



(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 202003047 A

(43)公開日：中華民國 109 (2020) 年 01 月 16 日

(21)申請案號：108109929

(22)申請日：中華民國 108 (2019) 年 03 月 22 日

(51)Int. Cl.：

*A61K47/68 (2017.01)**A61K47/65 (2017.01)**A61P35/00 (2006.01)**C07K16/32 (2006.01)**C07K16/24 (2006.01)**C07K16/22 (2006.01)**C07K16/28 (2006.01)**C07K16/30 (2006.01)**A61K31/4375 (2006.01)**A61K31/165 (2006.01)**A61K31/22 (2006.01)**A61K31/337 (2006.01)*

(30)優先權：2018/03/23 美國

62/647,346

2018/04/16 美國

62/658,276

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

美國

(72)發明人：曹 安東尼 濤 CAO, ANTHONY TOA (US)；佳黛 席拉 珍 GARDAL, SHYRA JANE (US)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：33 項 圖式數：22 共 91 頁

(54)名稱

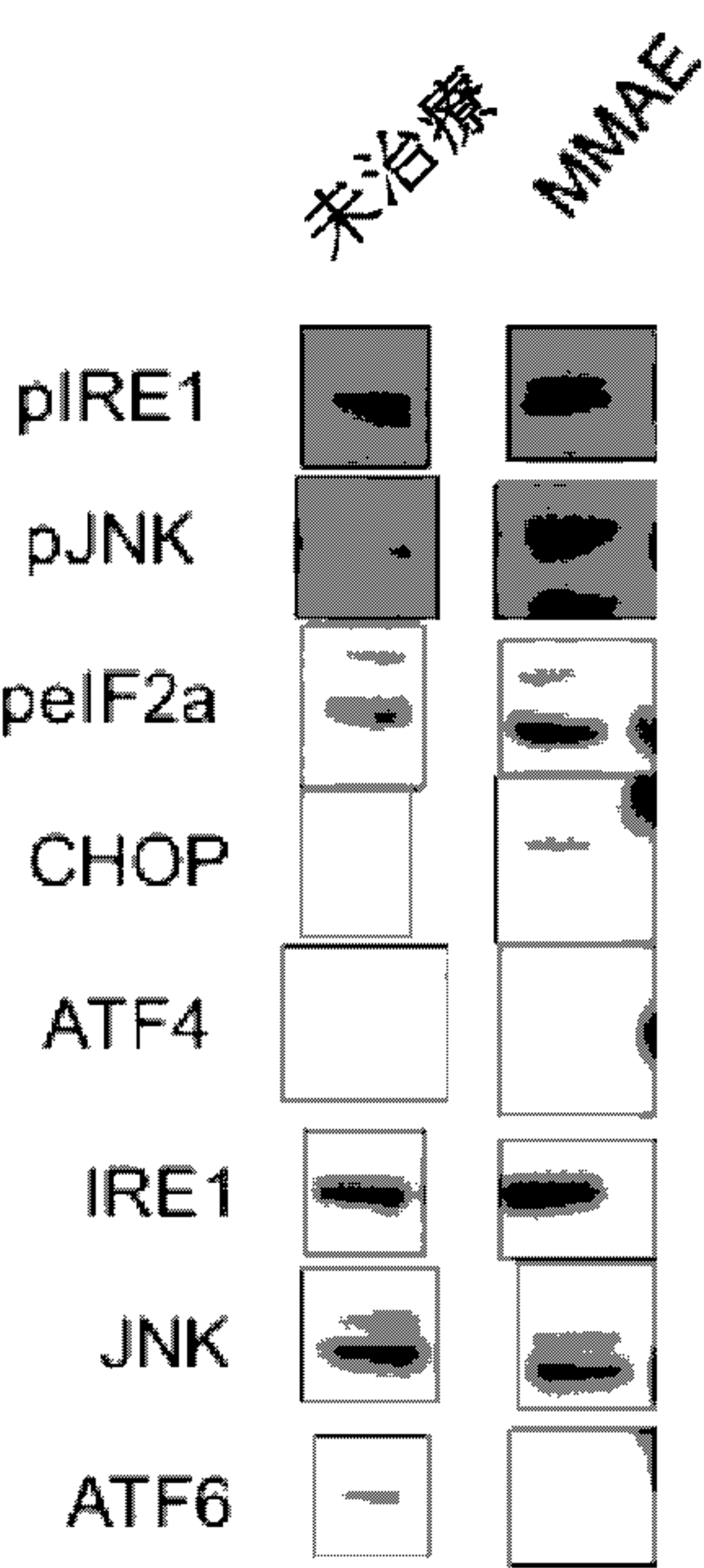
包括微管蛋白破壞劑之抗體藥物結合物治療實體腫瘤之用途

(57)摘要

本發明大體上係關於用於治療實體腫瘤之方法，其包括投予藥物-連接子-抗體結合物，其中所述藥物為微管蛋白破壞劑。

The present disclosure, relates, in general to methods for treating solid tumors comprising administering a drug-linker-antibody conjugate, wherein the drug is a tubulin disrupting agent.

指定代表圖：



【圖1A】



202003047

【發明摘要】

【中文發明名稱】

包括微管蛋白破壞劑之抗體藥物結合物治療實體腫瘤之用途

【英文發明名稱】

USE OF ANTIBODY DRUG CONJUGATES COMPRISING
TUBULIN DISRUPTING AGENTS TO TREAT SOLID TUMOR

【中文】

本發明大體上係關於用於治療實體腫瘤之方法，其包括投予藥物-連接子-抗體結合物，其中所述藥物為微管蛋白破壞劑。

【英文】

The present disclosure, relates, in general to methods for treating solid tumors comprising administering a drug-linker-antibody conjugate, wherein the drug is a tubulin disrupting agent.

【指定代表圖】

圖1A

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

包括微管蛋白破壞劑之抗體藥物結合物治療實體腫瘤之用途

【英文發明名稱】

USE OF ANTIBODY DRUG CONJUGATES COMPRISING
TUBULIN DISRUPTING AGENTS TO TREAT SOLID TUMOR

【技術領域】

【0001】 本發明大體上係關於治療實體腫瘤之方法，其包括投予藥物-連接子單元-抗體結合物治療，其中所述藥物為微管蛋白破壞劑。

【先前技術】

【0002】 微管為涉及許多細胞過程(諸如細胞分裂與細胞轉運)之重要異二聚體結構。微管之破壞誘導G2/M相之細胞週期停滯。微管/微管蛋白抑制劑可以根據其作用機制分為兩大類：促進微管蛋白聚合與穩定微管結構之試劑(例如太平洋紫杉醇)及抑制微管蛋白聚合與使微管結構不穩定之試劑(諸如類美登素(maytansinoids)、奧瑞他汀(auristatins)、長春鹼(vinblastine)與長春新鹼(vincristine))(Chen等人，《分子(Molecular)》22：1281，2017)。

【0003】 微管蛋白破壞劑諸如MMAE已用於白血病之抗體藥物結合物上。例如，貝倫妥單抗維多汀(Brentuximab vedotin)為由抗CD30單株抗體組成之抗體-藥物結合物，所述抗CD30單株抗體藉由蛋白酶可裂解連接子結合到微管破壞劑、單甲基奧瑞他汀E。貝倫妥單抗維多汀已經被批准用於治療在自體幹細胞移植(ASCT)失敗之後或在至少2種先前的多試劑化療方案失敗之後的經典霍奇金(Hodgkin)淋巴瘤患者，所述患者不為

ASCT候選者，並且被批准用於治療處於復發/進展風險增加的霍奇金淋巴瘤患者的ASCT後鞏固。參見ADCETRIS®(貝倫妥單抗維多汀)US處方資訊及ADCETRIS®(貝倫妥單抗維多汀)EU產品特徵概述。其亦被批准用於在至少一種先前之多試劑化療方案失敗後之系統性間變性大細胞淋巴瘤。抗CD30 MMAE ADC尚未顯示在實體腫瘤中有效。

【發明內容】

【0004】 本發明提供了用於治療實體腫瘤之改進方法，其包括投予包括微管蛋白破壞劑之抗體藥物結合物。本文揭示了微管蛋白破壞劑影響實體腫瘤細胞中之ER應激蛋白路徑並誘導ATP分泌與其他ER應激現象，其誘導免疫細胞遷移至腫瘤部位並減少腫瘤生長。

【0005】 本文提供了一種用於治療實體腫瘤之方法，所述方法包括以有效治療實體腫瘤之量向有需要之受試者投予具有下式的抗體藥物結合劑：藥物-連接子單元-抗體(D-LU-Ab)，其中D為微管蛋白破壞劑。

【0006】 亦提供了一種用於調節實體腫瘤中ATP釋放之方法，所述方法包括以有效誘導實體腫瘤中細胞凋亡之量投予具有下式之抗體藥物結合劑：藥物-連接子單元-抗體(D-LU-Ab)，其中D為微管蛋白破壞劑。

【0007】 本發明進一步考慮的為一種誘導免疫細胞遷移至實體腫瘤之方法，所述方法包括以有效誘導免疫細胞浸潤至實體腫瘤中之量向有需要之受試者投予具有下式的抗體藥物結合劑：藥物-連接子單元-抗體(D-LU-Ab)，其中D為微管蛋白破壞劑。

【0008】 在另一態樣中，本發明提供了一種用於誘導實體腫瘤中免疫原性細胞死亡(ICD)之方法，所述方法包括以有效誘導實體腫瘤中免疫原性細胞死亡之量向有需要之受試者投予具有下式的抗體藥物結合劑：藥

物-連接子單元-抗體(D-LU-Ab)，其中D為微管蛋白破壞劑。

【0009】 應理解，藥物-連接子單元-抗體(D-LU-Ab)在本文中亦可稱為抗體藥物結合物或ADC。

【0010】 在各種實施例中，抗體與癌細胞表面上之抗原結合。在各種實施例中，抗體對以下具有特異性：CD30、CD19、CD70、CD71、CD20、CD52、CD133、EGFR、HER2、VEGF、VEGFR2、PD-1、PDL1、RANKL、CTLA-4、IL-6、SLAMF7、CD3、TNF- α 、PDGFR- α 、CD38、GD2、cCLB8、p97、連接素-4或EpCAM。

【0011】 在各種實施例中，微管蛋白破壞劑增加ER應激蛋白路徑、增加ATP分泌並增加高遷移率族盒1(HMGB1)蛋白。

【0012】 在各種實施例中，微管蛋白破壞劑選自由以下組成之群：奧瑞他汀、特吡萊辛(tubulysin)、秋水仙鹼(colchicine)、長春花生物鹼(vinca alkaloid)、紫杉烷(taxane)、克瑞托欣(cryptophycin)、類美登素(maytansinoid)、哈米特林(hemiasterlin)及其他微管蛋白破壞劑。考慮用於本發明方法之例示性微管蛋白破壞劑在具體實施方式中更詳細地描述。

【0013】 在各種實施例中，微管蛋白破壞劑為選自由以下組成之群的奧瑞他汀：單甲基奧瑞他汀E(MMAE)、單甲基奧瑞他汀F(MMAF)與海兔毒素(dolostatin)-10。

【0014】 在各種實施例中，微管蛋白破壞劑為選自由以下組成之群的特吡萊辛：特吡萊辛D、特吡苯丙胺酸與妥布洛辛(tubutyrosine)。

【0015】 在各種實施例中，微管蛋白破壞劑為選自由以下組成之群的秋水仙鹼：秋水仙鹼與CA-4。

【0016】 在各種實施例中，微管蛋白破壞劑為選自由以下組成之群

的長春花生物鹼：長春鹼(VBL)、長春瑞賓(VRL)、長春新鹼(VCR)與長春地辛(VDS)。

【0017】 在各種實施例中，微管蛋白破壞劑為選自由以下組成之群的紫杉烷：太平洋紫杉醇與多烯紫杉醇(docetaxel)。

【0018】 在各種實施例中，微管蛋白破壞劑為選自由以下組成之群的克瑞托欣：克瑞托欣-1與克瑞托欣-52。

【0019】 在各種實施例中，微管蛋白破壞劑為選自由以下組成之群的類美登素：美登素、美登醇、美登素類似物、DM1、DM3與DM4及安莎黴素(ansamatin)-2。

【0020】 在各種實施例中，微管蛋白破壞劑為選自由以下組成之群的哈米特林：哈米特林與HTI-286。

【0021】 在各種實施例中，微管蛋白破壞劑為選自由以下組成之群：塔卡醯胺(taccalonolide)A、塔卡醯胺B、塔卡醯胺AF、塔卡醯胺AJ、塔卡醯胺AI-環氧化物、迪斯德莫來(discodermolide)、埃坡黴素(epothilone)A、埃坡黴素B及絡厘麥萊蒂(laulimalide)。

【0022】 在各種實施例中，實體腫瘤為選自由以下組成之群：肺癌、乳癌、卵巢癌、子宮頸癌、胃腸癌、頭頸癌、黑素瘤、肉瘤、食道癌、胰臟癌、轉移性胰臟癌、胰臟之轉移性腺癌、膀胱癌、胃癌、纖維化癌、神經膠質瘤、惡性神經膠質瘤、瀰漫性內因性腦橋神經膠質瘤、復發性兒童腦腫瘤、腎細胞癌、透明細胞轉移性腎細胞癌、腎癌、前列腺癌、轉移性去勢難治性前列腺癌、IV期前列腺癌、轉移性黑素瘤、黑素瘤、惡性黑素瘤、復發性皮膚黑素瘤、黑素瘤腦轉移、IIIA期皮膚黑素瘤；IIIB期皮膚黑素瘤、IIIC期皮膚黑素瘤；IV期皮膚黑素瘤、頭頸部惡性黑素

瘤、肺癌、非小細胞肺癌(NSCLC)、鱗狀細胞非小細胞肺癌、乳癌、復發性轉移性乳癌、肝細胞癌、里克特(richter)症候群；瓦爾登斯特倫巨球蛋白血症、成人神經膠母細胞；成人神經膠質肉瘤、復發性神經膠母細胞瘤、復發性兒童橫紋肌肉瘤、復發性尤文氏肉瘤/外周原始神經外胚層瘤、復發性神經母細胞瘤；復發性骨肉瘤、結腸直腸癌、MSI陽性結腸直腸癌；MSI陰性結腸直腸癌、鼻咽非角化癌、復發性鼻咽未分化性瘤、子宮頸腺癌；子宮頸腺鱗癌；子宮頸鱗狀細胞癌；復發性子宮頸癌；IVA期子宮頸癌；IVB期子宮頸癌；肛管鱗狀細胞癌；轉移性肛管癌；復發性肛管癌、復發性頭頸癌；頭頸部鱗狀細胞癌(HNSCC)、卵巢癌、結腸癌、胃癌、晚期GI癌、胃腺癌；胃食道交界腺癌、骨腫瘤、軟組織肉瘤；骨肉瘤、胸腺癌、尿道上皮癌、復發性梅克爾細胞癌；III期梅克爾細胞癌；IV期梅克爾細胞癌、骨髓發育不良症候群與塞紮萊(Sezary)症候群。在一個實施例中，實體腫瘤為非淋巴瘤實體腫瘤。在一些實施例中，實體腫瘤可以為多發性骨髓瘤。

【0023】 在各種實施例中，藥物-連接子單元-抗體結合物/抗體藥物結合物包括蛋白酶可裂解連接子、酸可裂解連接子或二硫化物連接子。

【0024】 在各種實施例中，蛋白酶可裂解連接子包括硫醇反應性間隔子及二肽。在各種實施例中，蛋白酶可裂解連接子由硫醇反應性馬來醯亞胺己醯基間隔子、纈胺酸-瓜胺酸二肽及對胺基-苄氧基羰基間隔子組成。

【0025】 在各種實施例中，酸可裂解連接子為胍連接子或季銨連接子。

【0026】 在各種實施例中，所述方法進一步包括向受試者投予化療

方案。

【0027】 在各種實施例中，化療方案基本上由作為組合療法之以下各者組成：小紅莓(doxorubicin)、長春鹼與達卡巴嗪(AVD)。在其他實施例中，化療方案基本上由作為組合療法之以下各者組成：環磷醯胺、長春新鹼與潑尼松(CHP)。

【0028】 在各種實施例中，抗體藥物結合物之抗體為單株抗體。在各種實施例中，抗體為人類或人源化抗體。

【0029】 在各種實施例中，抗體為抗CD30抗體且抗CD30抗體藥物結合物包括：i)SEQ ID NO: 4中列出之重鏈CDR1、SEQ ID NO: 6中列出之重鏈CDR2、SEQ ID NO: 8中列出之重鏈CDR3；及ii)SEQ ID NO: 12中列出之輕鏈CDR1、SEQ ID NO: 14中列出之輕鏈CDR2及SEQ ID NO: 16中列出之輕鏈CDR13。

【0030】 在某些實施例中，抗體為抗CD30抗體且抗CD30抗體藥物結合物包括：i)與SEQ ID NO: 2中列出之重鏈可變區具有至少85%一致性之胺基酸序列及ii)與SEQ ID NO: 10中列出之輕鏈可變區具有至少85%一致性之胺基酸序列。在此考慮了胺基酸可變區序列可與SEQ ID NO: 2或SEQ ID NO: 10具有90%、95%、96%、97%、98%或99%一致性。

【0031】 在各種實施例中，抗體為抗CD30抗體且抗體藥物結合物之抗CD30抗體為嵌合AC10抗體。

【0032】 在各種實施例中，藥物-連接子單元-抗體結合物/抗體藥物結合物包括單甲基奧瑞他汀E及蛋白酶可裂解連接子。在各種實施例中，蛋白酶可裂解連接子包括硫醇反應性間隔子及二肽。在各種實施例中，蛋白酶可裂解連接子由硫醇反應性馬來醯亞胺己醯基間隔子、纈胺酸-瓜胺

酸二肽及對胺基-苄氧基羰基間隔子組成。

【0033】 在各種實施例中，抗CD30抗體藥物結合物為貝倫妥單抗維多汀。在各種實施例中，每3週投予一次抗CD30抗體藥物結合物。

【0034】 在各種實施例中，抗CD30抗體藥物結合物之抗CD30抗體為單株抗CD30抗體。在各種實施例中，抗CD30抗體藥物結合物之抗CD30抗體為嵌合AC10抗體。

【0035】 在各種實施例中，抗體藥物結合物包括單甲基奧瑞他汀E及蛋白酶可裂解連接子。在各種實施例中，蛋白酶可裂解連接子包括硫醇反應性間隔子及二肽。在各種實施例中，蛋白酶可裂解連接子由硫醇反應性馬來醯亞胺己醯基間隔子、纈胺酸-瓜胺酸二肽及對胺基-苄氧基羰基間隔子組成。

【0036】 在各種實施例中，抗體為IgG抗體，較佳IgG1或IgG2抗體。

【0037】 應理解，本文所描述之各特性或實施例或組合為本發明之態樣中之任一個的非限制性說明性實例，且因此意謂可與本文所描述之任何其他特性或實施例或組合進行組合。例如，在用諸如「一個實施例」、「一些實施例」、「某些實施例」、「進一步實施例」、「特定例示性實施例」及/或「另一實施例」之語言描述特性之情況下，此等類型之實施例中之各個均為意欲與本文所描述且不必列出各個可能性組合之任何其他特性或特性組合進行組合之特性的非限制性實例。此等特性或特性組合應用於本發明之態樣中之任一個。在揭示落入範圍內之值之實例的情況下，考慮此等實例中之任一個作為範圍之可能性端點，考慮到此等端點之間之任何及所有數值，且設想具有上端點及下端點之任何及所有組合。

【圖式簡單說明】

【0038】 圖1A-1C顯示用MMAE治療後ER應激蛋白誘導之水準。Western印跡表明蛋白質與磷酸化水準(圖1A)。圖1B顯示ATP分泌之水準，且圖1C顯示HMGB1從細胞釋放之水準。

【0039】 圖2A-2B說明微管蛋白破壞劑MMAE、長春新鹼及太平洋紫杉醇之ER應激誘導水準。圖2A顯示CHOP螢光素酶測定之ER應激誘導，且圖2B顯示體內異種移植模型中之ER應激誘導。

【0040】 圖3A-3E顯示回應於MiaPac2胰臟細胞(圖3A，ATP)或PC-3前列腺腫瘤細胞(圖3B，ATP)中之微管蛋白破壞劑MMAE、長春新鹼及太平洋紫杉醇的ATP分泌及其他影響。用MMAE治療PC-3細胞引起ER應激(IRE1及JNK的磷酸化)(圖3C)、ATP釋放(圖3D)及HMGB1釋放(圖3E)。

【0041】 圖4A-D顯示了對無胸腺裸鼠中移植之PC-3細胞及免疫細胞浸潤之治療的影響。圖4A，樹突細胞；圖4B，巨噬細胞浸潤；圖4C，樹突細胞抗原呈遞；圖4D，巨噬細胞抗原呈遞。

【0042】 圖5A-E顯示治療對細胞介素/趨化介素產生之影響，如藉由ELISA對無胸腺裸鼠中移植的PC-3細胞所量測。圖5A-5C分別為MIP-1a、IP-10及IL-1B的腫瘤內細胞介素水準；圖5D-5F分別為IP-10、GCSF及IL-6之外周循環細胞介素水準。

【0043】 圖6顯示用MMAE、長春新鹼及太平洋紫杉醇治療後HeLa子宮頸癌細胞之Western印跡的ER應激誘導。

【0044】 圖7A及7B顯示在皮膚細胞實體腫瘤細胞系中用MMAE、長春新鹼及太平洋紫杉醇治療對作為一組的ATP釋放的影響(圖7A)並被細

胞類型分解(圖7B)。圖7C顯示了治療對皮膚癌細胞中HMGB1釋放之影響。

【0045】 圖8A-8C顯示A2058(圖8A)、SK-MEL-5(圖8B)及SK-MEL-28(圖8C)皮膚細胞之MMAE治療導致比太平洋紫杉醇更穩健之2/3腫瘤細胞系中抗原呈遞的增加。

【0046】 圖9A-9B顯示用MMAE、長春新鹼、太平洋紫杉醇或抗p97-MMAE治療A2058(圖9A)或SK-MEL-5(圖9B)腫瘤細胞對測試之細胞介素及趨化介素的影響。

【0047】 圖10A-10B顯示MMAE、長春新鹼及太平洋紫杉醇對BxPC3(圖10A)及HPAFII(圖10B)細胞抗原呈遞增加之影響。圖10C-10D分別顯示BxPC-3細胞中之ATP分泌及HMGB-1釋放。

【0048】 圖11A-11B顯示用MMAE、長春新鹼、太平洋紫杉醇或抗p97-MMAE治療BxPC3(圖11A)或HPAFII(圖11B)腫瘤細胞對測試細胞介素及趨化介素之影響。

【0049】 圖12A-12C顯示在與巨噬細胞共培養後，MMAE、長春新鹼、太平洋紫杉醇或p97-MMAE治療Calu-1(圖12A)、HT1080(圖12B)及SK-MES-1(圖12C)細胞對抗原呈遞水準之影響。圖12D-12F顯示了Calu-1(圖12D)、HT-1080(圖12E)及SK-MES-1細胞(圖12F)之HMGB-1釋放。

【0050】 圖13顯示用MMAE、長春新鹼、太平洋紫杉醇或p97-MMAE治療後Calu-1細胞中細胞介素或趨化介素誘導之水準。

【0051】 圖14A-14B顯示MMAE、含MMAE之ADC(抗CD71 OKT9)、長春新鹼及太平洋紫杉醇對MCF7細胞抗原呈遞(圖14A)及細胞介素/趨化介素產生(圖14B)之影響。

【0052】 圖15A-C顯示 MMAE或 含MMAE之ADC(Ladiratuzumab vedotin，SGN-LIV1A)對MCF-7乳腺癌細胞應激誘導(圖15A)、ATP分泌(圖15B)及HMGB1釋放(圖15C)之影響。

【0053】 圖16A-16B顯示MMAE、艾日布林、太平洋紫杉醇、多烯紫杉醇或SGN-LIV1A對MCF-7乳腺癌細胞應激誘導(圖16A)及ATP分泌(圖16B)之影響。

【0054】 圖17A-17E顯示 含有MMAE之ADC SGN-LIV1A或 抗CD71-MMAE對無胸腺裸鼠中移植的MCF-7細胞中免疫活性的影響：圖17A，樹突細胞浸潤；圖17B，樹突細胞抗原呈遞；圖17C，巨噬細胞抗原呈遞；圖17D，IP10水準；圖17E，RANTES水準。

【0055】 圖18顯示用MMAE、毒胡蘿蔔素或含MMAE之ADC(因福土單抗維多汀(Enfortumab vedotin)，ASG-22ME)治療之MDA-MB-468細胞的ATP分泌。

【0056】 圖19A-19G顯示用MMAE、特吡萊辛M、長春新鹼與太平洋紫杉醇治療之Hep3b(圖19D)、Huh7(圖19E)及JHH7(圖19F-19G)上ATP分泌(圖19A，JHH7；圖19B，Huh7；圖19C，Hep3b)及共刺激(通過CD86表現量測，JHH7)及抗原呈遞(藉由MHCII表現細胞之頻率量測)之水準。

【0057】 圖20A-20C顯示用MMAE、特吡萊辛M、長春新鹼或太平洋紫杉醇治療Hep3b(圖20A)、Huh7(圖20B)及JHH7(圖20C)細胞對細胞介素及趨化介素水準之影響。

【0058】 圖21A-21B顯示MMAE、含有MMAE的ADC(因福土單抗維多汀，ASG-22ME)、長春新鹼及太平洋紫杉醇對T-24膀胱腫瘤細胞

ATP分泌(圖21A)、抗原呈遞(圖21B)及細胞介素/趨化介素產生(圖21C)之影響。

【0059】 圖22A-22B顯示了MMAE、MMAE-ADC(SGN-CD48A)及對照對U-266細胞之影響。圖22A顯示使用磷酸-JNK Thr183/Tyr185(pJNK)、PARP、ATF4、AT6、磷酸IRE-1 Ser274(pIRE-1)進行之Western印跡分析；圖22B顯示細胞毒性標記HSP70及鈣網蛋白之染色。

【實施方式】

【0060】 本發明提供了用於治療實體腫瘤之方法，其包括投予包括微管蛋白破壞劑之抗體藥物結合物。本文揭示了微管蛋白破壞劑影響實體腫瘤細胞中之ER應激蛋白路徑並誘導ATP分泌與其他ER應激現象，其誘導免疫細胞遷移至腫瘤部位並減少腫瘤生長。

定義

【0061】 除非另有定義，否則本文中所使用之所有技術及科學術語具有與本發明所屬領域之一般熟習此項技術者通常所理解相同之含義。以下參考文獻為技術者提供用於本發明中之多個術語之一般定義：Singleton等人，《微生物學與分子生物學辭典(DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY)》(第2版1994)；《劍橋科技辭典(THE CAMBRIDGE DICTIONARY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY)》(沃克(Walker)編，1988)，《遺傳學字典(THE GLOSSARY OF GENETICS)》，第5版，R.里格爾(Rieger)等人(編)，斯普林格出版社(Springer Verlag)(1991)；黑爾(Hale)及馬哈姆(Marham)，《哈珀柯林斯生物學辭典(THE HARPER COLLINS DICTIONARY OF

BIOLOGY)》(1991)。

【0062】 本文引用之各揭示、專利申請、專利及其他參考文獻以與本發明不矛盾之程度以全文引用之方式併入。

【0063】 除非上下文另外明確地說明，否則如本文及所附申請專利範圍中所使用之單數形式「一」、「及」及「所述」包含複數個提及物。因此，例如，「一種衍生物」之提及包含複數個此類衍生物，且「一個受試者」之提及包含對一個或多個受試者之提及等。

【0064】 應進一步理解，在各種實施例之描述使用術語「包括」之情況下，熟習此項技術者將理解，在一些特定情況下，可使用語言「基本上由.....組成」或「由.....組成」來替代地描述實施例。

【0065】 除非另外定義，否則本文所使用之所有技術及科學術語均具有與本發明所屬領域之一般熟習此項技術者通常所理解相同之含義。儘管與本文所描述之彼等方法及材料類似或等效之方法及材料可用於實踐所揭示之方法及組合物，但本文描述例示性方法、裝置及材料。

【0066】 如本文所使用之「治療有效量」或「有效量」係指有效產生預期之對健康具有有益影響之試劑之量。

【0067】 如本文所用，術語「實體腫瘤」係指通常不含有囊腫或液體區域之異常組織塊。實體腫瘤可為良性或惡性的。不同類型之實體腫瘤以形成其之細胞類型而命名。實體腫瘤包含肉瘤與癌瘤。肉瘤係指血管、骨、脂肪組織、韌帶、淋巴管、肌肉或肌腱中之腫瘤。癌瘤係指上皮細胞中形成之腫瘤。考慮實體腫瘤為非淋巴瘤實體腫瘤。

【0068】 術語「微管蛋白破壞劑」係指抑制微管功能的試劑。微管蛋白破壞劑可以根據其作用機理分為兩大類：促進微管蛋白聚合與穩定微

管結構之試劑與抑制微管蛋白聚合與使微管結構不穩定之試劑。例示性微管蛋白破壞劑在具體實施方式中更詳細地描述。

【0069】 本文所用之術語「免疫細胞遷移」係指免疫細胞(包含外周血液單核細胞、T細胞、B細胞、天然殺傷細胞、單核球、巨噬細胞、樹突細胞、嗜鹼性球、粒細胞及其類似物)向腫瘤部位移動或從腫瘤部位移動。

【0070】 除非上下文另有指示，否則術語「治療(treat/treating/treatment)」係指治療性治療及防止疫病之進展或復發之預防性手段，其中目標為抑制或減緩(減輕)非所需生理學變化或病症，諸如癌症出現或擴散。有益或所需之臨床結果包含但不限於症狀緩解、疾病程度減輕、疾病狀態穩定(亦即，未惡化)、疾病進展延緩或減慢、疾病狀態改善或緩和及緩解(部分抑或全部緩解)，無論可檢測抑或不可檢測。「治療」亦可意謂存活期與未接受治療之預期存活期相比延長。需要治療之彼等患者包含已患有病況或病症之彼等患者以及易於患上病況或病症之彼等患者。術語「治療」包含以下任何或全部：抑制腫瘤細胞、癌細胞或腫瘤之生長；抑制腫瘤細胞或癌細胞之複製、減輕整體腫瘤負荷或減少癌細胞之數量，並改善與疾病相關之一種或多種症狀。

【0071】 「患者」或「受試者」之實例包含但不限於人類、大鼠、小鼠、天竺鼠、猴、豬、山羊、牛、馬、狗、貓、鳥及家禽。在例示性實施例中，患者為人類。

【0072】 本文所使用之術語「醫藥學上可接受之」係指在合理之醫學判斷範疇內適合於與人類及動物之組織接觸且沒有過量毒性、刺激性、過敏反應或與合理之益處/風險比率相稱之其他問題或併發症的彼等化合

物、材料、組合物及/或劑型。術語「醫藥學上相容之成分」係指與抗體-藥物結合物一起投予之醫藥學上可接受之稀釋劑、佐劑、賦形劑或載劑。

【0073】 術語「特異性結合」及「特異性地結合」意謂抗CD30抗體將以高度選擇性方式與其對應之靶CD30反應但不與多種其他抗原反應。

【0074】 術語「單株抗體」係指衍生自包含任何真核或原核細胞殖株或噬菌體殖株之單細胞殖株之抗體而不指產生其之方法。因此，如本文所使用之術語「單株抗體」不限於經由融合瘤技術產生之抗體。

【0075】 在兩個或兩個以上核酸或多肽序列之上下文中，術語「一致性」或「一致性百分比」係指當比較且比對以得到最大對應關係時，兩個或兩個以上相同或具有特定百分比之核苷酸或胺基酸殘基之序列或子序列，所述核苷酸或胺基酸殘基為相同的。為確定一致性百分比，出於最佳比較目的而比對序列(例如，可在第一胺基酸序列或核酸序列中引入間隙以與第二胺基酸或核酸序列最佳比對)。隨後比較在對應之胺基酸位置或核苷酸位置處之胺基酸殘基或核苷酸。若第一序列中之位置被與第二序列中之相應位置相同的胺基酸殘基或核苷酸佔據，則分子在所述位置處一致。兩個序列之間之一致性百分比為所述序列共享之相同位置之數量之函數(亦即 $\% \text{一致性} = \text{相同位置之}\# / \text{位置(例如重迭位置)之總}\# \times 100$)。在某些實施例中，兩個序列長度相同。

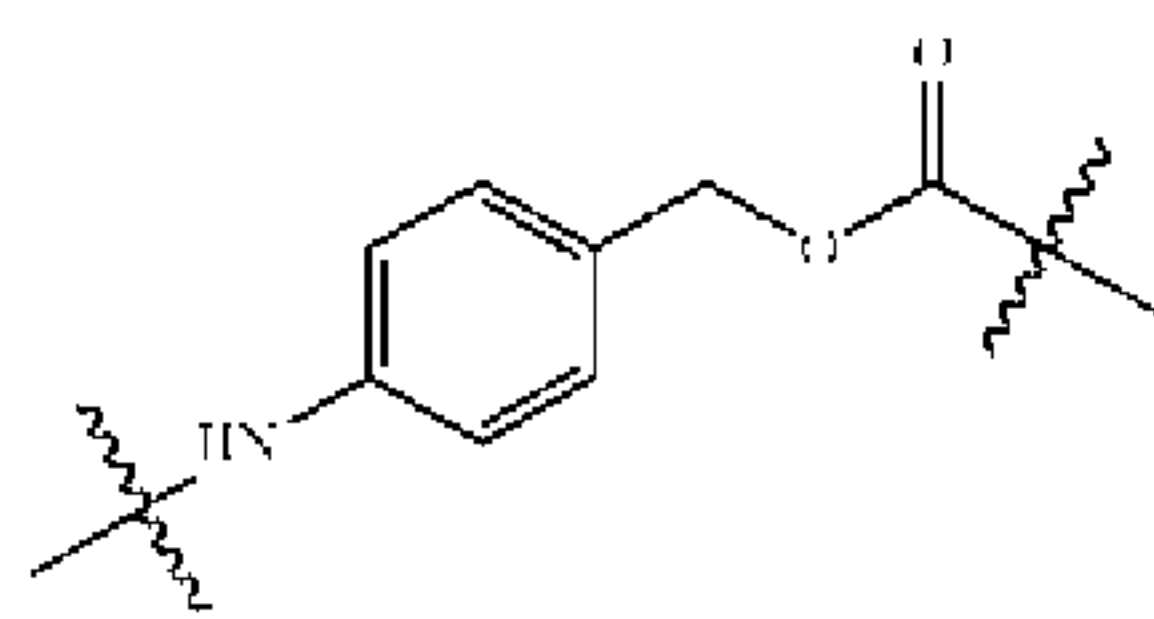
【0076】 在兩個核酸或多肽之上下文中，術語「實質上相同」係指具有以下之兩個或兩個以上序列或子序列：至少70%或至少75%一致性；更典型地至少80%或至少85%一致性；且甚至更典型地至少90%、至少95%或至少98%一致性(例如，如使用以下闡述之方法中之一種所測定)。

【0077】 可使用數學算法來測定兩個序列之間之一致性百分比。用於比較兩個序列之數學演算法的較佳非限制性實例係Karlin及Altschul，1990，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-2268之演算法，如Karlin及Altschul，1993，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877中所修改。將此類算法併入Altschul等人，1990，《分子生物學雜誌(J. Mol. Biol.)》215:403-410之NBLAST及XBLAST程式中。可用分數=100且字長=12之NBLAST程序進行BLAST核苷酸檢索以獲得與編碼受關注蛋白質之核酸同源之核苷酸序列。可用分數=50且字長=3之XBLAST程序進行BLAST蛋白質檢索以獲得與受關注蛋白質同源之胺基酸序列。為使間隙式比對達成比較目的，可如Altschul等人，1997，《核酸研究(Nucleic Acids Res.)》25:3389-3402中所述使用間隙式BLAST。替代地，PSI-Blast可用於進行偵測分子(相同)之間之遠緣關係之迭代檢索。用於比較序列之數學算法之另一較佳非限制性實例為Myers及Miller，CABIOS(1989)之算法。此類算法併入ALIGN程序(版本2.0)中，所述程序為GCG序列比對軟件包之一部分。用於序列分析之另外的算法在此項技術中已知且包含如Torellis及Robotti，1994，Comput. Appl. Biosci. 10:3-5中所描述之ADVANCE及ADAM；及Pearson及Lipman，1988，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444-8中所述之FASTA。替代地，可使用CLUSTAL W算法進行蛋白質序列比對，如Higgins等人，1996，《酶學方法(Methods Enzymol.)》266:383-402所描述。

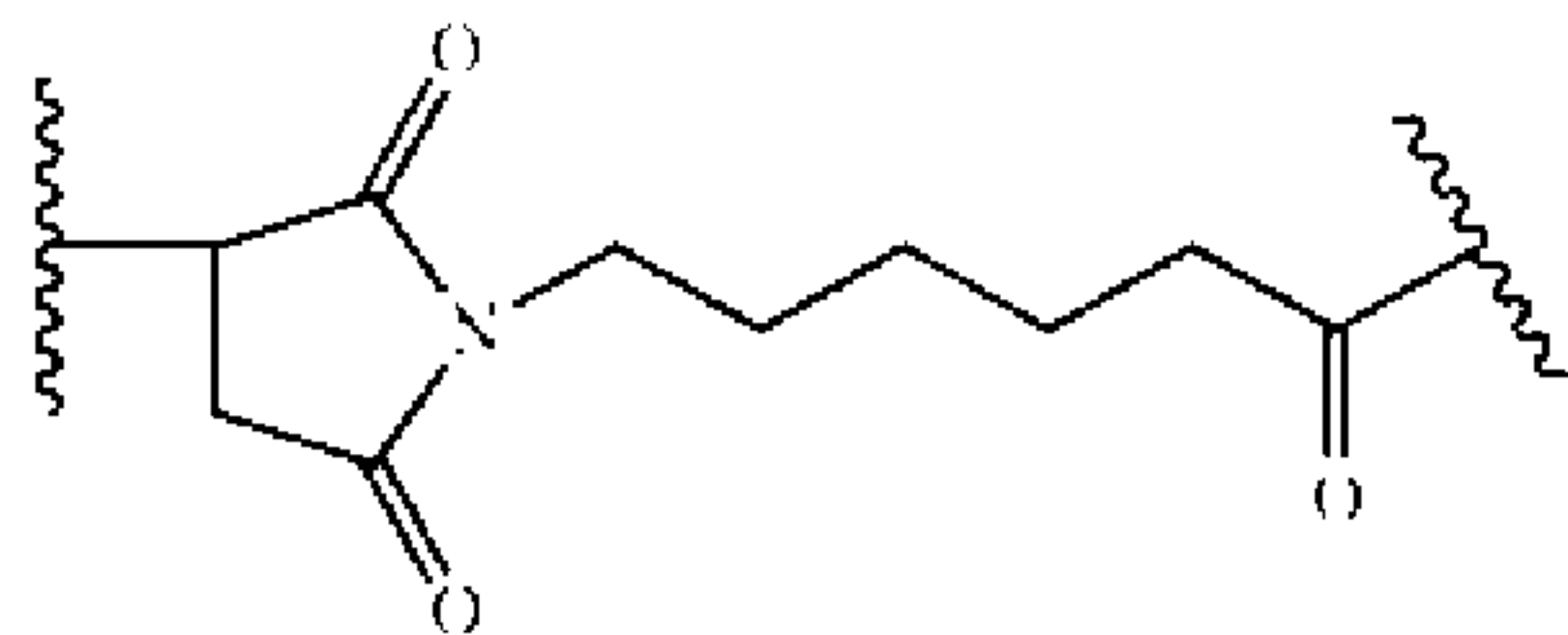
【0078】 縮寫「MMAE」係指單甲基奧瑞他汀E。

【0079】 縮寫「vc」及「val-cit」係指二肽纈胺酸-瓜胺酸。

【0080】 縮寫「PAB」係指自我分解型間隔子。



【0081】 縮寫「MC」係指延伸子(stretcher)馬來醯亞胺己醯基：



【0082】 cAC10-MC-vc-PAB-MMAE係指經由MC-vc-PAB連接子結合至藥物MMAE之嵌合AC10抗體。

【0083】 抗CD30 vc-PAB-MMAE抗體-藥物結合物係指經由包括二肽纈胺酸瓜胺酸及自我分解型間隔子PAB之連接子結合至藥物MMAE之抗CD30抗體，如美國專利第9,211,319號之式(I)所示。

抗體

【0084】 本發明之抗體較佳為單株抗體且可為多特異性抗體、人類抗體、人源化抗體或嵌合抗體、單鏈抗體、Fab片段、F(ab')片段、Fab表現文庫產生之片段及任何上述者之抗原結合片段。如本文所使用之術語「抗體」係指免疫球蛋白分子及免疫球蛋白分子之免疫活性部分，亦即含有免疫特異性地結合CD30之抗原結合位點之分子。本發明之免疫球蛋白分子可為免疫球蛋白分子之任何類型(例如IgG、IgE、IgM、IgD、IgA及IgY)、類別(例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1及IgA2)或子類別。

【0085】 在本發明之某些實施例中，抗體為本發明之人類抗原結合抗體片段，且包含但不限於Fab、Fab'及F(ab')₂、Fd、單鏈Fv(scFv)、單鏈抗體、二硫化物連接之Fv(sdFv)及包括VL或VH結構域之片段。包含單鏈抗體之抗原結合抗體片段可單獨包括一或多個可變區或包括與以下中之全部或部分組合之可變區：鉸鏈區、CH1、CH2、CH3及CL結構域。本

發明亦包含亦包括一或多個可變區與鉸鏈區、CH1、CH2、CH3及CL結構域之任何組合的抗原結合片段。抗體較佳為人類、鼠類(例如小鼠及大鼠)、驢、綿羊、兔、山羊、天竺鼠、駱駝科動物、馬或雞。如本文所用，「人類」抗體包含具有人類免疫球蛋白之胺基酸序列之抗體，且包含分離自人類免疫球蛋白文庫、分離自人類B細胞或分離自針對一種或多種人類免疫球蛋白基因轉殖之動物的抗體，如下文例如藉由Kucherlapati等人之美國專利第5,939,598號所述。

【0086】 本發明之抗體可為單特異性抗體、雙特異性抗體、三特異性抗體或具有更高多特異性。多特異性抗體可對CD30之不同表位具有特異性，或可對CD30以及異源蛋白質均具有特異性。參見例如PCT揭示WO 93/17715；WO 92/08802；WO 91/00360；WO 92/05793；Tutt等人，1991，《免疫學雜誌(J. Immunol.)》147:60 69；美國專利第4,474,893號；第4,714,681號；第4,925,648號；第5,573,920號；第5,601,819號；Kostelny等人，1992，《免疫學雜誌(J. Immunol.)》148:1547 1553。

【0087】 可就本發明之抗體所包括之特定CDR而言來描述或規定本發明之抗體。本發明涵蓋包括重鏈或輕鏈可變結構域之抗體或其衍生物，所述可變結構域包括(a)一組三種CDR，其中所述CDR組來自期望之單株抗體；及(b)一組四種構架區，其中所述構架區組與期望之單株抗體中之構架區組不同，且其中所述抗體或其衍生物免疫特異性地結合靶抗原。

【0088】 在各種實施例中，抗體與癌細胞表面上之抗原結合。在各種實施例中，抗體對以下具有特異性：CD30、CD19、CD70、CD71、CD20、CD52、CD133、EGFR、HER2、VEGF、VEGFR2、PD-1、PDL1、RANKL、CTLA-4、IL-6、SLAMF7、CD3、TNF- α 、PDGFR-

α 、CD38、GD2、cCLB8、p97、連接素-4或EpCAM。

【0089】考慮用於本文之抗CD19抗體揭示於例如美國專利9,073,993中。考慮用於本文之抗CD70抗體揭示於例如美國專利9,345,785中。結合癌症相關抗原之其他抗體為此項技術中已知的，包含但不限於利妥昔單抗、阿達木單抗、阿侖單抗、曲妥珠單抗、阿侖單抗、替伊莫單抗、西妥昔單抗、貝伐單抗、帕尼單抗、奧伐木單抗、伊派利單抗、貝倫妥單抗維多汀、帕妥珠單抗、曲妥珠單抗-美坦新偶聯物、奧濱尤妥珠單抗、雷莫蘆單抗、帕博利珠單抗、托西莫單抗、納武單抗迪奴圖單抗、達雷木單抗、萊西單抗、埃羅妥珠單抗與阿特珠單抗。

【0090】藉由用霍奇金氏病(HD)細胞株或純化CD30抗原使小鼠免疫來產生此項技術中已知之鼠類抗CD30 mAb。起初稱為C10(Bowen等人，1993，《免疫學雜誌(J. Immunol.)》151:5896 5906)之AC10之特徵在於針對類人類NK之細胞株YT製備之此抗CD30 mAb(Bowen等人，1993，《免疫學雜誌(J. Immunol.)》151:5896 5906)。最初，此mAb之信號傳導活性為藉由CD28及CD45分子之細胞表面表現之下調、細胞表面CD25表現之上調及C10與YT細胞結合後之同型黏附之誘導來證明。AC10抗體之序列列於SEQ ID NO: 1-16及下表A中。亦參見美國專利第7,090,843號，所述專利以引用之方式併入本文中，其揭示嵌合AC10抗體。

【0091】在一個態樣中，本發明之抗體免疫特異性地結合CD30且對惡性細胞發揮細胞生長抑制及細胞毒性有影響。在某些實施例中，本發明之抗體包括AC10之一或多種CDR。

【0092】在一個特定實施例中，本發明涵蓋包括重鏈可變結構域之

抗CD30抗體或其衍生物，所述可變結構域包括(a)一組三種CDR，其中所述CDR組包括SEQ ID NO: 4、6或8；及(b)一組四種構架區，其中所述構架區組與單株抗體AC10中之構架區組不同，且其中所述抗體或其衍生物免疫特異性地結合CD30。

【0093】 在各種實施例中，本發明涵蓋包括輕鏈可變結構域之抗體或其衍生物，所述可變結構域包括(a)一組三種CDR，其中所述CDR組包括SEQ ID NO: 12、14或16；及(b)一組四種構架區，其中所述構架區組與單株抗體AC10中之構架區組不同，且其中所述抗體或其衍生物免疫特異性地結合CD30。

【0094】 另外，亦可就本發明之抗體之一級結構而言來描述或規定本發明之抗體。與已知抗體例如AC10之可變區具有至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%且最佳至少98%一致性(如使用此項技術中已知及本文所描述之方法所計算)之抗體亦包含在本方法中。本發明之抗體還可以根據其對靶抗原之結合親和力來描述或指定。較佳結合親和力包含彼等解離常數或 K_d 小於 5×10^2 M、 10^{-2} M、 5×10^{-3} M、 10^{-3} M、 5×10^{-4} M、 10^{-4} M、 5×10^{-5} M、 10^{-5} M、 5×10^{-6} M、 10^{-6} M、 5×10^{-7} M、 10^{-7} M、 5×10^{-8} M、 10^{-8} M、 5×10^{-9} M、 10^{-9} M、 5×10^{-10} M、 10^{-10} M、 5×10^{-11} M、 10^{-11} M、 5×10^{-12} M、 10^{-12} M、 5×10^{-13} M、 10^{-13} M、 5×10^{-14} M、 10^{-14} M、 5×10^{-15} M或 10^{-15} M。

【0095】 抗體亦包含經修飾之衍生物，所述修飾亦即藉由使任何類型之分子與抗體共價附接以使得共價附接不阻止抗體與靶抗原結合。例如但不限於抗體衍生物包含已經修飾之抗體，所述修飾例如藉由糖基化、乙

醯化、PEG化、磷酸化、醯胺化、藉由已知保護/阻隔基進行之衍生化、蛋白質裂解、與細胞配位體或其他蛋白質之連接等來進行。許多化學修飾中之任一種都可藉由包含但不限於特定的化學裂解、乙醯化、甲醯化、衣黴素之代謝合成等之已知技術來進行。另外，所述衍生物可含有一或多種非典型胺基酸。

