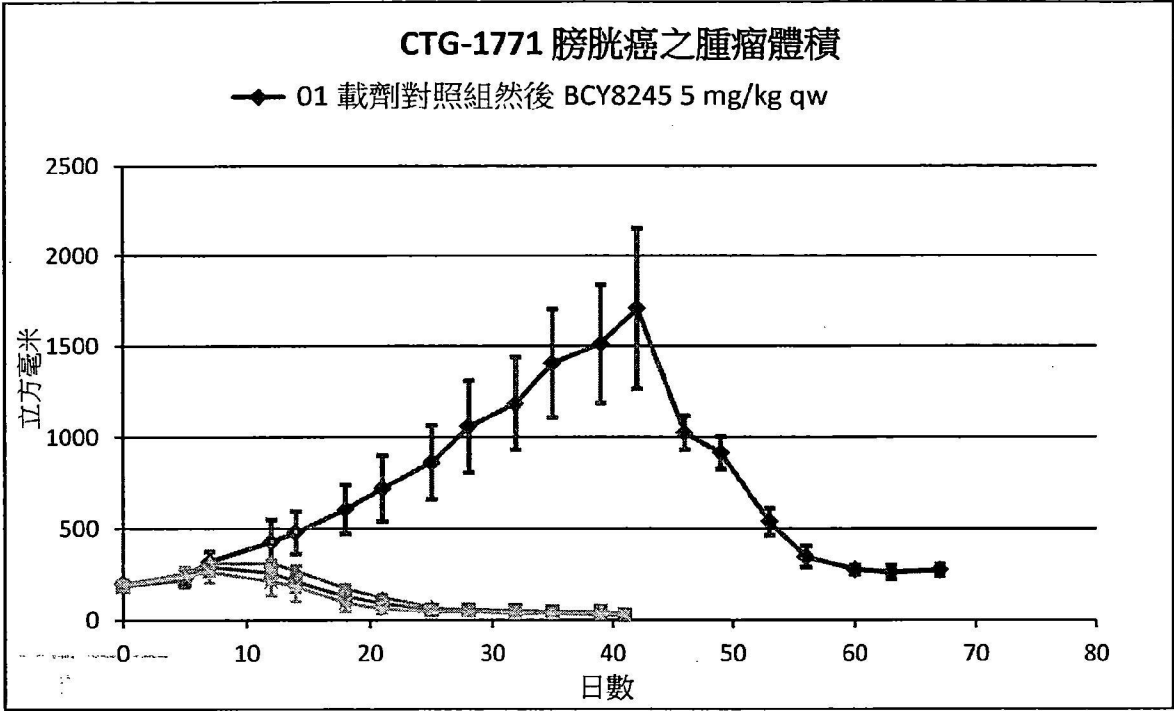
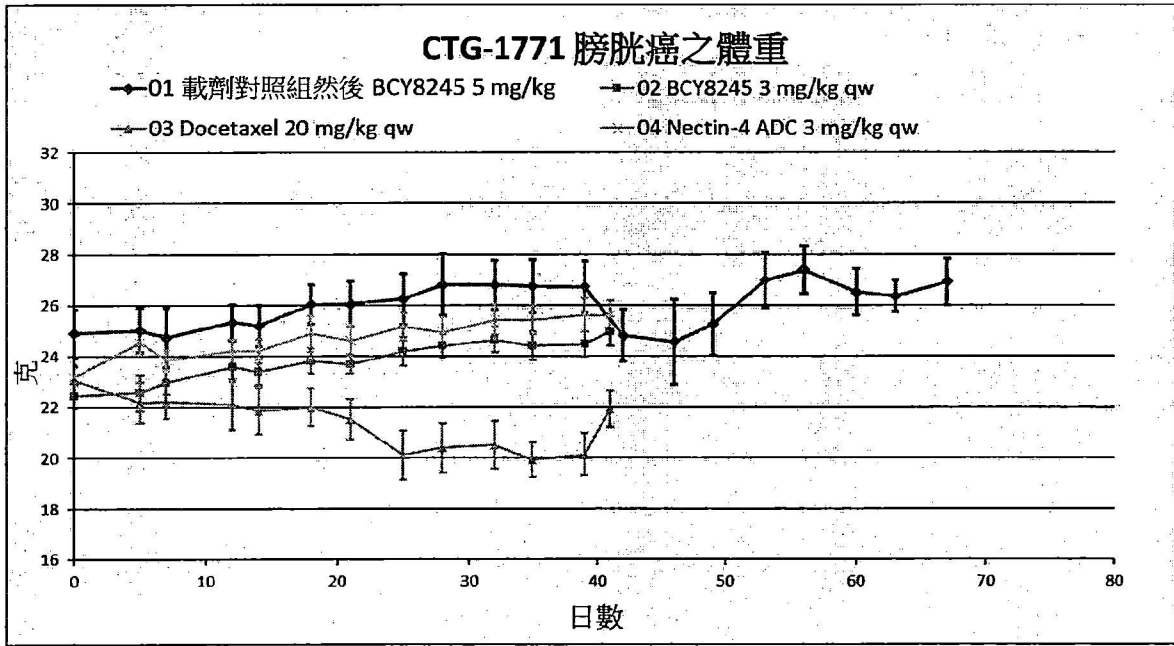


