



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 120189526 A

(43) 申请公布日 2025. 06. 24

(21) 申请号 202510341677.X

(22) 申请日 2019.12.12

(30) 优先权数据

62/779,400 2018.12.13 US

62/779,406 2018.12.13 US

62/941,220 2019.11.27 US

(62) 分案原申请数据

201980081875.X 2019.12.12

(71) 申请人 卫材R&D管理有限公司

地址 日本东京都

(72) 发明人 N·菲什金 T·萨马拉科恩

J·帕拉西诺 K·新井 Y·小竹

大久保真也 村井则夫 宫野雅之

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所

11256

专利代理师 杨宏军

(51) Int.Cl.

A61K 47/68 (2017.01)

A61K 31/351 (2006.01)

A61K 31/4025 (2006.01)

A61K 31/496 (2006.01)

A61K 31/551 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

权利要求书4页 说明书222页

序列表(电子公布) 附图6页

(54) 发明名称

荷伯希二烯抗体-药物缀合物及使用方法

(57) 摘要

本申请涉及荷伯希二烯抗体-药物缀合物及使用方法。本披露涉及结合至人类肿瘤学靶标的接头-药物化合物及抗体-药物缀合物。这类接头-药物化合物及抗体-药物缀合物包含荷伯希二烯剪接调节子药物部分。本披露进一步涉及用于通过施用本文所提供的这类抗体-药物缀合物来治疗赘生性病症的方法及组合物。还要求保护荷伯希二烯本身。进一步要求保护其用途,以及由荷伯希二烯或其ADC产生的新抗原的用途,或针对该新抗原的疫苗。

1. 一种具有式 (I) 的抗体-药物缀合物:



其中:

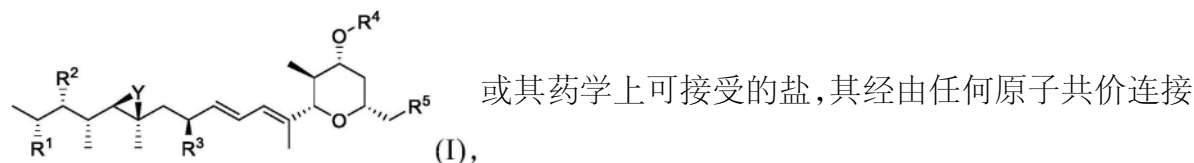
Ab为靶向赘生性细胞的抗体或抗原结合片段;

H为荷伯希二烯剪接调节子;

L为将Ab共价连接至H的接头;并且

p为1至15的整数。

2. 如权利要求1所述的抗体-药物缀合物,其中该荷伯希二烯剪接调节子包含具有式 (I) 的化合物:



至L,其中:

Y选自O、S、NR⁶及CR⁶R⁷;

R¹、R²及R³各自独立地选自氢、羟基、-O-(C₁-C₆烷基)、-O-C(=O)-(C₁-C₆烷基)、-C(=O)-O-(C₁-C₆烷基)及C₁-C₆烷基;

R⁴选自氢、C₁-C₆烷基、-C(=O)-(C₁-C₆烷基)、-C(=O)-(C₃-C₈碳环基)、-C(=O)-(C₃-C₈杂环基)及-C(=O)-NR⁶R⁷;

R⁵选自氢、羟基、-CH₂-OH、-CO₂H、-C(=O)-O-(C₁-C₆烷基)、-C(=O)-NR⁶R⁷、-NR⁶-C(=O)-R⁸、-O-C(=O)-NR⁶R⁷、-NR⁶-C(=O)-R⁸及-NR⁶-C(=O)-NR⁶R⁷;

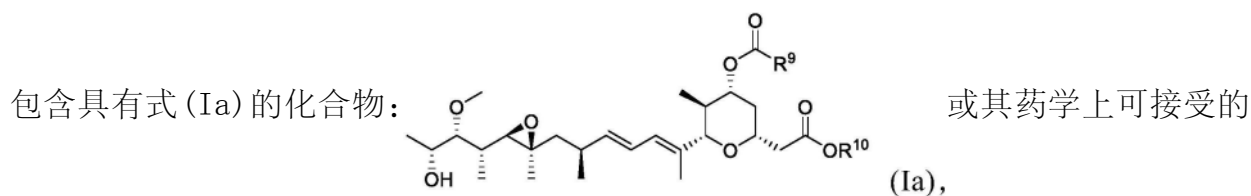
R⁶及R⁷各自独立地选自氢、-R⁸、-C(=O)-R⁸及-C(=O)-O-R⁸;并且

R⁸选自C₁-C₆烷基、C₃-C₈碳环基及C₃-C₈杂环基,

其中R¹、R²、R³、R⁴、R⁵、R⁶、R⁷及R⁸各自独立地经0至3个独立地选自以下的基团取代:卤素、羟基、C₁-C₆烷基、-O-(C₁-C₆烷基)、-CO₂H、-C(=O)-(C₁-C₆烷基)、-C(=O)-(C₃-C₈碳环基)、-C(=O)-(C₃-C₈杂环基)、-NR⁶R⁷、C₃-C₈碳环基、C₁-C₆烷基羟基、C₁-C₆烷基烷氧基、苄基及C₃-C₈杂环基,其中的每一个可独立地经0或1个选自以下的基团取代:卤素、羟基、C₁-C₃烷基、C₁-C₃烷氧基、C₁-C₃卤烷基、-NH-C(=O)-(C₁-C₃烷基)及-NH-C(=O)-O-(C₁-C₃烷基),并且

其中共价连接至L的原子的价数未超出。

3. 如权利要求1或权利要求2所述的抗体-药物缀合物,其中该荷伯希二烯剪接调节子



盐,其经由任何原子共价连接至L,其中:

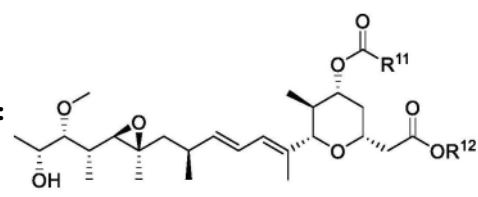
R⁹选自C₃-C₈杂环基;

R¹⁰选自H及C₁-C₆烷基,

其中R⁹及R¹⁰各自独立地经0至3个独立地选自以下的基团取代:卤素、羟基、C₁-C₃烷基、C₁-C₃烷氧基、-NH₂、-NH-(C₁-C₃烷基)及-N-(C₁-C₃烷基)₂,并且

其中共价连接至L的原子的价数未超出。

4. 如权利要求1至3中任一项所述的抗体-药物缀合物, 其中该荷伯希二烯剪接调节子

包含具有式 (Ib) 的化合物:  或其药学上可接受的

盐, 其经由任何原子共价连接至L, 其中:

R^{11} 选自 $\ast-N(R^{13})$ 、 $\ast-N(R^{13})$ 及 $\ast-N(R^{13})$, 其中 $\ast$ 指示 R^{11} 与该化合物的其余部分的连接点;

R^{12} 及 R^{13} 各自独立地选自H及甲基; 并且

其中共价连接至L的原子的价数未超出。

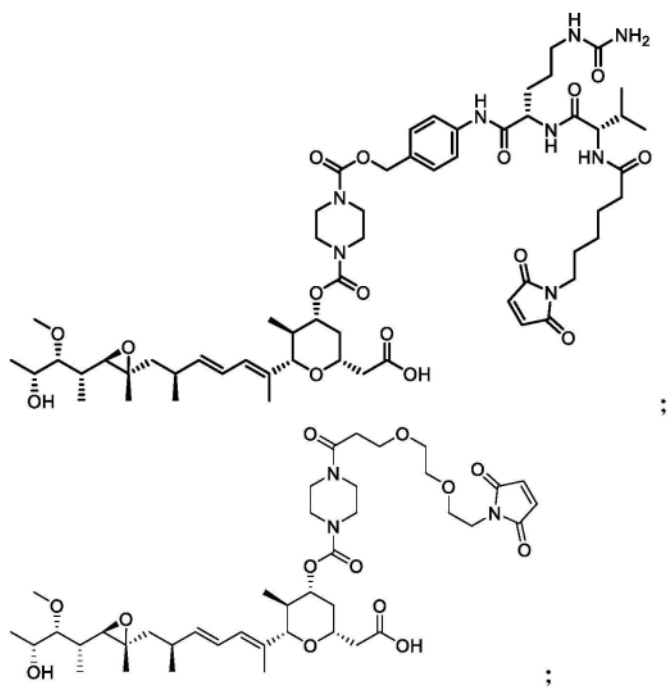
5. 如权利要求1至4中任一项所述的抗体-药物缀合物,

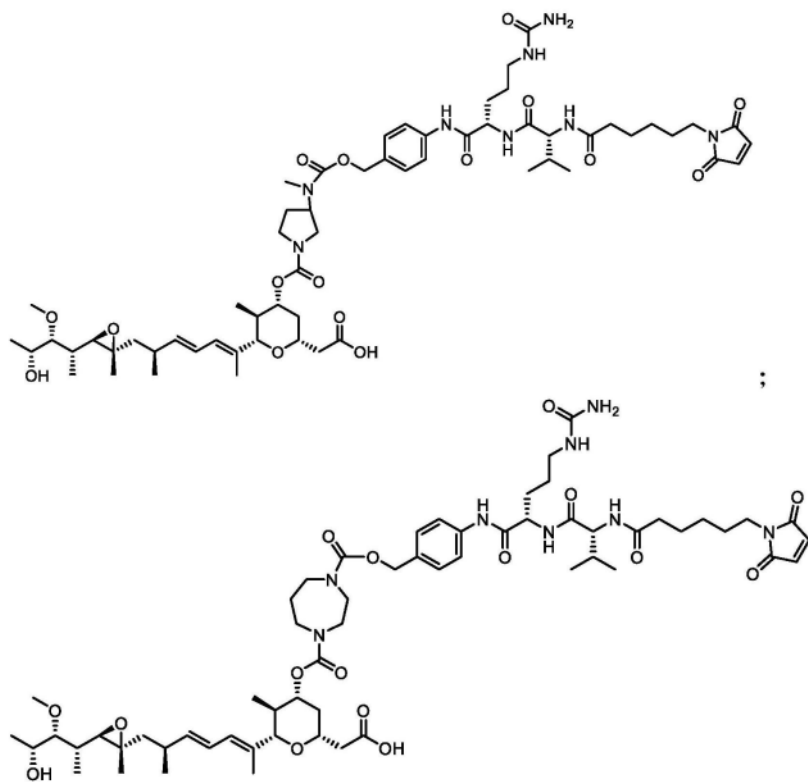
其中该荷伯希二烯剪接调节子经由任何原子共价连接至L

其中该荷伯希二烯剪接调节子选自H1、H2、H3及H12; 并且

其中共价连接至L的原子的价数未超出。

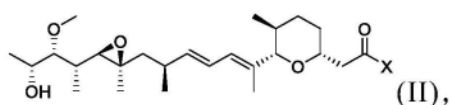
6. 如权利要求1或权利要求2所述的抗体-药物缀合物, 其中L共价连接至该荷伯希二烯剪接调节子 (“L-H”), 且L-H具有选自以下结构的结构:





及其药学上可接受的盐。

7. 如权利要求1所述的抗体-药物缀合物, 其中该荷伯希二烯剪接调节子是具有式 (II) 的剪接调节子:



或其药学上可接受的盐, 其经由任何原子共价连接至

L, 其中:

X为羟基或 NR^6R^7 ;

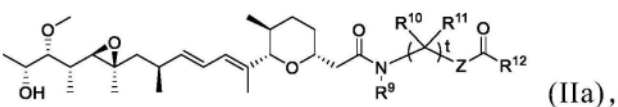
R^6 及 R^7 各自独立地选自氢、 $-\text{R}^8$ 、 $-\text{C}(=\text{O})-\text{R}^8$ 、 $-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{R}^8$ 、 $-(\text{C}_1-\text{C}_6\text{烷基})-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{R}^8$ 及 $-(\text{C}_1-\text{C}_6\text{烷基})-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{R}^8$; 并且

R^8 选自 C_1-C_6 烷基、 C_3-C_8 碳环基及 C_3-C_8 杂环基,

其中 R^6 、 R^7 及 R^8 各自独立地经0至3个独立地选自以下的基团取代: 卤素、羟基、 C_1-C_6 烷基、 $-\text{O}-(\text{C}_1-\text{C}_6\text{烷基})$ 、 $-\text{CO}_2\text{H}$ 、 $-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-(\text{C}_1-\text{C}_6\text{烷基})$ 、 $-\text{C}(=\text{O})-(\text{C}_1-\text{C}_6\text{烷基})$ 、 $-\text{C}(=\text{O})-(\text{C}_3-\text{C}_8\text{碳环基})$ 、 $-\text{C}(=\text{O})-(\text{C}_3-\text{C}_8\text{杂环基})$ 、 $-\text{NR}^6\text{R}^7$ 、 C_3-C_8 碳环基、 C_1-C_6 烷基羟基、 C_1-C_6 烷基烷氧基、苄基及 C_3-C_8 杂环基, 其中的每一个可独立地经0或1个选自以下的基团取代: 卤素、羟基、 C_1-C_3 烷基、 C_1-C_3 烷氧基、 C_1-C_3 卤烷基、 $-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-(\text{C}_1-\text{C}_3\text{烷基})$ 及 $-\text{NH}-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-(\text{C}_1-\text{C}_3\text{烷基})$, 并且

其中共价连接至L的原子的价数未超出。

8. 如权利要求1或权利要求7所述的抗体-药物缀合物, 其中该荷伯希二烯剪接调节子是具有式 (IIa) 的剪接调节子:



或其药学上可

接受的盐, 其经由任何原子共价连接至L, 其中:

Z选自NR⁹及O;

R⁹选自氢及C₁-C₆烷基;

R¹⁰及R¹¹各自独立地选自氢、卤素、羟基、C₁-C₆烷基、-O-(C₁-C₆烷基)、-CO₂H、-C(=O)-O-(C₁-C₆烷基)、-C(=O)-(C₁-C₆烷基)、-C(=O)-(C₃-C₈碳环基)、-C(=O)-(C₃-C₈杂环基)、C₃-C₈碳环基、C₁-C₆烷基羟基、C₁-C₆烷基烷氧基、苄基及C₃-C₈杂环基;

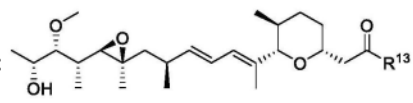
R¹²选自C₁-C₆烷基、C₃-C₈碳环基、C₃-C₈杂环基,

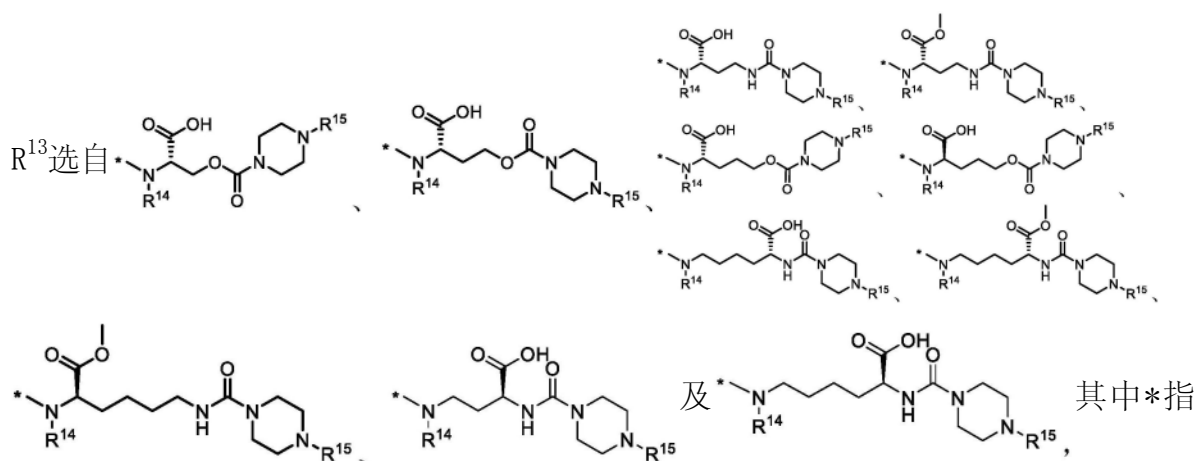
其中R⁹、R¹⁰、R¹¹及R¹²各自独立地经0或1个选自以下的基团取代:卤素、羟基、C₁-C₃烷基、C₁-C₃烷氧基及C₁-C₃卤烷基;

t为选自1、2、3、4、5及6的整数;并且

其中共价连接至L的原子的价数未超出。

9. 如权利要求1、7或8所述的抗体-药物缀合物,其中该荷伯希二烯剪接调节子是具有

式(IIb)的剪接调节子: (IIb), 或其药学上可接受的盐,其经由任何原子共价连接至L,其中:



示R¹³与该化合物的其余部分的连接点;

R¹⁴及R¹⁵各自独立地选自氢及甲基;并且

其中共价连接至L的原子的价数未超出。

10. 如权利要求1、7、8或9所述的抗体-药物缀合物,其中该荷伯希二烯剪接调节子经由任何原子共价连接至L;

其中该荷伯希二烯剪接调节子选自H4、H13、H14、H15、H16、H17、H18、H19、H20、H21、H23及H24;并且

其中共价连接至L的原子的价数未超出。

荷伯希二烯抗体-药物缀合物及使用方法

[0001] 本申请是申请日为2019年12月12日、发明名称为“荷伯希二烯抗体-药物缀合物及使用方法”的中国发明专利申请No.201980081875.X (PCT申请号为PCT/US2019/066029)的分案申请。本披露要求以下项的优先权权益:2018年12月13日提交的美国临时专利申请号62/779,400;2018年12月13日提交的美国临时申请号62/779,406;以及2019年11月27日提交的美国临时申请号62/941,220。所有上述申请均通过引用以其全文并入本文。

[0002] 本披露涉及包含荷伯希二烯(herboxidiene)剪接调节子及抗体或其抗原结合片段的抗体-药物缀合物(ADC),例如结合人类肿瘤学抗原靶标的抗体-药物缀合物。本披露进一步涉及可用于治疗或诊断表达靶标抗原和/或适合于通过RNA剪接破坏进行的治疗的癌症的方法及组合物,以及制造那些组合物的方法。

[0003] 人类基因组中的大部分蛋白质编码基因由通过内含子(非编码区)间隔开的多个外显子(编码区)构成。基因表达产生单一前体信使RNA(pre-mRNA)。随后,通过称为剪接的方法自pre-mRNA移除内含子序列,产生成熟信使RNA(mRNA)。通过包括不同外显子组合,交替剪接产生编码独特蛋白质异形体的mRNA。

[0004] RNA剪接通过剪接体催化,该剪接体为由五个小核RNA(snRNA U1、U2、U4、U5及U6)及相关蛋白质构成的动态多蛋白质-RNA复合物。剪接体在pre-mRNA上组装以建立催化内含子的切除及外显子的接合的多个RNA及蛋白质相互作用的动态级联(Matera及Wang (2014) Nat Rev Mol Cell Biol.[自然分子细胞生物学综述]15(2):108-21)。越来越多的证据将人类疾病与影响许多基因的RNA剪接中的调节异常联系起来(Scotti及Swanson (2016) Nat Rev Genet.[遗传学自然评论]17(1):19-32)。

[0005] 剪接体为癌症生物学中的重要靶标。几项研究现已记录癌细胞的剪接概况以及自身剪接因素中的大量更改(Agrawal等人(2018) Curr Opin Genet Dev.[遗传学与发展的最新观点]48:67-74)。交替剪接可引起差异性外显子包括/排除、内含子滞留或隐藏剪接位点使用(Seiler等人(2018) Cell Rep.[细胞报告]23(1):282-296)。总而言之,这些事件造成可能促成肿瘤形成或耐疗法性的功能改变(Siegfried及Karni (2018) Curr Opin Genet Dev.[遗传学与发展的最新观点]48:16-21)。

[0006] 某些天然产物可结合SF3b剪接体复合物。这些小分子通过促进内含子滞留和/或外显子跳读来调节剪接(Teng等人(2017) Nat Commun.[自然通讯]8:15522)。举例而言,已显示作为自链霉菌属(*Streptomyces* sp.) A7847分离的天然存在的聚酮的荷伯希二烯(Isaac等人(1992) J.Org.Chem.[有机化学杂志]57:7220-26)及其衍生物调节剪接。参见例如Imaizumi等人(2017) J.Antibiot.[抗生素杂志]70:675-79。所得转录物的相当大一部分含有提前终止密码子,触发无意义介导mRNA衰变(NMD)。此外,因为典型剪接受损,故典型转录物大幅减少,此可能不利地影响细胞功能及活力。出于此原因,剪接调节子已变为一类用于治疗癌症的有前景的药物(Puthenveetil等人(2016) Bioconjugate Chem.[生物缀合化学]27:1880-8)。

[0007] 原癌基因人类表皮生长因子受体2(HER2)编码属于人类表皮生长因子受体(EGFR)家族的跨膜酪氨酸激酶受体(King等人(1985) Science[科学]229:974-6)。HER2的过度表达

使得能够组成性活化诸如PI3K-AKT-mTOR路径的生长因子信号传导路径,且由此充当包括约20%侵袭性乳癌的几种类型的癌症中的致癌驱动因子(Slamon等人(1989)Science[科学]244:707-12;Gajria及Chandarlapaty(2011)Expert Rev Anticancer Ther.[抗癌治疗专家综述]11:263-75)。鉴于HER2放大介导经转型的表现型且因为HER2表达很大程度上限于恶性细胞,故HER2为用于靶向某些癌症和/或递送新颖癌症治疗的有前景的抗原(Parakh等人(2017)Cancer Treat Rev.[癌症治疗综述]59:1-21)。用于靶向递送癌症疗法的额外抗原包括但不限于CD138(还称为多配体蛋白聚糖-1)及蝶素A型受体2(EPHA2)。

[0008] CD138为维持细胞形态及与周围微环境的相互作用所必需的细胞表面硫酸乙酰肝素蛋白聚糖(Akl等人(2015)Oncotarget[肿瘤靶标]6(30):28693-715;Szatmári等人(2015)Dis Markers[疾病标志]2015:796052)。一般而言,癌细胞中的CD138表达的损失减少对胞外基质的细胞黏附且增强细胞运动性及侵袭性(Teng等人(2012)Matrix Biol.[基质生物学]31:3-16)。经增加的基质CD138表达还更改纤维结合蛋白产生及胞外基质组织(Yang等人(2011)Am J Pathol.[美国病理学杂志]178:325-35)。另外,基质纤维母细胞中的经增加的CD138表达与血管生成及癌症发展相关联(Maeda等人(2006)Oncogene[癌基因]25:1408-12)。CD138表达在B细胞发育期间增加,且其存在为浆细胞的标志(Ribatti(2017)Immunol Lett.[免疫学快报]188:64-7)。CD138表达在作为浆细胞恶性病的多发性骨髓瘤中得以维持。因此,CD138为用于靶向治疗几种癌症及其他血液恶性肿瘤的引人注目的抗原(Sherbenou等人(2015)Blood Rev.[血液综述]29(2):81-91;Wijdenes等人(1996)Br J Haematol.[英国血液病杂志]94(2):318-23)。

[0009] EPHA2为在几种恶性癌症源性细胞系中以及在晚期癌症形式中充分地过度表达的跨膜糖蛋白(Wykosky及Debinski(2008)Mol Cancer Ref.[分子癌症研究]6(12):1795-1806)。例如,EPHA2在约61%的GBM患者肿瘤(Wykosky等人(2008)Clin Cancer Res.[临床癌症研究]14:199-208)、76%的卵巢癌(Thaker等人(2004)Clin Cancer Res.[临床癌症研究]10:5145-50)和85%的前列腺腺癌(Zeng等人(2003)Am J Pathol.[美国病理学杂志]163:2271-6)中强烈过度表达。EPHA2蛋白关于一定百分比的患者肿瘤及一定百分比的肿瘤内细胞而言高度地过度表达,且为可在配体结合时内化的质膜定位受体(Walker-Daniels等人(2002)Mol Cancer Res.[分子癌症研究]1:79-87)。此外,EPHA2的表达与不良预后、转移增加及存活率降低相关。因此,EPHA2因其表达模式、定位及癌症患者的结果中的功能重要性而为用于靶向递送新颖抗癌疗法的另一引人注目的抗原。

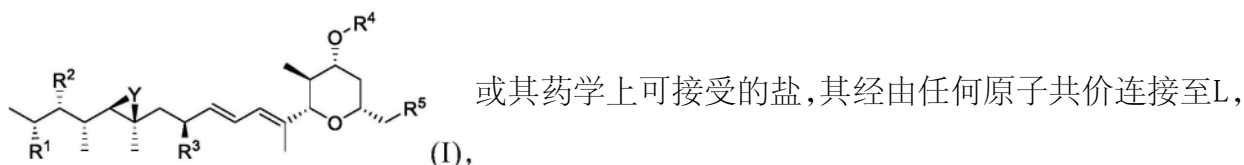
[0010] 在不同实施例中,本披露部分提供具有针对赘生性细胞的生物活性的新颖荷伯希二烯剪接调节子。荷伯希二烯剪接调节子可单独或作为ADC的部分来使用以减缓、抑制和/或逆转哺乳动物中的肿瘤生长,且可适用于治疗人类癌症患者。在不同实施例中,本披露提供采用荷伯希二烯剪接调节子的新颖抗体-药物缀合物。

[0011] 更具体而言,在不同实施例中,本披露涉及能够结合并杀伤赘生性细胞的抗体-药物缀合物(ADC)复合物。在不同实施例中,本文所披露的ADC复合物包含将剪接调节子连接至全长抗体或抗原结合片段的接头。在不同实施例中,这些ADC复合物还能够在结合之后内化到靶细胞中。

[0012] 在一些实施例中,抗体-药物缀合物是具有式(I)的抗体-药物缀合物:Ab-(L-H)_p,其中Ab是靶向赘生性细胞的抗体或抗原结合片段;H为荷伯希二烯剪接调节子;L为将Ab共

价连接至H的接头;且p为1至15的整数。

[0013] 在一些实施例中,作为荷伯希二烯剪接调节子的H包含具有式(I)的化合物:



其中:

Y选自O、S、NR⁶及CR⁶R⁷;

R¹、R²及R³各自独立地选自氢、羟基、-O-(C₁-C₆烷基)、-O-C(=O)-(C₁-C₆烷基)、-C(=O)-O-(C₁-C₆烷基)及C₁-C₆烷基;

R⁴选自氢、C₁-C₆烷基、-C(=O)-(C₁-C₆烷基)、-C(=O)-(C₃-C₈碳环基)、-C(=O)-(C₃-C₈杂环基)及-C(=O)-NR⁶R⁷;

R⁵选自氢、羟基、-CH₂-OH、-CO₂H、-C(=O)-O-(C₁-C₆烷基)、-C(=O)-NR⁶R⁷、-NR⁶-C(=O)-R⁸、-O-C(=O)-NR⁶R⁷、-NR⁶-C(=O)-R⁸及-NR⁶-C(=O)-NR⁶R⁷;

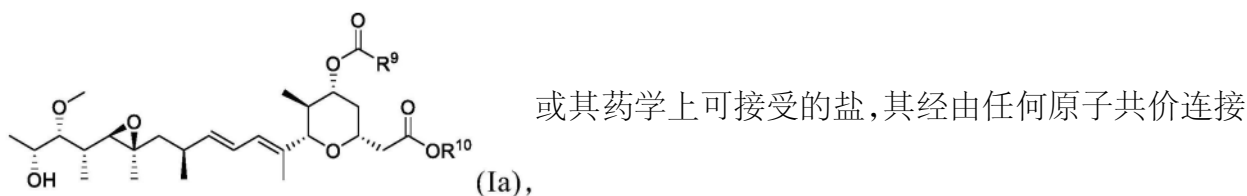
R⁶及R⁷各自独立地选自氢、-R⁸、-C(=O)-R⁸及-C(=O)-O-R⁸;并且

R⁸选自C₁-C₆烷基、C₃-C₈碳环基及C₃-C₈杂环基,

其中R¹、R²、R³、R⁴、R⁵、R⁶、R⁷及R⁸各自独立地经0至3个独立地选自以下的基团取代:卤素、羟基、C₁-C₆烷基、-O-(C₁-C₆烷基)、-CO₂H、-C(=O)-(C₁-C₆烷基)、-C(=O)-(C₃-C₈碳环基)、-C(=O)-(C₃-C₈杂环基)、-NR⁶R⁷、C₃-C₈碳环基、C₁-C₆烷基羟基、C₁-C₆烷基烷氧基、苄基及C₃-C₈杂环基,其中的每一个可独立地经0或1个选自以下的基团取代:卤素、羟基、C₁-C₃烷基、C₁-C₃烷氧基、C₁-C₃卤烷基、-NH-C(=O)-(C₁-C₃烷基)及-NH-C(=O)-O-(C₁-C₃烷基),并且

其中共价连接至L的原子的价数未超出。

[0014] 在一些实施例中,作为荷伯希二烯剪接调节子的H包含具有式(Ia)的化合物:



至L,其中:

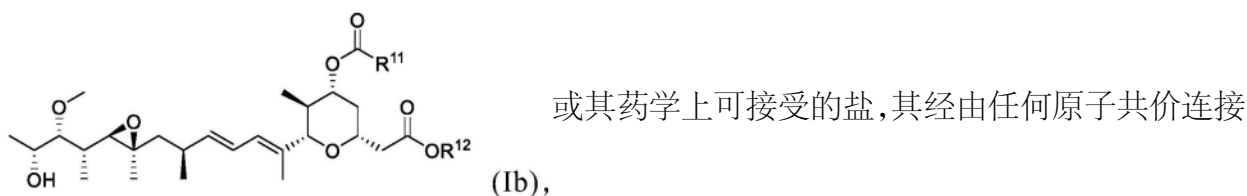
R⁹选自C₃-C₈杂环基;

R¹⁰选自H及C₁-C₆烷基,

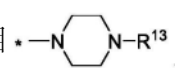
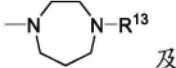
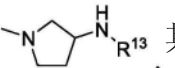
其中R⁹及R¹⁰各自独立地经0至3个独立地选自以下的基团取代:卤素、羟基、C₁-C₃烷基、C₁-C₃烷氧基、-NH₂、-NH-(C₁-C₃烷基)及-N-(C₁-C₃烷基)₂,并且

其中共价连接至L的原子的价数未超出。

[0015] 在一些实施例中,作为荷伯希二烯剪接调节子的H包含具有式(Ib)的化合物:



至L,其中:

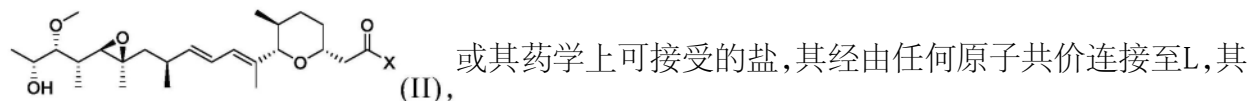
R^{11} 选自 、 及 , 其中*指示 R^{11} 与该化合物的其余

部分的连接点;

R^{12} 及 R^{13} 各自独立地选自H及甲基;并且

其中共价连接至L的原子的价数未超出。

[0016] 在一些实施例中,作为荷伯希二烯剪接调节子的H包含具有式(II)的化合物:



中:

X为羟基或 NR^6R^7 ;

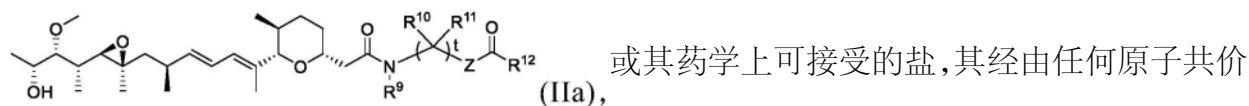
R^6 及 R^7 各自独立地选自氢、 $-R^8$ 、 $-C(=O)-R^8$ 、 $-C(=O)-O-R^8$ 、 $-(C_1-C_6\text{烷基})-O-C(=O)-R^8$ 及 $-(C_1-C_6\text{烷基})-NH-C(=O)-R^8$;及

R^8 选自 C_1-C_6 烷基、 C_3-C_8 碳环基及 C_3-C_8 杂环基,

其中 R^6 、 R^7 及 R^8 各自独立地经0至3个独立地选自以下的基团取代:卤素、羟基、 C_1-C_6 烷基、 $-O-(C_1-C_6\text{烷基})$ 、 $-CO_2H$ 、 $-C(=O)-O-(C_1-C_6\text{烷基})$ 、 $-C(=O)-(C_1-C_6\text{烷基})$ 、 $-C(=O)-(C_3-C_8\text{碳环基})$ 、 $-C(=O)-(C_3-C_8\text{杂环基})$ 、 $-NR^6R^7$ 、 C_3-C_8 碳环基、 C_1-C_6 烷基羟基、 C_1-C_6 烷基烷氧基、苄基及 C_3-C_8 杂环基,其中的每一个可独立地经0或1个选自以下的基团取代:卤素、羟基、 C_1-C_3 烷基、 C_1-C_3 烷氧基、 C_1-C_3 卤烷基、 $-NH-C(=O)-(C_1-C_3\text{烷基})$ 及 $-NH-C(=O)-O-(C_1-C_3\text{烷基})$, 并且

其中共价连接至L的原子的价数未超出。

[0017] 在一些实施例中,作为荷伯希二烯剪接调节子的H包含具有式(IIa)的化合物:



连接至L,其中:

Z选自 NR^9 及O;

R^9 选自氢及 C_1-C_6 烷基;

R^{10} 及 R^{11} 各自独立地选自氢、卤素、羟基、 C_1-C_6 烷基、 $-O-(C_1-C_6\text{烷基})$ 、 $-CO_2H$ 、 $-C(=O)-O-(C_1-C_6\text{烷基})$ 、 $-C(=O)-(C_1-C_6\text{烷基})$ 、 $-C(=O)-(C_3-C_8\text{碳环基})$ 、 $-C(=O)-(C_3-C_8\text{杂环基})$ 、 C_3-C_8 碳环基、 C_1-C_6 烷基羟基、 C_1-C_6 烷基烷氧基、苄基及 C_3-C_8 杂环基;

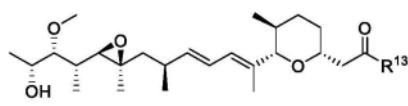
R^{12} 选自 C_1-C_6 烷基、 C_3-C_8 碳环基、 C_3-C_8 杂环基,

其中 R^9 、 R^{10} 、 R^{11} 及 R^{12} 各自独立地经0或1个选自以下的基团取代:卤素、羟基、 C_1-C_3 烷基、 C_1-C_3 烷氧基及 C_1-C_3 卤烷基;

t为选自1、2、3、4、5及6的整数;并且

其中共价连接至L的原子的价数未超出。

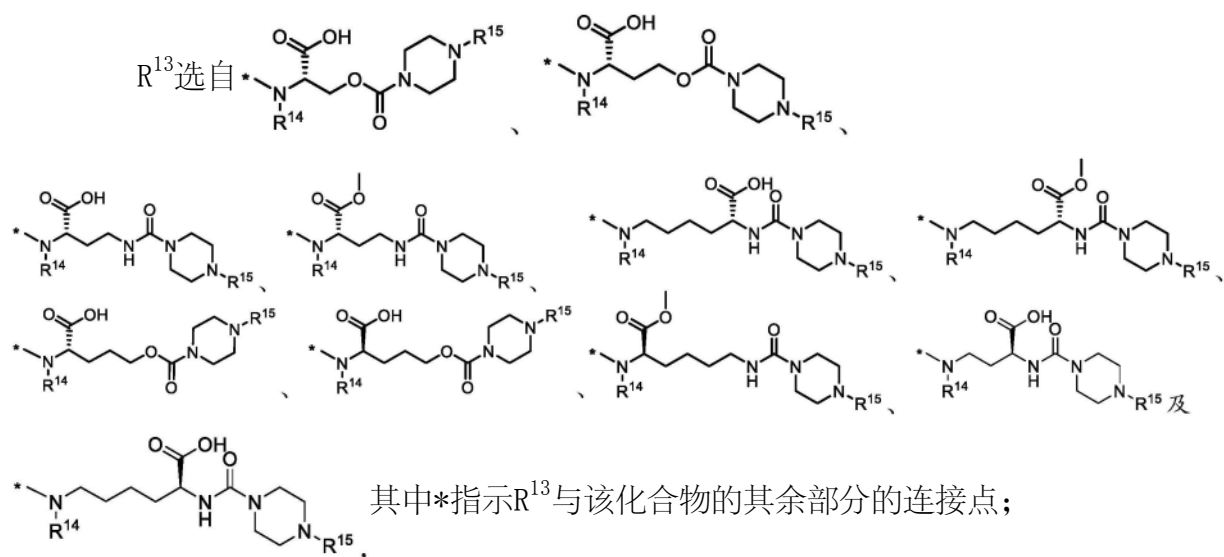
[0018] 在一些实施例中,作为荷伯希二烯剪接调节子的H包含具有式(IIb)的化合物:



(IIb),

或其药学上可接受的盐,其经由任何原子共价连接至

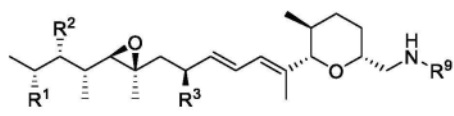
L,其中:



R^{14} 及 R^{15} 各自独立地选自氢及甲基;并且

其中共价连接至L的原子的价数未超出。

[0019] 在一些实施例中,作为荷伯希二烯剪接调节子的H包含具有式(III)的化合物:



(III),

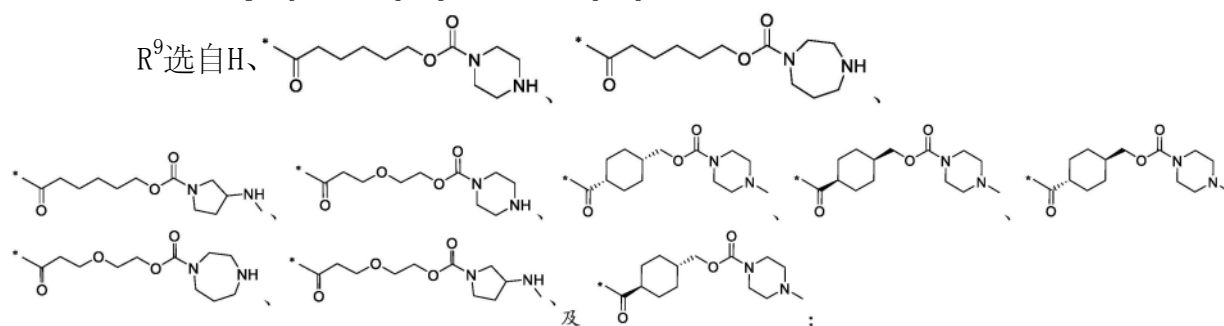
或其药学上可接受的盐,其经由任何原子共价连接至

L,其中:

R^1 、 R^2 及 R^3 各自独立地选自氢、羟基、-O-(C_1 - C_6 烷基)、-O-C(=O)-(C_1 - C_6 烷基)、-C(=O)-O-(C_1 - C_6 烷基)及 C_1 - C_6 烷基;

R^6 及 R^7 各自独立地选自氢、- R^8 、-C(=O)- R^8 及-C(=O)-O- R^8 ;

R^8 选自 C_1 - C_6 烷基、 C_3 - C_8 碳环基及 C_3 - C_8 杂环基;并且



其中 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^6 、 R^7 及 R^8 各自独立地经0至3个独立地选自以下的基团取代:卤素、羟基、 C_1 - C_6 烷基、-O-(C_1 - C_6 烷基)、-CO₂H、-C(=O)-(C_1 - C_6 烷基)、-C(=O)-(C_3 - C_8 碳环基)、-C(=O)-(C_3 - C_8 杂环基)、-NR⁶R⁷、 C_3 - C_8 碳环基、 C_1 - C_6 烷基羟基、 C_1 - C_6 烷基烷氧基、苄基及 C_3 - C_8 杂环基,其中的每一个可独立地经0或1个选自以下的基团取代:卤素、羟基、 C_1 - C_3 烷基、 C_1 - C_3 烷氧基、 C_1 - C_3 卤烷基、-NH-C(=O)-(C_1 - C_3 烷基)及-NH-C(=O)-O-(C_1 - C_3 烷基),

其中共价连接至L的原子的价数未超出;并且

其中*指示R⁹与该化合物的其余部分的连接点。

[0020] 在一些实施例中,接头包含可裂解肽部分。在一些实施例中,可裂解肽部分可通过酶裂解。在一些实施例中,可裂解肽部分或接头包含氨基酸单元。在一些实施例中,氨基酸单元包含缬氨酸-瓜氨酸(“Val-Cit”或“VC”)。在一些其他实施例中,氨基酸单元包含缬氨酸-丙氨酸(“Val-Ala”或“VA”)。在一些其他实施例中,氨基酸单元包含麸氨酸-缬氨酸-瓜氨酸(“Glu-Val-Cit”或“EVC”)。在一些其他实施例中,氨基酸单元包含丙氨酸-丙氨酸-天冬酰胺(“Ala-Ala-Asn”或“AAN”)。

[0021] 在一些实施例中,接头包含可裂解葡萄糖醛酸部分。在一些实施例中,可裂解葡萄糖醛酸部分可通过酶裂解。在一些实施例中,可裂解葡萄糖醛酸部分可通过葡萄糖醛酸酶裂解。在一些实施例中,可裂解葡萄糖醛酸部分可通过 β -葡萄糖醛酸酶裂解。

[0022] 在一些实施例中,接头包含至少一个间隔子单元。在一些实施例中,间隔子单元或接头包含聚乙二醇(PEG)部分。在一些实施例中,PEG部分包含-(PEG)_m-且m为1至10的整数。在一些实施例中,m为2。在一些其他实施例中,间隔子单元或接头包含烷基部分。在一些实施例中,烷基部分包含-(CH₂)_n-且n为1至10的整数。在一些实施例中,n为2。在一些实施例中,n为5。在一些实施例中,n为6。

[0023] 在一些实施例中,间隔子单元经由顺丁烯二酰亚胺(Mal)部分(“Mal-间隔子单元”)连接至抗体或抗原结合片段。在一些实施例中,Mal-间隔子单元可与抗体或抗原结合片段上的半胱氨酸残基反应。在一些实施例中,Mal-间隔子单元经由抗体或抗原结合片段上的半胱氨酸残基接合至抗体或抗原结合片段。

[0024] 在一些实施例中,接头包含Mal-间隔子单元及可裂解肽部分。在一些实施例中,可裂解肽部分包含氨基酸单元。在一些实施例中,可裂解肽部分或氨基酸单元包含Val-Cit。在一些实施例中,可裂解肽部分或氨基酸单元包含Val-Ala。在一些实施例中,可裂解肽部分或氨基酸单元包含Glu-Val-Cit。在一些实施例中,可裂解肽部分或氨基酸单元包含Ala-Ala-Asn。在一些实施例中,Mal-间隔子单元包含烷基部分。在一些实施例中,Mal-间隔子单元包含PEG部分。在一些实施例中,Mal-间隔子单元包含顺丁烯二酰亚胺基己酰基(MC)。

[0025] 在一些实施例中,Mal-间隔子单元将抗体或抗原结合片段连接至接头中的可裂解部分。在一些实施例中,接头中的可裂解部分包含可裂解肽部分。在一些实施例中,可裂解肽部分包含氨基酸单元。在一些实施例中,可裂解肽部分或氨基酸单元包含Val-Cit、Val-Ala、Glu-Val-Cit或Ala-Ala-Asn。在一些实施例中,接头包含MC-Val-Cit。在一些实施例中,接头包含MC-Val-Ala。在一些实施例中,接头包含MC-Glu-Val-Cit。在一些实施例中,接头包含MC-Ala-Ala-Asn。在一些实施例中,Mal-间隔子单元包含烷基部分。在一些实施例中,Mal-间隔子单元包含PEG部分。在一些实施例中,Mal-间隔子单元包含顺丁烯二酰亚胺基己酰基(MC)。

[0026] 在一些实施例中,接头中的可裂解部分直接地接合至荷伯希二烯剪接调节子,或间隔子单元将接头中的可裂解部分连接至荷伯希二烯剪接调节子。在一些实施例中,缀合物的裂解从抗体或抗原结合片段及接头释放荷伯希二烯剪接调节子。在一些实施例中,将接头中的可裂解部分连接至荷伯希二烯剪接调节子的间隔子单元为自消融型间隔子单元。

[0027] 在一些实施例中,将接头中的可裂解部分连接至荷伯希二烯剪接调节子的间隔子单元包含对氨基苄氧基羰基(pABC)。在一些实施例中,pABC将接头中的可裂解部分连接至

荷伯希二烯剪接调节子。在一些实施例中,接头中的可裂解部分包含可裂解肽部分。在一些实施例中,可裂解肽部分包含氨基酸单元。在一些实施例中,可裂解肽部分或氨基酸单元包含Val-Cit、Val-Ala、Glu-Val-Cit或Ala-Ala-Asn。在一些实施例中,接头包含Val-Cit-pABC。在一些其他实施例中,接头包含Val-Ala-pABC。在一些实施例中,接头包含Glu-Val-Cit-pABC。在一些实施例中,接头包含Ala-Ala-Asn-pABC。

[0028] 在一些实施例中,将接头中的可裂解部分连接至荷伯希二烯剪接调节子的间隔子单元包含对胺基苯甲基(pAB)。在一些实施例中,pAB将接头中的可裂解部分连接至荷伯希二烯剪接调节子。在一些实施例中,接头中的可裂解部分包含可裂解肽部分。在一些实施例中,可裂解肽部分包含氨基酸单元。在一些实施例中,可裂解肽部分或氨基酸单元包含Val-Cit、Val-Ala、Glu-Val-Cit或Ala-Ala-Asn。在一些实施例中,接头包含Val-Cit-pAB。在一些其他实施例中,接头包含Val-Ala-pAB。在一些其他实施例中,接头包含Glu-Val-Cit-pAB。在一些其他实施例中,接头包含Ala-Ala-Asn-pAB。

[0029] 在不同实施例中,接头为不可裂解接头。在一些实施例中,ADC的荷伯希二烯剪接调节子通过降解抗体或抗原结合片段来释放。在一些实施例中,在通过靶标细胞内化且在靶标细胞内降解后,接头与抗体及药物的至少一个氨基酸保持共价缔合。

[0030] 在一些实施例中,接头为包含至少一个间隔子单元的不可裂解接头。在一些实施例中,间隔子单元或接头包含聚乙二醇(PEG)部分。在一些实施例中,PEG部分包含-(PEG)_m-且m为1至10的整数。在一些实施例中,m为2。在一些其他实施例中,间隔子单元或接头包含烷基部分。在一些实施例中,烷基部分包含-(CH₂)_n-或-(CH₂)_n-O-(CH₂)_n且n为1至10的整数。在一些实施例中,n为2。在一些实施例中,n为5。在一些实施例中,n为6。

[0031] 在一些实施例中,不可裂解接头中的间隔子单元经由顺丁烯二酰亚胺(Ma1)部分(“Ma1-间隔子单元”)连接至抗体或抗原结合片段。在一些实施例中,Ma1-间隔子单元可与抗体或抗原结合片段上的半胱氨酸残基反应。在一些实施例中,Ma1-间隔子单元经由抗体或抗原结合片段上的半胱氨酸残基接合至抗体或抗原结合片段。在一些实施例中,Ma1-间隔子单元包含烷基部分。在一些实施例中,Ma1-间隔子单元包含PEG部分。在一些实施例中,接头或Ma1-间隔子单元包含顺丁烯二酰亚胺基己酰基(MC)。在一些实施例中,接头或Ma1-间隔子单元包含顺丁烯二酰亚胺基己酰基(MC)及至少一个额外间隔子单元。在一些实施例中,接头或Ma1-间隔子单元包含MC-(PEG)₂。在一些实施例中,接头或Ma1-间隔子单元包含MC-(PEG)₂及至少一个额外间隔子单元。在一些实施例中,接头或Ma1-间隔子单元包含Ma1-Hex。在一些实施例中,接头或Ma1-间隔子单元包含Ma1-Hex及至少一个额外间隔子单元。在一些实施例中,接头或Ma1-间隔子单元包含Ma1-Et。在一些实施例中,接头或Ma1-间隔子单元包含Ma1-Et及至少一个额外间隔子单元。在一些实施例中,接头或Ma1-间隔子单元包含Ma1-Et-O-Et。在一些实施例中,接头或Ma1-间隔子单元包含Ma1-Et-O-Et及至少一个额外间隔子单元。在一些实施例中,Ma1-间隔子单元将抗体或抗原结合片段连接至荷伯希二烯剪接调节子。

[0032] 在一些实施例中,Ab选自本文所披露的抗体或结合域序列中的任一个。在一些实施例中,Ab为靶向表达HER2和/或HER2的赘生性细胞的抗体或结合域序列。在一些实施例中,Ab为靶向表达CD138和/或CD138的赘生性细胞的抗体或结合域序列。在一些实施例中,Ab为靶向表达EPHA2和/或EPHA2的赘生性细胞的抗体或结合域序列。在一些实施例中,Ab为

靶向表达MSLN和/或MSLN的赘生性细胞的抗体或结合域序列。在一些实施例中,Ab为靶向表达FOLH1和/或FOLH1的赘生性细胞的抗体或结合域序列。在一些实施例中,Ab为靶向表达CDH6和/或CDH6的赘生性细胞的抗体或结合域序列。在一些实施例中,Ab为靶向表达CEACAM5和/或CEACAM5的赘生性细胞的抗体或结合域序列。在一些实施例中,Ab为靶向表达CFC1B和/或CFC1B的赘生性细胞的抗体或结合域序列。在一些实施例中,Ab为靶向表达ENPP3和/或ENPP3的赘生性细胞的抗体或结合域序列。在一些实施例中,Ab为靶向表达FOLR1和/或FOLR1的赘生性细胞的抗体或结合域序列。在一些实施例中,Ab为靶向表达HAVCR1和/或HAVCR1的赘生性细胞的抗体或结合域序列。在一些实施例中,Ab为靶向表达KIT和/或KIT的赘生性细胞的抗体或结合域序列。在一些实施例中,Ab为靶向表达MET和/或MET的赘生性细胞的抗体或结合域序列。在一些实施例中,Ab为靶向表达MUC16和/或MUC16的赘生性细胞的抗体或结合域序列。在一些实施例中,Ab为靶向表达SLC39A6和/或SLC39A6的赘生性细胞的抗体或结合域序列。在一些实施例中,Ab为靶向表达SLC44A4和/或SLC44A4的赘生性细胞的抗体或结合域序列。在一些实施例中,Ab为靶向表达STEAP1和/或STEAP1的赘生性细胞的抗体或结合域序列。在一些实施例中,Ab为靶向另一癌症抗原的抗体或结合域序列。

[0033] 在一些实施例中,L选自本文所披露的接头中的任一种或本文所披露的接头组分的任何组合。在一些实施例中,L为包含MC-Val-Cit-pABC、Mal-(PEG)₂-CO、MC-Val-Ala-pAB、MC-Val-Ala-pABC、MC-Val-Cit-pAB、Mal-Hex、Mal-Et或Mal-Et-O-Et的接头。在一些实施例中,接头还可包含一个或多个额外间隔子单元。在一些实施例中,L为ADL1、ADL2、ADL5、ADL6、ADL7、ADL10、ADL12、ADL13、ADL14、ADL15、ADL21、ADL22或ADL23接头。在一些实施例中,L为ADL1、ADL2、ADL5、ADL6、ADL7、ADL12、ADL13、ADL14、ADL15、ADL21或ADL23接头。在一些实施例中,L为ADL12、ADL14或ADL15接头。在一些实施例中,ADL1、ADL2、ADL5、ADL6、ADL7、ADL12、ADL13、ADL14、ADL15、ADL21或ADL23接头还可包含一个或多个额外间隔子单元。在一些实施例中,L为ADL1接头且可视情况包含一个或多个额外间隔子单元。在一些实施例中,L为ADL2接头且可视情况包含一个或多个额外间隔子单元。在一些实施例中,L为ADL5接头且可视情况包含一个或多个额外间隔子单元。在一些实施例中,L为ADL6接头且可视情况包含一个或多个额外间隔子单元。在一些实施例中,L为ADL7接头且可视情况包含一个或多个额外间隔子单元。在一些实施例中,L为ADL12接头且可视情况包含一个或多个额外间隔子单元。在一些实施例中,L为ADL14接头且可视情况包含一个或多个额外间隔子单元。在一些实施例中,L为ADL15接头且可视情况包含一个或多个额外间隔子单元。在本文所描述的ADC的不同实施例中,p为1至10。在不同实施例中,p为2至8。在不同实施例中,p为4至8。在一些实施例中,p为4。在一些实施例中,p为8。

[0034] 在一些实施例中,提供一组ADC,由此发生随机缀合,且该组中的平均p介于约2与约8之间。在一些实施例中,提供一组ADC,由此发生随机缀合,且该组中的平均p介于约4与约8之间。在一些实施例中,提供一组ADC,由此发生随机缀合,且该组中的平均p为约4。在一些实施例中,提供一组ADC,由此发生随机缀合,且该组中的平均p为约8。本文提供包含所描述的ADC中的任一种的多个复本的组合(例如药物组合),其中组合中的ADC的平均药物负载(平均p)为约3.5至约5.5(例如约4)或约7至约9(例如约8)。

[0035] 在一些实施例中,ADC的抗体或抗原结合片段(Ab)靶向来源于血液恶性肿瘤或实

体瘤的赘生性细胞。在一些实施例中,抗体或抗原结合片段靶向来源于血液恶性肿瘤的赘生性细胞。在一些实施例中,血液恶性肿瘤选自B细胞恶性肿瘤、白血病(例如急性骨髓性白血病)、淋巴瘤及骨髓瘤(例如多发性骨髓瘤)。在一些实施例中,血液恶性肿瘤选自急性骨髓性白血病及多发性骨髓瘤。在一些实施例中,抗体或抗原结合片段靶向来源于实体瘤的赘生性细胞。在一些实施例中,实体瘤选自乳癌(例如HER2阳性乳癌)、胃癌(例如胃腺癌)、前列腺癌、卵巢癌、肺癌(例如肺腺癌)、子宫癌(例如子宫浆液性子宫内膜癌)、唾液腺癌、黑色素瘤、大肠癌、子宫颈癌、胰脏癌、肾癌、结直肠癌及食道癌。在一些实施例中,实体瘤选自HER2阳性乳癌、胃腺癌、前列腺癌及骨肉瘤。

[0036] 在不同实施例中,ADC的抗体或抗原结合片段(Ab)为抗HER2抗体或其抗原结合片段。在一些实施例中,抗体或抗原结合片段结合至HER2且靶向表达HER2的赘生性细胞(即ADC靶向表达HER2的赘生性细胞)。在一些实施例中,ADC的抗体或抗原结合片段为内化性抗HER2抗体或其内化性抗原结合片段。

[0037] 在一些实施例中,抗HER2抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:1(HCDR1)、SEQ ID NO:2(HCDR2)及SEQ ID NO:3(HCDR3)的氨基酸序列的三个重链互补决定区(HCDR1、HCDR2及HCDR3);及包含SEQ ID NO:4(LCDR1)、SEQ ID NO:5(LCDR2)及SEQ ID NO:6(LCDR3)的氨基酸序列的三个轻链互补决定区(LCDR1、LCDR2及LCDR3)。在一些实施例中,抗HER2抗体或抗原结合片段为内化性抗体或内化性抗原结合片段。在一些实施例中,抗HER2抗体或抗原结合片段包含人类框架序列。在一些实施例中,抗HER2抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:19的氨基酸序列的重链可变区及包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列的轻链可变区。在一些实施例中,抗HER2抗体或抗原结合片段包含人类IgG重链恒定区。在一些实施例中,抗HER2抗体或抗原结合片段包含人类IgG1重链恒定区。在一些实施例中,抗HER2抗体或抗原结合片段包含人类Igκ或λ轻链恒定区。在一些实施例中,抗HER2抗体或抗原结合片段与包含SEQ ID NO:19的重链可变域及SEQ ID NO:20的轻链可变域的抗体竞争结合相同表位和/或结合相同表位。

[0038] 在不同实施例中,ADC的抗体或抗原结合片段(Ab)为抗CD138抗体或其抗原结合片段。在一些实施例中,抗体或抗原结合片段结合至CD138且靶向表达CD138的赘生性细胞(即ADC靶向表达CD138的赘生性细胞)。在一些实施例中,ADC的抗体或抗原结合片段为内化性抗CD138抗体或其内化性抗原结合片段。

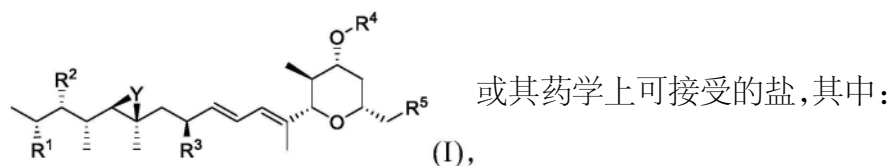
[0039] 在一些实施例中,抗CD138抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:7(HCDR1)、SEQ ID NO:8(HCDR2)及SEQ ID NO:9(HCDR3)的氨基酸序列的三个重链互补决定区(HCDR1、HCDR2及HCDR3);及包含SEQ ID NO:10(LCDR1)、SEQ ID NO:11(LCDR2)及SEQ ID NO:12(LCDR3)的氨基酸序列的三个轻链互补决定区(LCDR1、LCDR2及LCDR3)。在一些实施例中,抗CD138抗体或抗原结合片段为内化性抗体或内化性抗原结合片段。在一些实施例中,抗CD138抗体或抗原结合片段包含人类框架序列。在一些实施例中,抗CD138抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:21的氨基酸序列的重链可变区及包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列的轻链可变区。在一些实施例中,抗CD138抗体或抗原结合片段包含鼠IgG2a重链恒定区。在一些实施例中,抗CD138抗体或抗原结合片段包含鼠Igκ轻链恒定区。在一些实施例中,抗CD138抗体或抗原结合片段包含人类IgG重链恒定区。在一些实施例中,抗CD138抗体或抗原结合片段包含人类IgG2a重链恒定区。在一些实施例中,抗CD138抗体或抗原结合片段包含

人类Igκ或λ轻链恒定区。在一些实施例中,抗CD138抗体或抗原结合片段与包含SEQ ID NO: 21的重链可变域及SEQ ID NO:22的轻链可变域的抗体竞争结合相同表位和/或结合相同表位。

[0040] 在不同实施例中,ADC的抗体或抗原结合片段(Ab)为抗EPHA2抗体或其抗原结合片段。在一些实施例中,抗体或抗原结合片段结合至EPHA2且靶向表达EPHA2的赘生性细胞(即ADC靶向表达EPHA2的赘生性细胞)。在一些实施例中,ADC的抗体或抗原结合片段为内化性抗EPHA2抗体或其内化性抗原结合片段。

[0041] 在一些实施例中,该抗EPHA2抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:13(HCDR1)、SEQ ID NO:14(HCDR2)和SEQ ID NO:15(HCDR3)的氨基酸序列的三个重链互补决定区(HCDR1、HCDR2和HCDR3);及包含SEQ ID NO:16(LCDR1)、SEQ ID NO:17(LCDR2)及SEQ ID NO:18(LCDR3)的氨基酸序列的三个轻链互补决定区(LCDR1、LCDR2及LCDR3)。在一些实施例中,抗EPHA2抗体或抗原结合片段为内化性抗体或内化性抗原结合片段。在一些实施例中,抗EPHA2抗体或抗原结合片段包含人类框架序列。在一些实施例中,抗EPHA2抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:23的氨基酸序列的重链可变区及包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列的轻链可变区。在一些实施例中,抗EPHA2抗体或抗原结合片段包含人类IgG重链恒定区。在一些实施例中,抗EPHA2抗体或抗原结合片段包含人类IgG1重链恒定区。在一些实施例中,抗EPHA2抗体或抗原结合片段包含人类Igκ或λ轻链恒定区。在一些实施例中,抗EPHA2抗体或抗原结合片段与包含SEQ ID NO:23的重链可变域及SEQ ID NO:24的轻链可变域的抗体竞争结合相同表位和/或结合相同表位。

[0042] 在一些实施例中,本文披露具有式(I)的化合物:



Y选自O、S、NR⁶及CR⁶R⁷;

R¹、R²及R³各自独立地选自氢、羟基、-O-(C₁-C₆烷基)、-O-C(=O)-(C₁-C₆烷基)、-C(=O)-O-(C₁-C₆烷基)及C₁-C₆烷基;

R⁴选自氢、C₁-C₆烷基、-C(=O)-(C₁-C₆烷基)、-C(=O)-(C₃-C₈碳环基)、-C(=O)-(C₃-C₈杂环基)及-C(=O)-NR⁶R⁷;

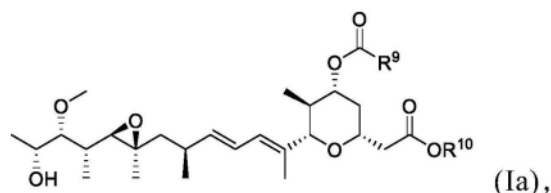
R⁵选自氢、羟基、-CH₂-OH、-CO₂H、-C(=O)-O-(C₁-C₆烷基)、-C(=O)-NR⁶R⁷、-NR⁶-C(=O)-R⁸、-O-C(=O)-NR⁶R⁷、-NR⁶-C(=O)-R⁸及-NR⁶-C(=O)-NR⁶R⁷;

R⁶及R⁷各自独立地选自氢、-R⁸、-C(=O)-R⁸及-C(=O)-O-R⁸;并且

R⁸选自C₁-C₆烷基、C₃-C₈碳环基及C₃-C₈杂环基,

其中R¹、R²、R³、R⁴、R⁵、R⁶、R⁷及R⁸各自独立地经0至3个独立地选自以下的基团取代: 卤素、羟基、C₁-C₆烷基、-O-(C₁-C₆烷基)、-CO₂H、-C(=O)-(C₁-C₆烷基)、-C(=O)-(C₃-C₈碳环基)、-C(=O)-(C₃-C₈杂环基)、-NR⁶R⁷、C₃-C₈碳环基、C₁-C₆烷基羟基、C₁-C₆烷基烷氧基、苄基及C₃-C₈杂环基,其中的每一个可独立地经0或1个选自以下的基团取代: 卤素、羟基、C₁-C₃烷基、C₁-C₃烷氧基、C₁-C₃卤烷基、-NH-C(=O)-(C₁-C₃烷基)及-NH-C(=O)-O-(C₁-C₃烷基)。

[0043] 在一些实施例中,本文提供具有式(Ia)的化合物:



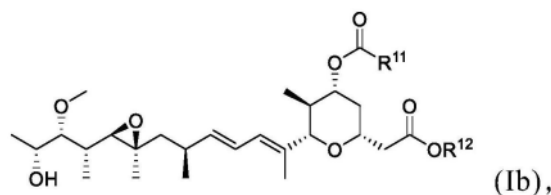
或其药学上可接受的盐,其中:

R^9 选自 C_3 - C_8 杂环基;并且

R^{10} 选自H及 C_1 - C_6 烷基,

其中 R^9 及 R^{10} 各自独立地经0至3个独立地选自以下的基团取代:卤素、羟基、 C_1 - C_3 烷基、 C_1 - C_3 烷氧基、 $-NH_2$ 、 $-NH$ -(C_1 - C_3 烷基)及 $-N$ -(C_1 - C_3 烷基)₂。

[0044] 在一些实施例中,本文提供具有式(Ib)的化合物:



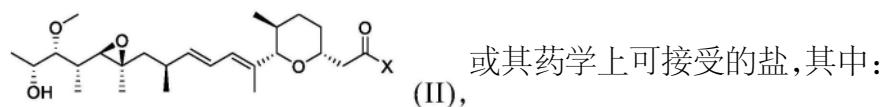
或其药学上可接受的盐,其中:

R^{11} 选自 $^*-N(R^{13})-N(R^{13})$ 、 $^*-N(R^{13})-N(R^{13})$ 及 $^*-N(R^{13})-N(R^{13})$, 其中*指示 R^{11} 与该化合物的其余

部分的连接点;并且

R^{12} 及 R^{13} 各自独立地选自H及甲基。

[0045] 在一些实施例中,本文提供具有式(II)的化合物:



或其药学上可接受的盐,其中:

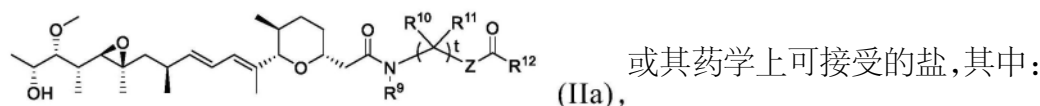
X为 NR^6R^7 ;

R^6 及 R^7 各自独立地选自氢、 $-R^8$ 、 $-C(=O)-R^8$ 、 $-C(=O)-O-R^8$ 、 $-(C_1-C_6\text{烷基})-O-C(=O)-R^8$ 及 $-(C_1-C_6\text{烷基})-NH-C(=O)-R^8$;并且

R^8 选自 C_1 - C_6 烷基、 C_3 - C_8 碳环基及 C_3 - C_8 杂环基,

其中 R^6 、 R^7 及 R^8 各自独立地经0至3个独立地选自以下的基团取代:卤素、羟基、 C_1 - C_6 烷基、 $-O$ -(C_1 - C_6 烷基)、 $-CO_2H$ 、 $-C(=O)$ -(C_1 - C_6 烷基)、 $-C(=O)$ -(C_3 - C_8 碳环基)、 $-C(=O)$ -(C_3 - C_8 杂环基)、 $-NR^6R^7$ 、 C_3 - C_8 碳环基、 C_1 - C_6 烷基羟基、 C_1 - C_6 烷基烷氧基、苄基及 C_3 - C_8 杂环基,其中的每一个可独立地经0或1个选自以下的基团取代:卤素、羟基、 C_1 - C_3 烷基、 C_1 - C_3 烷氧基、 C_1 - C_3 卤烷基、 $-NH-C(=O)$ -(C_1 - C_3 烷基)及 $-NH-C(=O)-O$ -(C_1 - C_3 烷基)。

[0046] 在一些实施例中,本文提供具有式(IIa)的化合物:



或其药学上可接受的盐,其中:

Z选自 NR^9 及O;

R^9 选自氢及 C_1 - C_6 烷基;

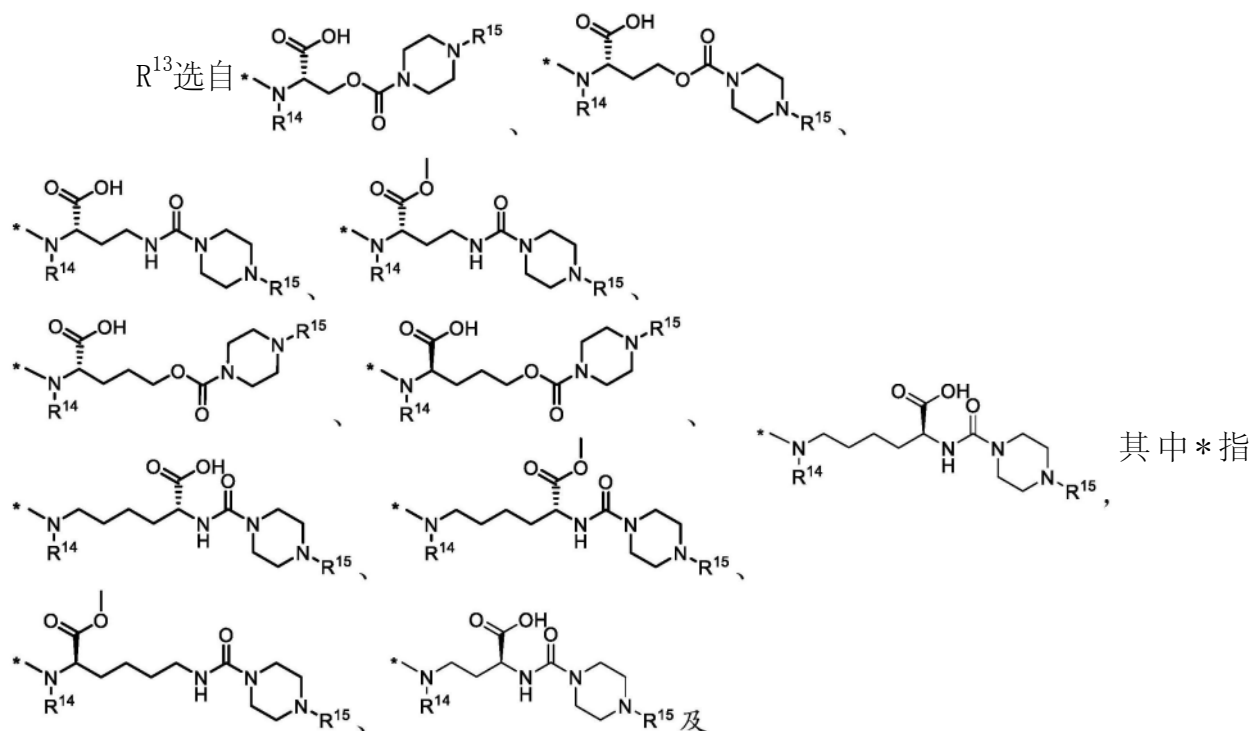
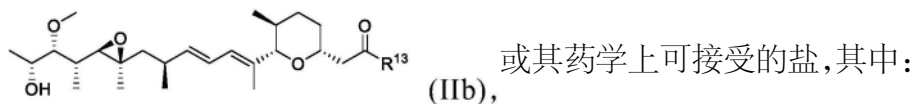
R^{10} 及 R^{11} 各自独立地选自氢、卤素、羟基、 C_1 - C_6 烷基、 $-O$ -(C_1 - C_6 烷基)、 $-CO_2H$ 、 $-C(=O)-O$ -(C_1 - C_6 烷基)、 $-C(=O)$ -(C_1 - C_6 烷基)、 $-C(=O)$ -(C_3 - C_8 碳环基)、 $-C(=O)$ -(C_3 - C_8 杂环基)、 C_3 - C_8 碳环基、 C_1 - C_6 烷基羟基、 C_1 - C_6 烷基烷氧基、苄基及 C_3 - C_8 杂环基;

R^{12} 选自 C_1 - C_6 烷基、 C_3 - C_8 碳环基、 C_3 - C_8 杂环基,

其中 R^9 、 R^{10} 、 R^{11} 及 R^{12} 各自独立地经0或1个选自以下的基团取代:卤素、羟基、 C_1 - C_3 烷基、 C_1 - C_3 烷氧基及 C_1 - C_3 卤烷基;并且

t 为选自1、2、3、4、5及6的整数。

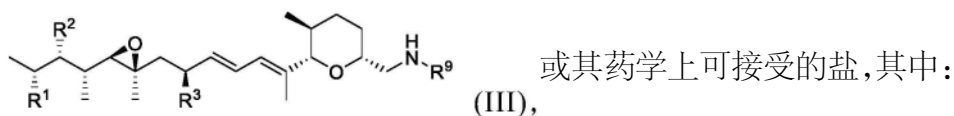
[0047] 在一些实施例中,本文提供具有式(IIb)的化合物:



示 R^{13} 与该化合物的其余部分的连接点;并且

R^{14} 及 R^{15} 各自独立地选自氢及甲基。

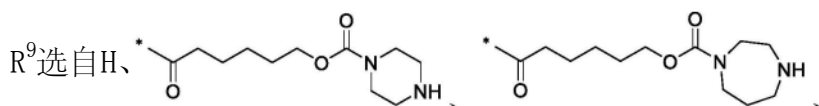
[0048] 在一些实施例中,本文提供具有式(III)的化合物:

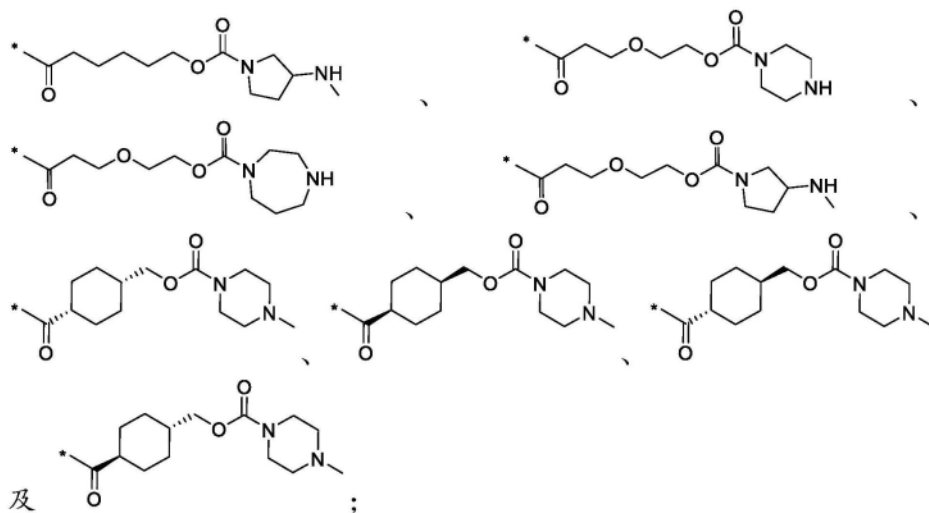


R^1 、 R^2 及 R^3 各自独立地选自氢、羟基、-O- (C_1 - C_6 烷基)、-O-C(=O)- (C_1 - C_6 烷基)、-C(=O)-O- (C_1 - C_6 烷基)及 C_1 - C_6 烷基;

R^6 及 R^7 各自独立地选自氢、- R^8 、-C(=O)- R^8 及-C(=O)-O- R^8 ;

R^8 选自 C_1 - C_6 烷基、 C_3 - C_8 碳环基及 C_3 - C_8 杂环基;并且

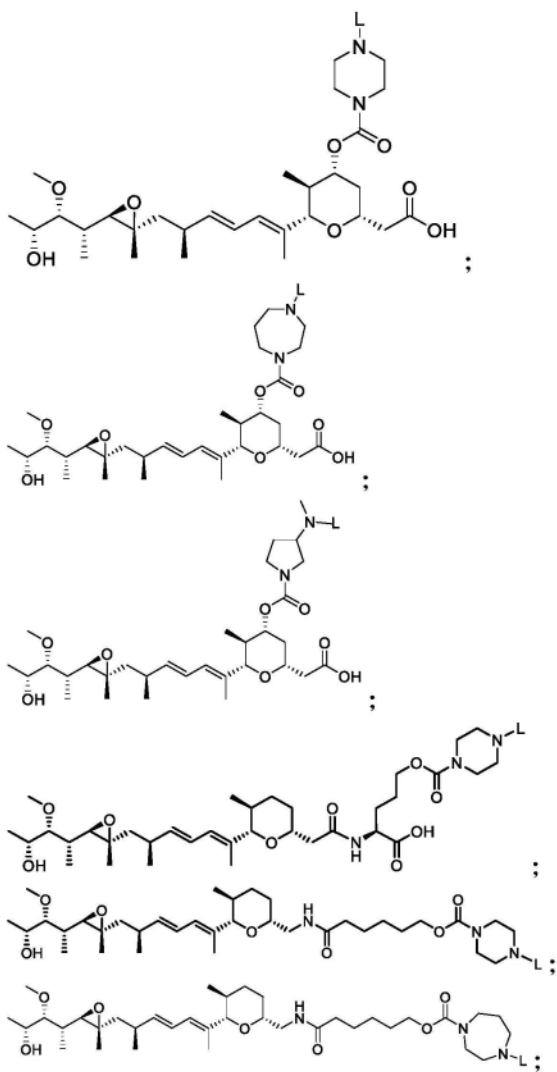


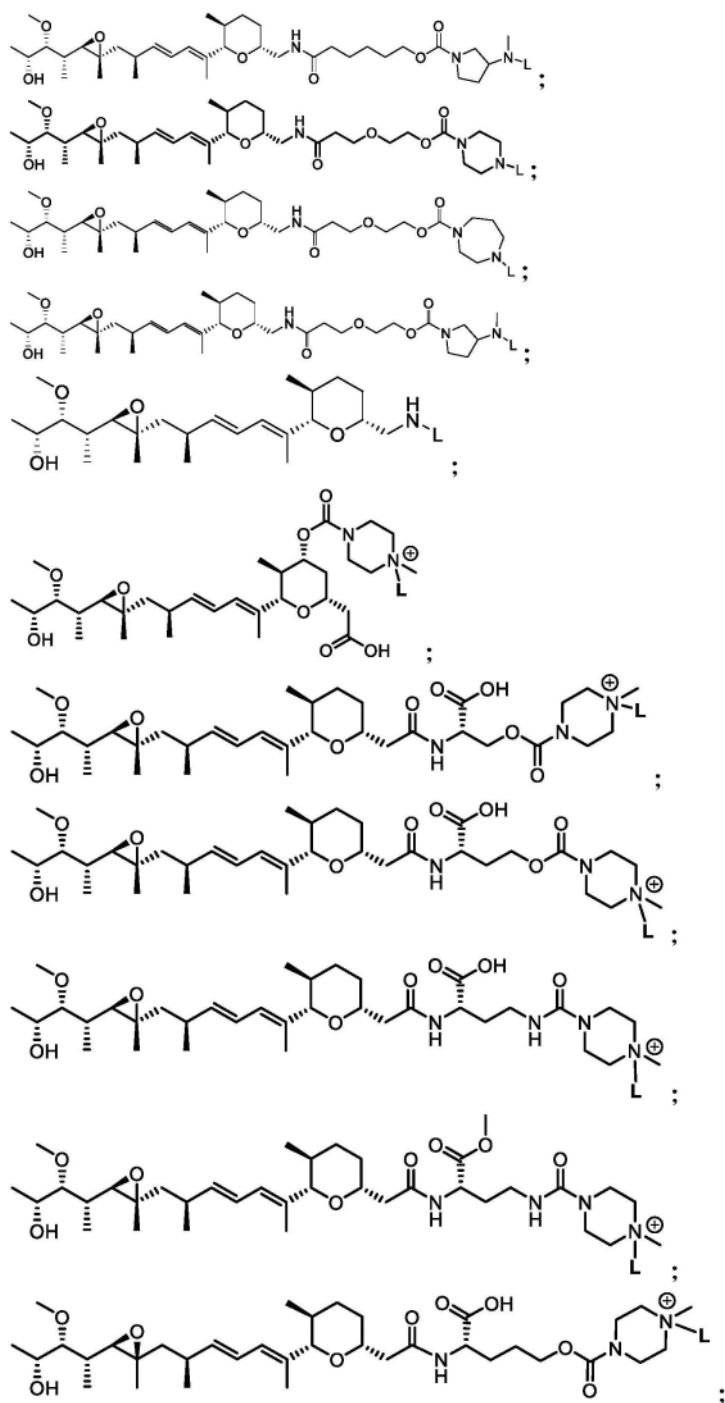


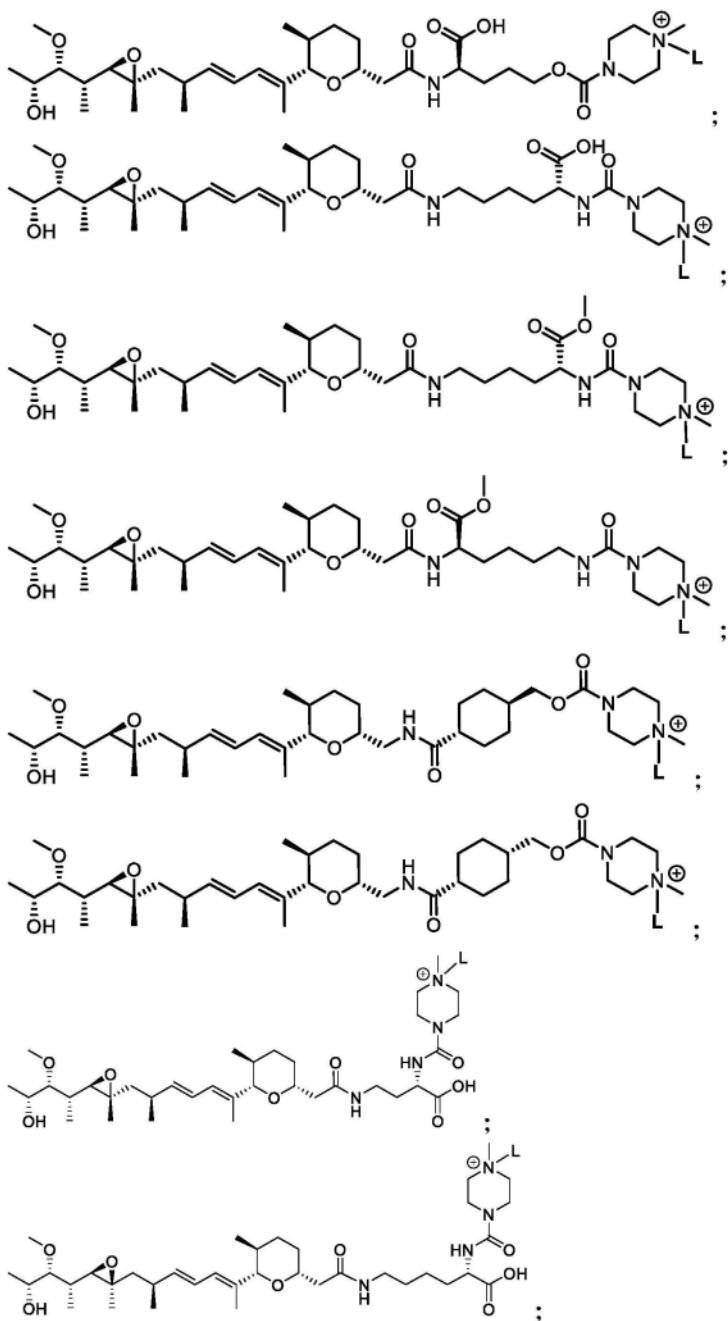
其中 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^6 、 R^7 及 R^8 各自独立地经0至3个独立地选自以下的基团取代：卤素、羟基、 C_1 - C_6 烷基、-O- (C_1 - C_6 烷基)、-CO₂H、-C(=O)- (C_1 - C_6 烷基)、-C(=O)- (C_3 - C_8 碳环基)、-C(=O)- (C_3 - C_8 杂环基)、-NR⁶R⁷、 C_3 - C_8 碳环基、 C_1 - C_6 烷基羟基、 C_1 - C_6 烷基烷氧基、苄基及 C_3 - C_8 杂环基，其中的每一个可独立地经0或1个选自以下的基团取代：卤素、羟基、 C_1 - C_3 烷基、 C_1 - C_3 烷氧基、 C_1 - C_3 卤烷基、-NH-C(=O)- (C_1 - C_3 烷基) 及 -NH-C(=O)-O- (C_1 - C_3 烷基)；并且

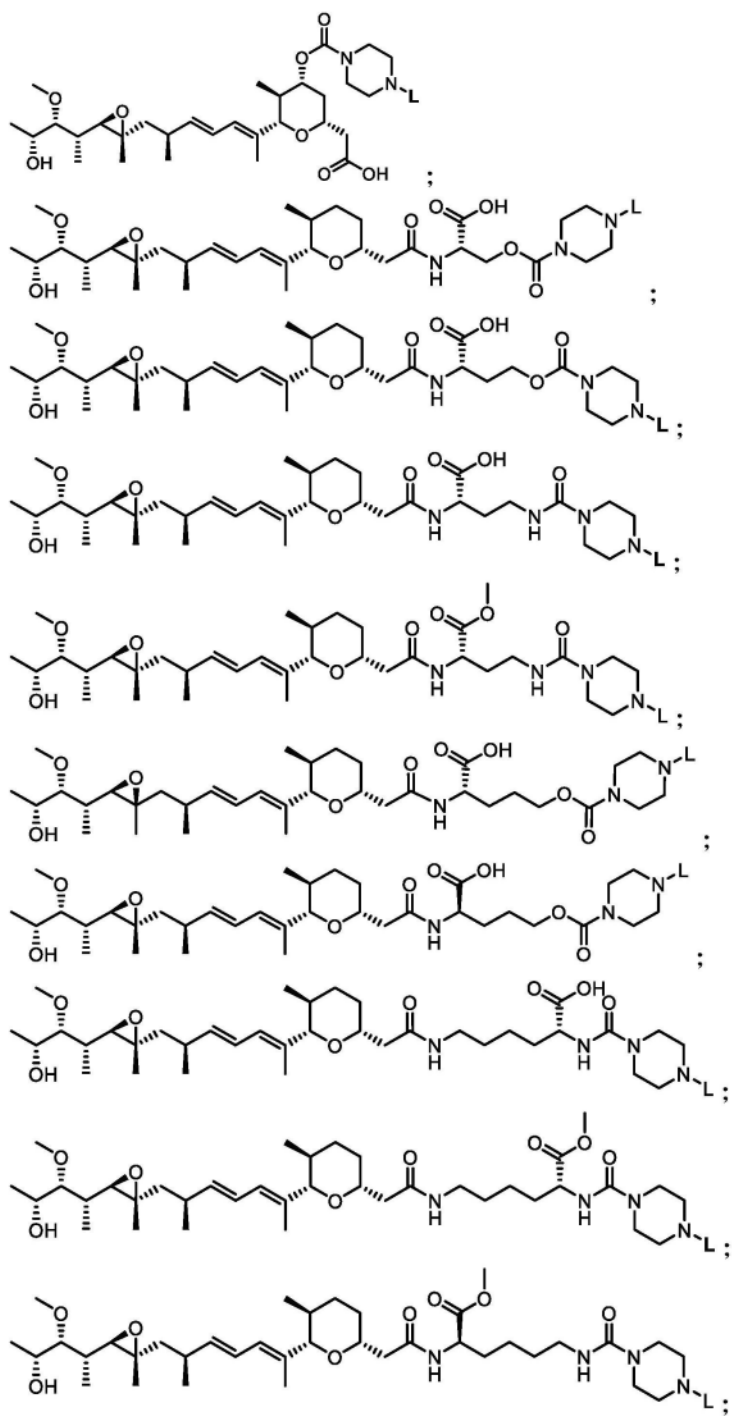
其中*指示 R^9 与该化合物的其余部分的连接点。

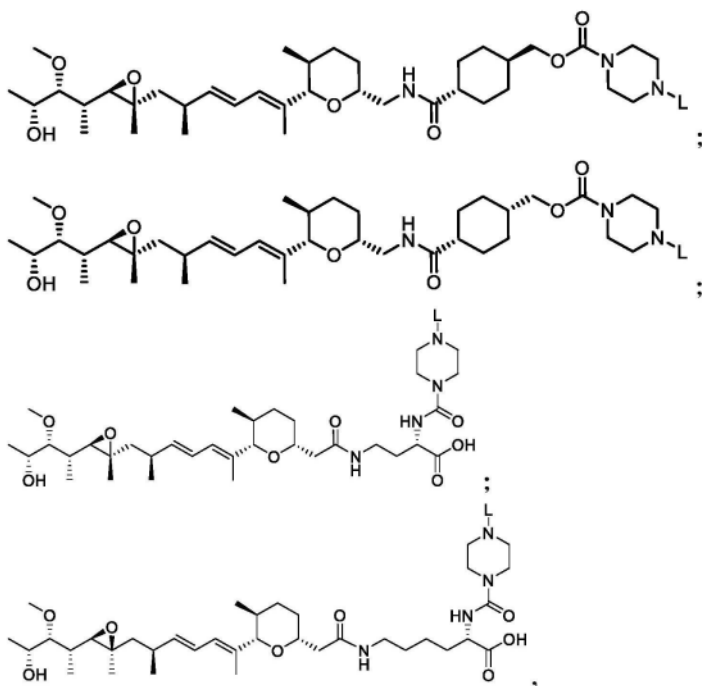
[0049] 在一些实施例中，本文提供选自以下的化合物：











及其药学上可接受的盐，

其中L为共价连接至抗体的接头。

[0050] 此外，在不同实施例中，本文提供所描述的ADC化合物、荷伯希二烯化合物及组合物例如在治疗例如癌症的赘生性病症中的治疗性用途。在某些方面中，本披露提供治疗赘生性病症的方法，该赘生性病症例如表达由ADC的抗体或抗原结合片段靶向的抗原的癌症，该抗原诸如HER2、CD138、EPHA2、MSLN、FOLH1、CDH6、CEACAM5、CFC1B、ENPP3、FOLR1、HAVCR1、KIT、MET、MUC16、SLC39A6、SLC44A4或STEAP1。

[0051] 在某些方面中，本披露提供治疗患有或疑似患有赘生性病症的受试者的方法，其通过向受试者施用治疗有效量和/或治疗有效方案的所描述的ADC或组合物中的任一种来进行。在一些实施例中，赘生性病症为血液恶性肿瘤或实体瘤。在一些实施例中，赘生性病症为血液恶性肿瘤。在一些实施例中，血液恶性肿瘤选自B细胞恶性肿瘤、白血病、淋巴瘤及骨髓瘤。在一些实施例中，血液恶性肿瘤选自急性骨髓性白血病及多发性骨髓瘤。在一些实施例中，赘生性病症为实体瘤。在一些实施例中，实体瘤选自乳癌（例如HER2阳性乳癌）、胃癌（例如胃腺癌）、前列腺癌、卵巢癌、肺癌（例如肺腺癌）、子宫癌（例如子宫浆液性子宫内膜癌）、唾液腺癌、黑色素瘤、大肠癌、子宫颈癌、胰脏癌、肾癌、结直肠癌及食道癌。在一些实施例中，实体瘤选自HER2阳性乳癌、胃腺癌、前列腺癌及骨肉瘤。

[0052] 在一些实施例中，用抗体-药物缀合物或组合物进行的治疗诱导对不表达靶标抗原但邻近于表达靶标抗原的赘生性细胞的赘生性细胞的旁观者杀灭。在一些实施例中，受试者具有表达靶标抗原的一个或多个赘生性细胞。

[0053] 在一些实施例中，靶标抗原为HER2。在一些实施例中，一个或多个赘生性细胞处于HER2表达性乳癌、卵巢癌、胃癌、肺癌（例如肺腺癌）、子宫癌（例如子宫浆液性子宫内膜癌）、骨肉瘤或唾液腺癌中。在一些实施例中，受试者对用(a)单独施用时的抗HER2抗体和/或(b)单独施用时的荷伯希二烯剪接调节子进行的治疗无反应或反应不良。在一些实施例中，受试者对用单独施用时的荷伯希二烯剪接调节子进行的治疗不耐受、无反应或反应不良。

[0054] 在一些实施例中,靶标抗原为CD138。在一些实施例中,一个或多个赘生性细胞处于CD138表达性多发性骨髓瘤中。在一些实施例中,受试者对用(a)单独施用时的抗CD138抗体和/或(b)单独施用时的荷伯希二烯剪接调节子进行治疗无反应或反应不良。在一些实施例中,受试者对用单独施用时的荷伯希二烯剪接调节子进行治疗不耐受、无反应或反应不良。

[0055] 在一些实施例中,靶标抗原为EPHA2。在一些实施例中,一个或多个赘生性细胞处于EPHA2表达性乳癌、前列腺癌、卵巢癌、肺癌、黑色素瘤、大肠癌或食道癌中。在一些实施例中,受试者对用(a)单独施用时的抗EPHA2抗体和/或(b)单独施用时的荷伯希二烯剪接调节子进行治疗无反应或反应不良。在一些实施例中,受试者对用单独施用时的荷伯希二烯剪接调节子进行治疗不耐受、无反应或反应不良。

[0056] 在一些实施例中,靶标抗原为MSLN。在一些实施例中,一个或多个赘生性细胞处于MSLN表达性卵巢癌、子宫颈癌、胰脏癌或肺癌(例如肺腺癌)中。在一些实施例中,受试者对用(a)单独施用时的抗MSLN抗体和/或(b)单独施用时的剪接调节子进行治疗无反应或反应不良。在一些实施例中,受试者对用单独施用时的剪接调节子进行治疗不耐受、无反应或反应不良。

[0057] 在一些实施例中,靶标抗原为FOLH1。在一些实施例中,一个或多个赘生性细胞处于FOLH1表达性前列腺癌中。在一些实施例中,受试者对用(a)单独施用时的抗FOLH1抗体和/或(b)单独施用时的剪接调节子进行治疗无反应或反应不良。在一些实施例中,受试者对用单独施用时的剪接调节子进行治疗不耐受、无反应或反应不良。

[0058] 在一些实施例中,靶标抗原为CDH6。在一些实施例中,一个或多个赘生性细胞处于CDH6表达性肾癌中。在一些实施例中,受试者对用(a)单独施用时的抗CDH6抗体和/或(b)单独施用时的剪接调节子进行治疗无反应或反应不良。在一些实施例中,受试者对用单独施用时的剪接调节子进行治疗不耐受、无反应或反应不良。

[0059] 在一些实施例中,靶标抗原为CEACAM5。在一些实施例中,一个或多个赘生性细胞处于CEACAM5表达性结直肠癌中。在一些实施例中,受试者对用(a)单独施用时的抗CEACAM5抗体和/或(b)单独施用时的剪接调节子进行治疗无反应或反应不良。在一些实施例中,受试者对用单独施用时的剪接调节子进行治疗不耐受、无反应或反应不良。

[0060] 在一些实施例中,靶标抗原为CFC1B。在一些实施例中,一个或多个赘生性细胞处于CFC1B表达性胰脏癌中。在一些实施例中,受试者对用(a)单独施用时的抗CFC1B抗体和/或(b)单独施用时的剪接调节子进行治疗无反应或反应不良。在一些实施例中,受试者对用单独施用时的剪接调节子进行治疗不耐受、无反应或反应不良。

[0061] 在一些实施例中,靶标抗原为ENPP3。在一些实施例中,一个或多个赘生性细胞处于ENPP3表达性肾癌中。在一些实施例中,受试者对用(a)单独施用时的抗ENPP3抗体和/或(b)单独施用时的剪接调节子进行治疗无反应或反应不良。在一些实施例中,受试者对用单独施用时的剪接调节子进行治疗不耐受、无反应或反应不良。

[0062] 在一些实施例中,靶标抗原为FOLR1。在一些实施例中,一个或多个赘生性细胞处于FOLR1表达性卵巢癌中。在一些实施例中,受试者对用(a)单独施用时的抗FOLR1抗体和/或(b)单独施用时的剪接调节子进行治疗无反应或反应不良。在一些实施例中,受试者对用单独施用时的剪接调节子进行治疗不耐受、无反应或反应不良。

[0063] 在一些实施例中,靶标抗原为HAVCR1。在一些实施例中,一个或多个赘生性细胞处于HAVCR1表达性肾癌或食道癌中。在一些实施例中,受试者对用(a)单独施用时的抗HAVCR1抗体和/或(b)单独施用时的剪接调节子进行治疗无反应或反应不良。在一些实施例中,受试者对用单独施用时的剪接调节子进行治疗不耐受、无反应或反应不良。

[0064] 在一些实施例中,靶标抗原为KIT。在一些实施例中,一个或多个赘生性细胞处于KIT表达性肾癌中。在一些实施例中,受试者对用(a)单独施用时的抗KIT抗体和/或(b)单独施用时的剪接调节子进行治疗无反应或反应不良。在一些实施例中,受试者对用单独施用时的剪接调节子进行治疗不耐受、无反应或反应不良。

[0065] 在一些实施例中,靶标抗原为MET。在一些实施例中,一个或多个赘生性细胞处于MET表达性肾癌或食道癌中。在一些实施例中,受试者对用(a)单独施用时的抗MET抗体和/或(b)单独施用时的剪接调节子进行治疗无反应或反应不良。在一些实施例中,受试者对用单独施用时的剪接调节子进行治疗不耐受、无反应或反应不良。

[0066] 在一些实施例中,靶标抗原为MUC16。在一些实施例中,一个或多个赘生性细胞处于MUC16表达性卵巢癌、子宫颈癌或乳癌中。在一些实施例中,受试者对用(a)单独施用时的抗MUC16抗体和/或(b)单独施用时的剪接调节子进行治疗无反应或反应不良。在一些实施例中,受试者对用单独施用时的剪接调节子进行治疗不耐受、无反应或反应不良。

[0067] 在一些实施例中,靶标抗原为SLC39A6。在一些实施例中,一个或多个赘生性细胞处于SLC39A6表达性乳癌或前列腺癌中。在一些实施例中,受试者对用(a)单独施用时的抗SLC39A6抗体和/或(b)单独施用时的剪接调节子进行治疗无反应或反应不良。在一些实施例中,受试者对用单独施用时的剪接调节子进行治疗不耐受、无反应或反应不良。

[0068] 在一些实施例中,靶标抗原为SLC44A4。在一些实施例中,一个或多个赘生性细胞处于SLC44A4表达性前列腺癌中。在一些实施例中,受试者对用(a)单独施用时的抗SLC44A4抗体和/或(b)单独施用时的剪接调节子进行治疗无反应或反应不良。在一些实施例中,受试者对用单独施用时的剪接调节子进行治疗不耐受、无反应或反应不良。

[0069] 在一些实施例中,靶标抗原为STEAP1。在一些实施例中,一个或多个赘生性细胞处于STEAP1表达性前列腺癌中。在一些实施例中,受试者对用(a)单独施用时的抗STEAP1抗体和/或(b)单独施用时的剪接调节子进行治疗无反应或反应不良。在一些实施例中,受试者对用单独施用时的剪接调节子进行治疗不耐受、无反应或反应不良。

[0070] 在某些其他方面中,本披露提供减少或抑制患有或疑似患有赘生性病症的受试者中的肿瘤生长的方法,其通过向受试者施用治疗有效量和/或治疗有效方案的所描述的ADC或组合物中的任一种来进行。

[0071] 在一些实施例中,用抗体-药物缀合物或组合物进行治疗诱导对不表达靶标抗原但邻近于表达靶标抗原的赘生性肿瘤细胞的赘生性肿瘤细胞的旁观者杀灭。在一些实施例中,肿瘤包含表达靶标抗原的一个或多个赘生性细胞。

[0072] 在一些实施例中,靶标抗原为HER2。在一些实施例中,一个或多个赘生性细胞来源于HER2表达性乳癌、卵巢癌、胃癌、肺癌(例如肺腺癌)、子宫癌(例如子宫浆液性子宫内膜癌)、骨肉瘤或唾液腺癌。在一些实施例中,肿瘤对用(a)单独施用时的抗HER2抗体和/或(b)单独施用时的荷伯希二烯剪接调节子进行治疗具有抗性 or 难治性。

[0073] 在一些实施例中,靶标抗原为CD138。在一些实施例中,一个或多个赘生性细胞来

源于CD138表达性多发性骨髓瘤。在一些实施例中,肿瘤对用(a)单独施用时的抗CD138抗体和/或(b)单独施用时的荷伯希二烯剪接调节子进行治疗具有抗性或难治性。

[0074] 在一些实施例中,靶标抗原为EPHA2。在一些实施例中,一个或多个赘生性细胞来源于EPHA2表达性乳癌、前列腺癌、卵巢癌、肺癌、黑色素瘤、大肠癌或食道癌。在一些实施例中,肿瘤对用(a)单独施用时的抗EPHA2抗体和/或(b)单独施用时的荷伯希二烯剪接调节子进行治疗具有抗性或难治性。

[0075] 在一些实施例中,靶标抗原为MSLN。在一些实施例中,一个或多个赘生性细胞来源于MSLN表达性卵巢癌、子宫颈癌、胰脏癌或肺癌(例如肺腺癌)。在一些实施例中,肿瘤对用(a)单独施用时的抗MSLN抗体和/或(b)单独施用时的剪接调节子进行治疗具有抗性或难治性。

[0076] 在一些实施例中,靶标抗原为FOLH1。在一些实施例中,一个或多个赘生性细胞来源于FOLH1表达性前列腺癌。在一些实施例中,肿瘤对用(a)单独施用时的抗FOLH1抗体和/或(b)单独施用时的剪接调节子进行治疗具有抗性或难治性。

[0077] 在一些实施例中,靶标抗原为CDH6。在一些实施例中,一个或多个赘生性细胞来源于CDH6表达性肾癌。在一些实施例中,肿瘤对用(a)单独施用时的抗CDH6抗体和/或(b)单独施用时的剪接调节子进行治疗具有抗性或难治性。

[0078] 在一些实施例中,靶标抗原为CEACAM5。在一些实施例中,一个或多个赘生性细胞来源于CEACAM5表达性结直肠癌。在一些实施例中,肿瘤对用(a)单独施用时的抗CEACAM5抗体和/或(b)单独施用时的剪接调节子进行治疗具有抗性或难治性。

[0079] 在一些实施例中,靶标抗原为CFC1B。在一些实施例中,一个或多个赘生性细胞来源于CFC1B表达性胰脏癌。在一些实施例中,肿瘤对用(a)单独施用时的抗CFC1B抗体和/或(b)单独施用时的剪接调节子进行治疗具有抗性或难治性。

[0080] 在一些实施例中,靶标抗原为ENPP3。在一些实施例中,一个或多个赘生性细胞来源于ENPP3表达性肾癌。在一些实施例中,肿瘤对用(a)单独施用时的抗ENPP3抗体和/或(b)单独施用时的剪接调节子进行治疗具有抗性或难治性。

[0081] 在一些实施例中,靶标抗原为FOLR1。在一些实施例中,一个或多个赘生性细胞来源于FOLR1表达性卵巢癌。在一些实施例中,肿瘤对用(a)单独施用时的抗FOLR1抗体和/或(b)单独施用时的剪接调节子进行治疗具有抗性或难治性。

[0082] 在一些实施例中,靶标抗原为HAVCR1。在一些实施例中,一个或多个赘生性细胞来源于HAVCR1表达性肾癌或食道癌。在一些实施例中,肿瘤对用(a)单独施用时的抗HAVCR1抗体和/或(b)单独施用时的剪接调节子进行治疗具有抗性或难治性。

[0083] 在一些实施例中,靶标抗原为KIT。在一些实施例中,一个或多个赘生性细胞来源于KIT表达性肾癌。在一些实施例中,肿瘤对用(a)单独施用时的抗KIT抗体和/或(b)单独施用时的剪接调节子进行治疗具有抗性或难治性。

[0084] 在一些实施例中,靶标抗原为MET。在一些实施例中,一个或多个赘生性细胞来源于MET表达性肾癌或食道癌。在一些实施例中,肿瘤对用(a)单独施用时的抗MET抗体和/或(b)单独施用时的剪接调节子进行治疗具有抗性或难治性。

[0085] 在一些实施例中,靶标抗原为MUC16。在一些实施例中,一个或多个赘生性细胞来源于MUC16表达性卵巢癌、子宫颈癌或乳癌。在一些实施例中,肿瘤对用(a)单独施用时的抗

MUC16抗体和/或(b)单独施用时的剪接调节子进行治疗具有抗性 or 难治性。

[0086] 在一些实施例中,靶标抗原为SLC39A6。在一些实施例中,一个或多个赘生性细胞来源于SLC39A6表达性乳癌或前列腺癌。在一些实施例中,肿瘤对用(a)单独施用时的抗SLC39A6抗体和/或(b)单独施用时的剪接调节子进行治疗具有抗性 or 难治性。

[0087] 在一些实施例中,靶标抗原为SLC44A4。在一些实施例中,一个或多个赘生性细胞来源于SLC44A4表达性前列腺癌。在一些实施例中,肿瘤对用(a)单独施用时的抗SLC44A4抗体和/或(b)单独施用时的剪接调节子进行治疗具有抗性 or 难治性。

[0088] 在一些实施例中,靶标抗原为STEAP1。在一些实施例中,一个或多个赘生性细胞来源于STEAP1表达性前列腺癌。在一些实施例中,肿瘤对用(a)单独施用时的抗STEAP1抗体和/或(b)单独施用时的剪接调节子进行治疗具有抗性 or 难治性。

[0089] 在又其他方面中,本披露提供确定患有或疑似患有赘生性病症的受试者是否对用所描述的ADC或组合物中的任一种进行治疗起反应的方法,其通过提供来自受试者的生物样品且使生物样品与ADC或组合物接触来进行。在一些实施例中,生物样品为肿瘤样品。在一些实施例中,肿瘤样品为肿瘤活检或血液样品。在一些实施例中,血液样品选自血液、血液部分或自血液或血液部分获得的细胞。在一些实施例中,受试者具有表达靶标抗原的一个或多个赘生性细胞。在一些实施例中,靶标抗原为HER2。在一些实施例中,一个或多个赘生性细胞来源于HER2表达性乳癌、卵巢癌、胃癌、肺癌(例如肺腺癌)、子宫癌(例如子宫浆液性子宫内膜癌)、骨肉瘤或唾液腺癌。在一些实施例中,靶标抗原为CD138。在一些实施例中,一个或多个赘生性细胞来源于CD138表达性多发性骨髓瘤。在一些实施例中,靶标抗原为EPHA2。在一些实施例中,一个或多个赘生性细胞来源于EPHA2表达性乳癌、前列腺癌、卵巢癌、肺癌、黑色素瘤、大肠癌或食道癌。在一些实施例中,靶标抗原为MSLN。在一些实施例中,一个或多个赘生性细胞来源于MSLN表达性卵巢癌、子宫颈癌、胰脏癌或肺癌(例如肺腺癌)。在一些实施例中,靶标抗原为FOLH1。在一些实施例中,一个或多个赘生性细胞来源于FOLH1表达性前列腺癌。在一些实施例中,靶标抗原为CDH6。在一些实施例中,一个或多个赘生性细胞来源于CDH6表达性肾癌。在一些实施例中,靶标抗原为CEACAM5。在一些实施例中,一个或多个赘生性细胞来源于CEACAM5表达性结直肠癌。在一些实施例中,靶标抗原为CFC1B。在一些实施例中,一个或多个赘生性细胞来源于CFC1B表达性胰脏癌。在一些实施例中,靶标抗原为ENPP3。在一些实施例中,一个或多个赘生性细胞来源于ENPP3表达性肾癌。在一些实施例中,靶标抗原为FOLR1。在一些实施例中,一个或多个赘生性细胞来源于FOLR1表达性卵巢癌。在一些实施例中,靶标抗原为HAVCR1。在一些实施例中,一个或多个赘生性细胞来源于HAVCR1表达性肾癌或食道癌。在一些实施例中,靶标抗原为KIT。在一些实施例中,一个或多个赘生性细胞来源于KIT表达性肾癌。在一些实施例中,靶标抗原为MET。在一些实施例中,一个或多个赘生性细胞来源于MET表达性肾癌或食道癌。在一些实施例中,靶标抗原为MUC16。在一些实施例中,一个或多个赘生性细胞来源于MUC16表达性卵巢癌、子宫颈癌或乳癌。在一些实施例中,靶标抗原为SLC39A6。在一些实施例中,一个或多个赘生性细胞来源于SLC39A6表达性乳癌或前列腺癌。在一些实施例中,靶标抗原为SLC44A4。在一些实施例中,一个或多个赘生性细胞来源于SLC44A4表达性前列腺癌。在一些实施例中,靶标抗原为STEAP1。在一些实施例中,一个或多个赘生性细胞来源于STEAP1表达性前列腺癌。

[0090] 在不同实施例中,本文进一步提供包含ADC及药学上可接受的稀释剂、载体和/或

赋形剂的药物组合物。还披露产生所描述的ADC化合物及组合物的方法。

本申请涉及下述项：

项1.一种具有式(I)的抗体-药物缀合物：



其中：

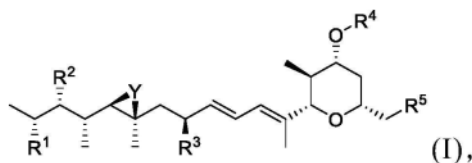
Ab为靶向赘生性细胞的抗体或抗原结合片段；

H为荷伯希二烯剪接调节子；

L为将Ab共价连接至H的接头；并且

p为1至15的整数。

项2.如项1所述的抗体-药物缀合物，其中该荷伯希二烯剪接调节子包含具有式(I)的化合物：



或其药学上可接受的盐，其经由任何原子共价

(I),

连接至L，其中：

Y选自O、S、NR⁶及CR⁶R⁷；

R¹、R²及R³各自独立地选自氢、羟基、-O-(C₁-C₆烷基)、-O-C(=O)-(C₁-C₆烷基)、-C(=O)-O-(C₁-C₆烷基)及C₁-C₆烷基；

R⁴选自氢、C₁-C₆烷基、-C(=O)-(C₁-C₆烷基)、-C(=O)-(C₃-C₈碳环基)、-C(=O)-(C₃-C₈杂环基)及-C(=O)-NR⁶R⁷；

R⁵选自氢、羟基、-CH₂-OH、-CO₂H、-C(=O)-O-(C₁-C₆烷基)、-C(=O)-NR⁶R⁷、-NR⁶-C(=O)-R⁸、-O-C(=O)-NR⁶R⁷、-NR⁶-C(=O)-R⁸及-NR⁶-C(=O)-NR⁶R⁷；

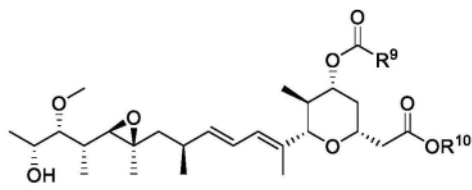
R⁶及R⁷各自独立地选自氢、-R⁸、-C(=O)-R⁸及-C(=O)-O-R⁸；并且

R⁸选自C₁-C₆烷基、C₃-C₈碳环基及C₃-C₈杂环基，

其中R¹、R²、R³、R⁴、R⁵、R⁶、R⁷及R⁸各自独立地经0至3个独立地选自以下的基团取代：卤素、羟基、C₁-C₆烷基、-O-(C₁-C₆烷基)、-CO₂H、-C(=O)-(C₁-C₆烷基)、-C(=O)-(C₃-C₈碳环基)、-C(=O)-(C₃-C₈杂环基)、-NR⁶R⁷、C₃-C₈碳环基、C₁-C₆烷基羟基、C₁-C₆烷基烷氧基、苄基及C₃-C₈杂环基，其中的每一个可独立地经0或1个选自以下的基团取代：卤素、羟基、C₁-C₃烷基、C₁-C₃烷氧基、C₁-C₃卤烷基、-NH-C(=O)-(C₁-C₃烷基)及-NH-C(=O)-O-(C₁-C₃烷基)，并且

其中共价连接至L的原子的价数未超出。

项3.如项1或项2所述的抗体-药物缀合物，其中该荷伯希二烯剪接调节子包含具有式(Ia)的化合物：



(Ia),

或其药学上可接受的盐，其经由任何原子

共价连接至L，其中：

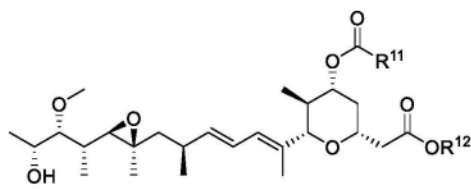
R⁹选自C₃-C₈杂环基；

R^{10} 选自H及 C_1 - C_6 烷基,

其中 R^9 及 R^{10} 各自独立地经0至3个独立地选自以下的基团取代:卤素、羟基、 C_1 - C_3 烷基、 C_1 - C_3 烷氧基、 $-NH_2$ 、 $-NH-(C_1-C_3\text{烷基})$ 及 $-N-(C_1-C_3\text{烷基})_2$,并且

其中共价连接至L的原子的价数未超出。

项4.如项1至3中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该荷伯希二烯剪接调节子包含具有式(Ib)的化合物:



或其药学上可接受的盐,其经由任何原子

(Ib),

共价连接至L,其中:

R^{11} 选自 $-N(R^{13})$ 、 $-N(R^{13})$ 及 $-N(R^{13})$, 其中*指示 R^{11} 与该化合物的其余

部分的连接点;

