(19)中華民國智慧財產局
(12)發明說明書公開本 (11)公開編號：TW 201347775 A
(43)公開日： 中華民國 102 (2013) 年 12 月 01 日

(21)申請案號：102114493 (22)申請日： 中華民國 102 (2013) 年 04 月 23 日
(51)Int. Cl.： *A61K47/48 (2006.01)* *C07K16/30 (2006.01)*
A61P35/00 (2006.01)
(30)優先權：2012/04/24 美國 61/637,808
(71)申請人：西雅圖遺傳學公司 (美國) SEATTLE GENETICS, INC. (US)
美國
第一三共股份有限公司 (日本) DAIICHI SANKYO COMPANY, LIMITED (JP)
日本
(72)發明人：大塚敏明 OHTSUKA, TOSHIAKI (JP) ；市川公久 ICHIKAWA, KIMIHISA (JP) ；
矢田步美 YADA, AYUMI (JP)
(74)代理人：陳長文
申請實體審查：無 申請專利範圍項數：22 項 圖式數：23 共 121 頁

(54)名稱

ＤＲ５配體藥物結合物

DR5 LIGAND DRUG CONJUGATES

(57)摘要

本發明提供配體藥物結合物，其具有經由連接基團及/或間隔體附接至治療劑之 DR5 結合部分，其可有效治療各種癌症。

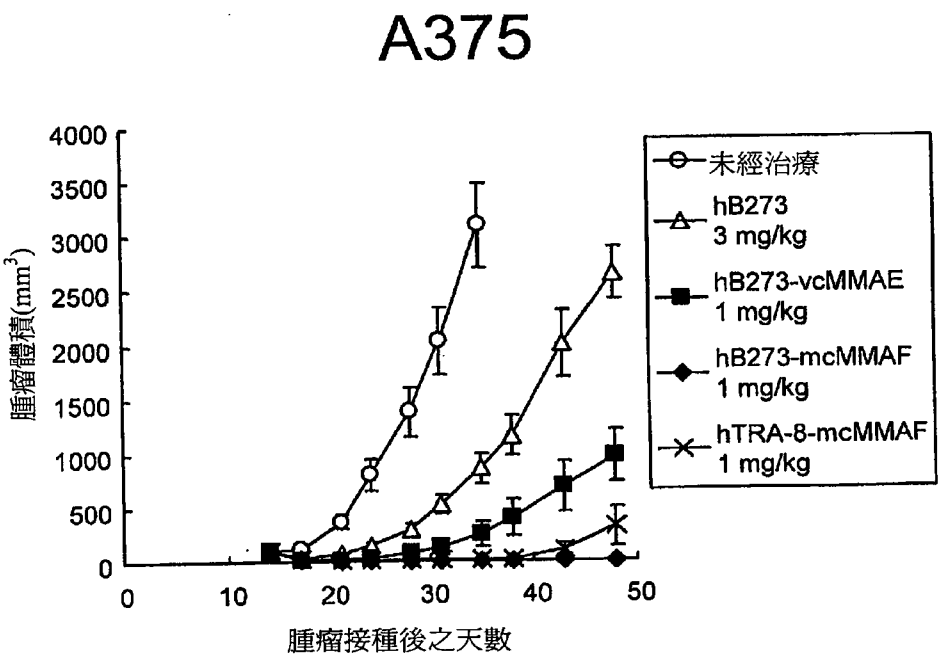


圖 13

(19)中華民國智慧財產局
(12)發明說明書公開本 (11)公開編號：TW 201347775 A
(43)公開日： 中華民國 102 (2013) 年 12 月 01 日

(21)申請案號：102114493 (22)申請日： 中華民國 102 (2013) 年 04 月 23 日
(51)Int. Cl.： *A61K47/48 (2006.01)* *C07K16/30 (2006.01)*
A61P35/00 (2006.01)
(30)優先權：2012/04/24 美國 61/637,808
(71)申請人：西雅圖遺傳學公司 (美國) SEATTLE GENETICS, INC. (US)
美國
第一三共股份有限公司 (日本) DAIICHI SANKYO COMPANY, LIMITED (JP)
日本
(72)發明人：大塚敏明 OHTSUKA, TOSHIAKI (JP) ；市川公久 ICHIKAWA, KIMIHISA (JP) ；
矢田步美 YADA, AYUMI (JP)
(74)代理人：陳長文
申請實體審查：無 申請專利範圍項數：22 項 圖式數：23 共 121 頁

(54)名稱

ＤＲ５配體藥物結合物

DR5 LIGAND DRUG CONJUGATES

(57)摘要

本發明提供配體藥物結合物，其具有經由連接基團及/或間隔體附接至治療劑之 DR5 結合部分，其可有效治療各種癌症。

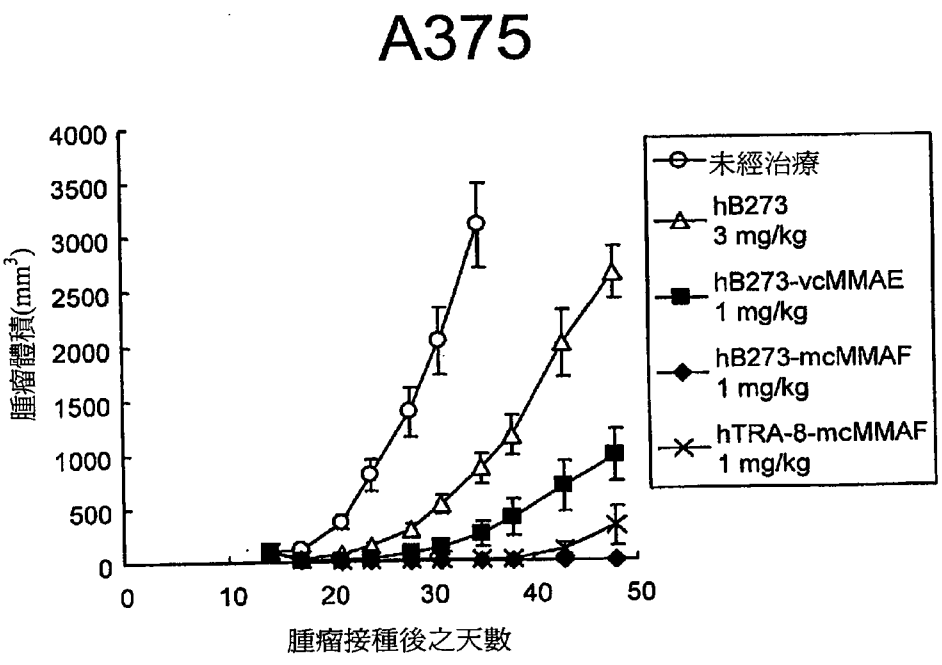


圖 13

201347775

發明摘要

※ 申請案號：102116493

※ 申請日：102-06-13

※IPC 分類：C07K 16/30 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

【發明名稱】

DR5配體藥物結合物

DR5 LIGAND DRUG CONJUGATES

【中文】

本發明提供配體藥物結合物，其具有經由連接基團及/或間隔體附接至治療劑之DR5結合部分，其可有效治療各種癌症。

【英文】

Ligand Drug Conjugates are provided having a DR5 binding moiety attached via linking groups and/or spacers to a therapeutic agent that are effective in treatment of various cancers.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（13）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：

無

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

無

發明專利說明書

（本說明書格式、順序，請勿任意更動）

【發明名稱】

DR5配體藥物結合物

DR5 LIGAND DRUG CONJUGATES

相關申請案交叉參考

本申請案主張2012年4月24日提出申請之美國臨時申請案第61/637,808號之優先權，該案件之全部內容皆出於所有目的以引用方式併入本文中。

關於對在聯邦政府發起之研究及開發下進行之本發明之權利的聲明

不適用

「序列表」(一個表或以ASCII文字檔案提交之電腦程式列表附件)參考

序列表書寫於檔案-75-1TW.TXT中，創建於2013年4月22日，20,480個字節，機器格式IBM-PC，MS-Windows操作系統，其出於所有目的全部內容以引用方式併入。

【先前技術】

參與細胞凋亡誘導之細胞表面受體(例如含有死亡結構域之受體)由於配體結合而在細胞膜上多聚化，且以生物方式觸發細胞中凋亡信號之誘導(Cell Death and Differentiation, 10:66-75 (2003))。該等細胞表面受體之實例包括與腫瘤壞死因子(下文中稱爲TNF)相關之細胞凋亡誘導配體(下文中稱爲TRAIL)受體家族。TRAIL係TNF蛋白質家族之成員，其包括Fas配體及TNF-α (Wiley SR等人， Immunity 1995年12月；3(6):673-82)。該等蛋白質係有效的細胞凋亡誘導物。

TNF家族蛋白質之受體的特徵在於細胞外結構域中之富含半胱胺

酸重複序列。其中，Fas (Fas配體之受體)及TNF受體I (下文中稱爲TNFRI，TNF-α之受體)統稱爲含有死亡結構域之受體。該等受體具有對凋亡信號傳導至關重要之細胞內結構域，其稱爲死亡結構域且與果蠅屬(Drosophila)自殺基因reaper同源(Golstein, P.等人，(1995) Cell. 81, 185-186；White, K等人，(1994) Science 264, 677-683)。

已鑒定出五種TRAIL受體，且其中兩種受體(DR4 [TRAIL-R1]及DR5 [TRAIL-R2])能夠誘導凋亡信號傳導，而其他三種受體(DcR1 [TRAIL-R3]、DcR2 [TRAIL-R4]及骨保護素(osteoprotegerin) [OPG])不誘導凋亡信號傳導。與Fas及TNFRI一樣，DR4及DR5之細胞內區段含有死亡結構域並經由包括Fas相關死亡結構域蛋白質(下文中稱爲FADD)及半胱天冬酶-8之路徑來誘導凋亡信號傳導(Chaudhary PM等人，Immunity 1997年12月；7(6): 821-30；Schneider P等人，Immunity 1997年12月；7(6): 831-36)。

對於上文Fas、TNFRI、DR4及DR5，分別結合該等分子之激動型抗體對表面上具有該等靶分子之細胞具有細胞凋亡誘導活性(Journal of Cellular Physiology, 209: 1021-1028 (2006)；Leukemia, Apl; 21 (4): 805-812 (2007)；Blood, 99: 1666-1675 (2002)；Cellular Immunology, 1月; 153 (1): 184-193 (1994))。該等激動型抗體之功效藉由與二級抗體或效應細胞交聯而增強(Journal of Immunology, 149: 3166-3173 (1992)；European Journal of Immunology, 10月; 23 (10): 2676-2681 (1993))。

能夠結合參與細胞凋亡誘導之細胞表面受體的抗DR5抗體當前正作爲治療劑處於臨床研發中，且預期會顯示治療效果並以特異性及激動方式殺死表現該受體之細胞(癌細胞及免疫疾病相關細胞)。已提出該抗體之作用機制係藉由在抗體與受體結合之前或之後抗體分子交聯在一起形成多聚體來調介。抗體之該多聚化隨後使得抗原受體多聚化

(即，細胞凋亡誘導)。看來，在活體外實驗中，需要藉由添加對抗該抗體之二級抗體實施人工交聯來增強該抗體之活性，且在活體內，與免疫效應細胞上之Fc受體交聯係產生抗體活性所需要之作用機制。最近，已嘗試藉由改變抗體之結構來進一步增強抗體之原始功能。例如，據報導，移除抗體上之特定碳水化合物結構可改良對Fc受體之親和性。該作用機制錶明細胞表面受體之非內化抗體較佳。

然而，仍然需要治療DR5表現癌症之方法。

【發明內容】

本發明尤其提供用於將藥物靶向遞送至DR5表現細胞之配體藥物結合物。本發明者已實施大量研究且發現，含有能夠誘導細胞凋亡之抗體的抗體-藥物結合物比單獨該抗體具有更顯著之癌症治療效果。藉由使用本發明之抗體-藥物結合物，抗體本身呈現細胞凋亡誘導效應且結合至抗體之藥物亦呈現治療效果。由於該等原因，該抗體-藥物結合物對單獨抗體不能有效治療之患者具有有效的治療效果。本文所述之配體藥物結合物對表現DR5之細胞(例如表現DR5之癌細胞)具有強效細胞毒性及/或細胞生長抑制活性。在一些實施例中，配體藥物結合物具有下式：

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

其中L係配體單元，LU係連接體單元且D係藥物單元(或細胞毒性劑)。下標p係1至20之整數。因此，配體藥物結合物包含共價連接至至少一個藥物單元之配體單元。藥物單元可直接或經由連接體單元(-LU-)共價連接。下文更全面闡述之配體單元係DR5結合劑，例如抗DR5抗體。因此，本發明亦提供治療(例如)各種癌症之方法。該等方法涵蓋使用配體單元係特異性結合DR5之抗DR5結合劑的配體藥物結合物。DR5結合劑可爲(例如)抗DR5抗體、抗DR5抗原結合片段、或包含人類化抗體重鏈及/或輕鏈可變區之胺基酸序列的其他DR5結合

劑或其衍生物。

在一些實施例中，配體藥物結合物包含共價附接至細胞毒性劑之DR5結合劑。在一些實施例中，配體藥物結合物具有下式：

$$L - (LU-D)_p \qquad \textbf{(I)}$$

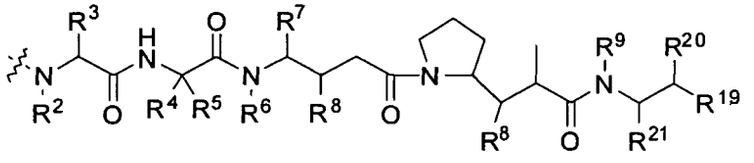
或其醫藥上可接受之鹽，其對表現DR5之靶細胞具有特異性，其中：

L係配體單元，其係DR5結合劑；且

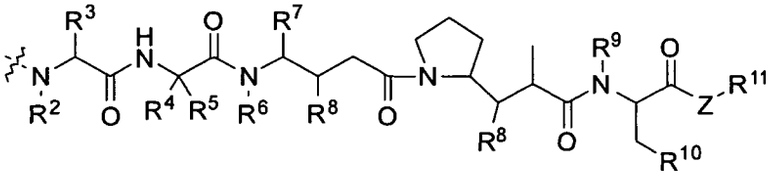
(LU-D)係連接體單元-藥物單元部分，其中LU係連接體單元，且D係具有抵抗該等靶細胞之細胞生長抑制胡細胞毒性活性的藥物單元；且

下標p係1至20之整數。

在一些實施例中，具有式(I)之配體藥物結合物包含具有式D_E或D_F之藥物單元：



D_E



D_F

或其醫藥上可接受之鹽，其中，在每一位置上獨立地：

波形線指示與該配體藥物結合物之其餘部分之附接點；

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

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

基)、-雜環、-C_1-C_{20}伸烷基(雜環)、-C_2-C_{20}伸烯基(雜環)或-C_2-C_{20}伸炔基(雜環)；

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

$\mathbf{R^5}$係-H或-C_1-C_8烷基；

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

R6係-H、-C_1-C_{20}烷基、-C_2-C_{20}烯基或-C_2-C_{20}炔基；

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

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

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

$\mathbf{R^{19}}$係-芳基、-雜環或-碳環；

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

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

$\mathbf{R^{10}}$係-芳基或-雜環；

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

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

m係0至1000範圍內之整數；

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

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

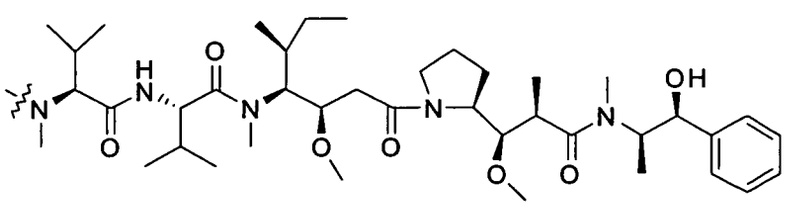
$\mathbf{R^{15}}$在每次出現時獨立地爲-H、-COOH、-$(CH_2)_n$-$N(R^{16})_2$、-$(CH_2)_n$-SO_3H、-$(CH_2)_n$-SO_3-C_1-C_{20}烷基、-$(CH_2)_n$-SO_3-C_2-C_{20}烯基或-$(CH_2)_n$-SO_3-C_2-C_{20}炔基；

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

n係0至6範圍內之整數；其中該等烷基、烯基、炔基、伸烷基、伸烯基、伸炔基、芳基、碳環及雜環基團無論單獨抑或作爲另一基團之一部分皆視情況經取代。

在一些實施例中，藥物單元具有式D_E或其醫藥上可接受之鹽形式。在一些實施例中，D係D_E。在一些實施例中，D係D_F。

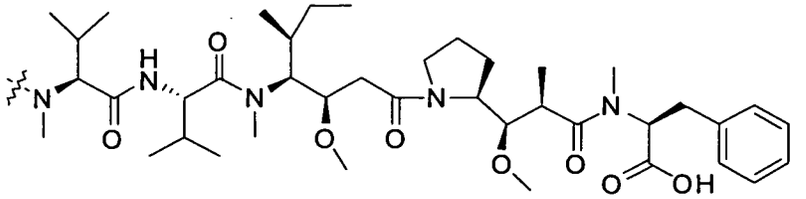
在一些實施例中，藥物單元具有下式：



或其醫藥上可接受之鹽形式；該DR5結合劑係抗DR5抗體，其經由該抗體之硫原子附接至該連接體單元；該連接體單元包含-Val-Cit-

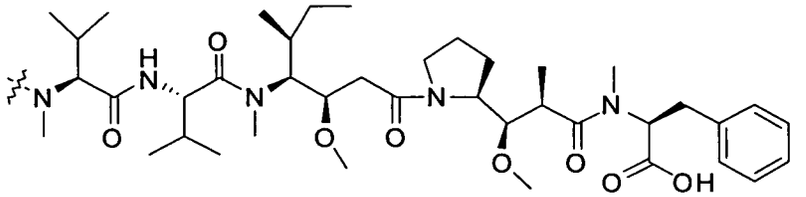
部分；且該下標p係1至8之整數。

在一些實施例中，藥物單元具有下式：



或其醫藥上可接受之鹽形式；該DR5結合劑係抗DR5抗體，其經由該抗體之硫原子附接至該連接體單元；該連接體單元包含-Val-Cit-部分；且該下標p係1至8之整數。

在一些實施例中，藥物單元具有下式：



或其醫藥上可接受之鹽形式；該DR5結合劑係抗DR5抗體，其經由該抗體之硫原子附接至該連接體單元；該連接體單元包含-琥珀醯亞胺-己酸-部分；且該下標p係1至8之整數。

在一些實施例中，具有式(I)之配體藥物結合物包含具有下式之LU：

$$—A_a—W_w—Y_y—$$

或其醫藥上可接受之鹽形式，其中：

-A-係延伸體單元(Stretcher unit)；

下標a係0或1；

各W獨立地爲胺基酸單元；

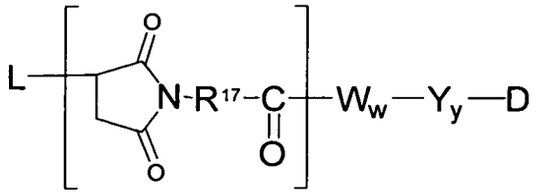
下標w係0至12之整數；

-Y-係間隔體單元；且

下標y係0、1或2。

在一些實施例中，包含具有式-$A_a—W_w—Y_y—$之LU的配體藥物結

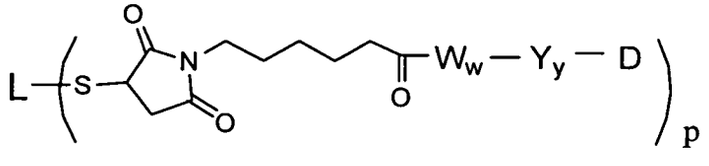
合物具有下式：



或其醫藥上可接受之鹽形式，其中：

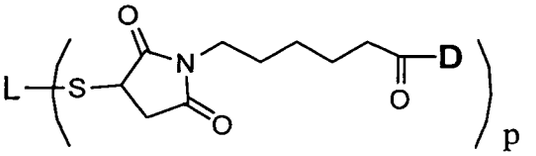
R^{17}係選自由下列組成之群之成員：-C_1-C_{10}伸烷基-、-C_2-C_{10}伸烯基-、-C_2-C_{10}伸炔基-、-碳環基-、-O-(C_1-C_8伸烷基)-、O-(C_2-C_8伸烯基)-、-O-(C_2-C_8伸炔基)-、-伸芳基-、-C_1-C_{10}伸烷基-伸芳基-、-C_2-C_{10}伸烯基-伸芳基、-C_2-C_{10}伸炔基-伸芳基、-伸芳基-C_1-C_{10}伸烷基-、-伸芳基-C_2-C_{10}伸烯基-、-伸芳基-C_2-C_{10}伸炔基-、-C_1-C_{10}伸烷基-(碳環基)-、-C_2-C_{10}伸烯基-(碳環基)-、-C_2-C_{10}伸炔基-(碳環基)-、-(碳環基)-C_1-C_{10}伸烷基-、-(碳環基)-C_2-C_{10}伸烯基-、-(碳環基)-C_2-C_{10}伸炔基、雜環基-、-C_1-C_{10}伸烷基-(雜環基)-、-C_2-C_{10}伸烯基-(雜環基)-、-C_2-C_{10}伸炔基-(雜環基)-、-(雜環基)-C_1-C_{10}伸烷基-、-(雜環基)-C_2-C_{10}伸烯基-、-(雜環基)-C_2-C_{10}伸炔基-、-$(CH_2CH_2O)_r$-及-$(CH_2CH_2O)_r$-CH_2-，其中r係1至10之整數，且其中該等烷基、烯基、炔基、伸烷基、伸烯基、伸炔基、芳基、碳環、碳環基、雜環基及伸芳基無論單獨抑或作爲另一基團之一部分皆視情況經取代。

在一些實施例中，包含具有式-A_a—W_w—Y_y—之LU的配體藥物結合物具有下式：



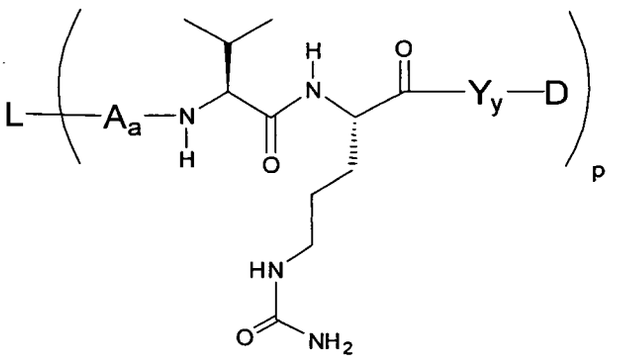
或其醫藥上可接受之鹽形式，其中S係由配體單元(L)提供之硫原子。

在一些實施例中，包含具有式-A_a—W_w—Y_y—之LU的配體藥物結合物具有下式：



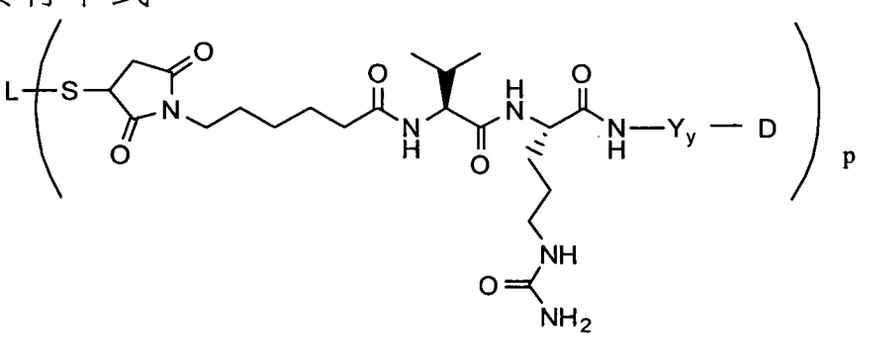
或其醫藥上可接受之鹽形式，其中S係由配體單元(L)提供之硫原子。

在一些實施例中，包含具有式-A_a—W_w—Y_y—之LU的配體藥物結合物具有下式：



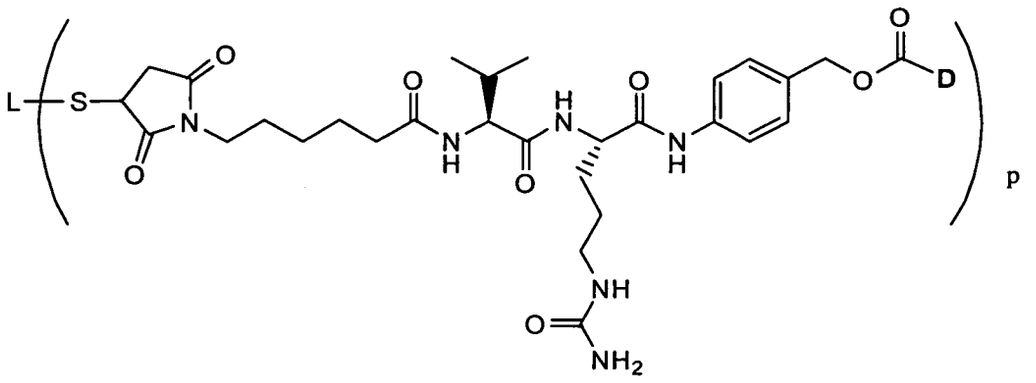
或其醫藥上可接受之鹽形式。

在一些實施例中，包含具有式-A_a—W_w—Y_y—之LU的配體藥物結合物具有下式：



或其醫藥上可接受之鹽形式。

在一些實施例中，包含具有式-A_a—W_w—Y_y—之LU的配體藥物結合物具有下式：



或其醫藥上可接受之鹽形式。

在一些實施例中，對於包含具有式-A_a—W_w—Y_y—之LU的配體藥物結合物，w係2至12範圍內之整數，且y係1或2。在一些實施例中，w係2且y係1或2。在一些實施例中，W_w係-纈胺酸-瓜胺酸-且y係1或2。

在一些實施例中，配體藥物結合物具有式(I)之式，其中L係抗DR5抗體。在一些實施例中，抗DR5抗體包含(a) 重鏈免疫球蛋白，其具有由SEQ ID NO: 11之胺基酸殘基1-5組成之CDR1、由SEQ ID NO:12之胺基酸殘基1-17組成之CDR2及由SEQ ID NO:13之胺基酸殘基1-13組成之CDR3；及(b) 輕鏈免疫球蛋白，其具有由SEQ ID NO: 14之胺基酸殘基1-16組成之CDR1、由SEQ ID NO:15之胺基酸殘基1-7組成之CDR2及由SEQ ID NO:16之胺基酸殘基1-9組成之CDR3。

在一些實施例中，配體藥物結合物具有下式：

$$L-(LU\text{-}D)_p \qquad \textbf{(I)}$$

或其醫藥上可接受之鹽，其對表現DR5之靶細胞具有特異性，其中：

L係配體單元，其係包含如下之抗DR5抗體：(a) 重鏈免疫球蛋白，其具有由SEQ ID NO: 11之胺基酸殘基1-5組成之CDR1、由SEQ ID NO:12之胺基酸殘基1-17組成之CDR2及由SEQ ID NO:13之胺基酸殘基1-13組成之CDR3；及(b) 輕鏈免疫球蛋白，其具有由SEQ

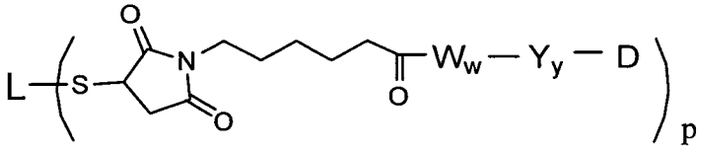
ID NO: 14之胺基酸殘基1-16組成之CDR1、由SEQ ID NO:15之胺基酸殘基1-7組成之CDR2及由SEQ ID NO:16之胺基酸殘基1-9組成之CDR3；且

(LU-D)係連接體單元-藥物單元部分，其中LU係連接體單元，且D係藥物單元，其中藥物單元係奧瑞司他汀(auristatin)；且

下標p係1至20之整數。

在一些實施例中，奧瑞司他汀係奧瑞司他汀E、AEB、AEVB、AFP、MMAF或MMAE。在一些實施例中，奧瑞司他汀係MMAF。在一些實施例中，奧瑞司他汀係MMAE。

在一些實施例中，配體藥物結合物具有下式：



或其醫藥上可接受之鹽形式，其中：

L係配體單元，其係包含如下之抗DR5抗體：(a) 重鏈免疫球蛋白，其具有由SEQ ID NO: 11之胺基酸殘基1-5組成之CDR1、由SEQ ID NO:12之胺基酸殘基1-17組成之CDR2及由SEQ ID NO:13之胺基酸殘基1-13組成之CDR3；及(b) 輕鏈免疫球蛋白，其具有由SEQ ID NO: 14之胺基酸殘基1-16組成之CDR1、由SEQ ID NO:15之胺基酸殘基1-7組成之CDR2及由SEQ ID NO:16之胺基酸殘基1-9組成之CDR3；

S係配體單元之硫原子；

各W獨立地爲胺基酸單元；

下標w係0至12之整數；

Y係間隔體單元；且

下標y係0、1或2。

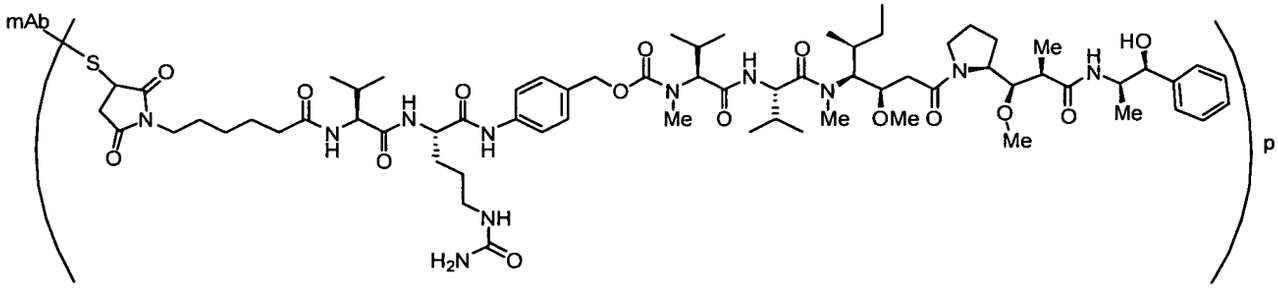
在一些實施例中，W_w係纈胺酸-瓜胺酸。在一些實施例中，不存在胺基酸單元。在一些實施例中，不存在間隔體單元。

在一些實施例中， 配體藥物結合物之p值介於1與20之間。在一些實施例中，p值係2、4、6、8、10、12、14、16、18或20。在一些實施例中，p值介於1與8之間。在一些實施例中，p值介於2與8之間。在一些實施例中，p值係2、4、6或8。

在一些實施例中，抗DR5抗體包含含有SEQ ID NO:9之胺基酸殘基1-122的重鏈可變區及包含SEQ ID NO:10之胺基酸殘基1-114的輕鏈可變區。

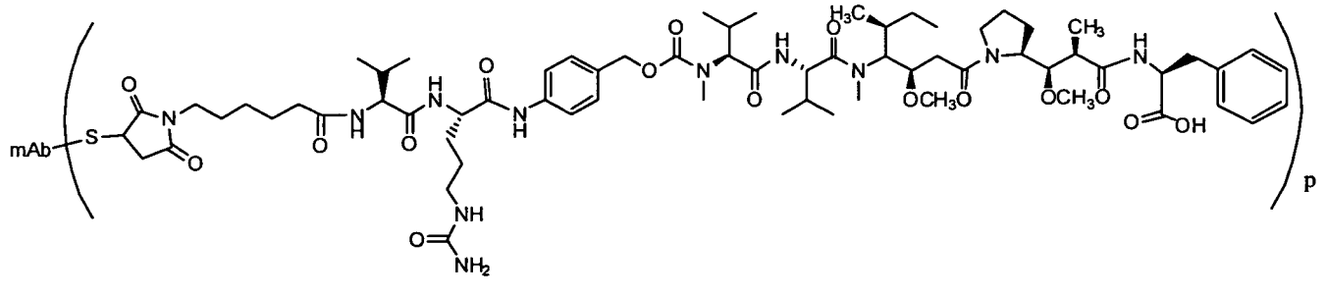
在一些實施例中，抗DR5抗體包含由SEQ ID NO:9之胺基酸殘基1-452組成之重鏈及由SEQ ID NO:10之胺基酸殘基1-219組成之輕鏈。在一些實施例中，抗DR5抗體包含由SEQ ID NO:9之胺基酸殘基1-451組成之重鏈及由SEQ ID NO:10之胺基酸殘基1-219組成之輕鏈。