【0096】 考慮用於本發明之抗體可由此項技術中已知之任何合適方法產生。

【0097】 本發明進一步提供包括編碼蛋白質之核苷酸序列之核酸，所述蛋白質包含但不限於本發明之蛋白質及其片段。本文考慮之核酸較佳編碼一種或多種結合至CD30且對HD細胞發揮細胞毒性或細胞生長抑制有影響之抗體之CDR。本發明之例示性核酸包括SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 13或SEQ ID NO: 15。本發明之可變區核酸包括SEQ ID NO: 1或SEQ ID NO: 9。(參見表A)。

表A

分子	核苷酸或胺基酸	SEQ ID NO
AC 10重鏈可變區	核苷酸	1
AC 10重鏈可變區	胺基酸	2
AC 10重鏈-CDR1(H1)	核苷酸	3
AC 10重鏈-CDR1(H1)	胺基酸	4
AC 10重鏈-CDR2(H2)	核苷酸	5
AC 10重鏈-CDR2(H2)	胺基酸	6
AC 10重鏈-CDR3(H3)	核苷酸	7
AC 10重鏈-CDR3(H3)	胺基酸	8
AC 10輕鏈可變區	核苷酸	9
AC 10輕鏈可變區	胺基酸	10

AC 10輕鏈-CDR1(L1)	核苷酸	11
AC 10輕鏈-CDR1(L1)	胺基酸	12
AC 10輕鏈-CDR2(L2)	核苷酸	13
AC 10輕鏈-CDR2(L2)	胺基酸	14
AC 10輕鏈-CDR3(L3)	核苷酸	15
AC 10輕鏈-CDR3(L3)	胺基酸	16

【0098】 在各種實施例中，抗體為IgG抗體，例如IgG1、IgG2、IgG3或IgG4抗體，較佳IgG1抗體。

抗體-藥物結合物

【0099】 本文考慮使用包括微管蛋白破壞劑之藥物-連接子單元-抗體結合物或抗體藥物結合物來治療實體腫瘤。

【0100】 本領域已知幾種不同種類之微管蛋白破壞劑，包含奧瑞他汀、特吡萊辛、秋水仙鹼、長春花生物鹼、紫杉烷、克瑞托欣、類美登素、哈密特林與其他微管蛋白破壞劑。

【0101】 奧瑞他汀為天然產物海兔毒素之衍生物。例示性奧瑞他汀包含海兔毒素-10、MMAE(正甲基纈胺酸-纈胺酸-多拉索因-多拉普因-降麻黃鹼)與MMAF(正甲基纈胺酸-纈胺酸-多拉索因-多拉普因-苯丙胺酸)與AFP。WO 2015/057699描述了PEG化之奧瑞他汀，其包含MMAE。考慮使用之另外的海兔毒素衍生物揭示於美國專利9,345,785中，其以引入之方式併入本文中。

【0102】 特吡萊辛包含但不限於特吡萊辛D、特吡萊辛M、特吡苯丙胺酸與妥布洛辛。WO2017-096311及WO2016-040684描述了包含特吡萊辛M之特吡萊辛類似物。

【0103】 秋水仙鹼包含但不限於秋水仙鹼與CA-4。

【0104】 長春花生物鹼包含但不限於長春鹼(VBL)、長春瑞賓

(VRL)、長春新鹼(VCR)與長春地辛(VDS)。

【0105】 紫杉烷包含但不限於太平洋紫杉醇與多烯紫杉醇。

【0106】 克瑞托欣包含但不限於克瑞托欣-1與克瑞托欣-52。

【0107】 類美登素包含但不限於美登素、美登醇、美登素類似物、DM1、DM3與DM4與安莎黴素-2。例示性類美登素藥物部分包含具有經修飾之芳環的彼等類美登素藥物部分，諸如：C-19-去氫(美國專利第4,256,746號)(藉由氫化鋰鋁還原安莎黴素P2來製備)；C-20-羥基(或C-20-去甲基)+/-C-19-去氫(美國專利第4,361,650號及第4,307,016號)(藉由使用鏈黴菌(STREPTOMYCES)或放線菌(ACTINOMYCES)去甲基化或使用LAH去氫來製備)；及C-20-去甲氧基、C-20-醯氧基(-OCOR)、+/-去氫(美國專利第4,294,757號)(藉由使用醯基氫醯化來製備)及在其他位置具有修飾之彼等類美登素藥物部分。

【0108】 類美登素藥物部分亦包含具有以下修飾之彼等類美登素藥物部分，諸如：C-9-SH(美國專利第4,424,219號)(藉由美登醇與H.sub.25或P.sub.2S.sub.5之反應來製備)；C-14-烷氧基甲基(去甲氧基/CH.sub.2OR)(美國專利第4,331,598號)；C-14-羥基甲基或醯氧基甲基(CH.sub.2OH或CH.sub.2OAc)(美國專利第4,450,254號)(由諾卡菌屬(NOCARDIA)製備)；C-15-羥基/醯氧基(美國專利第4,364,866號)(藉由鏈黴菌轉化美登醇來製備)；C-15-甲氧基(美國專利第4,313,946號及第4,315,929號)(自滑桃樹(TREWIA NUDLFLORA)分離)；C-18-N-去甲基(美國專利第4,362,663號及第4,322,348號)(藉由鏈黴菌使美登醇去甲基化來製備)；及4,5-去氧(美國專利第4,371,533號)(藉由三氯化鈦/LAH還原美登醇來製備)。在人乳腺癌細胞系SK-BR-3上體外測試結合HER-2之TA.1-

類美登素結合物的細胞毒性(CHARI等人，《癌症研究(CANCER RESEARCH)》52:127-131(1992))。藥物結合物實現類似於游離類美登素藥物之細胞毒性程度，其可藉由增加每抗體分子之類美登素分子數目而增加。

【0109】 哈密特林包含但不限哈密特林與HTI-286。

【0110】 其他微管蛋白破壞劑包含塔卡醯胺A、塔卡醯胺、B、塔卡醯胺AF、塔卡醯胺AJ、塔卡醯胺AI-環氧化物、迪斯德莫來、埃坡黴素A、埃坡黴素B與絡厘麥萊蒂。

【0111】 考慮用於本文方法之藥物-連接子單元-抗體或或抗體藥物結合物包括連接子單元，通常，ADC或ADC衍生物包括治療劑與抗體或其衍生物之間的連接子區域。連接子蛋白酶可裂解連接子、酸可裂解連接子、二硫化物連接子、自穩定連接子。在各種實施例中，連接子可在細胞內條件下裂解，使得連接子之裂解從細胞內環境中之抗體釋放治療劑。

【0112】 例如，在一些實施例中，連接子為藉由細胞內環境(例如，溶酶體或核內體或胞膜窖內)中存在之裂解劑可裂解的。連接子可為例如由細胞內肽酶或蛋白酶(包含但不限於溶酶體或內體蛋白酶)裂解之肽基連接子。肽基連接子通常為至少兩個胺基酸長或至少三個胺基酸長。裂解劑可包含組織蛋白酶B及組織蛋白酶D以及纖維蛋白溶酶，已知其均水解二肽藥物衍生物，導致靶細胞內部之活性藥物之釋放(參見，例如DUBOWCHIK及WALKER, 1999, PHARM. THERAPEUTICS 83:67-123)。最典型之肽基連接子為可由存在於抗原-表現細胞中之酶裂解之肽基連接子。例如，可使用可藉由在癌組織中高度表現之硫醇相關蛋白酶組織蛋白酶B裂解之肽基連接子(例如，Phe-Leu或Gly-Phe-Leu-Gly連接

子)。其他此類連接子描述於，例如，美國專利號6,214,345中。在特定實施例中，由細胞內蛋白酶可裂解之肽基連接子為Val-Cit連接子或Phe-Lys連接子(參見例如，美國專利第6,214,345號，其描述使用Val-Cit連接子合成小紅莓)。使用細胞內蛋白質水解釋放治療劑之一個優點為所述試劑在結合時通常毒性降低且結合物之血清穩定性通常較高。亦參見美國專利9,345,785。

【0113】 術語「細胞內裂解之」及「細胞內裂解」係指抗體藥物結合物或其類似物在細胞內之代謝過程或反應，由此藥物部分(D)與抗體單元之間的共價附接，例如連接子斷裂，產生游離藥物，或細胞在內自抗體分離之結合物之其他代謝物。因此，藥物-連接子-AB結合物之裂解部分為細胞內代謝物。

【0114】 在各種實施例中，可裂解連接子為PH敏感，亦即在某些PH值下對水解敏感。通常，PH敏感性連接子通常可在酸性條件下水解。例如，可使用在溶酶體中可水解之酸不穩定連接子(例如，脲、半卡巴脲、硫半卡巴脲、順式烏頭醯胺、原酸酯、縮醛、縮酮或類似者)。(參見，例如，美國專利第5,122,368號；第5,824,805號；第5,622,929號；DUBOWCHIK與WALKER，1999，PHARM. THERAPEUTICS 83:67-123；NEVILLE等人，1989，BIOL. CHEM. 264:14653-14661.)。此類連接子在中性PH值條件(諸如血液中之PH值條件)下相對穩定，但在低於PH 5.5或5.0(近似溶酶體之PH值)下不穩定。在某些實施例中，可水解連接子為硫醚連接子(諸如經由醯脲鍵附接至治療劑之硫醚(參見，例如美國專利第5,622,929號))。

【0115】 在各種實施例中，連接子在還原條件下可裂解(例如，二硫

化物連接子)。已知各種二硫化物連接子，包含(例如)可使用SATA (N-丁二醯亞胺基-5-乙醯基硫基乙酸酯)、SPDP (N-丁二醯亞胺基-3-(2-吡啶基二硫基)丙酸酯)、SPDB (N-丁二醯亞胺基-3-(2-吡啶基二硫基)丁酸酯)及SMPT (N-丁二醯亞胺基-氧基羰基-A-甲基-A-(2-吡啶基-二硫基)甲苯)形成之連接子(參見，例如THORPE等人，1987, CANCER RES. 47:5924-5931；WAWRZYNCZAK等人，免疫結合物：腫瘤放射影像及治療中之抗體結合物(*IMMUNOCONJUGATES: ANTIBODY CONJUGATES IN RADIOIMAGERY AND THERAPY OF CANCER*)(C. W. VOGEL編, OXFORD U.出版, 1987)。亦參見美國專利第4,880,935號。)

【0116】 在各種實施例中，連接子為丙二酸酯連接子(JOHNSON等人, 1995, ANTICANCER RES. 15:1387-93)、馬來醯亞胺基苯甲醯基連接子(LAU等人, 1995, BIOORG-MED-CHEM. 3(10):1299-1304)或3'-N-醯胺類似物(LAU等人, 1995, BIOORG-MED-CHEM. 3(10):1305-12)。

【0117】 在一些實施例中，連接子單元不可裂解且藥物藉由抗體降解來釋放。(亦見美國揭示第2005/0238649號)。

【0118】 在各種實施例中，連接子對細胞外環境實質上不敏感。如本文所用，在連接子之上下文中，「對細胞外環境實質上不敏感」意謂不超過約20%，通常不超過約15%，更通常不超過約10%，甚至更通常不超過約5%，不超過約3%，或不超過約1%之連接子在ADC或ADC衍生物存在於細胞外環境中(例如，在血漿中)時被裂解。連接子是否對胞外環境實質上不敏感可以例如藉由獨立地與血漿一起溫育(a)ADC或ADC衍生物(「ADC樣品」)及(b)等莫耳量之未結合抗體或治療劑(「對照樣品」)預定的時間段(例如，2、4、8、16或24小時)，並且然後比較ADC樣品中存在

之未結合抗體或治療劑的量與對照樣品中存在的量，例如藉由高效液相層析量測。

【0119】 在各種實施例中，連接子促進細胞內化。在某些實施例中，當與治療劑結合時(亦即，在如本文所述之ADC或ADC衍生物連接子-治療劑部分之背景中)，連接子促進細胞內化。在又其他實施例中，當結合到藥物及抗原特異性抗體或其衍生物兩者時(即，在如本文所述之ADC或ADC衍生物的環境中)，連接子促進細胞內化。

【0120】 2003年7月31日提交的題為「藥物結合物及其用於治療癌症，自身免疫性疾病或感染性疾病的用途(DRUG CONJUGATES AND THEIR USE FOR TREATING CANCER, AN AUTOIMMUNE DISEASE OR AN INFECTIOUS DISEASE)」的WO 2004010957中描述了可用於本發明組合物及方法的各種連接子。

【0121】 在各種實施例中，蛋白酶可裂解連接子包括硫醇反應性間隔子及二肽。在一些實施例中，蛋白酶可裂解連接子由硫醇反應性馬來醯亞胺己醯基間隔子、纈胺酸-瓜胺酸二肽及對胺基-苄氧基羰基間隔子組成。

【0122】 在各種實施例中，酸可裂解連接子為胍連接子或季銨連接子。

【0123】 包括馬來醯亞胺基團之自穩定連接子描述於美國專利9,504,756中，其以引用之方式併入本文中。

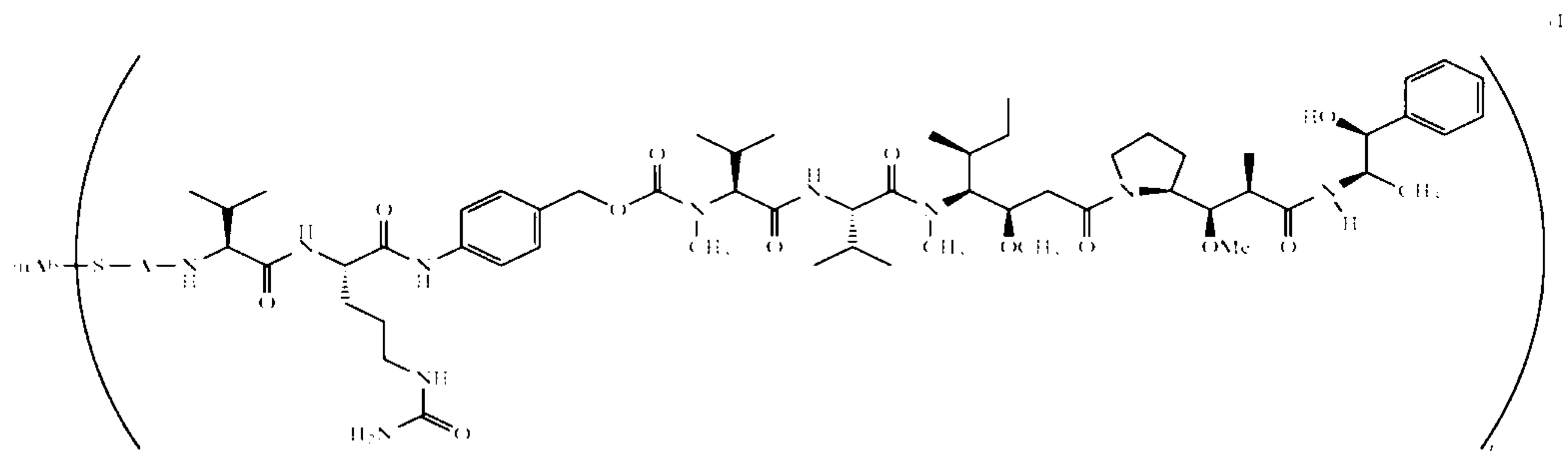
【0124】 在各種實施例中，微管蛋白破壞劑，諸如奧瑞他汀藉由如美國專利9,463,252中所述之形成具有連接子單元之一醯胺鍵合之一C端羧基被結合到一連接子中，其以引入之方式併入本文中。在各種實施例

中，連接子單元包括至少一個胺基酸。N,N-二烷基奧瑞他汀之結合劑-藥物結合物(ADC)揭示於美國專利8,992,932。

【0125】 在各種實施例中，連接子亦包括延伸子單元及/或胺基酸單元。例示性延伸子單元與胺基酸單元描述於中美國專利9,345,785及美國專利9,078,931，其各者以引用之方式併入本文中。

【0126】 在各種實施例中，本文提供了包括抗CD30抗體之抗體藥物結合物之用途，所述抗CD30抗體經由VC-PAB連接子與MMAE共價連接。將抗體藥物結合物遞送至受試者作為醫藥組合物。美國專利第9,211,319號中描述CD30抗體藥物結合物，其以引用之方式併入本文中。

【0127】 在各種實施例中，本發明之藥物-連接子單元-抗體/抗體-藥物結合物具有下式：



或其醫藥學上可接受之鹽；其中：MAB為單株抗體，諸如抗CD30或抗CD19抗體，S為抗體之硫原子，A-為延伸子單元，p為約3至約5。

【0128】 藥物負荷由 p 表示，醫藥組合物中每抗體之藥物分子平均數量。例如，若 p 為約4，則全部考慮進醫藥組合物中存在之抗體中之平均藥物負荷為約4。 P 在約3至約5、更佳約3.6至約4.4、甚至更佳約3.8至約4.2範圍內。 P 可為約3、約4或約5。結合反應製備中之每抗體之平均藥物數量可由諸如質譜法、ELISA分析及HPLC之習知方法來表徵。亦可就 p 而言來確定抗體-藥物結合物之定量分佈。在一些情況下，其中 p 為具有其

他藥物負荷之抗體-藥物-結合物之特定值之均質抗體-藥物-結合物之分離、純化及表徵可藉由諸如逆相HPLC或電泳之方法來實現。

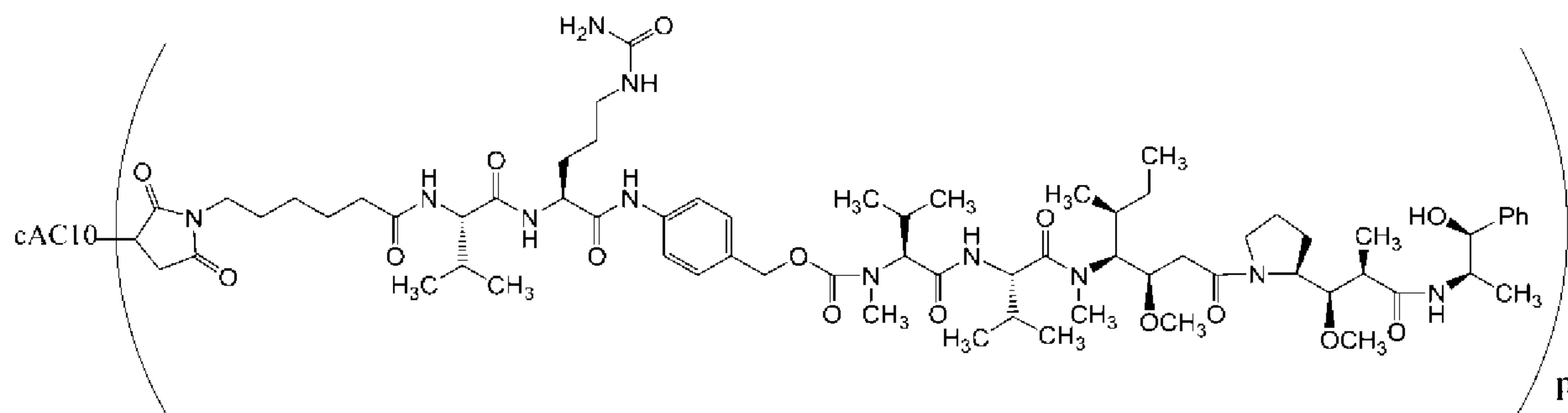
【0129】 延伸子單元(A)能夠經由抗體之硫氫基將抗體單元與纈胺酸-瓜胺酸胺基酸單元連接。硫氫基可例如藉由還原抗原特異性抗體之鏈間二硫鍵來產生。例如，延伸子單元可經由由還原抗體之鏈間二硫鍵產生之硫原子來連接至抗體。在一些實施例中，延伸子單元僅經由由還原抗體之鏈間二硫鍵產生之硫原子來連接至抗體。在一些實施例中，硫氫基可藉由使抗體之賴胺酸部分之胺基與2-亞胺基硫雜環戊烷(特勞特(TRAUT)試劑)或其他硫氫基生成試劑反應來產生。在某些實施例中，抗體為重組抗體且經工程化以攜帶一種或多種賴胺酸。在某些其他實施例中，重組抗體經工程化以攜帶另外之硫氫基，例如另外之半胱胺酸。

【0130】 MMAE之合成與結構描述於中美國專利第6,884,869號中，其以全文引用之方式併入本文中且用於所有目的。例示性延伸子單元之合成及結構以及用於製造抗體藥物結合物之方法描述於例如美國揭示第2006/0074008號及第2009/0010945號中，其各者以全文引用之方式併入本文中。

【0131】 代表性延伸子單元描述在美國專利9,211,319之式IIIa及IIIb之方括號內，且所述專利以引用之方式併入本文中。

【0132】 在各種實施例中，抗體藥物結合物包括單甲基奧瑞他汀E及蛋白酶可裂解連接子。在此考慮了蛋白酶可裂解連接子包括硫醇反應性間隔子及二肽。在各種實施例中，蛋白酶可裂解連接子由硫醇反應性馬來醯亞胺己醯基間隔子、纈胺酸-瓜胺酸二肽及對胺基-苄氧基羰基間隔子組成。

【0133】 在一個較佳之實施例中，抗體藥物結合物為貝倫妥單抗維多汀，一種具有以下結構之抗體-藥物結合物：



【0134】 貝倫妥單抗維多汀為由以下三種組分組成之CD30定向之抗體-藥物結合物：(i)嵌合IgG1抗體cAC10，對人類CD30具有特異性；(ii)微管破壞劑MMAE；及(iii)將MMAE共價附接至cAC10之蛋白酶可裂解連接子。藥物與抗體比率或藥物負荷由貝倫妥單抗維多汀之結構中之「p」表示，且範圍為1至8之整數值。醫藥組合物中之貝倫妥單抗維多汀之平均藥物負荷為約4。

使用方法

【0135】 本文提供了用於治療實體腫瘤之方法，其包括投予包括微管蛋白破壞劑之抗體-藥物結合物以治療實體腫瘤。在各種實施例中，考慮本發明之方法藉由在破壞微管功能後誘導ER應激路徑來治療實體腫瘤。在各種實施例中，包括微管蛋白破壞劑之抗體藥物結合劑誘導實體腫瘤中之細胞凋亡。

【0136】 在各種實施例中，包括微管蛋白破壞劑之抗體藥物結合劑增加免疫細胞向實體腫瘤之遷移。

【0137】 在實例中證明，微管蛋白破壞劑增加ER應激蛋白路徑，諸如增加ATP分泌及增加高遷移率族盒1(HMGB1)蛋白水準，其導致細胞凋亡增加，其又可將免疫細胞吸引到凋亡及細胞應激位點。

【0138】 考慮本文之方法減少受試者中之腫瘤大小或腫瘤負荷，及/或減少受試者中之轉移。在各種實施例中，受試者中之腫瘤大小減少約25-50%、約40-70%或約50-90%或更多。在各種實施例中，所述方法將腫瘤大小減小10%、20%、30%或更多。在各種實施例中，所述方法將腫瘤大小減小10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%。

【0139】 考慮本文之方法減少腫瘤負荷，並且一旦癌症進入緩解亦減少或預防腫瘤之復發。

【0140】 本文考慮之例示性實體腫瘤包含：肺癌、乳癌、卵巢癌、子宮頸癌、胃腸癌、頭頸癌、黑素瘤、肉瘤、食道癌、胰臟癌、轉移性胰臟癌、胰臟之轉移性腺癌、膀胱癌、胃癌、纖維化癌、神經膠質瘤、惡性神經膠質瘤、瀰漫性內因性腦橋神經膠質瘤、復發性兒童腦腫瘤、腎細胞癌、透明細胞轉移性腎細胞癌、腎癌、前列腺癌、轉移性去勢難治性前列腺癌、IV期前列腺癌、轉移性黑素瘤、黑素瘤、惡性黑素瘤、復發性皮膚黑素瘤、黑素瘤腦轉移、IIIA期皮膚黑素瘤；IIIB期皮膚黑素瘤、IIIC期皮膚黑素瘤；IV期皮膚黑素瘤、頭頸部惡性黑素瘤、肺癌、非小細胞肺癌(NSCLC)、鱗狀細胞非小細胞肺癌、乳癌、復發性轉移性乳癌、肝細胞癌、里克特(richter)症候群；瓦爾登斯特倫巨球蛋白血症、成人神經膠母細胞；成人神經膠質肉瘤、復發性神經膠母細胞瘤、復發性兒童橫紋肌肉瘤、復發性尤文氏肉瘤/外周原始神經外胚層瘤、復發性神經母細胞瘤；復發性骨肉瘤、結腸直腸癌、MSI陽性結腸直腸癌；MSI陰性結腸直腸癌、鼻咽非角化癌、復發性鼻咽未分化性癌、子宮頸腺癌；子宮頸腺鱗癌；子宮頸鱗狀細胞癌；復發性子宮頸癌；IVA期子宮頸癌；IVB期子宮

頸癌；肛管鱗狀細胞癌；轉移性肛管癌；復發性肛管癌、復發性頭頸癌；頭頸部鱗狀細胞癌(HNSCC)、卵巢癌、結腸癌、胃癌、晚期GI癌、胃腺癌;胃食道交界腺癌、骨腫瘤、軟組織肉瘤；骨肉瘤、胸腺癌、尿道上皮癌、復發性梅克爾細胞癌；III期梅克爾細胞癌；IV期梅克爾細胞癌、骨髓發育不良症候群與塞紮萊(Sezary)症候群。在一個實施例中，實體腫瘤為非淋巴瘤實體腫瘤。在一些實施例中，實體腫瘤可以為多發性骨髓瘤。

【0141】 在各種實施例中，ADC可以與一種或多種化療劑一起投予。例示性化療劑揭示於下表中且可單獨或與一種或多種另外之化療劑組合使用，所述另外之化療劑又可以與抗體藥物結合物組合投予。化療劑

烷化劑	天然產物
氮芥	抗有絲分裂藥物
雙氯乙基甲胺	
環磷醯胺	紫杉烷
依弗醯胺(IFOSFAMIDE)	太平洋紫杉醇
美法侖(MELPHALAN)	長春花生物鹼
氮芥苯丁酸	長春鹼(VLB)
	長春新鹼
亞硝脲	長春地辛
卡氮芥(BCNU)	長春瑞賓
環己亞硝脲(CCNU)	TAXOTERE®(多烯紫杉醇)
甲基環己亞硝脲(甲基-CCNU)	雌莫司汀(ESTRAMUSTINE)
	雌莫司汀磷酸鹽
乙烯亞胺/甲基三聚氰胺	
三乙烯三聚氰胺(TEM)	表鬼臼毒素(EPIPODOPHYLOTOXINS)
三乙烯硫代磷醯胺	依託泊苷(ETOPOSIDE)
(噻替哌(THIOTEPA))	替尼泊苷(TENIPOSIDE)
六甲三聚氰胺	
(HMM，六甲蜜胺)	抗生素
	放線菌素D
烷磺酸鹽	道諾黴素(紅比黴素)
硫酸布他卡因	小紅莓(阿德力黴素)
	米托蒽醌(MITOXANTRONE)
三嗪	伊達比星(IDARUBICIN)
達卡巴嗪(DTIC)	表柔比星(EPIRUBICIN)

抗代謝物 葉酸類似物 胺甲喋呤 三甲曲沙(TRIMETREXATE) 培美曲塞(PEMETREXED) (多靶抗葉酸劑) 嘧啶類似物 5-氟尿嘧啶 氟脫氧尿苷 吉西他濱(GEMCITABINE) 胞嘧啶阿拉伯糖 (AraC，阿糖胞苷) 5-氮雜胞苷 2,2'-二氟脫氧-胞苷 嘌呤類似物 6-硫醇嘌呤 6-硫鳥嘌呤 硫唑嘌呤 2'-脫氧助間型黴素 (噴司他丁(PENTOSTATIN)) 赤式輕基壬基腺嘌呤(EHNA) 氟達拉賓磷酸鹽(FLUDARABINE PHOSPHATE) 2-氯脫氧腺苷 (克拉屈濱(CLADRIBINE)，2-CdA) I型拓撲異構酶抑制劑 喜樹鹼 拓朴替康(TOPOTECAN) 伊立替康(IRINOTECAN) 生物反應調節劑 G-CSF GM-CSF 分化劑 視網酸衍生物 激素及拮抗劑 腎上腺皮質類固醇/拮抗劑	戊柔比星(VALRUBICIN) 博萊黴素 光神黴素(紅黴素) 絲裂黴素C 放線菌素 阿非科林(APHIDICOLIN) 酶類 L-天冬醯胺酸酶 L-精胺酸酶 輻射增敏藥 甲硝唑 米索硝唑 去甲基米索硝唑 哌莫硝唑 依他硝唑 尼莫拉唑 RSU 1069 EO9 RB 6145 SR4233 菸鹼醯胺 5-溴化脫氧尿嘧啶 5-碘化脫氧尿嘧啶 溴化脫氧胞苷 雜項劑 雙膦酸鹽 RANKL抑制劑 狄諾塞麥(DENOSUMAB) 鉑配位錯合物 順鉑 卡鉑 奧沙利鉑 蔥醌 米托蔥醌 經取代之尿素 脛基尿素
--	---

降鈣素 潑尼松(PREDNISONE)及等效物 地塞米松(DEXAMETHASONE) 胺魯米特(AINOGLUTETHIMIDE) 助孕素 經孕酮己酸酯 醋酸甲經孕酮 醋酸甲地孕酮 雌性素 乙烯雌酚 乙炔雌二醇/等效物 抗雌性素 他莫昔芬(TAMOXIFEN) 雄性素 丙酸睪酮 氟經甲基睪酮/等效物 抗雄性素 氟他胺(FLUTAMIDE) 促性腺素釋放 激素類似物 亮丙瑞林(LEUPROLIDE) 非類固醇抗雄性素 氟他胺(FLUTAMIDE) 組蛋白脫乙酰基酶抑制劑 伏立諾他(VORINOSTAT) 羅米地辛(ROMIDEPSIN)	甲胛衍生物 N-甲胛(MIH) 甲基苄胛 腎上腺皮質抑止劑 米托坦(<i>o,p'</i> -DDD) 胺魯米特 細胞介素 干擾素(α 、 β 、 γ) 介白素-2 光敏劑 血紫質衍生物 PHOTOFRIN® 苯并紫質衍生物 NPE6 本紫質錫(SnET2) 苯博瑞德-A(PHEOBORIDE-A) 細菌葉綠素-A 萘酞菁 酞菁 鋅酞菁 輻射 X-射線 紫外光 Γ 輻射 可見光 紅外輻射 微波輻射
--	--

【0142】 在各種實施例中，治療以週期為基礎投予，例如，每週兩次、每週一次、每兩週一次、每三週一次、每月一次，每兩個月一次或以更長的間隔投予。在相關實施例中，在例示性治療中，抗體藥物結合物以0.1至15 mg/kg之劑量範圍投予。

【0143】 在一個態樣中，本發明之方法包含投予醫藥組合物之步

驟。在某些實施例中，醫藥組合物為無菌組合物。

【0144】 本發明之方法使用用於將治療劑直接或間接引入哺乳動物受試者之任何醫學上可接受的方法進行，包含但不限於注射、口服攝取、鼻內、局部、透皮、腸胃外、吸入噴霧、陰道或直腸投予。如本文所用之術語腸胃外包含皮下、靜脈內、肌內與腦池內注射以及導管或輸注技術。亦考慮藉由皮內、乳房內、腹膜內、鞘內、眼球後、肺內注射及/或手術植入在特定部位投予。

【0145】 在一個實施例中，藉由直接注射到需要治療之癌症或患病組織部位或藉由持續遞送或持續釋放機制進行投予，所述持續遞送或持續釋放機制可以內部遞送調配物。例如，能夠持續遞送組合物(例如，可溶性多肽、抗體或小分子)之可生物降解的微球或膠囊或其他可生物降解的聚合物組態可包含在植入癌症附近或在癌症部位的本發明之調配物中。

【0146】 治療組合物亦可以在多個部位遞送給患者。多次投予可以同時進行或者可以在一段時間內投予。在某些情況下，提供治療組合物之連續流動為有益的。

【0147】 本發明中亦考慮投予多種試劑，諸如抗體組合物與本文所述之另一種試劑(包含但不限於化療劑)聯合。

【0148】 給定劑量中抗體藥物結合物組合物之量可以根據投予治療之個體的大小以及所治療病症的特徵而變化。在例示性的治療中，可能需要投予約1毫克/天、5毫克/天、10毫克/天、20毫克/天、50毫克/天、75毫克/天、100毫克/天、150毫克/天、200毫克/天、250毫克/天、500毫克/天或1000毫克/天。此等濃度可以作為單一劑型或多劑量投予。標準劑量-反應研究，首先在動物模型中，然後在臨床試驗中，揭示了用於特定疾病狀

態及患者群體之最佳劑量。

【0149】亦考慮了包括任何前述抗體藥物結合物的組合物，或其在製備用於治療實體腫瘤之藥物中的用途。亦考慮注射器，例如單次使用或預填充注射器；包括前述抗體或組合物中之任一者的無菌密封容器，例如，小瓶、瓶、器皿及/或試劑盒或包裝，視情況伴以適合之使用說明書。

調配物

【0150】可以使用各種遞送系統來投予藥物-連接子單元-抗體結合物/抗體-藥物結合物。在本發明之某些實施例中，抗體-藥物結合物化合物之投予為藉由靜脈內輸液或藉由皮下注射進行。在一些實施例中，投予為藉由靜脈內輸液30分鐘、1小時或兩小時進行。

【0151】抗體-藥物結合物化合物可作為包括一種或多種醫藥學上相容之成分的醫藥組合物來投予。例如，所述醫藥組合物典型地包含一種或多種醫藥學上可接受之載體，例如基於水之載體(例如無菌液體)。當靜脈內投予醫藥組合物時，水為更典型之載體。

【0152】若需要，則所述組合物亦可含有例如鹽水、緩衝劑、鹽、非離子清潔劑及/或糖。合適之醫藥載體之實例描述於E. W. Martin之「雷明頓醫藥科學(Remington's Pharmaceutical Sciences)」中。調配物對應於投予模式。

【0153】本發明提供例如包括治療有效量之抗體-藥物結合物、緩衝劑、視情況選用之低溫保護劑、視情況選用之增積劑、視情況選用之鹽及視情況選用之界面活性劑之醫藥組合物。可將另外之試劑添加至所述組合物中。單個試劑可提供多種功能。例如，諸如海藻糖之糖可充當低溫保

護劑及增積劑。可根據本發明使用任何合適之醫藥學上可接受之緩衝劑、界面活性劑、低溫保護劑及增積劑。

【0154】 除了提供用於治療血液癌症之方法之外，本發明亦提供包含已經受冷凍乾燥之藥物結合物調配物或蛋白質保存之其他方法以及未經受冷凍乾燥之抗體藥物調配物之抗體藥物結合物調配物。

【0155】 在一些實施例中，抗體藥物結合物調配物包括(i)約1-25 mg/ml、約3至約10 mg/ml或約5 mg/ml抗體-藥物結合物(例如式I抗體-藥物結合物或其醫藥學上可接受之鹽)；(ii)約5-50 mM、較佳約10 mM至約25 mM選自檸檬酸鹽、磷酸鹽或組胺酸緩衝劑或其組合、較佳檸檬酸鈉、磷酸鉀、組胺酸、組胺酸鹽酸鹽或其組合之緩衝劑；(iii)約3%至約10%蔗糖或海藻糖或其組合；(iv)視情況選用之約0.05至2 mg/ml選自聚山梨醇酯20或聚山梨醇酯80或其組合之界面活性劑；及(v)水，其中所述組合物之pH為約5.3至約7，較佳約6.6。

【0156】 在一些實施例中，抗體藥物結合物調配物將包括約1-25 mg/ml、約3至約10 mg/ml、較佳約5 mg/ml抗體-藥物結合物；(ii)約10 mM至約25 mM選自檸檬酸鈉、磷酸鉀、組胺酸、組胺酸鹽酸鹽或其組合之緩衝劑；(iii)約3%至約7%海藻糖或蔗糖或其組合；視情況選用之(iv)約0.05至約1 mg/ml選自聚山梨醇酯20或聚山梨醇酯80之界面活性劑；及(v)水，其中所述組合物之pH為約5.3至約7，較佳約6.6。

【0157】 在一些實施例中，抗體藥物結合物調配物將包括約5 mg/ml抗體-藥物結合物；(ii)約10 mM至約25 mM選自檸檬酸鈉、磷酸鉀、組胺酸、組胺酸鹽酸鹽或其組合之緩衝劑；(iii)約3%至約7%海藻糖；視情況選用之(iv)約0.05至約1 mg/ml選自聚山梨醇酯20或聚山梨醇

酯80之界面活性劑；及(v)水，其中所述組合物之pH為約5.3至約7，較佳約6.6。

【0158】 上述調配物中之任一種可以液體或冷凍形式儲存，且可視情況經受保存過程。在一些實施例中，將上述調配物冷凍乾燥，亦即使其經受冷凍乾燥。在一些實施例中，使上述調配物經受保存過程，例如冷凍乾燥，且隨後用例如水之合適的液體重組。冷凍乾燥意謂所述組合物在真空下進行冷凍乾燥。冷凍乾燥典型地藉由冷凍特定調配物以使得溶質與一或多種溶劑分離來實現。隨後藉由昇華(亦即初次乾燥)且接著藉由脫附(亦即二次乾燥)來移除溶劑。

【0159】 本發明之調配物可與本文所描述之方法或與其他方法一起使用以用於治療疾病。抗體藥物結合物調配物可在投予至受試者之前進行進一步稀釋。在一些實施例中，調配物將用鹽水稀釋且在投予至受試者之前保持在IV袋或注射器中。因此，在一些實施例中，用於治療受試者中之血液癌症之方法將包括向其有需要其之受試者投予週劑量之醫藥組合物，所述醫藥組合物包括具有式I之抗體-藥物結合物，其中抗體-藥物結合物之投予劑量占受試者體重約1.8 mg/kg或1.2 mg/kg至占受試者體重之0.9 mg/kg，且投予所述醫藥組合物至少三週，且其中抗體藥物結合物在投予至受試者之前存在於包括以下之調配物中：(i)約1-25 mg/ml、較佳約3至約10 mg/ml抗體-藥物結合物；(ii)約5-50 mM、較佳約10 mM至約25 mM選自檸檬酸鈉、磷酸鉀、組胺酸、組胺酸鹽酸鹽或其組合之緩衝劑；(iii)約3%至約10%蔗糖或海藻糖或其組合；(iv)視情況選用之約0.05至2 mg/ml選自聚山梨醇酯20或聚山梨醇酯80或其組合之界面活性劑；及(v)水，其中所述組合物之pH為約5.3至約7、較佳約6.6。

【0160】 提供包含小紅莓、長春鹼、達卡巴嗪、環磷醯胺、長春新鹼或潑尼松之考慮用於本文之化療劑之調配物以典型地用於治療癌症。例如，小紅莓、長春鹼、達卡巴嗪環磷醯胺、長春新鹼與潑尼松為可商購的且由美國FDA及其他管制機構批准用於治療患有多種類型癌症之患者。

【0161】 本發明亦提供用於治療實體腫瘤之試劑盒。試劑盒可包括(a)含有抗體-藥物結合物之容器及視情況選用之包括一種或多種化療劑之容器。若需要，則此類試劑盒可進一步包含各種習知醫藥試劑盒組分之一種或多種，諸如具有一種或多種醫藥學上可接受之載體之容器、另外的容器等，如對於熟習此項技術者而言為顯而易見的。試劑盒中亦可包含印刷說明書作為插入物或標籤，指示待投予之組分之量、投予指南及/或用於混合組分之指南。

實例

實例1-微管蛋白破壞劑對實體腫瘤之影響

【0162】 評估微管蛋白破壞劑對實體腫瘤細胞系之影響。用MMAE治療癌細胞並評估以下免疫原性細胞死亡(ICD)特徵；ER應激、ATP分泌及細胞外HMGB1水準。

【0163】 MCF7乳腺癌細胞用100nM MMAE治療16小時並在RIPA緩衝液中收集用於Western印跡分析。用MMAE治療激活ER應激反應之所有3種路徑，如IRE1及eIF2a之磷酸化(圖1A)所示以及全長ATF6之裂解所示。嚴重之ER應激為在腫瘤細胞表面上促吞噬信號曝露之先決條件，並且由MMAE引起，如藉由磷酸化IRE1激活JNK信號及CHOP表現所示。

【0164】 ICD之誘導之特徵亦在於ATP及HMGB1的分泌。細胞外ATP充當強趨化信號，促進免疫細胞向腫瘤部位之遷移。一旦到達，細胞

外HMGB1經由各種促炎受體(TLR2、TLR4、RAGE)發信號以激活抗原呈遞細胞，藉此促進腫瘤內之免疫活性。用MMAE治療MCF7細胞導致ATP與HMGB1之分泌增加(圖1B、1C)。

【0165】 嚴重之ER應激導致CHOP上調，並引發線粒體凋亡。將MiaPaca2胰臟腫瘤細胞工程化以表現CHOP驅動之螢光素酶報告系統(購自Signosis, Inc.)，其允許對嚴重之ER應激進行定量監測。用MMAE、長春新鹼及太平洋紫杉醇治療MiaPaca-CHOP-螢光素酶細胞，並在16小時後測定螢光素酶表現。用MMAE及長春新鹼治療顯示作為嚴重之ER應激誘導之代表的螢光素酶信號的劑量依賴性增加，而太平洋紫杉醇在峰值劑量下誘導適度之螢光素酶信號(圖2A)。

【0166】 將MiaPaca-CHOP-螢光素酶細胞皮下移植到NOD/SCID/ γ 鏈缺陷小鼠中。皮下腫瘤用MMAE(0.36 mg/kg)、長春新鹼(1.0 mg/kg)與太平洋紫杉醇(10 mg/kg)瘤內治療，並隨時間監測腫瘤螢光素酶信號。如所證明的，用MMAE與長春新鹼治療在移植之腫瘤中迅速引起嚴重之ER應激，而太平洋紫杉醇不誘導ER應激(圖2B)。

【0167】 MiaPaca2細胞用MMAE、長春新鹼或太平洋紫杉醇治療。治療16小時後收集上清液，並分析ATP分泌。用MMAE治療引起穩健的ATP分泌，而太平洋紫杉醇治療導致適度的ATP分泌(圖3A)。

【0168】 PC-3前列腺腫瘤細胞亦用MMAE、長春新鹼或太平洋紫杉醇治療。治療16小時後收集上清液，並分析ATP分泌。用MMAE與長春新鹼治療引起穩健的ATP分泌，而太平洋紫杉醇治療導致適度的ATP分泌(圖3B)。用含有MMAE之ADC(SGN-LIV1A)或MMAE治療PC-3細胞24小時，並在RIPA緩衝液中收集用於western印跡分析(圖3C)。用MMAE治療

引起ER應激(IRE1與JNK的磷酸化)及ATP與HMGB1之釋放，導致免疫原性細胞死亡的誘導(圖3D-3E)。

【0169】 將無胸腺裸鼠皮下植入PC-3細胞。在達到200立方毫米時，小鼠接受單次腹膜內劑量之含MMAE之ADC(SGN-LIV1A或抗CD71-MMAE)。ADC治療後8天，切除腫瘤並藉由流式細胞術評估免疫細胞浸潤與組成。用MMAE-ADC治療之腫瘤顯示增加的免疫細胞浸潤，其進一步顯示出增強的活化(圖4A-D)。

【0170】 在另一項研究中，無胸腺裸鼠皮下植入PC-3細胞。在達到200立方毫米時，小鼠接受單次腹膜內劑量之含MMAE之ADC(SGN-LIV1A或抗CD71-MMAE)。ADC治療後8天，切除腫瘤並在RIPA緩衝液中勻化，並藉由ELISA量測細胞介素/趨化介素之產生。亦藉由ELISA在血清中量測外周細胞介素水準。除了增加腫瘤內之免疫細胞外，如細胞介素與趨化介素從此等免疫細胞產生之增加所證明的，存在增強的免疫活性(圖5A-F)。

【0171】 將HeLa子宮頸癌細胞用1000nM或100nM MMAE、長春新鹼或太平洋紫杉醇治療16小時，並收集用於western印跡分析。各種治療激活ER應激反應，如IRE1之磷酸化所示。然而，MMAE引起更嚴重之ER應激反應，其藉由減少劑量維持，如JNK的進一步磷酸化所證明。用較低劑量之太平洋紫杉醇未觀察到穩健的JNK磷酸化(圖6)。

【0172】 皮膚腫瘤系A2058、SK-MEL-5與 SK-MEL-28、Calu-1(肺)、HT-1080(纖維肉瘤)、SK-MES-1(肺)與BXPC3(胰臟)細胞用MMAE、長春新鹼與太平洋紫杉醇治療。治療17小時後收集上清液，並分析ATP分泌。用MMAE與長春新鹼治療在所測定之大多數細胞系中引起

ATP分泌(6/7)，並且在所有測定之細胞系中能夠誘導比太平洋紫杉醇更穩健的反應(圖7A)。用MMAE治療引起所有3種A2058、SK-MEL-5、SK-MEL-28(皮膚)細胞系之有效ATP分泌，而太平洋紫杉醇僅從3種細胞系中的1種引起ATP分泌(圖7B)。

【0173】 A2058、SK-MEL-5、SK-MEL-28(皮膚)、Calu-1、HT-1080、SK-MES-1(肺)及BXPC3與HPAFII(胰臟)細胞用含有MMAE的ADC(例如，抗-p97-MMAE或抗-CD71-MMAE)或太平洋紫杉醇治療。治療一夜後收集上清液，並藉由ELISA分析HMGB1釋放。用含有MMAE之ADC或太平洋紫杉醇治療在所測定之大多數細胞系(5/7)中引起HMGB1釋放，並且能夠在所測定的所有細胞系中誘導比太平洋紫杉醇更穩健的反應。用抗CD71-MMAE治療從3種皮膚細胞系中的2種引起有效之HMGB1釋放。參見例如圖7C及下面的另外的描述。

【0174】 在另外之實驗中，將用MMAE治療之細胞系共培養或「進料」至衍生自健康供體之外周血單核細胞(PBMC)的免疫細胞，並評估治療的細胞對免疫細胞功能的影響。

實例2-微管蛋白破壞劑對免疫細胞活化之分析

【0175】 為了測定微管蛋白破壞劑對腫瘤細胞誘導免疫細胞活化能力之影響，將用微管蛋白破壞劑治療的細胞及在經歷ER應激與潛在細胞死亡的過程中進料至抗原呈遞細胞並量測對APC誘導的影響。

【0176】 藉由將PBMC黏附於細胞培養級塑膠上，從來自2個健康供體之PBMC中富集巨噬細胞。24小時後移除未黏附之細胞，留下富含巨噬細胞之細胞群。

【0177】 用MMAE、長春新鹼與太平洋紫杉醇治療A2058、SK-

MEL-5與SK-MEL-28(皮膚)細胞24小時。洗滌並收集細胞，且隨後與上述製備之富集之巨噬細胞共培養。共培養後4天收集巨噬細胞，並藉由流式細胞術測定免疫激活。定量抗原呈遞水準(如藉由MHCII表現細胞之頻率所量測)並將其標準化為與未治療之腫瘤細胞共培養的巨噬細胞。腫瘤細胞之MMAE治療導致2/3腫瘤細胞系中抗原呈遞的增加，其比太平洋紫杉醇更穩健(圖8A-8C)。

【0178】 24小時後收集來自巨噬細胞與染色的A2058及SK-MEL-5腫瘤細胞的共培養物的上清液，並藉由ELISA測定細胞介素與趨化介素產生的水準，並將其標準化為與未治療之腫瘤細胞共培養的巨噬細胞。用MMAE或含MMAE之ADC(抗-p97-MMAE)治療腫瘤細胞導致指示的細胞介素與趨化介素的增加，其比用太平洋紫杉醇治療更穩健(圖9A-9B)。與未治療之細胞相比，A2058細胞顯示GM-CSF、IFN γ 、MCP-3、IL-1RA、IL-7、MIP-1a、MIP-1b增加，而SK-MEL-5細胞顯示GM-CSF、INFa2、IFN γ 、MCP-3、IL-12p70、IL-17A、IL-1a、IL-1b、MCP-1、MIP-1a、MIP-1b增加)。

