202519520

(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本 (11)公開編號：TW 202519520 A

(43)公開日： 中華民國 114 (2025) 年 05 月 16 日

(21)申請案號：114103019 (22)申請日： 中華民國 108 (2019) 年 05 月 31 日

(51)Int. Cl.： *C07D405/12 (2006.01)* *A61K31/496 (2006.01)*
*A61K47/68 (2017.01)* *A61P35/00 (2006.01)*

(30)優先權：2018/06/01 美國 62/679,672
2018/06/01 美國 62/679,631
2018/12/13 美國 62/779,324

(71)申請人：日商衛材Ｒ＆Ｄ企管股份有限公司 (日本) EISAI R&D MANAGEMENT CO., LTD. (JP)
日本

(72)發明人：帕羅里　艾蜜拉 PAZOLLI, ERMIRA (US)；波納米希　希爾維亞 BUONAMICI, SILVIA (IT)；薩馬拉孔　茲瓦卡 SAMARAKOON, THIWANKA (LK)；普瑞札趴提　蘇迪普 PRAJAPATI, SUDEEP (NP)；費許金　納森 FISHKIN, NATHAN (US)；帕拉西諾　詹姆士 PALACINO, JAMES (US)；賽勒　米雪兒 SEILER, MICHAEL (US)；朱平 ZHU, PING (CN)；庫克　安德魯 COOK, ANDREW (US)；史密斯　彼得 SMITH, PETER (GB)；劉項 LIU, XIANG (CN)；艾雷里　旭比 ELLERY, SHELBY (US)；雷諾　多明尼克 REYNOLDS, DOMINIC (GB)；游　麗華 YU, LIHUA (US)；吳　振華 WU, ZHENHUA (US)；彭　壽永 PENG, SHOUYONG (US)；卡蘭德拉　尼可拉斯 CALANDRA, NICHOLAS (US)；希恩　瑪格 SHEEHAN, MEGAN (US)；蕭　勇宏 XIAO, YONGHONG (US)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：有　申請專利範圍項數：20 項　圖式數：25　　共 533 頁

(54)名稱

剪接調節抗體-藥物結合物及其使用方法

(57)摘要

本發明揭示結合至人類腫瘤目標之連接子-藥物化合物及抗體-藥物結合物。該等連接子-藥物化合物及抗體-藥物結合物包含剪接調節劑藥物部分。本發明進一步係關於藉由投與本文所提供之抗體-藥物結合物用於治療贅生性病症之方法及組合物。

Linker-drug compounds and antibody-drug conjugates that bind to human oncology targets are disclosed. The linker-drug compounds and antibody-drug conjugates comprise a splicing modulator drug moiety. The disclosure further relates to methods and compositions for use in the treatment of neoplastic disorders by administering the antibody-drug conjugates provided herein.

202519450
202519450
專利案號：114103019
原申請案號：108118955

# 【發明摘要】

【中文發明名稱】

剪接調節抗體-藥物結合物及其使用方法

【英文發明名稱】

SPLICING MODULATOR ANTIBODY-DRUG CONJUGATES AND METHODS OF USE

【中文】

本發明揭示結合至人類腫瘤目標之連接子-藥物化合物及抗體-藥物結合物。該等連接子-藥物化合物及抗體-藥物結合物包含剪接調節劑藥物部分。本發明進一步係關於藉由投與本文所提供之抗體-藥物結合物用於治療贅生性病症之方法及組合物。

【英文】

Linker-drug compounds and antibody-drug conjugates that bind to human oncology targets are disclosed. The linker-drug compounds and antibody-drug conjugates comprise a splicing modulator drug moiety. The disclosure further relates to methods and compositions for use in the treatment of neoplastic disorders by administering the antibody-drug conjugates provided herein.

【指定代表圖】

無

【代表圖之符號簡單說明】

無

# 【發明說明書】

【中文發明名稱】

剪接調節抗體-藥物結合物及其使用方法

【英文發明名稱】

SPLICING MODULATOR ANTIBODY-DRUG CONJUGATES AND METHODS OF USE

【技術領域】

【0001】 本發明係關於抗體-藥物結合物(ADC)，其包含剪接調節劑及結合人類腫瘤抗原目標之抗體或其抗原結合片段。本發明進一步係關於可用於治療或診斷表現目標抗原及/或適合於藉由破壞 RNA 剪接治療之癌症的方法及組合物，以及製備該等組合物之方法。

【先前技術】

【0002】 人類基因組中之大部分蛋白質編碼基因係由以內含子(非編碼區域)隔開之多個外顯子(編碼區)構成。基因表現產生單一前驅信使 RNA(pre-mRNA)。隨後，藉由稱為剪接之方法自 pre-mRNA 移除內含子序列，產生成熟信使 RNA(mRNA)。藉由包括不同外顯子組合，選擇性剪接產生編碼不同蛋白質同功異型物之 mRNA。

【0003】 RNA 剪接係由剪接體催化，剪接體係由五個小核 RNA(snRNA U1、U2、U4、U5 及 U6)及相關聯蛋白質構成的動態多蛋白質-RNA 複合體。該剪接體組裝於 pre-mRNA 上以建立催化內含子之切除及外顯子之連接的多種 RNA 及蛋白質相互作用之動態級聯(Matera 及 Wang (2014) Nat Rev Mol Cell Biol. 15(2):108-21)。越來越多的證據已將人類疾病與影響許多基因之 RNA 剪接失調相關聯(Scotti 及 Swanson

(2016) Nat Rev Genet. 17(1):19-32)。

【0004】 剪接體係癌症生物學中之重要目標。若干研究現已證明癌細胞剪接譜以及剪接因子本身之顯著變化(Agrawal 等人(2018) Curr Opin Genet Dev. 48:67-74)。選擇性剪接會引起不同的外顯子包含/排除、內含子保留或隱蔽剪接位點之使用(Seiler 等人(2018) Cell Rep. 23(1):282-296)。總而言之，此等事件造成功能變化，而功能變化可引起腫瘤發生或對療法之抗性(Siegfried 及 Karni (2018) Curr Opin Genet Dev. 48:16-21)。

【0005】 某些天然產物可以結合 SF3b 剪接體複合體。此等小分子藉由促進內含子保留及/或外顯子跳躍來調節剪接(Teng 等人(2017) Nat Commun. 8:15522)。由此得到的轉錄物中有相當大一部分含有提前終止密碼子，由此觸發無義介導之 mRNA 衰減(NMD)。另外，由於典型剪接受損，使得典型轉錄物大幅減少，由此可能不利地影響細胞功能及活力。出於此原因，剪接調節劑變為治療癌症的一類頗具前景之藥物(Puthenveetil 等人(2016) Bioconjugate Chem. 27:1880-8)。

【0006】 原癌基因人類表皮生長因子受體 2(*HER2*)編碼跨膜酪胺酸激酶受體，該受體屬於人類表皮生長因子受體(EGFR)家族(King 等人(1985) Science 229:974-6)。HER2 之過度表現能夠組成性活化生長因子信號傳導路徑，諸如 PI3K-AKT-mTOR 路徑，並由此用作包括約 20%之侵襲性乳房癌瘤在內之若干類型癌症的致癌驅動因素(Slamon 等人(1989) Science 244:707-12 ; Gajria 及 Chandarlapaty (2011) Expert Rev Anticancer Ther. 11:263-75)。鑒於 HER2 擴增介導轉化之表型，且由於 HER2 表現主要侷限於惡性細胞，故 HER2 成為靶向某些癌症及/或遞送

新穎癌症治療的一種頗具前景之抗原(Parakh 等人(2017) Cancer Treat Rev. 59:1-21)。靶向遞送癌症療法之額外抗原包括(但不限於)CD138(又稱為多配體蛋白聚糖-1)及蝶素 A 型受體 2(EPHA2)。

【0007】 CD138 係一種細胞表面硫酸乙醯肝素蛋白聚糖，其係維持細胞形態及與周圍微環境相互作用必不可少的(Akl 等人(2015) Oncotarget 6(30):28693-715 ； Szatmári 等人(2015) Dis Markers 2015:796052)。一般而言，癌細胞中 CD138 表現之損失使得細胞對細胞外基質之黏附減少並使細胞活動性及侵襲增加(Teng 等人(2012) Matrix Biol. 31:3-16)。增加基質 CD138 表現亦改變纖維結合蛋白之產生及細胞外基質之組織(Yang 等人(2011) Am J Pathol. 178:325-35)。另外，增加基質纖維母細胞中 CD138 之表現與血管生成及癌症進展相關(Maeda 等人(2006) Oncogene 25:1408-12)。在 B 細胞發育期間，CD138 表現增加，且其存在係漿細胞之標誌(Ribatti (2017) Immunol Lett. 188:64-7)。CD138 表現在多發性骨髓瘤(一種漿細胞惡性疾病)中得以維持。因此，CD138 係靶向治療若干癌症及其他血液惡性病的引人注目之抗原(Sherbenou 等人(2015) Blood Rev. 29(2):81-91 ； Wijdenes 等人(1996) Br J Haematol. 94(2):318-23)。

【0008】 EPHA2 係在若干惡性癌症源性細胞株及晚期形式之癌症中大量過度表現的一種跨膜醣蛋白(Wykosky 及 Debinski (2008) Mol Cancer Ref. 6(12):1795-1806)。舉例而言，EPHA2 在約 61%之 GBM 患者腫瘤(Wykosky 等人(2008)Clin Cancer Res.14:199-208)、76%之卵巢癌(Thaker 等人(2004)Clin Cancer Res.10:5145-50)及 85%之前列腺腺癌(Zeng 等人(2003)Am J Pathol.163:2271-6)中大量過度表現。就患者腫瘤

之百分比及腫瘤內細胞之百分比而言，EPHA2 蛋白質高度過度表現，且為可在配體結合時內化的質膜定位之受體(Walker-Daniels 等人(2002) Mol Cancer Res. 1:79-87)。另外，EPHA2 之表現與預後不良、轉移增加及存活率降低相關。因此，EPHA2 因其表現模式、定位及在癌症患者之結果中的功能重要性而成為靶向遞送新穎抗癌療法的另一引人注目之抗原。

【發明內容】

【0009】 在各種實施例中，本發明部分地提供針對贅生性細胞具有生物活性之新穎化合物。該等化合物可減慢、抑制及/或逆轉哺乳動物中之腫瘤生長，且可用於治療人類癌症患者。在各種實施例中，本發明提供採用該等新穎化合物或其他功能性剪接抑制劑分子之新穎抗體-藥物結合物。

【0010】 更具體言之，在各種實施例中，本發明係關於能夠結合並殺滅贅生性細胞之抗體-藥物結合物(ADC)複合物。在各種實施例中，本文所揭示之 ADC 複合物包含將剪接調節劑連接至全長抗體或抗原結合片段之連接子。在各種實施例中，該等 ADC 複合物亦能夠在結合之後內化至目標細胞中。

【0011】 在各種實施例中，ADC 複合物可由式(I)表示：

$Ab\text{-}(L\text{-}D)_p$ (I)

其中 Ab 係靶向贅生性細胞或另一腫瘤相關目標之抗體或其抗原結合片段；

D 係剪接調節劑；

L 係將 Ab 共價連接至 D 之連接子；且

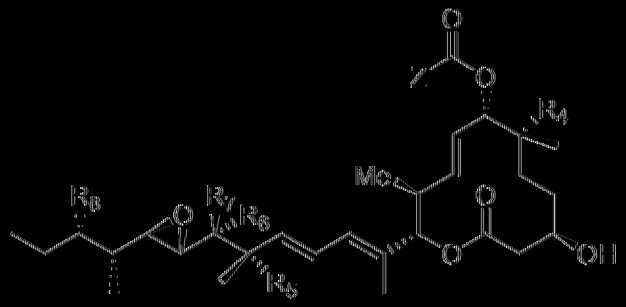
$p$ 係 1 至 15 之整數。

[0012] 在各種實施例中，ADC 複合物可由式(I)表示：

$Ab-(L-D)_p$ (I)

其中 Ab 係靶向資生性細胞之抗體或其抗原結合片段；

D 係式(II)之剪接調節劑：



(II)，或其醫藥學上可接受之鹽，其中：

$R^1$ 係選自不存在、氫、$C_1$-$C_6$ 烷基、$C_1$-$C_6$ 烷基烷氧基、$C_1$-$C_6$ 烷基胺基、$C_1$-$C_6$ 烷基羧酸基團、$C_1$-$C_6$ 烷基羥基、$C_3$-$C_8$ 環烷基、苯甲基、$C_3$-$C_8$ 雜環基、-O-C(=O)-($C_1$-$C_6$ 烷基)基團及 $CD_3$；

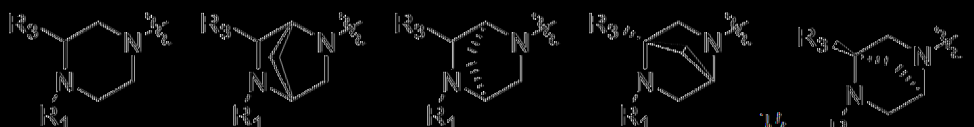
$R^3$ 係選自氫、$C_1$-$C_6$ 烷基、$C_1$-$C_6$ 烷基烷氧基、$C_1$-$C_6$ 烷基胺基、$C_1$-$C_6$ 烷基羧酸基團、$C_1$-$C_6$ 烷基羥基、$C_3$-$C_8$ 環烷基、苯甲基、$C_3$-$C_8$ 雜環基及 -O-C(=O)-($C_1$-$C_6$ 烷基)基團；且

$R^4$、$R^5$ 及 $R^8$ 各自獨立地選自氫、羥基、-O-($C_1$-$C_6$ 烷基)基團、-O-C(=O)-($C_1$-$C_6$ 烷基)基團及 $C_1$-$C_6$ 烷基；

$R^6$ 及 $R^7$ 各自獨立地選自氫、-O-$R^{17}$、-O-C(=O)-$R^{17}$、-O-C(=O)-$NR^{15}R^{16}$、$C_1$-$C_6$ 烷基及 $NR^{15}R^{16}$；

$R^{15}$ 及 $R^{16}$ 各自獨立地選自氫、$R^{17}$、-C(=O)-$R^{17}$ 及 -C(=O)-O-$R^{17}$；

$R^{17}$ 係選自氫、$C_1$-$C_6$ 烷基、$C_3$-$C_8$ 環烷基、苯甲基及 $C_3$-$C_8$ 雜環基；且

Z 係選自  ；

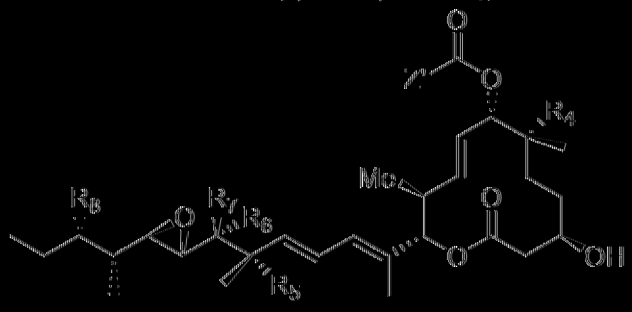
其中 $R^1$、$R^3$、$R^4$、$R^5$、$R^6$、$R^7$、$R^8$、$R^{15}$、$R^{16}$ 及 $R^{17}$ 各自獨立地經 0 至 3 個獨立地選自以下之基團取代：鹵素、羥基、$C_1$-$C_6$ 烷基、-O-($C_1$-$C_6$ 烷基)基團、$-NR^{15}R^{16}$、$C_3$-$C_8$ 環烷基、$C_1$-$C_6$ 烷基羥基、$C_1$-$C_6$ 烷基烷氧基、苯甲基及 $C_3$-$C_8$ 雜環基，

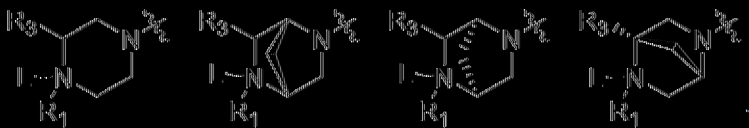
其中 $R^6$ 及 $R^7$ 中至少一個係氫；

且其中 L 係將 Ab 共價連接至 D 之連接子；且

*p* 係 1 至 15 之整數。

[0013] 在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段能夠內化至目標細胞中。在一些實施例中，該連接子共價連接至式(II)之剪接調節劑(「L-$D_1$」)，且 L-D 具有式(II-A)之結構：

 (II-A)，或其醫藥學上可接受之鹽，

其中 Z' 係選自  ；且

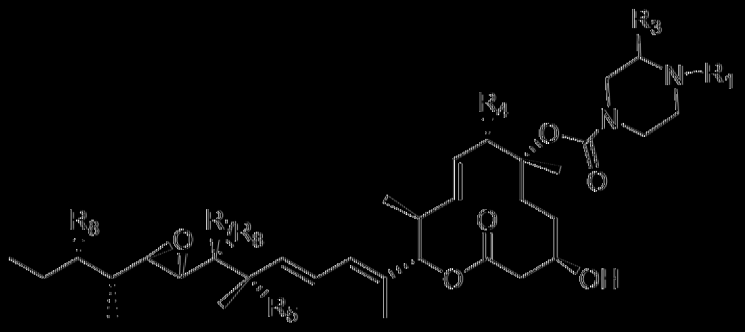
其中所有其他變數係如關於式(II)所定義。

[0014] 在各種其他實施例中，ADC 複合物可由式(I)表示：

$Ab-(L-D)_p$ (I)

其中 Ab 係靶向資生性細胞之抗體或其抗原結合片段；

D 係式(IV)之剪接調節劑：



(IV)，或其醫藥學上可接受之鹽，其中：

$R^1$ 係選自氫、$C_1$-$C_6$ 烷基、$C_1$-$C_6$ 烷基烷氧基、$C_1$-$C_6$ 烷基胺基、$C_1$-$C_6$ 烷基羧酸基團、$C_1$-$C_6$ 烷基羥基、$C_3$-$C_8$ 環烷基、苯甲基、$C_3$-$C_8$ 雜環基、-O-C(=O)-($C_1$-$C_6$ 烷基)基團及 $CD_3$；

$R^3$ 係選自氫、$C_1$-$C_6$ 烷基、$C_1$-$C_6$ 烷基烷氧基、$C_1$-$C_6$ 烷基胺基、$C_1$-$C_6$ 烷基羧酸基團、$C_1$-$C_6$ 烷基羥基、$C_3$-$C_8$ 環烷基、苯甲基、$C_3$-$C_8$ 雜環基及 -O-C(=O)-($C_1$-$C_6$ 烷基)基團；且

$R^4$、$R^5$ 及 $R^8$ 各自獨立地選自氫、羥基、-O-($C_1$-$C_6$ 烷基)基團、-O-C(=O)-($C_1$-$C_6$ 烷基)基團及 $C_1$-$C_6$ 烷基；

$R^6$ 及 $R^7$ 各自獨立地選自氫、-O-$R^{17}$、-O-C(=O)-$R^{17}$、-O-C(=O)-$NR^{15}R^{16}$、$C_1$-$C_6$ 烷基及 $NR^{15}R^{16}$；

$R^{15}$ 及 $R^{16}$ 各自獨立地選自氫、$R^{17}$、-C(=O)-$R^{17}$ 及 -C(=O)-O-$R^{17}$；且

$R^{17}$ 係選自氫、$C_1$-$C_6$ 烷基、$C_3$-$C_8$ 環烷基、苯甲基及 $C_3$-$C_8$ 雜環基；

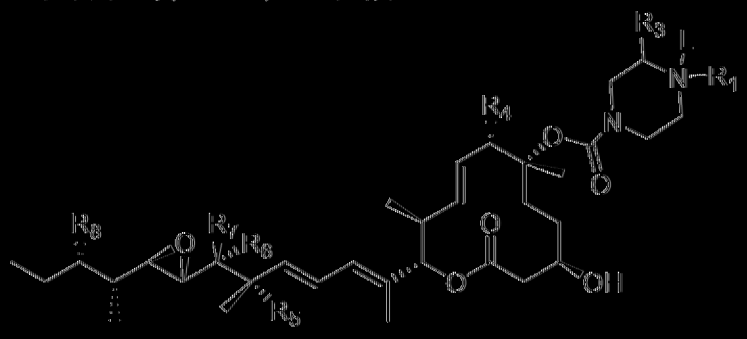
其中 $R^1$、$R^3$、$R^4$、$R^5$、$R^6$、$R^7$、$R^8$、$R^{15}$、$R^{16}$ 及 $R^{17}$ 各自獨立地經 0 至 3 個獨立地選自以下之基團取代：鹵素、羥基、$C_1$-$C_6$ 烷基、-O-($C_1$-$C_6$ 烷基)基團、$NR^{15}R^{16}$、$C_3$-$C_8$ 環烷基、$C_1$-$C_6$ 烷基羥基、$C_1$-$C_6$ 烷基烷氧基、苯甲基及 $C_3$-$C_8$ 雜環基，

其中 $R^6$ 及 $R^7$ 中至少一個係氟；

且其中 L 係將 Ab 共價連接至 D 之連接子；且

$p$ 係 1 至 15 之整數。

[0015] 在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段能夠內化至目標細胞中。在一些實施例中，該連接子共價連接至剪接調節劑(「L-D」)，且 L-D 具有式(IV-A)之結構：



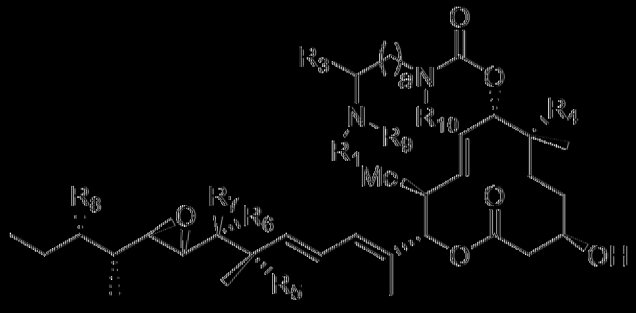
(IV-A)，或其醫藥學上可接受之鹽。

[0016] 在各種其他實施例中，ADC 複合物可由式(I)表示：

$Ab-(L-D)_p$ (I)

其中 Ab 係靶向資生性細胞之抗體或其抗原結合片段；

D 係式(VI)之剪接調節劑：



(VI)，或其醫藥學上可接受之鹽，其中：

$R^1$ 及 $R^9$ 各自獨立地選自氫、$C_1$-$C_6$ 烷基、$C_1$-$C_6$ 烷基烷氧基、$C_1$-$C_6$ 烷基胺基、$C_1$-$C_6$ 烷基羧酸基團、$C_1$-$C_6$ 烷基醇基、$C_3$-$C_8$ 環烷基、苯甲基、$C_3$-$C_8$ 雜環基、-O-C(=O)-($C_1$-$C_6$ 烷基)基團及 $CD_3$；

$R^3$ 係選自氫、$C_1$-$C_6$ 烷基、$C_1$-$C_6$ 烷基烷氧基、$C_1$-$C_6$ 烷基胺基、$C_1$-$C_6$ 烷基羧酸基團、$C_1$-$C_6$ 烷基羥基、$C_3$-$C_8$ 環烷基、苯甲基、$C_3$-$C_8$ 雜環基及-O-C(=O)-($C_1$-$C_6$ 烷基)基團；

$R^4$、$R^5$ 及 $R^8$ 各自獨立地選自氫、羥基、-O-($C_1$-$C_6$ 烷基)基團、-O-C(=O)-($C_1$-$C_6$ 烷基)基團及 $C_1$-$C_6$ 烷基；

$R^6$ 及 $R^7$ 各自獨立地選自氫、-O-$R^{17}$、-O-C(=O)-$R^{17}$、-O-C(=O)-$NR^{15}R^{16}$、$C_1$-$C_6$ 烷基、-$NR^{15}R^{16}$ 及連接子；

$R^{10}$ 係選自氫、$C_1$-$C_6$ 烷基、-C(=O)-($C_1$-$C_6$ 烷基)基團及-$CD_3$；

$R^{15}$ 及 $R^{16}$ 各自獨立地選自氫、$R^{17}$、-C(=O)-$R^1$ 及-C(=O)-O-$R^{17}$；

$R^{17}$ 係選自氫、$C_1$-$C_6$ 烷基、$C_3$-$C_8$ 環烷基、苯甲基及 $C_3$-$C_8$ 雜環基；且

a 係 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10；

其中 $R^1$、$R^3$、$R^4$、$R^5$、$R^6$、$R^7$、$R^8$、$R^9$、$R^{10}$、$R^{15}$、$R^{16}$ 及 $R^{17}$ 各自獨立地經 0 至 3 個獨立地選自以下之基團取代：鹵素、羥基、$C_1$-$C_6$ 烷基、-O-($C_1$-$C_6$ 烷基)基團、-$NR^{15}R^{16}$、$C_3$-$C_8$ 環烷基、$C_1$-$C_6$ 烷基羥基、$C_1$-$C_6$ 烷基烷氧基、苯甲基及 $C_3$-$C_8$ 雜環基；

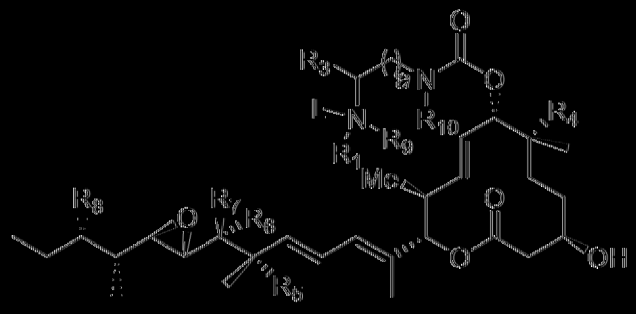
其中 $R^6$ 及 $R^7$ 中至少一個係氫；且

其中 $R^1$ 及 $R^9$ 不能皆不存在；

且其中 L 係將 Ab 共價連接至 D 之連接子；且

*p* 係 1 至 15 之整數。

【0017】 在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段能夠內化至目標細胞中。在一些實施例中，該連接子共價連接至剪接調節劑(「L-D」)，且 L-D 具有式(VI-A)之結構：



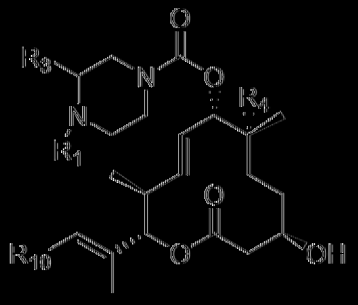
(VI-A)，或其醫藥學上可接受之鹽。

[0018] 在各種其他實施例中，ADC 複合物可由式(I)表示：

$Ab-(L-D)_p$ (I)

其中 Ab 係靶向賀伯性細胞之抗體或其抗原結合片段；

D 係式(VIII)之勇接調節劑：



(VIII)，或其醫藥學上可接受之鹽，其中：

$R^1$ 係選自不存在、氫、$C_1$-$C_6$ 烷基、$C_1$-$C_6$ 烷基烷氧基、$C_1$-$C_6$ 烷基胺基、$C_1$-$C_6$ 烷基羧酸基團、$C_1$-$C_6$ 烷基羥基、$C_3$-$C_8$ 環烷基、苯甲基、$C_3$-$C_8$ 雜環基、-O-C(=O)-($C_1$-$C_6$烷基)基團及 $CD_3$；

$R^3$ 係選自氫、$C_1$-$C_6$ 烷基、$C_1$-$C_6$ 烷基烷氧基、$C_1$-$C_6$ 烷基胺基、$C_1$-$C_6$ 烷基羧酸基團、$C_1$-$C_6$ 烷基羥基、$C_3$-$C_8$ 環烷基、苯甲基、$C_3$-$C_8$ 雜環基及 -O-C(=O)-($C_1$-$C_6$烷基)基團；

$R^4$ 係選自氫、羥基、-O-($C_1$-$C_6$ 烷基)基團、-O-C(=O)-($C_1$-$C_6$ 烷基)基團及 $C_1$-$C_6$烷基；且

$R^{10}$係選自 3 至 10 員碳環及 3 至 10 員雜環，其各自經 0 至 3 個 $R^a$ 取代，其中各 $R^a$ 獨立地選自鹵素、$C_1$-$C_6$ 烷基、-O-($C_1$-$C_6$)烷基、$C_1$-$C_6$

烷基烷氧基、$C_1$-$C_6$烷基羥基、-S(=O)$_w$-(4至7員雜環)、4至7員碳環及4至7員雜環；

$R^{15}$及$R^{16}$各自獨立地選自氫、$R^{17}$、-C(=O)-$R^{17}$及-C(=O)-O-$R^{17}$；且

$R^{17}$係選自氫、$C_1$-$C_6$烷基、$C_3$-$C_8$環烷基、苯甲基及$C_3$-$C_8$雜環基；

其中$R^1$、$R^3$、$R^4$、$R^{10}$、$R^{15}$、$R^{16}$及$R^{17}$各自獨立地經0至3個獨立地選自以下之基團取代：鹵素、羥基、$C_1$-$C_6$烷基、-O-($C_1$-$C_6$烷基)基團、-N$R^{15}R^{16}$、$C_3$-$C_8$環烷基、$C_1$-$C_6$烷基羥基、$C_1$-$C_6$烷基烷氧基、苯甲基及$C_3$-$C_8$雜環基；且

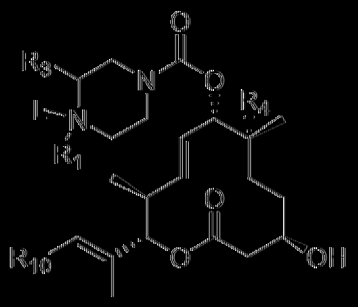
其中各$R^a$獨立地經0至3個獨立地選自以下之基團取代：鹵素、羥基、-N$R^{15}R^{16}$、$C_1$-$C_6$烷基、-(C=O)-($C_1$-$C_6$烷基)基團、-(C=O)-($C_1$-$C_6$烷基)-($C_3$-$C_{10}$雜環基)、-S(=O)$_w$-($C_3$-$C_8$雜環基)基團及$C_1$-$C_6$烷基羧酸基團，其各自經0、1或2個獨立地選自以下之基團取代：鹵素、羥基、-N$R^{15}R^{16}$及$C_1$-$C_3$烷基；且

w係0、1或2；

且其中L係將Ab共價連接至D之連接子；且

*p*係1至15之整數。

【0019】在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段能夠內化至目標細胞中。在一些實施例中，該連接子共價連接至剪接調節劑(「L-D」)，且L-D具有式(VIII-A)之結構：



(VIII-A)，或其醫藥學上可接受之鹽。

[0020] 在一些實施例中，剪接調節劑包含 SF3b 複合體之調節劑。

在一些實施例中，該剪接調節劑包含普拉烯內酯(pladienolide)或普拉烯內酯衍生物。在一些實施例中，該剪接調節劑包含普拉烯內酯 D 或普拉烯內酯 D 衍生物。在一些實施例中，普拉烯內酯 D 或衍生物包含 D2、D1、D4、D8、D10、D11 (E7107)、D20、D21、D22、D12 或 D25。在一些實施例中，普拉烯內酯 D 或衍生物包含 D2。在一些實施例中，普拉烯內酯 D 或衍生物包含 D1。在一些實施例中，普拉烯內酯 D 或衍生物包含 D4。在一些實施例中，普拉烯內酯 D 或衍生物包含 D12。

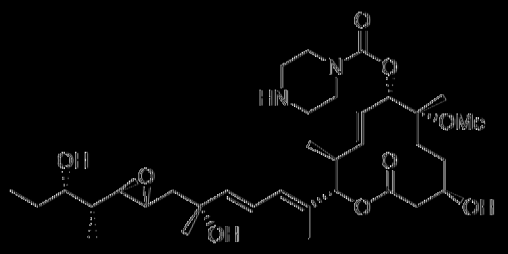
[0021] 在一些實施例中，普拉烯內酯 D 或衍生物係兩性離子型普拉烯內酯 D 或衍生物。在一些實施例中，兩性離子型普拉烯內酯 D 或衍生物包含 D22 或 D25。

[0022] 在一些其他實施例中，該剪接調節劑包含普拉烯內酯 B 或普拉烯內酯 B 衍生物。在一些實施例中，普拉烯內酯 B 或衍生物包含 D9、D18、D19 或 D13。

在一些實施例中，該剪接調節劑包含芳基普拉烯內酯。在一些實施例中，該芳基普拉烯內酯包含 D15、D14、D16、D17、D26 或 D33。在一些實施例中，該芳基普拉烯內酯包含 D15。在一些實施例

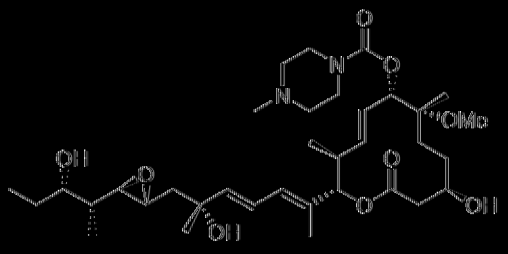
中，該芳基普拉烯內酯係兩性離子型芳基普拉烯內酯。在一典實施例中，該兩性離子型芳基普拉烯內酯包含 D33。

[0023] 在一典實施例中，該勇接調節劑包含 D1：



(D1)。

[0024] 在一典實施例中，該勇接調節劑包含 D2：



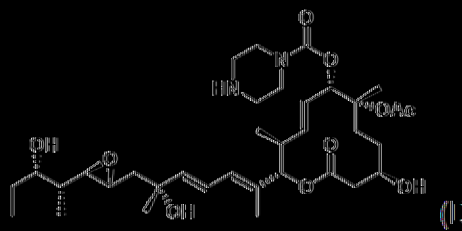
(D2)。

[0025] 在一典實施例中，該勇接調節劑包含 D3：



(D3)。

[0026] 在一典實施例中，該勇接調節劑包含 D4：



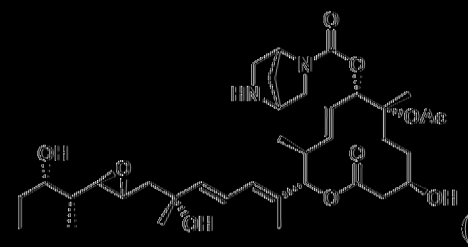
(D4)。

[0027] 在一典實施例中，該勇接調節劑包含 D4'：



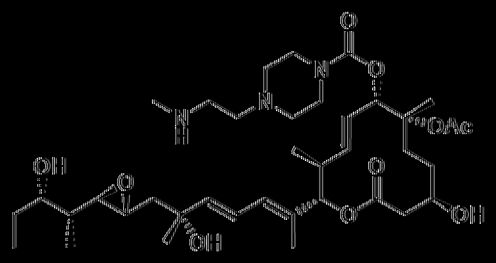
(D4')。

[0028] 在一些實施例中，該剪接調節劑包含 D5：



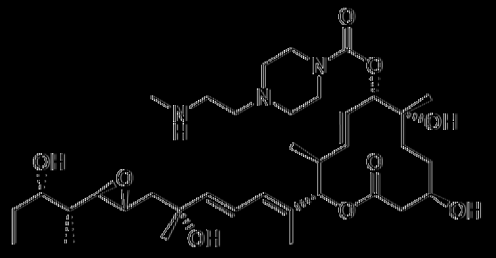
(D5)。

[0029] 在一些實施例中，該剪接調節劑包含 D6：



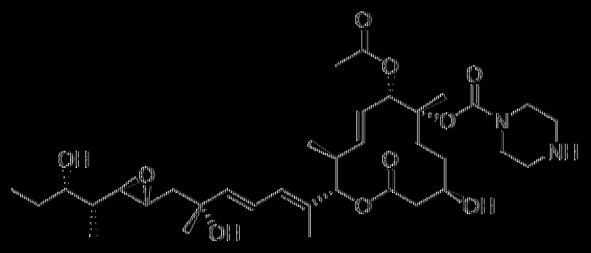
(D6)。

[0030] 在一些實施例中，該剪接調節劑包含 D7：



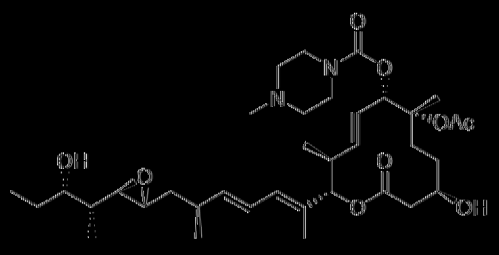
(D7)。

[0031] 在一些實施例中，該剪接調節劑包含 D8：



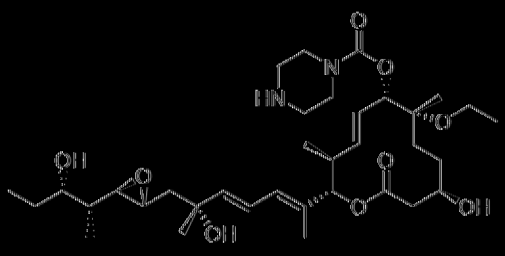
(D8)。

[0032] 在一些實施例中，該剪接調節劑包含 D9：



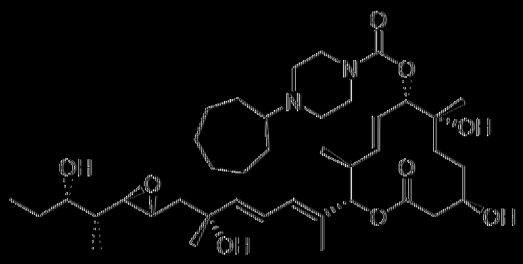
(D9)。

[0033] 在一些實施例中，該剪接調節劑包含 D10：



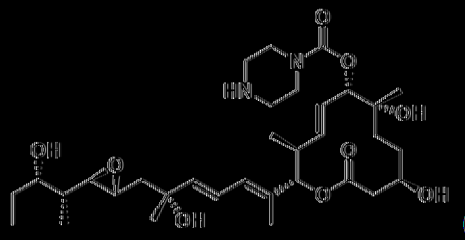
(D10)。

[0034] 在一些實施例中，該剪接調節劑包含 D11：



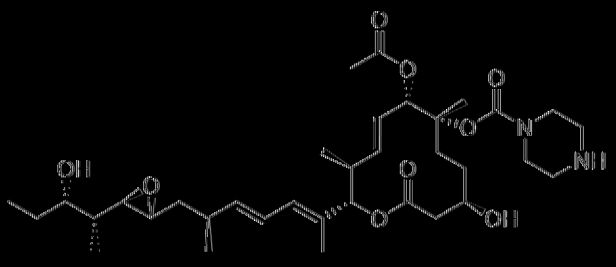
(D11)。

[0035] 在一些實施例中，該剪接調節劑包含 D12：



(D12)。

[0036] 在一些實施例中，該剪接調節劑包含 D13：



(D13)。

[0037] 在一些實施例中，該剪接調節劑包含 D14：



(D14)。

[0038] 在一些實施例中，該共接調節劑包含 D15：



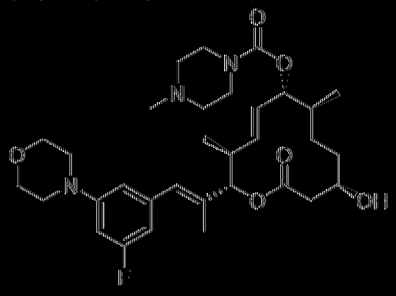
(D15)。

[0039] 在一些實施例中，該共接調節劑包含 D16：



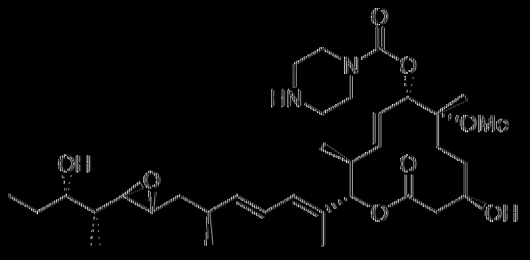
(D16)。

[0040] 在一些實施例中，該共接調節劑包含 D17：



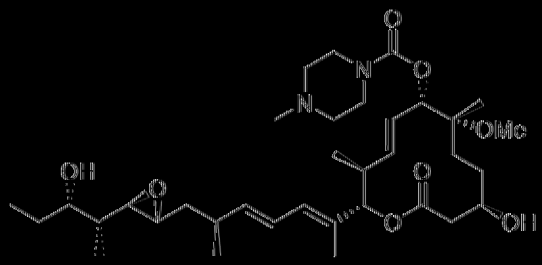
(D17)。

[0041] 在一些實施例中，該共接調節劑包含 D18：



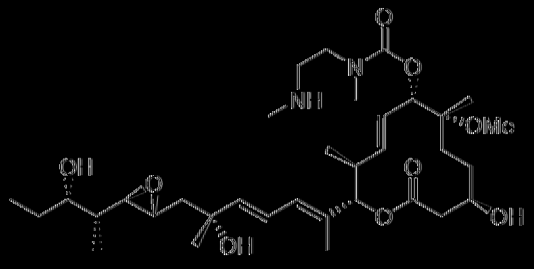
(D18)。

[0042] 在一些實施例中，該共接調節劑包含 D19：



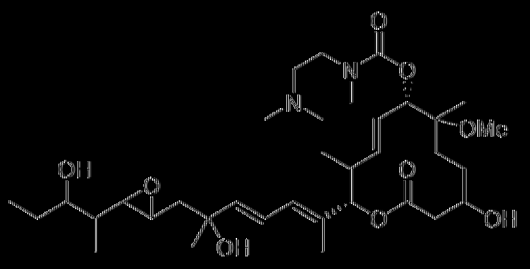
(D19)。

[0043] 在一些實施例中，該剪接調節劑包含 D20：



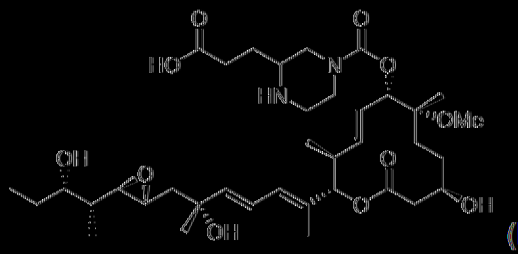
(D20)。

[0044] 在一些實施例中，該剪接調節劑包含 D21：



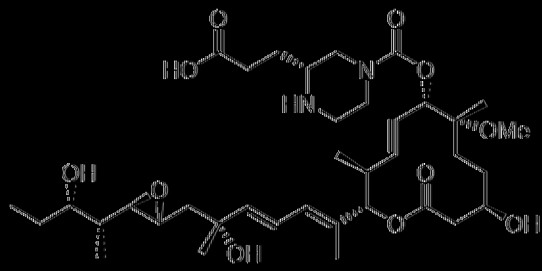
(D21)。

[0045] 在一些實施例中，該剪接調節劑包含 D22：



(D22)。

[0046] 在一些實施例中，該剪接調節劑包含 D23：



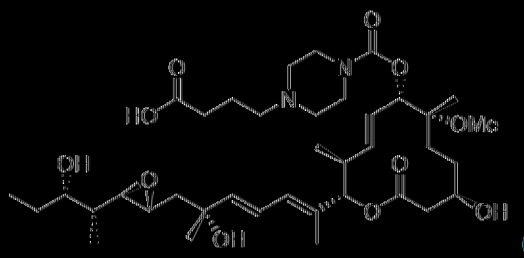
(D23)。

[0047] 在一些實施例中，該剪接調節劑包含 D24：



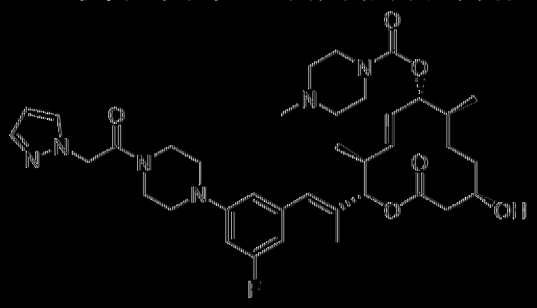
(D24)。

[0048] 在一些實施例中，核酶接調節劑包含 D25：



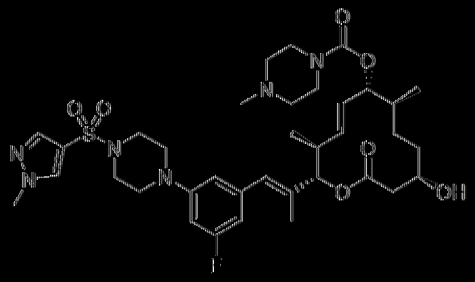
(D25)。

[0049] 在一些實施例中，核酶接調節劑包含 D26：



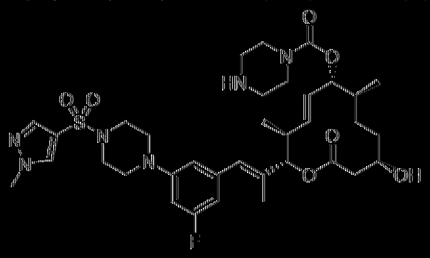
(D26)。

[0050] 在一些實施例中，核酶接調節劑包含 D27：



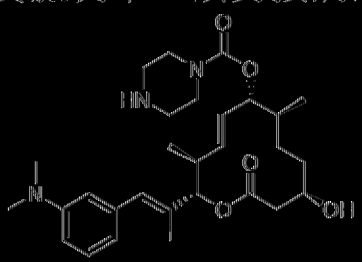
(D27)。

[0051] 在一些實施例中，核酶接調節劑包含 D28：



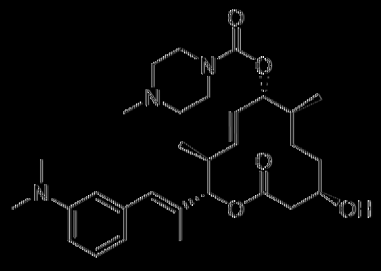
(D28)。

[0052] 在一些實施例中，核酶接調節劑包含 D29：



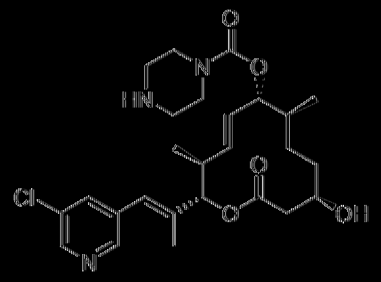
(D29)。

[0053] 在一些實施例中，該剪接調節劑包含 D30：



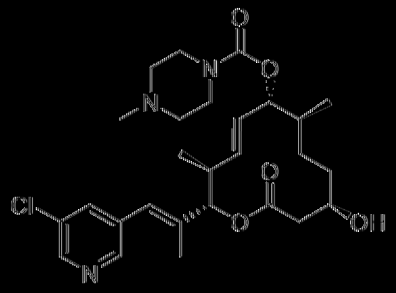
(D30)。

[0054] 在一些實施例中，該剪接調節劑包含 D31：



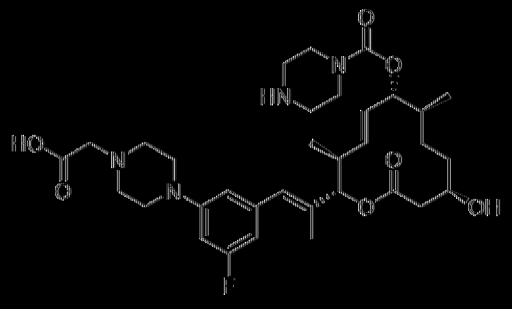
(D31)。

[0055] 在一些實施例中，該剪接調節劑包含 D32：



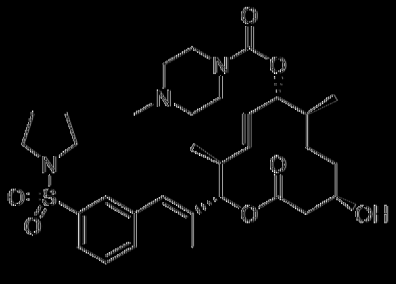
(D32)。

[0056] 在一些實施例中，該剪接調節劑包含 D33：



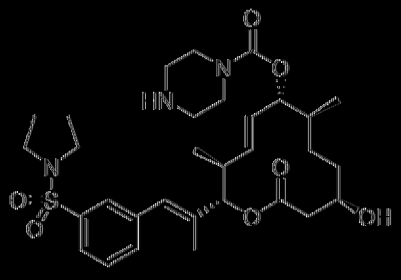
(D33)。

[0057] 在一些實施例中，該剪接調節劑包含 D34：



(D34)。

[0058] 在一些實施例中，該酶接調節劑包含 D35：



(D35)。

[0059] 在一些實施例中，該酶接調節劑包含表 7 中所列藥物部分之一。在一些實施例中，該酶接調節劑包含 D1、D2、D3、D4、D4'、D5、D6、D7、D8、D9、D10、D11、D12、D13、D14、D15、D16、D17、D18、D19、D20、D21、D22、D23、D24、D25、D26、D27、D28、D29、D30、D31、D32、D33、D34 及/或 D35。

[0060] 在一些實施例中，揭示一種酶接調節劑，以及其單獨或作為 ADC 之一部分用作治療劑的用途。在一些實施例中，該酶接調節劑包含 D4、D4'、D12、D15、D8、D9、D10、D13、D18、D19、D20、D21、D22、D25 或 D33。

[0061] 在一些實施例中，該酶接調節劑包含 D4 且該連接子包含 MC-Val-Cit-pABC。在一些實施例中，該酶接調節劑包含 D4 且該連接子包含 MC-β-葡萄糖醛酸苷。在一些實施例中，該酶接調節劑包含 D12 且該連接子包含 MC-Val-Cit-pABC。在一些實施例中，該酶接調節劑包含 D12 且該連接子包含 MC-β-葡萄糖醛酸苷。在一些實施例中，該酶接調節劑包含 D15 且該連接子包含 MC-Val-Ala-pAB。

[0062] 在各種實施例中，本文所揭示之 ADC 中使用的連接子在細胞外穩定，使得該 ADC 當存在於細胞外條件中時保持完整，但能夠在內化至細胞，例如腫瘤或癌症細胞中時裂解。在一些實施例中，當該

ADC 進入表現該 ADC 之抗體或抗原結合片段所靶向之抗原的細胞時，該剪接調節劑自該抗體或抗原結合片段裂解。在一些實施例中，連接子係可裂解連接子。

【0063】 在一些實施例中，該連接子包含可裂解肽部分。在一些實施例中，該可裂解肽部分可藉由酶裂解。在一些實施例中，該可裂解肽部分或連接子包含胺基酸單元。在一些實施例中，該胺基酸單元包含纈胺酸-瓜胺酸(「Val-Cit」或「VC」)。在一些其他實施例中，該胺基酸單元包含纈胺酸-丙胺酸(「Val-Ala」或「VA」)。在一些其他實施例中，該胺基酸單元包含麩胺酸-纈胺酸-瓜胺酸(「Glu-Val-Cit」或「EVC」)。在一些其他實施例中，該胺基酸單元包含丙胺酸-丙胺酸-天冬醯胺(「Ala-Ala-Asn」或「AAN」)。

【0064】 在一些實施例中，該連接子包含可裂解葡萄糖醛酸苷部分。在一些實施例中，該可裂解葡萄糖醛酸苷部分可藉由酶裂解。在一些實施例中，該可裂解葡萄糖醛酸苷部分可藉由葡萄糖醛酸苷酶裂解。在一些實施例中，該可裂解葡萄糖醛酸苷部分可藉由 β-葡萄糖醛酸苷酶裂解。

【0065】 在一些實施例中，該連接子包含至少一個間隔子單元。在一些實施例中，該間隔子單元或連接子包含聚乙二醇(PEG)部分。在一些實施例中，PEG 部分包含-$(PEG)_m$-且 $m$ 係 1 至 10 之整數。在一些實施例中，$m$ 係 2。在一些其他實施例中，該間隔子單元或連接子包含烷基部分。在一些實施例中，烷基部分包含-$(CH_2)_n$-且 $n$ 係 1 至 10 之整數。在一些實施例中，$n$ 係 2。在一些實施例中，$n$ 係 5。在一些實施例中，$n$ 係 6。

【0066】在一些實施例中，該間隔子單元經由順丁烯二醯亞胺(Mal)部分(「Mal-間隔子單元」)連接至該抗體或抗原結合片段。在一些實施例中，該 Mal-間隔子單元可與該抗體或抗原結合片段上之半胱胺酸殘基反應。在一些實施例中，該 Mal-間隔子單元經由該抗體或抗原結合片段上之半胱胺酸殘基接合至該抗體或抗原結合片段。

【0067】在一些實施例中，該連接子包含 Mal-間隔子單元及可裂解肽部分。在一些實施例中，該可裂解肽部分包含胺基酸單元。在一些實施例中，該可裂解肽部分或胺基酸單元包含 Val-Cit。在一些實施例中，該可裂解肽部分或胺基酸單元包含 Val-Ala。在一些實施例中，該可裂解肽部分或胺基酸單元包含 Glu-Val-Cit。在一些實施例中，該可裂解肽部分或胺基酸單元包含 Ala-Ala-Asn。在一些實施例中，該 Mal-間隔子單元包含烷基部分。在一些實施例中，該 Mal-間隔子單元包含 PEG 部分。在一些實施例中，該 Mal-間隔子單元包含順丁烯二醯亞胺基己醯基(MC)。

【0068】在一些實施例中，該 Mal-間隔子單元將該抗體或抗原結合片段連接至該連接子中之可裂解部分。在一些實施例中，該連接子中之可裂解部分包含可裂解肽部分。在一些實施例中，該可裂解肽部分包含胺基酸單元。在一些實施例中，該可裂解肽部分或胺基酸單元包含 Val-Cit、Val-Ala、Glu-Val-Cit 或 Ala-Ala-Asn。在一些實施例中，連接子包含 MC-Val-Cit。在一些實施例中，連接子包含 MC-Val-Ala。在一些實施例中，該連接子包含 MC-Glu-Val-Cit。在一些實施例中，連接子包含 MC-Ala-Ala-Asn。在一些實施例中，該 Mal-間隔子單元包含烷基部分。在一些實施例中，該 Mal-間隔子單元包含 PEG 部分。在一些實施例中，該 Mal-間隔子單元包含順丁烯二醯亞胺基己醯基(MC)。

【0069】在一些實施例中，該連接子中之可裂解部分直接地接合至該剪接調節劑，或間隔子單元將該連接子中之可裂解部分連接至該剪接調節劑。在一些實施例中，該結合物之裂解將該剪接調節劑自該抗體或抗原結合片段及該連接子釋放。在一些實施例中，將該連接子中之可裂解部分連接至該剪接調節劑的間隔子單元係自我分解型的。

【0070】在一些實施例中，將該連接子中之可裂解部分連接至該剪接調節劑的間隔子單元包含對胺基苯甲氧基羰基(pABC)。在一些實施例中，pABC 將該連接子中之可裂解部分連接至該剪接調節劑。在一些實施例中，該連接子中之可裂解部分包含可裂解肽部分。在一些實施例中，該可裂解肽部分包含胺基酸單元。在一些實施例中，該可裂解肽部分或胺基酸單元包含 Val-Cit、Val-Ala、Glu-Val-Cit 或 Ala-Ala-Asn。在一些實施例中，該連接子包含 Val-Cit-pABC。在一些其他實施例中，該連接子包含 Val-Ala-pABC。在一些實施例中，該連接子包含 Glu-Val-Cit-pABC。在一些實施例中，該連接子包含 Ala-Ala-Asn-pABC。

【0071】在一些實施例中，將該連接子中之可裂解部分連接至該剪接調節劑的間隔子單元包含對胺基苯甲基(pAB)。在一些實施例中，pAB 將該連接子中之可裂解部分連接至該剪接調節劑。在一些實施例中，該連接子中之可裂解部分包含可裂解肽部分。在一些實施例中，該可裂解肽部分包含胺基酸單元。在一些實施例中，該可裂解肽部分或胺基酸單元包含 Val-Cit、Val-Ala、Glu-Val-Cit 或 Ala-Ala-Asn。在一些實施例中，該連接子包含 Val-Cit-pAB。在一些其他實施例中，該連接子包含 Val-Ala-pAB。在一些其他實施例中，該連接子包含 Glu-Val-Cit-pAB。在一些其他實施例中，該連接子包含 Ala-Ala-Asn-pAB。

【0072】 在各種實施例中，該連接子係不可裂解連接子。在一些實施例中，該 ADC 中之剪接調節劑藉由該抗體或抗原結合片段之降解而釋放。在一些實施例中，當藉由目標細胞內化且在目標細胞內降解時，該連接子保持與該抗體之至少一個胺基酸及藥物共價締合。

【0073】 在一些實施例中，該連接子係包含至少一個間隔子單元的不可裂解連接子。在一些實施例中，該間隔子單元或連接子包含聚乙二醇(PEG)部分。在一些實施例中，PEG 部分包含-$(PEG)_m$-且 $m$ 係 1 至 10 之整數。在一些實施例中，$m$ 係 2。在一些其他實施例中，該間隔子單元或連接子包含烷基部分。在一些實施例中，烷基部分包含-$(CH_2)_n$-或-$(CH_2)_n$-O-$(CH_2)_n$且 $n$ 係 1 至 10 之整數。在一些實施例中，$n$ 係 2。在一些實施例中，$n$ 係 5。在一些實施例中，$n$ 係 6。

【0074】 在一些實施例中，不可裂解連接子中的間隔子單元經由順丁烯二醯亞胺(Mal)部分(「Mal-間隔子單元」)連接至該抗體或抗原結合片段。在一些實施例中，該 Mal-間隔子單元可與該抗體或抗原結合片段上之半胱胺酸殘基反應。在一些實施例中，該 Mal-間隔子單元經由該抗體或抗原結合片段上之半胱胺酸殘基接合至該抗體或抗原結合片段。在一些實施例中，該 Mal-間隔子單元包含烷基部分。在一些實施例中，該 Mal-間隔子單元包含 PEG 部分。在一些實施例中，該連接子或 Mal-間隔子單元包含順丁烯二醯亞胺基己醯基(MC)。在一些實施例中，該連接子或 Mal-間隔子單元包含順丁烯二醯亞胺基己醯基(MC)及至少一個額外間隔子單元。在一些實施例中，該連接子或 Mal-間隔子單元包含 MC-$(PEG)_2$。在一些實施例中，該連接子或 Mal-間隔子單元包含 MC-$(PEG)_2$及至少一個額外間隔子單元。在一些實施例中，該連接子或 Mal-間隔子

單元包含 Mal-Hex。在一些實施例中，該連接子或 Mal-間隔子單元包含 Mal-Hex 及至少一個額外間隔子單元。在一些實施例中，該連接子或 Mal-間隔子單元包含 Mal-Et。在一些實施例中，該連接子或 Mal-間隔子單元包含 Mal-Et 及至少一個額外間隔子單元。在一些實施例中，該連接子或 Mal-間隔子單元包含 Mal-Et-O-Et。在一些實施例中，該連接子或 Mal-間隔子單元包含 Mal-Et-O-Et 及至少一個額外間隔子單元。在一些實施例中，該 Mal-間隔子單元將該抗體或抗原結合片段連接至該剪接調節劑。

【0075】 在各種實施例中，ADC 複合物可由式(I)表示：

$$Ab\text{-}(L\text{-}D)_p \quad (I)$$

其中 Ab 係靶向贅生性細胞或另一腫瘤相關目標諸如癌症抗原之抗體或其抗原結合片段(例如本文所揭示之抗體或結合結構域序列中之任一個)；D 係適合於治療癌症之任何小分子(例如剪接調節劑，例如本文所揭示之剪接調節劑中之任一種)；L 係將 Ab 共價連接至 D 之連接子(例如本文所揭示之連接子中之任一種)；且 *p* 係 1 至 15 之整數。

【0076】 在一些實施例中，Ab 係選自本文所揭示之抗體或結合結構域序列中之任一種。在一些實施例中，Ab 係靶向 HER2 及/或 HER2 表現性贅生性細胞之抗體或結合結構域序列。在一些實施例中，Ab 係靶向 CD138 及/或 CD138 表現性贅生性細胞之抗體或結合結構域序列。在一些實施例中，Ab 係靶向 EPHA2 及/或 EPHA2 表現性贅生性細胞之抗體或結合結構域序列。在一些實施例中，Ab 係靶向另一癌症抗原之抗體或結合結構域序列。

【0077】 在一些實施例中，D 係剪接調節劑。在一些實施例中，D

係選自本文所揭示之剪接調節劑中之任一種。在一些實施例中，D 係選自以下之剪接調節劑：D2、D1、D4、D8、D10、D11 (E7107)、D20、D21、D22、D12、D25、D9、D18、D19、D13、D15、D14、D16、D17、D26 及 D33，或其任何衍生物。在一些實施例中，D 係選自以下之剪接調節劑：D4、D12、D15、D8、D9、D10、D13、D18、D19、D20、D21、D22、D25 及 D33，或其任何衍生物。在一些實施例中，D 係包含 D2 或其任何衍生物之剪接調節劑。在一些實施例中，D 係包含 D1 或其任何衍生物之剪接調節劑。

【0078】 在一些實施例中，L 係選自本文所揭示之連接子中之任一種，或本文所揭示之連接子組分之任何組合。在一些實施例中，L 係包含以下之連接子：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。在一些實施例中，該連接子亦可包含一或多個額外間隔子單元。在一些實施例中，L 係 ADL1、ADL2、ADL5、ADL6、ADL7、ADL10、ADL12、ADL13、ADL14、ADL15、ADL21、ADL22 或 ADL23 連接子。在一些實施例中，L 係 ADL1、ADL2、ADL5、ADL6、ADL7、ADL12、ADL13、ADL14、ADL21、ADL23 或 ADL15 連接子。在一些實施例中，L 係 ADL12、ADL14 或 ADL15 連接子。在一些實施例中，ADL1、ADL2、ADL5、ADL6、ADL7、ADL12、ADL13、ADL14、ADL21、ADL23 或 ADL15 連接子亦可包含一或多個額外間隔子單元。在一些實施例中，L 係 ADL1 連接子且可視情況包含一或多個額外間隔子單元。在一些實施例中，L 係 ADL2 連接子且可視情況包含一或多個額外間隔子單元。在一些實施例中，L 係 ADL5 連接子且可視情況包

含一或多個額外間隔子單元。在一些實施例中，L 係 ADL6 連接子且可視情況包含一或多個額外間隔子單元。在一些實施例中，L 係 ADL7 連接子且可視情況包含一或多個額外間隔子單元。在一些實施例中，L 係 ADL12 連接子且可視情況包含一或多個額外間隔子單元。在一些實施例中，L 係 ADL14 連接子且可視情況包含一或多個額外間隔子單元。在一些實施例中，L 係 ADL15 連接子且可視情況包含一或多個額外間隔子單元。在本文所描述之 ADC 的各種實施例中，*p* 係 1 至 10。在各種實施例中，*p* 係 2 至 8。在各種實施例中，*p* 係 4 至 8。在各種實施例中，*p* 係 4。在一些實施例中，*p* 係 8。

【0079】在一些實施例中，式(I)之 L-D 係 ADL1-D1。在一些實施例中，式(I)之 L-D 係 ADL6-D1。在一些實施例中，式(I)之 L-D 係 ADL5-D2。在一些實施例中，式(I)之 L-D 係 ADL1-D18。在一些實施例中，式(I)之 L-D 係 ADL5-D19。在一些實施例中，式(I)之 L-D 係 ADL14-D1。在一些實施例中，式(I)之 L-D 係 ADL12-D1。在一些實施例中，式(I)之 L-D 係 ADL15-D1。在一些實施例中，式(I)之 L-D 係 ADL12-D20。在一些實施例中，式(I)之 L-D 係 ADL10-D1。在一些實施例中，式(I)之 L-D 係 ADL12-D2。在一些實施例中，式(I)之 L-D 係 ADL15-D2。在一些實施例中，式(I)之 L-D 係 ADL12-D21。在一些實施例中，式(I)之 L-D 係 ADL6-D9。在一些實施例中，式(I)之 L-D 係 ADL1-D4。在一些實施例中，式(I)之 L-D 係 ADL1-D3。在一些實施例中，式(I)之 L-D 係 ADL1-D12。在一些實施例中，式(I)之 L-D 係 ADL1-D7。在一些實施例中，式(I)之 L-D 係 ADL1-D6。在一些實施例中，式(I)之 L-D 係 ADL1-D5。在一些實施例中，式(I)之 L-D 係 ADL22-D4。

在一些實施例中，式(I)之 L-D 係 ADL5-D10。在一些實施例中，式(I)之 L-D 係 ADL5-D11。在一些實施例中，式(I)之 L-D 係 ADL1-D13。在一些實施例中，式(I)之 L-D 係 ADL1-D8。在一些實施例中，式(I)之 L-D 係 ADL1-D22。在一些實施例中，式(I)之 L-D 係 ADL5-D25。在一些實施例中，式(I)之 L-D 係 ADL12-D22。在一些實施例中，式(I)之 L-D 係 ADL5-D15。在一些實施例中，式(I)之 L-D 係 ADL1-D14。在一些實施例中，式(I)之 L-D 係 ADL5-D26。在一些實施例中，式(I)之 L-D 係 ADL1-D16。在一些實施例中，式(I)之 L-D 係 ADL5-D17。在一些實施例中，式(I)之 L-D 係 ADL1-D33。在一些實施例中，式(I)之 L-D 係 ADL1-D28。在一些實施例中，式(I)之 L-D 係 ADL1-D31。在一些實施例中，式(I)之 L-D 係 ADL1-D29。在一些實施例中，式(I)之 L-D 係 ADL1-D35。在一些實施例中，式(I)之 L-D 係 ADL5-D32。在一些實施例中，式(I)之 L-D 係 ADL5-D27。在一些實施例中，式(I)之 L-D 係 ADL12-D35。在一些實施例中，式(I)之 L-D 係 ADL12-D28。在一些實施例中，式(I)之 L-D 係 ADL1-D23。在一些實施例中，式(I)之 L-D 係 ADL1-D24。

【0080】在一些實施例中，提供一組 ADC，由此發生隨機結合，且該組中之平均 *p* 係在約 2 與約 8 之間。在一些實施例中，提供一組 ADC，由此發生隨機結合，且該組中之平均 *p* 係在約 4 與約 8 之間。在一些實施例中，提供一組 ADC，由此發生隨機結合，且該組中之平均 *p* 係約 4。在一些實施例中，提供一組 ADC，由此發生隨機結合，且該組中之平均 *p* 係約 8。本文提供包含所述 ADC 中之任一種之多個複本的組合物(例如醫藥組合物)，其中該組合物中 ADC 之平均藥物負載(平均 *p*)係

約 3.5 至約 5.5(例如約 4)、或約 7 至約 9(例如約 8)。

【0081】 在一些實施例中，該 ADC 中之抗體或抗原結合片段(Ab)靶向源自血液惡性病或實體腫瘤之贅生性細胞。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段靶向源自血液惡性病之贅生性細胞。在一些實施例中，該血液惡性病係選自 B 細胞惡性病、白血病(例如急性骨髓性白血病)、淋巴瘤及骨髓瘤(例如多發性骨髓瘤)。在一些實施例中，該血液惡性病係選自急性骨髓性白血病及多發性骨髓瘤。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段靶向源自實體腫瘤之贅生性細胞。在一些實施例中，該實體腫瘤係選自乳癌(例如 HER2 陽性乳癌)、胃癌(例如胃腺癌)、前列腺癌、卵巢癌、肺癌(例如肺腺癌)、子宮癌(例如子宮漿液性子宮內膜癌)、唾腺管癌、黑素瘤、結腸癌、子宮頸癌、胰臟癌、腎癌、結腸直腸癌及食道癌。在一些實施例中，該實體腫瘤係選自 HER2 陽性乳癌、胃腺癌及前列腺癌。

【0082】 在各種實施例中，該 ADC 中之抗體或抗原結合片段(Ab)係抗 HER2 抗體或其抗原結合片段。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段結合至 HER2 且靶向 HER2 表現性贅生性細胞(亦即，該 ADC 靶向 HER2 表現性贅生性細胞)。在一些實施例中，該 ADC 中之抗體或抗原結合片段係內化性抗 HER2 抗體或其內化性抗原結合片段。

【0083】 在一些實施例中，該抗 HER2 抗體或抗原結合片段包括含 SEQ ID NO:1(HCDR1)、SEQ ID NO:2(HCDR2)及 SEQ ID NO:3(HCDR3)之胺基酸序列的三個重鏈互補決定區(HCDR1、HCDR2 及 HCDR3)；以及含 SEQ ID NO:4(LCDR1)、SEQ ID NO:5(LCDR2)及 SEQ ID NO: 6(LCDR3)之胺基酸序列的三個輕鏈互補決定區(LCDR1、LCDR2 及 LCDR3)。在一些實施例中，該抗 HER2 抗體或抗原結合片段

係內化性抗體或內化性抗原結合片段。在一些實施例中，該抗 HER2 抗體或抗原結合片段包含人類構架序列。在一些實施例中，該抗 HER2 抗體或抗原結合片段包括含 SEQ ID NO: 19 之胺基酸序列之重鏈可變區及含 SEQ ID NO: 20 之胺基酸序列之輕鏈可變區。在一些實施例中，該抗 HER2 抗體或抗原結合片段包含人類 IgG 重鏈恆定區。在一些實施例中，該抗 HER2 抗體或抗原結合片段包含人類 IgG1 重鏈恆定區。在一些實施例中，該抗 HER2 抗體或抗原結合片段包含人類 Igκ 或 λ 輕鏈恆定區。在一些實施例中，該抗 HER2 抗體或抗原結合片段與包含 SEQ ID NO: 19 之重鏈可變結構域及 SEQ ID NO: 20 之輕鏈可變結構域的抗體競爭結合及/或與其結合相同抗原決定基。

【0084】 在各種實施例中，該 ADC 中之抗體或抗原結合片段(Ab)係抗 CD138 抗體或其抗原結合片段。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段結合至 CD138 且靶向 CD138 表現性贅生性細胞(亦即，該 ADC 靶向 CD138 表現性贅生性細胞)。在一些實施例中，該 ADC 中之抗體或抗原結合片段係內化性抗 CD138 抗體或其內化性抗原結合片段。

【0085】 在一些實施例中，該抗 CD138 抗體或抗原結合片段包括含 SEQ ID NO: 7(HCDR1)、SEQ ID NO: 8(HCDR2)及 SEQ ID NO: 9(HCDR3)之胺基酸序列的三個重鏈互補決定區(HCDR1、HCDR2 及 HCDR3)；以及含 SEQ ID NO: 10(LCDR1)、SEQ ID NO: 11(LCDR2)及 SEQ ID NO: 12(LCDR3)之胺基酸序列的三個輕鏈互補決定區(LCDR1、LCDR2 及 LCDR3)。在一些實施例中，該抗 CD138 抗體或抗原結合片段係內化性抗體或內化性抗原結合片段。在一些實施例中，該抗 CD138 抗體或抗原結合片段包含人類構架序列。在一些實施例中，該抗 CD138 抗

體或抗原結合片段包括含 SEQ ID NO: 21 之胺基酸序列之重鏈可變區及含 SEQ ID NO: 22 之胺基酸序列之輕鏈可變區。在一些實施例中，該抗 CD138 抗體或抗原結合片段包含鼠類 IgG2a 重鏈恆定區。在一些實施例中，該抗 CD138 抗體或抗原結合片段包含鼠類 Igκ 輕鏈恆定區。在一些實施例中，該抗 CD138 抗體或抗原結合片段包含人類 IgG 重鏈恆定區。在一些實施例中，該抗 CD138 抗體或抗原結合片段包含人類 IgG2a 重鏈恆定區。在一些實施例中，該抗 CD138 抗體或抗原結合片段包含人類 Igκ 或 λ 輕鏈恆定區。在一些實施例中，該抗 CD138 抗體或抗原結合片段與包含 SEQ ID NO: 21 之重鏈可變結構域及 SEQ ID NO: 22 之輕鏈可變結構域的抗體競爭結合及/或與其結合相同抗原決定基。

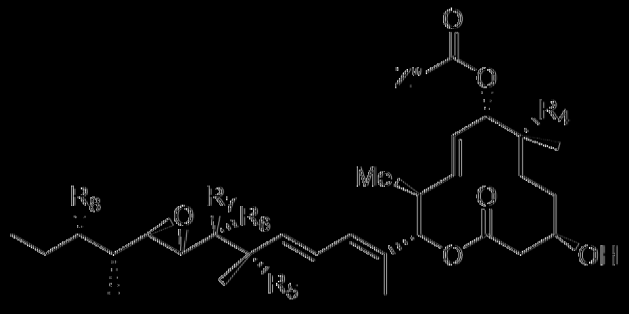
【0086】 在各種實施例中，該 ADC 中之抗體或抗原結合片段(Ab)係抗 EPHA2 抗體或其抗原結合片段。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段結合至 EPHA2 且靶向 EPHA2 表現性贅生性細胞(亦即，該 ADC 靶向 EPHA2 表現性贅生性細胞)。在一些實施例中，該 ADC 中之抗體或抗原結合片段係內化性抗 EPHA2 抗體或其內化性抗原結合片段。

【0087】 在一些實施例中，該抗 EPHA2 抗體或抗原結合片段包括含 SEQ ID NO: 13(HCDR1)、SEQ ID NO: 14(HCDR2)及 SEQ ID NO: 15(HCDR3)之胺基酸序列的三個重鏈互補決定區(HCDR1、HCDR2 及 HCDR3)；以及含 SEQ ID NO: 16(LCDR1)、SEQ ID NO: 17(LCDR2)及 SEQ ID NO: 18(LCDR3)之胺基酸序列的三個輕鏈互補決定區(LCDR1、LCDR2 及 LCDR3)。在一些實施例中，該抗 EPHA2 抗體或抗原結合片段係內化性抗體或內化性抗原結合片段。在一些實施例中，該抗 EPHA2 抗體或抗原結合片段包含人類構架序列。在一些實施例中，該抗 EPHA2 抗

體或抗原結合片段包括含 SEQ ID NO: 23 之胺基酸序列之重鏈可變區及含 SEQ ID NO: 24 之胺基酸序列之輕鏈可變區。在一些實施例中，該抗 EPHA2 抗體或抗原結合片段包含人類 IgG 重鏈恆定區。在一些實施例中，該抗 EPHA2 抗體或抗原結合片段包含人類 IgG1 重鏈恆定區。在一些實施例中，該抗 EPHA2 抗體或抗原結合片段包含人類 Igκ 或 λ 輕鏈恆定區。在一些實施例中，該抗 EPHA2 抗體或抗原結合片段與包含 SEQ ID NO: 23 之重鏈可變結構域及 SEQ ID NO: 24 之輕鏈可變結構域的抗體競爭結合及/或與其結合相同抗原決定基。

[0088] 在各種實施例中，本文亦提供包含由以下通式定義之連接子-藥物的化合物：L-D，其中 L 為連接子部分，且 D 為藥物部分(例如剪接調節劑藥物部分)。在各種實施例中，本文所揭示之連接子-藥物(L-D)化合物可連接至抗體或抗原結合片段及/或適用於本文所揭示之 ADC 中，例如式(I)之 ADC 中。

[0089] 在各種實施例中，本文所揭示之連接子-藥物(L-D)化合物包含根據式(III)之連接子-藥物結構。在各種實施例中，本發明提供一種式(III)之連接子-藥物(L-D)化合物：



(III)，或其醫藥學上可接受之鹽，其中：

$R^1$ 係選自不存在、氫、$C_1$-$C_6$ 烷基、$C_1$-$C_6$ 烷基烷氧基、$C_1$-$C_6$ 烷基胺基、$C_1$-$C_6$ 烷基羧酸基團、$C_1$-$C_6$ 烷基羥基、$C_3$-$C_8$ 環烷基、苯甲基、

$C_3$-$C_8$雜環基、-O-C(=O)-($C_1$-$C_6$烷基)基團及$CD_3$；

$R^2$不存在或為連接子；

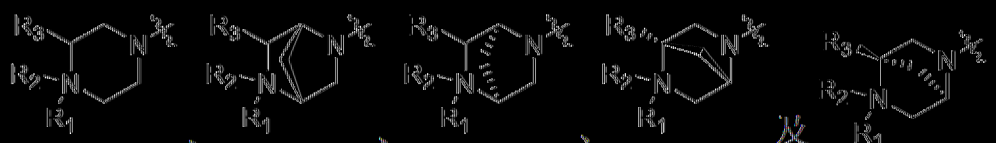
$R^3$係選自氫、$C_1$-$C_6$烷基、$C_1$-$C_6$烷基烷氧基、$C_1$-$C_6$烷基胺基、$C_1$-$C_6$烷基羧酸基團、$C_1$-$C_6$烷基羥基、$C_3$-$C_8$環烷基、苯甲基、$C_3$-$C_8$雜環基及-O-C(=O)-($C_1$-$C_6$烷基)基團；且

$R^4$、$R^5$及$R^8$各自獨立地選自氫、羥基、-O-($C_1$-$C_6$烷基)基團、-O-C(=O)-($C_1$-$C_6$烷基)基團及$C_1$-$C_6$烷基；

$R^6$及$R^7$各自獨立地選自氫、-O-$R^{17}$、-O-C(=O)-$R^{17}$、-O-C(=O)-$NR^{15}R^{16}$、$C_1$-$C_6$烷基、-$NR^{15}R^{16}$及連接子；

$R^{15}$及$R^{16}$各自獨立地選自氫、$R^{17}$、-C(=O)-$R^{17}$及-C(=O)-O-$R^{17}$；

$R^{17}$係選自氫、$C_1$-$C_6$烷基、$C_3$-$C_8$環烷基、苯甲基及$C_3$-$C_8$雜環基；且

Z''係選自  ；

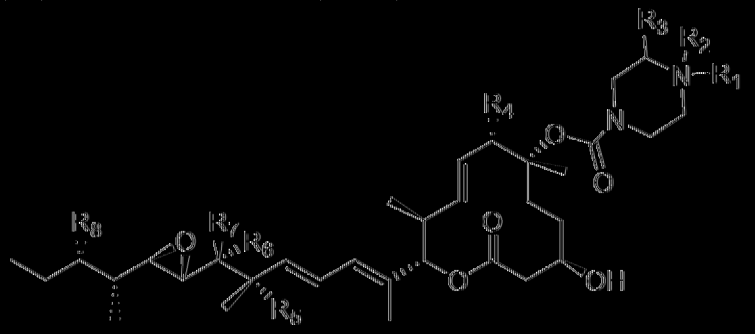
其中$R^1$、$R^2$、$R^3$、$R^4$、$R^5$、$R^6$、$R^7$、$R^8$、$R^{15}$、$R^{16}$及$R^{17}$各自獨立地經0至3個獨立地選自以下之基團取代：鹵素、羥基、$C_1$-$C_6$烷基、-O-($C_1$-$C_6$烷基)基團、-$NR^{15}R^{16}$、$C_3$-$C_8$環烷基、$C_1$-$C_6$烷基羥基、$C_1$-$C_6$烷基烷氧基、苯甲基及$C_3$-$C_8$雜環基；

其中$R^6$及$R^7$中至少一個係氫；且

其中若$R^2$係連接子，則$R^6$及$R^7$均不為連接子，且若$R^6$或$R^7$係連接子，則$R^2$不存在。

[0090] 在各種其他實施例中，本文所揭示之連接子-藥物(L-D)化合物包含根據式(V)之連接子-藥物結構。在各種實施例中，本發明提供

種式(V)之連接子-藥物(L-D)化合物：



(V)，或其醫藥學上可接受之鹽，其中：

$R^1$ 係選自不存在、氫、$C_1$-$C_6$ 烷基、$C_1$-$C_6$ 烷基烷氧基、$C_1$-$C_6$ 烷基胺基、$C_1$-$C_6$ 烷基羧酸基團、$C_1$-$C_6$ 烷基羥基、$C_3$-$C_8$ 環烷基、苯甲基、$C_3$-$C_8$ 雜環基、-O-C(=O)-($C_1$-$C_6$ 烷基)基團及 $CD_3$；

$R^2$ 不存在或為連接子；

$R^3$ 係選自氫、$C_1$-$C_6$ 烷基、$C_1$-$C_6$ 烷基烷氧基、$C_1$-$C_6$ 烷基胺基、$C_1$-$C_6$ 烷基羧酸基團、$C_1$-$C_6$ 烷基羥基、$C_3$-$C_8$ 環烷基、苯甲基、$C_3$-$C_8$ 雜環基及 -O-C(=O)-($C_1$-$C_6$ 烷基)基團；且

$R^4$、$R^5$ 及 $R^8$ 各自獨立地選自氫、羥基、-O-($C_1$-$C_6$ 烷基)基團、-O-C(=O)-($C_1$-$C_6$ 烷基)基團及 $C_1$-$C_6$ 烷基；

$R^6$ 及 $R^7$ 各自獨立地選自氫、-O-$R^{17}$、-O-C(=O)-$R^{17}$、-O-C(=O)-$NR^{15}R^{16}$、$C_1$-$C_6$ 烷基、$-NR^{15}R^{16}$ 及連接子；

$R^{15}$ 及 $R^{16}$ 各自獨立地選自氫、$R^{17}$、-C(=O)-$R^{17}$ 及 -C(=O)-O-$R^{17}$；且

$R^{17}$ 係選自氫、$C_1$-$C_6$ 烷基、$C_3$-$C_8$ 環烷基、苯甲基及 $C_3$-$C_8$ 雜環基；

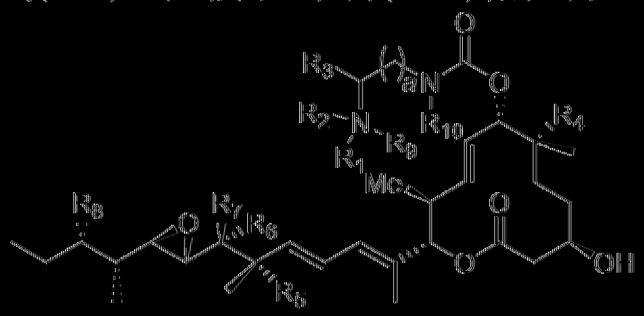
其中 $R^1$、$R^2$、$R^3$、$R^4$、$R^5$、$R^6$、$R^7$、$R^8$、$R^{15}$、$R^{16}$ 及 $R^{17}$ 各自獨立地經 0 至 3 個獨立地選自以下之基團取代：鹵素、羥基、$C_1$-$C_6$ 烷基、-O-($C_1$-$C_6$ 烷基)基團、$-NR^{15}R^{16}$、$C_3$-$C_8$ 環烷基、$C_1$-$C_6$ 烷基羥基、$C_1$-$C_6$ 烷

基烷氧基、苯甲基及 $C_3$-$C_8$ 雜環基；

其中 $R^6$ 及 $R'$ 中至少一個係氮；且

其中若 $R^2$ 係連接子，則 $R^6$ 及 $R'$ 均不為連接子，且若 $R^6$ 或 $R'$ 係連接子，則 $R^2$ 不存在。

[0091] 在各種其他實施例中，本文所揭示之連接子-藥物(L-D)化合物包含根據式(VII)之連接子-藥物結構。在各種實施例中，本發明提供一種式(VII)之連接子-藥物(L-D)化合物：



(VII)，或其醫藥學上可接受之鹽，其中：

$R^1$ 及 $R^9$ 各自獨立地選自不存在、氫、$C_1$-$C_6$ 烷基、$C_1$-$C_6$ 烷基烷氧基、$C_1$-$C_6$ 烷基胺基、$C_1$-$C_6$ 烷基羧酸基團、$C_1$-$C_6$ 烷基羥基、$C_3$-$C_8$ 環烷基、苯甲基、$C_3$-$C_8$ 雜環基、-O-C(=O)-($C_1$-$C_6$ 烷基)基團及 $CD_3$；

$R^2$ 不存在或為連接子；

$R^3$ 係選自氫、$C_1$-$C_6$ 烷基、$C_1$-$C_6$ 烷基烷氧基、$C_1$-$C_6$ 烷基胺基、$C_1$-$C_6$ 烷基羧酸基團、$C_1$-$C_6$ 烷基羥基、$C_3$-$C_8$ 環烷基、苯甲基、$C_3$-$C_8$ 雜環基及-O-C(=O)-($C_1$-$C_6$ 烷基)基團；

$R^4$、$R^5$ 及 $R^8$ 各自獨立地選自氫、羥基、-O-($C_1$-$C_6$ 烷基)基團、-O-C(=O)-($C_1$-$C_6$ 烷基)基團及 $C_1$-$C_6$ 烷基；

$R^6$ 及 $R'$ 各自獨立地選自氫、-O-$R^{17}$、-O-C(=O)-$R^{17}$、-O-C(=O)-$NR^{15}R^{16}$、$C_1$-$C_6$ 烷基、-$NR^{15}R^{16}$ 及連接子；

$R^{10}$係選自氫、$C_1$-$C_6$烷基、-C(=O)-($C_1$-$C_6$烷基)基團及$CD_3$；

$R^{15}$及$R^{16}$各自獨立地選自氫、$R^{17}$、-C(=O)-$R^{17}$及-C(=O)-O-$R^{17}$；

$R^{17}$係選自氫、$C_1$-$C_6$烷基、$C_3$-$C_8$環烷基、苯甲基及$C_3$-$C_8$雜環基；且

a係1、2、3、4、5、6、7、8、9或10；

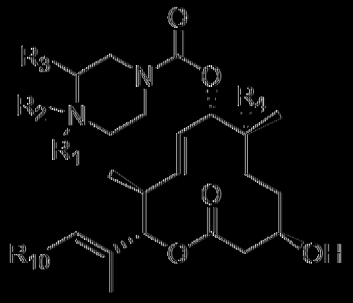
其中$R^1$、$R^2$、$R^3$、$R^4$、$R^5$、$R^6$、$R^7$、$R^8$、$R^9$、$R^{10}$、$R^{15}$、$R^{16}$及$R^{17}$各自獨立地經0至3個獨立地選自以下之基團取代：鹵素、羥基、$C_1$-$C_6$烷基、-O-($C_1$-$C_6$烷基)基團、$-NR^{15}R^{16}$、$C_3$-$C_8$環烷基、$C_1$-$C_6$烷基羥基、$C_1$-$C_6$烷基烷氧基、苯甲基及$C_3$-$C_8$雜環基；

其中$R^6$及$R^7$中至少一個係氫；

其中若$R^2$係連接子，則$R^6$及$R^7$均不為連接子，且若$R^6$或$R^7$係連接子，則$R^2$不存在；且

其中$R^1$及$R^9$不能皆不存在。

[0092] 在各種其他實施例中，本文所揭示之連接子-藥物(L-D)化合物包含根據式(IX)之連接子-藥物結構。在各種實施例中，本發明提供一種式(IX)之連接子-藥物(L-D)化合物：



(IX)，或其醫藥學上可接受之鹽，其中：

$R^1$係選自不存在、氫、$C_1$-$C_6$烷基、$C_1$-$C_6$烷基烷氧基、$C_1$-$C_6$烷基胺基、$C_1$-$C_6$烷基羧酸基團、$C_1$-$C_6$烷基羥基、$C_3$-$C_8$環烷基、苯甲基、$C_3$-$C_8$雜環基、-O-C(=O)-($C_1$-$C_6$烷基)基團及$CD_3$；

$R^2$係連接子；

$R^3$係選自氫、$C_1$-$C_6$烷基、$C_1$-$C_6$烷基烷氧基、$C_1$-$C_6$烷基胺基、$C_1$-$C_6$烷基羧酸基團、$C_1$-$C_6$烷基羥基、$C_3$-$C_8$環烷基、苯甲基、$C_3$-$C_8$雜環基及-O-C(=O)-($C_1$-$C_6$烷基)基團；

$R^4$係選自氫、羥基、-O-($C_1$-$C_6$烷基)基團、-O-C(=O)-($C_1$-$C_6$烷基)基團及$C_1$-$C_6$烷基；

$R^{10}$係選自3至10員碳環及3至10員雜環，其各自經0至3個$R^a$取代，其中各$R^a$獨立地選自鹵素、$C_1$-$C_6$烷基、-O-($C_1$-$C_6$)烷基、$C_1$-$C_6$烷基烷氧基、$C_1$-$C_6$烷基羥基、-S(=O)$_w$-(4至7員雜環)、4至7員碳環及4至7員雜環；

$R^{15}$及$R^{16}$各自獨立地選自氫、$R^{17}$、-C(=O)-$R^{17}$及-C(=O)-O-$R^{17}$；且

$R^{17}$係選自氫、$C_1$-$C_6$烷基、$C_3$-$C_8$環烷基、苯甲基及$C_3$-$C_8$雜環基；

其中$R^1$、$R^2$、$R^3$、$R^4$、$R^{10}$、$R^{15}$、$R^{16}$及$R^{17}$各自獨立地經0至3個獨立地選自以下之基團取代：鹵素、羥基、$C_1$-$C_6$烷基、-O-($C_1$-$C_6$烷基)基團、-N$R^{15}R^{16}$、$C_3$-$C_8$環烷基、$C_1$-$C_6$烷基羥基、$C_1$-$C_6$烷基烷氧基、苯甲基及$C_3$-$C_8$雜環基；且

其中各$R^a$獨立地經0至3個獨立地選自以下之基團取代：鹵素、羥基、-N$R^{15}R^{16}$、$C_1$-$C_6$烷基、-(C=O)-($C_1$-$C_6$烷基)基團、-(C=O)-($C_1$-$C_6$烷基)-($C_3$-$C_{10}$雜環基)基團及$C_1$-$C_6$烷基羧酸基團，其各自經0、1或2個獨立地選自以下之基團取代：鹵素、羥基、-N$R^{15}R^{16}$及$C_1$-$C_3$烷基；且

w係0、1或2。

【0093】另外，在各種實施例中，本文提供所述ADC複合物及組

合物例如在治療贅生性病症，例如癌症中之治療用途。在某些態樣中，本發明提供治療贅生性病症，例如表現該 ADC 中之抗體或抗原結合片段所靶向之抗原之癌症的方法，該抗原為諸如 HER2、CD138、EPHA2、MSLN、FOLH1、CDH6、CEACAM5、CFC1B、ENPP3、FOLR1、HAVCR1、KIT、MET、MUC16、SLC39A6、SLC44A4 或 STEAP1。

【0094】 在某些態樣中，本發明提供治療患有或疑似患有贅生性病症之個體的方法，其係藉由向該個體投與治療有效量及/或方案的所述 ADC 或組合物中之任一種實現。在一些實施例中，該贅生性病症係血液惡性病或實體腫瘤。在一些實施例中，該贅生性病症係血液惡性病。在一些實施例中，該血液惡性病係選自 B 細胞惡性病、白血病、淋巴瘤及骨髓瘤。在一些實施例中，該血液惡性病係選自急性骨髓性白血病及多發性骨髓瘤。在一些實施例中，該贅生性病症係實體腫瘤。在一些實施例中，該實體腫瘤係選自乳癌(例如 HER2 陽性乳癌)、胃癌(例如胃腺癌)、前列腺癌、卵巢癌、肺癌(例如肺腺癌)、子宮癌(例如子宮漿液性子宮內膜癌)、唾腺管癌、黑素瘤、結腸癌、子宮頸癌、胰臟癌、腎癌、結腸直腸癌及食道癌。在一些實施例中，該實體腫瘤係選自 HER2 陽性乳癌、胃腺癌及前列腺癌。

【0095】 在一些實施例中，用該抗體-藥物結合物或組合物治療誘導對不表現目標抗原但鄰近於表現目標抗原之贅生性細胞的贅生性細胞之旁觀者殺滅。在一些實施例中，該個體具有一或多個表現目標抗原之贅生性細胞。

【0096】 在一些實施例中，該目標抗原係 HER2。在一些實施例中，該一或多個贅生性細胞係源自 HER2 表現性乳癌、卵巢癌、胃癌、肺

癌(例如肺腺癌)、子宮癌(例如子宮漿液性子宮內膜癌)或唾腺管癌。在一些實施例中，該個體對用(a)單獨投與時之抗 HER2 抗體及/或(b)單獨投與時之剪接調節劑治療無反應或反應不良。在一些實施例中，該個體對用單獨投與時之剪接調節劑治療不耐受、無反應或反應不良。

【0097】 在一些實施例中，該目標抗原係 CD138。在一些實施例中，該一或多個贅生性細胞係源自 CD138 表現性多發性骨髓瘤。在一些實施例中，該個體對用(a)單獨投與時之抗 CD138 抗體及/或(b)單獨投與時之剪接調節劑治療無反應或反應不良。在一些實施例中，該個體對用單獨投與時之剪接調節劑治療不耐受、無反應或反應不良。

【0098】 在一些實施例中，該目標抗原係 EPHA2。在一些實施例中，該一或多個贅生性細胞係源自 EPHA2 表現性乳癌、前列腺癌、卵巢癌、肺癌、黑素瘤、結腸癌或食道癌。在一些實施例中，該個體對用(a)單獨投與時之抗 EPHA2 抗體及/或(b)單獨投與時之剪接調節劑治療無反應或反應不良。在一些實施例中，該個體對用單獨投與時之剪接調節劑治療不耐受、無反應或反應不良。

【0099】 在一些實施例中，該目標抗原係 MSLN。在一些實施例中，該一或多個贅生性細胞係源自 MSLN 表現性卵巢癌、子宮頸癌、胰臟癌或肺癌(例如肺腺癌)。在一些實施例中，該個體對用(a)單獨投與時之抗 MSLN 抗體及/或(b)單獨投與時之剪接調節劑治療無反應或反應不良。在一些實施例中，該個體對用單獨投與時之剪接調節劑治療不耐受、無反應或反應不良。

【0100】 在一些實施例中，該目標抗原係 FOLH1。在一些實施例中，該一或多個贅生性細胞係源自 FOLH1 表現性前列腺癌。在一些實施

例中，該個體對用(a)單獨投與時之抗 FOLH1 抗體及/或(b)單獨投與時之剪接調節劑治療無反應或反應不良。在一些實施例中，該個體對用單獨投與時之剪接調節劑治療不耐受、無反應或反應不良。

【0101】 在一些實施例中，該目標抗原係 CDH6。在一些實施例中，該一或多個贅生性細胞係源自 CDH6 表現性腎癌。在一些實施例中，該個體對用(a)單獨投與時之抗 CDH6 抗體及/或(b)單獨投與時之剪接調節劑治療無反應或反應不良。在一些實施例中，該個體對用單獨投與時之剪接調節劑治療不耐受、無反應或反應不良。

【0102】 在一些實施例中，該目標抗原係 CEACAM5。在一些實施例中，該一或多個贅生性細胞係源自 CEACAM5 表現性結腸直腸癌。在一些實施例中，該個體對用(a)單獨投與時之抗 CEACAM5 抗體及/或(b)單獨投與時之剪接調節劑治療無反應或反應不良。在一些實施例中，該個體對用單獨投與時之剪接調節劑治療不耐受、無反應或反應不良。

【0103】 在一些實施例中，該目標抗原係 CFC1B。在一些實施例中，該一或多個贅生性細胞係源自 CFC1B 表現性胰臟癌。在一些實施例中，該個體對用(a)單獨投與時之抗 CFC1B 抗體及/或(b)單獨投與時之剪接調節劑治療無反應或反應不良。在一些實施例中，該個體對用單獨投與時之剪接調節劑治療不耐受、無反應或反應不良。

【0104】 在一些實施例中，該目標抗原係 ENPP3。在一些實施例中，該一或多個贅生性細胞係源自 ENPP3 表現性腎癌。在一些實施例中，該個體對用(a)單獨投與時之抗 ENPP3 抗體及/或(b)單獨投與時之剪接調節劑治療無反應或反應不良。在一些實施例中，該個體對用單獨投與時之剪接調節劑治療不耐受、無反應或反應不良。

【0105】 在一些實施例中，該目標抗原係 FOLR1。在一些實施例中，該一或多個贅生性細胞係源自 FOLR1 表現性卵巢癌。在一些實施例中，該個體對用(a)單獨投與時之抗 FOLR1 抗體及/或(b)單獨投與時之剪接調節劑治療無反應或反應不良。在一些實施例中，該個體對用單獨投與時之剪接調節劑治療不耐受、無反應或反應不良。

【0106】 在一些實施例中，該目標抗原係 HAVCR1。在一些實施例中，該一或多個贅生性細胞係源自 HAVCR1 表現性腎癌或食道癌。在一些實施例中，該個體對用(a)單獨投與時之抗 HAVCR1 抗體及/或(b)單獨投與時之剪接調節劑治療無反應或反應不良。在一些實施例中，該個體對用單獨投與時之剪接調節劑治療不耐受、無反應或反應不良。

【0107】 在一些實施例中，該目標抗原係 KIT。在一些實施例中，該一或多個贅生性細胞係源自 KIT 表現性腎癌。在一些實施例中，該個體對用(a)單獨投與時之抗 KIT 抗體及/或(b)單獨投與時之剪接調節劑治療無反應或反應不良。在一些實施例中，該個體對用單獨投與時之剪接調節劑治療不耐受、無反應或反應不良。

【0108】 在一些實施例中，該目標抗原係 MET。在一些實施例中，該一或多個贅生性細胞係源自 MET 表現性腎癌或食道癌。在一些實施例中，該個體對用(a)單獨投與時之抗 MET 抗體及/或(b)單獨投與時之剪接調節劑治療無反應或反應不良。在一些實施例中，該個體對用單獨投與時之剪接調節劑治療不耐受、無反應或反應不良。

【0109】 在一些實施例中，該目標抗原係 MUC16。在一些實施例中，該一或多個贅生性細胞係源自 MUC16 表現性卵巢癌、子宮頸癌或乳癌。在一些實施例中，該個體對用(a)單獨投與時之抗 MUC16 抗體及/或

(b)單獨投與時之剪接調節劑治療無反應或反應不良。在一些實施例中，該個體對用單獨投與時之剪接調節劑治療不耐受、無反應或反應不良。

【0110】 在一些實施例中，該目標抗原係 SLC39A6。在一些實施例中，該一或多個贅生性細胞係源自 SLC39A6 表現性乳癌或前列腺癌。在一些實施例中，該個體對用(a)單獨投與時之抗 SLC39A6 抗體及/或(b)單獨投與時之剪接調節劑治療無反應或反應不良。在一些實施例中，該個體對用單獨投與時之剪接調節劑治療不耐受、無反應或反應不良。

【0111】 在一些實施例中，該目標抗原係 SLC44A4。在一些實施例中，該一或多個贅生性細胞係源自 SLC44A4 表現性前列腺癌。在一些實施例中，該個體對用(a)單獨投與時之抗 SLC44A4 抗體及/或(b)單獨投與時之剪接調節劑治療無反應或反應不良。在一些實施例中，該個體對用單獨投與時之剪接調節劑治療不耐受、無反應或反應不良。

【0112】 在一些實施例中，該目標抗原係 STEAP1。在一些實施例中，該一或多個贅生性細胞係源自 STEAP1 表現性前列腺癌。在一些實施例中，該個體對用(a)單獨投與時之抗 STEAP1 抗體及/或(b)單獨投與時之剪接調節劑治療無反應或反應不良。在一些實施例中，該個體對用單獨投與時之剪接調節劑治療不耐受、無反應或反應不良。

【0113】 在某些其他態樣中，本發明提供減少或抑制患有或疑似患有贅生性病症之個體中之腫瘤生長的方法，其係藉由向該個體投與治療有效量及/或方案的所述 ADC 或組合物中之任一種實現。

【0114】 在一些實施例中，用該抗體-藥物結合物或組合物治療誘導對不表現目標抗原但鄰近於表現目標抗原之贅生性腫瘤細胞的贅生性腫瘤細胞之旁觀者殺滅。在一些實施例中，該腫瘤包含一或多個表現目標抗原

之贅生性細胞。

【0115】在一些實施例中，該目標抗原係 HER2。在一些實施例中，該一或多個贅生性細胞係源自 HER2 表現性乳癌、卵巢癌、胃癌、肺癌(例如肺腺癌)、子宮癌(例如子宮漿液性子宮內膜癌)或唾腺管癌。在一些實施例中，該腫瘤對用(a)單獨投與時之抗 HER2 抗體及/或(b)單獨投與時之剪接調節劑治療具有抗性或難以用其治療。

【0116】在一些實施例中，該目標抗原係 CD138。在一些實施例中，該一或多個贅生性細胞係源自 CD138 表現性多發性骨髓瘤。在一些實施例中，該腫瘤對用(a)單獨投與時之抗 CD138 抗體及/或(b)單獨投與時之剪接調節劑治療具有抗性或難以用其治療。

【0117】在一些實施例中，該目標抗原係 EPHA2。在一些實施例中，該一或多個贅生性細胞係源自 EPHA2 表現性乳癌、前列腺癌、卵巢癌、肺癌、黑素瘤、結腸癌或食道癌。在一些實施例中，該腫瘤對用(a)單獨投與時之抗 EPHA2 抗體及/或(b)單獨投與時之剪接調節劑治療具有抗性或難以用其治療。

【0118】在一些實施例中，該目標抗原係 MSLN。在一些實施例中，該一或多個贅生性細胞係源自 MSLN 表現性卵巢癌、子宮頸癌、胰臟癌或肺癌(例如肺腺癌)。在一些實施例中，該腫瘤對用(a)單獨投與時之抗 MSLN 抗體及/或(b)單獨投與時之剪接調節劑治療具有抗性或難以用其治療。

【0119】在一些實施例中，該目標抗原係 FOLH1。在一些實施例中，該一或多個贅生性細胞係源自 FOLH1 表現性前列腺癌。在一些實施例中，該腫瘤對用(a)單獨投與時之抗 FOLH1 抗體及/或(b)單獨投與時之

剪接調節劑治療具有抗性或難以用其治療。

【0120】 在一些實施例中，該目標抗原係 CDH6。在一些實施例中，該一或多個贅生性細胞係源自 CDH6 表現性腎癌。在一些實施例中，該腫瘤對用(a)單獨投與時之抗 CDH6 抗體及/或(b)單獨投與時之剪接調節劑治療具有抗性或難以用其治療。

【0121】 在一些實施例中，該目標抗原係 CEACAM5。在一些實施例中，該一或多個贅生性細胞係源自 CEACAM5 表現性結腸直腸癌。在一些實施例中，該腫瘤對用(a)單獨投與時之抗 CEACAM5 抗體及/或(b)單獨投與時之剪接調節劑治療具有抗性或難以用其治療。

【0122】 在一些實施例中，該目標抗原係 CFC1B。在一些實施例中，該一或多個贅生性細胞係源自 CFC1B 表現性胰臟癌。在一些實施例中，該腫瘤對用(a)單獨投與時之抗 CFC1B 抗體及/或(b)單獨投與時之剪接調節劑治療具有抗性或難以用其治療。

【0123】 在一些實施例中，該目標抗原係 ENPP3。在一些實施例中，該一或多個贅生性細胞係源自 ENPP3 表現性腎癌。在一些實施例中，該腫瘤對用(a)單獨投與時之抗 ENPP3 抗體及/或(b)單獨投與時之剪接調節劑治療具有抗性或難以用其治療。

【0124】 在一些實施例中，該目標抗原係 FOLR1。在一些實施例中，該一或多個贅生性細胞係源自 FOLR1 表現性卵巢癌。在一些實施例中，該腫瘤對用(a)單獨投與時之抗 FOLR1 抗體及/或(b)單獨投與時之剪接調節劑治療具有抗性或難以用其治療。

【0125】 在一些實施例中，該目標抗原係 HAVCR1。在一些實施例中，該一或多個贅生性細胞係源自 HAVCR1 表現性腎癌或食道癌。在一

些實施例中，該腫瘤對用(a)單獨投與時之抗 HAVCR1 抗體及/或(b)單獨投與時之剪接調節劑治療具有抗性或難以用其治療。

【0126】 在一些實施例中，該目標抗原係 KIT。在一些實施例中，該一或多個贅生性細胞係源自 KIT 表現性腎癌。在一些實施例中，該腫瘤對用(a)單獨投與時之抗 KIT 抗體及/或(b)單獨投與時之剪接調節劑治療具有抗性或難以用其治療。

【0127】 在一些實施例中，該目標抗原係 MET。在一些實施例中，該一或多個贅生性細胞係源自 MET 表現性腎癌或食道癌。在一些實施例中，該腫瘤對用(a)單獨投與時之抗 MET 抗體及/或(b)單獨投與時之剪接調節劑治療具有抗性或難以用其治療。

【0128】 在一些實施例中，該目標抗原係 MUC16。在一些實施例中，該一或多個贅生性細胞係源自 MUC16 表現性卵巢癌、子宮頸癌或乳癌。在一些實施例中，該腫瘤對用(a)單獨投與時之抗 MUC16 抗體及/或(b)單獨投與時之剪接調節劑治療具有抗性或難以用其治療。

【0129】 在一些實施例中，該目標抗原係 SLC39A6。在一些實施例中，該一或多個贅生性細胞係源自 SLC39A6 表現性乳癌或前列腺癌。在一些實施例中，該腫瘤對用(a)單獨投與時之抗 SLC39A6 抗體及/或(b)單獨投與時之剪接調節劑治療具有抗性或難以用其治療。

【0130】 在一些實施例中，該目標抗原係 SLC44A4。在一些實施例中，該一或多個贅生性細胞係源自 SLC44A4 表現性前列腺癌。在一些實施例中，該腫瘤對用(a)單獨投與時之抗 SLC44A4 抗體及/或(b)單獨投與時之剪接調節劑治療具有抗性或難以用其治療。

【0131】 在一些實施例中，該目標抗原係 STEAP1。在一些實施例

中，該一或多個贅生性細胞係源自 STEAP1 表現性前列腺癌。在一些實施例中，該腫瘤對用(a)單獨投與時之抗 STEAP1 抗體及/或(b)單獨投與時之剪接調節劑治療具有抗性或難以用其治療。

【0132】 在又其他態樣中，本發明提供確定患有或疑似患有贅生性病症之個體是否會對用所述 ADC 或組合物中之任一種治療起反應的方法，其係藉由提供來自該個體之生物樣品及使該生物樣品與該 ADC 或組合物接觸來實現。在一些實施例中，該生物樣品係腫瘤樣品。在一些實施例中，該腫瘤樣品係腫瘤切片或血液樣品。在一些實施例中，該血液樣品係選自血液、血液級分或自該血液或血液級分獲得的細胞。在一些實施例中，該個體具有一或多個表現目標抗原之贅生性細胞。在一些實施例中，該目標抗原係 HER2。在一些實施例中，該一或多個贅生性細胞係源自 HER2 表現性乳癌、卵巢癌、胃癌、肺癌(例如肺腺癌)、子宮癌(例如子宮漿液性子宮內膜癌)或唾腺管癌。在一些實施例中，該目標抗原係 CD138。在一些實施例中，該一或多個贅生性細胞係源自 CD138 表現性多發性骨髓瘤。在一些實施例中，該目標抗原係 EPHA2。在一些實施例中，該一或多個贅生性細胞係源自 EPHA2 表現性乳癌、前列腺癌、卵巢癌、肺癌、黑素瘤、結腸癌或食道癌。在一些實施例中，該目標抗原係 MSLN。在一些實施例中，該一或多個贅生性細胞係源自 MSLN 表現性卵巢癌、子宮頸癌、胰臟癌或肺癌(例如肺腺癌)。在一些實施例中，該目標抗原係 FOLH1。在一些實施例中，該一或多個贅生性細胞係源自 FOLH1 表現性前列腺癌。在一些實施例中，該目標抗原係 CDH6。在一些實施例中，該一或多個贅生性細胞係源自 CDH6 表現性腎癌。在一些實施例中，該目標抗原係 CEACAM5。在一些實施例中，該一或多個贅

生性細胞係源自 CEACAM5 表現性結腸直腸癌。在一些實施例中，該目標抗原係 CFC1B。在一些實施例中，該一或多個贅生性細胞係源自 CFC1B 表現性胰臟癌。在一些實施例中，該目標抗原係 ENPP3。在一些實施例中，該一或多個贅生性細胞係源自 ENPP3 表現性腎癌。在一些實施例中，該目標抗原係 FOLR1。在一些實施例中，該一或多個贅生性細胞係源自 FOLR1 表現性卵巢癌。在一些實施例中，該目標抗原係 HAVCR1。在一些實施例中，該一或多個贅生性細胞係源自 HAVCR1 表現性腎癌或食道癌。在一些實施例中，該目標抗原係 KIT。在一些實施例中，該一或多個贅生性細胞係源自 KIT 表現性腎癌。在一些實施例中，該目標抗原係 MET。在一些實施例中，該一或多個贅生性細胞係源自 MET 表現性腎癌或食道癌。在一些實施例中，該目標抗原係 MUC16。在一些實施例中，該一或多個贅生性細胞係源自 MUC16 表現性卵巢癌、子宮頸癌或乳癌。在一些實施例中，該目標抗原係 SLC39A6。在一些實施例中，該一或多個贅生性細胞係源自 SLC39A6 表現性乳癌或前列腺癌。在一些實施例中，該目標抗原係 SLC44A4。在一些實施例中，該一或多個贅生性細胞係源自 SLC44A4 表現性前列腺癌。在一些實施例中，該目標抗原係 STEAP1。在一些實施例中，該一或多個贅生性細胞係源自 STEAP1 表現性前列腺癌。

【0133】 在各種實施例中，本文進一步提供包含 ADC 及醫藥學上可接受之稀釋劑、載劑及/或賦形劑之醫藥組合物。亦揭示製造所述 ADC 複合物及組合物之方法。

【圖式簡單說明】

【0134】 **圖 1** 顯示在競爭性結合分析中例示性有效負載化合物之劑

量反應。用抗 SF3B1 抗體及閃爍近接分析(SPA)珠粒混合液使來自過度表現 flag 標記之野生型 SF3B1 之 293F 細胞的核提取物免疫沈澱。結合反應含有抗體-珠粒混合物及遞增濃度之化合物，隨後與 $^{3}H$ 標記之普拉二烯內酯 B(PB)探針競爭。y 軸表示相對於 DMSO 對照(0%)之特異性結合變化百分比(反應%)。資料表示為平均值±標準差(SD)。

【0135】 **圖 2** 顯示在活體外剪接分析中由例示性有效負載化合物進行之剪接調節。將來自 HeLa S3 細胞之核提取物與 Ad2.2 pre-mRNA 及遞增濃度之化合物一起培育，隨後經由 RT-PCR 對剪接調節定量。Ad2.2 序列係源自在分支點序列周圍具有修飾之腺病毒 Ad2 pre-mRNA 受質。y 軸表示相對於 DMSO 對照(0%)之剪接變化百分比(反應%)。資料表示為平均值±SD。

【0136】 **圖 3** 顯示在 HER2 擴增之乳癌細胞(HCC1954)中例示性有效負載化合物之活力劑量反應。將細胞與化合物一起培育 144 小時(6 天)並在 CellTiter-Glo®試劑中讀取活力。資料表示為平均值±SD。

【0137】 **圖 4** 顯示細胞結合分析之結果。藉由流動式細胞測量術評估例示性 HER2-ADC 與 JIMT1 細胞之結合。量測平均螢光強度值以測定結合物之結合，隨後測定 PE 標記之二級抗體之結合。資料表示為平均值±SD。

【0138】 **圖 5A** 顯示在 HER2 擴增之乳癌細胞(HCC1954)中例示性 HER2-ADC 之活力劑量反應。**圖 5B** 顯示在 HER2 擴增之胃癌細胞(N87)中例示性 HER2-ADC 之活力劑量反應。**圖 5C** 顯示在 HER2 擴增之乳癌細胞(SKBR3)中例示性 HER2-ADC 之活力劑量反應。將細胞與結合物一起培育 144 小時(6 天)並在 CellTiter-Glo®試劑中讀取活力。資料表示為

平均值±SD。

【0139】 **圖 6** 顯示在非 HER2 表現性乳癌細胞(MCF7)中例示性 HER2-ADC 之活力劑量反應。將細胞與結合物一起培育 144 小時(6 天)並在 CellTiter-Glo®試劑中讀取活力。資料表示為平均值±SD。

【0140】 **圖 7** 顯示在 HER2 擴增之乳癌細胞(HCC1954)中 SLC25A19 剪接分析之結果。細胞與結合物一起培育 24 小時並在實時 qPCR 反應中，用特異性 Taqman 引子-探針集量測 SLC25A19 轉錄物之剪接。y 軸表示相對於 DMSO 對照(0%)之反應百分比(%)。資料表示為平均值±SD。

【0141】 **圖 8** 顯示旁觀者殺滅分析之結果。用例示性 HER2-ADC 處理螢光素酶標記的過度表現 HER2 之 H1568 細胞(目標陽性)或 H1568 細胞(目標陰性)，該等細胞係單獨塗鋪或在共培養物中一起培育 144 小時(6 天)。用 OneGlo®試劑讀取盤。y 軸表示相對於 PBS 對照(100%)之反應百分比(%)。資料表示為平均值±SD。

【0142】 **圖 9** 顯示用單次靜脈內劑量之例示性 HER2-ADC 或相應劑量相配之有效負載治療每組植入 HCC1954 之 CB17-SCID 小鼠(6-10 隻動物/組)的腫瘤生長動力學。在治療後，每週兩次量測腫瘤體積。資料表現為平均值±平均值之標準誤差(SEM)。

【0143】 **圖 10** 顯示在 CD138 表現性多發性骨髓瘤細胞株中例示性 CD138-ADC 之活力劑量反應。將 MOLP8 細胞與結合物一起培育 144 小時(6 天)並在 CellTiter-Glo®試劑中讀取活力。資料表示為平均值±SD。

【0144】 **圖 11** 顯示在 EPHA2 表現性前列腺癌細胞株中例示性 EPH2A-ADC 之活力劑量反應。將 PC3 細胞與結合物一起培育 144 小時

(6 天)並在 CellTiter-Glo®試劑中讀取活力。資料表示為平均值±SD。

【0145】 **圖 12A** 及**圖 12B** 顯示例示性抗 HER2 ADC，即 AB185-ADL1-D1 之活體外穩定性分析的結果。y 軸表示總抗體(**圖 12A**)及經結合(完整)有效負載(**圖 12B**)之濃度；x 軸表示在 37℃下以小時量度之時間。

【0146】 **圖 13** 顯示在帶有 N87 腫瘤之 CD17-SCID 小鼠中單次靜脈內劑量之後例示性抗 HER2 ADC，即 AB185-ADL1-D1 之血漿濃度。

【0147】 **圖 14** 顯示例示性 RNA 定序及蛋白質配體組(ligandome)實驗之示意圖。

【0148】 **圖 15** 顯示例示性 T 細胞激活實驗之示意圖。

【0149】 **圖 16** 顯示 FACS 分析之結果。自周邊血液單核細胞(PBMC)分離單核球並經由在細胞介素混合液中培養，誘導其分化成樹突狀細胞(DC)。執行 FACS 以驗證來自單核球之 DC 的成熟情況。

【0150】 **圖 17A-D** 顯示 ELISpot 分析之結果。**圖 17A** 顯示 ELISpot 盤，指示新抗原 1 引發 CD8+ T 細胞活化。藉由 IFNγ 之分泌監測 CD8+ T 細胞之刺激情況。**圖 17B** 顯示新抗原 1 ELISpot 盤(**圖 17A**)中 IFNγ 斑點之定量(斑點數量)。**圖 17C** 顯示 ELISpot 盤，指示新抗原 3 引發 CD8+ T 細胞活化。藉由 IFNγ 之分泌監測 CD8+ T 細胞之刺激情況。**圖 17D** 顯示新抗原 3 ELISpot 盤(**圖 17C**)中 IFNγ 斑點之定量(倍數變化)。

【0151】 **圖 18** 顯示比較例示性抗 HER2 ADC 在 HCC1954 乳癌細胞中之剪接效力(IC50 qPCR)與細胞效力(GI50 CTG)之標繪圖。所示值依據細胞致死率排定大小且依據選擇性剪接反應之深度設定陰影。

【0152】 **圖 19** 顯示比較例示性抗 HER2 ADC 在 N87 胃癌細胞中之

剪接效力(IC50 qPCR)與細胞效力(GI50 CTG)之標繪圖。所示值依據細胞致死率排定大小且依據選擇性剪接反應之深度設定陰影。

【0153】 **圖 20** 顯示比較例示性抗 HER2 ADC 之效力及致死率(在 HCC1954 乳癌細胞中)與相應有效負載之穩定性及滲透性的標繪圖。所示值依據有效負載穩定性排定大小且依據有效負載滲透性設定陰影。

【0154】 **圖 21** 顯示用媒劑或 10 mg/kg 曲妥珠單抗(trastuzumab)、TDM1 或例示性 HER2-ADC Q7D 靜脈內治療 2 個週期的每組植入 N87 之 CB17-SCID 小鼠(N=8 隻/組)的腫瘤生長動力學。資料表現為平均值±平均值之標準誤差(SEM)($mm^3$)。

【0155】 **圖 22** 顯示用媒劑或 10 mg/kg 曲妥珠單抗、TDM1 或例示性 HER2-ADC Q7D 靜脈內治療 2 個週期的每組植入 N87 之 CB17-SCID 小鼠(N=8 隻/組)的體重變化。資料表現為平均值±平均值之標準誤差(SEM)(%)。

【0156】 **圖 23** 顯示用媒劑或 10 mg/kg 曲妥珠單抗、TDM1 或例示性 HER2-ADC Q7D 靜脈內治療 2 個週期的每組植入 N87 之 CB17-SCID 小鼠(N=8 隻/組)的腫瘤生長動力學(左圖)及體重變化(右圖)。資料表示為平均值±SEM(腫瘤體積，$mm^3$)或平均值±SEM(體重，%)。

【0157】 **圖 24A-24D** 顯示用媒劑或 10 mg/kg 曲妥珠單抗、TDM1 或例示性 HER2-ADC Q7D 靜脈內治療 2 個週期的植入 N87 之 CB17-SCID 小鼠中 mRNA 接合點之藥效學(PD)調節。監測 FBXW5(成熟 mRNA 轉錄物)之 RT-qPCR 並顯示於**圖 24A** 及**圖 24C** 中。監測 TAOK1(新接合點轉錄物)之 RT-qPCR 並顯示於**圖 24B** 及**圖 24D** 中。在 48 小時(**圖 24A** 及**圖 24B**)或在指定時間(**圖 24C** 及**圖 24D**)時收集動物

(N=4 隻/組)。分離腫瘤用於 RNA 提取及 RT-qPCR。

【0158】 **圖 25** 顯示例示性目標適應症分析之示意圖。

【實施方式】

【0159】 本發明主張 2018 年 6 月 1 日提交之美國臨時專利申請案第 62/679,672 號、2018 年 6 月 1 日提交之美國臨時專利申請案第 62/679,631 號及 2018 年 12 月 13 日提交之美國臨時專利申請案第 62/779,324 號之優先權益。前述所有申請案均以全文引用之方式併入本文中。

【0160】 結合附圖，參照以下詳細描述可更容易地理解所揭示之組合物及方法，該等附圖形成本發明之一部分。

【0161】 在本文通篇，描述涉及組合物及使用該等組合物之方法。當本發明描述或主張與組合物相關聯之特徵或實施例時，此類特徵或實施例同樣適用於使用該組合物之方法。同樣，當本發明描述或主張與使用組合物之方法相關聯之特徵或實施例時，此類特徵或實施例同樣適用於該組合物。

【0162】 當表示值之範圍時，其包括使用該範圍內之任何特定值之實施例。另外，提及以範圍陳述之值包括在該範圍內的每一個值。所有範圍均包括其端點在內且可組合。當藉由在前面使用「約」，以近似值表示值時，應理解該特定值形成另一實施例。除非上下文另外明確指示，否則提及特定數字值至少包括該特定值。除非另外規定其使用之具體環境，否則使用「或」將意謂「及/或」。本文中引用之所有參考文獻均以引用的方式併入用於任何目的。在參考文獻與本說明書矛盾之情況下，將以本說明書為準。

【0163】 應瞭解，本文中為清楚起見而在單獨實施例之情形下描述的所揭示之組合物及方法之某些特徵亦可以單個實施例之組合形式提供。相反，為簡潔起見而在單個實施例之情形下描述的所揭示之組合物及方法的各種特徵亦可單獨或以任何子組合形式提供。

**定義**

【0164】 在本說明書及申請專利範圍通篇使用與本說明書各態樣相關之多種術語。除非另外指示，否則此類術語將具有其在此項技術中之普通含義。其他具體定義之術語應以符合本文所提供之定義的方式解釋。

【0165】 除非上下文另外明確規定，否則如本文所使用，單數形式「一個(種)(a/an)」及「該(the)」包括複數形式。

【0166】 熟習此項技術者自本文中所含教示顯而易知，在數字值及範圍之情形中，術語「約」或「近似地」係指近似值或範圍或該等值或範圍接近所述值或範圍，以使得實施例可根據預期執行，諸如在反應混合物中具有所需量之核酸或多肽。在一些實施例中，約意思指數字量±10%。

【0167】 術語「抗體-藥物結合物」、「抗體結合物」、「結合物」、「免疫結合物」及「ADC」可互換使用，且係指連接至一或多種抗體或抗原結合片段之一或多種治療性化合物(例如剪接調節劑)且其藉由以下通式定義：$Ab-(L-D)_p$(式 I)，其中 Ab=抗體或抗原結合片段，L=連接子部分，D=藥物部分(例如剪接調節劑藥物部分)，且 $p$=每個抗體或抗原結合片段之藥物部分的數量。包含剪接調節劑藥物部分之 ADC 在本文中又可更具體地稱為「裝載剪接調節劑之抗體」或「SMLA」。在包含剪接調節劑藥物部分之 ADC 中，「$p$」係指連接至該抗體或抗原結合片段的剪接調節劑化合物之數量。在一些實施例中，連接子 L 可以包括在該抗體或抗原結合

片段與該治療性化合物之間的可裂解部分。在一些實施例中，連接子 L 可以包括可藉由間隔子單元連接至抗體或抗原結合片段及治療性化合物之一或兩種之可裂解部分。在一些實施例中，當間隔子單元將可裂解部分連接至治療性化合物時，其係自我分解型間隔子單元。在其他實施例中，連接子 L 不包括可裂解部分，且為不可裂解連接子。在一些實施例中，連接子 L 可以包括至少一個間隔子單元，其可以直接地連接至該抗體或抗原結合片段及該治療性化合物。例示性可裂解及不可裂解連接子在本文中有描述及舉例說明。

【0168】 術語「抗體」係以最廣泛之含義使用，意思指經由免疫球蛋白分子可變區內之至少一個抗原識別位點識別且特異性結合至目標，諸如蛋白質、多肽、碳水化合物、聚核苷酸、脂質或前述之組合的免疫球蛋白分子。抗體之重鏈由重鏈可變結構域($V_H$)及重鏈恆定區($C_H$)構成。輕鏈由輕鏈可變結構域($V_L$)及輕鏈恆定結構域($C_L$)構成。出於本申請案之目的，成熟重鏈及輕鏈可變結構域各自包含自 N 端至 C 端如下佈置的在四個構架區(FR1、FR2、FR3 及 FR4)內之三個互補決定區(CDR1、CDR2 及 CDR3)：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3 及 FR4。「抗體」可為天然存在的或人造的，諸如藉由習知融合瘤技術製造之單株抗體。術語「抗體」包括全長單株抗體及全長多株抗體，以及抗體片段，諸如 Fab、Fab'、$F(ab')_2$、Fv 及單鏈抗體。抗體可為五個主要種類之免疫球蛋白中之任一種：IgA、IgD、IgE、IgG 及 IgM，或其亞類(例如同型 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4)。該術語進一步涵蓋人類抗體、嵌合抗體、人類化抗體及含有抗原識別位點之任何經修飾之免疫球蛋白分子，只要其展示所需生物活性(例如結合目標抗原、內化至表現目標抗原之細胞內)即

可。

【0169】 如本文所使用，術語「單株抗體」係指自實質上均質之抗體群體獲得的抗體，亦即，除可能少量存在的可能天然存在之突變以外，構成該群體之各個抗體係相同的。單株抗體針對單一抗原性抗原決定基具有高度特異性。相比之下，習知(多株)抗體製劑通常包括針對不同抗原決定基(或對其具有特異性)之多種抗體。修飾語「單株」指示抗體之性質係自實質上均質之抗體群獲得，且不應理解為需要藉由任何特殊方法來製造該抗體。舉例而言，擬根據本發明使用之單株抗體可藉由 Kohler 等人 (1975) Nature 256:495 最先描述的融合瘤方法製得，或可藉由重組 DNA 方法(參見例如美國專利第 4,816,567 號)製得。「單株抗體」亦可使用例如 Clackson 等人 (1991) Nature 352:624-8 及 Marks 等人 (1991) J. Mol. Biol. 222:581-97 中描述之技術自噬菌體抗體文庫分離。

【0170】 本文所描述之單株抗體特定地包括「嵌合」抗體，在該抗體中，重鏈及/或輕鏈之一部分與源自特定物種或屬於特定抗體種類或亞類之抗體中的相應序列一致或同源，而鏈之其餘部分與源自另一物種或屬於另一抗體種類或亞類之抗體中的相應序列一致或同源；以及此類抗體之片段，只要其特異性結合目標抗原及/或展現所需生物活性即可。

【0171】 如本文所使用，術語「人類抗體」係指由人類產生之抗體或具有由人類產生之抗體之胺基酸序列的抗體。

【0172】 如本文所使用，術語「嵌合抗體」係指免疫球蛋白分子之胺基酸序列源自兩種或兩種以上物種的抗體。在一些情況下，重鏈及輕鏈之可變區對應於源自具有所需特異性、親和力及活性之一個物種的抗體之可變區，而恆定區與源自另一物種(例如人類)之抗體同源，以使後一物種

中之免疫反應減到最少。

【0173】 如本文所使用，術語「人類化抗體」係指含有來自非人類(例如鼠類)抗體以及人類抗體之序列的抗體形式。此類抗體係含有源自非人類免疫球蛋白之最小序列之嵌合抗體。一般而言，人類化抗體將包含至少一個且通常兩個可變結構域之實質上全部，其中所有或實質上所有高變環對應於非人類免疫球蛋白之該等區域且所有或實質上所有構架(FR)區係人類免疫球蛋白序列之該等區域。人類化抗體視情況亦將包含免疫球蛋白恆定區(Fc)，通常人類免疫球蛋白恆定區之至少一部分。人類化抗體可藉由 Fv 構架區中及/或所置換之非人類殘基內殘基之取代而進一步修飾，以改進及優化抗體特異性、親和力及/或活性。

【0174】 如本文所使用，術語抗體之「抗原結合片段」或「抗原結合部分」係指抗體或蛋白質中保持特異性結合至抗原(例如 HER2、CD138、EPHA2、MSLN、FOLH1、CDH6、CEACAM5、CFC1B、ENPP3、FOLR1、HAVCR1、KIT、MET、MUC16、SLC39A6、SLC44A4、STEAP1)之能力之一或多個片段。抗原結合片段亦可保持內化至抗原表現細胞中之能力。在一些實施例中，抗原結合片段還保持免疫效應物活性。經顯示，全長抗體之片段可以執行全長抗體之抗原結合功能。術語抗體之「抗原結合片段」或「抗原結合部分」內所涵蓋之結合片段的實例包括(i) Fab 片段，一種由 $V_L$、$V_H$、$C_L$ 及 $C_{H1}$ 結構域組成之單價片段；(ii) $F(ab')_2$ 片段，一種包含藉由鉸鏈區處之二硫橋鍵連接之二個 Fab 片段的二價片段；(iii)由 $V_H$ 及 $C_{H1}$ 結構域組成之 Fd 片段；(iv)由抗體單一臂之 $V_L$ 及 $V_H$ 結構域組成之 Fv 片段；(v) dAb 片段，其包含單一可變結構域，例如 $V_H$ 結構域(參見例如 Ward 等人(1989)Nature 341:544-

6；以及國際公開案第 WO 1990/005144 號)；以及(vi)經分離之互補決定區(CDR)。此外，儘管 Fv 片段之兩個結構域 $V_L$ 及 $V_H$ 係由獨立基因編碼，但其可以使用重組方法，藉由使其能夠以單一蛋白質鏈形式製造之合成連接子接合，其中 $V_L$ 與 $V_H$ 區域配對形成單價分子(稱為單鏈 Fv(scFv))。參見例如 Bird 等人(1988) Science 242:423-6；及 Huston 等人(1988) Proc Natl Acad Sci. USA 85:5879-83。此類單鏈抗體亦意欲涵蓋在術語抗體之「抗原結合片段」或「抗原結合部分」內，且此項技術中已知為當結合時可以內化至細胞中的例示性結合片段類型(參見例如 Zhu 等人(2010) 9:2131-41；He 等人(2010) J Nucl Med. 51:427-32；及 Fitting 等人(2015) MAbs 7:390-402)。在某些實施例中，scFv 分子可以併入融合蛋白中。亦涵蓋其他形式之單鏈抗體，諸如雙功能抗體。雙功能抗體係二價雙特異性抗體，其中 $V_H$ 及 $V_L$ 結構域係在單一多肽鏈上表現，但使用太短而不允許同一鏈上之兩個結構域之間配對的連接子，由此迫使該等結構域與另一鏈之互補結構域配對且產生兩個抗原結合位點(參見例如 Holliger 等人(1993) Proc Natl Acad Sci. USA 90:6444-8；及 Poljak 等人(1994) Structure 2:1121-3)。抗原結合片段係使用熟習此項技術者已知之習知技術獲得，且該等結合片段係以與完整抗體相同之方式進行效用(例如結合親和力、內化)篩選。抗原結合片段可藉由裂解完整蛋白質，例如藉由蛋白酶或化學裂解來製備。

【0175】 如本文關於抗體或抗原結合片段所使用，「內化」係指抗體或抗原結合片段當結合至細胞時能夠吸收穿過細胞之脂質雙層膜進入內部隔室(亦即，「經內化」)，較佳地進入細胞中之降解隔室中。舉例而言，內化性抗 HER2 抗體係能夠在結合至細胞膜上之 HER2 之後吸收進入

細胞中的抗體。在一些實施例中，本文所揭示之 ADC 中使用的抗體或抗原結合片段靶向細胞表面抗原(例如 HER2)且係內化性抗體或內化性抗原結合片段(亦即，ADC 在抗原結合之後轉移穿過細胞膜)。在一些實施例中，該內化性抗體或抗原結合片段結合細胞表面上之受體。靶向細胞膜上之受體的內化性抗體或內化性抗原結合片段可以誘導受體介導之內吞作用。在一些實施例中，內化性抗體或內化性抗原結合片段經由受體介導之內吞作用吸收至細胞中。

【0176】 如關於抗體或抗原結合片段本文所使用，「非內化」係指抗體或抗原結合片段當結合至細胞時保留在細胞表面處。在一些實施例中，本文所揭示之 ADC 中使用的抗體或抗原結合片段靶向細胞表面抗原且為非內化性抗體或非內化性抗原結合片段(亦即，ADC 在抗原結合之後保留在細胞表面處且不轉移穿過細胞膜)。在一些實施例中，非內化性抗體或抗原結合片段結合非內化性受體或其他細胞表面抗原。例示性非內化性細胞表面抗原包括(但不限於) CA125 及 CEA，且結合至非內化性抗原目標之抗體亦係此項技術中所知的(參見例如 Bast 等人(1981) J Clin Invest. 68(5):1331-7；Scholler 及 Urban (2007) Biomark Med. 1(4):513-23；及 Boudousq 等人(2013) PLoS One 8(7):e69613)。

【0177】 如本文所使用，術語「人類表皮生長因子受體 2」、「HER2」或「HER2/NEU」係指任何天然形式之人類 HER2。該術語涵蓋全長 HER2(例如 UniProt 參考序列：P04626；SEQ ID NO: 31)，以及可以由細胞加工得到的任何形式之人類 HER2。該術語亦涵蓋人類 HER2 之功能變異體或片段，包括(但不限於)保持人類 HER2 之一或多種生物功能之剪接變異體、對偶基因變異體及同功異型物(亦即，除非上下文指示該

術語僅用於指野生型蛋白質，否則涵蓋變異體及片段)。HER2 可自人類分離，或可以重組方式或藉由合成方法製造。

【0178】 術語「抗 HER2 抗體」或「結合至 HER2 之抗體」係指結合，例如特異性結合至 HER2 的任何形式抗體或其片段，且涵蓋單株抗體(包括全長單株抗體)、多株抗體及生物功能抗體片段，只要其結合，例如特異性結合至 HER2 即可。美國專利第 5,821,337 號提供例示性 HER2 結合序列，包括例示性抗 HER2 抗體序列，且該案以引用之方式併入本文中。在一些實施例中，本文所揭示之 ADC 中使用的抗 HER2 抗體係內化性抗體或內化性抗體片段。曲妥珠單抗(美國專利第 5,821,337 號；Molina 等人(2001) Cancer Res. 61(12):4744-9)係例示性抗人類 HER2 抗體。

【0179】 如本文所使用，術語「多配體蛋白聚糖-1」、「SDC1」或「CD138」係指任何天然形式之人類 CD138。該術語涵蓋全長 CD138(例如 UniProt 參考序列：P18827；SEQ ID NO: 32)，以及可由細胞加工得到的任何形式之人類 CD138。該術語亦涵蓋人類 CD138 之功能變異體或片段，包括(但不限於)保持人類 CD138 之一或多種生物功能之剪接變異體、對偶基因變異體及同功異型物(亦即，除非上下文指示該術語僅用於指野生型蛋白質，否則涵蓋變異體及片段)。CD138 可自人類分離，或可以重組方式或藉由合成方法製造。

【0180】 術語「抗 CD138 抗體」或「結合至 CD138 之抗體」係指結合，例如特異性結合至 CD138 的任何形式之抗體或其片段，且涵蓋單株抗體(包括全長單株抗體)、多株抗體及生物功能抗體片段，只要其結合，例如特異性結合至 CD138 即可。在一些實施例中，本文所揭示之

ADC 中使用的抗 CD138 抗體係內化性抗體或內化性抗體片段。B-B4(Tassone 等人(2004) Blood 104:3688-96)係例示性抗人類 CD138 抗體。

【0181】 如本文所使用，術語「蝶素 A 型受體 2」或「EPHA2」係指任何天然形式之人類 EPHA2。該術語涵蓋全長 EPHA2(例如 UniProt 參考序列：P29317；SEQ ID NO: 33)，以及可由細胞加工得到的任何形式之人類 EPHA2。該術語亦涵蓋人類 EPHA2 之功能變異體或片段，包括(但不限於)保持人類 EPHA2 之一或多種生物功能之剪接變異體、對偶基因變異體及同功異型物(亦即，除非上下文指示該術語僅用於指野生型蛋白質，否則涵蓋變異體及片段)。EPHA2 可自人類分離，或可以重組方式或藉由合成方法製造。

【0182】 術語「抗 EPHA2 抗體」或「結合至 EPHA2 之抗體」係指結合，例如特異性結合至 EPHA2 的任何形式之抗體或其片段，且涵蓋單株抗體(包括全長單株抗體)、多株抗體及生物功能抗體片段，只要其結合，例如特異性結合至 EPHA2 即可。WO 2007/030642 提供例示性 EPHA2 結合序列，包括例示性抗 EPHA2 抗體序列，且該案以引用之方式併入本文中。在一些實施例中，本文所揭示之 ADC 中使用的抗 EPHA2 抗體係內化性抗體或內化性抗體片段。1C1 (WO 2007/030642；Jackson 等人(2008) Cancer Res. 68(22): 9367-74)係例示性抗人類 EPHA2 抗體。

【0183】 如本文所使用，術語「間皮素」或「MSLN」係指任何天然形式之人類 MSLN。該術語涵蓋全長 MSLN(例如 UniProt 參考序列：Q13421；SEQ ID NO:43)，以及可由細胞加工得到的任何形式之人類 MSLN。該術語亦涵蓋人類 MSLN 之功能變異體或片段，包括(但不限於)

保持人類 MSLN 之一或多種生物功能之剪接變異體、對偶基因變異體及同功異型物(亦即，除非上下文指示該術語僅用於指野生型蛋白質，否則涵蓋變異體及片段)。MSLN 可自人類分離，或可以重組方式或藉由合成方法製造。

【0184】 術語「抗 MSLN 抗體」或「結合至 MSLN 之抗體」係指結合，例如特異性結合至 MSLN 的任何形式之抗體或其片段，且涵蓋單株抗體(包括全長單株抗體)、多株抗體及生物功能抗體片段，只要其結合，例如特異性結合至 MSLN 即可。WO 2011/074621 提供例示性 MSLN 結合序列，包括例示性抗 MSLN 抗體序列，且該案以引用之方式併入本文中。在一些實施例中，本文所揭示之 ADC 中使用的抗 MSLN 抗體係內化性抗體或內化性抗體片段。11-25、IC14-30、IC7-4、IC17-35 及 2-9 係例示性抗人類 MSLN 抗體。

【0185】 如本文所使用，術語「麩胺酸羧肽酶 2」或「FOLH1」係指任何天然形式之人類 FOLH1。該術語涵蓋全長 FOLH1(例如 UniProt 參考序列：Q04609；SEQ ID NO: 44)，以及可由細胞加工得到的任何形式之人類 FOLH1。該術語亦涵蓋人類 FOLH1 之功能變異體或片段，包括(但不限於)保持人類 FOLH1 之一或多種生物功能之剪接變異體、對偶基因變異體及同功異型物(亦即，除非上下文指示該術語僅用於指野生型蛋白質，否則涵蓋變異體及片段)。FOLH1 可自人類分離，或可以重組方式或藉由合成方法製造。

【0186】 術語「抗 FOLH1 抗體」或「結合至 FOLH1 之抗體」係指結合，例如特異性結合至 FOLH1 的任何形式之抗體或其片段，且涵蓋單株抗體(包括全長單株抗體)、多株抗體及生物功能抗體片段，只要其結

合，例如特異性結合至 FOLH1 即可。WO 2019/012260 及 WO 2017/212250 提供例示性 FOLH1 結合序列，包括例示性抗 FOLH1 抗體序列，且該案以引用之方式併入本文中。在一些實施例中，本文所揭示之 ADC 中使用的抗 FOLH1 抗體係內化性抗體或內化性抗體片段。J591(脫免疫型)係例示性抗人類 FOLH1 抗體。

【0187】 如本文所使用，術語「鈣黏素-6」或「CDH6」係指任何天然形式之人類 CDH6。該術語涵蓋全長 CDH6(例如 UniProt 參考序列：P55285；SEQ ID NO: 45)，以及可由細胞加工得到的任何形式之人類 CDH6。該術語亦涵蓋人類 CDH6 之功能變異體或片段，包括(但不限於)保持人類 CDH6 之一或多種生物功能之剪接變異體、對偶基因變異體及同功異型物(亦即，除非上下文指示該術語僅用於指野生型蛋白質，否則涵蓋變異體及片段)。CDH6 可自人類分離，或可以重組方式或藉由合成方法製造。

【0188】 術語「抗 CDH6 抗體」或「結合至 CDH6 之抗體」係指結合，例如特異性結合至 CDH6 的任何形式之抗體或其片段，且涵蓋單株抗體(包括全長單株抗體)、多株抗體及生物功能抗體片段，只要其結合，例如特異性結合至 CDH6 即可。WO 2018/185618 提供例示性 CDH6 結合序列，包括例示性抗 CDH6 抗體序列，且該案以引用之方式併入本文中。在一些實施例中，本文所揭示之 ADC 中使用的抗 CDH6 抗體係內化性抗體或內化性抗體片段。

【0189】 如本文所使用，術語「癌胚抗原相關細胞黏附分子 5」或「CEACAM5」係指任何天然形式之人類 CEACAM5。該術語涵蓋全長 CEACAM5(例如 UniProt 參考序列：P06731；SEQ ID NO: 46)，以及可

由細胞加工得到的任何形式之人類 CEACAM5。該術語亦涵蓋人類 CEACAM5 之功能變異體或片段，包括(但不限於)保持人類 CEACAM5 之一或多種生物功能之剪接變異體、對偶基因變異體及同功異型物(亦即，除非上下文指示該術語僅用於指野生型蛋白質，否則涵蓋變異體及片段)。CEACAM5 可自人類分離，或可以重組方式或藉由合成方法製造。

【0190】 術語「抗 CEACAM5 抗體」或「結合至 CEACAM5 之抗體」係指結合，例如特異性結合至 CEACAM5 的任何形式之抗體或其片段，且涵蓋單株抗體(包括全長單株抗體)、多株抗體及生物功能抗體片段，只要其結合，例如特異性結合至 CEACAM5 即可。US 2015/0125386 提供例示性 CEACAM5 結合序列，包括例示性抗 CEACAM5 抗體序列，且該案以引用之方式併入本文中。在一些實施例中，本文所揭示之 ADC 中使用的抗 CEACAM5 抗體係內化性抗體或內化性抗體片段。hMN14 係例示性抗人類 CEACAM5 抗體。

【0191】 如本文所使用，術語「隱蔽家族蛋白質(cryptic family protein) 1B」或「CFC1B」係指任何天然形式之人類 CFC1B。該術語涵蓋全長 CFC1B(例如 UniProt 參考序列：P0CG36；SEQ ID NO: 47)，以及可由細胞加工得到的任何形式之人類 CFC1B。該術語亦涵蓋人類 CFC1B 之功能變異體或片段，包括(但不限於)保持人類 CFC1B 之一或多種生物功能之剪接變異體、對偶基因變異體及同功異型物(亦即，除非上下文指示該術語僅用於指野生型蛋白質，否則涵蓋變異體及片段)。CFC1B 可自人類分離，或可以重組方式或藉由合成方法製造。

【0192】 術語「抗 CFC1B 抗體」或「結合至 CFC1B 之抗體」係指結合，例如特異性結合至 CFC1B 的任何形式之抗體或其片段，且涵蓋單

株抗體(包括全長單株抗體)、多株抗體及生物功能抗體片段，只要其結合，例如特異性結合至 CFC1B 即可。WO 2002/088170 提供例示性 CFC1B 結合序列，包括例示性抗 CFC1B 抗體序列，且該案以引用之方式併入本文中。在一些實施例中，本文所揭示之 ADC 中使用的抗 CFC1B 抗體係內化性抗體或內化性抗體片段。

【0193】 如本文所使用，術語「外核苷酸焦磷酸酶/磷酸二酯酶家族成員 3」或「ENPP3」係指任何天然形式之人類 ENPP3。該術語涵蓋全長 ENPP3(例如 UniProt 參考序列：O14638；SEQ ID NO: 48)，以及可由細胞加工得到的任何形式之人類 ENPP3。該術語亦涵蓋人類 ENPP3 之功能變異體或片段，包括(但不限於)保持人類 ENPP3 之一或多種生物功能之剪接變異體、對偶基因變異體及同功異型物(亦即，除非上下文指示該術語僅用於指野生型蛋白質，否則涵蓋變異體及片段)。ENPP3 可自人類分離，或可以重組方式或藉由合成方法製造。

【0194】 術語「抗 ENPP3 抗體」或「結合至 ENPP3 之抗體」係指結合，例如特異性結合至 ENPP3 的任何形式之抗體或其片段，且涵蓋單株抗體(包括全長單株抗體)、多株抗體及生物功能抗體片段，只要其結合，例如特異性結合至 ENPP3 即可。Donate 等人((2016) Clin Cancer Res. 22(8):1989-99)提供例示性 ENPP3 結合序列，包括例示性抗 ENPP3 抗體序列，且該案以引用之方式併入本文中。在一些實施例中，本文所揭示之 ADC 中使用的抗 ENPP3 抗體係內化性抗體或內化性抗體片段。

【0195】 如本文所使用，術語「葉酸受體 α」或「FOLR1」係指任何天然形式之人類 FOLR1。該術語涵蓋全長 FOLR1(例如 UniProt 參考序列：P15328；SEQ ID NO: 49)，以及可由細胞加工得到的任何形式之人

類 FOLR1。該術語亦涵蓋人類 FOLR1 之功能變異體或片段，包括(但不限於)保持人類 FOLR1 之一或多種生物功能之剪接變異體、對偶基因變異體及同功異型物(亦即，除非上下文指示該術語僅用於指野生型蛋白質，否則涵蓋變異體及片段)。FOLR1 可自人類分離，或可以重組方式或藉由合成方法製造。

【0196】 術語「抗 FOLR1 抗體」或「結合至 FOLR1 之抗體」係指結合，例如特異性結合至 FOLR1 的任何形式之抗體或其片段，且涵蓋單株抗體(包括全長單株抗體)、多株抗體及生物功能抗體片段，只要其結合，例如特異性結合至 FOLR1 即可。WO 2005/080431 及 Coney 等人((1991) Cancer Res. 51(22):6125-32)提供例示性 FOLR1 結合序列，包括例示性抗 FOLR1 抗體序列，且該案以引用之方式併入本文中。在一些實施例中，本文所揭示之 ADC 中使用的抗 FOLR1 抗體係內化性抗體或內化性抗體片段。伐吐珠單抗(Farletuzumab)及 MOv19 係例示性抗人類 FOLR1 抗體。

【0197】 如本文所使用，術語「A 型肝炎病毒細胞受體 1」或「HAVCR1」係指任何天然形式之人類 HAVCR1。該術語涵蓋全長 HAVCR1(例如 UniProt 參考序列：Q96D42；SEQ ID NO: 50)，以及可由細胞加工得到的任何形式之人類 HAVCR1。該術語亦涵蓋人類 HAVCR1 之功能變異體或片段，包括(但不限於)保持人類 HAVCR1 之一或多種生物功能之剪接變異體、對偶基因變異體及同功異型物(亦即，除非上下文指示該術語僅用於指野生型蛋白質，否則涵蓋變異體及片段)。HAVCR1 可自人類分離，或可以重組方式或藉由合成方法製造。

【0198】 術語「抗 HAVCR1 抗體」或「結合至 HAVCR1 之抗體」

係指結合，例如特異性結合至 HAVCR1 的任何形式之抗體或其片段，且涵蓋單株抗體(包括全長單株抗體)、多株抗體及生物功能抗體片段，只要其結合，例如特異性結合至 HAVCR1 即可。Thomas 等人((2016) Mol Cancer Ther. 15(12):2946-54)提供例示性 HAVCR1 結合序列，包括例示性抗 HAVCR1 抗體序列，且該案以引用之方式併入本文中。在一些實施例中，本文所揭示之 ADC 中使用的抗 HAVCR1 抗體係內化性抗體或內化性抗體片段。

【0199】 如本文所使用，術語「肥大細胞/幹細胞生長因子受體 Kit」或「KIT」係指任何天然形式之人類 KIT。該術語涵蓋全長 KIT(例如 UniProt 參考序列：P10721；SEQ ID NO: 51)，以及可由細胞加工得到的任何形式之人類 KIT。該術語亦涵蓋人類 KIT 之功能變異體或片段，包括(但不限於)保持人類 KIT 之一或多種生物功能之剪接變異體、對偶基因變異體及同功異型物(亦即，除非上下文指示該術語僅用於指野生型蛋白質，否則涵蓋變異體及片段)。KIT 可自人類分離，或可以重組方式或藉由合成方法製造。

【0200】 術語「抗 KIT 抗體」或「結合至 KIT 之抗體」係指結合，例如特異性結合至 KIT 的任何形式之抗體或其片段，且涵蓋單株抗體(包括全長單株抗體)、多株抗體及生物功能抗體片段，只要其結合，例如特異性結合至 KIT 即可。Shi 等人((2016) Proc Natl Acad Sci USA 113(33):E4784-93)及 Abrams 等人((2018) Clin Cancer Res. 24(17):4297-308)提供例示性 KIT 結合序列，包括例示性抗 KIT 抗體序列，且該案以引用之方式併入本文中。在一些實施例中，本文所揭示之 ADC 中使用的抗 KIT 抗體係內化性抗體或內化性抗體片段。

【0201】 如本文所使用，術語「肝細胞生長因子受體」或「MET」係指任何天然形式之人類 MET。該術語涵蓋全長 MET(例如 UniProt 參考序列：P08581；SEQ ID NO: 52)，以及可由細胞加工得到的任何形式之人類 MET。該術語亦涵蓋人類 MET 之功能變異體或片段，包括(但不限於)保持人類 MET 之一或多種生物功能之剪接變異體、對偶基因變異體及同功異型物(亦即，除非上下文指示該術語僅用於指野生型蛋白質，否則涵蓋變異體及片段)。MET 可自人類分離，或可以重組方式或藉由合成方法製造。

【0202】 術語「抗 MET 抗體」或「結合至 MET 之抗體」係指結合，例如特異性結合至 MET 的任何形式之抗體或其片段，且涵蓋單株抗體(包括全長單株抗體)、多株抗體及生物功能抗體片段，只要其結合，例如特異性結合至 MET 即可。Yang 等人((2019) Acta Pharmacol Sin.)提供例示性 MET 結合序列，包括例示性抗 MET 抗體序列，且該案以引用之方式併入本文中。在一些實施例中，本文所揭示之 ADC 中使用的抗 MET 抗體係內化性抗體或內化性抗體片段。

【0203】 如本文所使用，術語「黏蛋白-16」或「MUC16」係指任何天然形式之人類 MUC16。該術語涵蓋全長 MUC16(例如 UniProt 參考序列：Q8WXI7；SEQ ID NO: 53)，以及可由細胞加工得到的任何形式之人類 MUC16。該術語亦涵蓋人類 MUC16 之功能變異體或片段，包括(但不限於)保持人類 MUC16 之一或多種生物功能之剪接變異體、對偶基因變異體及同功異型物(亦即，除非上下文指示該術語僅用於指野生型蛋白質，否則涵蓋變異體及片段)。MUC16 可自人類分離，或可以重組方式或藉由合成方法製造。

【0204】 術語「抗 MUC16 抗體」或「結合至 MUC16 之抗體」係指結合，例如特異性結合至 MUC16 的任何形式之抗體或其片段，且涵蓋單株抗體(包括全長單株抗體)、多株抗體及生物功能抗體片段，只要其結合，例如特異性結合至 MUC16 即可。Liu 等人((2016) Ann Oncol. 27(11):2124-30)提供例示性 MUC16 結合序列，包括例示性抗 MUC16 抗體序列，且該案以引用之方式併入本文中。在一些實施例中，本文所揭示之 ADC 中使用的抗 MUC16 抗體係內化性抗體或內化性抗體片段。

【0205】 如本文所使用，術語「鋅轉運蛋白 ZIP6」或「SLC39A6」係指任何天然形式之人類 SLC39A6。該術語涵蓋全長 SLC39A6(例如 UniProt 參考序列：Q13433；SEQ ID NO: 54)，以及可由細胞加工得到的任何形式之人類 SLC39A6。該術語亦涵蓋人類 SLC39A6 之功能變異體或片段，包括(但不限於)保持人類 SLC39A6 之一或多種生物功能之剪接變異體、對偶基因變異體及同功異型物(亦即，除非上下文指示該術語僅用於指野生型蛋白質，否則涵蓋變異體及片段)。SLC39A6 可自人類分離，或可以重組方式或藉由合成方法製造。

【0206】 術語「抗 SLC39A6 抗體」或「結合至 SLC39A6 之抗體」係指結合，例如特異性結合至 SLC39A6 的任何形式之抗體或其片段，且涵蓋單株抗體(包括全長單株抗體)、多株抗體及生物功能抗體片段，只要其結合，例如特異性結合至 SLC39A6 即可。Sussman 等人((2014) Mol Cancer Ther. 13(12):2991-3000)提供例示性 SLC39A6 結合序列，包括例示性抗 SLC39A6 抗體序列，且該案以引用之方式併入本文中。在一些實施例中，本文所揭示之 ADC 中使用的抗 SLC39A6 抗體係內化性抗體或內化性抗體片段。

【0207】如本文所使用，術語「膽鹼轉運蛋白樣蛋白質 4」或「SLC44A4」係指任何天然形式之人類 SLC44A4。該術語涵蓋全長 SLC44A4(例如 UniProt 參考序列：Q53GD3；SEQ ID NO: 55)，以及可由細胞加工得到的任何形式之人類 SLC44A4。該術語亦涵蓋人類 SLC44A4 之功能變異體或片段，包括(但不限於)保持人類 SLC44A4 之一或多種生物功能之剪接變異體、對偶基因變異體及同功異型物(亦即，除非上下文指示該術語僅用於指野生型蛋白質，否則涵蓋變異體及片段)。SLC44A4 可自人類分離，或可以重組方式或藉由合成方法製造。

【0208】術語「抗 SLC44A4 抗體」或「結合至 SLC44A4 之抗體」係指結合，例如特異性結合至 SLC44A4 的任何形式之抗體或其片段，且涵蓋單株抗體(包括全長單株抗體)、多株抗體及生物功能抗體片段，只要其結合，例如特異性結合至 SLC44A4 即可。Mattie 等人((2016) Mol Cancer Ther. 15(11):2679-87)提供例示性 SLC44A4 結合序列，包括例示性抗 SLC44A4 抗體序列，且該案以引用之方式併入本文中。在一些實施例中，本文所揭示之 ADC 中使用的抗 SLC44A4 抗體係內化性抗體或內化性抗體片段。

【0209】如本文所使用，術語「金屬還原酶 STEAP1」或「STEAP1」係指任何天然形式之人類 STEAP1。該術語涵蓋全長 STEAP1(例如 UniProt 參考序列：Q9UHE8；SEQ ID NO: 56)，以及可由細胞加工得到的任何形式之人類 STEAP1。該術語亦涵蓋人類 STEAP1 之功能變異體或片段，包括(但不限於)保持人類 STEAP1 之一或多種生物功能之剪接變異體、對偶基因變異體及同功異型物(亦即，除非上下文指示該術語僅用於指野生型蛋白質，否則涵蓋變異體及片段)。STEAP1 可

