

(21) 申請案號：112149061

(22) 申請日：中華民國 106 (2017) 年 12 月 14 日

(51) Int. Cl. : A61K47/68 (2017.01)

A61K31/4745 (2006.01)

A61K31/704 (2006.01)

A61K45/06 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

(30) 優先權：2016/12/14 美國

62/434,333

2017/06/13 日本

2017-115832

(71) 申請人：美商思進公司 (美國) SEAGEN INC. (US)

美國

(72) 發明人：利文格 馬修 R LEVENGOOD, MATTHEW R. (US)

(74) 代理人：陳長文；張哲倫；張雅雯

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：10 項 圖式數：17 共 135 頁

(54) 名稱

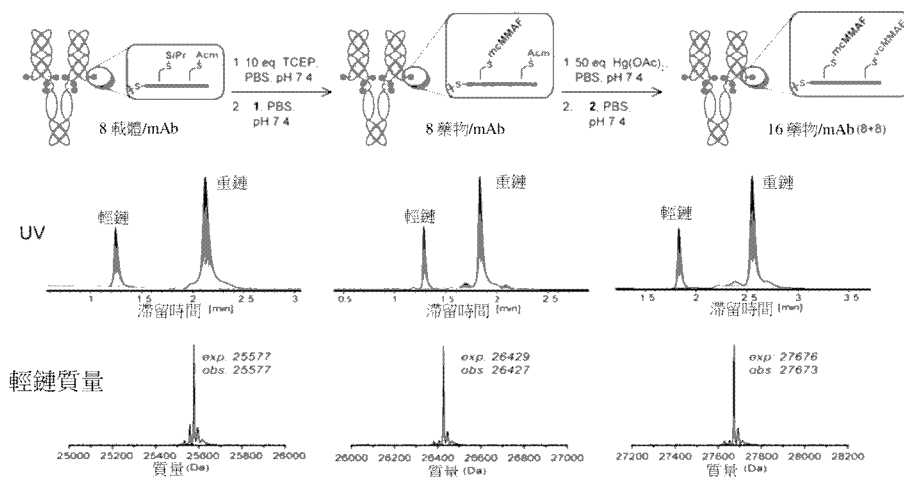
多重藥物之抗體藥物結合物

(57) 摘要

本發明尤其提供多重藥物之抗體藥物結合物(MD-ADCs)及連接組裝(LA)單元，該等係以位點特异性方式經由「正交」去保護及藥物加載進行構築。亦提供經保護之連接組裝單元，該等單元容許本發明之 MD-ADCs 及 LA 單元進行「正交」去保護及構築。

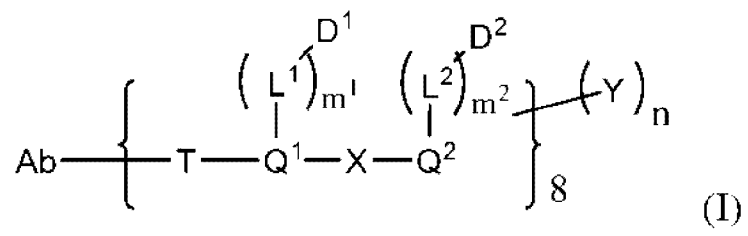
The present disclosure provides, inter alia, multi-drug Antibody Drug Conjugates (MD-ADCs) and Linking Assembly (LA) Units, that are constructed in a site-specific matter via ‘orthogonal’ deprotection and drug loading. Also provided are, Protected Linking Assembly Units, which allow for ‘orthogonal’ deprotection and construction of MD-ADCs and LA Units of the present disclosure.

指定代表圖：



【圖4】

特徵化學式：



【發明摘要】

【中文發明名稱】

多重藥物之抗體藥物結合物

【英文發明名稱】

MULTI-DRUG ANTIBODY DRUG CONJUGATES

【中文】

本發明尤其提供多重藥物之抗體藥物結合物(MD-ADCs)及連接組裝(LA)單元，該等係以位點特異性方式經由「正交」去保護及藥物加載進行構築。亦提供經保護之連接組裝單元，該等單元容許本發明之MD-ADCs及LA單元進行「正交」去保護及構築。

【英文】

The present disclosure provides, *inter alia*, multi-drug Antibody Drug Conjugates (MD-ADCs) and Linking Assembly (LA) Units, that are constructed in a site-specific matter via ‘orthogonal’ deprotection and drug loading. Also provided are, Protected Linking Assembly Units, which allow for ‘orthogonal’ deprotection and construction of MD-ADCs and LA Units of the present disclosure.

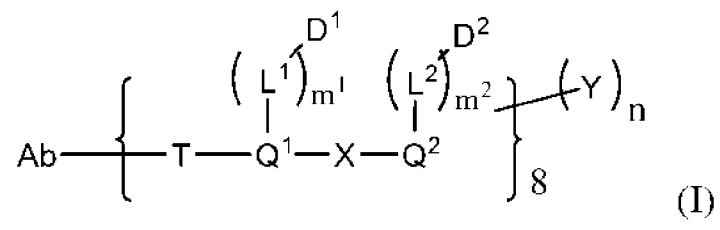
【指定代表圖】

圖4

【代表圖之符號簡單說明】

無

【特徵化學式】



【發明說明書】

【中文發明名稱】

多重藥物之抗體藥物結合物

【英文發明名稱】

MULTI-DRUG ANTIBODY DRUG CONJUGATES

【技術領域】

本發明尤其提供多重藥物之抗體藥物結合物(MD-ADC)及連接組裝(LA)單元，該等係以位點特異性方式經由「正交」去保護及藥物加載進行構築。亦提供經保護連接組裝單元，該等單元容許對本發明之MD-ADC及LA單元進行「正交」去保護及構築。

【先前技術】

抗體-藥物結合物(ADC)組合了單株抗體之腫瘤靶向特異性與細胞毒性彈頭之強力細胞殺死活性。人們日愈關注設計新ADC形式，此部分地係由於最近ADC之臨床成功，包含批准將貝倫妥單抗-維多汀(brentuximab vedotin) (ADCETRIS™)用於復發性何傑金氏淋巴瘤(Hodgkin lymphoma)及間變性大細胞淋巴瘤以及將阿多-曲妥珠單抗-莫登素(ado-trastuzumab mertansine) (KADCYLA™)用於HER2陽性轉移性乳癌。大部分該等新方法已著眼於解決現有臨床分子之一些缺點，例如異質藥物載量、有限之藥物-連接體穩定性及活性限於某一子組癌症類型之彈頭。為使得能夠改良ADC，業內已作出較顯著之改進。該等改進包含使得能夠獲得均質載量之位點特異性藥物-連接體結合策略、可改良穩定性之藥物-連接體連接方式、強力新酬載及利用替代釋放機制之連接體策略。

幾乎所有有效癌症化學療法皆利用互補藥物組合，該等互補藥物組合經設計以克服異質腫瘤細胞群體內之藥物敏感性差異。該策略最近已應用於ADC，現正組合測試ADC與臨床批准之未結合抗癌藥物。另外，ADC之新出現臨床及臨床前數據已證實，可經由藉由投與使用相同抗體之單獨ADC遞送替代彈頭來克服對特定ADC之不敏感性。藉由闡述用於靶向癌細胞抗原之抗體之可及雙重細胞毒性藥物結合技術，本文揭示單一ADC內之互補藥物酬載，其代表靶向藥物遞送領域中之顯著改進。該技術適用於其他靶向劑，其顯示首次使用正交硫醇保護基團來製備ADC且不依賴於改造抗體。所呈現一手數據證實，與習用ADC相比，具有兩種結合藥物之多重藥物之ADC (MD-ADC)展現增強之活體外及活體內活性。

在MD-ADC技術之一種範例中，使具有互補生理化學性質之兩種不同之高度強力奧裡斯他汀(auristatin)分子結合至單一抗體，此會增強ADC對異質癌細胞群體之活性。常用奧裡斯他汀藥物-連接體(亦稱為奧裡斯他汀連接組裝單元)包含mc-MMAF (1)、mc-vc-MMAF (2)及mc-vc-MMAE (3)。來自mc-vc-MMAE藥物連接體單甲基奧裡斯他汀E (MMAE)之所釋放藥物可滲透細胞且展現旁觀者活性，或可殺死鄰近抗原陰性癌細胞。然而，MMAE亦係多重藥物抗性(MDR)輸出體之受質且由此對具有高MDR表現之細胞具有減弱之活性。與之相反，分別自mc-vc-MMAF及mc-MMAF ADC釋放之MMAF及cys-mc-MMAF對藥物輸出並不敏感且保留對MDR(+)細胞之活性，但具有最小細胞滲透性。因此，其不展現旁觀者活性且對抗原陰性腫瘤細胞具有較小活性。組合彼等類型藥物之特徵可提供關於癌症之互補活性，從而產生具有增強之細胞毒性特徵之ADC。

迄今為止，僅報導單一實例之MD-ADC，但針對抗體Fab片段實施此工作且需要在基因上引入經改造半胱胺酸(eCys)殘基以使得能夠位點特異性地區分結合位點(Puthenveetil等人，Bioconjugate Chem. (2016) 27(4): 1030-1039)。已呈現使兩種單獨藥劑位點特異性地結合至抗體之諸多其他方式(Maruani等人，Org. Biomol. Org. (2016) 14(26): 6165-6178)，但大部分該等方法需要特定試劑(包含位點特異性胺基酸突變或定製酶)，且有時需要兩種不同結合柄。所有該等因素皆增加生成及篩選MD-ADC所需之試劑之複雜性。一種該方法利用經還原天然抗體二硫化物之噻嗪-二酮再橋接，隨後實施雙擊官能化(dual-Click functionalization)以構築較大均質產物，但此方法僅用於產生螢光團-藥物抗體結合物且消耗抗體上之兩個可結合位點，由此減小潛在總藥物載量。

需要一種將兩種藥物納入單一連接組裝單元中之方法(及ADC)，每一單元僅需要一個可結合位點，且使得以指定比率均勻及位點特異性加載兩種藥物。該方式不應依賴於需要限制性eCys位點或酶調介結合之經改造抗體且應適用於可針對抗體陣列(包含商業抗體及雜交瘤抗體庫)進行篩選之藥物組合。本發明可解決該等及其他需要。

【發明內容】

本文提供包括抗體及一至八個共價連接之連接組裝單元(LA)之多重藥物之抗體藥物結合物(MD-ADC)，其中最多8個共價連接之連接組裝單元中之每一者連接至藉由還原抗體中之鏈間二硫鍵聯所產生的硫醇，及/或每一共價連接之LA單元連接至來自經改造半胱胺酸殘基之硫醇，且其中每一共價連接之連接組裝單元具有二至四個連接於其上之藥物部分(亦稱為藥物單元，其中該等藥物單元中之兩者係不同的)及可選分隔劑(Y)。

該等MD-ADC之具體實施例提供於式(I)、(II)、(III)及(IV)以及式(I*)、(II*)、(III*)及(IV*)中。

本文亦提供可用於製備MD-ADC之連接組裝單元，其由式(Ia)、(IIa)、(IIIa)、(IVa)及(XIIIa)體現。

在另一態樣中，本文提供經保護連接組裝單元(可用於製備連接組裝單元及MD-ADC)，其由下文之式(Ib)、(IIb)、(IIIb)、(IVb)及(XIIIb)體現。

在另一態樣中，本文提供具有1至8個正交保護之ADC-連接體之抗體結合物。

在其他態樣中，本文提供醫藥組合物及使用所闡述MD-ADC治療疾病之方法。

【圖式簡單說明】

圖1A及1B展示在結合(A)之後及在去保護(B)之後於反相分離輕鏈及重鏈抗體之後之總離子層析圖(TIC)及UV層析圖(280 nm)。主要輕鏈及重鏈物質之去捲積質譜展示於層析圖右側且展示預計質量及觀察質量。應注意，因N-連接聚醣中之異質性，故存在多種重鏈質量物質。僅關注重鏈之G0醣型質量。LC = 輕鏈，HC = 重鏈。

圖2A及2B展示在乙醯胺基甲基(Acm)去保護且隨後添加N-乙基馬來醯亞胺(NEM)之後cAC10-mc-Cys之去捲積輕鏈質量，其中包含使用QMP樹脂之先前處理(A)或不包含該處理(B)。僅在(A)中觀察到向所釋放硫醇中添加NEM。

圖3展示，汞調介之Acm去保護並不影響抗體鏈間二硫化物完整性。馬來醯亞胺基己醯基-Cys(Acm)以2個載體/抗體結合至cAC10(S239C)。

此結合物之所有鏈間二硫鍵皆完整。使結合物經受汞調介之Acm去保護條件且隨後實施N-乙基馬來醯亞胺(NEM)結合(約20莫耳當量)。展示在反相分離輕鏈及重鏈後之去捲積輕鏈及重鏈質譜。此分析證實，僅將單一NEM分子添加至重鏈中且並不修飾輕鏈。此指示，汞處理並不影響抗體鏈間二硫化物。若汞處理破壞二硫鍵，則預計將添加多個NEM。應注意，因N-連接聚醣中之異質性，故存在多種重鏈質量物質。僅關注重鏈之G0醣型質量。LC = 輕鏈，HC = 重鏈

圖4展示反應示意圖，其包含用於依序暴露載體**4**上之Cys(SiPr)及Cys(Acm)殘基之條件及所得位點特異性藥物-連接體結合物。藉由反相UPLC-MS分析每一結合物。在每一中間體下方展示在反相分離後之UV層析圖及去捲積輕鏈質量。在每一步驟之前進行近定量轉化，從而主要產生單一輕鏈及重鏈物質。每一結合物之去捲積重鏈質量提供於圖6中。

圖5展示在反相分離輕鏈及重鏈之後之總離子層析圖(TIC)及UV層析圖(280 nm)。輕鏈及重鏈物質之去捲積質譜展示於層析圖右側且展示預計質量及觀察質量。應注意，因N-連接聚醣中之異質性，故存在多種重鏈質量物質。僅關注重鏈之G0醣型質量。LC = 輕鏈，HC = 重鏈

圖6展示在去除-SiPr並結合**1**之前(上圖)及之後(中圖)以及去除-Acm並結合**3**之後藥物-載體結合物cAC10-4之去捲積重鏈質量。每一中間體之UV層析展示於圖4中。應注意，因N-連接聚醣中之異質性，故存在多種重鏈質量物質。僅關注重鏈之G0醣型質量。

圖7展示使用藥物載體**4**製得之MD-ADC cAC10-1-3之SEC表徵。結合物含有98%之單體(6.77 min)。

圖8展示cAC10抗體、cAC10-4-(3-1) ADC或非結合性IgG1同型對照

在CD30(+) L540cy細胞上之飽和結合。cAC10裸抗體及cAC10-4-(3-1)之計算 K_D 值分別為0.35 nM及0.50 nM。cAC10或cAC10-4-(3-1)皆不結合至CD30(-) U-266細胞(未展示)。

圖9A及9B展示cAC10 ADC針對一組細胞系之活體外活性。所有三種ADC皆利用多工藥物載體4。對於加載單一藥物之ADC而言，第二Cys殘基經8個N-乙基馬來醯亞胺複本封端。將活性以ng/mL ADC形式報告為 IC_{50} 。在組A中，使用ADC將細胞處理96小時，且使用Cell TiterGlo (Promega)測定細胞存活率,而在組B中，使用Bright-Glo螢光素酶分析系統(Promega)測定細胞存活率。HL =何傑金氏淋巴瘤，ALCL =間變性大細胞淋巴瘤。

圖10展示，同型對照ADC (IgG1-4-(1-3))在CD30(+) L540cy細胞上不活化，而cAC10-4-(1-3)則具有高度活性。

圖11展示MDR(+) DEL-BVR異種移植模型上之活體內雙重-藥物ADC活性。使用藥物載體4製備每一MD-ADC。對於單一藥物結合物而言，第二Cys殘基經8個重複N-乙基馬來醯亞胺封端。

圖12展示具有異質CD30表現之活體內異種移植模型上之MD-ADC活性。異種移植模型係由Karpas 299 (CD30+)及Karpas 35R (CD30-)細胞之1:1混合物組成。使用藥物載體4製備每一MD-ADC。對於單一藥物結合物而言，第二Cys殘基經8個重複N-乙基馬來醯亞胺封端。

圖13展示，在長期處理分析中，與含有單一藥物載量(僅組分Aa或僅組分Ab)之ADC相比，包括組分Aa及組分Ab之多重藥物之ADC限制了ADC抗性細胞之過度生長。使用JHH-7細胞實施此實驗。

圖14展示，在群落形成分析中，與含有單一藥物載量(僅組分Aa或僅

組分Ab)之ADC或未處理細胞相比，包括組分Aa及組分Ab之多重藥物之ADC限制了ADC抗性細胞之過度生長。使用JHH-7細胞實施此實驗。

圖15展示，在群落形成分析中，與含有單一藥物載量(僅組分Aa或僅MMAE)之ADC或未處理細胞相比，包括組分Aa及MMAE之多重藥物之ADC限制了ADC抗性細胞之過度生長。使用MCF-7細胞實施此實驗。

圖16A-B展示製備用於16 + 8藥物載量之帶有3個半胱胺酸之藥物載體之分析數據。(A)在反相分離24載量MD ADC之輕鏈及重鏈之後之UV層析圖(280 nm)。應注意，存在單一輕鏈及重鏈峰。在1.44 min時洗脫之峰係滿載輕鏈(LC)。在1.91時洗脫之峰係滿載重鏈(HC)；(B)在cAC10抗體上使用藥物載體3之24載量(16 + 8) MD ADC之去捲積輕鏈質量。所觀察m/z對應於帶有載體3及3個總藥物單元(分成2 + 1)之完全結合之輕鏈。

圖17A-E展示不含PEG基團之製備雙載L49-連接組裝單元 Ab (8)-組分Aj(8)-組分Ak (8)之分析數據。(A)在反相分離MD ADC之輕鏈及重鏈之後之UV層析圖(280 nm)。在1.07 min下洗脫之峰係滿載LC。在1.62 min下洗脫之峰係滿載HC。在1.46 min下洗脫之峰係欠載第二結合藥物(每一HC帶有2個藥物，而非3個藥物)；(B)使用藥物載體且不含PEG臂之16載量(8 + 8) MD ADC之去捲積輕鏈質量；(C)使用藥物載體且不含PEG臂之完全結合之16載量(8 + 8) MD ADC之去捲積重鏈質量；(D)不含PEG基團之L49-連接組裝單元 Ab (8)-組分Aj(8)-組分Ak (8)之粒徑篩析層析。非聚乙二醇化支架上之共結合物具有最小聚集；(E)不含PEG基團之L49-連接組裝單元 Ab (8)-組分Aa(8)-組分Ak (8)。非聚乙二醇化支架上之共結合物具有最小聚集。

【實施方式】

相關申請案之交叉參考

本申請案在35 U.S.C. § 119(e)下主張2016年12月14日提出申請之美國臨時申請案第62/434,333號之國內優先權，且在35 U.S.C. §119(a)下主張2017年6月13日提出申請之日本專利申請案第2017-115832號之國外優先權，該日本專利申請案主張2016年12月14日提出申請美國臨時申請案62/434,333之優先權權益，每一者之內容出於所有目的以引用方式併入本文中。

概述

本文提供多重藥物之抗體藥物結合物(MD-ADC)，其係以位點特異性方式進行構築，可產生均質藥物載量(例如16藥物、24藥物或32藥物形式)且係使用無需經改造以引入其他天然或非天然胺基酸之抗體製得。MD-ADC之製備利用正交保護策略來構築連接組裝單元，該連接組裝單元在MD-ADC中以使得能夠在界定組裝中具有高藥物載量且可靈活容許藥物之不同化學計量學(藥物1對藥物2之比率)之方式使兩種藥物結合至靶向抗體。另外，僅需要關於抗體之單一連接化學來將每一藥物連接體組裝單元或其經正交保護之中間體連結至MD-ADC。正交保護位於抗體-連接體組裝單元中間體之連接組裝單元中(在共價連接D¹及D²中之一者或二者之前)，或位於用於製備MD-ADC之多重藥物連接體(MD-連接體)化合物(其中共價連接D¹及D²中之一者或二者)中。

本文所提供之MD-ADC另外提供以下優點：可成功地經由結合至相同抗體來使多種藥物靶向特定結合位點，此克服了與(例如)遞送ADC1/ADC2組合(其中ADC1具有擬遞送兩種不同藥物中之一者且ADC2具有另一藥物)有關之困難。在涉及共遞送(例如) ADC1及ADC2之方法

中，(1)該等結合物競爭抗原結合，從而使得細胞、尤其具有較低抗原拷貝數者上之藥物遞送及活性具有較大差異，或(2)該等結合物係以不同速率清除，從而使得兩種藥物在相同靶向細胞中之暴露產生藥效動力學可變性。

定義

除非另外陳述，否則本文所用之下列術語及片語意欲具有下列含義。除非另外由上下文指示，否則在本文中使用的商標名時，商標名包含商標名產品之產物配方、學名藥及活性醫藥成分。

本文所用之術語「抗體」係以最廣泛意義使用且具體而言涵蓋完整單株抗體、多珠抗體、單特異性抗體、多特異性抗體(例如雙特異性抗體)及展現期望生物活性之抗體片段(條件係抗體片段具有所需數量之用於藥物-連接體之連接位點)。抗體之天然形式係四聚體且係由免疫球蛋白鏈之兩個相同對組成，每一對具有一條輕鏈及一條重鏈。在每一對中，輕鏈及重鏈可變區(VL及VH)一起主要負責結合至抗原。輕鏈及重鏈可變結構域係由間雜有三個超變區(亦稱為「互補決定區」或「CDR」)之框架區組成。恆定區可由免疫系統識別並與其相互作用。(例如參見Janeway等人，2001, *Immuno.Biology*，第5版，Garland Publishing, New York)。抗體可為任一類型(例如IgG、IgE、IgM、IgD及IgA)、種類(例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1及IgA2)或亞類。抗體可源自任何適宜物種。在一些態樣中，抗體係人類或鼠類起源。抗體可為(例如)人類、人類化或嵌合抗體。

本文所用之術語「單株抗體」係指自實質上均質抗體之群體獲得之抗體，亦即，除可少量存在之可能天然突變外，構成該群體之個別抗體皆

相同。單株抗體具有高度特異性，其針對單一抗原位點。修飾詞「單株」指示抗體之特徵在於自實質上同源之抗體群體獲得，且不應解釋為需要藉由任一特定方法來產生該抗體。

「完整抗體」係包括抗原結合可變區以及輕鏈恆定結構域(C_L)及重鏈恆定結構域C_H1、C_H2、C_H3及C_H4 (針對抗體種類視情況)者。恆定結構域可為天然序列恆定結構域(例如人類天然序列恆定結構域)或其胺基酸序列變體。

「抗體片段」包括完整抗體之一部分，其包括其抗原結合或可變區。為用於本發明中，抗體片段必須具有所需數量之用於連接至藥物-連接體(在本文中稱為連接組裝單元)之位點。亦即，本發明之抗體片段通常包含形成發現於天然抗體中之4個二硫鍵之全部8個半胱胺酸殘基，從而在完全還原時每一半胱胺酸殘基可用於經由連接組裝單元來加載藥物。

「抗原」係抗體能夠特異性結合之實體。

術語「特異性結合(specific binding及specifically binds)」意指，抗體或抗體衍生物以選擇性方式結合其相應靶抗原且不結合多種其他抗原。通常，抗體或抗體衍生物以至少約 1×10^{-7} M及更通常 10^{-8} M至 10^{-9} M、 10^{-10} M、 10^{-11} M或 10^{-12} M之親和力進行結合，且以大於其結合至除預定抗原或密切相關抗原外之非特異性抗原(例如BSA、酪蛋白)之親和力至少兩倍之親和力結合至預定抗原。

術語「抑制(inhibit或inhibition)」意指減小可量測量或完全預防。

術語「治療有效量」係指有效治療哺乳動物之疾病或病症之結合物之量。在癌症情形下，治療有效量之結合物提供下列生物效應中之一或多者：減少癌細胞數；減小腫瘤大小；抑制(亦即在一定程度上減慢且較佳

終止)癌細胞浸潤至周邊器官中；抑制(亦即在一定程度上減慢且較佳終止)腫瘤轉移；在一定程度上抑制腫瘤生長；及/或在一定程度上減輕與癌症有關之一或多種症狀。就藥物抑制現有癌細胞之生長及/或殺死現有癌細胞而言，其具有細胞生長抑制性及/或細胞毒性。對於癌症療法而言，在一些態樣中，通常藉由評價疾病進展時間(TTP)及/或測定反應率(RR)來量測效能。

除非另外由上下文指示，否則術語「實質性」或「實質上」係指大部分(亦即>50%)群體、混合物或試樣，通常係大於50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%之群體。

術語「經細胞內裂解」及「細胞內裂解」係指在細胞內部關於MD-ADC之代謝過程或反應，藉此藥物單元(D¹或D²)與連接組裝單元(LA)或抗體(Ab)之間之共價連接發生破裂，從而在細胞產生自MD-ADC解離之游離藥物(包含其降解物產物)。源自該解離之部分由此係細胞內代謝物。

術語「細胞毒性活性」係指藥物或MD-ADC或MD-ADC之細胞內代謝物之細胞殺死效應。細胞毒性活性通常係由IC₅₀值表示，該參數係每一單元體積中一半細胞在暴露於細胞毒性劑後之濃度(莫耳濃度或質量)。

術語「細胞生長抑制活性」係指細胞生長抑制劑或具有細胞生長抑制劑作為其藥物單元之MD-ADC或其細胞內代謝物(其中該代謝物係細胞生長抑制劑)之除細胞殺死外之抗增殖效應。

本文所用之術語「細胞毒性劑」係指具有細胞毒性活性且破壞細胞之物質。該術語意欲包含化學治療劑及毒素(例如細菌、真菌、植物或動物起源之小分子毒素或酶活性毒素)，且包含其合成類似物及衍生物。

本文所用之術語「細胞生長抑制劑」係指具有細胞生長抑制活性(例如抑制負責或有助於細胞生長或繁殖之細胞功能)之物質。細胞生長抑制劑包含諸如蛋白質抑制劑等抑制劑，例如酶抑制劑。

