



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113164447 A

(43) 申请公布日 2021.07.23

(21) 申请号 201980082964.6

(22) 申请日 2019.10.14

(30) 优先权数据

18200527.2 2018.10.15 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2021.06.15

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2019/077784 2019.10.14

(87) PCT国际申请的公布数据

W02020/078905 EN 2020.04.23

(71) 申请人 默克专利股份公司

地址 德国达姆施塔特

(72) 发明人 C·多奇 B·皮亚特 N·拉舍

H·达门 F·赞克 A·齐默曼

M·里克

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

代理人 黄登高 初明明

(51) Int.Cl.

A61K 31/404 (2006.01)

A61K 31/437 (2006.01)

A61K 31/4375 (2006.01)

A61K 31/497 (2006.01)

A61K 31/506 (2006.01)

A61K 31/519 (2006.01)

A61K 31/5365 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

权利要求书1页 说明书89页 附图23页

(54) 发明名称

利用DNA烷化剂和ATR抑制剂的组合疗法

(57) 摘要

本发明涉及DNA烷基化ADC和ATR抑制剂的协同组合。

1. 一种用于治疗有此需要的受试者中的癌症的方法,其包括以任何次序向所述受试者施用ATR抑制剂和DNA烷基化ADC。
2. 根据权利要求1的方法,其中DNA烷基化ADC是荷有倍癌毒素的ADC。
3. 根据权利要求2的方法,其中所述ADC针对EGFR、Her2、cMet-EGFR或cMet。
4. 根据权利要求1的方法,其中所述ATR抑制剂选自化合物1或其药学上可接受的盐、化合物2或其药学上可接受的盐、化合物3或其药学上可接受的盐、化合物4或其药学上可接受的盐、化合物5或其药学上可接受的盐、化合物6或其药学上可接受的盐、化合物7或其药学上可接受的盐、或者化合物8或其药学上可接受的盐。
5. 根据权利要求4的方法,其中所述ATR抑制剂是化合物1或其药学上可接受的盐。
6. 根据权利要求1的方法,其中所述受试者经历了至少一轮先前的癌症疗法;其中任选地,所述癌症对先前的疗法具有抗性或变得抗性。
7. 根据权利要求1的方法,其进一步包括对所述受试者施用化学疗法(CT)、放射疗法(RT)、或化学疗法和放射疗法(CRT)。
8. 根据权利要求7的方法,其中在先导阶段过程中施用ATR抑制剂和DNA烷基化ADC,而在维持阶段过程中施用ATR抑制剂但不施用DNA烷基化ADC。
9. 根据权利要求8的方法,其中在先导阶段过程中施用ATR抑制剂和DNA烷基化ADC,而在维持阶段过程中施用DNA烷基化ADC但不施用ATR抑制剂。
10. 一种药物组合物,其包含ATR抑制剂和DNA烷基化ADC以及至少药学上可接受的载体、稀释剂、赋形剂和/或佐剂。
11. 一种组合,其包含ATR抑制剂和DNA烷基化剂。
12. 根据权利要求11的药物组合物或根据权利要求12的组合,用于制造用于治疗癌症的药物的用途。
13. 根据权利要求11的组合或根据权利要求12的药物组合物,其用作药物。
14. 一种药盒,其包含ATR抑制剂和DNA烷基化ADC。
15. 一种药盒,其包括ATR抑制剂和包装插页,所述包装插页包含关于使用与DNA烷基化ADC组合的所述ATR抑制剂以在受试者中治疗癌症或延迟癌症进展的说明书。
16. 一种药盒,其包括DNA烷基化ADC和包装插页,所述包装插页包含关于使用与ATR抑制剂组合的所述DNA烷基化ADC以在受试者中治疗癌症或延迟癌症进展的说明书。
17. 根据权利要求17的药盒,其中所述药盒进一步包括包装插页,所述包装插页包含关于使用所述ATR抑制剂和所述DNA烷基化ADC以在受试者中治疗癌症或延迟癌症进展的说明书。
18. 根据权利要求18的药盒,其包括第一容器和第二容器以及包装插页,其中所述第一容器包含至少一个剂量的包含所述ATR抑制剂的药物,并且所述第二容器包含至少一个剂量的包含所述DNA烷基化ADC的药物,并且所述包装插页包含使用所述药物用于治疗受试者的癌症的说明书。
19. 一种用于宣传与ATR抑制剂组合的DNA烷基化ADC的方法,其包括向目标受众推广该组合用于治疗患有癌症的受试者的用途。
20. 根据权利要求2的方法,其中所述DNA烷基化ADC是选自DUBA、DDM和/或DSA的荷有倍癌毒素的ADC。

利用DNA烷化剂和ATR抑制剂的组合疗法

技术领域

[0001] 本发明涉及用于治疗癌症的组合疗法,其利用ATR抑制剂以及与抗体分子附着的DNA烷化剂,从而形成抗体-药物缀合物。

背景技术

[0002] 尽管学术界和工业界正在寻求开发越来越高级的疗法来对抗癌症,但全球癌症负担仍然很高,其中每年1-2千万人被诊断有癌症,以及每年高达1千万例癌症有关的死亡。

[0003] 倍癌霉素是一类高度有效的抗肿瘤药物候选物。倍癌霉素的合成类似物包括阿多来新、比折来新和卡折来新。作为环丙基吡咯并吡啶家族的成员,这些研究性药物已进展到用于癌症治疗的临床试验。待在体内评估的倍癌霉素家族的第一个成员是CC-1065,并且尽管显示中等的抗肿瘤活性,但肝毒性限制了其有效性。在这个时间点,尚未报告关于倍癌霉素家族的任何成员的临床开发。

[0004] 在改善基于倍癌霉素的疗法的治疗指数的努力中,已开发了几种ADC,包括BMS-936561 (抗CD70)和SYD985 (抗HER2)。BMS-936561首先在晚期透明细胞癌和B细胞非霍奇金淋巴瘤患者中进行分析;然而,尽管在高达8 mpk的剂量下是耐受的,临床试验仍在I期过程中停止。最近以来,Synthon生成了SYD985 (曲妥珠单抗倍癌霉素),其利用由可切割的接头与曲妥珠单抗缀合的称为开环-DUBA的倍癌霉素前药,作为ado-恩美曲妥珠单抗的替代物。SYD985目前处于III期临床研究中。

[0005] 尽管进行了几次尝试,但基于倍癌霉素家族成员的药物尚未批准用于人治疗,既没有基于像这样的倍癌霉素的药物,也没有基于荷有倍癌霉素的ADC的药物。

[0006] 就有效性和安全性两者而言,本领域仍然存在对于改善的癌症疗法的高度未满足的需求。建立关于ADC的组合疗法可能提出用于增加功效、减小副作用和减慢抗性发展的策略,尤其是因为单一药剂疗法很少是治愈性的。

发明内容

[0007] 抑制DNA损伤修复的几种ATRi (共济失调毛细血管扩张症和RAD3相关蛋白抑制剂)目前处于临床开发中。至今这些无一获得批准。

[0008] 在导致本发明的研究工作过程中,发明人惊讶地发现荷有倍癌霉素的ADC与ATR抑制剂的组合不仅显示了组合功效,而且还显示了高度协同效应。

[0009] 本发明人假设,DNA损伤应答抑制剂(DDRi)的组合可能提出对基于荷有倍癌霉素的ADC的改善癌症疗法的另外策略。选择了几种不同的DDRi,并且在体外模型和体内模型中进行测试。HCC-1954和MDA-MB-468癌细胞用选择的DDRi以及单独或与抗体附着的倍癌霉素的组合进行治疗,并且将该组合治疗的抗增殖效应与单独的单一药剂的效应进行比较。

[0010] 将“裸露”倍癌霉素以及荷有倍癌霉素的ADC与本领域已知的几种DDRi组合。此类DDRi的作用模式是多种多样的,例如减少Rad 51表达、CHK1抑制、WEE1激酶抑制、O6-烷基鸟嘌呤-DNA烷基转移酶抑制、DN-PK抑制、Parp抑制、MTH1抑制、ATR抑制、CHK1抑制、NEK1抑制、

TOP2抑制、Her2抑制及其它。

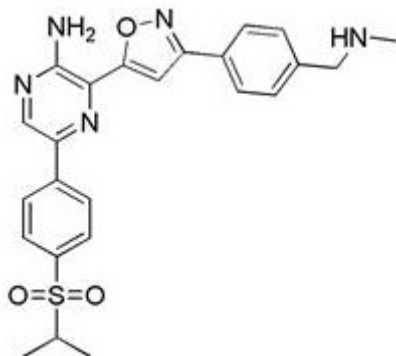
[0011] 导致本发明的实验令人惊讶地显示了,激酶ATR的专一抑制剂及其主要下游效应物检查点激酶1 (CHK1) (其在对复制应激的应答中起中心作用)的抑制剂,以高度协同的方式增强了荷有倍癌毒素的ADC的细胞毒性效应。

[0012] 几种基于倍癌毒素的ADC显示了在体外以及体内与不同的ATR抑制剂组合的强协同效应。荷有HER2表达NCI-N87肿瘤的rag2小鼠,用靶向HER2的倍癌毒素-ADC和两种不同的ATR抑制剂进行治疗。ATR抑制剂单一治疗显示了非常轻微的肿瘤生长抑制,而用浓度低于最大有效剂量的ADC的治疗导致部分肿瘤应答。然而,组合治疗在良好耐受的同时,导致非常强的抗肿瘤效应。这项研究证实,相对于用作为单一药剂的药物治疗,使用抗-HER2-倍癌毒素 ADC将倍癌毒素靶向递送至肿瘤与ATR抑制剂的全身应用组合的优越性。

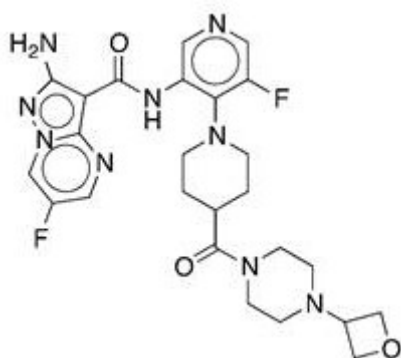
[0013] 因为像这样的倍癌毒素由于高毒性似乎不是用于人癌症疗法的有希望的候选物,因此荷有倍癌毒素的ADC与ATRi的组合是高度有前途的。这可能支持在临床场景中评估此类组合的努力。

[0014] 根据本发明待治疗的癌症的具体类型包括但不限于卵巢癌、腹膜癌、输卵管癌、肺癌、头颈癌、结肠癌、神经内分泌系统癌、尿路上皮癌、前列腺癌、食道癌、膀胱癌、胃癌、间充质癌、乳腺癌、胰腺癌及其组织学亚型。在一些实施方案中,癌症选自小细胞肺癌 (SCLC)、非小细胞肺癌 (NSCLC)、头颈部鳞状细胞癌 (SCCHN)、结肠直肠癌 (CRC)、原发性神经内分泌瘤和肉瘤,或者选自卵巢癌、原发性腹膜癌和输卵管癌的PARPi抗性复发性癌症。

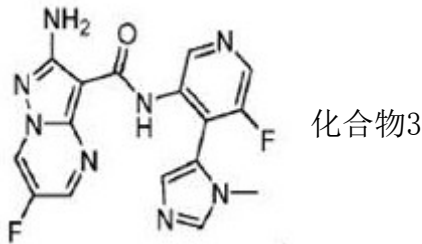
[0015] 在一些方面,ATR抑制剂由下述式之一表示:



化合物1



化合物2



或其药学上可接受的盐。

[0016] 在进一步的实施方案中,将荷有DNA烷化剂的ADC和ATR抑制剂与放射疗法(RT)、进一步的化学疗法(CT)或化学放射疗法(CRT)组合使用。

[0017] 在一个进一步方面,本公开内容提供了用于宣传与ATR抑制剂组合的荷有DNA烷化剂的ADC的方法,其包括向目标受众推广该组合用于治疗患有癌症的受试者的用途。

[0018] 本文还提供的是药物组合物,其包含荷有DNA烷化剂的ADC、ATR抑制剂和至少一种药学上可接受的赋形剂或佐剂。

[0019] 在一个进一步方面,本发明涉及包括荷有DNA烷化剂的ADC和包装插页的药盒,所述包装插页包含关于使用与ATR抑制剂组合的荷有DNA烷化剂的ADC以在受试者中治疗癌症或延迟癌症进展的说明书。还提供的是包括ATR抑制剂和包装插页的药盒,所述包装插页包含关于使用与荷有DNA烷化剂的ADC组合的ATR抑制剂以在受试者中治疗癌症或延迟癌症进展的说明书。

[0020] 先前段落的药盒可以进一步需要关于放射疗法、另外的化学疗法或放射化学疗法的说明书。

附图说明

[0021] 图1显示了A)抗体的LC通过基序 $(G_4S)_3LPETGS$ 在C末端上延长。B)抗体的LC通过基序 $LPETGS$ 在C末端上延长。C)在一条链上携带scFv,且在另一条链上携带Fab的SEED抗体。Fab通过 $LPETGS$ 序列在C末端上延长。D)携带总共四个SrtA位点的抗体。 $(G_4S)_3LPETGS$ SrtA识别基序在C末端上融合到LC,且 $LPETGS$ 序列在C末端上融合到HC。E)天然mAb。

[0022] 图2显示了用于确定协同作用评分的剂量矩阵测定法的实验设置方案。从左到右浓度渐增的DUBA的系列稀释物、以及从上到下的DDRi的系列稀释物单独或组合加入细胞中。细胞强烈地(深色)或较弱地(浅色)响应治疗。必须考虑以下三种情况:1)可加性:化合物并不相互作用,并且所得到的细胞应答不超过单一药剂的应答。2)拮抗作用:组合的效应弱于单一药剂的效应。3)对组合治疗的应答强于单一药剂的效应。

[0023] 图3显示了协同作用筛选的结果。倍癌霉素变体DUBA与DDRi组合用于HCC-1954和MDA-MB-468细胞,并且组合效应报告为协同作用评分。定义了 ± 1 的截断协同作用评分。在此范围内,组合的S被假设为可加的, $S > 1$ 指示协同作用, $S < 1$ 指示拮抗作用。描述了来自独立实验的各个数据点,以及作为条的生物学重复的平均值。

[0024] 图4显示了DDM和DUBA对用ATR或非靶向siRNA治疗的细胞的效力。各个数据点和IC50值的平均值作为黑色条展示。

[0025] 图6:以ADC形式研究的倍癌霉素变体DUBA (10)、DDM (38)和DSA (13)的化学结构。药物以开环形式展示。

[0026] 图7:携带不同的接头-药物的 α HER2-倍癌毒素ADC α HER2-1、 α HER2-2和 α HER2-3、Kadcyla和aHEL-1对呈现HER2的细胞系的选择性指数。通过将各个分子对于HER2阴性细胞系MDA-MB-468的IC₅₀值除以分子对于所指示的HER2阳性细胞系的IC₅₀值,来计算选择性指数。条表示关于每一个ADC的选择性指数的平均值。

[0027] 图8:抗EGFR α EGFR-1和 α EGFR-7 ADC对于EGFR过表达细胞系的选择性指数。通过将各个分子对于EGFR阴性细胞系MCF7的IC₅₀值除以对于所指示的EGFR阳性细胞系的IC₅₀值,来计算选择性。关于不同EGFR阳性细胞系的选择性通过灰色阴影指示。条表示用某种ADC治疗的细胞系的选择性指数的平均值。

[0028] 图9:与AZD6738组合的基于倍癌毒素的ADC和小分子对HCC-1954的协同作用评分。展示了各个数据点以及由条表示的各个点的平均值。

[0029] 图10:荷有倍癌毒素的ADC α HER2-2和 α HER2-6与不同ATRi的组合,对NCI-N87或MDA-MB-453细胞的协同作用评分。作为对照,包括小分子DUBA和吉西他滨以及作为阴性对照的Kadcyla。条代表独立生物学重复的平均值。

[0030] 图11:对HT29细胞的协同作用评分与细胞CHK1磷酸化抑制之间的相关性。ATRi就CHK1磷酸化抑制而言越有效,协同作用评分越高。对于用于HCC-1954细胞的小分子药物DUBA与几种ATRi的组合,显示了这种相关性。关于用于HCC-1954的与ADC α HER2-2组合的相同ATRi再现了相关性。将ATRi的子集与 α HER2-2和另一种基于DUBA的ADC α HER2-6组合用于MDA-MB-453和NCI-N87细胞。

[0031] 图12:西妥昔单抗-倍癌毒素ADC与ATRi AZD6738的组合,对于EGFR阳性细胞系和EGFR阴性细胞系MCF7的协同作用评分。作为对照,将西妥昔单抗-MMAE与ATRi AZD6738组合。展示了各个数据点以及实验的平均值。

[0032] 图13:作为3步方法,用于确定剂量降低指数的MNED曲线位移测定法。1) ADC α HER2-1的细胞毒性在细胞活力实验中进行确认。2) 滴定ATRi 1 的抑制剂效力以鉴定MNED。3) 通过将ADC α HER2-1系列稀释来执行MNED曲线位移测定法。将 α HER2-1的系列稀释物单独或与ATRi 1一起以先前确定的MNED加入HCC-1954细胞中。这导致ADC朝向较低效力的左移。将作为质量对照的抑制剂以MNED加入细胞中,证实了对细胞活力没有作用。

[0033] 图14: α HER2-1与AZD6738或VE-822的组合,对HER2阳性细胞系和HER2阴性细胞系MDA-MB-468的实验对象组的剂量降低指数。ATRi在组合组中以其各个MNED(表11表)给予。

[0034] 图15:ADC α HER2-1与ATRi AZD6738、VE-822、ATRi 1和BAY73的组合用于HCC-1954细胞。ATRi在组合治疗组中以其各个MNED给予,如表11中所概括的。A) 单一药剂和组合组的IC₅₀值作为各个数据点进行描绘。黑色条指示了关于每组的IC₅₀值的平均值。B) 绘制了与ATRi组合的 α HER2-1的DRI。DRI根据A)中所示的IC₅₀值进行计算。

[0035] 图16:当与恒定浓度的ATRi AZD6738和VE-822组合时, α HER2-1、 α HER2-2和 α HER2-3与Kadcyla的DRI比较。DRI使用表12和表13中的IC₅₀值进行计算。将ATRi以MNED加入ADC中(表11表)。