在一些實施例中，配體藥物結合物具有下式：



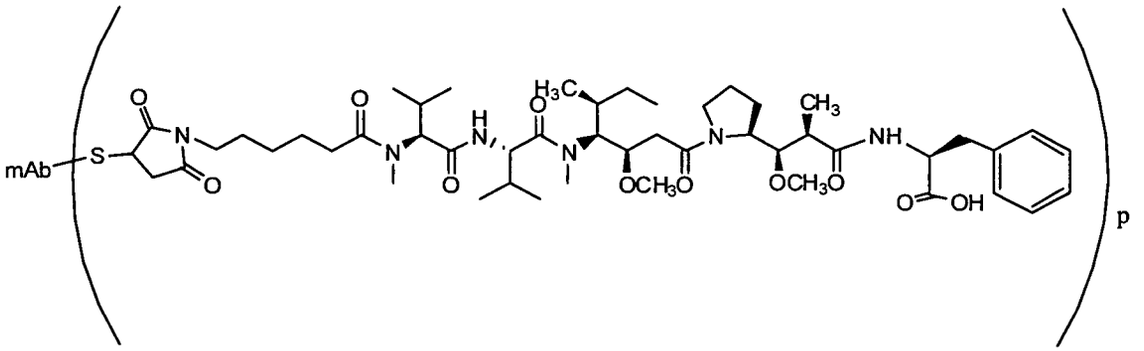
或其醫藥上可接受之鹽形式，其中mAb係如本文所述抗DR5抗體，S係抗體之硫原子，且p係1至8之整數。在一些實施例中，p係3至5。在一些實施例中，p係1至3。

在一些實施例中，配體藥物結合物具有下式：



或其醫藥上可接受之鹽形式，其中mAb係如本文所述抗DR5抗體，S係抗體之硫原子，且p係1至8之整數。在一些實施例中，p係3至5。在一些實施例中，p係1至3。

在一些實施例中，配體藥物結合物具有下式：



或其醫藥上可接受之鹽形式，其中mAb係如本文所述抗DR5抗體，S係抗體之硫原子，且p係1至8之整數。在一些實施例中，p係3至5。在一些實施例中，p係1至3。

在另一態樣中，本發明提供包含如本文所述配體藥物結合物之混合物的組合物。在一些實施例中，組合物之平均p值介於1與20之間。在一些實施例中，組合物之平均p值介於1與10之間。在一些實施例中，組合物之平均p值係約3.5至約4.5。

在另一態樣中，本發明提供醫藥上組合物，其包含如本文所述配體藥物結合物與醫藥上可接受之賦形劑之混合物。

在又一態樣中，本發明提供抗腫瘤劑，其包含如本文所述配體藥物結合物作爲有效成份。

在再一態樣中，本發明提供治療表現DR5蛋白或係DR5陽性癌症之癌症的方法。在一些實施例中，該方法包含向有需要之個體投與有效量之如本文所述配體藥物結合物。在一些實施例中，DR5陽性或DR5表現癌症選自由下列組成之群：黑色素瘤、膠質母細胞瘤、結腸直腸癌、非小細胞肺癌、子宮癌、胰臟癌、前列腺癌、乳癌、卵巢癌及血液癌症。在一些實施例中，癌症係胰臟癌。在一些實施例中，癌

症係黑色素瘤。在一些實施例中，癌症係乳癌。在一些實施例中，癌症係卵巢癌。在一些實施例中，癌症係結腸直腸癌。在一些實施例中，癌症係腎癌。在一些實施例中，癌症係膠質母細胞瘤。

【圖式簡單說明】

圖1-12提供使用本發明之hB273配體藥物結合物進行評價之12種細胞系的結果。

圖13-23提供本發明配體藥物結合物之活體內結果。

【實施方式】

定義及縮寫

除非文中另有說明，否則當在本文中使用商品名時，提及商品名亦指商品名產品之產品調配物、學名藥(generic drug)及活性醫藥成份。

本文所用之術語「DR5結合劑」及「抗DR5結合劑」係指特異性結合DR5之分子(例如，蛋白質)。實例可包括全長抗DR5抗體、全長抗DR5抗體之片段、或包括抗體重鏈及/或輕鏈可變區之其他藥劑及其衍生物。

本文所用之術語「抑制(inhibit或inhibition of)」意指降低可量測的量或完全阻止。

在DR5結合劑對DR5表現細胞之效果的上下文中，術語「消滅(deplete)」係指減少DR5表現細胞之數量或消除該等細胞。

術語「化合物」係指且涵蓋化學化合物本身以及以下物質(無論是否明確陳述，且除非上下文明確指出排除以下物質)：化合物之非晶形及結晶形式，包括多晶形形式，其中該等形式可爲混合物之一部分或處於分離狀態；化合物之游離酸及遊離鹼形式，其通常爲本文所提供結構中所顯示的形式；化合物之異構物，其係指光學異構物及互變異構物，其中光學異構物包括對映異構物及非對映異構物、對掌性

異構物及非對掌性異構物，且光學異構物包括分離的光學異構物以及光學異構物混合物，包括外消旋及非外消旋混合物；其中異構物可呈分離形式或呈與一或多種其他異構物之混合物形式；化合物之同位素，包括含有氘及氚之化合物，且包括含有放射性同位素(包括治療及診斷上有效之放射性同位素)之化合物；化合物之多聚形式，包括二聚、三聚等形式；化合物之鹽，較佳爲醫藥上可接受之鹽，包括酸加成鹽及鹼加成鹽，包括具有有機抗衡離子及無機抗衡離子之鹽，且包括兩性離子形式，其中若化合物涉及兩種或更多種抗衡離子，則該兩種或更多種抗衡離子可相同或不同；及化合物之溶劑合物，包括半溶劑合物、單溶劑合物、二溶劑合物等，包括有機溶劑合物及無機溶劑合物，該等無機溶劑合物包括水合物；其中若化合物涉及兩種或更多種溶劑分子，則該兩種或更多種溶劑分子可相同或不同。在一些情形下，在本文中提及本發明化合物將包括明確提及上述形式中之一或多者，例如，鹽及/或溶劑合物，然而，該提及僅出於強調目的，且不應理解爲排除其他上文確定之上述形式。

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

無論單獨抑或作爲另一基團之一部分，烷基可以「經取代」搥

及。經取代烷基係經一或多個基團、較佳1至3個基團(及選自鹵素之任何其他取代基)取代之烷基，該等基團包括(但不限於)-鹵素、-O-(C_1-C_8烷基)、-O-(C_2-C_8烯基)、-O-(C_2-C_8 炔基)、-芳基、-C(O)R'、-OC(O)R'、-C(O)OR'、-C(O)NH_2、-C(O)NHR'、-C(O)N(R')$_2$、-NHC(O)R'、-SR'、-SO_3R'、-S(O)$_2$R'、-S(O)R'、-OH、=O、-N_3、-NH_2、-NH(R')、-N(R')$_2$及-CN，其中各R'獨立地選自-H、-C_1-C_8烷基、-C_2-C_8烯基、-C_2-C_8炔基或-芳基，且其中該-O-(C_1-C_8烷基)、-O-(C_2-C_8烯基)、-O-(C_2-C_8炔基)、-芳基、-C_1-C_8烷基、-C_2-C_8烯基及-C_2-C_8炔基可視情況經一或多個包括(但不限於)以下之基團進一步取代：-C_1-C_8烷基、-C_2-C_8烯基、-C_2-C_8炔基、-鹵素、-O-(C_1-C_8烷基)、-O-(C_2-C_8烯基)、-O-(C_2-C_8炔基)、-芳基、-C(O)R''、-OC(O)R''、-C(O)OR''、-C(O)NH_2、-C(O)NHR''、-C(O)N(R'')$_2$、-NHC(O)R''、-SR''、-SO_3R''、-S(O)$_2$R''、-S(O)R''、-OH、-N_3、-NH_2、-NH(R'')、-N(R'')$_2$及-CN，其中各R''獨立地選自-H、-C_1-C_8烷基、-C_2-C_8烯基、-C_2-C_8炔基或-芳基。

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

與烷基一樣，烯基及炔基可經取代。「經取代」烯基或炔基係經一或多個基團、較佳1至3個基團(及選自鹵素之任何其他取代基)取代

之烯基或炔基，該等基團包括(但不限於)-鹵素、-O-(C_1-C_8烷基)、-O-(C_2-C_8烯基)、-O-(C_2-C_8炔基)、-芳基、-C(O)R'、-OC(O)R'、-C(O)OR'、-$C(O)NH_2$、-C(O)NHR'、-$C(O)N(R')_2$、-NHC(O)R'、-SR'、-SO_3R'、-$S(O)_2R'$、-S(O)R'、-OH、=O、-N_3、-NH_2、-NH(R')、-$N(R')_2$及-CN，其中各R'獨立地選自-H、-C_1-C_8烷基、-C_2-C_8烯基、-C_2-C_8炔基或-芳基，且其中該-O-(C_1-C_8烷基)、-O-(C_2-C_8烯基)、-O-(C_2-C_8炔基)、-芳基、-C_1-C_8烷基、-C_2-C_8烯基及-C_2-C_8炔基可視情況經一或多個包括(但不限於)以下之取代基進一步取代：-C_1-C_8烷基、-C_2-C_8烯基、-C_2-C_8炔基、-鹵素、-O-(C_1-C_8烷基)、-O-(C_2-C_8烯基)、-O-(C_2-C_8炔基)、-芳基、-C(O)R''、-OC(O)R''、-C(O)OR''、-$C(O)NH_2$、-C(O)NHR''、-$C(O)N(R'')_2$、-NHC(O)R''、-SR''、-SO_3R''、-$S(O)_2R''$、-S(O)R''、-OH、-N_3、-NH_2、-NH(R'')、-$N(R'')_2$及-CN，其中各R''獨立地選自-H、-C_1-C_8烷基、-C_2-C_8烯基、-C_2-C_8炔基或-芳基。

除非另有說明，否則術語「伸烷基」係指如下飽和具支鏈或直鏈烴基團：具有約1個至約20個碳原子(以及其中碳原子之範圍及具體數目的所有組合及次組合)，其中約1個至約8個碳原子較佳；且具有藉由自母體烷烴之相同或兩個不同碳原子移除兩個氫原子而得到之兩個單價基團中心。典型伸烷基包括(但不限於)亞甲基、伸乙基、伸丙基、伸丁基、伸戊基、伸己基、伸庚基、伸辛基、伸壬基、伸癸基、1,4-伸環己基及諸如此類。無論單獨抑或作爲另一基團之一部分，伸烷基可視情況經一或多個基團、較佳1至3個基團(及選自鹵素之任何其他取代基)取代，該等基團包括(但不限於)-鹵素、-O-(C_1-C_8烷基)、-O-(C_2-C_8烯基)、-O-(C_2-C_8炔基)、-芳基、-C(O)R'、-OC(O)R'、-C(O)OR'、-$C(O)NH_2$、-C(O)NHR'、-$C(O)N(R')_2$、-NHC(O)R'、-SR'、-SO_3R'、-$S(O)_2R'$、-S(O)R'、-OH、=O、-N_3、

NH_2、-NH(R')、-N(R')$_2$及-CN，其中各R'獨立地選自-H、-C_1-C_8烷基、-C_2-C_8烯基、-C_2-C_8炔基或-芳基，且其中該-O-(C_1-C_8烷基)、-O-(C_2-C_8烯基)、-O-(C_2-C_8炔基)、-芳基、-C_1-C_8烷基、-C_2-C_8烯基及-C_2-C_8炔基可視情況經一或多個包括(但不限於)以下之取代基進一步取代：-C_1-C_8烷基、-C_2-C_8烯基、-C_2-C_8炔基、-鹵素、-O-(C_1-C_8烷基)、-O-(C_2-C_8烯基)、-O-(C_2-C_8炔基)、-芳基、-C(O)R''、-OC(O)R''、-C(O)OR''、-C(O)NH_2、-C(O)NHR''、-C(O)N(R'')$_2$、-NHC(O)R''、-SR''、-SO_3R''、-S(O)$_2$R''、-S(O)R''、-OH、-N_3、-NH_2、-NH(R'')、-N(R'')$_2$及-CN，其中各R''獨立地選自-H、-C_1-C_8烷基、-C_2-C_8烯基、-C_2-C_8炔基或-芳基。

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

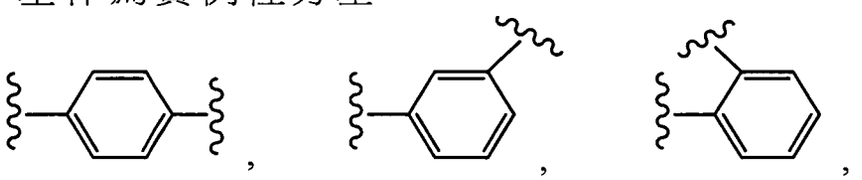
除非另有說明，否則術語「伸炔基」係指含有至少一個碳碳三鍵之視情況經取代之伸烷基。實例性伸炔基包括(例如)乙炔(-C≡C-)、丙炔基(-CH$_2$C≡C-)及4-戊炔基(-CH$_2$CH$_2$CH$_2$C≡CH-)。

除非另有說明，否則術語「芳基」係指藉由自母體芳香族環系統之單一碳原子移除一個氫原子而得到之具有6-20個碳原子(以及其中碳原子之範圍及具體數目的所有組合及次組合)之單價芳香族烴基團。一些芳基在實例性結構中表示成「Ar」。典型芳基包括(但不限於)衍生自苯、經取代苯、苯基、萘、蒽、聯苯及諸如此類之基團。

無論單獨抑或作爲另一基團之一部分，芳基可視情況經一或多個、較佳1個至5個或甚至1個至2個基團取代，該等基團包括(但不限於)-鹵素、-C_1-C_8烷基、-C_2-C_8烯基、-C_2-C_8炔基、-O-(C_1-C_8烷基)、-O-(C_2-C_8烯基)、-O-(C_2-C_8炔基)、-芳基、-C(O)R'、-OC(O)R'、-C(O)OR'、-C(O)NH_2、-C(O)NHR'、-C(O)N(R')$_2$、-NHC(O)R'、-

SR'、-SO_3R'、-$S(O)_2$R'、-S(O)R'、-OH、-NO_2、-N_3、-NH_2、-NH(R')、-$N(R')_2$及-CN，其中各R'獨立地選自-H、-C_1-C_8烷基、-C_2-C_8烯基、-C_2-C_8炔基或-芳基，且其中該-C_1-C_8烷基、-C_2-C_8烯基、-C_2-C_8炔基、-O-(C_1-C_8烷基)、-O-(C_2-C_8烯基)、-O-(C_2-C_8炔基)及-芳基可視情況經一或多個包括(但不限於)以下之取代基進一步取代：-C_1-C_8烷基、-C_2-C_8烯基、-C_2-C_8炔基、-鹵素、-O-(C_1-C_8烷基)、-O-(C_2-C_8烯基)、-O-(C_2-C_8炔基)、-芳基、-C(O)R''、-OC(O)R''、-C(O)OR''、-$C(O)NH_2$、-C(O)NHR''、-$C(O)N(R'')_2$、-NHC(O)R''、-SR''、-SO_3R''、-$S(O)_2$R''、-S(O)R''、-OH、-N_3、-NH_2、-NH(R'')、-$N(R'')_2$及-CN，其中各R''獨立地選自-H、-C_1-C_8烷基、-C_2-C_8烯基、-C_2-C_8炔基或-芳基。

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



其中芳基(例如苯基)可未經取代或經取代。在一些實施例中，伸芳基係經取代之伸芳基，其中其經至多四個基團取代，該等基團包括(但不限於)-C_1-C_8烷基、-O-(C_1-C_8 烷基)、-芳基、-C(O)R'、-OC(O)R'、-C(O)OR'、-$C(O)NH_2$、-C(O)NHR'、-$C(O)N(R')_2$、-NHC(O)R'、-$S(O)_2$R'、-S(O)R'、-OH、-鹵素、-N_3、-NH_2、-NH(R')、-$N(R')_2$及-CN；其中各R'獨立地選自H、-C_1-C_8烷基及芳基。

除非另有說明，否則術語「雜環」係指具有3個至14個環原子(亦稱爲環成員)且其中至少一個環中之至少一個環原子係選自N、O、P

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

雜環闡述於Paquette，「Principles of Modern Heterocyclic Chemistry」(W.A. Benjamin, New York, 1968)，尤其第1、3、4、6、7及9篇；「The Chemistry of Heterocyclic Compounds, A series of Monographs」(John Wiley & Sons，New York，1950年至今)，尤其第13、14、16、19及28卷；及*J. Am. Chem. Soc.* 82:5566 (1960)。

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

「雜環」基團之實例包括(例如且不加以限制)吡啶基、二氫吡啶基、四氫吡啶基(哌啶基)、噻唑基、嘧啶基、呋喃基、噻吩基、吡咯基、吡唑基、咪唑基、四唑基、苯並呋喃基、萘硫基(thianaphthalenyl)、吲哚基、假吲哚基、喹啉基、異喹啉基、苯並咪唑基、六氫吡啶基、4-六氫吡啶酮基、吡咯啶基、2-吡咯啶酮基、吡咯啉基、四氫呋喃基、雙-四氫呋喃基、四氫吡喃基、雙-四氫吡喃基、四氫喹啉基、四氫異喹啉基、十氫喹啉基、八氫異喹啉基、氮雜卓基、三嗪基、6H-1,2,5-噻二嗪基、2H,6H-1,5,2-二噻嗪基、噻吩基、噻蒽基、吡喃基、異苯並呋喃基、苯並吡喃基、呫噸基、啡噁噻基、

2H-吡咯基、異噻唑基、異噁唑基、吡嗪基、嗒嗪基、中氮茚基、異吲哚基、3H-吲哚基、1H-吲唑基、嘌呤基、4H-喹嗪基、呔嗪基、萘啶基、喹喏啉基、喹唑啉基、吩啉基、喋啶基、4H-哢唑基、哢唑基、β-哢啉基、啡啶基、吖啶基、嘧啶基、啡啉基、啡嗪基、啡噻嗪基、呋呫基、啡噁嗪基、異苯並二氫吡喃基、苯並二氫吡喃基、咪唑啶基、咪唑啉基、吡唑啶基、吡唑啉基、六氫吡嗪基、二氫吲哚基、異二氫吲哚基、喔啶基、嗎啉基、噁唑啶基、苯並三唑基、苯並異噁唑基、羥吲哚基、苯並噁唑啉基及靛紅基(isatinoyl)。較佳之「雜環」基團包括(但不限於)苯並呋喃基、苯並苯硫基、吲哚基、苯並吡唑基、香豆素基(coumarinyl)、異喹啉基、吡咯基、苯硫基、呋喃基、噻唑基、咪唑基、吡唑基、三唑基、喹啉基、嘧啶基、吡啶基、吡啶酮基、吡嗪基、嗒嗪基、異噻唑基、異噁唑基及四唑基。

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

H、-C_1-C_8烷基、-C_2-C_8烯基、-C_2-C_8炔基或芳基。

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

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

除非另有說明，否則術語「碳環」係指具有3至14個環原子(以及其中碳原子之範圍及具體數目的所有組合及次組合)之飽和或不飽和的非芳香族單環狀、二環狀或多環狀環系統，其中所有環原子均爲碳原子。單環狀碳環較佳具有3至6個環原子，仍更佳地具有5或6個環原子。二環狀碳環較佳具有7至12個環原子，例如，以二環[4,5]、[5,5]、[5,6]或[6,6]系統排列；或具有9或10個環原子，以二環[5,6]或[6,6]系統排列。術語「碳環」包括(例如)稠合至芳基環之單環狀碳環環(例如，稠合至苯環之單環狀碳環環)。碳環較佳具有3至8個碳環原

子。

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

單環狀碳環取代基之實例包括-環丙基、-環丁基、-環戊基、-1-環戊-1-烯基、-1-環戊-2-烯基、-1-環戊-3-烯基、環己基、-1-環己-1-烯基、-1-環己-2-烯基、-1-環己-3-烯基、-環庚基、-環辛基、-1,3-環己二烯基、-1,4-環己二烯基、-1,3-環庚二烯基、-1,3,5-環庚三烯基及-環辛二烯基。

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

除非上下文另有說明，否則連字號(-)表示與懸垂分子(pendant

molecule)的附接點。因此，術語「-(C_1-C_8伸烷基)芳基」或「-C_1-C_8伸烷基(芳基)」係指如本文所定義之C_1-C_8伸烷基，其中伸烷基在該伸烷基之任一碳原子處附接至懸垂分子且鍵結至該伸烷基之碳原子之一個氫原子經如本文所定義之芳基替換。典型「-(C_1-C_8伸烷基)芳基」、「-(C_2-C_8伸烯基)芳基」及「-(C_2-C_8伸炔基)芳基」基團包括(但不限於)苄基、2-苯基乙烷-1-基、2-苯基乙烯-1-基、萘基甲基、2-萘基乙烷-1-基、2-萘基乙烯-1-基、萘並苄基、2-萘並苯基乙烷-1-基及諸如此類。

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

分子中特定位置上任何取代基或變量之定義意欲獨立於該分子中其他地方之定義。應瞭解，熟習此項技術者可選擇本發明化合物上之取代基及取代模式，以提供化學上穩定且可藉由業內已知技術以及彼等下文所述方法容易地合成的化合物。

本文所用之保護基團係指選擇性地阻斷(暫時地或永久地)多官能團化合物中之一個反應位點的基團。適用於本發明之羥基-保護基團係醫藥上可接受的，且可需要或可不需要在投與至個體後自母體化合物裂解以使化合物具有活性。在體內經由正常代謝過程進行裂解。羥基保護基團已爲熟習此項技術者所熟知，參見，PROTECTIVE GROUPS IN ORGANIC SYNTHESIS，T. W. *Greene*及P. G. M. Wuts (John Wiley & sons，第3版)，該文獻之全部內容出於所有目的以引用方式併入本文中，且包括例如醚(例如，烷基醚及矽基醚，包括(例如)二烷基矽基醚、三烷基矽基醚、二烷基烷氧基矽基醚)、酯、碳酸酯、胺基甲酸酯、磺酸酯及磷酸酯保護基團。羥基保護基團之實例包

括(但不限於)甲基醚；甲氧基甲基醚、甲基硫代甲基醚、(苯基二甲基矽基)甲氧基甲基醚、苄基氧基甲基醚、對-甲氧基苄基氧基甲基醚、對-硝基苄基氧基甲基醚、鄰-硝基苄基氧基甲基醚、(4-甲氧基苯氧基)甲基醚、愈創木酚甲基醚、第三丁氧基甲基醚、4-戊烯基氧基甲基醚、甲矽烷氧基甲基醚、2-甲氧基乙氧基甲基醚、2,2,2-三氯乙氧基甲基醚、雙(2-氯乙氧基)甲基醚、2-(三甲基矽基)乙氧基甲基醚、甲氧基甲基醚、四氫吡喃基醚、1-甲氧基環己基醚、4-甲氧基四氫硫代吡喃基醚、4-甲氧基四氫硫代吡喃基醚S,S-二氧化物、1-[(2-氯-4-甲基)苯基]-4-甲氧基六氫吡啶-4-基醚、1-(2-氟苯基)-4-甲氧基六氫吡啶-4-基醚、1,4-二噁烷-2-基醚、四氫呋喃基醚、四氫硫代呋喃基醚；經取代乙基醚，例如1-乙氧基乙基醚、1-(2-氯乙氧基)乙基醚、1-[2-(三甲基矽基)乙氧基]乙基醚、1-甲基-1-甲氧基乙基醚、1-甲基-1-苄基氧基乙基醚、1-甲基-1-苄基氧基-2-氟乙基醚、1-甲基-1-苯氧基乙基醚、2-三甲基矽基醚、第三丁基醚、烯丙基醚、炔丙基醚、對-氯苯基醚、對-甲氧基苯基醚、苄基醚、對-甲氧基苄基醚、3,4-二甲氧基苄基醚、三甲基矽基醚、三乙基矽基醚、三丙基矽基醚、二甲基異丙基矽基醚、二乙基異丙基矽基醚、二甲基己基矽基醚、第三丁基二甲基矽基醚、二苯基甲基矽基醚、苯甲醯基甲酸酯、乙酸酯、氯乙酸酯、二氯乙酸酯、三氯乙酸酯、三氟乙酸酯、甲氧基乙酸酯、三苯基甲氧基乙酸酯、苯基乙酸酯、苯甲酸酯、烷基甲基碳酸酯、烷基9-芴基甲基碳酸酯、烷基乙基碳酸酯、烷基2,2,2,-三氯乙基碳酸酯、1,1-二甲基-2,2,2-三氯乙基碳酸酯、烷基磺酸酯、甲烷磺酸酯、苄基磺酸酯、甲苯磺酸酯、亞甲基縮醛、亞乙基縮醛及第三丁基亞甲基縮酮。較佳之保護基團由式-R、-Si(R)(R)(R)、-C(O)R、-C(O)OR、-C(O)NH(R)、$-S(O)_2R$、$-S(O)_2OH$、$P(O)(OH)_2$及-P(O)(OH)OR表示，其中R係C_1-C_{20}烷基、C_2-C_{20}烯基、C_2-C_{20}炔基、-C_1-C_{20}伸烷基(碳

環)、-C_2-C_{20}伸烯基(碳環)、-C_2-C_{20}伸炔基(碳環)、-C_6-C_{10}芳基、-C_1-C_{20}伸烷基(芳基)、-C_2-C_{20}伸烯基(芳基)、-C_2-C_{20}伸炔基(芳基)、-C_1-C_{20}伸烷基(雜環)、-C_2-C_{20}伸烯基(雜環)或-C_2-C_{20}伸炔基(雜環)，其中該等烷基、烯基、炔基、伸烷基、伸烯基、伸炔基、芳基、碳環及雜環基團無論單獨抑或作爲另一基團之一部分皆視情況經取代。

縮寫詞「AFP」係指二甲基纈胺酸-纈胺酸-D,L-異白胺酸(dolaisoleuine)-D,L-脯胺酸(dolaproine)-苯丙胺酸-對-伸苯基二胺(參見下文式XVIII)。

縮寫詞「MMAE」係指單甲基奧瑞司他汀E (參見下文式XIII)。

縮寫詞「AEB」係指藉由使奧瑞司他汀E與對乙醯基苯甲酸反應而生成之酯(參見下文式XXII)。

縮寫詞「AEVB」係指藉由使奧瑞司他汀E與苯甲醯基戊酸反應而生成之酯(參見下文式XXIII)。

縮寫詞「MMAF」係指D-纈胺酸-纈胺酸-D,L-異白胺酸-D,L-脯胺酸-苯丙胺酸(參見下文式XXI)。

術語「醫藥上可接受的」意指已獲得聯邦或州政府管理機構批准或已列於美國藥典(U.S. Pharmacopeia)或其他公認藥典中可用於動物(且更具體而言用於人類)中。術語「醫藥上相容之成份」係指與抗體或抗體衍生物一起投與之醫藥上可接受之稀釋劑、佐劑、賦形劑或媒劑。

術語「動物」係指人類、非人類哺乳動物(例如，狗、貓、兔、牛、馬、綿羊、山羊、豬、鹿及諸如此類)及非哺乳動物(例如，禽類及諸如此類)。

概述

本文所述方法涵蓋使用配體單元係特異性結合DR5之抗DR5結合劑的配體藥物結合物。DR5結合劑可爲(例如)抗DR5抗體、抗DR5抗

原結合片段、或包含人類化抗體重鏈及/或輕鏈可變區之胺基酸序列的其他DR5結合劑或其衍生物。

配體藥物結合物

本發明尤其提供用於靶向遞送藥物之配體藥物結合物。本發明者已發現，該等配體藥物結合物對表現DR5之細胞具有強效細胞毒性及/或細胞生長抑制活性。該等配體藥物結合物包含共價連接到至少一個藥物單元之配體單元。藥物單元可直接或經由連接體單元(-LU-)共價連接。

在一些實施例中，配體藥物結合物具有下式：

$$L - (LU-D)_p \qquad \textbf{(I)}$$

或其醫藥上可接受之鹽；其中：

L係配體單元，即，本發明之DR5結合劑；且

(LU-D)係連接體單元-藥物單元部分，其中：

LU-係連接體單元，且

-D係對靶細胞具有細胞生長抑制或細胞毒性活性之藥物單元；且

p係1至20。

在一些實施例中，配體藥物結合物之p值(每一配體裝載之藥物單元之數目)係1至20。在一些實施例中，p在1至10、1至9、1至8、1至7、1至6、1至5、1至4、1至3或1至2範圍內。在一些實施例中，p在2至10、2至9、2至8、2至7、2至6、2至5、2至4或2至3範圍內。在一些實施例中，p值係2、4、6或8。在其他實施例中，p係1、2、3、4、5或6。

在一些實施例中，配體藥物結合物具有下式：

$$L - (A_a-W_w-Y_y-D)_p \qquad \textbf{(II)}$$

或其醫藥上可接受之鹽；

其中：

L係配體單元，即DR5結合劑；且

$-A_a-W_w-Y_y-$係連接體單元(LU)，其中：

-A-係延伸體單元，

a係0或1，

各-W-獨立地爲胺基酸單元，

w係0至12範圍內之整數，

-Y-係自脫落(self-immolative)間隔體單元，

y係0、1或2；

-D係對靶細胞具有細胞生長抑制或細胞毒性活性之藥物單元；且

p係1至20。

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

在包含複數種配體藥物結合物之組合物中，p係每一配體之藥物分子的平均數，亦稱爲平均載藥量。平均載藥量可在每一配體1個至約20個藥物(D)範圍內。在一些實施例中，平均p值(每一配體之平均載藥量)係約2至約8。在一些實施例中，平均p值(每一配體之平均載藥量)係約3.5至約4.5。在一些實施例中，平均p值(每一配體之平均載藥量)係約1、約2、約3、約4、約5或約6。結合反應製備中每一配體

之平均藥物數可藉由諸如質譜、ELISA分析及HPLC等習用手段來測定。亦可測定就p而言配體藥物結合物之定量分佈。在一些情形下，可藉由諸如逆相HPLC或電泳等手段來達成p爲一定值之同質配體藥物結合物與具有其他載藥量之配體藥物結合物的分離、純化及表徵。

配體藥物結合物之產生可藉由熟習此項技術者所習知之任何技術來達成。簡言之，配體藥物結合物包含DR5結合劑作爲配體單元、藥物及視情況將藥物與結合劑連接在一起之連接體。可利用諸多不同反應將藥物及/或連接體共價附接至結合劑。此通常藉由使結合劑(例如，抗體分子)之胺基酸殘基反應來達成，該等胺基酸殘基包括離胺酸之胺基團、麩胺酸及天冬胺酸之遊離羧酸基團、半胱胺酸之巯基及芳香族胺基酸之各個部分。一種最常用之非特異性共價附接方法係實施碳化二亞胺反應以使化合物之羧基(或胺基)基團與抗體之胺基(或羧基)基團連接。另外，已使用諸如二醛或亞胺酸酯等雙官能劑來使化合物之胺基與抗體分子之胺基連接。亦可利用席夫鹼反應(Schiff base reaction)使藥物附接至結合劑。該方法涉及含有二醇或羥基之藥物的高碘酸鹽氧化，由此形成醛，其隨後與結合劑反應。經由與結合劑之胺基形成席夫鹼來進行附接。亦可使用異硫氰酸酯作爲偶合劑將藥物共價附接至結合劑。其他技術已爲熟習此項技術者所習知且在本發明之範圍內。

在某些實施例中，使中間體(其爲連接體之前體)與藥物在合適條件下反應。在某些實施例中，在藥物及/或中間體上使用反應基團。隨後使藥物與中間體間之反應產物(或衍生化藥物)與DR5結合劑在合適條件下反應。

配體藥物結合物之每一特定單元在本文中予以更詳細闡述。實例性連接體單元、延伸體單元、胺基酸單元、自脫落間隔體單元及藥物單元之合成及結構亦闡述於美國專利申請公開案第2003-0083263

號、第2005-0238649號、第2005-0009751號、第2006-0074008號及第2009-0010945號中，每一公開案之全部內容皆出於所有目的以引用方式併入本文中。

連接體單元

通常，配體藥物結合物在藥物單元與配體單元之間包含連接體區域。在一些實施例中，連接體可在細胞內條件下裂解，由此在細胞內環境中連接體裂解，使得配體釋放藥物單元。在另一些其他實施例中，連接體單元不可裂解且係藉由(例如)抗體降解來釋放藥物。

在一些實施例中，連接體可由存在於細胞內環境中(例如，在溶酶體或胞內體或胞膜窖內)之裂解劑裂解。連接體可爲(例如)由包括(但不限於)溶酶體或胞內體蛋白酶在內之細胞內肽酶或蛋白酶裂解之肽基連接體。在一些實施例中，肽基連接體長度爲至少兩個胺基酸或長度爲至少三個胺基酸。裂解劑可包括組織蛋白酶B及D及纖溶酶，已知所有此等裂解劑均使二肽藥物衍生物水解，從而導致活性藥物在靶細胞內釋放(例如，參見Dubowchik及Walker，1999, *Pharm. Therapeutics* 83:67-123)。最典型者係可由存在於DR5表現細胞中之酶裂解之肽基連接體。例如，可使用可由硫醇依賴性蛋白酶組織蛋白酶-B(其高度表現於癌性組織中)裂解之肽基連接體(例如，Phe-Leu或Gly-Phe-Leu-Gly (SEQ ID NO:21)連接體)。該等連接體之其他實例闡述於(例如)美國專利第6,214,345號中，該專利案之全部內容出於所有目的以引用方式併入本文中。在具體實施例中，可由細胞內蛋白酶裂解之肽基連接體係Val-Cit連接體或Phe-Lys連接體(例如，參見美國專利第6,214,345號，該專利案闡述使用Val-Cit連接體來合成多柔比星(doxorubicin))。利用治療劑之細胞內蛋白質水解釋放之一個優點在於結合時藥劑通常會減毒且結合物之血清穩定性通常較高。