術語「癌症」及「癌性」係指或闡述哺乳動物中特徵通常在於細胞生長失調之生理病狀或病症。「腫瘤」包括一或多個癌細胞。

本文之「自體免疫疾病」係源自並針對個體之自身組織或蛋白質之疾病或病症。

本文所用之「患者」係指投與MD-ADC之個體。「患者」之實例包含(但不限於)人類、大鼠、小鼠、天竺鼠、非人類靈長類動物、豬、山羊、牛、馬、狗、貓、鳥及雞。通常，患者係大鼠、小鼠、狗、非人類靈長類動物或人類。在一些態樣中，患者係需要有效量之MD-ADC之人類。

除非另外由上下文指示，否則術語「治療(treat或treatment)」係指治療性治療及預防復發之預防性措施，其中目標係抑制或減緩(減弱)不期望生理學變化或病症(例如癌症之發生或傳播)。出於本發明目的，有益或期望臨床結果包含(但不限於)減輕症狀、降低疾病程度、穩定疾病狀態(亦即不惡化)、延遲或減慢疾病進展、改善或緩和疾病狀態及可檢測或不可檢測地緩解病情(部分或全部)。在一些態樣中，「治療」亦意指與不接受治療之預期存活相比延長存活。需要治療者包含已患有病狀或病症者且在一些態樣中進一步包含易於患有病狀或病症者。

在癌症背景中，術語「治療」包含以下任何或所有情形：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；減弱整體腫瘤負荷；或降低癌性細胞數量；及改善一或多種與疾病有關之症狀。

本文所用之術語「鹽」係指化合物(例如藥物、連接組裝單元或MD-

ADC)之有機或無機鹽。在一些態樣中，該化合物含有至少一個胺基，且因此可與胺基形成酸加成鹽。實例性鹽包含(但不限於)硫酸鹽、三氟乙酸鹽、檸檬酸鹽、乙酸鹽、草酸鹽、氯化物、溴化物、碘化物、硝酸鹽、硫酸氫鹽、磷酸鹽、酸式磷酸鹽、異菸鹼酸鹽、乳酸鹽、水楊酸鹽、酸式檸檬酸鹽、酒石酸鹽、油酸鹽、鞣酸鹽、泛酸鹽、酒石酸氫鹽、抗壞血酸鹽、琥珀酸鹽、馬來酸鹽、龍膽酸鹽、富馬酸鹽、葡萄糖酸鹽、葡糖醛酸鹽、糖二酸鹽、甲酸鹽、苯甲酸鹽、麩胺酸鹽、甲磺酸鹽、乙磺酸鹽、苯磺酸鹽、對甲苯磺酸鹽及雙羥萘酸鹽(亦即1,1'-亞甲基-雙-(2-羥基3-萘酸鹽))。鹽可涉及納入另一分子，例如乙酸根離子、琥珀酸根離子或其他相對離子。相對離子可為穩定母體化合物上之電荷之任一有機或無機部分。另外，鹽在其結構中具有一個以上之帶電原子。倘若存在多個帶電原子作為鹽之一部分，則有時存在多個相對離子。因此，鹽可具有一或多個帶電原子及/或一或多個相對離子。「醫藥上可接受之鹽」係適於投與如本文所闡述之個體者且在一些態樣中包含由以下文獻所闡述之鹽：P. H. Stahl及C. G. Wermuth編輯，Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection and Use, Weinheim/Zürich:Wiley-VCH/VHCA, 2002，其列示內容以引用方式具體併入本文中。

除非另外指示，否則術語「烷基」(本身或作為另一術語之一部分)係指具有指示碳原子數之未經取代之直鏈或具支鏈飽和烴(舉例而言，「-C₁-C₈烷基」或「-C₁-C₁₀」烷基分別係指具有1至8或1至10個碳原子之烷基)。在未指示碳原子數時，烷基具有1至8個碳原子。代表性直鏈「-C₁-C₈烷基」基團包含(但不限於)-甲基、-乙基、-正丙基、-正丁基、-正戊基、-正己基、-正庚基及-正辛基；而具支鏈-C₁-C₈烷基包含(但不限於)-

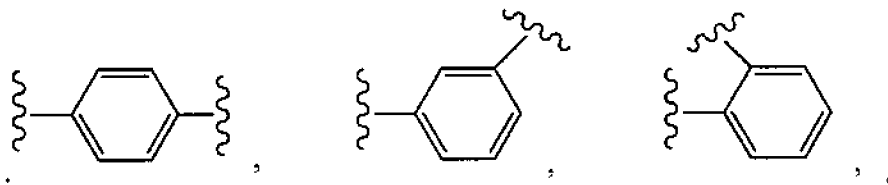
異丙基、-第二丁基、-異丁基、-第三丁基、-異戊基及-2-甲基丁基；術語「烯基」(本身或作為另一術語之一部分)係指不飽和-C₂-C₈烷基且包含(但不限於)-乙烯基、-烯丙基、-1-丁烯基、-2-丁烯基、-異丁烯基、-1-戊烯基、-2-戊烯基、-3-甲基-1-丁烯基、-2-甲基-2-丁烯基、-2,3-二甲基-2-丁烯基、-1-己烯基、2-己烯基、-3-己烯基，術語「炔基」(本身或作為另一術語之一部分)係指具有一或多個三鍵之不飽和-C₂-C₈烷基，例如-乙炔基、-丙炔基、-1-丁炔基、-2-丁炔基、-1-戊炔基、-2-戊炔基及-3-甲基-1-丁炔基。

除非另外指示，否則「伸烷基」(本身或作為另一術語之一部分)係指如下經取代或未經取代之飽和或不飽和具支鏈或直鏈或環狀烴基團：其具有所陳述數量之碳原子、通常1-10個碳原子，且具有藉由自母體烷烴之相同或兩個不同碳原子去除兩個氫原子所衍生之兩個單價基團中心。典型伸烷基包含(但不限於)：亞甲基(-CH₂-)、1,2-伸乙基(-CH₂CH₂-)、1,3-伸丙基(-CH₂CH₂CH₂-)、1,4-伸丁基(-CH₂CH₂CH₂CH₂-)及諸如此類。在一些態樣中，伸烷基係具支鏈或直鏈烴(亦即，其並非環狀烴)。在其他態樣中，伸烷基係通常並非環狀烴之飽和伸烷基。

除非另外指示，否則「芳基」(本身或作為另一術語之一部分)意指藉由自母體芳香族環系統之單一碳原子去除一個氫原子所衍生之具有6-20個碳(較佳地6-14個碳)原子之經取代或未經取代的單價碳環芳香族烴基團。一些芳基在實例性結構中表示為「Ar」。典型芳基包含(但不限於)衍生自苯、經取代苯、萘、蒽、聯苯及諸如此類之基團。實例性芳基係苯基。

除非另外指示，否則「伸芳基」(本身或作為另一術語之一部分)係

如上文所定義之芳基，其中一個芳基氫原子經鍵代替(亦即，其係二價)且可呈鄰位、間位或對位定向，如在下列結構中使用苯基作為實例性基團所展示：



除非另外指示，否則「C₃-C₈雜環」(本身或作為另一術語之一部分)係指如下單價經取代或未經取代之芳香族或非芳香族單環或雙環環系統：具有3至8個碳原子(亦稱為環成員)及一至四個獨立地選自N、O、P或S之雜原子環成員，且藉由自母體環系統之環原子去除一個氫原子來衍生。雜環中之一或多個N、C或S原子可發生氧化。包括該雜原子之環可為芳香族環或非芳香族環。除非另有所述，否則雜環可在任何雜原子或碳原子處與其側基連接，從而得到穩定結構。C₃-C₈雜環之代表性實例包含(但不限於)吡咯啶基、氮雜環丁基、六氫吡啶基、嗎啉基、四氫呋喃基、四氫吡喃基、苯并呋喃基、苯并噻吩、吲哚基、苯并吡啶基、吡咯基、噻吩基(噻吩)、呋喃基、噻唑基、咪唑基、吡唑基、嘧啶基、吡啶基、吡嗪基、噻嗪基、異噻唑基及異噁唑基。

除非另外指示，否則「C₃-C₈雜環基」(本身或作為另一術語之一部分)係指上文所定義之C₃-C₈雜環基團，其中雜環基團之一個氫原子經鍵代替(亦即，其係二價)。在所選實施例中，例如在連接組裝單元之一部分包括雜環基時，該雜環基係上文所定義之雜環基團，其中雜環基團之一或兩個氫原子經鍵代替(亦即，雜環可為二價或三價)。

除非另外指示，否則「C₃-C₈碳環」(本身或作為另一術語之一部分)係藉由自母體環系統之環原子去除一個氫原子所衍生之3-、4-、5-、6-、

7-或8員單價、經取代或未經取代、飽和或不飽和之非芳香族單環或雙環碳環。代表性-C₃-C₈碳環包含(但不限於)環丙基、環丁基、環戊基、環五二烯基、環己基、環己烯基、1,3-環己二烯基、1,4-環己二烯基、環庚基、1,3-環庚二烯基、1,3,5-環庚三烯基、環辛基及環辛二烯基。

除非另外指示，否則「C₃-C₈碳環基」(本身或作為另一術語之一部分)係指上文所定義之C₃-C₈碳環基團，其中碳環基團之另一氫原子經鍵代替(亦即，其係二價)。在所選實施例中，例如在連接組裝單元之一部分包括碳環基時，該碳環基係上文所定義之碳環基團，其中碳環基團之一或兩個氫原子經鍵代替(亦即，碳環可為二價或三價)。

除非另外陳述，否則術語「雜烷基」(本身或與另一術語組合)意指由所陳述數量之碳原子及1至10個、較佳地1至3個選自由O、N、Si及S組成之群之雜原子組成之穩定直鏈或具支鏈烴或其組合(完全飽和或含有1至3個不飽和度)，且其中氮原子及硫原子可視情況經氧化且氮雜原子可視情況經四級鉸化。雜原子O、N及S可置於雜烷基之任何內部位置或烷基連接至分子之其他部分之位置。雜原子Si可置於雜烷基之任何位置，包含烷基連接至分子之其他部分之位置。實例包含-CH₂-CH₂-O-CH₃、-CH₂-CH₂-NH-CH₃、-CH₂-CH₂-N(CH₃)-CH₃、-CH₂-S-CH₂-CH₃、-CH₂-CH₂-S(O)-CH₃、-NH-CH₂-CH₂-NH-C(O)-CH₂-CH₃、-CH₂-CH₂-S(O)₂-CH₃、-CH=CH-O-CH₃、-Si(CH₃)₃、-CH₂-CH=N-O-CH₃及-CH=CH-N(CH₃)-CH₃。至多兩個雜原子可係連續的，例如-CH₂-NH-OCH₃及-CH₂-O-Si(CH₃)₃。在較佳實施例中，C₁ - C₄雜烷基或伸雜烷基具有1至4個碳原子及1或2個雜原子且C₁ - C₃雜烷基或伸雜烷基具有1至3個碳原子及1或2個雜原子。在一些態樣中，雜烷基或伸雜烷基係飽和的。

除非另外指示，否則術語「伸雜烷基」(本身或作為另一取代基之一部分)意指衍生自雜烷基(如上文所論述)之二價基團，例如-CH₂-CH₂-S-CH₂-CH₂-及-CH₂-S-CH₂-CH₂-NH-CH₂-。對於伸雜烷基而言，雜原子亦可佔據一個或二個鏈末端。另外，對於伸烷基及伸雜烷基連接基團而言，並不暗示連接基團之定向。在某些態樣中，例如在連接基團或系鏈基團包括伸雜烷基時，伸雜烷基係上文所定義之雜烷基，其中雜烷基之一或兩個氫原子經鍵代替(亦即，伸雜烷基可為二價或三價)。

「經取代烷基」及「經取代芳基」分別意指一或多個氫原子各自獨立地經取代基代替之烷基及芳基。典型取代基包含(但不限於) -X、-O⁻、-OR、-SR、-S⁻、-NR₂、-NR₃、=NR、-CX₃、-CN、-OCN、-SCN、-N=C=O、-NCS、-NO、-NO₂、=N₂、-N₃、-NRC(=O)R、-C(=O)R、-C(=O)NR₂、-SO₃⁻、-SO₃H、-S(=O)₂R、-OS(=O)₂OR、-S(=O)₂NR、-S(=O)R、-OP(=O)(OR)₂、-P(=O)(OR)₂、-PO₃⁻、-PO₃H₂、-AsO₂H₂、-C(=O)X、-C(=S)R、-CO₂R、-CO₂⁻、-C(=S)OR、C(=O)SR、C(=S)SR、C(=S)NR₂或C(=NR)NR₂，其中每一X獨立地係鹵素：-F、-Cl、-Br或-I；且每一R獨立地係-H、-C₁-C₂₀烷基、-C₆-C₂₀芳基、-C₃-C₁₄雜環、保護基團或前藥部分。典型取代基亦包含(=O)。如上文所闡述之伸烷基、碳環、碳環基、伸芳基、雜烷基、伸雜烷基、雜環及雜環基未經取代或類似地經取代。在一些實施例中，「烷基」及「伸烷基」之取代基包含-X、-O⁻、-OR、-SR、-S⁻、-NR₂、-CX₃、-CN、-OCN、-SCN、-NRC(=O)R、-C(=O)R、-C(=O)NR₂、-SO₃⁻、-SO₃H或-CO₂R。在一些實施例中，「芳基」、「碳環」、「碳環基」、「伸芳基」、「雜烷基」、「伸雜烷基」、「雜環」及「雜環基」之取代基包含-X、-O⁻、-C₁-C₂₀烷基、-OR、-SR、-S⁻、

-NR₂、-CX₃、-CN、-OCN、-SCN、-NRC(=O)R、-C(=O)R、-C(=O)NR₂、
-SO₃⁻、-SO₃H或-CO₂R。

如本文中所使用，術語「游離藥物」係指未直接或間接共價連接至MD-ADC之任何其他部分或MD-ADC之降解產物之生物活性藥物部分。因此，游離藥物係指結合之前之藥物或在其經由釋放機制(其可由MD-ADC中之可選連接基團提供)剛自連接組裝單元裂解時或在後續細胞內轉化或代謝時之存在形式。在一些態樣中，游離藥物具有形式H-D，該形式在一些態樣中以帶電部分形式存在。游離藥物係能夠施加期望生物效應之藥理學活性物質。在一些態樣中，藥理學活性物質係母體藥物且在其他態樣中包含連接組裝單元中不發生後續細胞內代謝之組分或殘餘物。

如本文中所使用，術語「分隔劑」係遮蔽特定藥物單元或連接組裝單元之疏水性之結構單元。在一些態樣中，「分隔劑」增加藥物連接組裝單元之親水性性質。在其他態樣中，分隔劑改良其所連接之連接組裝單元或MD-ADC之藥物動力學性質。

如本文中所使用，術語「自我穩定性連接體組裝體」係指具有鹼性官能基之經取代琥珀醯亞胺，該鹼性官能基鄰近琥珀醯亞胺且能夠催化經取代琥珀醯亞胺之羰基-氮鍵之水解。藉由鹼性官能基水解經取代琥珀醯亞胺可形成經自我穩定連接體。自我穩定性連接體組裝體之其他細節闡述於WO 2013/173337中。在一些態樣中，自我穩定性連接體組裝體係具有本文所揭示結構之MDPr。

如本文中所使用，術語「經改造半胱胺酸殘基」或「eCys殘基」係指納入抗體中之半胱胺酸胺基酸或其衍生物。可將一或多個eCys殘基納入抗體中，且通常將eCys殘基納入抗體之重鏈或輕鏈中。通常，藉由誘

變親代抗體之核酸序列以編碼一或多個含有半胱胺酸或其衍生物之胺基酸殘基來將eCys殘基納入抗體中。適宜突變包含使用半胱胺酸或其衍生物代替抗體之輕鏈或重鏈中之期望殘基，在抗體之輕鏈或重鏈中之期望位置納入額外半胱胺酸或其衍生物，以及將額外半胱胺酸或其衍生物添加至胺基酸之期望重鏈或輕鏈之N-末端及/或C-末端。半胱胺酸(Cys)之衍生物包含(但不限於) β -2-Cys、 β -3-Cys、高半胱胺酸及N-甲基半胱胺酸。

態樣及實施例

本文提供多重藥物之抗體藥物結合物(MD-ADC，如下文所闡述)以及連接組裝單元(LA) (其連接至存在兩個不同藥物單元(D¹及D²)之多種藥物單元)及經保護連接組裝單元(PLA)或支架，後二者皆具有用於連接至抗體及D¹及D²之官能基。MD-ADC、LA單元或PLA單元中之每一者視情況具有分隔劑(Y)，該分隔劑連接於LA或PLA單元或MD-ADC之一部分之位點或組分上。

多重藥物之抗體藥物結合物

在一態樣中，本文提供多重藥物之抗體藥物結合物(MD-ADC)，其中兩個不同藥物單元共價連接至抗體以用於在治療方案中同時靶向遞送兩種不同藥物。對於每一抗體而言，兩種藥物以整數比率連接，且在一些態樣中以1:1比率、2:1比率或3:1比率連接於每一連接組裝單元上。通常，MD-ADC之抗體上連接有1至8個連接組裝單元，連接組裝單元在一些態樣中連結至每一抗體中總共2至32個藥物單元中之兩個不同藥物單元(D¹+D²)，更通常連結至總共2至20個藥物單元中之2至10個藥物單元。

在一些實施例中，藉由以下方式來達成總藥物載量16 (D¹藥物單元對D²藥物單元之比率為1:1)：完全還原抗體，從而4個鏈間二硫鍵聯中之每

一者發生裂解以產生8個用於連接連接組裝單元或經正交保護之ADC-連接體之硫醇。進一步設計連接組裝單元及經正交保護之ADC-連接體以具有連結至分隔劑(例如PEG基團)之可選連接位點。分隔劑可連接至連接組裝單元或經正交保護之ADC-連接體上之各個位點，如下文更完整地所論述。

在一些實施例中，連接組裝單元在一或多個經改造半胱胺酸(eCys)殘基處連接至抗體。eCys殘基係納入抗體之重鏈或輕鏈中之半胱胺酸胺基酸或其衍生物。應理解，可將一或多個eCys殘基納入單一抗體中。通常，藉由誘變親代抗體之核酸序列以編碼一或多個含有半胱胺酸之胺基酸殘基來製備包括eCys殘基之抗體。熟習此項技術者可確定用於納入eCys殘基之適宜位置，且其他資訊可參見美國專利第9,000,130號，其內容出於所有目的併入本文中。

為便於組裝，通常在連接至抗體之前構築連接組裝單元(連接有藥物單元) -且下文具有經連接之藥物單元之經組裝連接組裝單元之背景中加以論述。然而，熟習此項技術者應瞭解，構築順序可有所變化。舉例而言，具有保護基團之連接組裝單元可連接至抗體，其中去除保護基團且在添加至抗體中之後添加藥物單元。

連接組裝單元

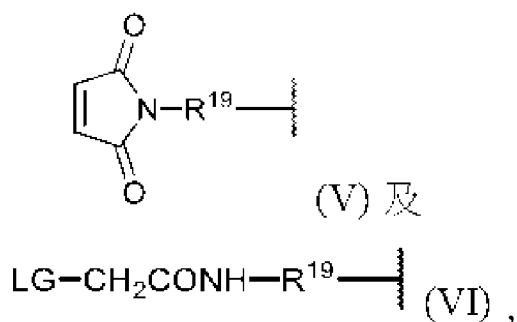
連接組裝(LA)單元之特徵在於下列特性：(1)抗體系鏈基團促進LA連接至抗體硫醇；(2)呈去保護形式之連接基團(Q¹及Q²)容許共價連接藥物單元(D¹及D²)；(3)連接基團連接體在兩個連接基團(X)之間提供連結；及可選基團，包含藥物連接基團(L¹及L²)及分隔劑(Y)。

在某些實施例中，LA單元之特徵在於式(Ia)結構：

及共價連接至第一連接基團(Q¹)之官能基。在一些實施例中，系鏈基團(T)具有共價連接至分隔劑(Y)之位點。

諸多適於作為系鏈基團之官能基已闡述於文獻中且包含彼等經設計以連接至存在於抗體中之硫醇部分之官能基。彼等官能基包含馬來醯亞胺基部分(例如馬來醯亞胺基己醯基及自我穩定性部分(例如mDPR)，參見WO 2013/173337)。

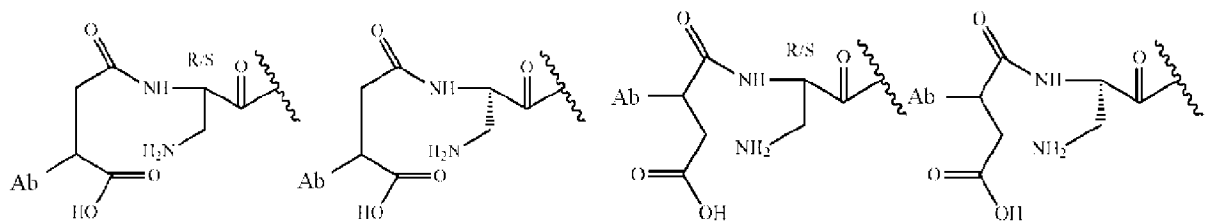
本發明範圍內之在共價連接至抗體硫醇之前之系鏈基團之實例包含式(V)及(VI)的基團：



其中，LG係離去基團，右側之波浪線係連接基團(Q¹及Q²)，且R¹⁹係如下文所定義。熟習此項技術者將認識到，式(V)馬來醯亞胺能夠與抗體之硫醇發生反應，且參照式VI，抗體之硫醇將經由親核性攻擊共價連接至帶碳LG以置換離去基團(LG)。適宜離去基團已為熟習此項技術者所熟知且包含鹵素、甲苯磺酸根及甲磺酸根。

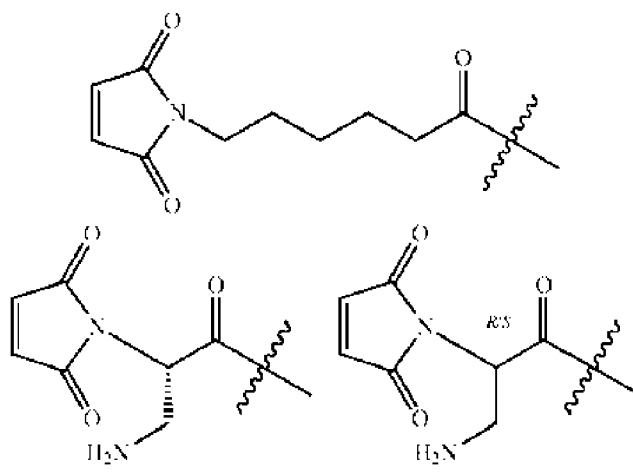
在一些實施例中，R¹⁹係C₁-C₁₀伸烷基-、C₁-C₁₀伸雜烷基-、C₃-C₈碳環基-、-O-(C₁-C₈烷基)-、-伸芳基-、C₁-C₁₀伸烷基-伸芳基-、-伸芳基-C₁-C₁₀伸烷基-、C₁-C₁₀伸烷基-(C₃-C₈碳環基)-、(C₃-C₈碳環基)-C₁-C₁₀伸烷基-、C₃-C₈雜環基-、C₁-C₁₀伸烷基-(C₃-C₈雜環基)、(C₃-C₈雜環基)-C₁-C₁₀伸烷基-、C₁-C₁₀伸烷基-C(=O)-、C₁-C₁₀伸雜烷基-C(=O)-、C₃-C₈碳環基-C(=O)-、-O-(C₁-C₈烷基)-C(=O)-、-伸芳基-C(=O)、C₁-C₁₀伸烷基-伸

亦應理解，在一些實施例中，式(V)及式(VII)中所展示之經取代馬來醯亞胺在連接至抗體硫醇之後以水解形式存在。亦即，在實例性實施例中，所得經取代琥珀醯亞胺係呈水解形式，如下文所展示：



在一些態樣中，式(V)及(VI)之 R^{19} 取代基視情況經取代。在一些彼等實施例中，式(V)之 R^{19} 取代基經基礎單元(例如 $(CH_2)_xNH_2$ 、 $(CH_2)_xNHR^a$ 及 $(CH_2)_xNR^a_2$)取代，其中下標 x 係介於1-4之間之整數且每一 R^a 係獨立選擇之 C_1 - C_6 烷基，或兩個 R^a 基團與其所連接之氮組合形成氮雜環丁基、吡咯啶基或六氫吡啶基。

在一些實施例中，在共價連接至抗體硫醇之前之系鏈基團(T)係選自由以下組成之群：



在一些所選實施例中，在連接至抗體硫醇之前之系鏈基團(T)係(例如)可由蛋白酶裂解之含有馬來醯亞胺基之連接體部分。因此，可由蛋白酶裂解之用於本文所闡述MD-ADC之實例性T單元包含下列結構，其中S係抗體硫醇之硫原子，右側之波浪線係連接基團連接體，且左側波浪線係

諸如硫醇、胺、羥基、羧酸或醯胺等官能基之胺基酸，例如半胱胺酸、絲胺酸、蘇胺酸、酪胺酸、離胺酸、瓜胺酸、精胺酸、天門冬胺酸鹽、麩胺酸鹽、天門冬醯胺及麩醯胺酸。彼等官能基能夠與保護基團、藥物單元或可選連接基團上之適宜相應基團發生反應。

在一些實施例中，連接基團(Q¹及Q²)獨立地選自諸如半胱胺酸、絲胺酸、蘇胺酸、離胺酸、瓜胺酸及精胺酸等胺基酸。在一些實施例中，連接基團(Q¹及Q²)獨立地選自由以下組成之群：半胱胺酸、絲胺酸及離胺酸。在一些實施例中，連接基團(Q¹及Q²)係半胱胺酸。

在一些實施例中，連接基團(Q¹及Q²)獨立地選自半胱胺酸(Cys)衍生物，例如Cys (StBu)、H-Cys(Acm)-OH、H-Cys(Trt)-OH、H-Cys(StBu)-OH、H-Cys(Bzl)-OH、H-Cys(S-Et)-OH、H-Cys(SO₃H)-OH、H-Cys(胺基乙基)-OH、H-Cys(胺甲醯基)-OH、H-Cys(S-苯基)-OH、H-Cys(Boc)-OH及H-Cys(羥乙基)-OH。