實例3

用微管蛋白破壞劑治療後抗原呈遞之另外分析

【0179】 藉由將PBMC黏附於細胞培養級塑膠上，從來自2個健康供體之PBMC中富集巨噬細胞。24小時後移除未黏附之細胞，留下富含巨噬細胞之細胞群。

【0180】 用MMAE、長春新鹼與太平洋紫杉醇治療BxPC3與HPAFII(胰臟)細胞24小時。洗滌並收集細胞，且隨後與上述製備之富集之巨噬細胞共培養。共培養後4天收集巨噬細胞，並藉由流式細胞術測定

免疫激活。定量抗原呈遞水準(如藉由MHCII表現細胞之頻率所量測)並將其標準化為與未治療之腫瘤細胞共培養之巨噬細胞。腫瘤細胞之MMAE與長春新鹼治療導致1/2腫瘤細胞系中抗原呈遞之增加，而用太平洋紫杉醇治療不會導致巨噬細胞抗原呈遞之變化(圖10A-10B)。用MMAE、長春新鹼或太平洋紫杉醇治療BxPC-3細胞17小時並分析ATP分泌。用所有3種微管蛋白結合劑治療能夠引起相同水準之ATP分泌(圖10C)。

【0181】 用太平洋紫杉醇或含MMAE之ADC(抗-p97-MMAE)治療24小時後，藉由ELISA評估BxPC-3細胞之HMGB1釋放。與太平洋紫杉醇治療相比，MMAE驅動之細胞死亡導致HMGB1釋放適度增加(圖10D)。

【0182】 24小時後收集來自巨噬細胞與染色的腫瘤細胞的共培養物的上清液，並藉由ELISA測定細胞介素與趨化介素產生的水準，並將其標準化為與未治療之腫瘤細胞共培養的巨噬細胞。用MMAE或抗-p97-MMAE治療腫瘤細胞導致指示的細胞介素與趨化介素的增加，其比用太平洋紫杉醇治療更穩健(圖11A-11B)。

【0183】 如上所述，在與巨噬細胞共培養後，測試另外的細胞系[Calu-1(肺)、HT1080(纖維肉瘤)與SK-MES-1(皮膚)]的抗原呈遞水準。定量共刺激(如藉由CD86表現巨噬細胞，Calu-1之頻率所量測)或抗原呈遞(如藉由MHCII表現巨噬細胞，HT1080與SK-MES-1之頻率所量測)之水準並將其標準化為與未治療之腫瘤細胞共培養的巨噬細胞。腫瘤細胞的MMAE治療導致3/3腫瘤細胞系中免疫激活的增加，其比用太平洋紫杉醇治療更穩健(圖12A-12C)。用含有MMAE之ADC(抗-p97-MMAE)、長春新鹼或太平洋紫杉醇治療Calu-1、HT-1080與SK-MES-1細胞24小時，並藉由ELISA分析HMGB1釋放。用抗p97-MMAE治療從3個細胞系中的2個

中引起有效的HMGB1釋放(圖12D-12F)。

【0184】 24小時後收集來自巨噬細胞與染色的腫瘤細胞的上清液，並藉由ELISA測定細胞介素與趨化介素產生的水準，並將其標準化為如上所述之與未治療之腫瘤細胞共培養的巨噬細胞。用MMAE或含MMAE之ADC治療Calu-1細胞導致指示的細胞介素與趨化介素的增加，其比用太平洋紫杉醇治療更穩健(圖13)。

【0185】 用MMAE、含MMAE之ADC(抗CD71 OKT9-1006)長春新鹼與太平洋紫杉醇治療MCF7(三陰性乳腺癌)細胞24小時。洗滌並收集細胞，且隨後與上述製備之富集之巨噬細胞共培養。共培養後4天收集巨噬細胞，並藉由流式細胞術測定免疫激活。用MMAE或含有MMAE之ADC治療腫瘤細胞導致巨噬細胞抗原呈遞的增加，如藉由MHCII表現巨噬細胞的頻率所量測，其比用太平洋紫杉醇治療更穩健(圖14A)。24小時後收集來自巨噬細胞與染色MCF7細胞的共培養物的上清液，並藉由ELISA測定細胞介素與趨化介素產生的水準，並將其標準化為與未治療之腫瘤細胞共培養的巨噬細胞。用MMAE或含MMAE之ADC治療MCF7細胞導致指示的細胞介素與趨化介素的增加，其比用太平洋紫杉醇治療更穩健(圖14B)。

【0186】 用MMAE或含MMAE之ADC(SGN-LIV1A)治療MCF7細胞16小時，並在RIPA緩衝液中收集用於western印跡分析。用MMAE治療激活ER應激反應的所有3種路徑，如IRE1與eIF2 α 的磷酸化以及全長ATF6之裂解所示。嚴重的ER應激為在腫瘤細胞表面上促吞噬信號曝露的先決條件，並且由MMAE引起，如藉由磷酸化IRE1激活JNK信號傳導及CHOP表現所示(圖15A)。ICD之誘導之特徵亦在於ATP及HMGB1的分泌。細胞

外ATP充當強趨化信號，促進免疫細胞向腫瘤部位之遷移。一旦到達，細胞外HMGB1經由各種促炎受體(TLR2、TLR4、RAGE)發信號以激活抗原呈遞細胞，藉此促進腫瘤內之免疫活性。用MMAE於SGN-LIV1A治療MCF7細胞導致ATP與HMGB1之分泌增加(圖15B-15C)。

【0187】 用SGN-LIV1A或艾日布林治療MCF7引起嚴重的ER應激(IRE1及JNK的磷酸化)，而太平洋紫杉醇及多烯紫杉醇不引起JNK磷酸化。在用SGN-LIV1A或艾日布林治療48小時後，ATP分泌增加亦為明顯的，表明由於微管破壞導致有效之ICD誘導，而太平洋紫杉醇與多烯紫杉醇均未引起ATP分泌(圖16A-16B)。

【0188】 SCID小鼠皮下植入MCF7細胞。在達到200立方毫米時，小鼠接受單次腹膜內劑量之含MMAE之ADC(SGN-LIV1A或抗CD71-MMAE)。ADC治療後8天，切除腫瘤並藉由流式細胞術評估免疫細胞組成。由於MMAE驅動之細胞死亡與免疫原性，MMAE-ADC治療之腫瘤顯示腫瘤浸潤性免疫細胞的免疫激活水準增加(圖17A-17E)。

【0189】 用MMAE或含MMAE之ADC(ASG-22ME)治療MDA-MB-468細胞。治療48小時後收集上清液，並分析ATP分泌。用MMAE或ASG-22ME治療引起與已知ER應激及自噬誘導物毒胡蘿蔔素相當的穩健ATP分泌(圖18)。

【0190】 用MMAE、特吡萊辛M、長春新鹼與太平洋紫杉醇治療肝腫瘤系Hep3b、Huh7與JHH7細胞24小時並分析ATP分泌。用MMAE或特吡萊辛M治療從評估的3種細胞系中的3種引起有效的ATP分泌(圖19A-C)。洗滌並收集細胞，隨後與如上述製備之富集的巨噬細胞共培養。共培養後4天收集巨噬細胞，並藉由流式細胞術測定免疫激活。定量共刺激(如

藉由CD86表現，JHH7所量測)與抗原呈遞(如藉由MHCII表現細胞，Hep3b、Huh7與JHH7之頻率所量測)的水準，並將其標準化為與與太平洋紫杉醇治療的腫瘤細胞共培養的巨噬細胞。腫瘤細胞之MMAE治療導致3/3腫瘤細胞系中免疫激活的增加，其比太平洋紫杉醇更穩健(圖19D-19G)。24小時後收集來自巨噬細胞與染色肝腫瘤細胞的共培養物的上清液，並藉由ELISA測定細胞介素與趨化介素產生的水準，並將其標準化為與未治療之腫瘤細胞共培養的巨噬細胞。用MMAE或特吡萊辛M治療Hep3b、Huh7與JHH7細胞導致指示的細胞介素及趨化介素的增加，其比用太平洋紫杉醇治療更穩健(圖20A-20C)。

【0191】 用MMAE或含MMAE之ADC(ASG-22ME)治療T-24(膀胱)細胞48小時並分析ATP分泌。用MMAE或ASG-22ME治療引起有效的ATP分泌(圖21A)。亦用MMAE、含MMAE之ADC(ASG22ME，因福土單抗維多汀)、長春新鹼與太平洋紫杉醇治療T-24細胞24小時。洗滌並收集細胞，隨後與如上述製備之富集的巨噬細胞共培養。共培養後4天收集巨噬細胞，並藉由流式細胞術測定免疫激活。定量抗原呈遞水準(如藉由MHCII表現巨噬細胞的頻率所量測)並將其標準化為與未治療之腫瘤細胞共培養的巨噬細胞。用MMAE或含有MMAE之ADC治療T-24細胞導致巨噬細胞抗原呈遞的增加，其比用太平洋紫杉醇治療更穩健(圖21B)。24小時後收集來自巨噬細胞與染色T-24腫瘤細胞的共培養物的上清液，並藉由ELISA測定細胞介素與趨化介素產生的水準，並將其標準化為與未治療之腫瘤細胞共培養的巨噬細胞。用MMAE或含MMAE之ADC治療T-24細胞導致指示的細胞介素與趨化介素的增加，其比用太平洋紫杉醇治療更穩健(圖21C)。

【0192】 用游離MMAE(492nM)、含MMAE之ADC(SGN-CD48A，10ng/ml)與非結合MMAE-ADC(10ng/ml)治療U-266多發性骨髓瘤細胞24與48小時。在各個時間點收集細胞並製備全細胞裂解物。將各樣品之裂解物在SDS-Page上運行並轉移到硝酸纖維素膜上。使用磷酸-JNK Thr183/Tyr185(pJNK)、PARP、ATF4、AT6、磷酸-IRE-1Ser274(pIRE-1)進行Western印跡分析。β-肌動蛋白用作負荷對照。多發性骨髓瘤細胞諸如U-266顯示高水準之內源性ER應激，其藉由檢測基礎pJNK與pIRE-1染色指示(圖22A)。然而，用MMAE與SGN-CD48A治療進一步增加了ER應激反應，如ATF4表現的升高以及JNK的磷酸化所示。PARP(較低分子量帶)之裂解為經歷細胞凋亡的細胞的指示。重要的為，MMAE在U-266細胞中誘導ER應激足以引起ICD標記。

【0193】 U-266細胞用游離MMAE(492nM)、含MMAE之ADC(SGN-CD48A，10 ng/ml)治療48小時，並且非結合MMAE-ADC(10 ng/ml)治療48小時。收集細胞，在流動緩衝液中洗滌，隨後對膜聯蛋白(Annexin)V(細胞凋亡的標記)與HSP70進行染色。細胞亦用膜聯蛋白V與鈣網蛋白染色。在兩種條件下，選擇膜聯蛋白V陰性之細胞，並測定HSP70或鈣網蛋白陽性之百分比。ICD標記百分比之增加在死亡前用SGN-CD48A與游離MMAE治療後在細胞表面上為明顯的(圖22B)，提供有效的促吞噬細胞信號以增強抗腫瘤免疫。

【0194】 上述說明性實例中闡述之本發明中之許多修改及變體預期為熟習此項技術者所想到。因此，本發明應該僅受隨附申請專利範圍中所呈現之限制的限制。

【序列表】

<110> 美商西雅圖遺傳學公司

<120> 包括微管蛋白破壞劑之抗體藥物結合物治療實體腫瘤之用途

<130> 32850/52785P2

<160> 16

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 351

<212> DNA

<213> 小家鼠

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(351)

<400> 1

cag atc cag ctg cag cag tct gga cct gag gtg gtg aag cct ggg gct	48
Gln Ile Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Val Val Lys Pro Gly Ala	
1 5 10 15	
tca gtg aag ata tcc tgc aag gct tct ggc tac acc ttc act gac tac	96
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr	
20 25 30	
tat ata acc tgg gtg aag cag aag cct gga cag gga ctt gag tgg att	144
Tyr Ile Thr Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile	
35 40 45	
gga tgg att tat cct gga agc ggt aat act aag tac aat gag aag ttc	192
Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Asn Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe	
50 55 60	
aag ggc aag gcc aca ttg act gta gac aca tcc tcc agc aca gcc ttc	240
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Phe	
65 70 75 80	
atg cag ctc agc agc ctg aca tct gag gac act gct gtc tat ttc tgt	288
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys	
85 90 95	
gcg aac tat ggt aac tac tgg ttt gct tac tgg ggc caa ggg act cag	336
Ala Asn Tyr Gly Asn Tyr Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln	
100 105 110	
gtc act gtc tct gca	351
Val Thr Val Ser Ala	
115	

<210> 2

<211> 117

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 2

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

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

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

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

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

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

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

Val Thr Val Ser Ala
115

<210> 3
<211> 15
<212> DNA
<213> 小家鼠

<400> 3
gactactata taacc 15

<210> 4
<211> 5
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 4

Asp Tyr Tyr Ile Thr
1 5

<210> 5
<211> 51
<212> DNA
<213> 小家鼠

<400> 5
tggattttatc ctggaagcgg taatactaag tacaatgaga agttcaaggg c 51

<210> 6
<211> 17
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 6

Trp Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Asn Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 7
<211> 24
<212> DNA
<213> 小家鼠

<400> 7
tatggtaact actggtttgc ttac 24

<210> 8
<211> 8
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 8

Tyr Gly Asn Tyr Trp Phe Ala Tyr
1 5

<210> 9
<211> 333
<212> DNA
<213> 小家鼠

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(333)

<400> 9
gac att gtg ctg acc caa tct cca gct tct ttg gct gtg tct cta ggg 48
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

cag agg gcc acc atc tcc tgc aag gcc agc caa agt gtt gat ttt gat 96
Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Phe Asp
20 25 30

ggt gat agt tat atg aac tgg tac caa cag aaa cca gga cag cca ccc 144
Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

aaa gtc ctc atc tat gct gca tcc aat cta gaa tct ggg atc cca gcc 192
Lys Val Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
50 55 60

agg ttt agt ggc agt ggg tct ggg aca gac ttc acc ctc aac atc cat 240
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
65 70 75 80

cct gtg gag gag gag gat gct gca acc tat tac tgt cag caa agt aat 288
Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn
85 90 95

gag gat ccg tgg acg ttc ggt gga ggc acc aag ctg gaa atc aaa 333
Glu Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 10

<211> 111
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 10

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

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

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

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

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

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

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

<210> 11
<211> 45
<212> DNA
<213> 小家鼠

<400> 11
aaggccagcc aaagtgttga ttttgatggt gatagttata tgaac 45

<210> 12
<211> 15
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 12

Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Phe Asp Gly Asp Ser Tyr Met Asn
1 5 10 15

<210> 13
<211> 21
<212> DNA
<213> 小家鼠

<400> 13
gctgcatcca atctagaatc t 21

<210> 14
<211> 7
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 14

Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser
1 5

<210> 15
<211> 27
<212> DNA
<213> 小家鼠

<400> 15
cagcaaagta atgaggatcc gtggacg 27

<210> 16
<211> 9
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 16
Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Trp Thr
1 5

【發明申請專利範圍】

【第1項】

一種治療實體腫瘤之方法，所述方法包括以有效治療所述實體腫瘤之量向有需要之受試者投予具有下式的抗體藥物結合劑：藥物-連接子單元-抗體(D-LU-Ab)，其中D為微管蛋白破壞劑。

【第2項】

一種調節實體腫瘤中ATP釋放之方法，所述方法包括以有效誘導所述實體腫瘤中細胞凋亡之量投予具有下式之抗體藥物結合劑：藥物-連接子單元-抗體(D-LU-Ab)，其中D為微管蛋白破壞劑。

【第3項】

一種誘導免疫細胞遷移至實體腫瘤之方法，所述方法包括以有效誘導免疫細胞浸潤至所述實體腫瘤中之量向有需要之受試者投予具有下式的抗體藥物結合劑：藥物-連接子單元-抗體(D-LU-Ab)，其中D為微管蛋白破壞劑。

【第4項】

一種誘導實體腫瘤中免疫原性細胞死亡(ICD)之方法，所述方法包括以有效誘導所述實體腫瘤中免疫原性細胞死亡之量向有需要之受試者投予具有下式的抗體藥物結合劑：藥物-連接子單元-抗體(D-LU-Ab)，其中D為微管蛋白破壞劑。

【第5項】

如請求項1至4中任一項之方法，其中所述抗體對以下各者具有特異性：CD30、CD19、CD70、CD71、CD20、CD52、CD133、EGFR、HER2、VEGF、VEGFR2、PD-1、PDL1、RANKL、CTLA-4、IL-6、

SLAMF7、CD3、TNF- α 、PDGFR- α 、CD38、GD2、cCLB8、p97、 連接素-4或EpCAM。

【第6項】

如前述請求項中任一項之方法，其中所述微管蛋白破壞劑增加ER應激蛋白路徑、增加ATP分泌且增加高遷移率族盒1(HMGB1)蛋白。

【第7項】

如前述請求項中任一項之方法，其中所述微管蛋白破壞劑選自由以下組成之群：奧瑞他汀、特吡萊辛、秋水仙鹼、長春花生物鹼、紫杉烷、克瑞托欣、類美登素、哈密特林及其他微管蛋白破壞劑。

【第8項】

如前述請求項中任一項之方法，其中所述微管蛋白破壞劑為選自由以下組成之群的奧瑞他汀：單甲基奧瑞他汀E(MMAE)、單甲基奧瑞他汀F(MMAF)與海兔毒素-10。

【第9項】

如請求項1至7中任一項之方法，其中所述微管蛋白破壞劑為選自由以下組成之群的特吡萊辛：特吡萊辛D、特吡苯丙胺酸與妥布洛辛。

【第10項】

如請求項1至7中任一項之方法，其中所述微管蛋白破壞劑為選自由以下組成之群的秋水仙鹼：秋水仙鹼與CA-4。

【第11項】

如請求項1至7中任一項之方法，其中所述微管蛋白破壞劑為選自由以下組成之群的長春花生物鹼：長春鹼(VBL)、長春瑞賓(VRL)、長春新鹼(VCR)與長春地辛(VDS)。

【第12項】

如請求項1至7中任一項之方法，其中所述微管蛋白破壞劑為選自由以下組成之群的紫杉烷：太平洋紫杉醇與多烯紫杉醇。

【第13項】

如請求項1至7中任一項之方法，其中所述微管蛋白破壞劑為選自由以下組成之群的克瑞托欣：克瑞托欣-1與克瑞托欣-52。

【第14項】

如請求項1至7中任一項之方法，其中所述微管蛋白破壞劑為選自由以下組成之群的類美登素：美登素、美登醇、美登素類似物、DM1、DM3與DM4及安莎黴素-2。

【第15項】

如請求項1至7中任一項之方法，其中所述微管蛋白破壞劑為選自由以下組成之群的哈密特林：哈密特林與HTI-286。

【第16項】

如請求項1至7中任一項之方法，其中所述微管蛋白破壞劑選自由以下組成之群：塔卡醯胺A、塔卡醯胺B、塔卡醯胺AF、塔卡醯胺AJ、塔卡醯胺AI-環氧化物、迪斯德莫來、埃坡黴素A、埃坡黴素B及絡厘麥萊蒂。

【第17項】

如前述請求項中任一項之方法，其中所述實體腫瘤為選自由以下組成之群：肺癌、乳癌、卵巢癌、子宮頸癌、胃腸癌、頭頸癌、黑素瘤、肉瘤、食道癌、胰臟癌、轉移性胰臟癌、胰臟之轉移性腺癌、膀胱癌、胃癌、纖維化癌、神經膠質瘤、惡性神經膠質瘤、瀰漫性內因性腦橋神經膠質瘤、復發性兒童腦腫瘤、腎細胞癌、透明細胞轉移性腎細胞癌、腎癌、

前列腺癌、轉移性去勢難治性前列腺癌、IV期前列腺癌、轉移性黑素瘤、黑素瘤、惡性黑素瘤、復發性皮膚黑素瘤、黑素瘤腦轉移、IIIA期皮膚黑素瘤；IIIB期皮膚黑素瘤、IIIC期皮膚黑素瘤；IV期皮膚黑素瘤、頭頸部惡性黑素瘤、肺癌、非小細胞肺癌(NSCLC)、鱗狀細胞非小細胞肺癌、乳癌、復發性轉移性乳癌、肝細胞癌、里克特症候群；瓦爾登斯特倫巨球蛋白血症、成人神經膠母細胞；成人神經膠質肉瘤、復發性神經膠母細胞瘤、復發性兒童橫紋肌肉瘤、復發性尤文氏肉瘤/外周原始神經外胚層瘤、復發性神經母細胞瘤；復發性骨肉瘤、結腸直腸癌、MSI陽性結腸直腸癌；MSI陰性結腸直腸癌、鼻咽非角化癌、復發性鼻咽未分化性瘤、子宮頸腺癌；子宮頸腺鱗癌；子宮頸鱗狀細胞癌；復發性子宮頸癌；IVA期子宮頸癌；IVB期子宮頸癌；肛管鱗狀細胞癌；轉移性肛管癌；復發性肛管癌、復發性頭頸癌；頭頸部鱗狀細胞癌(HNSCC)、卵巢癌、結腸癌、胃癌、晚期GI癌、胃腺癌；胃食道交界腺癌、骨腫瘤、軟組織肉瘤；骨肉瘤、胸腺癌、尿道上皮癌、復發性梅克爾細胞癌；III期梅克爾細胞癌；IV期梅克爾細胞癌、骨髓發育不良症候群與塞紮萊症候群。

【第18項】

如前述請求項中任一項之方法，其中所述抗體藥物結合物包括蛋白酶可裂解連接子、酸可裂解連接子或二硫化物連接子。

【第19項】

如請求項18之方法，其中所述蛋白酶可裂解連接子包括硫醇反應性間隔子及二肽。

【第20項】

如請求項18或19之方法，其中所述蛋白酶可裂解連接子由硫醇反應

性馬來醯亞胺己醯基間隔子、纈胺酸-瓜胺酸二肽及對胺基-苄氧基羰基間隔子組成。

【第21項】

如請求項18之方法，其中所述酸可裂解連接子為胍連接子或四級銨連接子。

【第22項】

如前述請求項中任一項之方法，其進一步包括投予化療方案。

【第23項】

如請求項22之方法，其中所述化療方案基本上由作為組合療法之以下各者組成：小紅莓、長春鹼與達卡巴嗪(AVD)。

【第24項】

如請求項22之方法，其中所述化療方案基本上由作為組合療法之以下各者組成：環磷醯胺、長春新鹼與潑尼松(CHP)。

【第25項】

如前述請求項中任一項之方法，其中所述抗體藥物結合物之所述抗體為單株抗體。

【第26項】

如前述請求項中任一項之方法，其中所述抗體為抗CD30抗體且所述抗CD30抗體藥物結合物包括：

i)SEQ ID NO: 4中列出之重鏈CDR1、SEQ ID NO: 6中列出之重鏈CDR2、SEQ ID NO: 8中列出之重鏈CDR3；及

ii)SEQ ID NO: 12中列出之輕鏈CDR1、SEQ ID NO: 14中列出之輕鏈CDR2及SEQ ID NO: 16中列出之輕鏈CDR13。

【第27項】

如請求項1至25中任一項之方法，其中所述抗體為抗CD30抗體且所述抗CD30抗體藥物結合物包括：

i)與SEQ ID NO: 2中列出之重鏈可變區具有至少85%一致性之胺基酸序列，及

ii)與SEQ ID NO: 10中列出之輕鏈可變區具有至少85%一致性之胺基酸序列。

【第28項】

如前述請求項中任一項之方法，其中所述抗體為抗CD30抗體且所述抗體藥物結合物之所述抗CD30抗體為嵌合AC10抗體。

【第29項】

如前述請求項中任一項之方法，其中所述抗體藥物結合物包括單甲基奧瑞他汀E及蛋白酶可裂解連接子。

【第30項】

如請求項29之方法，其中所述蛋白酶可裂解連接子包括硫醇反應性間隔子及二肽。

【第31項】

如請求項29或30之方法，其中所述蛋白酶可裂解連接子之由硫醇反應性馬來醯亞胺己醯基間隔子、纈胺酸-瓜胺酸二肽及對胺基-苄氧基羰基間隔子組成。

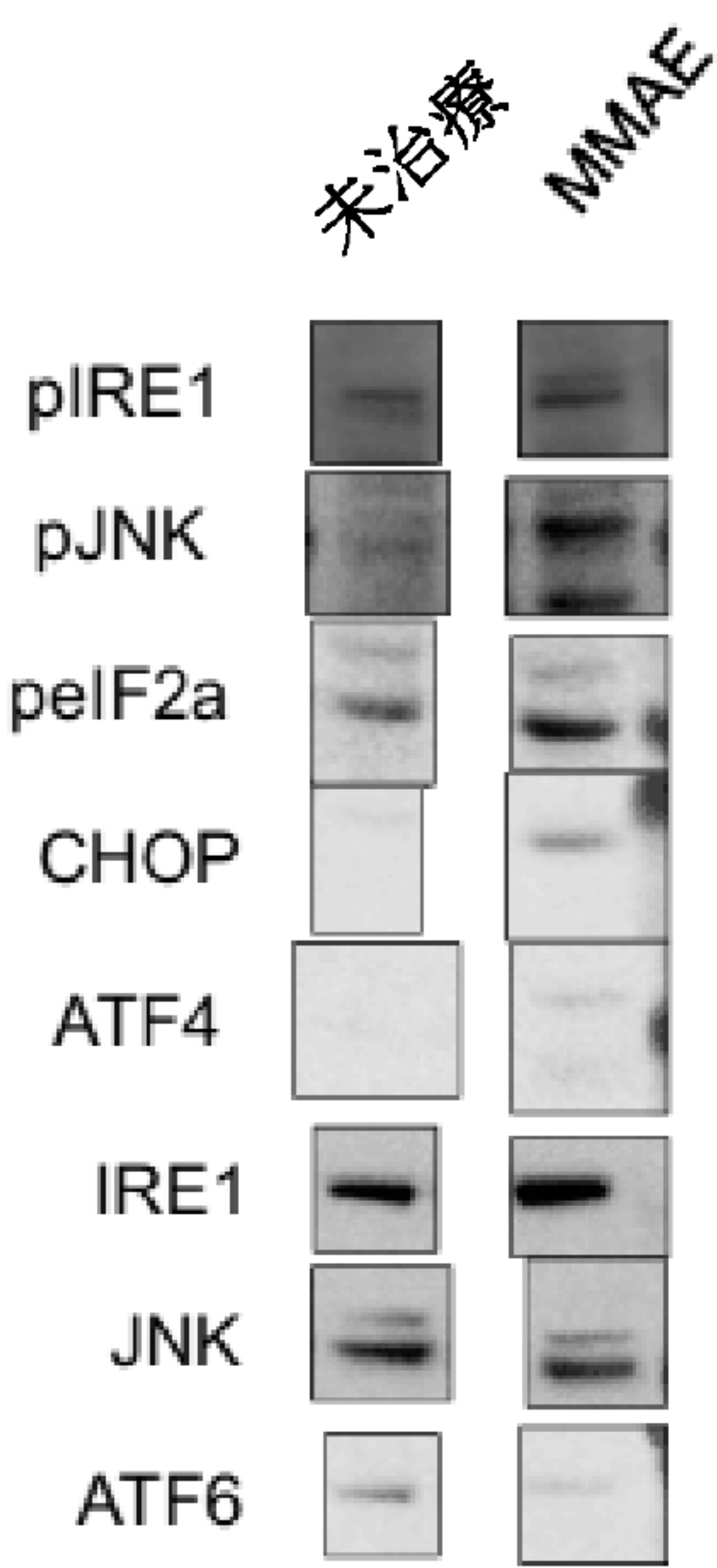
【第32項】

如前述請求項中任一項之方法，其中所述抗CD30抗體藥物結合物為貝倫妥單抗維多汀。

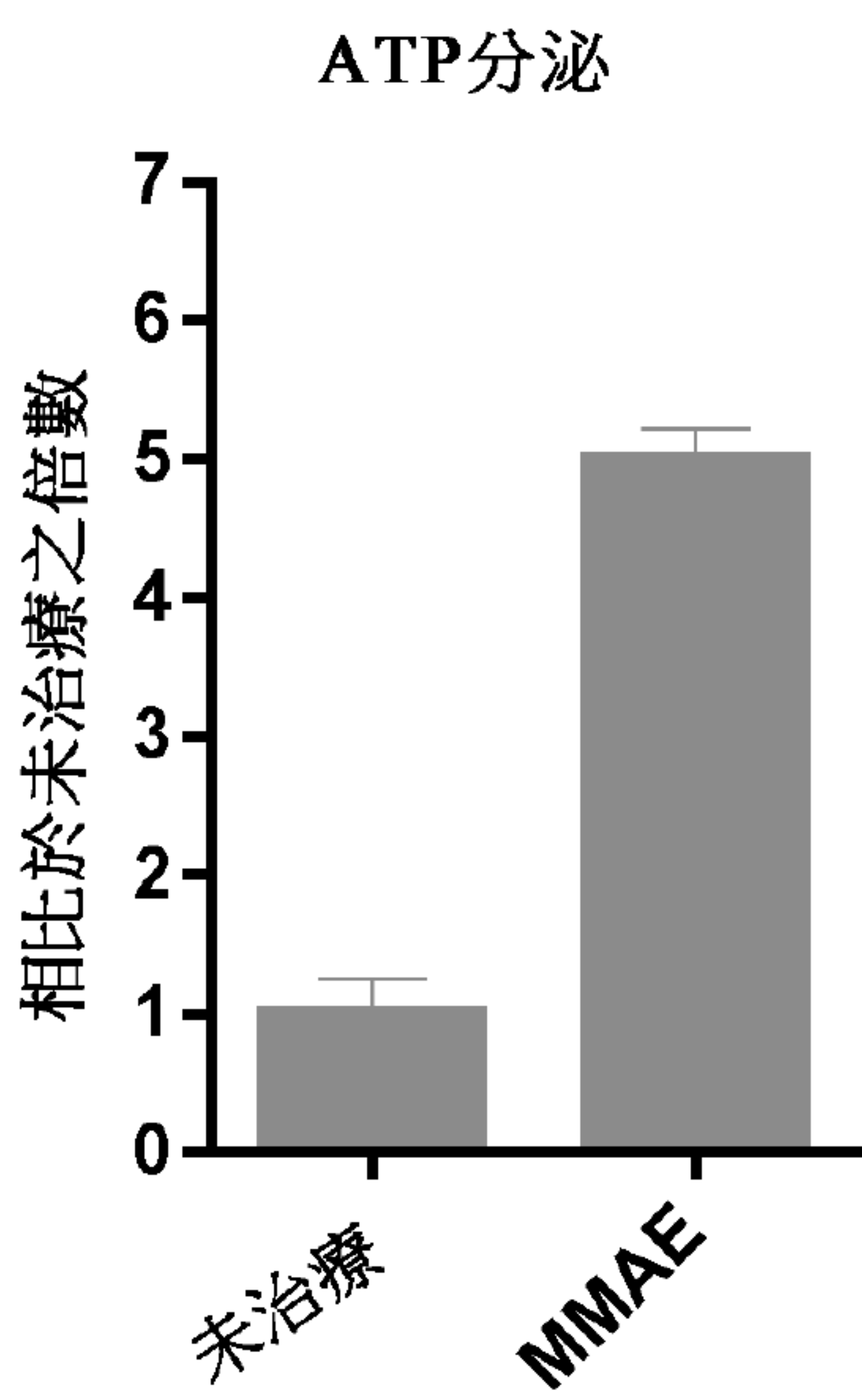
【第33項】

如前述請求項中任一項之方法，其中所述抗體藥物結合物誘導免疫細胞遷移至所述腫瘤位點中。

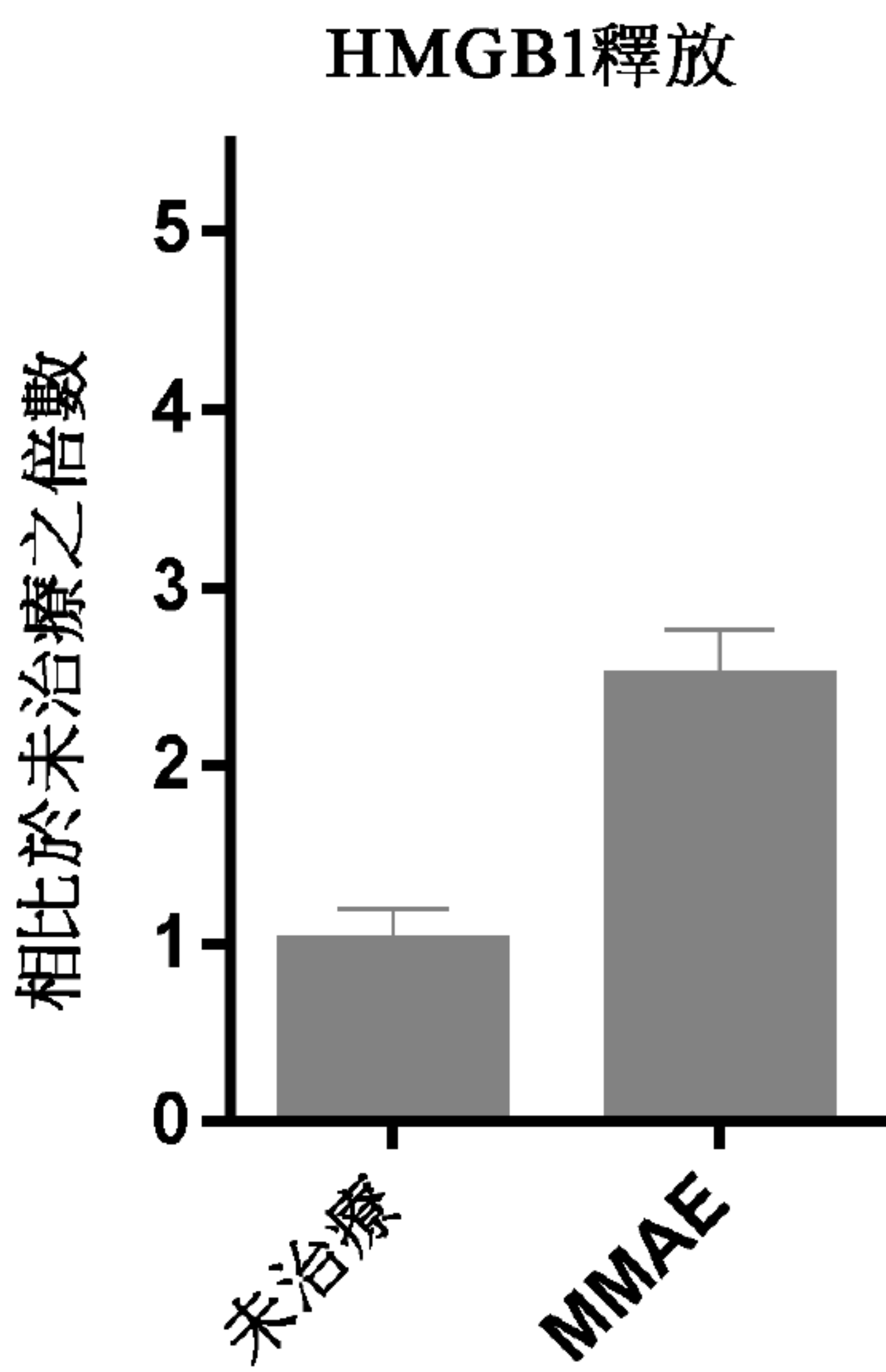
【發明圖式】



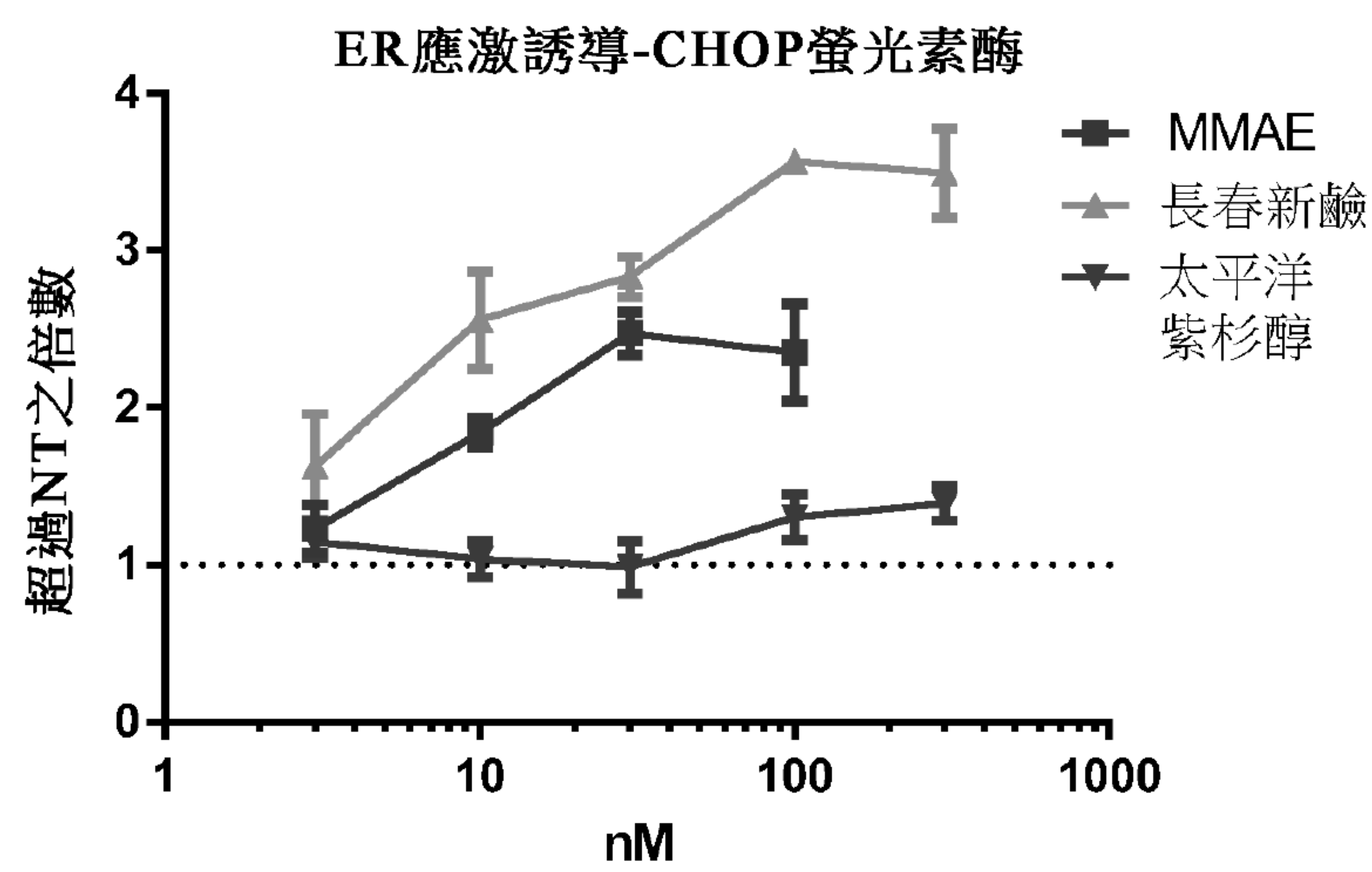
【圖1A】



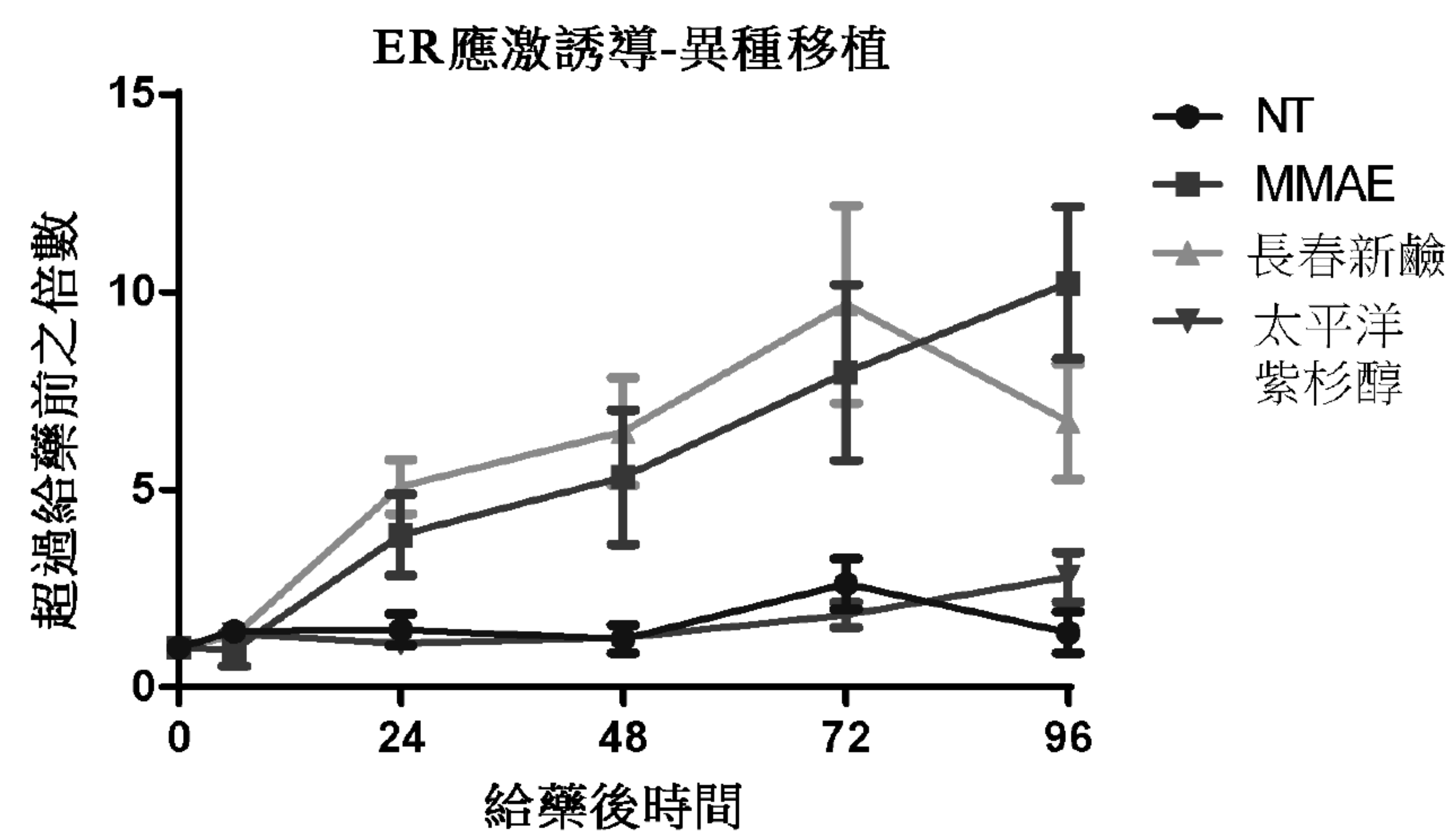
【圖1B】



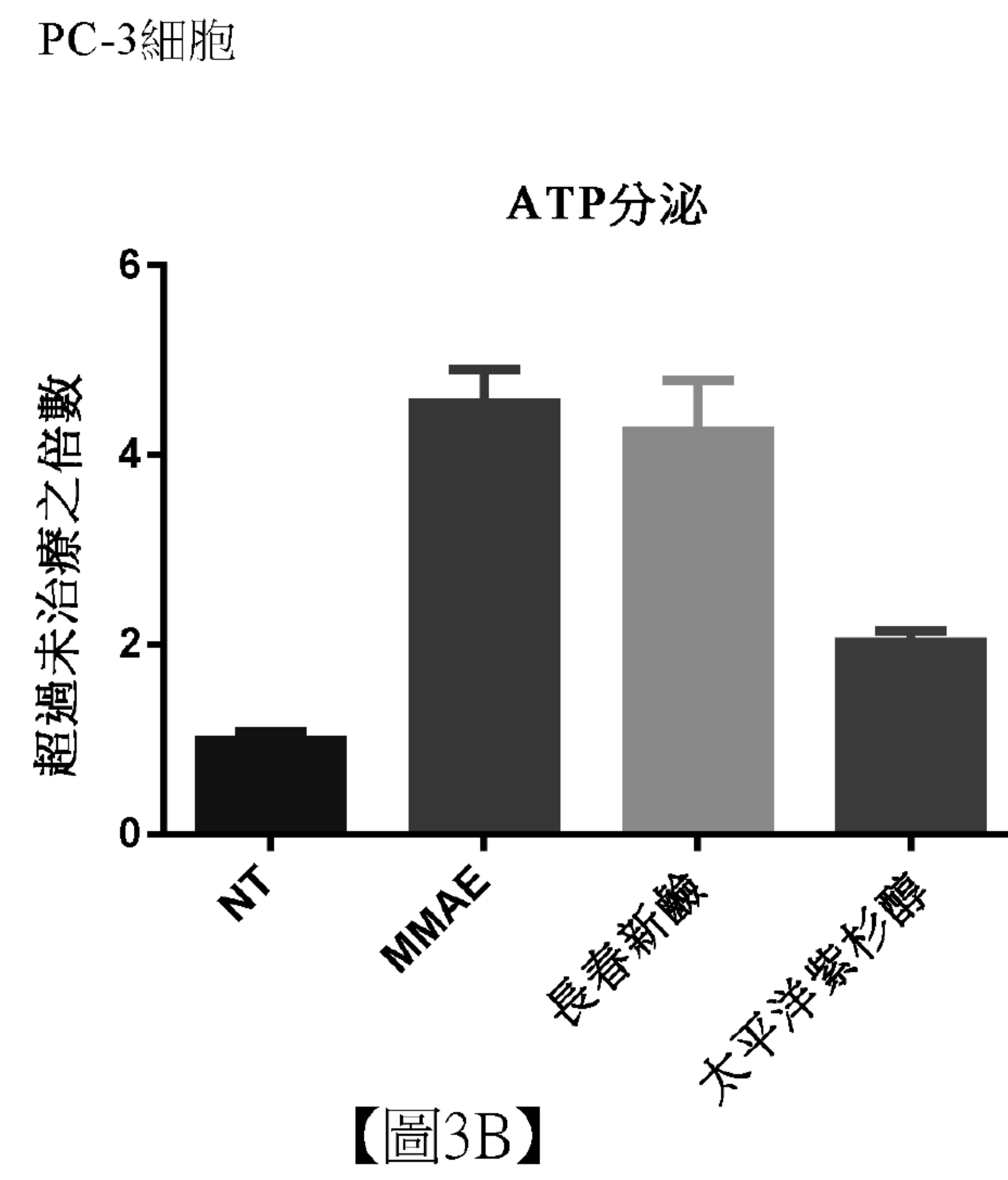
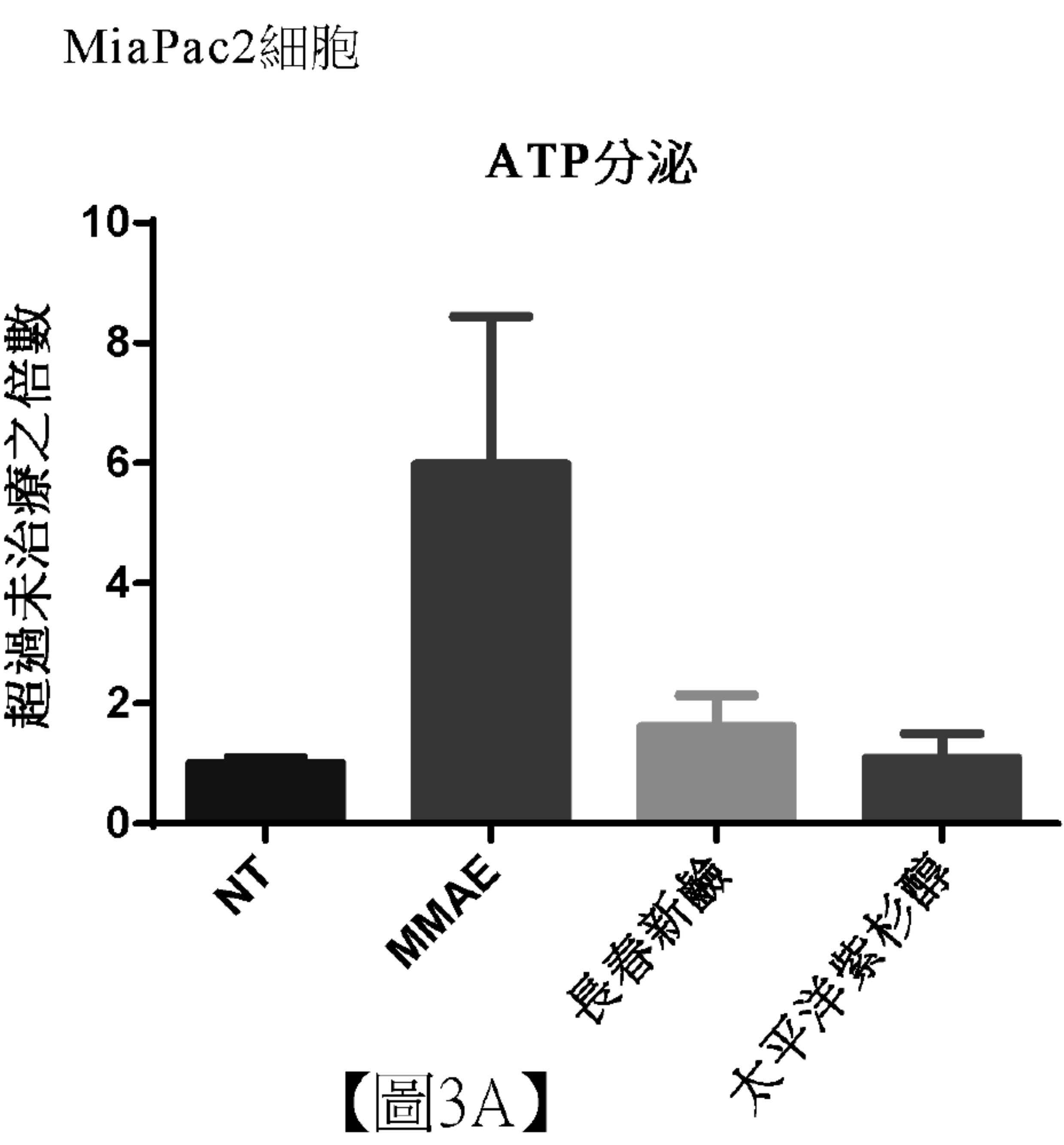
【圖1C】