R^{12} 及 R^{13} 各自独立地选自H及甲基;并且

其中共价连接至L的原子的价数未超出。

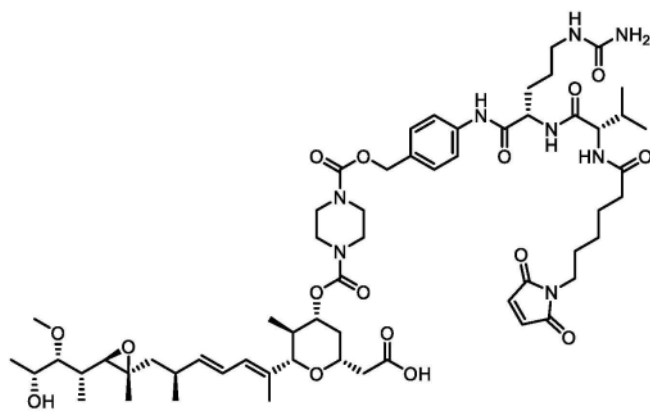
项5.如项1至4中任一项所述的抗体-药物缀合物,

其中该荷伯希二烯剪接调节子经由任何原子共价连接至L

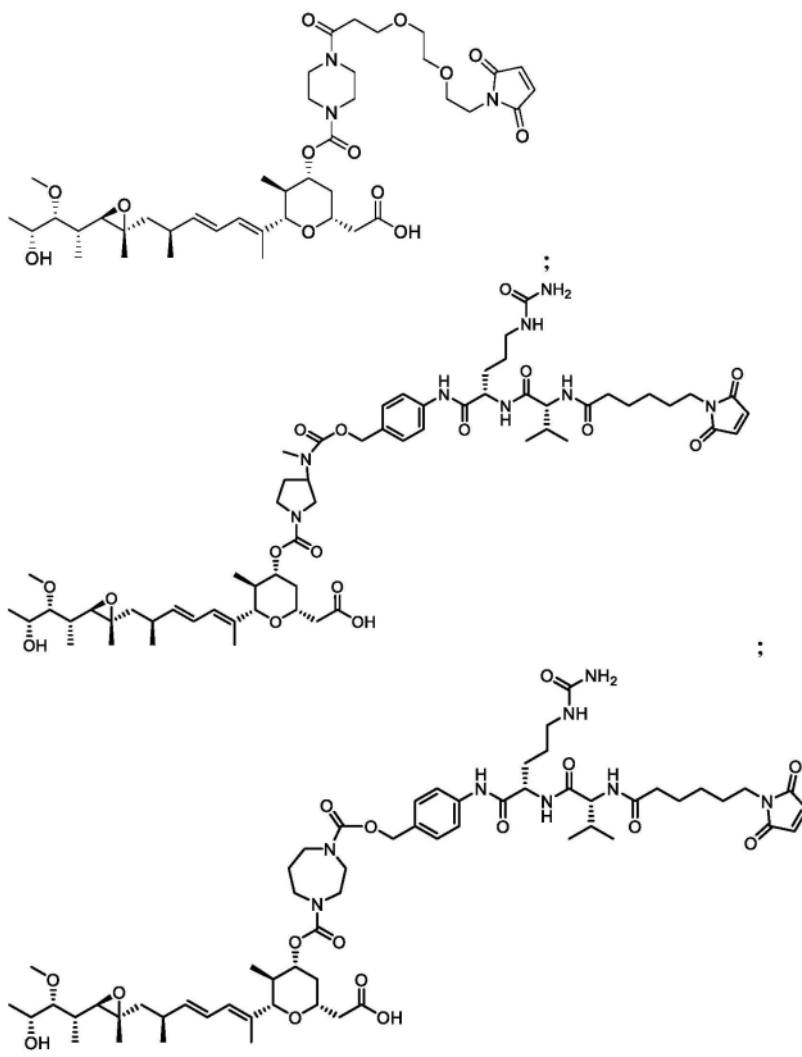
其中该荷伯希二烯剪接调节子选自H1、H2、H3及H12;并且

其中共价连接至L的原子的价数未超出。

项6.如项1或项2所述的抗体-药物缀合物,其中L共价连接至该荷伯希二烯剪接调节子("L-H"),且L-H具有选自以下结构的结构:

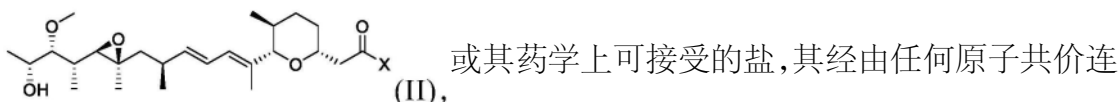


;



及其药学上可接受的盐。

项7.如项1所述的抗体-药物缀合物,其中该荷伯希二烯剪接调节子是具有式(II)的剪接调节子:



接至L,其中:

X为羟基或NR⁶R⁷;

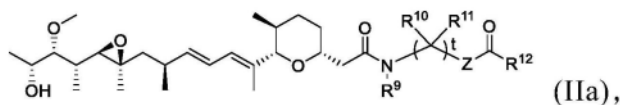
R⁶及R⁷各自独立地选自氢、-R⁸、-C(=O)-R⁸、-C(=O)-O-R⁸、-(C₁-C₆烷基)-O-C(=O)-R⁸及-(C₁-C₆烷基)-NH-C(=O)-R⁸;并且

R⁸选自C₁-C₆烷基、C₃-C₈碳环基及C₃-C₈杂环基,

其中R⁶、R⁷及R⁸各自独立地经0至3个独立地选自以下的基团取代：卤素、羟基、C₁-C₆烷基、-O-(C₁-C₆烷基)、-CO₂H、-C(=O)-O-(C₁-C₆烷基)、-C(=O)-(C₁-C₆烷基)、-C(=O)-(C₃-C₈碳环基)、-C(=O)-(C₃-C₈杂环基)、-NR⁶R⁷、C₃-C₈碳环基、C₁-C₆烷基羟基、C₁-C₆烷基烷氧基、苄基及C₃-C₈杂环基，其中的每一个可独立地经0或1个选自以下的基团取代：卤素、羟基、C₁-C₃烷基、C₁-C₃烷氧基、C₁-C₃卤烷基、-NH-C(=O)-(C₁-C₃烷基)及-NH-C(=O)-O-(C₁-C₃烷基)，并且

其中共价连接至L的原子的价数未超出。

项8.如项1或项7所述的抗体-药物缀合物,其中该荷伯希二烯剪接调节子是具有式(IIa)的剪接调节子:



或其药学上可接受的盐,其经由任何

原子共价连接至L,其中:

Z选自NR⁹及O;

R⁹选自氢及C₁-C₆烷基;

R¹⁰及R¹¹各自独立地选自氢、卤素、羟基、C₁-C₆烷基、-O-(C₁-C₆烷基)、-CO₂H、-C(=O)-O-(C₁-C₆烷基)、-C(=O)-(C₁-C₆烷基)、-C(=O)-(C₃-C₈碳环基)、-C(=O)-(C₃-C₈杂环基)、C₃-C₈碳环基、C₁-C₆烷基羟基、C₁-C₆烷基烷氧基、苄基及C₃-C₈杂环基;

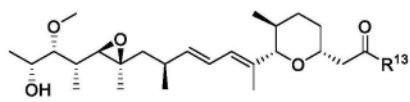
R¹²选自C₁-C₆烷基、C₃-C₈碳环基、C₃-C₈杂环基,

其中R⁹、R¹⁰、R¹¹及R¹²各自独立地经0或1个选自以下的基团取代:卤素、羟基、C₁-C₃烷基、C₁-C₃烷氧基及C₁-C₃卤烷基;

t为选自1、2、3、4、5及6的整数;并且

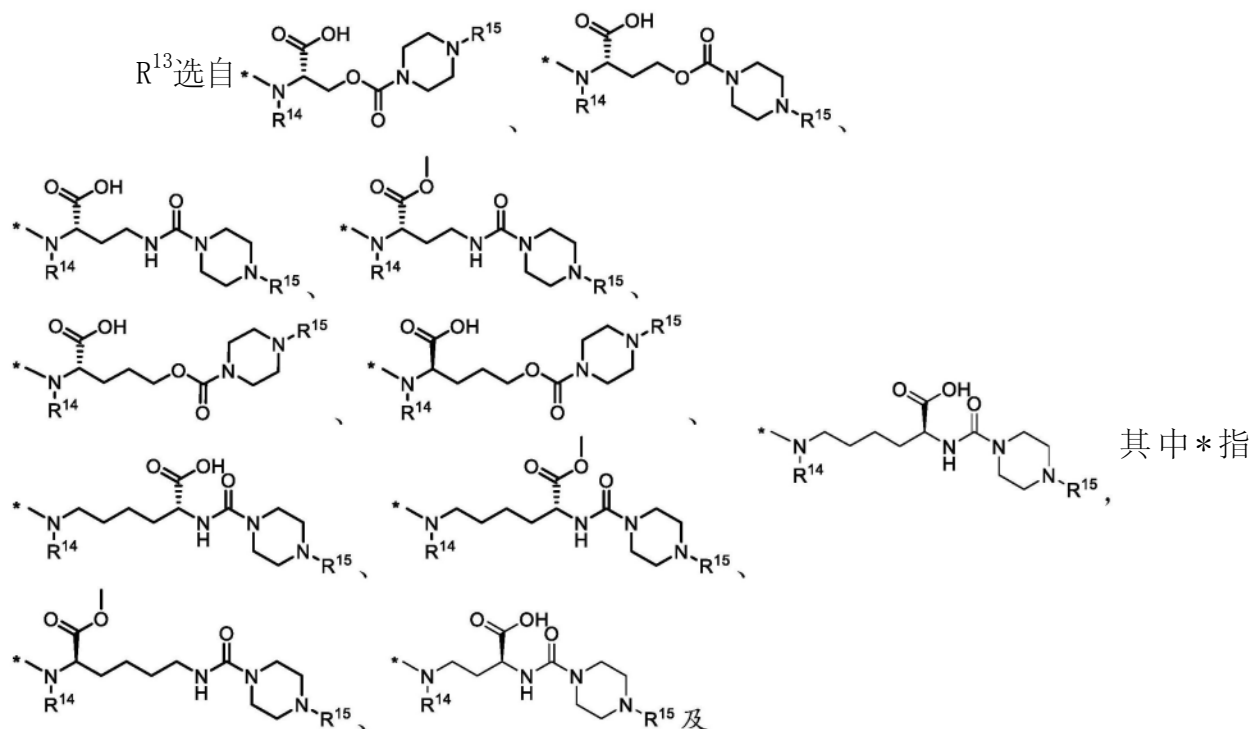
其中共价连接至L的原子的价数未超出。

项9.如项1、7或8所述的抗体-药物缀合物,其中该荷伯希二烯剪接调节子是具有式(IIb)的剪接调节子:



或其药学上可接受的盐,其经由任何原子共

价连接至L,其中:



示R¹³与该化合物的其余部分的连接点;

R^{14} 及 R^{15} 各自独立地选自氢及甲基;并且

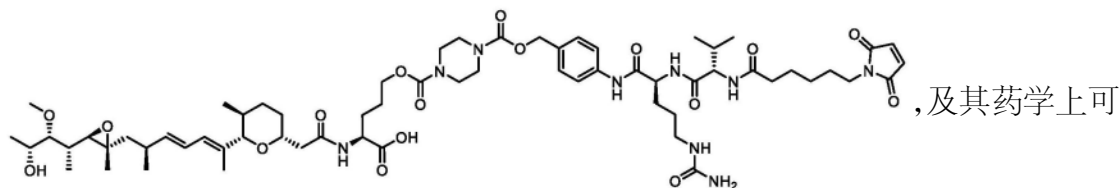
其中共价连接至L的原子的价数未超出。

项10.如项1、7、8或9所述的抗体-药物缀合物,其中该荷伯希二烯剪接调节子经由任何原子共价连接至L;

其中该荷伯希二烯剪接调节子选自H4、H13、H14、H15、H16、H17、H18、H19、H20、H21、H23及H24;并且

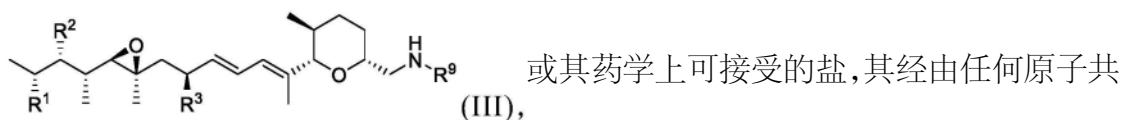
其中共价连接至L的原子的价数未超出。

项11.如项1或项7所述的抗体-药物缀合物,其中L共价连接至该荷伯希二烯剪接调节子(“L-H”),且L-H具有选自以下结构的结构:



接受的盐。

项12.如项1所述的抗体-药物缀合物,其中该荷伯希二烯剪接调节子是具有式(III)的剪接调节子:

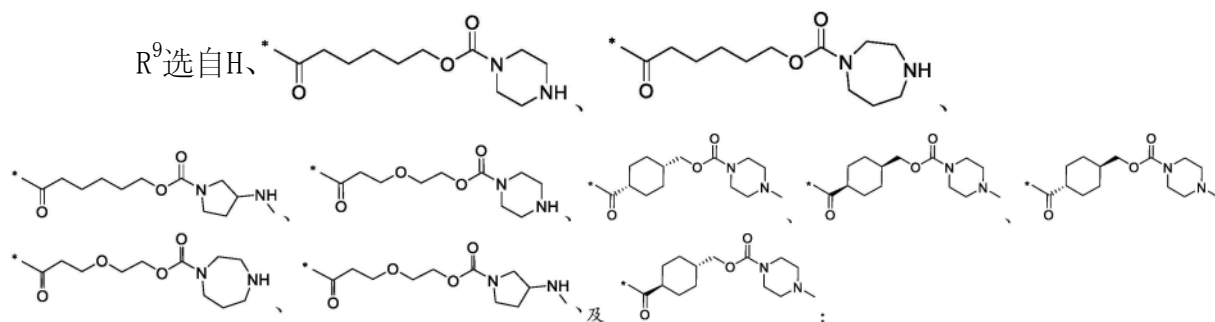


价连接至L,其中:

R^1 、 R^2 及 R^3 各自独立地选自氢、羟基、-O- (C_1 - C_6 烷基)、-O-C(=O)- (C_1 - C_6 烷基)、-C(=O)-O- (C_1 - C_6 烷基)及 C_1 - C_6 烷基;

R^6 及 R^7 各自独立地选自氢、- R^8 、-C(=O)- R^8 及-C(=O)-O- R^8 ;

R^8 选自 C_1 - C_6 烷基、 C_3 - C_8 碳环基及 C_3 - C_8 杂环基;并且



其中 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^6 、 R^7 及 R^8 各自独立地经0至3个独立地选自以下的基团取代:卤素、羟基、 C_1 - C_6 烷基、-O- (C_1 - C_6 烷基)、-CO₂H、-C(=O)- (C_1 - C_6 烷基)、-C(=O)- (C_3 - C_8 碳环基)、-C(=O)- (C_3 - C_8 杂环基)、-NR⁶R⁷、 C_3 - C_8 碳环基、 C_1 - C_6 烷基羟基、 C_1 - C_6 烷基烷氧基、苄基及 C_3 - C_8 杂环基,其中的每一个可独立地经0或1个选自以下的基团取代:卤素、羟基、 C_1 - C_3 烷基、 C_1 - C_3 烷氧基、 C_1 - C_3 卤烷基、-NH-C(=O)- (C_1 - C_3 烷基)及-NH-C(=O)-O- (C_1 - C_3 烷基),

其中共价连接至L的原子的价数未超出;并且

其中*指示 R^9 与该化合物的其余部分的连接点。

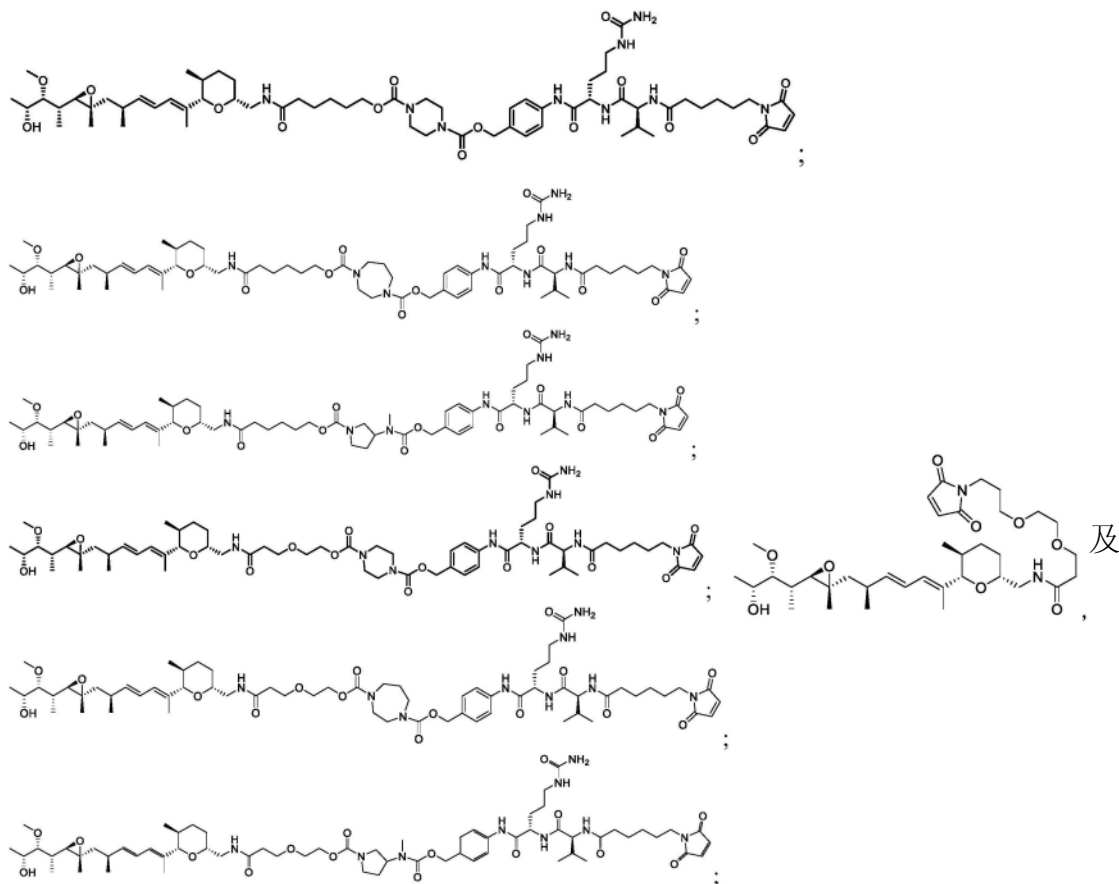
项13.如项1或项12所述的抗体-药物缀合物,

其中该荷伯希二烯剪接调节子经由任何原子共价连接至L；

其中该荷伯希二烯剪接调节子选自H5、H6、H7、H8、H9、H10、H11、H22及H25；并且

其中共价连接至L的原子的价数未超出。

项14. 如项1或项12所述的抗体-药物缀合物, 其中该接头共价连接至该荷伯希二烯剪接调节子(“L-H”), 且L-H具有选自以下结构的结构:



其药学上可接受的盐。

项15. 如项1的抗体-药物缀合物,

其中该荷伯希二烯剪接调节子经由任何原子共价连接至L；

其中该荷伯希二烯剪接调节子选自H1、H2、H3、H4、H5、H6、H7、H8、H9、H10、H11、H12、H13、H14、H15、H16、H17、H18、H19、H20、H21、H22、H23、H24及H25；并且

其中共价连接至L的原子的价数未超出。

项16. 如项15所述的抗体-药物缀合物, 其中该荷伯希二烯剪接调节子为H1。

项17. 如项15所述的抗体-药物缀合物, 其中该荷伯希二烯剪接调节子为H2。

项18. 如项15所述的抗体-药物缀合物, 其中该荷伯希二烯剪接调节子为H3。

项19. 如项15所述的抗体-药物缀合物, 其中该荷伯希二烯剪接调节子为H4。

项20. 如项15所述的抗体-药物缀合物, 其中该荷伯希二烯剪接调节子为H5。

项21. 如项15所述的抗体-药物缀合物, 其中该荷伯希二烯剪接调节子为H6。

项22. 如项15所述的抗体-药物缀合物, 其中该荷伯希二烯剪接调节子为H7。

项23. 如项15所述的抗体-药物缀合物, 其中该荷伯希二烯剪接调节子为H8。

项24. 如项15所述的抗体-药物缀合物, 其中该荷伯希二烯剪接调节子为H9。

项25.如项15所述的抗体-药物缀合物,其中该荷伯希二烯剪接调节子为H10。

项26.如项15所述的抗体-药物缀合物,其中该荷伯希二烯剪接调节子为H11。

项27.如项15所述的抗体-药物缀合物,其中该荷伯希二烯剪接调节子为H12。

项28.如项15所述的抗体-药物缀合物,其中该荷伯希二烯剪接调节子为H13。

项29.如项15所述的抗体-药物缀合物,其中该荷伯希二烯剪接调节子为H14。

项30.如项15所述的抗体-药物缀合物,其中该荷伯希二烯剪接调节子为H15。

项31.如项15所述的抗体-药物缀合物,其中该荷伯希二烯剪接调节子为H16。

项32.如项15所述的抗体-药物缀合物,其中该荷伯希二烯剪接调节子为H17。

项33.如项15所述的抗体-药物缀合物,其中该荷伯希二烯剪接调节子为H18。

项34.如项15所述的抗体-药物缀合物,其中该荷伯希二烯剪接调节子为H19。

项35.如项15所述的抗体-药物缀合物,其中该荷伯希二烯剪接调节子为H20。

项36.如项15所述的抗体-药物缀合物,其中该荷伯希二烯剪接调节子为H21。

项37.如项15所述的抗体-药物缀合物,其中该荷伯希二烯剪接调节子为H22。

项38.如项15所述的抗体-药物缀合物,其中该荷伯希二烯剪接调节子为H23。

项39.如项15所述的抗体-药物缀合物,其中该荷伯希二烯剪接调节子为H24。

项40.如项1至39中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该接头是可裂解接头。

项41.如项40所述的抗体-药物缀合物,其中该接头包含可裂解肽部分。

项42.如项41所述的抗体-药物缀合物,其中该可裂解肽部分可被酶裂解。

项43.如项40至42中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该可裂解肽部分或接头包含氨基酸单元。

项44.如项43所述的抗体-药物缀合物,其中该氨基酸单元包含缬氨酸-瓜氨酸(Val-Cit)。

项45.如项43所述的抗体-药物缀合物,其中该氨基酸单元包含缬氨酸-丙氨酸(Val-Ala)。

项46.如项43所述的抗体-药物缀合物,其中该氨基酸单元包含谷氨酰胺-缬氨酸-瓜氨酸(Glu-Val-Cit)。

项47.如项43所述的抗体-药物缀合物,其中该氨基酸单元包含丙氨酸-丙氨酸-天冬酰胺(Ala-Ala-Asn)。

项48.如项40所述的抗体-药物缀合物,其中该接头包含可裂解葡萄糖苷酸部分。

项49.如项48所述的抗体-药物缀合物,其中该可裂解葡萄糖苷酸部分可被酶裂解。

项50.如项48或项49所述的抗体-药物缀合物,其中该可裂解葡萄糖苷酸部分可被葡萄糖醛酸糖苷酶裂解。

项51.如项48至50中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该可裂解葡萄糖苷酸部分可被 β -葡萄糖醛酸糖苷酶裂解。

项52.如项1至51中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该接头包含至少一个间隔子单元。

项53.如项52所述的抗体-药物缀合物,其中该间隔子单元或接头包含聚乙二醇(PEG)部分。

项54.如项53所述的抗体-药物缀合物,其中该PEG部分包含-(PEG)_m-且m是1至10的整数。

项55.如项54所述的抗体-药物缀合物,其中m是2。

项56.如项52所述的抗体-药物缀合物,其中该间隔子单元或接头包含烷基部分。

项57.如项56所述的抗体-药物缀合物,其中该烷基部分包含-(CH₂)_n-且n是1至10的整数。

项58.如项57所述的抗体-药物缀合物,其中n是2。

项59.如项57所述的抗体-药物缀合物,其中n是5。

项60.如项57所述的抗体-药物缀合物,其中n是6。

项61.如项52至60中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该间隔子单元经由马来酰亚胺(Ma1)部分(“Ma1-间隔子单元”)连接至该抗体或抗原结合片段。

项62.如项61所述的抗体-药物缀合物,其中该Ma1-间隔子单元可与该抗体或抗原结合片段上的半胱氨酸残基反应。

项63.如项61或项62所述的抗体-药物缀合物,其中该Ma1-间隔子单元经由该抗体或抗原结合片段上的半胱氨酸残基接合至该抗体或抗原结合片段。

项64.如项61至63中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该接头包含该Ma1-间隔子单元和可裂解肽部分。

项65.如项64所述的抗体-药物缀合物,其中该可裂解肽部分包含氨基酸单元。

项66.如项64或项65所述的抗体-药物缀合物,其中该可裂解肽部分或氨基酸单元包含Val-Cit。

项67.如项64或项65所述的抗体-药物缀合物,其中该可裂解肽部分或氨基酸单元包含Val-Ala。

项68.如项64或项65所述的抗体-药物缀合物,其中该可裂解肽部分或氨基酸单元包含Glu-Val-Cit。

项69.如项64或项65所述的抗体-药物缀合物,其中该可裂解肽部分或氨基酸单元包含Ala-Ala-Asn。

项70.如项61至69中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该Ma1-间隔子单元包含烷基部分。

项71.如项61至69中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该Ma1-间隔子单元包含PEG部分。

项72.如项61至71中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该Ma1-间隔子单元包含马来酰亚胺基己酰基(MC)。

项73.如项61至72中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该Ma1-间隔子单元将该抗体或抗原结合片段连接至该接头中的可裂解部分。

项74.如项73所述的抗体-药物缀合物,其中该接头中的可裂解部分包含可裂解肽部分。

项75.如项74所述的抗体-药物缀合物,其中该可裂解肽部分包含氨基酸单元。

项76.如项74或项75所述的抗体-药物缀合物,其中该可裂解肽部分或氨基酸单元包含Val-Cit、Val-Ala、Glu-Val-Cit或Ala-Ala-Asn。

项77.如项73至76中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该接头包含MC-Val-Cit。

项78.如项73至76中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该接头包含MC-Val-Ala。

项79.如项73至76中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该接头包含MC-Glu-Val-Cit。

项80.如项73至76中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该接头包含MC-Ala-Ala-Asn。

项81.如项73至80中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该Mal-间隔子单元包含烷基部分。

项82.如项73至80中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该Mal-间隔子单元包含PEG部分。

项83.如项73至82中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该Mal-间隔子单元包含马来酰亚胺基己酰基(MC)。

项84.如项52至83中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该接头中的可裂解部分直接地接合至该剪接调节子,或其中间隔子单元将该接头中的可裂解部分连接至该剪接调节子。

项85.如项84所述的抗体-药物缀合物,其中该缀合物的裂解使该剪接调节子自该抗体或抗原结合片段和该接头释放。

项86.如项84或项85所述的抗体-药物缀合物,其中将该接头中的可裂解部分连接至该剪接调节子的该间隔子单元是自消融型的。

项87.如项84至86中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中将该接头中的可裂解部分连接至该剪接调节子的该间隔子单元包含对氨基苄氧基羰基(pABC)。

项88.如项87所述的抗体-药物缀合物,其中该pABC将该接头中的可裂解部分连接至该剪接调节子。

项89.如项87或项88所述的抗体-药物缀合物,其中该接头中的可裂解部分包含可裂解肽部分。

项90.如项89所述的抗体-药物缀合物,其中该可裂解肽部分包含氨基酸单元。

项91.如项89或项90所述的抗体-药物缀合物,其中该可裂解肽部分或氨基酸单元包含Val-Cit、Val-Ala、Glu-Val-Cit或Ala-Ala-Asn。

项92.如项87至91中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该接头包含Val-Cit-pABC。

项93.如项87至91中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该接头包含Val-Ala-pABC。

项94.如项87至91中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该接头包含Glu-Val-Cit-pABC。

项95.如项87至91中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该接头包含Ala-Ala-Asn-pABC。

项96.如项84至86中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中将该接头中的可裂解部

分连接至该剪接调节子的该间隔子单元包含对氨基苄基 (pAB)。

项97. 如项96所述的抗体-药物缀合物, 其中该pAB将该接头中的可裂解部分连接至该剪接调节子。

项98. 如项96或项97所述的抗体-药物缀合物, 其中该接头中的可裂解部分包含可裂解肽部分。

项99. 如项98所述的抗体-药物缀合物, 其中该可裂解肽部分包含氨基酸单元。

项100. 如项98或项99所述的抗体-药物缀合物, 其中该可裂解肽部分或氨基酸单元包含Val-Cit、Val-Ala、Glu-Val-Cit或Ala-Ala-Asn。

项101. 如项96至100中任一项所述的抗体-药物缀合物, 其中该接头包含Val-Cit-pAB。

项102. 如项96至100中任一项所述的抗体-药物缀合物, 其中该接头包含Val-Ala-pAB。

项103. 如项96至100中任一项所述的抗体-药物缀合物, 其中该接头包含Glu-Val-Cit-pAB。

项104. 如项96至100中任一项所述的抗体-药物缀合物, 其中该接头包含Ala-Ala-Asn-pAB。

项105. 如项1至39中任一项所述的抗体-药物缀合物, 其中该接头是不可裂解接头。

项106. 如项105所述的抗体-药物缀合物, 其中该接头包含至少一个间隔子单元。

项107. 如项105或项106所述的抗体-药物缀合物, 其中该间隔子单元或接头包含聚乙二醇 (PEG) 部分。

项108. 如项107所述的抗体-药物缀合物, 其中该PEG部分包含-(PEG)_m-且m是1至10的整数。

项109. 如项108所述的抗体-药物缀合物, 其中m是2。

项110. 如项105或项106所述的抗体-药物缀合物, 其中该间隔子单元或接头包含烷基部分。

项111. 如项110所述的抗体-药物缀合物, 其中该烷基部分包含-(CH₂)_n-且n是1至10的整数。

项112. 如项111所述的抗体-药物缀合物, 其中n是2。

项113. 如项111所述的抗体-药物缀合物, 其中n是5。

项114. 如项111所述的抗体-药物缀合物, 其中n是6。

项115. 如项106至114中任一项所述的抗体-药物缀合物, 其中该间隔子单元经由马来酰亚胺 (Mal) 部分 (“Mal-间隔子单元”) 连接至该抗体或抗原结合片段。

项116. 如项115所述的抗体-药物缀合物, 其中该Mal-间隔子单元可与该抗体或抗原结合片段上的半胱氨酸残基反应。

项117. 如项115或项116所述的抗体-药物缀合物, 其中该Mal-间隔子单元经由该抗体或抗原结合片段上的半胱氨酸残基接合至该抗体或抗原结合片段。

项118. 如项115至117中任一项所述的抗体-药物缀合物, 其中该Mal-间隔子单元包含烷基部分。

项119.如项115至117中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该Mal-间隔子单元包含PEG部分。

项120.如项115至119中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该接头或Mal-间隔子单元包含马来酰亚胺基己酰基(MC)。

项121.如项120所述的抗体-药物缀合物,其中该接头或Mal-间隔子单元包含马来酰亚胺基己酰基(MC)和至少一个额外间隔子单元。

项122.如项115至119中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该接头或Mal-间隔子单元包含MC-(PEG)₂。

项123.如项122所述的抗体-药物缀合物,其中该接头或Mal-间隔子单元包含MC-(PEG)₂和至少一个额外间隔子单元。

项124.如项115至119中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该接头或Mal-间隔子单元包含Mal-Hex。

项125.如项124所述的抗体-药物缀合物,其中该接头或Mal-间隔子单元包含Mal-Hex和至少一个额外间隔子单元。

项126.如项115至119中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该接头或Mal-间隔子单元包含Mal-Et。

项127.如项126所述的抗体-药物缀合物,其中该接头或Mal-间隔子单元包含Mal-Et和至少一个额外间隔子单元。

项128.如项115至119中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该接头或Mal-间隔子单元包含Mal-Et-O-Et。

项129.如项128所述的抗体-药物缀合物,其中该接头或Mal-间隔子单元包含Mal-Et-O-Et和至少一个额外间隔子单元。

项130.如项115至129中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该Mal-间隔子单元将该抗体或抗原结合片段连接至该剪接调节子。

项131.如项115至130中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该接头包含MC-Val-Cit-pABC。

项132.如项115至130中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该接头包含MC-(PEG)₂-CO。

项133.如项1至132中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段靶向源自血液恶性肿瘤或实体瘤的赘生性细胞。

项134.如项1至133中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段靶向源自血液恶性肿瘤的赘生性细胞。

项135.如项133或项134所述的抗体-药物缀合物,其中该血液恶性肿瘤选自B细胞恶性肿瘤、白血病、淋巴瘤和骨髓瘤。

项136.如项133至135中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该血液恶性肿瘤选自急性骨髓性白血病和多发性骨髓瘤。

项137.如项1至133中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段靶向源自实体瘤的赘生性细胞。

项138.如项133或项137所述的抗体-药物缀合物,其中该实体瘤选自乳癌、胃癌、

前列腺癌、卵巢癌、肺癌、子宫癌、唾液腺癌、黑色素瘤、大肠癌、子宫颈癌、胰脏癌、肾癌、结直肠癌及食道癌。

项139.如项1至138中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段靶向表达HER2的细胞。

项140.如项139所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段是抗HER2抗体或抗原结合片段。

项141.如项139或项140所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:1(HCDR1)、SEQ ID NO:2(HCDR2)和SEQ ID NO:3(HCDR3)的氨基酸序列的三个重链互补决定区(HCDR1、HCDR2和HCDR3);及包含SEQ ID NO:4(LCDR1)、SEQ ID NO:5(LCDR2)及SEQ ID NO:6(LCDR3)的氨基酸序列的三个轻链互补决定区(LCDR1、LCDR2及LCDR3)。

项142.如项139至141中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:19的氨基酸序列的重链可变区及包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列的轻链可变区。

项143.如项139至142中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段包含人IgG1重链恒定区。

项144.如项139至143中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段包含人Igκ轻链恒定区。

项145.如项1至138中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段靶向表达CD138的细胞。

项146.如项145所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段是抗CD138抗体或抗原结合片段。

项147.如项145或项146所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:7(HCDR1)、SEQ ID NO:8(HCDR2)和SEQ ID NO:9(HCDR3)的氨基酸序列的三个重链互补决定区(HCDR1、HCDR2和HCDR3);及包含SEQ ID NO:10(LCDR1)、SEQ ID NO:11(LCDR2)及SEQ ID NO:12(LCDR3)的氨基酸序列的三个轻链互补决定区(LCDR1、LCDR2及LCDR3)。

项148.如项145至147中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:21的氨基酸序列的重链可变区及包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列的轻链可变区。

项149.如项145至148中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段包含人IgG2a重链恒定区。

项150.如项145至149中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段包含人Igκ轻链恒定区。

项151.如项1至138中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段靶向表达EPHA2的细胞。

项152.如项151所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段是抗EPHA2抗体或抗原结合片段。

项153.如项151或项152所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段包

含含有SEQ ID NO:13(HCDR1)、SEQ ID NO:14(HCDR2)和SEQ ID NO:15(HCDR3)的氨基酸序列的三个重链互补决定区(HCDR1、HCDR2和HCDR3);及包含SEQ ID NO:16(LCDR1)、SEQ ID NO:17(LCDR2)及SEQ ID NO:18(LCDR3)的氨基酸序列的三个轻链互补决定区(LCDR1、LCDR2及LCDR3)。

项154.如项151至153中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:23的氨基酸序列的重链可变区及包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列的轻链可变区。

项155.如项151至154中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段包含人IgG1重链恒定区。

项156.如项151至155中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段包含人Igκ轻链恒定区。

项157.如项1至138中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段靶向表达MSLN的细胞。

项158.如项157所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段是抗MSLN抗体或抗原结合片段。

项159.如项1至138中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段靶向表达FOLH1的细胞。

项160.如项159所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段是抗FOLH1抗体或抗原结合片段。

项161.如项1至138中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段靶向表达CDH6的细胞。

项162.如项161所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段是抗CDH6抗体或抗原结合片段。

项163.如项1至138中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段靶向表达CEACAM5的细胞。

项164.如项163所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段是抗CEACAM5抗体或抗原结合片段。

项165.如项1至138中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段靶向表达CFC1B的细胞。

项166.如项165所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段是抗CFC1B抗体或抗原结合片段。

项167.如项1至138中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段靶向表达ENPP3的细胞。

项168.如项167所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段是抗ENPP3抗体或抗原结合片段。

项169.如项1至138中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段靶向表达FOLR1的细胞。

项170.如项169所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段是抗FOLR1抗体或抗原结合片段。

项171.如项1至138中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段靶向表达HAVCR1的细胞。

项172.如项171所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段是抗HAVCR1抗体或抗原结合片段。

项173.如项1至138中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段靶向表达KIT的细胞。

项174.如项173所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段是抗KIT抗体或抗原结合片段。

项175.如项1至138中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段靶向表达MET的细胞。

项176.如项175所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段是抗MET抗体或抗原结合片段。

项177.如项1至138中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段靶向表达MUC16的细胞。

项178.如项177所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段是抗MUC16抗体或抗原结合片段。

项179.如项1至138中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段靶向表达SLC39A6的细胞。

项180.如项179所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段是抗SLC39A6抗体或抗原结合片段。

项181.如项1至138中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段靶向表达SLC44A4的细胞。

项182.如项181所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段是抗SLC44A4抗体或抗原结合片段。

项183.如项1至138中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段靶向表达STEAP1的细胞。

项184.如项183所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段是抗STEAP1抗体或抗原结合片段。

项185.如项1至184中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中p是1至10。

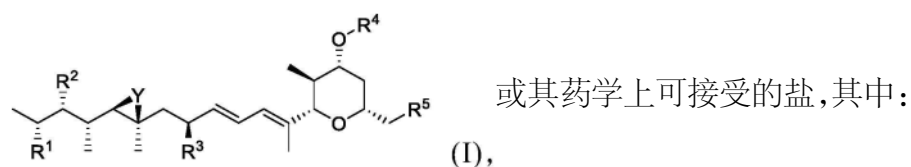
项186.如项1至185中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中p是2至8。

项187.如项1至186中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中p是4至8。

项188.如项1至187中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中p是4。

项189.如项1至187中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中p是8。

项190.一种具有式(I)的化合物,



或其药学上可接受的盐,其中:

Y选自O、S、NR⁶及CR⁶R⁷;

R^1 、 R^2 及 R^3 各自独立地选自氢、羟基、-O- (C_1 - C_6 烷基)、-O-C(=O)- (C_1 - C_6 烷基)、-C(=O)-O- (C_1 - C_6 烷基)及 C_1 - C_6 烷基;

R^4 选自氢、 C_1 - C_6 烷基、-C(=O)- (C_1 - C_6 烷基)、-C(=O)- (C_3 - C_8 碳环基)、-C(=O)- (C_3 - C_8 杂环基)及-C(=O)- NR^6R^7 ;

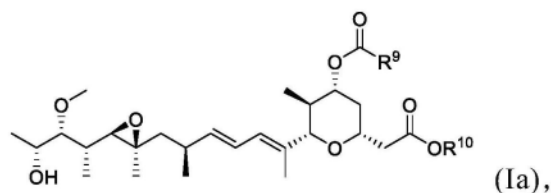
R^5 选自氢、羟基、-CH₂-OH、-CO₂H、-C(=O)-O- (C_1 - C_6 烷基)、-C(=O)- NR^6R^7 、- NR^6 -C(=O)- R^8 、-O-C(=O)- NR^6R^7 、- NR^6 -C(=O)- R^8 及- NR^6 -C(=O)- NR^6R^7 ;

R^6 及 R^7 各自独立地选自氢、- R^8 、-C(=O)- R^8 及-C(=O)-O- R^8 ;并且

R^8 选自 C_1 - C_6 烷基、 C_3 - C_8 碳环基及 C_3 - C_8 杂环基,

其中 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^7 及 R^8 各自独立地经0至3个独立地选自以下的基团取代:卤素、羟基、 C_1 - C_6 烷基、-O- (C_1 - C_6 烷基)、-CO₂H、-C(=O)- (C_1 - C_6 烷基)、-C(=O)- (C_3 - C_8 碳环基)、-C(=O)- (C_3 - C_8 杂环基)、- NR^6R^7 、 C_3 - C_8 碳环基、 C_1 - C_6 烷基羟基、 C_1 - C_6 烷基烷氧基、苄基及 C_3 - C_8 杂环基,其中的每一个可独立地经0或1个选自以下的基团取代:卤素、羟基、 C_1 - C_3 烷基、 C_1 - C_3 烷氧基、 C_1 - C_3 卤烷基、-NH-C(=O)- (C_1 - C_3 烷基)及-NH-C(=O)-O- (C_1 - C_3 烷基)。

项191. 如项190所述的化合物,其中该化合物是具有式(Ia)的化合物:



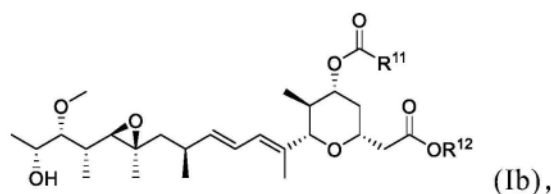
或其药学上可接受的盐,其中:

R^9 选自 C_3 - C_8 杂环基;并且

R^{10} 选自H及 C_1 - C_6 烷基,

其中 R^9 及 R^{10} 各自独立地经0至3个独立地选自以下的基团取代:卤素、羟基、 C_1 - C_3 烷基、 C_1 - C_3 烷氧基、-NH₂、-NH- (C_1 - C_3 烷基)及-N- (C_1 - C_3 烷基)₂。

项192. 如项190或项191所述的化合物,其中该化合物是具有式(Ib)的化合物:



或其药学上可接受的盐,其中:

R^{11} 选自 $\text{*}-\text{N}(\text{R}^{13})_2$ 、 $\text{*}-\text{N}(\text{R}^{13})$ 及 $\text{*}-\text{N}(\text{R}^{13})$, 其中*指示 R^{11} 与该化合物的其余

部分的连接点;并且

R^{12} 及 R^{13} 各自独立地选自H及甲基。

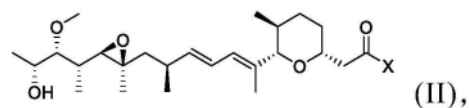
项193. 如项190所述的化合物,其中该化合物为H1或其药学上可接受的盐。

项194. 如项190所述的化合物,其中该化合物为H2或其药学上可接受的盐。

项195. 如项190所述的化合物,其中该化合物为H3或其药学上可接受的盐。

项196. 如项190所述的化合物,其中该化合物为H12或其药学上可接受的盐。

项197. 一种具有式(II)的化合物:



或其药学上可接受的盐,其中:

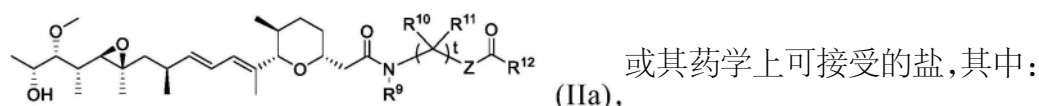
X为NR⁶R⁷;

R⁶及R⁷各自独立地选自氢、-R⁸、-C(=O)-R⁸、-C(=O)-O-R⁸、-(C₁-C₆烷基)-O-C(=O)-R⁸及-(C₁-C₆烷基)-NH-C(=O)-R⁸;并且

R⁸选自C₁-C₆烷基、C₃-C₈碳环基及C₃-C₈杂环基,

其中R⁶、R⁷及R⁸各自独立地经0至3个独立地选自以下的基团取代:卤素、羟基、C₁-C₆烷基、-O-(C₁-C₆烷基)、-CO₂H、-C(=O)-O-(C₁-C₆烷基)、-C(=O)-(C₁-C₆烷基)、-C(=O)-(C₃-C₈碳环基)、-C(=O)-(C₃-C₈杂环基)、-NR⁶R⁷、C₃-C₈碳环基、C₁-C₆烷基羟基、C₁-C₆烷基烷氧基、苄基及C₃-C₈杂环基,其中的每一个可独立地经0或1个选自以下的基团取代:卤素、羟基、C₁-C₃烷基、C₁-C₃烷氧基、C₁-C₃卤烷基、-NH-C(=O)-(C₁-C₃烷基)及-NH-C(=O)-O-(C₁-C₃烷基)。

项198. 如项197所述的化合物,其中该化合物为具有式(IIa)的化合物:



Z选自NR⁹及O;

R⁹选自氢及C₁-C₆烷基;

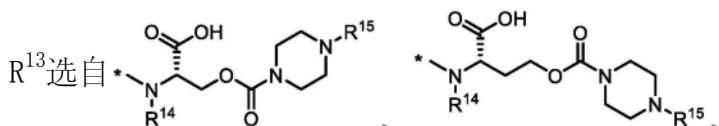
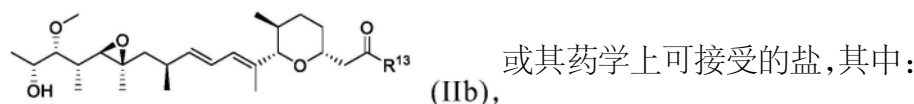
R¹⁰及R¹¹各自独立地选自氢、卤素、羟基、C₁-C₆烷基、-O-(C₁-C₆烷基)、-CO₂H、-C(=O)-O-(C₁-C₆烷基)、-C(=O)-(C₁-C₆烷基)、-C(=O)-(C₃-C₈碳环基)、-C(=O)-(C₃-C₈杂环基)、C₃-C₈碳环基、C₁-C₆烷基羟基、C₁-C₆烷基烷氧基、苄基及C₃-C₈杂环基;

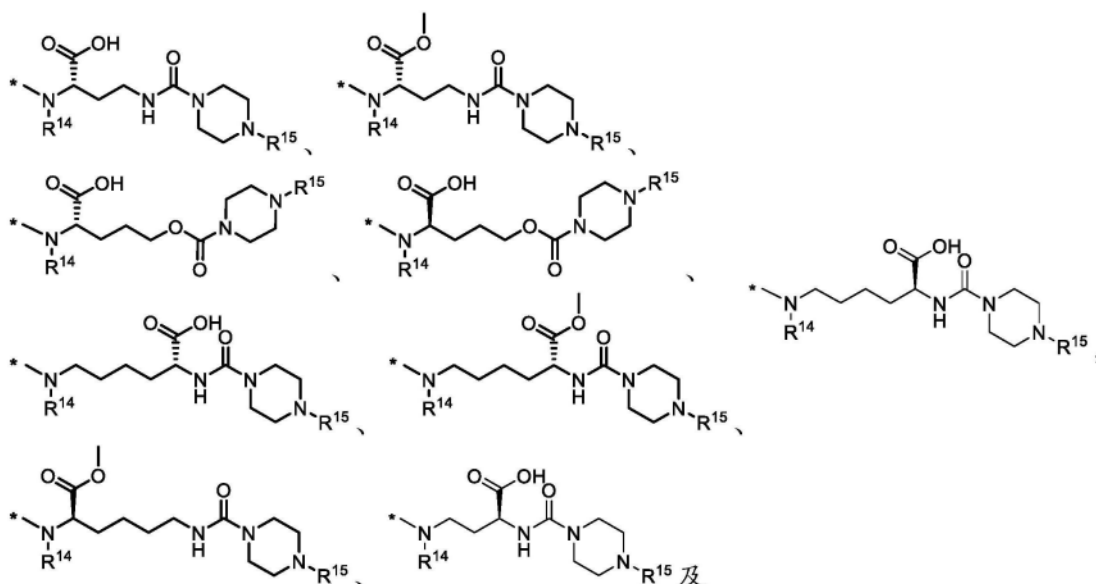
R¹²选自C₁-C₆烷基、C₃-C₈碳环基、C₃-C₈杂环基,

其中R⁹、R¹⁰、R¹¹及R¹²各自独立地经0或1个选自以下的基团取代:卤素、羟基、C₁-C₃烷基、C₁-C₃烷氧基及C₁-C₃卤烷基;并且

t为选自1、2、3、4、5及6的整数。

项199. 如项197或项198所述的化合物,其中该化合物为具有式(IIb)的化合物:





其中*指示 R^{13} 与该化合物的其余部分的连接点;并且

R^{14} 及 R^{15} 各自独立地选自氢及甲基。

项200.如项197所述的化合物,其中该化合物为H4或其药学上可接受的盐。

项201.如项197所述的化合物,其中该化合物为H13或其药学上可接受的盐。

项202.如项197所述的化合物,其中该化合物为H14或其药学上可接受的盐。

项203.如项197所述的化合物,其中该化合物为H15或其药学上可接受的盐。

项204.如项197所述的化合物,其中该化合物为H16或其药学上可接受的盐。

项205.如项197所述的化合物,其中该化合物为H17或其药学上可接受的盐。

项206.如项197所述的化合物,其中该化合物为H18或其药学上可接受的盐。

项207.如项197所述的化合物,其中该化合物为H19或其药学上可接受的盐。

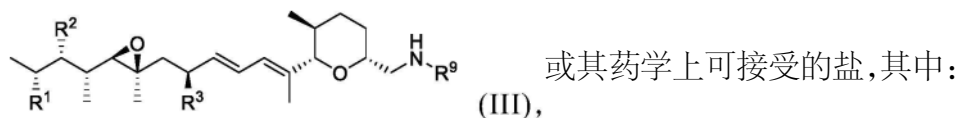
项208.如项197所述的化合物,其中该化合物为H20或其药学上可接受的盐。

项209.如项197所述的化合物,其中该化合物为H21或其药学上可接受的盐。

项210.如项197所述的化合物,其中该化合物为H23或其药学上可接受的盐。

项211.如项197所述的化合物,其中该化合物为H24或其药学上可接受的盐。

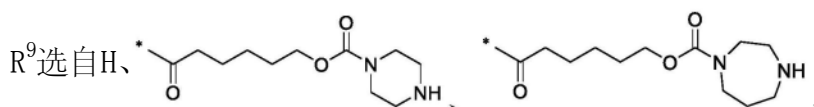
项212.一种具有式(III)的化合物:

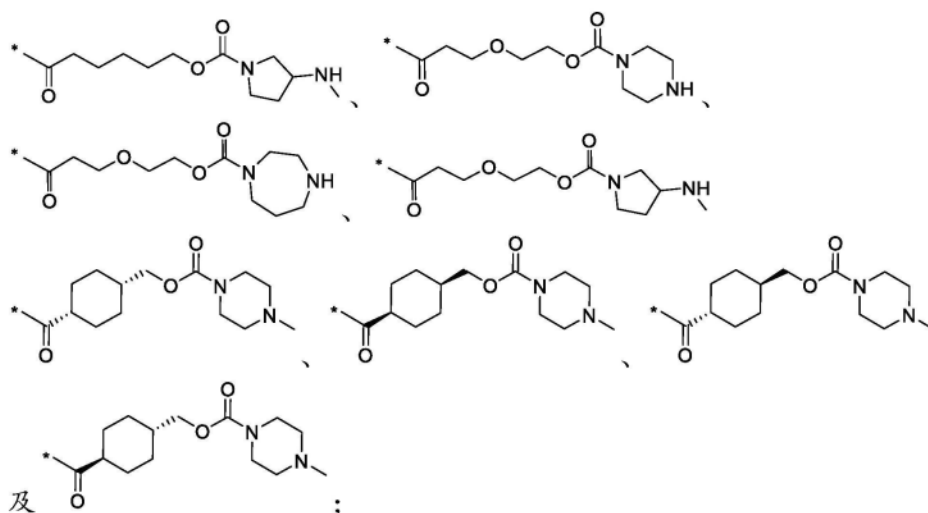


R^1 、 R^2 及 R^3 各自独立地选自氢、羟基、-O- (C_1 - C_6 烷基)、-O-C(=O)- (C_1 - C_6 烷基)、-C(=O)-O- (C_1 - C_6 烷基)及 C_1 - C_6 烷基;

R^6 及 R^7 各自独立地选自氢、- R^8 、-C(=O)- R^8 及-C(=O)-O- R^8 ;

R^8 选自 C_1 - C_6 烷基、 C_3 - C_8 碳环基及 C_3 - C_8 杂环基;并且





其中 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^6 、 R^7 及 R^8 各自独立地经0至3个独立地选自以下的基团取代：卤素、羟基、 C_1 - C_6 烷基、-O- (C_1 - C_6 烷基)、 $-CO_2H$ 、 $-C(=O)-$ (C_1 - C_6 烷基)、 $-C(=O)-$ (C_3 - C_8 碳环基)、 $-C(=O)-$ (C_3 - C_8 杂环基)、 $-NR^6R^7$ 、 C_3 - C_8 碳环基、 C_1 - C_6 烷基羟基、 C_1 - C_6 烷基烷氧基、苄基及 C_3 - C_8 杂环基，其中的每一个可独立地经0或1个选自以下的基团取代：卤素、羟基、 C_1 - C_3 烷基、 C_1 - C_3 烷氧基、 C_1 - C_3 卤烷基、 $-NH-C(=O)-$ (C_1 - C_3 烷基) 及 $-NH-C(=O)-O-$ (C_1 - C_3 烷基)；并且

其中*指示 R^9 与该化合物的其余部分的连接点。

项213. 如项212所述的化合物，其中该化合物为H5或其药学上可接受的盐。

项214. 如项212所述的化合物，其中该化合物为H6或其药学上可接受的盐。

项215. 如项212所述的化合物，其中该化合物为H7或其药学上可接受的盐。

项216. 如项212所述的化合物，其中该化合物为H8或其药学上可接受的盐。

项217. 如项212所述的化合物，其中该化合物为H9或其药学上可接受的盐。

项218. 如项212所述的化合物，其中该化合物为H10或其药学上可接受的盐。

项219. 如项212所述的化合物，其中该化合物为H22或其药学上可接受的盐。

项220. 一种药物组合物，该药物组合物包含如项190至219中任一项所述的化合物或其药学上可接受的盐及药学上可接受的载体。

项221. 一种组合物，该组合物包含如项1至189中任一项所述的抗体-药物缀合物的多个拷贝，其中该组合物中抗体-药物缀合物的平均p是约3.5至约5.5。

项222. 如项221所述的组合物，其中该组合物中抗体-药物缀合物的平均p是约4。

项223. 一种组合物，该组合物包含如项1至189中任一项所述的抗体-药物缀合物的多个拷贝，其中该组合物中抗体-药物缀合物的平均p是约7至约9。

项224. 如项223所述的组合物，其中该组合物中抗体-药物缀合物的平均p是约8。

项225. 一种治疗患有或疑似患有赘生性病症的受试者的方法，该方法包括向该受试者施用治疗有效量的如项1至189中任一项所述的抗体-药物缀合物、如项190至219中任一项所述的化合物或如项220至224中任一项所述的组合物。

项226. 如项225所述的方法，其中该赘生性病症是血液恶性肿瘤或实体瘤。

项227. 如项225或项226所述的方法，其中该赘生性病症是血液恶性肿瘤。

项228. 如项227所述的方法，其中该血液恶性肿瘤选自急性骨髓性白血病和多发性骨髓瘤。

项229.如项225或项226所述的方法,其中该赘生性病症是实体瘤。

项230.如项229所述的方法,其中该实体瘤选自乳癌、胃癌、前列腺癌、卵巢癌、肺癌、子宫癌、唾液腺癌、黑色素瘤、大肠癌、子宫颈癌、胰脏癌、肾癌、结直肠癌及食道癌。

项231.如项225至230中任一项所述的方法,其中该受试者具有一个或多个表达靶抗原的赘生性细胞。

项232.如项231所述的方法,其中该靶抗原是HER2。

项233.如项231或项232所述的方法,其中该一个或多个赘生性细胞源自表达HER2的乳腺癌、卵巢癌、胃癌、肺癌、子宫癌、骨肉瘤或涎腺导管癌。

项234.如项233所述的方法,其中该肺癌是肺腺癌和/或该子宫癌是子宫浆液性子宫内膜癌。

项235.如项232至234中任一项所述的方法,其中该受试者对用(a)单独施用时的抗HER2抗体和/或(b)单独施用时的剪接调节子进行的治疗无响应或响应不良。

项236.如项232至235中任一项所述的方法,其中该受试者对用单独施用时的剪接调节子进行的治疗不耐受、无响应或响应不良。

项237.如项231所述的方法,其中该靶抗原是CD138。

项238.如项231或项237所述的方法,其中该一个或多个赘生性细胞源自表达CD138的多发性骨髓瘤。

项239.如项237或项238所述的方法,其中该受试者对用(a)单独施用时的抗CD138抗体和/或(b)单独施用时的剪接调节子进行的治疗无响应或响应不良。

项240.如项237至239中任一项所述的方法,其中该受试者对用单独施用时的剪接调节子进行的治疗不耐受、无响应或响应不良。

项241.如项231所述的方法,其中该靶抗原是EPHA2。

项242.如项231或项241所述的方法,其中该一个或多个赘生性细胞源自表达EPHA2的乳腺癌、前列腺癌、卵巢癌、肺癌、黑素瘤、结肠癌或食道癌。

项243.如项241或项242所述的方法,其中该受试者对用(a)单独施用时的抗EPHA2抗体和/或(b)单独施用时的剪接调节子进行的治疗无响应或响应不良。

项244.如项241至243中任一项所述的方法,其中该受试者对用单独施用时的剪接调节子进行的治疗不耐受、无响应或响应不良。

项245.一种减少或抑制患有或疑似患有赘生性病症的受试者中的肿瘤生长的方法,该方法包括向该受试者施用治疗有效量的如项1至189中任一项所述的抗体-药物缀合物、如项190至219中任一项所述的化合物或如项220至224中任一项所述的组合物。

项246.如项245所述的方法,其中该肿瘤包含一个或多个表达靶抗原的赘生性细胞。

项247.如项246所述的方法,其中该靶抗原是HER2。

项248.如项246或项247所述的方法,其中该一个或多个赘生性细胞源自表达HER2的乳腺癌、卵巢癌、胃癌、肺癌、子宫癌、骨肉瘤或涎腺导管癌。

项249.如项248所述的方法,其中该肺癌是肺腺癌和/或该子宫癌是子宫浆液性子宫内膜癌。

项250.如项247至249中任一项所述的方法,其中该肿瘤对用(a)单独施用时的抗

HER2抗体和/或(b)单独施用时的剪接调节子进行治疗具有抗性或难治性。

项251.如项246所述的方法,其中该靶抗原是CD138。

项252.如项246或项251所述的方法,其中该一个或多个赘生性细胞源自表达CD138的多发性骨髓瘤。

项253.如项251或项252所述的方法,其中该肿瘤对用(a)单独施用时的抗CD138抗体和/或(b)单独施用时的剪接调节子进行治疗具有抗性或难治性。

项254.如项246所述的方法,其中该靶抗原是EPHA2。

项255.如项246或项254所述的方法,其中该一个或多个赘生性细胞源自表达EPHA2的乳腺癌、前列腺癌、卵巢癌、肺癌、黑素瘤、结肠癌或食道癌。

项256.如项254或项255所述的方法,其中该肿瘤对用(a)单独施用时的抗EPHA2抗体和/或(b)单独施用时的剪接调节子进行治疗具有抗性或难治性。

项257.一种确定患有或疑似患有赘生性病症的受试者是否对用如项1至189中任一项所述的抗体-药物缀合物、如项190至219中任一项所述的化合物或如项220至224中任一项所述的组合物进行治疗起反应的方法,该方法包括提供来自该受试者的生物样品且使该生物样品与如项1至189中任一项所述的抗体-药物缀合物、如项190至219中任一项所述的化合物或如项220至224中任一项所述的组合物接触。

项258.如项257所述的方法,其中该生物样品是肿瘤样品。

项259.如项258所述的方法,其中该肿瘤样品是肿瘤活检或血液样品。

项260.如项259所述的方法,其中该血液样品选自血液、血液级分或自该血液或血液级分获得的细胞。

项261.如项257至260中任一项所述的方法,其中该受试者具有一个或多个表达靶抗原的赘生性细胞。

项262.如项261所述的方法,其中该靶抗原是HER2。

项263.如项261或项262所述的方法,其中该一个或多个赘生性细胞源自表达HER2的乳腺癌、卵巢癌、胃癌、肺癌、子宫癌、骨肉瘤或涎腺导管癌。

项264.如项263所述的方法,其中该肺癌是肺腺癌和/或该子宫癌是子宫浆液性子宫内膜癌。

项265.如项261所述的方法,其中该靶抗原是CD138。

项266.如项261或项265所述的方法,其中该一个或多个赘生性细胞源自表达CD138的多发性骨髓瘤。

项267.如项261所述的方法,其中该靶抗原是EPHA2。

项268.如项261或项267所述的方法,其中该一个或多个赘生性细胞源自表达EPHA2的乳腺癌、前列腺癌、卵巢癌、肺癌、黑素瘤、结肠癌或食道癌。

项269.如项1至189中任一项所述的抗体-药物缀合物、如项190至219中任一项所述的化合物或如项220至224中任一项所述的组合物,其用于治疗赘生性病症。

项270.如项269所使用的抗体-药物缀合物、化合物或组合物,其中该赘生性病症具有表达靶标抗原的一个或多个赘生性细胞。

项271.如项270所使用的抗体-药物缀合物、化合物或组合物,其中该靶标抗原为HER2。

项272.如项270或项271所使用的抗体-药物缀合物、化合物或组合物,其中该赘生性病症为HER2表达性乳癌、卵巢癌、胃癌、肺癌、子宫癌、骨肉瘤或唾液腺癌。

项273.如项272所述的抗体-药物缀合物、化合物或组合物,其中该肺癌为肺腺癌和/或该子宫癌为子宫浆液性子宫内膜癌。

项274.如项270所使用的抗体-药物缀合物、化合物或组合物,其中该靶标抗原为CD138。

项275.如项270或项274所使用的抗体-药物缀合物、化合物或组合物,其中该赘生性病症为CD138表达性多发性骨髓瘤。

项276.如项270所使用的抗体-药物缀合物、化合物或组合物,其中该靶标抗原为EPHA2。

项277.如项270或项276所使用的抗体-药物缀合物、化合物或组合物,其中该赘生性病症为EPHA2表达性乳癌、前列腺癌、卵巢癌、肺癌、黑色素瘤、大肠癌或食道癌。

项278.如项1至189中任一项所述的抗体-药物缀合物、如项190至219中任一项所述的化合物或如项220至224中任一项所述的组合物用于治疗赘生性病症的用途。

项279.如项278所述的用途,其中该赘生性病症由具有一个或多个表达靶抗原的赘生性细胞表征。

项280.如项279所述的用途,其中该靶抗原是HER2。

项281.如项279或项280所述的用途,其中该赘生性病症为HER2表达性乳癌、卵巢癌、胃癌、肺癌、子宫癌、骨肉瘤或唾液腺癌。

项282.如项281所述的用途,其中该肺癌是肺腺癌和/或该子宫癌是子宫浆液性子宫内膜癌。

项283.如项279所述的用途,其中该靶抗原是CD138。

项284.如项279或项283所述的用途,其中该赘生性病症是表达CD138的多发性骨髓瘤。

项285.如项279所述的用途,其中该靶抗原是EPHA2。

项286.如项279或项285所述的用途,其中该赘生性病症是表达EPHA2的乳腺癌、前列腺癌、卵巢癌、肺癌、黑色素瘤、结肠癌或食道癌。

项287.如项1至189中任一项所述的抗体-药物缀合物、如项190至219中任一项所述的化合物或如项220至224中任一项所述的组合物在制造用于治疗赘生性病症的药剂的方法中的用途。

项288.如项287所述的用途,其中该赘生性病症由具有一个或多个表达靶抗原的赘生性细胞表征。

项289.如项288所述的用途,其中该靶抗原是HER2。

项290.如项288或项289所述的用途,其中该赘生性病症是表达HER2的乳腺癌、卵巢癌、胃癌、肺癌、子宫癌、骨肉瘤或涎腺导管癌。

项291.如项290所述的用途,其中该肺癌是肺腺癌和/或该子宫癌是子宫浆液性子宫内膜癌。

项292.如项288所述的用途,其中该靶抗原是CD138。

项293.如项288或项292所述的用途,其中该赘生性病症是表达CD138的多发性骨

髓瘤。

项294.如项288所述的用途,其中该靶抗原是EPHA2。

项295.如项288或项294所述的用途,其中该赘生性病症是表达EPHA2的乳腺癌、前列腺癌、卵巢癌、肺癌、黑素瘤、结肠癌或食道癌。

项296.一种生产如项1至189中任一项所述的抗体-药物缀合物的方法,该方法包括在允许缀合的条件下使抗体或抗原结合片段与接合至剪接调节子的接头反应。

项297.一种诱导至少一种新抗原的方法,该方法包括使赘生性细胞与有效量的如项1至189中任一项所述的抗体-药物缀合物、如项190至219中任一项所述的化合物或如项220至224中任一项所述的组合物接触,由此诱导至少一种新抗原的产生。

项298.如项297所述的方法,其中该赘生性细胞存在于体外细胞培养物中。

项299.如项297或项298所述的方法,其中该赘生性细胞获得自受试者。

项300.如项297所述的方法,其中该赘生性细胞存在于受试者中。

项301.如项297至300中任一项所述的方法,其中该赘生性细胞源自血液恶性肿瘤或实体瘤。

项302.如项301所述的方法,其中该血液恶性肿瘤选自B细胞恶性肿瘤、白血病、淋巴瘤和骨髓瘤。

项303.如项301或项302所述的方法,其中该血液恶性肿瘤选自急性骨髓性白血病和多发性骨髓瘤。

项304.如项301所述的方法,其中该实体瘤选自乳癌、胃癌、前列腺癌、卵巢癌、肺癌、子宫癌、唾液腺癌、黑色素瘤、大肠癌、子宫颈癌、胰脏癌、肾癌、结直肠癌及食道癌。

项305.一种在患有或疑似患有赘生性病症的受试者中诱导至少一种新抗原和/或T细胞反应的方法,该方法包括向该受试者施用有效量的如项1至189中任一项所述的抗体-药物缀合物、如项190至219中任一项所述的化合物或如项220至224中任一项所述的组合物。

项306.一种治疗患有或疑似患有赘生性病症的受试者的方法,该方法包括向该受试者施用有效量的如项1至189中任一项所述的抗体-药物缀合物、如项190至219中任一项所述的化合物或如项220至224中任一项所述的组合物,其中该化合物、抗体-药物缀合物或组合物的施用诱导至少一种新抗原和/或T细胞反应。

项307.如项305或项306所述的方法,其中与该化合物、抗体-药物缀合物或组合物的标准剂量相比,所施用的该化合物、抗体-药物缀合物或组合物的量由于诱导至少一种新抗原和/或T细胞反应而减少。

项308.如项305至307中任一项所述的方法,其中与该化合物、抗体-药物缀合物或组合物的标准剂量相比,该化合物、抗体-药物缀合物或组合物的施用量减少10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、75%或90%。

项309.如项305至308中任一项所述的方法,其中与该化合物、抗体-药物缀合物或组合物的标准给药方案相比,该化合物、抗体-药物缀合物或组合物以低至少10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、75%或90%的频率施用。

项310.如项305至309中任一项所述的方法,其中该化合物、抗体-药物缀合物或组合物的施用量和/或剂量引起较低全身性毒性和/或经改善的耐药性。

项311.如项305至310中任一项所述的方法,该方法进一步包括施用至少一种额外疗法。

项312.如项311所述的方法,其中与该化合物、抗体-药物缀合物、组合物和/或该至少一种额外疗法的标准剂量相比,所施用的该化合物、抗体-药物缀合物、组合物和/或该至少一种额外疗法的量由于诱导至少一种新抗原和/或T细胞反应而减少。

项313.如项311或项312所述的方法,其中与该剪接调节子、抗体-药物缀合物、组合物和/或该至少一种额外疗法的标准剂量相比,该化合物、抗体-药物缀合物、组合物和/或该至少一种额外疗法的施用量减少10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、75%或90%。

项314.如项311至313中任一项所述的方法,其中与该化合物、抗体-药物缀合物、组合物和/或该至少一种额外疗法的标准给药方案相比,该化合物、抗体-药物缀合物、组合物和/或该至少一种额外疗法以低至少10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、75%或90%的频率施用。

项315.如项311至314中任一项所述的方法,其中该化合物、抗体-药物缀合物、组合物和/或该至少一种额外疗法的施用量和/或剂量引起较低全身性毒性和/或经改善的耐药性。

项316.如项311至315中任一项所述的方法,其中该化合物、抗体-药物缀合物或组合物的施用在该至少一种额外疗法的施用之前开始。

项317.如项311至315中任一项所述的方法,其中该化合物、抗体-药物缀合物或组合物的施用在该至少一种额外疗法的施用之后开始。

项318.如项311至315中任一项所述的方法,其中该化合物、抗体-药物缀合物或组合物的施用与该至少一种额外疗法的施用同时开始。

项319.如项305至318中任一项所述的方法,其中该化合物、抗体-药物缀合物或组合物的施用在初始施用之后重复至少一次。

项320.如项319所述的方法,其中该化合物、抗体-药物缀合物或组合物用于重复施用的量与用于初始施用的量相比减少。

项321.如项319或项320所述的方法,其中与该化合物、抗体-药物缀合物或组合物的标准剂量相比,该化合物、抗体-药物缀合物或组合物用于重复施用的量减少。

项322.如项319至321中任一项所述的方法,其中与该化合物、抗体-药物缀合物或组合物的标准剂量相比,该化合物、抗体-药物缀合物或组合物用于重复施用的量减少10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、75%或90%。

项323.如项311至322中任一项所述的方法,其中该至少一种额外疗法的施用在初始施用之后重复至少一次。

项324.如项323所述的方法,其中该至少一种额外疗法用于重复施用的量与用于初始施用的量相比减少。

项325.如项323或项324所述的方法,其中与该至少一种额外疗法的标准剂量相比,该至少一种额外疗法用于重复施用的量减少。

项326.如项323至325中任一项所述的方法,其中与该至少一种额外疗法的标准剂量相比,该至少一种额外疗法用于重复施用的量减少10%、15%、20%、25%、30%、35%、

40%、45%、50%、75%或90%。

项327.如项319至326中任一项所述的方法,其中该化合物、抗体-药物缀合物或组合物的重复施用与该至少一种额外疗法的重复施用同时进行。

项328.如项319至326中任一项所述的方法,其中该化合物、抗体-药物缀合物或组合物的重复施用与该至少一种额外疗法的重复施用依序或错开进行。

项329.如项311至328中任一项所述的方法,其中该至少一种额外疗法包含施用检查点抑制剂。

项330.如项329所述的方法,其中该受试者对单独施用时的该检查点抑制剂不耐受、无反应或反应不良。

项331.如项329或项330所述的方法,其中该检查点抑制剂靶向CTLA4、PD1、PDL1、OX40、CD40、GITR、LAG3、TIM3和/或KIR。

项332.如项329至331中任一项所述的方法,其中该检查点抑制剂靶向CTLA4、OX40、CD40和/或GITR。

项333.如项329至332中任一项所述的方法,其中该检查点抑制剂包含细胞毒性T淋巴细胞相关抗原4路径 (CTLA4) 抑制剂。

项334.如项333所述的方法,其中该CTLA4抑制剂为抗CTLA4抗体。

项335.如项334所述的方法,其中该抗CTLA4抗体为伊匹木单抗。

项336.如项329至332中任一项所述的方法,其中该检查点抑制剂包含程序性死亡-1路径 (PD1) 抑制剂。

项337.如项336所述的方法,其中该PD1抑制剂为抗PD1抗体。

项338.如项337所述的方法,其中该抗PD1抗体为纳武单抗。

项339.如项336所述的方法,其中该PD1抑制剂为抗PDL1抗体。

项340.如项339所述的方法,其中该抗PDL1抗体为阿特珠单抗。

项341.如项329至332中任一项所述的方法,其中该检查点抑制剂包含CTLA4抑制剂及PD1抑制剂。

项342.如项341所述的方法,其中该CTLA4抑制剂为抗CTLA4抗体。

项343.如项342所述的方法,其中该抗CTLA4抗体为伊匹木单抗。

项344.如项341所述的方法,其中该PD1抑制剂为抗PD1抗体。

项345.如项344所述的方法,其中该抗PD1抗体为纳武单抗。

项346.如项341所述的方法,其中该PD1抑制剂为抗PDL1抗体。

项347.如项346所述的方法,其中该抗PDL1抗体为阿特珠单抗。

项348.如项311至328中任一项所述的方法,其中该至少一种额外疗法包含施用新抗原疫苗。

项349.如项348所述的方法,其中该化合物、抗体-药物缀合物或组合物在施用该新抗原疫苗之前施用。

项350.如项348所述的方法,其中该化合物、抗体-药物缀合物或组合物在施用该新抗原疫苗之后施用。

项351.如项348所述的方法,其中该化合物、抗体-药物缀合物或组合物在施用该新抗原疫苗的同时施用。

项352.如项348至351中任一项所述的方法,其中该化合物、抗体-药物缀合物或组合物的施用在初始施用之后重复至少一次。

项353.如项352所述的方法,其中该化合物、抗体-药物缀合物或组合物用于重复施用的量与用于初始施用的量相比减少。

项354.如项348至353中任一项所述的方法,其中该新抗原疫苗包含至少一种新抗原肽。

项355.如项354所述的方法,其中该至少一种新抗原肽的长度在约10个至约35个氨基酸范围内。

项356.如项354或项355所述的方法,其中该至少一种新抗原肽的长度介于约15至约25个氨基酸范围内。

项357.如项354至356中任一项所述的方法,其中该至少一种新抗原肽包含一个或超过一个新抗原序列。

项358.如项357所述的方法,其中该新抗原序列为对该受试者具有特异性的新抗原序列。

项359.如项357所述的方法,其中该新抗原序列为通用新抗原序列。

项360.如项358所述的方法,其中该新抗原序列为用于该受试者的个人化新抗原疫苗。

项361.如项360所述的方法,其中该新抗原序列已通过对在该受试者中透过施用有效量的该化合物、抗体-药物缀合物或组合物诱导的至少一种新抗原进行定序来识别。

项362.如项360或项361所述的方法,其中该新抗原序列能够结合至于该受试者中表达的至少一种HLA等位基因。

项363.如项359所述的方法,其中该新抗原序列为通用新抗原疫苗。

项364.如项363所述的方法,其中该新抗原序列能够结合至于患有该赘生性病症的受试者群体中的至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%或至少45%受试者中表达的至少一种HLA等位基因。

项365.如项363或项364所述的方法,其中该新抗原序列能够引发针对于患有该赘生性病症的受试者群体的至少1%、至少5%或至少10%中存在的肿瘤的T细胞反应。

项366.如项354至365中任一项所述的方法,其中该至少一种新抗原肽包含通过使赘生性细胞与有效量的该剪接调节子、抗体-药物缀合物或组合物接触而诱导的新抗原序列。

项367.如项348所述的方法,其中该新抗原疫苗包含至少一种新抗原肽及药学上可接受的载体。

项368.如项367所述的方法,其中该至少一种新抗原肽连接至该药学上可接受的载体。

项369.如项367或项368所述的方法,其中该药学上可接受的载体选自肽、血清白蛋白、钥孔虫凝集素蛋白、免疫球蛋白、甲状腺球蛋白、卵白蛋白、类毒素或减毒类毒素衍生物、细胞因子及趋化因子。

项370.如项367至369中任一项所述的方法,其中该新抗原肽及该药学上可接受的载体经由接头共价连接。

项371.如项367至369中任一项所述的方法,其中该新抗原肽及该药学上可接受的载体以融合蛋白形式表达。

项372.如项348所述的方法,其中该新抗原疫苗包含至少一种新抗原肽及药学上可接受的稀释剂。

项373.如项348所述的方法,其中该新抗原疫苗包含至少一种新抗原肽及药学上可接受的佐剂。

项374.如项366所述的方法,其中该赘生性细胞存在于活体外细胞培养物中。

项375.如项366或项374所述的方法,其中该赘生性细胞自该受试者获得。

项376.如项366所述的方法,其中该赘生性细胞存在于该受试者中。

项377.如项348至353中任一项所述的方法,其中该新抗原疫苗包含至少一种新抗原mRNA。

项378.如项377所述的方法,其中该至少一种新抗原mRNA编码一个或超过一个新抗原序列。

项379.如项378所述的方法,其中该新抗原序列为对该受试者具有特异性的新抗原序列。

项380.如项378所述的方法,其中该新抗原序列为通用新抗原序列。

项381.如项379所述的方法,其中该新抗原序列为用于该受试者的个人化新抗原疫苗。

项382.如项381所述的方法,其中该新抗原序列已通过对在该受试者中透过施用有效量的该化合物、抗体-药物缀合物或组合物诱导的至少一种新抗原进行定序来识别。

项383.如项381或项382所述的方法,其中该新抗原序列能够结合至于该受试者中表达的至少一种HLA等位基因。

项384.如项380所述的方法,其中该新抗原序列为通用新抗原疫苗。

项385.如项384所述的方法,其中该新抗原序列能够结合至于患有该赘生性病症的受试者群体中的至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%或至少45%受试者中表达的至少一种HLA等位基因。

项386.如项384或项385所述的方法,其中该新抗原序列能够引发针对于患有该赘生性病症的受试者群体的至少1%、至少5%或至少10%中存在的肿瘤的T细胞反应。

项387.如项378至386中任一项所述的方法,其中该至少一种新抗原mRNA编码通过使赘生性细胞与有效量的该化合物、抗体-药物缀合物或组合物接触而诱导的新抗原序列。

项388.如项377所述的方法,其中该新抗原疫苗包含至少一种新抗原mRNA及药学上可接受的载体。

项389.如项388所述的方法,其中该至少一种新抗原mRNA与该药学上可接受的载体连接。

项390.如项388或项389所述的方法,其中该药学上可接受的载体选自肽、血清白蛋白、钥孔虫凝集素蛋白、免疫球蛋白、甲状腺球蛋白、卵白蛋白、类毒素或减毒类毒素衍生物、细胞因子及趋化因子。

项391.如项377所述的方法,其中该新抗原疫苗包含至少一种新抗原mRNA及药学上可接受的稀释剂。

项392.如项377所述的方法,其中该新抗原疫苗包含至少一种新抗原mRNA及药理学上可接受的佐剂。

项393.如项377至392中任一项所述的方法,其中该新抗原mRNA通过囊封剂囊封。

项394.如项393所述的方法,其中该囊封剂为脂质体。

项395.如项393所述的方法,其中该囊封剂为纳米粒子。

项396.如项387所述的方法,其中该赘生性细胞存在于活体外细胞培养物中。

项397.如项387或项396所述的方法,其中该赘生性细胞自该受试者获得。

项398.如项387所述的方法,其中该赘生性细胞存在于该受试者中。

项399.如项311至328中任一项所述的方法,其中该至少一种额外疗法包含施用细胞因子或细胞因子类似物。

项400.如项399所述的方法,其中该受试者对单独施用时的该细胞因子或细胞因子类似物不耐受、无反应或反应不良。

项401.如项399或项400所述的方法,其中该细胞因子或细胞因子类似物包含T细胞强化子。

项402.如项399至401中任一项所述的方法,其中该细胞因子或细胞因子类似物包含IL-2、IL-10、IL-12、IL-15、IFN γ 和/或TNF α 。

项403.如项311至328中任一项所述的方法,其中该至少一种额外疗法包含施用经工程改造的肿瘤靶向性T细胞。

项404.如项305至403中任一项所述的方法,该方法进一步包括在施用该化合物、抗体-药物缀合物或组合物之后在该受试者中检测一种或多种新抗原和/或T细胞反应。

项405.如项404所述的方法,该方法进一步包括若检测到一种或多种新抗原和/或T细胞反应,则继续施用该化合物、抗体-药物缀合物或组合物。

项406.如项404或项405所述的方法,该方法进一步包括若检测到一种或多种新抗原和/或T细胞反应,则以较低频率和/或以经减少的剂量继续施用该化合物、抗体-药物缀合物或组合物。

项407.如项404至406中任一项所述的方法,其中检测该受试者中的一种或多种新抗原和/或T细胞反应指示用该化合物、抗体-药物缀合物或组合物进行的治疗的功效。

项408.如项305至407中任一项所述的方法,其中该受试者具有约150个突变或更少的非同义突变负荷。

项409.如项305至408中任一项所述的方法,其中该受试者具有约100个突变或更少的非同义突变负担。

项410.如项305至409中任一项所述的方法,其中该受试者具有约50个突变或更少的非同义突变负担。

项411.如项305至410中任一项所述的方法,其中该赘生性病症为血液恶性肿瘤或实体瘤。

项412.如项411所述的方法,其中该血液恶性肿瘤选自B细胞恶性肿瘤、白血病、淋巴瘤及骨髓瘤。

项413.如项411或项412所述的方法,其中该血液恶性肿瘤选自急性骨髓性白血病及多发性骨髓瘤。

项414.如项411所述的方法,其中该实体瘤选自乳癌、胃癌、前列腺癌、卵巢癌、肺癌、子宫癌、唾液腺癌、黑色素瘤、大肠癌、子宫颈癌、胰脏癌、肾癌、结直肠癌及食道癌。

项415.一种治疗患有或疑似患有赘生性病症的受试者的方法,该方法包括:

(a)向该受试者施用有效量的如项1至189中任一项所述的抗体-药物缀合物、如项190至219中任一项所述的化合物或如项220至224中任一项所述的组合物,其中该化合物、抗体-药物缀合物或组合物的施用诱导至少一种新抗原和/或T细胞反应;

(b)在施用该化合物、抗体-药物缀合物或组合物之后,检测该受试者中的一种或多种新抗原和/或T细胞反应;及

(c)若检测到一种或多种新抗原和/或T细胞反应,则继续施用该化合物、抗体-药物缀合物或组合物。

项416.如项415所述的方法,其中检测该受试者中的一种或多种新抗原和/或T细胞反应指示用该化合物、抗体-药物缀合物或组合物进行的治疗的功效。

项417.一种治疗患有或疑似患有赘生性病症的受试者的方法,该方法包括向该受试者施用有效量的如项1至189中任一项所述的抗体-药物缀合物、如项190至219中任一项所述的化合物或如项220至224中任一项所述的组合物;及至少一种额外疗法。

项418.如项417所述的方法,其中该至少一种额外疗法包含至少一种、至少两种、至少三种、至少四种或至少五种额外疗法。

项419.如项417或项418所述的方法,其中该化合物、抗体-药物缀合物或组合物的施用诱导至少一种新抗原和/或T细胞反应。

项420.如项417至419中任一项所述的方法,其中与该化合物、抗体-药物缀合物或组合物和/或该至少一种额外疗法的标准剂量相比,该化合物、抗体-药物缀合物或组合物和/或该至少一种额外疗法的施用量减少10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、75%或90%。

项421.如项417至420中任一项所述的方法,其中与该化合物、抗体-药物缀合物或组合物和/或该至少一种额外疗法的标准给药方案相比,该化合物、抗体-药物缀合物或组合物和/或该至少一种额外疗法以低至少10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、75%或90%的频率施用。

项422.如项417至421中任一项所述的方法,其中该化合物、抗体-药物缀合物或组合物和/或该至少一种额外疗法的施用量和/或剂量引起较低全身性毒性和/或经改善的耐药性。

项423.如项417至422中任一项所述的方法,其中该化合物、抗体-药物缀合物或组合物的施用在该至少一种额外疗法的施用之前开始。

项424.如项417至422中任一项所述的方法,其中该剪接调节子、抗体-药物缀合物、或组合物的施用是在施用该至少一种额外疗法之后起始。

项425.如项417至422中任一项所述的方法,其中该化合物、抗体-药物缀合物或组合物的施用与该至少一种额外疗法的施用同时开始。

项426.如项417至425中任一项所述的方法,其中该化合物、抗体-药物缀合物或组合物的施用在初始施用之后重复至少一次。

项427.如项426所述的方法,其中该化合物、抗体-药物缀合物或组合物用于重复

施用的量与用于初始施用的量相比减少。

项428. 如项426或项427所述的方法, 其中与该化合物、抗体-药物缀合物或组合物的标准剂量相比, 该化合物、抗体-药物缀合物或组合物用于重复施用的量减少。

项429. 如项426至428中任一项所述的方法, 其中与该化合物、抗体-药物缀合物或组合物的标准剂量相比, 该化合物、抗体-药物缀合物或组合物用于重复施用的量减少10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、75%或90%。

项430. 如项417至429中任一项所述的方法, 其中该至少一种额外疗法的施用在初始施用之后重复至少一次。

项431. 如项430所述的方法, 其中该至少一种额外疗法用于重复施用的量与用于初始施用的量相比减少。

项432. 如项430或项431所述的方法, 其中与该至少一种额外疗法的标准剂量相比, 该至少一种额外疗法用于重复施用的量减少。

项433. 如项430至432中任一项所述的方法, 其中与该至少一种额外疗法的标准剂量相比, 该至少一种额外疗法用于重复施用的量减少10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、75%或90%。

项434. 如项426至433中任一项所述的方法, 其中该化合物、抗体-药物缀合物或组合物的重复施用与该至少一种额外疗法的重复施用同时进行。

项435. 如项426至433中任一项所述的方法, 其中该化合物、抗体-药物缀合物或组合物的重复施用与该至少一种额外疗法的重复施用依序或错开进行。

项436. 如项417至435中任一项所述的方法, 其中该至少一种额外疗法包含施用检查点抑制剂。

项437. 如项436所述的方法, 其中该受试者对单独施用时的该检查点抑制剂不耐受、无反应或反应不良。

项438. 如项436或项437所述的方法, 其中该检查点抑制剂靶向CTLA4、PD1、PDL1、OX40、CD40、GITR、LAG3、TIM3和/或KIR。

项439. 如项436至438中任一项所述的方法, 其中该检查点抑制剂靶向CTLA4、OX40、CD40和/或GITR。

项440. 如项436至439中任一项所述的方法, 其中该检查点抑制剂包含细胞毒性T淋巴细胞相关抗原4途径 (CTLA4) 抑制剂。

项441. 如项440所述的方法, 其中该CTLA4抑制剂为抗CTLA4抗体。

项442. 如项441所述的方法, 其中该抗CTLA4抗体为伊匹木单抗。

项443. 如项436至439中任一项所述的方法, 其中该检查点抑制剂包含程序性死亡-1路径 (PD1) 抑制剂。

项444. 如项443所述的方法, 其中该PD1抑制剂为抗PD1抗体。

项445. 如项444所述的方法, 其中该抗PD1抗体为纳武单抗。

项446. 如项443所述的方法, 其中该PD1抑制剂为抗PDL1抗体。

项447. 如项446所述的方法, 其中该抗PDL1抗体为阿特珠单抗。

项448. 如项436至439中任一项所述的方法, 其中该检查点抑制剂包含CTLA4抑制剂及PD1抑制剂。

项449.如项448所述的方法,其中该CTLA4抑制剂为抗CTLA4抗体。

项450.如项449所述的方法,其中该抗CTLA4抗体为伊匹木单抗。

项451.如项448所述的方法,其中该PD1抑制剂为抗PD1抗体。

项452.如项451所述的方法,其中该抗PD1抗体为纳武单抗。

项453.如项448所述的方法,其中该PD1抑制剂为抗PDL1抗体。

项454.如项453所述的方法,其中该抗PDL1抗体为阿特珠单抗。

项455.如项417至435中任一项所述的方法,其中该至少一种额外疗法包含施用新抗原疫苗。

项456.如项455所述的方法,其中该化合物、抗体-药物缀合物或组合物在施用该新抗原疫苗之前施用。

项457.如项455所述的方法,其中该化合物、抗体-药物缀合物或组合物在施用该新抗原疫苗之后施用。

项458.如项455所述的方法,其中在施用该新抗原疫苗的同时施用该化合物、抗体-药物缀合物或组合物。

项459.如项455至458中任一项所述的方法,其中该化合物、抗体-药物缀合物或组合物的施用在初始施用之后重复至少一次。

项460.如项459所述的方法,其中该化合物、抗体-药物缀合物或组合物用于重复施用的量与用于初始施用的量相比减少。

项461.如项455至460中任一项所述的方法,其中该新抗原疫苗包含至少一种新抗原肽。

项462.如项461所述的方法,其中该至少一种新抗原肽的长度介于约10至约35个氨基酸范围内。

项463.如项461或项462所述的方法,其中该至少一种新抗原肽的长度介于约15至约25个氨基酸范围内。

项464.如项461至463中任一项所述的方法,其中该至少一种新抗原肽包含一个或超过一个新抗原序列。

项465.如项464所述的方法,其中该新抗原序列为对该受试者具有特异性的新抗原序列。

项466.如项464所述的方法,其中该新抗原序列为通用新抗原序列。

项467.如项465所述的方法,其中该新抗原序列为用于该受试者的个人化新抗原疫苗。

项468.如项467所述的方法,其中该新抗原序列已通过对该受试者中透过施用有效量的该化合物、抗体-药物缀合物或组合物诱导的至少一种新抗原进行定序来识别。

项469.如项467或项468所述的方法,其中该新抗原序列能够结合至于该受试者中表达的至少一种HLA等位基因。

项470.如项466所述的方法,其中该新抗原序列为通用新抗原疫苗。

项471.如项470所述的方法,其中该新抗原序列能够结合至于患有该赘生性病症的受试者群体中的至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%或至少45%受试者中表达的至少一种HLA等位基因。

项472.如项470或项471所述的方法,其中该新抗原序列能够引发针对于患有该赘生性病症的受试者群体的至少1%、至少5%或至少10%中存在的肿瘤的T细胞反应。

项473.如项464至472中任一项所述的方法,其中该至少一种新抗原肽包含通过使赘生性细胞与有效量的该化合物、抗体-药物缀合物或组合物接触而诱导的新抗原序列。

项474.如项455所述的方法,其中该新抗原疫苗包含至少一种新抗原肽及药学上可接受的载体。

项475.如项474所述的方法,其中该至少一种新抗原肽连接至该药学上可接受的载体。

项476.如项474或项475所述的方法,其中该药学上可接受的载体选自肽、血清白蛋白、钥孔虫凝集素蛋白、免疫球蛋白、甲状腺球蛋白、卵白蛋白、类毒素或减毒类毒素衍生物、细胞因子及趋化因子。

项477.如项474至476中任一项所述的方法,其中该新抗原肽及该药学上可接受的载体经由接头共价连接。

项478.如项474至476中任一项所述的方法,其中该新抗原肽及该药学上可接受的载体以融合蛋白形式表达。

项479.如项455所述的方法,其中该新抗原疫苗包含至少一种新抗原肽及药学上可接受的稀释剂。

项480.如项455所述的方法,其中该新抗原疫苗包含至少一种新抗原肽及药学上可接受的佐剂。

项481.如项473所述的方法,其中该赘生性细胞存在于活体外细胞培养物中。

项482.如项473或项481所述的方法,其中该赘生性细胞自该受试者获得。

项483.如项473所述的方法,其中该赘生性细胞存在于该受试者中。

项484.如项455至460中任一项所述的方法,其中该新抗原疫苗包含至少一种新抗原mRNA。

项485.如项484所述的方法,其中该至少一种新抗原mRNA编码一个或超过一个新抗原序列。

项486.如项485所述的方法,其中该新抗原序列为对该受试者具有特异性的新抗原序列。

项487.如项485所述的方法,其中该新抗原序列为通用新抗原序列。

项488.如项486所述的方法,其中该新抗原序列为用于该受试者的个人化新抗原疫苗。

项489.如项488所述的方法,其中该新抗原序列已通过对在该受试者中透过施用有效量的该化合物、抗体-药物缀合物或组合物诱导的至少一种新抗原进行定序来识别。

项490.如项488或项489所述的方法,其中该新抗原序列能够结合至于该受试者中表达的至少一种HLA等位基因。

项491.如项487所述的方法,其中该新抗原序列为通用新抗原疫苗。

项492.如项491所述的方法,其中该新抗原序列能够结合至于患有该赘生性病症的受试者群体中的至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%或至少45%受试者中表达的至少一种HLA等位基因。

项493.如项491或项492所述的方法,其中该新抗原序列能够引发针对于患有该赘生性病症的受试者群体的至少1%、至少5%或至少10%中存在的肿瘤的T细胞反应。

项494.如项484至493中任一项所述的方法,其中该至少一种新抗原mRNA编码通过使赘生性细胞与有效量的该化合物、抗体-药物缀合物或组合物接触而诱导的新抗原序列。

项495.如项484所述的方法,其中该新抗原疫苗包含至少一种新抗原mRNA及药学上可接受的载体。

项496.如项495所述的方法,其中该至少一种新抗原mRNA连接至该药学上可接受的载体。

项497.如项495或项496所述的方法,其中该药学上可接受的载体选自肽、血清白蛋白、钥孔虫凝集素蛋白、免疫球蛋白、甲状腺球蛋白、卵白蛋白、类毒素或减毒类毒素衍生物、细胞因子及趋化因子。

项498.如项484所述的方法,其中该新抗原疫苗包含至少一种新抗原mRNA及药学上可接受的稀释剂。

项499.如项484所述的方法,其中该新抗原疫苗包含至少一种新抗原mRNA及药学上可接受的佐剂。

项500.如项484至499中任一项所述的方法,其中该新抗原mRNA通过囊封剂来囊封。

项501.如项500所述的方法,其中该囊封剂为脂质体。

项502.如项500所述的方法,其中该囊封剂为纳米粒子。

项503.如项494所述的方法,其中该赘生性细胞存在于活体外细胞培养物中。

项504.如项494或项503所述的方法,其中该赘生性细胞自该受试者获得。

项505.如项494所述的方法,其中该赘生性细胞存在于该受试者中。

项506.如项417至435中任一项所述的方法,其中该至少一种额外疗法包含施用细胞因子或细胞因子类似物。

项507.如项506所述的方法,其中该受试者对单独施用时的该细胞因子或细胞因子类似物不耐受、无反应或反应不良。

项508.如项506或项507所述的方法,其中该细胞因子或细胞因子类似物包含T细胞强化子。

项509.如项506至508中任一项所述的方法,其中该细胞因子或细胞因子类似物包含IL-2、IL-10、IL-12、IL-15、IFN γ 和/或TNF α 。

项510.如项417至435中任一项所述的方法,其中该至少一种额外疗法包含施用经工程改造的肿瘤靶向性T细胞。

项511.如项417至510中任一项所述的方法,其中该受试者具有约150个突变或更少的非同义突变负荷。

项512.如项417至511中任一项所述的方法,其中该受试者具有约100个突变或更少的非同义突变负荷。

项513.如项417至512中任一项所述的方法,其中该受试者具有约50个突变或更少的非同义突变负荷。

项514.如项417至513中任一项所述的方法,其中该赘生性病症为血液恶性肿瘤或

实体瘤。

项515.如项514所述的方法,其中该血液恶性肿瘤选自B细胞恶性肿瘤、白血病、淋巴瘤及骨髓瘤。

项516.如项514或项515所述的方法,其中该血液恶性肿瘤选自急性骨髓性白血病及多发性骨髓瘤。

项517.如项514所述的方法,其中该实体瘤选自乳癌、胃癌、前列腺癌、卵巢癌、肺癌、子宫癌、唾液腺癌、黑色素瘤、大肠癌、子宫颈癌、胰脏癌、肾癌、结直肠癌及食道癌。

项518.一种识别至少一种新抗原的方法,该方法包括:

(a)使赘生性细胞与有效量的如项1至189中任一项所述的抗体-药物缀合物、如项190至219中任一项所述的化合物或如项220至224中任一项所述的组合物接触;

(b)在使该赘生性细胞与该化合物、抗体-药物缀合物或组合物接触之后,检测至少一种经交替剪接的mRNA转录物;

(c)预测该至少一种经交替剪接的mRNA转录物向至少一种肽的翻译;及

(d)比较该至少一种肽与参考蛋白质体,其中若该至少一种肽不匹配该参考蛋白质体中的任何肽,则识别出至少一种新抗原。

项519.如项518所述的方法,其中检测至少一种经交替剪接的mRNA转录物包含RNAseq。

项520.如项518或项519所述的方法,其中预测该至少一种经交替剪接的mRNA转录物的翻译包含定量该至少一种转录物的剪接百分比(dPSI)值中的变化。

项521.如项518至520中任一项所述的方法,其中预测该至少一种经交替剪接的mRNA转录物的翻译包含RiboSeq和/或核糖体剖析。

项522.如项518至521中任一项所述的方法,其中该方法进一步包括针对所预测的主要组织相容复合体(MHC)结合对该至少一种肽进行评估。

项523.如项522所述的方法,其中所预测的MHC结合通过量测该至少一种肽的原始亲和力预测结合强度来确定。

项524.如项523所述的方法,其中约500nM或更高的原始亲和力预测结合强度指示MHC结合。

项525.如项522至524中任一项所述的方法,其中所预测的MHC结合通过以下来确定:识别一系列随机肽的预测结合强度的分布;且比较该至少一种肽之预测结合强度与该分布。

项526.如项525所述的方法,其中该分布的前2%中的预测结合强度指示弱MHC结合。

项527.如项525所述的方法,其中该分布的前0.5%中的预测结合强度指示强MHC结合。

项528.如项518至527中任一项所述的方法,其中该赘生性细胞存在于活体外细胞培养物中。

项529.如项528所述的方法,其中该赘生性细胞自该受试者获得。

项530.如项518至527中任一项所述的方法,其中该赘生性细胞存在于该受试者中。

项531.如项518至530中任一项所述的方法,该方法进一步包括接触一个或多个额外赘生性细胞以识别至少一种通用新抗原。

项532.一种识别至少一种新抗原的方法,该方法包括:

(a)使赘生性细胞与有效量的如项1至189中任一项所述的抗体-药物缀合物、如项190至219中任一项所述的化合物或如项220至224中任一项所述的组合物接触;

(b)在使该赘生性细胞与该化合物、抗体-药物缀合物或组合物接触之后,检测包含潜在新抗原序列的至少一种肽;及

(c)比较该至少一种肽与参考蛋白质体,其中若该至少一种肽不匹配该参考蛋白质体中的任何肽,则识别出至少一种新抗原。

项533.如项532所述的方法,其中该方法进一步包括针对所预测的主要组织相容复合体(MHC)结合对该至少一种肽进行评估。

项534.如项533所述的方法,其中所预测的MHC结合通过量测该至少一种肽的原始亲和力预测结合强度来确定。

项535.如项534所述的方法,其中约500nM或更高的原始亲和力预测结合强度指示MHC结合。

项536.如项533至535中任一项所述的方法,其中所预测的MHC结合通过以下来确定:识别一系列随机肽的预测结合强度的分布;且比较该至少一种肽的预测结合强度与该分布。

项537.如项536所述的方法,其中该分布的前2%中的预测结合强度指示弱MHC结合。

项538.如项536所述的方法,其中该分布的前0.5%中的预测结合强度指示强MHC结合。

项539.如项532至538中任一项所述的方法,其中该赘生性细胞存在于活体外细胞培养物中。

项540.如项539所述的方法,其中该赘生性细胞自该受试者获得。

项541.如项532至538中任一项所述的方法,其中该赘生性细胞存在于该受试者中。

项542.如项532至541中任一项所述的方法,该方法进一步包括接触一个或多个额外赘生性细胞以识别至少一种通用新抗原。

项543.一种制造新抗原疫苗的方法,该方法包括:

(a)使用如项518至542中任一项所述的方法识别至少一种新抗原;及

(b)将该至少一种新抗原与药学上可接受的载体、稀释剂或佐剂一起配制。

项544.如项543所述的方法,其中该至少一种新抗原连接至该药学上可接受的载体。

项545.如项544所述的方法,其中该药学上可接受的载体选自肽、血清白蛋白、钥孔虫凝集素、免疫球蛋白、甲状腺球蛋白、卵白蛋白、类毒素或减毒类毒素衍生物、细胞因子及趋化因子。

项546.一种治疗患有或疑似患有赘生性病症的受试者的方法,该方法包括:

(a)向该受试者施用有效量的如项1至189中任一项所述的抗体-药物缀合物、如项

190至219中任一项所述的化合物或如项220至224中任一项所述的组合物；

(b) 在施用该化合物、抗体-药物缀合物或组合物之后，检测该受试者中的一种或多种新抗原；

(c) 比较该一种或多种新抗原与一组通用新抗原；及

(d) 向该受试者施用包含存在于该受试者中的至少一种通用新抗原的通用新抗原疫苗。

项547. 如项546所述的方法，其中该通用新抗原疫苗单独施用或与至少一种额外疗法组合施用。

项548. 如项547所述的方法，其中该至少一种额外疗法包含至少一种、至少两种、至少三种、至少四种或至少五种额外疗法。

项549. 如项547或项548所述的方法，其中该至少一种额外疗法包含该化合物、抗体-药物缀合物或组合物的重复施用。

项550. 如项549所述的方法，其中该化合物、抗体-药物缀合物或组合物的重复施用在该通用新抗原疫苗的施用之前开始。

项551. 如项549所述的方法，其中该化合物、抗体-药物缀合物或组合物的重复在该通用新抗原疫苗的施用之后开始。

项552. 如项549所述的方法，其中该化合物、抗体-药物缀合物或组合物的重复施用与该通用新抗原疫苗的施用同时开始。

项553. 如项549至552中任一项所述的方法，其中该化合物、抗体-药物缀合物或组合物用于重复施用的量与用于初始施用的量相比减少。

项554. 如项549至553中任一项所述的方法，其中与该化合物、抗体-药物缀合物或组合物的标准剂量相比，该化合物、抗体-药物缀合物或组合物用于重复施用的量减少。

项555. 如项549至554中任一项所述的方法，其中与该化合物、抗体-药物缀合物或组合物的标准剂量相比，该化合物、抗体-药物缀合物或组合物用于重复施用的量减少10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、75%或90%。

项556. 如项547至555中任一项所述的方法，其中该至少一种额外疗法包含施用检查点抑制剂。

项557. 如项556所述的方法，其中该检查点抑制剂的施用在该通用新抗原疫苗的施用和/或该化合物、抗体-药物缀合物或组合物的重复施用之前起始。

项558. 如项556所述的方法，其中该检查点抑制剂的施用在该通用新抗原疫苗的施用和/或该化合物、抗体-药物缀合物或组合物的重复之后开始。

项559. 如项556所述的方法，其中该检查点抑制剂的施用与该通用新抗原疫苗的施用和/或该化合物、抗体-药物缀合物或组合物的重复施用同时开始。

项560. 如项556至559中任一项所述的方法，其中该检查点抑制剂的施用在初始施用之后重复至少一次。

项561. 如项560所述的方法，其中用于重复施用的该检查点抑制剂的量相较于用于初始施用的量有所减少。

项562. 如项560或项561所述的方法，其中用于重复施用的该检查点抑制剂的量相较于该检查点抑制剂的标准剂量有所减少。

项563.如项560至562中任一项所述的方法,其中与该检查点抑制剂的标准剂量相比,该检查点抑制剂用于重复施用的量减少10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、75%或90%。

项564.如项556至563中任一项所述的方法,其中该受试者对单独施用时的该检查点抑制剂不耐受、无响应或响应不良。

项565.如项556至564中任一项所述的方法,其中该检查点抑制剂靶向CTLA4、PD1、PDL1、OX40、CD40、GITR、LAG3、TIM3和/或KIR。

项566.如项556至565中任一项所述的方法,其中该检查点抑制剂靶向CTLA4、OX40、CD40和/或GITR。

项567.如项556至566中任一项所述的方法,其中该检查点抑制剂包含细胞毒性T淋巴细胞相关抗原4途径(CTLA4)抑制剂。

项568.如项567所述的方法,其中该CTLA4抑制剂是抗CTLA4抗体。

项569.如项568所述的方法,其中该抗CTLA4抗体是伊匹木单抗。

项570.如项556至566中任一项所述的方法,其中该检查点抑制剂包含程序性死亡-1途径(PD1)抑制剂。

项571.如项570所述的方法,其中该PD1抑制剂是抗PD1抗体。

项572.如项571所述的方法,其中该抗PD1抗体是纳武单抗。

项573.如项570所述的方法,其中该PD1抑制剂是抗PDL1抗体。

项574.如项573所述的方法,其中该抗PDL1抗体是阿特珠单抗。

项575.如项556至566中任一项所述的方法,其中该检查点抑制剂包含CTLA4抑制剂和PD1抑制剂。

项576.如项575所述的方法,其中该CTLA4抑制剂是抗CTLA4抗体。

项577.如项576所述的方法,其中该抗CTLA4抗体是伊匹木单抗。

项578.如项575所述的方法,其中该PD1抑制剂是抗PD1抗体。

项579.如项578所述的方法,其中该抗PD1抗体是纳武单抗。

项580.如项575所述的方法,其中该PD1抑制剂为抗PDL1抗体。

项581.如项580所述的方法,其中该抗PDL1抗体为阿特珠单抗。

项582.如项546至581中任一项所述的方法,其中该通用新抗原疫苗包含至少一种新抗原肽。

项583.如项582所述的方法,其中该至少一种新抗原肽的长度介于约10至约35个氨基酸范围内。

项584.如项582或项583所述的方法,其中该至少一种新抗原肽的长度介于约15至约25个氨基酸范围内。

项585.如项582至584中任一项所述的方法,其中该至少一种新抗原肽包含一个或超过一个通用新抗原序列。

项586.如项585所述的方法,其中该通用新抗原序列能够结合至于患有该赘生性病症的受试者群体中的至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%或至少45%受试者中表达的至少一种HLA等位基因。

项587.如项585或项586所述的方法,其中该通用新抗原序列能够引发针对于患有

该赘生性病症的受试者群体的至少1%、至少5%或至少10%中存在的肿瘤的T细胞反应。

项588.如项582所述的方法,其中该通用新抗原疫苗包含至少一种新抗原肽及药学上可接受的载体。

项589.如项588所述的方法,其中该至少一种新抗原肽连接至该药学上可接受的载体。

项590.如项588或项589所述的方法,其中该药学上可接受的载体选自肽、血清白蛋白、钥孔虫凝血蓝蛋白、免疫球蛋白、甲状腺球蛋白、卵白蛋白、类毒素或减毒类毒素衍生物、细胞因子及趋化因子。

项591.如项588至590中任一项所述的方法,其中该新抗原肽和该药学上可接受的载体经由接头共价连接。

项592.如项588至590中任一项所述的方法,其中该新抗原肽和该药学上可接受的载体表达为融合蛋白。

项593.如项582所述的方法,其中该通用新抗原疫苗包含至少一种新抗原肽和药学上可接受的稀释剂。

项594.如项582所述的方法,其中该通用新抗原疫苗包含至少一种新抗原肽和药学上可接受的佐剂。

项595.如项546至581中任一项所述的方法,其中该通用新抗原疫苗包含至少一种新抗原mRNA。

项596.如项595所述的方法,其中该至少一种新抗原mRNA编码一个或超过一个通用新抗原序列。

项597.如项596所述的方法,其中该通用新抗原序列能够结合至于患有该赘生性病症的受试者群体中的至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%或至少45%受试者中表达的至少一种HLA等位基因。

项598.如项596或项597所述的方法,其中该通用新抗原序列能够引发针对于患有该赘生性病症的受试者群体的至少1%、至少5%或至少10%中存在的肿瘤的T细胞反应。

项599.如项595所述的方法,其中该通用新抗原疫苗包含至少一种新抗原mRNA和药学上可接受的载体。

项600.如项599所述的方法,其中该至少一种新抗原mRNA与该药学上可接受的载体连接。

项601.如项599或项600所述的方法,其中该药学上可接受的载体选自肽、血清白蛋白、钥孔虫凝血蓝蛋白、免疫球蛋白、甲状腺球蛋白、卵白蛋白、类毒素或减毒的类毒素衍生物、细胞因子和趋化因子。

项602.如项595所述的方法,其中该通用新抗原疫苗包含至少一种新抗原mRNA和药学上可接受的稀释剂。

项603.如项595所述的方法,其中该通用新抗原疫苗包含至少一种新抗原mRNA和药学上可接受的佐剂。

项604.如项595至603中任一项所述的方法,其中该新抗原mRNA通过包封剂包封。

项605.如项604所述的方法,其中该包封剂是脂质体。

项606.如项604所述的方法,其中该包封剂是纳米颗粒。

项607.如项546至606中任一项所述的方法,其中该受试者具有约150个突变或更少的非同义突变负担。

项608.如项546至607中任一项所述的方法,其中该受试者具有约100个突变或更少的非同义突变负担。

项609.如项546至608中任一项所述的方法,其中该受试者具有约50个突变或更少的非同义突变负担。

项610.如项546至609中任一项所述的方法,其中该赘生性病症是血液恶性肿瘤或实体瘤。

项611.如项610所述的方法,其中该血液恶性肿瘤选自B细胞恶性肿瘤、白血病、淋巴瘤和骨髓瘤。

项612.如项610或项611所述的方法,其中该血液恶性肿瘤选自急性骨髓性白血病和多发性骨髓瘤。

项613.如项610所述的方法,其中该实体瘤选自乳癌、胃癌、前列腺癌、卵巢癌、肺癌、子宫癌、唾液腺癌、黑色素瘤、大肠癌、子宫颈癌、胰脏癌、肾癌、结直肠癌及食道癌。

项614.一种新抗原疫苗,该新抗原疫苗包含至少一种新抗原肽,其中该至少一种新抗原肽包含通过使赘生性细胞与有效量的如项1至189中任一项所述的抗体-药物缀合物、如项190至219中任一项所述的化合物或如项220至224中任一项所述的组合物接触而诱导的新抗原序列。

项615.如项614所述的新抗原疫苗,其中该至少一种新抗原肽的长度在约10个至约35个氨基酸范围内。

项616.如项614或项615所述的新抗原疫苗,其中该至少一种新抗原肽的长度在约15个至约25个氨基酸范围内。

项617.如项614至616中任一项所述的新抗原疫苗,该新抗原疫苗进一步包含药学上可接受的载体。

项618.如项617所述的新抗原疫苗,其中该至少一种新抗原肽与该药学上可接受的载体连接。

项619.如项617或项618所述的新抗原疫苗,其中该药学上可接受的载体选自肽、血清白蛋白、钥孔血蓝蛋白、免疫球蛋白、甲状腺球蛋白、卵白蛋白、类毒素或减毒的类毒素衍生物、细胞因子和趋化因子。

项620.如项617至619中任一项所述的新抗原疫苗,其中该新抗原肽和该药学上可接受的载体经由接头共价连接。

项621.如项617至619中任一项所述的新抗原疫苗,其中该新抗原肽和该药学上可接受的载体表达为融合蛋白。

项622.如项614至616中任一项所述的新抗原疫苗,该新抗原疫苗进一步包含药学上可接受的稀释剂。

项623.如项614至616中任一项所述的新抗原疫苗,该新抗原疫苗进一步包含药学上可接受的佐剂。

项624.如项614至623中任一项所述的新抗原疫苗,其中该赘生性细胞存在于体外细胞培养物中。

项625.如项614至624中任一项所述的新抗原疫苗,其中该赘生性细胞获得自受试者。

项626.如项614至623中任一项所述的新抗原疫苗,其中该赘生性细胞存在于受试者中。

项627.一种新抗原疫苗,该新抗原疫苗包含至少一种新抗原mRNA,其中该至少一种新抗原mRNA编码通过使赘生性细胞与有效量的如项1至189中任一项所述的抗体-药物缀合物、如项190至219中任一项所述的化合物或如项220至224中任一项所述的组合物接触而诱导的新抗原序列。

项628.如项627所述的新抗原疫苗,该新抗原疫苗进一步包含药学上可接受的载体。

项629.如项628所述的新抗原疫苗,其中该至少一种新抗原mRNA与该药学上可接受的载体连接。

项630.如项628或项629所述的新抗原疫苗,其中该药学上可接受的载体选自肽、血清白蛋白、钥孔戚血蓝蛋白、免疫球蛋白、甲状腺球蛋白、卵白蛋白、类毒素或减毒的类毒素衍生物、细胞因子和趋化因子。

项631.如项627所述的新抗原疫苗,该新抗原疫苗进一步包含药学上可接受的稀释剂。

项632.如项627所述的新抗原疫苗,该新抗原疫苗进一步包含药学上可接受的佐剂。

项633.如项627至632中任一项所述的新抗原疫苗,其中该新抗原mRNA通过包封剂包封。

项634.如项633所述的新抗原疫苗,其中该包封剂是脂质体。

项635.如项633所述的新抗原疫苗,其中该包封剂是纳米颗粒。

项636.如项627至635中任一项所述的新抗原疫苗,其中该赘生性细胞存在于体外细胞培养物中。

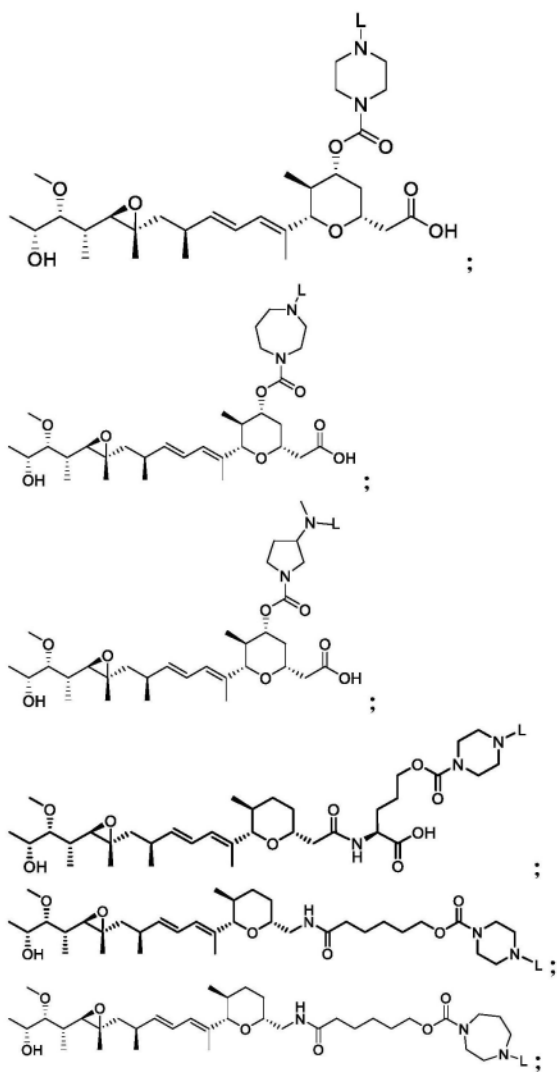
项637.如项627至636中任一项所述的新抗原疫苗,其中该赘生性细胞获得自受试者。