圖 27

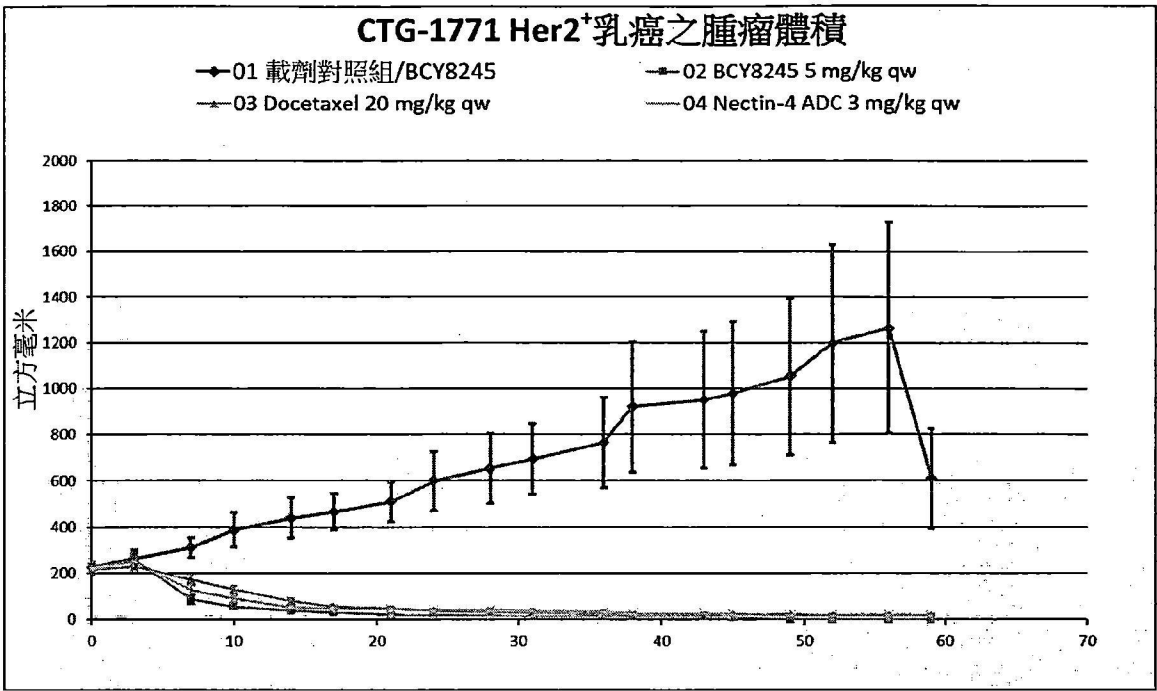


(A)