[0036] 图17:与ATRi组合的荷有倍癌毒素的ADC的DRI。A) ATRi与荷有倍癌毒素的ADC α HER2-1、 α HER2-2和 α HER2-3以及Kadcyla的组合的DRI是缩减的,与细胞系无关。展示了各个数据点,并且通过黑条指示了平均值。这些数据已经呈现。B) 与荷有倍癌毒素的ADC组合的ATRi的DRI。结果是缩减的,与使用哪个ADC变量无关。展示了各个数据点,并且通过黑条指

示了平均值。

[0037] 图18:强化效应的剂量依赖性。用ADC α HER2-1和渐增剂量的VE-822 (左)或AZD6738 (右)治疗MDA-MB-468细胞。展示了各个数据点,并且通过黑条表示了平均值。

[0038] 图19:在分别的MNED下, α HER2-1单一疗法以及 α HER2-1与AZD6378或VE-822组合的组合疗法的选择性指数比较。对于仅用ADC治疗的细胞,根据等式2计算选择性指数。

[0039] 图20: α GP-1作为单一药剂或与恒定剂量的ATRi AZD6738和VE-822组合,对GP阳性细胞MDA-MB-468和WISH的效力。抑制剂以MNED给予细胞。展示了生物学重复实验的各个 IC_{50} 值。

[0040] 图21:与ATR抑制剂AZD6738和ATRi 1组合的 α HER2-6,在荷有NCI-N87异种移植物的H2d Rag2小鼠中的治疗功效。A)将抗肿瘤活性评价为与媒介物以及单一药剂 α HER2-6、AZD6738和ATRi 1相比,肿瘤体积的变化。因此,在第0天开始,小鼠(N=10/组)用静脉内的 1.0 mg kg^{-1} α HER2-6、经口的 50 mg kg^{-1} AZD6738或ATRi 1进行治疗,每天一次,共两周,或者用以与单一药剂相同的剂量和时间表的 α HER2-6加上AZD6738或 α HER2-6加上ATRi 1的组合进行治疗,如通过箭头指示的。与第0天相比,较高的虚线指示了73%的肿瘤体积增加,而较低的虚线指示了66%的肿瘤体积减少。虚线之间的范围指示了肿瘤停滞,并且低于较低的线指示了肿瘤消退。B)在个别动物的水平上,组合组 α HER2-6加上AZD6738或 α HER2-6加上ATRi 1的肿瘤体积。用 α HER2-6加上AZD6738的治疗导致1/10的治愈,而用 α HER2-6加上ATRi 1的治疗导致2/10的治愈。

[0041] 图22:在荷有NCI-N87-异种移植物的H2d Rag2小鼠中,与ATR抑制剂AZD6738和ATRi 1组合的 α HER2-6的治疗耐受性。体重作为组合治疗以及相应的单一药剂 α HER2-6、AZD6738和ATRi 1的耐受性量度进行评价。

[0042] 图23:以ADC形式应用的倍癌霉素衍生物的化学结构。描绘了DC1 (19)、DC4 (20)、DC44 (21)、DU-257 (22)、小沟结合剂(23)、开环-DUBA (10)、DSA (13)、CBI-TMI (24)和该分子的衍生物(26)的结构。虚线框指示了接头的附着点。

具体实施方式

[0043] 定义

除非上下文另外明确指出,否则“一个”、“一种”和“该/所述”包括复数指示物。因此,例如,提及抗体指一种或多种抗体或至少一种抗体。因此,术语“一个”(或“一种”)、“一个或多个/一种或多种”和“至少一个/种”在本文中可互换使用。

[0044] 当用于修饰数字定义参数(例如,本文所述的化合物的剂量或用组合疗法的治疗时间的长度)时,“约”意指该参数可以由低于或高于该参数的所述数值多达10%而变。例如,约 10 mg/kg 的剂量可以在 9 mg/kg 和 11 mg/kg 之间变化。

[0045] 抗体-药物缀合物或ADC是本领域众所周知的。存在用于将药物与抗体连接的几种技术。这些例如在Beck等人,Nature reviews,第16卷,2017年5月中进行综述。

[0046] 抗体-药物缀合物也称为ADC或免疫缀合物,是靶向的化学治疗分子,通过将有效的细胞毒性药物靶向表达抗原的肿瘤细胞,来组合抗体和细胞毒性药物两者的特性,从而增强其抗肿瘤活性。对于给定的靶抗原,成功的抗体-药物缀合物开发取决于抗体选择、接头稳定性、细胞毒性药物效力以及接头-药物与抗体缀合模式的优化。更特别地,选择性抗

体-药物缀合物的特征在于下述中的至少一种或多种：

(i) 抗体-药物缀合物的形成方法,其中所述抗体保留对靶抗原足够的特异性,并且其中药物功效得到维持;(ii) 抗体-药物缀合物的稳定性足以限制血液中的药物释放以及对非靶向细胞的伴随损伤;(iii) 足够的细胞膜转运效率(胞吞作用),以达到治疗性细胞内抗体-药物缀合物的浓度;(iv) 来自抗体-药物缀合物的足够的细胞内药物释放,足以达到治疗药物浓度;以及(v) 以纳摩尔或亚纳摩尔量的药物细胞毒性。

[0047] 抗体-药物缀合物允许将药物部分靶向递送至肿瘤,并且在其中细胞内累积的一些实施方案中,其中未缀合药物的全身施用可能导致对正常细胞的无法接受的毒性水平(Polakakis P. (2005) *Current Opinion in Pharmacology* 5:382-387)。

[0048] 抗体-药物缀合物是靶向的化学治疗分子,其通过将有效的细胞毒性药物靶向表达抗原的肿瘤细胞,来组合抗体和细胞毒性药物两者的性质(Teicher, B.A. (2009) *Current Cancer Drug Targets* 9:982-1004),从而通过使功效达到最大且使脱靶活性降到最低来增强治疗指数(Carter, P.J. 和 Senter P.D. (2008) *The Cancer Jour.* 14(3): 154-169; Chari, R.V. (2008) *Acc. Chem. Res.* 41:98-107)。

[0049] 在一些实施方案中,本发明的ADC针对选自下述蛋白质(1) - (87)的肿瘤相关抗原或细胞表面受体。

[0050] (1) BMPR1B (骨形态发生蛋白受体1B型, Genbank登录号NM_0012033)

(2) E16 (LAT1、SLC7A5, Genbank登录号NM_003486)

(3) STEAP1 (前列腺的六次跨膜上皮抗原, Genbank登录号NM_012449)

(4) 0772P (CA125、MUC16, Genbank登录号AF361486)

(5) MPF (MPF、MSLN、SMR、巨核细胞增效因子、间皮素, Genbank登录号NM_005823)

(6) Napi2b (Napi3b, NAPI-3B, NPTIIb, SLC34A2, 溶质载体家族34 (磷酸钠), 成员2, II型钠依赖性磷酸转运蛋白3b, Genbank登录号NM_006424)

(7) Serna Sb (FLJ10372、KIAA144S、Mm.4201S、SEMASB、SEMAG、Semaphorin Sb Hlog、sema结构域、七血小板反应蛋白重复(I型和I型样)、跨膜5结构域(TM)和短细胞质结构域、(semaphorin) SB, Genbank登录号AB040878)

(8) PSCA hlg (27000SOC12Rik、CS30008016Rik、RIKEN cDNA 27000SOC12、RIKEN cDNA 27000SOC 12基因, Genbank登录号AY3S8628);

(9) ETBR (内皮素B型受体, Genbank登录号AY27S463);

(10) MSG783 (RNF124、假定蛋白FLJ20315, Genbank登录号NM_017763);

(11) STEAP2 (HGNC_8639、IPCA-1、PCANAP1、STAMP1、STEAP2、STMP、前列腺癌相关基因1、前列腺癌相关蛋白1、前列腺的六次跨膜上皮细胞抗原2、六次跨膜前列腺蛋白, Genbank登录号AF455138)

(12) TrpM4 (BR22450, FLJ20041, TRPM4, TRPM4B, 瞬时受体电位阳离子通道, 亚家族M, 成员4, Genbank登录号NM_017636)

(13) CRIPTO (CR、CR1、CRGF、CRIPTO、TDGF1、畸胎瘤衍生的生长因子, Genbank登录号NP_003203或NM_003212)

(14) CD21 (CR2(补体受体2)或C3DR (C3d/EB病毒受体)或Hs.73792 Genbank登录号M26004)

(15) CD79b (CD79B、CD79~、IGb (免疫球蛋白相关的 β)、B29,Genbank登录号NM_000626或11038674)

(16) FcRH2 (IFGP4、IRTA4、SPAP1A (含SH2结构域的磷酸酶锚定蛋白1a)、SPAP1B、SPAP1C,Genbank登录号NM_030764、AY358130)

(17) HER2 (ErbB2,Genbank登录号M1 1730)

(18) NCA (CEACAM6,Genbank登记号M18728);

(19) MDP (DPEP1,Genbank登录号BC017023)

(20) IL20Ra (IL20Ra、ZCYTOR7,Genbank登录号AF184971);

(21) Brevican (BCAN、BEHAB,Genbank登录号AF229053)

(22) EphB2R (DRT、ERK、Hek5、EPHT3、Tyro5,Genbank登录号NM_004442)

(23) ASLG659 (B7h,Genbank登录号AX092328)

(24) PSCA (前列腺干细胞抗原前体,Genbank登录号AJ297436)

(25) GEDA (Genbank登录号AY260763);

(26) BAFF-R (B细胞活化因子受体、BLyS受体3、BR3,Genbank登录号AF116456); BAFF受体/pid=NP_443177.1 -

(27) CD22 (B细胞受体CD22-B同种型、BL-CAM、Lyb-8、Lyb8、SIGLEC-2、FLJ22814,Genbank登录号AK026467);

(28) CD79a (CD79A,CD79a,免疫球蛋白相关的 α ,B细胞特异性蛋白,其与Ig β (CD79B) 共价相互作用并与IgM分子在表面上形成复合物,转导涉及B细胞分化的信号),Genbank登录号NP_001774.10

(29) CXCR5 (伯基特淋巴瘤受体1,G蛋白偶联受体,其由CXCL13趋化因子激活,在淋巴细胞迁移和体液防御中起作用,在HIV-2感染以及可能的AIDS、淋巴瘤、骨髓瘤和白血病发展中起作用);372 aa,pI: 8.54 MW: 41959 TM: 7 [P]基因染色体:1 1q23.3,Genbank登录号NP_001707.1)

(30) HLA-DOB (II类MHC分子的 β 亚基(Ia抗原),其结合肽并将其呈递给CD4⁺ T淋巴细胞;273 aa,pI: 6.56 MW: 30820 TM: 1 [P]基因染色体:6p21.3,Genbank登录号NP_002111.1)

(31) P2X5 (Genbank登录号NP_002552.2)

(32) CD72 (B细胞分化抗原CD72、Lyb-2) Genbank登录号NP_001773.1)

(33) LY64 (淋巴细胞抗原64 (RP105),富含亮氨酸重复(LRR)家族的I型膜蛋白,调节B细胞活化和细胞凋亡,功能丧失与系统性红斑狼疮患者中增加的疾病活动性相关);661 aa,Genbank登记号NP_005573.1)

(34) FcRH1 (Genbank登录号NP_443170.1)

(35) FCRH5 Genbank登录号人:AF343662、AF343663、AF343664、AF343665、AF369794、AF397453、AK.090423、AK.090475、AL834187、AY358085;小鼠:AK.089756、AY158090、AY506558;NP_112571.1

(36) TENB2 (TMEFF2、tomoregulin、TPEF、HPP1、TR,推定的跨膜蛋白聚糖,与生长因子的EGF/hereregulin家族和卵泡抑素有关),NCBI登录:AAD55776、AAF91397、AAG49451、NCBI RefSeq: NP_057276;NCBI基因:23671;OMIM:605734;SwissProt Q9UIK5;Genbank

登录号AF1 79274;AY358907、CAF85723、CQ782436

(37) PMEL1 (银同源物;SIL V;D12S53E;PMEL1 7;SI;SIL);ME20;gp100)
BC001414;BT007202;M32295;M77348;NM_006928;

(38) TMEFF1;H7365;C9orf2;C9ORF2;U19878;X83961;NM_080655;NM_003692;

(39) GDNF-Ra1 (GDNF家族受体 α 1;GFRA1;GDNFR;GDNFRA;RETL1;TRNR1;RET1L;
GDNFR- α 1;GFR-ALPHA-1);U95847;BC014962;NM_145793,NM_005264;

(40) Ly6E (淋巴细胞抗原6复合物,基因座E,Ly67、RIG-E、SCA-2、TSA-1);15 NP
002337.1;NM_002346.2;

(41) TMEM46 (shisa同源物2 (非洲爪蟾 (*Xenopus laevis*)));SHISA2);NP
001007539.1;NM_001007538。

[0051] (42) Ly6G6D (淋巴细胞抗原6复合物,基因座G6D;Ly6-D,MEGT1);NP 067079.2;
NM_021246.2;

(43) LGR5 NP 003658.1;NM_003667.2;

(44) RET (ret原癌基因;MEN2A;HSCR1;MEN2B;MTC1;PTC;CDHF12;Hs.168114;
RET5 1;RET-ELE1);NP_066124.1;NM_020975.4;

(45) LY6K (淋巴细胞抗原6复合物,基因座K;LY6K;HSJ001348;FLJ35226);NP_
059997.3;NM_017527.3;

(46) GPR19 (G蛋白偶联受体19;Mm.4787);NP 006134.1;NM_006143.2;

(47) GPR54 (KISS1受体;KISS1R;GPR54;HOT7T1 75;AXOR12);NP 115940.2;10
NM_032551.4;

(48) ASPHD1 (含天冬氨酸 β -羟化酶结构域1;LOC253982);NP 859069.2;NM_
181718.3;

(49) 酪氨酸酶 (TYR;OCA1A;OCA1A;酪氨酸酶;SHEP3);NP 000363.1;NM_000372.4;

(50) TMEM1 18 (环指蛋白,跨膜2;RNFT2;FLJ14627);NP Ishikawa,N.等人
(2007) Cancer Res. 67 (24):11601-11611;de Nooij-van Dalen,A.G等人;NM_
001109903.1;

(51) GPR1 72A (G蛋白偶联受体172A;GPCR41;FLJ11856;D15Erttd747e);NP
078807.1;NM_024531.3

(52) CD33

(53) CLL-1 (CLEC12A、MICL和DCAL2),

(54) CEACAM-5

(55) MUC-1

(56) EGFR

(57) c-Met

(58) avb6

(59) ROR1

(60) 叶酸R1

(61) HER2

(62) 5T4

- (63) Trop-2
- (64) gpNMB
- (65) CanAg
- (66) 钙粘蛋白-3
- (67) 钙粘蛋白-6
- (68) CD44v6
- (69) CD138
- (70) CD174
- (71) EpCAM
- (72) cKit
- (73) EphA2
- (74) EphA4
- (75) FGFR2
- (76) FGFR3
- (77) GCC
- (78) IGF1R1
- (79) 间皮素
- (80) NaPi2B
- (81) PSMA
- (82) TIM1
- (83) PTK7
- (84) TF (组织因子)
- (85) IL13RA2
- (86) GRP78
- (87) γ GT

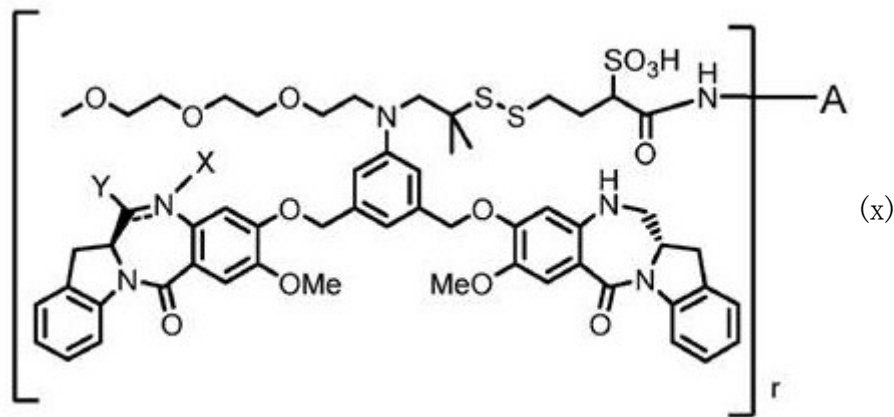
在一个实施方案中,本发明的ADC可以携带倍癌霉素作为DNA烷化剂。可用于本发明中的倍癌霉素的实例在表4和5以及图23中进行阐述。

[0052] 已用于ADC中的DNA烷化剂的进一步类别是吡啶啉苯并二氮杂草,例如Miller等人, *Mol Cancer Ther*, August 1, 2016 (15) (8) 1870-1878。

[0053] 对于BMS-936561和SYD985,描述了可用于本发明中的进一步倍癌霉素。

[0054] SYD985中的倍癌霉素是开环-DUBA (参见图6, (10))。

[0055] 在一些实施方案中,可用于本发明中的非倍癌霉素DNA-烷化剂具有下式 (x) :



或其药学上可接受的盐。N和C之间的双线=表示单键或双键，条件是当它是双键时，X不存在且Y是氢；并且当它是单键时，X是氢且Y是-SO₃H。术语“A”是如下定义的抗体或抗原结合片段。

[0056] 药物“施用(Administering)”于患者或药物对患者的“施用(administration)”(以及该短语的语法等价形式)指直接施用，其可以通过医疗专业人员对患者的施用或可以是自施用，和/或间接施用，其可以是开出药物处方的行为。例如，指示患者自施用药物或向患者提供药物处方的医生将药物施用于患者。

[0057] “抗体”是能够通过位于免疫球蛋白分子可变区中的至少一个抗原识别位点，与靶如碳水化合物、多核苷酸、脂质、多肽等特异性结合的免疫球蛋白分子。如本文使用的，术语“抗体”不仅包括完整的多克隆或单克隆抗体，还包括(除非另有说明)与完整抗体竞争特异性结合的其任何抗原结合片段或抗体片段、包含抗原结合部分的融合蛋白(例如抗体-药物缀合物)、包含抗原识别位点的免疫球蛋白分子的任何其它修饰的构型、具有多表位特异性的抗体组合物和多特异性抗体(例如双特异性抗体)。