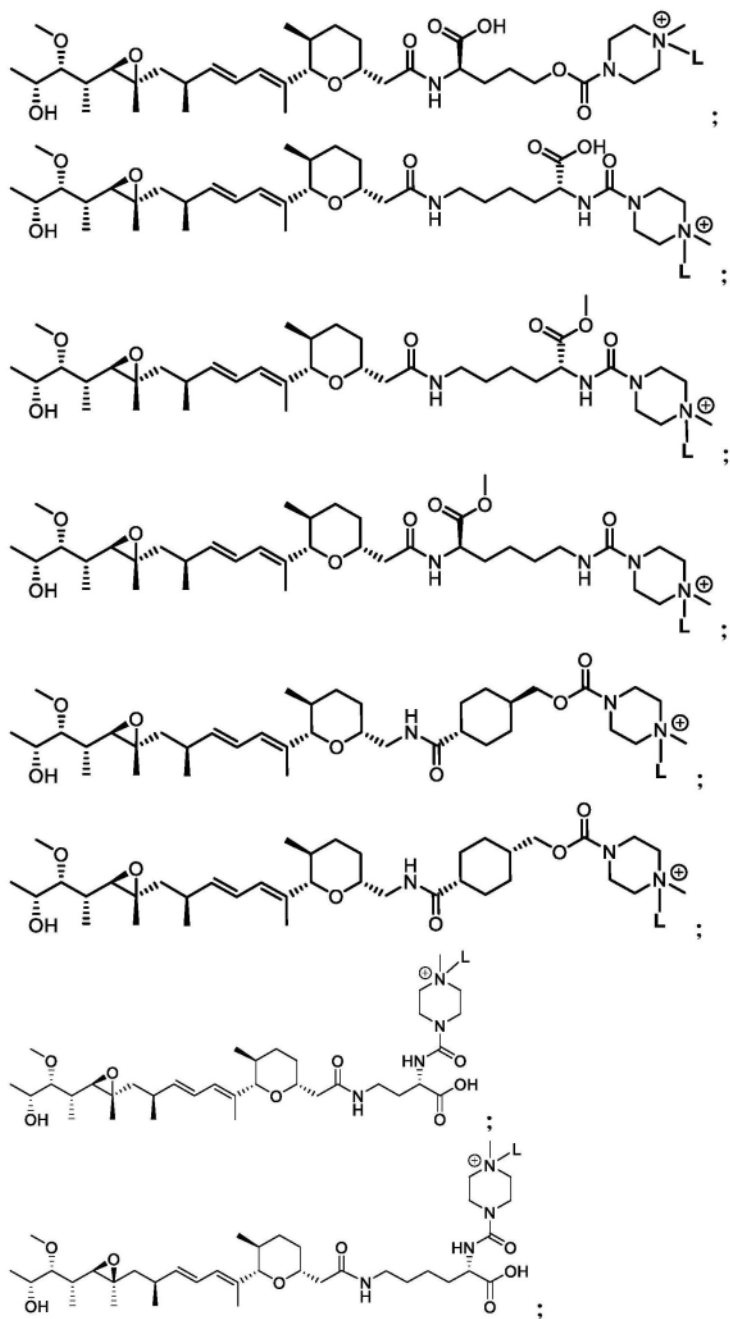
项638.如项627至635中任一项所述的新抗原疫苗,其中该赘生性细胞存在于受试者中。

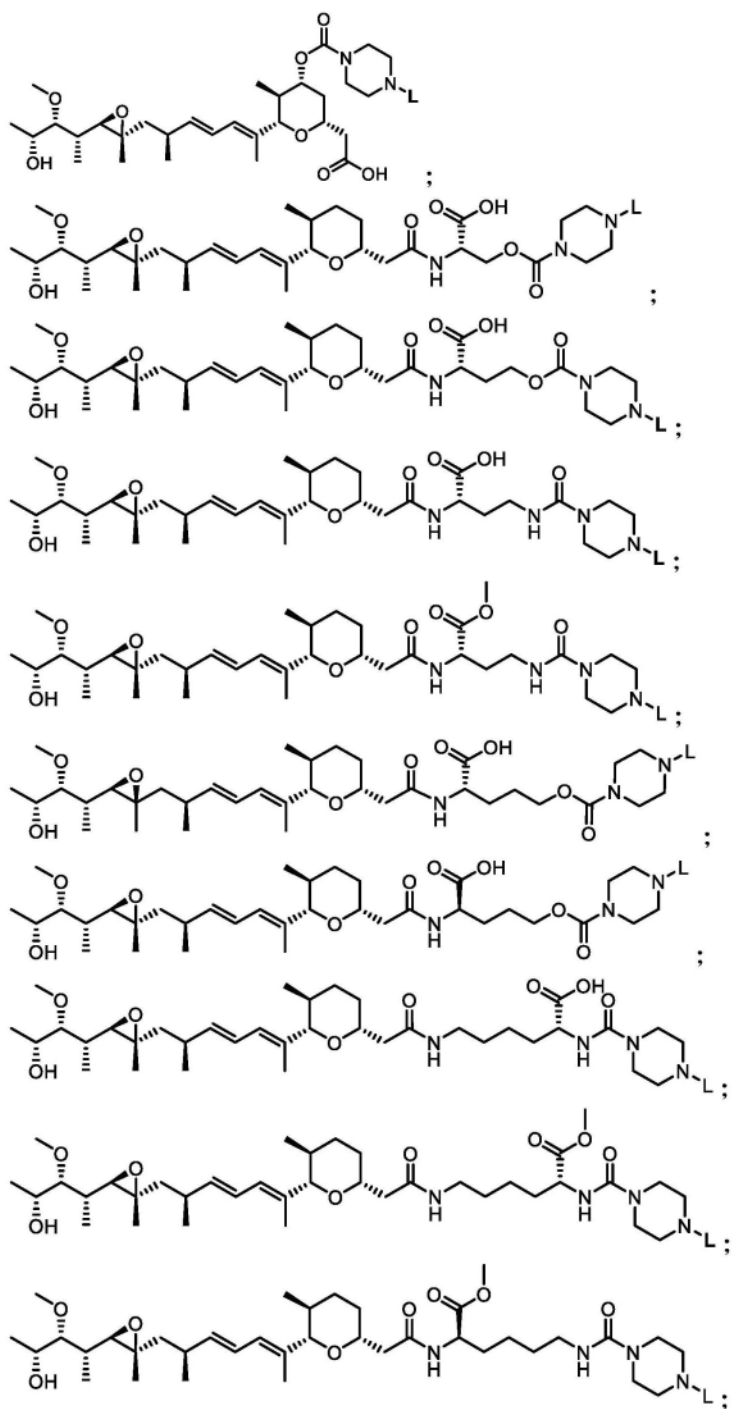
项639.一种治疗患有或疑似患有赘生性病症的受试者的方法,该方法包括向该受试者施用治疗有效量的如项190至219中任一项所述的化合物或如项220所述的药物组合物。

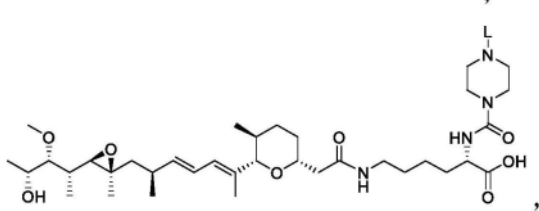
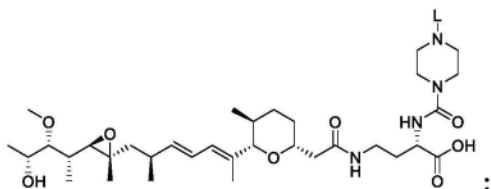
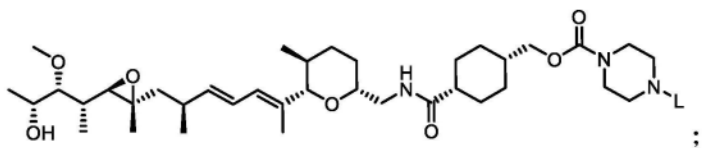
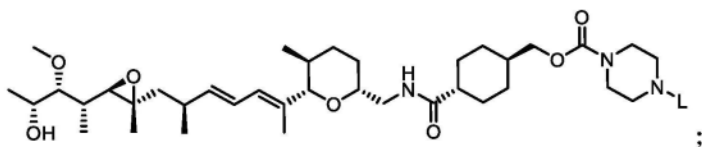
项640.一种减少或抑制患有或疑似患有赘生性病症的受试者中的肿瘤生长的方法,该方法包括向该受试者施用治疗有效量的如项190至219中任一项所述的化合物或如项220所述的药物组合物。

项641.一种化合物,该化合物选自:





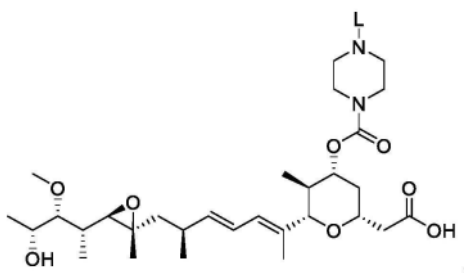




及其药学上可接受的盐,

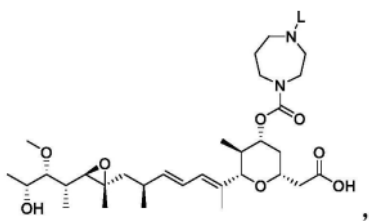
其中L为共价连接至抗体的接头。

项642. 如项641所述的化合物, 其中该化合物为



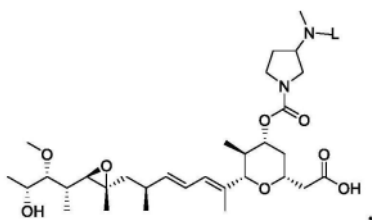
或其药学上可接受的盐。

项643. 如项641所述的化合物, 其中该化合物为



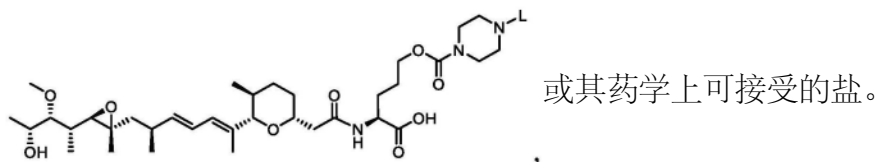
或其药学上可接受的盐。

项644. 如项641所述的化合物, 其中该化合物为

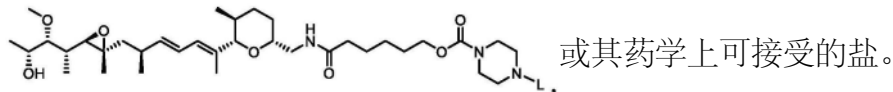


或其药学上可接受的盐。

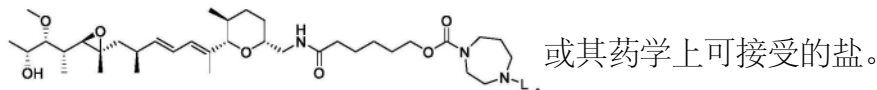
项645. 如项641所述的化合物, 其中该化合物为



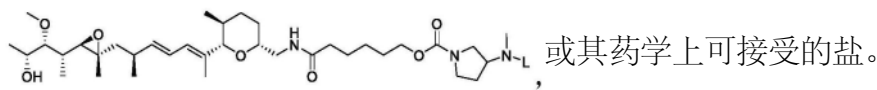
项646. 如项641所述的化合物, 其中该化合物为



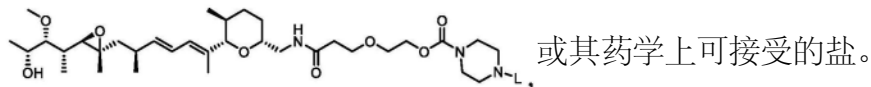
项647. 如项641所述的化合物, 其中该化合物为



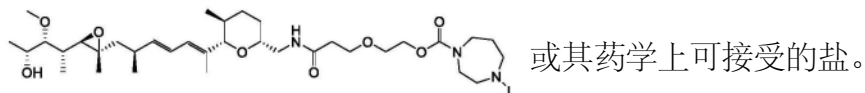
项648. 如项641所述的化合物, 其中该化合物为



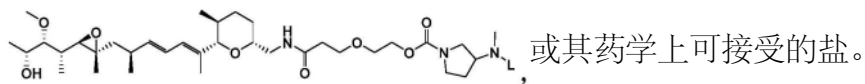
项649. 如项641所述的化合物, 其中该化合物为



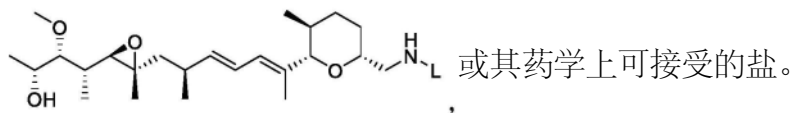
项650. 如项641所述的化合物, 其中该化合物为



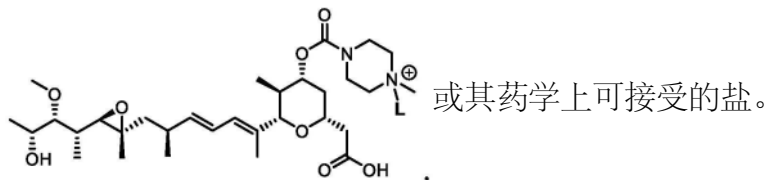
项651. 如项641所述的化合物, 其中该化合物为



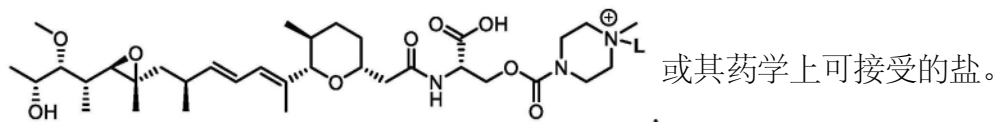
项652. 如项641所述的化合物, 其中该化合物为



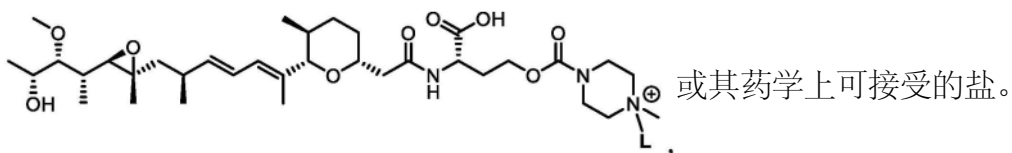
项653. 如项641所述的化合物, 其中该化合物为



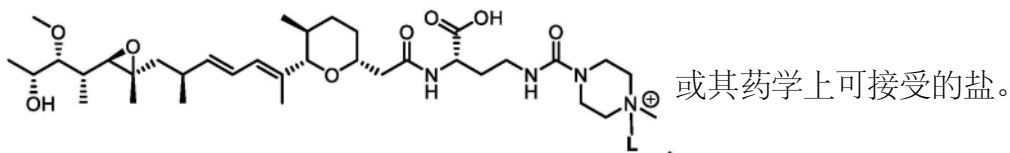
项654. 如项641所述的化合物, 其中该化合物为



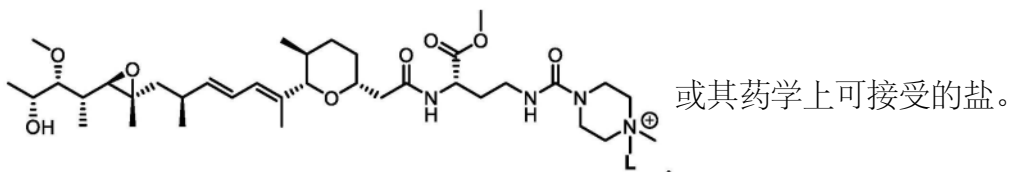
项655. 如项641所述的化合物, 其中该化合物为



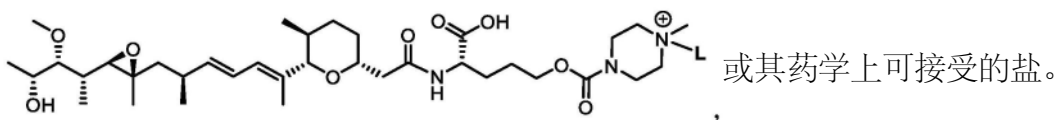
项656. 如项641所述的化合物, 其中该化合物为



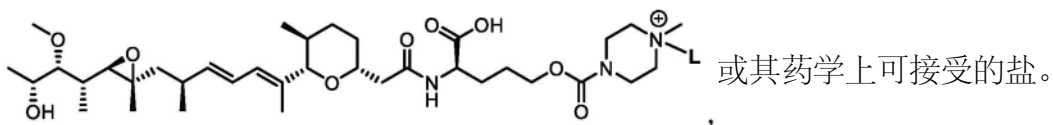
项657. 如项641所述的化合物, 其中该化合物为



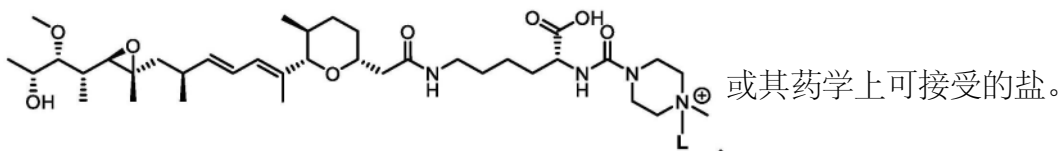
项658. 如项641所述的化合物, 其中该化合物为



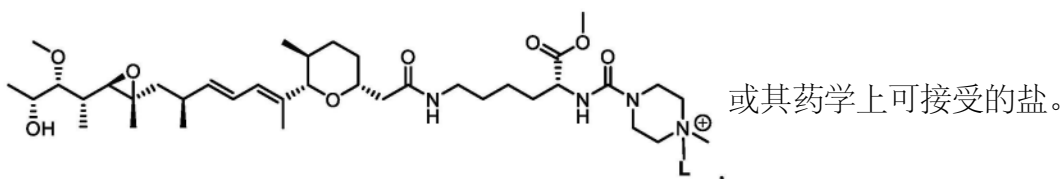
项659. 如项641所述的化合物, 其中该化合物为



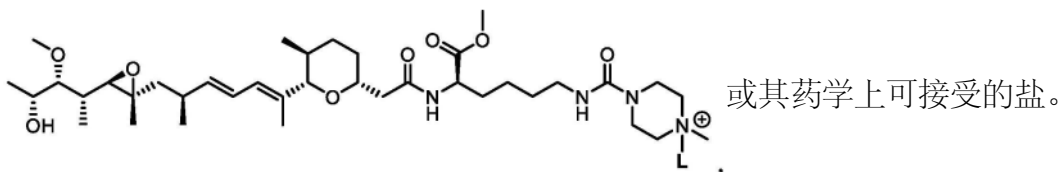
项660. 如项641所述的化合物, 其中该化合物为



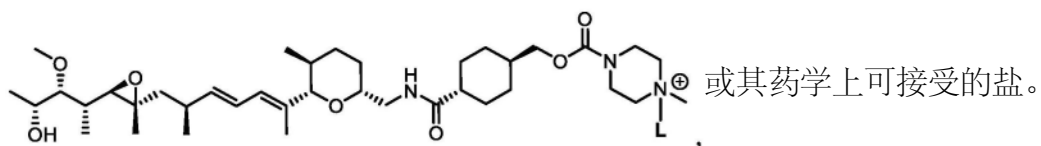
项661. 如项641所述的化合物, 其中该化合物为



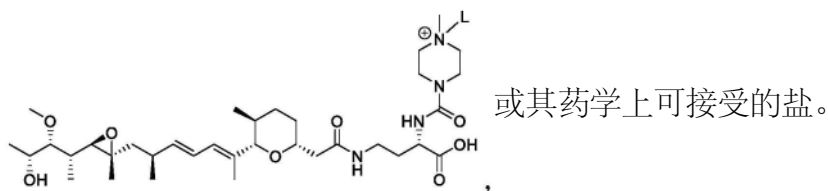
项662. 如项641所述的化合物, 其中该化合物为



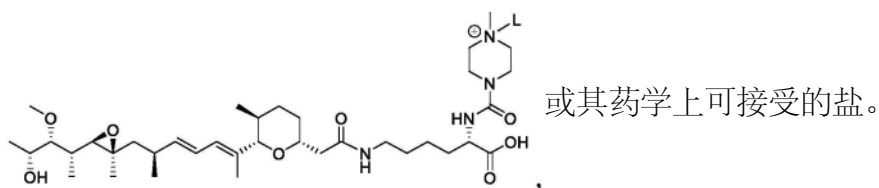
项663. 如项641所述的化合物, 其中该化合物为



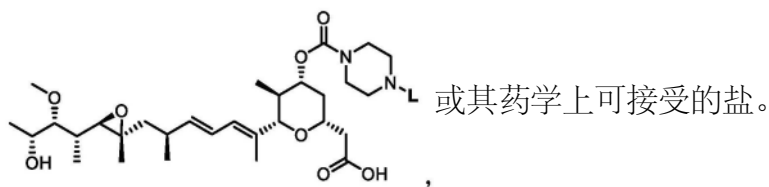
项664. 如项641所述的化合物, 其中该化合物为



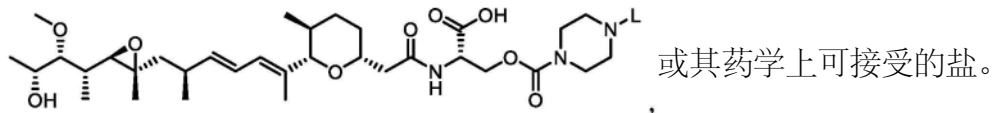
项665. 如项641所述的化合物, 其中该化合物为



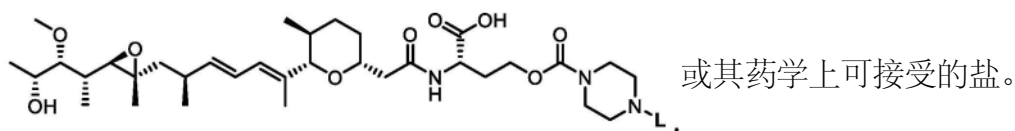
项666. 如项641所述的化合物, 其中该化合物为



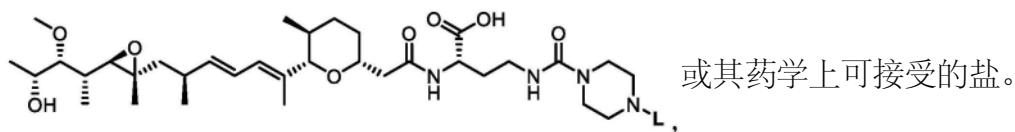
项667. 如项641所述的化合物, 其中该化合物为



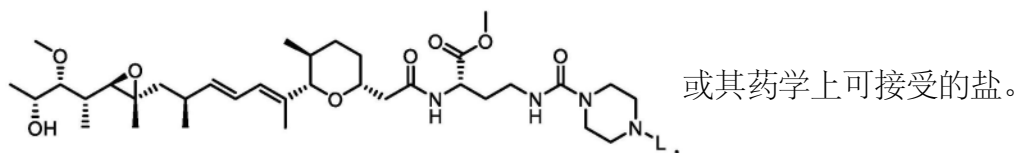
项668. 如项641所述的化合物, 其中该化合物为



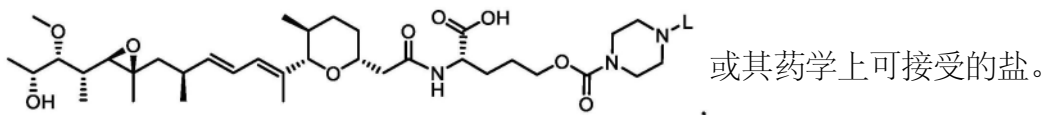
项669. 如项641所述的化合物, 其中该化合物为



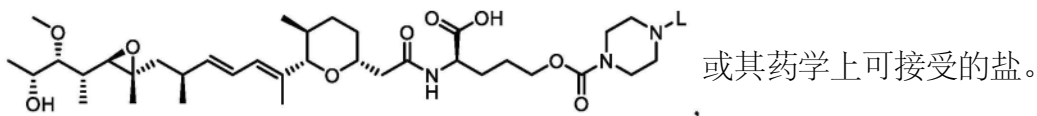
项670. 如项641所述的化合物, 其中该化合物为



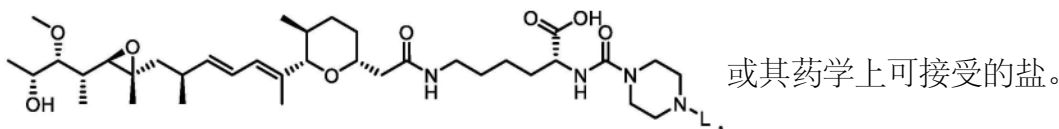
项671. 如项641所述的化合物, 其中该化合物为



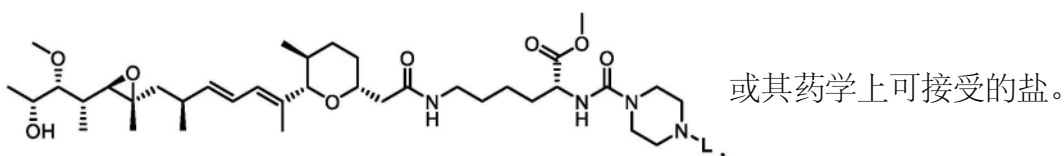
项672. 如项641所述的化合物, 其中该化合物为



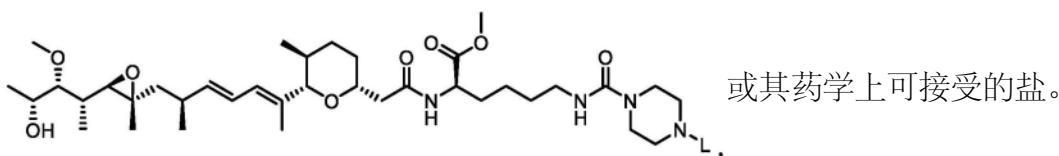
项673. 如项641所述的化合物, 其中该化合物为



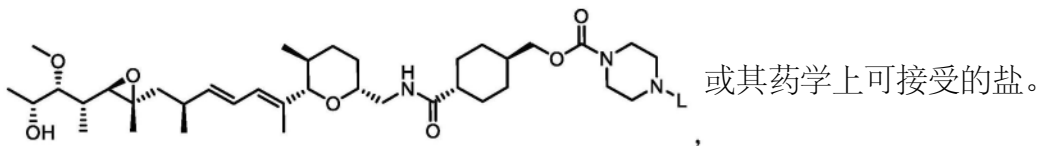
项674. 如项641所述的化合物, 其中该化合物为



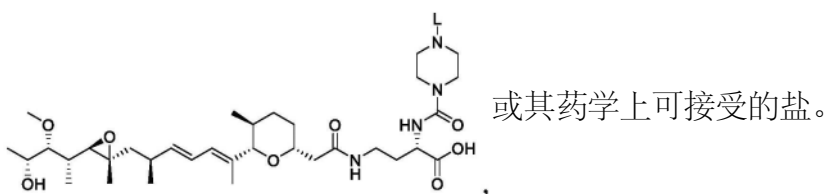
项675. 如项641所述的化合物, 其中该化合物为



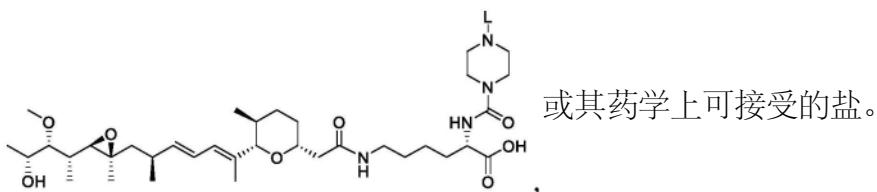
项676. 如项641所述的化合物, 其中该化合物为



项677. 如项641所述的化合物, 其中该化合物为



项678. 如项641所述的化合物, 其中该化合物为



项679. 如项641至678中任一项所述的化合物, 其中该接头为可裂解接头。

项680. 如项679所述的化合物, 其中该接头包含可裂解肽部分。

项681. 如项680所述的化合物, 其中该可裂解肽部分可通过酶裂解。

项682. 如项679至681中任一项所述的化合物, 其中该可裂解肽部分或接头包含氨

基酸单元。

项683.如项682所述的化合物,其中该氨基酸单元包含缬氨酸-瓜氨酸(Val-Cit)。

项684.如项682所述的化合物,其中该氨基酸单元包含缬氨酸-丙氨酸(Val-Ala)。

项685.如项682所述的化合物,其中该氨基酸单元包含麸酰氨酸-缬氨酸-瓜氨酸(Glu-Val-Cit)。

项686.如项682所述的化合物,其中该氨基酸单元包含丙氨酸-丙氨酸-天冬酰氨酸(Ala-Ala-Asn)。

项687.如项679所述的化合物,其中该接头包含可裂解葡萄糖醛酸部分。

项688.如项687所述的化合物,其中该可裂解葡萄糖醛酸部分可通过酶裂解。

项689.如项687或项688所述的化合物,其中该可裂解葡萄糖醛酸部分可通过葡萄糖醛酸酶裂解。

项690.如项687至689中任一项所述的化合物,其中该可裂解葡萄糖醛酸部分可通过 β -葡萄糖醛酸酶裂解。

项691.如项641至690中任一项所述的化合物,其中该接头包含至少一个间隔子单元。

项692.如项691所述的化合物,其中该间隔子单元或接头包含聚乙二醇(PEG)部分。

项693.如项692所述的化合物,其中该PEG部分包含-(PEG)_m-且m为1至10的整数。

项694.如项693所述的化合物,其中m为2。

项695.如项693所述的化合物,其中该间隔子单元或接头包含烷基部分。

项696.如项695所述的化合物,其中该烷基部分包含-(CH₂)_n-且n为1至10的整数。

项697.如项696所述的化合物,其中n为2。

项698.如项696所述的化合物,其中n为5。

项699.如项696所述的化合物,其中n为6。

项700.如项691至699中任一项所述的化合物,其中该间隔子单元经由顺丁烯二酰亚胺(Ma1)部分(“Ma1-间隔子单元”)连接至该抗体或抗原结合片段。

项701.如项700所述的化合物,其中该Ma1-间隔子单元可与该抗体或抗原结合片段上的半胱氨酸残基反应。

项702.如项700或项701所述的化合物,其中该Ma1-间隔子单元经由该抗体或抗原结合片段上的半胱氨酸残基接合至该抗体或抗原结合片段。

项703.如项700至702中任一项所述的化合物,其中该接头包含该Ma1-间隔子单元及可裂解肽部分。

项704.如项703所述的化合物,其中该可裂解肽部分包含氨基酸单元。

项705.如项703或项704所述的化合物,其中该可裂解肽部分或氨基酸单元包含Val-Cit。

项706.如项703或项704所述的化合物,其中该可裂解肽部分或氨基酸单元包含Val-Ala。

项707.如项703或项704所述的化合物,其中该可裂解肽部分或氨基酸单元包含Glu-Val-Cit。

项708.如项703或项704所述的化合物,其中该可裂解肽部分或氨基酸单元包含Ala-Ala-Asn。

项709.如项700至708中任一项所述的化合物,其中该Ma1-间隔子单元包含烷基部分。

项710.如项700至708中任一项所述的化合物,其中该Ma1-间隔子单元包含PEG部分。

项711.如项700至710中任一项所述的化合物,其中该Ma1-间隔子单元包含顺丁烯二酰亚胺基己酰基(MC)。

项712.如项700至711中任一项所述的化合物,其中该Ma1-间隔子单元将该抗体或抗原结合片段连接至该接头中的可裂解部分。

项713.如项712所述的化合物,其中该接头中的该可裂解部分包含可裂解肽部分。

项714.如项713所述的化合物,其中该可裂解肽部分包含氨基酸单元。

项715.如项713或项714所述的化合物,其中该可裂解肽部分或氨基酸单元包含Val-Cit、Val-Ala、Glu-Val-Cit或Ala-Ala-Asn。

项716.如项712至715中任一项所述的化合物,其中该接头包含MC-Val-Cit。

项717.如项712至715中任一项所述的化合物,其中该接头包含MC-Val-Ala。

项718.如项712至715中任一项所述的化合物,其中该接头包含MC-Glu-Val-Cit。

项719.如项712至715中任一项所述的化合物,其中该接头包含MC-Ala-Ala-Asn。

项720.如项712至719中任一项所述的化合物,其中该Ma1-间隔子单元包含烷基部分。

项721.如项712至719中任一项所述的化合物,其中该Ma1-间隔子单元包含PEG部分。

项722.如项712至721中任一项所述的化合物,其中该Ma1-间隔子单元包含顺丁烯二酰亚胺基己酰基(MC)。

项723.如项691至722中任一项所述的化合物,其中该接头中的该可裂解部分直接地接合至该剪接调节子,或其中间隔子单元将该接头中的该可裂解部分连接至该剪接调节子。

项724.如项723所述的化合物,其中该缀合物的裂解使该剪接调节子自该抗体或抗原结合片段和该接头释放。

项725.如项723或项724所述的化合物,其中将该接头中的可裂解部分连接至该剪接调节子的该间隔子单元是自消融型的。

项726.如项723至725中任一项所述的化合物,其中将该接头中的该可裂解部分连接至该剪接调节子的该间隔子单元包含对氨基苄氧基羰基(pABC)。

项727.如项726所述的化合物,其中该pABC将该接头中的可裂解部分连接至该剪接调节子。

项728.如项726或项727所述的化合物,其中该接头中的可裂解部分包含可裂解肽部分。

项729.如项728所述的化合物,其中该可裂解肽部分包含氨基酸单元。

项730.如项728或项729所述的化合物,其中该可裂解肽部分或氨基酸单元包含

Val-Cit、Val-Ala、Glu-Val-Cit或Ala-Ala-Asn。

项731.如项726至730中任一项所述的化合物,其中该接头包含Val-Cit-pABC。

项732.如项726至730中任一项所述的化合物,其中该接头包含Val-Ala-pABC。

项733.如项726至730中任一项所述的化合物,其中该接头包含Glu-Val-Cit-pABC。

项734.如项726至730中任一项所述的化合物,其中该接头包含Ala-Ala-Asn-pABC。

项735.如项723至725中任一项所述的化合物,其中将该接头中的该可裂解部分连接至该剪接调节子的该间隔子单元包含对胺基苯甲基(pAB)。

项736.如项735所述的化合物,其中该pAB将该接头中的可裂解部分连接至该剪接调节子。

项737.如项735或项736所述的化合物,其中该接头中的可裂解部分包含可裂解肽部分。

项738.如项737所述的化合物,其中该可裂解肽部分包含氨基酸单元。

项739.如项737或项738所述的化合物,其中该可裂解肽部分或氨基酸单元包含Val-Cit、Val-Ala、Glu-Val-Cit或Ala-Ala-Asn。

项740.如项735至739中任一项所述的化合物,其中该接头包含Val-Cit-pAB。

项741.如项735至739中任一项所述的化合物,其中该接头包含Val-Ala-pAB。

项742.如项735至739中任一项所述的化合物,其中该接头包含Glu-Val-Cit-pAB。

项743.如项735至739中任一项所述的化合物,其中该接头包含Ala-Ala-Asn-pAB。

项744.如项641至678中任一项所述的化合物,其中该接头为不可裂解接头。

项745.如项744所述的化合物,其中该接头包含至少一个间隔子单元。

项746.如项744或项745所述的化合物,其中该间隔子单元或接头包含聚乙二醇(PEG)部分。

项747.如项746所述的化合物,其中该PEG部分包含-(PEG)_m-且m是1至10的整数。

项748.如项747所述的化合物,其中m是2。

项749.如项744或项745所述的化合物,其中该间隔子单元或接头包含烷基部分。

项750.如项749所述的化合物,其中该烷基部分包含-(CH₂)_n-且n是1至10的整数。

项751.一种产生抗体-药物缀合物的方法,该方法包括在允许缀合的条件下使抗体或抗原结合片段与如项641至750中任一项所述的化合物反应。

附图说明

[0091] 图1A-1D显示经HER2放大的乳腺癌细胞(HCC1954)及胃癌细胞(NCI-N87)中的示例性有效负载化合物的活力剂量反应。将细胞与化合物一起培育72小时(3天)或144小时(6天),且在CellTiter-Glo® 2.0试剂中读取活力。图1A显示在72小时培育之后HCC1954细胞中的活力剂量反应。图1B显示在72小时培育之后NCI-N87细胞中的活力剂量反应。图1C显示在144小时培育之后HCC1954细胞中的活力剂量反应。图1D显示在144小时培育之后NCI-N87细胞中的活力剂量反应。数据表示为平均值±SD。

[0092] 图2A及图2B显示经HER2放大的乳腺癌细胞(HCC1954)(图2A)及胃癌细胞(NCI-N87)

(图2B)中的SLC25A19剪接分析的结果。将细胞与化合物一起培育6小时,且在实时qPCR反应中用特定Taqman引物-探针集量测SLC25A19转录物的剪接。y轴代表相对于DMSO对照(0.1%)的反应百分比(%)。数据表示为平均值 $\pm$ SD。

具体实施方式

[0093] 所披露的组合物及方法可参照以下详细描述来更容易地理解。

[0094] 在本文通篇,描述涉及组合物及使用这类组合物的方法。当本披露描述或主张与组合物相关联的特点或实施例时,此类特点或实施例同等地适用于使用该组合物的方法。同样,当本披露描述或主张与使用该组合物的方法相关联的特点或实施例时,此类特点或实施例同等地适用于该组合物。

[0095] 当值的范围得以表示时,其包括使用该范围内的任何特定值的实施例。此外,对按范围陈述的值的提及包括彼范围内的每一值。所有范围均包括其端点且可组合。当通过在前面使用“约”,以近似值表示值时,应理解特定值形成另一实施例。除非上下文另外明确地指示,否则对特定数值的提及至少包括彼特定值。除非另外指示其具体使用情形,否则“或”的使用意谓“和/或”。

[0096] 应了解,出于清楚起见在单独实施例的情形下描述于本文中的所披露的组合物及方法的某些特点还可以单个实施例的组合形式提供。相反地,出于简便起见在单个实施例的情形下描述的所披露的组合物及方法的各种特点还可单独地或以任何子组合形式提供。

[0097] 本文所引用的所有参考文献均出于任何目的以引用的方式并入。在参考文献与本发明说明书矛盾的情况下,以本发明说明书为准。

定义

[0098] 在本说明书及申请专利范围通篇使用与描述的方面相关的各种术语。除非另外指示,否则将给与这类术语以其在此项技术中的普通含义。其他经特定定义的术语以与本文所提供的定义一致的方式来解释。

[0099] 除非上下文另外明确地指示,否则如本文所使用的单数形式“一个/种(a/an)”及“该(the)”包括复数形式。

[0100] 如本领域普通技术人员自本文所含的教示内容显而易见,在数值及范围的情形下,术语“约”或“近似地”是指近似或接近所叙述值或范围以使得实施例可根据预期执行,诸如在反应混合物中具有所需量的核酸或多肽的值或范围。在一些实施例中,约意谓数字量 $\pm 10\%$ 。

[0101] 术语“抗体-药物缀合物”、“抗体缀合物”、“缀合物”、“免疫缀合物”和“ADC”可互换使用,且是指连接至一种或多种抗体或抗原结合片段的一种或多种治疗性化合物(例如剪接调节子)且其由以下通式定义: $Ab-(L-H)_p$ (式I), 其中Ab=抗体或抗原结合片段, L=接头部分, H=荷伯希二烯剪接调节子(例如荷伯希二烯或其衍生物), 且p=每个抗体或抗原结合片段的药物部分的数目。包含荷伯希二烯剪接调节子的ADC还可在本文中更具体地称为“负载荷伯希二烯剪接调节子的抗体”或“SMLA”。在包含荷伯希二烯剪接调节子的ADC中, “p”是指连接至抗体或抗原结合片段的荷伯希二烯剪接调节子的数目。在一些实施例中, 接头L可包括介于抗体或抗原结合片段与荷伯希二烯剪接调节子之间的可裂解部分。在一些实施例中, 接头L可包括可通过间隔子单元连接至抗体或抗原结合片段及荷伯希二烯剪接

调节子中的任一者或两者的可裂解部分。在一些实施例中,当间隔子单元将可裂解部分连接至荷伯希二烯剪接调节子时,其为自消融型间隔子单元。在其他实施例中,接头L不包括可裂解部分且为不可裂解接头。在一些实施例中,接头L可包括可直接地连接至抗体或抗原结合片段及荷伯希二烯剪接调节子的至少一个间隔子单元。示例性可裂解接头及不可裂解接头描述且例示于本文中。

[0102] 术语“抗体”在最广泛意义上用于指经由免疫球蛋白分子的可变区内的至少一个抗原辨识位点辨识且特异性结合至诸如蛋白质、多肽、碳水化合物、聚核苷酸、脂质或前述物质的组合的靶标的免疫球蛋白分子。抗体的重链由重链可变域(V_H)及重链恒定区(C_H)构成。轻链由轻链可变域(V_L)及轻链恒定域(C_L)构成。出于本申请案的目的,成熟重链可变域及轻链可变域各自包含自N端至C端排列的四个框架区(FR1、FR2、FR3及FR4)内的三个互补决定区(CDR1、CDR2及CDR3):FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3及FR4。“抗体”可为天然存在的或人造的,诸如通过常规融合瘤技术产生的单克隆抗体。术语“抗体”包括全长单克隆抗体及全长多克隆抗体以及诸如Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv的抗体片段及单链抗体。抗体可为五个主要类别的免疫球蛋白IgA、IgD、IgE、IgG及IgM或其子类(例如同型IgG1、IgG2、IgG3、IgG4)中的任一种。该术语进一步涵盖人类抗体、嵌合抗体、人类化抗体及含有抗原辨识位点的任何经修饰的免疫球蛋白分子,只要其展现所需生物活性(例如结合靶标抗原、于表达靶标抗原的细胞内内化)即可。

[0103] 如本文所使用的术语“单克隆抗体”是指自实质上均质的抗体群体获得的抗体,即除可能少量存在的可能性天然存在的突变以外,构成该群体的个别抗体为相同的。单克隆抗体针对单一抗原性表位具有高度特异性。相反,常规的(多克隆)抗体制剂通常包括针对不同表位或对其具有特异性的多种抗体。修饰语“单克隆”表示从基本上均质的抗体群体获得的抗体的特征,而不应解释为要求通过任何特定方法生产抗体。举例而言,根据本披露使用的单克隆抗体可通过首先由Kohler等人(1975)Nature[自然]256:495描述的融合瘤方法来制造,或可通过重组DNA方法(参见例如美国专利第4,816,567号)来制造。“单克隆抗体”还可使用例如Clackson等人(1991)Nature[自然]352:624-8及Marks等人(1991)J Mol Biol.[分子生物学杂志]222:581-97中所描述的技术自噬菌体抗体文库分离。

[0104] 本文所描述的单克隆抗体具体地包括“嵌合”抗体,其中重链和/或轻链的一部分与来源于特定物种或属于特定抗体类别或子类别的抗体中的对应序列相同或同源,而链的其余部分与来源于另一物种或属于另一抗体类别或子类别的抗体中的对应序列相同或同源;只要它们特异性结合靶抗原和/或表现出所需的生物学活性。

[0105] 如本文所使用的术语“人类抗体”是指由人类产生的抗体或具有由人类产生的抗体的氨基酸序列的抗体。

[0106] 如本文所使用的术语“嵌合抗体”是指其中免疫球蛋白分子的氨基酸序列来源于两个或更多个物种的抗体。在一些情况下,重链及轻链两者的可变区对应于来源于具有所需特异性、亲和力及活性的一个物种的抗体的可变区,而恒定区与来源于另一物种(例如人类)的抗体同源以使后一物种中的免疫反应减至最少。

[0107] 如本文所使用的术语“人类化抗体”是指含有来自非人类(例如鼠)抗体以及人类抗体的序列的抗体形式。这类抗体为含有来源于非人类免疫球蛋白的最小序列的嵌合抗体。一般而言,人类化抗体包含实质上所有至少一个且通常两个可变域,其中所有或实质上

所有高变环对应于非人类免疫球蛋白的可变域且所有或实质上所有框架 (FR) 区为人类免疫球蛋白序列的可变域。人类化抗体视情况还包含免疫球蛋白恒定区 (Fc) 的至少一部分, 通常人类免疫球蛋白的恒定区的至少一部分。人类化抗体可通过 Fv 框架区中和/或经置换的非人类残基内的残基的取代而经进一步修饰以改进且优化抗体特异性、亲和力和/或活性。

[0108] 如本文所使用的术语抗体的“抗原结合片段”或“抗原结合部分”是指保持特异性结合至抗原 (例如 HER2、CD138、EPHA2、MSLN、FOLH1、CDH6、CEACAM5、CFC1B、ENPP3、FOLR1、HAVCR1、KIT、MET、MUC16、SLC39A6、SLC44A4 或 STEAP1) 的能力的抗体或蛋白质的一个或多个片段。抗原结合片段还可保持内化至表达抗原的细胞中的能力。在一些实施例中, 抗原结合片段还保持免疫效应子活性。经显示, 全长抗体的片段可执行全长抗体的抗原结合功能。术语抗体的“抗原结合片段”或“抗原结合部分”内所涵盖的结合片段的实例包括 (i) Fab 片段, 即由 V_L 域、 V_H 域、 C_L 域及 C_H1 域组成的单价片段; (ii) $F(ab')_2$ 片段, 即包含通过铰链区处的二硫桥键连接的两个 Fab 片段的二价片段; (iii) 由 V_H 域及 C_H1 域组成的 Fd 片段; (iv) 由具有抗体的单个臂的 V_L 域及 V_H 域组成的 Fv 片段; (v) 包含例如 V_H 域的单个可变域的 dAb 片段 (参见例如 Ward 等人 (1989) *Nature* [自然] 341:544-6; 及国际公开案第 WO 1990/005144 号); 及 (vi) 经分离的互补决定区 (CDR)。此外, 尽管 Fv 片段的两个结构域 V_L 及 V_H 由单独基因编码, 但其可使用重组方法通过使其能够以单一蛋白链形式制造的合成接头来接合, 其中 V_L 区及 V_H 区配对以形成单价分子 (称为单链 Fv (scFv))。参见例如 Bird 等人 (1988) *Science* [科学] 242:423-6; 及 Huston 等人 (1988) *Proc Natl Acad Sci. USA* [美国国家科学院院刊] 85:5879-83。这类单链抗体还意欲涵盖在术语抗体的“抗原结合片段”或“抗原结合部分”内, 且在此项技术中称为示例性类型的可在结合后内化至细胞中的结合片段 (参见例如 Zhu 等人 (2010) 9:2131-41; He 等人 (2010) *J Nucl Med.* [核医学杂志] 51:427-32; 及 Fitting 等人 (2015) *MAbs* 7:390-402)。在某些实施例中, scFv 分子可并入融合蛋白中。还涵盖诸如双功能抗体的单链抗体的其他形式。双功能抗体为二价双特异性抗体, 其中 V_H 域及 V_L 域在单个多肽链上、但使用过短而不允许相同链上的两个结构域之间进行配对的接头进行表达, 由此迫使结构域与另一链的互补域配对且产生两个抗原结合位点 (参见例如 Holliger 等人 (1993) *Proc Natl Acad Sci. USA* [美国国家科学院院刊] 90:6444-8; 及 Poljak 等人 (1994) *Structure* [结构] 2:1121-3)。抗原结合片段使用本领域普通技术人员已知的常规技术获得, 且结合片段以与完整抗体相同的方式进行效用 (例如结合亲和力、内化) 筛选。抗原结合片段可通过裂解完整蛋白, 例如通过蛋白酶或化学裂解来制备。

[0109] 如本文关于抗体或抗原结合片段所使用的“内化性”是指抗体或抗原结合片段在结合至细胞后能够吸收透过细胞的脂质双层膜进入内部隔室 (即“经内化”), 较佳地进入细胞中的降解隔室中。举例而言, 内化性抗 HER2 抗体为在结合至细胞膜上的 HER2 之后能够吸收至细胞中的抗体。在一些实施例中, 本文所披露的 ADC 中所使用的抗体或抗原结合片段靶向细胞表面抗原 (例如 HER2) 且为内化性抗体或内化性抗原结合片段 (即 ADC 在抗原结合之后转移透过细胞膜)。在一些实施例中, 内化性抗体或抗原结合片段结合细胞表面上的受体。靶向细胞膜上的受体的内化性抗体或内化性抗原结合片段可诱导受体介导的胞吞作用。在一些实施例中, 内化性抗体或内化性抗原结合片段经由受体介导的胞吞作用吸收至细胞中。

[0110] 如本文关于抗体或抗原结合片段所使用的“非内化性”是指抗体或抗原结合片段在结合至细胞后保留在细胞表面处。在一些实施例中,本文所披露的ADC中所使用的抗体或抗原结合片段靶向细胞表面抗原且为非内化性抗体或非内化性抗原结合片段(即ADC在抗原结合之后保留在细胞表面处且不转移透过细胞膜)。在一些实施例中,非内化性抗体或抗原结合片段结合非内化性受体或其他细胞表面抗原。示例性非内化性细胞表面抗原包括但不限于CA125及CEA,且结合至非内化性抗原靶标的抗体还为此项技术中已知的(参见例如Bast等人(1981)*J Clin Invest.*[临床研究杂志]68(5):1331-7;Scholler及Urban(2007)*Biomark Med.*[医学生物标志物]1(4):513-23;及Boudousq等人(2013)*PLoS One*[公共科学图书馆综合]8(7):e69613)。

[0111] 如本文所使用的术语“人类表皮生长因子受体2”、“HER2”或“HER2/NEU”是指任何天然形式的人类HER2。该术语涵盖全长HER(例如UniProt参考序列:P04626;SEQ ID NO:31)以及可由细胞加工得到的任何形式的人类HER2。该术语还涵盖人类HER2的功能变异体或片段,包括但不限于保持人类HER2的一种或多种生物功能的剪接变异体、等位基因变异体及异形体(即除非上下文指示该术语仅用于指野生型蛋白质,否则涵盖变异体及片段)。HER2可自人类分离,或可以重组方式或通过合成方法产生。

[0112] 术语“抗HER2抗体”或“结合至HER2的抗体”是指结合(例如特异性结合)至HER2的任何形式的抗体或其片段,且涵盖单克隆抗体(包括全长单克隆抗体)、多克隆抗体及生物功能抗体片段,只要这类生物功能抗体片段结合(例如特异性结合)至HER2即可。美国专利第5,821,337号提供示例性HER2结合序列,包括示例性抗HER2抗体序列,且该案以引用的方式并入本文中。在一些实施例中,本文所披露的ADC中所使用的抗HER2抗体为内化性抗体或内化性抗体片段。曲妥珠单抗(trastuzumab)(美国专利第5,821,337号;Molina等人(2001)*Cancer Res.*[癌症研究]61(12):4744-9)为示例性抗人类HER2抗体。

[0113] 如本文所使用的术语“多配体蛋白聚糖-1”、“SDC1”或“CD138”是指任何天然形式的人类CD138。该术语涵盖全长CD138(例如UniProt参考序列:P18827;SEQ ID NO:32)以及可由细胞加工得到的任何形式的人类CD138。该术语还涵盖人类CD138的功能变异体或片段,包括但不限于保持人类CD138的一种或多种生物功能的剪接变异体、等位基因变异体及异形体(即除非上下文指示该术语仅用于指野生型蛋白质,否则涵盖变异体及片段)。CD138可自人类分离,或可以重组方式或通过合成方法产生。

[0114] 术语“抗CD138抗体”或“结合至CD138的抗体”是指结合(例如特异性结合)至CD138的任何形式的抗体或其片段,且涵盖单克隆抗体(包括全长单克隆抗体)、多克隆抗体及生物功能抗体片段,只要这类生物功能抗体片段结合(例如特异性结合)至CD138即可。在一些实施例中,本文所披露的ADC中所使用的抗CD138抗体为内化性抗体或内化性抗体片段。B-B4(Tassone等人(2004)*Blood*[血液]104:3688-96)为示例性抗人类CD138抗体。

[0115] 如本文所使用的术语“蝶素A型受体2”或“EPHA2”是指任何天然形式的人类EPHA2。该术语涵盖全长EPHA2(例如UniProt参考序列:P29317;SEQ ID NO:33)以及可由细胞加工得到的任何形式的人类EPHA2。该术语还涵盖人类EPHA2的功能变异体或片段,包括但不限于保持人类EPHA2的一种或多种生物功能的剪接变异体、等位基因变异体及异形体(即除非上下文指示该术语仅用于指野生型蛋白质,否则涵盖变异体及片段)。EPHA2可自人类分离,或可以重组方式或通过合成方法产生。

[0116] 术语“抗EPHA2抗体”或“结合至EPHA2的抗体”是指结合(例如特异性结合)至EPHA2的任何形式的抗体或其片段,且涵盖单克隆抗体(包括全长单克隆抗体)、多克隆抗体及生物功能抗体片段,只要这类生物功能抗体片段结合(例如特异性结合)至EPHA2即可。WO 2007/030642提供示例性EPHA2结合序列,包括示例性抗EPHA2抗体序列,且该案以引用的方式并入本文中。在一些实施例中,本文所披露的ADC中所使用的抗EPHA2抗体为内化性抗体或内化性抗体片段。1C1 (WO 2007/030642; Jackson等人(2008) Cancer Res. [癌症研究] 68 (22): 9367-74) 为示例性抗人类EPHA2抗体。

[0117] 如本文所使用的术语“间皮素”或“MSLN”是指任何天然形式的人类MSLN。该术语涵盖全长MSLN(例如UniProt参考序列: Q13421; SEQ ID NO: 94) 以及可由细胞加工得到的任何形式的人类MSLN。该术语还涵盖人类MSLN的功能变异体或片段,包括但不限于保持人类MSLN的一种或多种生物功能的剪接变异体、等位基因变异体及异形体(即除非上下文指示该术语仅用于指野生型蛋白质,否则涵盖变异体及片段)。MSLN可自人类分离,或可以重组方式或通过合成方法产生。

[0118] 术语“抗MSLN抗体”或“结合至MSLN的抗体”是指结合(例如特异性结合)至MSLN的任何形式的抗体或其片段,且涵盖单克隆抗体(包括全长单克隆抗体)、多克隆抗体及生物功能抗体片段,只要这类生物功能抗体片段结合(例如特异性结合)至MSLN即可。WO 2011/074621提供示例性MSLN结合序列,包括示例性抗MSLN抗体序列,且该案以引用的方式并入本文中。在一些实施例中,本文所披露的ADC中所使用的抗MSLN抗体为内化性抗体或内化性抗体片段。11-25、IC14-30、IC7-4、IC17-35及2-9为示例性抗人类MSLN抗体。

[0119] 如本文所使用的术语“麸氨酸羧肽酶2”或“FOLH1”是指任何天然形式的人类FOLH1。该术语涵盖全长FOLH1(例如UniProt参考序列: Q04609; SEQ ID NO: 95) 以及可由细胞加工得到的任何形式的人类FOLH1。该术语还涵盖人类FOLH1的功能变异体或片段,包括但不限于保持人类FOLH1的一种或多种生物功能的剪接变异体、等位基因变异体及异形体(即除非上下文指示该术语仅用于指野生型蛋白质,否则涵盖变异体及片段)。FOLH1可自人类分离,或可以重组方式或通过合成方法产生。

[0120] 术语“抗FOLH1抗体”或“结合至FOLH1的抗体”是指结合(例如特异性结合)至FOLH1的任何形式的抗体或其片段,且涵盖单克隆抗体(包括全长单克隆抗体)、多克隆抗体及生物功能抗体片段,只要这类生物功能抗体片段结合(例如特异性结合)至FOLH1即可。WO 2019/012260及WO 2017/212250提供示例性FOLH1结合序列,包括示例性抗FOLH1抗体序列,且这类案以引用的方式并入本文中。在一些实施例中,本文所披露的ADC中所使用的抗FOLH1抗体为内化性抗体或内化性抗体片段。J591(去免疫型)为示例性抗人类FOLH1抗体。

[0121] 如本文所使用的术语“钙黏素-6”或“CDH6”是指任何天然形式的人类CDH6。该术语涵盖全长CDH6(例如UniProt参考序列: P55285; SEQ ID NO: 96) 以及可由细胞加工得到的任何形式的人类CDH6。该术语还涵盖人类CDH6的功能变异体或片段,包括但不限于保持人类CDH6的一种或多种生物功能的剪接变异体、等位基因变异体及异形体(即除非上下文指示该术语仅用于指野生型蛋白质,否则涵盖变异体及片段)。CDH6可自人类分离,或可以重组方式或通过合成方法产生。

[0122] 术语“抗CDH6抗体”或“结合至CDH6的抗体”是指结合(例如特异性结合)至CDH6的任何形式的抗体或其片段,且涵盖单克隆抗体(包括全长单克隆抗体)、多克隆抗体及生物

功能抗体片段,只要这类生物功能抗体片段结合(例如特异性结合)至CDH6即可。WO 2018/185618提供示例性CDH6结合序列,包括示例性抗CDH6抗体序列,且该案以引用的方式并入本文中。在一些实施例中,本文所披露的ADC中所使用的抗CDH6抗体为内化性抗体或内化性抗体片段。

[0123] 如本文所使用的术语“癌胚抗原相关细胞黏附分子5”或“CEACAM5”是指任何天然形式的人类CEACAM5。该术语涵盖全长CEACAM5(例如UniProt参考序列:P06731;SEQ ID NO:97)以及可由细胞加工得到的任何形式的人类CEACAM5。该术语还涵盖人类CEACAM5的功能变异体或片段,包括但不限于保持人类CEACAM5的一种或多种生物功能的剪接变异体、等位基因变异体及异形体(即除非上下文指示该术语仅用于指野生型蛋白质,否则涵盖变异体及片段)。CEACAM5可自人类分离,或可以重组方式或通过合成方法产生。

[0124] 术语“抗CEACAM5抗体”或“结合至CEACAM5的抗体”是指结合(例如特异性结合)至CEACAM5的任何形式的抗体或其片段,且涵盖单克隆抗体(包括全长单克隆抗体)、多克隆抗体及生物功能抗体片段,只要这类生物功能抗体片段结合(例如特异性结合)至CEACAM5即可。US2015/0125386提供示例性CEACAM5结合序列,包括示例性抗CEACAM5抗体序列,且该案以引用的方式并入本文中。在一些实施例中,本文所披露的ADC中所使用的抗CEACAM5抗体为内化性抗体或内化性抗体片段。hMN14为示例性抗人类CEACAM5抗体。

[0125] 如本文所使用的术语“隐藏家族蛋白1B”或“CFC1B”是指任何天然形式的人类CFC1B。该术语涵盖全长CFC1B(例如UniProt参考序列:P0CG36;SEQ ID NO:98)以及可由细胞加工得到的任何形式的人类CFC1B。该术语还涵盖人类CFC1B的功能变异体或片段,包括但不限于保持人类CFC1B的一种或多种生物功能的剪接变异体、等位基因变异体及异形体(即除非上下文指示该术语仅用于指野生型蛋白质,否则涵盖变异体及片段)。CFC1B可自人类分离,或可以重组方式或通过合成方法产生。

[0126] 术语“抗CFC1B抗体”或“结合至CFC1B的抗体”是指结合(例如特异性结合)至CFC1B的任何形式的抗体或其片段,且涵盖单克隆抗体(包括全长单克隆抗体)、多克隆抗体及生物功能抗体片段,只要这类生物功能抗体片段结合(例如特异性结合)至CFC1B即可。WO 2002/088170提供示例性CFC1B结合序列,包括示例性抗CFC1B抗体序列,且该案以引用的方式并入本文中。在一些实施例中,本文所披露的ADC中所使用的抗CFC1B抗体为内化性抗体或内化性抗体片段。

[0127] 如本文所使用的术语“外核苷酸焦磷酸酶/磷酸二酯酶家族成员3”或“ENPP3”是指任何天然形式的人类ENPP3。该术语涵盖全长ENPP3(例如UniProt参考序列:014638;SEQ ID NO:99)以及可由细胞加工得到的任何形式的人类ENPP3。该术语还涵盖人类ENPP3的功能变异体或片段,包括但不限于保持人类ENPP3的一种或多种生物功能的剪接变异体、等位基因变异体及异形体(即除非上下文指示该术语仅用于指野生型蛋白质,否则涵盖变异体及片段)。ENPP3可自人类分离,或可以重组方式或通过合成方法产生。

[0128] 术语“抗ENPP3抗体”或“结合至ENPP3的抗体”是指结合(例如特异性结合)至ENPP3的任何形式的抗体或其片段,且涵盖单克隆抗体(包括全长单克隆抗体)、多克隆抗体及生物功能抗体片段,只要这类生物功能抗体片段结合(例如特异性结合)至ENPP3即可。Donate等人((2016)Clin Cancer Res.[临床癌症研究]22(8):1989-99)提供示例性ENPP3结合序列,包括示例性抗ENPP3抗体序列,且该文献以引用的方式并入本文中。在一些实施例中,本

文所披露的ADC中所使用的抗ENPP3抗体为内化性抗体或内化性抗体片段。

[0129] 如本文所使用的术语“叶酸受体 α ”或“FOLR1”是指任何天然形式的人类FOLR1。该术语涵盖全长FOLR1(例如UniProt参考序列:P15328;SEQ ID NO:100)以及可由细胞加工得到的任何形式的人类FOLR1。该术语还涵盖人类FOLR1的功能变异体或片段,包括但不限于保持人类FOLR1的一种或多种生物功能的剪接变异体、等位基因变异体及异形体(即除非上下文指示该术语仅用于指野生型蛋白质,否则涵盖变异体及片段)。FOLR1可自人类分离,或可以重组方式或通过合成方法产生。

[0130] 术语“抗FOLR1抗体”或“结合至FOLR1的抗体”是指结合(例如特异性结合)至FOLR1的任何形式的抗体或其片段,且涵盖单克隆抗体(包括全长单克隆抗体)、多克隆抗体及生物功能抗体片段,只要这类生物功能抗体片段结合(例如特异性结合)至FOLR1即可。WO 2005/080431及Coney等人((1991)Cancer Res.[癌症研究]51(22):6125-32)提供示例性FOLR1结合序列,包括示例性抗FOLR1抗体序列,且该案及文献以引用的方式并入本文中。在一些实施例中,本文所披露的ADC中所使用的抗FOLR1抗体为内化性抗体或内化性抗体片段。伐吐珠单抗(Farletuzumab)及M0v19为示例性抗人类FOLR1抗体。

[0131] 如本文所使用的术语“A型肝炎病毒细胞受体1”或“HAVCR1”是指任何天然形式的人类HAVCR1。该术语涵盖全长HAVCR1(例如UniProt参考序列:Q96D42;SEQ ID NO:101)以及可由细胞加工得到的任何形式的人类HAVCR1。该术语还涵盖人类HAVCR1的功能变异体或片段,包括但不限于保持人类HAVCR1的一种或多种生物功能的剪接变异体、等位基因变异体及异形体(即除非上下文指示该术语仅用于指野生型蛋白质,否则涵盖变异体及片段)。HAVCR1可自人类分离,或可以重组方式或通过合成方法产生。

[0132] 术语“抗HAVCR1抗体”或“结合至HAVCR1的抗体”是指结合(例如特异性结合)至HAVCR1的任何形式的抗体或其片段,且涵盖单克隆抗体(包括全长单克隆抗体)、多克隆抗体及生物功能抗体片段,只要这类生物功能抗体片段结合(例如特异性结合)至HAVCR1即可。Thomas等人((2016)Mol Cancer Ther.[分子癌症治疗学]15(12):2946-54)提供示例性HAVCR1结合序列,包括示例性抗HAVCR1抗体序列,且该文献以引用的方式并入本文中。在一些实施例中,本文所披露的ADC中所使用的抗HAVCR1抗体为内化性抗体或内化性抗体片段。

[0133] 如本文所使用的术语“肥大细胞/干细胞生长因子受体Kit”或“KIT”是指任何天然形式的人类KIT。该术语涵盖全长KIT(例如UniProt参考序列:P10721;SEQ ID NO:102)以及可由细胞加工得到的任何形式的人类KIT。该术语还涵盖人类KIT的功能变异体或片段,包括但不限于保持人类KIT的一种或多种生物功能的剪接变异体、等位基因变异体及异形体(即除非上下文指示该术语仅用于指野生型蛋白质,否则涵盖变异体及片段)。KIT可自人类分离,或可以重组方式或通过合成方法产生。

[0134] 术语“抗KIT抗体”或“结合至KIT的抗体”是指结合(例如特异性结合)至KIT的任何形式的抗体或其片段,且涵盖单克隆抗体(包括全长单克隆抗体)、多克隆抗体及生物功能抗体片段,只要这类生物功能抗体片段结合(例如特异性结合)至KIT即可。Shi等人((2016)Proc Natl Acad Sci USA[美国科学院院刊]113(33):E4784-93)和Abrams等人((2018)Clin Cancer Res.[临床癌症研究]24(17):4297-308)提供了示例性KIT结合序列,包括示例性抗KIT抗体序列,且将这些文献通过引用并入本文。在一些实施例中,本文所披露的ADC中所使用的抗KIT抗体为内化性抗体或内化性抗体片段。

[0135] 如本文所使用的术语“肝细胞生长因子受体”或“MET”是指任何天然形式的人类MET。该术语涵盖全长MET(例如UniProt参考序列:P08581;SEQ ID NO:103)以及可由细胞加工得到的任何形式的人类MET。该术语还涵盖人类MET的功能变异体或片段,包括但不限于保持人类MET的一种或多种生物功能的剪接变异体、等位基因变异体及异形体(即除非上下文指示该术语仅用于指野生型蛋白质,否则涵盖变异体及片段)。MET可自人类分离,或可以重组方式或通过合成方法产生。

[0136] 术语“抗MET抗体”或“结合至MET的抗体”是指结合(例如特异性结合)至MET的任何形式的抗体或其片段,且涵盖单克隆抗体(包括全长单克隆抗体)、多克隆抗体及生物功能抗体片段,只要这类生物功能抗体片段结合(例如特异性结合)至MET即可。Yang等人((2019)Acta Pharmacol Sin.[中国药理学报])提供示例性MET结合序列,包括示例性抗MET抗体序列,且该文献以引用的方式并入本文中。在一些实施例中,本文所披露的ADC中所使用的抗MET抗体为内化性抗体或内化性抗体片段。

[0137] 如本文所使用的术语“黏蛋白-16”或“MUC16”是指任何天然形式的人类MUC16。该术语涵盖全长MUC16(例如UniProt参考序列:Q8WXI7;SEQ ID NO:104)以及可由细胞加工得到的任何形式的人类MUC16。该术语还涵盖人类MUC16的功能变异体或片段,包括但不限于保持人类MUC16的一种或多种生物功能的剪接变异体、等位基因变异体及异形体(即除非上下文指示该术语仅用于指野生型蛋白质,否则涵盖变异体及片段)。MUC16可自人类分离,或可以重组方式或通过合成方法产生。

[0138] 术语“抗MUC16抗体”或“结合至MUC16的抗体”是指结合(例如特异性结合)至MUC16的任何形式的抗体或其片段,且涵盖单克隆抗体(包括全长单克隆抗体)、多克隆抗体及生物功能抗体片段,只要这类生物功能抗体片段结合(例如特异性结合)至MUC16即可。Liu等人((2016)Ann Oncol.[肿瘤学年鉴]27(11):2124-30)提供示例性MUC16结合序列,包括示例性抗MUC16抗体序列,且该文献以引用的方式并入本文中。在一些实施例中,本文所披露的ADC中所使用的抗MUC16抗体为内化性抗体或内化性抗体片段。

[0139] 如本文所使用的术语“锌转运子ZIP6”或“SLC39A6”是指任何天然形式的人类SLC39A6。该术语涵盖全长SLC39A6(例如UniProt参考序列:Q13433;SEQ ID NO:105)以及可由细胞加工得到的任何形式的人类SLC39A6。该术语还涵盖人类SLC39A6的功能变异体或片段,包括但不限于保持人类SLC39A6的一种或多种生物功能的剪接变异体、等位基因变异体及异形体(即除非上下文指示该术语仅用于指野生型蛋白质,否则涵盖变异体及片段)。SLC39A6可自人类分离,或可以重组方式或通过合成方法产生。

[0140] 术语“抗SLC39A6抗体”或“结合至SLC39A6的抗体”是指结合(例如特异性结合)至SLC39A6的任何形式的抗体或其片段,且涵盖单克隆抗体(包括全长单克隆抗体)、多克隆抗体及生物功能抗体片段,只要这类生物功能抗体片段结合(例如特异性结合)至SLC39A6即可。Sussman等人((2014)Mol Cancer Ther.[分子癌症治疗学]13(12):2991-3000)提供示例性SLC39A6结合序列,包括示例性抗SLC39A6抗体序列,且该文献以引用的方式并入本文中。在一些实施例中,本文所披露的ADC中所使用的抗SLC39A6抗体为内化性抗体或内化性抗体片段。

[0141] 如本文所使用的术语“胆碱转运子样蛋白4”或“SLC44A4”是指任何天然形式的人类SLC44A4。该术语涵盖全长SLC44A4(例如UniProt参考序列:Q53GD3;SEQ ID NO:106)以及

可由细胞加工得到的任何形式的人类SLC44A4。该术语还涵盖人类SLC44A4的功能变异体或片段,包括但不限于保持人类SLC44A4的一种或多种生物功能的剪接变异体、等位基因变异体及异形体(即除非上下文指示该术语仅用于指野生型蛋白质,否则涵盖变异体及片段)。SLC44A4可自人类分离,或可以重组方式或通过合成方法产生。

[0142] 术语“抗SLC44A4抗体”或“结合至SLC44A4的抗体”是指结合(例如特异性结合)至SLC44A4的任何形式的抗体或其片段,且涵盖单克隆抗体(包括全长单克隆抗体)、多克隆抗体及生物功能抗体片段,只要这类生物功能抗体片段结合(例如特异性结合)至SLC44A4即可。Mattie等人((2016)Mol Cancer Ther.[分子癌症治疗学]15(11):2679-87)提供例示性SLC44A4结合序列,包括示例性抗SLC44A4抗体序列,且该文献以引用之方式并入本文中。在一些实施例中,本文所披露的ADC中所使用的抗SLC44A4抗体为内化性抗体或内化性抗体片段。

[0143] 如本文所使用的术语“金属还原酶STEAP1”或“STEAP1”是指任何天然形式的人类STEAP1。该术语涵盖全长STEAP1(例如UniProt参考序列:Q9UHE8;SEQ ID NO:107)以及可由细胞加工得到的任何形式的人类STEAP1。该术语还涵盖人类STEAP1的功能变异体或片段,包括但不限于保持人类STEAP1的一种或多种生物功能的剪接变异体、等位基因变异体及异形体(即除非上下文指示该术语仅用于指野生型蛋白质,否则涵盖变异体及片段)。STEAP1可自人类分离,或可以重组方式或通过合成方法产生。

[0144] 术语“抗STEAP1抗体”或“结合至STEAP1的抗体”是指结合(例如特异性结合)至STEAP1的任何形式的抗体或其片段,且涵盖单克隆抗体(包括全长单克隆抗体)、多克隆抗体及生物功能抗体片段,只要这类生物功能抗体片段结合(例如特异性结合)至STEAP1即可。WO 2008/052187提供示例性STEAP1结合序列,包括示例性抗STEAP1抗体序列,且该案以引用的方式并入本文中。在一些实施例中,本文所披露的ADC中所使用的抗STEAP1抗体为内化性抗体或内化性抗体片段。

[0145] 如本文所使用的术语“特异性”、“特异性结合(specifically binds及binds specifically)”是指抗体或抗原结合片段(例如抗HER2抗体)与异质蛋白质及其他生物制品群体中的靶标抗原(例如HER2)之间的结合反应。可通过在一组给定条件下将与适当抗原的结合与不相关抗原或抗原混合物的结合进行比较来测试抗体的结合特异性。若抗体结合至适当抗原且亲和力为与不相关抗原或抗原混合物的结合亲和力的至少2、5、7倍且较佳10倍或更多倍,则认为其具有特异性。“特异性抗体”或“靶标特异性抗体”为仅结合靶标抗原(例如HER2)、但不结合至其他抗原(或展现与其他抗原的最小结合)的抗体。在某些实施例中,特异性结合靶抗原(例如HER2)的抗体或抗原结合片段的 K_D 小于 $1 \times 10^{-6}M$ 、小于 $1 \times 10^{-7}M$ 、小于 $1 \times 10^{-8}M$ 、小于 $1 \times 10^{-9}M$ 、小于 $1 \times 10^{-10}M$ 、小于 $1 \times 10^{-11}M$ 、小于 $1 \times 10^{-12}M$ 或小于 $1 \times 10^{-13}M$ 。在一些实施例中,KD是1pM至500pM。在一些实施例中, K_D 介于500pM至1 μM 、1 μM 至100nM或100mM至10nM之间。

[0146] 术语“表位”是指能够由抗体辨识且特异性结合的抗原的部分。当抗原为多肽时,表位可由连续氨基酸或通过多肽的三级折迭而邻接的非连续氨基酸形成。抗体所结合的表位可使用此项技术中已知的任何表位定位技术来识别,该表位定位技术包括用于表位识别的X射线结晶学,其通过直接观测抗原-抗体复合物,以及监测抗体与抗原的片段或突变型变异体的结合,或监测抗体及抗原的不同部分的溶剂可接近性。用于定位抗体表位的示例

性策略包括但不限于基于数组的寡肽扫描、受限蛋白质水解、定点突变诱发、高通量突变诱发定位、氢-氘交换及质谱法(参见例如Gershoni等人(2007) 21:145-56;及Hager-Braun及Tomer(2005)Expert Rev Proteomics[蛋白质组学专家评论]2:745-56)。

[0147] 还可使用竞争性结合及表位分箱(epitope binning)来确定共有相同或重迭表位的抗体。竞争性结合可使用诸如“Antibodies, A Laboratory Manual[抗体, 实验室手册]”, Cold Spring Harbor Laboratory[冷泉港实验室出版社], Harlow及Lane(1988年第1版, 2014年第2版)中所描述的分析的交叉阻断分析来进行评估。在一些实施例中, 当在交叉阻断分析中, 测试抗体或结合蛋白使参考抗体或结合蛋白(例如包含CDR和/或选自表2-4中所识别的可变域的可变域的结合蛋白)与靶标抗原(诸如HER2)的结合减少至少约50%(例如50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%、99.5%或更高或其间的任何百分比)时, 识别出竞争性结合, 和/或反之亦然。在一些实施例中, 竞争性结合可归因于共享或类似(例如部分重迭)的表位, 或由于其中抗体或结合蛋白在邻近表位处结合的位阻(参见例如Tzartos, Methods in Molecular Biology[分子生物学中的方法](Morris, 编(1998)第66卷, 第55-66页))。在一些实施例中, 可使用竞争性结合来分选共有类似表位的结合蛋白的群组。举例而言, 竞争结合的结合蛋白可“分箱”为具有重迭或邻近表位的结合蛋白组, 而不竞争的结合蛋白归入不具有重迭或邻近表位的单独结合蛋白组。

[0148] 术语“ k_{on} ”或“ k_a ”是指抗体与抗原缔合以形成抗体/抗原复合物的缔合速率常数。该速率可使用诸如表面电浆共振、生物层干涉量测术或ELISA分析的标准分析来测定。

[0149] 术语“ k_{off} ”或“ k_d ”是指抗体自抗体/抗原复合物解离的解离速率常数。该速率可使用诸如表面电浆共振、生物层干涉量测术或ELISA分析的标准分析来测定。

[0150] 术语“ K_D ”是指特定抗体-抗原相互作用的平衡解离常数。 K_D 通过 k_a/k_d 来计算。该速率可使用诸如表面电浆共振、生物层干涉量测术或ELISA分析的标准分析来测定。

[0151] 在本文所披露的ADC中, 术语“p”或“荷伯希二烯剪接调节子负载量”或“荷伯希二烯剪接调节子: 抗体比”或“荷伯希二烯剪接调节子与抗体比”或“HAR”是指每个抗体或抗原结合片段的荷伯希二烯剪接调节子的数目, 即荷伯希二烯剪接调节子负载量, 或每个抗体或抗原结合片段(Ab)的-L-H部分的数目。在包含荷伯希二烯剪接调节子的ADC中, “p”是指连接至抗体或抗原结合片段的荷伯希二烯剪接调节子的数目。举例而言, 若两个荷伯希二烯剪接调节子(例如各自具有H3结构的两种化合物)均连接至抗体或抗原结合片段, 则 $p=2$ 。在包含如本文所描述的ADC的多个复本的组合物中, “平均p”是指每个抗体或抗原结合片段的-L-H部分的平均数目, 还称为“平均荷伯希二烯剪接调节子负载量”。

[0152] “接头”或“接头部分”在本文中用于指能够将化合物(通常药物部分, 诸如荷伯希二烯剪接调节子药物部分)共价接合至另一部分(诸如抗体或抗原结合片段)的任何化学部分。接头可能在使化合物或抗体保持活性的条件下易于发生或实质上抵抗酸诱导的裂解、肽酶诱导的裂解、基于光的裂解、酯酶诱导的裂解和/或二硫键裂解。

[0153] 术语“药剂”在本文中用于指化合物、化合物的混合物、生物大分子或由生物材料制成的提取物。术语“治疗剂”或“药物”是指能够调节生物过程和/或具有生物活性的药剂。本文所描述的荷伯希二烯剪接调节子为示例性治疗剂。

[0154] 术语“化学治疗剂”或“抗癌剂”在本文中用于指不管作用机制如何, 均有效治疗癌症的所有药剂。转移或血管生成的抑制常常为化学治疗剂的特性。化学治疗剂包括抗体、生

物分子及小分子,且涵盖本文所描述的荷伯希二烯剪接调节子化合物。化学治疗剂可为细胞毒性剂或细胞生长抑制剂。术语“细胞生长抑制剂”是指抑制或遏制细胞生长和/或细胞增殖的药剂。术语“细胞毒性剂”是指主要通过干扰细胞的表达活性和/或运作而造成细胞死亡的物质。

[0155] 如本文所使用的术语“荷伯希二烯剪接调节子 (herboxidiene splicing modulator/herboxidiene splice modulator)”、“荷伯希二烯剪接体调节子”是指通过与剪接体的组分相互作用而具有抗癌活性且与荷伯希二烯结构上相关的化合物。在一些实施例中,荷伯希二烯剪接调节子更改靶标细胞中的剪接速率或形式。充当抑制剂的荷伯希二烯剪接调节子例如能够减少不受控的细胞增殖。在一些实施例中,荷伯希二烯剪接调节子可通过结合至SF3b剪接体复合物而起作用。这类调节子可为天然存在的或合成的荷伯希二烯衍生物或类似物。当提及荷伯希二烯剪接调节子或其类似物时,如本文所使用的术语“衍生物”及“类似物”意谓与荷伯希二烯保持基本上相同、类似或经增强的生物功能或活性、但具有经改变的化学或生物学结构的任何该化合物。在一些实施例中,荷伯希二烯剪接调节子为荷伯希二烯衍生物。

[0156] 如本文所使用的“荷伯希二烯剪接调节子药物部分”是指提供荷伯希二烯剪接调节子化合物的结构的ADC或组合物的组分,例如具有式 (I) 的ADC或包含-L-H的组合物中的荷伯希二烯剪接调节子 (H) 组分。

[0157] 如本文所使用的“剪接体”是指自诸如pre-mRNA区段的一个或多个RNA区段移除内含子的核糖核蛋白复合物。

[0158] 术语“同源物”是指通过例如在对应位置处具有相同或类似的化学残基的序列而展现与另一分子的同源性的分子。

[0159] 如本文所使用的术语“抑制 (inhibit或inhibition of)”意谓减少可量测的量,且可包括但不需要完全预防或抑制。

[0160] 术语“靶标阴性”、“靶标抗原阴性”或“抗原阴性”是指细胞或组织不存在靶标抗原表达。术语“靶标阳性”、“靶标抗原阳性”或“抗原阳性”是指存在靶标抗原表达。举例而言,不表达靶标抗原的细胞或细胞系可描述为靶标阴性的,而表达靶标抗原的细胞或细胞系可描述为靶标阳性的。

[0161] 术语“旁观者杀灭”或“旁观者效应”是指在靶标阳性细胞存在的情况下靶标阴性细胞的杀灭,其中在靶标阳性细胞不存在的情况下未观测到靶标阴性细胞的杀灭。细胞间接触或至少靶标阳性细胞与靶标阴性细胞之间的邻近使得能够进行旁观者杀灭。此类杀灭可与“脱靶杀灭”相区分,该“脱靶杀灭”是指对靶标阴性细胞的无差别杀灭。在靶标阳性细胞不存在的情况下可观测到“脱靶杀灭”。

[0162] 术语“赘生性病症”与“癌症”在本文中可互换用于指存在具有致癌细胞特有的特征,诸如不受控的增殖、不灭性、转移潜在性、快速生长及增殖速率和/或某些形态特点的细胞。通常,癌细胞可呈肿瘤或肿块形式,但这类细胞可单独存在于受试者内,或可在血流中作为诸如白血病细胞或淋巴瘤细胞的独立细胞循环。术语“赘生性病症”及“癌症”包括所有类型的癌症及癌症转移,包括血液恶性肿瘤、实体瘤、肉瘤、癌瘤及其他实体瘤癌症及非实体瘤癌症。血液恶性肿瘤可包括B细胞恶性肿瘤、血癌 (白血病)、浆细胞癌 (骨髓瘤,例如多发性骨髓瘤) 或淋巴结癌 (淋巴瘤)。示例性B细胞恶性肿瘤包括慢性淋巴球性白血病 (CLL)、

滤泡性淋巴瘤、套细胞淋巴瘤及弥漫性大B细胞淋巴瘤。白血病可包括急性淋巴母细胞白血病(ALL)、急性骨髓性白血病(AML)、慢性淋巴球性白血病(CLL)、慢性骨髓性白血病(CML)、慢性骨髓单核球性白血病(CMML)、急性单核球性白血病(AMoL)等。淋巴瘤可包括霍奇金氏淋巴瘤(Hodgkin's lymphoma)及非霍奇金氏淋巴瘤。其他血液恶性肿瘤可包括骨髓化生不良症候群(MDS)。实体瘤可包括癌瘤,诸如腺癌,例如乳癌、胰脏癌、前列腺癌、大肠癌或结直肠癌、肺癌、胃癌、子宫颈癌、子宫内膜癌、卵巢癌、胆管癌、神经胶质瘤、黑色素瘤等。

[0163] 术语“肿瘤”及“赘瘤”是指由过量细胞生长或增殖造成的良性或恶性的任何组织肿块,包括癌前病变。

[0164] 术语“肿瘤细胞”与“赘生性细胞”可互换使用且是指来源于肿瘤或赘瘤的个别细胞或总细胞群,包括非致瘤细胞及癌干细胞两者。当仅提及缺乏更新及分化能力的那些肿瘤细胞时,如本文所使用的术语“肿瘤细胞”由术语“非致瘤”修饰以将那些肿瘤细胞与癌干细胞区分开。

[0165] 术语“受试者”与“患者”在本文中可互换用于指任何动物,诸如任何哺乳动物,包括但不限于人类、非人类灵长类动物、啮齿动物及其类似动物。在一些实施例中,哺乳动物为小鼠。在一些实施例中,哺乳动物为人类。在一些实施例中,受试者为小鼠。在一些实施例中,受试者为人类。

[0166] 术语“共施用”或“组合”施用一种或多种治疗剂包括同时施用及按任何次序连续施用。

[0167] “药物组合物”是指呈准许施用活性成分且随后提供活性成分的预期生物活性和/或达成治疗效果的形式,且不含对应施用配制品的受试者具有不可接受毒性的额外组分的制剂。药物组合物可为无菌的。

[0168] “药物赋形剂”包含诸如佐剂、载体、pH调节剂及缓冲剂、张力调节剂、润湿剂、防腐剂和其类似试剂的物质。

[0169] “药学上可接受的”意谓经联邦管制机构或洲政府审批通过或可由其审批通过,或在*美国药典*(U.S. Pharmacopeia)或其他普遍公认药典中列出以用于动物且更具体地用于人类。

[0170] “药学上可接受的盐”为保持母体化合物的所需生物活性且不赋予非所需毒理学作用的盐。这类盐的实例为:(a)用无机酸形成的酸加成盐,这类无机酸例如为盐酸、氢溴酸、硫酸、磷酸、硝酸及其类似无机酸;及用有机酸形成的盐,这类有机酸例如为乙酸、草酸、酒石酸、琥珀酸、顺丁烯二酸、反丁烯二酸、葡萄糖酸、柠檬酸、苹果酸、抗坏血酸、苯甲酸、鞣酸、棕榈酸、海藻酸、聚赖氨酸、萘磺酸、甲磺酸、对甲苯磺酸、萘二磺酸、聚半乳糖醛酸及其类似有机酸;及(b)由诸如氯、溴及碘的元素阴离子形成的盐。参见例如Haynes等人“Commentary:Occurrence of Pharmaceutically Acceptable Anions and Cations in the Cambridge Structural Database[评论:剑桥结构数据库中存在药学上可接受的阴离子和阳离子]”,*JPharmaceutical Sciences*[药学杂志],第94卷,第10号(2005),及Berge等人“Pharmaceutical Salts[药用盐]”,*J Pharmaceutical Sciences*[药学杂志],第66卷,第1期(1977),这类文献以引用的方式并入本文中。

[0171] 如本文所使用的术语“有效量”是指本文所描述的化合物、ADC或组合物(例如荷伯希二烯剪接调节子或ADC)足以执行经特定地陈述的目的,例如足以在施用之后产生治疗效

果,诸如肿瘤生长率降低或肿瘤体积减小、癌症症状减轻或治疗功效的一些其他标志的量。有效量可以与所陈述目的相关的常规方式来测定。术语“治疗有效量”是指本文所描述的化合物、ADC或组合物有效地可检测性地杀灭肿瘤细胞、减少和/或抑制肿瘤细胞的生长或扩散、肿瘤的尺寸或数目和/或癌症的程度、阶段、发展和/或严重程度的其他量度的量。治疗有效量可视预期施用(活体外或活体内)或所治疗的受试者及疾病病况,例如受试者的体重及年龄、疾病病况的严重程度、施用方式及其可易于由一般本领域普通技术人员确定的类似者而变化。该术语还适用于在靶标细胞中诱导特定反应,例如抑制细胞生长的剂量。具体剂量可视例如特定药物组合物、受试者及其年龄以及现有健康状况或健康状况的风险、待遵循的给药方案、疾病的严重程度、施用时序(不论其是否与其他药剂组合施用)、待施用的组织以及携载其的物理递送系统而变化。在癌症情况下,治疗有效量的ADC可减少癌细胞的数目、减小肿瘤尺寸、抑制(例如减缓或停止)肿瘤转移、抑制(例如减缓或停止)肿瘤生长和/或缓解一种或多种症状。

[0172] “预防有效量”是指在必需剂量及时间段下有效达成所需预防结果的量。通常,由于预防剂量在疾病之前或在疾病早期阶段时用于受试者中,故预防有效量小于治疗有效量。

[0173] 如本文所使用的“以治疗”或“治疗性”及语法相关术语是指疾病的任何后果的任何改善,诸如经延长的存活期、较低发病率和/或由替代性治疗模式引起的副作用减轻。如此项技术中易于了解,治疗操作涵盖但不需要疾病的完全根除。如本文所使用的“治疗(treatment或treat)”是指将所描述的ADC或组合物施用至例如患者的受试者。治疗可用于治愈、愈合、减轻、缓解、更改、补救、改善、缓和、改进或影响病症(例如癌症)、病症的症状或患病症的倾向性。在一些实施例中,除治疗患有病况的受试者之外,还可预防性提供本文所披露的组合物以预防或降低罹患彼病况的可能性。

[0174] 在一些实施例中,使用经标记的ADC。合适“标记”包括放射性核种、酶、受质、辅因子、抑制因子、荧光部分、化学发光部分、磁性粒子及其类似物。

[0175] 如本文所使用的“蛋白质”意谓至少两个共价连接的氨基酸。该术语涵盖多肽、寡肽及肽。在一些实施例中,两个或更多个共价连接的氨基酸通过肽键连接。蛋白质可由天然存在的氨基酸及肽键构成,例如当蛋白质使用表达系统及宿主细胞以重组方式制成时如此。可替代地,蛋白质可包括合成氨基酸(例如高苯丙氨酸、瓜氨酸、鸟氨酸及正白氨酸)或肽仿真物结构(即“肽或蛋白质类似物”,诸如类肽)。类肽为其侧链附接至肽主链的氮原子而非附接至 α -碳(因为其处于氨基酸中)的示例性类别的肽模拟物,且具有相较于肽而言不同的氢键结及构形特征(参见例如Simon等人(1992)Proc Natl Acad Sci.USA[美国国家科学院院刊]89:9367)。因此,类肽可能对蛋白质水解或其他生理或储存条件具有抗性,且有效地渗透细胞膜。可并入这类合成氨基酸,详言的当通过此项技术中熟知的常规方法活体外合成抗体时如此。此外,还可使用肽模拟的、合成和天然存在的残基/结构的任何组合。“氨基酸”还包括诸如脯氨酸及羟基脯氨酸的亚氨基酸残基。氨基酸“R基”或“侧链”可呈(L)-或(S)-组态。在一具体实施例中,氨基酸呈(L)-或(S)-组态。

[0176] “重组蛋白”为使用重组技术、使用此项技术中已知的任何技术及方法,即经由表达重组核酸而制成的蛋白质。用于产生重组蛋白的方法及技术在此项技术中众所周知。

[0177] “经分离的”蛋白质未伴随在其天然状态下通常与其缔合的至少某种材料,例如占

给定样品中总蛋白质的至少约5重量%或至少约50重量%。应理解,经分离的蛋白质可视情况而定占总蛋白质含量的5重量%至99.9重量%。举例而言,可经由使用诱导性启动子或高表达启动子以显著较高的浓度制造蛋白质,以使得以经增加的浓度水平制造蛋白质。该定义包括在此项技术中已知的广泛多种的生物体和/或宿主细胞中产生抗体。

[0178] 对于氨基酸序列,序列一致性和/或类似性可使用包括但不限于Smith及Waterman (1981)Adv Appl Math.[应用数学进展]2:482的局域序列一致性算法、Needleman及Wunsch (1970)J Mol Biol.[分子生物学杂志]48:443的序列一致性比对算法、Pearson及Lipman (1988)Proc Nat Acad Sci.USA[美国国家科学院院刊]85:2444的类似性方法检索、这些算法的计算机化实施方案(在威斯康星州麦迪逊市科学路575号(575Science Drive, Madison,Wis.)的遗传学计算机组(Genetics Computer Group)的威斯康星遗传学软件包(Wisconsin Genetics Software Package)中的GAP、BESTFIT、FASTA及TFASTA)、Devereux等人(1984)Nucl Acid Res.[核酸研究]12:387-95描述的Best Fit序列程序的此项技术中已知的标准技术,较佳使用预设设定或通过检验来测定。较佳地,一致性百分比通过FastDB基于以下参数来计算:错配罚分1;空隙罚分1;空隙尺寸罚分0.33;及接合罚分30(“Current Methods in Sequence Comparison and Analysis[当前序列比较和分析方法]”, Macromolecule Sequencing and Synthesis,Selected Methods and Applications[高分子测序与合成,部分方法与应用],第127-149页(1988),Alan R.Liss,Inc[艾伦利斯出版公司])。

[0179] 适用算法的实例为PILEUP。PILEUP使用渐进式成对比对由一组相关序列产生多序列比对。其还可绘制显示用于产生比对的丛集关系的树形图。PILEUP使用Feng及Doolittle (1987)J Mol Evol.[分子进化杂志]35:351-60的渐进式比对方法的简化形式;该方法类似于Higgins及Sharp(1989)CABIOS 5:151-3所描述的方法。适用PILEUP参数包括预设空隙权重3.00、预设空隙长度权重0.10及加权末端空隙。

[0180] 适用算法的另一实例为以下中所描述的BLAST算法:Altschul等人(1990)J Mol Biol.[分子生物学杂志]215:403-10;Altschul等人(1997)Nucl Acid Res.[核酸研究]25:3389-402;及Karin等人(1993)Proc Natl Acad Sci.USA[美国国家科学院院刊]90:5873-87。特别适用的BLAST程序为自Altschul等人(1996)Methods in Enzymology[酶学方法]266:460-80获得的WU-BLAST-2程序。WU-BLAST-2使用若干检索参数,其中大部分设定成默认值。用以下值设定可调参数:重迭间隔=I、重迭分数=0.125、字临限值(T)=II。HSP S及HSP S2参数为动态值且通过程序本身视特定序列的组成及检索目的序列所对照的特定数据库的组成而确立;然而可调节这类值以提高敏感性。

[0181] 额外的适用算法为Altschul等人(1997)Nucl Acid Res.[核酸研究]25:3389-402所报导的带空隙的BLAST。带空隙的BLAST使用BLOSUM-62取代计分;临限值T参数设定成9;二次打击法(two-hit method)用于触发无空隙的延伸部分,加入空隙长度k,代价为10+k;Xu设定成16,且Xg在数据库检索阶段设定成40,且在算法输出阶段设定成67。空隙比对由对应于约22比的计分触发。

[0182] 一般而言,本文所披露的蛋白质及其变异体(包括靶标抗原(诸如HER2、CD138或EPHA2、MSLN、FOLH1、CDH6、CEACAM5、CFC1B、ENPP3、FOLR1、HAVCR1、KIT、MET、MUC16、SLC39A6、SLC44A4或STEAP1)变异体及抗体可变域变异体(包括个别变异CDR))与本文所描绘的序列

之间的氨基酸同源性、类似性或一致性为至少80%，例如同源性或一致性为至少85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、近似100%或100%。

[0183] 以类似方式,关于抗体及本文所识别的其他蛋白质的核酸序列的“核酸序列一致性百分比(%)”定义为与抗原结合蛋白的编码序列中的核苷酸残基相同的候选序列中的核苷酸残基百分比。特定方法利用设定成预设参数的WU-BLAST-2的BLASTN模块,其中重迭间隔及重迭分数分别设定成1及0.125。

[0184] 尽管引入氨基酸序列变化的位点或区域为预先确定的,但突变本身无需预先确定。举例而言,为使给定位点处的突变的效能优化,可在靶标密码子或区域处进行随机突变诱发且筛选经表达的抗原结合蛋白CDR变异体的所需活性的最佳组合。用于在具有已知序列的DNA中的预确定位点处进行取代突变的技术为众所周知的,例如MI3引物突变诱发及PCR突变诱发。

[0185] 如本文所使用的“烷基”或“烷基基团”意谓完全饱和的直链、分支链或环烃链。在某些实施例中,烷基可含有1-8个碳原子(“C₁-C₈烷基”)。在某些实施例中,烷基可含有1-6个碳原子(“C₁-C₆烷基”)。在某些实施例中,烷基含有1-3个碳原子。在又其他实施例中,烷基含有2-3个碳原子,且在又其他实施例中,烷基含有1-2个碳原子。

[0186] 如本文所使用的“烷基烷氧基”意谓经烷氧基取代的烷基。

[0187] 如本文所使用的“烷氧基”是指经由氧(“烷氧基”)原子连接至主碳链的如先前所定义的烷基。

[0188] 如本文所使用的“烷基羟基”意谓经羟基取代的烷基。

[0189] 如本文所使用的“羟基(hydroxy或hydroxyl)”是指-OH。

[0190] 如本文所使用的“碳环”或“碳环基”包括芳族基团(例如芳基)及非芳族基团(例如环烷基)两者。在某些实施例中,碳环基团含有3-10个碳原子(“3至10员碳环”)。在某些实施例中,碳环基团含有3-8个碳原子(“3至8员碳环”)。在某些实施例中,碳环基团含有3-6个碳原子(“3至6员碳环”)。在某些实施例中,碳环基团含有3-5个碳原子(“3至5员碳环”)。

[0191] 如本文所使用的“卤烷基”是指经一个或多个卤素原子取代的烷基。

[0192] “卤素”是指任何卤素基团,例如-F、-Cl、-Br或-I。

[0193] 如本文所使用的术语“杂环(heterocycle或heterocyclyl或heterocyclic)”、“杂环基”意谓在环中含有至少一个杂原子的单环杂环、双环杂环或三环杂环。

[0194] 单环杂环是含有至少一个独立地选自O、N和S的杂原子的3元、4元、5元、6元、7元或8元环。在一些实施例中,杂环是含有一个选自O、N和S的杂原子的3元或4元环。在一些实施例中,杂环是含有零个或一个双键以及一个、两个或三个选自O、N和S的杂原子的5元环。在一些实施例中,杂环是含有零个、一个或两个双键以及一个、两个或三个选自O、N和S的杂原子的6元、7元或8元环。单环杂环的代表性实例包括但不限于氮杂环丁烷基、氮杂环庚烷基、吡丙啶基、二氮杂环庚烷基、1,3-二噁烷基、1,3-二氧戊环基、二氢吡喃基(包括3,4-二氢-2H-吡喃-6-基)、1,3-二硫杂环戊烷基、1,3-二噻烷基、咪唑啉基、咪唑烷基、异噻唑啉基、异噻唑烷基、异噻唑啉基、异噻唑烷基、吗啉基、噁二唑啉基、噁二唑烷基、噻唑啉基、噻唑烷基、哌嗪基、哌啶基、吡喃基、吡唑啉基、吡唑烷基、吡咯啉基、吡咯烷基、四氢呋喃基、四氢吡喃基(包括四氢-2H-吡喃-4-基)、四氢噻吩基、噻二唑啉基、噻二唑烷基、噻唑啉基、噻唑烷基、硫代吗啉基、1,1-二氧化硫代吗啉基(硫代吗啉砜)、硫代吡喃基、以及三噻烷基。

[0195] 本披露的双环杂环可包括与芳基稠合的单环杂环、或与单环烷基稠合的单环杂环、或与单环烯基稠合的单环杂环、或与具有总计5至12个环原子的单环杂环稠合的单环杂环。双环杂环的实例包括但不限于3,4-二氢-2H-哌喃基、1,3-苯并间二氧杂环戊烯基、1,3-苯并二硫杂环戊烯基、2,3-二氢-1,4-苯并间二氧杂环己烯基、2,3-二氢-1-苯并呋喃基、2,3-二氢-1-苯并噻吩基、2,3-二氢-1H-吡啶基及1,2,3,4-四氢喹啉基。

[0196] 术语“杂环(heterocycle或heterocyclyl或heterocyclic)”、“杂环基”涵盖杂芳基。“杂芳基”是指具有一个或多个闭合环且在这类环中的至少一个中具有一个或多个杂原子(氧、氮或硫)的环状部分,其中这类环中的至少一个为芳族环,且其中该环或这类环可独立地经稠合和/或桥连。实例包括但不限于苯基、噻吩基、三唑基、吡啶基、嘧啶基、哒嗪基及吡嗪基。

[0197] 如本文所描述,本披露的化合物可含有“视情况经取代的”部分。一般而言,术语“经取代的”无论前面是否有术语“视情况”均意谓指定部分的一个或多个氢经合适取代基置换。除非另外指示,否则“视情况经取代的”基团可在该基团的各可取代位置处具有合适取代基,且当任何给定结构中的超过一个位置可经超过一个选自指定群组的取代基取代时,在各位置处的取代基可相同或不同。依据本披露预想的取代基组合较佳为引起形成稳定或化学上可行的化合物的取代基组合。

[0198] 本领域普通技术人员应理解,“取代”或“经取代”或“不存在”包括以下隐含限制条件:该取代或不存在根据经取代原子及取代基的准许价数,且取代或不存在产生稳定化合物,例如该稳定化合物不自发地经历诸如通过重排、环化、消除等进行的转型。出于本披露的目的,诸如氮的杂原子可具有氢取代基和/或满足杂原子价数的本文所描述的有机化合物的任何容许取代基。

[0199] “稳定”是指化合物在经受允许其产生、检测且在某些实施例中其回收、纯化及用于本文所披露的目的中的一个或多个的条件时,实质上不经化学上和/或物理上改变。在一些实施例中,稳定化合物或化学上可行的化合物为当在水分或其他化学反应性条件不存在的情况下保持在40℃或更低的温度下达至少一周时实质上不经改变的化合物。在一些实施例中,本文所披露的化合物为稳定的。

[0200] 本文所教示的对映异构体可包括“对映异构性纯”异构体,其在一个或多个特定不对称中心处实质上包含单个对映异构体,例如大于或等于90%、92%、95%、98%或99%或等于100%的单个对映异构体。“不对称中心”或“手性中心”是指包含四个不同取代基的四面体碳原子。

[0201] 本文所描述的化合物还可在构成这类化合物的原子中的一个或多个处含有非天然比例的原子同位素。举例而言,化合物可经诸如氘(^2H)、氚(^3H)、碳-13(^{13}C)或碳-14(^{14}C)的放射性同位素放射性标记。本文所披露的化合物的所有同位素变异体无论是否具有放射性均意欲涵盖于本披露的范畴内。另外,本文所描述的化合物的所有互变异构形式均意欲处于本披露的范畴内。

抗体-药物缀合物

[0202] 本披露的抗体-药物缀合物(ADC)化合物包括具有抗癌活性的ADC化合物。明确而言,ADC化合物包括结合(即通过接头共价连接)至荷伯希二烯剪接调节子的抗体或抗原结合片段(包括其抗原结合片段),例如其中荷伯希二烯剪接调节子在不结合至抗体或抗原结

合片段时具有细胞毒性或细胞生长抑制作用。在不同实施例中,荷伯希二烯剪接调节子在不结合至抗体或抗原结合片段时能够与SF3b剪接体复合物结合和/或相互作用。在不同实施例中,荷伯希二烯剪接调节子在不结合至抗体或抗原结合片段时能够调节活体外和/或活体内RNA剪接。在不同实施例中,通过靶向RNA剪接,本文所披露的荷伯希二烯剪接调节子及ADC为强效抗增生剂。在不同实施例中,本文所披露的荷伯希二烯剪接调节子及ADC可靶向主动分裂细胞及休眠细胞两者。

[0203] 在不同实施例中,本披露至少部分地基于特定生物活性荷伯希二烯剪接调节子可在用于ADC中时提供经改善的特性的发现。尽管荷伯希二烯剪接调节子在单独使用时可显示理想上经改善的特点(例如稳健SF3b剪接体复合物结合、对RNA剪接的强效调节),但在不同实施例中,荷伯希二烯剪接调节子在结合至抗体或抗原结合片段时可展现少量这类理想上经改善的特点。因此,用作人类治疗剂,例如用作肿瘤药剂的ADC的研发及生产可能不仅仅需要识别能够结合至一个或多个所需靶标且连接至单独使用以治疗癌症的药物的抗体。将抗体连接至荷伯希二烯剪接调节子可对抗体及荷伯希二烯剪接调节子中的一者或两者的活性具有显著影响,还即视所选接头和/或荷伯希二烯剪接调节子的类型而变化的影响。因此,在一些实施例中,ADC的组分经选择以(i)保持分离的抗体及荷伯希二烯剪接调节子部分所展现的一种或多种治疗特性;(ii)维持抗体或抗原结合片段的特异性结合特性;(iii)使荷伯希二烯剪接调节子负载量及荷伯希二烯剪接调节子与抗体比优化;(iv)允许经由稳定连接至抗体或抗原结合片段来递送,例如胞内递送荷伯希二烯剪接调节子部分;(v)保持ADC作为完整缀合物的稳定性直至转运或递送至靶标位点为止;(vi)将施用之前或之后的ADC的聚集减至最少;(vii)允许细胞环境中裂解或其他释放机制之后的荷伯希二烯剪接调节子部分的治疗作用,例如细胞毒性作用;(viii)展现与分离的抗体及荷伯希二烯剪接调节子部分的活体内抗癌治疗功效相当或优于其的活体内抗癌治疗功效;(ix)将通过荷伯希二烯剪接调节子部分进行的脱靶杀灭减至最少;和/或(x)展现所需药物动力学及药效动力学特性、可配制性及毒理学/免疫学概况。可能需要这些特性中的各者以识别用于治疗用途的经改善的ADC(Ab等人(2015)Mol Cancer Ther.[分子癌症治疗学]14:1605-13)。

[0204] 在不同实施例中,本文所披露的ADC展现上文所列类别中的一些或各个中的出乎意料地有利的特性。举例而言,在一些实施例中,与包含替代接头和/或药物部分(例如替代荷伯希二烯剪接调节子)的ADC相比,本文所披露的ADC构筑体展现出出乎意料地有利的荷伯希二烯剪接调节子负载量、聚集和/或稳定性概况,和/或保留抗体结合功能、药物活性和/或经改善的旁观者杀灭,同时减少脱靶杀灭。在一些实施例中,与使用替代接头和/或荷伯希二烯剪接调节子部分的ADC相比,本文所披露的ADC构筑体展现优良稳定性、活性、效力或其他效果(活体内或活体外量测)。在一些实施例中,本文所披露的ADC构筑体在以单次剂量施用时代现活体内治疗功效。在一些实施例中,与使用替代接头和/或荷伯希二烯剪接调节子部分的ADC相比,本文所披露的ADC构筑体出乎意料地稳定。

[0205] 本披露的ADC化合物可将有效剂量的细胞毒性剂或细胞生长抑制剂选择性递送至癌细胞或肿瘤组织。已发现,所披露的ADC针对表达各别靶标抗原(例如HER2、CD138、EPHA2、MSLN、FOLH1、CDH6、CEACAM5、CFC1B、ENPP3、FOLR1、HAVCR1、KIT、MET、MUC16、SLC39A6、SLC44A4或STEAP1)的细胞具有强效细胞毒性和/或细胞生长抑制活性。在一些实施例中,ADC的细胞毒性和/或细胞生长抑制活性视细胞中的靶标抗原表达而定。在一些实施例中,

所披露的ADC特别有效地杀灭表达靶标抗原的癌细胞,同时将脱靶杀灭减至最少。在一些实施例中,所披露的ADC不对不表达靶标抗原的癌细胞展现细胞毒性和/或细胞生长抑制作用。

[0206] 示例性HER2表达性癌症包括但不限于乳癌、胃癌、膀胱癌、尿道上皮细胞癌、食道癌、肺癌(例如肺腺癌)、子宫癌(例如子宫浆液性子宫内膜癌)、唾液腺癌、子宫颈癌、子宫内膜癌及卵巢癌(English等人(2013)Mol Diagn Ther.[分子诊断与疗法]17:85-99)。

[0207] 示例性CD138表达性癌症包括但不限于胸内癌(例如肺癌、间皮瘤)、皮肤癌(例如基底细胞癌、鳞状细胞癌)、头颈癌(例如喉癌、喉咽癌、鼻咽癌)、乳癌、泌尿生殖癌(例如子宫颈癌、卵巢癌、子宫内膜癌、前列腺癌、膀胱癌、尿道上皮癌)、血液恶性肿瘤(例如骨髓瘤(诸如多发性骨髓瘤)、B细胞恶性肿瘤、霍奇金氏淋巴瘤)及甲状腺癌(Szatmári等人(2015)Dis Markers[疾病标志]2015:796052)。

[0208] 示例性EPHA2表达性癌症包括乳癌、脑癌、卵巢癌、膀胱癌、胰脏癌、食道癌、肺癌、前列腺癌、黑色素瘤、食道癌及胃癌(Tandon等人(2011)Expert Opin Ther Targets[治疗靶标专家意见]15(1):31-51)。

[0209] 在一些实施例中,ADC的裂解自抗体或抗原结合片段及接头释放荷伯希二烯剪接调节子。在一些实施例中,接头和/或荷伯希二烯剪接调节子设计成促进旁观者杀灭(邻近细胞杀灭)。在一些实施例中,接头和/或荷伯希二烯剪接调节子设计成促进在细胞内化及接头-荷伯希二烯剪接调节子部分和/或单独荷伯希二烯剪接调节子部分扩散至邻近细胞之后经由裂解进行的旁观者杀灭。在一些实施例中,接头促进细胞内化。在一些实施例中,接头设计成将胞外环境中的裂解减至最少且由此降低针对脱靶组织(例如非癌变组织)的毒性,同时保持ADC结合至靶标组织及对不表达由ADC的抗体或抗原结合片段靶向的抗原但环绕表达彼抗原的靶标癌组织的癌组织的旁观者杀灭。在一些实施例中,荷伯希二烯剪接调节子部分或通过ADC裂解产生的荷伯希二烯剪接调节子部分的分解代谢物设计成促进靶标细胞的吸收或邻近细胞(即可渗透细胞)的吸收。这类荷伯希二烯剪接调节子部分及分解代谢物在本文中可称为“旁观者活性”,而具有经降低的细胞渗透性的药物部分或分解代谢物可称为“旁观者非活性”。

[0210] 在一些实施例中,所披露的ADC还展现旁观者杀灭活性,但展现低脱靶细胞毒性。在不受理论束缚的情况下,在ADC向实体瘤中的渗透受到限制和/或肿瘤细胞中的靶标抗原表达具异质性时,ADC的旁观者杀灭活性可为特别有益的。在一些实施例中,相对于用包含不可裂解接头的ADC进行的相当治疗而言,包含可裂解接头的ADC特别有效地进行旁观者杀灭和/或展现经改善的旁观者杀灭活性。在一些实施例中,本文所披露的ADC展现相比于单独药物部分而言经改善的溶解性及靶标细胞渗透性。在一些实施例中,本文所披露的ADC展现相比于单独荷伯希二烯剪接调节子部分的细胞毒性而言经改善的细胞毒性。在一些实施例中,本文所披露的ADC使用在评估为单独荷伯希二烯剪接调节子时展现较低细胞毒性的药物部分,但出乎意料地比包含在评估为单独荷伯希二烯剪接调节子时具有较高细胞毒性的其他荷伯希二烯剪接调节子部分的ADC更佳。在一些实施例中,相对于用包含不可裂解接头的ADC进行的相当治疗而言,荷伯希二烯剪接调节子的裂解及释放改善ADC的细胞毒性。在其他实施例中,ADC不需要荷伯希二烯剪接调节子的裂解及释放来具有所需生物活性。在一些实施例中,包含具有经增加的间隔子长度的不可裂解接头(例如ADL12)的ADC提供相对

于用包含可裂解接头(例如ADL1、ADL5)的ADC进行的相当治疗而言相同或类似的细胞毒性、及相对于用包含较短不可裂解接头的ADC进行的相当治疗而言出乎意料地优良的细胞毒性。在一些实施例中,包含具有经增加的间隔子长度且不具有羰基的不可裂解接头(例如ADL12)的ADC提供相对于用包含可裂解接头(例如ADL1、ADL5)的ADC进行的相当治疗而言相同或类似的细胞毒性、及相对于用包含具有相同或类似间隔子长度且具有羰基的不可裂解接头(例如ADL10)的ADC进行的相当治疗而言出乎意外地优良的细胞毒性。在一些实施例中,相对于用包含未经修饰的不可裂解MC接头(例如ADL10)的ADC进行的相当治疗而言,自不可裂解MC接头(例如ADL12)移除羰基可引起细胞毒性增加大于50倍、大于75倍、大于100倍、大于150倍或大于200倍。在一些实施例中,相对于用包含未经修饰的不可裂解MC接头(例如ADL10)的ADC进行的相当治疗而言,自不可裂解MC接头(例如ADL12)移除羰基且增加间隔子长度(例如添加至少一个间隔子单元)可引起细胞毒性增加大于50倍、大于75倍、大于100倍、大于150倍或大于200倍。

[0211] 本文提供包含靶向肿瘤细胞的抗体或其抗原结合片段(Ab)、剪接调节子药物部分(D)及将Ab共价连接至D的接头部分(L)的ADC化合物。在某些方面中,抗体或抗原结合片段能够以高特异性及高亲和力结合至肿瘤相关抗原(例如HER2、CD138、EPHA2、MSLN、FOLH1、CDH6、CEACAM5、CFC1B、ENPP3、FOLR1、HAVCR1、KIT、MET、MUC16、SLC39A6、SLC44A4或STEAP1)。在某些实施例中,抗体或抗原结合片段在结合后内化至靶标细胞中,例如内化至该细胞中的降解隔室中。在不同实施例中,可使用在结合至靶标细胞后内化、经历降解且释放荷伯希二烯剪接调节子部分以杀灭癌细胞的ADC。可通过酶作用、水解、氧化或任何其他机制自ADC的抗体和/或接头部分释放荷伯希二烯剪接调节子部分。

[0212] 示例性ADC具有式(I):



其中Ab=抗体或抗原结合片段,L=接头部分,H=荷伯希二烯剪接调节子药物部分,且p=每个抗体或抗原结合片段的剪接调节子药物部分的数目。

[0213] 在某些实施例中,用于所描述的ADC及组合物中的靶向荷伯希二烯剪接调节子的部分为抗体或抗原结合片段。本文还提供且描述用于所描述的ADC及组合物中的其他示例性靶向药物的部分。在一些实施例中,靶向荷伯希二烯剪接调节子的部分可为各种细胞结合剂及非抗体骨架中的任一者。在一些实施例中,靶向荷伯希二烯剪接调节子的部分为细胞结合剂。如本文所使用的术语“细胞结合剂”是指能够结合至动物(例如人类)细胞且递送荷伯希二烯剪接调节子部分(例如如本文所披露的荷伯希二烯剪接调节子药物部分)的任何药剂。该术语涵盖本文所披露的示例性抗体及抗原结合片段(例如单克隆抗体及其诸如Fab及scFV的片段)。该术语进一步涵盖示例性细胞结合剂,诸如DARPin、duobody、双环肽、纳米抗体、辛替恩(centyrin)、MSH(黑色素细胞刺激激素)、受体-Fc融合分子、T细胞受体结构、类固醇激素(诸如雄激素及雌激素)、生长因子、群落刺激因子(诸如EGF)及其他非抗体骨架。在不同实施例中,非抗体骨架可大体上分为两个结构类别,即结构域设定大小的化合物(约6-20kDa)及限制性肽(约2-4kDa)。示例性结构域设定大小的骨架包括但不限于亲和抗体、亲和素(affilin)、抗运载蛋白(anticalin)、阿特里莫(atrimer)、DARPin、FN3骨架(例如纤连蛋白(adnectin)及辛替恩)、非诺莫(fynomer)、孔尼兹域(Kunitz domain)、纤维结合素连接蛋白(pronectin)、O-body及受体-Fc融合蛋白,而示例性限制性肽包括高亲合