在其他實施例中，可裂解連接體係pH敏感性，亦即在某些pH值

下對水解敏感。通常，pH敏感性連接體可在酸性條件下水解。例如，可使用可在溶酶體中水解之酸不穩定性連接體(例如，腙、半卡腙、硫代半卡腙、順式-烏頭醯胺、原酸酯、縮醛、縮酮或諸如此類)。(例如，參見美國專利第5,122,368號、第5,824,805號、第5,622,929號；Dubowchik及Walker, 1999, *Pharm. Therapeutics* 83:67-123；Neville等人，1989, *Biol. Chem.* 264:14653-14661)。該等連接體在中性pH條件下(例如在血液中)相對穩定，但在低於pH 5.5或5.0下(近似溶酶體之pH)不穩定。在某些實施例中，可水解連接體係硫醚連接體(例如，經由醯腙鍵附接至治療劑之硫醚) (例如，參見美國專利第5,622,929號)。

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

在再一些其他具體實施例中，連接體係丙二酸酯連接體(Johnson等人，1995, *Anticancer Res.* 15:1387-93)、馬來醯亞胺基苯甲醯基連接體(Lau等人，1995, *Bioorg-Med-Chem.* 3(10):1299-1304)、馬來醯亞胺基己醯基(「mc」)連接體(Doronina等人，2006, *Bioconjug Chem.* 17:114-24)或3'-N-醯胺類似物(Lau等人，1995, *Bioorg-Med-Chem.* 3(10):1305-12)。

在再一些其他實施例中，連接體單元不可裂解且藉由抗體降解來釋放藥物。(例如，參見美國公開案第20050238649號，其全部內容皆出於所有目的以引用方式併入本文中)。

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

在其他非互斥實施例中，連接體促進細胞內化。在某些實施例中，當結合至治療劑時(即，在本文所述之配體藥物結合物之連接體-治療劑部分的背景下)，連接體促進細胞內化。在再一些其他實施例中，當結合至奧瑞司他汀化合物及抗DR5抗體二者時，連接體促進細胞內化。

可用於本發明組合物及方法之各種實例性連接體闡述於WO 2004/010957、美國公開案第2006/0074008號、美國公開案第2005/0238649號及美國公開案第2006/0024317號中(各文件之全部內容皆出於所有目的以引用方式併入本文中)。

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

$$-A_a-W_w-Y_y-$$

其中：-A-係延伸體單元，

a係0或1，

各-W-獨立地爲胺基酸單元，

w係0至12範圍內之整數，

-Y-係自脫落間隔體單元，且

y係0、1或2。

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

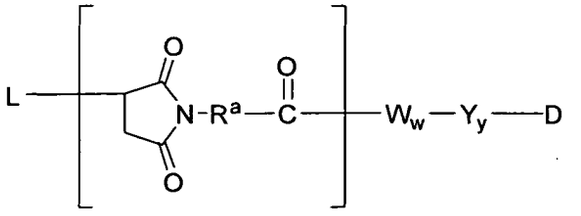
結構單元

當存在時，延伸體單元(A)能夠使配體單元連接至胺基酸單元(-W-)(若存在)；連接至間隔體單元(-Y-)(若存在)；或連接至藥物單元(-D)。可天然或經由化學操作存在於DR5結合劑上之有用官能團包括(但不限於)巯基、胺基、羥基、碳水化合物之異頭羥基(anomeric hydroxyl group)及羧基。適宜官能團係巯基及胺基。在一個實例中，巯基可藉由還原抗DR5抗體之分子內二硫鍵來產生。在另一實施例中，巯基可藉由使抗DR5抗體之離胺酸部分之胺基與2-亞胺基硫口東(Traut試劑)或其他巯基產生試劑反應來產生。在某些實施例中，抗DR5抗體係重組抗體，且經改造以帶有一或多個離胺酸。在某些其他實施例中，重組抗DR5抗體經改造以帶有額外巯基，例如，額外半胱胺酸。

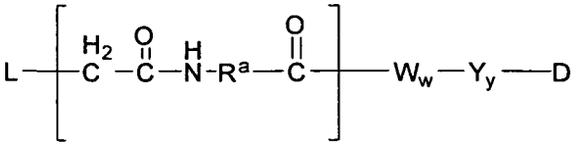
在一個實施例中，延伸體單元與配體單元之硫原子形成鍵。硫原子可衍生自配體之巯基。該實施例之代表性延伸體單元繪示於式IIIa及IIIb之方括號內，其中L-、-W-、-Y-、-D、w及y如上文所定義，且R^a選自-C_1-C_{10}伸烷基-、-C_2-C_{10}伸烯基-、-C_2-C_{10}伸炔基-、-碳環基-、-O-(C_1-C_8伸烷基)-、O-(C_2-C_8伸烯基)-、-O-(C_2-C_8伸炔基)-、-伸芳基-、-C_1-C_{10}伸烷基-伸芳基-、-C_2-C_{10}伸烯基-伸芳基、-C_2-C_{10}伸

炔基-伸芳基、-伸芳基-C_1-C_{10}伸烷基-、-伸芳基-C_2-C_{10}伸烯基-、-伸芳基-C_2-C_{10}伸炔基-、-C_1-C_{10}伸烷基-(碳環基)-、-C_2-C_{10}伸烯基-(碳環基)-、-C_2-C_{10}伸炔基-(碳環基)-、-(碳環基)-C_1-C_{10}伸烷基-、-(碳環基)-C_2-C_{10}伸烯基-、-(碳環基)-C_2-C_{10}伸炔基、雜環基-、-C_1-C_{10}伸烷基-(雜環基)-、-C_2-C_{10}伸烯基-(雜環基)-、-C_2-C_{10}伸炔基-(雜環基)-、-(雜環基)-C_1-C_{10}伸烷基-、-(雜環基)-C_2-C_{10}伸烯基-、-(雜環基)-C_2-C_{10}伸炔基-、-$(CH_2CH_2O)_r$-或-$(CH_2CH_2O)_r$-CH_2-，且r係1至10範圍內之整數，其中該等烷基、烯基、炔基、伸烷基、伸烯基、伸炔基、芳基、碳環、碳環基、雜環基及伸芳基無論單獨抑或作爲另一基團之一部分皆視情況經取代。在一些實施例中，該等烷基、烯基、炔基、伸烷基、伸烯基、伸炔基、芳基、碳環、碳環基、雜環基及伸芳基無論單獨抑或作爲另一基團之一部分均未經取代。在一些實施例中，R^a選自-C_1-C_{10}伸烷基-、-碳環基-、-O-(C_1-C_8伸烷基)-、-伸芳基-、-C_1-C_{10}伸烷基-伸芳基-、-伸芳基-C_1-C_{10}伸烷基-、-C_1-C_{10}伸烷基-(碳環基)-、-(碳環基)-C_1-C_{10}伸烷基-、-C_3-C_8雜環基-、-C_1-C_{10}伸烷基-(雜環基)-、-(雜環基)-C_1-C_{10}伸烷基-、-$(CH_2CH_2O)_r$-及-$(CH_2CH_2O)_r$-CH_2-；且r係1至10範圍內之整數，其中該等伸烷基未經取代且其餘基團視情況經取代。

自所有實例性實施例可以瞭解到，即使未明確指出，1至20個藥物部分可連接至配體(p = 1-20)。在一些實施例中，2、4、6或8個藥物部分連接至配體(p = 2、4、6或8)。

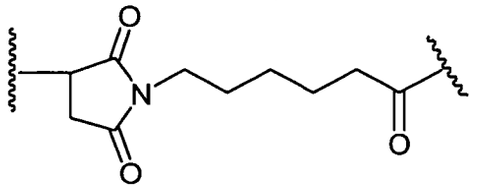


IIIa

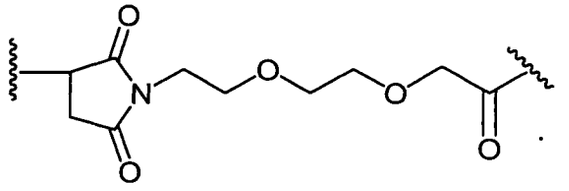


IIIb

例示性延伸體單元係R^a爲-$(CH_2)_5$-之式IIIa中者：

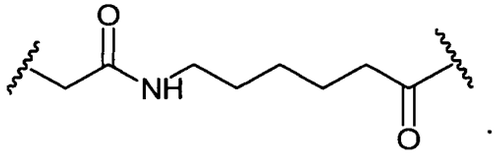


另一例示性延伸體單元係R^a爲-$(CH_2CH_2O)_r$-CH_2-；且r爲2之式IIIa中者：

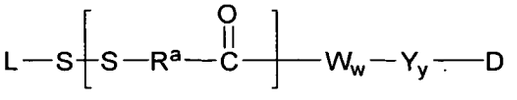


例示性延伸體單元係R^a爲-伸芳基-或伸芳基-C_1-C_{10}伸烷基-之式IIIa中者。在一些實施例中，芳基係未經取代之苯基。

又一例示性延伸體單元係R^a爲-$(CH_2)_5$-之式IIIb中者：

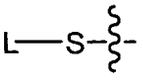


在某些實施例中，延伸體單元經由配體單元之硫原子與延伸體單元之硫原子間之二硫鍵連接至配體單元。該實施例之代表性延伸體單元繪示於式IV之方括號內，其中R^a、L-、-W-、-Y-、-D、w及y如上文所定義。



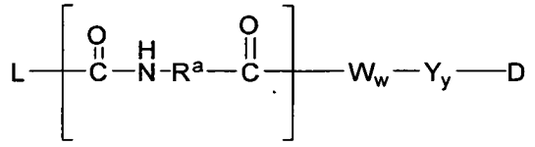
IV

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

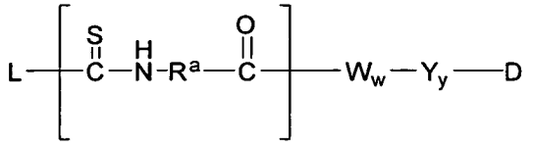


在再一些其他實施例中，在附接至L之前，延伸體含有可與配體之一級或二級胺基形成鍵之反應位點。該等反應位點之實例包括(但不限於)活性酯，例如琥珀醯亞胺酯、4-硝基苯基酯、五氟苯基酯、四氟苯基酯、酐、醯氯、磺醯氯、異氰酸酯及異硫氰酸酯。該實施例

之代表性延伸體單元繪示於式Va及Vb之方括號內，其中-R^a-、L-、-W-、-Y-、-D、w及y如上文所定義。

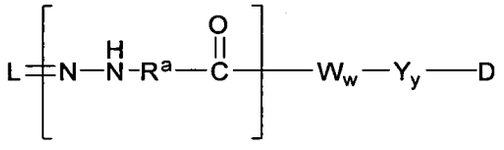


Va

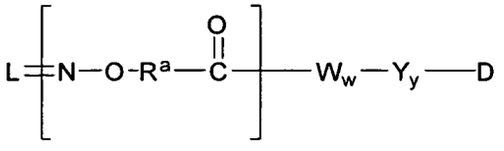


Vb

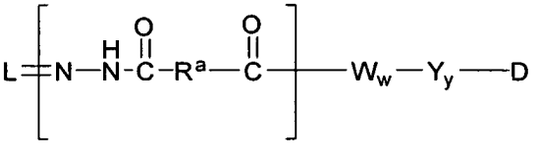
在一些實施例中，延伸體含有對可存在於配體上之經修飾碳水化合物之(-CHO)基團具有反應性的反應位點。例如，可使用諸如高碘酸鈉等試劑將碳水化合物適度氧化，且可使經氧化碳水化合物之所得(-CHO)單元與含有諸如醯肼、肟、一級或二級胺、肼、硫代半卡腙、肼羧酸酯及芳基醯肼等官能團之延伸體(例如Kaneko等人，1991, *Bioconjugate Chem.* 2:133-41闡述者)縮合。該實施例之代表性延伸體單元繪示於式VIa、VIb及VIc之方括號內，其中-R^a-、L-、-W-、-Y-、-D、w及y如上文所定義。



VIa



VIb

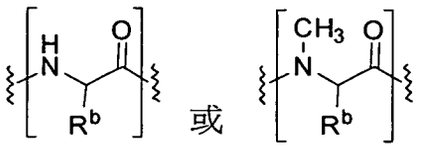


VIc

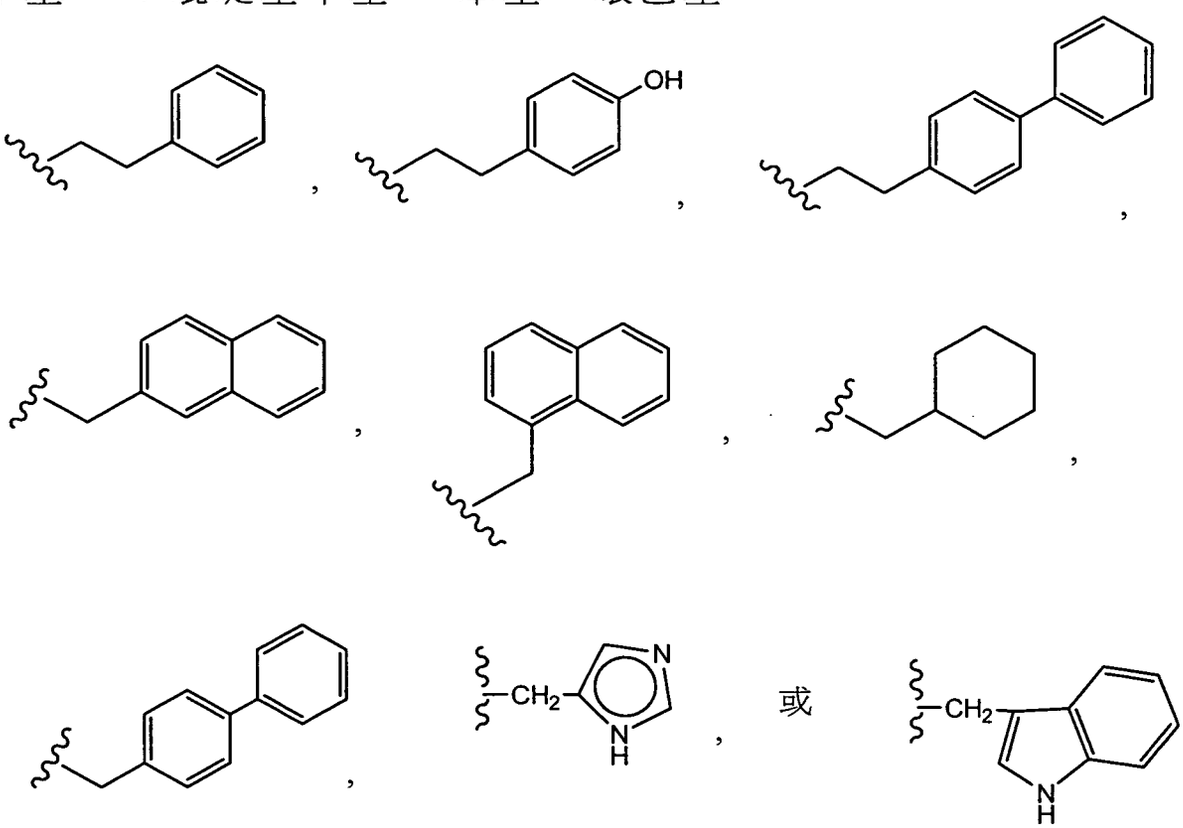
胺基酸單元

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

W_w-可爲(例如)單肽、二肽、三肽、四肽、五肽、六肽、七肽、八肽、九肽、十肽、十一肽或十二肽單元。各-W-單元獨立地具有下文方括號中所示之式，且w係0至12範圍內之整數：



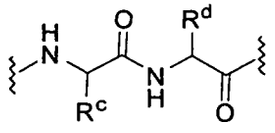
其中R^b係氫、甲基、異丙基、異丁基、第二丁基、苄基、對-羥基苄基、$-CH_2OH$、$-CH(OH)CH_3$、$-CH_2CH_2SCH_3$、$-CH_2CONH_2$、$-CH_2COOH$、$-CH_2CH_2CONH_2$、$-CH_2CH_2COOH$、$-(CH_2)_3NHC(=NH)NH_2$、$-(CH_2)_3NH_2$、$-(CH_2)_3NHCOCH_3$、$-(CH_2)_3NHCHO$、$-(CH_2)_4NHC(=NH)NH_2$、$-(CH_2)_4NH_2$、$-(CH_2)_4NHCOCH_3$、$-(CH_2)_4NHCHO$、$-(CH_2)_3NHCONH_2$、$-(CH_2)_4NHCONH_2$、$-CH_2CH_2CH(OH)CH_2NH_2$、2-吡啶基甲基-、3-吡啶基甲基-、4-吡啶基甲基-、苯基、環己基、



在一些實施例中，胺基酸單元可由一或多種酶(包括癌症或腫瘤相關蛋白酶)酶促裂解，以釋出藥物單元(-D)，在一個實施例中其在釋

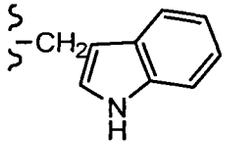
放以提供藥物(D)後於活體內被質子化。

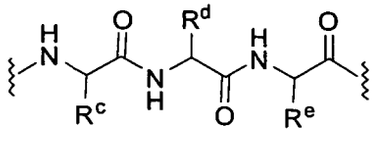
在某些實施例中，胺基酸單元可包含天然胺基酸。在其他實施例中，胺基酸單元可包含非天然胺基酸。例示性W_w單元由式(VII)-(IX)表示：



(VII)

其中R^c及R^d如下：

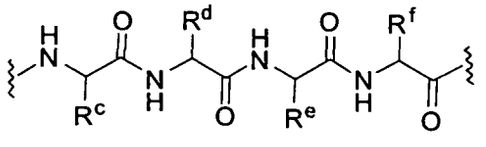
R^c	R^d
苄基	$(CH_2)_4NH_2$；
甲基	$(CH_2)_4NH_2$；
異丙基	$(CH_2)_4NH_2$；
異丙基	$(CH_2)_3NHCONH_2$；
苄基	$(CH_2)_3NHCONH_2$；
異丁基	$(CH_2)_3NHCONH_2$；
第二丁基	$(CH_2)_3NHCONH_2$；
	$(CH_2)_3NHCONH_2$；
苄基	甲基；
苄基	$(CH_2)_3NHC(=NH)NH_2$；



(VIII)

其中R^c、R^d及R^e如下：

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



(IX)

其中R^c、R^d、R^e及R^f如下：

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

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

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

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

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

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

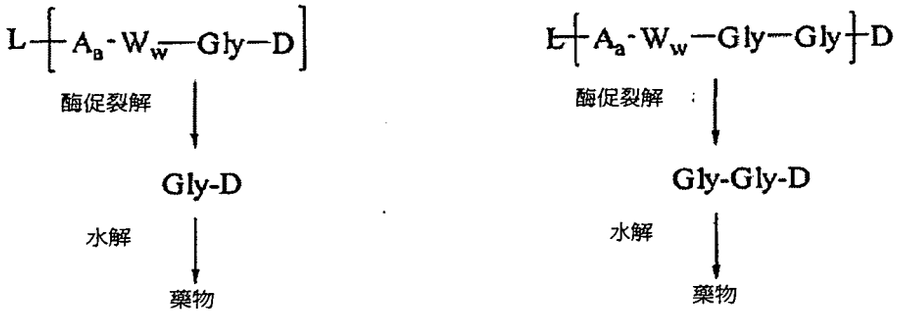
間隔體單元

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

間隔體單元具有兩種一般類型：非自脫落或自脫落。非自脫落

間隔體單元係其中間隔體單元之一部分或全部在胺基酸單元自配體-藥物結合物裂解(尤其酶促裂解)後仍保持結合至藥物部分的間隔體單元。非自脫落間隔體單元之實例包括(但不限於) (甘胺酸-甘胺酸)間隔體單元及甘胺酸間隔體單元(二者均繪示於反應圖**1**中) (下文)。當含有甘胺酸-甘胺酸間隔體單元或甘胺酸間隔體單元之結合物經歷經由酶(例如，腫瘤細胞相關蛋白酶、癌細胞相關蛋白酶或淋巴細胞相關蛋白酶)之酶促裂解時，甘胺酸-甘胺酸-藥物部分或甘胺酸-藥物部分自L-Aa-Ww-裂解。在一個實施例中，在靶細胞內發生獨立的水解反應，使甘胺酸-藥物部分鍵裂解並釋出藥物。

反應圖1



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

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

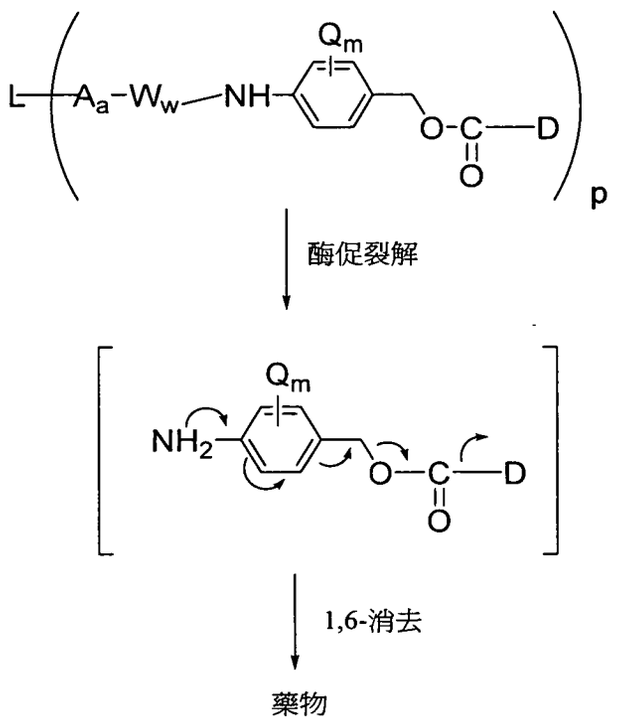
或者，含有自脫落間隔體單元之結合物可釋放-D。本文所用之術語「自脫落間隔體」係指能夠將兩個隔開之化學部分共價連接在一起成爲穩定的由三部分組成的分子之雙官能化學部分。若其與第一部分之鍵裂解，其將自發地與第二化學部分分開。

在一些實施例中，$-Y_y-$係對-胺基苄基醇(PAB)單元(參見反應圖**2**及**3**)，其伸苯基部分經Q_m取代，其中Q係$-C_1-C_8$烷基、$-C_2-C_8$烯基、$-C_2-C_8$炔基、$-O-(C_1-C_8$烷基)、$-O-(C_2-C_8$烯基)、$-O-(C_2-C_8$炔基)、-鹵

素、-硝基或-氰基；且m係0至4範圍內之整數。烷基、烯基及炔基無論單獨抑或作爲另一基團之一部分均可視情況經取代。

在一些實施例中，-Y-係PAB基團，其經由PAB基團之胺基氮原子連接至-W_w-且經由碳酸酯、胺基甲酸酯或醚基團直接連接至-D。不欲受限於任何特定理論或機制，反應圖**2**繪示經由胺基甲酸酯或碳酸酯基團直接附接至-D之PAB基團之可能的藥物釋放機制，如Toki等人，2002, *J. Org. Chem.* 67:1866-1872所述。

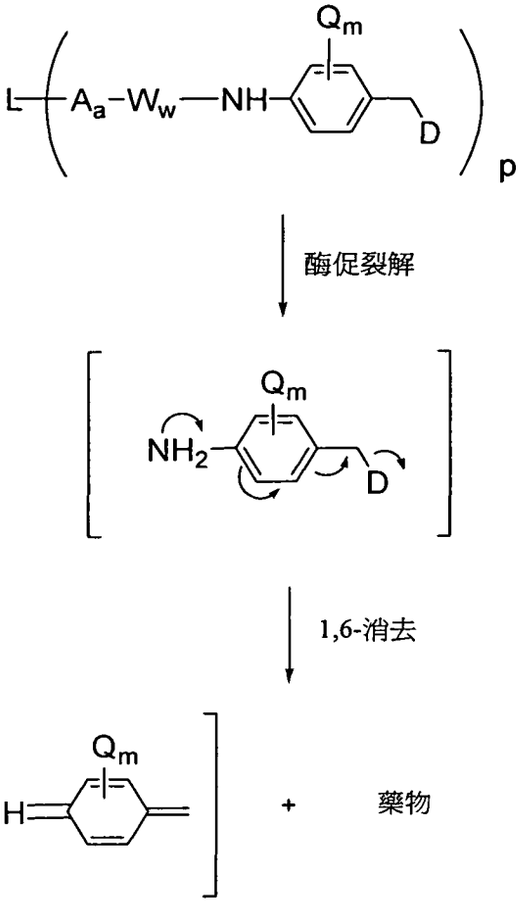
反應圖2



在反應圖**2**中，Q係-C_1-C_8烷基、-C_2-C_8烯基、-C_2-C_8炔基、-O-(C_1-C_8烷基)、-O-(C_2-C_8烯基)、-O-(C_2-C_8炔基)、-鹵素、-硝基或-氰基；m係0至4範圍內之整數；且p在1至約20範圍內。烷基、烯基及炔基無論單獨抑或作爲另一基團之一部分均可視情況經取代。

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

反應圖3



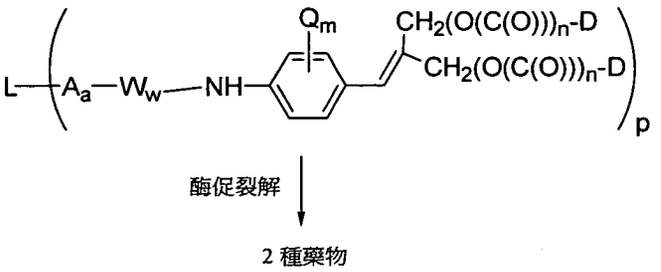
在反應圖3中，Q係-C_1-C_8烷基、-C_2-C_8烯基、-C_2-C_8炔基、-O-(C_1-C_8烷基)、-O-(C_2-C_8烯基)、-O-(C_2-C_8炔基)、-鹵素、-硝基或-氰基；m係0至4範圍內之整數；且p在1至約20範圍內。烷基、烯基及炔基無論單獨抑或作爲另一基團之一部分均可視情況經取代。

自脫落間隔體之其他實例包括(但不限於)在電子學上與PAB基團類似之芳香族化合物，例如2-胺基咪唑-5-甲醇衍生物(Hay等人，1999, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 9:2237)及鄰或對-胺基苄基縮醛。可使用在醯胺鍵水解後經歷環化之間隔體，例如經取代及未經取代之4-胺基丁酸醯胺(Rodrigues等人，1995, *Chemistry Biology* 2:223)、經適當取代之二環[2.2.1]及二環[2.2.2]環系統(Storm等人，1972, *J. Amer. Chem. Soc.* 94:5815)及2-胺基苯基丙酸醯胺(Amsberry等人，1990, *J. Org. Chem.* 55:5867)。在甘胺酸之α-位置經取代之含胺藥物之消去(Kingsbury等人，1984, *J. Med. Chem.* 27:1447)亦爲自脫落間隔體之實

例。

在一個實施例中，間隔體單元係如反應圖**4**中所繪示之具支鏈雙(羥基甲基)-苯乙烯(BHMS)單元，其可用於納入及釋放多種藥物。

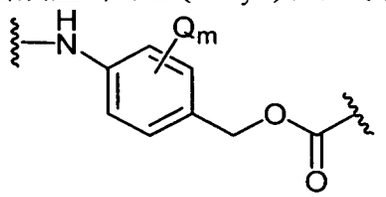
反應圖4



在反應圖**4**中，Q係-C_1-C_8烷基、-C_2-C_8烯基、-C_2-C_8炔基、-O-(C_1-C_8烷基)、-O-(C_2-C_8烯基)、-O-(C_2-C_8炔基)、-鹵素、-硝基或-氰基；m係0至4範圍內之整數；n係0或1；且p係1至約20之整數。烷基、烯基及炔基無論單獨抑或作爲另一基團之一部分均可視情況經取代。

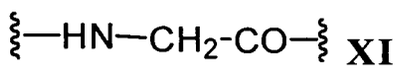
在一些實施例中，-D部分相同。在再一實施例中，-D部分不同。

在一個態樣中，間隔體單元(-Y_y-)由式(**X**)-(**XII**)表示：



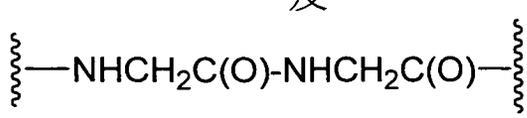
X

其中Q係-C_1-C_8烷基、-C_2-C_8烯基、-C_2-C_8炔基、-O-(C_1-C_8烷基)、-O-(C_2-C_8烯基)、-O-(C_2-C_8炔基)、-鹵素、-硝基或-氰基；且m係0至4範圍內之整數。烷基、烯基及炔基無論單獨抑或作爲另一基團之一部分均可視情況經取代。



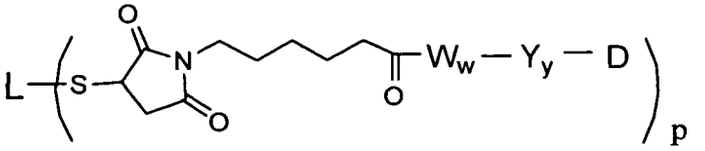
XI

及



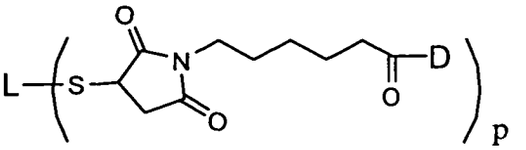
XII

在一組所選實施例中，式I及II之結合物係：

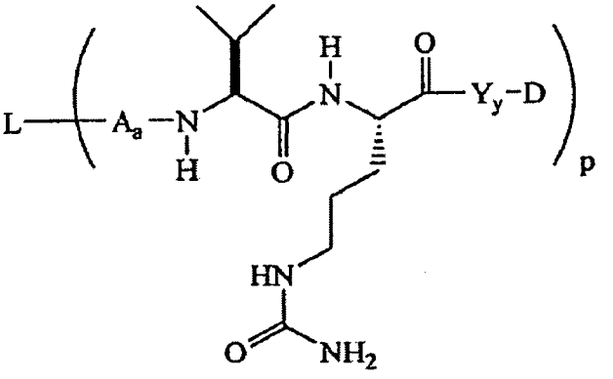


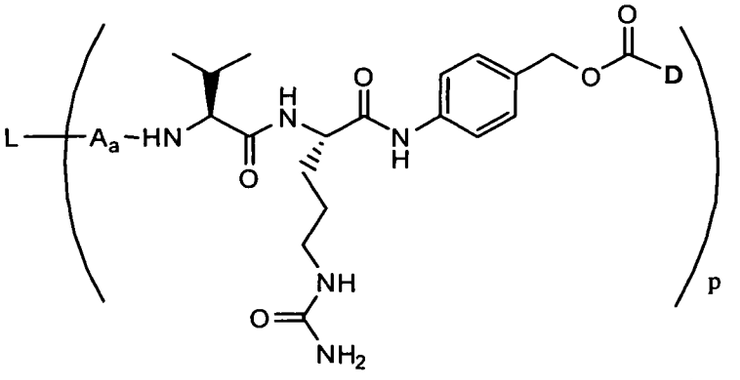
其中w及y各自爲0、1或2，

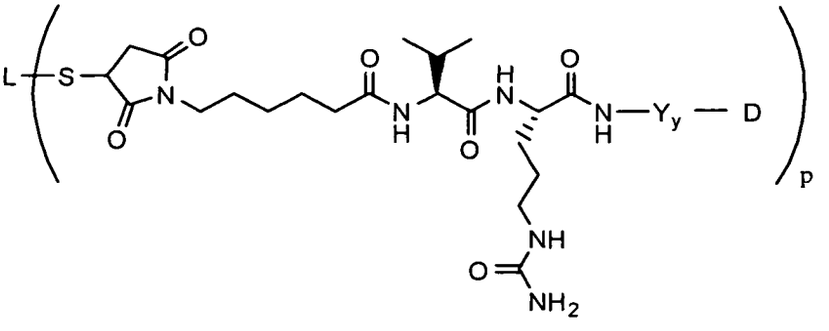
及，



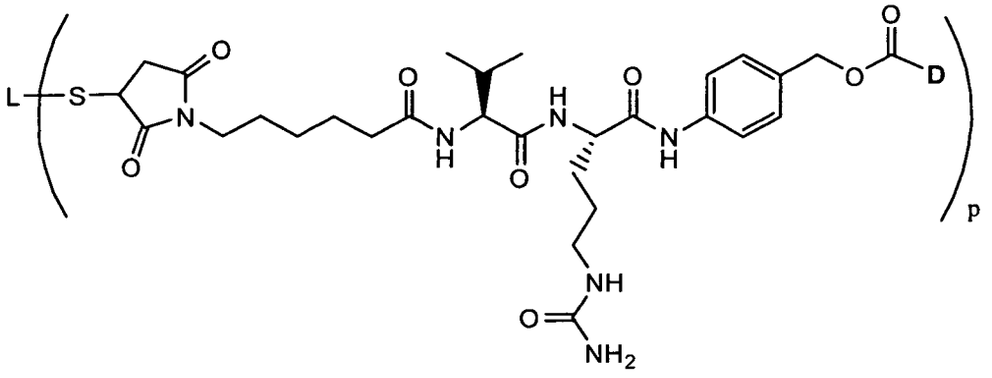
其中w及y各自爲0，







，及



其中A_a、W_w、Y_y、D及L具有上文所提供之含義。

藥物單元

藥物部分(D)可爲任何細胞毒性、細胞生長抑制或免疫調節(例如，免疫抑制)劑或藥物。D係具有可與間隔體單元、與胺基酸單元、與延伸體單元或與配體單元形成鍵之原子的藥物單元(部分)。在一些實施例中，藥物單元D具有可與間隔體單元形成鍵之氮原子。本文所用之術語「藥物單元」及「藥物部分」同義且可互換使用。