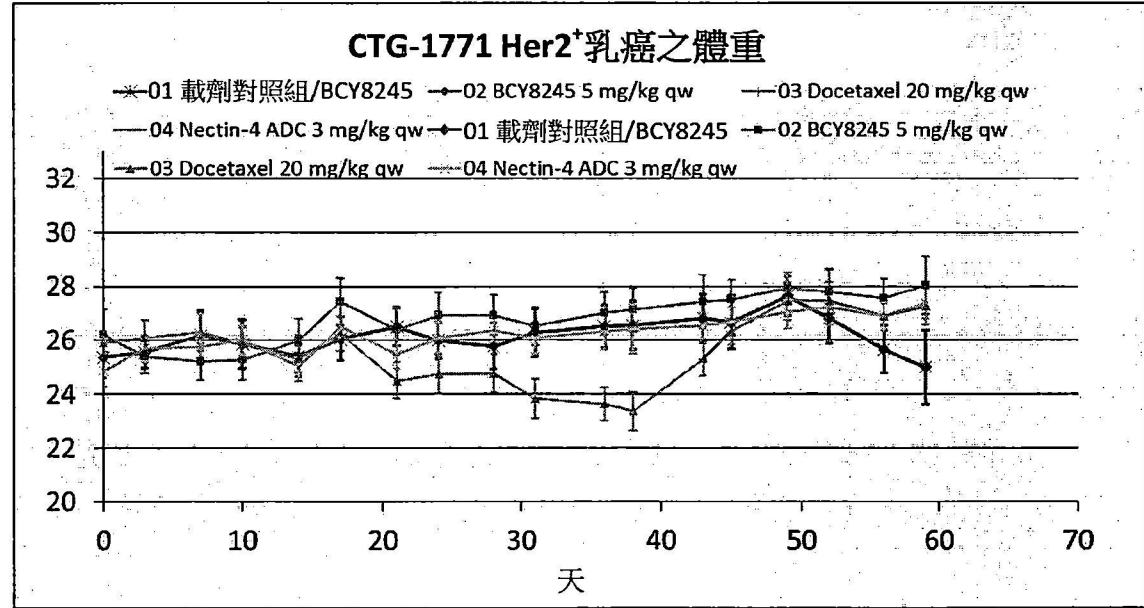


(B)

圖 28

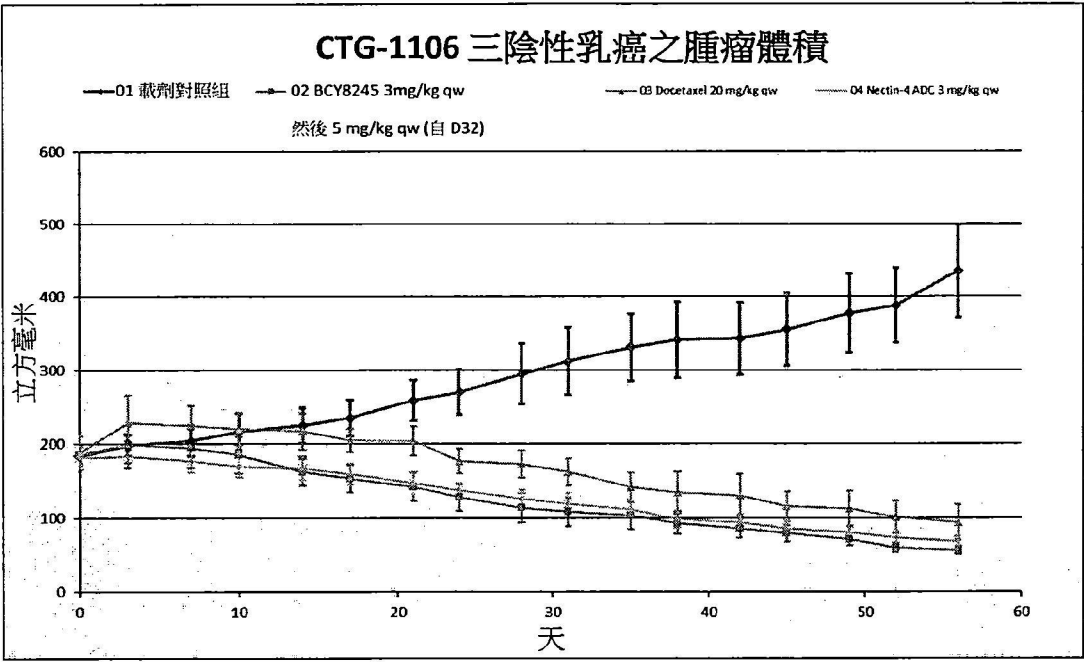


(A)