在一些實施例中，連接基團(Q¹及Q²)獨立地選自半胱胺酸(Cys)衍生物，例如Cys(Stmp)、Cys(Mmt)、硫代脯胺酸、Cys(Dpm)、Cys(Thp)、Cys(4-MeOBzl)、Cys(Npys)、Cys(Cys)。

在一些實施例中，連接基團(Q¹及Q²)獨立地選自半胱胺酸(Cys)衍生物，例如β-2-Cys、β-3-Cys、高半胱胺酸及N-甲基半胱胺酸。

根據本文所闡述之連接基團、保護基團、藥物單元或可選連接基團，連接基團與毗鄰基團或鍵聯之間之適宜共價連接包含二硫化物、硫醚、肽、肼、酯或胺基甲酸酯鍵。

應理解，連接基團並不必須包含胺基酸殘基。只要連接基團包括能夠經「正交」保護/去保護之官能基且進一步包括能夠共價連接至連接基

團連接體及/或可選連接單元之化學基團，則該連接基團亦係連接組裝單元之適宜組分。

連接基團連接體(X 、 X^1 、 X^2 及 X^B)

為在連接基團之間提供適宜間隔，本文所提供之連接組裝單元在一些實施例中包含連接基團連接體(X 、 X^1 及 X^2)。彼等連接基團連接體通常係除在連接基團(Q^1 及 Q^2)之間提供間隔外亦在MC-ADC組合物於活體內代謝時產生良性組分之基團。典型連接基團連接體係(例如)甘胺酸、丙胺酸、 β -丙胺酸及二肽或三肽。儘管各種胺基酸可用於此背景中，但較佳胺基酸係具有在構築LA期間無需保護/去保護步驟之側鏈者。舉例而言，在構築LA期間無需保護/去保護步驟之適宜胺基酸包含甘胺酸、丙胺酸、 β -丙胺酸、纈胺酸、白胺酸、苯丙胺酸及脯胺酸。在連接基團連接體係胺基酸之實施例中，每一胺基酸上之胺基位置可經取代或未經取代。

在一些實施例中，連接基團連接體(X 、 X^1 或 X^2)係二肽，其中每一肽獨立地選自由以下組成之群：甘胺酸、丙胺酸、 β -丙胺酸、纈胺酸、白胺酸、苯丙胺酸及脯胺酸。

在一些實施例中，連接基團連接體(X 、 X^1 或 X^2)係三肽，其中每一肽獨立地選自由以下組成之群：甘胺酸、丙胺酸、 β -丙胺酸、纈胺酸、白胺酸、苯丙胺酸及脯胺酸。

在一些實施例中，連接基團連接體具支鏈。亦即，連接基團(Q^1 及 Q^2)連接至單一連接基團連接體(X^B)。在該等實施例中，具支鏈連接基團連接體(X^B)直接連接至系鏈基團(T)。典型具支鏈連接基團連接體係(例如)在其側鏈中包含其他官能基之胺基酸，該其他官能基提供共價連接具支鏈連接基團連接體及系鏈基團之容易方式。適宜胺基酸包含(但不限於)離胺

酸、天門冬胺酸、麩胺酸、絲胺酸、蘇胺酸、天門冬醯胺及麩醯胺酸。在一些實施例中，具支鏈連接基團連接體係離胺酸。儘管經由胺基酸之側鏈來共價連接具支鏈連接基團連接體(X^B)與系鏈基團係適宜連接方式，但熟習此項技術者將認識到，上文所列示三官能胺基酸中之每一官能基可用於將連接基團 Q^1 及 Q^2 以及系鏈基團(T)共價連接至具支鏈連接基團連接體(X^B)。

在一些實施例中，每一胺基酸上之胺基位置獨立地經甲基取代。

應理解，考慮到連接基團連接體之作用，無需胺基酸單元。只要連接基團連接體包括共價連接至連接體組裝單元中之兩個或更多個連接基團(Q^1 及 Q^2)之化學基團，則該基團係連接組裝單元中之適宜組分。

可選連接基團(L^1 及 L^2)

連接組裝單元之其他組分係可選連接基團(L^1 及 L^2)，可包含該等基團以用於(例如)促進將藥物單元連接至LA單元或用於引入可裂解連接基團。在一些實施例中，本發明之連接組裝單元在藥物單元與連接基團(Q^1 或 Q^2)之間包含可選連接基團。應理解，在LA單元連接至抗體之前使可選連接基團連接至藥物單元，或在藥物單元連接之前使可選連接基團連接至LA單元。熟習此項技術者將認識到，「可選」指示連接體可由(例如)藥物單元與連接基團連接體之間之直接鍵代替。

業內已知諸多用於使藥物單元連接至存在於連接體上之抗體或位點中之官能基之連接體-且該等連接體可在本文中用於使藥物單元連接至連接組裝單元之連接基團。

在一些實施例中，可選連接基團包含末端馬來醯亞胺，其容許與連接單元 Q^1 或 Q^2 進行可靠鍵聯。應理解，末端馬來醯亞胺官能基主要可用

或細胞生長抑制性。通常，可釋放連接基團經設計以用於在結合物已內化至靶細胞中後立即有效釋放游離藥物，但亦可經設計以將游離藥物釋放於靶向細胞附近。用於裂解之適宜識別位點係容許有效釋放MD-ADC之藥物單元者。通常，識別位點係肽裂解位點(例如在基於肽之可釋放連接體組裝體中)、醣裂解位點(例如在基於醣之可釋放連接體組裝體中，其係或包括葡萄糖醛酸苷單元)或二硫化物裂解位點(例如在基於二硫化物之可釋放連接體組裝體中)。肽裂解位點之實例包含由細胞內蛋白酶(例如存在於溶酶體中者)所識別者。醣裂解位點之實例包含由醣苷酶(包含葡萄糖醛酸苷酶，例如 β -葡萄糖醛酸苷酶)所識別者。

在一些實施例中，可釋放連接基團(L^{R1} 或 L^{R2})係二肽。在一些實施例中，該二肽係-Val-Cit-、-Phe-Lys-或-Val-Ala-。

在一些實施例中， L^1 及 L^2 獨立地選自由以下組成之群：馬來醯亞胺基-己醯基(mc)、馬來醯亞胺基-己醯基-纈胺酸-瓜胺酸(mc-vc)、馬來醯亞胺基-己醯基-纈胺酸-瓜胺酸-對胺基苄基氧基羰基(mc-vc-PABC)及MDPr-vc。應理解，在一些實施例中， L^1 及 L^2 進一步經鹼性部分(例如胺)取代以形成上文所論述且更詳細論述(WO 2013/173337)之自我穩定性琥珀醯亞胺連接體。

業內已知共價連接藥物單元與可選連接基團(L^1 或 L^2)之一般方法且業內已知連接體或傳統ADC可與本發明MD-ADC一起使用。舉例而言，奧裡斯他汀及美坦辛(maytansine) ADC當前在臨床研發中用於治療癌症。單甲基奧裡斯他汀E經由蛋白酶可裂解肽連接體結合至抗體，單甲基奧裡斯他汀F經由馬來醯亞胺基己酸直接結合至抗體，DM1經由二硫化物或直接經由雜雙官能SMCC連接體進行結合，且DM4經由二硫化物連接體進行結

合。彼等連接體系統可與本文所闡述之MD-ADC一起使用且端視所用連接體系統藉由酶可裂解系統或非酶可裂解系統來釋放藥物。二硫化物、硫醚、肽、胼、酯或胺基甲酸酯鍵皆係亦可用於連結藥物單元D¹或D²與第一或第二可選連接基團(L¹或L²)之鍵實例。

可經由可選連接基團之任何適宜原子來連接可選分隔劑(Y)。業內已知製備該等鍵聯之方法。

可選分隔劑(Y)

本文所闡述之MD-ADC亦可包含經連接分隔劑(Y)。分隔劑可用於(例如)遮蔽特定藥物單元或連接組裝單元之疏水性。因此，諸多分隔劑將用於增加其所連接之MD-ADC之親水性特徵。

代表性分隔劑包含聚乙二醇(PEG)單元、環糊精單元、聚醯胺、親水性肽、多醣及樹枝狀聚合物。

在可選分隔劑包含於基團T、L¹、L²、X、X¹或X²、Q¹或Q²中之一或多者中時，分隔劑在一些實施例中包含容許共價連接分隔劑與連接組裝單元之離胺酸殘基。

聚乙二醇單元(PEG)

可使用多分散性PEG、單分散性PEG及離散PEG來製備本發明化合物。多分散性PEG係不同大小及分子量之異質混合物，而單分散性PEG通常係自異質混合物純化而來且由此提供單一鏈長度及分子量。較佳PEG單元係離散PEG，其係以逐步方式合成且並非經由聚合製程合成之化合物。離散PEG提供具有界定及指定鏈長之單一分子。

本文所提供之PEG單元包括一或多條聚乙二醇鏈。聚乙二醇鏈可連接至一起，例如呈線性、具支鏈或星型構形。通常，至少一條PEG鏈係衍

生於一端以用於共價連接至連接組裝單元之組分(例如 Q^1 、 Q^2 、 X 、 X^1 或 X^2 或可選藥物連接體(L^1 或 L^2))之適當位點。至連接組裝單元之實例性連接係藉助非條件性可裂解鍵聯或經由條件性可裂解鍵聯來達成。實例性連接係經由醯胺鍵聯、醚鍵聯、酯鍵聯、胺鍵聯、脲鍵聯、二硫鍵聯、肽鍵聯或三唑鍵聯。在一些態樣中，藉助非條件性可裂解鍵聯來連接至連接組裝單元。在一些實施例中，並不經由酯鍵聯、胺鍵聯、脲鍵聯或二硫鍵聯來連接至連接組裝單元。在一些實施例中，並不經由胺鍵聯來連接至連接組裝單元。

條件性可裂解鍵聯係指在循環於血漿中時對裂解實質上不敏感但在細胞內或腫瘤內環境中對裂解敏感之鍵聯。非條件性可裂解鍵聯係對任一生物環境中之裂解實質上不敏感者。胺之化學水解、二硫化物還原及肽鍵或糖苷鍵聯之酶裂解係條件性可裂解鍵聯之實例。

PEG單元在連接組裝單元直接連接至MD-ADC (或其中間體)。PEG單元之其他末端係自由的且未繫鏈(untethered)並可採用甲氧基、羧酸、醇或其他適宜官能基之形式。甲氧基、羧酸、醇或其他適宜官能基用作PEG單元之末端PEG亞單元之帽(cap)。未繫鏈(untethered)意指PEG單元未在該未繫鏈位點連接至藥物單元、抗體或連接藥物單元及/或抗體之連接組分。對於PEG單元包括一條以上PEG鏈之該等實施例而言，多條PEG鏈可為相同或不同化學部分(例如具有不同分子量或亞單元數量之PEG)。多條PEG鏈在單一連接位點連接至連接組裝單元。熟習此項技術者應理解，除包括重複聚乙二醇亞單元外，PEG單元亦可含有非PEG物質(例如用以促進多條PEG鏈彼此偶合或用於促進偶合至連接組裝單元)。非PEG物質係指PEG單元中並非重複 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ 亞單元部分之原子。在本文所提

供之一些實施例中，PEG單元包括兩條單體PEG鏈彼此經由非PEG元素連接。在本文所提供之其他實施例中，PEG單元包括兩條線性PEG鏈連接至一個中心核心(其連接至連接組裝單元)(亦即PEG單元本身具支鏈)。

存在熟習此項技術者可使用之許多PEG連接方法[參見例如Goodson等人(1990) *Bio/Technology* 8:343 (在定點誘變之後介白素-2於其醯基化位點之聚乙二醇化)；EP 0 401 384 (PEG至G-CSF之偶合)；Malik等人(1992) *Exp. Hematol.* 20:1028-1035 (使用三氟乙烷磺醯氯進行GM-CSF之聚乙二醇化)；ACT Pub. No. WO 90/12874 (使用半胱胺酸特異性mPEG衍生物進行含有重組引入之半胱胺酸殘基之紅血球生成素之聚乙二醇化)；美國專利第5,757,078號(EPO肽之聚乙二醇化)；美國專利第5,672,662號(用於生物技術應用之經丙酸或丁酸及其功能衍生物單取代之聚(乙二醇)及相關聚合物)；美國專利第6,077,939號(肽之N端 α -碳之聚乙二醇化)；Veronese等人(1985) *Appl. Biochem. Biochnol* 11:141-142 (使用PEG-硝基苯基碳酸酯(「PEG-NPC」)或PEG-三氯苯基碳酸酯進行肽之N端 α -碳之聚乙二醇化)；及Veronese (2001) *Biomaterials* 22:405-417 (關於肽及蛋白質聚乙二醇化之綜述文章)]。

舉例而言，PEG可經由反應性基團以共價方式結合至胺基酸殘基。反應性基團係活化PEG分子可結合者(例如游離胺基或羧基)。舉例而言，N-末端胺基酸殘基及離胺酸(K)殘基具有游離胺基；且C-末端胺基酸殘基具有游離羧基。硫氫基(例如如發現於半胱胺酸殘基上者)亦可用作用於連接PEG之反應性基團。另外，已闡述在多肽之C-末端特異性引入活化基團(例如醯肼、醛及芳香族-胺基)之酶輔助方法(參見Schwarz等人 (1990) *Methods Enzymol.* 184:160；Rose等人(1991) *Bioconjugate Chem.*

2:154；及Gaertner等人 (1994) *J. Biol. Chem.* **269**:7224]。

在一些實施例中，使用具有不同反應性部分之甲氧基化PEG (「mPEG」)將PEG分子連接至胺基。該等反應性部分之非限制性實例包含琥珀酸琥珀醯亞胺基酯(SS)、碳酸琥珀醯亞胺基酯(SC)、mPEG-亞胺酸酯、對硝基苯基碳酸酯(NPC)、丙酸琥珀醯亞胺基酯(SPA)及氰尿醯氯。該等mPEG之非限制性實例包含mPEG-琥珀酸琥珀醯亞胺基酯(mPEG-SS)、mPEG₂-琥珀酸琥珀醯亞胺基酯(mPEG₂-SS)、mPEG-碳酸琥珀醯亞胺基酯(mPEG-SC)、mPEG₂-碳酸琥珀醯亞胺基酯(mPEG₂-SC)、mPEG-亞胺酸酯、mPEG-對-硝基苯基碳酸酯(mPEG-NPC)、mPEG-亞胺酸酯、mPEG₂-對-硝基苯基碳酸酯(mPEG₂-NPC)、mPEG-丙酸琥珀醯亞胺基酯(mPEG-SPA)、mPEG₂-丙酸琥珀醯亞胺基酯(mPEG₂-SPA)、mPEG-N-羥基-琥珀醯亞胺(mPEG-NHS)、mPEG₂-N-羥基-琥珀醯亞胺(mPEG₂-NHS)、mPEG-氰尿醯氯、mPEG₂-氰尿醯氯、mPEG₂-離胺醇-NPC及mPEG₂-Lys-NHS。

通常，對至少一條構成PEG單元之PEG鏈實施官能化，從而其能夠共價連接至連接組裝單元。官能化包含(例如)經由胺、硫醇、NHS酯、馬來醯亞胺、炔烴、疊氮化物、羰基或其他官能基進行。在一些實施例中，PEG單元進一步包括偶合至其連接組裝單元或偶合兩條或更多條PEG鏈之非PEG材料(亦即不包括-CH₂CH₂O-之材料)。

可使用眾多種聚乙二醇(PEG)物質，且可使用實質上任一適宜反應性PEG試劑。在一些實施例中，反應性PEG試劑使得在連接至連接組裝單元(例如Q¹、Q²、X、X¹或X²或可選藥物連接體(L¹或L²))時形成胺基甲酸酯或醯胺鍵。下列PEG試劑可用於各種實施例中：mPEG₂-NHS、mPEG₂-

ALD、多臂PEG、mPEG(MAL)₂、mPEG₂(MAL)、mPEG-NH₂、mPEG-SPA、mPEG-SBA、mPEG-硫酯、mPEG-雙酯、mPEG-BTC、mPEG-ButyrALD、mPEG-ACET、異源功能PEG (NH₂-PEG-COOH、Boc-PEG-NHS、Fmoc-PEG-NHS、NHS-PEG-VS、NHS-PEG-MAL)、PEG丙烯酸酯(ACRL-PEG-NHS)、PEG-磷脂(例如mPEG-DSPE)、SUNBRITE™系列之多臂PEG (包含GL系列之由熟習此項技術者所選化學物質活化之基於甘油之PEG)、任一SUNBRITE活化之PEG (包含(但不限於)羧基-PEGs、p-NP-PEGs、三氟代乙烷磺醯氯-PEG、醛PEG、縮醛-PEG、胺基-PEG、硫醇-PEG、馬來醯亞胺基-PEGs、羥基-PEG-胺、胺基-PEG-COOK羥基-PEG-醛、羧酸酐型-PEG、官能化PEG-磷脂及如由熟習此項技術者所選用於其特定應用及用途之其他類似及/或適宜反應性PEG。

在連接組裝單元中存在PEG單元能夠對所得MD-ADC之藥物動力學具有兩個潛在影響。期望影響係降低源於由藥物單元之所暴露疏水性要素所誘導非特異性相互作用之減小之清除(及隨後之暴露增加)。第二影響係不期望影響且係有時源自MD-ADC之分子量增加之分佈之體積及速率的降低。增加PEG亞單元數量會增加結合物之流體動力學半徑，從而降低擴散性。繼而，降低之擴散性通常會減弱MD-ADC滲透至腫瘤中之能力(Schmidt及Wittrup, *Mol Cancer Ther* 2009;8:2861-2871)。因該兩種競爭藥物動力學效應，期望使用足夠大之PEG以降低MD-ADC清除，由此增加血漿暴露，但不應大至大大減弱其擴散性，此導致干擾MD-ADC到達預期靶細胞群體之能力。關於選擇用於特定藥物-連接體之最佳PEG大小之方法，參見實例(例如US2016/0310612之實例1、18及21)。

在一組實施例中，PEG單元包括至少6個亞單元、至少7個亞單元、

至少8個亞單元、至少9個亞單元、至少10個亞單元、至少11個亞單元、至少12個亞單元、至少13個亞單元、至少14個亞單元、至少15個亞單元、至少16個亞單元、至少17個亞單元、至少18個亞單元、至少19個亞單元、至少20個亞單元、至少21個亞單元、至少22個亞單元、至少23個亞單元或至少24個亞單元。如本文中所使用，PEG單元之亞單元係指具有式 $-\{\text{-(CH}_2\text{CH}_2\text{O)}-\}$ 之聚乙二醇部分。

在一些該等實施例中，PEG單元包括不超過約72個亞單元。

在一組實施例中，PEG單元包括一或多條線性PEG鏈，每一鏈具有至少2個亞單元、至少3個亞單元、至少4個亞單元、至少5個亞單元、至少6個亞單元、至少7個亞單元、至少8個亞單元、至少9個亞單元、至少10個亞單元、至少11個亞單元、至少12個亞單元、至少13個亞單元、至少14個亞單元、至少15個亞單元、至少16個亞單元、至少17個亞單元、至少18個亞單元、至少19個亞單元、至少20個亞單元、至少21個亞單元、至少22個亞單元、至少23個亞單元或至少24個亞單元。在較佳實施例中，PEG單元包括總共至少6個亞單元、至少8個亞單元、至少10個亞單元或至少12個亞單元。在一些該等實施例中，PEG單元包括不超過總共約72個亞單元、較佳地不超過總共約36個亞單元。

在另一組實施例中，PEG單元包括總共4至72、4至60、4至48、4至36或4至24個亞單元、5至72、5至60、5至48、5至36或5至24個亞單元、6至72、6至60、6至48、6至36或6至24個亞單元、7至72、7至60、7至48、7至36或7至24個亞單元、8至72、8至60、8至48、8至36或8至24個亞單元、9至72、9至60、9至48、9至36或9至24個亞單元、10至72、10至60、10至48、10至36或10至24個亞單元、11至72、11至60、11至48、

11至36或11至24個亞單元、12至72、12至60、12至48、12至36或12至24個亞單元、13至72、13至60、13至48、13至36或13至24個亞單元、14至72、14至60、14至48、14至36或14至24個亞單元、15至72、15至60、15至48、15至36或15至24個亞單元、16至72、16至60、16至48、16至36或16至24個亞單元、17至72、17至60、17至48、17至36或17至24個亞單元、18至72、18至60、18至48、18至36或18至24個亞單元、19至72、19至60、19至48、19至36或19至24個亞單元、20至72、20至60、20至48、20至36或20至24個亞單元、21至72、21至60、21至48、21至36或21至24個亞單元、22至72、22至60、22至48、22至36或22至24個亞單元、23至72、23至60、23至48、23至36或23至24個亞單元或24至72、24至60、24至48、24至36或24個亞單元。

在另一組實施例中，PEG單元包括一或多條線性PEG鏈，該等線性PEG鏈具有總共4至72、4至60、4至48、4至36或4至24個亞單元、5至72、5至60、5至48、5至36或5至24個亞單元、6至72、6至60、6至48、6至36或6至24個亞單元、7至72、7至60、7至48、7至36或7至24個亞單元、8至72、8至60、8至48、8至36或8至24個亞單元、9至72、9至60、9至48、9至36或9至24個亞單元、10至72、10至60、10至48、10至36或10至24個亞單元、11至72、11至60、11至48、11至36或11至24個亞單元、12至72、12至60、12至48、12至36或12至24個亞單元、13至72、13至60、13至48、13至36或13至24個亞單元、14至72、14至60、14至48、14至36或14至24個亞單元、15至72、15至60、15至48、15至36或15至24個亞單元、16至72、16至60、16至48、16至36或16至24個亞單元、17至72、17至60、17至48、17至36或17至24個亞單元、18至72、18至60、18

至48、18至36或18至24個亞單元、19至72、19至60、19至48、19至36或19至24個亞單元、20至72、20至60、20至48、20至36或20至24個亞單元、21至72、21至60、21至48、21至36或21至24個亞單元、22至72、22至60、22至48、22至36或22至24個亞單元、23至72、23至60、23至48、23至36或23至24個亞單元或24至72、24至60、24至48、24至36或24個亞單元。

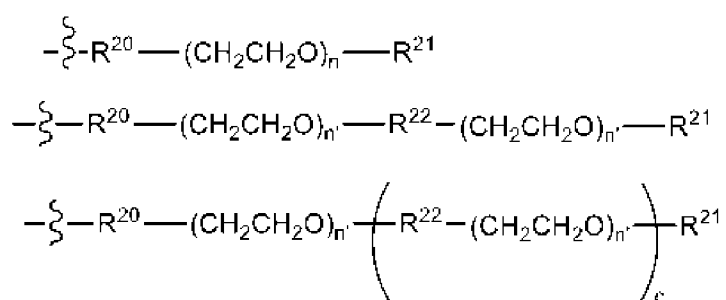
在另一組實施例中，PEG單元係衍生之線性單一PEG鏈，其具有至少2個亞單元、至少3個亞單元、至少4個亞單元、至少5個亞單元、至少6個亞單元、至少7個亞單元、至少8個亞單元、至少9個亞單元、至少10個亞單元、至少11個亞單元、至少12個亞單元、至少13個亞單元、至少14個亞單元、至少15個亞單元、至少16個亞單元、至少17個亞單元、至少18個亞單元、至少19個亞單元、至少20個亞單元、至少21個亞單元、至少22個亞單元、至少23個亞單元或至少24個亞單元。

在另一組實施例中，PEG單元係衍生之線性單一PEG鏈，其具有6至72、6至60、6至48、6至36或6至24個亞單元、7至72、7至60、7至48、7至36或7至24個亞單元、8至72、8至60、8至48、8至36或8至24個亞單元、9至72、9至60、9至48、9至36或9至24個亞單元、10至72、10至60、10至48、10至36或10至24個亞單元、11至72、11至60、11至48、11至36或11至24個亞單元、12至72、12至60、12至48、12至36或12至24個亞單元、13至72、13至60、13至48、13至36或13至24個亞單元、14至72、14至60、14至48、14至36或14至24個亞單元、15至72、15至60、15至48、15至36或15至24個亞單元、16至72、16至60、16至48、16至36或16至24個亞單元、17至72、17至60、17至48、17至36或17至24個亞單

元、18至72、18至60、18至48、18至36或18至24個亞單元、19至72、19至60、19至48、19至36或19至24個亞單元、20至72、20至60、20至48、20至36或20至24個亞單元、21至72、21至60、21至48、21至36或21至24個亞單元、22至72、22至60、22至48、22至36或22至24個亞單元、23至72、23至60、23至48、23至36或23至24個亞單元或24至72、24至60、24至48、24至36或24個亞單元。

在另一組實施例中，PEG單元係衍生之線性單一PEG鏈，其具有2至72、2至60、2至48、2至36或2至24個亞單元、2至72、2至60、2至48、2至36或2至24個亞單元、3至72、3至60、3至48、3至36或3至24個亞單元、3至72、3至60、3至48、3至36或3至24個亞單元、4至72、4至60、4至48、4至36或4至24個亞單元、5至72、5至60、5至48、5至36或5至24個亞單元。

可用作本文所提供任一實施例中之分隔劑之實例性線性PEG單元如下：



其中波浪線指示至平行連結體單元之連接位點，

R^{20} 係PEG連接單元，

R^{21} 係PEG加帽單元(Capping Unit)，

R^{22} 係PEG偶合單元(亦即用於將多個PEG亞單元鏈偶合至一起)

下標 n 獨立地選自2至72 (較佳地4至72、更佳地6至72、8至72、10至

72、12至72或6至24)；

下標 e 為2至5

每一下標 n' 獨立地選自1至72。在較佳實施例中，在PEG單元中存在至少6個、較佳地至少8個、至少10個或至少12個PEG亞單元。在一些實施例中，在PEG單元中存在不超過72或36個PEG亞單元。