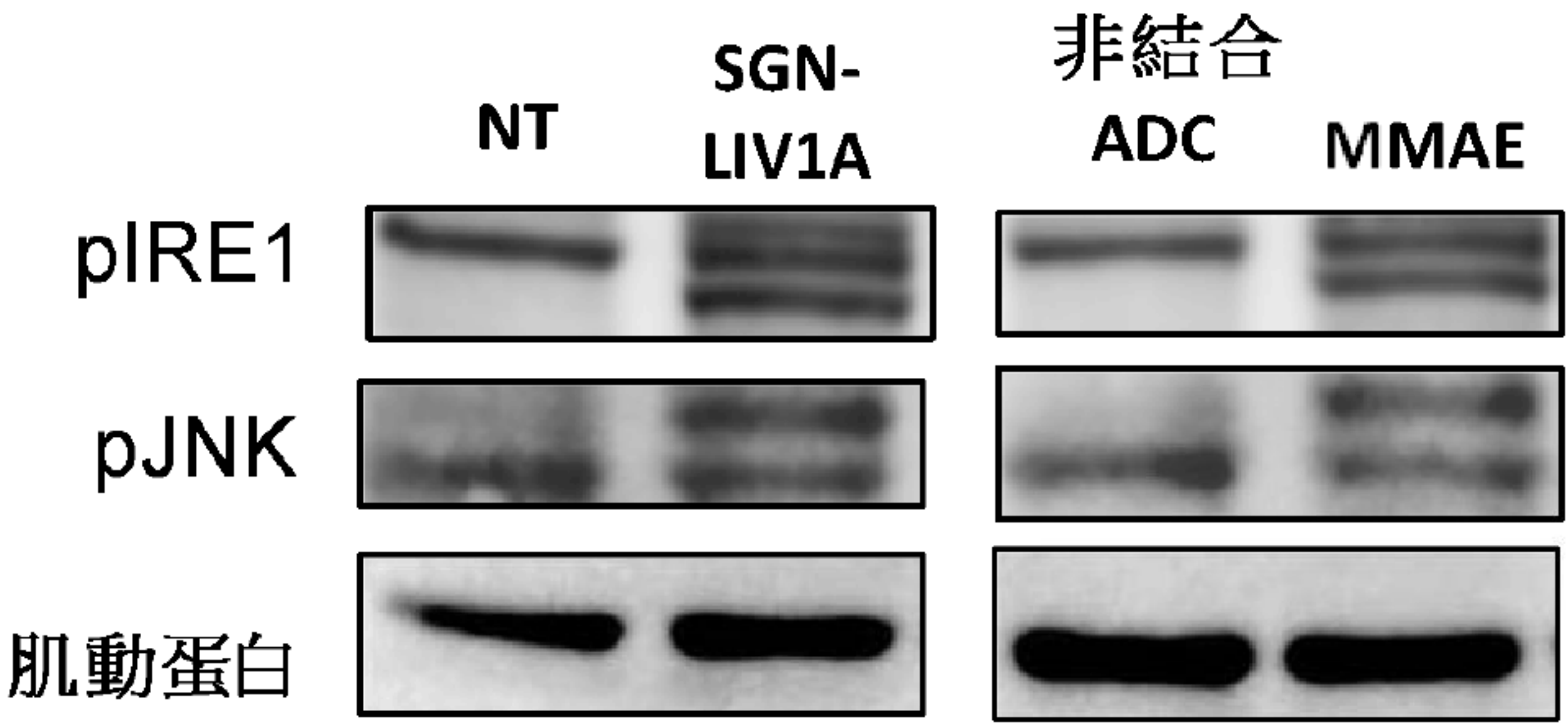


【圖2A】

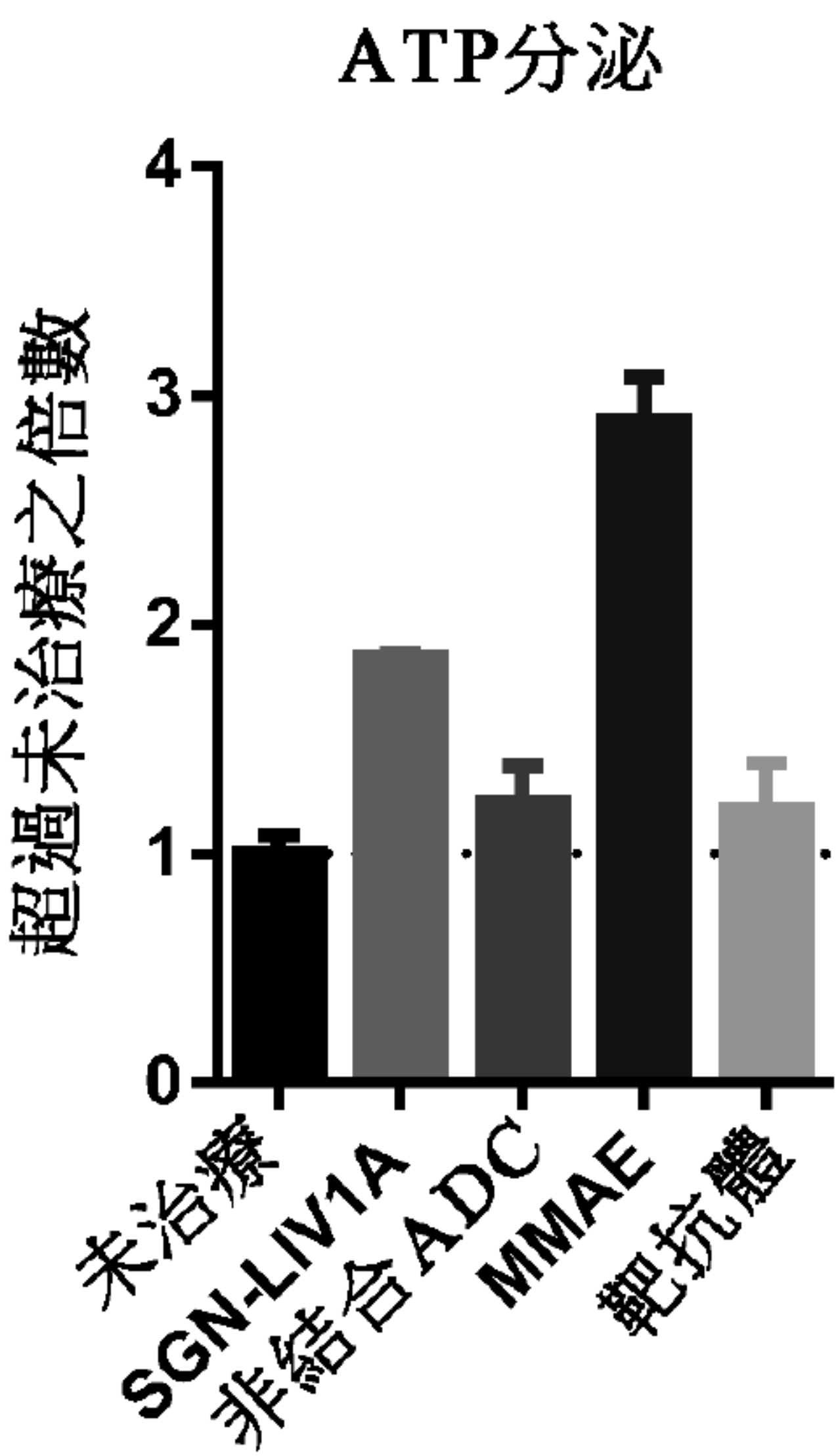


【圖2B】

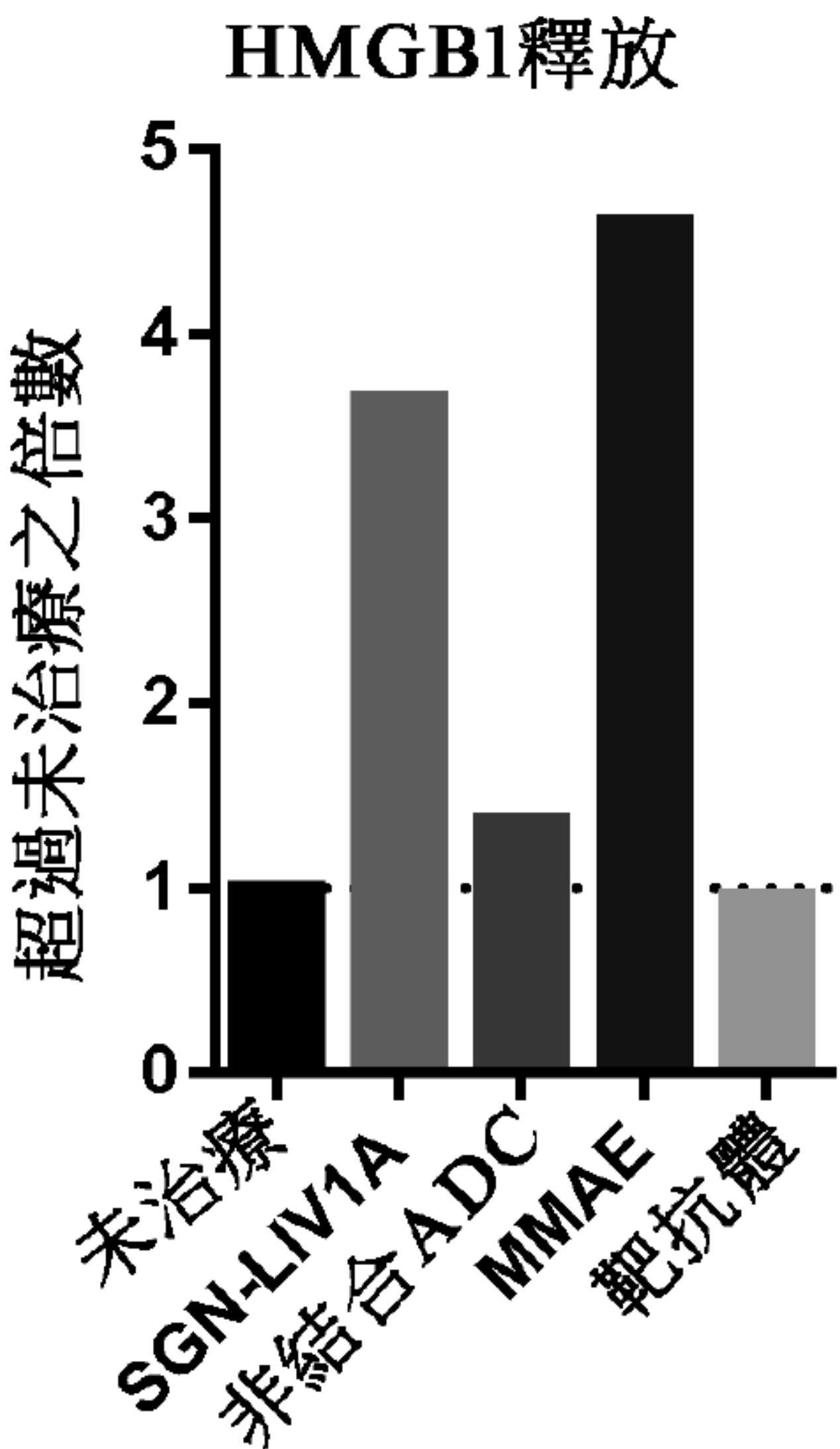




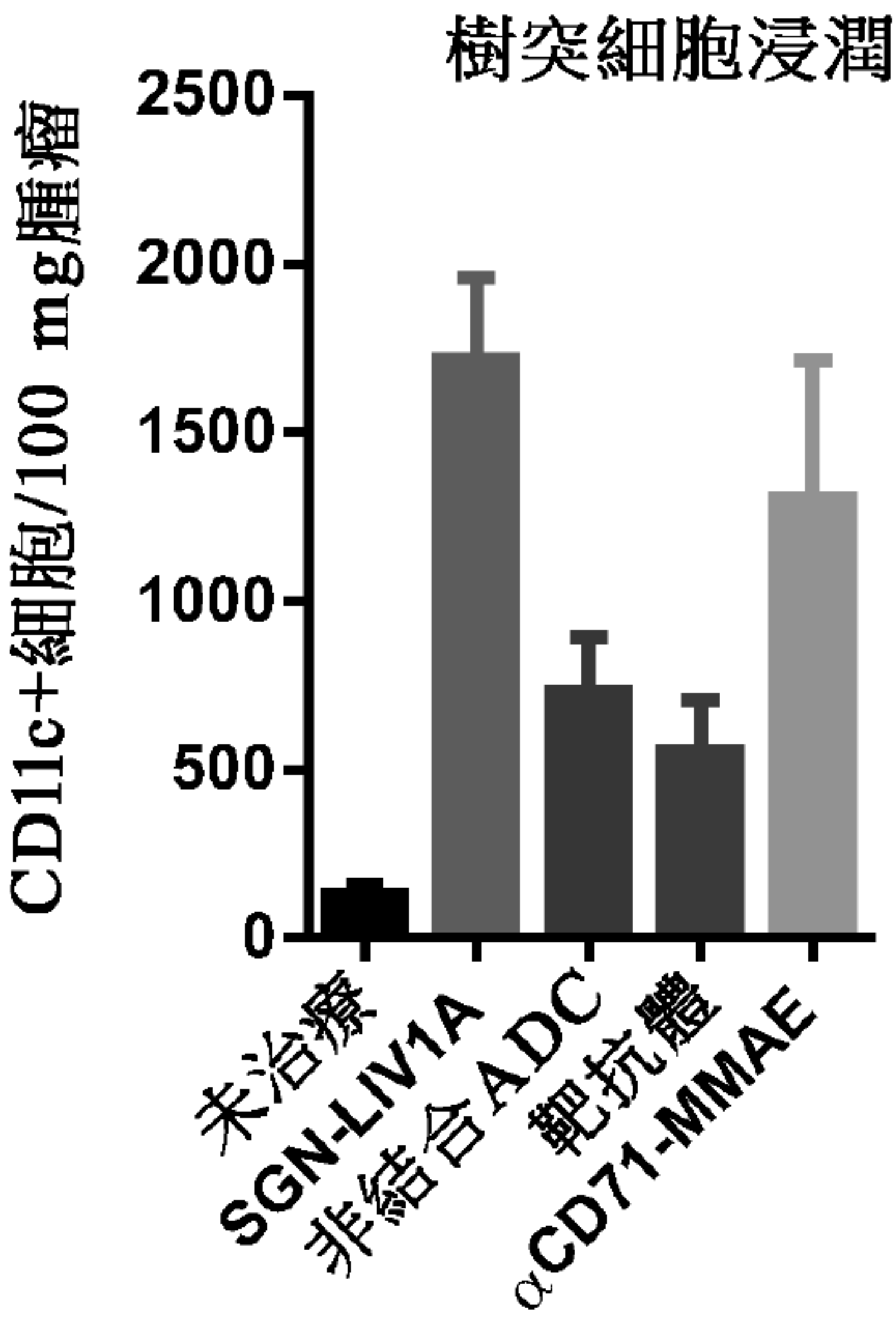
【圖3C】



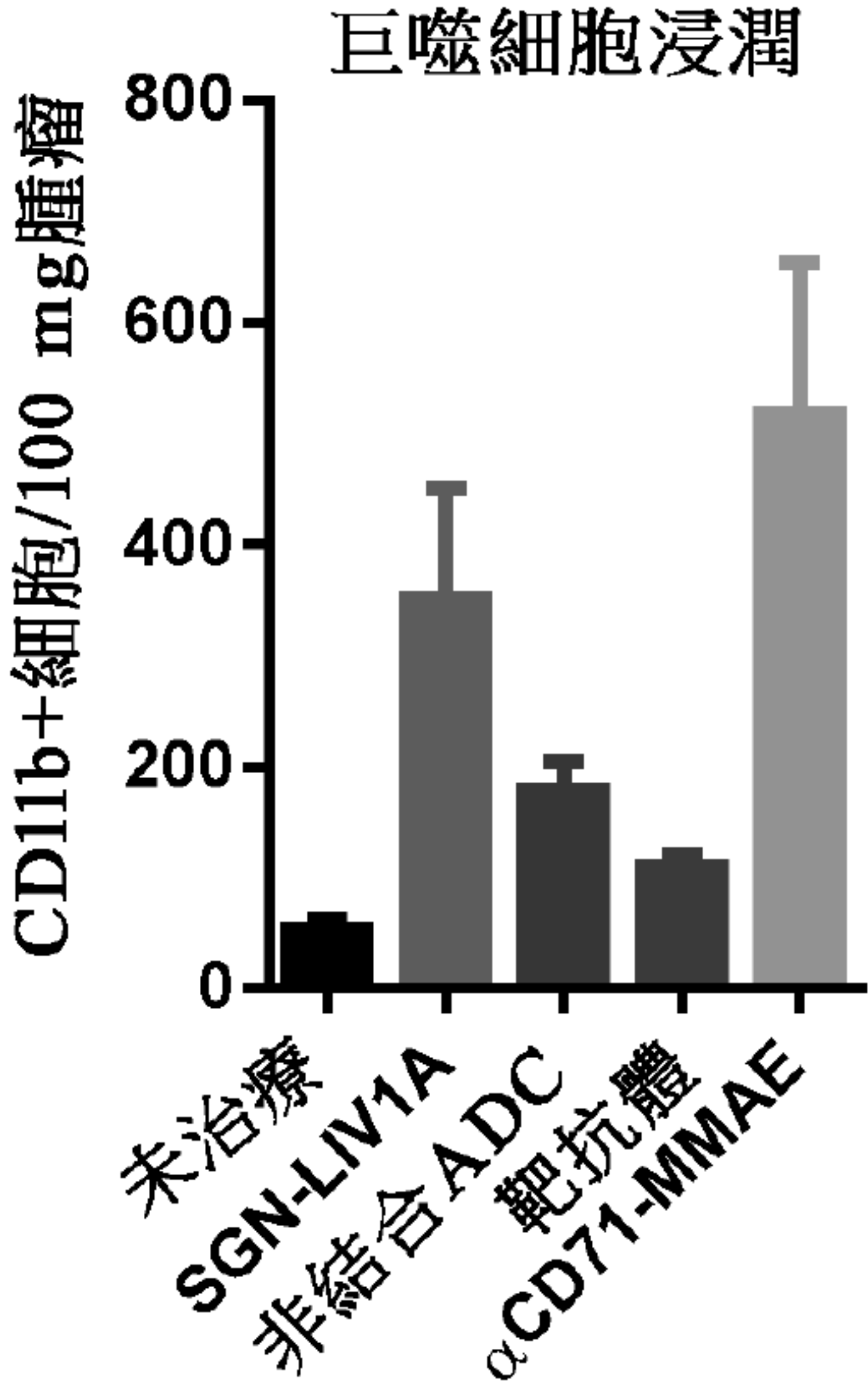
【圖3D】



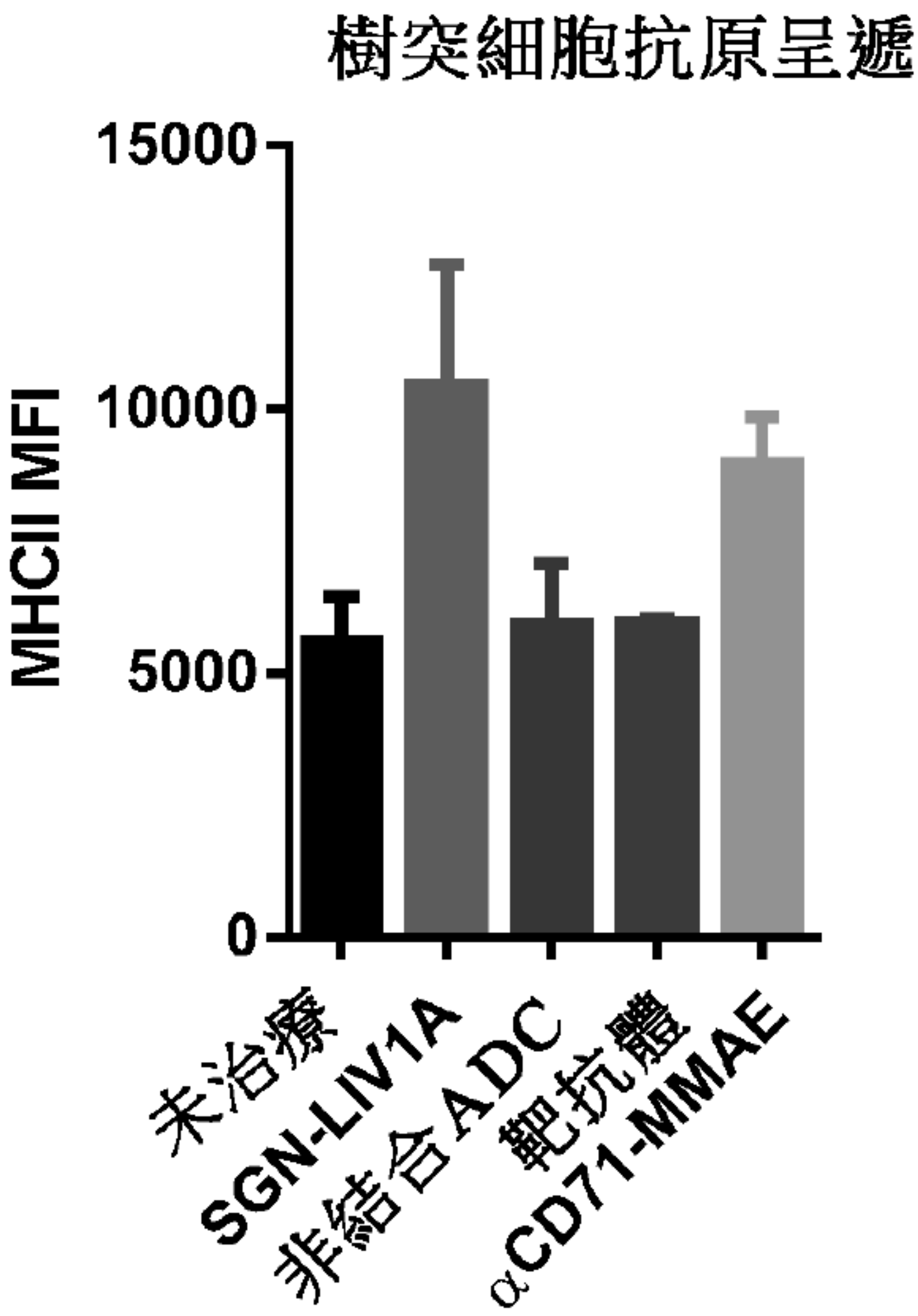
【圖3E】



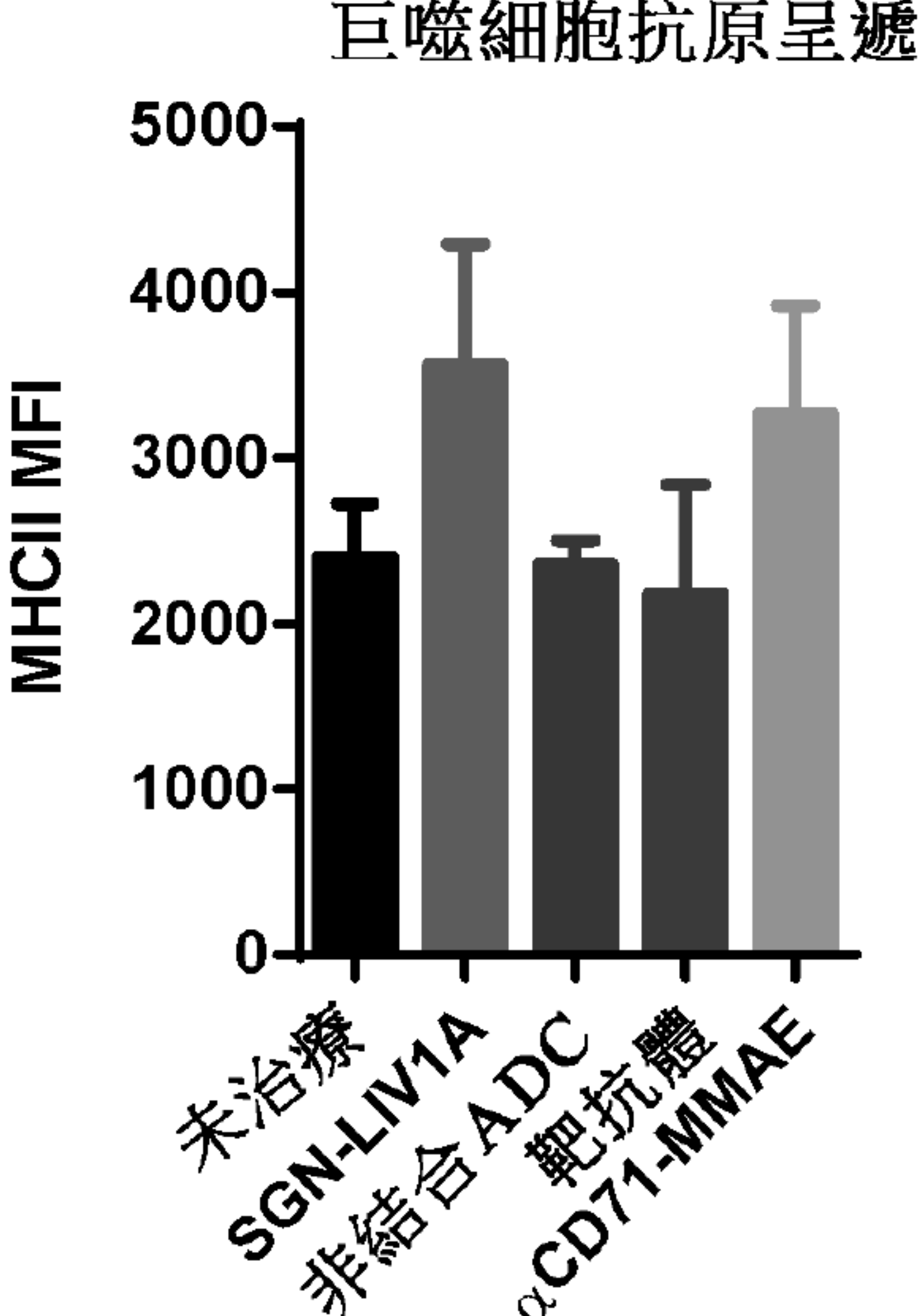
【圖4A】



【圖4B】

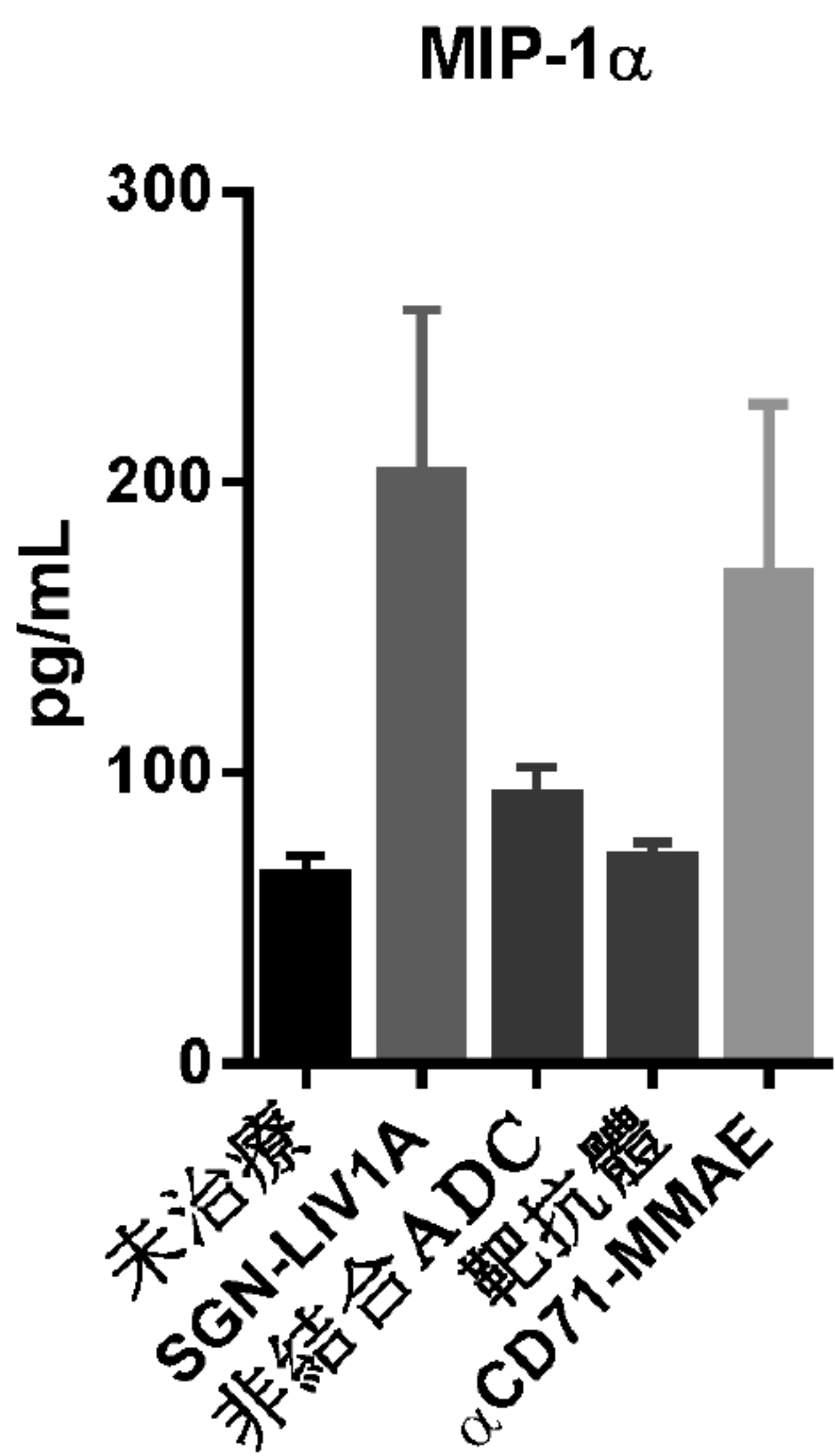


【圖4C】

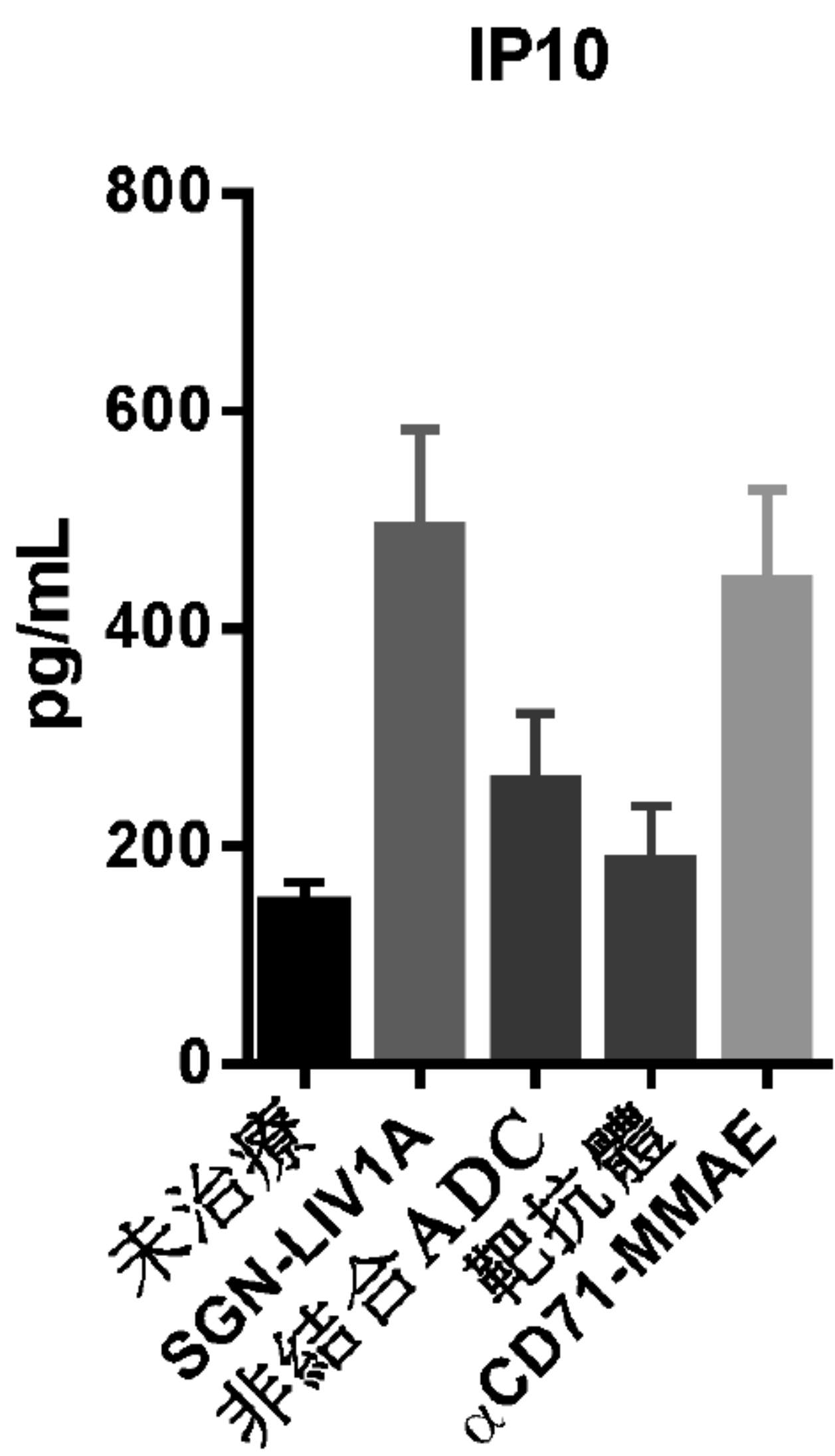


【圖4D】

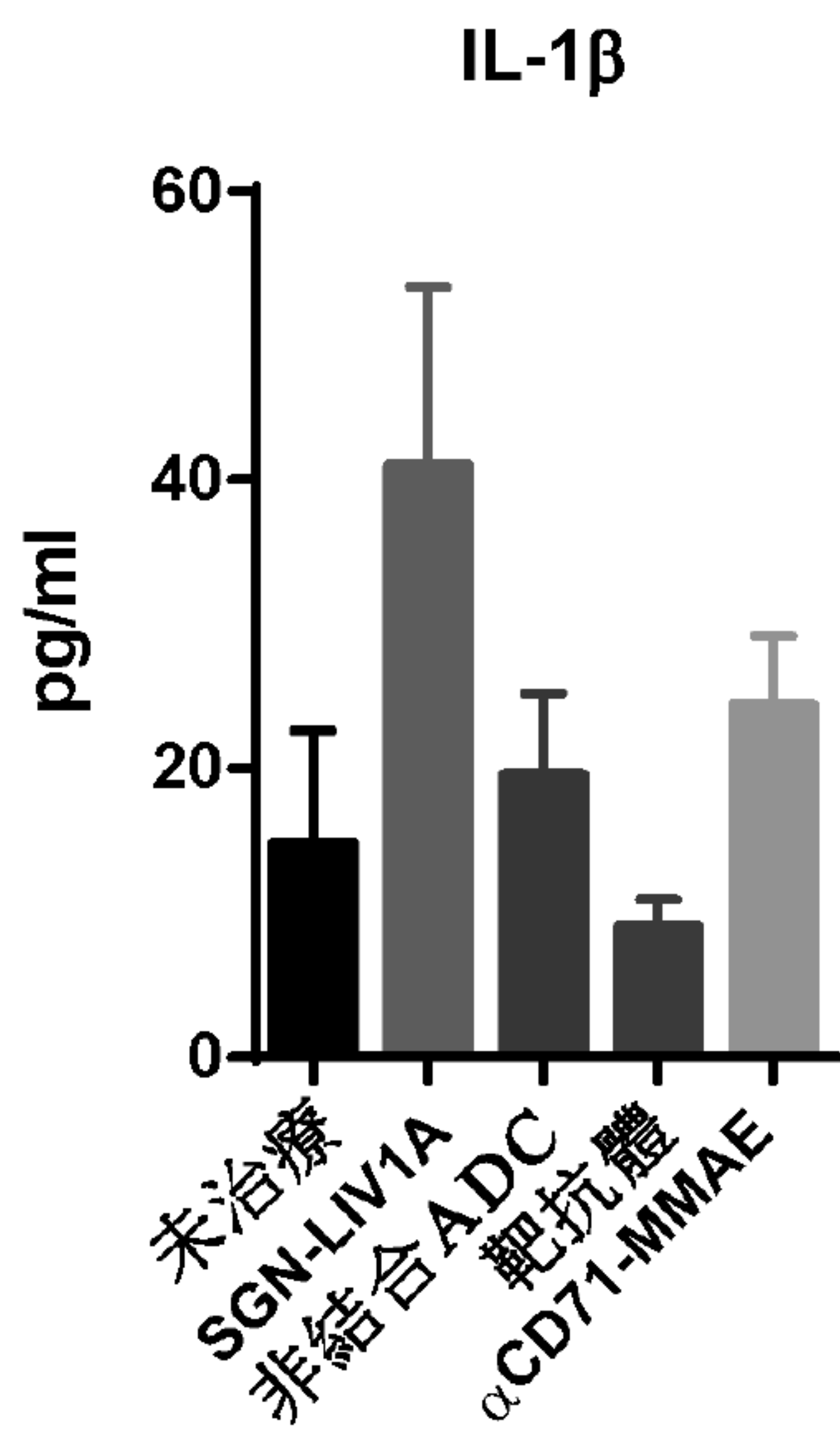
腫瘤內細胞介素水準



【圖5A】

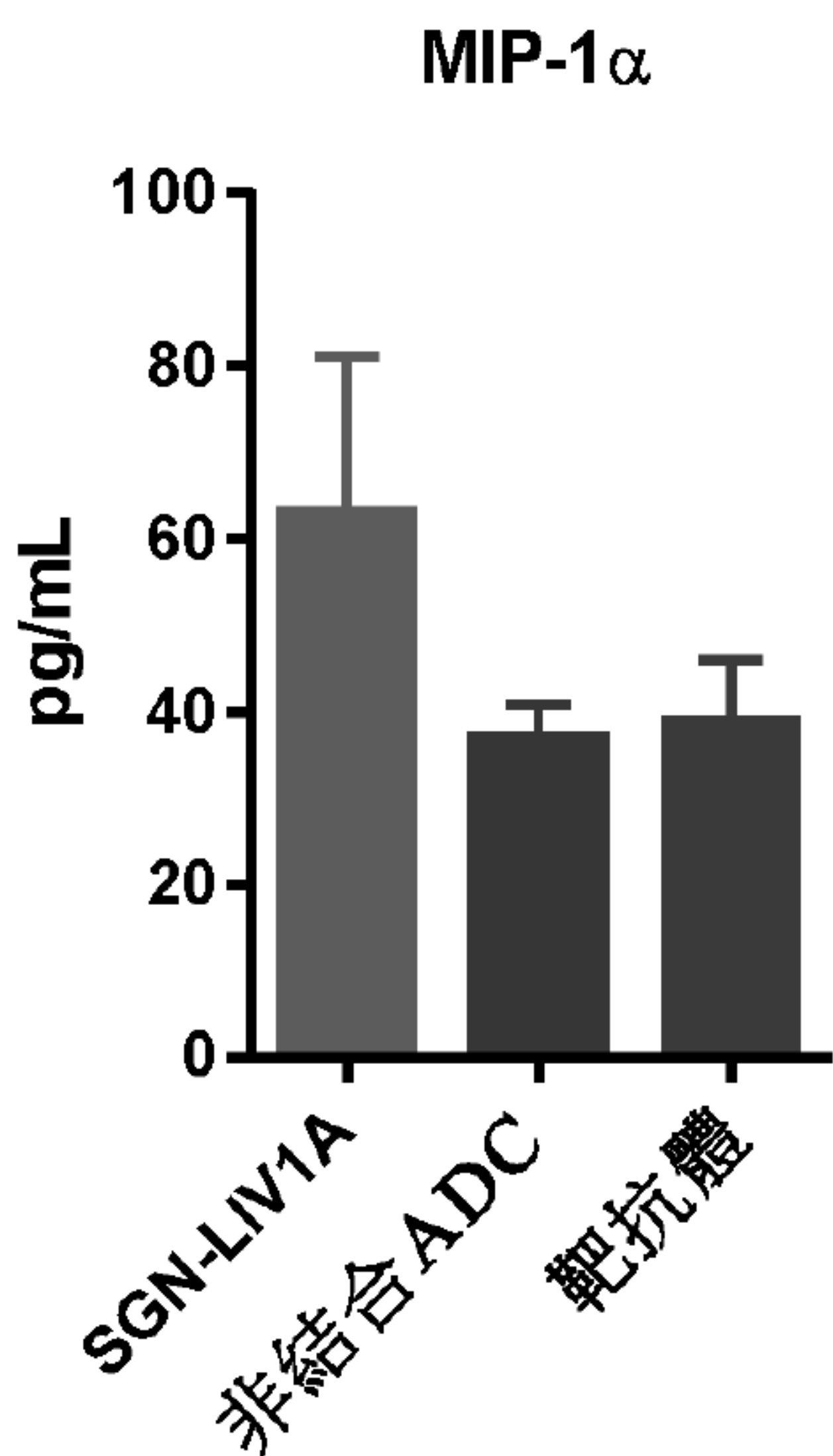


【圖5B】

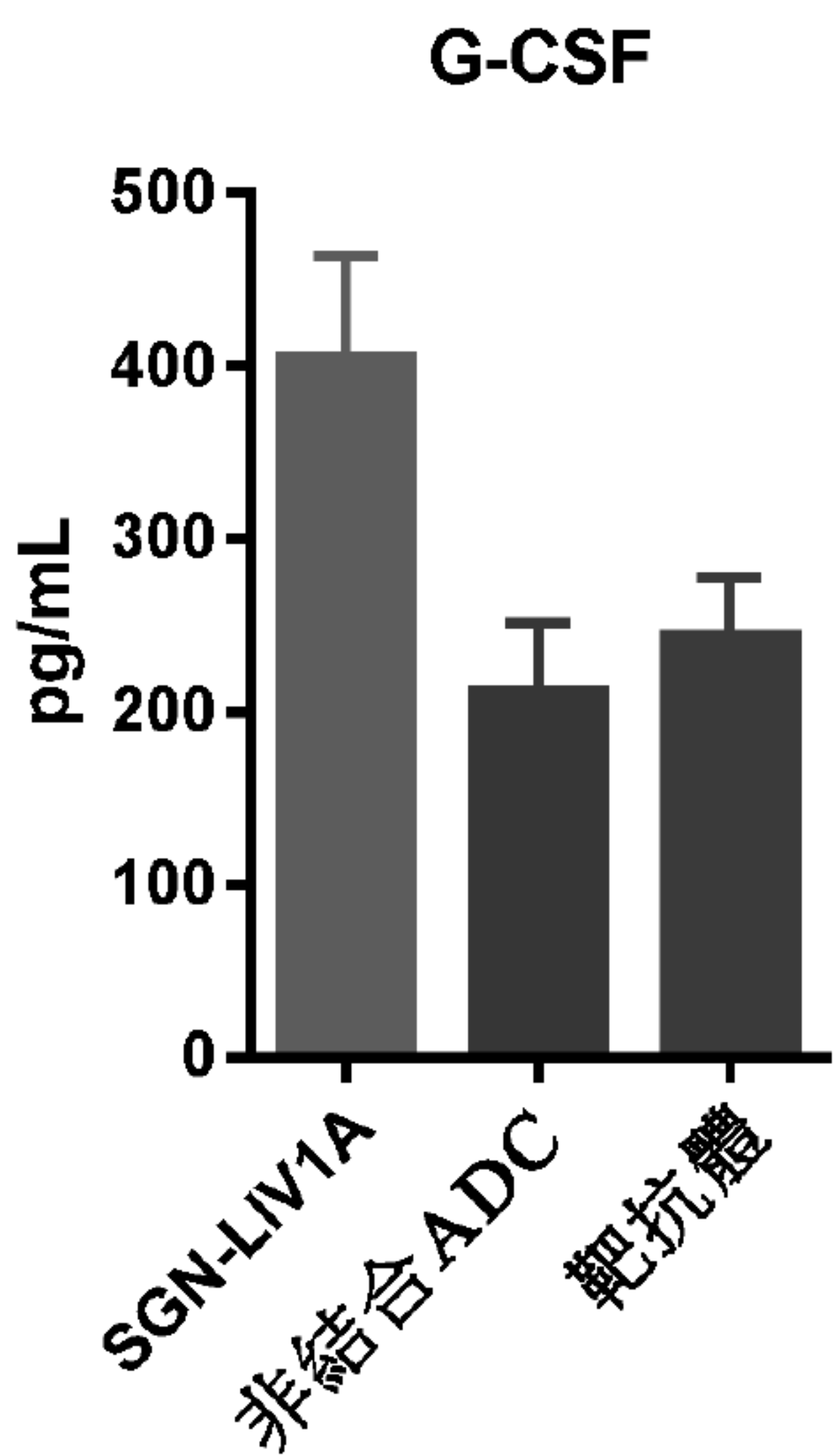


【圖5C】

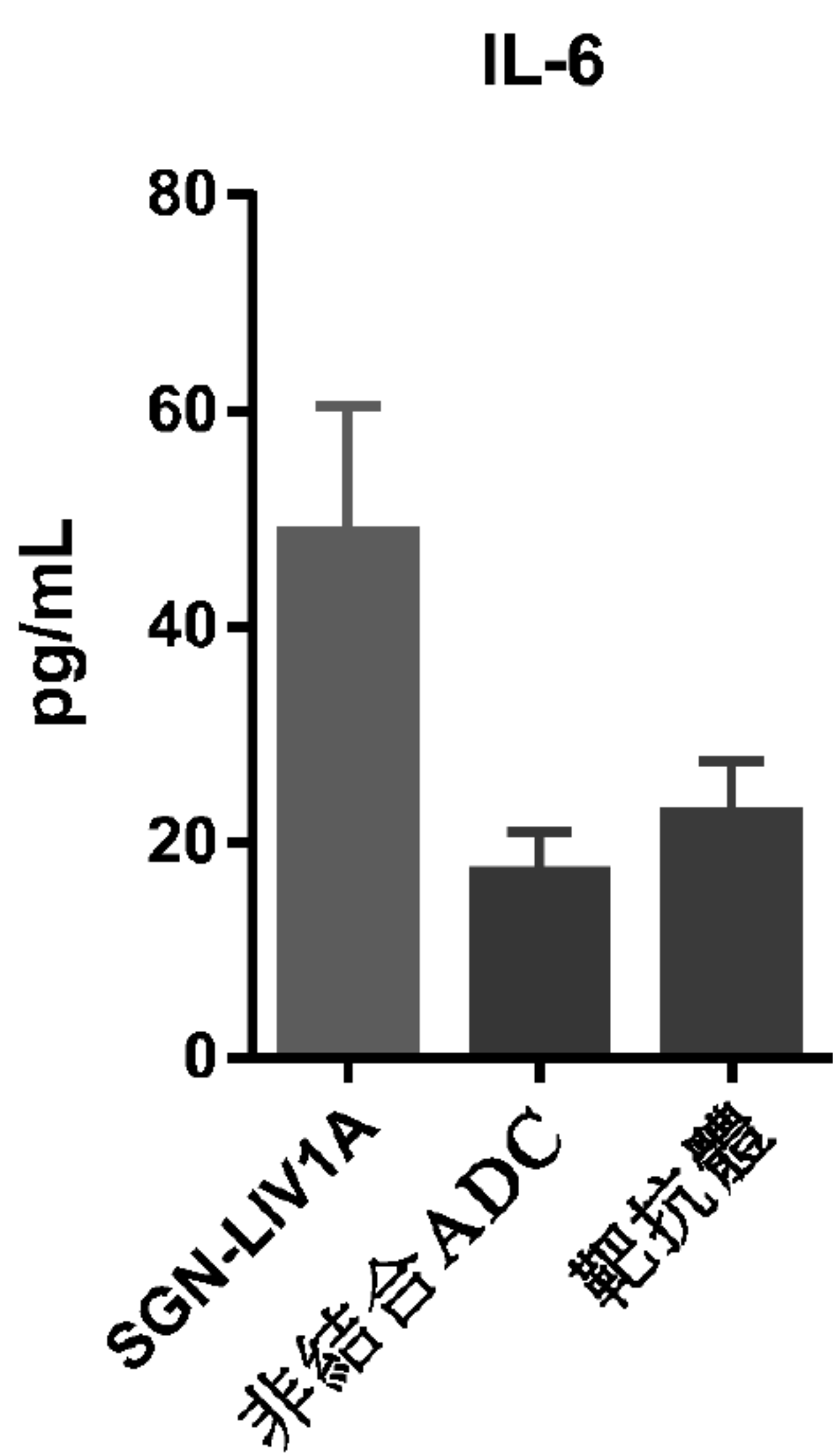