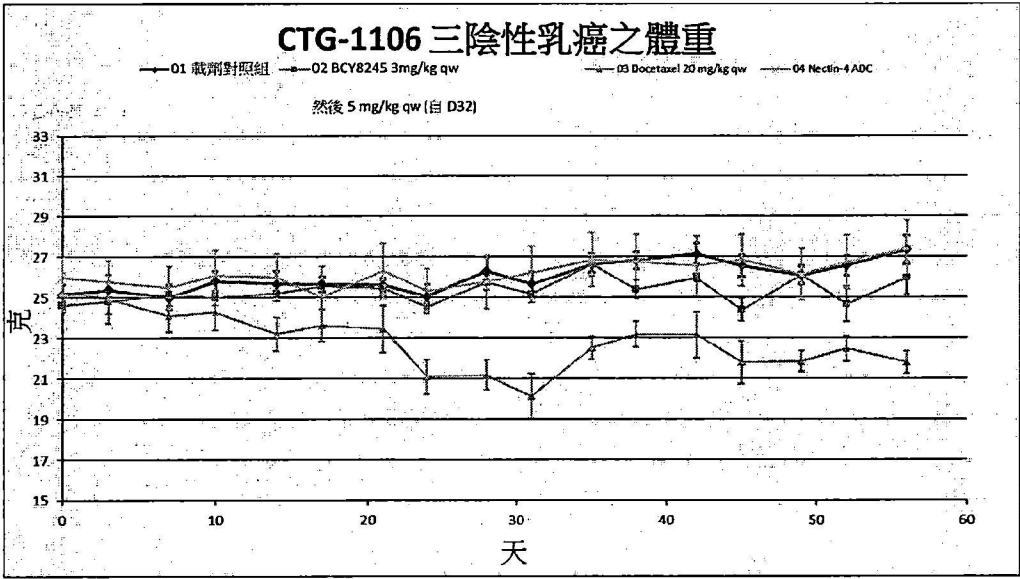


(B)

圖 29

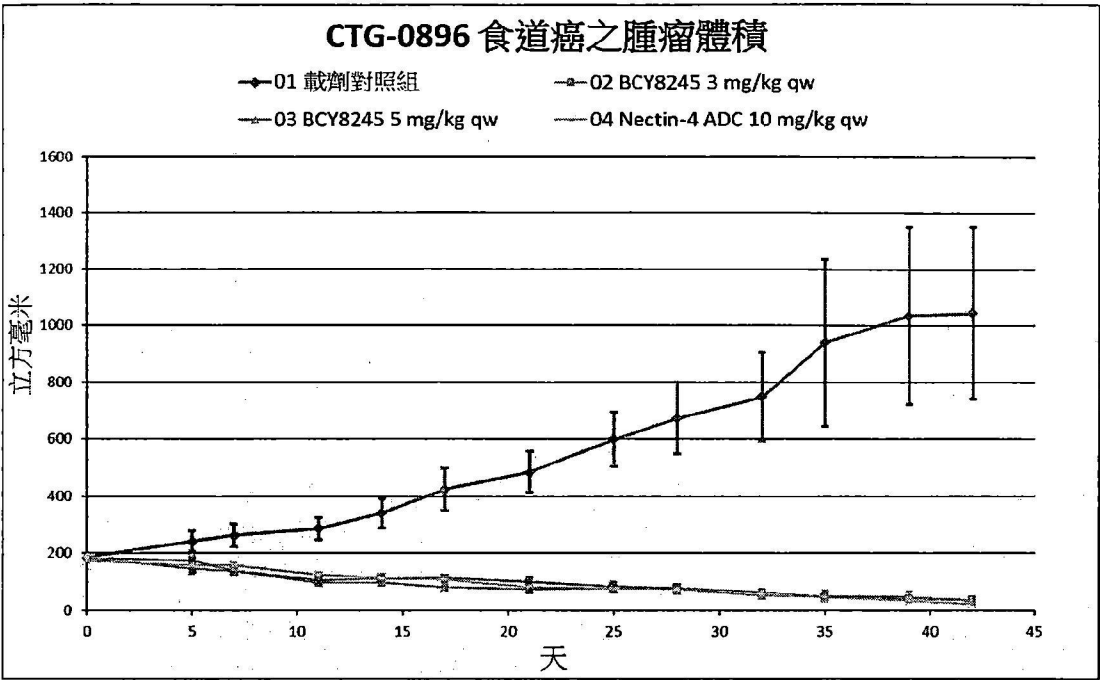


(A)