[0058] 抗体的“抗原结合片段”或“抗体片段”包含完整抗体的一部分，其仍能够具有完整抗体的抗原结合和/或可变区。抗原结合片段包括例如，Fab、Fab’、F(ab’)₂、Fd和Fv片段、结构域抗体(dAb，例如鲨鱼和骆驼科抗体)、包括互补决定区(CDR)的片段、单链可变片段抗体(scFv)、单链抗体分子、由抗体片段形成的多特异性抗体、大抗体(maxibody)、微型抗体、细胞内抗体、双抗体、三抗体、四抗体、v-NAR和双scFv、线性抗体(参见例如，美国专利5,641,870，实施例2；Zapata等人(1995) Protein Eng. 8H0: 1057)、以及含有免疫球蛋白的至少一部分的多肽，所述部分足以对多肽赋予特异性的抗原结合。抗体的木瓜蛋白酶消化产生两个等同的称为“Fab”片段的抗原结合片段和残留的“Fc”片段，该名称反映了容易结晶的能力。Fab片段由整条L链连同H链的可变区结构域(VH)、以及一条重链的第一恒定结构域(CH1)组成。每个Fab片段就抗原结合而言是单价的，即，它具有单个抗原结合位点。抗体的胃蛋白酶处理产生单个大的F(ab’)₂片段，其大致对应于具有不同抗原结合活性且仍能够交联抗原的两个二硫键连接的Fab片段。Fab’片段与Fab片段的不同之处在于：在CH1结构域的羧基末端处具有少数另外的残基，包括来自抗体较链区的一个或多个半胱氨酸。Fab’-SH是本文关于Fab’的名称，其中恒定结构域的半胱氨酸残基荷有游离硫醇基。F(ab’)₂抗体片段最初作为在其之间具有较链半胱氨酸的成对的Fab’片段产生。抗体片段的其它化学偶联也是已知的。

[0059] “ATR抑制剂”或“ATRi”指介导DNA损伤应答的ATR激酶途径的抑制剂。优选地，ATR

抑制剂是抑制ATR激酶的酶促活性的分子。可用于本发明的治疗方法、药物和用途中的ATR抑制剂的实例包括化合物1至5中的任一种或其药学上可接受的盐。进一步的ATR抑制剂在以下中描述:WO 2013/049726、WO 2013/152298、WO 2013/049859、US-2013-0089625、US-2013-0115312、US-2014-0107093、US-2013-0096139、WO 2011/143426、US-2013-0095193、WO 2014/055756、WO 2011/143419、WO 2011/143422、WO 2011/143425、US-2013-0115311、US-2013-0115312、US-2013-0115313、US-2013-0115314、WO 2011/163527、WO 2012/178123、WO 2012/178124、WO 2012/178125、US-2014-0113005、WO2013/049726、WO 2013/071085、WO 2010/071837、WO 2014/089379、WO 2014/143242、WO 2014/143241、WO 2015/084384、WO 2014/143240、WO 2015/187451、WO 2015/085132、WO 2014/062604、WO 2014/143240、WO 2013/071094、WO 2013/071093、WO 2013/071090、WO 2013/071088、WO 2013/049859、WO 2013/049719、WO 2013/049720、WO 2013/049722、WO 2012/138,938、WO 2011/163527、WO 2011/143,423、WO 2011/143,426、WO 2011/143,399和/或WO 2010/054398,所述所有专利整体引入本文作为参考。

[0060] “生物标记物”一般指的是指示疾病状态的生物分子及其定量和定性测量。“预后性生物标记物”与疾病结果相关联,不依赖于疗法。例如,肿瘤缺氧是负面预后性标记物 - 肿瘤缺氧越高,疾病结果为负面的可能性越高。“预测性生物标记物”指示患者是否可能积极响应特定疗法。例如,HER2概况分析通常用于乳腺癌患者中,以确定这些患者是否可能响应赫赛汀(曲妥珠单抗,Genentech)。“应答性生物标记物”提供了对疗法的应答的测量,并且因此提供了疗法是否有效的指示。例如,前列腺特异性抗原的水平减少一般指示用于前列腺癌患者的抗癌疗法是有效的。当将标记物用作鉴定或选择患者用于本文所述治疗的基础时,可以在治疗之前和/或过程中测量标记物,并且获得的值由临床医生用于评价下述中的任一种:(a)个体最初接受治疗的大概或可能适合性;(b)个体最初接受治疗的大概或可能不适合性;(c)对治疗的应答性;(d)个体继续接受治疗的大概或可能适合性;(e)个体继续接受治疗的大概或可能不适合性;(f)调整剂量;(g)预测临床益处的可能性;或(h)毒性。如本领域技术人员将充分理解的,在临床场景中生物标记物的测量是这种参数用作用于启动、继续、调整和/或停止本文所述治疗的施用的基础的明确指示。

[0061] “癌症”、“癌性”或“恶性”指的是或描述哺乳动物中通常以不受控制的细胞生长为特征的生理状况。癌症的实例包括但不限于癌、淋巴瘤、白血病、母细胞瘤和肉瘤。此类癌症的更具体实例包括鳞状细胞癌、骨髓瘤、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、神经胶质瘤、霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、急性髓样白血病、多发性骨髓瘤、胃肠(道)癌、肾癌、卵巢癌、肝癌、成淋巴细胞性白血病、淋巴细胞性白血病、结肠直肠癌、子宫内膜癌、肾癌、前列腺癌、甲状腺癌、黑素瘤、软骨肉瘤、成神经细胞瘤、胰腺癌、多形性成胶质细胞瘤、宫颈癌、脑癌、胃癌、膀胱癌、肝癌、乳腺癌、结肠癌、尿路上皮癌和头颈癌。

[0062] “化学疗法”是涉及化学治疗剂的疗法,所述化学治疗剂是可用于癌症治疗中的化合物。化学疗法剂的实例包括烷化剂,例如噻替派和环磷酰胺;烷基磺酸盐,例如白消安、英丙舒凡和派泊舒凡;氮丙啶,例如苯并多巴、卡波醌、美妥替派和乌瑞替派;乙撑亚胺和甲基蜜胺,包括六甲蜜胺、三乙撑蜜胺、三乙撑磷酰胺(triethylenephosphoramidate)、三乙撑硫代磷酰胺(triethylenethiophosphoramidate)和三羟甲基蜜胺(trimethylolomelamine);乙酸原化合物(acetogenin)(尤其是布拉他辛和布拉他辛酮); δ -9-四氢大麻酚(屈大麻酚);

β -拉帕酮;拉帕醇;秋水仙碱;白桦脂酸;苔藓抑素;培美曲塞;callystatin;鬼臼毒素;鬼臼酸;替尼泊苷;念珠藻素(特别是念珠藻素1和念珠藻素8);多拉司他汀;艾榴塞洛素(eleutherobin);pancratistatin;TLK-286;CDP323,经口 α -4整联蛋白抑制剂;sarcodictyin;海绵抑素;氮芥,例如苯丁酸氮芥、萘氮芥、氯磷酰胺、雌莫司汀、异环磷酰胺、甲氯乙胺、盐酸氧化氮芥、美法仑、新氮芥、苯芥胆甾醇、泼尼氮芥、曲磷胺和尿嘧啶芥末;亚硝基脲,例如卡莫司汀、氯脲霉素、福莫司汀、洛莫斯汀、尼莫斯汀和雷莫斯汀;达内霉素,包括达内霉素A;埃波霉素;以及新制癌菌素生色团和相关的色蛋白烯二炔抗生素生色团、阿克拉霉素、放线菌素D、氨基霉素、重氮丝氨酸、博来霉素、放线菌素C、carabycin、洋红霉素、嗜癌霉素、色霉素(chromomycini)、更生霉素、柔红霉素、地托比星、6-重氨基5-氧代-L-正亮氨酸、多柔比星(包括吗啉代-多柔比星、氰基吗啉代-多柔比星、2-吡咯代-多柔比星、多柔比星HCl脂质体注射剂和脱氧多柔比星)、表柔比星、依索比星、伊达比星、麻西罗霉素、丝裂霉素如丝裂霉素C、霉酚酸、诺拉霉素、橄榄霉素、培洛霉素、泊非霉素、嘌呤霉素、三铁阿霉素、罗多比星、链黑菌素、链佐星、杀结核菌素、乌苯美司、净司他丁和佐柔比星;抗代谢物,例如氨甲蝶呤、吉西他滨、替加氟、卡培他滨、埃博霉素和5-氟尿嘧啶(5-FU);叶酸类似物,例如二甲叶酸、氨甲蝶呤、蝶罗呤和三甲曲沙;嘌呤类似物,例如氟达拉滨、6-巯基嘌呤、硫咪嘌呤和硫鸟嘌呤;嘧啶类似物,例如安西他滨、阿扎胞苷、6-氮杂尿苷、卡莫氟、阿糖胞苷、双脱氧尿苷、去氧氟鸟苷、依诺他滨、氟尿苷和伊马替尼(2-苯基氨基嘧啶衍生物)、以及其它c-Kit抑制剂;抗肾上腺素,例如氨鲁米特、米托坦和曲洛司坦;叶酸补充剂,例如亚叶酸;乙酰葡醛酯;醛磷酰胺糖苷;氨基酮戊酸;恩尿嘧啶;安吡啶;bestrabucil;比生群;依达曲沙;地磷酰胺;地美可辛;地吡醌;依氟鸟氨酸;依利醋铵;依托格鲁;硝酸镓;羟基脲;香菇多糖;氯尼达明;美登木素生物碱,例如美登素和安丝菌素;米托胍脲;米托蒽醌;莫派达醇;硝氨丙吡啶;喷司他丁;蛋氨酸;吡柔比星;洛索蒽醌;2-乙基酰肼;丙卡巴肼;PSK多糖复合物(JHS Natural Products, Eugene, OR);雷佐生;根霉素;西索菲兰;锗螺胺;细交链孢菌酮酸;三亚胺醌;2,2',2''-三氯三乙胺;单端孢霉烯(尤其是T-2毒素、疣孢菌素A、杆孢菌素A和蛇形菌素);尿烷;长春地辛;达卡巴嗪;甘露莫司汀;二溴甘露醇;二溴卫矛醇;派泊溴烷;gacytosine;阿糖胞苷("Ara-C");噻替派;类紫杉烷,例如紫杉醇、白蛋白改造的紫杉醇纳米制剂和多西他赛;苯丁酸氮芥(chlorambucil);6-巯鸟嘌呤;巯基嘌呤;氨甲蝶呤;铂类似物,例如顺铂和卡铂;长春碱;铂;异环磷酰胺;米托蒽醌;长春新碱;奥沙利铂;甲酰四氢叶酸(leucovorin);长春瑞滨;诺肖林;依达曲沙;道诺霉素;氨甲蝶呤;伊班膦酸盐;二氟甲基鸟氨酸(DMFO);维甲酸,例如视黄酸,以及上述任何的药学上可接受的盐、酸或衍生物;以及上述两种或更多种的组合,例如CHOP,关于环磷酰胺、多柔比星、长春新碱和泼尼松龙的组合疗法的缩写,或者FOLFOX,关于用与5-FU和甲酰四氢叶酸组合的奥沙利铂的治疗方案的缩写。

[0063] “临床结果”、“临床参数”、“临床应答”或“临床终点”指与患者对疗法的反应有关的任何临床观察或测量。临床结果的非限制性实例包括肿瘤应答(TR)、总生存期(OS)、无进展生存期(PFS)、无疾病生存期、肿瘤复发时间(TTR)、肿瘤进展时间(TTP)、相对风险(RR)、毒性或副作用。

[0064] “完全应答”或“完全缓解”指响应治疗的所有癌症体征消失。这并不一定意味着癌症已治愈。

[0065] 如本文使用的,“包含”预期意指组合物和方法包括所列举的要素,但不排除其它要素。当用于限定组合物和方法时,“基本上由……组成”应该意指排除对组合物或方法具有任何重要意义的其它要素。“由……组成”应该意指对于请求保护的组合物和基本方法步骤,排除不仅仅是微量要素的其它成分。由这些过渡术语各自限定的实施方案都在本发明的范围内。相应地,预期方法和组合物可以包括另外的步骤和组分(包含),或者可替代地包括不重要的步骤和组合物(基本上由其组成),或者可替代地仅预期所述的方法步骤或组合物(由其组成)。

[0066] “剂量(Dose)”和“剂量(dosage)”指用于施用的活性剂或治疗剂的具体量。此类量包括在“剂型”中,其指适合作为用于人受试者和其它哺乳动物的单位剂量的物理上不连续的单位,每个单位含有计算为产生所需起效、耐受性和疗效的预定数量的活性剂,与一种或多种合适的药物赋形剂如载体结合。

[0067] “Fc”是包含通过二硫键保持在一起的两条H链的羧基末端部分的片段。抗体的效应子功能由Fc区中的序列决定,所述区域也被某些类型细胞上存在的Fc受体(FcR)识别。

[0068] 本发明的抗体的“功能片段”包含完整抗体的一部分,一般包括完整抗体的抗原结合区域或可变区、或者保留或具有修饰的FcR结合能力的抗体的Fc区。功能性抗体片段的实例包括线性抗体、单链抗体分子、以及由抗体片段形成的多特异性抗体。

[0069] “Fv”是最小的抗体片段,其含有完整的抗原识别和抗原结合位点。该片段由紧密非共价结合的一个重链和一个轻链可变区结构域的二聚体组成。从这两个结构域的折叠中,产生六个高变环(各自来自H链和L链的3个环),所述环贡献了用于抗原结合的氨基酸残基,并且对抗体赋予抗原结合特异性。然而,即使单个可变结构域(或仅包含对于抗原特异性的三个HVR的一半Fv)也具有识别和结合抗原的能力,尽管亲和力低于整个结合位点。

[0070] “人抗体”是具有氨基酸序列的抗体,所述氨基酸序列对应于由人产生的抗体的氨基酸序列,和/或已使用如本文公开的用于制备人抗体的任何技术进行制备。人抗体的这个定义具体地排除了包含非人抗原结合残基的人源化抗体。可以使用本领域已知的各种技术来产生人抗体,所述技术包括噬菌体展示文库(参见例如,Hoogenboom和Winter(1991), JMB 227: 381;Marks等人(1991) JMB 222: 581)。还可用于制备人单克隆抗体的是在Cole等人(1985) *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, 第77页; Boerner等人(1991), *J. Immunol* 147(1): 86; van Dijk和van de Winkel (2001) *Curr. Opin. Pharmacol* 5: 368)中描述的方法。人抗体可以通过将抗原施用于转基因动物进行制备,所述转基因动物已进行修饰以响应抗原攻击而产生此类抗体,但其内源基因座已丧失能力,例如免疫的异种小鼠(xenomice)(参见例如,关于XENOMOUSE技术的美国专利号6,075,181;和6,150,584)。关于经由人B细胞杂交瘤技术生成的人抗体,还参见例如Li等人(2006) *PNAS USA*, 103: 3557。

[0071] 非人(例如鼠)抗体的“人源化”形式是嵌合抗体,其含有衍生自非人免疫球蛋白的最小序列。在一个实施方案中,人源化抗体是人免疫球蛋白(受体抗体),其中来自受体HVR的残基被替换为来自非人物种(供体抗体)的HVR的残基,所述非人物种例如具有所需特异性、亲和力和/或能力的小鼠、大鼠、兔或非人灵长类动物。在一些情况下,人免疫球蛋白的构架(“FR”)残基被替换为相应的非人残基。此外,人源化抗体可以包含在受体抗体或供体抗体中未发现的残基。可以进行这些修饰以进一步改善抗体性能,例如结合亲和力。一般而

言,人源化抗体将包含至少一个可变结构域,并且通常是两个可变结构域的基本上全部,其中高变环的全部或基本上全部对应于非人免疫球蛋白序列的那些,并且FR区的全部或基本上全部是人免疫球蛋白序列的那些,尽管FR区可以包括改善抗体性能的一个或多个个别FR残基取代,所述抗体性能例如结合亲和力、异构化、免疫原性等。FR中这些氨基酸取代的数目通常在H链中不多于6,且在L链中不多于3。人源化抗体还任选地包含免疫球蛋白恒定区(Fc)的至少一部分,通常是人免疫球蛋白的那种。关于进一步细节,参见例如, Jones等人(1986) *Nature* 321: 522; Riechmann等人(1988), *Nature* 332: 323; Presta (1992) *Curr. Op. Struct. Biol.* 2: 593; Vaswani和Hamilton (1998), *Ann. Allergy, Asthma & Immunol.* 1: 105; Harris (1995) *Biochem. Soc. Transactions* 23: 1035; Hurle和Gross (1994) *Curr. Op. Biotech.* 5: 428; 以及美国专利号6,982,321和7,087,409。

[0072] “免疫球蛋白”(Ig)在本文中可与“抗体”互换使用。基本的4链抗体单元是由两条等同的轻(L)链和两条等同的重(H)链组成的异四聚体糖蛋白。IgM抗体由5个基本异四聚体单元连同称为J链的另外多肽组成,并且含有10个抗原结合位点,而IgA抗体包含2-5个基本4链单元,其可以聚合形成与J链组合的多价装配物。在IgG的情况下,4链单元一般为约150,000道尔顿。每条L链通过一个共价二硫键与H链相连,而两条H链取决于H链同种型通过一个或多个二硫键彼此相连。每条H链和L链还具有规则间隔的链内二硫桥。每条H链在N末端处具有可变结构域(VH),随后为关于 α 链和 γ 链各自的三个恒定结构域(CH)、以及关于 μ 和 ϵ 同种型的四个CH结构域。每条L链在N末端处具有可变结构域(VL),随后为在其另一端处的恒定结构域。VL与VH对齐,且CL与重链的第一恒定结构域(CH1)对齐。认为特定的氨基酸残基在轻链和重链可变结构域之间形成界面。VH和VL的配对一起形成单个抗原结合位点。关于不同类别抗体的结构和性质,参见例如, *Basic and Clinical Immunology*, 第8版, Sties等人(编辑), Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1994, 第71页和第6章。基于其恒定结构域的氨基酸序列,来自任何脊椎动物物种的L链可以被指定为两种明显不同的类型之一,称为 κ 和 λ 。取决于其重链(CH)恒定结构域的氨基酸序列,免疫球蛋白可以被指定为不同类别或同种型。存在五个类别的免疫球蛋白: IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,分别具有指定为 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 的重链。基于CH序列和功能的相对较小差异,将 γ 和 α 类别进一步分成子类,例如,人表达下述子类: IgG1、IgG2A、IgG2B、IgG3、IgG4、IgA1和IgK1。