自人類分離，或可以重組方式或藉由合成方法製造。

【0210】 術語「抗 STEAP1 抗體」或「結合至 STEAP1 之抗體」係指結合，例如特異性結合至 STEAP1 的任何形式之抗體或其片段，且涵蓋單株抗體(包括全長單株抗體)、多株抗體及生物功能抗體片段，只要其結合，例如特異性結合至 STEAP1 即可。WO 2008/052187 提供例示性 STEAP1 結合序列，包括例示性抗 STEAP1 抗體序列，且該案以引用之方式併入本文中。在一些實施例中，本文所揭示之 ADC 中使用的抗 STEAP1 抗體係內化性抗體或內化性抗體片段。

【0211】 如本文所使用，術語「特異性」、「特異性結合(specifically binds)」及「特異性結合(binds specifically)」係指抗體或抗原結合片段(例如抗 HER2 抗體)與蛋白質及其他生物製品之異質群體中的目標抗原(例如 HER2)之間的結合反應。可藉由在一組給定條件下將同適當抗原之結合與同不相關抗原或抗原混合物之結合相比較來測試抗體之結合特異性。若該抗體結合至適當抗原的親和力係與不相關抗原或抗原混合物之結合親和力的至少 2、5、7 倍且較佳地 10 倍或更高倍數，則認為其具有特異性。「特異性抗體」或「目標特異性抗體」係僅結合目標抗原(例如 HER2)，但不結合至其他抗原(或與其展現最小結合)的抗體。在某些實施例中，特異性結合目標抗原(例如 HER2)之抗體或抗原結合片段的 $K_D$ 小於 $1\times10^{-6}$ M、小於 $1\times10^{-7}$ M、小於 $1\times10^{-8}$ M、小於 $1\times10^{-9}$ M、小於 $1\times10^{-10}$ M、小於 $1\times10^{-11}$ M、小於 $1\times10^{-12}$ M 或小於 $1\times10^{-13}$ M。在某些實施例中，$K_D$ 係 1 pM 至 500 pM。在一些實施例中，$K_D$ 係在 500 pM 至 1 μM、1 μM 至 100 nM 或 100 mM 至 10 nM 之間。

【0212】 術語「抗原決定基」係指抗原中能夠被抗體識別且特異性

結合之部分。當抗原係多肽時，抗原決定基可由連續胺基酸或藉由多肽之三級摺疊而並置之非連續胺基酸形成。抗體所結合之抗原決定基可以使用此項技術中已知之任何抗原決定基定位技術鑑別，包括 X 射線結晶學，藉由直接觀測抗原-抗體複合體，以及監測抗體與抗原之片段或突變型變異體之結合，或監測抗體及抗原之不同部分的溶劑可接近性鑑別抗原決定基。用於定位抗體之抗原決定基的例示性策略包括(但不限於)基於陣列之寡肽掃描、限制性蛋白水解、定點突變誘發、高通量突變誘發定位、氫-氘交換及質譜法(參見例如 Gershoni 等人(2007) 21:145-56；以及 Hager-Braun 及 Tomer (2005) Expert Rev Proteomics 2:745-56)。

【0213】 亦可使用競爭性結合及抗原決定基分組確定共有一致或重疊抗原決定基之抗體。競爭性結合可以使用交叉阻斷分析，諸如「Antibodies, A Laboratory Manual」, Cold Spring Harbor Laboratory, Harlow 及 Lane(1988 年第 1 版, 2014 年第 2 版)中所描述之分析評價。在一些實施例中，當在交叉阻斷分析中，測試抗體或結合蛋白使參考抗體或結合蛋白(例如包含 CDR 及/或選自表 2-4 中所標識之可變結構域之可變結構域的結合蛋白)與目標抗原諸如 HER2 之結合降低至少約 50%(例如 50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%、99.5%或更高百分比，或其間之任何百分比)時，鑑別出競爭性結合，及/或反之亦然。在一些實施例中，競爭性結合可由共有或類似(例如部分重疊)之抗原決定基引起，或由抗體或結合蛋白在鄰近抗原決定基處結合時之位阻引起(參見例如 Tzartos, Methods in Molecular Biology (Morris 編(1998) 第 66 卷, 第 55-66 頁))。在一些實施例中，可使用競爭性結合分選共有類似抗原決定基之結合蛋白組。舉例而言，競爭結合之結合蛋白可「分組」為具有重疊或鄰

近抗原決定基之結合蛋白組，而不競爭之該等結合蛋白歸入不具有重疊或鄰近抗原決定基之獨立結合蛋白組。

【0214】術語「$k_{on}$」或「$k_a$」係指抗體與抗原締合形成抗體/抗原複合體之締合速率常數。該速率可使用標準分析，諸如表面電漿共振、生物層干涉法或 ELISA 分析測定。

【0215】術語「$k_{off}$」或「$k_d$」係指抗體自抗體/抗原複合體解離之解離速率常數。該速率可使用標準分析，諸如表面電漿共振、生物層干涉法或 ELISA 分析測定。

【0216】術語「$K_D$」係指特定抗體-抗原相互作用之平衡解離常數。$K_D$ 係藉由 $k_a/k_d$ 計算。該速率可使用標準分析，諸如表面電漿共振、生物層干涉法或 ELISA 分析測定。

【0217】術語「$p$」或「藥物負載」或「藥物:抗體比率」或「藥物與抗體比」或「DAR」係指每個抗體或抗原結合片段之藥物部分的數量，亦即藥物負載，或式(I)之 ADC 中每個抗體或抗原結合片段(Ab)之-L-D 部分的數量。在包含剪接調節劑藥物部分之 ADC 中，「$p$」係指連接至抗體或抗原結合片段的剪接調節劑化合物之數量。舉例而言，若有兩種剪接調節劑化合物(例如兩種化合物各自具有 D1 之結構)連接至抗體或抗原結合片段，則 $p$=2。在包含式(I)之 ADC 之多個複本的組合物中，「平均 $p$」係指每個抗體或抗原結合片段的-L-D 部分之平均數量，又稱為「平均藥物負載」。

【0218】「連接子」或「連接子部分」在本文中用於指能夠將化合物，通常為藥物部分諸如剪接調節劑藥物部分共價接合至另一部分諸如抗體或抗原結合片段的任何化學部分。連接子在使化合物或抗體保持活性之

條件下易於發生或實質上抵抗酸誘導之裂解、肽酶誘導之裂解、光誘導之裂解、酯酶誘導之裂解及二硫鍵裂解。

【0219】 術語「試劑」在本文中用於指化合物、化合物之混合物、生物大分子或由生物材料製成之提取物。術語「治療劑」或「藥物」係指能夠調節生物過程及/或具有生物活性之試劑。本文所描述之剪接調節劑化合物係例示性治療劑。

【0220】 術語「化學治療劑」或「抗癌劑」在本文中用於指有效治療癌症之所有試劑，不管作用機制如何。抑制轉移或血管生成常常係化學治療劑之一種特性。化學治療劑包括抗體、生物分子及小分子，且涵蓋本文所描述之剪接調節劑化合物。化學治療劑可以為細胞毒性劑或細胞生長抑制劑。術語「細胞生長抑制劑」係指抑制或遏止細胞生長及/或細胞繁殖之試劑。術語「細胞毒性劑」係指主要藉由干擾細胞之表現活性及/或功能來引起細胞死亡的物質。

【0221】 如本文所使用，術語「剪接調節劑(splicing modulator)」、「剪接體調節劑」或「剪接調節劑(splice modulator)」係指藉由與剪接體各組分相互作用而具有抗癌活性的化合物。在一些實施例中，剪接調節劑改變目標細胞中之剪接速率或形式。充當抑制劑之剪接調節劑例如能夠減少不受控制之細胞增殖。在一些實施例中，剪接調節劑可藉由結合至 SF3b 剪接體複合體起作用。此類調節劑可以為天然化合物或合成化合物。剪接調節劑及此類調節劑之類別的非限制性實例包括普拉二烯內酯(例如普拉二烯內酯 D 或普拉二烯內酯 B)、普拉二烯內酯衍生物(例如普拉二烯內酯 D 或普拉二烯內酯 B 衍生物)、赫伯西地(herboxidiene)、赫伯西地衍生物、斯考他汀(spliceostatin)、斯考他汀衍

生物、蘇地黴素(sudemycin)或蘇地黴素衍生物。如本文所使用，當提及剪接調節劑或類似物時，術語「衍生物」及「類似物」意思指保持與原始化合物基本上相同、類似或增強之生物功能或活性，但具有改變之化學或生物結構的任何此類化合物。在一些實施例中，該剪接調節劑包含普拉二烯內酯或普拉二烯內酯衍生物。

【0222】 如本文所使用，「普拉二烯內酯衍生物」係指結構與稱為普拉二烯內酯之天然產物家族的成員相關且保持該起始化合物之一或多種生物功能的化合物。普拉二烯內酯最先在細菌普拉特鏈黴菌(*Streptomyces platensis*)中鑑別(Mizui 等人(2004) J Antibiot. 57:188-96)為具有強效地細胞毒性且使細胞週期停滯於細胞週期之 G1 及 G2/M 期(例如 Bonnal 等人(2012) Nat Rev Drug Dis 11:847-59)。有七種天然存在之普拉二烯內酯，即普拉二烯內酯 A-G (Mizui 等人(2004) J Antibiot. 57:188-96；Sakai 等人(2004) J Antibiotics 57:180-7)。美國專利第 7,884,128 號及第 7,816,401 號描述合成普拉二烯內酯 B 及 D 之例示性方法且關於此類方法各自以引用之方式併入本文中。普拉二烯內酯 B 及 D 之合成亦可使用 Kanada 等人((2007)Angew Chem Int Ed. 46:4350-5)中所描述之例示性方法執行。Kanada 等人及國際公開案第 WO 2003/099813 號描述自普拉二烯內酯 D(WO 2003/099813 之 11107D)合成 E7107(D11)(WO 2003/099813 之化合物 45)的例示性方法。對應的美國專利號為 Kotake 等人之第 7,550,503 號。此等參考文獻中關於所述合成方法各自併入本文中。

【0223】 如本文所使用，「剪接調節劑藥物部分」係指 ADC 或組合物中提供剪接調節劑化合物之結構的組分，例如式(I)之 ADC 中或包含-

L-D 之組合物中之剪接調節劑(D)組分。

【0224】 如本文所使用，「剪接體」係指自一或多個 RNA 區段，諸如 pre-mRNA 區段移除內含子之核糖核蛋白複合體。

【0225】 術語「同源物」係指因例如在相應位置處具有相同或類似之化學殘基序列而與另一分子展現同源性的分子。

【0226】 如本文所使用，術語「抑制(inhibit)」或「之抑制(inhibition of)」意思指減少可量測之量，且可包括但不需要完全預防或抑制。

【0227】 術語「目標陰性」、「目標抗原陰性」或「抗原陰性」係指細胞或組織中不存在目標抗原表現。術語「目標陽性」、「目標抗原陽性」或「抗原陽性」係指存在目標抗原表現。舉例而言，不表現目標抗原之細胞或細胞株可以描述為目標陰性的，而表現目標抗原之細胞或細胞株可以描述為目標陽性的。

【0228】 術語「旁觀者殺滅」或「旁觀者效應」係指在目標陽性細胞存在下對目標陰性細胞之殺滅，其中在無目標陽性細胞存在下未觀察到目標陰性細胞之殺滅。細胞間接觸、或至少目標陽性與目標陰性細胞之間鄰近能夠進行旁觀者殺滅。此類殺滅可與「脫靶殺滅」相區分，脫靶殺滅係指對目標陰性細胞之無差別殺滅。在無目標陽性細胞存在下可以觀察到「脫靶殺滅」。

【0229】 術語「贅生性病症」及「癌症」在本文中可互換使用，意思指存在具有致癌細胞特有之特徵，諸如不受控制之增殖、不滅性、轉移可能性、較快的生長及增殖速率、及/或某些形態特徵的細胞。通常，癌細胞可呈腫瘤或腫塊形式，但此類細胞可單獨存在於個體內，或可在血流

中作為獨立細胞循環，諸如白血病或淋巴瘤細胞。術語「贅生性病症」及「癌症」包括所有類型之癌症及癌症轉移，包括血液惡性病、實體腫瘤、肉瘤、癌瘤以及其他實體及非實體腫瘤癌症。血液惡性病可以包括 B 細胞惡性病、血液癌症(白血病)、漿細胞之癌症(骨髓瘤，例如多發性骨髓瘤)或淋巴結癌症(淋巴瘤)。例示性 B 細胞惡性病包括慢性淋巴球性白血病(CLL)、濾泡性淋巴瘤、套細胞淋巴瘤及彌漫性大 B 細胞淋巴瘤。白血病可以包括急性淋巴母細胞白血病(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)、慢性骨髓單核球性白血病(CMML)、急性單核球性白血病(AMoL)等。淋巴瘤可以包括霍奇金氏淋巴瘤(Hodgkin's lymphoma)及非霍奇金氏淋巴瘤。其他血液惡性病可包括骨髓發育不良症候群(MDS)。實體腫瘤可以包括癌瘤，諸如腺癌，例如乳癌、胰臟癌、前列腺癌、結腸癌或結腸直腸癌、肺癌、胃癌、子宮頸癌、子宮內膜癌、卵巢癌、膽管上皮癌、神經膠質瘤、黑素瘤等。

【0230】 術語「腫瘤」及「贅瘤」係指由過量細胞生長或增殖引起之任何組織腫塊，可為良性或惡性的，包括癌前病變。

【0231】 術語「腫瘤細胞」與「贅生性細胞」可互換使用且係指源自腫瘤或贅瘤之個別細胞或總細胞群，包括非致瘤細胞及癌症幹細胞兩種。如本文所使用，當僅提及缺乏更新及分化能力之腫瘤細胞時，術語「腫瘤細胞」將由術語「非致瘤」修飾以區分腫瘤細胞與癌症幹細胞。

【0232】 術語「個體」與「患者」在本文中可互換地使用，意思指任何動物，諸如任何哺乳動物，包括(但不限於)人類、非人類靈長類動物、嚙齒動物及類似動物。在一些實施例中，哺乳動物係小鼠。在一些實施例中，哺乳動物係人類。在一些實施例中，個體係小鼠。在一些實施例

中，個體係人類。

【0233】術語「共投與」或「組合」投與一或多種治療劑包括同時投與及按任何次序連續投與。

【0234】「醫藥組合物」係指呈准許投與活性成分且隨後提供活性成分之預定生物活性及/或實現治療作用之形式的製劑，且其不含對將投與該調配物之個體具有不可接受毒性之額外組分。該醫藥組合物可為無菌的。

【0235】「醫藥賦形劑」包含諸如佐劑、載劑、pH 調節劑及緩衝劑、張力調節劑、濕潤劑、防腐劑及類似物之材料。

【0236】「醫藥學上可接受」意謂聯邦管理機構或洲政府批准或可批准，或美國藥典(U.S. Pharmacopeia)或其他一般公認之藥典中列出可用於動物且更特定言之用於人類。

【0237】「醫藥學上可接受之鹽」係指保留母體化合物之所需生物活性且不賦予非所需毒理學作用之鹽。該等鹽之實例為：(a)用無機酸形成之酸加成鹽，該等無機酸例如為氫氯酸、氫溴酸、硫酸、磷酸、硝酸及類似酸；及用有機酸形成之鹽，該等有機酸例如為乙酸、草酸、酒石酸、琥珀酸、順丁烯二酸、反丁烯二酸、葡萄糖酸、檸檬酸、蘋果酸、抗壞血酸、苯甲酸、鞣酸、棕櫚酸、海藻酸、聚麩胺酸、萘磺酸、甲烷磺酸、對甲苯磺酸、萘二磺酸、聚半乳糖醛酸及類似酸；及(b)由諸如氯、溴及碘之元素陰離子形成之鹽。參見例如 Haynes 等人，「Commentary: Occurrence of Pharmaceutically Acceptable Anions and Cations in the Cambridge Structural Database」, J Pharmaceutical Sciences, 第 94 卷, 第 10 期 (2005)；及 Berge 等人，「Pharmaceutical Salts」, J

Pharmaceutical Sciences, 第 66 卷, 第 1 期(1977)，其以引用的方式併入本文中。

【0238】 如本文所使用，術語「有效量」係指足以執行特別陳述之目的，例如在投與之後產生治療作用，諸如減小腫瘤生長速率或腫瘤體積、減少癌症症狀、或治療功效之某一其他指標的本文所描述之化合物、ADC 或組合物(例如剪接調節劑或 ADC)之量。有效量可以與所述目的相關之常規方式測定。術語「治療有效量」係指有效可偵測地殺滅腫瘤細胞、減少及/或抑制腫瘤細胞之生長或擴散、腫瘤之尺寸或數量、及/或關於癌症之水準、分期、進展及/或嚴重程度之其他量度的本文所描述之化合物、ADC 或組合物之量。治療有效量可取決於預定應用(活體外或活體內)或所治療之個體及疾病病況，例如個體之體重及年齡、疾病病況之嚴重程度、投與方式及類似因素而變化，其可由一般熟習此項技術者容易地確定。該術語亦適用於將在目標細胞中誘導特定反應，例如抑制細胞生長之劑量。具體劑量可取決於例如特定醫藥組合物、個體及其年齡以及現有健康狀況或健康狀況之風險、遵循之給藥方案、疾病之嚴重程度、其是否與其他試劑組合投與、投藥時間安排、其所投與之組織及載運其之物理遞送系統而變化。在癌症情況下，治療有效量之 ADC 可以減少癌細胞之數量、減小腫瘤尺寸、抑制(例如減慢或停止)腫瘤轉移、抑制(例如減慢或停止)腫瘤生長及/或緩解一或多種症狀。

【0239】「預防有效量」係指在必需劑量下且在必需時間段內有效達成所需預防結果之量。通常，由於預防劑量係在患病之前或在疾病早期用於個體，故預防有效量將小於治療有效量。

【0240】 如本文所使用，「治療」或「治療性」及語法相關術語係

指疾病之任何後果之任何改良，諸如延長存活期、較低發病率及/或減輕由替代性治療模式引起之副作用。如此項技術中易於理解，治療操作涵蓋但不需要疾病之完全根除。如本文所使用，「治療(Treatment)」或「治療(treat)」係指將所述 ADC 或組合物投與個體，例如患者。治療可為治癒、癒合、減輕、緩解、改變、補救、改善、緩和、改良或影響病症、病症之症狀或患該病症(例如癌症)之傾向性。在一些實施例中，除治療患有病況之個體外，亦可預防性提供本文所揭示之組合物以預防或降低發展該病況之可能性。

【0241】 在一些實施例中，使用經標記之 ADC。適合「標記」包括放射性核種、酶、受質、輔因子、抑制劑、螢光部分、化學發光部分、磁性粒子及類似物。

【0242】 如本文所使用，「蛋白質」意謂至少兩個共價連接之胺基酸。該術語涵蓋多肽、寡肽及肽。在一些實施例中，該兩個或兩個以上共價連接之胺基酸係藉由肽鍵連接。蛋白質可以由天然存在之胺基酸及肽鍵構成，例如當蛋白質係使用表現系統及宿主細胞以重組方式製備時。或者，該蛋白質可以包括合成胺基酸(例如高苯丙胺酸、瓜胺酸、鳥胺酸及正白胺酸)、或肽模擬物結構，亦即「肽或蛋白質類似物」，諸如類肽。類肽係一類例示性肽模擬物，其側鏈連接至肽主鏈之氮原子，而非連接至α-碳(當其在胺基酸中時)，且具有不同於肽之氫鍵結及構象特徵(參見例如 Simon 等人(1992) Proc Natl Acad Sci. USA 89:9367)。因此，類肽可對蛋白水解或其他生理或儲存條件具有抗性，並在滲透細胞膜時有效。特別是當在活體外藉由此項技術中熟知之習知方法合成抗體時，可以併入此類合成胺基酸。此外，亦可使用肽模擬物、合成及天然存在之殘基/結構的

任何組合。「胺基酸」亦包括亞胺基酸殘基，諸如脯胺酸及羥脯胺酸。胺基酸「R 基團」或「側鏈」可呈(L)-或(S)-組態。在一個特定實施例中，胺基酸呈(L)-或(S)-組態。

【0243】「重組蛋白」係使用重組技術，使用此項技術中已知之任何技術及方法，亦即，經由表現重組核酸製備的蛋白質。用於製造重組蛋白之方法及技術係此項技術中熟知的。

【0244】「經分離」蛋白質未伴隨在其天然狀態中通常與其締合之至少某種材料，例如佔給定樣品中總蛋白質之至少約 5 重量%或至少約 50 重量%。應瞭解，經分離蛋白質可取決於情況而按總蛋白質之重量計構成 5%至 99.9%。舉例而言，可經由使用誘導性啟動子或高表現啟動子而以顯著較高之濃度製備蛋白質，使得以增加之濃度水準製得該蛋白質。該定義包括在此項技術中已知之多種生物體及/或宿主細胞中製造抗體。

【0245】 對於胺基酸序列，序列一致性及/或相似性可使用此項技術中已知之標準技術測定，包括(但不限於) Smith 及 Waterman (1981) Adv Appl Math. 2:482 之局部序列一致性演算法；Needleman 及 Wunsch(1970) J Mol Biol. 48:443 之序列一致性比對演算法；Pearson 及 Lipman(1988) Proc Nat Acad Sci. USA 85:2444 之相似性檢索方法；此等演算法之電腦化實施(Wisconsin Genetics 套裝軟體中之 GAP、BESTFIT、FASTA 及 TFAST；Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wis.)；由 Devereux 等人(1984) Nucl Acid Res. 12:387-95 所描述之最佳擬合序列程式，較佳使用預設設定或藉由檢查。較佳地，一致性百分比係藉由 FastDB，基於以下參數計算：錯配罰分 1；空位罰分 1；空位尺寸罰分 0.33；及接合罰分 30(「Current Methods in

Sequence Comparison and Analysis,」 Macromolecule Sequencing and Synthesis, Selected Methods and Applications, 第 127-149 頁 (1988), Alan R. Liss, Inc)。

【0246】 有用演算法之實例係 PILEUP。PILEUP 使用漸進式逐對比對來產生一組相關序列之多序列比對。其亦可繪製顯示用於產生該比對之叢集關係的樹形圖。PILEUP 使用 Feng 及 Doolittle(1987) J Mol Evol. 35:351-60 之漸進性比對方法之簡化形式；該方法類似於 Higgins 及 Sharp(1989)CABIOS 5:151-3 所描述之方法。有用的 PILEUP 參數包括預設空位權重 3.00、預設空位長度權重 0.10 及加權之末端空位。

【0247】 有用演算法之另一實例係以下中描述之 BLAST 演算法：Altschul 等人(1990) J Mol Biol. 215:403-10；Altschul 等人(1997) Nucl Acid Res. 25:3389-402；及 Karin 等人(1993) Proc Natl Acad Sci. USA 90:5873-87。特別有用的 BLAST 程式係 WU-BLAST-2 程式，其係自 Altschul 等人(1996) Methods in Enzymology 266:460-80 獲得。WU-BLAST-2 使用若干檢索參數，其中大部分設定成預設值。使用以下值設定可調參數：重疊間隔=1、重疊分數=0.125、字臨限值(T)=II。HSP S 及 HSP S2 參數係動態值且由程式本身根據特定序列之組成及檢索所關注序列之特定資料庫之組成來確定；不過，可調整該等值以增加靈敏度。

【0248】 額外有用的演算法係 Altschul 等人(1997)Nucl Acid Res. 25:3389-402 所報導的帶空位之 BLAST。帶空位之 BLAST 使用 BLOSUM-62 取代計分；臨限值 T 參數設定為 9；兩匹配點法(two-hit method)用於觸發無空位之延伸部分，加入空位長度 k，代價為 10+k；Xu 設定為 16，且 Xg 在資料庫檢索階段設定為 40，且在演算法輸出階段設

定為 67。帶空位之比對係藉由對應於約 22 位元之分值觸發。

【0249】 一般而言，本文所揭示之蛋白質及其變異體，包括目標抗原變異體(諸如 HER2、CD138、EPHA2、MSLN、FOLH1、CDH6、CEACAM5、CFC1B、ENPP3、FOLR1、HAVCR1、KIT、MET、MUC16、SLC39A6、SLC44A4 或 STEAP1)及抗體可變結構域變異體(包括各個變異體 CDR)與本文中所描繪之序列之間的胺基酸同源性、相似性或一致性係至少 80%，例如同源性或一致性係至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、近似 100%或 100%。

【0250】 以類似方式，關於抗體及本文中所標識之其他蛋白質之核酸序列的「核酸序列一致性百分比(%)」定義為候選序列中與抗原結合蛋白編碼序列中之核苷酸殘基一致的核苷酸殘基之百分比。特定方法利用設定為預設參數的 WU-BLAST-2 之 BLASTN 模組，其中重疊間隔及重疊分數分別設定為 1 及 0.125。

【0251】 引入胺基酸序列變化之位點或區域係預先確定的，而突變本身無需預先確定。舉例而言，為了使給定位點處突變之效能最佳，可以在目標密碼子或區域處進行隨機突變誘發並篩選所表現之抗原結合蛋白 CDR 變異體的所需活性之最佳組合。在具有已知序列之 DNA 中的預定位點處進行取代突變之技術為人所熟知，例如 MI3 引子突變誘發及 PCR 突變誘發。

【0252】 如本文所使用，「烷基(alkyl/alkyl group)」意謂完全飽和之直鏈、分支鏈或環狀烴鏈。在某些實施例中，烷基含有 1-8 個碳原子(「$C_1$-$C_8$ 烷基」)。在某些實施例中，烷基含有 1-6 個碳原子(「$C_1$-$C_6$ 烷

基」)。在某些實施例中，烷基含有 1-3 個碳原子。在又其他實施例中，烷基含有 2-3 個碳原子，且在又其他實施例中，烷基含有 1-2 個碳原子。

【0253】 如本文所使用，「烷基烷氧基」意謂經烷氧基取代之烷基。如本文所使用，「烷氧基」係指經由氧(「烷氧基」)原子連接至主碳鏈的如先前所定義之烷基。

【0254】 如本文所使用，「烷基胺基」意謂經胺基取代之烷基。如本文所使用，「胺基」係指-$NH_2$、-NH(烷基)或-N(烷基)(烷基)。

【0255】 如本文所使用，「烷基羥基」意謂經胺基取代之烷基。如本文所使用，「羥基(hydroxy/hydroxyl)」係指-OH。

【0256】「伸烷基」係指烷基之二價基基團。舉例而言，-$CH_2$-、-$CH_2CH_2$-、-$CH_2CH_2CH_2$-、-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-、-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-及-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-分別係指亞甲基、伸乙基、伸正丙基、伸正丁基、伸正戊基及伸正己基。

【0257】 如本文所使用，「碳環」包括芳族基團(例如芳基)及非芳族基團(例如環烷基)兩者。在某些實施例中，碳環基團含有 3-10 個碳原子(「3 至 10 員碳環」)。在某些實施例中，碳環基團含有 3-8 個碳原子(「3 至 8 員碳環」)。在某些實施例中，碳環基團含有 3-6 個碳原子(「3 至 6 員碳環」)。在某些實施例中，碳環基團含有 3-5 個碳原子(「3 至 5 員碳環」)。

【0258】「鹵素」係指任何鹵素基團，例如-F、-Cl、-Br 或-I。

【0259】 如本文中所使用，「雜環」、「雜環基」及「雜環的」意謂在環中含有至少一個雜原子之單環雜環、雙環雜環或三環雜環。

【0260】 單環雜環係含有至少一個獨立地選自 O、N 及 S 之雜原子

的 3 員、4 員、5 員、6 員、7 員或 8 員環。在一些實施例中，該雜環係含有一個選自 O、N 及 S 之雜原子的 3 員或 4 員環。在一些實施例中，該雜環係含有零個或一個雙鍵及一個、兩個或三個選自 O、N 及 S 之雜原子的 5 員環。在一些實施例中，該雜環係含有零個、一個或兩個雙鍵及一個、兩個或三個選自 O、N 及 S 之雜原子的 6 員、7 員或 8 員環。單環雜環之代表性實例包括(但不限於)氮雜環丁烷基、氮雜環庚烷基、氮雜環丙烷基、二氮雜環庚烷基、1,3-二噁烷基、1,3-二氧雜環戊烷基、二氫哌喃基(包括 3,4-二氫-2H-哌喃-6-基)、1,3-二硫烷基、1,3-二噻烷基、咪唑啉基、咪唑啶基、異噻唑啉基、異噻唑啶基、異噁唑啉基、異噁唑啶基、嗎啉基、噁二唑啉基、噁二唑啶基、噁唑啉基、噁唑啶基、哌嗪基、哌啶基、哌喃基、吡唑啉基、吡唑啶基、吡咯啉基、吡咯啶基、四氫呋喃基、四氫哌喃基(包括四氫-2H-哌喃-4-基)、四氫噻吩基、噻二唑啉基、噻二唑啶基、噻唑啉基、噻唑啶基、硫代嗎啉基、1,1-二氧離子基硫代嗎啉基(硫代嗎啉碸)、硫代哌喃基及三噻烷基。

【0261】 本發明之雙環雜環包括與芳基稠合之單環雜環，或與單環環烷基稠合之單環雜環，或與單環環烯基稠合之單環雜環，或與具有總計 5 至 12 個環原子之單環雜環稠合之單環雜環。雙環雜環之實例包括(但不限於)3,4-二氫-2H-哌喃基、1,3-苯并二氧雜環戊烯基、1,3-苯并二硫雜環戊烯基、2,3-二氫-1,4-苯并二氧雜環己烯基、2,3-二氫-1-苯并呋喃基、2,3-二氫-1-苯并噻吩基、2,3-二氫-1H-吲哚基及 1,2,3,4-四氫喹啉基。

【0262】 術語「雜環」、「雜環基」及「雜環的」涵蓋雜芳基。「雜芳基」係指具有一或多個閉合環且在至少一個環中具有一或多個雜原子(氧、氮或硫)之環狀部分，其中該等環中之至少一個係芳族環，且其中該

一或多個環可獨立地為稠合及/或橋連的。實例包括(不限於)苯基、噻吩基、三唑基、吡啶基、嘧啶基、噠嗪基及吡嗪基。

【0263】 如本文所描述，本發明之化合物可含有「視情況經取代之」部分。一般而言，術語「經取代」無論前面是否有術語「視情況」均意謂指定部分之一或多個氫經適合取代基置換。除非另外指示，否則「視情況經取代之」基團可在該基團之每一可取代位置處具有適合取代基，且當任何給定結構中之超過一個位置可經超過一個選自指定群組之取代基取代時，在每一位置處之取代基可相同或不同。依據本發明預想的取代基之組合較佳係使得形成穩定或化學上可行之化合物的取代基。

【0264】 熟習此項技術者應瞭解，「取代」或「經……取代」或「不存在」包括隱含限制條件：此類取代或不存在係根據經取代原子及取代基之容許價態，且該取代或不存在產生穩定化合物，例如該化合物不會自發地經歷轉化，諸如藉由重排、環化、消除等。出於本發明之目的，雜原子諸如氮可具有氫取代基及/或滿足雜原子價數的本文所述有機化合物之任何容許的取代基。

【0265】「穩定」係指化合物在經受允許其製造、偵測且在某些實施例中其回收、純化及用於本文所揭示之一或多個目的之條件時，在化學上及/或物理上實質上不改變。在一些實施例中，穩定化合物或化學上可行之化合物係當在無水分或其他化學反應性條件存在下於 40℃或更低溫度保持至少一週時不會實質上改變的化合物。在一些實施例中，本文所揭示之化合物係穩定的。

【0266】 本文所教示之對映異構體可包括「對映異構性純」異構體，其在一或多個特定不對稱中心處實質上包含單一對映異構體，例如大

於或等於 90%、92%、95%、98%或 99%或等於 100%之單一對映異構體。「不對稱中心」或「對掌性中心」係指包含四個不同取代基的四面體碳原子。

【0267】 本文所描述之化合物亦可在構成此類化合物之一或多個原子處含有非天然比例之原子同位素。舉例而言，該等化合物可經放射性同位素，諸如氘($^{2}H$)、氚($^{3}H$)、碳-13($^{13}C$)或碳-14($^{14}C$)放射性標記。本文所揭示之化合物之所有同位素變異體無論是否具放射性均意欲涵蓋於本發明之範圍內。此外，本文所描述之化合物的所有互變異構形式意欲涵蓋於所主張之揭示內容的範圍內。

**抗體-藥物結合物**

【0268】 本發明之抗體-藥物結合物(ADC)複合物包括具有抗癌活性之複合物。確切地說，該等 ADC 複合物包括抗體或抗原結合片段(包括其抗原結合片段)結合(亦即，藉由連接子共價連接)至藥物部分(例如剪接調節劑)，其中該藥物部分當未結合至抗體或抗原結合片段時具有細胞毒性或細胞生長抑制作用。在各種實施例中，該藥物部分當未結合至抗體或抗原結合片段時能夠與 SF3b 剪接體複合體結合及/或相互作用。在各種實施例中，該藥物部分當未結合至抗體或抗原結合片段時能夠調節活體外及/或活體內 RNA 剪接。在各種實施例中，藉由靶向 RNA 剪接，本文所揭示之藥物部分及 ADC 係強效抗增殖劑。在各種實施例中，本文所揭示之藥物部分及 ADC 可以靶向積極分裂之細胞及休眠細胞。

【0269】 在各種實施例中，本發明至少部分地基於發現某些生物活性剪接調節劑當用於 ADC 中時可以提供改善的特性。剪接調節劑當單獨使用時可以顯示合意地改善的特徵(例如穩固的 SF3b 剪接體複合體結合、

對 RNA 剪接之強效調節)，而在各種實施例中，該剪接調節劑當結合至抗體或抗原結合片段時可以展現少量該等合意地改善之特徵。因此，用作人類治療劑，例如作為腫瘤藥劑之 ADC 的開發及製造可能不僅僅需要鑑別能夠結合至一或多個所需目標且連接至單獨使用以治療癌症之藥物的抗體。將抗體連接至藥物可對該抗體及該藥物中之一種或兩種的活性具有顯著影響，該影響將取決於所選連接子及/或藥物之類型而變化。因此，在一些實施例中，所選 ADC 之組分應(i)保持分離之抗體及藥物部分所展現的一或多種治療特性；(ii)維持抗體或抗原結合片段之特異性結合特性；(iii)使藥物負載及藥物與抗體比率達到最佳；(iv)允許經由穩定連接至抗體或抗原結合片段遞送，例如細胞內遞送藥物部分；(v)保持 ADC 作為完整結合物之穩定性，直至轉運或遞送至目標位點；(vi)使 ADC 在投與之前或之後之聚集減到最少；(vii)在藥物部分於細胞環境中經歷裂解或其他釋放機制之後實現治療作用，例如細胞毒性作用；(viii)展現類似於或優於分離之抗體及藥物部分的活體內抗癌治療功效；(ix)使藥物部分引起之脫靶殺滅減到最少；及/或(x)展現所需之藥物動力學及藥效學特性、可調配性及毒理/免疫譜。可能需要此等特性中之每一種以鑑別用於治療用途的改善之 ADC (Ab 等人(2015) Mol Cancer Ther. 14:1605-13)。

【0270】 在各種實施例中，本文所揭示之 ADC 展現出乎意料地有利的上文所列類別中之一些或每種特性。舉例而言，在一些實施例中，相較於包含替代性連接子及/或藥物部分(例如替代性剪接調節劑)之 ADC，本文所揭示之 ADC 構築體展現意外地有利的藥物負載、聚集及/或穩定性型態，及/或保持抗體結合功能、藥物活性及/或改善之旁觀者殺滅，同時減少脫靶殺滅。在一些實施例中，相較於使用替代性連接子及/或藥物部

分(例如替代性剪接調節劑)之 ADC，本文所揭示之 ADC 構築體展示優良的穩定性、活性、效力或其他作用(在活體內或活體外量測)。在一些實施例中，本文所揭示之 ADC 構築體當以單次劑量投與時展現活體內治療功效。在一些實施例中，相較於使用替代性連接子及/或藥物部分(例如替代性剪接調節劑)之 ADC，本文所揭示之 ADC 構築體意外地穩定。

【0271】 本發明之 ADC 複合物可以將有效劑量之細胞毒性或細胞生長抑制劑選擇性遞送至癌細胞或腫瘤組織。已發現，所揭示之 ADC 針對表現各別目標抗原(例如 HER2、CD138、EPHA2、MSLN、FOLH1、CDH6、CEACAM5、CFC1B、ENPP3、FOLR1、HAVCR1、KIT、MET、MUC16、SLC39A6、SLC44A4、STEAP1)之細胞具有強效細胞毒性及/或細胞生長抑制活性。在一些實施例中，ADC 之細胞毒性及/或細胞生長抑制活性取決於細胞中之目標抗原表現。在一些實施例中，所揭示之 ADC 在殺滅表現目標抗原之癌細胞方面特別有效，同時使脫靶殺滅減到最少。在一些實施例中，所揭示之 ADC 不會對不表現目標抗原之癌細胞展現細胞毒性及/或細胞生長抑制作用。

【0272】 例示性 HER2 表現性癌症包括(但不限於)乳癌、胃癌、膀胱癌、尿道上皮細胞癌瘤、食道癌、肺癌(例如肺腺癌)、子宮癌(例如子宮漿液性子宮內膜癌)、唾腺管癌、子宮頸癌、子宮內膜癌及卵巢癌(English 等人(2013) Mol Diagn Ther. 17:85-99)。

【0273】 例示性 CD138 表現性癌症包括(但不限於)胸內癌症(例如肺癌、間皮瘤)、皮膚癌(例如基底細胞癌、鱗狀細胞癌)、頭頸癌(例如喉部、喉咽、鼻咽癌)、乳癌、泌尿生殖癌(例如子宮頸癌、卵巢癌、子宮內膜癌、前列腺癌、膀胱癌、尿道上皮癌)、血液惡性病(例如骨髓瘤諸如多

發性骨髓瘤、B 細胞惡性病、霍奇金氏淋巴瘤)及甲狀腺癌(Szatmári 等人(2015) Dis Markers 2015:796052)。

【0274】 例示性 EPHA2 表現性癌症包括乳癌、腦癌、卵巢癌、膀胱癌、胰臟癌、食道癌、肺癌、前列腺癌、黑素瘤、食道癌及胃癌(Tandon 等人(2011) Expert Opin Ther Targets 15(1):31-51)。

【0275】 在一些實施例中，ADC 之裂解將剪接調節劑自抗體或抗原結合片段及連接子釋放。在一些實施例中，連接子及/或剪接調節劑係設計成用於促進旁觀者殺滅(鄰近細胞殺滅)。在一些實施例中，連接子及/或剪接調節劑係設計成在連接子-藥物部分及/或單獨藥物部分經細胞內化並擴散至鄰近細胞之後經由裂解而促進旁觀者殺滅。在其他實施例中，連接子促進細胞內化。在一些實施例中，連接子係設計成用於使細胞外環境中之裂解減到最少且由此降低針對脫靶組織(例如非癌變組織)之毒性，同時保持 ADC 結合至目標組織及對不表現作為 ADC 中抗體或抗原結合片段之目標的抗原但包圍表現該抗原之目標癌症組織的癌組織之旁觀者殺滅。在一些實施例中，由 ADC 裂解產生的藥物部分或藥物部分之分解代謝物係設計成用於促進目標細胞或鄰近細胞之吸收(亦即，細胞可滲透)。此類藥物部分及分解代謝物在本文中可稱為「旁觀者活性(bystander active)」，而細胞滲透性較低之藥物部分或分解代謝物可以稱為「旁觀者惰性(bystander inactive)」。

【0276】 在一些實施例中，所揭示之 ADC 亦展示旁觀者殺滅活性，但較低之脫靶細胞毒性。不受理論束縛，在 ADC 向實體腫瘤中之穿透受到限制及/或腫瘤細胞中之目標抗原表現呈現異質性時，ADC 之旁觀者殺滅活性可為特別有益的。在一些實施例中，相對於利用含不可裂解連

接子之 ADC 的類似治療方法，包含可裂解連接子之 ADC 具有特別有效的旁觀者殺滅作用及/或展示改善的旁觀者殺滅活性。在一些實施例中，本文所揭示之 ADC 展現相對於單獨藥物部分改善的溶解度及目標細胞滲透率。在一些實施例中，本文所揭示之 ADC 展現相對於單獨藥物部分改善的細胞毒性。在一些實施例中，本文所揭示之 ADC 使用當作為單獨藥物評價時展現較低細胞毒性之藥物部分，又意外地優於包含當作為單獨藥物評價時具有較高細胞毒性之其他藥物部分的 ADC。在一些實施例中，相對於利用包含不可裂解連接子之 ADC 的類似治療方法，剪接調節劑之裂解及釋放使 ADC 之細胞毒性改善。在其他實施例中，剪接調節劑之裂解及釋放並非 ADC 具有所需生物活性所需的。在一些實施例中，包含具有增加之間隔子長度之不可裂解連接子的 ADC(例如 ADL12)提供相對於用包含可裂解連接子之 ADC(例如 ADL1、ADL5)之類似治療方法相同或類似之細胞毒性及相對於用包含較短不可裂解連接子之 ADC 之類似治療方法意外地優良的細胞毒性。在一些實施例中，包含具有增加之間隔子長度且不含羰基之不可裂解連接子的 ADC(例如 ADL12)提供相對於用包含可裂解連接子之 ADC(例如 ADL1、ADL5)的類似治療方法相同或類似之細胞毒性及相對於用包含具有相同或類似間隔子長度且含羰基之不可裂解連接子之 ADC(例如 ADL10)的類似治療方法意外地優良的細胞毒性。在一些實施例中，自不可裂解 MC 連接子(例如 ADL12)移除羰基可使細胞毒性相對於用包含未修飾之不可裂解 MC 連接子之 ADC(例如 ADL10)的類似治療方法增加超過 50 倍、超過 75 倍、超過 100、超過 150 倍或超過 200 倍。在一些實施例中，自不可裂解 MC 連接子(例如 ADL12)移除羰基及增加間隔子長度(例如添加至少一個間隔子單元)可使細胞毒性相對於用

包含未修飾之不可裂解 MC 連接子之 ADC(例如 ADL10)的類似治療方法增加超過 50 倍、超過 75 倍、超過 100 倍、超過 150 倍或超過 200 倍。

【0277】 本文提供 ADC 複合物，其包含靶向腫瘤細胞之抗體或其抗原結合片段(Ab)、剪接調節劑藥物部分(D)及將 Ab 共價連接至 D 之連接子部分(L)。在某些態樣中，該抗體或抗原結合片段能夠以高特異性及高親和力結合至腫瘤相關抗原(例如 HER2、CD138、EPHA2、MSLN、FOLH1、CDH6、CEACAM5、CFC1B、ENPP3、FOLR1、HAVCR1、KIT、MET、MUC16、SLC39A6、SLC44A4、STEAP1)。在某些實施例中，該抗體或抗原結合片段在結合時內化至目標細胞中，例如內化至該細胞中之降解隔室中。在各種實施例中，可以使用在結合至目標細胞時內化，經歷降解，並釋放剪接調節劑藥物部分以殺滅癌細胞的 ADC。剪接調節劑藥物部分可藉由酶作用、水解、氧化或任何其他機制自該 ADC 中之抗體及/或連接子部分釋放。

【0278】 例示性 ADC 具有式(I)：

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

其中 Ab=抗體或抗原結合片段，L=連接子部分，D=剪接調節劑藥物部分，且 $p$=每個抗體或抗原結合片段的剪接調節劑藥物部分之數量。

【0279】 在某些較佳實施例中，用於所述 ADC 及組合物中之藥物-靶向部分係抗體或抗原結合片段。本文亦提供及描述用於所述 ADC 及組合物中之其他例示性藥物-靶向部分。在一些實施例中，藥物-靶向部分可以為多種細胞結合劑及非抗體支架中之任一種。在一些實施例中，該藥物靶向部分係細胞結合劑。如本文所使用，術語「細胞結合劑」係指能夠結合至動物(例如人類)細胞並遞送藥物部分(例如，如本文所揭示之剪接調

節劑藥物部分)的任何試劑。該術語涵蓋本文所揭示之例示性抗體及抗原結合片段(例如單株抗體及其片段諸如 Fab 及 scFV)。該術語進一步涵蓋例示性細胞結合劑，諸如 DARPin、duobody、雙環肽、奈米抗體、辛替恩(centyrin)、黑素細胞刺激激素(melanocyte-stimulating hormone，MSH)、受體-Fc 融合分子、T 細胞受體結構、類固醇激素諸如雄激素及雌激素、生長因子、集落刺激因子諸如 EGF，及其他非抗體支架。在各種實施例中，非抗體支架可以大體上分為二個結構種類，即結構域大小確定之化合物(約 6-20 kDa)及限制性肽(約 2-4 kDa)。例示性結構域設定大小之支架包括(但不限於)親和抗體、親和素(affilin)、抗運載蛋白(anticalin)、阿特里莫(atrimer)、DARPin、FN3 支架(例如纖連蛋白(adnectin)及辛替恩)、非諾莫(fynomer)、孔尼茲結構域(Kunitz domain)、纖維結合素連接蛋白(pronectin)、O 抗體及受體-Fc 融合蛋白，而例示性限制性肽包括高親合性多聚體(avimer)、雙環肽及 Cys 結(Cys-knot)。在一些實施例中，用於所述 ADC 及組合物中之藥物-靶向部分係選自親和抗體(affibody)、親和素、抗運載蛋白、阿特里莫、DARPin、FN3 支架諸如纖連蛋白或辛替恩、菲諾體、孔尼茲結構域、纖維結合素連接蛋白、O 抗體、高親和性多聚體、雙環肽及 Cys 結。在一些實施例中，用於所述 ADC 及組合物中之藥物-靶向部分係受體-Fc 融合蛋白，例如 HER2-Fc 嵌合融合蛋白。非抗體支架評述於例如 Vazquez-Lombardi 等人(2015) Drug Dis Today 20(10):1271-83。

**抗體**

【0280】 式(I)之抗體或抗原結合片段(Ab)在其範圍內包括特異性結合至癌細胞上之目標抗原的任何抗體或抗原結合片段。該抗體或抗原結合

片段可以結合至目標抗原，其中如藉由例如 BIAcore®分析所量測，解離常數($K_D$)≤1 mM、≤100 nM 或≤10 nM，或其間任何量。在某些實施例中，$K_D$ 係 1 pM 至 500 pM。在一些實施例中，$K_D$ 係在 500 pM 至 1 μM、1 μM 至 100 nM 或 100 mM 至 10 nM 之間。

【0281】 在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段係包含二條重鏈及二條輕鏈之四鏈抗體(又稱為免疫球蛋白或全長或完整抗體)。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段係雙鏈半抗體(一條輕鏈及一條重鏈)或免疫球蛋白之抗原結合片段。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段係免疫球蛋白中保持結合目標癌症抗原之能力及/或提供免疫球蛋白之功能的抗原結合片段。

【0282】 在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段係抗體或其抗原結合片段。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段係內化性抗體或其內化性抗原結合片段。在一些實施例中，該內化性抗體或其內化性抗原結合片段結合至細胞表面上表現之目標癌症抗原並在結合時進入細胞。在一些實施例中，在 ADC 進入表現目標癌症抗原之細胞並存在於該細胞中之後(亦即，在 ADC 內化之後)，ADC 中之剪接調節劑藥物部分例如藉由裂解、藉由抗體或抗原結合片段降解或藉由任何其他適合釋放機制自該 ADC 之抗體或抗原結合片段釋放。

【0283】 例示性本發明抗體之胺基酸序列闡述於表 2-4 中。

**表 1.抗體**

| **mAb** | **類型** | **目標** |
|---|---|---|
| 曲妥珠單抗(AB185) | 人類化 | HER2/NEU |
| B-B4 (AB205) | 鼠類 | CD138 (多配體蛋白聚糖-1) |
| 1C1 (AB206) | 人類化 | EPHA2 |

## 表 2. mAb 可變區之胺基酸序列

| mAb | IgG 鏈 | SEQ ID NO | 胺基酸序列 |
|---|---|---|---|
| 曲妥珠單抗 (AB185) | 重鏈 | 19 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWV ARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISAD TSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCS RWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVS S |
| 曲妥珠單抗 (AB185) | 輕鏈 | 20 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRA SQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLI YSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFTL TISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTF GQGTKVEIKRT |
| B-B4 (AB205) | 重鏈 | 21 | QVQLQQSGSELMMPGASVKISCKA TGYTFSNYWIQRPGHGLEWIGEILP GTGRTIYNEKFKGKATFTADISSNT VQMQLSSLTSEDSAVYYCARRDYY GNFYYAMDYWGQGTSVTVSS |
| B-B4 (AB205) | 輕鏈 | 22 | DIQMTQSTSSLSASLGDRVTISCSAS QGINNYLNWYQQKPDGTVELLIYY TSTLQSGVPSRFSGSGSGTDYSLTIS NLEPEDIGTYYCQQYSKLPRTFGGG TKLEIK |
| 1C1 (AB206) | 重鏈 | 23 | EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFTFSHYMMAWVRQAPGKGLEW VSRIGPSGGPTHYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY CAGYDSGYDYVAVAGPAE-YFQHWGQGTLVTVSS |
| 1C1 (AB206) | 輕鏈 | 24 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRA SQSISTWLAWYQQKPGKAPKLLIY KASNLHTGVPSRFSGSGSGTEFSLTI SGLQPDDFATYYCQQYNSYS-RTFGQGTKVEIK |

## 表 3. mAb CDR 之胺基酸序列

| mAb | IgG 鏈 | SEQ ID NO | 胺基酸序列 |
|---|---|---|---|
| 曲妥珠單抗 (AB185) | HCDR1 | 1 | GFNIKDTYIH |
| 曲妥珠單抗 (AB185) | HCDR2 | 2 | RIYPTNGYTRYADSVKG |
| 曲妥珠單抗 (AB185) | HCDR3 | 3 | WGGDGFYAMDV |
| 曲妥珠單抗 (AB185) | LCDR1 | 4 | RASQDVNTAVAW |
| 曲妥珠單抗 (AB185) | LCDR2 | 5 | SASFLES |
| 曲妥珠單抗 (AB185) | LCDR3 | 6 | QQHYTTPPT |
| B-B4 (AB205) | HCDR1 | 7 | NYWIE |

| | | | |
|---|---|---|---|
| B-B4 (AB205) | HCDR2 | 8 | ILPGTGRTIYNEKFKGKA |
| B-B4 (AB205) | HCDR3 | 9 | RDYYGNFYYAMDY |
| B-B4 (AB205) | LCDR1 | 10 | ASQGINNYLN |
| B-B4 (AB205) | LCDR2 | 11 | TSTLQS |
| B-B4 (AB205) | LCDR3 | 12 | QQYSKLPRT |
| 1C1 (AB206) | HCDR1 | 13 | HYMMA |
| 1C1 (AB206) | HCDR2 | 14 | RIGPSGGPTHYADSVKG |
| 1C1 (AB206) | HCDR3 | 15 | YDSGYDYVAVAGPAE-YFQH |
| 1C1 (AB206) | LCDR1 | 16 | RASWSISTWLA |
| 1C1 (AB206) | LCDR2 | 17 | KASNLHT |
| 1C1 (AB206) | LCDR3 | 18 | QQYNSYS-RT |

## 表 4. 全長 mAb Ig 鏈之胺基酸序列

| mAb | IgG 鏈 | 類別 | SEQ ID NO | 胺基酸序列 |
|---|---|---|---|---|
| 曲妥珠單抗 (AB185) | 重鏈 | IgG1 | 25 | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSC AASGFNIKDTYIHWVRQAPGKG LEWVARIYPTNGYTRYADSVKG RFTISADTSKNTAYLQMNSLRA EDTAVYYCSRWGGDGFYAMDY WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPL APSSKSTSGGTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPS VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK |
| 曲妥珠單抗 (AB185) | 輕鏈 | κ | 26 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC RASQDVNTAVAWYQQKPGKAP KLLIYSASFLYSGVPSRFSGSRSG TDFTLTISSLQPEDFATYYCQQH YTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGN |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| | | | | SQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTL<br>SKADYEKHKVYACEVTHQGLSS<br>PVTKSFNRGEC |
| B-B4<br>(AB205) | 重鏈 | IgG2a | 27 | QVQLQQSGSELMMPGASVKISC<br>KATGYTFSNYWIQRPGHGLEWI<br>GEILPGTGRTIYNEKFKGKATFT<br>ADISSNTVQMQLSSLTSEDSAVY<br>YCARRDYYGNFYYAMDYWGQ<br>GTSVTVSSAKTTPPSVYPLAPGS<br>AAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPV<br>TVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQS<br>DLYTLSSSVTVPSSTWPSETVTC<br>NVAHPASSTKVDKKIVPRDCGC<br>KPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVL<br>TITLTPKVTCVVVDISKDDPEVQ<br>FSWFVDDVEVHTAQTQPREEQF<br>NSTFRSVSELPIMHQDWLNGKE<br>FKCRVNSAAFPAPIEKTISKTKG<br>RPKAPQVYTIPPPKEQMAKDKV<br>SLTCMITDFFPEDITVEWQWNG<br>QPAENYKNTQPIMDTDGSYFVY<br>SKLNVQKSNWEAGNTFTCSVLH<br>EGLHNHHTEKSLSHSPG |
| B-B4<br>(AB205) | 輕鏈 | κ | 28 | DIQMTQSTSSLSASLGDRVTISCS<br>ASQGINNYLNWYQQKPDGTVE<br>LLIYYTSTLQSGVPSRFSGSGSGT<br>DYSLTISNLEPEDIGTYYCQQYS<br>KLPRTFGGGTKLEIKRADAAPT<br>VSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLN<br>NFYPKDINVKWKIDGSERQNGV<br>LNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTL<br>TKDEYERHNSYTCEATHKTSTS<br>PIVKSFNRNEC |
| 1C1<br>(AB206) | 重鏈 | IgG1 | 29 | EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSC<br>AASGFTFSHYMMAWVRQAPGK<br>GLEWVSRIGPSGGPTHYADSVK<br>GRFTISRDNSKNTLYLQMNSLR<br>AEDTAVYYCAGYDSGYDYVAV<br>AGPAEYFQHWGQGTLVTVSSAS<br>TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL<br>GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT<br>SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT<br>VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTK<br>VDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP<br>ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR<br>TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW<br>YVDGVEVHNAKTKPREEQYNS<br>TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY<br>KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ<br>PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSL<br>TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP<br>ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKL<br>TVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA<br>LHNHYTQKSLSLSPG |
| 1C1<br>(AB206) | 輕鏈 | κ | 30 | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC<br>RASQSISTWLAWYQQKPGKAPK |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| | | | | LLIYKASNLHTGVPSRFSGSGSG<br>TEFSLTISGLQPDDFATYYCQQY<br>NSYSRTFGQGTKVEIKRTVAAPS<br>VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN<br>NFYPREAKVQWKVDNALQSGN<br>SQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTL<br>SKADYEKHKVYACEVTHQGLSS<br>PVTKSFNRGEC |

## 表 5. 例示性目標抗原胺基酸序列

| 抗原 | SEQ ID NO | 胺基酸序列 |
|---|---|---|
| HER2/NEU | 31 | MELAALCRWGLLLALLPPGAASTQVCTGTDMKLRLPASPET<br>HLDMLRHLYQGCQVVQGNLELTYLPTNASLSFLQDIQEVQG<br>YVLIAHNQVRQVPLQRLRIVRGTQLFEDNYALAVLDNGDPL<br>NNTTPVTGASPGGLRELQLRSLTEILKGGVLIQRNPQLCYQD<br>TILWKDIFHKNNQLALTLIDTNRSRACHPCSPMCKGSRCWGE<br>SSEDCQSLTRTVCAGGCARCKGPLPTDCCHEQCAAGCTGPK<br>HSDCLACLHFNHSGICELHCPALVTYNTDTFESMPNPEGRYT<br>FGASCVTACPYNYLSTDVGSCTLVCPLHNQEVTAEDGTQRC<br>EKCSKPCARVCYGLGMEHLREVRAVTSANIQEFAGCKKIFGS<br>LAFLPESFDGDPASNTAPLQPEQLQVFETLEEITGYLYISAWP<br>DSLPDLSVFQNLQVIRGRILHNGAYSLTLQGLGISWLGLRSLR<br>ELGSGLALIHHNTHLCFVHTVPWDQLFRNPHQALLHTANRP<br>EDECVGEGLACHQLCARGHCWGPGPTQCVNCSQFLRGQEC<br>VEECRVLQGLPREYVNARHCLPCHPECQPQNGSVTCFGPEA<br>DQCVACAHYKDPPFCVARCPSGVKPDLSYMPIWKFPDEEGA<br>CQPCPINCTHSCVDLDDKGCPAEQRASPLTSIISAVVGILLVV<br>VLGVVFGILIKRRQQKIRKYTMRRLLQETELVEPLTPSGAMP<br>NQAQMRILKETELRKVKVLGSGAFGTVYKGIWIPDGENVKIP<br>VAIKVLRENTSPKANKEILDEAYVMAGVGSPYVSRLLGICLT<br>STVQLVTQLMPYGCLLDHVRENRGRLGSQDLLNWCMQIAK<br>GMSYLEDVRLVHRDLAARNVLVKSPNHVKITDFGLARLLDI<br>DETEYHADGGKVPIKWMALESILRRRFTHQSDVWSYGVTV<br>WELMTFGAKPYDGIPAREIPDLLEKGERLPQPPICTIDVYMIM<br>VKCWMIDSECRPRFRELVSEFSRMARDPQRFVVIQNEDLGPA<br>SPLDSTFYRSLLEDDDMGDLVDAEEYLVPQQGFFCPDPAPGA<br>GGMVHHRHRSSSTRSGGGDLTLGLEPSEEEAPRSPLAPSEGA<br>GSDVFDGDLGMGAAKGLQSLPTHDPSPLQRYSEDPTVPLPSE<br>TDGYVAPLTCSPQPEYVNQPDVRPQPPSPREGPLPAARPAGA<br>TLERPKTLSPGKNGVVKDVFAFGGAVENPEYLTPQGGAAPQ<br>PHPPPAFSPAFDNLYYWDQDPPERGAPPSTFKGTPTAENPEY<br>LGLDVPV |
| CD138 | 32 | MRRAALWLWLCALALSLQPALPQIVATNLPPEDQDGSGDDS<br>DNFSGSGAGALQDITLSQQTPSTWKDTQLLTAIPTSPEPTGLE<br>ATAASTSTLPAGEGPKEGEAVVLPEVEPGLTAREQEATPRPR<br>ETTQLPTTHLASTTTATTAQEPATSHPHRDMQPGHHETSTPA<br>GPSQADLHTPHTEDGGPSATERAAEDGASSQLPAAEGSGEQ<br>DFTFETSGENTAVVAVEPDRRNQSPVDQGATGASQGLLDRK<br>EVLGGVIAGGLVGLIFAVCLVGFMLYRMKKKDEGSYSLEEP<br>KQANGGAYQKPTKQEEFYA |
| EPHA2 | 33 | MELQAARACFALLWGCALAAAAAAAQGKEVVLLDFAAAGG<br>ELGWLTHPYGKGWDLMQNIMNDMPIYMYSVCNVMSGDQD<br>NWLRTNWVYRGEAERIFIELKFTVRDCNSFPGGASSCKETFN<br>LYYAESDLDYGTNFQKRLFTKIDTIAPDEITVSSDFEARHVKL<br>NVEERSVGPLTRKGFYLAFQDIGACVALLSVRVYYKKCPELL |

| | | |
|---|---|---|
| | | QGLAHFPETIAGSDAPSLATVAGTCVDHAVVPPGGEEPRMH<br>CAVDGEWLVPIGQCLCQAGYEKVEDACQACSPGFFKFEASE<br>SPCLECPEHTLPSPEGATSCECEEGFFRAPQDPASMPCTRPPS<br>APHYLTAVGMGAKVELRWTPPQDSGGREDIVYSVTCEQCW<br>PESGECGPCEASVRYSEPPHGLTRTSVTVSDLEPHMNYTFTV<br>EARNGVSGLVTSRSFRTASVSINQTEPPKVRLEGRSTTSLSVS<br>WSIPPPQQSRVWKYEVTYRKKGDSNSYNVRRTEGFSVTLDD<br>LAPDTTYLVQVQALTQEGQGAGSKVHEFQTLSPEGSGNLAV<br>IGGVAVGVVLLLVLAGVGFFIHRRRKNQRARQSPEDVYFSKS<br>EQLKPLKTYVDPHTYEDPNQAVLKFTTEIHPSCVTRQKVIGA<br>GEFGEVYKGMLKTSSGKKEVPVAIKTLKAGYTEKQRVDFLG<br>EAGIMGQFSHHNIIRLEGVISKYKPMMIITEYMENGALDKFLR<br>EKDGEFSVLQLVGMLRGIAAGMKYLANMNYVHRDLAARNI<br>LVNSNLVCKVSDFGLSRVLEDDPEATYTTSGGKIPIRWTAPE<br>AISYRKFTSASDVWSFGIVMWEVMTYGERPYWELSNHEVM<br>KAINDGFRLPTPMDCPSAIYQLMMQCWQQERARRPKFADIV<br>SILDKLIRAPDSLKTLADFDPRVSIRLPSTSGSEGVPFRTVSEW<br>LESIKMQQYTEHFMAAGYTAIEKVVQMTNDDIKRIGVRLPG<br>HQKRIAYSLLGLKDQVNTVGIPI |
| MSLN | 43 | MALPTARPLLGSCGTPALGSLLFLLFSLGWVQPSRTLAGETG<br>QEAAPLDGVLANPPNISSLSPRQLLGFPCAEVSGLSTERVREL<br>AVALAQKNVKLSTEQLRCLAHRLSEPPEDLDALPLDLLLFLN<br>PDAFSGPQACTRFFSRITKANVDLLPRGAPERQRLLPAALAC<br>WGVRGSLLSEADVRALGGLACDLPGRFVAESAEVLLPRLVS<br>CPGPLDQDQQEAARAALQGGGPPYGPPSTWSVSTMDALRGL<br>LPVLGQPIIRSIPQGIVAAWRQRSSRDPSWRQPERTILRPRFRR<br>EVEKTACPSGKKAREIDESLIFYKKWELEACVDAALLATQM<br>DRVNAIPFTYEQLDVLKHKLDELYPQGYPESVIQHLGYLFLK<br>MSPEDIRKWNVTSLETLKALLEVNKGHEMSPQAPRRPLPQV<br>ATLIDRFVKGRGQLDKDTLDTLTAFYPGYLCSLSPEELSSVPP<br>SSIWAVRPQDLDTCDPRQLDVLYPKARLAFQNMNGSEYFVK<br>IQSFLGGAPTEDLKALSQQNVSMDLATFMKLRTDAVLPLTV<br>AEVQKLLGPHVEGLKAEERHRPVRDWILRQRQDDLDTLGLG<br>LQGGIPNGYLVLDLSMQEALSGTPCLLGPGPVLTVLALLLAS<br>TLA |
| FOLH1 | 44 | MWNLLHETDSAVATARRPRWLCAGALVLAGGFFLLGFLFG<br>WFIKSSNEATNITPKHNMKAFLDELKAENIKKFLYNFTQIPHL<br>AGTEQNFQLAKQIQSQWKEFGLDSVELAHYDVLLSYPNKTH<br>PNYISIINEDGNEIFNTSLFEPPPPGYENVSDIVPPFSAFSPQGM<br>PEGDLVYVNYARTEDFFKLERDMKINCSGKIVIARYGKVFRG<br>NKVKNAQLAGAKGVILYSDPADYFAPGVKSYPDGWNLPGG<br>GVQRGNILNLNGAGDPLTPGYPANEYAYRRGIAEAVGLPSIP<br>VHPIGYYDAQKLLEKMGGSAPPDSSWRGSLKVPYNVGPGFT<br>GNFSTQKVKMHIHSTNEVTRIYNVIGTLRGAVEPDRYVILGG<br>HRDSWVFGGIDPQSGAAVVHEIVRSFGTLKKEGWRPRRTILF<br>ASWDAEEFGLLGSTEWAEENSRLLQERGVAYINADSSIEGNY<br>TLRVDCTPLMYSLVHNLTKELKSPDEGFEGKSLYESWTKKSP<br>SPEFSGMPRISKLGSGNDFEVFFQRLGIASGRARYTKNWETN<br>KFSGYPLYHSVYETYELVEKFYDPMFKYHLTVAQVRGGMV<br>FELANSIVLPFDCRDYAVVLRKYADKIYSISMKHPQEMKTYS<br>VSFDSLFSAVKNFTEIASKFSERLQDFDKSNPIVLRMMNDQL<br>MFLERAFIDPLGLPDRPFYRHVIYAPSSHNKYAGESFPGIYDA<br>LFDIESKVDPSKAWGEVKRQIYVAAFTVQAAAETLSEVA |
| CDH6 | 45 | MRTYRYFLLLFWVGQPYPTLSTPLSKRTSGFPAKKRALELSG<br>NSKNELNRSKRSWMWNQFFLLEEYTGSDYQYVGKLHSDQD<br>RGDGSLKYILSGDGAGDLFIINENTGDIQATKRLDREEKPVYI |

| | | |
|---|---|---|
| | | LRAQAINRRTGRPVEPESEFIIKIHDINDNEPIFTKEVYTATVPE<br>MSDVGTFVVQVTATDADDPTYGNSAKVVYSILQGQPYFSVE<br>SETGIIKTALLNMDRENREQYQVVIQAKDMGGQMGGLSGTT<br>TVNITLTDVNDNPPRFPQSTYQFKTPESSPPGTPIGRIKASDAD<br>VGENAEIEYSITDGEGLDMFDVITDQETQEGIITVKKLLDFEK<br>KKVYTLKVEASNPYVEPRFLYLGPFKDSATVRIVVEDVDEPP<br>VFSKLAYILQIREDAQINTTIGSVTAQDPDAARNPVKYSVDR<br>HTDMDRIFNIDSGNGSIFTSKLLDRETLLWHNITVIATEINNPK<br>QSSRVPLYIKVLDVNDNAPEFAEFYETFVCEKAKADQLIQTL<br>HAVDKDDPYSGHQFSFSLAPEAASGSNFTIQDNKDNTAGILT<br>RKNGYNRHEMSTYLLPVVISDNDYPVQSSTGTVTVRVCACD<br>HHGNMQSCHAEALIHPTGLSTGALVAILLCIVILLVTVVLFAA<br>LRRQRKKEPLIISKEDIRDNIVSYNDEGGGEEDTQAFDIGTLR<br>NPEAIEDNKLRRDIVPEALFLPRRTPTARDNTDVRDFINQRLK<br>ENDTDPTAPPYDSLATYAYEGTGSVADSLSSLESVTTDADQD<br>YDYLSDWGPRFKKLADMYGGVDSDKDS |
| CEACAM5 | 46 | MESPSAPPHRWCIPWQRLLLTASLLTFWNPPTTAKLTIESTPF<br>NVAEGKEVLLLVHNLPQHLFGYSWYKGERVDGNRQIIGYVI<br>GTQQATPGPAYSGREIIYPNASLLIQNIIQNDTGFYTLHVIKSD<br>LVNEEATGQFRVYPELPKPSISSNNSKPVEDKDAVAFTCEPET<br>QDATYLWWVNNQSLPVSPRLQLSNGNRTLTLFNVTRNDTAS<br>YKCETQNPVSARRSDSVILNVLYGPDAPTISPLNTSYRSGENL<br>NLSCHAASNPPAQYSWFVNGTFQQSTQELFIPNITVNNSGSY<br>TCQAHNSDTGLNRTTVTTITVYAEPPKPFITSNNSNPVEDEDA<br>VALTCEPEIQNTTYLWWVNNQSLPVSPRLQLSNDNRTLTLLS<br>VTRNDVGPYECGIQNKLSVDHSDPVILNVLYGPDDPTISPSYT<br>YYRPGVNLSLSCHAASNPPAQYSWLIDGNIQQHTQELFISNIT<br>EKNSGLYTCQANNSASGHSRTTVKTITVSAELPKPSISSNNSK<br>PVEDKDAVAFTCEPEAQNTTYLWWVNGQSLPVSPRLQLSNG<br>NRTLTLFNVTRNDARAYVCGIQNSVSANRSDPVTLDVLYGP<br>DTPIISPPDSSYLSGANLNLSCHSASNPSPQYSWRINGIPQQHT<br>QVLFIAKITPNNNGTYACFVSNLATGRNNSIVKSITVSASGTS<br>PGLSAGATVGIMIGVLVGVALI |
| CFC1B | 47 | MTWRHHVRLLFTVSLALQIINLGNSYQREKHNGGREEVTKV<br>ATQKHRQSPLNWTSSHFGEVTGSAEGWGPEEPLPYSWAFGE<br>GASARPRCCRNGGTCVLGSFCVCPAHFTGRYCEHDQRRSEC<br>GALEHGAWTLRACHLCRCIFGALHCLPLQTPDRCDPKDFLA<br>SHAHGPSAGGAPSLLLLLPCALLHRLLRPDAPAHPRSLVPSV<br>LQRERRPCGRPGLGHRL |
| ENPP3 | 48 | MESTLTLATEQPVKKNTLKKYKIACIVLLALLVIMSLGLGLG<br>LGLRKLEKQGSCRKKCFDASFRGLENCRCDVACKDRGDCC<br>WDFEDTCVESTRIWMCNKFRCGETRLEASLCSCSDDCLQRK<br>DCCADYKSVCQGETSWLEENCDTAQQSQCPEGFDLPPVILFS<br>MDGFRAEYLYTWDTLMPNINKLKTCGIHSKYMRAMYPTKT<br>FPNHYTIVTGLYPESHGIIDNNMYDVNLNKNFSLSSKEQNNP<br>AWWHGQPMWLTAMYQGLKAATYFWPGSEVAINGSFPSIY<br>MPYNGSVPFEERISTLLKWLDLPKAERPRFYTMYFEEPDSSG<br>HAGGPVSARVIKALQVVDHAFGMLMEGLKQRNLHNCVNIIL<br>LADHGMDQTYCNKMEYMTDYFPRINFFYMYEGPAPRIRAH<br>NIPHDFFSFNSEEIVRNLSCRKPDQHFKPYLTPDLPKRLHYAK<br>NVRIDKVHLFVDQQWLAVRSKSNTNCGGGNHGYNNEFRSM<br>EAIFLAHGPSFKEKTEVEPFENIEVYNLMCDLLRIQPAPNNGT<br>HGSLNHLLKVPFYEPSHAEEVSKFSVCGFANPLPTESLDCFCP<br>HLQNSTQLEQVNQMLNLTQEEITATVKVNLPFGRPRVLQKN<br>VDHCLLYHREYVSGFGKAMRMPMWSSYTVPQLGDTSPLPP<br>TVPDCLRADVRVPPSESQKCSFYLADKNITHGFLYPPASNRT |

| | | |
|---|---|---|
| | | SDSQYDALITSNLVPMYEEFRKMWDYFHSVLLIKHATERNG<br>VNVVSGPIFDYNYDGHFDAPDEITKHLANTDVPIPTHYFVVL<br>TSCKNKSHTPENCPGWLDVLPFIIPHRPTNVESCPEGKPEALW<br>VEERFTAHIARVRDVELLTGLDFYQDKVQPVSEILQLKTYLP<br>TFETTI |
| FOLR1 | 49 | MAQRMTTQLLLLLVWVAVVGEAQTRIAWARTELLNVCMN<br>AKHHKEKPGPEDKLHEQCRPWRKNACCSTNTSQEAHKDVS<br>YLYRFNWNHCGEMAPACKRHFIQDTCLYECSPNLGPWIQQV<br>DQSWRKERVLNVPLCKEDCEQWWEDCRTSYTCKSNWHKG<br>WNWTSGFNKCAVGAACQPFHFYFPTPTVLCNEIWTHSYKVS<br>NYSRGSGRCIQMWFDPAQGNPNEEVARFYAAAMSGAGPWA<br>AWPFLLSLALMLLWLLS |
| HAVCR1 | 50 | MHPQVVILSLILHLADSVAGSVKVGGEAGPSVTLPCHYSGAV<br>TSMCWNRGSCSLFTCQNGIVWTNGTHVTYRKDTRYKLLGD<br>LSRRDVSLTIENTAVSDSGVYCCRVEHRGWFNDMKITVSLEI<br>VPPKVTTTPIVTTVPTVTTVRTSTTVPTTTTVPMTTVPTTTVP<br>TTMSIPTTTTVLTTMTVSTTTSVPTTTSIPTTTSVPVTTTVSTF<br>VPPMPLPRQNHEPVATSPSSPQPAETHPTTLQGAIRREPTSSPL<br>YSYTTDGNDTVTESSDGLWNNNQTQLFLEHSLLTANTTKGI<br>YAGVCISVLVLLALLGVIIAKKYFFKKEVQQLSVSFSSLQIKA<br>LQNAVEKEVQAEDNIYIENSLYATD |
| KIT | 51 | MRGARGAWDFLCVLLLLLRVQTGSSQPSVSPGEPSPPSIHPG<br>KSDLIVRVGDEIRLLCTDPGFVKWTFEILDETNENKQNEWITE<br>KAEATNTGKYTCTNKHGLSNSIYVFVRDPAKLFLVDRSLYG<br>KEDNDTLVRCPLTDPEVTNYSLKGCQGKPLPKDLRFIPDPKA<br>GIMIKSVKRAYHRLCLHCSVDQEGKSVLSEKFILKVRPAFKA<br>VPVVSVSKASYLLREGEEFTVTCTIKDVSSSVYSTWKRENSQ<br>TKLQEKYNSWHHGDFNYERQATLTISSARVNDSGVFMCYA<br>NNTFGSANVTTTLEVVDKGFINIFPMINTTVFVNDGENVDLIV<br>EYEAFPKPEHQQWIYMNRTFTDKWEDYPKSENESNIRYVSE<br>LHLTRLKGTEGGTYTFLVSNSDVNAAIAFNVYVNTKPEILTY<br>DRLVNGMLQCVAAGFPEPTIDWYFCPGTEQRCSASVLPVDV<br>QTLNSSGPPFGKLVVQSSIDSSAFKHNGTVECKAYNDVGKTS<br>AYFNFAFKGNNKEQIHPHTLFTPLLIGFVIVAGMMCIIVMILT<br>YKYLQKPMYEVQWKVVEEINGNNYVYIDPTQLPYDHKWEF<br>PRNRLSFGKTLGAGAFGKVVEATAYGLIKSDAAMTVAVKM<br>LKPSAHLTEREALMSELKVLSYLGNHMNIVNLLGACTIGGPT<br>LVITEYCCYGDLLNFLRRKRDSFICSKQEDHAEAALYKNLLH<br>SKESSCSDSTNEYMDMKPGVSYVVPTKADKRRSVRIGSYIER<br>DVTPAIMEDDELALDLEDLLSFSYQVAKGMAFLASKNCIHR<br>DLAARNILLTHGRITKICDFGLARDIKNDSNYVVKGNARLPV<br>KWMAPESIFNCVYTFESDVWSYGIFLWELFSLGSSPYPGMPV<br>DSKFYKMIKEGFRMLSPEHAPAEMYDIMKTCWDADPLKRPT<br>FKQIVQLIEKQISESTNHIYSNLANCSPNRQKPVVDHSVRINS<br>VGSTASSSQPLLVHDDV |
| MET | 52 | MKAPAVLAPGILVLLFTLVQRSNGECKEALAKSEMNVNMK<br>YQLPNFTAETPIQNVILHEHHIFLGATNYIYVLNEEDLQKVAE<br>YKTGPVLEHPDCFPCQDCSSKANLSGGVWKDNINMALVVD<br>TYYDDQLISCGSVNRGTCQRHVFPHNHTADIQSEVHCIFSPQI<br>EEPSQCPDCVVSALGAKVLSSVKDRFINFFVGNTINSSYFPDH<br>PLHSISVRRLKETKDGFMFLTDQSYIDVLPEFRDSYPIKYVHA<br>FESNNFIYFLTVQRETLDAQTFHTRIIRFCSINSGLHSYMEMPL<br>ECILTEKRKKRSTKKEVFNILQAAYVSKPGAQLARQIGASLN<br>DDILFGVFAQSKPDSAEPMDRSAMCAFPIKYVNDFFNKIVNK<br>NNVRCLQHFYGPNHEHCFNRTLLRNSSGCEARRDEYRTEFT<br>TALQRVDLFMGQFSEVLLTSISTFIKGDLTIANLGTSEGRFMQ |

| | | |
|---|---|---|
| | | VVVSRSGPSTPHVNFLLDSHPVSPEVIVEHTLNQNGYTLVITG<br>KKITKIPLNGLGCRHFQSCSQCLSAPPFVQCGWCHDKCVRSE<br>ECLSGTWTQQICLPAIYKVFPNSAPLEGGTRLTICGWDFGFRR<br>NNKFDLKKTRVLLGNESCTLTLSESTMNTLKCTVGPAMNKH<br>FNMSIIISNGHGTTQYSTFSYVDPVITSISPKYGPMAGGTLLTL<br>TGNYLNSGNSRHISIGGKTCTLKSVSNSILECYTPAQTISTEFA<br>VKLKIDLANRETSIFSYREDPIVYEIHPTKSFISGGSTITGVGKN<br>LNSVSVPRMVINVHEAGRNFTVACQHRSNSEIICCTTPSLQQL<br>NLQLPLKTKAFFMLDGILSKYFDLIYVHNPVFKPFEKPVMIS<br>MGNENVLEIKGNDIDPEAVKGEVLKVGNKSCENIHLHSEAV<br>LCTVPNDLLKLNSELNIEWKQAISSTVLGKVIVQPDQNFTGLI<br>AGVVSISTALLLLLGFFLWLKKRKQIKDLGSELVRYDARVHT<br>PHLDRLVSARSVSPTTEMVSNESVDYRATFPEDQFPNSSQNG<br>SCRQVQYPLTDMSPILTSGDSDISSPLLQNTVHIDLSALNPEL<br>VQAVQHVVIGPSSLIVHFNEVIGRGHFGCVYHGTLLDNDGK<br>KIHCAVKSLNRITDIGEVSQFLTEGIIMKDFSHPNVLSLLGICL<br>RSEGSPLVVLPYMKHGDLRNFIRNETHNPTVKDLIGFGLQVA<br>KGMKYLASKKFVHRDLAARNCMLDEKFTVKVADFGLARD<br>MYDKEYYSVHNKTGAKLPVKWMALESLQTQKFTTKSDVW<br>SFGVLLWELMTRGAPPYPDVNTFDITVYLLQGRRLLQPEYCP<br>DPLYEVMLKCWHPKAEMRPSFSELVSRISAIFSTFIGEHYVHV<br>NATYVNVKCVAPYPSLLSSEDNADDEVDTRPASFWETS |
| MUC16 | 53 | MLKPSGLPGSSSPTRSLMTGSRSTKATPEMDSGLTGATLSPK<br>TSTGAIVVTEHTLPFTSPDKTLASPTSSVVGRTTQSLGVMSSA<br>LPESTSRGMTHSEQRTSPSLSPQVNGTPSRNYPATSMVSGLSS<br>PRTRTSSTEGNFTKEASTYTLTVETTSGPVTEKYTVPTETSTT<br>EGDSTETPWDTRYIPVKITSPMKTFADSTASKENAPVSMTPA<br>ETTVTDSHTPGRTNPSFGTLYSSFLDLSPKGTPNSRGETSLELI<br>LSTTGYPFSSPEPGSAGHSRISTSAPLSSSASVLDNKISETSIFS<br>GQSLTSPLSPGVPEARASTMPNSAIPFSMTLSNAETSAERVRS<br>TISSLGTPSISTKQTAETILTFHAFAETMDIPSTHIAKTLASEWL<br>GSPGTLGGTSTSALTTTSPSTTLVSEETNTHHSTSGKETEGTL<br>NTSMTPLETSAPGEESEMTATLVPTLGFTTLDSKIRSPSQVSSS<br>HPTRELRTTGSTSGRQSSSTAAHGSSDILRATTSSTSKASSWT<br>SESTAQQFSEPQHTQWVETSPSMKTERPPASTSVAAPITTSVP<br>SVVSGFTTLKTSSTKGIWLEETSADTLIGESTAGPTTHQFAVP<br>TGISMTGGSSTRGSQGTTHLLTRATASSETSADLTLATNGVP<br>VSVSPAVSKTAAGSSPPGGTKPSYTMVSSVIPETSSLQSSAFR<br>EGTSLGLTPLNTRHPFSSPEPDSAGHTKISTSIPLLSSASVLED<br>KVSATSTFSHHKATSSITTGTPEISTKTKPSSAVLSSMTLSNAA<br>TSPERVRNATSPLTHPSPSGEETAGSVLTLSTSAETTDSPNIHP<br>TGTLTSESSESPSTLSLPSVSGVKTTFSSSTPSTHLFTSGEETEE<br>TSNPSVSQPETSVSRVRTTLASTSVPTPVFPTMDTWPTRSAQF<br>SSSHLVSELRATSSTSVTNSTGSALPKISHLTGTATMSQTNRD<br>TFNDSAAPQSTTWPETSPRFKTGLPSATTTVSTSATSLSATVM<br>VSKFTSPATSSMEATSIREPSTTILTTETTNGPGSMAVASTNIPI<br>GKGYITEGRLDTSHLPIGTTASSETSMDFTMAKESVSMSVSPS<br>QSMDAAGSSTPGRTSQFVDTFSDDVYHLTSREITIPRDGTSSA<br>LTPQMTATHPPSPDPGSARSTWLGILSSSPSSPTPKVTMSSTFS<br>TQRVTTSMIMDTVETSRWNMPNLPSTTSLTPSNIPTSGAIGKS<br>TLVPLDTPSPATSLEASEGGLPTLSTYPESTNTPSIHLGAHASS<br>ESPSTIKLTMASVVKPGSYTPLTFPSIETHIHVSTARMAYSSGS<br>SPEMTAPGETNTGSTWDPTTYITTTDPKDTSSAQVSTPHSVR<br>TLRTTENHPKTESATPAAYSGSPKISSSPNLTSPATKAWTITD<br>TTEHSTQLHYTKLAEKSSGFETQSAPGPVSVVIPTSPTIGSSTL<br>ELTSDVPGEPLVLAPSEQTTITLPMATWLSTSLTEEMASTDLD |

| | | |
|---|---|---|
| | | ISSPSSPMSTFAIFPPMSTPSHELSKSEADTSAIRNTDSTTLDQH<br>LGIRSLGRTGDLTTVPITPLTTTWTSVIEHSTQAQDTLSATMS<br>PTHVTQSLKDQTSIPASASPSHLTEVYPELGTQGRSSSEATTF<br>WKPSTDTLSREIETGPTNIQSTPPMDNTTTGSSSSGVTLGIAHL<br>PIGTSSPAETSTNMALERRSSTATVSMAGTMGLLVTSAPGRSI<br>SQSLGRVSSVLSESTTEGVTDSSKGSSPRLNTQGNTALSSSLE<br>PSYAEGSQMSTSIPLTSSPTTPDVEFIGGSTFWTKEVTTVMTS<br>DISKSSARTESSSATLMSTALGSTENTGKEKLRTASMDLPSPT<br>PSMEVTPWISLTLSNAPNTTDSLDLSHGVHTSSAGTLATDRS<br>LNTGVTRASRLENGSDTSSKSLSMGNSTHTSMTYTEKSEVSS<br>SIHPRPETSAPGAETTLTSTPGNRAISLTLPFSSIPVEEVISTGIT<br>SGPDINSAPMTHSPITPPTIVWTSTGTIEQSTQPLHAVSSEKVS<br>VQTQSTPYVNSVAVSASPTHENSVSSGSSTSSPYSSASLESLD<br>STISRRNAITSWLWDLTTSLPTTTWPSTSLSEALSSGHSGVSN<br>PSSTTTEFPLFSAASTSAAKQRNPETETHGPQNTAASTLNTDA<br>SSVTGLSETPVGASISSEVPLPMAITSRSDVSGLTSESTANPSL<br>GTASSAGTKLTRTISLPTSESLVSFRMNKDPWTVSIPLGSHPT<br>TNTETSIPVNSAGPPGLSTVASDVIDTPSDGAESIPTVSFSPSPD<br>TEVTTISHFPEKTTHSFRTISSLTHELTSRVTPIPGDWMSSAMS<br>TKPTGASPSITLGERRTITSAAPTTSPIVLTASFTETSTVSLDNE<br>TTVKTSDILDARKTNELPSDSSSSSDLINTSIASSTMDVTKTAS<br>ISPTSISGMTASSSPSLFSSDRPQVPTSTTETNTATSPSVSSNTY<br>SLDGGSNVGGTPSTLPPFTITHPVETSSALLAWSRPVRTFSTM<br>VSTDTASGENPTSSNSVVTSVPAPGTWTSVGSTTDLPAMGFL<br>KTSPAGEAHSLLASTIEPATAFTPHLSAAVVTGSSATSEASLL<br>TTSESKAIHSSPQTPTTPTSGANWETSATPESLLVVTETSDTTL<br>TSKILVTDTILFSTVSTPPSKFPSTGTLSGASFPTLLPDTPAIPLT<br>ATEPTSSLATSFDSTPLVTIASDSLGTVPETTLTMSETSNGDAL<br>VLKTVSNPDRSIPGITIQGVTESPLHPSSTSPSKIVAPRNTTYEG<br>SITVALSTLPAGTTGSLVFSQSSENSETTALVDSSAGLERASV<br>MPLTTGSQGMASSGGIRSGSTHSTGTKTFSSLPLTMNPGEVT<br>AMSEITTNRLTATQSTAPKGIPVKPTSAESGLLTPVSASSSPSK<br>AFASLTTAPPTWGIPQSTLTFEFSEVPSLDTKSASLPTPGQSLN<br>TIPDSDASTASSSLSKSPEKNPRARMMTSTKAISASSFQSTGFT<br>ETPEGSASPSMAGHEPRVPTSGTGDPRYASESMSYPDPSKAS<br>SAMTSTSLASKLTTLFSTGQAARSGSSSSPISLSTEKETSFLSPT<br>ASTSRKTSLFLGPSMARQPNILVHLQTSALTLSPTSTLNMSQE<br>EPPELTSSQTIAEEEGTTAETQTLTFTPSETPTSLLPVSSPTEPT<br>ARRKSSPETWASSISVPAKTSLVETTDGTLVTTIKMSSQAAQ<br>GNSTWPAPAEETGSSPAGTSPGSPEMSTTLKIMSSKEPSISPEI<br>RSTVRNSPWKTPETTVPMETTVEPVTLQSTALGSGSTSISHLP<br>TGTTSPTKSPTENMLATERVSLSPSPPEAWTNLYSGTPGGTR<br>QSLATMSSVSLESPTARSITGTGQQSSPELVSKTTGMEFSMW<br>HGSTGGTTGDTHVSLSTSSNILEDPVTSPNSVSSLTDKSKHKT<br>ETWVSTTAIPSTVLNNKIMAAEQQTSRSVDEAYSSTSSWSDQ<br>TSGSDITLGASPDVTNTLYITSTAQTTSLVSLPSGDQGITSLTN<br>PSGGKTSSASSVTSPSIGLETLRANVSAVKSDIAPTAGHLSQT<br>SSPAEVSILDVTTAPTPGISTTITTMGTNSISTTTPNPEVGMST<br>MDSTPATERRTTSTEHPSTWSSTAASDSWTVTDMTSNLKVA<br>RSPGTISTMHTTSFLASSTELDSMSTPHGRITVIGTSLVTPSSD<br>ASAVKTETSTSERTLSPSDTTASTPISTFSRVQRMSISVPDILST<br>SWTPSSTEAEDVPVSMVSTDHASTKTDPNTPLSTFLFDSLSTL<br>DWDTGRSLSSATATTSAPQGATTPQELTLETMISPATSQLPFS<br>IGHITSAVTPAAMARSSGVTFSRPDPTSKKAEQTSTQLPTTTS<br>AHPGQVPRSAATTLDVIPHTAKTPDATFQRQGQTALTTEARA<br>TSDSWNEKEKSTPSAPWITEMMNSVSEDTIKEVTSSSSVLRTL |

| | | |
|---|---|---|
| | | NTLDINLESGTTSSPSWKSSPYERIAPSESTTDKEAIHPSTNTV<br>ETTGWVTSSEHASHSTIPAHSASSKLTSPVVTTSTREQAIVSM<br>STTTWPESTRARTEPNSFLTIELRDVSPYMDTSSTTQTSIISSPG<br>STAITKGPRTEITSSKRISSSFLAQSMRSSDSPSEAITRLSNFPA<br>MTESGGMILAMQTSPPGATSLSAPTLDTSATASWTGTPLATT<br>QRFTYSEKTTLFSKGPEDTSQPSPPSVEETSSSSSLVPIHATTSP<br>SNILLTSQGHSPSSTPPVTSVFLSETSGLGKTTDMSRISLEPGT<br>SLPPNLSSTAGEALSTYEASRDTKAIHHSADTAVTNMEATSS<br>EYSPIPGHTKPSKATSPLVTSHIMGDITSSTSVFGSSETTEIETV<br>SSVNQGLQERSTSQVASSATETSTVITHVSSGDATTHVTKTQ<br>ATFSSGTSISSPHQFITSTNTFTDVSTNPSTSLIMTESSGVTITT<br>QTGPTGAATQGPYLLDTSTMPYLTETPLAVTPDFMQSEKTTL<br>ISKGPKDVSWTSPPSVAETSYPSSLTPFLVTTIPPATSTLQGQH<br>TSSPVSATSVLTSGLVKTTDMLNTSMEPVTNSPQNLNNPSNEI<br>LATLAATTDIETIHPSINKAVTNMGTASSAHVLHSTLPVSSEP<br>STATSPMVPASSMGDALASISIPGSETTDIEGEPTSSLTAGRKE<br>NSTLQEMNSTTESNIILSNVSVGAITEATKMEVPSFDATFIPTP<br>AQSTKFPDIFSVASSRLSNSPPMTISTHMTTTQTGSSGATSKIP<br>LALDTSTLETSAGTPSVVTEGFAHSKITTAMNNDVKDVSQTN<br>PPFQDEASSPSSQAPVLVTTLPSSVAFTPQWHSTSSPVSMSSV<br>LTSSLVKTAGKVDTSLETVTSSPQSMSNTLDDISVTSAATTDI<br>ETTHPSINTVVTNVGTTGSAFESHSTVSAYPEPSKVTSPNVTT<br>STMEDTTISRSIPKSSKTTRTETETTSSLTPKLRETSISQEITSST<br>ETSTVPYKELTGATTEVSRTDVTSSSSTSFPGPDQSTVSLDIST<br>ETNTRLSTSPIMTESAEITITTQTGPHGATSQDTFTMDPSNTTP<br>QAGIHSAMTHGFSQLDVTTLMSRIPQDVSWTSPPSVDKTSSP<br>SSFLSSPAMTTPSLISSTLPEDKLSSPMTSLLTSGLVKITDILRT<br>RLEPVTSSLPNFSSTSDKILATSKDSKDTKEIFPSINTEETNVK<br>ANNSGHESHSPALADSETPKATTQMVITTTVGDPAPSTSMPV<br>HGSSETTNIKREPTYFLTPRLRETSTSQESSFPTDTSFLLSKVPT<br>GTITEVSSTGVNSSSKISTPDHDKSTVPPDTFTGEIPRVFTSSIK<br>TKSAEMTITTQASPPESASHSTLPLDTSTTLSQGGTHSTVTQG<br>FPYSEVTTLMGMGPGNVSWMTTPPVEETSSVSSLMSSPAMT<br>SPSPVSSTSPQSIPSSPLPVTALPTSVLVTTTDVLGTTSPESVTS<br>SPPNLSSITHERPATYKDTAHTEAAMHHSTNTAVTNVGTSGS<br>GHKSQSSVLADSETSKATPLMSTTSTLGDTSVSTSTPNISQTN<br>QIQTEPTASLSPRLRESSTSEKTSSTTETNTAFSYVPTGAITQA<br>SRTEISSSRTSISDLDRPTIAPDISTGMITRLFTSPIMTKSAEMT<br>VTTQTTTPGATSQGILPWDTSTTLFQGGTHSTVSQGFPHSEIT<br>TLRSRTPGDVSWMTTPPVEETSSGFSLMSPSMTSPSPVSSTSP<br>ESIPSSPLPVTALLTSVLVTTTNVLGTTSPEPVTSSPPNLSSPTQ<br>ERLTTYKDTAHTEAMHASMHTNTAVANVGTSISGHESQSSV<br>PADSHTSKATSPMGITFAMGDTSVSTSTPAFFETRIQTESTSSL<br>IPGLRDTRTSEEINTVTETSTVLSEVPTTTTTEVSRTEVITSSRT<br>TISGPDHSKMSPYISTETITRLSTFPFVTGSTEMAITNQTGPIGT<br>ISQATLTLDTSSTASWEGTHSPVTQRFPHSEETTTMSRSTKGV<br>SWQSPPSVEETSSPSSPVPLPAITSHSSLYSAVSGSSPTSALPVT<br>SLLTSGRRKTIDMLDTHSELVTSSLPSASSFSGEILTSEASTNT<br>ETIHFSENTAETNMGTTNSMHKLHSSVSIHSQPSGHTPPKVTG<br>SMMEDAIVSTSTPGSPETKNVDRDSTSPLTPELKEDSTALVM<br>NSTTESNTVFSSVSLDAATEVSRAEVTYYDPTFMPASAQSTK<br>SPDISPEASSSHSNSPPLTISTHKTIATQTGPSGVTSLGQLTLDT<br>STIATSAGTPSARTQDFVDSETTSVMNNDLNDVLKTSPFSAE<br>EANSLSSQAPLLVTTSPSPVTSTLQEHSTSSLVSVTSVPTPTLA<br>KITDMDTNLEPVTRSPQNLRNTLATSEATTDTHTMHPSINTA<br>VANVGTTSSPNEFYFTVSPDSDPYKATSAVVITSTSGDSIVST |

| | | |
|---|---|---|
| | | SMPRSSAMKKIESETTFSLIFRLRETSTSQKIGSSSDTSTVFDK<br>AFTAATTEVSRTELTSSSRTSIQGTEKPTMSPDTSTRSVTMLS<br>TFAGLTKSEERTIATQTGPHRATSQGTLTWDTSITTSQAGTHS<br>AMTHGFSQLDLSTLTSRVPEYISGTSPPSVEKTSSSSSLLSLPAI<br>TSPSPVPTTLPESRPSSPVHLTSLPTSGLVKTTDMLASVASLPP<br>NLGSTSHKIPTTSEDIKDTEKMYPSTNIAVTNVGTTTSEKESY<br>SSVPAYSEPPKVTSPMVTSFNIRDTIVSTSMPGSSEITRIEMEST<br>FSLAHGLKGTSTSQDPIVSTEKSAVLHKLTTGATETSRTEVAS<br>SRRTSIPGPDHSTESPDISTEVIPSLPISLGITESSNMTIITRTGPP<br>LGSTSQGTFTLDTPTTSSRAGTHSMATQEFPHSEMTTVMNKD<br>PEILSWTIPPSIEKTSFSSSLMPSPAMTSPPVSSTLPKTIHTTPSP<br>MTSLLTPSLVMTTDTLGTSPEPTTSSPPNLSSTSHEILTTDEDT<br>TAIEAMHPSTSTAATNVETTSSGHGSQSSVLADSEKTKATAP<br>MDTTSTMGHTTVSTSMSVSSETTKIKRESTYSLTPGLRETSIS<br>QNASFSTDTSIVLSEVPTGTTAEVSRTEVTSSGRTSIPGPSQST<br>VLPEISTRTMTRLFASPTMTESAEMTIPTQTGPSGSTSQDTLTL<br>DTSTTKSQAKTHSTLTQRFPHSEMTTLMSRGPGDMSWQSSPS<br>LENPSSLPSLLSLPATTSPPPISSTLPVTISSSPLPVTSLLTSSPVT<br>TTDMLHTSPELVTSSPPKLSHTSDERLTTGKDTTNTEAVHPST<br>NTAASNVEIPSSGHESPSSALADSETSKATSPMFITSTQEDTTV<br>AISTPHFLETSRIQKESISSLSPKLRETGSSVETSSAIETSAVLSE<br>VSIGATTEISRTEVTSSSRTSISGSAESTMLPEISTTRKIIKFPTSP<br>ILAESSEMTIKTQTSPPGSTSESTFTLDTSTTPSLVITHSTMTQR<br>LPHSEITTLVSRGAGDVPRPSSLPVEETSPPSSQLSLSAMISPSP<br>VSSTLPASSHSSSASVTSLLTPGQVKTTEVLDASAEPETSSPPS<br>LSSTSVEILATSEVTTDTEKIHPFSNTAVTKVGTSSSGHESPSS<br>VLPDSETTKATSAMGTISIMGDTSVSTLTPALSNTRKIQSEPA<br>SSLTTRLRETSTSEETSLATEANTVLSKVSTGATTEVSRTEAIS<br>FSRTSMSGPEQSTMSQDISIGTIPRISASSVLTESAKMTITTQTG<br>PSESTLESTLNLNTATTPSWVETHSIVIQGFPHPEMTTSMGRG<br>PGGVSWPSPPFVKETSPPSSPLSLPAVTSPHPVSTTFLAHIPPSP<br>LPVTSLLTSGPATTTDILGTSTEPGTSSSSSLSTTSHERLTTYK<br>DTAHTEAVHPSTNTGGTNVATTSSGYKSQSSVLADSSPMCTT<br>STMGDTSVLTSTPAFLETRRIQTELASSLTPGLRESSGSEGTSS<br>GTKMSTVLSKVPTGATTEISKEDVTSIPGPAQSTISPDISTRTV<br>SWFSTSPVMTESAEITMNTHTSPLGATTQGTSTLDTSSTTSLT<br>MTHSTISQGFSHSQMSTLMRRGPEDVSWMSPPLLEKTRPSFS<br>LMSSPATTSPSPVSSTLPESISSSPLPVTSLLTSGLAKTTDMLH<br>KSSEPVTNSPANLSSTSVEILATSEVTTDTEKTHPSSNRTVTD<br>VGTSSSGHESTSFVLADSQTSKVTSPMVITSTMEDTSVSTSTP<br>GFFETSRIQTEPTSSLTLGLRKTSSSEGTSLATEMSTVLSGVPT<br>GATAEVSRTEVTSSSRTSISGFAQLTVSPETSTETITRLPTSSIM<br>TESAEMMIKTQTDPPGSTPESTHTVDISTTPNWVETHSTVTQ<br>RFSHSEMTTLVSRSPGDMLWPSQSSVEETSSASSLLSLPATTS<br>PSPVSSTLVEDFPSASLPVTSLLNPGLVITTDRMGISREPGTSS<br>TSNLSSTSHERLTTLEDTVDTEDMQPSTHTAVTNVRTSISGHE<br>SQSSVLSDSETPKATSPMGTTYTMGETSVSISTSDFFETSRIQI<br>EPTSSLTSGLRETSSSERISSATEGSTVLSEVPSGATTEVSRTE<br>VISSRGTSMSGPDQFTISPDISTEAITRLSTSPIMTESAESAITIE<br>TGSPGATSEGTLTLDTSTTTFWSGTHSTASPGFSHSEMTTLMS<br>RTPGDVPWPSLPSVEEASSVSSSLSSPAMTSTSFFSTLPESISSS<br>PHPVTALLTLGPVKTTDMLRTSSEPETSSPPNLSSTSAEILATS<br>EVTKDREKIHPSSNTPVVNVGTVIYKHLSPSSVLADLVTTKPT<br>SPMATTSTLGNTSVSTSTPAFPETMMTQPTSSLTSGLREISTSQ<br>ETSSATERSASLSGMPTGATTKVSRTEALSLGRTSTPGPAQST<br>ISPEISTETITRISTPLTTTGSAEMTITPKTGHSGASSQGTFTLDT |

| | | |
|---|---|---|
| | | SSRASWPGTHSAATHRSPHSGMTTPMSRGPEDVSWPSRPSVE<br>KTSPPSSLVSLSAVTSPSPLYSTPSESSHSSPLRVTSLFTPVMM<br>KTTDMLDTSLEPVTTSPPSMNITSDESLATSKATMETEAIQLS<br>ENTAVTQMGTISARQEFYSSYPGLPEPSKVTSPVVTSSTIKDI<br>VSTTIPASSEITRIEMESTSTLTPTPRETSTSQEIHSATKPSTVPY<br>KALTSATIEDSMTQVMSSSRGPSPDQSTMSQDISTEVITRLST<br>SPIKTESTEMTITTQTGSPGATSRGTLTLDTSTTFMSGTHSTAS<br>QGFSHSQMTALMSRTPGDVPWLSHPSVEEASSASFSLSSPVM<br>TSSSPVSSTLPDSIHSSSLPVTSLLTSGLVKTTELLGTSSEPETS<br>SPPNLSSTSAEILAITEVTTDTEKLEMTNVVTSGYTHESPSSVL<br>ADSVTTKATSSMGITYPTGDTNVLTSTPAFSDTSRIQTKSKLS<br>LTPGLMETSISEETSSATEKSTVLSSVPTGATTEVSRTEAISSS<br>RTSIPGPAQSTMSSDTSMETITRISTPLTRKESTDMAITPKTGP<br>SGATSQGTFTLDSSSTASWPGTHSATTQRFPQSVVTTPMSRG<br>PEDVSWPSPLSVEKNSPPSSLVSSSSVTSPSPLYSTPSGSSHSSP<br>VPVTSLFTSIMMKATDMLDASLEPETTSAPNMNITSDESLAA<br>SKATTETEAIHVFENTAASHVETTSATEELYSSSPGFSEPTKVI<br>SPVVTSSSIRDNMVSTTMPGSSGITRIEIESMSSLTPGLRETRTS<br>QDITSSTETSTVLYKMPSGATPEVSRTEVMPSSRTSIPGPAQST<br>MSLDISDEVVTRLSTSPIMTESAEITITTQTGYSLATSQVTLPL<br>GTSMTFLSGTHSTMSQGLSHSEMTNLMSRGPESLSWTSPRFV<br>ETTRSSSSLTSLPLTTSLSPVSSTLLDSSPSSPLPVTSLILPGLVK<br>TTEVLDTSSEPKTSSSPNLSSTSVEIPATSEIMTDTEKIHPSSNT<br>AVAKVRTSSSVHESHSSVLADSETTITIPSMGITSAVDDTTVF<br>TSNPAFSETRRIPTEPTFSLTPGFRETSTSEETTSITETSAVLYG<br>VPTSATTEVSMTEIMSSNRIHIPDSDQSTMSPDIITEVITRLSSS<br>SMMSESTQMTITTQKSSPGATAQSTLTLATTTAPLARTHSTV<br>PPRFLHSEMTTLMSRSPENPSWKSSLFVEKTSSSSSLLSLPVTT<br>SPSVSSTLPQSIPSSSFSVTSLLTPGMVKTTDTSTEPGTSLSPNL<br>SGTSVEILAASEVTTDTEKIHPSSSMAVTNVGTTSSGHELYSS<br>VSIHSEPSKATYPVGTPSSMAETSISTSMPANFETTGFEAEPFS<br>HLTSGFRKTNMSLDTSSVTPTNTPSSPGSTHLLQSSKTDFTSS<br>AKTSSPDWPPASQYTEIPVDIITPFNASPSITESTGITSFPESRFT<br>MSVTESTHHLSTDLLPSAETISTGTVMPSLSEAMTSFATTGVP<br>RAISGSGSPFSRTESGPGDATLSTIAESLPSSTPVPFSSSTFTTT<br>DSSTIPALHEITSSSATPYRVDTSLGTESSTTEGRLVMVSTLDT<br>SSQPGRTSSSPILDTRMTESVELGTVTSAYQVPSLSTRLTRTD<br>GIMEHITKIPNEAAHRGTIRPVKGPQTSTSPASPKGLHTGGTK<br>RMETTTTALKTTTTALKTTSRATLTTSVYTPTLGTLTPLNAS<br>MQMASTIPTEMMITTPYVFPDVPETTSSLATSLGAETSTALPR<br>TTPSVFNRESETTASLVSRSGAERSPVIQTLDVSSSEPDTTAS<br>WVIHPAETIPTVSKTTPNFFHSELDTVSSTATSHGADVSSAIPT<br>NISPSELDALTPLVTISGTDTSTTFPTLTKSPHETETRTTWLTH<br>PAETSSTIPRTIPNFSHHESDATPSIATSPGAETSSAIPIMTVSPG<br>AEDLVTSQVTSSGTDRNMTIPTLTLSPGEPKTIASLVTHPEAQ<br>TSSAIPTSTISPAVSRLVTSMVTSLAAKTSTTNRALTNSPGEPA<br>TTVSLVTHPAQTSPTVPWTTSIFFHSKSDTTPSMTTSHGAESS<br>SAVPTPTVSTEVPGVVTPLVTSSRAVISTTIPILTLSPGEPETTP<br>SMATSHGEEASSAIPTPTVSPGVPGVVTSLVTSSRAVTSTTIPI<br>LTFSLGEPETTPSMATSHGTEAGSAVPTVLPEVPGMVTSLVA<br>SSRAVTSTTLPTLTLSPGEPETTPSMATSHGAEASSTVPTVSPE<br>VPGVVTSLVTSSSGVNSTSIPTLILSPGELETTPSMATSHGAEA<br>SSAVPTPTVSPGVSGVVTPLVTSSRAVTSTTIPILTLSSSEPETT<br>PSMATSHGVEASSAVLTVSPEVPGMVTSLVTSSRAVTSTTIPT<br>LTISSDEPETTTSLVTHSEAKMISAIPTLAVSPTVQGLVTSLVT<br>SSGSETSAFSNLTVASSQPETIDSWVAHPGTEASSVVPTLTVS |

| | | |
|---|---|---|
| | | TGEPFTNISLVTHPAESSSTLPRTTSRFSHSELDTMPSTVTSPE<br>AESSSAISTTISPGIPGVLTSLVTSSGRDISATFPTVPESPHESEA<br>TASWVTHPAVTSTTVPRTTPNYSHSEPDTTPSIATSPGAEATS<br>DFPTITVSPDVPDMVTSQVTSSGTDTSITIPTLTLSSGEPETTTS<br>FITYSETHTSSAIPTLPVSPGASKMLTSLVISSGTDSTTTFPTLT<br>ETPYEPETTAIQLIHPAETNTMVPRTTPKFSHSKSDTTLPVAIT<br>SPGPEASSAVSTTTISPDMSDLVTSLVPSSGTDTSTTFPTLSET<br>PYEPETTATWLTHPAETSTTVSGTIPNFSHRGSDTAPSMVTSP<br>GVDTRSGVPTTTIPPSIPGVVTSQVTSSATDTSTAIPTLTPSPGE<br>PETTASSATHPGTQTGFTVPIRTVPSSEPDTMASWVTHPPQTS<br>TPVSRTTSSFSHSSPDATPVMATSPRTEASSAVLTTISPGAPEM<br>VTSQITSSGAATSTTVPTLTHSPGMPETTALLSTHPRTETSKTF<br>PASTVFPQVSETTASLTIRPGAETSTALPTQTTSSLFTLLVTGT<br>SRVDLSPTASPGVSAKTAPLSTHPGTETSTMIPTSTLSLGLLET<br>TGLLATSSSAETSTSTLTLTVSPAVSGLSSASITTDKPQTVTSW<br>NTETSPSVTSVGPPEFSRTVTGTTMTLIPSEMPTPPKTSHGEG<br>VSPTTILRTTMVEATNLATTGSSPTVAKTTTTFNTLAGSLFTP<br>LTTPGMSTLASESVTSRTSYNHRSWISTTSSYNRRYWTPATS<br>TPVTSTFSPGISTSSIPSSTAATVPFMVPFTLNFTITNLQYEEDM<br>RHPGSRKFNATERELQGLLKPLFRNSSLEYLYSGCRLASLRPE<br>KDSSATAVDAICTHRPDPEDLGLDRERLYWELSNLTNGIQEL<br>GPYTLDRNSLYVNGFTHRSSMPTTSTPGTSTVDVGTSGTPSSS<br>PSPTTAGPLLMPFTLNFTITNLQYEEDMRRTGSRKFNTMESV<br>LQGLLKPLFKNTSVGPLYSGCRLTLLRPEKDGAATGVDAICT<br>HRLDPKSPGLNREQLYWELSKLTNDIEELGPYTLDRNSLYVN<br>GFTHQSSVSTTSTPGTSTVDLRTSGTPSSLSSPTIMAAGPLLVP<br>FTLNFTITNLQYGEDMGHPGSRKFNTTERVLQGLLGPIFKNTS<br>VGPLYSGCRLTSLRSEKDGAATGVDAICIHHLDPKSPGLNRE<br>RLYWELSQLTNGIKELGPYTLDRNSLYVNGFTHRTSVPTSST<br>PGTSTVDLGTSGTPFSLPSPATAGPLLVLFTLNFTITNLKYEED<br>MHRPGSRKFNTTERVLQTLLGPMFKNTSVGLLYSGCRLTLL<br>RSEKDGAATGVDAICTHRLDPKSPGVDREQLYWELSQLTNG<br>IKELGPYTLDRNSLYVNGFTHWIPVPTSSTPGTSTVDLGSGTP<br>SSLPSPTTAGPLLVPFTLNFTITNLKYEEDMHCPGSRKFNTTE<br>RVLQSLLGPMFKNTSVGPLYSGCRLTLLRSEKDGAATGVDAI<br>CTHRLDPKSPGVDREQLYWELSQLTNGIKELGPYTLDRNSLY<br>VNGFTHQTSAPNTSTPGTSTVDLGTSGTPSSLPSPTSAGPLLV<br>PFTLNFTITNLQYEEDMHHPGSRKFNTTERVLQGLLGPMFKN<br>TSVGLLYSGCRLTLLRPEKNGAATGMDAICSHRLDPKSPGLN<br>REQLYWELSQLTHGIKELGPYTLDRNSLYVNGFTHRSSVAPT<br>STPGTSTVDLGTSGTPSSLPSPTTAVPLLVPFTLNFTITNLQYG<br>EDMRHPGSRKFNTTERVLQGLLGPLFKNSSVGPLYSGCRLIS<br>LRSEKDGAATGVDAICTHHLNPQSPGLDREQLYWQLSQMTN<br>GIKELGPYTLDRNSLYVNGFTHRSSGLTTSTPWTSTVDLGTS<br>GTPSPVPSPTTTGPLLVPFTLNFTITNLQYEENMGHPGSRKFNI<br>TESVLQGLLKPLFKSTSVGPLYSGCRLTLLRPEKDGVATRVD<br>AICTHRPDPKIPGLDRQQLYWELSQLTHSITELGPYTLDRDSL<br>YVNGFTQRSSVPTTSTPGTFTVQPETSETPSSLPGPTATGPVLL<br>PFTLNFTITNLQYEEDMRRPGSRKFNTTERVLQGLLMPLFKN<br>TSVSSLYSGCRLTLLRPEKDGAATRVDAVCTHRPDPKSPGLD<br>RERLYWKLSQLTHGITELGPYTLDRHSLYVNGFTHQSSMTTT<br>RTPDTSTMHLATSRTPASLSGPMTASPLLVLFTINFTITNLRYE<br>ENMHHPGSRKFNTTERVLQGLLRPVFKNTSVGPLYSGCRLTL<br>LRPKKDGAATKVDAICTYRPDPKSPGLDREQLYWELSQLTH<br>SITELGPYTLDRDSLYVNGFTQRSSVPTTSIPGTPTVDLGTSGT<br>PVSKPGPSAASPLLVLFTLNFTITNLRYEENMQHPGSRKFNTT |

| | | |
|---|---|---|
| | | ERVLQGLLRSLFKSTSVGPLYSGCRLTLLRPEKDGTATGVDA<br>ICTHHPDPKSPRLDREQLYWELSQLTHNITELGPYALDNDSLF<br>VNGFTHRSSVSTTSTPGTPTVYLGASKTPASIFGPSAASHLLIL<br>FTLNFTITNLRYEENMWPGSRKFNTTERVLQGLLRPLFKNTS<br>VGPLYSGCRLTLLRPEKDGEATGVDAICTHRPDPTGPGLDRE<br>QLYLELSQLTHSITELGPYTLDRDSLYVNGFTHRSSVPTTSTG<br>VVSEEPFTLNFTINNLRYMADMGQPGSLKFNITDNVMQHLLS<br>PLFQRSSLGARYTGCRVIALRSVKNGAETRVDLLCTYLQPLS<br>GPGLPIKQVFHELSQQTHGITRLGPYSLDKDSLYLNGYNEPG<br>PDEPPTTPKPATTFLPPLSEATTAMGYHLKTLTLNFTISNLQY<br>SPDMGKGSATFNSTEGVLQHLLRPLFQKSSMGPFYLGCQLIS<br>LRPEKDGAATGVDTTCTYHPDPVGPGLDIQQLYWELSQLTH<br>GVTQLGFYVLDRDSLFINGYAPQNLSIRGEYQINFHIVNWNL<br>SNPDPTSSEYITLLRDIQDKVTTLYKGSQLHDTFRFCLVTNLT<br>MDSVLVTVKALFSSNLDPSLVEQVFLDKTLNASFHWLGSTY<br>QLVDIHVTEMESSVYQPTSSSSTQHFYLNFTITNLPYSQDKAQ<br>PGTTNYQRNKRNIEDALNQLFRNSSIKSYFSDCQVSTFRSVPN<br>RHHTGVDSLCNFSPLARRVDRVAIYEEFLRMTRNGTQLQNF<br>TLDRSSVLVDGYSPNRNEPLTGNSDLPFWAVILIGLAGLLGVI<br>TCLICGVLVTTRRRKKEGEYNVQQQCPGYYQSHLDLEDLQ |
| SLC39A6 | 54 | MARKLSVILILTFALSVTNPLHELKAAAFPQTTEKISPNWESG<br>INVDLAISTRQYHLQQLFYRYGENNSLSVEGFRKLLQNIGIDK<br>IKRIHIHHDHDHHSDHEHHSDHERHSDHEHHSEHEHHSDHD<br>HHSHHNHAASGKNKRKALCPDHDSDSSGKDPRNSQGKGAH<br>RPEHASGRRNVKDSVSASEVTSTVYNTVSEGTHFLETIETPRP<br>GKLFPKDVSSSTPPSVTSKSRVSRLAGRKTNESVSEPRKGFM<br>YSRNTNENPQECFNASKLLTSHGMGIQVPLNATEFNYLCPAII<br>NQIDARSCLIHTSEKKAEIPPKTYSLQIAWVGGFIAISIISFLSLL<br>GVILVPLMNRVFFKFLLSFLVALAVGTLSGDAFLHLLPHSHA<br>SHHHSHSHEEPAMEMKRGPLFSHLSSQNIEESAYFDSTWKGL<br>TALGGLYFMFLVEHVLTLIKQFKDKKKKNQKKPENDDDVEI<br>KKQLSKYESQLSTNEEKVDTDDRTEGYLRADSQEPSHFDSQ<br>QPAVLEEEEVMIAHAHPQEVYNEYVPRGCKNKCHSHFHDTL<br>GQSDDLIHHHHDYHHILHHHHHQNHHPHSHSQRYSREELKD<br>AGVATLAWMVIMGDGLHNFSDGLAIGAAFTEGLSSGLSTSV<br>AVFCHELPHELGDFAVLLKAGMTVKQAVLYNALSAMLAYL<br>GMATGIFIGHYAENVSMWIFALTAGLFMYVALVDMVPEML<br>HNDASDHGCSRWGYFFLQNAGMLLGFGIMLLISIFEHKIVFRI<br>NF |
| SLC44A4 | 55 | MGGKQRDEDDEAYGKPVKYDPSFRGPIKNRSCTDVICCVLF<br>LLFILGYIVVGIVAWLYGDPRQVLYPRNSTGAYCGMGENKD<br>KPYLLYFNIFSCILSSNIISVAENGLQCPTPQVCVSSCPEDPWT<br>VGKNEFSQTVGEVFYTKNRNFCLPGVPWNMTVITSLQQELC<br>PSFLLPSAPALGRCFPWTNVTPPALPGITNDTTIQQGISGLIDS<br>LNARDISVKIFEDFAQSWYWILVALGVALVLSLLFILLLRLVA<br>GPLVLVLILGVLGVLAYGIYYCWEEYRVLRDKGASISQLGFT<br>TNLSAYQSVQETWLAALIVLAVLEAILLLMLIFLRQRIRIAIAL<br>LKEASKAVGQMMSTMFYPLVTFVLLLICIAYWAMTALYLAT<br>SGQPQYVLWASNISSPGCEKVPINTSCNPTAHLVNSSCPGLM<br>CVFQGYSSKGLIQRSVFNLQIYGVLGLFWTLNWVLALGQCV<br>LAGAFASFYWAFHKPQDIPTFPLISAFIRTLRYHTGSLAFGALI<br>LTLVQIARVILEYIDHKLRGVQNPVARCIMCCFKCCLWCLEK<br>FIKFLNRNAYIMIAIYGKNFCVSAKNAFMLLMRNIVRVVVLD<br>KVTDLLLFFGKLLVVGGVGVLSFFFFSGRIPGLGKDFKSPHL<br>NYYWLPIMTSILGAYVIASGFFSVFGMCVDTLFLCFLEDLER<br>NNGSLDRPYYMSKSLLKILGKKNEAPPDNKKRKK |

| | | |
|---|---|---|
| STEAP1 | 56 | MESRKDITNQEELWKMKPRRNLEEDDYLHKDTGETSMLKR<br>PVLLHLHQTAHADEFDCPSELQHTQELFPQWHLPIKIAAIIAS<br>LTFLYTLLREVIHPLATSHQQYFYKIPILVINKVLPMVSITLLA<br>LVYLPGVIAAIVQLHNGTKYKKFPHWLDKWMLTRKQFGLLS<br>FFFAVLHAIYSLSYPMRRSYRYKLLNWAYQQVQQNKEDAWI<br>EHDVWRMEIYVSLGIVGLAILALLAVTSIPSVSDSLTWREFH<br>YIQSKLGIVSLLLGTIHALIFAWNKWIDIKQFVWYTPPTFMIA<br>VFLPIVVLIFKSILFLPCLRKKILKIRHGWEDVTKINKTEICSQL |

【0284】 在各種實施例中，本文所揭示之 ADC 可以包含上表中所列重鏈及輕鏈可變結構域之任何集合，或例如藉由將六個 CDR 移植至所選人類供體抗體構架中得到的來自重鏈及輕鏈集合之六個 CDR 序列的集合。在各種實施例中，本文所揭示之 ADC 可以包含與上表中所列序列同源的胺基酸序列，只要該 ADC 保持結合至其目標癌症抗原(例如其 $K_D$ 小於 $1\times10^{-8}$ M)之能力並保持本文所揭示之 ADC 的一或多種功能特性(例如內化能力、調節 RNA 剪接、抑制細胞生長等)。

【0285】 在一些實施例中，ADC 進一步包含人類重鏈及輕鏈恆定結構域或其片段。舉例而言，ADC 可以包含人類 IgG 重鏈恆定結構域(諸如 IgG1)及人類 κ 或 λ 輕鏈恆定結構域。在各種實施例中，所述 ADC 之抗體或抗原結合片段包含人類免疫球蛋白 G 亞型 1(IgG1)重鏈恆定結構域及人類 Igκ 輕鏈恆定結構域。

【0286】 在各種其他實施例中，ADC 之目標癌症抗原係人類表皮生長因子受體 2(HER2)。

【0287】 在各種實施例中，抗 HER2 抗體或其抗原結合片段包含如下三個重鏈 CDR 及三個輕鏈 CDR：如由 Kabat 編號系統所定義，由 SEQ ID NO:1 組成之重鏈 CDR1(HCDR1)、由 SEQ ID NO:2 組成之重鏈 CDR2(HCDR2)、由 SEQ ID NO:3 組成之重鏈 CDR3(HCDR3)；由 SEQ ID NO:4 組成之輕鏈 CDR1(LCDR1)、由 SEQ ID NO:5 組成之輕鏈 CDR2(LCDR2)及由 SEQ ID NO: 6 組成之輕鏈 CDR3(LCDR3)。

【0288】在各種實施例中，抗 HER2 抗體或其抗原結合片段包括含 SEQ ID NO: 19 之胺基酸序列之重鏈可變區及含 SEQ ID NO: 20 之胺基酸序列之輕鏈可變區。在一些實施例中，抗 HER2 抗體或其抗原結合片段包含 SEQ ID NO: 19 之重鏈可變區胺基酸序列及 SEQ ID NO: 20 之輕鏈可變區胺基酸序列，或與所揭示序列至少 95%一致的序列。在一些實施例中，抗 HER2 抗體或其抗原結合片段具有與 SEQ ID NO: 19 至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%一致之重鏈可變區胺基酸序列及/或與 SEQ ID NO: 20 至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%一致之輕鏈可變區胺基酸序列。

【0289】在各種實施例中，抗 HER2 抗體或其抗原結合片段係內化性抗體或內化性抗原結合片段。在各種實施例中，抗 HER2 抗體包含人類 IgG1 重鏈恆定結構域及人類 Igκ 輕鏈恆定結構域。

【0290】在各種實施例中，抗 HER2 抗體包含 SEQ ID NO: 19 之重鏈胺基酸序列或與 SEQ ID NO: 19 至少 95%一致之序列，及 SEQ ID NO: 20 之輕鏈胺基酸序列或與 SEQ ID NO: 20 至少 95%一致之序列。在特定實施例中，抗 HER2 抗體包含 SEQ ID NO: 19 之重鏈胺基酸序列及 SEQ ID NO: 20 之輕鏈胺基酸序列，或與所揭示序列至少 95%一致之序列。在一些實施例中，抗 HER2 抗體具有與 SEQ ID NO: 19 至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%一致之重鏈胺基酸序列及與 SEQ ID NO: 20 至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%一致之輕鏈胺基酸序列。在各種實施例中，抗 HER2 抗體係曲妥珠單抗或其抗原結合片段。

【0291】在各種實施例中，抗 HER2 抗體或其抗原結合片段包含曲妥珠單抗之三個重鏈 CDR 及三個輕鏈 CDR，或其中該等 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)之不超過一個、二個、三個、四個、五個或六個胺基酸添加、缺失或取代。

【0292】在各種其他實施例中，ADC之目標癌症抗原係人類多配體蛋白聚糖-1(CD138)。

【0293】在各種實施例中，抗 CD138 抗體或其抗原結合片段包含如下三個重鏈 CDR 及三個輕鏈 CDR：如由 Kabat 編號系統所定義，由 SEQ ID NO: 7 組成之重鏈 CDR1(HCDR1)、由 SEQ ID NO: 8 組成之重鏈 CDR2(HCDR2)、由 SEQ ID NO: 9 組成之重鏈 CDR3(HCDR3)；由 SEQ ID NO: 10 組成之輕鏈 CDR1(LCDR1)、由 SEQ ID NO: 11 組成之輕鏈 CDR2(LCDR2)及由 SEQ ID NO: 12 組成之輕鏈 CDR3(LCDR3)。

【0294】在各種實施例中，抗 CD138 抗體或其抗原結合片段包括含 SEQ ID NO: 21 之胺基酸序列之重鏈可變區及含 SEQ ID NO: 22 之胺基酸序列之輕鏈可變區。在一些實施例中，抗 CD138 抗體或其抗原結合片段包含 SEQ ID NO: 21 之重鏈可變區胺基酸序列及 SEQ ID NO: 22 之輕鏈可變區胺基酸序列，或與所揭示序列至少 95%一致的序列。在一些實施例中，抗 CD138 抗體或其抗原結合片段具有與 SEQ ID NO: 21 至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%一致之重鏈可變區胺基酸序列及/或與 SEQ ID NO: 22 至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%一致之輕鏈可變區胺基酸序列。

【0295】在各種實施例中，抗 CD138 抗體或其抗原結合片段係內化性抗體或內化性抗原結合片段。在各種實施例中，抗 CD138 抗體包含

鼠類 IgG2a 重鏈恆定結構域及鼠類 Igκ 輕鏈恆定結構域。在各種實施例中，抗 CD138 抗體包含人類 IgG2a 重鏈恆定結構域及人類 Igκ 輕鏈恆定結構域。

【0296】 在各種實施例中，抗 CD138 抗體包含 SEQ ID NO: 21 之重鏈胺基酸序列或與 SEQ ID NO: 21 至少 95%一致之序列，及 SEQ ID NO: 22 之輕鏈胺基酸序列或與 SEQ ID NO: 22 至少 95%一致之序列。在特定實施例中，抗 CD138 抗體包含 SEQ ID NO: 21 之重鏈胺基酸序列及 SEQ ID NO: 22 之輕鏈胺基酸序列，或與所揭示序列至少 95%一致之序列。在一些實施例中，抗 CD138 抗體具有與 SEQ ID NO: 21 至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%一致之重鏈胺基酸序列及與 SEQ ID NO: 22 至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%一致之輕鏈胺基酸序列。在各種實施例中，抗 CD138 抗體係 B-B4 或其抗原結合片段。

【0297】 在各種實施例中，抗 CD138 抗體或其抗原結合片段包含之 B-B4 之三個重鏈 CDR 及三個輕鏈 CDR 或其中該等 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)之不超過一個、二個、三個、四個、五個或六個胺基酸添加、缺失或取代。

【0298】 在各種其他實施例中，ADC 之目標癌症抗原係人類蝶素 A 型受體 2(EPHA2)。

【0299】 在各種實施例中，抗 EPHA2 抗體或其抗原結合片段包含如下三個重鏈 CDR 及三個輕鏈 CDR：如由 Kabat 編號系統所定義，由 SEQ ID NO: 13 組成之重鏈 CDR1(HCDR1)、由 SEQ ID NO: 14 組成之

重鏈 CDR2(HCDR2)、由 SEQ ID NO: 15 組成之重鏈 CDR3(HCDR3)；由 SEQ ID NO: 16 組成之輕鏈 CDR1(LCDR1)、由 SEQ ID NO: 17 組成之輕鏈 CDR2(LCDR2)及由 SEQ ID NO: 18 組成之輕鏈 CDR3(LCDR3)。

【0300】在各種實施例中，抗 EPHA2 抗體或其抗原結合片段包括含 SEQ ID NO: 23 之胺基酸序列之重鏈可變區及含 SEQ ID NO: 24 之胺基酸序列之輕鏈可變區。在一些實施例中，抗 EPHA2 抗體或其抗原結合片段包含 SEQ ID NO: 23 之重鏈可變區胺基酸序列及 SEQ ID NO: 24 之輕鏈可變區胺基酸序列，或與所揭示序列至少 95%一致的序列。在一些實施例中，抗 EPHA2 抗體或其抗原結合片段具有與 SEQ ID NO: 23 至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%一致之重鏈可變區胺基酸序列及/或與 SEQ ID NO: 24 至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%一致之輕鏈可變區胺基酸序列。

【0301】在各種實施例中，抗 EPHA2 抗體或其抗原結合片段係內化性抗體或內化性抗原結合片段。在各種實施例中，抗 EPHA2 抗體包含人類 IgG1 重鏈恆定結構域及人類 Igκ 輕鏈恆定結構域。

【0302】在各種實施例中，抗 EPHA2 抗體包含 SEQ ID NO: 23 之重鏈胺基酸序列或與 SEQ ID NO: 23 至少 95%一致之序列，及 SEQ ID NO: 24 之輕鏈胺基酸序列或與 SEQ ID NO: 24 至少 95%一致之序列。在特定實施例中，抗 EPHA2 抗體包含 SEQ ID NO: 23 之重鏈胺基酸序列及 SEQ ID NO: 24 之輕鏈胺基酸序列，或與所揭示序列至少 95%一致之序列。在一些實施例中，抗 EPHA2 抗體具有與 SEQ ID NO: 23 至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%一致之重鏈胺基酸序列及與 SEQ

ID NO: 24 至少 96%、至少 97%、至少 98%或至少 99%一致之輕鏈胺基酸序列。在一些實施例中，抗 EPHA2 抗體包含由 SEQ ID NO: 23 之核苷酸序列編碼之重鏈；以及由 SEQ ID NO: 24 之核苷酸序列編碼之輕鏈。在各種實施例中，抗 EPHA2 抗體係 1C1 或其抗原結合片段。

【0303】在各種實施例中，抗 EPHA2 抗體或其抗原結合片段包含 1C1 之三個重鏈 CDR 及三個輕鏈 CDR 或其中該等 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)之不超過一個、二個、三個、四個、五個或六個胺基酸添加、缺失或取代。

【0304】在各種實施例中，胺基酸取代係單一殘基之胺基酸取代。插入通常將為約約 1 至約 20 個胺基酸殘基，但更多的插入可為容許的，只要保留生物功能(例如結合至目標抗原)即可。缺失通常在約 1 至約 20 個胺基酸殘基之範圍內，但在一些情況下，缺失可能要大得多。取代、缺失、插入或其任何組合均可用於獲得最終衍生物或變異體。一般而言，對數個胺基酸進行此等變化以使該分子，特別是抗原結合蛋白之免疫原性及特異性之改變減到最少。然而，在某些情況下，更大的變化可為容許的。保守取代一般係根據以下如表 6 所描繪之圖表進行。

**表 6**

| 原始殘基 | 例示性取代 |
|---|---|
| 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 |

【0305】 藉由選擇保守性低於表 6 中所示取代的取代實現功能或免疫屬性之顯著變化。舉例而言，可以進行較明顯地影響以下之取代：改變區域中多肽主鏈之結構，例如 α-螺旋或 β-摺疊結構；目標位點處該分子之電荷或疏水性；或側鏈之體積。一般可使多肽特性發生最大變化的取代係這樣一些取代，在該等取代中，(a)親水性殘基，例如絲胺醯基或蘇胺醯基取代疏水性殘基，例如白胺醯基、異白胺醯基、苯丙胺醯基、纈胺醯基或丙胺醯基(或經疏水性殘基取代)；(b)半胱胺酸或脯胺酸取代任何其他

殘基(或經任何其他殘基取代)；(c)具有正電性側鏈之殘基，例如離胺醯基、精胺醯基或組胺醯基取代負電性殘基，例如麩胺醯基或天冬胺醯基(或經負電性殘基取代)；或(d)具有大體積側鏈之殘基，例如苯丙胺酸取代不具有側鏈之殘基，例如甘胺酸(或經該殘基取代)。

【0306】 在 ADC 中使用變異抗體序列之各種實施例中，該等變異體通常展現相同的定性生物活性且會引起相同的免疫反應，不過亦可視需要選擇變異體以改變抗原結合蛋白之特徵。或者，該變異體可以設計成使得抗原結合蛋白之生物活性改變。舉例而言，可以改變或移除糖基化位點。

【0307】 各種抗體可以用於本文所使用之 ADC 以靶向癌細胞。如下文所示，本文所揭示之 ADC 中的連接子-有效負載在靶向不同腫瘤抗原之抗體存在下意外地有效。在腫瘤細胞而非健康細胞上表現、或在腫瘤細胞上表現量高於健康細胞之適合抗原，以及針對該等抗原之抗體係此項技術中已知的。此等抗體可以與本文所揭示之連接子及剪接調節劑有效負載一起使用。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段靶向 HER2，且 HER2 靶向抗體或抗原結合片段係曲妥珠單抗。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段靶向 CD138，且 CD138 靶向抗體或抗原結合片段係 B-B4。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段靶向 EPHA2，且 EPHA2 靶向抗體或抗原結合片段係 1C1。在一些實施例中，所揭示之連接子及剪接調節劑有效負載在若干不同腫瘤靶向抗體存在下意外地有效，而靶向 HER2 之抗體諸如曲妥珠單抗、靶向 CD138 之抗體諸如 B-B4 及靶向 EPHA2 之抗體諸如 1C1 提供明顯改善之藥物:抗體比率、聚集水準、穩定性(亦即，活體外及活體內穩定性)、腫瘤靶向(亦即，細胞毒性、效力)及/

或治療功效。改善之治療功效可在活體外或活體內量測，且可包括減慢之腫瘤生長速率及/或減小之腫瘤體積。

【0308】 在某些實施例中，使用針對相同目標之替代抗體或針對不同抗原目標之抗體且提供至少一些以上描述之有利功能特性(例如改善之穩定性、改善之腫瘤靶向、改善之治療功效等)。在一些實施例中，當所揭示之連接子及剪接調節劑有效負載結合至替代性 HER2、CD138 或 EPHA2 靶向抗體或抗原結合片段時，觀察到此等有利功能特性中之一些或全部。在一些其他實施例中，當所揭示之連接子及剪接調節劑有效負載結合至 HER2 靶向抗體或抗原結合片段時，觀察到此等有利功能特性中之一些或全部。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段靶向 HER2。在一些實施例中，HER2 靶向抗體或抗原結合片段係曲妥珠單抗。在一些其他實施例中，當所揭示之連接子及剪接調節劑有效負載結合至 CD138 靶向抗體或抗原結合片段時，觀察到此等有利功能特性中之一些或全部。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段靶向 CD138。在一些實施例中，CD138 靶向抗體或抗原結合片段係 B-B4。在一些其他實施例中，當所揭示之連接子及剪接調節劑有效負載結合至 EPHA2 靶向抗體或抗原結合片段時，觀察到此等有利功能特性中之一些或全部。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段靶向 EPHA2。在一些實施例中，EPHA2 靶向抗體或抗原結合片段係 1C1。

**連接子**

【0309】 在各種實施例中，ADC 中之連接子在細胞外以一種足以在治療上有效之方式穩定。在一些實施例中，連接子在細胞外部穩定，使得 ADC 當存在於細胞外條件中時(例如在轉運或遞送至細胞中之前)保持完

整。在 ADC 之情形中使用的術語「完整」意思指抗體或抗原結合片段保持連接至藥物部分(例如剪接調節劑)。如本文所使用，在連接子或包含連接子之 ADC 的情形中，「穩定」意思指當 ADC 存在於細胞外條件中時，ADC 樣品中之不超過 20%、不超過約 15%、不超過約 10%、不超過約 5%、不超過約 3%或不超過約 1%之連接子(或其間任何百分比)經裂解(或在總體 ADC 之情況下在其他方面係不完整的)。在一些實施例中，相較於替代性連接子及/或具有替代性連接子及/或剪接調節劑有效負載之 ADC，本文所揭示之連接子及/或 ADC 意外地穩定。在一些實施例中，本文所揭示之 ADC 可以保持完整超過約 48 小時、超過 60 小時、超過約 72 小時、超過約 84 小時或超過約 96 小時。

【0310】 可例如藉由在血漿中包括 ADC 預定時間段(例如 2、4、6、8、16、24、48 或 72 小時)且接著定量該血漿中存在之游離藥物部分之量來確定連接子在細胞外是否穩定。穩定性可使 ADC 之定位時間能夠靶向腫瘤細胞且防止藥物部分過早釋放，否則可能因無差別地損害正常及腫瘤組織而減小 ADC 之治療指數。在一些實施例中，該連接子在目標細胞外部穩定且在進入細胞內部後自 ADC 釋放藥物部分，由此使該藥物可以結合至其目標(例如 SF3b 剪接體複合體)。因此，有效連接子將：(i)維持抗體或抗原結合片段之特異性結合特性；(ii)允許經由穩定連接至抗體或抗原結合片段遞送，例如細胞內遞送藥物部分；(iii)保持穩定及完整性直至 ADC 經轉運或遞送至目標位點目標位點；以及(iv)在裂解或替代性釋放機制之後實現藥物部分之治療作用，例如細胞毒性作用。

【0311】 連接子可能影響 ADC 之物理-化學特性。由於許多細胞毒性劑本質上係疏水性的，故將其連接至具有額外疏水性部分之抗體可能引

起聚集。ADC 聚集物係不溶性的且通常限制抗體上可獲得的藥物負載，由此可能不利地影響 ADC 之效力。一般而言，生物製品之蛋白質聚集物亦與免疫原性增加相關聯。如下文所示，本文所揭示之連接子使 ADC 具有較低聚集量及所需之藥物負載。

【0312】 連接子可為「可裂解」或「不可裂解」的(Ducry 及 Stump (2010) Bioconjugate Chem. 21:5-13)。可裂解連接子係設計成當經受某些環境因素，例如當內化至目標細胞中時釋放出藥物部分(例如剪接調節劑)，而不可裂解連接子一般依賴於抗體或抗原結合片段本身之降解。

【0313】 在一些實施例中，連接子係不可裂解連接子。在一些實施例中，ADC 之剪接調節劑藥物部分係藉由抗體或抗原結合片段降解而釋放。當經目標細胞內化且在目標細胞內降解時，不可裂解連接子往往會保持與抗體之至少一個胺基酸及藥物之共價締合。本文描述多種例示性不可裂解連接子，且其他係此項技術中已知的。例示性不可裂解連接子可以包含硫醚；環己基；N-琥珀醯亞胺基 4-(N-順丁烯二醯亞胺基甲基)環己烷-1 甲酸酯(SMCC)；或 N-羥基琥珀醯亞胺(NHS)；一或多個聚乙二醇(PEG)部分，例如 1、2、3、4、5 或 6 個 PEG 部分；或一或多個烷基部分。

【0314】 在一些實施例中，連接子係可裂解連接子。可裂解連接子係指包含可裂解部分之任何連接子。如本文所使用，術語「可裂解部分」係指可經裂解之任何化學鍵。適合的可裂解化學鍵係此項技術中熟知的且包括(但不限於)酸不穩定性鍵、蛋白酶/肽酶不穩定性鍵、光不穩定性鍵、二硫鍵及酯酶不穩定性鍵。包含可裂解部分之連接子可經由在連接子中特定位點處裂解而允許剪接調節劑藥物部分自 ADC 釋放。

【0315】 在一些實施例中，連接子可在細胞內條件下裂解，由此連

接子之裂解使剪接調節劑藥物部分在細胞內環境中充分地自抗體或抗原結合片段釋放以活化藥物及/或使藥物在治療上有效。在一些實施例中，剪接調節劑藥物部分未自抗體或抗原結合片段裂解，直至 ADC 進入表現對 ADC 之抗體或抗原結合片段具有特異性之抗原的細胞，且在進入細胞時，該剪接調節劑藥物部分自抗體或抗原結合片段裂解。在一些實施例中，連接子包含可裂解部分，該可裂解部分經安置以使得連接子或抗體或抗原結合片段在裂解時皆不會保持結合至剪接調節劑藥物部分。例示性可裂解連接子包括酸不穩定性連接子、蛋白酶/肽酶敏感性連接子、光不穩定性連接子、含二甲基連接子、含二硫化物連接子或含磺醯胺連接子。

【0316】 在一些實施例中，該連接子係 pH 敏感性連接子，且在某些 pH 值下對水解敏感。通常，pH 敏感性連接子可在酸性條件下水解。此裂解策略一般在核內體(約 pH 5-6)及溶酶體(約 pH 4.8)細胞內隔室中利用低於細胞溶質(約 pH 7.4)之 pH 值，以觸發連接子中酸不穩定性基團，諸如腙之水解(Jain 等人(2015) Pharm Res 32:3526-40)。在一些實施例中，連接子係酸不穩定性及/或可水解連接子。舉例而言，可使用可在溶酶體中水解且含有酸不穩定基團(例如腙、半卡巴腙(semicarbazone)、硫半卡巴腙(thiosemicarbazone)、順式烏頭醯胺、原酸酯、縮醛、縮酮或類似物)的酸不穩定性連接子。參見例如美國專利第 5,122,368 號、第 5,824,805 號、第 5,622,929 號；Dubowchik 及 Walker (1999) Pharm Therapeutics 83:67-123；Neville 等人(1989) Biol Chem. 264:14653-61。此類連接子在中性 pH 值條件下，諸如血液中之 pH 值條件下相對穩定，但在低於 pH 5.5 或 5.0(近似溶酶體之 pH 值)下不穩定。在某些實施例中，可水解連接子係硫醚連接子(諸如經由醯腙鍵連接至治療劑之硫

醚)(參見例如美國專利第 5,622,929 號)。

【0317】 在一些實施例中，連接子可在還原條件下裂解。在一些實施例中，連接子可在諸如麩胱甘肽或二硫蘇糖醇之類還原劑存在下裂解。在一些實施例中，連接子係可裂解二硫化物連接子或可裂解磺醯胺連接子。

【0318】 在一些實施例中，連接子係可裂解二硫化物連接子。各種二硫化物連接子係此項技術中已知的，包括例如可使用 N-琥珀醯亞胺基-5-乙醯基硫基乙酸酯(SATA)、N-琥珀醯亞胺基-3-(2-吡啶基二硫基)丙酸酯(SPDP)、N-琥珀醯亞胺基-3-(2-吡啶基二硫基)丁酸酯(SPDB)及 N-琥珀醯亞胺基氧基羰基-α-甲基-α-(2-吡啶基-二硫基)甲苯(SMPT)、SPDB 及 SMPT 形成之連接子。參見例如 Thorpe 等人(1987) Cancer Res. 47:5924-31；Wawrzynczak 等人, In Immunoconjugates: Antibody Conjugates in Radioimagery and Therapy of Cancer (C. W. Vogel 編, Oxford U. Press, 1987)。亦參見美國專利第 4,880,935 號。通常使用二硫化物連接子利用細胞內硫醇之豐度，由此可以有助於其二硫鍵之裂解。含量最豐複之細胞內硫醇，即還原麩胱甘肽之細胞內濃度一般在 1-10 nM 範圍內，其比血液中含量最豐富之低分子硫醇(亦即，半胱胺酸)的約 5 μM 之細胞內濃度要高約 1,000 倍(Goldmacher 等人, In Cancer Drug Discovery and Development: Antibody-Drug Conjugates and Immunotoxins (G. L. Phillips 編, Springer, 2013))。蛋白質二硫化物異構酶家族之細胞內酶亦可促進二硫化物連接子之細胞內裂解。如本文所使用，可裂解二硫化物連接子係指包含可裂解二硫化物部分之任何連接子。術語「可裂解二硫化物部分」係指可以例如藉由硫醇或酶裂解及/或還原的二硫鍵。

【0319】在一些實施例中，連接子係可裂解磺醯胺連接子。如本文所使用，可裂解磺醯胺連接子係指包含可裂解磺醯胺部分之任何連接子。術語「可裂解磺醯胺部分」係指磺醯胺基團，亦即連接至胺基之磺醯基，其中硫-氮鍵可以裂解。

【0320】在一些實施例中，連接子可為樹突狀型連接子，其經由分支之多官能連接子部分將超過一個藥物部分共價連接至抗體或抗原結合片段。參見例如 Sun 等人(2002) Bioorg Med Chem Lett. 12:2213-5；Sun 等人(2003) Bioorg Med Chem. 11:1761-8。樹突狀連接子可增加藥物與抗體之莫耳比，亦即藥物負載，其與 ADC 之效力有關。因此，在抗體或抗原結合片段僅帶有一個反應性半胱胺酸硫醇基情況下，例如多個剪接調節劑藥物部分可經由樹突狀連接子連接。在一些實施例中，連接子部分或連接子-藥物部分可以經由還原之二硫橋連化學物質或限制性離胺酸利用技術連接至抗體或抗原結合片段。參見例如國際公開案第 WO 2013/173391 號及第 WO 2013/173393 號。

【0321】在一些實施例中，連接子可藉由細胞內環境(例如溶酶體或核內體或胞膜窖內)中存在之裂解劑，例如酶裂解。連接子可為例如由細胞內肽酶或蛋白酶，包括(但不限於)溶酶體或核內體蛋白酶裂解之肽連接子。

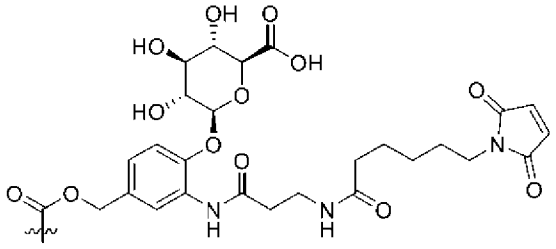
【0322】在一些實施例中，連接子係可裂解肽連接子。如本文所使用，可裂解肽連接子係指包含可裂解肽部分之任何連接子。術語「可裂解肽部分」係指可以藉由細胞內環境中存在之試劑裂解的任何化學鍵連接之胺基酸(天然或合成胺基酸衍生物)。舉例而言，連接子可以包含纈胺酸-丙胺酸(Val-Ala)序列、或纈胺酸-瓜胺酸(Val-Cit)序列，其可藉由肽酶諸

如組織蛋白酶，例如組織蛋白酶 B 裂解。在一些實施例中，連接子可以包含麩胺酸-纈胺酸-瓜胺酸(Glu-Val-Cit)序列。在一些實施例中，連接子係酶可裂解連接子且該連接子中之可裂解肽部分可藉由酶裂解。在一些實施例中，可裂解肽部分可藉由溶酶體酶，例如組織蛋白酶裂解。在一些實施例中，連接子係組織蛋白酶可裂解之連接子。在一些實施例中，連接子中之可裂解肽部分可藉由溶酶體半胱胺酸組織蛋白酶，諸如組織蛋白酶 B、C、F、H、K、L、O、S、V、X 或 W 裂解。在一些實施例中，可裂解肽部分可藉由組織蛋白酶 B 裂解。可以藉由組織蛋白酶 B 裂解之例示性二肽係纈胺酸-瓜胺酸(Val-Cit)(Dubowchik 等人(2002) Bioconjugate Chem. 13:855-69)。

【0323】 在一些實施例中，連接子或連接子中之可裂解肽部分包含胺基酸單元。在一些實施例中，胺基酸單元使連接子能夠經蛋白酶裂解，由此在 ADC 暴露於一或多種細胞內蛋白酶，諸如一或多種溶酶體酶時，促進剪接調節劑藥物部分自該 ADC 釋放(Doronina 等人(2003) Nat Biotechnol. 21:778-84 ; Dubowchik 及 Walker (1999) Pharm Therapeutics 83:67-123)。例示性胺基酸單元包括(但不限於)二肽、三肽、四肽及五肽。例示性二肽包括(但不限於)纈胺酸-丙胺酸(Val-Ala)、纈胺酸-瓜胺酸(Val-Cit)、丙胺酸-天冬醯胺(Ala-Asn)、丙胺酸至苯丙胺酸(Ala-Phe)、苯丙胺酸-離胺酸(Phe-Lys)、丙胺酸-離胺酸(Ala-Lys)、丙胺酸-纈胺酸(Ala-Val)、纈胺酸-離胺酸(Val-Lys)、離胺酸-離胺酸(Lys-Lys)、苯丙胺酸-瓜胺酸(Phe-Cit)、白胺酸-瓜胺酸(Leu-Cit)、異白胺酸-瓜胺酸(Ile-Cit)、色胺酸-瓜胺酸(Trp-Cit)及苯丙胺酸-丙胺酸(Phe-Ala)。例示性三肽包括(但不限於)丙胺酸-丙胺酸-天冬醯胺(Ala-Ala-Asn)、甘胺

酸-纈胺酸-瓜胺酸(Gly-Val-Cit)、甘胺酸-甘胺酸-甘胺酸(Gly-Gly-Gly)、苯丙胺酸-苯丙胺酸-離胺酸(Phe-Phe-Lys)、麩胺酸-纈胺酸-瓜胺酸(Glu-Val-Cit)(參見例如 Anami 等人(2018) Nat Comm. 9:2512，關於包含 Glu-Val-Cit 之例示性連接子以引用之方式併入本文中)及甘胺酸-苯丙胺酸-離胺酸(Gly-Phe-Lys)。其他例示性胺基酸單元包括(但不限於)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-$N^9$-甲苯磺醯基-Arg 及 Phe-$N^9$-硝基-Arg，如例如美國專利第 6,214,345 號中所述。在一些實施例中，連接子中之胺基酸單元包含 Val-Ala。在一些實施例中，連接子中之胺基酸單元包含 Val-Cit。在一些實施例中，連接子中之胺基酸單元包含 Glu-Val-Cit。胺基酸單元可包含天然存在之胺基酸殘基及/或微量胺基酸及/或非天然存在之胺基酸類似物，諸如瓜胺酸。胺基酸單元可針對藉由特定酶之酶裂解進行設計及優化，該特定酶例如為腫瘤相關蛋白酶、溶酶體蛋白酶諸如組織蛋白酶 B、C、D 或 S，或纖維蛋白溶酶蛋白酶。

【0324】 在一些實施例中，連接子係可裂解 β-葡萄糖醛酸苷連接子。如本文所使用，可裂解 β-葡萄糖醛酸苷連接子係指包含可裂解 β-葡萄糖醛酸苷部分之任何連接子。例示性可裂解 β-葡萄糖醛酸苷連接子包含以下結構：



。

【0325】 術語「可裂解 β-葡萄糖醛酸苷部分」係指可一具有 β-葡萄糖醛酸苷酶活性之試劑裂解的糖苷鍵。在一些實施例中，連接子包含可藉

由 β-葡萄糖醛酸苷酶裂解之糖苷鍵。β-葡萄糖醛酸苷酶係催化具有 β-組態之葡萄糖醛酸苷之糖苷鍵水解的 UDP-葡萄糖醛酸基轉移酶。

【0326】 在一些實施例中，本文所揭示之 ADC 包含連接子中之可裂解 β-葡萄糖醛酸苷部分，該部分可藉由酶裂解。在一些實施例中，連接子中之可裂解 β-葡萄糖醛酸苷部分可藉由溶酶體酶，例如 β-葡萄糖醛酸苷酶裂解。在一些實施例中，連接子係 β-葡萄糖醛酸苷酶可裂解之連接子。在一些實施例中，連接子中之可裂解 β-葡萄糖醛酸苷部分允許在 ADC 內化之後藉由 β-葡萄糖醛酸苷酶裂解連接子，由此促進在細胞環境中藥物部分自 ADC 釋放。

【0327】 在一些實施例中，任何本文所揭示之 ADC 中的連接子可以包含至少一個間隔子單元，用於將抗體或抗原結合片段接合至藥物部分(例如剪接調節劑藥物部分)。在一些實施例中，在抗體或抗原結合片段與可裂解部分之間之間隔子單元當存在時，將連接子中之裂解位點(例如可裂解肽部分)接合至抗體或抗原結合片段。在一些實施例中，在藥物部分與可裂解部分之間之間隔子單元當存在時，將連接子中之裂解位點(例如可裂解肽部分)接合至藥物部分。在一些實施例中，不存在裂解位點，且使用間隔子單元將抗體或抗原結合片段連接至藥物部分。

【0328】 在一些實施例中，連接子及/或連接子中之間隔子單元實質上具有親水性。親水性連接子可用於降低可經由多藥耐藥性(MDR)或功能上類似之轉運蛋白自抗性癌細胞泵出藥物之程度。在一些實施例中，親水性連接子可以包括一或多個聚乙二醇(PEG)部分，例如 1、2、3、4、5 或 6 個 PEG 部分。在一些實施例中，連接子包含 2 個 PEG 部分。

【0329】 在一些實施例中，連接子中之間隔子單元包含一或多個

PEG 部分。在一些實施例中，間隔子單元包含一或多個-$(PEG)_m$-，且 *m* 係 1 至 10 之整數(亦即，*m* 可以為 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10)。在一些實施例中，*m* 在 1 至 10 範圍內；在 2 至 8 範圍內；在 2 至 6 範圍內；在 2 至 5 範圍內；在 2 至 4 範圍內；或在 2 至 3 範圍內。在一些實施例中，*m* 係 2。在一些實施例中，間隔子單元包含$(PEG)_2$、$(PEG)_3$、$(PEG)_4$、$(PEG)_5$、$(PEG)_6$、$(PEG)_7$、$(PEG)_8$、$(PEG)_9$ 或$(PEG)_{10}$。在一些實施例中，間隔子單元包含$(PEG)_2$。

【0330】 在一些實施例中，連接子中之間隔子單元包含烷基部分。在一些實施例中，間隔子單元包含一或多個-$(CH_2)_n$-，且 *n* 係 1 至 10 之整數(亦即，*n* 可以為 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10)。在一些實施例中，*n* 在 1 至 10 範圍內；在 2 至 8 範圍內；在 2 至 6 範圍內；在 2 至 5 範圍內；在 2 至 4 範圍內；或在 2 至 3 範圍內。在一些實施例中，*n* 係 2。在一些實施例中，*n* 係 5。在一些實施例中，*n* 係 6。在一些實施例中，間隔子單元包含$(CH_2)_2$、$(CH_2)_3$、$(CH_2)_4$、$(CH_2)_5$、$(CH_2)_6$、$(CH_2)_7$、$(CH_2)_8$、$(CH_2)_9$ 或$(CH_2)_{10}$。在一些實施例中，間隔子單元包含$(CH_2)_2$(「Et」)。在一些實施例中，間隔子單元包含$(CH_2)_6$(「Hex」)。在一些實施例中，間隔子單元包含$(CH_2)_2$-O-$(CH_2)_2$(「Et-O-Et」)。