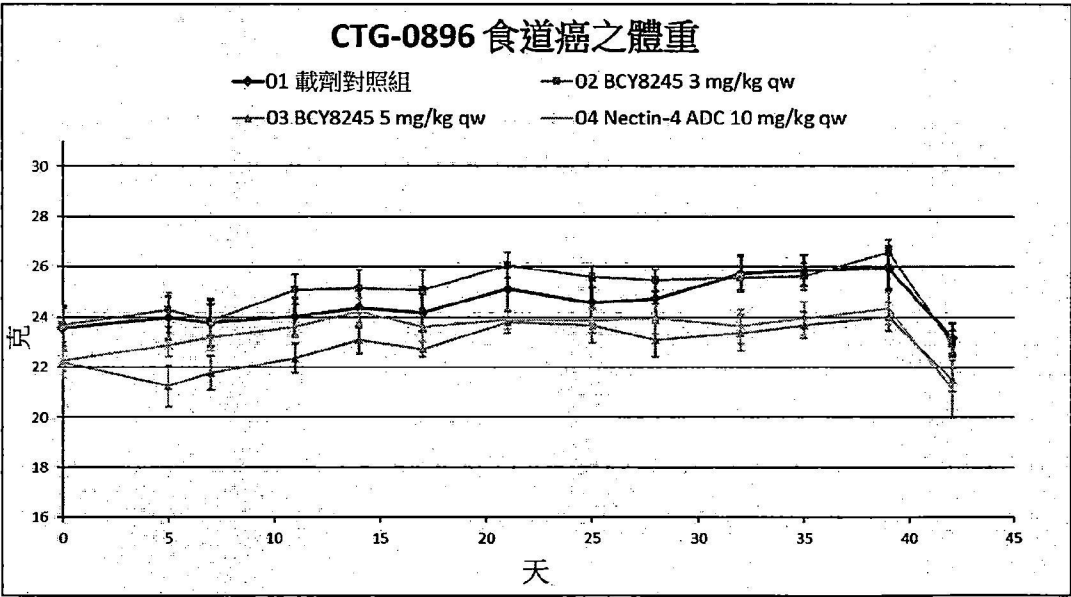


(B)

圖 30



(A)



(B)