在較佳實施例中，下標 n 為8或約8、12或約12、24或約24。

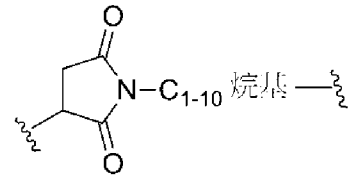
PEG連接單元係PEG單元之一部分且使PEG單元共價連接至連接組裝單元之其他部分。因此，連接組裝單元之一部分(T、 Q^1 、 L^1 、 D^1 、X、 Q^2 、 L^2 、 D^2 、 X^1 或 X^2)具有鍵結至PEG單元之官能基。用於將PEG單元連接至連接組裝單元上之位點之官能基包含形成二硫鍵或硫醚鍵之硫氫基、形成脙鍵之醛、酮或肼基團、形成脞鍵之羥基胺、形成肽鍵之羧酸基團或胺基、形成酯鍵之羧酸基團或羥基、形成磺醯胺鍵之磺酸、形成胺基甲酸酯鍵之醇及形成磺醯胺鍵或胺基甲酸酯鍵或醯胺鍵之胺。因此，在一些實施例中，PEG單元(例如)經由二硫化物、硫醚、脙、脞、肽、酯、磺醯胺、胺基甲酸酯或醯胺鍵共價連接至連接組裝單元上之位點。在其他實施例中，藉助發生於連接PEG單元與連接組裝單元時之點擊化學(疊氮化物與炔烴官能基之間之環加成產物)、加成反應、加成/消除或取代反應來連接PEG連接單元。

PEG偶合單元係PEG單元之一部分且係用於連結重複 CH_2CH_2O -亞單元之兩條或更多條鏈之非PEG材料。在實例性實施例中，PEG偶合單元 R^{22} 係- C_{1-10} 伸烷基-C(O)-NH-、- C_{1-10} 伸烷基-NH-C(O)-、- C_{2-10} 伸烷基-NH-、- C_{2-10} 伸烷基-O-、- C_{1-10} 伸烷基-S-或- C_{2-10} 伸烷基-NH-。

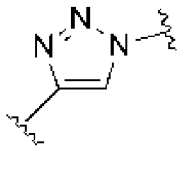
在實例性實施例中，PEG連接單元 R^{20} 係-C(O)-、-O-、-S-、-S(O)-

、-NH-、-C(O)O-、-C(O)C₁₋₁₀烷基、-C(O)C₁₋₁₀烷基-O-、-C(O)C₁₋₁₀烷基-CO₂-、-C(O)C₁₋₁₀烷基-NH-、-C(O)C₁₋₁₀烷基-S-、-C(O)C₁₋₁₀烷基-C(O)-NH-、-C(O)C₁₋₁₀烷基-NH-C(O)-、-C₁₋₁₀烷基、-C₁₋₁₀烷基-O-、-C₁₋₁₀烷基-CO₂-、-C₁₋₁₀烷基-NH-、-C₁₋₁₀烷基-S-、-C₁₋₁₀烷基-C(O)-NH-、-C₁₋₁₀烷基-NH-C(O)-、-CH₂CH₂SO₂-C₁₋₁₀烷基-、-CH₂C(O)-C₁₋₁₀烷基-、=N-(O或N)-C₁₋₁₀烷基-O-、=N-(O或N)-C₁₋₁₀烷基-NH-、=N-(O或N)-C₁₋₁₀

烷基-CO₂-、=N-(O或N)-C₁₋₁₀烷基-S-、



或

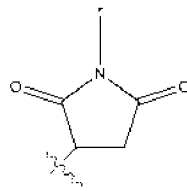


；

每一R²¹獨立地係-C₁₋₁₀烷基、-C₂₋₁₀烷基-CO₂H、-C₂₋₁₀烷基-OH、-C₂₋₁₀烷基-NH₂、C₂₋₁₀烷基-NH(C₁₋₃烷基)或C₂₋₁₀烷基-N(C₁₋₃烷基)₂；且

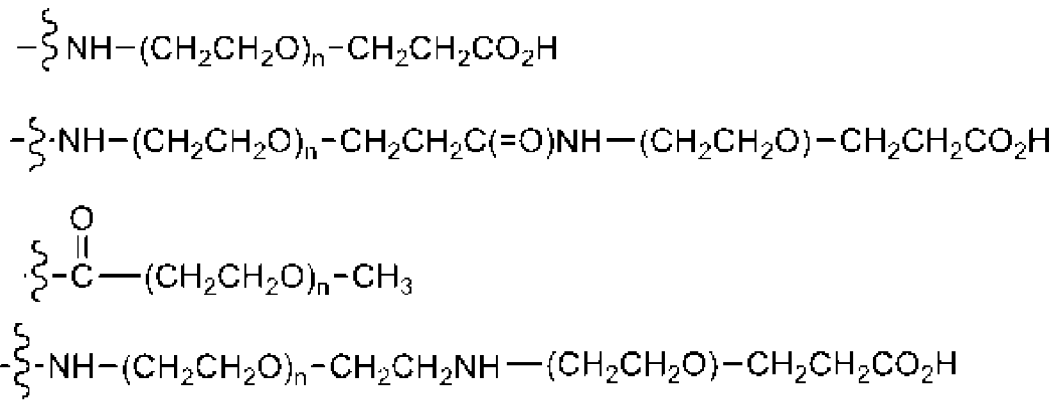
每一R²²獨立地係-C₁₋₁₀烷基-C(O)-NH-、-C₁₋₁₀烷基-NH-C(O)-、-C₂₋₁₀烷基-NH-、-C₂₋₁₀烷基-O-、-C₁₋₁₀烷基-S-或-C₂₋₁₀烷基-NH-。

在一些實施例中，R²⁰係-NH-、-C(=O)-、三唑連接之基團或-S-或馬



來醯亞胺基連接之基團(例如)，其中波浪線指示至連接組裝單元之連接位點且星號指示與PEG單元之連接位點。在一些該等態樣中，R²¹係C₁₋₁₀烷基、-C₂₋₁₀烷基-CO₂H、-C₂₋₁₀烷基-OH或-C₂₋₁₀烷基-NH₂。

可用於本文所提供之任一實施例中之闡釋性直鏈PEG單元如下：



其中波浪線指示至連接組裝單元之連接位點，且每一下標 n 獨立地選自4至72、6至72、8至72、10至72、12至72、6至24或8至24。在一些實施例中，下標 n 為約8、約12或約24。

在一些實施例中，將PEG單元添加至連接組裝單元之末端連接基團(Q)中。此可使用具有末端胺之衍生PEG單元來達成。在一些實施例中，經由1-3個胺基酸(例如單肽、二肽或三肽)使具有末端胺之衍生PEG連接至連接組裝單元之末端連接基團(Q)。舉例而言，在一些實施例中，以式Q-甘胺酸-PEG單元之形式使PEG單元連接至之末端連接基團(Q)。

如本文所闡述，選擇PEG單元，從而其改良所得MD-ADC之清除，但並不顯著影響結合物滲透至腫瘤中之能力。在MD-ADC之藥物單元及連接組裝單元具有相當於馬來醯亞胺基葡萄糖醛酸苷MMAE藥物-連接體之疏水性之實施例中，選擇使用之PEG單元具有較佳地8個亞單元至約24個亞單元、更佳地約12個亞單元。在MD-ADC之藥物單元及連接組裝單元之疏水性大於馬來醯亞胺基葡萄糖醛酸苷MMAE藥物-連接體之實施例中，有時需要具有更多亞單元之PEG單元。

在本發明之較佳實施例中，PEG單元為約300道爾頓至約5千道爾頓、約300道爾頓至約4千道爾頓、約300道爾頓至約3千道爾頓、約300道爾頓至約2千道爾頓或約300道爾頓至約1千道爾頓。在一些該等態樣中，

PEG單元具有至少6個亞單元或至少8、10或12個亞單元。在一些該等態樣中，PEG單元具有至少6個亞單元或至少8、10或12個亞單元，但不超過72個亞單元，較佳地不超過36個亞單元。

在本發明之較佳實施例中，除PEG單元外，在連接組裝單元中不存在其他PEG亞單元(亦即，在如本文所提供結合物及其中間體之任何其他組分中不存在PEG亞單元)。在本發明之其他實施例中，除PEG單元外，在連接組裝單元中存在不超過8、不超過7、不超過6、不超過5、不超過4、不超過3、不超過2或不超過1個其他聚乙二醇亞單元(亦即，在如本文所提供結合物及其中間體之其他組分中存在不超過8、7、6、5、4、3、2或1個其他聚乙二醇(-OCH₂CH₂-)亞單元。) 該等組分包含延伸體單元、平行連結體單元、藥物單元、支鏈單元及可釋放組裝單元。

應瞭解，在提及PEG亞單元時且端視背景，亞單元之數量可代表平均數量，例如在提及MD-ADC或中間體化合物群體及使用多分散性PEG時。

藥物單元(D¹及D²)

經由連接基團(Q¹或Q²)使兩個或更多個藥物單元(其中存在兩個不同藥物單元(D¹ + D²))共價連接至LA單元。如先前部分中所提及，在一些實施例中，LA單元包含可選連接基團(L¹及L²)。應理解，可在連接LA單元之前使可選連接基團連接至藥物部分，或可在連接藥物部分之前使可選連接基團連接至LA單元。

本發明效應在藥物單元係疏水性性質之實施例中更為明顯。因此，本發明之游離藥物較佳係疏水性性質。

藥物單元(D)係細胞毒性或細胞生長抑制藥物(亦在本文中稱為細胞

毒性劑或細胞生長抑制劑)之單元。藥物單元具有提供與第一或第二連接基團(Q¹或Q²)之共價鍵之原子。在一些實施例中，藥物單元(D¹或D²)具有可分別與第一或第二連接基團(Q¹或Q²)形成鍵之氮原子。在其他實施例中，藥物單元(D¹或D²)具有提供與第一或第二連接基團(Q¹或Q²)之鍵之羧酸部分。在其他實施例中，藥物單元(D¹或D²)含有提供與第一或第二連接基團(Q¹或Q²)之鍵之硫氫基官能基殘基。在其他實施例中，藥物單元具有提供與第一或第二連接基團(Q¹或Q²)之鍵之羥基或酮官能基殘基。

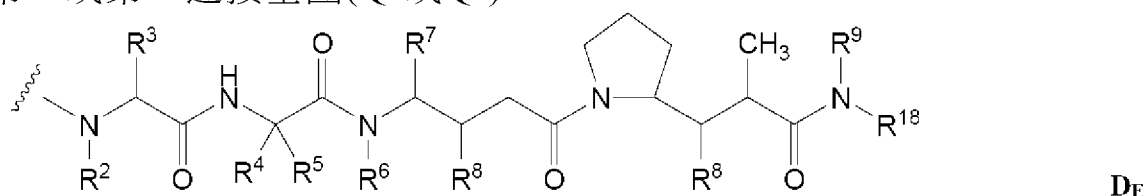
有用種類之細胞毒性劑包含(例如)抗微管蛋白劑、DNA小溝黏合劑、DNA複製抑制劑、烷基化劑、抗生素、抗葉酸劑、抗代謝物、化學療法敏化劑、拓撲異構酶抑制劑、長春花生物鹼或諸如此類。特定而言，有用種類細胞毒性劑之實例包含(例如) DNA小溝黏合劑、DNA烷基化劑及微管蛋白抑制劑。實例性細胞毒性劑包含(例如)奧裡斯他汀、喜樹鹼(camptothecin)、多卡米星(duocarmycin)、依託泊昔(etoposide)、美坦辛及類美登素(maytansinoid)、紫杉烷(taxane)、苯并二氮呋或含苯并二氮呋藥物(例如吡咯并[1,4]-苯并二氮呋(PBD)、二氫吲哚并苯并二氮呋及噁啶并苯并二氮呋)及長春花生物鹼。所選含苯并二氮呋藥物闡述於WO 2010/091150、WO 2012/112708、WO 2007/085930及WO 2011/023883中。

在某些實施例中，細胞毒性劑係美坦辛或類美登素(例如DM1、DM4)(另一群抗微管蛋白劑)。(ImmunoGen, Inc.；亦參見Chari等人，1992, *Cancer Res.* 52:127-131及美國專利第8,163,888號)。

在一些實施例中，藥物係苯并二氮呋(包含含苯并二氮呋藥物，例如吡咯并[1,4]苯并二氮呋(PBD)、二氫吲哚并苯并二氮呋及噁啶并苯并二

D¹或D²藥物單元之藥物之SlogP值為(a)約1.5、約2或2.5至約7、(b)約1.5、約2或2.5至約6、(c)約1.5、約2或約2.5至約5、(d)約1.5、約2或2.5至約4或(e)約1.5、約2或約2.5至約3。

奧裡斯他汀D¹或D²藥物單元較佳地具有下式D_E，其中經由N末端連接至第一或第二連接基團(Q¹或Q²)：



其中，在每一位置獨立地：

R²係選自由H及C₁-C₈烷基組成之群；

R³係選自由以下組成之群：H、C₁-C₈烷基、C₃-C₈碳環、芳基、C₁-C₈烷基-芳基、C₁-C₈烷基-(C₃-C₈碳環)、C₃-C₈雜環及C₁-C₈烷基-(C₃-C₈雜環)；

R⁴係選自由以下組成之群：H、C₁-C₈烷基、C₃-C₈碳環、芳基、C₁-C₈烷基-芳基、C₁-C₈烷基-(C₃-C₈碳環)、C₃-C₈雜環及C₁-C₈烷基-(C₃-C₈雜環)；

R⁵係選自由H及甲基組成之群；

或R⁴及R⁵一起形成碳環且具有式-(CR^aR^b)_n-，其中R^a及R^b獨立地選自由以下組成之群：H、C₁-C₈烷基及C₃-C₈碳環且n係選自由以下組成之群：2、3、4、5及6；

R⁶係選自由H及C₁-C₈烷基組成之群；

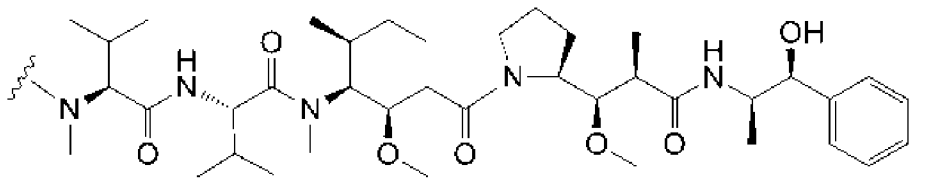
R⁷係選自由以下組成之群：H、C₁-C₈烷基、C₃-C₈碳環、芳基、C₁-C₈烷基-芳基、C₁-C₈烷基-(C₃-C₈碳環)、C₃-C₈雜環及C₁-C₈烷基-(C₃-C₈雜環)；

每一 R^8 獨立地選自由以下組成之群：H、OH、 C_1 - C_8 烷基、 C_3 - C_8 碳環及O-(C_1 - C_8 烷基)；

R^9 係選自由H及 C_1 - C_8 烷基組成之群；

R^{18} 係選自由以下組成之群： $-C(R^8)_2-C(R^8)_2$ -芳基、 $-C(R^8)_2-C(R^8)_2$ -(C_3 - C_8 雜環)及($C(R^8)_2-C(R^8)_2$ -(C_3 - C_8 碳環))。

經由N末端結合之MMAE展示如下：



在一些實施例中， D^1 或 D^2 藥物單元係長春花提取物化合物、喜樹鹼或蔥環細胞毒性化合物之藥物單元。彼等藥物單元在存在於 $-L^1-D^1$ 或 $-L^2-D^2$ 部分中時之實例結構在本文中係如針對藥物-連接體中間體所闡述。

存在諸多可用於測定MD-ADC是否對細胞系施加細胞生長抑制或細胞毒性效應之不同分析。在測定MD-ADC是否對細胞系施加細胞生長抑制或細胞毒性效應之一實例中，使用胸苷納入分析。舉例而言，將密度為5,000個細胞/孔之細胞在96孔板中培養72小時時段並在72小時時段之最終8小時期間暴露於 $0.5 \mu\text{Ci } ^3\text{H}$ -胸苷，且在存在及不存在MD-ADC下量測 ^3H -胸苷在培養物之細胞中之納入。若培養物細胞之 ^3H -胸苷納入小於在相同條件下培養但未與MD-ADC接觸之相同細胞系之細胞，則MD-ADC對細胞系具有細胞生長抑制或細胞毒性效應。

在另一實例中，為測定MD-ADC是否對癌細胞系施加細胞生長抑制或細胞毒性效應，藉由在細胞中測定染料(例如中性紅、台盼藍或ALAMAR™藍)之攝取來量測細胞存活率(例如參見Page等人，1993, *Intl. J. of Oncology* 3:473-476)。在此一分析中，在含有染料之培養基中培育

細胞，洗滌細胞，並使用分光光度計測量剩餘染料-反映染料之細胞攝取)。亦可使用蛋白質結合染料磺基玫瑰紅B -SRB)測量細胞毒性(Skehan 等人，1990, *J. Nat'l Cancer Inst.* 82:1107-12)。較佳MD-ADC包含關於細胞系之IC₅₀值(定義為殺死50%細胞之mAB濃度)小於1000 ng/ml、較佳地小於500 ng/ml、更佳地小於100 ng/ml、甚至最佳地小於50或甚至小於10 ng/ml者。

業內已知用於連接藥物與連接體之一般程序。例如參見美國專利第8,163,888號、第7,659,241號、第7,498,298號、美國公開案第US20110256157號及國際申請案第WO2011023883號及第WO2005112919號。

抗體(Ab)及(Ab*)

可用於本文所闡述MD-ADC中之抗體基本上係任何具有4個可用鏈間二硫鍵聯或8個硫醇之抗體，該等硫醇係藉由還原D¹ + D²介於2至16之間(在成1:1比率時)之MD-ADC之彼等鏈間二硫鍵聯所產生。該等抗體通常係未改造抗體-其中未進行修飾以引入其他胺基酸或肽之抗體，但在一些實施例中對該等抗體進行基因改造以含有用於D¹ + D²介於2至32之間(在成1:1比率時)之MD-ADC之可結合半胱胺酸殘基。

在一些實施例中，本發明抗體包含一或多種經改造半胱胺酸(eCys)殘基。eCys殘基係納入抗體之重鏈或輕鏈中之半胱胺酸胺基酸或其衍生物，通常藉由誘變親代抗體來將一或多個eCys殘基納入抗體中。其他資訊可參見美國專利第9,000,130號，其內容出於所有目的併入本文中。在一些實施例中，半胱胺酸(Cys)之衍生物包含(但不限於) β-2-Cys、β-3-Cys、高半胱胺酸及N-甲基半胱胺酸。

L^1 係接合 D^1 與 Q^1 之可選連接基團；

每一 L^2 係獨立選擇之接合 D^2 與 Q^2 之可選連接基團；

下標 m^1 及 m^2 各自獨立地為0或1；

Y 係分隔劑，其連接至 L 、 Q^1 、 X^1 、 X^2 、 Q^2 、 L^1 或 L^2 上之位點；且

下標 n 為0或1。

在每一上述實施例中， L 、 Q^1 、 Q^2 、 X^1 、 X^2 、 L^1 、 L^2 、 D^1 、 D^2 及 Y 係如前述部分中所闡述。

參照上述式(I)、(II)、(III)及(IV)，適宜抗體(Ab)係完整抗體或完全還原之抗體。術語「完全還原」欲指所有4個鏈間二硫鍵聯皆已還原以提供8個可連接至系鏈基團(T)之硫醇之抗體。

在一些實施例中，使用 Ab^* 代替式(I)、(II)、(III)及(IV)中之Ab。 Ab^* 係包括一或多個經改造半胱胺酸(eCys)殘基之抗體，該等eCys殘基係游離的，從而硫醇可連接至系鏈基團(T)。在該等實施例中，T係連接至抗體重鏈或輕鏈中之經改造半胱胺酸或其衍生物之硫原子之系鏈基團，但亦可連接至藉由還原該抗體中之鏈間二硫鍵聯所產生之硫醇。

在一組實施例中，抗體係針對癌細胞抗原。在另一組實施例中，抗體係針對細菌相關抗原。在又一組實施例中，抗體係針對自體免疫細胞抗原。

有用多株抗體係衍生自免疫化動物之血清之抗體分子之異質群體。有用單株抗體係特定抗原性決定子(例如癌細胞抗原、病毒抗原、微生物抗原、蛋白質、肽、碳水化合物、化學物質、核酸或其片段)之抗體之均質群體。可藉由使用業內已知之任何技術來製備所關注抗原之單株抗體(mAb)，該技術可藉由培養物中之連續細胞系來產生抗體分子。

有用單株抗體包含(但不限於)人類單株抗體、人類化單株抗體或嵌合人類-小鼠(或其他物種)單株抗體。抗體包含全長抗體及其抗原結合片段。可藉由業內已知之諸多技術中之任一者來製備人類單株抗體(例如Teng等人, 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 80:7308-7312; Kozbor等人, 1983, *Immunology Today* 4:72-79; 及Olsson等人, 1982, *Meth. Enzymol.* 92:3-16)。

抗體可為抗體中免疫特異性結合至靶細胞(例如癌細胞抗原、病毒抗原或微生物抗原)之功能活性片段、衍生物或類似物或結合至腫瘤細胞或基質之其他抗體。就此而言,「功能活性」意指,片段、衍生物或類似物能夠免疫特異性結合至靶細胞。為測定何種CDR序列結合抗原,可將含有CDR序列之合成肽與抗原一起用於結合分析中(藉由業內已知之任何結合分析方法,例如BIA核心分析)(例如參見Kabat等人, 1991, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第5版, National Institute of Health, Bethesda, Md; Kabat E等人, 1980, *J. Immunology* 125(3):961-969)。

另外,重組抗體(例如嵌合及人類化單株抗體,其包括人類及非人類部分且可使用標準重組DNA技術製得)係有用抗體。嵌合抗體係不同部分源自不同動物物種之分子,例如具有衍生自鼠類單株及人類免疫球蛋白恆定區之可變區者。(例如參見美國專利第4,816,567號;及美國專利第4,816,397號,其全部內容以引用方式併入本文中。)人類化抗體係來自非人類物種之抗體分子,其具有一或多個來自非人類物種之互補決定區(CDR)及來自人類免疫球蛋白分子之框架區。(例如參見美國專利第5,585,089號,其全部內容以引用方式併入本文中。)該等嵌合及人類化

單株抗體可藉由業內已知之重組DNA技術產生，例如使用闡述於以下文獻中之方法：國際公開案第WO 87/02671號；歐洲專利公開案第0 184 187號；歐洲專利公開案第0 171 496號；歐洲專利公開案第0 173 494號；國際公開案第WO 86/01533號；美國專利第4,816,567號；歐洲專利公開案第012 023號；Berter等人，1988, *Science* 240:1041-1043；Liu等人，1987, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:3439-3443；Liu等人，1987, *J. Immunol.* 139:3521-3526；Sun等人，1987, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:214-218；Nishimura等人，1987, *Cancer. Res.* 47:999-1005；Wood等人，1985, *Nature* 314:446-449；及Shaw等人，1988, *J. Natl. Cancer. Inst.* 80:1553-1559；Morrison, 1985, *Science* 229:1202-1207；Oi等人，1986, *BioTechniques* 4:214；美國專利第5,225,539號；Jones等人，1986, *Nature* 321:552-525；Verhoeyan等人，1988, *Science* 239:1534；及Beidler等人，1988, *J. Immunol.* 141:4053-4060；每一者之全部內容以引用方式併入本文中。

尤其期望完整人類抗體且可使用不能表現內源性免疫球蛋白重鏈及輕鏈基因但可表現人類重鏈及輕鏈基因之轉基因小鼠產生。

癌細胞抗原之免疫特異性抗體可以商業方式獲得或藉由熟習此項技術者已知之任何方法(例如化學合成或重組表現技術)產生。可(例如)自基因庫資料庫或其類似資料庫、文獻公開案或藉由常規選殖及測序來獲得編碼癌細胞抗原之免疫特異性抗體之核苷酸序列。

在一具體實施例中，可使用用於治療癌症之已知抗體。癌細胞抗原之免疫特異性抗體可以商業方式獲得或藉由熟習此項技術者已知之任何方法(例如重組表現技術)產生。可(例如)自基因庫資料庫或其類似資料庫、

文獻公開案或藉由常規選殖及測序來獲得編碼癌細胞抗原之免疫特異性抗體之核苷酸序列。

在另一具體實施例中，根據本發明之組合物及方法使用用於治療自體免疫疾病之抗體。細胞中負責產生自體免疫抗體之抗原之免疫特異性抗體可自任何組織(例如大學科學家或公司)獲得或藉由熟習此項技術者已知之任何方法(例如化學合成或重組表現技術)產生。

在某些實施例中，有用抗體可結合至表現於活化淋巴球上之受體或受體複合物。受體或受體複合物可包括免疫球蛋白基因超家族成員、TNF受體超家族成員、整聯蛋白、細胞介素受體、趨化介素受體、主要組織相容蛋白、凝集素或補體控制蛋白。

在一些態樣中，抗體將特異性結合CD19、CD20、CD30、CD33、CD70、 α -v- β -6、Liv-1或Lewis Y抗原。

抗CD30抗體可為(例如)嵌合AC10抗體貝倫妥單抗(brentuximab)。抗CD30抗體可具有含有SEQ ID NO:1中所陳述胺基酸序列之重鏈可變區、含有SEQ ID NO:2中所陳述胺基酸序列之輕鏈可變區、含有SEQ ID NO:7中所陳述胺基酸序列之人類 γ I恆定區及含有SEQ ID NO:8中所陳述胺基酸序列之人類 κ 恆定區。

抗CD30抗體可為(例如)人類化AC10抗體。抗CD30抗體可具有含有SEQ ID NO:9中所陳述胺基酸序列之重鏈可變區、含有SEQ ID NO:10中所陳述胺基酸序列之輕鏈可變區。該抗體可進一步包括具有SEQ ID NO:7中所陳述胺基酸序列之人類 γ I恆定區，視情況在位置239 (根據EU索引)具有絲胺酸至半胱胺酸取代，且包括具有SEQ ID NO:8中所陳述胺基酸序列之人類 κ 恆定區。

抗CD70抗體可為(例如)人類化抗體(例如參見US 2009/0148942)。在一實例性實施例中，抗CD70抗體具有含有SEQ ID NO:3中所陳述胺基酸序列之重鏈可變區及含有SEQ ID NO:4中所陳述胺基酸序列之輕鏈可變區。

抗CD19抗體可為(例如)人類化抗體(例如參見US 2009/0136526，其全部內容出於所有目的以引用方式併入本文中)。在一實例性實施例中，hBU12抗體具有含有SEQ ID NO:5中所陳述胺基酸序列之重鏈可變區及含有SEQ ID NO:6中所陳述胺基酸序列之輕鏈可變區。