【0331】 可使用間隔子單元例如將抗體或抗原結合片段直接地或間接地連接至藥物部分。在一些實施例中，間隔子單元將抗體或抗原結合片段直接地連接至該剪接調節劑藥物部分。在一些實施例中，抗體或抗原結合片段及剪接調節劑藥物部分係經由包含一或多個 PEG 部分(例如$(PEG)_2$)或一或多個烷基部分(例如$(CH_2)_2$、$(CH_2)_6$ 或$(CH_2)_2$-O-$(CH_2)_2$)之間隔子單元連接。在一些實施例中，間隔子單元將抗體或抗原結合片段間

接地連接至剪接調節劑藥物部分。在一些實施例中，間隔子單元經由可裂解部分(例如可裂解肽一可裂解 β-葡萄糖醛酸苷)及/或用於將間隔子單元接合至抗體或抗原結合片段之連接部分例如順丁烯二醯亞胺部分將抗體或抗原結合片段間接地連接至剪接調節劑藥物部分。

【0332】 在各種實施例中，間隔子單元經由順丁烯二醯亞胺(Mal)部分連接至抗體或抗原結合片段(亦即，該抗體或抗原結合片段)。

【0333】 經由 Mal 連接至抗體或抗原結合片段之間隔子單元在本文中稱為「Mal-間隔子單元」。如本文所使用，術語「Mal」或「順丁烯二醯亞胺部分」意思指含有順丁烯二醯亞胺基且可與硫氫基，例如抗體或抗原結合片段上半胱胺酸殘基之硫氫基反應的化合物。可與硫氫基(硫醇)反應之其他官能基包括(但不限於)碘乙醯胺、溴乙醯胺、乙烯基吡啶、二硫化物、吡啶基二硫化物、異氰酸酯及異硫氰酸酯。在一些實施例中，該 Mal-間隔子單元可與該抗體或抗原結合片段上之半胱胺酸殘基反應。在一些實施例中，該 Mal-間隔子單元係經由半胱胺酸殘基接合至抗體或抗原結合片段。在一些實施例中，該 Mal-間隔子單元包含 PEG 部分。在一些實施例中，該 Mal-間隔子單元包含烷基部分。

【0334】 在一些實施例中，連接子包含 Mal-間隔子單元及可裂解肽部分。在一些實施例中，該可裂解肽部分包含胺基酸單元。在一些實施例中，胺基酸單元包含 Val-Cit。在一些實施例中，胺基酸單元包含 Val-Ala。在一些實施例中，胺基酸單元包含 Glu-Val-Cit。在一些實施例中，該連接子包含 Mal-間隔子單元及 Val-Cit。在一些實施例中，該連接子包含 Mal-間隔子單元及 Val-Ala。在一些實施例中，連接子包含 Mal-間隔子單元及 Val-Cit，其中該 Mal-間隔子單元包含順丁烯二醯亞胺基己醯基

(MC)。在一些實施例中，連接子包含 Mal-間隔子單元及 Val-Ala，其中該 Mal-間隔子單元包含順丁烯二醯亞胺基己醯基(MC)。在一些實施例中，該連接子包含 Mal-間隔子單元及可裂解 β-葡萄糖醛酸苷部分。

【0335】 在一些實施例中，該連接子包含結構：Mal-間隔子單元。在一些實施例中，該 Mal-間隔子單元包含順丁烯二醯亞胺基己醯基(MC)。在一些實施例中，該連接子包含結構：MC。在一些實施例中，該連接子包含結構：Mal-$(CH_2)_2$ (「Mal-Et」)。在一些實施例中，該連接子包含結構：Mal-$(CH_2)_6$ (「Mal-Hex」)。在一些實施例中，該連接子包含結構：Mal-$(CH_2)_2$-O-$(CH_2)_2$ (「Mal-Et-O-Et」)。在一些實施例中，該連接子包含結構：Mal-$(PEG)_2$。在一些實施例中，該連接子包含結構：Mal-$(PEG)_2$-CO。

【0336】 在各種實施例中，Mal-間隔子單元將抗體或抗原結合片段連接至可裂解肽部分。在一些實施例中，連接子包含 Mal-間隔子單元-肽。在一些實施例中，該連接子包含結構：Mal-間隔子單元-Val-Cit。在一些實施例中，該 Mal-間隔子單元包含順丁烯二醯亞胺基己醯基(MC)。在一些實施例中，該連接子包含結構：MC-Val-Cit。

【0337】 在一些實施例中，該連接子包含結構：Mal-間隔子單元-Val-Ala。在一些實施例中，該 Mal-間隔子單元包含順丁烯二醯亞胺基己醯基(MC)。在一些實施例中，該連接子包含結構：MC-Val-Ala。

【0338】 在各種實施例中，Mal-間隔子單元將抗體或抗原結合片段連接至可裂解 β-葡萄糖醛酸苷部分。在一些實施例中，連接子包含 Mal-間隔子單元-β-葡萄糖醛酸苷。在一些實施例中，連接子包含 MC-β-葡萄糖醛酸苷。

【0339】 在各種實施例中，連接子中之可裂解部分直接地接合至剪接調節劑藥物部分。在其他實施例中，間隔子單元用於將連接子中之可裂解部分連接至剪接調節劑藥物部分。在各種實施例中，剪接調節劑藉由間隔子單元連接至連接子中之可裂解部分。

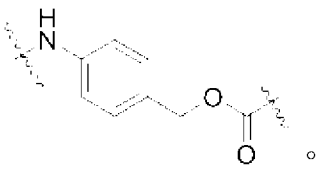
【0340】 間隔子單元可以為「自我分解型」或「非自我分解型」的。「非自分解型」間隔子單元係在連接子裂解時部分或所有間隔子單元仍然結合至剪接調節劑藥物部分之間隔子單元。非自分解型間隔子單元之實例包括(但不限於)甘胺酸間隔子單元及甘胺酸-甘胺酸間隔子單元。非自我分解型間隔子單元最終可隨時間降解，但在細胞條件下不會容易地完全釋放出所連接之原生藥物部分。「自我分解型」間隔子單元允許在細胞內條件下釋放出原生藥物部分。「原生藥物」或「原生藥物部分」係在間隔子單元裂解/降解之後未保持間隔子單元或其他化學修飾部分者。

【0341】 自我分解型化學物質係此項技術中已知的且可針對所揭示之 ADC 容易地選擇。在各種實施例中，將連接子中之可裂解部分連接至剪接調節劑藥物部分的間隔子單元係自我分解型的，且在細胞內條件下裂解可裂解部分之同時或不久之前/之後經歷自我分解。在一些實施例中，剪接調節劑係藉由自我分解型間隔子單元連接至連接子中之可裂解部分。在某些實施例中，剪接調節劑係藉由自我分解型間隔子單元連接至連接子中之可裂解部分，該可裂解部分包含 Val-Cit，且順丁烯二醯亞胺基己醯基(MC)將該可裂解部分接合至抗體或抗原結合片段。在某些實施例中，剪接調節劑係藉由自我分解型間隔子單元連接至連接子中之可裂解部分，該可裂解部分包含 Val-Ala，且順丁烯二醯亞胺基己醯基(MC)將該可裂解部分接合至抗體或抗原結合片段。在某些實施例中，剪接調節劑係藉由自

我分解型間隔子單元連接至連接子中之可裂解部分，該可裂解部分包含 Glu-Val-Cit，且順丁烯二醯亞胺基己醯基(MC)將該可裂解部分接合至抗體或抗原結合片段。在某些實施例中，剪接調節劑經由連接子中之 Mal-間隔子單元(例如 MC)接合至抗體或抗原結合片段，該連接子接合至 Val-Cit 可裂解部分及 pABC 或 pAB 自我分解型間隔子單元。在某些其他實施例中，剪接調節劑經由連接子中之 Mal-間隔子單元(例如 MC)接合至抗體或抗原結合片段，該連接子接合至 Val-Ala 可裂解部分及 pABC 或 pAB 自我分解型間隔子單元。在某些其他實施例中，剪接調節劑經由連接子中之 Mal-間隔子單元(例如 MC)接合至抗體或抗原結合片段，該連接子接合至 Glu-Val-Cit 可裂解部分及 pABC 或 pAB 自我分解型間隔子單元。

【0342】 在某些實施例中，連接子中之自我分解型間隔子單元包含對胺基苯甲基單元。在一些實施例中，對胺基苯甲醇(pABOH)經由醯胺鍵連接至連接子中之胺基酸單元可裂解部分，且在 pABOH 與藥物部分之間形成胺基甲酸酯、胺基甲酸甲酯或碳酸酯(Hamann 等人(2005) Expert Opin Ther Patents 15:1087-103)。在一些實施例中，自我分解型間隔子單元係或包含對胺基苯甲氧基羰基(pABC)。不受理論束縛，認為 pABC 之自我分解涉及自發 1,6-消除反應(Jain 等人(2015) Pharm Res. 32:3526-40)。

【0343】 在各種實施例中，所揭示之 ADC 中使用的對胺基苯甲氧基羰基(pABC)之結構顯示於下：




。

【0344】 在各種實施例中，自我分解型間隔子單元將連接子中之可

裂解部分連接至該剪接調節劑。在一些實施例中，自我分解型間隔子單元係 pABC。在一些實施例中，pABC 將該連接子中之可裂解部分連接至該剪接調節劑。在一些實施例中，pABC 在可裂解部分裂解後經歷自我分解，且剪接調節劑以其天然、活性形式自 ADC 釋放。

【0345】 在一些實施例中，抗 HER2 抗體或抗原結合片段藉由包含 MC-Val-Cit-pABC 之連接子接合至剪接調節劑。在其他實施例中，抗 HER2 抗體或抗原結合片段藉由包含 MC-Val-Ala-pABC 之連接子接合至剪接調節劑。

【0346】 在一些實施例中，抗 CD138 抗體或抗原結合片段藉由包含 MC-Val-Cit-pABC 之連接子接合至剪接調節劑。在其他實施例中，抗 CD138 抗體或抗原結合片段藉由包含 MC-Val-Ala-pABC 之連接子接合至剪接調節劑。

【0347】 在一些實施例中，抗 EPHA2 抗體或抗原結合片段藉由包含 MC-Val-Cit-pABC 之連接子接合至剪接調節劑。在其他實施例中，抗 EPHA2 抗體或抗原結合片段藉由包含 MC-Val-Ala-pABC 之連接子接合至剪接調節劑。

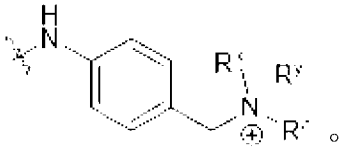
【0348】 在一些實施例中，在連接子中之可裂解肽部分裂解後，pABC 經歷自我分解。在一些實施例中，該可裂解肽部分包含胺基酸單元。在一些實施例中，連接子包含胺基酸單元-pABC。在一些實施例中，胺基酸單元係 Val-Cit。在一些實施例中，連接子包含 Val-Cit-pABC。在一些實施例中，胺基酸單元係 Val-Ala。在一些實施例中，連接子包含 Val-Ala-pABC。在一些實施例中，胺基酸單元係 Glu-Val-Cit。在一些實施例中，連接子包含 Glu-Val-Cit-pABC。在一些實施例中，胺基酸單元

係 Ala-Ala-Asn。在一些實施例中，連接子包含 Ala-Ala-Asn-pABC。

【0349】 在一些實施例中，在連接子中之可裂解 β-葡萄糖醛酸苷部分裂解後，pABC 經歷自我分解。在一些實施例中，連接子包含 β-葡萄糖醛酸苷-pABC。

【0350】 在某些實施例中，連接子中之自我分解型間隔子單元包含對胺基苯甲基單元。在一些實施例中，連接子中之自我分解型間隔子單元包含對胺基苯甲基(pAB)。在一些實施例中，pAB 之自我分解涉及自發 1,6-消除反應。

【0351】 在各種實施例中，所揭示之 ADC 中使用的對胺基苯甲基(pAB)之結構顯示於下：



。

【0352】 在各種實施例中，自我分解型間隔子單元將連接子中之可裂解部分連接至剪接調節劑。在一些實施例中，自我分解型間隔子單元係 pAB。在一些實施例中，pAB 將該連接子中之可裂解部分連接至剪接調節劑。在一些實施例中，pAB 在可裂解部分裂解時經歷自我分解，且剪接調節劑以其天然、活性形式自 ADC 釋放。

【0353】 在一些實施例中，抗 HER2 抗體或抗原結合片段藉由包含 MC-Val-Cit-pAB 之連接子接合至剪接調節劑。在其他實施例中，抗 HER2 抗體或抗原結合片段藉由包含 MC-Val-Ala-pAB 之連接子接合至剪接調節劑。

【0354】 在一些實施例中，抗 CD138 抗體或抗原結合片段藉由包含 MC-Val-Cit-pAB 之連接子接合至剪接調節劑。在其他實施例中，抗

CD138 抗體或抗原結合片段藉由包含 MC-Val-Ala-pAB 之連接子接合至剪接調節劑。

【0355】在一些實施例中，抗 EPHA2 抗體或抗原結合片段藉由包含 MC-Val-Cit-pAB 之連接子接合至剪接調節劑。在其他實施例中，抗 EPHA2 抗體或抗原結合片段藉由包含 MC-Val-Ala-pAB 之連接子接合至剪接調節劑。

【0356】在一些實施例中，在連接子中之可裂解肽部分裂解後，pAB 經歷自我分解。在一些實施例中，該可裂解肽部分包含胺基酸單元。在一些實施例中，連接子包含胺基酸單元-pAB。在一些實施例中，胺基酸單元係 Val-Cit。在一些實施例中，連接子包含 Val-Cit-pAB。在一些實施例中，胺基酸單元係 Val-Ala。在一些實施例中，連接子包含 Val-Ala-pAB。在一些實施例中，胺基酸單元係 Glu-Val-Cit。在一些實施例中，連接子包含 Glu-Val-Cit-pAB。在一些實施例中，胺基酸單元係 Ala-Ala-Asn。在一些實施例中，連接子包含 Ala-Ala-Asn-pAB。

【0357】在一些實施例中，在連接子中之可裂解 β-葡萄糖醛酸苷部分裂解後，pAB 經歷自我分解。在一些實施例中，連接子包含 β-葡萄糖醛酸苷-pAB。

【0358】在一些其他實施例中，剪接調節劑係藉由非自我分解型間隔子單元連接至連接子中之可裂解部分。在某些實施例中，剪接調節劑係藉由非自我分解型間隔子單元連接至連接子中之可裂解部分，該可裂解部分包含 Val-Cit，且順丁烯二醯亞胺基己醯基(MC)將該可裂解部分接合至抗體或抗原結合片段。在某些實施例中，剪接調節劑係藉由非自我分解型間隔子單元連接至連接子中之可裂解部分，該可裂解部分包含 Val-Ala，

且順丁烯二醯亞胺基己醯基(MC)將該可裂解部分接合至抗體或抗原結合片段。

【0359】 在各種態樣中，ADC 之抗體或抗原結合片段經由連接子結合至剪接調節劑藥物部分，其中連接子包含 Mal-間隔子單元(例如 MC)、可裂解胺基酸單元及 pABC。在一些實施例中，間隔子單元包含烷基部分。在一些實施例中，該 Mal-間隔子單元包含順丁烯二醯亞胺基己醯基(MC)。在一些實施例中，連接子包含 Mal-間隔子單元-胺基酸單元-pABC。在一些實施例中，連接子包含 MC-胺基酸單元-pABC。在一些實施例中，連接子包含 MC-Val-Cit-pABC。在一些實施例中，連接子包含 MC-Val-Ala-pABC。在一些實施例中，連接子包含 MC-Glu-Val-Cit-pABC。在一些實施例中，連接子包含 MC-Ala-Ala-Asn-pABC。

【0360】 在各種其他態樣中，ADC 之抗體或抗原結合片段經由連接子結合至剪接調節劑藥物部分，其中連接子包含 Mal-間隔子單元(例如 MC)、可裂解胺基酸單元及 pAB。在一些實施例中，間隔子單元包含烷基部分。在一些實施例中，該 Mal-間隔子單元包含順丁烯二醯亞胺基己醯基(MC)。在一些實施例中，連接子包含 Mal-間隔子單元-胺基酸單元-pAB。在一些實施例中，連接子包含 MC-胺基酸單元-pAB。在一些實施例中，連接子包含 MC-Val-Cit-pAB。在一些實施例中，連接子包含 MC-Val-Ala-pAB。在一些實施例中，連接子包含 MC-Glu-Val-Cit-pAB。在一些實施例中，連接子包含 MC-Ala-Ala-Asn-pAB。

【0361】 在各種其他態樣中，ADC 之抗體或抗原結合片段經由連接子結合至剪接調節劑藥物部分，其中連接子包含 Mal-間隔子單元(例如 MC)、可裂解 β-葡萄糖醛酸苷及 pABC。在一些實施例中，連接子包含

Mal-間隔子單元-β-葡萄糖醛酸苷-pABC。在一些實施例中，連接子包含MC-β-葡萄糖醛酸苷-pABC。

【0362】 在再其他態樣中，ADC 之抗體或抗原結合片段經由連接子結合至剪接調節劑藥物部分，其中連接子包含 Mal-間隔子單元(例如 MC)、可裂解 β-葡萄糖醛酸苷及 pAB。在一些實施例中，連接子包含 Mal-間隔子單元-β-葡萄糖醛酸苷-pAB。在一些實施例中，連接子包含 MC-β-葡萄糖醛酸苷-pAB。

【0363】 在各種實施例中，ADC 複合物具有式(I)：

$Ab-(L-D)_p$ (I)

其中 Ab 係靶向贅生性細胞之抗體或抗原結合片段；

D 係剪接調節劑；

L 係將 Ab 共價連接至 D 之連接子；且

*p* 係 1 至 15 之整數。

【0364】 在一些實施例中，ADC 之抗體或抗原結合片段(Ab)經由連接子結合至剪接調節劑藥物部分，其中連接子係所揭示或以引用的方式併入本文中之連接子中的任一種，或包含所揭示或以引用的方式併入本文中之連接子中之任一種的一或多種組分。

【0365】 在一些實施例中，連接子包含可裂解部分，其係安置成使得在裂解之後，連接子或抗體或抗原結合片段之部分皆不保持結合剪接調節劑。在一些實施例中，可裂解部分係可裂解肽部分，例如胺基酸單元，諸如 Val-Cit 或 Val-Ala。在一些實施例中，胺基酸單元或連接子包含 Val-Cit。在一些實施例中，胺基酸單元或連接子包含 Val-Ala。在一些實施例中，胺基酸單元或連接子包含 Glu-Val-Cit。

【0366】在一些實施例中，連接子包含至少一個間隔子單元，用於將抗體或抗原結合片段接合至可裂解部分。在一些實施例中，連接子包含至少一個間隔子單元，用於將抗體或抗原結合片段接合至藥物部分。在一些實施例中，間隔子單元或連接子包含至少一個烷基部分。

【0367】在一些實施例中，連接子中之間隔子單元經由 Mal 部分(「Mal-間隔子單元」)連接至抗體或抗原結合片段。在一些實施例中，Mal-間隔子單元包含至少一個烷基部分。在一些實施例中，連接子包含順丁烯二醯亞胺基己醯基(MC)。在一些實施例中，連接子包含 Mal-$(CH_2)_2$(「Mal-Et」)。在一些實施例中，連接子包含 Mal-$(CH_2)_6$ (「Mal-Hex」)。在一些實施例中，連接子包含 Mal-$(CH_2)_2$-O-$(CH_2)_2$ (「Mal-Et-O-Et」) 。在一些實施例中，連接子包含 Mal-$(PEG)_2$-CO。在一些實施例中，該 Mal-間隔子單元將抗體或抗原結合片段連接至藥物部分。

【0368】在一些實施例中，Mal-間隔子單元或連接子包含 Mal-$(PEG)_2$、Mal-$(PEG)_3$、Mal-$(PEG)_4$、Mal-$(PEG)_5$、Mal-$(PEG)_6$、Mal-$(PEG)_7$ 或 Mal-$(PEG)_8$。在一些實施例中，Mal-間隔子單元或連接子包含 Mal-$(PEG)_2$。在一些實施例中，Mal-間隔子單元或連接子包含 Mal-$(PEG)_2$-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。在一些實施例中，Mal-間隔子單元或連接子包含 Mal-$(PEG)_2$-CO。在一些實施例中，Mal-間隔子單元或連接子包含 Mal-$(PEG)_2$-CO 及至少一個額外間隔子單元。在一些實施例中，Mal-$(PEG)_2$-CO 將抗體或抗原結合片段連接至藥物部分。在一些實施例中，連接子包含 Mal-$(PEG)_2$-CO 或由其組成。「Mal-$(PEG)_2$-CO」連接子之實例在本文中又稱為「ADL2」或「ADL2」連接

子。

【0369】在一些實施例中，Mal-間隔子單元或連接子包含 MC。在一些實施例中，Mal-間隔子單元或連接子包含 MC 及至少一個額外間隔子單元。在一些實施例中，MC 將抗體或抗原結合片段連接至藥物部分。在一些實施例中，連接子包含 MC 或由其組成。「MC」連接子之實例在本文中又稱為「ADL10」或「ADL10」連接子。

【0370】在一些實施例中，Mal-間隔子單元或連接子包含 Mal-$(CH_2)_6$(「Mal-Hex」)。在一些實施例中，Mal-間隔子單元或連接子包含 Mal-Hex 及至少一個額外間隔子單元。在一些實施例中，Mal-Hex 將抗體或抗原結合片段連接至藥物部分。在一些實施例中，連接子包含 Mal-Hex。「Mal-Hex」連接子之實例在本文中又稱為「ADL12」或「ADL12」連接子。

【0371】在一些實施例中，Mal-間隔子單元或連接子包含 Mal-$(CH_2)_2$(「Mal-Et」)。在一些實施例中，Mal-間隔子單元或連接子包含 Mal-Et 及至少一個額外間隔子單元。在一些實施例中，Mal-Et 將抗體或抗原結合片段連接至藥物部分。在一些實施例中，連接子包含 Mal-Et。「Mal-Et」連接子之實例在本文中又稱為「ADL14」或「ADL14」連接子。

【0372】在一些實施例中，Mal-間隔子單元或連接子包含 Mal-$(CH_2)_2$-O-$(CH_2)_2$ (「Mal-Et-O-Et」)。在一些實施例中，Mal-間隔子單元或連接子包含 Mal-Et-O-Et 及至少一個額外間隔子單元。在一些實施例中，Mal-Et-O-Et 將抗體或抗原結合片段連接至藥物部分。在一些實施例中，連接子包含 Mal-Et-O-Et。「Mal-Et-O-Et」連接子之實例在本文中又

稱為「ADL15」或「ADL15」連接子。

【0373】 在一些其他實施例中，Mal-間隔子單元將抗體或抗原結合片段連接至連接子中之可裂解部分。在一些實施例中，連接子中之可裂解部分係可裂解肽部分，例如胺基酸單元。在一些實施例中，可裂解肽部分係 Val-Cit 或 Val-Ala。在一些實施例中，Mal-間隔子單元或連接子包含 MC。在一些實施例中，連接子包含 MC-Val-Cit。在一些實施例中，連接子包含 MC-Val-Ala。在一些實施例中，連接子包含 MC-Glu-Val-Cit。在一些實施例中，連接子包含 MC-Ala-Ala-Asn。

【0374】 在一些實施例中，間隔子單元將連接子中之可裂解部分連接至剪接調節劑。在一些實施例中，將可裂解部分連接至剪接調節劑之間隔子單元係自我分解型的。

【0375】 在一些實施例中，間隔子單元包含 pABC。在一些實施例中，pABC 將可裂解部分連接至剪接調節劑。在一些實施例中，可裂解部分係可裂解肽部分，例如胺基酸單元。在一些實施例中，連接子包含胺基酸單元-pABC。

【0376】 在一些實施例中，連接子包含 Val-Cit-pABC。在一些實施例中，連接子包含 Val-Cit-pABC 及用於將連接子接合至抗體或抗原結合片段之 MC Mal-間隔子單元。在一些實施例中，連接子包含 MC-Val-Cit-pABC。在一些實施例中，連接子包含 MC-Val-Cit-pABC 及至少一個額外間隔子單元。MC-Val-Cit-pABC 連接子之實例在本文中又稱為「ADL1」或「ADL1」連接子。

【0377】 在一些實施例中，連接子包含 Val-Ala-pABC。在一些實施例中，連接子包含 Val-Ala-pABC 及用於將連接子接合至抗體或抗原結

合片段之 MC Mal-間隔子單元。在一些實施例中，連接子包含 MC-Val-Ala-pABC。在一些實施例中，連接子包含 MC-Val-Ala-pABC 及至少一個額外間隔子單元。MC-Val-Ala-pABC 連接子之實例在本文中又稱為「ADL6」或「ADL6」連接子。

【0378】 在一些實施例中，連接子包含 Glu-Val-Cit-pABC。在一些實施例中，連接子包含 Glu-Val-Cit-pABC 及用於將連接子接合至抗體或抗原結合片段之 MC Mal-間隔子單元。在一些實施例中，連接子包含 MC-Glu-Val-Cit-pABC。在一些實施例中，連接子包含 MC-Glu-Val-Cit-pABC 及至少一個額外間隔子單元。MC-Glu-Val-Cit-pABC 連接子之實例在本文中又稱為「ADL23」或「ADL23」連接子。

【0379】 在一些實施例中，連接子包含 Ala-Ala-Asn-pABC。在一些實施例中，連接子包含 Ala-Ala-Asn-pABC 及用於將連接子接合至抗體或抗原結合片段之 MC Mal-間隔子單元。在一些實施例中，連接子包含 MC-Ala-Ala-Asn-pABC。在一些實施例中，連接子包含 MC-Ala-Ala-Asn-pABC 及至少一個額外間隔子單元。MC-Ala-Ala-Asn-pABC 連接子之實例在本文中又稱為「ADL21」或「ADL21」連接子。

【0380】 在一些其他實施例中，間隔子單元包含 pAB。在一些實施例中，pAB 將可裂解部分連接至剪接調節劑。在一些實施例中，可裂解部分係可裂解肽部分，例如胺基酸單元。在一些實施例中，連接子包含胺基酸單元-pAB。

【0381】 在一些實施例中，連接子包含 Val-Ala-pAB。在一些實施例中，連接子包含 Val-Ala-pAB 及用於將連接子接合至抗體或抗原結合片段之 MC Mal-間隔子單元。在一些實施例中，連接子包含 MC-Val-

Ala-pAB。在一些實施例中，連接子包含 MC-Val-Ala-pAB 及至少一個額外間隔子單元。MC-Val-Ala-pAB 連接子之實例在本文中又稱為「ADL5」或「ADL5」連接子。

【0382】在一些實施例中，連接子包含 Val-Cit-pAB。在一些實施例中，連接子包含 Val-Cit-pAB 及用於將連接子接合至抗體或抗原結合片段之 MC Mal-間隔子單元。在一些實施例中，連接子包含 MC-Val-Cit-pAB。在一些實施例中，連接子包含 MC-Val-Cit-pAB 及至少一個額外間隔子單元。MC-Val-Cit-pAB 連接子之實例在本文中又稱為「ADL7」或「ADL7」連接子。

【0383】在一些實施例中，連接子包含 β-葡萄糖醛酸苷-pABC。在一些實施例中，連接子包含 β-葡萄糖醛酸苷-pABC 及用於將連接子接合至抗體或抗原結合片段之 MC Mal-間隔子單元。在一些實施例中，連接子包含 MC-β-葡萄糖醛酸苷-pABC。在一些實施例中，連接子包含 MC-β-葡萄糖醛酸苷-pABC 及至少一個額外間隔子單元。MC-β-葡萄糖醛酸苷-pABC 連接子之實例在本文中又稱為「ADL13」或「ADL13」連接子。

【0384】在一些實施例中，連接子包含 β-葡萄糖醛酸苷-pAB。在一些實施例中，連接子包含 β-葡萄糖醛酸苷-pAB 及用於將連接子接合至抗體或抗原結合片段之 MC Mal-間隔子單元。在一些實施例中，連接子包含 MC-β-葡萄糖醛酸苷-pAB。

【0385】在一些實施例中，抗體或抗原結合片段經由 ADL1、ADL2、ADL5、ADL6、ADL7、ADL12、ADL13、ADL14、ADL21、ADL23 或 ADL15 連接子結合至剪接調節劑藥物部分。已發現，在各種實施例中，包含 ADL1、ADL2、ADL5、ADL6、ADL7、ADL12、

ADL13、ADL14、ADL21、ADL23 或 ADL15 連接子及本文所揭示之剪接調節劑藥物部分的 ADC 展示治療性 ADC 之所需特性。在各種實施例中，此等特性包括(但不限於)有效藥物負載量、低聚集量、在儲存條件下或當在體內循環時的穩定性(例如血清穩定性)、對目標表現細胞保持與未結合抗體相當的親和力、針對目標表現細胞之強效細胞毒性、較低的脫靶細胞殺滅水準、較高的旁觀者殺滅水準及/或有效的活體內抗癌活性，皆係與使用其他連接子-有效負載之 ADC 相比較。舉例而言，在各種實施例中，相較於使用其他連接子-有效負載(例如 ADL10 連接子及剪接調節劑藥物部分)之 ADC，包含 ADL1、ADL2、ADL5、ADL6、ADL7、ADL12、ADL13、ADL14、ADL21、ADL23 或 ADL15 連接子及本文所揭示之剪接調節劑藥物部分的 ADC 展現增加的抑制目標表現細胞生長及/或增殖之能力。在各種實施例中，相較於基於其他剪接調節劑之 ADC(例如 Puthenveetil 等人 Bioconjugate Chem.(2016)27:1880-8 中所報導的基於泰蘭他汀 A(thailanstatin A)之 ADC)，包含 ADL1、ADL2、ADL5、ADL6、ADL7、ADL12、ADL13、ADL14、ADL21、ADL23 或 ADL15 連接子及本文所揭示之剪接調節劑藥物部分的 ADC 展現意外地增加的活體內穩定性(例如血漿穩定性)。

【0386】 在一些實施例中，利用連接子-有效負載與例如抗 HER2 抗體諸如曲妥珠單抗；抗 CD138 抗體諸如 B-B4；或抗 EPHA2 抗體諸如 1C1 之結合物可觀察到由 ADL1、ADL2、ADL5、ADL6、ADL7、ADL12、ADL13、ADL14、ADL21、ADL23 或 ADL15 連接子及本文所揭示之剪接調節劑藥物部分的特定組合所提供之良好或優良功能特性。

【0387】 在一些實施例中，ADC 包含 ADL1-剪接調節劑及包含保

持靶向贅生性細胞並內化於贅生性細胞中之能力之抗體或其抗原結合片段的抗體或抗原結合片段。在一些實施例中，ADC 包含 ADL2-剪接調節劑及包含保持靶向贅生性細胞並內化於贅生性細胞中之能力之抗體或其抗原結合片段的抗體或抗原結合片段。在一些實施例中，ADC 包含 ADL5-剪接調節劑及包含保持靶向贅生性細胞並內化於贅生性細胞中之能力之抗體或其抗原結合片段的抗體或抗原結合片段。在一些實施例中，ADC 包含 ADL6-剪接調節劑及包含保持靶向贅生性細胞並內化於贅生性細胞中之能力之抗體或其抗原結合片段的抗體或抗原結合片段。在一些實施例中，ADC 包含 ADL7-剪接調節劑及包含保持靶向贅生性細胞並內化於贅生性細胞中之能力之抗體或其抗原結合片段的抗體或抗原結合片段。在一些實施例中，ADC 包含 ADL12-剪接調節劑及包含保持靶向贅生性細胞並內化於贅生性細胞中之能力之抗體或其抗原結合片段的抗體或抗原結合片段。在一些實施例中，ADC 包含 ADL13-剪接調節劑及包含保持靶向贅生性細胞並內化於贅生性細胞中之能力之抗體或其抗原結合片段的抗體或抗原結合片段。在一些實施例中，ADC 包含 ADL14-剪接調節劑及包含保持靶向贅生性細胞並內化於贅生性細胞中之能力之抗體或其抗原結合片段的抗體或抗原結合片段。在一些實施例中，ADC 包含 ADL15-剪接調節劑及包含保持靶向贅生性細胞並內化於贅生性細胞中之能力之抗體或其抗原結合片段的抗體或抗原結合片段。

【0388】 在一些實施例中，ADC 包含 ADL1-剪接調節劑及靶向表現 HER2 之贅生性細胞的抗體或其抗原結合片段。在一些實施例中，ADC 包含 ADL2-剪接調節劑及靶向表現 HER2 之贅生性細胞的抗體或其抗原結合片段。在一些實施例中，ADC 包含 ADL5-剪接調節劑及靶向表

現 HER2 之贅生性細胞的抗體或其抗原結合片段。在一些實施例中，ADC 包含 ADL6-剪接調節劑及靶向表現 HER2 之贅生性細胞的抗體或其抗原結合片段。在一些實施例中，ADC 包含 ADL7-剪接調節劑及靶向表現 HER2 之贅生性細胞的抗體或其抗原結合片段。在一些實施例中，ADC 包含 ADL12-剪接調節劑及靶向表現 HER2 之贅生性細胞的抗體或其抗原結合片段。在一些實施例中，ADC 包含 ADL13-剪接調節劑及靶向表現 HER2 之贅生性細胞的抗體或其抗原結合片段。在一些實施例中，ADC 包含 ADL14-剪接調節劑及靶向表現 HER2 之贅生性細胞的抗體或其抗原結合片段。在一些實施例中，ADC 包含 ADL15-剪接調節劑及靶向表現 HER2 之贅生性細胞的抗體或其抗原結合片段。

【0389】 在一些實施例中，靶向表現 HER2 之贅生性細胞的抗體或其抗原結合片段係內化性抗體或內化性抗原結合片段。在一些實施例中，靶向表現 HER2 之贅生性細胞的抗體或抗原結合片段包括含 SEQ ID NO:1(HCDR1)、SEQ ID NO:2(HCDR2)及 SEQ ID NO:3(HCDR3)之胺基酸序列的三個重鏈互補決定區(HCDR)；以及含 SEQ ID NO:4(LCDR1)、SEQ ID NO:5(LCDR2)及 SEQ ID NO: 6(LCDR3)之胺基酸序列的三個輕鏈互補決定區(LCDR)。

【0390】 在一些實施例中，ADC 具有式(I)：

$Ab\text{-}(L\text{-}D)_p$ (I)

其中：

(i) Ab 係抗 HER2 抗體或其抗原結合片段，其包括含 SEQ ID NO:1(HCDR1)、SEQ ID NO:2(HCDR2)及 SEQ ID NO:3(HCDR3)之胺基酸序列的三個重鏈互補決定區(HCDR)；以及含 SEQ ID NO:4(LCDR1)、

SEQ ID NO:5(LCDR2)及 SEQ ID NO: 6(LCDR3)之胺基酸序列的三個輕鏈互補決定區(LCDR)；

(ii) D 係剪接調節劑；

(iii) L 係包含 ADL1、ADL2、ADL5、ADL6、ADL7、ADL12、ADL13、ADL14、ADL21、ADL23 或 ADL15 之連接子；且

(iv) *p* 係 1 至 15 之整數。

【0391】在一些實施例中，靶向表現 HER2 之贅生性細胞的抗體或其抗原結合片段包括含 SEQ ID NO: 19 之胺基酸序列之重鏈可變區及含 SEQ ID NO: 20 之胺基酸序列之輕鏈可變區。在一些實施例中，靶向表現 HER2 之贅生性細胞的抗體或其抗原結合片段包含人類 IgG1 重鏈恆定結構域及人類 Igκ 輕鏈恆定結構域。在一些實施例中，該抗體係曲妥珠單抗。在一些實施例中，*p* 係 1 至 10、2 至 8 或 4 至 8 之整數。在一些實施例中，*p* 係 4。在一些實施例中，*p* 係 8。

【0392】在一些實施例中，ADC 包含 ADL1-剪接調節劑及靶向表現 CD138 之贅生性細胞的抗體或其抗原結合片段。在一些實施例中，ADC 包含 ADL2-剪接調節劑及靶向表現 CD138 之贅生性細胞的抗體或其抗原結合片段。在一些實施例中，ADC 包含 ADL5-剪接調節劑及靶向表現 CD138 之贅生性細胞的抗體或其抗原結合片段。在一些實施例中，ADC 包含 ADL6-剪接調節劑及靶向表現 CD138 之贅生性細胞的抗體或其抗原結合片段。在一些實施例中，ADC 包含 ADL7-剪接調節劑及靶向表現 CD138 之贅生性細胞的抗體或其抗原結合片段。在一些實施例中，ADC 包含 ADL12-剪接調節劑及靶向表現 CD138 之贅生性細胞的抗體或其抗原結合片段。在一些實施例中，ADC 包含 ADL13-剪接調節劑及靶

向表現 CD138 之贅生性細胞的抗體或其抗原結合片段。在一些實施例中，ADC 包含 ADL14-剪接調節劑及靶向表現 CD138 之贅生性細胞的抗體或其抗原結合片段。在一些實施例中，ADC 包含 ADL15-剪接調節劑及靶向表現 CD138 之贅生性細胞的抗體或其抗原結合片段。

【0393】 在一些實施例中，靶向表現 CD138 之贅生性細胞的抗體或其抗原結合片段係內化性抗體或內化性抗原結合片段。在一些實施例中，靶向表現 CD138 之贅生性細胞的抗體或抗原結合片段包括含 SEQ ID NO: 7(HCDR1)、SEQ ID NO: 8(HCDR2)及 SEQ ID NO: 9(HCDR3)之胺基酸序列的三個重鏈互補決定區(HCDR)；以及含 SEQ ID NO: 10(LCDR1)、SEQ ID NO: 11(LCDR2)及 SEQ ID NO: 12(LCDR3)之胺基酸序列的三個輕鏈互補決定區(LCDR)。

【0394】 在一些實施例中，ADC 具有式(I)：

$Ab\text{-}(L\text{-}D)_p$ (I)

其中：

(i) Ab 係抗 CD138 抗體或其抗原結合片段，其包括含 SEQ ID NO: 7(HCDR1)、SEQ ID NO: 8(HCDR2)及 SEQ ID NO: 9(HCDR3)之胺基酸序列的三個重鏈互補決定區(HCDR)；以及含 SEQ ID NO: 10(LCDR1)、SEQ ID NO: 11(LCDR2)及 SEQ ID NO: 12(LCDR3)之胺基酸序列的三個輕鏈互補決定區(LCDR)；

(ii) D 係剪接調節劑；

(iii) L 係包含 ADL1、ADL2、ADL5、ADL6、ADL7、ADL12、ADL13、ADL14、ADL21、ADL23 或 ADL15 之連接子；且

(iv) *p* 係 1 至 15 之整數。

【0395】在一些實施例中，靶向表現 CD138 之贅生性細胞的抗體或其抗原結合片段包括含 SEQ ID NO: 21 之胺基酸序列之重鏈可變區及含 SEQ ID NO: 22 之胺基酸序列之輕鏈可變區。在一些實施例中，靶向表現 CD138 之贅生性細胞的抗體或其抗原結合片段包含鼠類 IgG2a 重鏈恆定結構域及鼠類 Igκ 輕鏈恆定結構域。在一些實施例中，靶向表現 CD138 之贅生性細胞的抗體或其抗原結合片段包含人類 IgG2a 重鏈恆定結構域及人類 Igκ 輕鏈恆定結構域。在一些實施例中，該抗體係 B-B4。在一些實施例中，*p* 係 1 至 10、2 至 8 或 4 至 8 之整數。在一些實施例中，*p* 係 4。在一些實施例中，*p* 係 8。

【0396】在一些實施例中，ADC 包含 ADL1-剪接調節劑及靶向表現 EPHA2 之贅生性細胞的抗體或其抗原結合片段。在一些實施例中，ADC 包含 ADL2-剪接調節劑及靶向表現 EPHA2 之贅生性細胞的抗體或其抗原結合片段。在一些實施例中，ADC 包含 ADL5-剪接調節劑及靶向表現 EPHA2 之贅生性細胞的抗體或其抗原結合片段。在一些實施例中，ADC 包含 ADL6-剪接調節劑及靶向表現 EPHA2 之贅生性細胞的抗體或其抗原結合片段。在一些實施例中，ADC 包含 ADL7-剪接調節劑及靶向表現 EPHA2 之贅生性細胞的抗體或其抗原結合片段。在一些實施例中，ADC 包含 ADL12-剪接調節劑及靶向表現 EPHA2 之贅生性細胞的抗體或其抗原結合片段。在一些實施例中，ADC 包含 ADL13-剪接調節劑及靶向表現 EPHA2 之贅生性細胞的抗體或其抗原結合片段。在一些實施例中，ADC 包含 ADL14-剪接調節劑及靶向表現 EPHA2 之贅生性細胞的抗體或其抗原結合片段。在一些實施例中，ADC 包含 ADL15-剪接調節劑及靶向表現 EPHA2 之贅生性細胞的抗體或其抗原結合片段。

【0397】在一些實施例中，靶向表現 EPHA2 之贅生性細胞的抗體或其抗原結合片段係內化性抗體或內化性抗原結合片段。在一些實施例中，靶向表現 EPHA2 之贅生性細胞的抗體或抗原結合片段包括含 SEQ ID NO: 13(HCDR1)、SEQ ID NO: 14(HCDR2)及 SEQ ID NO: 15(HCDR3)之胺基酸序列的三個重鏈互補決定區(HCDR)；以及含 SEQ ID NO: 16(LCDR1)、SEQ ID NO: 17(LCDR2)及 SEQ ID NO: 18(LCDR3)之胺基酸序列的三個輕鏈互補決定區(LCDR)。

【0398】在一些實施例中，ADC 具有式(I)：

$Ab\text{-}(L\text{-}D)_p$ (I)

其中：

(i) Ab 係抗 EPHA2 抗體或其抗原結合片段，其包括含 SEQ ID NO: 13(HCDR1)、SEQ ID NO: 14(HCDR2)及 SEQ ID NO: 15(HCDR3)之胺基酸序列的三個重鏈互補決定區(HCDR)；以及含 SEQ ID NO: 16(LCDR1)、SEQ ID NO: 17(LCDR2)及 SEQ ID NO: 18(LCDR3)之胺基酸序列的三個輕鏈互補決定區(LCDR)；

(ii) D 係剪接調節劑；

(iii) L 係包含 ADL1、ADL2、ADL5、ADL6、ADL7、ADL12、ADL13、ADL14、ADL21、ADL23 或 ADL15 之連接子；且

(iv) *p* 係 1 至 15 之整數。

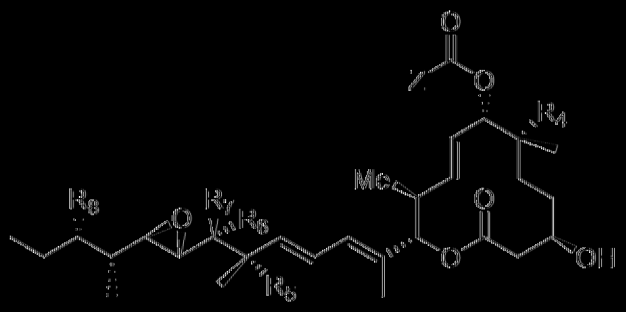
【0399】在一些實施例中，靶向表現 EPHA2 之贅生性細胞的抗體或其抗原結合片段包括含 SEQ ID NO: 23 之胺基酸序列之重鏈可變區及含 SEQ ID NO: 24 之胺基酸序列之輕鏈可變區。在一些實施例中，靶向表現 EPHA2 之贅生性細胞的抗體或其抗原結合片段包含人類 IgG1 重鏈

恆定結構域及人類 Igκ 輕鏈恆定結構域。在一典實施例中，該抗體係 1C1。在一典實施例中，*p* 係 1 至 10、2 至 8 或 4 至 8 之整數。在一典實施例中，*p* 係 4。在一典實施例中，*p* 係 8。

藥物部分

[0400] 本文所描述之 ADC 中的藥物部分(D)可為任何化學治療劑。有用的化學治療劑種類包括例如 RNA 剪接調節劑。在某些較佳實施例中，該藥物部分係剪接調節劑。在本文中將描述並舉例說明例示性剪接調節劑化合物。

[0401] 在各種實施例中，該藥物部分係式(II)之剪接調節劑化合物：



(II)，或其醫藥學上可接受之鹽，其中：

$R^1$ 係選自不存在、氫、$C_1$-$C_6$ 烷基、$C_1$-$C_6$ 烷基烷氧基、$C_1$-$C_6$ 烷基胺基、$C_1$-$C_6$ 烷基羧酸基團、$C_1$-$C_6$ 烷基醯基、$C_3$-$C_8$ 環烷基、苯甲基、$C_3$-$C_8$ 雜環基、-O-C(=O)-($C_1$-$C_6$ 烷基)基團及 $CD_3$；

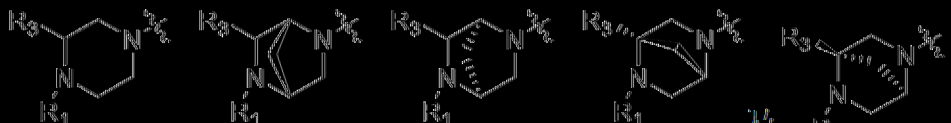
$R^3$ 係選自氫、$C_1$-$C_6$ 烷基、$C_1$-$C_6$ 烷基烷氧基、$C_1$-$C_6$ 烷基胺基、$C_1$-$C_6$ 烷基羧酸基團、$C_1$-$C_6$ 烷基醯基、$C_3$-$C_8$ 環烷基、苯甲基、$C_3$-$C_8$ 雜環基及 -O-C(=O)-($C_1$-$C_6$ 烷基)基團；且

$R^4$、$R^5$ 及 $R^8$ 各自獨立地選自氫、醯基、-O-($C_1$-$C_6$ 烷基)基團、-O-C(=O)-($C_1$-$C_6$ 烷基)基團及 $C_1$-$C_6$ 烷基；

$R^6$ 及 $R^7$ 各自獨立地選自氫、$-OR^{17}$、$-OC(=O)R^{17}$、$-OC(=O)NR^{15}R^{16}$、$C_1$-$C_6$ 烷基及 $-NR^{15}R^{16}$；

$R^{15}$ 及 $R^{16}$ 各自獨立地選自氫、$R^{17}$、$-C(=O)R^{17}$ 及 $-C(=O)-O-R^{17}$；

$R^{17}$ 係選自氫、$C_1$-$C_6$ 烷基、$C_3$-$C_8$ 環烷基、苯甲基及 $C_3$-$C_8$ 雜環基；且

Z 係選自  、、、及；

其中 $R^1$、$R^3$、$R^4$、$R^5$、$R^6$、$R^7$、$R^8$、$R^{15}$、$R^{16}$ 及 $R^{17}$ 各自獨立地經 0 至 3 個獨立地選自以下之基團取代：鹵素、羥基、$C_1$-$C_6$ 烷基、$-O-(C_1$-$C_6$ 烷基)基團、$-NR^{15}R^{16}$、$C_3$-$C_8$ 環烷基、$C_1$-$C_6$ 烷基羥基、$C_1$-$C_6$ 烷基烷氧基、苯甲基及 $C_3$-$C_8$ 雜環基，

其中 $R^6$ 及 $R^7$ 中至少一個係氫。

[0402] 在一些實施例中，$R^1$ 係選自氫、$C_1$-$C_4$ 烷基、$C_1$-$C_4$ 烷基羧酸基團及 $C_3$-$C_8$ 環烷基。在一些實施例中，$R^1$ 係氫。在一些實施例中，$R^1$ 係 $C_1$-$C_4$ 烷基。在一些實施例中，$R^1$ 係甲基。在一些實施例中，$R^1$ 係乙基。在一些實施例中，$R^1$ 係 $C_1$-$C_4$ 烷基羧酸基團。在一些實施例中，$R^1$ 係 $-CH_2CH_2CH_2CO_2H$。在一些實施例中，$R^1$ 係 $C_3$-$C_8$ 環烷基。在一些實施例中，$R^1$ 係環戊基。

[0403] 在一些實施例中，$R^3$ 係選自氫、$C_1$-$C_4$ 烷基、$C_1$-$C_4$ 烷基烷氧基、$C_1$-$C_4$ 烷基羧酸基團及 $C_1$-$C_4$ 烷基羥基。在一些實施例中，$R^3$ 係選自氫及 $C_1$-$C_4$ 烷基羧酸基團。在一些實施例中，$R^3$ 係氫。在一些實施例中，$R^3$ 係 $C_1$-$C_4$ 烷基羧酸基團。在一些實施例中，$R^3$ 係 $-CH_2CH_2CO_2H$。

[0404] 在一些實施例中，$R^4$ 係選自氫、羥基、$-O-(C_1$-$C_4$ 烷基)基

團、-O-C(=O)-($C_1$-$C_4$ 烷基)基團及 $C_1$-$C_4$ 烷基。在一些實施例中，$R^4$ 係氫。在一些實施例中，$R^4$ 係羥基。在一些實施例中，$R^4$ 係-O-($C_1$-$C_4$ 烷基)基團。在一些實施例中，$R^4$ 係-$OCH_3$。在一些實施例中，$R^4$ 係-$OCH_2CH_3$。在一些實施例中，$R^4$ 係-O-C(=O)-($C_1$-$C_4$ 烷基)基團。在一些實施例中，$R^4$ 係-O-C(=O)-$CH_3$。在一些實施例中，$R^4$ 係-O-C(=O)-$CH_2CH_3$。在一些實施例中，$R^4$ 係 $C_1$-$C_4$ 烷基。在一些實施例中，$R^4$ 係甲基。在一些實施例中，$R^4$ 係乙基。

【0405】 在一些實施例中，$R^5$ 係選自氫、羥基、-O-($C_1$-$C_4$ 烷基)基團及 $C_1$-$C_4$ 烷基。在一些實施例中，$R^5$ 係氫。在一些實施例中，$R^5$ 係羥基。在一些實施例中，$R^5$ 係-O-($C_1$-$C_4$ 烷基)基團。在一些實施例中，$R^5$ 係 $C_1$-$C_4$ 烷基。

【0406】 在一些實施例中，$R^6$ 係氫。在一些實施例中，$R^7$ 係氫。在一些實施例中，$R^6$ 係氫且 $R^7$ 係-O-$R^{17}$。在一些實施例中，$R^6$ 係氫且 $R^7$ 係-$OR^{17}$，其中 $R^{17}$ 係選自氫及 $C^1$-$C^4$ 烷基。在一些實施例中，$R^6$ 係氫且 $R^7$ 係-O-$R^{17}$，其中 $R^{17}$ 係氫。在一些實施例中，$R^6$ 係-O-$R^{17}$ 且 $R^7$ 係氫。在一些實施例中，$R^6$ 係-O-$R^{17}$ 且 $R^7$ 係氫，其中 $R^{17}$ 係選自氫及 $C^1$-$C^4$ 烷基。在一些實施例中，$R^6$ 係-O-$R^{17}$ 且 $R^7$ 係氫，其中 $R^{17}$ 係氫。在一些實施例中，$R^6$ 係氫且 $R^7$ 係-$NR^{15}R^{16}$。在一些實施例中，$R^6$ 係氫且 $R^7$ 係-$NR^{15}R^{16}$，其中 $R^{15}$ 係 H 且 $R^{16}$ 係選自氫、$R^{17}$、-C(=O)-$R^{17}$ 及-C(=O)-O-$R^{17}$。在一些實施例中，$R^6$ 係氫且 $R^7$ 係-$NR^{15}R^{16}$，其中 $R^{15}$ 係 H 且 $R^{16}$ 係選自氫、$R^{17}$、-C(=O)-$R^{17}$ 及-C(=O)-O-$R^{17}$，且其中 $R^{17}$ 係選自氫、$C_1$-$C_6$ 烷基、$C_3$-$C_8$ 環烷基及 $C_3$-$C_8$ 雜環基。在一些實施例中，$R^6$ 係-O-$R^{17}$。在一些實施例中，$R^6$ 係-O-C(=O)-$R^{17}$。在一些實施例中，$R^6$ 係 $C_1$-$C_6$ 烷

基。在一些實施例中，$R^6$ 係 $C_1$-$C_4$ 烷基。在一些實施例中，$R^6$ 係 $C_1$ 烷基。在一些實施例中，$R^6$ 係-$NR^{15}R^{16}$。在一些實施例中，$R^7$ 係-O-$R^{17}$。在一些實施例中，$R^7$ 係-O-C(=O)-$R^{17}$。在一些實施例中，$R^7$ 係 $C_1$-$C_6$ 烷基。在一些實施例中，$R^7$ 係 $C_1$-$C_4$ 烷基。在一些實施例中，$R^7$ 係 $C_1$ 烷基。在一些實施例中，$R^7$ 係-$NR^{15}R^{16}$。

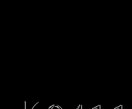
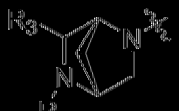
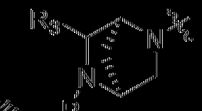
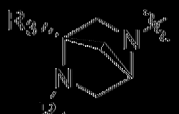
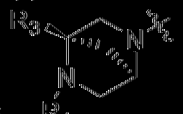
【0407】 在一些實施例中，$R^8$ 係選自氫、羥基、-O-($C_1$-$C_4$ 烷基)基團及($C_1$-$C_4$ 烷基)。在一些實施例中，$R^8$ 係氫。在一些實施例中，$R^8$ 係羥基。在一些實施例中，$R^8$ 係-O-($C_1$-$C_4$ 烷基)基團。在一些實施例中，$R^8$ 係-O-($C_1$ 烷基)基團。

【0408】 在一些實施例中，$R^{15}$ 係氫。在一些實施例中，$R^{15}$ 係 $R^{17}$。在一些實施例中，$R^{15}$ 係-C(=O)-$R^{17}$。在一些實施例中，$R^{15}$ 係-C(=O)-O-$R^{17}$。

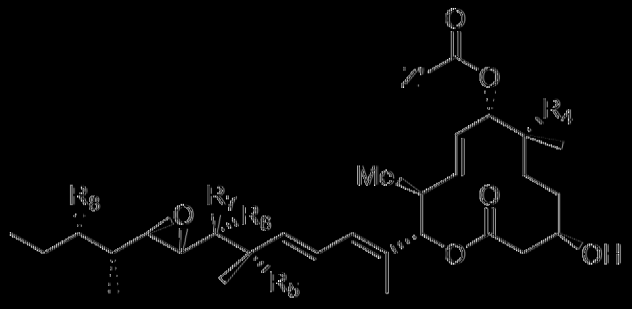
【0409】 在一些實施例中，$R^{16}$ 係氫。在一些實施例中，$R^{16}$ 係 $R^{17}$。在一些實施例中，$R^{16}$ 係-C(=O)-$R^{17}$。在一些實施例中，$R^{16}$ 係-C(=O)-O-$R^{17}$。

【0410】 在一些實施例中，$R^{17}$ 係選自氫、$C_1$-$C_4$ 烷基、$C_3$-$C_6$ 環烷基及 $C_3$-$C_8$ 雜環基。在一些實施例中，$R^{17}$ 係氫。在一些實施例中，$R^{17}$ 係 $C_1$-$C_4$ 烷基。在一些實施例中，$R^{17}$ 係 $C_1$ 烷基。在一些實施例中，$R^{17}$ 係 $C_3$-$C_6$ 環烷基。在一些實施例中，$R^{17}$ 係 $C_3$ 環烷基。在一些實施例中，$R^{17}$ 係 $C_4$ 環烷基。在一些實施例中，$R^{17}$ 係 $C_5$ 環烷基。在一些實施例中，$R^{17}$ 係 $C_6$ 環烷基。在一些實施例中，$R^{17}$ 係 $C_3$-$C_8$ 雜環基。在一些實施例中，$R^{17}$ 係 $C_3$ 雜環基。在一些實施例中，$R^{17}$ 係 $C_4$ 雜環基。在一些實施例中，$R^{17}$ 係 $C_5$ 雜環基。在一些實施例中，$R^{17}$ 係 $C_6$ 雜環基。在一些實施例中，

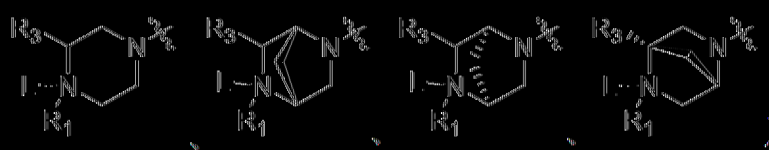
$R^{17}$係$C_7$雜環基。在一些實施例中，$R^{17}$係$C_8$雜環基。

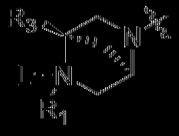
[0411] 在一些實施例中，Z係  。在一些實施例中，Z係  。在一些實施例中，Z係  。在一些實施例中，Z係  。在一些實施例中，Z係  。

[0412] 在一些實施例中，式(II)之勞接調節劑化合物連接至例如式(I)之ADC中之連接子L，如式(II-A)中所示：



(II-A)，



其中Z係選自  ；且

其中所有其他變數係如關於式(II)所定義。

[0413] 在各種其他實施例中，藥物部分係式(IV)之勞接調節劑化合物：



(IV)，或其醫藥學上可接

受之鹽，其中：

$R^1$ 係選自氫、$C_1$-$C_6$ 烷基、$C_1$-$C_6$ 烷基烷氧基、$C_1$-$C_6$ 烷基胺基、$C_1$-$C_6$ 烷基羧酸基團、$C_1$-$C_6$ 烷基羥基、$C_3$-$C_8$ 環烷基、苯甲基、$C_3$-$C_8$ 雜環基、-O-C(=O)-($C_1$-$C_6$ 烷基)基團及-$CD_3$；

$R^3$ 係選自氫、$C_1$-$C_6$ 烷基、$C_1$-$C_6$ 烷基烷氧基、$C_1$-$C_6$ 烷基胺基、$C_1$-$C_6$ 烷基羧酸基團、$C_1$-$C_6$ 烷基羥基、$C_3$-$C_8$ 環烷基、苯甲基、$C_3$-$C_8$ 雜環基及-O-C(=O)-($C_1$-$C_6$ 烷基)基團；且

$R^4$、$R^5$ 及 $R^8$ 各自獨立地選自氫、羥基、-O-($C_1$-$C_6$ 烷基)基團、-O-C(=O)-($C_1$-$C_6$ 烷基)基團及 $C_1$-$C_6$ 烷基；

$R^6$ 及 $R^7$ 各自獨立地選自氫、-O-$R^{17}$、-O-C(=O)-$R^{17}$、-O-C(=O)-$NR^{15}R^{16}$、$C_1$-$C_6$ 烷基及-$NR^{15}R^{16}$；

$R^{15}$ 及 $R^{16}$ 各自獨立地選自氫、$R^{17}$、-C(=O)-$R^{17}$ 及-C(=O)-O-$R^{17}$；且

$R^{17}$ 係選自氫、$C_1$-$C_6$ 烷基、$C_3$-$C_8$ 環烷基、苯甲基及 $C_3$-$C_8$ 雜環基；

其中 $R^1$、$R^3$、$R^4$、$R^5$、$R^6$、$R^7$、$R^8$、$R^{15}$、$R^{16}$ 及 $R^{17}$ 各自獨立地經 0 至 3 個獨立地選自以下之基團取代：鹵素、羥基、$C_1$-$C_6$ 烷基、-O-($C_1$-$C_6$ 烷基)基團、-$NR^{15}R^{16}$、$C_3$-$C_8$ 環烷基、$C_1$-$C_6$ 烷基羥基、$C_1$-$C_6$ 烷基烷氧基、苯甲基及 $C_3$-$C_8$ 雜環基，

其中 $R^6$ 及 $R^7$ 中至少一個係氫。

【0414】 在一些實施例中，$R^1$ 係選自氫、$C_1$-$C_4$ 烷基、$C_1$-$C_4$ 烷基羧酸基團及 $C_3$-$C_8$ 環烷基。在一些實施例中，$R^1$ 係氫。在一些實施例中，$R^1$ 係 $C_1$-$C_4$ 烷基。在一些實施例中，$R^1$ 係甲基。在一些實施例中，$R^1$ 係乙基。在一些實施例中，$R^1$ 係 $C_1$-$C_4$ 烷基羧酸基團。在一些實施例中，$R^1$

係-$CH_2CH_2CH_2CO_2H$。在一些實施例中，$R^1$ 係 $C_3$-$C_8$ 環烷基。在一些實施例中，$R^1$ 係環庚基。

【0415】 在一些實施例中，$R^3$ 係選自氫、$C_1$-$C_4$ 烷基、$C_1$-$C_4$ 烷基烷氧基、$C_1$-$C_4$ 烷基羧酸基團及 $C_1$-$C_4$ 烷基羥基。在一些實施例中，$R^3$ 係選自氫及 $C_1$-$C_4$ 烷基羧酸基團。在一些實施例中，$R^3$ 係氫。在一些實施例中，$R^3$ 係 $C_1$-$C_4$ 烷基羧酸基團。在一些實施例中，$R^3$ 係-$CH_2CH_2CO_2H$。

【0416】 在一些實施例中，$R^4$ 係選自氫、羥基、-O-($C_1$-$C_4$ 烷基)基團、-O-C(=O)-($C_1$-$C_4$ 烷基)基團及 $C_1$-$C_4$ 烷基。在一些實施例中，$R^4$ 係氫。在一些實施例中，$R^4$ 係羥基。在一些實施例中，$R^4$ 係-O-($C_1$-$C_4$ 烷基)基團。在一些實施例中，$R^4$ 係-$OCH_3$。在一些實施例中，$R^4$ 係-$OCH_2CH_3$。在一些實施例中，$R^4$ 係-O-C(=O)-($C_1$-$C_4$ 烷基)基團。在一些實施例中，$R^4$ 係-O-C(=O)-$CH_3$。在一些實施例中，$R^4$ 係-O-C(=O)-$CH_2CH_3$。在一些實施例中，$R^4$ 係 $C_1$-$C_4$ 烷基。在一些實施例中，$R^4$ 係甲基。在一些實施例中，$R^4$ 係乙基。

【0417】 在一些實施例中，$R^5$ 係選自氫、羥基、-O-($C_1$-$C_4$ 烷基)基團及 $C_1$-$C_4$ 烷基。在一些實施例中，$R^5$ 係氫。在一些實施例中，$R^5$ 係羥基。在一些實施例中，$R^5$ 係-O-($C_1$-$C_4$ 烷基)基團。在一些實施例中，$R^5$ 係 $C_1$-$C_4$ 烷基。

【0418】 在一些實施例中，$R^6$ 係氫。在一些實施例中，$R^7$ 係氫。在一些實施例中，$R^6$ 係氫且 $R^7$ 係-O-$R^{17}$。在一些實施例中，$R^6$ 係氫且 $R^7$ 係-$OR^{17}$，其中 $R^{17}$ 係選自氫及 $C^1$-$C^4$ 烷基。在一些實施例中，$R^6$ 係氫且 $R^7$ 係-O-$R^{17}$，其中 $R^{17}$ 係氫。在一些實施例中，$R^6$ 係-O-$R^{17}$ 且 $R^7$ 係氫。在一些實施例中，$R^6$ 係-O-$R^{17}$ 且 $R^7$ 係氫，其中 $R^{17}$ 係選自氫及 $C^1$-$C^4$ 烷

基。在一些實施例中，$R^6$ 係-O-$R^{17}$ 且 $R^7$ 係氫，其中 $R^{17}$ 係氫。在一些實施例中，$R^6$ 係氫且 $R^7$ 係-$NR^{15}R^{16}$。在一些實施例中，$R^6$ 係氫且 $R^7$ 係-$NR^{15}R^{16}$，其中 $R^{15}$ 係 H 且 $R^{16}$ 係選自氫、$R^{17}$、-C(=O)-$R^{17}$ 及-C(=O)-O-$R^{17}$。在一些實施例中，$R^6$ 係氫且 $R^7$ 係-$NR^{15}R^{16}$，其中 $R^{15}$ 係 H 且 $R^{16}$ 係選自氫、$R^{17}$、-C(=O)-$R^{17}$ 及-C(=O)-O-$R^{17}$，且其中 $R^{17}$ 係選自氫、$C_1$-$C_6$ 烷基、$C_3$-$C_8$ 環烷基及 $C_3$-$C_8$ 雜環基。在一些實施例中，$R^6$ 係-O-$R^{17}$。在一些實施例中，$R^6$ 係-O-C(=O)-$R^{17}$。在一些實施例中，$R^6$ 係 $C_1$-$C_6$ 烷基。在一些實施例中，$R^6$ 係 $C_1$-$C_4$ 烷基。在一些實施例中，$R^6$ 係 $C_1$ 烷基。在一些實施例中，$R^6$ 係-$NR^{15}R^{16}$。

【0419】 在一些實施例中，$R^7$ 係-O-$R^{17}$。在一些實施例中，$R^7$ 係-O-C(=O)-$R^{17}$。在一些實施例中，$R^7$ 係 $C_1$-$C_6$ 烷基。在一些實施例中，$R^7$ 係 $C_1$-$C_4$ 烷基。在一些實施例中，$R^7$ 係 $C_1$ 烷基。在一些實施例中，$R^7$ 係-$NR^{15}R^{16}$。

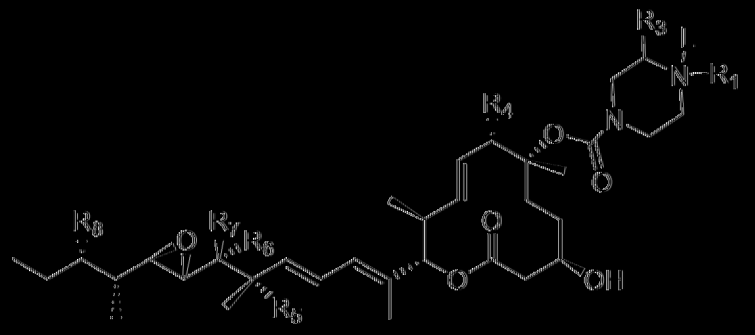
【0420】 在一些實施例中，$R^8$ 係選自氫、羥基、-O-($C_1$-$C_4$ 烷基)基團及($C_1$-$C_4$ 烷基)。在一些實施例中，$R^8$ 係氫。在一些實施例中，$R^8$ 係羥基。在一些實施例中，$R^8$ 係-O-($C_1$-$C_4$ 烷基)基團。在一些實施例中，$R^8$ 係-O-($C_1$ 烷基)基團。

【0421】 在一些實施例中，$R^{15}$ 係氫。在一些實施例中，$R^{15}$ 係 $R^{17}$。在一些實施例中，$R^{15}$ 係-C(=O)-$R^{17}$。在一些實施例中，$R^{15}$ 係-C(=O)-O-$R^{17}$。

【0422】 在一些實施例中，$R^{16}$ 係氫。在一些實施例中，$R^{16}$ 係 $R^{17}$。在一些實施例中，$R^{16}$ 係-C(=O)-$R^{17}$。在一些實施例中，$R^{16}$ 係-C(=O)-O-$R^{17}$。

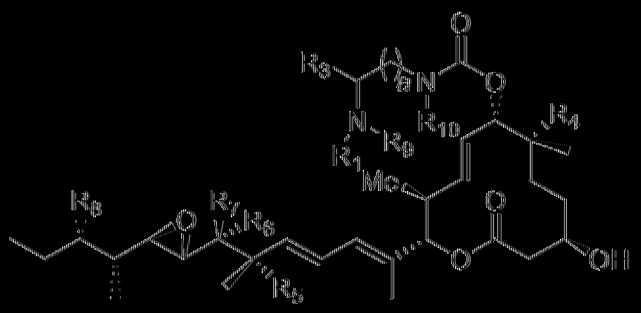
[0423] 在一些實施例中，$R^{1'}$係選自氫、$C_1$-$C_4$烷基、$C_3$-$C_6$環烷基及$C_3$-$C_8$雜環基。在一些實施例中，$R^{1'}$係氫。在一些實施例中，$R^{1'}$係$C_1$-$C_4$烷基。在一些實施例中，$R^{1'}$係$C_1$烷基。在一些實施例中，$R^{1'}$係$C_3$-$C_6$環烷基。在一些實施例中，$R^{1'}$係$C_3$環烷基。在一些實施例中，$R^{1'}$係$C_4$環烷基。在一些實施例中，$R^{1'}$係$C_5$環烷基。在一些實施例中，$R^{1'}$係$C_6$環烷基。在一些實施例中，$R^{1'}$係$C_3$-$C_8$雜環基。在一些實施例中，$R^{1'}$係$C_3$雜環基。在一些實施例中，$R^{1'}$係$C_4$雜環基。在一些實施例中，$R^{1'}$係$C_5$雜環基。在一些實施例中，$R^{1'}$係$C_6$雜環基。在一些實施例中，$R^{1'}$係$C_7$雜環基。在一些實施例中，$R^{1'}$係$C_8$雜環基。

[0424] 在一些實施例中，式(IV)之剪接調節劑化合物連接至例如式(I)之ADC中之連接子L，如式(IV-A)中所示：



(IV-A)。

[0425] 在各種其他實施例中，藥物部分係式(VI)之剪接調節劑化合物：



(VI)，或其醫藥學上可接受之鹽，其中：

$R^1$及$R^9$各自獨立地選自氫、$C_1$-$C_6$烷基、$C_1$-$C_6$烷基烷氧基、$C_1$-$C_6$

烷基胺基、$C_1$-$C_6$ 烷基羧酸基團、$C_1$-$C_6$ 烷基羥基、$C_3$-$C_8$ 環烷基、苯甲基、$C_3$-$C_8$ 雜環基、-O-C(=O)-($C_1$-$C_6$ 烷基)基團及-$CD_3$；

$R^3$ 係選自氫、$C_1$-$C_6$ 烷基、$C_1$-$C_6$ 烷基烷氧基、$C_1$-$C_6$ 烷基胺基、$C_1$-$C_6$ 烷基羧酸基團、$C_1$-$C_6$ 烷基羥基、$C_3$-$C_8$ 環烷基、苯甲基、$C_3$-$C_8$ 雜環基及-O-C(=O)-($C_1$-$C_6$ 烷基)基團；

$R^4$、$R^5$ 及 $R^8$ 各自獨立地選自氫、羥基、-O-($C_1$-$C_6$ 烷基)基團、-O-C(=O)-($C_1$-$C_6$ 烷基)基團及 $C_1$-$C_6$ 烷基；

$R^6$ 及 $R^7$ 各自獨立地選自氫、-O-$R^{17}$、-O-C(=O)-$R^{17}$、-O-C(=O)-$NR^{15}R^{16}$、$C_1$-$C_6$ 烷基、-$NR^{15}R^{16}$ 及連接子；

$R^{10}$ 係選自氫、$C_1$-$C_6$ 烷基、-C(=O)-($C_1$-$C_6$ 烷基)基團及-$CD_3$；

$R^{15}$ 及 $R^{16}$ 各自獨立地選自氫、$R^{17}$、-C(=O)-$R^{17}$ 及-C(=O)-O-$R^{17}$；

$R^{17}$ 係選自氫、$C_1$-$C_6$ 烷基、$C_3$-$C_8$ 環烷基、苯甲基及 $C_3$-$C_8$ 雜環基；且

a 係 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10；

其中 $R^1$、$R^3$、$R^4$、$R^5$、$R^6$、$R^7$、$R^8$、$R^9$、$R^{10}$、$R^{15}$、$R^{16}$ 及 $R^{17}$ 各自獨立地經 0 至 3 個獨立地選自以下之基團取代：鹵素、羥基、$C_1$-$C_6$ 烷基、-O-($C_1$-$C_6$ 烷基)基團、-$NR^{15}R^{16}$、$C_3$-$C_8$ 環烷基、$C_1$-$C_6$ 烷基羥基、$C_1$-$C_6$ 烷基烷氧基、苯甲基及 $C_3$-$C_8$ 雜環基；

其中 $R^6$ 及 $R^7$ 中至少一個係氫；且

其中 $R^1$ 及 $R^9$ 不能同時不存在。

【0426】 在一些實施例中，$R^1$ 係選自氫、$C_1$-$C_4$ 烷基、$C_1$-$C_4$ 烷基羧酸基團及 $C_3$-$C_8$ 環烷基。在一些實施例中，$R^1$ 係氫。在一些實施例中，$R^1$ 係 $C_1$-$C_4$ 烷基。在一些實施例中，$R^1$ 係甲基。在一些實施例中，$R^1$ 係

乙基。在一些實施例中，$R^1$ 係 $C_1$-$C_4$ 烷基羧酸基團。在一些實施例中，$R^1$ 係-$CH_2CH_2CH_2CO_2H$。在一些實施例中，$R^1$ 係 $C_3$-$C_8$ 環烷基。在一些實施例中，$R^1$ 係環庚基。

【0427】 在一些實施例中，$R^3$ 係選自氫、$C_1$-$C_4$ 烷基、$C_1$-$C_4$ 烷基烷氧基、$C_1$-$C_4$ 烷基羧酸基團及 $C_1$-$C_4$ 烷基羥基。在一些實施例中，$R^3$ 係選自氫及 $C_1$-$C_4$ 烷基羧酸基團。在一些實施例中，$R^3$ 係氫。在一些實施例中，$R^3$ 係 $C_1$-$C_4$ 烷基羧酸基團。在一些實施例中，$R^3$ 係-$CH_2CH_2CO_2H$。

【0428】 在一些實施例中，$R^4$ 係選自氫、羥基、-O-($C_1$-$C_4$ 烷基)基團、-O-C(=O)-($C_1$-$C_4$ 烷基)基團及 $C_1$-$C_4$ 烷基。在一些實施例中，$R^4$ 係氫。在一些實施例中，$R^4$ 係羥基。在一些實施例中，$R^4$ 係-O-($C_1$-$C_4$ 烷基)基團。在一些實施例中，$R^4$ 係-$OCH_3$。在一些實施例中，$R^4$ 係-$OCH_2CH_3$。在一些實施例中，$R^4$ 係-O-C(=O)-($C_1$-$C_4$ 烷基) 基團。在一些實施例中，$R^4$ 係-O-C(=O)-$CH_3$。在一些實施例中，$R^4$ 係-O-C(=O)-$CH_2CH_3$。在一些實施例中，$R^4$ 係 $C_1$-$C_4$ 烷基。在一些實施例中，$R^4$ 係甲基。在一些實施例中，$R^4$ 係乙基。

【0429】 在一些實施例中，$R^5$ 係選自氫、羥基、-O-($C_1$-$C_4$ 烷基)基團及 $C_1$-$C_4$ 烷基。在一些實施例中，$R^5$ 係氫。在一些實施例中，$R^5$ 係羥基。在一些實施例中，$R^5$ 係-O-($C_1$-$C_4$ 烷基) 基團。在一些實施例中，$R^5$ 係 $C_1$-$C_4$ 烷基。

【0430】 在一些實施例中，$R^9$ 係選自不存在、氫、$C_1$-$C_4$ 烷基、-(C=O)-($C_1$-$C_4$ 烷基)基團及-$CD_3$。在一些實施例中，$R^9$ 不存在。在一些實施例中，$R^9$ 係氫。在一些實施例中，$R^9$ 係 $C_1$-$C_4$ 烷基。在一些實施例中，該 $C_1$-$C_4$ 烷基係甲基。在一些實施例中，該 $C_1$-$C_4$ 烷基係乙基。在一

些實施例中，$R^9$ 係-(C=O)-($C_1$-$C_4$ 烷基)基團。在一些實施例中，該-(C=O)-($C_1$-$C_4$ 烷基)基團係-(C=O)-甲基。在一些實施例中，$R^9$ 係-$CD_3$。

【0431】在一些實施例中，$R^{10}$ 係選自氫、$C_1$-$C_4$ 烷基、-(C=O)-($C_1$-$C_4$ 烷基)基團及-$CD_3$。在一些實施例中，$R^{10}$ 係氫。在一些實施例中，$R^{10}$ 係 $C_1$-$C_4$ 烷基。在一些實施例中，該 $C_1$-$C_4$ 烷基係甲基。在一些實施例中，該 $C_1$-$C_4$ 烷基係乙基。在一些實施例中，$R^{10}$ 係-(C=O)-($C_1$-$C_4$ 烷基)基團。在一些實施例中，該-(C=O)-($C_1$-$C_4$ 烷基)基團係-(C=O)-甲基。在一些實施例中，$R^{10}$ 係-$CD_3$。

【0432】在一些實施例中，$R^6$ 係氫。在一些實施例中，$R^7$ 係氫。在一些實施例中，$R^6$ 係氫且 $R^7$ 係-O-$R^{17}$。在一些實施例中，$R^6$ 係氫且 $R^7$ 係-O$R^{17}$，其中 $R^{17}$ 係選自氫及 $C^1$-$C^4$ 烷基。在一些實施例中，$R^6$ 係氫且 $R^7$ 係-O-$R^{17}$，其中 $R^{17}$ 係氫。在一些實施例中，$R^6$ 係-O-$R^{17}$ 且 $R^7$ 係氫。在一些實施例中，$R^6$ 係-O-$R^{17}$ 且 $R^7$ 係氫，其中 $R^{17}$ 係選自氫及 $C^1$-$C^4$ 烷基。在一些實施例中，$R^6$ 係-O-$R^{17}$ 且 $R^7$ 係氫，其中 $R^{17}$ 係氫。在一些實施例中，$R^6$ 係氫且 $R^7$ 係-N$R^{15}R^{16}$。在一些實施例中，$R^6$ 係氫且 $R^7$ 係-N$R^{15}R^{16}$，其中 $R^{15}$ 係 H 且 $R^{16}$ 係選自氫、$R^{17}$、-C(=O)-$R^{17}$ 及-C(=O)-O-$R^{17}$。在一些實施例中，$R^6$ 係氫且 $R^7$ 係-N$R^{15}R^{16}$，其中 $R^{15}$ 係 H 且 $R^{16}$ 係選自氫、$R^{17}$、-C(=O)-$R^{17}$ 及-C(=O)-O-$R^{17}$，且其中 $R^{17}$ 係選自氫、$C_1$-$C_6$ 烷基、$C_3$-$C_8$ 環烷基及 $C_3$-$C_8$ 雜環基。在一些實施例中，$R^6$ 係-O-$R^{17}$。在一些實施例中，$R^6$ 係-O-C(=O)-$R^{17}$。在一些實施例中，$R^6$ 係 $C_1$-$C_6$ 烷基。在一些實施例中，$R^6$ 係 $C_1$-$C_4$ 烷基。在一些實施例中，$R^6$ 係 $C_1$ 烷基。在一些實施例中，$R^6$ 係-N$R^{15}R^{16}$。

【0433】在一些實施例中，$R^7$ 係-O-$R^{17}$。在一些實施例中，$R^7$ 係-

O-C(=O)-$R^{17}$。在一些實施例中，$R^7$ 係 $C_1$-$C_6$ 烷基。在一些實施例中，$R^7$ 係 $C_1$-$C_4$ 烷基。在一些實施例中，$R^7$ 係 $C_1$ 烷基。在一些實施例中，$R^7$ 係-$NR^{15}R^{16}$。

【0434】在一些實施例中，$R^8$ 係選自氫、羥基、-O-($C_1$-$C_4$ 烷基)基團及($C_1$-$C_4$ 烷基)。在一些實施例中，$R^8$ 係氫。在一些實施例中，$R^8$ 係羥基。在一些實施例中，$R^8$ 係-O-($C_1$-$C_4$ 烷基)基團。在一些實施例中，$R^8$ 係-O-($C_1$ 烷基)基團。

【0435】在一些實施例中，$R^{15}$ 係氫。在一些實施例中，$R^{15}$ 係 $R^{17}$。在一些實施例中，$R^{15}$ 係-C(=O)-$R^{17}$。在一些實施例中，$R^{15}$ 係-C(=O)-O-$R^{17}$。

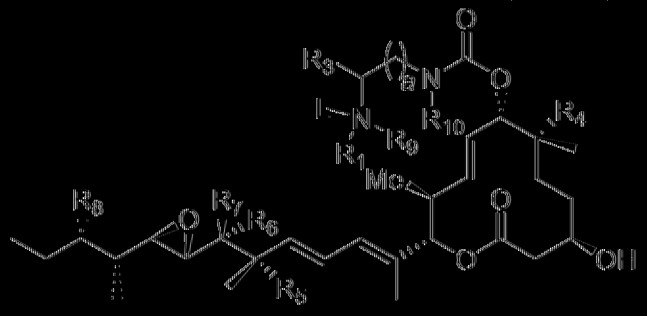
【0436】在一些實施例中，$R^{16}$ 係氫。在一些實施例中，$R^{16}$ 係 $R^{17}$。在一些實施例中，$R^{16}$ 係-C(=O)-$R^{17}$。在一些實施例中，$R^{16}$ 係-C(=O)-O-$R^{17}$。

【0437】在一些實施例中，$R^{17}$ 係選自氫、$C_1$-$C_4$ 烷基、$C_3$-$C_6$ 環烷基及 $C_3$-$C_8$ 雜環基。在一些實施例中，$R^{17}$ 係氫。在一些實施例中，$R^{17}$ 係 $C_1$-$C_4$ 烷基。在一些實施例中，$R^{17}$ 係 $C_1$ 烷基。在一些實施例中，$R^{17}$ 係 $C_3$-$C_6$ 環烷基。在一些實施例中，$R^{17}$ 係 $C_3$ 環烷基。在一些實施例中，$R^{17}$ 係 $C_4$ 環烷基。在一些實施例中，$R^{17}$ 係 $C_5$ 環烷基。在一些實施例中，$R^{17}$ 係 $C_6$ 環烷基。在一些實施例中，$R^{17}$ 係 $C_3$-$C_8$ 雜環基。在一些實施例中，$R^{17}$ 係 $C_3$ 雜環基。在一些實施例中，$R^{17}$ 係 $C_4$ 雜環基。在一些實施例中，$R^{17}$ 係 $C_5$ 雜環基。在一些實施例中，$R^{17}$ 係 $C_6$ 雜環基。在一些實施例中，$R^{17}$ 係 $C_7$ 雜環基。在一些實施例中，$R^{17}$ 係 $C_8$ 雜環基。

【0438】在一些實施例中，a 係 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或

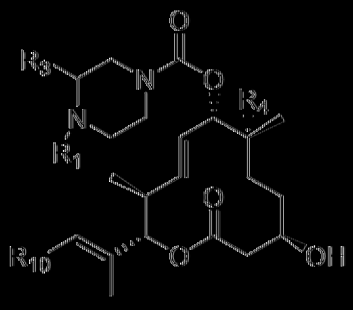
10。在一些實施例中，a 係 1、2、3、4、5 或 6。在一些實施例中，a 係 1、2、3、4 或 5。在一些實施例中，a 係 1、2、3 或 4。在一些實施例中，a 係 1、2 或 3。在一些實施例中，a 係 1 或 2。在一些實施例中，a 係 1。在一些實施例中，a 係 2。在一些實施例中，a 係 3。在一些實施例中，a 係 4。在一些實施例中，a 係 5。在一些實施例中，a 係 6。在一些實施例中，a 係 7。在一些實施例中，a 係 8。在一些實施例中，a 係 9。在一些實施例中，a 係 10。

[0439] 在一些實施例中，式(VI)之剪接調節劑化合物連接至例如式(I)之 ADC 中之連接子 L，如式(VI-A)中所示：



(VI-A)。

[0440] 在各種其他實施例中，藥物部分係式(VIII)之剪接調節劑化合物：



(VIII)，或其醫藥學上可接受之鹽，其中：

$R^1$ 係選自不存在、氫、$C_1$-$C_6$ 烷基、$C_1$-$C_6$ 烷基烷氧基、$C_1$-$C_6$ 烷基胺基、$C_1$-$C_6$ 烷基羧酸基團、$C_1$-$C_6$ 烷基鹵基、$C_3$-$C_8$ 環烷基、苯甲基、$C_3$-$C_8$ 雜環基、-O-C(=O)-($C_1$-$C_6$ 烷基)基團及 $CD_3$；

$R^3$ 係選自氫、$C_1$-$C_6$ 烷基、$C_1$-$C_6$ 烷基烷氧基、$C_1$-$C_6$ 烷基胺基、$C_1$-

$C_6$烷基羧酸基團、$C_1$-$C_6$烷基羥基、$C_3$-$C_8$環烷基、苯甲基、$C_3$-$C_8$雜環基及-O-C(=O)-($C_1$-$C_6$烷基)基團；

$R^4$係選自氫、羥基、-O-($C_1$-$C_6$烷基)基團、-O-C(=O)-($C_1$-$C_6$烷基)基團及$C_1$-$C_6$烷基；且

$R^{10}$係選自3至10員碳環及3至10員雜環，其各自經0至3個$R^a$取代，其中各$R^a$獨立地選自鹵素、$C_1$-$C_6$烷基、-O-($C_1$-$C_6$)烷基、$C_1$-$C_6$烷基烷氧基、$C_1$-$C_6$烷基羥基、-S(=O)$_w$-(4至7員雜環)、4至7員碳環及4至7員雜環；

$R^{15}$及$R^{16}$各自獨立地選自氫、$R^{17}$、-C(=O)-$R^{17}$及-C(=O)-O-$R^{17}$；且

$R^{17}$係選自氫、$C_1$-$C_6$烷基、$C_3$-$C_8$環烷基、苯甲基及$C_3$-$C_8$雜環基；

其中$R^1$、$R^3$、$R^4$、$R^{10}$、$R^{15}$、$R^{16}$及$R^{17}$各自獨立地經0至3個獨立地選自以下之基團取代：鹵素、羥基、$C_1$-$C_6$烷基、-O-($C_1$-$C_6$烷基)基團、-N$R^{15}R^{16}$、$C_3$-$C_8$環烷基、$C_1$-$C_6$烷基羥基、$C_1$-$C_6$烷基烷氧基、苯甲基及$C_3$-$C_8$雜環基；且

其中各$R^a$獨立地經0至3個獨立地選自以下之基團取代：鹵素、羥基、-N$R^{15}R^{16}$、$C_1$-$C_6$烷基、-(C=O)-($C_1$-$C_6$烷基)基團、-(C=O)-($C_1$-$C_6$烷基)-($C_3$-$C_{10}$雜環基)及$C_1$-$C_6$烷基羧酸基團，其各自經0、1或2個獨立地選自以下之基團取代：鹵素、羥基、-N$R^{15}R^{16}$及$C_1$-$C_3$烷基；且

w係0、1或2。

【0441】在一些實施例中，$R^1$係選自不存在、氫、$C_1$-$C_4$烷基、$C_1$-$C_4$烷基羧酸基團及$C_3$-$C_8$環烷基。在一些實施例中，$R^1$係氫。在一些實施例中，$R^1$係$C_1$-$C_4$烷基。在一些實施例中，$R^1$係甲基。在一些實施例

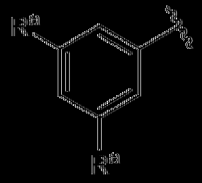
中，$R^1$ 係乙基。在一些實施例中，$R^1$ 係 $C_1$-$C_4$ 烷基羧酸基團。在一些實施例中，$R^1$ 係-$CH_2CH_2CH_2CO_2H$。在一些實施例中，$R^1$ 係 $C_3$-$C_8$ 環烷基。在一些實施例中，$R^1$ 係環庚基。

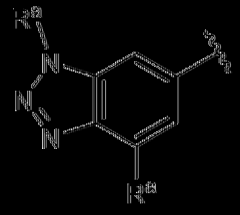
【0442】 在一些實施例中，$R^3$ 係選自氫、$C_1$-$C_4$ 烷基、$C_1$-$C_4$ 烷基烷氧基、$C_1$-$C_4$ 烷基羧酸基團及 $C_1$-$C_4$ 烷基羥基。在一些實施例中，$R^3$ 係選自氫及 $C_1$-$C_4$ 烷基羧酸基團。在一些實施例中，$R^3$ 係氫。在一些實施例中，$R^3$ 係 $C_1$-$C_4$ 烷基羧酸基團。在一些實施例中，$R^3$ 係-$CH_2CH_2CO_2H$。

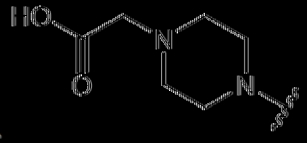
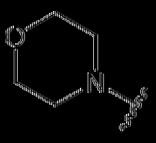
【0443】 在一些實施例中，$R^4$ 係選自氫、羥基、-O-($C_1$-$C_4$ 烷基)基團、-O-C(=O)-($C_1$-$C_4$ 烷基)基團及 $C_1$-$C_4$ 烷基。在一些實施例中，$R^4$ 係氫。在一些實施例中，$R^4$ 係羥基。在一些實施例中，$R^4$ 係-O-($C_1$-$C_4$ 烷基)基團。在一些實施例中，$R^4$ 係-$OCH_3$。在一些實施例中，$R^4$ 係-$OCH_2CH_3$。在一些實施例中，$R^4$ 係-O-C(=O)-($C_1$-$C_4$ 烷基) 基團。在一些實施例中，$R^4$ 係-O-C(=O)-$CH_3$。在一些實施例中，$R^4$ 係-O-C(=O)-$CH_2CH_3$。在一些實施例中，$R^4$ 係 $C_1$-$C_4$ 烷基。在一些實施例中，$R^4$ 係甲基。在一些實施例中，$R^4$ 係乙基。

【0444】 在一些實施例中，$R^{10}$ 係選自 6 至 9 員碳環及 6 至 9 員雜環，其各自經 0 至 2 個 $R^a$ 取代，其中各 $R^a$ 獨立地經 0 至 3 個獨立地選自以下之基團取代：鹵素、羥基、$C_1$-$C_6$ 烷基、-(C=O)-($C_1$-$C_6$ 烷基)基團、-(C=O)-($C_1$-$C_6$ 烷基)-(3 至 10 員雜環)基團及 $C_1$-$C_6$ 烷基羧酸基團。

【0445】 在一些實施例中，該碳環係經 0 至 2 個 $R^a$ 取代之苯基，其中各 $R^a$ 獨立地經 0 至 3 個獨立地選自以下之基團取代：鹵素、羥基、$C_1$-$C_6$ 烷基、-(C=O)-($C_1$-$C_6$ 烷基)基團、-(C=O)-($C_1$-$C_6$ 烷基)-(3 至 10 員雜環)基團及 $C_1$-$C_6$ 烷基羧酸基團。在一些實施例中，該苯基經 2 個 $R^a$ 取

代，其中各 $R^a$ 獨立地經 0 至 3 個獨立地選自以下之基團取代：鹵素、羥基、$C_1$-$C_6$ 烷基、-(C=O)-($C_1$-$C_6$ 烷基)基團、-(C=O)-($C_1$-$C_6$ 烷基)-(3 至 10 員雜環)基團及 $C_1$-$C_6$ 烷基羧酸基團。在一典實施例中，該苯基係  。

[0446] 在一典實施例中，該雜環係經 0 至 2 個 $R^a$ 取代之 9 員雜環，其中各 $R^a$ 獨立地經 0 至 3 個獨立地選自以下之基團取代：鹵素、羥基、$C_1$-$C_6$ 烷基、-(C=O)-($C_1$-$C_6$ 烷基)基團、-(C=O)-($C_1$-$C_6$ 烷基)-(3 至 10 員雜環)基團及 $C_1$-$C_6$ 烷基羧酸基團。在一典實施例中，該 9 員雜環係  。

[0447] 在一典實施例中，$R^a$ 係選自鹵素、3 至 10 員碳環及 3 至 10 員雜環，其中各 $R^a$ 獨立地經 0 至 3 個獨立地選自以下之基團取代：鹵素、羥基、$C_1$-$C_6$ 烷基、-(C=O)-($C_1$-$C_6$ 烷基)基團、-(C=O)-($C_1$-$C_6$ 烷基)-(3 至 10 員雜環)基團及 $C_1$-$C_6$ 烷基羧酸基團。在一典實施例中，$R^a$ 係選自鹵素、  、  、  及  。

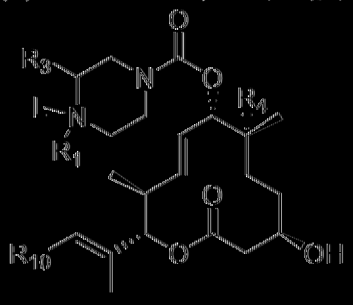
[0448] 在一典實施例中，$R^{15}$ 係氫。在一典實施例中，$R^{15}$ 係 $R^{17}$。在一典實施例中，$R^{15}$ 係-C(=O)-$R^{17}$。在一典實施例中，$R^{15}$ 係-C(=O)-O-$R^{17}$。

[0449] 在一典實施例中，$R^{16}$ 係氫。在一典實施例中，$R^{16}$ 係

$R^{17}$。在一些實施例中，$R^{16}$ 係 -C(=O)-$R^{17}$。在一些實施例中，$R^{16}$ 係 -C(=O)-O-$R^{17}$。

[0450] 在一些實施例中，$R^{17}$ 係選自氫、$C_1$-$C_4$ 烷基、$C_3$-$C_6$ 環烷基及 $C_3$-$C_8$ 雜環基。在一些實施例中，$R^{17}$ 係氫。在一些實施例中，$R^{17}$ 係 $C_1$-$C_4$ 烷基。在一些實施例中，$R^{17}$ 係 $C_1$ 烷基。在一些實施例中，$R^{17}$ 係 $C_3$-$C_6$ 環烷基。在一些實施例中，$R^{17}$ 係 $C_3$ 環烷基。在一些實施例中，$R^{17}$ 係 $C_4$ 環烷基。在一些實施例中，$R^{17}$ 係 $C_5$ 環烷基。在一些實施例中，$R^{17}$ 係 $C_6$ 環烷基。在一些實施例中，$R^{17}$ 係 $C_3$-$C_8$ 雜環基。在一些實施例中，$R^{17}$ 係 $C_3$ 雜環基。在一些實施例中，$R^{17}$ 係 $C_4$ 雜環基。在一些實施例中，$R^{17}$ 係 $C_5$ 雜環基。在一些實施例中，$R^{17}$ 係 $C_6$ 雜環基。在一些實施例中，$R^{17}$ 係 $C_7$ 雜環基。在一些實施例中，$R^{17}$ 係 $C_8$ 雜環基。

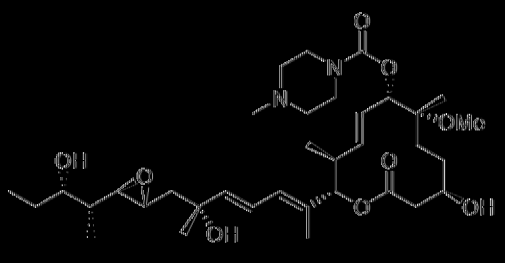
[0451] 在一些實施例中，式(VIII)之剪接調節劑化合物連接至例如式(I)之 ADC 中之連接子 L，如式(VIII-A)中所示：



(VIII-A)。

[0452] 在各種實施例中，藥物部分係選自 D2 及 D1 之剪接調節劑。

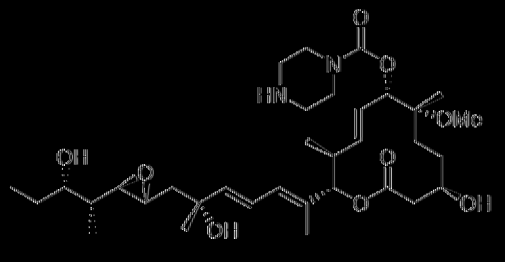
[0453] 在各種實施例中，藥物部分係 D2。在各種實施例中，所揭示之 ADC 中使用的 D2 藥物部分之結構顯示於下：



D2 。

[0454] 在各種實施例中，本文所描述之 ADC(例如式(I)之 ADC)中的連接子經由哌啶基團上之胺共價連接至 D2 藥物部分。在各種實施例中，藥物部分係 D2 衍生物。在各種實施例中，D2 衍生物保持 D2 之至少一種生物功能或活性(例如 SF3b 複合體結合、活體外剪接活性、細胞毒性)，但具有改變之化學結構。

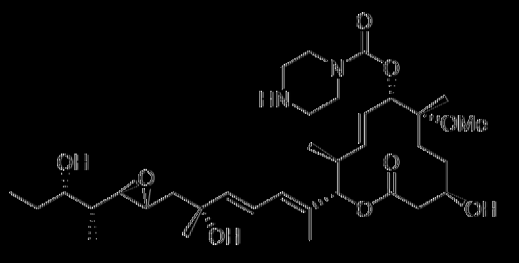
[0455] 在各種實施例中，藥物部分係 D1 或其醫藥學上可接受之鹽。在各種實施例中，所揭示之 ADC 中使用的 D1 藥物部分之結構顯示於下：



D1 。

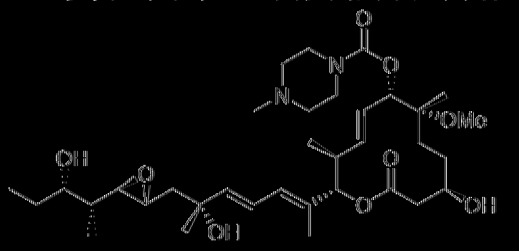
[0456] 在各種實施例中，本文所描述之 ADC(例如式(I)之 ADC)中的連接子經由哌啶基團上之胺共價連接至 D1 藥物部分。在各種實施例中，藥物部分係 D1 衍生物。在各種實施例中，D1 衍生物保持 D1 之至少一種生物功能或活性(例如 SF3b 複合體結合、活體外剪接活性、細胞毒性)，但具有改變之化學結構。

[0457] 在一些實施例中，該剪接調節劑包含 D1：



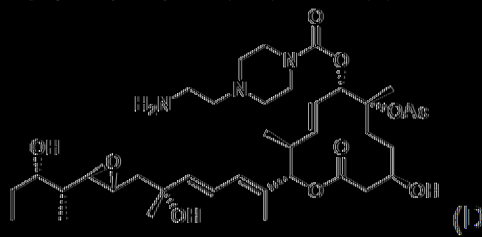
(D1)。

[0458] 在一典實施例中，該剪接調節劑包含 D2：



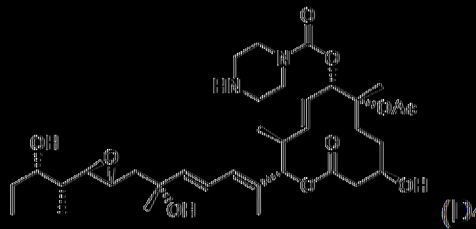
(D2)。

[0459] 在一典實施例中，剪接調節劑包含 D3：



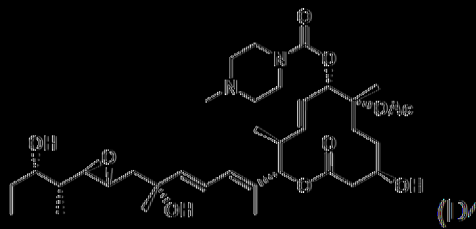
(D3)。

[0460] 在一典實施例中，剪接調節劑包含 D4：



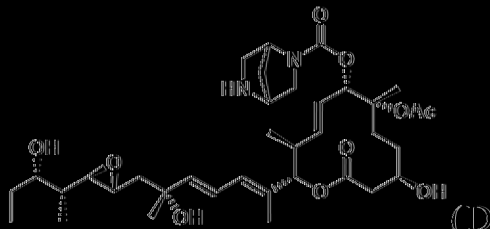
(D4)。

[0461] 在一典實施例中，剪接調節劑包含 D4'：



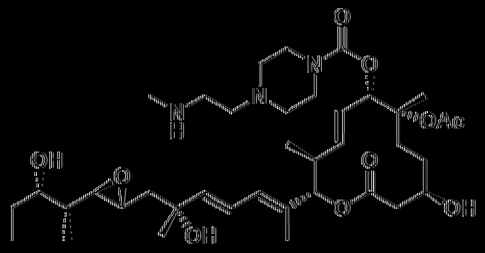
(D4')。

[0462] 在一典實施例中，剪接調節劑包含 D5：



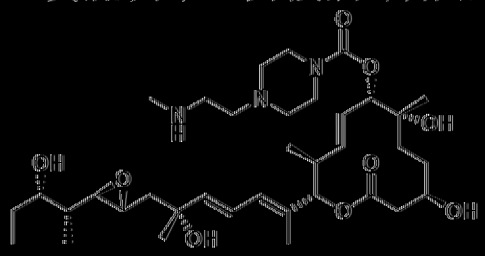
(D5)。

[0463] 在一些實施例中，剪接調節劑包含 D6：



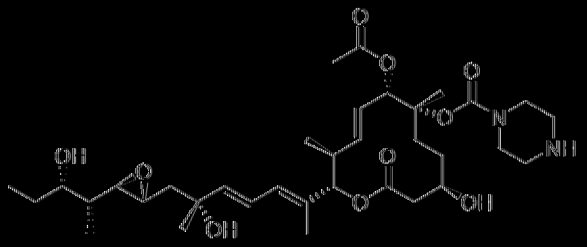
(D6)。

[0464] 在一些實施例中，剪接調節劑包含 D7：



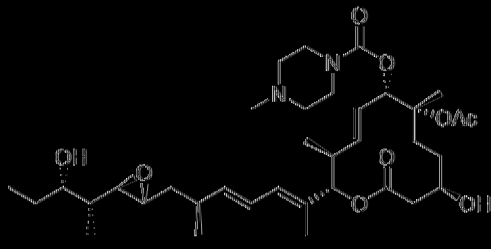
(D7)。

[0465] 在一些實施例中，剪接調節劑包含 D8：



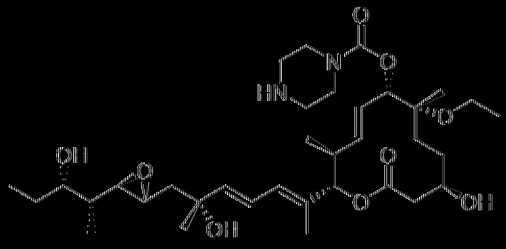
(D8)。

[0466] 在一些實施例中，剪接調節劑包含 D9：



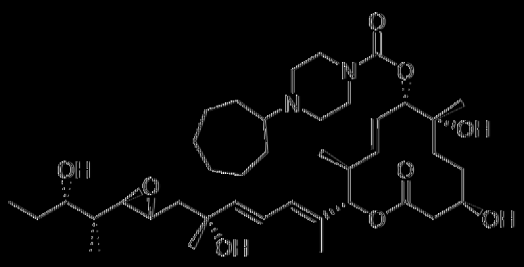
(D9)。

[0467] 在一些實施例中，剪接調節劑包含 D10：



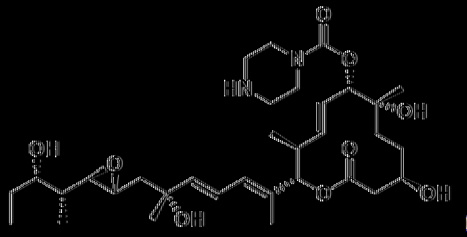
(D10)。

[0468] 在一些實施例中，剪接調節劑包含 D11：



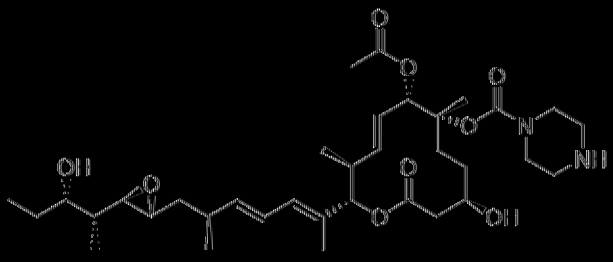
(D11)。

[0469] 在一些實施例中，偶接調節劑包含 D12：



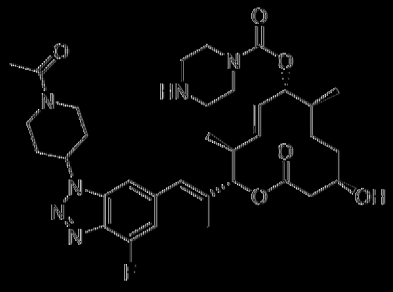
(D12)。

[0470] 在一些實施例中，偶接調節劑包含 D13：



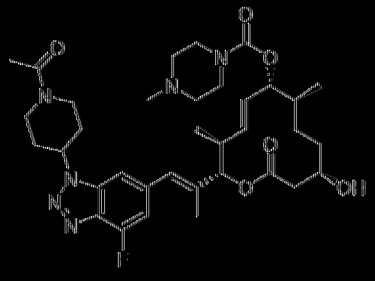
(D13)。

[0471] 在一些實施例中，偶接調節劑包含 D14：



(D14)。

[0472] 在一些實施例中，偶接調節劑包含 D15：



(D15)。

[0473] 在一些實施例中，偶接調節劑包含 D16：



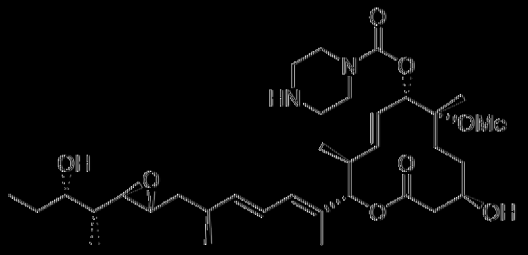
(D16)。

[0474] 在一典實施例中，共接調節劑包含 D17：



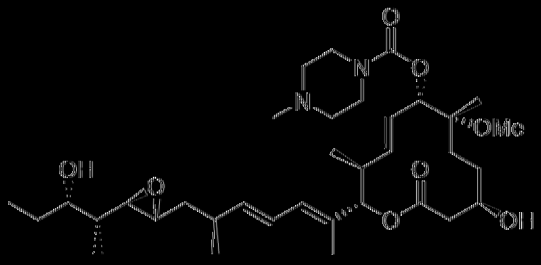
(D17)。

[0475] 在一典實施例中，共接調節劑包含 D18：



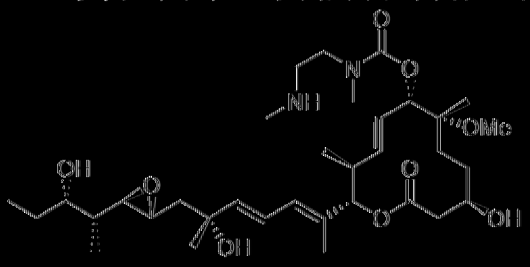
(D18)。

[0476] 在一典實施例中，共接調節劑包含 D19：



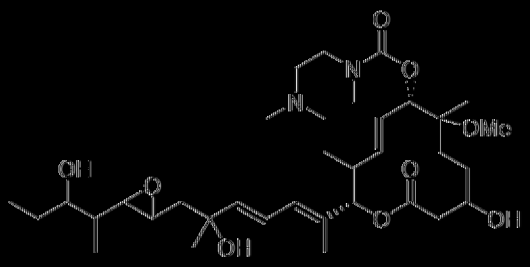
(D19)。

[0477] 在一典實施例中，共接調節劑包含 D20：



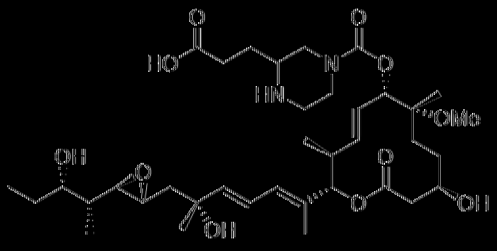
(D20)。

[0478] 在一典實施例中，共接調節劑包含 D21：



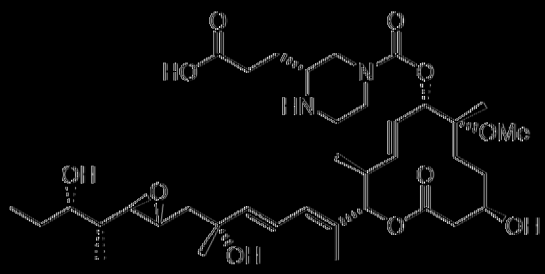
(D21)。

[0479] 在一些實施例中，剪接調節劑包含 D22：



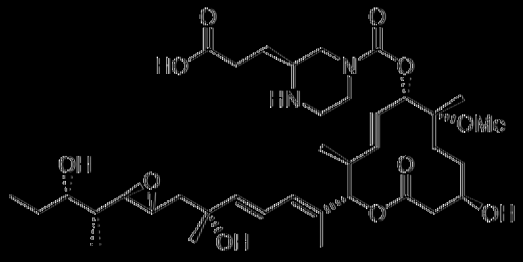
(D22)。

[0480] 在一些實施例中，剪接調節劑包含 D23：



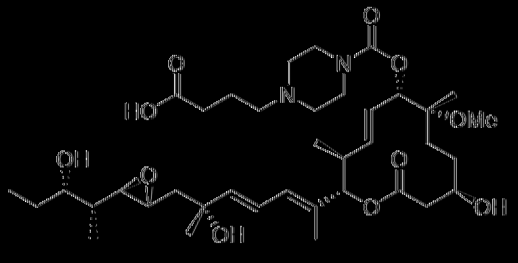
(D23)。

[0481] 在一些實施例中，剪接調節劑包含 D24：



(D24)。

[0482] 在一些實施例中，剪接調節劑包含 D25：



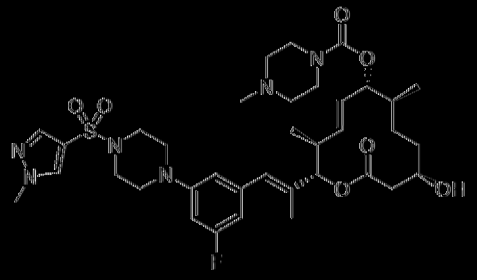
(D25)。

[0483] 在一些實施例中，剪接調節劑包含 D26：



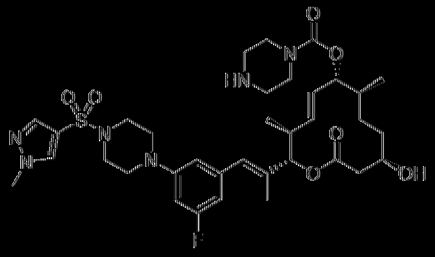
(D26)。

[0484] 在一些實施例中，剪接調節劑包含 D27：



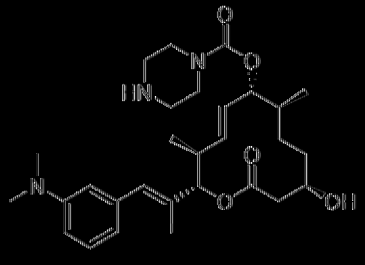
(D27)。

[0485] 在一些實施例中，剪接調節劑包含 D28：



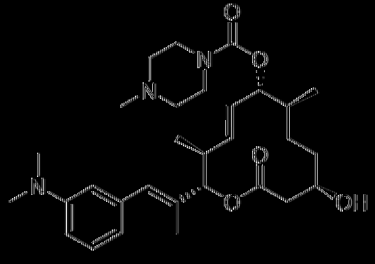
(D28)。

[0486] 在一些實施例中，剪接調節劑包含 D29：



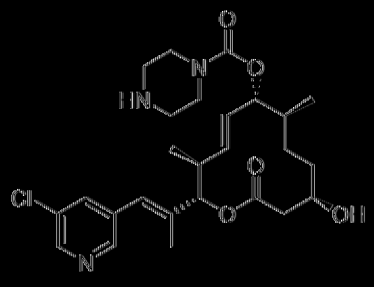
(D29)。

[0487] 在一些實施例中，剪接調節劑包含 D30：



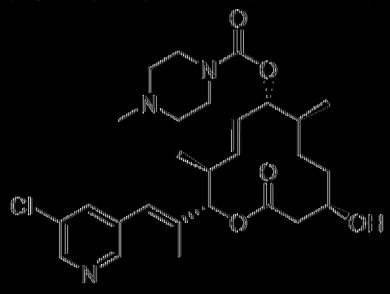
(D30)。

[0488] 在一些實施例中，剪接調節劑包含 D31：



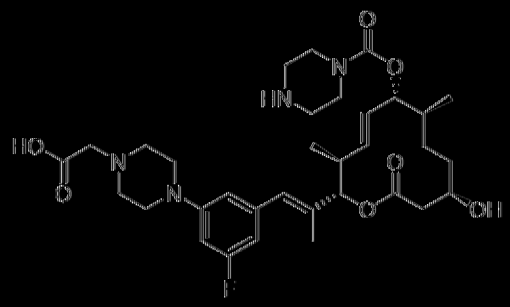
(D31)。

[0489] 在一些實施例中，剪接調節劑包含 D32：



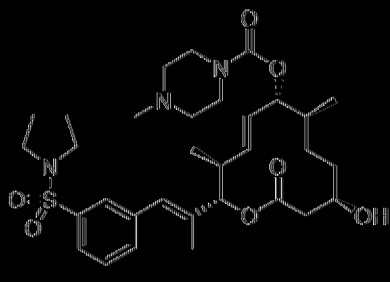
(D32)。

[0490] 在一些實施例中，剪接調節劑包含 D33：



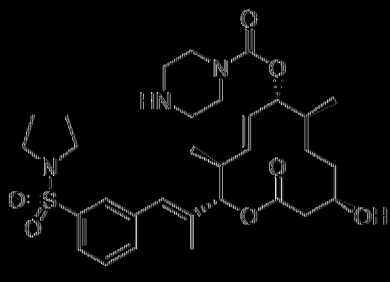
(D33)。

[0491] 在一些實施例中，剪接調節劑包含 D34：



(D34)。

[0492] 在一些實施例中，剪接調節劑包含 D35：



(D35)。

【0493】 例示性 ADC 具有式(I)：

$Ab-(L-D)_p$ (I)

其中

Ab 係靶向贅生性細胞之抗體或抗原結合片段；

D 係 D2；

L 係將 Ab 共價連接至 D 之連接子；且

*p* 係 1 至 15 之整數。

【0494】 在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段靶向表現以下之細胞：HER2、CD138、EPHA2、MSLN、FOLH1、CDH6、CEACAM5、CFC1B、ENPP3、FOLR1、HAVCR1、KIT、MET、MUC16、SLC39A6、SLC44A4 及/或 STEAP1。

【0495】 在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段靶向 HER2 表現性細胞。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段係抗 HER2 抗體或抗原結合片段。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段包括含 SEQ ID NO:1(HCDR1)、SEQ ID NO:2(HCDR2)及 SEQ ID NO:3(HCDR3)之胺基酸序列的三個重鏈互補決定區(HCDR1、HCDR2 及 HCDR3)；以及含 SEQ ID NO:4(LCDR1)、SEQ ID NO:5(LCDR2)及 SEQ ID NO:6(LCDR3)之胺基酸序列的三個輕鏈互補決定區(LCDR1、LCDR2 及 LCDR3)。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段包括含 SEQ ID NO:19 之胺基酸序列之重鏈可變區及含 SEQ ID NO: 20 之胺基酸序列之輕鏈可變區。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段包含人類 IgG1 重鏈恆定區。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段包含人類 Igκ 輕鏈恆定區。

【0496】在一些其他實施例中，該抗體或抗原結合片段靶向 CD138 表現性細胞。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段係抗 CD138 抗體或抗原結合片段。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段包括含 SEQ ID NO: 7(HCDR1)、SEQ ID NO: 8(HCDR2)及 SEQ ID NO: 9(HCDR3)之胺基酸序列的三個重鏈互補決定區(HCDR1、HCDR2 及 HCDR3)；以及含 SEQ ID NO: 10(LCDR1)、SEQ ID NO: 11(LCDR2)及 SEQ ID NO: 12(LCDR3)之胺基酸序列的三個輕鏈互補決定區(LCDR1、LCDR2 及 LCDR3)。在一些實施例中，該體或抗原結合片段包括含 SEQ ID NO: 21 之胺基酸序列之重鏈可變區及含 SEQ ID NO: 22 之胺基酸序列之輕鏈可變區。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段包含鼠類 IgG2a 重鏈恆定區。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段包含鼠類 Igκ 輕鏈恆定區。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段包含人類 IgG2a 重鏈恆定區。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段包含人類 Igκ 輕鏈恆定區。

【0497】在一些其他實施例中，該抗體或抗原結合片段靶向 EPHA2 表現性細胞。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段係抗 EPHA2 抗體或抗原結合片段。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段包括含 SEQ ID NO: 13(HCDR1)、SEQ ID NO: 14(HCDR2)及 SEQ ID NO: 15(HCDR3)之胺基酸序列的三個重鏈互補決定區(HCDR1、HCDR2 及 HCDR3)；以及含 SEQ ID NO: 16(LCDR1)、SEQ ID NO: 17(LCDR2)及 SEQ ID NO: 18(LCDR3)之胺基酸序列的三個輕鏈互補決定區(LCDR1、LCDR2 及 LCDR3)。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段包括含 SEQ ID NO: 23 之胺基酸序列之重鏈可變區及含 SEQ ID NO: 24 之胺基酸序列之輕鏈可變區。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段包

含人類 IgG1 重鏈恆定區。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段包含人類 Igκ 輕鏈恆定區。

【0498】 在一些其他實施例中，該抗體或抗原結合片段靶向 MSLN 表現性細胞。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段係抗 MSLN 抗體或抗原結合片段。

【0499】 在一些其他實施例中，該抗體或抗原結合片段靶向 FOLH1 表現性細胞。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段係抗 FOLH1 抗體或抗原結合片段。

【0500】 在一些其他實施例中，該抗體或抗原結合片段靶向 CDH6 表現性細胞。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段係抗 CDH6 抗體或抗原結合片段。

【0501】 在一些其他實施例中，該抗體或抗原結合片段靶向 CEACAM5 表現性細胞。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段係抗 CEACAM5 抗體或抗原結合片段。

【0502】 在一些其他實施例中，該抗體或抗原結合片段靶向 CFC1B 表現性細胞。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段係抗 CFC1B 抗體或抗原結合片段。

【0503】 在一些其他實施例中，該抗體或抗原結合片段靶向 ENPP3 表現性細胞。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段係抗 ENPP3 抗體或抗原結合片段。

【0504】 在一些其他實施例中，該抗體或抗原結合片段靶向 FOLR1 表現性細胞。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段係抗 FOLR1 抗體或抗原結合片段。

【0505】在一些其他實施例中，該抗體或抗原結合片段靶向 HAVCR1 表現性細胞。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段係抗 HAVCR1 抗體或抗原結合片段。

【0506】在一些其他實施例中，該抗體或抗原結合片段靶向 KIT 表現性細胞。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段係抗 KIT 抗體或抗原結合片段。

【0507】在一些其他實施例中，該抗體或抗原結合片段靶向 MET 表現性細胞。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段係抗 MET 抗體或抗原結合片段。

【0508】在一些其他實施例中，該抗體或抗原結合片段靶向 MUC16 表現性細胞。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段係抗 MUC16 抗體或抗原結合片段。

【0509】在一些其他實施例中，該抗體或抗原結合片段靶向 SLC39A6 表現性細胞。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段係抗 SLC39A6 抗體或抗原結合片段。

【0510】在一些其他實施例中，該抗體或抗原結合片段靶向 SLC44A4 表現性細胞。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段係抗 SLC44A4 抗體或抗原結合片段。

【0511】在一些其他實施例中，該抗體或抗原結合片段靶向 STEAP1 表現性細胞。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段係抗 STEAP1 抗體或抗原結合片段。

【0512】在一些實施例中，L 係選自本文所揭示之連接子中之任一種，或本文所揭示之連接子組分之任何組合。在一些實施例中，L 係包含

以下之連接子：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。在一些實施例中，該連接子亦可包含一或多個額外間隔子單元。在一些實施例中，L 係 ADL1、ADL2、ADL5、ADL6、ADL7、ADL12、ADL13、ADL14、ADL21、ADL23 或 ADL15 連接子。在一些實施例中，L 係 ADL12、ADL14 或 ADL15 連接子。在一些實施例中，ADL1、ADL2、ADL5、ADL6、ADL7、ADL12、ADL13、ADL14、ADL21、ADL23 或 ADL15 連接子亦可包含一或多個額外間隔子單元。

【0513】另一例示性 ADC 具有式(I)：

$Ab\text{-}(L\text{-}D)_p$　(I)

其中

Ab 係靶向贅生性細胞之抗體或抗原結合片段；

D 係 D1；

L 係將 Ab 共價連接至 D 之連接子；且

*p* 係 1 至 15 之整數。

【0514】在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段靶向表現以下之細胞：HER2、CD138、EPHA2、MSLN、FOLH1、CDH6、CEACAM5、CFC1B、ENPP3、FOLR1、HAVCR1、KIT、MET、MUC16、SLC39A6、SLC44A4 及/或 STEAP1。

【0515】在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段靶向 HER2 表現性細胞。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段係抗 HER2 抗體或抗原結合片段。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段包括含 SEQ ID NO:1(HCDR1)、SEQ ID NO:2(HCDR2)及 SEQ ID NO:3(HCDR3)之胺基

酸序列的三個重鏈互補決定區(HCDR1、HCDR2 及 HCDR3)；以及含 SEQ ID NO:4(LCDR1)、SEQ ID NO:5(LCDR2)及 SEQ ID NO: 6(LCDR3)之胺基酸序列的三個輕鏈互補決定區(LCDR1、LCDR2 及 LCDR3)。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段包括含 SEQ ID NO: 19 之胺基酸序列之重鏈可變區及含 SEQ ID NO: 20 之胺基酸序列之輕鏈可變區。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段包含人類 IgG1 重鏈恆定區。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段包含人類 Igκ 輕鏈恆定區。

【0516】在一些其他實施例中，該抗體或抗原結合片段靶向 CD138 表現性細胞。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段係抗 CD138 抗體或抗原結合片段。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段包括含 SEQ ID NO: 7(HCDR1)、SEQ ID NO: 8(HCDR2)及 SEQ ID NO: 9(HCDR3)之胺基酸序列的三個重鏈互補決定區(HCDR1、HCDR2 及 HCDR3)；以及含 SEQ ID NO: 10(LCDR1)、SEQ ID NO: 11(LCDR2)及 SEQ ID NO: 12(LCDR3)之胺基酸序列的三個輕鏈互補決定區(LCDR1、LCDR2 及 LCDR3)。在一些實施例中，該體或抗原結合片段包括含 SEQ ID NO: 21 之胺基酸序列之重鏈可變區及含 SEQ ID NO: 22 之胺基酸序列之輕鏈可變區。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段包含鼠類 IgG2a 重鏈恆定區。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段包含鼠類 Igκ 輕鏈恆定區。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段包含人類 IgG2a 重鏈恆定區。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段包含人類 Igκ 輕鏈恆定區。

【0517】在一些其他實施例中，該抗體或抗原結合片段靶向 EPHA2 表現性細胞。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段係抗

EPHA2 抗體或抗原結合片段。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段包括含 SEQ ID NO: 13(HCDR1)、SEQ ID NO: 14(HCDR2)及 SEQ ID NO: 15(HCDR3)之胺基酸序列的三個重鏈互補決定區(HCDR1、HCDR2及 HCDR3)；以及含 SEQ ID NO: 16(LCDR1)、SEQ ID NO: 17(LCDR2)及 SEQ ID NO: 18(LCDR3)之胺基酸序列的三個輕鏈互補決定區(LCDR1、LCDR2 及 LCDR3)。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段包括含 SEQ ID NO: 23 之胺基酸序列之重鏈可變區及含 SEQ ID NO: 24 之胺基酸序列之輕鏈可變區。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段包含人類 IgG1 重鏈恆定區。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段包含人類 Igκ 輕鏈恆定區。

【0518】在一些其他實施例中，該抗體或抗原結合片段靶向 MSLN 表現性細胞。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段係抗 MSLN 抗體或抗原結合片段。

【0519】在一些其他實施例中，該抗體或抗原結合片段靶向 FOLH1 表現性細胞。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段係抗 FOLH1 抗體或抗原結合片段。

【0520】在一些其他實施例中，該抗體或抗原結合片段靶向 CDH6 表現性細胞。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段係抗 CDH6 抗體或抗原結合片段。

【0521】在一些其他實施例中，該抗體或抗原結合片段靶向 CEACAM5 表現性細胞。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段係抗 CEACAM5 抗體或抗原結合片段。

【0522】在一些其他實施例中，該抗體或抗原結合片段靶向

CFC1B 表現性細胞。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段係抗 CFC1B 抗體或抗原結合片段。

【0523】在一些其他實施例中，該抗體或抗原結合片段靶向 ENPP3 表現性細胞。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段係抗 ENPP3 抗體或抗原結合片段。

【0524】在一些其他實施例中，該抗體或抗原結合片段靶向 FOLR1 表現性細胞。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段係抗 FOLR1 抗體或抗原結合片段。

【0525】在一些其他實施例中，該抗體或抗原結合片段靶向 HAVCR1 表現性細胞。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段係抗 HAVCR1 抗體或抗原結合片段。

【0526】在一些其他實施例中，該抗體或抗原結合片段靶向 KIT 表現性細胞。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段係抗 KIT 抗體或抗原結合片段。

【0527】在一些其他實施例中，該抗體或抗原結合片段靶向 MET 表現性細胞。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段係抗 MET 抗體或抗原結合片段。

【0528】在一些其他實施例中，該抗體或抗原結合片段靶向 MUC16 表現性細胞。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段係抗 MUC16 抗體或抗原結合片段。

【0529】在一些其他實施例中，該抗體或抗原結合片段靶向 SLC39A6 表現性細胞。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段係抗 SLC39A6 抗體或抗原結合片段。

【0530】在一些其他實施例中，該抗體或抗原結合片段靶向 SLC44A4 表現性細胞。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段係抗 SLC44A4 抗體或抗原結合片段。

【0531】在一些其他實施例中，該抗體或抗原結合片段靶向 STEAP1 表現性細胞。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段係抗 STEAP1 抗體或抗原結合片段。

【0532】另一例示性 ADC 具有式(I)：

$Ab\text{-}(L\text{-}D)_p$ (I)

其中

Ab 係靶向贅生性細胞之抗體或抗原結合片段；

D 係 D4；

L 係將 Ab 共價連接至 D 之連接子；且

*p* 係 1 至 15 之整數。

【0533】在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段靶向表現以下之細胞：HER2、CD138、EPHA2、MSLN、FOLH1、CDH6、CEACAM5、CFC1B、ENPP3、FOLR1、HAVCR1、KIT、MET、MUC16、SLC39A6、SLC44A4 及/或 STEAP1。

【0534】在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段靶向 HER2 表現性細胞。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段係抗 HER2 抗體或抗原結合片段。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段包括含 SEQ ID NO:1(HCDR1)、SEQ ID NO:2(HCDR2)及 SEQ ID NO:3(HCDR3)之胺基酸序列的三個重鏈互補決定區(HCDR1、HCDR2 及 HCDR3)；以及含 SEQ ID NO:4(LCDR1)、SEQ ID NO:5(LCDR2)及 SEQ ID NO:

6(LCDR3)之胺基酸序列的三個輕鏈互補決定區(LCDR1、LCDR2 及 LCDR3)。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段包括含 SEQ ID NO: 19 之胺基酸序列之重鏈可變區及含 SEQ ID NO: 20 之胺基酸序列之輕鏈可變區。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段包含人類 IgG1 重鏈恆定區。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段包含人類 Igκ 輕鏈恆定區。

【0535】 在一些其他實施例中，該抗體或抗原結合片段靶向 CD138 表現性細胞。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段係抗 CD138 抗體或抗原結合片段。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段包括含 SEQ ID NO: 7(HCDR1)、SEQ ID NO: 8(HCDR2)及 SEQ ID NO: 9(HCDR3)之胺基酸序列的三個重鏈互補決定區(HCDR1、HCDR2 及 HCDR3)；以及含 SEQ ID NO: 10(LCDR1)、SEQ ID NO: 11(LCDR2)及 SEQ ID NO: 12(LCDR3)之胺基酸序列的三個輕鏈互補決定區(LCDR1、LCDR2 及 LCDR3)。在一些實施例中，該體或抗原結合片段包括含 SEQ ID NO: 21 之胺基酸序列之重鏈可變區及含 SEQ ID NO: 22 之胺基酸序列之輕鏈可變區。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段包含鼠類 IgG2a 重鏈恆定區。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段包含鼠類 Igκ 輕鏈恆定區。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段包含人類 IgG2a 重鏈恆定區。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段包含人類 Igκ 輕鏈恆定區。

【0536】 在一些其他實施例中，該抗體或抗原結合片段靶向 EPHA2 表現性細胞。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段係抗 EPHA2 抗體或抗原結合片段。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段包括含 SEQ ID NO: 13(HCDR1)、SEQ ID NO: 14(HCDR2)及 SEQ ID

NO: 15(HCDR3)之胺基酸序列的三個重鏈互補決定區(HCDR1、HCDR2及HCDR3)；以及含SEQ ID NO: 16(LCDR1)、SEQ ID NO: 17(LCDR2)及SEQ ID NO: 18(LCDR3)之胺基酸序列的三個輕鏈互補決定區(LCDR1、LCDR2及LCDR3)。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段包括含SEQ ID NO: 23之胺基酸序列之重鏈可變區及含SEQ ID NO: 24之胺基酸序列之輕鏈可變區。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段包含人類IgG1重鏈恆定區。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段包含人類Igκ輕鏈恆定區。

【0537】在一些其他實施例中，該抗體或抗原結合片段靶向MSLN表現性細胞。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段係抗MSLN抗體或抗原結合片段。

【0538】在一些其他實施例中，該抗體或抗原結合片段靶向FOLH1表現性細胞。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段係抗FOLH1抗體或抗原結合片段。

【0539】在一些其他實施例中，該抗體或抗原結合片段靶向CDH6表現性細胞。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段係抗CDH6抗體或抗原結合片段。

【0540】在一些其他實施例中，該抗體或抗原結合片段靶向CEACAM5表現性細胞。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段係抗CEACAM5抗體或抗原結合片段。

【0541】在一些其他實施例中，該抗體或抗原結合片段靶向CFC1B表現性細胞。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段係抗CFC1B抗體或抗原結合片段。

【0542】在一些其他實施例中，該抗體或抗原結合片段靶向 ENPP3 表現性細胞。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段係抗 ENPP3 抗體或抗原結合片段。

【0543】在一些其他實施例中，該抗體或抗原結合片段靶向 FOLR1 表現性細胞。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段係抗 FOLR1 抗體或抗原結合片段。

【0544】在一些其他實施例中，該抗體或抗原結合片段靶向 HAVCR1 表現性細胞。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段係抗 HAVCR1 抗體或抗原結合片段。

【0545】在一些其他實施例中，該抗體或抗原結合片段靶向 KIT 表現性細胞。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段係抗 KIT 抗體或抗原結合片段。

【0546】在一些其他實施例中，該抗體或抗原結合片段靶向 MET 表現性細胞。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段係抗 MET 抗體或抗原結合片段。

【0547】在一些其他實施例中，該抗體或抗原結合片段靶向 MUC16 表現性細胞。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段係抗 MUC16 抗體或抗原結合片段。

【0548】在一些其他實施例中，該抗體或抗原結合片段靶向 SLC39A6 表現性細胞。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段係抗 SLC39A6 抗體或抗原結合片段。

【0549】在一些其他實施例中，該抗體或抗原結合片段靶向 SLC44A4 表現性細胞。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段係抗

SLC44A4 抗體或抗原結合片段。

【0550】在一些其他實施例中，該抗體或抗原結合片段靶向 STEAP1 表現性細胞。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段係抗 STEAP1 抗體或抗原結合片段。

【0551】另一例示性 ADC 具有式(I)：

$Ab\text{-}(L\text{-}D)_p$ (I)

其中

Ab 係靶向贅生性細胞之抗體或抗原結合片段；

D 係 D12；

L 係將 Ab 共價連接至 D 之連接子；且

*p* 係 1 至 15 之整數。

【0552】在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段靶向表現以下之細胞：HER2、CD138、EPHA2、MSLN、FOLH1、CDH6、CEACAM5、CFC1B、ENPP3、FOLR1、HAVCR1、KIT、MET、MUC16、SLC39A6、SLC44A4 及/或 STEAP1。

【0553】在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段靶向 HER2 表現性細胞。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段係抗 HER2 抗體或抗原結合片段。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段包括含 SEQ ID NO:1(HCDR1)、SEQ ID NO:2(HCDR2)及 SEQ ID NO:3(HCDR3)之胺基酸序列的三個重鏈互補決定區(HCDR1、HCDR2 及 HCDR3)；以及含 SEQ ID NO:4(LCDR1)、SEQ ID NO:5(LCDR2)及 SEQ ID NO:6(LCDR3)之胺基酸序列的三個輕鏈互補決定區(LCDR1、LCDR2 及 LCDR3)。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段包括含 SEQ ID NO:

19 之胺基酸序列之重鏈可變區及含 SEQ ID NO: 20 之胺基酸序列之輕鏈可變區。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段包含人類 IgG1 重鏈恆定區。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段包含人類 Igκ 輕鏈恆定區。

【0554】 在一些其他實施例中，該抗體或抗原結合片段靶向 CD138 表現性細胞。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段係抗 CD138 抗體或抗原結合片段。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段包括含 SEQ ID NO: 7(HCDR1)、SEQ ID NO: 8(HCDR2)及 SEQ ID NO: 9(HCDR3)之胺基酸序列的三個重鏈互補決定區(HCDR1、HCDR2 及 HCDR3)；以及含 SEQ ID NO: 10(LCDR1)、SEQ ID NO: 11(LCDR2)及 SEQ ID NO: 12(LCDR3)之胺基酸序列的三個輕鏈互補決定區(LCDR1、LCDR2 及 LCDR3)。在一些實施例中，該體或抗原結合片段包括含 SEQ ID NO: 21 之胺基酸序列之重鏈可變區及含 SEQ ID NO: 22 之胺基酸序列之輕鏈可變區。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段包含鼠類 IgG2a 重鏈恆定區。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段包含鼠類 Igκ 輕鏈恆定區。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段包含人類 IgG2a 重鏈恆定區。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段包含人類 Igκ 輕鏈恆定區。

【0555】 在一些其他實施例中，該抗體或抗原結合片段靶向 EPHA2 表現性細胞。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段係抗 EPHA2 抗體或抗原結合片段。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段包括含 SEQ ID NO: 13(HCDR1)、SEQ ID NO: 14(HCDR2)及 SEQ ID NO: 15(HCDR3)之胺基酸序列的三個重鏈互補決定區(HCDR1、HCDR2 及 HCDR3)；以及含 SEQ ID NO: 16(LCDR1)、SEQ ID NO: 17(LCDR2)

及 SEQ ID NO: 18(LCDR3)之胺基酸序列的三個輕鏈互補決定區(LCDR1、LCDR2 及 LCDR3)。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段包括含 SEQ ID NO: 23 之胺基酸序列之重鏈可變區及含 SEQ ID NO: 24 之胺基酸序列之輕鏈可變區。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段包含人類 IgG1 重鏈恆定區。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段包含人類 Igκ 輕鏈恆定區。

【0556】在一些其他實施例中，該抗體或抗原結合片段靶向 MSLN 表現性細胞。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段係抗 MSLN 抗體或抗原結合片段。

【0557】在一些其他實施例中，該抗體或抗原結合片段靶向 FOLH1 表現性細胞。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段係抗 FOLH1 抗體或抗原結合片段。

【0558】在一些其他實施例中，該抗體或抗原結合片段靶向 CDH6 表現性細胞。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段係抗 CDH6 抗體或抗原結合片段。

【0559】在一些其他實施例中，該抗體或抗原結合片段靶向 CEACAM5 表現性細胞。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段係抗 CEACAM5 抗體或抗原結合片段。

【0560】在一些其他實施例中，該抗體或抗原結合片段靶向 CFC1B 表現性細胞。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段係抗 CFC1B 抗體或抗原結合片段。

【0561】在一些其他實施例中，該抗體或抗原結合片段靶向 ENPP3 表現性細胞。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段係抗 ENPP3 抗體

或抗原結合片段。

【0562】在一些其他實施例中，該抗體或抗原結合片段靶向 FOLR1 表現性細胞。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段係抗 FOLR1 抗體或抗原結合片段。

【0563】在一些其他實施例中，該抗體或抗原結合片段靶向 HAVCR1 表現性細胞。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段係抗 HAVCR1 抗體或抗原結合片段。

【0564】在一些其他實施例中，該抗體或抗原結合片段靶向 KIT 表現性細胞。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段係抗 KIT 抗體或抗原結合片段。

【0565】在一些其他實施例中，該抗體或抗原結合片段靶向 MET 表現性細胞。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段係抗 MET 抗體或抗原結合片段。

【0566】在一些其他實施例中，該抗體或抗原結合片段靶向 MUC16 表現性細胞。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段係抗 MUC16 抗體或抗原結合片段。

【0567】在一些其他實施例中，該抗體或抗原結合片段靶向 SLC39A6 表現性細胞。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段係抗 SLC39A6 抗體或抗原結合片段。

【0568】在一些其他實施例中，該抗體或抗原結合片段靶向 SLC44A4 表現性細胞。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段係抗 SLC44A4 抗體或抗原結合片段。

【0569】在一些其他實施例中，該抗體或抗原結合片段靶向

STEAP1 表現性細胞。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段係抗 STEAP1 抗體或抗原結合片段。

【0570】另一例示性 ADC 具有式(I)：

$Ab\text{-}(L\text{-}D)_p$ (I)

其中

Ab 係靶向贅生性細胞之抗體或抗原結合片段；

D 係 D15；

L 係將 Ab 共價連接至 D 之連接子；且

*p* 係 1 至 15 之整數。

【0571】在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段靶向表現以下之細胞：HER2、CD138、EPHA2、MSLN、FOLH1、CDH6、CEACAM5、CFC1B、ENPP3、FOLR1、HAVCR1、KIT、MET、MUC16、SLC39A6、SLC44A4 及/或 STEAP1。

【0572】在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段靶向 HER2 表現性細胞。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段係抗 HER2 抗體或抗原結合片段。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段包括含 SEQ ID NO:1(HCDR1)、SEQ ID NO:2(HCDR2)及 SEQ ID NO:3(HCDR3)之胺基酸序列的三個重鏈互補決定區(HCDR1、HCDR2 及 HCDR3)；以及含 SEQ ID NO:4(LCDR1)、SEQ ID NO:5(LCDR2)及 SEQ ID NO:6(LCDR3)之胺基酸序列的三個輕鏈互補決定區(LCDR1、LCDR2 及 LCDR3)。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段包括含 SEQ ID NO:19 之胺基酸序列之重鏈可變區及含 SEQ ID NO: 20 之胺基酸序列之輕鏈可變區。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段包含人類 IgG1 重鏈恆

定區。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段包含人類 Igκ 輕鏈恆定區。

【0573】在一些其他實施例中，該抗體或抗原結合片段靶向 CD138 表現性細胞。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段係抗 CD138 抗體或抗原結合片段。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段包括含 SEQ ID NO: 7(HCDR1)、SEQ ID NO: 8(HCDR2)及 SEQ ID NO: 9(HCDR3)之胺基酸序列的三個重鏈互補決定區(HCDR1、HCDR2 及 HCDR3)；以及含 SEQ ID NO: 10(LCDR1)、SEQ ID NO: 11(LCDR2)及 SEQ ID NO: 12(LCDR3)之胺基酸序列的三個輕鏈互補決定區(LCDR1、LCDR2 及 LCDR3)。在一些實施例中，該體或抗原結合片段包括含 SEQ ID NO: 21 之胺基酸序列之重鏈可變區及含 SEQ ID NO: 22 之胺基酸序列之輕鏈可變區。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段包含鼠類 IgG2a 重鏈恆定區。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段包含鼠類 Igκ 輕鏈恆定區。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段包含人類 IgG2a 重鏈恆定區。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段包含人類 Igκ 輕鏈恆定區。

【0574】在一些其他實施例中，該抗體或抗原結合片段靶向 EPHA2 表現性細胞。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段係抗 EPHA2 抗體或抗原結合片段。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段包括含 SEQ ID NO: 13(HCDR1)、SEQ ID NO: 14(HCDR2)及 SEQ ID NO: 15(HCDR3)之胺基酸序列的三個重鏈互補決定區(HCDR1、HCDR2 及 HCDR3)；以及含 SEQ ID NO: 16(LCDR1)、SEQ ID NO: 17(LCDR2)及 SEQ ID NO: 18(LCDR3)之胺基酸序列的三個輕鏈互補決定區(LCDR1、LCDR2 及 LCDR3)。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段

包括含 SEQ ID NO: 23 之胺基酸序列之重鏈可變區及含 SEQ ID NO: 24 之胺基酸序列之輕鏈可變區。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段包含人類 IgG1 重鏈恆定區。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段包含人類 Igκ 輕鏈恆定區。

【0575】 在一些其他實施例中，該抗體或抗原結合片段靶向 MSLN 表現性細胞。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段係抗 MSLN 抗體或抗原結合片段。

【0576】 在一些其他實施例中，該抗體或抗原結合片段靶向 FOLH1 表現性細胞。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段係抗 FOLH1 抗體或抗原結合片段。

【0577】 在一些其他實施例中，該抗體或抗原結合片段靶向 CDH6 表現性細胞。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段係抗 CDH6 抗體或抗原結合片段。

【0578】 在一些其他實施例中，該抗體或抗原結合片段靶向 CEACAM5 表現性細胞。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段係抗 CEACAM5 抗體或抗原結合片段。

【0579】 在一些其他實施例中，該抗體或抗原結合片段靶向 CFC1B 表現性細胞。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段係抗 CFC1B 抗體或抗原結合片段。

【0580】 在一些其他實施例中，該抗體或抗原結合片段靶向 ENPP3 表現性細胞。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段係抗 ENPP3 抗體或抗原結合片段。

【0581】 在一些其他實施例中，該抗體或抗原結合片段靶向

FOLR1 表現性細胞。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段係抗 FOLR1 抗體或抗原結合片段。

【0582】在一些其他實施例中，該抗體或抗原結合片段靶向 HAVCR1 表現性細胞。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段係抗 HAVCR1 抗體或抗原結合片段。

【0583】在一些其他實施例中，該抗體或抗原結合片段靶向 KIT 表現性細胞。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段係抗 KIT 抗體或抗原結合片段。

【0584】在一些其他實施例中，該抗體或抗原結合片段靶向 MET 表現性細胞。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段係抗 MET 抗體或抗原結合片段。

【0585】在一些其他實施例中，該抗體或抗原結合片段靶向 MUC16 表現性細胞。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段係抗 MUC16 抗體或抗原結合片段。

【0586】在一些其他實施例中，該抗體或抗原結合片段靶向 SLC39A6 表現性細胞。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段係抗 SLC39A6 抗體或抗原結合片段。

【0587】在一些其他實施例中，該抗體或抗原結合片段靶向 SLC44A4 表現性細胞。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段係抗 SLC44A4 抗體或抗原結合片段。

【0588】在一些其他實施例中，該抗體或抗原結合片段靶向 STEAP1 表現性細胞。在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段係抗 STEAP1 抗體或抗原結合片段。

【0589】在一些實施例中，L 係選自本文所揭示之連接子中之任一種，或本文所揭示之連接子組分之任何組合。在一些實施例中，L 係可裂解連接子。在一些實施例中，L 係不可裂解連接子。在一些實施例中，L 係包含以下之連接子：MC-Val-Cit-pABC、MC-Val-Ala-pABC、MC-Val-Ala-pAB、MC-Glu-Val-Cit-pABC、Ala-Ala-Asn-pABC 或 β-葡萄糖醛酸苷。在一些實施例中，L 係包含 Mal-Hex、Mal-Et 或 Mal-Et-O-Et 之連接子。在一些實施例中，L 係包含以下之連接子：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。在一些實施例中，該連接子亦可包含一或多個額外間隔子單元。在一些實施例中，L 係 ADL1、ADL2、ADL5、ADL6、ADL7、ADL12、ADL13、ADL14、ADL21、ADL23 或 ADL15 連接子。在一些實施例中，L 係 ADL12、ADL14 或 ADL15 連接子。在一些實施例中，ADL1、ADL2、ADL5、ADL6、ADL7、ADL12、ADL13、ADL14、ADL21、ADL23 或 ADL15 連接子亦可包含一或多個額外間隔子單元。

【0590】在一些實施例中，*p* 係 1 至 10。在一些實施例中，*p* 係 2 至 8。在一些實施例中，*p* 係 4 至 8。在一些實施例中，*p* 係 4。在一些實施例中，*p* 係 8。

【0591】另一例示性 ADC 具有式(I)：

$Ab\text{-}(L\text{-}D)_p$　(I)

其中 Ab 係抗 HER2 抗體或抗原結合片段，其包括含 SEQ ID NO:1(HCDR1)、SEQ ID NO:2(HCDR2)及 SEQ ID NO:3(HCDR3)之胺基酸序列的三個重鏈互補決定區(HCDR1、HCDR2 及 HCDR3)；以及含

SEQ ID NO:4 (LCDR1)、SEQ ID NO:5(LCDR2)及 SEQ ID NO: 6(LCDR3)之胺基酸序列的三個輕鏈互補決定區(LCDR1、LCDR2 及 LCDR3)；

D 係 D2、D1、D4、D12 或 D15；

L 係將 Ab 共價連接至 D 之連接子；且

*p* 係 1 至 15 之整數。

【0592】在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段包括含 SEQ ID NO: 19 之胺基酸序列之重鏈可變區及含 SEQ ID NO: 20 之胺基酸序列之輕鏈可變區。

【0593】在一些實施例中，L 係選自本文所揭示之連接子中之任一種，或本文所揭示之連接子組分之任何組合。在一些實施例中，L 係包含以下之連接子：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。在一些實施例中，該連接子亦可包含一或多個額外間隔子單元。在一些實施例中，L 係 ADL1、ADL2、ADL5、ADL6、ADL7、ADL12、ADL13、ADL14、ADL21、ADL23 或 ADL15 連接子。在一些實施例中，L 係 ADL12、ADL14 或 ADL15 連接子。在一些實施例中，ADL1、ADL2、ADL5、ADL6、ADL7、ADL12、ADL13、ADL14、ADL21、ADL23 或 ADL15 連接子亦可包含一或多個額外間隔子單元。

【0594】另一例示性 ADC 具有式(I)：

$Ab\text{-}(L\text{-}D)_p$　(I)

其中 Ab 係抗 CD138 抗體或抗原結合片段，其包括含 SEQ ID NO: 7(HCDR1)、SEQ ID NO: 8(HCDR2)及 SEQ ID NO: 9(HCDR3)之胺基酸

序列的三個重鏈互補決定區(HCDR1、HCDR2 及 HCDR3)；以及含 SEQ ID NO: 10(LCDR1) 、 SEQ ID NO: 11(LCDR2) 及 SEQ ID NO: 12(LCDR3)之胺基酸序列的三個輕鏈互補決定區(LCDR1 、LCDR2 及 LCDR3)；

D 係 D2、D1、D4、D12 或 D15；

L 係將 Ab 共價連接至 D 之連接子；且

*p* 係 1 至 15 之整數。

【0595】 在一些實施例中，該體或抗原結合片段包括含 SEQ ID NO: 21 之胺基酸序列之重鏈可變區及含 SEQ ID NO: 22 之胺基酸序列之輕鏈可變區。

【0596】 在一些實施例中，L 係選自本文所揭示之連接子中之任一種，或本文所揭示之連接子組分之任何組合。在一些實施例中，L 係包含以下之連接子：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。在一些實施例中，該連接子亦可包含一或多個額外間隔子單元。在一些實施例中，L 係 ADL1、ADL2、ADL5、ADL6、ADL7、ADL12、ADL13、ADL14、ADL21、ADL23 或 ADL15 連接子。在一些實施例中，L 係 ADL12、ADL14 或 ADL15 連接子。在一些實施例中，ADL1、ADL2、ADL5、ADL6、ADL7、ADL12、ADL13、ADL14、ADL21、ADL23 或 ADL15 連接子亦可包含一或多個額外間隔子單元。

【0597】 另一例示性 ADC 具有式(I)：

$Ab\text{-}(L\text{-}D)_p$ (I)

其中 Ab 係抗 EPHA2 抗體或抗原結合片段，其包括含 SEQ ID NO:

13(HCDR1)、SEQ ID NO: 14(HCDR2)及 SEQ ID NO: 15(HCDR3)之胺基酸序列的三個重鏈互補決定區(HCDR1、HCDR2 及 HCDR3)；以及含 SEQ ID NO: 16(LCDR1)、SEQ ID NO: 17(LCDR2)及 SEQ ID NO: 18(LCDR3)之胺基酸序列的三個輕鏈互補決定區(LCDR1、LCDR2 及 LCDR3)；

D 係 D2、D1、D4、D12 或 D15；

L 係將 Ab 共價連接至 D 之連接子；且

p 係 1 至 15 之整數。

【0598】 在一些實施例中，該抗體或抗原結合片段包括含 SEQ ID NO: 23 之胺基酸序列之重鏈可變區及含 SEQ ID NO: 24 之胺基酸序列之輕鏈可變區。

【0599】 在一些實施例中，L 係選自本文所揭示之連接子中之任一種，或本文所揭示之連接子組分之任何組合。在一些實施例中，L 係包含以下之連接子：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。在一些實施例中，該連接子亦可包含一或多個額外間隔子單元。在一些實施例中，L 係 ADL1、ADL2、ADL5、ADL6、ADL7、ADL12、ADL13、ADL14、ADL21、ADL23 或 ADL15 連接子。在一些實施例中，L 係 ADL12、ADL14 或 ADL15 連接子。在一些實施例中，ADL1、ADL2、ADL5、ADL6、ADL7、ADL12、ADL13、ADL14、ADL21、ADL23 或 ADL15 連接子亦可包含一或多個額外間隔子單元。

【0600】 在各種實施例中，包含 D2 或 D1 藥物部分之 ADC 可以包括可裂解或不可裂解連接子。

【0601】 在各種實施例中，連接子係可裂解連接子。在各種實施例中，該可裂解連接子包含 MC-Val-Cit-pABC。在各種實施例中，該可裂解連接子包含 MC-Val-Ala-pABC。在各種實施例中，該可裂解連接子包含 MC-Val-Ala-pAB。在各種實施例中，該可裂解連接子包含 MC-Glu-Val-Cit-pABC。在各種實施例中，該可裂解連接子包含 MC-Ala-Ala-Asn-pABC。

【0602】 在各種其他實施例中，連接子係不可裂解連接子。在各種實施例中，該不可裂解連接子包含單獨或與至少一個額外間隔子單元組合之 MC。在各種實施例中，該不可裂解連接子包含單獨或與至少一個額外間隔子單元組合之 Mal-Hex。在各種實施例中，該不可裂解連接子包含單獨或與至少一個額外間隔子單元組合之 Mal-Et。在各種實施例中，該不可裂解連接子包含單獨或與至少一個額外間隔子單元組合之 Mal-Et-O-Et。

【0603】 在各種實施例中，在包含 D2 或 D1 藥物部分之 ADC 中，*p* 係 1 至 10。在各種實施例中，*p* 係 2 至 8。在各種實施例中，*p* 係 4 至 8。在各種實施例中，*p* 係 4。在各種實施例中，*p* 係 8。

【0604】 在各種實施例中，相對於包含替代性藥物部分(例如選擇性剪接調節劑藥物部分)之 ADC，包含如本文所揭示之 D2 或 D1 藥物部分的 ADC 展現改善之藥物:抗體比率、較低聚集水準、增加之穩定性、增加之在靶癌細胞殺滅作用、減弱之脫靶非癌細胞殺滅作用及/或增加之細胞毒性及/或效力。在一些實施例中，包含如本文所揭示之 D2 或 D1 藥物部分的 ADC 提供良好或優良的上文所列類別中之一或多種的特性或作為治療性 ADC 之所有功能特性。在一些實施例中，相較於包含替代性藥物部

分(例如替代性剪接調節劑藥物部分)之 ADC，包含 D2 或 D1 藥物部分之 ADC 展現意外地有效的效力及增加的對表現該 ADC 所靶向之抗原之細胞的細胞生長及/或增殖之抑制。在一些實施例中，效力可以使得細胞增殖減少 50%的化合物之濃度($GI_{50}$)量測。在各種實施例中，相較於利用替代性藥物部分(例如替代性剪接調節劑藥物部分，例如泰蘭他汀 A)之 ADC，包含 D2 或 D1 藥物部分之 ADC 展現意外地增加的活體內穩定性(例如血漿穩定性)。參見例如 Puthenveetil 等人(Bioconjugate Chem.(2016)27:1880-8)中所描述之 ADC，該 ADC 顯示在 72 小時之時有效負載完全生物轉化(亦即，乙酸酯完全水解)。

【0605】 在某些實施例中，作為連接子部分之前驅體的中間物與藥物部分(例如剪接調節劑)在適當條件下反應。在某些實施例中，在該藥物及/或該中間物或連接子上使用反應性基團。藥物與中間物之間的反應產物，或衍生化藥物(藥物加連接子)隨後與抗體或抗原結合片段在適當條件下反應。或者，該中間物或連接子可先與抗體或抗原結合片段或衍生化抗體或抗原結合片段反應，且接著與該藥物或衍生化藥物反應。