圖 31

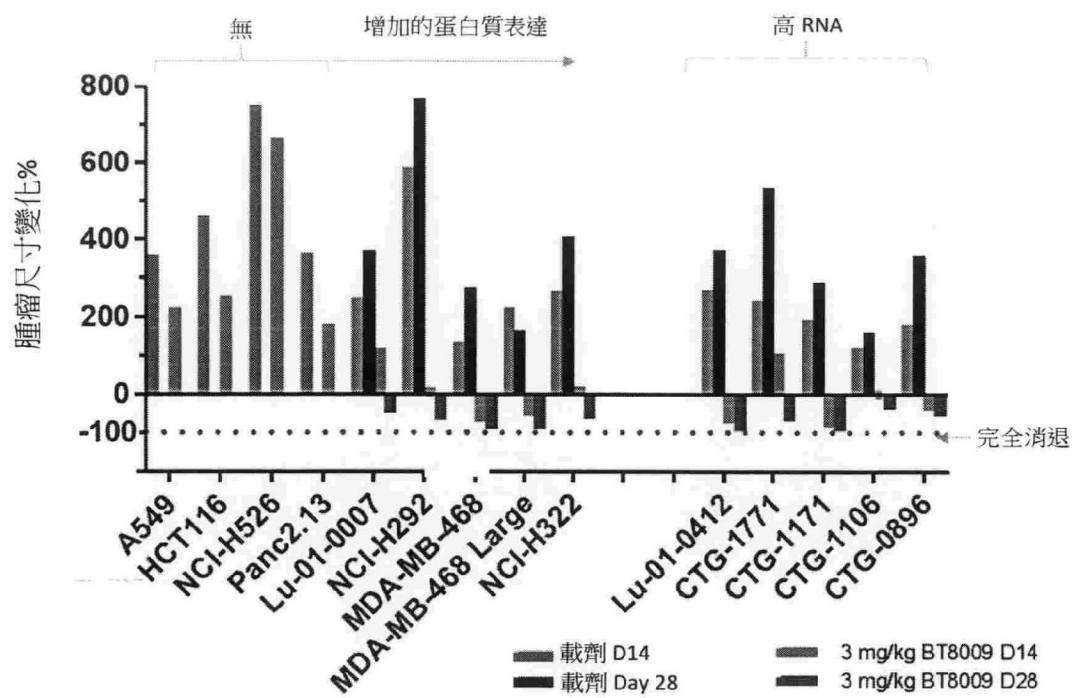


圖 32

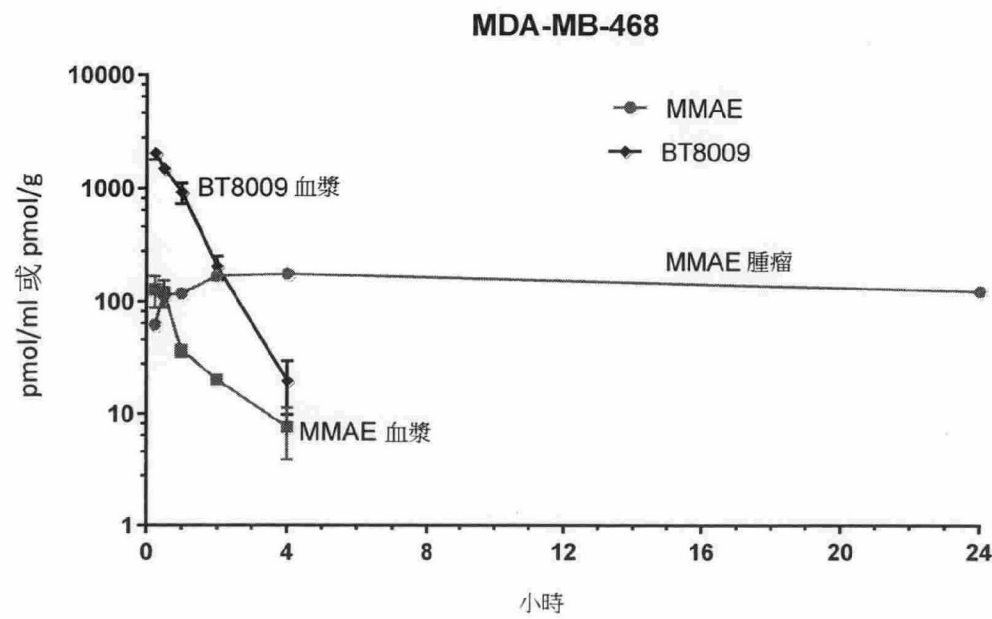