性多聚体(avimer)、双环肽及Cys结(Cys-knot)。在一些实施例中,用于所描述的ADC及组合物中的靶向药物的部分选自亲和抗体、亲和素、抗运载蛋白、阿特里莫、DARPin、FN3骨架(诸如纤连蛋白或辛替恩)、非诺莫、孔尼兹域、纤维结合素连接蛋白、O-body、高亲和性多聚体、双环肽及Cys结。在一些实施例中,用于所描述的ADC及组合物中的靶向药物的部分为受体-Fc融合蛋白,例如HER2-Fc嵌合融合蛋白。非抗体骨架综述于例如Vazquez-Lombardi等人(2015)Drug Dis Today[今日药物疾病]20(10):1271-83中。

抗体

[0214] 式(I)抗体或抗原结合片段(Ab)在其范畴内包括特异性结合至癌细胞上的靶标抗原的任何抗体或抗原结合片段。抗体或抗原结合片段可结合至靶标抗原,其中如通过例如BIAcore®分析所量测,解离常数(K_D) $\leq 1\text{mM}$ 、 $\leq 100\text{nM}$ 或 $\leq 10\text{nM}$ 或其间任何量。在某些实施例中, K_D 为1pM至500pM。在一些实施例中, K_D 介于500pM至1 μM 、1 μM 至100nM或100mM至10nM之间。

[0215] 在一些实施例中,抗体或抗原结合片段为包含两个重链及两个轻链的四链抗体(还称为免疫球蛋白或全长抗体或完整抗体)。在一些实施例中,抗体或抗原结合片段为双链半抗体(一个轻链及一个重链)或免疫球蛋白的抗原结合片段。在一些实施例中,抗体或抗原结合片段为保持结合靶标癌抗原的能力和/或提供免疫球蛋白功能的能力的免疫球蛋白的抗原结合片段。

[0216] 在一些实施例中,抗体或抗原结合片段为抗体或其抗原结合片段。在一些实施例中,抗体或抗原结合片段为内化性抗体或其内化性抗原结合片段。在一些实施例中,内化性抗体或其内化性抗原结合片段结合至于细胞表面上表达的靶标癌抗原且在结合后进入细胞。在一些实施例中,在ADC进入且存在于表达靶标癌抗原的细胞中之后(即在ADC已经内化之后),例如通过裂解、通过抗体或抗原结合片段降解或通过任何其他合适的释放机制自ADC的抗体或抗原结合片段释放ADC的荷伯希二烯剪接调节子药物部分。

[0217] 本披露的示例性抗体的氨基酸序列阐述于表2-4中。

表1. 抗体

mAb	类型	靶标
曲妥珠单抗(AB185)	人源化	HER2/NEU
B-B4(AB205)	鼠	CD138(多配体蛋白聚糖-1)
1C1(AB206)	人源化	EPHA2

表2.mAb可变区的氨基酸序列

mAb	IgG 链	SEQ ID NO	氨基酸序列
曲妥珠单抗(AB185)	重链	19	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF NIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPT NGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYL QMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMD YWGQGTLLTVSS
曲妥珠单抗(AB185)	轻链	20	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQ DVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFL YSGVPSRFSGRSGTDFTLTISSLQPE DFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKR T

B-B4 (AB205)	重链	21	QVQLQQSGSELMMPGASVKISCKATGY TFSNYWIQRPGHGLEWIGEILPGTGRT IYNEKFKGKATFTADISSNTVQMQLSS LTSEDSAVYYCARRDYGNFYAMDYW GGTSTVTVSS
B-B4 (AB205)	轻链	22	DIQMTQSTSSLSASLGDRVTISCSASQ GINNYLNWYQQKPDGTVELLIYYTSTL QSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEPE DIGTYCQQYSKLPRTFGGGKLEIK
IC1 (AB206)	重链	23	EVQLLESGLLVQPGGSLRLSCAASGF TFSHYMMAWVRQAPGKGLEWVSRIGPS GGPTHYADSVKGRFTISRDNKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCAGYDSGYDYVAV AGPAE-YFQHWGQGTLLVTVSS
IC1 (AB206)	轻链	24	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQ SISTWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASNL HTGVPSRFSGSGSGTEFSLTISGLQPD DFATYYCQQYNSYS-RTFGQGTKVEIK

表3.mAb CDR的氨基酸序列

mAb	IgG 链	SEQ ID NO	氨基酸序列
曲妥珠单抗 (AB185)	HCDR1	1	GFNIKDTYIH
曲妥珠单抗 (AB185)	HCDR2	2	RIYPTNGYTRYADSVKG
曲妥珠单抗 (AB185)	HCDR3	3	WGGDGFYAMDY
曲妥珠单抗 (AB185)	LCDR1	4	RASQDVNTAVAW
曲妥珠单抗 (AB185)	LCDR2	5	SASFLYS
曲妥珠单抗 (AB185)	LCDR3	6	QQHYTTPPT
B-B4 (AB205)	HCDR1	7	NYWIE
B-B4 (AB205)	HCDR2	8	ILPGTGRTIYNEKFKGKA
B-B4 (AB205)	HCDR3	9	RDYYGNFYAMDY
B-B4 (AB205)	LCDR1	10	ASQGINNYLN
B-B4 (AB205)	LCDR2	11	TSTLQS
B-B4 (AB205)	LCDR3	12	QQYSKLPRT
IC1 (AB206)	HCDR1	13	HYMMA
IC1 (AB206)	HCDR2	14	RIGPSGGPTHYADSVKG
IC1 (AB206)	HCDR3	15	YDSGYDYVAVAGPAE-YFQH
IC1 (AB206)	LCDR1	16	RASWSISTWLA
IC1 (AB206)	LCDR2	17	KASNLHT
IC1 (AB206)	LCDR3	18	QQYNSYS-RT

表4.全长mAb Ig链的氨基酸序列

mAb	IgG 链	类别	SEQ ID NO	氨基酸序列
曲妥珠单抗 (AB185)	重链	IgG1	25	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWV ARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISA DTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC SRWGGDGFYAMDYWGQGLVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPPKSCDKTHTCPPCPAPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
曲妥珠单抗 (AB185)	轻链	K	26	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCR ASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLI YSASFYSGVPSRFSGSRSGTDFT LTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPP TFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

B-B4 (AB205)	重链	IgG2a	27	QVQLQQSGSELMMPGASVKISCKA TGYTFSNYWIQRPGHGLEWIGEIL PGTGRTIYNEKFKGKATFTADISS NTVQMQLSSLTSEDSAVYYCARRD YYGNFYAMDYWGQGTSVTVSSAK TTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLG CLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGV HTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSST WPSETVTCNVAPASSTKVDKKIV PRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPP KPKDVLITITLTPKVTCTVVDISKD DPEVQFSWFVDDVEVHTAQTQPRE EQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGK EFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTKG RPKAPQVYTIPPPKEQMAKDVSLS TCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAE NYKNTQPIMDTDGSYFVYSKLNQV KSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHT EKSLSHSPG
B-B4 (AB205)	轻链	κ	28	DIQMTQSTSSLSASLGDRVTISCS ASQGINNYLNWYQQKPDGTVELLI YYTSTLQSGVPSRFSGSGSGTDYS LTISNLEPEDIGTYICQQYSKLPR TFGGGTKLEIKRADAAPTVSIFPP SSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDI NVKWKIDGSRQNGVLNSWTDQDS KDSTYSMSSTLTTLTKDEYERHNSY TCEATHKTSSTPIVKSFNRECE
1C1 (AB206)	重链	IgG1	29	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFTFSHYMMAWVRQAPGKGLEWV SRIGPSGGPTHYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC AGYDSGYDYVAVAGPAEYFQHWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHNK PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPC PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVELTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPV LSDSGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSP G
1C1 (AB206)	轻链	κ	30	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCR ASQSIISTWLAWYQQKPGKAPKLLI YKASNLHTGVPSRFSGSGSGTEFS LTISGLQPDFFATYYCQYNSYSR TFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYSLSSLTTLTKADYEEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

表5. 示例性靶标抗原氨基酸序列

抗原	SEQ ID NO	氨基酸序列
HER2/NEU	31	MELAALCRWGLLLALLPPGAASTQVCTGTDMKLRLPASPETHLDM LRHLYQGCQVVGNNLELTYPNTASLSFLQDIQEVQGYVLIHNNQ VRQVPLQRLRIVRGTLFEDNYALAVLDNGDPLNNTTPVTGASPG GLRELQLRSLTEILKGGVLIQRNPQLCYQDTILWKDIFHKNQLA LTLIDTNRSRACHPCSPMCKGSRGWGESSEDCQSLTRTVCAGGCA RCKGPLPTDCCHEQCAAGCTGPKHSDCLACLFHNSGICELHCPA LVTYNTDTFESMPNPEGRTYFGASCVTACPYNYLSTDVGSCTLVC PLHNQEVTAEDGTQRCEKCSKPCARVCYGLGMEHLREVRAVTSAN IQEFAGCKIFGSLAFLPESFDGDPASNTAPLQPEQLQVFETLEE ITGYLYISAWPDSLPLDSVFNQLQVIRGRILHNGAYSLLTQGLGI SWLGLRSLRELGSGLALIHNNHLCFVHTVPWDQLFRNPHQALLH TANRPEDECVGEGGLACHQLCARGHCWGPPTQCVNCSQFLRGQEC VEECRVLQGLPREYVNARHCLPCHPECQPPQNGSVTCFGPEADQCV ACAHYKDPFFCVARCPSGVKPDLSYMPIWKFPDEEGACQPCPINC THSCVDLDDKGCPAEQRASPLTSIIISAVVGILLVVVLGVVGI KRRQQKIRKYTMRRLLQETELVEPLTPSGAMPNQAQMIRKETEL RKVKVLGSGAFGTVYKGIWIPDGENVKIPVAIKVIRENTSPKANK EILDEAYVMAGVGSPPYVSRLGICLTSTVQLVTLQMPYGCGLDHY RENRGRSLGQDLNWCMIKAGMSYLEDVRLVHRDLAARNVLVKS PNHVKITDFGLARLLDIDETEHADGGKVPKIKWMALESILRRRFT HQSDVWSYGVTVWELMTFGAKPYDGIPIREIPDLLEKGERLPQPP ICTIDVYIMVVKCWMIDSECRPRFRELVSSEFSRMARDPQRFVVIQ NEDLGPAASPLDSTFYRSLLEDDDDMGDLVDAEEYLVPQQGFFCPDP APGAGGMVHHRHRSSTRSGGGDLTLGLEPSEEEAPRSPLAPSEG AGSDVFDGDLGMAAGLQSLPHTDPSPLQRYSEDPTVPLPSETD GYVAPLTCSPQPEYVNQPDVRPQPPSPREGPLPAARPAAGATLERP KTLSPGKNGVVKDVFAFGGAVENPEYLTQQGGAAPQPHPPAFSP AFDNLYYWDQDPPPERGAPPSTFKGTPTAENPEYLGLDVPV
CD138	32	MRRAALWLWLCALALSQPALPQIVATNLPPEDQDGGSDSDNFS GSGAGALQDITLSQQTPTWKTQLLTAIPTSEPTGLEATAAST STLPAGEGPKGEAVVLPEVEPGLTAREQEATPRPRETTQLPHTH LASTTTATTAEPATSHPHRDMQPGHHETSTPAGPSQADLHTPHT EDGGPSATERAAEDGASSQLPAAEGSGEQDFTFETSGENTAVVAV EPDRRNQSPVDQGATGASQGLLDRKEVLGGVIAGGLVGLIFAVCL VGFMLYRMKKKDEGSYSLEEPKQANGGAYQKPTKQEEFYA
EPHA2	33	MELQAARACFALLWGICALAAAAAQGKEVVLLDFAAAGGELGWLT HPYGGKGDLMQNMNDMPIYMYSCNVMSGDQDNWLRTNWNVYRGE AERIFIELKFTVRDCNSFPGGASSCKETFNLYYAESDLDYGTNFQ KRLFTKIDTIAPDEITVSSDFEARHVKNVEERSVGPLTRKGFYL AFQDIGACVALLSVRVYKKCPPELLQGLAHFPETIAGSDAPSLAT VAGTCVDHAVVPPGGEEPRMHCAVDGEWLVPVIGQCLCQAGYEKVE DACQACSPGFFKFEASESPCLECPEHTLPSPEGATSCCEEGFFR APQDPASMPCTRPPSAPHYLTAVGMGAKVELRWTPPDSSGGREDI

		VYSVTCEQCWPESGECGPCEASVRYSEPPHGLTRTSVTVSDLEPH MNYTFTVEARNGVSGLVTSRSFRTASVSINQTEPPKVRLEGRSTT SLSVSWSI PPPQQSRVWKYEVITYRKKGDSNSYNVRRTTEGFSVTL DLAPDTTYLVQVQALTQEGQGAGSKVHEFQTLSPEGSGNLAVIGG VAVGVVLLVLVLAGVGGFIHRRRNQRARQSPEDVYFSKSEQLKPL KTYVDPHTYEDPNQAVLKFTTEIHPSCVTRQKVIGAGEFGEVYKG MLKTSSGKKEVPVAIKTLKAGYTEKQRVDFLGEAGIMGQFSHHNI IRLEGVISKYKPMMIITEYMENGALDKFLREKDGESVLQVLGML RGIAAGMKYLANMNYVHRDLAARNILVNSNLVCKVSDFGLSRVLE DDPEATYTTSGGKIPIRWTAPEAISYRKFTSASDVWSFGIVMWEV MTYGERPYWELSNHEVMKAINDGFRLPMPDCPSAIYQLMMQCWQ QERARRPKFADIVSILDKLIRAPDSLKTLDADFDPVRSIRLPSTSG SEGVPPFRTVSEWLES IKMQQYTEHFMAAGYTAIEKVVMQMTNDDIK RIGVRLPGHQKRIAYSLGLKQVNTVGIPI
MSLN	94	MALPTARPLLGSCGTPALGSLFLFLSLGWVQPSRTLGETGQEA APLDGVLANPPNISSLSRQLLGFPCAESVGLSTERVRELAVALA QKNVKLSTEQLRCLAHRLSEPPEDLDALPLDLLFLNPDASFSGPQ ACTRFFSRITKANVDLLPRGAPERQRLPAALACWGVRSLLSEA DVRALGLGLACDLPGRFVAESAELVLPRLVSCPGPLDQDQQAARA ALQGGGPPYPGPSTWSVSTMDALRGLLPVLGQPIIRSI PQGIVAA WRQRSSRDPSWRQPRTILRPRFRREVEKTACPSGKKAREIDESL IFYKKWELEACVDAALLATQMDRVNAIPFTYEQLDVLKHKLDLEY PQGYPESVIQHLGYLFLKMSPEDIRKWNVTSLCTLKALLEVNKGH EMSPQAPRPLPQVATLIDRFVKGRGQLDKDLDLDTLTAIFYPGYLC SLSPEELSSVPPSSIWAVRPQDLDTCDPRQLDVLYPKARLAFQNM NGSEYFVKIQSFLGGAPTEDLKALSQQNVSMDLATFMKLRTDAVL PLTVAEVQKLLGPHVEGLKAEERHRPVRDWILRQRQDDLDLTLGLG LQGGIPNGYLVLDLSMQEALSGTPCLLGGPGPVLTVLALLLASTLA
FOLH1	95	MWNLLHETDSAVATARPRWLCAGALVLAGGFFLLGLFLGWFIKS SNEATNITPKHNMKAFLDELKAENIKKFLYNFTQIPHLAGTEQNF QLAKQIQSQWKEFGGLDSVELAHYDVLLSYPNKTHPNYISINEDG NEIFNTSLFEPPPPGYENVSDIVPPSAFSPQGMPEGDLVYVNYA RTEDFFKLERDMKINCSGKIVARIYGVFRGNKVKNQLAGAKGV ILYSDPADYFAPGVKSYPDGWNLPGGGVQRGNI LNNGAGDPLTP GYPANAYARRGIAEAVGLPSIPVHPIGYDAQKLEKMGGSAPP DSSWRGSLKVPYNVGPGETGNFSTQKVKMHIHSTNEVTRIYNVIG TLRGAVEPDRYVILGGHRDSWVFGGIDPQSGAAVVHEIVRSFGTL KKEGWRPRRTILFASWDAEEFGLLGSTEWAEENSRLQERGVAYI NADSSIEGNYTLRVDCTPLMYSLVHNLTKELKSPDEGFEGKSLYE SWTKKSPSPFSGMPRISKLGSNDFEVFFQRLGIASGRARYTKN WETNKFSGYPLYHSVYETIELVEKFYDPMFKYHLTVAQVRGGMVF ELANSIVLPFDCRDYAVVLRKYADKIYS ISMKHPQEMKTYSVSFD SLFSAVKNFTEIASKFSERLQDFDKSNPIVLRMMNDQMLFLERAF IDPLGLPDRPPFYRHVIYAPSSHNKYAGESFPGIYDALFDIESKVD PSKAWGEVKRQIYVAAFTVQAAAETLSEVA
CDH6	96	MRTYRYFLLLFVWGQPYPTLSTPLSKRTSGFPAKKRALELSGNSK NELNRSKRSMWNQFFLLEEYTGSDYQYVGKLHSDQDRGDSGLKY ILSGDGAGDLFIINENTGDIQATKRLDREEKPVYILRAQAINRRT GRPVEPESEFIIKIHDINDNEPIFTKEVYTATVPMSDVGTFFVVQ VTATDADDPYGNASAKVVYSILQGGPYFVSVESETGIIKTALLNMD RENREYQVVIQAKDMGGQMGLSGTTVNITLTDVNDNPPRFPQ STYQFKTPESSPPGTPIGRIKASDADVGENAEIEYSITDGEGLDM FDVITDQETQEGIIITVKKLLDFEKKKVYTLKVEASNPHYEPFLY LGPFKDSATVRIVVEDVDEPPVFSKLAYILQIREDAQINTTIGSV TAQDPDAARNPVKYSVDRHTMDRIFNIDSGNGSIFTSKLLDRET LLWHNITVIATEINNPKQSSRVPLYIKVLDVNDNAPEFAEFYETF VCEKAKADQLIQTLHAVDKDDPYSGHQFSFSLAPEAASGSNFTIQ DNKDNTAGILTRKNGYNRHEMSTYLLPVVISDNNDYPVQSSTGTVT VRVCACDHHGNMQSCHAEALIHPTGLSTGALVAILLCIVILLVTV

		VLFAALRRQRKKEPLIISKEDIRDNIIVSYNDEGGGEEDTQAFDIG TLRNPEAIEDNKLRRDIVPEALFLPRRTPTARDNTDVRDFINQRL KENDTDPTAPPYDSLATYAYEGTGSVADSLSSLESVTTDADQDYD YLSDWGPREFKKLADMYGGVDSKDSD
CEACAM5	97	MESPSAPPHRWCIIPWQRLLLTASLLTFWNPPTTAKLTIESTPFNV AEGKEVLLLVHNLPHQLFGYSWKGERVDGNRQIIGYVIGTQQAT PGPAYSGREIIYPNASLLIQNIIQNNDTGFTLHVIKSDLVNEEAT GQFRVYPELPKPSISSNNSKPVEDKDAVAFTCEPETQDATYLLWWV NNQSLPVSRLQLSNGNRTLTLFNVTRNDTASYKCETQNPVSARR SDSVILNVLYGPDAPTISPLNTSYRSGENLNLSCHAASNPPAQYS WVFVNGTFQQSTQELFIPNITVNNSGSYTCQAHNSDTGLNRTVTVT ITVYAEPPKPFITSNNSNPFVEDEDAVALTCEPEIQNTTYLWWVNN QSLPVSRLQLSNDNRTLTLFSVTRNDVGPYECGIQNKLSVDHSD PVILNVLYGPDPTISPSYTYRPGVNLSSLSCHAASNPPAQYSWL IDGNIQQHTQELFISNITEKNSGLYTCQANNSASGHSRTTVKTIT VSAELPKPSISSNNSKPVEDKDAVAFTCEPEAQNTTYLWWVNGQS LPVSPRLQLSNGNRTLTLFNVTRNDARAYVCGIQNSVSANRSDPV TLDVLYGPDPTIISPDPSSYLSGANLNLSCHSASNPPSPQYSWRIN GIPQQHTQVLFIAKITPNNNGTYACFVSNLATGRNNSIVKSITVS ASGTSPGLSAGATVGIMIGVLVGVALI
CFC1B	98	MTWRHHVRLFTVSLALQIINLGNSYQREKHNGGREEVTKVATQK HRQSPNLWNTSSHFGVEVTGSAEGWGPEEPLPYSWAFGEGASARPC CRNGGTCVLGSFCVCPAHFTGRYCEHDQRRSECGALEHGAWTLRA CHLCRCIFGALHCLPLQTPDRCDPKDFLASHAHGPSAGGAPSLLL LLPCALLHRLLRPDAPAHPRSLVPSVLQRERRPCGRPGLGHRL
ENPP3	99	MESTLTATEQPVKKNTLKKYKIACIVLLALLVIMSLGLGLGLGL RKLEKQSGCRKKCFDASFRGLENCRCDVACKDRGDCCWDFEDTCV ESTRIWMCNKFRCGETRLASLCSCSDCLQRKDCCADYKVCQG ETSWLEENCDAQQSQCEGFDLPPVILFSMDGFRAEYLYTWDTL MPNINKLKTGCIHISKYMRAMYPTKTFPNHYTIVTGLYPESHGII NNMYDVNLNKNFSLSSKEQNNPAWHGQPMWLTAMYQGLKAATYF WPGSEVAINGSFPSIYMPYNGSVPFEEIRSTLLKWLDPKAERPR FYTMFYEEPDSGSHAGGPVSARVIKALQVVDHAFGLMEGLKQRN LHNCVNIILLADHGMDQTYCNKMEYMTDYFPRINFFYMYEGPAPR IRAHNIPHDFFSFNSEIIVRNLSCKRPDQHFHPYLPDLPKRLHY AKNVRIDKVLHFDVQQLAVRSKNTNCGGGNHGYNNEFRSMEA FLAHGPSFKEKTEVEPFENIEVYNLMCDLLRIQPAPNNGTHGSLN HLLKVPFYEPSHAEEVSKFSVCGFANPLPTESLDCFCPHLQNSTQ LEQVNQMLNLTQEEITATVKVNLFPGRPRVLQKNVDHCLLYHREY VSGFGKAMRMPMWSSYTVPQLGDTSLPPTVPDCLRADVRVPPSE SQKCSFYLDKNITHGFLYPASNRTSDSQYDALITSNLVPMYEE FRKMWDYFHSVLLIKHATERNGVNVVSGPIFDYNYDGHFADPEI TKHLANTDVPIPTHYFVVLTSCKNKSHTPENCPGWLDVLPFIIPH RPTNVESCEPGKPEALWVEERFTHAHARVRDVELLTGLDFYQDKV QPVSEILQLKTYLPTFETTI
FOLR1	100	MAQRMTTQLLLLLLVWVAVVGEAQTRIAWARTELLNVMCNAKHHKE KPGPEDKLHEQCRPWRKNACCSTNTSQEAHKDVSYLRFNWNHCG EMAPACKRHFIQDTCLYECSPNLGPWIIQQVDQSWRKERVNLVPLC KEDCEQWWEDCRTSYTCKSNWHKGWNWTSGFNKCAVGAACQPFHF YFPTPTVLCNEIWTSHYKVSNSYRSGSGRCIQMWFDPAQGNPNEEV ARFYAAAMSAGAPWAAWPFLLSLALMLLWLLS
HAVCR1	101	MHPQVVILSLILHLADSVAGSVKVGGEAGPSVTLPCHYSGAVTSM CWNRGSCSLFTCQNGIVWTNGTHVTRYKRDTRYKLLGDLRRDVS TIENTAVSDSGVYCCRVHRGWFNMDKITVSLEIVPPKVTTPIV TTVPTVTVTSTTTPVTTPVTTPVTTPVTTPVTTPVTTPVTTPVT TMTVSTTTSVPTTTSIPTTTSVPVTTTVSTFVPPMPLPRQNHPEV ATSPSSQPAETHPTTLQGAIRREPTSSPLYSYTTDGNNDVTTESS DGLWNNNTQLFLEHSLLTANTTKGIYAGVCISVLVLLALLGVII AKKYFFKKEVQQLSVSFSSLQIKALQNAVEKEVQAEDNIYIENSL

		YATD
KIT	102	MRGARGAWDFLCVLLLLLRVQTGSSQPSVSPGEPSPPSIHPGKSD LIVRVGDEIRLLCTDPGFVKWTFEILDETENENKQNEWITEKAEAT NTGKYTCTCNKHGLSNSIYVFVRDPAKLFLVDRSLYGKEDNDTLVR CPLTDPEVTNYSLSKGCQKGKPLPKDLRFIPDPKAGIMIKSVKRAYH RLCLHCSVDQEGKSVLSEKFILKVRPAFKAVPVVSVSKASYLLRE GEEFTVTCTIKDVSSSVYSTWKRENSQTKLQEKYNSWHHGFNYE RQATLTISSARVNDSGVFMCIYANNTFGSANVTTLLEVVDKGFINI FPMINTTVFVNDGENVDLIVEYEAFKPEHQQWIYMNRTFTDKWE DYPKSENESENIRYVSELHLTRLKGTEGGTYTFLVSNSDVNAIAF NVYVNTKPEILTYDRLVNGMLQCVAAGFPEPTIDWYFCPGTEQRC SASVLPVDVQTLNSSGPPFPGKLVVQSSIDSSAFKHNGTVECKAYN DVGKTSAYFNFAFKGNNKEQIHPHTLFTPLLIGFVIVAGMMCIIV MILTYKYLQKPMYEVQWKVVEEINGNNYVYIDPTQLPYDHKWEFP RNRLSFGKTLGAGAFGVVEATAYGLIKSDAAMTVAVKMLKPSAH LTEREALMSELKVLSYLGNHMNIIVNLLGACTIGGPTLVITEYCCY GDLLNFLRRKRDSFICSKQEDHAEALYKNLLHSSKSSCSSTNE YMDMKPGVSYYVPTKADKRRSVRIGSYIERDVTAIMEDDELALD LEDLLSFYSYQVAKGMAFLASKNCIHRDLAARNILLTHGRITKICD FGLARDIKNDSNYVVGKNARLPVKWMAPEISFNCVYTFESDVWSY GIFLWELFSLGSSPYGMPVDSKFYKMIKEGFRMLSPEHAPAEY DIMKTCWDADPLKRPTFKQIVQLIEKQISESTNHIYSNLANCSPN RQKPVDHDSVRINSVGSTASSSQPLLHVHDDV
MET	103	MKAPAVLAPGILVLLFTLVQSRNGECKEALAKSEMNVNMKYQLPN FTAETPIQNVILHEHHIFLGATNYIYVLNEEDLQKVAEYKTGPVL EHPDCFCPCQDCSSKANLSGGVWKNINMALVVDYDDQLISCGS VNRGTCQRHVFPNHNTADIQSEVHCIFSPQIEEPSQCPDCVVSAL GAKVLSSVKDRFINFFVGNTINSSYFPDHPHLSISVRRLKETKDG FMFLTDQSYIDVLPEFRDSYPIKYVHAFESNNFIYFLTQVRETLD AQTFHTRIIRFCSINSLHSYMEMPLECILTEKRKKRSTKKEVFN ILQAAVYSKPGAQLARQIGASLNDDILFGVFAQSKPDSAPMDRS AMCAFFIKYVNDFFNKIVNKNNVRLQHFGYGNHEHCENRLLRN SSGCEARRDEYRTEFTTALQRVDLFMGQFSEVLLTSISTFIKGD TIANLGTSEGRFMQVVVSRSRGPSTPHVNFLDLSHPVSPEVIVEHT LNQNGYTLVITGKKITKIPLNGLGCRHFQSCSQCLSAPPFVQCGW CHDKCVRSEECCLSGTWQICLPAIYKVFNPNSAPLEGGTRLTICG WDFGFRNNKFDLKKTRVLLGNESCTLTLESTMTNLKCTVGPAM NKHFNMSIIISNGHGTQYSTFSYVDPVITSISPKYGPMAGTLL TLTGNYLNSGNSRHSIGGKTCTLKSVSNSILECYTPAQTISTEF AVKLKIDLANRETSIFSYREDPIVYEHPTKSFISGGSTITGVGK NLNSVSVPRMVINVEAGRNFVACQHRNSNEICCTTPSLQQLN LQLPLKTKAFFMLDGLSKYFDLIYVHNPFVKPFKPVMMISMNE NVLEIKGNDIDPEAVKGEVLKVGKNSCENIHLHSEAVLCTVPNDL LKLNSSELNIEWKQAISSTVLGKVIQPDQNFGLIAGVVISITAL LLLGLFFWLKKRKQIKDLGSELVRYDARVHTPHLDRLVSARSVS PTTEMVSNESVDYRATFPEDQFPNSSQNGSCRQVQYPLTDMSPIL TSGSDSISSPQLQNTVHIDLSALNPVLQAVQHVVIGPSSLIVHF NEVIGRGHFGCVYHGTLLDNDGKKIHCAVKSINRITDIGEVSQFL TEGIIMKDFSHPNVLSLLGICLRSEGSPLVVLPMKHGDLNRFIR NETHNPTVKDLIGFGLQVAKGMKYLASKKFVHRDLAARNCMLDEK FTVKVADFGLARDMYDKEYYSVHNKTGAKLPVKWMALESLOTQKF TTKSDVWSFGVLLWELMTRGAPPYPDVNTFDITVYLLQGRRLQF EYCPDPLYEVMKLCWHPKAEMRPSFSELVSRISAIFSTFIGEHYV HVNATYVNVKCVAPYPSLLSSEDNADDEVDTRPASFWETS
MUC16	104	MLKPSGLPGSSSPTRSLMTGSRSTKATPEMDSGLTGATLSPKTST GAIVVTEHTLPFTSPDKTLASPTSSVVGRTTQSLGVMSSALPEST SRGMTHSEQRTSPSLSPQVNGTPSRNYPATSMVSGLSPPRTRTSS TEGNFTKEASTYTLTVETTSGPVTEKYTVPTETSTTEGDSTETPW DTRYIPVKITSPMKTFADSTASKENAPVSMTPAETTVTDSHTPGR

		TNPSFGTLYSSFLDLSPKGTPNRGETSLELILSTTGYPFSSPEP GSAGHSRISTSAPLSSASVLDNKISETSIIFSGQSLTSPLSPGVP EARASTMPNSAIPFSMTLSNAETSAERVRSTISSLGTPSISTKQT AETILTFHAFaETMDIPSTHIAKTLASEWLGSPGTGGTSTSTALT TTSPSTTLVSEETNTHHSTSGKETEGTLNTSMTPLETSAPGESE MTATLVPTLGFTTLDKIRSPSQVSSSHPTRELRTTGSTSGRQSS STAAHGSSDILRATTSSSTSKASSWTSESTAQQFSEPQHTQWVETS PSMKTERPPASTSVAAPITTSVPSVVSFGFTTLKTSSTKGIWLEET SADTLIGESTAGPTTHQFAVPTGISMTGGSSSTRGSQGTTHLLTRA TASSETSADLTATNGVPVSVSPAVSKTAAGSSPPGGTKPSYTMV SSVIPETSSLQSSAFREGTSLGLTPLNTRHPFSSPEPDSAGHTKI STSIPLLSSASVLEDKVSATSTFHHKATSSITGTPEISTKTKP SSAVLSSMTLSNAATSPEVRNATSPLTHPSPSGEETAGSVLTLT TSAETTDSPNIHPTGTLTSESSESPSTLSLPSVSGVKTTFSSSTP STHLFTSGEETEETSNPVSQPETSVSVRVTTLASTSVPTPVFPT MDTWPTRSAQFSSSHLVSELRATSSSTSVTNSTGSALPKISHLTGT ATMSQTNRDFTNDSAAPQSTTWPETSPRFKTGLPSATTTVSTSAT SLSATVMVSKFTSPATSSMEATSIREPSTTILTTETTINGPGSMAV ASTNIPIGKGYITEGRDTSHLPIGTTASSETSMDFTMAKESVSM SVSPSQSMDAAGSSTPGRTSQFVDTFSDDVYHLTSREITIPRDT SSALTPQMTATHPPSPDPGSARSTWLGILSSSPSSPTPKVTMSST ESTQRVTTSMIMDTVETSRWNMPNLPSTTSLTPSNIPTSGAIGKS TLVPLDTPSPATSLASEEGGLPTLSTYPESTNTPSIHLGAHASSE SPSTIKLTMASVVKPGSYTPLTFPSIETHIHVSTARMAYSSGSSP EMTAPGETNTGSTWDPTTYITTTDPKDTSSAQVSTPHSVRTLRTT ENHPKTESATPAAYSGSPKISSSPNLTPATKAWTITDTEHSTQ LHYTKLAEKSSGFETQSAPGPVSVVIPTSPPTIGSSSTLELTSVPG EPLVLAPSEQTTITLPMATWLSTSLTEEMASTDLDISPSSPMGT FAIFPPMSTPSHELKSEADTSAIRNTDSTTLDQHLGIRSLGRGTG DLTTVPITPLTTTWTSVIEHSTQAQDTLSATMSPHTVTSQSLKDT SIPASASPSHLTEVYPELGTQGRSSSEATTFWKPSTDTLSREIET GPTNIQSTPPMDNTTTGSSSSGVTLGIAHLPIGTSSPAETSTNMA LERRSSTATVSMAGTMGLLVTSAPGRSISQSLGRVSSVLSESTTE GVTDSKSGSSPRLNTQGNALSSSLEPSYAEGSQMSTSIPLTSSP TTPDVEFIGGSTFWTKEVTTVMSTDISKSSARTESSSATLMSAL GSTENTGKEKLRTASMDLPSPTPSMEVTPWISLTLNAPNTDLSL DLSHGVTSSAGTLATDRSLNTGVTRASRLENGSDTSSKSLSMGN STHTSMTYTEKSEVSSSIHPRPETSAPGAETTLTSTPGNRAISLT LPFSSIPVEEVISTGITSGPDINSAPMTHSPITPPTIVWTSSTGTI EQSTQPLHAVSSEKVSQVQTQSTPYVNSVAVSASPTHENSVSOGSS TSSPYSSASLESLDSTISRRNAITSWLWDLTSLPTTTWPSTSL EALSSGHSGVSNPSSSTTEFFPLFSAASTSAKQRNPETETHGPQN TAASTLNTDASSVTGLSETFVGASISSEVPLPMAITSRSDVSGLT SESTANPSLGTASSAGTKLRTISLPTSESLVFRMNKDPWTVSI PLGSHPTTNTETSIPVNSAGPPGLSTVASDVIDTPSDGAESIPTV SFSPSPDTEVTTISHFPEKTTTHSFTISSLTHELTSRVTPPIPGDW MSSAMSTKPTGASPSITLGERRTITSAAPTTSPIVLTASFETST VSLDNETTVKTSIDILDARKTNELPSDSSSSSDLINTSIASSSTMDV TKTASISPTISGMTASSSPSLFSSDRPQVPTSTTETNTATSPSV SSNTYSLDGGSNVGGTPSTLPPFTITHPVETSSALLAWSRPVRTF STMVSTDATASGENPTSSNSVVTSPAPGTWTSVGSTTDLPAMGFL KTSPAGEAHSLLASTIEPATAFTPHLSAAVVTGSSATSEASLLTT SESKAIHSSPQTPTTPTSGANWETSATPESLLVVTETSDTTLTSK ILVTDITILFSTVSTPPSKFPSTGTLSGASFPTLLPDTPAIPLTAT EPTSSLATSFDSSTPLVTIASDSLGTVPETTLTMSSETSNGDALVLK TVSNPDRSIPGITIQQVTESPLHPSSTSPSKIVAPRNTTYEGSIT VALSTLPAGTTGSLVFSQSSSENSETTALVDSSAGLERASVMPLTT GSQGMASGGIRSGSTHSTGTGTFSSSLPLTMNPGEVTAMSEITTN RLATATQSTAPKGI PVKPTSAESGLLTPVSASSSPSKAFASLTAP
--	--	--

		PTWGI PQSTLTFFEFSEVPSLDTKSASLPTPGQSLNTIPDSDASTA SSSLSKSPEKNPRARMMTSTKAISASSFQSTGFTETPEGSASPSM AGHEPRVPTSGTGDPYASESMSYPDPKASSAMTSTSLASKLTT LFSTGQAARSGSSSSPISLSTEKETSFLSPTASTSRKTSFLGLGPS MARQPNILVHLQTSALTLSPTSTLNMSQEEPELTSSQTIABEEG TTAETQTLTFTPSETPTSLLPVSSPTEPTARRKSSPETWASSISV PAKTSLVETTDGTLVTTIKMSSQAAQGNSTWPAEETGSSPAGT SPGSPPEMSTTLKIMSSKEPSISPEIRSTVRNSPWKTPETVPMET TVEPVTLQSTALGSGSTSISHLPTGTTSPKSPTENMLATERVSL SPSPPEAWTNLYSGTPGGTRQSLATMSSVSLESPTARSITGTGQQ SSPELVSKTTGMEFSMWHGSTGGTTGDTHVSLSTSSNILEDPVTS PNSVSSSLTDKSKHKTETWVSTTAIPSTVLNNKIMAAEQQTSRSVD EAYSSSTSSWSDQTSGSDITLGASPDVNTNTLYITSTAQTLVSLP SGDQGITSLTNPSSGGKTSSASSVTSPSIGLETLRANVSAVKSDIA PTAGHLSQTSPPAEVSLDVTAPTAPGISTTTITMTGNTSISTTTP NPEVGMSTMDSTPATERRTTSTEHPSTWSSTAASDSWTVTDMTSN LKVARSPGTISTMHTTSFLASSTELDSMSTPHGRITVIGTSLVTP SSDASAVKTETSTERTLSPSDTTASTPISTFSRVQRMSISVPDI LSTSWTPSSSTEADVPVSMVSTDHASTKTDPNPLSTFLFDSLST LDWDTGRSLSSATATTSAPQGATTQELTLETMISPATSQLPFSI GHITSAVTPAAMARSSGVTFSRPDPTSCKAEQTSQLPSTTSAPH GQVPRSAATTLDVIPHAKTPDATFQRQQTALTTEARATSDSWN EKEKSTPSAPWITEMMNSVSEDTIKEVTSSSSVLRLNTLDINLE SGTSSSPWKSSPYERIAPESESTDKEAHPSTNTVETTGWVTS EHASHSTIPAHSASSKLTSPVVTTSTREQAIVSMSTTTWPESTRA RTEPNSTFLTELDRVSPYMDTSSTTQTSIISSPGSTAITKGRTE ITSSKRISSSFLAQSMRSDSPSEAITRLSNFPAMTESGGMILAM QTSPPGATSLSAPTLDTSATASWTGTPLATTQREFYTKTDLFSK GPEDTSQSPSPSVEETSSSSSLVPIHATTSPSNILLTSQGHSPSS TPPVTSVFLSETSGLGKTTDMSRISLEPGTSLPPNLSSTAGEALS TYEASRDTKAIHHSADTAVTNMEATSSEYSPPIPGHTKPSKATSPL VTSHIMGDISSSTSVFGSSETTEIETVSSVNQGLQERSTSQVASS ATETSTVITHVSSGDATTHVTKTQATFSSGTSISSPHQFITSTNT FTDVSTNPSTSLIMTESSGVTITTTQTGPTGAATQGPYLLDSTMP YLTETPLAVTPDFMQSEKTTLISKGPKDVSWTSPPSVAETSYPSS LTPFLVTTIPPATSTLQGHSTSSPVSATSVLTSGLVKTTMDLNTS MEPVTNSPQNLNPNSEILATLAATTDIETIHPSINKAVTNMGTA SSAHVLHSTLPVSSEPSTATSPMVPASSMGDALASISIPGSETTD IEGETSSSLTAGRKENSTLQEMNSTTESNIIILSNVSVGAITEATK MEVPSFDATFIPTPAQSTKFPDIFSVASSRLSNSPPMTISTHMTT TQTGSSGATSKIPLALDTSTLETSAGTPSVVTEGFAHSKITAMN NDVKDVSTNPPFQDEASSPSSQAPVLVTTLPSSVAFTPWWHSTS SPVSMSSVLTSSSLVKTAGKVDTSLETVTSSPQMSNTLDDISVTS AATTDIETHPSINTVVTVNGTTGSAFESHSTVSAYPEPSKVTSP NVTTSTMEDTTISRSIPKSSKTRTETETTSSLTPKLRETSISQE ITSSTETSTVPYKELTGATTEVSRDVTSSSSSTSFPGPDQSTVSL DISTETNTRLSTSPIMTESAEITITTQTGPHGATSQDFTTMDPSN TTPQAGIHSAMTHGFSQLDVTTLMSRIPQDVSWTSPPSVDKTSSP SSFLSSPAMTTPSLISSTLPEDKLSPPMTSLLTSGLVKITDILRT RLEPVTSSLPNFSSTSDKILATSKDSKDTKEIFPSINTEETNVKA NNSGHESHSPALADSETPKATTQMVITTTVGDPAPSTSMPVHGSS ETTNIKREPTYFLTPRLRETSTSQESSFPTDTSFLLSKVPTGTIT EVSSTGVNSSSKISTPDHDKSTVPPDTFTGEIPRVFTSSIKTKSA EMTITTQASPPESASHSTLPLDTSTTSLQGGTHSTVTQGFYSEV TTLMGMPGNVSWMTTPPVEETSSVSSLMSSPAMTSPSPVSSSTSP QSIPSSPLPVTALPTSVLVTTTDLVLTGTTSPESVTSSPPNLSITH ERPATYKDTAHTAAMHHSTNTAVTNVGTSGSGHKSQSSVLADSE TSKATPLMSTTSTLGDTSVSTSTPNISQTNQIQTEPTASLSPRLR ESSTSEKTSSTTETNTAFSYVPTGAIQASRTEISSRSTISDLD
--	--	---

		RPTIAPDISTGMITRLFTSPIMTKSAEMTVTTQTTTPGATSQGIL PWDSTSTTLFQGGTHSTVSQGFPHSEITTLRSRTPGDVSWMTTPPV EETSSGFSLMSPSMTSPSPVSSTSPESIPSSPLPVTALLTVLVT TTNVLGTTSPPEPVTSSPPNLSSPTQERLTTYKDTAHEAMHASMH TNTAVANVGTSISGHESQSSVPADSHTSKATSPMGITFAMGDTSV STSTPAFFETRIQTESTSSLIPGLRDTRTSEEINTVTETSTVLSE VPTTTTTTEVSRTEVITSSRTTISGPDHSMSPYISTETITRLSTF PFVTGSTEMAITNQTPIGTISQATLTLDTSSSTASWEGTHSPVTQ RFPHSEETTTMSRSTKGVSWQSPPSVEETSSPSPVPLPAITSHS SLYSAVSGSSPTSALPVTSLTSGRRKTIDMLDTHSELVTSSLPS ASSFSGEILTSEASTNTETIHFSENTAETNMGTNSMHKLHSSVS IHSQPSGHTPPKVTGSMMEDAIVSTSTPGSPETKNVDRDSTSPLT PELKEDSTALVMNSTTESNTVFSSVSLDAATEVSRAEVTTYDPTF MPASAQSTKSPDISPEASSSHSNPPLTISTHKTATQTGPSGV SLGQLTLDTSTIATSAGTPSARTQDFVDSETTSMVNNDLNVLKT SPFSAEEANSLSSQAPLLVTTSPSPVTSTLQEHSTSSLVSVTSVP TPTLAKITDMDTNLEPVTRSPQNLRLTLATSEATDTHMTSPIN TAVANVGTTSSPNEFYFTVSPDSDPYKATSAVVTSTSGDSIVST SMPRSSAMKKIESETTFLIFRLRETSTSQKIGSSSDTSTVFDKA FTAATTEVSRTELTSSRTSIQGTETKPTMSPDSTRSVTMLSTFA GLTKSEERTIATQTGPHRATSQGTTLTWDTSITTSQAGTHSAMTHG FSQLDLSTLTSRVPEYISGTSPPSVEKTSSSSSLLSLPAITSPSP VPTTLPESRPSSPVHLTSLPTSGLVKTTDMLASVASLPPNLGSTS HKIPTTSEDIDKDEKMPSTNIAVTNVGTTTSEKESYSSVPAYSE PPKVTSPMVTSTFNIRDITIVSTSMPGSSSEITRIEMESTFSLAHGLK GTSTSQDPIVSTEKSAVLHKLTTGATETSRTEVASSRRTSIPGPD HSTESPDISTEVIPLSLGITESSNMTIITRTGPPLGSTSQGT FTLDTPTTSSRAGTHSMATQEFPHSEM TTVMNKDPEILSWTIPPS IEKTSFSSSLMPSPAMTSPPVSSSTLPKTIHTTSPMSTSLTPSLV MTTDTLGTSPPEPTTSSPPNLSSSTSEILTTDEDTTAEAMHPTST TAATNVETTSSGHGSQSSVLADSEKTKATAPMDTTSTMGHTTVST SMSVSSSETTKIKRESTYSLTPGLRETSISQNASFSDTSTIVLSEV PTGTTAEVSRTEVTSSGRTSIPGPSQSTVLPEISTRMTRLFASP TMTESAEMTIPTQTGPSGSTSQDTLTLDTSTTKSQAKTHSTLTQR FPHSEM TLMRGPDMQSSPSPLENPSSSLPSLLSLPATTSPFP ISSTLPVTISSSPLPVTSLTSSPVTTTDMHLTSPLETSPPKL SHTSDERLTGKDTTNTAEVHPSTNTAASNVEIPSSGHESPSSAL ADSETSKATSPMFITSTQEDTTVAISTPHFLETSTRIQKESISSLS PKLRETGSSSVETSSAIETSAVLSEVSI GATTEISRTEVTSSRTS ISGSAESTMLPEISTTRKIIKFPTSPILAESSEMTIKTQTSPPGS TSESTFTLDTSTTPSLVITHSTMTQRLPHSEITTLVSRGAGDVPR PSSLPVEETSPSSQLSLSAMISPPVSSSTLPASSHSSSSASVTS LTPGQVKTEVLDAEAPETSSPPSLSSSTSEILATSEVTTDTEK IHPFSNTAVTKVGTSSSGHESPSSVLPDSETTKATSAMGTISIMG DTSVSTLTALSNTRKIQSEPASSLTTRLRETSTSEETSLATEAN TVLSKVSTGATTEVSRTEAISFSRTSMGPEQSTMSQDISIGTIP RISASSVLTESAKMTITTQTGPSESTLESTLNLNTATTPSWVETH SIVIQGFPHPEMTTSMGRGPGGVSWSPPPFVKETSPSSPLSLPA VTSPHPVSTTFLAHI PPSPLPVTSLTSGPATTTDILGTSTEPGT SSSSSLSTTSHERLTTYKDTAHEAVHPSTNTGGTNVATTSSGYK SQSSVLADSSPMCTTSTMGDTSVLTSTPAFLETRRIQTELASSLT PGLRESSGSEGTSSGTMSTVLSKVPTGATTEISKEDVTSIPGPA QSTISPDISTRTVSWFSTSPVMTESAEITMNTHTSPLGATTQGT TLDTSSSTSLTMTHSTISQGFSSHQMS TLMRRGPEDEVSWMSPPLL EKTRPSFSLMSPATTSPSPVSSSTLPESISSSPLPVTSLTSGLA KTTDMLHKSSEPVTNSPANLSSTSEILATSEVTTDTEKTHPSSN RTVTDVGTSSSGHESTSFVLADQTSKVTPMVITSTMEDTSVST STPGFFETSRIQTEPTSSLTGLLRKTSSEGTSLATEMSTVLSGV PTGATAEVSRTEVTSSRTSISGFAQLTVSPETSTETITRLPTSS
--	--	---

		IMTESAEMMIKTQTDPPGSTPESTHTVDISTTPNWNVETHSTVTQR FSHSEMTTLVSRSPGDMLWPSQSSVEETSSASSLLSLPATTSPSP VSSSTLVEDEFPSASLPVTSLLNPGLVITTD RMGISREPGTSSTSNL SSTSHERLTTLEDTVDTEDMQPSTHTAVTNVRSISGHESQSSVL SDSETPKATSPMGTTYTMGETSVSISTSDFFETSRIQIEPTSSLT SGLRETSSSERISSATEGSTVLSEVP SGATTEVSRTEVISSRGTS MSGPDQFTISPDISTEAITRLSTSPIMTESAESAITIETGSPGAT SEGLTLTLDSTTTTFWSGTHSTASPGFSHSEMTTLMSTRPGDVPWP SLPSVEEASSVSSSLSSPAMTSTSFSTLPESISSSPHPVTALLT LGPVKTTDMLRTSSEPETSSPPNLSSTSAEILATSEVTKDREKIH PSSNTPVVNVGTVIYKHLSPSSVLADLVTTKPTSPMATTSTLGNT SVSTSTPAFPETMMTQPTSSSLTSGLREISTSQETSSATERSASLS GMPTGATTKVSRTEALSLGRTSTPGPAQSTISPEISTETITRIST PLTTTGSAEMTITPKTGHSGASSQGTFTLDTSSRASWP GTHSAAT HRSPHSGMTTPMSRGPEDVSWPSRPSVEKTSPPSSSLVLSAVTSP SPLYSTPSESSHSSPLRVTSLFTPVMMKTTDMLDTSLEPVTSP SMNITSDESLATSKATMETEAIQLSENTAVTQMGTISARQEFYSS YPGLPEPSKVTSPVVTSSSTIKDIVSTTIPASSEITRIEMESTSTL TPTPRETSTSQEIHSATKPSTVPYKALTSATIEDSMTQVMSSSRG PSPDQSTMSQDISTEVITRLSTSPIKTESTEMTITTQTGSPGATS RGTLLTLDSTTFMSGTHSTASQGFSSHQM TALMSRTPGDVPWL SH PSVEEASSASFSLSSPVMTSSSPVSSSTLPDSIHSSSLPVTLLTS GLVKTELLGTSSEPETSSPPNLSSTSAEILAITEVTTDTEKLEM TNVVTSGYTHESPSSVLADSVTTKATSSMGITYPTGDTNSVLTSTP AFSDTSRIQTKSKLSLTPGLMETSISEETSSATEKSTVLSSVPTG ATTEVSRTEAISSSRTSIPGPAQSTMSSDTSMETITRISTPLTRK ESTDMAITPKTGPGSGATSQGTFTLDSSTASWP GTHSATTQRFPQ SVVTTTPMSRGPEDVSWPSPLSVEKNSPSSSLVSSSSVTSPGLYS TPSGSSHSSPVPVTSLFTSIMMKATDMLDASLEPETTSAPNMNIT SDESLAASKATTETEAIHV FENTAASHVETTSATEELYSSSPGFS EPTKVISPVVTSSSIRDNMVSTTMPGSSGITRIEIESMSSLTPLGL RETRTSQDITSSSTETSTVLYKMPSGATPEVSRTEVMPSSRTSIPG PAQSTMSLDISDEVVTRLSTSPIMTESAEITITTQTGYSLATSQV TLPLGTSMTFLSGTHSTMSQGLSHSEMNLMSRGPESLSWTSRPF VETTRSSSSSLTSLPLTTSLSPVSSSTLLDSSPSSPLPVTSLILPGL VKTTEVLDTSSSEPKTSSSPNLSSTSV EIPATSEIMTDTEKIHPS NTAVAKVRTSSSVHESHSSVLADSETTITIPSMGITS AVDDTTVF TSNPAFSETRRIPTPTFSLTPGFRETSTSEETTSITETS AVLYG VPTSATTEVSMTEIMSSNRIHIPDSQSTMSPDIITEVITRLSSS SMMSESTQMTITTQKSSPGATAQSTLTLATTTAPLARTHSTVPPR FLHSEMTTLMSTRPENPSWKSSLFVEKTSSSSSLSLPVTTSPSV SSTLPQSI PSSSFVTSLLTPGMVKTTDTSTEPGTSLSPNLSGTS VEILAASEVTTDTEKIHPSSSMAVTNVGTTSSGHELYSSSVIHSE PSKATYPVGTTPSSMAETSISTSM PANFETTGF EAEPFSHLTSGFR KTNMSLDTSSVTPNTTPSSPGSTHLLQSSKTDFTSSAKTSSPDWP PASQYTEIPVDIITPFNASPSITESTGITSFPE SRFTMSVTESTH HLSTDLLPSAETISTGTVMPSLSEAMTSFATTGVPRAISGSGSPF SRTESGPGDATLSTIAESLPSSTPVPFSSSTFTTTDSSTIPALHE ITSSSATPYRVDTS LGTESSTTEGR LVMVSTLDTSSQPGRTSSSP ILDTRMTESVELGTVTSAYQVPSLSTRLTRTDGIMEHITKIPNEA AHRGTIRPVKGPQTSTSPASPKGLHTGGTKRMETTTTALKTTT TA LKTTSRATLTTSVYTPTLGTLTPLNASMQMASTIPTEMMITTPYV FPDVPETTSSLATSLGAETSTALPRTPSVFNRESETTASLVRS GAERSPVIQTLDVSSSEPDTTASWVIHPAETIPTVSKTTPNFFHS ELDTVSSSTATSHGADVSSAIPTNISPS ELDALTPLVTISGDTST TFPTLT KSPHETETRTTWLTHPAETSSSTIPRTIPNFSHHESDATP SIATSPGAETSSAIPIMTVSPGAEDLVTSQVTS SGTDRNMTIPTL TLSPGEPKTIASLVTHPEAQ TSSAIPTSTISPAVSRLVTSMTVTS AAKTSTTNRALTNSPGEPATTVSLVTHPAQTSPTVPWTTTSIFFHS
--	--	---

		KSDTTPSMTTSHGAESSSAVPTPTVSTEVPGVVTPLVTSRAVIS TTIPILTLSPGEPETTPSMATSHGEEASSAIPTPTVSPGVPGVVT SLVTSSRAVTSTTIPIILTFSLGEPETTPSMATSHGTEAGSAVPTV LPEVPGMVTSLVASSRAVTSTTLPTLTLSPGEPETTPSMATSHGA EASSTVPTVSPVPGVVTSVLTSSSGVNSTSIPTLILSPGLETT PSMATSHGAEASSAVPTPTVSPGVSGVVTPLVTSRAVTSTTIPI LTLSSSEPETTPSMATSHGVEASSAVLTVSPEVPGMVTSLVTSSR AVTSTTIPTLTISSEPETTTSLVTHSEAKMISAIPTLAVSPTVQ GLVTSVLTSSGSETSAFNLTVASSQPETIDSWVAHPGTEASSVV PTLTVSTGEFPTNISLVTHPAESSSTLPRTTSRFSHSELDTMPST VTSPEAESSSAISTTISPPIPGVLTSLVTSSGRDISATFPTVPES PHESEATASWVTHPAVTSTTVPRTPPNYSHSEPDTTPSIATSPGA EATSDFPITITVSPDVPDMVTSQVTSSGTDTSITITLTLSSGEPE TTTSFITYSEHTSSAIPTLPVSPGASKMLTSLVISSGTDSTTF PTLTETPYEPETTAIQLIHPAETNTMVPRTTPKFHSHKSDTLPV AITS PGPEASSAVSTTISPDMSDLVTSVLPSSGTDSTTFPTLS ETPYEPETTATWLTHPAETSTTVSGTIPNFSHRGSDTAPSMVTS GVDTRSGVPTTIPPSIPGVVTSQVTSSATDTSTAIPTLTPSPGE PETTASSATHPGTQTGFVPIRTVPSSEPDTMASWVTHPPQTSTP VSRTTSSFSHSSPDATPVMATSPRTEASSAVLTTISPGAPEMVTS QITSSGAATSTTVPTLTHSPGMPETTALLSTHPRTEKTFPAST VFPQVSETTASLTIRPGAETSTALPTQTTSSFLTLLVTGTGRVDL SPTASPGVSAKTAPLSTHPGTETSTMIPTSTLSLGLLETTGLLAT SSSAETSTSTLTLTVSPAVSGLSSASITTDKPQTVTSWNTESTPS VTSVGPPEFSRTVTGTTMTLIPSEMPTPPKTSHGEGVSPTTILRT TMVEATNLATTGSSPTVAKTTTTFNTLAGSLFTPLTTPGMSLTAS ESVTSRTSYNHRSWISTTSSYNRRYWPATSTPVTSTFSPGISTS SIPSSATAATVPFMPVFTLNFTITNLQYEDMRHGPSRKFNATERE LQGLLKPLFRNSSLEYLYSGCRLASLRPEKDSSATAVDAICTHRP DPEDLGLDRERLYWELSNLTNGIQELGPYTLDRNSLYVNGFTHRS SMPTTSTPGTSTVDVGTSGTPSSSPSPPTAGPLLMPFTLNFTITN LQYEDMRRTGSRKFNTMESVLQGLLKPLFKNTSVGPLYSGCRLT LLRPEKDGAATGVDAICTHRLDPKSPGLNREQLYWELSKLTNDIE ELGPYTLDRNSLYVNGFTHQSSVSTSTPGTSTVDLRTSGTPSSL SSPTIMAAGPLLVPFTLNFTITNLQYGEDMGHGPSRKFNTERVL QGLLGPIFKNTSVGPLYSGCRLTSLRSEKDGAATGVDAICHHLD PKSPGLNRERLYWELSQLTNGIKELGPYTLDRNSLYVNGFTHRTS VPTSSTPGTSTVDLGTSGTPFSLPSPATAGPLLVLFTLNFTITNL KYEEDMRHGPSRKFNTERVLQTLGPMFKNTSVGLLYSGCRLTL LRSEKDGAATGVDAICTHRLDPKSPGVDREQLYWELSQLTNGIKE LGPYTLDRNSLYVNGFTHWIPVPTSSTPGTSTVDLGTSGTPSSLPS PTTAGPLLVPFTLNFTITNLKYEEDMHCPGSRKFNTTERVLQSL GPMFKNTSVGPLYSGCRLTLLRSEKDGAATGVDAICTHRLDPKSP GVDREQLYWELSQLTNGIKELGPYTLDRNSLYVNGFTHQTSAPNT STPGTSTVDLGTSGTPSSLPSPTSAGPLLVPFTLNFTITNLQYEE DMHHPGSRKFNTTERVLQGLLGPMFKNTSVGLLYSGCRLTLLRPE KNGAATGMDAICSHRLDPKSPGLNREQLYWELSQLTHGIKELGPY TLDRNSLYVNGFTHRSSVAPTSTPGTSTVDLGTSGTPSSLPSPTT AVPLLVPFTLNFTITNLQYGEDMRHGPSRKFNTERVLQGLLGPL FKNSSVGPLYSGCRLISLRSEKDGAATGVDAICTHHLNPQSPGLD REQLYWQLSQMTNGIKELGPYTLDRNSLYVNGFTHRSSGLTSTP WTSTVDLGTSGTPSPVPSPTTGTPLLVPFTLNFTITNLQYEEENMG HPGSRKFNTITESVLQGLLKPLFKNTSVGPLYSGCRLTLLRPEKD VATRVDAICTHRPDKIPGLDRQQLYWELSQLTHSITELGPYTL RDSLYVNGFTQRSSVPTTSTPGTFTVQPETSETPSSLPGTATGP VLLPFTLNFTITNLQYEDMRHGPSRKFNTERVLQGLLMPLFKN TSVSSLYSGCRLTLLRPEKDGAATRVDAVCTHRPDKSPGLDRER LYWKLSQLTHGITELGPYTLDRHSLYVNGFTHQSSMTTTRTPDTS TMHLATSRTPASLSGPMTASPLLVLFTINFTITNLRYEENMHHPG
--	--	--

		SRKFNTTERVLQGLLRPVFKNTSVGPLYSGCRLTLLRPKKDGAAT KVDAICTYRDPKSPGLDREQLYWELSQLTHSITELGPYTLDRDS LYVNGFTQRSSVPTTSIPGTPTVDLGTSGTPVSKPGPSAASPLL LFTLNFTITNLRYEENMQHPGSRKFNTTERVLQGLLRSLFKSTSV GPLYSGCRLTLLRPEKDGTATGVDAICTHHPDKSPRLDREQLYW ELSQLTHNITELGPYALDNDLSLVNGFTHRSSVSTTSTPGTPTVY LGASKTPASIFGPSAASHLLILFTLNFTITNLRYEENMWPGSRKF NTTERVLQGLLRPLFKNTSVGPLYSGCRLTLLRPEKDGEATGVDA ICTHRPDPPTGPGLDREQLYLELSQLTHSITELGPYTLDRDSL GVNGFTHRSSVPTTSTGVVSEEPFTLNFTINNLRYMADMGPGLKFN ITDNVMQHLSPFLQFQSSSLGARYTGCRVIALRSVKNGAETRVDDL CTYLQPLSGPGLPIKQVFHELSSQQTGHTRLGPYSLDKDSL YNEPGPDEPPTTPKPAFTFLPPLSEATTAMGYHLKTLTLNFTISN LQYSPDMGKGSATFNSTEGVLQHLRLPLFQKSSMGPFYLGCLIS LRPEKDGAATGVDTTCTYHPDPVPGGLDIQQLYWELSQLTHGVTQ LGFYVLDRLDLSLVINGYAPQNLISIRGEYQINFHIVNWNLSNPPTS SEYITLLRDIQDKVTTLYKGSQDLHDTFRFCLVTNLMTDSVLVTVK ALFSSNLDPSLVEQVFLDKTLNASFWHLGSTYQLVDIHVTMESS VYQPTSSSSSTQHLYNFTITNLPSYQDKAQPGTTNYQRNKNIED ALNQLFRNSSIKSYFSDCQVSTFRSVPNRHHTGVDSLNCNFSPLAR RVDRVAIYEEFLMRNTRNGTQLQNFRTLDRSSVLVDGYSPNRNEPLT GNSDLFFWAVILIGLAGLLGVITCLICGVLVTTTRRRKKEGEYNVQ QQCPGYQSHLDLEDLQ
SLC39A6	105	MARKLSVILITLTFALSVTNPLHELKAAAFPTTEKISPNWESGIN VDLAISTRQYHLQQLFYRYGENNSLSVEGFRKLLQNIQIDKIKRI HIHHDHSDHEHSDHERHSDHEHSEHEHSDHSDHSHHNHA ASGKNKRKALCPDHSDSSGKDPNRSQGGKAHRPEHASGRNRVND SVSASEVTSTVYNTVSEGTHTFLETIETPRPGKLFKPKDVSSSTPPS VTSKSRVSLRAGRKTNESVSEPRKGFMYSRNTNENPQECFNASKL LTSHGMGIQVPLNATEFNYLCPAIIINQIDARSLIHTSEKKAIEIP PKTYSLQIAVWGGFIAISIIISFLSLLGVILVPLMNRVFFKFLLSF LVALAVGTLSGDAFLHLLPHSHASHHHSHSHSHEEPAMEMKRGPLFS HLSSQNIIESAYFDSTWKGLTALGGLYFMFLVEHVLTLIKQFKDK KKKNQKKPENDDDDVEIKQLSKYESQLSTNEEKVDTDDRTEGYLR ADSQEPSHFDSQQPAVLEEEVMIHAHAPQEVYNEYVPRGCKNKC HSHFHDTLGQSDDLIHHHDYHHIHHHHHHQNHHPHSHSQRYSRE ELKDAGVATLAWMVIMGDGLHNFSDGLAIGAAFTGLSSGLSTSV AVFCHELPHLGDFAVLLKAGMTVKQAVLYNALSAMLAYLGMATG IFIGHYAENVSMWIFALTAGLFMYVALVDMVPEMLHNDASDHGCS RWGYFFLQNAAGMLLGGFIMLLISIFEHKIVFRINF
SLC44A4	106	MGGKQRDEDEAYGKPVKYDPSFRGPIKNRSCTDVICCVLFLFLFI LGYIVVGIVAWLYGDPQVLYPRNSTGAYCGMGENKDKPYLLYFN IFSCILSSNIISVAENGLQCPTPQVCVSSCPEDPWTVGKNEFSQT VGEVFTYKRNFCPLPGVPWNMTVITSLQQLCPSFLLPSAPALGR CFPWTNVTTPALPGITNDTTIQQGISGLIDSLNARDISVKIFEDF AQSWYIWLVALGVALVLSLLFILLRLVAGPLVLVLILGLVGLVLA YGIYYCWEERYRVLDRKGASISQLGFTTNLSAYQSVQETWLAALIV LAVLEAIIILLMLIFLRQIRIAIALKEASKAVGQMMSTMEYPLV TFVLLLLICIAWAMTALYLATSGQPQYVLWASNISSPGCEKVPIN TSCNPTAHLVNSSCPGLMCMVFQGYSSKGLIQRSVFNLQIYGVGL FWTLNWLALGQCVLGAFASFYWAFHKPDIPTFPLISAFIRTL RYHTGSLAFGALILTLVQIARVILEYIDHKLRGVQNPVARCIMCC FKCCLWCLEKFIKFLNRNAYIMIAIYGKNFCVSAKNAFMLMRNI VRVVVLDKVTDLFFFGLKLLVVGGVGVLSFFFFSGRIPGLGKDFK SPHLNYYWLPIMTSILGAYVIASGFFSVFGMCDTLFLCFLEDLE RNNGLDRPYMSKSLKILGKKNEAPPDNKKRKK
STEAP1	107	MESRKDITNQEELWKMKPRRNLEEDDYLHKDTGETSMLKRPVLLH LHQTAHADEFDCPSELQHTQELFPQWHLPIKIAAIIASLTFLYTL LREVIHPLATSHQQYFYKIPILVINKVLPVMSITLLALVLMFYPLVI AAIVQLHNGTKYKKFPHWLDKWMLTRKQFGLLSFFFVAVLHAIYSL SYPMRRSYRYKLLNWAYQQVQONKEDAWIEHDVWRMEIYVSLGIV GLAILALLAVTSPSVSDSLTWREFHYIQSKLGIVSLLGLTIHAL IFAWNKWIDIKQFVWYTPPTFMIAVFLPIVVLIFKSIILFLPLCRK KILKIRHWEDVTINKTEICSQL

[0218] 在不同实施例中,本文所披露的ADC可包含上表中所列举的重链及轻链可变域的任何集合,或例如通过将六个CDR移植至所选人类供体抗体框架中得到的来自重链及轻链集合的六个CDR序列的集合。在不同实施例中,本文所披露的ADC可包含与上表中所列举的序列同源的氨基酸序列,只要ADC保持结合至其靶标癌抗原(例如其中 K_D 小于 $1 \times 10^{-8} M$)的能力且保持本文所披露的ADC的一种或多种功能特性(例如内化、调节RNA剪接、抑制细胞生长等的能力)即可。

[0219] 在一些实施例中,ADC进一步包含人类重链及轻链恒定域或其片段。举例而言,ADC可包含人类IgG重链恒定域(诸如IgG1)及人类 κ 或 λ 轻链恒定域。在不同实施例中,所描述的ADC的抗体或抗原结合片段包含人类免疫球蛋白G亚型1(IgG1)重链恒定域及人类Ig κ 轻链恒定域。

[0220] 在各种其他实施例中,ADC的靶标癌抗原为人类表皮生长因子受体2(HER2)。

[0221] 在不同实施例中,抗HER2抗体或其抗原结合片段包含如下三个重链CDR及三个轻链CDR:如由Kabat编号系统所定义,由SEQ ID NO:1组成的重链CDR1(HCDR1)、由SEQ ID NO:2组成的重链CDR2(HCDR2)、由SEQ ID NO:3组成的重链CDR3(HCDR3);由SEQ ID NO:4组成的轻链CDR1(LCDR1)、由SEQ ID NO:5组成的轻链CDR2(LCDR2)及由SEQ ID NO:6组成的轻链CDR3(LCDR3)。

[0222] 在不同实施例中,抗HER2抗体或其抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:19的氨基酸序列的重链可变区及包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列的轻链可变区。在一些实施例中,抗HER2抗体或其抗原结合片段包含SEQ ID NO:19的重链可变区氨基酸序列及SEQ ID NO:20的轻链可变区氨基酸序列或与所披露的序列具有至少95%一致性的序列。在一些实施例中,抗HER2抗体或其抗原结合片段具有与SEQ ID NO:19具有至少96%、至少97%、至少98%或至少99%一致性的重链可变区氨基酸序列和/或与SEQ ID NO:20具有至少96%、至少97%、至少98%或至少99%一致性的轻链可变区氨基酸序列。

[0223] 在不同实施例中,抗HER2抗体或其抗原结合片段为内化性抗体或内化性抗原结合片段。在不同实施例中,抗HER2抗体包含人类IgG1重链恒定域及人类Ig κ 轻链恒定域。

[0224] 在不同实施例中,抗HER2抗体包含SEQ ID NO:19的重链氨基酸序列或与SEQ ID NO:19具有至少95%一致性的序列及SEQ ID NO:20的轻链氨基酸序列或与SEQ ID NO:20具有至少95%一致性的序列。在特定实施例中,抗HER2抗体包含SEQ ID NO:19的重链氨基酸序列及SEQ ID NO:20的轻链氨基酸序列或与所披露的序列具有至少95%一致性的序列。在一些实施例中,抗HER2抗体具有与SEQ ID NO:19具有至少96%、至少97%、至少98%或至少99%一致性的重链氨基酸序列及与SEQ ID NO:20具有至少96%、至少97%、至少98%或至少99%一致性的轻链氨基酸序列。在不同实施例中,抗HER2抗体为曲妥珠单抗或其抗原结合片段。

[0225] 在不同实施例中,抗HER2抗体或其抗原结合片段包含曲妥珠单抗的三个重链CDR及三个轻链CDR,或其中CDR包括HCDR1(SEQ ID NO:1)、HCDR2(SEQ ID NO:2)、HCDR3(SEQ ID NO:3)、LCDR1(SEQ ID NO:4)、LCDR2(SEQ ID NO:5)及LCDR3(SEQ ID NO:6)的不超过一个、两个、三个、四个、五个或六个氨基酸添加、删除或取代。

[0226] 在各种其他实施例中,ADC的靶标癌抗原为人类多配体蛋白聚糖-1(CD138)。

[0227] 在不同实施例中,抗CD138抗体或其抗原结合片段包含如下三个重链CDR及三个轻链CDR:由SEQ ID NO:7组成的重链CDR1(HCDR1)、由SEQ ID NO:8组成的重链CDR2(HCDR2)、由SEQ ID NO:9组成的重链CDR3(HCDR3);由SEQ ID NO:10组成的轻链CDR1(LCDR1)、由SEQ ID NO:11组成的轻链CDR2(LCDR2)和由SEQ ID NO:12组成的轻链CDR3(LCDR3),如由Kabat编号系统所定义。

[0228] 在不同实施例中,抗CD138抗体或其抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:21的氨基酸序列的重链可变区及包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列的轻链可变区。在一些实施例中,

抗CD138抗体或其抗原结合片段包含SEQ ID NO:21的重链可变区氨基酸序列及SEQ ID NO:22的轻链可变区氨基酸序列或与所披露的序列具有至少95%一致性的序列。在一些实施例中,抗CD138抗体或其抗原结合片段具有与SEQ ID NO:21具有至少96%、至少97%、至少98%或至少99%一致性的重链可变区氨基酸序列和/或与SEQ ID NO:22具有至少96%、至少97%、至少98%或至少99%一致性的轻链可变区氨基酸序列。

[0229] 在不同实施例中,抗CD138抗体或其抗原结合片段为内化性抗体或内化性抗原结合片段。在不同实施例中,抗CD138抗体包含鼠IgG2a重链恒定域及鼠Igκ轻链恒定域。在不同实施例中,抗CD138抗体包含人类IgG2a重链恒定域及人类Igκ轻链恒定域。

[0230] 在不同实施例中,抗CD138抗体包含SEQ ID NO:21的重链氨基酸序列或与SEQ ID NO:21具有至少95%一致性的序列及SEQ ID NO:22的轻链氨基酸序列或与SEQ ID NO:22具有至少95%一致性的序列。在特定实施例中,抗CD138抗体包含SEQ ID NO:21的重链氨基酸序列及SEQ ID NO:22的轻链氨基酸序列或与所披露的序列具有至少95%一致性的序列。在一些实施例中,抗CD138抗体具有与SEQ ID NO:21具有至少96%、至少97%、至少98%或至少99%一致性的重链氨基酸序列及与SEQ ID NO:22具有至少96%、至少97%、至少98%或至少99%一致性的轻链氨基酸序列。在不同实施例中,抗CD138抗体为B-B4或其抗原结合片段。

[0231] 在不同实施例中,抗CD138抗体或其抗原结合片段包含B-B4的三个重链CDR及三个轻链CDR,或其中CDR包括HCDR1 (SEQ ID NO:7)、HCDR2 (SEQ ID NO:8)、HCDR3 (SEQ ID NO:9)、LCDR1 (SEQ ID NO:10)、LCDR2 (SEQ ID NO:11)及LCDR3 (SEQ ID NO:12)的不超过一个、两个、三个、四个、五个或六个氨基酸添加、删除或取代。

[0232] 在各种其他实施例中,ADC的靶标癌抗原为人类蝶素A型受体2 (EPHA2)。

[0233] 在不同实施例中,抗EPHA2抗体或其抗原结合片段包含如下三个重链CDR及三个轻链CDR:由SEQ ID NO:13组成的重链CDR1 (HCDR1)、由SEQ ID NO:14组成的重链CDR2 (HCDR2)、由SEQ ID NO:15组成的重链CDR3 (HCDR3);由SEQ ID NO:16组成的轻链CDR1 (LCDR1)、由SEQ ID NO:17组成的轻链CDR2 (LCDR2)和由SEQ ID NO:18组成的轻链CDR3 (LCDR3),如由Kabat编号系统所定义。

[0234] 在不同实施例中,抗EPHA2抗体或其抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:23的氨基酸序列的重链可变区及包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列的轻链可变区。在一些实施例中,抗EPHA2抗体或其抗原结合片段包含SEQ ID NO:23的重链可变区氨基酸序列及SEQ ID NO:24的轻链可变区氨基酸序列或与所披露的序列具有至少95%一致性的序列。在一些实施例中,抗EPHA2抗体或其抗原结合片段具有与SEQ ID NO:23具有至少96%、至少97%、至少98%或至少99%一致性的重链可变区氨基酸序列和/或与SEQ ID NO:24具有至少96%、至少97%、至少98%或至少99%一致性的轻链可变区氨基酸序列。

[0235] 在不同实施例中,抗EPHA2抗体或其抗原结合片段为内化性抗体或内化性抗原结合片段。在不同实施例中,抗EPHA2抗体包含人类IgG1重链恒定域及人类Igκ轻链恒定域。

[0236] 在不同实施例中,抗EPHA2抗体包含SEQ ID NO:23的重链氨基酸序列或与SEQ ID NO:23具有至少95%一致性的序列及SEQ ID NO:24的轻链氨基酸序列或与SEQ ID NO:24具有至少95%一致性的序列。在特定实施例中,抗EPHA2抗体包含SEQ ID NO:23的重链氨基酸序列及SEQ ID NO:24的轻链氨基酸序列或与所披露的序列具有至少95%一致性的序列。在

一些实施例中,抗EPHA2抗体具有与SEQ ID NO:23具有至少96%、至少97%、至少98%或至少99%一致性的重链氨基酸序列及与SEQ ID NO:24具有至少96%、至少97%、至少98%或至少99%一致性的轻链氨基酸序列。在一些实施例中,抗EPHA2抗体包含由SEQ ID NO:23的核苷酸序列编码的重链;及由SEQ ID NO:24的核苷酸序列编码的轻链。在不同实施例中,抗EPHA2抗体为1C1或其抗原结合片段。

[0237] 在不同实施例中,抗EPHA2抗体或其抗原结合片段包含1C1的三个重链CDR及三个轻链CDR,或其中CDR包括HCDR1(SEQ ID NO:13)、HCDR2(SEQ ID NO:14)、HCDR3(SEQ ID NO:15)、LCDR1(SEQ ID NO:16)、LCDR2(SEQ ID NO:17)及LCDR3(SEQ ID NO:18)的不超过一个、两个、三个、四个、五个或六个氨基酸添加、删除或取代。

[0238] 在不同实施例中,氨基酸取代具有单独残基。插入的数量级通常为约1至约20个氨基酸残基,但显著更大的插入可为容许的,只要保持生物功能(例如结合至靶标抗原)即可。删除通常介于约1至约20个氨基酸残基范围内,但在一些情况下,删除可能要大得多。取代、删除、插入或其任何组合可用于获得最终衍生物或变异体。一般而言,对数个氨基酸作出这些改变以将对分子,明确而言抗原结合蛋白的免疫原性及特异性的更改减至最少。然而,在某些情况下,更多变化可为容许的。保守取代一般根据以下如表6所描绘的图表进行。

表6

原始残基	示例性取代
Ala	Ser
Arg	Lys
Asn	Gln, His
Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn
Glu	Asp
Gly	Pro
His	Asn, Gln
Ile	Leu, Val
Leu	Ile, Val
Lys	Arg, Gln, Glu
Met	Leu, Ile
Phe	Met, Leu, Tyr
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr
Tyr	Trp, Phe
Val	Ile, Leu

[0239] 通过选择保守性低于表6中所示的取代的取代来作出功能或免疫属性中的实质性改变。举例而言,可进行更显著地影响以下的取代:更改区域中多肽主链的结构,例如 α -螺旋或 β -折迭结构;靶标位点处该分子的电荷或疏水性;或侧链的体积。一般可产生多肽特性

中的最大改变的取代为其中具有以下情况的取代, (a) 例如丝胺酰基或苏胺酰基的亲水性残基取代例如白胺酰基、异白胺酰基、苯丙胺酰基、缬胺酰基或丙胺酰基的疏水性残基(或经疏水性残基取代); (b) 半胱氨酸或脯氨酸取代任何其他残基(或经任何其他残基取代); (c) 例如离胺酰基、精胺酰基或组胺酰基的具有正电性侧链的残基取代例如麸胺酰基或天冬胺酰基的负电性残基(或经负电性残基取代); 或(d) 例如苯丙氨酸的具有大体积侧链的残基取代例如甘氨酸的不具有侧链的残基(或经不具有侧链的残基取代)。

[0240] 在其中变异抗体序列用于ADC中的不同实施例, 变异体通常展现相同定性生物活性且引发相同免疫反应, 但还可视需要选择变异体以修改抗原结合蛋白的特征。可替代地, 变异体可设计成使得抗原结合蛋白的生物活性得到改变。举例而言, 可改变或移除糖基化位点。

[0241] 各种抗体可与本文所使用的ADC一起使用以靶向癌细胞。如下文所示, 本文所披露的ADC中的接头-有效负载在靶向不同肿瘤抗原的抗体的情况下出乎意料地有效。于肿瘤细胞而非健康细胞上表达、或于肿瘤细胞上以高于健康细胞的表达量表达的合适抗原以及针对这类抗原的抗体为此项技术中已知的。这些抗体可与本文所披露的接头及荷伯希二烯剪接调节子有效负载一起使用。在一些实施例中, 抗体或抗原结合片段靶向HER2, 且靶向HER2的抗体或抗原结合片段为曲妥珠单抗。在一些实施例中, 抗体或抗原结合片段靶向CD138, 且靶向CD138的抗体或抗原结合片段为B-B4。在一些实施例中, 抗体或抗原结合片段靶向EPHA2, 且靶向EPHA2的抗体或抗原结合片段为1C1。在一些实施例中, 尽管所披露的接头及荷伯希二烯剪接调节子有效负载在若干不同靶向肿瘤的抗体的情况下出乎意料地有效, 但靶向HER2的抗体(诸如曲妥珠单抗)、靶向CD138的抗体(诸如B-B4)及靶向EPHA2的抗体(诸如1C1)提供特定地经改善的药物: 抗体比、聚集量、稳定性(即活体外及活体内稳定性)、肿瘤靶向(即细胞毒性、效力)和/或治疗功效。经改善的治疗功效可在活体外或活体内量测, 且可包括经减慢的肿瘤生长速率和/或经减小的肿瘤体积。

[0242] 在某些实施例中, 使用针对不同抗原靶标的相同靶标或抗体的替代抗体, 且提供上文所描述的有利功能特性(例如经改善的稳定性、经改善的肿瘤靶向、经改善的治疗功效等)中的至少一些。在一些实施例中, 当所披露的接头及荷伯希二烯剪接调节子有效负载结合至替代性靶向HER2、CD138或EPHA2的抗体或抗原结合片段时, 观测到这些有利功能特性中的一些或全部。在一些其他实施例中, 当所披露的接头及荷伯希二烯剪接调节子有效负载结合至靶向HER2的抗体或抗原结合片段时, 观测到这些有利功能特性中的一些或全部。在一些实施例中, 抗体或抗原结合片段靶向HER2。在一些实施例中, 靶向HER2的抗体或抗原结合片段为曲妥珠单抗。在一些其他实施例中, 当所披露的接头及荷伯希二烯剪接调节子有效负载结合至靶向CD138的抗体或抗原结合片段时, 观测到这些有利功能特性中的一些或全部。在一些实施例中, 抗体或抗原结合片段靶向CD138。在一些实施例中, 靶向CD138的抗体或抗原结合片段为B-B4。在一些其他实施例中, 当所披露的接头及荷伯希二烯剪接调节子有效负载结合至靶向EPHA2的抗体或抗原结合片段时, 观测到这些有利功能特性中的一些或全部。在一些实施例中, 抗体或抗原结合片段靶向EPHA2。在一些实施例中, 靶向EPHA2的抗体或抗原结合片段为1C1。

接头

[0243] 在不同实施例中, ADC中的接头以足以具治疗有效性的方式具胞外稳定性。在一些

实施例中,接头在细胞外部稳定以使得ADC在存在于胞外条件中时(例如在转运或递送至细胞中之前)保持完整。在ADC的情形下使用的术语“完整”意谓抗体或抗原结合片段保持连接至药物部分(例如荷伯希二烯剪接调节子)。在接头或包含接头的ADC的情形下,如本文所使用的“稳定”意谓当ADC存在于胞外条件中时,ADC样品中的不超过20%、不超过约15%、不超过约10%、不超过约5%、不超过约3%或不超过约1%(或其间任何百分比)的接头经裂解(或在总体ADC在其他方面不完整的情况下)。在一些实施例中,与替代性接头和/或具有替代性接头和/或荷伯希二烯剪接调节子有效负载的ADC相比,本文所披露的接头和/或ADC出乎意料地稳定。在一些实施例中,本文所披露的ADC可保持完整达超过约48小时、超过60小时、超过约72小时、超过约84小时或超过约96小时。

[0244] 可例如通过在血浆中包括ADC达预先确定的时间段(例如2、4、6、8、16、24、48或72小时)且随后定量血浆中存在的游离药物部分的量来确定接头在细胞外是否稳定。稳定性可允许ADC的定位时间靶向肿瘤细胞且防止药物部分过早释放,该过早释放可能因无差别地损害正常组织及肿瘤组织两者而减小ADC的治疗指数。在一些实施例中,接头在靶标细胞外部稳定且一旦处于细胞内部则自ADC释放药物部分,以使得药物可结合至其靶标(例如结合至SF3b剪接体复合物)。因此,有效接头将:(i)维持抗体或抗原结合片段的特异性结合特性;(ii)允许经由稳定连接至抗体或抗原结合片段递送(例如胞内递送)药物部分;(iii)保持稳定及完整直至ADC已经转运或递送至其靶标位点;及(iv)允许裂解或替代性释放机制之后的药物部分的治疗作用,例如细胞毒性作用。

[0245] 接头可能影响ADC的物理-化学特性。由于许多细胞毒性剂本质上具疏水性,故将其连接至具有额外疏水性部分的抗体可能引起聚集。ADC聚集物不可溶且通常限制向抗体上的可达成药物负载,此可能不利地影响ADC的效力。一般而言,生物制品的蛋白质聚集物还与免疫原性增加相关。如下文所示,本文所披露的接头使ADC具有低聚集量及所需药物负载量。

[0246] 接头可为“可裂解的”或“不可裂解的”(Ducry及Stump(2010)Bioconjugate Chem.[生物缀合化学]21:5-13)。可裂解接头设计成在经受某些环境因素时,例如在内化至靶标细胞中时释放药物部分(例如荷伯希二烯剪接调节子),然而不可裂解接头一般依赖于抗体或抗原结合片段自身的降解。

[0247] 在一些实施例中,接头为不可裂解接头。在一些实施例中,ADC的荷伯希二烯剪接调节子药物部分通过降解抗体或抗原结合片段来释放。在经靶标细胞内化且在靶标细胞内降解时,不可裂解接头倾向于保持与抗体的至少一个氨基酸及药物共价缔合。本文描述多种示例性不可裂解接头,且其他不可裂解接头为此项技术中已知的。示例性不可裂解接头可包含硫醚、环己基、N-琥珀酰亚胺基4-(N-顺丁烯二酰亚胺基甲基)环己烷-1甲酸酯(SMCC)或N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)、一个或多个聚乙二醇(PEG)部分(例如1、2、3、4、5或6个PEG部分)或一个或多个烷基部分。

[0248] 在一些实施例中,接头为可裂解接头。可裂解接头是指包含可裂解部分的任何接头。如本文所使用的术语“可裂解部分”是指可经裂解的任何化学键。合适的可裂解化学键在此项技术中众所周知且包括但不限于酸不稳定性键、蛋白酶/肽酶不稳定性键、光不稳定性键、二硫键及酯酶不稳定性键。包含可裂解部分的接头可允许经由在接头中的特定位置处裂解而自ADC释放荷伯希二烯剪接调节子药物部分。

[0249] 在一些实施例中,接头在胞内条件下可裂解以使得接头的裂解在胞内环境中自抗体或抗原结合片段充分地释放荷伯希二烯剪接调节子药物部分以活化药物和/或赋予药物治疗有效性。在一些实施例中,荷伯希二烯剪接调节子药物部分未自抗体或抗原结合片段裂解直至ADC进入表达对ADC的抗体或抗原结合片段具有特异性的抗原的细胞为止,且在进入细胞后荷伯希二烯剪接调节子药物部分自抗体或抗原结合片段裂解。在一些实施例中,接头包含经定位以使得在裂解后接头或抗体或抗原结合片段的部分不保持结合至荷伯希二烯剪接调节子药物部分的可裂解部分。示例性可裂解接头包括酸不稳定性接头、蛋白酶/肽酶敏感性接头、光不稳定性接头、含二甲基接头、含二硫化物接头或含磺酰胺接头。

[0250] 在一些实施例中,接头为pH敏感性接头,且在某些pH值下对水解敏感。通常,pH敏感性接头可在酸性条件下水解。此裂解策略一般在胞内体腔内隔室(pH约5-6)及溶酶体胞内隔室(pH约4.8)中利用相较于细胞溶质胞内隔室(pH约7.4)而言较低的pH,以触发诸如腺的接头中的酸不稳定性基团的水解(Jain等人(2015) *Pharm Res* [药学研究] 32:3526-40)。在一些实施例中,接头为酸不稳定性接头和/或可水解接头。举例而言,可使用可在溶酶体中水解且含有酸不稳定性基团的酸不稳定性接头(例如腺、半卡巴腺、硫半卡巴腺、顺式乌头酸酰胺、原酸酯、缩醛、缩酮或其类似物)。参见例如美国专利第5,122,368号;第5,824,805号;第5,622,929号;Dubowchik及Walker(1999) *Pharm Therapeutics* [药理学和治疗学] 83:67-123;Neville等人(1989) *Biol Chem.* [生物化学] 264:14653-61。这类接头在中性pH条件,诸如血液中的pH条件下相对稳定,但在低于pH 5.5或5.0(溶酶体的近似pH)下不稳定。在某些实施例中,可水解接头为硫醚接头(诸如经由酰胺键连接至治疗剂的硫醚)(参见例如美国专利第5,622,929号)。

[0251] 在一些实施例中,接头可在还原条件下裂解。在一些实施例中,接头可在诸如麸胱甘肽或二硫苏糖醇的还原剂存在的情况下裂解。在一些实施例中,接头为可裂解二硫化物接头或可裂解磺酰胺接头。

[0252] 在一些实施例中,接头为可裂解二硫化物接头。各种二硫化物接头为此项技术中已知的,包括例如可使用SATA(N-琥珀酰亚胺基-5-乙酰基硫基乙酸酯)、SPDP(N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫基)丙酸酯)、SPDB(N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫基)丁酸酯)及SMPT(N-琥珀酰亚胺基氧基羰基- α -甲基- α -(2-吡啶基-二硫基)甲苯)、SPDB及SMPT形成的二硫化物接头。参见例如Thorpe等人(1987) *Cancer Res.* [癌症研究] 47:5924-31;Wawrzynczak等人,在 *Immunoconjugates:Antibody Conjugates in Radioimaging and Therapy of Cancer* [免疫缀合物:抗体在放射成像和癌症治疗中缀合] 中(C.W.Vogel编,牛津大学出版社(Oxford U.Press),1987)。还参见美国专利第4,880,935号。通常使用二硫化物接头以开发胞内硫醇的丰度,此可有助于其二硫键的裂解。最多丰度胞内硫醇、经减少的麸胱甘肽的胞内浓度一般介于1-10nM范围内,比在约5 μ M下的血液中最丰富的低分子硫醇(即半胱氨酸)的胞内浓度高约1,000倍(Goldmacher等人,在 *Cancer Drug Discovery and Development:Antibody-Drug Conjugates and Immunotoxins* [癌症药物的发现和开发:抗体-药物缀合物和免疫毒素] 中(G.L.Phillips编,Springer,2013))。蛋白质二硫化物异构酶家族的胞内酶还可促进二硫化物接头的胞内裂解。如本文所使用的可裂解二硫化物接头是指包含可裂解二硫化物部分的任何接头。术语“可裂解二硫化物部分”是指可例如通过硫醇或酶进行裂解和/或还原的二硫键。

[0253] 在一些实施例中,接头为可裂解磺酰胺接头。如本文所使用的可裂解磺酰胺接头是指包含可裂解磺酰胺部分的任何接头。术语“可裂解磺酰胺部分”是指磺酰胺基团,即连接至胺基的磺酰基,其中硫-氮键可经裂解。

[0254] 在一些实施例中,接头可为用于经由分支的多官能接头部分将超过一个药物部分共价连接至抗体或抗原结合片段的树突状型接头。参见例如Sun等人(2002) *Bioorg Med Chem Lett.* [生物有机与药物化学快报] 12:2213-5; Sun等人(2003) *Bioorg Med Chem.* [生物有机与药物化学] 11:1761-8。树突状接头可增加药物与抗体的莫耳比,即药物负载量,其与ADC的效力有关。因此,举例而言,在抗体或抗原结合片段仅承载一个反应性半胱氨酸硫醇基的情况下,多个荷伯希二烯剪接调节子药物部分可经由树突状接头连接。在一些实施例中,接头部分或接头-药物部分可经由经还原的二硫桥连化学物质或限制性离氨酸利用技术连接至抗体或抗原结合片段。参见例如国际公开案第WO 2013/173391号及第WO 2013/173393号。

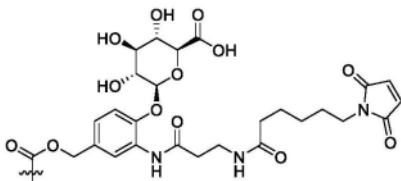
[0255] 在一些实施例中,接头可通过胞内环境中(例如溶酶体或胞内体或胞膜窖内)存在的裂解剂,例如酶进行裂解。接头可为例如通过包括但不限于溶酶体或胞内体蛋白酶的胞内肽酶或蛋白酶裂解的肽接头。

[0256] 在一些实施例中,接头为可裂解肽接头。如本文所使用的可裂解肽接头是指包含可裂解肽部分的任何接头。术语“可裂解肽部分”是指可通过胞内环境中存在的药剂裂解的任何化学键连接的氨基酸(天然或合成氨基酸衍生物)。举例而言,接头可包含可通过诸如组织蛋白酶(例如组织蛋白酶B)的肽酶裂解的缬氨酸-丙氨酸(Val-Ala)序列或缬氨酸-瓜氨酸(Val-Cit)序列。在一些实施例中,接头可包含麸氨酸-缬氨酸-瓜氨酸(Glu-Val-Cit)序列。在一些实施例中,接头为酶可裂解接头且接头中的可裂解肽部分可通过酶裂解。在一些实施例中,可裂解肽部分可通过例如组织蛋白酶的溶酶体酶裂解。在一些实施例中,接头为组织蛋白酶可裂解接头。在一些实施例中,接头中的可裂解肽部分可通过诸如组织蛋白酶B、C、F、H、K、L、O、S、V、X或W的溶酶体半胱氨酸组织蛋白酶裂解。在一些实施例中,可裂解肽部分可通过组织蛋白酶B裂解。可通过组织蛋白酶B裂解的示例性二肽为缬氨酸-瓜氨酸(Val-Cit) (Dubowchik等人(2002) *Bioconjugate Chem.* [生物缀合化学] 13:855-69)。

[0257] 在一些实施例中,接头或接头中的可裂解肽部分包含氨基酸单元。在一些实施例中,氨基酸单元允许通过蛋白酶裂解接头,由此促进在暴露于一种或多种胞内蛋白酶(诸如一种或多种溶酶体酶)后荷伯希二烯剪接调节子药物部分自ADC的释放(Doronina等人(2003) *Nat Biotechnol.* [自然生物技术] 21:778-84; Dubowchik及Walker (1999) *Pharm Therapeutics* [药理学和治疗学] 83:67-123)。示例性氨基酸单元包括但不限于二肽、三肽、四肽及五肽。示例性二肽包括但不限于缬氨酸-丙氨酸(Val-Ala)、缬氨酸-瓜氨酸(Val-Cit)、丙氨酸-天冬酰胺(Ala-Asn)、丙氨酸-苯丙氨酸(Ala-Phe)、苯丙氨酸-离氨酸(Phe-Lys)、丙氨酸-离氨酸(Ala-Lys)、丙氨酸-缬氨酸(Ala-Val)、缬氨酸-离氨酸(Val-Lys)、离氨酸-离氨酸(Lys-Lys)、苯丙氨酸-瓜氨酸(Phe-Cit)、白氨酸-瓜氨酸(Leu-Cit)、异白氨酸-瓜氨酸(Ile-Cit)、色氨酸-瓜氨酸(Trp-Cit)及苯丙氨酸-丙氨酸(Phe-Ala)。示例性三肽包括但不限于丙氨酸-丙氨酸-天冬酰胺(Ala-Ala-Asn)、甘氨酸-缬氨酸-瓜氨酸(Gly-Val-Cit)、甘氨酸-甘氨酸-甘氨酸(Gly-Gly-Gly)、苯丙氨酸-苯丙氨酸-离氨酸(Phe-Phe-Lys)、麸氨酸-缬氨酸-瓜氨酸(Glu-Val-Cit) (参见Anami等人(2018) *Nat. Comm.* [自然通讯])

9:2512) 及甘氨酸-苯丙氨酸-离氨酸 (Gly-Phe-Lys)。其他示例性氨基酸单元包括但不限于如例如美国专利第6,214,345号中所描述的Gly-Phe-Gly-Gly (SEQ ID NO:34)、Gly-Phe-Leu-Gly (SEQ ID NO:35)、Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO:36)、Phe-N⁹-tosyl-Arg及Phe-N⁹-Nitro-Arg。在一些实施例中,接头中的氨基酸单元包含Val-Ala。在一些实施例中,接头中的氨基酸单元包含Val-Cit。在一些实施例中,接头中的氨基酸单元包含Glu-Val-Cit。氨基酸单元可包含天然存在的氨基酸残基和/或次级氨基酸和/或非天然存在的氨基酸类似物(诸如瓜氨酸)。氨基酸单元可针对通过特定酶进行的酶裂解进行设计及优化,该特定酶例如为肿瘤相关蛋白酶、溶酶体蛋白酶(诸如组织蛋白酶B、C、D或S)或纤维蛋白溶酶蛋白酶。

[0258] 在一些实施例中,接头为可裂解 β -葡萄糖醛酸接头。如本文所使用的可裂解 β -葡萄糖醛酸接头是指包含可裂解 β -葡萄糖醛酸部分的任何接头。示例性可裂解 β -葡萄糖醛酸接头包含以下结构:



[0259] 术语“可裂解 β -葡萄糖醛酸部分”是指可通过具有 β -葡萄糖醛酸酶活性的药剂裂解的糖苷键。在一些实施例中,接头包含可通过 β -葡萄糖醛酸酶裂解的糖苷键。 β -葡萄糖醛酸酶为催化具有 β -组态的葡萄糖醛酸的糖苷键的水解的UDP-葡萄糖醛酸基转移酶。

[0260] 在一些实施例中,本文所披露的ADC包含可通过酶裂解的接头中的可裂解 β -葡萄糖醛酸部分。在一些实施例中,接头中的可裂解 β -葡萄糖醛酸部分可通过例如 β -葡萄糖醛酸酶的溶酶体酶裂解。在一些实施例中,接头为 β -葡萄糖醛酸酶可裂解接头。在一些实施例中,接头中的可裂解 β -葡萄糖醛酸部分允许在ADC内化之后通过 β -葡萄糖醛酸酶进行的接头裂解,由此促进细胞环境中药物部分自ADC的释放。

[0261] 在一些实施例中,本文所披露的ADC中的任一种中的接头可包含将抗体或抗原结合片段接合至药物部分(例如荷伯希二烯剪接调节子药物部分)的至少一个间隔子单元。在一些实施例中,介于抗体或抗原结合片段与可裂解部分之间的间隔子单元当存在时将接头中的裂解位点(例如可裂解肽部分)接合至抗体或抗原结合片段。在一些实施例中,介于药物部分与可裂解部分之间的间隔子单元当存在时将接头中的裂解位点(例如可裂解肽部分)接合至药物部分。在一些实施例中,不存在裂解位点,且使用间隔子单元来将抗体或抗原结合片段连接至药物部分。

[0262] 在一些实施例中,接头和/或接头中的间隔子单元实质上具有亲水性。亲水性接头可用于降低可经由多重抗药性(MDR)或功能上类似的转运子自抗药性癌细胞中泵送出药物的程度。在一些实施例中,亲水性接头可包括一个或多个聚乙二醇(PEG)部分,例如1、2、3、4、5或6个PEG部分。在一些实施例中,接头包含2个PEG部分。

[0263] 在一些实施例中,接头中的间隔子单元包含一个或多个PEG部分。在一些实施例中,间隔子单元包含一个或多个 $-(\text{PEG})_m-$,且 m 为1至10的整数(即 m 可为1、2、3、4、5、6、7、8、9或10)。在一些实施例中, m 介于1至10范围内;介于2至8范围内;介于2至6范围内;介于2至5范围内;介于2至4范围内;或介于2至3范围内。在一些实施例中, m 为2。在一些实施例中,间隔子单元包含 $(\text{PEG})_2$ 、 $(\text{PEG})_3$ 、 $(\text{PEG})_4$ 、 $(\text{PEG})_5$ 、 $(\text{PEG})_6$ 、 $(\text{PEG})_7$ 、 $(\text{PEG})_8$ 、 $(\text{PEG})_9$ 或 $(\text{PEG})_{10}$ 。在

一些实施例中,间隔子单元包含(PEG)₂。

[0264] 在一些实施例中,接头中的间隔子单元包含烷基部分。在一些实施例中,间隔子单元包含一个或多个 $-(CH_2)_n-$,且n为1至10的整数(即n可为1、2、3、4、5、6、7、8、9或10)。在一些实施例中,n介于1至10范围内;介于2至8范围内;介于2至6范围内;介于2至5范围内;介于2至4范围内;或介于2至3范围内。在一些实施例中,n为2。在一些实施例中,n为5。在一些实施例中,n为6。在一些实施例中,间隔子单元包含 $(CH_2)_2$ 、 $(CH_2)_3$ 、 $(CH_2)_4$ 、 $(CH_2)_5$ 、 $(CH_2)_6$ 、 $(CH_2)_7$ 、 $(CH_2)_8$ 、 $(CH_2)_9$ 或 $(CH_2)_{10}$ 。在一些实施例中,间隔子单元包含 $(CH_2)_2$ (“Et”)。在一些实施例中,间隔子单元包含 $(CH_2)_6$ (“Hex”)。在一些实施例中,间隔子单元包含 $(CH_2)_2-O-(CH_2)_2$ (“Et-O-Et”)。

[0265] 可使用间隔子单元例如以将抗体或抗原结合片段直接地或间接地连接至药物部分。在一些实施例中,间隔子单元将抗体或抗原结合片段直接地连接至荷伯希二烯剪接调节子药物部分。在一些实施例中,抗体或抗原结合片段及荷伯希二烯剪接调节子药物部分经由包含一个或多个PEG部分(例如(PEG)₂)或一个或多个烷基部分(例如 $(CH_2)_2$ 、 $(CH_2)_6$ 或 $(CH_2)_2-O-(CH_2)_2$)的间隔子单元连接。在一些实施例中,间隔子单元将抗体或抗原结合片段间接地连接至荷伯希二烯剪接调节子药物部分。在一些实施例中,间隔子单元经由可裂解部分(例如可裂解肽或可裂解 β -葡萄糖醛酸)和/或用以将间隔子单元接合至抗体或抗原结合片段的连接部分(例如顺丁烯二酰亚胺部分)来将抗体或抗原结合片段间接连接至荷伯希二烯剪接调节子药物部分。

[0266] 在不同实施例中,间隔子单元经由顺丁烯二酰亚胺(Ma1)部分连接至抗体或抗原结合片段(即抗体或抗原结合片段)。

[0267] 经由Ma1连接至抗体或抗原结合片段的间隔子单元在本文中称为“Ma1-间隔子单元”。如本文所使用的术语“Ma1”或“顺丁烯二酰亚胺部分”意谓含有顺丁烯二酰亚胺基且可与硫氢基,例如抗体或抗原结合片段上的半胱氨酸残基的硫氢基反应的化合物。可与硫氢基(硫醇)反应的其他官能基包括但不限于碘乙酰胺、溴乙酰胺、乙烯基吡啶、二硫化物、吡啶基二硫化物、异氰酸酯及异硫氰酸酯。在一些实施例中,Ma1-间隔子单元可与抗体或抗原结合片段上的半胱氨酸残基反应。在一些实施例中,Ma1-间隔子单元经由半胱氨酸残基接合至抗体或抗原结合片段。在一些实施例中,Ma1-间隔子单元包含PEG部分。在一些实施例中,Ma1-间隔子单元包含烷基部分。

[0268] 在某些实施例中,接头包含Ma1-间隔子单元及可裂解肽部分。在一些实施例中,可裂解肽部分包含氨基酸单元。在一些实施例中,氨基酸单元包含Val-Cit。在一些实施例中,氨基酸单元包含Val-Ala。在一些实施例中,氨基酸单元包含Glu-Val-Cit。在一些实施例中,接头包含Ma1-间隔子单元及Val-Cit。在一些实施例中,接头包含Ma1-间隔子单元及Val-Ala。在一些实施例中,接头包含Ma1-间隔子单元及Val-Cit,其中Ma1-间隔子单元包含顺丁烯二酰亚胺基己酰基(MC)。在一些实施例中,接头包含Ma1-间隔子单元及Val-Ala,其中Ma1-间隔子单元包含顺丁烯二酰亚胺基己酰基(MC)。在一些实施例中,接头包含Ma1-间隔子单元及可裂解 β -葡萄糖醛酸部分。

[0269] 在一些实施例中,接头包含以下结构:Ma1-间隔子单元。在一些实施例中,Ma1-间隔子单元包含顺丁烯二酰亚胺基己酰基(MC)。在一些实施例中,接头包含以下结构:MC。在一些实施例中,接头包含以下结构:Ma1- $(CH_2)_2$ (“Ma1-Et”)。在一些实施例中,接头包含以下

结构:Ma1-(CH₂)₆ (“Ma1-Hex”)。在一些实施例中,接头包含以下结构:Ma1-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂ (“Ma1-Et-O-Et”)。在一些实施例中,接头包含以下结构:Ma1-(PEG)₂。在一些实施例中,接头包含以下结构:Ma1-(PEG)₂-CO。

[0270] 在不同实施例中,Ma1-间隔子单元将抗体或抗原结合片段连接至可裂解肽部分。在一些实施例中,接头包含Ma1-间隔子单元-肽。在一些实施例中,接头包含以下结构:Ma1-间隔子单元-Val-Cit。在一些实施例中,Ma1-间隔子单元包含顺丁烯二酰亚胺基己酰基(MC)。在一些实施例中,接头包含以下结构:MC-Val-Cit。

[0271] 在一些实施例中,接头包含以下结构:Ma1-间隔子单元-Val-Ala。在一些实施例中,Ma1-间隔子单元包含顺丁烯二酰亚胺基己酰基(MC)。在一些实施例中,接头包含以下结构:MC-Val-Ala。

[0272] 在不同实施例中,Ma1-间隔子单元将抗体或抗原结合片段连接至可裂解β-葡萄糖醛酸部分。在一些实施例中,接头包含Ma1-间隔子单元-β-葡萄糖醛酸。在一些实施例中,接头包含MC-β-葡萄糖醛酸。

[0273] 在不同实施例中,接头中的可裂解部分直接地接合至荷伯希二烯剪接调节子药物部分。在其他实施例中,间隔子单元用于将接头中的可裂解部分连接至荷伯希二烯剪接调节子药物部分。在不同实施例中,荷伯希二烯剪接调节子通过间隔子单元连接至接头中的可裂解部分。

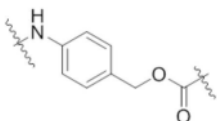
[0274] 间隔子单元可为“自消融型”或“非自消融型”间隔子单元。“非自消融型”间隔子单元为间隔子单元的部分或全部在接头裂解后保持结合至荷伯希二烯剪接调节子药物部分的间隔子单元。非自消融型间隔子单元的实例包括但不限于甘氨酸间隔子单元及甘氨酸-甘氨酸间隔子单元。非自消融型间隔子单元最终可随时间推移而降解,但在细胞条件下不会容易地完全释放所连接的天然药物部分。“自消融型”间隔子单元允许在胞内条件下释放天然药物部分。“天然药物”或“天然药物部分”为在间隔子单元裂解/降解之后不保留间隔子单元的部分或其他化学修饰。

[0275] 自我分解型化学物质为此项技术中已知的且可针对所披露的ADC容易地选择。在不同实施例中,将接头中的可裂解部分连接至荷伯希二烯剪接调节子药物部分的间隔子单元为自消融型间隔子单元,且与在胞内条件下的可裂解部分裂解同时或在其之前/在其之后不久进行自我分解。在一些实施例中,荷伯希二烯剪接调节子通过自消融型间隔子单元连接至接头中的可裂解部分。在某些实施例中,荷伯希二烯剪接调节子通过自消融型间隔子单元连接至接头中的可裂解部分,可裂解部分包含Val-Cit,且顺丁烯二酰亚胺基己酰基(MC)将可裂解部分接合至抗体或抗原结合片段。在某些实施例中,荷伯希二烯剪接调节子通过自消融型间隔子单元连接至接头中的可裂解部分,可裂解部分包含Val-Ala,且顺丁烯二酰亚胺基己酰基(MC)将可裂解部分接合至抗体或抗原结合片段。在某些实施例中,荷伯希二烯剪接调节子通过自消融型间隔子单元连接至接头中的可裂解部分,可裂解部分包含Glu-Val-Cit,且顺丁烯二酰亚胺基己酰基(MC)将可裂解部分接合至抗体或抗原结合片段。在某些实施例中,荷伯希二烯剪接调节子经由接合至Val-Cit可裂解部分的接头中的Ma1-间隔子单元(例如MC)及pABC或pAB自消融型间隔子单元接合至抗体或抗原结合片段。在某些实施例中,荷伯希二烯剪接调节子经由接合至Val-Ala可裂解部分的接头中的Ma1-间隔子单元(例如MC)及pABC或pAB自消融型间隔子单元接合至抗体或抗原结合片段。在某些实

施例中, 荷伯希二烯剪接调节子经由接合至Glu-Val-Cit可裂解部分的接头中的Mal-间隔子单元(例如MC)及pABC或pAB自消融型间隔子单元接合至抗体或抗原结合片段。

[0276] 在某些实施例中, 接头中的自消融型间隔子单元包含对氨基苯甲基单元。在一些实施例中, 对氨基苯甲醇(pABOH)经由酰胺键连接至接头中的氨基酸单元或其他可裂解部分, 且在pABOH与药物部分之间制成胺基甲酸酯、胺基甲酸甲酯或碳酸酯(Hamann等人(2005)Expert Opin Ther Patents[治疗术专利专家评论]15:1087-103)。在一些实施例中, 自消融型间隔子单元为或包含对氨基苄氧基羰基(pABC)。在不受理论束缚的情况下, 认为pABC的自我分解涉及自发1,6-消除反应(Jain等人(2015)Pharm Res.[药物研究]32:3526-40)。

[0277] 在不同实施例中, 所披露的ADC中所使用的对氨基苄氧基羰基(pABC)的结构显示于下:



[0278] 在不同实施例中, 自消融型间隔子单元将接头中的可裂解部分连接至荷伯希二烯剪接调节子。在一些实施例中, 自消融型间隔子单元为pABC。在一些实施例中, pABC将接头中的可裂解部分连接至荷伯希二烯剪接调节子。在一些实施例中, 在可裂解部分裂解后pABC进行自我分解, 且荷伯希二烯剪接调节子以其天然活性形式自ADC释放。

[0279] 在一些实施例中, 抗HER2抗体或抗原结合片段通过包含MC-Val-Cit-pABC的接头接合至荷伯希二烯剪接调节子。在其他实施例中, 抗HER2抗体或抗原结合片段通过包含MC-Val-Ala-pABC的接头接合至荷伯希二烯剪接调节子。

[0280] 在一些实施例中, 抗CD138抗体或抗原结合片段通过包含MC-Val-Cit-pABC的接头接合至荷伯希二烯剪接调节子。在其他实施例中, 抗CD138抗体或抗原结合片段通过包含MC-Val-Ala-pABC的接头接合至荷伯希二烯剪接调节子。

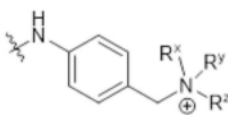
[0281] 在一些实施例中, 抗EPHA2抗体或抗原结合片段通过包含MC-Val-Cit-pABC的接头接合至荷伯希二烯剪接调节子。在其他实施例中, 抗EPHA2抗体或抗原结合片段通过包含MC-Val-Ala-pABC的接头接合至荷伯希二烯剪接调节子。

[0282] 在一些实施例中, 在接头中的可裂解肽部分裂解后, pABC进行自我分解。在一些实施例中, 可裂解肽部分包含氨基酸单元。在一些实施例中, 接头包含氨基酸单元-pABC。在一些实施例中, 氨基酸单元为Val-Cit。在一些实施例中, 接头包含Val-Cit-pABC。在一些实施例中, 氨基酸单元为Glu-Val-Cit。在一些实施例中, 连接符包含Glu-Val-Cit-pABC。在一些实施例中, 氨基酸单元为Val-Ala。在一些实施例中, 接头包含Val-Ala-pABC。在一些实施例中, 氨基酸单元为Ala-Ala-Asn。在一些实施例中, 接头包含Ala-Ala-Asn-pABC。

[0283] 在一些实施例中, 在接头中的可裂解 β -葡萄糖醛酸部分裂解后, pABC进行自我分解。在一些实施例中, 接头包含 β -葡萄糖醛酸-pABC。

[0284] 在某些实施例中, 接头中的自消融型间隔子单元包含对氨基苯甲基单元。在一些实施例中, 接头中的自消融型间隔子单元包含对氨基苯甲基(pAB)。在一些实施例中, pAB的自我分解涉及自发1,6-消除反应。

[0285] 在不同实施例中, 所披露的ADC中所使用的对氨基苯甲基(pAB)的结构显示于下:



[0286] 在不同实施例中,自消融型间隔子单元将接头中的可裂解部分连接至荷伯希二烯剪接调节子。在一些实施例中,自消融型间隔子单元为pAB。在一些实施例中,pAB将接头中的可裂解部分连接至荷伯希二烯剪接调节子。在一些实施例中,pAB在可裂解部分裂解后进行自我分解,且荷伯希二烯剪接调节子以其天然活性形式自ADC释放。

[0287] 在一些实施例中,抗HER2抗体或抗原结合片段通过包含MC-Val-Cit-pAB的接头接合至荷伯希二烯剪接调节子。在其他实施例中,抗HER2抗体或抗原结合片段通过包含MC-Val-Ala-pAB的接头接合至荷伯希二烯剪接调节子。

[0288] 在一些实施例中,抗CD138抗体或抗原结合片段通过包含MC-Val-Cit-pAB的接头接合至荷伯希二烯剪接调节子。在其他实施例中,抗CD138抗体或抗原结合片段通过包含MC-Val-Ala-pAB的接头接合至荷伯希二烯剪接调节子。

[0289] 在一些实施例中,抗EPHA2抗体或抗原结合片段通过包含MC-Val-Cit-pAB的接头接合至荷伯希二烯剪接调节子。在其他实施例中,抗EPHA2抗体或抗原结合片段通过包含MC-Val-Ala-pAB的接头接合至荷伯希二烯剪接调节子。

[0290] 在一些实施例中,在接头中的可裂解肽部分裂解后,pAB进行自我分解。在一些实施例中,可裂解肽部分包含氨基酸单元。在一些实施例中,接头包含氨基酸单元-pAB。在一些实施例中,氨基酸单元为Val-Cit。在一些实施例中,接头包含Val-Cit-pAB。在一些实施例中,氨基酸单元为Val-Ala。在一些实施例中,接头包含Val-Ala-pAB。在一些实施例中,氨基酸单元为Glu-Val-Cit。在一些实施例中,接头包含Glu-Val-Cit-pAB。在一些实施例中,氨基酸单元为Ala-Ala-Asn。在一些实施例中,接头包含Ala-Ala-Asn-pAB。