[0073] “输注(Infusion)”或“输注(infusing)”指通过静脉将含有药物的溶液引入体内,用于治疗目的。一般地,这经由静脉(IV)袋来实现。

[0074] “与……组合”或“与……联合”指一种化合物加上一种或多种其它化合物的施用。因此,“与……组合”或“与……联合”指一种化合物的施用,加上以任何次序的一种或多种其它化合物的施用。例如,一种化合物可以在一种或多种其它化合物施用于个体之前、过程中或之后施用。如本文使用的,就包含荷有DNA烷化剂的ADC和ATR抑制剂的组合的施用而言,术语“组合”意指将这些化合物以任何次序施用于患者。例如,化合物可以同时或序贯地施用。另外,在存在另外的化学疗法的情况下,可以同时施用两种化合物,随后为第三种化合物的序贯施用。另外,化合物可以作为单一或分开的组合物、制剂或单位剂型施用。另外,两种化合物可以作为单一组合物、制剂或单位剂型施用,而第三种化合物作为分开的组合物、制剂或单位剂型施用。应了解,荷有DNA烷化剂的ADC、ATR抑制剂和潜在的另外的化学治疗剂或放射疗法或放射化学疗法,在同一天或不同天时以及根据适当的给药方案以任何次

序施用。

[0075] “转移性”癌症指已从身体的一个部分(例如,肺)扩散到身体的另一部分的癌症。

[0076] 如本文使用的,“单克隆抗体”指从基本上同质的抗体群体中获得的抗体,即,除了可能以少量存在的可能的天然存在的突变和/或翻译后修饰(例如,异构化和酰胺化)之外,构成群体的个别抗体是等同的。单克隆抗体针对单个抗原位点是高度特异性的。与通常包括针对不同决定簇(表位)的不同抗体的多克隆抗体制剂形成对比,每种单克隆抗体针对抗原上的单一决定簇。除其特异性之外,单克隆抗体的优点在于它们通过杂交瘤培养物合成,并且不受其它免疫球蛋白的污染。修饰语“单克隆”指示抗体的特征为从基本上同质的抗体群体中获得,而不应解释为要求通过任何特定方法的抗体生产。例如,待根据本发明使用的单克隆抗体可以通过各种技术进行制备,所述技术包括例如杂交瘤方法(例如,Kohler和Milstein (1975) *Nature* 256: 495;Hongo等人(1995) *Hybridoma* 14 (3): 253;Harlow等人(1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press,第2版;Hammerling等人(1981) *In: Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563 (Elsevier,N.Y.),重组DNA方法(参见例如,美国专利号4,816,567),噬菌体展示技术(参见例如,Clackson等人(1991) *Nature* 352: 624;Marks等人(1992) *JMB* 222: 581;Sidhu等人(2004) *JMB* 338 (2): 299;Lee等人(2004) *JMB* 340 (5): 1073;Fellouse (2004) *PNAS USA* 101 (34): 12467;和Lee等人(2004) *J. Immunol. Methods* 284 (1-2): 119),以及在具有人免疫球蛋白基因座或编码人免疫球蛋白序列的基因的部分或全部的动物中,用于产生人或人样抗体的技术(参见例如,WO 1998/24893;WO 1996/34096;WO 1996/33735;WO 1991/10741;Jakobovits等人(1993) *PNAS USA* 90: 2551;Jakobovits等人(1993) *Nature* 362: 255;Bruggemann等人(1993) *Year in Immunol.* 7: 33;美国专利号5,545,807;5,545,806;5,569,825;5,625,126;5,633,425;和5,661,016;Marks等人(1992) *Bio/Technology* 10: 779;Lonberg等人(1994) *Nature* 368: 856;Morrison (1994) *Nature* 368: 812;Fishwild等人(1996) *Nature Biotechnol.* 14: 845;Neuberger (1996) *Nature Biotechnol.* 14: 826;以及Lonberg和Huszar (1995), *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93)。本文的单克隆抗体特别包括嵌合抗体(免疫球蛋白),其中重链和/或轻链的一部分与衍生自特定物种或者属于特定抗体类别或亚类的抗体中的相应序列等同或同源,而链的剩余部分与衍生自另一物种或者属于另一抗体类别或亚类的抗体中的相应序列等同或同源,以及此类抗体的片段,只要它们显示出所需的生物学活性。(参见例如,美国专利号4,816,567;4,816,567;Morrison等人(1984) *PNAS USA*,81: 6851)。

[0077] “客观应答”指可测量的应答,包括完全应答(CR)或部分应答(PR)。

[0078] “部分应答”指响应治疗,一种或多种肿瘤或病损的大小、或体内癌症的程度的减少。

[0079] “患者”和“受试者”在本文中可互换使用,以指需要癌症治疗的哺乳动物。一般地,患者是被诊断为患有癌症的一种或多种症状或者处于患有癌症的一种或多种症状的风险中的人。在某些实施方案中,“患者”或“受试者”可以指非人哺乳动物,例如非人灵长类动物、犬、猫、兔、猪、小鼠或大鼠,或者用于筛选、表征并评估药物和疗法的动物。

[0080] “药学上可接受的”指示物质或组合物必须在化学上和/或毒理学上适合于哺乳动

物的治疗。

[0081] 术语“药学上可接受的佐剂”指增强机体对抗原的免疫应答的任何和所有物质。药学上可接受的佐剂的非限制性实例是：明矾、弗氏不完全佐剂、MF59、dsRNA的合成类似物例如聚(I:C)、细菌LPS、细菌鞭毛蛋白、咪唑并喹啉、含有特异性CpG基序的寡聚脱氧核苷酸、细菌细胞壁的片段例如胞壁酰二肽和Quil-A®。

[0082] 如本文使用的，“药学上可接受的载体”或“药学上可接受的稀释剂”意指与药物施用相容的任何和所有溶剂、分散介质、包衣、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂。此类介质和试剂用于药物活性物质的用途是本领域众所周知的。可接受的载体、赋形剂或稳定剂在所采用的剂量和浓度下对接受者无毒，并且在不限本发明范围的情况下包括：另外的缓冲剂；防腐剂；助溶剂；抗氧化剂，包括抗坏血酸和甲硫氨酸；螯合剂，例如EDTA；金属络合物（例如Zn蛋白络合物）；可生物降解的聚合物，例如聚酯；成盐抗衡离子，例如钠、多元糖醇；氨基酸，例如丙氨酸、甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸、赖氨酸、鸟氨酸、亮氨酸、2-苯丙氨酸、谷氨酸和苏氨酸；有机糖或糖醇，例如乳糖醇、水苏糖、甘露糖、山梨糖、木糖、核糖、核糖醇、肌醇糖(myoinisitose)、肌醇、半乳糖、半乳糖醇、甘油、环醇（例如肌醇）、聚乙二醇；含硫的还原剂，例如尿素、谷胱甘肽、硫辛酸、硫代乙醇酸钠、硫代甘油、[α]-单硫代甘油和硫代硫酸钠；低分子量蛋白质，例如人血清白蛋白、牛血清白蛋白、明胶或其它免疫球蛋白；和亲水性聚合物，例如聚乙烯吡咯烷酮。其它药学上可接受的载体、赋形剂或稳定剂，例如Remington's Pharmaceutical Sciences第16版，Osol, A. 编辑(1980)中描述的那些，也可以包括在本文所述的药物组合物中，条件是它们不会不利地影响药物组合物的所需特性。

[0083] 分子的“药学上可接受的盐”指分子的盐形式。药学上可接受的盐可以涉及另一种分子，例如乙酸根离子、琥珀酸根离子或其它抗衡离子的包括。抗衡离子可以是稳定母体化合物上的电荷的任何有机或无机部分。此外，药学上可接受的盐可以在其结构中具有多于一个荷电原子。其中多重荷电原子是药学上可接受的盐的部分的情况可以具有多重抗衡离子。因此，药学上可接受的盐可以具有一个或多个荷电原子和/或一个或多个抗衡离子。如果本发明的化合物是碱，则所需药学上可接受的盐可以通过本领域中可用的任何合适的方法来制备，例如，用无机酸或有机酸处理游离碱，所述无机酸例如盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸、甲磺酸、磷酸等等，所述有机酸例如乙酸、马来酸、琥珀酸、扁桃酸、富马酸、丙二酸、丙酮酸、草酸、乙醇酸、水杨酸、吡喃糖基酸(pyranosidyl acid)如葡萄糖醛酸或半乳糖醛酸、α羟酸如柠檬酸或酒石酸、氨基酸如天冬氨酸或谷氨酸、芳族酸如苯甲酸或肉桂酸、磺酸如对甲苯磺酸或乙磺酸等等。如果本发明的化合物是酸，则可以通过任何合适的方法来制备所需的药学上可接受的盐，例如，用无机碱或有机碱例如胺（伯胺、仲胺或叔胺）、碱金属氢氧化物或碱土金属氢氧化物等等处理游离酸。合适的盐的说明性实例包括但不限于衍生自氨基酸例如甘氨酸和精氨酸，氨，伯胺、仲胺和叔胺，以及环胺例如哌啶、吗啉和哌嗪的有机盐，以及衍生自钠、钙、钾、镁、锰、铁、铜、锌、铝和锂的无机盐。

[0084] “复发性”癌症是在对初始疗法如手术的应答后，在初始部位或远处部位已再生的癌症。局部“复发性”癌症是在与先前治疗的癌症相同的位置中，在治疗后复发的癌症。

[0085] 一种或多种症状的“减轻”（以及该短语的语法等价形式）指减少一种或多种症状的严重程度或频率，或者一种或多种症状的消除。

[0086] “血清”指可以与凝固的血液分开的透明液体。血清与血浆(正常未凝固血液的液体部分)不同,所述血浆含有红细胞和白细胞以及血小板。血清是这样的组分,其既不是血细胞(血清不含白血细胞或红血细胞),也不是凝血因子。不包括纤维蛋白原的血浆帮助血凝块形成。凝块使得血清和血浆之间存在差异。

[0087] “单链Fv”,也缩写为“sFv”或“scFv”,是包含连接成单条多肽链的VH和VL抗体结构域的抗体片段。优选地,sFv多肽进一步包含在VH和VL结构域之间的多肽接头,其使得sFv能够形成用于抗原结合的所需结构。关于sFv的综述,参见例如,Pluckthun (1994),In: The Pharmacology of Monoclonal Antibodies,第113卷,Rosenburg和Moore (编辑),Springer-Verlag,New York,第269页。

[0088] “持续应答”意指在用本文所述的治疗剂或组合疗法的治疗停止后的持续疗效。在一些实施方案中,持续应答具有的持续时间至少与治疗持续时间相同,或者是治疗持续时间的至少1.5、2.0、2.5或3倍。

[0089] “全身”治疗是其中药物物质通过血液运输,到达并影响遍及全身的细胞的治疗。

[0090] 在本发明的每种情况下,荷有DNA烷化剂的ADC或ATR抑制剂的“治疗有效量”,指在必要的剂量和时间段下有效的量,当施用于患有癌症的患者时,所述量具有预期的疗效,例如缓和、改善、减轻或消除患者中的一种或多种癌症表现,或者在治疗癌症患者的过程中的任何其它临床结果。疗效通过一个剂量的施用不一定出现,并且可能仅在一系列剂量的施用后才出现。因此,可以以一次或多次施用来施用治疗有效量。此类治疗有效量可以根据以下因素而变:如个体的疾病状态、年龄、性别和重量,以及荷有烷化剂的ADC或ATR抑制剂在个体中引发所需应答的能力。治疗有效量也是这样的量,其中荷有烷化剂的ADC或ATR抑制剂的治疗有益效应超过了任何毒性或有害效应。

[0091] “治疗(treating)”状况或患者或者状况或患者的“治疗(treatment)”,指采取步骤以获得有益结果或所需结果,包括临床结果。为了本发明的目的,有益临床结果或所需临床结果包括但不限于一种或多种癌症症状的缓和、改善;疾病程度的缩小;疾病进展的延迟或减缓;疾病状态的改善、减轻或稳定;或其它有益结果。应了解,对“治疗(treating)”或“治疗(treatment)”的提及包括所确定的状况症状的预防以及缓和。因此,状态、病症或状况的“治疗(treating)”或“治疗(treatment)”包括:(1) 预防或延迟受试者中发展的状态、病症或状况的临床症状的出现,所述受试者可能患有或易患状态、病症或状况,但尚未经历或展示状态、病症或状况的临床症状或亚临床症状,(2) 抑制状态、病症或状况,即,阻止、降低或延迟疾病或其复发(在维持治疗的情况下)或者其至少一种临床症状或亚临床症状的发展,或(3) 缓解或减弱疾病,即,引起状态、病症或状况或者其至少一种临床症状或亚临床症状的消退。

[0092] 当“肿瘤”应用于诊断有或怀疑患有癌症的受试者时,它指任何大小的恶性或潜在恶性的赘生物或组织团块,并且包括原发性肿瘤和继发性赘生物。实体瘤是通常不含囊肿或液体区域的异常生长或组织团块。不同类型的实体瘤因形成其的细胞类型而命名。实体瘤的实例是肉瘤、癌和淋巴瘤。白血病(血液中的癌症)一般不形成实体瘤。

[0093] 如本文使用的,“单位剂型”指适合于待治疗的受试者的治疗制剂的物理上不连续的单位。然而,应理解,本发明的组合物的日总用量由主治医生在合理的医学判断范围内决定。关于任何特定受试者或生物体的具体有效剂量水平取决于各种因素,包括待治疗的病

症和病症的严重程度;所采用的具体活性剂的活性;所采用的具体组合物;受试者的年龄、体重、一般健康、性别和饮食;所采用的具体活性剂的施用时间和排泄率;治疗持续时间;与所采用的具体化合物组合或同时使用的药物和/或另外疗法,以及医学领域众所周知的类似因素。

[0094] “可变的”指可变结构域的某些区段在抗体中的序列方面广泛不同的事实。V结构域介导抗原结合,并且限定特定抗体对于其特定抗原的特异性。然而,可变性并非跨越可变结构域整个跨度均匀分布的。相反,它集中在轻链和重链可变结构域两者中、称为高变区(HVR)的三个区段中。可变结构域的更高度保守的部分称为构架区(FR)。天然重链和轻链的可变结构域各自包含由三个HVR连接的四个FR区,在很大程度上采取 β -片层构型,所述三个HVR形成连接 β -片层结构并在一些情况下形成其部分的环。每条链中的HVR通过FR区紧密结合在一起,并且与来自另一条链的HVR一起促成抗体的抗原结合位点的形成(参见Kabat等人(1991) Sequences of Immunological Interest,第5版,National Institute of Health,Bethesda,MD)。恒定结构域并不直接涉及抗体与抗原的结合,而是显示出各种效应子功能,例如抗体参与抗体依赖性细胞毒性。

[0095] 抗体的“可变区”或“可变结构域”指抗体重链或轻链的氨基末端结构域。重链和轻链的可变结构域可以分别被称为“VH”和“VL”。这些结构域一般是抗体的最可变部分(相对于相同类别的其它抗体),并且含有抗原结合位点。

[0096] 如本文使用的,为了方便起见,多个项目、结构元件、组成元件和/或材料可以存在于共同的列表中。然而,这些列表应该被解释为如同列表的每个成员个别地鉴定为分开且唯一的成员。因此,仅基于其在共同组中的存在而无相反指示,此类列表的各个成员都不应该被解释为同一列表中任何其它成员的事实上的等价物。

[0097] 浓度、量和其它数值数据可以在本文中以范围格式表述或呈现。应理解,此类范围形式仅为了方便和简洁起见而使用,并且因此应该被灵活地解释为不仅包括明确叙述为范围界限的数值,而且还包括包含在该范围内的所有个别的数值或子范围,如同每个数值和子范围被明确叙述一样。作为说明,“约1至约5”的数值范围应该被解释为不仅包括约1至约5的明确叙述的值,而且还包括在所指示范围内的个别值和子范围。因此,在该数值范围内包括的是个别值,例如2、3和4,以及子范围,例如1-3、2-4和3-5等,以及个别地1、2、3、4和5。同样的原理适用于仅叙述一个数值作为最小值或最大值的范围。此外,不管所描述范围或特点的广度如何,此类解释都应该适用。

[0098] 缩写

说明书中使用的一些缩写包括:

ATR:共济失调毛细血管扩张症和RAD3相关蛋白

BID:每天两次

CDR:互补决定区

CRC:结肠直肠癌

CRT:化学放射疗法

CT:化学疗法

DNA:脱氧核糖核酸

Ig:免疫球蛋白

IHC:免疫组织化学
IV:静脉内
mCRC:转移性结肠直肠癌
MSI-H:高微卫星不稳定性状态
MSI-L:低微卫星不稳定性状态
MSS:微卫星稳定性状态
NK:天然杀伤
NSCLC:非小细胞肺癌
OS:总生存期
PFS:无进展生存期
QD:每天一次
QID:一天四次
Q2W:每两周一次
Q3W:每三周一次
RNA:核糖核酸
RR:相对风险
RT:放射疗法
SCCHN:头颈部鳞状细胞癌
SCLC:小细胞肺癌
SoC:护理标准
TID:一天三次
TR:肿瘤应答
TTP:肿瘤进展时间
TTR:肿瘤复发时间

首先从链霉菌属(*Streptomyces*)物种的培养肉汤中分离的倍癌霉素是抗肿瘤抗生素家族的成员,其包括倍癌霉素A、倍癌霉素SA和CC-1065。倍癌霉素与DNA的小沟结合,并且随后引起不可逆的DNA烷基化。这破坏了核酸体系结构,其最终导致肿瘤细胞死亡。

[0099] 倍癌霉素是最初从链霉菌属中分离的一类天然化合物。这些高度有效的分子具有共同的分子构成,由DNA烷基化单元和DNA结合单元组成,如通过倍癌霉素衍生物DUBA (11)所示出的。在结合DNA双链的富含AT区域的小沟后,出现腺嘌呤的N3加入DUBA的活化环丙烷环上,导致DNA的烷基化。尽管倍癌霉素包含反应性环丙烷环,但它们在水性介质中是相当稳定的。然而,倍癌霉素在DNA的存在下显示出显著的烷基化效率和速率。使用核磁共振(NMR)光谱学研究了倍癌霉素SA (DSA, 13)和DNA的复合物,以阐明这种现象。在不存在配体的情况下,倍癌霉素的两个亚基是共面的。在DNA的小沟中结合后,疏水性接触达到最大,导致DSA的构象变化。这两个亚基就彼此而言是扭曲的,激活分子用于烷基化。