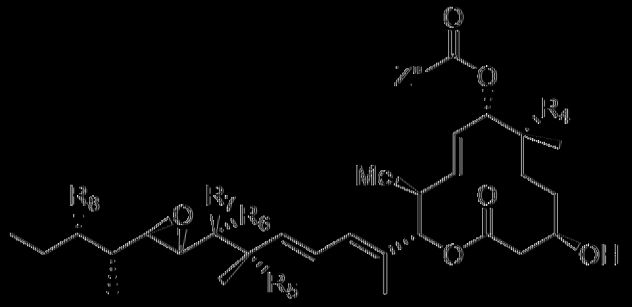
【0606】 多種不同反應可用於將藥物部分及/或連接子部分共價連接至抗體或抗原結合片段。此通常係藉由使抗體或抗原結合片段之一或多個胺基酸殘基，包括離胺酸之胺基、麩胺酸及天冬胺酸之游離羧酸基、半胱胺酸之硫氫基及芳族胺基酸之各種部分反應來實現。舉例而言，非特異性共價連接可以使用碳化二亞胺反應進行以將藥物部分上之羧基(或胺基)連接至抗體或抗原結合片段上之胺基(或羧基)。另外，亦可使用雙官能試劑諸如二醛或醯亞胺酯將藥物部分上之胺基連接至抗體或抗原結合片段上之胺基。希夫鹼(Schiff base)反應亦可用於將藥物(例如剪接調節劑)連接至

結合劑。此方法涉及過碘酸鹽氧化含有二醇或經其之藥物，由此形成醛，隨後與結合劑反應。連接係經由與結合劑之胺基形成希夫鹼而發生。亦可使用異硫氰酸酯作為偶合劑，用於將藥物共價連接至結合劑。其他技術係熟習此項技術者所知的且在本發明之範圍內。可使用此項技術中已知之各種化學物質產生且連接至抗體或抗原結合片段之藥物部分的實例包括剪接調節劑，例如本文中描述及舉例說明之剪接調節劑。

連接子-藥物/藥物化合物

[0607] 本文進一步揭示例示性連接子-藥物(L-D)化合物，以及包含此等化合物之多個複本的組合物。在各種實施例中，本文所揭示之連接子-藥物化合物可藉由以下通式定義：L-D，其中 L 係連接子部分，且 D 係藥物部分(例如剪接調節劑藥物部分)。在某些實施例中，所揭示之 L-D 化合物適用於本文所描述 ADC，例如式(I)之 ADC 中。

[0608] 在各種實施例中，本文所揭示之連接子-藥物(L-D)化合物包含根據式(III)之連接子-藥物結構。在各種實施例中，本發明提供一種式(III)之連接子-藥物(L-D)化合物：



(III)，或其醫藥學上可接受之鹽，其中：

$R^1$ 係選自不存在、氫、$C_1$-$C_6$ 烷基、$C_1$-$C_6$ 烷基烷氧基、$C_1$-$C_6$ 烷基胺基、$C_1$-$C_6$ 烷基羧酸基團、$C_1$-$C_6$ 烷基經基、$C_3$-$C_8$ 環烷基、苯甲基、$C_3$-$C_8$ 雜環基、-O-C(=O)-($C_1$-$C_6$烷基)基團及 $CD_3$；

$R^2$不存在或為連接子；

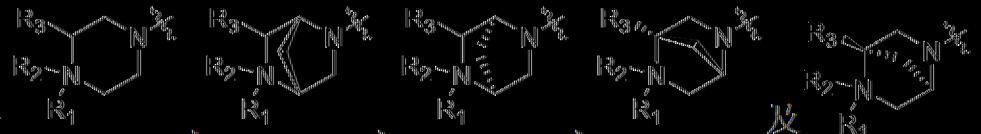
$R^3$係選自氫、$C_1$-$C_6$烷基、$C_1$-$C_6$烷基烷氧基、$C_1$-$C_6$烷基胺基、$C_1$-$C_6$烷基羧酸基團、$C_1$-$C_6$烷基羥基、$C_3$-$C_8$環烷基、苯甲基、$C_3$-$C_8$雜環基及-O-C(=O)-($C_1$-$C_6$烷基)基團；且

$R^4$、$R^5$及$R^8$各自獨立地選自氫、羥基、-O-($C_1$-$C_6$烷基)基團、-O-C(=O)-($C_1$-$C_6$烷基)基團及$C_1$-$C_6$烷基；

$R^6$及$R^7$各自獨立地選自氫、-O-$R^{17}$、-O-C(=O)-$R^{17}$、-O-C(=O)-$NR^{15}R^{16}$、$C_1$-$C_6$烷基、-$NR^{15}R^{16}$及連接子；

$R^{15}$及$R^{16}$各自獨立地選自氫、$R^{17}$、-C(=O)-$R^{17}$及-C(=O)-O-$R^{17}$；

$R^{17}$係選自氫、$C_1$-$C_6$烷基、$C_3$-$C_8$環烷基、苯甲基及$C_3$-$C_8$雜環基；且

Z''係選自  ；

其中$R^1$、$R^2$、$R^3$、$R^4$、$R^5$、$R^6$、$R^7$、$R^8$、$R^{15}$、$R^{16}$及$R^{17}$各自獨立地經0至3個獨立地選自以下之基團取代：鹵素、羥基、$C_1$-$C_6$烷基、-O-($C_1$-$C_6$烷基)基團、-$NR^{15}R^{16}$、$C_3$-$C_8$環烷基、$C_1$-$C_6$烷基羥基、$C_1$-$C_6$烷基烷氧基、苯甲基及$C_3$-$C_8$雜環基；

其中$R^6$及$R^7$中至少一個係氫；且

其中若$R^2$係連接子，則$R^6$及$R^7$均不為連接子，且若$R^6$或$R^7$係連接子，則$R^2$不存在。

〔0609〕在一些實施例中，$R^1$係選自不存在、氫、$C_1$-$C_4$烷基、$C_1$-$C_4$烷基羧酸基團及$C_3$-$C_8$環烷基。在一些實施例中，$R^1$不存在。在一些實施例中，$R^1$係氫。在一些實施例中，$R^1$係$C_1$-$C_4$烷基。在一些實施例

中，$R^1$ 係甲基。在一些實施例中，$R^1$ 係乙基。在一些實施例中，$R^1$ 係 $C_1$-$C_4$ 烷基羧酸基團。在一些實施例中，$R^1$ 係-$CH_2CH_2CH_2CO_2H$。在一些實施例中，$R^1$ 係 $C_3$-$C_8$ 環烷基。在一些實施例中，$R^1$ 係環庚基。

【0610】 在一些實施例中，$R^3$ 係選自氫、$C_1$-$C_4$ 烷基、$C_1$-$C_4$ 烷基烷氧基、$C_1$-$C_4$ 烷基羧酸基團及 $C_1$-$C_4$ 烷基羥基。在一些實施例中，$R^3$ 係選自氫及 $C_1$-$C_4$ 烷基羧酸基團。在一些實施例中，$R^3$ 係氫。在一些實施例中，$R^3$ 係 $C_1$-$C_4$ 烷基羧酸基團。在一些實施例中，$R^3$ 係-$CH_2CH_2CO_2H$。

【0611】 在一些實施例中，$R^4$ 係選自氫、羥基、-O-($C_1$-$C_4$ 烷基)基團、-O-C(=O)-($C_1$-$C_4$ 烷基)基團及 $C_1$-$C_4$ 烷基。在一些實施例中，$R^4$ 係氫。在一些實施例中，$R^4$ 係羥基。在一些實施例中，$R^4$ 係-O-($C_1$-$C_4$ 烷基)基團。在一些實施例中，$R^4$ 係-$OCH_3$。在一些實施例中，$R^4$ 係-$OCH_2CH_3$。在一些實施例中，$R^4$ 係-O-C(=O)-($C_1$-$C_4$ 烷基) 基團。在一些實施例中，$R^4$ 係-O-C(=O)-$CH_3$。在一些實施例中，$R^4$ 係-O-C(=O)-$CH_2CH_3$。在一些實施例中，$R^4$ 係 $C_1$-$C_4$ 烷基。在一些實施例中，$R^4$ 係甲基。在一些實施例中，$R^4$ 係乙基。

【0612】 在一些實施例中，$R^5$ 係選自氫、羥基、-O-($C_1$-$C_4$ 烷基)基團及 $C_1$-$C_4$ 烷基。在一些實施例中，$R^5$ 係氫。在一些實施例中，$R^5$ 係羥基。在一些實施例中，$R^5$ 係-O-($C_1$-$C_4$ 烷基) 基團。在一些實施例中，$R^5$ 係 $C_1$-$C_4$ 烷基。

【0613】 在一些實施例中，$R^2$ 不存在且 $R^6$ 係連接子。在一些實施例中，$R^2$ 不存在且 $R^7$ 係連接子。在一些實施例中，$R^2$ 係連接子。在一些實施例中，$R^6$ 係氫。在一些實施例中，$R^7$ 係氫。

【0614】 在一些實施例中，$R^6$ 係氫且 $R^7$ 係-O-$R^{17}$。在一些實施例

中，$R^6$係氫且 $R^7$係-$OR^{17}$，其中 $R^{17}$係選自氫及 $C^1$-$C^4$烷基。在一些實施例中，$R^6$係氫且 $R^7$係-O-$R^{17}$，其中 $R^{17}$係氫。在一些實施例中，$R^6$係-O-$R^{17}$且 $R^7$係氫。在一些實施例中，$R^6$係-O-$R^{17}$且 $R^7$係氫，其中 $R^{17}$係選自氫及 $C^1$-$C^4$烷基。在一些實施例中，$R^6$係-O-$R^{17}$且 $R^7$係氫，其中 $R^{17}$係氫。在一些實施例中，$R^6$係氫且 $R^7$係-$NR^{15}R^{16}$。在一些實施例中，$R^6$係氫且 $R^7$係-$NR^{15}R^{16}$，其中 $R^{15}$係 H 且 $R^{16}$係選自氫、$R^{17}$、-C(=O)-$R^{17}$及-C(=O)-O-$R^{17}$。在一些實施例中，$R^6$係氫且 $R^7$係-$NR^{15}R^{16}$，其中 $R^{15}$係 H 且 $R^{16}$係選自氫、$R^{17}$、-C(=O)-$R^{17}$及-C(=O)-O-$R^{17}$，且其中 $R^{17}$係選自氫、$C_1$-$C_6$烷基、$C_3$-$C_8$環烷基及 $C_3$-$C_8$雜環基。在一些實施例中，$R^6$係-O-$R^{17}$。在一些實施例中，$R^6$係-O-C(=O)-$R^{17}$。在一些實施例中，$R^6$係 $C_1$-$C_6$烷基。在一些實施例中，$R^6$係 $C_1$-$C_4$烷基。在一些實施例中，$R^6$係 $C_1$烷基。在一些實施例中，$R^6$係-$NR^{15}R^{16}$。

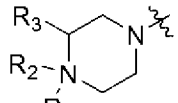
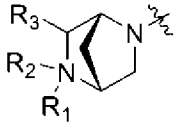
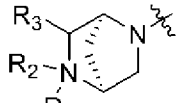
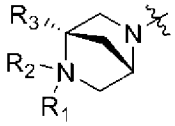
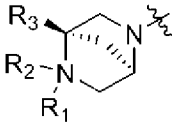
【0615】在一些實施例中，$R^7$係-O-$R^{17}$。在一些實施例中，$R^7$係-O-C(=O)-$R^{17}$。在一些實施例中，$R^7$係 $C_1$-$C_6$烷基。在一些實施例中，$R^7$係 $C_1$-$C_4$烷基。在一些實施例中，$R^7$係 $C_1$烷基。在一些實施例中，$R^7$係-$NR^{15}R^{16}$。

【0616】在一些實施例中，$R^8$係選自氫、羥基、-O-($C_1$-$C_4$烷基)基團及 ($C_1$-$C_4$烷基)。在一些實施例中，$R^8$係氫。在一些實施例中，$R^8$係羥基。在一些實施例中，$R^8$係-O-($C_1$-$C_4$烷基)基團。在一些實施例中，$R^8$係-O-($C_1$烷基)基團。

【0617】在一些實施例中，$R^{15}$係氫。在一些實施例中，$R^{15}$係 $R^{17}$。在一些實施例中，$R^{15}$係-C(=O)-$R^{17}$。在一些實施例中，$R^{15}$係-C(=O)-O-$R^{17}$。

【0618】在一些實施例中，$R^{16}$ 係氫。在一些實施例中，$R^{16}$ 係 $R^{17}$。在一些實施例中，$R^{16}$ 係-C(=O)-$R^{17}$。在一些實施例中，$R^{16}$ 係-C(=O)-O-$R^{17}$。

【0619】在一些實施例中，$R^{17}$ 係選自氫、$C_1$-$C_4$ 烷基、$C_3$-$C_6$ 環烷基及 $C_3$-$C_8$ 雜環基。在一些實施例中，$R^{17}$ 係氫。在一些實施例中，$R^{17}$ 係 $C_1$-$C_4$ 烷基。在一些實施例中，$R^{17}$ 係 $C_1$ 烷基。在一些實施例中，$R^{17}$ 係 $C_3$-$C_6$ 環烷基。在一些實施例中，$R^{17}$ 係 $C_3$ 環烷基。在一些實施例中，$R^{17}$ 係 $C_4$ 環烷基。在一些實施例中，$R^{17}$ 係 $C_5$ 環烷基。在一些實施例中，$R^{17}$ 係 $C_6$ 環烷基。在一些實施例中，$R^{17}$ 係 $C_3$-$C_8$ 雜環基。在一些實施例中，$R^{17}$ 係 $C_3$ 雜環基。在一些實施例中，$R^{17}$ 係 $C_4$ 雜環基。在一些實施例中，$R^{17}$ 係 $C_5$ 雜環基。在一些實施例中，$R^{17}$ 係 $C_6$ 雜環基。在一些實施例中，$R^{17}$ 係 $C_7$ 雜環基。在一些實施例中，$R^{17}$ 係 $C_8$ 雜環基。

【0620】在一些實施例中，Z'係  。在一些實施例中，Z'係  。在一些實施例中，Z'係  。在一些實施例中，Z'係  。在一些實施例中，Z'係  。

【0621】在一些實施例中，$R^2$ 係連接子。在一些實施例中，該連接子包含至少一個可裂解肽部分。在一些實施例中，該至少一個可裂解肽部分可藉由酶裂解。在一些實施例中，該連接子或可裂解肽部分包含至少一個胺基酸單元。在一些實施例中，該至少一個胺基酸單元係選自精胺酸、組胺酸、離胺酸、天冬胺酸、麩胺酸、絲胺酸、蘇胺酸、天冬醯胺、麩醯胺酸、半胱胺酸、硒半胱胺酸、甘胺酸、脯胺酸、丙胺酸、纈胺酸、異白

胺酸、甲硫胺酸、苯丙胺酸、酪胺酸、色胺酸及瓜胺酸。在一些實施例中，該至少一個胺基酸單元係選自丙胺酸、瓜胺酸及纈胺酸。在一些實施例中，連接子包含瓜胺酸及纈胺酸。在一些實施例中，連接子包含丙胺酸及纈胺酸。

【0622】 在一些實施例中，連接子包含選自磺醯胺、β-葡萄糖醛酸苷、二硫化物及羰基之部分。在一些實施例中，連接子包含磺醯胺。在一些實施例中，連接子包含 β-葡萄糖醛酸苷。在一些實施例中，連接子包含二硫化物。在一些實施例中，連接子包含羰基。

【0623】 在一些實施例中，該連接子包含間隔子單元。在一些實施例中，該間隔子單元係選自烷基及聚乙二醇(PEG)部分。在一些實施例中，該烷基係 $C_1$-$C_{12}$ 烷基。在一些實施例中，該烷基係 $C_1$-$C_6$ 烷基。在一些實施例中，該烷基係亞甲基。在一些實施例中，該烷基係伸乙基。在一些實施例中，該烷基係伸正丙基。在一些實施例中，該烷基係伸正丁基。在一些實施例中，該烷基係伸正戊基。在一些實施例中，該烷基係伸正己基。在一些實施例中，PEG 部分包含-$(PEG)_m$-，其中 m 係 1 至 10 之整數。在一些實施例中，m 係 1。在一些實施例中，m 係 2。在一些實施例中，m 係 3。在一些實施例中，m 係 4。在一些實施例中，m 係 5。在一些實施例中，m 係 6。

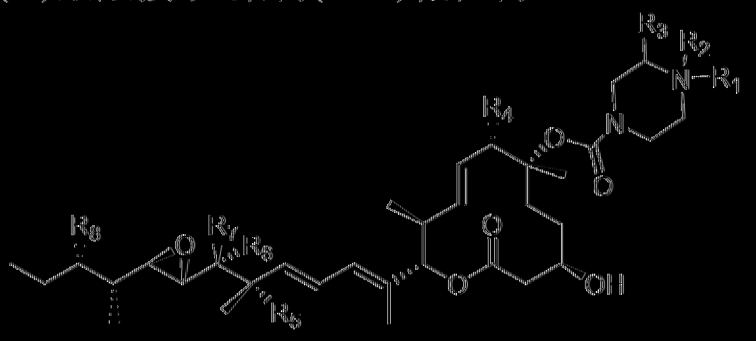
【0624】 在一些實施例中，連接子包含順丁烯二醯亞胺(Mal)部分(「Mal-間隔子單元」)。在一些實施例中，該連接子包含自我分解型間隔子單元。在一些實施例中，該自我分解型間隔子單元係選自對胺基苯甲氧基羰基(pABC)及對胺基苯甲基(pAB)。

【0625】 在一些實施例中，連接子包含 Mal-間隔子單元、烷基、至

少一個胺基酸單元及自我分解型間隔子。在一典實施例中，至少一個胺基酸單元係選自內胺酸、瓜胺酸及纈胺酸。在一典實施例中，該至少一個胺基酸單元包含內胺酸及纈胺酸。在一典實施例中，該至少一個胺基酸單元包含瓜胺酸及纈胺酸。在一典實施例中，該自我分解型間隔子係選自 pAB 及 pABC。在一典實施例中，該自我分解型間隔子包含 pAB。在一典實施例中，該自我分解型間隔子包含 pABC。在一典實施例中，該烷基包含 $C_1$-$C_6$烷基。

[0626] 在一典實施例中，連接子包含 Mal 間隔子單元、PEG 部分、至少一個胺基酸單元及自我分解型間隔子。在一典實施例中，至少一個胺基酸單元係選自內胺酸、瓜胺酸及纈胺酸。在一典實施例中，該至少一個胺基酸單元包含內胺酸及纈胺酸。在一典實施例中，該至少一個胺基酸單元包含瓜胺酸及纈胺酸。在一典實施例中，該自我分解型間隔子係選自 pAB 及 pABC。在一典實施例中，該自我分解型間隔子包含 pAB。在一典實施例中，該自我分解型間隔子包含 pABC。在一典實施例中，PEG 部分包含 $(PEG)_m$，其中 m 係 1 至 6 之整數。

[0627] 在各種其他實施例中，本文所揭示之連接子-藥物(L-D)化合物包含根據式(V)之連接子-藥物結構。在各種實施例中，本發明提供一種式(V)之連接子-藥物(L-D)化合物：



(V)，或其醫藥學上可接受之鹽，其中：

$R^1$ 係選自不存在、氫、$C_1$-$C_6$ 烷基、$C_1$-$C_6$ 烷基烷氧基、$C_1$-$C_6$ 烷基胺基、$C_1$-$C_6$ 烷基羧酸基團、$C_1$-$C_6$ 烷基羥基、$C_3$-$C_8$ 環烷基、苯甲基、$C_3$-$C_8$ 雜環基、-O-C(=O)-($C_1$-$C_6$ 烷基)基團及-$CD_3$；

$R^2$ 不存在或為連接子；

$R^3$ 係選自氫、$C_1$-$C_6$ 烷基、$C_1$-$C_6$ 烷基烷氧基、$C_1$-$C_6$ 烷基胺基、$C_1$-$C_6$ 烷基羧酸基團、$C_1$-$C_6$ 烷基羥基、$C_3$-$C_8$ 環烷基、苯甲基、$C_3$-$C_8$ 雜環基及-O-C(=O)-($C_1$-$C_6$ 烷基)基團；且

$R^4$、$R^5$ 及 $R^8$ 各自獨立地選自氫、羥基、-O-($C_1$-$C_6$ 烷基)基團、-O-C(=O)-($C_1$-$C_6$ 烷基)基團及 $C_1$-$C_6$ 烷基；

$R^6$ 及 $R^7$ 各自獨立地選自氫、-O-$R^{17}$、-O-C(=O)-$R^{17}$、-O-C(=O)-$NR^{15}R^{16}$、$C_1$-$C_6$ 烷基、-$NR^{15}R^{16}$ 及連接子；

$R^{15}$ 及 $R^{16}$ 各自獨立地選自氫、$R^{17}$、-C(=O)-$R^{17}$ 及-C(=O)-O-$R^{17}$；且

$R^{17}$ 係選自氫、$C_1$-$C_6$ 烷基、$C_3$-$C_8$ 環烷基、苯甲基及 $C_3$-$C_8$ 雜環基；

其中 $R^1$、$R^2$、$R^3$、$R^4$、$R^5$、$R^6$、$R^7$、$R^8$、$R^{15}$、$R^{16}$ 及 $R^{17}$ 各自獨立地經 0 至 3 個獨立地選自以下之基團取代：鹵素、羥基、$C_1$-$C_6$ 烷基、-O-($C_1$-$C_6$ 烷基)基團、-$NR^{15}R^{16}$、$C_3$-$C_8$ 環烷基、$C_1$-$C_6$ 烷基羥基、$C_1$-$C_6$ 烷基烷氧基、苯甲基及 $C_3$-$C_8$ 雜環基；

其中 $R^6$ 及 $R^7$ 中至少一個係氫；且

其中若 $R^2$ 係連接子，則 $R^6$ 及 $R^7$ 均不為連接子，且若 $R^6$ 或 $R^7$ 係連接子，則 $R^2$ 不存在。

【0628】 在一些實施例中，$R^1$ 係選自不存在、氫、$C_1$-$C_4$ 烷基、$C_1$-$C_4$ 烷基羧酸基團及 $C_3$-$C_8$ 環烷基。在一些實施例中，$R^1$ 不存在。在一些

實施例中，$R^1$ 係氫。在一些實施例中，$R^1$ 係 $C_1$-$C_4$ 烷基。在一些實施例中，$R^1$ 係甲基。在一些實施例中，$R^1$ 係乙基。在一些實施例中，$R^1$ 係 $C_1$-$C_4$ 烷基羧酸基團。在一些實施例中，$R^1$ 係-$CH_2CH_2CH_2CO_2H$。在一些實施例中，$R^1$ 係 $C_3$-$C_8$ 環烷基。在一些實施例中，$R^1$ 係環庚基。

【0629】 在一些實施例中，$R^3$ 係選自氫、$C_1$-$C_4$ 烷基、$C_1$-$C_4$ 烷基烷氧基、$C_1$-$C_4$ 烷基羧酸基團及 $C_1$-$C_4$ 烷基羥基。在一些實施例中，$R^3$ 係選自氫及 $C_1$-$C_4$ 烷基羧酸基團。在一些實施例中，$R^3$ 係氫。在一些實施例中，$R^3$ 係 $C_1$-$C_4$ 烷基羧酸基團。在一些實施例中，$R^3$ 係-$CH_2CH_2CO_2H$。

【0630】 在一些實施例中，$R^4$ 係選自氫、羥基、-O-($C_1$-$C_4$ 烷基)基團、-O-C(=O)-($C_1$-$C_4$ 烷基)基團及 $C_1$-$C_4$ 烷基。在一些實施例中，$R^4$ 係氫。在一些實施例中，$R^4$ 係羥基。在一些實施例中，$R^4$ 係-O-($C_1$-$C_4$ 烷基)基團。在一些實施例中，$R^4$ 係-$OCH_3$。在一些實施例中，$R^4$ 係-$OCH_2CH_3$。在一些實施例中，$R^4$ 係-O-C(=O)-($C_1$-$C_4$ 烷基)基團。在一些實施例中，$R^4$ 係-O-C(=O)-$CH_3$。在一些實施例中，$R^4$ 係-O-C(=O)-$CH_2CH_3$。在一些實施例中，$R^4$ 係 $C_1$-$C_4$ 烷基。在一些實施例中，$R^4$ 係甲基。在一些實施例中，$R^4$ 係乙基。

【0631】 在一些實施例中，$R^5$ 係選自氫、羥基、-O-($C_1$-$C_4$ 烷基)基團及 $C_1$-$C_4$ 烷基。在一些實施例中，$R^5$ 係氫。在一些實施例中，$R^5$ 係羥基。在一些實施例中，$R^5$ 係-O-($C_1$-$C_4$ 烷基)基團。在一些實施例中，$R^5$ 係 $C_1$-$C_4$ 烷基。

【0632】 在一些實施例中，$R^2$ 不存在且 $R^6$ 係連接子。在一些實施例中，$R^2$ 不存在且 $R^7$ 係連接子。在一些實施例中，$R^2$ 係連接子。在一些實施例中，$R^6$ 係氫。在一些實施例中，$R^7$ 係氫。

【0633】在一些實施例中，$R^6$ 係氫且 $R^7$ 係-O-$R^{17}$。在一些實施例中，$R^6$ 係氫且 $R^7$ 係-O$R^{17}$，其中 $R^{17}$ 係選自氫及 $C^1$-$C^4$ 烷基。在一些實施例中，$R^6$ 係氫且 $R^7$ 係-O-$R^{17}$，其中 $R^{17}$ 係氫。在一些實施例中，$R^6$ 係-O-$R^{17}$ 且 $R^7$ 係氫。在一些實施例中，$R^6$ 係-O-$R^{17}$ 且 $R^7$ 係氫，其中 $R^{17}$ 係選自氫及 $C^1$-$C^4$ 烷基。在一些實施例中，$R^6$ 係-O-$R^{17}$ 且 $R^7$ 係氫，其中 $R^{17}$ 係氫。在一些實施例中，$R^6$ 係氫且 $R^7$ 係-N$R^{15}R^{16}$。在一些實施例中，$R^6$ 係氫且 $R^7$ 係-N$R^{15}R^{16}$，其中 $R^{15}$ 係 H 且 $R^{16}$ 係選自氫、$R^{17}$、-C(=O)-$R^{17}$ 及-C(=O)-O-$R^{17}$。在一些實施例中，$R^6$ 係氫且 $R^7$ 係-N$R^{15}R^{16}$，其中 $R^{15}$ 係 H 且 $R^{16}$ 係選自氫、$R^{17}$、-C(=O)-$R^{17}$ 及-C(=O)-O-$R^{17}$，且其中 $R^{17}$ 係選自氫、$C_1$-$C_6$ 烷基、$C_3$-$C_8$ 環烷基及 $C_3$-$C_8$ 雜環基。在一些實施例中，$R^6$ 係-O-$R^{17}$。在一些實施例中，$R^6$ 係-O-C(=O)-$R^{17}$。在一些實施例中，$R^6$ 係 $C_1$-$C_6$ 烷基。在一些實施例中，$R^6$ 係 $C_1$-$C_4$ 烷基。在一些實施例中，$R^6$ 係 $C_1$ 烷基。在一些實施例中，$R^6$ 係-N$R^{15}R^{16}$。

【0634】在一些實施例中，$R^7$ 係-O-$R^{17}$。在一些實施例中，$R^7$ 係-O-C(=O)-$R^{17}$。在一些實施例中，$R^7$ 係 $C_1$-$C_6$ 烷基。在一些實施例中，$R^7$ 係 $C_1$-$C_4$ 烷基。在一些實施例中，$R^7$ 係 $C_1$ 烷基。在一些實施例中，$R^7$ 係-N$R^{15}R^{16}$。

【0635】在一些實施例中，$R^8$ 係選自氫、羥基、-O-($C_1$-$C_4$ 烷基)基團及($C_1$-$C_4$ 烷基)。在一些實施例中，$R^8$ 係氫。在一些實施例中，$R^8$ 係羥基。在一些實施例中，$R^8$ 係-O-($C_1$-$C_4$ 烷基)基團。在一些實施例中，$R^8$ 係-O-($C_1$ 烷基)基團。

【0636】在一些實施例中，$R^{15}$ 係氫。在一些實施例中，$R^{15}$ 係 $R^{17}$。在一些實施例中，$R^{15}$ 係-C(=O)-$R^{17}$。在一些實施例中，$R^{15}$ 係-

C(=O)-O-$R^{17}$。

【0637】在一些實施例中，$R^{16}$係氫。在一些實施例中，$R^{16}$係$R^{17}$。在一些實施例中，$R^{16}$係-C(=O)-$R^{17}$。在一些實施例中，$R^{16}$係-C(=O)-O-$R^{17}$。

【0638】在一些實施例中，$R^{17}$係選自氫、$C_1$-$C_4$烷基、$C_3$-$C_6$環烷基及$C_3$-$C_8$雜環基。在一些實施例中，$R^{17}$係氫。在一些實施例中，$R^{17}$係$C_1$-$C_4$烷基。在一些實施例中，$R^{17}$係$C_1$烷基。在一些實施例中，$R^{17}$係$C_3$-$C_6$環烷基。在一些實施例中，$R^{17}$係$C_3$環烷基。在一些實施例中，$R^{17}$係$C_4$環烷基。在一些實施例中，$R^{17}$係$C_5$環烷基。在一些實施例中，$R^{17}$係$C_6$環烷基。在一些實施例中，$R^{17}$係$C_3$-$C_8$雜環基。在一些實施例中，$R^{17}$係$C_3$雜環基。在一些實施例中，$R^{17}$係$C_4$雜環基。在一些實施例中，$R^{17}$係$C_5$雜環基。在一些實施例中，$R^{17}$係$C_6$雜環基。在一些實施例中，$R^{17}$係$C_7$雜環基。在一些實施例中，$R^{17}$係$C_8$雜環基。

【0639】在一些實施例中，$R^2$係連接子。在一些實施例中，該連接子包含至少一個可裂解肽部分。在一些實施例中，該至少一個可裂解肽部分可藉由酶裂解。在一些實施例中，該連接子或可裂解肽部分包含至少一個胺基酸單元。在一些實施例中，該至少一個胺基酸單元係選自精胺酸、組胺酸、離胺酸、天冬胺酸、麩胺酸、絲胺酸、蘇胺酸、天冬醯胺、麩醯胺酸、半胱胺酸、硒半胱胺酸、甘胺酸、脯胺酸、丙胺酸、纈胺酸、異白胺酸、甲硫胺酸、苯丙胺酸、酪胺酸、色胺酸及瓜胺酸。在一些實施例中，該至少一個胺基酸單元係選自丙胺酸、瓜胺酸及纈胺酸。在一些實施例中，連接子包含瓜胺酸及纈胺酸。在一些實施例中，連接子包含丙胺酸及纈胺酸。

【0640】 在一些實施例中，連接子包含選自磺醯胺、β-葡萄糖醛酸苷、二硫化物及羰基之部分。在一些實施例中，連接子包含磺醯胺。在一些實施例中，連接子包含 β-葡萄糖醛酸苷。在一些實施例中，連接子包含二硫化物。在一些實施例中，連接子包含羰基。

【0641】 在一些實施例中，該連接子包含間隔子單元。在一些實施例中，該間隔子單元係選自烷基及聚乙二醇(PEG)部分。在一些實施例中，該烷基係 $C_1$-$C_{12}$ 烷基。在一些實施例中，該烷基係 $C_1$-$C_6$ 烷基。在一些實施例中，該烷基係亞甲基。在一些實施例中，該烷基係伸乙基。在一些實施例中，該烷基係伸正丙基。在一些實施例中，該烷基係伸正丁基。在一些實施例中，該烷基係伸正戊基。在一些實施例中，該烷基係伸正己基。在一些實施例中，PEG 部分包含-$(PEG)_m$-，其中 m 係 1 至 10 之整數。在一些實施例中，m 係 1。在一些實施例中，m 係 2。在一些實施例中，m 係 3。在一些實施例中，m 係 4。在一些實施例中，m 係 5。在一些實施例中，m 係 6。

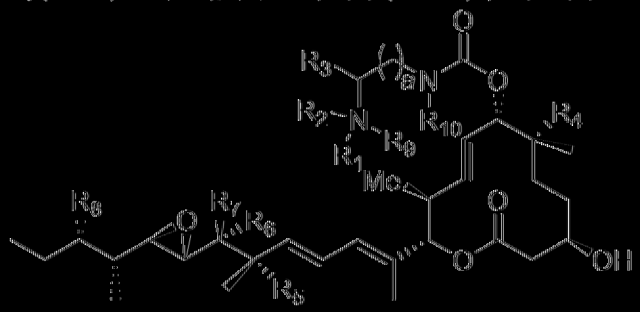
【0642】 在一些實施例中，連接子包含順丁烯二醯亞胺(Mal)部分(「Mal-間隔子單元」)。在一些實施例中，該連接子包含自我分解型間隔子單元。在一些實施例中，該自我分解型間隔子單元係選自對胺基苯甲氧基羰基(pABC)及對胺基苯甲基(pAB)。

【0643】 在一些實施例中，連接子包含 Mal-間隔子單元、烷基、至少一個胺基酸單元及自我分解型間隔子。在一些實施例中，至少一個胺基酸單元係選自丙胺酸、瓜胺酸及纈胺酸。在一些實施例中，該至少一個胺基酸單元包含丙胺酸及纈胺酸。在一些實施例中，該至少一個胺基酸單元包含瓜胺酸及纈胺酸。在一些實施例中，該自我分解型間隔子係選自

pAB 及 pABC。在一典實施例中，該自我分解型間隔子包含 pAB。在一典實施例中，該自我分解型間隔子包含 pABC。在一典實施例中，該烷基包含 $C_1$-$C_6$ 烷基。

[0644] 在一典實施例中，連接子包含 Mal 間隔子單元、PEG 部分、至少一個胺基酸單元及自我分解型間隔子。在一典實施例中，至少一個胺基酸單元係選自丙胺酸、瓜胺酸及纈胺酸。在一典實施例中，該至少一個胺基酸單元包含丙胺酸及纈胺酸。在一典實施例中，該至少一個胺基酸單元包含瓜胺酸及纈胺酸。在一典實施例中，該自我分解型間隔子係選自 pAB 及 pABC。在一典實施例中，該自我分解型間隔子包含 pAB。在一典實施例中，該自我分解型間隔子包含 pABC。在一典實施例中，PEG 部分包含 $(PEG)_m$，其中 m 係 1 至 6 之整數。

[0645] 在各種其他實施例中，本文所揭示之連接子-藥物(L-D)化合物包含根據式(VII)之連接子-藥物結構。在各種實施例中，本發明提供一種式(VII)之連接子-藥物(L-D)化合物：



(VII)，或其醫藥學上可接受之鹽，其中：

$R^1$ 及 $R^9$ 各自獨立地選自不存在、氫、$C_1$-$C_6$ 烷基、$C_1$-$C_6$ 烷基烷氧基、$C_1$-$C_6$ 烷基胺基、$C_1$-$C_6$ 烷基羧酸基團、$C_1$-$C_6$ 烷基羥基、$C_3$-$C_8$ 環烷基、苯甲基、$C_3$-$C_8$ 雜環基、-O-C(=O)-($C_1$-$C_6$ 烷基)基團及 $CD_3$；

$R^2$ 不存在或為連接子；

$R^3$ 係選自氫、$C_1$-$C_6$ 烷基、$C_1$-$C_6$ 烷基烷氧基、$C_1$-$C_6$ 烷基胺基、$C_1$-$C_6$ 烷基羧酸基團、$C_1$-$C_6$ 烷基羥基、$C_3$-$C_8$ 環烷基、苯甲基、$C_3$-$C_8$ 雜環基及-O-C(=O)-($C_1$-$C_6$ 烷基)基團；

$R^4$、$R^5$ 及 $R^8$ 各自獨立地選自氫、羥基、-O-($C_1$-$C_6$ 烷基)基團、-O-C(=O)-($C_1$-$C_6$ 烷基)基團及 $C_1$-$C_6$ 烷基；

$R^6$ 及 $R^7$ 各自獨立地選自氫、-O-$R^{17}$、-O-C(=O)-$R^{17}$、-O-C(=O)-$NR^{15}R^{16}$、$C_1$-$C_6$ 烷基、-$NR^{15}R^{16}$ 及連接子；

$R^{10}$ 係選自氫、$C_1$-$C_6$ 烷基、-C(=O)-($C_1$-$C_6$ 烷基)基團及-$CD_3$；

$R^{15}$ 及 $R^{16}$ 各自獨立地選自氫、$R^{17}$、-C(=O)-$R^{17}$ 及-C(=O)-O-$R^{17}$；

$R^{17}$ 係選自氫、$C_1$-$C_6$ 烷基、$C_3$-$C_8$ 環烷基、苯甲基及 $C_3$-$C_8$ 雜環基；且

a 係 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10；

其中 $R^1$、$R^2$、$R^3$、$R^4$、$R^5$、$R^6$、$R^7$、$R^8$、$R^9$、$R^{10}$、$R^{15}$、$R^{16}$ 及 $R^{17}$ 各自獨立地經 0 至 3 個獨立地選自以下之基團取代：鹵素、羥基、$C_1$-$C_6$ 烷基、-O-($C_1$-$C_6$ 烷基)基團、-$NR^{15}R^{16}$、$C_3$-$C_8$ 環烷基、$C_1$-$C_6$ 烷基羥基、$C_1$-$C_6$ 烷基烷氧基、苯甲基及 $C_3$-$C_8$ 雜環基；

其中 $R^6$ 及 $R^7$ 中至少一個係氫；

其中若 $R^2$ 係連接子，則 $R^6$ 及 $R^7$ 均不為連接子，且若 $R^6$ 或 $R^7$ 係連接子，則 $R^2$ 不存在；且

其中 $R^1$ 及 $R^9$ 不能同時不存在。

【0646】 在一些實施例中，$R^1$ 係選自不存在、氫、$C_1$-$C_4$ 烷基、$C_1$-$C_4$ 烷基羧酸基團及 $C_3$-$C_8$ 環烷基。在一些實施例中，$R^1$ 不存在。在一些實施例中，$R^1$ 係氫。在一些實施例中，$R^1$ 係 $C_1$-$C_4$ 烷基。在一些實施例

中，$R^1$ 係甲基。在一些實施例中，$R^1$ 係乙基。在一些實施例中，$R^1$ 係 $C_1$-$C_4$ 烷基羧酸基團。在一些實施例中，$R^1$ 係-$CH_2CH_2CH_2CO_2H$。在一些實施例中，$R^1$ 係 $C_3$-$C_8$ 環烷基。在一些實施例中，$R^1$ 係環庚基。

【0647】 在一些實施例中，$R^3$ 係選自氫、$C_1$-$C_4$ 烷基、$C_1$-$C_4$ 烷基烷氧基、$C_1$-$C_4$ 烷基羧酸基團及 $C_1$-$C_4$ 烷基羥基。在一些實施例中，$R^3$ 係選自氫及 $C_1$-$C_4$ 烷基羧酸基團。在一些實施例中，$R^3$ 係氫。在一些實施例中，$R^3$ 係 $C_1$-$C_4$ 烷基羧酸基團。在一些實施例中，$R^3$ 係-$CH_2CH_2CO_2H$。

【0648】 在一些實施例中，$R^4$ 係選自氫、羥基、-O-($C_1$-$C_4$ 烷基)基團、-O-C(=O)-($C_1$-$C_4$ 烷基)基團及 $C_1$-$C_4$ 烷基。在一些實施例中，$R^4$ 係氫。在一些實施例中，$R^4$ 係羥基。在一些實施例中，$R^4$ 係-O-($C_1$-$C_4$ 烷基)基團。在一些實施例中，$R^4$ 係-$OCH_3$。在一些實施例中，$R^4$ 係-$OCH_2CH_3$。在一些實施例中，$R^4$ 係-O-C(=O)-($C_1$-$C_4$ 烷基)基團。在一些實施例中，$R^4$ 係-O-C(=O)-$CH_3$。在一些實施例中，$R^4$ 係-O-C(=O)-$CH_2CH_3$。在一些實施例中，$R^4$ 係 $C_1$-$C_4$ 烷基。在一些實施例中，$R^4$ 係甲基。在一些實施例中，$R^4$ 係乙基。

【0649】 在一些實施例中，$R^5$ 係選自氫、羥基、-O-($C_1$-$C_4$ 烷基)基團及 $C_1$-$C_4$ 烷基。在一些實施例中，$R^5$ 係氫。在一些實施例中，$R^5$ 係羥基。在一些實施例中，$R^5$ 係-O-($C_1$-$C_4$ 烷基)基團。在一些實施例中，$R^5$ 係 $C_1$-$C_4$ 烷基。

【0650】 在一些實施例中，$R^9$ 係選自不存在、氫、$C_1$-$C_4$ 烷基、-(C=O)-($C_1$-$C_4$ 烷基)基團及-$CD_3$。在一些實施例中，$R^9$ 不存在。在一些實施例中，$R^9$ 係氫。在一些實施例中，$R^9$ 係 $C_1$-$C_4$ 烷基。在一些實施例中，該 $C_1$-$C_4$ 烷基係甲基。在一些實施例中，該 $C_1$-$C_4$ 烷基係乙基。在一

些實施例中，$R^9$ 係-(C=O)-($C_1$-$C_4$ 烷基)基團。在一些實施例中，該-(C=O)-($C_1$-$C_4$ 烷基)基團係-(C=O)-甲基。在一些實施例中，$R^9$ 係-$CD_3$。

【0651】在一些實施例中，$R^{10}$ 係選自氫、$C_1$-$C_4$ 烷基、-(C=O)-($C_1$-$C_4$ 烷基)基團及-$CD_3$。在一些實施例中，$R^{10}$ 係氫。在一些實施例中，$R^{10}$ 係 $C_1$-$C_4$ 烷基。在一些實施例中，該 $C_1$-$C_4$ 烷基係甲基。在一些實施例中，該 $C_1$-$C_4$ 烷基係乙基。在一些實施例中，$R^{10}$ 係-(C=O)-($C_1$-$C_4$ 烷基)基團。在一些實施例中，該-(C=O)-($C_1$-$C_4$ 烷基)基團係-(C=O)-甲基。在一些實施例中，$R^{10}$ 係-$CD_3$。

【0652】在一些實施例中，$R^2$ 不存在且 $R^6$ 係連接子。在一些實施例中，$R^2$ 不存在且 $R^7$ 係連接子。在一些實施例中，$R^2$ 係連接子。在一些實施例中，$R^6$ 係氫。在一些實施例中，$R^7$ 係氫。在一些實施例中，$R^6$ 係氫且 $R^7$ 係-O-$R^{17}$。在一些實施例中，$R^6$ 係氫且 $R^7$ 係-O$R^{17}$，其中 $R^{17}$ 係選自氫及 $C^1$-$C^4$ 烷基。在一些實施例中，$R^6$ 係氫且 $R^7$ 係-O-$R^{17}$，其中 $R^{17}$ 係氫。在一些實施例中，$R^6$ 係-O-$R^{17}$ 且 $R^7$ 係氫。在一些實施例中，$R^6$ 係-O-$R^{17}$ 且 $R^7$ 係氫，其中 $R^{17}$ 係選自氫及 $C^1$-$C^4$ 烷基。在一些實施例中，$R^6$ 係-O-$R^{17}$ 且 $R^7$ 係氫，其中 $R^{17}$ 係氫。在一些實施例中，$R^6$ 係氫且 $R^7$ 係-N$R^{15}R^{16}$。在一些實施例中，$R^6$ 係氫且 $R^7$ 係-N$R^{15}R^{16}$，其中 $R^{15}$ 係 H 且 $R^{16}$ 係選自氫、$R^{17}$、-C(=O)-$R^{17}$ 及-C(=O)-O-$R^{17}$。在一些實施例中，$R^6$ 係氫且 $R^7$ 係-N$R^{15}R^{16}$，其中 $R^{15}$ 係 H 且 $R^{16}$ 係選自氫、$R^{17}$、-C(=O)-$R^{17}$ 及-C(=O)-O-$R^{17}$，且其中 $R^{17}$ 係選自氫、$C_1$-$C_6$ 烷基、$C_3$-$C_8$ 環烷基及 $C_3$-$C_8$ 雜環基。在一些實施例中，$R^6$ 係-O-$R^{17}$。在一些實施例中，$R^6$ 係-O-C(=O)-$R^{17}$。在一些實施例中，$R^6$ 係 $C_1$-$C_6$ 烷基。在一些實施例中，$R^6$ 係 $C_1$-$C_4$ 烷基。在一些實施例中，$R^6$ 係 $C_1$ 烷基。在一些實施例中，$R^6$ 係-

$NR^{15}R^{16}$。

【0653】在一些實施例中，$R^7$係-O-$R^{17}$。在一些實施例中，$R^7$係-O-C(=O)-$R^{17}$。在一些實施例中，$R^7$係 $C_1$-$C_6$烷基。在一些實施例中，$R^7$係 $C_1$-$C_4$烷基。在一些實施例中，$R^7$係 $C_1$烷基。在一些實施例中，$R^7$係-$NR^{15}R^{16}$。

【0654】在一些實施例中，$R^8$係選自氫、羥基、-O-($C_1$-$C_4$烷基)基團及($C_1$-$C_4$烷基)。在一些實施例中，$R^8$係氫。在一些實施例中，$R^8$係羥基。在一些實施例中，$R^8$係-O-($C_1$-$C_4$烷基)基團。在一些實施例中，$R^8$係-O-($C_1$烷基)基團。

【0655】在一些實施例中，$R^{15}$係氫。在一些實施例中，$R^{15}$係$R^{17}$。在一些實施例中，$R^{15}$係-C(=O)-$R^{17}$。在一些實施例中，$R^{15}$係-C(=O)-O-$R^{17}$。

【0656】在一些實施例中，$R^{16}$係氫。在一些實施例中，$R^{16}$係$R^{17}$。在一些實施例中，$R^{16}$係-C(=O)-$R^{17}$。在一些實施例中，$R^{16}$係-C(=O)-O-$R^{17}$。

【0657】在一些實施例中，$R^{17}$係選自氫、$C_1$-$C_4$烷基、$C_3$-$C_6$環烷基及 $C_3$-$C_8$雜環基。在一些實施例中，$R^{17}$係氫。在一些實施例中，$R^{17}$係 $C_1$-$C_4$烷基。在一些實施例中，$R^{17}$係 $C_1$烷基。在一些實施例中，$R^{17}$係 $C_3$-$C_6$環烷基。在一些實施例中，$R^{17}$係 $C_3$環烷基。在一些實施例中，$R^{17}$係 $C_4$環烷基。在一些實施例中，$R^{17}$係 $C_5$環烷基。在一些實施例中，$R^{17}$係 $C_6$環烷基。在一些實施例中，$R^{17}$係 $C_3$-$C_8$雜環基。在一些實施例中，$R^{17}$係 $C_3$雜環基。在一些實施例中，$R^{17}$係 $C_4$雜環基。在一些實施例中，$R^{17}$係 $C_5$雜環基。在一些實施例中，$R^{17}$係 $C_6$雜環基。在一些實施例中，

$R^{17}$係$C_7$雜環基。在一些實施例中，$R^{17}$係$C_8$雜環基。

【0658】在一些實施例中，a 係 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10。在一些實施例中，a 係 1、2、3、4、5 或 6。在一些實施例中，a 係 1、2、3、4 或 5。在一些實施例中，a 係 1、2、3 或 4。在一些實施例中，a 係 1、2 或 3。在一些實施例中，a 係 1 或 2。在一些實施例中，a 係 1。在一些實施例中，a 係 2。在一些實施例中，a 係 3。在一些實施例中，a 係 4。在一些實施例中，a 係 5。在一些實施例中，a 係 6。在一些實施例中，a 係 7。在一些實施例中，a 係 8。在一些實施例中，a 係 9。在一些實施例中，a 係 10。

【0659】在一些實施例中，$R^2$係連接子。在一些實施例中，該連接子包含至少一個可裂解肽部分。在一些實施例中，該至少一個可裂解肽部分可藉由酶裂解。在一些實施例中，該連接子或可裂解肽部分包含至少一個胺基酸單元。在一些實施例中，該至少一個胺基酸單元係選自精胺酸、組胺酸、離胺酸、天冬胺酸、麩胺酸、絲胺酸、蘇胺酸、天冬醯胺、麩醯胺酸、半胱胺酸、硒半胱胺酸、甘胺酸、脯胺酸、丙胺酸、纈胺酸、異白胺酸、甲硫胺酸、苯丙胺酸、酪胺酸、色胺酸及瓜胺酸。在一些實施例中，該至少一個胺基酸單元係選自丙胺酸、瓜胺酸及纈胺酸。在一些實施例中，連接子包含瓜胺酸及纈胺酸。在一些實施例中，連接子包含丙胺酸及纈胺酸。

【0660】在一些實施例中，連接子包含選自磺醯胺、β-葡萄糖醛酸苷、二硫化物及羰基之部分。在一些實施例中，連接子包含磺醯胺。在一些實施例中，連接子包含 β-葡萄糖醛酸苷。在一些實施例中，連接子包含二硫化物。在一些實施例中，連接子包含羰基。

【0661】在一些實施例中，該連接子包含間隔子單元。在一些實施例中，該間隔子單元係選自烷基及聚乙二醇(PEG)部分。在一些實施例中，該烷基係 $C_1$-$C_{12}$ 烷基。在一些實施例中，該烷基係 $C_1$-$C_6$ 烷基。在一些實施例中，該烷基係亞甲基。在一些實施例中，該烷基係伸乙基。在一些實施例中，該烷基係伸正丙基。在一些實施例中，該烷基係伸正丁基。在一些實施例中，該烷基係伸正戊基。在一些實施例中，該烷基係伸正己基。在一些實施例中，PEG 部分包含-$(PEG)_m$-，其中 m 係 1 至 10 之整數。在一些實施例中，m 係 1。在一些實施例中，m 係 2。在一些實施例中，m 係 3。在一些實施例中，m 係 4。在一些實施例中，m 係 5。在一些實施例中，m 係 6。

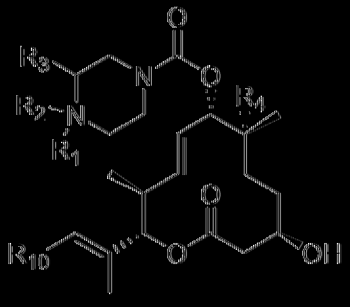
【0662】在一些實施例中，連接子包含順丁烯二醯亞胺(Mal)部分(「Mal-間隔子單元」)。在一些實施例中，該連接子包含自我分解型間隔子單元。在一些實施例中，該自我分解型間隔子單元係選自對胺基苯甲氧基羰基(pABC)及對胺基苯甲基(pAB)。

【0663】在一些實施例中，連接子包含 Mal-間隔子單元、烷基、至少一個胺基酸單元及自我分解型間隔子。在一些實施例中，至少一個胺基酸單元係選自丙胺酸、瓜胺酸及纈胺酸。在一些實施例中，該至少一個胺基酸單元包含丙胺酸及纈胺酸。在一些實施例中，該至少一個胺基酸單元包含瓜胺酸及纈胺酸。在一些實施例中，該自我分解型間隔子係選自 pAB 及 pABC。在一些實施例中，該自我分解型間隔子包含 pAB。在一些實施例中，該自我分解型間隔子包含 pABC。在一些實施例中，該烷基包含 $C_1$-$C_6$ 烷基。

【0664】在一些實施例中，連接子包含 Mal-間隔子單元、PEG 部

分、至少一個胺基酸單元及自我分解型間隔子。在一些實施例中，至少一個胺基酸單元係選自內胺酸、瓜胺酸及纈胺酸。在一些實施例中，該至少一個胺基酸單元包含內胺酸及纈胺酸。在一些實施例中，該至少一個胺基酸單元包含瓜胺酸及纈胺酸。在一些實施例中，該自我分解型間隔子係選自 pAB 及 pABC。在一些實施例中，該自我分解型間隔子包含 pAB。在一些實施例中，該自我分解型間隔子包含 pABC。在一些實施例中，PEG 部分包含 $(PEG)_m$，其中 m 係 1 至 6 之整數。

[0665] 在各種其他實施例中，本文所揭示之連接子-藥物(L-D)化合物包含根據式(IX)之連接子-藥物結構。在各種實施例中，本發明提供一種式(IX)之連接子-藥物(L-D)化合物：



(IX)，或其醫藥學上可接受之鹽，其中：

$R^1$ 係選自不存在、氫、$C_1$-$C_6$ 烷基、$C_1$-$C_6$ 烷基烷氧基、$C_1$-$C_6$ 烷基胺基、$C_1$-$C_6$ 烷基羧酸基團、$C_1$-$C_6$ 烷基羥基、$C_3$-$C_8$ 環烷基、苯甲基、$C_3$-$C_8$ 雜環基、-O-C(=O)-($C_1$-$C_6$ 烷基)基團及 $CD_3$；

$R^2$ 係連接子；

$R^3$ 係選自氫、$C_1$-$C_6$ 烷基、$C_1$-$C_6$ 烷基烷氧基、$C_1$-$C_6$ 烷基胺基、$C_1$-$C_6$ 烷基羧酸基團、$C_1$-$C_6$ 烷基羥基、$C_3$-$C_8$ 環烷基、苯甲基、$C_3$-$C_8$ 雜環基及 -O-C(=O)-($C_1$-$C_6$ 烷基)基團；

$R^4$ 係選自氫、羥基、-O-($C_1$-$C_6$ 烷基)基團、-O-C(=O)-($C_1$-$C_6$ 烷基)基團及 $C_1$-$C_6$ 烷基；

$R^{10}$係選自 3 至 10 員碳環及 3 至 10 員雜環，其各自經 0 至 3 個 $R^a$ 取代，其中各 $R^a$ 獨立地選自鹵素、$C_1$-$C_6$ 烷基、-O-($C_1$-$C_6$)烷基、$C_1$-$C_6$ 烷基烷氧基、$C_1$-$C_6$烷基羥基、-S(=O)$_w$-(4 至 7 員雜環)、4 至 7 員碳環及 4 至 7 員雜環；

$R^{15}$ 及 $R^{16}$ 各自獨立地選自氫、$R^{17}$、-C(=O)-$R^{17}$ 及-C(=O)-O-$R^{17}$；且

$R^{17}$係選自氫、$C_1$-$C_6$烷基、$C_3$-$C_8$環烷基、苯甲基及 $C_3$-$C_8$雜環基；

其中 $R^1$、$R^2$、$R^3$、$R^4$、$R^{10}$、$R^{15}$、$R^{16}$及 $R^{17}$各自獨立地經 0 至 3 個獨立地選自以下之基團取代：鹵素、羥基、$C_1$-$C_6$ 烷基、-O-($C_1$-$C_6$ 烷基)基團、-$NR^{15}R^{16}$、$C_3$-$C_8$ 環烷基、$C_1$-$C_6$ 烷基羥基、$C_1$-$C_6$ 烷基烷氧基、苯甲基及 $C_3$-$C_8$雜環基；且

其中各 $R^a$獨立地經 0 至 3 個獨立地選自以下之基團取代：鹵素、羥基、-$NR^{15}R^{16}$、$C_1$-$C_6$烷基、-(C=O)-($C_1$-$C_6$烷基)基團、-(C=O)-($C_1$-$C_6$烷基)-($C_3$-$C_{10}$雜環基)及 $C_1$-$C_6$烷基羧酸基團，其各自經 0、1 或 2 個獨立地選自以下之基團取代：鹵素、羥基、-$NR^{15}R^{16}$及 $C_1$-$C_3$烷基；且

w 係 0、1 或 2。

【0666】 在一些實施例中，$R^1$係選自不存在、氫、$C_1$-$C_4$烷基、$C_1$-$C_4$ 烷基羧酸基團及 $C_3$-$C_8$ 環烷基。在一些實施例中，$R^1$ 不存在。在一些實施例中，$R^1$ 係氫。在一些實施例中，$R^1$ 係 $C_1$-$C_4$ 烷基。在一些實施例中，$R^1$ 係甲基。在一些實施例中，$R^1$ 係乙基。在一些實施例中，$R^1$ 係 $C_1$-$C_4$烷基羧酸基團。在一些實施例中，$R^1$係-$CH_2CH_2CH_2CO_2H$。在一些實施例中，$R^1$係 $C_3$-$C_8$環烷基。在一些實施例中，$R^1$係環庚基。

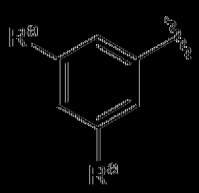
【0667】 在一些實施例中，$R^3$ 係選自氫、$C_1$-$C_4$ 烷基、$C_1$-$C_4$ 烷基

烷氧基、$C_1$-$C_4$ 烷基羧酸基團及 $C_1$-$C_4$ 烷基羥基。在一些實施例中，$R^3$ 係選自氫及 $C_1$-$C_4$ 烷基羧酸基團。在一些實施例中，$R^3$ 係氫。在一些實施例中，$R^3$ 係 $C_1$-$C_4$ 烷基羧酸基團。在一些實施例中，$R^3$ 係-$CH_2CH_2CO_2H$。

【0668】 在一些實施例中，$R^4$ 係選自氫、羥基、-O-($C_1$-$C_4$ 烷基)基團、-O-C(=O)-($C_1$-$C_4$ 烷基)基團及 $C_1$-$C_4$ 烷基。在一些實施例中，$R^4$ 係氫。在一些實施例中，$R^4$ 係羥基。在一些實施例中，$R^4$ 係-O-($C_1$-$C_4$ 烷基) 基團。在一些實施例中，$R^4$ 係-$OCH_3$。在一些實施例中，$R^4$ 係-$OCH_2CH_3$。在一些實施例中，$R^4$ 係-O-C(=O)-($C_1$-$C_4$ 烷基)基團。在一些實施例中，$R^4$ 係-O-C(=O)-$CH_3$。在一些實施例中，$R^4$ 係-O-C(=O)-$CH_2CH_3$。在一些實施例中，$R^4$ 係 $C_1$-$C_4$ 烷基。在一些實施例中，$R^4$ 係甲基。在一些實施例中，$R^4$ 係乙基。

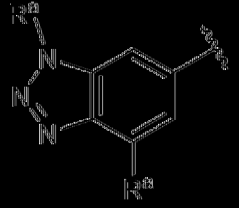
【0669】 在一些實施例中，$R^{10}$ 係選自 6 至 9 員碳環及 6 至 9 員雜環，其各自經 0 至 2 個 $R^a$ 取代，其中各 $R^a$ 獨立地經 0 至 3 個獨立地選自以下之基團取代：鹵素、羥基、$C_1$-$C_6$ 烷基、-(C=O)-($C_1$-$C_6$ 烷基)基團、-(C=O)-($C_1$-$C_6$ 烷基)-(3 至 10 員雜環)基團及 $C_1$-$C_6$ 烷基羧酸基團。

【0670】 在一些實施例中，該碳環係經 0 至 2 個 $R^a$ 取代之苯基，其中各 $R^a$ 獨立地經 0 至 3 個獨立地選自以下之基團取代：鹵素、羥基、$C_1$-$C_6$ 烷基、-(C=O)-($C_1$-$C_6$ 烷基)基團、-(C=O)-($C_1$-$C_6$ 烷基)-(3 至 10 員雜環)基團及 $C_1$-$C_6$ 烷基羧酸基團。在一些實施例中，該苯基經 2 個 $R^a$ 取代，其中各 $R^a$ 獨立地經 0 至 3 個獨立地選自以下之基團取代：鹵素、羥基、$C_1$-$C_6$ 烷基、-(C=O)-($C_1$-$C_6$ 烷基)基團、-(C=O)-($C_1$-$C_6$ 烷基)-(3 至 10 員雜環)基團及 $C_1$-$C_6$ 烷基羧酸基團。在一些實施例中，該苯基係



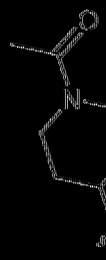
。

[0671] 在一典實施例中，該雜環係經 0 至 2 個 $R^a$ 取代之 9 員雜環，其中各 $R^a$ 獨立地經 0 至 3 個獨立地選自以下之基團取代：鹵素、羥基、$C_1$-$C_6$ 烷基、-(C=O)-($C_1$-$C_6$ 烷基)基團、-(C=O)-($C_1$-$C_6$ 烷基)-(3 至 10 員雜環)基團及 $C_1$-$C_6$ 烷基羧酸基團。在一典實施例中，該 9 員雜環係

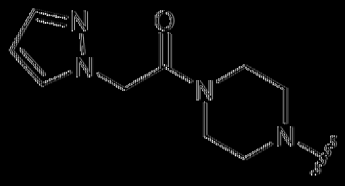


。

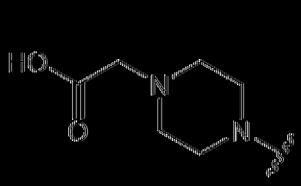
[0672] 在一典實施例中，$R^a$ 係選自鹵素、3 至 10 員碳環及 3 至 10 員雜環，其中各 $R^a$ 獨立地經 0 至 3 個獨立地選自以下之基團取代：鹵素、羥基、$C_1$-$C_6$ 烷基、-(C=O)-($C_1$-$C_6$ 烷基)基團、-(C=O)-($C_1$-$C_6$ 烷基)-(3 至 10 員雜環)基團及 $C_1$-$C_6$ 烷基羧酸基團。在一典實施例中，$R^a$ 係選自鹵素、



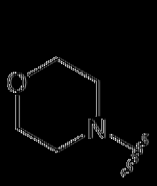
、



、



及



。

[0673] 在一典實施例中，$R^{15}$ 係氫。在一典實施例中，$R^{15}$ 係 $R^{17}$。在一典實施例中，$R^{15}$ 係 -C(=O)-$R^{17}$。在一典實施例中，$R^{15}$ 係 -C(=O)-O-$R^{17}$。

[0674] 在一典實施例中，$R^{16}$ 係氫。在一典實施例中，$R^{16}$ 係 $R^{17}$。在一典實施例中，$R^{16}$ 係 -C(=O)-$R^{17}$。在一典實施例中，$R^{16}$ 係 -C(=O)-O-$R^{17}$。

[0675] 在一典實施例中，$R^{17}$ 係選自氫、$C_1$-$C_4$ 烷基、$C_3$-$C_6$ 環烷

基及 $C_3$-$C_8$ 雜環基。在一些實施例中，$R^{17}$ 係氫。在一些實施例中，$R^{17}$ 係 $C_1$-$C_4$ 烷基。在一些實施例中，$R^{17}$ 係 $C_1$ 烷基。在一些實施例中，$R^{17}$ 係 $C_3$-$C_6$ 環烷基。在一些實施例中，$R^{17}$ 係 $C_3$ 環烷基。在一些實施例中，$R^{17}$ 係 $C_4$ 環烷基。在一些實施例中，$R^{17}$ 係 $C_5$ 環烷基。在一些實施例中，$R^{17}$ 係 $C_6$ 環烷基。在一些實施例中，$R^{17}$ 係 $C_3$-$C_8$ 雜環基。在一些實施例中，$R^{17}$ 係 $C_3$ 雜環基。在一些實施例中，$R^{17}$ 係 $C_4$ 雜環基。在一些實施例中，$R^{17}$ 係 $C_5$ 雜環基。在一些實施例中，$R^{17}$ 係 $C_6$ 雜環基。在一些實施例中，$R^{17}$ 係 $C_7$ 雜環基。在一些實施例中，$R^{17}$ 係 $C_8$ 雜環基。

【0676】 在一些實施例中，$R^2$ 係連接子。在一些實施例中，該連接子包含至少一個可裂解肽部分。在一些實施例中，該至少一個可裂解肽部分可藉由酶裂解。在一些實施例中，該連接子或可裂解肽部分包含至少一個胺基酸單元。在一些實施例中，該至少一個胺基酸單元係選自精胺酸、組胺酸、離胺酸、天冬胺酸、麩胺酸、絲胺酸、蘇胺酸、天冬醯胺、麩醯胺酸、半胱胺酸、硒半胱胺酸、甘胺酸、脯胺酸、丙胺酸、纈胺酸、異白胺酸、甲硫胺酸、苯丙胺酸、酪胺酸、色胺酸及瓜胺酸。在一些實施例中，該至少一個胺基酸單元係選自丙胺酸、瓜胺酸及纈胺酸。在一些實施例中，連接子包含瓜胺酸及纈胺酸。在一些實施例中，連接子包含丙胺酸及纈胺酸。

【0677】 在一些實施例中，連接子包含選自磺醯胺、β-葡萄糖醛酸苷、二硫化物及羰基之部分。在一些實施例中，連接子包含磺醯胺。在一些實施例中，連接子包含 β-葡萄糖醛酸苷。在一些實施例中，連接子包含二硫化物。在一些實施例中，連接子包含羰基。

【0678】 在一些實施例中，該連接子包含間隔子單元。在一些實施

例中，該間隔子單元係選自烷基及聚乙二醇(PEG)部分。在一些實施例中，該烷基係 $C_1$-$C_{12}$ 烷基。在一些實施例中，該烷基係 $C_1$-$C_6$ 烷基。在一些實施例中，該烷基係亞甲基。在一些實施例中，該烷基係伸乙基。在一些實施例中，該烷基係伸正丙基。在一些實施例中，該烷基係伸正丁基。在一些實施例中，該烷基係伸正戊基。在一些實施例中，該烷基係伸正己基。在一些實施例中，PEG 部分包含-$(PEG)_m$-，其中 m 係 1 至 10 之整數。在一些實施例中，m 係 1。在一些實施例中，m 係 2。在一些實施例中，m 係 3。在一些實施例中，m 係 4。在一些實施例中，m 係 5。在一些實施例中，m 係 6。

【0679】 在一些實施例中，連接子包含順丁烯二醯亞胺(Mal)部分(「Mal-間隔子單元」)。在一些實施例中，該連接子包含自我分解型間隔子單元。在一些實施例中，該自我分解型間隔子單元係選自對胺基苯甲氧基羰基(pABC)及對胺基苯甲基(pAB)。

【0680】 在一些實施例中，連接子包含 Mal-間隔子單元、烷基、至少一個胺基酸單元及自我分解型間隔子。在一些實施例中，至少一個胺基酸單元係選自丙胺酸、瓜胺酸及纈胺酸。在一些實施例中，該至少一個胺基酸單元包含丙胺酸及纈胺酸。在一些實施例中，該至少一個胺基酸單元包含瓜胺酸及纈胺酸。在一些實施例中，該自我分解型間隔子係選自 pAB 及 pABC。在一些實施例中，該自我分解型間隔子包含 pAB。在一些實施例中，該自我分解型間隔子包含 pABC。在一些實施例中，該烷基包含 $C_1$-$C_6$ 烷基。

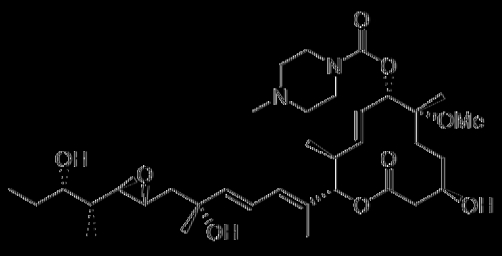
【0681】 在一些實施例中，連接子包含 Mal-間隔子單元、PEG 部分、至少一個胺基酸單元及自我分解型間隔子。在一些實施例中，至少一

個胺基酸單元係選自內胺酸、瓜胺酸及纈胺酸。在一些實施例中，該至少一個胺基酸單元包含內胺酸及纈胺酸。在一些實施例中，該至少一個胺基酸單元包含瓜胺酸及纈胺酸。在一些實施例中，該自我分解型間隔子係選自 pAB 及 pABC。在一些實施例中，該自我分解型間隔子包含 pAB。在一些實施例中，該自我分解型間隔子包含 pABC。在一些實施例中，PEG 部分包含 $-(PEG)_m-$，其中 m 係 1 至 6 之整數。

[0682] 在一些實施例中，該藥物部分係選自以下之剪接調節劑：D1、D2、D3、D4、D4'、D5、D6、D7、D8、D9、D10、D11、D12、D13、D14、D15、D16、D17、D18、D19、D20、D21、D22、D23、D24、D25、D26、D27、D28、D29、D30、D31、D32、D33、D34 及 D35。

[0683] 在各種實施例中，藥物部分係選自 D2 及 D1 之剪接調節劑。

[0684] 在各種實施例中，藥物部分係 D2。在各種實施例中，所揭示之連接子-藥物(L-D)化合物中所使用之 D2 藥物部分的結構顯示於下：

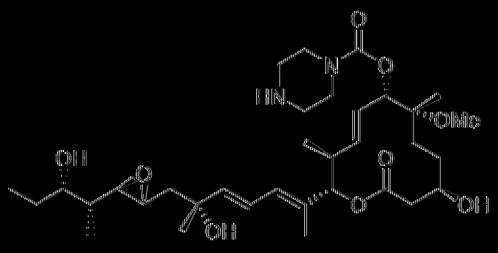


D2 。

[0685] 在各種實施例中，本文所描述之連接子-藥物(L-D)化合物中的連接子經由哌啶基團上之胺共價連接至 D2 藥物部分。在各種實施例中，藥物部分係 D2 衍生物。在各種實施例中，D2 衍生物保持 D2 之至少

一種生物功能或活性(例如 SF3b 複合體結合、活體外剪接活性、細胞毒性)，但具有改變之化學結構。

[0686] 在各種實施例中，藥物部分係 D1。在各種實施例中，所揭示之連接子-藥物(L-D)化合物中所使用之 D1 藥物部分的結構顯示於下：

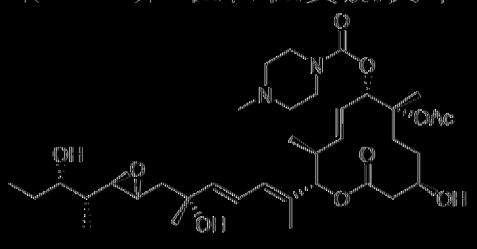


D1

[0687] 在各種實施例中，本文所描述之連接子-藥物(L-D)化合物中的連接子經由哌啶基團上之胺共價連接至 D1 藥物部分。在各種實施例中，藥物部分係 D1 衍生物。在各種實施例中，D1 衍生物保持 D1 之至少一種生物功能或活性(例如 SF3b 複合體結合、活體外剪接活性、細胞毒性)，但具有改變之化學結構。

[0688] 本文亦揭示單獨使用或作為本文所揭示之 ADC 中之藥物部分使用的剪接調節劑藥物化合物。在各種實施例中，本發明進一步提供包含此等化合物之多個複本的組合物，例如包含剪接調節劑藥物化合物及醫藥學上可接受之賦劑的醫藥組合物。

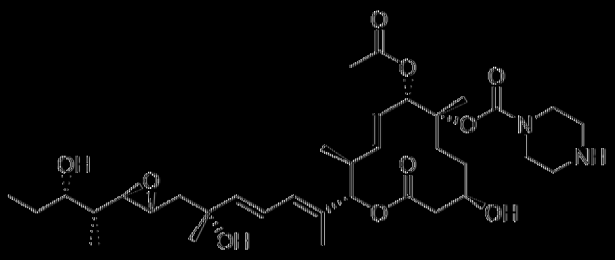
[0689] 在各種實施例中本發明提供選自下式之化合物的化合物：



(D4)及其醫藥學上可接受之鹽。在各種實施例中，本發明進一步提供包含該化合物或其醫藥學上可接受之鹽及醫藥

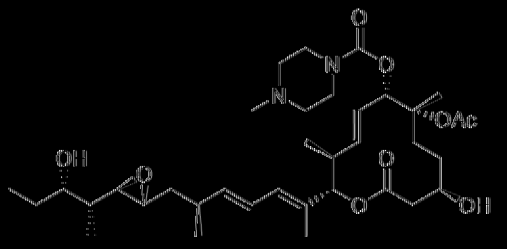
學上可接受之載劑的醫藥組合物。

[0690] 在各種其他實施例中，本發明提供選自下式之化合物的化合物：



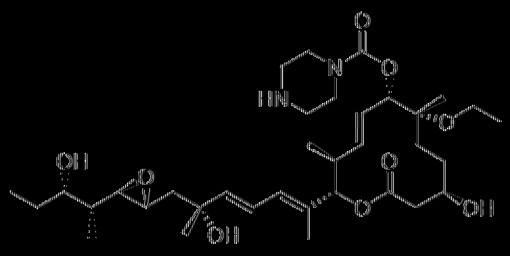
(D8)及其醫藥學上可接受之鹽。在各種實施例中，本發明進一步提供包含該化合物或其醫藥學上可接受之鹽及醫藥學上可接受之載劑的醫藥組合物。

[0691] 在各種其他實施例中，本發明提供選自下式之化合物的化合物：



(D9)及其醫藥學上可接受之鹽。在各種實施例中，本發明進一步提供包含該化合物或其醫藥學上可接受之鹽及醫藥學上可接受之載劑的醫藥組合物。

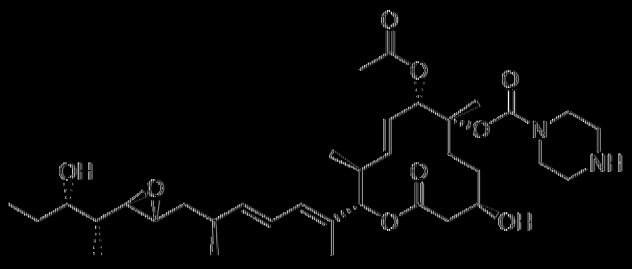
[0692] 在各種其他實施例中，本發明提供選自下式之化合物的化合物：



(D10)及其醫藥學上可接受之鹽。在各種實施例中，本發明進一步提供包含該化合物或其醫藥學上可接受之鹽及醫藥學上可接受之載劑的醫藥組合物。

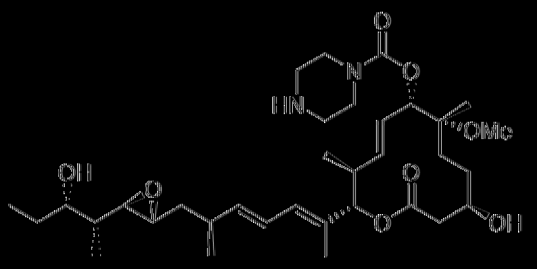
[0693] 在各種其他實施例中，本發明提供選自下式之化合物的化

合物：



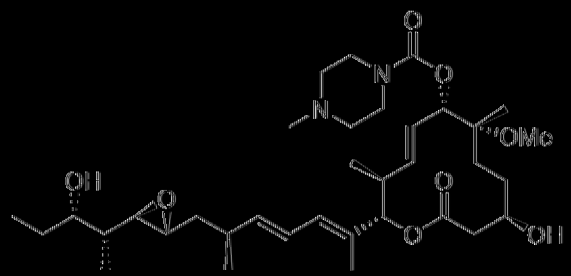
(D13)及其醫藥學上可接受之鹽。在各種實施例中，本發明進一步提供包含該化合物或其醫藥學上可接受之鹽及醫藥學上可接受之載劑的醫藥組合物。

[0694] 在各種其他實施例中，本發明提供選自下式之化合物的化合物：



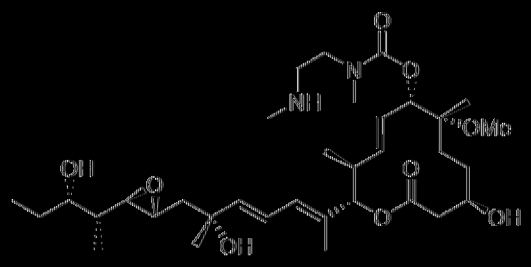
(D18)及其醫藥學上可接受之鹽。在各種實施例中，本發明進一步提供包含該化合物或其醫藥學上可接受之鹽及醫藥學上可接受之載劑的醫藥組合物。

[0695] 在各種其他實施例中，本發明提供選自下式之化合物的化合物：



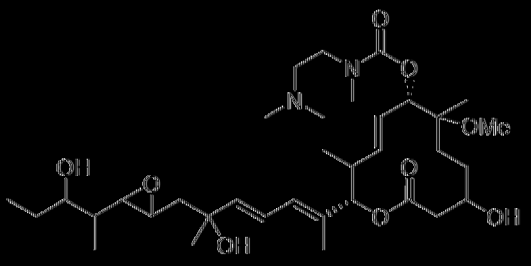
(D19)及其醫藥學上可接受之鹽。在各種實施例中，本發明進一步提供包含該化合物或其醫藥學上可接受之鹽及醫藥學上可接受之載劑的醫藥組合物。

[0696] 在各種其他實施例中，本發明提供選自下式之化合物的化合物：



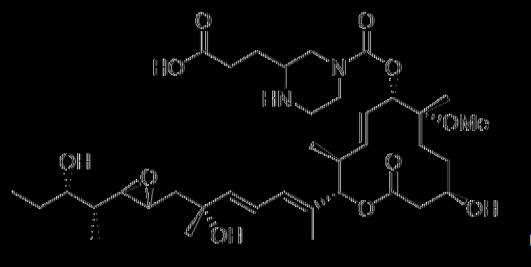
(I320)及其醫藥學上可接受之鹽。在各種實施例中，本發明進一步提供包含該化合物或其醫藥學上可接受之鹽及醫藥學上可接受之賦劑的醫藥組合物。

〔0697〕在各種其他實施例中，本發明提供選自下式之化合物的化合物：



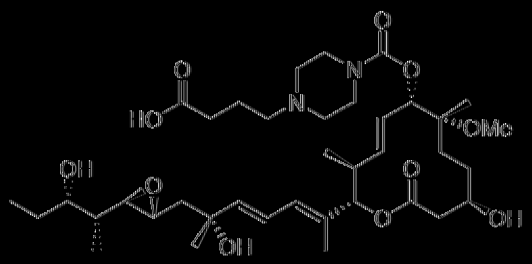
(I321)及其醫藥學上可接受之鹽。在各種實施例中，本發明進一步提供包含該化合物或其醫藥學上可接受之鹽及醫藥學上可接受之賦劑的醫藥組合物。

〔0698〕在各種其他實施例中，本發明提供選自下式之化合物的化合物：



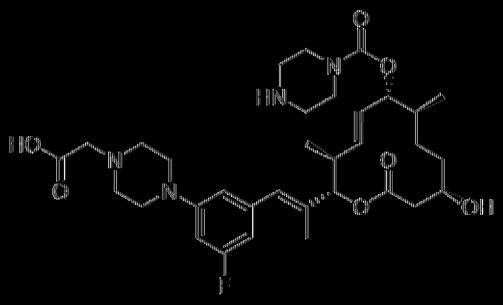
(I322)及其醫藥學上可接受之鹽。在各種實施例中，本發明進一步提供包含該化合物或其醫藥學上可接受之鹽及醫藥學上可接受之賦劑的醫藥組合物。

〔0699〕在各種其他實施例中，本發明提供選自下式之化合物的化合物：



(D25)及其醫藥學上可接受之鹽。在各種實施例中，本發明進一步提供包含該化合物或其醫藥學上可接受之鹽及醫藥學上可接受之賦形劑的醫藥組合物。

[0700] 在各種其他實施例中，本發明提供選自下式之化合物的化合物：



(D33)及其醫藥學上可接受之鹽。在各種實施例中，本發明進一步提供包含該化合物或其醫藥學上可接受之鹽及醫藥學上可接受之賦形劑的醫藥組合物。

藥物負載

[0701] 藥物負載係由 *p* 表示，且在本文中又稱為藥物:抗體比(DAR)。藥物負載可在每個抗體或抗原結合片段 1 至 10 個藥物部分之範圍內。在一典實施例中，*p* 係 1 至 10 之整數。在一典實施例中，*p* 係 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 之整數。在一典實施例中，*p* 係 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 之整數。在一典實施例中，*p* 係 1 至 8 之整數。在一典實施例中，*p* 係 2 至 4 之整數。在其他實施例中，*p* 係 4 至 8 之整數。在其他實施例中，*p* 係 1、2、3、4、5、6、7 或 8，較佳地為 4 或 8。

[0702] 藥物負載可受抗體或抗原結合片段上連接位點之數目的限

制。在一些實施例中，ADC 之連接子部分(L)經由抗體或抗原結合片段上一或多個胺基酸殘基上之化學活性基團連接至抗體或抗原結合片段。舉例而言，連接子可經由游離胺基、亞胺基、羥基、硫醇基或羧基連接至抗體或抗原結合片段(例如 N 末端或 C 末端、一或多個離胺酸殘基之 ε 胺基、一或多個麩胺酸或天冬胺酸殘基之游離羧酸基團、或一或多個半胱胺酸殘基之硫氫基)。連接子所連接之位點可為抗體或抗原結合片段之胺基酸序列中之天然殘基，或其可例如藉由 DNA 重組技術(例如藉由半胱胺酸殘基引入胺基酸序列中)或藉由蛋白質生物化學(例如藉由還原、pH 調整或水解)引入抗體或抗原結合片段中。

【0703】 在一些實施例中，可結合至抗體或抗原結合片段之藥物部分的數量受游離半胱胺酸殘基之數量限制。舉例而言，在連接係半胱胺酸硫醇基之情況下，抗體可具有僅一個或數個半胱胺酸硫醇基，或可具有僅一個或數個可作為連接一連接子之方式的具有足夠反應性之硫醇基。一般而言，抗體不含有許多可連接至藥物部分的游離及反應性半胱胺酸硫氫基。實際上，抗體中之大部分半胱胺酸硫醇殘基參與鏈間或鏈內二硫鍵。因此，在一些實施例中，結合至半胱胺酸可能需要至少部分還原抗體。連接子-毒素與抗體之過量連接可藉由還原可用於形成二硫鍵之半胱胺酸殘基使抗體不穩定。因此，最佳的藥物:抗體比率應當增加 ADC 之效力(藉由增加每個抗體連接之藥物部分的數量)，同時不會使抗體或抗原結合片段不穩定。在一些實施例中，最佳比率可以為 2、4、6 或 8。

【0704】 在一些實施例中，使抗體或抗原結合片段在結合之前暴露於還原條件，以便產生一或多個游離半胱胺酸殘基。在一些實施例中，抗體可在部分或總體還原條件下用還原劑諸如二硫蘇糖醇(DTT)或參(2-羧基

乙基)膦(TCEP)還原，以產生反應性半胱胺酸硫醇基。未配對半胱胺酸可經由用限定莫耳當量之 TCEP 部分還原來產生，由此可減少連接輕鏈及重鏈(每個 H-L 配對有一對)以及鉸鏈區中之二條重鏈(在人類 IgG1 情況下，每個 H-H 配對有二對)的鏈間二硫鍵，同時留下完整鏈內二硫鍵(Stefano 等人(2013) Methods Mol Biol. 1045:145-71)。在實施例中，藉由例如採用工作電極施加交替的還原及氧化電壓，以電化學方式還原抗體內之二硫鍵。此方法可允許二硫鍵還原與分析裝置(例如電化學偵測裝置、NMR 頻譜儀或質譜儀)或化學分離裝置(例如液相層析儀(例如 HPLC)或電泳裝置(參見例如美國公開案第 20140069822 號))之在線偶合。在某些實施例中，抗體經歷變性條件，以顯出胺基酸殘基，諸如半胱胺酸上之反應性親核基團。

【0705】 ADC 之藥物負載可藉由不同方式控制，例如：(i)限制藥物-連接子中間物或連接子試劑相對於抗體之莫耳過量；(ii)限制結合反應時間或溫度；(iii)用於半胱胺酸硫醇修飾之部分或限制性還原條件；及/或(iv)利用重組技術工程改造抗體之胺基酸序列以修飾半胱胺酸殘基之數量及位置，由此控制連接子-藥物連接之數量及/或位置。

【0706】 在一些實施例中，將游離半胱胺酸殘基引入抗體或抗原結合片段之胺基酸序列中。舉例而言，可製備出半胱胺酸工程改造之抗體，其中親本抗體之一或多個胺基酸經半胱胺酸胺基酸置換。任何形式之抗體均可如此工程改造，亦即突變。舉例而言，親本 Fab 抗體片段可工程改造成形成半胱胺酸工程改造之 Fab，稱為「ThioFab」。類似地，親本單株抗體可工程改造成形成「ThioMab」。單位點突變在 ThioFab 中產生單一工程改造之半胱胺酸殘基，而歸因於 IgG 抗體之二聚體性質，單位點突變在

ThioMab 中產生二個工程改造之半胱胺酸殘基。編碼親本多肽之胺基酸序列變異體的 DNA 可藉由此項技術中已知之多種方法製備(參見例如國際公開案第 WO 2006/034488 號中所描述之方法)。此等方法包括(但不限於)藉由先前製備的編碼該多肽之 DNA 的定點(或寡核苷酸介導之)突變誘發、PCR 突變誘發及卡匣突變誘發製備。重組抗體變異體亦可藉由限制性片段操作或藉由重疊延伸 PCR，利用合成寡核苷酸構築。式(I)之 ADC 包括(但不限於)具有 1、2、3 或 4 個工程改造之半胱胺酸胺基酸的抗體(Lyon 等人(2012) Methods Enzymol. 502:123-38)。在一些實施例中，一或多個游離半胱胺酸殘基已存在於抗體或抗原結合片段中，無需使用工程改造，在此情況下，可使用現有游離半胱胺酸殘基將抗體或抗原結合片段結合至藥物部分。

【0707】 在超過一個親核性基團與藥物-連接子中間物或連接子部分試劑反應，隨後與藥物部分試劑反應之情況下，在包含抗體或抗原結合片段及連接子部分之多個複本的反應混合物中，接著所得產物可為 ADC 複合物之混合物，其具有一或多個藥物部分連接至該混合物中抗體或抗原結合片段之每一複本的分佈。在一些實施例中，由結合反應得到之 ADC 之混合物中的藥物負載在每個抗體或抗原結合片段連接 1 至 10 個藥物部分之範圍內。每個抗體或抗原結合片段之藥物部分的平均數量(亦即，平均藥物負載或平均)可以藉由此項技術中已知之任何習知方法，例如藉由質譜分析(例如反相 LC-MS)及/或高效液相層析(例如 HIC-HPLC)計算。在一些實施例中，每個抗體或抗原結合片段之藥物部分的平均數量係藉由疏水相互作用層析-高效液相層析法(HIC-HPLC)測定。在一些實施例中，每個抗體或抗原結合片段之藥物部分的平均數量係藉由反相液相層析-質譜

法(LC-MS)測定。在一些實施例中，每個抗體或抗原結合片段之藥物部分的平均數量係約 1.5 至約 3.5、約 2.5 至約 4.5、約 3.5 至約 5.5、約 4.5 至約 6.5、約 5.5 至約 7.5、約 6.5 至約 8.5 或約 7.5 至約 9.5。在一些實施例中，每個抗體或抗原結合片段之藥物部分的平均數量係約 2 至約 4、約 3 至約 5、約 4 至約 6、約 5 至約 7、約 6 至約 8、約 7 至約 9、約 2 至約 8 或約 4 至約 8。

【0708】 在一些實施例中，每個抗體或抗原結合片段之藥物部分的平均數量係約 2。在一些實施例中，每個抗體或抗原結合片段之藥物部分的平均數量係約 1.5、約 1.6、約 1.7、約 1.8、約 1.9、約 2、約 2.1、約 2.2、約 2.3、約 2.4 或約 2.5。在一些實施例中，每個抗體或抗原結合片段之藥物部分的平均數量係 2。

【0709】 在一些實施例中，每個抗體或抗原結合片段之藥物部分的平均數量係約 4。在一些實施例中，每個抗體或抗原結合片段之藥物部分的平均數量係約 3.5、約 3.6、約 3.7、約 3.8、約 3.9、約 4、約 4.1、約 4.2、約 4.3、約 4.4 或約 4.5。在一些實施例中，每個抗體或抗原結合片段之藥物部分的平均數量係 4。

【0710】 在一些實施例中，每個抗體或抗原結合片段之藥物部分的平均數量係約 8。在一些實施例中，每個抗體或抗原結合片段之藥物部分的平均數量係約 7.5、約 7.6、約 7.7、約 7.8、約 7.9、約 8、約 8.1、約 8.2、約 8.3、約 8.4 或約 8.5。在一些實施例中，每個抗體或抗原結合片段之藥物部分的平均數量係 8。

【0711】 在各種實施例中，如關於每個抗體或抗原結合片段之藥物部分的平均數量所使用之術語「約」意思指±10%。

【0712】 個別 ADC 複合物或「物種」可在混合物中藉由質譜分析鑑別且藉由 UPLC 或 HPLC，例如疏水性相互作用層析(HIC-HPLC)分離。在某些實施例中，具有單一負載值的均質或接近均質之 ADC 產物可例如藉由電泳或層析法自結合混合物分離。

【0713】 在一些實施例中，較高藥物負載(例如 $p>8$)可能引起某些抗體-藥物結合物之聚集、不可溶性、毒性或細胞滲透性喪失。較高的藥物負載亦可能不利地影響某些 ADC 之藥物動力學(例如清除率)。在一些實施例中，較低之藥物負載(例如 $p<2$)可降低某些 ADC 針對目標表現細胞及/或旁觀者細胞之效力。在一些實施例中，本發明之 ADC 的藥物負載在約 2 至約 8；約 2 至約 6；約 2 至約 5；約 3 至約 5；約 2 至約 4；或約 4 至約 8 之範圍內。

【0714】 在一些實施例中，使用例如抗體或抗原結合片段上鏈內二硫鍵之部分還原實現約 2 之藥物負載及/或平均藥物負載，並提供有益的特性。在一些實施例中，使用例如抗體或抗原結合片段上鏈內二硫鍵之部分還原實現約 4 之藥物負載及/或平均藥物負載，並提供有益的特性。在一些實施例中，使用例如抗體或抗原結合片段上鏈內二硫鍵之部分還原實現約 8 之藥物負載及/或平均藥物負載，並提供有益的特性。在一些實施例中，小於約 2 之藥物負載及/或平均藥物負載可能產生不可接受地高水準的未結合之抗體物種，該物種可與 ADC 競爭結合至目標抗原及/或提供降低之治療功效。在一些實施例中，大於約 8 之藥物負載及/或平均藥物負載可能產生不可接受地高水準之產物異質性及/或 ADC 聚集。大於約 8 之藥物負載及/或平均藥物負載亦可能因使抗體或抗原結合片段穩定所需之一或多個化學鍵的損失而影響 ADC 之穩定性。

【0715】 本發明包括製造所述 ADC 之方法。簡言之，ADC 包含作為該抗體或抗原結合片段之抗體或抗原結合片段、藥物部分(例如剪接調節劑)及將接合藥物部分及抗體或抗原結合片段之連接子。在一些實施例中，ADC 可使用具有用於共價連接至藥物部分及抗體或抗原結合片段之反應性官能基的連接子製備。舉例而言，在一些實施例中，抗體或抗原結合片段之半胱胺酸硫醇可與連接子或藥物-連接子中間物之反應性官能基(例如順丁烯二醯亞胺部分)形成一鍵以製備 ADC。ADC 可藉由熟習此項技術者已知之任何技術產生。

【0716】 在一些實施例中，ADC 係藉由使抗體或抗原結合片段與連接子及藥物部分(例如剪接調節劑)依序接觸，以使抗體或抗原結合片段先共價連接至連接子，且接著預先形成之抗體-連接子中間物與藥物部分反應來製造。抗體-連接子中間物在接觸藥物部分之前可經歷或可不經歷純化步驟。在其他實施例中，ADC 係藉由使抗體或抗原結合片段與連接子-藥物化合物接觸來製造，該連接子-藥物化合物係由連接子與藥物部分反應預先形成。預先形成之連接子-藥物化合物在接觸抗體或抗原結合片段之前可經歷或可不經歷純化步驟。在其他實施例中，抗體或抗原結合片段接觸一種反應混合物中之連接子及藥物部分，由此允許在抗體或抗原結合片段與連接子之間及連接子與藥物部分之間並行形成共價鍵。此製造 ADC 之方法可以包括一反應，其中抗體或抗原結合片段在將連接子添加至反應混合物中之前接觸抗體或抗原結合片段，且反之亦然。在某些實施例中，ADC 係藉由使抗體或抗原結合片段與接合至藥物部分之連接子，諸如 ADL1-剪接調節劑(例如 ADL1-D1)或 ADL5-剪接調節劑(例如 ADL5-D2)在允許結合之條件下反應來製造。

【0717】 根據以上所描述之方法製備的 ADC 可經歷純化步驟。該純化步驟可涉及此項技術中已知用於純化蛋白質之任何生物化學方法，或其任何方法組合。此等方法包括(但不限於)切向流過濾(TFF)、親和層析法、離子交換層析法、基於電荷或等電點之任何層析法、混合模式層析法例如 CHT(陶瓷羥基磷灰石)、疏水相互作用層析法、尺寸排阻層析法、透析、過濾、選擇性沈澱或其任何組合。

**治療用途及組合物**

【0718】 本文揭示使用所揭示之 ADC 及組合物治療個體之病症，例如贅生性病症的方法。ADC 可單獨或與第二治療劑組合投與，且可以醫藥學上可接受之調配物、劑量及給藥方案投與。可針對毒性以及功效指標評價 ADC 之治療功效並相應地調整。功效量度包括(但不限於)在活體外或活體內觀察到的細胞生長抑制及/或細胞毒性作用、腫瘤體積減小、腫瘤生長抑制作用及/或存活期延長。

【0719】 已知確定 ADC 是否對細胞發揮細胞生長抑制及/或細胞毒性作用之方法。舉例而言，ADC 之細胞毒性或細胞生長抑制活性可藉由以下量測：使表現 ADC 之目標蛋白的哺乳動物細胞暴露於細胞培養基；培養細胞約 6 小時至約 6 天時間；以及量測細胞活力。基於細胞之活體外分析亦可用於量測 ADC 之活力(增殖)、細胞毒性及對細胞凋亡之誘導(半胱天冬酶活化)。

【0720】 為確定 ADC 是否發揮細胞生長抑制作用，可使用胸苷摻入分析。舉例而言，可將以 5,000 個細胞/孔之密度塗鋪於 96 孔盤的表現目標抗原之癌細胞培養 72 小時的時間，並在 72 小時之時間的最後 8 小時期間，使其暴露於 0.5 μCi 之 $^{3}$H-胸苷。在 ADC 存在及不存在下，量測培

養之細胞中 $^{3}H$-胸苷之摻入量。

【0721】 為測定細胞毒性，可量測壞死或細胞凋亡(計劃性細胞死亡)。壞死通常伴隨質膜滲透性之增加、細胞膨脹及質膜破裂。細胞凋亡可例如藉由量測 DNA 斷裂來定量。用於定量活體外測定 DNA 斷裂之市售光學量測方法係可用的。此類分析之實例，包括 TUNEL (其偵測斷裂之 DNA 中經標記核苷酸之摻入)及基於 ELISA 之分析，描述於 Biochemica (1999)第 2 期, 第 34-37 頁 (Roche Molecular Biochemicals)中。

【0722】 細胞凋亡亦可藉由量測細胞之形態變化來測定。舉例而言，與壞死相同，質膜完整性之喪失可藉由量測對某些染料(例如螢光染料，諸如吖啶橙或溴化乙錠)之吸收來測定。用於量測凋亡細胞數量之方法描述於 Duke 及 Cohen, Current Protocols in Immunology (Coligan 等人編(1992)第 3.17.1-3.17.16 頁)中。細胞亦可用 DNA 染料(例如吖啶橙、溴化乙錠或碘化丙錠)標記且觀察細胞沿內部核膜之染色體凝聚及邊聚情況。在一些實施例中，細胞凋亡亦可藉由針對半胱天冬酶活性篩選進行測定。在一些實施例中，可使用 Caspase-Glo®分析量測半胱天冬酶-3 及半胱天冬酶-7 之活性。在一些實施例中，該分析提供在針對半胱天冬酶活性、螢光素酶活性及細胞溶解優化之試劑中發光之半胱天冬酶-3/7 受質。在一些實施例中，以「添加-混合-量測」方式添加 Caspase-Glo® 3/7 試劑可引起細胞溶解，隨後引起半胱天冬酶對受質之裂解並產生由螢光素酶製造的「輝光型」發光信號。在一些實施例中，發光可與存在之半胱天冬酶活性之量成比例，且可以充當細胞凋亡之指示。可經量測以測定細胞凋亡之其他形態變化包括例如細胞質凝聚、膜囊胞形成增加及細胞收縮。

測定此等方法中之任一種對癌細胞的影響指示，ADC 可用於治療癌症。

【0723】 細胞活力可例如藉由測定細胞中諸如中性紅、錐蟲藍、結晶紫或 ALAMAR™藍之類染料之吸收來量測(參見例如 Page 等人(1993)Intl J Oncology 3:473-6)。在該分析中，在含有染料之培養基中培育細胞，洗滌細胞，且以分光光度法量測剩餘染料，其反映細胞對染料之吸收。亦可例如藉由定量 ATP (有代謝活性之細胞之指示)量測細胞活力。在某些實施例中，如本文所提供之實例中所描述，可以使用 CellTiter-Glo®發光細胞活力分析評估所製備之 ADC 或剪接調節劑化合物之活體外效力及/或細胞活力。在某些實施例中，在此分析中，將單一試劑(CellTiter-Glo®試劑)直接添加至在補充血清之培養基中培養的細胞中。添加試劑引起細胞溶解並產生與所存在之 ATP 的量成正比例之發光信號。ATP 之量與存在於培養物中之細胞的數量成正比。亦可使用蛋白質結合染料磺醯若丹明 B(sulforhodamine B，SRB)量測細胞毒性(Skehan 等人(1990) J Natl Cancer Inst. 82:1107-12)。

【0724】 亦可評價所揭示之 ADC 的旁觀者殺滅活性。旁觀者殺滅活性可以例如藉由採用兩個細胞株之分析測定，該兩個細胞株之一對目標抗原呈陽性且一個對目標抗原呈陰性。在某些實施例中，該分析之設計允許僅追蹤目標陰性細胞。在某些實施例中，在以下三個條件下塗鋪細胞：(i)單獨目標陰性細胞(加標籤或經標記)；(ii)單獨目標陽性細胞；以及(iii)目標陰性細胞與目標陽性細胞之共培養物。接著，用 ADC 處理細胞並監測細胞毒性。當在 CellTiter-Glo®試劑存在下讀取盤時，可監測所有細胞群之活力。當在 OneGlo®試劑存在下讀取盤時，僅加標籤或經標記之目標陰性細胞產生信號。當將目標陰性細胞與目標陽性細胞混合時，目標陰

性細胞之殺滅指示旁觀者殺滅，而在無目標陽性細胞存在下，目標陰性細胞之殺滅指示脫靶殺滅。

【0725】在某些態樣中，本發明之特徵在於一種藉由破壞 RNA 剪接殺滅癌細胞或組織、抑制或調節癌細胞或組織之生長、或干擾癌細胞或組織之代謝的方法。該方法可以用於破壞 RNA 剪接會提供治療益處之任何個體。可以得益於破壞 RNA 剪接之個體包括(但不限於)患有贅生性病症諸如血液惡性病或實體腫瘤、或者有患贅生性病症之風險的個體。在某些實施例中，該血液惡性病係 B 細胞惡性病、血液癌症(白血病)、漿細胞癌症(骨髓瘤，例如多發性骨髓瘤)或淋巴結癌症(淋巴瘤)。在某些實施例中，血液惡性病係急性骨髓性白血病或多發性骨髓瘤。在某些實施例中，白血病係急性淋巴母細胞白血病(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)、慢性骨髓單核球性白血病(CMML)、急性單核球性白血病(AMoL)。在某些實施例中，淋巴瘤係霍奇金氏淋巴瘤或非霍奇金氏淋巴瘤。在某些實施例中，血液惡性病係骨髓發育不良症候群(MDS)。在某些實施例中，實體腫瘤係癌瘤諸如乳癌、胰臟癌、前列腺癌、結腸或結腸直腸癌、肺癌、胃癌、子宮頸癌、子宮內膜癌、卵巢癌、膽管上皮癌、神經膠質瘤或黑素瘤。在一些實施例中，實體腫瘤係乳癌、胃癌、前列腺癌、卵巢癌、肺癌(例如肺腺癌)、子宮癌(例如子宮漿液性子宮內膜癌)、唾腺管癌、黑素瘤、結腸癌、子宮頸癌、胰臟癌、腎癌、結腸直腸癌及食道癌。在某些實施例中，肺癌係肺腺癌。在某些實施例中，子宮癌係子宮漿液性子宮內膜癌。

【0726】在各種實施例中，可將所揭示之 ADC 投與表現 HER2 之任何細胞或組織，諸如表現 HER2 之贅生性細胞或組織中。例示性實施例

包括抑制 HER2 介導之細胞信號傳導之方法或殺滅細胞之方法。該方法可以用於表現 HER2 之任何細胞或組織，諸如癌細胞或轉移性病變。HER2 表現性癌症之非限制性實例包括乳癌、胃癌、膀胱癌、尿道上皮細胞癌、食道癌、肺癌(例如肺腺癌)、子宮癌(例如子宮漿液性子宮內膜癌)、唾腺管癌、子宮頸癌、子宮內膜癌及卵巢癌(English 等人(2013) Mol Diagn Ther. 17:85-99)。HER2 表現性細胞之非限制性實例包括 HCC1954 及 SKBR3 人類乳房導管癌細胞、N87 人類胃癌細胞及包含編碼 HER2 或其部分之重組核酸的細胞。

【0727】 在各種實施例中，可將所揭示之 ADC 投與表現 CD138 之任何細胞或組織，諸如表現 CD138 之贅生性細胞或組織中。例示性實施例包括抑制 CD138 介導之細胞信號傳導之方法或殺滅細胞之方法。該方法可以用於表現 CD138 之任何細胞或組織，諸如癌細胞或轉移性病變。CD138 表現性癌症之非限制性實例包括胸內癌症(例如肺癌、間皮瘤)、皮膚癌(例如基底細胞癌、鱗狀細胞癌)、頭頸癌(例如喉部、喉咽、鼻咽癌)、乳癌、泌尿生殖癌(例如子宮頸癌、卵巢癌、子宮內膜癌、前列腺癌、膀胱癌、尿道上皮癌)、血液惡性病(例如骨髓瘤，諸如多發性骨髓瘤、霍奇金氏淋巴瘤)及甲狀腺癌(Szatmári 等人(2015) Dis Markers 2015:796052)。CD138 表現性細胞之非限制性實例包括 MOLP8 人類多發性骨髓瘤細胞及包含編碼 CD138 或其部分之重組核酸的細胞。

【0728】 在各種實施例中，可將所揭示之 ADC 投與表現 EPHA2 之任何細胞或組織，諸如表現 EPHA2 之贅生性細胞或組織中。例示性實施例包括抑制 EPHA2 介導之細胞信號傳導之方法或殺滅細胞之方法。該方法可以用於表現 EPHA2 之任何細胞或組織，諸如癌細胞或轉移性病變。

EPHA2 表現性癌症之非限制性實例包括乳癌、腦癌、卵巢癌、膀胱癌、胰臟癌、食道癌、肺癌、前列腺癌、黑素瘤、食道癌及胃癌(Tandon 等人(2011) Expert Opin Ther Targets 15(1):31-51。EPHA2 表現性細胞之非限制性實例包括 PC3 人類前列腺癌細胞及包含編碼 EPHA2 或其部分之重組核酸的細胞。

【0729】 例示性方法包括使細胞與有效量(亦即，足以殺滅細胞之量)的如本文所描述之 ADC 接觸之步驟。該方法可以用於例如在活體外、活體內、離體或原位培養之細胞。舉例而言，可以在活體外於培養基中培養表現 HER2 之細胞(例如藉由對腫瘤或轉移性病變切片檢查收集的細胞；來自確定之癌細胞株之細胞；或重組細胞)且可以藉由將 ADC 添加至該培養基中來影響接觸步驟。該方法將引起對表現 HER2 之細胞，包括特別是表現 HER2 之腫瘤細胞的殺滅。或者，可藉由任何適合投與途徑(例如靜脈內、皮下或與腫瘤組織直接地接觸)將 ADC 投與個體以獲得活體內作用。此方法可以用於靶向其他細胞表面抗原(例如 CD138、EPHA2)之抗體。

【0730】 所揭示之 ADC 治療性組合物的活體內作用可以在適合動物模型中評價。舉例而言，可以使用異種癌症模型，其中將癌症外植體或傳代之異種移植組織引入免疫損害動物，諸如裸小鼠或 SCID 小鼠中(Klein 等人(1997) Nature Med. 3:402-8)。可使用量測對腫瘤形成、腫瘤消退或轉移之抑制作用的分析及類似分析量測功效。

【0731】 亦可使用評價藉由諸如細胞凋亡之類機制促進腫瘤死亡之活體內分析。在一個實施例中，可以檢查來自用該治療性組合物治療之荷瘤小鼠的異種移植物中細胞凋亡灶點之存在並與未治療之帶有異種移植物

之異種移植小鼠相比較。在經治療小鼠之該中發現細胞凋亡灶點之範圍提供關於該組合物治療功效之指示。

【0732】 本文進一步提供治療贅生性病症，例如癌症之方法。本文所揭示之 ADC 可以投與非人類哺乳動物或人類個體以用於治療目的。該等治療方法需要向患有或疑似患有贅生性病症之個體投與治療有效量的包含剪接調節劑連接至靶向抗體之 ADC 或組合物，該靶向抗體結合至癌細胞表面上表現之抗原、可實現結合或定位於癌細胞表面上。在一些實施例中，用該抗體-藥物結合物或組合物治療誘導對不表現目標抗原但鄰近於表現目標抗原之贅生性細胞的贅生性細胞之旁觀者殺滅。

【0733】 例示性實施例係將剪接調節劑遞送表現 HER2 之細胞的方法，該方法包含使剪接調節劑與免疫特異性結合至 HER2 抗原決定基之抗體結合並使該細胞暴露於 ADC。適用本發明之 ADC 的表現 HER2 之例示性腫瘤細胞包括胃癌細胞及乳房導管癌細胞。

【0734】 另一例示性實施例係將剪接調節劑遞送表現 CD138 之細胞的方法，該方法包含使剪接調節劑與免疫特異性結合至 CD138 抗原決定基之抗體結合並使該細胞暴露於 ADC。適用本發明之 ADC 的表現 CD138 之例示性腫瘤細胞包括多發性骨髓瘤細胞。

【0735】 另一例示性實施例係將剪接調節劑遞送表現 EPHA2 之細胞的方法，該方法包含使剪接調節劑與免疫特異性結合至 EPHA2 抗原決定基之抗體結合並使該細胞暴露於 ADC。適用本發明之 ADC 的表現 EPHA2 之例示性腫瘤細胞包括前列腺癌細胞。

【0736】 另一例示性實施例係見少或抑制腫瘤(例如 HER2 表現性腫瘤、CD138 表現性腫瘤、EPHA2 表現性腫瘤)之生長的方法，該方法包

含投與治療有效量的 ADC 或包含 ADC 之組合物。在一些實施例中，該治療足以減少或抑制患者之腫瘤的生長、減少轉移性病變之數量或尺寸、減小腫瘤負荷、減小原發腫瘤負荷、降低侵襲性、延長存活時間及/或維持或改善生活品質。在一些實施例中，腫瘤對單獨投與時的 ADC 之抗體或抗原結合片段(例如抗 HER2 抗體、抗 CD138 抗體、抗 EPHA2 抗體)具有抗性或難以用其治療，及/或腫瘤對單獨投與時的剪接調節劑藥物部分具有抗性或難以用其治療。

【0737】 在某些態樣中，本發明提供一種減少或抑制 HER2 表現性腫瘤之生長的方法。在某些實施例中，用該抗體-藥物結合物或組合物治療誘導對不表現 HER2 但鄰近於表現 HER2 之贅生性腫瘤細胞的腫瘤細胞之旁觀者殺滅。例示性 HER2 表現性腫瘤類型包括(但不限於)源自 HER2 表現性乳癌、胃癌、膀胱癌、尿道上皮細胞癌、食道癌、肺癌(例如肺腺癌)、子宮癌(例如子宮漿液性子宮內膜癌)、唾腺管癌、子宮頸癌、子宮內膜癌及卵巢癌之腫瘤。在一些實施例中，HER2 表現性腫瘤係源自 HER2 表現性乳癌、卵巢癌、胃癌、肺癌(例如肺腺癌)、子宮癌(例如子宮漿液性子宮內膜癌)或唾腺管癌之腫瘤。在某些實施例中，HER2 表現性腫瘤係肺腺癌或子宮漿液性子宮內膜癌。

【0738】 在某些態樣中，本發明提供一種減少或抑制 CD138 表現性腫瘤之生長的方法。在某些實施例中，用該抗體-藥物結合物或組合物治療誘導對不表現 CD138 但鄰近於表現 CD138 之贅生性腫瘤細胞的腫瘤細胞之旁觀者殺滅。例示性 CD138 表現性腫瘤類型包括(但不限於)源自 CD138 表現性胸內癌症(例如肺癌、間皮瘤)、皮膚癌(例如基底細胞癌、鱗狀細胞癌)、頭頸癌(例如喉部、喉咽、鼻咽癌)、乳癌、泌尿生殖癌(例

如子宮頸癌、卵巢癌、子宮內膜癌、前列腺癌、膀胱癌、尿道上皮癌)及甲狀腺癌之腫瘤。

【0739】 在某些態樣中，本發明提供一種減少或抑制 EPHA2 表現性腫瘤之生長的方法。在某些實施例中，用抗體-藥物結合物或組合物治療誘導對不表現 EPHA2 但鄰近於表現 EPHA2 之贅生性腫瘤細胞的腫瘤細胞之旁觀者殺滅。例示性 EPHA2 表現性腫瘤類型包括(但不限於)源自 EPHA2 表現性乳癌、腦癌、卵巢癌、膀胱癌、胰臟癌、食道癌、肺癌、前列腺癌、黑素瘤、食道癌、胃癌之腫瘤。在某些實施例中，EPHA2 表現性腫瘤係源自 EPHA2 表現性乳癌、前列腺癌、卵巢癌、肺癌、黑素瘤、結腸癌或食道癌之腫瘤。

【0740】 另外，可以將本發明之抗體投與表現 ADC 能夠結合之抗原的非人類哺乳動物以用於獸醫學目的或作為人類疾病之動物模型。就後者而言，此類動物模型可用於評價所揭示之 ADC 之治療功效(例如測試劑量及投藥時程)。

【0741】 本文進一步提供所揭示之 ADC 及組合物的治療用途。例示性實施例係 ADC 在治療贅生性病症(例如 HER2 表現性癌症、CD138 表現性癌症、EPHA2 表現性癌症)中之用途。另一例示性實施例係用於治療贅生性病症(例如 HER2 表現性癌症、CD138 表現性癌症、EPHA2 表現性癌症)之 ADC。用於鑑別患有表現目標抗原(例如 HER2、CD138、EPHA2、MSLN、FOLH1、CDH6、CEACAM5、CFC1B、ENPP3、FOLR1、HAVCR1、KIT、MET、MUC16、SLC39A6、SLC44A4、STEAP1)之癌症之個體的方法係此項技術中已知的且可用於鑑別適合用所揭示之 ADC 治療的患者。

【0742】 另一例示性實施例係 ADC 在製造用於治療贅生性病症(例如 HER2 表現性癌症、CD138 表現性癌症、EPHA2 表現性癌症)之藥劑之方法中的用途。

【0743】 用於實踐前述方法之治療性組合物可以調配成包含適合於所需遞送方法的醫藥學上可接受之載劑的醫藥組合物。例示性實施例係包含本發明之 ADC 及醫藥學上可接受之載劑的醫藥組合物。適合載劑包括當與治療性組合物組合時保持該治療性組合物之抗腫瘤功能且一般不與患者之免疫系統反應的任何材料。醫藥學上可接受之載劑包括生理上相容之任何及所有溶劑、分散介質、包衣劑、抗細菌劑及抗真菌劑、等張劑及吸收延遲劑，及類似物。醫藥學上可接受之載劑的實例包括例如以下一或多種：水、生理食鹽水、磷酸鹽緩衝生理食鹽水、右旋糖、甘油、乙醇、甲磺酸鹽及類似物，以及其組合。在許多情況下，該組合物中包括等張劑，例如糖、多元醇諸如甘露糖醇、山梨糖醇、或氯化鈉。醫藥學上可接受之載劑可進一步包含極少量之輔助物質，諸如濕潤劑或乳化劑、防腐劑或緩衝劑，由此可增加 ADC 之保存期限或有效性。

【0744】 治療性調配物可經溶解且經由能夠將治療性組合物遞送至腫瘤部位之任何途徑投與。可能有效之投藥途徑包括(但不限於)靜脈內、非經腸、腹膜內、肌肉內、腫瘤內、皮內、器官內、原位及類似途徑。治療性蛋白質製劑可經凍乾並以無菌粉末形式例如在真空下儲存，且接著在注射之前於抑菌水(含有例如苯甲醇防腐劑)中或無菌水中復原。治療性調配物可以包含 ADC 或其醫藥學上可接受之鹽，例如甲磺酸鹽。

【0745】 在一些實施例中，每天、兩月一次或其間任何時間段向患者投與 ADC。使用前述方法治療癌症之劑量及投與方案將隨該方法及目

標癌症而變化，且一般將取決於此項技術中所理解之多種其他因素。

【0746】已知各種遞送系統且其可用於投與一或多種本發明之ADC。投與 ADC 之方法包括(但不限於)非經腸投與(例如皮內、肌肉內、腹膜內、靜脈內及皮下)、硬膜外投與、腫瘤內投與及黏膜投與(例如鼻內及經口途徑)。此外，可採用經肺投與，例如藉由使用吸入器或噴霧器，及具有氣霧劑之調配物。參見例如美國專利第 6,019,968 號、第 5,985,320 號、第 5,985,309 號、第 5,934,272 號、第 5,874,064 號、第 5,855,913 號、第 5,290,540 號及第 4,880,078 號；以及國際公開案第 WO 1992/019244 號、第 WO 1997/032572 號、第 WO 1997/044013 號、第 WO 1998/031346 號及第 WO 1999/066903 號中所描述的用於經肺投與之組合物及方法。ADC 可藉由任何便利途徑投與，例如藉由輸注或快速注射，或藉由經上皮或黏膜皮膚內層(lining) (例如口腔黏膜、直腸及腸黏膜等)吸收。投與可為全身或局部的。

【0747】本文所揭示之治療性組合物可在製造及儲存條件下無菌且穩定。在一些實施例中，該等 ADC 或醫藥組合物中之一或多種係以乾燥無菌凍乾粉末或無水濃縮物形式提供於氣密密封式容器中且其可復原(例如用水或生理食鹽水)至適當濃度以向個體投與。在一些實施例中，該等預防劑或治療劑或醫藥組合物中之一或多種係以至少 5 mg、至少 10 mg、至少 15 mg、至少 25 mg、至少 35 mg、至少 45 mg、至少 50 mg、至少 75 mg 或至少 100 mg、或其間任何量之單位劑量，以乾燥無菌凍乾粉末形式提供於氣密密封式容器中。在一些實施例中，凍乾之 ADC 或醫藥組合物係在原始容器中在 2℃與 8℃之間儲存。在一些實施例中，本文所描述之 ADC 或醫藥組合物中的一或多種係以液體形式提供於氣密密封

式容器，例如指示試劑之數量及濃度的容器中。在一些實施例中，液體形式的所投與之組合物係以至少 0.25 mg、至少 0.5 mg/mL、至少 1 mg/mL、至少 2.5 mg/mL、至少 5 mg/mL、至少 8 mg/mL、至少 10 mg/mL、至少 15 mg/mL、至少 25 mg/mL、至少 50 mg/mL、至少 75 mg/mL 或至少 100 mg/mL ADC 提供於氣密密封式容器中。該液體形式可以在原始容器中在 2℃與 8℃之間儲存。

【0748】 在一些實施例中，所揭示之 ADC 可以併入適合於非經腸投與之醫藥組合物中。可注射溶液可以由在弗林特(flint)或琥珀色小瓶、安瓿或預填充注射器、或其他已知之遞送或儲存裝置中之液體或凍乾劑型構成。

【0749】 本文所描述之組合物可呈多種形式。此等形式包括例如液體、半固體及固體劑型，諸如液體溶液(例如可注射溶液及可輸注溶液)、分散液或懸浮液、錠劑、丸劑、粉劑、脂質體及栓劑。較佳形式取決於預期之投藥模式及治療應用。

【0750】 在各種實施例中治療涉及經由可接受之投與途徑單次快速注射或重複投與 ADC 製劑。

【0751】 可針對給定樣品中目標抗原之水準(例如目標抗原表現細胞之水準)評價患者以便幫助確定最有效之給藥方案等。例示性實施例係一種確定患者是否對用本發明之 ADC 治療起反應之方法，該方法包含提供來自患者之生物樣品並使生物樣品與 ADC 接觸。例示性生物樣品包括組織或體液，諸如炎性滲出物、血液、血清、腸液、糞便樣品或腫瘤切片(例如源自患有目標抗原表現性癌症，例如 HER2 表現性癌症、CD138 表現性癌症、EPHA2 表現性癌症，或有患目標抗原表現性癌症之風險之患

者的腫瘤切片)。在一些實施例中，樣品(例如組織及/或體液)可以自個體獲得，且可以使用適合免疫方法偵測及/或量測目標抗原之蛋白質表現(例如 HER2、CD138、EPHA2、MSLN、FOLH1、CDH6、CEACAM5、CFC1B、ENPP3、FOLR1、HAVCR1、KIT、MET、MUC16、SLC39A6、SLC44A4、STEAP1)。此類評價亦在整個療法用於監測目的，且可用於測量治療成功性並評價其他參數。

【0752】 在一些實施例中，可藉由使來自個體之腫瘤樣品與 ADC 接觸並評價腫瘤生長速率或體積來評價 ADC 之功效。在一些實施例中，當確定 ADC 有效時，可將其投與個體。

【0753】 以上治療方法可以與多種額外手術、化學療法或放射療法方案中之任一組合。在一些實施例中，本文所揭示之 ADC 或組合物係與一或多種額外治療劑，例如一或多種化學治療劑共調配及/或共投與。化學治療劑之非限制性實例包括烷基化劑，例如氮芥(nitrogen mustard)、伸乙亞胺化合物及磺酸烷基酯；抗代謝物，例如葉酸、嘌呤或嘧啶拮抗劑；抗有絲分裂劑，例如抗微管蛋白劑，諸如艾瑞布林(eribulin)或甲磺酸艾瑞布林(Halaven™)、長春花生物鹼(vinca alkaloid)及奧瑞他汀(auristatin)；細胞毒性抗生素；損害或干擾 DNA 表現或複製之化合物，例如 DNA 小溝結合劑；以及生長因子受體拮抗劑。在一些實施例中，化學治療劑可以為細胞毒性或細胞生長抑制劑。細胞毒性劑之實例包括(但不限於)抗有絲分裂劑，諸如艾瑞布林或甲磺酸艾瑞布林(Halaven™)、奧瑞他汀(例如單甲基奧瑞他汀 E (MMAE)、單甲基奧瑞他汀 F (MMAF))、類美登素(maytansinoid)(例如美登素(maytansine))、海兔毒素(dolastatin)、多司他汀(duostatin)、念珠藻環肽(cryptophycin)、長春花

生物鹼(例如長春新鹼(vincristine)、長春鹼(vinblastine))、紫杉烷(taxane)、紫杉醇(taxol)及秋水仙鹼(colchicine)；蒽環黴素(anthracycline)(例如道諾黴素(daunorubicin)、小紅莓(doxorubicin)、二羥基蒽二酮(dihydroxyanthracindione))；細胞毒性抗生素(例如絲裂黴素(mitomycin)、放射菌素(actinomycin)、倍癌黴素(duocarmycin)(例如CC-1065)、金黴素(auromycin)、金黴素(duomycin)、卡奇黴素(calicheamicin)、內黴素(endomycin)、酚黴素(phenomycin))；烷基化劑(例如順鉑(cisplatin))；插入劑(例如溴化乙錠)；拓樸異構酶抑制劑(例如依託泊苷(etoposide)、替尼泊苷(tenoposide))；放射性同位素，諸如$At^{211}$、$I^{131}$、$I^{125}$、$Y^{90}$、$Re^{186}$、$Re^{188}$、$Sm^{153}$、$Bi^{212}$或$^{213}$、$P^{32}$及鐳之放射性同位素(例如$Lu^{177}$)；以及細菌、真菌、植物或動物起源之毒素(例如蓖麻毒素(ricin)(例如蓖麻毒素 A 鏈)、白喉毒素(diphtheria toxin)、綠膿桿菌外毒素(*Pseudomonas exotoxin*)A(例如 PE40)、內毒素、有絲分裂素(mitogellin)、康普瑞汀(combrestatin)、侷限麴菌素(restrictocin)、白樹素(gelonin)、α-帚麴菌素(alpha-sarcin)、相思子毒素(abrin)(例如相思子毒素 A 鏈)、莫迪素(modeccin)(例如莫迪素 A 鏈)、麻瘋樹毒蛋白(curicin)、巴豆毒素(crotin)、肥皂草(*Sapaonaria officinalis*)抑制劑、糖皮質激素)。

【0754】本文亦揭示一或多種所揭示之 ADC 在例如根據以上所描述之方法製造用於治療癌症之藥劑中的用途。在一些實施例中，使用本文所揭示之 ADC，例如根據以上所描述之方法治療癌症。

【0755】在各種實施例中，用於本文所描述之實驗室及治療應用之套組係在本發明之範圍內。此類套組可以包含載劑、包裝或經分隔以接納

一或多個容器諸如小瓶、管及類似物之容器，每個容器包含擬用於本文所揭示之方法中之獨立成分之一，以及包含使用說明書(諸如本文所描述之用途)之標籤或插頁。套組可以包括含藥物部分之容器。本發明亦提供包裝在指示藥劑之數量的氣密密封式容器，諸如安瓿或藥囊中之一或多種ADC 或其醫藥組合物。

【0756】 套組可以包含以上描述之容器，及與其相聯之一或多個其他容器，該一或多個其他容器包含自商業及使用者觀點看合乎需要之材料，包括緩衝劑、稀釋劑、過濾劑、針、注射器；列出內含物及/或使用說明書之載體、包裝、容器、小瓶及/或管標籤；及具有使用說明書之包裝插頁。

【0757】 標籤可存在於容器上或與容器一起存在以容器該組合物係用於特定療法或非治療性應用，諸如預後、預防、診斷或實驗室應用。標籤亦可指示關於活體內或活體外用途，諸如本文所描述之用途的指導。在插頁或標籤上亦可包括指導及或其他資訊，該插頁或標籤係包括在套組中或之上。標籤可位於容器之上或與容器相聯。當將形成標籤之字母、數字或其他字符模製或蝕刻至容器自身中時，標籤可在容器上。當標籤存在於亦固持容器之貯器或載體內時，標籤可例如以包裝插頁形式與容器相聯。標籤可指示該組合物係用於診斷或治療病況，諸如本文所描述之癌症。

**新抗原及使用方法**

【0758】 在各種實施例中，本文亦揭示藉由在腫瘤細胞中誘導新抗原，使得該等腫瘤細胞可由患者之免疫系統靶向清除，以此治療患者的方法。不受理論束縛，在各種實施例中，投與單獨及/或作為 ADC 或組合物之一部分的剪接調節劑可以產生例如因再表現之內含子駐留內源性反轉錄

病毒而誘導免疫反應、誘導雙股 RNA 免疫反應之新抗原，及/或產生誘導免疫原性細胞死亡之新抗原。

【0759】 如本文所使用，術語「新抗原」係指先前未使免疫系統暴露的由一或多個腫瘤特異性突變產生及/或由腫瘤暴露於藥物(例如單獨及/或作為 ADC 或組合物之一部分的本文所揭示之剪接調節劑中之任一種或多種)產生之任何抗原。腫瘤特異性突變可包括錯義突變、框移、易位及 mRNA 剪接變異體，以及影響諸如磷酸化及糖基化之轉譯後加工之突變。在各種實施例中，此等例示性突變可源自非同義編碼變化及/或改變 mRNA 加工(例如剪接)之突變。在各種實施例中，所有此等例示性突變均會導致分子變化，該等分子變化可由適當 T 細胞受體辨別。在優選實施例較佳實施例中，例示性新抗原係藉由遞送單獨及/或作為 ADC 或組合物之一部分的剪接調節劑所誘導的新抗原。在各種實施例中，遞送剪接調節劑(例如本文所揭示之剪接調節劑中之任一種或多種)可以誘導新穎 mRNA 剪接，由此轉譯出免疫系統先前未暴露過的含有一或多個新穎肽結構域之蛋白質。在各種實施例中，腫瘤特異性突變可為由遞送或投與剪接調節劑、ADC 或包含剪接調節劑或 ADC 之組合物產生的 mRNA 剪接變異體。

【0760】 不受理論束縛，在各種實施例中，遞送單獨及作為 ADC 或組合物之一部分的剪接調節劑可以誘導新穎 mRNA 剪接(例如外顯子跳躍、內含子保留)，由此引起各種基因之開放閱讀框架及/或編碼序列的改變。在各種實施例中，此等改變之基因轉譯成由免疫系統識別為外源的含有一或多個新穎肽結構域之蛋白質。在各種實施例中，在無剪接調節劑處理存在下，該一或多個新穎肽結構域不存在於該蛋白質或人類蛋白質組之

任何其他部分中。在各種實施例中，含有該一或多個新穎肽結構域之蛋白質可藉由蛋白酶體降解以產生新穎肽片段，該等新穎肽片段充當例如經由 MHC 呈現進行之免疫肽呈現機制的受質。在各種實施例中，代表新抗原之新穎肽片段可呈遞於例如腫瘤細胞上之 MHC1 結合肽組中。

【0761】 在各種實施例中，遞送單獨及作為 ADC 或組合物之一部分的剪接調節劑會引起一或多個腫瘤細胞內在事件(例如細胞生長停滯)。在各種實施例中，腫瘤細胞內在事件可引起(1)吞噬細胞之接合增強(Bracci 等人 (2014) Cell Death Differ. 21(1):15-25)；(2)新穎肽片段轉運至腫瘤引流淋巴結以與抗原呈現細胞接合；(3)抗原呈現細胞加工來自吞噬腫瘤細胞之新穎肽片段，且將該等片段作為新抗原呈現給循環原生 T 細胞群；(4)新穎肽片段與將該等片段識別為新抗原之 T 細胞表現受體相互作用；(5)效應 T 細胞反應之成熟及活化(例如 CD4+及/或 CD8+ T 細胞；及/或(6) T 細胞與暴露於剪接調節劑治療之額外腫瘤細胞接合且將代表新抗原之新穎肽片段呈現於其表面 MHC1 複合體上。在各種實施例中，腫瘤細胞內在事件可直接地或間接地引起效應功能之 T 細胞接合及/或新抗原呈現腫瘤細胞之殺滅。

【0762】 另外，不受理論束縛，在各種實施例中，遞送單獨及作為 ADC 或組合物之一部分的剪接調節劑可引起內含子駐留內源性反轉錄病毒之再表現，由此引起雙股 RNA 免疫反應。

【0763】 此外，不受理論束縛，在各種實施例中，遞送單獨及作為 ADC 或組合物之一部分的剪接調節劑可引起藉由剪接調節劑誘導之突變源性新抗原釋放所觸發之免疫原性細胞死亡。在各種實施例中，遞送單獨及作為 ADC 或組合物之一部分的剪接調節劑可誘導雙股 RNA 免疫反

應。在各種實施例中，雙股 RNA 免疫反應可由內含子駐留內源性反轉錄病毒之再表現引起。在各種實施例中，雙股 RNA 免疫反應可引起腫瘤細胞死亡。在各種實施例中，遞送單獨及作為 ADC 或組合物之一部分的剪接調節劑可誘導免疫原性細胞死亡。在各種實施例中，免疫原性細胞死亡可由突變源性新抗原之釋放及/或針對腫瘤細胞之宿主免疫反應引起。

【0764】 因此，在各種實施例中，揭示治療方法，其包含藉由投與一或多種剪接調節劑及/或 ADC 及/或包含剪接調節劑或 ADC 之組合物，例如本文所揭示之任何剪接調節劑、ADC 或組合物來誘導新抗原。在各種實施例中，該方法包含投與劑量低於不誘導新抗原所需之劑量的剪接調節劑、ADC 或組合物。在一些實施例中，該方法包含投與一或多次初始誘導劑量以產生新抗原並誘導免疫反應(例如將原生 T 細胞轉化成記憶細胞)，隨後投與降低之劑量或投與頻率(亦即，歸因於剪接調節劑、ADC 或組合物之組合作用及新抗原之免疫靶向)。在一些實施例中，治療可包含投與剪接調節劑、ADC 或組合物以誘導基於新抗原之免疫反應與至少一種額外療法(例如第二抗癌療法)的組合。舉例而言，在一些實施例中，治療可包含投與剪接調節劑、ADC 或組合物以誘導基於新抗原之免疫反應與投與一或多種檢查點抑制劑的組合。在一些實施例中，治療可包含投與剪接調節劑、ADC 或組合物以誘導基於新抗原之免疫反應與投與一或多種細胞介素或細胞介素類似物的組合。在一些實施例中，治療可包含投與剪接調節劑、ADC 或組合物以誘導基於新抗原之免疫反應與投與一或多種新抗原疫苗的組合。在一些其他實施例中，治療可包含投與剪接調節劑、ADC 或組合物以誘導基於新抗原之免疫反應與投與一或多種工程改造之腫瘤靶向 T 細胞(例如 CAR-T)的組合。

【0765】 在一些實施例中，新抗原可以用於監測剪接調節劑、ADC 或組合物治療之有效性。舉例而言，在投與剪接調節劑、ADC 或組合物之後，可以獲得患者樣品(例如腫瘤切片)並針對新抗原或針對免疫或炎症反應之標誌進行篩選。若偵測到新抗原及/或免疫反應，則可例如以降低之劑量提供進一步的治療。

【0766】 在各種實施例中，揭示治療方法，其包含藉由投與一或多種剪接調節劑及/或 ADC 及/或包含剪接調節劑或 ADC 之組合物，例如本文所揭示之任何剪接調節劑、ADC 或組合物來誘導雙股 RNA 免疫反應。

【0767】 在各種實施例中，揭示治療方法，其包含藉由投與一或多種剪接調節劑及/或 ADC 及/或包含剪接調節劑或 ADC 之組合物，例如本文所揭示之任何剪接調節劑、ADC 或組合物來誘導免疫原性細胞死亡。

【0768】 在各種實施例中，剪接調節劑、包含剪接調節劑之 ADC 或組合物之投與可以與任何已知抗癌療法組合。可用於腫瘤治療之當前免疫活化策略的實例包括(但不限於)用免疫檢查點抑制劑(ICI)分子治療、用細胞介素或細胞介素類似物治療、用腫瘤相關疫苗進行疫苗接種及工程改造腫瘤靶向 T 細胞(例如擴增腫瘤浸潤性淋巴細胞或 CAR-T)。此等技術主要集中於增強或誘導對已有腫瘤抗原(細胞表面蛋白之突變或異常表現)的免疫反應。此等策略中之一或多種可涉及一或多個能夠誘導抗原 T 細胞反應之突變。舉例而言，患者對檢查點抑制之反應可能與非同義突變負荷相關。另外，可使用依賴於預先存在之突變及此等突變之抗原性的癌症疫苗方法。

【0769】 剪接調節劑及/或包含此類調節劑之 ADC 可誘導出現在多個譜系中之轉錄組的大範圍變化。此等 mRNA 變化之轉譯可產生穩健且

可再現之蛋白質變化，該等變化產生在多個 HLA 同型中具有高親和力之 MHC1 結合新肽。不受理論束縛，歸因於轉錄組及蛋白質組之大量變化，剪接調節劑及/或 ADC 治療可以富集潛在地反應性新抗原之數量以增強適應性免疫反應之接合。

【0770】如本文所描述，術語「剪接調節劑(splicing modulator)」、「剪接體調節劑」或「剪接調節劑(splice modulator)」係指藉由與剪接體各組分相互作用而具有抗癌活性的化合物。在一些實施例中，剪接調節劑改變目標細胞中之剪接速率或形式。充當抑制劑之剪接調節劑例如能夠減少不受控制之細胞增殖。確切地說，在一些實施例中，剪接調節劑可藉由抑制 SF3b 剪接體複合體起作用。在一些實施例中，剪接調節劑係選自本文所揭示之剪接調節劑中之任一種或多種。在一些實施例中，剪接調節劑係作為單獨藥劑使用，遞送至細胞及/或投與個體。在一些其他實施例中，剪接調節劑係作為 ADC(例如選自本文所揭示之例示性 ADC 中之任一種)之一部分使用，遞送至細胞及/或投與個體。在一些其他實施例中，剪接調節劑係作為包含剪接調節劑之多個複本或帶有該剪接調節劑之 ADC 之多個複本的組合物之一部分使用，遞送至細胞及/或投與個體。此類組合物在本文中已揭示。

【0771】在一些實施例中，作為 ADC(例如選自本文所揭示之例示性 ADC 中之任一種的 ADC)之一部分使用、遞送至細胞及/或投與個體的調節劑提供相對於作為單獨藥劑使用、遞送至、及/或投與個體之剪接調節劑增加之治療益處。舉例而言，在一些實施例中，作為 ADC 之一部分使用、遞送至、及/或投與個體的剪接調節劑提供剪接調節劑向表現靶抗原(亦即，ADC 中之抗體部分所靶向之抗原)之贅生性細胞的靶向遞送。

在一些實施例中，剪接調節劑之此類靶向遞送使脫靶治療及/或脫靶細胞毒性減少。在一些實施例中，此類靶向遞送促進腫瘤選擇性新抗原呈現於贅生性細胞上，而非呈現於不表現目標抗原之健康細胞上。在一些實施例中，此類靶向遞送引起例如至少 75%、80%、85%、90%、95%或 99%的在經靶向贅生性細胞而非脫靶細胞中表示新抗原之新穎 mRNA 及 MHC 相關肽的選擇性剪接及誘導。因此，不受理論束縛，在一些實施例中，由於在用如本文所揭示之 ADC 治療後腫瘤細胞上新抗原之優先表現，在效應 T 細胞激活及/或擴增(例如使用新抗原疫苗)之後，免疫系統可優先攻擊新抗原呈現贅生性細胞而非健康細胞。

**免疫誘導及治療方案：**

【0772】 在各種實施例中，本發明提供一種誘導至少一種新抗原之方法，該方法係藉由使贅生性細胞與有效量之剪接調節劑、基於剪接調節劑之抗體-藥物結合物(ADC)或包含剪接調節劑或 ADC 之組合物接觸實現。在各種實施例中，本發明提供一種誘導雙股 RNA 免疫反應之方法，該方法係藉由使贅生性細胞與有效量之剪接調節劑、基於剪接調節劑之抗體-藥物結合物(ADC)或包含剪接調節劑或 ADC 之組合物接觸實現。在各種實施例中，本發明提供一種誘導免疫原性細胞死亡之方法，該方法係藉由使贅生性細胞與有效量之剪接調節劑、基於剪接調節劑之抗體-藥物結合物(ADC)或包含剪接調節劑或 ADC 之組合物接觸實現。

【0773】 在一些實施例中，該至少一種新抗原包含 SEQ ID NO:37-65 中之任一個之胺基酸序列。在一些實施例中，該至少一種新抗原包含 SEQ ID NO: 37 之胺基酸序列。在一些實施例中，該至少一種新抗原包含 SEQ ID NO: 39 之胺基酸序列。在一些實施例中，該至少一種新抗原包含

SEQ ID NO:46-49 中之任一個之胺基酸序列。

【0774】 在一些實施例中，贅生性細胞存在於活體外細胞培養物中。在一些實施例中，贅生性細胞係自個體獲得。在一些實施例中，贅生性細胞存在於個體體內。在一些實施例中，贅生性細胞係源自血液惡性病或實體腫瘤。在一些實施例中，該血液惡性病係選自 B 細胞惡性病、白血病、淋巴瘤及骨髓瘤。在一些實施例中，該血液惡性病係選自急性骨髓性白血病及多發性骨髓瘤。在一些實施例中，該實體腫瘤係選自乳癌(例如 HER2 陽性乳癌)、胃癌(例如胃腺癌)、前列腺癌、卵巢癌、肺癌(例如肺腺癌)、子宮癌(例如子宮漿液性子宮內膜癌)、唾腺管癌、黑素瘤、結腸癌、子宮頸癌、胰臟癌、腎癌、結腸直腸癌及食道癌。在一些實施例中，該實體腫瘤係選自 HER2 陽性乳癌、胃腺癌及前列腺癌。

【0775】 在各種實施例中，本發明進一步提供一種在患有或疑似患有贅生性病症之個體中誘導至少一種新抗原及/或 T 細胞反應的方法，該方法係藉由向該個體投與有效量之剪接調節劑、ADC 或包含剪接調節劑或 ADC 之組合物實現。在各種實施例中，本文亦提供一種治療患有或疑似患有贅生性病症之個體的方法，該方法係藉由向該個體投與有效量之剪接調節劑、ADC 或包含剪接調節劑或 ADC 之組合物實現，其中該剪接調節劑、抗體-藥物結合物或組合物之投與將誘導至少一種新抗原及/或 T 細胞反應。

【0776】 在各種其他實施例中，本發明提供一種在患有或疑似患有贅生性病症之個體中誘導雙股 RNA 免疫反應的方法，該方法係藉由向該個體投與有效量之剪接調節劑、ADC 或包含剪接調節劑或 ADC 之組合物實現。在各種實施例中，本文亦提供一種治療患有或疑似患有贅生性病症

之個體的方法，該方法係藉由向該個體投與有效量之剪接調節劑、ADC 或包含剪接調節劑或 ADC 之組合物實現，其中該剪接調節劑、抗體-藥物結合物或組合物之投與將誘導雙股 RNA 免疫反應。

【0777】 在又其他實施例中，本發明提供一種在患有或疑似患有贅生性病症之個體中誘導免疫原性細胞死亡的方法，該方法係藉由向該個體投與有效量之剪接調節劑、ADC 或包含剪接調節劑或 ADC 之組合物實現。在各種實施例中，本文進一步提供一種治療患有或疑似患有贅生性病症之個體的方法，該方法係藉由向該個體投與有效量之剪接調節劑、ADC 或包含剪接調節劑或 ADC 之組合物實現，其中該剪接調節劑、抗體-藥物結合物或組合物之投與將誘導免疫原性細胞死亡。

【0778】 在本文所描述之治療方法的一些實施例中，該至少一種新抗原包含 SEQ ID NO:37-65 中之任一個之胺基酸序列。在一些實施例中，該至少一種新抗原包含 SEQ ID NO: 37 之胺基酸序列。在一些實施例中，該至少一種新抗原包含 SEQ ID NO: 39 之胺基酸序列。在一些實施例中，該至少一種新抗原包含 SEQ ID NO:46-49 中之任一個之胺基酸序列。

【0779】 在一些實施例中，本發明進一步提供一種治療患有或疑似患有贅生性病症之個體的方法，該方法係藉由向該個體投與有效量之剪接調節劑、ADC 或包含剪接調節劑或 ADC 之組合物實現，其中投與該剪接調節劑、抗體-藥物結合物或組合物以及一或多種包含第二藥劑之額外療法將誘導免疫原性細胞死亡。

【0780】 在本文所描述之治療方法的一些實施例中，相較於該剪接調節劑、抗體-藥物結合物、組合物或第二藥劑之標準劑量，剪接調節

劑、抗體-藥物結合物、組合物或第二藥劑之投與量因至少一種新抗原及/或 T 細胞反應之誘導而減少。在一些實施例中，剪接調節劑、抗體-藥物結合物、組合物或第二藥劑之投與量相較於剪接、抗體-藥物結合物、組合物或第二藥劑之標準劑量減少 10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、75%或 90%。在一些實施例中，該剪接調節劑、抗體-藥物結合物、組合物或第二藥劑之投與頻率比該剪接調節劑、抗體-藥物結合物、組合物或第二藥劑之標準給藥方案低至少 10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、75%或 90%。在一些實施例中，該剪接調節劑、抗體-藥物結合物、組合物或第二藥劑之投與量及/或劑量使全身毒性降低及/或耐受性改善。

【0781】 如本文所使用，術語「標準劑量」或「標準給藥方案」係指治療劑之任何常用或常規給藥方案，例如由製造商提出、經管理機構批准或以其他方式在人類個體中經測試滿足平均患者需求之方案。在一些實施例中，治療劑係具有抗癌活性之剪接調節劑、抗體、抗體-藥物結合物。

【0782】 舉例而言，作為本文所揭示之例示性抗 HER2 抗體之曲妥珠單抗的標準給藥方案可為經 90 分鐘靜脈內投與 8 mg/kg(第 1 週)，隨後每 3 週(第 4 週至治療週期結束時)經 30-90 分鐘靜脈內投與 6 mg/kg(Herceptin®(曲妥珠單抗)FDA Label Supplement, 2017)。

【0783】 作為另一實例，作為例示性抗 CTLA4 檢查點抑制劑抗體之伊匹單抗(ipilimumab)的標準給藥方案可為每 3 週經 90 分鐘靜脈內投與 3 mg/kg，持續 4 次劑量(Yervoy® (伊匹單抗) FDA Label Supplement, 2018)。伊匹單抗之另一種標準給藥方案可為每 3 週經 90 分鐘靜脈內投與

10 mg/kg，持續 4 次劑量，隨後每 12 週投與 10 mg/kg，持續長達 3 年(Yervoy® (伊匹單抗) FDA Label Supplement, 2018)。

【0784】 作為另一實例，作為例示性抗 PD1 檢查點抑制劑抗體之納武單抗(nivolumab)的標準給藥方案可為每 2 週經 60 分鐘靜脈內投與 3 mg/kg (Opdivo® (nivolumab) FDA Label, 2015)。

【0785】 作為另一個實例，作為例示性抗 PDL1 檢查點抑制劑抗體之阿特珠單抗(atezolizumab)的標準給藥方案可為每 3 週經 60 分鐘靜脈內投與 1200 mg (Tecentriq® (阿特珠單抗) FDA Label Supplement, 2018)。

【0786】 作為又另一實例，作為例示性抗 HER2 抗體-藥物結合物之 T-DM1 的標準給藥方案可為每 3 週經 90 分鐘靜脈內投與 3.6 mg/kg (Kadcyla® (T-DM1) FDA Label Supplement, 2016)。

【0787】 在一些實施例中，本文所描述之方法可進一步包含投與至少一種額外療法(例如檢查點抑制劑、新抗原疫苗、細胞介素或細胞介素類似物、CAR-T 等)。在一些實施例中，相較於該剪接調節劑、抗體-藥物結合物、組合物及/或該至少一種額外療法之標準劑量，該剪接調節劑、抗體-藥物結合物、組合物及/或該至少一種額外療法之投與量因至少一種新抗原及/或 T 細胞反應之誘導而減少。在一些實施例中，相較於該剪接調節劑、抗體-藥物結合物、組合物及/或該至少一種額外療法之標準劑量，該剪接調節劑、抗體-藥物結合物、組合物及/或該至少一種額外療法之投與量因雙股 RNA 免疫反應之誘導而減少。在一些實施例中，相較於該剪接調節劑、抗體-藥物結合物、組合物及/或該至少一種額外療法之標準劑量，該剪接調節劑、抗體-藥物結合物、組合物及/或該至少一種額外

療法之投與量因免疫原性細胞死亡之誘導而減少。在一些實施例中，相較於該剪接調節劑、抗體-藥物結合物、組合物及/或該至少一種額外療法之標準劑量，該剪接調節劑、抗體-藥物結合物、組合物及/或該至少一種額外療法之投與量減少 10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、75%或 90%。在一些實施例中，該剪接調節劑、抗體-藥物結合物、組合物及/或該至少一種額外療法之投與頻率比該剪接調節劑、抗體-藥物結合物、組合物及/或該至少一種額外療法之標準給藥方案低至少 10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、75%或 90%。在一些實施例中，該剪接調節劑、抗體-藥物結合物、組合物及/或該至少一種額外療法之投與量及/或劑量使全身毒性降低及/或耐受性改善。

【0788】 在一些實施例中，該剪接調節劑、抗體-藥物結合物或組合物之投與係在投與該至少一種額外療法之前起始。在其他實施例中，該剪接調節劑、抗體-藥物結合物或組合物之投與係在投與該至少一種額外療法之後起始。在又其他實施例中，該剪接調節劑、抗體-藥物結合物或組合物之投與係與該至少一種額外療法之投與同時起始。

【0789】 在一些實施例中，在初始投與之後，重複投與該剪接調節劑、抗體-藥物結合物或組合物至少一次。在一些實施例中，用於重複投與的該剪接調節劑、抗體-藥物結合物或組合物之量相較於用於初始投與之量有所減少。在一些實施例中，用於重複投與的該剪接調節劑、抗體-藥物結合物或組合物之量相較於該剪接調節劑、抗體-藥物結合物或組合物之標準劑量有所減少。在一些實施例中，用於重複投與的該剪接調節劑、抗體-藥物結合物或組合物之量相較於該剪接調節劑、抗體-藥物結合

物或組合物之標準劑量或初始劑量減少 10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、75%或 90%。

【0790】 在一些實施例中，在初始投與之後，重複投與該至少一種額外療法至少一次。在一些實施例中，用於重複投與的該至少一種額外療法之量相較於用於初始投與之量有所減少。在一些實施例中，用於重複投與的至少一種額外療法之量相較於該至少一種額外療法之標準劑量有所減少。在一些實施例中，用於重複投與的該至少一種額外療法之量相較於該至少一種額外療法之標準劑量或初始劑量減少 10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、75%或 90%。

【0791】 在一些實施例中，該剪接調節劑、抗體-藥物結合物或組合物之重複投與係與該至少一種額外療法之重複投與同時進行。在一些實施例中，該剪接調節劑、抗體-藥物結合物或組合物之投與係與該至少一種額外療法之重複投與依序或錯開進行。

【0792】 在一些實施例中，該至少一種額外療法包含投與檢查點抑制劑，例如本文所揭示之任何檢查點抑制劑。在一些實施例中，個體對單獨投與時的檢查點抑制劑不耐受、無反應或反應不良。在一些實施例中，檢查點抑制劑靶向 PD1/PDL1、CTLA4、OX40、CD40、LAG3、TIM3、GITR 及/或 KIR。在一些實施例中，檢查點抑制劑靶向 CTLA4、OX40、CD40 及/或 GITR。在一些實施例中，檢查點抑制劑係對其目標具有抑制或促效活性之抗體。在一些實施例中，檢查點抑制劑與抑制性抗體或其他類似抑制性分子一起靶向。在其他實施例中，檢查點抑制劑與促效劑抗體或其他類似促效劑分子一起靶向。

【0793】 在一些其他實施例中，該至少一種額外療法包含投與新抗

原疫苗，例如本文所揭示之任何新抗原疫苗。在一些實施例中，該剪接調節劑、ADC 或組合物係在投與該新抗原疫苗之前投與。在一些實施例中，該剪接調節劑、ADC 或組合物係在投與該新抗原疫苗之後投與。在一些實施例中，該剪接調節劑、ADC 或組合物之投與係與該新抗原疫苗之投與同時進行。在一些實施例中，在初始投與之後，重複投與該剪接調節劑、ADC 或組合物至少一次。在一些實施例中，用於重複投與的該剪接調節劑、ADC 或組合物之量相較於用於初始投與之量有所減少。

【0794】 在一些實施例中，新抗原疫苗包含至少一種新抗原肽。在一些實施例中，該至少一種新抗原肽之長度在約 10 個至約 50 個胺基酸範圍內。在一些實施例中，該至少一種新抗原肽之長度在約 10 個至約 35 個胺基酸範圍內。在一些實施例中，該至少一種新抗原肽之長度在約 15 個至約 25 個胺基酸範圍內。在一些實施例中，該至少一種新抗原肽包含一個或超過一個新抗原序列。

【0795】 在一些實施例中，該新抗原序列包含 SEQ ID NO:37-65 中之任一個之胺基酸序列。在一些實施例中，該新抗原序列包含 SEQ ID NO: 37 之胺基酸序列。在一些實施例中，該新抗原序列包含 SEQ ID NO: 39 之胺基酸序列。在一些實施例中，該新抗原序列包含 SEQ ID NO:46-49 中之任一個之胺基酸序列。

【0796】 在一些其他實施例中，該新抗原序列包含 SEQ ID NO:66-93 中之任一個之胺基酸序列，或 SEQ ID NO:66-93 中之任一個之抗原部分。在一些實施例中，該新抗原序列包含 SEQ ID NO: 66 之胺基酸序列，或 SEQ ID NO: 66 之抗原部分。在一些實施例中，該新抗原序列包含 SEQ ID NO:74-77 中之任一個之胺基酸序列，或 SEQ ID NO:74-77 中

之任一個之抗原部分。在一些實施例中，新抗原序列及/或抗原部分之長度在約 10 個至約 50 個胺基酸範圍內。在一些實施例中，新抗原序列及/或抗原部分之長度在約 10 個至約 35 個胺基酸範圍內。在一些實施例中，新抗原序列及/或抗原部分之長度在約 15 個至約 25 個胺基酸範圍內。在一些實施例中，新抗原序列及/或抗原部分之長度範圍係約 10 個至約 20 個胺基酸。在一些實施例中，新抗原序列及/或抗原部分不排他性地與典型肽序列重疊或由典型肽序列組成(例如表 21 中加底線之例示性典型肽序列中之任一個)。

【0797】 如本文所使用，術語新抗原序列之「抗原部分」或「抗原片段」係指新抗原序列中保持誘導 T 細胞反應(例如抗原特異性擴增及/或效應 T 細胞群成熟)之能力的一或多個片段。在一些實施例中，抗原部分亦可保持由抗原呈現細胞(例如樹突狀細胞)內化、加工及/或呈現之能力。在一些實施例中，抗原部分亦保持 T 細胞激活功能。在一些實施例中，新抗原序列之抗原部分之長度在約 10 個至約 50 個胺基酸範圍內。在一些實施例中，新抗原序列之抗原部分之長度在約 10 個至約 35 個胺基酸範圍內。在一些實施例中，新抗原序列之抗原部分之長度在約 15 個至約 25 個胺基酸範圍內。在一些實施例中，新抗原序列之抗原部分之長度範圍係約 10 個至約 20 個胺基酸。在一些實施例中，將新抗原序列之抗原部分(例如 SEQ ID NO: 66-93 中之任一個的抗原部分)或其編碼 mRNA 調配為新抗原疫苗。

【0798】 抗原部分之一個例示性實施例係側接 SEQ ID NO: 66 之胺基酸 45-53 的區域。抗原部分之另一例示性實施例係側接 SEQ ID NO: 66 之胺基酸 82-90 之區域。在一些實施例中，該抗原部分能夠結合至個體體

內表現之至少一個 HLA 對偶基因(例如 HLA-A*02:01)。在一些其他實施例中，該抗原部分能夠結合至罹患贅生性病症之個體群體中至少 10%、至少 15%、至少 20%、至少 25%、至少 30%、至少 35%、至少 40%或至少 45%之個體體內表現之至少一個 HLA 對偶基因。在一些實施例中，抗原部分能夠引起針對存在於罹患贅生性病症之個體群體之至少 1%、至少 5%或至少 10%中之腫瘤的 T 細胞反應。

【0799】 在一些實施例中，抗原部分不排他性地與典型肽序列重疊或由典型肽序列組成。如本文所使用，術語「典型肽序列」係指在不與剪接調節劑接觸情況下(例如在不與單獨及/或作為 ADC 或組合物之一部分的剪接調節劑接觸之情況下)存在於人類蛋白質組中及/或先前已使免疫暴露的任何相鄰肽序列。在一些實施例中，典型肽序列係源自典型轉錄物開放閱讀框架及/或由典型轉錄物開放閱讀框架編碼。例示性典型肽序列在表 21 中加底線。

【0800】 在一些實施例中，當投與剪接調節劑(例如單獨及/或作為 ADC 或組合物之一部分)時，典型肽序列可源自緊靠在剪接調節劑所誘導之異常剪接事件之前的 5'框內 24 個核苷酸及/或由其編碼。因此，在一些實施例中，典型肽序列包含緊靠剪接調節劑所誘導之新抗原序列之 N 末端的 8 個胺基酸或由其組成。在一些實施例中，當 5'外顯子序列以密碼子之末端核苷酸終止時，典型肽序列終止於外顯子末端。在一些其他實施例中，當 5'外顯子序列以密碼子之三個核苷酸中之一個或兩個終止時，典型肽序列係源自不完整密碼子之前的 24 個核苷酸及/或由該等核苷酸編碼。在一些實施例中，在異常剪接事件 3'之 mRNA 序列可在源自 5'外顯子之相同開放閱讀框架中轉譯，直至達到終止密碼子，之後可終止轉譯。在一

些實施例中，當異常剪接事件(例如外顯子跳躍)引起典型轉錄物開放閱讀框架之保留時，可轉譯 C 末端序列得到額外 24 個核苷酸，編碼 8 個 C 端胺基酸。在此情形中，在一些實施例中，僅跨異常外顯子接合點之區域可編碼新抗原序列。在一些實施例中，當開放閱讀框架移位(例如內含子保留)時，完整 C 末端序列(由 3' mRNA 編碼)可編碼新抗原序列。

【0801】 在一些實施例中，藉由比較新抗原序列與典型肽序列；及選擇不排他性地與典型肽序列重疊、由典型肽序列組成及/或與典型肽序列對準的新抗原序列之一部分來選擇新抗原序列之抗原部分。在一些實施例中，可以與全長新抗原序列(例如得到抗原部分之新抗原序列)相同之方式，針對抗原性及/或 T 細胞激活功能篩選新抗原序列之抗原部分。在一些實施例中，使用 T 細胞激活分析，諸如本文所描述之例示性 T 細胞激活實驗，評價新抗原序列之抗原部分的抗原性及/或 T 細胞激活功能。