抗體可為人類化抗CD33抗體(US 2013/0309223，其全部內容出於所有目的以引用方式併入本文中)、人類化抗 β 6抗體(例如參見WO 2013/123152，其全部內容出於所有目的以引用方式併入本文中)、人類化抗Liv-1抗體(例如參見US 2013/0259860，其全部內容出於所有目的以引用方式併入本文中)或人類化AC10抗體(例如參見US 8,257,706，其全部內容出於所有目的以引用方式併入本文中)。

至抗體之實例性連接係經由硫醚鍵聯。

癌細胞抗原位點

可用於治療癌症之抗體之實例包含(但不限於)：人類化抗HER2單株抗體HERCEPTIN((曲妥珠單抗(trastuzumab)；Genentech)，其用於治療患有轉移性乳癌之患者；RITUXAN((利妥昔單抗(rituximab)；Genentech)，其係用於治療患有非何傑金氏淋巴瘤(non-Hodgkin's lymphoma)之患者之嵌合抗CD20單株抗體；OvaRex (AltaRex Corporation, MA)，其係用於治療卵巢癌之鼠類抗體；Panorex (Glaxo Wellcome, NC)，其係用於治療結腸直腸癌之鼠類IgG_{2a}抗體；西妥昔單抗

(Cetuximab) Erbitux (Imclone Systems Inc., NY), 其係用於治療表皮生長因子陽性癌症(例如頭頸癌)之抗EGFR IgG嵌合抗體 ; Vitaxin (MedImmune, Inc., MD), 其係用於治療肉瘤之人類化抗體 ; Campath I/H (Leukosite, MA), 其係用於治療慢性淋巴球性白血病(CLL)之人類化IgG₁抗體 ; Smart MI95 (Protein Design Labs, Inc., CA), 其係用於治療急性骨髓樣白血病(AML)之人類化抗CD33 IgG抗體 ; LymphoCide (Immunomedics, Inc., NJ), 其係用於治療非何傑金氏淋巴瘤之人類化抗CD22 IgG抗體 ; Smart ID10 (Protein Design Labs, Inc., CA), 其係用於治療非何傑金氏淋巴瘤之人類化抗HLA-DR抗體 ; Oncolym (Techniclone, Inc., CA), 其係用於治療非何傑金氏淋巴瘤之經放射性標記之鼠類抗HLA-Dr10抗體 ; Allomune (BioTransplant, CA), 其係用於治療何傑金氏病(Hodgkin's Disease)或非何傑金氏淋巴瘤之人類化抗CD2 mAb ; Avastin (Genentech, Inc., CA), 其係用於治療肺癌及結腸直腸癌之抗VEGF人類化抗體 ; 依帕珠單抗(Epratuzamab) (Immunomedics, Inc., NJ及Amgen, CA), 其係用於治療非何傑金氏淋巴瘤之抗CD22抗體 ; 及CEAcide (Immunomedics, NJ), 其係用於治療結腸直腸癌之人類化抗CEA抗體。

可用於治療癌症之其他抗體包含(但不限於)針對下列抗原之抗體 : CA125 (卵巢癌)、CA15-3 (癌瘤)、CA19-9 (癌瘤)、L6 (癌瘤)、Lewis Y (癌瘤)、Lewis X (癌瘤)、 α 胎兒蛋白(癌瘤)、CA 242 (結腸直腸癌)、胎盤鹼性磷酸酶(癌瘤)、前列腺特異性抗原(前列腺癌)、前列腺酸性磷酸酶(前列腺癌)、表皮生長因子(癌瘤)、MAGE-1 (癌瘤)、MAGE-2 (癌瘤)、MAGE-3 (癌瘤)、MAGE -4 (癌瘤)、抗轉鐵蛋白受體(癌瘤)、p97 (黑色

素瘤)、MUC1-KLH (乳癌)、CEA (結腸直腸癌)、gp100 (黑色素瘤)、MART1 (黑色素瘤)、PSA (前列腺癌)、IL-2受體(T細胞白血病及淋巴瘤)、CD20 (非何傑金氏淋巴瘤)、CD52 (白血病)、CD33 (白血病)、CD22 (淋巴瘤)、人類絨毛膜促性腺素(癌瘤)、CD38 (多發性骨髓瘤)、CD40 (淋巴瘤)、黏蛋白(癌瘤)、P21 (癌瘤)、MPG (黑色素瘤)及Neu癌基因產物(癌瘤)。一些特異性有用抗體包含(但不限於) BR96 mAb (Trail, P. A., Willner, D., Lasch, S. J., Henderson, A. J., Hofstead, S. J., Casazza, A. M., Firestone, R. A., Hellström, I., Hellström, K. E., 「Cure of Xenografted Human Carcinomas by BR96-Doxorubicin Immunoconjugates」 *Science* 1993, 261, 212-215)、BR64 (Trail, PA, Willner, D, Knipe, J., Henderson, A. J., Lasch, S. J., Zoeckler, M. E., Trailsmith, M. D., Doyle, T. W., King, H. D., Casazza, A. M., Braslawsky, G. R., Brown, J. P., Hofstead, S. J., (Greenfield, R. S., Firestone, R. A., Mosure, K., Kadow, D. F., Yang, M. B., Hellstrom, K. E.及Hellstrom, I. 「Effect of Linker Variation on the Stability, Potency, and Efficacy of Carcinoma-reactive BR64-Doxorubicin Immunoconjugates」 *Cancer Research* 1997, 57, 100-105)、針對CD40抗原之mAb (例如S2C6 mAb) (Francisco, J. A., Donaldson, K. L., Chace, D., Siegall, C. B.及Wahl, A. F. 「Agonistic properties and *in vivo* antitumor activity of the anti-CD-40 antibody, SGN-14」 *Cancer Res.* 2000, 60, 3225-3231)、針對CD70抗原之mAb (例如1F6 mAb及2F2 mAb) 及針對CD30抗原之mAb (例如AC10) (Bowen, M. A., Olsen, K. J., Cheng, L., Avila, D.及Podack, E. R. 「Functional effects of CD30 on a

large granular lymphoma cell line YT」 *J. Immunol.*, 151, 5896-5906, 1993; Wahl等人, 2002 *Cancer Res.* 62(13):3736-42)。可使用許多結合至腫瘤相關抗原之其他內化抗體且已予以綜述(Franke, A. E., Sievers, E. L.及Scheinberg, D. A., 「Cell surface receptor-targeted therapy of acute myeloid leukemia: a review」 *Cancer Biother Radiopharm.* 2000,15, 459-76 ; Murray, J. L., 「Monoclonal antibody treatment of solid tumors: a coming of age」 *Semin Oncol.* 2000, 27, 64-70 ; Breitling, F. 及Dubel, S., *Recombinant Antibodies*, John Wiley, and Sons, New York, 1998)。

連接組裝單元及MD-ADC之所選實施例

由式Ib、IIb、IIb或IVb代表之連接組裝單元，其中T包括馬來醯亞胺基。

由式Ib、IIb、IIb或IVb代表之連接組裝單元，其中T包括馬來醯亞胺基，且X、X¹、X²、Q¹及Q²中之每一者係胺基酸。

由式Ib、IIb、IIb或IVb代表之連接組裝單元，其中n為0且Y不存在。

由式Ia、IIa、IIa或IVa代表之連接組裝單元，其中n為0，Y不存在，且L¹及L²中之每一者獨立地選自由以下組成之群：馬來醯亞胺基-己醯基(mc)、馬來醯亞胺基-己醯基-纈胺酸-瓜胺酸(mc-vc)及馬來醯亞胺基-己醯基-纈胺酸-瓜胺酸-對胺基苄基氧基羰基(mc-vc-PABC)。

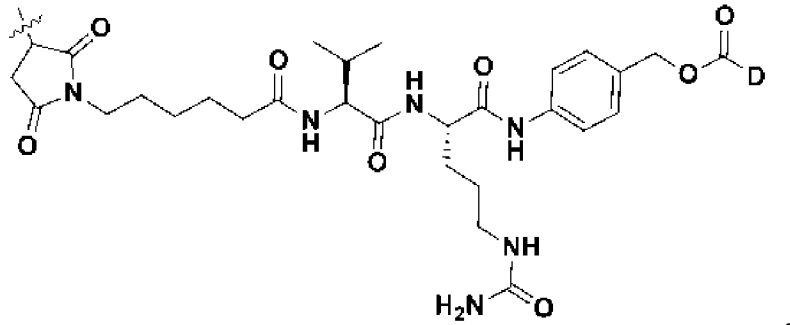
由式Ia、IIa、IIa或IVa代表之連接組裝單元，其中T係自我穩定性連接體。

由式Ia、IIa、IIa或IVa代表之連接組裝單元，其中T係MDPr-vc連接

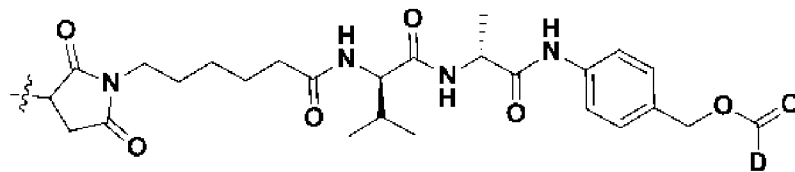
D²或任何其他L²-D²單元代替之結構；

且其中R^{PR}係氫或保護基團，例如酸不穩定性保護基團，例如BOC；

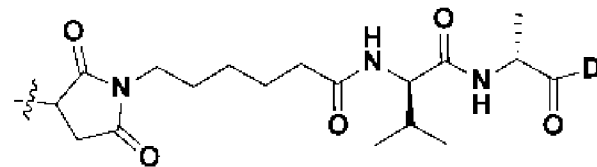
為便於參照本文所闡述之化合物及組裝，組分mc-VC-PABC-D具有結構



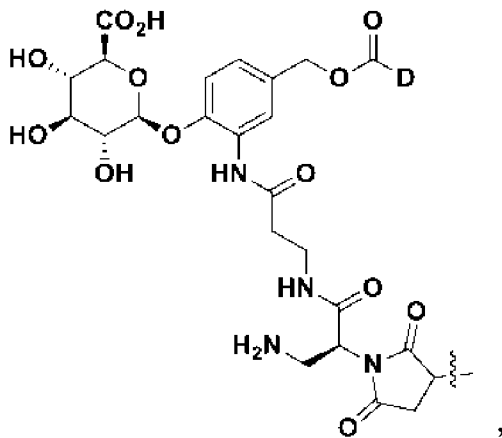
組分mc-VA-PABC-D具有結構



組分mc-VA-D具有結構



且組分MDPr-PABC(gluc)-D具有結構



其中mc-VC-PABC-D、mc-VA-PABC-D、mc-VA-D及MDPr-

X^B 係具支鏈連接基團連接體；

D^1 係第一藥物部分；

D^2 係第二藥物部分；

L^1 係接合 D^1 與 Q^1 之可選連接基團；

L^2 係接合 D^2 與 Q^2 之可選連接基團；

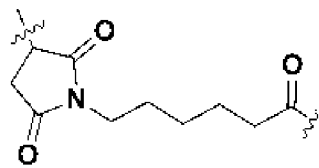
下標 m^1 及 m^2 各自獨立地選自0及1；

Y 係分隔劑，其連接至 L 、 Q^1 、 X^B 、 Q^2 、 L^1 或 L^2 上之位點；且

下標 n 為0、1或2。

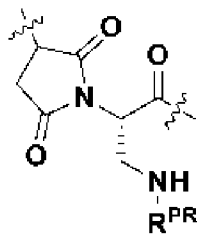
提供 $2 \times$ 藥物載量之本發明之其他實例性藥物-連接體化合物包含下列：

係自8至24或自12至38範圍的整數。在較佳實施例中，一個 R^{21} 係-CH₃且另一者係-CH₂CH₂CO₂H。



在一些實施例中，在存在具有結構  之mc部分之任

一上述結構中，該部分經MDPr部分代替，該MDPr部分具有結構



，其中 R^{PR} 係氫或保護基團，從而提供MDPr-VC-PABC-D、

MDPr-VA-D及MDPr-VA-PABC-D作為- L^1 - D^1 或- L^2 - D^2 。

在其他實施例中，存在MDPr部分之上述結構中之該部分經mc部分代替以提供mc-PABC(gluc)D作為- L^1 - D^1 或- L^2 - D^2 。

應理解，任一含有MDPr之- L^1 - D^1 或- L^2 - D^2 部分中之MDPr中之經取代琥珀醯亞胺可以水解形式存在(亦即，將水分子添加至一個而非兩個羰基-氮鍵中)。

在一些實施例中，作為- L^1 - D^1 或- L^2 - D^2 部分之MDPr-PABC(gluc)-D經mc-PABC(gluc)-D代替。

應理解，任一含有MDPr之- L^1 - D^1 或- L^2 - D^2 部分中之MDPr中之經取代琥珀醯亞胺可以水解形式存在(亦即，將水分子添加至一個而非兩個羰基-氮鍵中)。包括mc之- L^1 - D^1 或- L^2 - D^2 部分之琥珀醯亞胺環亦可呈水解形式。

使用方法

癌症治療

MD-ADC可用於抑制腫瘤細胞或癌細胞之繁殖，引起腫瘤或癌細胞

中之細胞凋亡，或治療患者之癌症。MD-ADC可由此用於治療癌症之各種環境中。可使用MD-ADC將藥物遞送至腫瘤細胞或癌細胞中。不受限於理論，在一實施例中，MD-ADC之抗體結合至癌細胞或腫瘤細胞相關抗原或與其締合，且MD-ADC可經由受體調介之胞吞作用或其他內化機制吸收(內化)於腫瘤細胞或癌細胞內部。抗原可連接至腫瘤細胞或癌細胞或可為與腫瘤細胞或癌細胞有關之細胞外基質蛋白。在位於細胞內部時，藥物經由可裂解機制釋放於細胞內。在一替代實施例中，藥物或藥物單元在腫瘤細胞或癌細胞外部自MD-ADC裂解，且藥物或藥物單元隨後滲透細胞。

在一實施例中，抗體結合至腫瘤細胞或癌細胞。

在另一實施例中，抗體結合至腫瘤細胞或癌細胞表面上之腫瘤細胞或癌細胞抗原。

在另一實施例中，抗體結合至作為與腫瘤細胞或癌細胞有關之細胞外基質蛋白之腫瘤細胞或癌細胞抗原。

抗體對特定腫瘤細胞或癌細胞之特異性可對於測定最有效治療之彼等腫瘤或癌症較為重要。舉例而言，靶向存在於造血癌症中之癌細胞抗原之MD-ADC可用於治療血液學惡性腫瘤(舉例而言，抗CD30、抗CD70、抗CD19、抗CD33結合抗體可用於治療血液學惡性腫瘤)。靶向存在於實體腫瘤上之癌細胞抗原之MD-ADC可用於治療該等實體腫瘤。

可使用MD-ADC治療之癌症包含(但不限於)造血癌症(例如淋巴瘤(何傑金氏淋巴瘤及非何傑金氏淋巴瘤)及白血病)及實體腫瘤。造血癌症之實例包含濾泡性淋巴瘤、間變性大細胞淋巴瘤、外套細胞淋巴瘤、急性骨髓母細胞性白血病、慢性骨髓細胞性白血病、慢性淋巴球性白血病、瀰漫性

大B細胞淋巴瘤及多發性骨髓瘤。實體腫瘤之實例包含纖維肉瘤、黏液肉瘤、脂肪肉瘤、軟骨肉瘤、骨原性肉瘤、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、尤恩氏腫瘤(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、口腔癌、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、髓質癌、支氣管癌、腎細胞癌、肝細胞瘤、膽管癌、絨毛膜癌、精原細胞瘤、胚胎性癌、維爾姆斯氏腫瘤(Wilms' tumor)、子宮頸癌、子宮癌、睪丸癌、小細胞肺癌、膀胱癌、肺癌、上皮癌、神經膠質瘤、多形性神經膠母細胞瘤、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、寡樹突神經膠細胞瘤、腦脊髓膜瘤、皮膚癌、黑色素瘤、神經母細胞瘤及視網膜母細胞瘤。

用於癌症之多模態療法

可藉由投與MD-ADC來治療或抑制癌症，包含(但不限於)腫瘤、轉移或特徵在於細胞生長不受控制之其他疾病或病症。

在其他實施例中，提供治療癌症之方法，包含向有需要之患者投與有效量之MD-ADC及化學治療劑。在一實施例中，化學治療劑係治療尚未發現變為難治性之癌症者。在另一實施例中，化學治療劑係治療已發現變為難治性之癌症者。可將MD-ADC投與亦經受手術以治療癌症之患者。

在一些實施例中，患者亦接受其他治療，例如輻射療法。在一具體實施例中，同時投與MD-ADC與化學治療劑或輻射療法。在另一具體實施例中，在投與MD-ADC之前或之後投與化學治療劑或輻射療法。

可經一系列時段來投與化學治療劑。可投與任一化學治療劑或其組合，例如標準護理化學治療劑。

另外，提供使用MD-ADC治療癌症之方法來代替化學療法或輻射療法，其中已證實或可證實化學療法或輻射療法對於所治療個體具有過高毒性，例如產生不可接受或不能承受之副效應。可視情況使用另一癌症治療(例如手術、輻射療法或化學療法)來治療所治療患者，此取決於何種治療發現為可接受或可承受。

自體免疫疾病之治療

MD-ADC可用於殺死產生自體免疫疾病之細胞或抑制其複製或用於治療自體免疫疾病。MD-ADC可由此用於各種環境中以用於治療患者之自體免疫疾病。可使用MD-ADC將藥物遞送至靶細胞中。不受限於理論，在一實施例中，MD-ADC與靶細胞表面上之抗原締合，且MD-ADC然後經由受體調介之胞吞作用吸收於靶細胞內部。在位於細胞內部後，連接體單元立即發生裂解，從而釋放藥物或藥物單元。所釋放藥物然後在胞質溶膠中自由遷移並誘導細胞毒性或細胞生長抑制活性。在一替代實施例中，藥物在靶細胞外部自MD-ADC裂解，且藥物或藥物單元隨後滲透細胞。

在一實施例中，抗體結合至自體免疫抗原。在一態樣中，抗原位於涉及自體免疫病狀之細胞之表面上。

在另一實施例中，抗體結合至細胞表面上之自體免疫抗原。

在一實施例中，抗體結合至與自體免疫疾病狀態有關之活化淋巴球。

在另一實施例中，MD-ADC殺死產生與特定自體免疫疾病有關之自

體免疫抗體之細胞或抑制其繁殖。

可使用MD-ADC治療之特定類型之自體免疫疾病包含(但不限於) Th2淋巴球相關病症(例如異位性皮膚炎、異位性氣喘、鼻炎結膜炎、過敏性鼻炎、歐門氏症候群(Omenn's syndrome)、全身性硬化及移植物抗宿主病)；Th1淋巴球相關病症(例如類風濕性關節炎、多發性硬化、牛皮癬、薛格連氏症候群(Sjorgren's syndrome)、橋本氏甲狀腺炎(Hashimoto's thyroiditis)、格雷夫斯氏病(Grave's disease)、原發性膽管肝硬化、韋格納氏肉芽腫(Wegener's granulomatosis)及結核病)；及活化B淋巴球相關病症(例如全身性紅斑狼瘡、古巴士德氏症候群(Goodpasture's syndrome)、類風濕性關節炎及I型糖尿病)。

自體免疫疾病之多重藥物療法

亦揭示治療自體免疫疾病之方法，包含向有需要之患者投與有效量之MD-ADC及另一已知用於治療自體免疫疾病之治療劑。

組合物及投與方法

本發明提供包括本文所闡述之MD-ADC及醫藥上可接受之載劑之醫藥組合物。MD-ADC可呈容許將化合物投與患者以用於治療與抗體所結合抗原之表現有關之病症之任何形式。舉例而言，結合物可呈液體或固體之形式。較佳投與途徑係非經腸途徑。非經腸投與包含皮下注射、靜脈內、肌內、胸骨內注射或輸注技術。在一態樣中，非經腸投與組合物。在一態樣中，經靜脈內投與結合物。可藉由任何便利途徑(例如藉由輸注或濃注注射)來進行投與。

醫藥組合物可經調配以容許在將組合物投與患者時化合物生物可利用。組合物可採用一或多個劑量單位之形式，其中(例如)錠劑可為單一劑

量單位。

用於製備醫藥組合物之材料之所用量可為非毒性。熟習此項技術者將明瞭，醫藥組合物中之活性成分之最佳劑量將取決於多個因素。相關因素包含(但不限於)動物類型(例如人類)、化合物之特定形式、投與方式及所用組合物。

組合物可(例如)呈液體形式。液體可用於藉由注射遞送。在藉由注射投與之組合物中，亦可包含表面活性劑、防腐劑、潤濕劑、分散劑、懸浮劑、緩衝劑、穩定劑及等滲劑中之一或多者。

不論呈溶液、懸浮液抑或其他類似形式，本發明之液體組合物亦可包含下列佐劑中之一或多者：無菌稀釋劑，例如注射用水、鹽水溶液(較佳地生理鹽水)、林格氏溶液(Ringer's solution)、等滲氯化鈉；不揮發性油，例如可用作溶劑或懸浮介質之合成單或二甘油酯、聚乙二醇、甘油、環糊精、丙二醇或其他溶劑；抗細菌劑，例如苄基醇或對羥基苯甲酸甲酯；抗氧化劑，例如抗壞血酸或亞硫酸氫鈉；螯合劑，例如乙二胺四乙酸；緩衝劑，例如胺基酸、乙酸鹽、檸檬酸鹽或磷酸鹽；洗滌劑，例如非離子型表面活性劑、多元醇；及用於調節張力之試劑(例如氯化鈉或右旋糖)。非經腸組合物可封閉於安瓿(由玻璃、塑膠或其他材料製得之可棄式唧筒或多劑量小瓶)中。生理學鹽水係一實例性佐劑。可注射組合物較佳係無菌的。

有效治療特定病症或病狀之結合物之量將取決於該病症或病狀之性質，且可藉由標準臨床技術測定。另外，可視情況採用活體外或活體內分析來幫助鑑別最佳劑量範圍。組合物中所利用之確切劑量亦將取決於投與途徑及疾病或病症之嚴重程度，且應根據從業醫師之判斷及各患者之情況

來決定。

該等組合物包括有效量之化合物，從而獲得適宜劑量。通常，此量為佔組合物至少約0.01重量%之化合物。

對於靜脈內投與而言，該組合物可包括約0.01 mg至約100 mg MD-ADC/kg動物體重。在一態樣中，該組合物可包含約1 mg至約100 mg MD-ADC/kg動物體重。在另一態樣中，投與量在約0.1 mg/kg體重化合物至約25 mg/kg體重化合物範圍內。

通常，投與患者之結合物之劑量通常為約0.01 mg/kg個體體重至約100 mg/kg個體體重。在一些實施例中，投與患者之劑量介於約0.01 mg/kg個體體重至約15 mg/kg個體體重之間。在一些實施例中，投與患者之劑量介於約0.1 mg/kg個體體重與約15 mg/kg個體體重之間。在一些實施例中，投與患者之劑量介於約0.1 mg/kg個體體重與約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個體體重至約5 mg/kg個體體重或約0.1 mg/kg個體體重至約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個體體重至約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個體體重至約10 mg/kg個體體重之間。在一些實施例中，投與劑量介於約0.1 mg/kg至4 mg/kg、甚至更佳地0.1 mg/kg至3.2 mg/kg或甚至更佳地0.1 mg/kg至2.7 mg/kg治療週期中之個體體重之間。

術語「載劑」係指與化合物一起投與之稀釋劑、佐劑或賦形劑。該等醫藥載劑可為液體，例如水及油，包含彼等石油、動物、植物或合成起源，例如花生油、大豆油、礦物油、芝麻油。載劑可為鹽水、阿拉伯樹膠、明膠、澱粉糊劑、滑石粉、角蛋白、膠質二氧化矽、尿素。另外，可

使用輔助劑、穩定劑、增稠劑、潤滑劑及著色劑。在一實施例中，在投與患者時，化合物或組合物及醫藥上可接受之載劑係無菌的。在經靜脈內投與化合物時，水係實例性載劑。亦可採用鹽水溶液及水性右旋糖及甘油溶液作為液體載劑、特定而言用於可注射溶液。適宜醫藥載劑亦包含賦形劑，例如澱粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明膠、麥芽、水稻、麵粉、白堊、矽膠、硬脂酸鈉、單硬脂酸甘油酯、滑石粉、氯化鈉、脫脂奶粉、甘油、丙二醇、水、乙醇。本發明組合物(若期望)亦可含有極少量之潤濕劑或乳化劑或pH緩衝劑。

在一實施例中，根據常規程序將結合物調配為適於靜脈內投與動物、尤其人類之醫藥組合物。通常，用於靜脈內投與之載劑或媒劑係無菌等滲緩衝劑水溶液。在需要之情形下，組合物亦可包含增溶劑。用於靜脈內投與之組合物可視情況包括局部麻醉劑，例如減輕注射位點處之疼痛之利多卡因(lignocaine)。通常，各成分可分開供應或以單位劑型混合至一起，例如作為於指示活性劑之量之氣密性密封容器(例如安瓿或小藥囊)中之乾燥凍乾粉劑或無水濃縮物。在結合物擬藉由輸注來投與之情形下，可(例如)使用含有無菌醫藥級水或鹽水之輸注瓶來分配該結合物。在結合物藉由注射來投與之情形下，可提供含有注射用無菌水或鹽水之安瓿，從而可在投與之前混合各成分。

通常將醫藥組合物調配為無菌、實質上等滲且完全符合美國食品藥物管理局(U.S. Food and Drug Administration)之所有良好製造實踐(Good Manufacturing Practice, GMP)規範。

經正交保護之抗體-藥物結合物連接體

本發明提供經「正交」保護(亦即經保護以容許在連接藥物單元時選

論述，藥物單元可包含可選連接基團 L^1 及 L^2 。

在式Ib、IIb、IIIb及IVb之一些實施例中，
T係具有末端馬來醯亞胺基部分之系鏈基團。

在式Ib、IIb、IIIb及IVb之一些實施例中，
Q¹係包括第一半胱胺酸部分或其類似物之第一連接基團；
Q²係包括第二半胱胺酸部分或其類似物之第二連接基團；
P¹係第一硫醇保護基團；且