[0100] 荷兰制药公司Synthon的目前处于临床开发中的基于倍癌霉素的ADC是SYD985。这种ADC由倍癌霉素前药开环-DUBA组成,所述开环-DUBA经由组织蛋白酶B可切割的二肽接头与抗HER2抗体曲妥珠单抗连接。

[0101] WO2015/104373公开了荷有倍癌霉素的ADC用于子宫内膜癌治疗的用途。

[0102] WO 2011/133039公开了DNA烷化剂CC-1065及其靶向HER2的ADC的一系列类似物。在实施例15中,许多曲妥珠单抗-倍癌霉素缀合物针对裸鼠中的N87 (即,HER2 IHC (免疫组织化学) 3+胃肿瘤) 异种移植物进行测试。结果显示于WO 2011/133039的图4A、4B和4C中。与抗体曲妥珠单抗本身和对照媒介物相比,在用12 mg/kg i.v.的单次剂量治疗后,所有六种ADC都降低了肿瘤体积并改善了存活,而不影响体重。

[0103] WO 2015/104385公开了含有倍癌霉素的ADC,其用于治疗表达HER2的人实体瘤和血液恶性肿瘤。

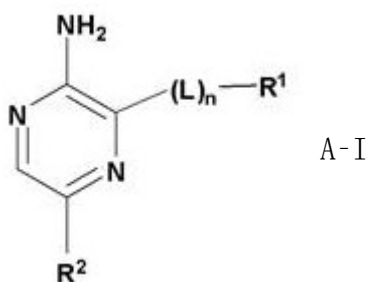
[0104] 本领域中所所述的倍癌霉素及其衍生物可以用于本发明的目的。

[0105] 本发明部分起于DNA烷基化ADC和ATR抑制剂的组合益处的发现。令人惊讶的是,本发明的组合显示为优于仅组合治疗。发明人已显示了,该组合的强化效应在细胞培养物和体内模型中是协同的。

[0106] 因此,在一个方面,本发明提供了DNA烷基化ADC和ATR抑制剂,其用于在治疗有此需要的受试者中的癌症的方法中使用,所述方法包括向受试者施用DNA烷基化ADC和ATR抑制剂。类似地,本发明提供了该组合在用于治疗有此需要的受试者中的癌症的方法中的用途,所述方法包括向受试者施用DNA烷基化ADC和ATR抑制剂。类似地,本发明提供了DNA烷基化ADC和ATR抑制剂用于制造用于治疗有此需要的受试者中的癌症的药物的用途,其包括向受试者施用DNA烷基化ADC和ATR抑制剂。

[0107] 应当理解,在本发明的所有实施方案中,应用治疗有效量的DNA烷基化ADC和ATR抑制剂。

[0108] 在一些方面,ATR抑制剂是由式A-I表示的化合物:



或其药学上可接受的盐,

其中:

R^1 是具有独立地选自氮、氧和硫的0-4个杂原子的5-6元单环芳基或杂芳基环,其中所述单环芳基或杂芳基环任选地稠合至另一个环,以形成具有独立地选自氮、氧和硫的0-6个杂原子的8-10元双环芳基或杂芳基环;每个 R^1 任选地由1-5个 J^1 基团取代;

R^2 是具有独立地选自氮、氧和硫的0-3个杂原子的5-6元单环芳基或杂芳基环,其中所述单环芳基或杂芳基环任选地稠合至另一个环,以形成具有独立地选自氮、氧和硫的0-4个杂原子的8-10元双环芳基或杂芳基环;每个 R^2 任选地由1-5个 J^2 基团取代;

L是-C(O)NH-或-C(O)N(C₁₋₆烷基)-;

n是0或1;

每个 J^1 和 J^2 独立地是卤素、-CN、-NO₂、-V¹-R或-(V²)_m-Q;

V¹是C₁₋₁₀脂族链,其中0-3个亚甲基单元任选地并且独立地由O、NR''、S、C(O)、S(O)或S(O)₂替换;V¹任选地由1-6次出现的 J^{V1} 取代;

V^2 是 C_{1-10} 脂族链,其中0-3个亚甲基单元任选地并且独立地由O、NR^{''}、S、C(O)、S(O)或S(O)₂替换; V^2 任选地由1-6次出现的 J^{V2} 取代;

m是0或1;

Q是具有独立地选自氮、氧和硫的0-4个杂原子的3-8元饱和或不饱和单环,或者是具有独立地选自氮、氧和硫的0-6个杂原子的9-10元饱和或不饱和双环;每个Q任选地由0-5个 J^Q 取代;

每个 J^{V1} 或 J^{V2} 独立地是卤素、CN、NH₂、NO₂、 C_{1-4} 脂族基、NH(C_{1-4} 脂族基)、N(C_{1-4} 脂族基)₂、OH、O(C_{1-4} 脂族基)、CO₂H、CO₂(C_{1-4} 脂族基)、C(O)NH₂、C(O)NH(C_{1-4} 脂族基)、C(O)N(C_{1-4} 脂族基)₂、NHC(O)(C_{1-4} 脂族基)、N(C_{1-4} 脂族基)CO(C_{1-4} 脂族基)、SO₂(C_{1-4} 脂族基)、NHSO₂(C_{1-4} 脂族基)或N(C_{1-4} 脂族基)SO₂(C_{1-4} 脂族基),其中所述 C_{1-4} 脂族基任选地由卤素取代;

R是H或 C_{1-6} 脂族基,其中所述 C_{1-6} 脂族基任选地由1-4次出现的以下取代: NH₂、NH(C_{1-4} 脂族基)、N(C_{1-4} 脂族基)₂、卤素、 C_{1-4} 脂族基、OH、O(C_{1-4} 脂族基)、NO₂、CN、CO₂H、CO₂(C_{1-4} 脂族基)、CO(C_{1-4} 脂族基)、O(卤代 C_{1-4} 脂族基)或卤代 C_{1-4} 脂族基;

每个 J^Q 独立地是卤素、氧代、CN、NO₂、X-R或-(X)_p-Q⁴;

p是0或1;

X是 C_{1-10} 脂族基,其中所述 C_{1-10} 脂族基的1-3个亚甲基单元任选地由-NR、-O-、-S-、C(O)、S(O)₂或S(O)替换;其中X任选地且独立地由1-4次出现的以下取代: NH₂、NH(C_{1-4} 脂族基)、N(C_{1-4} 脂族基)₂、卤素、 C_{1-4} 脂族基、OH、O(C_{1-4} 脂族基)、NO₂、CN、CO(C_{1-4} 脂族基)、CO₂H、CO₂(C_{1-4} 脂族基)、C(O)NH₂、C(O)NH(C_{1-4} 脂族基)、C(O)N(C_{1-4} 脂族基)₂、SO(C_{1-4} 脂族基)、SO₂(C_{1-4} 脂族基)、SO₂NH(C_{1-4} 脂族基)、SO₂N(C_{1-4} 脂族基)₂、NHC(O)(C_{1-4} 脂族基)、N(C_{1-4} 脂族基)C(O)(C_{1-4} 脂族基),其中所述 C_{1-4} 脂族基任选地由1-3次出现的卤素取代;

Q⁴是具有独立地选自氮、氧和硫的0-4个杂原子的3-8元饱和或不饱和单环,或者是具有独立地选自氮、氧和硫的0-6个杂原子的8-10元饱和或不饱和双环;每个Q⁴任选地由1-5个 J^{Q4} 取代;

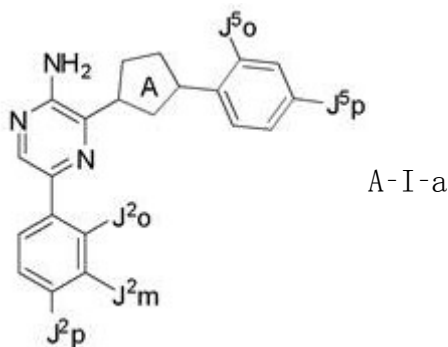
J^{Q4} 是卤素、CN或 C_{1-4} 烷基,其中至多2个亚甲基单元任选地由O、NR*、S、C(O)、S(O)或S(O)₂替换;

R是H或 C_{1-4} 烷基,其中所述 C_{1-4} 烷基任选地由1-4个卤素取代;

R^{''}和R*各自独立地是H、 C_{1-4} 烷基或不存在;其中所述 C_{1-4} 烷基任选地由1-4个卤素取代。

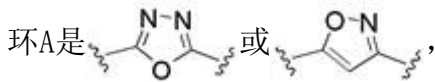
[0109] 在一些实施方案中,L是-C(O)NH-;且R¹和R²是苯基。

[0110] 在另一个实施方案中,ATR抑制剂是由式A-I-a表示的化合物:

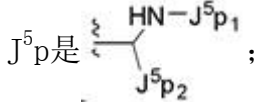


或其药学上可接受的盐，

其中：



J^5_o 是H、F、Cl、 C_{1-4} 脂族基，0 (C_{1-3} 脂族基) 或OH；



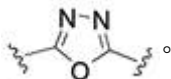
J^5_{p1} 是H、 C_{1-4} 脂族基、氧杂环丁烷基、四氢呋喃基、四氢吡喃基；其中 J^5_{p1} 任选地由1-2次出现的OH或卤素取代；

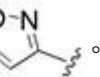
J^5_{p2} 是H、甲基、乙基、 CH_2F 、 CF_3 或 CH_2OH ；

J^2_o 是H、CN或 SO_2CH_3 ；

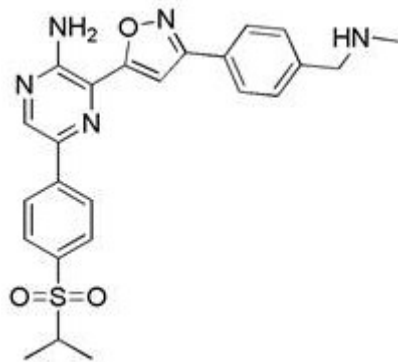
J^2_m 是H、F、Cl或甲基；

J^2_p 是 $-SO_2$ (C_{1-6} 烷基)、 $-SO_2$ (C_{3-6} 环烷基)、 $-SO_2$ (4-6元杂环基)、 $-SO_2$ (C_{1-4} 烷基)N (C_{1-4} 烷基) $_2$ 或 $-SO_2$ (C_{1-4} 烷基) - (4-6元杂环基)，其中所述杂环基含有选自氧、氮和硫的1个杂原子；并且其中所述 J^2_p 任选地由1-3次出现的卤素、OH或0 (C_{1-4} 烷基) 取代。

[0111] 在一些实施方案中，环A是 。

[0112] 在其它实施方案中，环A是 。

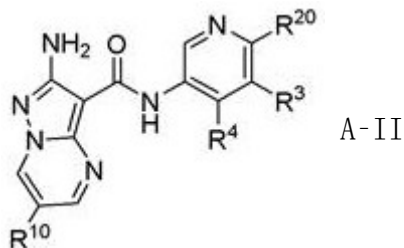
[0113] 在一些优选的实施方案中，ATR抑制剂是由下式表示的化合物(化合物1)：



化合物1

或其药学上可接受的盐。化合物1也称为3-[3-(4-甲基氨基甲基-苯基)-异噁唑-5-基]-5-[4-(丙烷-2-磺酰基)-苯基]吡嗪-2-基胺。

[0114] 在另一个方面，ATR抑制剂由式A-II表示：



或者其药学上可接受的盐或衍生物，

其中:

R^{10} 选自氟、氯或 $-C(J^{10})_2CN$;

J^{10} 独立地是H或 C_{1-2} 烷基;或

两次出现的 J^{10} 连同它们与之附着的碳原子一起,形成3-4元的任选取代的碳环;

R^{20} 是H、卤素、 $-CN$ 、 NH_2 、任选地由0-3次出现的氟取代的 C_{1-2} 烷基;或 C_{1-3} 脂族链,其中所述脂族链的至多两个亚甲基单元任选地由 $-O-$ 、 $-NR^a-$ 、 $-C(O)-$ 或 $-S(O)_z$ 替换;

R^3 是H、卤素、任选地由1-3次出现的卤素取代的 C_{1-4} 烷基、 C_{3-4} 环烷基、 $-CN$ 或 C_{1-3} 脂族链,其中所述脂族链的至多两个亚甲基单元任选地由 $-O-$ 、 $-NR^a-$ 、 $-C(O)-$ 或 $-S(O)_z$ 替换;

R^4 是 Q^1 或 C_{1-10} 脂族链,其中所述脂族链的至多四个亚甲基单元任选地由 $-O-$ 、 $-NR^a-$ 、 $-C(O)-$ 或 $-S(O)_z$ 替换;每个 R^4 任选地由0-5次出现的 J^{Q1} 取代;或

R^3 和 R^4 连同它们与之结合的原子一起,形成具有选自氧、氮和硫的0-2个杂原子的5-6元芳族或非芳族环;由 R^3 和 R^4 形成的环任选地由0-3次出现的 J^Z 取代;

Q^1 是3-7元完全饱和、部分不饱和或芳族单环,所述3-7元环具有选自氧、氮和硫的0-3个杂原子;或者具有选自氧、氮和硫的0-5个杂原子的7-12元完全饱和、部分不饱和或芳族双环;

J^Z 独立地是 C_{1-6} 脂族基、 $=O$ 、卤素或 $\rightarrow O$;

J^{Q1} 独立地是 $-CN$ 、卤素、 $=O$ 、 Q^2 或 C_{1-8} 脂族链,其中所述脂族链中至多三个亚甲基单元任选地由 $-O-$ 、 $-NR^a-$ 、 $-C(O)-$ 或 $-S(O)_z$ 替换;每次出现的 J^{Q1} 任选地由0-3次出现的 J^R 取代;或

在同一原子上两次出现的 J^{Q1} 连同它们与之相连的原子一起,形成具有选自氧、氮和硫的0-2个杂原子的3-6元环;其中由两次出现的 J^{Q1} 形成的环任选地由0-3次出现的 J^X 取代;或

两次出现的 J^{Q1} 连同 Q^1 一起形成6-10元饱和或部分不饱和的桥环系统;

Q^2 独立地选自具有选自氧、氮或硫的0-3个杂原子的3-7元完全饱和、部分不饱和或芳族单环;或者具有选自氧、氮或硫的0-5个杂原子的7-12元完全饱和、部分不饱和或芳族双环;

J^R 独立地是 $-CN$ 、卤素、 $=O$ 、 $\rightarrow O$; Q^3 或 C_{1-6} 脂族链,其中所述脂族链的至多三个亚甲基单元任选地由 $-O-$ 、 $-NR^a-$ 、 $-C(O)-$ 或 $-S(O)_z$ 替换;每个 J^R 任选地由0-3次出现的 J^T 取代;或

在同一原子上两次出现的 J^R 连同它们与之相连的原子一起,形成具有选自氧、氮或硫的0-2个杂原子的3-6元环;其中由两次出现的 J^R 形成的环任选地由0-3次出现的 J^X 取代;或

两次出现的 J^R 连同 Q^2 一起形成6-10元饱和或部分不饱和的桥环系统;

Q^3 是具有选自氧、氮和硫的0-3个杂原子的3-7元完全饱和、部分不饱和或芳族单环;或者具有选自氧、氮和硫的0-5个杂原子的7-12元完全饱和、部分不饱和或芳族双环;

J^X 独立地是 $-CN$ 、 $=O$ 、卤素或 C_{1-4} 脂族链,其中所述脂族链的至多两个亚甲基单元任选地由 $-O-$ 、 $-NR^a-$ 、 $-C(O)-$ 或 $-S(O)_z$ 替换;

J^T 独立地是卤素、 $-CN$ 、 $\rightarrow O$; $=O$ 、 $-OH$ 、 C_{1-6} 脂族链,其中所述脂族链的至多两个亚甲基单元任选地由 $-O-$ 、 $-NR^a-$ 、 $-C(O)-$ 或 $-S(O)_z$ 替换;或者具有选自氧、氮和硫的0-2个杂原子的3-6元非芳族环;每次出现的 J^T 任选地由0-3个出现的 J^M 取代;或

在同一原子上两次出现的 J^T 连同它们与之相连的原子一起,形成具有选自氧、氮和硫的0-2个杂原子的3-6元环;或

两次出现的 J^T 连同 Q^3 一起形成6-10元的饱和或部分不饱和的桥环系统;

J^M 独立地是卤素或 C_{1-6} 脂族基;

z 是0、1或2;和

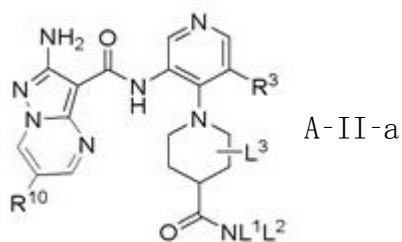
R^a 独立地是H或 C_{1-4} 脂族基。

[0115] 在一些实施方案中, R^{10} 和 R^3 是氟。

[0116] 在其它实施方案中, R^4 是 Q^1 。

[0117] 在另外其它实施方案中, Q^1 独立地是哌啶基和咪唑基。

[0118] 在另一个实施方案中,ATR抑制剂由式A-II-a表示:



或者其药学上可接受的盐或前药,

其中:

R^{10} 是氟、氯或 $-C(J^{10})_2CN$;

J^{10} 独立地是H或 C_{1-2} 烷基;或

两次出现的 J^{10} 连同它们与之附着的碳原子一起,形成任选取代的3-4元碳环;

R^3 是H;氯;氟;任选地由1-3次出现的卤素取代的 C_{1-4} 烷基; C_{3-4} 环烷基; $-CN$;或 C_{1-3} 脂族链,其中所述脂族链的至多两个亚甲基单元任选地由 $-O-$ 、 $-NR^a-$ 、 $-C(O)-$ 或 $-S(O)_z$ 替换;

L^1 是H;具有选自氧、氮和硫的0-2个杂原子的3-7元芳族或非芳族环;或 C_{1-6} 脂族链,其中所述脂族链的至多两个亚甲基单元任选地由 $-O-$ 、 $-NR^a-$ 、 $-C(O)-$ 或 $-S(O)_z$ 替换;每个 L^1 任选地由以下取代: C_{1-4} 脂族基; $-CN$;卤素; $-OH$;或具有选自氧、氮和硫的0-2个杂原子的3-6元非芳族环;