【0802】 在一些實施例中，新抗原序列係對個體具有特異性之新抗原序列。在一些實施例中，新抗原序列係用於個體之個人化新抗原疫苗。在一些實施例中，用於產生針對個體之個人化新抗原疫苗的新抗原序列能夠結合至個體體內表現之至少一個 HLA 對偶基因。在一些實施例中，藉由例如在投與剪接調節劑或 ADC 之後，鑑別個體之腫瘤中表現的新抗原，並選擇包含在患者之腫瘤中所觀察到的新抗原序列之疫苗，例如包含在腫瘤中觀察到的 SEQ ID NO:37-65 中之任一個之胺基酸序列的疫苗，選擇個人化新抗原疫苗。

【0803】 術語「個人化」當用於描述新抗原疫苗時係指藉由鑑別在患者體內產生之一或多個新抗原，較佳地在暴露於剪接調節劑、ADC 或組合物之後於患者體內鑑別之新抗原，且接著使用該等新抗原中之一或多

個作為用於該患者之疫苗之基礎而產生的疫苗。因此，在一些實施例中，給與患者剪接調節劑、ADC 或組合物並篩選由該治療產生之新抗原。在一些實施例中，所選新抗原疫苗包含本文所揭示之新抗原肽或 mRNA 並確定在暴露於剪接調節劑、ADC 或組合物之後存在於患者體內。在一些實施例中，可向患者一次性或重複投與剪接調節劑、ADC 或組合物及/或肽或 mRNA 疫苗。隨後，在一些實施例中，使用該等新抗原中之一或多種產生給與患者之個人化疫苗。在一些實施例中，用於產生個人化疫苗之一或多種新抗原對一或多個患者特異性 HLA 對偶基因具有結合親和力。在一些實施例中，患者表現結合至一或多種新抗原之一或多個 MHC1 對偶基因。可使用此項技術中已知的任何計算預測方法來確定有關給定新抗原是否會結合至特定 MHC1 對偶基因之預測。例示性計算預測方法揭示於例如 Meydan 等人(2013) BMC Bioinformatics 14(增刊 2):S13，關於此類方法以引用之方式併入本文中。

【0804】 在一些其他實施例中，新抗原序列係通用新抗原序列。在一些實施例中，新抗原序列係通用新抗原疫苗。

【0805】 術語「通用」當用於描述新抗原疫苗時係指具有基於常見或已知新抗原之肽或 mRNA 序列的疫苗，該肽或 mRNA 序列係藉由對多個患者及/或患者組織樣品中產生之新抗原定序，較佳地在暴露於剪接調節劑、ADC 或組合物之後對新抗原定序所觀察到的。該疫苗中使用之肽或 mRNA 序列不必存在於每個患者體內，而是在至少數個患者或患者組織樣品中觀察到。在一些實施例中，可向患者一次性或重複投與剪接調節劑、ADC 或組合物及/或肽或 mRNA 疫苗。隨後，在一些實施例中，使用該肽或 mRNA 序列對其他患者疫苗接種。在一些實施例中，給與患者剪

接調節劑、ADC 或組合物，且接著給與具有已知新抗原之肽或 mRNA 疫苗以增強針對由該剪接調節劑、ADC 或組合物產生之新抗原的免疫反應。在一些實施例中，給與患者通用肽或 mRNA 疫苗，且接著一次性或重複給與剪接調節劑、ADC 或組合物。在一些實施例中，用於產生通用新抗原疫苗之新抗原序列(或多個序列)係基於給定患者群體中總體 MHC1 對偶基因頻率選擇(Maiers 等人(2007) Hum. Immunol. 68(9):779-88)。

【0806】 在一些實施例中，該新抗原(例如通用新抗原)序列能夠結合至罹患贅生性病症之個體群體中至少 10%、至少 15%、至少 20%、至少 25%、至少 30%、至少 35%、至少 40%或至少 45%之個體體內表現之至少一個 HLA 對偶基因。在一些實施例中，新抗原序列能夠引發針對存在於罹患贅生性病症之個體群體之至少 1%、至少 5%或至少 10%中之腫瘤的 T 細胞反應。

【0807】 在一些實施例中，藉由對個體中由投與有效量之剪接調節劑、抗體-藥物結合物或組合物誘導之至少一種新抗原肽或其編碼 mRNA 定序來鑑別新抗原序列。在一些實施例中，該至少一種新抗原肽包含藉由使贅生性細胞與有效量之剪接調節劑、抗體-藥物結合物或組合物接觸所誘導的新抗原序列。在一些實施例中，贅生性細胞存在於活體外細胞培養物中。在一些實施例中，贅生性細胞係自個體獲得。在一些實施例中，贅生性細胞係存在於個體中。

【0808】 在一些實施例中，新抗原疫苗包含至少一種新抗原肽及醫藥學上可接受之載劑(例如本文所描述之例示性載劑中之任一種)。在一些實施例中，該至少一種新抗原肽與醫藥學上可接受之載劑連接。在一些實施例中，該醫藥學上可接受之載劑係選自肽、血清白蛋白、匙孔螺血氰蛋

白、免疫球蛋白、甲狀腺球蛋白、卵白蛋白、類毒素或減毒之類毒素衍生物、細胞介素及趨化介素。在一些實施例中，新抗原肽及醫藥學上可接受之載劑係經由連接子共價連接。在一些實施例中，新抗原肽及醫藥學上可接受之載劑係表現為融合蛋白形式。在一些實施例中，新抗原疫苗包含至少一種新抗原肽及醫藥學上可接受之稀釋劑。在一些實施例中，新抗原疫苗包含至少一種新抗原肽及醫藥學上可接受之佐劑。

【0809】在一些實施例中，新抗原疫苗包含至少一種新抗原mRNA。在一些實施例中，該至少一種新抗原 mRNA 編碼一個或超過一個新抗原序列。在一些實施例中，該新抗原序列包含 SEQ ID NO:37-65 中之任一個之胺基酸序列。在一些實施例中，該新抗原序列包含 SEQ ID NO: 37 之胺基酸序列。在一些實施例中，該新抗原序列包含 SEQ ID NO: 39 之胺基酸序列。在一些實施例中，該新抗原序列包含 SEQ ID NO:46-49 中之任一個之胺基酸序列。

【0810】在一些其他實施例中，該新抗原序列包含 SEQ ID NO:66-93 中之任一個之胺基酸序列，或 SEQ ID NO:66-93 中之任一個之抗原部分。在一些實施例中，該新抗原序列包含 SEQ ID NO: 66 之胺基酸序列，或 SEQ ID NO: 66 之抗原部分。在一些實施例中，該新抗原序列包含 SEQ ID NO:74-77 中之任一個之胺基酸序列，或 SEQ ID NO:74-77 中之任一個之抗原部分。在一些實施例中，新抗原序列及/或抗原部分之長度在約 10 個至約 50 個胺基酸範圍內。在一些實施例中，新抗原序列及/或抗原部分之長度在約 10 個至約 35 個胺基酸範圍內。在一些實施例中，新抗原序列及/或抗原部分之長度在約 15 個至約 25 個胺基酸範圍內。在一些實施例中，新抗原序列及/或抗原部分之長度範圍係約 10 個至約 20

個胺基酸。在一些實施例中，新抗原序列及/或抗原部分不排他性地與典型肽序列重疊或由典型肽序列組成(例如表 21 中加底線之例示性典型肽序列中之任一個)。

【0811】 在一些實施例中，新抗原序列係對個體具有特異性之新抗原序列。在一些實施例中，新抗原序列係用於個體之個人化新抗原疫苗。在一些實施例中，新抗原序列能夠結合至個體體內表現之至少一個 HLA 對偶基因。

【0812】 在一些其他實施例中，新抗原序列係通用新抗原序列。在一些實施例中，新抗原序列係通用新抗原疫苗。在一些實施例中，該新抗原序列能夠結合至罹患贅生性病症之個體群體中至少 10%、至少 15%、至少 20%、至少 25%、至少 30%、至少 35%、至少 40%或至少 45%之個體體內表現之至少一個 HLA 對偶基因。在一些實施例中，新抗原序列能夠引發針對存在於罹患贅生性病症之個體群體之至少 1%、至少 5%或至少 10%中之腫瘤的 T 細胞反應。

【0813】 在一些實施例中，已藉由對至少一種新抗原之蛋白質序列進行定序來鑑別新抗原序列。在一些實施例中，藉由對編碼個體中由投與有效量之剪接調節劑、抗體-藥物結合物或組合物所誘導之新抗原的至少一個 mRNA 定序來鑑別新抗原序列。在一些實施例中，該至少一種新抗原 mRNA 編碼藉由使贅生性細胞與有效量之剪接調節劑、抗體-藥物結合物或組合物接觸所誘導的新抗原序列。在一些實施例中，贅生性細胞存在於活體外細胞培養物中。在一些實施例中，贅生性細胞係自個體獲得。在一些實施例中，贅生性細胞係存在於個體中。

【0814】 在一些實施例中，新抗原疫苗包含至少一種新抗原 mRNA

及醫藥學上可接受之載劑(例如本文所描述之例示性載劑中之任一種)。在一些實施例中，該至少一種新抗原 mRNA 與醫藥學上可接受之載劑連接。在一些實施例中，該醫藥學上可接受之載劑係選自肽、血清白蛋白、匙孔螺血氰蛋白、免疫球蛋白、甲狀腺球蛋白、卵白蛋白、類毒素或減毒之類毒素衍生物、細胞介素及趨化介素。在一些實施例中，新抗原疫苗包含至少一種新抗原 mRNA 及醫藥學上可接受之稀釋劑。在一些實施例中，新抗原疫苗包含至少一種新抗原 mRNA 及醫藥學上可接受之佐劑。在一些實施例中，新抗原 mRNA 經包封劑包封。在一些實施例中，該包封劑係脂質體。在一些實施例中，該包封劑係奈米粒子。

【0815】 在一些實施例中，至少一種額外療法包含投與細胞介素或細胞介素類似物，例如本文所揭示之任何細胞介素或細胞介素類似物。在一些實施例中，個體對單獨投與時的該細胞介素或細胞介素類似物不耐受、無反應或反應不良。在一些實施例中，細胞介素或細胞介素類似物包含 T 細胞增強劑。在一些實施例中，細胞介素或細胞介素類似物包含 IL-2、IL-10、IL-12、IL-15、IFNγ 及/或 TNFα。在一些實施例中，細胞介素或細胞介素類似物包含 IL-2、IL-10、IL-12 及/或 IL-15。在一些實施例中，在投與剪接調節劑、抗體-藥物結合物或組合物後，歸因於新抗原之誘導及呈現，投與細胞介素或細胞介素類似物使 T 細胞激活增強。

【0816】 在一些實施例中，該至少一種額外療法包含投與工程改造之腫瘤靶向 T 細胞(亦即，CAR-T)，例如本文所揭示之任何 CAR-T 療法。

【0817】 在一些實施例中，本文所描述之方法可進一步包含在投與該剪接調節劑、抗體-藥物結合物或組合物之後，偵測個體中之一或多種

新抗原及/或 T 細胞反應，且若偵測到一或多種新抗原及/或 T 細胞反應，則視情況，繼續投與該剪接調節劑、抗體-藥物結合物或組合物。在一些實施例中，偵測到該個體中之一或多種新抗原及/或 T 細胞反應指示該剪接調節劑、抗體-藥物結合物組合物之治療功效。在一些實施例中，若偵測到一或多個新抗原及/或 T 細胞反應，則繼續用該額外療法以及剪接調節劑、抗體-藥物結合物或組合物治療。在一些實施例中，若偵測到一或多種新抗原及/或 T 細胞反應，則以降低之劑量及/或頻率繼續治療。

【0818】 在一些實施例中，本文所描述之方法可進一步包含在投與該剪接調節劑、抗體-藥物結合物或組合物之後，偵測該個體中之雙股 RNA 免疫反應，且若偵測到雙股 RNA 免疫反應，則視情況，繼續投與該剪接調節劑、抗體-藥物結合物或組合物。在一些實施例中，偵測到該個體中之雙股 RNA 免疫反應指示該剪接調節劑、抗體-藥物結合物或組合物之治療功效。在一些實施例中，若偵測到雙股 RNA 免疫反應，則繼續用該額外療法以及剪接調節劑、抗體-藥物結合物或組合物治療。在一些實施例中，若偵測到雙股 RNA 免疫反應，則以降低之劑量及/或頻率繼續治療。

【0819】 在一些實施例中，本文所描述之方法可進一步包含在投與該剪接調節劑、抗體-藥物結合物或組合物之後，偵測該個體中之免疫原性細胞死亡，且若偵測到免疫原性細胞死亡，則視情況，繼續投與該剪接調節劑、抗體-藥物結合物或組合物。在一些實施例中，偵測到該個體中之免疫原性細胞死亡指示該剪接調節劑、抗體-藥物結合物或組合物之治療功效。在一些實施例中，若偵測到免疫原性細胞死亡，則繼續用該額外療法以及剪接調節劑、抗體-藥物結合物或組合物治療。在一些實施例

中，若偵測到免疫原性細胞死亡，則以降低之劑量及/或頻率繼續治療。

【0820】 在一些實施例中，個體具有約 150 個突變或更少之非同義突變負荷。在一些實施例中，個體具有約 100 個突變或更少之非同義突變負荷。在一些實施例中，個體具有約 50 個突變或更少之非同義突變負荷。在一些實施例中，個體患有或疑似患有贅生性病症，例如血液惡性病或實體腫瘤。在一些實施例中，該血液惡性病係選自 B 細胞惡性病、白血病、淋巴瘤及骨髓瘤。在一些實施例中，該血液惡性病係選自急性骨髓性白血病及多發性骨髓瘤。在一些實施例中，該實體腫瘤係選自乳癌、胃癌、前列腺癌、卵巢癌、肺癌、子宮癌、唾腺管癌、黑素瘤、結腸癌、子宮頸癌、胰臟癌、腎癌、結腸直腸癌及食道癌。在一些實施例中，該實體腫瘤係選自 HER2 陽性乳癌、胃腺癌及前列腺癌。

【0821】 在各種實施例中，本發明進一步提供一種治療患有或疑似患有贅生性病症之個體的方法，其包含：(a)向該個體投與有效量之剪接調節劑、ADC 或包含剪接調節劑或 ADC 之組合物，其中投與該剪接調節劑、抗體-藥物結合物或組合物誘導至少一種新抗原及/或 T 細胞反應；(b)在投與該剪接調節劑、抗體-藥物結合物或組合物之後，偵測該個體中之一或多種新抗原及/或 T 細胞反應；以及(c)若偵測到一或多種新抗原及/或 T 細胞反應，則繼續投與該剪接調節劑、抗體-藥物結合物或組合物。在一些實施例中，偵測到該個體中之一或多種新抗原及/或 T 細胞反應指示該剪接調節劑、抗體-藥物結合物組合物之治療功效。在一些實施例中，該一或多種新抗原包含 SEQ ID NO: 37-65 中之任一個之胺基酸序列。在一些實施例中，該一或多種新抗原包含 SEQ ID NO: 37 之胺基酸序列。在一些實施例中，該一或多種新抗原包含 SEQ ID NO: 39 之胺基酸序

列。在一些實施例中，該一或多種新抗原包含 SEQ ID NO: 46-49 中之任一個之胺基酸序列。

**剪接調節劑/ADC 及免疫檢查點抑制之組合：**

【0822】 在各種實施例中，患有如本文中所描述之癌症的患者可以用剪接調節劑、ADC 或組合物與檢查點抑制劑療法之組合治療。免疫檢查點係減慢或終止免疫反應且防止免疫細胞不受控制的活性造成過度組織損傷的抑制性途徑。如本文所使用，術語「檢查點抑制劑」意圖指抑制一或多個抑制性路徑，由此允許更廣泛之免疫活性的任何治療劑，包括任何小分子化合物、抗體、核酸分子或多肽，或其任何片段。

【0823】 經顯示，用免疫檢查點抑制治療患者在某些臨床適應症中具有穩健功效。最近，FDA 批准對具有展現較高微衛星不穩定性的與組織譜系無關之腫瘤的患者使用檢查點抑制劑。此批准部分地基於觀察到反應率與突變負荷呈正相關(Rizvi 等人(2015) Science 348(6230):124-8；Hellmann 等人 2018) Cancer Cell 33(5):853-861)。來自文獻之估計值在絕對數目上且隨譜系而不同，但一般支持超過約 150-250 個突變之臨限值，反應機率升高。分析 TCGA 資料顯示，較大百分比之成年發病型腫瘤譜系具有相當低的非同義突變負荷(Vogelstein 等人(2013) Science 339:1549-58)。大多數譜系之中位非同義突變率為每位患者約 30-80 個，遠低於有關改善對檢查點抑制劑之反應機率的臨限值。

【0824】 舉例而言，經顯示，HER2 陽性乳房癌具有每個患者樣品存在中值為約 60 個之非同義突變。然而，如上文所提及，估計檢查點抑制劑治療功效之臨限值在約 150-250 個非同義突變範圍內，亦即，高於此臨限值之患者比較可能顯示完全緩解、部分緩解及/或穩定疾病，而低於

此臨限值之患者比較可能展現進行性疾病。因此，需要增加非同義突變及/或呈現於腫瘤細胞上之新抗原之表觀數量的策略，且其可增加例如對檢查點抑制劑療法之總體反應機率。由於細胞介素(及其類似物)經由類似的作用機制起作用，故此類策略亦可增加對基於細胞介素之療法的總體反應機率。

【0825】當前 HER2 陽性乳癌之反應率係約 15%-25% (CTI NCT02129556)。在本文所揭示之各種實施例中，用剪接調節劑、ADC 或組合物與檢查點抑制劑及/或細胞介素療法之組合治療可以改善此類反應率。在各種實施例中，用剪接調節劑、ADC 或組合物與檢查點抑制劑及/或細胞介素療法之組合治療可適用於任何成年發病型腫瘤，特別是中值非同義突變率低於所估計的約 150 個突變臨限值之腫瘤。在各種實施例中，適合於用單獨本發明之剪接調節劑、ADC 或組合物或其與額外療法(例如檢查點抑制劑療法、細胞介素療法)之組合治療的例示性癌症類型包括(但不限於)食道癌、非霍奇金氏淋巴瘤、結腸直腸癌、頭頸癌、胃癌、子宮內膜癌、胰臟腺癌、卵巢癌、前列腺癌、肝細胞癌、神經膠母細胞瘤、乳癌(例如 HER2 陽性乳癌)、肺癌(例如非小細胞肺癌)、慢性淋巴球性白血病及急性骨髓性白血病。其他例示性適合癌症類型在例如 Vogelstein 等人 (2013) Science 339:1549-58 中已鑑別，該文獻以全文引用之方式併入本文中。

【0826】由於許多檢查點抑制劑療法係基於腫瘤相關抗原之慢性表現，故需要定期治療加強以獲得功效及「再加強」反應性 T 細胞群。本文所描述的剪接調節劑或 ADC 源性新抗原之可誘導性提供治療性給藥方案，該等給藥方案可設計成用於增強新抗原反應性 T 細胞之免疫反應，同

時限制通常由慢性抗原刺激引起之 T 細胞耗竭。舉例而言，在一些實施例中，將初始劑量之剪接調節劑、ADC 或組合物投與個體以觸發異常剪接及新抗原肽之製造。在一些實施例中，在允許蛋白質產生及抗原呈現之一段時間之後，接著向個體投與初始劑量之檢查點抑制劑以加強及/或增強效應 T 細胞激活及擴增。在一些實施例中，剪接調節劑、ADC 或組合物與檢查點抑制劑之劑量之間的等待期係約 2 天、約 3 天、約 4 天、約 5 天、約 6 天或約 7 天。在一些實施例中，等待期係在約 3 天至約 5 天之間。在一些實施例中，檢查點抑制劑靶向 CTLA4、OX40、CD40 及/或 GITR。在一些實施例中，剪接調節劑、ADC 或組合物與檢查點抑制劑之組合治療益處可為加和性的或超加性的。

【0827】 在一些實施例中，在允許 T 細胞激活及擴增之一段時間後，接著向個體投與第二或後續劑量之剪接調節劑、ADC 或組合物以觸發新抗原肽之再呈現。在一些實施例中，檢查點抑制劑之初始劑量與剪接調節劑、ADC 或組合物之第二或後續劑量之間的等待期係約 2 週、約 3 週、約 4 週或約 5 週。在一些實施例中，等待期係約 3 週。在一些實施例中，在第二或後續劑量之剪接調節劑、ADC 或組合物之後，免疫系統可以與新抗原呈現腫瘤細胞接合及/或引起腫瘤細胞殺滅。在一些實施例中，接著向個體投與第二或後續劑量之檢查點抑制劑，在允許二次 T 細胞激活及擴增後進一步擴增記憶效應 T 細胞群。

【0828】 在一些實施例中，在此例示性初始治療方案之後給與剪接調節劑、ADC 或組合物可為脈衝式的，亦即，可以較長時間間隔(例如約每 4 週、約每 5 週、約每 6 週)給與剪接調節劑、ADC 或組合物以允許抗原呈現、T 細胞接合及/或腫瘤細胞殺滅，及/或記憶 T 細胞群之恢復。在

一些實施例中，在隨後的時間點，剪接調節劑、ADC 或組合物治療可以與一或多種旨在恢復效應物針對耗竭之 T 細胞群之功能性的檢查點抑制劑組合。舉例而言，在一些實施例中，在隨後的時間點，剪接調節劑、ADC 或組合物治療可以與一或多種靶向 PD1/PDL1、LAG3 及/或 TIM3 之檢查點抑制劑組合。在一些實施例中，新抗原呈現及激活之脈衝性質可允許以較低頻率及/或以較低劑量投與檢查點抑制劑及/或剪接調節劑、ADC 或組合物。在一些實施例中，相較於不與剪接調節劑、ADC 或組合物治療同時投與時之檢查點抑制劑，新抗原呈現之脈衝性可以例如藉由降低用檢查點抑制劑之標準給藥方案通常所觀察到的不良反應之可能風險而使檢查點抑制劑(例如抗 CTLA4 抗體，諸如伊匹單抗)具有一或多種治療益處。

【0829】 在某些實施例中，檢查點抑制劑係細胞毒性 T 淋巴球相關抗原(CTLA4)路徑之抑制劑。CTLA4，亦稱為 CD152，係下調免疫反應之蛋白質受體。CTLA4 在調節性 T 細胞中組成性表現，但在活化後僅在習知 T 細胞中上調。如本文所使用，術語「CTLA4 抑制劑」意圖指 CTLA4 及/或 CTLA4 途徑之任何抑制劑。例示性 CTLA4 抑制劑包括(但不限於)抗 CTLA4 抗體。用於人類之 CTLA4 阻斷抗體係基於在抗小鼠腫瘤免疫模型中所見的臨床前活性而開發。例示性抗 CTLA4 抗體包括(但不限於)伊匹單抗(MDX-010)及替西木單抗(tremelimumab) (CP-675,206)，兩者均為完全人類抗體。伊匹單抗係血漿半衰期為約 12-14 天之 IgG1；曲美單抗係血漿半衰期為約 22 天之 IgG2。參見例如 Phan 等人(2003) Proc Natl Acad Sci USA. 100:8372-7；Ribas 等人(2005) J Clin Oncol. 23:8968-77；Weber 等人(2008) J Clin Oncol. 26:5950-6。在一些實施例

中，抗 CTLA4 抗體係伊匹單抗。

【0830】 在某些實施例中，檢查點抑制劑係計劃性死亡-1 (PD1)路徑之抑制劑。計劃性細胞死亡 1 (PD1)路徑表示主要免疫控制開關，其可藉由腫瘤細胞接合以克服活性 T 細胞免疫監視。PD1 之配體(PDL1 及 PDL2)係組成性表現的或可在各種腫瘤中誘導。已發現腫瘤細胞上 PDL1 之高表現(及 PDL2 之較低程度)與各種其他實體腫瘤類型之不良預後及存活期相關。此外，已表明 PD1 調節惡性黑素瘤患者中之腫瘤特異性 T 細胞擴增。此等觀測結果表明 PD1/PDL1 路徑在腫瘤免疫逃避中發揮關鍵作用，且可視為治療性干預之引人注目之目標。如本文所使用，術語「PD1 抑制劑」意圖指 PD1 及/或 PD1 途徑之任何抑制劑。例示性 PD1 抑制劑包括(但不限於)抗 PD1 抗體及抗 PDL1 抗體。在某些實施例中，檢查點抑制劑係抗 PD1 抗體。例示性抗 PD1 抗體包括(但不限於)納武單抗及派姆單抗(pembrolizumab) (MK-3475)。舉例而言，納武單抗係完全人類免疫球蛋白 G4 (IgG4) PD1 免疫檢查點抑制劑抗體，其破壞 PD1 受體與其配體 PDL1 及 PDL2 之相互作用，由此抑制細胞免疫反應(Guo 等人(2017) J Cancer 8(3):410-6)。在一些實施例中，抗 PD1 抗體係納武單抗。舉例而言，派姆單抗係 IgG4/κ 同型之強效且高選擇性人類化 mAb，其係設計成直接阻斷 PD1 與其配體 PDL1 及 PDL2 之間的相互作用。派姆單抗明顯增強經培養的來自健康人類供體、癌症患者及靈長類動物之血球中之 T 淋巴球免疫反應。亦報導派姆單抗調節介白素-2 (IL-2)、腫瘤壞死因子 α (TNFα)、干擾素 γ (IFNγ)及其他細胞介素之含量。例示性抗 PDL1 抗體包括(但不限於)阿特珠單抗、阿維魯單抗(avelumab)及德瓦魯單抗(durvalumab)。舉例而言，阿特珠單抗係 IgG1 人類化 mAb，據報

導，其藉由靶向多種惡性細胞上表現之 PDL1 來阻斷 PD1/PDL1 相互作用。此 PD1/PDL1 路徑之阻斷可以刺激針對腫瘤之免疫防禦機制(Abdin 等人(2018) Cancers (Basel) 10(2):32)。在一些實施例中，抗 PDL1 抗體係阿特珠單抗。

【0831】在某些實施例中，檢查點抑制劑靶向 PD1/PDL1、CTLA4、OX40、CD40、LAG3、TIM3、GITR 及/或 KIR。在某些實施例中，檢查點抑制劑靶向 CTLA4、OX40、CD40 及/或 GITR。在某些實施例中，檢查點抑制劑與抑制性抗體或其他類似抑制性分子(例如抑制性抗 CTLA4 或抗 PD1/PDL1 抗體)一起靶向。在某些其他實施例中，檢查點抑制劑與針對該目標之促效劑一起靶向；此類別之實例包括刺激性目標 OX40、CD40 及/或 GITR。在一些實施例中，靶向 OX40、CD40 及/或 GITR 之檢查點抑制劑係促效劑抗體。針對 OX40 之促效劑抗體可具有雙重作用，亦即，抑制調節性 T 細胞遏止作用，同時增強效應 T 細胞功能。另外，經顯示促效抗 GITR 抗體使效應 T 細胞對調節性 T 細胞誘導之抑制作用具有較高抗性(Karaki 等人(2016) Vaccines (Basel) 4(4):37)。同樣，促效劑 CD40 抗體展示出 T 細胞依賴性抗腫瘤活性。樹突狀細胞上 CD40 之活化使腫瘤抗原之交叉呈現增加並因此使活化的針對腫瘤之效應 T 細胞的數量增加(Ellmark 等人(2015) Oncoimmunol. 4(7):e1011484)。

【0832】在某些實施例中，檢查點抑制劑靶向 CTLA4 (例如抗 CTLA4 抗體)。在某些實施例中，靶向 CTLA4 促進原生 T 細胞之激活及活化。在某些實施例中，檢查點抑制劑靶向 OX40 (例如抗 OX40 抗體)。在某些實施例中，靶向 OX40 增強效應 T 細胞之擴增。在某些實施例中，檢查點抑制劑靶向 CD40 (例如抗 CD40 抗體)。在某些實施例中，靶向

CD40 抑制 T 細胞之「致耐受性」激活及/或調節性 T 細胞之形成。在某些實施例中，檢查點抑制劑靶向 GITR (例如抗 GITR 抗體)。在某些實施例中，靶向 GITR 抑制調節性 T 細胞之活性。在某些實施例中，利用剪接調節劑、ADC 或組合物與靶向 CTLA4、OX40、CD40 及/或 GITR 之藥劑的組合療法之益處(例如對至少一種症狀或疾病進展風險/速率之影響)係加和性的。在一些實施例中，利用剪接調節劑、ADC 或組合物與靶向 CTLA4、OX40、CD40 及/或 GITR 之藥劑的組合療法之益處係超加性的(亦即，協同性的)。

【0833】 檢查點抑制劑治療策略係基於以下假設：治療促進及/或增強 T 細胞針對較弱或不良抗原性腫瘤(例如 CTLA4)之反應的引發，或治療恢復及/或再激活對腫瘤抗原起反應但由於抗原呈現(例如 PD1、PDL1)之長期性而「耗竭」的 T 細胞(Chen 及 Mellman (2013) Immunity 39(1):1-10)。適合檢查點抑制療法及藥劑之實例，例如抗 PD1 抗體、抗 PDL1 抗體或抗 CTLA4 抗體，係此項技術中已知的。參見例如 WO 2001/014424、WO 2013/173223、WO 2016/007235。

【0834】 將在檢查點抑制劑療法之後出現的此等激活之 T 細胞反應與在可與激活之免疫系統反應之腫瘤細胞中誘導新抗原的治療相組合可以提供有益的協同作用。由於剪接調節劑或 ADC 源性新抗原尚未呈現 T 細胞激活，故與 CTLA4 抑制劑組合可為特別有益的。在一些實施例中，治療包含在初始投與 CTLA4 抑制劑以刺激 CD8 T 細胞激活之前、同時或之後，投與一或多種剪接調節劑、ADC 或組合物以誘導新抗原之產生。在一些實施例中，向患者額外投與 CTLA4 抑制劑，例如以進一步刺激新抗原反應性 CD8 群體之激活及/或活化。在一些實施例中，可向患者額外投

與剪接調節劑、ADC 或組合物以增加腫瘤之新抗原呈現。剪接調節劑、ADC 或組合物及檢查點抑制劑療法之重複投與可以同時進行或以錯開之時間間隔進行。在一些實施例中，治療進一步包含投與 PD1/PDL1 抑制劑共治療，例如以恢復腫瘤微環境內耗竭之新抗原靶向 T 細胞之效應功能。

【0835】 如本文所使用，術語「組合」或「組合療法」係指投與一或多種剪接調節劑、ADC 或組合物以及額外藥劑或療法(例如檢查點抑制劑、細胞介素或細胞介素類似物、新抗原疫苗 CAR-T)作為治療方案之一部分，旨在由一或多種所投與之藥劑的共同作用提供有益的(亦即，加和性或協同性)作用。在一些實施例中，該組合亦可包括一或多種額外藥劑，包括(但不限於)化學治療劑、抗血管生成劑及減少免疫遏止作用之藥劑(例如第二檢查點抑制劑)。該組合之有益作用包括(但不限於)由治療劑組合產生之藥物動力學或藥效學共同作用。組合投與此等治療劑通常係在限定時間段(例如數分鐘、數小時、數天或數週，取決於所選組合)內進行。

【0836】 如本文所使用，「組合」投與或「共投與」意思指在個體罹患醫學病況(例如贅生性病症)期間，將兩種或兩種以上不同治療遞送給該個體。舉例而言，在一些實施例中，在個體已診斷患有疾病或病症之後且在疾病或病症已治癒或消除之前，或當個體鑑別為有患病風險但在個體出現疾病症狀之前，遞送該兩種或兩種以上治療。在一些實施例中，一種治療之遞送在第二治療之遞送開始之時仍存在，以使得存在重疊。在一些實施例中，第一治療與第二治療係同時起始。此等類型之遞送在本文中有時稱為「並行」、「同時」或「伴隨」遞送。在其他實施例中，一種治療之

遞送在第二治療之遞送開始之前結束。此類型之遞送在本文中有時稱為「連續」或「依序」遞送。

【0837】 在一些實施例中，該兩種治療(例如剪接調節劑、ADC 或組合物及檢查點抑制劑)係包含在同一組合物中。此類組合物可以任何適當形式且藉由任何適合途徑投與。在其他實施例中，該兩種治療(例如剪接調節劑、ADC 或組合物及檢查點抑制劑)係以獨立組合物，以任何適當形式且藉由任何適合途徑投與。舉例而言，在一些實施例中，包含剪接調節劑或 ADC 之組合物及包含檢查點抑制劑之組合物可在不同時間點以任何次序同時或依序投與；在任一情況下，其應當在足夠接近之時間投與，以便提供所希望之治療或預防作用。

【0838】 在並行或依序遞送之實施例中，治療可由於組合投與而更有效。在一些實施例中，該第一治療要比在不存在第二治療之情況下投與第一治療時所觀察到的作用有效，例如在較少第一治療(例如利用較低劑量)之情況下觀察到等效的作用。在一些實施例中，該第一治療更有效以使得症狀或與疾病或病症相關之其他參數的減少大於在不存在第二治療之情況下遞送第一治療時所觀察到之情況。在其他實施例中，在第二治療存在下觀察到類似情形。在一些實施例中，組合療法之益處(例如對至少一種症狀或疾病進展之風險/速率的影響)係加和性的。在一些實施例中，組合療法之益處係超加性的。

【0839】 在各種實施例中，本發明提供一種治療患有或疑似患有贅生性病症之個體的方法，其係藉由向該個體投與有效量的剪接調節劑、ADC 或包含剪接調節劑或 ADC 之組合物；以及至少一種額外療法(例如檢查點抑制劑療法、細胞介素或細胞介素類似物、新抗原疫苗、CAR-T)

實現。在一些實施例中，投與剪接調節劑、或組合物將誘導至少一種新抗原及/或 T 細胞反應。在一些實施例中，投與剪接調節劑、ADC 或組合物將誘導雙股 RNA 免疫反應。在一些實施例中，投與剪接調節劑、ADC 或組合物將誘導免疫原性細胞死亡。在一些實施例中，該至少一種額外療法可包含至少一種、至少兩種、至少三種、至少四種或至少五種額外療法。舉例而言，在一些實施例中，剪接調節劑、ADC 或組合物可與兩種檢查點療法組合投與，亦即，使用兩種不同檢查點抑制劑。在一些其他實施例中，剪接調節劑、ADC 或組合物可以與檢查點抑制劑療法及新抗原疫苗組合投與。

【0840】 在組合療法之一些實施例中，該剪接調節劑、抗體-藥物結合物或組合物及/或該至少一種額外療法之投與量相較於該剪接調節劑、抗體-藥物結合物或組合物及/或該至少一種額外療法之標準劑量減少 10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、75%或 90%。在一些實施例中，該剪接調節劑、抗體-藥物結合物或組合物及/或該至少一種額外療法之投與頻率比該剪接調節劑、抗體-藥物結合物或組合物及/或該至少一種額外療法之標準給藥方案低至少 10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、75%或 90%。在一些實施例中，該剪接調節劑、抗體-藥物結合物或組合物及/或該至少一種額外療法之投與量及/或劑量使全身毒性降低及/或耐受性改善。

【0841】 在一些實施例中，該剪接調節劑、抗體-藥物結合物或組合物之投與係在投與該至少一種額外療法之前起始。在一些實施例中，該剪接調節劑、抗體-藥物結合物或組合物之投與係在投與該至少一種額外療法之後起始。在一些實施例中，該剪接調節劑、抗體-藥物結合物或組合

物之投與係與該至少一種額外療法之投與同時起始。

【0842】 在一些實施例中，在初始投與之後，重複投與該剪接調節劑、抗體-藥物結合物或組合物至少一次。在一些實施例中，用於重複投與的該剪接調節劑、抗體-藥物結合物或組合物之量相較於用於初始投與之量有所減少。在一些實施例中，用於重複投與的該剪接調節劑、抗體-藥物結合物或組合物之量相較於該剪接調節劑、抗體-藥物結合物或組合物之標準劑量有所減少。在一些實施例中，用於重複投與的該剪接調節劑、抗體-藥物結合物或組合物之量相較於該剪接調節劑、抗體-藥物結合物或組合物之標準劑量減少 10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、75%或 90%。

【0843】 在一些實施例中，在初始投與之後，重複投與該至少一種額外療法至少一次。在一些實施例中，用於重複投與的該至少一種額外療法之量相較於用於初始投與之量有所減少。在一些實施例中，用於重複投與的至少一種額外療法之量相較於該至少一種額外療法之標準劑量有所減少。在一些實施例中，用於重複投與的該至少一種額外療法之量相較於該至少一種額外療法之標準劑量減少 10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、75%或 90%。

【0844】 在一些實施例中，該剪接調節劑、抗體-藥物結合物或組合物之重複投與係與該至少一種額外療法之重複投與同時進行。在一些實施例中，該剪接調節劑、抗體-藥物結合物或組合物之重複投與係與該至少一種額外療法之重複投與依序或錯開進行。

【0845】 在各種實施例中，本發明提供一種治療患有或疑似患有贅生性病症之個體的方法，該方法係藉由向該個體投與有效量之剪接調節

劑、ADC 或包含剪接調節劑或 ADC 之組合物；以及檢查點抑制劑療法實現。在一些實施例中，檢查點抑制劑療法包含投與至少一種檢查點抑制劑。在一些實施例中，個體對單獨投與時的至少一種檢查點抑制劑不耐受、無反應或反應不良。在一些實施例中，如使用例如免疫相關反應標準(immune-related Response Criteria，irRC)及/或實體腫瘤中之免疫相關反應評價標準(irRECIST)所確定，個體可視為對至少一種檢查點抑制劑無反應或反應不良。參見例如 Wolchok 等人(2009) Clin Cancer Res. 15(23):7412-20；Bohnsack 等人，「Adaptation of the Immune-Related Response Criteria:irRECIST」 (Abstract 4958) ESMO 2014。例示性標準可包括此項技術中用於界定當所評價之治療係免疫-腫瘤學藥物(例如檢查點抑制劑)時在治療期間癌症患者之腫瘤何時改善(「起反應」)、保持不變(「穩定」)或惡化(「進展」)的標準。在一些實施例中，若個體出現針對至少一種檢查點抑制劑(例如伊匹單抗)所鑑別之一種或超過一種不良(2+級)事件，則可認為個體對各別檢查點抑制劑不耐受。在一些實施例中，例如，若個體出現選自小腸結腸炎、肝炎、皮炎(包括中毒性表皮壞死溶解)、神經病變及內分泌病之一或多例不良事件，則可認為個體對伊匹單抗治療不耐受(Yervoy® (伊匹單抗) FDA Label Supplement, 2018)。

【0846】在一些實施例中，檢查點抑制劑靶向 PD1/PDL1、CTLA4、OX40、CD40、LAG3、TIM3、GITR 及/或 KIR。在一些實施例中，檢查點抑制劑靶向 CTLA4、OX40、CD40 及/或 GITR。在一些實施例中，檢查點抑制劑與抑制性抗體或其他類似抑制性分子一起靶向。在一些其他實施例中，檢查點抑制劑與促效劑抗體或其他類似促效劑分子一起靶向。在一些實施例中，檢查點抑制劑包含細胞毒性 T 淋巴球相關抗原

4 途徑(CTLA4)抑制劑。在一些實施例中，CTLA4 抑制劑係抗 CTLA4 抗體。在一些實施例中，抗 CTLA4 抗體係伊匹單抗。在一些實施例中，檢查點抑制劑包含計劃性死亡-1 路徑(PD1)抑制劑。在一些實施例中，PD1 抑制劑係抗 PD1 抗體。在一些實施例中，抗 PD1 抗體係納武單抗。在一些實施例中，PD1 抑制劑係抗 PDL1 抗體。在一些實施例中，抗 PDL1 抗體係阿特珠單抗。在一些實施例中，檢查點抑制劑包含 CTLA4 抑制劑及 PD1 抑制劑。在一些實施例中，檢查點抑制劑靶向 OX40。在一些實施例中，檢查點抑制劑靶向 CD40。在一些實施例中，檢查點抑制劑靶向 GITR。在一些實施例中，利用剪接調節劑、ADC 或組合物及檢查點抑制劑(例如靶向 CTLA4、PD1/PDL1、OX40、CD40 及/或 GITR 之抗體或分子)之組合療法的益處(例如對至少一種症狀或疾病進展之風險/速率的影響)係加和性的。在一些實施例中，利用剪接調節劑、或組合物及檢查點抑制劑(例如靶向 CTLA4、PD1/PDL1、OX40、CD40 及/或 GITR 之抗體或分子)之組合療法的益處係超加性的(亦即，協同性的)。

【0847】 在各種實施例中，本發明提供一種治療患有或疑似患有贅生性病症之個體的方法，該方法係藉由向該個體投與有效量之剪接調節劑、ADC 或包含剪接調節劑或 ADC 之組合物；以及細胞介素或細胞介素類似物療法實現。在一些實施例中，細胞介素或細胞介素類似物療法包含投與至少一種細胞介素或細胞介素類似物。在一些實施例中，個體對單獨投與時的細胞介素或細胞介素類似物不耐受、無反應或反應不良。

【0848】 在一些實施例中，細胞介素或細胞介素類似物包含 T 細胞增強劑。在一些實施例中，細胞介素或細胞介素類似物包含 IL-2、IL-10、IL-12、IL-15、IFNγ 及/或 TNFα。在一些實施例中，細胞介素或細

胞介素類似物包含 IL-2、IL-10、IL-12 及/或 IL-15。在一些實施例中，在投與剪接調節劑、抗體-藥物結合物或組合物後，歸因於新抗原之誘導及呈現，投與細胞介素或細胞介素類似物使 T 細胞激活增強。

【0849】 在一些實施例中，細胞介素或細胞介素類似物包含 IL-2。在一些實施例中，IL-2 加強對效應細胞之信號，促進其擴增(Rosenberg (2014) J Immunol. 192(12):5451-8)。在一些實施例中，細胞介素或細胞介素類似物包含 IL-10。在一些實施例中，IL-10 加強 CD8+ T 細胞激活及活化(Mumm 等人(2011) Cancer Cell 20(6):781-96)。在一些實施例中，細胞介素或細胞介素類似物包含 IL-12。在一些實施例中，IL-12 組合先天性及適應性免疫反應以加強抗原特異性引發及靶向(Tugues 等人(2015) Cell Death Differ. 22(2):237-46)。在一些實施例中，細胞介素或細胞介素類似物包含 IL-15。在一些實施例中，IL-15 加強 T 效應(CD8)細胞激活及/或活化。在一些實施例中，細胞介素或細胞介素類似物包含 IFNγ。在一些實施例中，IFNγ 補充 IFNγ 之 T 效應細胞分泌。在一些實施例中，細胞介素或細胞介素類似物包含 TNFα。在一些實施例中，TNFα 補充 TNFα 之 T 效應細胞分泌。

【0850】 在一些實施例中，將初始劑量之剪接調節劑、ADC 或組合物投與個體以觸發異常剪接及新抗原肽之製造。在一些實施例中，在允許蛋白質產生及抗原呈現之一段時間之後，接著向個體投與初始劑量之細胞介素或細胞介素類似物以加強及/或增強效應 T 細胞激活及擴增。在一些實施例中，在剪接調節劑、ADC 或組合物與細胞介素或細胞介素類似物之劑量之間的等待期係約 2 天、約 3 天、約 4 天、約 5 天、約 6 天或約 7 天。在一些實施例中，等待期係在約 3 天至約 5 天之間。在一些實施例

中，細胞介素或細胞介素類似物為 IL-2、IL-10、IL-12、IL-15、IFNγ 及/或 TNFα。在一些實施例中，剪接調節劑、ADC 或組合物與細胞介素或細胞介素類似物之組合治療益處可為加和性的或超加性的。

【0851】 在一些其他實施例中，將初始劑量之細胞介素或細胞介素類似物投與個體以加強及/或增強效應 T 細胞激活及擴增。在一些實施例中，在等待期後，接著向個體投與初始劑量之剪接調節劑、ADC 或組合物以觸發異常剪接及新抗原肽之製造。在一些實施例中，在細胞介素或細胞介素類似物與剪接調節劑、ADC 或組合物之劑量之間的等待期係約 2 天、約 3 天、約 4 天、約 5 天、約 6 天或約 7 天。在一些實施例中，等待期係在約 3 天至約 5 天之間。在一些實施例中，細胞介素或細胞介素類似物為 IL-2、IL-10、IL-12、IL-15、IFNγ 及/或 TNFα。在一些實施例中，細胞介素或細胞介素類似物與剪接調節劑、ADC 或組合物之組合治療益處可為加和性的或超加性的。

【0852】 在一些實施例中，在允許 T 細胞激活及擴增之一段時間後，接著向個體投與第二或後續劑量之剪接調節劑、ADC 或組合物以觸發新抗原肽之再呈現。在一些實施例中，初始劑量之細胞介素或細胞介素類似物與第二或後續劑量之剪接調節劑、ADC 或組合物之間的等待期係約 2 週、約 3 週、約 4 週或約 5 週。在一些實施例中，等待期係約 3 週。在一些實施例中，可例如在後續劑量之剪接調節劑、ADC 或組合物之間穿插投與後續劑量之細胞介素或細胞介素類似物。在一些實施例中，在第二或後續劑量之剪接調節劑、ADC 或組合物之後，免疫系統可以與新抗原呈現腫瘤細胞接合及/或引起腫瘤細胞殺滅。在一些實施例中，在此例示性初始治療方案之後給與剪接調節劑、ADC 或組合物可為脈衝式的，

亦即，可以較長時間間隔(例如約每 4 週、約每 5 週、約每 6 週)給與剪接調節劑、ADC 或組合物以允許抗原呈現、T 細胞接合及/或腫瘤細胞殺滅，及/或記憶 T 細胞群之恢復。

【0853】 在一些實施例中，個體具有約 150 個突變或更少之非同義突變負荷。在一些實施例中，個體具有約 100 個突變或更少之非同義突變負荷。在一些實施例中，個體具有約 50 個突變或更少之非同義突變負荷。在一些實施例中，個體患有或疑似患有贅生性病症，例如血液惡性病或實體腫瘤。在一些實施例中，該血液惡性病係選自 B 細胞惡性病、白血病、淋巴瘤及骨髓瘤。在一些實施例中，該血液惡性病係選自急性骨髓性白血病及多發性骨髓瘤。在一些實施例中，該實體腫瘤係選自乳癌、胃癌、前列腺癌、卵巢癌、肺癌、子宮癌、唾腺管癌、黑素瘤、結腸癌、子宮頸癌、胰臟癌、腎癌、結腸直腸癌及食道癌。在一些實施例中，該實體腫瘤係選自 HER2 陽性乳癌、胃腺癌及前列腺癌。

**剪接調節劑/ADC 與新抗原疫苗之組合：**

【0854】 在各種實施例中，患有如本文中所描述之癌症的患者可以用剪接調節劑、ADC 或組合物與新抗原疫苗之組合治療。不受理論束縛，單獨或與免疫檢查點抑制劑(ICI)分子組合使用之疫苗在早期試驗中顯示出前景(Ott 等人(2017)Nature 547(7662):217-21；Sahin 等人(2017)Nature 547(7662):222-6)，但一般需要對患者腫瘤突變進行定序(Ott 等人(2017) Nature 547(7662):217-21；Aldous 及 Dong (2018) Bioorg. Med. Chem. 26(10):2842-9)。因此，疫苗通常取決於足夠數量的抗原性非同義突變。一般而言，具有極低突變負荷之腫瘤提供極少候選抗原，且快速生長之腫瘤提供有限的鑑別及產生患者特異性疫苗之時間。

【0855】迄今為止，開發在較高百分比患者中具有廣泛免疫原性之疫苗的嘗試係集中於頻繁突變、異位過度表現或擴增、及/或在生物體內以「自身」蛋白質形式存在的蛋白質。另外，此等蛋白質通常在免疫受限之組織中表現(例如在神經內分泌腫瘤類型中表現之神經元標記物)，而其他蛋白質通常可在胚胎發生期間表現(例如癌胚抗原)。因此，使用此類蛋白質作為抗原之疫苗的效用通常侷限於特定腫瘤譜系或呈現該等抗原中之一或多種的亞群。亦需要藉由對患者腫瘤樣品定序來確定疫苗效用，此可能耗時的。

【0856】此外，若此等抗原以「自身」蛋白質形式存在，則免疫系統有可能被激活以將此等抗原識別為「自身」的且因此不起反應。或替代地，若免疫系統能夠對此等抗原產生效應物反應，則可能在可表現抗原之組織中產生在靶副作用。在此兩種情況中，一個關鍵難題係大部分抗原肽源自「過客」基因(亦即，在腫瘤發生過程中突變或擴增，但在腫瘤本身之繼續存活或增殖中不發揮重要作用的基因)。因此，此等基因可經沉默而對腫瘤進展無顯著影響，且因此將允許腫瘤「逃避」針對此等抗原之免疫反應。不希望受理論束縛，此機制可在腫瘤演變中起到作用，其中在腫瘤發生之早期階段期間，腫瘤通常「選擇」具有強抗原性之隨機突變(Dunn 等人(2004) Annu. Rev. Immunol. 22:329-60)。

【0857】此外，某些證據亦指示慢性抗原呈現及免疫刺激會引起免疫細胞無反應性及耗竭(Pardoll (2012) Nat. Rev. Cancer 12(4):252-64)。此等表型構成當前 ICI 治療背後之治療原理的基礎，因為經顯示，ICI 阻遏耗竭之免疫細胞表型(α-PD1/PD-L1)或促進額外的免疫細胞反應(α-CTLA4)。值得注意的是，在 α-CTLA4 療法之情況下，已報導某一亞群

之患者展現嚴重免疫相關不良事件，此可能由促進 T 細胞活化及打破限制自身反應性免疫反應之免疫耐受機制引起。

【0858】 此兩種方法(亦即，從頭觸發或增強針對新抗原之免疫反應或使現有免疫反應缺乏或耗竭)與慢性免疫活化相關。因此，此等方法對無反應性、編輯及經設計以遏止免疫接合之其他腫瘤介導之機制敏感。

【0859】 相比之下，用本文所揭示之剪接調節劑、ADC 或組合物治療可以誘導針對表示新抗原之新穎序列的免疫反應。在一些實施例中，新抗原之呈現為適應性免疫系統提供更多不同目標，以與其接合並活化。在一些實施例中，剪接調節劑、ADC 或組合物明顯地誘導選擇性剪接及由此得到之新抗原的能力可降低由長期暴露於突變驅動之新抗原引起之免疫系統疲勞的風險及/或限制腫瘤細胞適應於逃避療法之能力。在一些實施例中，投與剪接調節劑、ADC 或組合物與新抗原疫苗之組合將增強針對由該剪接調節劑、ADC 或組合物產生之新抗原的免疫反應。在一些實施例中，剪接調節劑、ADC 或組合物係在疫苗接種之前、期間或之後投與。在一些實施例中，在治療過程期間，可投與剪接調節劑、ADC 或組合物及/或疫苗一次或超過一次。在一些實施例中，在治療過程期間，投與疫苗一次且投與該剪接調節劑、ADC 或組合物超過一次。在一些實施例中，在治療過程期間，投與疫苗一次且接著投與一或多種輔助劑。

【0860】 如本文所使用，術語「新抗原疫苗」係指一或多種免疫原性新抗原肽或 mRNA，例如至少兩種、至少三種、至少四種、至少五種或更多種新抗原肽之彙集樣品。術語「疫苗」係指用於產生免疫性以預防及/或治療疾病(例如贅生性病症，例如血液惡性病或實體腫瘤)之組合物。因此，疫苗係包含免疫原性試劑之藥劑，且意欲用於人類或動物以在疫苗

接種後產生特異性免疫防禦及保護性物質。新抗原疫苗可另外包括醫藥學上可接受之載劑、稀釋劑、賦形劑及/或佐劑。

【0861】 如本文所使用，術語「免疫原性」係指可引起免疫反應，例如 T 細胞反應之任何藥劑或組合物。免疫反應可為抗體介導的或細胞介導的，或兩者兼而有之。

【0862】 在一些實施例中，給與患者剪接調節劑、ADC 或組合物，且接著給與具有已知新抗原之肽或 mRNA 疫苗以增強針對由該剪接調節劑、ADC 或組合物產生之新抗原的免疫反應。在一些其他實施例中，給與患者剪接調節劑、ADC 或組合物並篩選由該治療產生之新抗原。隨後，使用該等新抗原中之一或多種產生給與該患者之個人化疫苗。在該等實施例中之任一個中，可向患者一次性或重複投與剪接調節劑、ADC 或組合物及/或肽或 mRNA 疫苗。

【0863】 在各種實施例中，適合用於疫苗之新抗原可藉由篩選來自患者之一或多個組織樣品(例如來自腫瘤切片)中具有改變之剪接及穩健表現的一組轉錄物來鑑別。在一些實施例中，基於整個異常剪接之 mRNA 接合點之轉譯，在篩選之樣品中鑑別變異蛋白質序列，同時保留側接跨接合點之胺基酸變化的蛋白質序列之部分(至多 12 個胺基酸)。在一些實施例中，例如使用諸如 NetMHC1 之類工具，針對結合至 MHC1 對偶基因之高親和力掃描此等跨接合點之肽片段(Nielsen 等人(2003) Protein Sci 12(5):1007-17；Andreatta 及 Neilsen (2016) Bioinformatics 32(4):511-7)。此等結果允許過濾新肽以得到預測作為獨特患者 HLA 對偶基因組成之高親和力結合物的新肽，以及組裝預測將與不同群體中以高頻率存在之 HLA 對偶基因廣泛結合的新肽池(Maiers 等人(2007) Hum Immunol

68(9):779-88)。在各種實施例中，接著例如藉由與適合載劑或佐劑結合，將所鑑別之新肽調配為疫苗(Ott 等人(2017) Nature 547(7662):217-21)，或以 mRNA 形式遞送(Sahin 等人(2017) Nature 547(7662):222-6)。

【0864】 在一些實施例中，所選新抗原係基於篩選各個患者針對剪接調節劑、ADC 或組合物之腫瘤反應以鑑別一或多種由治療產生之新抗原，用於後續疫苗接種中。在其他實施例中，新抗原係例如基於篩選來自不同患者之一組樣品以鑑別由該剪接調節劑、ADC 或組合物產生之共同新抗原且接著使用該等新抗原作為將來患者之通用疫苗。

【0865】 不受理論束縛，在一些實施例中，使用通用新抗原疫苗將避免對每一患者之腫瘤之特有突變狀態定序及分析的需求，因為所選新抗原不取決於腫瘤突變，而是模擬由剪接調節劑、ADC 或組合物產生之新抗原，且一般被身體識別為外來的。此外，在一些實施例中，由於相較於模擬由剪接調節劑、ADC 組合物產生之新抗原的突變，患者之腫瘤細胞比較可能突變而無法產生取決於腫瘤突變之一或多種新抗原，故使用新抗原疫苗可為特別有效的。此可允許調配本體疫苗，其在較高百分比之患者中具有廣泛免疫原性，從而加速治療方案的開始。可根據本文略述之時程對患者疫苗接種，且在完成疫苗接種後之前，可進一步用剪接調節劑、ADC 組合物組合物治療以例如誘導新抗原肽之表現。在一些實施例中，可在疫苗接種之前、同時或之後，向患者投與剪接調節劑、ADC 或組合物。在一些實施例中，向患者投與剪接調節劑、ADC 或組合物，篩選在一組通用新抗原中發現之一或多種新抗原，並用包含至少一種在該個體中鑑別之通用新抗原的通用新抗原疫苗進行疫苗接種。在一些實施例中，在疫苗接種之後，可向患者投與剪接調節劑、ADC 或組合物一次或超過一

次。在治療過程期間，可投與剪接調節劑或 ADC 或組合物及/或疫苗一次或超過一次。

【0866】 在各種實施例中，疫苗可包含一種或超過一種新抗原肽或 mRNA。在各種實施例中，疫苗可包含一種或多於一種長新抗原肽。在各種實施例中，此類「長」新抗原肽在專職抗原呈現細胞諸如樹突狀細胞中經歷高效內化、加工及交叉呈現。類似地，經顯示，在其他情形中，長疫苗肽可在人體中誘導細胞毒性 T 細胞(Melief 及 van der Burg (2008) Nat Rev Cancer 8(5):351-60)。在各種實施例中，新抗原肽延伸至包含新抗原肽序列本身以及側接胺基酸序列。在各種實施例中，延伸之肽序列促進例如樹突狀細胞之抗原呈現細胞對蛋白質之吸收。在各種實施例中，延伸之肽序列能夠在具有不同 HLA 同型之模型中實現高效抗原呈現及 T 細胞激活。在各種實施例中，相較於較短新抗原肽及/或較短肽序列(例如長度小於約 10 個或小於約 5 個胺基酸之肽序列)，較長之新抗原肽及/或延伸之肽序列展現增加之抗原呈現細胞(例如樹突狀細胞)吸收、增加之抗原呈現及/或增加之 T 細胞激活。在一些實施例中，長新抗原肽之長度範圍係約 5 個至約 50 個胺基酸。在一些實施例中，長新抗原肽之長度在約 10 個至約 50 個胺基酸範圍內。在一些實施例中，長新抗原肽之長度在約 10 個至約 35 個胺基酸範圍內。在一些實施例中，長新抗原肽之長度在約 15 個至約 25 個胺基酸範圍內。例示性長新抗原肽之胺基酸序列陳述於表 21 中。

【0867】 如本文所使用，新抗原肽或 mRNA 疫苗涵蓋使用新抗原肽或其編碼 mRNA 之片段，只要該片段保留免疫原性潛能即可。

【0868】 在一些實施例中，新抗原疫苗包含至少一種新抗原肽。在一些實施例中，新抗原疫苗包含至少 2 種、至少 3 種、至少 4 種、至少 5

種、至少 6 種、至少 7 種、至少 8 種、至少 9 種、至少 10 種、至少 12 種、至少 15 種或至少 20 種新抗原肽。在一些實施例中，新抗原肽之長度範圍係約 5 至約 50 個胺基酸。在一些實施例中，新抗原肽之長度在約 10 個至約 50 個胺基酸範圍內。在一些實施例中，新抗原肽之長度在約 10 個至約 35 個胺基酸範圍內。在一些實施例中，新抗原肽之長度在約 15 個至約 25 個胺基酸範圍內。

【0869】 在各種實施例中，本發明提供一種治療患有或疑似患有贅生性病症之個體的方法，該方法係藉由向該個體投與有效量之剪接調節劑、ADC 或包含剪接調節劑或 ADC 之組合物；以及新抗原疫苗實現。新抗原疫苗可為例如肽或 mRNA 新抗原疫苗。在一些實施例中，該剪接調節劑、ADC 或組合物係在投與該新抗原疫苗之前投與。在一些實施例中，該剪接調節劑、ADC 或組合物係在投與該新抗原疫苗之後投與。在一些實施例中，該剪接調節劑、ADC 或組合物之投與係與該新抗原疫苗之投與同時進行。在一些實施例中，在初始投與之後，重複投與該剪接調節劑、ADC 或組合物至少一次。在一些實施例中，用於重複投與的該剪接調節劑、ADC 或組合物之量相較於用於初始投與之量有所減少。

【0870】 在各種實施例中，本發明進一步提供用於治療患有或疑似患有贅生性病症之個體的組合，其包含剪接調節劑、ADC 或包含剪接調節劑或 ADC 之組合物；以及新抗原疫苗(例如通用新抗原疫苗)。在一些實施例中，新抗原疫苗係肽或 mRNA 新抗原疫苗。在一些實施例中，該組合進一步包含至少一種額外療法。在一些實施例中，該至少一種額外療法包含至少一種、至少兩種、至少三種、至少四種或至少五種額外療法。

【0871】 在各種實施例中，本發明進一步提供一種治療患有或疑似

患有贅生性病症之個體的方法，該方法係藉由(a)向該個體投與有效量之剪接調節劑、ADC 或包含剪接調節劑或 ADC 之組合物；(b)在投與該剪接調節劑、ADC 或組合物之後，偵測該個體中之一或多種新抗原；(c)將該一或多新抗原與一組通用新抗原相比較；以及(d)向該個體投與包含存在於該個體中之至少一種通用新抗原的通用新抗原疫苗。在一些實施例中，該通用新抗原疫苗係單獨或與至少一種額外療法組合投與。在一些實施例中，該至少一種額外療法包含至少一種、至少兩種、至少三種、至少四種或至少五種額外療法。

【0872】 在一些實施例中，該至少一種額外療法包含重複投與該剪接調節劑、ADC 或組合物。在一些實施例中，該剪接調節劑、ADC 或組合物之重複投與係在投與該通用新抗原疫苗之前起始。在一些實施例中，該剪接調節劑、ADC 或組合物之重複投與係在投與該通用新抗原疫苗之後起始。在一些實施例中，該剪接調節劑、ADC 或組合物之重複投與係與該通用新抗原疫苗之投與同時起始。在一些實施例中，用於重複投與的該剪接調節劑、ADC 或組合物之量相較於用於初始投與之量有所減少。在一些實施例中，用於初始及/或重複投與的該剪接調節劑、ADC 或組合物之量相較於該剪接調節劑、ADC 或組合物之標準劑量有所減少。在一些實施例中，用於初始及/或重複投與的該剪接調節劑 ADC 或組合物之量相較於該剪接調節劑、ADC 或組合物之標準劑量減少 10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、75%或 90%。

【0873】 在一些實施例中，該至少一種額外療法包含投與檢查點抑制劑(例如本文所描述之例示性檢查點抑制劑中之任一種)。在一些實施例中，檢查點抑制劑之投與係在投與該通用新抗原疫苗及/或重複投與該剪

接調節劑、ADC 或組合物之前起始。在一些實施例中，該檢查點抑制劑之投與係在投與該通用新抗原疫苗及/或重複投與該剪接調節劑、ADC 或組合物之後起始。在一些實施例中，該檢查點抑制劑之投與係在投與該通用新抗原疫苗及/或重複投與該剪接調節劑、ADC 或組合物同時起始。在一些實施例中，在初始投與之後，重複投與該檢查點抑制劑至少一次。在一些實施例中，用於重複投與的檢查點抑制劑之量相較於用於初始投與之量有所減少。在一些實施例中，用於重複投與的檢查點抑制劑之量相較於檢查點抑制劑之標準劑量有所減少。在一些實施例中，用於重複投與的檢查點抑制劑之量相較於檢查點抑制劑之標準劑量減少 10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、75%或 90%。在一些實施例中，個體對單獨投與時的檢查點抑制劑不耐受、無反應或反應不良。

【0874】 在各種實施例中，本文亦提供包含至少一種新抗原肽或至少一種新抗原 mRNA 之新抗原疫苗。在一些實施例中，新抗原疫苗包含至少一種新抗原肽。在一些其他實施例中，新抗原疫苗包含至少一種新抗原 mRNA。

【0875】 在各種實施例中，本文亦提供包含套組，其剪接調節劑、ADC 或包含剪接調節劑或 ADC 之組合物；以及新抗原疫苗(例如通用新抗原疫苗)。在一些實施例中，新抗原疫苗係肽或 mRNA 新抗原疫苗。在一些實施例中，該套組進一步包含一或多種額外組分，包括(但不限於)：使用說明書；其他試劑，例如一或多種額外治療劑；用於製備該剪接調節劑、ADC、組合物及/或新抗原以治療性投與的裝置、容器或其他材料；醫藥學上可接受之載劑；以及用於向患者投與該剪接調節劑、ADC、組合物及/或新抗原疫苗之裝置、容器或其他材料。使用說明書可包括有關

治療應用之指導，其包括例如患有或疑似患有贅生性病症之患者之推薦劑量及/或投與模式。在各種實施例中，該套組進一步含有關於治療用途之說明書，例如使用該剪接調節劑、ADC 或組合物及該新抗原疫苗治療或預患者之贅生性病症。在各種實施例中，該套組進一步含有至少一種額外治療劑(例如用於與該剪接調節劑、ADC 或組合物及該新抗原疫苗，例如檢查點抑制劑一起投與)。在各種實施例中，將該剪接調節劑、ADC、組合物及/或新抗原疫苗調配為醫藥組合物形式。

【0876】 在本文所揭示之方法及組合物的一些實施例中，新抗原疫苗包含至少一種新抗原肽。在一些實施例中，該至少一種新抗原肽之長度在約 10 個至約 50 個胺基酸範圍內。在一些實施例中，該至少一種新抗原肽之長度在約 10 個至約 35 個胺基酸範圍內。在一些實施例中，該至少一種新抗原肽之長度在約 15 個至約 25 個胺基酸範圍內。

【0877】 在一些實施例中，該至少一種新抗原肽包含一個或超過一個新抗原序列。在一些實施例中，該新抗原序列包含 SEQ ID NO:37-65 中之任一個之胺基酸序列。在一些實施例中，該新抗原序列包含 SEQ ID NO: 37 之胺基酸序列。在一些實施例中，該新抗原序列包含 SEQ ID NO: 39 之胺基酸序列。在一些實施例中，該新抗原序列包含 SEQ ID NO:46-49 中之任一個之胺基酸序列。

【0878】 在一些其他實施例中，該新抗原序列包含 SEQ ID NO:66-93 中之任一個之胺基酸序列，或 SEQ ID NO:66-93 中之任一個之抗原部分。在一些實施例中，該新抗原序列包含 SEQ ID NO: 66 之胺基酸序列，或 SEQ ID NO: 66 之抗原部分。在一些實施例中，該新抗原序列包含 SEQ ID NO:74-77 中之任一個之胺基酸序列，或 SEQ ID NO:74-77 中

之任一個之抗原部分。在一些實施例中，新抗原序列及/或抗原部分之長度在約 10 個至約 50 個胺基酸範圍內。在一些實施例中，新抗原序列及/或抗原部分之長度在約 10 個至約 35 個胺基酸範圍內。在一些實施例中，新抗原序列及/或抗原部分之長度在約 15 個至約 25 個胺基酸範圍內。在一些實施例中，新抗原序列及/或抗原部分之長度範圍係約 10 個至約 20 個胺基酸。在一些實施例中，新抗原序列及/或抗原部分不排他性地與典型肽序列重疊或由典型肽序列組成(例如表 21 中加底線之例示性典型肽序列中之任一個)。

【0879】 在一些實施例中，新抗原序列係對個體具有特異性之新抗原序列。在一些實施例中，新抗原序列係用於個體之個人化新抗原疫苗。在一些實施例中，新抗原序列能夠結合至個體體內表現之至少一個 HLA 對偶基因。

【0880】 在一些其他實施例中，新抗原序列係通用新抗原序列。在一些實施例中，新抗原序列係通用新抗原疫苗。在一些實施例中，該新抗原序列能夠結合至罹患贅生性病症之個體群體中至少 10%、至少 15%、至少 20%、至少 25%、至少 30%、至少 35%、至少 40%或至少 45%之個體體內表現之至少一個 HLA 對偶基因。在一些實施例中，新抗原序列能夠引發針對存在於罹患贅生性病症之個體群體之至少 1%、至少 5%或至少 10%中之腫瘤的 T 細胞反應。

【0881】 在一些實施例中，藉由對個體中由投與有效量之剪接調節劑、抗體-藥物結合物或組合物誘導之至少一種新抗原肽定序來鑑別新抗原序列。在一些實施例中，該至少一種新抗原肽包含藉由使贅生性細胞與有效量之剪接調節劑、抗體-藥物結合物或組合物接觸所誘導的新抗原序

列。在一些實施例中，贅生性細胞存在於活體外細胞培養物中。在一些實施例中，贅生性細胞係自個體獲得。在一些實施例中，贅生性細胞係存在於個體中。

【0882】 在一些實施例中，新抗原疫苗包含至少一種新抗原肽或 mRNA 及醫藥學上可接受之載劑。在一些實施例中，新抗原肽或 mRNA 可與適合載劑連接以幫助引發免疫反應。用於連接至免疫原性試劑(例如新抗原肽或 mRNA)之例示性載劑包括血清白蛋白、匙孔螺血氰蛋白、免疫球蛋白分子、甲狀腺球蛋白、卵白蛋白、破傷風類毒素或來自其他病原菌(諸如白喉、大腸桿菌(*E. coli*)、霍亂或幽門螺旋桿菌(*H. pylori*))之類毒素，或減毒之毒素衍生物。用於刺激或增強免疫反應之其他載劑包括細胞介素，諸如 IL-1、IL-1α 及 IL-1β 肽、IL-2、γINF、IL-10、GM-CSF；及趨化介素，諸如 M1P1α 及 M1P1β 以及 RANTES。如例如 WO 97/17613 及 WO 97/17614 中所述，免疫原性試劑亦可與增進跨組織轉運之肽連接。在一些實施例中，該醫藥學上可接受之載劑係選自肽、血清白蛋白、匙孔螺血氰蛋白、免疫球蛋白、甲狀腺球蛋白、卵白蛋白、類毒素或減毒之類毒素衍生物、細胞介素及趨化介素。

【0883】 在一些實施例中，新抗原肽或 mRNA 可與醫藥學上可接受之載劑連接。免疫原性試劑可藉由化學交聯與載劑連接。用於將免疫原性肽與載劑連接之技術包括使用 N-琥珀醯亞胺基-3-(2-吡啶基-硫基)丙酸酯(SPDP)及 4-(N-順丁烯二醯亞胺基甲基)環己烷-1-甲酸琥珀醯亞胺酯(SMCC)形成二硫鍵(若肽缺乏硫氫基，則其可藉由添加半胱胺酸殘基來提供)。此等試劑在其本身與存在於一種蛋白質上之肽半胱胺酸之間產生二硫鍵，且經由離胺酸上之 ε-胺基或其他胺基酸中之其他游離胺基產生醯

胺鍵。多種此類二硫鍵/醯胺形成試劑描述於 Jansen 等人((1982) Immun Rev. 62:185)中。其他雙官能偶合劑形成硫醚而非二硫鍵。許多此等硫醚形成劑係可商購的，且包括 6-順丁烯二醯亞胺基己酸、2-溴乙酸及 2-碘乙酸、4-(N-順丁烯二醯亞胺基-甲基)環己烷-1-甲酸之反應性酯。羧基可藉由將其與琥珀醯亞胺或 1-羥基-2-硝基-4-磺酸鈉鹽組合來活化。在一些實施例中，新抗原肽及醫藥學上可接受之載劑係經由連接子共價連接。

【0884】 新抗原及其他該等免疫原性肽亦可表現為與載劑之融合蛋白形式。免疫原性肽可在胺基末端、羧基末端或肽內(內部)任何位點處與載劑連接。在一些實施例中，免疫原性肽之多個重複序列可存在於融合蛋白中。在一些實施例中，新抗原肽及醫藥學上可接受之載劑係表現為融合蛋白形式。

【0885】 在一些實施例中，新抗原疫苗包含至少一種新抗原肽或其編碼 mRNA 及醫藥學上可接受之稀釋劑。在一些實施例中，新抗原疫苗包含至少一種新抗原肽或其編碼 mRNA 及醫藥學上可接受之佐劑(例如本文所描述之佐劑)。

【0886】 在本文所揭示之方法及組合物的一些實施例中，新抗原疫苗包含至少一種新抗原 mRNA。在一些實施例中，該至少一種新抗原 mRNA 編碼一個或超過一個新抗原序列。在一些實施例中，該新抗原序列包含 SEQ ID NO:37-65 中之任一個之胺基酸序列。在一些實施例中，該新抗原序列包含 SEQ ID NO: 37 之胺基酸序列。在一些實施例中，該新抗原序列包含 SEQ ID NO: 39 之胺基酸序列。在一些實施例中，該新抗原序列包含 SEQ ID NO:46-49 中之任一個之胺基酸序列。

【0887】 在一些其他實施例中，該新抗原序列包含 SEQ ID NO:66-

93 中之任一個之胺基酸序列，或 SEQ ID NO:66-93 中之任一個之抗原部分。在一些實施例中，該新抗原序列包含 SEQ ID NO: 66 之胺基酸序列，或 SEQ ID NO: 66 之抗原部分。在一些實施例中，該新抗原序列包含 SEQ ID NO:74-77 中之任一個之胺基酸序列，或 SEQ ID NO:74-77 中之任一個之抗原部分。在一些實施例中，新抗原序列及/或抗原部分之長度在約 10 個至約 50 個胺基酸範圍內。在一些實施例中，新抗原序列及/或抗原部分之長度在約 10 個至約 35 個胺基酸範圍內。在一些實施例中，新抗原序列及/或抗原部分之長度在約 15 個至約 25 個胺基酸範圍內。在一些實施例中，新抗原序列及/或抗原部分之長度範圍係約 10 個至約 20 個胺基酸。在一些實施例中，新抗原序列及/或抗原部分不排他性地與典型肽序列重疊或由典型肽序列組成(例如表 21 中加底線之例示性典型肽序列中之任一個)。

【0888】 在一些實施例中，新抗原序列係對個體具有特異性之新抗原序列。在一些實施例中，新抗原序列係用於個體之個人化新抗原疫苗。在一些實施例中，新抗原序列能夠結合至個體體內表現之至少一個 HLA 對偶基因。

【0889】 在一些其他實施例中，新抗原序列係通用新抗原序列。在一些實施例中，新抗原序列係通用新抗原疫苗。在一些實施例中，該新抗原序列能夠結合至罹患贅生性病症之個體群體中至少 10%、至少 15%、至少 20%、至少 25%、至少 30%、至少 35%、至少 40%或至少 45%之個體體內表現之至少一個 HLA 對偶基因。在一些實施例中，新抗原序列能夠引發針對存在於罹患贅生性病症之個體群體之至少 1%、至少 5%或至少 10%中之腫瘤的 T 細胞反應。

【0890】 在一些實施例中，藉由對個體中由投與有效量之剪接調節劑、抗體-藥物結合物或組合物所誘導之至少一種新抗原 mRNA 定序來鑑別新抗原序列。在一些實施例中，該至少一種新抗原 mRNA 編碼藉由使贅生性細胞與有效量之剪接調節劑、抗體-藥物結合物或組合物接觸所誘導的新抗原序列。在一些實施例中，贅生性細胞存在於活體外細胞培養物中。在一些實施例中，贅生性細胞係自個體獲得。在一些實施例中，贅生性細胞係存在於個體中。

【0891】 在一些實施例中，新抗原疫苗包含至少一種新抗原 mRNA 及醫藥學上可接受之載劑。在一些實施例中，該至少一種新抗原 mRNA 與醫藥學上可接受之載劑連接。在一些實施例中，該醫藥學上可接受之載劑係選自肽、血清白蛋白、匙孔螺血氰蛋白、免疫球蛋白、甲狀腺球蛋白、卵白蛋白、類毒素或減毒之類毒素衍生物、細胞介素及趨化介素。

【0892】 在一些實施例中，新抗原疫苗包含至少一種新抗原 mRNA 及醫藥學上可接受之稀釋劑。在一些實施例中，新抗原疫苗包含至少一種新抗原 mRNA 及醫藥學上可接受之佐劑(例如本文所描述之佐劑)。

【0893】 在一些實施例中，新抗原 mRNA 經包封劑包封。在一些實施例中，該包封劑保護新抗原 mRNA 免於降解並改善疫苗遞送(McNamara 等人(2015) J Immunol Res. 2015:794528)。在一些實施例中，該包封劑係脂質體。在一些實施例中，該脂質體係陽離子性脂質體，諸如氯化 N-[1-(2,3-二油醯氧基)丙基]-N,N,N-三甲基銨 1 (DOTAP)。在一些實施例中，該包封劑係奈米粒子。在一些實施例中，奈米粒子保護新抗原 mRNA 免受核酸酶降解及/或增強細胞吸收及/或遞送效率。在一些實施例中，奈米粒子可工程改造成可完全降解。在一些實施例中，奈米粒子

係呈可生物降解核-殼結構之奈米粒子，其中 pH 反應性聚(b-胺基酯)(PBAE)核經磷脂殼包封(Su 等人(2011) Mol Pharm. 8(3):774-87)。在一些實施例中，此類奈米粒子在活體內遞送 mRNA 及引發抗腫瘤免疫反應方面特別有效。

【0894】 在一些實施例中，個體具有約 150 個突變或更少之非同義突變負荷。在一些實施例中，個體具有約 100 個突變或更少之非同義突變負荷。在一些實施例中，個體具有約 50 個突變或更少之非同義突變負荷。在一些實施例中，個體患有或疑似患有贅生性病症，例如血液惡性病或實體腫瘤。在一些實施例中，該血液惡性病係選自 B 細胞惡性病、白血病、淋巴瘤及骨髓瘤。在一些實施例中，該血液惡性病係選自急性骨髓性白血病及多發性骨髓瘤。在一些實施例中，該實體腫瘤係選自乳癌、胃癌、前列腺癌、卵巢癌、肺癌、子宮癌、唾腺管癌、黑素瘤、結腸癌、子宮頸癌、胰臟癌、腎癌、結腸直腸癌及食道癌。在一些實施例中，該實體腫瘤係選自 HER2 陽性乳癌、胃腺癌及前列腺癌。

【0895】 如本文所使用，「佐劑」係指能夠增加、擴增或調節針對伴隨之免疫原性試劑(例如新抗原肽或 mRNA)之免疫反應的物質。在某些實施例中，本發明之新抗原可與佐劑，亦即本身不引起適應性免疫反應但擴增或調節針對伴隨之新抗原之反應的物質組合投與。多種佐劑可與所揭示之新抗原組合使用以便引發免疫反應。在一些實施例中，選擇的佐劑可強化對新抗原之固有反應，而不會引起新抗原之構象變化，該等構象變化將影響該反應之定性形式。在一些實施例中，選擇的佐劑可增強 T 效應(例如 CD8)細胞激活及/或活化。

【0896】 在某些實施例中，佐劑係鋁鹽(礬)，諸如氫氧化鋁、磷酸

鋁及硫酸鋁。此類佐劑可與或不與其他特異性免疫刺激劑一起使用，該等免疫刺激劑諸如為 3 脫-O-醯化單磷醯脂質 A (MPL)或 3-DMP、聚合或單體胺基酸，諸如聚麩胺酸或聚離胺酸。該等佐劑可與或不與其他特異性免疫刺激劑一起使用，該等免疫刺激劑諸如為胞壁醯肽(例如 N-乙醯基胞壁醯基-L-蘇胺醯基-D-異麩醯胺酸(thr-MDP)、N-乙醯基-去甲胞壁醯基-L-丙胺醯基-D-異麩醯胺酸(nor-MDP)、N-乙醯基胞壁醯基-L-丙胺醯基-D-異麩醯胺醯基-L-丙胺酸-2-(1'-2'二軟脂醯基-sn-甘油基-3-羥基磷醯基氧基)-乙胺(MTP-PE)、N-乙醯基葡萄糖胺基-N-乙醯基胞壁醯基-L-Al-D-isoglu-L-Ala-二軟脂醯氧基丙醯胺(DTP-DPP))或其他細菌細胞壁組分。其他佐劑係水包油乳液且包括(a) MF59 (WO 90/14837)，其含有 5%角鯊烯、0.5% Tween 80 及 0.5% Span 85 (視情況含有各種量之 MTP-PE)，使用微流化床諸如 110Y 型微流化床(Microfluidics)調配成次微米級粒子，(b) SAF，其含有 10%角鯊烯、0.4% Tween 80、5%普洛尼克(pluronic)嵌段聚合物 L121 及 thr-MDP，微流化成次微米級乳液或渦旋以產生較大粒度的乳液，及(c) Ribi™ 佐劑系統(RAS) (Ribi ImmunoChem)，其含有 2%角鯊烯、0.2% Tween 80 及一或多種來自由以下組成之群的細菌細胞壁組分：單磷醯基脂質 A (MPL)、海藻糖二黴菌酸酯(TDM)及細胞壁骨架(CWS)，例如 MPL-FCWS (Detox™)。在一些實施例中，佐劑係皂素，諸如 Stimulon™ (QS21)，或由其產生之粒子，諸如 ISCOM (免疫刺激複合體)及 ISCOMATRIX。其他佐劑包括弗氏完全佐劑(Complete Freund's Adjuvant，CFA)及弗氏不完全佐劑(Incomplete Freund's Adjuvant，IFA)；細胞介素，諸如介白素(IL-1、IL-2 及 IL-12)；巨噬細胞群落刺激因子(M-CSF)；及腫瘤壞死因子(TNF)。

【0897】 佐劑可與免疫原性試劑(例如新抗原肽或 mRNA)一起以單一組合物投與，或可在投與免疫原性試劑之前、同時或之後投與。在一些實施例中，免疫原性試劑及佐劑可在同一小瓶中包裝及供應，或可包裝在獨立小瓶中且在使用之前混合。在一些實施例中，免疫原性試劑及佐劑可包裝有標籤，指示預定治療應用。在一些實施例中，若免疫原性試劑及佐劑係獨立包裝的，則該包裝可包括有關在使用前混合之說明書。佐劑及/或載劑之選擇取決於含有佐劑之免疫原性調配物之穩定性、投與途徑、給藥時程、佐劑對經疫苗接種之物種之功效，且對於人類而言，醫藥學上可接受之佐劑係已獲相關管理機構批准或可批准用於人類投與的佐劑。舉例而言，弗氏完全佐劑不適合人類投與。然而，單獨或視情況與礬、QS21 及 MPL 中之任一種及其所有組合相組合之礬、MPL 或弗氏不完全佐劑(Chang 等人 (1998) Adv Drug Deliv Rev. 32:173-186)適合於人類投與。

【0898】 在一些實施例中，本發明進一步提供篩選及鑑別至少一種新抗原之方法。更具體言之，在各種實施例中，本發明提供一種鑑別至少一種新抗原之方法，該方法係藉由以下方式實現：(a)使贅生性細胞與有效量之剪接調節劑、ADC 或包含剪接調節劑或 ADC 之組合物接觸；(b)在該贅生性細胞與該剪接調節劑、ADC 或組合物接觸之後，偵測至少一種選擇性剪接之 mRNA 轉錄物；(c)預測該至少一種選擇性剪接之 mRNA 轉錄物向至少一種肽之轉譯；以及(d)將該至少一種肽與參考蛋白質組相比較，其中若該至少一種肽與該參考蛋白質組中任何肽不匹配，則鑑別出至少一種新抗原。在各種實施例中，該方法進一步包含接觸一或多種額外贅生性細胞以鑑別至少一種通用新抗原。在各種實施例中，對一或多個額外贅生性細胞或樣品(例如組織切片)重複該方法以確定適合的新抗原(例

如用於新抗原疫苗中)及/或鑑別一或多種通用新抗原。

【0899】 在各種其他實施例中，本發明提供一種鑑別至少一種新抗原之方法，該方法係藉由以下方式實現：(a)使贅生性細胞與有效量之剪接調節劑、ADC 或包含剪接調節劑或 ADC 之組合物接觸；(b)在該贅生性細胞與該剪接調節劑、ADC 或組合物接觸之後，偵測至少一種包含潛在新抗原序列之肽；以及(c)將該至少一種肽與參考蛋白質組相比較，其中若該至少一種肽與該參考蛋白質組中之任何肽均不匹配，則鑑別出至少一新抗原。在各種實施例中，該方法進一步包含接觸一或多種額外贅生性細胞以鑑別至少一種通用新抗原。在各種實施例中，對一或多個額外贅生性細胞或樣品(例如組織切片)重複該方法以確定適合的新抗原(例如用於新抗原疫苗中)及/或鑑別一或多種通用新抗原。

【0900】 在本文所描述之新抗原鑑別方法的一些實施例中，偵測至少一種選擇性剪接之 mRNA 轉錄物包含 RNAseq。在一些實施例中，預測該至少一種選擇性剪接之 mRNA 轉錄物之轉譯包含對該至少一種轉錄物之剪接百分比變化(dPSI)值定量。在一些實施例中，預測該至少一種選擇性剪接之 mRNA 轉錄物之轉譯包含 RiboSeq 及/或核糖體圖譜分析。

【0901】 在本文所描述之新抗原鑑別方法的一些實施例中，該等方法進一步包含評價該至少一種肽的預測之主要組織相容複合體(MHC)結合。在一些實施例中，預測之 MHC 結合係藉由量測該至少一種肽之原始親和力預測之結合強度來測定。在一些實施例中，原始親和力預測之結合強度為約 500 nM 或更高指示 MHC 結合。在一些實施例中，預測之 MHC 結合係藉由鑑別一系列隨機肽之預測結合強度的分佈；及將該至少一種肽之預測結合強度與該分佈相比較來確定。在一些實施例中，該分佈

之前 2.0%中之預測結合強度指示較弱的 MHC 結合。在一些實施例中，該分佈之前 0.5%中之預測結合強度指示較強的 MHC 結合。

【0902】 在本文所述之新抗原鑑別方法的一些實施例中，贅生性細胞存在於活體外細胞培養物中。在一些實施例中，贅生性細胞係自個體獲得。在一些實施例中，贅生性細胞係存在於個體中。

【0903】 在各種實施例中，本文亦提供製造新抗原疫苗之方法，該方法係藉由以下方式進行：(a)使用本文所揭示之例示性鑑別方法中之任一種鑑別至少一種新抗原(例如至少一種新抗原肽或其編碼 mRNA)；及(b)將該至少一種新抗原與醫藥學上可接受之載劑、稀釋劑或佐劑(例如本文所描述之醫藥學上可接受之載劑、稀釋劑或佐劑中之任一種)一起調配。在一些實施例中，該疫苗中使用的至少一種新抗原包含 SEQ ID NO:37-65 中之任一個之胺基酸序列。在一些實施例中，該疫苗中使用的至少一種新抗原包含 SEQ ID NO: 37 之胺基酸序列。在一些實施例中，該疫苗中使用的至少一種新抗原包含 SEQ ID NO: 39 之胺基酸序列。在一些實施例中，該疫苗中使用的至少一種新抗原包含 SEQ ID NO:46-49 中之任一個之胺基酸序列。

【0904】 在一些其他實施例中，該疫苗中使用的至少一種新抗原包含 SEQ ID NO:66-93 中之任一個之胺基酸序列，或 SEQ ID NO:66-93 中之任一個之抗原部分。在一些實施例中，該疫苗中使用的至少一種新抗原包含 SEQ ID NO: 66 之胺基酸序列，或 SEQ ID NO: 66 之抗原部分。在一些實施例中，該疫苗中使用的至少一種新抗原包含 SEQ ID NO:74-77 中之任一個之胺基酸序列，或 SEQ ID NO:74-77 中之任一個之抗原部分。在一些實施例中，該至少一種新抗原及/或抗原部分之長度在約 10 個

至約 50 個胺基酸範圍內。在一些實施例中，該至少一種新抗原及/或抗原部分之長度在約 10 個至約 35 個胺基酸範圍內。在一些實施例中，該至少一種新抗原及/或抗原部分之長度在約 15 個至約 25 個胺基酸範圍內。在一些實施例中，該至少一種新抗原及/或抗原部分之長度範圍係約 10 個至約 20 個胺基酸。在一些實施例中，該至少一種新抗原及/或抗原部分不排他性地與典型肽序列重疊或由典型肽序列組成(例如表 21 中加底線之例示性典型肽序列中之任一個)。

【0905】 在一些實施例中，該疫苗中使用的至少一種新抗原與醫藥學上可接受之載劑連接。在一些實施例中，該醫藥學上可接受之載劑係選自肽、血清白蛋白、匙孔螺血氰蛋白、免疫球蛋白、甲狀腺球蛋白、卵白蛋白、類毒素或減毒之類毒素衍生物、細胞介素及趨化介素。

**剪接調節劑/ADC 與工程改造之 T 細胞(CAR-T)之組合：**

【0906】 在各種實施例中，患有如本文中所描述之癌症的患者可以用剪接調節劑、ADC 或組合物與一或多種工程改造之腫瘤靶向 T 細胞(亦即，CAR-T)之組合治療。因此，在各種實施例中，本發明提供一種治療患有或疑似患有贅生性病症之個體的方法，該方法係藉由向該個體投與有效量之剪接調節劑、ADC 或包含剪接調節劑或 ADC 之組合物；以及工程改造之腫瘤靶向 T 細胞(亦即，CAR-T)實現。在各種實施例中，嵌合 T 細胞受體可使用可與鑑別之新抗原反應的抗原識別序列進行工程改造。

【0907】 舉例而言，在各種實施例中，為了靶向細胞表面蛋白質之細胞外結構域中剪接調節劑或誘導之變化，可藉由識別細胞表面表現之新抗原蛋白質結構域的第一鑑別抗體對嵌合抗原反應性 T 細胞受體(CAR)進行工程改造。接著，此類抗體之抗原識別序列可與 T 細胞受體結構域融

合，用於選擇性靶向及活化。

【0908】 在各種其他實施例中，採用將腫瘤細胞之抗原呈現機制與剪接調節劑或 ADC 源性新抗原相結合之策略。在一些實施例中，可用剪接調節劑、ADC 或組合物處理含有已知且常常表示 HLA 對偶基因(例如 HLA-A*02:01)之細胞並藉由配體組學(ligandomics)鑑別 MHC1 結合之新抗原。在一些實施例中，此等肽可用於激活及/或擴增來自表現相同 HLA 對偶基因之健康供體之 T 細胞。在一些實施例中，可分離此類 T 細胞且對 T 細胞受體(TCR) α 及 β 鏈進行定序以鑑別同源抗原識別/可變區。在一些實施例中，接著可對同源 CAR 進行工程改造。

【0909】 在一些實施例中，將 CAR 序列選殖至患者來源之 T 細胞群中，且使用當前可用之方案進行擴增。在一些實施例中，在用剪接調節劑、ADC 或組合物處理後，接著將經工程改造之 T 細胞回輸至患者之患者的循環中。在一些實施例中，在用剪接調節劑、ADC 或組合物處理後，腫瘤細胞可開始呈現抗原。在一些實施例中，經工程改造之 T 細胞群可與抗原呈現腫瘤細胞接合且殺滅該等抗原呈現腫瘤細胞。

【0910】 熟習此項技術者將易於瞭解，本文所描述的本發明之方法的其他適合修改及改編顯而易見且可在不脫離本發明之範圍或本文所揭示之實施例的情況下，使用適合等效物進行。現已詳細描述本發明，參照以下實例將更清楚地理解本發明，該等實例僅出於說明之目的被包括在內且不意欲為限制性的。

**實例**

**實例 1**

【0911】 描述具有表 7-9 中所顯示之結構的有效負載、連接子及可

結合之連接子-有效負載(連接子-藥物，即 L-D)化合物的合成方法。可結合之連接子-有效負載係用於製備抗體-藥物結合物(ADC)。例示性 ADC 描述於實例 3-5 中。

**1.1 試劑及材料**

【0912】 以下合成方法中所使用之起始物質係可商購的或可藉由標準方法，自已知材料容易地製備。所揭示的可結合之連接子-有效負載可使用本文所描述之反應及技術製備。在描述以下所描述之合成方法中，應瞭解，除非另外指示，否則所有提出之反應條件，包括溶劑、反應氛圍、反應溫度、實驗持續時間及處理程序之選擇，均可選擇該反應之標準條件。熟習有機合成之技術者應瞭解，分子之多個部分上存在的官能基應與所提出之試劑及反應相容。與反應條件不相容之取代基對於熟習此項技術者為顯而易見的，且因此在本文中指定替代方法。

【0913】 製備型液相層析-質譜法(LC/MS)係使用 Waters 自動純化系統(AutoPurification System)及 XTerra MS C18 管柱(5 μm，19 mm×100 mm)在酸性移動相條件下進行。核磁共振(NMR)譜圖係在 400 MHz 下，使用 Varian 儀器(Agilent Technologies)記錄。微波加熱係使用 Biotage Emrys Liberator 或 Initiator 微波執行。管柱層析法係使用 Teledyne Isco Combiflash Rf200d 進行。溶劑移除係使用 Büchi 旋轉式蒸發器或 Genevac 離心式蒸發器進行。

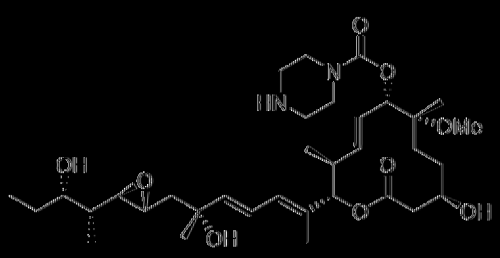
【0914】 **術語/縮寫**：如本文所使用，術語「惰性化」係指用基本上不含水分之惰性氣體，諸如氮氣或氬氣置換反應器(例如反應容器、燒瓶、玻璃反應器)中之空氣。本文中使用以下縮寫：DCM=二氯甲烷，DMF=二甲基甲醯胺，HPLC=高效液相層析，KHMDS=雙(三甲基矽烷基)

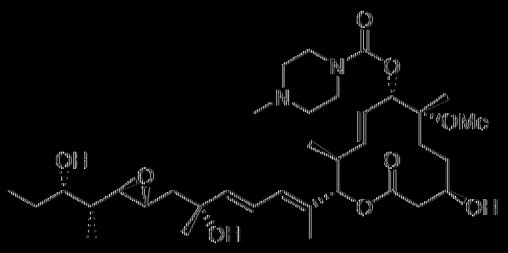
胺基鈉，LC/MS：液相層析-質譜法，MeOH：甲醇，RT：室溫，TBSCl：氯化第三丁基二甲基矽烷，THF：四氫呋喃，TLC：薄層層析法。多重性係使用以下縮寫指示：s：單峰，d：二重峰，t：三重峰，q：四重峰，quint：五重峰，sxt：六重峰，m：多重峰，dd：兩個二重峰，ddd：雙重兩個二重峰，dt：兩個三重峰，br s：寬單峰。

[0915] LC/MS：移動相：A(0.1%甲酸/H2O)及 B(0.1%甲酸/乙腈)。梯度：5%至 95% B，1.8 分鐘。管柱：Waters Acquity BEH C18 管柱(1.7 μm，2.1×50 mm)。

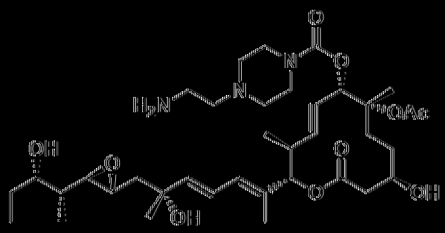
[0916] 參考文獻：美國專利第 7,884,128 號及第 7,816,401 號描述合成普拉烯內酯 B 及 D 之例示性方法且關於此類方法各自以引用之方式併入本文中。普拉烯內酯 B 及 D 之合成亦可使用 Kanada 等人((2007)Angew Chem Int Ed.46:4350-5)中所描述之例示性方法執行。Kanada 等人及國際公開案第 WO 2003/099813 號描述自普拉烯內酯 D(WO 2003/099813 之 1110'D)合成 E'10'(D11)(WO 2003/099813 之化合物 45)的例示性方法。對應的美國專利號為 Kotake 等人之第 7,550,503 號。此等參考文獻中關於所述合成方法各自併入本文中。

表 7. 例示性藥物部分(有效負載)之結構

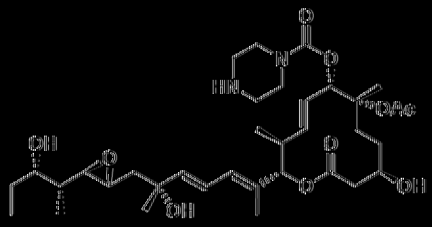
| 有效負載之結構 / ID<br>(有效負載系列) |
|---|
|  <br>D1<br>(普拉烯內酯 D) |



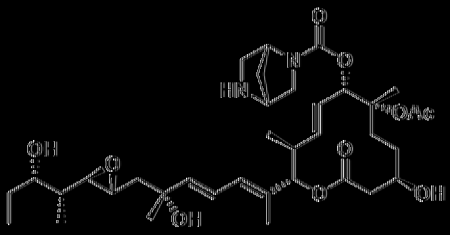
ID2
(普拉烯內酯 D)



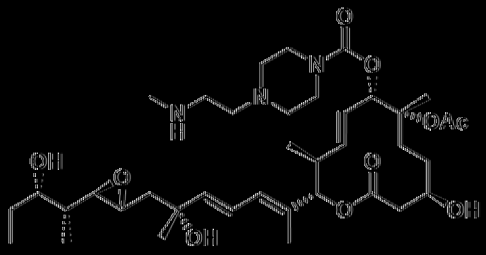
ID3
(普拉烯內酯 D)



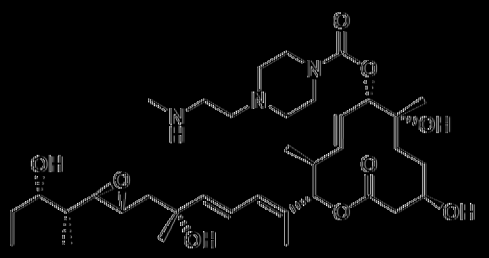
ID4
(普拉烯內酯 D)



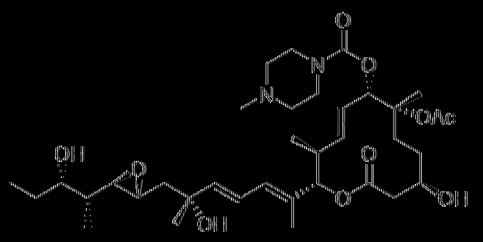
ID5
(普拉烯內酯 D)



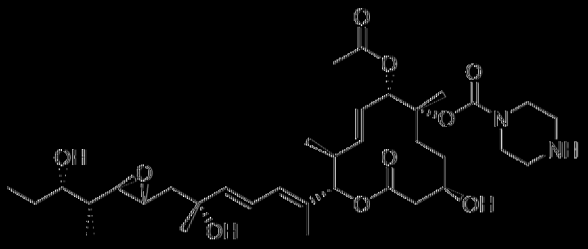
ID6
(普拉烯內酯 D)



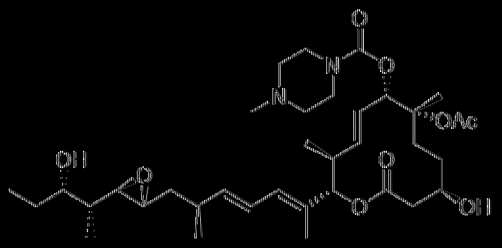
D7
(普拉烯內酯 D)



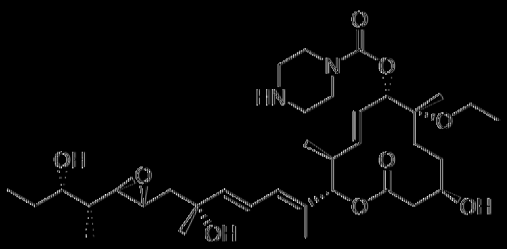
D4'
(普拉烯內酯 D)



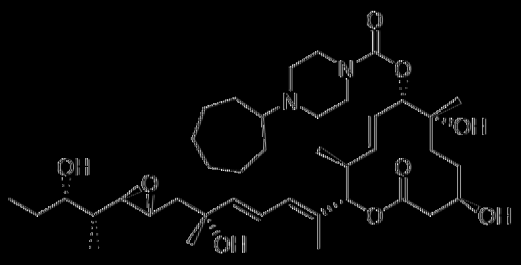
D8
(普拉烯內酯 D)



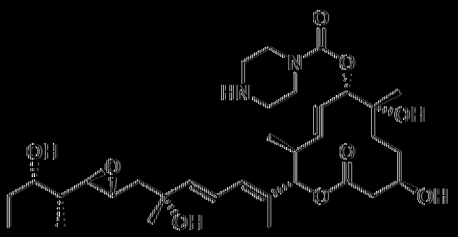
D9
(普拉烯內酯 B)



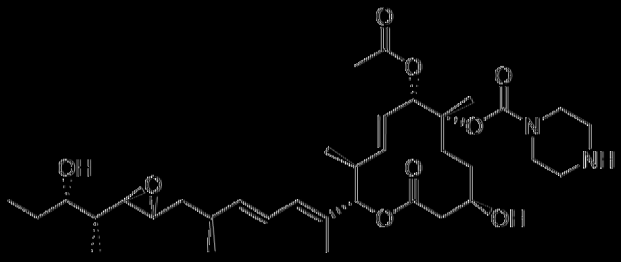
D10
(普拉烯內酯 D)



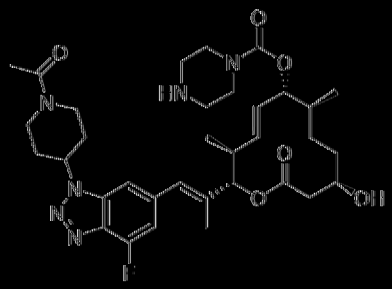
D11 (F7107)
(普拉洛烯內酯 D)



D12
(普拉洛烯內酯 D)



D13
(普拉洛烯內酯 B)



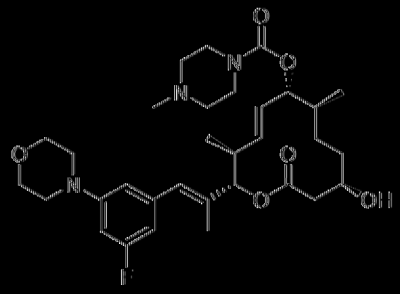
D14
(芳基普拉洛烯內酯)



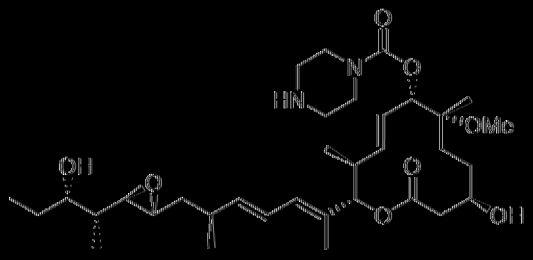
D15
(芳基普拉洛烯內酯)



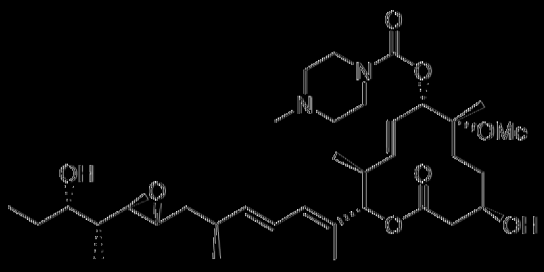
D16
(芳烴醇拉坦烯內酯)



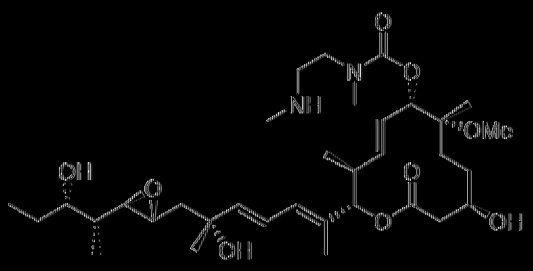
D17
(芳烴醇拉坦烯內酯)



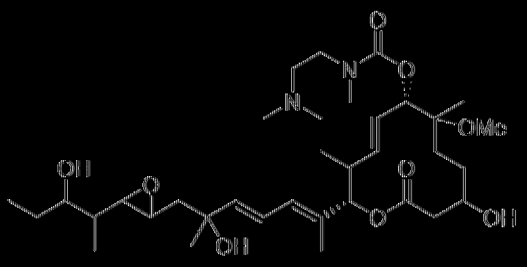
D18
(醇拉坦烯內酯 B)



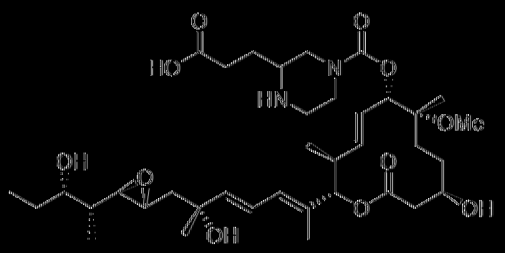
D19
(醇拉坦烯內酯 B)



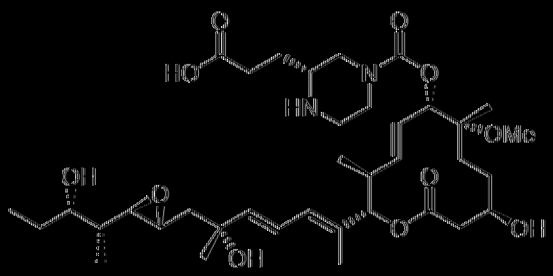
D20
(醇拉坦烯內酯 D)



D21
(普拉烯內酯 D)



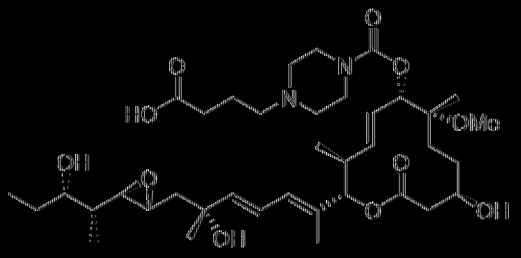
D22
(兩性離子型普拉烯內酯 D)



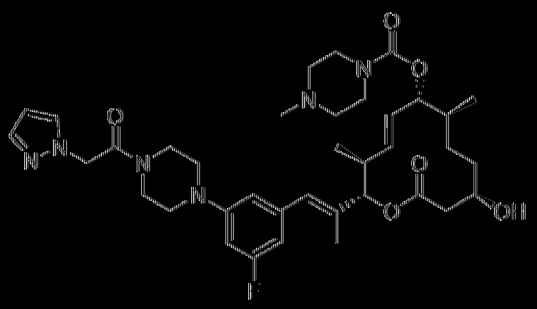
D23
(兩性離子型普拉烯內酯 D)



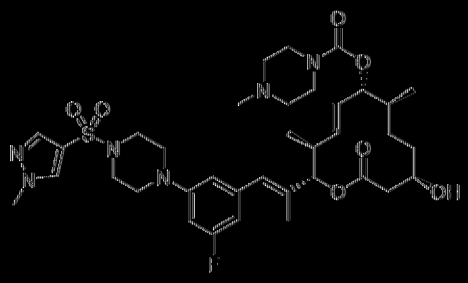
D24
(兩性離子型普拉烯內酯 D)



D25
(兩性離子型普拉烯內酯 D)



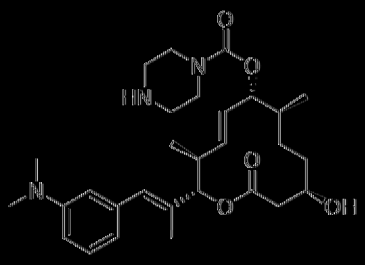
D26
(芳基哌拉嗪烯內酯)



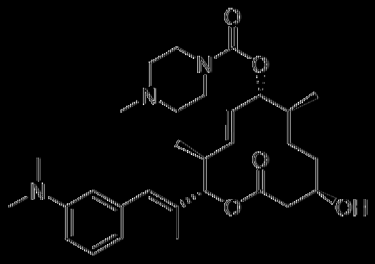
D27
(芳基哌拉嗪烯內酯)



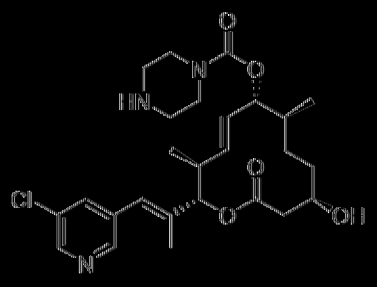
D28
(芳基哌拉嗪烯內酯)



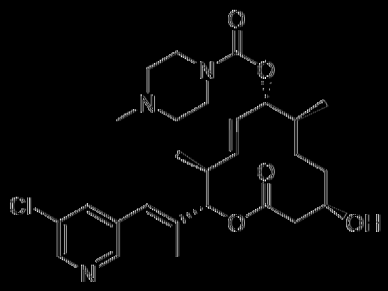
D29
(芳基哌拉嗪烯內酯)



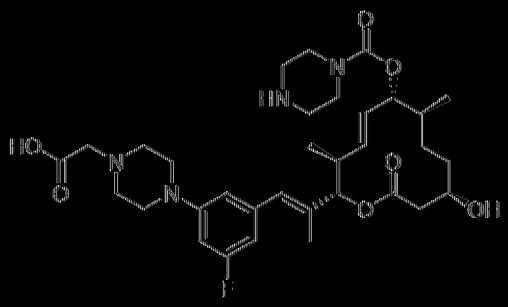
D30
(芳基哌拉嗪烯內酯)



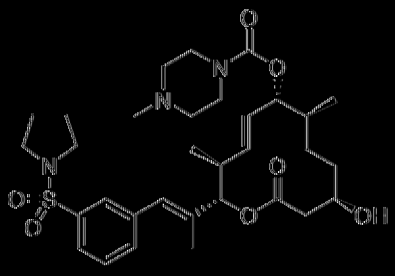
ID31
(芳基哌拉嗪烯內酯)



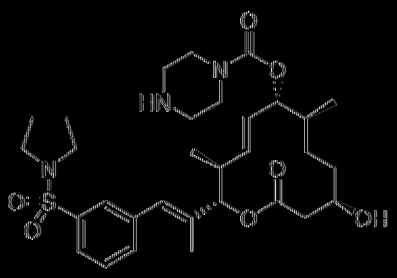
ID32
(芳基哌拉嗪烯內酯)



ID33
(兩性離子型芳基哌拉嗪烯內酯)



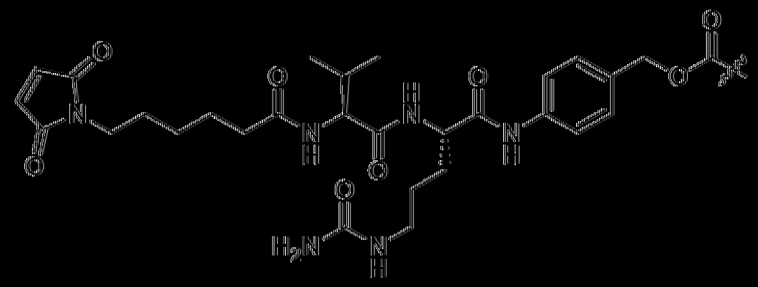
ID34
(兩性離子型芳基哌拉嗪烯內酯)



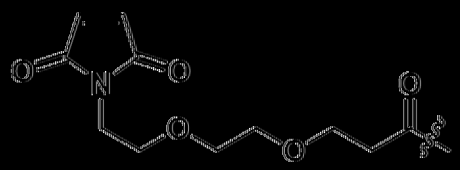
D35
(兩性離子型芳基許拉烯內酯)

表 8. 例示性連接子之結構

連接子結構 / ID
(IUPAC 名稱)



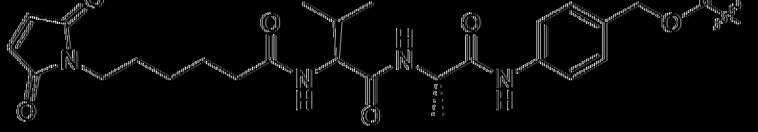
ADL1 - 「MC Val Cit pABC」
(甲酸{4-[(2S)-5-(胺甲醯基胺基)-2-[(2S)-2-(6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)-1-醯胺基-3-甲基丁醯胺基]戊醯胺基]苯基}甲酯)



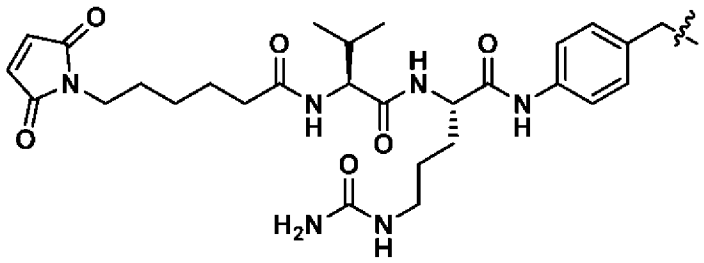
ADL2 - 「MC (PEG)$_2$ CO」
(3-{2-[2-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)乙氧基]乙氧基}丙醛)



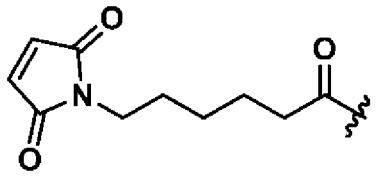
ADL5 - 「MC Val Ala pAB」
(6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)-N-[(1S)-2-甲基-1-{[(1S)-1-[(4-甲基苯基)胺甲醯基]乙基]胺甲醯基}丙基]己醯胺)



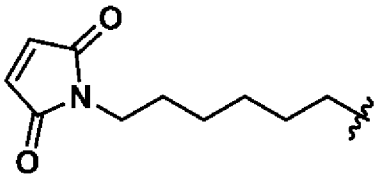
ADL6 - 「MC Val Ala pABC」
(甲酸{4-[(2S)-2-[(2S)-2-(6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)-1-醯胺基-3-甲基丁醯胺基]丙醯胺基]苯基}甲酯)



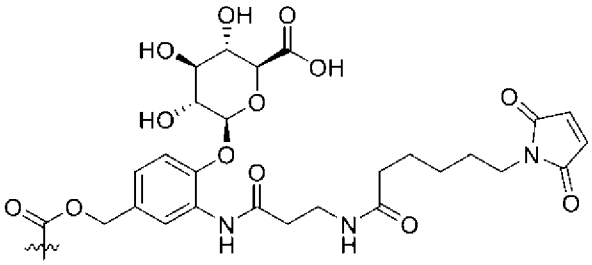
ADL7 - 「MC-Val-Cit-pAB」
(N-[(1S)-1-{[(1S)-4-(胺甲醯基胺基)-1-[(4-甲基苯基)胺甲醯基]丁基]胺甲醯基}-2-甲基丙基]-6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯胺)



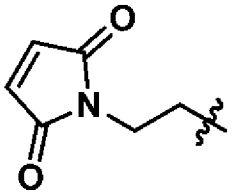
ADL10 - 「MC」
(6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醛)



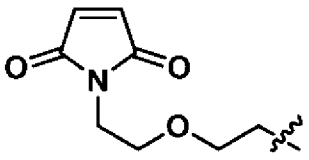
ADL12 - 「Mal-Hex」
(1-己基-2,5-二氫-1H-吡咯-2,5-二酮)



ADL13 - 「MC-β-葡萄糖醛酸苷」
((2S,3S,4S,5R,6S)-6-(2-{3-[6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯胺基]丙醯胺基}-4-[(甲醯氧基)甲基]苯氧基)-3,4,5-三羥基氧雜環己烷-2-甲酸)

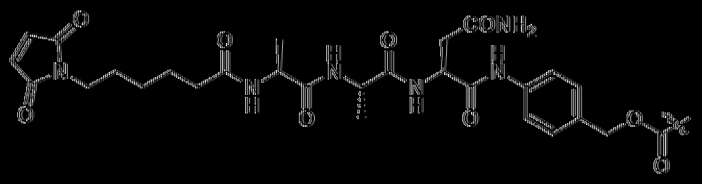


ADL14 - 「Mal-Et」
(1-乙基-2,5-二氫-1H-吡咯-2,5-二酮)

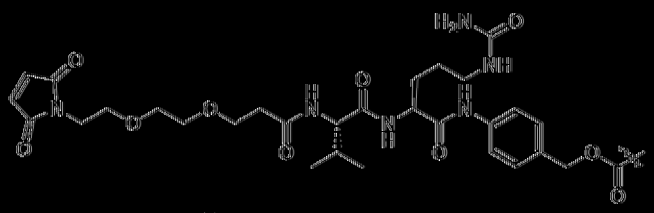


ADL15 - 「Mal-Et-O-Et」

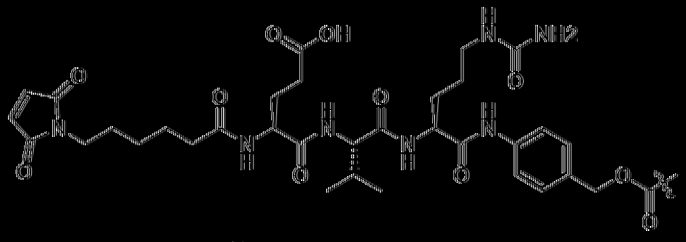
(1-(2-乙氧基乙基)-2,5-二氧-1H-吡咯-2,5-二酮)



ADL21 -「MC-Ala-Ala-Asp-pABC」

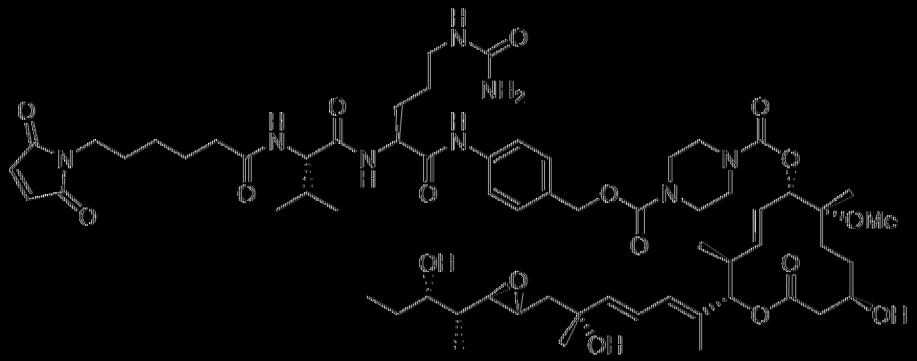


ADL22 -「Mc-PEG2-Val-Cit-pABC」

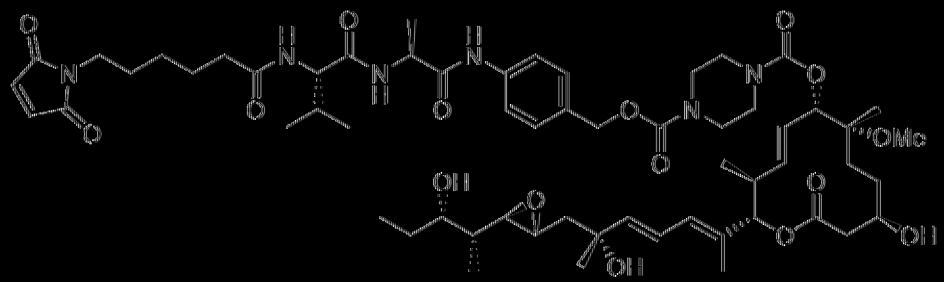


ADL23 -「MC-Glu-Val-Cit-pABS」

表 9. 例示性可結合連接子-有效負載(L-D)化合物之結構

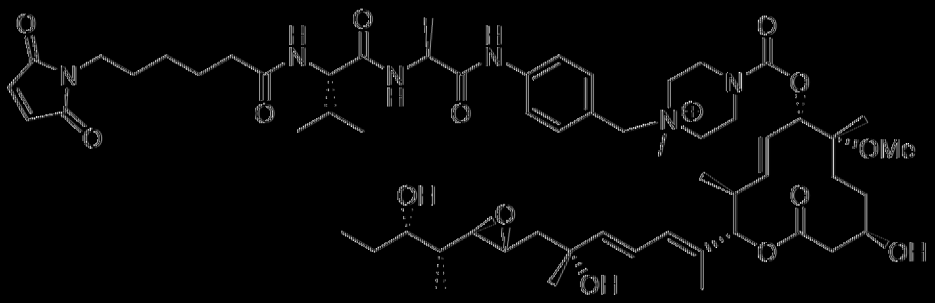


化學式：$C_{63}H_{84}N_8O_{17}$
精確質量：1234.67
分子量：1235.48
ADL1-D1



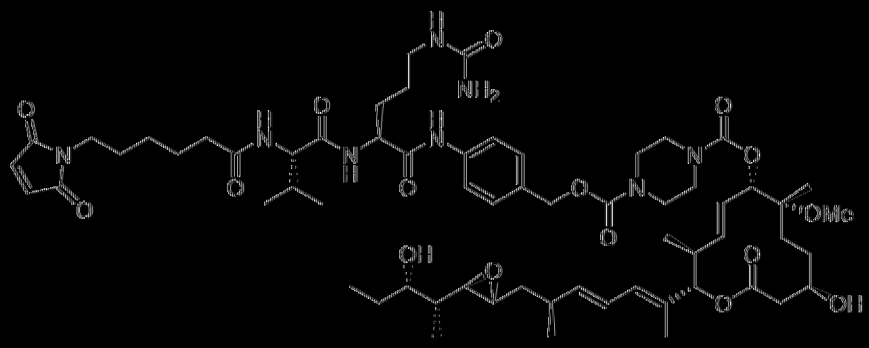
化學式：$C_{60}H_{80}N_6O_{16}$
精確質量：1148.63
分子量：1149.30

ADL6-D1



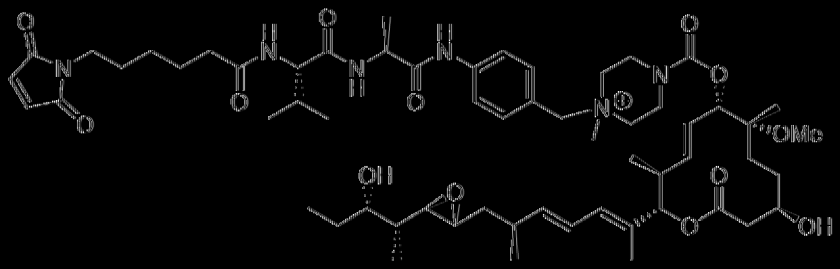
化學式：$C_{80}H_{91}N_8O_{14}^+$
精確質量：1119.66
分子量：1120.42

ADL5-D2



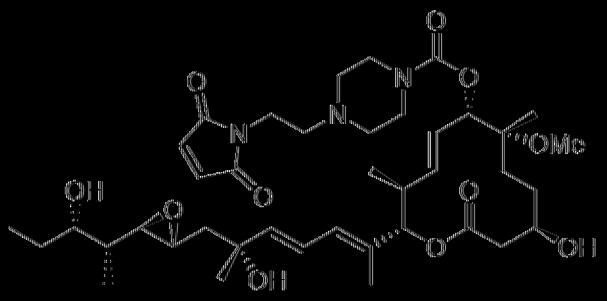
化學式：$C_{88}H_{91}N_8O_{15}$
精確質量：1218.68
分子量：1219.49

ADL1-D18

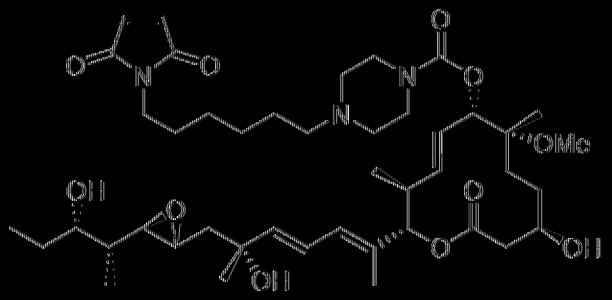


化學式：$C_{80}H_{91}N_8O_{13}^+$
精確質量：1103.66
分子量：1104.42

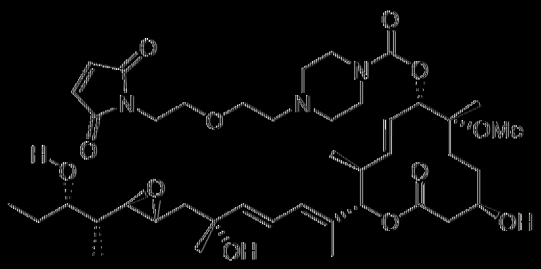
ADL5-D19



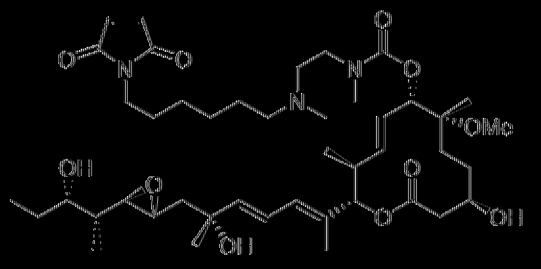
化學式：$C_{49}H_{61}N_3O_{11}$
精確質量：759.43
分子量：759.94
ADL14-ID1



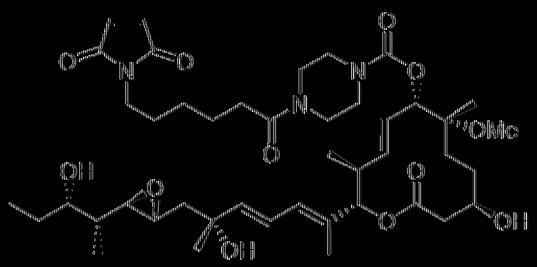
化學式：$C_{44}H_{59}N_3O_{11}$
精確質量：815.49
分子量：816.05
ADL12-ID1



化學式：$C_{42}H_{55}N_3O_{12}$
精確質量：809.46
分子量：809.89
ADL15-ID1

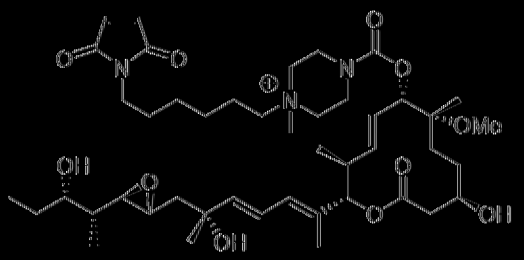


化學式：$C_{44}H_{57}N_3O_{11}$
精確質量：817.51
分子量：816.06
ADL12-ID20



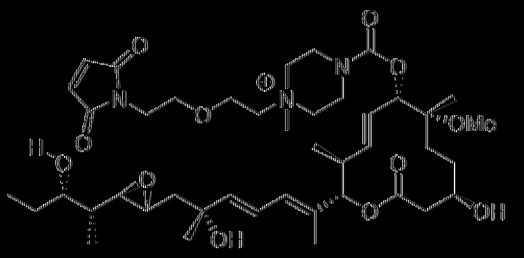
化學式：$C_{44}H_{67}N_3O_{12}$
精確質量：829.47
分子量：830.03

ADL10-D1



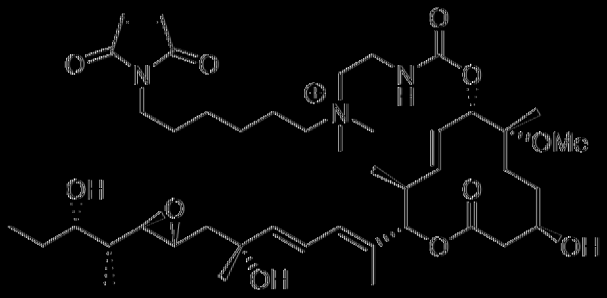
化學式：$C_{45}H_{72}N_3O_{11}^+$
精確質量：830.52
分子量：831.08

ADL12-D2



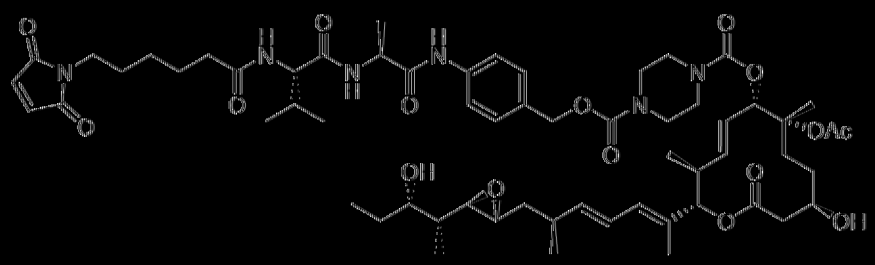
化學式：$C_{43}H_{68}N_3O_{12}^+$
精確質量：818.48
分子量：819.03

ADL15-D2



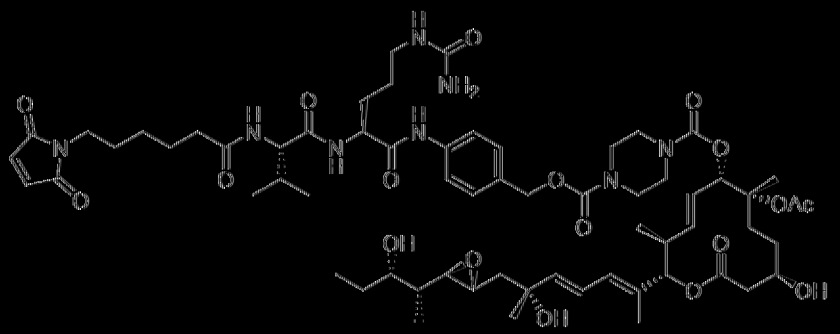
化學式：$C_{44}H_{72}N_3O_{11}^+$
精確質量：818.52
分子量：819.07

ADL12-D21



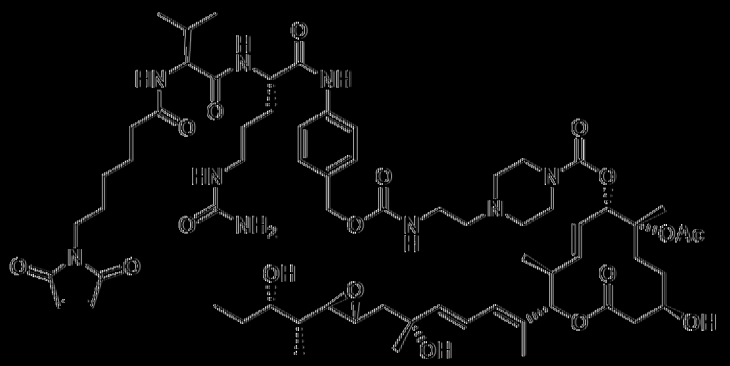
化學式：$C_{61}H_{80}N_8O_{16}$
精確質量：1160.63
分子量：1161.40

ADL6-D9



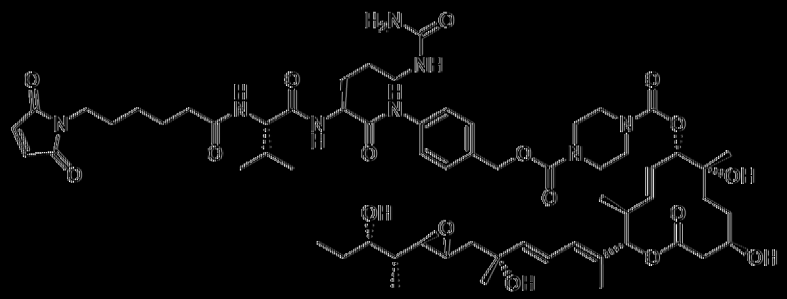
化學式：$C_{61}H_{81}N_9O_{16}$
精確質量：1159.67
分子量：1160.49

ADL1-D4



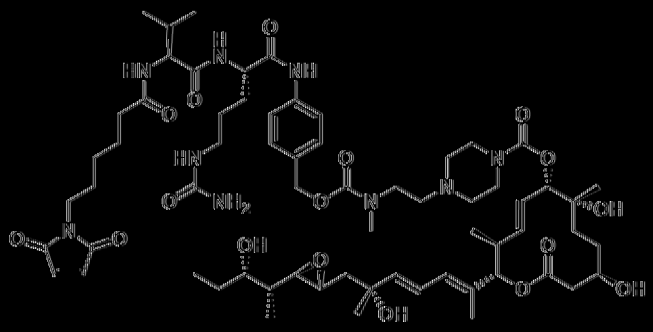
化學式：$C_{68}H_{89}N_9O_{18}$
分子量：1300.46

ADL1-D3



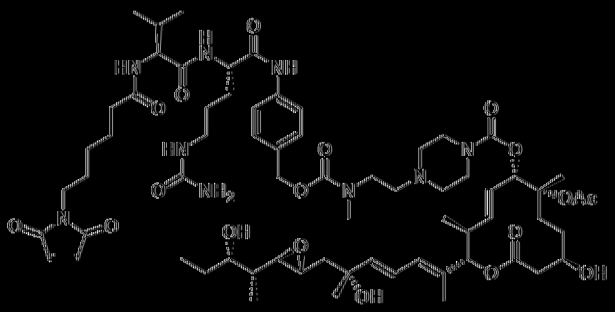
化學式：$C_{61}H_{79}N_9O_{17}$
分子量：1177.46

ADL1-D12



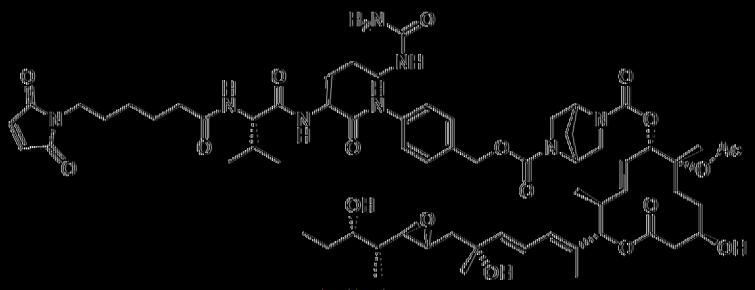
化學式：$C_{63}H_{80}N_8O_{17}$
分子量：1276.35

ADL1-D7



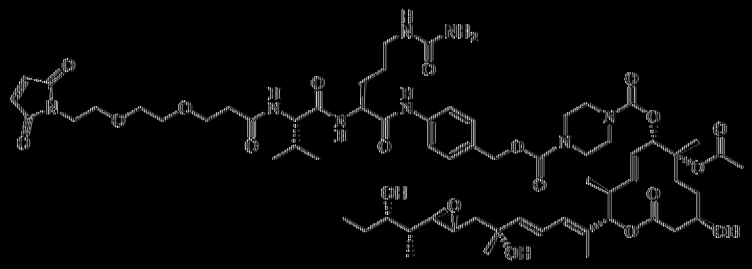
化學式：$C_{65}H_{82}N_8O_{18}$
分子量：1320.39

ADL1-D6



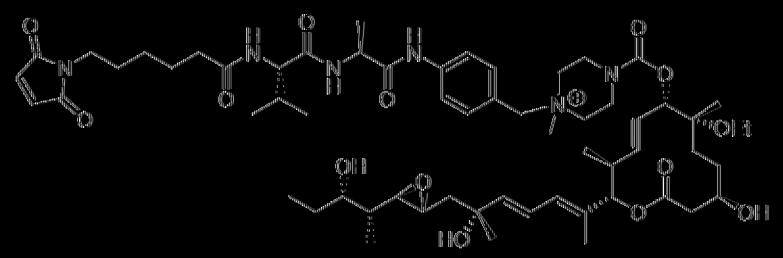
化學式：$C_{63}H_{80}N_8O_{16}$
分子量：1276.51

ADL1-D5

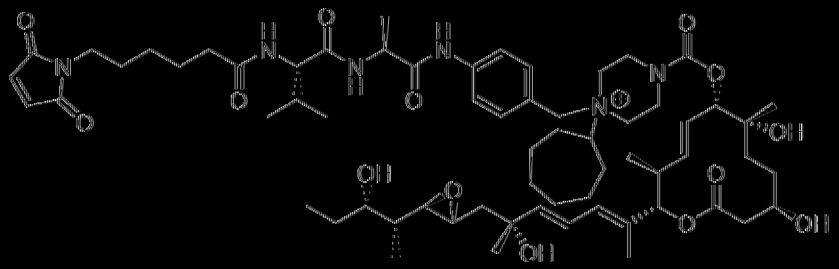


化學式：$C_{63}H_{80}N_8O_{16}$
分子量：1260.52

ADL22-D4



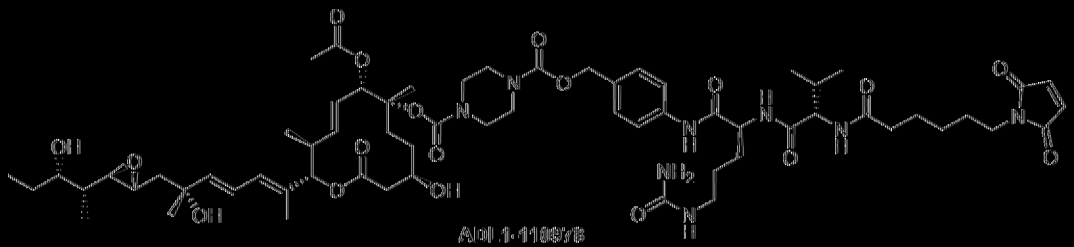
化學式：$C_{61}H_{80}N_6O_{14}^{+}$
精確質量：1133.67
分子量：1134.44
ADL5-D10



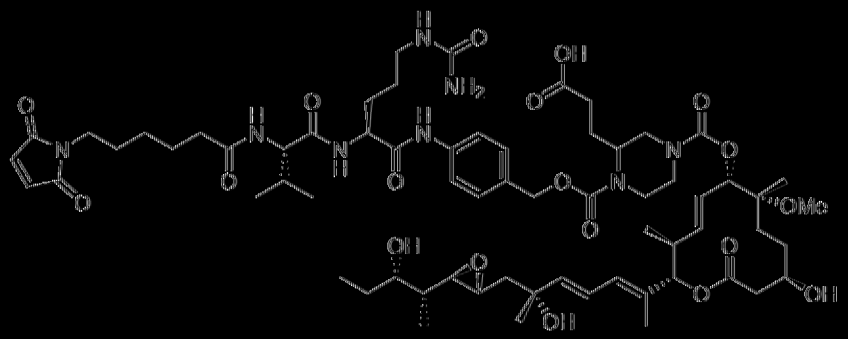
化學式：$C_{63}H_{82}N_6O_{14}^{+}$
精確質量：1167.72
分子量：1168.53
ADL5-D11



化學式：$C_{68}H_{84}N_6O_{17}$
精確質量：1248.67
分子量：1247.40
ADL1-D13

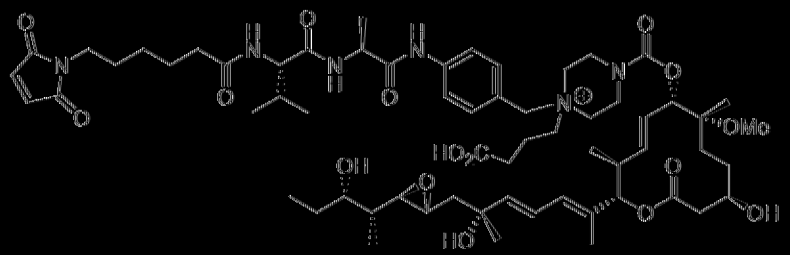


ADL1-1108/B
化學式：$C_{68}H_{84}N_6O_{16}$
精確質量：1232.67
分子量：1263.40
ADL1-D8



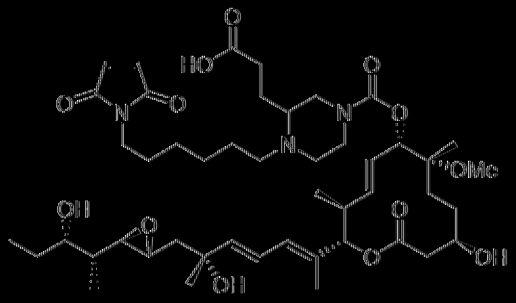
化學式：$C_{68}H_{88}N_8O_{19}$
精確質量：1306.60
分子量：1307.55

ADL11-D22



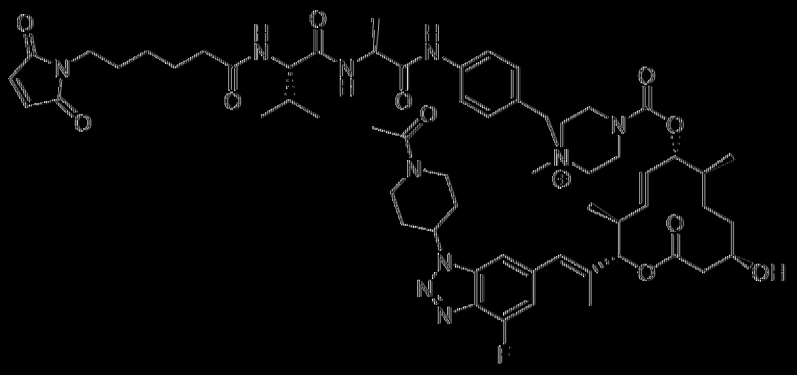
化學式：$C_{68}H_{86}N_8O_{16}^{+}$
精確質量：1191.60
分子量：1192.48

ADL5-D25



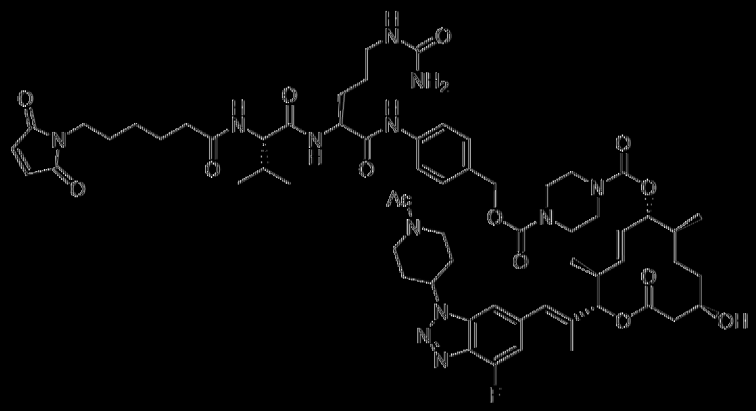
化學式：$C_{47}H_{73}N_3O_{15}$
精確質量：887.51
分子量：888.11

ADL12-D22



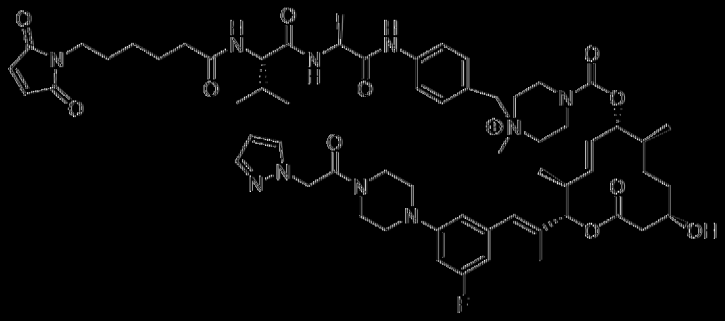
化學式：$C_{60}H_{69}N_{10}O_{11}^{+}$
精確質量：1137.61
分子量：1138.37

ADL5-D15



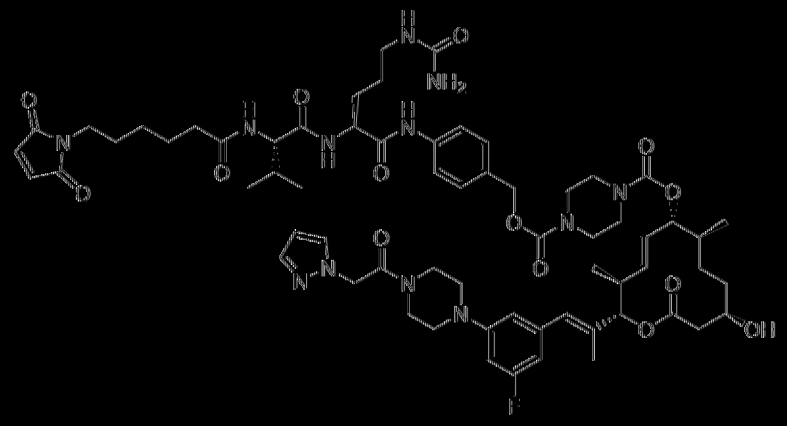
化學式：$C_{59}H_{69}N_{12}O_{14}$
精確質量：1252.63
分子量：1253.44

ADL1-D14



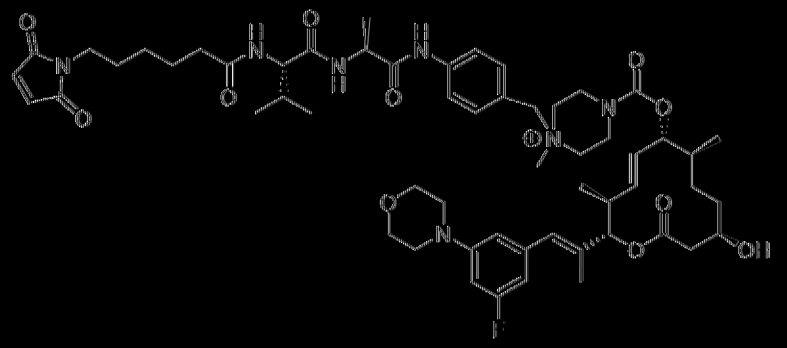
化學式：$C_{62}H_{69}N_{10}O_{11}^{+}$
精確質量：1163.63
分子量：1164.41

ADL5-D26



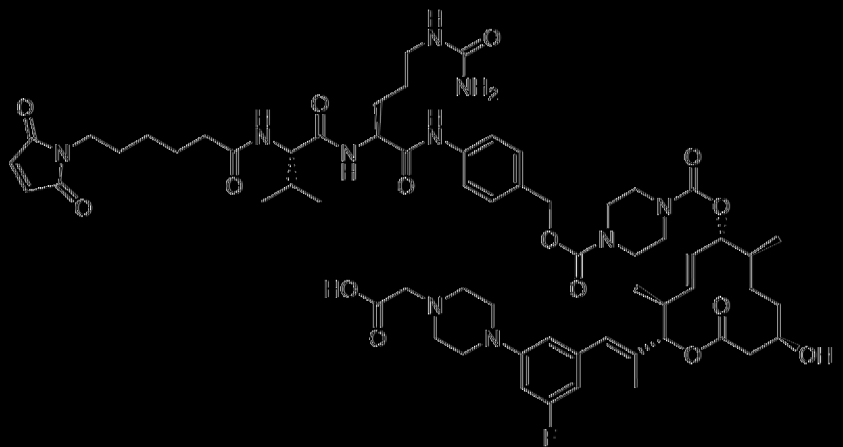
化學式：$C_{60}H_{67}FN_{12}O_{14}$
精確質量：1270.64
分子量：1279.48

ADL1-D16



化學式：$C_{57}H_{69}FN_7O_{11}^+$
精確質量：1056.58
分子量：1057.29

ADL5-D17

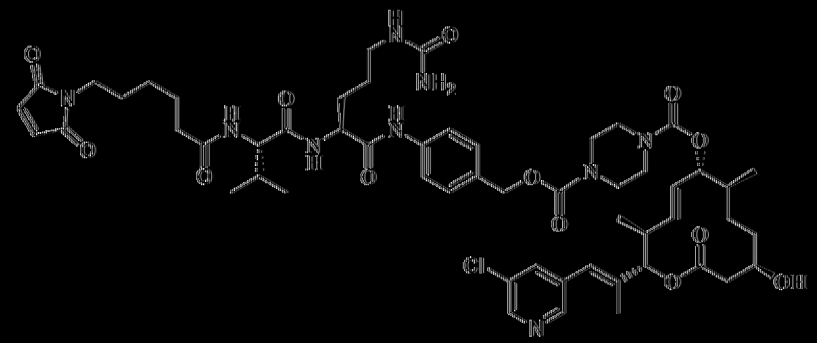


化學式：$C_{62}H_{70}FN_{10}O_{15}$
精確質量：1278.62
分子量：1279.42

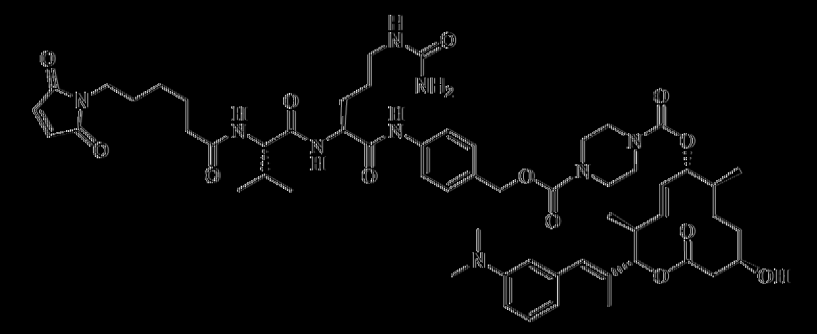
ADL1-D33



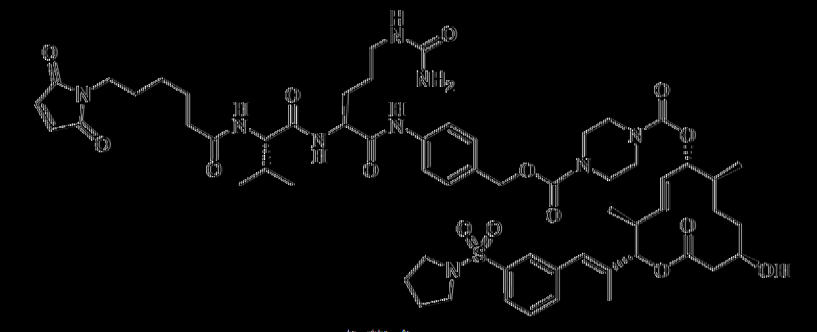
化學式：$C_{61}H_{71}N_{12}O_{15}S$
分子量：1215.33
ADL1-D28



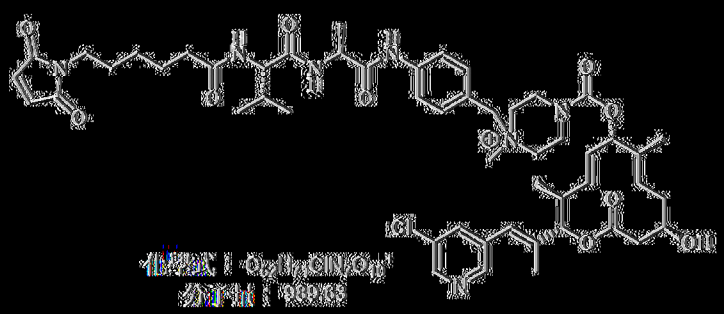
化學式：$C_{57}H_{74}ClN_9O_{12}$
分子量：1104.70
ADL1-D31



化學式：$C_{61}H_{81}N_9O_{13}$
分子量：1112.34
ADL1-D29

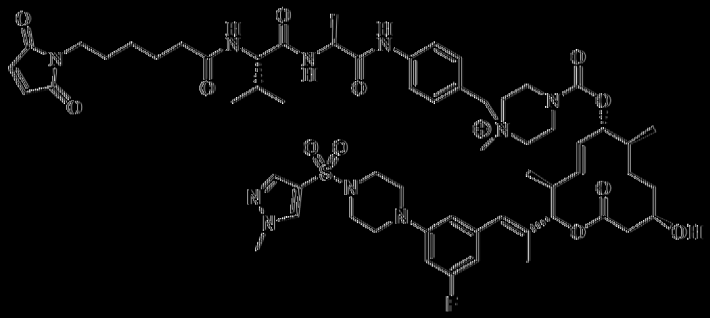


化學式：$C_{61}H_{83}N_9O_{15}S$
分子量：1269.43
ADL1-D35



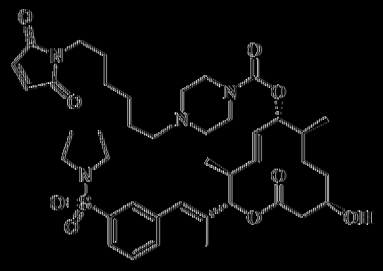
化學式：$C_{72}H_{91}ClN_4O_{19}$
分子量：1383.93

ADL5-D32



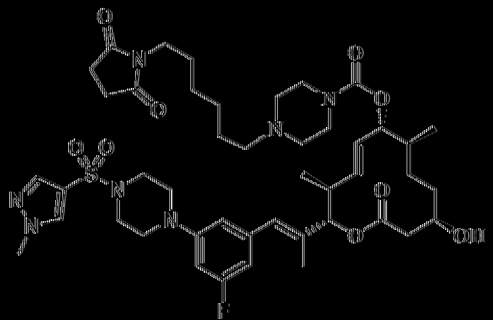
化學式：$C_{81}H_{94}N_{10}O_{19}S^{+}$
分子量：1500.46

ADL5-D27



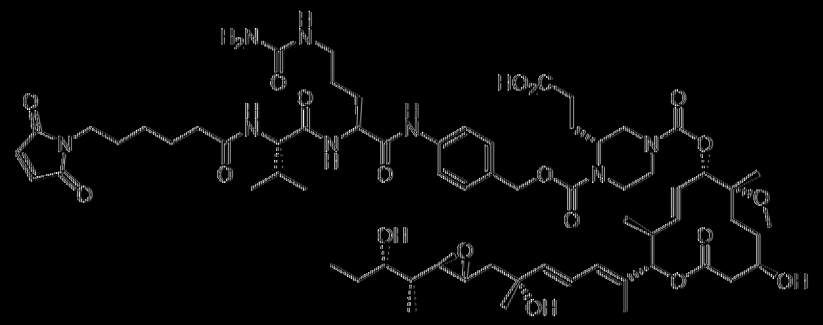
化學式：$C_{71}H_{94}N_4O_{19}S$
分子量：1282.60

ADL12-D35



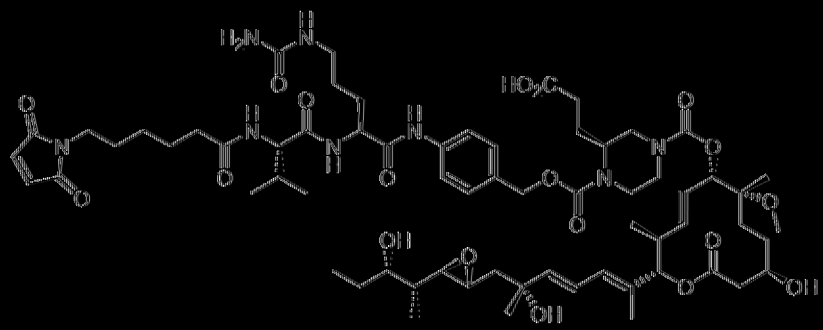
化學式：$C_{79}H_{94}N_7O_{19}S$
分子量：1488.11