[0291] 在一些实施例中,在接头中的可裂解 β -葡萄糖醛酸部分裂解后,pAB进行自我分解。在一些实施例中,接头包含 β -葡萄糖醛酸-pAB。

[0292] 在一些其他实施例中,荷伯希二烯剪接调节子通过非自消融型间隔子单元连接至接头中的可裂解部分。在某些实施例中,荷伯希二烯剪接调节子通过非自消融型间隔子单元连接至接头中的可裂解部分,可裂解部分包含Val-Cit,且顺丁烯二酰亚胺基己酰基(MC)将可裂解部分接合至抗体或抗原结合片段。在某些实施例中,荷伯希二烯剪接调节子通过非自消融型间隔子单元连接至接头中的可裂解部分,可裂解部分包含Val-Ala,且顺丁烯二酰亚胺基己酰基(MC)将可裂解部分接合至抗体或抗原结合片段。

[0293] 在各个方面中,ADC的抗体或抗原结合片段经由接头结合至荷伯希二烯剪接调节子药物部分,其中接头包含Mal-间隔子单元(例如MC)、可裂解氨基酸单元及pABC。在一些实施例中,间隔子单元包含烷基部分。在一些实施例中,Mal-间隔子单元包含顺丁烯二酰亚胺基己酰基(MC)。在一些实施例中,接头包含Mal-间隔子单元-氨基酸单元-pABC。在一些实施例中,接头包含MC-氨基酸单元-pABC。在一些实施例中,接头包含MC-Val-Cit-pABC。在一些实施例中,接头包含MC-Val-Ala-pABC。在一些实施例中,接头包含MC-Glu-Val-Cit-pABC。在一些实施例中,接头包含MC-Ala-Ala-Asn-pABC。

[0294] 在各个其他方面中,ADC的抗体或抗原结合片段经由接头结合至荷伯希二烯剪接调节子药物部分,其中接头包含Mal-间隔子单元(例如MC)、可裂解氨基酸单元及pAB。在一

些实施例中,间隔子单元包含烷基部分。在一些实施例中,Ma1-间隔子单元包含顺丁烯二酰亚胺基己酰基(MC)。在一些实施例中,接头包含Ma1-间隔子单元-氨基酸单元-pAB。在一些实施例中,接头包含MC-氨基酸单元-pAB。在一些实施例中,接头包含MC-Val-Cit-pAB。在一些实施例中,接头包含MC-Val-Ala-pAB。在一些实施例中,接头包含MC-Glu-Val-Cit-pAB。在一些实施例中,接头包含MC-Ala-Ala-Asn-pAB。

[0295] 在各个其他方面中,ADC的抗体或抗原结合片段经由接头结合至荷伯希二烯剪接调节子药物部分,其中接头包含Ma1-间隔子单元(例如MC)、可裂解 β -葡萄糖醛酸及pABC。在一些实施例中,接头包含Ma1-间隔子单元- β -葡萄糖醛酸-pABC。在一些实施例中,接头包含MC- β -葡萄糖醛酸-pABC。

[0296] 在又其他方面中,ADC的抗体或抗原结合片段经由接头结合至荷伯希二烯剪接调节子药物部分,其中接头包含Ma1-间隔子单元(例如MC)、可裂解 β -葡萄糖醛酸及pAB。在一些实施例中,接头包含Ma1-间隔子单元- β -葡萄糖醛酸-pAB。在一些实施例中,接头包含MC- β -葡萄糖醛酸-pAB。

[0297] 在不同实施例中,ADC化合物具有式(I):



其中Ab为靶向赘生性细胞的抗体或抗原结合片段;

H为荷伯希二烯剪接调节子;

L为将Ab共价连接至D的接头;并且

p为1至15的整数。

[0298] 在一些实施例中,ADC的抗体或抗原结合片段(Ab)经由接头结合至荷伯希二烯剪接调节子药物部分,其中接头为所披露或以引用的方式并入本文中的接头中的任一种,或包含所披露或以引用的方式并入本文中的接头中的任一种的一种或多种组分。

[0299] 在一些实施例中,接头包含经定位以使得接头或抗体或抗原结合片段的部分在裂解之后不保持结合至荷伯希二烯剪接调节子的可裂解部分。在一些实施例中,可裂解部分为可裂解肽部分,例如氨基酸单元,诸如Val-Cit或Val-Ala。在一些实施例中,氨基酸单元或接头包含Val-Cit。在一些实施例中,氨基酸单元或接头包含Val-Ala。在一些实施例中,氨基酸单元或接头包含Glu-Val-Cit。

[0300] 在一些实施例中,接头包含将抗体或抗原结合片段接合至可裂解部分的至少一个间隔子单元。在一些实施例中,接头包含将抗体或抗原结合片段接合至药物部分的至少一个间隔子单元。在一些实施例中,间隔子单元或接头包含至少一个烷基部分。

[0301] 在一些实施例中,接头中的间隔子单元经由Ma1部分("Ma1-间隔子单元")连接至抗体或抗原结合片段。在一些实施例中,Ma1-间隔子单元包含至少一个烷基部分。在一些实施例中,接头包含顺丁烯二酰亚胺基己酰基(MC)。在一些实施例中,接头包含Ma1-(CH₂)₂("Ma1-Et")。在一些实施例中,接头包含Ma1-(CH₂)₆("Ma1-Hex")。在一些实施例中,接头包含Ma1-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂("Ma1-Et-O-Et")。在一些实施例中,接头包含Ma1-(PEG)₂-CO。在一些实施例中,Ma1-间隔子单元将抗体或抗原结合片段连接至药物部分。

[0302] 在一些实施例中,Ma1-间隔子单元或接头包含Ma1-(PEG)₂、Ma1-(PEG)₃、Ma1-(PEG)₄、Ma1-(PEG)₅、Ma1-(PEG)₆、Ma1-(PEG)₇或Ma1-(PEG)₈。在一些实施例中,Ma1-间隔子单元或接头包含Ma1-(PEG)₂。在一些实施例中,Ma1-间隔子单元或接头包含Ma1-(PEG)₂-CO、

Mal-(PEG)₃-CO、Mal-(PEG)₄-CO、Mal-(PEG)₅-CO、Mal-(PEG)₆-CO、Mal-(PEG)₇-CO或Mal-(PEG)₈-CO。在一些实施例中,Mal-间隔子单元或接头包含Mal-(PEG)₂-CO。在一些实施例中,Mal-间隔子单元或接头包含Mal-(PEG)₂-CO及至少一个额外间隔子单元。在一些实施例中,Mal-(PEG)₂-CO将抗体或抗原结合片段连接至药物部分。在一些实施例中,接头包含Mal-(PEG)₂-CO或由其组成。“Mal-(PEG)₂-CO”接头的实例在本文中还称为“ADL2”或“ADL2”接头。

[0303] 在一些实施例中,Mal-间隔子单元或接头包含MC。在一些实施例中,Mal-间隔子单元或接头包含MC及至少一个额外间隔子单元。在一些实施例中,MC将抗体或抗原结合片段连接至药物部分。在一些实施例中,接头包含MC或由其组成。“MC”接头的实例在本文中还称为“ADL10”或“ADL10”接头。

[0304] 在一些实施例中,Mal-间隔子单元或接头包含Mal-(CH₂)₆ (“Mal-Hex”)。在一些实施例中,Mal-间隔子单元或接头包含Mal-Hex及至少一个额外间隔子单元。在一些实施例中,Mal-Hex将抗体或抗原结合片段连接至药物部分。在一些实施例中,接头包含Mal-Hex。“Mal-Hex”接头的实例在本文中还称为“ADL12”或“ADL12”接头。

[0305] 在一些实施例中,Mal-间隔子单元或接头包含Mal-(CH₂)₂ (“Mal-Et”)。在一些实施例中,Mal-间隔子单元或接头包含Mal-Et及至少一个额外间隔子单元。在一些实施例中,Mal-Et将抗体或抗原结合片段连接至药物部分。在一些实施例中,接头包含Mal-Et。“Mal-Et”接头的实例在本文中还称为“ADL14”或“ADL14”接头。

[0306] 在一些实施例中,Mal-间隔子单元或接头包含Mal-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂ (“Mal-Et-O-Et”)。在一些实施例中,Mal-间隔子单元或接头包含Mal-Et-O-Et及至少一个额外间隔子单元。在一些实施例中,Mal-Et-O-Et将抗体或抗原结合片段连接至药物部分。在一些实施例中,接头包含Mal-Et-O-Et。“Mal-Et-O-Et”接头的实例在本文中还称为“ADL15”或“ADL15”接头。

[0307] 在一些其他实施例中,Mal-间隔子单元将抗体或抗原结合片段连接至接头中的可裂解部分。在一些实施例中,接头中的可裂解部分为可裂解肽部分,例如氨基酸单元。在一些实施例中,可裂解肽部分为Val-Cit或Val-Ala。在一些实施例中,Mal-间隔子单元或接头包含MC。在一些实施例中,接头包含MC-Val-Cit。在一些实施例中,接头包含MC-Val-Ala。在一些实施例中,接头包含MC-Glu-Val-Cit。在一些实施例中,接头包含MC-Ala-Ala-Asn。

[0308] 在一些实施例中,间隔子单元将接头中的可裂解部分连接至荷伯希二烯剪接调节子。在一些实施例中,将可裂解部分连接至荷伯希二烯剪接调节子的间隔子单元为自消融型间隔子单元。

[0309] 在一些实施例中,间隔子单元包含pABC。在一些实施例中,pABC将可裂解部分连接至荷伯希二烯剪接调节子。在一些实施例中,可裂解部分为可裂解肽部分,例如氨基酸单元。在一些实施例中,接头包含氨基酸单元-pABC。

[0310] 在一些实施例中,接头包含Val-Cit-pABC。在一些实施例中,接头包含将接头接合至抗体或抗原结合片段的Val-Cit-pABC及MC Mal-间隔子单元。在一些实施例中,接头包含MC-Val-Cit-pABC。在一些实施例中,接头包含MC-Val-Cit-pABC及至少一个额外间隔子单元。MC-Val-Cit-pABC接头的实例在本文中还称为“ADL1”或“ADL1”接头。

[0311] 在一些实施例中,接头包含Val-Ala-pABC。在一些实施例中,接头包含将接头接合至抗体或抗原结合片段的Val-Ala-pABC及MC Mal-间隔子单元。在一些实施例中,接头包含

MC-Val-Ala-pABC。在一些实施例中,接头包含MC-Val-Ala-pABC及至少一个额外间隔子单元。MC-Val-Ala-pABC接头的实例在本文中还称为“ADL6”或“ADL6”接头。

[0312] 在一些实施例中,接头包含Glu-Val-Cit-pABC。在一些实施例中,接头包含将接头接合至抗体或抗原结合片段的Glu-Val-Cit-pABC及MC Mal-间隔子单元。在一些实施例中,接头包含MC-Glu-Val-Cit-pABC。在一些实施例中,接头包含MC-Glu-Val-Cit-pABC及至少一个额外间隔子单元。MC-Glu-Val-Cit-pABC接头的实例在本文中还称为“ADL23”或“ADL23”接头。

[0313] 在一些实施例中,接头包含Ala-Ala-Asn-pABC。在一些实施例中,接头包含将接头接合至抗体或抗原结合片段的Ala-Ala-Asn-pABC及MC Mal-间隔子单元。在一些实施例中,接头包含MC-Ala-Ala-Asn-pABC。在一些实施例中,接头包含MC-Ala-Ala-Asn-pABC及至少一个额外间隔子单元。MC-Ala-Ala-Asn-pABC接头的实例在本文中还称为“ADL21”或“ADL21”接头。

[0314] 在一些其他实施例中,间隔子单元包含pAB。在一些实施例中,pAB将可裂解部分连接至荷伯希二烯剪接调节子。在一些实施例中,可裂解部分为可裂解肽部分,例如氨基酸单元。在一些实施例中,接头包含氨基酸单元-pAB。

[0315] 在一些实施例中,接头包含Val-Ala-pAB。在一些实施例中,接头包含将接头接合至抗体或抗原结合片段的Val-Ala-pAB及MC Mal-间隔子单元。在一些实施例中,接头包含MC-Val-Ala-pAB。在一些实施例中,接头包含MC-Val-Ala-pAB及至少一个额外间隔子单元。MC-Val-Ala-pAB接头的实例在本文中还称为“ADL5”或“ADL5”接头。

[0316] 在一些实施例中,接头包含Val-Cit-pAB。在一些实施例中,接头包含将接头接合至抗体或抗原结合片段的Val-Cit-pAB及MC Mal-间隔子单元。在一些实施例中,接头包含MC-Val-Cit-pAB。在一些实施例中,接头包含MC-Val-Cit-pAB及至少一个额外间隔子单元。MC-Val-Cit-pAB接头的实例在本文中还称为“ADL7”或“ADL7”接头。

[0317] 在一些实施例中,接头包含 β -葡萄糖醛酸-pABC。在一些实施例中,接头包含将接头接合至抗体或抗原结合片段的 β -葡萄糖醛酸-pABC及MC Mal-间隔子单元。在一些实施例中,接头包含MC- β -葡萄糖醛酸-pABC。在一些实施例中,接头包含MC- β -葡萄糖醛酸-pABC及至少一个额外间隔子单元。MC- β -葡萄糖醛酸-pABC的实例在本文中还称为“ADL13”或“ADL13”接头。

[0318] 在一些实施例中,接头包含 β -葡萄糖醛酸-pAB。在一些实施例中,接头包含将接头接合至抗体或抗原结合片段的 β -葡萄糖醛酸-pAB及MC Mal-间隔子单元。在一些实施例中,接头包含MC- β -葡萄糖醛酸-pAB。

[0319] 在一些实施例中,抗体或抗原结合片段经由ADL1、ADL2、ADL5、ADL6、ADL7、ADL12、ADL13、ADL14、ADL15、ADL21或ADL23接头结合至荷伯希二烯剪接调节子药物部分。已发现,在不同实施例中,包含ADL1、ADL2、ADL5、ADL6、ADL7、ADL12、ADL13、ADL14、ADL15、ADL21或ADL23接头及本文所披露的荷伯希二烯剪接调节子药物部分的ADC展现治疗性ADC所需的特性。在不同实施例中,这些特性包括但不限于有效药物负载量、低聚集量、在储存条件下或当在体内循环时的稳定性(例如血清稳定性)、对表达靶标的细胞保持与未结合抗体相当的亲和力、针对表达靶标的细胞的强效细胞毒性、较低脱靶细胞杀灭水平、较高旁观者杀灭水平和/或有效活体内抗癌活性,全部特性均与使用其他接头-有效负载的ADC相比较而言。举

例而言,在不同实施例中,与使用其他接头-有效负载(例如ADL10接头及荷伯希二烯剪接调节子药物部分)的ADC相比,包含ADL1、ADL2、ADL5、ADL6、ADL7、ADL12、ADL13、ADL14、ADL15、ADL21或ADL23接头及本文所披露的荷伯希二烯剪接调节子药物部分的ADC展现经增加的抑制表达靶标的细胞生长和/或增殖的能力。在不同实施例中,与基于其他剪接调节子的ADC(例如如Puthenveetil等人Bioconjugate Chem.[生物缀合化学](2016) 27:1880-8中所报导的基于泰兰他汀A(thailanstatin A)的ADC)相比,包含ADL1、ADL2、ADL5、ADL6、ADL7、ADL12、ADL13、ADL14、ADL15、ADL21或ADL23接头及本文所披露的荷伯希二烯剪接调节子药物部分的ADC展现出意料地经增加的活体内稳定性(例如血浆稳定性)。

[0320] 在一些实施例中,在结合至例如抗HER2抗体(诸如曲妥珠单抗)、抗CD138抗体(诸如B-B4)或抗EPHA2抗体(诸如1C1)的接头-有效负载的情况下可观测到由ADL1、ADL2、ADL5、ADL6、ADL7、ADL12、ADL13、ADL14、ADL15、ADL21或ADL23接头与本文所披露的荷伯希二烯剪接调节子药物部分的特定组合所提供的良好或优良功能特性。

[0321] 在一些实施例中,ADC包含ADL1-荷伯希二烯剪接调节子及包含保持靶向增生性细胞且内化于增生性细胞中的能力的抗体或其抗原结合片段的抗体或抗原结合片段。在一些实施例中,ADC包含ADL2-荷伯希二烯剪接调节子及包含保持靶向增生性细胞且内化于增生性细胞中的能力的抗体或其抗原结合片段的抗体或抗原结合片段。在一些实施例中,ADC包含ADL5-荷伯希二烯剪接调节子及包含保持靶向增生性细胞且内化于增生性细胞中的能力的抗体或其抗原结合片段的抗体或抗原结合片段。在一些实施例中,ADC包含ADL6-荷伯希二烯剪接调节子及包含保持靶向增生性细胞且内化于增生性细胞中的能力的抗体或其抗原结合片段的抗体或抗原结合片段。在一些实施例中,ADC包含ADL7-荷伯希二烯剪接调节子及包含保持靶向增生性细胞且内化于增生性细胞中的能力的抗体或其抗原结合片段的抗体或抗原结合片段。在一些实施例中,ADC包含ADL12-荷伯希二烯剪接调节子及包含保持靶向增生性细胞且内化于增生性细胞中的能力的抗体或其抗原结合片段的抗体或抗原结合片段。在一些实施例中,ADC包含ADL13-荷伯希二烯剪接调节子及包含保持靶向增生性细胞且内化于增生性细胞中的能力的抗体或其抗原结合片段的抗体或抗原结合片段。在一些实施例中,ADC包含ADL14-荷伯希二烯剪接调节子及包含保持靶向增生性细胞且内化于增生性细胞中的能力的抗体或其抗原结合片段的抗体或抗原结合片段。在一些实施例中,ADC包含ADL15-荷伯希二烯剪接调节子及包含保持靶向增生性细胞且内化于增生性细胞中的能力的抗体或其抗原结合片段的抗体或抗原结合片段。

[0322] 在一些实施例中,ADC包含ADL1-荷伯希二烯剪接调节子及靶向表达HER2的增生性细胞的抗体或其抗原结合片段。在一些实施例中,ADC包含ADL2-荷伯希二烯剪接调节子及靶向表达HER2的增生性细胞的抗体或其抗原结合片段。在一些实施例中,ADC包含ADL5-荷伯希二烯剪接调节子及靶向表达HER2的增生性细胞的抗体或其抗原结合片段。在一些实施例中,ADC包含ADL6-荷伯希二烯剪接调节子及靶向表达HER2的增生性细胞的抗体或其抗原结合片段。在一些实施例中,ADC包含ADL7-荷伯希二烯剪接调节子及靶向表达HER2的增生性细胞的抗体或其抗原结合片段。在一些实施例中,ADC包含ADL12-荷伯希二烯剪接调节子及靶向表达HER2的增生性细胞的抗体或其抗原结合片段。在一些实施例中,ADC包含ADL13-荷伯希二烯剪接调节子及靶向表达HER2的增生性细胞的抗体或其抗原结合片段。在一些实施例中,ADC包含ADL14-荷伯希二烯剪接调节子及靶向表达HER2的增生性细胞的抗体或其

抗原结合片段。在一些实施例中,ADC包含ADL15-荷伯希二烯剪接调节子及靶向表达HER2的赘生性细胞的抗体或其抗原结合片段。

[0323] 在一些实施例中,靶向表达HER2的赘生性细胞的抗体或其抗原结合片段为内化性抗体或内化性抗原结合片段。在一些实施例中,靶向表达HER2的赘生性细胞的抗体或其抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:1(HCDR1)、SEQ ID NO:2(HCDR2)及SEQ ID NO:3(HCDR3)的氨基酸序列的三个重链互补决定区(HCDR);及包含SEQ ID NO:4(LCDR1)、SEQ ID NO:5(LCDR2)及SEQ ID NO:6(LCDR3)的氨基酸序列的三个轻链互补决定区(LCDR)。

[0324] 在一些实施例中,ADC具有式(I):



其中:

(i) Ab为包含含有SEQ ID NO:1(HCDR1)、SEQ ID NO:2(HCDR2)及SEQ ID NO:3(HCDR3)的氨基酸序列的三个重链互补决定区(HCDR)及包含SEQ ID NO:4(LCDR1)、SEQ ID NO:5(LCDR2)及SEQ ID NO:6(LCDR3)的氨基酸序列的三个轻链互补决定区(LCDR)的抗HER2抗体或其抗原结合片段;

(ii) H为荷伯希二烯剪接调节子;

(iii) L为包含ADL1、ADL2、ADL5、ADL6、ADL7、ADL12、ADL13、ADL14、ADL15、ADL21或ADL23的接头;及

(iv) p为1至15的整数。

[0325] 在一些实施例中,靶向表达HER2的赘生性细胞的抗体或其抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:19的氨基酸序列的重链可变区及包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列的轻链可变区。在一些实施例中,靶向表达HER2的赘生性细胞的抗体或其抗原结合片段包含人类IgG1重链恒定域及人类Igκ轻链恒定域。在一些实施例中,抗体为曲妥珠单抗。在一些实施例中,p为1至10、2至8或4至8的整数。在一些实施例中,p为4。在一些实施例中,p为8。

[0326] 在一些实施例中,ADC包含ADL1-荷伯希二烯剪接调节子及靶向表达CD138的赘生性细胞的抗体或其抗原结合片段。在一些实施例中,ADC包含ADL2-荷伯希二烯剪接调节子及靶向表达CD138的赘生性细胞的抗体或其抗原结合片段。在一些实施例中,ADC包含ADL5-荷伯希二烯剪接调节子及靶向表达CD138的赘生性细胞的抗体或其抗原结合片段。在一些实施例中,ADC包含ADL6-荷伯希二烯剪接调节子及靶向表达CD138的赘生性细胞的抗体或其抗原结合片段。在一些实施例中,ADC包含ADL7-荷伯希二烯剪接调节子及靶向表达CD138的赘生性细胞的抗体或其抗原结合片段。在一些实施例中,ADC包含ADL12-荷伯希二烯剪接调节子及靶向表达CD138的赘生性细胞的抗体或其抗原结合片段。在一些实施例中,ADC包含ADL13-荷伯希二烯剪接调节子及靶向表达CD138的赘生性细胞的抗体或其抗原结合片段。在一些实施例中,ADC包含ADL14-荷伯希二烯剪接调节子及靶向表达CD138的赘生性细胞的抗体或其抗原结合片段。在一些实施例中,ADC包含ADL15-荷伯希二烯剪接调节子及靶向表达CD138的赘生性细胞的抗体或其抗原结合片段。

[0327] 在一些实施例中,靶向表达CD138的赘生性细胞的抗体或其抗原结合片段为内化性抗体或内化性抗原结合片段。在一些实施例中,靶向表达CD138的赘生性细胞的抗体或其抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:7(HCDR1)、SEQ ID NO:8(HCDR2)及SEQ ID NO:9(HCDR3)的氨基酸序列的三个重链互补决定区(HCDR);及包含SEQ ID NO:10(LCDR1)、SEQ ID NO:11

(LCDR2) 及SEQ ID NO:12 (LCDR3) 的氨基酸序列的三个轻链互补决定区 (LCDR)。

[0328] 在一些实施例中,ADC具有式 (I):



其中:

(i) Ab为包含含有SEQ ID NO:7 (HCDR1)、SEQ ID NO:8 (HCDR2) 及SEQ ID NO:9 (HCDR3) 的氨基酸序列的三个重链互补决定区 (HCDR) 及包含SEQ ID NO:10 (LCDR1)、SEQ ID NO:11 (LCDR2) 及SEQ ID NO:12 (LCDR3) 的氨基酸序列的三个轻链互补决定区 (LCDR) 的抗CD138抗体或其抗原结合片段;

(ii) H为荷伯希二烯剪接调节子;

(iii) L为包含ADL1、ADL2、ADL5、ADL6、ADL7、ADL12、ADL13、ADL14、ADL15、ADL21或ADL23的接头;并且

(iv) p为1至15的整数。

[0329] 在一些实施例中,靶向表达CD138的赘生性细胞的抗体或其抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:21的氨基酸序列的重链可变区及包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列的轻链可变区。在一些实施例中,靶向表达CD138的赘生性细胞的抗体或其抗原结合片段包含鼠IgG2a重链恒定域及鼠Igκ轻链恒定域。在一些实施例中,靶向表达CD138的赘生性细胞的抗体或其抗原结合片段包含人类IgG2a重链恒定域及人类Igκ轻链恒定域。在一些实施例中,抗体为B-B4。在一些实施例中,p为1至10、2至8或4至8的整数。在一些实施例中,p为4。在一些实施例中,p为8。

[0330] 在一些实施例中,ADC包含ADL1-荷伯希二烯剪接调节子及靶向表达EPHA2的赘生性细胞的抗体或其抗原结合片段。在一些实施例中,ADC包含ADL2-荷伯希二烯剪接调节子及靶向表达EPHA2的赘生性细胞的抗体或其抗原结合片段。在一些实施例中,ADC包含ADL5-荷伯希二烯剪接调节子及靶向表达EPHA2的赘生性细胞的抗体或其抗原结合片段。在一些实施例中,ADC包含ADL6-荷伯希二烯剪接调节子及靶向表达EPHA2的赘生性细胞的抗体或其抗原结合片段。在一些实施例中,ADC包含ADL7-荷伯希二烯剪接调节子及靶向表达EPHA2的赘生性细胞的抗体或其抗原结合片段。在一些实施例中,ADC包含ADL12-荷伯希二烯剪接调节子及靶向表达EPHA2的赘生性细胞的抗体或其抗原结合片段。在一些实施例中,ADC包含ADL13-荷伯希二烯剪接调节子及靶向表达EPHA2的赘生性细胞的抗体或其抗原结合片段。在一些实施例中,ADC包含ADL14-荷伯希二烯剪接调节子及靶向表达EPHA2的赘生性细胞的抗体或其抗原结合片段。在一些实施例中,ADC包含ADL15-荷伯希二烯剪接调节子及靶向表达EPHA2的赘生性细胞的抗体或其抗原结合片段。

[0331] 在一些实施例中,靶向表达EPHA2的赘生性细胞的抗体或其抗原结合片段为内化性抗体或内化性抗原结合片段。在一些实施例中,靶向表达EPHA2的赘生性细胞的抗体或其抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:13 (HCDR1)、SEQ ID NO:14 (HCDR2) 及SEQ ID NO:15 (HCDR3) 的氨基酸序列的三个重链互补决定区 (HCDR);及包含SEQ ID NO:16 (LCDR1)、SEQ ID NO:17 (LCDR2) 及SEQ ID NO:18 (LCDR3) 的氨基酸序列的三个轻链互补决定区 (LCDR)。

[0332] 在一些实施例中,ADC具有式 (I):



其中:

(i) Ab为包含含有SEQ ID NO:13(HCDR1)、SEQ ID NO:14(HCDR2)及SEQ ID NO:15(HCDR3)的氨基酸序列的三个重链互补决定区(HCDR)及包含SEQ ID NO:16(LCDR1)、SEQ ID NO:17(LCDR2)及SEQ ID NO:18(LCDR3)的氨基酸序列的三个轻链互补决定区(LCDR)的抗EPHA2抗体或其抗原结合片段;

(ii) H为荷伯希二烯剪接调节子;

(iii) L为包含ADL1、ADL2、ADL5、ADL6、ADL7、ADL12、ADL13、ADL14、ADL15、ADL21或ADL23的接头;并且

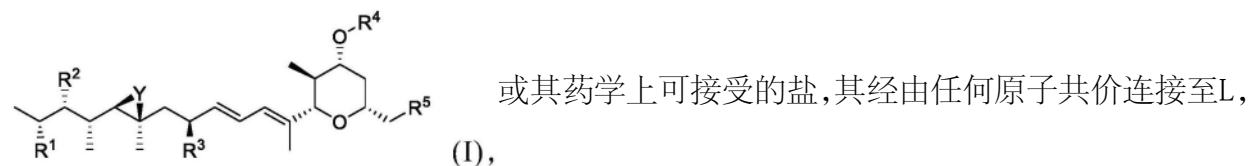
(iv) p为1至15的整数。

[0333] 在一些实施例中,靶向表达EPHA2的赘生性细胞的抗体或其抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:23的氨基酸序列的重链可变区及包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列的轻链可变区。在一些实施例中,靶向表达EPHA2的赘生性细胞的抗体或其抗原结合片段包含人类IgG1重链恒定域及人类Igκ轻链恒定域。在一些实施例中,抗体为1C1。在一些实施例中,p为1至10、2至8或4至8的整数。在一些实施例中,p为4。在一些实施例中,p为8。

荷伯希二烯剪接调节子

[0334] 在一些实施例中,抗体-药物缀合物为式(I) 抗体-药物缀合物:Ab-(L-H)_p,其中Ab为靶向赘生性细胞的抗体或抗原结合片段;H为荷伯希二烯剪接调节子;L为将Ab共价连接至H的接头;且p为1至15的整数。

[0335] 在一些实施例中,作为荷伯希二烯剪接调节子的H包含具有式(I)的化合物:



其中:

Y选自O、S、NR⁶及CR⁶R⁷;

R¹、R²及R³各自独立地选自氢、羟基、-O-(C₁-C₆烷基)、-O-C(=O)-(C₁-C₆烷基)、-C(=O)-O-(C₁-C₆烷基)及C₁-C₆烷基;

R⁴选自氢、C₁-C₆烷基、-C(=O)-(C₁-C₆烷基)、-C(=O)-(C₃-C₈碳环基)、-C(=O)-(C₃-C₈杂环基)及-C(=O)-NR⁶R⁷;

R⁵选自氢、羟基、-CH₂-OH、-CO₂H、-C(=O)-O-(C₁-C₆烷基)、-C(=O)-NR⁶R⁷、-NR⁶-C(=O)-R⁸、-O-C(=O)-NR⁶R⁷、-NR⁶-C(=O)-R⁸及-NR⁶-C(=O)-NR⁶R⁷;

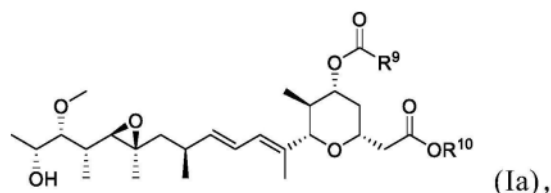
R⁶及R⁷各自独立地选自氢、-R⁸、-C(=O)-R⁸及-C(=O)-O-R⁸;及

R⁸选自C₁-C₆烷基、C₃-C₈碳环基及C₃-C₈杂环基,

其中R¹、R²、R³、R⁴、R⁵、R⁶、R⁷及R⁸各自独立地经0至3个独立地选自以下的基团取代:卤素、羟基、C₁-C₆烷基、-O-(C₁-C₆烷基)、-CO₂H、-C(=O)-(C₁-C₆烷基)、-C(=O)-(C₃-C₈碳环基)、-C(=O)-(C₃-C₈杂环基)、-NR⁶R⁷、C₃-C₈碳环基、C₁-C₆烷基羟基、C₁-C₆烷基烷氧基、苄基及C₃-C₈杂环基,其中的每一个可独立地经0或1个选自以下的基团取代:卤素、羟基、C₁-C₃烷基、C₁-C₃烷氧基、C₁-C₃卤烷基、-NH-C(=O)-(C₁-C₃烷基)及-NH-C(=O)-O-(C₁-C₃烷基),且

其中共价连接至L的原子的价数未超出。

[0336] 在一些实施例中,作为荷伯希二烯剪接调节子的H包含具有式(Ia)的化合物:



或其药学上可接受的盐,其经由任何原子共价连接

至L,其中:

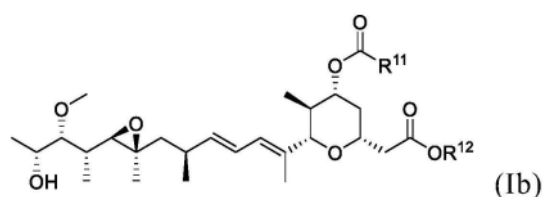
R^9 选自 C_3 - C_8 杂环基;

R^{10} 选自H及 C_1 - C_6 烷基,

其中 R^9 及 R^{10} 各自独立地经0至3个独立地选自以下的基团取代:卤素、羟基、 C_1 - C_3 烷基、 C_1 - C_3 烷氧基、 $-NH_2$ 、 $-NH-(C_1-C_3\text{烷基})$ 及 $-N-(C_1-C_3\text{烷基})_2$,且

其中共价连接至L的原子的价数未超出。

[0337] 在一些实施例中,作为荷伯希二烯剪接调节子的H包含具有式(Ib)的化合物:



[0338] ,或其药学上可接受的盐,其经由任何原子共价连接至L,其中:

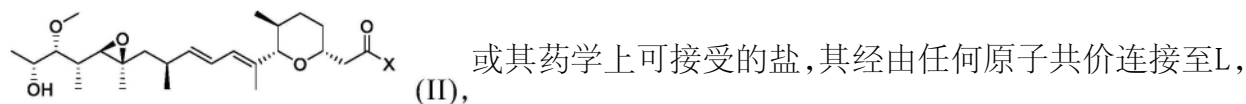
R^{11} 选自 $\cdot-N\text{---}(\text{piperidine ring})\text{---}N-R^{13}$ 、 $\cdot-N\text{---}(\text{piperazine ring})\text{---}N-R^{13}$ 及 $\cdot-N\text{---}(\text{pyrrolidine ring})\text{---}N-R^{13}$, 其中*指示 R^{11} 与该化合物的其余

部分的连接点;

R^{12} 及 R^{13} 各自独立地选自H及甲基;并且

其中共价连接至L的原子的价数未超出。

[0339] 在一些实施例中,作为荷伯希二烯剪接调节子的H包含具有式(II)的化合物:



其中:

X为羟基或 NR^6R^7 ;

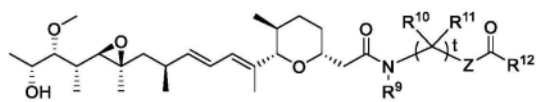
R^6 及 R^7 各自独立地选自氢、 $-R^8$ 、 $-C(=O)-R^8$ 、 $-C(=O)-O-R^8$ 、 $-(C_1-C_6\text{烷基})-O-C(=O)-R^8$ 及 $-(C_1-C_6\text{烷基})-NH-C(=O)-R^8$;并且

R^8 选自 C_1 - C_6 烷基、 C_3 - C_8 碳环基及 C_3 - C_8 杂环基,

其中 R^6 、 R^7 及 R^8 各自独立地经0至3个独立地选自以下的基团取代:卤素、羟基、 C_1 - C_6 烷基、 $-O-(C_1-C_6\text{烷基})$ 、 $-CO_2H$ 、 $-C(=O)-O-(C_1-C_6\text{烷基})$ 、 $-C(=O)-(C_1-C_6\text{烷基})$ 、 $-C(=O)-(C_3-C_8\text{碳环基})$ 、 $-C(=O)-(C_3-C_8\text{杂环基})$ 、 $-NR^6R^7$ 、 C_3 - C_8 碳环基、 C_1 - C_6 烷基羟基、 C_1 - C_6 烷基烷氧基、苄基及 C_3 - C_8 杂环基,其中的每一个可独立地经0或1个选自以下的基团取代:卤素、羟基、 C_1 - C_3 烷基、 C_1 - C_3 烷氧基、 C_1 - C_3 卤烷基、 $-NH-C(=O)-(C_1-C_3\text{烷基})$ 及 $-NH-C(=O)-O-(C_1-C_3\text{烷基})$, 且

其中共价连接至L的原子的价数未超出。

[0340] 在一些实施例中,作为荷伯希二烯剪接调节子的H包含具有式(IIa)的化合物:



或其药学上可接受的盐,其经由任何原子共价连接至L,其中:

Z选自NR⁹及O;

R⁹选自氢及C₁-C₆烷基;

R¹⁰及R¹¹各自独立地选自氢、卤素、羟基、C₁-C₆烷基、-O-(C₁-C₆烷基)、-CO₂H、-C(=O)-O-(C₁-C₆烷基)、-C(=O)-(C₁-C₆烷基)、-C(=O)-(C₃-C₈碳环基)、-C(=O)-(C₃-C₈杂环基)、C₃-C₈碳环基、C₁-C₆烷基羟基、C₁-C₆烷基烷氧基、苄基及C₃-C₈杂环基;

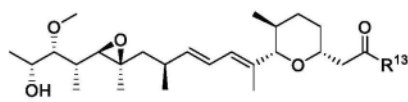
R¹²选自C₁-C₆烷基、C₃-C₈碳环基、C₃-C₈杂环基,

其中R⁹、R¹⁰、R¹¹及R¹²各自独立地经0或1个选自以下的基团取代:卤素、羟基、C₁-C₃烷基、C₁-C₃烷氧基及C₁-C₃卤烷基;

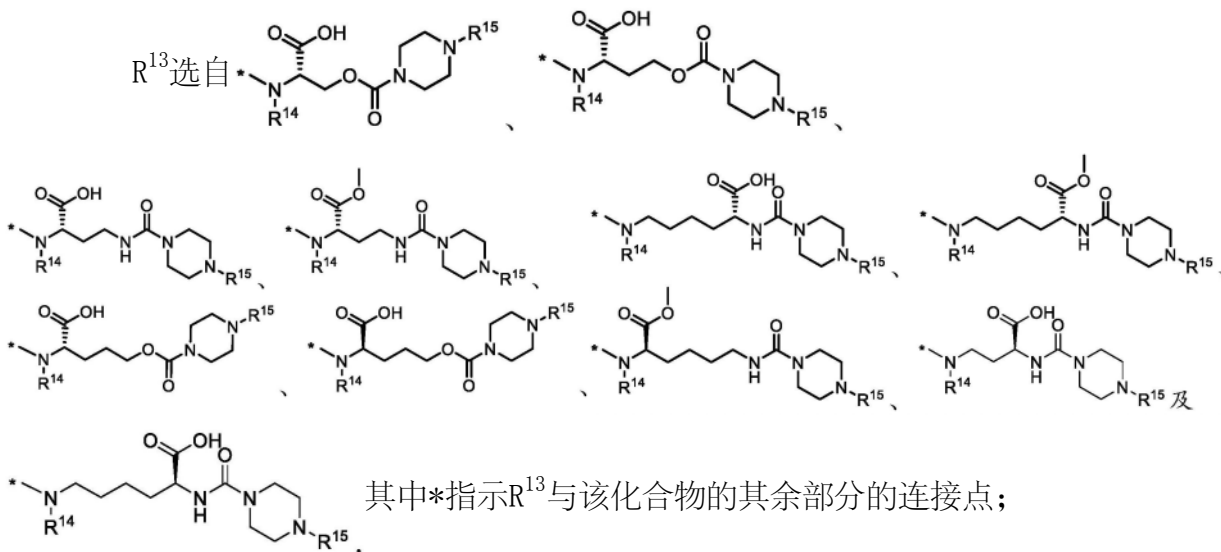
t为选自1、2、3、4、5及6的整数;并且

其中共价连接至L的原子的价数未超出。

[0341] 在一些实施例中,作为荷伯希二烯剪接调节子的H包含具有式(IIb)的化合物:



或其药学上可接受的盐,其经由任何原子共价连接至L,其中:

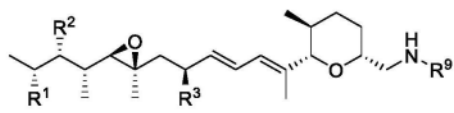


其中*指示R¹³与该化合物的其余部分的连接点;

R¹⁴及R¹⁵各自独立地选自氢及甲基;并且

其中共价连接至L的原子的价数未超出。

[0342] 在一些实施例中,作为荷伯希二烯剪接调节子的H包含具有式(III)的化合物:

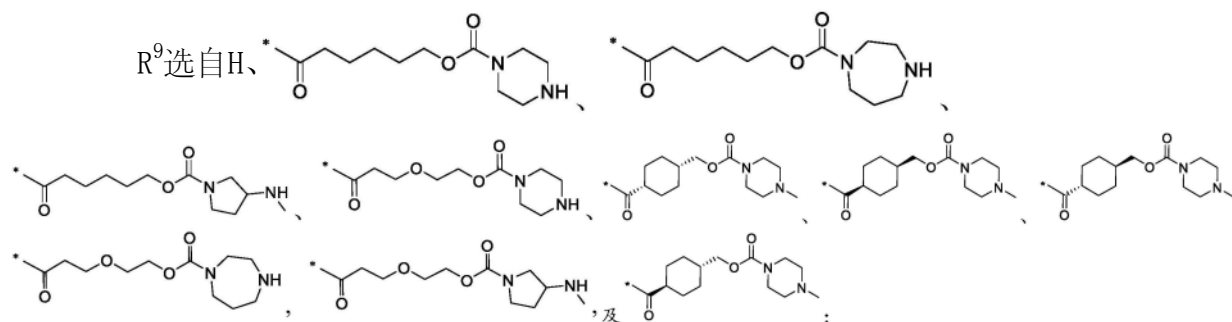


或其药学上可接受的盐,其经由任何原子共价连接至L,其中:

R¹、R²及R³各自独立地选自氢、羟基、-O-(C₁-C₆烷基)、-O-C(=O)-(C₁-C₆烷基)、-C(=O)-O-(C₁-C₆烷基)及C₁-C₆烷基;

R^6 及 R^7 各自独立地选自氢、 $-R^8$ 、 $-C(=O)-R^8$ 及 $-C(=O)-O-R^8$;

R^8 选自 C_1-C_6 烷基、 C_3-C_8 碳环基及 C_3-C_8 杂环基;并且



其中 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^6 、 R^7 及 R^8 各自独立地经0至3个独立地选自以下的基团取代:卤素、羟基、 C_1-C_6 烷基、 $-O-(C_1-C_6$ 烷基)、 $-CO_2H$ 、 $-C(=O)-(C_1-C_6$ 烷基)、 $-C(=O)-(C_3-C_8$ 碳环基)、 $-C(=O)-(C_3-C_8$ 杂环基)、 $-NR^6R^7$ 、 C_3-C_8 碳环基、 C_1-C_6 烷基羟基、 C_1-C_6 烷基烷氧基、苄基及 C_3-C_8 杂环基,其中的每一个可独立地经0或1个选自以下的基团取代:卤素、羟基、 C_1-C_3 烷基、 C_1-C_3 烷氧基、 C_1-C_3 卤烷基、 $-NH-C(=O)-(C_1-C_3$ 烷基)及 $-NH-C(=O)-O-(C_1-C_3$ 烷基),

其中共价连接至L的原子的价数未超出;并且

其中*指示 R^9 与该化合物的其余部分的连接点。

[0343] 在一些实施例中,抗体或抗原结合片段靶向表达以下的细胞:HER2、CD138、EPHA2、MSLN、FOLH1、CDH6、CEACAM5、CFC1B、ENPP3、FOLR1、HAVCR1、KIT、MET、MUC16、SLC39A6、SLC44A4和/或STEAP1。

[0344] 在一些实施例中,抗体或抗原结合片段靶向表达HER2的细胞。在一些实施例中,抗体或抗原结合片段为抗HER2抗体或抗原结合片段。在一些实施例中,抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:1(HCDR1)、SEQ ID NO:2(HCDR2)及SEQ ID NO:3(HCDR3)的氨基酸序列的三个重链互补决定区(HCDR1、HCDR2及HCDR3);及包含SEQ ID NO:4(LCDR1)、SEQ ID NO:5(LCDR2)及SEQ ID NO:6(LCDR3)的氨基酸序列的三个轻链互补决定区(LCDR1、LCDR2及LCDR3)。在一些实施例中,抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:19的氨基酸序列的重链可变区及包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列的轻链可变区。在一些实施例中,抗体或抗原结合片段包含人类IgG1重链恒定区。在一些实施例中,抗体或抗原结合片段包含人类Ig κ 轻链恒定区。

[0345] 在一些其他实施例中,抗体或抗原结合片段靶向表达CD138的细胞。在一些实施例中,抗体或抗原结合片段为抗CD138抗体或抗原结合片段。在一些实施例中,抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:7(HCDR1)、SEQ ID NO:8(HCDR2)及SEQ ID NO:9(HCDR3)的氨基酸序列的三个重链互补决定区(HCDR1、HCDR2及HCDR3);及包含SEQ ID NO:10(LCDR1)、SEQ ID NO:11(LCDR2)及SEQ ID NO:12(LCDR3)的氨基酸序列的三个轻链互补决定区(LCDR1、LCDR2及LCDR3)。在一些实施例中,抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:21的氨基酸序列的重链可变区及包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列的轻链可变区。在一些实施例中,抗体或抗原结合片段包含鼠IgG2a重链恒定区。在一些实施例中,抗体或抗原结合片段包含鼠Ig κ 轻链恒定区。在一些实施例中,抗体或抗原结合片段包含人类IgG2a重链恒定区。在一些实施例中,抗体或抗原结合片段包含人类Ig κ 轻链恒定区。

[0346] 在一些其他实施例中,抗体或抗原结合片段靶向表达EPHA2的细胞。在一些实施例

中,抗体或抗原结合片段为抗EPHA2抗体或抗原结合片段。在一些实施例中,抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:13(HCDR1)、SEQ ID NO:14(HCDR2)及SEQ ID NO:15(HCDR3)的氨基酸序列的三个重链互补决定区(HCDR1、HCDR2及HCDR3);及包含SEQ ID NO:16(LCDR1)、SEQ ID NO:17(LCDR2)及SEQ ID NO:18(LCDR3)的氨基酸序列的三个轻链互补决定区(LCDR1、LCDR2及LCDR3)。在一些实施例中,抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:23的氨基酸序列的重链可变区及包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列的轻链可变区。在一些实施例中,抗体或抗原结合片段包含人类IgG1重链恒定区。在一些实施例中,抗体或抗原结合片段包含人类Igκ轻链恒定区。

[0347] 在一些其他实施例中,抗体或抗原结合片段靶向表达MSLN的细胞。在一些实施例中,抗体或抗原结合片段为抗MSLN抗体或抗原结合片段。

[0348] 在一些其他实施例中,抗体或抗原结合片段靶向表达FOLH1的细胞。在一些实施例中,抗体或抗原结合片段为抗FOLH1抗体或抗原结合片段。

[0349] 在一些其他实施例中,抗体或抗原结合片段靶向表达CDH6的细胞。在一些实施例中,抗体或抗原结合片段为抗CDH6抗体或抗原结合片段。

[0350] 在一些其他实施例中,抗体或抗原结合片段靶向表达CEACAM5的细胞。在一些实施例中,抗体或抗原结合片段为抗CEACAM5抗体或抗原结合片段。

[0351] 在一些其他实施例中,抗体或抗原结合片段靶向表达CFC1B的细胞。在一些实施例中,抗体或抗原结合片段为抗CFC1B抗体或抗原结合片段。

[0352] 在一些其他实施例中,抗体或抗原结合片段靶向表达ENPP3的细胞。在一些实施例中,抗体或抗原结合片段为抗ENPP3抗体或抗原结合片段。

[0353] 在一些其他实施例中,抗体或抗原结合片段靶向表达FOLR1的细胞。在一些实施例中,抗体或抗原结合片段为抗FOLR1抗体或抗原结合片段。

[0354] 在一些其他实施例中,抗体或抗原结合片段靶向表达HAVCR1的细胞。在一些实施例中,抗体或抗原结合片段为抗HAVCR1抗体或抗原结合片段。

[0355] 在一些其他实施例中,抗体或抗原结合片段靶向表达KIT的细胞。在一些实施例中,抗体或抗原结合片段为抗KIT抗体或抗原结合片段。

[0356] 在一些其他实施例中,抗体或抗原结合片段靶向表达MET的细胞。在一些实施例中,抗体或抗原结合片段为抗MET抗体或抗原结合片段。

[0357] 在一些其他实施例中,抗体或抗原结合片段靶向表达MUC16的细胞。在一些实施例中,抗体或抗原结合片段为抗MUC16抗体或抗原结合片段。

[0358] 在一些其他实施例中,抗体或抗原结合片段靶向表达SLC39A6的细胞。在一些实施例中,抗体或抗原结合片段为抗SLC39A6抗体或抗原结合片段。

[0359] 在一些其他实施例中,抗体或抗原结合片段靶向表达SLC44A4的细胞。在一些实施例中,抗体或抗原结合片段为抗SLC44A4抗体或抗原结合片段。

[0360] 在一些其他实施例中,抗体或抗原结合片段靶向表达STEAP1的细胞。在一些实施例中,抗体或抗原结合片段为抗STEAP1抗体或抗原结合片段。

[0361] 在一些实施例中,L选自本文所披露的接头中的任一种或本文所披露的接头组分的任何组合。在一些实施例中,L为包含MC-Val-Cit-pABC、Mal-(PEG)₂-CO、MC-Val-Ala-pAB、MC-Val-Ala-pABC、MC-Val-Cit-pAB、Mal-Hex、Mal-Et或Mal-Et-O-Et的接头。在一些实

施例中,接头还可包含一个或多个额外间隔子单元。在一些实施例中,L为ADL1、ADL2、ADL5、ADL6、ADL7、ADL12、ADL13、ADL14、ADL15、ADL21或ADL23接头。在一些实施例中,L为ADL12、ADL14或ADL15接头。在一些实施例中,ADL1、ADL2、ADL5、ADL6、ADL7、ADL12、ADL13、ADL14、ADL15、ADL21或ADL23接头还可包含一个或多个额外间隔子单元。

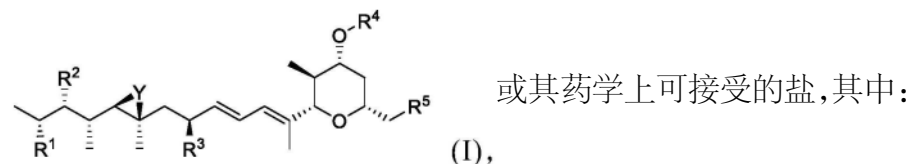
[0362] 在某些实施例中,在适当条件下使作为接头部分的前体的中间物与荷伯希二烯剪接调节子部分反应。在某些实施例中,在荷伯希二烯剪接调节子和/或中间物或接头上使用反应基。随后,在适当条件下使荷伯希二烯剪接调节子与中间物之间的反应产物或所衍生的荷伯希二烯剪接调节子(荷伯希二烯剪接调节子加上接头)与抗体或抗原结合片段反应。可替代地,首先可使中间物或接头与抗体或抗原结合片段或所衍生的抗体或抗原结合片段反应,且随后与药物或所衍生的药物反应。

[0363] 多个不同反应可供用于将荷伯希二烯剪接调节子部分和/或接头部分共价连接至抗体或抗原结合片段。此通常通过使抗体或抗原结合片段的一个或多个氨基酸残基,包括离氨酸的胺基、麸氨酸及天冬氨酸的游离羧酸基、半胱氨酸的硫氢基及芳族氨基酸的各种部分反应来实现。举例而言,非特异性共价连接可使用碳化二亚胺反应以使荷伯希二烯剪接调节子部分上的羧基(或胺基)连接至抗体或抗原结合片段上的胺基(或羧基)来进行。另外,还可使用诸如二醛或亚胺基酯的双官能试剂以将荷伯希二烯剪接调节子部分上的胺基连接至抗体或抗原结合片段上的胺基。希夫碱反应(Schiff base reaction)还可供用于将药物(例如荷伯希二烯剪接调节子)连接至结合剂。此方法涉及过碘酸盐氧化含有二醇或羟基基团的药物,由此形成醛,随后使该醛与结合剂反应。连接经由用结合剂的胺基形成希夫碱而发生。还可使用异硫氰酸酯作为偶合剂以用于将药物共价连接至结合剂。其他技术为本领域普通技术人员已知且处于本披露的范畴内。可使用此项技术中已知的各种化学反应生成且连接至抗体或抗原结合片段的药物部分的实例包括荷伯希二烯剪接调节子,例如本文所描述且例示的荷伯希二烯剪接调节子。

接头-荷伯希二烯剪接调节子/荷伯希二烯剪接调节子化合物

[0364] 本文进一步披露示例性接头-荷伯希二烯剪接调节子(L-H)化合物以及包含这类化合物的多个复本的组合。在不同实施例中,本文所披露的接头-荷伯希二烯剪接调节子化合物可由以下通式界定:L-H,其中L=接头部分,且H=荷伯希二烯剪接调节子。在某些实施例中,所披露的L-H化合物适用于本文所描述的ADC。

[0365] 在一些实施例中,本文披露具有式(I)的化合物:



Y选自O、S、NR⁶及CR⁶R⁷;

R¹、R²及R³各自独立地选自氢、羟基、-O-(C₁-C₆烷基)、-O-C(=O)-(C₁-C₆烷基)、-C(=O)-O-(C₁-C₆烷基)及C₁-C₆烷基;

R⁴选自氢、C₁-C₆烷基、-C(=O)-(C₁-C₆烷基)、-C(=O)-(C₃-C₈碳环基)、-C(=O)-(C₃-C₈杂环基)及-C(=O)-NR⁶R⁷;

R⁵选自氢、羟基、-CH₂-OH、-CO₂H、-C(=O)-O-(C₁-C₆烷基)、-C(=O)-NR⁶R⁷、-NR⁶-C

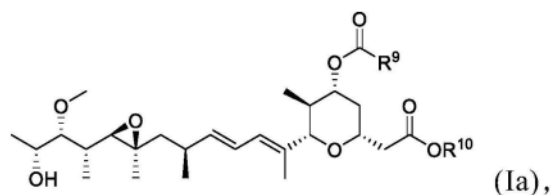
(=O) -R⁸、-O-C(=O) -NR⁶R⁷、-NR⁶-C(=O) -R⁸及-NR⁶-C(=O) -NR⁶R⁷;

R⁶及R⁷各自独立地选自氢、-R⁸、-C(=O) -R⁸及-C(=O) -O-R⁸;并且

R⁸选自C₁-C₆烷基、C₃-C₈碳环基及C₃-C₈杂环基,

其中R¹、R²、R³、R⁴、R⁵、R⁶、R⁷及R⁸各自独立地经0至3个独立地选自以下的基团取代: 卤素、羟基、C₁-C₆烷基、-O-(C₁-C₆烷基)、-CO₂H、-C(=O) -(C₁-C₆烷基)、-C(=O) -(C₃-C₈碳环基)、-C(=O) -(C₃-C₈杂环基)、-NR⁶R⁷、C₃-C₈碳环基、C₁-C₆烷基羟基、C₁-C₆烷基烷氧基、苄基及C₃-C₈杂环基,其中的每一个可独立地经0或1个选自以下的基团取代: 卤素、羟基、C₁-C₃烷基、C₁-C₃烷氧基、C₁-C₃卤烷基、-NH-C(=O) (C₁-C₃烷基)及-NH-C(=O) -O-(C₁-C₃烷基)。

[0366] 在一些实施例中,本文提供具有式(Ia)的化合物:



或其药学上可接受的盐,其经由任何原子共价连接

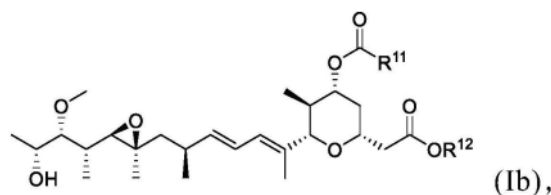
至L,其中:

R⁹选自C₃-C₈杂环基;并且

R¹⁰选自H及C₁-C₆烷基,

其中R⁹及R¹⁰各自独立地经0至3个独立地选自以下的基团取代: 卤素、羟基、C₁-C₃烷基、C₁-C₃烷氧基、-NH₂、-NH-(C₁-C₃烷基)及-N-(C₁-C₃烷基)₂。

[0367] 在一些实施例中,本文提供具有式(Ib)的化合物:



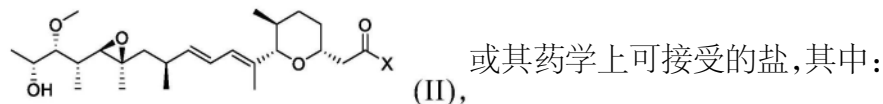
或其药学上可接受的盐,其中:

R¹¹选自 $\text{*}-\text{N}(\text{CH}_2)_2\text{N}-\text{R}^{13}$ 、 $\text{N}(\text{CH}_2)_2\text{N}-\text{R}^{13}$ 及 $\text{*}-\text{N}(\text{CH}_2)_2\text{N}-\text{R}^{13}$, 其中*指示R¹¹与该化合物的其

余部分的连接点;

R¹²及R¹³各自独立地选自H及甲基。

[0368] 在一些实施例中,本文提供具有式(II)的化合物:



X为羟基或NR⁶R⁷;

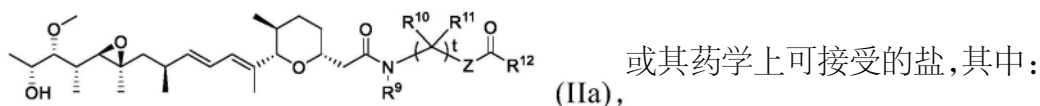
R⁶及R⁷各自独立地选自氢、-R⁸、-C(=O) -R⁸、-C(=O) -O-R⁸、-(C₁-C₆烷基) -O-C(=O) -R⁸及-(C₁-C₆烷基) -NH-C(=O) -R⁸;并且

R⁸选自C₁-C₆烷基、C₃-C₈碳环基及C₃-C₈杂环基,

其中R⁶、R⁷及R⁸各自独立地经0至3个独立地选自以下的基团取代: 卤素、羟基、C₁-C₆烷基、-O-(C₁-C₆烷基)、-CO₂H、-C(=O) -O-(C₁-C₆烷基)、-C(=O) -(C₁-C₆烷基)、-C(=O) -(C₃-C₈碳环基)、-C(=O) -(C₃-C₈杂环基)、-NR⁶R⁷、C₃-C₈碳环基、C₁-C₆烷基羟基、C₁-C₆烷基烷氧基、苄基及C₃-C₈杂环基,其中的每一个可独立地经0或1个选自以下的基团取代: 卤素、羟基、C₁-

C₃烷基、C₁-C₃烷氧基、C₁-C₃卤烷基、-NH-C(=O) (C₁-C₃烷基) 及 -NH-C(=O)-O- (C₁-C₃烷基)。

[0369] 在一些实施例中, 本文提供具有式 (IIa) 的化合物:



Z选自NR⁹及O;

R⁹选自氢及C₁-C₆烷基;

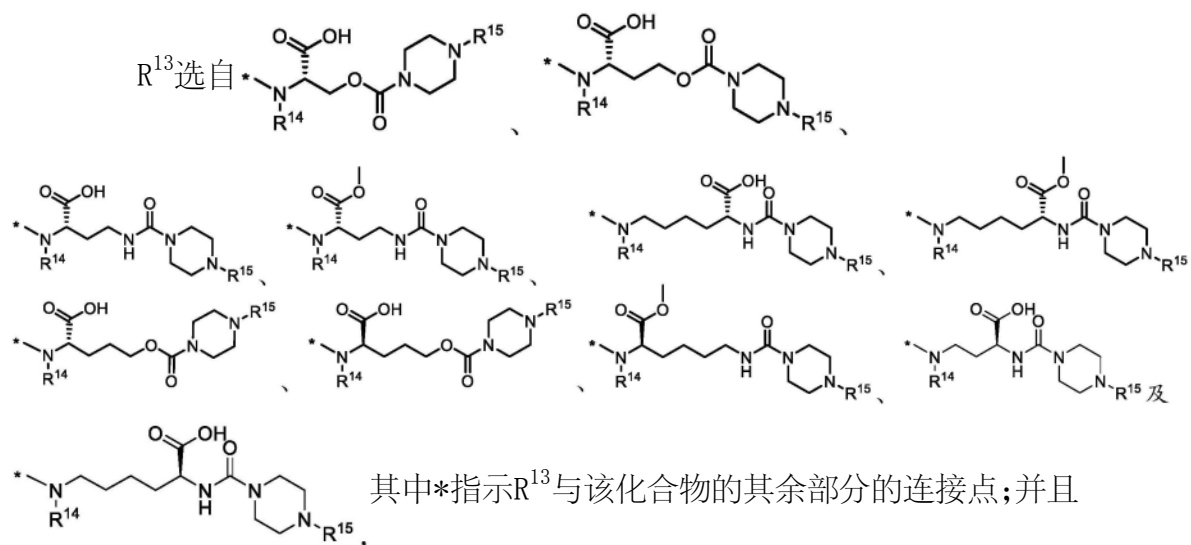
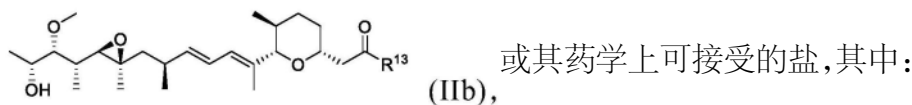
R¹⁰及R¹¹各自独立地选自氢、卤素、羟基、C₁-C₆烷基、-O- (C₁-C₆烷基)、-CO₂H、-C(=O)-O- (C₁-C₆烷基)、-C(=O)- (C₁-C₆烷基)、-C(=O)- (C₃-C₈碳环基)、-C(=O)- (C₃-C₈杂环基)、C₃-C₈碳环基、C₁-C₆烷基羟基、C₁-C₆烷基烷氧基、苄基及C₃-C₈杂环基;

R¹²选自C₁-C₆烷基、C₃-C₈碳环基、C₃-C₈杂环基,

其中R⁹、R¹⁰、R¹¹及R¹²各自独立地经0或1个选自以下的基团取代: 卤素、羟基、C₁-C₃烷基、C₁-C₃烷氧基及C₁-C₃卤烷基; 并且

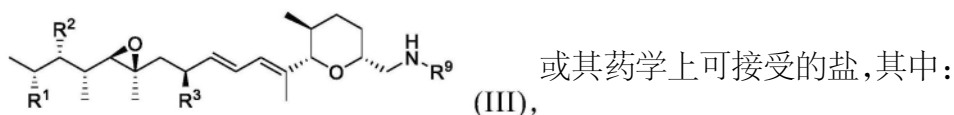
t为选自1、2、3、4、5及6的整数。

[0370] 在一些实施例中, 本文提供具有式 (IIb) 的化合物:



R¹⁴及R¹⁵各自独立地选自氢及甲基。

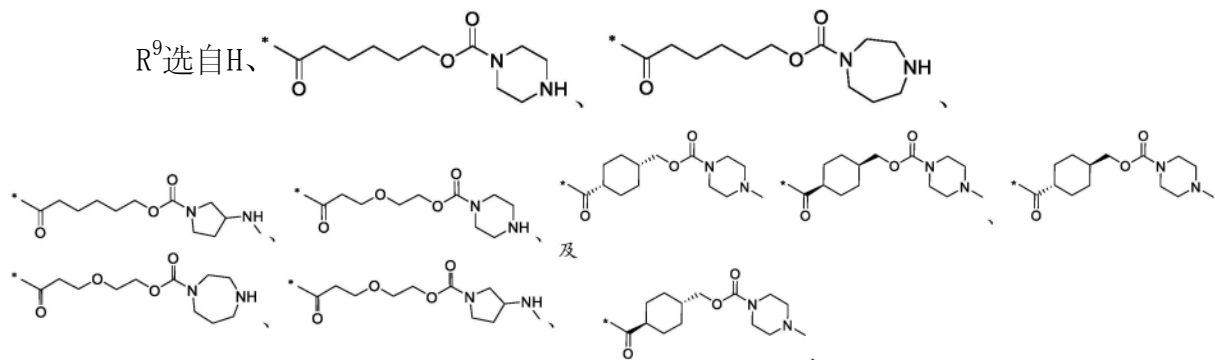
[0371] 在一些实施例中, 本文提供具有式 (III) 的化合物:



R¹、R²及R³各自独立地选自氢、羟基、-O- (C₁-C₆烷基)、-O-C(=O)- (C₁-C₆烷基)、-C(=O)-O- (C₁-C₆烷基) 及C₁-C₆烷基;

R⁶及R⁷各自独立地选自氢、-R⁸、-C(=O)-R⁸及-C(=O)-O-R⁸;

R⁸选自C₁-C₆烷基、C₃-C₈碳环基及C₃-C₈杂环基; 并且

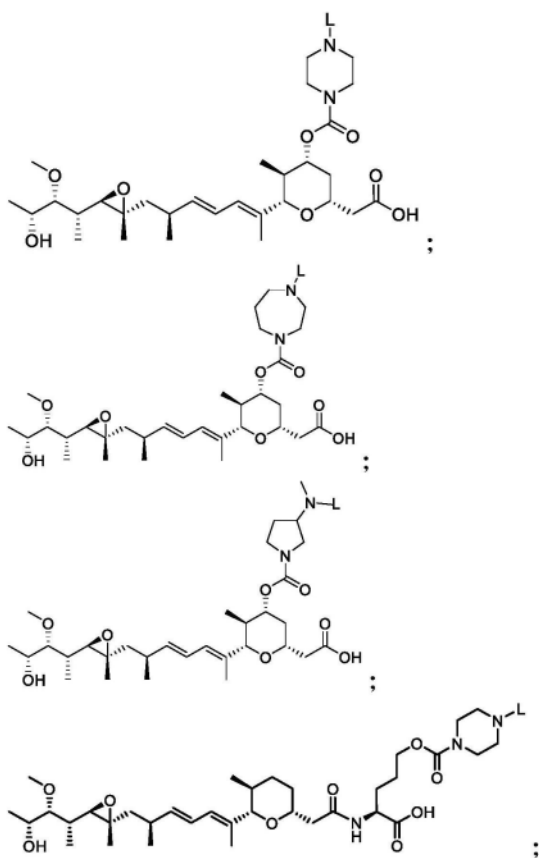


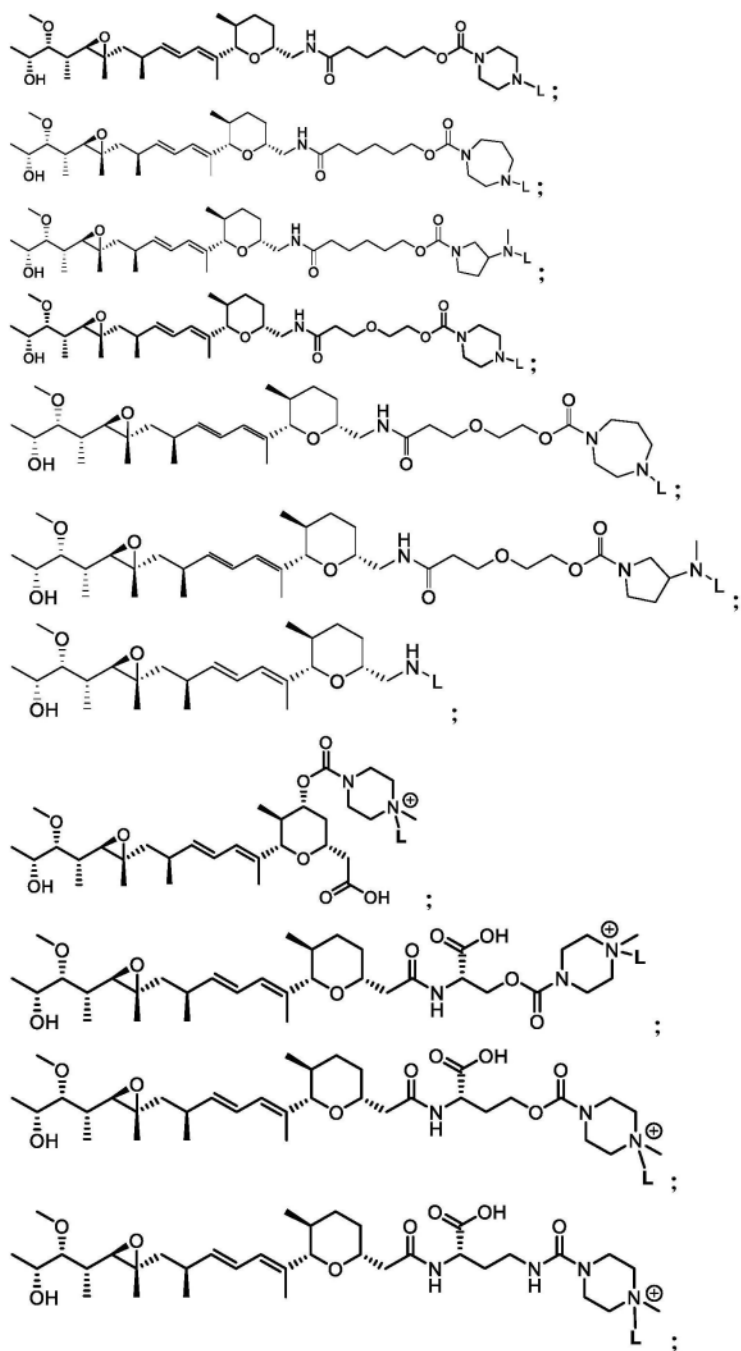
其中R¹、R²、R³、R⁶、R⁷及R⁸各自独立地经0至3个独立地选自以下的基团取代：卤素、羟基、C₁-C₆烷基、-O- (C₁-C₆烷基)、-CO₂H、-C(=O)- (C₁-C₆烷基)、-C(=O)- (C₃-C₈碳环基)、-C(=O)- (C₃-C₈杂环基)、-NR⁶R⁷、C₃-C₈碳环基、C₁-C₆烷基羟基、C₁-C₆烷基烷氧基、苄基及C₃-C₈杂环基，其中的每一个可独立地经0或1个选自以下的基团取代：卤素、羟基、C₁-C₃烷基、C₁-C₃烷氧基、C₁-C₃卤烷基、-NH-C(=O)- (C₁-C₃烷基) 及 -NH-C(=O)-O- (C₁-C₃烷基)；并且

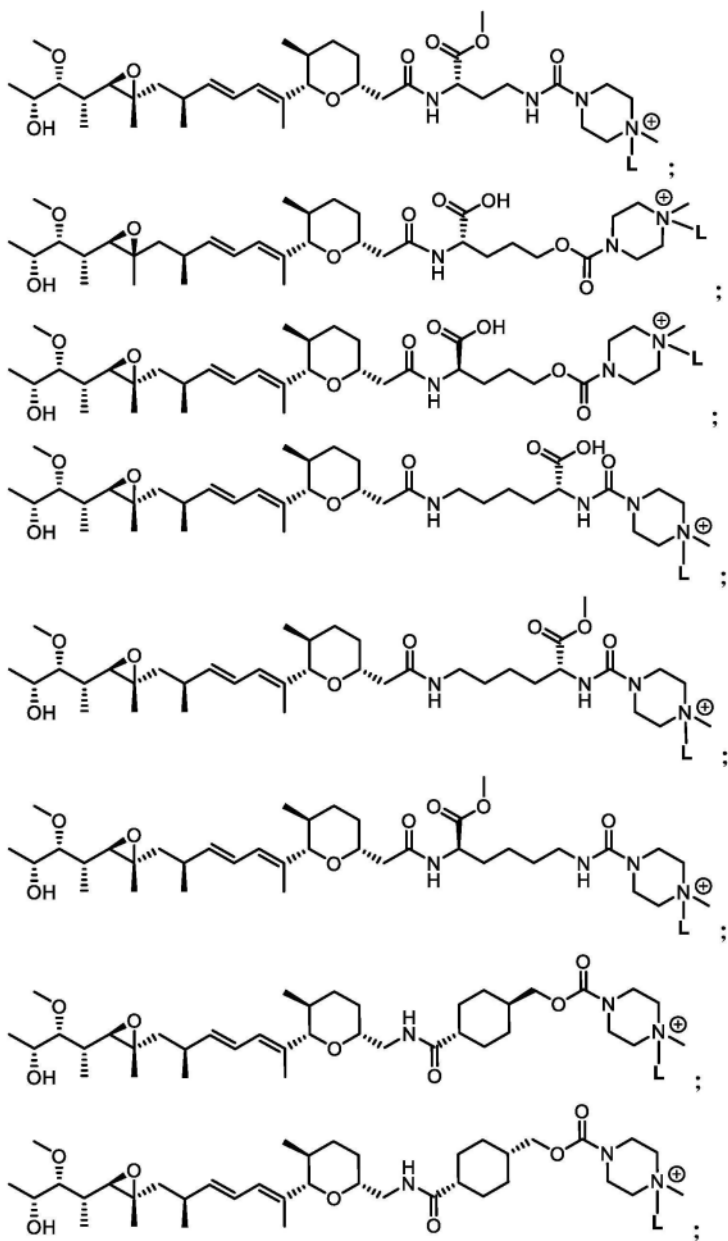
其中*指示R⁹与该化合物的其余部分的连接点。

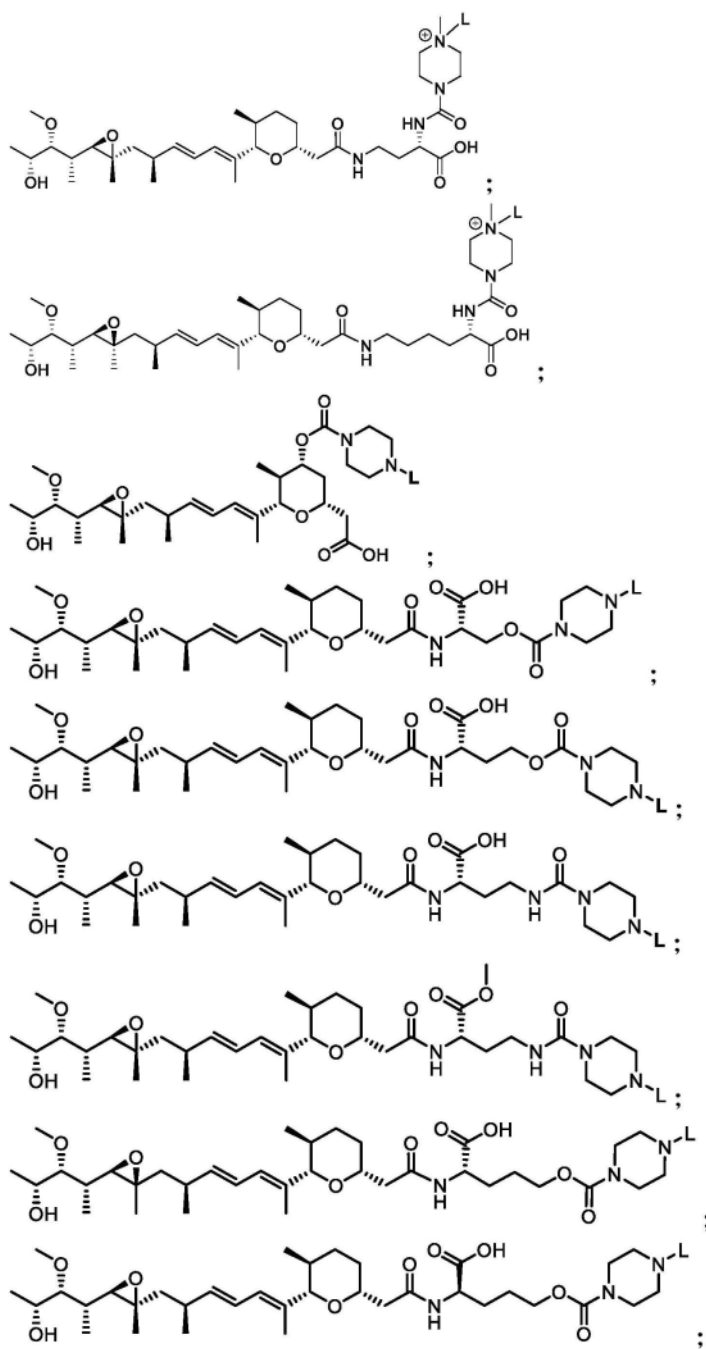
[0372] 在一些实施例中,本文提供化合物H1或其药学上可接受的盐。在一些实施例中,本文提供化合物H4或其药学上可接受的盐。在一些实施例中,本文提供化合物H5或其药学上可接受的盐。在一些实施例中,本文提供化合物H6或其药学上可接受的盐。在一些实施例中,本文提供化合物H7或其药学上可接受的盐。在一些实施例中,本文提供化合物H8或其药学上可接受的盐。在一些实施例中,本文提供化合物H9或其药学上可接受的盐。在一些实施例中,本文提供化合物H10或其药学上可接受的盐。在一些实施例中,本文提供化合物H2或其药学上可接受的盐。在一些实施例中,本文提供化合物H3或其药学上可接受的盐。在一些实施例中,本文提供化合物H12或其药学上可接受的盐。在一些实施例中,本文提供化合物H13或其药学上可接受的盐。在一些实施例中,本文提供化合物H14或其药学上可接受的盐。在一些实施例中,本文提供化合物H15或其药学上可接受的盐。在一些实施例中,本文提供化合物H16或其药学上可接受的盐。在一些实施例中,本文提供化合物H17或其药学上可接受的盐。在一些实施例中,本文提供化合物H18或其药学上可接受的盐。在一些实施例中,本文提供化合物H19或其药学上可接受的盐。在一些实施例中,本文提供化合物H20或其药学上可接受的盐。在一些实施例中,本文提供化合物H21或其药学上可接受的盐。在一些实施例中,本文提供化合物H22或其药学上可接受的盐。在一些实施例中,本文提供化合物H23或其药学上可接受的盐。在一些实施例中,本文提供化合物H24或其药学上可接受的盐。在一些实施例中,本文提供化合物H25或其药学上可接受的盐。

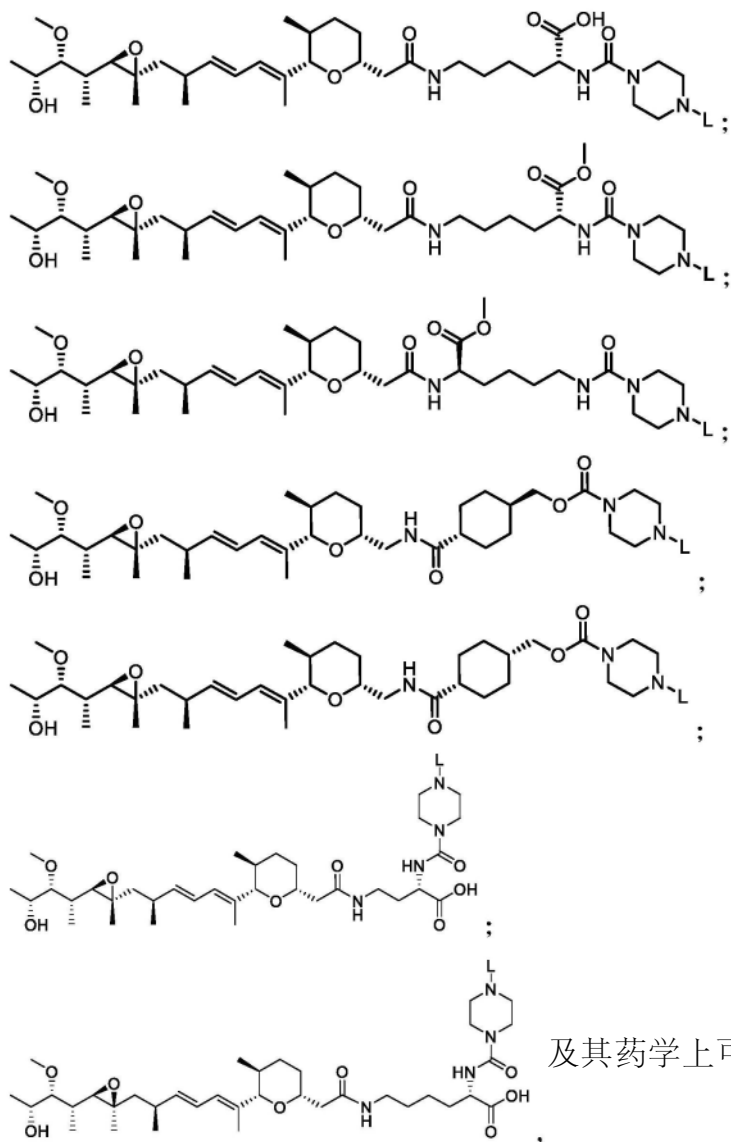
[0373] 在一些实施例中,本文提供选自以下的化合物:











及其药学上可接受的盐,其中L为共价连

接至抗体的接头。

[0374] 在一些实施例中,接头包含至少一个可裂解肽部分。在一些实施例中,至少一个可裂解肽部分可通过酶裂解。在一些实施例中,接头或可裂解肽部分包含至少一个氨基酸单元。在一些实施例中,至少一个氨基酸单元选自精氨酸、组氨酸、离氨酸、天冬氨酸、麸氨酸、丝氨酸、苏氨酸、天冬酰胺、麸酰胺、半胱氨酸、硒半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、丙氨酸、缬氨酸、异白氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸及瓜氨酸。在一些实施例中,至少一个氨基酸单元选自丙氨酸、瓜氨酸及缬氨酸。在一些实施例中,接头包含瓜氨酸及缬氨酸。在一些实施例中,接头包含丙氨酸及缬氨酸。

[0375] 在一些实施例中,接头包含选自磺酰胺、 β -葡萄糖醛酸、二硫化物及羰基的部分。在一些实施例中,接头包含磺酰胺。在一些实施例中,接头包含 β -葡萄糖醛酸。在一些实施例中,接头包含二硫化物。在一些实施例中,接头包含羰基。

[0376] 在一些实施例中,接头包含间隔子单元。在一些实施例中,间隔子单元选自烷基及聚乙二醇(PEG)部分。在一些实施例中,烷基为 C_1 - C_{12} 烷基。在一些实施例中,烷基为 C_1 - C_6 烷基。在一些实施例中,烷基为亚甲基。在一些实施例中,烷基为仲乙基。在一些实施例中,烷基为仲正丙基。在一些实施例中,烷基为仲正丁基。在一些实施例中,烷基为仲正戊基。在一

些实施例中,烷基为伸正己基。在一些实施例中,PEG部分包含-(PEG)_m-,其中m为1至10的整数。在一些实施例中,m为1。在一些实施例中,m为2。在一些实施例中,m为3。在一些实施例中,m为4。在一些实施例中,m为5。在一些实施例中,m为6。

[0377] 在一些实施例中,接头包含顺丁烯二酰亚胺(Ma1)部分(“Ma1-间隔子单元”)。在一些实施例中,接头包含自消融型间隔子单元。在一些实施例中,自消融型间隔子单元选自对氨基苄氧基羰基(pABC)及对氨基苯甲基(pAB)。

[0378] 在一些实施例中,接头包含Ma1-间隔子单元、烷基、至少一个氨基酸单元及自消融型间隔子。在一些实施例中,至少一个氨基酸单元选自丙氨酸、瓜氨酸及缬氨酸。在一些实施例中,至少一个氨基酸单元包含丙氨酸及缬氨酸。在一些实施例中,至少一个氨基酸单元包含瓜氨酸及缬氨酸。在一些实施例中,自消融型间隔子选自pAB及pABC。在一些实施例中,自消融型间隔子包含pAB。在一些实施例中,自消融型间隔子包含pABC。在一些实施例中,烷基包含C₁-C₆烷基。

[0379] 在一些实施例中,接头包含Ma1-间隔子单元、PEG部分、至少一个氨基酸单元及自消融型间隔子。在一些实施例中,至少一个氨基酸单元选自丙氨酸、瓜氨酸及缬氨酸。在一些实施例中,至少一个氨基酸单元包含丙氨酸及缬氨酸。在一些实施例中,至少一个氨基酸单元包含瓜氨酸及缬氨酸。在一些实施例中,自消融型间隔子选自pAB及pABC。在一些实施例中,自消融型间隔子包含pAB。在一些实施例中,自消融型间隔子包含pABC。在一些实施例中,PEG部分包含-(PEG)_m-,其中m为1至6的整数。

药物负载量

[0380] 药物负载量由p表示且在本文中还可称为荷伯希二烯剪接调节子与抗体比(HAR)。药物负载量可介于每个抗体或抗原结合片段1至10个药物部分范围内。在一些实施例中,p为1至10的整数。在一些实施例中,p为1至10、1至9、1至8、1至7、1至6、1至5、1至4、1至3或1至2的整数。在一些实施例中,p为2至10、2至9、2至8、2至7、2至6、2至5、2至4或2至3的整数。在一些实施例中,p为1至8的整数。在一些实施例中,p为2至5的整数。在一些实施例中,p为2至4的整数。在一些实施例中,p为3至4的整数。在其他实施例中,p为4至8的整数。在其他实施例中,p为1、2、3、4、5、6、7或8,较佳地4或8。

[0381] 药物负载量可受抗体或抗原结合片段上的连接位点的数目限制。在一些实施例中,ADC的接头部分(L)经由抗体或抗原结合片段上的一个或多个氨基酸残基上的化学活性基团连接至抗体或抗原结合片段。举例而言,接头可经由游离胺基、亚胺基、羟基、硫醇基或羧基连接至抗体或抗原结合片段(例如连接至N端或C端、连接至一个或多个离氨酸残基的ε胺基、连接至一个或多个赖氨酸或天冬氨酸残基的游离羧酸基或连接至一个或多个半胱氨酸残基的巯基)。与接头连接的位点可为抗体或抗原结合片段的氨基酸序列中的天然残基,或其可例如通过DNA重组技术(例如通过将半胱氨酸残基引入氨基酸序列中)或通过蛋白质生物化学(例如通过还原、pH调节或水解)引入抗体或抗原结合片段中。

[0382] 在一些实施例中,可结合至抗体或抗原结合片段的药物部分的数目受游离半胱氨酸残基的数目限制。举例而言,在连接为半胱氨酸硫醇基的情况下,抗体可具有仅一个或数个半胱氨酸硫醇基,或可具有仅一个或数个接头可经由其连接的具足够反应性的硫醇基。一般而言,抗体不含有许多可连接至药物部分的游离反应性半胱氨酸硫醇基。实际上,抗体中的大部分半胱氨酸硫醇残基涉及于链间或链内二硫键中。因此,在一些实施例中,缀合至

半胱氨酸可能需要抗体的至少部分还原。接头-毒素与抗体的过量连接可通过还原可供用于形成二硫键的半胱氨酸残基来使抗体去稳定。因此,优化药物:抗体比应增加ADC的效力(通过增加每个抗体的经连接的药物部分的数目),且不使抗体或抗原结合片段去稳定。在一些实施例中,最佳比率可为2、4、6或8。

[0383] 在一些实施例中,使抗体或抗原结合片段在缀合之前暴露于还原条件以便生成一个或多个游离半胱氨酸残基。在一些实施例中,可在部分或总体还原条件下用诸如二硫苏糖醇(DTT)或三(2-羧乙基)膦(TCEP)的还原剂还原抗体以生成反应性半胱氨酸硫醇基。可经由用受限莫耳当量的TCEP进行部分还原来生成未经配对的半胱氨酸,该受限莫耳当量的TCEP可还原连接轻链及重链(一对/个H-L配对)及铰链区中的两个重链(在人类IgG1的情况下,两对/个H-H配对)的链间二硫键,但使链内二硫键完整(Stefano等人(2013) *Methods Mol Biol.* [分子生物学方法] 1045:145-71)。在实施例中,例如通过采用施加交替还原及氧化电压的工作电极来以电化学方式还原抗体内的二硫键。此方法可允许将二硫键还原与分析装置(例如电化学检测装置、NMR光谱仪或质谱仪)或化学分离装置(例如液体层析仪(例如HPLC)或电泳装置(参见例如美国公开案第20140069822号))的在线偶合。在某些实施例中,抗体经受变性条件以显露诸如半胱氨酸的氨基酸残基上的反应性亲核基团。

[0384] ADC的药物负载量可以不同方式控制,例如通过:(i)限制药物-接头中间物或接头试剂相对于抗体而言的莫耳过量;(ii)限制缀合反应时间或温度;(iii)用于半胱氨酸硫醇修饰的部分或限制性还原条件;和/或(iv)通过重组技术工程改造抗体的氨基酸序列以使得修饰半胱氨酸残基的数目及位置以控制接头-药物连接的数目和/或位置。

[0385] 在一些实施例中,将游离半胱氨酸残基引入抗体或抗原结合片段的氨基酸序列中。举例而言,可制备经半胱氨酸工程改造的抗体,其中亲本抗体的一个或多个氨基酸经半胱氨酸氨基酸置换。任何形式的抗体均可经如此工程改造,即突变。举例而言,亲本Fab抗体片段可经工程改造以形成经半胱氨酸工程改造的Fab,称为“ThioFab”。类似地,亲本单克隆抗体可经工程改造以形成“ThioMab”。单位点突变在ThioFab中产生单个经工程改造的半胱氨酸残基,而归因于IgG抗体的二聚体性质,单位点突变在ThioMab中产生两个经工程改造的半胱氨酸残基。编码亲本多肽的氨基酸序列变异体的DNA可通过此项技术中已知的各种方法来制备(参见例如国际公开案第W0 2006/034488号中所描述的方法)。这些方法包括但不限于通过先前所制备的编码多肽的DNA的定点(或寡核苷酸介导的)突变诱发、PCR突变诱发及卡匣突变诱发进行的制备。重组抗体变异体还可通过限制性片段操作或通过重迭延伸PCR用合成寡核苷酸来构筑。具有式(I)的ADC包括但不限于具有1、2、3或4个经工程改造的半胱氨酸氨基酸的抗体(Lyon等人(2012) *Methods Enzymol.* [酶学方法] 502:123-38)。在一些实施例中,在不使用工程改造的情况下,一个或多个游离半胱氨酸残基已存在于抗体或抗原结合片段中,在此情况下可使用现有游离半胱氨酸残基以将抗体或抗原结合片段结合至药物部分。

[0386] 在超过一个亲核性基团与药物-接头中间物或接头部分试剂反应,随后与药物部分试剂反应的情况下,在包含抗体或抗原结合片段及接头部分的多个复本的反应混合物中,随后所得产物可为ADC化合物的混合物,该混合物具有一个或多个药物部分连接至混合物中的抗体或抗原结合片段的各复本的分布。在一些实施例中,由缀合反应得到的ADC的混合物中的药物负载量介于每个抗体或抗原结合片段1至10个经连接的药物部分范围内。每

个抗体或抗原结合片段的药物部分的平均数目(即平均药物负载量或平均p)可通过此项技术中已知的任何常规方法,例如通过质谱分析(例如逆相LC-MS)和/或高效液相层析(例如HIC-HPLC)来计算。在一些实施例中,每个抗体或抗原结合片段的药物部分的平均数目通过疏水相互作用层析法-高效液相层析法(HIC-HPLC)来测定。在一些实施例中,每个抗体或抗原结合片段的药物部分的平均数目通过逆相液相层析法-质谱法(LC-MS)来测定。在一些实施例中,每个抗体或抗原结合片段的药物部分的平均数目为约1.5至约3.5、约2.5至约4.5、约3.5至约5.5、约4.5至约6.5、约5.5至约7.5、约6.5至约8.5或约7.5至约9.5。在一些实施例中,每个抗体或抗原结合片段的药物部分的平均数目为约2至约4、约3至约5、约4至约6、约5至约7、约6至约8、约7至约9、约2至约8或约4至约8。

[0387] 在一些实施例中,每个抗体或抗原结合片段的药物部分的平均数目为约2。在一些实施例中,每个抗体或抗原结合片段的药物部分的平均数目为约1.5、约1.6、约1.7、约1.8、约1.9、约2、约2.1、约2.2、约2.3、约2.4或约2.5。在一些实施例中,每个抗体或抗原结合片段的药物部分的平均数目为2。

[0388] 在一些实施例中,每个抗体或抗原结合片段的药物部分的平均数目为约4。在一些实施例中,每个抗体或抗原结合片段的药物部分的平均数目为约3.5、约3.6、约3.7、约3.8、约3.9、约4、约4.1、约4.2、约4.3、约4.4或约4.5。在一些实施例中,每个抗体或抗原结合片段的药物部分的平均数目为4。

[0389] 在一些实施例中,每个抗体或抗原结合片段的药物部分的平均数目为约8。在一些实施例中,每个抗体或抗原结合片段的药物部分的平均数目为约7.5、约7.6、约7.7、约7.8、约7.9、约8、约8.1、约8.2、约8.3、约8.4或约8.5。在一些实施例中,每个抗体或抗原结合片段的药物部分的平均数目为8。

[0390] 在不同实施例中,如关于每个抗体或抗原结合片段的药物部分的平均数目所使用的术语“约”意谓 $\pm 10\%$ 。

[0391] 个别ADC化合物或“物种”可在混合物中通过质谱法识别且通过UPLC或HPLC,例如疏水性相互作用层析(HIC-HPLC)分离。在某些实施例中,具有单一负载值的均质或接近均质的ADC产物可例如通过电泳或层析法自缀合混合物分离。

[0392] 在一些实施例中,较高药物负载量(例如 $p > 8$)可引起某些抗体-药物缀合物的聚集、不可溶、毒性或细胞渗透性损失。较高药物负载量还可能不利地影响某些ADC的药物动力学(例如清除率)。在一些实施例中,较低药物负载量(例如 $p < 2$)可能降低某些ADC针对表达靶标的细胞和/或旁观者细胞的效力。在一些实施例中,本披露的ADC的药物负载量介于约2至约8;约2至约6;约2至约5;约3至约5;约2至约4;或约4至约8范围内。

[0393] 在一些实施例中,例如使用抗体或抗原结合片段上的链内二硫化物的部分还原来达成约2的药物负载量和/或平均药物负载量,且提供有益特性。在一些实施例中,例如使用抗体或抗原结合片段上的链内二硫化物的部分还原来达成约4的药物负载量和/或平均药物负载量,且提供有益特性。在一些实施例中,例如使用抗体或抗原结合片段上的链内二硫化物的部分还原来达成约8的药物负载量和/或平均药物负载量,且提供有益特性。在一些实施例中,小于约2的药物负载量和/或平均药物负载量可能产生不可接受地高水平的未经结合的抗体物种,这类物种可与ADC竞争结合至靶标抗原和/或提供经降低的治疗功效。在一些实施例中,大于约8的药物负载量和/或平均药物负载量可能产生不可接受地高水平的

产物异质性和/或ADC聚集。大于约8的药物负载量和/或平均药物负载量还可能因使抗体或抗原结合片段稳定所需的一个或多个化学键的损失而影响ADC的稳定性。

[0394] 本披露包括产生所描述的ADC的方法。简言之,ADC包含作为该抗体或抗原结合片段的抗体或抗原结合片段、药物部分(例如荷伯希二烯剪接调节子)及接合药物部分及抗体或抗原结合片段的接头。在一些实施例中,ADC可使用具有用于共价连接至药物部分及抗体或抗原结合片段的反应性官能基的接头来制备。举例而言,在一些实施例中,抗体或抗原结合片段的半胱氨酸硫醇可与接头或药物-接头中间物的反应性官能基(例如顺丁烯二酰亚胺部分)一起形成键以制造ADC。ADC生成可通过本领域普通技术人员已知的任何技术来实现。

[0395] 在一些实施例中,ADC通过以下产生:首先使抗体或抗原结合片段与接头及药物部分(例如荷伯希二烯剪接调节子)以依序方式接触以使得抗体或抗原结合片段共价连接至接头,且随后使预先形成的抗体-接头中间物与药物部分反应。抗体-接头中间物在接触药物部分之前可经受或可不经受纯化步骤。在其他实施例中,ADC通过使抗体或抗原结合片段与接头-药物化合物接触来产生,该接头-药物化合物通过使接头与药物部分反应而预先形成。预先形成的接头-药物化合物在接触抗体或抗原结合片段之前可经受或可不经受纯化步骤。在其他实施例中,抗体或抗原结合片段接触一种反应混合物中的接头及药物部分,允许在抗体或抗原结合片段与接头之间及接头与药物部分之间同时形成共价键。此产生ADC的方法可包括一反应,其中抗体或抗原结合片段在将接头添加至反应混合物中之前接触抗体或抗原结合片段,且反之亦然。在某些实施例中,ADC通过在允许缀合的条件下使抗体或抗原结合片段与接合至药物部分的接头,诸如ADL1-荷伯希二烯剪接调节子(例如ADL1-79392)或ADL5-荷伯希二烯剪接调节子(例如ADL5-0349)反应来产生。

[0396] 根据上文所描述的方法制备的ADC可经受纯化步骤。纯化步骤可涉及此项技术中已知用于纯化蛋白质的任何生物化学方法或其任何方法组合。这些方法包括但不限于切向流过滤(TFF)、亲和性层析法、离子交换层析法、基于电荷或等电点的任何层析法、混合模式层析法(例如CHT(陶瓷羟基磷灰石))、疏水相互作用层析法、粒径筛析层析法、透析、过滤、选择性沉淀或其任何组合。

治疗用途及组合物

[0397] 本文披露使用所披露的ADC及组合物治疗受试者的病症(例如赘生性病症)的方法。ADC可单独或与第二治疗剂组合施用,且可以任何药学上可接受的配方、剂量及给药方案施用。可针对毒性以及功效指标评估ADC治疗功效且作出相应地调整。功效量度包括但不限于活体外或活体内观测到的细胞生长抑制和/或细胞毒性作用、肿瘤体积减小、肿瘤生长抑制和/或经延长的存活期。

[0398] 已知确定ADC是否对细胞发挥细胞生长抑制和/或细胞毒性作用的方法。举例而言,ADC的细胞毒性或细胞生长抑制活性可通过以下量测:使表达ADC的靶标蛋白的哺乳动物细胞暴露于细胞培养基中;培养细胞达约6小时至约6天的时段;及量测细胞活力。基于细胞的活体外分析还可用于量测ADC的活力(增殖)、细胞毒性及细胞凋亡诱导(凋亡蛋白酶活化)。

[0399] 为确定ADC是否发挥细胞生长抑制作用,可使用胸苷并入分析。举例而言,可将呈5,000个细胞/所涂铺的96孔盘的孔的密度的表达靶标抗原的癌细胞培养72小时时段,且在

72小时时段的最最后8小时期间暴露于 $0.5\mu\text{Ci}$ 的 ^3H -胸苷。在ADC存在及不存在的情况下,量测培养物的细胞中 ^3H -胸苷的并入量。

[0400] 为测定细胞毒性,可量测坏死或细胞凋亡(计划性细胞死亡)。坏死通常伴随有质膜的渗透性增加;细胞膨胀及质膜破裂。细胞凋亡可例如通过量测DNA断裂来定量。用于定量活体外测定DNA断裂的商业测光方法为可用的。此类测定法的实例(包括TUNEL(它检测掺入片段化DNA中的标记核苷酸)和基于ELISA的测定法)在Biochemica[生物化学], (1999), 第2期,第34-37页(罗氏分子生物化学(Roche Molecular Biochemicals))中有所描述。

[0401] 细胞凋亡还可通过量测细胞中的形态变化来测定。举例而言,如同坏死一样,质膜完整性的损失可通过量测对某些染料(例如荧光染料,诸如吖啶橙或溴化乙锭)的吸收来测定。用于量测凋亡细胞数目的方法已由Duke及Cohen, Current Protocols in Immunology [免疫学实验室指南] (Coligan等人,编(1992)第3.17.1-3.17.16页)描述。细胞还可经DNA染料(例如吖啶橙、溴化乙锭或碘化丙锭)标记且观测细胞的沿内部核膜的染色体凝聚及边聚。在一些实施例中,细胞凋亡还可通过针对凋亡蛋白酶活性进行筛选来测定。在一些实施例中,可使用Caspase-Glo®分析来量测凋亡蛋白酶-3及凋亡蛋白酶-7的活性。在一些实施例中,分析在针对凋亡蛋白酶活性、荧光素酶活性及细胞溶解优化的试剂中提供发光凋亡蛋白酶-3/7受质。在一些实施例中,以“添加-混合-量测”格式添加Caspase-Glo® 3/7试剂可引起细胞溶解,接着引起受质的凋亡蛋白酶裂解且生成由荧光素酶产生的“辉光型”发光信号。在一些实施例中,发光可与所存在的凋亡蛋白酶活性的量成比例,且可充当细胞凋亡的指示符。可经量测以测定细胞凋亡的其他形态变化包括例如细胞质凝聚、经增加的膜起泡及细胞收缩。针对对癌细胞的这些影响中的任一者的测定指示,ADC可用于治疗癌症。

[0402] 细胞活力可例如通过测定细胞中诸如中性红、锥虫蓝、结晶紫或ALAMAR™蓝的染料的吸收来量测(参见例如Page等人(1993) Intl J Oncology [国际肿瘤学杂志] 3:473-6)。在此类分析中,在含有染料的培养基中培育细胞,洗涤细胞,且以分光亮度法量测反映细胞对染料的吸收的剩余染料。细胞活力还可例如通过定量作为具代谢活性的细胞的指示符的ATP来量测。在某些实施例中,所制备的ADC或荷伯希二烯剪接调节子化合物的活体外效力和/或细胞活力可使用如本文所提供的实例中所描述的CellTiter-Glo®发光细胞活力分析来评估。在某些实施例中,在此分析中,将单一试剂(CellTiter-Glo®试剂)直接添加至在补充血清的培养基中培养的培养细胞中。添加试剂引起细胞溶解且生成与所存在的ATP的量成比例的发光信号。ATP的量与存在于培养物中的细胞的数目成正比。还可使用蛋白质结合染料磺酰罗丹明B(sulforhodamine B, SRB)来量测细胞毒性(Skehan等人(1990) J Natl Cancer Inst. [美国癌症研究所杂志] 82:1107-12)。

[0403] 还可评估所披露的ADC的旁观者杀灭活性。旁观者杀灭活性可例如通过采用两个细胞系的分析测定,这类两个细胞系中的一者对靶标抗原呈阳性,而一者对靶标抗原呈阴性。在某些实施例中,分析的设计允许仅追踪靶标阴性细胞。在某些实施例中,在以下三个条件下涂铺细胞:(i)单独靶标阴性细胞(加卷标或经标记);(ii)单独靶标阳性细胞;及(iii)靶标阴性细胞与靶标阳性细胞的共培养物。随后,用ADC治疗细胞,接着监测细胞毒性。当用CellTiter-Glo®试剂读取盘时,可监测所有细胞群的活力。当用OneGlo®试剂读取盘时,仅加卷标或经标记的靶标阴性细胞产生信号。靶标阴性细胞与靶标阳性细胞混合时的杀灭指示旁观者杀灭,而在靶标阳性细胞不存在的情况下的靶标阴性细胞的杀灭指示脱靶

杀灭。

[0404] 在某些方面中,本披露的特点在于通过破坏RNA剪接来杀灭癌细胞或组织、抑制或调节癌细胞或组织的生长、或干扰癌细胞或组织的代谢的方法。该方法可用于RNA剪接破坏提供治疗效益的任何受试者。可自破坏RNA剪接受益的受试者包括但不限于患有赘生性病症或处于患有赘生性病症的风险下的受试者,该赘生性病症诸如血液恶性肿瘤或实体瘤。在某些实施例中,血液恶性肿瘤为B细胞恶性肿瘤、血癌(白血病)、浆细胞癌(骨髓瘤,例如多发性骨髓瘤)或淋巴结癌(淋巴瘤)。在某些实施例中,血液恶性肿瘤为急性骨髓性白血病或多发性骨髓瘤。在某些实施例中,白血病为急性淋巴母细胞白血病(ALL)、急性骨髓性白血病(AML)、慢性淋巴球性白血病(CLL)、慢性骨髓性白血病(CML)、慢性骨髓单核球性白血病(CMML)或急性单核球性白血病(AMoL)。在某些实施例中,淋巴瘤为霍奇金氏淋巴瘤或非霍奇金氏淋巴瘤。在某些实施例中,血液恶性肿瘤为骨髓化生不良症候群(MDS)。在某些实施例中,实体瘤为癌瘤,诸如乳癌、胰脏癌、前列腺癌、大肠癌或结直肠癌、肺癌、胃癌、子宫颈癌、子宫内膜癌、卵巢癌、胆管上皮癌、神经胶质瘤或黑色素瘤。在某些实施例中,实体瘤为乳癌、胃癌、前列腺癌、卵巢癌、肺癌(例如肺腺癌)、子宫癌(例如子宫浆液性子宫内膜癌)、唾液腺癌、黑色素瘤、大肠癌、子宫颈癌、胰脏癌、肾癌、结直肠癌或食道癌。在某些实施例中,肺癌为肺腺癌。在某些实施例中,子宫癌为子宫浆液性子宫内膜癌。

[0405] 在不同实施例中,可在诸如表达HER2的赘生性细胞或组织的表达HER2的任何细胞或组织中施用所披露的ADC。示例性实施例包括抑制HER2介导的细胞信号传导的方法或杀灭细胞的方法。该方法可用于表达HER2的任何细胞或组织,诸如癌细胞或转移性病变。HER2表达性癌症的非限制性实例包括乳癌、胃癌、膀胱癌、尿道上皮细胞癌、食道癌、肺癌(例如肺腺癌)、子宫癌(例如子宫浆液性子宫内膜癌)、唾液腺癌、子宫颈癌、子宫内膜癌及卵巢癌(English等人(2013)Mol Diagn Ther.[分子诊断与疗法]17:85-99)。表达HER2的细胞的非限制性实例包括HCC1954及SKBR3人类乳房导管癌细胞、N87人类胃癌细胞及包含编码HER2或其部分的重组核酸的细胞。

[0406] 在不同实施例中,可在诸如表达CD138的赘生性细胞或组织的表达CD138的任何细胞或组织中施用所披露的ADC。示例性实施例包括抑制CD138介导的细胞信号传导的方法或杀灭细胞的方法。该方法可用于表达CD138的任何细胞或组织,诸如癌细胞或转移性病变。CD138表达性癌症的非限制性实例包括胸内癌症(例如肺癌、间皮瘤)、皮肤癌(例如基底细胞癌、鳞状细胞癌)、头颈癌(例如喉癌、喉咽癌、鼻咽癌)、乳癌、泌尿生殖癌(例如子宫颈癌、卵巢癌、子宫内膜癌、前列腺癌、膀胱癌、尿道上皮癌)、血液恶性肿瘤(例如骨髓瘤,诸如多发性骨髓瘤、霍奇金氏淋巴瘤)及甲状腺癌(Szatmári等人(2015)Dis Markers[疾病标志]2015:796052)。表达CD138的细胞的非限制性实例包括MOLP8人类多发性骨髓瘤细胞及包含编码CD138或其部分的重组核酸的细胞。

[0407] 在不同实施例中,可在诸如表达EPHA2的赘生性细胞或组织的表达EPHA2的任何细胞或组织中施用所披露的ADC。示例性实施例包括抑制EPHA2介导的细胞信号传导的方法或杀灭细胞的方法。该方法可用于表达EPHA2的任何细胞或组织,诸如癌细胞或转移性病变。EPHA2表达性癌症的非限制性实例包括乳癌、脑癌、卵巢癌、膀胱癌、胰脏癌、食道癌、肺癌、前列腺癌、黑色素瘤、食道癌及胃癌(Tandon等人(2011)Expert Opin Ther Targets[治疗靶标专家意见]15(1):31-51)。EPHA2表达性细胞的非限制性实例包括PC3人类前列腺癌细

胞及包含编码EPHA2或其部分的重组核酸的细胞。

[0408] 示例性方法包括使细胞与有效量(即足以杀灭细胞的量)的如本文所描述的ADC接触的步骤。该方法可用于例如活体外、活体内、离体或原位培养物中的细胞上。举例而言,可在培养基中活体外培养表达HER2的细胞(例如通过肿瘤或转移性病变的活检收集的细胞;来自已建立的癌细胞系的细胞;或重组细胞),且可通过将ADC添加至培养基中来影响接触步骤。该方法将引起对表达HER2的细胞,详言的包括表达HER2的肿瘤细胞的杀灭。可替代地,可通过任何合适的施用途径(例如静脉内、皮下或与肿瘤组织直接地接触)将ADC施用至受试者以具有活体内效果。此方法可用于靶向其他细胞表面抗原(例如CD138、EPHA2)的抗体。

[0409] 所披露的ADC治疗性组合物的活体内效果可在合适动物模型中进行评估。举例而言,可使用异种癌症模型,其中将癌症外植体或所传代的异种移植组织引入诸如裸小鼠或SCID小鼠的免疫受损动物中(Klein等人(1997)Nature Med.[自然医学]3:402-8)。可使用量测对肿瘤形成、肿瘤消退或转移的抑制的分析及其类似分析预测功效。

[0410] 还可使用评估通过诸如细胞凋亡的机制进行的肿瘤死亡促进的活体内分析。在一个实施例中,可检查来自经治疗性组合物治疗的携肿瘤小鼠的异种移植物的细胞凋亡灶点的存在且与未经治疗的对照携异种移植小鼠对比。在经治疗的小鼠的肿瘤中发现细胞凋亡灶点的程度提供关于组合物治疗功效的指示。

[0411] 本文进一步提供治疗例如癌症的赘生性病症的方法。本文所披露的ADC可施用至非人类哺乳动物或人类受试者以用于治疗目的。治疗方法需要向患有或疑似患有赘生性病症的受试者施用治疗有效量的包含连接至与经表达抗原结合的靶向抗体的荷伯希二烯剪接调节子的ADC或组合物,可进行结合,或定位于癌细胞表面上。在一些实施例中,用抗体-药物缀合物或组合物进行的治疗诱导对不表达靶标抗原但邻近于表达靶标抗原的赘生性细胞的赘生性细胞的旁观者杀灭。

[0412] 示例性实施例为将荷伯希二烯剪接调节子递送至表达HER2的细胞的方法,该方法包括使荷伯希二烯剪接调节子结合至免疫特异性结合至HER2表位的抗体且使细胞暴露于ADC。指示本披露的ADC的表达HER2的示例性肿瘤细胞包括胃癌细胞及乳房导管癌细胞。

[0413] 另一示例性实施例为将荷伯希二烯剪接调节子递送至表达CD138的细胞的方法,该方法包括使荷伯希二烯剪接调节子结合至免疫特异性结合至CD138表位的抗体且使细胞暴露于ADC。指示本披露的ADC的表达CD138的示例性肿瘤细胞包括多发性骨髓瘤细胞。

[0414] 另一示例性实施例为将荷伯希二烯剪接调节子递送至表达EPHA2的细胞的方法,该方法包括使荷伯希二烯剪接调节子结合至免疫特异性结合至EPHA2表位的抗体且使细胞暴露于ADC。指示本披露的ADC的表达EPHA2的示例性肿瘤细胞包括前列腺癌细胞。

[0415] 另一示例性实施例为减少或抑制肿瘤(例如HER2表达性肿瘤、CD138表达性肿瘤、EPHA2表达性肿瘤)的生长的方法,该方法包括施用治疗有效量的ADC或包含ADC的组合物。在一些实施例中,该治疗足以减少或抑制患者肿瘤的生长、减少转移性病变的数目或尺寸、减轻肿瘤负荷、减轻原发性肿瘤负荷、降低侵袭性、延长存活时间和/或维持或改善生活质量。在一些实施例中,肿瘤对单独施用时的ADC的抗体或抗原结合片段(例如抗HER2抗体、抗CD138抗体、抗EPHA2抗体)具有抗性或缺乏反应性,和/或肿瘤对单独施用时的荷伯希二烯剪接调节子药物部分具有抗性或缺乏反应性。

[0416] 在某些方面中,本披露提供减少或抑制HER2表达性肿瘤的生长的方法。在某些实施例中,用抗体-药物缀合物或组合物进行的治疗诱导对不表达HER2但邻近于表达HER2的赘生性肿瘤细胞的肿瘤细胞的旁观者杀灭。示例性HER2表达性肿瘤类型包括但不限于来源于HER2表达性乳癌、胃癌、膀胱癌、尿道上皮细胞癌、食道癌、肺癌(例如肺腺癌)、子宫癌(例如子宫浆液性子宫内膜癌)、唾液腺癌、子宫颈癌、子宫内膜癌及卵巢癌的肿瘤。在某些实施例中,HER2表达性肿瘤为来源于HER2表达性乳癌、卵巢癌、胃癌、肺癌(例如肺腺癌)、子宫癌(例如子宫浆液性子宫内膜癌)、骨肉瘤或唾液腺癌的肿瘤。在某些实施例中,HER2表达性肿瘤为肺腺癌或子宫浆液性子宫内膜癌。

[0417] 在某些方面中,本披露提供减少或抑制CD138表达性肿瘤的生长的方法。在某些实施例中,用抗体-药物缀合物或组合物进行的治疗诱导对不表达CD138但邻近于表达CD138的赘生性肿瘤细胞的肿瘤细胞的旁观者杀灭。示例性CD138表达性肿瘤类型包括但不限于来源于CD138表达性胸内癌症(例如肺癌、间皮瘤)、皮肤癌(例如基底细胞癌、鳞状细胞癌)、头颈癌(例如喉癌、喉咽癌、鼻咽癌)、乳癌、泌尿生殖癌(例如子宫颈癌、卵巢癌、子宫内膜癌、前列腺癌、膀胱癌、尿道上皮癌)及甲状腺癌的肿瘤。

[0418] 在某些方面中,本披露提供减少或抑制EPHA2表达性肿瘤的生长的方法。在某些实施例中,用抗体-药物缀合物或组合物进行的治疗诱导对不表达EPHA2但邻近于表达EPHA2的赘生性肿瘤细胞的肿瘤细胞的旁观者杀灭。示例性EPHA2表达性肿瘤类型包括但不限于来源于EPHA2表达性乳癌、脑癌、卵巢癌、膀胱癌、胰脏癌、食道癌、肺癌、前列腺癌、黑色素瘤、食道癌及胃癌的肿瘤。在某些实施例中,EPHA2表达性肿瘤为来源于EPHA2表达性乳癌、前列腺癌、卵巢癌、肺癌、黑色素瘤、大肠癌或食道癌的肿瘤。