圖 33

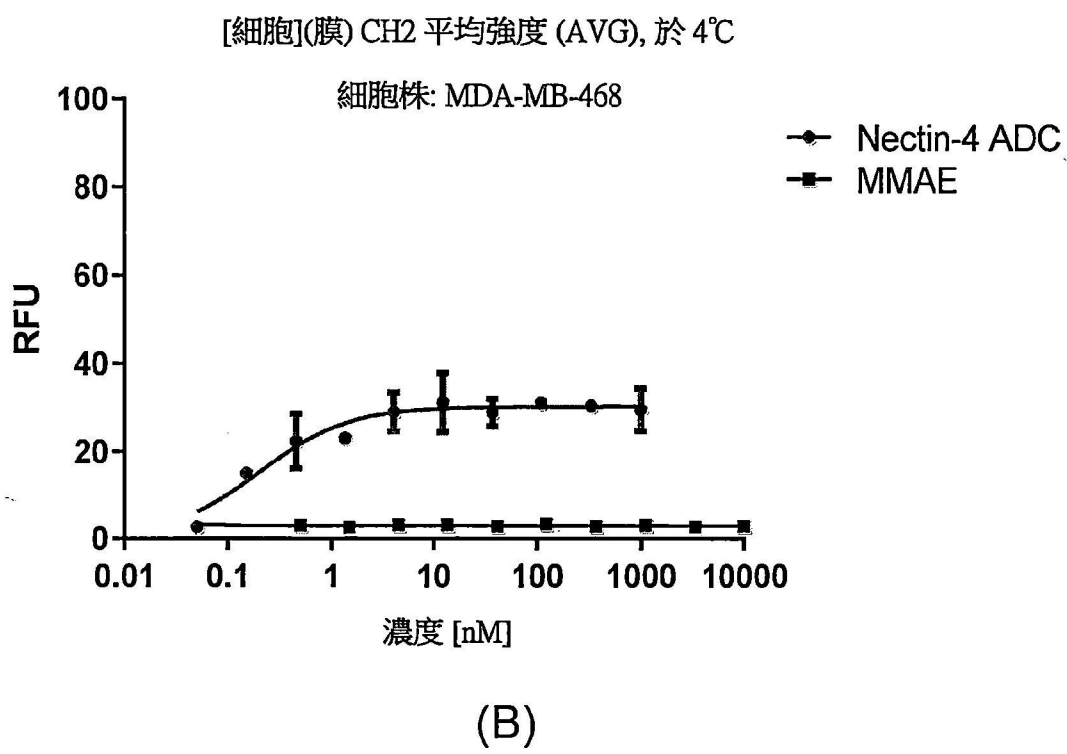
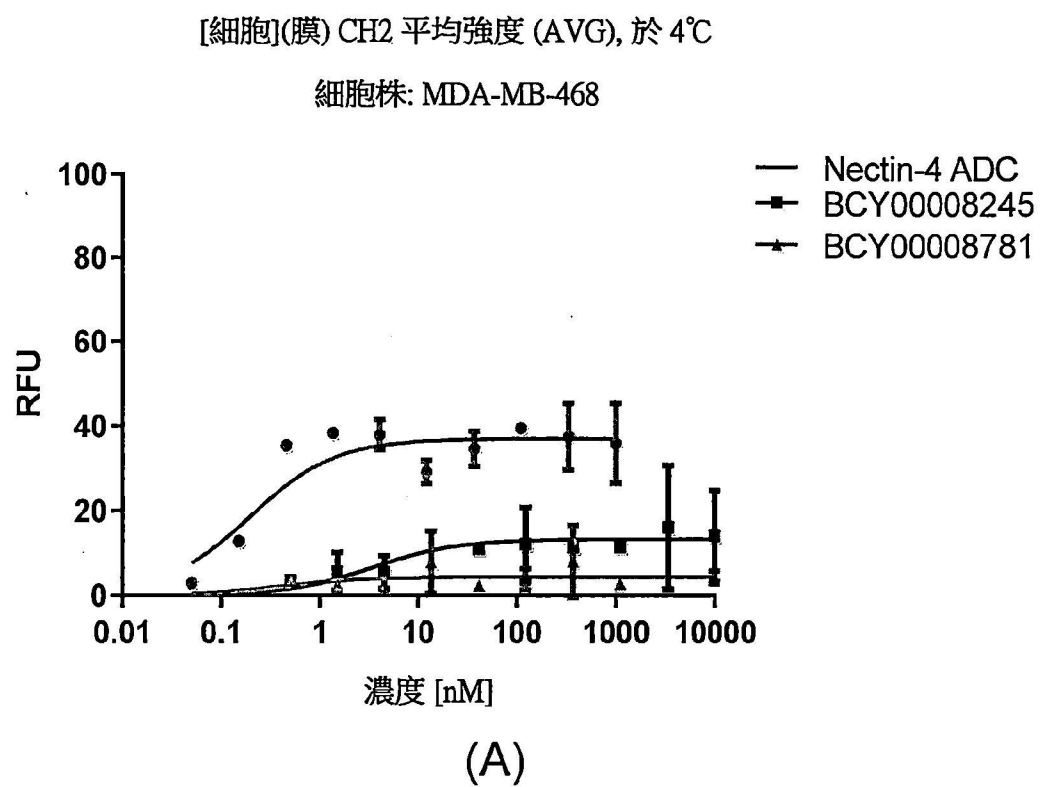


圖 34