有用之細胞毒性或免疫調節劑種類包括(例如)抗微管蛋白劑、DNA小溝結合劑、DNA複製抑制劑及烷基化劑。

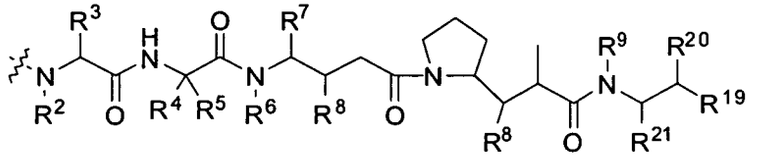
在一些實施例中，藥物係奧瑞司他汀，例如奧瑞司他汀E (業內亦稱爲多拉司他汀-10 (dolastatin-10)之衍生物)或其衍生物。奧瑞司他汀可爲(例如)由奧瑞司他汀E與酮酸形成之酯。例如，可使奧瑞司他汀E與對乙醯基苯甲酸或苯甲醯基戊酸反應以分別產生AEB及AEVB。其他典型奧瑞司他汀包括AFP、MMAF及MMAE。實例性奧瑞司他汀之合成及結構闡述於美國專利申請公開案第2003-0083263號、第2005-0238649號及第2005-0009751號；國際專利公開案第WO 04/010957號、國際專利公開案第WO 02/088172號及美國專利第6,323,315號；第6,239,104號；第6,034,065號；第5,780,588號；第5,665,860號；第5,663,149號；第5,635,483號；第5,599,902號；第5,554,725號；第5,530,097號；第5,521,284號；第5,504,191號；第

5,410,024號；第5,138,036號；第5,076,973號；第4,986,988號；第4,978,744號；第4,879,278號；第4,816,444號；及第4,486,414號中，各文件之全部內容皆出於所有目的以引用方式併入本文中。

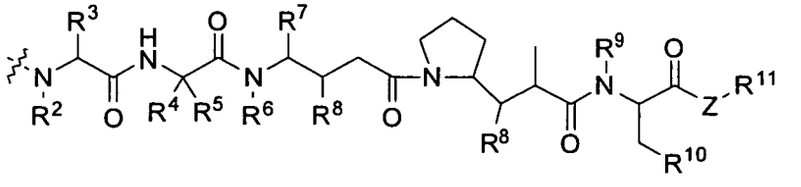
已顯示奧瑞司他汀會幹擾微管動力學及核及細胞分裂，且具有抗癌活性。本發明之奧瑞司他汀結合微管蛋白，且可對DR5表現細胞系施加細胞毒性或細胞生長抑制效應。業內已知諸多可用於測定奧瑞司他汀或所得抗體-藥物結合物是否對期望細胞系施加細胞生長抑制或細胞毒性效應之不同分析。

用於測定化合物是否結合微管蛋白之方法已爲業內所習知。參見例如Muller等人，*Anal. Chem* 2006, 78, 4390-4397；Hamel等人，*Molecular Pharmacology,* 1995 47: 965-976；及Hamel等人，*The Journal of Biological Chemistry,* 1990 265:28, 17141-17149。出於本發明之目的，可測定化合物對微管蛋白之相對親和性。本發明之一些較佳奧瑞司他汀結合微管蛋白之親和性介於MMAE對微管蛋白之結合親和性之1/10(較弱親和性)至MMAE對微管蛋白之結合親和性之10倍、20倍或甚至100倍(較高親和性)範圍內。

在一些實施例中，-D係式$\mathbf{D_E}$或$\mathbf{D_F}$之奧瑞司他汀：



$\mathbf{D_E}$



$\mathbf{D_F}$

或其醫藥上可接受之鹽形式；其中，在每一位置上獨立地：

波形線表示鍵；

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

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

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

$\mathbf{R^5}$係-H或-C_1-C_8烷基；

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

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

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

各$\mathbf{R^8}$獨立地爲-H、-OH、-C_1-C_{20}烷基、-C_2-C_{20}烯基、-C_2-C_{20}炔基、-O-(C_1-C_{20}烷基)、-O-(C_2-C_{20}烯基)、-O-(C1-C_{20}炔基)或-碳環；

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

$\mathbf{R^{19}}$係-芳基、-雜環或-碳環；

$\mathbf{R^{20}}$係-H、-C_1-C_{20}烷基、-C_2-C_{20}烯基、-C_2-C_{20}炔基、-碳環、-OS

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

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

R^{10}係-芳基或-雜環；

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

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

m係1至1000範圍內之整數；

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

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

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

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

n係0至6範圍內之整數；其中該等烷基、烯基、炔基、伸烷基、伸烯基、伸炔基、芳基、碳環及雜環基團無論單獨抑或作爲另一基團之一部分皆視情況經取代。

式D_E之奧瑞司他仃包括該等烷基、烯基、炔基、伸烷基、伸烯基、伸炔基、芳基、碳環及雜環基團未經取代者。

式D_E之奧瑞司他仃包括R^2、R^3、R^4、R^5、R^6、R^7、R^8及R^9基團未經取代且R^{19}、R^{20}及R^{21}基團視情況如本文所述經取代者。

式D_E之奧瑞司他仃包括如下者：

R^2係-C_1-C_8烷基；

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

R^5係-氫；

R^6係-C_1-C_8烷基；

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

R^9係-氫或-C_1-C_8烷基；

R^{19}係視情況經取代之苯基；

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

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

式D_E之奧瑞司他汀包括如下者：

R^2係甲基；

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

R^4係-H、-C_1-C_8烷基、-C_2-C_8烯基、-C_2-C_8炔基、單環狀C_3-C_6碳環、-C_6-C_{10}芳基、-C_1-C_8伸烷基(C_6-C_{10}芳基)、-C_2-C_8伸烯基(C_6-C_{10}芳基)、-C_2-C_8伸炔基(C_6-C_{10}芳基)、-C_1-C_8伸烷基(單環狀C_3-C_6碳環)、-C_2-C_8伸烯基(單環狀C_3-C_6碳環)、-C_2-C_8伸炔基(單環狀C_3-C_6碳環)；其

中該等烷基、烯基、炔基、伸烷基、伸烯基、伸炔基、芳基及碳環基團無論單獨抑或作爲另一基團之一部分皆視情況經取代；

R^5係-H；

R^6係甲基；

R^7係-C_1-C_8烷基、-C_2-C_8烯基或-C_2-C_8炔基；

各R^8係甲氧基；

R^9係-氫或-C_1-C_8烷基；

R^{19}係苯基；

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

R^{21}係甲基；或其醫藥上可接受之鹽形式。

式D_E之奧瑞司他汀包括如下者：

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

式D_E之奧瑞司他汀包括如下者：

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

式D_F之奧瑞司他汀包括如下者：

R^2係甲基；

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

伸烯基(單環狀C_3-C_6碳環)、-C_2-C_{20}伸炔基(單環狀C_3-C_6碳環)、-C_6-C_{10}芳基、-C_1-C_{20}伸烷基(C_6-C_{10}芳基)、-C_2-C_{20}伸烯基(C_6-C_{10}芳基)、-C_2-C_{20}伸炔基(C_6-C_{10}芳基)、-雜環、-C_1-C_{20}伸烷基(雜環)、-C_2-C_{20}伸烯基(雜環)或-C_2-C_{20}伸炔基(雜環)；其中該等烷基、烯基、炔基、伸烷基、伸烯基、伸炔基、碳環、芳基及雜環基團無論單獨抑或作爲另一基團之一部分皆視情況經取代；

$\mathbf{R^5}$係-H；

$\mathbf{R^6}$係甲基；

各$\mathbf{R^8}$係甲氧基；

$\mathbf{R^9}$係-H、-C_1-C_{20}烷基、-C_2-C_{20}烯基或-C_2-C_{20}炔基；其中該等烷基、烯基及炔基視情況經取代；

$\mathbf{R^{10}}$係視情況經取代之芳基或視情況經取代之雜環；

Z係-O-、-S-、-NH-或-NR^{12}-，其中$\mathbf{R^{12}}$係-C_1-C_{20}烷基、-C_2-C_{20}烯基或-C_2-C_{20}炔基，其各自視情況經取代；且

$\mathbf{R^{11}}$係-H、-C_1-C_{20}烷基、-C_2-C_{20}烯基、-C_2-C_{20}炔基、-芳基、-雜環、-$(\mathbf{R^{13}O})_m$-$\mathbf{R^{14}}$或-$(\mathbf{R^{13}O})_m$-$CH(\mathbf{R^{15}})_2$，其中該等烷基、烯基、炔基、芳基及雜環基團視情況經取代；

m係1至1000範圍內之整數；

$\mathbf{R^{13}}$係-C_2-C_{20}伸烷基、-C_2-C_{20}伸烯基或-C_2-C_{20}伸炔基，其各自視情況經取代；

$\mathbf{R^{14}}$係-H、-C_1-C_{20}烷基、-C_2-C_{20}烯基或-C_2-C_{20}炔基，其中該等烷基、烯基及炔基視情況經取代；

$\mathbf{R^{15}}$在每次出現時獨立地爲-H、-COOH、-$(CH_2)_n$-$N(R^{16})_2$、-$(CH_2)_n$-SO_3H、-$(CH_2)_n$-SO_3-C_1-C_{20}烷基、-$(CH_2)_n$-SO_3-C_2-C_{20}烯基或-$(CH_2)_n$-SO_3-C_2-C_{20}炔基，其中該等烷基、烯基及炔基視情況經取代；

$\mathbf{R^{16}}$在每次出現時獨立地爲-H、-C_1-C_{20}烷基、-C_2-C_{20}烯基、-C_2-

C_{20}炔基或-$(CH_2)_n$-COOH，其中該等烷基、烯基及炔基視情況經取代；且

n係0至6範圍內之整數；或其醫藥上可接受之鹽形式。

在某些該等實施例中，R^{10}係視情況經取代之苯基。

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

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

式D_F之奧瑞司他汀包括如下者：

R^2係C_1-C_3烷基；R^3係H或C_1-C_3烷基；R^4係C_1-C_5烷基；R^5係H；R^6係C_1-C_3烷基；R^7係C_1-C_5烷基；R^8係C_1-C_3烷氧基；R^9係氫或C_1-C_8烷基；R^{10}係視情況經取代之苯基；Z係O、S或NH；且R^{11}如本文所定義；或其醫藥上可接受之鹽形式。

式D_F之奧瑞司他汀包括如下者：

R^2係甲基；R^3係H或C_1-C_3烷基；R^4係C_1-C_5烷基；R^5係H；R^6係甲基；R^7係異丙基或第二丁基；R^8係甲氧基；R^9係氫或C_1-C_8烷基；R^{10}係視情況經取代之苯基；Z係O、S或NH；且R^{11}如本文所定義；或其醫藥上可接受之鹽形式。

式D_F之奧瑞司他汀包括如下者：

R^2係甲基；R^3係H或C_1-C_3烷基；R^4係C_1-C_5烷基；R^5係H；R^6係甲基；R^7係異丙基或第二丁基；R^8係甲氧基；R^9係氫或C_1-C_8烷基；R^{10}係苯基；且Z係O或NH且R^{11}如本文所定義，較佳爲氫；或其醫藥上可接受之鹽形式。

式D_F之奧瑞司他汀包括如下者：

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

烷基；$\mathbf{R^{10}}$係苯基；且**Z**係O或NH且R^{11}如本文所定義，較佳爲氫；或其醫藥上可接受之鹽形式。

式$\mathbf{D_E}$或$\mathbf{D_F}$之奧瑞司他汀包括如下者：R^3、R^4及R^7獨立地爲異丙基或第二丁基且$\mathbf{R^5}$係-H。在實例性實施例中，R^3及R^4各自爲異丙基，$\mathbf{R^5}$係H，且$\mathbf{R^7}$係第二丁基。其餘取代基如本文所定義。

式$\mathbf{D_E}$或$\mathbf{D_F}$之奧瑞司他汀包括如下者：R^2及R^6各自爲甲基，且$\mathbf{R^9}$係H。其餘取代基如本文所定義。

式$\mathbf{D_E}$或$\mathbf{D_F}$之奧瑞司他汀包括R^8在每次出現時爲$-OCH_3$者。其餘取代基如本文所定義。

式$\mathbf{D_E}$或$\mathbf{D_F}$之奧瑞司他汀包括如下者：R^3及R^4各自爲異丙基，R^2及R^6各自爲甲基，$\mathbf{R^5}$係H，$\mathbf{R^7}$係第二丁基，R^8在每次出現時爲$-OCH_3$，且R^9係H。其餘取代基如本文所定義。

式$\mathbf{D_F}$之奧瑞司他汀包括**Z**係-O-或-NH-者。其餘取代基如本文所定義。

式$\mathbf{D_F}$之奧瑞司他汀包括R^{10}係芳基者。其餘取代基如本文所定義。

式$\mathbf{D_F}$之奧瑞司他汀包括R^{10}係-苯基者。其餘取代基如本文所定義。

式$\mathbf{D_F}$之奧瑞司他汀包括Z係-O-且R^{11}係H、甲基或第三丁基者。其餘取代基如本文所定義。

式$\mathbf{D_F}$之奧瑞司他汀包括如下者：當Z係-NH時，R^{11}係$-(R^{13}O)_m-CH(R^{15})_2$，其中$R^{15}$係$-(CH_2)_n-N(R^{16})_2$，且$R^{16}$係$-C_1-C_8$烷基或$-(CH_2)_n-COOH$。其餘取代基如本文所定義。

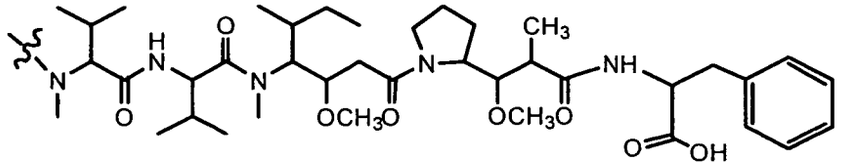
式$\mathbf{D_F}$之奧瑞司他汀包括如下者：當Z係-NH時，R^{11}係$-(R^{13}O)_m-CH(R^{15})_2$，其中$R^{15}$係$-(CH_2)_n-SO_3H$。其餘取代基如本文所定義。

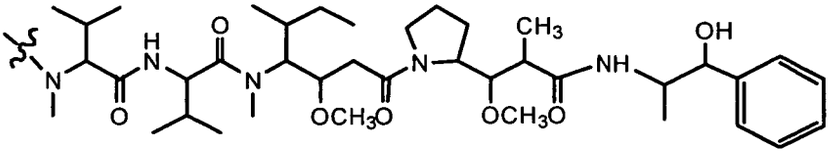
在較佳實施例中，當D係式$\mathbf{D_E}$之奧瑞司他汀時，w係1至12、較

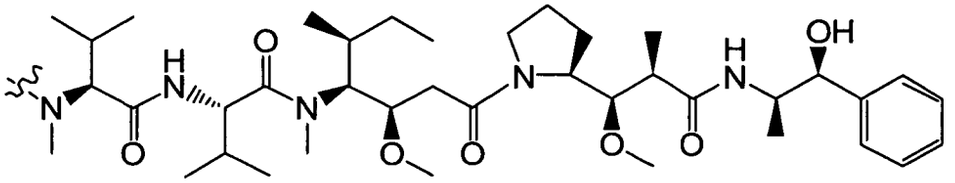
佳2至12範圍內之整數，y係1或2，且a較佳爲1。

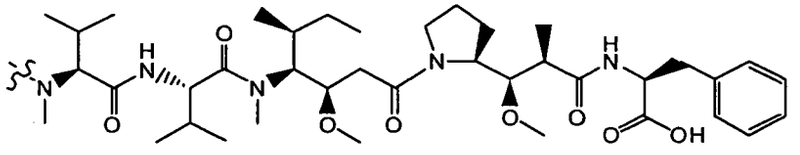
在一些實施例中，當D係式$\mathbf{D_F}$之奧瑞司他汀時，a係1且w及y係0。

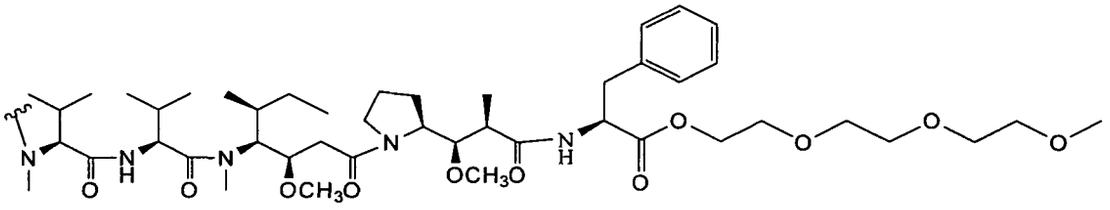
例示性藥物單元(-D)包括具有以下結構之藥物單元：

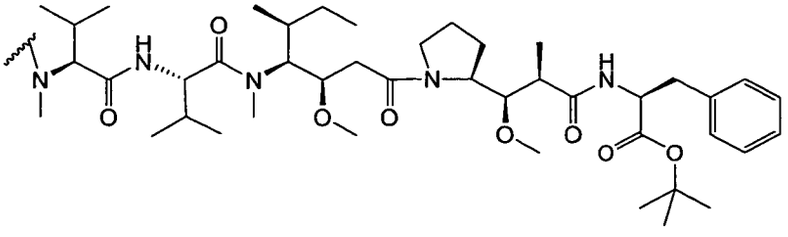


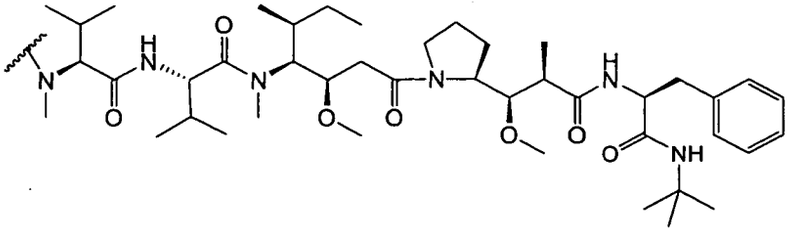


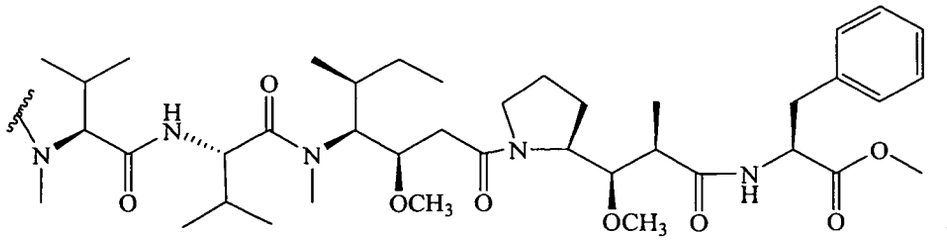




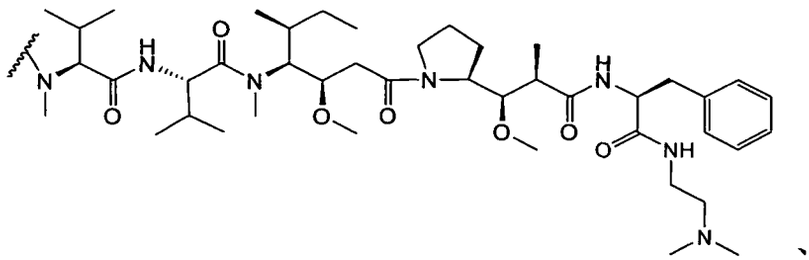




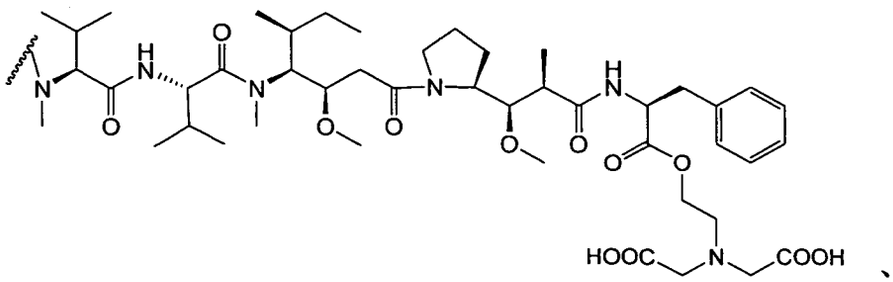




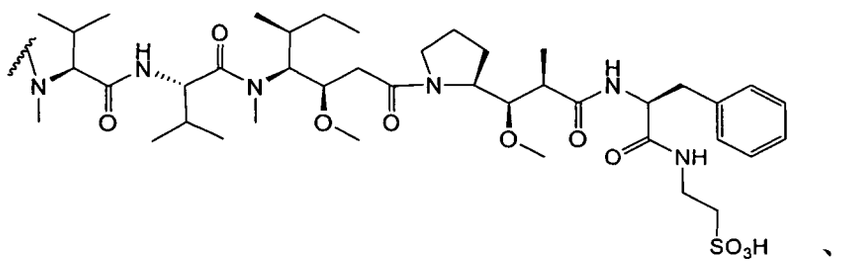
、



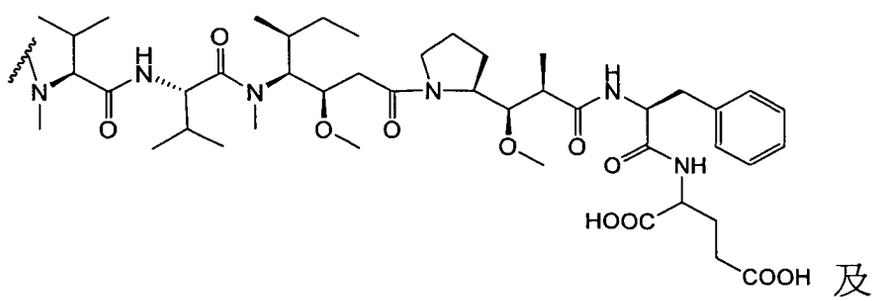
、



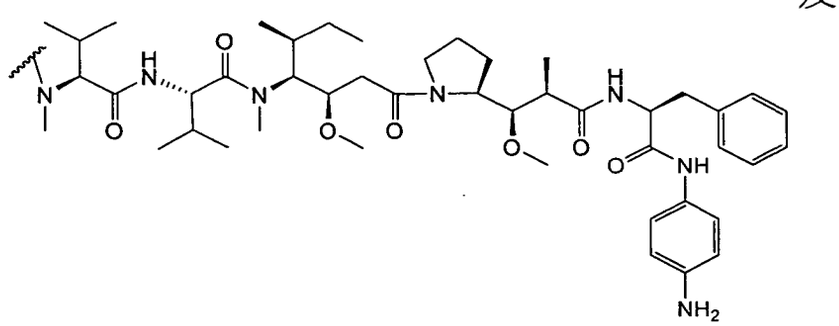
、



、



及



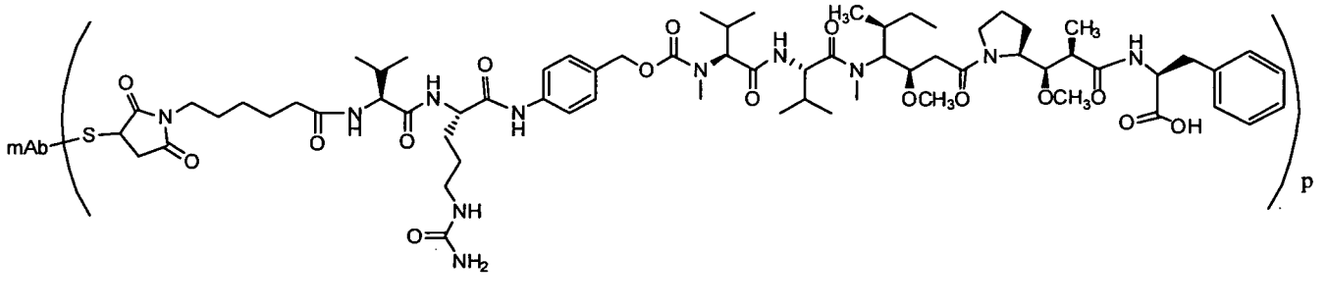
或其醫藥上可接受之鹽或溶劑合物。

在一個態樣中，可使親水性基團(例如但不限於三乙二醇酯(TEG))在R^{11}處附接至藥物單元。不欲受限於理論，親水性基團有助

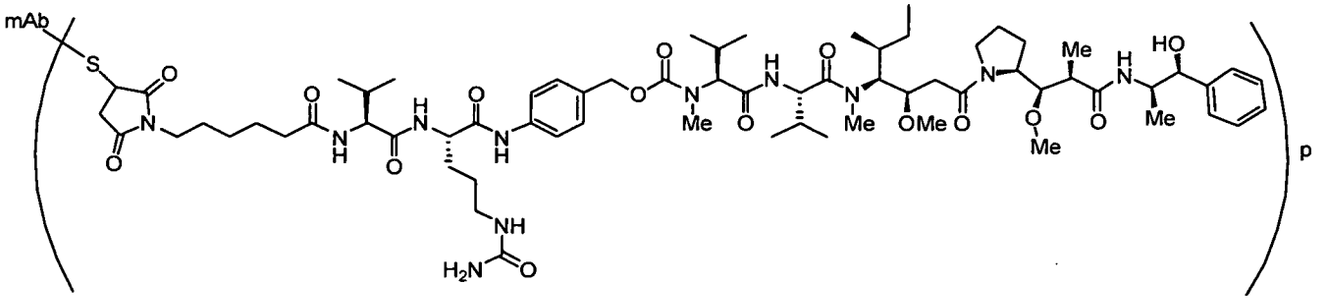
於藥物單元之內化及不凝聚。

在一些實施例中，藥物單元並非TZT-1027。在一些實施例中，藥物單元並非奧瑞司他汀E、多拉司他汀10或奧瑞司他汀PE。

實例性配體藥物結合物具有以下結構，其中「mAb」表示抗DR5抗體且S係抗體之硫原子。下標p係1至約20且較佳1至約5之整數。

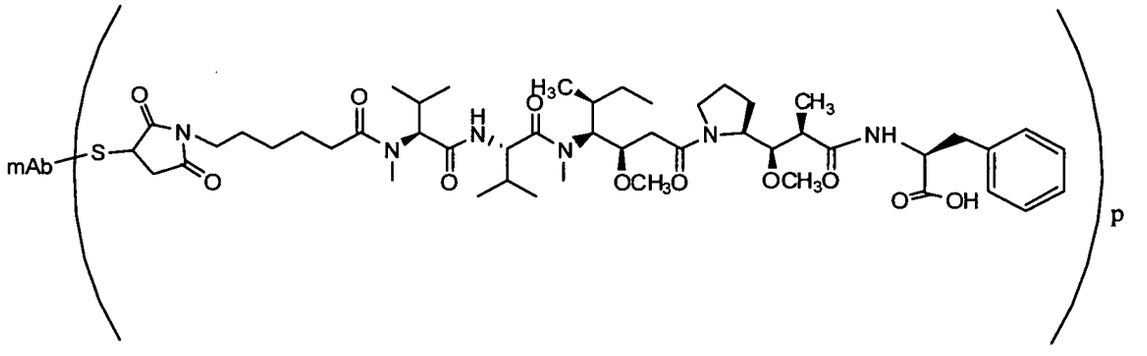


L-mc-vc-MMAF，



L-mc-vc-MMAE，

或



L-mc-MMAF

或其醫藥上可接受之鹽形式。

在一些實施例中，藥物單元係卡奇黴素(calicheamicin)、喜樹鹼(camptothecin)、類美登素(maytansinoid)或蒽環類抗生素(anthracycline)。在一些實施例中，藥物係紫杉烷、拓撲異構酶抑制

劑、長春花生物鹼或諸如此類。

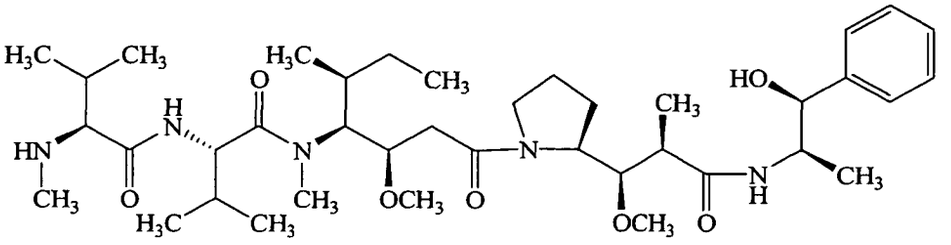
在一些典型實施例中，適宜細胞毒性劑包括(例如)DNA小溝結合劑(例如，烯二炔及來昔菌素(lexitropsin)、CBI化合物；亦參見美國專利第6,130,237號)、多卡米星(duocarmycin)、紫杉烷(例如，紫杉醇(paclitaxel)及多西他賽(docetaxel))、嘌呤黴素(puromycin)及長春花生物鹼。其他細胞毒性劑包括(例如) CC-1065、SN-38、托泊替康(topotecan)、嗎啉基-多柔比星(morpholino-doxorubicin)、根黴素(rhizoxin)、氰基嗎啉基-多柔比星、棘黴素(echinomycin)、考布他汀(combretastatin)、紡綞菌素(netropsin)、埃博黴素(epothilone) A及B、雌莫司汀(estramustine)、藍藻菌素(cryptophysins)、西馬多丁(cemadotin)、類美登素、盤皮海綿內酯(discodermolide)、軟珊瑚醇(eleutherobin)及米托蒽醌(mitoxantrone)。

在一些實施例中，藥物係抗微管蛋白劑。抗微管蛋白劑之實例包括奧瑞司他汀、紫杉烷(例如，Taxol®(紫杉醇)、Taxotere®(多西他賽))、T67 (Tularik)及長春花生物鹼(例如，長春新鹼(vincristine)、長春鹼(vinblastine)、長春地辛(vindesine)及長春瑞濱(vinorelbine))。其他抗微管蛋白劑包括(例如)漿果赤黴素(baccatin)衍生物、紫杉烷類似物(例如，埃博黴素A及B)、諾考達唑(nocodazole)、秋水仙素(colchicine)及秋水仙醯胺(colcimid)、雌莫司汀、藍藻菌素(cryptophycins)、西馬多丁、類美登素、考布他汀、盤皮海綿內酯及軟珊瑚醇。

在某些實施例中，細胞毒性劑係另一類抗微管蛋白劑類美登素。例如，在具體實施例中，類美登素係美坦辛(maytansine)或DM-1(ImmunoGen公司；亦參見Chari等人，1992, *Cancer Res.* 52:127-131)。

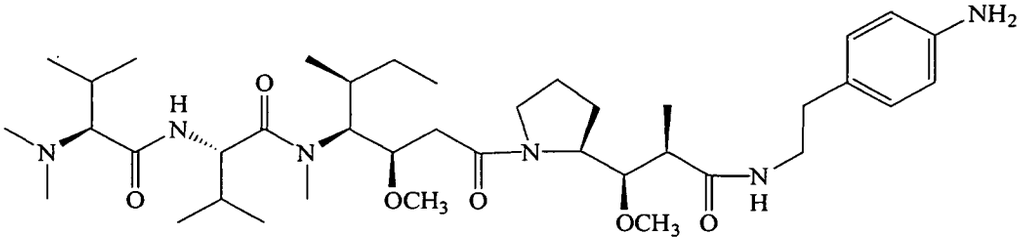
在某些實施例中，細胞毒性或細胞生長抑制劑係多拉司他汀。

在某些實施例中，細胞毒性或細胞生長抑制劑係奧瑞司他汀類。因此，在一具體實施例中，細胞毒性或細胞生長抑制劑係MMAE(式**XIII**)。在另一具體實施例中，細胞毒性或細胞生長抑制劑係AFP(式**XVIII**)。

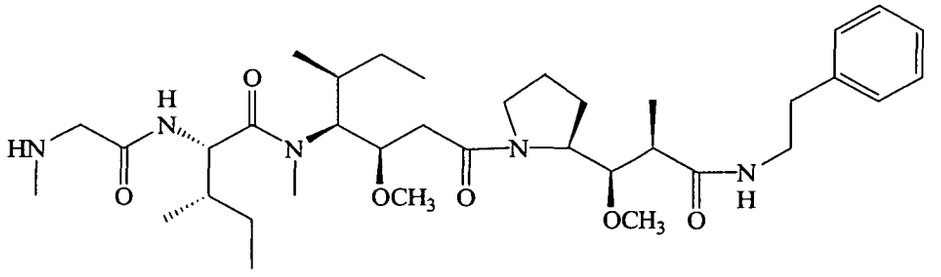


(XIII)