ADL12-D28



化學式：$C_{68}H_{89}N_9O_{19}$
分子量：1307.45

ADL1-D23



化學式：$C_{68}H_{89}N_9O_{19}$
分子量：1307.45

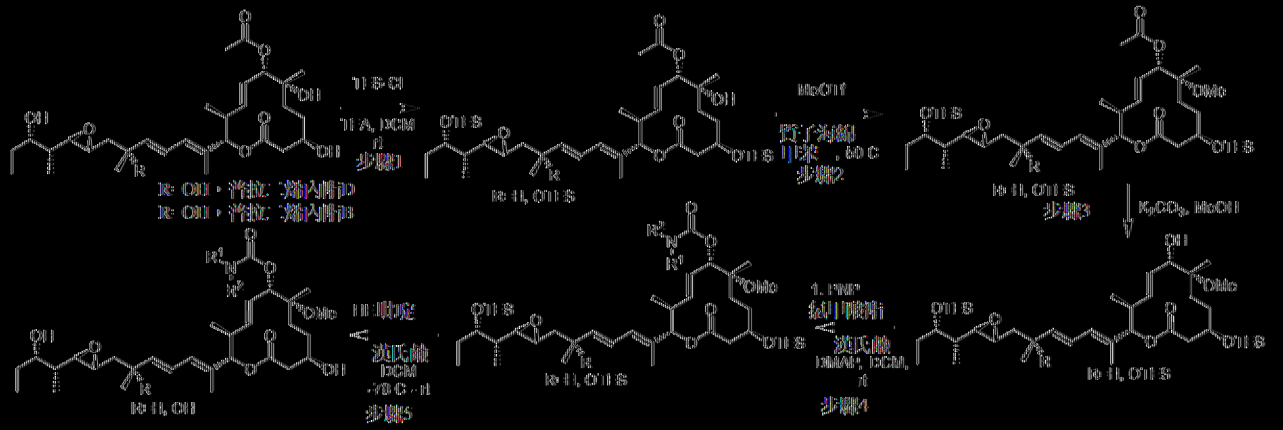
ADL1-D24



ADL5-D30

## 1.2 製備具於肼基-烯內酯之有效負載

### 1.2.1 綜述-通用程序 1



**流程 1**

【0917】**步驟 1**：將乙酸(2S,3S,6S,7R,10R,E)-7,10-二羥基-2-((R,2E,4E)-6-羥基-7-((2S,3S)-3-((2R,3S)-3-羥基戊-2-基)氧雜環丙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-3,7-二甲基-12-側氧基氧雜環十二碳-4-烯-6-基酯(1.7 g，3.154 mmol)、三乙胺(4.40 mL，31.536 mmol)、1,2-二氯乙烷(31.5 mL，3.154 mmol)組合並在室溫下攪拌。添加氯三乙基矽烷(2.1 mL，12.615 mmol)並攪拌隔夜。將鹽水倒入反應混合物中並攪拌 30 分鐘，且分離有機層。用 DCM (3×)反萃取水層。合併有機層，乾燥(無水 $Na_2SO_4$)，濃縮至乾，並層析分離，得到乙酸(2S,3S,6S,7R,10R,E)-7-羥基-3,7-二甲基-2-((R,2E,4E)-6-甲基-6-((三乙基矽烷基)氧基)-7-((2S,3S)-3-((2S,3S)-3-((三乙基矽烷基)氧基)戊-2-基)氧雜環丙烷-2-基)庚-2,4-二烯-2-基)-12-側氧基-10-((三乙基矽烷基)氧基)氧雜環十二碳-4-烯-6-基酯(1.274 g，1.423 mmol，45.1%產率)。

【0918】$^1$H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*6): δ ppm 0.51 - 0.64 (m, 18 H) 0.74 - 0.84 (m, 9 H) 0.90 - 0.97 (m, 26 H) 1.04 (s, 3 H) 1.18 (s, 4 H) 1.37 (s, 3 H) 1.41 - 1.57 (m, 4 H) 1.69 (s, 3 H) 1.84 - 1.93 (m, 1 H) 2.00 - 2.05 (m, 3 H) 2.24 - 2.35 (m, 1 H) 2.38 - 2.45 (m, 1 H) 2.72 - 2.80 (m, 1 H) 3.28 - 3.30 (m, 1 H) 3.62 - 3.70 (m, 1 H) 3.80 - 3.90 (m, 1 H) 4.56 (s, 1 H) 4.81 - 4.93 (m, 2 H) 5.41 - 5.52 (m, 1 H) 5.63 - 5.73 (m, 1 H) 5.77 - 5.87 (m, 1 H) 6.01 - 6.12 (m, 1 H) 6.42 (dd, J=15.12, 11.11 Hz, 1 H)。

【0919】**步驟 2**：在 0℃下，向乙酸(2S,3S,6S,7R,10R,E)-7-羥基-3,7-二甲基-2-((R,2E,4E)-6-甲基-6-((三乙基矽烷基)氧基)-7-((2S,3S)-3-

((2S,3S)-3-((三乙基矽烷基)氧基)戊-2-基)氧雜環丙烷-2-基)庚-2,4-二烯-2-基)-12-側氧基-10-((三乙基矽烷基)氧基)氧雜環十二碳-4-烯-6-基酯(0.7 g，0.782 mmol)於甲苯(4.16 mL，39.085 mmol)中之溶液中添加N,N,N',N'-四甲基-1,8-萘二胺 =(1.173 g，5.472 mmol)，隨後添加三氟甲烷磺酸甲酯(0.354 mL，3.127 mmol)。接著，使反應混合物升溫至 50℃並加熱 3 小時。蒸發溶劑。藉由管柱層析法純化，得到呈無色油狀之乙酸(2S,3S,6S,7R,10R,E)-7-甲氧基-3,7-二甲基-2-((R,2E,4E)-6-甲基-6-((三乙基矽烷基)氧基)-7-((2S,3S)-3-((2S,3S)-3-((三乙基矽烷基)氧基)戊-2-基)氧雜環丙烷-2-基)庚-2,4-二烯-2-基)-12-側氧基-10-((三乙基矽烷基)氧基)氧雜環十二碳-4-烯-6-基酯(467 mg，0.513 mmol，65.7%產率)。

【0920】 $^{1}$H-NMR (400 MHz, MeOH-*d*4): δ ppm 0.62 - 0.70 (m, 18 H) 0.83 - 0.95 (m, 13 H) 0.99 - 1.07 (m, 27 H) 1.22 (s, 3 H) 1.24 - 1.36 (m, 2 H), 1.28 - 1.28 (m, 1 H) 1.45 (s, 3 H) 1.47 - 1.65 (m, 8 H) 1.78 (d, J=0.88 Hz, 3 H) 1.91 - 2.00 (m, 1 H) 2.07 (s, 3 H) 2.37 - 2.45 (m, 1 H) 2.51 - 2.68, (m, 3 H) 2.88 - 2.92 (m, 1 H) 3.20 - 3.24 (m, 1 H) 3.35 (s, 3 H) 3.74 - 3.82 (m, 1 H) 3.93 - 4.02 (m, 1 H) 4.94 - 4.99 (m, 1 H) 5.08 - 5.14 (m, 1 H), 5.53 - 5.64 (m, 1 H) 5.70 - 5.79 (m, 1 H) 5.81 - 5.88 (m, 1 H) 6.12 - 6.18 (m, 1 H) 6.47 - 6.58 (m, 1 H)。

【0921】 **步驟 3**：將乙酸(2S,3S,6S,7R,10R,E)-7-羥基-3,7-二甲基-2-((R,2E,4E)-6-甲基-6-((三乙基矽烷基)氧基)-7-((2R,3R)-3-((2S,3S)-3-((三乙基矽烷基)氧基)戊-2-基)氧雜環丙烷-2-基)庚-2,4-二烯-2-基)-12-側氧基-10-((三乙基矽烷基)氧基)氧雜環十二碳-4-烯-6-基酯(500 mg，0.558 mmol)溶解於 MeOH (6009 μL，148.524 mmol)中並添加碳酸鉀(232

mg，1.675 mmol)。在室溫下攪拌反應混合物 1 小時並顯示反應完成。用水稀釋反應混合物並用 EtOAc (3×)萃取。用鹽水洗滌合併之有機層，經硫酸鈉乾燥，過濾並濃縮。藉由管柱層析法純化，得到(4R,7R,8S,11S,12S,E)-7,8-二羥基-7,11-二甲基-12-((R,2E,4E)-6-甲基-6-((三乙基矽烷基)氧基)-7-((2R,3R)-3-((2S,3S)-3-((三乙基矽烷基)氧基)戊-2-基)氧雜環丙烷-2-基)庚-2,4-二烯-2-基)-4-((三乙基矽烷基)氧基)氧雜環十二碳-9-烯-2-酮(305 mg，0.357 mmol，64.0%產率)。

【0922】 $^{1}$H-NMR (400 MHz, MeOH-*d*4): δ ppm 0.61 - 0.72 (m, 18 H) 0.82 - 0.92 (m, 7 H) 0.92 - 1.06 (m, 30 H) 1.19 - 1.40 (m, 7 H) 1.42 - 1.66 (m, 8 H) 1.51 - 1.52 (m, 1 H) 1.75 - 1.81 (m, 3 H) 1.91 - 2.01 (m, 1 H) 2.34 - 2.45 (m, 1 H) 2.51 - 2.61 (m, 2 H) 2.61 - 2.69 (m, 1 H) 2.86 - 2.94 (m, 1 H) 3.67 - 3.73 (m, 1 H) 3.73 - 3.80 (m, 1 H) 3.89 - 3.96 (m, 1 H) 4.08 - 4.17 (m, 1 H) 4.93 - 4.99 (m, 1 H) 5.36 - 5.47 (m, 1 H) 5.67 - 5.78 (m, 1 H) 5.80 - 5.88 (m, 1 H) 6.10 - 6.19 (m, 1 H) 6.47 - 6.58 (m, 1 H)。

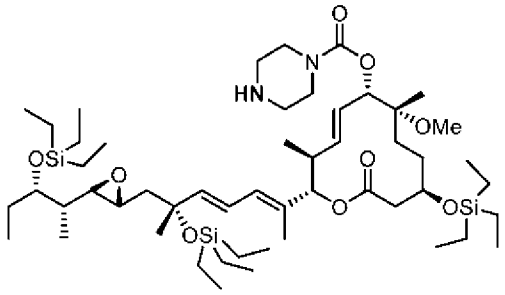
【0923】 **步驟 4**：將(4R,7R,8S,11S,12S,E)-8-羥基-7-甲氧基-7,11-二甲基-12-((R,2E,4E)-6-甲基-6-((三乙基矽烷基)氧基)-7-((2S,3S)-3-((2S,3S)-3-((三乙基矽烷基)氧基)戊-2-基)氧雜環丙烷-2-基)庚-2,4-二烯-2-基)-4-((三乙基矽烷基)氧基)氧雜環十二碳-9-烯-2-酮(0.386 g，0.445 mmol)、DCM (0.1 M)、DMAP (1.0 當量)、漢氏鹼(Hunig's base) (5.0 當量)、氯甲酸 4-硝基苯酯(1.8 當量)組合並攪拌隔夜。接著，用 1N NaOH 萃取反應混合物。乾燥(無水 $Na_2SO_4$)有機層並濃縮至乾。殘餘物與 DCM (0.1 M)、漢氏鹼(5.0 當量)、胺(2.0 當量)混合，組合並攪拌 1 小時。濃縮

反應混合物並層析分離，得到三 TES-普拉二烯內酯胺基甲酸酯。

【0924】**步驟 5**：將三 TES-普拉二烯內酯胺基甲酸酯(1 當量)、DCM (0.04 M)及 DIPEA (191 當量)組合並冷卻至-78℃。添加氟化氫-吡啶(6.2 當量)且使反應升溫至室溫並攪拌隔夜。在冰浴中冷卻反應混合物，接著添加飽和 $NaHCO_3$，攪拌，並用 DCM 萃取。合併有機層，經無水 $Na_2SO_4$ 乾燥，濃縮，並層析分離，得到普拉二烯內酯胺基甲酸酯。

**1.2.1.1 D1**

【0925】採用通用程序 1 (如 1.2.1 部分中所略述)合成 D1。

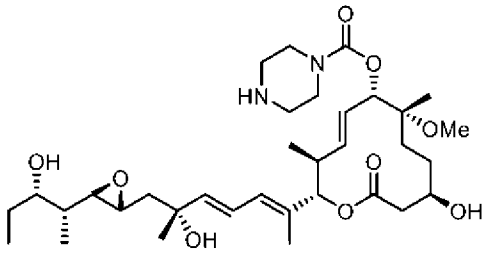


【0926】哌嗪-1-甲酸(2S,3S,6S,7R,10R,E)-7-甲氧基-3,7-二甲基-2-((R,2E,4E)-6-甲基-6-((三乙基矽烷基)氧基)-7-((2S,3S)-3-((2S,3S)-3-((三乙基矽烷基)氧基)戊-2-基)氧雜環丙烷-2-基)庚-2,4-二烯-2-基)-12-側氧基-10-((三乙基矽烷基)氧基)氧雜環十二碳-4-烯-6-基酯(240 mg，0.245 mmol，55.1%產率)。LC/MS (ESI, m/z), 980.4 $[M+H]^+$。

【0927】$^1$H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$-*d*): δ ppm 0.56 - 0.66 (m, 18 H) 0.78 - 0.91 (m, 9 H) 0.96 (t, J=7.91 Hz, 27 H) 1.18 - 1.22 (m, 3 H) 1.23 - 1.28 (m, 1 H) 1.37 - 1.41 (m, 3 H) 1.41 - 1.63 (m, 7 H) 1.69 - 1.74 (m, 3 H) 1.89 (dd, J=13.87, 4.96 Hz, 1 H) 2.33 - 2.62 (m, 4 H) 2.78 - 2.89 (m, 5 H), 3.35 (s, 3 H) 3.43 - 3.52 (m, 4 H) 3.73 (td, J=6.40, 3.51 Hz, 1 H) 3.86 (br dd, J=7.84, 3.95 Hz, 1 H) 4.94 - 5.13 (m, 2 H) 5.58 - 5.76 (m, 3 H) 6.12, (br d, J=0.75 Hz, 1 H) 6.41 (dd, J=15.06, 11.04 Hz, 1

H)。

**D1**

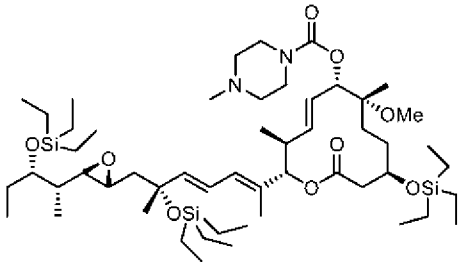


【0928】 哌嗪-1-甲酸(2S,3S,6S,7R,10R,E)-7-甲氧基-3,7-二甲基-2-((R,2E,4E)-6-甲基-6-((三乙基矽烷基)氧基)-7-((2S,3S)-3-((2S,3S)-3-((三乙基矽烷基)氧基)戊-2-基)氧雜環丙烷-2-基)庚-2,4-二烯-2-基)-12-側氧基-10-((三乙基矽烷基)氧基)氧雜環十二碳-4-烯-6-基酯(240 mg，0.245 mmol，55.1%產率)。LC/MS (ESI, m/z), 637.6 $[M+H]^+$。

【0929】 $^1$H-NMR (400 MHz, MeOH-*d*4): δ ppm 0.83 - 1.01 (m, 10 H) 1.23 (s, 3 H) 1.25 - 1.32 (m, 1 H) 1.35 (s, 3 H) 1.40 - 1.61 (m, 6 H) 1.61 - 1.71 (m, 2 H) 1.79 (d, J=0.75 Hz, 3 H) 1.84 - 1.93 (m, 1 H) 2.45 - 2.63 (m, 3 H) 2.63 - 2.72 (m, 1 H) 2.77 - 2.85 (m, 4 H) 2.86 - 2.94 (m, 1 H) 3.33 - 3.37 (m, 3 H) 3.40 - 3.57 (m, 5 H) 3.77 - 3.89 (m, 1 H) 4.38 - 4.42 (m, 1 H) 5.01 - 5.12 (m, 2 H) 5.52 - 5.65 (m, 1 H) 5.69 - 5.80 (m, 1 H) 5.84 - 5.92 (m, 1 H) 6.09 - 6.18 (m, 1 H) 6.49 - 6.60 (m, 1 H)。

**1.2.1.2 D2**

【0930】 採用通用程序 1 (如 1.2.1 部分中所略述)合成 D2。

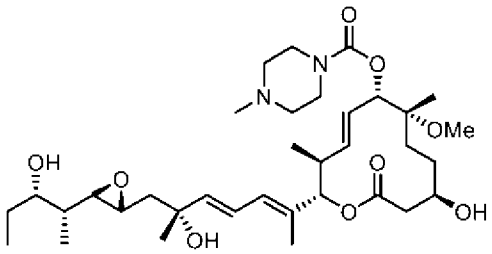


【0931】 4-甲基哌嗪-1-甲酸(2S,3S,6S,7R,10R,E)-7-甲氧基-3,7-二

甲基-2-((R,2E,4E)-6-甲基-6-((三乙基矽烷基)氧基)-7-((2R,3R)-3-((2S,3S)-3-((三乙基矽烷基)氧基)戊-2-基)氧雜環丙烷-2-基)庚-2,4-二烯-2-基)-12-側氧基-10-((三乙基矽烷基)氧基)氧雜環十二碳-4-烯-6-基酯(413 mg，0.416 mmol，90%產率)。LC/MS (ESI, m/z), 994 $[M+H]^+$。

【0932】 $^1$H-NMR (400 MHz, MeOH-*d*4): δ ppm 0.61 - 0.71 (m, 18 H) 0.83 - 0.94 (m, 9 H) 0.98 - 1.07 (m, 28 H) 1.23 (s, 3 H) 1.41 - 1.48 (m, 3 H) 1.48 - 1.65 (m, 7 H) 1.72 - 1.81 (m, 3 H) 1.93 - 1.99 (m, 1 H) 2.03 (s, 3 H) 2.32 (s, 3 H) 2.38 - 2.48 (m, 5 H) 2.52 - 2.67 (m, 3 H) 2.87 - 2.93 (m, 1 H) 3.47 - 3.61 (m, 4 H) 3.72 - 3.81 (m, 1 H) 3.96 - 4.04 (m, 1 H) 4.53 - 4.62 (m, 1 H) 4.93 - 5.07 (m, 2 H) 5.51 - 5.64 (m, 1 H) 5.69 - 5.79 (m, 1 H) 5.81 - 5.92 (m, 1 H) 6.09 - 6.21 (m, 1 H) 6.46 - 6.60 (m, 1 H)。

**D2**



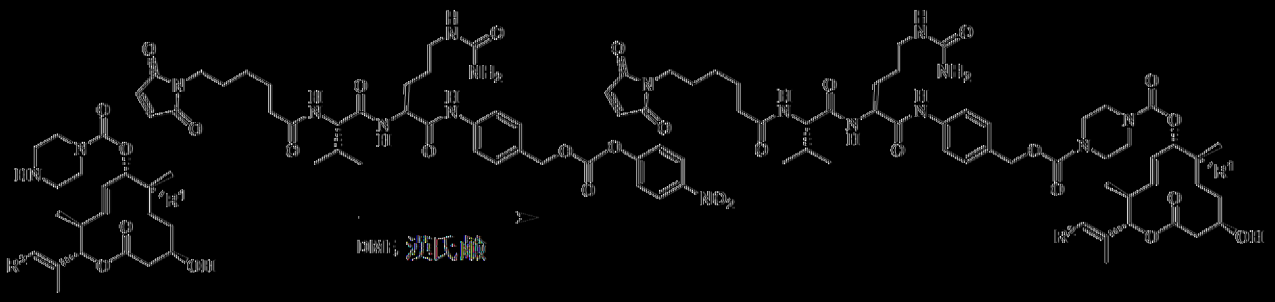

【0933】 4-甲基哌嗪-1-甲酸(2S,3S,6S,7R,10R,E)-10-羥基-2-((R,2E,4E)-6-羥基-7-((2R,3R)-3-((2R,3S)-3-羥基戊-2-基)氧雜環丙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-7-甲氧基-3,7-二甲基-12-側氧基氧雜環十二碳-4-烯-6-基酯(37.8 mg，0.058 mmol，24.05%產率)。LC/MS (ESI, m/z), 651.69 $[M+H]^+$。

【0934】 $^1$H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*6): δ ppm 0.76 - 0.89 (m, 9 H) 1.10 (s, 3 H) 1.20 - 1.26 (m, 3 H) 1.30 - 1.42 (m, 4 H) 1.42 - 1.55 (m,

2 H) 1.66 - 1.75 (m, 3 H) 1.75 - 1.82 (m, 1 H) 2.13 - 2.21 (m, 3 H) 2.25 (br s, 4 H) 2.31 - 2.41 (m, 2 H) 2.54 - 2.60 (m, 2 H) 2.72 - 2.82 (m, 1 H) 3.22 (s, 3 H) 3.36 - 3.40 (m, 3 H) 3.66 - 3.76 (m, 1 H) 4.36 - 4.46 (m, 1 H) 4.53 - 4.60 (m, 1 H) 4.78 - 4.85 (m, 1 H) 4.86 - 4.96 (m, 2 H) 5.36 - 5.50 (m, 1 H) 5.60 - 5.74 (m, 1 H) 5.80 - 5.92 (m, 1 H) 6.02 - 6.11 (m, 1 H) 6.34 - 6.46 (m, 1 H)。

1.3 製備 MC-Val-Cit-pABC 連接子-有效負載

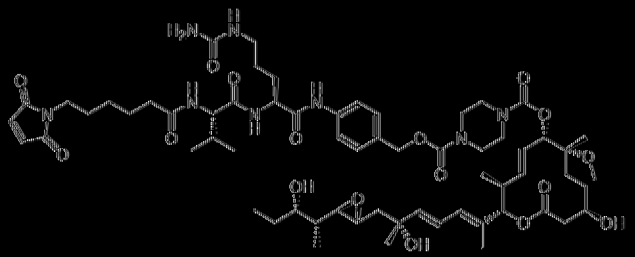
1.3.1 綜述 - 通用程序 1




流程 2

[0935] 將有效負載(1.0 當量)、漢氏鹼(3.0 當量)、DMF (0.1 M)及碳酸 4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯胺基)-5-脲基戊醯胺基)-3-甲基丁醯胺基)苯甲酯(4-硝基苯基)酯(1.2 當量)組合並在室溫下攪拌隔夜。接著，濃縮反應混合物並經由管柱層析法(MeOH/DCM)或反相 HPLC 純化，得到產物。

1.3.1.1 ADL1-D1



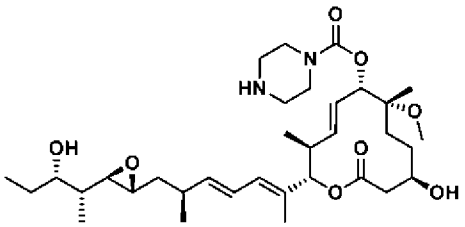
[0936] 連接子-有效負載(ADL1-D1)：採用通用程序 1 (如 1.3.1

部分中所略述)合成哌嗪-1,4-二甲酸 1-(4-((S)-2-((S)-2-((((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)胺基)-3-甲基丁醯胺基)-5-脲基戊醯胺基)苯甲基)酯 4-((2S,3S,6S,7R,10R,E)-10- 羥 基 -2-((R,2E,4E)-6- 羥 基 -7-((2S,3S)-3-((2R,3S)-3-羥基戊-2-基)氧雜環丙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-7-甲氧基-3,7-二甲基-12-側氧基氧雜環十二碳-4-烯-6-基)酯(50 mg，0.040 mmol，42%產率)。LC/MS (ESI, m/z), 1258.5 $[M+Na]^+$。

【0937】 $^1$H-NMR (400 MHz, MeOH-*d*4): δ ppm 0.85 - 1.04 (m, 16 H) 1.18 - 1.26 (m, 3 H) 1.26 - 1.38 (m, 6 H) 1.40 - 1.71 (m, 14 H) 1.80 (s, 3 H) 1.85 - 1.98 (m, 2 H) 2.02 - 2.15 (m, 1 H) 2.24 - 2.34 (m, 2 H) 2.44 - 2.64 (m, 3 H) 2.65 - 2.72 (m, 1 H) 2.87 - 2.96 (m, 1 H) 3.06 -3.27 (m, 2 H) 3.37 (s, 6 H) 3.43 - 3.61 (m, 12 H) 3.79 - 3.90 (m, 1 H) 4.12 - 4.21 (m, 1 H) 4.48 - 4.55 (m, 1 H) 5.02 - 5.14 (m, 4 H) 5.55 - 5.65 (m, 1 H), 5.69 - 5.81 (m, 1 H) 5.85 - 5.93 (m, 1 H) 6.12 - 6.19 (m, 1 H) 6.49 - 6.60 (m, 1 H) 6.81 (s, 2 H) 7.29 - 7.38 (m, 2 H) 7.57 - 7.65 (m, 2 H)。

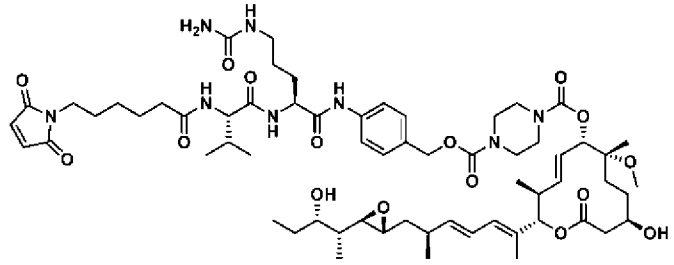
### 1.3.1.2 ADL1-D18

【0938】 有效負載 D18 係使用如 1.2.1 部分中所略述之程序，採用普拉二烯內酯 B 作為起始物質(SM) (R=H；流程 1)製備。




【0939】 哌嗪-1-甲酸(2S,3S,6S,7R,10R,E)-10-羥基-2-((S,2E,4E)-7-((2R,3R)-3-((2R,3S)-3-羥基戊-2-基)氧雜環丙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-7-甲氧基-3,7-二甲基-12-側氧基氧雜環十二碳-4-烯-6-基酯(205 mg，0.330 mmol，77%產率)。LC/MS (ESI, m/z), 621.6 $[M+H]^+$。

【0940】 $^1$H-NMR (400 MHz, MeOH-*d*4): δ ppm 0.88 - 0.99 (m, 9 H) 1.10 (d, *J*=6.78 Hz, 3 H) 1.24 (s, 4 H) 1.42 - 1.69 (m, 8 H) 1.77 (d, *J*=0.88 Hz, 3 H) 2.43 - 2.63 (m, 4 H) 2.64 - 2.70 (m, 1 H) 2.71 - 2.82 (m, 5 H) 3.34 (br s, 3 H) 3.37 (s, 2 H) 3.42 - 3.57 (m, 5 H) 3.79 - 3.89 (m, 1 H) 5.06 (s, 2 H), 5.54 - 5.63 (m, 1 H) 5.64 - 5.80 (m, 2 H) 6.07 - 6.16 (m, 1 H) 6.29 - 6.40 (m, 1 H)。



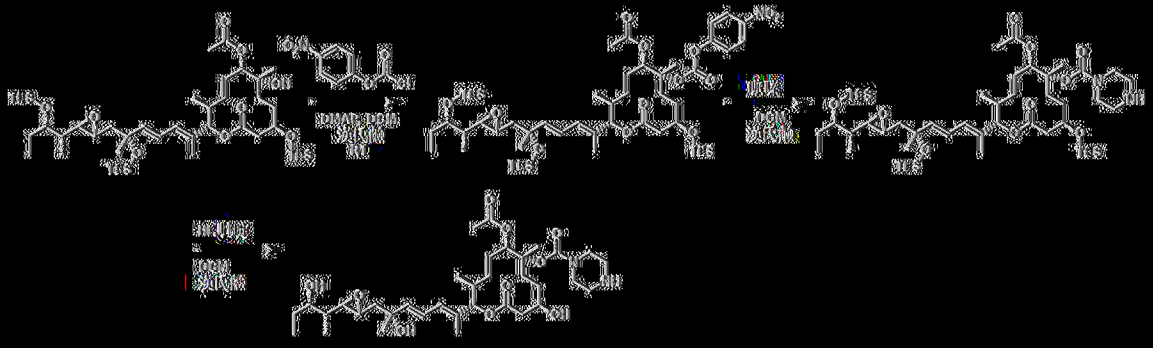
【0941】 **連接子-有效負載(ADL1-D18)**：採用通用程序 1 (如 1.3.1 部分中所略述)合成哌嗪-1,4-二甲酸 1-(4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯胺基)-5-脲基戊醯胺基)-3-甲基丁醯胺基)苯甲基)酯 4-((2S,3S,6S,7R,10R,E)-10-羥基-2-((S,2E,4E)-7-((2S,3S)-3-((2R,3S)-3-羥基戊-2-基)氧雜環丙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-7-甲氧基-3,7-二甲基-12-側氧基氧雜環十二碳-4-烯-6-基)酯(72 mg，0.059 mmol，54.7%產率)。LC/MS (ESI, m/z), 1220.08 $[M+H]^+$。

【0942】 $^1$H-NMR (400 MHz, MeOH-*d*4): δ ppm 0.87 - 1.02 (m, 15 H) 1.10 (d, *J*=6.78 Hz, 3 H) 1.23 (s, 4 H) 1.29 - 1.38 (m, 2 H) 1.44 - 1.68 (m, 13 H), 1.54 - 1.55 (m, 1 H) 1.77 (d, *J*=0.75 Hz, 4 H) 1.87 - 1.95 (m, 1 H) 2.05 - 2.15 (m, 1 H) 2.24 - 2.32 (m, 2 H) 2.45 - 2.62 (m, 4 H) 2.65 - 2.70 (m, 1 H), 2.71 - 2.78 (m, 1 H) 3.13 - 3.18 (m, 2 H) 3.46 - 3.58 (m, 11 H) 3.79 - 3.90 (m, 1 H) 4.13 - 4.21 (m, 1 H) 4.47 - 4.56 (m, 1 H) 5.11 (s, 4 H) 5.53 - 5.81 (m, 3 H) 6.06 - 6.16 (m, 1 H) 6.29 - 6.40

(m, 1 H) 6.81 (s, 2 H) 7.34 (d, *J* = 8.53 Hz, 2 H) 7.60 (d, *J* = 8.53 Hz, 2 H)。

1.3.1.3 ADL1-D8 及 ADL6-D8

[0943] 有效負載 D8 係根據以下略述之程序合成：

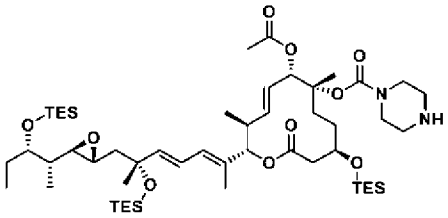


流程 3

[0944] 步驟 1：在 0°C 下，向 3-TES-普拉烯內酯 D (200 mg，0.223 mmol)於二氯甲烷(2 mL)中之溶液中添加 DMAP (409 mg，3.35 mmol)及氯甲酸 4-硝基苯酯(338 mg，1.675 mmol)。在室溫下攪拌反應混合物 7 天，用 EtOAc 及水萃取，接著分離各層。用 EtOAc (2×)萃取水層，並用鹽水洗滌合併之有機萃取物。合併之有機層經 $Na_2SO_4$ 乾燥，過濾並真空濃縮。急驟層析法得到乙酸(2S,3S,6S,7R,10R,E)-3,7-二甲基-2-((R,2E,4E)-6-甲基-6-((三乙基矽烷基)氧基)-7-((2R,3R)-3-((2S,3S)-3-((三乙基矽烷基)氧基)戊-2-基)氧雜環丙烷-2-基)庚-2,4-二烯-2-基)-7-(((4-硝基苯氧基)羰基)氧基)-12-側氧基-10-((三乙基矽烷基)氧基)氧雜環十二碳-4-烯-6-炔酯(170 mg，72%產率)。

[0945] $^1$H-NMR (400 MHz, $CHCl_3$-*d*): δ ppm 0.54 - 0.67 (m, 18 H) 0.78 - 1.03 (m, 36 H) 1.19 - 1.32 (m, 1 H) 1.39 (s, 3 H) 1.43 - 1.52 (m, 3 H) 1.55 - 1.63 (m, 3 H) 1.64 (s, 3 H) 1.74 (s, 3 H) 1.88 (dd, *J* = 13.80, 5.02 Hz, 1 H) 2.13 (s, 3 H) 2.23 - 2.37 (m, 1 H) 2.39 - 2.48 (m,

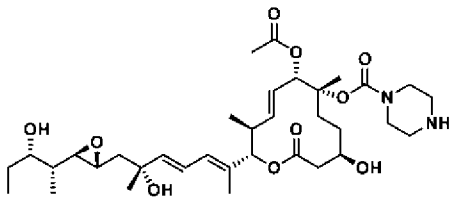
2 H) 2.51 - 2.63 (m, 2 H) 2.84 (s, 1 H) 3.69 - 3.77 (m, 1 H) 3.82 - 4.00 (m, 1 H) 5.04 (d, *J*=10.79 Hz, 1 H) 5.24 (d, *J*=9.03 Hz, 1 H) 5.67 - 5.84 (m, 3 H) 6.12 (d, *J*=10.16 Hz, 1 H) 6.42 (dd, *J*=15.06, 11.04 Hz, 1 H) 7.42 (d, *J*=9.29 Hz, 2 H) 8.29 (d, *J*=9.16 Hz, 2 H)。




【0946】 **步驟 2**：向乙酸(2S,3S,6S,7R,10R,E)-3,7-二甲基-2-((R,2E,4E)-6-甲基-6-((三乙基矽烷基)氧基)-7-((2R,3R)-3-((2S,3S)-3-((三乙基矽烷基)氧基)戊-2-基)氧雜環丙烷-2-基)庚-2,4-二烯-2-基)-7-(((4-硝基苯氧基)羰基)氧基)-12-側氧基-10-((三乙基矽烷基)氧基)氧雜環十二碳-4-烯-6-基酯(100 mg，0.094 mmol)於 DCM 中之溶液中添加哌嗪及 DMAP。攪拌所得淺黃色懸浮液 6 小時。濃縮反應混合物，得到粗產物。急驟層析法得到哌嗪-1-甲酸(2S,3S,6S,7R,10R,E)-6-乙醯氧基-3,7-二甲基-2-((R,2E,4E)-6-甲基-6-((三乙基矽烷基)氧基)-7-((2R,3R)-3-((2S,3S)-3-((三乙基矽烷基)氧基)戊-2-基)氧雜環丙烷-2-基)庚-2,4-二烯-2-基)-12-側氧基-10-((三乙基矽烷基)氧基)氧雜環十二碳-4-烯-7-基酯(95 mg，100%)。LC/MS (ESI, m/z), 1008.8 $[M+H]^+$。

【0947】 $^1$H-NMR (400 MHz, $CHCl_3$-*d*): δ ppm 0.42 - 0.70 (m, 22 H) 0.79 - 0.84 (m, 7 H) 0.86 - 0.91 (m, 4 H) 0.92 - 1.03 (m, 30 H) 1.15 - 1.30 (m, 2 H) 1.37 - 1.42 (m, 3 H) 1.44 - 1.52 (m, 3 H) 1.56 - 1.62 (m, 2 H) 1.62 - 1.68 (m, 1 H) 1.71 - 1.76 (m, 3 H) 1.83 - 1.93 (m, 1 H) 2.03 - 2.11 (m, 4 H) 2.36 - 2.45 (m, 2 H) 2.45 - 2.53 (m, 2 H) 2.54 - 2.64 (m, 1 H) 2.78 - 2.86 (m, 1 H) 2.86 - 3.07 (m, 4 H) 3.32 - 3.45 (m, 1 H) 3.45 -

3.64 (m, 3 H) 3.69 - 3.78 (m, 1 H) 3.79 - 3.94 (m, 1 H) 5.00 (d, *J*=10.54 Hz, 1 H) 5.18 (s, 1 H) 5.54 - 5.79 (m, 3 H) 5.98 - 6.21 (m, 1 H) 6.33 - 6.57 (m, 1 H) 6.84 - 6.96 (m, 3 H) 8.02 - 8.35 (m, 2 H) 8.06 - 8.08 (m, 1 H)。

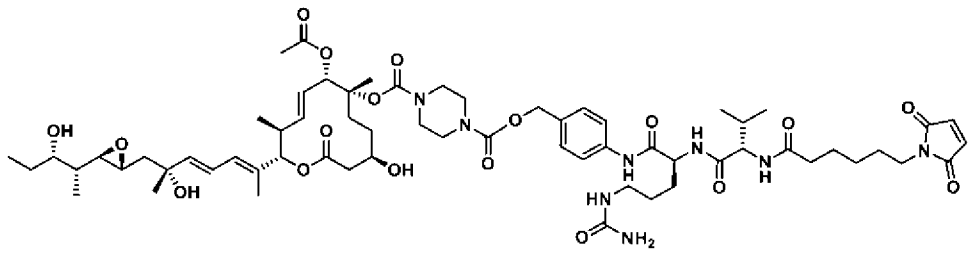


【0948】 **步驟 3**：向哌嗪-1-甲酸(2S,3S,6S,7R,10R,E)-6-乙醯氧基-3,7-二甲基-2-((R,2E,4E)-6-甲基-6-((三乙基矽烷基)氧基)-7-((2R,3R)-3-((2S,3S)-3-((三乙基矽烷基)氧基)戊-2-基)氧雜環丙烷-2-基)庚-2,4-二烯-2-基)-12-側氧基-10-((三乙基矽烷基)氧基)氧雜環十二碳-4-烯-7-基酯(95 mg，0.094 mmol)於 THF (3 mL)中之溶液中添加 TBAF (0.424 mL，1 M，0.424 mmol)並在室溫下攪拌 10 小時。濃縮混合物並用 EtOAc 萃取，用水及鹽水洗滌。分離有機層並用 $Na_2SO_4$ 乾燥，過濾並真空濃縮。HPLC 純化得到哌嗪-1-甲酸(2S,3S,6S,7R,10R,E)-6-乙醯氧基-10-羥基-2-((R,2E,4E)-6-羥基-7-((2R,3R)-3-((2R,3S)-3-羥基戊-2-基)氧雜環丙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-3,7-二甲基-12-側氧基氧雜環十二碳-4-烯-7-基酯(16 mg，26%)。LC/MS (ESI, m/z), 665.6 $[M+H]^+$。

【0949】 $^1$H-NMR (400 MHz, $CHCl_3$-*d*): δ ppm 0.90 (dd, *J*=6.84, 2.20 Hz, 6 H) 0.94 (t, *J*=7.40 Hz, 3 H) 1.20 - 1.30 (m, 1 H) 1.34 (s, 3 H) 1.39 - 1.54 (m, 3 H) 1.55 (s, 3 H) 1.59 - 1.73 (m, 3 H) 1.78 (d, *J*=0.88 Hz, 3 H) 1.86 (dd, *J*=13.99, 5.46 Hz, 1 H) 2.05 (s, 3 H) 2.39 - 2.53 (m, 3 H) 2.55 - 2.65 (m, 1 H) 2.67 (dd, *J*=8.03, 2.26 Hz, 1 H) 2.89 (s, 1 H) 3.22 (br s, 4 H) 3.50 - 3.57 (m, 1 H) 3.58 - 3.90 (m, 5 H) 5.08 (d,

*J*=10.67 Hz, 1 H) 5.18 (d, *J*=9.03 Hz, 1 H) 5.58 - 5.78 (m, 2 H) 5.88 (d, *J*=15.31 Hz, 1 H) 6.10 - 6.23 (m, 1 H) 6.53 (dd, *J*=15.25, 10.98 Hz, 1 H)。

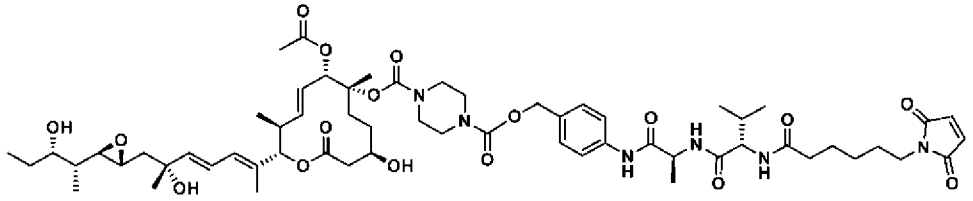
【0950】 **步驟 4**：



【0951】 **連接子-有效負載(ADL1-D8)**：向於 DMF (315 µL，4.066 mmol)中之碳酸 4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯胺基)-3-甲基丁醯胺基)-5-脲基戊醯胺基)苯甲酯(4-硝基苯基)酯(7.5 mg，10.166 µmol)中添加漢氏鹼(5.33 µL，0.03 mmol)。將反應物冷卻至 0℃，並添加哌嗪-1-甲酸(2S,3S,6S,7R,10R,E)-6-乙醯氧基-10-羥基-2-((R,2E,4E)-6-羥基-7-((2R,3R)-3-((2R,3S)-3-羥基戊-2-基)氧雜環丙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-3,7-二甲基-12-側氧基氧雜環十二碳-4-烯-7-基酯(7.50 mg，0.011 mmol)。在室溫下攪拌反應混合物，直至起始物質消耗。真空濃縮反應混合物。急驟層析法得到 ADL1-D8 (7.2 mg，5.70 µmol，56.1%產率)。LC/MS (ESI, m/z), 1263.8 $[M+H]^+$。通用程序 1 (1.3.1)亦可用於製備 ADL1-110987。

【0952】 $^1$H-NMR (400 MHz, 氯仿-*d*): δ ppm 0.80 - 1.02 (m, 16 H) 1.20 - 1.35 (m, 6 H) 1.38 - 1.48 (m, 2 H) 1.57 - 1.69 (m, 7 H) 1.74 - 1.81 (m, 4 H) 1.86 - 1.96 (m, 2 H) 2.00 - 2.11 (m, 4 H) 2.31 (br d, *J*=6.02 Hz, 2 H) 2.45 - 2.55 (m, 2 H) 2.59 - 2.74 (m, 2 H) 2.85 - 2.96 (m, 1 H) 3.05 - 3.25 (m, 5 H) 3.40 - 3.59 (m, 9 H) 3.62 - 3.88 (m, 1 H) 4.15 (d, *J*=7.53

Hz, 1 H) 5.05 - 5.22 (m, 5 H) 5.56 - 5.77 (m, 2 H) 5.84 - 5.98 (m, 1 H) 6.11 - 6.22 (m, 1 H) 6.47 - 6.61 (m, 1 H) 7.31 - 7.40 (m, 2 H) 7.56 - 7.65 (m, 2 H)。

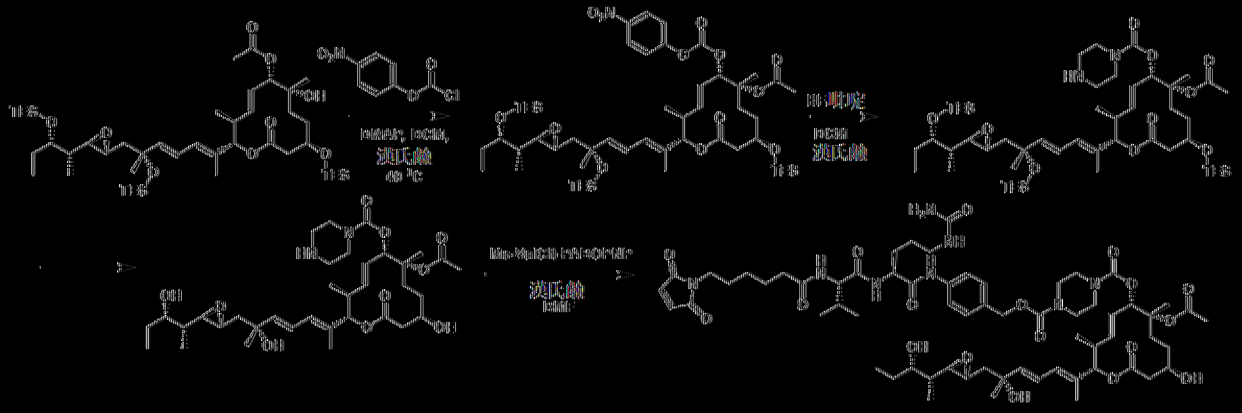


【0953】 **連接子-有效負載(ADL6-D8)**：向於 DMF (238 μL，3.069 mmol)中之碳酸 4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯胺基)-3-甲基丁醯胺基)丙醯胺基)苯甲酯(4-硝基苯基)酯(5 mg，7.673 μmol)中添加漢氏鹼(4.02 μL，.023 mmol)。將反應混合物冷卻至 0 ℃，並添加哌嗪-1-甲酸(2S,3S,6S,7R,10R,E)-6-乙醯氧基-10-羥基-2-((R,2E,4E)-6-羥基-7-((2R,3R)-3-((2R,3S)-3-羥基戊-2-基)氧雜環丙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-3,7-二甲基-12-側氧基氧雜環十二碳-4-烯-7-基酯。在室溫下攪拌反應混合物，直至起始物質消耗。真空濃縮反應混合物。HPLC 純化得到 ADL6-D8 (1.2 mg，1.019 μmol，13.28%產率)。LC/MS (ESI, m/z), 1199.9 $[M+Na]^+$。

【0954】 $^1$H NMR (400 MHz, $CHCl_3$-*d*): δ ppm 0.78 - 1.04 (m, 18 H) 1.15 - 1.52 (m, 58 H) 1.64 - 1.72 (m, 3 H) 1.78 (d, *J*=6.53 Hz, 4 H) 2.04 - 2.19 (m, 3 H) 2.21 - 2.30 (m, 1 H) 2.44 - 2.67 (m, 4 H) 2.76 (dd, *J*=6.09, 2.95 Hz, 1 H) 2.90 - 3.02 (m, 1 H) 3.42 - 3.57 (m, 8 H) 3.61 - 3.70 (m, 1 H) 3.77 (br s, 1 H) 4.10 - 4.27 (m, 1 H) 4.58 (br d, *J*=6.65 Hz, 1 H) 5.01 - 5.26 (m, 4 H) 5.52 - 5.70 (m, 2 H) 5.88 (s, 1 H) 5.93 - 6.02 (m, 1 H) 6.08 - 6.18 (m, 1 H) 6.47 - 6.58 (m, 1 H) 7.29 - 7.35 (m, 2 H) 7.55 (d, *J*=8.66 Hz, 1 H)。

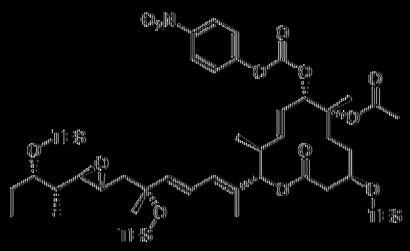
1.3.1.4 ADL1-D4

[0955] ADL1-D4 係使用以下略述之程序合成。




流程 4

[0956] 步驟 1：乙酸 (2S,3S,6S,7R,10R,E)-3,7-二甲基-2-((R,2E,4E)-6-甲基-6-((三乙基矽烷基)氧基)-7-((2R,3R)-3-((2S,3S)-3-((三乙基矽烷基)氧基)戊-2-基)氧雜環丙烷-2-基)庚-2,4-二烯-2-基)-6-(((4-硝基苯氧基)羰基)氧基)-12-側氧基-10-((三乙基矽烷基)氧基)氧雜環十二碳-4-烯-7-基酯。

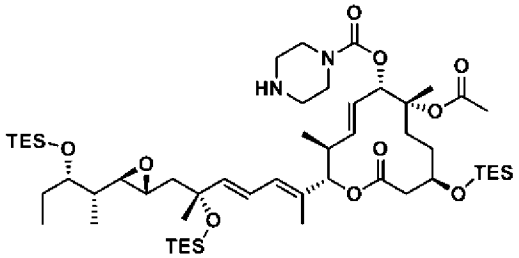


[0957] 在 20℃下，向三-TES 普拉烯內酯 D (160 mg，0.179 mmol)於 1,2-二氯乙烷(5 mL)中之溶液中添加 DMAP (32.7 mg，0.268 mmol)、三乙胺(0.75 mL，5.36 mmol)及氯甲酸 4-硝基苯酯(360 mg，1.787 mmol)。反應混合物在 40℃下攪拌 4 天，並在 60℃下攪拌 2 小時。用 EtOAc 稀釋反應混合物並用水洗滌，接著分離各層。用 EtOAc (2×)萃取水層。依序用水及鹽水洗滌合併之有機萃取物，經 $MgSO_4$ 乾燥，過濾，並真空濃縮。急驟層析法得到哌啶-1-甲酸

(2S,3S,6S,7R,10R,E)-7-乙醯氧基-3,7-二甲基-2-((R,2E,4E)-6-甲基-6-((三乙基矽烷基)氧基)-7-((2R,3R)-3-((2S,3S)-3-((三乙基矽烷基)氧基)戊-2-基)氧雜環丙烷-2-基)庚-2,4-二烯-2-基)-12-側氧基-10-((三乙基矽烷基)氧基)氧雜環十二碳-4-烯-6-基酯(150 mg，79%產率)。

【0958】 $^{1}$H-NMR (400 MHz, $CHCl_3$-*d*): δ ppm 0.48 - 0.71 (m, 24 H) 0.78 - 0.85 (m, 7 H) 0.86 - 0.93 (m, 5 H) 0.94 - 1.03 (m, 34 H) 1.18 - 1.22 (m, 2 H) 1.22 - 1.26 (m, 2 H) 1.35 - 1.43 (m, 4 H) 1.43 - 1.52 (m, 4 H) 1.54 (s, 4 H) 1.56 - 1.65 (m, 3 H) 1.68 - 1.72 (m, 3 H) 1.75 (br d, *J*=0.75 Hz, 2 H) 1.84 - 1.95 (m, 1 H) 2.01 - 2.06 (m, 2 H) 2.09 (s, 2 H) 2.11 (s, 2 H) 2.33 - 2.52 (m, 4 H) 2.57 (dd, *J*=8.09, 2.07 Hz, 2 H) 2.80 - 2.90 (m, 1 H) 3.66 - 3.80 (m, 1 H) 3.82 - 3.93 (m, 2 H) 4.92 - 5.13 (m, 2 H) 5.63 - 5.68 (m, 1 H) 5.69 - 5.74 (m, 1 H) 5.75 - 5.83 (m, 2 H) 6.12 (br d, *J*=10.67 Hz, 1 H) 6.41 (ddd, *J*=15.15, 11.01, 5.08 Hz, 1 H) 7.50 (d, *J*=9.41 Hz, 2 H) 8.35 (d, *J*=9.29 Hz, 2 H)。

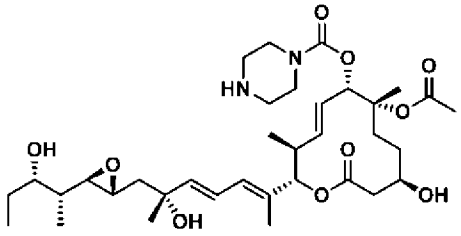
【0959】 **步驟 2**：哌嗪-1-甲酸(2S,3S,6S,7R,10R,E)-7-乙醯氧基-3,7-二甲基-2-((R,2E,4E)-6-甲基-6-((三乙基矽烷基)氧基)-7-((2R,3R)-3-((2S,3S)-3-((三乙基矽烷基)氧基)戊-2-基)氧雜環丙烷-2-基)庚-2,4-二烯-2-基)-12-側氧基-10-((三乙基矽烷基)氧基)氧雜環十二碳-4-烯-6-基酯。




【0960】 向乙酸(2S,3S,6S,7R,10R,E)-3,7-二甲基-2-((R,2E,4E)-6-甲基-6-((三乙基矽烷基)氧基)-7-((2R,3R)-3-((2S,3S)-3-((三乙基矽烷基)

氧基)戊-2-基)氧雜環丙烷-2-基)庚-2,4-二烯-2-基)-6-(((4-硝基苯氧基)羰基)氧基)-12-側氧基-10-((三乙基矽烷基)氧基)氧雜環十二碳-4-烯-7-基酯於 DCM (1 mL)中之溶液中添加哌嗪(0.447 g，5.195 mmol)及漢氏鹼(0.9 mL，5.195 mmol)。攪拌所得淺黃色懸浮液 6 小時。濃縮反應混合物並在矽膠上層析分離，得到哌嗪-1-甲酸(2S,3S,6S,7R,10R,E)-7-乙醯氧基-3,7-二甲基-2-((R,2E,4E)-6-甲基-6-((三乙基矽烷基)氧基)-7-((2R,3R)-3-((2S,3S)-3-((三乙基矽烷基)氧基)戊-2-基)氧雜環丙烷-2-基)庚-2,4-二烯-2-基)-12-側氧基-10-((三乙基矽烷基)氧基)氧雜環十二碳-4-烯-6-基酯(1.0 g，0.844 mmol，81%產率)。LC/MS (ESI, m/z), 1008.1 $[M+H]^+$。

**D4**

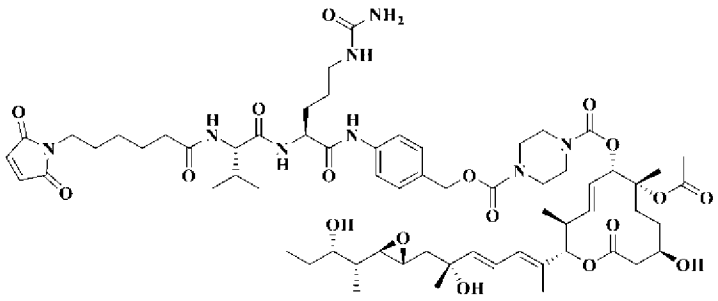



【0961】 **步驟 3**：將哌嗪-1-甲酸(2S, 3S,6S,7R,10R,E)-7-乙醯氧基-3,7-二甲基-2-((R,2E,4E)-6-甲基-6-((三乙基矽烷基)氧基)-7-((2S,3S)-3-((2S,3S)-3-((三乙基矽烷基)氧基)戊-2-基)氧雜環丙烷-2-基)庚-2,4-二烯-2-基)-12-側氧基-10-((三乙基矽烷基)氧基)氧雜環十二碳-4-烯-6-基酯(1.09 g，0.92 mmol)、DCM (20.71 mL，321.826 mmol)及 DIPEA (19.91 mL，114.018 mmol)組合並冷卻至-78℃。添加氟化氫-吡啶(0.518 g，5.232 mmol)並使反應物升溫至室溫且攪拌隔夜。LC/MS 表明脫矽烷化。在冰浴中冷卻反應混合物。添加飽和 $NaHCO_3$ 並攪拌，且用 DCM 萃取。合併有機層，經無水 $Na_2SO_4$ 乾燥並濃縮，且層析分離，得到哌嗪-1-甲酸(2S,3S,6S,7R,10R,E)-7-乙醯氧基-10-羥基-2-((R,2E,4E)-6-羥基-7-

((2S,3S)-3-((2R,3S)-3-羥基戊-2-基)氧雜環丙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-3,7-二甲基-12-側氧基氧雜環十二碳-4-烯-6-基酯(225 mg，36.8%)。LC/MS (ESI, m/z), 665.6 $[M+H]^+$。

【0962】 $^1$H-NMR (400 MHz, $CHCl_3$-*d*): δ ppm 0.87 - 0.92 (m, 6 H) 0.94 (t, *J*=7.40 Hz, 3 H) 1.16 - 1.31 (m, 1 H) 1.35 (s, 3 H) 1.40 - 1.56 (m, 4 H) 1.59 (s, 3 H) 1.66 (br dd, *J*=14.68, 7.03 Hz, 3 H) 1.76 - 1.80 (m, 3 H) 1.87 (dd, *J*=14.12, 5.46 Hz, 1 H) 2.05 (s, 3 H) 2.30 - 2.41 (m, 1 H) 2.50 (d, *J*=3.76 Hz, 2 H) 2.56 - 2.72 (m, 2 H) 2.90 (br d, *J*=2.01 Hz, 1 H) 3.19 (br t, *J*=5.14 Hz, 4 H) 3.50 - 3.59 (m, 1 H) 3.71 (br s, 4 H) 3.77 - 3.89 (m, 1 H) 5.01 - 5.13 (m, 2 H) 5.58 - 5.71 (m, 1 H) 5.71 - 5.81 (m, 1 H) 5.88 (d, *J*=15.31 Hz, 1 H) 6.15 (br d, *J*=10.79 Hz, 1 H) 6.53 (dd, *J*=15.18, 10.92 Hz, 1 H)。

**AD1-D4**



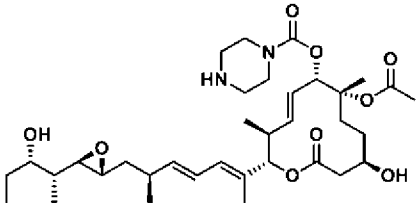
【0963】 在圓底燒瓶中，向於 DMF (966 μL)中之碳酸 4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯胺基)-3-甲基丁醯胺基)-5-脲基戊醯胺基)苯甲酯(4-硝基苯基)酯(23 mg，0.031 mmol)中添加漢氏鹼(16.33 μL，0.094 mmol)。將反應混合物冷卻至 0℃，並添加 D4 (22.80 mg，0.034 mmol)並在室溫下攪拌。真空濃縮反應混合物。急驟層析法得到 ADL1-D4 (30.5 mg，0.024 mmol，77%產率)。LC/MS (ESI, m/z), 1263.8 $[M+H]^+$。

【0964】 $^{1}$H-NMR (400 MHz, MeOH-$d_4$): δ ppm 0.87 - 0.93 (m, 7 H) 0.93 - 1.01 (m, 8 H) 1.19 - 1.34 (m, 4 H) 1.50 (s, 3 H) 1.57 (s, 5 H) 1.58 - 1.70 (m, 6 H) 1.70 - 1.77 (m, 1 H) 1.78 (s, 3 H) 1.83 - 1.95 (m, 2 H) 2.04 (s, 3 H) 2.05 - 2.13 (m, 1 H) 2.27 (t, *J*=7.40 Hz, 2 H) 2.32 - 2.42 (m, 1 H) 2.50 (d, *J*=3.64 Hz, 2 H) 2.55 - 2.74 (m, 2 H) 2.90 (td, *J*=5.83, 2.26 Hz, 1 H) 3.03 - 3.26 (m, 2 H) 3.35 (s, 13 H) 3.42 - 3.61 (m, 11 H) 3.80 (br dd, *J*=9.85, 3.58 Hz, 1 H) 4.16 (d, *J*=7.40 Hz, 1 H) 4.50 (dd, *J*=8.91, 5.14 Hz, 1 H) 4.56 (s, 1 H) 5.05 (dd, *J*=14.37, 10.10 Hz, 2 H) 5.09 (s, 2 H) 5.49 (s, 1 H) 5.59 - 5.69 (m, 1 H) 5.72 - 5.80 (m, 1 H) 5.87 (d, *J*=15.18 Hz, 1 H) 6.09 - 6.22 (m, 1 H) 6.44 - 6.60 (m, 1 H) 7.32 (d, *J*=8.66 Hz, 2 H) 7.58 (d, *J*=8.53 Hz, 2 H)。

### 1.3.1.5 ADL1-D9、ADL6-D9 及 ADL1-D13

**D9 及 D13**

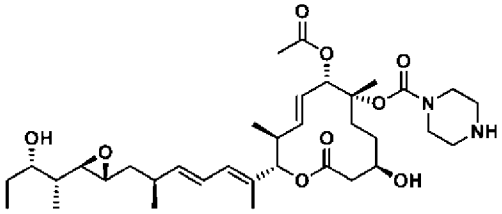
【0965】 D9 及 D13 係採用 D4 之合成中略述之程序(流程 4)，利用三-TES 普拉二烯內酯 B，以 3:1 之異構體混合物形式合成。




【0966】 **有效負載(D9)**：LC/MS (ESI, m/z), 649.7 $[M+H]^+$。

【0967】 $^{1}$H-NMR (400 MHz, $CHCl_3$-*d*): δ ppm 0.87 - 1.01 (m, 10 H) 1.08 (d, J=6.78 Hz, 3 H) 1.27 - 1.63 (m, 12 H) 1.66 - 1.74 (m, 1 H) 1.76 (s, 3 H) 1.97 - 2.10 (m, 3 H) 2.35 - 2.57 (m, 5 H) 2.58 - 2.65 (m, 1 H) 2.65 - 2.71 (m, 1 H) 2.77 (td, J=5.93, 2.32 Hz, 1 H) 2.89 - 3.05 (m, 4

H) 3.07 - 3.34 (m, 8 H) 3.50 - 3.68 (m, 5 H) 3.72 - 3.88 (m, 1 H) 4.88 - 5.09 (m, 1 H) 5.18 (d, J=10.67 Hz, 1 H) 5.50 - 5.84 (m, 3 H) 6.01 - 6.13 (m, 1 H) 6.19 - 6.36 (m, 1 H)。

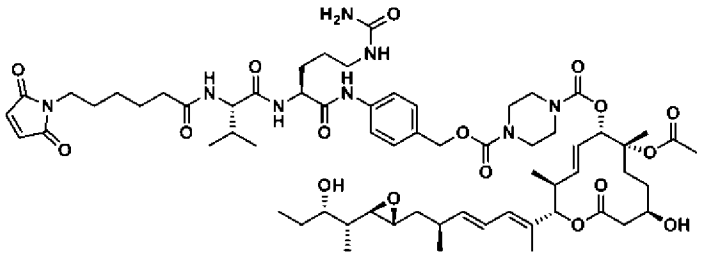


【0968】 **有效負載(D13)**：LC/MS (ESI, m/z), 649.6 $[M+H]^+$。

【0969】 $^1$H NMR (400 MHz, $CHCl_3$-*d*) δ ppm 0.84 - 1.01 (m, 11 H) 1.08 (d, *J*=6.78 Hz, 3 H) 1.29 - 1.64 (m, 10 H) 1.63 - 1.73 (m, 1 H) 1.76 (s, 3 H) 1.94 - 2.12 (m, 4 H) 2.37 - 2.58 (m, 4 H) 2.59 - 2.65 (m, 1 H) 2.68 (dd, *J*=7.40, 2.26 Hz, 1 H) 2.77 (td, *J*=5.93, 2.32 Hz, 1 H) 3.01 - 3.30 (m, 4 H) 3.49 (s, 1 H) 3.54 - 3.67 (m, 2 H) 3.69 - 3.92 (m, 5 H) 4.13 - 4.78 (m, 11 H) 5.13 - 5.24 (m, 2 H) 5.48 - 5.61 (m, 1 H) 5.62 - 5.74 (m, 2 H) 6.04 - 6.13 (m, 1 H) 6.18 - 6.32 (m, 1 H)。

**ADL1-D9**

【0970】 採用通用程序 1 (如 1.3.1 部分中所略述)合成 ADL1-D9。



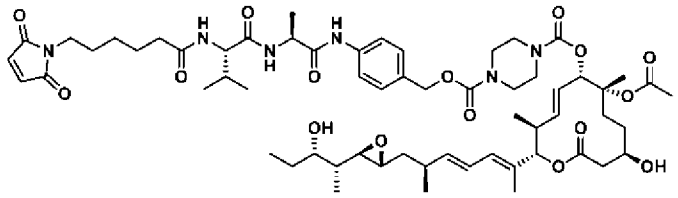
【0971】 **連接子-有效負載(ADL1-D9)**：(30.5 mg，0.024 mmol，77%產率)。LC/MS (ESI, m/z), 1263.8 $[M+H]^+$。

【0972】 $^1$H-NMR (400 MHz, MeOH-$d_4$): δ ppm 0.87 - 0.93 (m, 7 H) 0.93 - 1.01 (m, 8 H) 1.19 - 1.34 (m, 4 H) 1.50 (s, 3 H) 1.57 (s, 5 H)

1.58 - 1.70 (m, 6 H) 1.70 - 1.77 (m, 1 H) 1.78 (s, 3 H) 1.83 - 1.95 (m, 2 H) 2.04 (s, 3 H) 2.05 - 2.13 (m, 1 H) 2.27 (t, *J*=7.40 Hz, 2 H) 2.32 - 2.42 (m, 1 H) 2.50 (d, *J*=3.64 Hz, 2 H) 2.55 - 2.74 (m, 2 H) 2.90 (td, *J*=5.83, 2.26 Hz, 1 H) 3.03 - 3.26 (m, 2 H) 3.35 (s, 13 H) 3.42 - 3.61 (m, 11 H) 3.80 (br dd, *J*=9.85, 3.58 Hz, 1 H) 4.16 (d, *J*=7.40 Hz, 1 H) 4.50 (dd, *J*=8.91, 5.14 Hz, 1 H) 4.56 (s, 1 H) 5.05 (dd, *J*=14.37, 10.10 Hz, 2 H) 5.09 (s, 2 H) 5.49 (s, 1 H) 5.59 - 5.69 (m, 1 H) 5.72 - 5.80 (m, 1 H) 5.87 (d, *J*=15.18 Hz, 1 H) 6.09 - 6.22 (m, 1 H) 6.44 - 6.60 (m, 1 H) 7.32 (d, *J*=8.66 Hz, 2 H) 7.58 (d, *J*=8.53 Hz, 2 H)。

**ADL6-D9**

【0973】 採用通用程序 1 (如 1.3.1 部分中所略述)合成 ADL6-D9。

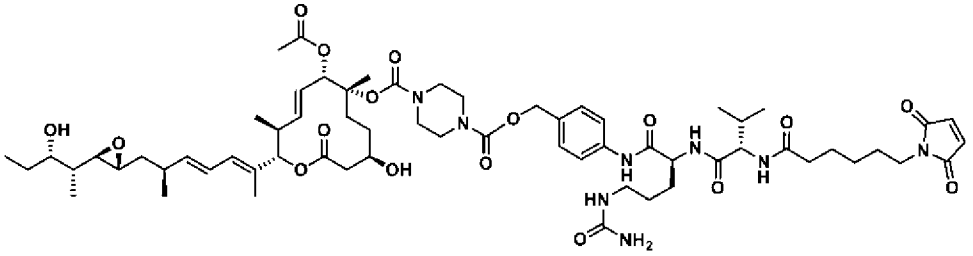


【0974】 **連接子-有效負載(ADL6-D9)**：向於 DMF (784 μL)中稀釋之碳酸 4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯胺基)-3-甲基丁醯胺基)丙醯胺基)苯甲酯(4-硝基苯基)酯(16.5 mg，0.025 mmol)中添加漢氏鹼(13.27 μL，0.076 mmol)。將反應混合物冷卻至 0℃，並添加 D9。在室溫下攪拌反應混合物，直至 LC/MS 顯示反應完成。真空濃縮反應混合物。在矽膠上利用 DCM/MeOH 對殘餘物執行急驟層析，得到標題化合物(16.7 mg，57%產率)。LC/MS (ESI, m/z), 1184.6 $[M+Na]^+$。

【0975】 $^1$H-NMR (400 MHz, MeOH-$d_4$): δ ppm 0.80 - 1.02 (m, 16

H) 1.05 - 1.12 (m, 4 H) 1.13 - 1.34 (m, 5 H) 1.38 - 1.51 (m, 7 H) 1.53 - 1.68 (m, 11 H) 1.71 - 1.80 (m, 4 H) 1.97 - 2.16 (m, 4 H) 2.24 - 2.32 (m, 2 H) 2.32 - 2.42 (m, 1 H) 2.43 - 2.55 (m, 3 H) 2.56 - 2.69 (m, 3 H) 2.73 (br d, *J*=2.13 Hz, 1 H) 3.07 - 3.18 (m, 1 H) 3.42 - 3.61 (m, 17 H) 3.75 - 3.91 (m, 1 H) 4.11 - 4.24 (m, 1 H) 4.43 (s, 2 H) 5.59 - 5.88 (m, 4 H) 6.06 - 6.17 (m, 1 H) 6.29 - 6.39 (m, 1 H) 7.24 - 7.39 (m, 2 H) 7.52 - 7.64 (m, 2 H)。

**ADL1-D13**

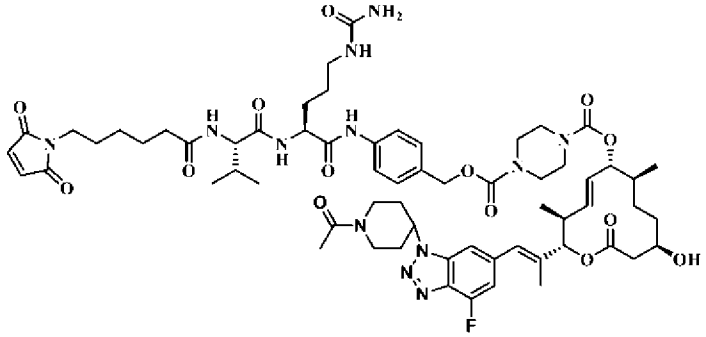


【0976】 **連接子-有效負載(AD1-D13)**：向於 DMF (176 μL，2.277 mmol)中之碳酸 4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯胺基)-3-甲基丁醯胺基)-5 脲基戊醯胺基)苯甲酯(4-硝基苯基)酯(4.2 mg，5.693 μmol)中添加漢氏鹼(2.98 μL，0.017 mmol)。將反應混合物冷卻至 0℃，並添加 D13 (4.06 mg，6.262 μmol)。在室溫下攪拌反應混合物，直至 LC/MS 顯示反應完成。真空濃縮反應混合物。在矽膠上利用 DCM/MeOH 對殘餘物執行急驟層析，得到標題化合物(4.8 mg，68%產率)。LC/MS (ESI, m/z), 1248.0 $[M+H]^+$。

【0977】 $^1$H-NMR (400 MHz, $CHCl_3$-*d*): δ ppm 0.58 - 0.98 (m, 10 H) 0.99 - 1.06 (m, 2 H) 1.11 - 1.31 (m, 6 H) 1.57 - 1.75 (m, 3 H) 2.11 - 2.26 (m, 1 H) 2.30 - 2.73 (m, 2 H) 3.28 - 3.80 (m, 7 H) 4.14 - 4.33 (m, 1 H) 4.44 - 4.55 (m, 1 H) 4.63 - 4.81 (m, 1 H) 4.92 - 5.06 (m, 1 H) 5.09 (s,

1 H) 5.49 - 5.74 (m, 1 H) 5.88 - 6.09 (m, 1 H) 6.14 - 6.36 (m, 1 H) 6.99 - 7.08 (m, 1 H) 7.21 - 7.38 (m, 2 H) 7.53 - 7.67 (m, 1 H) 7.95 (s, 1 H)。

**1.3.1.6 ADL1-D14**

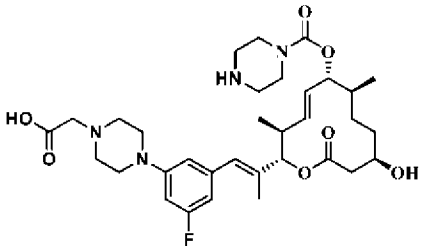


【0978】採用通用程序 1 (如 1.3.1 部分中所略述)合成哌嗪-1,4-二甲酸 1-((2S,3S,6R,7S,10R,E)-2-((E)-1-(1-(1-乙醯基哌啶-4-基)-4-氟-1H-苯并[d][1,2,3]三唑-6-基)丙-1-烯-2-基)-10-羥基-3,7-二甲基-12-側氧基氧雜環十二碳-4-烯-6-基)酯 4-(4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯胺基)-3-甲基丁醯胺基)-5-脲基戊醯胺基)苯甲基)酯(30 mg，0.024 mmol，39.2%產率)。LC/MS (ESI, m/z), 1254.5 $[M+H]^+$。

【0979】$^1$H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*6): δ ppm 0.75 - 1.00 (m, 12 H), 1.06 - 1.26 (m, 4 H), 1.26 - 1.77 (m, 13 H), 1.75 - 2.02 (m, 7 H), 2.08 (s, 8 H), 2.23 - 2.35 (m, 2 H), 2.54 - 2.70 (m, 2 H), 2.78 - 3.10 (m, 4 H), 3.36 (br s, 13 H), 3.66 - 3.79 (m, 1 H), 3.95 - 4.08 (m, 1 H), 4.11 - 4.25 (m, 1 H), 4.28 - 4.46 (m, 1 H), 4.46 - 4.58 (m, 1 H), 4.58 - 4.66 (m, 1 H), 4.66 - 4.77 (m, 1 H), 5.01 (s, 3 H), 5.14 - 5.27 (m, 1 H), 5.39 (s, 4 H), 5.71 - 5.79 (m, 1 H), 5.87 - 6.00 (m, 1 H), 6.63 - 6.75 (m, 1 H), 6.99 (s, 2 H), 7.13 - 7.24 (m, 1 H), 7.24 - 7.34 (m, 2 H), 7.52 - 7.62 (m, 2 H), 7.65 - 7.74 (m, 1 H), 7.75 - 7.82 (m, 1 H), 7.98 - 8.13 (m, 1 H)。

**1.3.1.7 ADL1-D33**

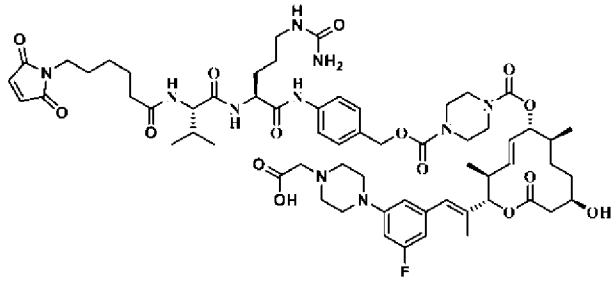
**D33**



【0980】 在 0℃下，向哌嗪-1-甲酸(2S,3S,6R,7S,10R,E)-2-((E)-1-(3-氟-5-(4-(2-甲氧基-2-側氧基乙基)哌嗪-1-基)苯基)丙-1-烯-2-基)-10-羥基-3,7-二甲基-12-側氧基氧雜環十二碳-4-烯-6-基酯(27 mg，0.042 mmol)於 THF/$H_2O$ (3 mL/1 mL)中之經攪拌溶液中添加 LiOH，並使反應混合物緩慢升溫至 25℃。哌嗪-1-甲酸(2S,3S,6R,7S,10R,E)-2-((E)-1-(3-氟-5-(4-(2-甲氧基-2-側氧基乙基)哌嗪-1-基)苯基)丙-1-烯-2-基)-10-羥基-3,7-二甲基-12-側氧基氧雜環十二碳-4-烯-6-基酯係使用國際申請案第 PCT/US2019/026992 號中略述之程序(參見例如程序 17 及 19)合成，該案以引用之方式併入本文中。6 小時後，用磷酸鹽緩衝液($NaH_2PO_4$，1.0 M，3 mL)中和反應混合物並分離各相。用乙酸乙酯(3 × 2 mL)萃取水層，且合併之有機層用無水硫酸鈉乾燥並真空濃縮。執行反相管柱層析，得到標題化合物(19.4 mg，0.031 mmol，73.4%產率)。LC/MS (ESI, m/z), 631.4 $[M+H]^+$。

【0981】 $^1$H-NMR (400 MHz, $CHCl_3$-*d*): δ ppm 0.85 - 1.16 (m, 2 H) 1.23 - 1.52 (m, 1 H) 1.57 - 1.77 (m, 1 H) 1.87 (s, 1 H) 1.92 - 2.13 (m, 1 H) 2.35 - 2.55 (m, 1 H) 2.50 - 2.74 (m, 1 H) 3.11 (br s, 1 H) 3.36 - 3.54 (m, 2 H) 3.64 (br d, *J*=10.42 Hz, 2 H) 3.77 - 3.90 (m, 1 H) 4.76 (br s, 4 H) 5.07 - 5.19 (m, 1 H) 5.38 - 5.68 (m, 1 H) 6.40 - 6.76 (m, 1 H) 8.02 - 8.66 (m, 1 H)。

**ADL1-D33**



【0982】 **連接子-有效負載(ADL1-D33)**：向於 DMF (714 μL，9.217 mmol)中之碳酸 4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯胺基)-3-甲基丁醯胺基)-5-脲基戊醯胺基)苯甲酯(4-硝基苯基)酯(17 mg，.023 mmol)中添加漢氏鹼(12.07 μL，0.069 mmol)。將反應混合物冷卻至 0℃，並添加 2-(4-(3-氟-5-((E)-2-((2S,3S,6R,7S,10R,E)-10-羥基-3,7-二甲基-12-側氧基-6-((哌嗪-1-羰基)氧基)氧雜環十二碳-4-烯-2-基)丙-1-烯-1-基)苯基)哌嗪-1-基)乙酸(16.71 mg，0.026 mmol)。在室溫下攪拌反應混合物，直至 LC/MS 顯示反應完成。真空濃縮反應混合物。在矽膠上執行急驟層析且再執行 HPLC 純化，得到標題化合物(13.5 mg，10.98 μmol，47.7%產率)。LC/MS (ESI, m/z), 1229.5 $[M+H]^+$。

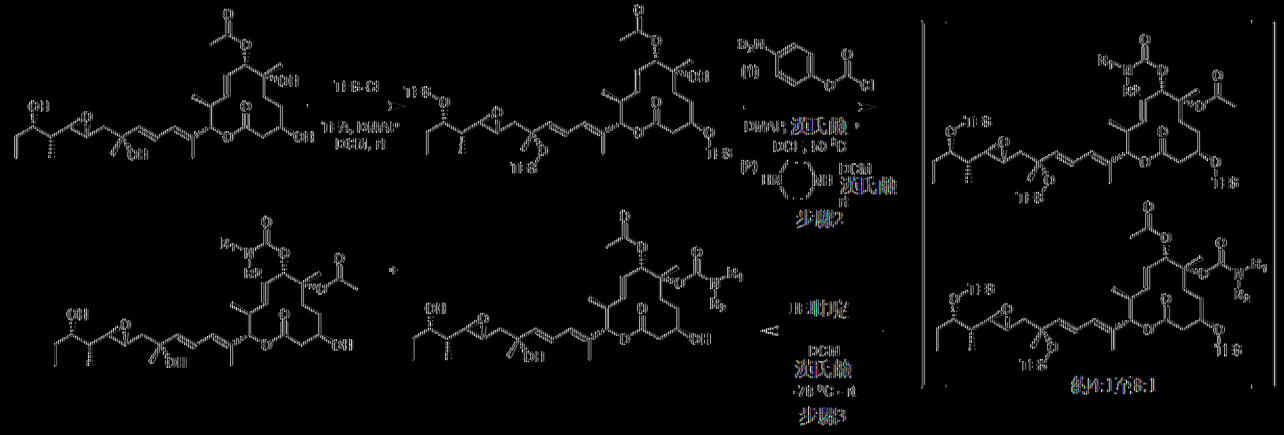
【0983】 $^1$H-NMR (400 MHz, MeOH-$d_4$): δ ppm 0.92 - 0.99 (m, 10 H) 1.01 (d, *J*=6.78 Hz, 3 H) 1.24 - 1.46 (m, 9 H) 1.52 - 1.70 (m, 10 H) 1.70 - 1.82 (m, 1 H) 1.87 (d, *J*=1.00 Hz, 4 H) 1.89 - 2.00 (m, 2 H) 2.01 - 2.23 (m, 2 H) 2.27 (t, *J*=7.40 Hz, 2 H) 2.46 (dd, *J*=14.31, 5.27 Hz, 1 H) 2.57 - 2.71 (m, 2 H) 2.86 (d, *J*=0.63 Hz, 1 H) 3.00 (s, 1 H) 3.06 - 3.27 (m, 4 H) 3.35 (s, 5 H) 3.41 - 3.53 (m, 19 H) 3.66 (s, 2 H) 3.76 - 3.90 (m, 1 H) 4.07 - 4.21 (m, 1 H) 4.39 - 4.69 (m, 37 H) 5.09 (s, 3 H) 5.13 (d, *J*=10.54 Hz, 1 H) 5.52 (dd, *J*=14.56, 9.03 Hz, 2 H) 6.55 (br s, 2 H) 6.69

(d, *J* = 1.38 Hz, 2 H) 7.33 (d, *J* = 8.66 Hz, 2 H) 7.59 (d, *J* = 8.53 Hz, 2 H) 7.88 - 8.04 (m, 1 H) 8.16 - 8.33 (m, 1 H)。

1.3.2 ADL1-D4、ADL1-D5、ADL21-D4、ADL22-D4、ADL23-D4、ADL13-D4

1.3.2.1 用於製備 D4 及 D5 之通用程序

[0984] 採用以下略述之 4 步驟程序合成標題化合物。




步驟 2

[0985] 在 20℃下，向 3-TES 普拉烯內酯 D (1.0 當量)於 1,2-二氯乙烷(0.2 M)中之溶液中添加 DMAP (1.5 當量)、三乙胺(30 當量)及氯甲酸 4-硝基苯酯(10 當量)。混合物在 40℃下攪拌 4 天，且接著在 60℃下攪拌 2 小時。用 EtOAc 稀釋反應混合物並用水洗滌，接著分離各層，並用 EtOAc (2x)萃取水層。合併之有機萃取物依序用水及鹽水洗滌，經硫酸鎂乾燥，過濾並真空濃縮。所得殘餘物藉由矽膠層析法(EtOAc/庚烷)純化，得到中間物碳酸酯。將碳酸酯(1.0 當量)、DCM (0.2M)、三乙胺(3.0 當量)及胺(2.0 當量)組合並在室溫下攪拌 1 小時。真空濃縮所得混合物並藉層析分離(DCM / MeOH)，得到呈區位異構體混合物形式之胺基甲酸酯中間物。

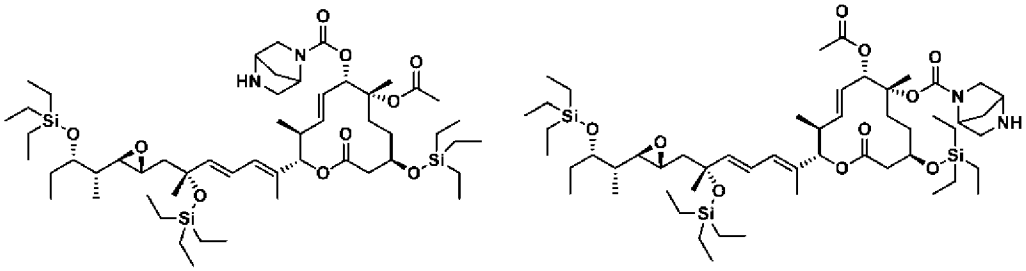
步驟 3

【0986】 將步驟 2 中獲得的胺基甲酸酯區位異構體混合物(1.0 當量)溶解於 DCM (0.04 M)中。添加漢氏鹼(124 當量)並將所得混合物冷卻至-78℃。逐滴添加 HF·吡啶(30 當量)並使混合物升溫至室溫，且在室溫下攪拌隔夜。接著，將混合物冷卻至-78℃並將飽和碳酸氫鈉逐滴添加至反應混合物中，且使混合物升溫至室溫。分離有機層並用 DCM (3×)萃取水層。合併之有機層經無水硫酸鈉乾燥，過濾，並真空濃縮。所得殘餘物經歷反相 HPLC 純化，得到每一所需區位異構體產物。

**D5**

【0987】 標題化合物係經由通用程序 1.3.2.1，步驟 2 及 3 (流程 xxxx)，在步驟 2 中使用 2,5-二氮雜雙環[2.2.1]庚烷製備。

**步驟 2**



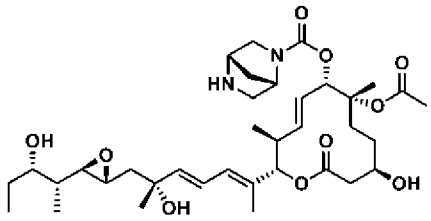
【0988】 獲得呈無色油狀的 2,5-二氮雜雙環[2.2.1]庚烷-2-甲酸(2S,3S,6S,7R,10R,E)-7-乙醯氧基-3,7-二甲基-2-((R,2E,4E)-6-甲基-6-((三乙基矽烷基)氧基)-7-((2R,3R)-3-((2S,3S)-3-((三乙基矽烷基)氧基)戊-2-基)氧雜環丙烷-2-基)庚-2,4-二烯-2-基)-12-側氧基-10-((三乙基矽烷基)氧基)氧雜環十二碳-4-烯-6-基酯及 2,5-二氮雜雙環[2.2.1]庚烷-2-甲酸(2S,3S,6S,7R,10R,E)-6-乙醯氧基-3,7-二甲基-2-((R,2E,4E)-6-甲基-6-((三乙基矽烷基)氧基)-7-((2R,3R)-3-((2S,3S)-3-((三乙基矽烷基)氧基)戊-2-基)氧雜環丙烷-2-基)庚-2,4-二烯-2-基)-12-側氧基-10-((三乙基矽烷基)氧基)氧雜環十二碳-4-烯-7-基酯之混合物(21.7 mg，45.1%)。LCMS (ESI,

m/z), $[M+H]^+$ 1020.6

【0989】 $^1$H NMR (400 MHz, 甲醇-d ) δ ppm 0.61 - 0.70 (m, 19 H) 0.82 - 0.95 (m, 10 H) 0.95 - 1.04 (m, 29 H) 1.23 (br dd, J=7.15, 4.64 Hz, 1 H)1.30 (s, 1 H) 1.42 - 1.64 (m, 12 H) 1.78 (s, 4 H) 1.88 - 2.01 (m, 2 H) 2.06 (br d, J=10.92 Hz, 3 H) 2.14 (br s, 1 H) 2.43 (br d, J=4.64 Hz, 2 H) 2.49 (br s, 1 H) 2.63 (dd, J=8.16, 2.13 Hz, 2 H) 2.86 - 2.91 (m, 1 H) 3.47 - 3.66 (m, 2 H) 3.76 (td, J=6.37, 3.33 Hz, 1 H) 3.95 (br d, J=4.27 Hz, 1 H) 4.34 (br s, 1H) 6.15 (br d, J=10.92 Hz, 1 H) 6.52 (dd, J=15.12, 10.98 Hz, 1H)

**步驟 3**

**D5-01**




【0990】 HPLC 純化得到呈白色固體狀之(1S,4S)-2,5-二氮雜雙環[2.2.1]庚烷-2-甲酸(2S,3S,6S,7R,10R,E)-7-乙醯氧基-10-羥基-2-((R,2E,4E)-6-羥基-7-((2R,3R)-3-((2R,3S)-3-羥基戊-2-基)氧雜環丙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-3,7-二甲基-12-側氧基氧雜環十二碳-4-烯-6-基酯(5 mg，34.7%)。LCMS (ESI, m/z), $[M+H]^+$ 677.6

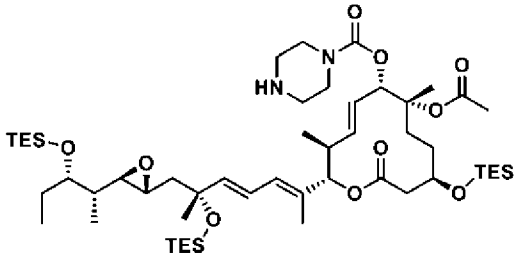
【0991】 1H NMR (400 MHz, 甲醇-*d*4) δ ppm 0.85 - 0.98 (m, 9 H) 1.25 (td, *J*=7.40, 4.14 Hz, 1 H) 1.34 (s, 3 H) 1.42 - 1.69 (m, 9 H) 1.79 (s, 4 H) 1.82 - 1.96 (m, 2 H) 2.04 (d, *J*=9.29 Hz, 3 H) 2.33 (br d, *J*=10.04 Hz, 1 H) 2.47 - 2.54 (m, 2 H) 2.57 - 2.72 (m, 2 H) 2.87 - 2.92

(m, 1 H) 3.03 (br s,2 H) 3.33 - 3.43 (m, 2 H) 3.43 - 3.57 (m, 2 H) 3.77 - 3.84 (m, 1 H) 3.86 - 3.94 (m, 1 H) 4.50 (br s, 1 H) 4.97 - 5.11 (m, 2 H) 5.60 - 5.68 (m, 1 H) 5.73 - 5.82 (m, 1 H) 5.88 (d, *J*=15.31 Hz, 1 H) 6.15 (br d, *J*=11.04 Hz, 1 H) 6.53 (dd, *J*=15.25, 10.98 Hz, 1 H) 8.54 (s, 1 H)

**D4**

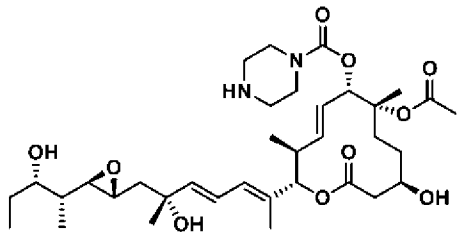
【0992】 標題化合物係經由通用程序 **1.3.2.1** 步驟 2 及 3，在步驟 2 中使用哌嗪製備。

**步驟 2**：



【0993】 通用程序 1.3.2.1，步驟 2，採用哌嗪，得到哌嗪-1-甲酸(2S,3S,6S,7R,10R,E)-7-乙醯氧基-3,7-二甲基-2-((R,2E,4E)-6-甲基-6-((三乙基矽烷基)氧基)-7-((2R,3R)-3-((2S,3S)-3-((三乙基矽烷基)氧基)戊-2-基)氧雜環丙烷-2-基)庚-2,4-二烯-2-基)-12-側氧基-10-((三乙基矽烷基)氧基)氧雜環十二碳-4-烯-6-基酯(1.0 g，0.844 mmol，81%產率)。LC/MS (ESI, m/z), 1008.1 $[M+H]^+$。

**步驟 3：D4**

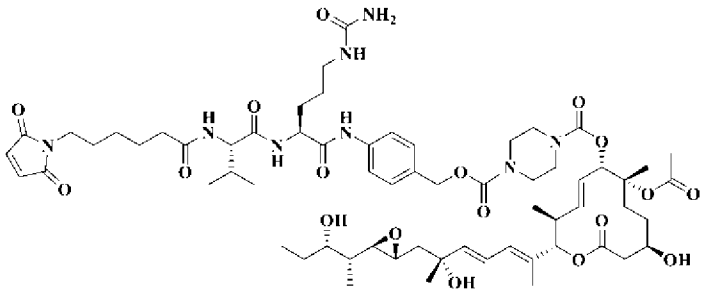


【0994】 HPLC 純化得到哌嗪-1-甲酸(2S,3S,6S,7R,10R,E)-7-乙醯氧基-10-羥基-2-((R,2E,4E)-6-羥基-7-((2S,3S)-3-((2R,3S)-3-羥基戊-2-

基)氧雜環丙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-3,7-二甲基-12-側氧基氧雜環十二碳-4-烯-6-基酯(225 mg，36.8 %)。LC/MS (ESI, m/z), 665.6 $[M+H]^+$。

【0995】 $^1$H-NMR (400 MHz, $CHCl_3$-*d*): δ ppm 0.87 - 0.92 (m, 6 H) 0.94 (t, *J*=7.40 Hz, 3 H) 1.16 - 1.31 (m, 1 H) 1.35 (s, 3 H) 1.40 - 1.56 (m, 4 H) 1.59 (s, 3 H) 1.66 (br dd, *J*=14.68, 7.03 Hz, 3 H) 1.76 - 1.80 (m, 3 H) 1.87 (dd, *J*=14.12, 5.46 Hz, 1 H) 2.05 (s, 3 H) 2.30 - 2.41 (m, 1 H) 2.50 (d, *J*=3.76 Hz, 2 H) 2.56 - 2.72 (m, 2 H) 2.90 (br d, *J*=2.01 Hz, 1 H) 3.19 (br t, *J*=5.14 Hz, 4 H) 3.50 - 3.59 (m, 1 H) 3.71 (br s, 4 H) 3.77 - 3.89 (m, 1 H) 5.01 - 5.13 (m, 2 H) 5.58 - 5.71 (m, 1 H) 5.71 - 5.81 (m, 1 H) 5.88 (d, *J*=15.31 Hz, 1 H) 6.15 (br d, *J*=10.79 Hz, 1 H) 6.53 (dd, *J*=15.18, 10.92 Hz, 1 H)。

**ADL1-D4**



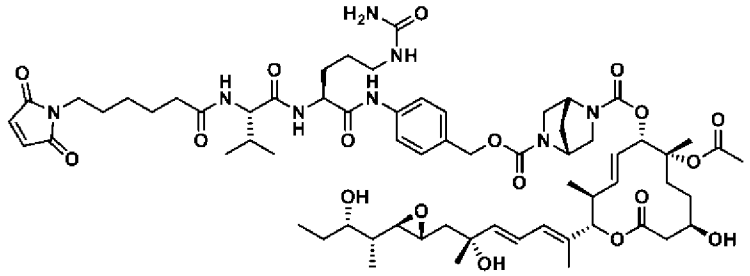
【0996】 採用通用程序 1 (1.3.1)製備 ADL1-D4。執行急驟層析，得到 ADL1-D4 (30.5 mg，0.024 mmol，77%產率)。

【0997】 LC/MS (ESI, m/z), 1263.8 $[M+H]^+$。

【0998】 $^1$H-NMR (400 MHz, MeOH-$d_4$): δ ppm 0.87 - 0.93 (m, 7 H) 0.93 - 1.01 (m, 8 H) 1.19 - 1.34 (m, 4 H) 1.50 (s, 3 H) 1.57 (s, 5 H) 1.58 - 1.70 (m, 6 H) 1.70 - 1.77 (m, 1 H) 1.78 (s, 3 H) 1.83 - 1.95 (m, 2

H) 2.04 (s, 3 H) 2.05 - 2.13 (m, 1 H) 2.27 (t, *J*=7.40 Hz, 2 H) 2.32 - 2.42 (m, 1 H) 2.50 (d, *J*=3.64 Hz, 2 H) 2.55 - 2.74 (m, 2 H) 2.90 (td, *J*=5.83, 2.26 Hz, 1 H) 3.03 - 3.26 (m, 2 H) 3.35 (s, 13 H) 3.42 - 3.61 (m, 11 H) 3.80 (br dd, *J*=9.85, 3.58 Hz, 1 H) 4.16 (d, *J*=7.40 Hz, 1 H) 4.50 (dd, *J*=8.91, 5.14 Hz, 1 H) 4.56 (s, 1 H) 5.05 (dd, *J*=14.37, 10.10 Hz, 2 H) 5.09 (s, 2 H) 5.49 (s, 1 H) 5.59 - 5.69 (m, 1 H) 5.72 - 5.80 (m, 1 H) 5.87 (d, *J*=15.18 Hz, 1 H) 6.09 - 6.22 (m, 1 H) 6.44 - 6.60 (m, 1 H) 7.32 (d, *J*=8.66 Hz, 2 H) 7.58 (d, *J*=8.53 Hz, 2 H)。

**ADL1-D5**

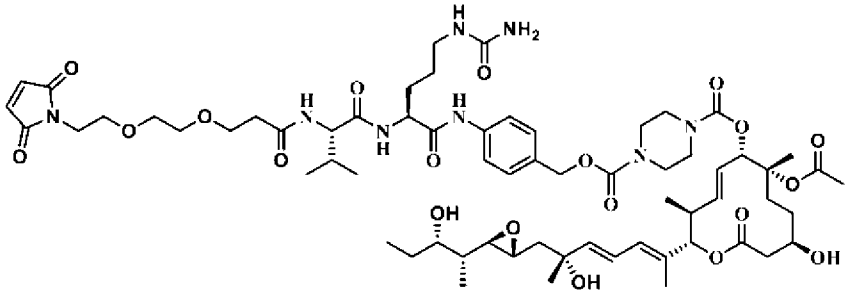


【0999】 採用通用程序 1 (1.3.1)，使用 D5 製備 ADL1-D5。執行急驟層析，得到(14 mg，51.6%產率)。LCMS (ESI, m/z), 1276.43 $[M+H]^+$

【1000】 1H NMR (400 MHz, 甲醇-*d*4) δ ppm 0.86 - 1.00 (m, 16 H) 1.23 - 1.40 (m, 7 H) 1.42 - 1.69 (m, 16 H) 1.73 - 1.80 (m, 4 H) 1.84 - 1.96 (m, 4H) 1.98 - 2.10 (m, 4 H) 2.27 (t, J=7.40 Hz, 2 H) 2.31 - 2.41 (m, 1 H) 2.50 (br d, J=3.39 Hz, 2 H) 2.56 - 2.64 (m, 1 H) 2.64 - 2.72 (m, 1 H) 2.80 - 2.93 (m, 1 H) 3.12 (br d, J=6.90 Hz, 1 H) 3.16 - 3.26 (m, 1 H) 3.35 - 3.56 (m, 7 H) 3.76 - 3.86 (m, 1 H) 4.16 (d, J=7.40 Hz, 1 H) 4.48 - 4.58 (m, 3H) 4.93 - 5.16 (m, 4 H) 5.65 (br d, J=9.91 Hz, 1 H) 5.70 - 5.82 (m, 1 H) 5.88 (d, J=15.18 Hz, 1 H) 6.14 (br d, J=11.04 Hz, 1 H) 6.50 - 6.58 (m, 1 H), 6.79 (s, 2 H) 7.26 - 7.36 (m, 2 H) 7.56 - 7.63 (m, 2

H)

**1.3.3 合成 ADL22-D4**



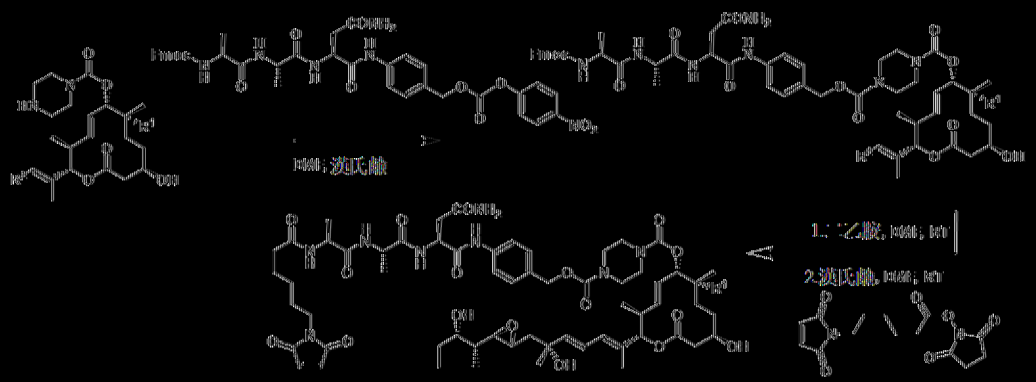
【1001】 向哌嗪-1-甲酸(2S,3S,6S,7R,10R,E)-7-乙醯氧基-10-羥基-2-((R,2E,4E)-6-羥基-7-((2R,3R)-3-((2R,3S)-3-羥基戊-2-基)氧雜環丙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-3,7-二甲基-12-側氧基氧雜環十二碳-4-烯-6-基酯(12 mg，0.018 mmol)於 DMF (2 mL)中之溶液中添加碳酸 4-((2S,5S)-15-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)-5-異丙基-4,7-二側氧基-2-(3-脲基丙基)-10,13-二氧雜-3,6-二氮雜十五烷醯胺基)苯甲酯(4-硝基苯基)酯(16.98 mg，.022 mmol)及漢氏鹼(7.00 mg，.054 mmol)。在 20℃下攪拌混合物 1 小時。將混合物直接真空濃縮至矽膠上並藉由管柱層析法(MeOH/DCM 0-20%)純化，得到呈白色固體狀之哌嗪-1,4-二甲酸 1-((2S,3S,6S,7R,10R,E)-7-乙醯氧基-10-羥基-2-((R,2E,4E)-6-羥基-7-((2R,3R)-3-((2R,3S)-3-羥基戊-2-基)氧雜環丙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-3,7-二甲基-12-側氧基氧雜環十二碳-4-烯-6-基)酯 4-(4-((2S,5S)-15-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)-5-異丙基-4,7-二側氧基-2-(3-脲基丙基)-10,13-二氧雜-3,6-二氮雜十五烷醯胺基)苯甲基)酯(12 mg，9.16 μmol，50.8%產率)。LCMS (ESI, m/z), 1310.2 $[M+H]^+$

【1002】 化學式：C65H96N8O20 分子量：1309.52

【1003】 1H NMR (400 MHz, DMSO-*d6*) δ ppm 0.73 - 0.89 (m, 17

H) 1.03 - 1.13 (m, 1 H) 1.21 - 1.25 (m, 4 H) 1.25 - 1.40 (m, 5 H) 1.42 - 1.47 (m, 4 H) 1.48, (br s, 3 H) 1.69 (s, 4 H) 1.73 - 1.83 (m, 1 H) 1.99 (s, 2 H) 2.10 - 2.25 (m, 1 H) 2.36 (br s, 3 H) 2.40 - 2.48 (m, 2 H) 2.54 - 2.66 (m, 2 H) 2.72 - 2.80, (m, 1 H) 2.88 - 3.08 (m, 2 H) 3.34 - 3.44 (m, 9 H) 3.44 - 3.48 (m, 3 H) 3.48 - 3.52 (m, 2 H) 3.52 - 3.59 (m, 3 H) 3.64 - 3.75 (m, 1 H) 4.24 (s, 1 H), 4.40 (br d, J= 5.65 Hz, 2 H) 4.62 (d, J= 5.02 Hz, 1 H) 4.80 - 4.85 (m, 1 H) 4.90 (br d, J= 9.03 Hz, 2 H) 5.01 (s, 2 H) 5.40 (s, 2 H) 5.48 - 5.57 (m, 1 H), 5.66 - 5.76 (m, 1 H) 5.81 - 5.91 (m, 1 H) 5.94 - 6.01 (m, 1 H) 6.02 - 6.11 (m, 1 H) 6.36 - 6.45 (m, 1 H) 7.02 (s, 2 H) 7.27 - 7.33 (m, 2 H) 7.58 (s, 2H) 7.81 - 7.89 (m, 1 H) 8.11 (br d, J= 7.40 Hz, 1 H) 9.96 - 10.02 (m, 1 H)

1.3.4 用於合成 ADL21-D12、ADL21-D1、ADL21-D4 之通用程序：




步驟 1

[1004] 將有效負載(1.0 當量)及((S)-1-(((S)-1-(((S)-4-胺基-1-((4-((((4-硝基苯氧基)羰基)氧基)甲基)苯基)胺基)-1,4-二側氧基丁-2-基)胺基)-1-側氧基丙-2-基)胺基)-1-側氧基丙-2-基)胺基甲酸(9H-第-9-基)甲酯(1.0 當量)溶解於 DMF (0.1M)中並添加溴氏鹽(3.0 當量)。在室溫下攪拌反應混合物 30 分鐘，之後，在真空中濃縮反應物並對所得殘餘物進行高

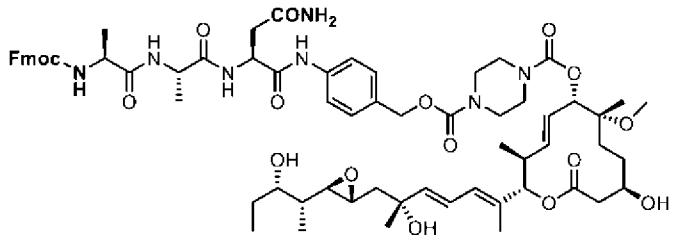
析分離(MeOH / DCM)，得到所需產物。

**步驟 2 及 3**

【1005】 將 fmoc-Ala-Ala-天冬醯胺 PABC 有效負載(1.0 當量)溶解於 N,N-二甲基甲醯胺(0.05 M)中，接著添加二乙胺(6.0 當量)。在室溫下攪拌反應 1 小時且使混合物蒸發至乾。用 N,N-二甲基甲醯胺(0.05 M)萃取粗產物。將 6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己酸 2,5-二側氧基吡咯啶-1-基酯(1.2 當量)及漢氏鹼(2.5 當量)添加至混合物中並在室溫下攪拌 1 小時。接著，真空濃縮混合物且所得殘餘物經由反相 HPLC 純化，得到所需順丁烯二醯亞胺基己醯基 Ala-Ala-天冬醯胺 PABC 連接子有效負載。

**1.3.4.1 ADL21-D1**

步驟 1：

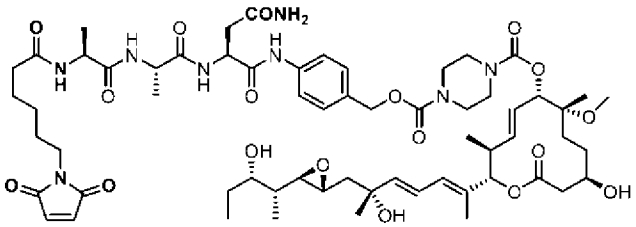



【1006】 哌嗪-1,4-二甲酸 1-(4-((5S,8S,11S)-11-(2-胺基-2-側氧基乙基)-1-(9H-芴-9-基)-5,8-二甲基-3,6,9-三側氧基-2-氧雜-4,7,10-三氮雜十二烷-12-醯胺基)苯甲基)酯 4-((2S,3S,6S,7R,10R,E)-10-羥基-2-((R,2E,4E)-6-羥基-7-((2R,3R)-3-((2R,3S)-3-羥基戊-2-基)氧雜環丙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-7-甲氧基-3,7-二甲基-12-側氧基氧雜環十二碳-4-烯-6-基)酯(140.2 mg，71.9%)。LCMS (ESI, m/z) 1265.6 $[M+H]^+$

化學式：$C_{67}H_{89}N_7O_{17}$

分子量：1264.48

步驟 2 及 3：

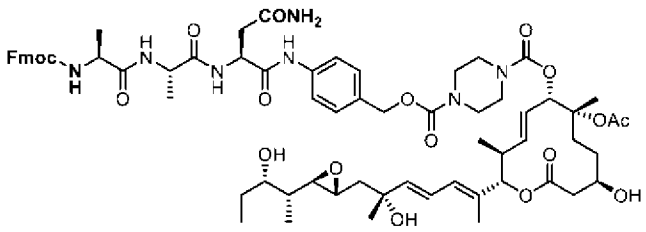


【1007】 哌嗪-1,4-二甲酸 1-(4-((S)-4-胺基-2-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯胺基)丙醯胺基)丙醯胺基)-4-側氧基丁醯胺基)苯甲基)酯 4-((2S,3S,6S,7R,10R,E)-10-羥基-2-((R,2E,4E)-6-羥基-7-((2R,3R)-3-((2R,3S)-3-羥基戊-2-基)氧雜環丙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-7-甲氧基-3,7-二甲基-12-側氧基氧雜環十二碳-4-烯-6-基)酯(49.1 mg，35.8%)。LCMS (ESI, m/z) 1258.19 $[M+Na]^+$

【1008】 $^1$H NMR (400 MHz, 甲醇-*d*4) δ ppm 0.85 - 0.98 (m, 10 H) 1.22 (s, 4 H) 1.26 - 1.45 (m, 14 H) 1.45 - 1.69 (m, 12 H) 1.79 (s, 3 H) 1.90 (s, 2H) 2.20 - 2.27 (m, 2 H) 2.52 (br dd, *J*=10.10, 3.70 Hz, 3 H) 2.67 (br d, *J*=2.13 Hz, 1 H) 2.85 (t, *J*=6.15 Hz, 3 H) 3.14 (t, *J*=1.57 Hz, 1 H) 3.41 - 3.57, (m, 14 H) 3.78 - 3.88 (m, 1 H) 4.27 (dd, *J*=12.36, 7.09 Hz, 2 H) 4.77 (s, 1 H) 4.97 - 5.13 (m, 6 H) 5.51 - 5.64 (m, 1 H) 5.72 (br d, *J*=9.66 Hz, 1 H), 5.88 (d, *J*=15.43 Hz, 1 H) 6.12 - 6.17 (m, 1 H) 6.47 - 6.61 (m, 1 H) 6.79 (s, 2 H) 7.33 (m, *J*=8.66 Hz, 2 H), 7.68 (m, *J*=8.66 Hz, 2 H)

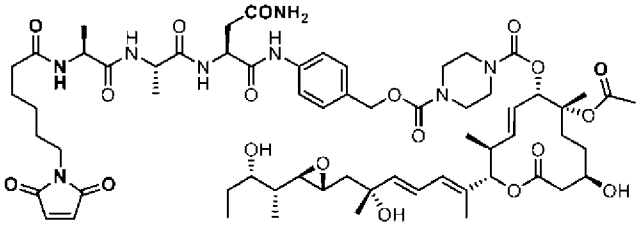
**1.3.4.2 ADL21-D4**

步驟 1



【1009】 哌嗪-1,4-二甲酸 1-((2S,3S,6S,7R,10R,E)-7-乙醯氧基-10-羥基-2-((R,2E,4E)-6-羥基-7-((2R,3R)-3-((2R,3S)-3-羥基戊-2-基)氧雜環丙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-3,7-二甲基-12-側氧基氧雜環十二碳-4-烯-6-基)酯 4-(4-((5S,8S,11S)-11-(2-胺基-2-側氧基乙基)-1-(9H-茀-9-基)-5,8-二甲基-3,6,9-三側氧基-2-氧雜-4,7,10-三氮雜十二烷-12-醯胺基)苯甲基)酯(125 mg，85.6%)。LCMS (ESI, m/z) 1293.4 $[M+H]^+$

步驟 2 及 3



【1010】 哌嗪-1,4-二甲酸 1-((2S,3S,6S,7R,10R,E)-7-乙醯氧基-10-羥基-2-((R,2E,4E)-6-羥基-7-((2R,3R)-3-((2R,3S)-3-羥基戊-2-基)氧雜環丙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-3,7-二甲基-12-側氧基氧雜環十二碳-4-烯-6-基)酯 4-(4-((S)-4-胺基-2-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯胺基)丙醯胺基)丙醯胺基)-4-側氧基丁醯胺基)苯甲基)酯(35 mg，80%)。LCMS (ESI, m/z) 1285.0 $[M+Na]^+$

【1011】 $^1$H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ ppm 0.71 - 0.87 (m, 9 H) 1.04 - 1.12 (m, 1 H) 1.14 - 1.26 (m, 13 H) 1.27 - 1.40 (m, 3 H) 1.40 - 1.52 (m, 9 H) 1.52 - 1.62 (m, 1 H) 1.69 (s, 3 H) 1.74 - 1.83 (m, 1 H) 1.99 (d, J=4.27 Hz, 4 H) 2.03 - 2.14 (m, 2 H) 2.15 - 2.26 (m, 1 H) 2.31 - 2.41 (m, 2 H) 2.54 - 2.65 (m, 4 H) 2.72 - 2.80 (m, 1 H) 3.17 (d, J=5.27 Hz, 3 H) 3.36 (br s, 9 H) 3.63 - 3.74 (m, 1 H) 3.99 - 4.12 (m, 2 H) 4.14 - 4.22 (m, 1 H) 4.23 - 4.30 (m, 1 H) 4.40 (d, J=5.65 Hz, 1 H) 4.55 - 4.65

(m, 2 H) 4.82 (s, 1 H) 4.87 - 4.93 (m, 2 H) 5.01 (s, 2 H) 5.47 - 5.57 (m, 1 H) 5.66 - 5.77 (m, 1 H) 6.01 - 6.09 (m, 1 H) 6.35 - 6.45 (m, 1 H) 6.89 - 6.96 (m, 1 H) 6.99 (s, 2 H) 7.30 (d, J = 8.66 Hz, 2 H) 7.36 - 7.42 (m, 1 H) 7.62 (s, 2 H) 7.97 - 8.21 (m, 3 H), 9.62 - 9.72 (m, 1 H)。

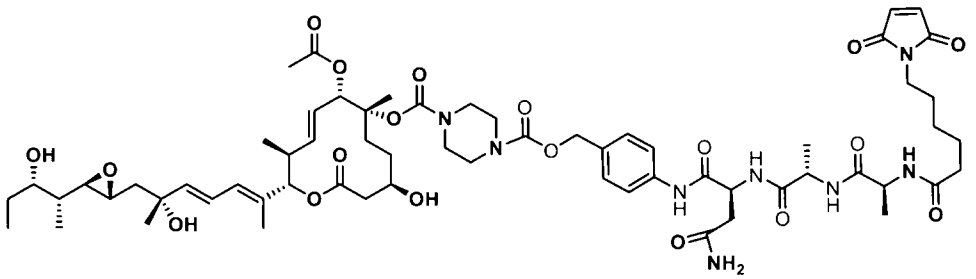
1.3.5 ADL21-D12




[1012] 向吡啶-1-甲酸(2S,3S,6S,7R,10R,E)-7,10-二羥基-2-((R,2E,4E)-6-羥基-7-((2R,3R)-3-((2R,3S)-3-羥基戊-2-基)氧雜環丙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-3,7-二甲基-12-側氧基氧雜環十二碳-4-烯-6-基酯(50 mg，0.08 mmol)於 DMF (1 mL)中之溶液中添加((S)-1-(((S)-1-(((S)-4-胺基-1-((4-((((4-硝基苯氧基)羰基)氧基)甲基)苯基)胺基)-1,4-二側氧基丁-2-基)胺基)-1-側氧基丙-2-基)胺基)-1-側氧基丙-2-基)胺基甲酸(9H-茀-9-基)甲酯(73.9 mg，0.096 mmol)，隨後添加 N-乙基-N-異丙基丙-2-胺(104 mg，0.803 mmol)。攪拌反應混合物 1 小時。將反應混合物濃縮至乾並藉由矽膠管柱層析法純化。濃縮含所需化合物之溶離份，得到透明油狀物，直接用於後續步驟，假定 100%產率。接著，將所得油狀物溶解於 DMF (2 mL)中並裝入二乙胺(58.7 mg，0.803 mmol)中。在 20℃下攪拌所得混合物 1 小時並真空濃縮。將殘餘物再溶解於 DMF (1 mL)中且接著添加 6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己酸 2,5-二側氧基吡咯啶-1-基酯(32.2 mg，0.104 mmol)及 N-乙基-N-異丙基丙-2-胺(104 mg，

0.803 mmol)。攪拌所得混合物 1 小時。將反應混合物濃縮至乾並在反相 HPLC 下純化，得到呈白色固體狀之哌嗪-1,4-二甲酸 1-(4-((S)-4-胺基-2-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯胺基)丙醯胺基)丙醯胺基)-4-側氧基丁醯胺基)苯甲基)酯 4-((2S,3S,6S,7R,10R,E)-7,10-二羥基-2-((R,2E,4E)-6-羥基-7-((2R,3R)-3-((2R,3S)-3-羥基戊-2-基)氧雜環丙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-3,7-二甲基-12-側氧基氧雜環十二碳-4-烯-6-基)酯(7.5 mg，6.14 μmol，7.65%產率)。LCMS (ESI, m/z) 1222.28 $[M+H]^+$

**1.3.6 ADL21-D8**



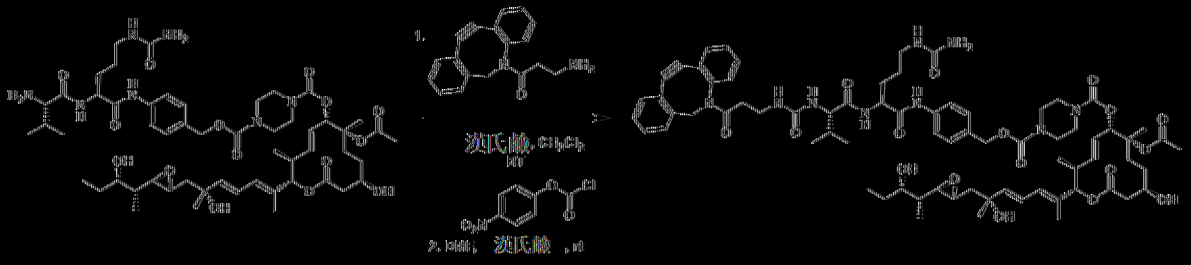
【1013】向哌嗪-1-甲酸(2S,3S,6S,7R,10R,E)-6-乙醯氧基-10-羥基-2-((R,2E,4E)-6-羥基-7-((2R,3R)-3-((2R,3S)-3-羥基戊-2-基)氧雜環丙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-3,7-二甲基-12-側氧基氧雜環十二碳-4-烯-7-基酯(27.0 mg，.041 mmol)於 DMF 中之溶液中添加((S)-1-(((S)-1-(((S)-4-胺基-1-((4((((4 硝基苯氧基)羰基)氧基)甲基)苯基)胺基)-1,4-二側氧基丁-2-基)胺基)-1-側氧基丙-2-基)胺基)-1-側氧基丙-2-基)胺基甲酸(9H-芴-9-基)甲酯(40.5 mg，.053 mmol)，隨後添加漢氏鹼(36.2 μl，0.203 mmol)。在室溫下攪拌 20 分鐘後，接著，真空濃縮混合物且所得殘餘物藉由管柱層析法(0-20% MeOH/DCM)純化，得到所需中間物。接著，將殘餘物與 DMF (2 mL)及二乙胺(29.7 mg，0.406 mmol)組合並在

室溫下攪拌 20 分鐘。隨後，真空濃縮混合物並將所得殘餘物再溶解於 DMF (2ml)中並用 6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己酸 2,5-二側氧基吡咯啶-1-基酯(16.28 mg，.053 mmol)及漢氏鹼(36.2 µl，0.203 mmol)處理。攪拌所得混合物 20 分鐘，隨後濃縮至乾並藉由管柱層析法純化所得殘餘物且以 0-20% MeOH/DCM 梯度溶離中間物。接著，所得殘餘物經歷反相 HPLC 純化，分離得到呈白色固體狀之哌嗪-1,4-二甲酸 1-((2S,3S,6S,7R,10R,E)-6- 乙醯氧基-10- 羥基-2-((R,2E,4E)-6- 羥基-7-((2R,3R)-3-((2R,3S)-3-羥基戊-2-基)氧雜環丙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-3,7-二甲基-12-側氧基氧雜環十二碳-4-烯-7-基)酯 4-(4-((S)-4-胺基-2-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯胺基)丙醯胺基)丙醯胺基)-4-側氧基丁醯胺基)苯甲基)酯(3.5 mg，2.77 µmol，6.82%產率)。哌嗪-1,4-二甲酸 1-((2S,3S,6S,7R,10R,E)-6-乙醯氧基-10-羥基-2-((R,2E,4E)-6-羥基-7-((2R,3R)-3-((2R,3S)-3-羥基戊-2-基)氧雜環丙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-3,7-二甲基-12-側氧基氧雜環十二碳-4-烯-7-基)酯 4-(4-((S)-4-胺基-2-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯胺基)丙醯胺基)丙醯胺基)-4-側氧基丁醯胺基)苯甲基)酯(3.5 mg，6.8%)。LCMS (ESI, m/z) 1285.60 $[M+Na]^+$

【1014】 $^1$H NMR: 0.68 - 0.90 (m, 11 H) 1.03 - 1.13 (m, 2 H) 1.15 - 1.26 (m, 14 H) 1.24 - 1.38 (m, 4 H) 1.40 - 1.63 (m, 12 H), 1.69 (s, 3 H) 1.74 - 1.83 (m, 1 H) 2.03 (s, 3 H) 2.06 - 2.12 (m, 2 H) 2.24 - 2.41 (m, 3 H) 2.53 - 2.63 (m, 4 H), 3.79 - 3.80 (m, 1H) 4.13 - 4.30 (m, 2 H) 4.32 - 4.33 (m, 1 H) 4.33 - 4.47 (m, 1 H) 4.44 - 4.48 (m, 1 H) 4.52 - 4.73 (m, 2 H) 4.74 - 4.97 (m, 2 H) 5.03 (s, 3 H) 5.47 - 5.61 (m, 1 H) 5.65 - 5.77 (m,

1 H) 5.79 - 5.92 (m, 1 H) 5.98 - 6.12 (m, 1 H) 6.30 - 6.46 (m, 1 H) 6.75 - 6.85 (m, 1 H) 6.90 - 6.95 (m, 1 H) 6.99 (s, 1H) 7.26 - 7.36 (m, 2 H) 7.37 - 7.46 (m, 1 H) 7.56 - 7.73 (m, 2 H) 7.90 - 8.09 (m, 1 H) 8.07 - 8.22 (m, 2 H) 8.46 (s, 1 H) 9.59 - 9.78 (m, 1 H)

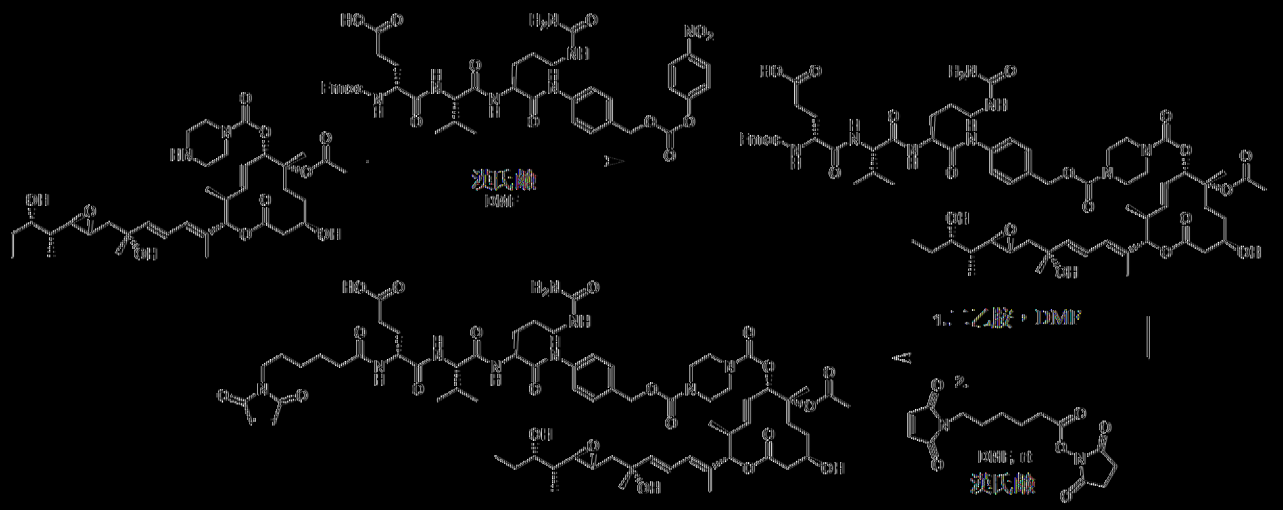
1.3.7 製備 DBCO-Val-Cit-pABC 連接子-有效負載，ADL25-D4




[1015] 在 0°C 下，向 3-胺基-1-(11,12-二氫-二苯并[b,f]氮呯5(6H)-基)內-1-酮(19.36 mg，0.07 mmol)於 DCM (5 mL)中之溶液中添加漢氏鹼(10.26 mg，0.079 mmol)，隨後添加氯甲酸 4-硝基苯酯(14.12 mg，0.07 mmol)。使反應物升溫至 20°C 並攪拌 2 小時。接著，將混合物濃縮至乾並用 DMF 萃取。向所得混合物中裝入漢氏鹼(10.26 mg，.079 mmol)及哌啶-1,4-二甲酸 1-((2S,3S,6S,7R,10R,E)-7-乙醯氧基-10-羥基-2-((R,2E,4E)-6-羥基-7-((2R,3R)-3-((2R,3S)-3-羥基戊-2-基)氧雜環內烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-3,7-二甲基-12-側氧基氧雜環十二碳-4-烯-6-基)酯 4-(4-((S)-2-((S)-2-胺基-3-甲基丁醯胺基)-5-脲基戊醯胺基)苯甲基)酯(50 mg，.047 mmol)並攪拌 1 小時。接著，將混合物濃縮至乾並藉由管柱層析法純化，隨後反相純化，得到哌啶-1,4-二甲酸 1-((2S,3S,6S,7R,10R,E)-7-乙醯氧基-10-羥基-2-((R,2E,4E)-6-羥基-7-((2R,3R)-3-((2R,3S)-3-羥基戊-2-基)氧雜環內烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-3,7-二甲基-12-側氧基氧雜環十二碳-4-烯-6-基)酯 4-(4-((9S,12S)-9-異內基-3,7,10-三側氧基-12-(3-脲基內基)-2,6,8,11-四氮雜十三烷-13-二

苯環辛炔醯胺基)苯甲基)酯(5.3 mg，8.27%)。LCMS (ESI, m/z) 1372.7 [M]+

1.3.8. 製備順丁烯二醯亞胺基-Glu-Val-Cit-pABC 連接子-有效負載




[1016] 向哌啶-1-甲酸(2S,3S,6S,7R,10R,E)-7-乙醯氧基-10-羥基-2-((R,2E,4E)-6-羥基-7-((2R,3R)-3-((2R,3S)-3-羥基戊-2-基)氧雜環丙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-3,7-二甲基-12-側氧基氧雜環十二碳-4-烯-6-基酯(20 mg，0.03 mmol)於 DMF (1 mL)中之溶液中添加(S)-4-((((9H-茀-9-基)甲氧基)羰基)胺基)-5-(((S)-3-甲基-1-(((S)-1-((4-((((4-硝基苯氧基)羰基)氧基)甲基)苯基)胺基)-1-側氧基-5-脲基戊-2-基)胺基)-1-側氧基丁-2-基)胺基)-5-側氧基戊酸(32.3 mg，0.036 mmol)及漢氏鹼(11.66 mg，0.09 mmol)並在 20℃下攪拌 1 小時。接著，添加二乙胺(110 mg，1.504 mmol)且在 20℃下再攪拌混合物 30 分鐘。接著，用乙酸乙酯萃取混合物並真空濃縮。用 DMF (1 mL)萃取所得殘餘物，6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己酸 2,5-二側氧基吡咯啶-1-基酯(13.91 mg，0.045 mmol)及漢氏鹼(11.66 mg，0.09 mmol)並攪拌反應 50 分鐘。接著，用乙酸乙酯萃取反應混合物，濃縮至乾並使用反相 HPLC 純化，得到

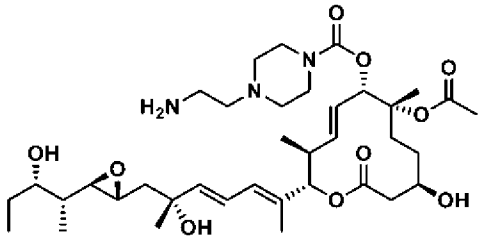
呈白色固體狀的(S)-5-(((S)-1-(((S)-1-((4-(((4-((((2S,3S,6S,7R,10R,E)-7-乙醯氧基-10-羥基-2-((R,2E,4E)-6-羥基-7-((2R,3R)-3-((2R,3S)-3-羥基戊-2-基)氧雜環丙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-3,7-二甲基-12-側氧基氧雜環十二碳-4-烯-6-基)氧基)羰基)哌嗪-1-羰基)氧基)甲基)苯基)胺基)-1-側氧基-5-脲基戊-2-基)胺基)-3-甲基-1-側氧基丁-2-基)胺基)-4-(6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯胺基)-5-側氧基戊酸(9.3 mg，6.68 μmol，22.20%產率)；LCMS (ESI, m/z) 1393.4 $[M+H]^+$

【1017】 $^1$H NMR (400 MHz, DMSO-*d*6) δ ppm 0.74 - 0.89 (m, 16 H) 1.03 - 1.66 (m, 25 H) 1.69 (s, 4 H) 1.74 - 1.94 (m, 2 H) 2.00 (s, 4 H) 2.09 (br d, J=4.39 Hz, 2 H) 2.21 (br d, J=7.53 Hz, 3 H) 2.31 - 2.42 (m, 2 H) 2.53 - 2.84 (m, 3 H) 2.89 - 3.09 (m, 2 H) 3.34 - 3.48 (m, 10 H) 3.65 - 3.74 (m, 1 H) 4.19, (dd, J=8.47, 6.59 Hz, 1 H) 4.26 - 4.45 (m, 3 H) 4.57 - 4.64 (m, 1 H) 4.79 - 4.85 (m, 1 H) 4.90 (br d, J=9.03 Hz, 2 H) 5.01 (s, 2 H) 5.43 (br s, 2 H), 5.47 - 5.59 (m, 1 H) 5.67 - 5.80 (m, 1 H) 5.81 - 5.93 (m, 1 H) 5.94 - 6.14 (m, 2 H) 6.35 - 6.47 (m, 1 H) 6.99 (s, 2 H) 7.30 (d, J=8.66 Hz, 2 H) 7.58, (d, J=8.53 Hz, 2 H) 7.63 - 7.71 (m, 1 H) 7.98 - 8.06 (m, 1 H) 8.15 - 8.27 (m, 1 H) 9.99 - 10.09 (m, 1 H)

**1.3.10. ADL1-D3、ADL10-D3**

【1018】 有效負載 D3 係經由以下提供之程序製備

**D3**

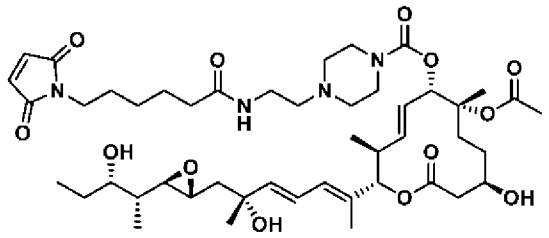


【1019】向哌嗪-1-甲酸(2S,3S,6S,7R,10R,E)-7-乙醯氧基-10-羥基-2-((R,2E,4E)-6-羥基-7-((2R,3R)-3-((2R,3S)-3-羥基戊-2-基)氧雜環丙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-3,7-二甲基-12-側氧基氧雜環十二碳-4-烯-6-基酯(55 mg，0.083 mmol)於 DCM (3 mL)中之混合物中添加(2-側氧基乙基)胺基甲酸(9H-芴-9-基)甲酯(46.5 mg，0.165 mmol)及三乙醯氧基硼氫化鈉(52.6 mg，0.248 mmol)。在室溫下攪拌反應 20 分鐘。接著，將反應混合物濃縮至乾並藉由矽膠管柱層析法(0-10% MeOH/DCM)純化。將純化之材料溶解於 DMF (3 mL)中。接著，向混合物中裝入二乙胺(121 mg，1.655 mmol)並在室溫下攪拌。接著，真空濃縮混合物並經由反相 HPLC 純化法純化，得到呈白色固體狀之 4-(2-胺基乙基)哌嗪-1-甲酸(2S,3S,6S,7R,10R,E)-7-乙醯氧基-10-羥基-2-((R,2E,4E)-6-羥基-7-((2R,3R)-3-((2R,3S)-3-羥基戊-2-基)氧雜環丙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-3,7-二甲基-12-側氧基氧雜環十二碳-4-烯-6-基酯(6 mg，8.48 μmol，10.25%產率)。

【1020】LCMS (ESI, m/z), 708.2 $[M+H]^+$

【1021】$^1$H NMR (400 MHz, DMSO-*d*6) δ ppm 0.74 - 0.86 (m, 9 H) 1.04 - 1.15 (m, 1 H) 1.23 (s, 3 H) 1.26 - 1.40 (m, 3 H) 1.45 (s, 4 H) 1.47 - 1.51 (m, 1 H), 1.52 - 1.63 (m, 1 H) 1.69 (s, 3 H) 1.73 - 1.82 (m, 1 H) 1.99 (s, 3 H) 2.13 - 2.42 (m, 9 H) 2.53 - 2.65 (m, 4 H) 2.72 - 2.80 (m, 1 H), 3.35 - 3.41 (m, 3 H)  3.65 - 3.76 (m, 1 H) 4.36 - 4.46 (m, 1 H) 4.57 - 4.66 (m, 1 H) 4.79 - 4.85 (m, 1 H) 4.87 - 4.95 (m, 2 H) 5.43 - 5.56 (m, 1 H) 5.64 - 5.77 (m, 1 H) 5.80 - 5.91 (m, 1 H) 6.01 - 6.12 (m, 1 H) 6.33 - 6.49 (m, 1 H)。

### 1.3.10.1 ADL10-D3

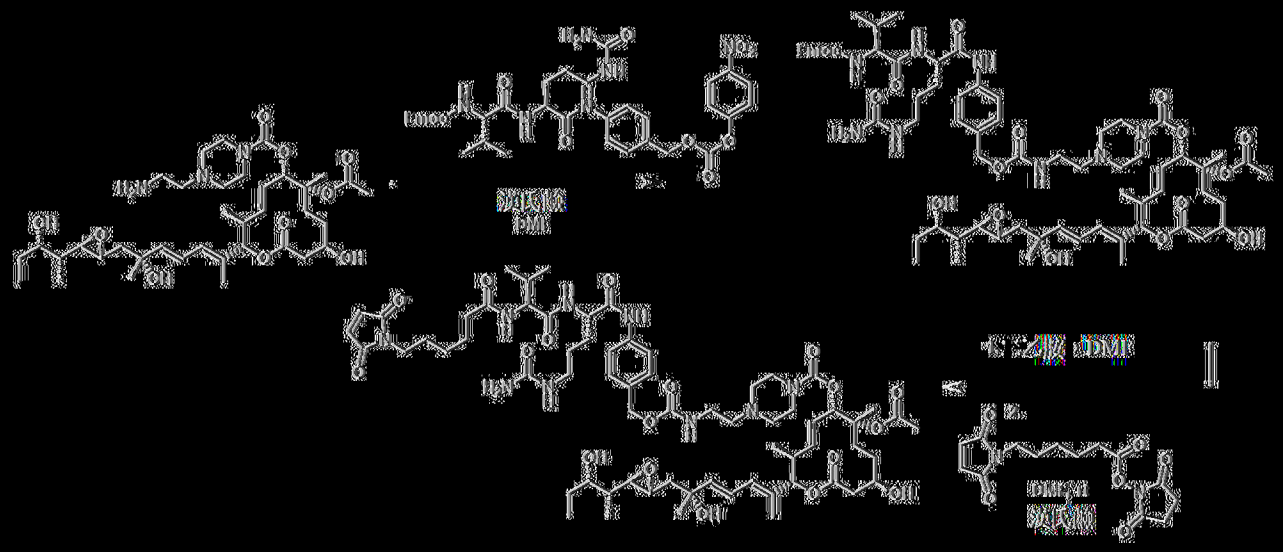


【1022】向 4-(2-胺基乙基)哌嗪-1-甲酸(2S,3S,6S,7R,10R,E)-7-乙醯氧基-10-羥基-2-((R,2E,4E)-6-羥基-7-((2R,3R)-3-((2R,3S)-3-羥基戊-2-基)氧雜環丙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-3,7-二甲基-12-側氧基氧雜環十二碳-4-烯-6-基酯(40 mg，.057 mmol)於 DMF (2 mL)中之溶液中添加 6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己酸 2,5-二側氧基吡咯啶-1-基酯(27.9 mg，0.09 mmol)，隨後添加漢氏鹼(36.5 mg，0.283 mmol)並攪拌 20 分鐘。接著，將所得混合物濃縮至矽膠上並經由管柱層析法(0-20% MeOH/DCM)純化，得到呈淺黃色固體狀的 4-(2-(6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯胺基)乙基)哌嗪-1-甲酸(2S,3S,6S,7R,10R,E)-7-乙醯氧基-10-羥基-2-((R,2E,4E)-6-羥基-7-((2R,3R)-3-((2R,3S)-3-羥基戊-2-基)氧雜環丙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-3,7-二甲基-12-側氧基氧雜環十二碳-4-烯-6-基酯(22 mg，43.2%產率)。LCMS (ESI, m/z) 902.1 $[M+H]^+$

【1023】$^1$H NMR (400 MHz, DMSO-d6) δ ppm 0.73 - 0.89 (m, 10 H) 0.99 - 1.29 (m, 10 H) 1.30 - 1.38 (m, 2 H) 1.40 - 1.49 (m, 9 H) 1.52 - 1.64 (m, 1 H), 1.69 (s, 3 H) 1.74 - 1.83 (m, 1 H) 1.93 - 2.07 (m, 5 H) 2.34 (br d, J=16.94 Hz, 9 H) 2.59 (s, 3 H) 3.07 - 3.21 (m, 2 H) 3.36 (br d, J=14.05 Hz, 3 H) 3.66 - 3.78 (m, 1 H) 4.37 - 4.45 (m, 1 H) 4.57 - 4.66 (m, 1 H) 4.79 - 4.86 (m, 1 H) 4.87 - 4.97 (m, 2 H) 5.46 - 5.57 (m, 1 H)

5.66 - 5.75 (m, 1 H) 5.81 - 5.91 (m, 1 H) 5.99 - 6.13 (m, 1 H) 6.31 - 6.47 (m, 1 H) 7.00 (s, 2 H) 7.62 - 7.71 (m, 1 H)

1.3.10.2 ADL1-D3



[1024] 向 4-(2-胺基乙基)哌啶-1-甲酸(2S,3S,6S,7R,10R,E)-7-乙醯氧基-10-羥基-2-((R,2E,4E)-6-羥基-7-((2R,3R)-3-((2R,3S)-3-羥基戊-2-基)氧雜環丙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-3,7-二甲基-12-側氧基氧雜環十二碳-4-烯-6-基酯(30 mg，0.042 mmol)於 DMF (2 mL)中之溶液中添加((S)-3-甲基-1-(((S)-1-((4-((((4-硝基苯氧基)羰基)氧基)甲基)苯基)胺基)-1-側氧基-5-脲基戊-2-基)胺基)-1-側氧基丙-2-基)胺基甲酸(9H-第-9-基)甲酯(35.7 mg，0.047 mmol)，隨後添加漢氏鹼(16.43 mg，0.127 mmol)並攪拌混合物 1 小時。將所得混合物直接濃縮至矽膠上並藉由矽膠管柱層析法純化，得到 4-(2-((((4-((S)-2-((S)-2-((((9H-第-9-基)甲氧基)羰基)胺基)-3-甲基丁醯胺基)-5-脲基戊醯胺基)苯甲基)氧基)羰基)胺基)乙基)哌啶-1-甲酸(2S,3S,6S,7R,10R,E)-7-乙醯氧基-10-羥基-2-((R,2E,4E)-6-羥基-7-((2R,3R)-3-((2R,3S)-3-羥基戊-2-基)氧雜環丙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-3,7-二甲基-12-側氧基氧雜環十二碳-4-烯-6-基酯，直接用

於後續步驟。向 4-(2-((((4-((S)-2-((S)-2-((((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)胺基)-3-甲基丁醯胺基)-5-脲基戊醯胺基)苯甲基)氧基)羰基)胺基)乙基)哌嗪-1-甲酸(2S,3S,6S,7R,10R,E)-7-乙醯氧基-10-羥基-2-((R,2E,4E)-6-羥基-7-((2R,3R)-3-((2R,3S)-3-羥基戊-2-基)氧雜環丙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-3,7-二甲基-12-側氧基氧雜環十二碳-4-烯-6-基酯(30 mg，0.022 mmol)於 DMF (2 mL)中之溶液中添加二乙胺(82 mg，1.123 mmol)並在20℃下攪拌混合物 1 小時。用乙酸乙酯萃取所得混合物並真空濃縮。接著，將所得殘餘物再溶解於 DMF 中並裝入 6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己酸 2,5-二側氧基吡咯啶-1-基酯(8.31 mg，0.027 mmol)及漢氏鹼(8.71 mg，.067 mmol)。在 20℃下攪拌所得混合物 1 小時。接著，將溶液濃縮至矽膠上並藉由管柱層析法(0-20% MeOH/DCM)純化，得到呈白色固體狀的 4-(2-((((4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯胺基)-3-甲基丁醯胺基)-5-脲基戊醯胺基)苯甲基)氧基)羰基)胺基)乙基)哌嗪-1-甲酸(2S,3S,6S,7R,10R,E)-7-乙醯氧基-10-羥基-2-((R,2E,4E)-6-羥基-7-((2R,3R)-3-((2R,3S)-3-羥基戊-2-基)氧雜環丙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-3,7-二甲基-12-側氧基氧雜環十二碳-4-烯-6-基酯(25 mg，0.019 mmol，85%產率)；LC/MS (ESI, m/z), 1306.2 $[M]^+$。

【1025】 $^1$H NMR (400 MHz, DMSO-$d_6$) δ ppm 0.75 - 0.89 (m, 18 H) 1.05 - 1.12 (m, 1 H) 1.15 - 1.20 (m, 1 H) 1.21 - 1.26 (m, 4 H) 1.26 - 1.39 (m, 5 H) 1.40 - 1.40 (m,1 H) 1.42 - 1.47 (m, 5 H) 1.57 (br s, 3 H) 1.69 (s, 4 H) 1.73 - 1.81 (m, 1 H) 1.92 - 1.98 (m, 1 H) 1.99 (d, $J$=4.39 Hz, 4 H) 2.14 - 2.26 (m, 1 H) 2.29 - 2.42 (m, 4H) 2.42 - 2.47 (m, 1 H)

2.53 – 2.64 (m, 2 H) 2.73 – 2.78 (m, 1 H) 2.88 – 3.08 (m, 2 H) 3.35 – 3.60 (m, 19 H) 3.65 – 3.75 (m, 1 H) 4.22 (dd, *J* = 8.47, 6.71 Hz, 1H) 4.32 – 4.45 (m, 2 H) 4.60 – 4.65 (m, 1 H) 4.79 – 4.85 (m, 1 H) 4.90 (br d, *J* = 9.03 Hz, 2 H) 5.01 (s, 2 H) 5.40 (s, 2 H) 5.47 – 5.58 (m, 1 H) 5.66 – 5.77 (m, 1H) 5.87 (s, 1 H) 5.97 (s, 1 H) 6.03 – 6.13 (m, 1 H) 6.35 – 6.45 (m, 1 H) 7.02 (s, 2 H) 7.30 (d, *J* = 8.53 Hz, 2 H) 7.59 (d, *J* = 8.53 Hz, 2 H) 7.81 – 7.88 (m, 1 H), 8.09 – 8.15 (m, 1 H) 9.90 – 10.09 (m, 1 H)

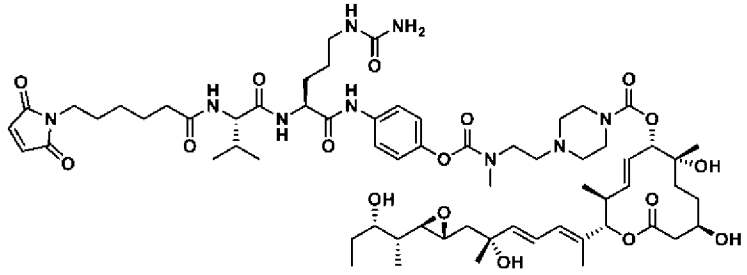
1.3.11 ADL1-144993 及 ADL1-144994 係經由以下通用程序製備




[0226] 向哌啶-1-甲酸(2S,3S,6S,7R,10R,E)-7-乙醯氧基-10-羥基-2-((R,2E,4E)-6-羥基-7-((2R,3R)-3-((2R,3S)-3-羥基戊-2-基)氧雜環丙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-3,7-二甲基-12-側氧基氧雜環十二碳-4-烯-6-基酯(30 mg，0.045 mmol)於 DCM (0.1 M)中之溶液中添加甲基(2-側氧基乙基)胺基甲酸(9H-第-9-基)甲酯(5 當量)及三乙醯氧基硼氫化鈉(10 當量)並攪拌 30 分鐘。接著，用乙酸乙酯萃取混合物並用水及鹽水洗滌。有機層經無水 $Na_2SO_4$ 乾燥，濃縮並藉由管柱層析法(0-10% MeOH/DCM 梯度)純化，分離出所需產物。接著，用 DMF (0.1M)萃取所得材料，裝入二乙胺(20 當量)並攪拌 20 分鐘。接著，將混合物濃縮至乾且在 DMF 中再稀釋並裝入碳酸 4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-

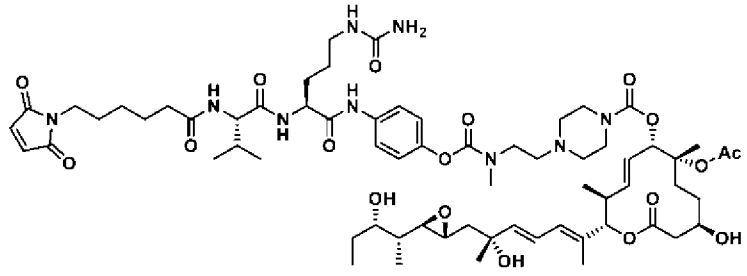
基)己醯胺基)-3-甲基丁醯胺基)-5-脲基戊醯胺基)苯甲酯(4-硝基苯基)酯(1.2 當量)，接著裝入漢氏鹼(3.0 當量)。攪拌混合物 30 分鐘，真空濃縮，並經由製備型 HPLC 純化法純化，得到目標產物。

**1.3.11.2 ADL1-144993**



【1027】通用程序 1 (1.3.11)，得到 4-(2-(((4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯胺基)-3-甲基丁醯胺基)-5-脲基戊醯胺基)苯氧基)羰基)(甲基)胺基)乙基)哌嗪-1-甲酸(2S,3S,6S,7R,10R,E)-7,10-二羥基-2-((R,2E,4E)-6-羥基-7-((2R,3R)-3-((2R,3S)-3-羥基戊-2-基)氧雜環丙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-3,7-二甲基-12-側氧基氧雜環十二碳-4-烯-6-基酯(3.1 mg，5.03%產率)。LC/MS (ESI, m/z), 1278.4 $[M+H]^+$。

**1.3.11.2 ADL1-144994**



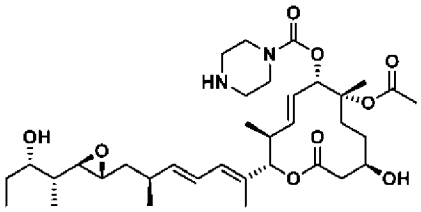
【1028】通用程序 1 (1.3.11)，得到 4-(2-(((4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯胺基)-3-甲基丁醯胺基)-5-脲基戊醯胺基)苯氧基)羰基)(甲基)胺基)乙基)哌嗪-1-甲酸(2S,3S,6S,7R,10R,E)-7,10-二羥基-2-((R,2E,4E)-6-羥基-7-((2R,3R)-3-

((2R,3S)-3-羥基戊-2-基)氧雜環丙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-3,7-二甲基-12-側氧基氧雜環十二碳-4-烯-6-基酯(2 mg，3.36%產率)。LC/MS (ESI, m/z), 1321.37 $[M+H]^+$。

**1.3.1.5 ADL1-D9、ADL6-D9 及 ADL1-D13**

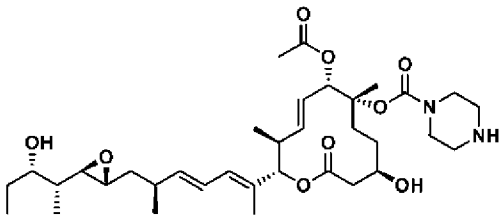
**D9 及 D13**

【1029】 D9 及 D13 係採用 D4 之合成(流程 4)中略述之程序，利用三-TES 普拉二烯內酯 B 以 3:1 異構體混合物形式合成。



【1030】 **有效負載(D9)**：LC/MS (ESI, m/z), 649.7 $[M+H]^+$。

【1031】 $^1$H-NMR (400 MHz, $CHCl_3$-*d*): δ ppm 0.87 - 1.01 (m, 10 H) 1.08 (d, J=6.78 Hz, 3 H) 1.27 - 1.63 (m, 12 H) 1.66 - 1.74 (m, 1 H) 1.76 (s, 3 H) 1.97 - 2.10 (m, 3 H) 2.35 - 2.57 (m, 5 H) 2.58 - 2.65 (m, 1 H) 2.65 - 2.71 (m, 1 H) 2.77 (td, J=5.93, 2.32 Hz, 1 H) 2.89 - 3.05 (m, 4 H) 3.07 - 3.34 (m, 8 H) 3.50 - 3.68 (m, 5 H) 3.72 - 3.88 (m, 1 H) 4.88 - 5.09 (m, 1 H) 5.18 (d, J=10.67 Hz, 1 H) 5.50 - 5.84 (m, 3 H) 6.01 - 6.13 (m, 1 H) 6.19 - 6.36 (m, 1 H)。



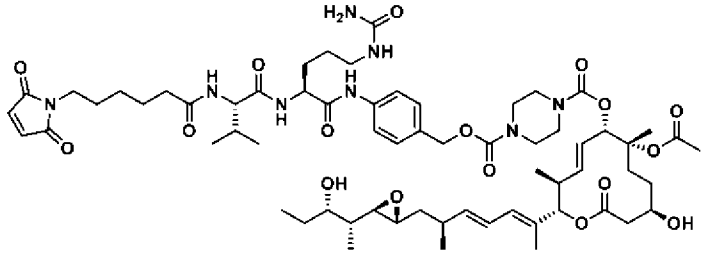
【1032】 **有效負載(D13)**：LC/MS (ESI, m/z), 649.6 $[M+H]^+$。

【1033】 $^1$H NMR (400 MHz, $CHCl_3$-*d*) δ ppm 0.84 - 1.01 (m, 11

H) 1.08 (d, *J*=6.78 Hz, 3 H) 1.29 - 1.64 (m, 10 H) 1.63 - 1.73 (m, 1 H) 1.76 (s, 3 H) 1.94 - 2.12 (m, 4 H) 2.37 - 2.58 (m, 4 H) 2.59 - 2.65 (m, 1 H) 2.68 (dd, *J*=7.40, 2.26 Hz, 1 H) 2.77 (td, *J*=5.93, 2.32 Hz, 1 H) 3.01 - 3.30 (m, 4 H) 3.49 (s, 1 H) 3.54 - 3.67 (m, 2 H) 3.69 - 3.92 (m, 5 H) 4.13 - 4.78 (m, 11 H) 5.13 - 5.24 (m, 2 H) 5.48 - 5.61 (m, 1 H) 5.62 - 5.74 (m, 2 H) 6.04 - 6.13 (m, 1 H) 6.18 - 6.32 (m, 1 H)。

**ADL1-D9**

【1034】 採用通用程序 1 (如 1.3.1 部分中所略述)合成 ADL1-D9。



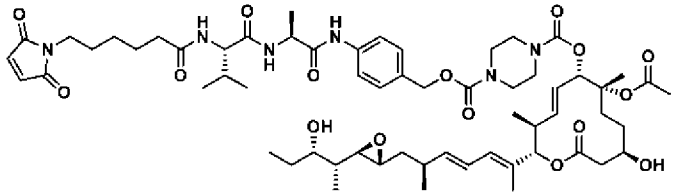
【1035】 **連接子-有效負載(ADL1-D9)**：(30.5 mg，0.024 mmol，77%產率)。LC/MS (ESI, m/z), 1263.8 $[M+H]^+$。

【1036】 $^1$H-NMR (400 MHz, MeOH-$d_4$): δ ppm 0.87 - 0.93 (m, 7 H) 0.93 - 1.01 (m, 8 H) 1.19 - 1.34 (m, 4 H) 1.50 (s, 3 H) 1.57 (s, 5 H) 1.58 - 1.70 (m, 6 H) 1.70 - 1.77 (m, 1 H) 1.78 (s, 3 H) 1.83 - 1.95 (m, 2 H) 2.04 (s, 3 H) 2.05 - 2.13 (m, 1 H) 2.27 (t, *J*=7.40 Hz, 2 H) 2.32 - 2.42 (m, 1 H) 2.50 (d, *J*=3.64 Hz, 2 H) 2.55 - 2.74 (m, 2 H) 2.90 (td, *J*=5.83, 2.26 Hz, 1 H) 3.03 - 3.26 (m, 2 H) 3.35 (s, 13 H) 3.42 - 3.61 (m, 11 H) 3.80 (br dd, *J*=9.85, 3.58 Hz, 1 H) 4.16 (d, *J*=7.40 Hz, 1 H) 4.50 (dd, *J*=8.91, 5.14 Hz, 1 H) 4.56 (s, 1 H) 5.05 (dd, *J*=14.37, 10.10 Hz, 2 H) 5.09 (s, 2 H) 5.49 (s, 1 H) 5.59 - 5.69 (m, 1 H) 5.72 - 5.80 (m, 1 H) 5.87 (d, *J*=15.18 Hz, 1 H) 6.09 - 6.22 (m, 1 H) 6.44 - 6.60 (m, 1 H) 7.32 (d,

*J*=8.66 Hz, 2 H) 7.58 (d, *J*=8.53 Hz, 2 H)。

**ADL6-D9**

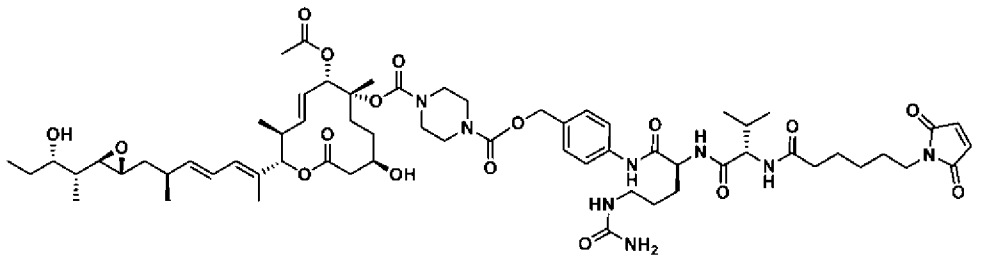
【1037】 採用通用程序 1 (如 1.3.1 部分中所略述)合成 ADL6-D9。