外周循環細胞介素水準



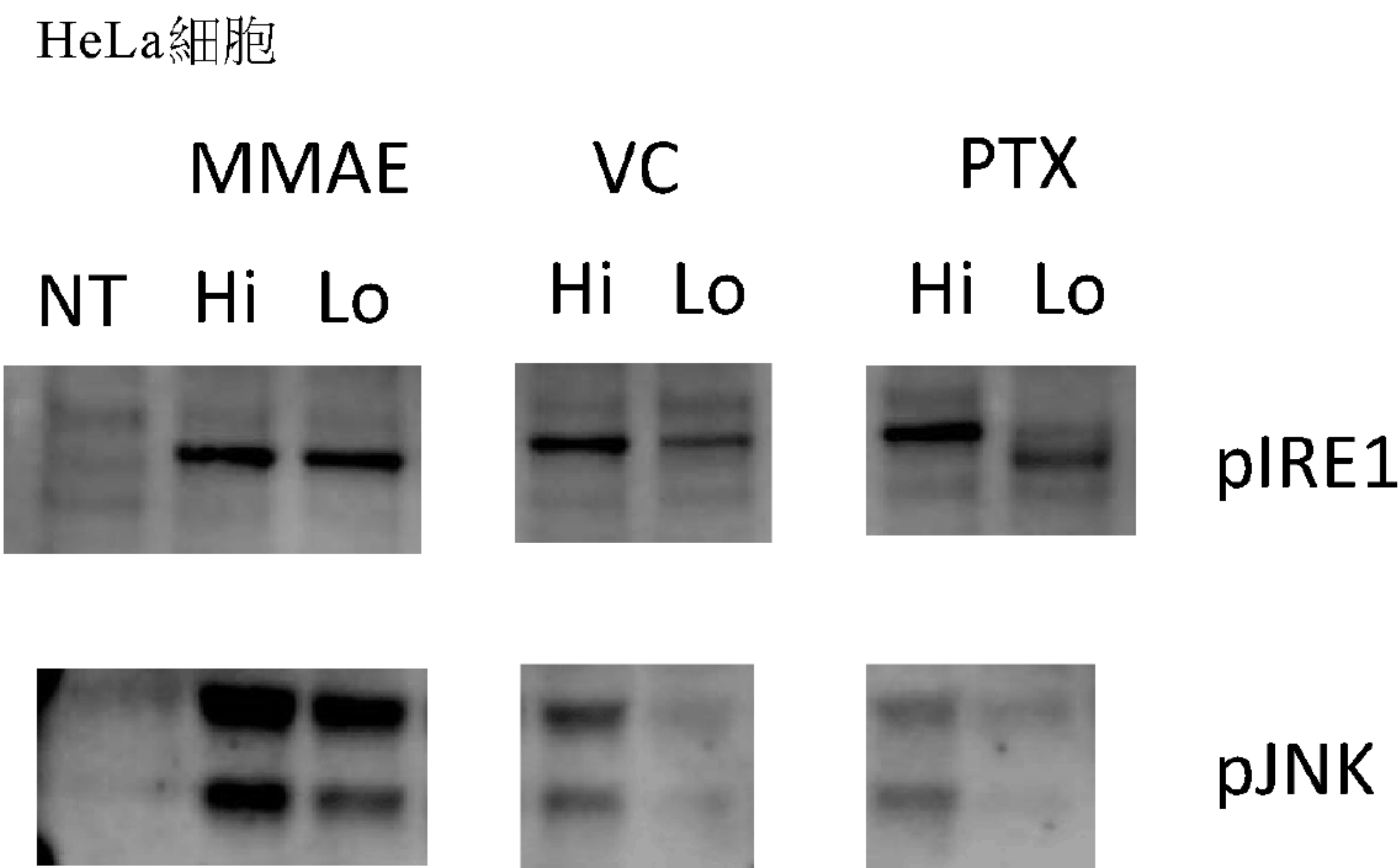
【圖5D】



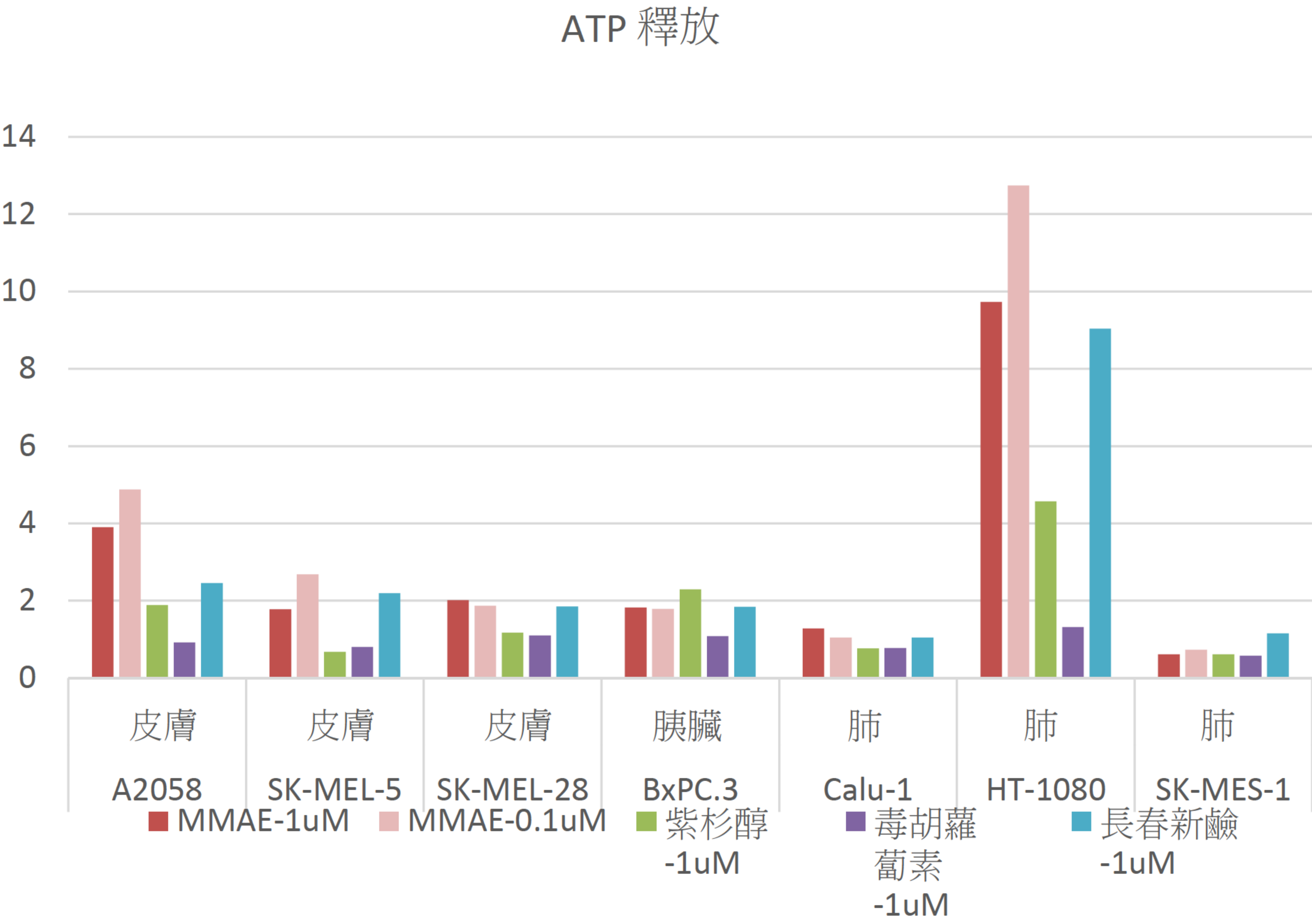
【圖5E】



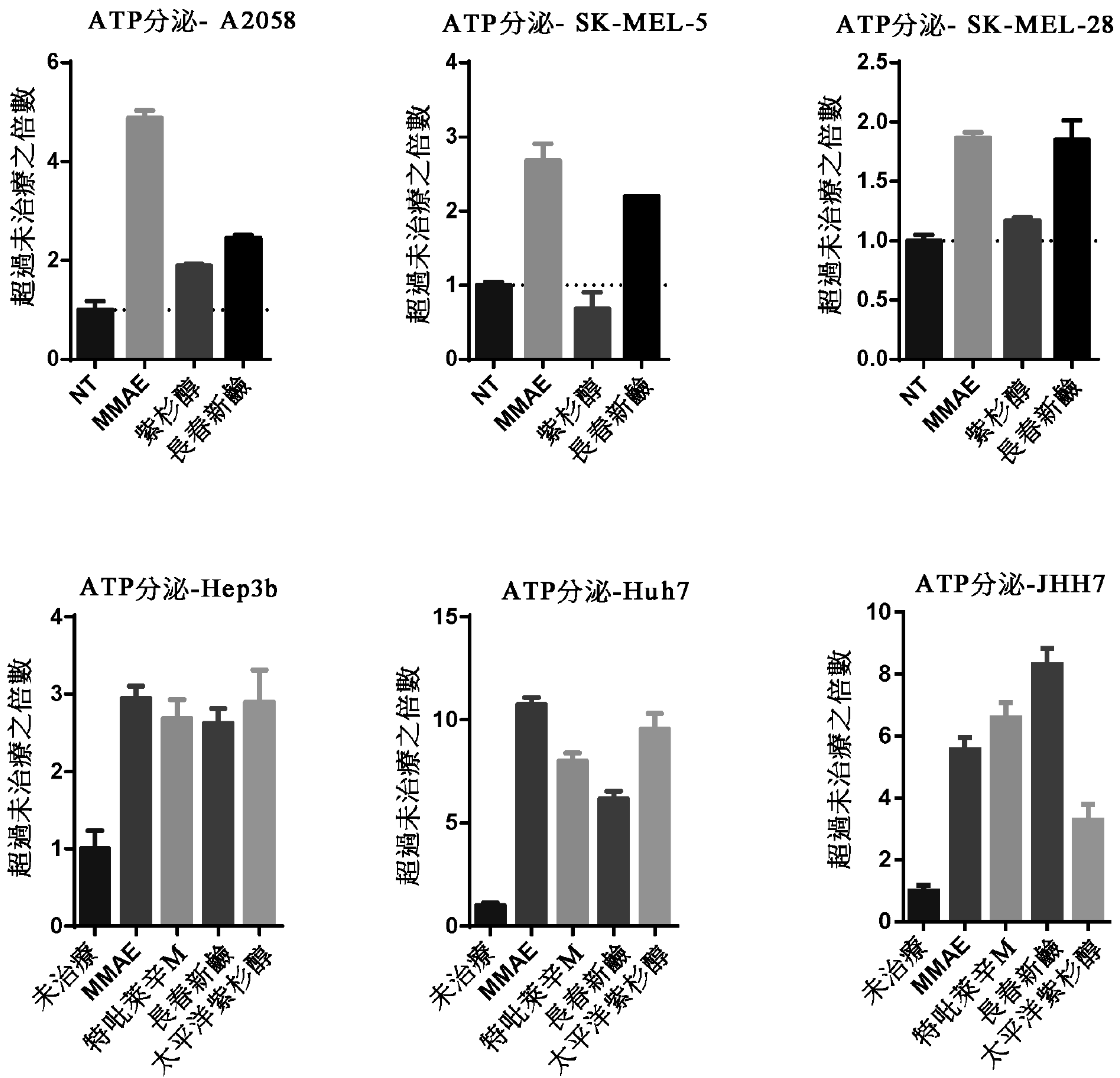
【圖5F】



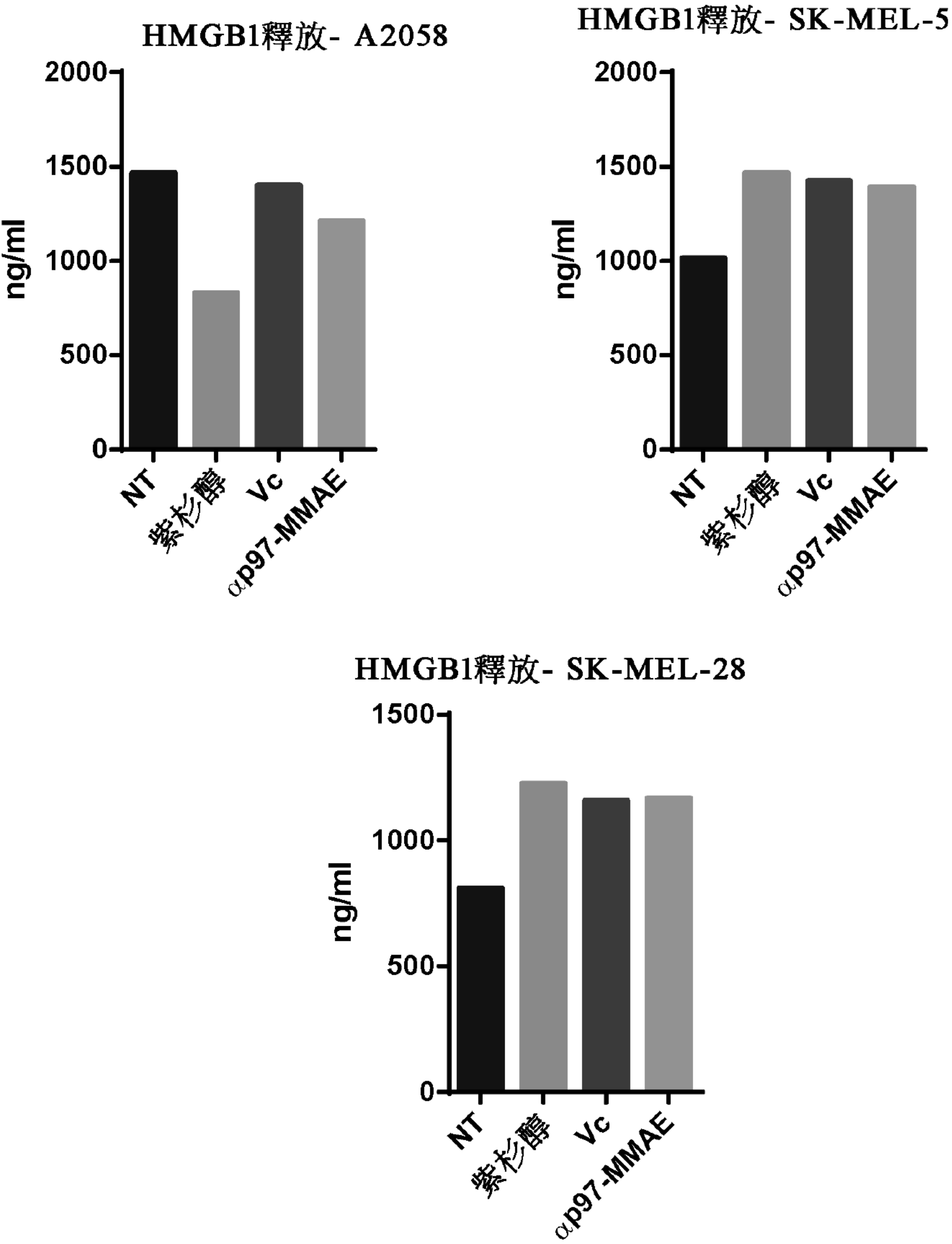
【圖6】



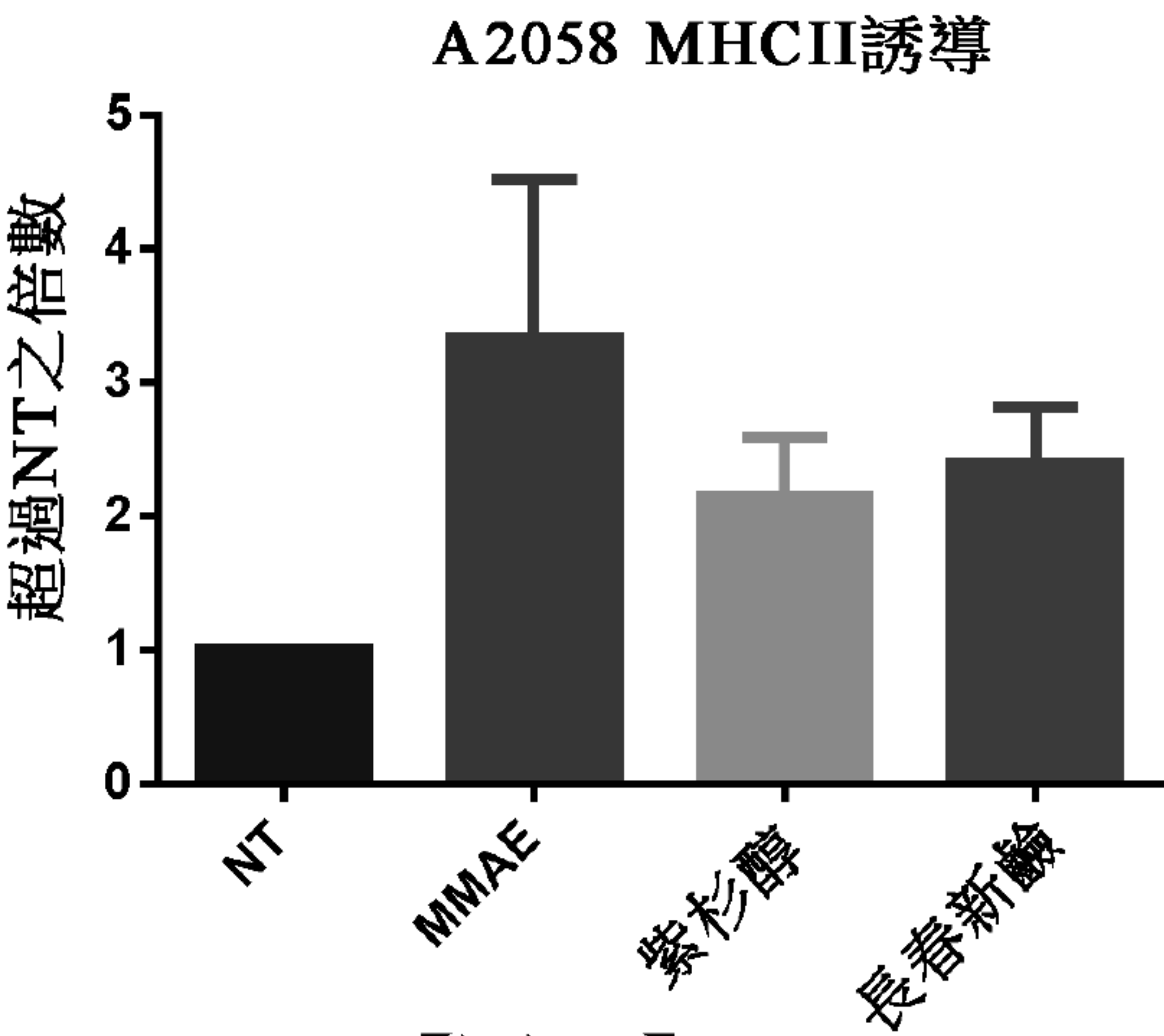
【圖7A】



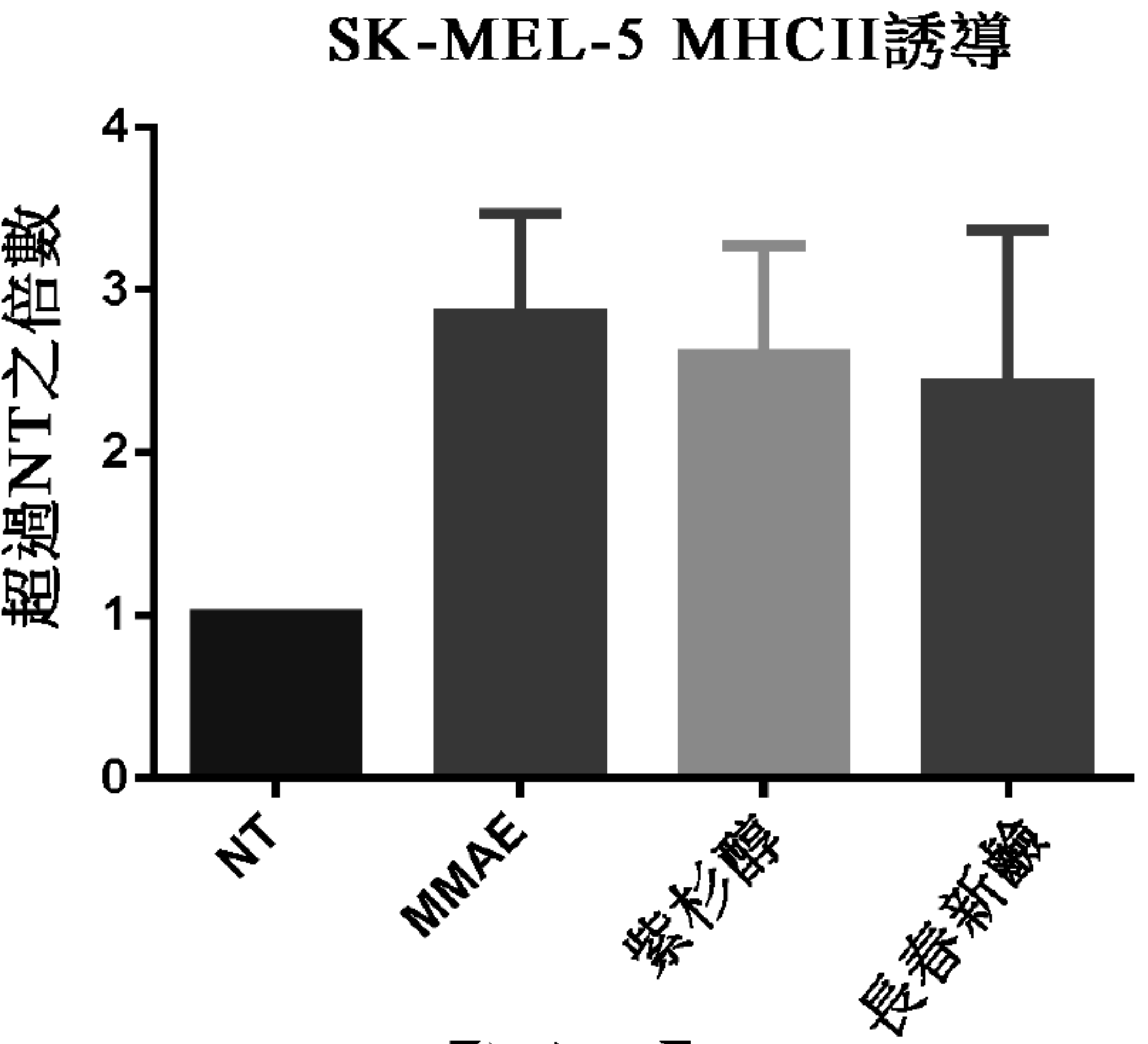
【圖7B】



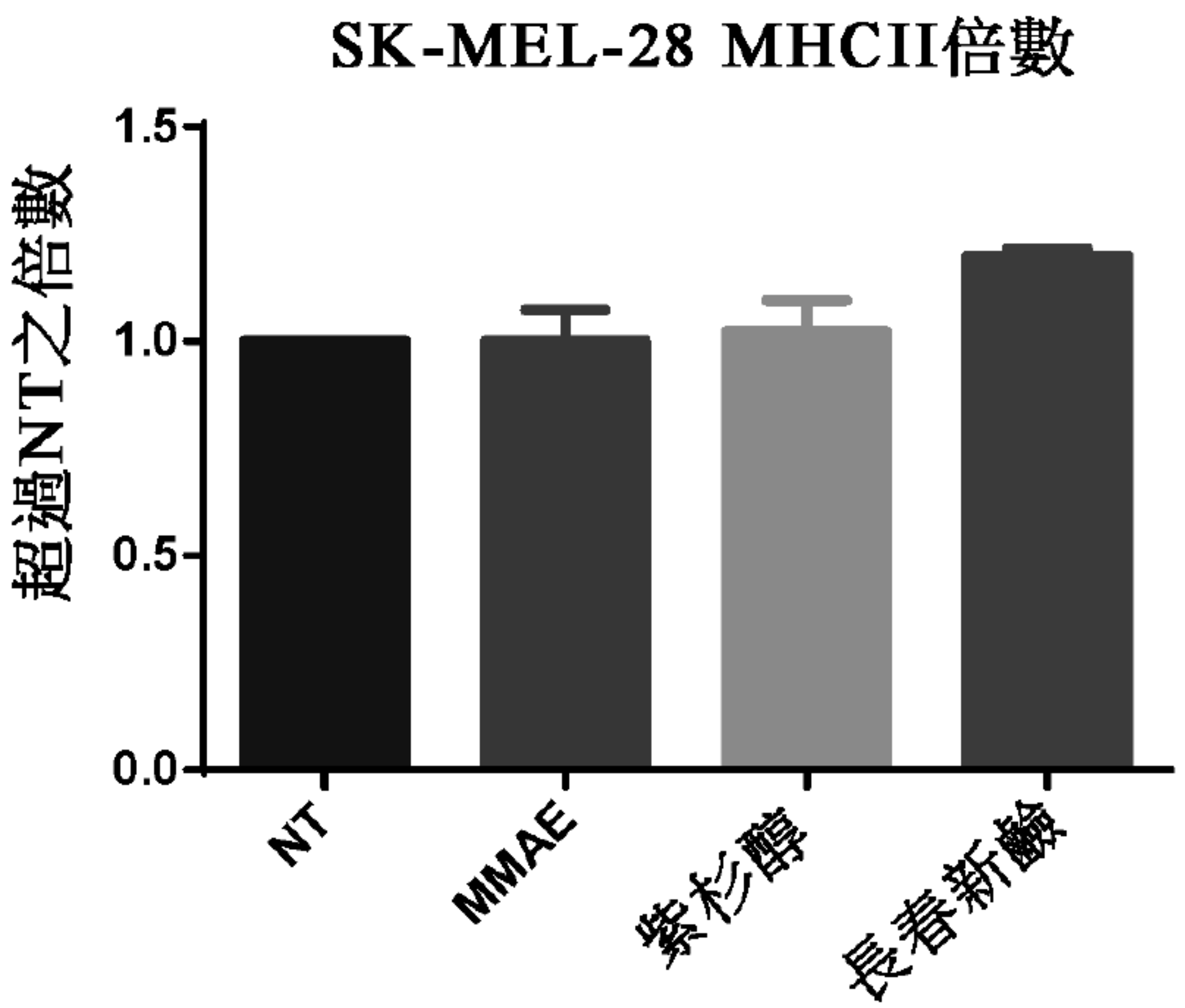
【圖7C】



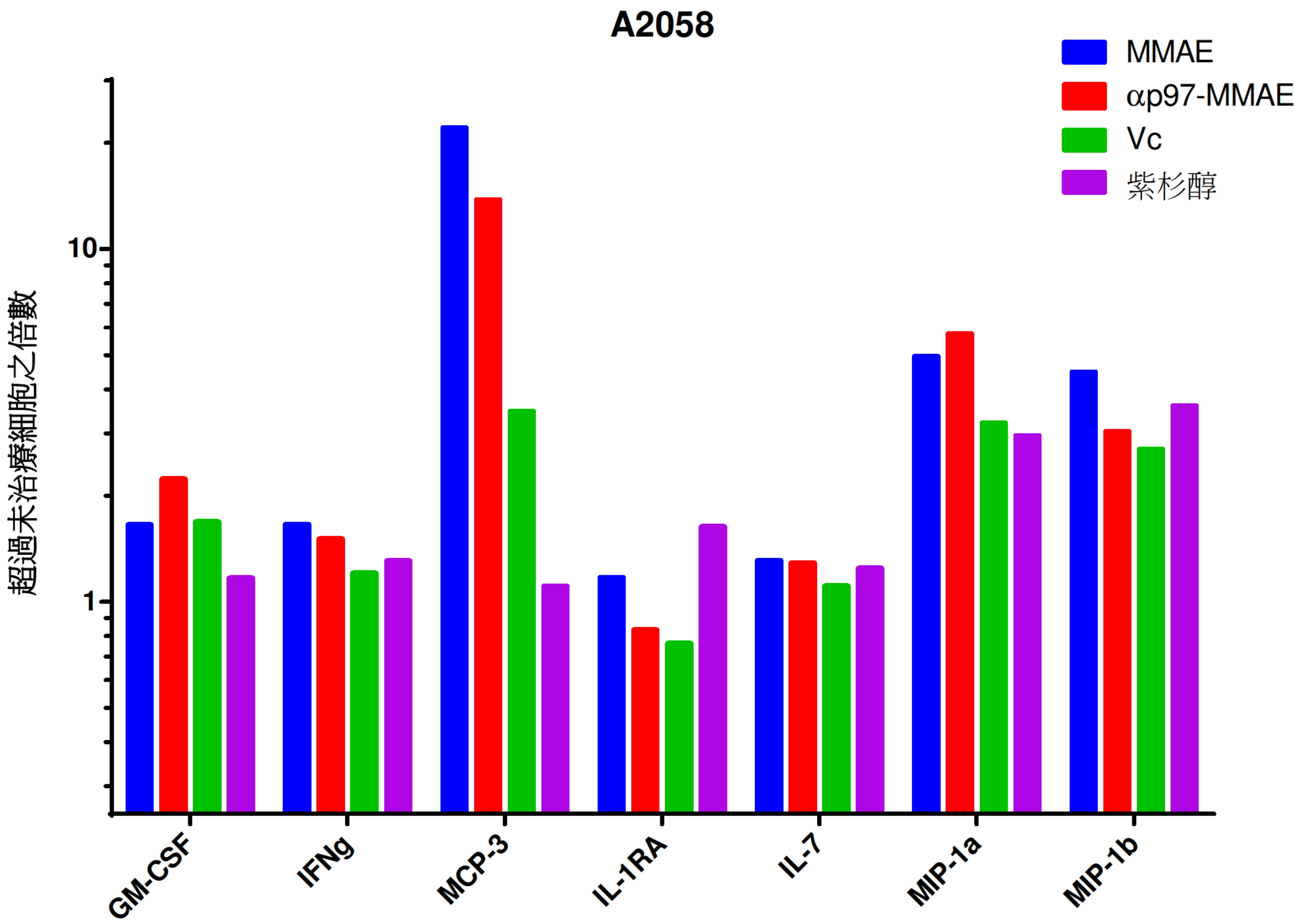
【圖8A】



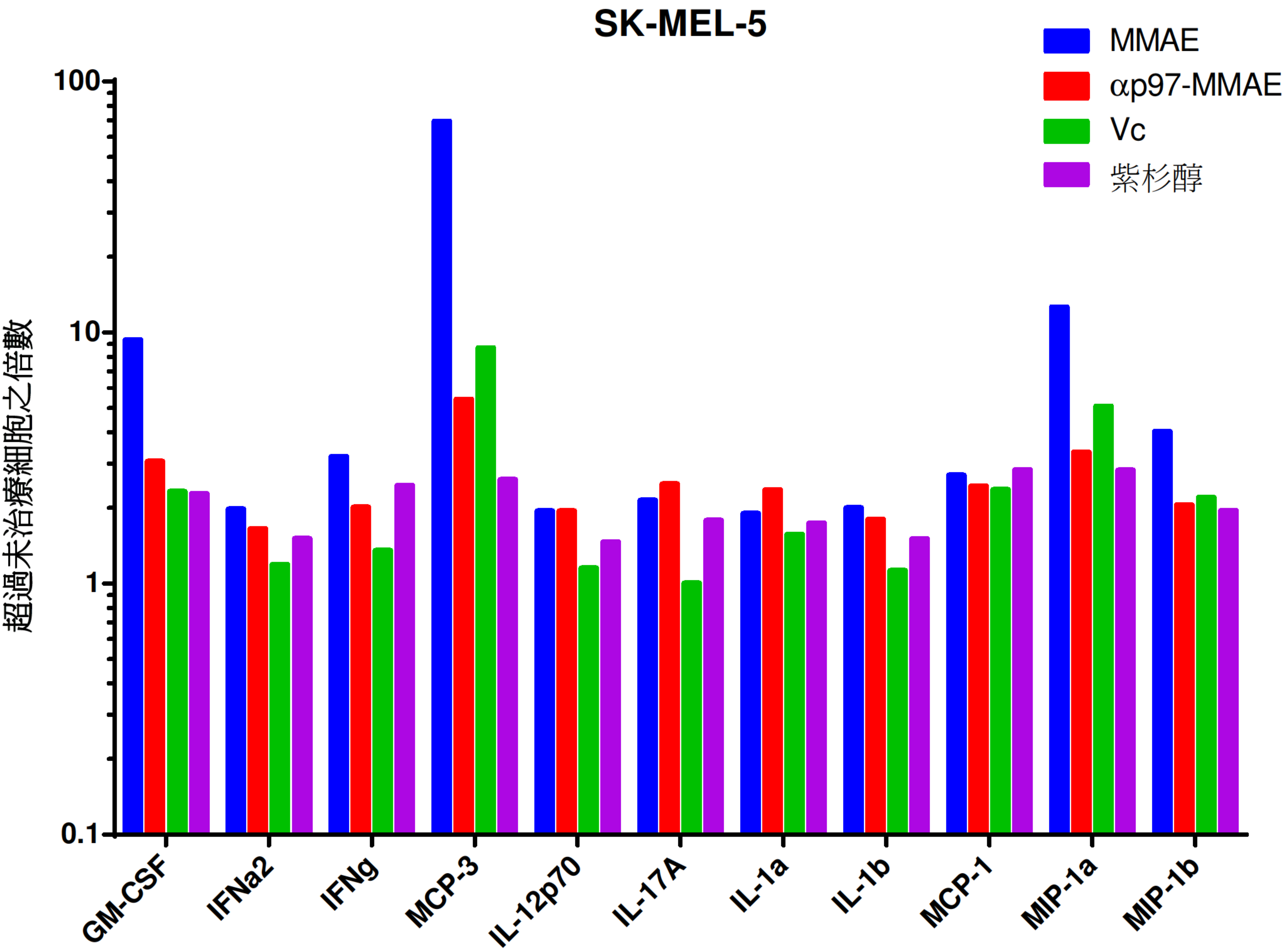
【圖8B】



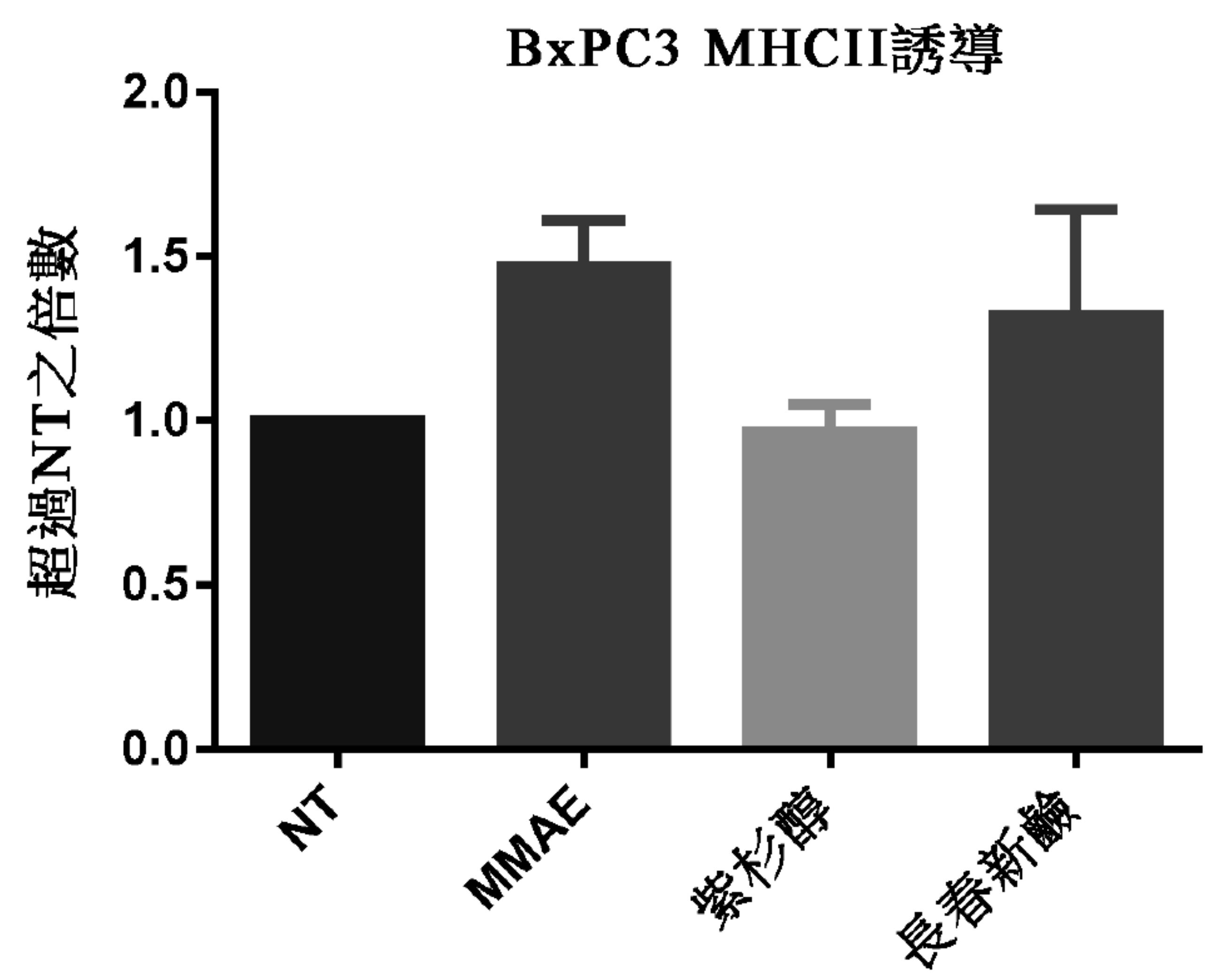
【圖8C】



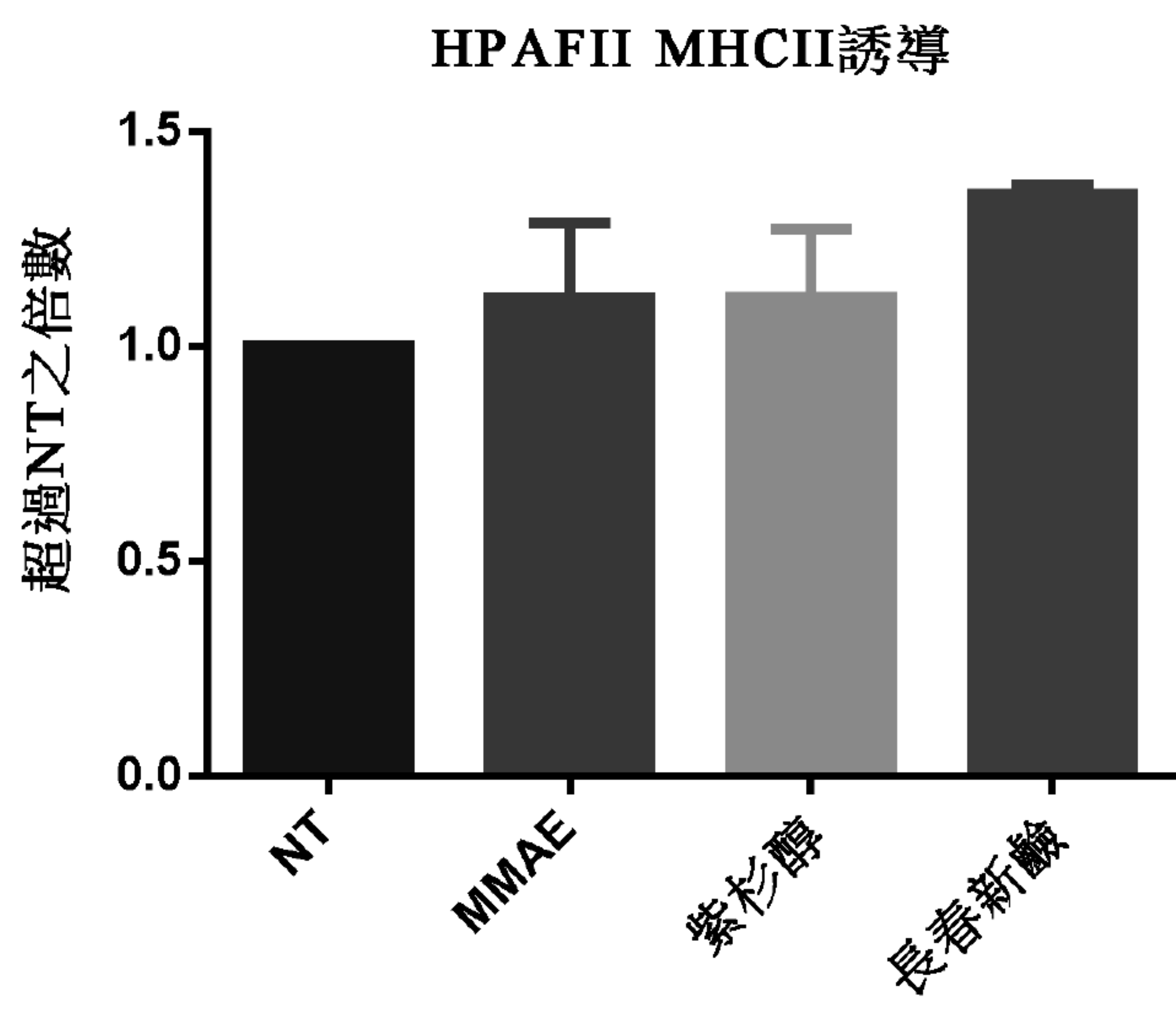
【圖9A】



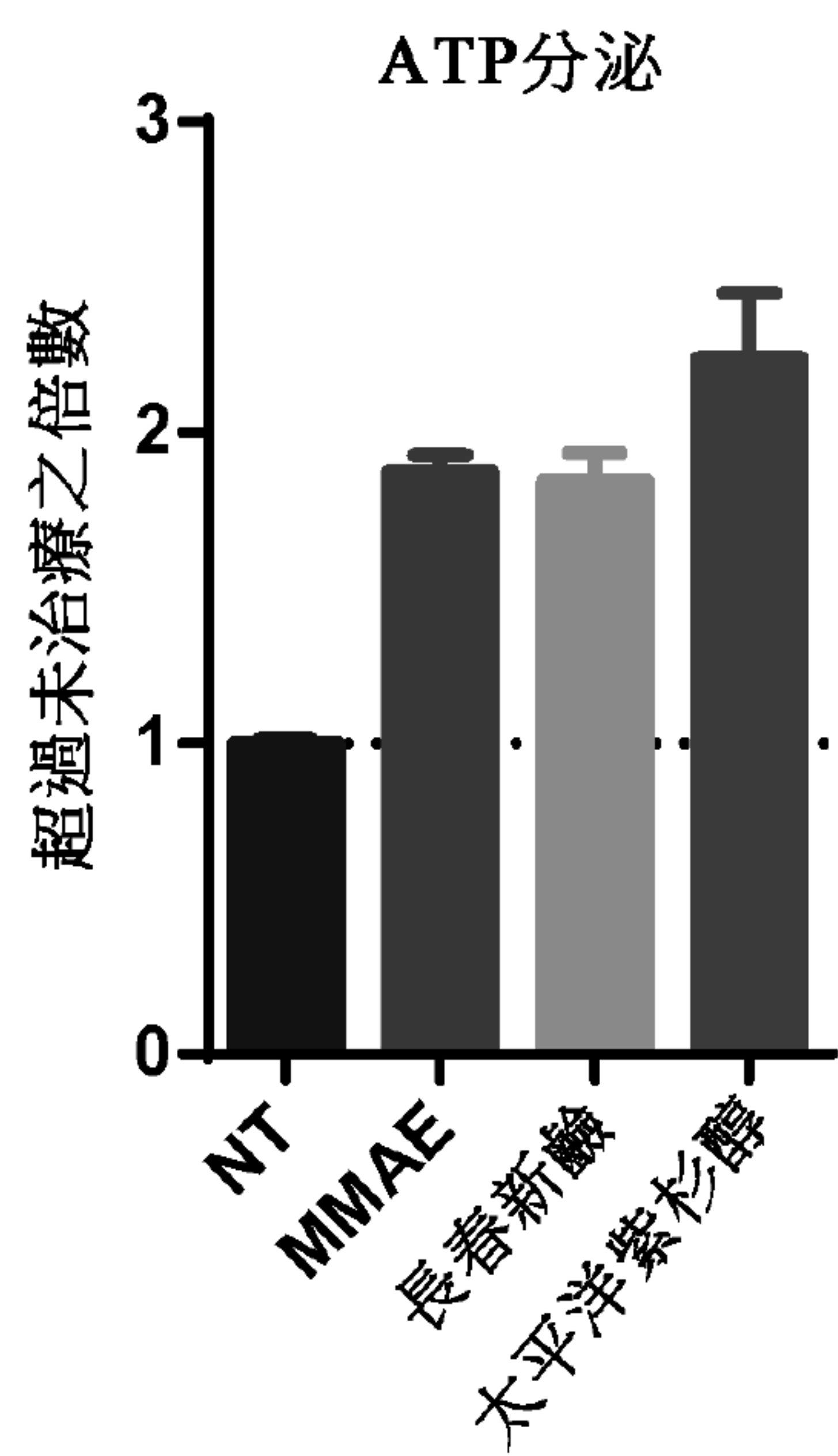
【圖9B】



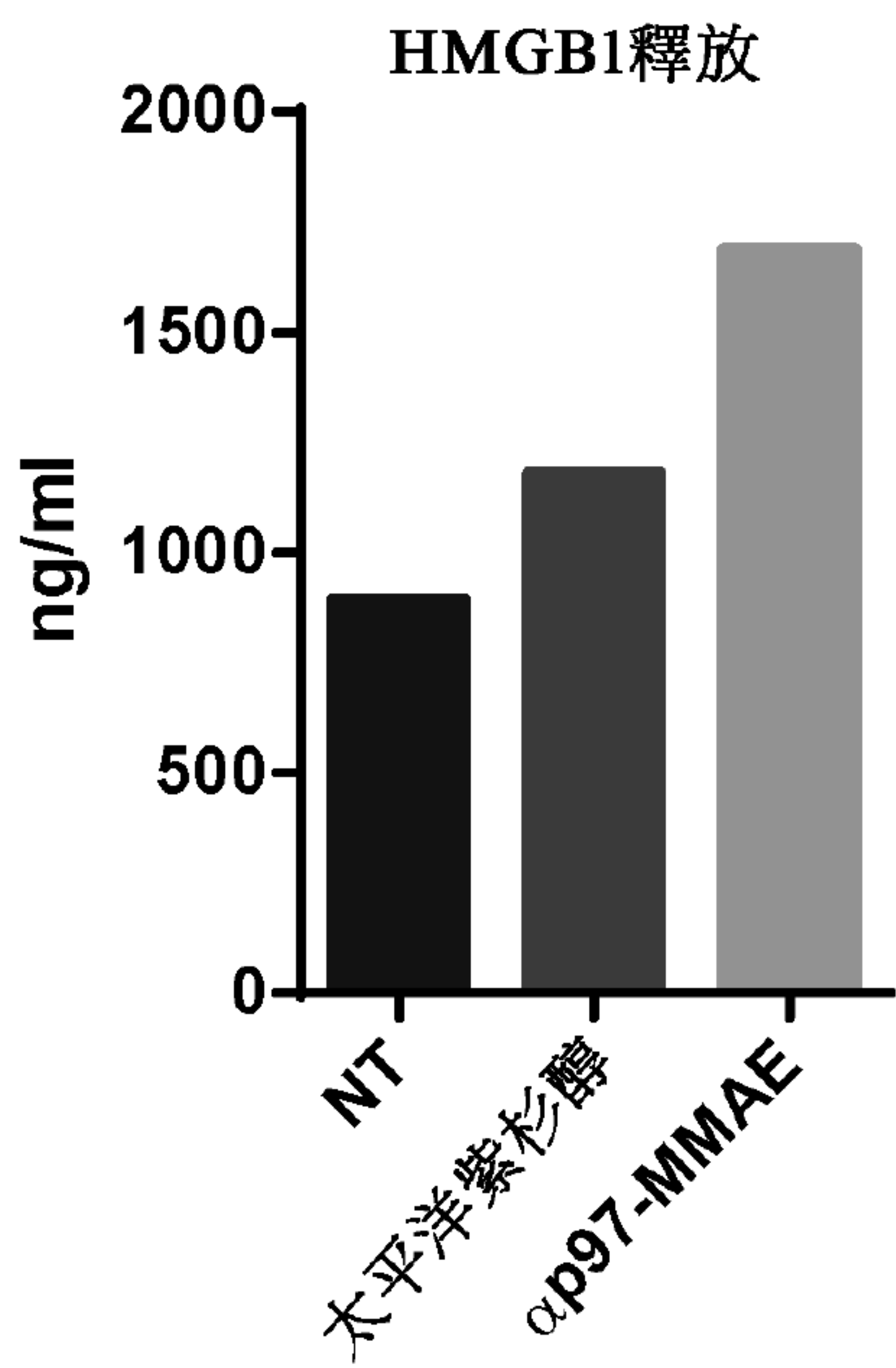