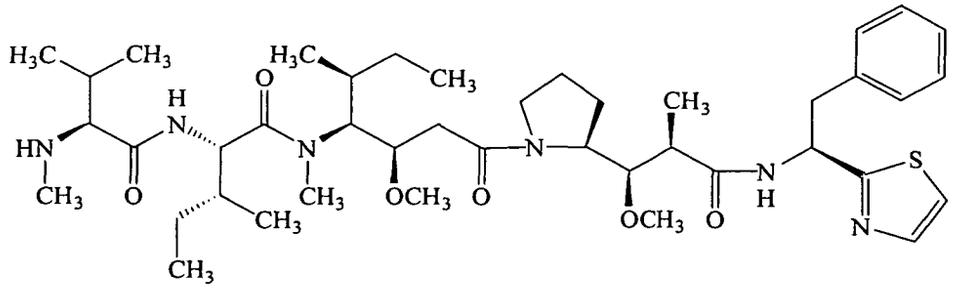
在某些實施例中，細胞毒性或細胞生長抑制劑係式**XIV-XXIII**化合物或其醫藥上可接受之鹽形式：



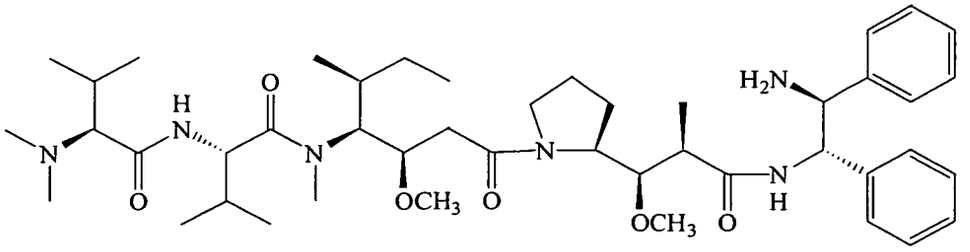
(XIV)



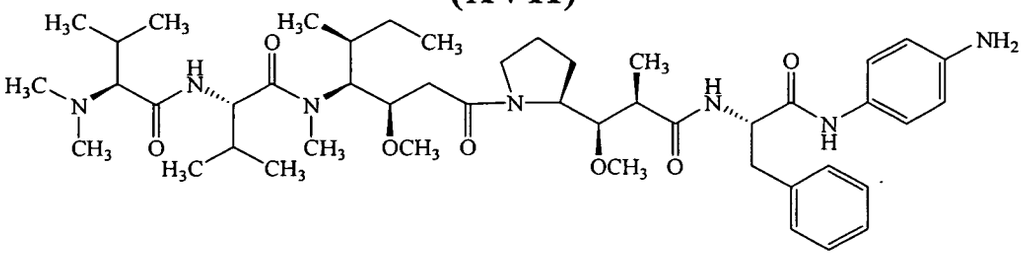
(XV)



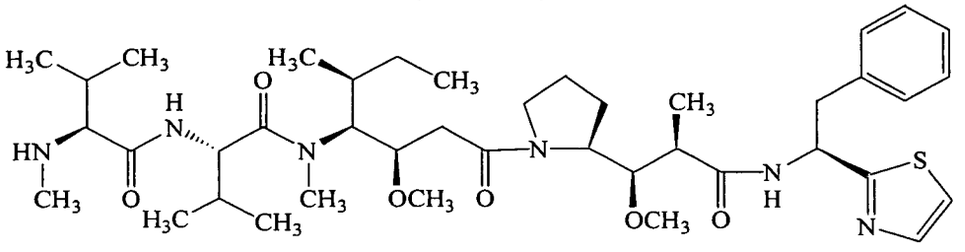
(XVI)



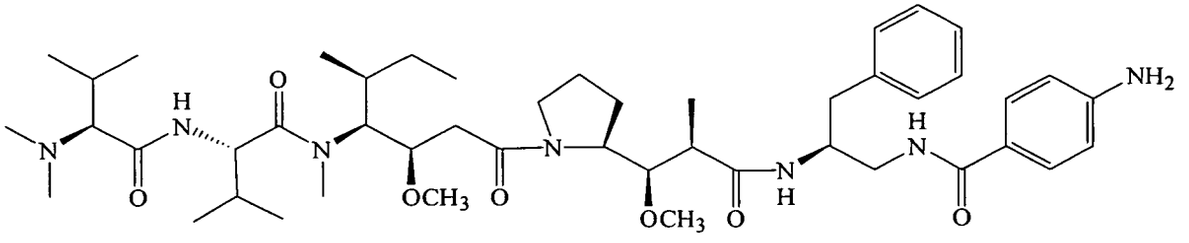
(XVII)



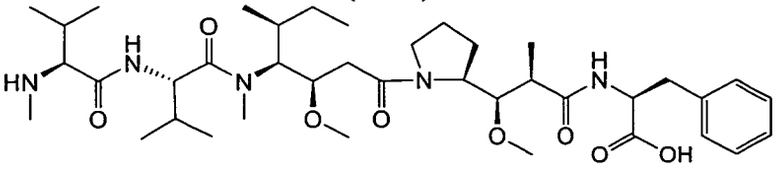
(XVIII)



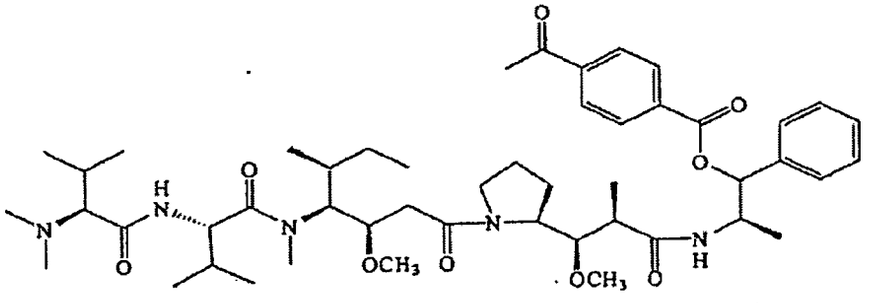
(XIX)



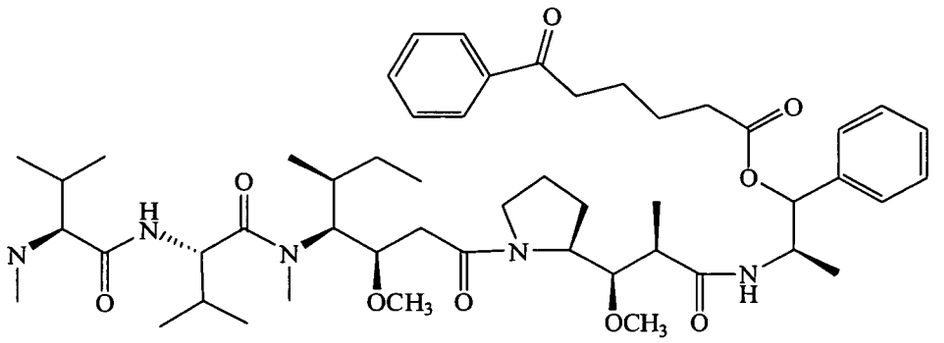
(XX)



(XXI)



(XXII)



(XXIII)

配體單元

在本發明中，配體藥物結合物中之配體單元(例如，抗體)特異性結合DR5且經由內化而呈現細胞毒性活性。配體藥物結合物到達表現配體單元(例如，抗體)作爲靶標而特異性結合之DR5的癌組織。因此，結合至抗體之藥物單元能夠選擇性地作用於靶細胞。因此，抗體-藥物結合物之功效與單獨抗體相比可大大增強。結合含有死亡結構域之受體之抗體(尤其抗DR5抗體)可選擇作爲可包含於本發明抗體-藥物結合物中之抗體。

結合DR5之抗體

(1) DR5基因

人類死亡受體5 (DR5)基因之核苷酸序列及胺基酸序列已以GI:22547118(登記號爲NM_147187)註冊於GenBank中。編碼DR5胺基酸序列中一或多個胺基酸經替換、缺失或添加之胺基酸序列且具有與DR5相當之生物活性的核苷酸序列亦包括於DR5基因之核苷酸序列中。另外，由DR5胺基酸序列中一或多個胺基酸經替換、缺失或添加之胺基酸序列組成且具有與DR5相當之生物活性的蛋白質亦包括於DR5中。

(2) 抗DR5之抗體

本發明之抗DR5抗體可以常用方式藉由用DR5或選自DR5胺基酸序列之任何多肽免疫動物來獲得。可收集及純化在活體中產生之該抗

體。

另外，單株抗體亦可自藉由按照習知方法使產生抗DR5抗體之抗體產生細胞與骨髓瘤細胞融合而建立之雜交瘤獲得(例如，Kohler及Milstein，*Nature* (1975) 256，第495-497頁；Kennet, R.編輯，*Monoclonal Antibody*，第365-367頁，Prenum Press, N.Y. (1980))。

作爲抗原之DR5可自表現DR5基因之基因改造宿主細胞獲得。

更具體而言，DR5可藉由製備能夠表現DR5基因之載體、將該載體引入宿主細胞中以表現該基因及純化所表現之DR5來獲得。

另外，在構築使DR5之細胞外區域與抗體恆定區融合之人工基因後，在合適基因表現系統中製備之蛋白質亦可用作免疫原。

(3) 其他抗體

除對抗上文DR5之單株抗體外，本發明抗體包括經人工改造以降低針對人類之異源抗原性之重組抗體，例如嵌合抗體、人類化抗體及人類抗體。該等抗體可藉由習知方法來製備。

該等嵌合抗體包括可變區與恆定區彼此異源之抗體，且其實例係藉由使衍生自小鼠之抗體之可變區基因連結至人類恆定區基因而產生之嵌合抗體(*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 81, 6851-6855 (1984))。

該等人類化抗體之實例包括僅互補決定區(CDR)轉移至人類抗體中之抗體(Nature (1986) 321，第522-525頁)以及CDR序列及部分框架中之胺基酸殘基藉由CDR移植而移植至人類抗體中之抗體(國際公開案第WO90/07861號)。

另外，存在人類抗體。術語「人類抗DR5抗體」係指僅具有衍生自人類染色體之抗體之基因序列的人類抗體。抗人類DR5抗體可藉由使用產生人類抗體且具有含有人類抗體重鏈及輕鏈基因之染色體片段的小鼠之方法來獲得(Tomizuka, K.等人，*Nature Genetics* (1997) 16，第133-143頁；Kuroiwa, Y.等人，*Nuc. Acids Res.* (1998) 26，第3447§

3448頁；Yoshida, H.等人，*Animal Cell Technology: Basic and Applied Aspects*，第10卷，第69-73頁(Kitagawa, Y., Matuda, T.及Iijima, S.編輯.)，Kluwer Academic Publishers, 1999；Tomizuka, K.等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2000) 97，第722-727頁)。

該轉基因動物或更具體而言非人類哺乳動物中之內源免疫球蛋白重鏈及輕鏈基因座被破壞且反之人類免疫球蛋白重鏈及輕鏈基因座已經由酵母人工染色體(YAC)載體或諸如此類引入該基因敲除動物中之基因修飾動物可藉由製備如上文所述基因敲除動物及轉基因動物並使該等動物雜交育種來產生。

抗體亦可自藉由以下產生之培養物上清液獲得：藉由重組DNA技術用cDNA、較佳含有編碼每一人類化抗體重鏈及輕鏈之cDNA的載體轉化真核細胞並培養產生重組人類單株抗體之轉化細胞。

在本文中，可用作宿主之細胞的實例包括真核細胞，較佳哺乳動物細胞，例如CHO細胞、淋巴細胞及骨髓瘤。

另外，亦已知獲得篩選自人類抗體文庫且衍生自噬菌體展示之人類抗體的方法(Wormstone, I. M.等人，*Investigative Ophthalmology & Visual Science* (2002) 43 (7)，第2301-2308頁；Carmen, S.等人，*Briefings in Functional Genomics and Proteomics* (2002), 1 (2)，第189-203頁；Siriwardena, D.等人，*Opthalmology* (2002) 109 (3)，第427-431頁)。

例如，將人類抗體重鏈及輕鏈可變區以單鏈抗體(scFv)展示於噬菌體表面上，且隨後選擇抗原結合噬菌體(*Nature Biotechnology* (2005), 23, (9)，第1105-1116頁)。

編碼抗原結合人類抗體可變區之DNA序列可藉由分析藉由抗原結合選擇之噬菌體的基因來測定。

在清楚抗原結合scFv之DNA序列後，可藉由製備具有該序列之表

現載體並將該載體引入適於表現之宿主中來獲得人類抗體(例如，參見 WO92/01047 、 WO92/20791 、 WO93/06213 、 WO93/11236 、 WO93/19172 、 WO95/01438 、 WO95/15388 ； *Annu. Rev. Immunol* (1994) 12，第433-455頁； *Nature Biotechnology* (2005) 23 (9)，第1105-1116頁)。

當抗體基因被分離且引入合適宿主中以製備抗體時，可使用宿主與表現載體之合適組合。

當使用真核細胞作爲宿主時，可使用動物細胞、植物細胞或真核微生物。

該等動物細胞之實例包括猿猴COS細胞(Gluzman, Y., *Cell* (1981) 23，第175-182頁，ATCC CRL-1650)、鼠科動物成纖維細胞NIH3T3(ATCC號爲CRL-1658)及中國倉鼠卵巢細胞之二氫葉酸還原酶缺失品系(CHO細胞，ATCC CCL-61)(Urlaub, G.及Chasin, L. A., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (1980) 77，第4216-4220頁)。

可使用之原核細胞的實例包括大腸桿菌(Escherichia coli)及枯草桿菌(Bacillus subtilis)。

抗體可藉由經由轉化將目標抗體基因引入該等細胞中並在活體外培養經轉化細胞來獲得。

本發明抗體之同種型並無限制。其實例包括IgG (IgG1、IgG2、IgG3及IgG4)、IgM、IgA (IgA1及IgA2)、IgD及IgE，但IgG及IgM較佳。

另外，本發明抗體可爲具有抗體之抗原結合位點之抗體片段或其修飾形式(只要其保持抗原結合性)。

該等抗體功能片段之實例包括Fab、$F(ab')_2$、藉由還原$F(ab')_2$獲得之單價可變區片段Fab'、Fv、藉由合適連接體連接重鏈與輕鏈Fv所得之單鏈Fv (scFv)、雙功能抗體(diabody或diabodies)、線性抗體及由

抗體片段形成之多特異性抗體，但該等片段並不限於上述片段，只要其保持抗原結合性即可。上述抗體片段可藉由使用諸如木瓜蛋白酶或胃蛋白酶等酶處理全長抗體分子來獲得。上述抗體片段亦可藉由使用編碼上述抗體片段之重鏈及輕鏈之核酸序列以容許適當之基因表現系統產生對應蛋白質來獲得。

該等抗體片段可藉由以與上文相同之方式獲得及表現該等基因以容許宿主產生對應蛋白質來製備。

本發明抗體可爲多株抗體、具有不同胺基酸序列之數種抗DR5抗體之混合物。該多株抗體之實例係具有不同CDR之數種抗體之混合物。可使用藉由培養產生不同抗體之細胞的混合物並純化培養物而獲得之抗體作爲該多株抗體(WO2004/061104)。

可對獲得之抗體統一進行純化。可採用一般蛋白質之分離及純化方法分離及純化該抗體。

例如，抗體可藉由適當選擇及組合層析管柱、過濾器、超濾、鹽析、透析、製備型聚丙烯醯胺凝膠電泳、等電聚焦及諸如此類進行分離及純化(Strategies for Protein Purification and Charcterization: A Laboratoy Course Manual, Daniel R. Marshak等人，Cold Spring Harbor Laboratory Press (1996)；Antibodies: A Laboratory Manual. Harlow及David Lane編輯, Cold Spring Harbor Laboratory (1988))，但分離及純化方法並不限於該等方法。

層析之實例包括親和層析、離子交換層析、疏水性層析、凝膠過濾、逆相層析及吸附層析。該等類型之層析法可使用諸如HPLC及FPLC等液相層析法來進行。

用於親和層析之管柱的實例包括蛋白質A管柱及蛋白質G管柱。

蛋白質A管柱之實例包括Hyper D、POROS及Sepharose F. F. (Pharmacia)。

另外，亦可藉由抗體與固定於載體上之抗原的結合法來化抗體。

(4) **抗DR5抗體之實例**

例如，闡述於國際公開案第WO98/51793號、第WO2001/83560號、第WO2002/94880號、第WO2003/54216號、第WO2004/50895號、第WO2006/83971號、第WO2007/22157號及第WO2011/038159號中之誘導DR5表現細胞凋亡之抗DR5抗體可用作本發明抗體-藥物結合物之組份。另外，稱爲來沙木單抗(Lexatumumab)、HGS-TR2J、Apomab、屈子曲單抗(drozitumab)、西他土珠(Conatumumab)及LBY135之抗DR5抗體及其變體亦可用作本發明抗體-藥物結合物之組份。然而，可用作該等組份之抗體並不限於上述實例，只要該等抗體能夠結合DR5蛋白質即可。

本發明之配體單元通常爲DR5結合劑。在一組實施例中，配體單元包含對應於人類化B273之重鏈胺基酸序列(SEQ ID NO:9)。人類化B273在本說明書中縮寫爲hB273。產生hB273之方法闡述於PCT公開案第PCT/JP2011/074866號中，該案件標題爲「A new anti-DR5 antibody」且於2011年10月27日提出申請(公開爲WO 2012/057288)，其全部內容且出於所有目的以引用方式併入本文中。在另一組實施例中，配體單元包含對應於人類化B273之重鏈胺基酸序列，其無羧基末端離胺酸殘基(亦即，具有SEQ ID NO:9之胺基酸殘基1-451之胺基酸序列的重鏈)。已由(例如) Harris, *J. Chromatography* (1995), 705:129-134報導轉譯後處理蛋白質以自羧基末端移除離胺酸或精胺酸殘基。在另一組實施例中，配體單元包含對應於人類化B273之輕鏈胺基酸序列(SEQ ID NO:10)。在又一實施例中，配體單元包含SEQ ID NO:9及10之重鏈及輕鏈胺基酸序列。在再一實施例中，配體單元包含SEQ ID NO:9之胺基酸殘基1-451之重鏈胺基酸及SEQ ID NO:10

之輕鏈胺基酸序列。在再一實施例中，配體單元包含(a) 重鏈免疫球蛋白，其具有由SEQ ID NO:11之胺基酸殘基1-5組成之CDR1、由SEQ ID NO:12之胺基酸殘基1-17組成之CDR2及由SEQ ID NO:13之胺基酸殘基1-13組成之CDR3；及(b) 輕鏈免疫球蛋白，其具有由SEQ ID NO: 14之胺基酸殘基1-16組成之CDR1、由SEQ ID NO:15之胺基酸殘基1-7組成之CDR2及由SEQ ID NO:16之胺基酸殘基1-9組成之CDR3。在另一實施例中，配體單元包含hB273之重鏈可變區，其包含SEQ ID NO:9之胺基酸殘基1-122；及hB273之輕鏈可變區，其包含SEQ ID NO:10之胺基酸殘基1-114。

另外，配體單元(L)具有至少一個可與連接體單元之官能團形成鍵之官能團。可天然、經由化學操作或經由改造存在於配體單元上之有用官能團包括(但不限於)巰基(-SH)、胺基、羥基、羧基、碳水化合物之異頭羥基及羧基。在一些實施例中，配體單元官能團係巰基。巰基通常爲溶劑可及巰基，例如半胱胺酸殘基上之溶劑可及巰基。巰基可藉由還原配體之分子內或分子間二硫鍵來產生。巰基亦可藉由使用2-亞胺基硫口東(Traut試劑)或另一巰基產生試劑使配體離胺酸部分之胺基反應來產生。

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

在實例性實施例中，可藉由胺基酸取代將半胱胺酸殘基改造至抗體重鏈或輕鏈可變區(例如，諸如雙功能抗體等抗體片段之重鏈或輕鏈可變區)中。胺基酸取代通常引入框架區中且位於可變區之抗原

決定部位-結合面之遠端。例如，胺基酸取代距離抗原決定部位-結合面或CDR可至少10埃、至少20埃或至少25埃。半胱胺酸殘基之適宜取代位置可基於已知或預測之抗體可變區的三維結構來測定。(通常參見Holliger及Hudson，2005, *Nature BioTechnology* 23(9):1126-1136.)在實例性實施例中，在V_H區之胺基酸位置84處及/或V_L區之位置14處引入絲胺酸至半胱胺酸之胺基酸取代(按照Kabat等人，Sequences of Proteins of Immunological Interest，第5版(Bethesda, MD, NIH) 1991之編號系統)。

爲控制附接至配體單元之藥物或連接體單元-藥物單元之數量，可藉由胺基酸取代來消去一或多個半胱胺酸殘基。例如，可藉由半胱胺酸至絲胺酸殘基之胺基酸取代來減少免疫球蛋白鉸鏈區中溶劑可及半胱胺酸殘基之數量。

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

分析

已知測定藥物或配體藥物結合物是否對細胞施加細胞生長抑制及/或細胞毒性效應之方法。通常，配體藥物結合物之細胞毒性或細胞生長抑制活性可藉由以下來量測：使表現靶蛋白之哺乳動物細胞暴露於存於細胞培養基中之配體藥物結合物；將細胞培養約6小時至約5天之時間段；及量測細胞生存率。可利用基於細胞之活體外分析來量測生存率(增殖)、配體藥物結合物之細胞毒性及對細胞凋亡之誘導(半胱天冬酶激活)。

可利用胸苷納入分析來測定配體藥物結合物是否施加細胞生長抑制效應。例如，可將以5,000個細胞/孔之密度鋪板於96孔板中之表現靶抗原之癌細胞培養72小時時間段，並在72小時時間段之最後8小

時期間暴露於0.5 μCi ^{3}H-胸苷。在存在及不存在配體藥物結合物下量測^{3}H-胸苷至培養物中之細胞的納入。

測定細胞毒性時，可量測壞死或細胞凋亡(程序性細胞死亡)。壞死通常伴隨質膜通透性增加；細胞腫脹；及質膜破裂。細胞凋亡之特徵通常在於膜起泡、細胞質濃縮及內源內切核酸酶激活。對癌細胞之該等效應中任一者的測定均表明配體藥物結合物可用於治療癌症。

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

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

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

亦可藉由量測細胞之形態變化來測定細胞凋亡。例如，與壞死一樣，質膜完整性之喪失可藉由量測某些染料(例如，螢光染料，例如，吖啶橙或溴化乙錠)之攝取來測定。Duke及Cohen，Current Protocols in Immunology (Coligan等人編輯，1992，第3.17.1-3.17.16頁)已闡述量測凋亡細胞數量之方法。亦可用DNA染料(例如，吖啶

橙、溴化乙錠或碘化丙錠)標記細胞，並針對染色質濃縮及沿內層核膜之著邊(margination)觀察細胞。可進行量測以測定細胞凋亡之其他形態變化包括(例如)細胞質濃縮、膜起泡增加及細胞皺縮。

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

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

組合物及投與方法

已知多種遞送系統且可使用該等系統來投與配體-藥物結合物。引入方法包括(但不限於)皮內、肌內、腹膜內、靜脈內及皮下途徑。可藉由(例如)輸注或濃注來投與。在某些較佳實施例中，藉由輸注來投與配體藥物結合物。非經腸投與係較佳之投與途徑。

可以包含一或多種醫藥上相容之成份之醫藥組合物形式來投與配體藥物結合物。例如，醫藥組合物通常包括一或多種醫藥載劑(例如，無菌液體，例如水及油，油包括石油、動物油、植物油或合成來源之油，例如花生油、大豆油、礦物油、芝麻油及諸如此類)。當靜脈內投與醫藥組合物時，水係更典型之載劑。亦可採用鹽水溶液及水性右旋糖及甘油溶液作爲液體載劑，尤其對於可注射溶液而言。適宜醫藥賦形劑已爲熟習此項技術者所習知。若需要，該組合物亦可含有

少量潤濕劑或乳化劑或pH緩衝劑。適宜醫藥載劑之實例闡述於E.W. Martin之「Remington's Pharmaceutical Sciences」中。調配物與投與方式相對應。

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

有效治療特定病症或病狀之化合物的量應端視病症或病狀之性質而定，且可藉由標準臨床技術來測定。另外，可視情況採用活體外或活體內分析來幫助確定最佳劑量範圍。擬用於組合物中之準確劑量亦應端視投與途徑及疾病或病症之嚴重程度而定，且應根據執業醫師之判斷及各患者之情況來決定。

組合物包含有效量之化合物，由此獲得適宜劑量。通常，以組合物之重量計，該量爲至少約0.01%之化合物。

靜脈內投與時，組合物可包含約0.01至約100 mg化合物/kg動物體重。在一個態樣中，組合物可包括約1至約100 mg化合物/kg動物體重。在另一態樣中，投與量介於約0.1至約25 mg化合物/kg體重範圍內。

通常，投與至患者之化合物的劑量通常爲約0.01 mg/kg至約100 mg/kg個體體重。在一些實施例中，投與至患者之劑量介於約0.01 mg/kg至約15 mg/kg個體體重之間。在一些實施例中，投與至患者之

劑量介於約0.1 mg/kg與約15 mg/kg個體體重之間。在一些實施例中，投與至患者之劑量介於約0.1 mg/kg與約20 mg/kg個體體重之間。在一些實施例中，投與劑量介於約0.1 mg/kg至約5 mg/kg或約0.1 mg/kg至約10 mg/kg個體體重之間。在一些實施例中，投與劑量介於約1 mg/kg至約15 mg/kg個體體重之間。在一些實施例中，投與劑量介於約1 mg/kg至約10 mg/kg個體體重之間。

通常將醫藥組合物調配成無菌的實質上等滲形式，且完全符合美國食品與藥物管理局(U.S. Food and Drug Administration)之所有良好製造規範(Good Manufacturing Practice) (GMP)規章制度。

使用配體藥物結合物之治療方法

該等配體藥物結合物可用於抑制腫瘤細胞或癌細胞之繁殖或用於治療動物癌症。因此，該等配體藥物結合物可以多種設定用於治療動物癌症。

可使用該等配體藥物結合物治療之特定癌症類型包括(但不限於)：(1) 實體腫瘤，包括但不限於纖維肉瘤、黏液肉瘤、脂肪肉瘤、軟骨肉瘤、成骨性肉瘤、脊索瘤、血管肉瘤、內皮肉瘤、淋巴管肉瘤、淋巴管內皮肉瘤、滑膜瘤、間皮瘤、尤文氏瘤(Ewing's tumor)、平滑肌肉瘤、橫紋肌肉瘤、結腸癌、結腸直腸癌、腎癌、胰臟癌、骨癌、乳癌、卵巢癌、前列腺癌、食管癌、胃癌、口癌、鼻癌、喉癌、鱗狀細胞癌、基底細胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳頭狀癌、乳頭狀腺癌、囊腺癌、髓樣癌、支氣管原癌、腎細胞癌、肝細胞瘤、膽管癌、絨毛膜癌、精原細胞瘤、胚胎性癌、維爾姆斯瘤(Wilms' tumor)、子宮頸癌、子宮癌、睾丸癌、小細胞肺癌、膀胱癌、肺癌、上皮癌、神經膠質瘤、膠質母細胞瘤、多形性星形細胞瘤、髓母細胞瘤、顱咽管瘤、室管膜瘤、松果體瘤、血管母細胞瘤、聽神經瘤、少突神經膠質瘤、腦膜瘤、皮膚癌、黑色素瘤、神經母細

胞瘤及視網膜母細胞瘤；(2) 血源性癌症，包括但不限於急性成淋巴細胞性白血病「ALL」、急性成淋巴細胞性B-細胞白血病、急性成淋巴細胞性T-細胞白血病、急性成髓細胞性白血病「AML」、急性早幼骨髓細胞性白血病「APL」、急性成單核細胞性白血病、急性紅白血病、急性巨核母細胞性白血病、急性骨髓單核細胞性白血病、急性非淋巴細胞性白血病、急性未分化性白血病、慢性骨髓細胞性白血病「CML」、慢性淋巴細胞性白血病「CLL、多毛細胞白血病、多發性骨髓瘤、急性及慢性白血病，例如，成淋巴細胞性髓性白血病及淋巴細胞性骨髓細胞性白血病；及(3) 淋巴瘤，例如霍奇金氏病(Hodgkin's disease)、非霍奇金氏淋巴瘤、多發性骨髓瘤、沃爾登斯特倫巨球蛋白血症(Waldenstrom's macroglobulinemia)、重鏈病及真性紅血球增多症。在一些實施例中，癌症係DR5陽性癌症或表現DR5之癌症。

在一些實施例中，本發明提供治療癌症之方法，其包含向有需要之個體投與有效量之包含共價附接至細胞毒性劑之DR5結合劑的配體藥物結合物或其醫藥組合物。在一些實施例中，配體藥物結合物包含上文所提供之式I。配體藥物結合物之有效量應端視所治療之個體、患病之嚴重程度及投與方式而定。有效量之測定已爲彼等熟習此項技術者所熟知，尤其可根據本文所提供之詳細揭示內容來測定。通常，配體藥物結合物之靈驗或有效量係藉由以下來測定：首先投與低劑量或少量，且隨後遞增所投與之劑量(dose或dosage)，直至在治療個體中觀察到期望治療效果而毒性副作用最小或沒有。用於測定本發明投與之合適劑量及投用時間表之適用方法闡述於(例如) *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*，第11版，Brunton、Lazo及Parker編輯，McGraw-Hill (2006)及*Remington: The Science and Practice of Pharmacy*，第21版，Gennaro編輯，Lippencott

Williams & Wilkins (2003)，二者均以引用方式併入本文中。

實例

DR5抗體藥物結合物之結合

如下製備hB273抗體藥物結合物。使用包含對應於胺基酸序列SEQ ID NO: 9或無羧基末端離胺酸殘基之胺基酸序列SEQ ID NO:9(亦即，SEQ ID NO:9之胺基酸殘基1-451之胺基酸序列)之重鏈且包含對應於胺基酸序列SEQ ID NO: 10之輕鏈的hB273抗體作爲配體單元。將介於5 mg/mL與25 mg/mL之間之濃度之hB273抗體溶液在37℃下預平衡，且隨後添加5-15% (v/v) 1 M磷酸鈉(pH 7.4)以使pH升高至7.5-8.0。亦添加1 mM之最終濃度之DTPA。藉由添加介於2莫耳當量與3莫耳當量之間之TCEP/莫耳抗體部分還原抗體。藉由在克規模還原及結合之前之若干小規模還原及結合根據經驗測定產生平均具有4種遊離硫醇之抗體所需的TCEP之量。在1至2小時之還原時段後，將抗體溶液冷卻至22℃，隨後用4至6莫耳當量之來自10 mM至20 mM儲存溶液之藥物連接體(例如，mc-vc-MMAF或mc-vc-MMAE或mc-MMAF)於DMSO中處理。經15分鐘時段添加藥物-連接體儲液。引入額外DMSO以使混合物達到15體積%之總DMSO。在藥物-連接體添加完成後、在每莫耳所添加藥物-連接體用5倍莫耳過量之N-乙醯基半胱胺酸處理之前，將反應混合物攪拌額外30分鐘。在驟冷後，藉由使用10透析過濾體積(diavolume)之PBS進行恆定體積透析過濾以移除殘餘遊離藥物及其他過程雜質。產生以下抗體藥物結合物：與mc-vc-MMAE結合之hB273之抗體藥物結合物(「hB273-vc-MMAE」)及與mc-MMAF結合之hB273之抗體藥物結合物(「hB273-mc-MMAF」)。所得抗體藥物結合物之平均載藥量爲每一抗體約3.5至4.5個藥物-連接體單元(亦即，平均p值爲約3.5至4.5)。可根據業內已知之方法量測平均載藥量或平均p值。作爲非限制性實例，可根據以引用方式併入本文中之Hamblett等

人之*Clinical Cancer Research* 10:7063-7070 (2004)中所述方法量測p值。在一種方法中，在包含抗體藥物結合物之試樣上、例如使用Ether-5PW管柱(Tosoh Bioscience, Montgomeryville, PA)實施疏水相互作用層析-高效液相層析。由於抗體及藥物具有相異吸光度最大值，故可藉由覆蓋峰譜確定並定量每一抗體之藥物單元之數量，藉此允許測定平均載藥量。在另一方法中，若抗體及藥物具有相異吸光度最大值(λ_{max})，則藉由紫外光及可見光吸收光譜(UV-VIS)量測p值。藉由使用抗體及藥物之量測總吸光度(藥物及抗體之吸光度)及消光係數，可測定抗體及藥物之濃度，自其可計算藥物對抗體之莫耳比。

上述方案亦可用於產生與mc-vc-MMAF結合之hB273之抗體藥物結合物(「hB273-vc-MMAF」)。爲製備平均載藥量爲每一抗體2個藥物-連接體單元(*亦即*，平均p值爲約2)之抗體藥物結合物，藉由將TCEP之量降低50%改良上述方案。藥物連接體之量亦降低50%。對應抗體藥物結合物縮寫爲hB273-vc-MMAE(2)、hB273-mc-MMAF(2)或hB273-vc-MMAF(2)。