L^2 是H;具有选自氧、氮和硫的0-2个杂原子的3-7元芳族或非芳族环;或 C_{1-6} 脂族链,其中所述脂族链的至多两个亚甲基单元任选地由 $-O-$ 、 $-NR^a-$ 、 $-C(O)-$ 或 $-S(O)_z$ 替换;每个 L^2 任选地由以下取代: C_{1-4} 脂族基; $-CN$;卤素; $-OH$;或具有选自氧、氮和硫的0-2个杂原子的3-6元非芳族环;或

L^1 和 L^2 连同它们与之附着的氮一起形成环D;环D任选地由0-5次出现的 J^G 取代;

L^3 是H、 C_{1-3} 脂族基或 CN ;

环D是具有选自氧、氮和硫的1-2个杂原子的3-7元杂环基环;或具有选自氧、氮和硫的1-5个杂原子的7-12元完全饱和或部分不饱和的双环;

J^G 是独立的卤素; $-CN$; $-N(R^o)_2$; $\rightarrow O$;3-6元碳环基;具有选自氧、氮和硫的1-2个杂原子的3-6元杂环基;或 C_{1-4} 烷基链,其中所述烷基链的至多两个亚甲基单元任选地由 $-O-$ 、 $-NR^a-$ 、 $-C(O)-$ 或 $-S(O)_z$ 替换;每个 J^G 任选地由0-2次出现的 J^K 取代;

在同一原子上两次出现的 J^G 连同它们与之相连的原子一起,形成具有选自氧、氮

和硫的0-2个杂原子的3-6元环;或

两次出现的J^G连同D环一起,形成6-10元饱和或部分不饱和的桥环系统;

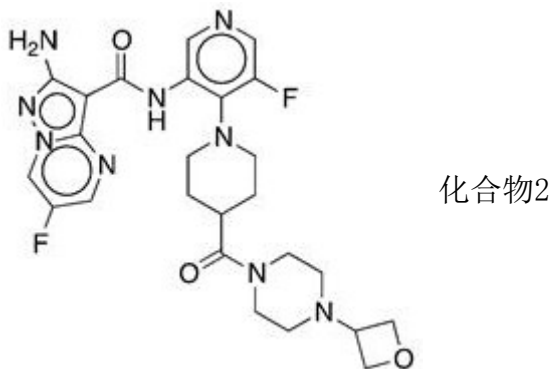
J^K是具有选自氧、氮和硫的0-2个杂原子的3-7元芳族或非芳族环;

z是0、1或2;和

R^a和R^o独立地是H或C₁₋₄烷基。

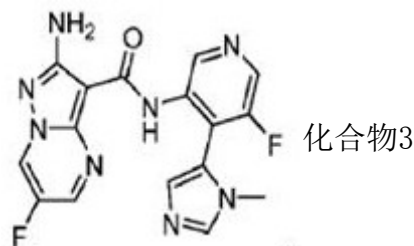
[0119] 在另一个实施方案中,R¹⁰和R³是氟。

[0120] 在其它优选的实施方案中,ATR抑制剂是由下式表示的化合物(化合物2):



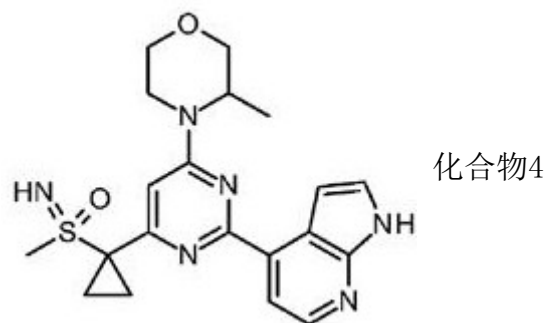
或其药学上可接受的盐。化合物2也称为2-氨基-6-氟-N-(5-氟-4-{4-[4-(氧杂环丁烷-3-基)哌嗪-1-羰基]哌啶-1-基}吡啶-3-基)吡唑并[1,5-a]嘧啶-3-甲酰胺。

[0121] 在一些优选的实施方案中,ATR抑制剂是由下式表示的化合物(化合物3):



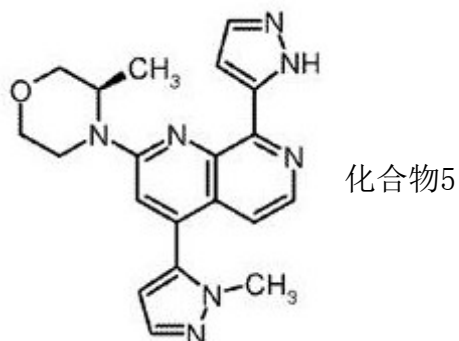
或其药学上可接受的盐。化合物3也称为2-氨基-6-氟-N-[5-氟-4-(1-甲基-1H-咪唑-5-基)吡啶-3-基]吡唑并[1,5-a]嘧啶-3-甲酰胺。

[0122] 另一种优选的ATR抑制剂是AZD6738,其也称为ceralasertib (CAS注册号1352226-88-0),或其药学上可接受的盐。它具有化学式4-{4-[(3R)-3-甲基吗啉-4-基]-6-[1-(S-甲基磺酰亚胺酰基(methylsulfonimidoyl))环丙基]嘧啶-2-基}-1H-吡咯并[2,3-b]吡啶,并且由下式(化合物4)表示:



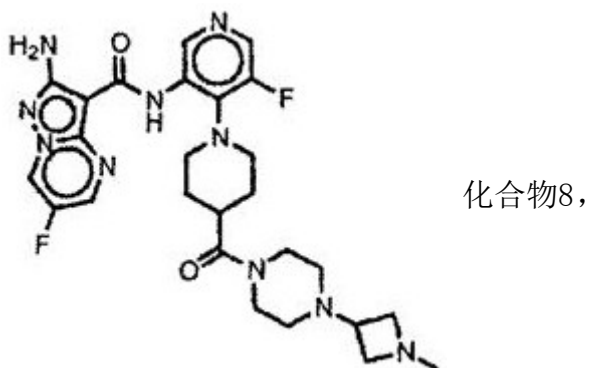
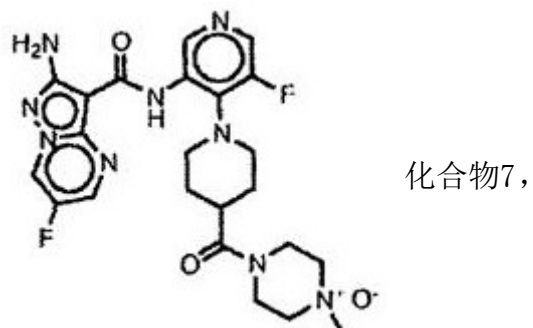
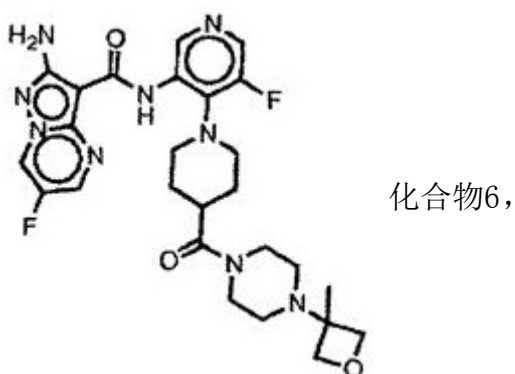
或其药学上可接受的盐。

[0123] 另一种优选的ATR抑制剂具有化学式2-[(3R)-3-甲基吗啉-4-基]-4-(1-甲基-1H-吡唑-5-基)-8-(1H-吡唑-5-基)-1,7-萘啶,并且由下式(化合物5)表示:



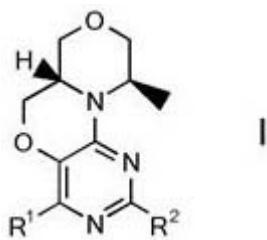
或其药学上可接受的盐。

[0124] 在一些实施方案中,ATR抑制剂选自下述:



或其药学上可接受的盐。

[0125] 可以用于本发明的组合疗法中的ATR抑制剂的进一步优选实例是下式I的化合物



其中

R^1 表示 $C(CH_3)_2SO_2A'$ 、 CH_2OSO_2A' 、 $C(CH_3)_2OH$ 、 $-[C(R^3)_2]_nHet^1$ 或1-甲磺酰基-环丙-1-基,

R^2 表示 Het^2 、 $NR^3(CH_2)_nHet^2$ 、 $OHet^2$ 、 Ar^1 、 $CONHHet^3$ 、 $COHet^3$ 或 $CONHA$,

R^3 表示H或 A' ,

Het^1 表示咪唑基、吡唑基、三唑基或吡啶基,其各自是未取代的,或者被 $COOH$ 、 $COOA'$ 、 CH_2OH 、 CH_2OA' 或A单取代的,

Het^2 表示1*H*-吡咯并[2,3-*b*]吡啶基、1*H*-吡咯并[2,3-*c*]吡啶基、吲哚基、苯并咪唑基、咪唑基、1,2,3,4-四氢异喹啉基、吡啶基、三唑基、吡唑基、喹啉基、异喹啉基、喹啉基或1,3-二氢-2*λ*6-2,2-二氧化-1-苯并噻唑基,其各自是未取代的,或者被 Hal 、 A' 、 $-[C(R^3)_2]_nOR^3$ 、 $CONH_2$ 、 SO_2 苯基、苄基、 CN 、 $-[C(R^3)_2]_nNH_2$ 、 $-[C(R^3)_2]_nNHA$ 、氧杂环丁烷基-NH-和/或 $NHCOA$ 单取代或二取代的,

Het^3 表示三唑基、噁嗪基、噻啶基、吡唑基或吡咯烷基,其各自是未取代的,或者被 $-[C(R^3)_2]_nOR^3$ 、 $-[C(R^3)_2]_nNH_2$ 或=O单取代的,

Ar^1 表示被 $-[C(R^3)_2]_nOR^3$ 、咪唑基、 $-[C(R^3)_2]_nNH_2$ 、吡唑基、氮杂环丙基或氧杂环丁烷基单取代的苯基,其各自可以是未取代的,或者被 $[C(R^3)_2]_nOR^3$ 或 $-[C(R^3)_2]_nNH_2$ 单取代的,

A表示具有1-6个C原子的无分支烷基或分支烷基,其中1-7个H原子可以被OH、F、Cl和/或Br替换,和/或其中一个或两个不相邻的 CH_2 基团可以由O和/或NH基团替换,

A' 表示具有1-4个C原子的无分支烷基或分支烷基,

Hal 表示F、Cl、Br或I,

n 表示0、1、2或3,

以及其药学上可接受的盐、互变异构体和立体异构体,包括其以所有比率的混合物。

[0126] 在优选的实施方案中, R^1 表示 $C(CH_3)_2SO_2A'$ 或 $C(CH_3)_2OH$ 。

[0127] 在进一步优选的实施方案中, R^2 表示 Het^2 。

[0128] 在进一步优选的实施方案中, R^3 表示H。

[0129] 在进一步优选的实施方案中,A表示具有1-6个C原子的无分支烷基或分支烷基,其中1-5个H原子可以被OH和/或F替换。

[0130] 在进一步优选的实施方案中, Het^2 表示1*H*-吡咯并[2,3-*b*]吡啶基、1*H*-吡咯并[2,3-*c*]吡啶基、吲哚基、苯并咪唑基或咪唑基,其各自是被 Hal 、 $-[C(R^3)_2]_nNH_2$ 和/或 $-[C(R^3)_2]_nNHA$ 单取代或二取代的,

在进一步优选的实施方案中, R^1 表示 $C(CH_3)_2SO_2A'$ 或 $C(CH_3)_2OH$,

R^2 表示 Het^2 ,

Het²表示1*H*-吡咯并[2,3-*b*]吡啶基、1*H*-吡咯并[2,3-*c*]吡啶基、吲哚基、苯并咪唑基或咪唑基,其各自是未取代的,或者被Hal、OH、- [C(R³)₂]_nNH₂、- [C(R³)₂]_nNHA、氧杂环丁烷基-NH-和/或NHCOA单取代或二取代的,

A表示具有1-6个C原子的无分支烷基或分支烷基,其中1-5个H原子可以被OH和/或F替换,

A'表示具有1-4个C原子的无分支烷基或分支烷基,

Hal表示F、Cl、Br或I,

n表示0、1、2或3。

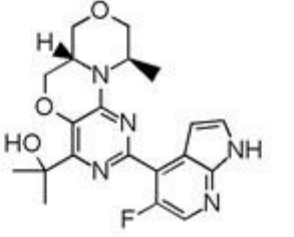
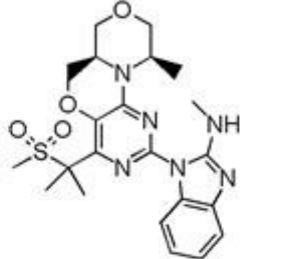
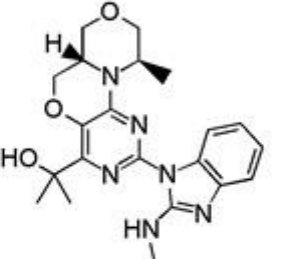
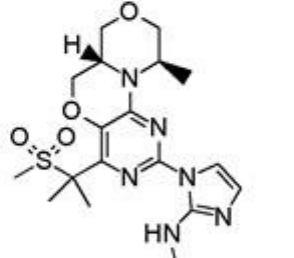
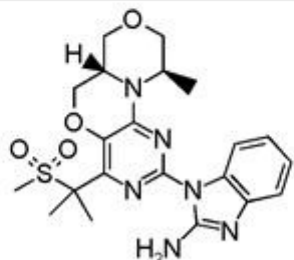
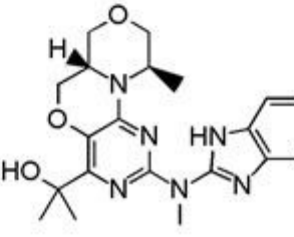
[0131] 在进一步优选的实施方案中,R¹表示C(CH₃)₂SO₂CH₃或C(CH₃)₂OH,

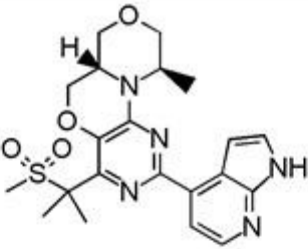
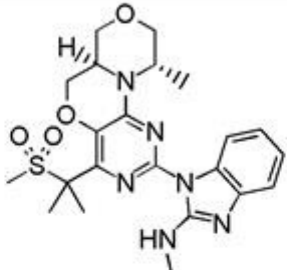
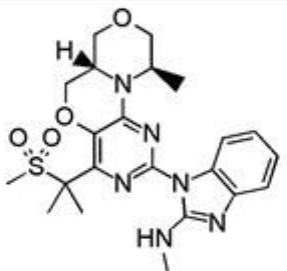
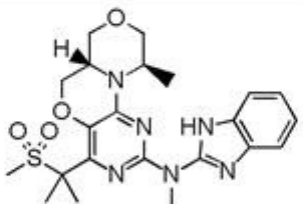
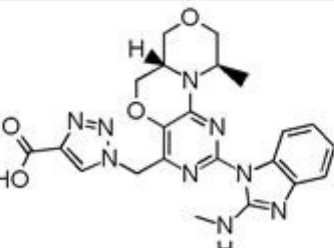
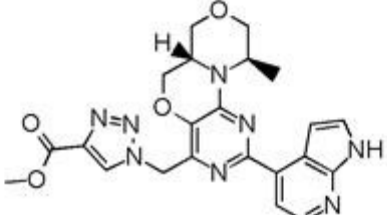
R²表示Het²,R³表示H,Het²表示1*H*-吡咯并[2,3-*b*]吡啶基、1*H*-吡咯并[2,3-*c*]吡啶基、吲哚基、苯并咪唑基或咪唑基,其各自是被Hal、- [C(R³)₂]_nNH₂和/或- [C(R³)₂]_nNHA单取代或二取代的,

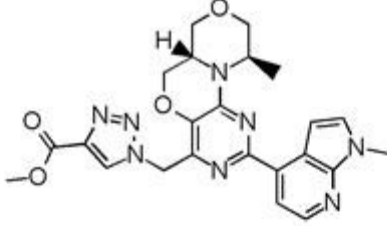
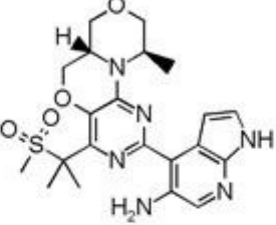
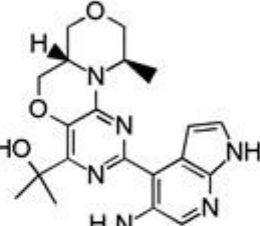
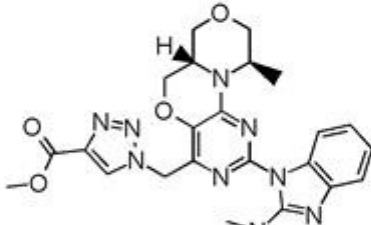
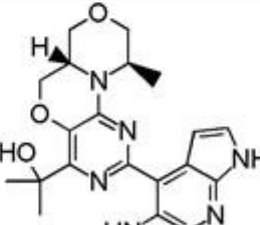
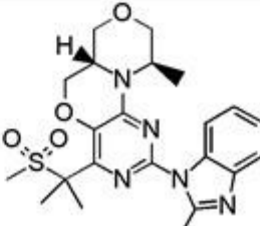
A表示具有1-6个碳原子的无分支烷基或分支烷基,其中1-5个H原子可以被OH和/或F取代,A'表示具有1-4个碳原子的无分支烷基或分支烷基,Hal表示F、Cl、Br或I,n表示0、1、2或3。

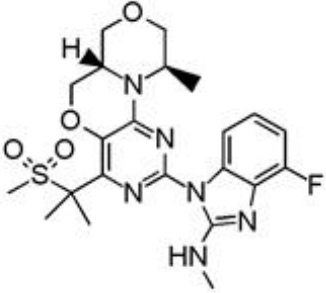
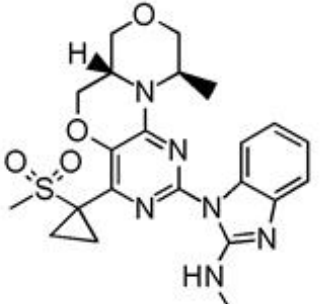
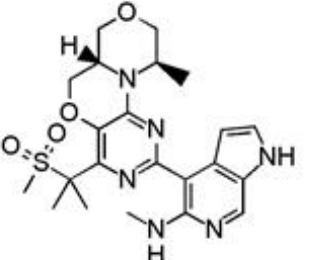
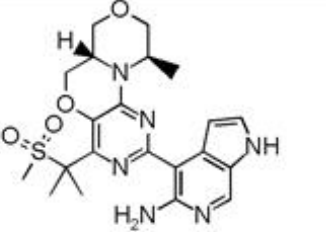
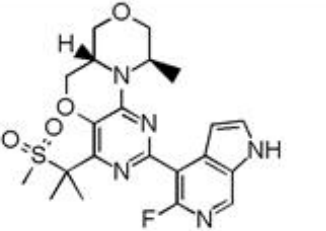
[0132] 下面描绘了本发明的ATRi的特别优选的实施方案。