P²係第二硫醇保護基團，且P¹與P²不同。

保護基團(P¹及P²)

連接體組裝單元之「正交」去保護(亦即選擇性去保護)容許合成具有特定期望比率之藥物及將此期望比率之藥物一致地遞送至靶位點之機制的連接體組裝單元。因此，保護基團(P¹及P²)係可連接至連接單元(Q¹及Q²)之選擇性可去除單元。為進行「正交」去保護，P¹及P²之屬性不同。

在一些實施例中，P¹及P²係硫醇保護基團。在一些實施例中，P¹係選自由以下組成之群：-S-異丙基(SiPr)、-S-第三丁基(StBu)及-S-甲基(SMe)；且P²係-CH₂NH-C(O)CH₃ (乙醯胺基甲基)。

在一些實施例中，經正交保護之ADC-連接體係由式Ib、IIb、IIIb或IVb代表，且T係MDPr-Val-Cit-；P¹係選自由以下組成之群：-S-異丙基(SiPr)、-S-第三丁基(StBu)及-S-甲基(SMe)；且P²係-CH₂NH-C(O)CH₃ (乙醯胺基甲基)。

在一些實施例中，經正交保護之ADC-連接體係由式Ib、IIb、IIIb或IVb代表，且X係選自由甘胺酸及丙胺酸組成之群；T係MDPr-Val-Cit-；P¹係選自由以下組成之群：-S-異丙基(SiPr)、-S-第三丁基(StBu)及-S-甲

基(SMe)；且P²係-CH₂NH-C(O)CH₃ (乙醯胺基甲基)。

在一些實施例中，經正交保護之ADC-連接體係由式Ib、IIb、IIIb或IVb代表，且T係MDPr-Val-Cit-；Q¹及Q²各自係半胱胺酸；X係甘胺酸；P¹係選自由以下組成之群：-S-異丙基(SiPr)、-S-第三丁基(StBu)及-S-甲基(SMe)；且P²係-CH₂NH-C(O)CH₃ (乙醯胺基甲基)。

在一些實施例中，經正交保護之ADC-連接體係由式Ib、IIb、IIIb或IVb代表，且T係MDPr-Val-Cit-；Q¹及Q²各自係半胱胺酸；X係甘胺酸；P¹係選自由以下組成之群：-S-異丙基(SiPr)、-S-第三丁基(StBu)及-S-甲基(SMe)；P²係-CH₂NH-C(O)CH₃ (乙醯胺基甲基)；下標n為1且Y包括PEG或環糊精基團。

實例

除非另有所述，否則所有溶劑及試劑皆係以最高可能純度購自商業來源且並不在使用之前另外純化。無水二甲基甲醯胺(DMF)及CH₂Cl₂係購自Aldrich。經Fmoc保護之胺基酸及2-Cl-三苯甲基氯樹脂(取代，1 mmol/g，200-300網目，1% DVB)係購自Novabiochem。經Fmoc保護之胺基-dPEG₂₄-COOH係購自Quanta Biodesign。MDPr係如先前所闡述製得。^[1]馬來醯亞胺基己醯基-MMAF (1)、馬來醯亞胺基己醯基-Val-Cit-PABC-MMAF (2)及馬來醯亞胺基己醯基-Val-Cit-PABC-MMAE (3)係如先前所闡述來合成。^[2] ^[3]在裝配有具有fritware PE中級多孔板之截止濾波器(Scienceware)之塑膠注射器(National Scientific Company)上實施固相合成。在界接配備有Acquity UPLC BEH C18 2.1 × 50 mm, 1.7μm反相管柱之Waters Acquity H-Class Ultra Performance LC之Waters Xevo G2 ToF質譜儀上實施小分子LC-MS。酸性移動相(0.1%甲酸)係由3%乙腈

盪5 min，然後添加額外DIPEA (0.225 mmol, 1.0 當量)，且將器皿再振盪30 min。藉由添加MeOH (1.0 mL)來將未反應樹脂驟冷5 min。然後使用DMF (5 × 5 mL)、CH₂Cl₂ (5 × 5 mL)、二乙醚(5 × 5 mL)洗滌樹脂並在真空中乾燥。

Fmoc去除程序：使用於DMF (5 × 3 mL)中之20%六氫吡啶處理含有經Fmoc保護肽之樹脂總共30 min。然後使用DMF (5 × 5 mL)洗滌樹脂，隨後進一步處理。

標準偶合程序：向去保護樹脂中添加於DMF (5 mL)中之N-末端胺基酸(1當量)、含有Fmoc-胺基酸或馬來醯亞胺基酸之溶液(3當量)、HATU (3當量)及DIPEA (6當量)。將反應器皿振盪1 hr。然後使用DMF (5 × 5 mL)洗滌樹脂。藉由添加含有Fmoc-Cys (4當量)、羥基苯并三唑(HOBT) (4當量)及N,N'-二異丙基碳化二亞胺(DIC) (4當量)之溶液來偶合Fmoc-Cys胺基酸(1當量)。

自樹脂之裂解：在5 mL塑膠注射器中，向乾燥樹脂中添加10%三氟乙酸(TFA)於CH₂Cl₂中之2 mL溶液(亦含有2.5% H₂O及2.5%三異丙基矽烷)。在1 min之後，將反應混合物轉移至20 mL硼矽酸鹽玻璃閃爍小瓶中。將此程序重複三次。在N₂流下乾燥裂解溶液，使用0.5 mL二乙醚洗滌3次，然後在真空中乾燥。粗產物隨後未經純化即使用或藉由反相HPLC使用上述程序純化。

藥物載體表徵：

馬來醯亞胺基己醯基-Cys(Acm)：

預期確切質量：385.13；觀察m/z：384.3 (M+H)⁺，LC-MS t_R = 0.66 min。據判斷，粗產物 > 95%純且隨後未經純化即用於抗體結合。

藉由以下方式如先前所闡述來製備ADC：還原抗體鏈間二硫化物，隨後添加25-100%過量之馬來醯亞胺。^[5]藉由向抗體溶液(1-10 mg/mL，於PBS中，pH 7.4)中添加12當量之參(2-羧基乙基)-膦(TCEP)來完全還原每一抗體之8個硫醇。藉由反相LC-MS監測抗體還原程度且視需要添加額外TCEP以完成反應。然後藉由超濾去除TCEP (3×，10倍稀釋至含有1 mM EDTA之pH 7.4 PBS中，在4000 × g下經由30-kDa MWCO過濾器離心)。使PBS-EDTA中之完全還原之抗體與10-16莫耳當量(25-100%過量)之藥物-連接體或藥物-載體(以10 mM DMSO儲備液形式)結合。將所得溶液渦旋並在室溫下保持10-20分鐘。藉由反相LC-MS如上文所闡述來評價結合程度，且視需要添加額外藥物-連接體或藥物-載體。在所有可用Cys硫醇皆發生烷基化後，立即藉由緩衝液交換在PBS下使用Nap-5去鹽管柱(GE Healthcare)或經由3-5輪超濾來純化粗製ADC溶液。以分光光度方式來測定最終ADC濃度。

mc-Cys(Acm) 之結合及試驗性去保護：

向PBS-EDTA中之經完全還原之cAC10抗體中添加10當量來自100 mM DMSO儲備液之mc-Cys(Acm)。將所得溶液渦旋並在室溫下保持15 min。此時，反相LC-MS指示抗體硫醇已完全烷基化且並不損失Acm保護基團之保真度。藉由超濾根據上述程序來純化結合物，且結合物之層析及質譜表徵展示於圖1A中。然後使具有8個載體/抗體之所得結合物cAC10-mc-Cys(Acm)經受去保護條件。向pH 7.4 PBS中之結合物中添加50當量乙酸汞(Hg(OAc)₂)水溶液(以10 mM儲備液形式)。將反應混合物在室溫下培育45 min。向反應混合物中添加Quadrasil MP樹脂之水性漿液(Sigma Aldrich, 0.025 mmol/g硫醇之容量，將1當量樹脂添加至1當量乙酸汞

中)，且將混合物劇烈渦旋15 min。此時，將混合物在 $13,200 \times g$ 下離心2 min並去除上清液。向上清液中添加10-20當量N-乙基馬來醯亞胺(NEM)以封端所釋放半胱胺酸硫醇。藉由LC-MS觀察修飾程度。如**圖1B**中所展示，產生所有8個Acm基團皆已去除且每一所釋放硫醇經NEM封端之結合物。

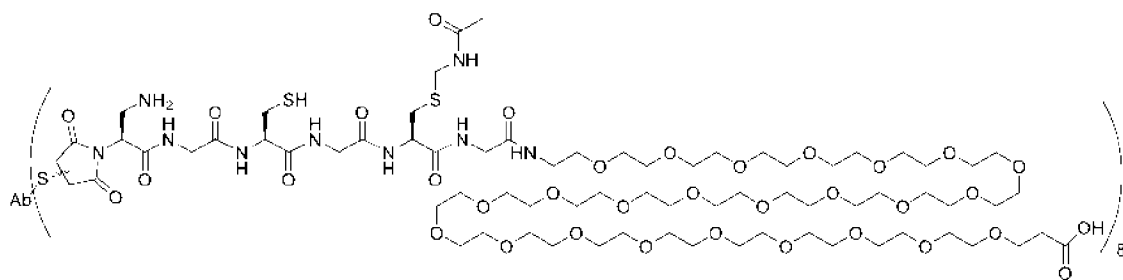
實例3：用於雙重修飾性抗體結合物之一般程序。

載體4結合物：向PBS-EDTA中之經完全還原之cAC10抗體中添加16當量來自10 mM DMSO儲備液之載體4。將所得溶液渦旋並在室溫下保持15 min。此時，反相LC-MS指示抗體硫醇已完全烷基化且並不損失Acm保護基團之保真度。藉由超濾根據上述程序來純化結合物。

Cys(SiPr)之去保護：向cAC10-4 (8個載體/抗體)中添加10-12當量之TCEP。將反應混合物在 37°C 下培育45 min，此時反相LC-MS指示已完成還原(藉由評估去捲積輕鏈及重鏈質量，實例可參見**圖2**)。在完成反應後，藉由3輪超濾在PBS-EDTA中如上文所闡述來去除過量TCEP及所釋放異丙基硫醇。

第一結合：向經完全還原之cAC10-4中添加50%莫耳過量之來自10 mM DMSO儲備液之馬來醯亞胺藥物-連接體。將所得溶液渦旋並在室溫下保持15 min。此時，使用反相LC-MS判斷反應進展，且視需要添加額外藥物-連接體或NEM直至所有硫醇已烷基化為止。藉由凝膠過濾或超濾根據上述程序來純化結合物。

Acm去保護：向含有cAC10-4-藥物/NEM之溶液中添加50當量之 $\text{Hg}(\text{OAc})_2$ 水溶液。將所得溶液渦旋並在室溫下保持45 min。向反應混合物中添加Quadrasil MP樹脂之水性漿液(0.025 mmol/g硫醇容量，將1當量

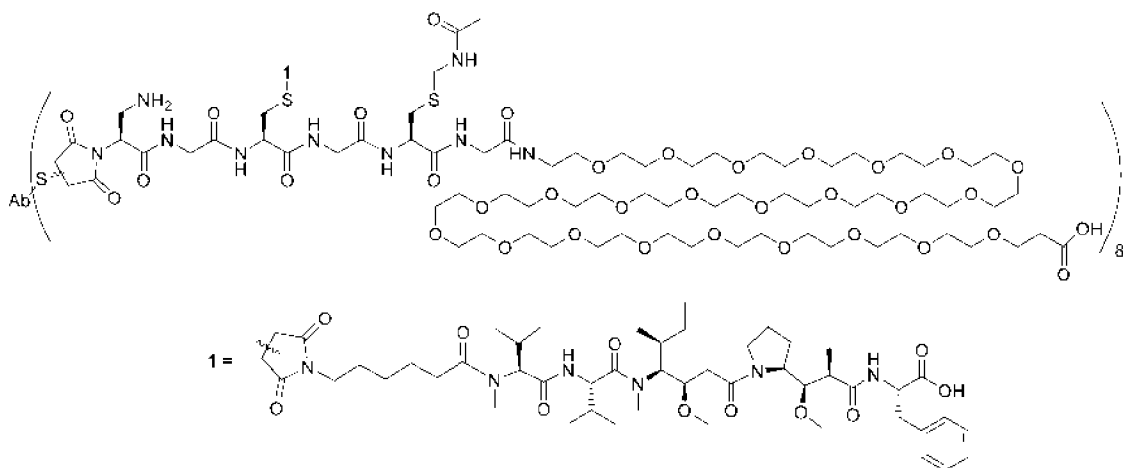


輕鏈： $t_R = 1.38$ min；預計質量：25503，觀察值：25504

重鏈： $t_R = 2.34$ min；預計質量：55658 (重鏈- 3 -SiPr)，觀察值：

55659

cAC10-4-1：

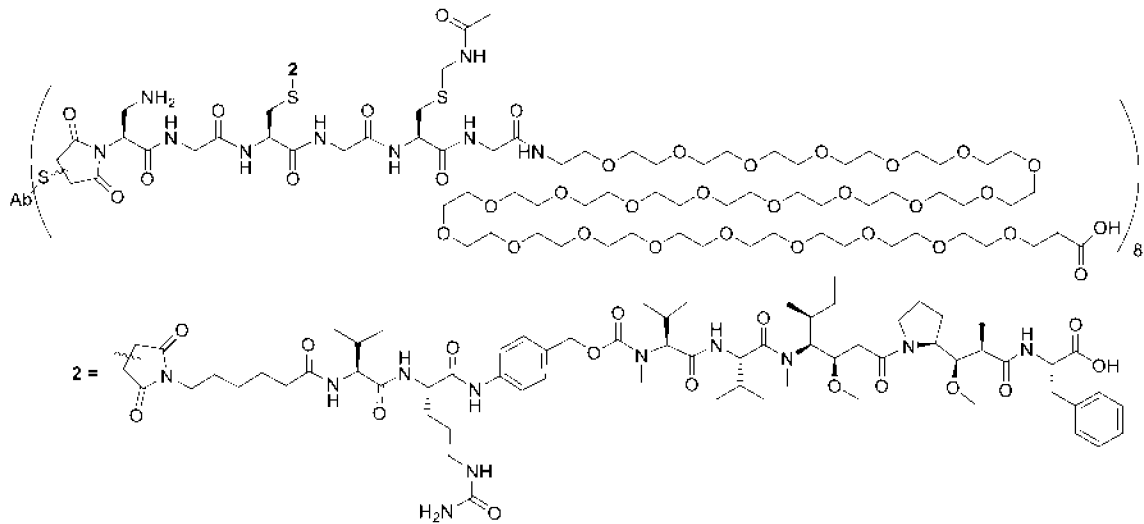


輕鏈： $t_R = 1.28$ min；預計質量：26429，觀察值：26427

重鏈： $t_R = 1.84$ min；預計質量：58434 (重鏈+3個藥物)，觀察值：

58430

cAC10-4-2：

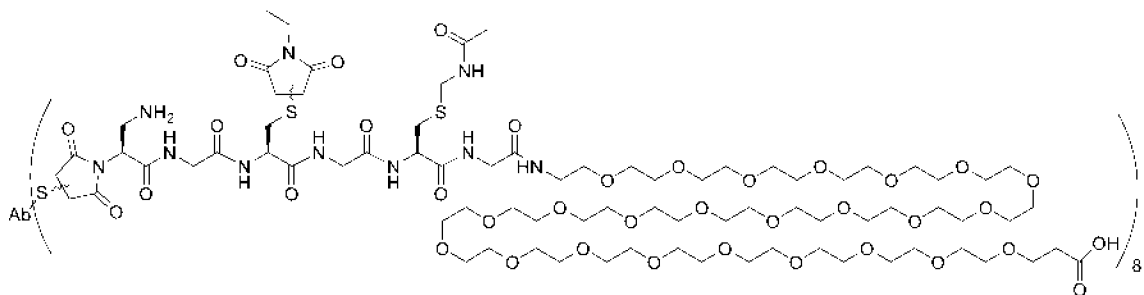


輕鏈： $t_R = 1.49$ min；預計質量：26834，觀察值：26382

重鏈： $t_R = 2.09$ min；預計質量：59651 (重鏈+3個藥物)，觀察值：

59646

cAC10-4-NEM：

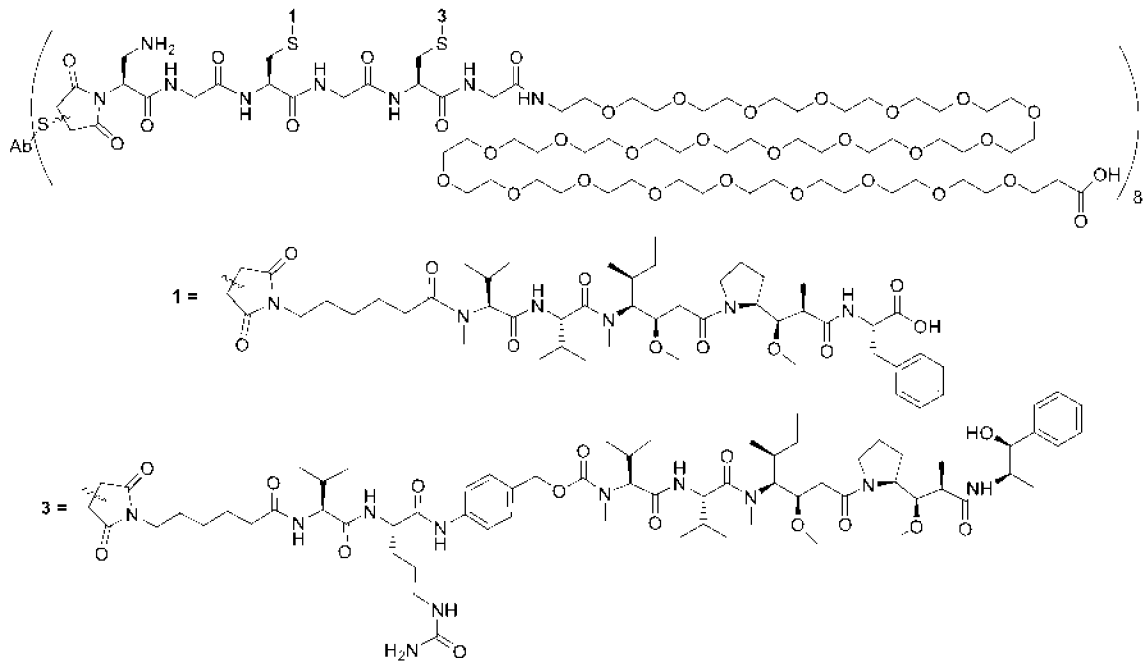


輕鏈： $t_R = 0.98$ min；預計質量：25629，觀察值：25627

重鏈： $t_R = 1.38$ min；預計質量：56034 (重鏈+3 NEM)，觀察值：

56031

cAC10-4-1-3：



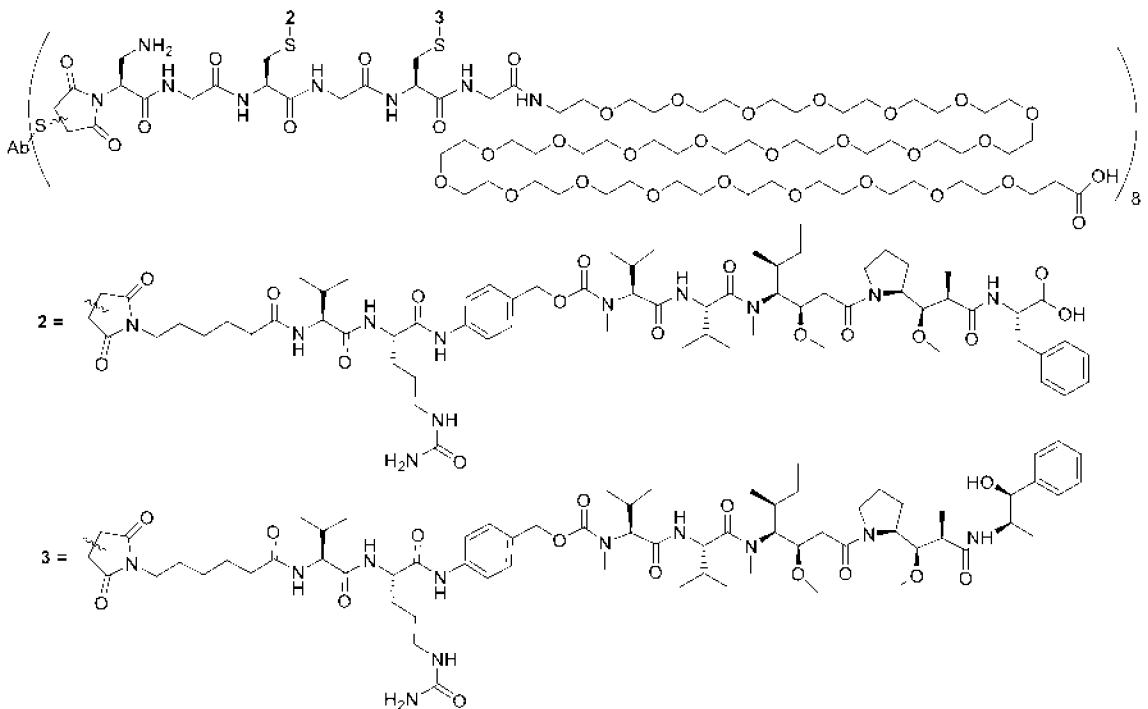
輕鏈： $t_R = 1.83$ min；預計質量：27675，觀察值：27673

重鏈： $t_R = 2.56$ min；預計質量：62172 (重鏈+3個藥物)，觀察值：

62170

SEC $t_R = 6.77$ min, 98.0%單體

cAC10-4-2-3：



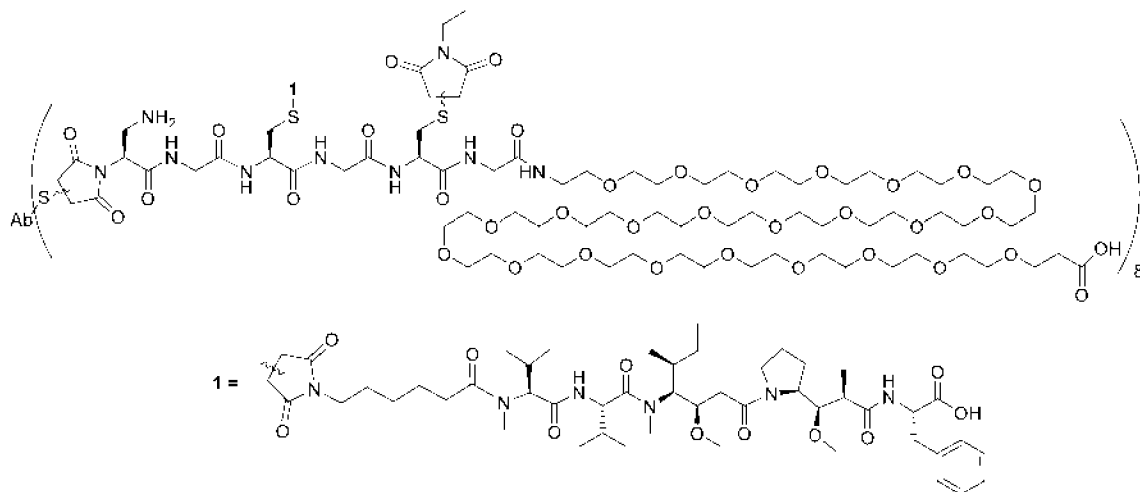
輕鏈： $t_R = 2.04$ min；預計質量：28080，觀察值：28081

重鏈： $t_R = 2.76$ min；預計質量：63389 (重鏈+3個藥物)，觀察值：

63389

SEC $t_R = 6.69$ min, 95.0 %單體

cAC10-4-1-NEM：



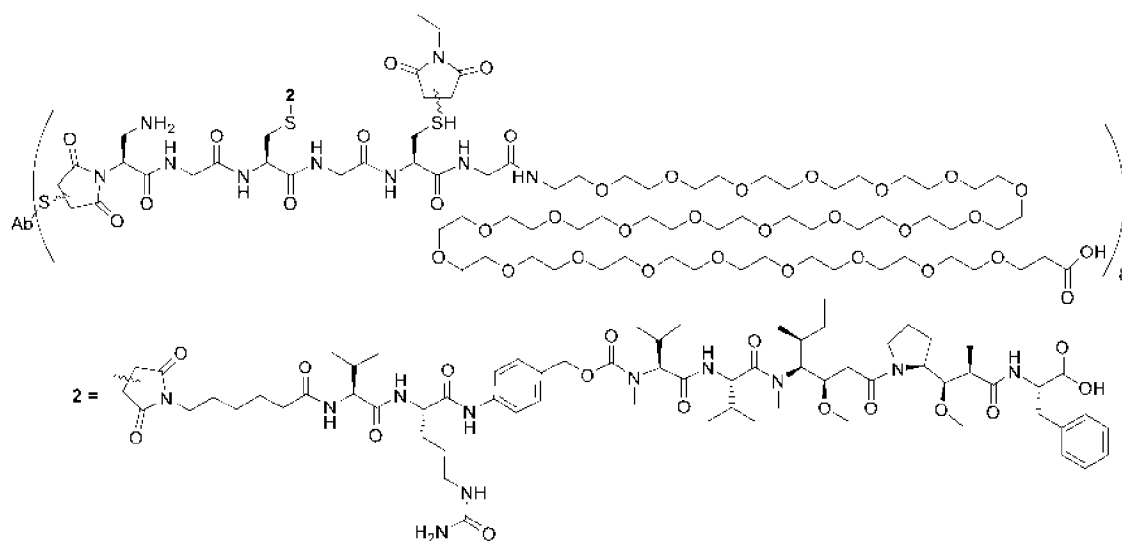
輕鏈： $t_R = 1.33$ min；預計質量：26483，觀察值：26482