如下製備與mc-MMAF結合之hTRA-8之抗體藥物結合物(「hTRA-8-mc-MMAF」)。使用包含對應於胺基酸序列SEQ ID NO: 1或無羧基末端離胺酸殘基之胺基酸序列SEQ ID NO:1 (亦即，SEQ ID NO:1之胺基酸殘基1-448之胺基酸序列)之重鏈且包含對應於胺基酸序列SEQ ID NO: 2之輕鏈的hTRA-8抗體作爲配體單元。該hTRA-8抗體稱爲替加珠單抗(Tigatuzumab)。使7.6 mg/mL之hTRA-8抗體溶液在37℃下預平衡，且隨後添加15%體積之500 mM硼酸鈉(pH 8.0)以使pH升高至7.5-8.0。該溶液亦含有1 mM DTPA。藉由添加2.6當量TCEP/莫耳抗體並在37℃下攪拌來部分還原抗體。28分鐘後，將還原抗體之溶液置於冰上，隨後立即使用4.8-4.9莫耳當量(相對於抗體)之藥物連接體(例如，mc-vc-MMAF或mc-vc-MMAE或mc-MMAF)以存於DMSO中之20.5 mM

溶液形式進行處理。引入額外DMSO以使混合物達到10體積%之DMSO。將反應混合物在冰上攪拌約90分鐘，隨後使用5倍莫耳過量之N-乙醯基半胱胺酸(相對於mc-vc-MMAF)進行處理。藉由正切流動過濾來分離結合物，首先濃縮至約10 mg/mL，隨後使用約10透析過濾體積之PBS進行透析過濾。所得抗體藥物結合物之平均載藥量爲每一抗體約四個藥物-連接體單元。

hB273 ADC抗若干腫瘤細胞系之活體外細胞毒性活性

將 hB273 、 hB273-vcMMAE 、 hB273-mcMMAF 及 hTRA-8-mcMMAF在培養基中稀釋以獲得2000 ng/mL，其中涉及4000 ng/mL山羊抗人類IgG Fc抗體(MP Biomedicals)。將該等溶液用培養基連續稀釋，並以50 μL/孔一式兩份地添加至96孔微量滴定板。活體外研究中所用之細胞系係A375 (人類黑色素瘤)、NCI-H2122 (人類肺腺癌)、HCT 15 (人類結腸直腸腺癌)、SK-OV-3 (人類卵巢腺癌)、LoVo (人類結腸直腸腺癌)、A2780 (人類卵巢癌)、A549 (人類肺腺癌)、Caki-2 (人類腎細胞癌)、HCT 116 (人類結腸直腸腺癌)、NCI-H1975 (人類肺腺癌)、MDA-MB-231 (人類乳腺癌)及U-87 MG (人類膠質母細胞瘤)。將細胞懸浮液用培養基調節至4.0 × 10^4個活細胞/mL且以50 μL/孔(= 2 × 10^3個活細胞/孔)添加至孔。空白孔中未接種細胞。在CO_2培育箱中培育72 hr後，藉由CellTiter-Glo發光細胞生存率分析(Promega)按照製造商說明書檢測ATP之量。藉由微量培養板讀數器(Mithras LB940, Berthold Technologies)來量測發光。根據以下等式計算每一孔之細胞生存率：

生存率(%) = 100 × (T-B)/(C-B)

T：測試孔之發光

C：具有未處理細胞之孔之平均發光

B：空白孔之平均發光

圖1-12提供使用本發明之hB273配體藥物結合物進行評價之12種細胞系的結果。如圖闡釋，hB273-vcMMAE及hB273-mcMMAF顯示比hB273更有效之抵抗若干人類腫瘤細胞系(例如LoVo (**圖5**)、A549 (**圖7**)及Caki-2 (**圖8**))之細胞毒性活性。另外，hB273-vcMMAE及hB273-mcMMAF顯示比hTRA-8-mcMMAF更有效之抵抗用於此分析之所有腫瘤細胞系之細胞毒性活性。

藉由BIACore之抗DR5 ADC之結合親和性之測定

DR5細胞外結構域蛋白表現載體之產生：爲構築表現由人類DR5序列SEQ ID NO:17之胺基酸殘基1-130組成之DR5區域(下文中稱作「sDR5」)的載體，使用用於擴增sDR5之引物組實施PCR反應：

DR5 Ndefw: 5'-gtggcatatggctctgatcacccaacaa-3' (SEQ ID NO:18)及

DR5 Xhorv: 5'-cgcctcgagtgattctttgtggacaca-3' (SEQ ID NO:19)，

使用編碼人類DR5細胞外結構域之cDNA作爲模板。將所得PCR產物用NdeI及XhoI裂解並選殖至pET21b(+) (由Novagen公司製造)之NdeI/XhoI位點中(下文縮寫爲「pET21b(+)-sDR5」)。由「pET21b(+)-sDR5」表現之重組DR5蛋白質稱作「rsDR5」 (SEQ ID NO:20)。

DR5細胞外結構域蛋白質(rsDR5)之產生：將大腸桿菌Origami B (DE3) (由Novagen公司製造)用表現質粒pET21b(+)-sDR5轉換並在補充有100 μg/ml氨苄西林(ampicillin) (由Sigma有限公司製造)及15 μg/ml卡那黴素(kanamycin) (由Wako Pure Chemical Industries有限公司製造)之2-YT培養基中培養，且藉由添加0.5 mM IPTG誘導DR5之一部分蛋白質表現。藉由以6000 rpm離心20分鐘收集細胞並將其懸浮於結合緩衝液(50 mM Tris-HCl pH 7.5, 300 mM NaCl)中，之後在冰上超音波均質化。將所得均質物以25,000 rpm離心20分鐘。回收上清液並施加至Ni-NTA (由Invitrogen公司製造)。在將試樣用結合緩衝液洗滌後，利用洗脫緩衝液(50 mM Tris-HCl pH 7.5、300 mM NaCl及300

mM咪唑)實施洗脫。將所洗脫試樣用透析緩衝液(50 mM Tris-HCl pH 8.0、20 mM NaCl)透析並施加至MONO Q，且利用洗脫緩衝液(50 mM Tris-HCl pH 8.0、1 M NaCl)實施梯度洗脫。藉由凝膠過濾管柱層析(Superdex 75 16/60，由GE Healthcare Bio-Sciences有限公司製造)使用PBS作爲溶劑進一步純化所洗脫試樣。於UV 280 nm (莫耳吸光度常數：14855)下量測藉由此方法獲得之重組蛋白之濃度。

使用Biacore之結合活性之量測：使用BIAcore 3000儀器(Biacore)在連續稀釋結合捕獲hB273、hB273-vc-MMAE或hB273-mc-MMAF之重組可溶性DR5蛋白(rsDR5)下測定動力學常數k_{on}及k_{off}。使用人類抗體捕獲套組(GE Healthcare Bio-Sciences AB)，由藉由標準EDC-NHS胺偶合化學法共價固定於CM5感測器晶片(Biacore)上之抗人類IgG (Fc)抗體捕獲hB273、hB273-vc-MMAE或hB273-mc-MMAF。對於抗人類IgG (Fc)之直接偶合，用HBS-EP+ (10 mM HEPES緩衝液pH 7.4、0.15 M NaCl、3 mM EDTA及0.05%表面活性劑P20)中之約1500-2000 RU塗佈CM5感測器晶片及參考流式細胞。以10 μl/min之流速裝載hB273、hB273-vc-MMAE或hB273-mc-MMAF (0.5~1 μg/ml)達1 min，且隨後使用0.3-85 nM之rsDR5濃度範圍以30 μl/min之流速實施動力學量測5 min，之後5 min解離期。對於再生而言，以10 μl/min之流速裝載3 M $MgCl_2$達30 sec。使用BIA評價軟體3.1 (Biacore)整體擬合所有感應圖以測定解離常數KD (KD = k_{off} /k_{on})。結果示於下表1中：

表1. 抗體親和性

名稱	k_{on} (1/Ms)	k_{off} (1/d)	kD (nM)
hB273	2.6E+06	6.7E-03	2.6
hB273-mc-MMAF	2.5E+06	6.2E-03	2.5
hB273-vc-MMAE	2.5E+06	7.8E-03	3.2

活體內抗腫瘤功效-方法

5至6週齡之無特定病原體之雌性及雄性CAnN.Cg-*Foxn1*nu/CrlCrlj小鼠(裸小鼠)購自Charles River Laboratories Japan公司，且在其達到6至8週齡時使用。將4至6隻小鼠一起圈養在已滅菌之籠子中，並保持在無特定病原體之條件下。在實驗室中，環境條件設置爲23℃之溫度及55%濕度，人工照明12 h (8:00 - 20:00)。給小鼠餵以FR-2飲食(Funabashi Farm有限公司)，並隨意提供含有氯(5-15 ppm)之水。

在所有研究中，選擇具有腫瘤之小鼠並基於腫瘤體積劃分實驗組。在裸小鼠中建立腫瘤後，使用數位卡尺(CD15-CX，Mitutoyo公司)量測所有具有腫瘤之小鼠中之腫瘤長度及寬度(mm)，精確至小數點後兩位。數據自動記錄於Sankyo動物實驗數據管理系統(SMAD，JMACSOFT公司)中。在SMAD中按照以下等式自動計算各小鼠之腫瘤體積：

$$\text{腫瘤體積}(mm^3) = 1/2 \times \text{長度} \times \text{寬度}^2$$

將腫瘤體積四捨五入成整數並使用四捨五入之腫瘤體積進行進一步分析。基於腫瘤體積，藉由消去具有呈絕對值之最大學生化殘差的小鼠選擇具有特定數量之腫瘤之小鼠。利用SMAD藉由隨機化組方法使用腫瘤體積將所選小鼠分成實驗組。在分組後，利用數位卡尺將各小鼠之腫瘤長度及寬度每週量測一次或兩次。計算各組之平均腫瘤體積及標準誤差(SE)並在SMAD中使用各小鼠之四捨五入之腫瘤體積將其四捨五入成整數。亦在SMAD中使用四捨五入之腫瘤體積根據以下等式計算各量測天時之腫瘤生長抑制(TGI，%)，並四捨五入成整數。

$$TGI\ (\%) = (1-T/C) \times 100$$

T：藥物治療組之平均腫瘤體積(mm^3)

C:：未治療組之平均腫瘤體積(mm^3)

將 hB273 、 hB273-vcMMAE 、 hB273-mcMMAF 及 hTRA-8-mcMMAF稀釋於鹽水中，並以10 mL/kg小鼠體重之體積投與至具有腫瘤之裸小鼠中。

各人類腫瘤異種移植物研究之詳細程序係如下：

A375

人類黑色素瘤細胞系A375購自美國典型細胞保藏中心(American Type Cell Collection) (ATCC)。第0天，將5 × 10^6個細胞經皮下接種至雌性裸小鼠之右肋腹中。第14天，將具有腫瘤之裸小鼠分成實驗組(n = 6)。在第14、21及28天靜脈內投與3 mg/kg hB273及1 mg/kg hB273-vcMMAE、hB273-mcMMAF及 hTRA-8-mcMMAF。

A2780

人類卵巢癌細胞系A2780購自美國典型細胞保藏中心(ATCC)。第0天，將5 × 10^6個細胞經皮下接種至雌性裸小鼠之右肋腹中。第11天，將具有腫瘤之裸小鼠分成實驗組(n = 6)。在第11、18及25天以3 mg/kg之劑量向小鼠靜脈內投與hB273 、 hB273-vcMMAE 、 hB273-mcMMAF及hTRA-8-mcMMAF。

Caki-2

人類腎細胞癌細胞系Caki-2購自美國典型細胞保藏中心(ATCC)。第0天，將實體瘤片(5 × 5 × 5 mm^3)經皮下接種至雄性裸小鼠之右肋腹中。第18天，將具有腫瘤之裸小鼠分成實驗組(n = 8)。在第18、25及32天以3 mg/kg之劑量向小鼠靜脈內投與hB273、hB273-vcMMAE、hB273-mcMMAF及hTRA-8-mcMMAF。

HCT -116

人類結腸直腸腺癌細胞系HCT-116購自美國典型細胞保藏中心(ATCC)。第0天，將6 × 10^6個細胞經皮下接種至雌性裸小鼠之右肋腹中。第11天，將具有腫瘤之裸小鼠分成實驗組(n = 6)。在第11、18及

25天以3 mg/kg之劑量向小鼠靜脈內投與hB273、hB273-vcMMAE、hB273-mcMMAF及hTRA-8-mcMMAF。

HCT -15

人類結腸直腸腺癌細胞系HCT-15購自美國典型細胞保藏中心(ATCC)。第0天，將6 × 10^6個細胞經皮下接種至雌性裸小鼠之右肋腹中。第9天，將具有腫瘤之裸小鼠分成實驗組(n = 6)。在第9、16及23天以3 mg/kg之劑量向小鼠靜脈內投與hB273、hB273-vcMMAE、hB273-mcMMAF及hTRA-8-mcMMAF。

LoVo

人類結腸直腸腺癌細胞系LoVo購自美國典型細胞保藏中心(ATCC)。第0天，將實體瘤片(5 × 5 × 5 mm^3)經皮下接種至雌性裸小鼠之右肋腹中。第10天，將具有腫瘤之裸小鼠分成實驗組(n = 8)。在第10、17及24天以3 mg/kg之劑量向小鼠靜脈內投與hB273、hB273-vcMMAE、hB273-mcMMAF及hTRA-8-mcMMAF。

NCI-H1299

人類肺癌細胞系NCI-H1299購自美國典型細胞保藏中心(ATCC)。第0天，將4 × 10^6個細胞經皮下接種至雌性裸小鼠之右肋腹中。第14天，將具有腫瘤之裸小鼠分成實驗組(n = 6)。在第14、21及28天以3 mg/kg之劑量向小鼠靜脈內投與hB273、hB273-vcMMAE、hB273-mcMMAF及hTRA-8-mcMMAF。

NCI-H1975

人類肺腺癌細胞系NCI-H975購自美國典型細胞保藏中心(ATCC)。第0天，將3 × 10^6個細胞經皮下接種至雌性裸小鼠之右肋腹中。第13天，將具有腫瘤之裸小鼠分成實驗組(n = 6)。在第13、20及27天以3 mg/kg之劑量向小鼠靜脈內投與hB273、hB273-vcMMAE、hB273-mcMMAF及hTRA-8-mcMMAF。

NCI-H2122

人類肺腺癌細胞系NCI-H2122購自美國典型細胞保藏中心(ATCC)。第0天，將3 × 10^6個細胞經皮下接種至雌性裸小鼠之右肋腹中。第15天，將具有腫瘤之裸小鼠分成實驗組(n = 6)。在第15、22及29天以1 mg/kg之劑量向小鼠靜脈內投與hB273、hB273-vcMMAE、hB273-mcMMAF及hTRA-8-mcMMAF。

SK-OV-3

人類卵巢腺癌細胞系SK-OV-3購自美國典型細胞保藏中心(ATCC)。第0天，將實體瘤片(5 × 5 × 5 mm^3)經皮下接種至雌性裸小鼠之右肋腹中。第14天，將具有腫瘤之裸小鼠分成實驗組(n = 10)。在第14、21及28天以3 mg/kg之劑量向小鼠靜脈內投與hB273、hB273-vcMMAE、hB273-mcMMAF及hTRA-8-mcMMAF。

U-87 MG

人類膠質母細胞瘤細胞系U-87 MG購自美國典型細胞保藏中心(ATCC)。第0天，將5 × 10^6個細胞經皮下接種至雌性裸小鼠之右肋腹中。第7天，將具有腫瘤之裸小鼠分成實驗組(n = 6或7)。在第7、14及21天以3 mg/kg之劑量向小鼠靜脈內投與hB273、hB273-vcMMAE、hB273-mcMMAF及hTRA-8-mcMMAF。

活體內抗腫瘤功效-結果

在Caki-2異種移植物模型(**圖15**)中，抗體(hB273、hB273-vcMMAE、hB273-mcMMAF及hTRA-8-mcMMAF)皆不顯示任何抗腫瘤活性。在A375 (**圖13**)、A2780 (**圖14**)、HCT 116 (**圖16**)、LoVo (**圖18**)、NCI-H1299 (**圖19**)、NCI-H1975 (**圖20**)、SK-OV-3 (**圖22**)及U-87 MG (**圖23**)之異種移植物模型中，hB273-vcMMAE及hB273-mcMMAF二者皆顯示比hB273更具有效抗腫瘤功效。在HCT-15 (**圖17**)及NCI-H2122 (**圖21**)異種移植物模型中，hB273-mcMMAF之抗腫瘤活性係與

hB273一樣有效，而在該等模型中，hB273-vcMMAE之抗腫瘤活性不如hB273有效。該等結果證實hB273配體藥物結合物具有比hB273更有效之抗腫瘤功效。

在A2780 (**圖14**)、HCT 116 (**圖16**)、LoVo (**圖18**)、NCI-H1299 (**圖19**)、NCI-H1975 (**圖20**)、NCI-H2122 (**圖21**)、SK-OV-3 (**圖22**)及U-87 MG (**圖23**)之異種移植物模型中，hB273-vcMMAE及hB273-mcMMAF二者顯示比hTRA-8-mcMMAF更有效之抗腫瘤功效。在A375 (**圖13**)及HCT-15 (**圖17**)異種移植物模型中，hB273-mcMMAF比hTRA-8-mcMMAF更有效。在A375異種移植物模型(**圖13**)中，在第48天，經hTRA-8-mcMMAF治療之6隻小鼠中之1隻無可觸知腫瘤，而在第48天，所有經hB273-mcMMAF治療之小鼠(n = 6)皆無可觸知腫瘤。該等結果證實，hB273配體藥物結合物具有比hTRA-8配體藥物結合物更有效之抗腫瘤功效。

***

本發明並不由本文所述具體實施例限於該範圍。除本文所述修改形式外，熟習此項技術者可根據上述說明及附圖明瞭本發明之各種修改形式。該等修改形式意欲屬於隨附申請專利範圍之範圍。除非自上下文另外明瞭，否則本發明之任何步驟、元件、實施例、特徵或態樣可與另一者組合使用。在本申請案中提及之所有專利申請、科學出版物、登記號及諸如此類之全部內容皆出於所有目的以引用方式併入本文中，其併入程度如同如此逐個指明一般。

【符號說明】

無

【序列表】

<110> 大塚　敏明
市川　公久
矢田　步美
美商西雅圖遺傳學公司
日商第一三共股份有限公司

<120> DR5 配體藥物結合物

<130> 83819-873428

<140> TW Not yet assigned
<141> Not yet assigned

<150> US 61/637,808
<151> 2012-04-24

<160> 22

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1
<211> 449
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的抗人類死亡受體 5 (DR5, TRAIL-R2)單株抗體 hTRA-8 重鏈

<400> 1

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

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

<210> 2
<211> 213
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的抗人類死亡受體 5 (DR5, TRAIL-R2)單株抗體 hTRA-8 輕鏈

```
<400> 2
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1                  5                  10                  15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ala
            20                  25                  30
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45
Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65                  70                  75                  80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Arg Thr
                85                  90                  95
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
            100                 105                 110
Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
        115                 120                 125
Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
    130                 135                 140
Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
145                 150                 155                 160
```

```
Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
                165                 170                 175
Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
            180                 185                 190
Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
        195                 200                 205
Asn Arg Gly Glu Cys
    210
```

<210> 3
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的抗人類死亡受體 5 (DR5, TRAIL-R2)單株抗體 TRA-8 重鏈 CDR1

```
<400> 3
Ser Tyr Val Met Ser
 1               5
```

<210> 4
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的抗人類死亡受體 5 (DR5, TRAIL-R2)單株抗體 TRA-8 重鏈 CDR2

```
<400> 4
Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys
 1               5                   10                  15
```

<210> 5
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的抗人類死亡受體 5 (DR5, TRAIL-R2)單株抗體 TRA-8 重鏈 CDR3

```
<400> 5
Arg Gly Asp Ser Met Ile Thr Thr Asp Tyr
 1               5                   10
```

<210> 6
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的抗人類死亡受體 5 (DR5, TRAIL-R2)單株抗體 TRA-8 輕鏈 CDR1

<400> 6
Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ala Val Ala
1 5 10

<210> 7
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的抗人類死亡受體 5 (DR5, TRAIL-R2)單株抗體 TRA-8 輕鏈 CDR2

<400> 7
Trp Ala Ser Thr Arg His Thr
1 5

<210> 8
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的抗人類死亡受體 5 (DR5, TRAIL-R2)單株抗體 TRA-8 輕鏈 CDR3

<400> 8
Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Arg Thr
1 5

<210> 9
<211> 452
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的抗人類死亡受體 5 (DR5, TRAIL-R2)單株抗體 hB273 重鏈

<400> 9
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Ile Gly Tyr
20 25 30
Phe Met Asn Trp Met Lys Gln Ser Pro Gly Met Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Arg Phe Asn Pro Tyr Asn Glu Asp Thr Phe Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95
Ala Arg Ser Ala Tyr Tyr Phe Asp Ser Gly Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp
100 105 110
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
115 120 125
Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
130 135 140

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

<210> 10
<211> 219
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的抗人類死亡受體 5 (DR5, TRAIL-R2)單株抗體 hB273 輕鏈

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

```
65                  70                  75                  80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser
                85                  90                  95
Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
            100                 105                 110
Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
        115                 120                 125
Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
    130                 135                 140
Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145                 150                 155                 160
Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
                165                 170                 175
Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
            180                 185                 190
Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
        195                 200                 205
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    210                 215
```

<210> 11
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的抗人類死亡受體 5 (DR5, TRAIL-R2)單株抗體 B273 重鏈 CDR1

```
<400> 11
Gly Tyr Phe Met Asn
 1               5
```

<210> 12
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的抗人類死亡受體 5 (DR5, TRAIL-R2)單株抗體 hB273 重鏈 CDR2

```
<400> 12
Arg Phe Asn Pro Tyr Asn Glu Asp Thr Phe Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
 1               5                  10                  15
Gly
```

<210> 13
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的抗人類死亡受體 5 (DR5, TRAIL-R2)單株抗體 B273 重鏈 CDR3

```
<400> 13
Ser Ala Tyr Tyr Phe Asp Ser Gly Gly Tyr Phe Asp Tyr
```

1 5 10

<210> 14
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的抗人類死亡受體 5 (DR5, TRAIL-R2)單株抗體 hB273 輕鏈 CDR1

<400> 14
Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Lys Asn Thr Tyr Leu His
1 5 10 15

<210> 15
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的抗人類死亡受體 5 (DR5, TRAIL-R2)單株抗體 B273 輕鏈 CDR2

<400> 15
Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
1 5

<210> 16
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的抗人類死亡受體 5 (DR5, TRAIL-R2)單株抗體 B273 輕鏈 CDR3

<400> 16
Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr
1 5

<210> 17
<211> 130
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的人類死亡受體 5 (DR5, TRAIL-R2)細胞外結構域(人類 DR5 之胺基酸 1 至 130)，sDR5

<400> 17
Ala Leu Ile Thr Gln Gln Asp Leu Ala Pro Gln Gln Arg Ala Ala Pro
1 5 10 15
Gln Gln Lys Arg Ser Ser Pro Ser Glu Gly Leu Cys Pro Pro Gly His
20 25 30
His Ile Ser Glu Asp Gly Arg Asp Cys Ile Ser Cys Lys Tyr Gly Gln
35 40 45

```
Asp Tyr Ser Thr His Trp Asn Asp Leu Leu Phe Cys Leu Arg Cys Thr
    50                  55                  60
Arg Cys Asp Ser Gly Glu Val Glu Leu Ser Pro Cys Thr Thr Thr Arg
65                  70                  75                  80
Asn Thr Val Cys Gln Cys Glu Glu Gly Thr Phe Arg Glu Glu Asp Ser
                85                  90                  95
Pro Glu Met Cys Arg Lys Cys Arg Thr Gly Cys Pro Arg Gly Met Val
            100                 105                 110
Lys Val Gly Asp Cys Thr Pro Trp Ser Asp Ile Glu Cys Val His Lys
        115                 120                 125
Glu Ser
    130
```

<210> 18
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人類死亡受體 5 (DR5, TRAIL-R2)細胞外結構域(sDR5)之合成 PCR 擴增引物 DR5 Ndefw

<400> 18
gtggcatatg gctctgatca cccaacaa 28

<210> 19
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人類死亡受體 5 (DR5, TRAIL-R2)細胞外結構域(sDR5)之合成 PCR 擴增引物 DR5 Xhorv

<400> 19
cgcctcgagt gattctttgt ggacaca 27

<210> 20
<211> 139
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的重組人類死亡受體 5 (DR5, TRAIL-R2)細胞外結構域(rsDR5)

<400> 20

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

```
            100                 105                 110
Val Lys Val Gly Asp Cys Thr Pro Trp Ser Asp Ile Glu Cys Val His
        115                 120                 125
Lys Glu Ser Leu Glu His His His His His His
    130                 135
```

<210> 21
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 可由組織蛋白酶-B 裂解之合成肽基連接體

<400> 21
Gly Phe Leu Gly
 1

<210> 22
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 來自連接體單元之合成胺基酸單元(W)
(LU) -A-W-Y-

<220>
<221> MOD_RES
<222> (4)...(4)
<223> 由六氫異菸酸修飾之 Gln

<400> 22
Gly Ser Val Gln
 1

申請專利範圍

1. 一種配體藥物結合物，其具有下式：

$L-(LU-D)_p$ **(I)**

或其醫藥上可接受之鹽，其對表現DR5之靶細胞具有特異性，其中：

L係配體單元，其係包含如下之抗DR5抗體：(a) 重鏈免疫球蛋白，其具有由SEQ ID NO:11之胺基酸殘基1至5組成之CDR1、由SEQ ID NO:12之胺基酸殘基1至17組成之CDR2及由SEQ ID NO:13之胺基酸殘基1至13組成之CDR3；及(b) 輕鏈免疫球蛋白，其具有由SEQ ID NO:14之胺基酸殘基1至16組成之CDR1、由SEQ ID NO:15之胺基酸殘基1至7組成之CDR2及由SEQ ID NO:16之胺基酸殘基1至9組成之CDR3；且

(LU-D)係連接體單元-藥物單元部分，其中

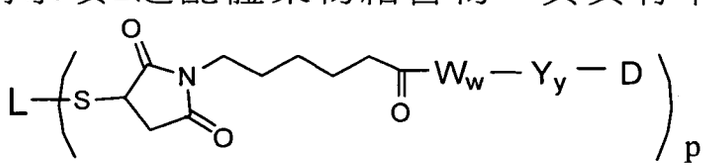
LU係連接體單元，且

D係藥物單元，其中該藥物單元係奧瑞司他汀(auristatin)；且

下標p係1至20之整數。

2. 如請求項1之配體藥物結合物，其中該奧瑞司他汀係奧瑞司他汀E、AEB、AEVB、AFP、MMAF或MMAE。

3. 如請求項1之配體藥物結合物，其具有下式：



或其醫藥上可接受之鹽形式，其中：

S係該配體單元之硫原子；

各W獨立地爲胺基酸單元；

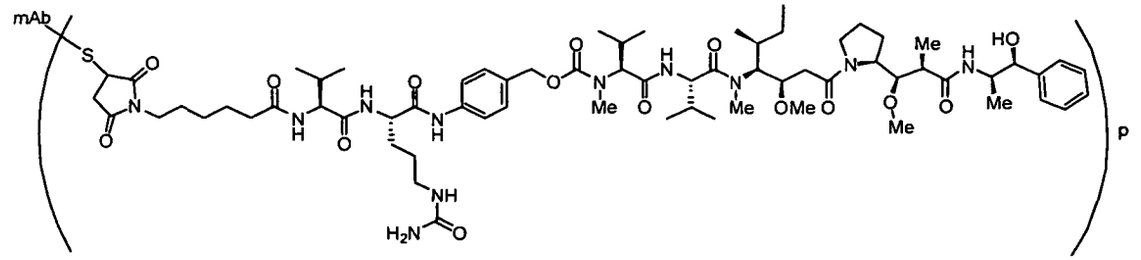
下標w係0至12之整數；

Y係間隔體單元；且

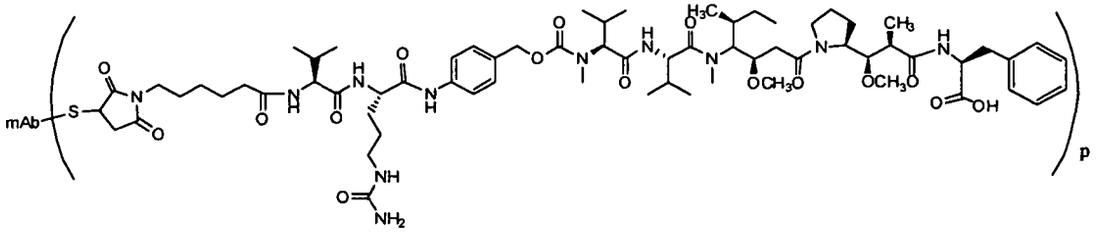
下標y係0、1或2。

4. 如請求項3之配體藥物結合物，其中W_w係纈胺酸-瓜胺酸。

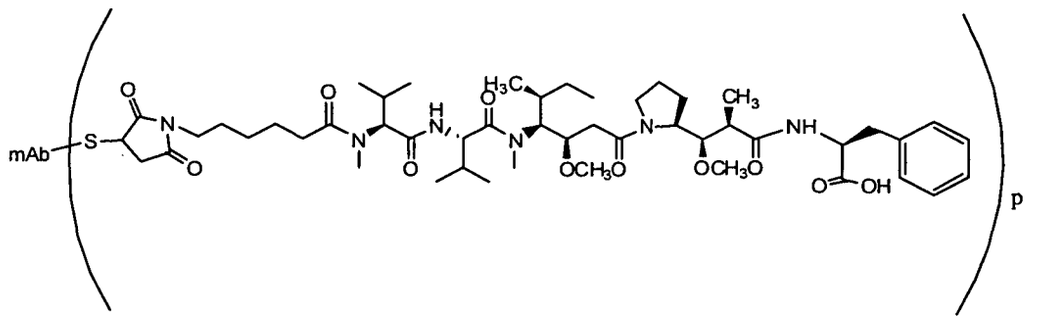
5. 如請求項1之配體藥物結合物，其具有下式：



，



，或



或其醫藥上可接受之鹽形式，其中：

mAb係該抗DR5抗體；

S係該抗體之硫原子；且

p係1至8之整數。

6. 如請求項1之配體藥物結合物，其中該抗DR5抗體包含含有SEQ ID NO:9之胺基酸殘基1至122的重鏈可變區及包含SEQ ID NO:10之胺基酸殘基1至114的輕鏈可變區。

7. 如請求項1之配體藥物結合物，其中該抗DR5抗體包含由SEQ ID NO:9之胺基酸殘基1至452組成的重鏈及由SEQ ID NO:10之胺基酸殘基1至219組成的輕鏈。

8. 如請求項1之配體藥物結合物，其中該抗DR5抗體包含由SEQ ID NO:9之胺基酸殘基1至451組成的重鏈及由SEQ ID NO:10之胺基酸殘基1至219組成的輕鏈。

9. 如請求項1之配體藥物結合物，其中p係1至8。

10. 一種醫藥組合物，其包含如請求項1至9中任一項之配體藥物結合物與醫藥上可接受之賦形劑的混合物。

11. 一種組合物，其包含如請求項1至9中任一項之配體藥物結合物之混合物，其中平均p值介於1與20之間。

12. 如請求項11之組合物，其中該平均p值係約3.5至約4.5。

13. 一種抗腫瘤劑，其包含如請求項1至9中任一項之配體藥物結合物作爲有效成份。

14. 一種如請求項1至9中任一項之配體藥物結合物之用途，其用於製造用以治療表現DR5蛋白質之癌症之藥劑。

15. 如請求項14之用途，其中該表現DR5蛋白質之癌症係選自由下列組成之群：黑色素瘤、結腸直腸癌、非小細胞肺癌、子宮癌、胰臟癌、前列腺癌、乳癌、卵巢癌及血液癌症。