[0419] 此外,可将本披露的抗体施用至表达能够与ADC结合的抗原的非人类哺乳动物以用于兽医学目的或作为人类疾病的动物模型。就后者而言,这类动物模型可用于评估所披露的ADC的治疗功效(例如测试剂量及施用疗程)。

[0420] 本文进一步提供所披露的ADC及组合物的治疗用途。示例性实施例为ADC在治疗赘生性疾病(例如HER2表达性癌症、CD138表达性癌症、EPHA2表达性癌症)中的用途。另一示例性实施例为用于治疗赘生性疾病(例如HER2表达性癌症、CD138表达性癌症、EPHA2表达性癌症)的ADC。用于识别患有表达靶标抗原(例如HER2、CD138、EPHA2、MSLN、FOLH1、CDH6、CEACAM5、CFC1B、ENPP3、FOLR1、HAVCR1、KIT、MET、MUC16、SLC39A6、SLC44A4或STEAP1)的癌症的受试者的方法为此项技术中已知的且可用于识别适用于用所披露的ADC进行的治疗的患者。

[0421] 另一示例性实施例为ADC在制造用于治疗赘生性疾病(例如HER2表达性癌症、CD138表达性癌症、EPHA2表达性癌症)的药剂的方法中的用途。

[0422] 用于实践前述方法的治疗性组合物可配制成包含适用于所需递送方法的药学上可接受的载体的药物组合物。示例性实施例为包含本披露的ADC及药学上可接受的载体的药物组合物。合适载体包括在与治疗性组合物组合时保持治疗性组合物的抗肿瘤功能且一般不可与患者免疫系统反应的任何材料。药学上可接受的载体包括生理上兼容的任何及所有溶剂、分散介质、包衣剂、抗菌剂及抗真菌剂、等张剂及吸收延迟剂及其类似物。药学上可接受的载体的实例包括水、生理盐水、磷酸盐缓冲生理盐水、右旋糖、甘油、乙醇、甲磺酸盐及其类似物以及其组合中的一或多者。在许多情况下,组合物中包括例如糖、多元醇(诸

如甘露糖醇、山梨糖醇)或氯化钠的等张剂。药学上可接受的载体可进一步包含极少量的辅助物质,诸如润湿剂或乳化剂、防腐剂或缓冲剂,这类辅助物质增强ADC的保存期限或有效性。

[0423] 治疗性配制品可溶解且经由能够将治疗性组合物递送至肿瘤部位的任何途径施用。潜在有效的施用途径包括但不限于静脉内、非经肠、腹膜内、肌内、瘤内、皮内、器官内、正位及其类似途径。治疗性蛋白制剂可冻干且以无菌粉末形式储存在例如真空下,且随后在注射之前于抑菌水(含有例如苯甲醇防腐剂)或无菌水中复原。治疗性配制品可包含ADC或其药学上可接受的盐(例如甲磺酸盐)。

[0424] 在一些实施例中,每天、两月一次或其间任何时间段向患者施用ADC。使用前述方法治疗癌症的剂量及施用方案将随该方法及靶标癌症而变化,且一般将视此项技术中所了解的多种其他因素而定。

[0425] 各种递送系统已为人所知且可用于施用一种或多种本披露的ADC。施用ADC的方法包括但不限于非经肠施用(例如皮内、肌内、腹膜内、静脉内及皮下)、硬膜外施用、瘤内施用及黏膜施用(例如鼻内及经口途径)。另外,可采用例如通过使用吸入器或喷雾器及具有气雾剂的配制品进行的经肺施用。参见例如以下中所描述的用于经肺施用的组合物及方法:美国专利第6,019,968号、第5,985,320号、第5,985,309号、第5,934,272号、第5,874,064号、第5,855,913号、第5,290,540号及第4,880,078号;及国际公开案第WO 1992/019244号、第WO 1997/032572号、第WO 1997/044013号、第WO 1998/031346号及第WO 1999/066903。ADC可通过任何便利途径施用,例如通过输注或快速注射或通过经上皮或黏膜皮肤内层(例如口腔黏膜、直肠及肠黏膜等)吸收。施用可为全身或局部的。

[0426] 本文所披露的治疗性组合物可在制造及储存条件下无菌且稳定。在一些实施例中,ADC或药物组合物中的一种或多种以干燥经灭菌冻干粉末或无水浓缩物形式供应于气密密封式容器中且可复原(例如用水或生理盐水)至适当浓度以向受试者施用。在一些实施例中,预防剂或治疗剂或药物组合物中的一种或多种以至少5mg、至少10mg、至少15mg、至少25mg、至少35mg、至少45mg、至少50mg、至少75mg或至少100mg或其间任何量的单位剂量以干燥无菌冻干粉末形式供应于气密密封式容器中。在一些实施例中,经冻干的ADC或药物组合物在原始容器中在2℃与8℃之间储存。在一些实施例中,本文所描述的ADC或药物组合物中的一种或多种以液体形式供应于气密密封式容器,例如指示药剂的量及浓度的容器中。在一些实施例中,液体形式的所施用的组合物供应于具有至少0.25mg/mL、至少0.5mg/mL、至少1mg/mL、至少2.5mg/mL、至少5mg/mL、至少8mg/mL、至少10mg/mL、至少15mg/mL、至少25mg/mL、至少50mg/mL、至少75mg/mL或至少100mg/mL ADC的气密密封式容器中。液体形式可在原始容器中在2℃与8℃之间储存。

[0427] 在一些实施例中,所披露的ADC可并入适用于非经肠施用的药物组合物中。可注射溶液可由于弗林特(flint)或琥珀色小瓶、安瓿或预填充注射器或其他已知递送或储存装置中的液体或冻干剂型构成。

[0428] 本文所描述的组合物可呈多种形式。这些形式包括例如液体、半固体及固体剂型,诸如液体溶液(例如可注射溶液及可输注溶液)、分散液或悬浮液、锭剂、丸剂、散剂、脂质体及栓剂。较佳形式视预期施用模式及治疗性应用而定。

[0429] 在不同实施例中,治疗涉及经由可接受的施用途径单次快速注射或重复施用ADC

制剂。

[0430] 可针对给定样品中靶标抗原的含量(例如表达靶标抗原的细胞的含量)对患者进行评估以便帮助确定最有效的给药方案等。示例性实施例为确定患者是否对用本披露的ADC进行治疗起反应的方法,该方法包括提供来自患者的生物样品且使生物样品与ADC接触。示例性生物样品包括组织或体液,诸如发炎性渗出物、血液、血清、肠液、粪便样品或肿瘤活检(例如来源于患有靶标抗原表达性癌症(例如HER2表达性癌症、CD138表达性癌症、EPHA2表达性癌症)或处于靶标抗原表达性癌症的风险下的患者的肿瘤活检)。在一些实施例中,样品(例如组织和/或体液)可自受试者获得,且可使用合适的免疫学方法来检测和/或量测靶标抗原(例如HER2、CD138、EPHA2、MSLN、FOLH1、CDH6、CEACAM5、CFC1B、ENPP3、FOLR1、HAVCR1、KIT、MET、MUC16、SLC39A6、SLC44A4或STEAP1)的蛋白质表达。这类评估还在整个疗法中用于监测目的,且可与其他参数评估组合用于规测治疗成功性。

[0431] 在一些实施例中,可通过使来自受试者的肿瘤样品与ADC接触且评估肿瘤生长速率或体积来评估ADC的功效。在一些实施例中,当确定ADC有效时,可将其施用至受试者。

[0432] 以上治疗方法可与广泛多种的额外手术、化学疗法或放射疗法方案中的任一者组合。在一些实施例中,本文所披露的ADC或组合物与一种或多种额外治疗剂,例如一种或多种化学治疗剂共配制和/或共施用。化学治疗剂的非限制性实例包括烷基化剂,例如氮芥(nitrogen mustard)、伸乙亚胺化合物及磺酸烷基酯;抗代谢物,例如叶酸、嘌呤或嘧啶拮抗剂;抗有丝分裂剂,例如抗微管蛋白剂,诸如艾瑞布尔(eribulin)或甲磺酸艾瑞布尔(HalavenTM)、长春花属生物碱(vinca alkaloid)及奥瑞他汀(auristatin);细胞毒性抗生素;损害或干扰DNA表达或复制的化合物,例如DNA小沟结合剂;以及生长因子受体拮抗剂。在一些实施例中,化学治疗剂可为细胞毒性剂或细胞生长抑制剂。细胞毒性剂的实例包括但不限于抗有丝分裂剂,诸如艾瑞布尔或甲磺酸艾瑞布尔(HalavenTM)、奥瑞他汀(例如单甲基奥瑞他汀E(MMAE)、单甲基奥瑞他汀F(MMAF))、类美登素(例如美登素)、海兔毒素、多斯他汀(duostatin)、念珠藻素、长春花属生物碱(例如长春新碱、长春花碱)、紫杉烷、紫杉醇及秋水仙碱;蒽环霉素(例如道诺霉素(daunorubicin)、小红莓、二羟基炭疽菌素(dihydroxyanthracindione));细胞毒性抗生素(例如丝裂霉素、放射菌素、倍癌霉素(例如CC-1065)、金霉素(auromycin/duomycin)、卡奇霉素(calicheamicin)、内霉素、酚霉素);烷基化剂(例如顺铂);插入剂(例如溴化乙锭);拓朴异构酶抑制剂(例如依托泊苷(etoposide)、替尼泊苷(tenoposide));放射性同位素,诸如At²¹¹、I¹³¹、I¹²⁵、Y⁹⁰、Re¹⁸⁶、Re¹⁸⁸、Sm¹⁵³、Bi²¹²或Bi²¹³、P³²及镭放射性同位素(例如Lu¹⁷⁷);及细菌、真菌、植物或动物起源的毒素(例如蓖麻毒素(例如蓖麻毒素A链)、白喉毒素、假单胞菌外毒素A(Pseudomonas exotoxin A)(例如PE40)、内毒素、有丝分裂素、康普瑞汀(combrestatin)、局限曲菌素、白树素、 α -帚曲菌素、相思子毒素(例如相思子毒素A链)、莫迪素(例如莫迪素A链)、麻疯树逆境蛋白(curicin)、巴豆毒素、肥皂草抑制剂(Sapaonaria officinalis inhibitor)、糖皮质激素)。

[0433] 本文还披露所披露的ADC中的一种或多种在例如根据上文所描述的方法制造用于治疗癌症的药剂中的用途。在一些实施例中,使用本文所披露的ADC,例如根据上文所描述的方法治疗癌症。

[0434] 在不同实施例中,用于本文所描述的实验室及治疗性应用的试剂盒处于本披露的

范畴内。这类试剂盒可包含经分隔以容纳诸如小瓶、套管及其类似物的一个或多个容器的载架、封装或容器,该一个或多个容器中的各者包含待用于本文所披露的方法中的独立元素中的一者以及包含诸如本文所描述的用途的使用说明书的标签或插页。试剂盒可包含含有药物部分的容器。本披露还提供封装在指示药剂的气密密封式容器(诸如安瓿或药囊)中的ADC或其药物组合物中的一或多者。

[0435] 试剂盒可包含上文所描述的容器及与其相联的一个或多个其他容器,该一个或多个其他容器包含自商业及使用者观点看合乎需要的材料,包括缓冲剂、稀释剂、过滤剂、针、注射器;列举内容物和/或使用说明书的载架、封装、容器、小瓶和/或套管标签;及具有使用说明书的药品说明书。

[0436] 标签可存在于容器上或容器中以指示组合物用于特定疗法或非治疗性应用,诸如预后、预防、诊断或实验室应用。标签还可指示关于活体内或活体外用途,诸如本文所描述的用途的指导。在包括在试剂盒中或试剂盒上的插页或标签上还可包括指导和/或其他信息。标签可处于容器上或与容器相联。当将形成卷标的字母、数字或其他字符模制或蚀刻至容器自身中时,标签可处于容器上。当标签存在于还固持容器的贮器或载架内时,标签可例如以药品说明书形式与容器相联。卷标可指示组合物用于诊断或治疗诸如本文所描述的癌症的病况。

新抗原及使用方法

[0437] 在不同实施例中,本文还披露通过在可由患者免疫系统靶向的肿瘤细胞中诱导新抗原以进行清除来治疗患者的方法。在不同实施例中,在不受理论束缚的情况下,施用单独和/或作为ADC或组合物的部分的荷伯希二烯剪接调节子可产生例如由于经再表达的内含子滞留性内源性反转录病毒而诱导免疫反应、诱导双股RNA免疫反应的新抗原,和/或产生诱导免疫原性细胞死亡的新抗原。

[0438] 如本文所使用的术语“新抗原”是指由于一个或多个肿瘤特异性突变和/或由于使肿瘤暴露于荷伯希二烯剪接调节子(例如单独和/或作为ADC或组合物的部分的本文所披露的荷伯希二烯剪接调节子中的任一者或多者),免疫系统先前尚未向其暴露的任何抗原。肿瘤特异性突变可包括误义突变、框移、易位及变异型mRNA剪接以及影响诸如磷酸化及糖基化的翻译后加工的突变。在不同实施例中,这些示例性突变可来源于更改mRNA加工(例如剪接)的非同义编码改变和/或突变。在不同实施例中,所有这些示例性突变均可能导致分子改变,这类分子改变可由适当T细胞受体辨别。在不同实施例中,示例性新抗原为通过递送单独和/或作为ADC或组合物的部分的荷伯希二烯剪接调节子而诱导的新抗原。在不同实施例中,递送荷伯希二烯剪接调节子(例如本文所披露的荷伯希二烯剪接调节子中的任一者或多者)可诱导新颖mRNA剪接,引起对含有免疫系统先前尚未向其暴露的一个或多个新颖肽域的蛋白质的翻译。在不同实施例中,肿瘤特异性突变可为由递送或施用荷伯希二烯剪接调节子、ADC或包含荷伯希二烯剪接调节子或ADC的组合物得到的mRNA剪接变异体。

[0439] 在不同实施例中,在不受理论束缚的情况下,递送单独且作为ADC或组合物的部分的荷伯希二烯剪接调节子可诱导新颖mRNA剪接(例如外显子跳读、内含子滞留),引起对各种基因的开放阅读框和/或编码序列的更改。在不同实施例中,这些经改变的基因翻译成由免疫系统识别为具外源性的含有一个或多个新颖肽域的蛋白质。在不同实施例中,在荷伯希二烯剪接调节子治疗不存在的情况下,一个或多个新颖肽域不存在于蛋白质或人类蛋白

质体的任何其他部分中。在不同实施例中,含有一个或多个新颖肽域的蛋白质可通过蛋白酶降解以产生新颖肽片段,这类新颖肽片段充当用于例如经由MHC呈现进行的免疫肽呈现机制的受质。在不同实施例中,代表新抗原的新颖肽片段可呈现于例如肿瘤细胞上的MHC1结合肽组中。

[0440] 在不同实施例中,递送单独且作为ADC或组合物的部分的荷伯希二烯剪接调节子可引起一个或多个肿瘤细胞内部事件(例如细胞生长遏制)。在不同实施例中,肿瘤细胞内部事件可引起(1)吞噬细胞的接合增强(Bracci等人(2014)Cell Death Differ.[细胞死亡和分化]21(1):15-25);(2)新颖肽片段转运至肿瘤引流淋巴结以与抗原呈现细胞接合;(3)抗原呈现细胞加工来自吞噬肿瘤细胞的新颖肽片段,并将这类片段作为新抗原呈现给循环天然T细胞群;(4)新颖肽片段与将这类片段辨识为新抗原的表达T细胞的受体相互作用;(5)效应T细胞反应的成熟及活化(例如CD4+和/或CD8+T细胞;和/或(6)T细胞与暴露于荷伯希二烯剪接调节子治疗的额外肿瘤细胞接合且将代表新抗原的新颖肽片段呈现于其表面MHC1复合物上。在不同实施例中,肿瘤细胞内部事件可直接地或间接地引起具有效应子功能的T细胞接合和/或对呈现新抗原的肿瘤细胞的杀灭。

[0441] 此外,在不同实施例中,在不受理论束缚的情况下,递送单独且作为ADC或组合物的部分的荷伯希二烯剪接调节子可引起内含子滞留性内源性反转录病毒的再表达,引起双股RNA免疫反应。

[0442] 此外,在不同实施例中,在不受理论束缚的情况下,递送单独且作为ADC或组合物的部分的荷伯希二烯剪接调节子可引起由以突变方式衍生的新抗原的剪接调节子诱导的释放触发的免疫原性细胞死亡。在不同实施例中,递送单独且作为ADC或组合物的部分的荷伯希二烯剪接调节子可诱导双股RNA免疫反应。在不同实施例中,双股RNA免疫反应可由内含子滞留性内源性反转录病毒的再表达引起。在不同实施例中,双股RNA免疫反应可引起肿瘤细胞死亡。在不同实施例中,递送单独且作为ADC或组合物的部分的荷伯希二烯剪接调节子可诱导免疫原性细胞死亡。在不同实施例中,免疫原性细胞死亡可由突变性衍生的新抗原的释放和/或针对肿瘤细胞的宿主免疫反应引起。

[0443] 因此,在不同实施例中,披露治疗方法,该方法包括通过施用一种或多种荷伯希二烯剪接调节子和/或ADC和/或包含荷伯希二烯剪接调节子或ADC的组合物,例如本文所披露的任何荷伯希二烯剪接调节子、ADC或组合物来诱导新抗原。在不同实施例中,该方法包含在不存在新抗原诱导的情况下,施用比需要剂量减少的剂量的荷伯希二烯剪接调节子、ADC或组合物。在一些实施例中,该方法包含施用一或多次初始诱导剂量以产生新抗原且诱导免疫反应(例如将天然T细胞转化成记忆细胞),接着施用经减少的剂量或施用频率(即归因于荷伯希二烯剪接调节子、ADC或组合物的组合效果及新抗原的免疫靶向)。在一些实施例中,治疗可包含施用荷伯希二烯剪接调节子、ADC或组合物以诱导基于新抗原的免疫反应与至少一种额外疗法(例如第二抗癌疗法)的组合。举例而言,在一些实施例中,治疗可包含施用荷伯希二烯剪接调节子、ADC或组合物以诱导基于新抗原的免疫反应与一种或多种检查点抑制剂的组合。在一些实施例中,治疗可包含施用荷伯希二烯剪接调节子、ADC或组合物以诱导基于新抗原的免疫反应与一种或多种细胞因子或细胞因子类似物的组合。在一些实施例中,治疗可包含施用荷伯希二烯剪接调节子、ADC或组合物以诱导基于新抗原的免疫反应与一种或多种新抗原疫苗的组合。在一些其他实施例中,治疗可包含施用荷伯希二烯剪

接调节子、ADC或组合物以诱导基于新抗原的免疫反应与一种或多种经工程改造的靶向肿瘤的T细胞(例如CAR-T)的组合。

[0444] 在一些实施例中,可使用新抗原来监测用荷伯希二烯剪接调节子、ADC或组合物进行的治疗的有效性。举例而言,在施用荷伯希二烯剪接调节子、ADC或组合物之后,可获得患者样品(例如肿瘤活检)且针对新抗原或针对免疫反应或发炎反应的标识符对其进行筛选。若检测到新抗原和/或免疫反应,则可例如以经减少的剂量提供进一步治疗。

[0445] 在不同实施例中,披露治疗方法,该方法包括通过施用一种或多种荷伯希二烯剪接调节子和/或ADC和/或包含荷伯希二烯剪接调节子或ADC的组合物,例如本文所披露的任何荷伯希二烯剪接调节子、ADC或组合物来诱导双股RNA免疫反应。

[0446] 在不同实施例中,披露治疗方法,该方法包括通过施用一种或多种荷伯希二烯剪接调节子和/或ADC和/或包含荷伯希二烯剪接调节子或ADC的组合物,例如本文所披露的任何荷伯希二烯剪接调节子、ADC或组合物来诱导免疫原性细胞死亡。

[0447] 在不同实施例中,荷伯希二烯剪接调节子、ADC或包含荷伯希二烯剪接调节子的组合物的施用可与任何已知抗癌疗法组合。可供用于肿瘤学治疗的现行免疫活化策略的实例包括但不限于用免疫检查点抑制剂(ICI)分子进行治疗、用细胞因子或细胞因子类似物进行治疗、用肿瘤相关疫苗进行的疫苗接种及经工程改造的靶向肿瘤的T细胞(例如肿瘤浸润性淋巴细胞或CAR-T扩增)。这些技术主要集中于增强或诱导针对已现存的肿瘤抗原的免疫反应(细胞表面蛋白的突变或异常表达)。这些策略中的一种或多种可涉及能够诱导抗原T细胞反应的一个或多个突变。举例而言,患者对检查点抑制的反应可能与非同义突变负荷相关。另外,可使用依赖于预先存在的突变及这些突变的抗原性的癌症疫苗方法。

[0448] 荷伯希二烯剪接调节子和/或包含这类调节子的ADC可诱导出现在多个谱系中的转录组的大范围改变。这些mRNA改变的翻译可产生稳健且可再现的蛋白质改变,这类蛋白质改变产生具有跨多个HLA同型的高亲和力MHC1结合新肽。在不受理论束缚的情况下,归因于转录组及蛋白质体的大量改变,用荷伯希二烯剪接调节子和/或ADC进行治疗可增浓潜在地反应性新抗原的数目以用于经增强的适应性免疫反应的接合。

[0449] 如本文所描述的术语“荷伯希二烯剪接调节子”、“剪接调节子(splicing modulator/splice modulator)”、“剪接体调节子”是指通过与剪接体的组分相互作用而具有抗癌活性的化合物。在一些实施例中,剪接调节子更改靶标细胞中的剪接速率或形式。充当抑制剂的荷伯希二烯剪接调节子例如能够减少不受控的细胞增殖。明确而言,在一些实施例中,荷伯希二烯剪接调节子可通过抑制SF3b剪接体复合物而起作用。在一些实施例中,荷伯希二烯剪接调节子选自本文所披露的荷伯希二烯剪接调节子中的任一种或多种。在一些实施例中,使用荷伯希二烯剪接调节子,递送至细胞,和/或作为单独药剂施用至受试者。在一些其他实施例中,使用荷伯希二烯剪接调节子,递送至细胞,和/或作为ADC(例如选自本文所披露的示例性ADC中的任一种的ADC)的部分施用至受试者。在一些其他实施例中,使用荷伯希二烯剪接调节子,递送至细胞,和/或作为包含荷伯希二烯剪接调节子的多个复本或携带荷伯希二烯剪接调节子的ADC的多个复本的组合物的部分施用至受试者。本文披露这类组合物。

[0450] 在一些实施例中,相比于所使用、递送至细胞和/或作为单独药剂施用至受试者的荷伯希二烯剪接调节子而言,所使用、递送至细胞和/或作为ADC(例如选自本文所披露的示

例性ADC中的任一种的ADC)的部分施用至受试者的荷伯希二烯剪接调节子提供新增治疗性效益。举例而言,在一些实施例中,所使用、递送至细胞和/或作为ADC的部分施用至受试者的荷伯希二烯剪接调节子提供荷伯希二烯剪接调节子向表达靶标抗原(即由ADC的抗体部分靶向的抗原)的赘生性细胞的靶向递送。在一些实施例中,该荷伯希二烯剪接调节子的靶向递送减少脱靶治疗和/或脱靶细胞毒性。在一些实施例中,该靶向递送促进于赘生性细胞上而非于不表达靶标抗原的健康细胞上的肿瘤选择性新抗原呈现。在一些实施例中,该靶向递送引起例如至少75%、80%、85%、90%、95%或99%的于靶向赘生性细胞而非脱靶细胞中代表新抗原的新颖mRNA及MHC相关肽的交替剪接及诱导。因此,在一些实施例中,在不受理论束缚的情况下,由于在用如本文所披露的ADC治疗之后肿瘤细胞上新抗原的优先表达,故在效应T细胞激活和/或扩增(例如使用新抗原疫苗)之后,免疫系统可优先攻击呈现新抗原的赘生性细胞而非健康细胞。

免疫诱导及治疗方案:

[0451] 在不同实施例中,本披露提供诱导至少一种新抗原的方法,其通过使赘生性细胞与有效量的荷伯希二烯剪接调节子、基于荷伯希二烯剪接调节子的抗体-药物缀合物(ADC)或包含荷伯希二烯剪接调节子或ADC的组合物接触来进行。在不同实施例中,本披露提供诱导双股RNA免疫反应的方法,其通过使赘生性细胞与有效量的荷伯希二烯剪接调节子、基于荷伯希二烯剪接调节子的抗体-药物缀合物(ADC)或包含荷伯希二烯剪接调节子或ADC的组合物接触来进行。在不同实施例中,本披露提供诱导免疫原性细胞死亡的方法,其通过使赘生性细胞与有效量的荷伯希二烯剪接调节子、基于荷伯希二烯剪接调节子的抗体-药物缀合物(ADC)或包含荷伯希二烯剪接调节子或ADC的组合物接触来进行。

[0452] 在一些实施例中,赘生性细胞存在于活体外细胞培养物中。在一些实施例中,赘生性细胞自受试者获得。在一些实施例中,赘生性细胞存在于受试者中。在一些实施例中,赘生性细胞来源于血液恶性肿瘤或实体瘤。在一些实施例中,血液恶性肿瘤选自B细胞恶性肿瘤、白血病、淋巴瘤及骨髓瘤。在一些实施例中,血液恶性肿瘤选自急性骨髓性白血病及多发性骨髓瘤。在一些实施例中,实体瘤选自乳癌(例如HER2阳性乳癌)、胃癌(例如胃腺癌)、前列腺癌、卵巢癌、肺癌(例如肺腺癌)、子宫癌(例如子宫浆液性子宫内膜癌)、唾液腺癌、黑色素瘤、大肠癌、子宫颈癌、胰脏癌、肾癌、结直肠癌及食道癌。在一些实施例中,实体瘤选自HER2阳性乳癌、胃腺癌、前列腺癌及骨肉瘤。

[0453] 在不同实施例中,本披露进一步提供在患有或疑似患有赘生性病症的受试者中诱导至少一种新抗原和/或T细胞反应的方法,其通过向受试者施用有效量的荷伯希二烯剪接调节子、ADC或包含荷伯希二烯剪接调节子或ADC的组合物来进行。在不同实施例中,本文还提供治疗患有或疑似患有赘生性病症的受试者的方法,其通过向受试者施用有效量的荷伯希二烯剪接调节子、ADC或包含荷伯希二烯剪接调节子或ADC的组合物来进行,其中荷伯希二烯剪接调节子、抗体-药物缀合物或组合物的施用诱导至少一种新抗原和/或T细胞反应。

[0454] 在各种其他实施例中,本披露提供在患有或疑似患有赘生性病症的受试者中诱导双股RNA免疫反应的方法,其通过向受试者施用有效量的荷伯希二烯剪接调节子、ADC或包含荷伯希二烯剪接调节子或ADC的组合物来进行。在不同实施例中,本文还提供治疗患有或疑似患有赘生性病症的受试者的方法,其通过向受试者施用有效量的荷伯希二烯剪接调节子、ADC或包含荷伯希二烯剪接调节子或ADC的组合物来进行,其中荷伯希二烯剪接调节子、

抗体-药物缀合物或组合物的施用诱导双股RNA免疫反应。

[0455] 在再其他实施例中,本披露提供在患有或疑似患有赘生性病症的受试者中诱导免疫原性细胞死亡的方法,其通过向受试者施用有效量的荷伯希二烯剪接调节子、ADC或包含荷伯希二烯剪接调节子或ADC的组合物来进行。在不同实施例中,本文进一步提供治疗患有或疑似患有赘生性病症的受试者的方法,其通过向受试者施用有效量的荷伯希二烯剪接调节子、ADC或包含荷伯希二烯剪接调节子或ADC的组合物来进行,其中荷伯希二烯剪接调节子、抗体-药物缀合物或组合物的施用诱导免疫原性细胞死亡。

[0456] 在一些实施例中,本披露进一步提供治疗患有或疑似患有赘生性病症的受试者的方法,其通过向受试者施用与包含第二药剂的一种或多种额外疗法组合的有效量的荷伯希二烯剪接调节子、ADC或包含荷伯希二烯剪接调节子或ADC的组合物来进行,其中荷伯希二烯剪接调节子、抗体-药物缀合物或组合物的施用诱导免疫原性细胞死亡。

[0457] 在本文所描述的治疗方法的一些实施例中,与荷伯希二烯剪接调节子、抗体-药物缀合物、组合物或第二药剂的标准剂量相比,荷伯希二烯剪接调节子、抗体-药物缀合物、组合物或第二药剂的施用量由于诱导至少一种新抗原和/或T细胞反应而减少。在一些实施例中,与荷伯希二烯剪接调节子、抗体-药物缀合物、组合物或第二药剂的标准剂量相比,荷伯希二烯剪接调节子、抗体-药物缀合物、组合物或第二药剂的施用量减少10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、75%或90%。在一些实施例中,与荷伯希二烯剪接调节子、抗体-药物缀合物、组合物或第二药剂的标准给药方案相比,荷伯希二烯剪接调节子、抗体-药物缀合物、组合物或第二药剂以低至少10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、75%或90%的频率施用。在一些实施例中,荷伯希二烯剪接调节子、抗体-药物缀合物、组合物或第二药剂的施用量和/或剂量引起较低全身性毒性和/或经改善的耐药性。

[0458] 如本文所使用的术语“标准剂量”或“标准给药方案”是指用于治疗剂的任何常用或常规给药方案,例如由制造商提出、经管理机构批准或在人类受试者中以其他方式经测试以满足平均患者需求的方案。在一些实施例中,治疗剂为具有抗癌活性的荷伯希二烯剪接调节子、抗体或抗体-药物缀合物。

[0459] 举例而言,用于作为本文所披露的示例性抗HER2抗体的曲妥珠单抗的标准给药方案可为经90min静脉内施用8mg/kg(第1周),接着每3周(第4周至疗法周期结束时)经30-90min静脉内施用6mg/kg(**Herceptin®**(曲妥珠单抗)FDA Label Supplement,2017)。

[0460] 作为另一实例,用于作为示例性抗CTLA4检查点抑制剂抗体的伊匹木单抗的标准给药方案可为每3周经90min静脉内施用3mg/kg,持续4次剂量(**Yervoy®**(伊匹木单抗)FDA Label Supplement,2018)。伊匹木单抗的另一标准给药方案可为每3周经90min静脉内施用10mg/kg,持续4次剂量,接着每12周10mg/kg,持续至多3年(**Yervoy®**(伊匹木单抗)FDA Label Supplement,2018)。

[0461] 作为另一实例,用于作为示例性抗PD1检查点抑制剂抗体的纳武单抗的标准给药方案可为每2周经60min静脉内施用3mg/kg(**Opdivo®**(纳武单抗)FDA Label,2015)。

[0462] 作为另一个实例,用于作为示例性抗PDL1检查点抑制剂抗体的阿特珠单抗的标准给药方案可为每3周经60min静脉内施用1200mg(**Tecentriq®**(阿特珠单抗)FDA Label Supplement,2018)。

[0463] 作为又另一实例,用于作为示例性抗HER2抗体-药物缀合物的T-DM1的标准给药方案可为每3周经90min静脉内施用3.6mg/kg (Kadcyla® (T-DM1) FDA Label Supplement, 2016)。

[0464] 在一些实施例中,本文所描述的方法可进一步包含施用至少一种额外疗法(例如检查点抑制剂、新抗原疫苗、细胞因子或细胞因子类似物、CAR-T等)。在一些实施例中,与荷伯希二烯剪接调节子、抗体-药物缀合物、组合物和/或至少一种额外疗法的标准剂量相比,荷伯希二烯剪接调节子、抗体-药物缀合物、组合物和/或至少一种额外疗法的施用量由于诱导至少一种新抗原和/或T细胞反应而减少。在一些实施例中,与荷伯希二烯剪接调节子、抗体-药物缀合物、组合物和/或至少一种额外疗法的标准剂量相比,荷伯希二烯剪接调节子、抗体-药物缀合物、组合物和/或至少一种额外疗法的施用量由于诱导双股RNA免疫反应而减少。在一些实施例中,与荷伯希二烯剪接调节子、抗体-药物缀合物、组合物和/或至少一种额外疗法的标准剂量相比,荷伯希二烯剪接调节子、抗体-药物缀合物、组合物和/或至少一种额外疗法的施用量由于诱导免疫原性细胞死亡而减少。在一些实施例中,与荷伯希二烯剪接调节子、抗体-药物缀合物、组合物和/或至少一种额外疗法的标准剂量相比,荷伯希二烯剪接调节子、抗体-药物缀合物、组合物和/或至少一种额外疗法的施用量减少10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、75%或90%。在一些实施例中,与荷伯希二烯剪接调节子、抗体-药物缀合物、组合物和/或至少一种额外疗法的标准给药方案相比,荷伯希二烯剪接调节子、抗体-药物缀合物、组合物和/或至少一种额外疗法以低至少10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、75%或90%的频率施用。在一些实施例中,荷伯希二烯剪接调节子、抗体-药物缀合物、组合物和/或至少一种额外疗法的施用量和/或剂量引起较低全身性毒性和/或经改善的耐药性。

[0465] 在一些实施例中,荷伯希二烯剪接调节子、抗体-药物缀合物或组合物的施用在至少一种额外疗法的施用之前开始。在其他实施例中,荷伯希二烯剪接调节子、抗体-药物缀合物或组合物的施用在至少一种额外疗法的施用之后开始。在再其他实施例中,荷伯希二烯剪接调节子、抗体-药物缀合物或组合物的施用与至少一种额外疗法的施用同时开始。

[0466] 在一些实施例中,荷伯希二烯剪接调节子、抗体-药物缀合物或组合物的施用在初始施用之后重复至少一次。在一些实施例中,荷伯希二烯剪接调节子、抗体-药物缀合物或组合物用于重复施用的量相较于用于初始施用的量而言减少。在一些实施例中,与荷伯希二烯剪接调节子、抗体-药物缀合物或组合物的标准剂量相比,荷伯希二烯剪接调节子、抗体-药物缀合物或组合物用于重复施用的量减少。在一些实施例中,与荷伯希二烯剪接调节子、抗体-药物缀合物或组合物的标准剂量或初始剂量相比,荷伯希二烯剪接调节子、抗体-药物缀合物或组合物用于重复施用的量减少10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、75%或90%。

[0467] 在一些实施例中,至少一种额外疗法的施用在初始施用之后重复至少一次。在一些实施例中,至少一种额外疗法用于重复施用的量相较于用于初始施用的量而言减少。在一些实施例中,与至少一种额外疗法的标准剂量相比,至少一种额外疗法用于重复施用的量减少。在一些实施例中,与至少一种额外疗法的标准剂量或初始剂量相比,至少一种额外疗法用于重复施用的量减少10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、75%或90%。

[0468] 在一些实施例中,荷伯希二烯剪接调节子、抗体-药物缀合物或组合物的重复施用与至少一种额外疗法的重复施用同时进行。在一些实施例中,荷伯希二烯剪接调节子、抗体-药物缀合物或组合物的施用与至少一种额外疗法的重复施用依序或错开进行。

[0469] 在一些实施例中,至少一种额外疗法包含施用检查点抑制剂,例如本文所披露的任何检查点抑制剂。在一些实施例中,受试者对单独施用时的检查点抑制剂不耐受、无反应或反应不良。在一些实施例中,检查点抑制剂靶向PD1/PDL1、CTLA4、OX40、CD40、LAG3、TIM3、GITR和/或KIR。在一些实施例中,检查点抑制剂靶向CTLA4、OX40、CD40和/或GITR。在一些实施例中,检查点抑制剂为对其靶标具有抑制性或促效活性的抗体。在一些实施例中,检查点抑制剂与抑制性抗体或其他类似抑制性分子一起靶向。在其他实施例中,检查点抑制剂与促效抗体或其他类似促效分子一起靶向。

[0470] 在一些其他实施例中,至少一种额外疗法包含施用新抗原疫苗,例如本文所披露的任何新抗原疫苗。在一些实施例中,荷伯希二烯剪接调节子、ADC或组合物在施用新抗原疫苗之前施用。在一些实施例中,荷伯希二烯剪接调节子、ADC或组合物在施用新抗原疫苗之后施用。在一些实施例中,荷伯希二烯剪接调节子、ADC或组合物与新抗原疫苗施用同时施用。在一些实施例中,荷伯希二烯剪接调节子、ADC或组合物的施用在初始施用之后重复至少一次。在一些实施例中,荷伯希二烯剪接调节子、ADC或组合物用于重复施用的量相较于用于初始施用的量而言减少。

[0471] 在一些实施例中,新抗原疫苗包含至少一种新抗原肽。在一些实施例中,至少一种新抗原肽的长度介于约10个至约50个氨基酸范围内。在一些实施例中,至少一种新抗原肽的长度介于约10个至约35个氨基酸范围内。在一些实施例中,至少一种新抗原肽的长度介于约15个至约25个氨基酸范围内。在一些实施例中,至少一种新抗原肽包含一个或超过一个新抗原序列。

[0472] 在一些实施例中,新抗原序列和/或抗原部分的长度介于约10个至约50个氨基酸范围内。在一些实施例中,至少一种新抗原肽的长度介于约10个至约35个氨基酸范围内。在一些实施例中,新抗原序列和/或抗原部分的长度介于约15个至约25个氨基酸范围内。在一些实施例中,新抗原序列和/或抗原部分的长度介于约10个至约20个氨基酸范围内。在一些实施例中,新抗原序列和/或抗原部分不排他性地覆盖典型肽序列或由典型肽序列组成(例如表8中加下划线的示例性典型肽序列中的任一者)。

[0473] 如本文所使用的术语新抗原序列的“抗原部分”或“抗原片段”是指保持诱导T细胞反应(例如效应T细胞群的抗原特异性扩增和/或成熟)的能力的新抗原序列的一个或多个片段。在一些实施例中,抗原部分还可保持由抗原呈现细胞(例如树突状细胞)内化、加工和/或呈现的能力。在一些实施例中,抗原部分还保持T细胞激活功能。在一些实施例中,新抗原序列的抗原部分的长度介于约10个至约50个氨基酸范围内。在一些实施例中,新抗原序列的抗原部分的长度介于约10个至约35个氨基酸范围内。在一些实施例中,新抗原序列的抗原部分的长度介于约15个至约25个氨基酸范围内。在一些实施例中,新抗原序列的抗原部分的长度介于约10个至约20个氨基酸范围内。在一些实施例中,新抗原序列的抗原部分(例如SEQ ID NO:66-93中的任一者的抗原部分)或其编码mRNA配制为新抗原疫苗。

[0474] 抗原部分的示例性实施例为侧接SEQ ID NO:66的氨基酸45-53的区域。抗原部分的另一示例性实施例为侧接SEQ ID NO:66的氨基酸82-90的区域。在一些实施例中,抗原部

分能够结合至于受试者中表达的至少一个HLA等位基因(例如HLA-A*02:01)。在一些其他实施例中,抗原部分能够结合至于罹患赘生性病症的受试者群体中至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%或至少45%的受试者中表达的至少一个HLA等位基因。在一些实施例中,抗原部分能够引发针对于罹患赘生性病症的受试者群体的至少1%、至少5%或至少10%中存在的肿瘤的T细胞反应。

[0475] 在一些实施例中,抗原部分不排他性地覆盖典型肽序列或由典型肽序列组成。如本文所使用的术语“典型肽序列”是指在与荷伯希二烯剪接调节子的接触不存在的情况下(例如在与单独和/或作为ADC或组合物的部分的荷伯希二烯剪接调节子的接触不存在的情况下)于人类蛋白质体中存在和/或免疫先前已向其暴露的任何邻接肽序列。在一些实施例中,典型肽序列来源于典型转录物开放阅读框和/或由典型转录物开放阅读框编码。示例性典型肽序列在表8中加下划线。

[0476] 在一些实施例中,当施用荷伯希二烯剪接调节子(例如单独和/或作为ADC或组合物的部分)时,典型肽序列可来源于由荷伯希二烯剪接调节子诱导的异常剪接事件之前的实时5'框内24个核苷酸和/或由其编码。因此,在一些实施例中,典型肽序列包含以下或由以下组成:紧靠着N端至由荷伯希二烯剪接调节子诱导的新抗原序列的8个氨基酸。在一些实施例中,当5'外显子序列以密码子的末端核苷酸终止时,典型肽序列终止于外显子末端。在一些其他实施例中,当5'外显子序列以密码子的三个核苷酸中的一个或两个终止时,典型肽序列来源于不完整密码子之前的24个核苷酸和/或由其编码。在一些实施例中,异常剪接事件的mRNA序列3'可在来源于5'外显子的相同开放阅读框中翻译直至到达终止密码子为止,因此可终止翻译。在一些实施例中,当异常剪接事件(例如外显子跳读)引起典型转录物开放阅读框的保守时,可翻译C端序列以用于额外的编码8个C端氨基酸的24个核苷酸。在此情形下,在一些实施例中,仅跨异常外显子接合点的区域可编码新抗原序列。在一些实施例中,当开放阅读框移位(例如内含子滞留)时,完整C端序列(由3'mRNA编码)可编码新抗原序列。

[0477] 在一些实施例中,新抗原序列的抗原部分通过以下来选择:比较新抗原序列与典型肽序列;及选择不排他性地覆盖典型肽序列、由典型肽序列组成和/或与典型肽序列比对的新抗原序列的一部分。在一些实施例中,可以与全长新抗原序列(例如衍生抗原部分的新抗原序列)相同的方式筛选新抗原序列的抗原部分的抗原性和/或T细胞激活功能。在一些实施例中,使用诸如本文所描述的示例性T细胞激活实验的T细胞激活分析评估新抗原序列的抗原部分的抗原性和/或T细胞激活功能。

[0478] 在一些实施例中,新抗原序列为对受试者具有特异性的新抗原序列。在一些实施例中,新抗原序列为用于受试者的个人化新抗原疫苗。在一些实施例中,用于产生用于受试者的个人化新抗原疫苗的新抗原序列能够结合至于受试者中表达的至少一个HLA等位基因。在一些实施例中,通过例如在施用荷伯希二烯剪接调节子或ADC之后识别于受试者肿瘤中表达的新抗原且选择包含于患者肿瘤中观测到的新抗原序列的疫苗来选择个人化新抗原疫苗。

[0479] 术语“个人化”在用于描述新抗原疫苗时是指通过识别于患者中产生的一种或多种新抗原,较佳地在暴露于荷伯希二烯剪接调节子、ADC或组合物之后于患者中识别的新抗原,且随后使用那些新抗原中的一或多者作为用于相同患者的疫苗的基体产生的疫苗。因

此,在一些实施例中,给与患者荷伯希二烯剪接调节子、ADC或组合物且筛选由治疗产生的新抗原。在一些实施例中,所选新抗原疫苗包含本文所披露且确认为在暴露于荷伯希二烯剪接调节子、ADC或组合物之后存在于患者中的新抗原肽或mRNA。在一些实施例中,可向患者施用一次或重复施用荷伯希二烯剪接调节子、ADC或组合物和/或肽或mRNA疫苗。随后,在一些实施例中,使用那些新抗原中的一或多者来产生给与至患者的个人化疫苗。在一些实施例中,用于产生个人化疫苗的一种或多种新抗原具有针对一种或多种患者特异性HLA等位基因的结合亲和力。在一些实施例中,患者表达结合至一种或多种新抗原的一个或多个MHC1等位基因。可使用此项技术中已知的任何计算预测方法来确定给定新抗原是否将结合至特异性MHC1等位基因的预测。示例性计算预测方法披露于例如Meydan等人(2013) BMC Bioinformatics[BMC生物信息学]14(增刊2):S13中,对于这类方法该文献以引用的方式并入本文中。

[0480] 在一些其他实施例中,新抗原序列为通用新抗原序列。在一些实施例中,新抗原序列为通用新抗原疫苗。

[0481] 术语“通用”在用于描述新抗原疫苗时是指具有基于常见或已知新抗原的肽或mRNA序列的疫苗,该/这类新抗原通过较佳地在暴露于荷伯希二烯剪接调节子、ADC或组合物之后对于多个患者和/或患者组织样品中产生的新抗原进行定序而观测到。疫苗中所使用的肽或mRNA序列不需要存在于每个患者中,但在至少几个患者或患者组织样品中观测到。在一些实施例中,可向患者施用一次或重复施用荷伯希二烯剪接调节子、ADC或组合物和/或肽或mRNA疫苗。随后,在一些实施例中,彼肽或mRNA序列用于疫苗接种另外患者。在一些实施例中,给与患者荷伯希二烯剪接调节子、ADC或组合物,且随后给与具有已知新抗原的肽或mRNA疫苗以增强针对由荷伯希二烯剪接调节子、ADC或组合物产生的新抗原的免疫反应。在一些实施例中,给与患者一次或重复给与通用肽或mRNA疫苗,且随后给与荷伯希二烯剪接调节子、ADC或组合物。在一些实施例中,用于产生通用新抗原疫苗的一个或多个新抗原序列基于给定患者群体中的总体MHC1等位基因频率来选择(Maiers等人(2007) Hum. Immunol.[人体免疫学]68(9):779-88)。

[0482] 在一些实施例中,新抗原(例如通用新抗原)序列能够与于罹患赘生性病症的受试者群体中的至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%或至少45%受试者中表达的至少一个HLA等位基因结合。在一些实施例中,新抗原序列能够引发针对于罹患赘生性病症的受试者群体的至少1%、至少5%或至少10%中存在的肿瘤的T细胞反应。

[0483] 在一些实施例中,已通过对通过施用有效量的荷伯希二烯剪接调节子、抗体-药物缀合物或组合物而于受试者中诱导的至少一种新抗原肽或其编码mRNA进行定序来识别新抗原序列。在一些实施例中,至少一种新抗原肽包含通过使赘生性细胞与有效量的荷伯希二烯剪接调节子、抗体-药物缀合物或组合物接触而诱导的新抗原序列。在一些实施例中,赘生性细胞存在于活体外细胞培养物中。在一些实施例中,赘生性细胞自受试者获得。在一些实施例中,赘生性细胞存在于受试者中。

[0484] 在一些实施例中,新抗原疫苗包含至少一种新抗原肽及药学上可接受的载体(例如本文所描述的示例性载体中的任一种)。在一些实施例中,至少一种新抗原肽与药学上可接受的载体连接。在一些实施例中,药学上可接受的载体选自肽、血清白蛋白、钥孔虫戚血

蓝蛋白、免疫球蛋白、甲状腺球蛋白、卵白蛋白、类毒素或减毒类毒素衍生物、细胞因子及趋化因子。在一些实施例中,新抗原肽及药学上可接受的载体经由接头共价连接。在一些实施例中,新抗原肽及药学上可接受的载体以融合蛋白形式表达。在一些实施例中,新抗原疫苗包含至少一种新抗原肽及药学上可接受的稀释剂。在一些实施例中,新抗原疫苗包含至少一种新抗原肽及药学上可接受的佐剂。

[0485] 在一些实施例中,新抗原疫苗包含至少一种新抗原mRNA。在一些实施例中,至少一种新抗原mRNA编码一个或超过一个新抗原序列。

[0486] 在一些实施例中,新抗原序列为对受试者具有特异性的新抗原序列。在一些实施例中,新抗原序列为用于受试者的个人化新抗原疫苗。在一些实施例中,新抗原序列能够结合至于受试者中表达的至少一个HLA等位基因。

[0487] 在一些其他实施例中,新抗原序列为通用新抗原序列。在一些实施例中,新抗原序列为通用新抗原疫苗。在一些实施例中,新抗原序列能够与于罹患赘生性病症的受试者群体中的至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%或至少45%受试者中表达的至少一个HLA等位基因结合。在一些实施例中,新抗原序列能够引发针对于罹患赘生性病症的受试者群体的至少1%、至少5%或至少10%中存在的肿瘤的T细胞反应。

[0488] 在一些实施例中,已通过对至少一种新抗原的蛋白质序列进行定序来识别新抗原序列。在一些实施例中,已通过对编码通过施用有效量的荷伯希二烯剪接调节子、抗体-药物缀合物或组合物而于受试者中诱导的新抗原的至少一种mRNA进行定序来识别新抗原序列。在一些实施例中,至少一种新抗原mRNA编码通过使赘生性细胞与有效量的荷伯希二烯剪接调节子、抗体-药物缀合物或组合物接触而诱导的新抗原序列。在一些实施例中,赘生性细胞存在于活体外细胞培养物中。在一些实施例中,赘生性细胞自受试者获得。在一些实施例中,赘生性细胞存在于受试者中。

[0489] 在一些实施例中,新抗原疫苗包含至少一种新抗原mRNA及药学上可接受的载体(例如本文所描述的示例性载体中的任一种)。在一些实施例中,至少一种新抗原mRNA与药学上可接受的载体连接。在一些实施例中,药学上可接受的载体选自肽、血清白蛋白、钥孔虫戚血蓝蛋白、免疫球蛋白、甲状腺球蛋白、卵白蛋白、类毒素或减毒类毒素衍生物、细胞因子及趋化因子。在一些实施例中,新抗原疫苗包含至少一种新抗原mRNA及药学上可接受的稀释剂。在一些实施例中,新抗原疫苗包含至少一种新抗原mRNA及药学上可接受的佐剂。在一些实施例中,新抗原mRNA通过囊封剂囊封。在一些实施例中,囊封剂为脂质体。在一些实施例中,囊封剂为纳米粒子。

[0490] 在一些实施例中,至少一种额外疗法包含施用细胞因子或细胞因子类似物,例如本文所披露的任何细胞因子或细胞因子类似物。在一些实施例中,受试者对单独施用时的细胞因子或细胞因子类似物不耐受、无反应或反应不良。在一些实施例中,细胞因子或细胞因子类似物包含T细胞强化子。在一些实施例中,细胞因子或细胞因子类似物包含IL-2、IL-10、IL-12、IL-15、IFN γ 和/或TNF α 。在一些实施例中,细胞因子或细胞因子类似物包含IL-2、IL-10、IL-12和/或IL-15。在一些实施例中,在施用荷伯希二烯剪接调节子、抗体-药物缀合物或组合物后,施用细胞因子或细胞因子类似物由于新抗原诱导及呈现而增强T细胞激活。

[0491] 在一些实施例中,至少一种额外疗法包含施用经工程改造的靶向肿瘤的T细胞(即CAR-T),例如本文所披露的任何CAR-T疗法。

[0492] 在一些实施例中,本文所描述的方法可进一步包含在施用荷伯希二烯剪接调节子、抗体-药物缀合物或组合物之后,检测受试者中的一种或多种新抗原和/或T细胞反应,且若检测到一种或多种新抗原和/或T细胞反应,则视情况继续施用荷伯希二烯剪接调节子、抗体-药物缀合物或组合物。在一些实施例中,检测受试者中的一种或多种新抗原和/或T细胞反应指示用荷伯希二烯剪接调节子、抗体-药物缀合物或组合物进行的治疗的功效。在一些实施例中,若检测到一种或多种新抗原和/或T细胞反应,则继续用额外疗法连同荷伯希二烯剪接调节子、抗体-药物缀合物或组合物一起进行的治疗。在一些实施例中,若检测到一种或多种新抗原和/或T细胞反应,则以经减少的剂量和/或经降低的频率继续治疗。

[0493] 在一些实施例中,本文所描述的方法可进一步包含在施用荷伯希二烯剪接调节子、抗体-药物缀合物或组合物之后,检测受试者中的双股RNA免疫反应,且若检测到双股RNA免疫反应,则视情况继续施用荷伯希二烯剪接调节子、抗体-药物缀合物或组合物。在一些实施例中,检测受试者中的双股RNA免疫反应指示用荷伯希二烯剪接调节子、抗体-药物缀合物或组合物进行的治疗的功效。在一些实施例中,若检测到双股RNA免疫反应,则继续用额外疗法连同荷伯希二烯剪接调节子、抗体-药物缀合物或组合物一起进行的治疗。在一些实施例中,若检测到双股RNA免疫反应,则以经减少的剂量和/或经降低的频率继续治疗。

[0494] 在一些实施例中,本文所描述的方法可进一步包含在施用荷伯希二烯剪接调节子、抗体-药物缀合物或组合物之后,检测受试者中的免疫原性细胞死亡,且若检测到免疫原性细胞死亡,则视情况继续施用荷伯希二烯剪接调节子、抗体-药物缀合物或组合物。在一些实施例中,检测受试者中的免疫原性细胞死亡指示用荷伯希二烯剪接调节子、抗体-药物缀合物或组合物进行的治疗的功效。在一些实施例中,若检测到免疫原性细胞死亡,则继续用额外疗法连同荷伯希二烯剪接调节子、抗体-药物缀合物或组合物一起进行的治疗。在一些实施例中,若检测到免疫原性细胞死亡,则以经减少的剂量和/或经降低的频率继续治疗。

[0495] 在一些实施例中,受试者具有约150个突变或更少的非同义突变负荷。在一些实施例中,受试者具有约100个突变或更少的非同义突变负荷。在一些实施例中,受试者具有约50个突变或更少的非同义突变负荷。在一些实施例中,受试者患有或疑似患有例如血液恶性肿瘤或实体瘤的赘生性病症。在一些实施例中,血液恶性肿瘤选自B细胞恶性肿瘤、白血病、淋巴瘤及骨髓瘤。在一些实施例中,血液恶性肿瘤选自急性骨髓性白血病及多发性骨髓瘤。在一些实施例中,实体瘤选自乳癌、胃癌、前列腺癌、卵巢癌、肺癌、子宫癌、唾液腺癌、黑色素瘤、大肠癌、子宫颈癌、胰腺癌、肾癌、结直肠癌及食道癌。在一些实施例中,实体瘤选自HER2阳性乳癌、胃腺癌、前列腺癌及骨肉瘤。

[0496] 在不同实施例中,本披露进一步提供治疗患有或疑似患有赘生性病症的受试者的方法,该方法包括:(a)向受试者施用有效量的荷伯希二烯剪接调节子、ADC或包含荷伯希二烯剪接调节子或ADC的组合物,其中施用荷伯希二烯剪接调节子、抗体-药物缀合物或组合物诱导至少一种新抗原和/或T细胞反应;(b)在施用荷伯希二烯剪接调节子、抗体-药物缀合物或组合物之后,检测受试者中的一种或多种新抗原和/或T细胞反应;及(c)若检测到一种或多种新抗原和/或T细胞反应,则继续施用荷伯希二烯剪接调节子、抗体-药物缀合物或

组合物。在一些实施例中,检测受试者中的一种或多种新抗原和/或T细胞反应指示用荷伯希二烯剪接调节子、抗体-药物缀合物或组合物进行的治疗的功效。在一些实施例中,一种或多种新抗原包含SEQ ID NO:37-65中的任一者的氨基酸序列。在一些实施例中,一种或多种新抗原包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列。在一些实施例中,一种或多种新抗原包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列。在一些实施例中,一种或多种新抗原包含SEQ ID NO:46-49中的任一者的氨基酸序列。

荷伯希二烯剪接调节子/ADC与免疫检查点抑制的组合:

[0497] 在不同实施例中,可用荷伯希二烯剪接调节子、ADC或组合物与检查点抑制剂疗法的组合治疗患有如本文所描述的癌症的患者。免疫检查点为减缓或终止免疫反应且防止免疫细胞的不受控活动的过度组织损伤的抑制性路径。如本文所使用的术语“检查点抑制剂”意图指抑制抑制性路径中的一个或多个,由此允许更广泛的免疫活性的任何治疗剂,其包括任何小分子化合物、抗体、核酸分子或多肽或其任何片段。

[0498] 已显示用免疫检查点抑制治疗患者在某些临床适应症中具有稳健功效。最近,FDA批准在具有展现高微卫星不稳定性、对组织谱系的不可知性的肿瘤的患者中使用检查点抑制剂。此批准部分地基于反应率与突变负荷正相关的观测结果(Rizvi等人(2015) *Science* [科学]348(6230):124-8;Hellmann等人(2018) *Cancer Cell* [癌细胞]33(5):853-861)。来自文献的估计值在绝对数值及谱系上有所不同,但一般支持超过约150-250个突变的临界值,反应机率升高。对TCGA数据的分析显示,大百分比的成年发病型肿瘤谱系具有相对低的非同义突变负荷(Vogelstein等人(2013) *Science* [科学]339:1549-58)。大多数谱系的中位非同义突变率为每位患者约30-80个,远低于经改善的检查点抑制剂的反应机率的临界值。

[0499] 举例而言,已显示HER2阳性乳癌具有每个患者样品约60个非同义突变的中值。然而,如上文所提及,检查点抑制剂治疗功效的临界值经估计介于约150-250个非同义突变范围内,即高于此临界值的患者更可能显示完全缓解、部分缓解和/或稳定疾病,然而低于此临界值的患者更可能展现进行性疾病。因此,需要增强明显数目的非同义突变和/或呈现于肿瘤细胞上的新抗原且可增强例如对检查点抑制剂疗法的总体反应机率的策略。由于细胞因子(及其类似物)经由类似作用机制起作用,故这类策略还可增强对基于细胞因子的疗法的总体反应机率。

[0500] 现行HER2阳性乳癌中的反应率为约15%-25%(CTI NCT02129556)。在本文所披露的不同实施例中,用荷伯希二烯剪接调节子、ADC或组合物进行的治疗与检查点抑制剂和/或细胞因子疗法的组合可改善这类反应率。在不同实施例中,用荷伯希二烯剪接调节子、ADC或组合物进行的治疗与检查点抑制剂和/或细胞因子疗法的组合可施用至任何成年发病型肿瘤,具体地其中中值非同义突变速率低于经估计的约150个突变临界值的成年发病型肿瘤。在不同实施例中,适用于单独或与额外疗法(例如检查点抑制剂疗法、细胞因子疗法)组合的用本披露的荷伯希二烯剪接调节子、ADC或组合物进行的治疗的示例性癌症类型包括但不限于食道癌、非霍奇金氏淋巴瘤、结直肠癌、头颈癌、胃癌、子宫内膜癌、胰脏腺癌、卵巢癌、前列腺癌、肝细胞癌、神经胶质细胞瘤、乳癌(例如HER2阳性乳癌)、肺癌(例如非小细胞肺癌)、慢性淋巴球性白血病及急性骨髓性白血病。其他示例性合适癌症类型在例如Vogelstein等人(2013) *Science* [科学]339:1549-58中识别出,该文献以全文引用的方式并入本文中。

[0501] 由于许多检查点抑制剂疗法基于肿瘤相关抗原的长期表达,故需要定期治疗加强以获得功效及“再加强”反应性T细胞群。本文所描述的荷伯希二烯剪接调节子或ADC源性新抗原的可诱导性质提供可设计成增强新抗原反应性T细胞的免疫反应、同时限制通常由长期抗原刺激导致的T细胞耗竭的治疗性给药方案。举例而言,在一些实施例中,将初始剂量的荷伯希二烯剪接调节子、ADC或组合物施用至受试者以触发异常剪接及新抗原肽的产生。在一些实施例中,在允许蛋白质产生及抗原呈现的一段时间之后,随后施用受试者初始剂量的检查点抑制剂以加强和/或增强效应T细胞激活及扩增。在一些实施例中,一定剂量的荷伯希二烯剪接调节子、ADC或组合物与检查点抑制剂之间的等待期为约2天、约3天、约4天、约5天、约6天或约7天。在一些实施例中,等待期介于约3天与约5天之间。在一些实施例中,检查点抑制剂靶向CTLA4、OX40、CD40和/或GITR。在一些实施例中,荷伯希二烯剪接调节子、ADC或组合物与检查点抑制剂的组合治疗效益可为累加的或超累加的。

[0502] 在一些实施例中,在允许T细胞激活及扩增的一定时段之后,随后施用受试者第二或后续剂量的荷伯希二烯剪接调节子、ADC或组合物以触发新抗原肽的再呈现。在一些实施例中,初始剂量的检查点抑制剂与第二或后续剂量的荷伯希二烯剪接调节子、ADC或组合物之间的等待期为约2周、约3周、约4周或约5周。在一些实施例中,等待期为约3周。在一些实施例中,在第二或后续剂量的荷伯希二烯剪接调节子、ADC或组合物之后,免疫系统可与呈现新抗原的肿瘤细胞接合和/或引发肿瘤细胞杀灭。在一些实施例中,随后施用受试者第二或后续剂量的检查点抑制剂以在允许二次T细胞激活及扩增之后进一步扩增记忆效应T细胞群。

[0503] 在一些实施例中,在此示例性初始治疗方案之后的荷伯希二烯剪接调节子、ADC或组合物的给药可为脉冲式给药,即可以经延长的间隔(例如约每4周、约每5周、约每6周)给药荷伯希二烯剪接调节子、ADC或组合物以允许抗原呈现、T细胞接合和/或肿瘤细胞杀灭和/或记忆T细胞群恢复。在一些实施例中,在稍后时间点,荷伯希二烯剪接调节子、ADC或组合物治疗可与经靶向的一种或多种检查点抑制剂组合以恢复经耗竭的T细胞群的效应功能。在一些实施例中,举例而言,在稍后时间点,荷伯希二烯剪接调节子、ADC或组合物治疗可与靶向PD1/PDL1、LAG3和/或TIM3的一种或多种检查点抑制剂组合。在一些实施例中,新抗原呈现及激活的脉冲式性质可允许检查点抑制剂和/或荷伯希二烯剪接调节子、ADC或组合物以较低频率和/或以较低剂量施用。在一些实施例中,与不与荷伯希二烯剪接调节子、ADC或组合物治疗同时施用时的检查点抑制剂相比,新抗原呈现的脉冲式性质可提供检查点抑制剂(例如抗CTLA4抗体,诸如伊匹木单抗)的一种或多种治疗效益,例如通过降低通常在检查点抑制剂标准给药方案的情况下观测到的不良反应的潜在风险来提供。

[0504] 在某些实施例中,检查点抑制剂为细胞毒性T淋巴球相关抗原(CTLA4)路径的抑制剂。还称为CD152的CTLA4为下调免疫反应的蛋白质受体。CTLA4在调节性T细胞中组成性表达,但在活化后仅在常规T细胞中上调。如本文所使用的术语“CTLA4抑制剂”意图指CTLA4和/或CTLA4路径的任何抑制剂。示例性CTLA4抑制剂包括但不限于抗CTLA4抗体。用于人类的CTLA4阻断抗体基于在小鼠抗肿瘤免疫模型中所见的临床前活性而研发出。示例性抗CTLA4抗体包括但不限于伊匹木单抗(MDX-010)及替西木单抗(tremelimumab)(CP-675,206),两者均为完全人类的。伊匹木单抗为血浆半衰期为约12-14天的IgG1;替西木单抗为血浆半衰期为约22天的IgG2。参见例如Phan等人(2003)Proc Natl Acad Sci USA.[美国国

家科学院院刊]100:8372-7;Ribas等人(2005)J Clin Oncol.[临床肿瘤学杂志]23:8968-77;Weber等人(2008)J Clin Oncol.[临床肿瘤学杂志]26:5950-6。在一些实施例中,抗CTLA4抗体为伊匹木单抗。

[0505] 在某些实施例中,检查点抑制剂为程序性死亡-1 (PD1) 路径的抑制剂。计划性细胞死亡1 (PD1) 路径代表可通过肿瘤细胞接合以克服活性T细胞免疫监视的主要免疫控制开关。PD1的配体 (PDL1及PDL2) 经组成性表达或可在各种肿瘤中经诱导。已发现肿瘤细胞上PDL1的高表达(且达至PDL2的较低程度)与各种其他实体瘤类型中的不良预后及存活期相关。此外,已表明PD1调节患有恶性黑色素瘤的患者中的肿瘤特异性T细胞扩增。这些观测结果表明,PD1/PDL1路径在肿瘤免疫逃避中发挥关键作用,且可视为治疗性干预的引人注目的靶标。如本文所使用的术语“PD1抑制剂”意图指PD1和/或PD1路径的任何抑制剂。示例性PD1抑制剂包括但不限于抗PD1抗体及抗PDL1抗体。在某些实施例中,检查点抑制剂为抗PD1抗体。示例性抗PD1抗体包括但不限于纳武单抗及派姆单抗(pembrolizumab) (MK-3475)。举例而言,纳武单抗为完全人类免疫球蛋白G4 (IgG4) PD1免疫检查点抑制剂抗体,其干扰PD1受体与其配体PDL1及PDL2的相互作用,由此抑制细胞免疫反应(Guo等人(2017)J Cancer [癌症期刊]8(3):410-6)。在一些实施例中,抗PD1抗体为纳武单抗。举例而言,派姆单抗为IgG4/ κ 同型的强效且高度选择性人类化mAb,其设计成直接地阻断PD1与其配体PDL1及PDL2之间的相互作用。派姆单抗强烈地增强来自健康人类供体、癌症患者及灵长类动物的经培养血细胞中的T淋巴球免疫反应。还报导派姆单抗调节介白素-2 (IL-2)、肿瘤坏死因子 α (TNF α)、干扰素 γ (IFN γ)及其他细胞因子的含量。示例性抗PDL1抗体包括但不限于阿特殊单抗、阿维鲁单抗(avelumab)及德瓦鲁单抗(durvalumab)。举例而言,阿特殊单抗为IgG1人类化mAb,据报导其通过靶向多种恶性细胞上的经表达PDL1来阻断PD1/PDL1相互作用。此PD1/PDL1路径阻断可刺激针对肿瘤的免疫防御机制(Abdin等人(2018)Cancers [癌症] (Basel [巴塞尔])10(2):32)。在一些实施例中,抗PDL1抗体为阿特殊单抗。

[0506] 在某些实施例中,检查点抑制剂靶向PD1/PDL1、CTLA4、OX40、CD40、LAG3、TIM3、GITR和/或KIR。在某些实施例中,检查点抑制剂靶向CTLA4、OX40、CD40和/或GITR。在某些实施例中,检查点抑制剂与抑制性抗体或其他类似抑制性分子(例如抑制性抗CTLA4抗体或抗PD1/PDL1抗体)一起靶向。在某些其他实施例中,检查点抑制剂与靶标的促效剂一起靶向;此类别的实例包括刺激性靶标OX40、CD40和/或GITR。在一些实施例中,靶向OX40、CD40和/或GITR的检查点抑制剂为促效抗体。针对OX40的促效抗体可具有双重作用,即抑制调节性T细胞遏制,同时增强效应T细胞功能。还已显示促效抗GITR抗体使效应T细胞对由调节性T细胞诱导的抑制更具抗性(Karaki等人(2016)Vaccines [疫苗] (Basel [巴塞尔])4(4):37)。同样,促效CD40抗体展现T细胞依赖性抗肿瘤活性。树突状细胞上CD40的活化增加肿瘤抗原的交叉呈现,且因此增加经活化的肿瘤定向效应T细胞的数目(Ellmark等人(2015)Oncoimmunol.[肿瘤免疫学]4(7):e1011484)。

[0507] 在某些实施例中,检查点抑制剂靶向CTLA4(例如抗CTLA4抗体)。在某些实施例中,靶向CTLA4促进天然T细胞的激活及活化。在某些实施例中,检查点抑制剂靶向OX40(例如抗OX40抗体)。在某些实施例中,靶向OX40增强效应T细胞的扩增。在某些实施例中,检查点抑制剂靶向CD40(例如抗CD40抗体)。在某些实施例中,靶向CD40抑制T细胞的“耐受原性(tolerogenic)”激活和/或调节性T细胞的形成。在某些实施例中,检查点抑制剂靶向GITR

(例如抗GITR抗体)。在某些实施例中,靶向GITR抑制调节性T细胞的活性。在某些实施例中,具有荷伯希二烯剪接调节子、ADC或组合物及CTLA4靶向剂、OX40靶向剂、CD40靶向剂和/或GITR靶向剂的组合疗法的效益(例如对疾病发展的至少一种症状或风险/速率的效果)为累加的。在一些实施例中,具有荷伯希二烯剪接调节子、ADC或组合物及CTLA4靶向剂、OX40靶向剂、CD40靶向剂和/或GITR靶向剂的组合疗法的效益为超累加的(即协同性的)。

[0508] 检查点抑制剂治疗策略基于以下假设:治疗促进和/或增强针对弱或不良抗原性肿瘤(例如CTLA4)的T细胞反应的激活,或治疗恢复和/或再激活对肿瘤抗原起反应,但由于抗原呈现(例如PD1、PDL1)的长期性质而已变得“耗竭”的T细胞(Chen及Mellman (2013) Immunity[免疫]39(1):1-10)。例如抗PD1抗体、抗PDL1抗体或抗CTLA4抗体的合适检查点抑制疗法及药剂的实例为此项技术中已知的。参见例如WO 2001/014424、WO 2013/173223、WO 2016/007235。

[0509] 组合检查点抑制剂疗法之后的这些经激活的T细胞反应与于可与经激活的免疫系统反应的肿瘤细胞中诱导新抗原的治疗可提供有益协同作用。当尚未呈现荷伯希二烯剪接调节子或ADC源性新抗原以进行T细胞激活时,具有CTLA4抑制剂的组合可为特别有益的。在一些实施例中,治疗包含施用一种或多种荷伯希二烯剪接调节子、ADC或组合物以诱导新抗原的产生,此前、同时或此后为用以刺激CD8 T细胞激活的CTLA4抑制剂的初始施用。在一些实施例中,向患者提供CTLA4抑制剂的额外施用,例如以进一步刺激新抗原反应性CD8群体的激活和/或活化。在一些实施例中,可向患者给与荷伯希二烯剪接调节子、ADC或组合物的额外施用以增加通过肿瘤进行的新抗原呈现。荷伯希二烯剪接调节子、ADC或组合物及检查点抑制剂疗法的重复施用可同时或以错开间隔出现。在一些实施例中,治疗进一步包含施用PD1/PDL1抑制剂共治疗,例如以恢复肿瘤微环境内的经耗竭的靶向新抗原的T细胞的效应功能。

[0510] 如本文所使用的术语“组合”或“组合疗法”是指作为治疗方案的一部分的一种或多种荷伯希二烯剪接调节子、ADC或组合物以及额外药剂或疗法(例如检查点抑制剂、细胞因子或细胞因子类似物、新抗原疫苗、CAR-T)的施用意欲提供所施用药剂中的一或多者的共作用的有益(即累加或协同性)效果。在一些实施例中,组合还可包括有包括但不限于化学治疗剂、抗血管生成剂及减少免疫遏制的药剂(例如第二检查点抑制剂)的一种或多种额外药剂。组合的有益效果包括但不限于由治疗剂组合产生的药物动力学或药效动力学共作用。这些治疗剂组合的施用通常经限定时间段(视所选组合而定,例如数分钟、数小时、数天或数周)进行。

[0511] 如本文所使用的“组合”施用或“共施用”意味在受试者罹患医学病况(例如赘生性病况)期间将两种或更多种不同治疗递送至受试者。举例而言,在一些实施例中,在受试者已诊断患有疾病或病症之后及在疾病或病症已治愈或消除之前或当受试者识别为处于风险下、但在受试者已出现疾病症状之前,递送两种或更多种治疗。在一些实施例中,一种治疗的递送在第二治疗的递送开始的时仍存在,以使得存在重迭。在一些实施例中,第一治疗及第二治疗同时开始。这些类型的递送在本文中有时称为“同时(simultaneous/concurrent)”或“伴随”递送。在其他实施例中,一种治疗的递送在第二治疗的递送开始之前结束。此类型的递送在本文中有时称为“连续”或“依序”递送。

[0512] 在一些实施例中,两种治疗(例如荷伯希二烯剪接调节子、ADC或组合物及检查点

抑制剂)均包含于同一组合物中。这类组合物可以任何适当形式且通过任何合适途径施用。在其他实施例中,两种治疗(例如荷伯希二烯剪接调节子、ADC或组合物及检查点抑制剂)均在单独组合物中以任何适当形式且通过任何合适途径施用。举例而言,在一些实施例中,包含荷伯希二烯剪接调节子或ADC的组合物及包含检查点抑制剂的组合物可同时或依序、在不同时间点按任何次序施用;在任一情况下,其施用时间应充分地接近以便提供所需治疗性效果或预防性效果。

[0513] 在同时或依序递送的实施例中,治疗可由于组合施用而更有效。在一些实施例中,第一治疗更有效,例如与在第二治疗不存在的情况下施用第一治疗所见效果相比,在第一治疗较少(例如具有较低剂量)的情况下见到等效效果。在一些实施例中,第一治疗更有效以使得症状减少或与疾病或病症相关的其他参数大于在第二治疗不存在的情况下递送第一治疗情况下所观测到的情况。在其他实施例中,在第二治疗的情况下观测到类似情形。在一些实施例中,组合疗法的效益(例如对至少一种症状或疾病发展的风险/速率的效果)为累加的。在一些实施例中,组合疗法的效益为超累加的。

[0514] 在不同实施例中,本披露提供治疗患有或疑似患有赘生性病症的受试者的方法,其通过向受试者施用有效量的荷伯希二烯剪接调节子、ADC或包含荷伯希二烯剪接调节子或ADC的组合物及至少一种额外疗法(例如检查点抑制剂疗法、细胞因子或细胞因子类似物、新抗原疫苗、CAR-T)来进行。在一些实施例中,荷伯希二烯剪接调节子、ADC或组合物的施用诱导至少一种新抗原和/或T细胞反应。在一些实施例中,荷伯希二烯剪接调节子、ADC或组合物的施用诱导双股RNA免疫反应。在一些实施例中,荷伯希二烯剪接调节子、ADC或组合物的施用诱导免疫原性细胞死亡。在一些实施例中,至少一种额外疗法可包含至少一种、至少两种、至少三种、至少四种或至少五种额外疗法。举例而言,在一些实施例中,荷伯希二烯剪接调节子、ADC或组合物可与两种检查点疗法(即使用两种不同检查点抑制剂)组合施用。在一些其他实施例中,荷伯希二烯剪接调节子、ADC或组合物可与检查点抑制剂疗法及新抗原疫苗组合施用。

[0515] 在组合疗法的一些实施例中,与荷伯希二烯剪接调节子、抗体-药物缀合物或组合物和/或至少一种额外疗法的标准剂量相比,荷伯希二烯剪接调节子、抗体-药物缀合物或组合物和/或至少一种额外疗法的施用量减少10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、75%或90%。在一些实施例中,与荷伯希二烯剪接调节子、抗体-药物缀合物或组合物和/或至少一种额外疗法的标准给药方案相比,荷伯希二烯剪接调节子、抗体-药物缀合物或组合物和/或至少一种额外疗法以低至少10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、75%或90%的频率施用。在一些实施例中,荷伯希二烯剪接调节子、抗体-药物缀合物或组合物和/或至少一种额外疗法的施用量和/或剂量引起较低全身性毒性和/或经改善的耐药性。

[0516] 在一些实施例中,荷伯希二烯剪接调节子、抗体-药物缀合物或组合物的施用在至少一种额外疗法的施用之前开始。在一些实施例中,荷伯希二烯剪接调节子、抗体-药物缀合物或组合物的施用在至少一种额外疗法的施用之后开始。在一些实施例中,荷伯希二烯剪接调节子、抗体-药物缀合物或组合物的施用与至少一种额外疗法的施用同时开始。

[0517] 在一些实施例中,荷伯希二烯剪接调节子、抗体-药物缀合物或组合物的施用在初始施用之后重复至少一次。在一些实施例中,荷伯希二烯剪接调节子、抗体-药物缀合物或

组合物用于重复施用的量相较于用于初始施用的量而言减少。在一些实施例中,与荷伯希二烯剪接调节子、抗体-药物缀合物或组合物的标准剂量相比,荷伯希二烯剪接调节子、抗体-药物缀合物或组合物用于重复施用的量减少。在一些实施例中,与荷伯希二烯剪接调节子、抗体-药物缀合物或组合物的标准剂量相比,荷伯希二烯剪接调节子、抗体-药物缀合物或组合物用于重复施用的量减少10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、75%或90%。

[0518] 在一些实施例中,至少一种额外疗法的施用在初始施用之后重复至少一次。在一些实施例中,至少一种额外疗法用于重复施用的量相较于用于初始施用的量而言减少。在一些实施例中,与至少一种额外疗法的标准剂量相比,至少一种额外疗法用于重复施用的量减少。在一些实施例中,与至少一种额外疗法的标准剂量相比,至少一种额外疗法用于重复施用的量减少10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、75%或90%。

[0519] 在一些实施例中,荷伯希二烯剪接调节子、抗体-药物缀合物或组合物的重复施用与至少一种额外疗法的重复施用同时进行。在一些实施例中,荷伯希二烯剪接调节子、抗体-药物缀合物或组合物的重复施用与至少一种额外疗法的重复施用依序或错开进行。

[0520] 在不同实施例中,本披露提供治疗患有或疑似患有赘生性病症的受试者的方法,该方法通过以下来进行:向受试者施用有效量的荷伯希二烯剪接调节子、ADC或包含荷伯希二烯剪接调节子或ADC的组合物;及检查点抑制剂疗法。在一些实施例中,检查点抑制剂疗法包含施用至少一种检查点抑制剂。在一些实施例中,受试者对单独施用时的至少一种检查点抑制剂不耐受、无反应或反应不良。在一些实施例中,如使用例如免疫相关反应准则(irRC)和/或实体瘤中的免疫相关反应评估准则(irRECIST)所确定,受试者可视为对至少一种检查点抑制剂无反应或反应不良。参见例如Wolchok等人(2009)Clin Cancer Res.[临床癌症研究]15(23):7412-20;Bohnsack等人“Adaptation of the Immune-Related Response Criteria:irRECIST[适应免疫相关反应标准:irRECIST]”(摘要4958)ESMO 2014。示例性准则可包括此项技术中用于界定当所评估的治疗为免疫-肿瘤学药物(例如检查点抑制剂)时在治疗期间癌症患者中的肿瘤何时改善(“反应”)、保持相同(“稳定”)或恶化(“发展”)的准则。在一些实施例中,若受试者呈现针对各别检查点抑制剂(例如伊匹木单抗)所识别的一桩或超过一桩不良(2+级)事件,则受试者可视为对至少一种检查点抑制剂不耐受。在一些实施例中,举例而言,若受试者呈现选自小肠结肠炎、肝炎、皮炎(包括中毒性表皮坏死溶解)、神经病变及内分泌病的一或多桩不良事件,则受试者可视为对伊匹木单抗治疗不耐受(Yervoy®(伊匹木单抗)FDA Label Supplement, 2018)。

[0521] 在一些实施例中,检查点抑制剂靶向PD1/PDL1、CTLA4、OX40、CD40、LAG3、TIM3、GITR和/或KIR。在一些实施例中,检查点抑制剂靶向CTLA4、OX40、CD40和/或GITR。在一些实施例中,检查点抑制剂与抑制性抗体或其他类似抑制性分子一起靶向。在一些其他实施例中,检查点抑制剂与促效抗体或其他类似促效分子一起靶向。在一些实施例中,检查点抑制剂包含细胞毒性T淋巴球相关抗原4路径(CTLA4)抑制剂。在一些实施例中,CTLA4抑制剂为抗CTLA4抗体。在一些实施例中,抗CTLA4抗体为伊匹木单抗。在一些实施例中,检查点抑制剂包含程序性死亡-1路径(PD1)抑制剂。在一些实施例中,PD1抑制剂为抗PD1抗体。在一些实施例中,抗PD1抗体为纳武单抗。在一些实施例中,PD1抑制剂为抗PDL1抗体。在一些实施例中,抗PDL1抗体为阿特珠单抗。在一些实施例中,检查点抑制剂包含CTLA4抑制剂及PD1抑

制剂。在一些实施例中,检查点抑制剂靶向OX40。在一些实施例中,检查点抑制剂靶向CD40。在一些实施例中,检查点抑制剂靶向GITR。在一些实施例中,具有荷伯希二烯剪接调节子、ADC或组合物与检查点抑制剂(例如靶向CTLA4的抗体或分子、靶向PD1/PDL1的抗体或分子、靶向OX40的抗体或分子、靶向CD40的抗体或分子和/或靶向GITR的抗体或分子)的组合疗法的效益(例如对至少一种症状或疾病发展的风险/速率的效果)为累加的。在一些实施例中,具有荷伯希二烯剪接调节子、ADC或组合物与检查点抑制剂(例如靶向CTLA4的抗体或分子、靶向PD1/PDL1的抗体或分子、靶向OX40的抗体或分子、靶向CD40的抗体或分子和/或靶向GITR的抗体或分子)的组合疗法的效益为超累加的(即协同性的)。

[0522] 在不同实施例中,本披露提供治疗患有或疑似患有赘生性病症的受试者的方法,其通过向受试者施用有效量的荷伯希二烯剪接调节子、ADC或包含荷伯希二烯剪接调节子或ADC的组合物及细胞因子或细胞因子类似物疗法来进行。在一些实施例中,细胞因子或细胞因子类似物疗法包含施用至少一种细胞因子或细胞因子类似物。在一些实施例中,受试者对单独施用时的至少一种细胞因子或细胞因子类似物不耐受、无反应或反应不良。

[0523] 在一些实施例中,细胞因子或细胞因子类似物包含T细胞强化子。在一些实施例中,细胞因子或细胞因子类似物包含IL-2、IL-10、IL-12、IL-15、IFN γ 和/或TNF α 。在一些实施例中,细胞因子或细胞因子类似物包含IL-2、IL-10、IL-12和/或IL-15。在一些实施例中,在施用荷伯希二烯剪接调节子、抗体-药物缀合物或组合物后,施用细胞因子或细胞因子类似物由于新抗原诱导及呈现而增强T细胞激活。

[0524] 在一些实施例中,细胞因子或细胞因子类似物包含IL-2。在一些实施例中,IL-2加强针对效应细胞的信号,促进其扩增(Rosenberg (2014) J Immunol. [免疫学杂志] 192 (12): 5451-8)。在一些实施例中,细胞因子或细胞因子类似物包含IL-10。在一些实施例中,IL-10加强CD8+T细胞激活及活化(Mumm等人(2011) Cancer Cell [癌细胞] 20 (6): 781-96)。在一些实施例中,细胞因子或细胞因子类似物包含IL-12。在一些实施例中,IL-12连接先天性免疫反应及适应性免疫反应以加强抗原特异性激活及靶向(Tugues等人(2015) Cell Death Differ. [细胞死亡和分化] 22 (2): 237-46)。在一些实施例中,细胞因子或细胞因子类似物包含IL-15。在一些实施例中,IL-15加强T效应(CD8)细胞激活和/或活化。在一些实施例中,细胞因子或细胞因子类似物包含IFN γ 。在一些实施例中,IFN γ 补充IFN γ 的T效应细胞分泌。在一些实施例中,细胞因子或细胞因子类似物包含TNF α 。在一些实施例中,TNF α 补充TNF α 的T效应细胞分泌。

[0525] 在一些实施例中,将初始剂量的荷伯希二烯剪接调节子、ADC或组合物施用至受试者以触发异常剪接及新抗原肽的产生。在一些实施例中,在允许蛋白质产生及抗原呈现的一定时段之后,随后施用受试者初始剂量的细胞因子或细胞因子类似物以加强和/或增强效应T细胞激活及扩增。在一些实施例中,一定剂量的荷伯希二烯剪接调节子、ADC或组合物与细胞因子或细胞因子类似物之间的等待期为约2天、约3天、约4天、约5天、约6天或约7天。在一些实施例中,等待期介于约3天与约5天之间。在一些实施例中,细胞因子或细胞因子类似物为IL-2、IL-10、IL-12、IL-15、IFN γ 和/或TNF α 。在一些实施例中,荷伯希二烯剪接调节子、ADC或组合物与细胞因子或细胞因子类似物的组合治疗效益可为累加的或超累加的。

[0526] 在一些其他实施例中,将初始剂量的细胞因子或细胞因子类似物施用至受试者以加强和/或增强效应T细胞激活及扩增。在一些实施例中,在一定等待期之后,随后施用受试

者初始剂量的荷伯希二烯剪接调节子、ADC或组合物以触发异常剪接及新抗原肽的产生。在一些实施例中,一定剂量的细胞因子或细胞因子类似物与荷伯希二烯剪接调节子、ADC或组合物之间的等待期为约2天、约3天、约4天、约5天、约6天或约7天。在一些实施例中,等待期介于约3天与约5天之间。在一些实施例中,细胞因子或细胞因子类似物为IL-2、IL-10、IL-12、IL-15、IFN γ 和/或TNF α 。在一些实施例中,细胞因子或细胞因子类似物与荷伯希二烯剪接调节子、ADC或组合物的组合治疗效益可为累加的或超累加的。

[0527] 在一些实施例中,在允许T细胞激活及扩增的一定时段之后,随后施用受试者第二或后续剂量的荷伯希二烯剪接调节子、ADC或组合物以触发新抗原肽的再呈现。在一些实施例中,初始剂量的细胞因子或细胞因子类似物与第二或后续剂量的荷伯希二烯剪接调节子、ADC或组合物之间的等待期为约2周、约3周、约4周或约5周。在一些实施例中,等待期为约3周。在一些实施例中,可例如在后续剂量的荷伯希二烯剪接调节子、ADC或组合物之间穿插施用后续剂量的细胞因子或细胞因子类似物。在一些实施例中,在第二或后续剂量的荷伯希二烯剪接调节子、ADC或组合物之后,免疫系统可与呈现新抗原的肿瘤细胞接合和/或引发肿瘤细胞杀灭。在一些实施例中,在此示例性初始治疗方案之后的荷伯希二烯剪接调节子、ADC或组合物的给药可为脉冲式给药,即可以经延长的间隔(例如约每4周、约每5周、约每6周)给药荷伯希二烯剪接调节子、ADC或组合物以允许抗原呈现、T细胞接合和/或肿瘤细胞杀灭和/或记忆T细胞群恢复。

[0528] 在一些实施例中,受试者具有约150个突变或更少的非同义突变负荷。在一些实施例中,受试者具有约100个突变或更少的非同义突变负荷。在一些实施例中,受试者具有约50个突变或更少的非同义突变负荷。在一些实施例中,受试者患有或疑似患有例如血液恶性肿瘤或实体瘤的赘生性病症。在一些实施例中,血液恶性肿瘤选自B细胞恶性肿瘤、白血病、淋巴瘤及骨髓瘤。在一些实施例中,血液恶性肿瘤选自急性骨髓性白血病及多发性骨髓瘤。在一些实施例中,实体瘤选自乳癌、胃癌、前列腺癌、卵巢癌、肺癌、子宫癌、唾液腺癌、黑色素瘤、大肠癌、子宫颈癌、胰脏癌、肾癌、结直肠癌及食道癌。在一些实施例中,实体瘤选自HER2阳性乳癌、胃腺癌、前列腺癌及骨肉瘤。

荷伯希二烯剪接调节子/ADC与新抗原疫苗的组合:

[0529] 在不同实施例中,可用荷伯希二烯剪接调节子、ADC或组合物与新抗原疫苗的组合治疗患有如本文所描述的癌症的患者。在不受理论束缚的情况下,单独或与免疫检查点抑制剂(ICI)分子组合使用的疫苗已在早期试验中显示出前景(Ott等人(2017)Nature[自然]547(7662):217-21;Sahin等人(2017)Nature[自然]547(7662):222-6),但一般需要对患者肿瘤突变进行定序(Ott等人(2017)Nature[自然]547(7662):217-21;Aldous及Dong(2018)Bioorg.Med.Chem.[生物有机化学与医药化学]26(10):2842-9)。如此,疫苗通常视足够数目的具有抗原性的非同义突变而定。一般而言,具有极低突变负荷的肿瘤提供很少候选抗原,且具有快速生长的肿瘤提供有限时间来识别且产生患者特异性疫苗。

[0530] 迄今为止,研发在大百分比患者中具有广泛免疫原性的疫苗的尝试已集中于频繁突变、异位性过度表达或放大的蛋白质和/或以生物体内“自身”蛋白质形式存在的蛋白质。另外,这些蛋白质通常在免疫受限组织中表达(例如在神经内分泌肿瘤类型中表达的神经元标记),而其他蛋白质可在胚胎发生期间正常表达(例如癌胚抗原)。因此,使用这类蛋白质作为抗原的疫苗的效用通常限于其中这类抗原中的一或多者得到呈现的特定肿瘤谱系

或亚集合。还需要通过对患者肿瘤样品进行定序来确认疫苗效用,该定序可能为耗时的。

[0531] 此外,若这些抗原以“自身”蛋白质形式存在,则免疫系统有可能经激活以将这些抗原识别为“自身”的且因此不起反应。或可替代地,若免疫系统能够对这些抗原产生效应子反应,则其可能在其中可表达抗原的组织中引起中靶副作用。在此两种情况下,关键挑战中的一者为大多数抗原肽来源于“乘客”基因(即在肿瘤形成过程中突变或放大、但在肿瘤本身的继续存活或增殖中不发挥关键作用的基因)。因此,这些基因可沉默且对肿瘤发展无显著影响,且因此将允许肿瘤“逃避”针对这些抗原的免疫反应。在不希望受理论束缚的情况下,此机制可在肿瘤演化中发挥作用,其中具有强抗原性的随机突变通常在肿瘤形成早期期间由肿瘤“针对性地选择”(Dunn等人(2004) *Annu. Rev. Immunol.* [免疫学年评] 22:329-60)。

[0532] 另外,某些证据还指示,长期抗原呈现及免疫刺激可能导致免疫细胞惰性及耗竭(Pardoll(2012) *Nat. Rev. Cancer* [自然综述-癌症] 12(4):252-64)。这些表型构成现行ICI治疗背后的治疗原理的基础,因为已显示ICI抑制经耗尽的免疫细胞表型(α -PD1/PD-L1)或促进额外免疫细胞反应(α -CTLA4)。值得注意地,在 α -CTLA4疗法的情况下,已报导特定亚集合的患者展现严重免疫相关不良事件,这类事件可能归因于促进T细胞活化及打破限制自我反应性免疫反应的免疫耐受机制。

[0533] 此两种方法(即从头触发或增强针对新抗原的免疫反应或阻遏现存免疫反应的情能或耗竭)与长期免疫活化相关。如此,这些方法对惰能、编辑及设计成遏制免疫接合的其他肿瘤介导的机制敏感。

[0534] 相比的下,用本文所披露的荷伯希二烯剪接调节子、ADC或组合物进行的治疗可诱导针对代表新抗原的序列的免疫反应。在一些实施例中,新抗原的呈现为适应性免疫系统提供更多一起进行接合及活化的不同靶标。在一些实施例中,荷伯希二烯剪接调节子、ADC或组合物急性地诱导交替剪接及所得新抗原的能力可降低由于长期暴露于突变驱动的新抗原而造成的免疫系统疲劳的风险和/或限制肿瘤细胞进行调适以逃避疗法的能力。在一些实施例中,施用荷伯希二烯剪接调节子、ADC或组合物与新抗原疫苗的组合增强针对由荷伯希二烯剪接调节子、ADC或组合物产生的新抗原的免疫反应。在一些实施例中,荷伯希二烯剪接调节子、ADC或组合物在疫苗接种之前、期间或之后施用。在一些实施例中,在治疗过程期间,可施用荷伯希二烯剪接调节子、ADC或组合物和/或疫苗一次或超过一次。在一些实施例中,在治疗过程期间,施用疫苗一次且施用荷伯希二烯剪接调节子、ADC或组合物超过一次。在一些实施例中,在治疗过程期间,施用疫苗一次且随后施用一种或多种加强剂。

[0535] 如本文所使用的术语“新抗原疫苗”是指一种或多种免疫原性新抗原肽或mRNA,例如至少两种、至少三种、至少四种、至少五种或更多种新抗原肽的汇集样品。术语“疫苗”是指用于生成用以预防和/或治疗疾病(例如赘生性病症,例如血液恶性肿瘤或实体瘤)的免疫性的组合物。因此,疫苗为包含免疫原性剂的药剂,且意欲用于人类或动物中以在疫苗接种后生成特定免疫防御及保护性物质。新抗原疫苗可另外包括药学上可接受的载体、稀释剂、赋形剂和/或佐剂。

[0536] 如本文所使用的术语“免疫原性”是指可引发例如T细胞反应的免疫反应的任何药剂或组合物。免疫反应可为抗体介导的或细胞介导的,或两者兼而有的。

[0537] 在一些实施例中,给与患者荷伯希二烯剪接调节子、ADC或组合物,且随后给与具

有已知新抗原的肽或mRNA疫苗以增强针对由荷伯希二烯剪接调节子、ADC或组合物产生的新抗原的免疫反应。在一些其他实施例中,给与患者荷伯希二烯剪接调节子、ADC或组合物且筛选由治疗产生的新抗原。随后,使用那些新抗原中的一或多者来产生给与至患者的个人化疫苗。在这些实施例中的任一者中,可向患者施用一次或重复施用荷伯希二烯剪接调节子、ADC或组合物和/或肽或mRNA疫苗。

[0538] 在不同实施例中,适用于疫苗的新抗原可通过筛选来自患者中的一个或多个组织样品(例如来自肿瘤活检)的具有经改变的剪接及稳健表达的一组转录物来识别。在一些实施例中,基于跨经异常剪接的mRNA接合点的翻译在所筛选的样品中识别变异蛋白质序列,同时保持侧接跨越接合点的氨基酸变化的蛋白质序列的部分(至多12个氨基酸)。在一些实施例中,例如使用诸如NetMHC1的工具扫描这些跨越接合点的肽片段与MHC1等位基因结合的高亲和力(Nielsen等人(2003) *Protein Sci*[蛋白质科学]12(5):1007-17;Andreatta及Nielsen(2016) *Bioinformatics*[生物信息学]32(4):511-7)。这些结果允许将新肽过滤成作为针对独特患者HLA等位基因组成所预测的高亲和力结合剂的新肽,以及装配预测为与不同群体中以高频存在的HLA等位基因广泛结合的新肽池(Maiers等人(2007) *Hum Immunol*[人类免疫学]68(9):779-88)。在不同实施例中,随后,例如通过缀合至合适载体或佐剂将所识别的新肽配制为疫苗(Ott等人(2017) *Nature* 547(7662):217-21),或作为mRNA递送(Sahin等人(2017) *Nature*[自然]547(7662):222-6)。

[0539] 在一些实施例中,所选新抗原基于用以识别由用于后续疫苗接种中的治疗产生的一种或多种新抗原的对针对荷伯希二烯剪接调节子、ADC或组合物的个别患者肿瘤反应的筛选。在其他实施例中,例如基于对一组来自不同患者的样品进行筛选以识别由荷伯希二烯剪接调节子、ADC或组合物产生的常见新抗原且随后用作用于未来患者的通用疫苗来选择新抗原。

[0540] 在一些实施例中,在不受理论束缚的情况下,通用新抗原疫苗的使用应避免对定序且分析各患者肿瘤的独特突变状态的需要,这是因为所选新抗原不视肿瘤突变而定,而实际上模拟由荷伯希二烯剪接调节子、ADC或组合物产生且一般由身体辨识为外源的新抗原。另外,在一些实施例中,新抗原疫苗的使用可特别地有效,这是因为与模拟由荷伯希二烯剪接调节子、ADC或组合物产生的新抗原的新抗原相比,患者肿瘤细胞更可能突变远离产生视肿瘤突变而定的一种或多种新抗原。此可允许配制本体疫苗,该本体疫苗在大百分比患者中具有广泛免疫原性,加速治疗方案开始。患者可根据本文所概述的时程进行疫苗接种,且在后续疫苗接种完成之前可进一步经荷伯希二烯剪接调节子、ADC或组合物治疗,例如以诱导新抗原肽的表达。在一些实施例中,可在疫苗接种之前、同时或之后施用患者荷伯希二烯剪接调节子、ADC或组合物。在一些实施例中,施用患者荷伯希二烯剪接调节子、ADC或组合物,对在一组通用新抗原中发现的一种或多种新抗原进行筛选,且接种包含于受试者中识别的至少一种通用新抗原的通用新抗原疫苗。在一些实施例中,在疫苗接种之后可施用患者荷伯希二烯剪接调节子、ADC或组合物一次或超过一次。在治疗过程期间,可施用荷伯希二烯剪接调节子或ADC或组合物和/或疫苗一次或超过一次。

[0541] 在不同实施例中,疫苗可包含一种或超过一种新抗原肽或mRNA。在不同实施例中,疫苗可包含一种或超过一种长新抗原肽。在不同实施例中,这类“长”新抗原肽在诸如树突状细胞的专职抗原呈现细胞中经历有效内化、加工及交叉呈现。类似地,在其他情形下,已

显示长疫苗肽在人类中诱导细胞毒性T细胞 (Melief及van der Burg (2008) Nat Rev Cancer [癌症自然评论] 8 (5): 351-60)。在不同实施例中,除侧接氨基酸序列之外,新抗原肽还经延长以包含新抗原肽序列本身。在不同实施例中,经延长的肽序列促进例如树突状细胞的抗原呈现细胞对蛋白质的吸收。在不同实施例中,经延长的肽序列使得能够在具有不同HLA同型的模型中进行有效抗原呈现及T细胞激活。在不同实施例中,与较短新抗原肽和/或较短肽序列 (例如长度小于约10个或小于约5个氨基酸的肽序列) 相比,较长新抗原肽和/或经延长的肽序列展现经增加的抗原呈现细胞 (例如树突状细胞) 吸收、经增加的抗原呈现和/或经增加的T细胞激活。在一些实施例中,长新抗原肽的长度介于约5个至约50个氨基酸范围内。在一些实施例中,长新抗原肽的长度介于约10个至约50个氨基酸范围内。在一些实施例中,至少一种新抗原肽的长度介于约10个至约35个氨基酸范围内。在一些实施例中,长新抗原肽的长度介于约15个至约25个氨基酸范围内。

[0542] 在一些实施例中,新抗原序列和/或抗原部分的长度介于约10个至约35个氨基酸范围内。在一些实施例中,新抗原序列和/或抗原部分的长度介于约15个至约25个氨基酸范围内。在一些实施例中,新抗原序列和/或抗原部分的长度介于约10个至约20个氨基酸范围内。在一些实施例中,新抗原序列和/或抗原部分不排他性地覆盖典型肽序列或由典型肽序列组成 (例如表8中加下划线的示例性典型肽序列中的任一者)。

[0543] 示例性长新抗原肽的氨基酸序列阐述于表8中。

[0544] 在施用含有普拉二烯内酯剪接调节子的ADC之后生成这些示例性新抗原肽,然而,在类似作用机制 (即类似剪接调节机制) 的情况下,可由荷伯希二烯剪接调节子产生类似新抗原肽。

表7. 新肽

新肽	SEQ ID NO	接合点 (HG19)	基因	事件类型	观测地
1 SPTLPPRSL	37	chr12:49663470-49663610:+	TUBA1C	内含子滞留	H1568
2 HPSIKRGLSSL	38	chr12:42729776-42781257:+	PPHLN1	外显子跳读	H1568
3 LLLPHHVL	39	chr12:49663470-49663610:+	TUBA1C	内含子滞留	H1568
4 RTAPGVRPPF	40	chr14:35182767-35183743:-	CFL2	内含子滞留	H1568
5 RPQKSIQAL	41	chr10:28822963-28823162:+	WAC	内含子滞留	H1568
6 APAPPPLPA	42	chr17:80009840-80011149:+	GPS1	内含子滞留	H1568
7 RPRPSFPVSL	43	chr7:55087058-55134942:+	EGFR	内含子滞留	H1568
8 RPKHGDGFSL	44	chr11:57472287-57472444:-	MED19	内含子滞留	H1568
9 GPAPGKTGL	45	chr7:75932393-75933118:+	HSBP1	内含子滞留	H1568
10 EAARKGNSL	46	chr1:53480715-53504588:+	SCP2	外显子跳读	H1568

11	RIKEKIEEL	47	chr9:72897499-72912881:+	SMC5	外显子跳读	H1568
12	EIKKRFRQF	48	chr1:28531860-28541450:-	DNAJC8	外显子跳读	H1568
13	HESAAMAET	49	chr11:102272937-102323254:-	TMEM123	外显子跳读	HCC1954
14	ALKLKQVGV	50	chr1:153610924-153617539:+	CHTOP	外显子跳读	H1568
15	DLKKRHITF	51	chr13:41323417-41331008:-	MRPS31	外显子跳读	H1568
16	DVKRNDIAM	52	chr1:41213277-41218822:+	NFYC	外显子跳读	H1568
17	IPSDHILTPA	53	chr6:149718900-149720239:+	TAB2	外显子跳读	H1568
18	TVFSTSSLK	54	chr11:61197654-61213412:+	SDHAF2	外显子跳读	H1568
19	ITSCLLNF	55	chr5:137892555-137893090:-	HSPA9	内含子滞留	H1568
20	RASPVRGQL	56	chr7:75677544-75677893:+	MDH2	内含子滞留	H1568
21	VVRKPVIAL	57	chr1:36923582-36929406:-	MRPS15	外显子跳读	H1568
22	LLSEKKKIS	58	chr6:31750622-31750872:-	VAR5	内含子滞留	H1568
23	APASKPRPRL	59	chr19:3573798-3574380:+	HMG20B	内含子滞留	H1568
24	RYGQLSEKF	60	chr19:33076813-33078158:+	PDCD5	外显子跳读	HCC1954
25	VYISNVSKL	61	chr3:53920961-53925796:-	SELK	外显子跳读	HCC1954
26	LPTKETPSF	62	chr2:85133241-85133394:+	TMSB10	Alt 3'ss	HCC1954
27	GEAPPPPPA	63	chr17:80223672-80231181:-	CSNK1D	内含子滞留	HCC1954
28	LEEISKQEI	64	chr17:27804724-27807385:+	TAOK1	外显子跳读	HCC1954
29	IYNHITVKI	65	chr4:2886393-2896308:+	ADD1	外显子跳读	HCC1954

[0545] 表7中所列举的二十九个新肽的蛋白质序列可经延长。除侧接氨基酸序列之外,经延长的蛋白质序列还并有两个新肽序列本身。经延长的蛋白质序列较佳促进树突状细胞对蛋白质的吸收,且使得能够在具有不同HLA同型的模型中进行抗原呈现及T细胞激活。二十九个经延长的新肽的氨基酸序列阐述于表8中。

表8. 经延长的新肽的氨基酸序列

基因	SEQ ID NO	经延长的新肽氨基酸序列*
TUBA1C	66	VDLEPTVIGELTSTVQVRSQAGTGGLSWGGSSAGHSPTLPFRSL SLLLLPHHVLQMKFALALTASSSTLSNSSQARKMLPITMPEGTT PLARRSLTSCWTEFASWLTSAPVFRASWFSTALVVELVLGSPRC SWNVSQLIMARSPSWSSPFTRRPRFPQL
PPHLN1	67	APPRSHPSIKRGLSSL
CFL2	68	MVRRARWPGGRGEARKAPRTAPGVRPPF
WAC	69	WVNCLFVSGRAAAGGGGGGAVPPYLELAGPPFLLLTIRIGLGR RSGRAGGRAGTQCGGERGPGFAAFRPLRPFRRLRVCACVVRGSA LGRSVGLPRGGAAGAPFSSSPAPHPRRVLCRCLLFLFFSCHDRR GDSQPYQVPAEAGVEGLEGAGGGREGLLERRPQKSIQALRCNT SETSTADPLKIPGLVPLALSSKV
GPS1	70	MPLPVQVFNLQVTSRGRPGPPRPRAPRHWGRAEVEQGRGACARS RSGTLRAGPPRAARVGGCRAEGASPPWLRRAIGGRRAPAPPPL PAAHGRGSRPPRR
EGFR	71	QPAQPRTGAPARRPRRPSFVSLRSAAPPTGTAGGTGRFVLRP GESGAGGGGDWDTLQARRGTAAGTSGAPNRSQSSLTFFAQL RRIGVSGRKPAGAGRLGPGSRTCAPRCLPRARRGPGAHPRGGR PPAETALFREAEETQKYSLPSPDFAGQAAF
MED19	72	FRLHTGPVSPVGGRRQMGRPKHGDGFSLVQCSFIMEQNG
HSBP1	73	GVVEITGEPSCSCRGEEASRAGRAGGVRLKGRSGPGELNVGP APGKTGLLIPLLRNWECEGSLRLALSAL
SCP2	74	KMGFPEAARKGNSL
SMC5	75	LEARIKEKIEELQQALI
DNAJC8	76	EIKKRFRQFKQAVYKQ
TMEM123	77	AHESAAMAETLQHVP
CHTOP	78	NRPSVQAALKLKQVGV
MRPS31	79	KTDDLKKRHITFTLGCGIC
NFYC	80	MKLDEDVKRNDIAMAI
TAB2	81	NSISQIPSDHILTPALFITFMTILD
SDHAF2	82	TVFSTSSLKLNQPKYLKMKSWPC
HSPA9	83	AEEDRRKKVITSCLLNFNLSKAQS
MDH2	84	RSFSTSAQVGQTRGGLQAEAPRPGPRASPVRGQL
MRPS15	85	RGYVVRKPVIALSVKI
VAR5	86	VDMDFGTGGQAGPVGRGKDWCTLAHVLLSEKKKISFSQIDRA WGGSQGTVLDKWGPVSELHPSAKEVSVGRNSVESLMTWAS
HMG20B	87	EKGSEEEVVRVPALSWGRPRAPAPASKPRPRDLNCLWLRPQPI FLWKLPRPVPAAATPLTGPLPL
PDCD5	88	RYGQLSEKFNRKVMDS
SELK	89	MVYISNVSKLCFSKM
TMSB10	90	NTLPTKETPSFLNPHTSWVPRPHREAPRLRVGVAAPLQRPLPA LHSH
CSNK1D	91	FGDIYLGEAPPPPPAARRPGPCGCQDQARSRKEVVAPAGSPRKS RHRRIVARTQRPLG
TAOK1	92	GSASDLLEEISKQEISF
ADD1	93	QLIYNHITVKINLQGD

*下划线指示来源于典型转录阅读开放框(即典型肽序列)的氨基酸。

[0546] 如本文所使用的新抗原肽或mRNA疫苗涵盖使用新抗原肽或其编码mRNA的片段,只要彼片段保持免疫原性潜能即可。

[0547] 在一些实施例中,新抗原疫苗包含至少一种新抗原肽。在一些实施例中,新抗原疫苗包含至少2种、至少3种、至少4种、至少5种、至少6种、至少7种、至少8种、至少9种、至少10种、至少12种、至少15种或至少20种新抗原肽。在一些实施例中,新抗原肽的长度介于约5个至约50个氨基酸范围内。在一些实施例中,新抗原肽的长度介于约10个至约50个氨基酸范围内。在一些实施例中,至少一种新抗原肽的长度介于约10个至约35个氨基酸范围内。在一些实施例中,新抗原肽的长度介于约15个至约25个氨基酸范围内。

[0548] 在不同实施例中,本披露提供治疗患有或疑似患有赘生性病症的受试者的方法,其通过向受试者施用有效量的荷伯希二烯剪接调节子、ADC或包含荷伯希二烯剪接调节子或ADC的组合物及新抗原疫苗来进行。新抗原疫苗可为例如肽或mRNA新抗原疫苗。在一些实

施例中, 荷伯希二烯剪接调节子、ADC或组合物在施用新抗原疫苗之前施用。在一些实施例中, 荷伯希二烯剪接调节子、ADC或组合物在施用新抗原疫苗之后施用。在一些实施例中, 荷伯希二烯剪接调节子、ADC或组合物与新抗原疫苗施用同时施用。在一些实施例中, 荷伯希二烯剪接调节子、ADC或组合物的施用在初始施用之后重复至少一次。在一些实施例中, 荷伯希二烯剪接调节子、ADC或组合物用于重复施用的量相较于用于初始施用的量而言减少。

[0549] 在不同实施例中, 本披露进一步提供用于治疗患有或疑似患有赘生性病症的受试者的包含荷伯希二烯剪接调节子、ADC或包含荷伯希二烯剪接调节子或ADC的组合物与新抗原疫苗(例如通用新抗原疫苗)的组合。在一些实施例中, 新抗原疫苗为肽或mRNA新抗原疫苗。在一些实施例中, 该组合进一步包含至少一种额外疗法。在一些实施例中, 至少一种额外疗法包含至少一种、至少两种、至少三种、至少四种或至少五种额外疗法。

[0550] 在不同实施例中, 本披露进一步提供治疗患有或疑似患有赘生性病症的受试者的方法, 其通过以下来进行: (a) 向受试者施用有效量的荷伯希二烯剪接调节子、ADC或包含荷伯希二烯剪接调节子或ADC的组合物; (b) 在施用荷伯希二烯剪接调节子、ADC或组合物之后, 检测受试者中的一种或多种新抗原; (c) 比较一或多新抗原与一组通用新抗原; 及 (d) 向受试者施用包含存在于受试者中的至少一种通用新抗原的通用新抗原疫苗。在一些实施例中, 通用新抗原疫苗单独或与至少一种额外疗法组合施用。在一些实施例中, 至少一种额外疗法包含至少一种、至少两种、至少三种、至少四种或至少五种额外疗法。

[0551] 在一些实施例中, 至少一种额外疗法包含荷伯希二烯剪接调节子、ADC或组合物的重复施用。在一些实施例中, 荷伯希二烯剪接调节子、ADC或组合物的重复施用在通用新抗原疫苗的施用之前开始。在一些实施例中, 荷伯希二烯剪接调节子、ADC或组合物的重复在通用新抗原疫苗的施用之后开始。在一些实施例中, 荷伯希二烯剪接调节子、ADC或组合物的重复施用与通用新抗原疫苗的施用同时开始。在一些实施例中, 荷伯希二烯剪接调节子、ADC或组合物用于重复施用的量相较于用于初始施用的量而言减少。在一些实施例中, 当不与疫苗治疗一起使用时, 与荷伯希二烯剪接调节子、ADC或组合物的标准剂量相比, 荷伯希二烯剪接调节子、ADC或组合物用于初始施用和/或重复施用的量减少。在一些实施例中, 与荷伯希二烯剪接调节子、ADC或组合物的标准剂量相比, 荷伯希二烯剪接调节子、ADC或组合物用于初始施用和/或重复施用的量减少10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、75%或90%。

[0552] 在一些实施例中, 至少一种额外疗法包含施用检查点抑制剂(例如本文所描述的示例性检查点抑制剂中的任一种)。在一些实施例中, 检查点抑制剂的施用在通用新抗原疫苗的施用和/或荷伯希二烯剪接调节子、ADC或组合物的重复施用之前开始。在一些实施例中, 检查点抑制剂的施用在通用新抗原疫苗的施用和/或荷伯希二烯剪接调节子、ADC或组合物的重复之后开始。在一些实施例中, 检查点抑制剂的施用与通用新抗原疫苗的施用和/或荷伯希二烯剪接调节子、ADC或组合物的重复施用同时开始。在一些实施例中, 检查点抑制剂的施用在初始施用之后重复至少一次。在一些实施例中, 检查点抑制剂用于重复施用的量相较于用于初始施用的量而言减少。在一些实施例中, 与检查点抑制剂的标准剂量相比, 检查点抑制剂用于重复施用的量减少。在一些实施例中, 与检查点抑制剂的标准剂量相比, 检查点抑制剂用于重复施用的量减少10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、75%或90%。在一些实施例中, 受试者对单独施用时的检查点抑制剂不耐受、无反应

或反应不良。

[0553] 在不同实施例中,本文还提供包含至少一种新抗原肽或至少一种新抗原mRNA的新抗原疫苗。在一些实施例中,新抗原疫苗包含至少一种新抗原肽。在一些其他实施例中,新抗原疫苗包含至少一种新抗原mRNA。

[0554] 在不同实施例中,本文还提供包含荷伯希二烯剪接调节子、ADC或包含荷伯希二烯剪接调节子或ADC的组合物及新抗原疫苗(例如通用新抗原疫苗)的试剂盒。在一些实施例中,新抗原疫苗为肽或mRNA新抗原疫苗。在一些实施例中,试剂盒进一步包含包括但不限于以下的一种或多种额外组分:使用说明书;其他药剂,例如一种或多种额外治疗剂;用于制备用以治疗性施用的荷伯希二烯剪接调节子、ADC、组合物和/或新抗原疫苗的装置、容器或其他材料;药学上可接受的载体;及用于向患者施用荷伯希二烯剪接调节子、ADC、组合物和/或新抗原疫苗的装置、容器或其他材料。使用说明书可包括治疗性应用的指南,该指南包括例如患有或疑似患有赘生性病症的患者中的建议剂量和/或施用模式。在不同实施例中,试剂盒进一步含有治疗用途说明书,例如荷伯希二烯剪接调节子、ADC或组合物及新抗原疫苗治疗或预防患者的赘生性病症的用途。在不同实施例中,试剂盒进一步含有至少一种额外治疗剂(例如用于连同荷伯希二烯剪接调节子、ADC或组合物及新抗原疫苗(例如检查点抑制剂)一起施用)。在不同实施例中,将荷伯希二烯剪接调节子、ADC、组合物和/或新抗原疫苗配制为药物组合物。

[0555] 在本文所披露的方法及组合物的一些实施例中,新抗原疫苗包含至少一种新抗原肽。在一些实施例中,至少一种新抗原肽的长度介于约10个至约50个氨基酸范围内。在一些实施例中,至少一种新抗原肽的长度介于约10个至约35个氨基酸范围内。在一些实施例中,至少一种新抗原肽的长度介于约15个至约25个氨基酸范围内。

[0556] 在一些实施例中,至少一种新抗原肽包含一种或超过一种本文所披露的新抗原序列。

[0557] 在一些实施例中,新抗原序列和/或抗原部分的长度介于约10个至约35个氨基酸范围内。在一些实施例中,新抗原序列和/或抗原部分的长度介于约15个至约25个氨基酸范围内。在一些实施例中,新抗原序列和/或抗原部分的长度介于约10个至约20个氨基酸范围内。在一些实施例中,新抗原序列和/或抗原部分不排他性地覆盖典型肽序列或由典型肽序列组成(例如表8中加下划线的示例性典型肽序列中的任一者)。