重鏈： $t_R = 1.90$ min；預計質量：58596 (重鏈+3 NEM)，觀察值：

58598

SEC $t_R = 6.91$ min, 97.5%單體

cAC10-4-2-NEM：



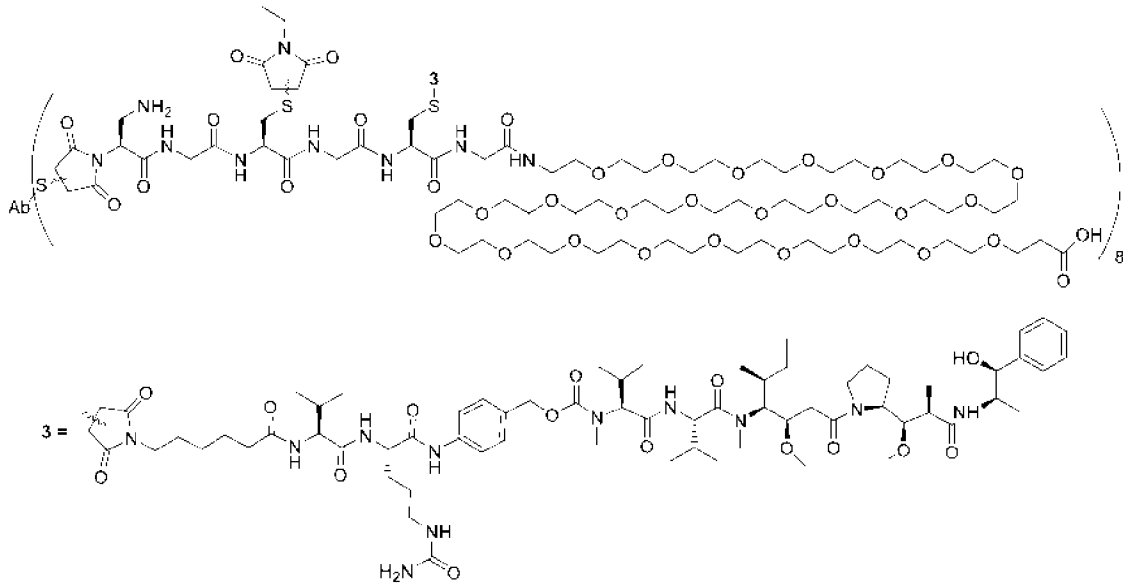
輕鏈： $t_R = 1.53$ min；預計質量：26888，觀察值：26889

重鏈： $t_R = 2.14$ min；預計質量：59813 (重鏈+3 NEM)，觀察值：

59815

SEC $t_R = 6.74$ min, 97.4%單體

cAC10-4-NEM-3：



輕鏈： $t_R = 1.55$ min；預計質量：26875，觀察值：26875

重鏈： $t_R = 2.19$ min；預計質量：59772 (重鏈+3個藥物)，觀察值：

59772

SEC $t_R = 7.03$ min, 97.8%單體

實例4：細胞結合分析

藉由流式細胞術在CD30(+) L540cy何傑金氏淋巴瘤細胞上評價抗體或ADC至細胞表面CD30之結合。將細胞(2×10^5)與每一抗體治療劑之4倍連續稀釋液以100 (L之總體積組合於流動緩衝液(PBS, 2%胎牛血清, 0.2% NaN_3)中。將細胞在冰上培育30 min，且然後使用冰冷流動緩衝液洗滌兩次。此時，以推薦稀釋度及100 μL 流動緩衝液之總體積添加經FITC標記之山羊抗人類Fc二級抗體(109-095-098, Jackson ImmunoResearch)。將細胞在冰上培育30 min，且然後使用冰冷流動緩衝

液洗滌兩次。藉由流式細胞術在Attune NxT流式細胞儀(Thermo Fisher Scientific)上檢驗經標記細胞。使用FlowJo軟體分析數據且使用GraphPad Prism 6繪圖。藉由非線性回歸使用單位點結合模型來測定結合常數。結果展示於圖8中。

實例5：活體外細胞毒性實驗

針對以下多個癌細胞系來評價活體外功效：L540cy (何傑金氏淋巴瘤)及DEL及DEL-BVR^[6] (間變性大細胞淋巴瘤)、U-266 (多發性骨髓瘤)。自DSMZ獲得L540cy及DEL且自ATCC獲得U-266。使用Cell Check 16面板(IDEXX Bioresearch)來證實細胞系之真實性。使用來自GenTarget, Inc. (San Diego, CA)之活體內即用慢病毒顆粒來生成穩定表現螢火蟲螢光素酶之U-266細胞。使U-266細胞生長至 1×10^6 個細胞/mL(>90%存活率)並使用慢病毒顆粒在RPMI 1640培養基+ 10% FBS中轉導72小時。在新黴素(neomycin)中選擇細胞且藉由在96孔板中稀釋選殖來產生穩定純系。使用Bright-Glo螢光素酶分析系統(Promega)使用EnVision Multilabel讀板儀(Perkin Elmer)來選擇穩定U-266luc細胞系。對於所有細胞毒性實驗而言，以對數期生長來培養細胞，然後在含有150 μ L補充有10-20% FBS之RPMI-1640之96孔板中接種24小時。以4 \times 工作濃度來製備連續ADC於細胞培養基中之稀釋液，且將50 μ L每一稀釋液添加至96孔板中。在添加ADC後，將細胞在37 $^{\circ}$ C下培育4天。在96小時之後，藉由CellTiter-Glo (Promega)評價生長抑制且在Envision讀板儀上量測發光。在本文中，將一式三份測得之IC₅₀值定義為產生滴定曲線過程中之半最大生長抑制之濃度。對於活體外旁觀者分析而言，在96孔板中以1:1比率來接種L540cy及螢光素酶(+) U-266細胞(U-266luc)。將測試物品稀釋

液添加至如上文所概述之細胞中。在96小時之後，藉由BrightGlo評價U-2661uc細胞之生長抑制且在Envision讀板儀上量測發光。結果展示於圖9及10中。

實例6：共投與2種ADC與在1種ADC上共結合2種藥物之對比

以相同總抗體濃度將ADC添加至細胞中且如上文所概述來量測細胞毒性。受體結合之競爭會降低共投與之活性(基於抗體)。在具有低受體拷貝數之細胞系上，該效應可較為明顯。

	細胞系	抗體數	共聚合物 IC ₅₀ (ng/mL)	共投與 IC ₅₀ (ng/mL)	倍數差
CD30 (cAC10)	L540cy	400,000	0.3	1.3	4
	Karpas 299	320,000	0.5	1.5	3
CD19 (hBU12)	SU-DHL-16	10,000	0.2	0.5	2.5
	Granta-519	10,000	3	124.5	41.5

實例7：活體內異種移植實驗

根據機構動物護理與使用委員會(Institutional Animal Care and Use Committee)在由實驗室動物護理認證協會(Association and Accreditation of Laboratory Animal Care)完全認證之設施中來實施所有實驗。使用經皮下植入嚴重合併性免疫缺陷(SCID)小鼠(Harlan, Indianapolis, IN)中之DHL-BVR、Karpas 299或Karpas-35R細胞實施療法實驗。向混合腫瘤模型植入含有2.5百萬個Karpas 299及2.5百萬個Karpas-35R細胞之混合物。¹⁴ 在腫瘤植入後，在平均腫瘤體積達到大約100 mm³時，將小鼠隨機化至研究組中。藉由腹膜腔內注射投用ADC一次。在腫瘤體積達到1000 mm³時，對動物實施安樂死。使用式(體積 = ½ × 長度 × 寬度 × 寬度)來計算腫瘤

則連接至上文所展示之連接組裝單元。

靶向CD19：

細胞系	h1B012 連接組裝單元 Aa 結合物 (IC ₅₀ , ng/mL)				
	組分 Ab (8)	組分 Aa (8)	組分 Ab (8) · 組分 Aa (8)	組分 Ab (16)	組分 Aa (16)
Raji	11.3	8.8	1.6	6.9	2.1
WSU-DLCL2	12.0	13.3	1.3	8.6	1.5

靶向(6)整聯蛋白：

細胞系	h2A2 連接組裝單元 Aa 結合物 (IC ₅₀ , ng/mL)				
	組分 Ab (8)	組分 Aa (8)	組分 Ab (8) · 組分 Aa (8)	組分 Ab (16)	組分 Aa (16)
BxPC3	21.8	24.8	6.6	6.9	10.8
SW780	51.5	3.1	1.8	5.5	1.7

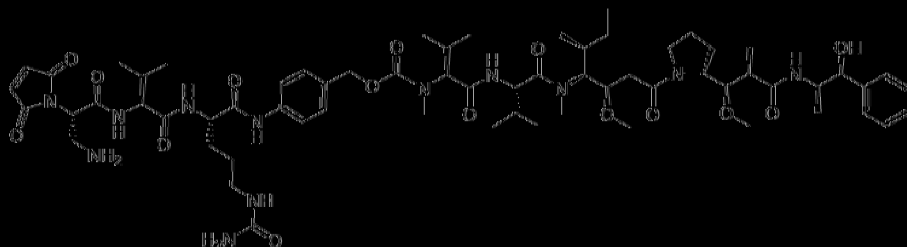
靶向肝癌：

細胞系	h2SG5 連接組裝單元 Aa 結合物 (IC ₅₀ , ng/mL)				
	組分 Ab (8)	組分 Aa (8)	組分 Ab (8) · 組分 Aa (8)	組分 Ab (16)	組分 Aa (16)
JHH-1	> 2000	45.0	16.7	125.9	13.7
Hep3B	45.1	36.4	8.0	40.4	9.4

靶向LIV-1：

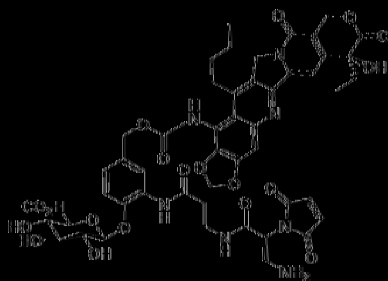
細胞系	hLIV22-連接組裝單抗Aa-結合物(IC ₅₀ , ng/ml)				
	組分Ac (8)	組分Aa (8)	組分Ac (8) 組分Aa (8)	組分Ac (16)	組分Aa (16)
SK- MEL-5	1/3.5	21.6	0.6	2.8	5.5

組分Ac (MDPr-vc-PABC-MMAE)



基於喜樹鹼及蘇派多克(superdox)之共結合物

1. 靶向CD30之MMAE/喜樹鹼結合物



組分Ad：

細胞系	CD30		cAC10-連接組裝單抗Aa-結合物(IC ₅₀ , ng/ml)		
	CD30	MDR	組分Ab (8)	組分Ad (8)	組分Ad (8) 組分Ab (8)
DIEL-BVR	212,000	8,000	> 2000	2.0	4.1
U-2661uc + LS40cy (1:1)	... (400,000)	...	3.9	> 1000	5.2

細胞系	CD19	hBU12-鏈接組裝單抗 Λ a-結合物($\times 50$, ng/ml)				
		組分 Λ a (8)	組分 Λ b (8)	組分 Λ h (8)	組分 Λ a (8)- 組分 Λ b (8)	組分 Λ a (8)-組 分 Λ h (8)
Raji	100k	33	80	97	3	5
RL	27k	4	340	60	1	2
Nalm-6	70k	8	5	9	2	3
WSU- DLCL2	30k	6	10	7	1	2

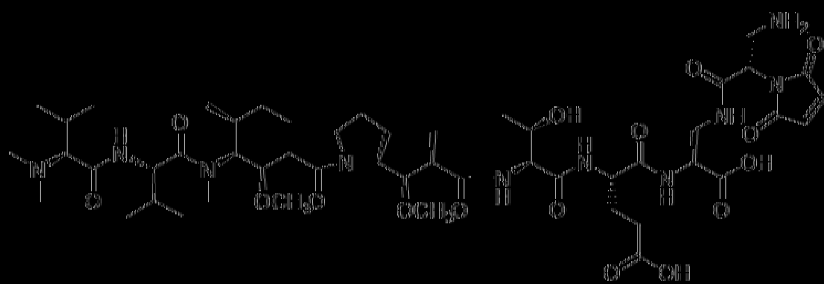
靶向抗原

細胞系	抗體1-鏈接組裝單抗 Λ a-結合物(IC ₅₀ , ng/ml)		
	組分 Λ a (8)	組分 Λ h (8)	組分 Λ a (8)-組分 Λ h(8)
HuH-7	8	> 2000	3
MDA-MB-231	20	1860	11

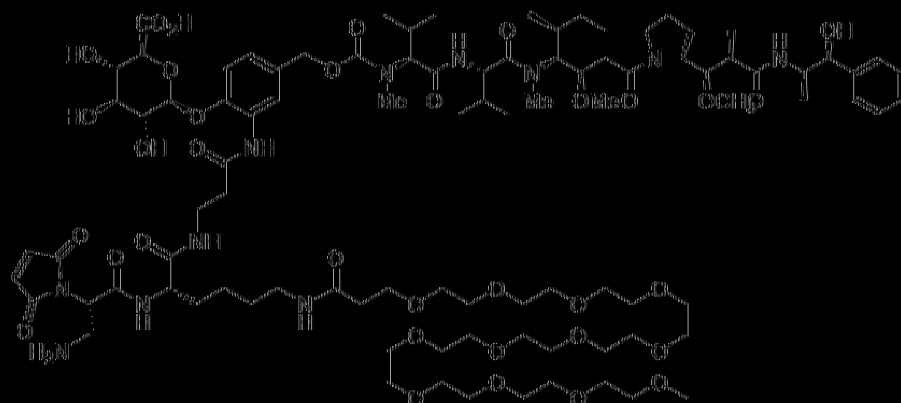
實例9：活體外抗性分析

使用兩個不同分析：長期暴露分析或群落形成分析來評估雙重-奧裡斯他汀ADC是否更有效地限制ADC抗性細胞之過度生長。在HUH-7 (肝癌細胞)或MCF-7 (LIV-1陽性)細胞上使用抗原特异性雙重-奧裡斯他汀ADC來實施此分析。儘管使用Cell Titer Glo細胞增殖分析提供類似於16載量mcMMAF ADC之IC₅₀值，但靶向肝癌細胞之雙重-奧裡斯他汀結合物可更有效地限制抗性細胞之過度生長。靶向MCF-7細胞上之LIV-1抗原之雙重-奧裡斯他汀ADC亦使得抗性群落之過度生長小於單藥物ADC。

長期暴露分析



組分 Ak (MMAE) :



實例12：含有靶向MCF12 (p97)之L49抗體之雙重-奧裡斯他汀ADC之活體外細胞毒性

使用類似於彼等上述方法之方法來測試各種雙重-奧裡斯他汀ADC之活體外細胞毒性活性。結果呈現於下表中。

L49-連接組裝單元Ab (8)-ADCs

細胞系	L49-連接組裝單元Ab 混合物 (IC ₅₀ , ng/ml)							
	組分 Ak (8)	組分 Ak (16)	組分 Aj (8)	組分 Aj (16)	組分 Aa (8)	組分 Aa (16)	組分 Aj (8) 組分 Ak (8)	組分 Aa (8) 組分 Ak (8)
A375	43.9	13.5	7.7	2.4	9.7	2.5	1.3	2.4
ICR37	2.2	0.9	1.5	0.5	2.5	1.5	0.06	0.8
Colo 853	27.4	13.3	5.2	1.6	7.8	5.2	3.5	4.8

參考文獻：

- [1] R. P. Lyon, J. R. Selter, T. D. Bovee, S. O. Doronina, J. H.

Hunter, M. E. Anderson, C. L. Balasubramanian, S. M. Duniho, C. I. Leiske, F. Li, P. D. Senter, *Nat. Biotechnol.* **2014**, *32*, 1059-1062 ◦

[2] S. O. Doronina, B. E. Toki, M. Y. Torgov, B. A. Mendelsohn, C. G. Cerveny, D. F. Chace, R. L. DeBlanc, R. P. Gearing, T. D. Bovee, C. B. Siegall, J. A. Francisco, A. F. Wahl, D. L. Meyer, P. D. Senter, *Nat. Biotechnol.* **2003**, *21*, 778-784 ◦

[3] S. O. Doronina, B. A. Mendelsohn, T. D. Bovee, C. G. Cerveny, S. C. Alley, D. L. Meyer, E. Oflazoglu, B. E. Toki, R. J. Sanderson, R. F. Zabinski, A. F. Wahl, P. D. Senter, *Bioconjug. Chem.* **2006**, *17*, 114-124 ◦

[4] A. F. Wahl, K. Klussman, J. D. Thompson, J. H. Chen, L. V. Francisco, G. Risdon, D. F. Chace, C. B. Siegall, J. A. Francisco, *Cancer Res.* **2002**, *62*, 3736-3742 ◦

[5] R. P. Lyon, D. L. Meyer, J. R. Setter, P. D. Senter, *Methods Enzymol.* **2012**, *502*, 123-138 ◦

[6] T. S. Lewis, K. Gordon, F. Li, A. Weimann, R. Bruders, J. Miyamoto, N. M. Okeley, X. Zhang, D. Chace, C.-L. Law, *Cancer Res.* **2014**, *74*, 688-688 ◦

[7] F. Li, K. K. Emmerton, M. Jonas, X. Zhang, J. B. Miyamoto, J. R. Setter, N. D. Nicholas, N. M. Okeley, R. P. Lyon, D. R. Benjamin, C. L. Law, *Cancer Res.* **2016** ◦

儘管出於清晰性及理解之目的已藉助闡釋及實例相當詳細地闡述了上文，但熟習此項技術者可在隨附申請專利範圍之範圍內實踐某些變化及

<210> SEQ ID NO 3
 <211> LENGTH: 113
 <212> TYPE: PRT
 <213> 生物體：人工
 <220> FEATURE:
 <223> 其他資訊：人類化鼠類序列

<400> SEQUENCE: 3

```

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

```

<210> SEQ ID NO 4
 <211> LENGTH: 112
 <212> TYPE: PRT
 <213> 生物體：人工
 <220> FEATURE:
 <223> 其他資訊：人類化鼠類序列

<400> SEQUENCE: 4

```

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

```

<210> SEQ ID NO 5

<211> LENGTH: 120

<212> TYPE: PRT

<213> 生物體: 人

<220> FEATURE:

<223> 其他資訊: 人類化鼠類序列

<400> SEQUENCE: 5

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

<210> SEQ ID NO 6

<211> LENGTH: 107

<212> TYPE: PRT

<213> 生物體: 人

<220> FEATURE:

<223> 其他資訊: 人類化鼠類序列

<400> SEQUENCE: 6

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

<210> SEQ ID NO 7

<211> LENGTH: 330

<212> TYPE: PRT

<213> 生物體: 智人

<400> SEQUENCE: 7

```
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1          5          10          15
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20          25          30
```

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

<210> SEQ ID NO 8

<211> LENGTH: 106

<212> TYPE: PRT

<213> 生物體：智人

<400> SEQUENCE: 8

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

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

<210> SEQ ID NO 9
 <211> LENGTH: 117
 <212> TYPE: PRT
 <213> 生物體: 人工
 <220> FEATURE:
 <223> 其他資訊: 重鏈可變區

<400> SEQUENCE: 9

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

<210> SEQ ID NO 10
 <211> LENGTH: 111
 <212> TYPE: PRT
 <213> 生物體: 人工
 <220> FEATURE:
 <223> 其他資訊: 輕鏈可變區

<400> SEQUENCE: 10

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

【序列表】

<110> 美商思進公司(SEAGEN INC.)

<120> 多重藥物之抗體藥物結合物

<130> TW 106144020

<150> US 62/434,333

<151> 2016-12-14

<150> JP 2017-115832

<151> 2017-06-13

<160> 10

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 117

<212> PRT

<213> 家鼯鼠

<400> 1

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

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

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

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

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

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

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

Val Thr Val Ser Ala
 115

<210> 2
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> 家鼯鼠

<400> 2

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

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

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

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

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

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

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

<210> 3
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>

<223> 人類化鼠類序列

<400> 3

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

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

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

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

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

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

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

Thr Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 4

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 人類化鼠類序列

<400> 4

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

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

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

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

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

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

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

<210> 5
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> 人工

<220>
 <223> 人類化鼠類序列

<400> 5

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

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

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

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

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

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

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 6
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 人類化鼠類序列

<400> 6

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

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

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

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

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

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

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

<210> 7
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 7

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
225 230 235 240

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

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

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

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

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

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

<210> 8
<211> 106
<212> PRT
<213> 智人

<400> 8

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

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

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

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

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

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

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

<210> 9

<211> 117

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 重鏈可變區

<400> 9

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

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

Tyr Ile Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

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

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

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

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

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 10

<211> 111

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 輕鏈可變區

<400> 10

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys 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 Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
50 55 60

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

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

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

【發明申請專利範圍】

【請求項1】

一種多重藥物之抗體藥物結合物(MD-ADC)，其包括抗體及一或多個共價連接之連接組裝單元(LA)，該一或多個共價連接之連接組裝單元中之每一者具有兩個不同的藥物單元 D^1 及 D^2 連接，其中 D^1 及 D^2 為不同的藥物物質，其中該一或多個共價連接之連接組裝單元中之每一者連接至來自該抗體中經還原的鏈間二硫鍵之半胱胺酸的硫原子，且其中該等共價連接之連接組裝單元中之每一者具有2至4個連接於其上之總藥物單元及可選的分隔劑(Partitioning Agent)(Y)。

【請求項2】

如請求項1之抗體藥物結合物，其包括抗體及8個共價連接之連接組裝單元(LA)，該8個共價連接之連接組裝單元中之每一者具有兩個不同的藥物單元 D^1 及 D^2 連接，其中該8個共價連接之連接組裝單元中之每一者連接至來自該抗體中經還原的鏈間二硫鍵之半胱胺酸的硫原子，且其中該等共價連接之連接組裝單元中之每一者具有2至4個連接於其上之總藥物單元及可選的分隔劑(Partitioning Agent)(Y)，其中該分隔劑(Y)為聚乙二醇(PEG)單元或環糊精單元，其中該抗體選擇性結合至癌細胞抗原，該癌細胞抗原能夠內化其所結合的MD-ADC，其中 D^1 及 D^2 分別係第一抗癌劑及第二抗癌劑，其中該第一抗癌劑對MDR⁺癌細胞具有細胞毒性活性且該第二抗癌劑對附近的抗原陰性癌細胞能具有旁觀者細胞毒性活性，或其中該第一及第二抗癌劑選自由長春花提取物化合物、喜樹鹼(camptothecin)或蔥環細胞毒性化合物所組成之群，從而該第一抗癌劑及第二抗癌劑具有互補活性特徵(profiles)。

【請求項3】

如請求項2之抗體藥物結合物，其中該第一抗癌劑或該第二抗癌劑選自由以下所組成之群：MMAE、喜樹鹼、蘇派多克(Superdox)、尾海兔素(Dolastatin)10、長春鹼(Vinblastine)及環丙沙星(Ciprofloxacin)。

【請求項4】

如請求項1之抗體藥物結合物，其中D¹及D²係來自於選自由以下所組成之群的藥物對：MMAE/MMAF、MMAE/喜樹鹼、蘇派多克/喜樹鹼、蘇派多克/MMAE、尾海兔素10/MMAE、尾海兔素10/MMAF、長春鹼/MMAE及長春鹼/MMAF。