16. 如請求項15之用途，其中該表現DR5蛋白質之癌症係胰臟癌。

17. 如請求項15之用途，其中該表現DR5蛋白質之癌症係黑色素瘤。

18. 如請求項15之用途，其中該表現DR5蛋白質之癌症係乳癌。

19. 如請求項15之用途，其中該表現DR5蛋白質之癌症係卵巢癌。

20. 如請求項15之用途，其中該表現DR5蛋白質之癌症係結腸直腸癌。

21. 如請求項15之用途，其中該表現DR5蛋白質之癌症係腎癌。

22. 如請求項15之用途，其中該表現DR5蛋白質之癌症係膠質母細胞瘤。

圖式

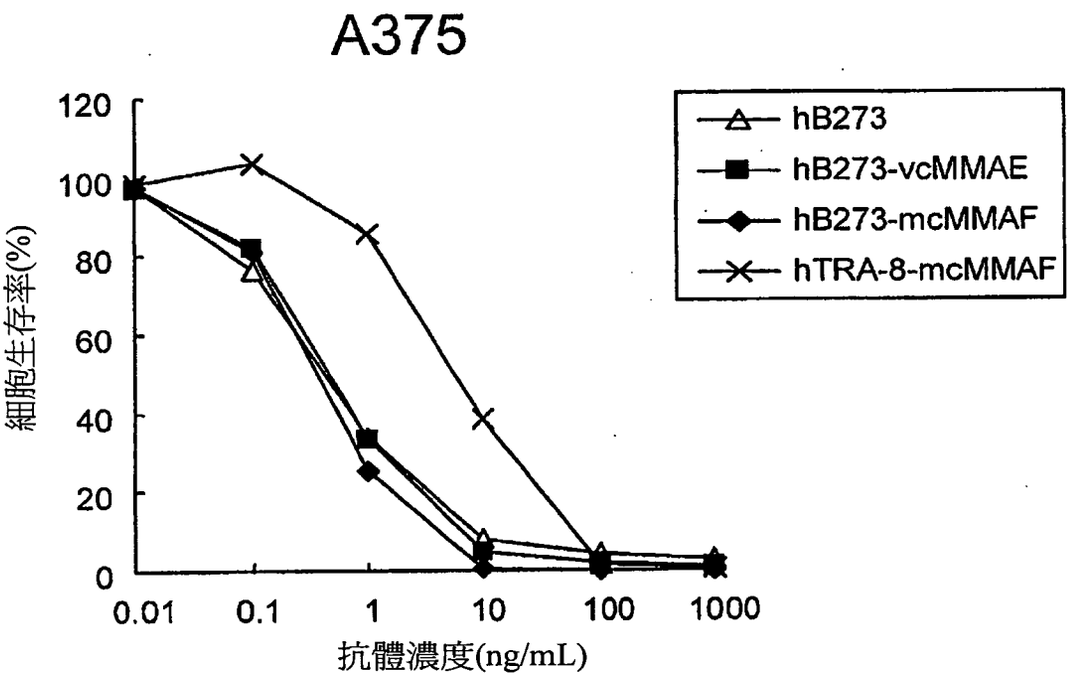

A375
120
100
80
60
40
20
0
細胞生存率(%)
0.01
0.1
1
10
100
1000
抗體濃度(ng/mL)
hB273
hB273-vcMMAE
hB273-mcMMAF
hTRA-8-mcMMAF

圖 1

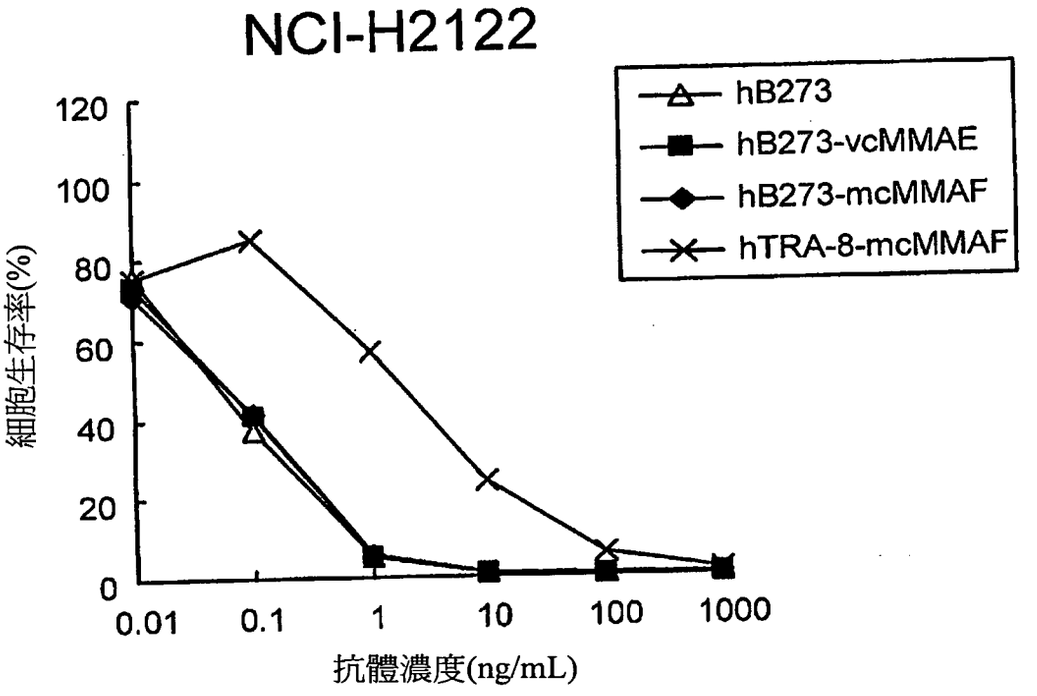

NCI-H2122
hB273
hB273-vcMMAE
hB273-mcMMAF
hTRA-8-mcMMAF
細胞生存率(%)
120
100
80
60
40
20
0
0.01
0.1
1
10
100
1000
抗體濃度(ng/mL)

圖 2

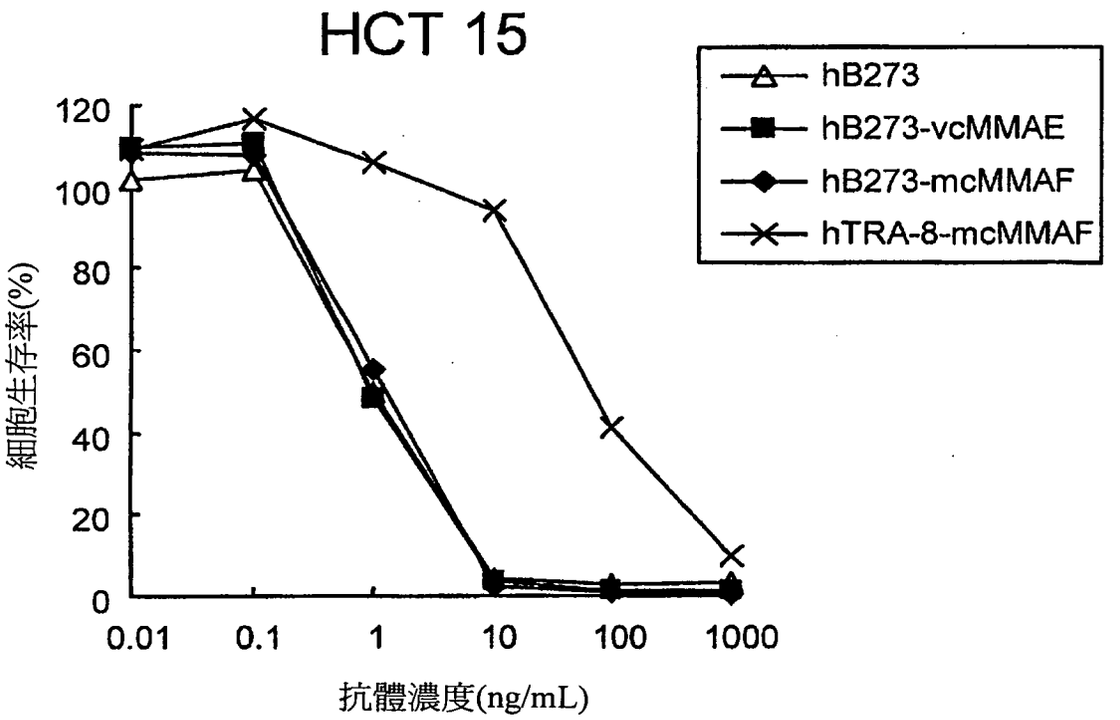

HCT 15
hB273
hB273-vcMMAE
hB273-mcMMAF
hTRA-8-mcMMAF
細胞生存率(%)
120
100
80
60
40
20
0
0.01
0.1
1
10
100
1000
抗體濃度(ng/mL)

圖 3

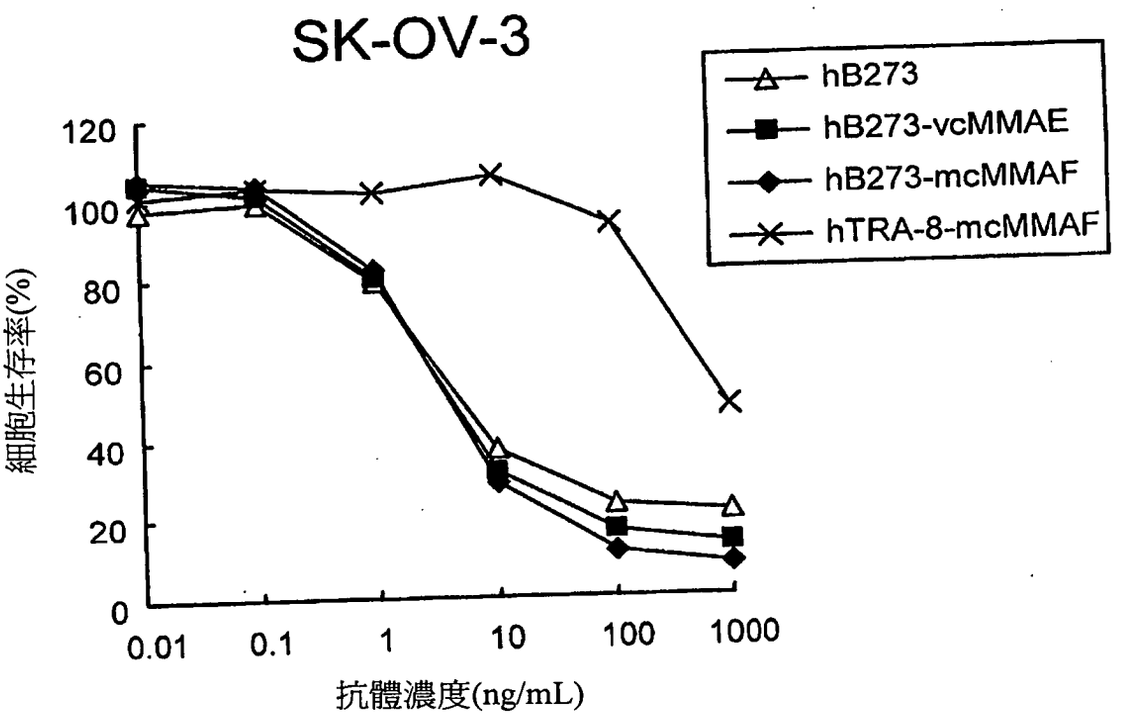

SK-OV-3
hB273
hB273-vcMMAE
hB273-mcMMAF
hTRA-8-mcMMAF
細胞生存率(%)
120
100
80
60
40
20
0
0.01
0.1
1
10
100
1000
抗體濃度(ng/mL)

圖 4

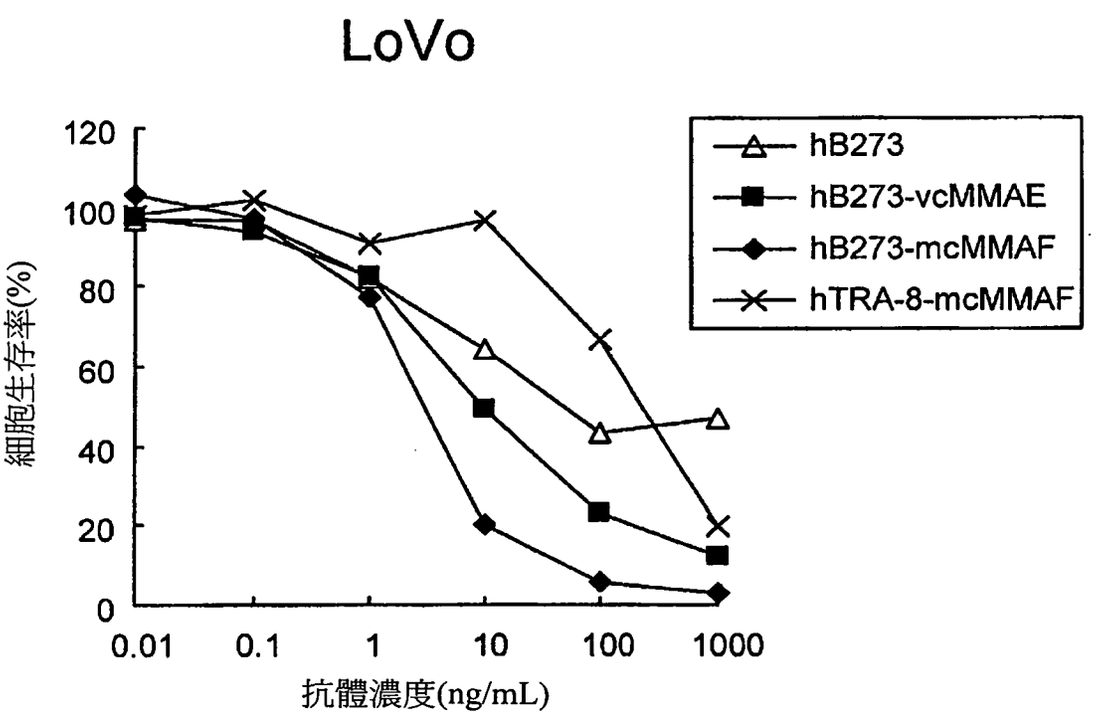

LoVo
120
100
80
60
40
20
0
細胞生存率(%)
0.01
0.1
1
10
100
1000
抗體濃度(ng/mL)
hB273
hB273-vcMMAE
hB273-mcMMAF
hTRA-8-mcMMAF

圖 5

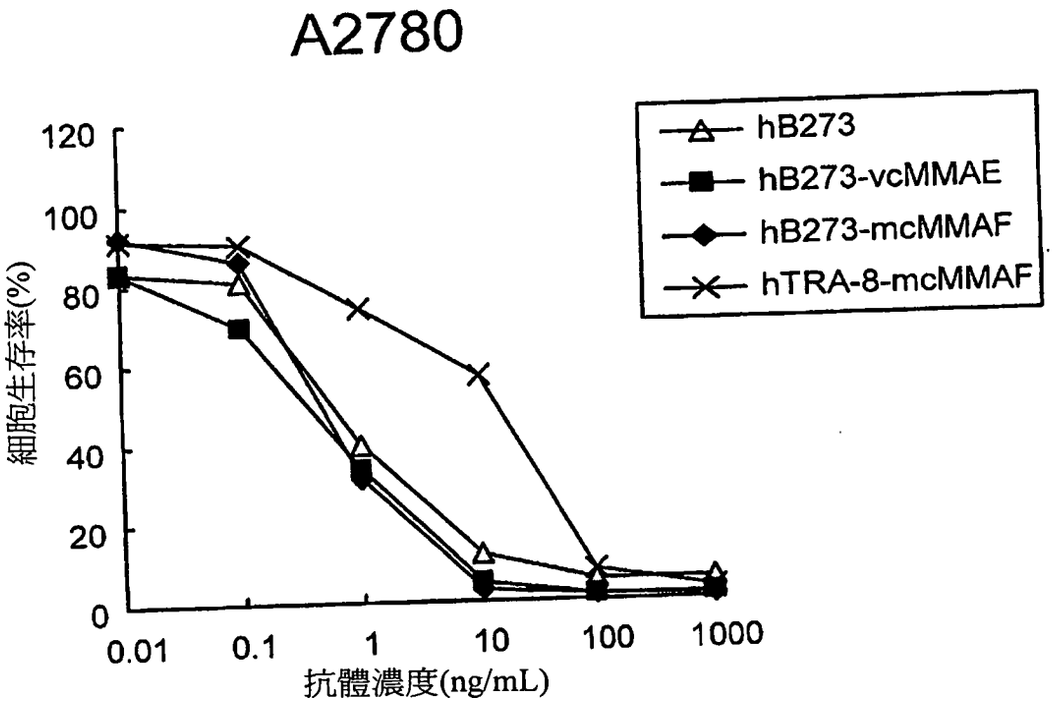

A2780
hB273
hB273-vcMMAE
hB273-mcMMAF
hTRA-8-mcMMAF
細胞生存率(%)
120
100
80
60
40
20
0
0.01
0.1
1
10
100
1000
抗體濃度(ng/mL)

圖 6

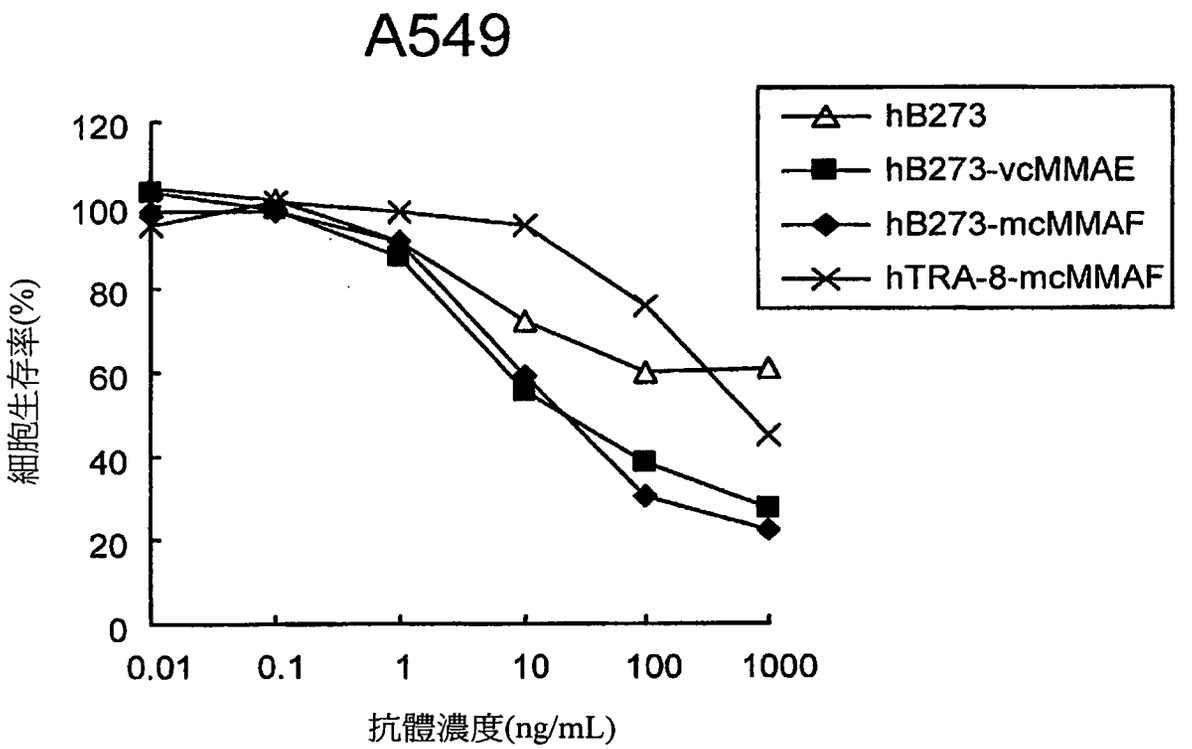

A549
hB273
hB273-vcMMAE
hB273-mcMMAF
hTRA-8-mcMMAF
細胞生存率(%)
120
100
80
60
40
20
0
0.01
0.1
1
10
100
1000
抗體濃度(ng/mL)

圖 7

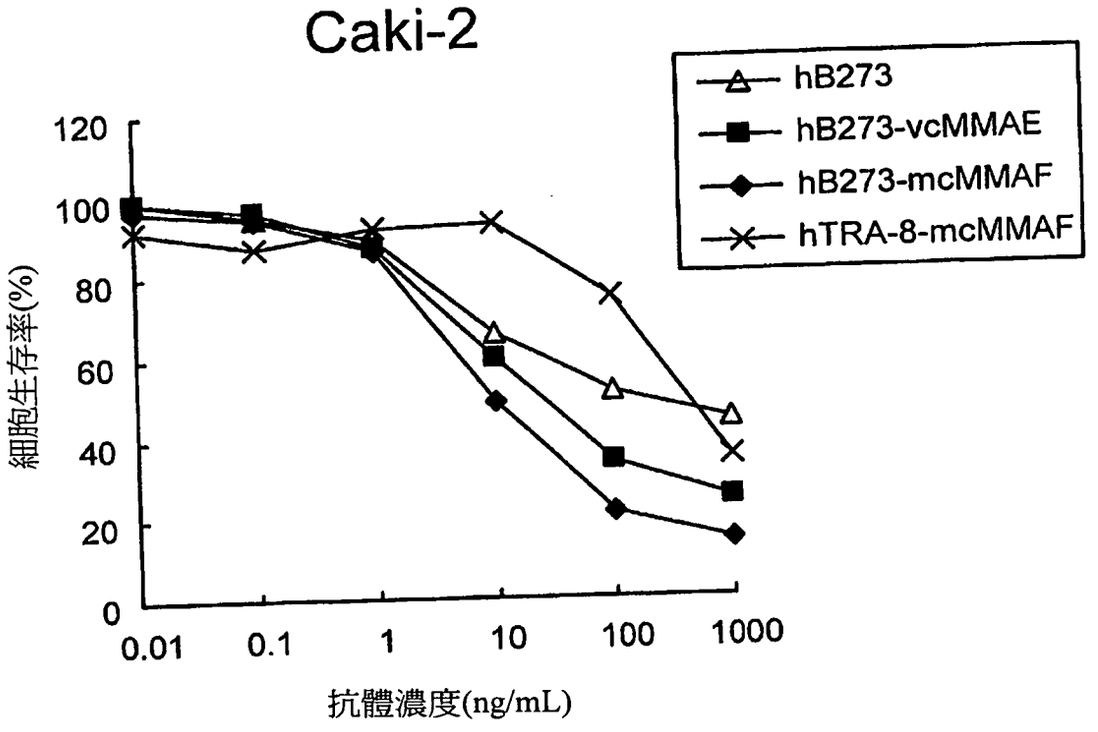

Caki-2
hB273
hB273-vcMMAE
hB273-mcMMAF
hTRA-8-mcMMAF
120
100
80
60
40
20
0
細胞生存率(%)
0.01
0.1
1
10
100
1000
抗體濃度(ng/mL)

圖 8

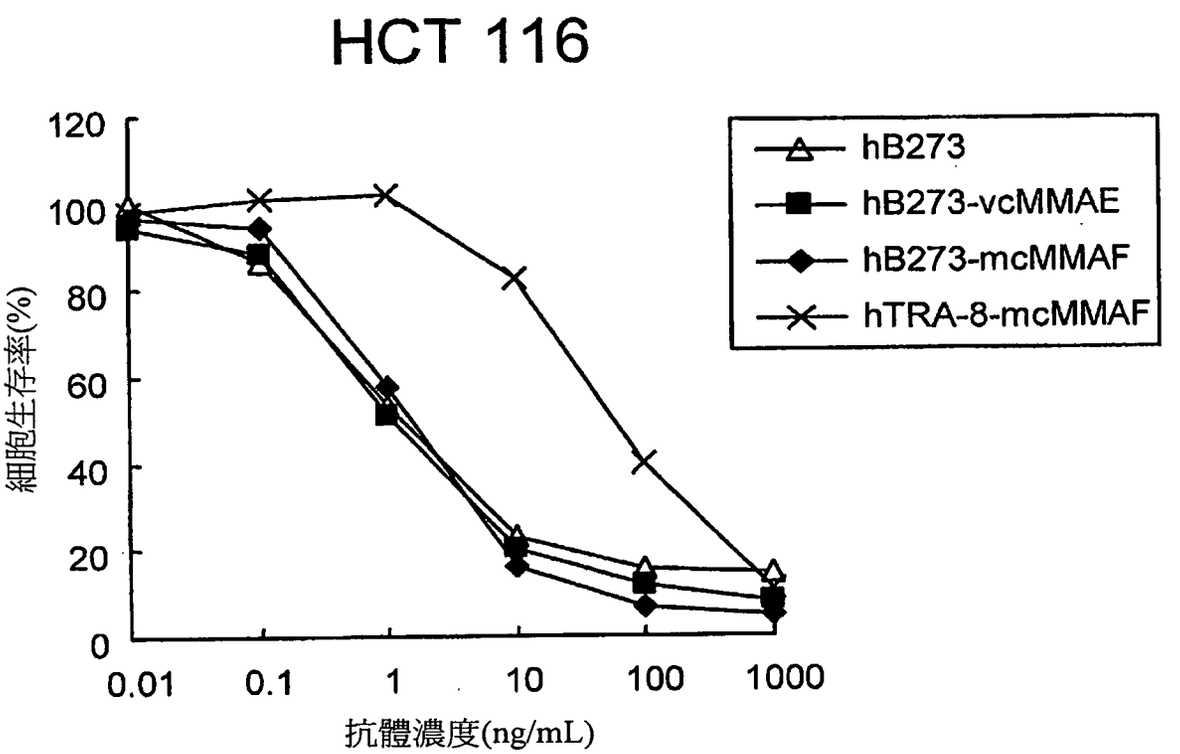

HCT 116
120
100
80
60
40
20
0
細胞生存率(%)
0.01
0.1
1
10
100
1000
抗體濃度(ng/mL)
hB273
hB273-vcMMAE
hB273-mcMMAF
hTRA-8-mcMMAF

圖 9

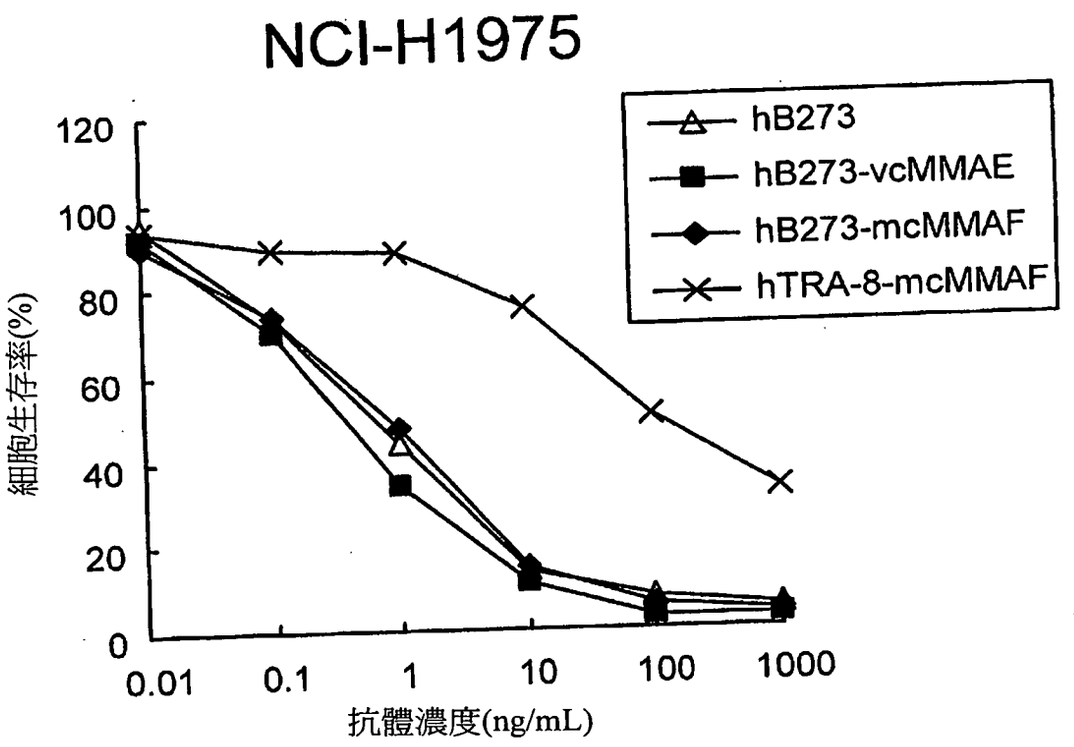

NCI-H1975
hB273
hB273-vcMMAE
hB273-mcMMAF
hTRA-8-mcMMAF
細胞生存率(%)
120
100
80
60
40
20
0
0.01
0.1
1
10
100
1000
抗體濃度(ng/mL)

圖 10

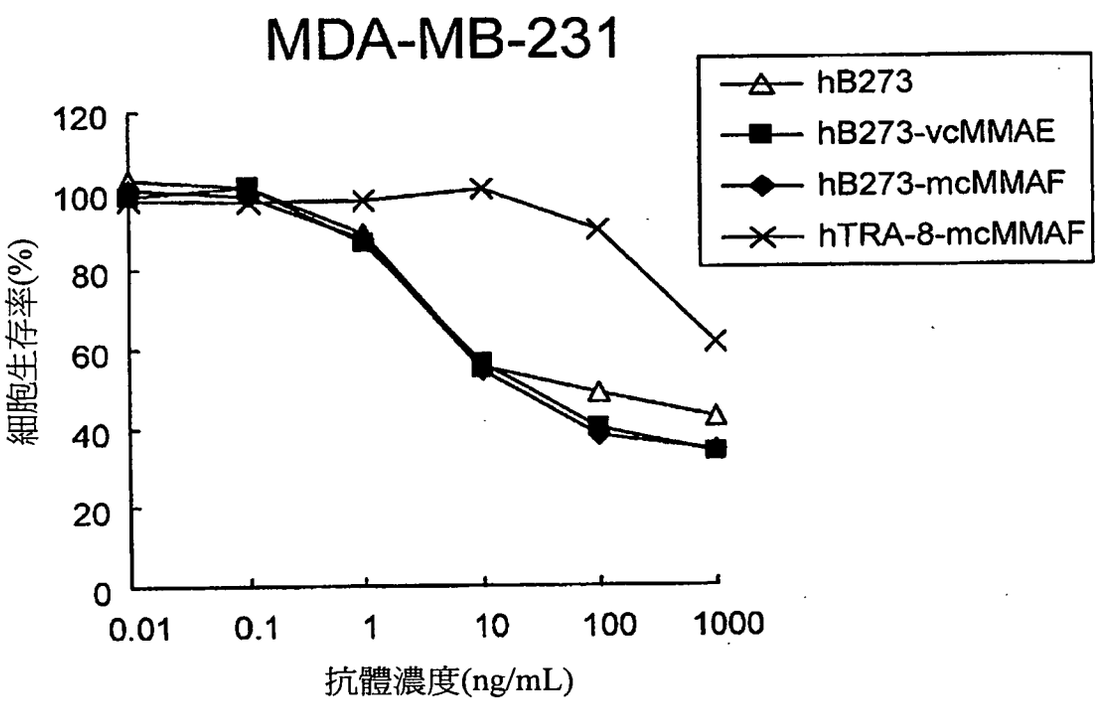

MDA-MB-231
hB273
hB273-vcMMAE
hB273-mcMMAF
hTRA-8-mcMMAF
細胞生存率(%)
120
100
80
60
40
20
0
0.01
0.1
1
10
100
1000
抗體濃度(ng/mL)

圖 11

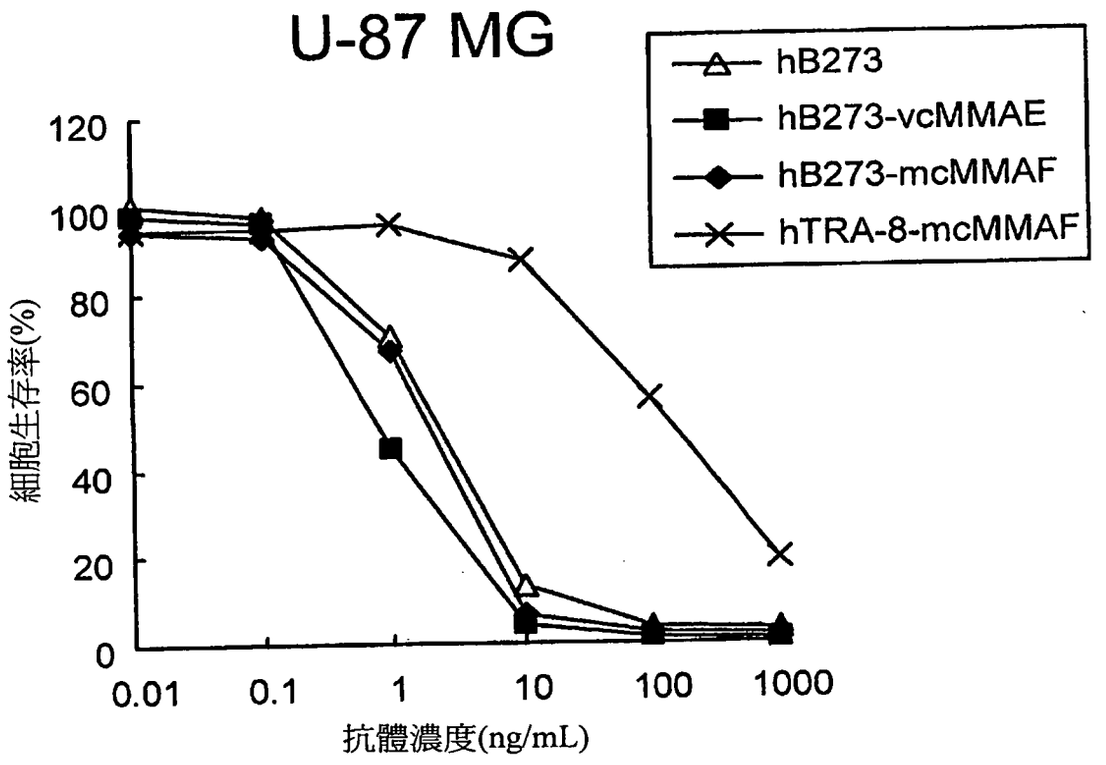

U-87 MG
hB273
hB273-vcMMAE
hB273-mcMMAF
hTRA-8-mcMMAF
細胞生存率(%)
120
100
80
60
40
20
0
0.01
0.1
1
10
100
1000
抗體濃度(ng/mL)