【圖10A】



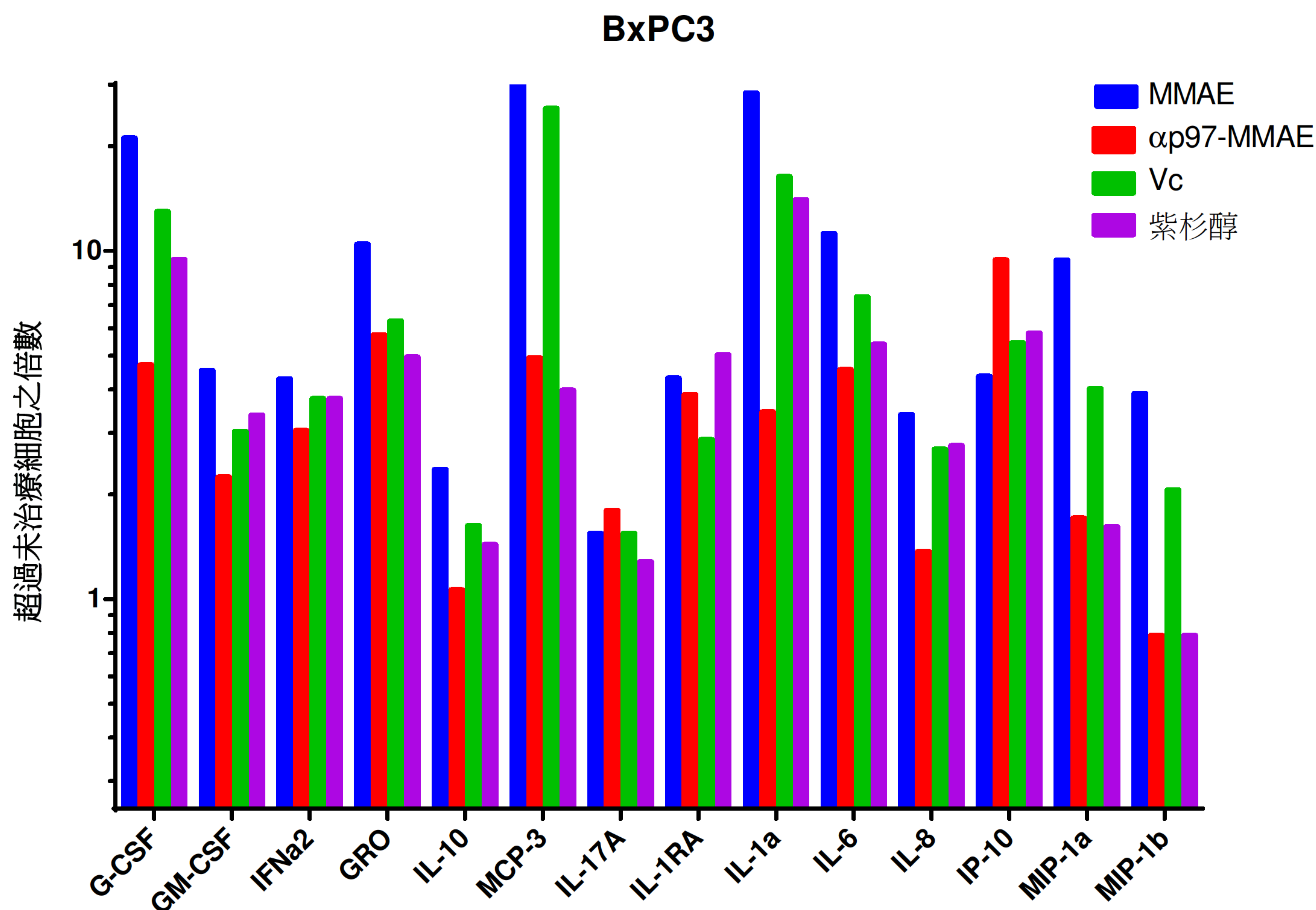
【圖10B】



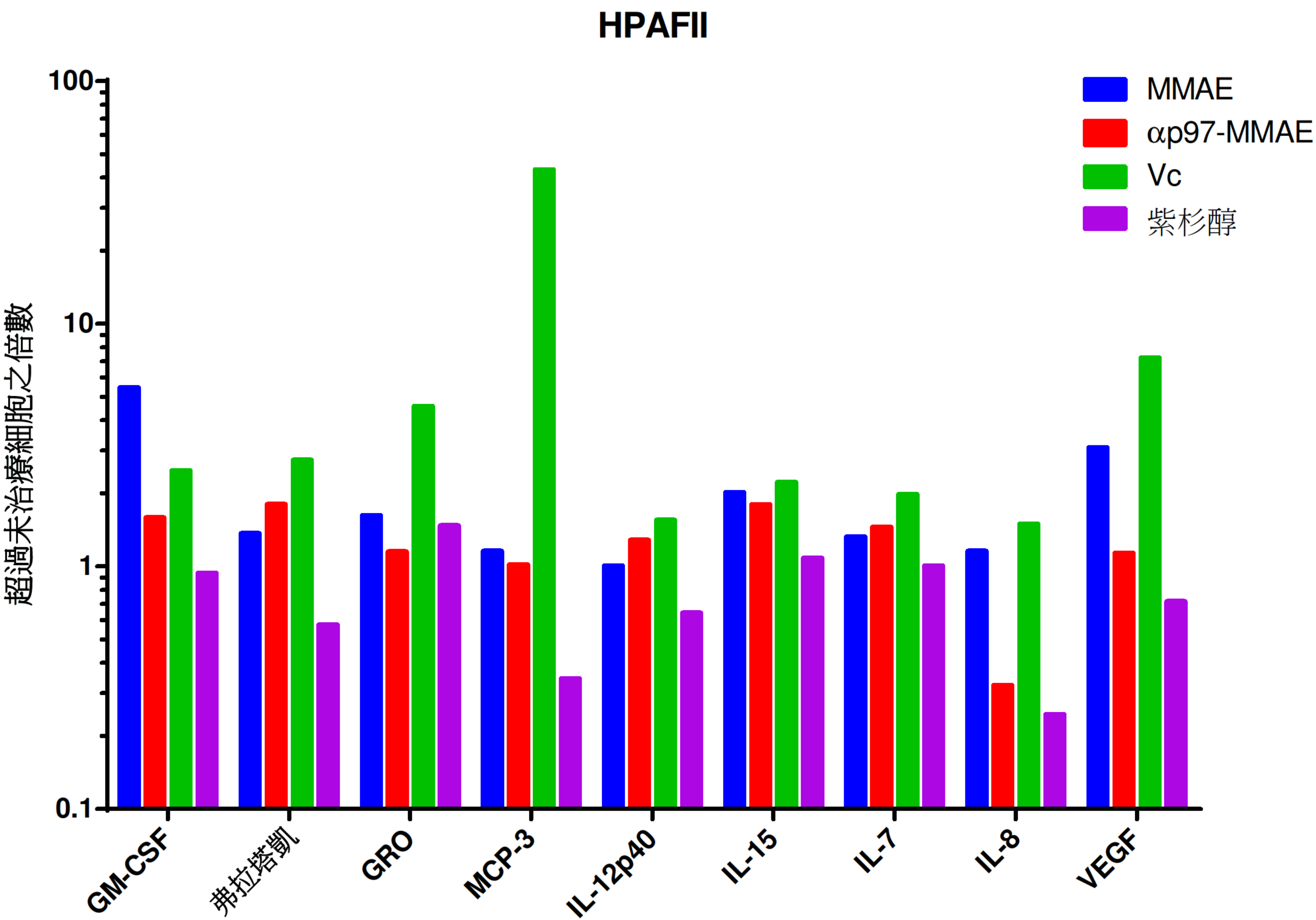
【圖10C】



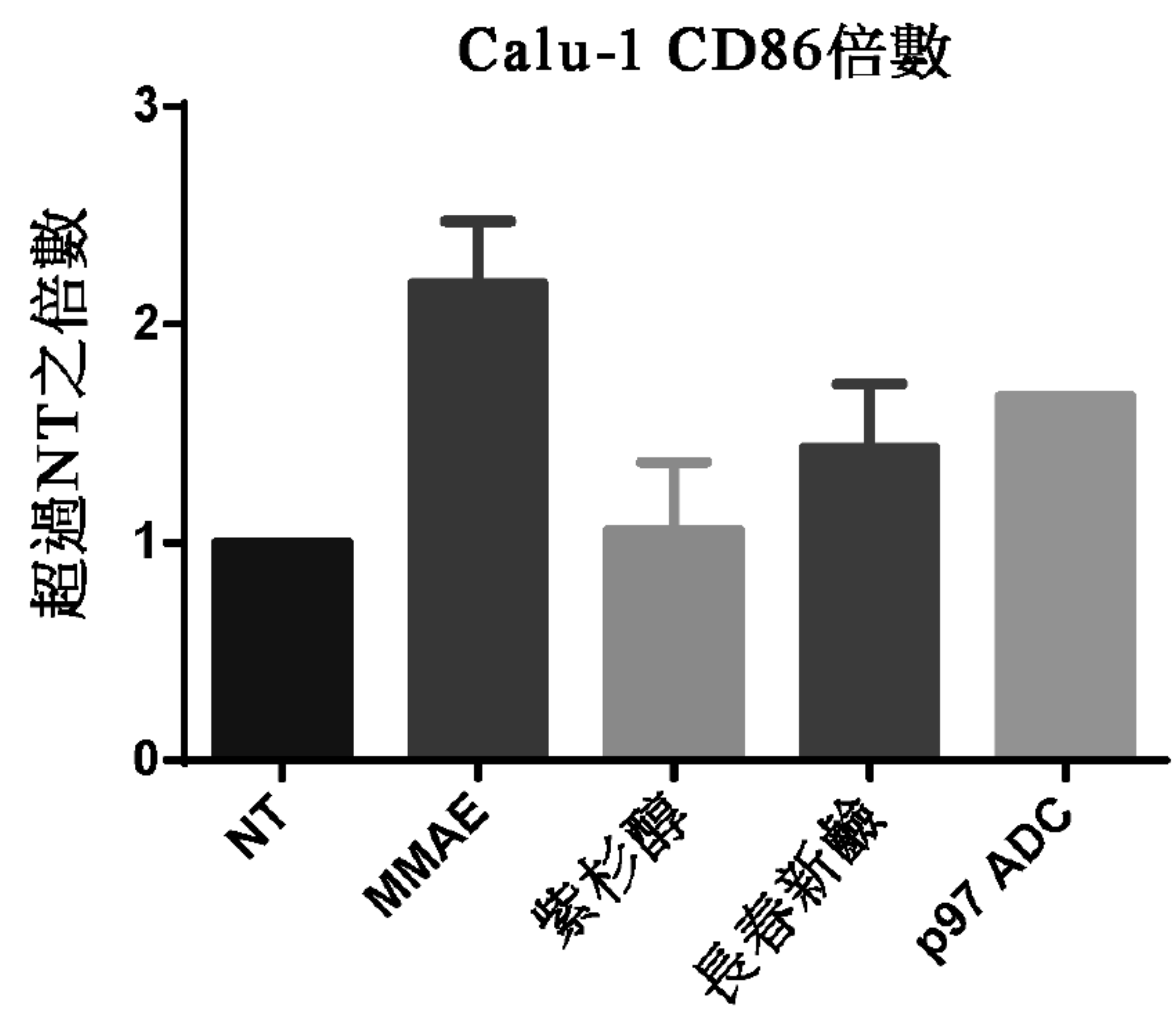
【圖10D】



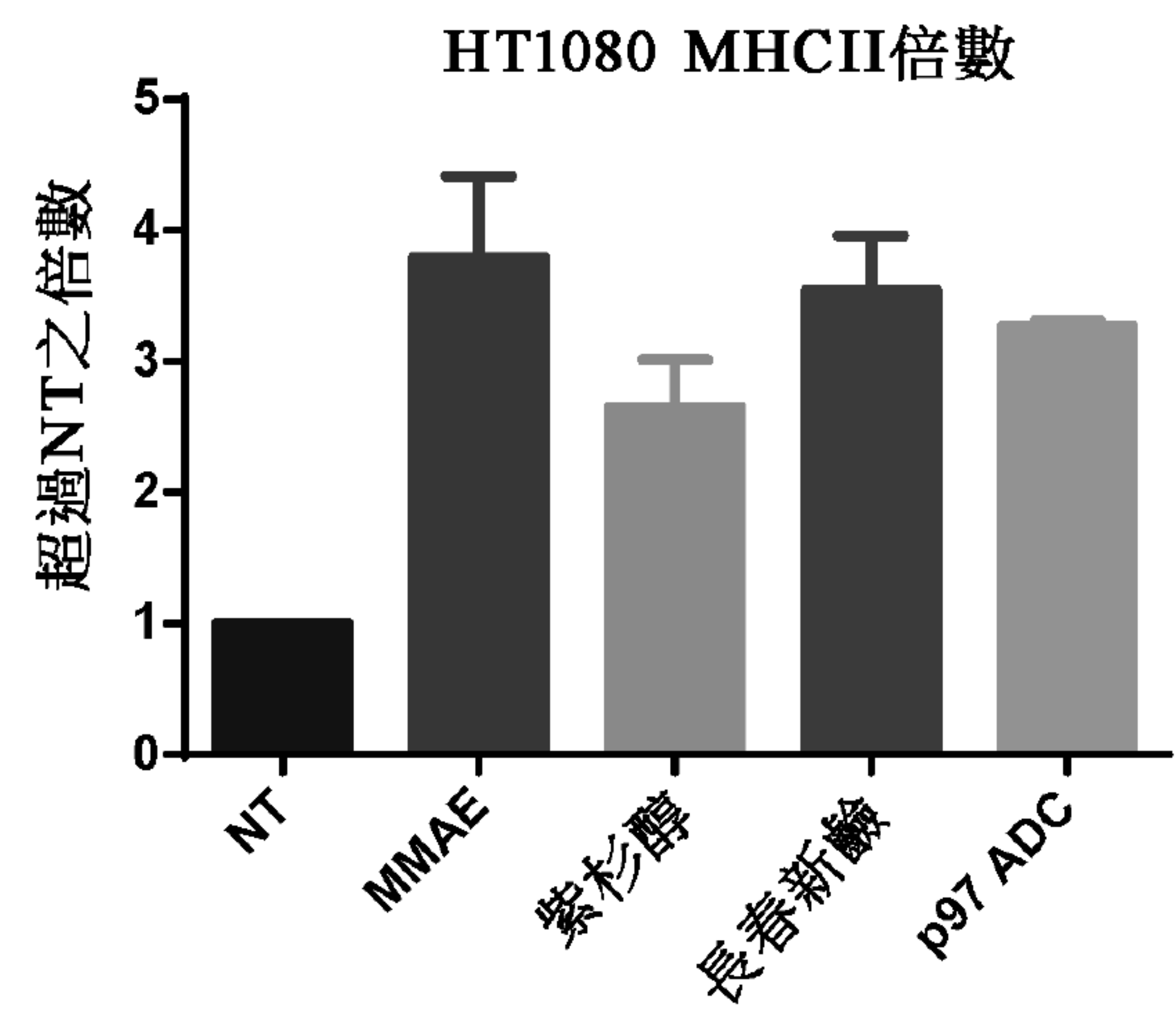
【圖11A】



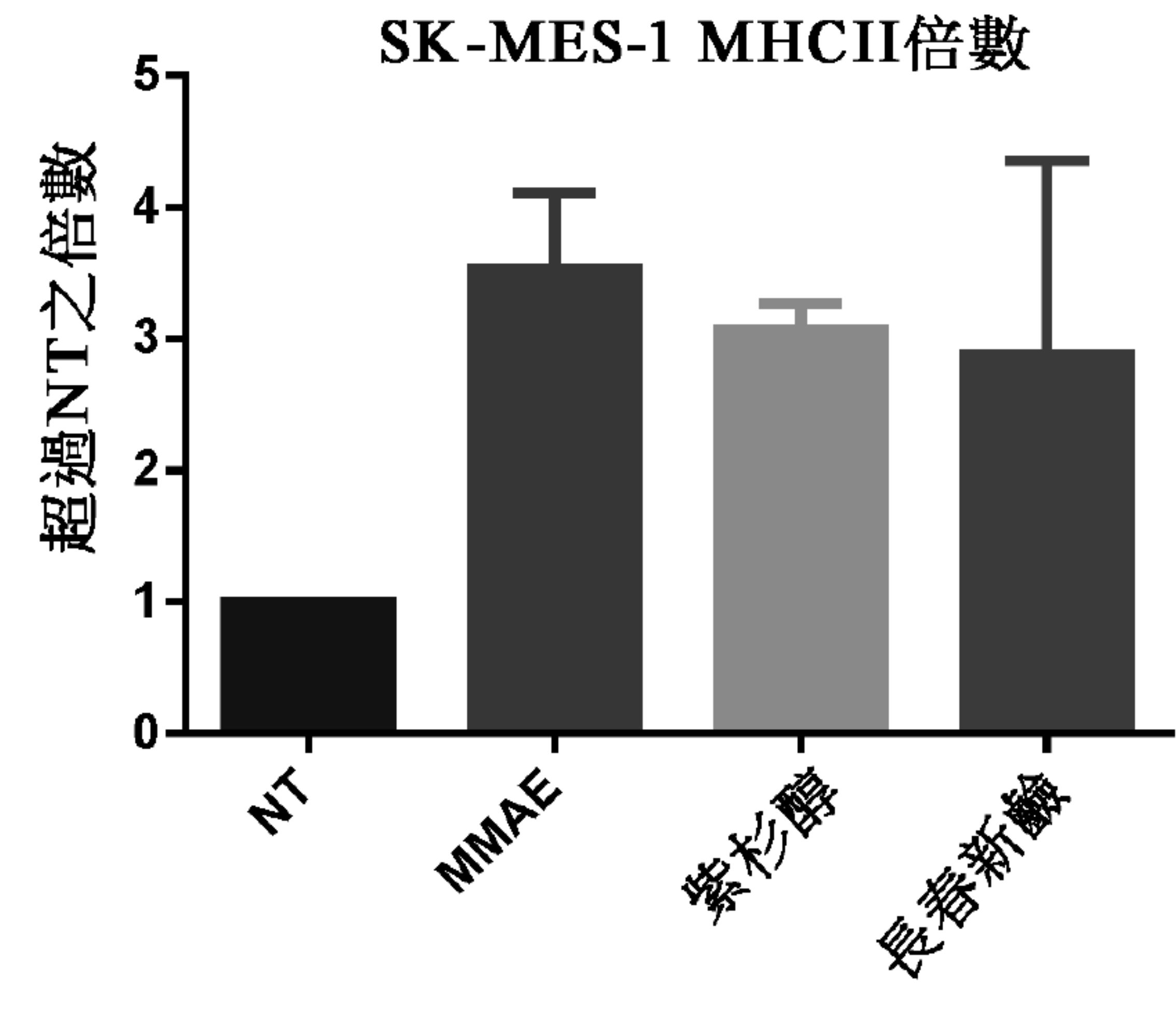
【圖11B】



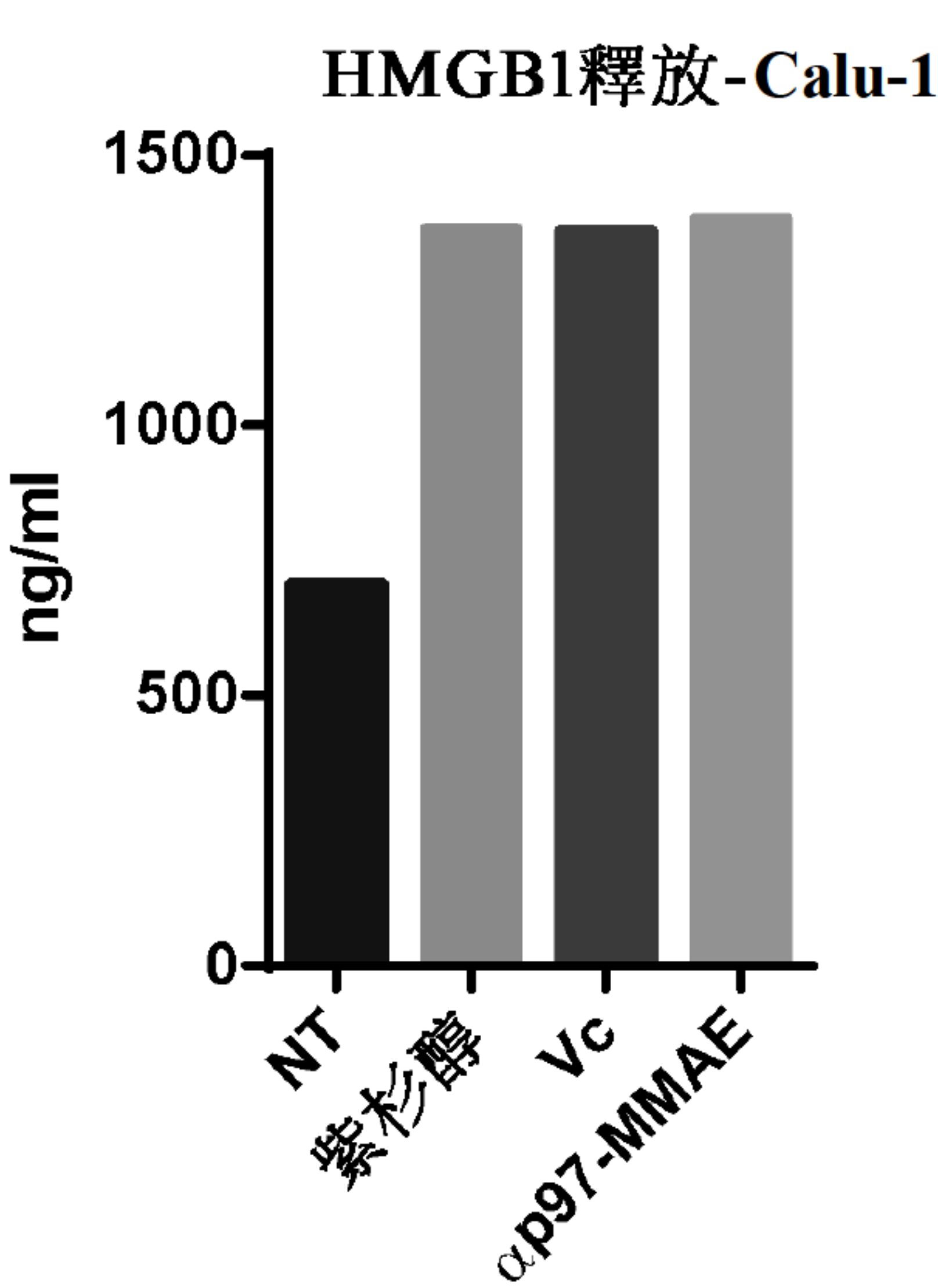
【圖12A】



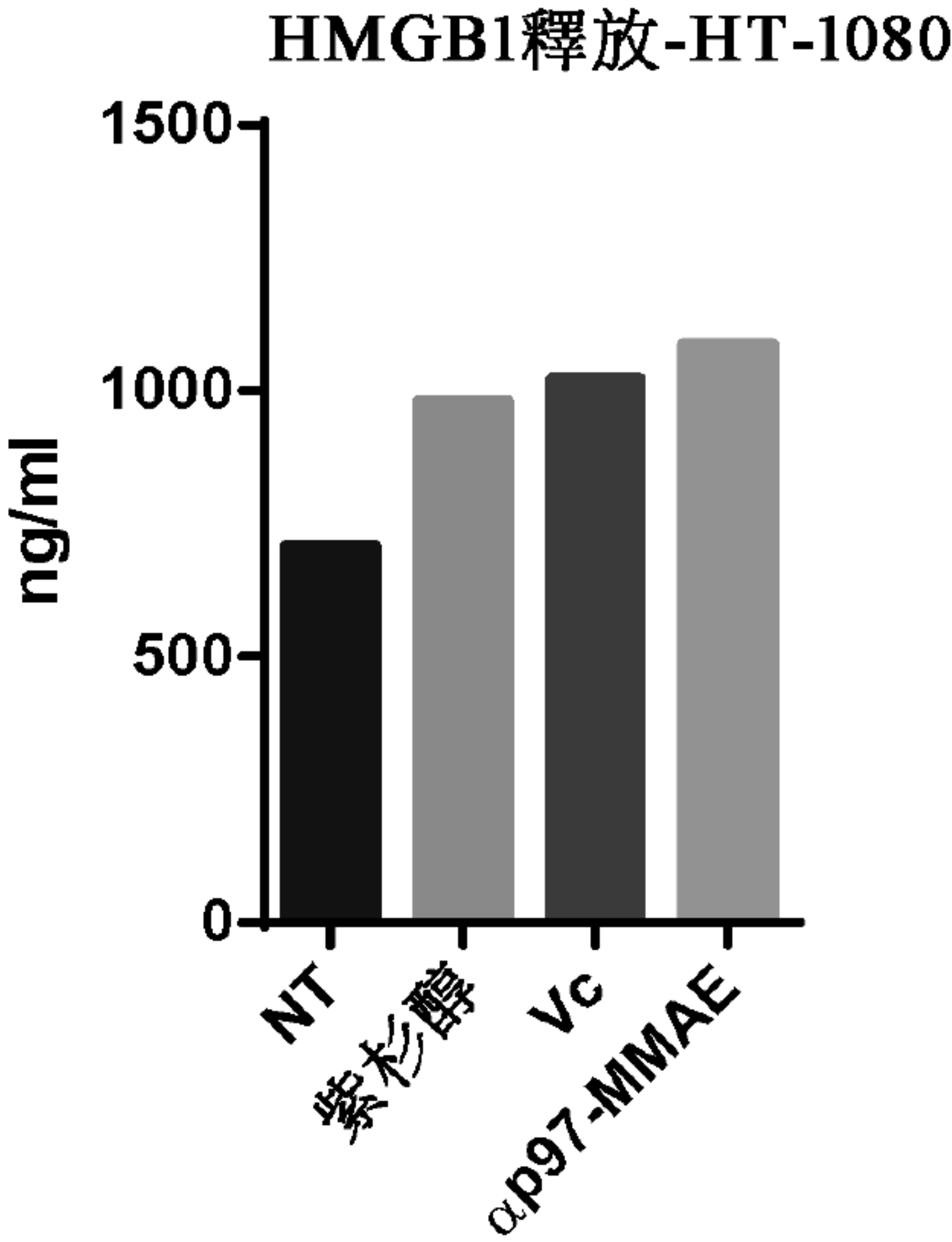
【圖12B】



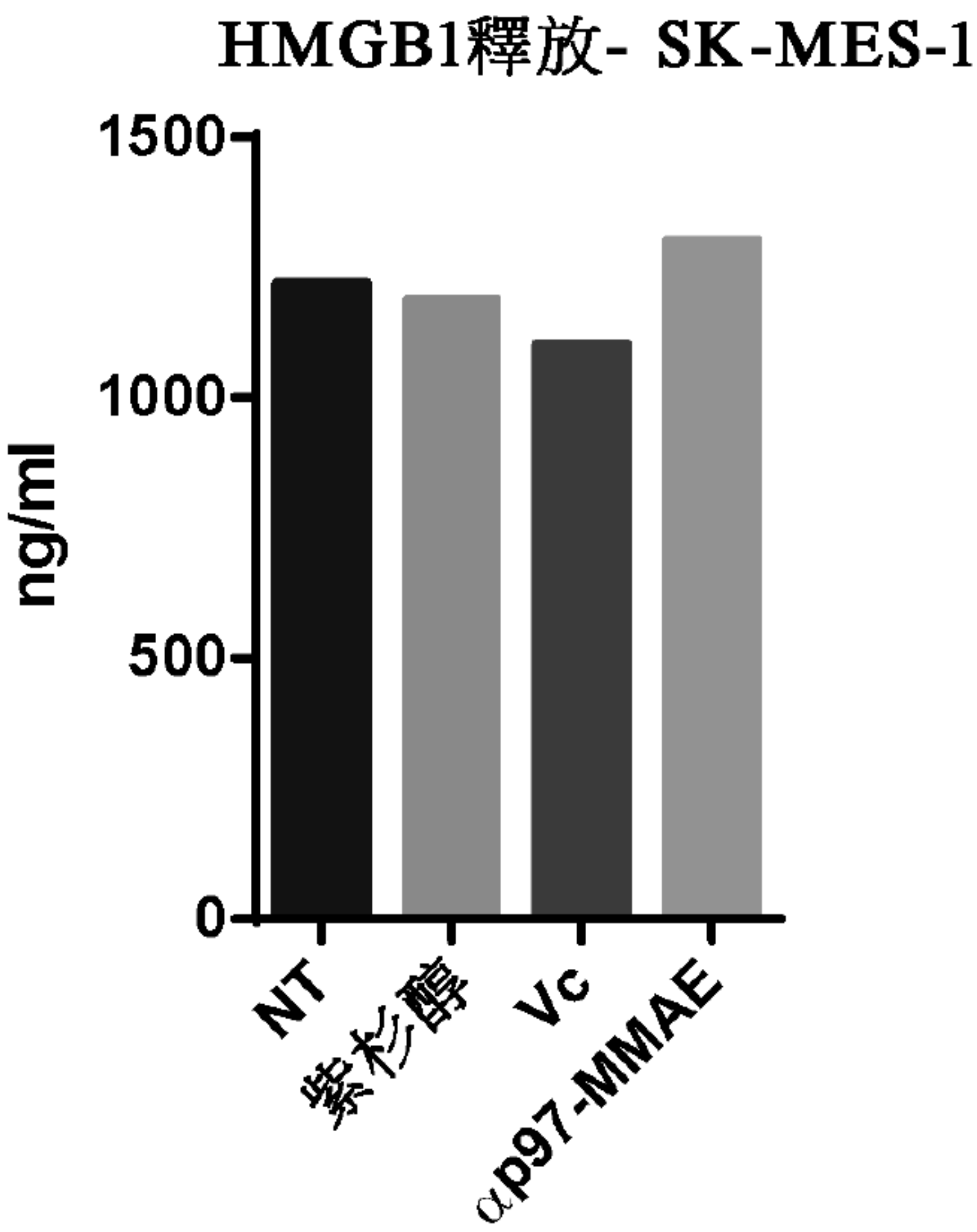
【圖12C】



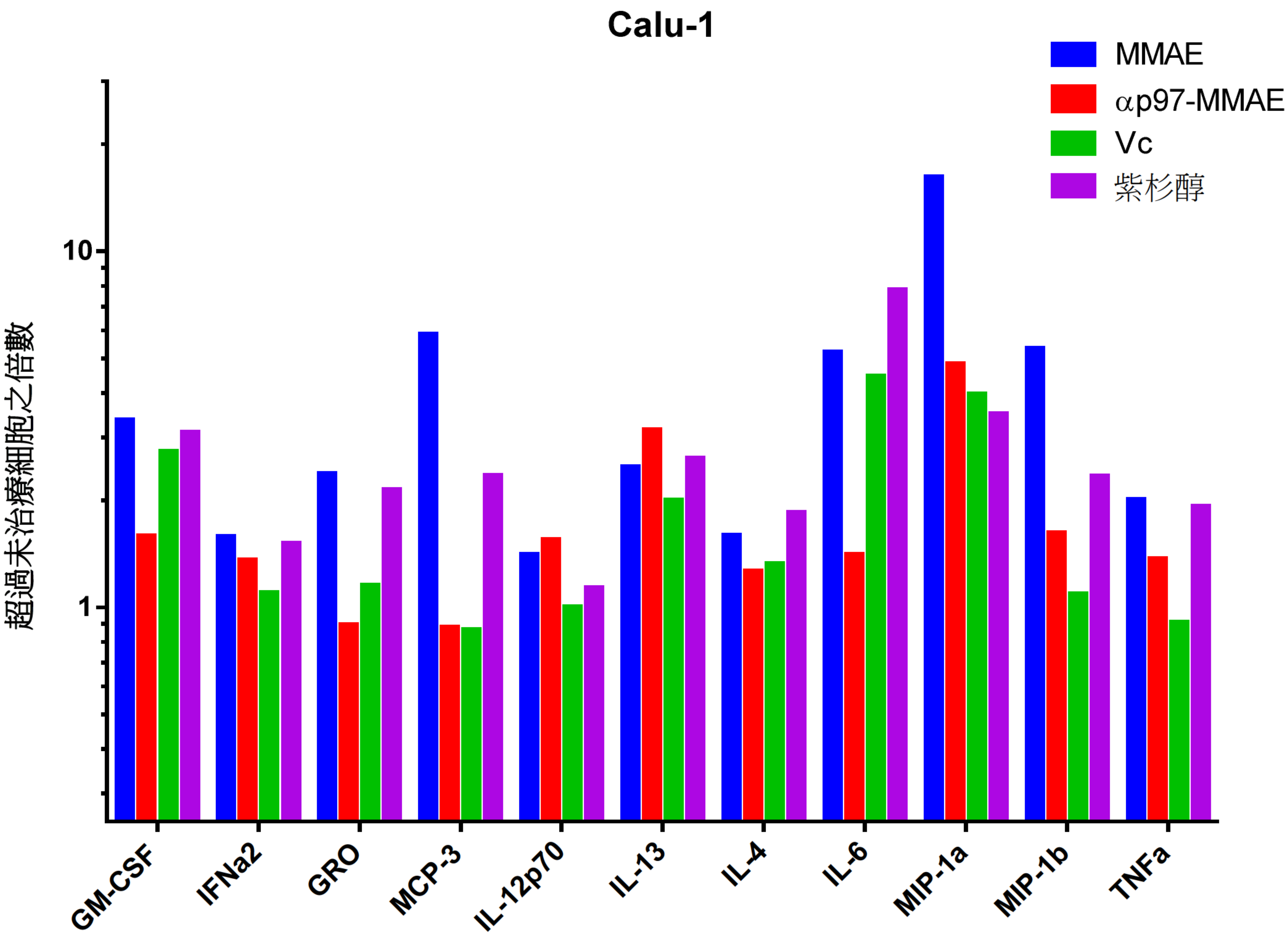
【圖12D】



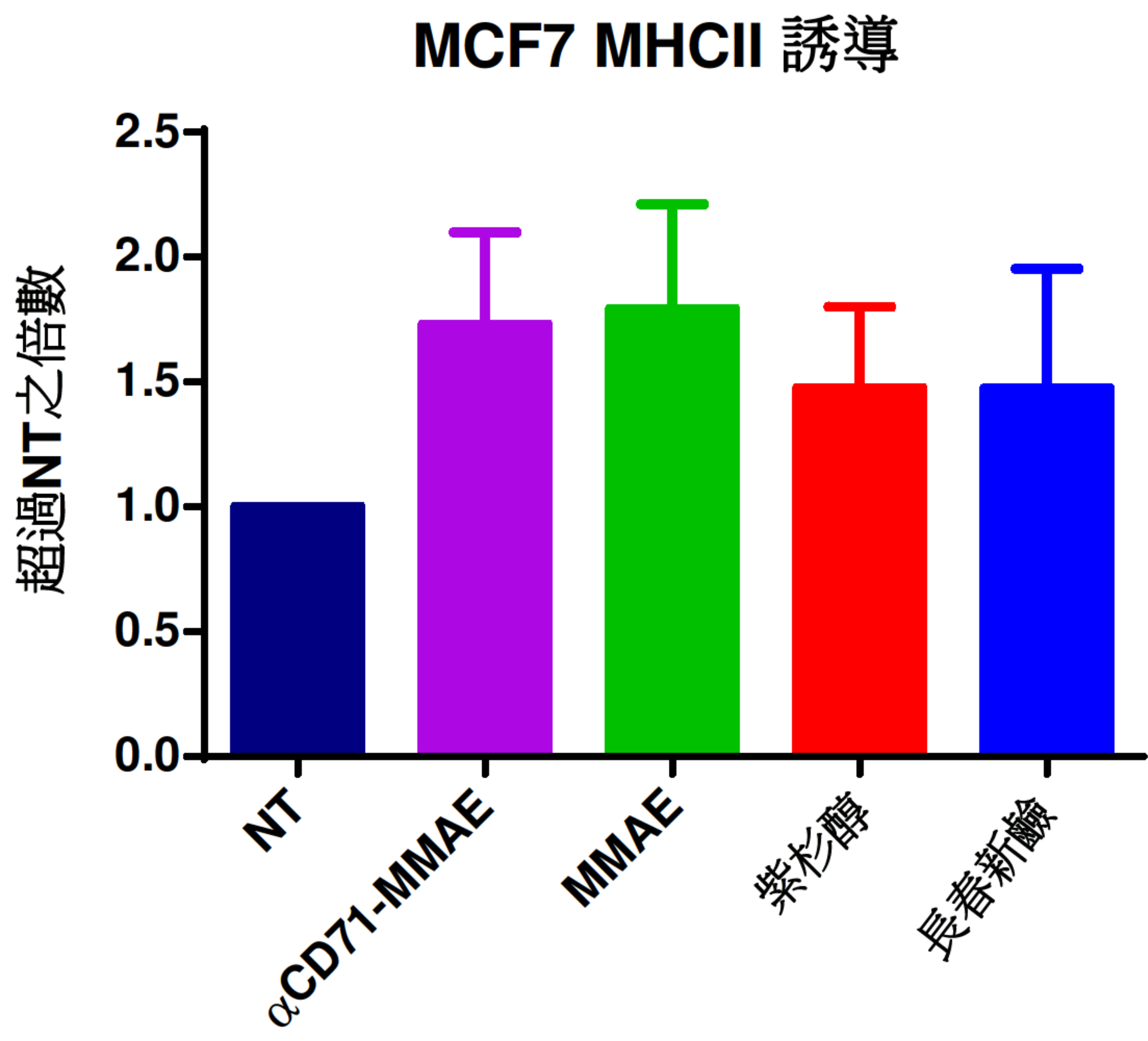
【圖12E】



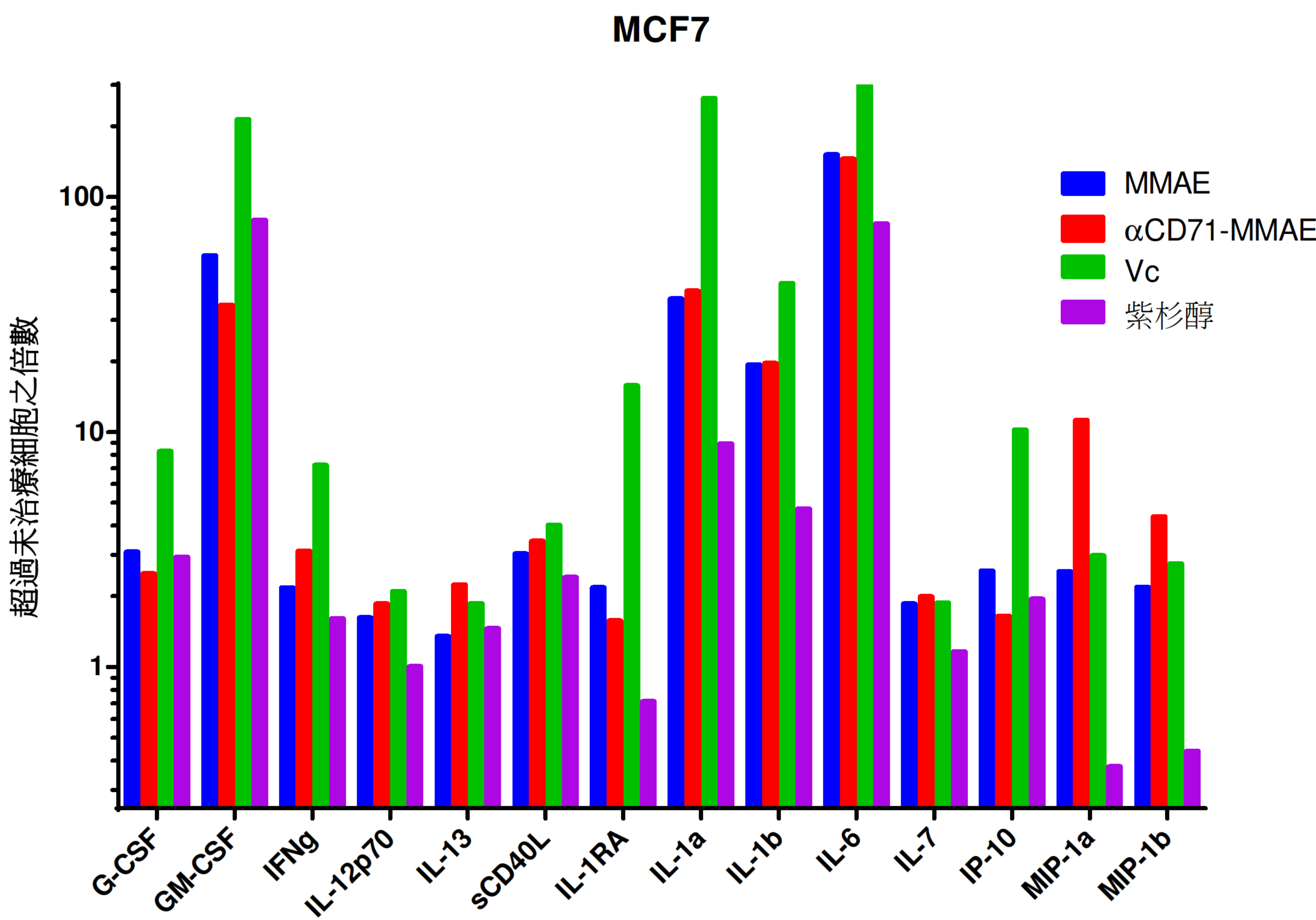
【圖12F】



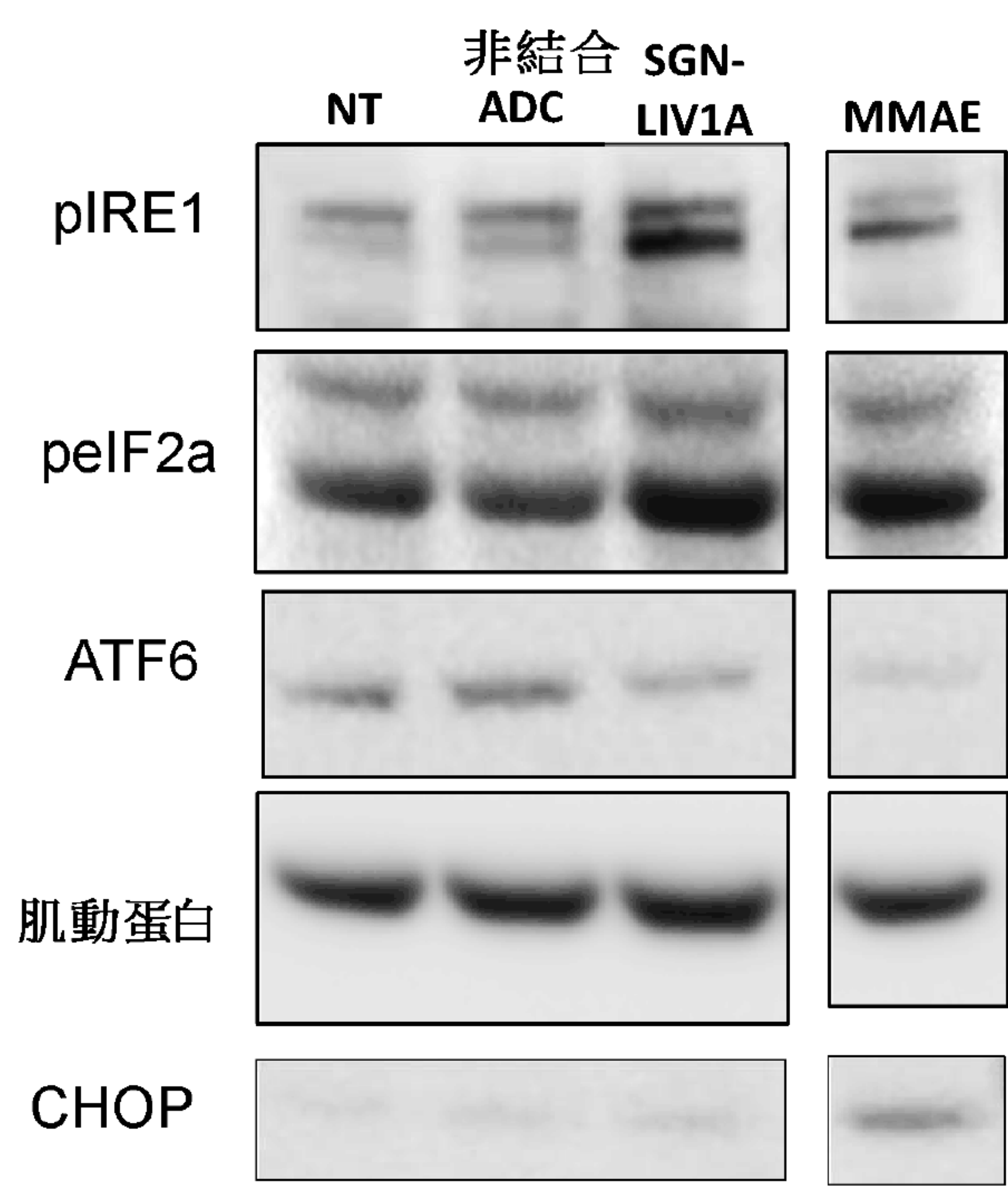
【圖13】