【請求項5】

如請求項2之抗體藥物結合物，其中對MDR⁺癌細胞具有旁觀者細胞毒性活性的該第一抗癌劑及對MDR⁺癌細胞具有細胞毒性活性的該第二抗癌劑分別係MMAE及MMAF。

【請求項6】

如請求項2之抗體藥物結合物，其中該第一抗癌劑及該第二抗癌劑係喜樹鹼及多柔比星(doxorubicin)。

【請求項7】

如請求項1之抗體藥物結合物，其中該連接組裝單元進一步包括分隔劑。

【請求項8】

如請求項7之抗體藥物結合物，其中該分隔劑係聚乙二醇單元。

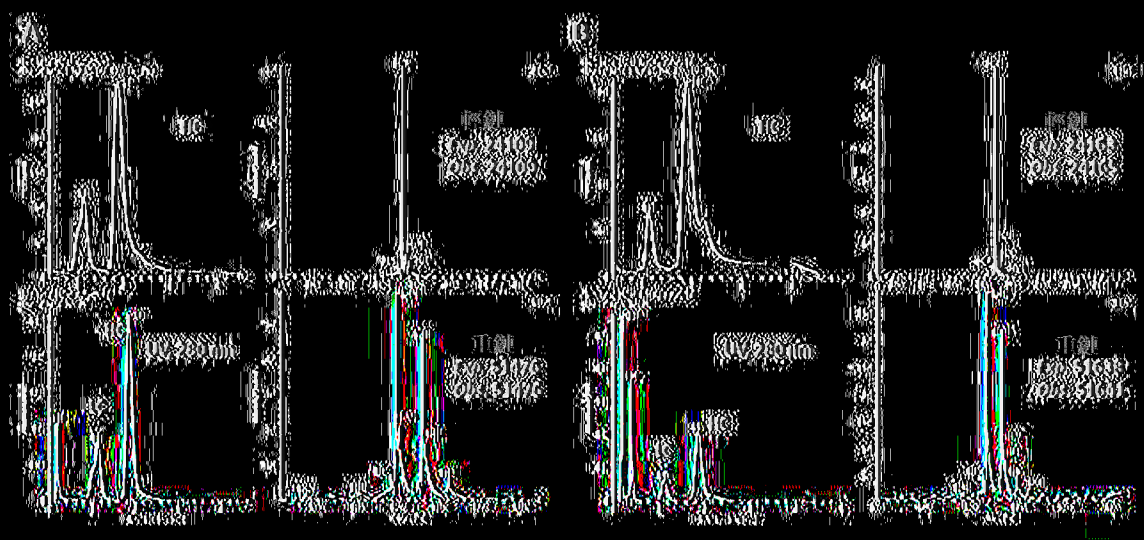
【請求項9】

如請求項7之抗體藥物結合物，其中該分隔劑係環糊精單元。

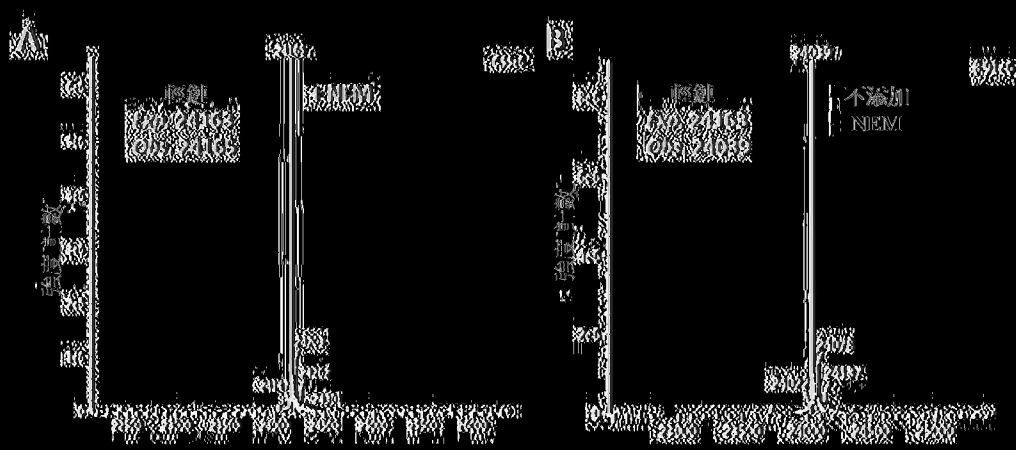
【請求項10】

如請求項1之抗體藥物結合物，其中該等共價連接之LA單元中之每一者具有總共三個連接至其之D¹及D²，其中D¹對D²之莫耳比為2:1。

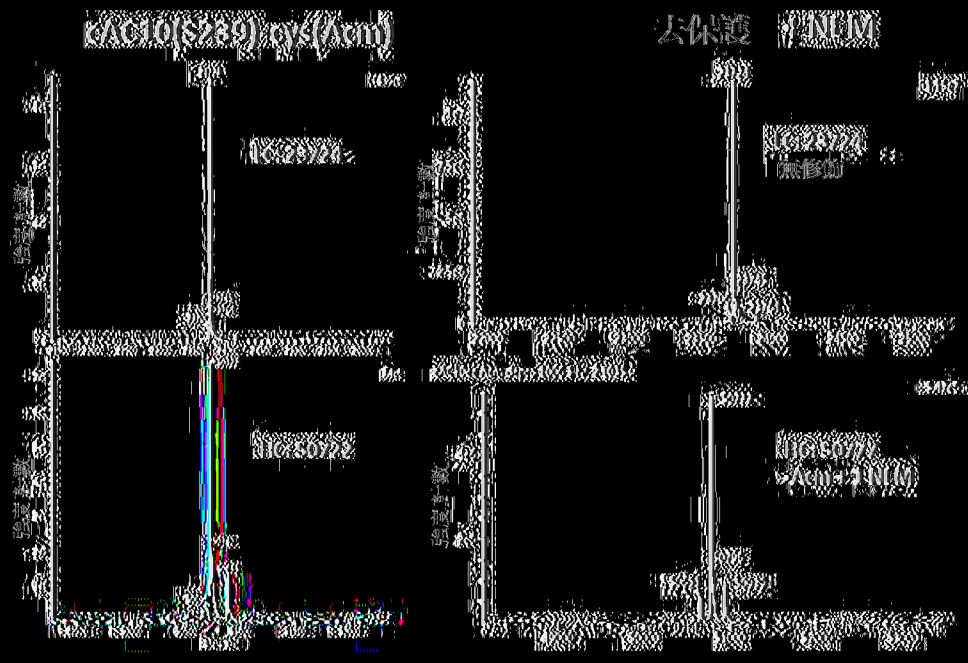
(發明圖式)



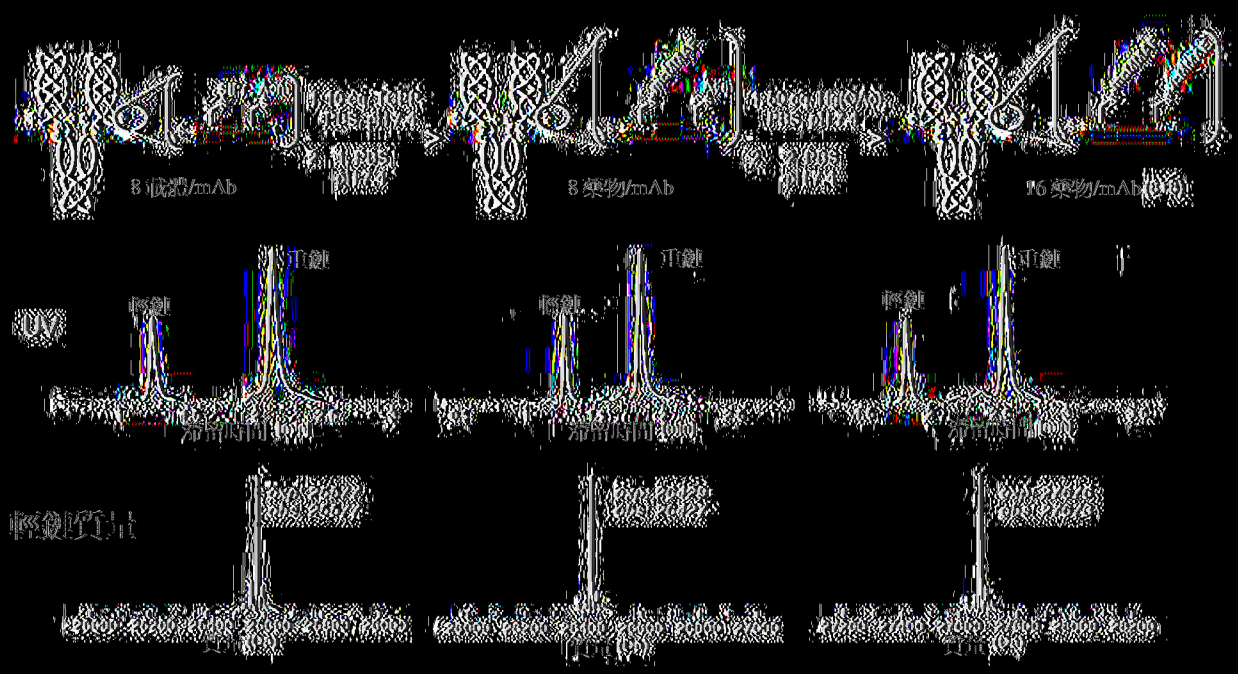
(圖1)



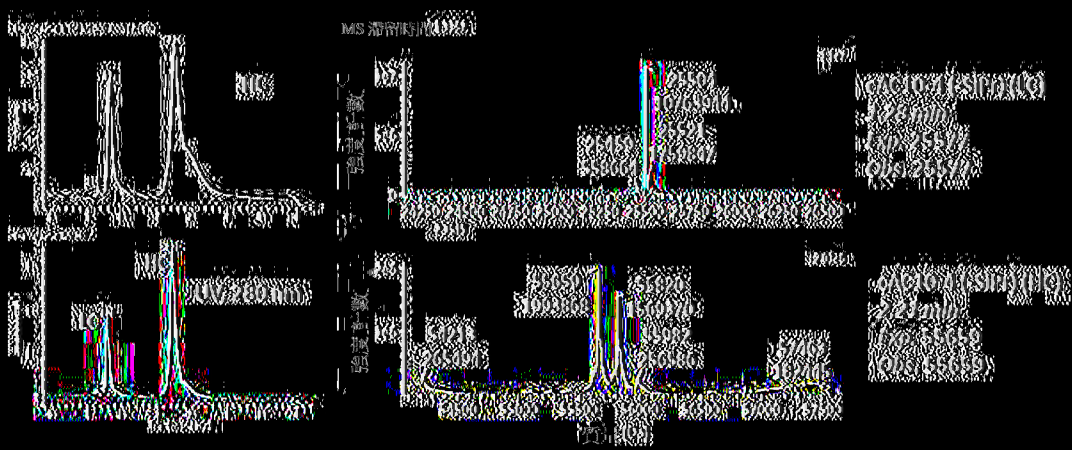
(圖2)



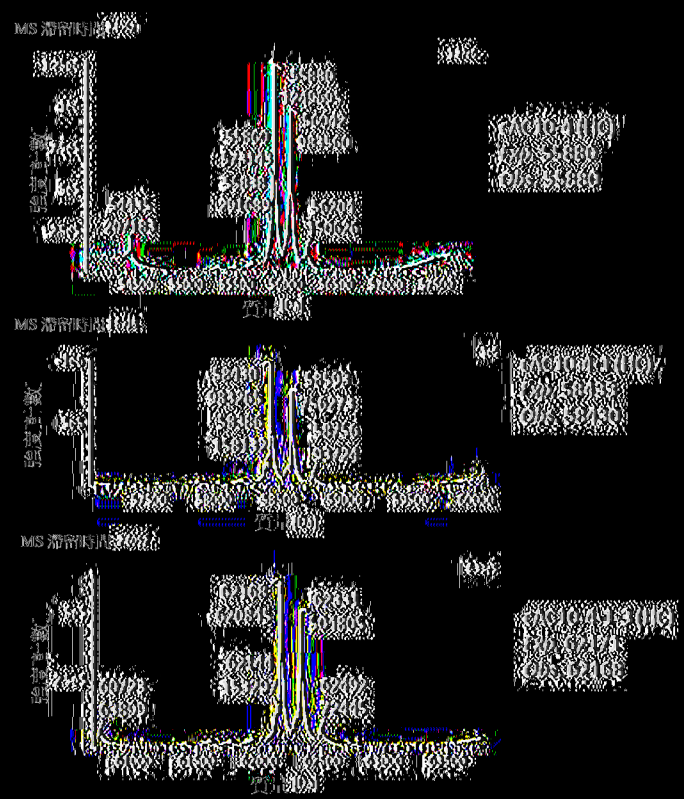
(圖3)



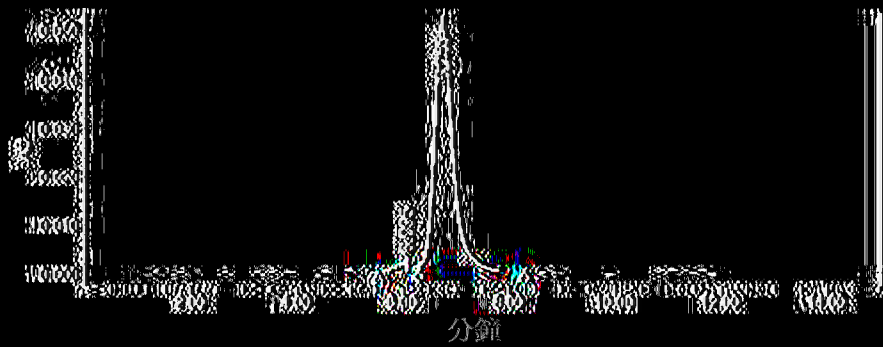
(圖4)



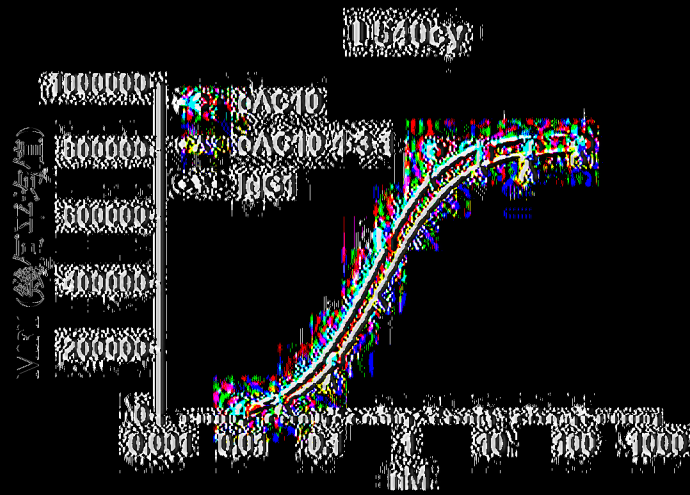
(圖5)



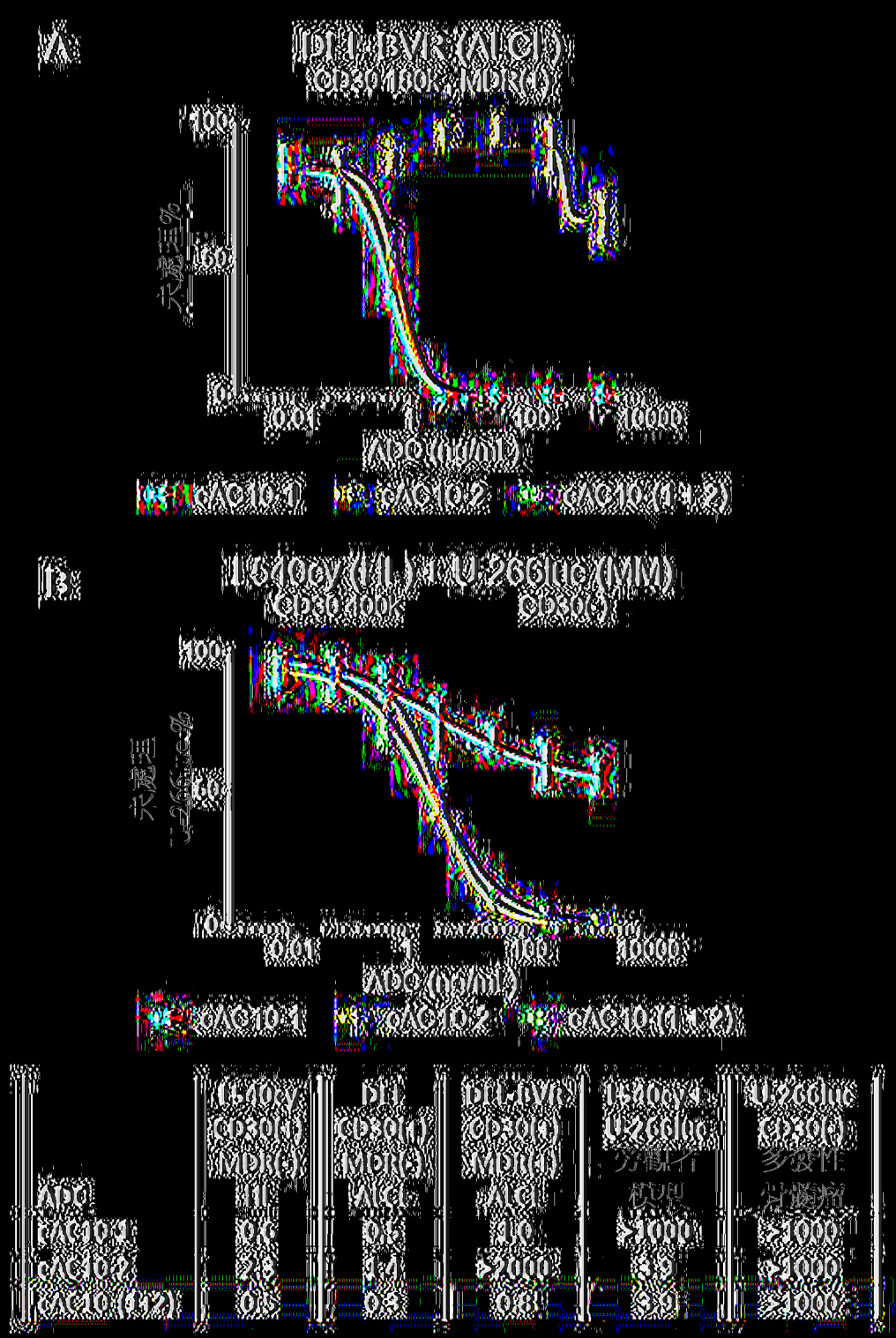
(圖6)



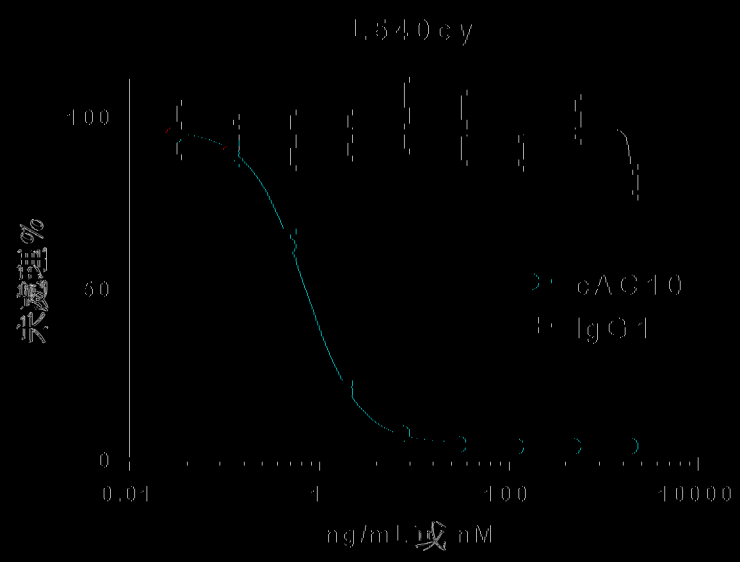
(圖7)



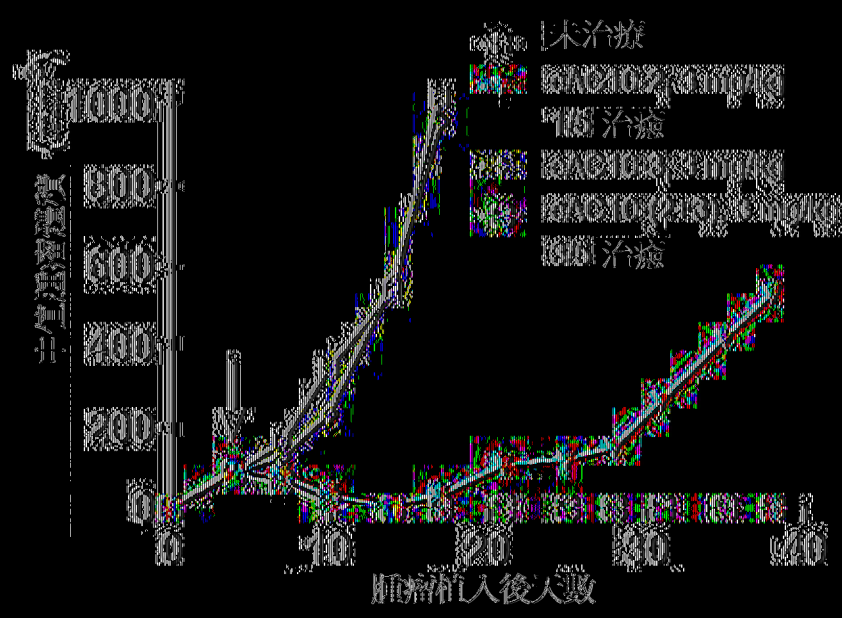
(圖8)



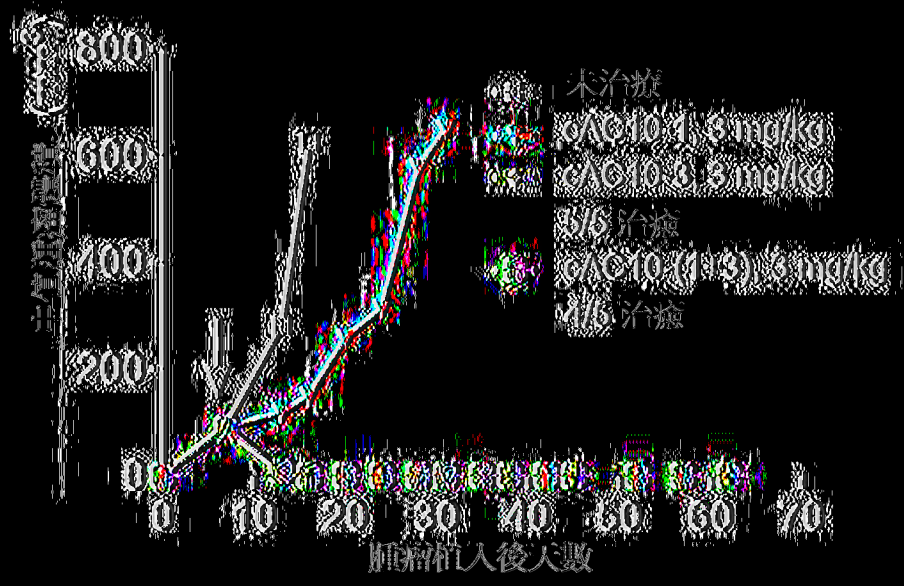
(圖9)



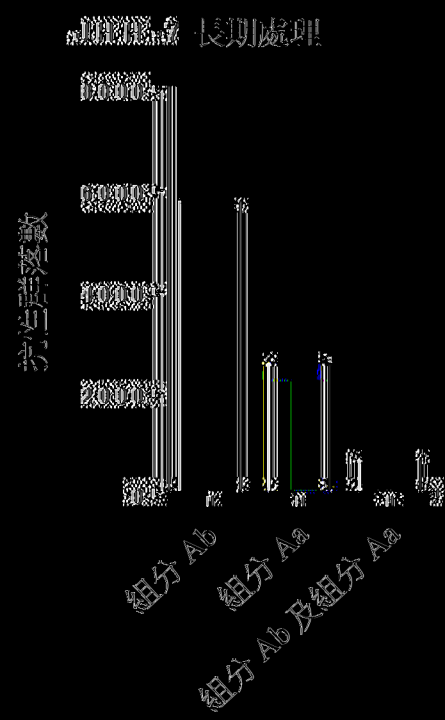
[(圖 10)]



[(圖 11)]

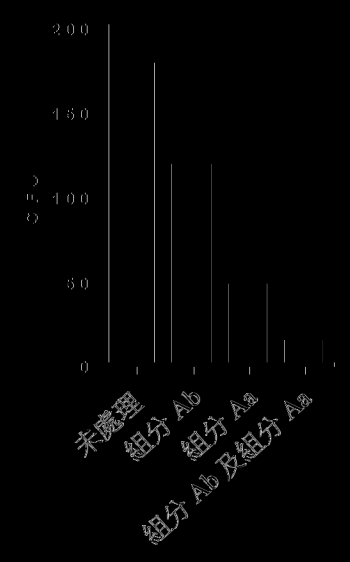


[圖 12]



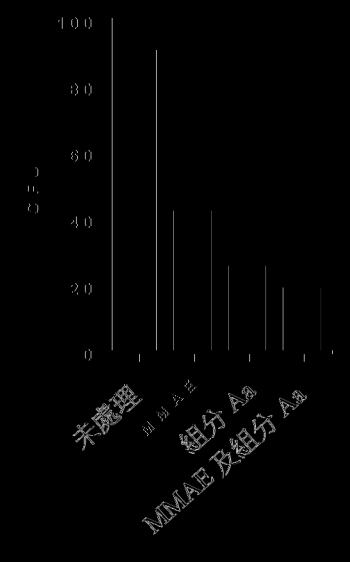
[圖 13]

JDCDF... / 群聚
形成分析



[(圖 14)]

MCF... / 群聚
形成分析



[(圖 15)]

【發明申請專利範圍】

【請求項1】

一種多重藥物之抗體藥物結合物(MD-ADC)，其包括抗體及一或多個共價連接之連接組裝單元(LA)，該一或多個共價連接之連接組裝單元中之每一者具有兩個不同的藥物單元 D^1 及 D^2 連接，其中 D^1 及 D^2 為不同的藥物物質，其中該一或多個共價連接之連接組裝單元中之每一者連接至來自該抗體中經還原的鏈間二硫鍵之半胱胺酸的硫原子，且其中該等共價連接之連接組裝單元中之每一者具有2至4個連接於其上之總藥物單元及可選的分隔劑(Partitioning Agent)(Y)。

【請求項2】

如請求項1之抗體藥物結合物，其包括抗體及8個共價連接之連接組裝單元(LA)，該8個共價連接之連接組裝單元中之每一者具有兩個不同的藥物單元 D^1 及 D^2 連接，其中該8個共價連接之連接組裝單元中之每一者連接至來自該抗體中經還原的鏈間二硫鍵之半胱胺酸的硫原子，且其中該等共價連接之連接組裝單元中之每一者具有2至4個連接於其上之總藥物單元及可選的分隔劑(Partitioning Agent)(Y)，其中該分隔劑(Y)為聚乙二醇(PEG)單元或環糊精單元，其中該抗體選擇性結合至癌細胞抗原，該癌細胞抗原能夠內化其所結合的MD-ADC，其中 D^1 及 D^2 分別係第一抗癌劑及第二抗癌劑，其中該第一抗癌劑對MDR⁺癌細胞具有細胞毒性活性且該第二抗癌劑對附近的抗原陰性癌細胞能具有旁觀者細胞毒性活性，或其中該第一及第二抗癌劑選自由長春花提取物化合物、喜樹鹼(camptothecin)或蔥環細胞毒性化合物所組成之群，從而該第一抗癌劑及第二抗癌劑具有互補活性特徵(profiles)。

【請求項3】

如請求項2之抗體藥物結合物，其中該第一抗癌劑或該第二抗癌劑選自由以下所組成之群：MMAE、喜樹鹼、蘇派多克(Superdox)、尾海兔素(Dolastatin)10、長春鹼(Vinblastine)及環丙沙星(Ciprofloxacin)。

【請求項4】

如請求項1之抗體藥物結合物，其中D¹及D²係來自於選自由以下所組成之群的藥物對：MMAE/MMAF、MMAE/喜樹鹼、蘇派多克/喜樹鹼、蘇派多克/MMAE、尾海兔素10/MMAE、尾海兔素10/MMAF、長春鹼/MMAE及長春鹼/MMAF。

【請求項5】

如請求項2之抗體藥物結合物，其中對MDR⁺癌細胞具有旁觀者細胞毒性活性的該第一抗癌劑及對MDR⁺癌細胞具有細胞毒性活性的該第二抗癌劑分別係MMAE及MMAF。

【請求項6】

如請求項2之抗體藥物結合物，其中該第一抗癌劑及該第二抗癌劑係喜樹鹼及多柔比星(doxorubicin)。

【請求項7】

如請求項1之抗體藥物結合物，其中該連接組裝單元進一步包括分隔劑。

【請求項8】

如請求項7之抗體藥物結合物，其中該分隔劑係聚乙二醇單元。

【請求項9】

如請求項7之抗體藥物結合物，其中該分隔劑係環糊精單元。

【請求項10】

一種如說明書中所述的發明。