圖 12

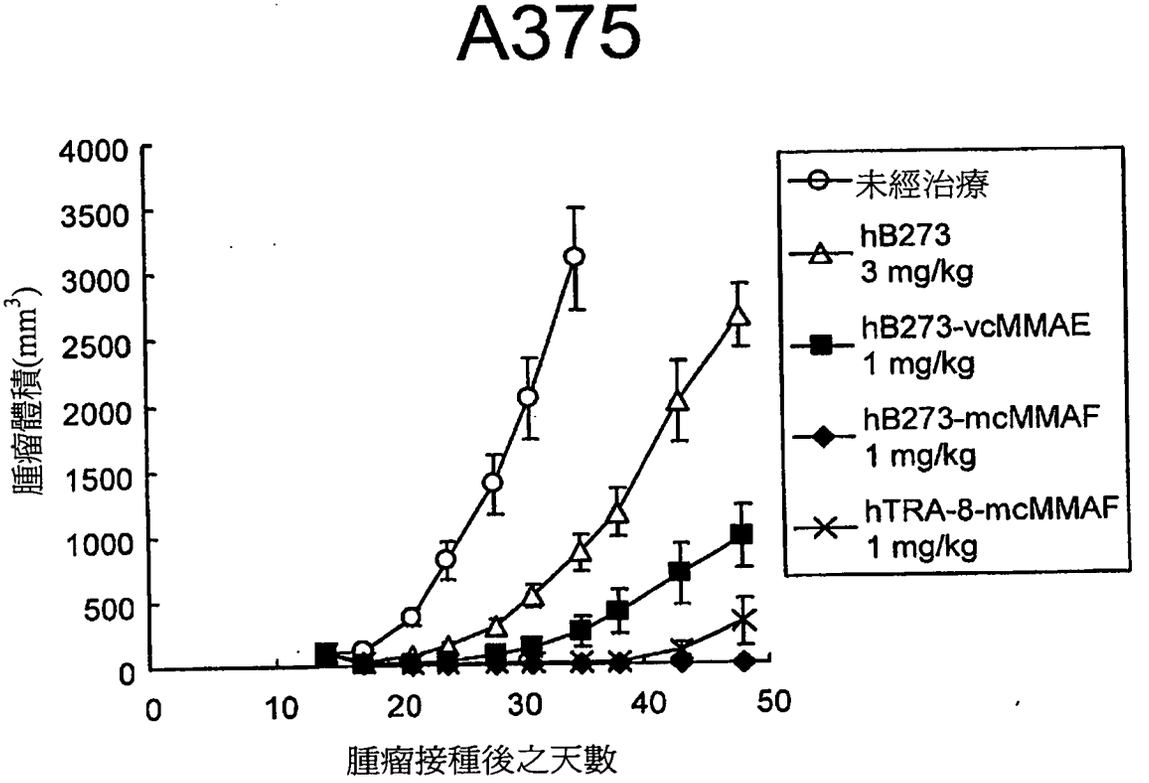

A375
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
腫瘤體積(mm3)
0
10
20
30
40
50
腫瘤接種後之天數
未經治療
hB273
3 mg/kg
hB273-vcMMAE
1 mg/kg
hB273-mcMMAF
1 mg/kg
hTRA-8-mcMMAF
1 mg/kg

圖 13

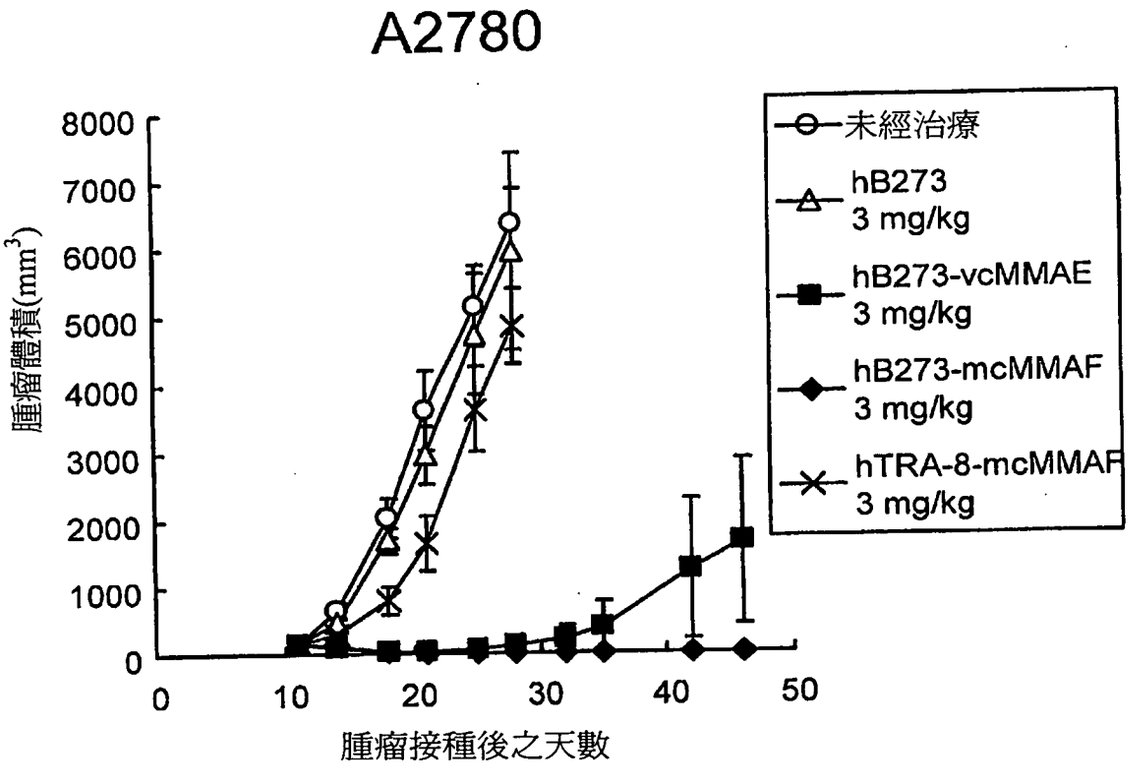

A2780
腫瘤體積(mm3)
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
0
10
20
30
40
50
腫瘤接種後之天數
未經治療
hB273
3 mg/kg
hB273-vcMMAE
3 mg/kg
hB273-mcMMAF
3 mg/kg
hTRA-8-mcMMAF
3 mg/kg

圖 14

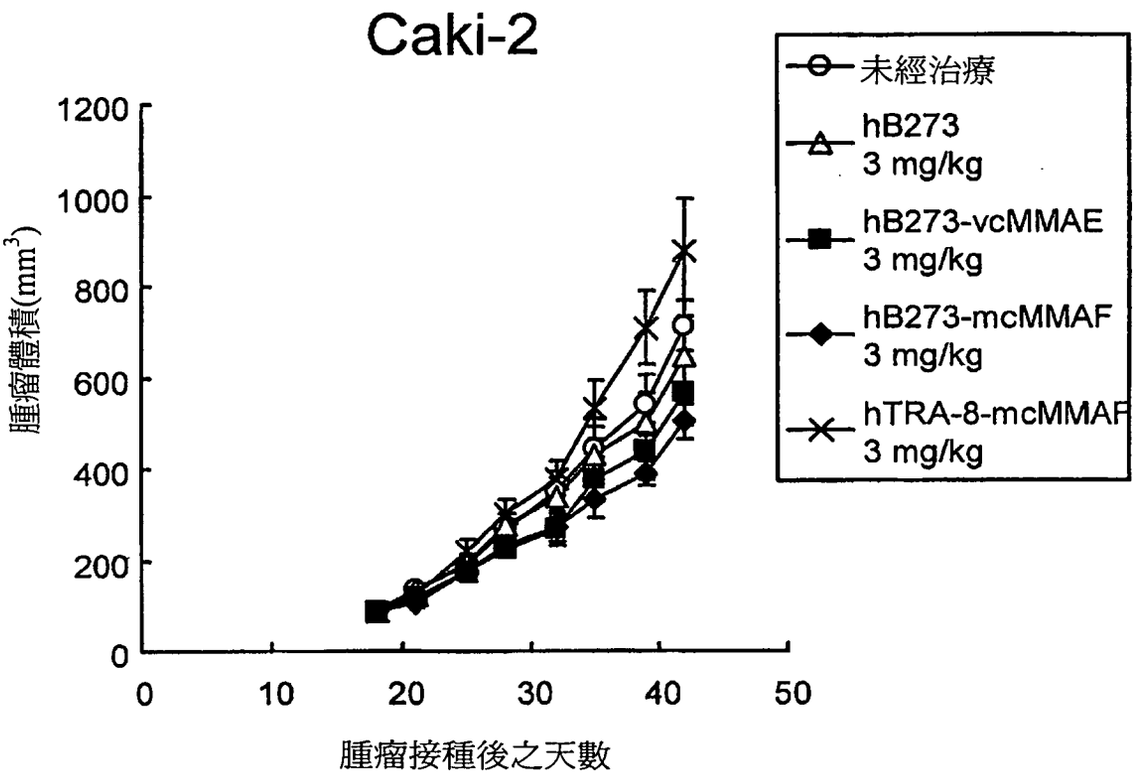

Caki-2
腫瘤體積(mm3)
1200
1000
800
600
400
200
0
0
10
20
30
40
50
腫瘤接種後之天數
未經治療
hB273
3 mg/kg
hB273-vcMMAE
3 mg/kg
hB273-mcMMAF
3 mg/kg
hTRA-8-mcMMAF
3 mg/kg

圖 15

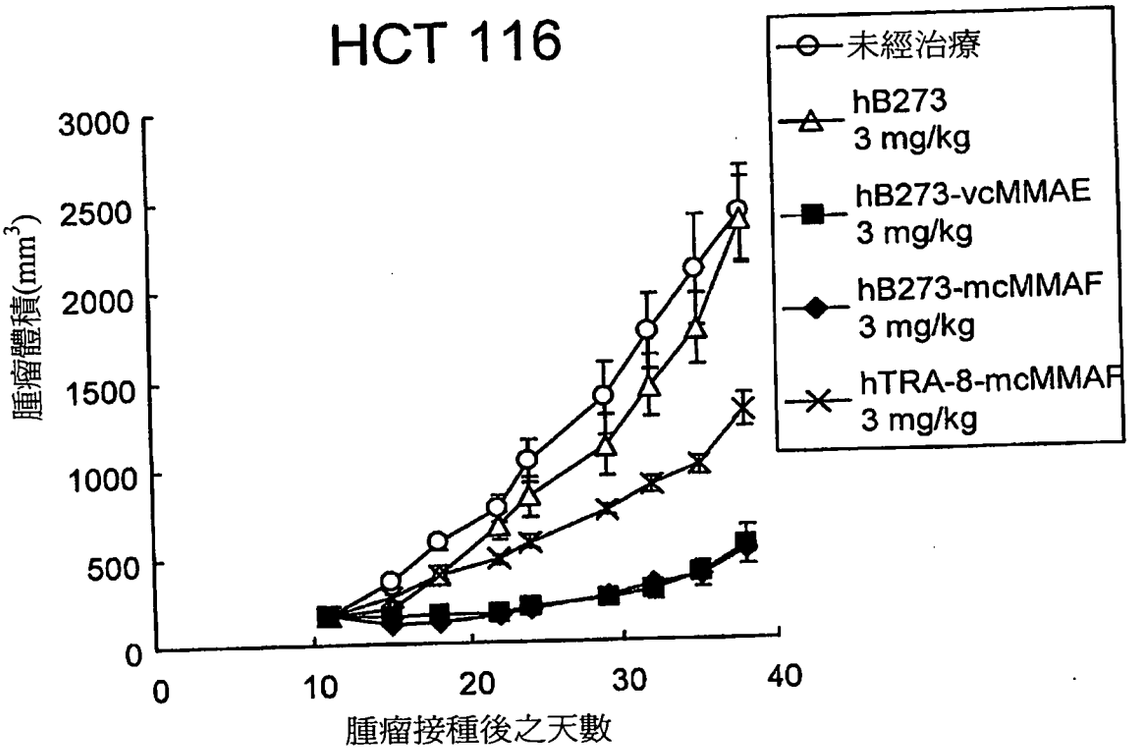

HCT 116
未經治療
hB273
3 mg/kg
hB273-vcMMAE
3 mg/kg
hB273-mcMMAF
3 mg/kg
hTRA-8-mcMMAF
3 mg/kg
腫瘤體積(mm3)
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
0
10
20
30
40
腫瘤接種後之天數

圖 16

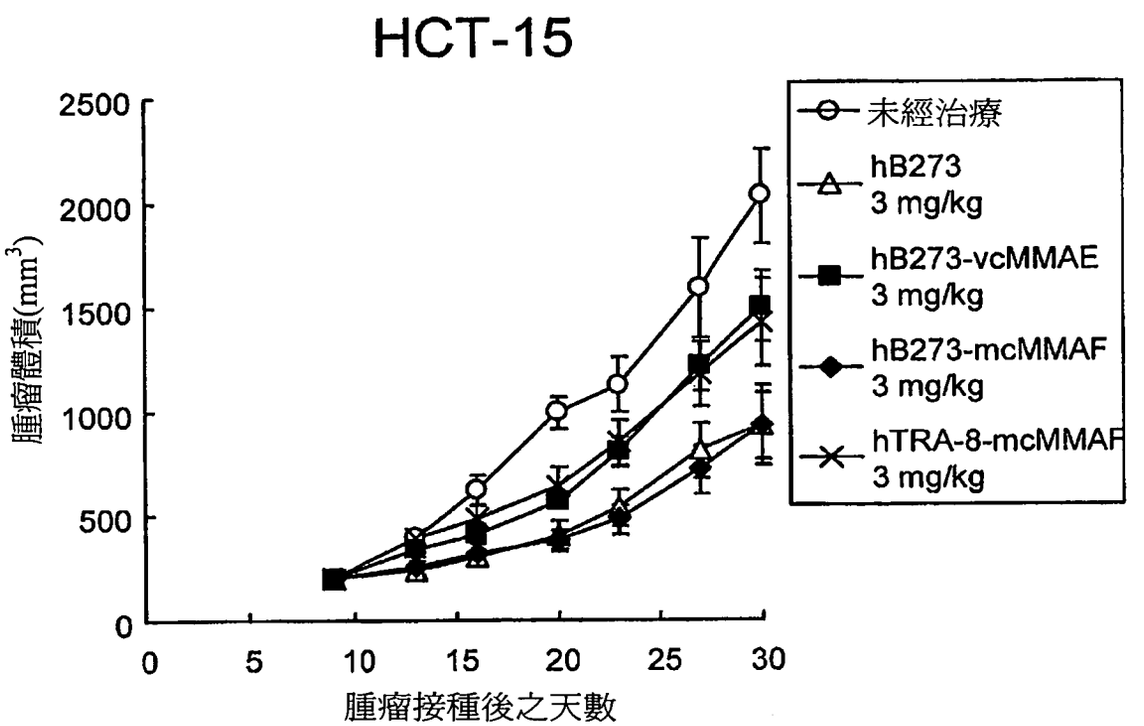

HCT-15
腫瘤體積(mm3)
2500
2000
1500
1000
500
0
0
5
10
15
20
25
30
腫瘤接種後之天數
未經治療
hB273
3 mg/kg
hB273-vcMMAE
3 mg/kg
hB273-mcMMAF
3 mg/kg
hTRA-8-mcMMAF
3 mg/kg

圖 17

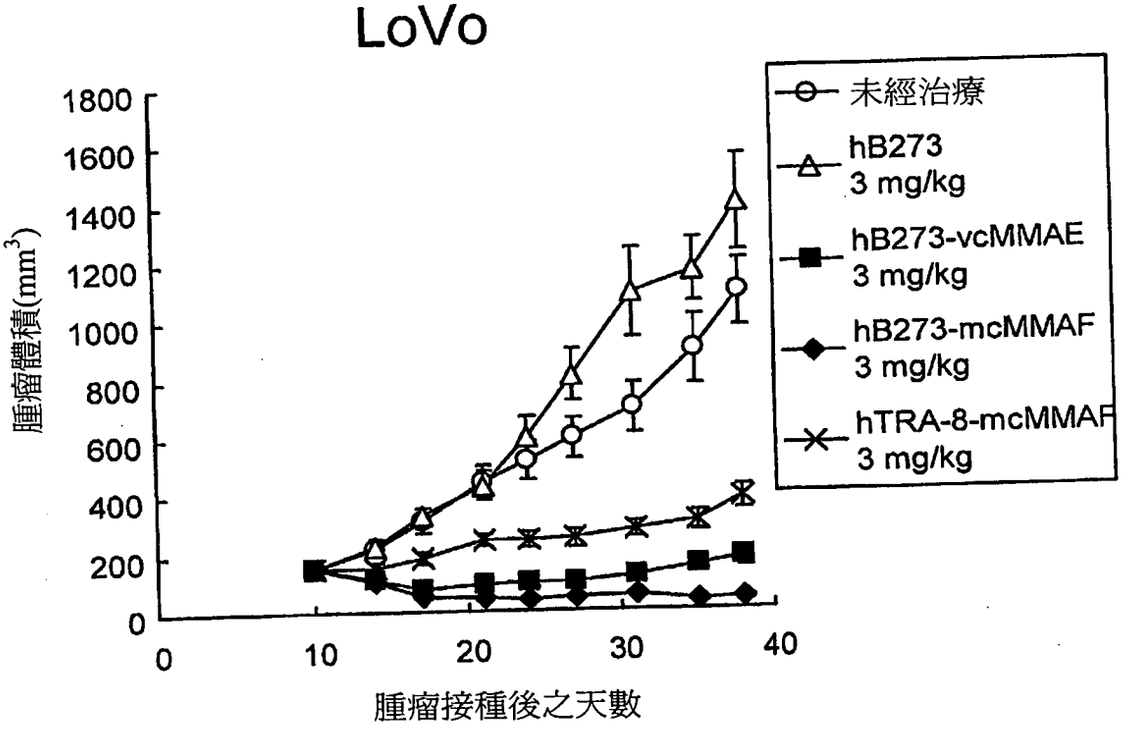

LoVo
腫瘤體積(mm3)
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
0
10
20
30
40
腫瘤接種後之天數
未經治療
hB273
3 mg/kg
hB273-vcMMAE
3 mg/kg
hB273-mcMMAF
3 mg/kg
hTRA-8-mcMMAF
3 mg/kg

圖 18

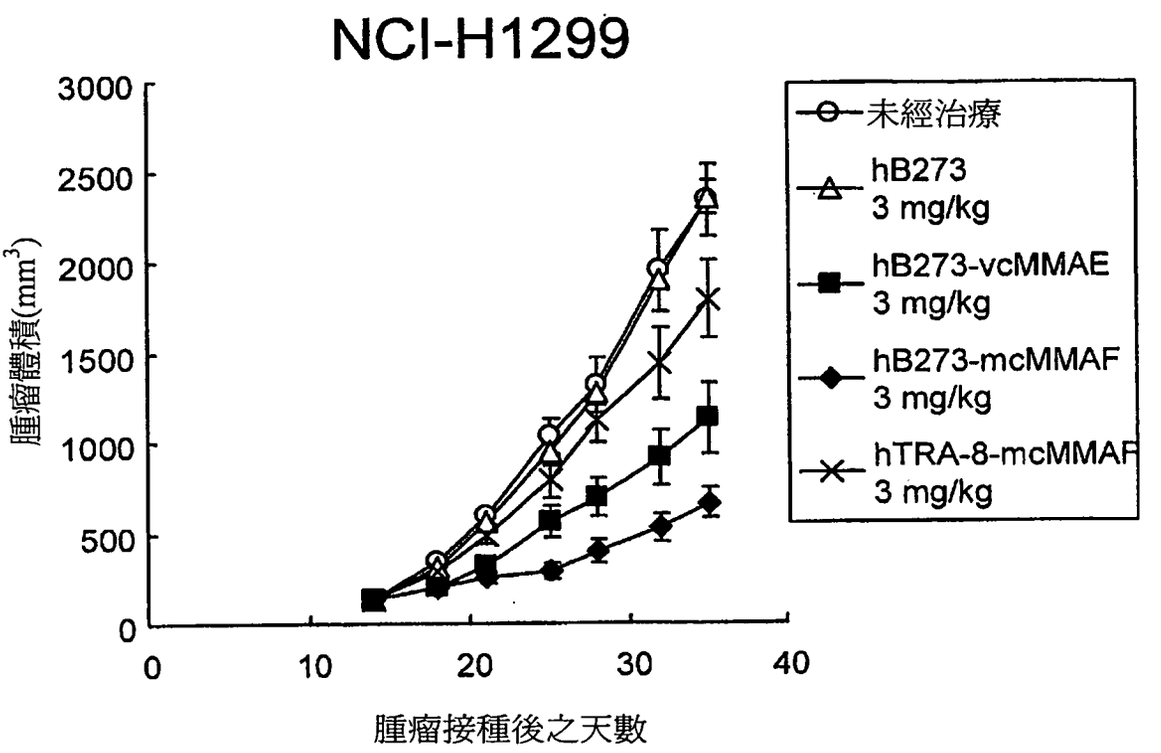

NCI-H1299
腫瘤體積(mm3)
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
0
10
20
30
40
腫瘤接種後之天數
未經治療
hB273
3 mg/kg
hB273-vcMMAE
3 mg/kg
hB273-mcMMAF
3 mg/kg
hTRA-8-mcMMAF
3 mg/kg

圖 19

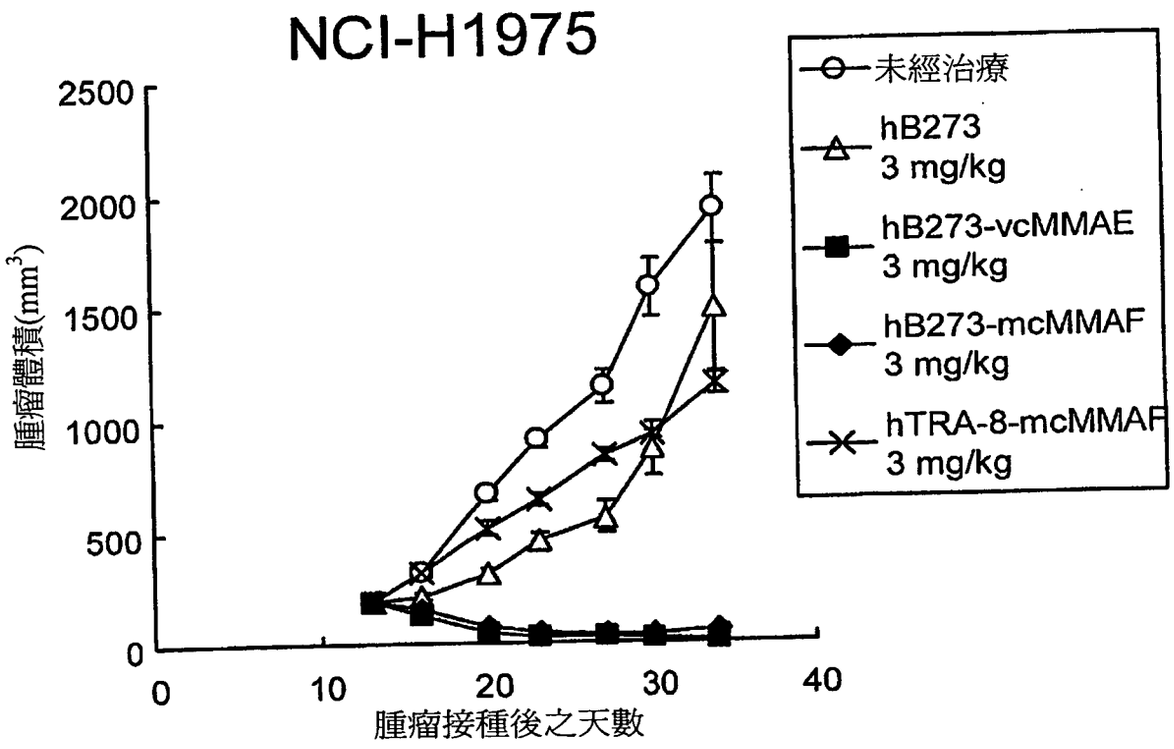

NCI-H1975
腫瘤體積(mm3)
2500
2000
1500
1000
500
0
0
10
20
30
40
腫瘤接種後之天數
未經治療
hB273
3 mg/kg
hB273-vcMMAE
3 mg/kg
hB273-mcMMAF
3 mg/kg
hTRA-8-mcMMAF
3 mg/kg

圖 20

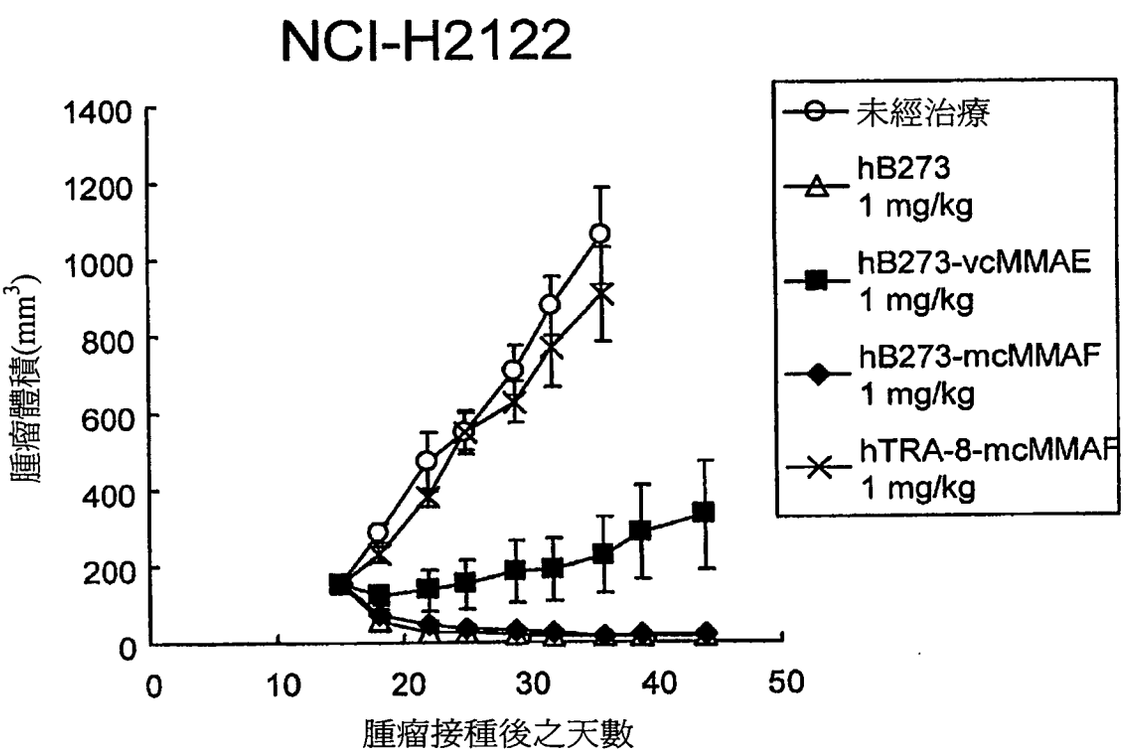

NCI-H2122
腫瘤體積(mm3)
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
0
10
20
30
40
50
腫瘤接種後之天數
未經治療
hB273
1 mg/kg
hB273-vcMMAE
1 mg/kg
hB273-mcMMAF
1 mg/kg
hTRA-8-mcMMAF
1 mg/kg

圖 21

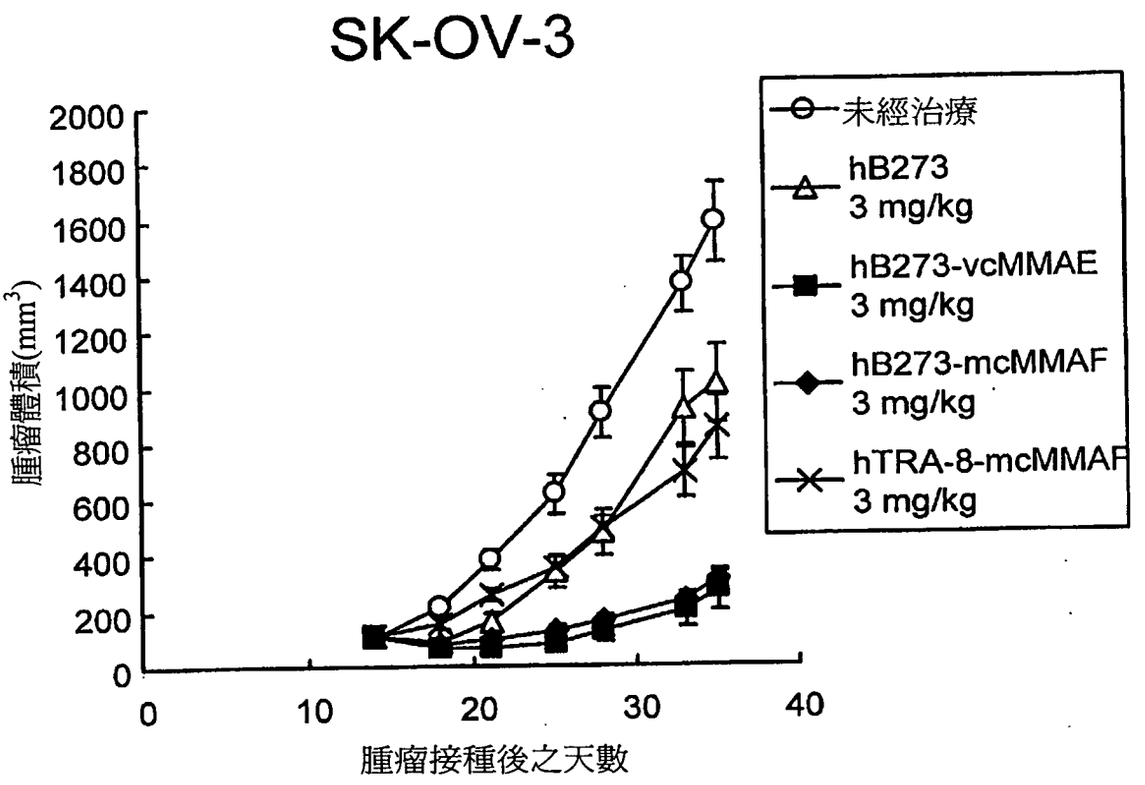

SK-OV-3
腫瘤體積(mm3)
2000
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
0
10
20
30
40
腫瘤接種後之天數
未經治療
hB273
3 mg/kg
hB273-vcMMAE
3 mg/kg
hB273-mcMMAF
3 mg/kg
hTRA-8-mcMMAF
3 mg/kg

圖 22

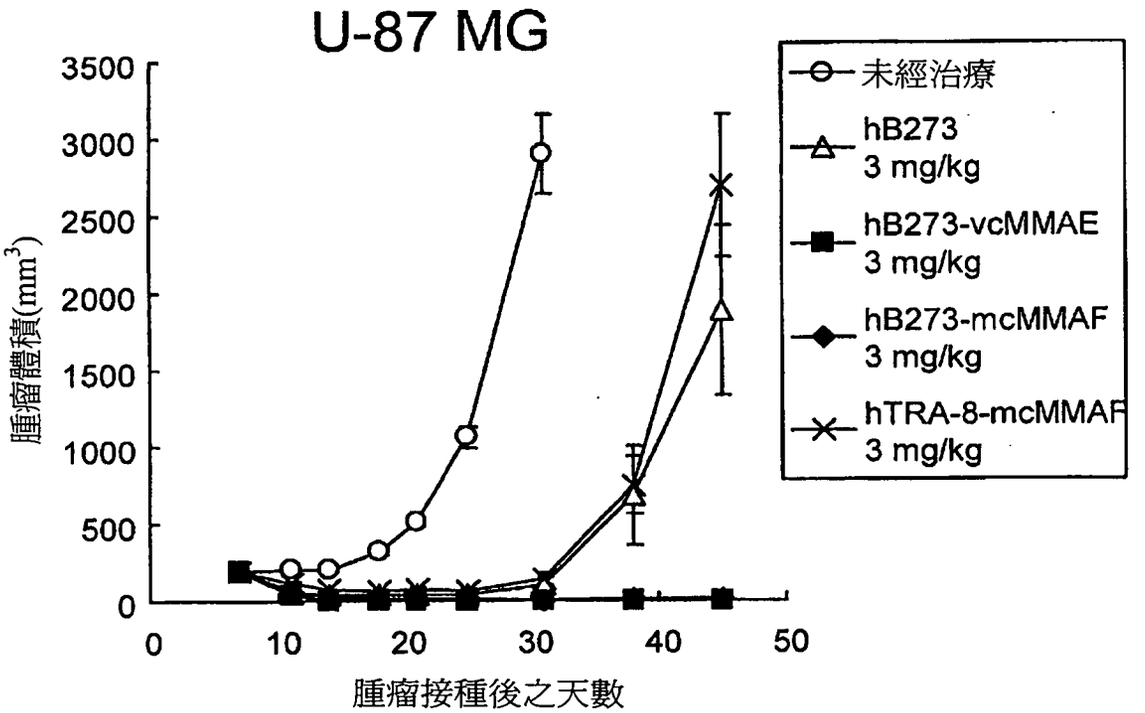

U-87 MG
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
腫瘤體積(mm3)
0
10
20
30
40
50
腫瘤接種後之天數
未經治療
hB273
3 mg/kg
hB273-vcMMAE
3 mg/kg
hB273-mcMMAF
3 mg/kg
hTRA-8-mcMMAF
3 mg/kg

圖 23