【1038】 **連接子-有效負載(ADL6-D9)**：向於 DMF (784 μL)中稀釋之碳酸 4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯胺基)-3-甲基丁醯胺基)丙醯胺基)苯甲酯(4-硝基苯基)酯(16.5 mg，0.025 mmol)中添加漢氏鹼(13.27 μL，0.076 mmol)。將反應混合物冷卻至 0℃，並添加 D9。在室溫下攪拌反應混合物，直至 LC/MS 顯示反應完成。真空濃縮反應混合物。在矽膠上，利用 DCM/MeOH 對殘餘物執行急驟層析，得到標題化合物(16.7 mg，57%產率)。LC/MS (ESI, m/z), 1184.6 $[M+Na]^+$。

【1039】 $^1$H-NMR (400 MHz, MeOH-$d_4$): δ ppm 0.80 - 1.02 (m, 16 H) 1.05 - 1.12 (m, 4 H) 1.13 - 1.34 (m, 5 H) 1.38 - 1.51 (m, 7 H) 1.53 - 1.68 (m, 11 H) 1.71 - 1.80 (m, 4 H) 1.97 - 2.16 (m, 4 H) 2.24 - 2.32 (m, 2 H) 2.32 - 2.42 (m, 1 H) 2.43 - 2.55 (m, 3 H) 2.56 - 2.69 (m, 3 H) 2.73 (br d, *J*=2.13 Hz, 1 H) 3.07 - 3.18 (m, 1 H) 3.42 - 3.61 (m, 17 H) 3.75 - 3.91 (m, 1 H) 4.11 - 4.24 (m, 1 H) 4.43 (s, 2 H) 5.59 - 5.88 (m, 4 H) 6.06 - 6.17 (m, 1 H) 6.29 - 6.39 (m, 1 H) 7.24 - 7.39 (m, 2 H) 7.52 - 7.64 (m, 2 H)。

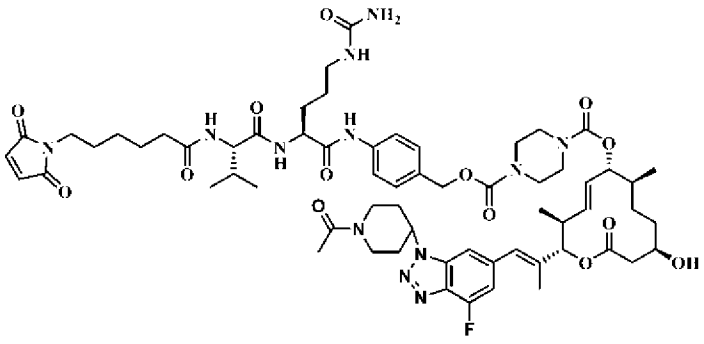
**ADL1-D13**



【1040】 **連接子-有效負載(AD1-D13)**：向於 DMF (176 μL，2.277 mmol)中之碳酸 4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯胺基)-3-甲基丁醯胺基)-5 脲基戊醯胺基)苯甲酯(4-硝基苯基)酯(4.2 mg，5.693 μmol)中添加漢氏鹼(2.98 μL，0.017 mmol)。將反應混合物冷卻至 0℃，並添加 D13 (4.06 mg，6.262 μmol)。在室溫下攪拌反應混合物，直至 LC/MS 顯示反應完成。真空濃縮反應混合物。在矽膠上，利用 DCM/MeOH 對殘餘物執行急驟層析，得到標題化合物(4.8 mg，68%產率)。LC/MS (ESI, m/z), 1248.0 $[M+H]^+$。

【1041】 $^1$H-NMR (400 MHz, $CHCl_3$-*d*): δ ppm 0.58 - 0.98 (m, 10 H) 0.99 - 1.06 (m, 2 H) 1.11 - 1.31 (m, 6 H) 1.57 - 1.75 (m, 3 H) 2.11 - 2.26 (m, 1 H) 2.30 - 2.73 (m, 2 H) 3.28 - 3.80 (m, 7 H) 4.14 - 4.33 (m, 1 H) 4.44 - 4.55 (m, 1 H) 4.63 - 4.81 (m, 1 H) 4.92 - 5.06 (m, 1 H) 5.09 (s, 1 H) 5.49 - 5.74 (m, 1 H) 5.88 - 6.09 (m, 1 H) 6.14 - 6.36 (m, 1 H) 6.99 - 7.08 (m, 1 H) 7.21 - 7.38 (m, 2 H) 7.53 - 7.67 (m, 1 H) 7.95 (s, 1 H)。

### 1.3.1.6 ADL1-D14

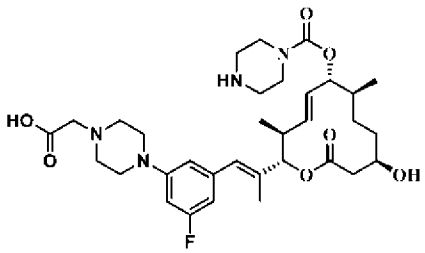


【1042】採用通用程序 1 (如 1.3.1 部分中所略述)合成哌嗪-1,4-二甲酸 1-((2S,3S,6R,7S,10R,E)-2-((E)-1-(1-(1-乙醯基哌啶-4-基)-4-氟-1H-苯并[d][1,2,3]三唑-6-基)丙-1-烯-2-基)-10-羥基-3,7-二甲基-12-側氧基氧雜環十二碳-4-烯-6-基)酯 4-(4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯胺基)-3-甲基丁醯胺基)-5-脲基戊醯胺基)苯甲基)酯(30 mg，0.024 mmol，39.2%產率)。LC/MS (ESI, m/z), 1254.5 $[M+H]^+$。

【1043】$^1$H-NMR (400 MHz, DMSO-$d_6$): δ ppm 0.75 - 1.00 (m, 12 H), 1.06 - 1.26 (m, 4 H), 1.26 - 1.77 (m, 13 H), 1.75 - 2.02 (m, 7 H), 2.08 (s, 8 H), 2.23 - 2.35 (m, 2 H), 2.54 - 2.70 (m, 2 H), 2.78 - 3.10 (m, 4 H), 3.36 (br s, 13 H), 3.66 - 3.79 (m, 1 H), 3.95 - 4.08 (m, 1 H), 4.11 - 4.25 (m, 1 H), 4.28 - 4.46 (m, 1 H), 4.46 - 4.58 (m, 1 H), 4.58 - 4.66 (m, 1 H), 4.66 - 4.77 (m, 1 H), 5.01 (s, 3 H), 5.14 - 5.27 (m, 1 H), 5.39 (s, 4 H), 5.71 - 5.79 (m, 1 H), 5.87 - 6.00 (m, 1 H), 6.63 - 6.75 (m, 1 H), 6.99 (s, 2 H), 7.13 - 7.24 (m, 1 H), 7.24 - 7.34 (m, 2 H), 7.52 - 7.62 (m, 2 H), 7.65 - 7.74 (m, 1 H), 7.75 - 7.82 (m, 1 H), 7.98 - 8.13 (m, 1 H)。

**1.3.1.7 ADL1-D33**

**D33**

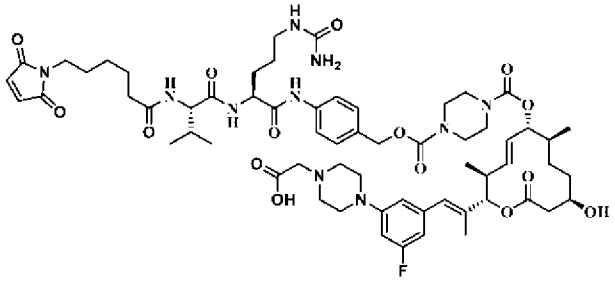



【1044】在 0℃下，向哌嗪-1-甲酸(2S,3S,6R,7S,10R,E)-2-((E)-1-(3-氟-5-(4-(2-甲氧基-2-側氧基乙基)哌嗪-1-基)苯基)丙-1-烯-2-基)-10-羥基-3,7-二甲基-12-側氧基氧雜環十二碳-4-烯-6-基酯(27 mg，0.042

mmol)於 THF/$H_2O$ (3 mL/1 mL)中之經攪拌溶液中添加 LiOH，並使反應混合物緩慢升溫至 25℃。使用國際申請案第 PCT/US2019/026992 號(參見例如程序 17 及 19)中略述之程序合成哌嗪-1-甲酸(2S,3S,6R,7S,10R,E)-2-((E)-1-(3-氟-5-(4-(2-甲氧基-2-側氧基乙基)哌嗪-1-基)苯基)丙-1-烯-2-基)-10-羥基-3,7-二甲基-12-側氧基氧雜環十二碳-4-烯-6-基酯，該案以引用之方式併入本文中。6 小時後，用磷酸鹽緩衝液($NaH_2PO_4$，1.0 M，3 mL)中和反應混合物並分離各相。用乙酸乙酯(3 × 2 mL)萃取水層，且合併之有機層用無水硫酸鈉乾燥並真空濃縮。反相管柱層析，得到標題化合物(19.4 mg，0.031 mmol，73.4%產率)。LC/MS (ESI, m/z), 631.4 $[M+H]^+$。

【1045】 $^1$H-NMR (400 MHz, $CHCl_3$-*d*): δ ppm 0.85 - 1.16 (m, 2 H) 1.23 - 1.52 (m, 1 H) 1.57 - 1.77 (m, 1 H) 1.87 (s, 1 H) 1.92 - 2.13 (m, 1 H) 2.35 - 2.55 (m, 1 H) 2.50 - 2.74 (m, 1 H) 3.11 (br s, 1 H) 3.36 - 3.54 (m, 2 H) 3.64 (br d, *J*=10.42 Hz, 2 H) 3.77 - 3.90 (m, 1 H) 4.76 (br s, 4 H) 5.07 - 5.19 (m, 1 H) 5.38 - 5.68 (m, 1 H) 6.40 - 6.76 (m, 1 H) 8.02 - 8.66 (m, 1 H)。

**ADL1-D33**

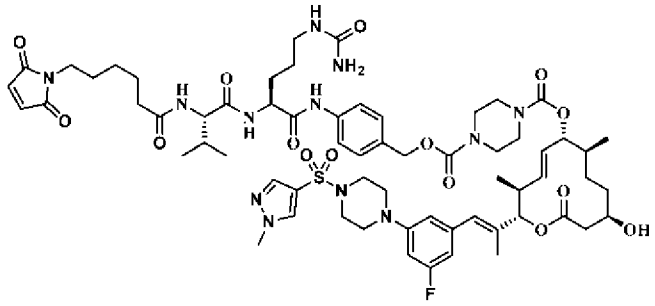


【1046】 **連接子-有效負載(ADL1-D33)**：向於 DMF (714 μL，9.217 mmol)中之碳酸 4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯胺基)-3-甲基丁醯胺基)-5-脲基戊醯胺基)苯甲酯(4-硝基苯基)

酯(17 mg，.023 mmol)中添加漢氏鹼(12.07 μL，0.069 mmol)。將反應混合物冷卻至 0℃，並添加 2-(4-(3-氟-5-((E)-2-((2S,3S,6R,7S,10R,E)-10-羥基-3,7-二甲基-12-側氧基-6-((哌嗪-1-羰基)氧基)氧雜環十二碳-4-烯-2-基)丙-1-烯-1-基)苯基)哌嗪-1-基)乙酸(16.71 mg，0.026 mmol)。在室溫下攪拌反應混合物，直至 LC/MS 顯示反應完成。接著，真空濃縮反應混合物。在矽膠上執行急驟層析且再執行 HPLC 純化，得到標題化合物(13.5 mg，10.98 μmol，47.7%產率)。LC/MS (ESI, m/z), 1229.5 $[M+H]^+$。

【1047】 $^1$H-NMR (400 MHz, MeOH-$d_4$): δ ppm 0.92 - 0.99 (m, 10 H) 1.01 (d, *J*=6.78 Hz, 3 H) 1.24 - 1.46 (m, 9 H) 1.52 - 1.70 (m, 10 H) 1.70 - 1.82 (m, 1 H) 1.87 (d, *J*=1.00 Hz, 4 H) 1.89 - 2.00 (m, 2 H) 2.01 - 2.23 (m, 2 H) 2.27 (t, *J*=7.40 Hz, 2 H) 2.46 (dd, *J*=14.31, 5.27 Hz, 1 H) 2.57 - 2.71 (m, 2 H) 2.86 (d, *J*=0.63 Hz, 1 H) 3.00 (s, 1 H) 3.06 - 3.27 (m, 4 H) 3.35 (s, 5 H) 3.41 - 3.53 (m, 19 H) 3.66 (s, 2 H) 3.76 - 3.90 (m, 1 H) 4.07 - 4.21 (m, 1 H) 4.39 - 4.69 (m, 37 H) 5.09 (s, 3 H) 5.13 (d, *J*=10.54 Hz, 1 H) 5.52 (dd, *J*=14.56, 9.03 Hz, 2 H) 6.55 (br s, 2 H) 6.69 (d, *J*=1.38 Hz, 2 H) 7.33 (d, *J*=8.66 Hz, 2 H) 7.59 (d, *J*=8.53 Hz, 2 H) 7.88 - 8.04 (m, 1 H) 8.16 - 8.33 (m, 1 H)。

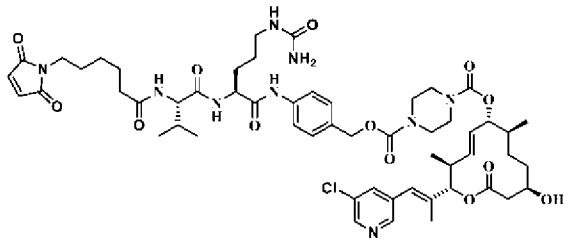
**ADL1-D28**



【1048】將碳酸 4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯胺基)-3-甲基丁醯胺基)-5-脲基戊醯胺基)苯甲酯(4-硝基苯基)酯(6.17 mg，8.37 μmol)及哌嗪-1-甲酸(2S,3S,6R,7S,10R,E)-2-((E)-1-(3-氟-5-(4-((1-甲基-1H-咪唑-4-基)磺醯基)哌嗪-1-基)苯基)丙-1-烯-2-基)-10-羥基-3,7-二甲基-12-側氧基氧雜環十二碳-4-烯-6-基酯(6 mg，8.37 μmol)溶解於 DMF (0.3 ml)中並添加漢氏鹼(4.39 μL，0.025 mmol)。在室溫下攪拌反應混合物隔夜。蒸發溶劑並進行反相 HPLC 純化，得到哌嗪-1,4-二甲酸(4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯胺基)-3-甲基丁醯胺基)-5-脲基戊醯胺基)苯甲基)酯 4-((2S,3S,6R,7S,10R,E)-2-((E)-1-(3-氟-5-(4-((1-甲基-1H-咪唑-4-基)磺醯基)哌嗪-1-基)苯基)丙-1-烯-2-基)-10-羥基-3,7-二甲基-12-側氧基氧雜環十二碳-4-烯-6-基)酯(1.5 mg，13.6%)。LC/MS (ESI, m/z), 1315.66 $[M+H]^+$。

【1049】$^1$H NMR (400 MHz, 甲醇-d4) d ppm 0.85 - 0.93 (m, 12 H) 1.16 - 1.31 (m, 6 H) 1.43 - 1.57 (m, 9 H) 1.62 - 1.70 (m, 1 H) 1.75 (s, 3 H) 1.77 - 1.90 (m, 2 H) 1.96 - 2.03 (m, 1 H) 2.13 - 2.20 (m, 2 H) 2.31 - 2.40 (m, 1 H) 2.46 - 2.55 (m, 2 H) 2.97 - 3.06 (m, 2 H) 3.08 - 3.10 (m, 1 H) 3.15 (br d, J=6.27 Hz, 9 H) 3.33 - 3.43 (m, 10 H) 3.71 (s, 4 H) 4.03 - 4.09 (m, 1 H) 4.37 - 4.44 (m, 1 H) 4.44 - 4.53 (m, 1 H) 4.96 - 5.06 (m, 3 H) 5.33- 5.51 (m, 2 H) 6.36 - 6.44 (m, 2 H) 6.45 - 6.53 (m, 2 H) 6.69 (s, 2 H) 7.19 - 7.25 (m, 2 H) 7.47 - 7.52 (m, 2 H) 7.63 - 7.70 (m, 2 H)

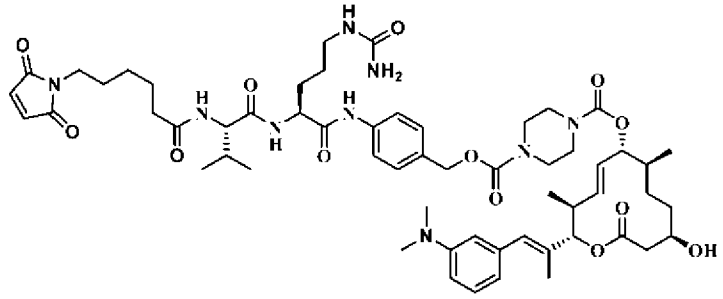
**ADL1-D31**



【1050】將碳酸 4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯胺基)-3-甲基丁醯胺基)-5-脲基戊醯胺基)苯甲酯(4-硝基苯基)酯(13.12 mg，.018 mmol)及哌嗪-1-甲酸(2S,3S,6R,7S,10R,E)-2-((E)-1-(5-氯吡啶-3-基)丙-1-烯-2-基)-10-羥基-3,7-二甲基-12-側氧基氧雜環十二碳-4-烯-6-基酯(9 mg，.018 mmol)溶解於 DMF (179 µl，2.312 mmol)中並添加漢氏鹼(9.32 µl，0.053 mmol)。在室溫下攪拌反應混合物隔夜。蒸發溶劑並經由反相 HPLC 純化，得到哌嗪-1,4-二甲酸 1-((2S,3S,6R,7S,10R,E)-2-((E)-1-(5-氯吡啶-3-基)丙-1-烯-2-基)-10-羥基-3,7-二甲基-12-側氧基氧雜環十二碳-4-烯-6-基)酯 4-(4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯胺基)-3-甲基丁醯胺基)-5-脲基戊醯胺基)苯甲基)酯(6.9 mg，34.09%)。LC/MS (ESI, m/z), 1105.59 $[M+H]^+$。

【1051】1H NMR (400 MHz, 甲醇-d4) d ppm 0.88 (s, 12 H) 1.17 - 1.31 (m, 4 H) 1.43 - 1.57 (m, 8 H) 1.61 - 1.70 (m, 1 H) 1.80 (d, J=1.25 Hz, 5 H), 1.92 - 2.01 (m, 1 H) 2.14 - 2.20 (m, 2 H) 2.32 - 2.42 (m, 1 H) 2.48 - 2.59 (m, 2 H) 2.96 - 3.14 (m, 3 H) 3.38 (s, 10 H) 3.36 - 3.36 (m, 1 H) 3.38 - 3.40 (m, 3 H) 3.67 - 3.75 (m, 1 H) 4.03 - 4.07 (m, 1 H) 4.37 - 4.42 (m, 1 H) 4.97 - 5.01 (m, 2 H) 5.04 - 5.11 (m, 1 H) 5.35 - 5.51 (m, 2 H) 6.46 - 6.52, (m, 1 H) 6.69 (s, 2 H) 7.18 - 7.26 (m, 2 H) 7.45 - 7.54 (m, 2 H) 7.68 - 7.74 (m, 1 H) 8.29 - 8.34 (m, 2 H)。

**ADL1-D29**

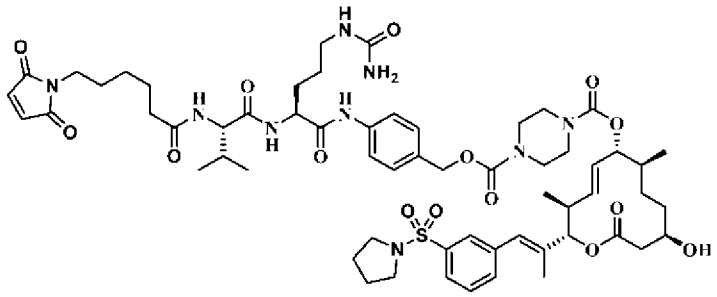


【1052】將碳酸 4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯胺基)-3-甲基丁醯胺基)-5-脲基戊醯胺基)苯甲酯(4-硝基苯基)酯(8.62 mg，0.012 mmol)及哌嗪-1-甲酸(2S,3S,6R,7S,10R,E)-2-((E)-1-(3-(二甲基胺基)苯基)丙-1-烯-2-基)-10-羥基-3,7-二甲基-12-側氧基氧雜環十二碳-4-烯-6-基酯(6 mg，0.012 mmol)溶解於 DMF (118 µl，1.518 mmol)及漢氏鹼(6.12 µl，0.035 mmol)中。在室溫下攪拌反應混合物隔夜。蒸發溶劑並經由反相 HPLC 純化，得到哌嗪-1,4-二甲酸 1-((2S,3S,6R,7S,10R,E)-2-((E)-1-(3-(二甲基胺基)苯基)丙-1-烯-2-基)-10-羥基-3,7-二甲基-12-側氧基氧雜環十二碳-4-烯-6-基)酯 4-(4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯胺基)-3-甲基丁醯胺基)-5-脲基戊醯胺基)苯甲基)酯(4.0 mg，30.79%)。LC/MS (ESI, m/z), 1112.59 $[M+H]^+$。

【1053】$^1$H NMR (400 MHz, 甲醇-$d_4$) δ ppm 0.87 (s, 12 H) 1.17 - 1.23 (m, 3 H) 1.26 - 1.32 (m, 1 H) 1.44 - 1.57 (m, 8 H) 1.63 - 1.69 (m, 1 H) 1.74 - 1.81 (m, 4 H) 1.83 - 1.88 (m, 1 H) 1.93 - 2.03 (m, 1 H) 2.13 - 2.20 (m, 2 H) 2.34 - 2.42 (m, 1 H) 2.48 - 2.57 (m, 2 H) 2.81 (s, 5 H) 2.98 - 3.05 (m, 2H) 3.08 - 3.14 (m, 1 H) 3.38 (br s, 9 H) 3.65 - 3.75 (m, 1 H) 4.03 - 4.07 (m, 1 H) 4.35 - 4.43 (m, 1 H) 4.44 - 4.52 (m, 1 H) 4.96 -

5.01 (m, 2 H) 5.02 - 5.08 (m, 1 H) 5.34 - 5.51 (m, 2 H) 6.43 - 6.48 (m, 1 H) 6.51 - 6.61 (m, 3 H) 6.69 (s, 2 H) 7.03 - 7.10 (m, 1 H) 7.20 - 7.26 (m, 2 H) 7.46 - 7.51 (m, 2H)。

**ADL1-D35**



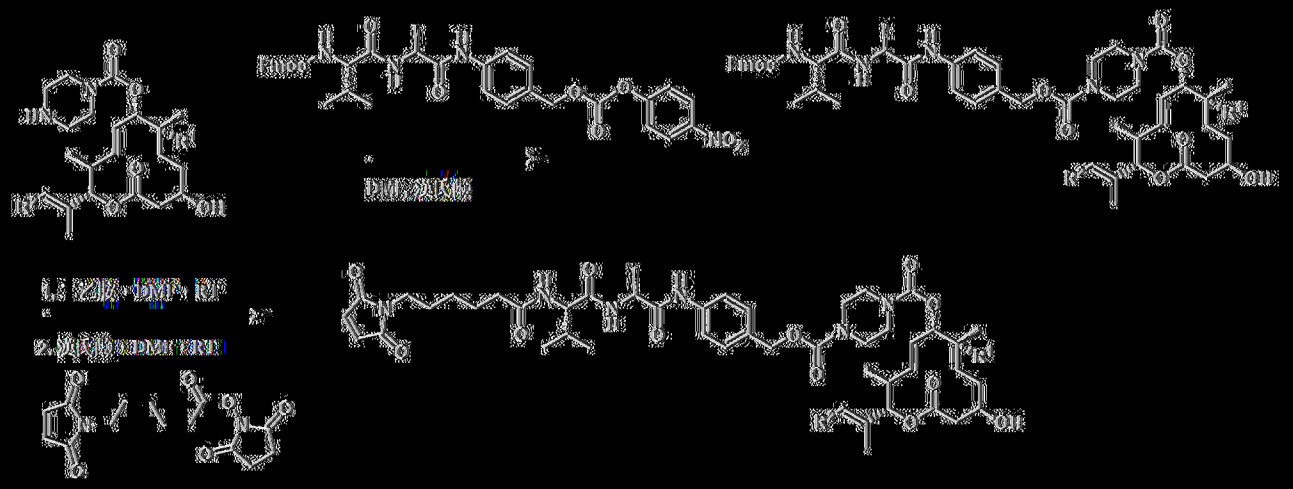
【1054】碳酸 4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯胺基)-3-甲基丁醯胺基)-5-脲基戊醯胺基)苯甲酯(4-硝基苯基)酯(9.78 mg，.013 mmol)及哌嗪-1-甲酸(2S,3S,6R,7S,10R,E)-10-羥基-3,7-二甲基-12-側氧基-2-((E)-1-(3-(吡咯啶-1-基磺醯基)苯基)丙-1-烯-2-基)氧雜環十二碳-4-烯-6-基酯(8 mg，0.013 mmol)溶解於 DMF (133 µl，1.722 mmol)中並添加漢氏鹼(6.94 µl，0.04 mmol) [兩滴]。在室溫下攪拌所得混合物隔夜，真空濃縮，並經由反相 HPLC 純化，得到產物哌嗪-1,4-二甲酸 1-(4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯胺基)-3-甲基丁醯胺基)-5-脲基戊醯胺基)苯甲基)酯 4-((2S,3S,6R,7S,10R,E)-10-羥基-3,7-二甲基-12-側氧基-2-((E)-1-(3-(吡咯啶-1-基磺醯基)苯基)丙-1-烯-2-基)氧雜環十二碳-4-烯-6-基)酯(8.2 mg，51.47%)。LC/MS (ESI, m/z), 1203.53 $[M+H]^+$。

【1055】1H NMR (400 MHz, 甲醇-d4) d ppm 0.85 - 0.93 (m, 12 H) 1.17 - 1.34 (m, 4 H) 1.42 - 1.57 (m, 8 H) 1.61 - 1.69 (m, 5 H) 1.79 (s, 4 H) 1.83 - 1.90 (m, 1 H) 1.94 - 2.03 (m, 1 H) 2.12 - 2.20 (m, 2 H) 2.33 -

2.43 (m, 1 H) 2.48 - 2.59 (m, 2 H) 2.96 - 3.05 (m, 2 H) 3.06 - 3.17 (m, 6 H) 3.31 -3.41 (m, 10 H) 3.67 - 3.77 (m, 1 H) 4.02 - 4.10 (m, 1 H) 4.36 - 4.43 (m, 1 H) 4.96 - 5.02 (m, 2 H) 5.04 - 5.11 (m, 1 H) 5.35 - 5.51 (m, 2 H) 6.59 (s, 1H) 6.69 (s, 2 H) 7.20 - 7.27 (m, 2 H) 7.45 - 7.52 (m, 4 H) 7.58 - 7.65 (m, 2 H)。

1.4 製備 MC-Val-Ala-pABC 連接子-有效負載

1.4.1 綜述



流程 5

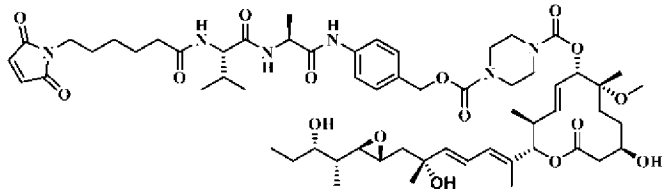
[1056] 步驟 1：將 I 環有效負載(1.0 當量)、DMF (0.1 M)、((S)-3-甲基-1-(((S)-1-((4-((((4-硝基苯氧基)羰基)氧基)甲基)苯基)胺基)-1-側氧基內-2-基)胺基)-1-側氧基丁-2-基)胺基甲酸(9H-芴-9-基)甲酯(1.5 當量；使用 WO 2012/153193 中所述之程序製備)及漢氏鹼(3.0 當量)組合並攪拌隔夜。將反應混合物濃縮至乾並層析分離，得到 fmocVal-Ala-pABC-有效負載。

[1057] 步驟 2：將溶解於 DMF (0.1 M)中之銨 fmoc-Val-Ala-pABC 有效負載(1.0 當量)及二乙胺(10 當量)組合並攪拌 30 分鐘。在高真空下將反應混合物濃縮至乾。將粗產物溶解於 DMF (0.1 M)中，並添加漢

氏鹼(2 當量)，之後，添加 6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己酸 2,5-二側氧基吡咯啶-1-基酯(3 當量)並攪拌隔夜。接著，將反應混合物濃縮至乾並層析分離(0-30% MeOH/DCM)，得到所需 MC-Val-Ala-pABC-有效負載。

#### 1.4.1.1 ADL6-110588

【1058】 **流程 5 - 步驟 1**：遵循以上略述之通用程序(1.4.1 部分)，得到哌嗪-1,4-二甲酸 1-(4-((S)-2-((S)-2-((((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)胺基)-3-甲基丁醯胺基)丙醯胺基)苯甲基)酯 4-((2S,3S,6S,7R,10R,E)-10-羥基-2-((R,2E,4E)-6-羥基-7-((2S,3S)-3-((2R,3S)-3-羥基戊-2-基)氧雜環丙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-7-甲氧基-3,7-二甲基-12-側氧基氧雜環十二碳-4-烯-6-基)酯(32 mg，0.027 mmol，27.9%產率)。LC/MS (ESI, m/z), $[M+Na]^+$ 1200.5。

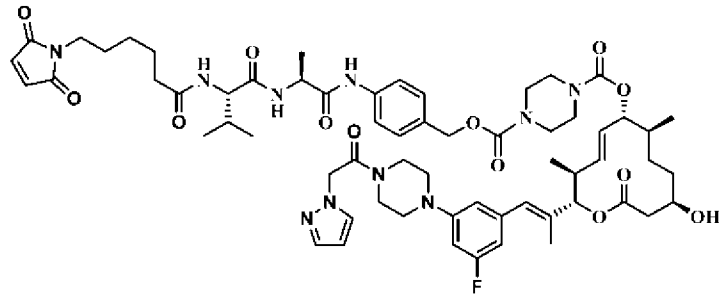


【1059】 **流程 5 - 步驟 2**：遵循以上略述之通用程序 (1.4.1 部分)，得到哌嗪-1,4-二甲酸 1-(4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯胺基)-3-甲基丁醯胺基)丙醯胺基)苯甲基)酯 4-((2S,3S,6S,7R,10R,E)-10-羥基-2-((R,2E,4E)-6-羥基-7-((2S,3S)-3-((2R,3S)-3-羥基戊-2-基)氧雜環丙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-7-甲氧基-3,7-二甲基-12-側氧基氧雜環十二碳-4-烯-6-基)酯(24 mg，0.021 mmol，77%產率)。LC/MS (ESI, m/z), 1149.2 $[M+H]^+$。

【1060】 $^1$H-NMR (400 MHz, MeOH-*d*4): δ ppm 0.85 - 1.02 (m, 16 H), 1.20 - 1.23 (m, 3 H) 1.23 - 1.32 (m, 3 H) 1.34 (s, 3 H) 1.41 - 1.46

(m, 4 H) 1.46 - 1.72 (m, 11 H) 1.78 (s, 3 H) 1.87 (dd, J=14.05, 5.40 Hz, 1 H) 2.08 (dq, J=13.77, 6.83 Hz, 1 H) 2.27 (t, J=7.40 Hz, 2 H) 2.43 - 2.63 (m, 3 H) 2.64 - 2.70 (m, 1 H) 2.90 (td, J=5.83, 2.26 Hz, 1 H) 3.32 - 3.33 (m, 4 H) 3.42 - 3.57 (m, 11 H) 3.82 (br dd, J=8.66, 3.89 Hz, 1 H) 4.15 (d, J=7.15 Hz, 1 H), 4.47 (q, J=7.15 Hz, 1 H) 4.99 - 5.12 (m, 4 H) 5.57 (dd, J=15.18, 9.79 Hz, 1 H) 5.69 - 5.78 (m, 1 H) 5.87 (d, J=15.18 Hz, 1 H) 6.13 (d, J=10.92 Hz, 1 H), 6.53 (dd, J=15.31, 10.92 Hz, 1 H) 6.78 (s, 2 H) 7.32 (d, J=8.53 Hz, 2 H) 7.58 (d, J=8.53 Hz, 2 H)。

**1.4.1.2 ADL6-D16**



【1061】 **流程 5 - 步驟 1**：遵循以上略述之通用程序(1.4.1 部分)，得到哌嗪-1,4-二甲酸 1-((2S,3S,6R,7S,10R,E)-2-((E)-1-(3-(4-(2-(1H-吡唑-1-基)乙醯基)哌嗪-1-基)-5-氟苯基)丙-1-烯-2-基)-10-羥基-3,7-二甲基-12-側氧基氧雜環十二碳-4-烯-6-基)酯 4-(4-((S)-2-((S)-2-((((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)胺基)-3-甲基丁醯胺基)丙醯胺基)苯甲基)酯(0.060 g，0.049 mmol，60.8%產率)。LC/MS (ESI, m/z), 1223.68 [M+H]。

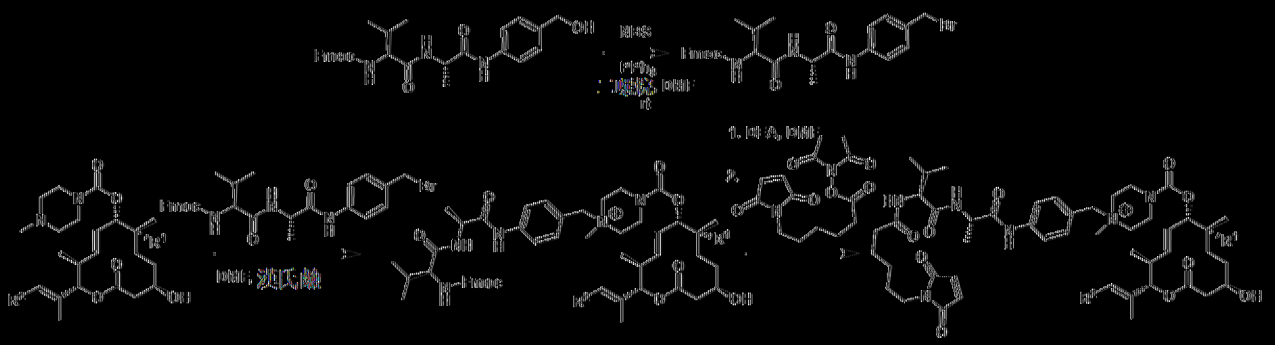
【1062】 **流程 5 - 步驟 2**：遵循以上略述之通用程序(1.4.1 部分)，得到哌嗪-1,4-二甲酸 1-((2S,3S,6R,7S,10R,E)-2-((E)-1-(3-(4-(2-(1H-吡唑-1-基)乙醯基)哌嗪-1-基)-5-氟苯基)丙-1-烯-2-基)-10-羥基-3,7-二甲基-12-側氧基氧雜環十二碳-4-烯-6-基)酯 4-(4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-二側氧

基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)乙醯胺基)-3-甲基丁醯胺基)丙醯胺基)苯甲基)酯(11.50 mg，9.64 μmol，12.05%產率)。LC/MS (ESI, m/z),1194.82 [M+H]⁺。

|(1063)| $^1$H-NMR (400 MHz, $CDCl_3$-*d*): δ ppm 0.97 (br d, J=1.25 Hz, 12 H), 1.24 - 1.41 (m, 5 H), 1.41 - 1.47(m, 3 H), 1.52 - 1.69 (m, 6 H), 1.84 - 1.90 (m, 3 H), 1.92 - 2.01 (m, 1 H), 2.02 - 2.16 (m, 1 H), 2.23 - 2.30 (m, 2 H), 2.42 - 2.51 (m, 1 H), 2.57 - 2.65 (m, 2 H), 3.19 - 3.28 (m, 4 H), 3.35 (s, 4 H), 3.40 - 3.54 (m, 11 H), 3.69 - 3.77 (m, 4 H), 3.78 - 3.85 (m, 1 H), 4.12 - 4.18 (m, 1 H), 4.43 - 4.51 (m, 1 H), 5.07 - 5.16 (m, 3 H), 5.20 (s, 2 H), 5.42 -5.62 (m, 2 H), 6.29 - 6.38 (m, 1 H), 6.46 - 6.58 (m, 2 H), 6.59 - 6.68 (m, 2 H), 7.28 - 7.37 (m, 2 H), 7.50 - 7.67 (m, 4 H)。

1.5 製備 MC-Val-Ala-pAB 連接子-有效負載

1.5.1 綜述




流程 6

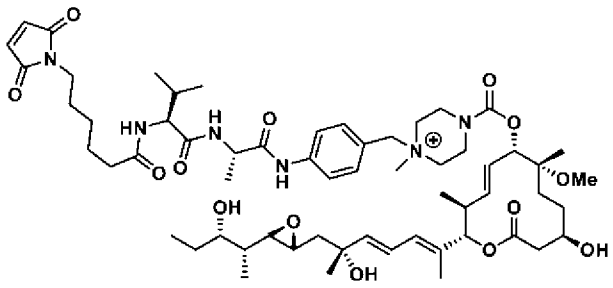
|(1064)| 步驟 1：將((S)-1-(((S)-1-((4-(羥基甲基)苯基)胺基)-1-側氧基丙-2-基)胺基)-3-甲基-1-側氧基丁-2-基)胺基甲酸(9H-茀-9-基)甲酯(0.5 g，0.97 mmol)、1,4-二噁烷(9.70 mL，0.97 mmol)、三苯基膦

(0.509 g，1.939 mmol)、N-溴代琥珀醯亞胺(0.345 g，1.939 mmol)及DMF (2.424 mL，0.97 mmol)組合並在室溫下攪拌 3 小時。濃縮反應混合物並層析分離，得到((S)-1-(((S)-1-((4-(溴甲基)苯基)胺基)-1-側氧基丙-2-基)胺基)-3-甲基-1-側氧基丁-2-基)胺基甲酸(9H-芴-9-基)甲酯(116 mg，0.201 mmol，20.68%產率)。LC/MS (ESI, m/z), 580.14 [M+H]。

【1065】 **步驟 2：**將有效負載(1.0 當量)、((S)-1-(((S)-1-((4-(溴甲基)苯基)胺基)-1-側氧基丙-2-基)胺基)-3-甲基-1-側氧基丁-2-基)胺基甲酸(9H-芴-9-基)甲酯(0.069 g，0.12 mmol)、N,N-二甲基甲醯胺(0.1 M)及漢氏鹼(1.5 當量)組合並攪拌隔夜。將反應混合物濃縮至乾並層析分離(0-10% MeOH/DCM)，得到四級銨 fmoc-Val-Ala-pAB 有效負載。

【1066】 **步驟 3：**將溶解於 DMF (0.1 M)中之四級銨 fmoc-Val-Ala-pAB 有效負載(1.0 當量)及二乙胺(10 當量)組合並攪拌 30 分鐘。在高真空下將反應混合物濃縮至乾。將粗產物溶解於 DMF (0.1 M)中並添加漢氏鹼(2 當量)，之後，添加 6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己酸 2,5-二側氧基吡咯啶-1-基酯(3 當量)並攪拌隔夜。接著，將反應混合物濃縮至乾並層析分離(0-30% MeOH/DCM)，得到所需四級銨連接子-有效負載。

### 1.5.1.1 ADL5-D2



【1067】 **流程 6 - 步驟 2：**溴化 1-(4-((S)-2-((S)-2-((((9H-芴-9-基)

甲氧基)羰基)胺基)-3-甲基丁醯胺基)丙醯胺基)苯甲基)-4-((((2S,3S,6S,7R,10R,E)-10-羥基-2-((R,2E,4E)-6-羥基-7-((2S,3S)-3-((2R,3S)-3-羥基戊-2-基)氧雜環丙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-7-甲氧基-3,7-二甲基-12-側氧基氧雜環十二碳-4-烯-6-基)氧基)羰基)-1-甲基哌嗪-1-鎓鹽(30 mg，0.024 mmol，26.5%產率)。LC/MS (ESI, m/z), 1149.77 $[M+H]^+$。

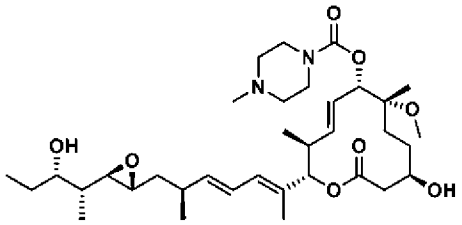
【1068】**流程 6 - 步驟 3：**單(1-(4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯胺基)-3-甲基丁醯胺基)丙醯胺基)苯甲基)-4-((((2S,3S,6S,7R,10R,E)-10-羥基-2-((R,2E,4E)-6-羥基-7-((2S,3S)-3-((2R,3S)-3-羥基戊-2-基)氧雜環丙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-7-甲氧基-3,7-二甲基-12-側氧基氧雜環十二碳-4-烯-6-基)氧基)羰基)-1-甲基哌嗪-1-鎓-2-離子)單溴化物(4.8 mg，15.33%產率)。LC/MS (ESI, m/z), 1120.99 $[M+H]^+$。

【1069】$^1$H-NMR (400 MHz, MeOH-*d*4): δ ppm 0.88 (s, 15 H), 1.09 - 1.26 (m, 9 H), 1.31 - 1.58 (m, 14 H), 1.42 - 1.44 (m, 1 H), 1.68 (s, 3 H), 1.73 - 1.81 (m, 1 H), 1.91 - 2.03 (m, 1 H), 2.14 - 2.22 (m, 2 H), 2.35 - 2.52 (m, 3 H), 2.53 - 2.60 (m, 1 H), 2.74 - 2.83 (m, 1 H), 2.97 (s, 3 H), 3.25 (s, 1 H), 3.28 - 3.46 (m, 8 H), 3.52 - 3.66 (m, 2 H), 3.70 - 3.78 (m, 1 H), 3.97 - 4.11 (m, 3 H), 4.32 - 4.41 (m, 1 H), 4.45 - 4.54 (m, 2 H), 4.91 - 5.01 (m, 2 H), 5.44 - 5.55 (m, 1 H), 5.57 - 5.70 (m, 1 H), 5.72 - 5.82 (m, 1 H), 6.00 - 6.08 (m, 1 H), 6.43 (dd, J=15.25, 10.98 Hz, 1 H), 6.69 (s, 2 H), 7.36 - 7.47 (m, 2 H), 7.67 -7.75 (m, 2 H)。

**1.5.1.2 ADL5-D19**

【1070】 採用以上略述之通用程序(1.5.1 部分)合成 ADL5-D19。有效負載 D19 係使用如 1.2.1 部分中所略述之程序合成。

**D19**



【1071】 4-甲基哌嗪-1-甲酸(2S,3S,6S,7R,10R,E)-10-羥基-2-((S,2E,4E)-7-((2R,3R)-3-((2R,3S)-3-羥基戊-2-基)氧雜環丙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-7-甲氧基-3,7-二甲基-12-側氧基氧雜環十二碳-4-烯-6-基酯(114.2 mg，0.180 mmol，82%產率)。LC/MS (ESI, m/z), 635.8 [M+H]。

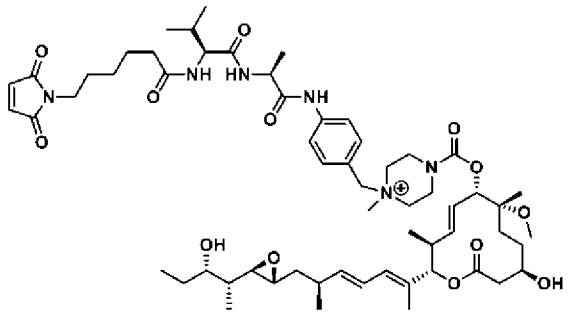
【1072】 $^1$H-NMR (400 MHz, MeOH-*d*4): δ ppm 0.88 - 1.00 (m, 9 H) 1.10 (d, *J*=6.65 Hz, 3 H) 1.16 - 1.27 (m, 4 H) 1.40 - 1.70 (m, 8 H) 1.77 (d, *J*=0.88 Hz, 3 H) 2.28 - 2.36 (m, 3 H) 2.42 (br t, *J*=5.08 Hz, 3 H) 2.47 - 2.61 (m, 4 H) 2.68 (dd, *J*=8.22, 2.20 Hz, 1 H) 2.74 (td, *J*=5.99, 2.20 Hz, 1 H) 3.13 -3.17 (m, 1 H) 3.34 - 3.38 (m, 3 H) 3.47 - 3.58 (m, 5 H) 3.81 - 3.87 (m, 1 H) 5.01 - 5.10 (m, 2 H) 5.54 - 5.81 (m, 3 H) 6.06 - 6.15 (m, 1 H) 6.34 (dd, *J*=15.00, 10.98 Hz, 1 H)。

【1073】 1-(4-((S)-2-((S)-2-((((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)胺基)-3-甲基丁醯胺基)丙醯胺基)苯甲基)-4-((((2S,3S,6S,7R,10R,E)-10-羥基-2-((S,2E,4E)-7-((2R,3R)-3-((2R,3S)-3-羥基戊-2-基)氧雜環丙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-7-甲氧基-3,7-二甲基-12-側氧基氧雜環十二碳-4-烯-6-基)氧基)羰基)-1-甲基哌嗪-1-鎓鹽(25 mg，45.6%)。LC/MS (ESI, m/z),

1133.1 [M+]$^+$。

【1074】 $^1$H-NMR (400 MHz, MeOH-*d*4): δ ppm 0.94 (br dd, *J*=18.45, 7.15 Hz, 18 H) 1.10 (d, *J*=6.78 Hz, 3 H) 1.25 (s, 4 H) 1.28 - 1.35 (m, 1 H) 1.46 (br d, *J*=7.03 Hz, 9 H) 1.59 - 1.70 (m, 2 H) 1.77 (s, 3 H) 2.05 - 2.12 (m, 1 H) 2.44 - 2.60 (m, 4 H) 2.63 - 2.72 (m, 1 H) 2.70 - 2.77 (m, 1 H) 3.06 (s, 3 H) 3.40 - 3.44 (m, 1 H) 3.50 (br d, *J*=1.63 Hz, 4 H) 3.64 - 3.75 (m, 1 H) 3.80 - 3.88 (m, 1 H) 3.91 - 3.99 (m, 1 H) 4.04 - 4.20 (m, 1 H) 4.21 - 4.28 (m, 1 H) 4.37 - 4.43 (m, 1 H) 4.59 (br s, 2 H) 4.93 - 4.95 (m, 2 H) 5.06 - 5.08 (m, 2 H) 5.57 - 5.80 (m, 4 H) 6.05 - 6.16 (m, 1 H) 6.27 - 6.41 (m, 1 H) 7.28 - 7.37 (m, 2 H) 7.38 - 7.45 (m, 2 H) 7.47 - 7.53 (m, 2 H) 7.65 - 7.72 (m, 2 H) 7.74 - 7.86 (m, 4 H)。

**ADL5-D19**

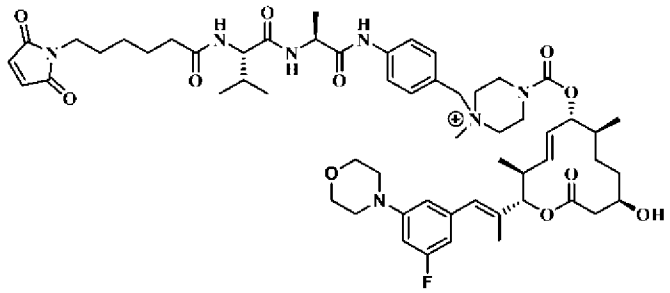


【1075】 **連接子-有效負載(ADL5-D19)**：1-(4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯胺基)-3-甲基丁醯胺基)丙醯胺基)苯甲基)-4-((((2S,3S,6S,7R,10R,E)-10-羥基-2-((S,2E,4E)-7-((2R,3R)-3-((2R,3S)-3-羥基戊-2-基)氧雜環丙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-7-甲氧基-3,7-二甲基-12-側氧基氧雜環十二碳-4-烯-6-基)氧基)羰基)-1-甲基哌嗪-1-鎓鹽(19.4 mg，0.018 mmol，80%產率)。LC/MS (ESI, m/z), 1105.9 [M+H]。

【1076】 $^1$H NMR (400 MHz, MeOH-*d*4): δ ppm 0.85 - 1.03 (m, 16 H) 1.10 (d, *J*=6.78 Hz, 3 H) 1.17 - 1.27 (m, 4 H) 1.29 - 1.37 (m, 3 H) 1.44 - 1.70, (m, 15 H) 1.74 - 1.80 (m, 3 H) 2.04 - 2.14 (m, 1 H) 2.30 (t, *J*=7.47 Hz, 2 H) 2.44 - 2.61 (m, 4 H) 2.64 - 2.69 (m, 1 H) 2.72 - 2.78 (m, 1 H) 3.09 (s, 3 H) 3.40 - 3.59 (m, 9 H) 3.62 - 3.77 (m, 2 H) 3.82 - 3.89 (m, 1 H) 4.12 - 4.21 (m, 3 H) 4.40 - 4.55 (m, 1 H) 4.56 - 4.66 (m, 3 H) 5.03 - 5.12 (m, 2 H) 5.55 - 5.81 (m, 3 H) 6.06 - 6.16 (m, 1 H) 6.26 - 6.41 (m, 1 H) 6.81 (s, 2 H) 7.48 - 7.57 (m, 2 H) 7.78 - 7.86 (m, 2 H)。

### 1.5.1.3 ADL5-D17

【1077】 採用以上略述之通用程序(1.5.1 部分)合成 ADL5-D17。有效負載 D17 係使用國際申請案第 PCT/US2019/026992 號(參見例如程序 2、程序 3 及程序 4 或 5)中略述之程序合成，該案以引用之方式併入本文中。



【1078】 **步驟 1：** 1-(4-((S)-2-((S)-2-((((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)胺基)-3-甲基丁醯胺基)丙醯胺基)苯甲基)-4-((((2S,3S,6R,7S,10R,E)-2-((E)-1-(3-氟-5-(N-嗎啉基)苯基)丙-1-烯-2-基)-10-羥基-3,7-二甲基-12-側氧基氧雜環十二碳-4-烯-6-基)氧基)羰基)-1-甲基哌嗪-1-鎓鹽(12.9 mg，69.8%)。LC/MS (ESI, m/z), 1086.43 [M+H]。

【1079】 $^1$H-NMR (400 MHz, MeOH-*d*4): δ ppm 0.96 - 1.07 (m, 12

H), 1.27 - 1.42 (m, 3 H), 1.46 (d, J=7.15 Hz, 3 H), 1.62 - 1.72 (m, 2 H), 1.88 (d, J=1.13 Hz, 3 H), 1.97 - 2.06 (m, 1 H), 2.04 - 2.14 (m, 1 H), 2.44 - 2.53 (m, 1 H), 2.58 - 2.69 (m, 2 H), 3.08 (s, 3 H), 3.13 - 3.19 (m, 4 H), 3.38 - 3.56 (m, 4 H), 3.61 - 3.75 (m, 2 H), 3.79 - 3.88 (m, 5 H), 3.90 - 3.98 (m, 1 H), 4.07 - 4.18 (m, 2 H), 4.20 - 4.29 (m, 1 H), 4.35 - 4.45 (m, 2 H), 4.45 - 4.54 (m, 1 H), 4.61 (s, 2 H), 4.86 - 4.92 (m, 2 H), 5.15 (d, J=10.67 Hz, 1 H), 5.46 - 5.65 (m, 2 H), 6.46 - 6.67 (m, 4 H), 7.28 - 7.37 (m, 2 H), 7.37 - 7.45 (m, 2 H), 7.47 - 7.53 (m, 2 H), 7.66 - 7.71 (m, 2 H), 7.74 - 7.84 (m, 4 H)。

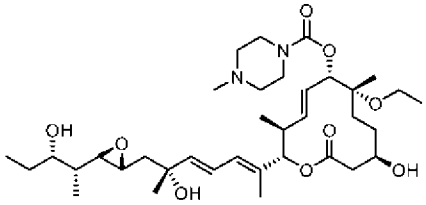
【1080】 **步驟 2**：溴化 1-(4-((R)-2-((R)-2-(6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯胺基)-3-甲基丁醯胺基)丙醯胺基)苯甲基)-4-((((2S,3S,6R,7S,10R,E)-2-((E)-1-(3-氟-5-(N-嗎啉基)苯基)丙-1-烯-2-基)-10-羥基-3,7-二甲基-12-側氧基氧雜環十二碳-4-烯-6-基)氧基)羰基)-1-甲基哌嗪-1-鎓鹽(7.6 mg，60.5%產率)。LC/MS (ESI, m/z), 1057.62 [M+H]。

【1081】 $^{1}$H-NMR (400 MHz, MeOH-*d*4): δ ppm 0.95 - 1.08 (m, 12 H), 1.24 - 1.42 (m, 5 H), 1.47 (d, J=7.15 Hz, 3 H), 1.52 - 1.71 (m, 6 H), 1.89 (d, J=1.13 Hz, 3 H), 1.95 - 2.05 (m, 1 H), 2.05 - 2.15 (m, 1 H), 2.26 - 2.34 (m, 2 H), 2.46 - 2.53 (m, 1 H), 2.58 - 2.69 (m, 2 H), 3.07 - 3.12 (m, 3 H), 3.14 -3.19 (m, 4 H), 3.39 - 3.58 (m, 6 H), 3.61 - 3.76 (m, 2 H), 3.80 - 3.86 (m, 5 H), 4.09 - 4.18 (m, 3 H), 4.43 - 4.51 (m, 1 H), 4.62 (s, 2 H), 4.87 - 4.93 (m, 2 H), 5.12 - 5.19 (m, 1 H), 5.46 - 5.65 (m, 2 H), 6.47 - 6.66 (m, 4 H), 6.80 (s, 2 H), 7.53 (d, J=8.66 Hz, 2 H), 7.82 (d,

J=8.66 Hz, 2 H)。

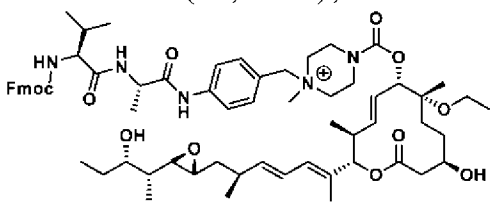
### 1.5.1.4 ADL5-D10

【1082】採用以上略述之通用程序(1.5.1 部分)合成 ADL5-D10。有效負載 D10 係使用如 1.2.1 部分中所略述之程序合成。



【1083】4-甲基哌嗪-1-甲酸(2S,3S,6S,7R,10R,E)-7-乙氧基-10-羥基-2-((R,2E,4E)-6-羥基-7-((2R,3R)-3-((2R,3S)-3-羥基戊-2-基)氧雜環丙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-3,7-二甲基-12-側氧基氧雜環十二碳-4-烯-6-基酯(16.6 mg，0.025 mmol，38.7%產率)。LC/MS (ESI, m/z), 665.7 $[M+H]^+$。

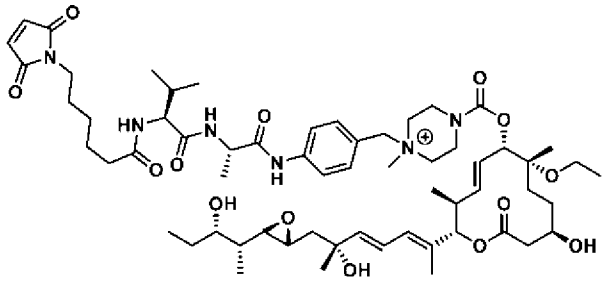
【1084】$^1$H-NMR (400 MHz, 甲醇-*d*): δ ppm 0.76 - 0.87 (m, 9 H), 1.03 - 1.09 (m, 3 H), 1.10 - 1.13 (m, 3 H) 1.13 - 1.19 (m, 1 H) 1.20 - 1.27 (m, 3 H), 1.29 - 1.48 (m, 6 H) 1.51 - 1.59 (m, 1 H) 1.65 - 1.71 (m, 3 H) 1.73 - 1.81 (m, 1 H) 2.20 (s, 3 H) , 2.27 - 2.34 (m, 4 H) 2.34 - 2.44 (m, 2 H) 2.44 - 2.53 (m, 1 H) 2.53 - 2.59 (m, 1 H) 2.76 - 2.83 (m, 1 H) 3.23 - 3.26 (m, 1 H) 3.34 - 3.52 (m, 7 H) 3.67 - 3.75 (m, 1 H) 4.86 - 4.92 (m, 1 H) 4.92 - 4.99 (m,1 H), 5.41 - 5.51 (m, 1 H), 5.60 - 5.71 (m, 1 H), 5.72 - 5.82 (m, 1 H), 6.00 - 6.07 (m, 1 H), 6.37 - 6.48 (m, 1 H)



【1085】**步驟 1**：呈無色釉狀之 1-(4-((S)-2-((S)-2-((((9H-芴-9-基)

甲氧基)羰基)胺基)-3-甲基丁醯胺基)丙醯胺基)苯甲基)-4-((((2S,3S,6S,7R,10R,E)-7-乙氧基-10-羥基-2-((R,2E,4E)-6-羥基-7-((2R,3R)-3-((2R,3S)-3-羥基戊-2-基)氧雜環丙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-3,7-二甲基-12-側氧基氧雜環十二碳-4-烯-6-基)氧基)羰基)-1-甲基哌嗪-1-鎓鹽(18.6 mg，0.016 mmol，87%產率)。LC/MS (ESI, m/z), 1163.01 $[M]^+$。

【1086】 $^1$H-NMR (400 MHz, MeOH-*d*4): δ ppm 0.86 - 1.03 (m, 16 H), 1.20 (s, 3 H), 1.25 (s, 4 H), 1.36 (s, 3 H), 1.43 - 1.72 (m, 10 H), 1.81 (s, 3 H), 1.84 -1.92 (m, 1 H), 2.06 - 2.14 (m, 1 H), 2.46 - 2.63 (m, 3 H), 2.67 - 2.72 (m, 1 H), 2.88 - 2.94 (m, 1 H), 3.03 - 3.09 (m, 3 H), 3.38 - 3.45 (m, 3 H), 3.54 (s, 6 H), 3.63 - 3.79 (m, 2 H), 3.81 - 3.88 (m, 1 H), 3.92 - 3.98 (m, 1 H), 4.07 - 4.18 (m, 2 H), 4.21 - 4.28 (m, 1 H), 4.36 - 4.44 (m, 2 H), 4.47 - 4.53 (m, 1 H), 4.55 - 4.63 (m, 3 H), 5.02 - 5.11 (m, 3 H), 5.56 - 5.66 (m, 1 H), 5.75 - 5.84 (m, 1 H), 5.86 - 5.92 (m, 1 H), 6.12 - 6.19 (m, 1 H), 6.49 - 6.61 (m, 1 H), 7.29 - 7.36 (m, 2 H), 7.38 - 7.44 (m, 2 H), 7.47 - 7.53 (m, 2 H), 7.64 - 7.71 (m, 2 H), 7.80 (dd, J=15.06, 7.91 Hz, 4 H)。



【1087】 **步驟 2**：1-(4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯胺基)-3-甲基丁醯胺基)丙醯胺基)苯甲基)-4-

((((2S,3S,6S,7R,10R,E)-7-乙氧基-10-羥基-2-((R,2E,4E)-6-羥基-7-((2R,3R)-3-((2R,3S)-3-羥基戊-2-基)氧雜環丙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-3,7-二甲基-12-側氧基氧雜環十二碳-4-烯-6-基)氧基)羰基)-1-甲基哌嗪-1-鎓鹽(14.09 mg，82%產率)。LC/MS (ESI, m/z), 1057.62 $[M+H]^+$。

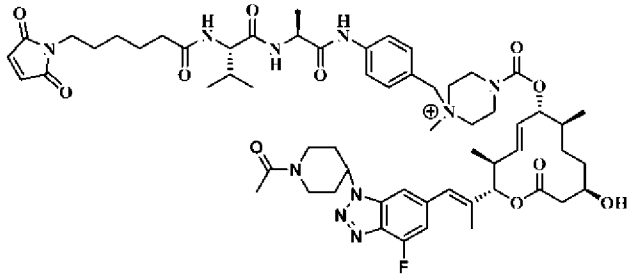
【1088】 $^1$H-NMR (400 MHz, MeOH-*d*4): δ ppm 0.87 - 1.03 (m, 15 H), 1.20 (s, 3 H), 1.22 - 1.29 (m, 4 H), 1.37 (s, 6 H), 1.45 - 1.72 (m, 14 H), 1.81 (s, 3 H), 1.84 - 1.95 (m, 1 H), 2.05 - 2.16 (m, 1 H), 2.26 - 2.36 (m, 2 H), 2.47 - 2.62 (m, 3 H), 2.66 - 2.74 (m, 1 H), 2.86 - 2.95 (m, 1 H), 3.11 (s, 3 H), 3.42 - 3.51 (m, 4 H), 3.51 - 3.62 (m, 5 H), 3.64 - 3.78 (m, 2 H), 3.81 - 3.89 (m, 1 H), 4.09 - 4.20 (m, 3 H), 4.43 - 4.52 (m, 1 H), 4.54 - 4.59 (m, 1 H), 4.55 - 4.67 (m, 2 H), 4.60 - 4.68 (m, 2 H), 5.01 - 5.12 (m, 2 H), 5.54 - 5.65 (m, 1 H), 5.75 - 5.86 (m, 1 H), 5.86 - 5.94 (m, 1 H), 6.10 - 6.21 (m, 1 H), 6.47 - 6.62 (m, 1 H), 6.81 (s, 2 H), 7.49 - 7.60 (m, 2 H) 7.76 - 7.89 (m, 2 H)。

**1.5.1.5 ADL5-D15**

【1089】 採用以上略述之通用程序(1.5.1 部分)合成 ADL5-D15。有效負載 D15 係使用國際申請案第 PCT/US2019/026992 號中略述之程序合成，該案以引用之方式併入本文中。

【1090】 **步驟 1**：1-(4-((S)-2-((S)-2-((((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)胺基)-3-甲基丁醯胺基)丙醯胺基)苯甲基)-4-((((2S,3S,6R,7S,10R,E)-2-((E)-1-(1-(1-乙醯基哌啶-4-基)-4-氟-1H-苯并[d][1,2,3]三唑-6-基)丙-1-烯-2-基)-10-羥基-3,7-二甲基-12-側氧基氧雜環十二碳-4-烯-6-基)氧基)羰

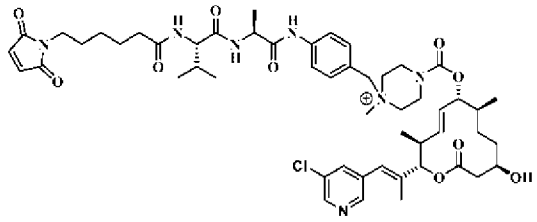
基)-1-甲基哌嗪-1-鎓鹽(100 mg，0.086 mmol，57.3%產率)。LC/MS (ESI, m/z), 1167.76 [M+H]。



【1091】**步驟 2**：4-((((2S,3S,6R,7S,10R,E)-2-((E)-1-(1-(1-乙醯基哌啶-4-基)-4-氟-1H-苯并[d][1,2,3]三唑-6-基)丙-1-烯-2-基)-10-羥基-3,7-二甲基-12-側氧基氧雜環十二碳-4-烯-6-基)氧基)羰基)-1-(4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯胺基)-3-甲基丁醯胺基)丙醯胺基)苯甲基)-1-甲基哌嗪-1-鎓鹽(32 mg，0.028 mmol，32.8%產率)。LC/MS (ESI, m/z), 1138.64 [M+H]。

【1092】$^{1}$H-NMR (400 MHz, MeOH-*d*4): δ ppm 0.99 (s, 10 H), 1.26 - 1.40 (m, 5 H), 1.42 - 1.49 (m, 3 H), 1.67 (br s, 6 H), 1.96 (d, J=1.00 Hz, 3 H), 2.00 - 2.13 (m, 2 H), 2.16 - 2.42 (m, 7 H), 2.44 - 2.55 (m, 1 H), 2.59 - 2.76 (m, 2 H), 2.98 - 3.26 (m, 4 H), 3.38 - 3.59 (m, 7 H), 3.60 - 3.76 (m, 2 H), 3.78 - 3.90 (m, 1 H), 4.13 (br d, J=7.15 Hz, 3 H), 4.41 - 4.52 (m, 1 H), 4.53 - 4.71 (m, 3 H), 4.89 - 4.97 (m, 1 H), 5.10 - 5.27 (m, 2 H), 5.48 - 5.67 (m, 2 H), 6.79 (s, 2 H) 7.07 - 7.17 (m, 1 H), 7.48 - 7.61 (m, 3 H), 7.78 - 7.84 (m, 2 H)。

### 1.5.1.5 ADL5-D32



【1093】 採用以上略述之通用程序(1.5.1 部分)合成 ADL5-D32。有效負載 D15 係使用國際申請案第 PCT/US2019/026992 號中略述之程序合成，該案以引用之方式併入本文中。

【1094】 **步驟 1**：1-(4-((S)-2-((S)-2-((((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)胺基)-3-甲基丁醯胺基)丙醯胺基)苯甲基)-4-((((2S,3S,6R,7S,10R,E)-2-((E)-1-(5-氯吡啶-3-基)丙-1-烯-2-基)-10-羥基-3,7-二甲基-12-側氧基氧雜環十二碳-4-烯-6-基)氧基)羰基)-1-甲基哌嗪-1-鎓鹽(15 mg，0.015 mmol，69.6%產率)LC/MS (ESI, m/z), 1018.4 $[M]^+$

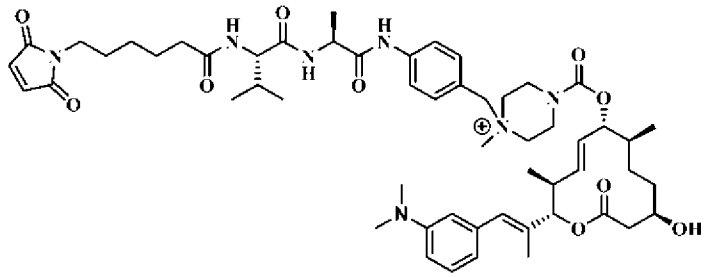
【1095】 1H NMR (400 MHz, 甲醇-d4) d ppm 0.99 (s, 14 H) 1.29 - 1.41 (m, 3 H) 1.44 - 1.49 (m, 3 H) 1.61 - 1.71 (m, 2 H) 1.92 (d, J=1.25 Hz, 3 H), 1.95 - 2.13 (m, 2 H) 2.45 - 2.53 (m, 1 H) 2.60 - 2.70 (m, 2 H) 3.04 - 3.09 (m, 3 H) 3.37 (s, 3 H) 3.39 - 3.47 (m, 1 H) 3.47 - 3.54 (m, 2 H) 3.61 - 3.75, (m, 2 H) 3.78 - 3.87 (m, 1 H) 3.93 - 3.99 (m, 1 H) 4.08 - 4.18 (m, 2 H) 4.22 - 4.29 (m, 1 H) 4.39 - 4.45 (m, 2 H) 4.45 - 4.53 (m, 1 H) 4.56 - 4.63 (m,3 H) 5.17 - 5.23 (m, 1 H) 5.48 - 5.64 (m, 2 H) 6.57 - 6.64 (m, 1 H) 7.28 - 7.36 (m,2 H) 7.37 - 7.45 (m, 2 H) 7.47 - 7.54 (m, 2 H) 7.64 - 7.70 (m, 2H) 7.75 - 7.84 (m, 5 H) 8.41 - 8.48 (m, 2 H)

【1096】 **步驟 2**：4-((((2S,3S,6R,7S,10R,E)-2-((E)-1-(5-氯吡啶-3-基)丙-1-烯-2-基)-10-羥基-3,7-二甲基-12-側氧基氧雜環十二碳-4-烯-6-基)氧基)羰基)-1-(4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯胺基)-3-甲基丁醯胺基)丙醯胺基)苯甲基)-1-甲基哌嗪-1-鎓鹽(6.2 mg，42.5%產率)。LC/MS (ESI, m/z), 990.34 [M+H]。

【1097】 1H NMR (400 MHz, 甲醇-d4) d ppm 0.97 - 1.09 (m, 12

H) 1.24 - 1.41 (m, 5 H) 1.47 (d, J=7.15 Hz, 3 H) 1.55 - 1.71 (m, 6 H) 1.92 (d, J=1.13 Hz, 3 H) 1.98 - 2.15 (m, 2 H) 2.27 - 2.36 (m, 2 H) 2.46 - 2.53 (m, 1 H) 2.60 - 2.71 (m, 2 H) 3.06 - 3.13 (m, 3 H) 3.35 - 3.38 (m, 1 H) 3.41 - 3.58 (m, 6 H) 3.62 - 3.76 (m, 2 H) 3.80 - 3.88 (m, 1 H) 4.08 - 4.19 (m, 3 H) 4.43 - 4.52 (m, 1 H) 4.57 - 4.66 (m, 2 H) 5.16 - 5.24 (m, 1 H) 5.49 - 5.68, (m, 2 H) 6.62 (s, 1 H) 6.81 (s, 2 H) 7.49 - 7.57 (m, 2 H) 7.76 - 7.87 (m, 3 H) 8.39 - 8.49 (m, 2 H)

**1.5.1.5 ADL5-D30**



【1098】 採用以上略述之通用程序(1.5.1 部分)合成 ADL5-D30。有效負載 D30 係使用國際申請案第 PCT/US2019/026992 號中略述之程序合成，該案以引用之方式併入本文中。

【1099】 **步驟 1**：1-(4-((S)-2-((S)-2-((((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)胺基)-3-甲基丁醯胺基)丙醯胺基)苯甲基)-4-((((2S,3S,6R,7S,10R,E)-2-((E)-1-(3-(二甲基胺基)苯基)丙-1-烯-2-基)-10-羥基-3,7-二甲基-12-側氧基氧雜環十二碳-4-烯-6-基)氧基)羰基)-1-甲基哌嗪-1-鎓鹽(16 mg，0.016 mmol，51.4%產率)。LC/MS (ESI, m/z), 1027.50 $[M+H]^+$

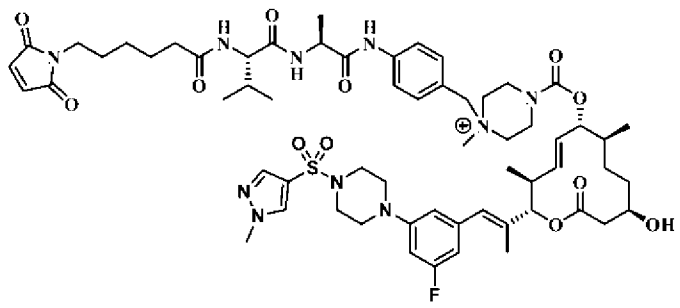
【1100】 1H NMR (400 MHz, 甲醇-$d_4$) d ppm 0.95 - 1.07 (m, 13 H) 1.31 - 1.42 (m, 2 H) 1.44 - 1.50 (m, 3 H) 1.63 - 1.71 (m, 2 H) 1.84 - 1.92 (m, 3H) 1.98 - 2.14 (m, 2 H) 2.47 - 2.56 (m, 1 H) 2.60 - 2.67 (m, 2

H) 2.93 (s, 6 H) 3.03 - 3.09 (m, 3 H) 3.37 (s, 4 H) 3.47 - 3.56 (m, 2 H) 3.63 - 3.75 (m, 2 H) 3.79 - 3.88 (m, 1 H) 3.92 - 3.98 (m, 1 H) 4.08 - 4.19 (m, 2 H) 4.21 - 4.27 (m, 1 H) 4.37 - 4.44 (m, 2 H) 4.45 - 4.54 (m, 1 H) 4.57 - 4.62 (m, 2H) 4.91 - 4.94 (m, 2 H) 5.15 - 5.20 (m, 1 H) 5.47 - 5.55 (m, 1 H) 5.56 - 5.65 (m, 1 H) 6.58 (s, 1 H) 6.67 (d, J=1.51 Hz, 3 H) 7.15 - 7.24 (m, 1 H), 7.28 - 7.36 (m, 2 H) 7.38 - 7.45 (m, 2 H) 7.47 - 7.54 (m, 2 H) 7.64 - 7.73 (m, 2 H) 7.75 - 7.85 (m, 4 H)

【1101】 **步驟 2**：4-((((2S,3S,6R,7S,10R,E)-2-((E)-1-(5-氯吡啶-3-基)丙-1-烯-2-基)-10-羥基-3,7-二甲基-12-側氧基氧雜環十二碳-4-烯-6-基)氧基)羰基)-1-(4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯胺基)-3-甲基丁醯胺基)丙醯胺基)苯甲基)-1-甲基哌嗪-1-鎓鹽(6.2 mg，42.5%產率)。LC/MS (ESI, m/z), 990.34 [M+H]。

【1102】 1H NMR (400 MHz, 甲醇-d4) d ppm 0.88 (d, J=6.65 Hz, 12 H) 1.16 - 1.30 (m, 4 H) 1.32 - 1.38 (m, 3 H) 1.43 - 1.58 (m, 6 H) 1.75 - 1.80, (m, 3 H) 1.84 - 1.92 (m, 1 H) 1.93 - 2.02 (m, 1 H) 2.14 - 2.21 (m, 2 H) 2.35 - 2.42 (m, 1 H) 2.48 - 2.57 (m, 2 H) 2.82 (s, 6 H) 2.94 - 3.02 (m, 3 H), 3.27 - 3.32 (m, 1 H) 3.35 - 3.45 (m, 4 H) 3.50 - 3.64 (m, 2 H) 3.68 - 3.76 (m, 1 H) 3.97 - 4.07 (m, 3 H) 4.31 - 4.40 (m, 1 H) 4.47 - 4.53 (m, 2 H) 5.03- 5.09 (m, 1 H) 5.35 - 5.44 (m, 1 H) 5.45 - 5.55 (m, 1 H) 6.42 - 6.50 (m, 1 H) 6.51 - 6.62 (m, 3 H) 6.69 (s, 2 H) 7.03 - 7.12 (m, 1 H) 7.38 - 7.44 (m, 2H) 7.66 - 7.75 (m, 2 H) 8.42 - 8.47 (m, 1 H)。

### 1.5.1.5 ADL5-D27



【1103】 採用以上略述之通用程序(1.5.1 部分)合成 ADL5-D27。有效負載 D27 係使用國際申請案第 PCT/US2019/026992 號中略述之程序合成，該案以引用之方式併入本文中。

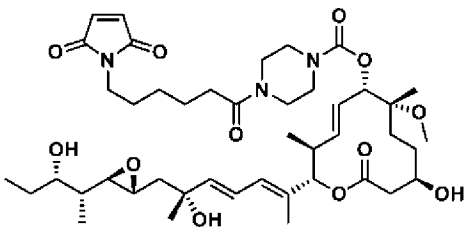
【1104】 **步驟 1**：1-(4-((S)-2-((S)-2-((((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)胺基)-3-甲基丁醯胺基)丙醯胺基)苯甲基)-4-((((2S,3S,6R,7S,10R,E)-2-((E)-1-(3-氟-5-(4-((1-甲基-1H-吡唑-4-基)磺醯基)哌嗪-1-基)苯基)丙-1-烯-2-基)-10-羥基-3,7-二甲基-12-側氧基氧雜環十二碳-4-烯-6-基)氧基)羰基)-1-甲基哌嗪-1-鎓鹽(25.2 mg，0.020 mmol，83%產率)。LC/MS (ESI, m/z), 1230.54 $[M+H]^+$

**步驟 2**：1-(4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯胺基)-3-甲基丁醯胺基)丙醯胺基)苯甲基)-4-((((2S,3S,6R,7S,10R,E)-2-((E)-1-(3-氟-5-(4-((1-甲基-1H-吡唑-4-基)磺醯基)哌嗪-1-基)苯基)丙-1-烯-2-基)-10-羥基-3,7-二甲基-12-側氧基氧雜環十二碳-4-烯-6-基)氧基)羰基)-1-甲基哌嗪-1-鎓鹽(5.2 mg，4.33 μmol，21.13%產率)。LC/MS (ESI, m/z), 1201.68 $[M+H]^+$

【1105】 $^1$H NMR (400 MHz, 甲醇-$d_4$) d ppm 0.87 (d, J=6.78 Hz, 12 H) 1.13 - 1.29 (m, 4 H) 1.31 - 1.38 (m, 3 H) 1.43 - 1.59 (m, 6 H) 1.71 - 1.79, (m, 3 H) 1.83 - 2.02 (m, 2 H) 2.14 - 2.21 (m, 2 H) 2.34 - 2.41 (m, 1 H) 2.56 (s, 8 H) 2.94 - 3.01 (m, 3 H) 3.12 - 3.18 (m, 8 H) 3.28 - 3.45

(m, 5 H), 3.48 - 3.63 (m, 2 H) 3.70 (s, 4 H) 3.97 - 4.07 (m, 3 H) 4.29 - 4.41 (m, 1 H) 4.49 (s, 2 H) 4.98 - 5.06 (m, 1 H) 5.34 - 5.54 (m, 2 H) 6.37 - 6.45 (m, 2H) 6.51 (s, 2 H) 6.69 (s, 2 H) 7.37 - 7.43 (m, 2 H) 7.63 - 7.73 (m, 4 H)

**1.5.1.6 ADL10-D1**



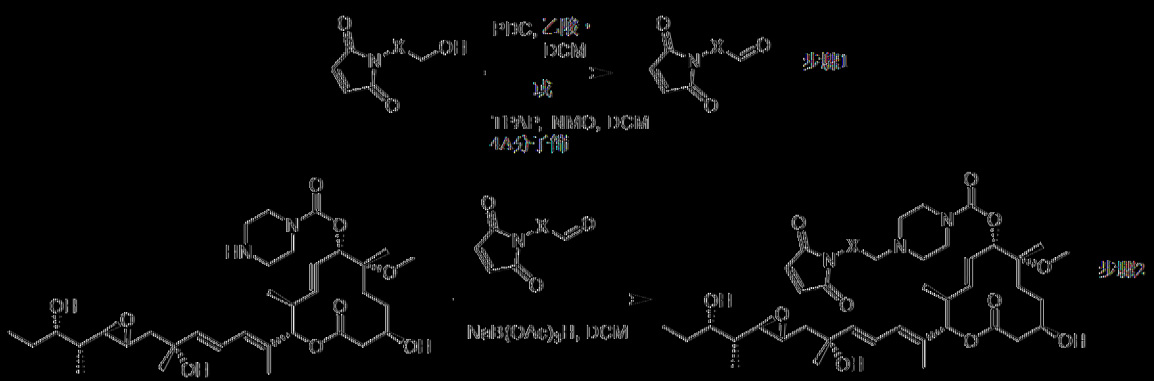
【1106】將哌嗪-1-甲酸(2S,3S,6S,7R,10R,E)-10-羥基-2-((R,2E,4E)-6-羥基-7-((2S,3S)-3-((2R,3S)-3-羥基戊-2-基)氧雜環丙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-7-甲氧基-3,7-二甲基-12-側氧基氧雜環十二碳-4-烯-6-基酯(0.012 g，0.019 mmol)、6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己酸 2,5-二側氧基吡咯啶-1-基酯(0.012 g，0.038 mmol)及 DCM (0.188 ml，0.019 mmol)組合並攪拌隔夜。將混合物直接裝載至矽膠管柱上並層析分離，得到 4-(6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯基)哌嗪-1-甲酸(2S,3S,6S,7R,10R,E)-10-羥基-2-((R,2E,4E)-6-羥基-7-((2S,3S)-3-((2R,3S)-3-羥基戊-2-基)氧雜環丙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-7-甲氧基-3,7-二甲基-12-側氧基氧雜環十二碳-4-烯-6-基酯(8.4 mg，10.12 μmol，53.7%產率)。LC/MS [M+Na] 853.5。

【1107】$^{1}$H-NMR (400 MHz, MeOH-*d*4): δ ppm 0.89 (s, 9 H) 1.21 - 1.39 (m, 9 H) 1.41 - 1.56 (m, 5 H) 1.57 - 1.71 (m, 6 H) 1.69 - 1.71 (m, 1 H) 1.79, (d, J=0.88 Hz, 3 H) 1.82 - 1.90 (m, 1 H) 2.34 - 2.43 (m, 1 H) 2.41 - 2.41 (m, 1 H) 2.46 - 2.63 (m, 3 H) 2.65 - 2.68 (m, 2 H) 2.68 (s, 3

H) 2.86 – 2.92 (m, 1 H) 3.33 (s, 3 H) 3.51 (br d, J=7.03 Hz, 6 H) 3.54 – 3.60 (m, 5 H) 3.77 – 3.88 (m, 1 H) 5.06 (s, 2 H) 5.53 – 5.63 (m, 1 H) 5.70 – 5.80 (m, 1 H), 5.83 – 5.94 (m, 1 H) 6.08 – 6.19 (m, 1 H) 6.47 – 6.59 (m, 1 H) 6.80 (s, 2 H)。

1.6 製備 ADL12-D1、ADL14-D1 及 ADL15-D1

1.6.1 綜述 – 通用程序 1



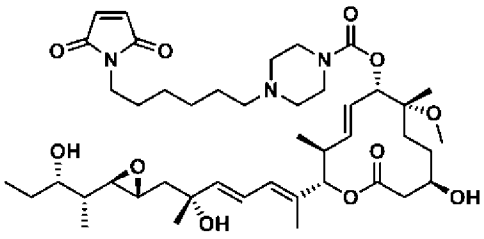

流程 7

[1108] 對於 ADL12-D1 – 步驟 1：向 1-(6-羥基-1H-吡咯-2,5-二酮(0.200 g，1.014 mmol)於 DCM (20.28 mL，1.014 mmol)中之經攪拌溶液中添加 PDC (3.81 g，10.14 mmol)及乙酸(0.1 mL)。在室溫下攪拌反應混合物 3 小時。接著，經二氧化矽墊過濾反應混合物並濃縮至乾，得到 6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醛(40 mg，0.205 mmol，20.21%產率)。

[1109] 對於 ADL14-D1 及 ADL15-D1 – 步驟 1：向順丁烯二醯亞胺醇(1.0 當量)於 DCM (0.05 M)中之經攪拌溶液中依序添加預活化之粉末狀 MS-4A 2.6 mg/1 mg 醇、N-甲基嗎啉-N-氧化物(1.2 當量)及 TPAP (0.1 當量)。在室溫下攪拌反應混合物 60 分鐘。接著，經矽膠墊過濾反應混合物並濃縮至乾。未純化之產物直接用於下一步驟(步驟 2)。

【1110】 **步驟 2**：將哌嗪-1-甲酸(2S,3S,6S,7R,10R,E)-10-羥基-2-((R,2E,4E)-6-羥基-7-((2S,3S)-3-((2R,3S)-3-羥基戊-2-基)氧雜環丙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-7-甲氧基-3,7-二甲基-12-側氧基氧雜環十二碳-4-烯-6-基酯(1.0 當量)、2-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)乙醛(2.0-3.0 當量)、DCM (0.1 M)、三乙醯氧基硼氫化鈉(3.0 當量)混合並攪拌 10 分鐘。接著，將反應混合物直接裝載至矽膠管柱上並層析分離，得到所需連接子-有效負載。

### 1.6.1.1 ADL12-D1

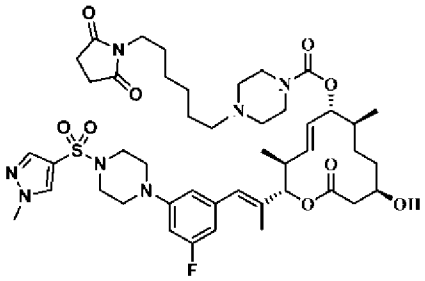


【1111】 **連接子-有效負載(ADL12-D1)**：採用如 1.6.1 部分中所略述之通用程序合成 4-(6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己基)哌嗪-1-甲酸(2S,3S,6S,7R,10R,E)-10-羥基-2-((R,2E,4E)-6-羥基-7-((2S,3S)-3-((2R,3S)-3-羥基戊-2-基)氧雜環丙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-7-甲氧基-3,7-二甲基-12-側氧基氧雜環十二碳-4-烯-6-基酯(41 mg，0.050 mmol，80%產率)。LC/MS $[M+]^+$ 816.75。

【1112】 $^1$H-NMR (400 MHz, MeOH-*d*4): δ ppm 0.86 - 0.98 (m, 9 H) 1.20 - 1.23 (m, 3 H) 1.23 - 1.40 (m, 8 H) 1.41 - 1.70 (m, 12 H) 1.79 (d, J=0.63 Hz, 3 H) 1.83 - 1.91 (m, 1 H) 2.33 - 2.40 (m, 2 H) 2.43 (br t, J=4.77 Hz, 4 H) 2.48 - 2.64 (m, 3 H) 2.65 - 2.69 (m, 1 H) 2.87 - 2.92 (m, 1 H) 3.32 (s, 3 H) 3.41 - 3.60 (m, 7 H) 3.79 - 3.87 (m, 1 H) 5.04 (dd, J=19.39, 10.23 Hz, 2 H) 5.57 (dd, J=15.18, 9.79 Hz, 1 H) 5.69 - 5.79 (m,

1 H) 5.87 (d, J=15.31 Hz, 1 H) 6.11 - 6.17 (m, 1 H) 6.49 - 6.58 (m, 1 H) 6.80 (s, 2 H)。

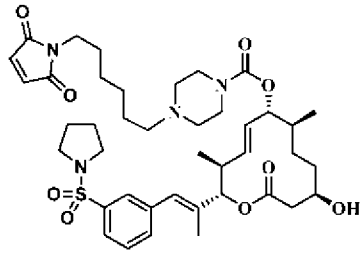
**1.6.1.X ADL12-D28**



【1113】 **連接子-有效負載(ADL12-D28)**：採用如 1.6.1 部分中所略述之通用程序合成 4-(6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己基)哌嗪-1-甲酸(2S,3S,6R,7S,10R,E)-2-((E)-1-(3-氟-5-(4-((1-甲基-1H-吡唑-4-基)磺醯基)哌嗪-1-基)苯基)丙-1-烯-2-基)-10-羥基-3,7-二甲基-12-側氧基氧雜環十二碳-4-烯-6-基酯(2.3 mg，30.7%)。LC/MS $[M+]^+$ 897.32

【1114】 $^1$H NMR (400 MHz, 甲醇-$d_4$) δ ppm 0.85 - 0.93 (m, 6 H) 1.16 - 1.34 (m, 6 H) 1.37 - 1.58 (m, 6 H) 1.72 - 1.77 (m, 3 H) 1.80 - 1.88 (m, 1 H), 2.23 - 2.41 (m, 7 H) 2.47 - 2.57 (m, 2 H) 3.08 - 3.19 (m, 9 H) 3.33 - 3.42 (m, 5 H) 3.70 (s, 4 H) 4.67 - 4.72 (m, 1 H) 4.98 - 5.07 (m, 1 H) 5.33 - 5.50 (m, 2 H) 6.36 - 6.43 (m, 2 H) 6.44 - 6.53 (m, 2 H) 6.70 (s, 2 H) 7.62 - 7.69 (m, 2 H)

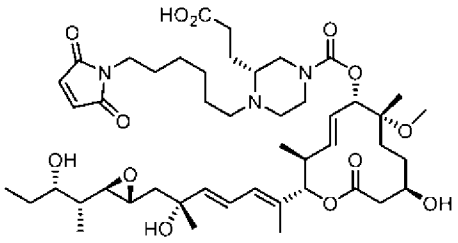
**1.6.1.X ADL12-D35**



【1115】 **連接子-有效負載(ADL12-D35)**：採用如 1.6.1 部分中所略述之通用程序合成 4-(6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己基)哌嗪-1-甲酸(2S,3S,6R,7S,10R,E)-10-羥基-3,7-二甲基-12-側氧基-2-((E)-1-(3-(吡咯啶-1-基磺醯基)苯基)丙-1-烯-2-基)氧雜環十二碳-4-烯-6-基酯(4.0 mg，5.11 μmol，28.8%產率)。LC/MS $[M+H]^+$ 783.5

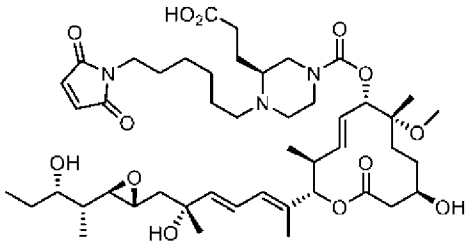
【1116】 1H NMR (400 MHz, 甲醇-*d*4) d ppm 0.91 (dd, *J*=6.78, 2.51 Hz, 6 H) 1.17 - 1.33 (m, 6 H) 1.38 - 1.59 (m, 6 H) 1.65 (s, 4 H) 1.80 (s, 3 H), 1.82 - 1.91 (m, 1 H) 2.23 - 2.41 (m, 7 H) 2.49 - 2.61 (m, 2 H) 3.14 (s, 4 H) 3.38 (br d, *J*=7.15 Hz, 6 H) 3.67 - 3.76 (m, 1 H) 4.68 - 4.73 (m, 1 H) 5.03 - 5.11 (m, 1 H) 5.34 - 5.52 (m, 2 H) 6.55 - 6.62 (m, 1 H) 6.70 (s, 2 H) 7.46 - 7.54 (m, 2 H) 7.58 - 7.65 (m, 2 H)

**1.6.1.X ADL12-D22 (R)**



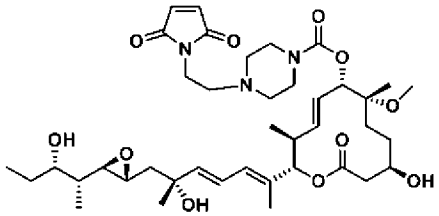
【1117】 **連接子-有效負載(ADL12-D28)**：採用如 1.6.1 部分中所略述之通用程序合成 3-((R)-1-(6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己基)-4-((((2S,3S,6S,7R,10R,E)-10-羥基-2-((R,2E,4E)-6-羥基-7-((2R,3R)-3-((2R,3S)-3-羥基戊-2-基)氧雜環丙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-7-甲氧基-3,7-二甲基-12-側氧基氧雜環十二碳-4-烯-6-基)氧基)羰基)哌嗪-2-基)丙酸(3.2 mg，3.60 μmol，15.39%產率)。LC/MS $[M+]^+$ 888.5

**1.6.1.X ADL12-D22**



【1118】 **連接子-有效負載(ADL12-D28)**：採用如 1.6.1 部分中所略述之通用程序合成 3-((S)-1-(6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己基)-4-((((2S,3S,6S,7R,10R,E)-10-羥基-2-((R,2E,4E)-6-羥基-7-((2R,3R)-3-((2R,3S)-3-羥基戊-2-基)氧雜環丙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-7-甲氧基-3,7-二甲基-12-側氧基氧雜環十二碳-4-烯-6-基)氧基)羰基)哌嗪-2-基)丙酸(3.6 mg，3.60 μmol，28.7%產率)。LC/MS $[M+]^+$ 888.56

**1.6.1.2 ADL14-D1**

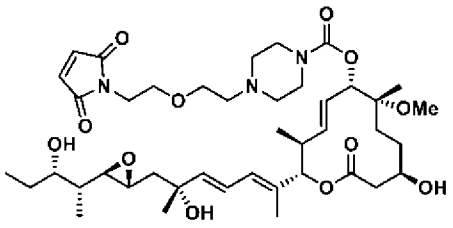


【1119】 **連接子-有效負載(ADL14-D1)**：採用如 1.6.1 部分中所略述之通用程序合成 4-(2-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)乙基)哌嗪-1-甲酸(2S,3S,6S,7R,10R,E)-10-羥基-2-((R,2E,4E)-6-羥基-7-((2S,3S)-3-((2R,3S)-3-羥基戊-2-基)氧雜環丙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-7-甲氧基-3,7-二甲基-12-側氧基氧雜環十二碳-4-烯-6-基酯(8 mg，10.53 μmol，33.5%產率)。LC/MS [M+H] 760.3。

【1120】 $^1$H-NMR (400 MHz, MeOH-*d*4): δ ppm 0.85 - 1.01 (m, 9 H), 1.17 - 1.33 (m, 5 H), 1.36 (s, 3 H), 1.41 - 1.71 (m, 7 H), 1.80 (s, 3 H), 1.83 - 1.95 (m, 1 H), 2.48 (br s, 10 H), 2.89 - 2.98 (m, 1 H), 3.40 - 3.57 (m, 5 H), 3.61 - 3.72 (m, 2 H), 3.78 - 3.91 (m, 1 H), 4.98 - 5.14 (m,

2 H), 5.50 - 5.52 (m, 1 H), 5.52 - 5.65 (m, 1 H), 5.69 - 5.82 (m, 1 H), 5.86 - 5.96 (m, 1 H), 6.09 - 6.21 (m, 1 H), 6.47 - 6.60 (m, 1 H), 6.79 - 6.90 (m, 2 H)。

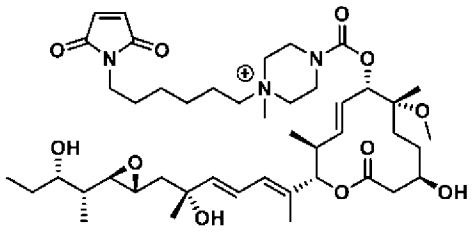
### 1.6.1.3 ADL15-D1



【1121】 **連接子-有效負載(ADL15-D1)**：採用如 1.6.1 部分中所略述之通用程序合成 4-(2-(2-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)乙氧基)乙基)哌嗪-1-甲酸(2S,3S,6S,7R,10R,E)-10-羥基-2-((R,2E,4E)-6-羥基-7-((2S,3S)-3-((2R,3S)-3-羥基戊-2-基)氧雜環丙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-7-甲氧基-3,7-二甲基-12-側氧基氧雜環十二碳-4-烯-6-基酯(7 mg，8.71 μmol，23.10%產率)。LC/MS [M=+H] 804.1。

【1122】 $^{1}$H-NMR (400 MHz, MeOH-*d*4): δ ppm 0.85 - 1.02 (m, 9 H), 1.18 - 1.32 (m, 4 H), 1.36 (s, 3 H), 1.40 - 1.72 (m, 7 H), 1.78 - 1.83 (m, 3 H), 1.85 - 1.93 (m, 1 H), 2.42 - 2.65 (m, 9 H), 2.67 - 2.73 (m, 1 H), 2.89 - 2.96 (m, 1 H), 3.37 (s, 5 H), 3.41 - 3.58 (m, 5 H), 3.59 - 3.67 (m, 4 H), 3.68 - 3.75 (m, 2 H), 3.81 - 3.89 (m, 1 H), 4.94 - 5.15 (m, 2 H), 5.61 (br d, J=10.04 Hz, 1 H), 5.69 - 5.82 (m, 1 H), 5.89 (br d, J=15.18 Hz, 1 H), 6.16 (br d, J=10.92 Hz, 1 H), 6.56 (br s, 1 H), 6.77 - 6.91 (m, 2 H)。

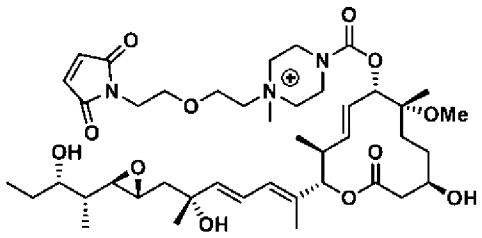
### 1.7 ADL12-D2



【1123】將 4-(6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己基)哌嗪-1-甲酸(2S,3S,6S,7R,10R,E)-10-羥基-2-((R,2E,4E)-6-羥基-7-((2S,3S)-3-((2R,3S)-3-羥基戊-2-基)氧雜環丙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-7-甲氧基-3,7-二甲基-12-側氧基氧雜環十二碳-4-烯-6-基酯(26 mg，0.032 mmol)、乙腈(319 μL，.032 mmol)、碘甲烷(19.92 μL，.319 mmol)組合並攪拌隔夜。將反應混合物濃縮至乾並層析分離(0-30% MeOH/DCM)，得到 1-(6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己基)-4-((((2S,3S,6S,7R,10R,E)-10-羥基-2-((R,2E,4E)-6-羥基-7-((2S,3S)-3-((2R,3S)-3-羥基戊-2-基)氧雜環丙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-7-甲氧基-3,7-二甲基-12-側氧基氧雜環十二碳-4-烯-6-基)氧基)羰基)-1-甲基哌嗪-1-鎓鹽(14 mg，0.017 mmol，52.9%產率)。LC/MS [M+] 831.6。

【1124】$^{1}$H-NMR (400 MHz, MeOH-d4): δ ppm 0.86 - 0.98 (m, 9 H) 1.26 (s, 4 H) 1.36 (s, 3 H) 1.40 - 1.58 (m, 9 H) 1.60 - 1.71 (m, 4 H) 1.80 (d, J=0.88 Hz, 4 H) 1.85 - 1.91 (m, 1 H) 1.87 - 1.88 (m, 1 H) 2.48 - 2.63 (m, 3 H) 2.65 - 2.72 (m, 1 H) 2.88 - 2.94 (m, 1 H) 3.18 (s, 3 H) 3.34 - 3.41 (m, 3 H) 3.53 (s, 10 H) 3.73 - 3.90 (m, 3 H) 3.90 - 4.06 (m, 2 H) 5.02 - 5.11 (m, 2 H) 5.56 - 5.66 (m, 1 H) 5.70 - 5.81 (m, 1 H) 5.84 - 5.94 (m, 1 H) 6.11 - 6.20 (m, 1 H) 6.50 - 6.60 (m, 1 H) 6.83 (s, 2 H)。

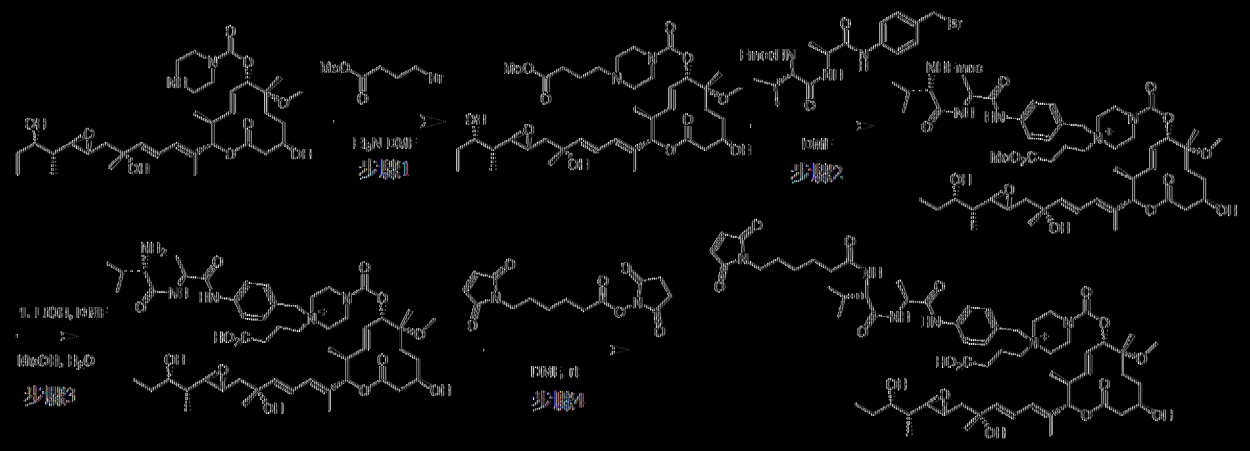
**1.8 ADL15-D2**



【1125】將 4-(2-(2-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)乙氧基)乙基)哌嗪-1-甲酸(2S,3S,6S,7R,10R,E)-10-羥基-2-((R,2E,4E)-6-羥基-7-((2S,3S)-3-((2R,3S)-3-羥基戊-2-基)氧雜環丙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-7-甲氧基-3,7-二甲基-12-側氧基氧雜環十二碳-4-烯-6-基酯(6 mg，7.463 μmol)、碘甲烷(0.467 μL，7.463 μmol)及乙腈(0.390 μL，7.463 μmol)組合並在室溫下攪拌。將反應混合物濃縮至乾，得到 4-(2-(2-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)乙氧基)乙基)-4-甲基-414-哌嗪-1-甲酸(2S,3S,6S,7R,10R,E)-10-羥基-2-((R,2E,4E)-6-羥基-7-((2S,3S)-3-((2R,3S)-3-羥基戊-2-基)氧雜環丙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-7-甲氧基-3,7-二甲基-12-側氧基氧雜環十二碳-4-烯-6-基酯(6 mg，7.33 μmol，98%產率)。LC/MS $[M+]^+$ 819.28。

【1126】$^1$H-NMR (400 MHz, MeOH-*d*4): δ ppm 0.74 - 0.88 (m, 9 H) 1.18 (br d, *J*=4.27 Hz, 5 H) 1.23 - 1.27 (m, 3 H) 1.28 - 1.49 (m, 5 H) 1.51 - 1.61 (m, 2 H) 1.66 - 1.71 (m, 3 H) 1.73 - 1.80 (m, 1 H) 2.36 - 2.53 (m, 3 H) 2.55 - 2.60 (m, 1 H) 2.78 - 2.83 (m, 1 H) 3.10 - 3.14 (m, 3 H) 3.23 - 3.25 (m, 3 H) 3.32 - 3.51 (m, 5 H) 3.52 - 3.67 (m, 6 H) 3.67 - 3.87 (m, 7 H) 4.93 - 5.01 (m, 2 H) 5.44 - 5.55 (m, 1 H) 5.61 - 5.70 (m, 1 H) 6.00 - 6.07 (m, 1 H) 6.38 - 6.48 (m, 1 H) 6.75 (s, 2 H)。

**1.9 ADL5-D25**




流程 8

[1127] 步驟 1：將 D1 (40 mg，0.063 mmol)溶解於 N,N-二甲基甲醯胺(730 µl，9.422 mmol)中並添加溴丁酸甲酯(23.69 µL，0.188 mmol)，隨後添加三乙胺(35.0 µL，0.251 mmol)。在室溫下攪拌溶液 2 天。蒸發溶劑。藉由管柱層析法純化，得到呈無色油狀之 4-(4-甲氧基-4-側氧基丁基)哌啶-1-甲酸(2S,3S,6S,7R,10R,E)-10-羥基-2-((R,2E,4E)-6-羥基-7-((2R,3R)-3-((2R,3S)-3-羥基戊-2-基)氧雜環丙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-7-甲氧基-3,7-二甲基-12-側氧基氧雜環十二碳-4-烯-6-基酯(51 mg，0.069 mmol，約 100%產率)。LC/MS (ESI, m/z), 737.4 [M+H]+。

[1128] $^1$H-NMR (400 MHz, MeOH-*d4*): δ ppm 0.76 - 0.86 (m, 9 H), 1.12 (s, 3 H), 1.14-1.19 (m, 1 H), 1.24 (s, 3 H), 1.34-1.50 (m, 5 H), 1.52-1.60 (m, 1 H), 1.69 (s, 6 H), 2.27 (s, 8 H), 2.37-2.49 (m, 3 H), 2.54-2.61 (m, 1 H), 2.77-2.83 (m, 1 H), 3.35-3.47 (m, 5 H), 3.56 (s, 3 H), 3.67-3.76 (m, 1 H), 4.46 (s, 3 H), 4.89-5.00 (m, 3 H), 5.42-5.52 (m, 1 H), 5.57-5.70 (m, 1 H), 5.73-5.81 (m, 1 H), 5.98-6.08 (m, 1 H), 6.43 (dd, *J* =15.25, 10.98 Hz, 1 H)。

【1129】**步驟 2**：使 Fmoc-ValAla-PAB 溴化物(88 mg，0.152 mmol)及 4-(4-甲氧基-4-側氧基丁基)哌嗪-1-甲酸(2S,3S,6S,7R,10R,E)-10-羥基-2-((R,2E,4E)-6-羥基-7-((2R,3R)-3-((2R,3S)-3-羥基戊-2-基)氧雜環丙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-7-甲氧基-3,7-二甲基-12-側氧基氧雜環十二碳-4-烯-6-基酯(51 mg，0.069 mmol)懸浮於 N,N-二甲基甲醯胺(670 μL，8.651 mmol)中。在室溫下攪拌反應隔夜。蒸發溶劑。藉由管柱層析法純化，得到呈蠟樣固體狀之 1-(4-((S)-2-((S)-2-((((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)胺基)-3-甲基丁醯胺基)丙醯胺基)苯甲基)-4-((((2S,3S,6S,7R,10R,E)-10-羥基-2-((R,2E,4E)-6-羥基-7-((2R,3R)-3-((2R,3S)-3-羥基戊-2-基)氧雜環丙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-7-甲氧基-3,7-二甲基-12-側氧基氧雜環十二碳-4-烯-6-基)氧基)羰基)-1-(4-甲氧基-4-側氧基丁基)哌嗪-1-鎓鹽(42 mg，0.034 mmol，49.1%產率)。LC/MS (ESI, m/z), 1235.4 $[M]^+$。

【1130】**步驟 3**：將 1-(4-((S)-2-((S)-2-((((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)胺基)-3-甲基丁醯胺基)丙醯胺基)苯甲基)-4-((((2S,3S,6S,7R,10R,E)-10-羥基-2-((R,2E,4E)-6-羥基-7-((2R,3R)-3-((2R,3S)-3-羥基戊-2-基)氧雜環丙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-7-甲氧基-3,7-二甲基-12-側氧基氧雜環十二碳-4-烯-6-基)氧基)羰基)-1-(4-甲氧基-4-側氧基丁基)哌嗪-1-鎓鹽(42 mg，0.034 mmol)溶解於 5:2:1 比率之 THF (600 μL，7.322 mmol)、MeOH (250 μL，6.179 mmol)、水(125 μL，6.939 mmol)中，並添加氫氧化鋰(1.221 mg，0.051 mmol)。在室溫下攪拌混合物 1 小時。用乙酸(5.84 μL，0.102 mmol)淬滅混合物並蒸發溶劑，且藉由 RP HPLC 純化，得到呈蠟樣固體狀之 1-(4-((S)-2-((S)-2-胺基-3-甲基丁醯胺基)丙

醯胺基)苯甲基)-1-(3-羧基丙基)-4-((((2S,3S,6S,7R,10R,E)-10-羥基-2-((R,2E,4E)-6-羥基-7-((2R,3R)-3-((2R,3S)-3-羥基戊-2-基)氧雜環丙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-7-甲氧基-3,7-二甲基-12-側氧基氧雜環十二碳-4-烯-6-基)氧基)羰基)哌嗪-1-鎓鹽(18.4 mg，0.018 mmol，54.2%產率)。LC/MS (ESI, m/z), 998.5 $[M]^+$。

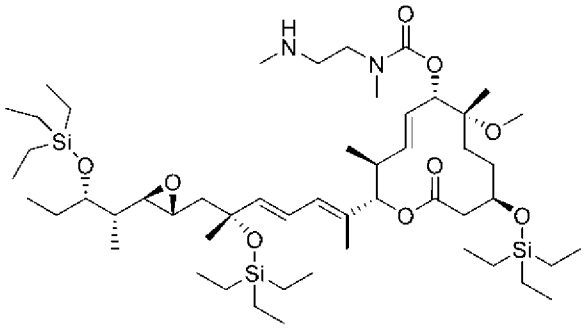
【1131】**步驟 4**：將 1-(4-((S)-2-((S)-2-胺基-3-甲基丁醯胺基)丙醯胺基)苯甲基)-1-(3-羧基丙基)-4-((((2S,3S,6S,7R,10R,E)-10-羥基-2-((R,2E,4E)-6-羥基-7-((2R,3R)-3-((2R,3S)-3-羥基戊-2-基)氧雜環丙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-7-甲氧基-3,7-二甲基-12-側氧基氧雜環十二碳-4-烯-6-基)氧基)羰基)哌嗪-1-鎓鹽(18.4 mg，0.018 mmol)溶解於 N,N-二甲基甲醯胺(356 μL，4.603 mmol)中並添加 6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己酸 2,5-二側氧基吡咯啶-1-基酯(6.81 mg，0.022 mmol)，隨後添加漢氏鹼(8.04 μL，0.046 mmol)。在室溫下攪拌反應溶液 30 分鐘。蒸發溶劑且粗產物藉由 RP HPLC 純化，得到呈白色凍乾固體狀之(1-(3-羧基丙基)-1-(4-((S)-2-((R)-2-(6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯胺基)-3-甲基丁醯胺基)丙醯胺基)苯甲基)-4-((((2S,3S,6S,7R,10R,E)-10-羥基-2-((R,2E,4E)-6-羥基-7-((2R,3R)-3-((2R,3S)-3-羥基戊-2-基)氧雜環丙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-7-甲氧基-3,7-二甲基-12-側氧基氧雜環十二碳-4-烯-6-基)氧基)羰基)哌嗪-1-鎓鹽(8.8 mg，7.38 μmol，40.1%產率)。LC/MS (ESI, m/z), 1191.5 $[M]^+$。

【1132】$^1$H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*6): δ ppm 0.68-0.81 (m, 18 H), 0.98-1.07 (m, 4 H), 1.07-1.14 (m, 3 H), 1.16 (br d, *J*=3.89 Hz, 5 H), 1.22-1.33 (m, 8 H), 1.36-1.47 (m, 7 H), 1.62 (s, 3 H) 1.66-1.73 (m, 1 H),

1.83-1.92 (m, 5 H), 1.98-2.13 (m, 2 H), 2.26 (dt, *J*=3.54, 1.80 Hz, 1 H), 2.27-2.33 (m, 1 H), 2.47-2.51 (m, 2 H), 2.58-2.62 (m, 1 H), 2.66-2.72 (m, 1 H), 3.15 (s, 3 H) 3.45-3.58 (m, 3 H), 3.60-3.68 (m, 2 H) 3.77-3.86 (m, 2 H), 4.06-4.13 (m, 1 H), 4.27-4.37 (m, 2 H), 4.46-4.54 (m, 3 H), 4.72-4.78 (m, 1 H), 4.80-4.87 (m, 2 H), 5.32-5.48 (m, 1 H), 5.53-5.67 (m, 1 H), 5.73-5.86 (m, 1 H), 5.93-6.05 (m, 1 H), 6.16-6.26 (m, 1 H), 6.20 (s, 1 H), 6.23-6.41 (m, 1 H), 6.27-6.38 (m, 1 H), 6.93 (s, 2 H), 6.98-7.06 (m, 2 H), 7.43-7.50 (m, 2 H), 7.62-7.69 (m, 2 H), 7.74-7.80 (m, 1 H), 8.22-8.27 (m, 1 H), 8.44-8.49 (m, 4 H), 10.15-10.22 (m, 1 H)。

**1.10 ADL12-D20 及 ADL12-D21**

【1133】採用如 1.2.1 部分中所略述之通用程序 1 合成 D20。

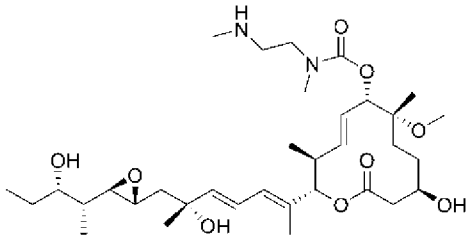


【1134】呈無色油狀之甲基(2-(甲基胺基)乙基)胺基甲酸(2S,3S,6S,7R,10R,E)-7-甲氧基-3,7-二甲基-2-((R,2E,4E)-6-甲基-6-((三乙基矽烷基)氧基)-7-((2R,3R)-3-((2S,3S)-3-((三乙基矽烷基)氧基)戊-2-基)氧雜環丙烷-2-基)庚-2,4-二烯-2-基)-12-側氧基-10-((三乙基矽烷基)氧基)氧雜環十二碳-4-烯-6-基酯(43 mg，0.044 mmol，90%產率)。LC/MS (ESI, m/z), 981.4 $[M+H]^+$。

【1135】$^1$H-NMR (400 MHz, MeOH-*d*4): δ ppm 0.62-0.73 (m, 18

H), 0.82-0.93 (m, 9 H), 0.95-1.06 (m, 27 H), 1.24 (br s, 4 H), 1.45 (br s, 10 H), 1.78 (br s, 3 H), 1.92-2.00 (m, 1 H), 2.46 (br s, 4 H), 2.51-2.67 (m, 3 H), 2.76-2.84 (m, 2 H), 2.86-2.93 (m, 1 H), 2.93-3.02 (m, 3 H), 3.34-3.38 (m, 3 H), 3.43-3.49 (m, 2 H), 3.72-3.82 (m, 1 H), 3.93-4.04 (m, 1 H), 4.94-5.07 (m, 2 H), 5.53-5.64 (m, 1 H), 5.72-5.89 (m, 2 H), 6.07-6.21 (m, 1 H), 6.44-6.61 (m, 1 H)。

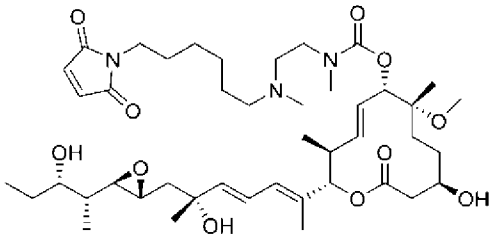
**D20**



【1136】呈無色油狀之甲基(2-(甲基胺基)乙基)胺基甲酸(2S,3S,6S,7R,10R,E)-10-羥基-2-((R,2E,4E)-6-羥基-7-((2R,3R)-3-((2R,3S)-3-羥基戊-2-基)氧雜環丙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-7-甲氧基-3,7-二甲基-12-側氧基氧雜環十二碳-4-烯-6-基酯(16.4 mg，0.026 mmol，58.6%產率)。LC/MS (ESI, m/z), 639.7 $[M+H]^+$。

【1137】$^1$H-NMR (400 MHz, MeOH-*d*4): δ ppm 0.92 (br d, *J*=6.53 Hz, 9 H), 1.25 (br s, 4 H), 1.36 (s, 3 H), 1.41-1.74 (m, 6 H), 1.45-1.59 (m, 1 H), 1.64-1.72 (m, 1 H), 1.80 (s, 3 H), 1.85-1.94 (m, 1 H), 2.42 (s, 3 H), 2.50-2.63 (m, 3 H), 2.65-2.73 (m, 1 H), 2.73-2.80 (m, 2 H), 2.88-3.01 (m, 4 H), 3.35-3.38 (m, 3 H), 3.35-3.40 (m, 3 H), 3.41-3.48 (m, 2 H), 3.52-3.57 (m, 1 H), 3.78-3.89 (m, 1 H), 5.00-5.13 (m, 2 H), 5.53-5.64 (m, 1 H), 5.71-5.82 (m, 1 H), 5.84-5.94 (m, 1 H), 6.12-6.19 (m, 1 H), 6.49-6.61 (m, 1 H)。

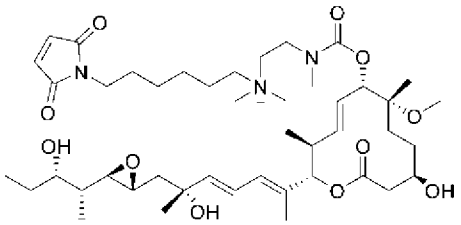
**ADL12-D20**



【1138】採用如 1.6.1 部分中所略述之通用程序合成 ALD12-D20 並得到無色油狀物(13.0 mg，0.016 mmol，67.7%)。LC/MS (ESI, m/z), 818.3 $[M+H]^+$。

【1139】$^1$H-NMR (400 MHz, MeOH-*d*4): δ ppm 0.91 (br s, 9 H), 1.21-1.31 (m, 4 H), 1.36 (br s, 7 H), 1.46-1.73 (m, 11 H), 1.80 (s, 3 H), 1.84-1.93 (m, 1 H), 2.50-2.72 (m, 7 H), 2.75-2.85 (m, 1 H), 2.87-3.09 (m, 7 H), 3.48-3.68 (m, 6 H) 3.80-3.89 (m, 1 H), 5.02-5.13 (m, 2 H), 5.55-5.66 (m, 1 H), 5.71-5.82 (m, 1 H), 5.85-5.94 (m, 1 H), 6.11-6.22 (m, 1 H), 6.49-6.61 (m, 1 H), 6.83 (br d, *J*=1.13 Hz, 2 H)。

**ADL12-D21**



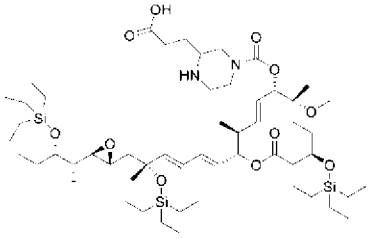
【1140】將(2-((6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己基)(甲基)胺基)乙基)(甲基)胺基甲酸((2S,3S,6S,7R,10R,E)-10-羥基-2-((R,2E,4E)-6-羥基-7-((2R,3R)-3-((2R,3S)-3-羥基戊-2-基)氧雜環丙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-7-甲氧基-3,7-二甲基-12-側氧基氧雜環十二碳-4-烯-6-基酯(7 mg，8.557 μmol)溶解於 N,N-二甲基甲醯胺(99 μl，1.284 mmol)中並添加甲基碘(2.68 μL，0.043 mmol)。在室溫下攪拌溶液

隔夜。蒸發溶劑。藉由管柱層析法純化，得到 6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)-N-(2-(((((2S,3S,6S,7R,10R,E)-10-羥基-2-((R,2E,4E)-6-羥基-7-((2R,3R)-3-((2R,3S)-3-羥基戊-2-基)氧雜環丙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-7-甲氧基-3,7-二甲基-12-側氧基氧雜環十二碳-4-烯-6-基)氧基)羰基)(甲基)胺基)乙基)-N,N-二甲基已-1-銨(7 mg，8.40 μmol，98%產率)。LC/MS (ESI, m/z), 832.7 $[M+H]^+$。

【1141】 $^1$H-NMR (400 MHz, MeOH-*d*4): δ ppm 0.75 - 0.87 (m, 9 H), 1.14 (s, 4 H), 1.25 (s, 3 H), 1.27-1.45 (m, 9 H), 1.48-1.61 (m, 4 H), 1.69 (s, 4 H), 1.72-1.79 (m, 2 H), 2.35-2.53 (m, 3 H), 2.53-2.60 (m, 1 H), 2.75-2.83 (m, 1 H), 2.85-2.95 (m, 3 H), 3.06 (br d, *J*=10.42 Hz, 6 H), 3.15-3.20 (m, 2 H), 3.25 (br d, *J*=2.38 Hz, 3 H), 3.42 (br d, *J*=6.90 Hz, 5 H), 3.53-3.69 (m, 2 H), 3.69-3.78 (m, 1 H), 4.88-5.01 (m, 2 H), 5.44-5.56 (m, 1 H), 5.59-5.72 (m, 1 H), 5.73-5.83 (m, 1 H), 5.99-6.10 (m, 1 H), 6.40 (s, 1 H), 6.72 (s, 2 H)。

**1.11 ADL12-D22**

【1142】 採用如 1.2.1 部分中所略述之通用程序 1 合成 D22。

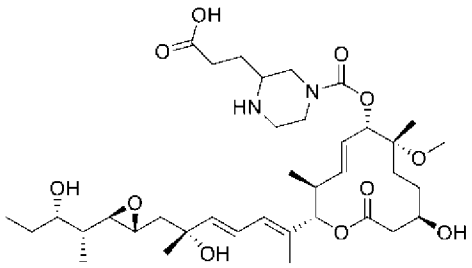



【1143】 呈無色油狀之 3-(4-((((2S,3S,6S,7R,10R,E)-7-甲氧基-3,7-二甲基-2-((R,2E,4E)-6-甲基-6-((三乙基矽烷基)氧基)-7-((2R,3R)-3-((2S,3S)-3-((三乙基矽烷基)氧基)戊-2-基)氧雜環丙烷-2-基)庚-2,4-二烯-2-基)-12-側氧基-10-((三乙基矽烷基)氧基)氧雜環十二碳-4-烯-6-基)氧基)

羰基)哌嗪-2-基)丙酸(48 mg，0.046 mmol，34.4%產率)。LC/MS (ESI, m/z), 1051.4 $[M+H]^+$。

【1144】$^1$H-NMR (400 MHz, MeOH-*d*4): δ ppm 0.62-0.70 (m, 18 H), 0.82-0.94 (m, 9 H), 1.01 (tt, *J*=7.92, 3.18 Hz, 27 H), 1.22-1.28 (m, 4 H), 1.45 (s, 3 H), 1.47-1.66 (m, 7 H), 1.76-1.87 (m, 5 H), 1.92-1.99 (m, 1 H), 2.36-2.47 (m, 3 H), 2.50-2.68 (m, 3 H), 2.86-2.93 (m, 1 H), 2.98-3.08 (m, 2 H), 3.10-3.18 (m, 1 H), 3.18-3.26 (m, 2 H), 3.27-3.31 (m, 1 H), 3.34-3.36 (m, 3 H), 3.36-3.37 (m, 1 H) 3.72-3.81 (m, 1 H), 3.95-4.19 (m, 3 H), 4.93-5.00 (m, 1 H), 5.01-5.07 (m, 1 H), 5.54-5.66 (m, 1 H) 5.72-5.81 (m, 1 H) 5.81-5.90 (m, 1 H), 6.12-6.19 (m, 1 H), 6.47-6.58 (m, 1 H)。

**D22**

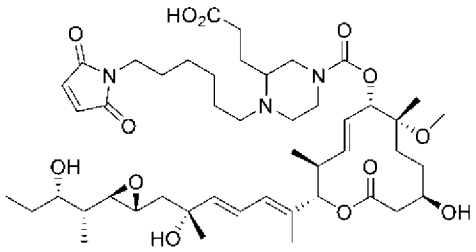



【1145】N-乙基-N-異丙基丙-3-(4-((((2S,3S,6S,7R,10R,E)-10-羥基-2-((R,2E,4E)-6-羥基-7-((2R,3R)-3-((2R,3S)-3-羥基戊-2-基)氧雜環丙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-7-甲氧基-3,7-二甲基-12-側氧基氧雜環十二碳-4-烯-6-基)氧基)羰基)哌嗪-2-基)丙酸(23.5 mg，0.031 mmol，68.2%產率)。LC/MS (ESI, m/z), 709.5 $[M+H]^+$。

【1146】$^1$H-NMR (400 MHz, DMSO-*d*6): δ ppm 0.71-0.77 (m, 9 H), 1.03 (s, 5 H), 1.14-1.20 (m, 6 H), 1.23-1.33 (m, 5 H), 1.36-1.48 (m, 5 H), 1.63 (s, 3 H), 1.67-1.75 (m, 1 H), 2.13-2.24 (m, 4 H), 2.58-2.64

(m, 1 H), 2.68-2.81 (m, 2 H), 3.20-3.20 (m, 3 H), 3.61-3.77 (m, 4 H), 4.28-4.39 (m, 1 H), 4.44-4.53 (m, 1 H), 4.79-4.88 (m, 2 H), 5.28-5.43 (m, 1 H), 5.52-5.66 (m, 1 H), 5.73-5.85 (m, 1 H), 5.94-6.04 (m, 1 H), 6.27-6.41 (m, 1 H), 6.43-6.53 (m, 2 H), 8.19-8.29 (m, 1 H)。

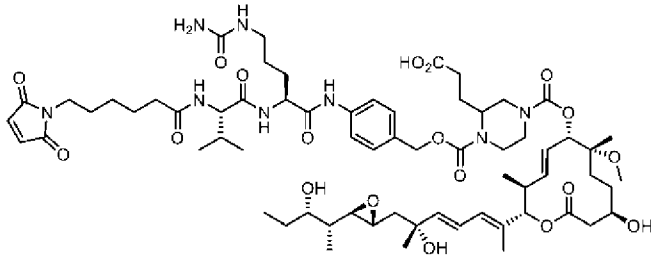
**ADL12-D22**



【1147】採用如 1.6.1 部分中所略述之通用程序合成 ADL12-D22 (3.6 mg，4.05 μmol，34.4%產率)。LC/MS (ESI, m/z), 888.7 $[M+H]^+$。

【1148】$^1$H-NMR (400 MHz, MeOH-*d*4): δ ppm 0.77-0.89 (m, 9 H), 1.08-1.31 (m, 13 H), 1.35-1.60 (m, 12 H), 1.69 (s, 3 H), 1.73-1.83 (m, 1 H), 1.85-1.97 (m, 1 H), 2.15-2.27 (m, 1 H), 2.27-2.83 (m, 11 H), 2.84-2.98 (m, 1 H), 3.39 (s, 7 H), 3.67-3.77 (m, 1 H), 4.89-5.01 (m, 2 H), 5.40-5.53 (m, 1 H), 5.59-5.69 (m, 1 H), 5.72-5.83 (m, 1 H), 5.99-6.11 (m, 1 H), 6.37-6.49 (m, 1 H), 6.69 (s, 2 H)。

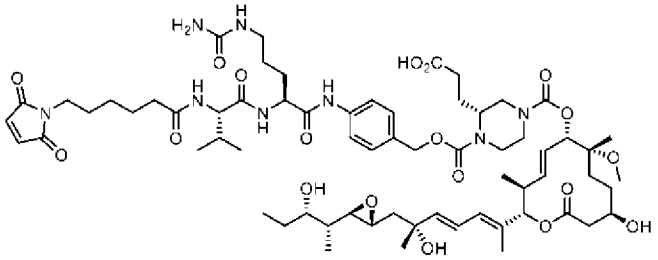
**ADL1-D22**



【1149】採用如 1.2.1 部分中所略述之通用程序 1 合成呈白色凍乾固體狀之 ADL1-D22 (4.7 mg，3.59 μmol，38.6%產率)。LC/MS (ESI, m/z), 1307.6 $[M+H]^+$。

【1150】 $^1$H NMR (400 MHz, DMSO-*d*6): δ ppm 0.68-0.79 (m, 16 H), 1.03 (s, 3 H), 1.16 (s, 5 H), 1.23-1.44 (m, 13 H), 1.48-1.55 (m, 1 H), 1.62 (s, 4 H), 1.68-1.74 (m, 1 H), 1.86-1.93 (m, 1 H), 2.02 (s, 4 H), 2.24-2.37 (m, 3 H), 2.46-2.51 (m, 2 H), 2.66-2.73 (m, 1 H), 2.79-2.99 (m, 4 H), 3.15 (s, 3 H), 3.21-3.22 (m, 2 H), 3.30 (s, 4 H), 3.61-3.67 (m, 1 H), 3.73-3.88 (m, 3 H), 4.01-4.08 (m, 1 H), 4.09-4.16 (m, 1 H), 4.29-4.38 (m, 2 H), 4.43-4.51 (m, 1 H), 4.73-4.78 (m, 1 H), 4.79-4.88 (m, 2 H), 4.91-4.98 (m, 2 H), 5.29-5.43 (m, 3 H), 5.54-5.67 (m, 1 H), 5.74-5.83 (m, 1 H), 5.95-6.07 (m, 1 H), 6.28-6.40 (m, 1 H), 6.54-6.62 (m, 1 H), 6.93 (s, 2 H), 7.17-7.26 (m, 2 H), 7.44-7.57 (m, 2 H), 7.66-7.76 (m, 1 H), 7.95-8.03 (m, 1 H), 8.42-8.49 (m, 1 H), 9.89-9.96 (m, 1 H)。

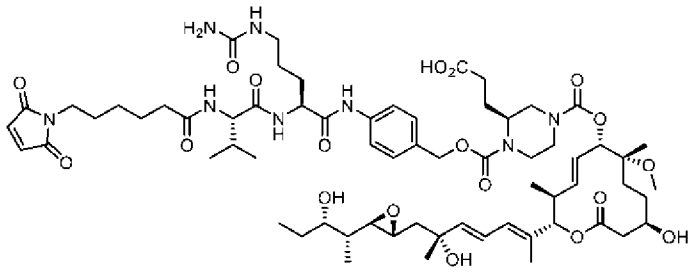
**ADL1-D23**



【1151】 將碳酸 4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯胺基)-3-甲基丁醯胺基)-5-脲基戊醯胺基)苯甲酯(4-硝基苯基)酯(16.76 mg，.023 mmol)及 3-((R)-4-((((2S,3S,6S,7R,10R,E)-10-羥基-2-((R,2E,4E)-6-羥基-7-((2R,3R)-3-((2R,3S)-3-羥基戊-2-基)氧雜環丙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-7-甲氧基-3,7-二甲基-12-側氧基氧雜環十二碳-4-烯-6-基)氧基)羰基)哌嗪-2-基)丙酸(16.1 mg，0.023 mmol)溶解於 DMF (229 µl，2.953 mmol)中並添加漢氏鹼(11.90 µl，0.068 mmol)。在室溫下攪拌反應混合物隔夜。接著，蒸發溶劑並進行反相 HPLC 純化，得

到 3-((R)-1-(((4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯胺基)-3-甲基丁醯胺基)-5-脲基戊醯胺基)苯甲基)氧基)羰基)-4-((((2S,3S,6S,7R,10R,E)-10-羥基-2-((R,2E,4E)-6-羥基-7-((2R,3R)-3-((2R,3S)-3-羥基戊-2-基)氧雜環丙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-7-甲氧基-3,7-二甲基-12-側氧基氧雜環十二碳-4-烯-6-基)氧基)羰基)哌嗪-2-基)丙酸(3.9 mg，2.98 μmol，13.13%產率)。LC/MS (ESI, m/z), 1308.6 $[M+H]^+$。

**ADL1-D24(S)**



【1152】將 3-((S)-4-((((2S,3S,6S,7R,10R,E)-10-羥基-2-((R,2E,4E)-6-羥基-7-((2R,3R)-3-((2R,3S)-3-羥基戊-2-基)氧雜環丙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-7-甲氧基-3,7-二甲基-12-側氧基氧雜環十二碳-4-烯-6-基)氧基)羰基)哌嗪-2-基)丙酸(10 mg，.014 mmol)、N,N-二甲基甲醯胺(141 μl，0.014 mmol)、漢氏鹼(5 μl，0.028 mmol)、碳酸 4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯胺基)-3-甲基丁醯胺基)-5-脲基戊醯胺基)苯甲酯(4-硝基苯基)酯(20.8 mg，.028 mmol)組合並攪拌 2 小時。層析分離(MeOH / $CH_2Cl_2$)，得到 3-((S)-1-(((4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)己醯胺基)-3-甲基丁醯胺基)-5-脲基戊醯胺基)苯甲基)氧基)羰基)-4-((((2S,3S,6S,7R,10R,E)-10-羥基-2-((R,2E,4E)-6-羥基-7-((2R,3R)-3-((2R,3S)-3-羥基戊-2-基)氧雜環丙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-7-甲氧基-3,7-二甲基-12-側氧基氧雜

環十二碳-4-烯-6-基)氧基)羰基)哌嗪-2-基)丙酸(5 mg，3.82 μmol，27.1%產率)。LC/MS (ESI, m/z), 1308.4 $[M+H]^+$。

**實例 2**

【1153】 剖析用於製備 ADC 之例示性剪接體調節劑有效負載。評價有效負載與 SF3b 複合體之結合、活體外剪接活性及抑制細胞生長之能力。

**2.1 SF3B1 結合/閃爍近接分析(SPA)**

【1154】 執行閃爍近接分析以量測化合物(「有效負載」)與 SF3b 複合體之結合親和力。製備分批固定至抗小鼠 PVT SPA 閃爍珠粒(PerkinElmer)之抗 SF3B1 抗體(MBL)如下：對於每 2.5 mg 核提取物，將 5 μg 抗 SF3B1 抗體及 1.5 mg 珠粒混合於 150 μL PBS 中。在 RT 下，培育抗體-珠粒混合物 30 分鐘並以 18,000 *g* 離心 5 分鐘。每 1.5 mg 抗體-珠粒混合物使用 150 μL PBS 再懸浮。使珠粒懸浮並將其添加至所製備之核提取物中。在 4℃下，在輕柔混合下將漿液培育 2 小時。接著，藉由以 18,000 *g* 離心 5 分鐘來收集珠粒，並用 PBS + 0.1% Triton X-100 洗滌兩次。在最後一個離心步驟之後，每 1.5 mg 珠粒用 150 μL PBS 懸浮。測試 SF3b 複合體與如先前(Kotake 等人(2007)Nat Chem Biol. 3(9):570-5)所描述合成的[$^3$H]標記之普拉二烯內酯 B 探針([$^3$H]-PB)的結合。用 50 μL 珠粒漿液並藉由添加不同濃度之 PB 或 PB-OH 製備 100 μL 結合反應物，且在 30 分鐘預培育之後，添加 2.5 nM [$^3$H]-PB。培育該混合物 30 分鐘，並使用 MicroBeta2 盤計數器(PerkinElmer)讀取發光信號。使用 Prism 7 (Graphpad)對資料進行非線性回歸曲線擬合。

【1155】 所有測試之有效負載均觀察到類似結合型態(**圖 1**)。大體

而言，特異性結合係在低奈莫耳濃度範圍內，表明所有測試之有效負載均為強效 SF3b 複合體結合劑且為用於 ADC 中的有前景之候選化合物。

**2.2 活體外剪接(IVS)**

【1156】 為評價有效負載在無細胞系統中之活性，執行活體外剪接分析。將有效負載與核提取物及 pre-mRNA 受質小型基因一起培育。

【1157】 **HeLa 核提取物製備**：使 HeLa S3 細胞集結粒再懸浮於低滲緩衝液(10 mM HEPES pH 7.9、1.5 mM $MgCl_2$、10 mM KCl、0.2 mM PMSF、0.5 mM DTT)中，且使懸浮液達到總計 5 個血球容積比(PCV)。離心之後，丟棄上清液，並用低滲緩衝液使細胞達到 3 PCV 且在冰上培育 10 分鐘。使用 dounce 均質機溶解細胞且接著離心。丟棄上清液，且用½核容積比(PNV)之低鹽緩衝液(20 mM HEPES pH 7.9、1.5 mM $MgCl_2$、20 mM KCl、0.2 mM EDTA、25%甘油、0.2 mM PMSF、0.5 mM DTT)使集結粒再懸浮，隨後用½ PNV 之高鹽緩衝液(除添加 1.4 M KCl 之外其餘與低鹽緩衝液相同)再懸浮。輕柔地混合核 30 分鐘，隨後離心。接著，將上清液(核提取物)透析至儲存緩衝液(20 mM HEPES pH 7.9、100 mM KCl、0.2 mM EDTA、20%甘油、0.2 mM PMSF、0.5 mM DTT)中。使用 NanoDrop 8000 UV-Vis 分光光度計(ThermoFisher Scientific)測定蛋白質濃度。

【1158】 **IVS**：使用 5' EcoRI 及 3' XbaI 限制位點將所有 Ad2 源性序列(Pellizzoni 等人(1998)Cell 95(5):615-24)選殖至 pcDNA3.1(+)載體(Promega)中。使用 XbaI 使質體線性化並用作活體外轉錄反應中之 DNA 模板。使用 EcoRI 使 FtzΔi 少內含子(intron-less)質體(Luo 及 Reed(1999)96(26):14937-42)線性化。在活體外轉錄所有 RNA 且接著分

別使用 MEGAScript T7 (Invitrogen)及 MegaClear (Invitrogen)套組純化。對於使用 Ad2 變異 pre-mRNA 進行之剪接反應，使用由 HeLa S3、2 ng pre-mRNA、0.2 ng FTZΔi 及不同濃度之化合物或 DMSO 製備之 8 μg 核提取物製備 1 μL 反應物。在 30℃下預培育 15 分鐘之後，添加 1 μL 剪接活化緩衝液(0.5 mM ATP、20 mM 磷酸肌酸、1.6 mM $MgCl_2$)，並在 30℃下培育反應物 90 分鐘。接著，用 13 μL DMSO 淬滅反應，並使用 25 nL 進行 RT-qPCR。RT-qPCR 反應物係使用以下製備：TaqMan RNA-to-$C_T$ 單步套組(Life Technologies)、來自剪接反應之 RNA、Ad2 (正向：ACTCTCTTCCGCATCGCTGT；反向：CCGACGGGTTTCCGATCCAA；探針：CTGTTGGGCTCGCGGTTG) 及 Ftz (正向：TGGCATCAGATTGCAAAGAC；反向：ACGCCGGGTGATGTATCTAT；探針：CGAAACGCACCCGTCAGACG) mRNA 引子-探針集。使用 Prism 7 (Graphpad)對所形成之剪接產物進行非線性回歸曲線擬合且相對於對照(DMSO)樣品正規化。鑒於所有測試之有效負載特異性結合至 SF3b 複合體且展示類似的結合型態(**圖 1**)，故假設所有的有效負載亦應在類似地程度上調節剪接。所有的有效負載均明顯地調節 Ad2.2 pre-mRNA 之剪接(**圖 2**)。在有效負載存在下，觀察到剪接產物之量減少。

**2.3 細胞活力**

【1159】將 HCC1954(美國典型培養物保藏中心(American Type Culture Collection，ATCC))乳房導管癌細胞以 2000 個細胞/孔塗鋪於平底 96 孔組織培養盤(Corning)中總體積為 90 μL 的補充有 10%胎牛血清之組織培養基(ThermoFisher Scientific)中。用自 200 nM 至 0.03 nM 的 3 倍連續稀釋之化合物處理細胞。一式三份，測試每一濃度。在處理時，使

用 CellTiter-Glo® 2.0 發光細胞活力分析，根據製造商之推薦(Promega；#G9241)評價具有未處理細胞之盤。將 CellTiter-Glo® 2.0 試劑添加至培養基中，培育並在 EnVision 多標記讀取器(PerkinElmer)上分析。值表示時間零(T0)。另外，在化合物處理 144 小時(T144)之後，使用 CellTiter-Glo®2.0 發光細胞活力分析測定活細胞之數目。使用在時間零(T0)時之發光值、DMSO 對照生長(C)及在化合物存在下之測試生長(T144)，計算在各化合物濃度水準下的生長百分比。生長抑制百分比計算如下：對於 T144>/=T0 之濃度，[(T144-T0)/(C-T0)]×100；對於 T144<T0 之濃度，[(T144-T0)/T0]×100。使用 Prism 7(Graphpad)生成劑量反應曲線圖並使用非線性回歸分析及 log(抑制劑)相對於反應變數斜率(四參數)進行擬合。

【1160】 在 HER2 擴增之 HCC1954 乳癌細胞中測定所有有效負載的細胞活力劑量反應。除滲透性較弱之有效負載諸如 D25 之外，大部分測試之有效負載展現在單數位奈莫耳濃度範圍內之 $GI_{50}$ 值(亦即，使細胞增殖減少 50%的化合物之濃度)(**圖 3**)。例示性滲透性資料顯示於表 14 中。

**實例 3**

【1161】 經由抗體上之半胱胺酸殘基將實例 2 中評價之例示性有效負載結合至例示性抗 HER2 抗體(曲妥珠單抗)。以下描述例示性抗 HER2 ADC 之製備及評價。

**3.1 抗體**

【1162】 使用曲妥珠單抗抗體(「AB185」)(Molina 等人(2001)Cancer Res.61(12):4744-9)製備抗 HER2 ADC(在本文中又稱為 SMLA)。

### 3.2 生物結合

【1163】將在 PBS 緩衝液(pH 7.0)中 10 mg/mL 之抗體(曲妥珠單抗)與 5 mM TCEP(2-4 莫耳當量)(ThermoFisher Scientific；#77720)混合以斷裂鏈間二硫鍵。在 22℃下輕柔地混合反應物 3 小時。接著添加丙二醇(15% v/v)，隨後添加 8 莫耳當量之連接子-有效負載(6 mM 於 DMSO 中之儲備液)，並充分地混合溶液。在 22℃下，將反應物放置於恆溫箱中之旋轉盤上。在 2 小時結合之後，藉由 AKTA GE M150(HiTrapTM 26/10 脫鹽管柱；流動速率：3 mL/min)(GE Healthcare Bio-Sciences)純化反應混合物以將未結合之有效負載移至 DPBS(pH 7.5)中。經由 Amicon 超濾器(30 kDa，Ultra-4)(EMD Millipore)濃縮所得結合物並經由 0.22 μm PVDF 拋棄式過濾器(EMD Millipore)進行無菌過濾。藉由 UV-VIS 量測最終澄清溶液，根據 Beer-Lambert 定律(A=$E$*$c$*l)及以下公式測定抗體濃度([mAb]；mole/L)及經結合有效負載之濃度([LD]；mole/L)：

$A_{280nm} = E^{mAb}_{280nm} * [mAb] * l + E^{LD}_{280nm} * [LD] * l$

$A_{252nm} = E^{mAb}_{252nm} * [mAb] * l + E^{LD}_{252nm} * [LD] * l$

$E^{mAb}_{280nm}$： 曲妥珠單抗 = 213,380 $cm^{-1}M^{-1}$

$E^{mAb}_{252nm}$： 曲妥珠單抗= 79,112 $cm^{-1}M^{-1}$

$E^{LD}_{280nm}$ = 800 $cm^{-1}M^{-1}$

$E^{LD}_{252nm}$ = 31,000 $cm^{-1}M^{-1}$

縮寫：c-莫耳濃度；l-光路長度(Nanodrop：0.1 cm)；$E$-莫耳消光係數；A-吸光度。

### 3.3 生理表徵

【1164】分別藉由液相層析-質譜法(LC/MS)、尺寸排阻層析法

(SEC)及反相高效液相層析法(HPLC)分析例示性抗 HER2 ADC 的藥物與抗體比(DAR)、聚集百分比及未結合之有效負載的百分比。一般而言，結合物含有少於 2%之游離藥物且含有少於 10%之聚集物。

### 3.3.1 LC/MS 分析 - DAR

【1165】使用與 Agilent G6224A Accurate Mass TOF 質譜儀介接的 Agilent 1290 UPLC 系統執行 LC/MS 分析。在 37℃下，用肽 N 糖苷酶 F(New England Biolabs；#P0705L)使結合物脫糖基化 4 小時，用 8 M Gdn-HCl(Sigma；#G9284)使其變性，且最後使用 DTT(5 mM 最終濃度)(Promega；#V3151)將其分成輕鏈及重鏈結構域。將所製備之樣品注射至 Agilent PLRP-S 管柱(2.1×150 mm，8 μm)上並在室溫(RT)下，經 28 分鐘用 25%B 至 50%B 之梯度溶離。移動相 A 係含 0.05% TFA 之水，移動相 B 係含 0.04% TFA 之乙腈，且流動速率係 1 mL/min。由解卷積之質譜，藉由對關於輕鏈(L0 或 L1)及重鏈(H0、H1、H2 及 H3)之未結合峰及藥物結合峰的強度求加權平均值來計算 DAR。使用以下公式計算完整結合物之總 DAR：$(DAR_{LC}*2)+(DAR_{HC}*2)$=總 DAR。例示性抗 HER2 ADC 之 DAR 值報告於表 10-14 中。

### 3.3.2 SEC 分析 - 聚集

【1166】使用 TOSON-G3000SWXL(#008541)管柱，在含 0.25 mM 氯化鉀及 15%(v/v)IPA 之 0.2 M 磷酸鉀(pH 7)中以 0.75 mL/min 之流動速率執行尺寸排阻層析。藉由曲線下面積積分測定高分子量及單體結合物組分在 280 nm 下之峰面積吸光度。例示性抗 HER2 ADC 之單體百分比報告於表 10 中。

### 3.3.3 HPLC 分析 - 游離藥物

【1167】在冰上用 10 體積乙腈使結合物沈澱 2 小時並短暫離心。接著，將含有殘留未結合之有效負載的上清液注射至 Agilent Poroshell 120 SB-C18 120A 管柱(4.6×100 mm，2.7 μm)上並在室溫下，經 10 分鐘用 45%B 至 70%B 之梯度溶離。移動相 A 係 100%水，移動相 B 係 100%乙腈，且流動速率係 0.6 mL/min 並在 252 nm 下偵測。經由 UV 偵測來定量殘留游離藥物之量並與未結合之連接子-有效負載之外部標準曲線相比較。例示性抗 HER2 ADC 之游離藥物百分比報告於表 10 中。

**3.4 結合表徵**

**3.4.1 FACS 結合至目標陽性細胞**

【1168】藉由流動式細胞測量術，使用間接免疫螢光法評價未結合之抗 HER2 抗體及抗 HER2 ADC 與目標陽性細胞之結合。將內源性表現 HER2 之乳癌細胞株 JIMT1 細胞(DSMZ)塗鋪($5\times10^4$ 個細胞/孔)於 v 型底之 96 孔盤(Greiner Bio-One)中並在 4℃下，將其與在分析培養基(補充有 10%(w/v)胎牛血清白蛋白之 RPMI-1640(Thermo Fisher Scientific))中稀釋至各種濃度的測試化合物一起培育 2 小時。接著，用 PBS + 2% FBS(FACS 緩衝液)洗滌細胞，並在 4℃下，在暗處用藻紅素標記(PE)之山羊抗人類免疫球蛋白 G(IgG)抗體(Invitrogen)染色 40 分鐘。用冷 FACS 緩衝液洗滌細胞並在室溫下，用 FluroFix 緩衝液(Biolegend)固定 30 分鐘。用 FACS 緩衝液洗掉固定劑。使用 LSRFortessa 流式細胞儀(BD Bioscience)分析固定細胞中 PE 之幾何平均螢光。包括曲妥珠單抗及 T-DM1(DM1 與曲妥珠單抗之結合物)作為對照。

【1169】所有抗 HER2 ADC 均展示穩固結合至 JIMT1 細胞中之 HER2。ADC 結合與曲妥珠單抗及 T-DM1 之結合相當(**圖 4**)。由此表明與

有效負載之結合不影響該抗體之抗原結合親和力。

**3.5 活體外分析**

**3.5.1 細胞活力**

【1170】 在若干 HER2 擴增之細胞株中測試抗 HER2 ADC 抑制細胞生長之能力。使用 HCC1954(ATCC，2000 個細胞/孔)、N87(ATCC，4000 個細胞/孔)、SKBR3(ATCC，3000 個細胞/孔)及 MCF7(ATCC，1500 個細胞/孔)細胞株。如 2.3 部分中所描述執行細胞活力分析。

【1171】 意外地是，並非所有 ADC 在 HCC1954 細胞中皆具有活性，不過具有類似之結合型態(**圖 1**)及生物化學特性類似之有效負載。具有某些連接子(例如 ADL10)及/或某些有效負載(例如 D14)之 ADC 抑制細胞生長之能力較弱，而具有替代性連接子(ADL1、ADL5、ADL12)及/或有效負載(例如 D1、D25、D2、D4)之 ADC 在 HCC1954 細胞中較為強效(**圖 5A** 以及表 10、11 及 14)。在所有細胞株(HCC1954、N87 及 SKBR3)及適應症(HCC1954 及 SKBR3 係高 HER2 乳癌細胞株；N87 係高 HER2 胃癌細胞株)中一般皆觀察到此等趨勢(**圖 5B-C** 以及表 11 及 12)。另外，一般而言，傳統的不可裂解連接子諸如 ADL10 不能高效地遞送剪接調節劑有效負載。不過，針對該等連接子之長度的少量改變將使 ADC 變得強效，例如比較 AB185-ADL10-D1 與 AB185-ADL12-D1 之細胞活力劑量反應(**圖 5A-C**)。

【1172】 為確保抗 HER2 ADC 之活性具有抗原依賴性，對 HER2 陰性 MCF7 細胞進行處理。測試 ADC 在穩固地靶向 HER2 陽性細胞之該等濃度下皆無活性(**圖 6** 及表 13)。由此表明，抗 HER2 ADC 活性具有抗原依賴性。

## 表 10.例示性抗 HER2 ADC 之表徵

| SMLA 批料 ID | 有效負載類別 | 連接子 | 連接子名稱 | DAR | 單體百分比 | 游離藥物(%) | 濃度 (mg/ml) | CTGlo 幾何平均 GI50 (nM) HCC 1954.1 | CTGlo 幾何平均 LD50 (nM) HCC1954.1 | CTGlo 平均 最低反應% HCC1954.1 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| AB185-ADL10-D8 | 普拉二烯內酯 D | ADL0010-01 | 順丁烯二醯亞胺基己醯基 | 2.000 | 99.000 | <1 | 0.730 | >200.000 | >200.000 | 58.601 |
| AB185-ADL10-D1 | 普拉二烯內酯 D | ADL0010-01 | 順丁烯二醯亞胺基己醯基 | 3.600 | 97.000 | <1 | 3.600 | 25.502 | >200.000 | 23.963 |
| AB185-ADL5-D17 | 芳基普拉二烯內酯 | ADL0005-01 | mc-Val-Ala-PAB (Qamine) | 3.960 | 98.000 | <1 | 1.400 | 2.668 | >160.000 | 14.873 |
| AB185-ADL1-D16 | 芳基普拉二烯內酯 | ADL0001-01 | mc-Val-Cit-PABC | 4.400 | 95.000 | <1 | 0.550 | 2.086 | 158.245 | |
| AB185-ADL5-D26 | 芳基普拉二烯內酯 | ADL0005-01 | mc-Val-Ala-PAB (Qamine) | 4.400 | 98.000 | <1 | 1.200 | 0.943 | >200.000 | |
| AB185-ADL1-D14 | 芳基普拉二烯內酯 | ADL0001-01 | mc-Val-Clt-PABC | 4.340 | 88.000 | <1 | 4.200 | 0.925 | >200.000 | 1.271 |
| AB185-ADL5-D15 | 芳基普拉二烯內酯 | ADL0005-01 | mc-Val-Ala-PAB (Qamine) | 4.000 | 98.000 | <1 | 0.780 | 0.912 | >200.000 | -45.388 |

## 表 10(續).例示性抗 HER2 ADC 之表徵

| SMLA 批料 ID | 有效負載類別 | 連接子 | 連接子名稱 | DAR | 單體百分比 | 游離藥物(%) | 濃度(mg/ml) | CTGlo 幾何平均 Gl50 (nM) HCC 1954.1 | CTGlo 幾何平均 LD50 (nM) HCC 1954.1 | CTGlo 平均 最低反應% HCC 1954.1 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| AB185-ADL5-D11 | 普拉二烯內酯 D | ADL0005-01 | mc-Val-Ala-PAB (Qamine) | 3.700 | 96.000 | <1 | 0.880 | 0.806 | >93.000 | -30.929 |
| AB185-ADL1-D33 | 芳基普拉二烯內酯 | ADL0001-01 | mc-Val-Cit-PABC | 8.000 | 95.000 | <1 | 0.570 | 0.466 | >200.000 | -25.859 |
| AB185-ADL1-D22 | 普拉二烯內酯 D | ADL0001-01 | mc-Val-Cit-PABC | 3.000 | 99.000 | <1 | 0.840 | 0.443 | >200.000 | -7.520 |
| AB185-ADL12-D2 | 普拉二烯內酯 D | ADL0012-01 | mal-(CH2)6-(不可裂解) | 3.600 | 98.600 | <1 | 1.060 | 0.432 | >200.000 | 18.569 |
| AB185-ADL1-D13 | 普拉二烯內酯 B | ADL0001-01 | mc-Val-Cit-PABC | 5.000 | 98.000 | <1 | 1.200 | 0.289 | 18.948 | -94.860 |
| AB185-ADL5-D19 | 普拉二烯內酯 B | ADL0005-01 | mc-Val-Ala-PAB (Qamine) | 6.600 | 97.000 | <1 | 3.230 | 0.278 | >200.000 | -47.381 |
| AB185-ADL5-D10 | 普拉二烯內酯 D | ADL0005-01 | mc-Val-Ala-PAB (Qamine) | 4.020 | 97.000 | <1 | 0.650 | 0.254 | >200.000 | -2.273 |

## 表 10(續).例示性抗 HER2 ADC 之表徵

| SMLA 批料 ID | 有效負載類別 | 連接子 | 連接子名稱 | DAR | 單體百分比 | 游離藥物 (%) | 濃度 (mg/ml) | CTGlo 幾何平均 GI50 (nM) HCC 1954.1 | CTGlo 幾何平均 LD50(nM) HCC 1954.1 | CTGlo 平均 最低反應% HCC 1954.1 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| AB185-ADL6-D9 | 普拉二烯內酯 D | ADL0006-01 | mc-Val-Ala-PABC | 5.200 | 98.000 | <1 | 0.500 | 0.244 | 4.206 | -94.511 |
| AB185-ADL5-D2 | 普拉二烯內酯 D | ADL0005-01 | mc-Val-Ala-PAB (Qamine) | 4.140 | 99 | <1 | 4.5 | 0.206 | >200.000 | -12.239 |
| AB185-ADL1-D8 | 普拉二烯內酯 D | ADL0001-01 | mc-Val-Cit-PABC | 7.200 | 97.000 | <1 | 3.410 | 0.188 | >200.000 | -55.079 |
| AB185-ADL5-D2 | 普拉二烯內酯 D | ADL0005-01 | mc-Val-Ala-PAB (Qamine) | 4.300 | 99.000 | <1 | 5.440 | 0.179 | >200.000 | -18.586 |
| AB185-ADL15-D2 | 普拉二烯內酯 D | ADL0015-01 | mal-CH2CH2-O-CH2CH2-(不可裂解) | 3.300 | 98.800 | <1 | 1.600 | 0.170 | >200.000 | -23.513 |
| AB185-ADL12-D20 | 普拉二烯內酯 D | ADL0012-01 | mal-(CH2)6-(不可裂解) | 3.200 | 98.600 | <1 | 1.390 | 0.142 | >200.000 | -57.399 |
| AB185-ADL12-D1 | 普拉二烯內酯 D | ADL0012-01 | mal-(CH2)6-(不可裂解) | 3.300 | 98.800 | <1 | 1.620 | 0.126 | >200.000 | -34.649 |