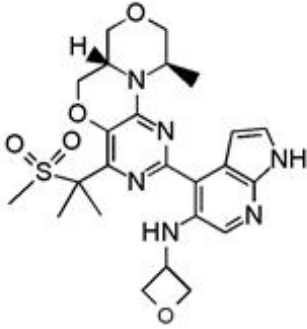
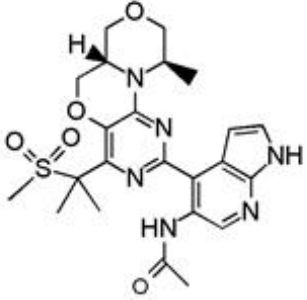
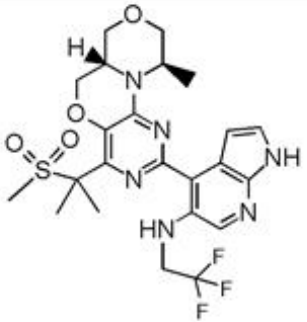
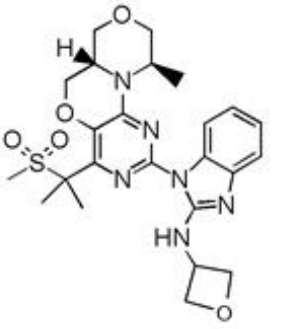
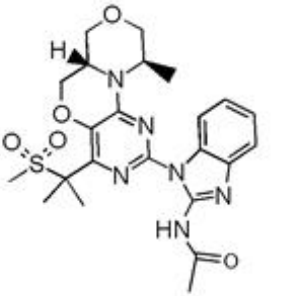
编号	结构
“A1”	
“A2”	
“A3”	
“A4”	
“A5”	
“A6”	

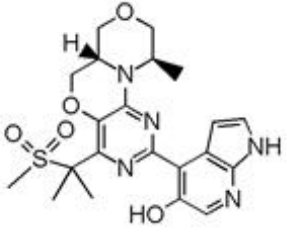
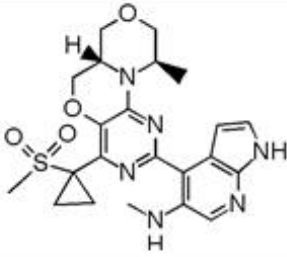
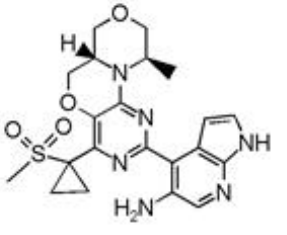
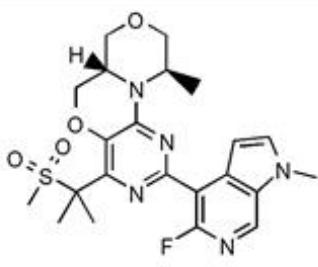
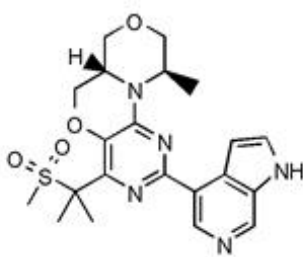
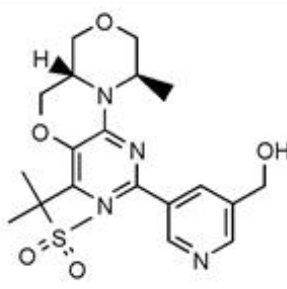
“A7”	
“A8”	
“A9”	
“A10”	
“A11”	
“A12”	

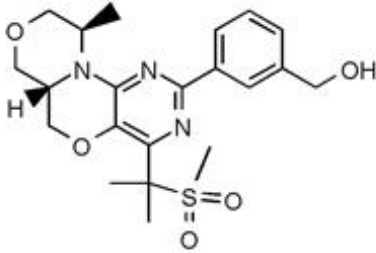
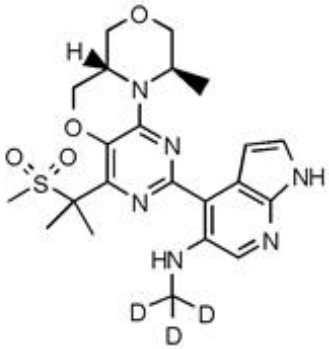
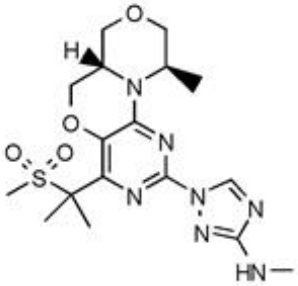
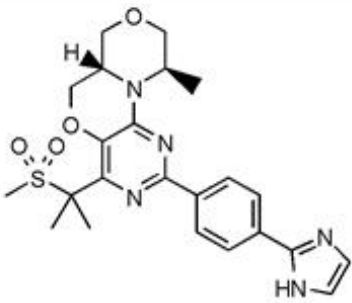
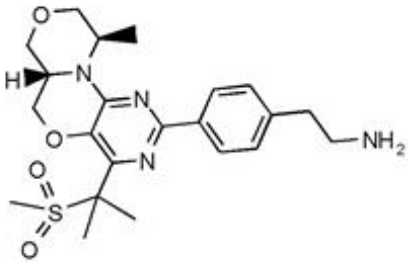
“A13”	
“A14”	
“A15”	
“A16”	
“A17”	
“A18”	

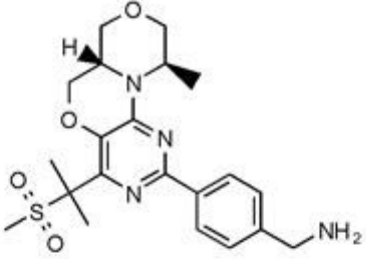
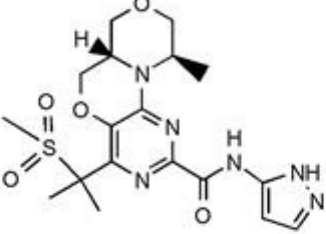
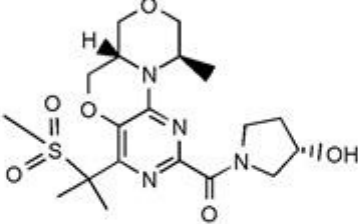
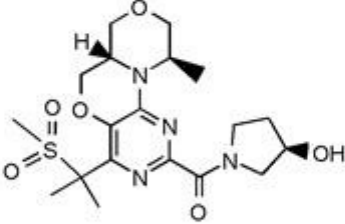
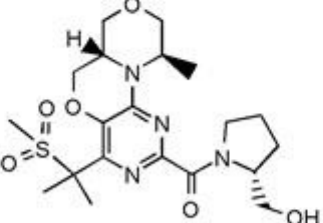
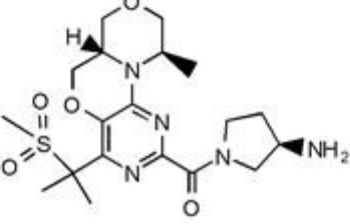
“A19”	
“A20”	
“A21”	
“A22”	
“A23”	
“A24”	

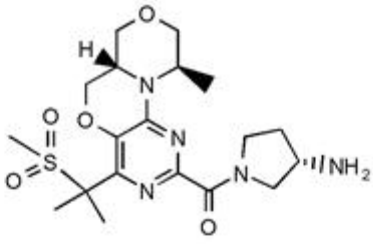
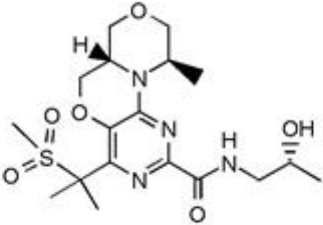
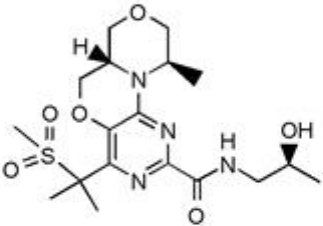
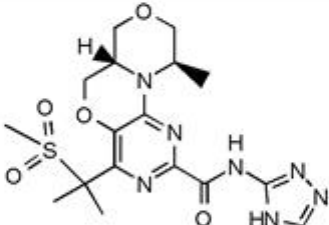
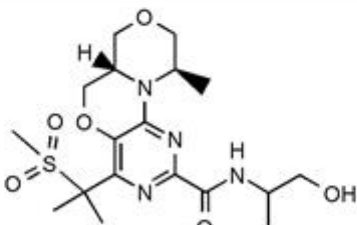
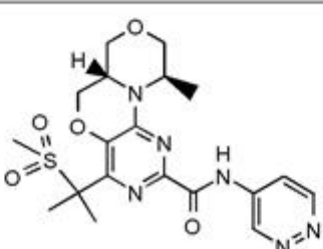
“A25”	
“A26”	
“A27”	
“A28”	
“A29”	

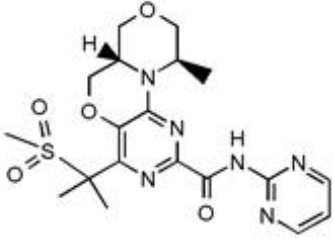
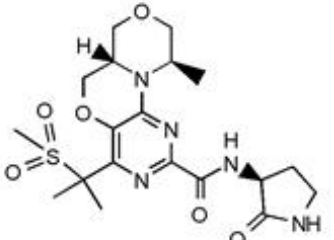
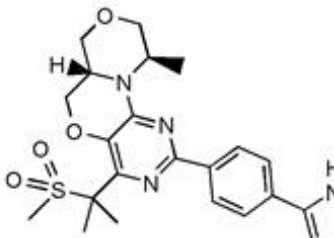
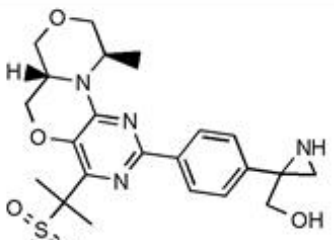
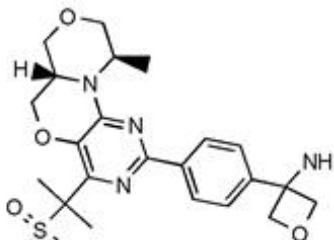
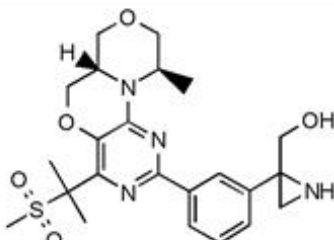
“A30”	
“A31”	
“A32”	
“A33”	
“A34”	

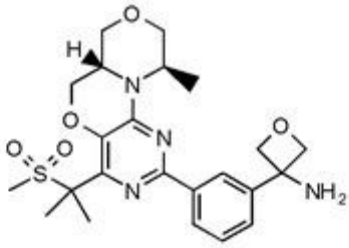
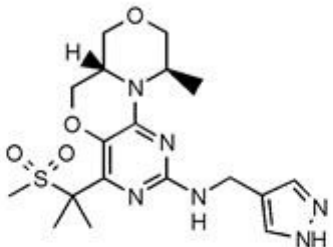
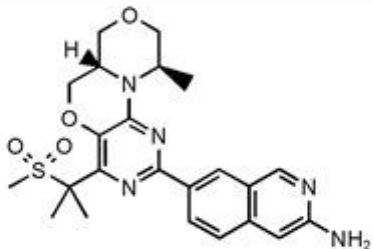
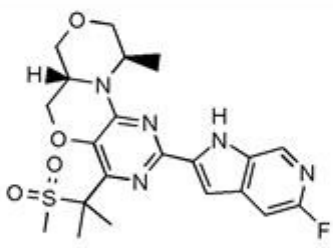
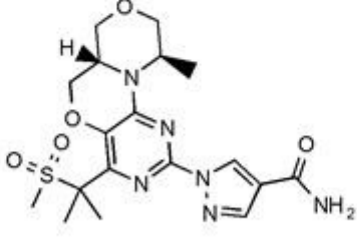
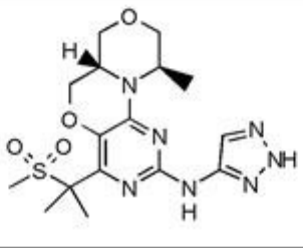
“A35”	
“A36”	
“A37”	
“A38”	
“A39”	
“A40”	

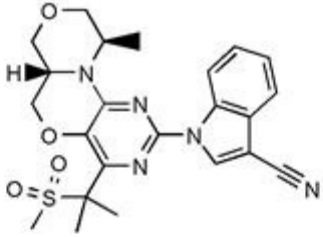
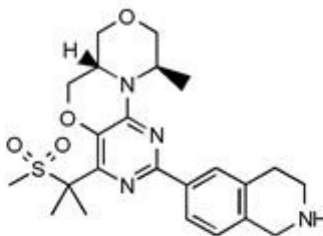
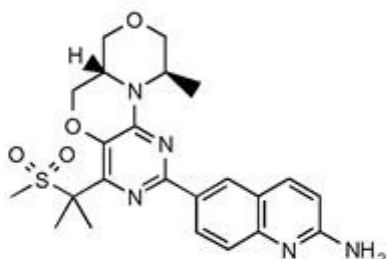
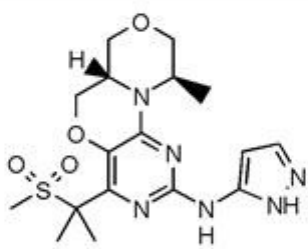
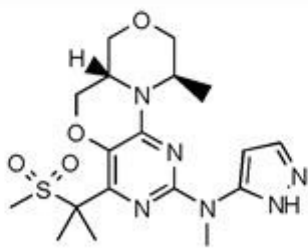
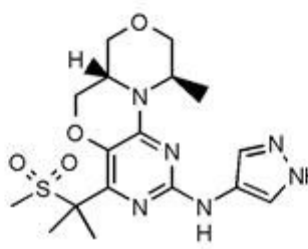
“A41”	 <chem>CC1(C)S(=O)(=O)N1C2=NC(=C(C=C2)C3=CC=C(C=C3)CO)N4C5CCN(C5)CC4</chem>
“A42”	 <chem>CC1(C)S(=O)(=O)N1C2=NC(=C(C=C2)C3=CC=C4C(=N3)NCC4)N5C6CCN(C6)CC5C7C(C)(C)N7</chem>
“A43”	 <chem>CC1(C)S(=O)(=O)N1C2=NC(=C(C=C2)C3=CN=CN3)N4C5CCN(C5)CC4</chem>
“A44”	 <chem>CC1(C)S(=O)(=O)N1C2=NC(=C(C=C2)C3=CC=C(C=C3)C4=CN=CN4)N5C6CCN(C6)CC5</chem>
“A45”	 <chem>CC1(C)S(=O)(=O)N1C2=NC(=C(C=C2)C3=CC=C(C=C3)CCN)N4C5CCN(C5)CC4</chem>

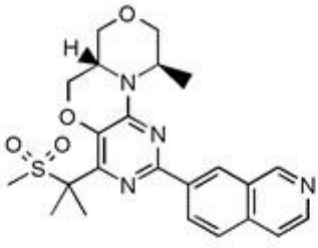
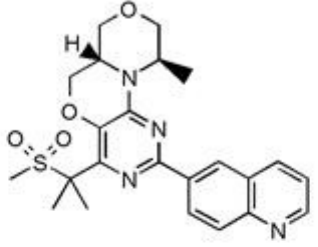
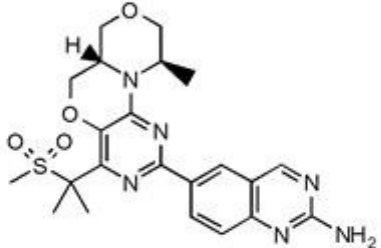
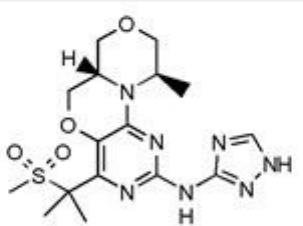
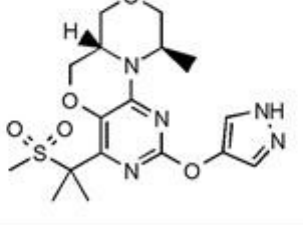
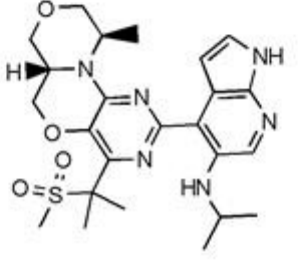
“A46”	
“A47”	
“A48”	
“A49”	
“A50”	
“A51”	

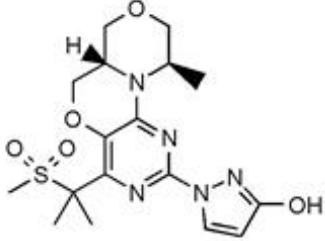
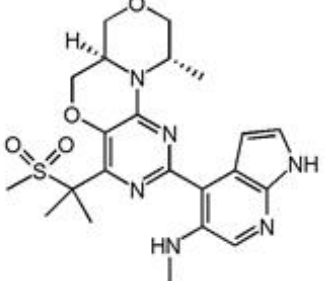
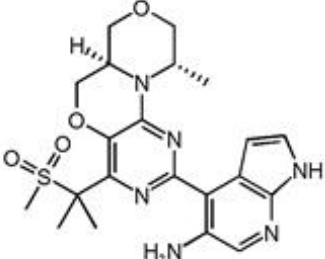
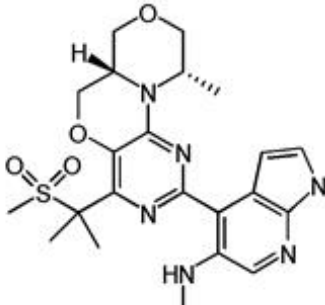
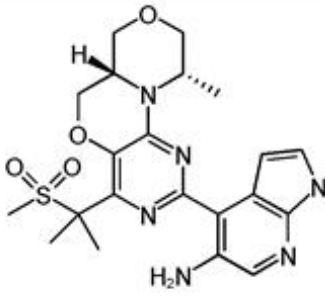
“A52”	
“A53”	
“A54”	
“A55”	
“A56”	
“A57”	