[0558] 在一些实施例中,新抗原序列为对受试者具有特异性的新抗原序列。在一些实施例中,新抗原序列为用于受试者的个人化新抗原疫苗。在一些实施例中,新抗原序列能够结合至于受试者中表达的至少一个HLA等位基因。

[0559] 在一些其他实施例中,新抗原序列为通用新抗原序列。在一些实施例中,新抗原序列为通用新抗原疫苗。在一些实施例中,新抗原序列能够与于罹患赘生性病症的受试者群体中的至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%或至少45%受试者中表达的至少一个HLA等位基因结合。在一些实施例中,新抗原序列能够引发针对于罹患赘生性病症的受试者群体的至少1%、至少5%或至少10%中存在的肿瘤的T细胞反应。

[0560] 在一些实施例中,已通过对通过施用有效量的荷伯希二烯剪接调节子、抗体-药物缀合物或组合物而于受试者中诱导的至少一种新抗原肽进行定序来识别新抗原序列。在一

些实施例中,至少一种新抗原肽包含通过使赘生性细胞与有效量的荷伯希二烯剪接调节子、抗体-药物缀合物或组合物接触而诱导的新抗原序列。在一些实施例中,赘生性细胞存在于活体外细胞培养物中。在一些实施例中,赘生性细胞自受试者获得。在一些实施例中,赘生性细胞存在于受试者中。

[0561] 在一些实施例中,新抗原疫苗包含至少一种新抗原肽或mRNA及药学上可接受的载体。在不同实施例中,新抗原肽或mRNA可与合适载体连接以帮助引发免疫反应。用于连接至免疫原性剂(例如新抗原肽或mRNA)的示例性载体包括血清白蛋白、钥孔虫戚血蓝蛋白、免疫球蛋白分子、甲状腺球蛋白、卵白蛋白、破伤风类毒素或来自诸如白喉、大肠杆菌(*E.coli*)、霍乱(*cholera*)或幽门螺旋杆菌(*H.pylori*)的其他病原菌的类毒素或减毒毒素衍生物。用于刺激或增强免疫反应的其他载体包括细胞因子(诸如IL-1、IL-1 α 及IL-1 β 肽、IL-2、 γ INF、IL-10、GM-CSF)及趋化因子(诸如MIP1 α 及MIP1 β 及RANTES)。免疫原性剂还可与增强跨组织转运的肽连接,如例如WO 97/17613及WO 97/17614中所描述。在一些实施例中,药学上可接受的载体选自肽、血清白蛋白、钥孔虫戚血蓝蛋白、免疫球蛋白、甲状腺球蛋白、卵白蛋白、类毒素或减毒类毒素衍生物、细胞因子及趋化因子。

[0562] 在一些实施例中,新抗原肽或mRNA可与药学上可接受的载体连接。免疫原性剂可通过化学交联与载体连接。用于将免疫原性肽与载体连接的技术包括使用N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基-硫基)丙酸酯(SPDP)及4-(N-顺丁烯二酰亚胺基甲基)环己烷-1-甲酸琥珀酰亚胺酯(SMCC)形成二硫键(若肽缺乏硫氢基,则此种情况可通过添加半胱氨酸残基来提供)。这些试剂在其本身与驻存于一种蛋白质上的肽半胱氨酸残基之间产生二硫键,且经由离氨酸上的 ϵ -胺基或其他氨基酸中的其他游离胺基产生酰胺键。各种这类二硫化物/酰胺形成剂描述于Jansen等人((1982) *Immun Rev.* [免疫学综述]62:185)中。其他双官能偶合剂形成硫醚键而非二硫键。许多这些硫醚形成剂为市售的,且包括6-顺丁烯二酰亚胺基己酸、2-溴乙酸及2-碘乙酸、4-(N-顺丁烯二酰亚胺基-甲基)环己烷-1-甲酸的反应性酯。羧基可通过将其与琥珀酰亚胺或1-羟基-2-硝基-4-磺酸钠盐组合来活化。在一些实施例中,新抗原肽及药学上可接受的载体经由接头共价连接。

[0563] 新抗原及其他这类免疫原性肽还可以与载体的融合蛋白形式表达。免疫原性肽可在胺基端、羧基端或肽内(内部)任何地方处的位点处与载体连接。在一些实施例中,免疫原性肽的多个重复序列可存在于融合蛋白中。在一些实施例中,新抗原肽及药学上可接受的载体以融合蛋白形式表达。

[0564] 在一些实施例中,新抗原疫苗包含至少一种新抗原肽或其编码mRNA及药学上可接受的稀释剂。在一些实施例中,新抗原疫苗包含至少一种新抗原肽或其编码mRNA及药学上可接受的佐剂(例如如本文所描述的佐剂)。

[0565] 在本文所披露的方法及组合物的一些实施例中,新抗原疫苗包含至少一种新抗原mRNA。在一些实施例中,至少一种新抗原mRNA编码一个或超过一个新抗原序列。

[0566] 在一些实施例中,新抗原序列和/或抗原部分的长度介于约10个至约50个氨基酸范围内。在一些实施例中,至少一种新抗原肽的长度介于约10个至约35个氨基酸范围内。在一些实施例中,新抗原序列和/或抗原部分的长度介于约15个至约25个氨基酸范围内。在一些实施例中,新抗原序列和/或抗原部分的长度介于约10个至约20个氨基酸范围内。在一些实施例中,新抗原序列和/或抗原部分不排他性地覆盖典型肽序列或由典型肽序列组成(例

如表8中加下划线的示例性典型肽序列中的任一者)。

[0567] 在一些实施例中,新抗原序列为对受试者具有特异性的新抗原序列。在一些实施例中,新抗原序列为用于受试者的个人化新抗原疫苗。在一些实施例中,新抗原序列能够结合至于受试者中表达的至少一个HLA等位基因。

[0568] 在一些其他实施例中,新抗原序列为通用新抗原序列。在一些实施例中,新抗原序列为通用新抗原疫苗。在一些实施例中,新抗原序列能够与于罹患赘生性病症的受试者群体中的至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%或至少45%受试者中表达的至少一个HLA等位基因结合。在一些实施例中,新抗原序列能够引发针对于罹患赘生性病症的受试者群体的至少1%、至少5%或至少10%中存在的肿瘤的T细胞反应。

[0569] 在一些实施例中,已通过对通过施用有效量的荷伯希二烯剪接调节子、抗体-药物缀合物或组合物而于受试者中诱导的至少一种新抗原mRNA进行定序来识别新抗原序列。在一些实施例中,至少一种新抗原mRNA编码通过使赘生性细胞与有效量的荷伯希二烯剪接调节子、抗体-药物缀合物或组合物接触而诱导的新抗原序列。在一些实施例中,赘生性细胞存在于活体外细胞培养物中。在一些实施例中,赘生性细胞自受试者获得。在一些实施例中,赘生性细胞存在于受试者中。

[0570] 在一些实施例中,新抗原疫苗包含至少一种新抗原mRNA及药学上可接受的载体。在一些实施例中,至少一种新抗原mRNA与药学上可接受的载体连接。在一些实施例中,药学上可接受的载体选自肽、血清白蛋白、钥孔虫凝集素、免疫球蛋白、甲状腺球蛋白、卵白蛋白、类毒素或减毒类毒素衍生物、细胞因子及趋化因子。

[0571] 在一些实施例中,新抗原疫苗包含至少一种新抗原mRNA及药学上可接受的稀释剂。在一些实施例中,新抗原疫苗包含至少一种新抗原mRNA及药学上可接受的佐剂(例如如本文所描述的佐剂)。

[0572] 在一些实施例中,新抗原mRNA通过囊封剂囊封。在一些实施例中,囊封剂保护新抗原mRNA免受降解且改善疫苗递送(McNamara等人(2015) *J Immunol Res.* [免疫学研究杂志] 2015:794528)。在一些实施例中,囊封剂为脂质体。在一些实施例中,脂质体为阳离子脂质体,诸如N-[1-(2,3-二油酰氧基)丙基]-N,N,N-三甲基氯化铵1(DOTAP)。在一些实施例中,囊封剂为纳米粒子。在一些实施例中,纳米粒子保护新抗原mRNA免受核酸酶降解和/或增强细胞吸收和/或递送效率。在一些实施例中,纳米粒子可工程改造为完全可降解。在一些实施例中,纳米粒子为具有由磷脂壳包封的pH反应性聚(b-胺基酯)(PBAE)核的生物可降解核-壳结构化纳米粒子(Su等人(2011) *Mol Pharm.* [分子药剂学] 8(3):774-87)。在一些实施例中,这类纳米粒子特别有效地活体内递送mRNA且引发抗肿瘤免疫反应。

[0573] 在一些实施例中,受试者具有约150个突变或更少的非同义突变负荷。在一些实施例中,受试者具有约100个突变或更少的非同义突变负荷。在一些实施例中,受试者具有约50个突变或更少的非同义突变负荷。在一些实施例中,受试者患有或疑似患有例如血液恶性肿瘤或实体瘤的赘生性病症。在一些实施例中,血液恶性肿瘤选自B细胞恶性肿瘤、白血病、淋巴瘤及骨髓瘤。在一些实施例中,血液恶性肿瘤选自急性骨髓性白血病及多发性骨髓瘤。在一些实施例中,实体瘤选自乳癌、胃癌、前列腺癌、卵巢癌、肺癌、子宫癌、唾液腺癌、黑色素瘤、大肠癌、子宫颈癌、胰脏癌、肾癌、结直肠癌及食道癌。在一些实施例中,实体瘤选自

HER2阳性乳癌、胃腺癌、前列腺癌及骨肉瘤。

[0574] 如本文所使用的“佐剂”是指能够增加、放大或调节针对伴随免疫原性剂(例如新抗原肽或mRNA)的免疫反应的物质。在某些实施例中,本披露的新抗原可与佐剂组合施用,这类佐剂即自身不引起适应性免疫反应、但放大或调节针对伴随新抗原的反应的物质。各种佐剂可与所披露的新抗原组合使用以便引发免疫反应。在一些实施例中,选定佐剂以强化针对新抗原的内部反应,而不造成影响反应的定性形式的新抗原中的构形变化。在一些实施例中,选定佐剂以增强T效应(例如CD8)细胞激活和/或活化。

[0575] 在某些实施例中,佐剂为铝盐(alum),诸如氢氧化铝、磷酸铝及硫酸铝。这类佐剂可与或不与其他特异性免疫刺激剂一起使用,这类其他特异性免疫刺激剂诸如3去-0-酰化单磷酰脂质A(MPL)或3-DMP、聚合氨基酸或单体氨基酸(诸如聚赖氨酸或聚离氨酸)。这类佐剂可与或不与其他特异性免疫刺激剂一起使用,这类其他特异性免疫刺激剂诸如为胞壁酰肽(例如N-乙酰基胞壁酰基-L-苏胺酰基-D-异亮酰氨酸(thr-MDP)、N-乙酰基-去甲胞壁酰基-L-丙胺酰基-D-异亮酰氨酸(nor-MDP)、N-乙酰基胞壁酰基-L-丙胺酰基-D-异亮酰胺酰基-L-丙氨酸-2-(1'-2'二软脂酰基-sn-甘油基-3-羟基磷酰基氧基)-乙胺(MTP-PE)、N-乙酰基葡萄糖胺基-N-乙酰基胞壁酰基-L-Ala-D-isoglu-L-Ala-二软脂酰氧基丙酰胺(DTP-DPP))或其他细菌细胞壁组分。其他佐剂为水包油乳液,且包括以下:(a)MF59(WO 90/14837),其含有5%角鲨烯、0.5% Tween 80及0.5% Span 85(视情况含有各种量的MTP-PE),其使用诸如型号110Y微流化床(Microfluidics)的微流化床配制成次微米级粒子;(b)SAF,其含有10%角鲨烯、0.4% Tween 80、5%普洛尼克(pluronic)嵌段聚合物L121及thr-MDP,其中的任一者微流化成次微米级乳液或经涡旋以生成较大粒度的乳液;及(c)Ribi™佐剂系统(RAS)(Ribi ImmunoChem),其含有2%角鲨烯、0.2% Tween 80及来自由以下组成的群的一种或多种细菌细胞壁组分:单磷酰脂质A(MPL)、海藻糖二霉菌酸酯(TDM)及细胞壁骨架(CWS)(例如MPL-FCWS(Detox™))。在一些实施例中,佐剂为诸如Stimulon™(QS21)的皂素或诸如ISCOM(免疫刺激复合物)及ISCOMATRIX的由其生成的粒子。其他佐剂包括弗氏完全佐剂(Complete Freund's Adjuvant, CFA)及弗氏不完全佐剂(Incomplete Freund's Adjuvant, IFA)、细胞因子(诸如介白素(IL-1、IL-2及IL-12))、巨噬细胞群落刺激因子(M-CSF)及肿瘤坏死因子(TNF)。

[0576] 佐剂可与免疫原性剂(例如新抗原肽或mRNA)一起以单一组合物形式施用,或可在免疫原性剂施用之前、同时或之后施用。在一些实施例中,免疫原性剂及佐剂可在同一小瓶中封装及供应,或可在单独小瓶中封装且在使用之前混合。在一些实施例中,免疫原性剂及佐剂可与标签一起封装,该标签指示预期治疗性应用。在一些实施例中,若免疫原性剂及佐剂分开封装,则封装可包括在使用之前混合的说明书。佐剂和/或载体的选择视含有佐剂的免疫原性配制物的稳定性、施用途径、给药时程、佐剂对疫苗接种的物种的功效而定,且在人类中,药学上可接受的佐剂为已由相关监管机构批准或可批准用于人类施用的佐剂。举例而言,弗氏完全佐剂不适用于人类施用。然而,单独或视情况与alum、QS21及MPL中的任一者及其所有组合组合的alum、MPL或弗氏不完全佐剂(Chang等人(1998)Adv Drug Deliv Rev.[先进药物递送综述]32:173-186)适用于人类施用。

[0577] 在一些实施例中,本披露进一步提供筛选及识别至少一种新抗原的方法。更具体言的,在不同实施例中,本披露提供识别至少一种新抗原的方法,其通过以下来进行:(a)使

赘生性细胞与有效量的荷伯希二烯剪接调节子、ADC或包含荷伯希二烯剪接调节子或ADC的组合物接触；(b) 在使赘生性细胞与荷伯希二烯剪接调节子、ADC或组合物接触之后，检测至少一种经交替剪接的mRNA转录物；(c) 预测至少一种经交替剪接的mRNA转录物向至少一种肽的翻译；及(d) 比较至少一种肽与参考蛋白质体，其中若至少一种肽与参考蛋白质体中的任何肽均不匹配，则识别出至少一种新抗原。在不同实施例中，该方法进一步包括接触一个或多个额外赘生性细胞以识别至少一种通用新抗原。在不同实施例中，对一个或多个额外赘生性细胞或样品(例如组织活检)重复该方法以确认合适新抗原(例如用于新抗原疫苗中)和/或识别一种或多种通用新抗原。

[0578] 在各种其他实施例中，本披露提供识别至少一种新抗原的方法，其通过以下来进行：(a) 使赘生性细胞与有效量的荷伯希二烯剪接调节子、ADC或包含荷伯希二烯剪接调节子或ADC的组合物接触；(b) 在使赘生性细胞与荷伯希二烯剪接调节子、ADC或组合物接触之后，检测至少一种包含潜在新抗原序列的肽；及(c) 比较至少一种肽与参考蛋白质体，其中若至少一种肽与参考蛋白质体中的任何肽均不匹配，则识别出至少一种新抗原。在不同实施例中，该方法进一步包括接触一个或多个额外赘生性细胞以识别至少一种通用新抗原。在不同实施例中，对一个或多个额外赘生性细胞或样品(例如组织活检)重复该方法以确认合适新抗原(例如用于新抗原疫苗中)和/或识别一种或多种通用新抗原。

[0579] 在本文所描述的新抗原识别方法的一些实施例中，检测至少一种经交替剪接的mRNA转录物包含RNAseq。在一些实施例中，预测至少一种经交替剪接的mRNA转录物的翻译包含定量至少一种转录物的剪接百分比(dPSI)值的变化。在一些实施例中，预测至少一种经交替剪接的mRNA转录物的翻译包含RiboSeq和/或核糖体剖析。

[0580] 在本文所描述的新抗原识别方法的一些实施例中，这类方法进一步包括针对所预测的主要组织相容复合体(MHC)结合对至少一种肽进行评估。在一些实施例中，所预测的MHC结合通过量测至少一种肽的原始亲和力预测结合强度来确定。在一些实施例中，约500nM或更高的原始亲和力预测结合强度指示MHC结合。在一些实施例中，所预测的MHC结合通过以下来确定：识别一系列随机肽的预测结合强度的分布；且比较该至少一种肽的预测结合强度与该分布。在一些实施例中，该分布的前2%中的预测结合强度指示弱MHC结合。在一些实施例中，该分布的前0.5%中的预测结合强度指示强MHC结合。

[0581] 在本文所描述的新抗原识别方法的一些实施例中，赘生性细胞存在于活体外细胞培养物中。在一些实施例中，赘生性细胞自受试者获得。在一些实施例中，赘生性细胞存在于受试者中。

[0582] 在不同实施例中，本文还提供制造新抗原疫苗的方法，其通过以下来进行：(a) 使用本文所披露的示例性识别方法中的任一种识别至少一种新抗原(例如至少一种新抗原肽或其编码mRNA)；及(b) 将至少一种新抗原连同药学上可接受的载体、稀释剂或佐剂(例如本文所描述的药学上可接受的载体、稀释剂或佐剂中的任一种)一起配制。

[0583] 在一些实施例中，至少一种新抗原和/或抗原部分的长度介于约10个至约50个氨基酸范围内。在一些实施例中，至少一种新抗原肽的长度介于约10个至约35个氨基酸范围内。在一些实施例中，至少一种新抗原和/或抗原部分的长度介于约15个至约25个氨基酸范围内。在一些实施例中，至少一种新抗原和/或抗原部分的长度介于约10个至约20个氨基酸范围内。在一些实施例中，至少一种新抗原和/或抗原部分不排他性地覆盖典型肽序列或由

典型肽序列组成(例如表8中加下划线的示例性典型肽序列中的任一者)。

[0584] 在一些实施例中,疫苗中所使用的至少一种新抗原与药学上可接受的载体连接。在一些实施例中,药学上可接受的载体选自肽、血清白蛋白、钥孔虫凝集素蛋白、免疫球蛋白、甲状腺球蛋白、卵白蛋白、类毒素或减毒类毒素衍生物、细胞因子及趋化因子。

荷伯希二烯剪接调节子/ADC与经工程改造的T细胞(CAR-T)的组合:

[0585] 在不同实施例中,可用荷伯希二烯剪接调节子、ADC或组合物与一种或多种经工程改造的靶向肿瘤的T细胞(即CAR-T)的组合治疗患有如本文所描述的癌症的患者。因此,在不同实施例中,本披露提供治疗患有或疑似患有赘生性病症的受试者的方法,其通过以下来进行:(a)向受试者施用有效量的荷伯希二烯剪接调节子、ADC或包含荷伯希二烯剪接调节子或ADC的组合物;及经工程改造的靶向肿瘤的T细胞(即CAR-T)来进行。在不同实施例中,嵌合T细胞受体可使用可与所识别的新抗原反应的抗原辨识序列来进行工程改造。

[0586] 举例而言,在不同实施例中,为靶向细胞表面蛋白的胞外域中的荷伯希二烯剪接调节子或ADC诱导的改变,可通过首先识别辨识细胞表面表达的新抗原蛋白质域的抗体来对嵌合抗原反应性T细胞受体(CAR)进行工程改造。随后,这类抗体的抗原辨识序列可与T细胞受体域融合以用于选择性靶向及活化。

[0587] 在各种其他实施例中,采用整合肿瘤细胞的抗原呈现机制以及荷伯希二烯剪接调节子或ADC源性新抗原的策略。在一些实施例中,可用荷伯希二烯剪接调节子、ADC或组合物治疗含有已知且常常表示的HLA等位基因(例如HLA-A*02:01)的细胞,且通过配体组学(ligandomics)识别MHC1结合新抗原。在一些实施例中,这些肽可用于激活和/或扩增来自表达相同HLA等位基因的健康供体的T细胞。在一些实施例中,可分离这类T细胞且对T细胞受体(TCR) α 及 β 链进行定序以识别同源抗原辨识区/可变区。在一些实施例中,随后可对同源CAR进行工程改造。

[0588] 在一些实施例中,将CAR序列选殖至患者源性T细胞群中且使用当前可用方案进行扩增。在一些实施例中,在用荷伯希二烯剪接调节子、ADC或组合物治疗后,随后将经工程改造的T细胞回输至患者循环中。在一些实施例中,在用荷伯希二烯剪接调节子、ADC或组合物治疗之后,肿瘤细胞可开始呈现抗原。在一些实施例中,经工程改造的T细胞群可与抗原呈现肿瘤细胞接合且杀灭这类抗原呈现肿瘤细胞。

[0589] 本领域普通技术人员将易于了解,本文所描述的本披露的方法的其他合适修改及改编显而易见且可在不脱离本披露的范畴或本文所披露的实施例的情况下使用合适等效方案进行。现已详细地描述本披露,参照以下实例将更清楚地理解本披露,这类实例仅出于说明的目的包括在内且不意欲为限制性的。

实例

实例1

[0589] 描述具有表9-11中所示的结构的有效负载、接头及可结合接头-有效负载(接头-药物,即L-D)化合物的合成方法。使用可结合接头-有效负载来制备抗体-药物缀合物(ADC)。示例性ADC描述于实例3-5中。

1.1试剂及材料

[0590] 以下合成方法中所使用的起始材料为市售的或可通过标准方法由已知材料容易地制备。所披露的可结合接头-有效负载可使用本文所描述的反应及技术来制备。在描述以

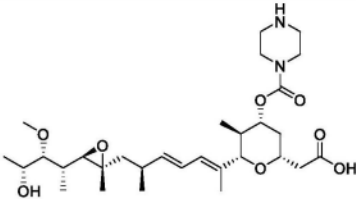
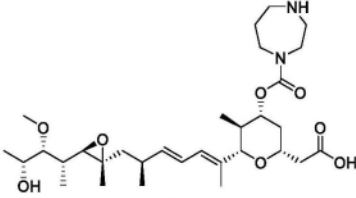
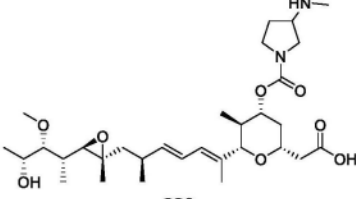
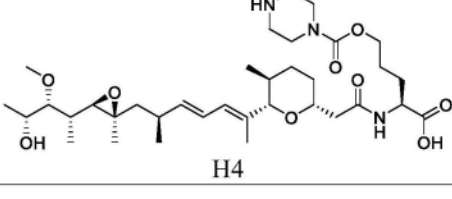
下所描述的合成方法中,应理解,除非另外指示,否则可选择所有所提出的反应条件(包括溶剂、反应氛围、反应温度、实验持续时间及处理程序的选择)作为彼反应的标准条件。熟习有机合成的技术者应理解,分子的各个部分上所存在的官能基应与所提出的试剂及反应物相容。与反应条件不兼容的取代基对于本领域普通技术人员为显而易见的,且因此在本文中指定替代方法。

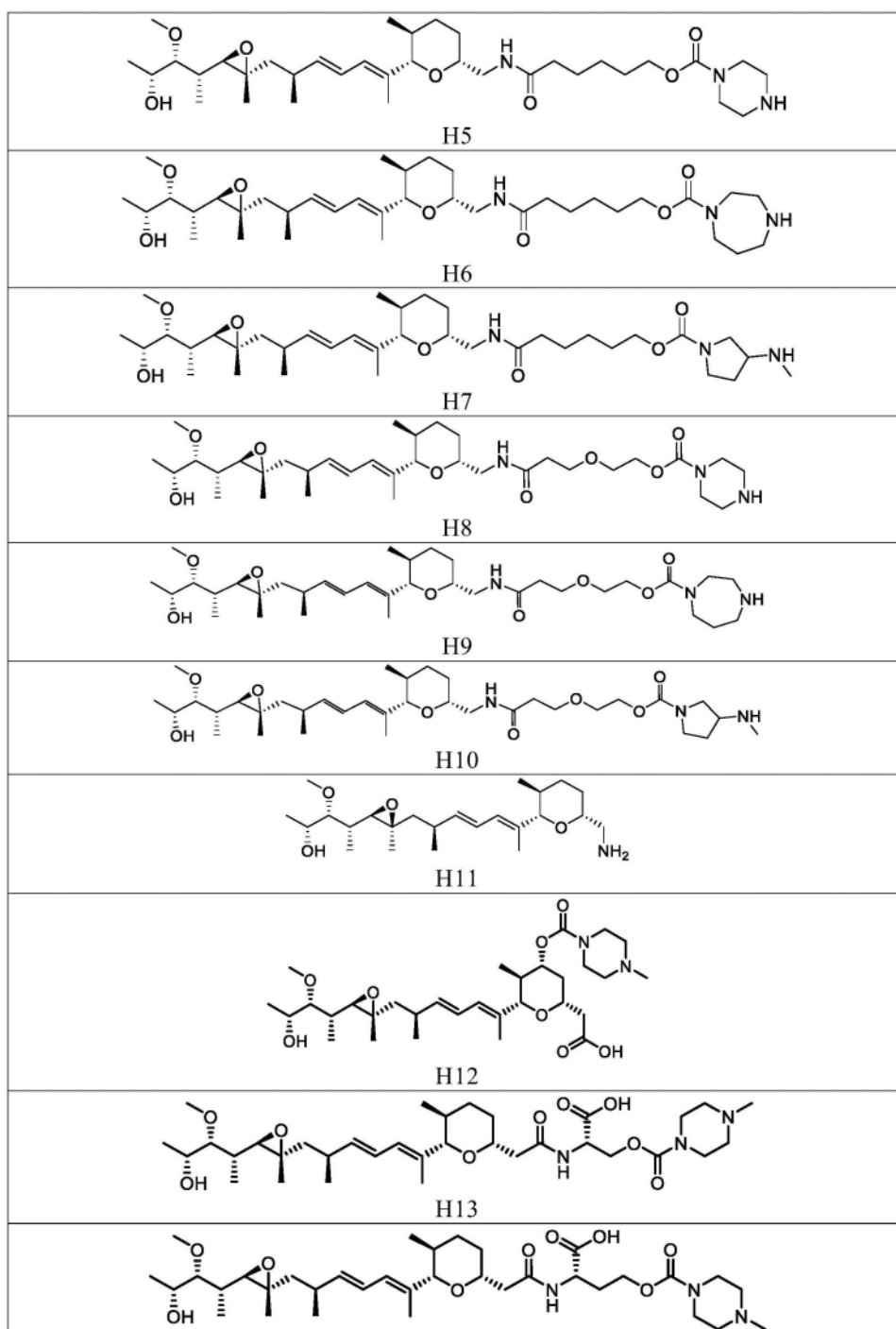
[0591] 使用Waters自动纯化系统及XTerra MS C18管柱(5 μ m,19mm $\times$ 100mm)在酸性移动相条件下进行制备型液相层析法-质谱法(LC/MS)。使用Varian仪器(Agilent Technologies)在400MHz下记录核磁共振(NMR)谱。使用Biotage Emrys Liberator或Initiator微波执行微波加热。使用Teledyne Isco Combiflash Rf200d进行管柱层析法。使用Büchi旋转式蒸发器或Genevac离心式蒸发器进行溶剂移除。

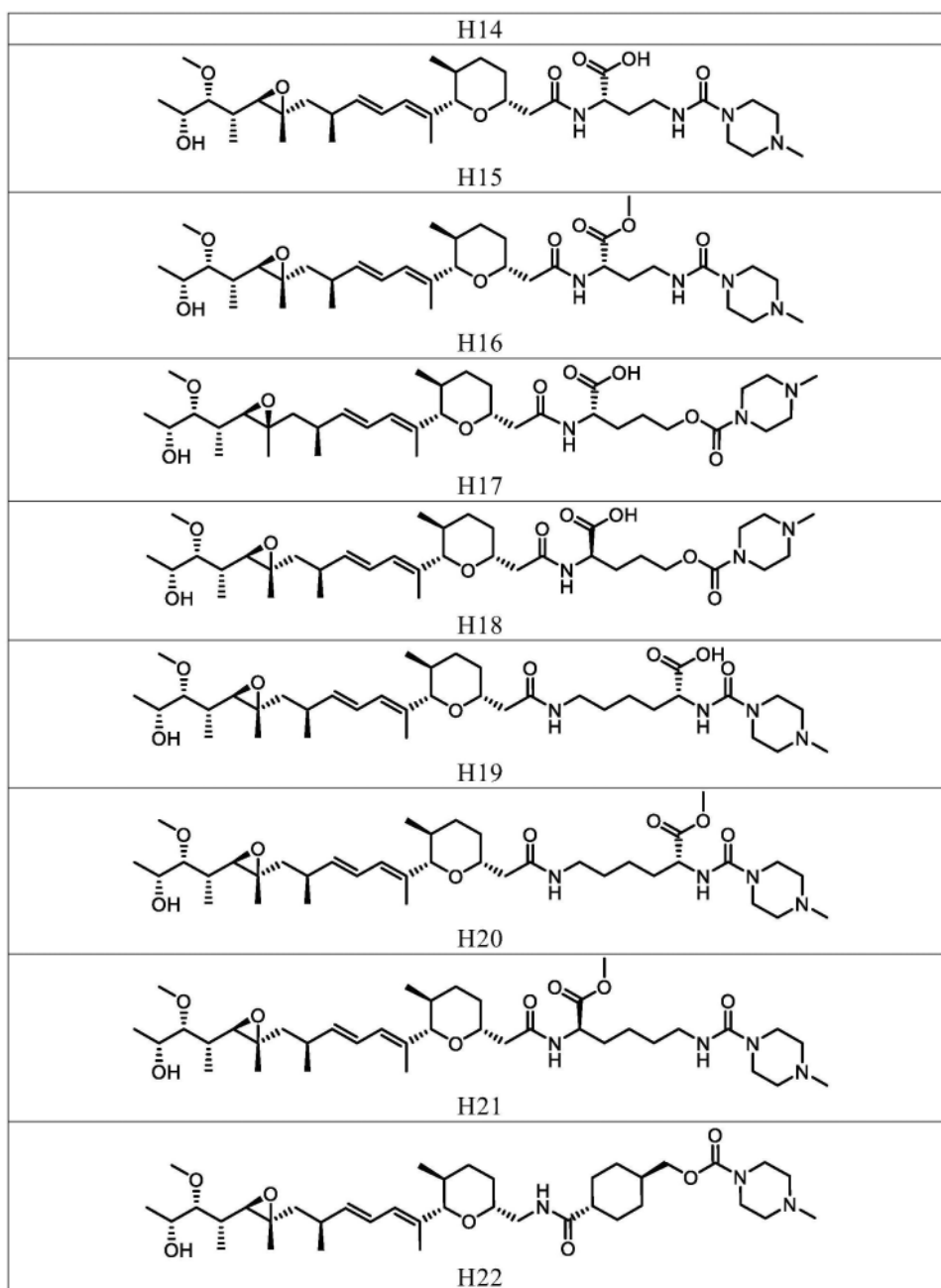
[0592] 术语/缩写:术语/缩写:如本文所使用的术语“惰性化”是指用诸如氮气或氩气的基本上不含水分的惰性气体置换反应器(例如反应容器、烧瓶、玻璃反应器)中的空气。本文使用以下缩写:DCM=二氯甲烷,DMF=二甲基甲酰胺,HPLC=高效液相层析法,KHMDS=双(三甲基硅烷基)胺基钾,LC/MS=液相层析法-质谱法,MeOH=甲醇,RT=室温,TBSCl=氯化第三丁基二甲基硅烷,THF=四氢呋喃,TLC=薄层层析法。使用以下缩写指示多重性:s=单重态,d=二重态,t=三重态,q=四重态,quint=五重态,sxt=六重态,m=多重态,dd=双二重态,ddd=双二倍二重态,dt=双三重态,br s=宽单重态。

[0593] LC/MS:移动相=A(含0.1%甲酸的H₂O)及B(含0.1%甲酸的乙腈)。梯度=1.8min内B 5%至95%。管柱=Waters Acquity BEH C18管柱(1.7 μ m,2.1 $\times$ 50mm)。

表9. 示例性药物部分(有效负载)的结构

有效负载 / ID
 H1
 H2
 H3
 H4





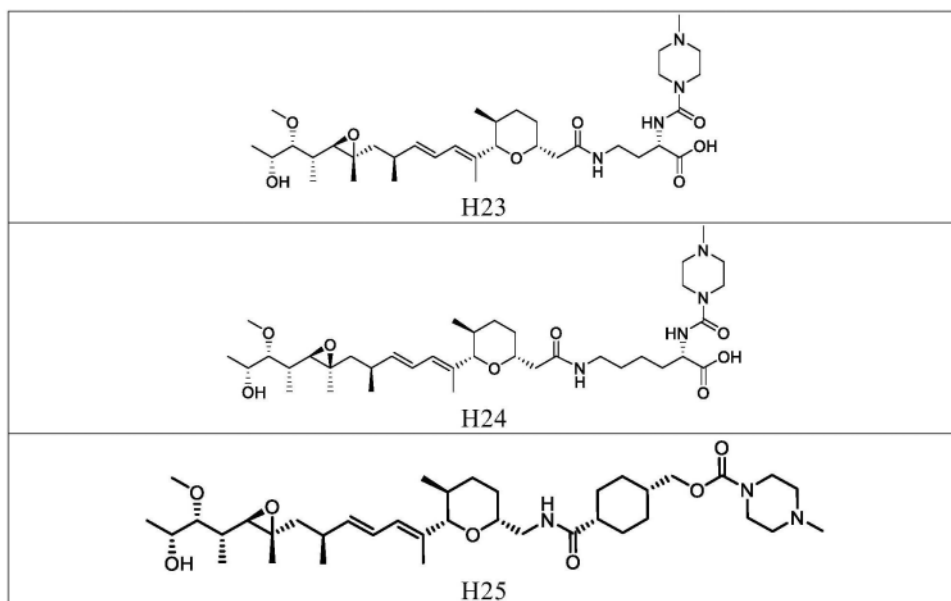
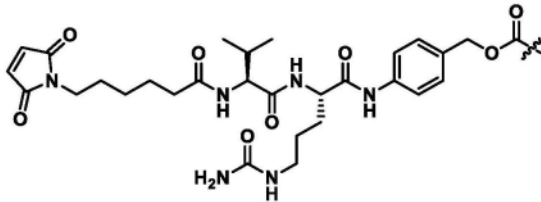
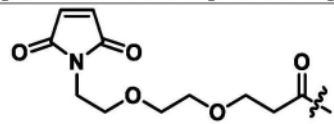
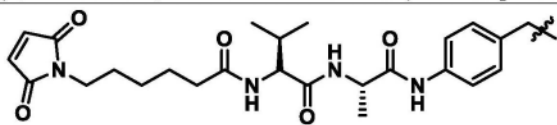
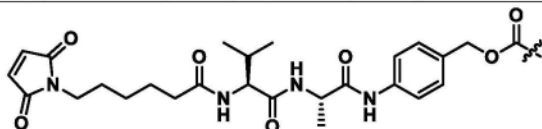


表10. 示例性接头的结构

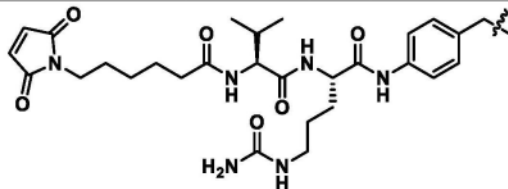
接头结构/ ID (IUPAC 名称)
 ADL1 / “MC-Val-Cit-pABC” (甲酸{4-[(2S)-5-(胺甲酰基胺基)-2-[(2S)-2-[6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酰基]-3-甲基丁酰基]戊酰基]苯基}甲酯)
 ADL2 / “MC-(PEG)2-CO” (3-{2-[2-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)乙氧基]乙氧基}丙醛)
 ADL5 / “MC-Val-Ala-pAB”

(6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)-N-[(1S)-2-甲基-1-[[[(1S)-1-[(4-甲基苯基)胺甲酰基]乙基]胺甲酰基]丙基]己酰胺])



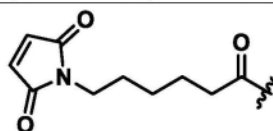
ADL6 / “MC-Val-Ala-pABC”

(甲酸{4-[(2S)-2-[(2S)-2-[6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酰胺基]-3-甲基丁酰胺基]丙酰胺基]苯基}甲酯)



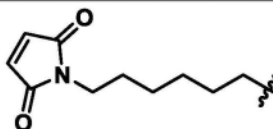
ADL7 / “MC-Val-Cit-pAB”

(N-[(1S)-1-[[[(1S)-4-(胺甲酰基胺基)-1-[(4-甲基苯基)胺甲酰基]丁基]胺甲酰基]-2-甲基丙基]-6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酰胺])



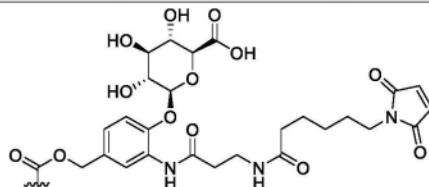
ADL10 / “MC”

(6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己醛)



ADL12 / “Mal-Hex”

(1-己基-2,5-二氢-1H-吡咯-2,5-二酮)



ADL13 / “MC-β-葡萄糖醛酸”

((2S,3S,4S,5R,6S)-6-(2-{3-[6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酰胺基]丙酰胺基}-4-[(甲酰氧基)甲基]苯氧基)-3,4,5-三羟基噁烷-2-甲酸)

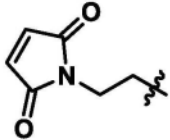
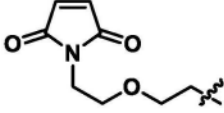
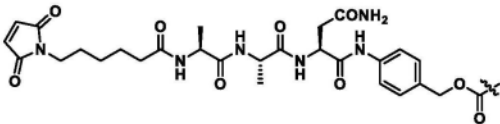
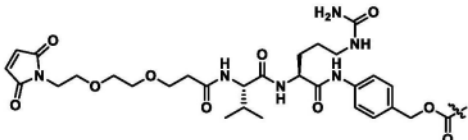
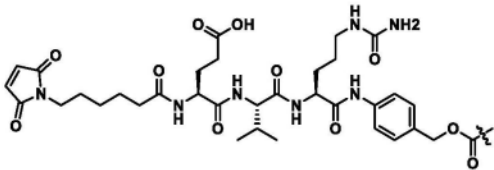
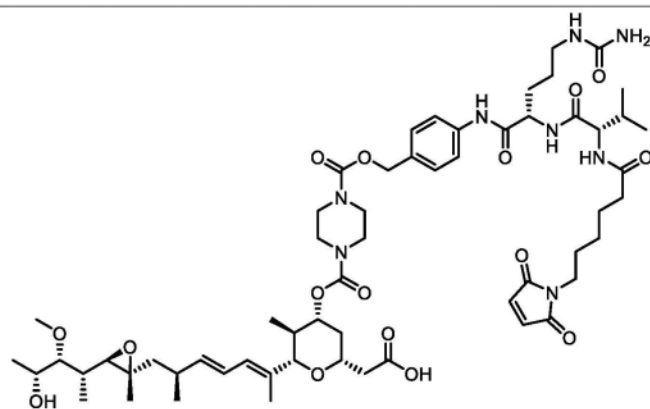
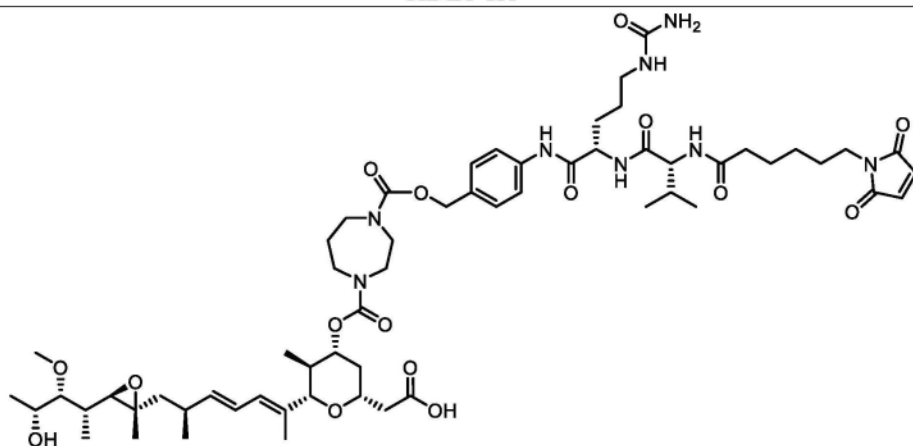
 ADL14 / “Mal-Et” (1-乙基-2,5-二氢-1H-吡咯-2,5-二酮)
 ADL15 / “Mal-Et-O-Et” (1-(2-乙氧基乙基)-2,5-二氢-1H-吡咯-2,5-二酮)
 ADL21 / “MC-Ala-Ala-Asp-pABC”
 ADL22 / “MC-(PEG)2-Val-Cit-pABC”
 ADL23 / “MC-Glu-Val-Cit-pABC”

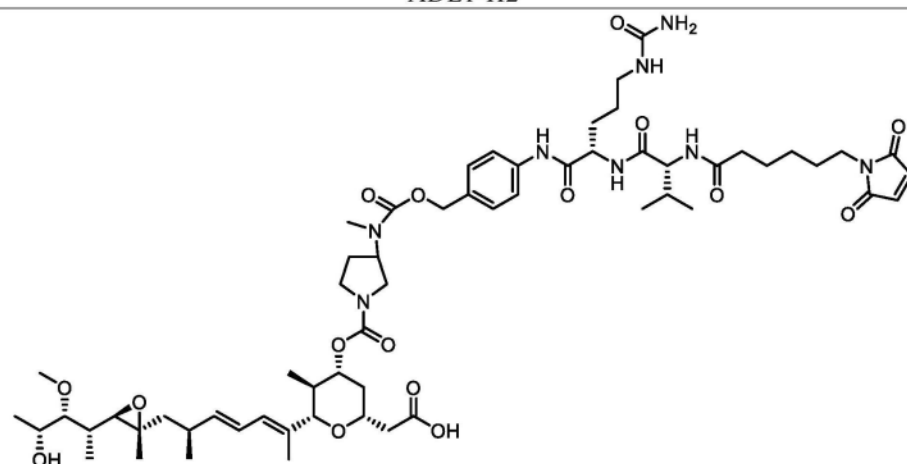
表11. 示例性可结合接头-有效负载(L-H)化合物的结构



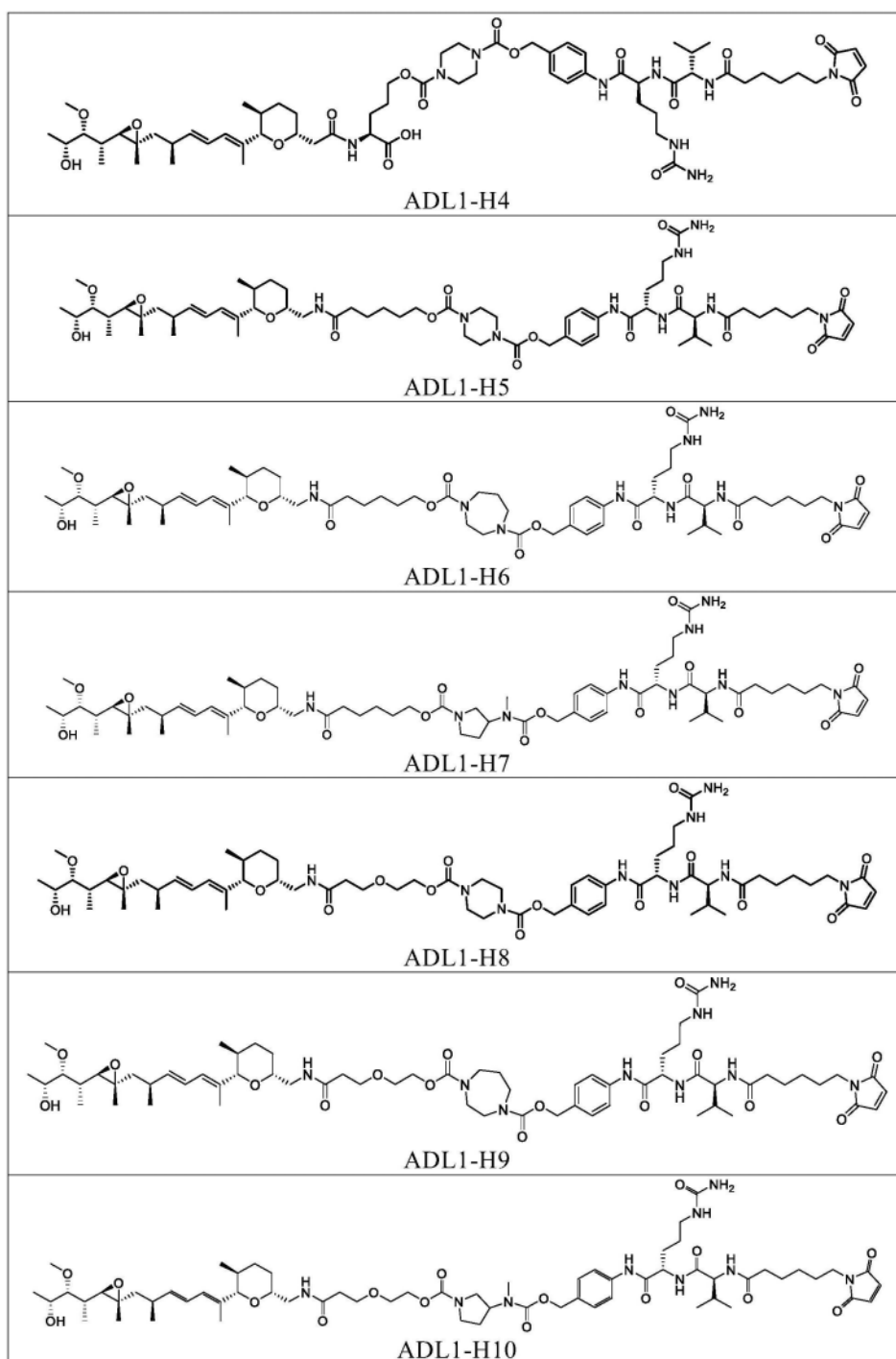
ADL1-H1

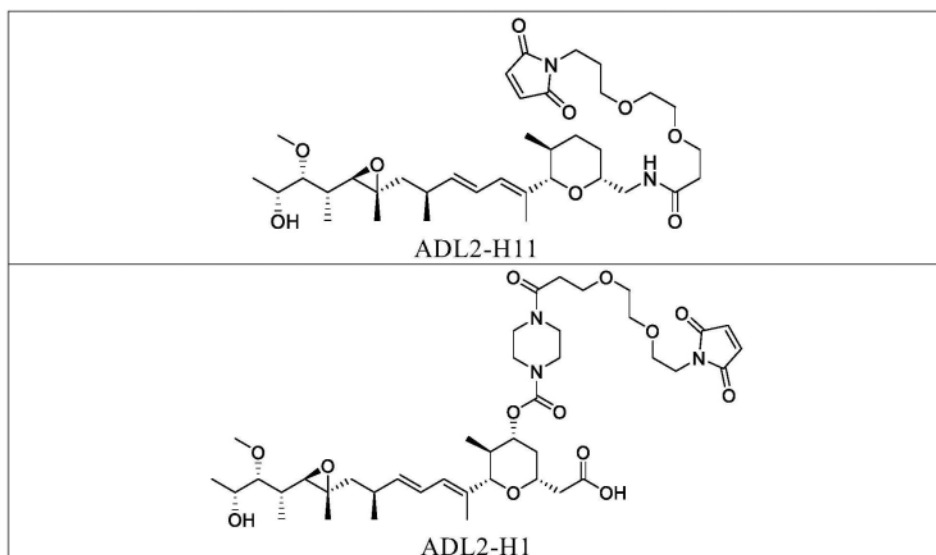


ADL1-H2



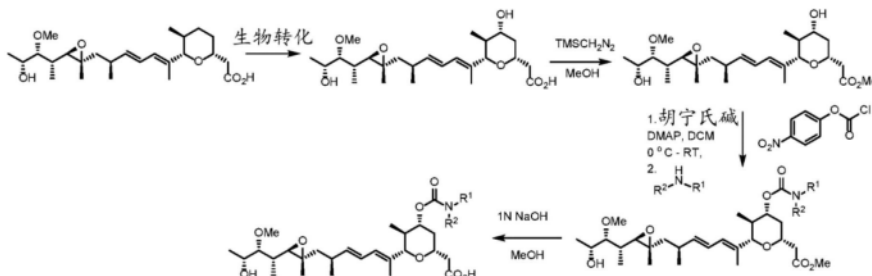
ADL1-H3





1.2制备ADL1-H1、ADL1-H2、ADL1-H3及ADL1-H4

1.2.1概述-通用程序1



方案1

[0594] 步骤1: 发酵及生物转化

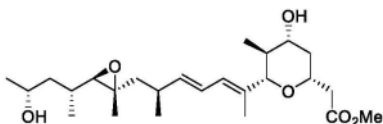
[0595] 将自日本土壤分离的糖丝菌属 (*Saccharothrix* sp.) EAS-AB4564的20%甘油储备溶液接种至于含有10mL SY-32介质 (1% D-葡萄糖、1%可溶性淀粉、0.5%大豆胨 (bactosoytone)、0.5%酵母提取物、0.2%硫酸铵、0.2% NaCl及2.3% TES, pH为8.0) 的试管中的第一种菌培养物中。将第一种菌培养物在往复式摇动器上在28℃下以200rpm摇动2天。在发酵之后,将第一种菌培养物接种至于1%v/v Erlenmeyer烧瓶中的无菌第二种菌培养物中,各烧瓶含有100mL新型SY-32介质。将第二种菌培养物在旋转式摇动器 (Iwashiyabioscience SC-144-GR) 上在28℃下以200rpm摇动2天。在发酵之后,将250mL第二培养物接种至含有10L新型SY-32介质及2mL防沫剂PE-M的15L发酵槽 (Sanki seiki MAT-15) 中。在搅拌及充气 (450rpm, 10L/min) 的条件下在28℃下进行发酵。48小时之后,将培养液以3000rpm离心10分钟。在移除上清液之后,将10L 20mM磷酸盐缓冲液 (pH 7.0) 添加至微生物集结粒中以用于洗涤微生物细胞。将悬浮液以3000rpm离心10分钟。在移除洗涤缓冲液之后,将10L反应缓冲液 (1% D-葡萄糖、0.2%六水合氯化镁、2.3% TES及1.3g荷伯希二烯, pH为8.0) 添加至微生物集结粒中,且将悬浮液转移至15L发酵槽中。在28℃下进行生物转化达6小时,同时进行搅拌及充气 (450rpm, 10L/min)。

[0596] 分离5-羟基荷伯希二烯

[0597] 将XAD-7HP (400g) 添加至上文所提及的混合物 (10L) 中,且将混合物以300rpm搅拌 (EYELA MAZELA Z) 30分钟。在搅动之后,使用染色及测试筛 (0.25mm孔径及0.16mm线径) 确

定XAD-7HP的分离。重复相同操作。通过1L丙酮萃取所收集的XAD-7HP,且在真空中移除溶剂。通过逆相MPLC (Yamazen EPCLC-W-制备型2XY) 及梯度溶离 (YMC-DispoPack AT ODS-25120g,添加有0.1%甲酸的25%至55%乙腈/水,经15分钟) 纯化萃取物,得到5-OH荷伯希二烯 (397.47mg), 且转化产率为29.5%。¹H-NMR及质谱资料与文献一致。参见例如EP0781772 B1及Ghosh等人 (2014) Org. Lett. [有机化学通讯] 16:3154-57。

[0598] 步骤2:合成2-((2R,4R,5S,6S)-4-羟基-6-((S,2E,4E)-7-((2R,3R)-3-((2R,3R,4R)-4-羟基-3-甲氧基戊-2-基)-2-甲基环氧乙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-5-甲基四氢-2H-哌喃-2-基) 乙酸甲酯



[0599] 在0℃下向2-((2R,4R,5S,6S)-4-羟基-6-((S,2E,4E)-7-((2R,3R)-3-((2R,3R,4R)-4-羟基-3-甲氧基戊-2-基)-2-甲基环氧乙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-5-甲基四氢-2H-哌喃-2-基) 乙酸 (45mg, 0.099mmol) 于THF (2mL) 及MeOH (0.5mL) 中的溶液中逐滴添加三甲基硅烷基重氮甲烷 (于己烷中2.0M, 0.148mL, 0.297mmol)。随后,使所得混合物逐渐升温至室温且在冷却至0℃之前搅拌1小时。随后,添加乙酸 (0.017mL, 0.297mmol) 且搅拌30分钟。随后,用AcOEt及饱和碳酸氢钠水溶液稀释混合物。将有机层分离,用水及盐水洗涤,经硫酸钠干燥,过滤,且在真空中浓缩。通过硅胶层析法纯化经分离的残余物,得到呈无色油状的2-((2R,4R,5S,6S)-4-羟基-6-((S,2E,4E)-7-((2R,3R)-3-((2R,3R,4R)-4-羟基-3-甲氧基戊-2-基)-2-甲基环氧乙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-5-甲基四氢-2H-哌喃-2-基) 乙酸甲酯 (36.1mg, 产率78%)。

[0600] ¹H NMR (400MHz, 氯仿-d) 0.80 (d, J=6.83Hz, 3H) 0.86 (d, J=6.83Hz, 3H) 1.03 (d, J=6.83Hz, 3H) 1.16 (d, J=6.3Hz, 3H) 1.20-1.24 (m, 1H) 1.26 (s, 3H) 1.31-1.34 (m, 3H) 1.40-1.59 (m, 2H) 1.63 (br. s., 2H) 1.69 (s, 3H) 1.87 (dd, J=13.66, 4.88Hz, 1H) 2.03 (ddd, J=10.37, 4.02, 2.20Hz, 1H) 2.42 (dd, J=15.61, 6.34Hz, 2H) 2.54 (d, J=9.8Hz, 2H) 2.62 (dd, J=15.6, 6.3Hz, 1H) 2.95 (t, J=5.37Hz, 1H) 3.33-3.44 (m, 2H) 3.52 (s, 3H) 3.65 (s, 3H) 3.79-3.90 (m, 2H) 5.45 (dd, J=15.12, 8.78Hz, 1H) 5.88 (d, J=11.22Hz, 1H) 6.21 (dd, J=15.12, 10.73Hz, 1H)。

[0601] 步骤3:胺基甲酸酯合成

[0602] 在0℃下向2-((2R,4R,5S,6S)-4-羟基-6-((S,2E,4E)-7-((2R,3R)-3-((2R,3R,4R)-4-羟基-3-甲氧基戊-2-基)-2-甲基环氧乙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-5-甲基四氢-2H-哌喃-2-基) 乙酸甲酯 (1.0当量, .075mmol)、氯甲酸4-硝苯酯 (2当量)、胡宁氏碱 (0.065mL, 4.5当量) 于二氯甲烷 (0.04M) 中的混合物中添加DMAP (0.05当量)。随后,使混合物升温至室温且搅拌16小时。将哌嗪 (10当量) 添加至混合物中且将所得混合物再搅拌1小时。随后,用DCM稀释混合物,且将有机层分离,用水及盐水洗涤,经硫酸钠干燥,过滤,且在真空中浓缩。将所得残余物通过硅胶层析法纯化且随后通过胺基官能化硅胶层析法纯化,得到所需产物。

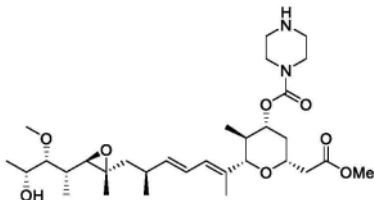
[0603] 步骤4:羧酸合成

[0604] 向获自步骤3的甲酯 (1.0当量, 0.039mmol) 于MeOH (0.02M) 中的混合物中添加氢

氧化钠水溶液(1.0当量,2N)。使混合物升温至40℃且在彼温度下搅拌4小时。随后,使所得混合物冷却至0℃且用盐酸水溶液(200μL,2N)中和。随后,在真空中浓缩混合物,且通过制备型HPLC(H₂O/MeCN/HCOOH=80/20/0.1至60/40/0.1)纯化所得残余物,得到所需产物。

1.2.2合成H1

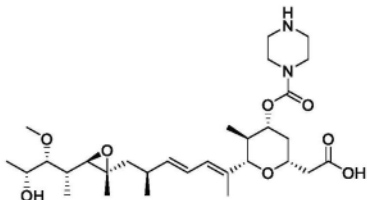
[0605] 哌嗪-1-甲酸(2S,3S,4R,6R)-2-((S,2E,4E)-7-((2R,3R)-3-((2R,3R,4R)-4-羟基-3-甲氧基戊-2-基)-2-甲基环氧乙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-6-(2-甲氧基-2-氧代乙基)-3-甲基四氢-2H-哌喃-4-基酯



[0606] 根据部分1.2.1的步骤3合成标题化合物,得到淡黄色油(22.3mg,产率52%)。

[0607] ¹H NMR(400MHz,氯仿-d) δ ppm 0.71(d,J=6.83Hz,3H)0.85(d,J=6.8Hz,3H)1.03(d,J=6.83Hz,3H)1.16(d,J=6.8Hz,3H)1.20-1.25(m,1H)1.26(s,3H)1.37(q,J=11.55Hz,1H)1.51(dt,J=8.90,6.52Hz,1H)1.63-1.67(m,1H)1.69(s,3H)1.83-2.07(m,10H)2.11-2.17(m,1H)2.36-2.45(m,2H)2.51-2.62(m,2H)2.81(s,4H)2.95(t,J=5.12Hz,1H)3.40-3.49(m,4H)3.52(s,3H)3.65(s,3H)3.80-3.94(m,2H)4.56(td,J=10.98,4.39Hz,1H)5.46(dd,J=15.12,8.78Hz,1H)5.90(d,J=10.24Hz,1H)6.21(dd,J=15.12,10.73Hz,1H)。

[0608] 2-((2R,4R,5S,6S)-6-((S,2E,4E)-7-((2R,3R)-3-((2R,3R,4R)-4-羟基-3-甲氧基戊-2-基)-2-甲基环氧乙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-5-甲基-4-((哌嗪-1-羰基)氧基)四氢-2H-哌喃-2-基)乙酸(H1)

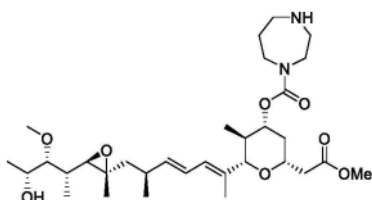


[0609] 根据部分1.2.1的步骤4合成标题化合物,得到无色油(16.0mg,产率73%)。LC/MS(ESI,m/z),567.77[M+H]⁺。

[0610] ¹H NMR(400MHz,甲醇-d₄) δ ppm 0.72(d,J=6.3Hz,3H)0.80(d,J=6.83Hz,3H)1.03(d,J=6.3Hz,3H)1.08(d,J=6.3Hz,3H)1.17(dd,J=13.2,11.2Hz,1H)1.25(s,3H)1.36(q,J=11.4Hz,1H)1.45-1.50(m,2H)1.68(s,3H)1.90(dd,J=13.42,4.15Hz,1H)2.14(dd,J=11.71,3.90Hz,1H)2.36-2.52(m,3H)2.63(d,J=9.27Hz,1H)2.95(dd,J=5.85,4.39Hz,1H)3.17(br.s,4H)3.46-3.53(m,4H)3.56-3.60(m,1H)3.69nr.s,4H)3.74-3.82(m,2H)3.85-3.92(m,1H)4.58(td,J=10.49,4.39Hz,1H)5.49(dd,J=15.12,8.78Hz,1H)5.94(d,J=10.73Hz,1H)6.28(dd,J=14.88,10.98Hz,1H)。

1.2.3合成H2

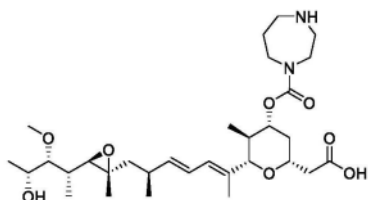
[0611] 1,4-二氮-1-甲酸(2S,3S,4R,6R)-2-((S,2E,4E)-7-((2R,3R)-3-((2R,3R,4R)-4-羟基-3-甲氧基戊-2-基)-2-甲基环氧乙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-6-(2-甲氧基-2-氧代乙基)-3-甲基四氢-2H-哌喃-4-基酯



[0612] 根据部分1.2.1的步骤3合成标题化合物(30.3mg,产率60%)。

[0613] ^1H NMR (500MHz, 氯仿- d) δ ppm 0.71 (d, $J=6.11\text{Hz}$, 3H) 0.84 (d, $J=6.73\text{Hz}$, 3H) 1.00-1.05 (m, 4H) 1.16 (d, $J=6.11\text{Hz}$, 3H) 1.19-1.24 (m, 1H) 1.26 (s, 3H) 1.32-1.40 (m, 1H) 1.51 (dt, $J=9.17, 6.42\text{Hz}$, 1H) 1.63-1.67 (m, 1H) 1.69 (s, 3H) 1.73-1.81 (m, 3H) 1.83-1.90 (m, 2H) 2.07-2.18 (m, 1H) 2.41 (dd, $J=15.28, 6.11\text{Hz}$, 2H) 2.51-2.60 (m, 2H) 2.82-2.95 (m, 5H) 3.41-3.49 (m, 4H) 3.51 (s, 3H) 3.64 (s, 3H) 3.79-3.95 (m, 2H) 4.57 (td, $J=10.70, 4.28\text{Hz}$, 1H) 5.45 (dd, $J=14.98, 8.86\text{Hz}$, 1H) 5.90 (d, $J=11.00\text{Hz}$, 1H) 6.20 (dd, $J=14.98, 10.70\text{Hz}$, 1H) .

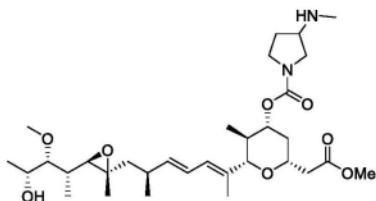
[0614] 2-((2R,4R,5S,6S)-4-((1,4-二氮-1-羰基)氧基)-6-((S,2E,4E)-7-((2R,3R)-3-((2R,3R,4R)-4-羟基-3-甲氧基戊-2-基)-2-甲基环氧乙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-5-甲基四氢-2H-哌喃-2-基)乙酸(H2)



[0615] 根据部分1.2.1的步骤4合成标题化合物,得到无色油(20.9mg,产率71%)。LC/MS (ESI, m/z), 581.81 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

[0616] ^1H NMR (400MHz, 甲醇- d_4) δ ppm 0.74 (d, $J=6.34\text{Hz}$, 3H) 0.80 (d, $J=7.32\text{Hz}$, 3H) 1.03 (d, $J=6.34\text{Hz}$, 3H) 1.08 (d, $J=6.34\text{Hz}$, 3H) 1.12-1.23 (m, 1H) 1.25 (s, 3H) 1.31-1.41 (m, 1H) 1.41-1.53 (m, 1H) 1.63-1.74 (m, 4H) 1.84-1.93 (m, 1H) 2.04 (br. s., 2H) 2.11-2.21 (m, 1H) 2.34-2.54 (m, 3H) 2.63 (d, $J=9.27\text{Hz}$, 1H) 2.90-2.98 (m, 2H) 3.21-3.36 (m, 7H) 3.50 (s, 3H) 3.53-3.66 (m, 2H) 3.69-3.79 (m, 3H) 3.83-3.95 (m, 1H) 4.57 (br. s., 1H) 5.49 (dd, $J=14.88, 9.03\text{Hz}$, 1H) 5.94 (d, $J=10.73\text{Hz}$, 1H) 6.24-6.36 (m, 1H) . 1.2.4合成H3

[0617] 3-(甲基氨基)吡咯啉-1-甲酸(2S,3S,4R,6R)-2-((S,2E,4E)-7-((2R,3R)-3-((2R,3R,4R)-4-羟基-3-甲氧基戊-2-基)-2-甲基环氧乙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-6-(2-甲氧基-2-氧代乙基)-3-甲基四氢-2H-哌喃-4-基酯

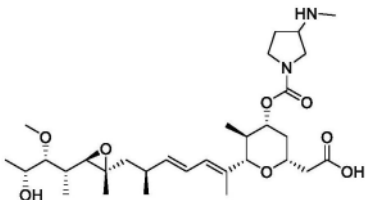


[0618] 根据部分1.2.1的步骤3合成标题化合物,得到无色油(9.6mg,产率19%)。

[0619] ^1H NMR (500MHz, 氯仿- d) δ ppm 0.71 (d, $J=6.3\text{Hz}$, 3H) 0.85 (d, $J=6.73\text{Hz}$, 3H) 0.99-1.05 (m, 4H) 1.17 (d, $J=6.11\text{Hz}$, 4H) 1.27 (s, 3H) 1.32-1.45 (m, 1H) 1.49-1.68 (m, 6H)

1.70 (s, 3H) 1.88 (dd, $J=13.45, 4.89\text{Hz}$, 1H) 2.00-2.08 (m, 1H) 2.10-2.17 (m, 1H) 2.38-2.47 (m, 5H) 2.52-2.61 (m, 2H) 2.94 (t, $J=5.50\text{Hz}$, 1H) 3.17-3.26 (m, 1H) 3.43 (d, $J=10.4\text{Hz}$, 2H) 3.52 (s, 4H) 3.65 (s, 3H) 3.78-3.86 (m, 1H) 3.87-3.95 (m, 1H) 4.51-4.57 (m, 1H) 5.45 (dd, $J=14.98, 8.86\text{Hz}$, 1H) 5.90 (d, $J=10.39\text{Hz}$, 1H) 6.21 (dd, $J=14.98, 10.70\text{Hz}$, 1H) .

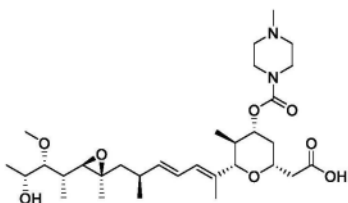
[0620] 2-((2R,4R,5S,6S)-6-((S,2E,4E)-7-((2R,3R)-3-((2R,3R,4R)-4-羟基-3-甲氧基戊-2-基)-2-甲基环氧乙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-5-甲基-4-((3-(甲基氨基)吡咯啶-1-羰基)氧基)四氢-2H-哌喃-2-基)乙酸(H3)



[0621] 根据部分1.2.1的步骤4合成标题化合物,得到无色油(9.8mg,定量产率)。LC/MS (ESI, m/z), 581.81 $[M+H]^+$ 。

[0622] ^1H NMR (400MHz, 甲醇- d_4) δ ppm 0.71 (d, $J=6.34\text{Hz}$, 3H) 0.85 (d, $J=6.83\text{Hz}$, 3H) 1.02 (d, $J=6.34\text{Hz}$, 3H) 1.16 (d, $J=6.34\text{Hz}$, 3H) 1.22-1.24 (m, 1H) 1.26 (s, 3H) 1.31-1.42 (m, 1H) 1.45-1.66 (m, 4H) 1.69 (s, 3H) 1.87 (dd, $J=13.66, 4.88\text{Hz}$, 1H) 2.02-2.20 (m, 2H) 2.38-2.51 (m, 4H) 2.51-2.60 (m, 2H) 2.94 (t, $J=5.12\text{Hz}$, 1H) 3.08-3.26 (m, 2H) 3.33-3.40 (m, 1H) 3.43 (d, $J=9.76\text{Hz}$, 2H) 3.51 (s, 3H) 3.64 (s, 3H) 3.83-3.94 (m, 1H) 4.51-4.59 (m, 1H) 5.45 (dd, $J=15.12, 8.78\text{Hz}$, 1H) 5.89 (d, $J=10.73\text{Hz}$, 1H) 6.20 (dd, $J=15.12, 10.73\text{Hz}$, 1H) .

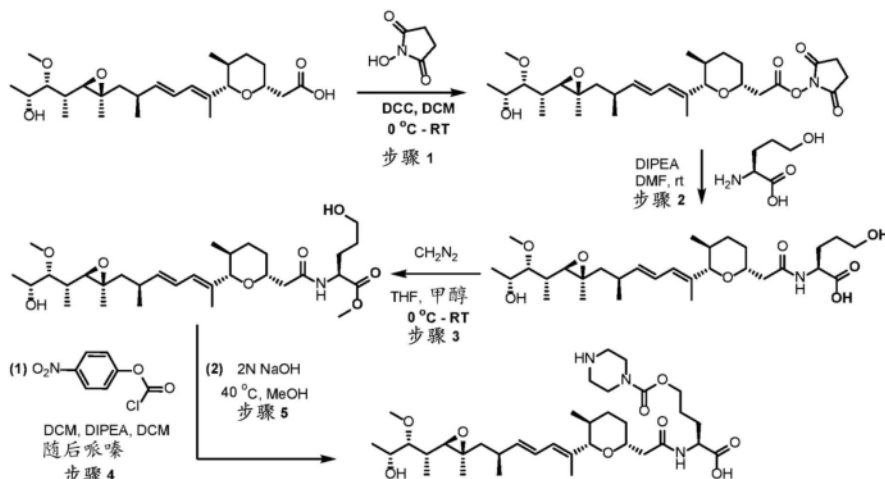
1.2.5合成H12



[0623] 根据部分1.2.1的步骤3(13.8mg,产率91%)及步骤4(4.58mg,产率76%)合成标题化合物,得到白色非晶固体。LC/MS (ESI, m/z), 581.55 $[M+H]^+$ 。

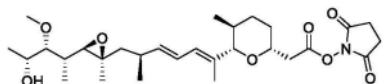
[0624] ^1H NMR (400MHz, 氯仿- d) δ ppm 0.71 (d, $J=6.83\text{Hz}$, 3H) 0.85 (d, $J=6.83\text{Hz}$, 3H) 1.03 (d, $J=6.34\text{Hz}$, 3H) 1.16 (d, $J=6.34\text{Hz}$, 3H) 1.26 (s, 4H) 1.48-1.57 (m, 1H) 1.61-1.68 (m, 1H) 1.89 (dd, $J=13.66, 4.39\text{Hz}$, 1H) 2.20 (br d, $J=8.29\text{Hz}$, 1H) 2.30 (s, 4H) 2.33-2.51 (m, 6H) 2.52-2.57 (m, 2H) 2.57-2.63 (m, 1H) 2.78-3.21 (m, 9H) 3.35-3.66 (m, 9H) 3.70-3.99 (m, 2H) 4.52 (br d, $J=3.90\text{Hz}$, 1H) 5.41-5.58 (m, 1H) 5.92 (br d, $J=11.22\text{Hz}$, 1H) 6.13-6.29 (m, 1H) .1.2.6合成H4

[0625] 根据方案2合成H4:



方案2

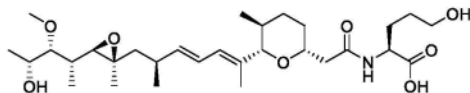
[0626] 步骤1: 2-((2R,5S,6S)-6-((S,2E,4E)-7-((2R,3R)-3-((2R,3R,4R)-4-羟基-3-甲氧基戊-2-基)-2-甲基环氧乙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-5-甲基四氢-2H-哌喃-2-基)乙酸2,5-二氧化吡咯啉-1-基酯



[0627] 在0°C下向2-((2R,5S,6S)-6-((S,2E,4E)-7-((2R,3R)-3-((2R,3R,4R)-4-羟基-3-甲氧基戊-2-基)-2-甲基环氧乙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-5-甲基四氢-2H-哌喃-2-基)乙酸(荷伯希二烯, 300mg, 0.684mmol)于DCM(10ml)中的混合物中添加DCC(310mg, 1.505mmol), 且将所得混合物搅拌15分钟。随后, 将N-羟基琥珀二酰胺(173mg, 1.505mmol)添加至混合物中。使所得混合物升温至室温且搅拌16小时。随后, 使混合物经由硅藻土过滤, 且用DCM洗涤滤饼。在真空中浓缩滤液, 且通过硅胶层析法(12g, 庚烷/AcOEt = 50/50至0/100)纯化所得残余物, 得到呈无色固体状的标题化合物(357mg, 产率97%)。

[0628] ¹H NMR(500MHz, 氯仿-d) δppm 0.66(d, J=6.73Hz, 3H) 0.83-0.89(m, 3H) 1.03(d, J=6.73Hz, 3H) 1.17(d, J=6.1Hz, 3H) 1.19-1.25(m, 4H) 1.27(s, 3H) 1.39-1.56(m, 3H) 1.59(s, 3H) 1.70(s, 3H) 1.79-1.93(m, 3H) 2.36-2.43(m, 1H) 2.52-2.55(m, 2H) 2.70(dd, J=15.28, 7.34Hz, 1H) 2.81(br.s., 3H) 2.83-2.90(m, 1H) 2.95(t, J=5.50Hz, 1H) 3.34(d, J=9.78Hz, 1H) 3.52(s, 3H) 3.79-3.87(m, 2H) 5.43(dd, J=15.28, 9.17Hz, 1H) 5.88(d, J=11.00Hz, 1H) 6.21-6.26(m, 1H)。

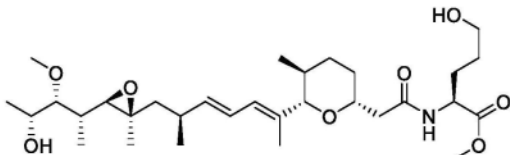
[0629] 步骤2: (S)-5-羟基-2-((2R,5S,6S)-6-((S,2E,4E)-7-((2R,3R)-3-((2R,3R,4R)-4-羟基-3-甲氧基戊-2-基)-2-甲基环氧乙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-5-甲基四氢-2H-哌喃-2-基)乙酰胺基)戊酸



[0630] 向于步骤1中获得的化合物(40mg, 0.075mmol)及(S)-2-氨基-5-羟基戊酸(19.88mg, 0.149mmol)于DMF(2mL)中的混合物中添加DIPEA(0.065mL, 0.373mmol)。将所得混合物在室温下搅拌4小时且随后用AcOEt稀释。将有机层分离, 用水及盐水洗涤, 经硫酸钠干燥, 过滤, 且在真空中浓缩。所得残余物不经进一步纯化即用于步骤3中。

[0631] ^1H NMR (400MHz, 氯仿- d) δ ppm 0.66 (d, $J=6.3\text{Hz}$, 3H) 0.85 (d, $J=6.8\text{Hz}$, 3H) 1.03 (d, $J=6.8\text{Hz}$, 3H) 1.15 (d, $J=6.3\text{Hz}$, 3H) 1.19-1.23 (m, 2H) 1.27 (s, 3H) 1.40-1.61 (m, 6H) 1.72 (s, 3H) 1.82-1.93 (m, 3H) 2.37-2.43 (m, 2H) 2.56 (d, $J=9.8\text{Hz}$, 1H) 2.99 (t, $J=5.3\text{Hz}$, 1H) 3.33 (d, $J=9.8\text{Hz}$, 1H) 3.52 (s, 3H) 3.54-3.70 (m, 4H) 3.81-3.87 (m, 2H) 4.56 (d, $J=5.4\text{Hz}$, 1H) 5.48 (dd, $J=15.12, 8.29\text{Hz}$, 1H) 5.89 (d, $J=11.2\text{Hz}$, 1H) 6.22 (dd, $J=15.1, 10.7\text{Hz}$, 1H) 7.30 (d, $J=7.3\text{Hz}$, 1H).

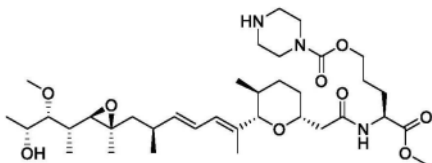
[0632] 步骤3: (S)-5-羟基-2-((2R,5S,6S)-6-((S,2E,4E)-7-((2R,3R)-3-((2R,3R,4R)-4-羟基-3-甲氧基戊-2-基)-2-甲基环氧乙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-5-甲基四氢-2H-哌喃-2-基)乙酰胺基)戊酸甲酯



[0633] 在 0°C 下向获自步骤2的化合物(35mg, 0.063mmol)于THF(2mL)及甲醇(0.5mL)中的混合物中添加三甲基硅烷基重氮甲烷(于己烷中2.0M, 0.095mL, 0.19mmol)。随后,使混合物升温至室温且搅拌1小时。随后,使混合物冷却至 0°C 且通过添加乙酸来淬灭。将所得混合物搅拌30分钟且随后在真空中浓缩。通过硅胶层析法(12g, 庚烷/AcOEt = 90/10至30/70)纯化所得残余物,得到标题化合物(15.7mg, 产率44%)。

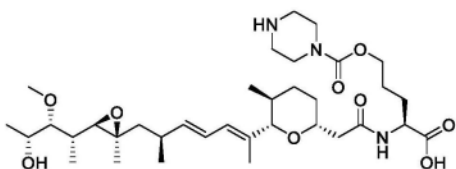
[0634] ^1H NMR (400MHz, 氯仿- d) δ ppm 0.66 (d, $J=6.8\text{Hz}$, 3H) 0.85 (d, $J=6.8\text{Hz}$, 3H) 1.03 (d, $J=6.3\text{Hz}$, 3H) 1.16 (d, $J=6.8\text{Hz}$, 3H) 1.19-1.23 (m, 3H) 1.27 (s, 3H) 1.47-1.70 (m, 7H) 1.73 (s, 3H) 1.77-1.94 (m, 6H) 2.34-2.59 (m, 5H) 2.96 (t, $J=5.4\text{Hz}$, 1H) 3.29-3.40 (m, 1H) 3.52 (s, 3H) 3.56-3.66 (m, 3H) 3.70 (s, 3H) 3.77-3.89 (m, 1H) 4.61 (td, $J=8.05, 4.88\text{Hz}$, 1H) 5.46 (dd, $J=15.12, 8.78\text{Hz}$, 1H) 5.89 (d, $J=10.73\text{Hz}$, 1H) 6.23 (dd, $J=15.12, 10.73\text{Hz}$, 1H) 7.10 (d, $J=8.29\text{Hz}$, 1H).

[0635] 步骤4: 哌嗪-1-甲酸(S)-4-(2-((2R,5S,6S)-6-((S,2E,4E)-7-((2R,3R)-3-((2R,3R,4R)-4-羟基-3-甲氧基戊-2-基)-2-甲基环氧乙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-5-甲基四氢-2H-哌喃-2-基)乙酰胺基)-5-甲氧基-5-氧代戊酯



[0636] 在室温下向于步骤3中产生的化合物(15.7mg, 0.028mmol)、氯甲酸4-硝苯酯(11.15mg, 0.055mmol)及胡宁氏碱(0.024mL, 0.138mmol)于DCM(1mL)中的混合物中添加DMAP(1.689mg, 0.014mmol)。将所得混合物在室温下搅拌16小时。随后,添加哌嗪(23.82mg, 0.277mmol)且将混合物再搅拌1小时。随后,用DCM稀释混合物,且将有机层分离,用水及盐水洗涤,经硫酸钠干燥,过滤,且在真空中浓缩。粗残余物不经纯化即用于下一步骤中。

[0637] 步骤5: (S)-2-(2-((2R,5S,6S)-6-((S,2E,4E)-7-((2R,3R)-3-((2R,3R,4R)-4-羟基-3-甲氧基戊-2-基)-2-甲基环氧乙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-5-甲基四氢-2H-哌喃-2-基)乙酰胺基)-5-((哌嗪-1-羰基)氧基)戊酸(H4)

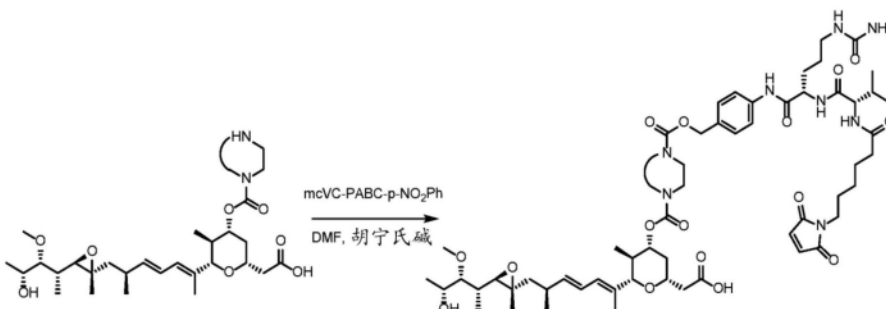


[0638] 向于步骤4中获得的残余物(15mg, 0.022mmol)及MeOH(1mL)的混合物中添加氢氧化钠水溶液(2N, 100 μ l, 0.20mmol)。使混合物升温至40℃且搅拌2小时。随后,使混合物冷却至0℃,且添加盐酸水溶液(100 μ L, 2N)。随后,在真空中浓缩所得混合物,且通过制备型HPLC($H_2O/MeCN/NH_3$ aq. = 60/40/0.1至30/70/0.1)纯化所得残余物,得到呈无色油状的标题化合物(7.0mg, 产率48%, 经步骤4及5)。LC/MS(ESI, m/z), 666.90[M+H]⁺。

[0639] ¹H NMR(400MHz, 甲醇-d₄) δ ppm 0.65(d, J=6.83Hz, 3H) 0.81(d, J=7.32Hz, 3H) 0.98-1.04(m, 3H) 1.08(d, J=6.34Hz, 3H) 1.17(d, J=11.71Hz, 1H) 1.22-1.28(m, 4H) 1.35(d, J=6.83Hz, 1H) 1.46-1.66(m, 10H) 1.70(s, 3H) 1.82-1.94(m, 3H) 2.25-2.31(m, 1H) 2.36-2.45(m, 2H) 2.61-2.65(m, 1H) 2.95(dd, J=6.10, 4.15Hz, 1H) 3.14(br. s., 2H) 3.50(s, 3H) 3.62-3.71(m, 4H) 3.76(t, J=6.3Hz, 1H) 4.03(dd, J=4.15, 1.71Hz, 1H) 4.29(br. s., 1H) 5.45(d, J=6.34Hz, 1H) 5.87(d, J=10.73Hz, 1H) 6.27(dd, J=15.12, 10.73Hz, 1H)。

1.2.7合成MC-Val-Cit-pABC接头-有效负载的通用程序

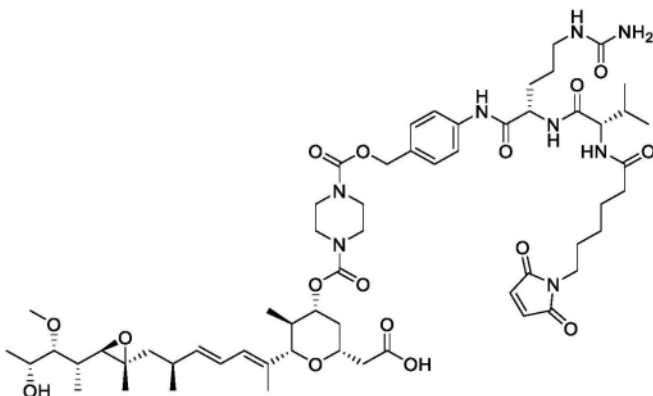
[0640] 合成MC-Val-Cit-pABC接头-有效负载的通用程序概述于方案3中。



方案3

[0641] 在室温下向有效负载(例如根据前述步骤合成的化合物;1.0当量)及(4-硝苯基)碳酸4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-二氧化代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酰胺基)-3-甲基丁酰胺基)-5-脲基戊酰胺基)苄酯(1.0当量)于DMF(0.028M)中的混合物中添加DIPEA(3.03当量)。将所得混合物在室温下搅拌16小时,在真空中浓缩,且通过逆相制备型HPLC($H_2O/MeCN/HCOOH$ =60/40/0.1至40/60/0.1)纯化所得残余物,得到所需化合物。

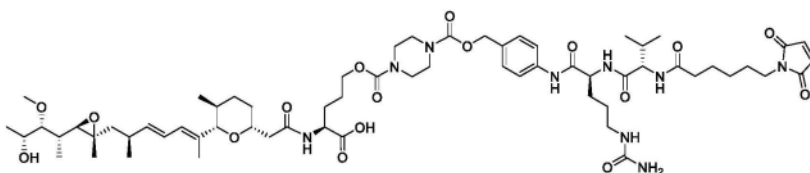
1.2.8合成ADL1-H1



[0642] 根据部分1.2.7中所阐述的通用程序合成ADL1-H1 (2-((2R,4R,5S,6S)-4-((4-(((4-((R)-2-((S)-2-(6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酰胺基)-3-甲基丁酰胺基)-5-脲基戊酰胺基)苄基)氧基)羰基)哌嗪-1-羰基)氧基)-6-((S,2E,4E)-7-((2R,3R)-3-((2R,3R,4R)-4-羟基-3-甲氧基戊-2-基)-2-甲基环氧乙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-5-甲基四氢-2H-哌喃-2-基)乙酸)且以无色油形式获得(12.7mg,产率39%)。

[0643] ^1H NMR (400MHz, 甲醇- d_4) δ ppm 0.71 (d, $J=5.85\text{Hz}$, 4H) 0.80 (d, $J=6.34\text{Hz}$, 3H) 0.94 (dd, $J=6.1, 3.2\text{Hz}$, 6H) 1.01 (d, $J=6.3\text{Hz}$, 3H) 1.08 (d, $J=6.6\text{Hz}$, 3H) 1.13-1.19 (m, 1H) 1.25 (s, 4H) 1.29-1.36 (m, 2H) 1.46-1.65 (m, 7H) 1.68 (s, 3H) 1.71-1.76 (m, 1H) 1.84-1.93 (m, 2H) 2.02-2.15 (m, 2H) 2.25 (t, $J=7.32\text{Hz}$, 2H) 2.37-2.51 (m, 3H) 2.58-2.67 (m, 2H) 2.79 (s, 4H) 2.82-2.96 (m, 2H) 3.08-3.23 (m, 8H) 3.39-3.54 (m, 15H) 3.76 (t, $J=6.34\text{Hz}$, 1H) 3.85-3.97 (m, 2H) 4.13 (d, $J=7.32\text{Hz}$, 1H) 4.46-4.58 (m, 2H) 5.07 (s, 2H) 5.48 (dd, $J=14.88, 9.03\text{Hz}$, 1H) 5.93 (d, $J=10.73\text{Hz}$, 1H) 6.28 (dd, $J=14.88, 10.98\text{Hz}$, 1H) 7.30 (d, $J=7.81\text{Hz}$, 2H) 7.57 (d, $J=7.81\text{Hz}$, 2H)。

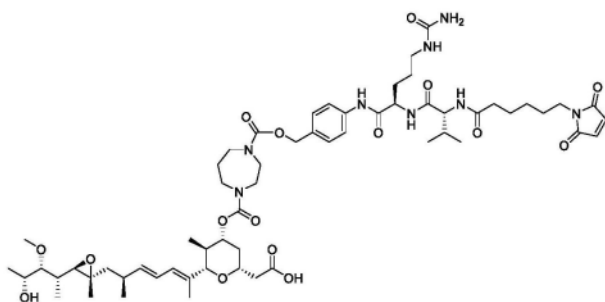
1.2.9ADL1-H4



[0644] 根据部分1.2.7中所阐述的通用程序合成ADL1-H4 ((S)-5-((4-(((4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酰胺基)-3-甲基丁酰胺基)-5-脲基戊酰胺基)苄基)氧基)羰基)哌嗪-1-羰基)氧基)-2-(2-((2R,5S,6S)-6-((S,2E,4E)-7-((2R,3R)-3-((2R,3R,4R)-4-羟基-3-甲氧基戊-2-基)-2-甲基环氧乙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-5-甲基四氢-2H-哌喃-2-基)乙酰胺基)戊酸)且以无色油形式获得(2.4mg,产率44%)。

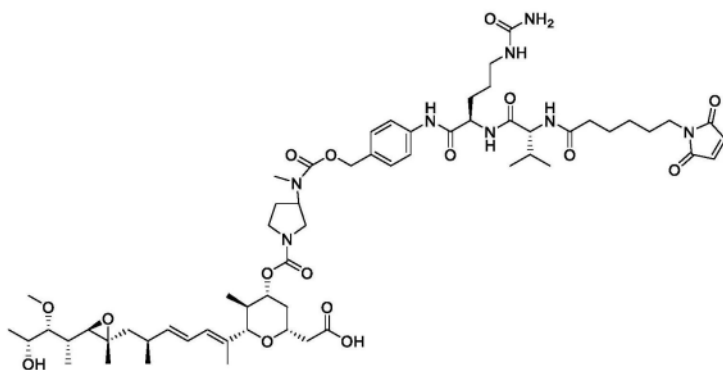
[0645] ^1H NMR (400MHz, 甲醇- d_4) δ ppm 0.64 (d, $J=6.50\text{Hz}$, 3H) 0.80 (d, $J=6.80\text{Hz}$, 3H) 0.84-0.89 (m, 1H) 0.89-0.97 (m, 6H) 0.97-1.03 (m, 2H) 1.08 (d, $J=6.34\text{Hz}$, 3H) 1.10-1.16 (m, 1H) 1.22-1.25 (m, 3H) 1.25-1.32 (m, 6H) 1.49-1.66 (m, 9H) 1.69 (s, 3H) 1.80-1.95 (m, 3H) 1.95-2.15 (m, 2H) 2.25 (t, $J=7.20\text{Hz}$, 2H) 2.33-2.48 (m, 1H) 2.62 (d, $J=9.76\text{Hz}$, 1H) 2.91-2.98 (m, 1H) 3.04-3.13 (m, 1H) 3.39-3.47 (m, 7H) 3.49 (s, 3H) 3.63 (s, 1H) 3.76 (t, $J=6.50\text{Hz}$, 1H) 3.99 (br. s, 1H) 4.14 (d, $J=7.20\text{Hz}$, 1H) 4.44-4.51 (m, 1H) 4.44-4.51 (m, 1H) 5.07 (br. s, 2H) 5.43 (dd, $J=15.37, 9.03\text{Hz}$, 1H) 5.82-5.90 (m, 1H) 6.19-6.36 (m, 1H) 6.77 (s, 1H) 7.30 (d, $J=8.29\text{Hz}$, 2H) 7.57 (d, $J=8.78\text{Hz}$, 2H)。

1.2.10ADL1-H2



[0646] 根据部分1.2.7中所阐述的通用程序合成ADL1-H2 (2-((2R,4R,5S,6S)-4-(((4-((R)-2-((R)-2-(6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酰胺基)-3-甲基丁酰胺基)-5-脲基戊酰胺基)苄基)氧基)羰基)-1,4-二氮-1-羰基)氧基)-6-((S,2E,4E)-7-((2R,3R)-3-((2R,3R,4R)-4-羟基-3-甲氧基戊-2-基)-2-甲基环氧乙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-5-甲基四氢-2H-哌喃-2-基)乙酸) 且以无色油形式获得 (10.4mg, 产率34%)。

[0647] ^1H NMR (400MHz, 甲醇- d_4) δ ppm 0.61-0.68 (m, 3H) 0.79 (d, $J=6.83\text{Hz}$, 3H) 0.94 (t, $J=6.10\text{Hz}$, 6H) 1.02 (d, $J=6.34\text{Hz}$, 3H) 1.04-1.10 (m, 3H) 1.10-1.17 (m, 1H) 1.19-1.31 (m, 8H) 1.42-1.49 (m, 2H) 1.51-1.65 (m, 8H) 1.67 (s, 3H) 1.69-1.78 (br. s, 3H) 1.83-1.93 (m, 2H) 1.94 (s, 1H) 2.00-2.10 (m, 2H) 2.25 (t, $J=7.32\text{Hz}$, 2H) 2.30-2.38 (m, 1H) 2.38-2.49 (m, 2H) 2.63 (d, $J=9.27\text{Hz}$, 1H) 2.94 (t, $J=5.12\text{Hz}$, 1H) 3.05-3.21 (m, 2H) 3.39-3.48 (m, 7H) 3.49 (s, 3H) 3.52-3.63 (m, 5H) 3.67-3.81 (m, 2H) 3.90 (br. s., 1H) 4.17 (t, $J=7.30\text{Hz}$, 1H) 4.45-4.55 (m, 2H) 5.00-5.08 (m, 2H) 5.48 (dd, $J=14.88, 9.51\text{Hz}$, 1H) 5.87-5.95 (m, 1H) 6.23-6.32 (m, 1H) 6.76 (s, $J=4.01\text{Hz}$, 2H) 7.28 (q, $J=7.81\text{Hz}$, 2H) 7.58 (t, $J=7.07\text{Hz}$, 2H) .1.2.11ADL1-H3



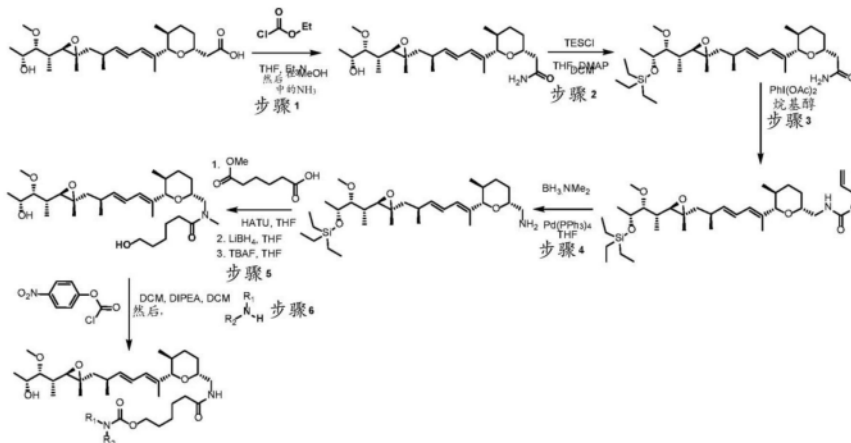
[0648] 根据部分1.2.7中所阐述的通用程序合成ADL1-H3 (2-((2R,4R,5S,6S)-4-((3-(((4-((R)-2-((R)-2-(6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酰胺基)-3-甲基丁酰胺基)-5-脲基戊酰胺基)苄基)氧基)羰基)(甲基)胺基)吡咯啉-1-羰基)氧基)-6-((S,2E,4E)-7-((2R,3R)-3-((2R,3R,4R)-4-羟基-3-甲氧基戊-2-基)-2-甲基环氧乙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-5-甲基四氢-2H-哌喃-2-基)乙酸) 且以无色油形式获得 (18.8mg, 产率37%)。

[0649] ^1H NMR (400MHz, 甲醇- d_4) δ ppm 0.72 (d, $J=6.83\text{Hz}$, 3H) 0.80 (d, $J=6.83\text{Hz}$, 3H) 0.90-0.97 (m, 6H) 1.02 (d, $J=6.34\text{Hz}$, 3H) 1.08 (d, $J=6.34\text{Hz}$, 3H) 1.16 (dd, $J=12.93, 11.46\text{Hz}$, 1H) 1.22-1.28 (m, 4H) 1.28-1.37 (m, 2H) 1.44-1.67 (m, 8H) 1.68 (s, 3H) 1.90 (dd, $J=13.42, 4.15\text{Hz}$, 2H) 2.00-2.15 (m, 4H) 2.25 (t, $J=7.32\text{Hz}$, 2H) 2.38-2.52 (m, 3H) 2.63 (d, $J=$

9.27Hz, 1H) 2.84 (s, 3H) 2.93-2.97 (m, 1H) 3.08 (d, J=6.34Hz, 1H) 3.16 (d, J=6.83Hz, 1H) 3.42-3.47 (m, 3H) 3.49 (s, 3H) 3.51-3.57 (m, 2H) 3.76 (t, J=6.34Hz, 1H) 3.85-3.92 (m, 1H) 4.14-4.19 (m, 1H) 4.47-4.55 (m, 2H) 4.71 (d, J=7.32Hz, 1H) 5.06 (s, 2H) 5.48 (dd, J=14.88, 9.03Hz, 1H) 5.93 (d, J=11.22Hz, 1H) 6.28 (dd, J=14.88, 10.98Hz, 1H) 6.76 (s, J=5.13Hz, 2H) 7.30 (d, J=8.29Hz, 2H) 7.56 (d, J=8.29Hz, 2H) .

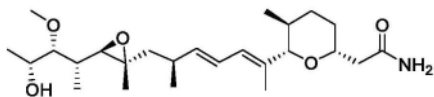
1.3制备ADL1-H5、ADL1-H6及ADL1-H7

1.3.1概述-通用程序2



方案3

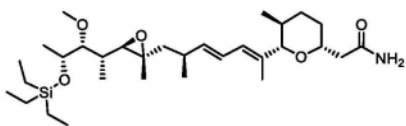
[0650] 步骤1: 2-((2R,5S,6S)-6-((S,2E,4E)-7-((2R,3R)-3-((2R,3R,4R)-4-羟基-3-甲氧基戊-2-基)-2-甲基环氧乙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-5-甲基四氢-2H-哌喃-2-基)乙酰胺



[0651] 在0℃下向2-((2R,5S,6S)-6-((S,2E,4E)-7-((2R,3R)-3-((2R,3R,4R)-4-羟基-3-甲氧基戊-2-基)-2-甲基环氧乙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-5-甲基四氢-2H-哌喃-2-基)乙酸(荷伯希二烯, 750mg, 1.71mmol)及三乙胺(1.192mL, 8.55mmol)于THF(15mL)中的混合物中添加氯甲酸乙酯(0.767mL, 5.13mmol)。将所得混合物在0℃下搅拌30min, 且随后添加含氨的甲醇(7M, 3.66mL, 25.65mmol)。将所得混合物在相同温度下再搅拌30分钟, 之后在真空中浓缩且通过硅胶层析法(庚烷/AcOEt=50/50至0/100, 随后AcOEt=80/20)纯化所得残余物, 得到呈无色固体状的标题化合物(632mg, 产率85%)。

[0652] ^1H NMR (400MHz, 氯仿-d) δ ppm 0.67 (d, J=6.34Hz, 3H) 0.85 (d, J=6.7Hz, 3H) 1.05 (d, J=6.34Hz, 3H) 1.16 (d, J=6.7Hz, 3H) 1.20-1.25 (m, 3H) 1.27 (s, 3H) 1.34-1.45 (m, 1H) 1.49-1.65 (m, 7H) 1.71 (s, 3H) 1.82-1.97 (m, 2H) 2.01-2.05 (m, 1H) 2.33-2.48 (m, 3H) 2.54 (d, J=9.27Hz, 2H) 2.95-2.99 (m, 1H) 3.34 (d, J=10.0Hz, 1H) 3.52 (s, 3H) 3.63-3.70 (m, 1H) 3.80-3.87 (m, 1H) 4.08-4.14 (m, 1H) 5.24-5.33 (m, 1H) 5.47 (dd, J=15.12, 9.27Hz, 1H) 5.90 (d, J=10.73Hz, 1H) 6.22 (dd, J=14.88, 10.98Hz, 1H) 6.61 (br. s, 1H) .

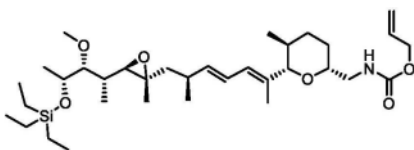
[0653] 步骤2: 2-((2R,5S,6S)-6-((S,2E,4E)-7-((2R,3R)-3-((2R,3R,4R)-3-甲氧基-4-((三乙基硅烷基)氧基)戊-2-基)-2-甲基环氧乙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-5-甲基四氢-2H-哌喃-2-基)乙酰胺



[0654] 在0℃下向于DCM (15mL) 中的自步骤1分离的化合物 (719mg, 1.446mmol) 及三乙胺 (2.015mL, 14.458mmol) 的混合物中添加三乙基氯硅烷 (1090mg, 7.229mmol) 及N,N-二甲基吡啶-4-胺 (177mg, 1.446mmol)。随后, 使所得混合物升温至室温且搅拌16小时。在搅拌之后, 用DCM (100mL) 稀释混合物, 且将混合物用水及盐水洗涤, 经硫酸钠干燥, 过滤, 且在真空中浓缩。将所得残余物与AcOEt (100mL) 及胺基官能化二氧化硅 (50g) 组合。将所得悬浮液在室温下搅拌16小时且随后过滤。用AcOEt/MeOH (9/1, 150mL) 洗涤滤液。在真空中浓缩合并母液, 且通过硅胶层析法纯化经分离的残余物 (40g, 庚烷/AcOEt = 70/30至0/100), 得到呈无色固体状的标题化合物 (807mg, 定量)。

[0655] ^1H NMR (400MHz, 氯仿-d) δ ppm 0.60 (q, $J=7.8\text{Hz}$, 6H) 0.67 (d, $J=6.3\text{Hz}$, 3H) 0.76 (d, $J=7.32\text{Hz}$, 3H) 0.95 (t, $J=7.8\text{Hz}$, 9H) 1.04 (td, $J=3.3, 1.7\text{Hz}$, 6H) 1.17-1.20 (m, 1H) 1.24 (s, 3H) 1.34-1.46 (m, 2H) 1.50-1.58 (m, 1H) 1.61 (s, 3H) 1.70 (s, 3H) 1.82-1.92 (m, 2H) 2.33-2.45 (m, 3H) 2.63 (d, $J=9.27\text{Hz}$, 1H) 3.05-3.09 (m, 1H), 3.34 (d, $J=9.76\text{Hz}$, 1H) 3.50 (s, 3H) 3.62-3.70 (m, 1H) 3.85 (t, $J=6.59\text{Hz}$, 1H) 5.29 (br. s., 1H) 5.48 (dd, $J=14.88, 8.54\text{Hz}$, 1H) 5.90 (d, $J=10.73\text{Hz}$, 1H) 6.21 (dd, $J=14.64, 11.22\text{Hz}$, 1H) 6.63 (br. s., 1H)。

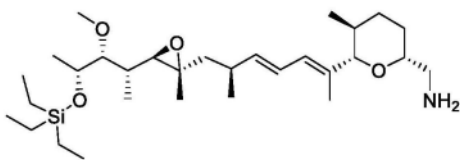
[0656] 步骤3: (((2R,5S,6S)-6-((S,2E,4E)-7-((2R,3R)-3-((2R,3R,4R)-3-甲氧基-4-((三乙基硅烷基)氧基)戊-2-基)-2-甲基环氧乙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-5-甲基四氢-2H-哌喃-2-基)甲基)胺基甲酸烯丙酯



[0657] 将于步骤2中分离的化合物 (807mg, 1.462mmol) 及二乙酸碘化苯 (1413mg, 4.387mmol) 于烯丙醇 (20mL) 中的混合物加热至60℃且搅拌3小时。随后, 使混合物冷却至室温, 且向其中添加AcOEt及碳酸氢钠水溶液 (各100mL)。分离有机相, 且用AcOEt萃取水相。将合并有机萃取物用水及盐水洗涤, 经硫酸钠干燥, 过滤, 且在真空中浓缩。通过硅胶层析法 (40g, 庚烷/AcOEt = 90/10至50/50) 纯化所得残余物, 得到呈无色油状的标题化合物 (663mg, 产率75%)。

[0658] ^1H NMR (400MHz, 氯仿-d) δ ppm 0.55-0.67 (m, 9H) 0.77 (d, $J=6.7\text{Hz}$, 3H) 0.87 (t, $J=6.5\text{Hz}$, 2H) 0.95 (t, $J=7.8\text{Hz}$, 9H) 1.04 (t, $J=5.5\text{Hz}$, 6H) 1.16-1.32 (m, 9H) 1.39-1.53 (m, 2H) 1.58 (s, 3H) 1.69 (s, 3H) 1.80-1.91 (m, 2H) 2.40 (br. s., 1H) 2.64 (d, $J=9.27\text{Hz}$, 1H) 3.01-3.10 (m, 2H) 3.26 (d, $J=10.24\text{Hz}$, 1H) 3.35-3.44 (m, 2H) 3.50 (s, 3H) 3.85 (t, $J=6.5\text{Hz}$, 1H) 4.54 (d, $J=5.37\text{Hz}$, 2H) 5.12 (br. s., 1H) 5.19 (dt, $J=10.49, 1.10\text{Hz}$, 1H) 5.25-5.33 (m, 1H) 5.45 (dd, $J=15.12, 8.78\text{Hz}$, 1H) 5.85-5.97 (m, 2H) 6.22 (dd, $J=14.88, 10.98\text{Hz}$, 1H)。

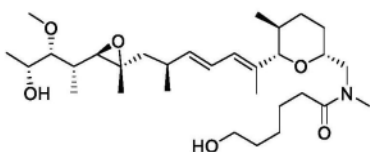
[0659] 步骤4: ((2R,5S,6S)-6-((S,2E,4E)-7-((2R,3R)-3-((2R,3R,4R)-3-甲氧基-4-((三乙基硅烷基)氧基)戊-2-基)-2-甲基环氧乙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-5-甲基四氢-2H-哌喃-2-基)甲胺



[0660] 向于步骤3中获得的化合物(663mg, 1.091mmol)及THF(15mL, 183.065mmol)的混合物中添加硼烷-二甲胺复合物(643mg, 10.906mmol)。在用氮气冲洗容器之后, 添加肆(三苯膦)钯(0)(37.8mg, 0.033mmol)且将混合物在室温下搅拌1小时。随后, 用AcOEt及饱和碳酸氢钠水溶液(各100mL)稀释混合物, 且分离各相。用AcOEt(50mL×3)萃取水层, 且随后将合并有机溶离份用水及盐水洗涤, 经硫酸钠干燥, 过滤, 且在真空中浓缩。通过胺基官能化硅胶层析法(40g, 庚烷/AcOEt=70/30至0/100)纯化所得残余物, 得到呈白色固体状的标题化合物(525mg, 产率92%)。

[0661] ^1H NMR(400MHz, 氯仿-d) δ ppm 0.60(q, J=7.80Hz, 6H) 0.65(d, J=6.8Hz, 3H) 0.77(d, J=6.83Hz, 3H) 0.95(t, J=7.8Hz, 9H) 1.03(dd, J=9.0, 6.6Hz, 6H) 1.14-1.21(m, 1H) 1.23(s, 3H), 1.30-1.34(m, 1H) 1.42(ddd, J=9.4, 7, 2.7Hz, 1H) 1.48-1.59(m, 6H) 1.70(s, 3H) 1.81-1.91(m, 2H) 2.34-2.44(m, 1H) 2.62-2.74(m, 3H) 3.06(dd, J=6.83, 2.93Hz, 1H) 3.25-3.31(m, 2H) 3.50(s, 3H) 3.81-3.89(quin, J=6.5Hz, 1H) 5.44(dd, J=15.12, 8.78Hz, 1H) 5.88(d, J=10.73Hz, 1H) 6.22(dd, J=15.12, 10.73Hz, 1H)。

[0662] 步骤5: 6-羟基-N-(((2R, 5S, 6S)-6-((S, 2E, 4E)-7-((2R, 3R)-3-((2R, 3R, 4R)-4-羟基-3-甲氧基戊-2-基)-2-甲基环氧乙烷-2-基)-6-甲基庚-2, 4-二烯-2-基)-5-甲基四氢-2H-哌喃-2-基)甲基)-N-甲基己酰胺



[0663] 向于步骤5中分离的化合物(133mg, 0.254mmol)及6-甲氧基-6-氧代己酸(0.056ml, 0.381mmol)于THF(2mL)中的混合物中添加HATU(145mg, 0.381mmol), 且随后将混合物在室温下搅拌16小时。随后, 添加AcOEt且将所得混合物用水及盐水洗涤, 经硫酸钠干燥, 过滤, 且在真空中浓缩。将所获得的残余物与THF(2mL)组合且冷却至0℃。随后, 添加硼氢化锂(22.1mg, 1.016mmol)且将混合物在相同温度下搅拌30分钟。随后, 使混合物升温至室温且再搅拌1小时。向混合物中添加饱和氯化铵水溶液, 接着为AcOEt及水。将有机相分离, 用水及盐水洗涤, 经硫酸钠干燥, 过滤且在真空中浓缩。随后, 将所得残余物溶解于THF(5mL, 61.02mmol)中, 且在0℃下添加TBAF(于THF中的1M溶液, 0.508mL, 0.508mmol)。将所得混合物在0℃下搅拌30分钟, 随后升温至室温, 接着在室温下再搅拌2小时。随后, 用AcOEt稀释混合物, 且将有机相分离, 用水及盐水洗涤, 经硫酸钠干燥, 过滤, 且在真空中浓缩。通过硅胶层析法(40g二氧化硅, 0-100%庚烷/EtOAc)纯化所得残余物, 得到呈无色油状的标题化合物(113mg, 产率85%)。

[0664] ^1H NMR(400MHz, 氯仿-d) δ ppm 0.64(d, J=6.3Hz, 3H) 0.84(d, J=6.8Hz, 3H) 1.03(d, J=6.3Hz, 3H) 1.14(d, J=6.3Hz, 3H) 1.17-1.21(m, 3H) 1.25(s, 3H) 1.27-1.40(m, 3H) 1.46-1.60(m, 6H) 1.60-1.67(m, 2H) 1.69(s, 3H) 1.77-1.92(m, 3H) 2.15(t, J=7.3Hz, 2H) 2.40(br. s, 1H) 2.53(d, J=9.76Hz, 2H) 2.92-3.02(m, 2H) 3.26(d, J=9.76Hz, 1H) 3.34-3.45(m,

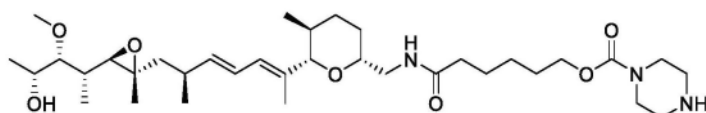
^1H 3.50 (s, 3H) 3.52-3.62 (m, 3H) 3.80-3.83 (m, 1H) 5.45 (dd, $J=15.12, 8.78\text{Hz}$, 1H) 5.89 (d, $J=10.73\text{Hz}$, 1H) 5.96 (br. s, 1H) 6.23 (dd, $J=14.88, 10.98\text{Hz}$, 1H) .

[0665] 步骤6:合成胺基甲酸酯通用程序

[0666] 向自步骤5分离的化合物 (28.3mg, 0.054mmol)、氯甲酸4-硝苯酯 (2.0当量) 及胡宁氏碱 (5当量) 于DCM (0.05M) 中的混合物中添加DMAP (0.5当量)。将所得混合物在室温下搅拌16小时。随后, 添加胺 (2.0当量), 且将混合物再搅拌1小时。随后, 用二氯甲烷稀释混合物, 且将有机层分离, 用水及盐水洗涤, 经硫酸钠干燥, 过滤, 且在真空中浓缩。随后, 通过胺基官能化硅胶层析法纯化所得残余物, 得到所需化合物。

1.3.2合成ADL1-H5

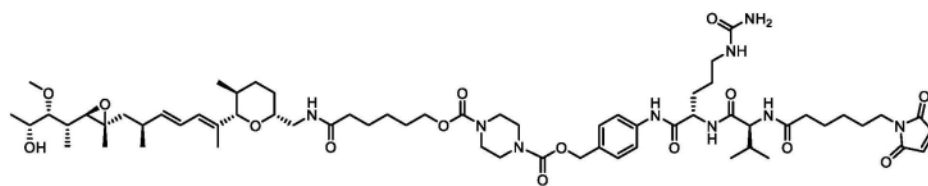
1.3.2.1合成H5



[0667] 哌嗪-1-甲酸6-(((2R,5S,6S)-6-((S,2E,4E)-7-((2R,3R)-3-((2R,3R,4R)-4-羟基-3-甲氧基戊-2-基)-2-甲基环氧乙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-5-甲基四氢-2H-哌喃-2-基)甲基)胺基)-6-氧代己酯 (H5)

[0668] 采用部分1.3.1中所阐述的步骤1-6, 得到呈无色油状的标题化合物 (24.5mg, 产率71%)。LC/MS (ESI, m/z), 636.89 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

[0669] ^1H NMR (400MHz, 氯仿- d) δ ppm 0.65 (d, $J=6.34\text{Hz}$, 3H) 0.85 (d, $J=6.83\text{Hz}$, 3H) 0.95 (dd, $J=16.8, 6.6\text{Hz}$, 1H) 1.03 (d, $J=6.34\text{Hz}$, 3H) 1.15 (d, $J=6.34\text{Hz}$, 3H) 1.18-1.25 (m, 2H) 1.26 (s, 3H) 1.29-1.40 (m, 3H) 1.47-1.69 (m, 8H) 1.70 (s, 3H) 1.79-1.92 (m, 2H) 1.92-2.07 (m, 4H) 2.15 (t, $J=7.56\text{Hz}$, 2H) 2.36-2.45 (m, 1H) 2.54 (d, $J=9.27\text{Hz}$, 1H) 2.80 (br. s., 4H) 2.89-3.04 (m, 2H) 3.27 (d, $J=10.24\text{Hz}$, 1H) 3.35-3.46 (m, 5H) 3.51 (s, 3H) 3.52-3.58 (m, 2H) 3.83 (t, $J=6.34\text{Hz}$, 1H) 4.05 (t, $J=6.34\text{Hz}$, 2H) 5.46 (dd, $J=15.12, 8.78\text{Hz}$, 1H) 5.82-5.95 (m, 2H) 6.24 (dd, $J=15.12, 10.73\text{Hz}$, 1H) . 1.3.2.2合成ADL1-H5



[0670] 1-(4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酰胺基)-3-甲基丁酰胺基)-5-脲基戊酰胺基)苄基)4-(6-(((2R,5S,6S)-6-((S,2E,4E)-7-((2R,3R)-3-((2R,3R,4R)-4-羟基-3-甲氧基戊-2-基)-2-甲基环氧乙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-5-甲基四氢-2H-哌喃-2-基)甲基)胺基)-6-氧代己基)哌嗪-1,4-二甲酸酯 (ADL1-H5)

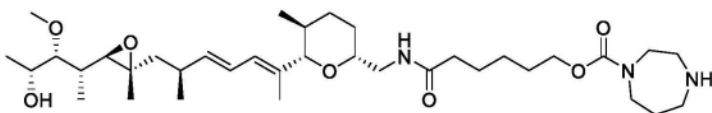
[0671] 采用部分1.2.7中所阐述的程序, 得到呈无色油状的标题化合物 (25.8mg, 产率54%)。

[0672] ^1H NMR (400MHz, 甲醇- d_4) δ ppm 0.65 (d, $J=6.83\text{Hz}$, 3H) 0.80 (d, $J=6.83\text{Hz}$, 3H) 0.94 (dd, $J=6.34, 4.39\text{Hz}$, 7H) 1.01 (d, $J=6.34\text{Hz}$, 3H) 1.07 (d, $J=6.30\text{Hz}$, 4H) 1.11-1.38 (m, 14H) 1.45-1.66 (m, 14H) 1.69 (s, 3H) 1.70-1.79 (m, 1H) 1.80-1.92 (m, 3H) 2.00-2.09 (m,

^1H NMR (400MHz, CDCl_3) δ ppm 2.17 (t, $J=7.07\text{Hz}$, 2H) 2.25 (t, $J=7.32\text{Hz}$, 3H) 2.42 (br. s., 1H) 2.63 (d, $J=9.76\text{Hz}$, 1H) 2.95 (dd, $J=5.85, 4.39\text{Hz}$, 1H) 3.02-3.11 (m, 2H) 3.17 (d, $J=6.83\text{Hz}$, 1H) 3.37-3.48 (m, 14H) 3.50 (s, 4H) 3.53 (t, $J=4.50\text{Hz}$, 2H) 3.63-3.67 (m, 2H) 3.76 (t, $J=6.34\text{Hz}$, 1H) 4.05 (t, $J=6.34\text{Hz}$, 3H) 4.14 (d, $J=7.32\text{Hz}$, 1H) 4.48 (dd, $J=8.78, 4.88\text{Hz}$, 1H) 5.06 (s, 2H) 5.46 (dd, $J=15.12, 8.78\text{Hz}$, 1H) 5.90 (d, $J=10.73\text{Hz}$, 1H) 6.20-6.38 (m, 1H) 6.76 (s, 2H) 7.30 (d, $J=8.29\text{Hz}$, 2H) 7.57 (d, $J=8.29\text{Hz}$, 2H).