## 表 10(續).例示性抗 HER2 ADC 之表徵

| SMLA 批料 ID | 有效負載類別 | 連接子 | 連接子名稱 | DAR | 單體百分比 | 游離藥物(%) | 濃度 (mg/ml) | CTGlo 幾何平均 GI50 (nM) HCC1954.1 | CTGlo 幾何平均 LD50 (nM) HCC1954.1 | CTGlo 平均 最低反應% HCC1954.1 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| T-DM1 | DM1 | ADL0019-01 | SMCC | 3.300 | 98.000 | <1 | 3.300 | 0.118 | 2.759 | -47.952 |
| AB185-ADL5-D2 | 普拉二烯內酯 D | ADL0005-01 | mc-Val-Ala-PAB (Qanine) | 8.500 | 98 | <1 | 5.1 | 0.086 | 2.918 | -63.909 |
| AB185-ADL6-D1 | 普拉二烯內酯 D | ADL0006-01 | mc-Val-Ala-PABC | 8.000 | 97.000 | <1 | 1.200 | 0.081 | 2.877 | -85.692 |
| AB185-ADL12-D1 | 普拉二烯內酯 D | ADL0012-01 | mal-(CH2)6-(不可裂解) | 3.000 | 98.000 | <1 | 2.860 | 0.081 | 2.148 | -68.999 |
| AB185-ADL12-D22 | 普拉二烯內酯 D | ADL0012-01 | mal-(CH2)6-(不可裂解) | 4.300 | 97.000 | <1 | 0.120 | 0.078 | >80.000 | 28.071 |
| AB185-ADL1-D4 | 普拉二烯內酯 D | ADL0001-01 | mc-Val-Cit-PABC | 8.000 | 98.000 | <1 | 3.600 | 0.073 | 1.949 | -67.199 |
| AB185-ADL15-D1 | 普拉二烯內酯 D | ADL0015-01 | mal-CH2CH2-O-CH2CH2-(不可裂解) | 3.200 | 98.800 | <1 | 0.950 | 0.062 | >200.000 | -57.829 |

## 表 10(續).例示性抗 HER2 ADC 之表徵

| SMLA 批料 ID | 有效負載類別 | 連接子 | 連接子名稱 | DAR | 單體百分比 | 游離藥物(%) | 濃度 (mg/ml) | CTGlo 幾何平均值 GI50 (nM) HCC 1954.1 | CTGlo 幾何平均值 LD50 (nM) HCC1954.1 | CTGlo 平均值 最低反應% HCC1954.1 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| AB185-ADL14-D1 | 普拉二烯內酯 D | ADL0014-01 | mal-CH2CH2-(不可裂解) | 3.500 | 98.600 | <1 | 0.740 | 0.055 | >200.000 | -56.889 |
| AB185-ADL1-D4 | 普拉二烯內酯 D | ADL0001-01 | mc-Val-Cit-PABC | 2.800 | 98.000 | <1 | 1.200 | 0.050 | >200.000 | -57.212 |
| AB185-ADL1-D1 | 普拉二烯內酯 D | ADL0001-01 | mc-Val-Cit-PABC | 3.900 | 99 | <1 | 5.2 | 0.046 | 0.374 | -78.519 |
| AB185-ADL1-D1 | 普拉二烯內酯 D | ADL0001-01 | mc-Val-Cit-PABC | 4.000 | 98.000 | <1 | 3.500 | 0.042 | 0.447 | -77.970 |
| AB185-ADL5-D25 | 兩性離子型普拉二烯內酯 D | ADL0005-01 | mc-Val-Ala-PAB (Qamine) | 6.000 | 98.000 | <1 | 0.170 | 0.038 | >113.000 | -46.265 |
| AB185-ADL1-D1 | 普拉二烯內酯 D | ADL0001-01 | mc-Val-Cit-PABC | 7.700 | 98.000 | <1 | 4.200 | 0.034 | 0.120 | -87.001 |

表 11. 例示性抗 HER2 ADC - HCC1954 細胞

| | ADC | | | | 有效負載 | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 樣品 | DAR | GI50 (nM) | LD50 (nM) | Rmin(%) | GI50 (nM) | LD50 (nM) | Rmin (%) |
| | | | | | | | |
| AB185-ADL12-D1 | 3.1 | 0.064 | 4.86 | -78.393 | 1.853 | 5.485 | -75.579 |
| AB185-ADL1-D8 | 7.2 | 0.075 | 1.01 | -72.765 | 2.638 | 11.175 | -80.463 |
| T-DM1 | 3 3 | 0.083 | >200 | -64.227 | | | |
| AB185-ADL1-D1 | 4.04 | 0.089 | 2.078 | -74.165 | 1.853 | 5.485 | -75.579 |
| AB185-ADL1-D4 | 4.9 | 0.145 | 1.217 | -75.638 | 1.699 | 6.374 | -81.34 |
| AB185-ADL5-D2 | 4.1 | 0.18 | >200 | -36.513 | 0.6 | 2.758 | -78.732 |
| AB185-ADL5-015 | 4 | 0.503 | >200 | -20.387 | 0.358 | 2.037 | -84.412 |
| AB185-ADL1-D18 | 3.8 | 5.994 | >200 | -8.011 | 0.208 | 0.787 | -90.055 |
| AB185-ADL12-D2 | 3.6 | 6.129 | >200 | 18.763 | 0.6 | 2.758 | -78.732 |
| AB185-ADL10-D1 | 3 5 | 6.642 | >200 | 8.138 | 1.853 | 5.485 | -75.579 |
| AB185-ADL5-D25 | 6.3 | 0.038 | >113.000 | -51.503 | 167.54 | >200 | 26.882 |
| AB185 | N/A | >200 | >200 | 76.916 | | | |

表 12. 例示性抗 HER2 ADC - N87 細胞

| | SMLA | | | | 有效負載 | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 樣品 | DAR | GI50 (nM) | LD50 (nM) | Rmin (%) | GI50 (nM) | LD50 (nM) | Rmin (%) |
| AB185-ADL1-D4 | 4.9 | 0.093 | >200 | -40.056 | 3.241 | 38.774 | -81.775 |
| AB185-ADL5-D15 | 4 | 0.106 | >200 | -50.886 | 0.41 | >200 | -68.045 |
| AB185-ADL5-D25 | 6.3 | 0.11 | 133 | -43.398 | >200 | >200 | 40.364 |
| AB185-ADL12-D1 | 3.1 | 0.111 | >200 | -41.228 | 7.041 | >200 | -40.041 |
| AB185-ADL1-D18 | 3.8 | 0.113 | >200 | -39.509 | 0.275 | 2.993 | -92.127 |
| AB185-ADL1-D1 | 4.04 | 0.163 | >200 | -41.075 | 7.041 | >200 | -40.041 |
| T-DM1 | 3.3 | 0.168 | >200 | -20.785 | | | |
| AB185-ADL1-D8 | 7.2 | 0.172 | >200 | -31.708 | 8.844 | >200 | -34.052 |
| AB185-ADL5-D2 | 4.1 | 0.206 | >200 | -51.328 | 0.749 | >200 | -72.706 |
| AB185-ADL12-D2 | 3.6 | 0.243 | >200 | -9.79 | 0.749 | >200 | -72.706 |
| AB185-ADL1-D14 | 4.3 | 0.296 | >200 | -26.143 | 2.925 | >200 | -52.662 |
| AB185-ADL10-D1 | 3.5 | 1.531 | >200 | 30.759 | 7.041 | >200 | -40.041 |
| AB185 | N/A | >200 | >200 | 77.029 | | | |

表 13. 例示性抗 HER2 ADC - MCF7 細胞

| | SMLA | | | | 有效負載 | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 樣品 | DAR | GI50 (nM) | LD50(nM) | Rmin (%) | GI50 (nM) | LD50 (nM) | Rmin (%) |
| T-DM1 | 3.3 | 38.503 | >200 | 3.876 | | | |
| AB185-ADL12-D1 | 3.1 | 57.818 | >200 | -30.172 | 16.998 | 135.42 | -63.414 |
| AB185-ADL5-D25 | 6.3 | 80.856 | 113 | 28.12 | >200 | >200 | 65.639 |
| AB185-ADL1-D4 | 4 9 | 189.392 | >200 | 43.848 | 11.416 | 96.46 | -60.923 |
| AB185-ADL5-D2 | 4.1 | >200 | >200 | 56.182 | 2.851 | 30.318 | -66.915 |
| AB185-ADL1-D8 | 7.2 | >200 | >200 | 61.169 | 29.614 | 181.521 | -62.957 |
| AB185-ADL1-D18 | 3.8 | >200 | >200 | 48.851 | 0.883 | 7.697 | -68.226 |
| AB185-ADL5-D15 | 4 | >200 | >200 | 49.619 | 0.961 | 130.398 | -68.503 |

| | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| AB185-ADL12-D2 | 3.6 | >200 | >200 | 48.868 | 2.851 | 30.318 | -66.915 |
| AB185-ADL10-D1 | 3.5 | >200 | >200 | 52.699 | 16.998 | 135.42 | -63.414 |
| AB185-ADL1-D14 | 4.3 | >200 | >200 | 49.325 | 5.288 | 77.198 | -61.886 |
| AB185-ADL1-D1 | 4.04 | >200 | >200 | 59.181 | 16.998 | 135.42 | -63.414 |
| AB185 | N/A | >200 | >200 | 72.747 | | | |

### 3.5.2 ADC 有效負載之 Caco-2 滲透性

【1173】在 37℃、95%濕度、5% $CO_2$ 下，在 transwell 24 孔盤中培養 Caco-2 細胞 21 天。藉由 TEER(跨上皮電阻)及螢光黃確定細胞單層之完整性。一式兩份，將 10 μM 有效負載分別摻加於細胞單層之兩側上。藉由緊接地在處理之後(t=0)及培育 2 小時之後，自兩個腔室獲取等分試樣，測定自頂部至底外側(A-B)方向及自底外側至頂部(B-A)方向的滲透速率。用含內標之有機溶劑使樣品中之蛋白質沈澱並藉由 LC-MS/MS(SCIEX；API 5500)分析。使用在兩個方向上有效負載/內標之面積比反應隨時間的變化生成滲透率(cm/sec)值。藉由 B-A/A-B 相除來計算外排率。對照化合物之低及高滲透及外排表現正如預期。滲透率值報告於表 14 中。

### 3.5.3 ADC 有效負載之化學穩定性

【1174】在 Mcilvane(檸檬酸鹽-磷酸鹽)緩衝液 pH 5.5(Boston Bioproducts；#BB-2466)中培育有效負載，最終濃度為 20 μM(低於儲備溶液中之 0.5% DMSO)。將有效負載溶液及內標抽吸至入 96 孔盤中，在 UPLC(Waters Aquity H 類別)上執行並分析初始層析信號(t=0)。管柱係 Waters UPLC HSS T3 1.8 μm 的 2.1×50 mm 管柱(#186003538)。採用移動相 A 經 1 分鐘自 95%至 10%之梯度，其中 A 係 0.1%甲酸/水且移動相 B 係 0.1%甲酸/乙腈(流動速率 0.9 mL/min)。在 37℃下，將有效負載溶液之其餘部分保持在盤振盪器(Eppendorf ThermoMixer)中。在 37℃下培育後 24 小時、72 小時及 96 小時，重複藉由 UPLC 進行之樣品分析。測定

在以下三個時間點有效負載及內標之面積比反應：時間 0、第 1 天、及第 3 天或第 4 天。時間 0 設定為 100。將隨後時間點的面積比反應與時間 0 相比較。殘餘物百分比計算如下：(第 X 天之面積比/時間 0 之面積比)*100=殘餘物%。在 Excel 中，藉由比較殘餘物%的對數及時間點計算直線之斜率。在 Excel 中，藉由 In(2)/斜率計算半衰期並報告於表 14 中。

## 表 14.例示性抗 HER2 ADC 及相應有效負載之表徵

| | | | SMLA 活性 | | | | | 有效負載之 SF3B1 結合及 mRNA 剪接調節 | | | 有效負載之細胞效力及致死率 | | | 有效負載之細胞滲透性 | | | 有效負載之化學穩定性 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| SMLA 批料 ID | 連接子 | DAR | CTGlo 幾何平均 GI50(nM) HCC1954.1 | CTGlo 幾何平均 LD50 (nM) HCC1954.1 | Rmin (%) (最大致死率) | 有效負載類別 | 質量 | SPA- ATS 幾何平均 IC50 (nM) SF3B1 (WT) HELA.2 | qPCR-IVS-ATS 幾何平均 IC50 (nM) Ad2.1 HELA.2 | qPCR-IVS-ATS 幾何平均 IC50 (nM) Ad2.2 HELA.2 | CTGlo- ATS 幾何平均 GI50 (nM)，72h 小時，THP1.1 | CTGlo- ATS 幾何平均 LD50 (nM)，72h 小時，THP1.1 | CTGlo-ATS 平均最低反應%，72 小時，THP1.1 | 滲透性平均值 Caco-2 A-B Perm (10e-6cm/s) | 滲透性平均值 Caco-2 B-A Perm (10e-6cm/s) | 外排率 | 穩定性平均值 穩定性 t1/2 pH5.5 (d) |
| AB185-ADL5-D25 | ADL0005-01 | 6.3 | 0.038 | >113.000 | -51.503 | 兩性離子型普拉二烯內酯 D | 722.917 | 14.557 | 243.749 | 50.858 | 348.114 | 2076.811 | -77.248 | 0.137 | 0.349 | 2.547 | 5 |
| AB185-ADL1-01 | ADL0001-01 | 4 | 0.042 | 0.447 | -78.554 | 普拉二烯內酯 D | 636.827 | 6.085 | 17.568 | 15.853 | 11.085 | 41.408 | -100.615 | 0.14 | 2.05 | 14.643 | 3.95 |
| AB185-ADL1-D4 | ADL0001-01 | 2.8 | 0.05 | >200.000 | -75.774 | 普拉二烯內酯 D | 664.837 | 8.778 | 20.887 | 17.321 | 10.943 | 33.329 | -99.957 | 0.1 | 1.79 | 17.9 | 4.4 |
| AB185-ADL14-D1 | ADL0014-01 | 3.5 | 0.055 | >200.000 | -59.225 | 普拉二烯內酯 D | 636.827 | 6.085 | 17.568 | 15.853 | 11.085 | 41.408 | -100.615 | 0.14 | 2.05 | 14.643 | 3.95 |
| AB185-ADL15-D1 | ADL0015-01 | 3.2 | 0.062 | >200 000 | -60.34 | 普拉二烯內酯 D | 636.827 | 6.085 | 17.568 | 15.853 | 11.085 | 41.408 | -100.615 | 0.14 | 2.05 | 14.643 | 3.95 |
| AB185-ADL1-D8 | ADL0001-01 | 7.2 | 0.075 | 1.01 | -72.765 | 普拉二烯內酯 D | 664.837 | 5.921 | 11.403 | 9.034 | 8.745 | 38.969 | -99.92 | 0.128 | 2.027 | 15.875 | 3.525 |
| AB185-ADL12-D22 | ADL0012-01 | 4.3 | 0.078 | >80.000 | 27.157 | 兩性離子型普拉二烯內酯 D | 708.89 | 29.188 | 66.293 | 49.131 | 223.348 | 1594.638 | -78.119 | 0.14 | 0.16 | 1.143 | |
| AB185-ADL12-D1 | ADL0012-01 | 3.1 | 0.081 | 2.148 | -85.136 | 普拉二烯內酯 D | 636.827 | 6.085 | 17.568 | 15.853 | 11.085 | 41.408 | -100.615 | 0.14 | 2.05 | 14.643 | 3.95 |
| AB185-ADL6-D1 | ADL0006-01 | 3.8 | 0.081 | 2.877 | -86.59 | 普拉二烯內酯 D | 635.827 | 6.085 | 17.568 | 15.853 | 11.085 | 41.408 | -100.615 | 0.14 | 2.05 | 14.643 | 3.95 |
| T-DM1 | SMCC | 3.3 | 0.118 | 2.759 | -56 | DM1 | 738.29 | >1200.000 | >25000.000 | >25000.000 | 0.503 | 3.287 | -93.785 | 0.38 | 28.6 | 75.263 | 1.3 |
| AB185-ADL12-D21 | ADL0012-01 | 3.3 | 0.128 | >200.000 | -39.556 | 普拉二烯內酯 D | 652.87 | | | | | | | | | | |

## 表 14(續). 例示性抗 HER2 ADC 及相應有效負載之表徵

| | | | SMLA 活性 | | | | | 有效負載之 SF3B1 結合及 mRNA 剪接調節 | | | 有效負載之細胞效力及致死率 | | | 有效負載之細胞滲透性 | | | 有效負載之化學穩定性 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| SMLA 批料 ID | 連接子 | DAR | CTGlo 幾何平均 GI50(nM) HCC1954.1 | CTGlo 幾何平均 LD50 (nM) HCC1954.1 | Rmin (%) (最大致死率) | 有效負載類別 | 質量 | SPA- ATS 幾何平均 IC50 (nM) SF3B1 (WT) HELA.2 | qPCR- IVS-ATS 幾何平均 IC50 (nM) Ad2.1 HELA.2 | qPCR- IVS-ATS 幾何平均 IC50 (nM) Ad2.2 HELA.2 | CTGlo- ATS 幾何平均 GI50 (nM)，72 小時，THP1.1 | CTGlo- ATS 幾何平均 LD50 (nM)，72 小時，THP1.1 | CTGlo-ATS 平均最低反應%，72 小時，THP1.1 | 滲透性平均值 Caco-2 A-B Perm (10e-6cm/s) | 滲透性平均值 Caco-2 B-A Perm (10e-6cm/s) | 外排率 | 穩定性平均值 穩定性 t1/2 pH5.5 (d) |
| AE185-ADL12-D20 | ADL0012-01 | 3.2 | 0.142 | >200.000 | -61.497 | 普拉二烯內酯 D | 638.843 | 18.251 | 10.929 | 8.748 | 28.336 | 113.557 | -100.664 | 0.16 | 0.38 | 2.375 | >7.000 |
| AB185-ADL15-D2 | ADL0015-01 | 3.3 | 0.17 | >200.000 | -25.778 | 普拉二烯內酯 D | 650.854 | 15.533 | 19.133 | 15.342 | 2.015 | 11.708 | -100.218 | 0.624 | 14.2 | 22.756 | 4 |
| AB185-ADL5-D2 | ADL0005-01 | 4.1 | 0.179 | >200.000 | -19.945 | 普拉二烯內酯 D | 650.854 | 15.533 | 19.133 | 15.342 | 2.015 | 11.708 | -100.218 | 0.624 | 14.2 | 22.756 | 4 |
| AB185-ADL6-D9 | ADL0006-01 | 5.2 | 0.244 | 4.206 | -95.509 | 普拉二烯內酯 B | 648.838 | 2.117 | 20.224 | 18.121 | 0.87 | 3.56 | -99.938 | 1.15 | 16.11 | 14.009 | <1.000 |
| AB185-ADL5-D10 | ADL0005-01 | 4 | 0.254 | >200.000 | -7.125 | 普拉二烯內酯 D | 664.881 | 9.228 | 16.317 | 14.658 | 1.819 | 8.454 | -99.951 | 1.81 | 23.5 | 12.983 | >7.000 |
| AB185-ADL1-D13 | ADL0001-01 | 5 | 0.289 | 18.948 | -95.484 | 普拉二烯內酯 B | 648.838 | 2.085 | 11.287 | 8.816 | 0.892 | 3.358 | -99.941 | 0.9 | 17.17 | 19.078 | <1000 |
| AB185-ADL12-D2 | ADL0012-01 | 3.6 | 0.432 | >200.000 | 17.824 | 普拉二烯內酯 D | 650.854 | 15.533 | 19.133 | 15.342 | 2.015 | 11.708 | -100.218 | 0.624 | 14.2 | 22.756 | 4 |
| AB185-ADL1-D22 | ADL0001-01 | 2.9 | 0.443 | >200.000 | 27.157 | 兩性離子型普拉二烯內酯 D | 708.89 | 29.188 | 66.293 | 49.131 | 223.348 | 1594.636 | -78.119 | 0.14 | 0.16 | 1.143 | |

## 表 14(續). 例示性抗 HER2 ADC 及相應有效負載之表徵

| | | | SMLA 活性 | | | | | 有效負載之 SF3B1 結合及 mRNA 剪接調節 | | | 有效負載之細胞效力及致死率 | | | 有效負載之細胞滲透性 | | | 有效負載之化學穩定性 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| SMLA 批料 ID | 連接子 | DAR | CTGlo 幾何平均 GI50(nM) HCC1954.1 | CTGlo 幾何平均 LD50(nM) HCC 1954.1 | Rmin (%) (最大致死率) | 有效負載類別 | 質量 | SPA-ATS 幾何平均 IC50 (nW) SF3B1 (WT) HELA.2 | qPCR-IVS-ATS 幾何平均 IC50 (nM) Ad2.1 HELA.2 | qPCR-IVS-ATS 幾何平均 IC50 (nM) Ad2.2 HELA.2 | CTGlo-ATS 幾何平均 GI50 (nM)，72 小時，THP1.1 | CTGlo-ATS 幾何平均 LD50 (nM)，72 小時，THPl.1 | CTGlo-ATS 平均最低反應%，72 小時，THP1.1 | 滲透性平均值 Caco-2 A-B Perm (10e-6 cm/s) | 滲透性平均值 Caco-2 B-A Pem (10e-6 cm/s) | 外排率 | 穩定性平均值 穩定性 t1/2 pH5.5(d) |
| AB185-ADL1-D33 | ADL0001-01 | 8 | 0.466 | >200.000 | -34.274 | 兩性離子型芳基普拉二烯內酯 | 630.758 | 35.694 | 33.402 | 72.404 | 195.752 | 5202.992 | -53.128 | 0.13 | 0.53 | 4.077 | |
| AB185-ADL5-D11 | ADL0005-01 | 3.7 | 0.806 | >93.000 | -57.844 | 普拉二烯內酯 D | 718.973 | 5.99 | 10.545 | 9.364 | 1.352 | 8.086 | -100.481 | 0.87 | 10.56 | 12.138 | 3.75 |
| AB185-ADL5-D15 | ADL0005-01 | 4 | 0.912 | >200. 000 | -50.337 | 芳基普拉二烯內酯 | 668.811 | 1.648 | 4.632 | 4.926 | 1.017 | 11.038 | -99.595 | 3.43 | 26.9 | 7.843 | >7.000 |
| AB185-ADL1-D14 | ADL0001-01 | 4.3 | 0.925 | >200.000 | 3.753 | 芳基普拉二烯內酯 | 654.784 | 1.924 | 10.022 | 8.586 | 3.584 | 25.594 | -99.209 | 0.06 | 12.13 | 202.167 | >7.000 |
| AB185-ADL5-D26 | ADL0005-01 | 4.3 | 0.943 | >200.000 | -29 | 芳基普拉二烯內酯 | 694.849 | 5.505 | 18.838 | 14.314 | 3.719 | 28.483 | -99.401 | 15.955 | 41.125 | 2.578 | >7.000 |
| AB185-ADL1-D16 | ADL0001-01 | 4.3 | 2.086 | 158.245 | -55 | 芳基普拉二烯內酯 | 680.822 | 5.564 | 16.01 | 15.144 | 2.975 | 21.48 | -99.681 | 0.72 | 23.3 | 32.361 | >7.000 |
| AB185-ADL5-D17 | ADL0005-01 | 4 | 2.668 | >160.000 | 12.42 | 芳基普拉二烯內酯 | 587.733 | 1.82 | 17.943 | 9.44 | 2.827 | 24.908 | -99.033 | 20.25 | 18.18 | 0. 898 | |
| AB185-ADL1-D18 | ADL0001-01 | 3.8 | 5.994 | >200 | -8.011 | 普拉二烯內酯 B | 620.828 | 0.99 | 12.686 | 12.709 | 0.863 | 4.355 | -99.621 | 1.19 | 27.4 | 23.025 | |
| AB185-ADL10-D1 | ADL0010-01 | 3.5 | 6.642 | >200 | 8.138 | 普拉二烯內酯 D | 636.827 | 6.085 | 17.568 | 15.853 | 11.085 | 41.408 | -100.615 | 0.14 | 2.05 | 14.643 | 3.95 |

### 3.5.4 細胞內剪接分析

【1175】 為了探尋例示性抗 HER2 ADC 之作用機制，在用遞增濃度之 ADC 處理的 HCC1954 細胞中檢查 SLC25A19 成熟轉錄物之剪接情況。

【1176】 將 HCC1954 細胞(ATCC)以 $1\times10^5$ 個細胞/孔塗鋪於無酚紅之 RPMI+10% FBS 培養基(ATCC)中，每孔 90 μL。在 3 倍稀釋劑量反應中用結合物處理細胞。分別在 24 小時或 6 小時之後，用含有 25 μL/mL RNAsin(Promega)之 50 μL CL 緩衝液(IgePal CA-630、5M NaCl、1M Tris HCl 1M pH 7.4 於水中)溶解細胞並在室溫下，在振盪器上培育 45 分鐘。使用所得混合物(0.5 μL)，根據製造商之推薦，在 Taqman 快速病毒 1 步主混合物(Fast Virus 1-Step MasterMix；Applied Biosystems)逆轉錄 PCR 反應中，用以下 Taqman 引子評估剪接調節：SLC25A19 (Invitrogen, Hs00222265_m1)；RPLPO (Invitrogen, Hs99999902_m1)；18S (Invitrogen, Hs99999901_s1)。

【1177】 T-DM1 對照(曲妥珠單抗加微管破壞劑作為有效負載)並不影響 SLC25A19 剪接(**圖 7**)。相比之下，在不同測試細胞株中展示強效生長抑制活性的抗 HER2 ADC(**圖 5**)亦展示強效剪接調節，指示在靶作用機制(**圖 7**)。同樣，在細胞活力分析中展現較低效力的抗 HER2 ADC 在剪接調節方面效力較弱。

### 3.5.5 旁觀者細胞殺滅分析

【1178】 在旁觀者細胞殺滅分析中量測例示性抗 HER2 結合物殺滅目標陽性細胞及鄰近的目標陰性細胞之能力。將非小細胞肺癌細胞 NCI-H1568(ATCC)工程改造成表現螢光素酶。在 GeneArt(ThermoFisher

Scientific)合成 cDNA 並選殖至 pLVX-EF1a 目的載體(ThermoFisher Scientific)中。單獨地，利用 TransIT®病毒轉染系統，根據製造商之說明書(Mirus Bio LLC；#MIR6003)，將 NCI-H1568 工程改造成表現人類 HER2(選殖至 pLenti6.3/V5-DEST 中，ThermoFisher Scientific)。為評估結合物之旁觀者活性，將 2000 個目標陽性(經 HER2 轉導)NCI-H1568 細胞及 2000 個目標陰性(加 luc 標籤)NCI-H1568 細胞一起塗鋪於透明 96 孔圓底盤(Corning)中並與一式三份以 30-0.005 nM 之 3 倍連續稀釋液給與的結合物一起培育。在處理時，根據製造商之推薦，使用 OneGlo®螢光素酶分析系統(Promega)及 CellTiter-Glo®2.0 發光細胞活力分析系統(Promega)分析具有未處理細胞之盤以測定時間零(T0)。在培養 6 天之後，藉由 OneGlo®螢光素酶分析系統(Promega)分析殘留細胞群體以量測目標陰性細胞存活率。藉由 CellTiter-Glo®2.0 發光細胞活力分析系統(T144)量測總體活力。如 2.3 部分中所描述計算劑量反應曲線。

【1179】 旁觀者殺滅分析之設計允許僅追蹤目標陰性細胞，該等細胞之消除依賴於由鄰近的目標陽性細胞所釋放之分解代謝物的吸收。如上文所論述，在以下三個條件下塗鋪細胞：(1)單獨目標陰性(加 luc 標籤)細胞；(2)單獨目標陽性細胞；以及(3)目標陰性細胞及目標陽性細胞之共培養物。當用 CellTiter-Glo®試劑讀取盤時，可追蹤所有細胞群之活力以確定抗原依賴性 ADC 活性。相比之下，當使用 OneGlo®試劑時，僅目標陰性(加 luc 標籤)細胞會具有信號。

【1180】 目標陰性(加 luc 標籤)細胞當獨立地培養時對用抗 HER2 ADC 處理不敏感(**圖 8**)。然而，當將目標陰性細胞與目標陽性細胞一起培養時，用抗 HER2 ADC 處理使得對目標陰性細胞之殺滅增加。此等資料

表明，目標陰性細胞當與目標陽性細胞共培養時更有效地被抗 HER2 ADC 殺滅，在本文中稱為旁觀者殺滅。旁觀者殺滅可與脫靶殺滅相區分，脫靶殺滅定義為在無目標陽性細胞存在且不依賴於與目標陽性細胞共培養下獨立地殺滅目標(抗原)陰性細胞。

【1181】 在本實驗中，AB185-ADL5-D2 展示的殺滅抗原異質癌細胞群之能力相較於 AB185-ADL1-D1 增加。不希望受理論所束縛，此效力差異可歸因於 D2 中一個甲基之添加，由此使有效負載之細胞效力及滲透性相較於 D1 增加三倍(參見表 14)。D2 ADC 處理抗原異質癌細胞群之有效性與 AB185-MC-Val-Cit-MMAE 對照 ADC 相當。

**3.6 活體內分析**

【1182】 在活體內評估展現強效剪接調節及細胞生長抑制之例示性抗 HER2 ADC。

**3.6.1 HCC1954 異種移植物功效研究**

【1183】 為了研究例示性抗 HER2 ADC 在小鼠異種移植模型中之功效，將 HCC1954(ATCC)乳房導管癌細胞($10\times10^6$ 個細胞/100 μL/1:1 RPMI:基質膠體積)皮下植入雌性 CB17-SCID 小鼠之側腹中。用單次 IV 快速注射之劑量之結合物(在 DPBS 中調配，pH 7.4)或媒劑對照治療小鼠。給與動物**圖 9** 中指示之量。每週兩次監測所有動物之腫瘤生長及體重，直至其達到以下端點中之任一個：(1)過量腫瘤體積(藉由使用橢球體公式計算：(長度×寬度 $^2$)/2)；或(2)出現任何健康問題，諸如過量體重減輕。所有動物研究均根據關於實驗室動物之護理及使用的 H3 生物醫學指導(H3 Biomedicine Guide for the Care and Use of Laboratory Animals)進行。

【1184】用低至 2 mg/kg 之單次劑量的抗 HER2 ADC(AB185-ADL5-D2 或 AB185-ADL1-D1)治療使得腫瘤顯著消退(**圖 9**)。亦觀察到經結合有效負載之劑量反應，由此具有較高 DAR 值(DAR 為約 4)之抗 HER2 ADC 展示相對於劑量相配之抗體 T-DM1 對照增加之功效及減慢之腫瘤再生長。另外，經由 ADC 靶向腫瘤之有效負載比相應未結合之有效負載強效。

**實例 4**

【1185】為了確定實例 3 中所描述之例示性抗 HER2 ADC 之特性是否能外推至靶向替代性抗原及/或適應症之其他 ADC，將所選有效負載與例示性抗 CD138 抗體(B-B4)及例示性抗 EPH2A 抗體(1C1)結合。CD138 係在惡變漿細胞上，例如多發性骨髓瘤中表現，而 EPH2A 更常在多種惡性病中表現。以下描述例示性抗 CD138 ADC 及抗 EPH2A ADC 之製備及評價。

**4.1 抗體**

【1186】分別使用 B-B4 抗體(「AB205」)(Tassone 等人(2004)Blood 104:3688-96)及 1C1 抗體(「AB206」)(Jackson 等人(2008)Cancer Res.68(22):9367-74)製備抗 CD138 ADC 及抗 EPH2A ADC。

**4.2 生物結合**

【1187】將在 PBS 緩衝液(pH 7.0)中 10 mg/mL 之抗體(B-B4 或 1C1)與 5 mM TCEP (2-4 莫耳當量)(ThermoFisher Scientific；#77720)混合以斷裂鏈間二硫鍵。在 22℃下，輕柔地混合反應物 3 小時。接著添加丙二醇(15% v/v)，隨後添加 8 莫耳當量之連接子-有效負載(6 mM 於

DMSO 中之儲備液)，並充分地混合溶液。在 22℃下，將反應物放置於恆溫箱中之旋轉盤上。在 2 小時結合之後，藉由 AKTA GE M150(HiTrapTM 26/10 脫鹽管柱；流動速率：3 mL/min)(GE Healthcare Bio-Sciences)純化反應混合物以將未結合之有效負載移至 DPBS(pH 7.5)中。經由 Amicon 超濾器(30 kDa，Ultra-4)(EMD Millipore)濃縮所得結合物並經由 0.22 μm PVDF 拋棄式過濾器(EMD Millipore)進行無菌過濾。藉由 UV-VIS 量測最終澄清溶液，根據 Beer-Lambert 定律(A=*E***c**l)及以下公式測定抗體濃度([mAb]；mole/L)及經結合有效負載之濃度([LD]；mole/L)：

$A_{280nm} = E^{mAb}_{280nm} * [mAb] * l + E^{LD}_{280nm} * [LD] * l$

$A_{252nm} = E^{mAb}_{252nm} * [mAb] * l + E^{LD}_{252nm} * [LD] * l$

$E^{mAb}_{280nm}$： B-B4 = 224,320 $cm^{-1}M^{-1}$

1C1 = 215,380 $cm^{-1}M^{-1}$

$E^{mAb}_{252nm}$： B-B4 = 83,670 $cm^{-1}M^{-1}$

1C1 = 80,337 $cm^{-1}M^{-1}$；

$E^{LD}_{280nm}$ = 800 $cm^{-1}M^{-1}$

$E^{LD}_{252nm}$ = 31,000 $cm^{-1}M^{-1}$

縮寫：c-莫耳濃度；l-光路長度(Nanodrop：0.1 cm)；E-莫耳消光係數；A-吸光度。

**4.3 生理表徵**

【1188】分別藉由液相層析-質譜法(LC/MS)、尺寸排阻層析法(SEC)及反相高效液相層析法(HPLC)分析例示性抗 CD138 ADC 及抗 EPHA2 ADC 的 DAR、聚集百分比及未結合之有效負載的百分比。本文

所描述之所有結合物均含有少於 2%之游離藥物且含有少於 10%之聚集物。

**4.3.1 LC/MS 分析 - DAR**

【1189】如 3.3.1 部分中所描述執行 LC/MS 分析。例示性抗 CD138 ADC 及抗 EPHA2 ADC 之 DAR 值報告於表 15-18 中。

**4.3.2 SEC 分析 - 聚集**

【1190】如 3.3.2 部分中所描述執行 SEC 分析。例示性抗 CD138 ADC 及抗 EPHA2 ADC 之單體百分比報告於表 15 及 17 中。

**4.3.3 HPLC 分析 - 游離藥物**

【1191】如 3.3.3 部分中所描述執行 HPLC 分析。例示性抗 CD138 ADC 及抗 EPHA2 ADC 之游離藥物百分比報告於表 15 及 17 中。

**4.4 活體外分析**

**4.4.1 細胞活力**

【1192】在 CD138 表現性 MOLP8 多發性骨髓瘤細胞株中測試抗 CD138 ADC。類似地，在 EPHA2 表現性 PC3 前列腺癌細胞株中測試抗 EPHA2 ADC。如 2.3 部分中所描述執行細胞活力分析。

【1193】有效負載與抗 CD138 抗體(**圖 10** 及表 16)及抗 EPHA2 抗體(**圖 11** 及表 18)之結合引起與 3.5.1 部分中關於抗 HER2 ADC 所論述類似的趨勢。確切地說，具有某些連接子(例如 ADL12)及/或有效負載(例如 D1、D25、D4)之 ADC 在抗原表現細胞中展示最高效力。一致地，替代性有效負載(例如 D14)儘管為強效小分子，但經由抗體介導之遞送來抑制細胞生長的能力較弱。

## 表 15.例示性抗 CD138 ADC 之表徵

| SMLA 批料 ID | 有效負載類別 | 連接子 | DAR | 單體百分比 | 游離藥物 (%) | 濃度(mg/ml) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| AB205-ADL1-D14 | 芳基普拉二烯內酯 | ADL0001 | 2.900 | 92.000 | <2 | 1.010 |
| AB205-ADL5-D15 | 芳基普拉二烯內酯 | ADL0005 | 2.800 | 95.000 | <2 | 1.060 |
| AB205-ADL5-D19 | 普拉二烯內酯 B | ADL0005 | 4.000 | 95.000 | <2 | 0.880 |
| AB205-ADL1-D1 | 普拉二烯內酯 D | ADL0001 | 5.000 | 98.000 | <2 | 0.620 |
| AB205-ADL1-D4 | 普拉二烯內酯 D | ADL0001 | 4.800 | 98.000 | <2 | 1.010 |
| AB205-ADL5-D25 | 兩性離子型普拉二烯內酯 D | ADL0005 | 6.400 | 98.000 | <2 | 0.890 |
| AB205-ADL10-D1 | 普拉二烯內酯 D | ADL0010 | 3.400 | 96.000 | <2 | 0.750 |

## 表 15(續).例示性抗 CD138 ADC 之表徵

| SMLA 批料 ID | 有效負載類別 | 連接子 | DAR | 單體百分比 | 游離藥物 (%) | 濃度 (mg/ml) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| AB205-ADL12-D1 | 普拉二烯內酯 D | ADLD012 | 3.800 | 97.000 | <2 | 0.830 |
| AB205-ADL12-D2 | 普拉二烯內酯 D | ADL0012 | 3.300 | 97.000 | <2 | 0.970 |

## 表 16. 例示性抗 CD138 ADC - MOLP8 細胞

| | | SMLA | | | 有效負載 | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 樣品 | DAR | GI50 (nM) | LD50 (nM) | Rmin (%) | GI50 (nM) | LD50 (nM) | Rmin (%) |
| AB205-ADL1-D1 | 5 | <0.061 | 0.656 | -100.099 | 6.885 | 25.712 | -100.248 |
| AB205-ADL5-D15 | 2.8 | 0.268 | >400 | 2.419 | 0.776 | 9.178 | -100.198 |
| AB205-ADL5-D19 | 4.9 | <0.061 | >400 | -46.23 | 0.84 | 4.58 | -62.2 |
| AB205-ADL10-D1 | 3.4 | 0.08 | >400 | -25.099 | 6.885 | 25.712 | -100.248 |
| AB205-ADL12-D1 | 3.8 | <0.061 | 0.168 | -99.851 | 6.885 | 25.712 | -100.248 |
| AB205-ADL12-D2 | 3.3 | <0.061 | >400 | -53.125 | 0.316 | 5.035 | -100.198 |
| AB205-ADL1-D14 | 3 | <0.061 | >400 | -74.008 | 1.9 | 8.5 | -61 |
| AB205-ADL1-D4 | 4.8 | <0.061 | 0.535 | -99.306 | 1.151 | 12.99 | -101.935 |
| AB205-ADL5-D25 | 6.4 | <0.061 | 11.669 | -76.736 | 149.874 | >400 | 5.94 |

## 表 17. 例示性抗 EPHA2 ADC 之表徵

| SMLA 批料 ID | 有效負載類別 | 連接子 | DAR | 單體百分比 | 游離藥物 (%) | 濃度(mg/ml) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| AB206-ADL1-D1 | 普拉二烯內酯 D | ADL0001 | 5.600 | 99.000 | <2 | 2.060 |
| AB206-ADL5-D2 | 普拉二烯內酯 D | ADL0005 | 6.300 | 99.000 | <2 | 1.900 |
| AB206-ADL1-D4 | 普拉二烯內酯 D | ADL0001 | 6.000 | 95.000 | <2 | 1.140 |
| AB206-ADL1-D8 | 普拉二烯內酯 D | ADL0001 | 6.500 | 95.000 | <2 | 1.660 |
| AB206-ADL1-D14 | 芳基普拉二烯內酯 | ADL0001 | 3.600 | 80.000 | <2 | 1.620 |
| AB206-ADL5-D19 | 普拉二烯內酯 B | ADL0005 | 4.600 | 97.000 | <2 | 0.960 |
| AB206-ADL5-D15 | 芳基普拉二烯內酯 | ADL0005 | 4.200 | 95.000 | <2 | 0.820 |

## 表 17(續). 例示性抗 EPHA2 ADC 之表徵

| SMLA 批料 ID | 有效負載類別 | 連接子 | DAR | 單體百分比 | 游離藥物 (%) | 濃度 (mg/ml) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| AB206-ADL5-D25 | 兩性離子型普拉二烯內酯 D | ADL0005 | 5.000 | 96.000 | <2 | 1.130 |
| AB206-ADL10-D1 | 普拉二烯內酯 D | ADL0010 | 2.700 | 97.000 | <2 | 1.620 |
| AB206-ADL12-D1 | 普拉二烯內酯 D | ADL0012 | 6.400 | 90.000 | <2 | 0.670 |
| AB206-ADL12-D2 | 普拉二烯內酯 D | ADL0012 | 6.300 | 90.000 | <2 | 0.850 |

## 表 18. 例示性抗 EPHA2 ADC - PC3 細胞

| | SMLA | | | | 有效負載 | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 樣品 | DAR | GI50 (nM) | LD50 (nM) | Rmin (%) | GI50 (nM) | LD50 (nM) | Rmin (%) |
| AB206-ADL1-D8 | 6.5 | 0.175 | 95.51 | -66.678 | 16.622 | 177.783 | -68.37 |
| AB206-ADL1-D4 | 6 | <0.061 | 2.732 | -69.096 | 11.057 | >400 | -55.97 |
| AB206-ADL1-D14 | 3.6 | 3.046 | >400 | -49.267 | 3.877 | >400 | -79.835 |
| AB206-ADL12-D1 | 6.4 | 0.808 | >400 | -64.516 | 13.291 | >400 | -71.987 |
| AB2G6-ADL12-D2 | 6.3 | 78.977 | >400 | 17.376 | 2.391 | >400 | -68.803 |
| AB206-ADL5-D19 | 4.6 | 71.73 | >400 | 19.765 | 1.41 | >400 | -29.33 |
| AB206-ADL10-D1 | 2.7 | >400 | >400 | 43.796 | 13.291 | >400 | -71.987 |
| AB206-ADL5-D15 | 4.2 | 9.959 | >400 | 2.441 | 3.877 | >400 | -79.835 |
| AB206-ADL5-D25 | 5 | 28.078 | >400 | 20.041 | >400 | >400 | 77.524 |
| AB206-ADL1-D1 | 5.6 | <0.061 | >400 | -59.643 | 13.291 | >400 | -71.987 |
| AB206-ADL5-D2 | 6.3 | 1.003 | >400 | 16.465 | 2.391 | >400 | -68.803 |

**實例 5**

【1194】 如下所述，評估例示性抗 HER2 ADC 之活體外及/或活體內穩定性。

**5.1 血漿中 AB185-ADL1-D1 之總抗體及經結合有效負載**

【1195】 在用 AB185-ADL1-D1 活體外治療(5.1.1 部分)或活體內治療(5.1.2 部分)後，藉由免疫沈澱 LC/MS/MS 技術定量血漿中總抗體(TAb)及經結合有效負載(CP)之水準。對於 TAb 及 CP，在小鼠血漿中分別自 0.5-100 μg/mL 及 0.5-500 ng/mL 之 $1/x^2$ 加權下，定量擬合呈線性。將血漿樣品與穩定同位素標記之通用單株人類抗體內標(SIu™MAB，Sigma，St. Louis，MO)及 10 mM PBS(pH 7.4)混合並在室溫下培育一小時。將 Dynabeads® MyOne™ 抗生蛋白鏈菌素 T1 磁珠(ThermoFisher Scientific)添加至混合物中並在室溫下再培育 30 分鐘。使用磁力架結合珠粒，依序用 CHAPS 緩衝液且接著 PBS 緩衝液洗滌。用 30 mM HCl 自珠粒溶離出所關注分析物。使用單獨的溶離液等分試樣定量 TAb 或 CP。對於 TAb，添加 pH 8.3 之 Tris-HCl，隨後添加胰蛋白酶並在 37℃下培育隔夜。對於 CP，添加 1M 乙酸銨，隨後添加氘化之有效負載內標及組織蛋白酶 B，並在 25℃下培育隔夜。藉由 LC/MS/MS 分析樣品並使用分析物與內標之面積比定量，且與各別校準曲線相比較。為計算 CP 濃度，針對有效負載之分子量、AB185-ADL1-D1 之分子量及 DAR(藥物與抗體比)校正 TAb 之濃度。

**5.1.1 AB185-ADL1-D1 在小鼠、大鼠及猴血漿中之活體外穩定性**

【1196】 向自小鼠、大鼠及猴彙集之血漿(Bioreclamation)及 PBS 中摻加 AB185-ADL1-D1(4.81 mg/mL)以達到 50 μg/mL 之最終濃度。在

37℃、95%濕度、5% $CO_2$ 下培育樣品 4 天，其方式使得 pH 穩定並使非特異性結合及蒸發減到最少。在 4 小時、24 小時、48 小時、72 小時及 96 小時的時候取出等分試樣並在-70℃下儲存直至加工。將樣品解凍並加工以使用以上關於總抗體及經結合有效負載所描述之方法(5.1 部分)進行生物分析。對於每一基質，時間 0 設定為 100%。對於每一基質，將隨後時間點之面積比反應分別與時間 0 相比較。殘餘物百分比計算如下：(第 X 天之面積比/時間 0 之面積比)*100=殘餘物%。在 Excel 中，藉由比較殘餘物%的對數及時間點計算直線之斜率。在 Excel 中，藉由 In(2)/斜率計算半衰期。

【1197】發現來自 AB185-ADL1-D1 之總抗體在緩衝液中及在所有物種之血漿中穩定，僅在 4 天內展現少量沈澱(**圖 12A**)。在 4 天內維持經結合(完整)有效負載 D1 水準(**圖 12B**)。

**5.1.2 在單次 IV 劑量之 AB185-ADL1-D1 之後小鼠血漿中之 Snapshot 藥物動力學(PK)**

【1198】用 10 mg/kg 或 20 mg/kg 單次 IV 劑量之 AB185-ADL1-D1 治療小鼠(CB17-SCID)，隨後在給藥後 24 小時、48 小時及 72 小時，終末收集(心臟穿刺)於肝素鋰管(n=3 個/時間點/劑量組)中。在 4℃下，以 5000 rpm 離心血液 5 分鐘以移除紅血球並在-80℃下儲存血漿直至加工。將樣品解凍並加工以使用以上關於總抗體及經結合有效負載所描述之方法(5.1 部分)進行生物分析。

【1199】在單次 IV 劑量之 AB185-ADL1-D1 之後，超過 400 ng/mL 之完整 D1 有效負載在給藥後 72 小時保持結合至 AB185 抗體(**圖 13**)。AB185-ADL1-D1 ADC 展示相較於帶有有效負載且作用機制類似之

替代性 ADC 改善的穩定性。Puthenveetil 等人(Bioconjugate Chem.(2016)27:1880-8)中所報導的基於泰蘭他汀 A 之 ADC 相對不太穩定，且在 72 小時的時候，顯示有效負載之完全生物轉化(亦即，乙酸酯完全水解)。

**5.2 AB185-ADL14-D1 及 AB185-ADL5-D25 之加速穩定性測試**

【1200】將新鮮製造之 SMLA(在 Eppendorf 管中各自約 1 mg，4-5mg/mL)離心並在 280 nm 下藉由 UV 吸收(NanoDrop)量測以測定蛋白質濃度。接著，在 37℃水浴中培育樣品並在以下四個時間點取樣：0(新鮮製備時)、1 天、2 天及 4 天。在-80℃下儲存在不同時間點獲取的樣品，直至完成最後一次取樣。在 22℃下解凍之後，用 SEC、疏水相互作用層析法(HIC)及反相 MS(RP-HPLC)分析樣品以定量抗體聚集/片段及 DAR。在四個時間點的 AB185-ADL14-D1 及 AB185-ADL5-D25 之聚集百分比、濃度及 DAR 值(HIC 及 RP-HPLC)顯示於表 19 中。

**表 19.所選抗 HER2 ADC 之加速穩定性測試**

| ADC | 儲存緩衝液 | 在 37℃下之天數 | 聚集(%) | 濃度 (mg/mL) | DAR | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | HFC | RP-HPLC |
| AB1B5-ADL14-D1 | DPBS(pH 7.5) | 0 | 0.68 | 4.99 | 4.3 | 4.32 |
| | | 1 | 1.18 | 4.98 | 4.29 | 4.31 |
| | | 2 | 1.31 | 5.12 | 4.33 | 4.32 |
| | | 4 | 2.08 | 5.02 | 4.28 | 4.27 |
| AB185-ADL5-D25 | DPBS(pH 7.5) | 0 | 0.84 | 5.05 | 4.54 | 4.22 |
| | | 1 | 1.14 | 4.16 | 4.44 | 4.19 |
| | | 2 | 1.41 | 4.52 | 4.74 | 4.19 |
| | | 4 | 2.43 | 3.98 | 4.64 | 4.12 |

**實例 6**

【1201】為確定用基於剪接調節劑之 ADC(亦即，本文所描述之例示性 ADC)處理之細胞是否能產生適合於激活 T 細胞轉變成效應細胞(亦即，能夠靶向新抗原之效應細胞)的該等新抗原，執行以下實驗。

## 6.1 RNA 定序及蛋白質配體組實驗

### 6.1.1 綜述

【1202】 探尋在 ADC 處理之後轉錄組之變化。用意圖觸發穩健的異常 mRNA 剪接之濃度(分別為 4 nM 及 1.3 nM)的 ADC(AB185-ADL1-D1)處理兩個過度表現 HER2 之細胞株，該等細胞株中一個為工程改造之非小細胞肺癌細胞株(NCI-H1568)且一個為 HER2 擴增之乳癌細胞株(HCC1954)。在處理後 24 小時，執行 RNAseq 實驗。此等實驗展示，多種 mRNA 轉錄物展現改變之剪接模式。

【1203】 接著，為探尋所鑑別之轉錄物是否能轉譯且作為新抗原呈現於腫瘤細胞 MHC1 複合體上，選擇允許 mRNA 轉錄物轉譯，但尚未出現廣泛細胞毒性作用(因為該等作用可能損害對供分析之細胞材料的收集)的時間點。接著，用 3 nM ADC 處理 NCI-H1568 及 HCC1954 細胞株 48 小時並藉由 LC-MS/MS 分析 MHC1 結合之肽組。依據達到 8-14 個胺基酸片段之初級肽尺寸(定義為關於結合至 MHC1 之尺寸限制標準)過濾肽組資料且接著針對已知人類蛋白質過濾。所鑑別之肽係表徵為自身抗原，不管偵測到該等肽之條件及細胞株如何。針對 RNAseq 資料之 3 碼閱讀框架轉譯對所有殘留肽序列進行定位。使用有關評價肽序列之嚴格標準(包括排除以下：在任何未處理樣品中鑑別之任何肽、在典型開放閱讀框架中不編碼之任何肽及不由 mRNA 之跨外顯子接合點部分編碼之任何肽，其中外顯子接合點藉由用 AB185-ADL1-D1 處理而改變)，鑑別四個 MHC1 結合之新肽。關於例示性 RNA 定序及蛋白質配體組實驗之示意圖，參見**圖 14**。

### 6.1.2 詳細方法

#### 6.1.2.1 ADC 處理之細胞的 RNA 定序

【1204】將 HCC1954 及過度表現 HER2 之 NCI-H1568(ATCC)細胞以 $1\times10^5$ 個細胞塗鋪於 6 孔組織培養盤(Corning)之各個孔中。分別用磷酸鹽緩衝生理食鹽水或 1.3 nM 及 4 nM 之 AB185-ADL1-D1 處理細胞 24 小時。使用 RNAeasy 微型套組(Qiagen)自細胞提取總 RNA，並評估品質及數量(2100 生物分析儀上之 RNA 6000 Nano LabChip 套組，皆來自 Agilent)。根據標準 Illumina 方案，製備多聚腺苷酸選擇之 RNA-Seq 文庫。使用 DNA-1000 套組，在 2100 生物分析儀(二者皆來自 Agilent)上檢查 cDNA 文庫之品質並定量。彙集文庫並在 HiSeq2000(Illumina)上定序以獲得 101 個鹼基之配對端讀段。

【1205】使用兩遍比對(two-pass alignment) 35，藉由 STAR 2.4.2a 將原始序列讀段與人類參考序列 hg19 比對，並使用 Kallisto 0.42.4(Bray 等人(2016)Nat Biotechnol.34(5):525-7)，針對映射至 GRCh37 之 GENCODE 註釋 v 25 執行同功異型物定量。藉由界定 6 nt(距剪接位點−3 nt 且在剪接位點之後+3)外顯子-內含子邊界區域並對與該等區域完全重疊之比對計數來估算保留之內含子計數。彙集每組所有技術重複實驗內的所有原始接合點計數，包括來自外顯子-內含子邊界之該等計數。使用二項 z 測試，針對經處理與未處理樣品池之間比例的差異評估差異性接合點使用。基於共享剪接位點之所有剪接接合點(及外顯子-內含子邊界)計算比例，類似於(PSI)量測中之剪接百分比。為保持高斯假設(Gaussian assumption)，僅考慮將經處理組與未處理組中共享剪接位點且總接合點計數(共享剪接位點之所有接合點的原始計數總和)大於或等於 10 個讀段者用於分析。對應於假發現率(FDR)校正之 q 值對於經處理(『異常』)接

合點≤0.05 且對於未處理(『典型』)接合點≤0.20 的 z 分數視為顯著的。

【1206】 將共享剪接位點且至少一個接合點在經處理樣品中明顯上調或至少一個接合點在未處理樣品中明顯上調的兩個或兩個以上剪接接合點分別視為異常或典型接合點。在視為差別性剪接之事件中，需要異常及典型接合點同時存在。在內含子保留事件之情況下，兩個外顯子-內含子邊界(5'及 3'剪接位點)以及橋連該兩個邊界之接合點需要為顯著的。

**6.1.2.2 ADC 處理之細胞的 MHC1 結合之肽組**

【1207】 將 HCC1954 及過度表現 HER2 之 NCI-H1568(ATCC)細胞以 $1\times10^8$ 個細胞塗鋪於 15 $cm^2$ 之組織培養盤(Corning)上。用磷酸鹽緩衝生理食鹽水或 3 nM AB185-ADL1-D1 處理細胞 48 小時。以機械方式自該等盤移出細胞並根據 Bassani-Sternberg 等人((2015)Mol Cell Proteomics 14(3):658-73)加工。簡言之，該程序涉及溶解細胞膜中之 MHC-1 蛋白質複合體，藉由免疫沈澱富集 MHC-1 蛋白質及其結合之肽，選擇性溶離並純化經結合肽，且藉由 LC/MS/MS 分析鑑別並定量肽。使用自其融合瘤細胞株 HB-95TM 純化之單株抗體 W6/32 進行免疫沈澱。在 Q Exactive HF 儀器上執行質譜分析。用 MaxQuant 軟體組(1.5.7.13 版)處理在本研究中獲取的原始文件，使用人類蛋白質序列資料庫(22017 版)進行肽及蛋白質鑑別及定量。除此資料庫外，亦包括基於對 AB185-ADL1-D1 處理之 HCC1954 及 NCI-H1568 細胞進行 RNAseq 實驗預測的轉錄物變異體。MaxQuant 執行 6 碼開放閱讀框架轉譯並整合所獲得的肽序列以與 $MS^2$譜圖相匹配。進一步針對 AB185-ADL1-D1 處理之樣品所特有的肽序列以及針對由 AB185-ADL1-D1 處理調節之 mRNA 剪接接合點所編碼的肽手動地過濾資料(**圖 14**)。藉由高嚴格度過濾

RNAseq 及 MHC-1 結合之配體組資料鑑別四種新肽。此等新肽係由四個基因編碼。使在本文中稱為新抗原 1、新抗原 2、新抗原 3 及新抗原 4 的四種新肽之蛋白質序列延伸以在以下實驗中觸發免疫細胞激活。除側接胺基酸序列之外，經延伸之蛋白質序列亦併入該兩個新肽序列本身。經延伸之蛋白質序列較佳地促進樹突狀細胞對蛋白質之吸收，且能夠在具有不同 HLA 同型之模型中進行抗原呈現及 T 細胞激活。

**6.2 T 細胞激活實驗**

**6.2.1 綜述**

【1208】 本實驗係在活體外重建正常人類次級淋巴器官(例如腫瘤引流淋巴結)中發生的相互作用。在本實驗中，自周邊血液單核細胞(PBMC)分離單核球並經由在細胞介素混合液中培養，誘導其分化成樹突狀細胞(DC)。在分化成為成熟 DC 之後，將成熟 DC 與經延伸之新肽序列一起培養。在培養期間，成熟 DC 吸收該等肽，將其加工成片段，並將其呈現於 MHC1 上以激活 CD8 T 細胞。接著，將 DC 與來自同一供體之額外 PBMC 混合並在細胞介素混合液中培育約 2 週以刺激 CD8 T 細胞之活化。培育後，將細胞轉移至再塗佈用於激活之該等肽的 ELISpot 盤中並藉由 IFNγ 之分泌監測 CD8 T 細胞之再刺激。接著，加工 ELISpot 盤並獲取圖像，且對 IFNγ 斑點計數以估算活性 CD8 T 細胞之數量。關於例示性 T 細胞激活實驗之示意圖，參見**圖 15**。

**6.2.2 詳細方法**

**6.2.2.1 新抗原介導之 T 細胞激活及活化 ELISpot**

【1209】 整體周邊血液單核細胞(PBMC)係購自多位供應商(StemExpress、HemaCare、Precision Medicine)並按照 Wölfl 及

Greenberg((2014)Nat Prot.9(4):950-66)，使用其產生抗原反應性 CD8+ T 細胞(**圖 15**)。簡言之，將冷凍之 PBMC($5\times10^7$ 個細胞)解凍並塗鋪於 T-75 組織培養塑料器皿(Corning)上補充有 5%人類 AB 血清及 1%青黴素/鏈黴素(penicillin/streptomycin)之 RPMI1640 中，保持 2-3 小時。移除並丟棄非黏附細胞，並在補充有 20 ng/mL GM-CSF 及 20 ng/mL IL-4 之 RPMI1640/5%人類血清中培養黏附細胞 5 天。在第 6 天，培養基進一步補充有 20 ng/mL TNF-α。在第 7 天，收集成熟 DC，計數並裝載由 MHC1-肽組實驗所鑑別的新肽(**圖 16**)。分離細胞並裝載 10 μg/$10^6$ 個細胞/毫升之最終濃度的各肽且培育 1 天。在第 8 天，用 20 μg/mL 絲裂黴素 C 處理 DC 達 30 分鐘並充分地洗滌。在處理 DC 之同時，解凍 $10^8$ 個相配之 PBMC 並用 RPMI1640 洗滌。接著，在 T25 燒瓶中，將 PBMC 與 DC 以 10:1 之比率混合於補充有 30 ng/mL IL-21 的 10 mL RPMI1640/5%人類 AB 血清中。在共培養 3 天(第 11 天)之後，再添加 10 mL 新鮮培養基並補充 5 ng/mL 最終濃度之 IL-7 及 IL-15。又共培養 3 天(第 14 天)後，再添加補充有 5 ng/mL 最終濃度之 IL-7 及 IL-15 的 10 mL 新鮮培養基並將共培養物移至 T-75 燒瓶中。在第 17 天，再添加補充 10 ng/mL 最終濃度之 IL-7 及 IL-15 的 20 mL 培養基並將細胞轉移至 T-175 燒瓶中。在第 20 天，收集細胞並按照製造商之說明書(R&D Systems)執行 ELISpot 分析。使用每孔 10 μg/mL 最終濃度之肽預裝載各孔，細胞密度為每孔 $2\times10^5$ 個細胞，一式兩份接種並培育隔夜。顯現 IFNγ 斑點並按照製造商之說明書，在 AID ELISpot 讀取器上讀取(**圖 17A-D**)。

【1210】 由抗原激活實驗得到的例示性資料顯示於**圖 17A-D** 中。如**圖 15** 中所略述，使供體來源之 PBMC 批料分化成 DC 並用新肽激活。分

析 ELISpot 資料顯示，在健康供體 PBMC 中，藉由 DC 呈現之新肽激活原生 T 細胞可引起效應(CD8)T 細胞群之抗原特異性擴增及成熟。如藉由 IFNγ 分泌證實，此等 T 細胞群僅在抗原肽存在下展現抗原特異性再活化，而在非激活肽存在下則不展現。

**RT-qPCR**

【1211】 根據製造商之說明書，使用 RNeasy Mini，用 DNA 酶 I 處理劑(Qiagen)及 20 μL 使用 Superscript VILO 逆轉錄酶(ThermoFisher Scientific)逆轉錄之 1-2 μg RNA，自細胞株中純化出 RNA。分離 RNA 溶解產物並根據製造商之說明書，使用 TaqMan Gene Expression Cells-to-CT 套組(ThermoFisher Scientific)逆轉錄。使用 TaqMan 基因表現主混合物(Gene Expression Master Mix；ThermoFisher Scientific)，用靶向新抗原接合點與 *GAPDH* RNA VIC-PL(ThermoFisher Scientific)之雙螺旋的轉錄物探針執行定量 PCR 並使用 *ΔΔCt* 方法定量。

**實例 7**

**7.1 RNA 定序及蛋白質配體組實驗**

**7.1.1 方法**

【1212】 如實例 6 (6.1 部分)中所描述執行 RNA 定序及蛋白質配體組實驗。關於例示性 RNA 定序及 MHC1 配體組實驗之示意圖，參見**圖 14**。

**7.1.2 結果**

【1213】 藉由高嚴格度過濾 RNAseq 及 MHC1 結合之配體組資料鑑別出二十九種新肽(表 20)。選出四種新肽並延伸以進行以下實驗，觸發免疫細胞激活。該四種所選新肽在表 20 中以粗體顯示。

表 20. 新肽

| 新肽 | | SEQ ID NO | 接合點(HG19) | 基因 | 事件類型 | 在以下中觀察到 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | SPTLPPRSL | 37 | chr12:49663470-49663610:+ | TUBA1C | 內含子保留 | H1568 |
| 2 | HPSIKRGLSSL | 38 | chr12:42729776-42781257:+ | PPHLN1 | 外顯子跳躍 | H1568 |
| 3 | LLLPHHVL | 39 | chr12:49663470-49663610:+ | TUBA1C | 內含子保留 | H1568 |
| 4 | RTAPGVRPPF | 40 | chr14:35182767-35183743:- | CFL2 | 內含子保留 | H1568 |
| 5 | RPQKSIQAL | 41 | chr10:28822963-28823162:+ | WAC | 內含子保留 | H1568 |
| 6 | APAPPPLPA | 42 | chr17:80009840-80011149:+ | GPS1 | 內含子保留 | H1568 |
| 7 | RPRPSFPVSL | 43 | chr7:55087058-55134942:+ | EGFR | 內含子保留 | H1568 |
| 8 | RPKHGDGFSL | 44 | chr11:57472287-57472444:- | MED19 | 內含子保留 | H1568 |
| 9 | GPAPGKTGL | 45 | chr7:75932393-75933118:+ | HSBP1 | 內含子保留 | H1568 |
| 10 | **EAARKGNSL** | **46** | **chr1:53480715-53504588:+** | **SCP2** | **外顯子跳躍** | **H1568** |
| 11 | **RIKEKIEEL** | **47** | **chr9:72897499-72912881:+** | **SMC5** | **外顯子跳躍** | **H1568** |
| 12 | **EIKKRFRQF** | **48** | **chr1:28531860-28541450:-** | **DNAJC8** | **外顯子跳躍** | **H1568** |
| 13 | **HESAAMAET** | **49** | **chr11:102272937-102323254:-** | **TMEM123** | **外顯子跳躍** | **HCC1954** |
| 14 | ALKLKQVGV | 50 | chr1:153610924-153617539:+ | CHTOP | 外顯子跳躍 | H1568 |
| 15 | DLKKRHITF | 51 | chr13:41323417-41331008:- | MRPS31 | 外顯子跳躍 | H1568 |
| 16 | DVKRNDIAM | 52 | chr1:41213277-41218822:+ | NFYC | 外顯子跳躍 | H1568 |
| 17 | IPSDHILTPA | 53 | chr6:149718900-149720239:+ | TAB2 | 外顯子跳躍 | H1568 |
| 18 | TVFSTSSLK | 54 | chr11:61197654-61213412:+ | SDHAF2 | 外顯子跳躍 | H1568 |
| 19 | ITSCLLNF | 55 | chr5:137892555-137893090:- | HSPA9 | 內含子保留 | H1568 |
| 20 | RASPVRGQL | 56 | chr7:75677544-75677893:+ | MDH2 | 內含子保留 | H1568 |
| 21 | VVRKPVIAL | 57 | chr1:36923582-36929406:- | MRPS15 | 外顯子跳躍 | H1568 |
| 22 | LLSEKKKIS | 58 | chr6:31750622-31750872:- | VARS | 內含子保留 | H1568 |
| 23 | APASKPRPRL | 59 | chr19:3573798-3574380:+ | HMG20B | 內含子保留 | H1568 |

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 24 | RYGQLSEKF | 60 | chr19:33076813-33078158:+ | PDCD5 | 外顯子跳躍 | HCC1954 |
| 25 | VYISNVSKL | 61 | chr3:53920961-53925796:- | SELK | 外顯子跳躍 | HCC1954 |
| 26 | LPTKETPSF | 62 | chr2:85133241-85133394:+ | TMSB10 | Alt 3'ss | HCC1954 |
| 27 | GEAPPPPPA | 63 | chr17:80223672-80231181:- | CSNK1D | 內含子保留 | HCC1954 |
| 28 | LEEISKQEI | 64 | chr17:27804724-27807385:+ | TAOK1 | 外顯子跳躍 | HCC1954 |
| 29 | IYNHITVKI | 65 | chr4:2886393-2896308:+ | ADD1 | 外顯子跳躍 | HCC1954 |

【1214】使該二十九種新肽之蛋白質序列延伸。除側接胺基酸序列之外，經延伸之蛋白質序列亦併入該兩個新肽序列本身。經延伸之蛋白質序列較佳地促進樹突狀細胞對蛋白質之吸收，且能夠在具有不同 HLA 同型之模型中進行抗原呈現及 T 細胞激活。該二十九種經延伸新肽之胺基酸序列闡述於表 21 中。

**表 21.經延伸新肽之胺基酸序列**

| 基因 | SEQ ID NO | 經延伸新肽之胺基酸序列* |
|---|---|---|
| TUBA1C | 66 | VDLEPTVIGELTSVTQVRSQGAGTGGLSWGGSAGHSPTLPPRSLSLLLLPHHVLQMKFALALTASSSTLSNSSQARKMLPITMPEGTTPLARRSLTSCWTEFASWLTSAPVFRASWFSTALVGELVLGSPRCSWNVSQLIMARSPSWSSPFTRRPRFPQL |
| PPHLN1 | 67 | APPRSHPSIKRGLSSL |
| CFL2 | 68 | MVRRARWPGGRGEARKAPRTAPGVRPPF |
| WAC | 69 | WVNCLFVSGRAAAGGGGGGAVPPYLELAGPPFLLLTLIRIGLGRRSGRAGGRAGTQCGGERGPGFAAFRPLRPFRRLRVCAVCVRGSALGRSVGLPRGGAAGAPFSSSPAPHPRRVLCRCLLFLFFSCHDRRGDSQPYQVPAEAGVEGLEGAGGGREGLLLERRPQKSIQALRCNTSETSTADPLKIPGLVPLALSSKV |
| GPS1 | 70 | MPLPVQVFNLQVTSRGRPGPPRPRAPRHWGRAEVEQGRGACARSRSGTLRAGPPRAARVGGCRAEGASPPWLRAAIGGRRAAPAPPPLPAAHGRGSRPPRR |
| EGFR | 71 | QPAQPRTGAPARRPRPRPSFPVSLRSAAPPTGTAGGTGRFVLRPGESGAGGGGDAWDTGLQARRGTAAGTSGAPNRSQLSSLTFPAQLRRIGVSGRKPGAGGRLGPGSRTCAPRCLPRARRGPGAHPRGGRCPPAETALFREAEEGTQKYSLPSDPAGQAAF |
| MED19 | 72 | FRLHTGPVSPVGGRRQMGRPKHGDGFSLQVCSFIMEQNG |
| HSBP1 | 73 | GVVEITGEPPCSCRGEEEASRAGRAGGVRLKRGSRGPGELNVGPAPGKTGLLIPLLRNWECGSLLRALSAL |
| SCP2 | 74 | KMGFPEAARKGNSL |
| SMC5 | 75 | LEARIKEKIEELQQALI |
| DNAJC8 | 76 | EIKKRFRQFKQAVYKQ |
| TMEM123 | 77 | AHESAAMAETLQHVPS |

| | | |
|---|---|---|
| CHTOP | 78 | NRPSVQAALKLKQVGV |
| MRPS31 | 79 | KTDDLKKRHITFTLGCGIC |
| NFYC | 80 | MKLDEDVKRNDIAMAI |
| TAB2 | 81 | NSISQIPSDHILTPALFITFMTILDL |
| SDHAF2 | 82 | TVFSTSSLKLNQPQKYLKMKSWPC |
| HSPA9 | 83 | AEEDRRKKVITSCLLNFNLSKAQS |
| MDH2 | 84 | RSFSTSAQVGQTRGGLQAEAPRPGPRASPVRGQL |
| MRPS15 | 85 | RGYVVRKPVIALSVKI |
| VARS | 86 | VDMDFGTGGQGAGPVGRGKDWSCTLAVHLLSEKKKISFSQIDRA WGGSQGTVLDKWGPGVVSELHPSAKEVSVGRNSVESLMTWAS |
| HMG20B | 87 | EKGSHEEEVRVPALSWGRPRAPAPASKPRPRLDLNCLWLRPQPIF LWKLRPRPVPAATPLTGPLPL |
| PDCD5 | 88 | RYGQLSEKFNRRKVMDS |
| SELK | 89 | MVYISNVSKLCFSKM |
| TMSB10 | 90 | NTLPTKETPSFLLNPHTSWVPRPHREAPRLRVGVAAPLQRPLPAL HSH |
| CSNK1D | 91 | FGDIYLGEAPPPPPAARRPGPCGCQDQARSRKEVVAPAGSPRKSR HRRIVARTQRPLG |
| TAOK1 | 92 | GSASDLLEEISKQEISF |
| ADD1 | 93 | QLIYNHITVKINLQGD |

* 底線指示來源於典型轉錄物閱讀開放框架(亦即，典型肽序列)之胺基酸。

## 7.2 T 細胞激活實驗

### 7.2.1 綜述

【1215】 關於例示性 T 細胞激活實驗之示意圖，參見**圖 15**。

### 7.2.2 材料

【1216】 用於 T 細胞激活之材料：

- RPMI 1640 培養基(Thermo Fisher Scientific，目錄號 A10491-01)
- 青黴素/鏈黴素(100×，Thermo Fisher Scientific，目錄號 15140122)
- 人類血清 AB 型(Sigma，目錄號 H3667-100ML)
- 重組人類 IL-4 (Peprotech，目錄號 200-04)
- 重組人類 GM-CSF (Peprotech，目錄號 300-03)
- 重組人類 TNF-α (Peprotech，目錄號 300-01A)

- 人類 IL-7 (Peprotech，目錄號 200-07)
- 人類 IL-15 (Peprotech，目錄號 200-15)
- 人類 IL-21 (Peprotech，目錄號 200-21)
- 肽(New England Peptide - 95%純度，溶解於 DMSO 中得到 10 μg/μL 濃度之 1000X 儲備液)
- 關於人類 IFN-y 之 ELISpot 套組(R&D Systems，目錄號 EL285)

**7.2.3 方法**

**7.2.3.1 人類單核球源性樹突狀細胞之產生及成熟以及新肽之裝載**

【1217】將冷凍或新鮮 PBMC 解凍並在預溫熱之 RPMI 培養基中洗滌一次，且保留非黏附細胞之等分試樣用於基線 TCR 定序。使 PBMC 以 $5\times10^6$ 個細胞/毫升再懸浮於 10 mL 樹突狀細胞(DC)培養基(RPMI1640，補充有 5%人類 AB 血清及 1%青黴素/鏈黴素)中，總計 $5\times10^7$ 個細胞。將細胞轉移至 T-75 組織培養塑料器皿中並在 37℃、5% $CO_2$ 下培育 2-3 小時。在輕柔振盪後，移除並丟棄非黏附細胞，且用預溫熱之 DC 培養基洗滌黏附(富含單核球)細胞三次。將補充有 20 ng/mL 最終濃度之 GM-CSF 及 20 ng/mL IL-4 的 10 mL DC 培養基添加至黏附細胞中。在 37℃、5% $CO_2$ 及 100%濕度下培育黏附細胞 5 天。在第 6 天，添加重組 TNF-α 達到 20 ng/mL 之最終濃度，再保持 48 小時。在第 7 天，收集 DC 並計數，接著裝載新肽(各自為 10 μg/$1\times10^6$ 個細胞/毫升)或無新肽對照。在第 8 天，收穫細胞作為成熟 DC。在 37℃下，用 20 μg/mL 最終濃度之絲裂黴素 C 處理成熟 DC 達 30 分鐘，隨後徹底洗滌，接著與 T 細胞共培育以實現激活。

**7.2.3.2 開始與自體 T 細胞之共培養**

【1218】在第 0 天，將冷凍或新鮮解凍並在預溫熱之培養基中洗滌一次。接著，在 T25 燒瓶中，使 PBMC 再懸浮並與 DC 以 10:1($10\times10^6$:$1\times10^6$ 個細胞)之比率混合於補充有 30 ng/mL IL-21 之 10 mL RPMI1640/5%人類 AB 血清中。在共培養 3 天(第 3 天)之後，再添加 10 mL 新鮮培養基並補充 5 ng/mL 最終濃度之 IL-7 及 IL-15。又共培養 3 天(第 6 天)後，再添加補充有 5 ng/mL 最終濃度之 IL-7 及 IL-15 的 10 mL 新鮮培養基並將共培養物移至 T-75 燒瓶中。在第 9 天，再添加補充 10 ng/mL 最終濃度之 IL-7 及 IL-15 的 20 mL 培養基並將細胞轉移至 T-175 燒瓶中。在第 11-12 天，收集細胞，按照製造商之說明書(R&D Systems)執行 ELISpot 分析，並執行 TCR 定序($1\times10^6$ 個細胞)。使用每孔 10 μg/mL 最終濃度之肽預裝載各孔，細胞密度為每孔 $2\times10^5$ 個細胞，一式兩份接種並培育隔夜。顯現 IFNγ 斑點並按照製造商之說明書，在 AID ELISpot 讀取器上讀取。

### 7.2.4 結果

【1219】由抗原激活實驗得到的例示性資料提供於表 22 中。

**表 22.T 細胞激活資料**

| 供體 | ELISpot 反應 | 基因 | SEQ ID NO | HLA (預測之結合) |
|---|---|---|---|---|
| 1 | +++ | DNAJC8 | 76 | A*31:01 / B*40:13 |
| 1 | + | TMEM123 | 77 | A*02:01 |
| 2 | +++ | TMEM123 | 77 | A*02:01 |
| 2 | + | SCP2 | 74 | B*39:06 |
| 6 | + | DNAJC8 | 76 | C*07:01 / B*27 |
| 7 | +++ | DNAJC8 | 76 | C*07:02 / C*06:02 |
| 8 | +++ | DNAJC8 | 76 | C*07:01 |
| 8 | + | SMC5 | 75 | C*07:01 / B*08:02 |
| 8 | +++ | SCP2 | 74 | C*03:03 |

【1220】 如**圖 15** 中所略述，使供體來源之 PBMC 批料分化成 DC 並用新肽激活。分析 ELISpot 資料顯示，在健康供體 PBMC 中，藉由 DC 呈現之新肽激活原生 T 細胞可引起效應(CD8)T 細胞群之抗原特異性擴增及成熟。如藉由 IFNγ 分泌證實，此等 T 細胞群僅在抗原肽存在下展現抗原特異性再活化，而在非激活肽存在下則不展現。資料亦表明，針對新肽之反應不必基於 HLA 預測。

**實例 8**

**8.1 新肽之鑑別**

**8.1.1 綜述**

【1221】 為鑑別由剪接調節得到的新肽，使用標準目標誘餌方法，將來自典型及剪接調節之蛋白質組的長度為 8 至 11 個胺基酸且預測結合至 I 類 MHC 之肽分別針對串聯質譜相匹配。首先，轉譯選擇性剪接之 mRNA 轉錄物並與參考蛋白質組相比較。接下來，搜索不匹配參考蛋白質組之譜圖以匹配新穎肽。有關用於鑑別由剪接調節得到的新穎肽之例示性方法的示意圖，參見**圖 14**。

**8.1.2 方法**

**8.1.2.1 產生潛在新肽之資料庫**

【1222】 為了產生潛在新肽之資料庫，鑑別未見於參考蛋白質組中跨接合點或含內含子之肽(參見 Li 等人(2011) Mol. Cell Proteomics 10(5):M110.006536)。自手動審查之蛋白質序列選擇源自參考蛋白質組之肽並下載。此外，針對見於正常組織中的接合點過濾蛋白質。作為替代方法，可以自剪接事件轉譯完整蛋白質，搜索跨接合點或含內含子之肽，且接著藉由 BLAST 與參考蛋白質組相匹配。

【1223】 為避免不必要的統計測試，僅使用預測可能結合至 MHC 之肽。使用 NetMHCPan 及/或 MHCnuggets 軟體評價蛋白質序列(二者來自參考蛋白質組及外顯子跳躍或內含子保留之轉錄物的預測轉譯)與 MHC1 對偶基因之高親和力結合。對於兩個套裝軟體，(i)藉由原始親和力結合預測強度(較弱結合之臨限值為 500 nM)，或(ii)藉由選擇大量隨機實際肽並鑑別針對該等肽之預測結合強度的分佈，選擇具有較強或較弱結合之匹配(hit)。接著，針對此分佈匹配任何新穎肽之預測結合強度。藉由後一方法(方法(ii))量測的較強及較弱結合之臨限值分別係在隨機實際肽之前 0.5%或前 2.0%內的預測結合強度(參見 Nielsen 及 Andreatta (2016) Genome Med. 8(1):33)。當前，MHC 預測限於長度為 8 至 11 個胺基酸且包含在免疫抗原決定基資料庫(Immune Epitope Database，IEDB)中之肽序列。

**8.1.2.2 藉由 RNAseq 及 RiboSeq 鑑別剪接調節得到的轉錄物**

【1224】 若干新肽係源自較大肽結構域(例如 TUBA1C)，而來自其餘轉譯區域之肽片段可能有無法偵測到的風險。此可為增強的未偵測區域之降解、MHC1 結合親和力或與藉由質譜法(MS)偵測相關聯之技術難題的結果。一般而言，RNAseq 分析會過高估計預測之新肽的數量(因為並非所有選擇性剪接之轉錄物均會轉譯)，而 MHC1-配體組會低估預測之新肽的數量。

【1225】 為確定新肽之清單，鑑別出結合核糖體的由可用剪接調節得到之變異體剪接接合點作為轉譯成蛋白質的標記物(Andreev 等人(2017) Nucleic Acids Res. 45(2):513-26)。RiboSeq 或核糖體圖譜分析允許偵測如藉由結合至轉錄物之核糖體的存在所證實的正進行活性轉譯之

mRNA 序列(及變異結構域)，以及特定外顯子接合點結構域。

**實例 9**

**9.1 例示性抗 HER2 ADC 之活體外分析**

**9.1.1 方法**

【1226】將 HCC1954、NCI-N87 或 MCF7 細胞(ATCC)以 $2.5\times10^3$ 個細胞/孔塗鋪於不含酚紅之 RPMI+10% FBS(ATCC)或 EMEM+10% FBS+胰島素(0.01 mg/mL)(對於 MCF7)中，每孔 90 μL。在 3 倍稀釋劑量反應中用結合物處理細胞(n=每種條件 3 個孔)。在 24 小時之後，用含有 25 μL/mL RNAsin(Promega)之 50 μL CL 緩衝液(IgePal CA-630、5M NaCl、1M Tris HCl 1M pH 7.4 於水中)溶解細胞並在室溫下，在振盪器上培育 45 分鐘。使用所得混合物(1 μL)，根據製造商之推薦，用以下 Taqman 引子評估 Taqman 快速病毒 1 步主混合物(Applied Biosystems)逆轉錄 PCR 反應中之剪接調節：SLC25A19(Invitrogen, Hs00222265_m1)；FBXW5(IDT，正向引子：CACACCAGATCGGCATCAA(SEQ ID NO:37)，反向引子：CGATGATGTGTCCGTGTATGT(SEQ ID NO:38)，探針：ATCCTGCCACACCAGATGACCAC(SEQ ID NO:39)，染料：FAM，猝滅劑：ZEN/Iowa Black FQ)；TAOK1(IDT，正向引子：CTGCTTCGGATTTACTAGAAGAGATA(SEQ ID NO:40)，反向引子：GCGTTCCCACAAAGGAATTG(SEQ ID NO:41)，探針：TGCTGACTTTGGCTCTGCTTCCAT(SEQ ID NO:42)染料：FAM，猝滅劑：ZEN/Iowa Black FQ)；RPLP0(Invitrogen, Hs99999902_m1)。

**9.2 例示性抗 HER2 ADC 之活體內功效及藥效學(PD)**

### 9.2.1 方法—在 NCI-N87 異種移植模型中之活體內功效

【1227】 CB17-SCID 小鼠(Charles River Laboratories)係根據聯邦、州、市及 AAALAC—馬薩諸塞州劍橋市(city of Cambridge, Massachusetts)中有關動物研究之認證政策保持。NCI-N87 人類胃癌細胞株係購自美國典型培養物保藏中心(ATCC 第 CRL-5822 號)。在腫瘤實驗中使用第 14 代細胞。最後在 2016 年 9 月測試細胞中之鼠類病原體且在 2018 年 12 月測試支原體。

【1228】 用帶有 25Ga 針之注射器將含 $5\times10^6$ 個細胞/0.1 毫升之單細胞懸浮液(50% ATCC 改良型 RPMI-1640 培養基，目錄號 A10491-01(Thermo-Fisher Scientific)；以及 50% Corning 基質膠，目錄號 356254(VWR Scientific))皮下注射於右側腹上。在第 0 天，小鼠以 180-183 $mm^3$ 之平均腫瘤體積隨機分組，n=8 隻/組進行功效研究且 n=4 隻/組進行藥效學(PD)研究。在第 1 天，每 7 天靜脈內投與 5 mL/kg 體積之測試物(10 mg/kg)，持續 2 個週期，以進行功效研究；使用單一療程進行 PD 評估。取決於測試物，在給與單次劑量後 24 小時、48 小時、72 小時及/或 96 小時，對 PD 組中之動物實施安樂死。每週量測腫瘤體積及體重一次或兩次，直至研究終止(第 61 天)。使用公式長度×寬度 $^2/2$ 計算腫瘤體積。在研究期間，移除達到端點(在任何方向上腫瘤尺寸≥20$mm^3$ 或腫瘤體積≥起始體重×100)或出現腫瘤潰瘍或眼睛感染的小鼠。

【1229】 化合物係在生物安全櫃中調配。測試物媒劑係磷酸鹽緩衝生理食鹽水 pH 7.4(目錄號 A10010-049(Thermo-Fisher Scientific))。分組如表 23 中所述。

【1230】 抗腫瘤活性計算如下：

T/C%公式 = 治療組/對照組*100

TGI%公式 = (媒劑組平均值第X天 - 治療組平均值第X天)/ 媒劑組平均值第X天 * 100，其中第 X 天係第 22 天。

**9.2.2 方法 - 活體內 PD (RT-qPCR)**

【1231】使用微陣列套組中之 MagMAX-96 以及 MagMAX Express-96 深孔磁性粒子處理器(Deep Well Magnetic Particle Processor；ThermoFisher Scientific)自腫瘤樣品中純化出 RNA。將腫瘤樣品(大小 50-100 mg)收集於 RNAlater 緩衝液中並保持在-80℃以待 RNA 分離。藉由將 2-3 個陶瓷珠粒及 1 mL Tri 試劑添加至含有腫瘤之管中，隨後在 Omni Bead Ruptor 24 儀器(Omni International)上破壞來執行組織均質化。RNA 分離係根據製造商之說明書進行。

【1232】分離 RNA 溶解產物並根據製造商之說明書，使用 TaqMan 快速病毒 1 步主混合物(ThermoFisher Scientific)進行逆轉錄。

【1233】使用 TaqMan 基因表現主混合物(ThermoFisher Scientific)，用靶向 FBXW5 或 TAOK1 接合點與 *RPLP0* RNA VIC-PL(ThermoFisher Scientific)之雙螺旋的轉錄物探針，自 cDNA 執行定量 PCR 並使用 *ΔΔCt* 方法定量。

**表 23. 分組**

| 測試物(功效) | 測試物(PD) |
|---|---|
| 媒劑(PBS) | 媒劑(PBS) |
| TDM1 | TDM1 |
| 曲妥珠單抗(AB185) | 曲妥珠單抗(AB185) |
| AB185-ADL5-D2 | AB185-ADL5-D2 |
| AB185-ADL1-D4 | AB185-ADL1-D4 |
| AB185-ADL5-D15 | AB185-ADL5-D15 |
| AB185-ADL14-D1 | AB185-ADL14-D1 |

**9.3 結果**

**活體外分析：**

【1234】在來自不同譜系之二個 HER2 陽性細胞株(HCC1954 乳癌及 N87 胃癌)及一個 HER2 陰性細胞株(MCF7)中量測例示性抗 HER2 ADC 之抗增殖活性。量測生長抑制之效率(GI50 效力)以及反應深度(相較於對照之 R min)。在 ADC 處理後，藉由 qPCR 量測指定細胞株上代表性看家基因 SLC25A19 中之選擇性剪接。量測 GI50 及剪接反應之深度。活體外分析之結果顯示於表 25 中。

【1235】一般而言，測試抗 HER2 ADC 對抗原陽性細胞株顯示有利之效力且在抗原細胞株中針對活力及剪接顯示最低反應。ADC 在細胞殺滅及 SLC25A19 之選擇性接合點剪接之完全性方面之反應深度不同。ADC 針對各抗原陽性細胞株分為四個類別之一：1)高反應深度/致死率及高剪接反應；2)高反應深度/致死率及低剪接反應；3)低反應深度/致死率及高剪接反應；或 4)低細胞致死率及低剪接反應。若干 ADC 針對 N87 胃癌細胞株顯示有利的第 3 類特性。AB185-ADL13-D4 在 HCC1954 及 N87 細胞中具有一致的致死率且顯示較強的剪接反應深度。此一致的抗原特異性致死率一般係 ADC 所希望的且水溶性連接子將允許甚至更高的藥物負載及良好的結合物規格。連接子轉換成 ADL23(EVC 三肽)意外地改變兩種細胞株之型態。AB185-ADL1-D12 之獨特之處還在於，其對 HCC1954 具有高度致死性，但該有效負載針對多種實體腫瘤及血液腫瘤細胞株之細胞效力始終較低。D12 亦係此系列中之唯一有效負載，具有較低外排率。因此，釋放此有效負載之 ADC 可針對表現目標抗原之多藥耐藥性癌症具有活性。

【1236】 當在 HCC1954 乳癌細胞中比較剪接效力(IC50 qPCR)與細胞效力(GI50 CTG)時，葡萄糖醛酸苷連接子及 D12 有效負載顯示有利的特性。C6/C7 胺基甲酸酯轉換(D8)有效負載及二鹼性有效負載(D5)顯示出細胞效力，但未展示最高效的選擇性剪接。利用 D4 或 D1 有效負載，自二肽轉換成三肽連接子使選擇性剪接效率降低，但仍保持較高的細胞活性。參見**圖 18**(依據細胞致死率排定大小，根據選擇性剪接反應之深度設定陰影)。

【1237】 當在 N87 胃癌細胞中比較剪接效力(IC50 qPCR)與細胞效力(GI50 CTG)時，葡萄糖醛酸苷連接子(利用 D4)及 D12 有效負載顯示有利的特性，與 HCC1954 中相同。總體而言，所有 ADC 均對 HER2 陰性細胞株 MCF7 顯示最小剪接及效力。儘管 D12 有效負載之細胞效力相對較低，但利用此有效負載之抗 HER2 ADC 的活性較高且該有效負載顯示較低的外排率。此等特性在多藥耐藥性癌症環境中可以潛在地轉變為更佳的功效。參見**圖 19**(依據細胞致死率排定大小，根據選擇性剪接反應之深度設定陰影)。

【1238】 對其他抗 HER2 ADC 執行活體外分析。抗 HER2 ADC 與相應有效負載之間的比較顯示於表 26 中。當將抗 HER2 ADC 之效力及致死率與相應有效負載之穩定性及滲透性相比較(**圖 20**)時，AB185-ADL5-D15 展示效力、致死率、化學穩定性及分解代謝物滲透性(例如針對推定的旁觀者殺滅)之有利平衡。如下所述，AB185-ADL5-D15 在活體內亦具有活性且在 NCI-N87 異種移植模型中展示強效抗腫瘤活性。

**活體內功效**：

【1239】 藉由將 NCI-N87 細胞接種於 SCID 小鼠中，產生人類

HER2 表現性 NCI-N87 胃癌細胞株及其異種移植模型以評價例示性抗 HER2 ADC 之抗腫瘤活性。使用曲妥珠單抗及 TDM1 作為比較物。

【1240】靜脈內曲妥珠單抗、TDM1 及四種 HER2 ADC 於 NCI-N87 胃癌異種移植模型中之抗腫瘤作用顯示於**圖 21** 及**圖 23** 中。體重影響顯示於**圖 22** 及**圖 23** 中。Q7D 靜脈內(IV)給與測試物或媒劑，持續 2 個週期。資料表示平均值±SEM(腫瘤體積，$mm^3$)或±SEM(體重，%)(N=8)。使用單因素變異數分析測試，在第 22 天相對於媒劑組，*$p<0.0001$。

【1241】有關在 NCI-N87 中之活體外及活體內功效的資料表格提供於表 24 中。資料表格表示腫瘤生長抑制(腫瘤體積之 TGI)百分比(%)或 T/C(腫瘤體積)%(N=8)。AB185-ADL5-D2 儘管在活體外具有極低致死性。但在活體內意外地具有活性，且展示相較於例如 AB185-ADL14-D1 改善的活體內功效。

**表 24.例示性抗 HER2 ADC 在 NCI-N87 中之功效**

| | 第 22 天(活體內) | | NCI-N87 (活體外) | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | TGI (%) | T/C (%) | $GI_{50}$ (nM) | $LD_{50}$ (nM) | $R_{min}$% |
| 媒劑/ IV/ Q7D×2 | - | - | - | - | - |
| TDM1/ 10 mg/kg/ IV/ Q7D×2 | 71 | 29 | 0.1 | 40 | -37 |
| 曲妥珠單抗/ 10 mg/kg/ IV/ Q7D×2 | 4 | 96 | >200 | >200 | 98 |
| AB185-ADL5-D2/ 10 mg/kg/ IV/ Q7D×2 | 73 | 27 | 0.2 | >200 | 0 |
| AB185-ADL1-D4/ 10 mg/kg/ IV/ Q7D×2 | 68 | 32 | 0.1 | >200 | -22 |
| AB185-ADL5-D15/ 10 mg/kg/ IV/ Q7D×2 | 67 | 33 | 0.1 | >200 | -37 |
| AB185-ADL14-D1/ 10 mg/kg/ IV/ Q7D×2 | -7 | 107 | 0.1 | >200 | -40 |

【1242】曲妥珠單抗，即一種抗人類 HER2 抗體且作為 HER2 陽性乳癌之標準護理療法，在此模型中並不展示抗腫瘤活性。然而，作為含有曲妥珠單抗加共價連接之 DM1(細胞毒性劑)之第二線治療的 TDM1 顯示明顯優於單獨曲妥珠單抗(TGI 4%)之抗腫瘤活性(TGI 71%)。在所測試的

四種 ADC 中，ABL185-ADL5-D2、AB185-ADL5-D15 及 AB185-ADL1-D4 顯示強效抗腫瘤活性且腫瘤生長抑制(TGI)分別為 73%、67%及 68%。所有反應組之腫瘤最終又開始生長。在任何組中皆未觀察到完全反應，且以下各組中的八隻動物之一顯示部分反應：TDM1、ABL185-ADL5-D2 及 AB185-ADL5-D15。小鼠對所有試劑及測試物具有良好耐受性且觀察到最低限度之體重減輕。總體而言，4 種測試抗 HER2 ADC 中有 3 種在 NCI-N87 腫瘤模型中展示與 TDM1 類似的強效抗腫瘤活性，同時無顯著體重減輕。

**活體內 PD：**

【1243】在 NCI-N87 胃癌異種移植模型中藉由靜脈內曲妥珠單抗、TDM1 及四種抗 HER2 ADC 進行的 mRNA 接合點之 PD 調節顯示於**圖 24A-24D** 中。監測 FBXW5(成熟 mRNA 轉錄物)及 TAOK1(新接合點轉錄物)之 RT-qPCR。靜脈內(IV)給與 10 mg/kg 測試物或媒劑。在 48 小時(**圖 24A** 及**圖 24B**)或在指定時間(**圖 24C** 及**圖 24D**)時收集動物(N=4 隻/組)。分離腫瘤用於 RNA 提取及 RT-qPCR。使用單因素變異數分析(**圖 24A** 及**圖 24B**)或雙因素變異數分析(**圖 24C** 及**圖 24D**)，相對於媒劑，*$p<0.05$。

【1244】曲妥珠單抗及 TDM1 均未在所觀察的 FBXW5 或 TAOK1 剪接中展現顯著變化。AB185 結合物 ADL5-D2/ADL1-D4/ADL5-D15 均展現 FBXW5 之顯著耗盡，且 AB185 結合物 ADL5-D2/ADL1-D4 展現 TAOK1 之顯著增加。ADL5-D15 顯示 TAOK1 之增加，但未達到統計顯著性。ADL14-D1 未展現任一 mRNA 轉錄物之豐度的統計顯著變化。

## 表 25.例示性抗 HER2 ADC 及相應有效負載之表徵

| | | | | | | | 特性- HER2 ADC | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | | 抗增殖活性 抗原(+)細胞#1 | | | 抗增殖活性 抗原(+)細胞#2 | | | 抗增殖活性 抗原(-)細胞 | | |
| ADC 批料 Id | 連接子 | 致死性/剪接類別 (HCC1954, N87) | DAR | 單體百分比 | 游離藥物 | 濃度 | CTGlo 幾何平均值 GI50 (nM) HER2 SMLA 篩選 HCC1954.1 | CTGlo 幾何平均值 LD50 (nM) HER2 SMLA 篩選 HCC1954.1 | CTGlo 平均值 MinResp% HER2 SMLA 篩選 HCC1954.1 | CTGlo 幾何平均值 GI50 (nM) HER2 SMLA 篩選 NCIN87 | CTGlo 幾何平均值 LD50 (nM) HER2 SMLA 篩選 NCIN87 | CTGlo 平均值 MinResp% HER2 SMLA 篩選 NCIN87 | CTGlo 幾何平均值 GI50 (nM) HER2 SMLA 篩選 MCF7 | CTGlo 幾何平均值 LD50 (nM) HER2 SMLA 篩選 MCF7 | CTGlo 平均值 MinResp% HER2 SMLA 篩選 MCF7 |
| AB185-ADL1-D12 | mc-Val-Cit-PABC | 1,3 | 6.25 | 99% | <1% | 0.82 | 0.032 | 0.09 | -78.471 | <0.015 | >100.000 | -35.162 | >100.000 | >100.000 | 53.606 |
| AB185-ADL13-D4 | b-葡萄糖醛酸苷 | 1,1 | 4.47 | 99% | <1% | 0.78 | 0.059 | 0.275 | -80.145 | 0.029 | 3.436 | -55.322 | >100.000 | >100.000 | 87.451 |
| AB185-ADL1-D5 | mc-Val-Cit-PABC | 1,3 | 6.14 | 99% | <1% | 1.1 | 0.079 | 0.298 | -81.189 | 0.04 | >100.000 | -32.663 | >100.000 | >100.000 | 93.099 |
| AB185-ADL23-D4 | mc-Glu-Val-Cit-PABC | 2,3 | 5.84 | 99% | <1% | 1.03 | 0.175 | 1.526 | -68.762 | 0.049 | >100.000 | -49.316 | >100.000 | >100.000 | 91.248 |
| AB185-ADL1-D3 | mc-Val-Cit-PABC | 2,3 | 6.75 | 99% | <1% | 1.13 | 0.117 | 0.741 | -77.982 | 0.049 | >100.000 | -15.629 | >100.000 | >100.000 | 91.495 |
| AB185-ADL22-D4 | mal-PEG2-Val-Cit-PABC | 1,3 | 6.12 | 99% | <1% | 1.01 | 0.134 | 0.797 | -75.134 | 0.057 | >100.000 | -25.808 | >100.000 | >100.000 | 79.996 |
| AB185-ADL21-D1 | mc-Ala-Ala-Asn-PABC | 2,3 | 5.51 | 99% | <1% | 1.35 | 0.207 | 2.65 | -72.894 | 0.072 | >100.000 | -46.965 | >100.000 | >100.000 | 74.018 |
| AB185-ADL21-D8 | mc-Ala-Ala-Asn-PABC | 4,3 | 6.4 | 99% | <1% | 1.67 | 0.493 | >100.000 | -37.547 | 0.138 | >100.000 | -40.873 | >100.000 | >100.000 | 94.772 |
| AB185-ADL21-D4 | mc-Ala-Ala-Asn-PABC | | 1.55 | 99% | <1% | 1.11 | 1.174 | >100.000 | 14.652 | 0.235 | >100.000 | -36.848 | >100.000 | >100.000 | 96.18 |
| AB185-ADL15-D2 | mal-CH2CH2-O-CH2CH2-(不可裂解) | 3,ND | 3.25 | 98.80% | <1% | 1.6 | 0.24 | >200.000 | -13.023 | 0.115 | >100.000 | -15.056 | | | |

## 表 25(續).例示性抗 HER2 ADC 及相應有效負載之表徵

| | | | | | | | 特性- HER2 ADC | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | | 剪接 PD 抗原(+)細胞#1 | | 剪接 PD 抗原(+)細胞#2 | | 剪接 PD 抗原(-)細胞 | |
| ADC 批料 Id | 連接子 | 致死性/剪接類別 (HCC1954,N87) | DAR | 單體百分比 | 游離藥物 | 濃度 | qPCR-CellScreen 幾何平均 IC50 (nM) HER2 SMLA 篩選 SLC25A19 HCC1954.1(裸) | qPCR-CellScreen 平均 MinResp% HER2 SMLA 篩選 SLC25A19 HCC1954.1(裸) | qPCR-CellScreen 幾何平均 IC50 (nM) HER2 SMLA 篩選 SLC25A19 NCIN87(裸) | qPCR-CellScreen 平均 MinResp% HER2 SMLA 篩選 SLC25A19 NCIN87(裸) | qPCR-CellScreen 幾何平均 IC50 (nM) HER2 SMLA 篩選 SLC25A19 MCF7(裸) | qPCR-CellScreen 平均 MinResp% HER2 SMLA 篩選 SLC25A19 MCF7(裸) |
| AB185-ADL1-D12 | mc-Val-Cit-PABC | 1,3 | 6.25 | 99% | <1% | 0.82 | 0.144 | -85.744 | 0.095 | -93.185 | >100.000 | -12.254 |
| AB185-ADL13-D4 | b-葡萄糖醛酸苷 | 1,1 | 4.47 | 99% | <1% | 0.78 | 0.45 | -72.455 | 0.177 | -93.984 | >100.000 | -28.389 |
| AB185-ADL1-D5 | mc-Val-Cit-PABC | 1,3 | 6.14 | 99% | <1% | 1.1 | 0.624 | -65.799 | 0.095 | -91.243 | >100.000 | -10.455 |
| AB185-ADL23-D4 | mc-Glu-Val-Cit-PABC | 2,3 | 5.84 | 99% | <1% | 1.03 | >100.000 | -40.549 | 0.249 | -89.841 | >100.000 | -16.033 |
| AB185-ADL1-D3 | mc-Val-Cit-PABC | 2,3 | 6.75 | 99% | <1% | 1.13 | >100.000 | -38.621 | 0.199 | -78.218 | >100.000 | -24.342 |
| AB185-ADL22-D4 | mal-PEG2-Val-Cit-PABC | 1,3 | 6.12 | 99% | <1% | 1.01 | 2.302 | -58.063 | 0.17 | -91.266 | >100.000 | -23.433 |
| AB185-ADL21-D1 | mc-Ala-Ala-Asn-PABC | 2,3 | 5.51 | 99% | <1% | 1.35 | >100.000 | -37.396 | 0.201 | -84.588 | >100.000 | -15.463 |
| AB185-ADL21-D8 | mc-Ala-Ala-Asn-PABC | 4,3 | 6.4 | 99% | <1% | 1.67 | >100.000 | -27.319 | 0.577 | -70.144 | >100.000 | -12.798 |
| AB185-ADL21-D4 | mc-Ala-Ala-Asn-PABC | | 1.55 | 99% | <1% | 1.11 | >100.000 | -16.088 | 5.097 | -54.535 | >100.000 | -12.096 |
| AB185-ADL15-D2 | mal-CH2CH2-O-CH2CH2-(不可裂解) | 3,ND | 3.25 | 98.80% | <1% | 1.6 | | | 0.296 | -83.148 | | |

## 表 25(續).例示性抗 HER2 ADC 及相應有效負載之表徵

| | | | | | | | 特性 - 相應游離藥物負載 | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | | | 目標結合 | 生物化學剪接分析 | | | 細胞效力<br>細胞株#1 | | 細胞效力<br>細胞株#2 | | 細胞效力<br>細胞株#3 | | 細胞滲透性 | | |
| ADC 批料 Id | 連接子 | 致死性/剪接類別 (HCC1954,N87) | DAR | 單體百分比 | 游離藥物 | 濃度 | SPA-ATS 幾何平均 IC50 (nM) SF3B1 (WT) HELA.2 | qPCR-IVS-ATS 幾何平均 IC50 (nM) Ad2.1 HELA.2 | qPCR-IVS-ATS 幾何平均 IC50 (nM) Ad2.2 HELA.2 | 比率 Ad2.1/2.2 | CTGlo-ATS 幾何平均 GI50 (nM) 72 小時 NCIH1650.1 | CTGlo-ATS 幾何平均 LD50 (nM)，72 小時 NCIH1650.1 | CTGlo-ATS 幾何平均 GI50 (nM) 72 小時 NCIH1568.1 | CTGlo-ATS 幾何平均 LD50 (nM) 72 小時 NCIH1568.1 | CTGlo-ATS 幾何平均 GI50 (nM) 72 小時 THP1.1 | CTGlo-ATS 幾何平均 LD50 (nM) 72 小時 THP1.1 | 滲透性平均值 Caco- 2 A-B Perm (10e-6 cm/s) | 滲透性平均值 Caco- 2 B-A Perm (10e-6 cm/s) | ER |
| AB185-ADL1-D12 | mc-Val-Cit-PABC | 1,3 | 6.25 | 99% | <1% | 0.82 | | 16.528 | 25.09 | 0.659 | 257.925 | >10000.00 | 163.604 | 1193.037 | 202.487 | 900.227 | 0.17 | 0.23 | 1.353 |
| AB185-ADL13-D4 | b-葡萄糖醛酸苷 | 1,1 | 4.47 | 99% | <1% | 0.78 | 8.778 | 20.887 | 17.321 | 1.206 | 11.941 | 1960.398 | 6.369 | 45.485 | 10.943 | 33.329 | 0.1 | 1.79 | 17.9 |
| AB185-ADL1-D5 | mc-Val-Cit-PABC | 1,3 | 6.14 | 99% | <1% | 1.1 | | 17.392 | 23.943 | 0.726 | | | | | | | | | |
| AB185-ADL23-D4 | mc-Glu-Val-Cit-PABC | 2,3 | 5.84 | 99% | <1% | 1.03 | 8.778 | 20.887 | 17.321 | 1.206 | 11.941 | 1960.398 | 6.369 | 45.485 | 10.943 | 33.329 | 0.1 | 1.79 | 17.9 |
| AB185-ADL1-D3 | mc-Val-Cit-PABC | 2,3 | 6.75 | 99% | <1% | 1.13 | | 9.326 | 10.928 | 0.853 | | | | | | | | | |
| AB185-ADL22-D4 | mal-PEG2-Val-Cit-PABC | 1,3 | 6.12 | 99% | <1% | 1.01 | 8.778 | 20.887 | 17.321 | 1.206 | 11.941 | 1960.398 | 6.369 | 45.485 | 10.943 | 33.329 | 0.1 | 1.79 | 17.9 |
| AB185-ADL21-D1 | mc-Ala-Ala-Asn-PABC | 2,3 | 5.51 | 99% | <1% | 1.35 | 6.085 | 17.568 | 15.853 | 1.108 | 12.121 | >10000.00 | 7.363 | 65.737 | 11.085 | 41.408 | 0.14 | 2.05 | 14.64 |
| AB185-ADL21-D8 | mc-Ala-Ala-Asn-PABC | 4,3 | 6.4 | 99% | <1% | 1.67 | 5.921 | 11.403 | 9.034 | 1.262 | 19.15 | >10000.00 | 6.568 | 68.125 | 8.745 | 38.969 | 0.128 | 2.027 | 15.88 |
| AB185-ADL21-D4 | mc-Ala-Ala-Asn-PABC | | 1.55 | 99% | <1% | 1.11 | 8.778 | 20.887 | 17.321 | 1.206 | 11.941 | 1960.398 | 6.369 | 45.485 | 10.943 | 33.329 | 0.1 | 1.79 | 17.9 |
| AB185-ADL15-D2 | mal-CH2CH2-O-CH2CH2-(不可裂解) | 3,ND | 3.25 | 98.80% | <1% | 1.6 | | | | | | | | | | | | | |

## 表 26. 例示性抗 HER2 ADC - HCC1954 細胞

| | | | | | 特性- HER2 ADCs | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | 抗增殖活性<br>抗原(+)細胞#1 | |
| ADC 批料 Id | 連接子 | DAR | 滲透性<br>Caco-2 A-B<br>(10e-6 cm/s) | pH 5.5 穩定性<br>(t1/2, 37℃) | CTGlo 幾何平均 GI50 (nM)<br>HER2 SMLA 篩選<br>HCC1954.1 | CTGlo 平均 MinResp%<br>HER2 SMLA 篩選<br>HCC1954.1 |
| AB185-ADL5-D19 | QVal-Ala | 6.600 | 16 | 0.8 | 0.278 | -47.381 |
| AB185-ADL5-D25 | QVal-Ala | 6.000 | 0.14 | 3.4 | 0.038 | -46.265 |
| AB185-ADL5-D2 | QVal-Ala | 4.140 | 0.6 | 4 | 0.206 | -12.239 |
| AB185-ADL1-04 | Val-Cit | 2.800 | 0.1 | 4.5 | 0.050 | -57.212 |
| AB185-ADL5-D10 | QVal-Ala | 4.020 | 1.8 | 5 | 0.254 | -2.273 |
| AB185-ADL1-D16 | Val-Cit | 4.400 | 0.72 | 7 | 2.086 | |
| AB185-ADL5-D17 | QVal-Ala | 3.960 | 20 | 7 | 2.668 | 14.873 |
| AB185-ADL5-D34 | QVal-Ala | | 26 | 7 | 3.325 | -38.285 |
| AB185-ADL5-D15 | QVal-Ala | 4.000 | 3.4 | 7 | 0.912 | -45.388 |

**實例 10**

**10.1 生物信息學-驅動之適應症/目標選擇**

【1245】 為鑑別相較於正常組織在低腫瘤突變負荷(TMB)腫瘤中高度表現之目標抗原，執行生物信息學預測分析。本實例解釋 1)如何定義每一過濾器；以及 2)如何使用抗原/適應症表鑑別適合目標/腫瘤對。有關例示性目標適應症分析之示意圖，參見**圖 25**。

**10.1.1 綜述**

【1246】 使用生物信息學預測分析鑑別目標抗原及適應症。針對腫瘤突變負荷(TMB)、用於 ADC 遞送之目標抗原的表現及腫瘤免疫浸潤，處理來自 TCGA 之資料。使用公開的 TMB 及浸潤之截止值對針對免疫檢查點抑制劑(ICI)之預測反應者相對於無反應者分層以執行分析，由此鑑別適應症及相配的抗原。進一步過濾表面抗原表現以評估抗原表現比任何正常組織高至少 2 倍(如由 GTEx 組織表現資料庫評價)的概率群體。進一步針對突變及免疫度量分析適合百分比患者具有一或多個目標抗原之適應症(或 TCGA 譜系亞群)。評估腫瘤突變負荷低於 10 個突變/兆鹼基之聚集物且 T 細胞浸潤分數高於 0.5 的抗原陽性患者之百分比。估計約 50%患者滿足此等標準之適應症列於表 27 中。此等組(但不限於此等組)中之患者可對用剪接調節劑 ADC(例如本文所描述之剪接調節劑 ADC)治療起反應。

**10.1.2 方法**

【1247】 **腫瘤學年鑒中適應症預測之抗原表註釋**：

**抗原**：抗原基因名稱，根據腫瘤學年鑒文獻綜述(參見 Moek 等人(2017)Annals of Oncology, 28: 3083-3091)，僅 59 個可能作為良好的

ADC 目標的基因包括在該表中(初始全分析包括所有計算機模擬之表面組(surfaceome)基因)

**組**：TCGA 組名稱

**SUBTYPE**：TCGA 腫瘤亞型資訊

**Cases_Total**：病例總數

**Cases.by.subtype**：依據亞型之病例數量

**LTPM_median**：由 Log2(TPM+1)得到的表現中值

**LTPM_median_LowTMB**：對於低 TMB(<350)病例，藉由 Log2(TPM+1)測定之表現中值

**LTMB_Median**：Log10(TMB)之中值

**LTMB_MAD**：由 Log10(TMB)之 MAD 值進行之標準差的穩固量測

**Infil_Median**：根據 PLoS One T 細胞標誌之浸潤分數之中值

**Infil_MAD**：由根據 PLoS One T 細胞標誌之浸潤分數的 MAD 值進行之標準差之穩固量測

**Cor.with.Purity**：表現量與腫瘤純度相關性

**GTEX_Tissue**：具有最高表現量中值之 GTEx 組織名稱

**GTEX_LTPM_Median**：在具有最高表現量中值之 GTEx 組織中抗原的中值表現量值

**Surfaceome.Filter***：在施用表面組過濾器之後的患者群：表現量>具有最高中值之 GTEx 正常組織的 2 倍

**LowTMB.Filter**：在施用低 TMB 過濾器之後的患者群：＜350 個/外顯子組序列(10 個/兆鹼基 2)

**LowTMB.Surfaceome.Filter**：在施用表面組及 tmb 過濾器之後的

患者群

**HiInfil.LowTMB.Surfaceome.Filter**：在施用以下三個過濾器之後的患者群：表面組表現量過濾器、低 tmb 過濾器及高浸潤過濾器

**Surfaceome.Filter.Perc**：在施用表面組過濾器之後的群體之百分比：表現量>具有最高中值之 GTEx 正常組織的 2 倍

**LowTMB.Filter.Perc**：在施用低 TMB 過濾器之後群體之百分比：＜350

**LowTMB.Surfaceome.Filter.Perc**：在施用表面組及 tmb 過濾器之後群體之百分比

**HiInfil.LowTMB.Surfaceome.Filter.Perc**：在施用以下三個過濾器之後群體之百分比：表面組表現量過濾器、低 tmb 過濾器及高浸潤過濾器

**【1248】 患者群之概率估計**：

**資源編輯**：

1. 泛癌免疫全景論文(Pan-can immune landscape paper)(Ready 等人(2019) Journal of Clinical Oncology, 37:992-1000)
2. 來自 Omicsoft 之 TCGA RNA 序列/外顯子組序列資料包
3. 免疫基因標誌(Thorsson 等人(2018) Immunity, 48, 812-830)
4. GTEx 資料 v7

使用 Omicsoft 資料，由 TCGA 外顯子組序列突變識別計算腫瘤突變負荷。使用 PLoS One T 細胞標誌(CD3D、CD3E、CD2)對樣品免疫浸潤定量。使用 log2(TPM+1)值，由 TCGA RNA 序列資料產生 Z 分數。

**Surfaceome.Filter**：各個患者相較於具有最高中值之 GTEx 正常組織具有>2 倍之表現量(log2(TPM+1))值的機率計算如下：

1. 鑑別所有 GTEx 正常組織中對此基因具有最高中值之 GTEx 正常組織，採用其作為 $T_h$

2. 使用合成少數類過採樣技術(Synthetic Minority Over-sampling Technique，SMOTE(Siemers 等人(2017)PLoS One, 12(7):e0179726)維持組織之資料分佈，對每一組織使用 1000 位患者合成此基因之 GTEx 資料

3. 對此患者將>該組織 $T_h$ 之 GTEx 合成資料之 2 倍的倍數計數(n 倍)，此患者將>GTEx 正常值之 2 倍的機率係 n/1000

4. 計算每位患者之該機率

5. 各個機率之總和係比 GTEx 正常值高>2 倍的該組群體之概率估計值

6. 當與其他過濾器一起施用時，各個機率之總和將僅針對通過其他過濾器之患者

### 10.1.3 實例

【1249】使用以上描述之例示性生物信息學預測分析鑑別的目標抗原及適應症闡述於表 27 中。

**表 27.例示性目標抗原及適應症**

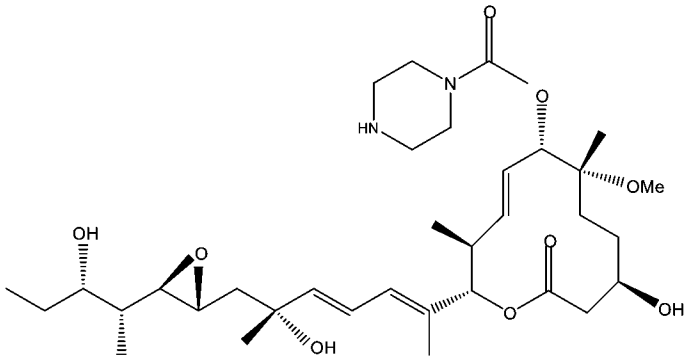
| 目標抗原 | 適應症 |
|---|---|
| MSLN | 卵巢癌<br>子宮頸癌<br>胰臟癌<br>肺腺癌 |
| EPHA2 | 食道癌 |
| FOLH1 | 前列腺癌 |
| CDH6 | 腎癌 |
| CEACAM5 | 結腸直腸癌 |
| CFC1B | 胰臟癌 |
| ENPP3 | 腎癌 |
| FOLR1 | 卵巢癌 |

| | |
|---|---|
| HAVCR1 | 腎癌<br>食道癌 |
| KIT | 腎癌 |
| MET | 腎癌<br>食道癌 |
| MUC16 | 卵巢癌<br>子宮頸癌<br>乳癌 |
| SLC39A6 | 乳癌<br>前列腺癌 |
| SLC44A4 | 前列腺癌 |
| STEAP1 | 前列腺癌 |

# 【發明申請專利範圍】

【請求項1】

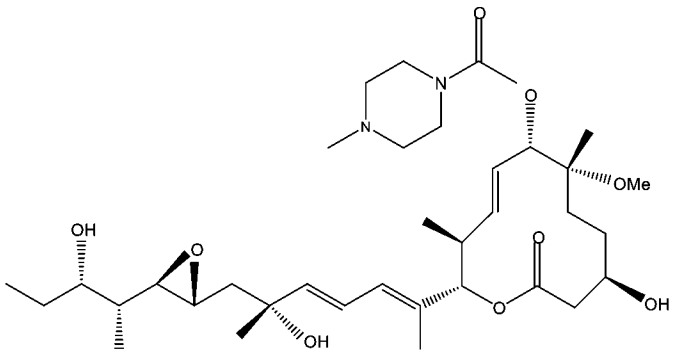
一種剪接調節劑，其包含式(D1)之化合物或其醫藥學上可接受之鹽，



(D1)。

【請求項2】

一種剪接調節劑，其包含式(D2)之化合物或其醫藥學上可接受之鹽，



(D2)。

【請求項3】

一種包含如請求項1或2之剪接調節劑之化合物或其醫藥學上可接受之鹽，其進而包含連接子L，該連接子L共價連接至：D1或其醫藥學上可接受之鹽、或者D2或其醫藥學上可接受之鹽；視情況其中上述連接子L包含可裂解部分。

【請求項4】

如請求項3之化合物，其中上述連接子L共價連接至D1或其醫藥學上

可接受之鹽之哌嗪雜環的氮原子，或者共價連接至D2或其醫藥學上可接受之鹽之哌嗪雜環的氮原子。

【請求項5】

如請求項3或4之化合物，其中上述連接子L係包含可裂解部分之可裂解連接子，上述連接子L中之上述可裂解部分包含：

(i)可裂解肽部分，其中該可裂解肽部分包含纈胺酸-瓜胺酸(Val-Cit)、纈胺酸-丙胺酸(Val-Ala)、麩胺酸-纈胺酸-瓜胺酸(Glu-Val-Cit)或丙胺酸-丙胺酸-天冬醯胺(Ala-Ala-Asn)；

或者

(ii)可裂解葡萄糖醛酸苷部分，其中該可裂解葡萄糖醛酸苷部分可藉由酶裂解；其中該可裂解葡萄糖醛酸苷部分可藉由葡萄糖醛酸苷酶裂解；其中該可裂解葡萄糖醛酸苷部分可藉由β-葡萄糖醛酸苷酶裂解。

【請求項6】

如請求項5之化合物，其中上述連接子L包含順丁烯二醯亞胺(Mal)部分，視情況其中該Mal部分包含順丁烯二醯亞胺基己醯基(MC)，視情況其中上述連接子L包含MC-Glu-Val-Cit、MC-Ala-Ala-Asn、MC-Val-Cit或MC-Val-Ala；視情況其中上述連接子L包含MC-Val-Cit或MC-Val-Ala。

【請求項7】

如請求項5或6之化合物，其中上述連接子L包含至少一個間隔子單元，視情況其中該間隔子單元包含：

(i)聚乙二醇(PEG)部分，視情況其中該PEG部分包含-$(PEG)_m$-且$m$係1至10之整數，視情況其中$m$係2；或者

(ii)烷基部分，視情況其中該烷基部分包含-$(CH_2)_n$-且$n$係1至10之整

數，視情況其中*n*係2、5或6；

並且視情況其中上述至少一個間隔子單元連接至順丁烯二醯亞胺(Mal)部分（「Mal-間隔子單元」）。

【請求項8】

如請求項5至7中任一項之化合物，其中上述連接子L之上述可裂解部分直接地接合至上述剪接調節劑，或者其中間隔子單元將上述連接子L之上述可裂解部分連接至上述剪接調節劑；視情況其中將上述連接子L中之上述可裂解部分連接至上述剪接調節劑的上述間隔子單元係自我分解型的。

【請求項9】

如請求項8之化合物，其中將上述連接子L中之上述可裂解部分連接至上述剪接調節劑的上述間隔子單元包含對胺基苯甲基(pAB)或對胺基苯甲氧基羰基(pABC)；視情況其中上述連接子L包含Val-Cit-pAB、Val-Ala-pAB、Val-Cit-pABC或Val-Ala-pABC；視情況其中上述連接子L包含MC-Val-Cit-pAB、MC-Val-Ala-pAB、MC-Val-Cit-pABC或MC-Val-Ala-pABC。

【請求項10】

如請求項3或4之化合物，其中上述連接子L係不可裂解連接子，視情況其中上述連接子L包含至少一個間隔子單元，且/或其中該至少一個間隔子單元或連接子L包含聚乙二醇(PEG)部分，視情況其中該PEG部分包含-$(PEG)_m$-且*m*係1至10之整數，視情況其中*m*係2。

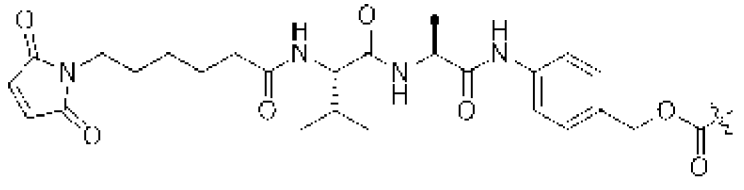
【請求項11】

如請求項3或4之化合物，其中上述連接子L係不可裂解連接子，視情

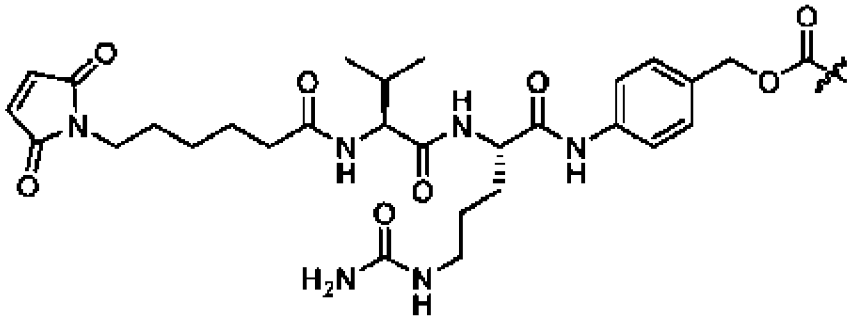
況其中上述連接子L包含至少一個間隔子單元，其中該至少一個間隔子單元或連接子L包含烷基部分，視情況其中該烷基部分包含-$(CH_2)_n$-且$n$係1至10之整數，視情況其中$n$係2、5或6。

【請求項12】

如請求項3或4之化合物，其中上述連接子L包含：



或



。

【請求項13】

一種式(I)之抗體-藥物結合物，

$Ab-(L-D)_p$　(I)

其中

Ab 係靶向贅生性細胞之抗體或抗原結合片段；

D 係包含剪接調節劑或其醫藥學上可接受之鹽的化合物；

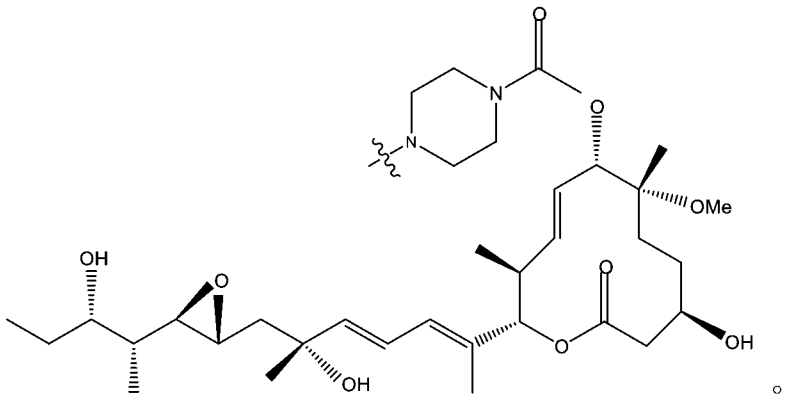
L 係將 Ab 共價連接至 D 之連接子；且

$p$係1至15之整數；

其中L-D包含如請求項3至12中任一項之化合物。

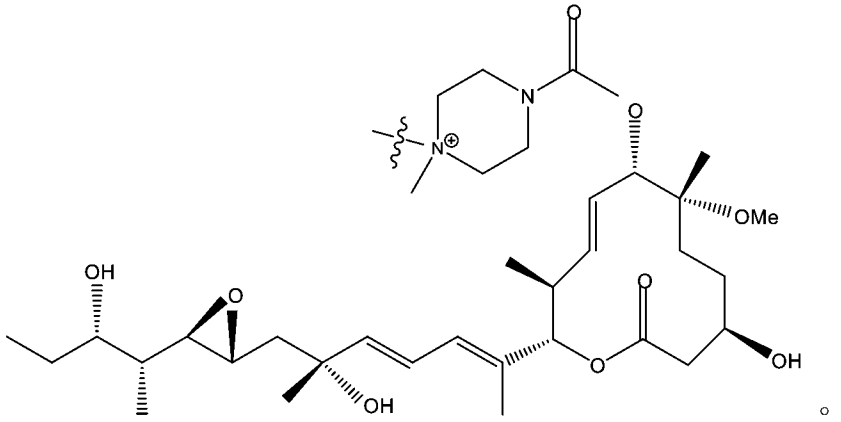
【請求項14】

如請求項13之抗體-藥物結合物，其中上述剪接調節劑D包含：



【請求項15】

如請求項13之抗體-藥物結合物，其中上述剪接調節劑D包含：



【請求項16】

如請求項13至15中任一項之抗體-藥物結合物，其中上述抗體或抗原結合片段靶向源自下列之贅生性細胞：

(1)血液惡性病，視情況其中該血液惡性病係選自B細胞惡性病、白血病、淋巴瘤及骨髓瘤；視情況其中該血液惡性病係選自急性骨髓性白血病及多發性骨髓瘤；或者

(2)實體腫瘤，視情況選自乳癌、胃癌、前列腺癌、卵巢癌、肺癌、子宮癌、唾腺管癌、黑素瘤、結腸癌、子宮頸癌、胰臟癌、腎癌、結腸直腸癌及食道癌。

【請求項17】

如請求項13至16中任一項之抗體-藥物結合物，其中上述抗體或抗原

結合片段靶向：

(i)HER2表現性細胞，視情況其中該抗體或抗原結合片段係抗HER2抗體或抗原結合片段；及/或其中該抗體或抗原結合片段包括含SEQ ID NO:1(HCDR1)、SEQ ID NO:2(HCDR2)及SEQ ID NO:3(HCDR3)之胺基酸序列的三個重鏈互補決定區(HCDR1、HCDR2及HCDR3)，以及含SEQ ID NO:4 (LCDR1)、SEQ ID NO:5(LCDR2)及SEQ ID NO: 6(LCDR3)之胺基酸序列的三個輕鏈互補決定區(LCDR1、LCDR2及LCDR3)；或者其中該抗體或抗原結合片段包括含SEQ ID NO: 19之胺基酸序列之重鏈可變區及含SEQ ID NO: 20之胺基酸序列之輕鏈可變區，視情況其中該抗體或抗原結合片段包含人類IgG1重鏈恆定區及/或其中該抗體或抗原結合片段包含人類Igκ輕鏈恆定區；

(ii)CD138表現性細胞；視情況其中該抗體或抗原結合片段係抗CD138抗體或抗原結合片段；及/或其中該抗體或抗原結合片段包括含SEQ ID NO: 7(HCDR1)、SEQ ID NO: 8(HCDR2)及SEQ ID NO: 9(HCDR3)之胺基酸序列的三個重鏈互補決定區(HCDR1、HCDR2及HCDR3)，以及含SEQ ID NO: 10(LCDR1)、SEQ ID NO: 11(LCDR2)及SEQ ID NO: 12(LCDR3)之胺基酸序列的三個輕鏈互補決定區(LCDR1、LCDR2及LCDR3)；或者其中該抗體或抗原結合片段包括含SEQ ID NO: 21之胺基酸序列之重鏈可變區及含SEQ ID NO: 22之胺基酸序列之輕鏈可變區，視情況其中該抗體或抗原結合片段包含人類IgG2a重鏈恆定區及/或其中該抗體或抗原結合片段包含人類Igκ輕鏈恆定區；

(iii)EPHA2表現性細胞；視情況其中該抗體或抗原結合片段係抗EPHA2抗體或抗原結合片段；及/或其中該抗體或抗原結合片段包括含

SEQ ID NO: 13(HCDR1)、SEQ ID NO: 14(HCDR2)及SEQ ID NO: 15(HCDR3)之胺基酸序列的三個重鏈互補決定區(HCDR1、HCDR2及HCDR3)，以及含SEQ ID NO: 16(LCDR1)、SEQ ID NO: 17(LCDR2)及SEQ ID NO: 18(LCDR3)之胺基酸序列的三個輕鏈互補決定區(LCDR1、LCDR2及LCDR3)；或者其中該抗體或抗原結合片段包括含SEQ ID NO: 23之胺基酸序列之重鏈可變區及含SEQ ID NO: 24之胺基酸序列之輕鏈可變區，視情況其中該抗體或抗原結合片段包含人類IgG1重鏈恆定區及/或其中該抗體或抗原結合片段包含人類Igκ輕鏈恆定區；

(iv)CEACAM5表現性細胞；視情況其中該抗體或抗原結合片段係抗CEACAM5抗體或抗原結合片段；或者

(v)STEAP1表現性細胞；視情況其中該抗體或抗原結合片段係抗STEAP1抗體或抗原結合片段。

【請求項18】

如請求項13至17中任一項之抗體-藥物結合物，其中*p*係1至10之整數，視情況其中*p*係2至8之整數，視情況其中*p*係4至8之整數，或者其中*p*係4或其中*p*係8。

【請求項19】

一種醫藥組合物，其包含如請求項1或2之剪接調節劑、如請求項3至12中任一項之化合物、或如請求項13至18中任一項之抗體-藥物結合物；及醫藥學上可接受之載劑。

【請求項20】

一種如請求項19之醫藥組合物之用途，其係用於製造治療贅生性病症之醫藥，其中上述贅生性病症係：

(i)血液惡性病，視情況其中該血液惡性病選自急性骨髓性白血病及多發性骨髓瘤；或

(ii)實體腫瘤，視情況其中該實體腫瘤選自乳癌、胃癌、前列腺癌、卵巢癌、肺癌、子宮癌、唾液管癌、黑素瘤、結腸癌、子宮頸癌、胰臟癌、腎癌、結腸直腸癌及食道癌。

# (發明圖式)




圖 (三)

特徵圖譜%

25
28
35
38
42
45
52
0.00
0.05
0.10
0.15
0.20
0.25
0.30
0.35
0.40
0.45
0.50
0.55
0.60
0.65
0.70
0.75
0.80
0.85
0.90
0.95
1.00
吸收(aV)
波長%

圖 7-27

25
24
23
22
21
20
19
18
17
16
15
14
13
12
11
10
9
8
7
6
5
4
3
2
1
0
圖 2
電壓(mV)
時間(ms)

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| A3′85-AD′-52 | A3′85-AD′-12 | A3′85-AD′-52 | A3′85-AD′-42 | A3′85-AD′-22 | A3′85 |

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| =DV′ | A3′85-AD′-D8 | A3′85-AD′-D4 | A3′85-AD′-D8 | A3′85-AD′-D′ | A3′85-AD′-C-D′ | A3′85-AD′-2-D′ |




圖 7-47

AB'85-AD'-D8
AB'85-AD'-D4
AB'85-AD'-C8
AB'85-AD'-C4
AB'85-AD'-C0
AB'85-AD'-B2
AB'85-AD'-B0
AB'85-AD'-D2
AB'85-AD'-D5
AB'85-AD'-D7
AB'85-AD'-D25
%計比
(dV)量流
(SA)積面

A365-AD1-D8
A365-AD1-C4
A365-AD1-C8
A365-AD1-C1
A365-AD1-C0
A365-AD1-C2
A365-AD1-C2
A365-AD1-C5
A365-AD1-C4
A365-AD1-C25
指數(%)
時間(sec)

圖式
C2/17/94DA.pdf
A3'85-AD'-D8
A3'85-AD'-C4
A3'85-AD'-C8
A3'85-AD'-C7
A3'85-AD'-0D1
A3'85-AD'-2C1
A3'85-AD'-5C2
A3'85-AD'-2C2
A3'85-AD'-5C5
A3'85-AD'-C4
A3'85-AD'-5C25
C2/17/94DA.pdf


存活%
150
100
50
0
-50
0.01
0.1
1
10
100
1000
濃度(nM)
T-DM1
AB185-ADL1-D8
AB185-ADL1-D4
AB185-ADL1-D18
AB185-ADL1-D1
AB185-ADL10-D1
AB185-ADL12-D1
AB185-ADL5-D2
AB185-ADL12-D2
AB185-ADL5-D15
AB185-ADL1-D14
AB185-ADL5-D25

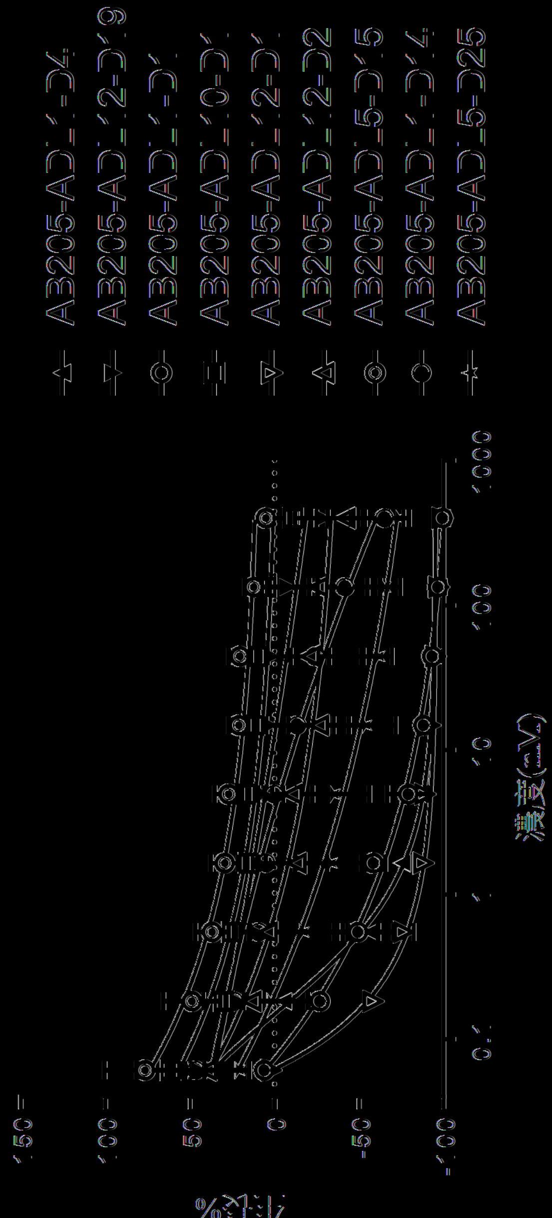
【圖6】

AB'85-AD'-C8
AB'85-AD'-C4
AB'85-AD'-C8
AB'85-AD'-C1
AB'85-AD'-C7
AB'85-AD'522
AB'85-AD'-C2
AB'85-AD'-C5
AB'85-AD'-C4
AB'85-AD'525
%對照
(%)相對強度
圖 1

A3'85-AD'5-C2
A3'85-VVAE
=-D'/'
A3'85-AD'/'=-D'/
A3'85-AD'5-C2
訪談紀錄
訪談(紀錄)
人際(空氣傳染)(1)%
200
100
0
0:00
0:00
0:00
0:00
(秒)時
(%)濕度

腫瘍体積（mm³）
（マイナス：SMD）
2500
2000
1500
1000
500
0
0
10
20
30
40
50
60
70
治療後日数
媒体、V、単次静脈
ヒトCD47 2 mg/kg、V、単次静脈
AB185-ADC-D DAR8 2 mg/kg、V、単次静脈
D 0.07 mg/kg、V、単次静脈
AB185-ADC-D2 DAR8 2 mg/kg、V、単次静脈
D2 0.07 mg/kg、V、単次静脈

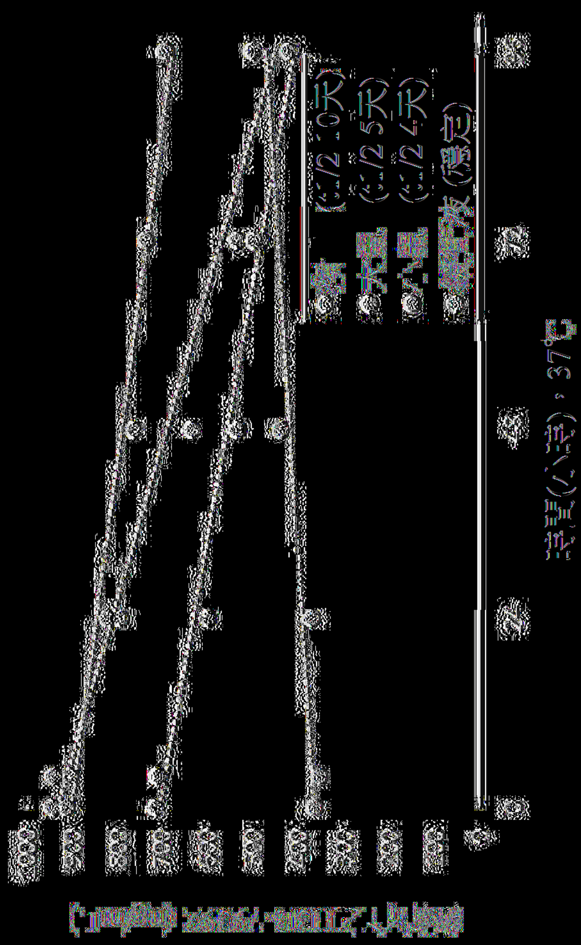
図2


150
100
50
0
-50
-100
生長%
0.1
1
10
100
1000
濃度(nM)
AB205-ADL1-D4
AB205-ADL12-D19
AB205-ADL1-D1
AB205-ADL10-D1
AB205-ADL12-D1
AB205-ADL12-D2
AB205-ADL5-D15
AB205-ADL1-D14
AB205-ADL5-D25

【圖10】

A3206-AD1-D8
A3206-AD1-D7
A3206-AD1-C8
A3206-AD1-C9
A3206-AD1-C1
A3206-AD1-C7
A3206-AD1-C1
A3206-AD1-C2
A3206-AD1-C22
A3206-AD1-C5
A3206-AD1-C4
A3206-AD1-C25
(V)
(mA)

溶出濃度(μg/mL)
時間(分鐘)，37℃
(n=12)

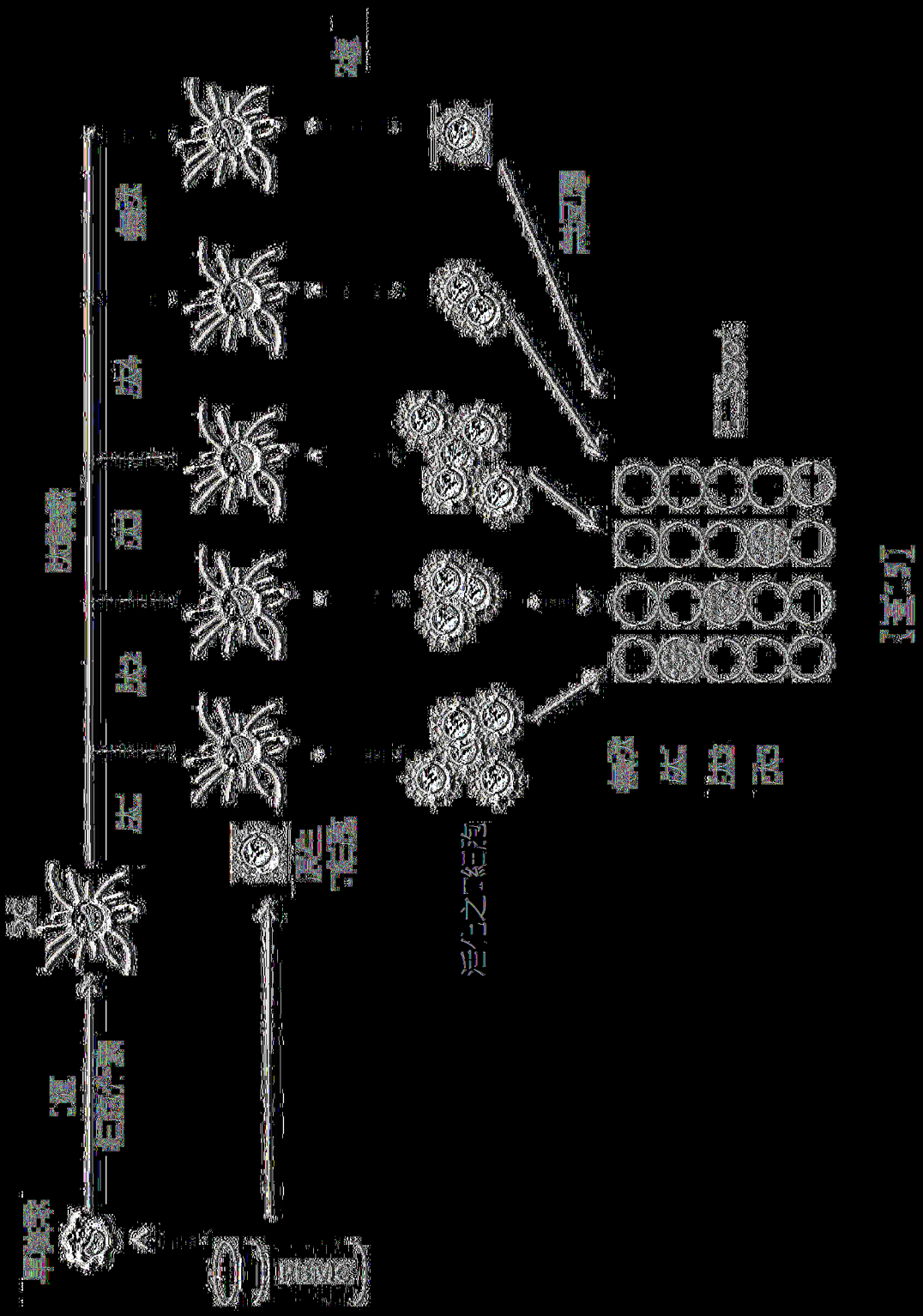


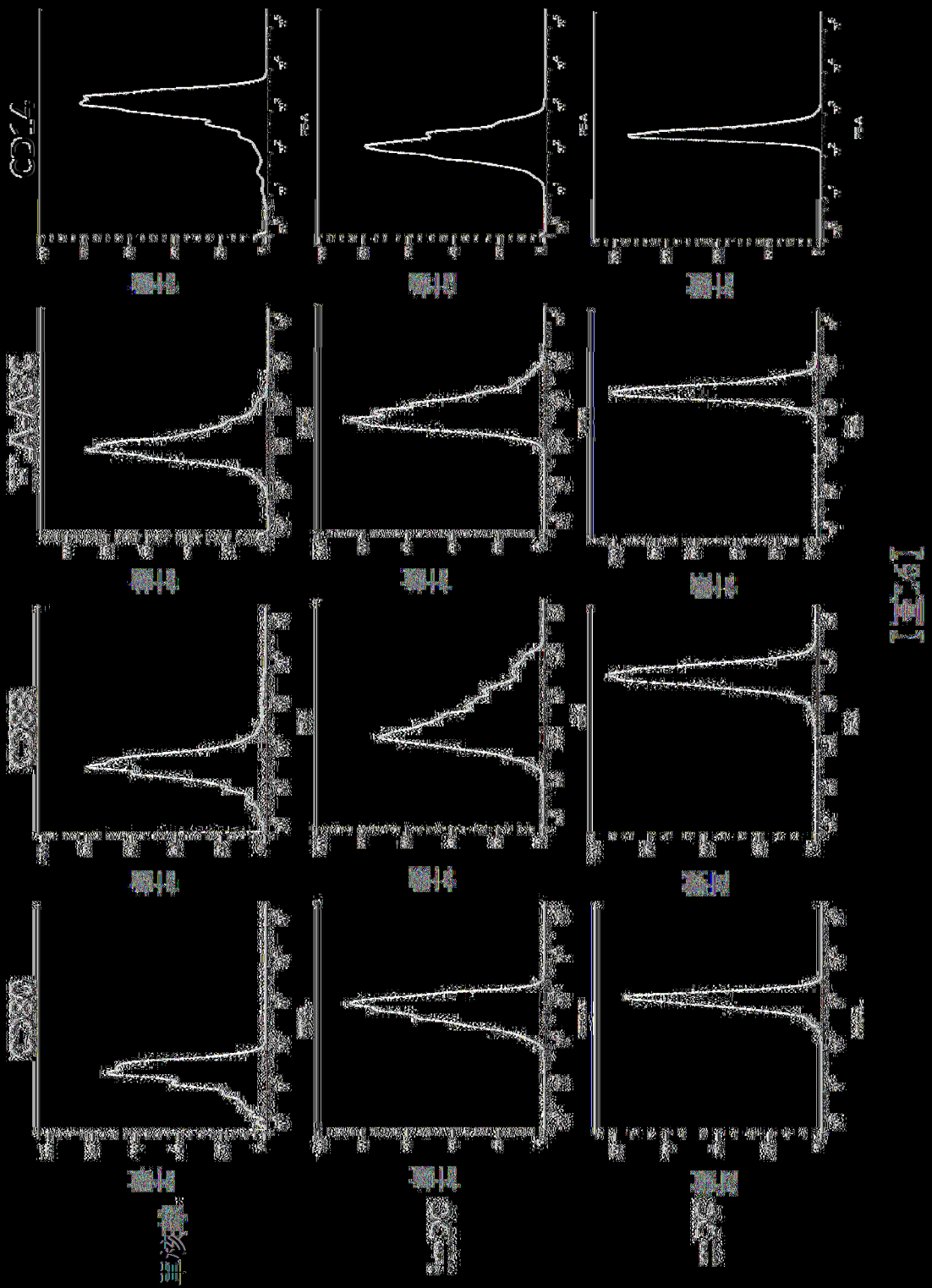

【圖23】

A3:85-ADL:-D: DAR4:0 mg/kg, IV, 單次給藥
A3:85-ADL:-D: DAR4:20 mg/kg, IV, 單次給藥
血漿濃度(ng/mL)
2000
1500
1000
500
0
24
48
72
時間(小時)

圖 7-3

圖 7-45

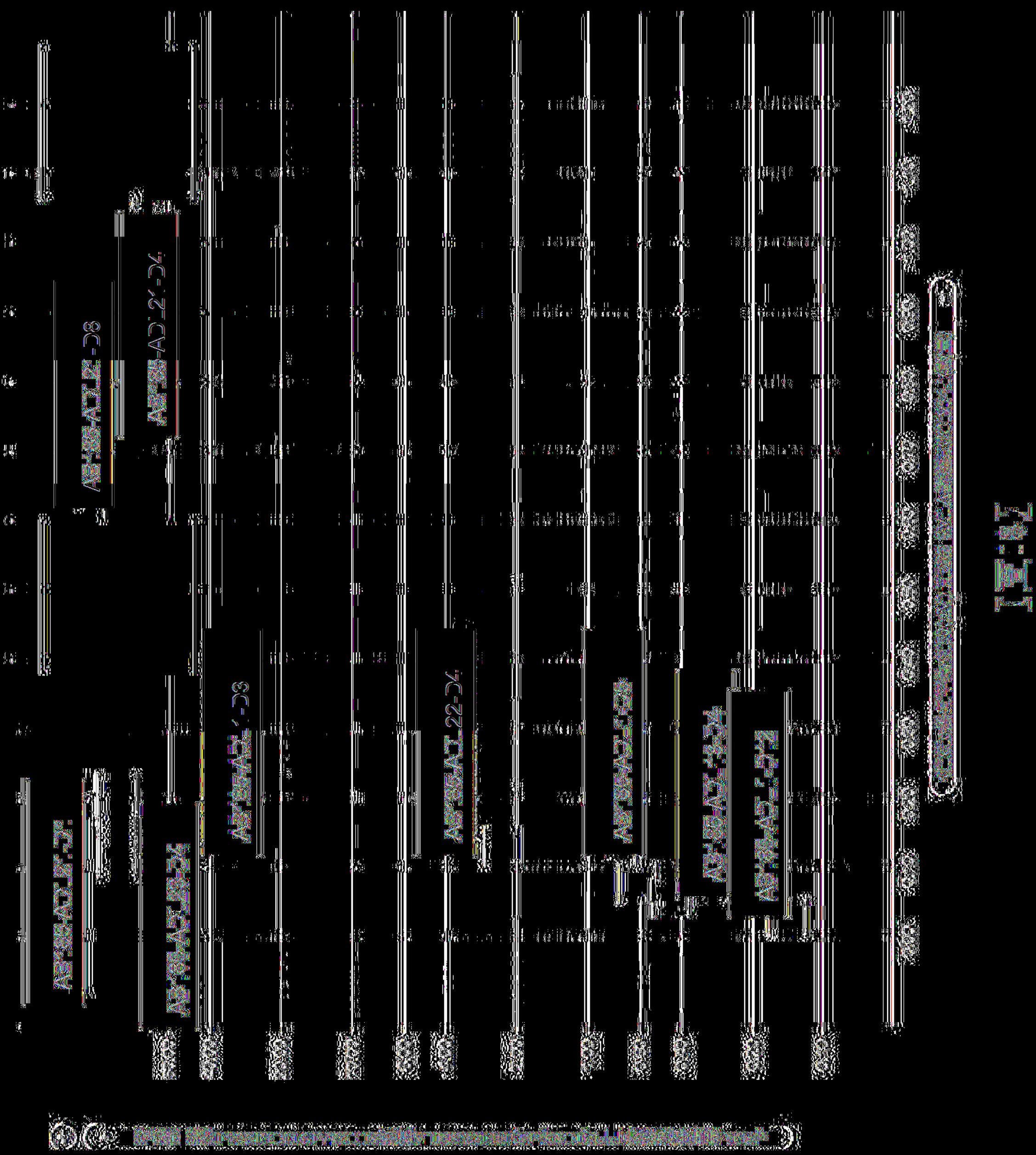




無法
第一階段
第二階段
第三階段
第四階段
(單位:百萬)

第一版
第二版
第三版
第四版
第五版
第六版

圖 C7-1
無缺
新竹県1
新竹県2
新竹県3
新竹県4
0
20
40
60
件数(件)



AB'85-AD'-5-C'7
AB'85-AD'-5-C'4
AB'85-AD'-5-C'5
AB'85-AD'-5-C'8
AB'85-AD'-5-C'6
AB'85-AD'-5-22
AB'85-AD'-5-225
AB'85-AD'-5-C'4
HER2 ADC 在 30 (nM) 中的 CC₅₀ 值
(220)

—◇— 實驗(AB:85/三安光電/T-DX1) IV，QD，2月追蹤
—□— 三安光電 5.0 mg/kg，IV，QD，2月追蹤
—△— T-DXd 5.0 mg/kg，IV，QD，2月追蹤
腫瘤體積
(mm³，平均值±SEM)
初始治療後時間(天)
0
20
40
60
80
0
500
1000
—◇— AB:85-ADC-1 1.0 mg/kg，IV，QD，2月追蹤
—◇— AB:85-ADC-2 1.0 mg/kg，IV，QD，2月追蹤
—◇— AB:85-ADC-3 1.0 mg/kg，IV，QD，2月追蹤
—◇— AB:85-ADC-4 1.0 mg/kg，IV，QD，2月追蹤
—◇— AB:85-ADC-5 1.0 mg/kg，IV，QD，2月追蹤

（圖 2-2）

—◇— 第1群(A3'85/三安宗重注厂-DV:) V，QTD，2型糖尿
—□— 三安宗重注，0 mg/kg，V，QTD，2型糖尿
—△— 厂-DV'，0 mg/kg，V，QTD，2型糖尿
—◇— A3'85-ADJ'4-D'.0 mg/kg，V，QTD，2型糖尿
—◇— A3'85-ADJ.5-D'.0 mg/kg，V，QTD，2型糖尿
—◇— A3'85-ADJ.5-D2'.0 mg/kg，V，QTD，2型糖尿
—◇— A3'85-ADJ'.-D4'.0 mg/kg，V，QTD，2型糖尿
初始治療後流量(天)
腫瘍変化:
(%，平均值±SEM)
20
0
-20
-0.'
-0.'
-0.'
20
40
60
80

- A3´85-AD┘5-D2´0 ㎎/㎏，V，Q7D，2/日投与
- A3´85-AD┘4-D´0 ㎎/㎏，V，Q7D，2/日投与
- A3´85-AD┘5-D´5´0 ㎎/㎏，V，Q7D，2/日投与
- A3´85-AD┘-D4´0 ㎎/㎏，V，Q7D，2/日投与

腫瘍体積
（㎜³，ヤギ的：SEM）

初期治療後経過日数（天）

腫瘍重量
（%，ヤギ的：SEM）

初期治療後経過日数（天）

媒体(A3´85/三安来静注/┌-DV:)，V，Q7D，2/日投与
三安来静注0 ㎎/㎏，V，Q7D，2/日投与
┌-DV:´0 ㎎/㎏，V，Q7D，2/日投与

（図23）

檢驗
=CV
主要流動步
AB-85-AD-5-C2
AB-85-AD-4-C4
AB-85-AD-5-C5
AB-85-AD-4-C7
=BXW5 of PCR
0
50
100
150
(124A)

A3'85AD'52
A3'85AD'C4
A3'85AD'C5
A3'85AD'47
zz
=CV'
=AOK'9'ECA
7'243'
'000
'000
'00

A3'85-AD'5-C2
EXW5 9C3
(°C2)
(°F)
0
24
48
72
96
120
50
100
150

AB'85-AD'5-C2
(C72)
(C72)
AOX'9CR

TCGA
RNAseq
CNV
甲基化數據
ADC
藥物資訊
表型訊息
TCGA臨床數據
TCGA
RNAseq
TCGA
外顯子組突變

圖 25