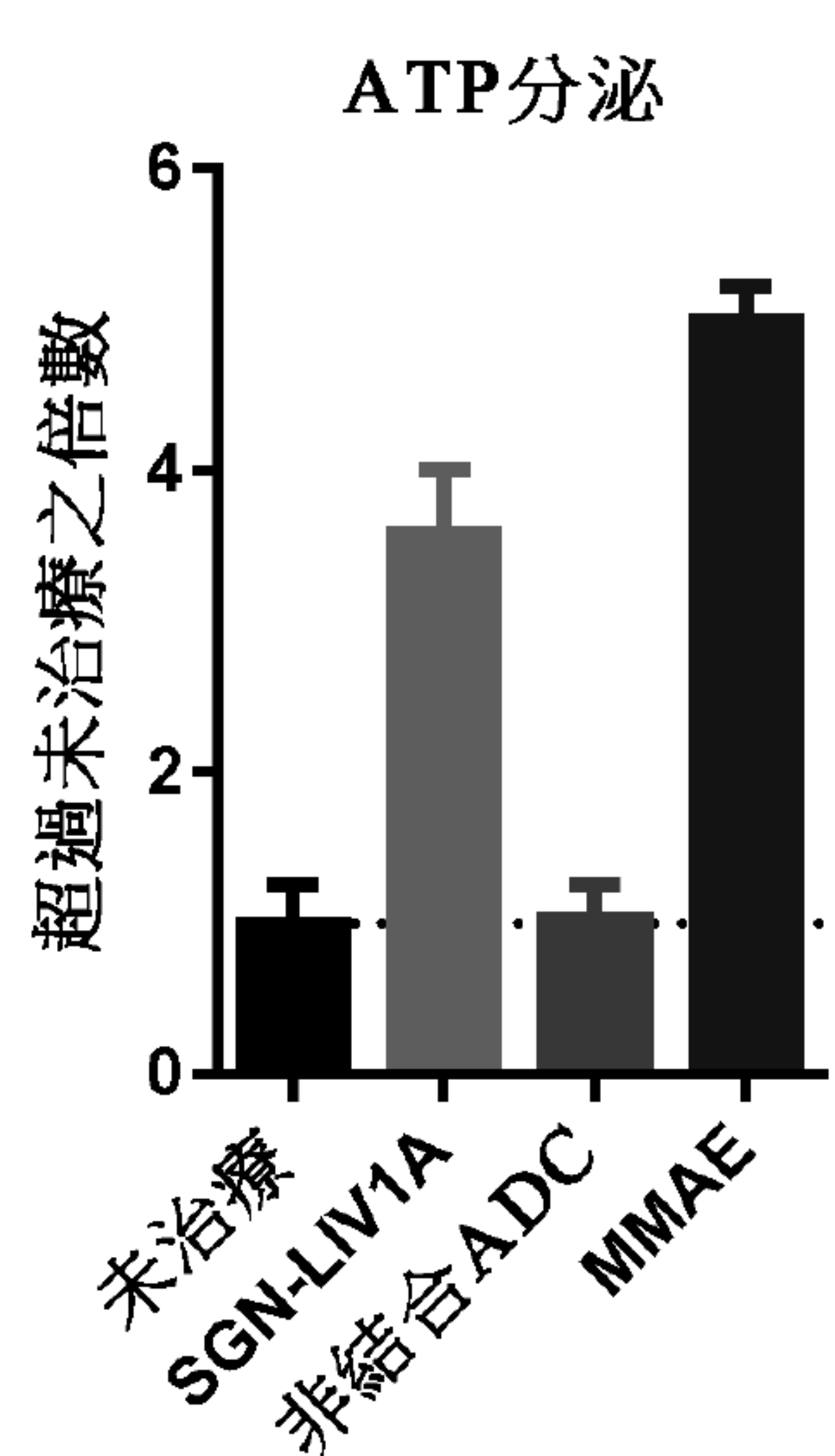
【圖14A】



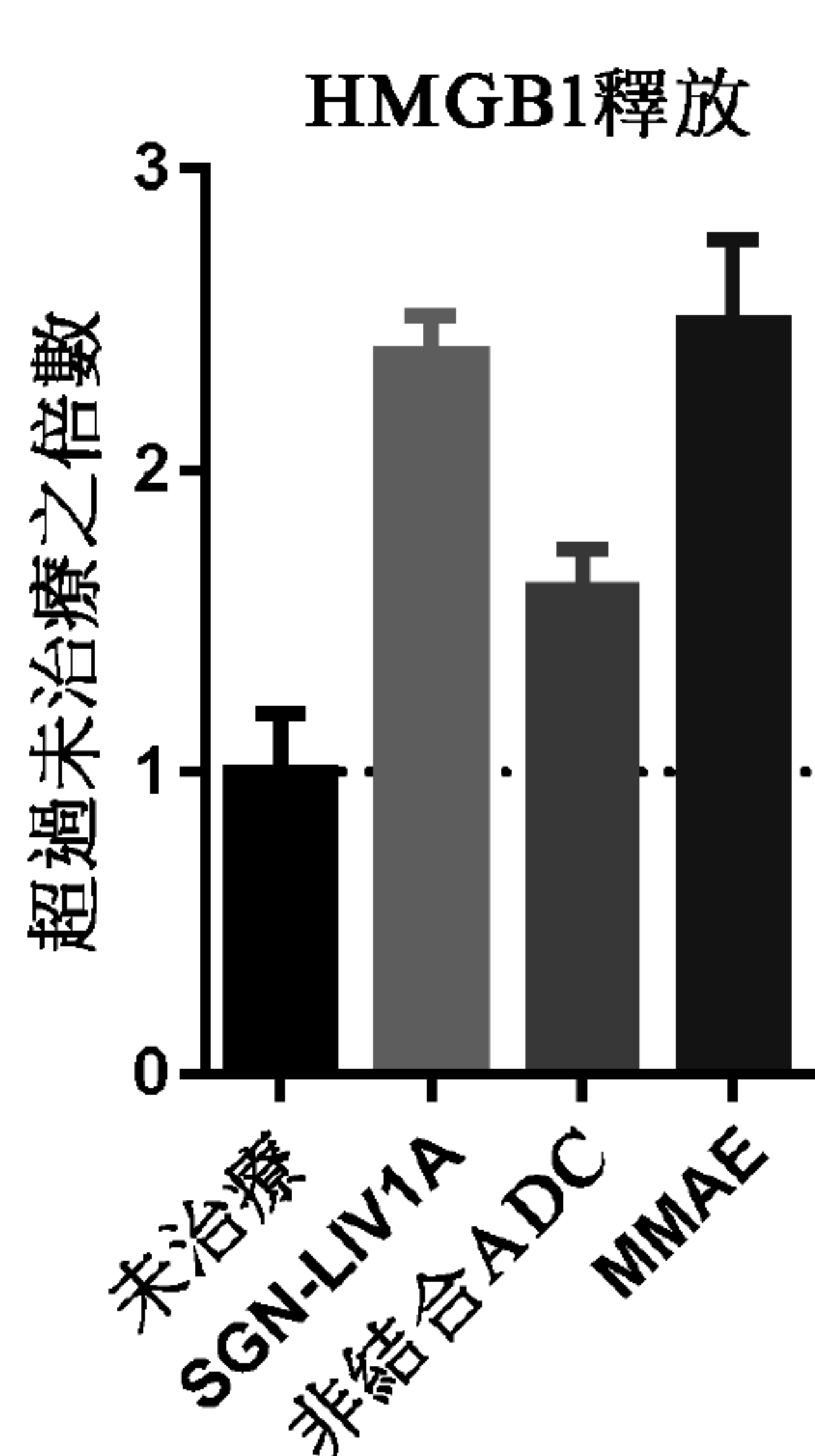
【圖14B】



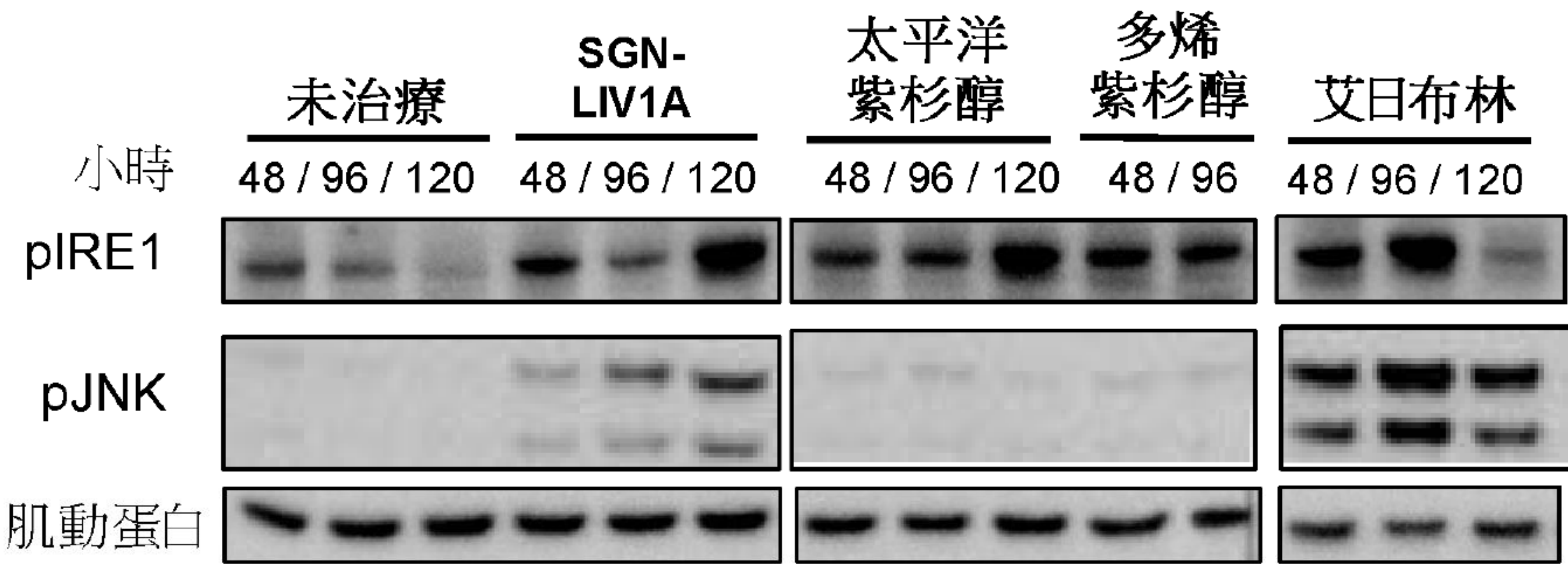
【圖15A】



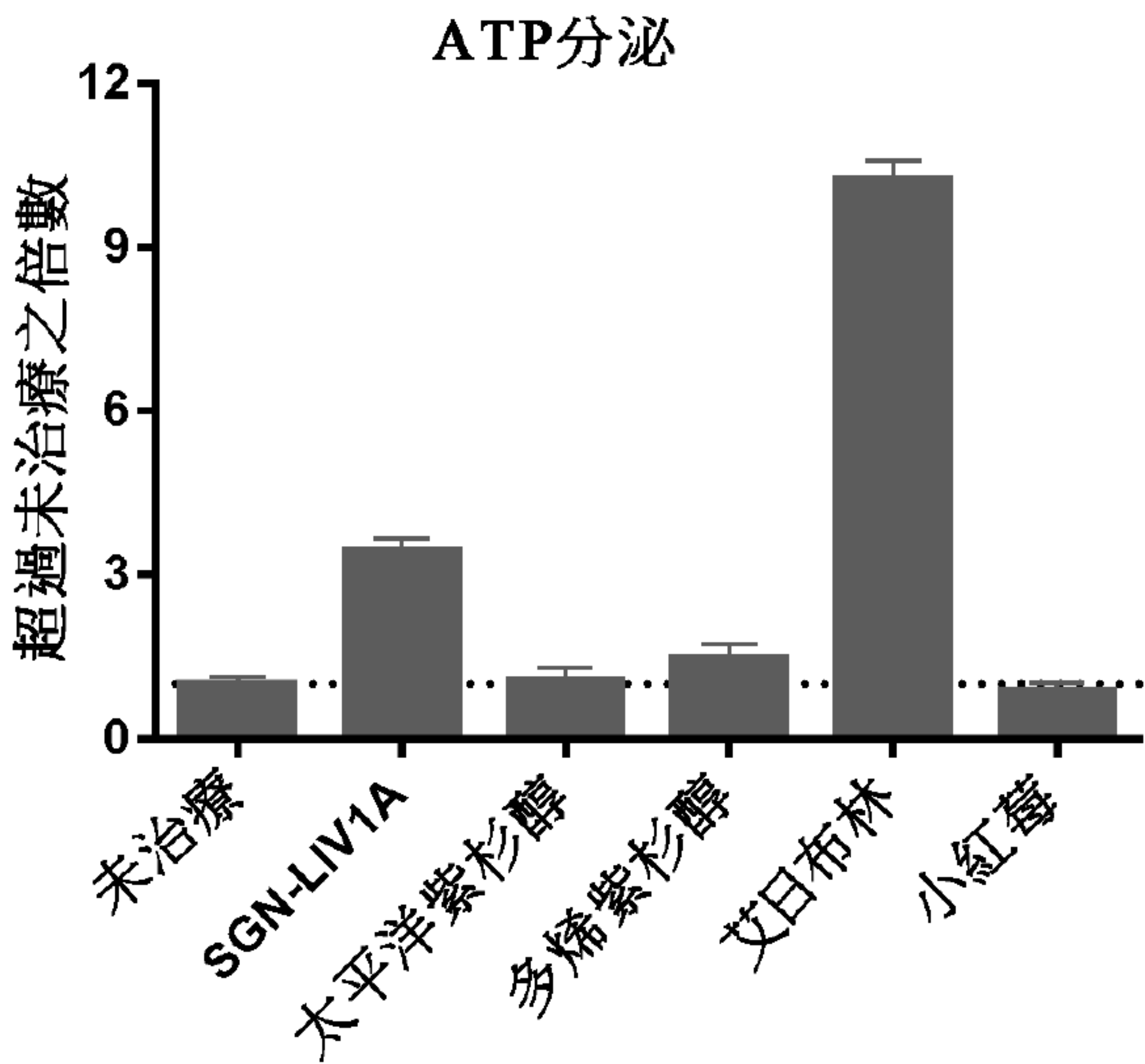
【圖15B】



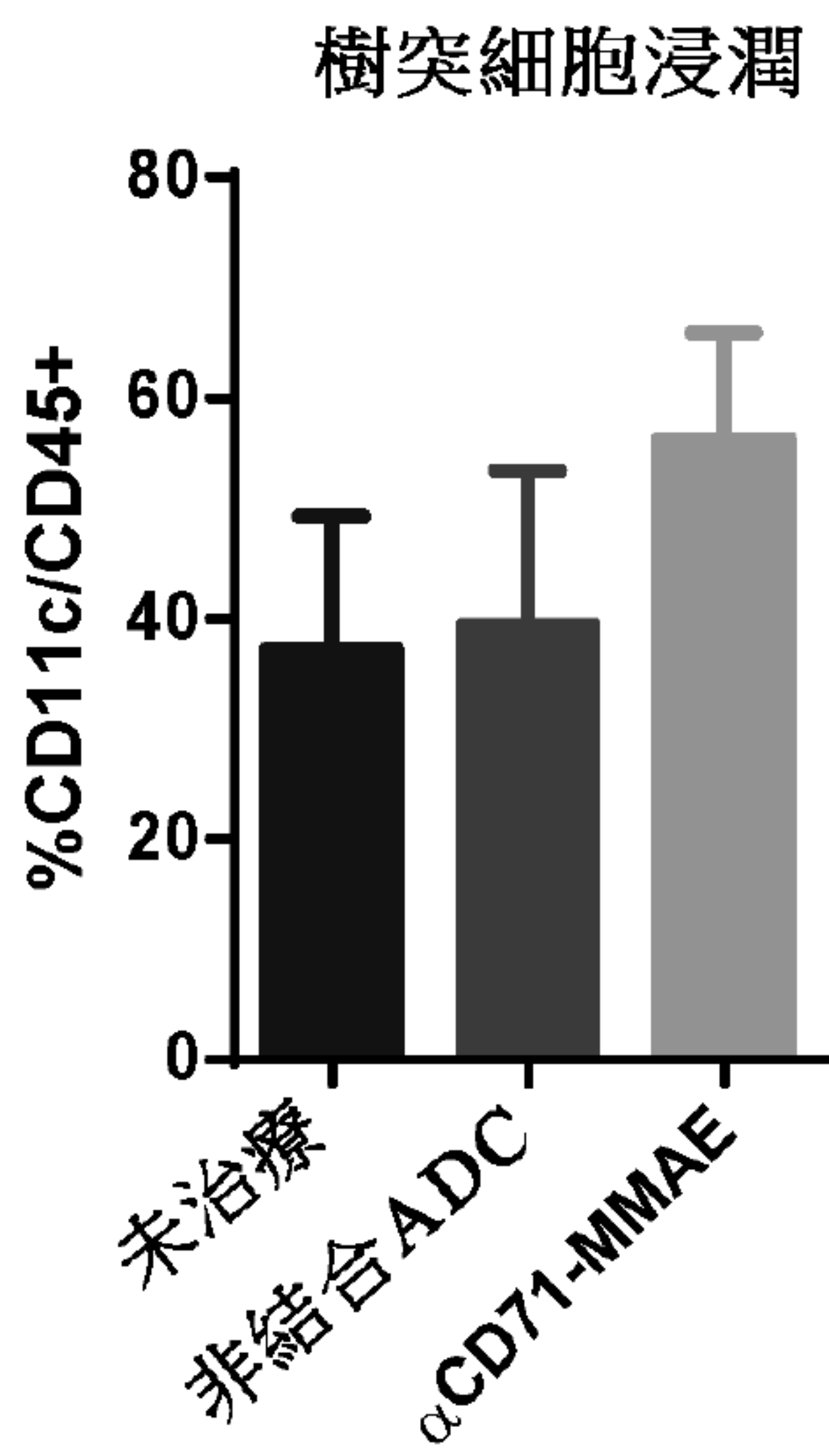
【圖15C】



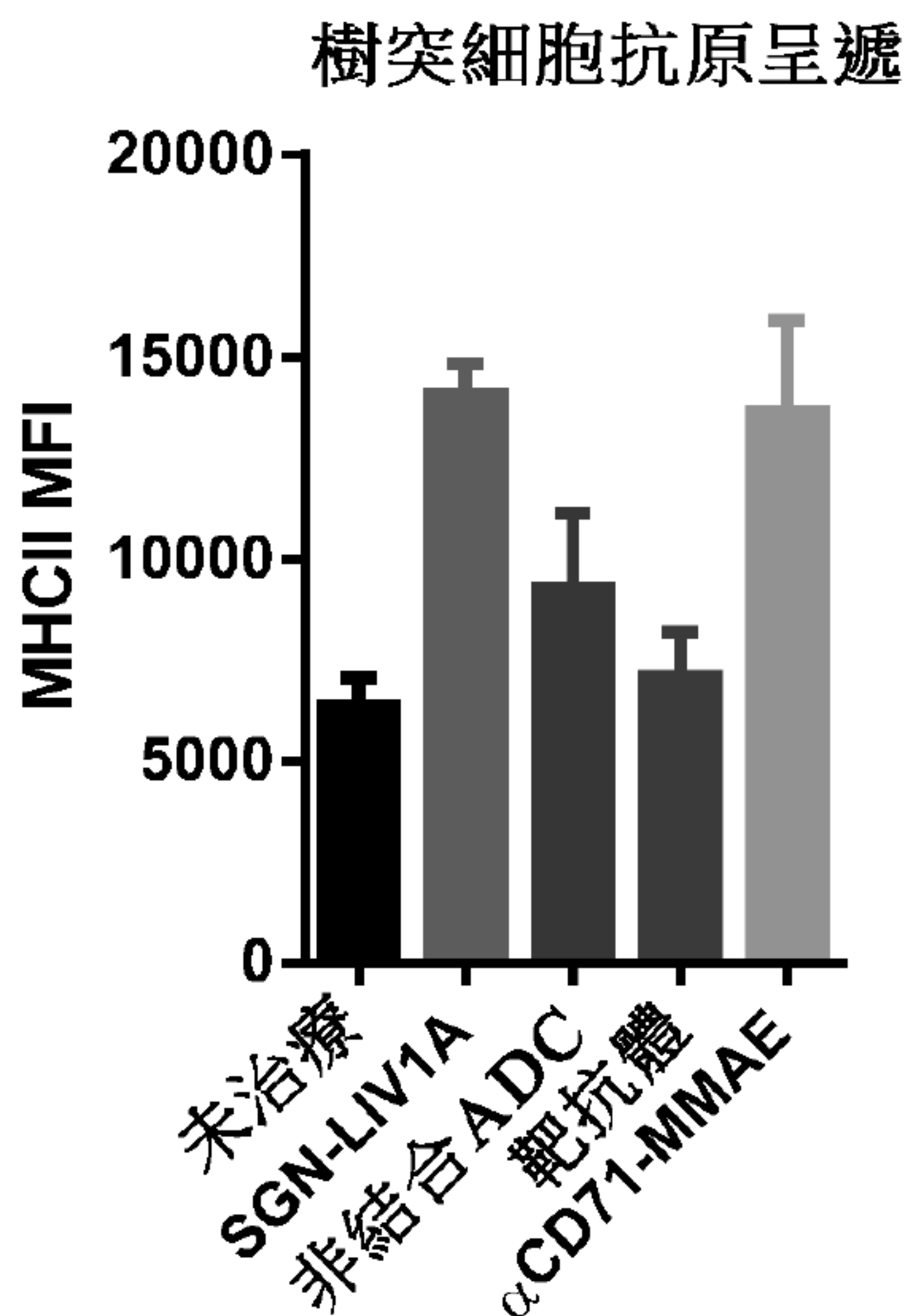
【圖16A】



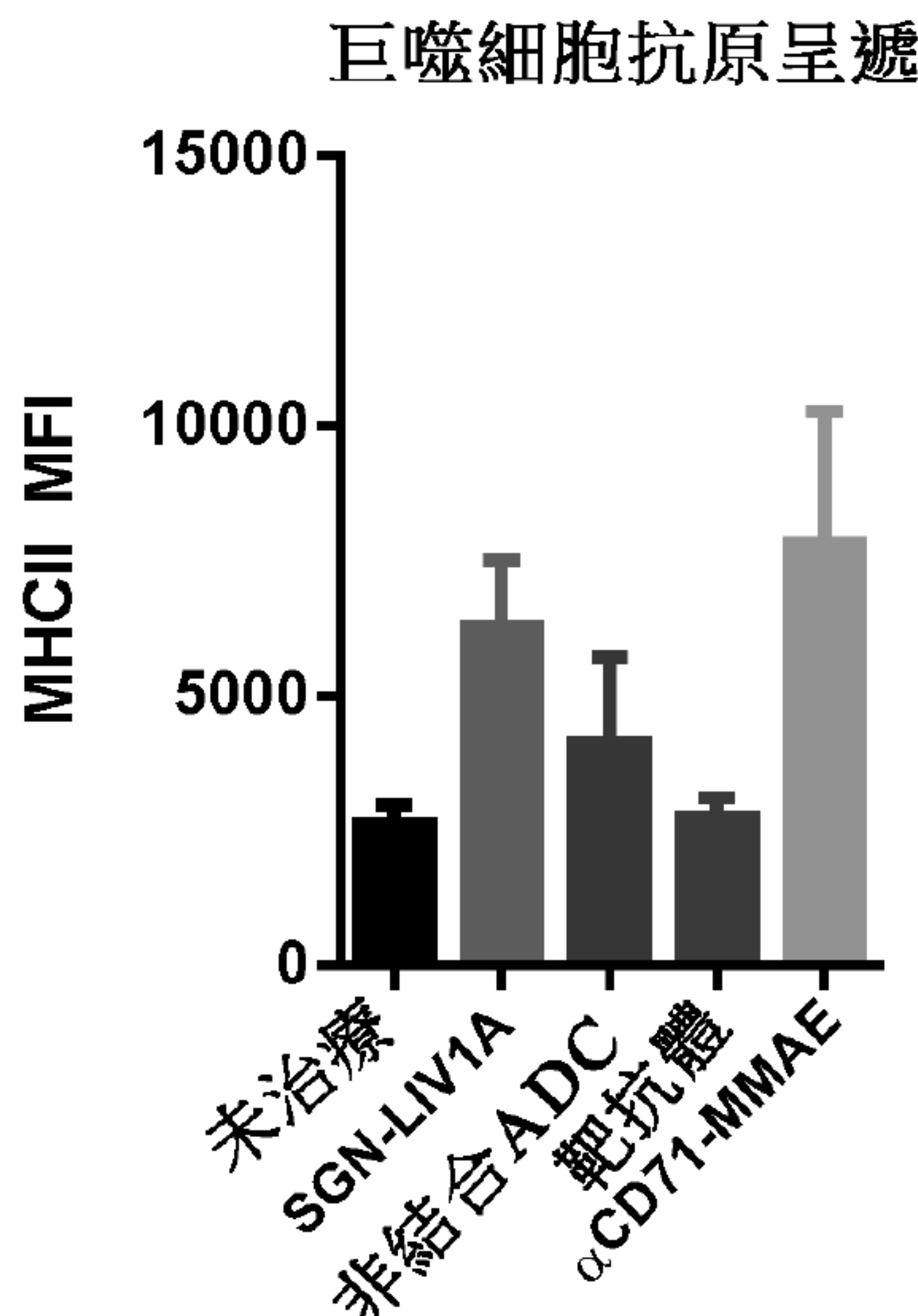
【圖16B】



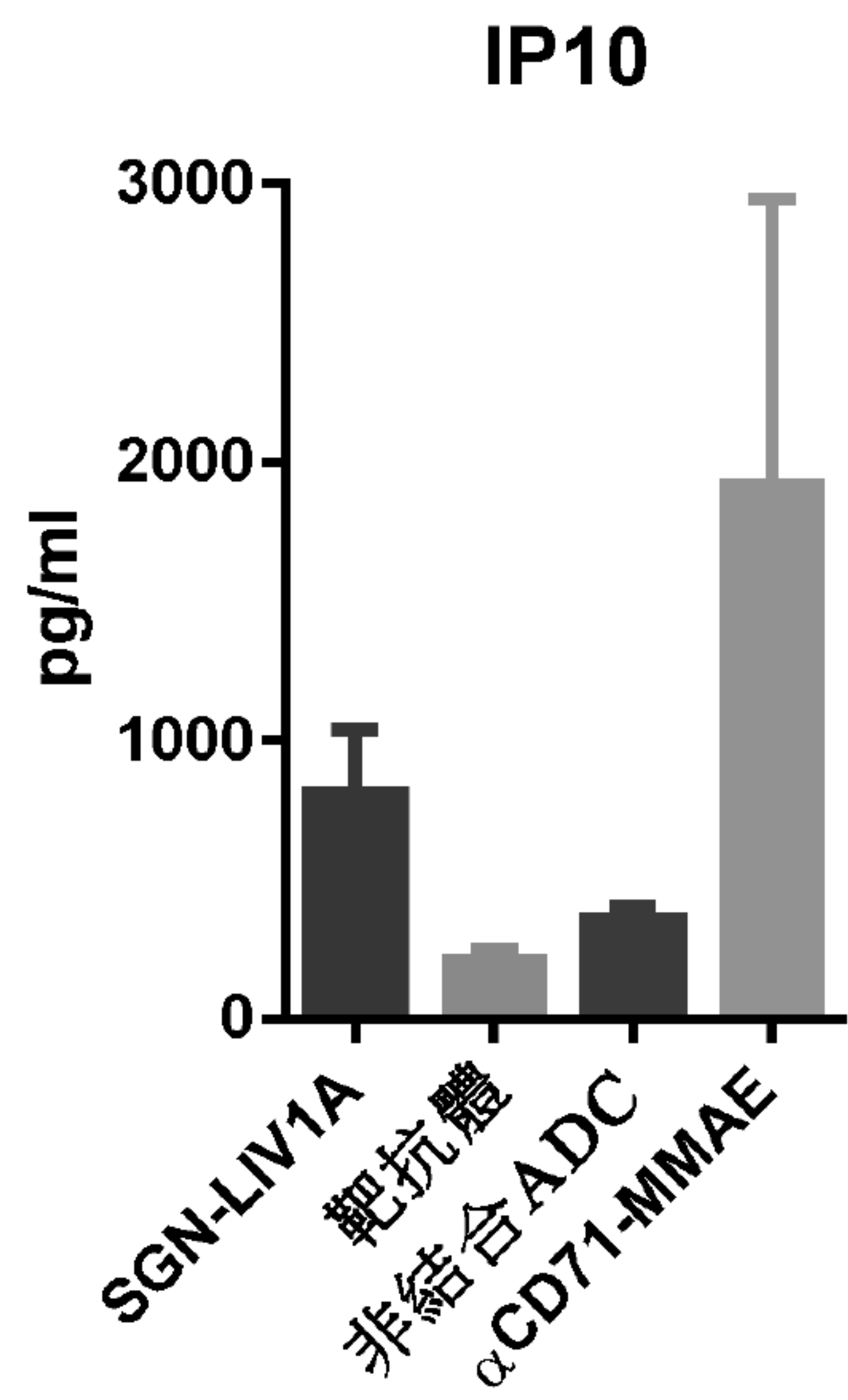
【圖17A】



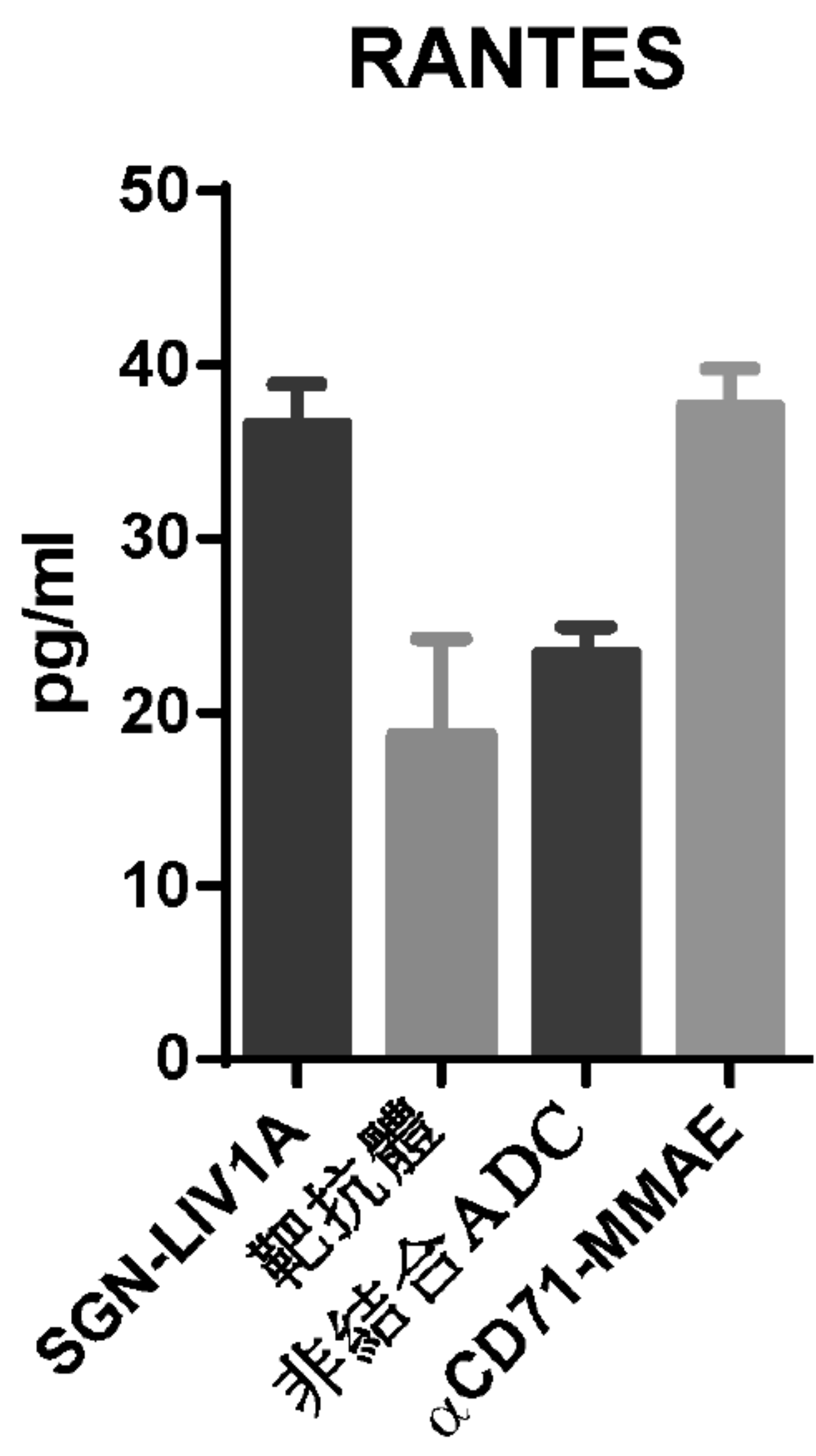
【圖17B】



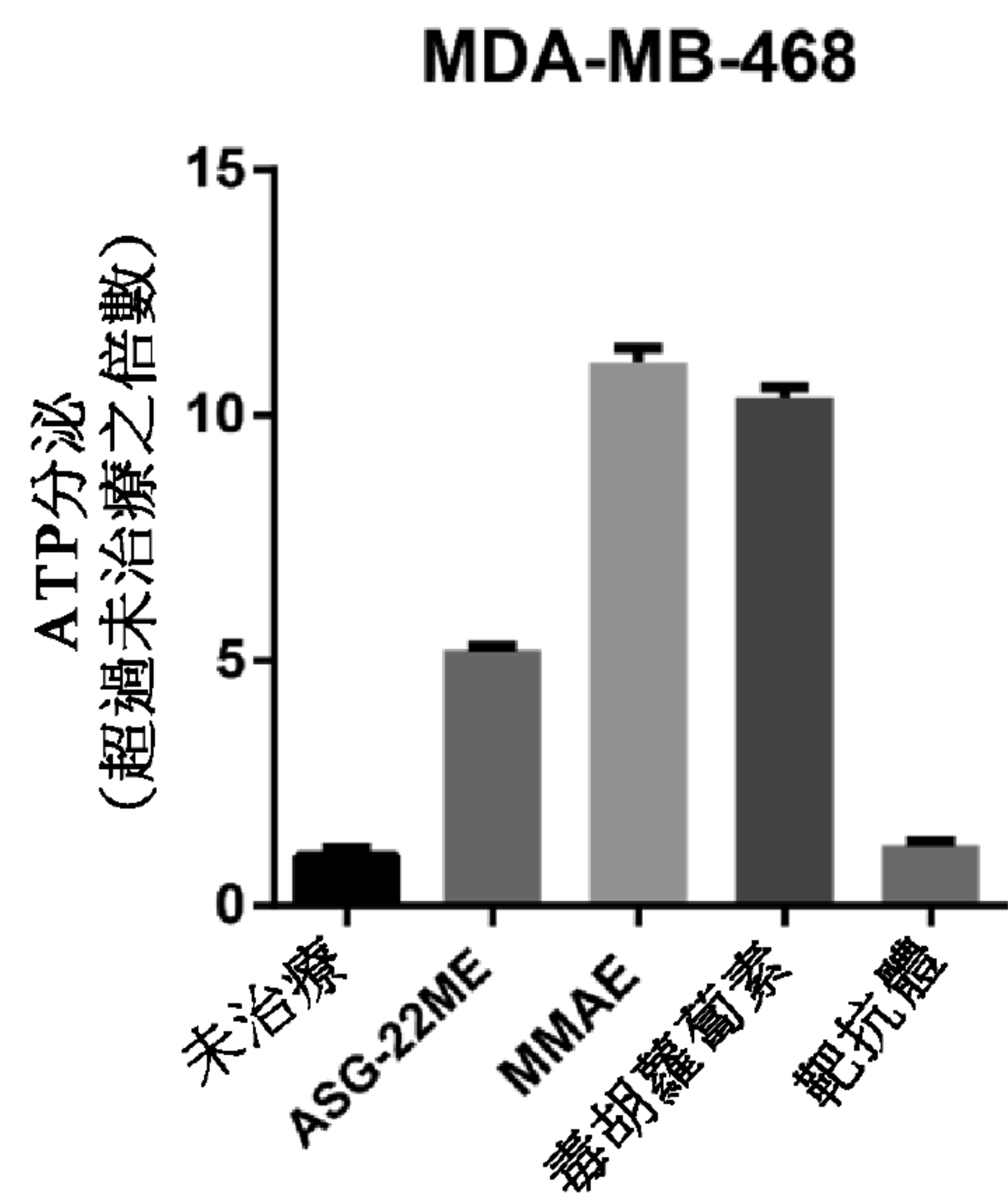
【圖17C】



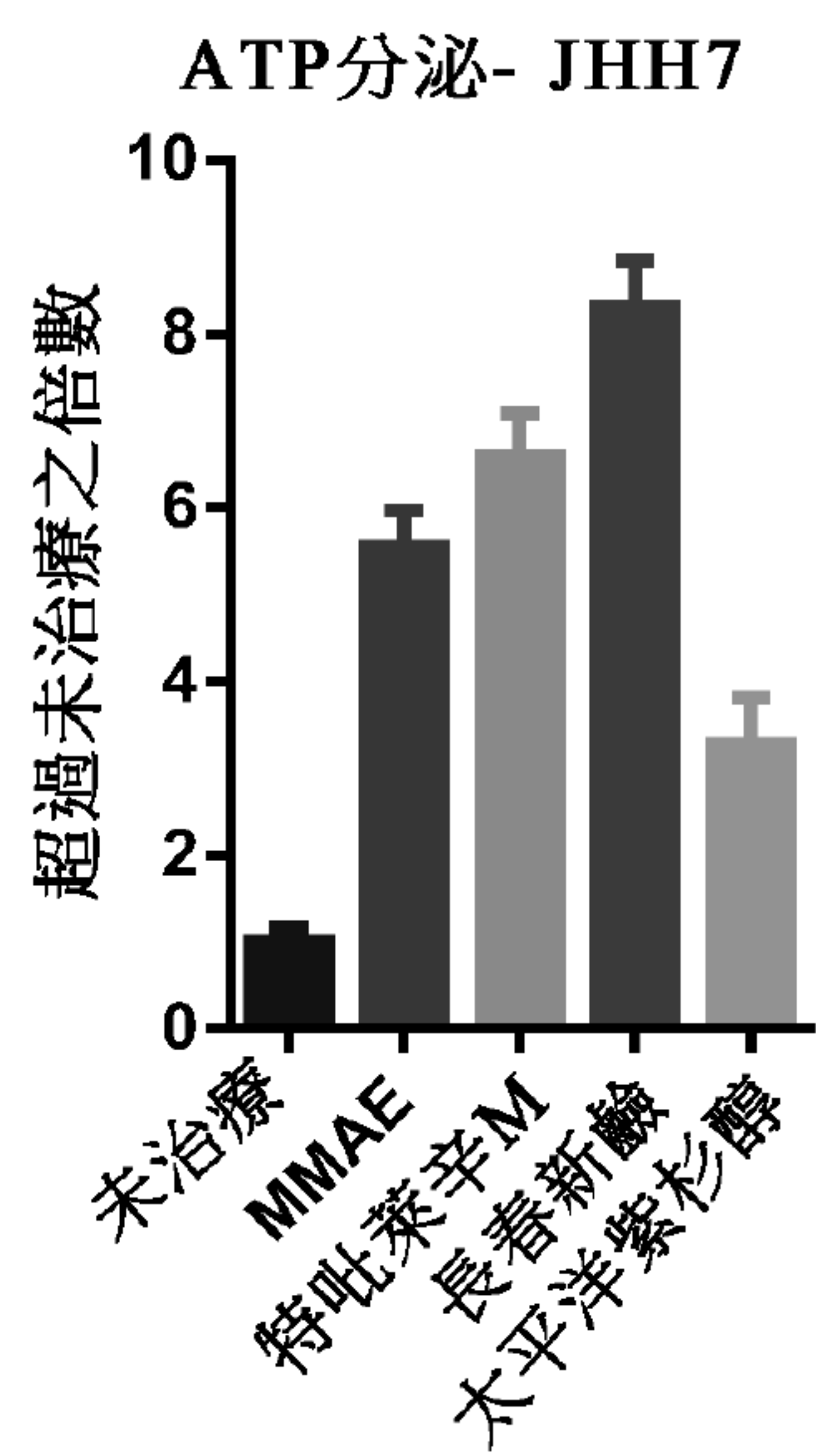
【圖17D】



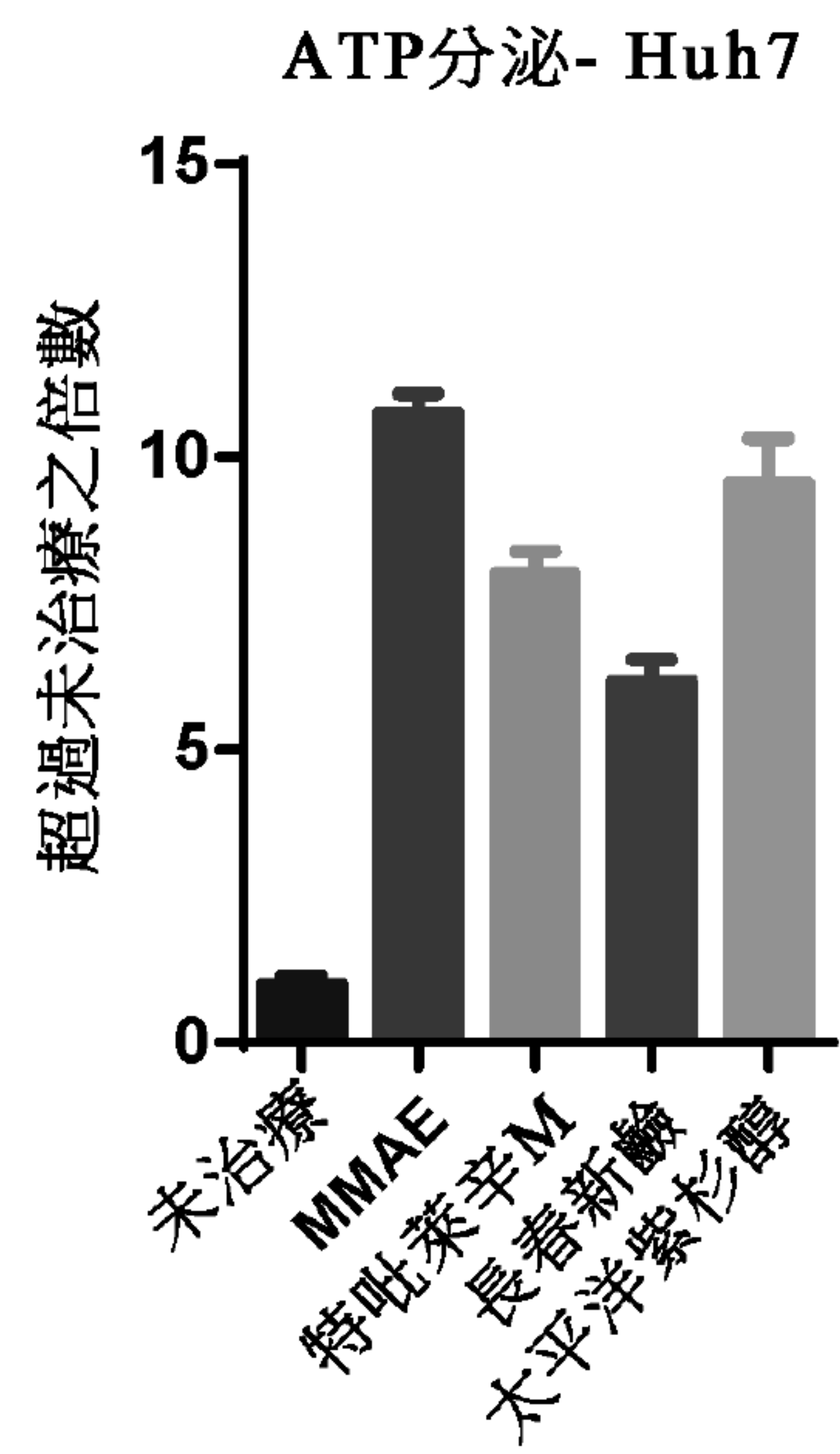
【圖17E】



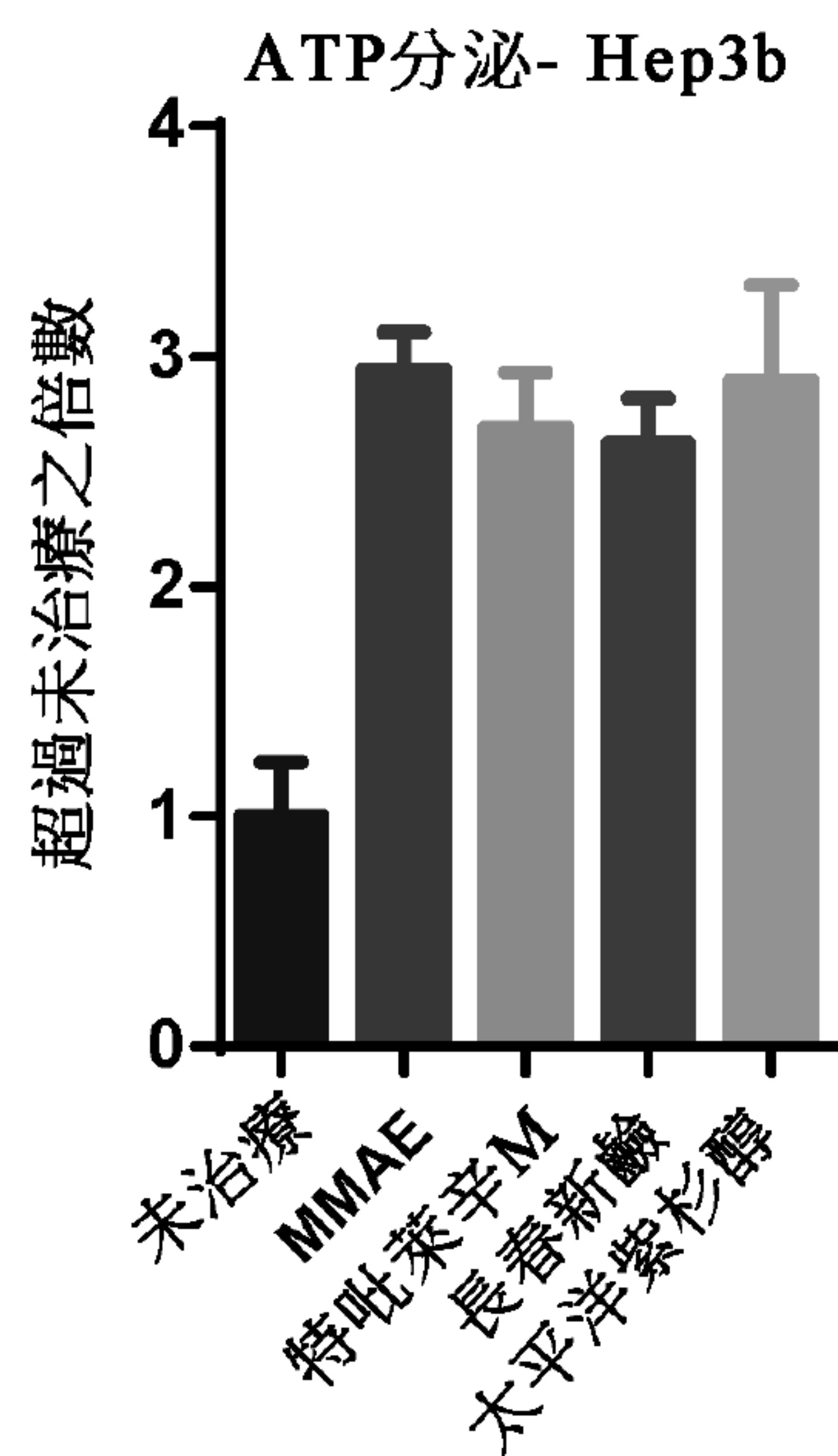