1.3.3 合成ADL1-H6

1.3.3.1 合成H6

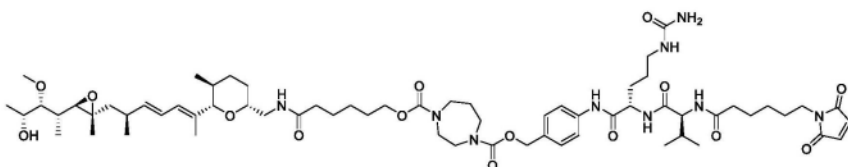


[0673] 1,4-二氮-1-甲酸6-(((2R,5S,6S)-6-((S,2E,4E)-7-((2R,3R)-3-((2R,3R,4R)-4-羟基-3-甲氧基戊-2-基)-2-甲基环氧乙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-5-甲基四氢-2H-哌喃-2-基)甲基)胺基)-6-氧代己酯(H6)

[0674] 采用部分1.3.1中所阐述的步骤1-6,得到呈无色油状的标题化合物(15.3mg,产率43%)。LC/MS (ESI, m/z), 650.92 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

[0675] ^1H NMR (400MHz, 氯仿- d) δ ppm 0.65 (d, $J=6.34\text{Hz}$, 3H) 0.85 (d, $J=6.34\text{Hz}$, 3H) 0.93-1.00 (m, 1H) 1.03 (d, $J=6.83\text{Hz}$, 3H) 1.16 (d, $J=6.83\text{Hz}$, 3H) 1.18-1.24 (m, 2H) 1.27 (s, 3H) 1.29-1.41 (m, 3H) 1.49-1.55 (m, 2H) 1.59-1.68 (m, 5H) 1.71 (s, 3H) 1.73-1.92 (m, 7H) 2.16 (t, $J=7.56\text{Hz}$, 2H) 2.36-2.46 (m, 1H) 2.54 (d, $J=9.27\text{Hz}$, 1H) 2.81-2.93 (m, 4H) 2.93-3.04 (m, 2H) 3.27 (d, $J=9.76\text{Hz}$, 1H) 3.37-3.49 (m, 4H) 3.52 (s, 3H) 3.54-3.59 (m, 2H) 3.79-3.88 (m, 1H) 4.05 (t, $J=6.34\text{Hz}$, 2H) 5.46 (dd, $J=15.12, 8.78\text{Hz}$, 1H) 5.82-5.96 (m, 2H) 6.24 (dd, $J=15.12, 10.73\text{Hz}$, 1H)。

1.3.3.2 合成ADL1-H6



[0676] 1-(4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酰胺基)-3-甲基丁酰胺基)-5-脲基戊酰胺基)苄基)4-(6-(((2R,5S,6S)-6-((S,2E,4E)-7-((2R,3R)-3-((2R,3R,4R)-4-羟基-3-甲氧基戊-2-基)-2-甲基环氧乙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-5-甲基四氢-2H-哌喃-2-基)甲基)胺基)-6-氧代己基)1,4-二氮-1,4-二甲酸酯(ADL-H6)

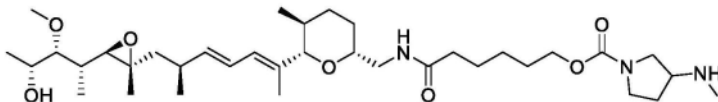
[0677] 采用部分1.2.7中所阐述的程序,得到呈无色油状的标题化合物(11.6mg,产率52%)。

[0678] ^1H NMR (400MHz, 甲醇- d_4) δ ppm 0.65 (d, $J=6.34\text{Hz}$, 3H) 0.80 (d, $J=6.83\text{Hz}$, 2H) 0.94 (dd, $J=6.83, 4.39\text{Hz}$, 6H) 0.98-1.16 (m, 9H) 1.19-1.36 (m, 9H) 1.44-1.65 (m, 14H) 1.69 (s, 3H) 1.71-1.78 (m, 4H) 1.80-1.92 (m, 3H) 2.00-2.10 (m, 1H) 2.11-2.19 (m, 2H) 2.25 (t, $J=7.56\text{Hz}$, 3H) 3.03-3.21 (m, 4H) 3.36-3.49 (m, 10H) 3.49-3.51 (m, 3H) 3.51-3.57 (m, 12H) 3.62-

3.67 (m, 8H) 3.70-3.82 (m, 1H) 3.97-4.05 (m, 2H) 4.14 (d, $J=7.32\text{Hz}$, 1H) 4.46-4.52 (m, 1H) 5.00-5.08 (m, 3H) 5.35-5.52 (m, 1H) 5.35-5.52 (m, 1H) 5.87-5.95 (m, 1H) 6.24-6.33 (m, 1H) 6.76 (s, 2H) 7.26-7.37 (m, 3H) 7.57 (d, $J=7.32\text{Hz}$, 3H) 8.19-8.24 (m, 1H) .

1.3.4合成ADL1-H7

1.3.4.1合成H7

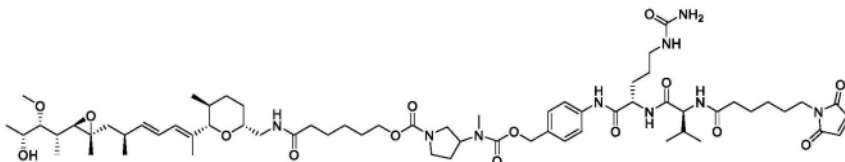


[0679] 3-(甲基氨基)吡咯啉-1-甲酸6-(((2R,5S,6S)-6-((S,2E,4E)-7-((2R,3R)-3-((2R,3R,4R)-4-羟基-3-甲氧基戊-2-基)-2-甲基环氧乙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-5-甲基四氢-2H-哌喃-2-基)甲基)胺基)-6-氧代己酯(H7)

[0680] 采用部分1.3.1中所阐述的步骤1-6,得到呈无色油状的标题化合物(26.6mg,产率76%)。LC/MS(ESI, m/z), 650.88[M+H]⁺。

[0681] ¹H NMR(400MHz, 氯仿-d) δ ppm 0.65 (d, $J=6.34\text{Hz}$, 3H) 0.85 (d, $J=6.34\text{Hz}$, 3H) 0.93-0.99 (m, 1H) 1.04 (d, $J=6.34\text{Hz}$, 3H) 1.16 (dd, $J=6.34, 0.98\text{Hz}$, 3H) 1.19-1.22 (m, 2H) 1.27 (s, 3H) 1.31-1.41 (m, 3H) 1.47-1.67 (m, 8H) 1.70 (s, 4H) 1.80-1.87 (m, 2H) 1.89 (d, $J=3.90\text{Hz}$, 1H) 2.03 (dd, $J=12.68, 6.34\text{Hz}$, 1H) 2.15 (t, $J=7.32\text{Hz}$, 2H) 2.41 (m, 3H) 2.54 (d, $J=9.76\text{Hz}$, 1H) 2.94-3.13 (m, 2H) 3.20 (m, 1H) 3.27 (d, $J=9.76\text{Hz}$, 1H) 3.35-3.50 (m, 3H) 3.51 (s, 3H) 3.53-3.60 (m, 2H) 3.79-3.88 (m, 1H) 4.04 (t, $J=6.34\text{Hz}$, 2H) 5.46 (dd, $J=15.12, 8.78\text{Hz}$, 1H) 5.82-5.96 (m, 2H) 6.24 (dd, $J=14.88, 10.98\text{Hz}$, 1H) .

1.3.4.2合成ADL1-H7



[0682] 6-(((2R,5S,6S)-6-((S,2E,4E)-7-((2R,3R)-3-((2R,3R,4R)-4-羟基-3-甲氧基戊-2-基)-2-甲基环氧乙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-5-甲基四氢-2H-哌喃-2-基)甲基)胺基)-6-氧代己基3-(((4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酰胺基)-3-甲基丁酰胺基)-5-脲基戊酰胺基)苄基)氧基)羰基)(甲基)胺基)吡咯啉-1-甲酸酯(ADL1-H7)

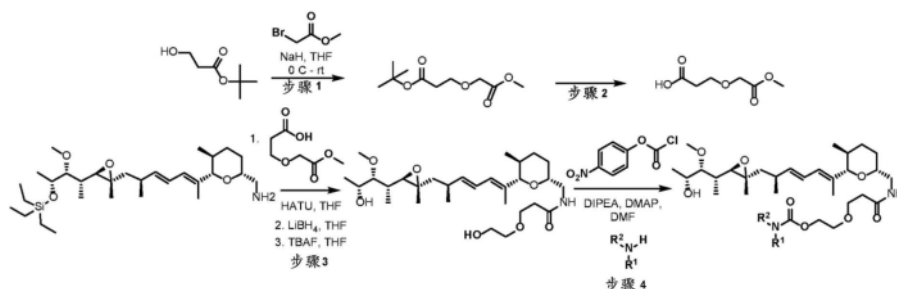
[0683] 采用部分1.2.7中所阐述的程序(将混合物搅拌16小时而非2小时),得到呈无色油状的标题化合物(20.1mg,产率54%)。

[0684] ¹H NMR(400MHz, 甲醇-d₄) δ ppm 0.65 (d, $J=6.30\text{Hz}$, 3H) 0.80 (d, $J=6.83\text{Hz}$, 3H) 0.94 (dd, $J=6.59, 4.63\text{Hz}$, 7H) 1.01 (d, $J=6.34\text{Hz}$, 3H) 1.08 (d, $J=6.34\text{Hz}$, 4H) 1.11-1.23 (m, 4H) 1.23-1.27 (m, 6H) 1.27-1.38 (m, 5H) 1.43-1.65 (m, 14H) 1.69 (s, 3H) 1.70-1.77 (m, 1H) 1.80-1.92 (m, 3H) 2.00-2.09 (m, 3H) 2.17 (t, $J=7.32\text{Hz}$, 2H) 2.25 (t, $J=7.30\text{Hz}$, 3H) 2.38-2.46 (m, 1H) 2.63 (d, $J=9.27\text{Hz}$, 1H) 2.83 (s, 3H) 2.84 (s, 3H) 2.92-2.96 (m, 1H) 2.97 (s, 3H) 3.02-3.21 (m, 4H) 3.30-3.42 (m, 3H) 3.45 (t, $J=7.07\text{Hz}$, 3H) 3.50 (s, 3H) 3.51-3.58 (m, 3H) 3.72-3.80 (m, 1H) 4.03 (t, $J=6.34\text{Hz}$, 2H) 4.15 (d, $J=7.32\text{Hz}$, 1H) 4.49 (dd, $J=9.03, 5.12\text{Hz}$, 1H) 5.06 (s, 2H) 5.46 (dd, $J=14.88, 9.03\text{Hz}$, 1H) 5.90 (d, $J=11.22\text{Hz}$, 1H) 6.28 (dd, $J=14.88, 10.98\text{Hz}$, 1H) .

=14.88, 10.98Hz, 1H) 6.76 (s, 2H) 7.30 (d, J=5.90Hz, 2H) 7.57 (d, J=8.29Hz, 2H) 7.95 (s, 1H) .

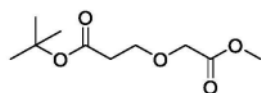
1.4合成ADL1-H8、ADL1-H9及ADL1-H10

1.4.1概述-通用程序4



方案4

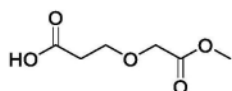
[0685] 步骤1: 3-羟基丙酸第三丁酯



[0686] 在0℃下向氢化钠(269mg, 6.157mmol)于DMF(30mL)中的混合物中添加3-羟基丙酸第三丁酯(0.909mL, 6.157mmol)。将混合物在0℃下搅拌1小时且随后逐滴添加溴乙酸甲酯(0.624mL, 6.157mmol)。使所得混合物升温至室温且在室温下搅拌16小时。随后, 添加饱和氯化铵水溶液且用AcOEt萃取混合物。随后, 将合并有机萃取物用水及盐水洗涤, 经硫酸钠干燥, 过滤, 且在真空中浓缩。通过硅胶层析法(80g, 庚烷/AcOEt=80/20至50/50)纯化经分离的残余物, 得到呈无色油状的标题化合物(97mg, 产率7%)。

[0687] ^1H NMR (400MHz, 氯仿-d) δ ppm 1.42 (s, 9H) 2.49-2.58 (m, 2H) 3.41 (s, 3H) 3.69-3.79 (m, 2H) 4.05-4.13 (m, 2H) .

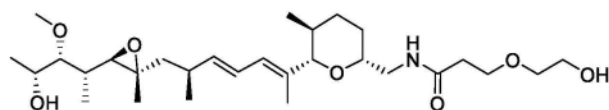
[0688] 步骤2: 3-(2-甲氧基-2-氧代乙氧基)丙酸



[0689] 将3-(2-甲氧基-2-氧代乙氧基)丙酸第三丁酯(66mg, 0.302mmol)于二氯甲烷(2mL)及TFA(2mL)中的混合物在室温下搅拌3小时。随后, 使混合物浓缩至干, 得到呈无色油状的标题化合物(58mg, 100%)。

[0690] ^1H NMR (400MHz, 氯仿-d) δ ppm 2.62-2.78 (m, 2H) 3.76 (s, 3H) 3.78-3.85 (m, 2H) 4.14 (d, J=1.95Hz, 2H) .

[0691] 步骤3: N-(((2R,5S,6S)-6-((S,2E,4E)-7-((2R,3R)-3-((2R,3R,4R)-4-羟基-3-甲氧基戊-2-基)-2-甲基环氧乙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-5-甲基四氢-2H-嘧啶-2-基)甲基)-3-(2-羟基乙氧基)丙烯酰胺



[0692] 在室温下向((2R,5S,6S)-6-((S,2E,4E)-7-((2R,3R)-3-((2R,3R,4R)-3-甲氧基-4-((三乙基硅烷基)氧基)戊-2-基)-2-甲基环氧乙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-

5-甲基四氢-2H-哌喃-2-基)甲胺(133mg, 0.254mmol)及3-(2-甲氧基-2-氧代乙氧基)丙酸(61.7mg, 0.381mmol)于THF(5mL)中的混合物中添加HATU(145mg, 0.381mmol)及DIPEA(221 μ L, 1.27mmol)。将混合物搅拌16小时且随后用AcOEt稀释。将有机层分离,用水及盐水洗涤,经硫酸钠干燥,过滤,且在真空中浓缩。

[0693] 将经分离的残余物溶解于THF(5mL)中且冷却至0℃,且随后添加硼氢化锂(22.12mg, 1.016mmol)。将所得混合物在相同温度下搅拌30分钟且随后升温至室温且再搅拌2小时。随后,添加饱和氯化铵水溶液及水且用AcOEt萃取水层。将合并有机层用水及盐水洗涤,经硫酸钠干燥,且在真空中浓缩。随后,将经分离的残余物溶解于THF(5mL)中且在0℃下添加TBAF(于THF溶液中1M, 0.508mL, 0.508mmol)。在于0℃下搅拌30分钟之后,使混合物升温至室温且搅拌2小时。随后,用AcOEt稀释混合物,且将有机层分离,用水及盐水洗涤,经硫酸钠干燥,过滤,且在真空中浓缩。通过硅胶层析法(24g,庚烷/AcOEt=70/30至0/100,随后AcOEt/MeOH=80/20)纯化所得残余物,得到呈无色油状的标题化合物(68mg,产率51%)。

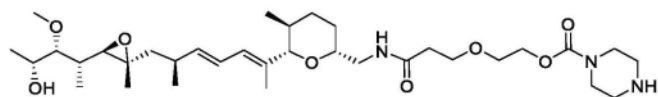
[0694] ^1H NMR(400MHz, 氯仿-d) δ ppm 0.65(d, J=6.34Hz, 3H) 0.85(d, J=6.83Hz, 3H) 1.04(d, J=6.34Hz, 3H) 1.16(d, J=6.8Hz, 4H) 1.19-1.22(m, 2H) 1.27(s, 3H) 1.42-1.65(m, 4H) 1.71(s, 3H) 1.79-1.92(m, 2H) 2.37-2.50(m, 4H) 2.54(d, J=9.27Hz, 2H) 2.89-3.05(m, 2H) 3.28(d, J=10.24Hz, 1H) 3.41(td, J=8.54, 2.44Hz, 1H) 3.52(s, 3H) 3.54-3.59(m, 2H) 3.61-3.68(m, 2H) 3.69-3.76(m, 2H) 3.78-3.91(m, 2H) 5.43-5.52(m, 1H) 5.92(d, J=10.73Hz, 1H) 6.24(dd, J=15.12, 10.73Hz, 1H) 6.77(m, 1H)。

[0695] 步骤4:合成胺基甲酸酯

[0696] 在室温下向N-(((2R,5S,6S)-6-((S,2E,4E)-7-((2R,3R)-3-((2R,3R,4R)-4-羟基-3-甲氧基戊-2-基)-2-甲基环氧乙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-5-甲基四氢-2H-哌喃-2-基)甲基)-3-(2-羟基乙氧基)丙酰胺(1.0当量, 0.043mmol)、氯甲酸4-硝苯酯(2.0当量, 0.086mmol)及DIPEA(5.0当量)于DCM(0.04M)中的混合物中添加DMAP(5.0当量)。将混合物在室温下搅拌16小时,且随后添加哌嗪(10.0当量),且将混合物再搅拌1小时。随后,用二氯甲烷稀释所得混合物,且将有机层分离,用水及盐水洗涤,经硫酸钠干燥,过滤,且在真空中浓缩。通过胺基官能化硅胶层析法(庚烷/AcOEt=50/50至0/100)纯化所得残余物,得到所需化合物。

1.4.2合成ADL1-H8

1.4.2.1合成H8



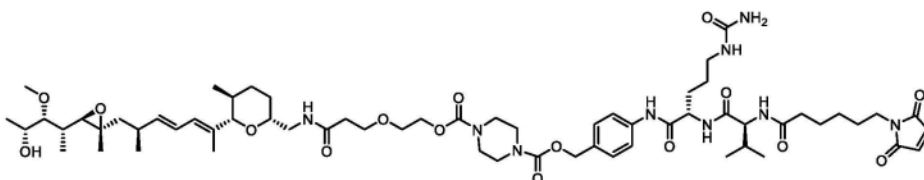
[0697] 哌嗪-1-甲酸2-(3-(((2R,5S,6S)-6-((S,2E,4E)-7-((2R,3R)-3-((2R,3R,4R)-4-羟基-3-甲氧基戊-2-基)-2-甲基环氧乙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-5-甲基四氢-2H-哌喃-2-基)甲基)胺基)-3-氧代丙氧基)乙酯(H8)

[0698] 采用部分1.4.1中所阐述的步骤1-4,得到呈淡黄色油状的标题化合物(19.2mg,产率70%)。LC/MS(ESI, m/z), 638.78[M+H]⁺。

[0699] ^1H NMR(400MHz, 氯仿-d) δ ppm 0.65(d, J=6.83Hz, 3H) 0.85(d, J=6.83Hz, 3H) 0.96(dd, J=18.54, 6.34Hz, 1H) 1.03(d, J=5.85Hz, 3H) 1.16(d, J=5.85Hz, 4H) 1.18-1.25(m, 2H) 1.27(s, 3H) 1.29-1.39(m, 1H) 1.41-1.63(m, 4H) 1.70(s, 3H) 1.77-1.97(m, 7H) 2.44

(t, J=5.61Hz, 2H) 2.47-2.57 (m, 1H) 2.80 (br. s., 4H) 2.85-2.99 (m, 1H) 2.99-3.09 (m, 1H) 3.27 (d, J=9.76Hz, 1H) 3.36-3.48 (m, 5H) 3.52 (s, 3H) 3.54-3.59 (m, 1H) 3.59-3.68 (m, 2H) 3.68-3.74 (m, 2H) 3.77-3.90 (m, 1H) 4.15-4.23 (m, 2H) 4.36 (t, J=6.10Hz, 1H) 5.44 (dd, J=14.88, 8.54Hz, 1H) 5.88 (d, J=10.73Hz, 1H) 6.23 (dd, J=14.88, 10.98Hz, 1H) 6.41 (br. s., 1H) .

1.4.2.2合成H8



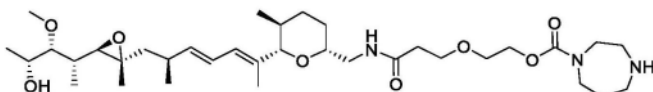
[0700] 1-(4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酰胺基)-3-甲基丁酰胺基)-5-脲基戊酰胺基)苄基)4-(2-(3-(((2R,5S,6S)-6-((S,2E,4E)-7-((2R,3R)-3-((2R,3R,4R)-4-羟基-3-甲氧基戊-2-基)-2-甲基环氧乙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-5-甲基四氢-2H-哌喃-2-基)甲基)胺基)-3-氧代丙氧基)乙基)哌嗪-1,4-二甲酸酯(ADL1-H8)

[0701] 采用类似于部分1.2.7中所阐述的程序的程序,得到呈无色油状的标题化合物(18.3mg,产率60%)。

[0702] ^1H NMR (400MHz, 甲醇- d_4) δ ppm 0.65 (d, J=6.30Hz, 3H) 0.80 (d, J=6.83Hz, 3H) 0.94 (dd, J=6.59, 4.15Hz, 7H) 1.01 (d, J=6.83Hz, 3H) 1.08 (d, J=6.34Hz, 3H) 1.10-1.23 (m, 4H) 1.25 (s, 3H) 1.26-1.32 (m, 3H) 1.44-1.65 (m, 10H) 1.68 (s, 3H) 1.70-1.75 (m, 1H) 1.80-1.92 (m, 3H) 2.00-2.09 (m, 1H) 2.25 (t, J=7.56Hz, 2H) 2.41 (t, J=5.85Hz, 2H) 2.63 (d, J=9.27Hz, 1H) 2.95 (dd, J=6.34, 4.39Hz, 1H) 3.08 (dt, J=13.05, 6.40Hz, 1H) 3.14-3.21 (m, 1H) 3.38-3.48 (m, 14H) 3.49 (s, 4H) 3.58-3.65 (m, 2H) 3.69 (t, J=6.10Hz, 2H) 3.72-3.80 (m, 1H) 4.13-4.19 (m, 3H) 4.48 (dd, J=9.02, 5.12Hz, 1H) 5.07 (s, 2H) 5.46 (dd, J=15.12, 9.27Hz, 1H) 5.90 (d, J=10.24Hz, 1H) 6.28 (dd, J=14.88, 10.98Hz, 1H) 6.76 (s, 2H) 7.30 (d, J=8.78Hz, 2H) 7.57 (d, J=7.25Hz, 2H) .

1.4.3合成ADL1-H9

1.4.3.1合成H9



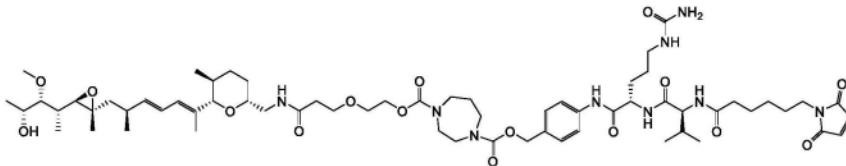
[0703] 1,4-二氮-1-甲酸2-(3-(((2R,5S,6S)-6-((S,2E,4E)-7-((2R,3R)-3-((2R,3R,4R)-4-羟基-3-甲氧基戊-2-基)-2-甲基环氧乙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-5-甲基四氢-2H-哌喃-2-基)甲基)胺基)-3-氧代丙氧基)乙酯(H9)

[0704] 采用部分1.4.1中所阐述的步骤1-4,得到呈无色油状的标题化合物(21.1mg,产率75%)。LC/MS (ESI, m/z), 652.86 [M+H]⁺。

[0705] ^1H NMR (400MHz, 氯仿- d) δ ppm 0.65 (d, J=6.83Hz, 3H) 0.85 (d, J=7.32Hz, 3H) 0.92-1.00 (m, 1H) 1.03 (d, J=6.8H, 3H) 1.16 (d, J=6.8H, 3H) 1.20-1.24 (m, 1H) 1.27 (s, 4H) 1.47-1.60 (m, 4H) 1.70 (s, 3H) 1.73-1.90 (m, 8H) 2.37-2.47 (m, 3H) 2.53 (d, J=9.8Hz, 1H)

2.81-2.86 (m, 2H) 2.87-2.92 (m, 2H) 2.94-2.97 (m, 1H) 2.99-3.07 (m, 1H) 3.27 (d, $J=9.76\text{Hz}$, 1H) 3.38-3.50 (m, 4H) 3.52 (s, 3H) 3.55-3.59 (m, 1H) 3.61-3.68 (m, 2H) 3.68-3.74 (m, 2H) 3.77-3.91 (m, 1H) 4.19 (br. s., 2H) 4.37 (t, $J=6.10\text{Hz}$, 1H) 5.41-5.50 (m, 1H) 5.89 (d, $J=11.22\text{Hz}$, 1H) 6.23 (dd, $J=14.88, 10.98\text{Hz}$, 1H) 6.46 (dd, $J=3.17, 1.22\text{Hz}$, 1H) .

1.4.3.2合成ADL1-H9



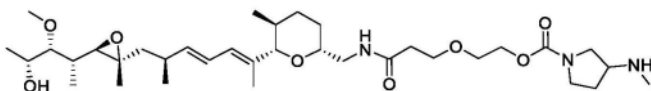
[0706] 1-(4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酰胺基)-3-甲基丁酰胺基)-5-脲基戊酰胺基)苄基)4-(2-(3-(((2R,5S,6S)-6-((S,2E,4E)-7-((2R,3R)-3-((2R,3R,4R)-4-羟基-3-甲氧基戊-2-基)-2-甲基环氧乙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-5-甲基四氢-2H-哌喃-2-基)甲基)胺基)-3-氧代丙氧基)乙基)1,4-二氮-1,4-二甲酸酯(ADL1-H9)

[0707] 采用类似于部分1.2.7中所阐述的程序的程序,得到标题化合物(25.2mg,产率72%)。

[0708] ^1H NMR (400MHz, 甲醇- d_4) δ ppm 0.65 (d, $J=6.30\text{Hz}$, 3H) 0.80 (d, $J=6.83\text{Hz}$, 3H) 0.93 (t, $J=5.85\text{Hz}$, 7H) 1.01 (d, $J=6.30\text{Hz}$, 3H) 1.08 (d, $J=6.30\text{Hz}$, 3H) 1.11-1.21 (m, 2H) 1.21-1.32 (m, 7H) 1.43-1.65 (m, 10H) 1.69 (s, 3H) 1.70-1.91 (m, 5H) 2.05 (q, $J=6.8\text{Hz}$, 1H) 2.25 (t, $J=7.32\text{Hz}$, 2H) 2.36-2.48 (m, 3H) 2.63 (d, $J=9.27\text{Hz}$, 1H) 2.95 (dd, $J=5.85, 4.39\text{Hz}$, 1H) 3.03-3.13 (m, 2H) 3.13-3.21 (m, 1H) 3.37-3.48 (m, 7H) 3.48-3.59 (m, 8H) 3.62-3.70 (m, 2H) 3.76 (quin, $J=6.46\text{Hz}$, 1H) 4.11-4.22 (m, 2H) 4.47-4.53 (m, 1H) 5.02-5.09 (m, 2H) 5.45 (dd, $J=14.88, 9.03\text{Hz}$, 1H) 5.90 (d, $J=10.73\text{Hz}$, 1H) 6.28 (dd, $J=14.64, 11.22\text{Hz}$, 1H) 6.76 (s, 2H) 7.26-7.37 (m, 2H) 7.57 (d, $J=7.81\text{Hz}$, 2H) .

1.4.4合成ADL1-H10

1.4.4.1合成H10



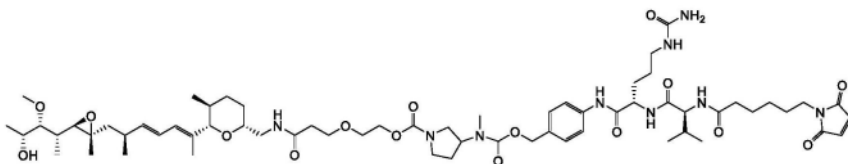
[0709] 3-(甲基胺基)吡咯啉-1-甲酸2-(3-(((2R,5S,6S)-6-((S,2E,4E)-7-((2R,3R)-3-((2R,3R,4R)-4-羟基-3-甲氧基戊-2-基)-2-甲基环氧乙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-5-甲基四氢-2H-哌喃-2-基)甲基)胺基)-3-氧代丙氧基)乙酯(H10)

[0710] 采用部分1.4.1中所阐述的步骤1-4,得到呈无色油状的标题化合物(24.8mg,产率88%)。LC/MS (ESI, m/z), 652.91 $[M+H]^+$ 。

[0711] ^1H NMR (400MHz, 氯仿- d) δ ppm 0.65 (d, $J=6.34\text{Hz}$, 3H) 0.85 (d, $J=6.83\text{Hz}$, 3H) 0.96 (dd, $J=18.78, 6.59\text{Hz}$, 1H) 1.03 (d, $J=6.8\text{Hz}$, 3H) 1.16 (d, $J=6.34\text{Hz}$, 3H) 1.18-1.25 (m, 3H) 1.27 (s, 3H) 1.20-1.32 (m, 5H) 1.41-1.63 (m, 4H) 1.70 (s, 3H) 1.72-1.90 (m, 4H) 2.02 (dd, $J=12.44, 6.10\text{Hz}$, 2H) 2.41 (s, 3H) 2.43-2.50 (m, 2H) 2.54 (d, $J=9.76\text{Hz}$, 1H) 2.95 (t, $J=5.37\text{Hz}$, 1H) 3.01-3.14 (m, 1H) 3.18-3.24 (m, 1H) 3.27 (d, $J=9.7\text{Hz}$, 1H) 3.38-3.49 (m, 2H) 3.52 (s, 6H) 3.61-3.65 (m, 2H) 3.69-3.74 (m, 2H) 3.83 (quin, $J=5.98\text{Hz}$, 1H) 4.15-4.22 (m,

¹H) 4.34 (t, J=6.10Hz, 1H) 5.44 (dd, J=15.12, 8.78Hz, 1H) 5.88 (d, J=11.22Hz, 1H) 6.23 (dd, J=14.88, 10.98Hz, 1H) 6.43 -6.51 (m, 1H) .

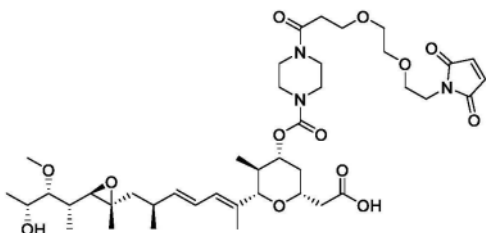
1.4.4.2合成ADL1-H10



[0712] 采用类似于部分1.2.7中所阐述的程序的程序,得到呈无色油状的标题化合物(22.1mg,产率57%)。

[0713] ¹H NMR (400MHz, 甲醇-d₄) δppm 0.65 (d, J=6.34Hz, 3H) 0.80 (d, J=6.83Hz, 3H) 0.94 (dd, J=6.34, 4.88Hz, 8H) 1.01 (dd, J=3.90, 2.93Hz, 4H) 1.08 (d, J=6.30Hz, 3H) 1.11-1.22 (m, 3H) 1.22-1.31 (m, 7H) 1.44-1.65 (m, 10H) 1.68 (s, 3H) 1.71-1.91 (m, 4H) 1.99-2.09 (m, 3H) 2.25 (t, J=7.56Hz, 2H) 2.41 (t, J=5.85Hz, 2H) 2.62 (d, J=9.27Hz, 1H) 2.84 (m, 4H) 2.93-2.99 (m, 2H) 3.04-3.13 (m, 2H) 3.13-3.21 (m, 1H) 3.43 (t, J=7.07Hz, 2H) 3.50 (s, 3H) 3.52-3.56 (m, 2H) 3.61 (t, J=4.39Hz, 2H) 3.69 (t, J=5.37Hz, 2H) 3.73-3.79 (m, 1H) 4.15 (d, J=7.32Hz, 3H) 4.49 (dd, J=9.03, 5.12Hz, 1H) 5.06 (s, 2H) 5.45 (dd, J=14.88, 9.03Hz, 1H) 5.90 (d, J=11.22Hz, 1H) 6.28 (dd, J=14.88, 10.98Hz, 1H) 6.76 (s, J=4.56Hz, 2H) 7.30 (d, J=8.29Hz, 2H) 7.57 (d, J=8.29Hz, 2H) .

1.5合成ADL2-H1



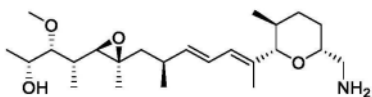
[0714] 2-((2R,4R,5S,6S)-4-((4-(3-(2-(2-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)乙氧基)乙氧基)丙酰基)哌嗪-1-羰基)氧基)-6-((S,2E,4E)-7-((2R,3R)-3-((2R,3R,4R)-4-羟基-3-甲氧基戊-2-基)-2-甲基环氧乙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-5-甲基四氢-2H-哌喃-2-基)乙酸(ADL2-H1)

[0715] 向H1(参见例如部分1.2.2;22.5mg,0.03mmol)于DMF(1mL)中的混合物中添加3-{2-[2-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)乙氧基]乙氧基}丙酸2,5-二氧代吡咯啉-1-基酯(10.55mg,0.03mmol)及DIPEA(0.016mL,0.089mmol)。将所得混合物在室温下搅拌4小时。随后,在真空中移除溶剂,且通过逆相层析法(ODS,24g,H₂O/MeCN=95/5至60/40)纯化所得残余物,得到呈无色油状的标题化合物(15.7mg,产率65%)。

[0716] ¹H NMR (400MHz, 甲醇-d₄) δppm 0.73 (d, J=6.34Hz, 4H) 0.97-1.15 (m, 13H) 1.21 (s, 2H) 1.28-1.41 (m, 1H) 1.42-1.62 (m, 2H) 1.69 (d, J=4.39Hz, 4H) 2.08-2.20 (m, 1H) 2.33-2.39 (m, 1H) 2.42-2.58 (m, 3H) 2.63 (t, J=5.30Hz, 2H) 2.91-2.94 (m, 1H) 3.33 (d, J=3.41Hz, 1H) 3.36 (d, J=1.95Hz, 2H) 3.44-3.60 (m, 18H) 3.60-3.67 (m, 4H) 3.69 (t, J=5.37Hz, 2H) 3.75-3.78 (m, 1H) 3.81-4.00 (m, 2H) 4.22-4.31 (m, 1H) 4.52-4.60 (m, 1H) 5.58-5.72 (m, 1H) 5.89-6.00 (m, 1H) 6.13-6.31 (m, 1H) 6.71-6.89 (m, 2H) .

1.6合成ADL2-H11

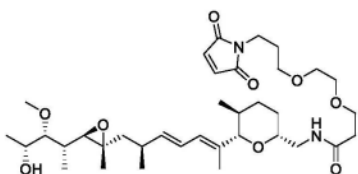
[0717] 步骤1:合成(2R,3R,4R)-4-((2R,3R)-3-((S,3E,5E)-6-((2S,3S,6R)-6-(胺基甲基)-3-甲基四氢-2H-哌喃-2-基)-2-甲基庚-3,5-二烯-1-基)-3-甲基环氧乙烷-2-基)-3-甲氧基戊-2-醇(H11)



[0718] 向((2R,5S,6S)-6-((S,2E,4E)-7-((2R,3R)-3-((2R,3R,4R)-3-甲氧基-4-((三乙基硅烷基)氧基)戊-2-基)-2-甲基环氧乙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-5-甲基四氢-2H-哌喃-2-基)甲胺(32mg,0.061mmol)于THF(1mL)中的混合物中添加TBAF(于THF中的1M溶液,0.183mL,0.183mmol)。将所得混合物在室温下搅拌2小时且随后用AcOEt稀释。将有机相分离,用水及盐水洗涤,经硫酸钠干燥,过滤,且在真空中浓缩。通过胺基官能化硅胶层析法(24g,庚烷/AcOEt=50/50至0/100,随后AcOEt/MeOH=80/20)纯化经分离的残余物,得到呈无色油状的标题化合物(15.1mg,产率60.4%)。LC/MS(ESI,m/z),410.07[M+H]⁺。

[0719] ¹H NMR(400MHz,氯仿-d) δppm 0.65(d,J=6.80Hz,3H) 0.86(d,J=6.80Hz,3H) 1.03(d,J=6.80Hz,3H) 1.16(d,J=6.30Hz,4H) 1.19-1.24(m,2H) 1.27(s,3H) 1.29-1.38(m,1H) 1.44-1.57(m,3H) 1.62-1.66(m,1H) 1.71(s,5H) 1.74-1.93(m,3H) 2.34-2.45(m,1H) 2.54(d,J=9.00Hz,1H) 2.62-2.74(m,2H) 2.92-2.98(m,1H) 3.24-3.32(m,2H) 3.52(s,3H) 3.79-3.88(m,1H) 5.39-5.48(m,1H) 5.88(d,J=10.73Hz,1H) 6.23(ddd,J=14.64,11.22,3.41Hz,1H)。

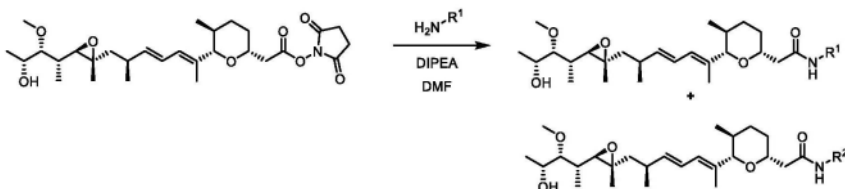
[0720] 步骤2:合成3-(2-(3-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)丙氧基)乙氧基)-N-(((2R,5S,6S)-6-((S,2E,4E)-7-((2R,3R)-3-((2R,3R,4R)-4-羟基-3-甲氧基戊-2-基)-2-甲基环氧乙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-5-甲基四氢-2H-哌喃-2-基)甲基)丙酰胺(ADL2-H11)



[0721] 向获自步骤1的化合物(15.1mg,0.037mmol)于DMF(1mL,12.915mmol)中的混合物中添加3-{2-[2-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)乙氧基]乙氧基}丙酸2,5-二氧代吡咯啉-1-基酯(13.1mg,0.037mmol)及DIPEA(0.019mL,0.111mmol)。将所得混合物在室温下搅拌16小时。随后,在真空中浓缩混合物且通过逆相层析法(ODS,24g,H₂O/MeCN=95/5至60/40)纯化所得残余物,得到呈无色油状的标题化合物(14.9mg,产率62%)。

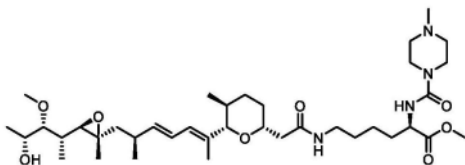
1.7合成H18、H20、H23、H16、H15、H24、H13、H14、H17、H19及H21

[0722] 经由以下通用程序(通用程序1.7)制备H18、H20、H23、H16、H15、H24、H13、H14、H17、H19及H21。



[0723] 向2-((2R,5S,6S)-6-((S,2E,4E)-7-((2R,3R)-3-((2R,3R,4R)-4-羟基-3-甲氧基戊-2-基)-2-甲基环氧乙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-5-甲基四氢-2H-哌喃-2-基)乙酸2,5-二氧化吡咯啉-1-基酯(1.0当量)于DMF(0.028M)中的溶液中添加胺(16mg, 0.056mmol)及DIPEA(2.0当量)。将反应混合物在室温下搅拌16小时,随后通过HPLC纯化混合物,得到所需产物。

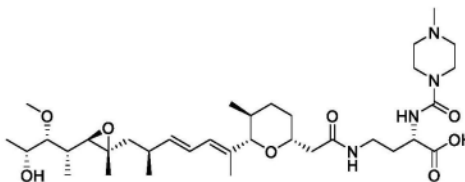
1.7.1合成H20



[0724] 采用通用程序1.7,得到呈无色非晶产物状的H20(15.7mg, 0.022mmol, 产率79%)。LC/MS(ESI, m/z), 707.99[M+H]⁺。

[0725] ¹H NMR(400MHz, 氯仿-d) δppm 0.66(d, J=6.83Hz, 3H) 0.85(d, J=6.83Hz, 3H) 1.04(d, J=6.83Hz, 3H) 1.16(d, J=6.34Hz, 3H) 1.18-1.25(m, 2H) 1.27(s, 4H) 1.30-1.59(m, 8H) 1.71-1.80(m, 2H) 1.81-1.89(m, 2H) 2.35(br d, J=3.90Hz, 2H) 2.38-2.44(m, 1H) 2.52-2.60(m, 4H) 2.79-2.86(m, 4H) 2.96(t, J=5.37Hz, 1H) 3.06-3.16(m, 1H) 3.24-3.30(m, 1H) 3.32(d, J=9.76Hz, 1H) 3.52(s, 3H) 3.64(br d, J=4.39Hz, 5H) 3.71(s, 3H) 3.83(t, J=5.85Hz, 1H) 4.30-4.42(m, 1H) 5.40-5.53(m, 3H) 5.89(br d, J=10.73Hz, 1H) 6.16-6.28(m, 1H) 6.75(br t, J=5.85Hz, 1H)。

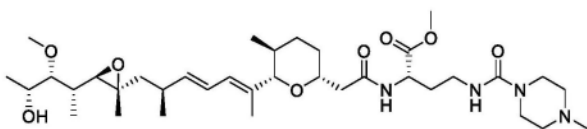
1.7.2合成H23



[0726] 自通用程序1.7获得H23(6.9mg, 产率37%)。LC/MS(ESI, m/z), 665.96[M+H]⁺。

[0727] ¹H NMR(400MHz, 甲醇-d₄) δppm 0.66(d, J=6.34Hz, 3H) 0.80(d, J=6.83Hz, 3H) 1.02(d, J=6.34Hz, 3H) 1.08(d, J=6.34Hz, 3H) 1.12-1.23(m, 2H) 1.25(s, 4H) 1.31-1.37(m, 1H) 1.43-1.55(m, 2H) 1.63(br d, J=13.17Hz, 1H) 1.67(s, 3H) 1.81-1.93(m, 3H) 2.21-2.40(m, 1H) 2.63(d, J=9.76Hz, 1H) 2.74(s, 2H) 2.92-2.97(m, 1H) 3.05(br s, 3H) 3.12-3.22(m, 1H) 3.31-3.38(m, 2H) 3.50(s, 3H) 3.63(br s, 4H) 3.68-3.78(m, 2H) 4.23(br d, J=4.39Hz, 1H) 5.45(dd, J=15.12, 8.78Hz, 1H) 5.89(br d, J=10.73Hz, 1H) 6.27(dd, J=14.88, 10.98Hz, 1H)。

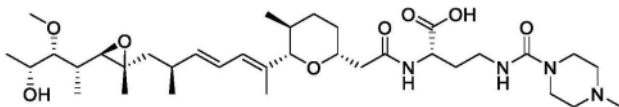
1.7.3合成H16



[0728] 采用通用程序1.7,得到呈无色非晶产物状的H16 (6.4mg,产率34%)。LC/MS (ESI, m/z), 679.86 $[M+H]^+$ 。

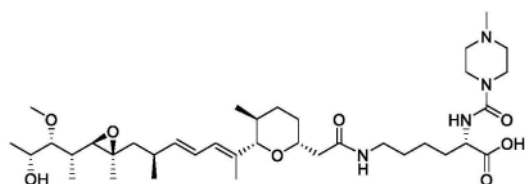
[0729] ^1H NMR (400MHz, 氯仿- d) δ ppm 0.67 (br d, $J=6.34$ Hz, 3H) 0.85 (br d, $J=6.83$ Hz, 3H) 1.01-1.06 (m, 3H) 1.14-1.19 (m, 3H) 1.19-1.28 (m, 5H) 1.43 (br dd, $J=12.20, 9.76$ Hz, 1H) 1.47-1.55 (m, 1H) 1.61-1.64 (m, 1H) 1.71 (br d, $J=7.32$ Hz, 3H) 1.83-1.90 (m, 2H) 2.03-2.20 (m, 1H) 2.37-2.44 (m, 3H) 2.49-2.56 (m, 5H) 2.75 (br s, 1H) 2.78-2.84 (m, 3H) 2.87-2.94 (m, 1H) 2.94-2.98 (m, 1H) 3.35 (br dd, $J=13.41, 10.00$ Hz, 2H) 3.52 (s, 4H) 3.60 (br s, 4H) 3.69 (br s, 3H) 3.71 (s, 4H) 3.83 (td, $J=12.56, 6.59$ Hz, 2H) 4.06-4.20 (m, 1H) 4.57-4.68 (m, 1H) 5.47 (td, $J=15.98, 8.54$ Hz, 1H) 5.81-5.96 (m, 1H) 6.14-6.36 (m, 1H)。

1.7.4合成H15



[0730] 通用程序1.7在合成H16期间得到作为副产物的H15 (6.6mg,产率35%)。LC/MS (ESI, m/z), 665.46 $[M+H]^+$ 。

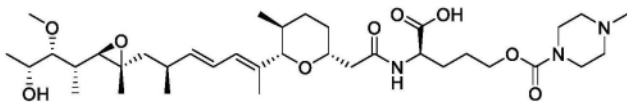
[0731] ^1H NMR (400MHz, 甲醇- d_4) δ ppm 0.66 (br d, $J=6.34$ Hz, 4H) 0.81 (br d, $J=5.85$ Hz, 3H) 0.99-1.04 (m, 4H) 1.07-1.10 (m, 4H) 1.17 (br s, 1H) 1.19-1.27 (m, 5H) 1.46-1.55 (m, 2H) 1.65 (br s, 1H) 1.68 (s, 4H) 1.82-1.95 (m, 2H) 2.00-2.18 (m, 1H) 2.29-2.49 (m, 4H) 2.61-2.67 (m, 4H) 2.92-3.03 (m, 5H) 3.34 (br d, $J=10.24$ Hz, 1H) 3.50 (s, 3H) 3.58-3.77 (m, 8H) 4.28 (t, $J=9.76$ Hz, 1H) 5.40-5.53 (m, 1H) 5.83-5.99 (m, 1H) 6.28 (dd, $J=14.63, 10.73$ Hz, 1H)。



[0732] 采用通用程序1.7,得到呈无色非晶产物状的H24 (12.1mg,产率94%)。LC/MS (ESI, m/z), 693.72 $[M+H]^+$ 。

[0733] ^1H NMR (400MHz, 甲醇- d_4) δ ppm 0.66 (d, $J=6.34$ Hz, 3H) 0.80 (d, $J=6.83$ Hz, 3H) 1.02 (d, $J=6.83$ Hz, 4H) 1.08 (d, $J=6.34$ Hz, 4H) 1.32-1.37 (m, 8H) 1.44-1.50 (m, 4H) 1.65-1.68 (m, 5H) 1.75-1.96 (m, 4H) 2.19-2.39 (m, 3H) 2.40-2.52 (m, 2H) 2.63 (d, $J=9.27$ Hz, 1H) 2.80 (s, 3H) 2.95 (dd, $J=6.34, 4.39$ Hz, 1H) 3.06-3.15 (m, 1H) 3.31-3.40 (m, 2H) 3.50 (s, 3H) 3.65-3.72 (m, 7H) 3.73-3.80 (m, 2H) 4.10-4.24 (m, 1H) 5.47 (dd, $J=15.12, 9.27$ Hz, 1H) 5.89 (d, $J=10.24$ Hz, 1H) 6.28 (dd, $J=15.12, 10.73$ Hz, 1H)。

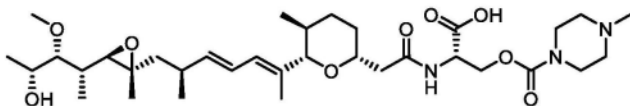
1.7.6合成H18



[0734] 采用通用程序1.7,得到呈无色非晶产物状的H18(8.1mg,产率53%)。LC/MS (ESI, m/z), 678.68[M-H]⁺。

[0735] ¹H NMR(400MHz, 氯仿-d) δppm 0.67(br d, J=6.34Hz, 3H) 0.87(d, J=6.83Hz, 3H) 1.03(br d, J=6.83Hz, 3H) 1.15-1.24(m, 5H) 1.28(s, 3H) 1.50-1.67(m, 5H) 1.75(br s, 1H) 1.82-1.94(m, 3H) 2.37-2.44(m, 3H) 2.56-2.60(m, 4H) 2.71-2.93(m, 3H) 3.00(br t, J=5.12Hz, 1H) 3.37(br d, J=10.24Hz, 1H) 3.53(s, 3H) 3.55-3.63(m, 1H) 3.65-3.76(m, 3H) 3.83-3.91(m, 1H) 4.04(br d, J=4.39Hz, 1H) 4.08-4.16(m, 1H) 4.41-4.53(m, 2H) 5.42-5.55(m, 1H) 5.91(br d, J=10.73Hz, 1H) 6.14-6.28(m, 1H) 7.21(br d, J=7.32Hz, 1H)。

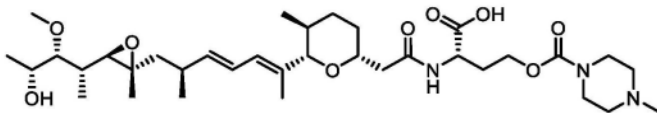
1.7.7合成H13



[0736] 采用通用程序1.7,得到呈无色非晶产物状的H13(6.7mg,产率36.7%)。LC/MS (ESI, m/z), 652.86[M+H]⁺。

[0737] ¹H NMR(400MHz, 甲醇-d₄) δppm 0.66(d, J=6.34Hz, 3H) 0.81(d, J=6.34Hz, 3H) 1.02(d, J=6.34Hz, 3H) 1.05-1.10(m, 3H) 1.14-1.23(m, 2H) 1.26(s, 4H) 1.34-1.52(m, 2H) 1.52-1.59(m, 1H) 1.65(br s, 1H) 1.70(s, 4H) 1.82-1.92(m, 2H) 2.41(qd, J=14.39, 6.10Hz, 3H) 2.63(d, J=9.76Hz, 1H) 2.73(br d, J=4.39Hz, 3H) 2.95(br t, J=5.12Hz, 2H) 2.99-3.09(m, 3H) 3.30-3.36(m, 1H) 3.50(s, 3H) 3.53-3.65(m, 2H) 3.65-3.78(m, 4H) 4.24-4.42(m, 2H) 4.55(br s, 1H) 5.36-5.55(m, 1H) 5.89(br d, J=10.73Hz, 1H) 6.21-6.43(m, 1H)。

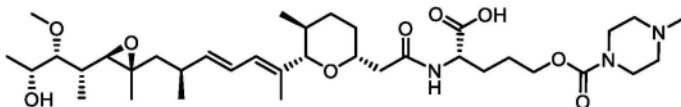
1.7.8合成H14



[0738] 采用通用程序1.7,得到呈无色非晶固体状的H14(15.5mg,产率83%)。LC/MS (ESI, m/z), 666.90[M+H]⁺。

[0739] ¹H NMR(400MHz, 氯仿-d) δppm 0.65(br d, J=6.34Hz, 3H) 0.85(br d, J=6.83Hz, 3H) 1.02(br d, J=6.34Hz, 3H) 1.14-1.28(m, 8H) 1.38-1.57(m, 2H) 1.57-1.65(m, 2H) 1.81-1.89(m, 2H) 2.04-2.19(m, 2H) 2.41(br d, J=4.88Hz, 3H) 2.54(d, J=9.76Hz, 1H) 2.65(s, 3H) 2.91-3.03(m, 5H) 3.33(br d, J=9.76Hz, 1H) 3.52(s, 3H) 3.70(br s, 5H) 3.81-3.87(m, 1H) 4.08-4.18(m, 2H) 4.52(br d, J=6.34Hz, 1H) 5.45(br dd, J=15.12, 8.78Hz, 1H) 5.89(br d, J=10.73Hz, 1H) 6.21(br dd, J=14.88, 10.98Hz, 2H) 7.15(br d, J=7.32Hz, 1H)。

1.7.9合成H17

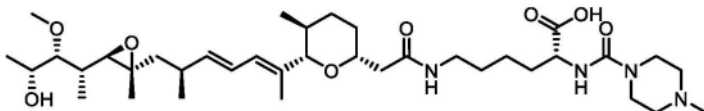


[0740] 采用通用程序1.7,得到呈无色非晶固体状的H17(12.94mg,产率68%)。LC/MS (ESI, m/z), 680.66[M+H]⁺。

[0741] ¹H NMR(400MHz, 甲醇-d₄) δppm 0.66(d, J=6.83Hz, 4H) 0.81(d, J=7.32Hz, 3H) 0.97-1.04(m, 5H) 1.08(d, J=6.34Hz, 5H) 1.10-1.16(m, 2H) 1.20-1.23(m, 1H) 1.25(s, 4H)

1.69(d, J=0.98Hz, 4H) 1.83(br d, J=3.41Hz, 1H) 1.87(br d, J=4.39Hz, 1H) 1.90(br d, J=4.39Hz, 1H) 2.24-2.30(m, 1H) 2.40(br dd, J=13.90, 9.02Hz, 2H) 2.58-2.62(m, 5H) 2.64(s, 1H) 2.84(br t, J=4.88Hz, 5H) 2.95(dd, J=6.34, 4.39Hz, 1H) 3.30-3.32(m, 1H) 3.50(s, 3H) 3.56-3.64(m, 6H) 3.74-3.79(m, 1H) 4.02(br t, J=5.37Hz, 3H) 4.32-4.35(m, 1H) 4.35-4.37(m, 1H) 5.45(dd, J=15.12, 8.78Hz, 1H) 5.85-5.91(m, 1H) 6.27(dd, J=15.12, 10.73Hz, 1H) .

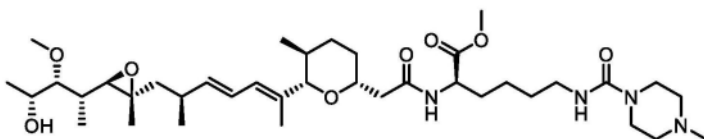
1.7.10合成H19



[0742] 采用通用程序1.7,得到呈无色非晶固体状的H19(5.53mg,产率56.4%)。LC/MS (ESI, m/z), 694.08[M+H]⁺。

[0743] ¹H NMR(400MHz, 甲醇-d₄) δppm 0.66(d, J=6.83Hz, 3H) 0.81(d, J=6.83Hz, 3H) 0.95-0.95(m, 1H) 1.02(d, J=6.83Hz, 3H) 1.08(d, J=6.34Hz, 3H) 1.12-1.22(m, 2H) 1.26(s, 4H) 1.34-1.52(m, 7H) 1.62(br d, J=13.66Hz, 2H) 1.68(s, 4H) 1.81-1.93(m, 3H) 2.08-2.08(m, 1H) 2.20-2.39(m, 2H) 2.39-2.50(m, 1H) 2.61-2.68(m, 4H) 2.90-2.97(m, 5H) 3.11-3.15(m, 2H) 3.30-3.34(m, 1H) 3.50(s, 3H) 3.56-3.62(m, 4H) 3.76(t, J=6.34Hz, 1H) 4.11-4.22(m, 1H) 5.45(dd, J=15.12, 8.78Hz, 1H) 5.90(br d, J=11.22Hz, 1H) 6.29(dd, J=14.88, 10.98Hz, 1H) .

1.7.11合成H21

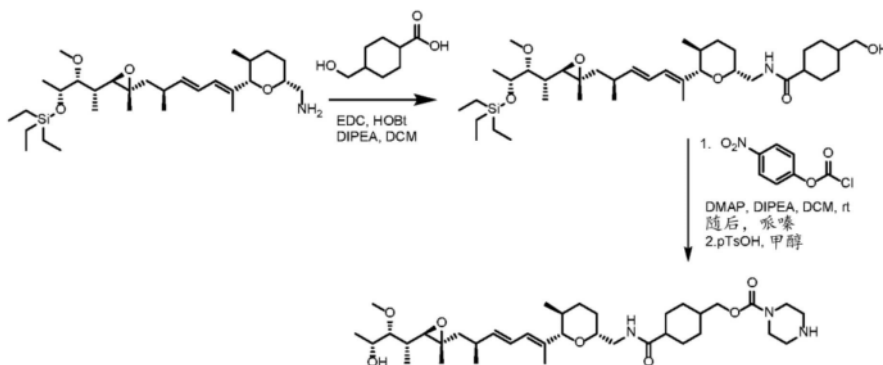


[0744] 采用通用程序1.7,得到H21,其以无色非晶固体形式获得(12.3mg,产率62.1%)。LC/MS (ESI, m/z), 708.03[M+H]⁺。

[0745] ¹H NMR(400MHz, 氯仿-d) δppm 0.67(br d, J=6.34Hz, 3H) 0.85(br d, J=6.83Hz, 3H) 1.02(br d, J=6.83Hz, 3H) 1.15-1.29(m, 9H) 1.29-1.42(m, 3H) 1.47-1.63(m, 6H) 1.74-1.79(m, 1H) 1.86(br dd, J=13.17, 3.90Hz, 2H) 2.40(br d, J=5.37Hz, 3H) 2.51-2.55(m, 4H) 2.78(br s, 4H) 2.96(br t, J=5.12Hz, 1H) 3.18(td, J=12.07, 6.10Hz, 2H) 3.37(br d, J=9.76Hz, 1H) 3.52(s, 3H) 3.57(br s, 4H) 3.69(s, 4H) 3.84(br t, J=5.85Hz, 1H) 4.50-4.57(m, 1H) 4.85-4.93(m, 2H) 5.44(br dd, J=15.12, 8.78Hz, 1H) 5.92(br d, J=10.24Hz, 1H) 6.15-6.38(m, 1H) 7.24-7.29(m, 2H) 8.24(br s, 1H) .

1.8合成H22及H25

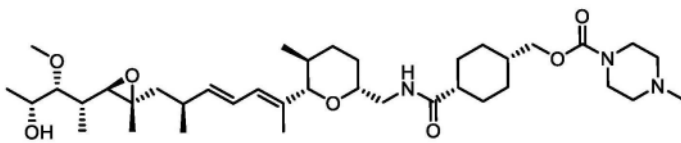
[0746] 经由以下通用程序制备H22及H25。



[0747] 步骤1:在室温下向((2R,5S,6S)-6-((S,2E,4E)-7-((2R,3R)-3-((2R,3R,4R)-3-甲氧基-4-((三乙基硅烷基)氧基)戊-2-基)-2-甲基环氧乙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-5-甲基四氢-2H-哌喃-2-基)甲胺(16.6mg,0.027mmol)及4-羧基-1-环己烷甲醇(顺式及反式的混合物,5.11mg,0.032mmol)于二氯甲烷(2ml)中的溶液中添加EDC(6.20mg,0.032mmol)及HOBt(4.54mg,0.03mmol)。将反应混合物在室温下搅拌16小时。随后,用二氯甲烷稀释混合物,且将有机层用水及盐水洗涤,随后经无水硫酸钠干燥。过滤固体,且浓缩滤液,且通过硅胶层析法纯化,得到呈无色油状的所需产物(8.3mg,产率47%)。

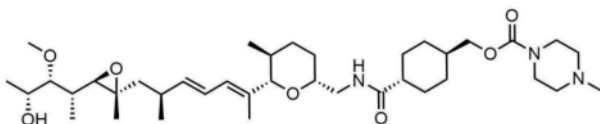
[0748] 步骤2:在室温下向4-(羟基甲基)-N-(((2R,5S,6S)-6-((S,2E,4E)-7-((2R,3R)-3-((2R,3R,4R)-3-甲氧基-4-((三乙基硅烷基)氧基)戊-2-基)-2-甲基环氧乙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-5-甲基四氢-2H-哌喃-2-基)甲基)环己烷甲酰胺(21mg,0.032mmol)及DIPEA(0.028ml,0.158mmol)的顺式、反式混合物于二氯甲烷(1ml)中的溶液中分批添加氯甲酸4-硝基苯酯(12.75mg,0.063mmol)及DMAP(1.932mg,0.016mmol)。将所得混合物在相同温度下搅拌16小时。随后,添加1-甲基哌嗪(31.7mg,.316mmol)且再搅拌1小时。用二氯甲烷稀释反应混合物,且将有机层用水及盐水洗涤,随后经Na₂SO₄干燥。过滤固体且将滤液浓缩至干。将所获得的残余物溶解于1.0mL MeOH及10mg p-TsOH中且在室温下搅拌2小时。通过添加100μL DIPEA来淬灭反应物,且随后在真空中移除溶剂。通过NH-硅胶层析法(Hep/AcOEt=50/50至0/100)纯化所获得的残余物,得到H25及H22。

1.8.1合成H25



[0749] 获得呈无色非晶产物状的H25(7.0mg,产率32.7%)。LC/MS(ESI,m/z),676.94[M+H]⁺。

[0750] ¹H NMR(400MHz,氯仿-d)δppm 0.68(d,J=6.83Hz,3H)1.02(d,J=7.32Hz,3H)1.10(d,J=6.83Hz,3H)1.17(d,J=6.34Hz,4H)1.25(s,3H)1.47-1.62(m,11H)1.71(s,3H)1.80-1.86(m,4H)2.13(s,1H)2.27-2.36(m,10H)2.49-2.65(m,1H)2.99-3.12(m,1H)3.29(d,J=10.20Hz,1H)3.32(s,4H)3.47(br t,J=4.88Hz,4H)3.72-3.73(m,1H)3.73-3.74(m,1H)3.99(d,J=6.83Hz,2H)4.21-4.36(m,1H)5.56-5.71(m,1H)5.92(s,1H)6.18-6.31(m,1H)1.8.2合成H22



[0751] 获得呈无色非晶产物状的H22 (5.6mg, 产率26.2%)。LC/MS (ESI, m/z), 676.89 [M+H]⁺。

[0752] ¹H NMR (400MHz, 氯仿-d) δppm 0.68 (d, J=6.83Hz, 3H) 1.02 (d, J=6.83Hz, 3H) 1.10 (d, J=7.32Hz, 3H) 1.14 (d, J=6.34Hz, 3H) 1.17 (s, 3H) 1.21-1.41 (m, 2H) 1.49-1.55 (m, 5H) 1.58-1.62 (m, 6H) 1.70 (s, 3H) 1.80-1.86 (m, 4H) 2.26-2.30 (m, 4H) 2.35 (br s, 4H) 2.46-2.57 (m, 1H) 2.89 (dd, J=3.66, 2.20Hz, 1H) 3.01-3.11 (m, 1H) 3.27 (d, J=9.76Hz, 1H) 3.38 (s, 3H) 3.47 (br t, J=4.88Hz, 4H) 3.53 (ddd, J=10.24, 6.83, 3.41Hz, 1H) 3.76 (d, J=5.37Hz, 1H) 3.89 (dd, J=6.34, 1.95Hz, 1H) 3.99 (d, J=7.32Hz, 2H) 5.68-5.77 (m, 1H) 5.91 (d, J=11.22Hz, 1H) 6.18 (dd, J=14.88, 10.98Hz, 1H)。实例2

[0753] 剖析用于制备ADC的示例性荷伯希二烯剪接体调节子有效负载。评估有效负载与SF3b复合物的结合、活体外剪接活性及抑制细胞生长的能力。

2.1体外剪接 (IVS)

[0754] 为评估有效负载在无细胞系统中的活性, 执行活体外剪接分析。将有效负载与核提取物及pre-mRNA受质小型基因一起培育。

[0755] HeLa核提取物的制备: 使HeLa S3细胞团块再悬浮于低渗缓冲液 (10mM HEPES pH 7.9、1.5mM MgCl₂、10mM KCl、0.2mM PMSF、0.5mM DTT) 中, 且使悬浮液达到总计5个红细胞压积 (packed cell volume, PCV)。离心之后, 丢弃上清液, 且用低渗缓冲液使细胞达到3PCV且在冰上培育10min。使用dounce均质机溶解细胞且随后进行离心。丢弃上清液, 且用1/2核容积比 (PNV) 的低盐缓冲液 (20mM HEPES pH 7.9、1.5mM MgCl₂、20mM KCl、0.2mM EDTA、25% 甘油、0.2mM PMSF、0.5mM DTT) 使集结粒再悬浮, 接着用1/2PNV的高盐缓冲液 (除1.4M KCl之外其余与低盐缓冲液相同) 使集结粒再悬浮。轻轻地混合核达30min, 之后进行离心。随后, 将上清液 (核提取物) 透析至储存缓冲液 (20mM HEPES pH7.9、100mM KCl、0.2mM EDTA、20% 甘油、0.2mM PMSF、0.5mM DTT) 中。使用NanoDrop 8000UV-Vis分光亮度计 (ThermoFisher Scientific) 测定蛋白质浓度。

[0756] IVS: 使用5' EcoRI及3' XbaI限制位点将所有Ad2源性序列 (Pellizzoni等人 (1998) Cell 95 (5): 615-24) 选殖至pcDNA3.1 (+) 载体 (Promega) 中。使用XbaI使质体线性化且用作活体外转录反应中的DNA模板。使用EcoRI使Ftz Δi无内含子质体 (Luo及Reed (1999) 96 (26): 14937-42) 线性化。使所有RNA进行活体外转录且随后分别使用MEGAScript T7 (英杰公司 (Invitrogen)) 及MegaClea r (英杰公司) 试剂盒进行纯化。对于使用Ad2变异pre-mRNA进行的剪接反应, 使用由HeLa S3、2ng pre-mRNA、0.2ng FTZ Δi及变化浓度的化合物或DMSO制备的8μg核提取物来制备1μL反应物。在30℃下预培育15min之后, 添加1μL剪接活化缓冲液 (0.5mM ATP、20mM磷酸肌酸、1.6mM MgCl₂), 且将反应物在30℃下培育90min。随后, 用13μL DMSO淬灭反应物, 且使用25nL以进行RT-qPCR。使用以下制备RT-qPCR反应: TaqMan RNA-至-C_T 1-步骤试剂盒 (生命技术公司 (Life Technologies)), 来自剪接反应的RNA, Ad2 (正向: ACTCTCTCCGCATCGCTGT; 反向: CCGACGGGTTTCCGATCCAA; 探针: CTGTTGGGCTCGCGGTTG) 和Ftz (正向: TGGCATCAGATTGCAAAGAC; 反向: ACGC CGGGTGATGTATCTAT; 探针:

CGAAACGCACCCGTCAGACG)mRNA引物-探针集。使用Prism 7 (Graphpad) 对所形成的剪接产物进行非线性回归曲线拟合且相对于对照(DMSO) 样品标准化。

[0757] 鉴于所有经测试的有效负载均特异性结合至SF3b复合物且展现类似结合概况,故假设所有有效负载还应在相当程度上调节剪接。所有有效负载均显著地调节Ad2.2 pre-mRNA的剪接(参见表13)。在有效负载存在的情况下,观测到剪接产物的量减少。

2.2细胞活力

[0758] 将HCC1954(美国菌种中心(American Type Culture Collection, ATCC)) 乳房导管癌细胞以2000个细胞/孔涂铺于平底96孔组织培养盘(Corning) 中的补充有10%胎牛血清的90μL总体积的组织培养基(ThermoFisher Scientific) 中。用200nM至0.03nM的3倍连续稀释的化合物处理细胞。一式三份测试各浓度。在处理时,根据制造商建议(Promega; 编号G9241) 使用CellTiter-Glo®2.0发光细胞活力分析评估具有未经处理的细胞的盘。将CellTiter-Glo®2.0试剂添加至培养基中,培育且在EnVision多标记读取器(PerkinElmer) 上进行分析。值表示零时(T0)。还使用CellTiter-Glo®2.0发光细胞活力分析测定144小时(T144) 化合物处理之后的活细胞的数目。使用零时(T0) 的发光值、DMSO对照生长(C) 及在化合物存在的情况下的测试生长(T144), 计算在化合物浓度水平中的各者下的生长百分比。生长抑制百分比计算如下:对于T144>=T0的浓度, $[(T144 - T0) / (C - T0)] \times 100$; 或对于T144<T0的浓度, $[(T144 - T0) / T0] \times 100$ 。使用Prism 7 (Graphpad) 生成剂量反应曲线图且使用非线性回归分析及log(抑制剂) 相对于反应一可变斜率(四个参数) 进行拟合。

[0759] 在经HER2放大的HCC1954乳癌细胞中测定所有有效负载的细胞活力剂量反应。大部分所测试的有效负载展现介于低奈莫耳范围内的GI₅₀值(即引起50%细胞增殖减少的化合物浓度)(参见表13)。

实例3

[0760] 经由抗体上的半胱氨酸残基将实例2中所评估的示例性有效负载化合物结合至示例性抗HER2抗体(曲妥珠单抗)。下文描述示例性抗HER2 ADC的制备及评估。

3.1抗体

[0761] 使用曲妥珠单抗抗体(“AB185”)(Molina等人(2001) Cancer Res. [癌症研究] 61 (12):4744-9) 制备抗HER2 ADC(在本文中也称为SMLA)。

3.2生物缀合

[0762] 将在PBS缓冲液(pH 7.0) 中10mg/mL的抗体(曲妥珠单抗) 与5mM TCEP(2-4摩尔当量)(赛默飞世尔科技公司; #77720) 混合以使链间二硫键断裂。将反应物在22℃下轻轻地混合3小时。随后,添加丙二醇(15% v/v), 接着为8莫耳当量的接头-有效负载(于DMSO中的6mM储备液), 且使溶液充分地混合。将反应物在22℃下置放于培育箱中的旋转盘上。在2小时的缀合之后,通过AKTA GE M150(HiTrap™ 26/10脱盐柱;流速:3mL/min) (GE医疗生物科学集团) 纯化反应混合物以将未缀合的有效负载移至DPBS(pH 7.5) 中。经由Amicon超滤器(30kDa, Ultra-4) (EMD Millipore) 浓缩所得缀合物, 且经由0.22μm PVDF抛弃式过滤器(EMD Millipore) 进行无菌过滤。通过UV-VIS测量最终的澄清溶液, 以根据Beer-Lambert定律($A = E \cdot c \cdot l$) 和以下公式测定抗体浓度([mAb]; mole/L) 和经缀合的有效负载的浓度([LD]; mole/L):

$$A_{280nm} = E_{280nm}^{mAb} \cdot [mAb] \cdot l + E_{280nm}^{LD} \cdot [LD] \cdot l$$

$$A_{252nm} = E_{252nm}^{mAb} * [mAb] * l + E_{252nm}^{LD} * [LD] * l$$

$$E_{280nm}^{mAb}: \text{曲妥珠单抗} = 213,380 \text{cm}^{-1} \text{M}^{-1}$$

$$E_{252nm}^{mAb}: \text{曲妥珠单抗} = 79,112 \text{cm}^{-1} \text{M}^{-1}$$

$$E_{280nm}^{LD} = 800 \text{cm}^{-1} \text{M}^{-1}$$

$$E_{252nm}^{LD} = 31,000 \text{cm}^{-1} \text{M}^{-1}$$

缩写: c-摩尔浓度; l-光路长度 (Nanodrop: 0.1cm); E-莫耳消光系数; A-吸亮度。

3.3 生物物理学表征

[0763] 分别通过液相层析法-质谱法 (LC/MS)、粒径筛析层析法 (SEC) 及逆相高效液相层析法 (HPLC) 分析示例性抗HER2 ADC的荷伯希二烯剪接调节子与抗体比 (HAR)、聚集%及未经结合的有效负载%。一般而言, 缀合物含有少于2%游离药物且含有少于10%聚集物。

3.3.1 LC/MS分析-HAR

[0764] 使用与Agilent G6224A精确质量TOF质谱仪介接的Agilent1290UPLC系统执行LC/MS分析。在37°C下, 用PNGase F (新英格兰实验室 (New England Biolabs); #P0705L) 使缀合物脱糖基化4小时, 用8M Gdn-HCl (西格玛公司 (Sigma); #G9284) 使其变性, 且最后使用DTT (5mM最终浓度) (普洛麦格公司; #V3151) 将其分成轻链和重链结构域。将所制备的样品注射至Agilent PLRP-S管柱 (2.1×150mm, 8μm) 上且在室温 (RT) 下经28min用25% B至50% B的梯度进行溶离。移动相A为具有0.05% TFA的水, 移动相B为具有0.04% TFA的乙腈, 且流动速率为1mL/min。由解卷积质谱、通过对关于轻链 (L0或L1) 及重链 (H0、H1、H2及H3) 的未结合峰及药物结合峰的强度求加权平均值来计算HAR。使用以下公式计算完整缀合物的总HAR: $(\text{HAR}_{LC} * 2) + (\text{HAR}_{HC} * 2) = \text{总HAR}$ 。示例性抗HER2 ADC的HAR值报导于表12中。

3.3.2 SEC分析-聚集

[0765] 使用TOSON-G3000SWXL (编号008541) 管柱在具有0.25M氯化钾及15% (v/v) IPA的0.2M磷酸钾 (pH 7) 中以0.75mL/min的流动速率执行尺寸筛析层析法。通过曲线下面积积分测定高分子量单体缀合物组分在280nm处的峰面积吸亮度。示例性抗HER2ADC的单体百分比报导于表12中。

3.3.3 HPLC分析-游离荷伯希二烯剪接调节子

[0766] 在冰上用10体积的乙腈使目的缀合物沉淀2小时且进行短暂离心。随后, 将含有残余未经结合的有效负载的上清液注射至Agilent Poroshell 120SB-C18 120A管柱 (4.6×100mm, 2.7μm) 上, 且在RT下经10min用45% B至70% B的梯度进行溶离。移动相A为100%水, 移动相B为100%乙腈, 且流动速率为0.6mL/min且检测在252nm处。经由UV检测定量残余游离荷伯希二烯剪接调节子的量, 且与未经结合的接头-有效负载的外部标准物曲线比较。示例性抗HER2 ADC的游离荷伯希二烯剪接调节子百分比报导于表12中。

3.4 结合表征

3.4.1 FACS与靶标阳性细胞的结合

[0767] 通过流动式细胞量测术使用间接免疫荧光评估未经结合的抗HER2抗体及抗HER2 ADC与靶标阳性细胞的结合。将作为内源性表达HER2的乳癌细胞系的JIMT1细胞 (DSMZ) 涂铺 (5×10^4 个细胞/孔) 于v型底96孔盘 (Greiner Bio-One) 中, 且在4°C下将其与在分析培养基 (补充有10% (w/v) 胎牛血清白蛋白的RPMI-1640 (Thermo Fisher Scientific)) 中稀释至各种浓度的测试化合物一起培育2小时。随后, 用PBS+2% FBS (FACS缓冲液) 洗涤细胞, 且在

4℃下在暗处用经藻红素标记 (PE) 的山羊抗人类免疫球蛋白G (IgG) 抗体 (英杰公司) 染色40min。用冷FACS缓冲液洗涤细胞,且在室温下用FluroFix缓冲液 (Biolegend) 固定30min。用FACS缓冲液洗掉固定剂。使用LSRFortessa流动式细胞量测仪 (BD Bioscience) 分析经固定细胞的PE的几何平均荧光。包括曲妥珠单抗及T-DM1 (与曲妥珠单抗结合的DM1) 作为对照。

3.5体外分析

3.5.1细胞活力

[0768] 在若干经HER2放大的细胞系中测试抗HER2 ADC抑制细胞生长的能力。使用HCC1954 (ATCC, 2000个细胞/孔) 细胞系。如部分2.3中所描述执行细胞活力分析。

[0769] 出乎意料地,并非所有ADC在HCC1954细胞中皆具有活性,不管具有类似结合概况 (参见表13) 及有类似生物化学特性的有效负载如何均如此。举例而言,具有ADL2接头的ADC不太能够抑制细胞生长 (例如比较ADL1-H1与ADL2-H1的活性)。

表 12. 荷伯希二烯剪接调节子有效负载的物理表征。

SMLA	荷伯希二烯 剪接调节子	接头	游离药 物%	单体%	浓度 (mg/ml)	渗透性 平均值 Caco-2 A-B Perm (10 ⁻⁶ cm/s)	渗透性 平均值	ER	稳定性 平均值 稳定性 t1/2 pH5.5 (d)	稳定性 平均值 稳定性 % pH5.5 t24h (%)
AB185-ADL1-H3	H3	ADL1	nd	99	1.380	nd	nd	nd	nd	nd
AB185-ADL1-H1	H1	ADL1	0.300	97	2.550	0.263	0.334	1.270	3.5	79
AB185-ADL1-H8	H8	ADL1	nd	98	0.320	nd	nd	nd	nd	nd
AB185-ADL1-H5	H5	ADL1	nd	98	2.490	1.040	23.6	22.692	>7	>100
AB185-ADL1-H7	H7	ADL1	nd	97	2.570	nd	nd	nd	nd	nd
AB185-ADL1-H10	H10	ADL1	nd	98	2.380	nd	nd	nd	nd	nd
AB185-ADL1-H9	H9	ADL1	nd	98	2.550	11.596	nd	nd	nd	nd
AB185-ADL1-H4	H4	ADL1	0.400	91	2.740	19.263	nd	nd	nd	nd
AB185-ADL1-H6	H6	ADL1	nd	99	2.050	5.725	nd	nd	nd	nd
AB185-ADL2-H1	H1	ADL2	nd	nd	2.090	0.263	0.334	1.270	3.5	79
AB185-ADL2-H11	H11	ADL2	nd	nd	3.060	nd	nd	nd	nd	nd

表 13. 示例性抗 HER2 ADC 及对荷伯希二烯剪接调节子有效负载的特征。

SMLA	荷伯希二烯剪接调节子	接头	HAR	SMLA 活性		有效负载 SF3B1 结合及 mRNA 剪接调节				荷伯希二烯剪接调节子细胞效力					
				CTGlo-ATG G 平均值 LD50 (nM) HER2 SMLA 筛 选 HCC1954.1	CTGlo-ATG G 平均值 LD50 (nM) HER2 SMLA 筛 选 HCC1954.1	SPA-ATG G 平均值 IC50 (nM) SF3B1 (WT) HELA.2	qPCR-IVS-ATG G 平均值 IC50 (nM) Ad2.1 HELA.2	qPCR-IVS-ATG G 平均值 IC50 (nM) Ad2.2 HELA.2	CTGlo-ATG G 平均值 LD50 (nM) THP1.1	CTGlo-ATG G 平均值 LD50 (nM) THP1.1	CTGlo-ATG G 平均值 LD50 (nM) THP1.1	CTGlo-ATG G 平均值 LD50 (nM) THP1.1	CTGlo-ATG G 平均值 LD50 (nM) THP1.1	CTGlo-ATG G 平均值 LD50 (nM) THP1.1	CTGlo-ATG G 平均值 LD50 (nM) THP1.1
AB185-ADL1-H3	H3	ADL1	4.520	0.067	0.246	nd	562.476	35.185	54.563	478.332	-92.943	114.915	>10000	19.182	-98.873
AB185-ADL1-H1	H1	ADL1	4.800	0.048	0.310	11.671	72.619	33.667	114.194	697.273	-84.238	182.271	>10000	10.179	-83.666
AB185-ADL1-H8	H8	ADL1	5.920	0.030	0.980	nd	12.902	12.916	1.218	11.851	-102.030	1.105	>10000	17.053	-103.148
AB185-ADL1-H5	H5	ADL1	4.920	0.180	1.040	12.903	30.268	17.764	0.433	3.415	-103.352	0.407	>10000	-25.308	-103.609
AB185-ADL1-H7	H7	ADL1	5.160	0.305	1.388	nd	14.452	12.059	0.650	6.756	-99.328	0.772	>10000	5.754	-100.376
AB185-ADL1-H10	H10	ADL1	4.710	0.162	3.963	nd	21.704	16.500	2.058	21.021	-98.789	3.036	>10000	9.194	-100.672
AB185-ADL1-H9	H9	ADL1	4.770	0.323	36.1	nd	9.679	8.659	1.337	14.441	-101.645	0.481	2.681	2.327	>10000
AB185-ADL1-H4	H4	ADL1	4.010	0.516	200	14.497	31.583	29.555	649.406	5337.399	-40.902	463.968	2575.18	728.583	>10000
AB185-ADL1-H6	H6	ADL1	6.090	3.952	400	nd	9.514	7.188	0.701	6.522	-101.275	0.219	1.336	0.978	>10000
AB185-ADL2-H1	H1	ADL2	3.200	355	400	11.671	72.619	33.667	114.194	697.273	-84.238	182.271	>10000	10.179	-83.666
AB185-ADL2-H11	H11	ADL2	2.600	235	400	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

nd = 未测定

3.5.2 ADC有效负载的Caco-2渗透性

[0770] 将Caco-2细胞在37℃、95%湿度、5% CO₂下在transwell 24孔盘中培养21天。通过TEER (经上皮电阻) 及荧光黄确认细胞单层的完整性。一式两份, 将10μM有效负载分别掺加于细胞单层的两侧上。通过紧接地在处理之后 (t=0) 及培育2小时之后自两个隔室取样等分试样来测定自顶部至底外侧 (A-B) 方向及自底外侧至顶部 (B-A) 方向的渗透速率。用含内标的有机溶剂使样品中的蛋白质沉淀并通过LC-MS/MS (SCIEX; API 5500) 分析。使用在两个方向上随时间推移的有效负载/内部标准物的面积比反应来生成渗透性 (cm/sec) 值。通过B-A/A-B相除来计算流出比。对照化合物的低渗透性及高渗透性以及流出表现正如预期。渗透性值报导于表12中。

3.5.3 ADC有效负载的化学稳定性

[0771] 在Mcilvane (柠檬酸盐-磷酸盐) 缓冲液pH 5.5 (波士顿生物制品公司 (Boston Bioproducts); #BB-2466) 中孵育有效负载, 最终浓度为20 μ M (低于储备溶液中的0.5% DMSO)。将荷伯希二烯剪接调节子溶液及内部标准物抽吸至入96孔盘中, 在UPLC (Waters Aquity H类) 上运作, 且分析初始层析信号 ($t=0$)。管柱为Waters UPLC HSS T3 1.8 μ m 2.1 $\times$ 50mm管柱 (编号186003538)。经1min采用95%至10%的移动相A梯度, 其中A为0.1%甲酸/水且移动相B为0.1%甲酸/乙腈 (流动速率0.9mL/min)。将荷伯希二烯剪接调节子溶液的剩余部分在37 $^{\circ}$ C下保持在盘摇动器 (Eppendorf ThermoMixer) 中。在37 $^{\circ}$ C下培育后24小时、72小时及96小时, 重复通过UPLC进行的样品分析。测定在以下三个时间点的有效负载和内标的面积比响应: 时间0、第1天、以及第3天或第4天。0时设定成100。比较稍后时间点与0时的面积比反应。剩余部分百分比计算如下: (第X天的面积比/0时的面积比) $\times$ 100 = 剩余部分%。在比较剩余部分%的对数与时间点的Excel中计算直线斜率。在Excel中通过 $\ln(2)$ /斜率计算半衰期且报导于表12中。

实例4

[0772] 如下文所描述评估示例性有效负载化合物。

4.1体外分析

4.1.1细胞活力

[0773] 在经HER2放大的HCC1954乳癌细胞及NCI-N87胃癌细胞中测定示例性有效负载化合物的细胞活力剂量反应。

[0774] 将HCC1954 (美国菌种中心 (ATCC)) 乳房导管癌细胞或NCI-N87 (ATCC) 胃癌细胞以500个细胞/孔涂铺于平底384孔组织培养盘 (Corning) 中的补充有10%胎牛血清的30 μ L总体积的组织培养基 (ThermoFisher Scientific) 中。用10000nM至0.01nM的4倍连续稀释的化合物处理细胞。一式三份测试各浓度。在处理时, 根据制造商建议 (Promega; 编号G9241) 使用CellTiter-Glo $^{\circ}$ 2.0发光细胞活力分析评估具有未经处理的细胞的盘。将CellTiter-Glo $^{\circ}$ 2.0试剂添加至培养基中, 培育且在EnVision多标记读取器 (PerkinElmer) 上进行分析。值表示零时 (T_0)。还使用CellTiter-Glo $^{\circ}$ 2.0发光细胞活力分析测定72小时 (T_{72}) 或144小时 (T_{144}) 化合物处理之后的活细胞的数目。使用零时 (T_0) 的发光值、DMSO对照生长 (C) 及在化合物存在的情况下的测试生长 (T_{72} 或 T_{144}), 计算在化合物浓度水平中的各者下的生长百分比。生长抑制百分比计算如下 (例如): 对于 $T_{144} > T_0$ 的浓度, $[(T_{144} - T_0) / (C - T_0)] \times 100$; 或对于 $T_{144} < T_0$ 的浓度, $[(T_{144} - T_0) / T_0] \times 100$ 。使用Prism 8 (Graphpad) 生成剂量反应曲线图且使用非线性回归分析及log (抑制剂) 相对于反应一可变斜率 (四个参数) 进行拟合。

[0775] 图1A-1D显示经HER2放大的乳癌细胞 (HCC1954) 及胃癌细胞 (NCI-N87) 中的示例性有效负载化合物的活力剂量反应。图1A显示在72小时培育之后HCC1954细胞中的活力剂量反应。图1B显示在72小时培育之后NCI-N87细胞中的活力剂量反应。图1C显示在144小时培育之后HCC1954细胞中的活力剂量反应。图1D显示在144小时培育之后NCI-N87细胞中的活力剂量反应。表14显示所有所测试的化合物的GI50、LD50及Rmin值。

4.1.2细胞内剪接PD分析

[0776] 还在经增加浓度的示例性有效负载化合物治疗的HCC1954细胞及NCI-N87细胞中检验SLC25A19成熟转录物的剪接。

[0777] 将HCC1954细胞或NCI-N87细胞(ATCC)以1000个细胞/孔涂铺于RPMI+10% FBS培养基(ATCC)中,每孔20 μ L。在4倍稀释剂量-反应中用化合物治疗细胞。6小时之后,对细胞进行PBS洗涤,且用含有25 μ L/mL RNAsin(Promega)的30 μ L CL缓冲液(IgePal CA-630、5M NaCl、于水中的1M Tris HCl 1M pH 7.4)进行溶解,且在RT下在振荡器上培育20min。根据制造商的建议,使用所得混合物(1 μ L)评估Taqman快速病毒1步主混合物(应用生物系统公司)逆转录PCR反应中的剪接调节,该反应使用以下Taqman引物:SLC25A19(英杰公司,Hs00222265_m1);RPLP0(英杰公司,Hs99999902_m1)。

[0778] 图2A及图2B显示经HER2放大的乳癌细胞(HCC1954)(图2A)及胃癌细胞(NCI-N87)(图2B)中的剪接分析的结果。表14显示所有所测试的化合物的IC50值。

表14. 示例性荷伯希二烯剪接调节子有效负载的表征。

化合物	HCC1954										NCI-N87									
	CTG 72h GI50 (nM)	CTG 72h LD50 (nM)	CTG 72h Rmin (%)	CTG 144h GI50 (nM)	CTG 144h LD50 (nM)	CTG 144h Rmin (%)	剪接 IC50 (nM)	CTG 72h GI50 (nM)	CTG 72h LD50 (nM)	CTG 72h Rmin (%)	CTG 144h GI50 (nM)	CTG 144h LD50 (nM)	CTG 144h Rmin (%)	剪接 IC50 (nM)	CTG 72h GI50 (nM)	CTG 72h LD50 (nM)	CTG 72h Rmin (%)	CTG 144h GI50 (nM)	CTG 144h LD50 (nM)	CTG 144h Rmin (%)
H17	138.654	10000	-48.872	125.718	275.218	-96.54	135.1	46.97	10000	-15.164	81.28	912.895	-65.458	113.6	5102.126	10000	29.113	10000	10000	10000
H22	624.477	10000	-20.785	435.9	1606.048	-88.195	1679	299.847	10000	-12.297	313.328	3937.618	-60.543	463.6	5102.126	10000	29.113	10000	10000	10000
H20	40.416	10000	-44.802	36.417	98.861	-94.301	51.44	29.413	10000	-62.676	21.01	532.734	-94.539	156.23	5102.126	10000	29.113	10000	10000	10000
H13	189.939	10000	-54.164	209.534	690.614	-97.151	319.7	53.935	10000	-15.164	114.882	2784.969	-80.613	108.3	5102.126	10000	29.113	10000	10000	10000
H14	626.028	10000	-42.359	681.616	2055.923	-95.522	1346	415.335	10000	-2.467	729.758	7944.263	-63.41	961.8	5102.126	10000	29.113	10000	10000	10000
H21	81.436	10000	-54.164	50.008	127.893	-97.761	157.4	35.451	10000	-7.791	40.936	654.736	-86.347	87.47	5102.126	10000	29.113	10000	10000	10000
H16	11.844	10000	-65.968	8.985	22.316	-98.779	16.7	6.758	10000	-21.717	3.624	98.186	-86.757	8.552	5102.126	10000	29.113	10000	10000	10000
H15	18.051	10000	-44.191	11.718	31.77	-95.522	37.06	6.002	10000	-18.031	3.499	106.186	-82.661	15.41	5102.126	10000	29.113	10000	10000	10000
H19	8989.184	10000	32.813	7928.26	10000	27.17	10000	10000	10000	44.396	3256.803	10000	17.442	10000	5102.126	10000	29.113	10000	10000	10000

在10000下的值高于最大剂量(>10 μ M)。

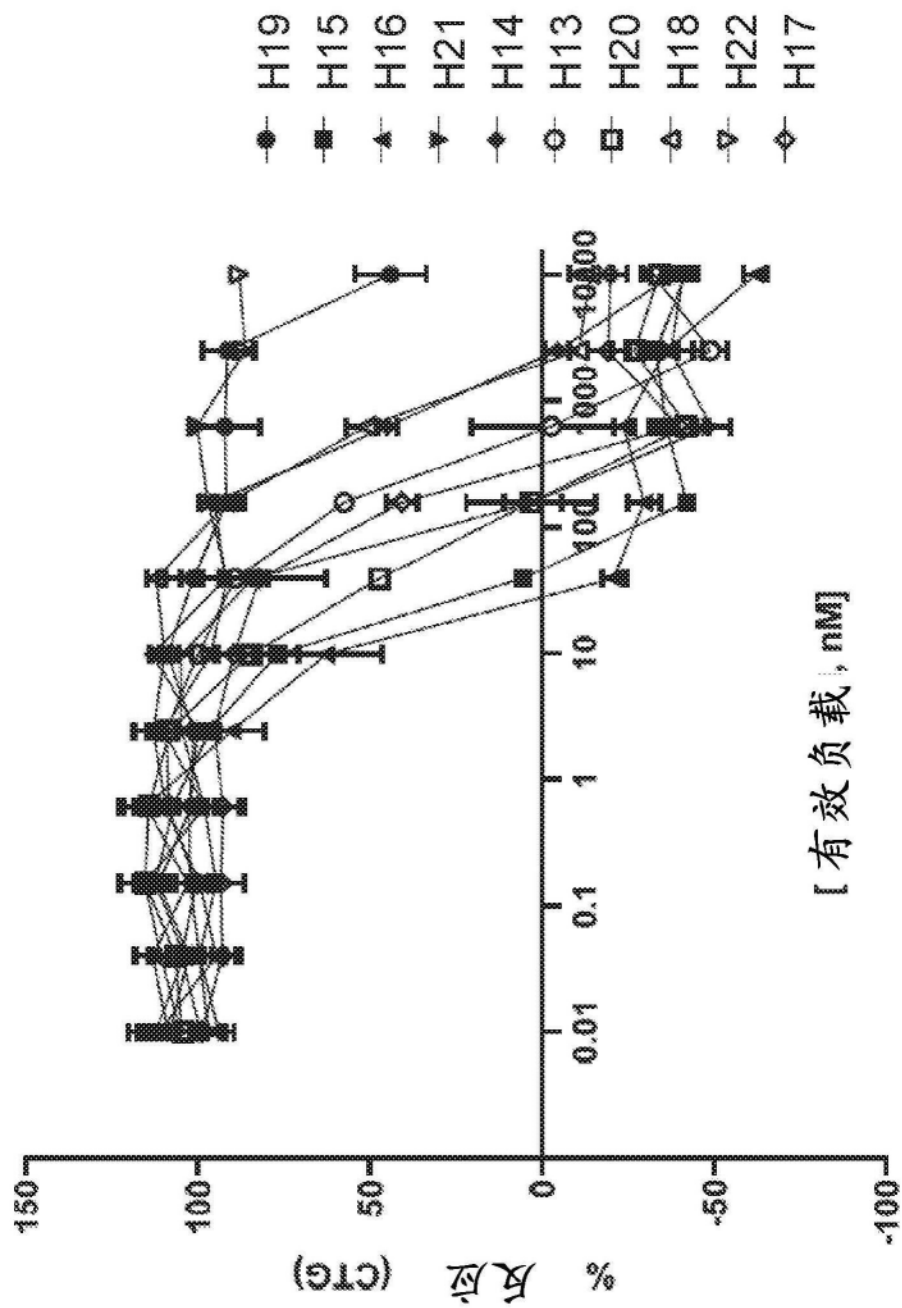


图1A

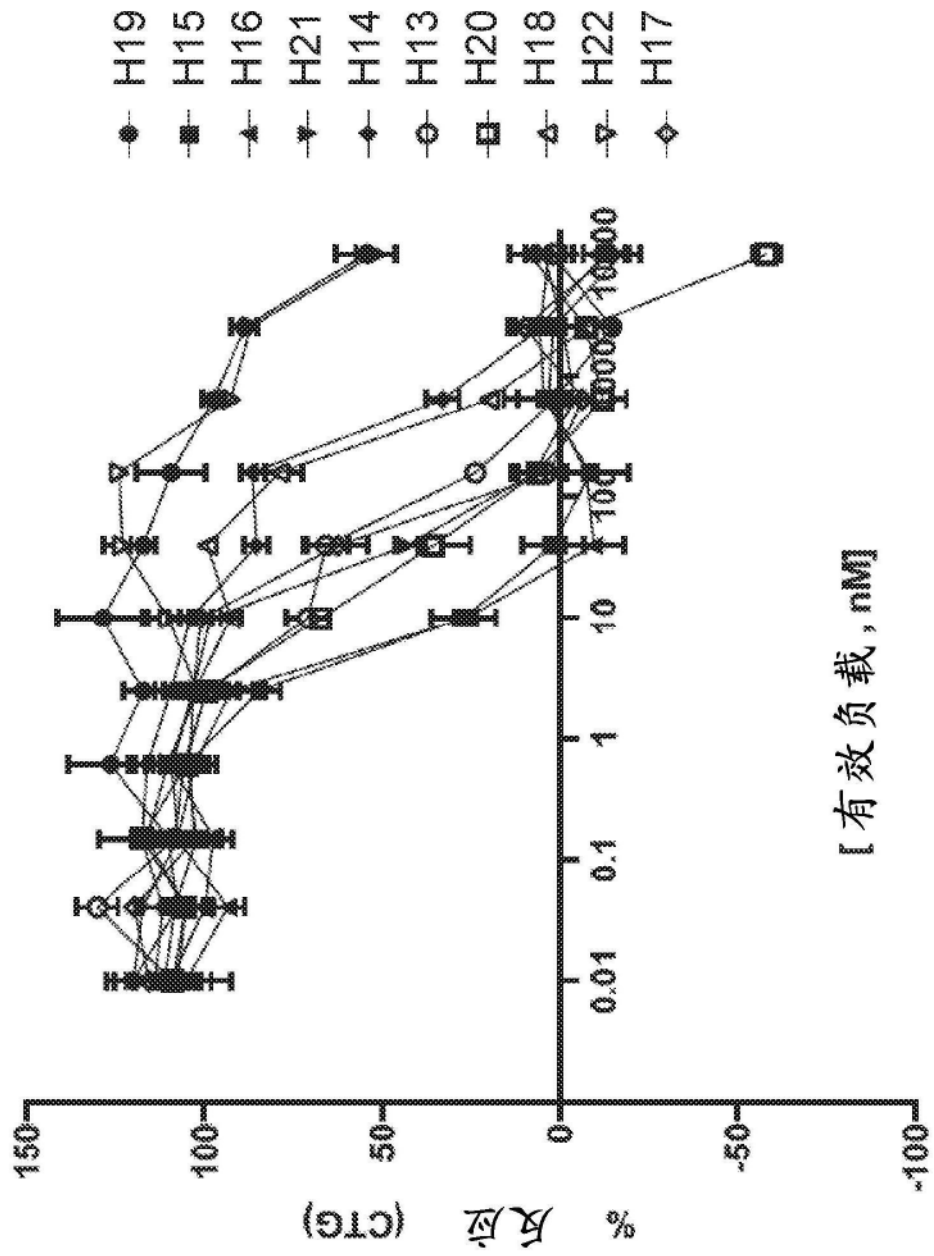


图1B

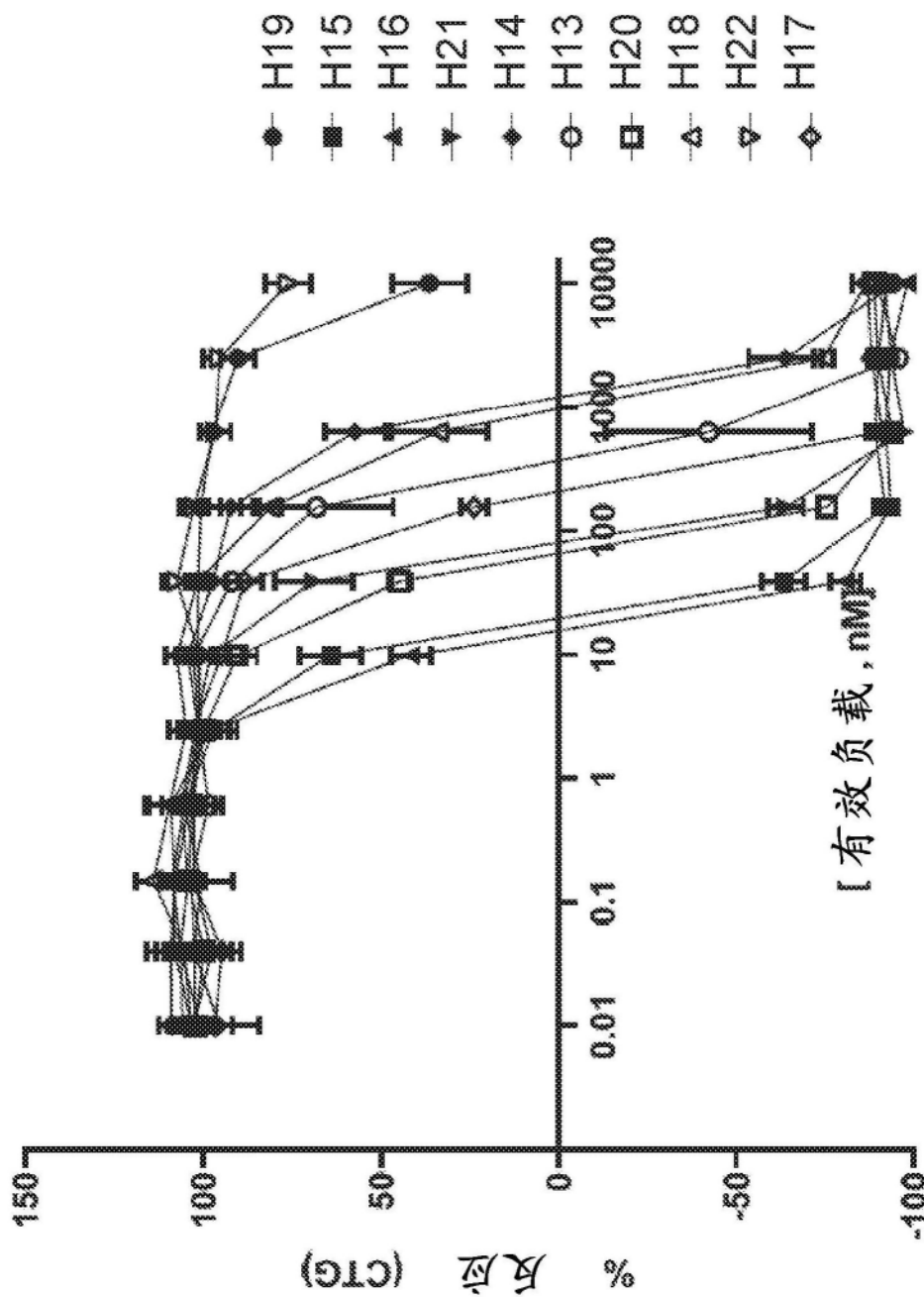


图1C

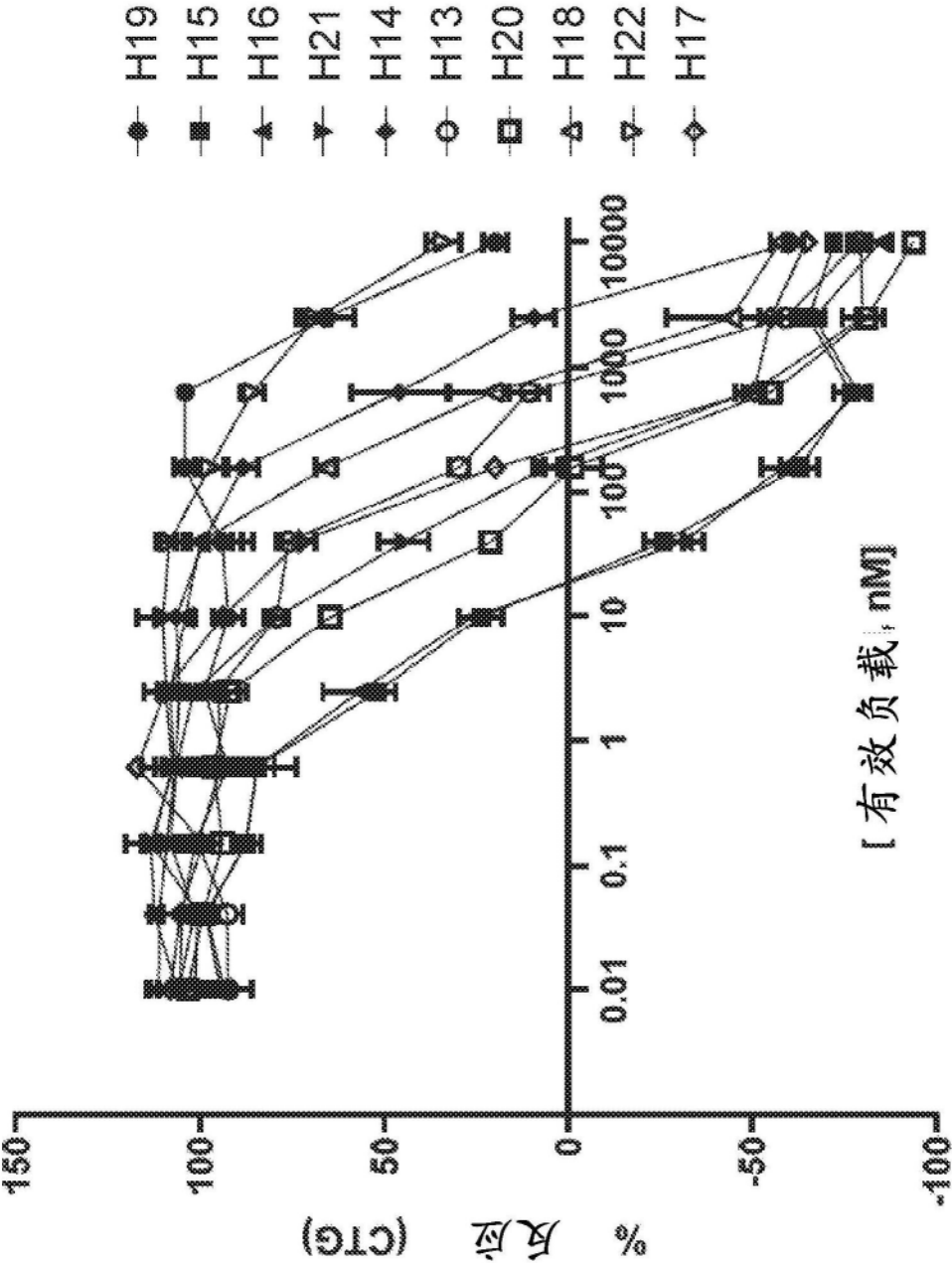


图1D

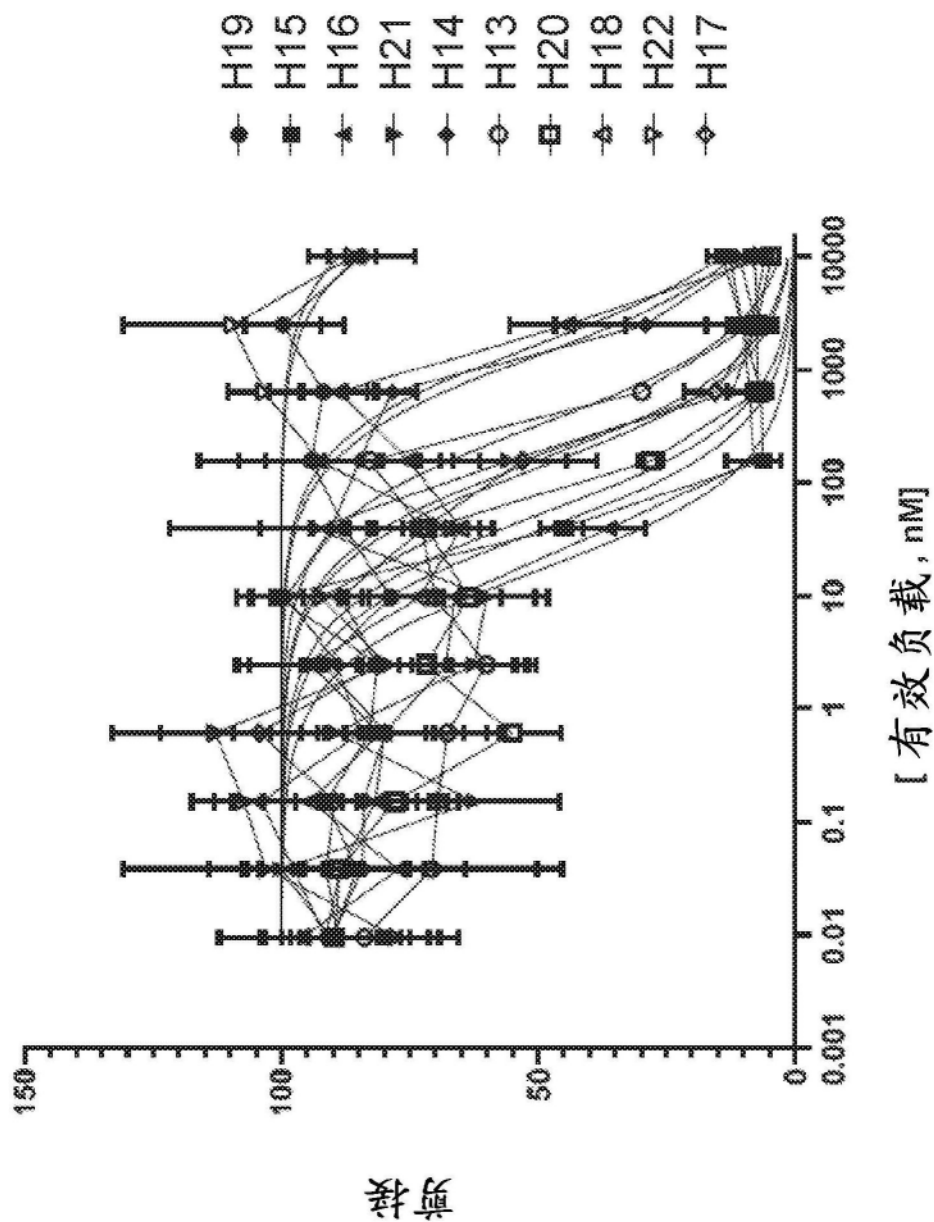


图2A

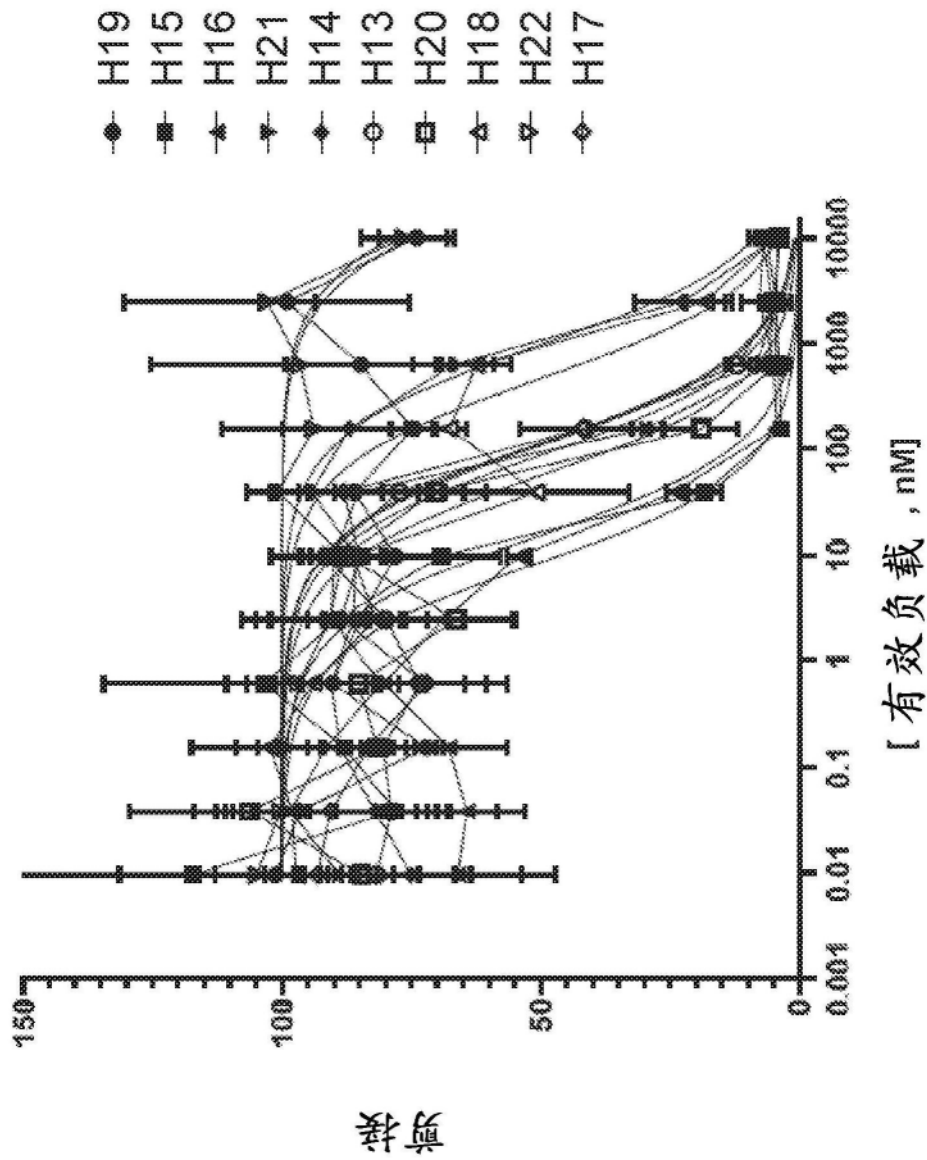


图2B