【圖18】



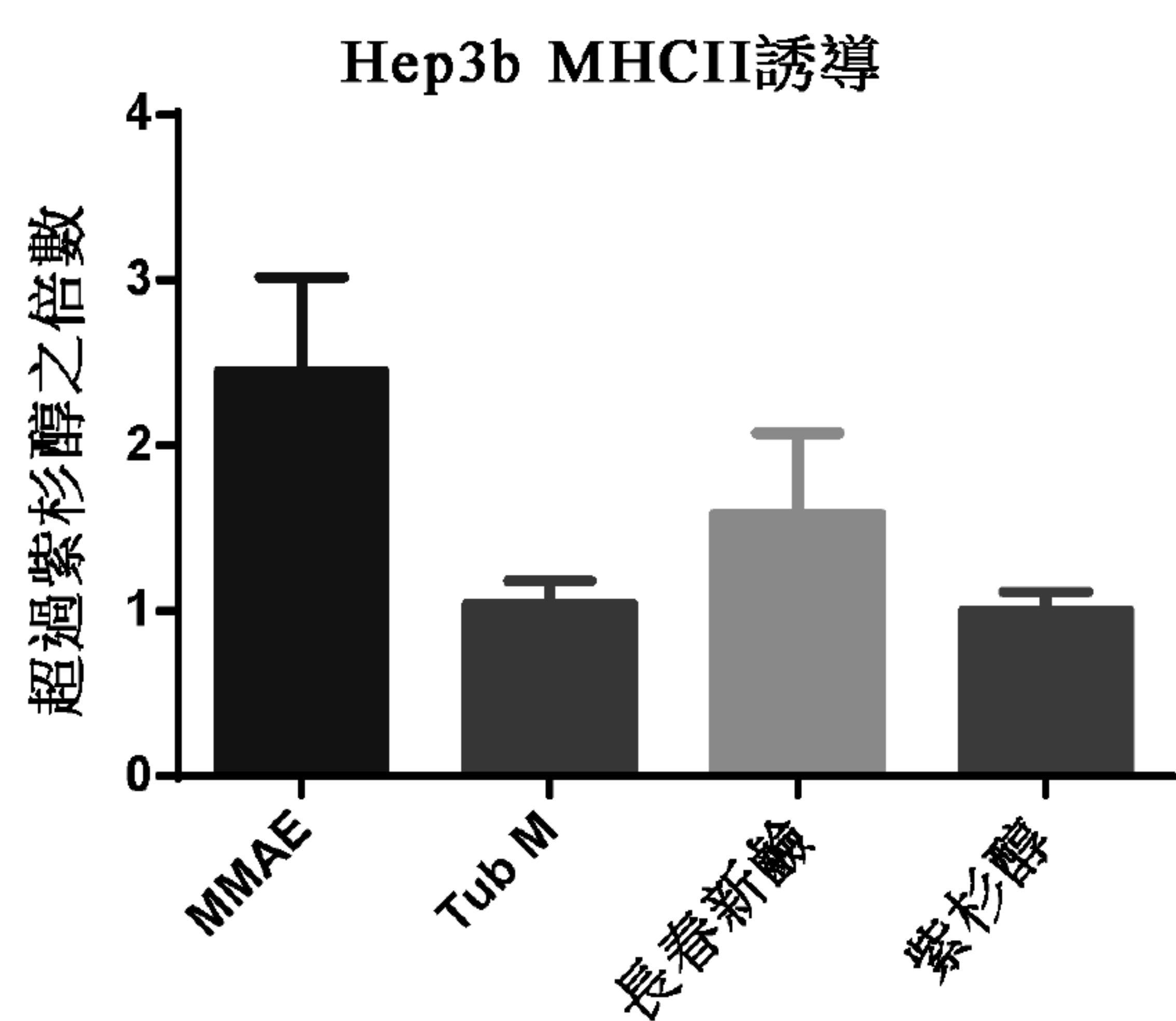
【圖19A】



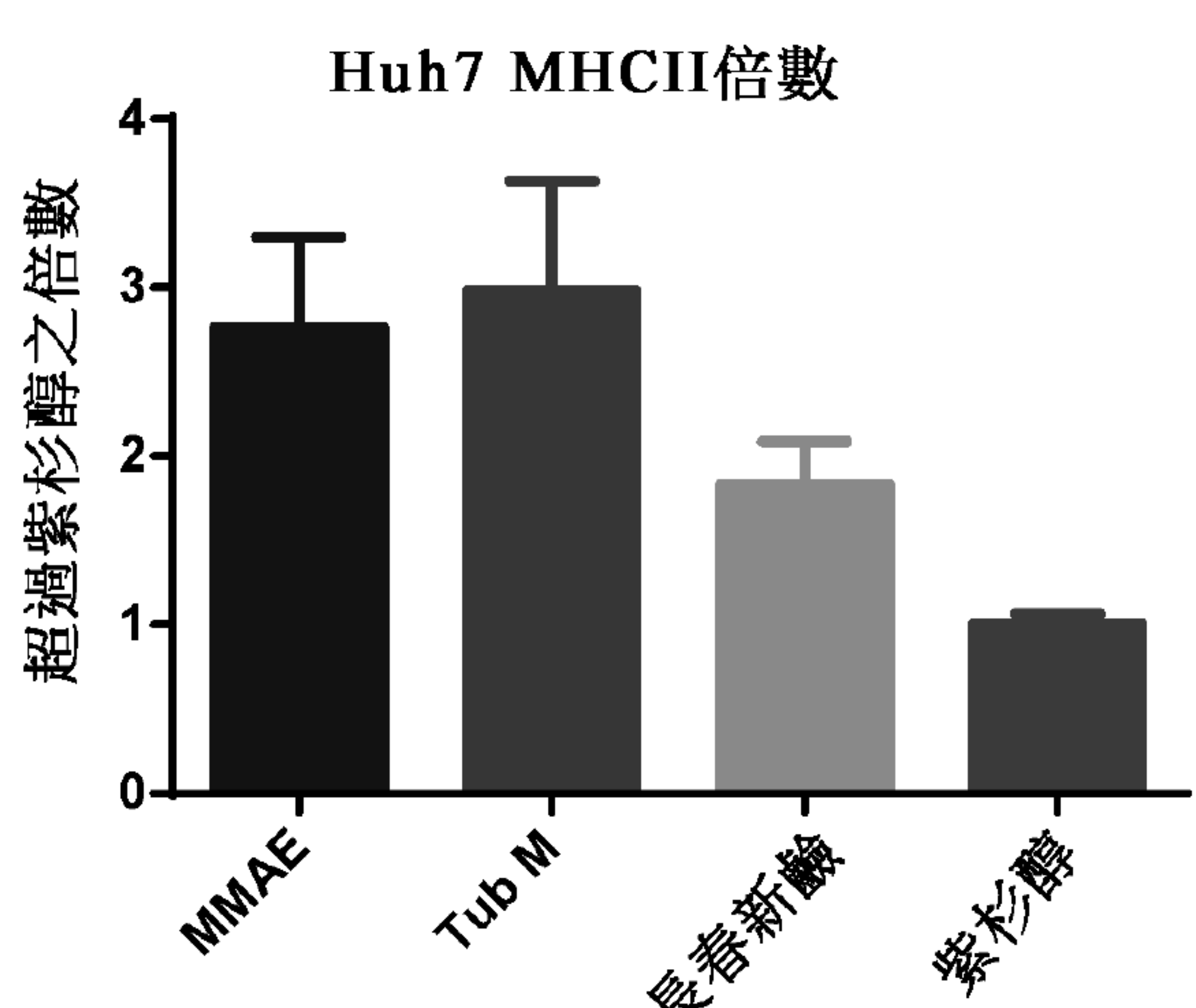
【圖19B】



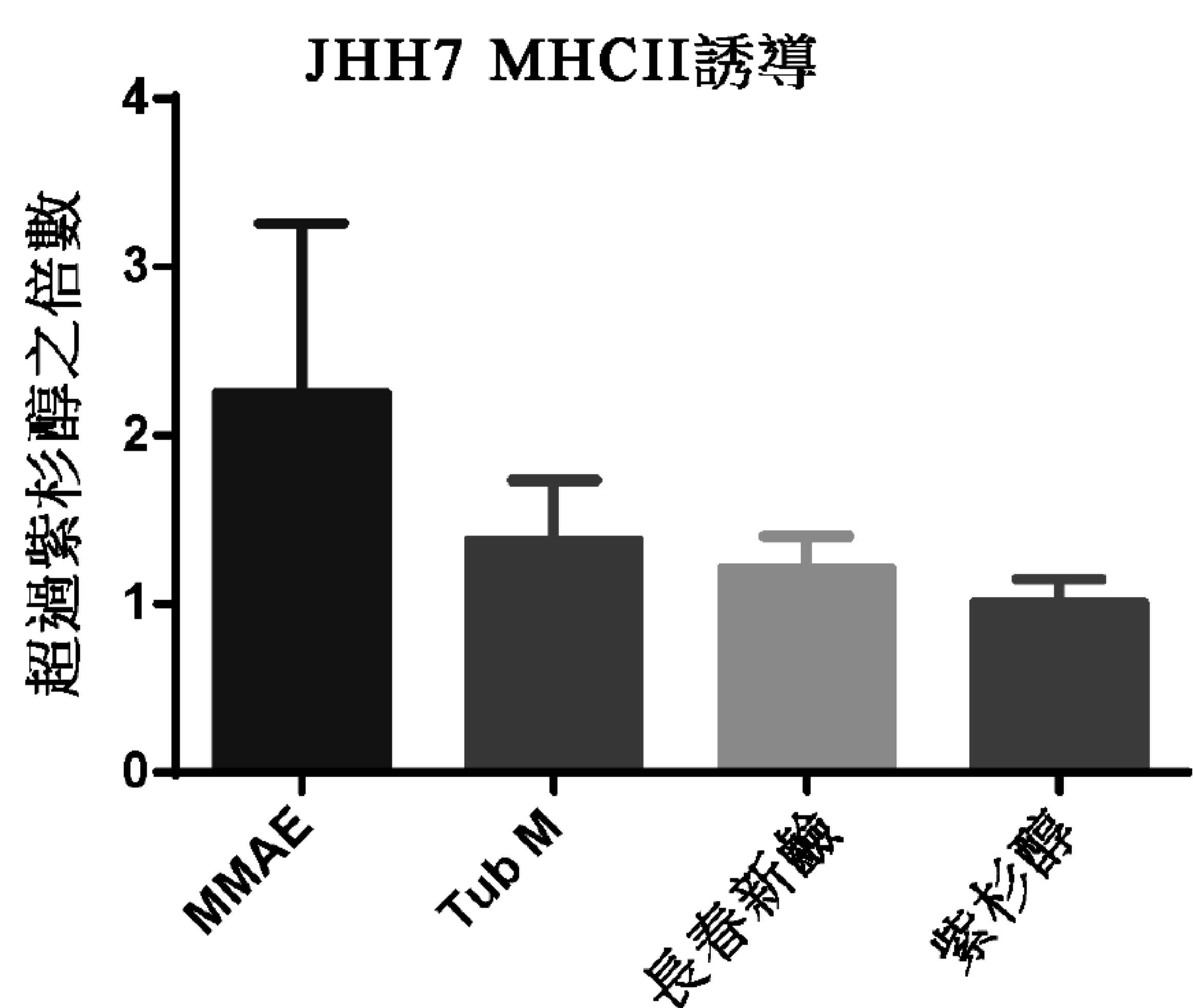
【圖19C】



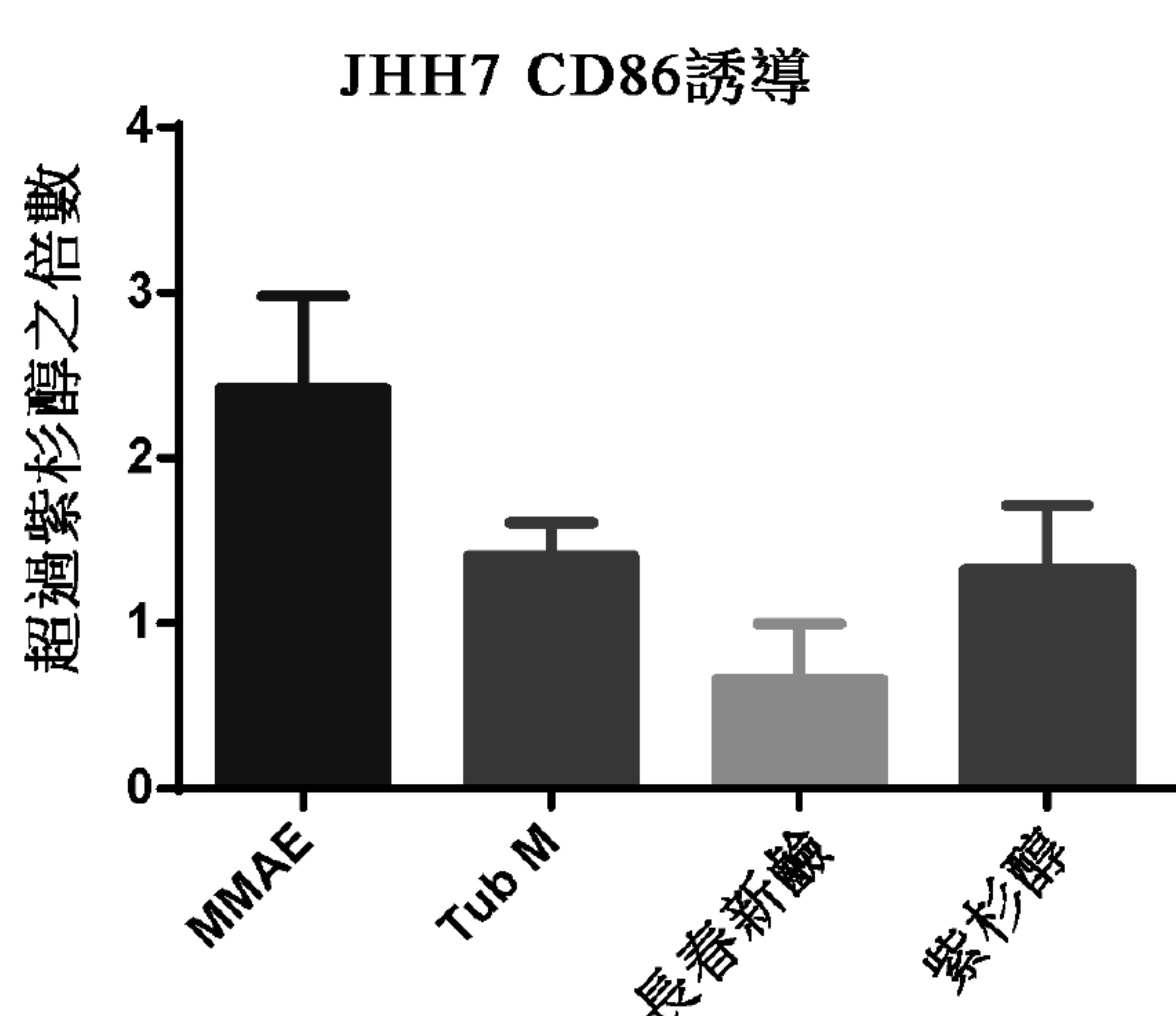
【圖19D】



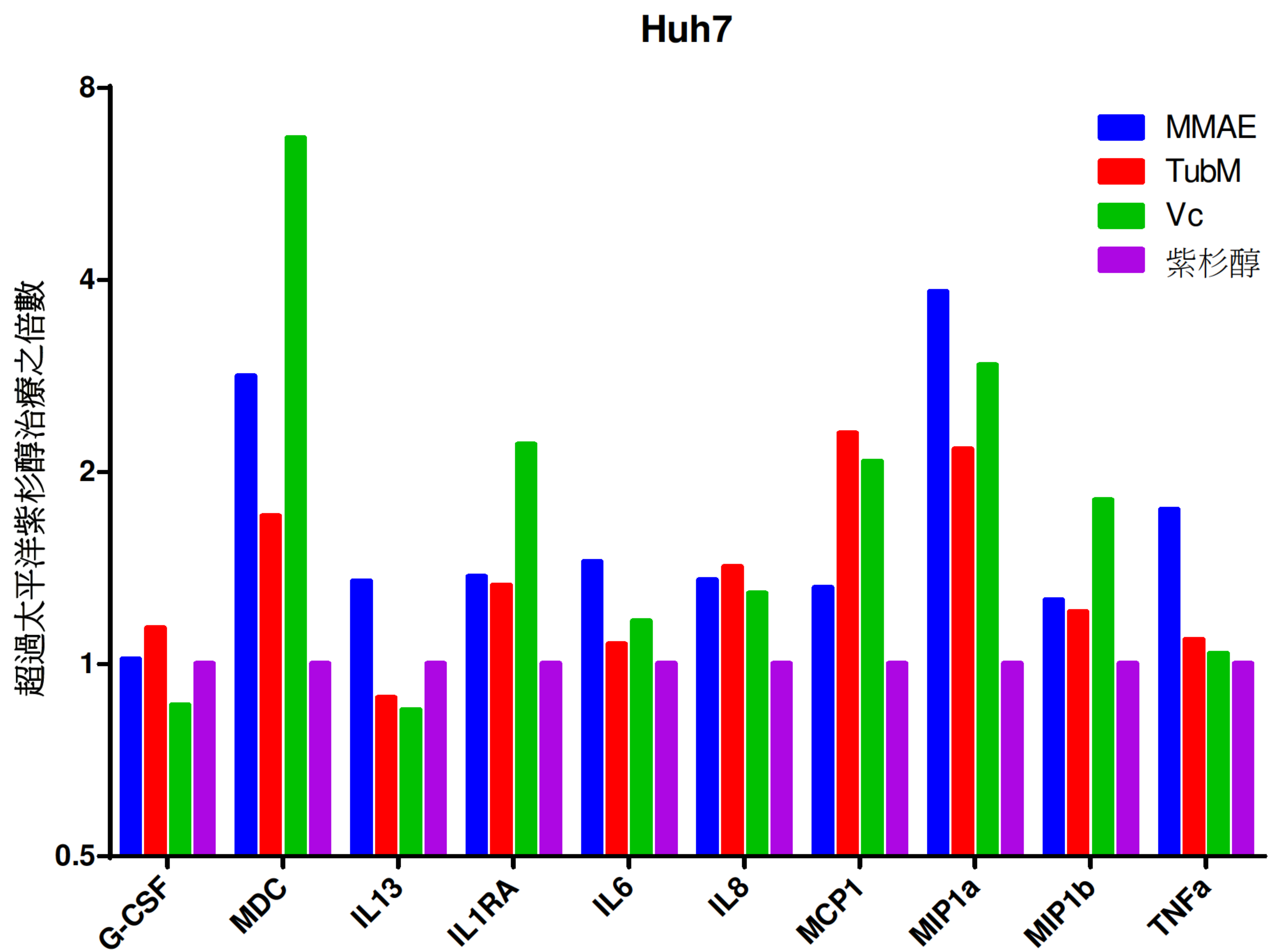
【圖19E】



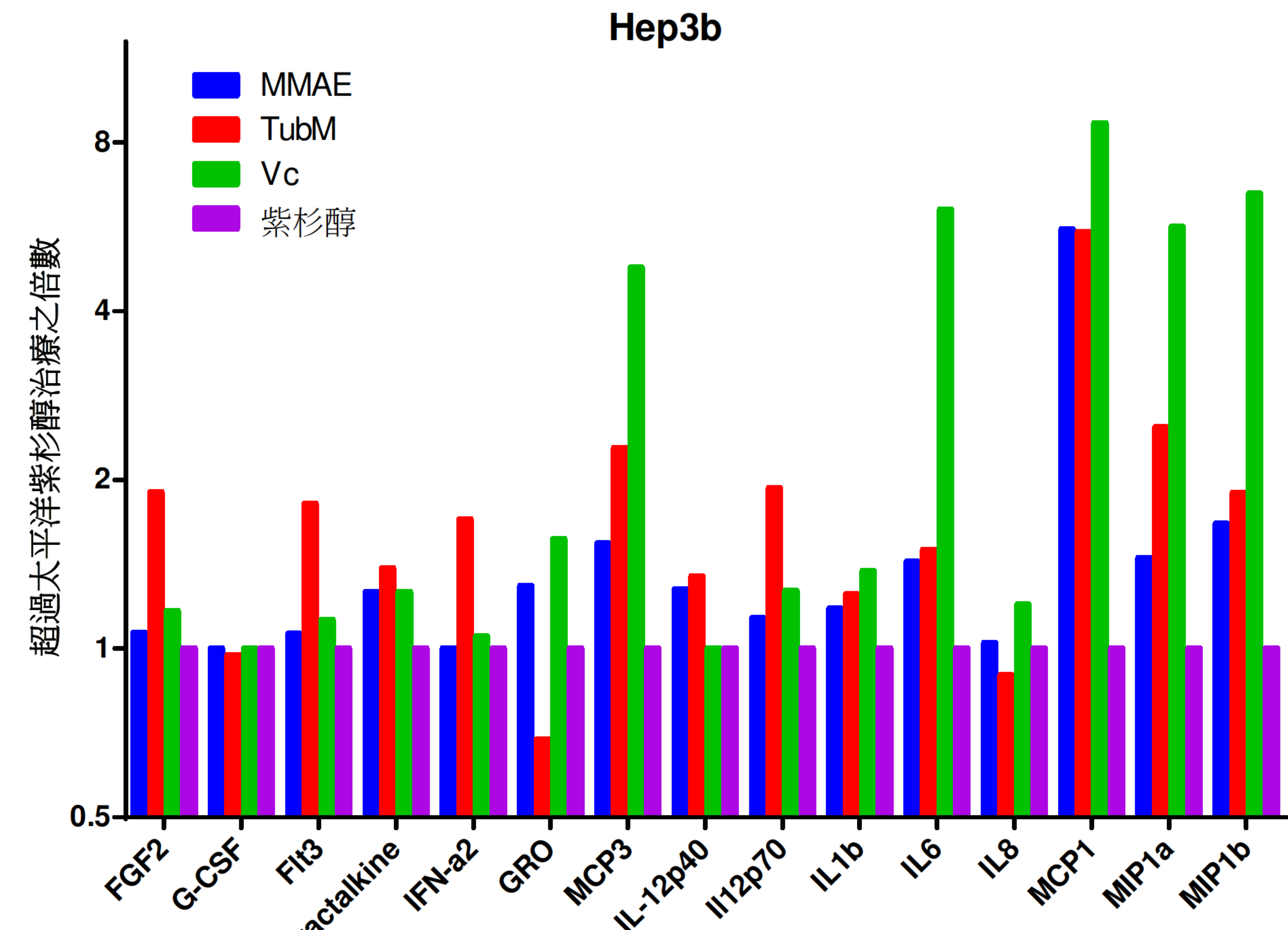
【圖19F】



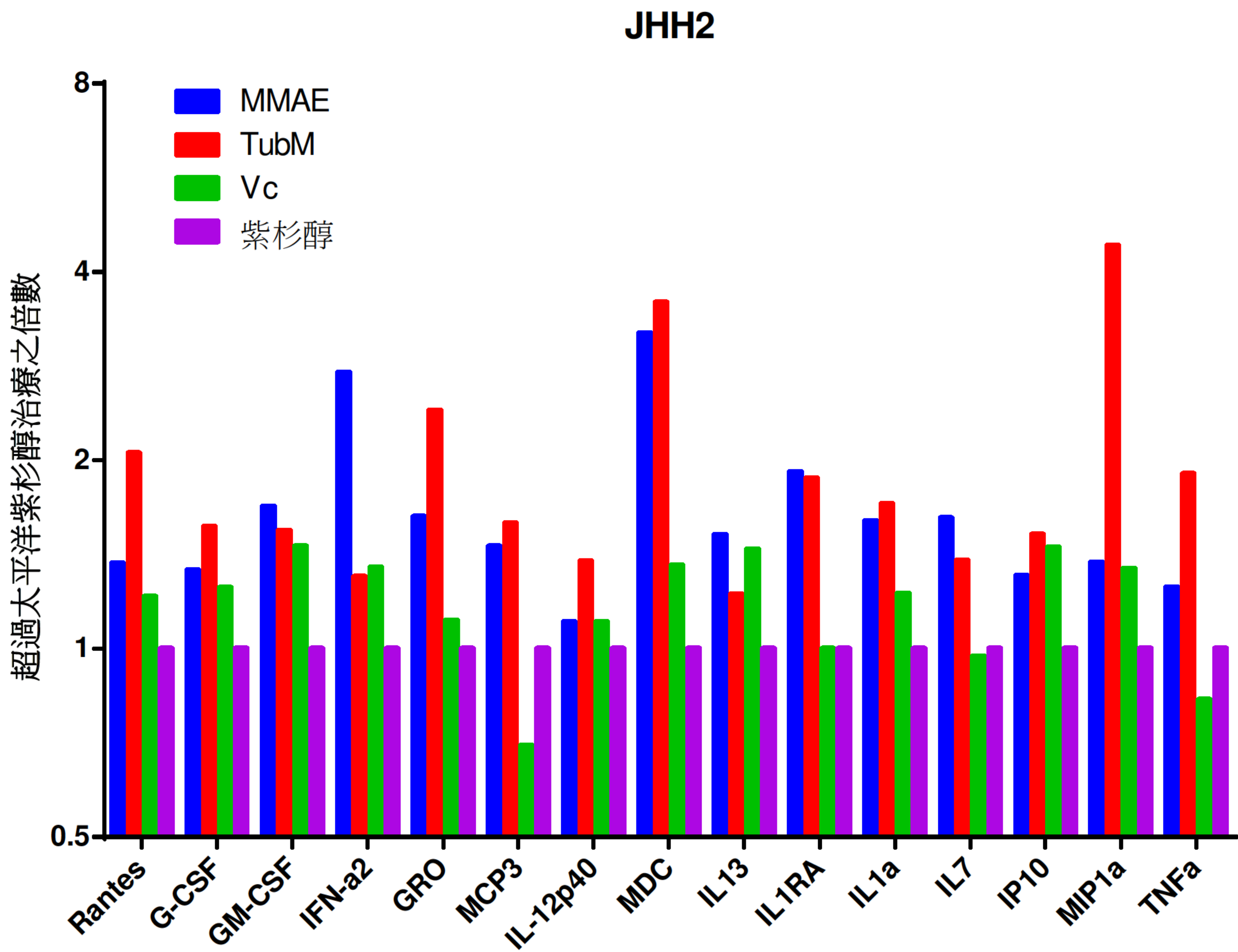
【圖19G】



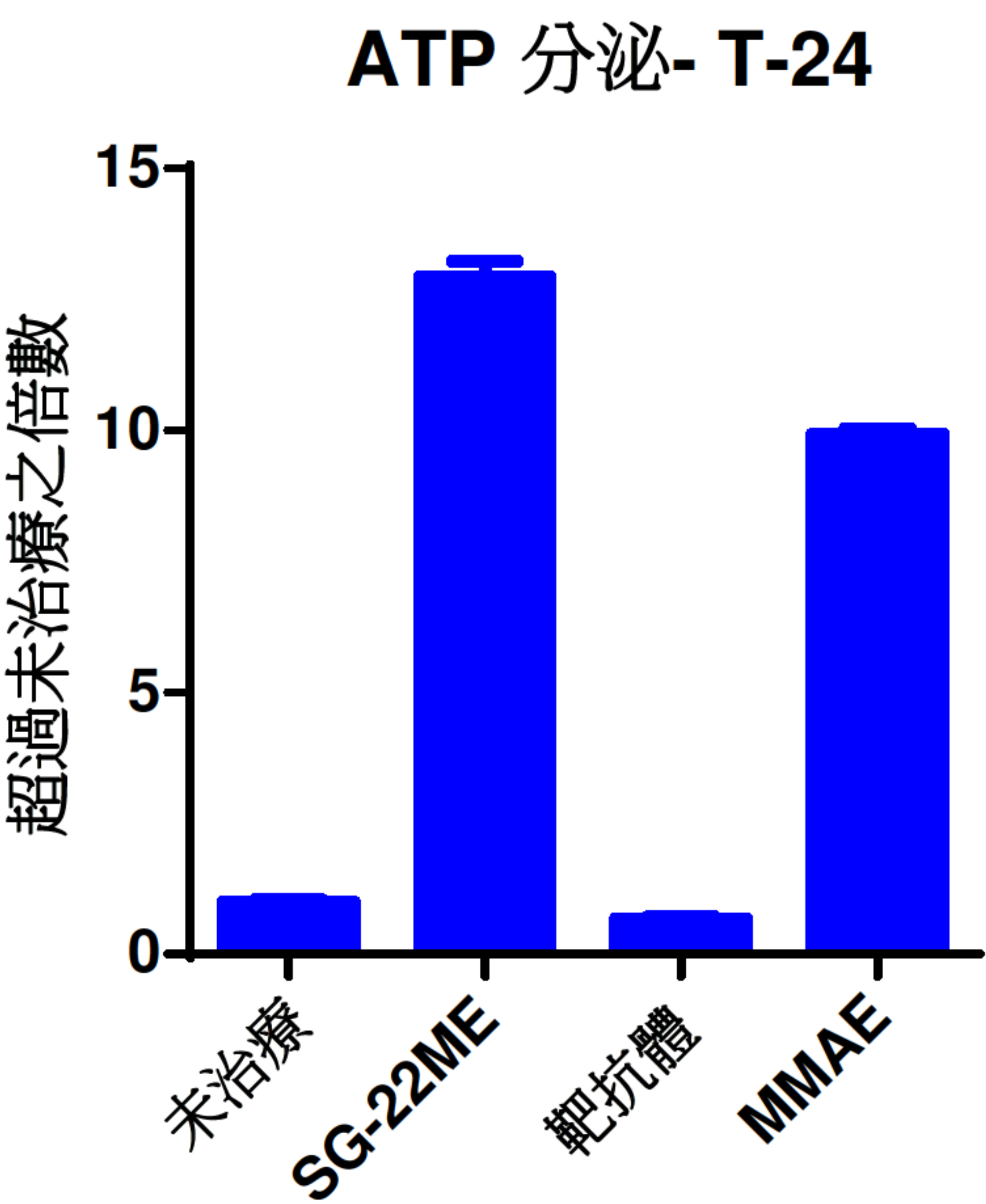
【圖20A】



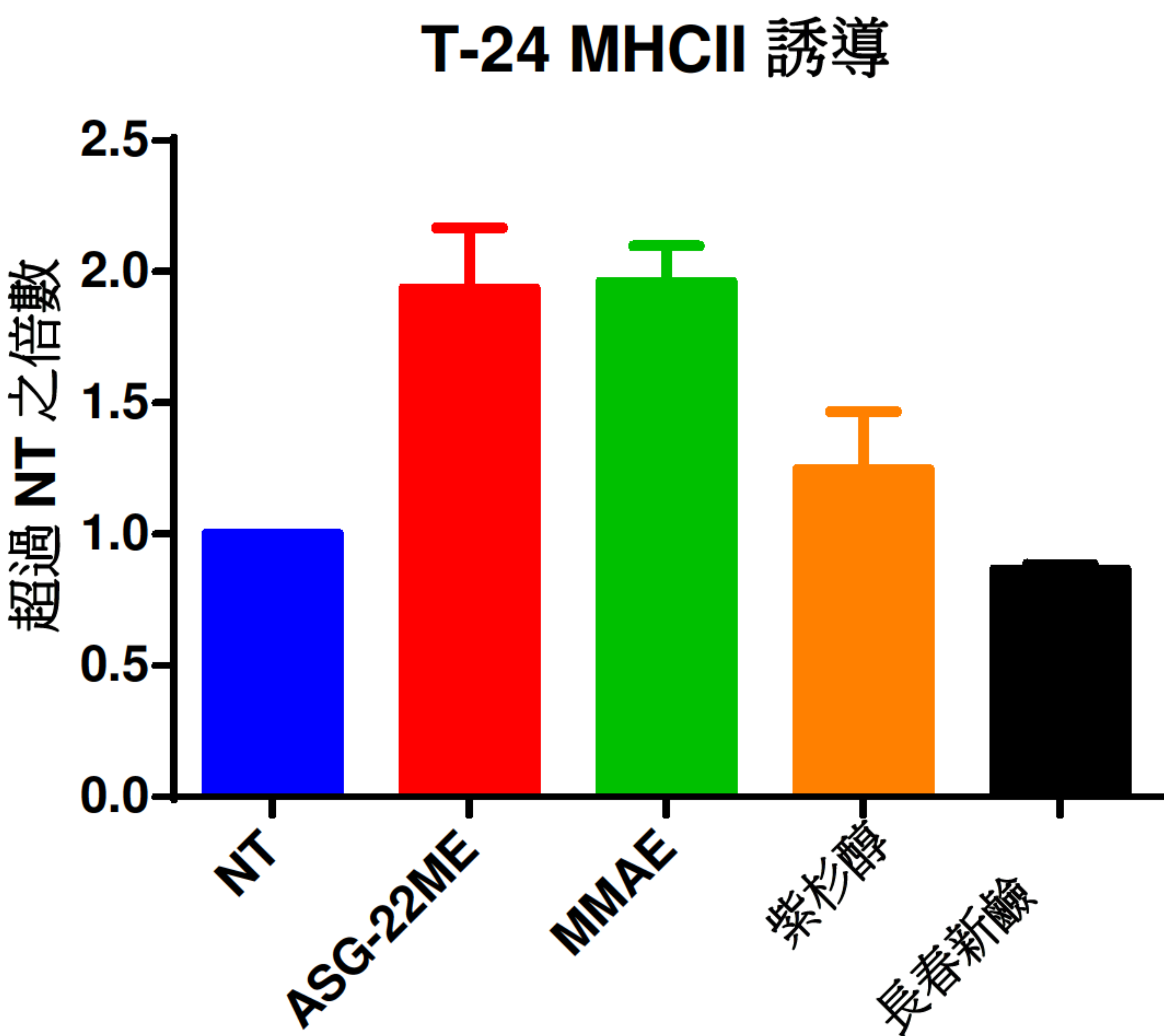
【圖20B】



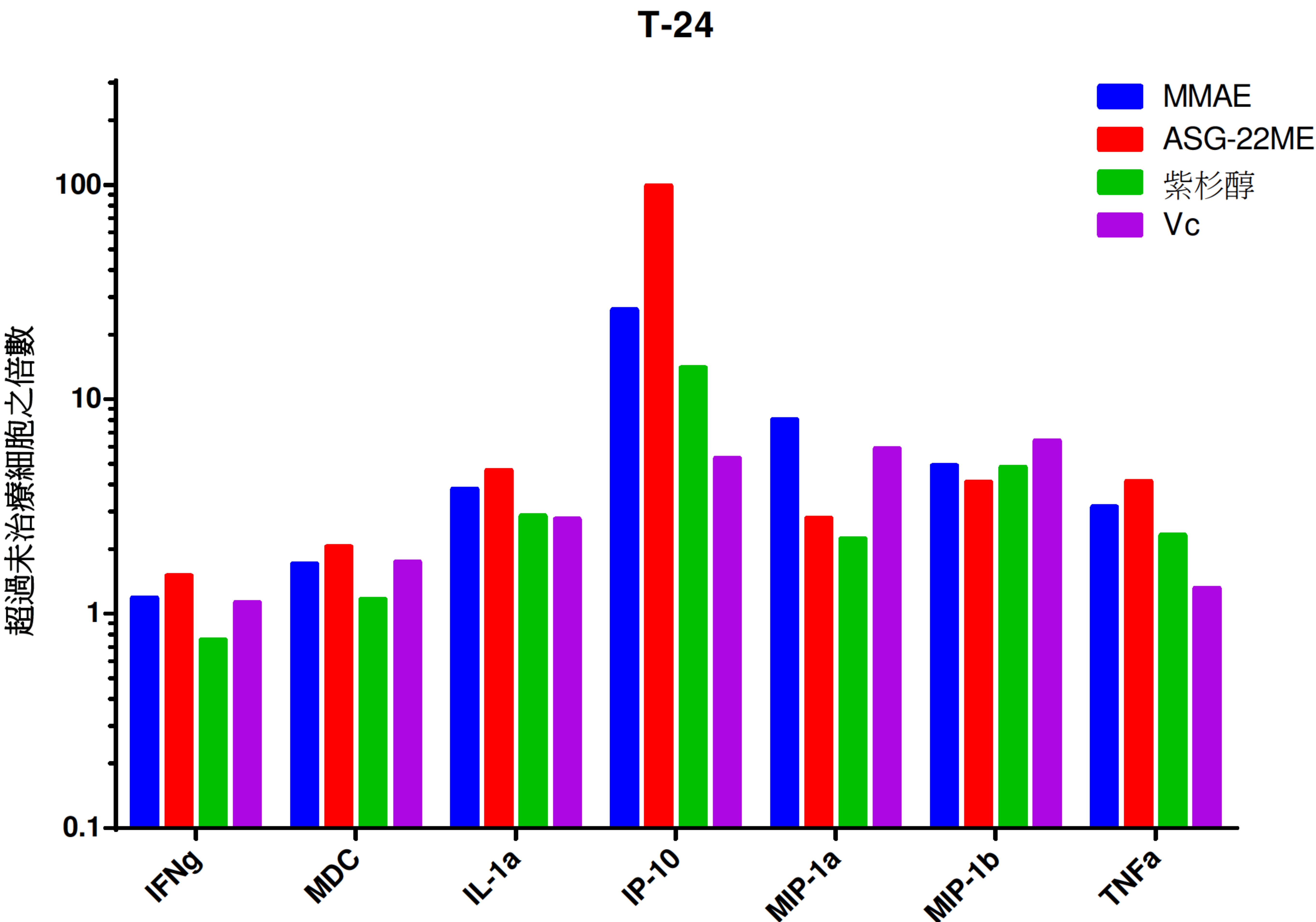
【圖20C】



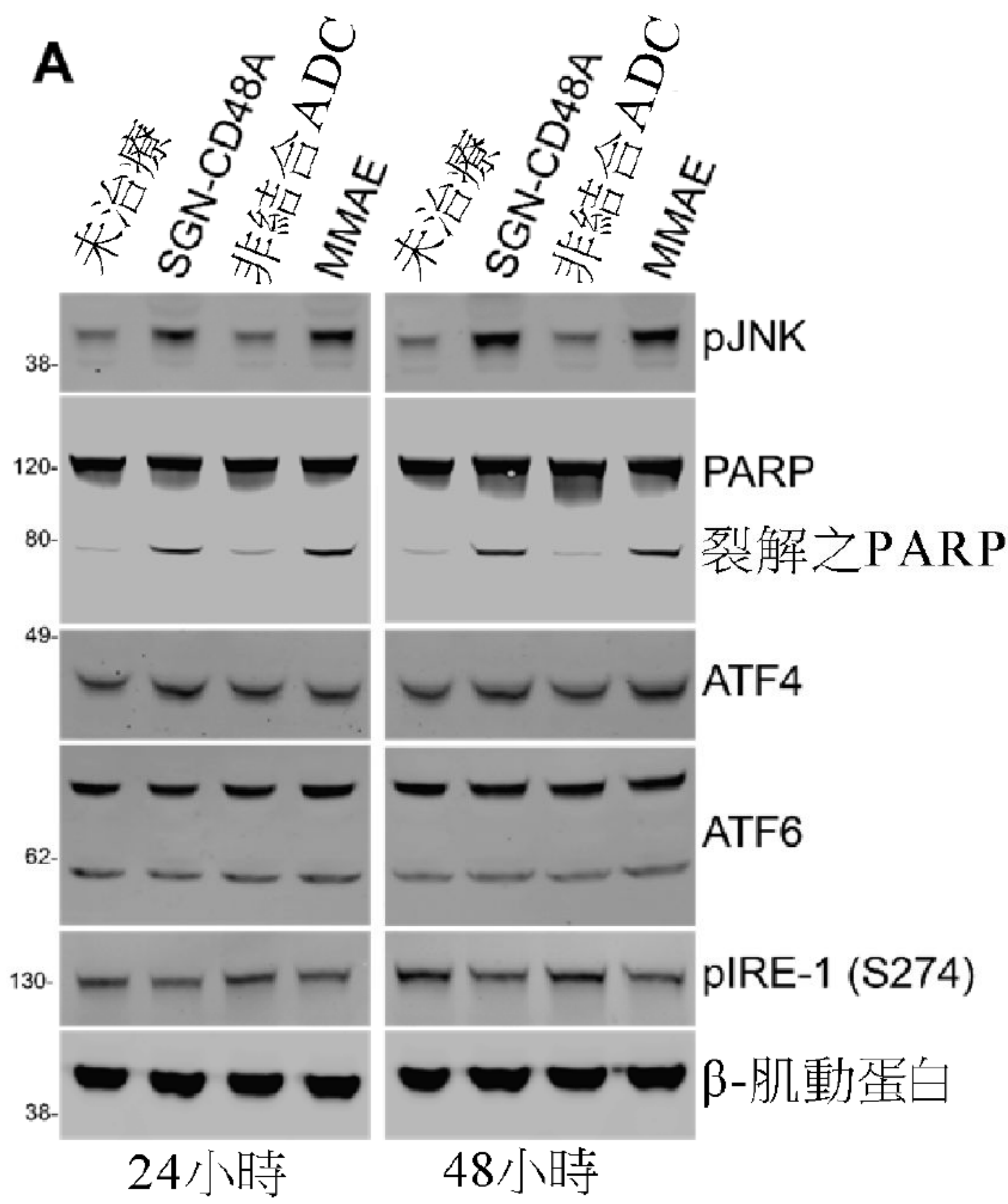
【圖21A】



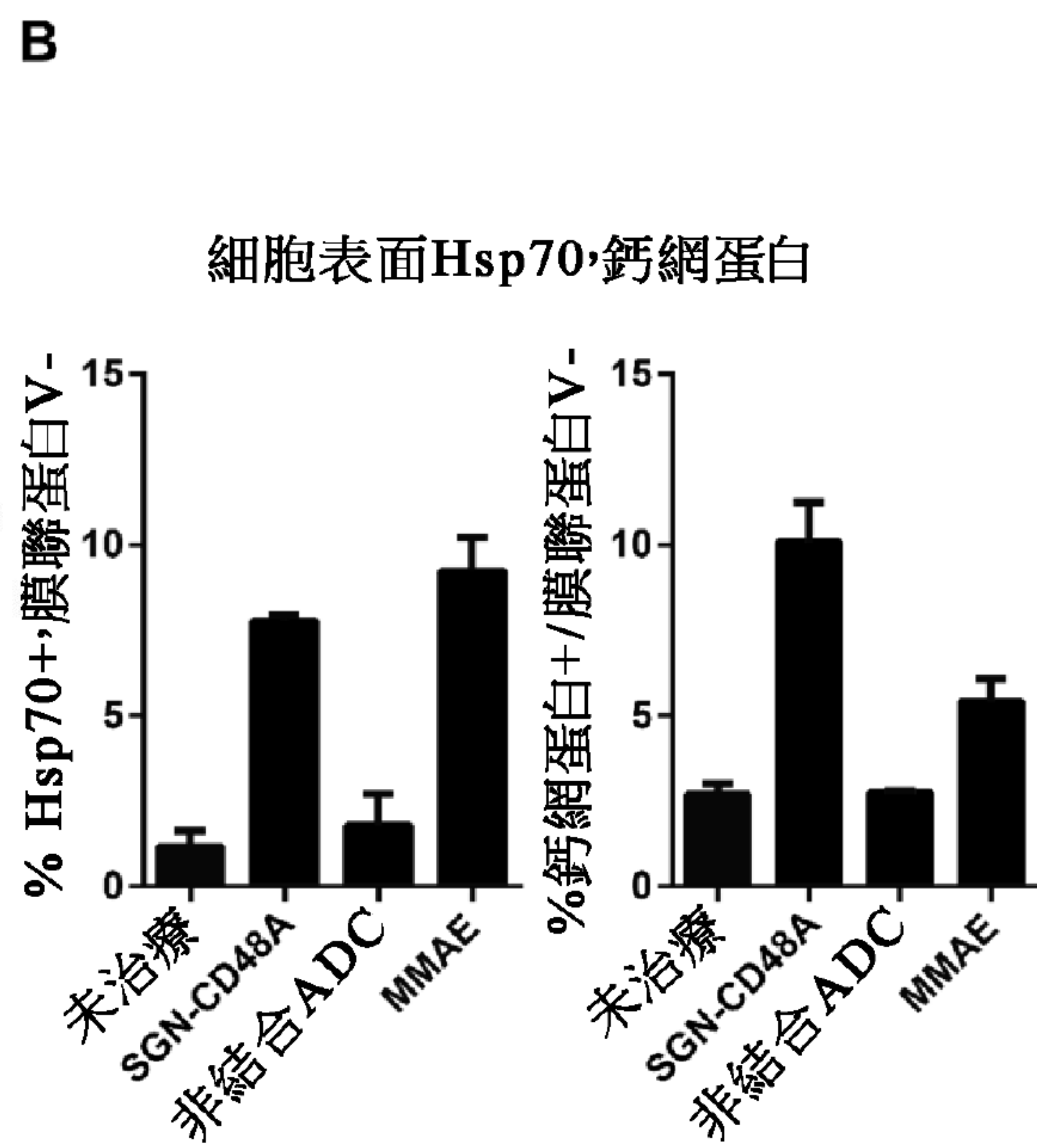
【圖21B】



【圖21C】



【圖22A】



【圖22B】