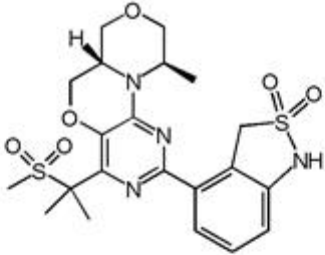
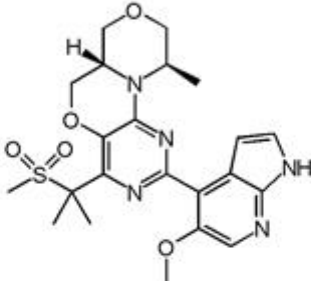
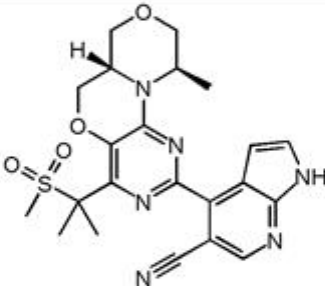
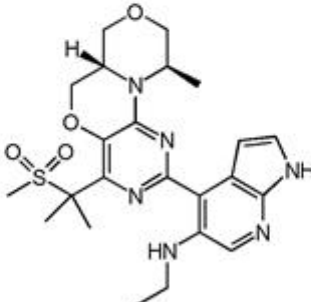
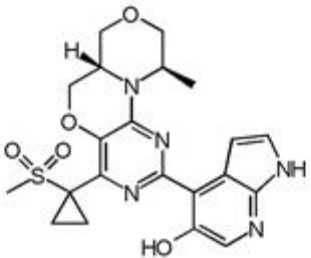
“A58”	
“A59”	
“A60”	
“A61”	
“A62”	
“A63”	

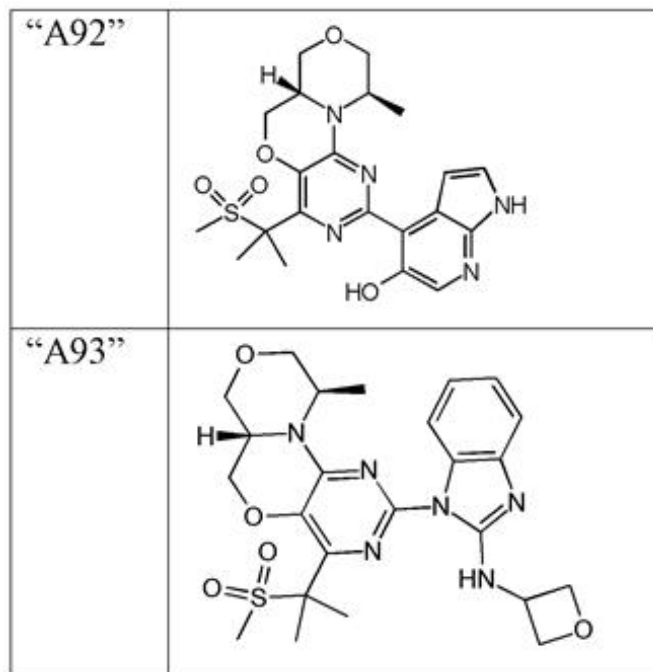
“A64”	
“A65”	
“A66”	
“A67”	
“A68”	
“A69”	

“A70”	
“A71”	
“A72”	
“A73”	
“A74”	
“A75”	

“A76”	
“A77”	
“A78”	
“A79”	
“A80”	
“A81”	

“A82”	
“A83”	
“A84”	
“A85”	
“A86”	

“A87”	
“A88”	
“A89”	
“A90”	
“A91”	



[0133] 以及其药学上可接受的溶剂化物、盐、互变异构体和立体异构体,包括其以所有比率的混合物。

[0134] 表6中描绘了可用于本发明中的ATRi的进一步优选的实施方案。

[0135] 在一个实施方案中,本发明的治疗组合用于人受试者的治疗中。对于这些人患者,在用治疗组合的治疗中的主要预计益处是风险/利益比中的增益。

[0136] 在各个实施方案中,本发明的治疗组合被用作一线、二线、三线或以后线的治疗。治疗线指由患者接受的用不同药物或其它疗法的治疗次序的放置。一线疗法方案是首先给予的治疗,而二线疗法或三线疗法分别在一线疗法后或在二线疗法后给予。因此,一线疗法是用于疾病或状况的第一治疗。在患有癌症的患者中,一线疗法(有时称为初级疗法或初级治疗)可以是手术、化学疗法、放射疗法或这些疗法的组合。通常,患者被给予后续的化学疗法方案(二线疗法或三线疗法),是因为患者并未对一线疗法或二线疗法显示阳性临床结果,或仅显示亚临床应答,或者显示阳性临床应答,但后来经历了复发,有时患有目前对引发较早阳性应答的较早疗法抗性的疾病。

[0137] 由于ATR抑制剂和DNA烷基化ADC之间的作用模式不同,因此具有增强的免疫有关不利事件的机会很低。在非临床发现或公开的临床结果中不存在重叠的免疫特征,使得本发明的组合疗法显示高于当单独施用时在这些药剂中一般观察到的增强不利事件的低风险。对于在每种情况下作为单一药剂的DNA烷基化ADC和ATR抑制剂,优选本发明的化合物1或2,鉴定和潜在的风险也被视为代表组合治疗的潜在风险。

[0138] 优选本发明的治疗组合应用于癌症的以后的治疗线中,特别是二线治疗或后续线治疗中。对于先前疗法次数没有限制,条件是受试者经历了至少一轮先前癌症疗法。先前轮的癌症疗法指对于用例如一种或多种化学治疗剂、放射疗法或化学放射疗法来治疗受试者的确定的时间表/阶段,并且该受试者对于此类先前治疗失败,所述先前治疗或完成或提前终止。一个原因可能是癌症对先前疗法抗性或变得抗性。用于治疗癌症患者的当前护理标准(SoC)经常涉及毒性和旧式化学疗法方案的施用。SoC与强烈不利事件的高风险相关,所

述不利事件很可能干扰生活质量(例如继发性癌症)。在一个实施方案中,在对单一化学疗法和/或双重化学疗法、放射疗法或化学放射疗法抗性的癌症患者中,ATR抑制剂和DNA烷基化剂的组合可以与SoC化学疗法一样有效,并且比SoC化学疗法更好地耐受。

[0139] 在一些实施方案中,ATR抑制剂静脉内或经口施用。在一些实施方案中,通过连续输注来施用ATR抑制剂。化合物1或其药学上可接受的盐优选静脉内施用。化合物2或其药学上可接受的盐、化合物3或其药学上可接受的盐、以及化合物4或其药学上可接受的盐优选经口施用。在一些实施方案中,在组合疗法中采用的ATR抑制剂可以以下述剂量施用:约20 mg/m²至约300 mg/m²、约30 mg/m²至约240 mg/m²、约40 mg/m²至约240 mg/m²、约40 mg/m²至约180 mg/m²、约60 mg/m²至约120 mg/m²、约80 mg/m²至约120 mg/m²、约90 mg/m²至约120 mg/m²、或约80 mg/m²至约100 mg/m²。在某些实施方案中,ATR抑制剂可以以约40 mg/m²至约300 mg/m² (例如约240 mg/m²)的剂量施用。在一些情况下,ATR抑制剂可以以约60 mg/m²至约180 mg/m² (例如120 mg/m²)的剂量施用。在某些情况下,ATR抑制剂可以以约80 mg/m²至约100 mg/m² (例如约90 mg/m²)的剂量施用。在一些实施方案中,ATR抑制剂可以以约40 mg/m²、约60 mg/m²、约90 mg/m²或约120 mg/m²的剂量施用。优选地,治疗组合的ATR抑制剂以约90 mg/m²的剂量施用。

[0140] 在一些实施方案中,ATR抑制剂是化合物1或其药学上可接受的盐,并且以下述剂量施用:约20 mg/m²至约300 mg/m²、约30 mg/m²至约240 mg/m²、约40 mg/m²至约240 mg/m²、约40 mg/m²至约180 mg/m²、约60 mg/m²至约120 mg/m²、约80 mg/m²至约120 mg/m²、约90 mg/m²至约120 mg/m²、或约80 mg/m²至约100 mg/m²。在一些实施方案中,化合物1或其药学上可接受的盐以约40 mg/m²、约60 mg/m²、约90 mg/m²或约120 mg/m²的剂量,优选以约90 mg/m²的剂量施用。

[0141] 应当理解,如本文所述,用于组合疗法中的剂量的上文提及范围的所有组合都是可能的。另外,在组合疗法中采用的两种化合物的给药可以彼此适应,以改善便利性和依从性。

[0142] 在一些实施方案中,组合方案包括先导阶段,任选地随后为在先导阶段完成后的维持阶段。如本文使用的,组合治疗包括限定的治疗期(即,第一阶段或先导阶段)。在此类时期或阶段完成后,可以随后为另一确定的治疗期(即,第二阶段或维持阶段)。

[0143] ATR抑制剂和DNA烷基化ADC可以以任何次序施用。例如,全部可以基本上同时或序贯地施用。ATR抑制剂和DNA烷基化ADC在分开的组合物、制剂或单位剂型中,以任何次序施用于患者,或者化合物在一种组合物、制剂或单位剂型中一起施用。

[0144] 在某些实施方案中,患者进一步获得放射疗法。在某些实施方案中,放射疗法包含约35-70 Gy/20-35分割。在一些实施方案中,放射疗法以标准分割(fractionation) (1.8至2 Gy,一周5天)给予,直到每天一次50-70 Gy的总剂量。在一个实施方案中,使用立体定向放射疗法以及伽玛刀。在姑息性场景中,还广泛使用其它分割方案,例如以5次分割的25 Gy或以10次分割的30 Gy。对于放射疗法,治疗的持续时间是当给予放射疗法时的时帧。这些干预适用于以电子、光子和质子、 α -发射体或其它离子给予的治疗,用放射性核苷酸的治疗,例如,用给予甲状腺癌患者的¹³¹I的治疗,以及用硼中子俘获疗法治疗的患者中。

[0145] 示例性的此类药学上可接受的组合物在下文和本文中进一步描述。

[0146] 通常,将ATR抑制剂或DNA烷基化ADC掺入适合施用于受试者的药物组合物内,其中

所述药物组合物包含化合物和药学上可接受的载体。在许多情况下,优选在组合物中包括等渗剂,例如糖、多元醇如甘露糖醇、山梨糖醇或氯化钠。药学上可接受的载体可以进一步包含少量的辅助物质,例如润湿剂或乳化剂、防腐剂或缓冲剂,其增强了化合物的贮存期限或有效性。

[0147] 本发明的组合物可以为各种形式。这些包括例如液体、半固体和固体剂型,例如液体溶液(例如可注射和可输注的溶液)、分散体或悬浮液、片剂、丸剂、粉末、脂质体和栓剂。优选的形式取决于预期的施用模式和治疗应用。在一个优选的实施方案中,DNA烷基化ADC通过静脉内输注或注射进行施用。在另一个优选的实施方案中,DNA烷基化ADC通过肌肉或皮下注射进行施用。在一个优选的实施方案中,ATR抑制剂通过静脉内输注、注射或经口进行施用。

[0148] 治疗组合物通常在生产和贮存条件下必须是无菌的和稳定的。可以将组合物配制为溶液、微乳剂、分散体、脂质体或适合于高药物浓度的其它有序结构。可以通过将所需量的活性化合物与根据需要的上文列举的成分之一或组合一起掺入适当的溶剂中,随后为过滤灭菌来制备无菌可注射溶液。一般地,通过将活性成分和来自上文列举的所需其它成分掺入无菌媒介物内来制备分散体,所述无菌媒介物含有基本分散介质。在用于制备无菌注射溶液的无菌粉末的情况下,优选的制备方法是真空干燥和冷冻干燥,其从其先前无菌过滤的溶液产生活性成分加上任何另外所需成分的粉末。溶液的适当流动性可以例如通过以下得到维持:使用包衣例如卵磷脂、在分散体的情况下维持所需粒子大小、以及使用表面活性剂。可注射组合物的延长吸收可以通过在组合物中包括延迟吸收的试剂来实现,所述试剂例如单硬脂酸盐和明胶。

[0149] 在一个进一步方面,提供了包含DNA烷基化ADC和ATR抑制剂的药盒。

[0150] 在一个进一步方面,提供了包括DNA烷基化ADC和包装插页的药盒,所述包装插页包含关于使用与ATR抑制剂组合的DNA烷基化ADC以在受试者中治疗癌症或延迟癌症进展的说明书。还提供的是包括ATR抑制剂和包装插页的药盒,所述包装插页包含关于使用与DNA烷基化ADC组合的ATR抑制剂以在受试者中治疗癌症或延迟癌症进展的说明书。药盒可以包括第一容器和第二容器以及包装插页,其中所述第一容器包含至少一个剂量的包含DNA烷基化ADC的药物,并且所述第二容器包含至少一个剂量的包含ATR抑制剂的药物,并且所述包装插页包含关于使用药物治疗受试者的癌症的说明书。ATR抑制剂和DNA烷基化ADC也可以包含在单个容器中。容器可以由相同或不同的形状(例如,小瓶、注射器和瓶子)和/或材料(例如,塑料或玻璃)组成。药盒可以进一步包含可以用于施用药物的其它材料,例如稀释剂、过滤器、IV袋和管线、针和注射器。

[0151] 图23显示了倍癌霉素的几个实例。

[0152] 从Dharmacon购买具有下述序列的针对CHK1 (CHEK1)、ATR、PLK1的siRNA以及非靶向siRNA的库:

siGENOME人CHEK1 (1111) SMARTpool siRNA:

GCAACAGUAAUUCGGUAUA

GGACUUCUCUCCAGUAAAC

AAAGAUAGAUGGUACAACA

AGAUAGAAGCGUGCCGUA

ON-TARGETplus人ATR (545) SMARTpool siRNA:

GAGAAAGGAUUGUAGACUA

GCAACUCGCCUAACAGAUUA

CCACGAAUGUUAACUCUAU

CCGCUAAUCUUCUAACAUU

ON-TARGETplus人PLK1 (5347) SMARTpool siRNA:

GCACAUACCGCCUGAGUCU

CCACCAAGGUUUUCGAUUG

GCUCUCAAUGACUCAACA

UCUCAAGGCCUCCUAAUAG

siGenome非靶向siRNA库#1:

UAGCGACUAAACACAUCAA

UAAGGCUAUGAAGAGAUAC

AUGUAUUGGCCUGUAUUAG

AUGAACGUGAAUUGCUCAA

用于本发明中的抗体具有下述氨基酸序列

a) α HER2抗体的氨基酸序列,如2009年通过药物库登录条目DB00072公开的。遗传修饰以粗体字体进行标记。

[0153] 重链:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFT
ISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDFYAMDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG
CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEVPPKS
CDKTHCTPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY
PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

具有SrtA识别基序的轻链:

MKLPVRLVLMFWIPASLSDIQMTQSPSSLSASVGRVITTCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYS
ASFLYSGVPSRFSGRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGGQTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLK
GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSP
VTKSFNRGECGGGGSGGGGSGGGGSLPETGS

b) α EGFR抗体西妥昔单抗的氨基酸序列。遗传修饰以粗体字体进行标记。

[0154] 天然重链:

QVQLKQSGPGLVQPSQSLITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKLEWLGVIWSSGNTDYNTPTFSTRLSI
NKDNSKQVFFKMNSLQSNDAIYYCARALTYDYEFAYWGQGTLLTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC
LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCD
KTHCTPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS
TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

具有SrtA识别基序的重链

QVQLKQSGPGLVQPSQSLITCTVSGFSLTNYGVHWRQSPGKGLEWLGVIWSSGNTDYNTPFSTRLSI
 NKDNSKQVFFKMNLSQNDTAIYYCARALTYDYEFAYWGQGLTVTSSAASKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC
 LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCD
 KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS
 TYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS
 DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKLPETG
 S

具有间隔基和SrtA识别基序的轻链:

DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGT
 DFTLSINSVESEDIADYYCQQNNWPTTFGAGTKLELKRVAAPSVEIFPPSDEQLKSGTASVCLLNFPYFREAKV
 QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSGGGG
 SGGGGSLPETGS

具有SrtA识别基序的轻链:

DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGT
 DFTLSINSVESEDIADYYCQQNNWPTTFGAGTKLELKRVAAPSVEIFPPSDEQLKSGTASVCLLNFPYFREAKV
 QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECLPETGS

c) α HEL抗体的氨基酸序列。遗传修饰以粗体字体进行标记。

[0155] 具有间隔基和SrtA识别基序的轻链:

DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASGNIHNYLAWYQQKPKGKAPKLLIYYTTLADGVPSRFSGSGSGT
 DYTFTISLQPEDVATYYCQHFWSPTPTFGGQTKVEIKRTVAAPSVEIFPPSDEQLKSGTASVCLLNFPYFREAKV
 QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGGGSGGGG
 SGGGGSLPETGS

天然重链:

QVQLQESGPGLVRPSQTLSTCTVSGFSLTGYGVNWRQPPGRGLEWIGMIWGDGNTDYNALSKSRVTM
 LKDTSKNQFSLRLSSVTAADTAVYYCARERDYRLDYWGQGLTVTSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVK
 DYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKSCDKTH
 TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR
 VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
 VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

d) α METxEGFR抗体的氨基酸序列。遗传修饰以粗体字体进行标记。

[0156] 具有scFv的SEED AG重链:

DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQSIGTNIHWYQQKPKGKAPKLLIKYASESISGVPSRFSGSGYGT
 DFTLTISLQPEDVATYYCQQNYNWPTTFGQTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVQSGAEVKKPGASVK
 VSKASGFSLTNYGVHWRQAPGQGLEWIGVIWSSGNTDYNTPFSTRVITITSDKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCA
 RALTYDYEFAYWGQGLTVTSS

SEED AG重链:

METDTLLLWVLLLVPGSTGEVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSAAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVS
 AISGSGGSTYY

ADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDRRITHTYWGQGLTVTSSASTKGPSVFPLA

PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP
SNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRPEVHLLPPSREEMTK
NQVSLTCLARGFYPKDIAVEWESNGQPENNYKTTTPSRQEPSQGTTTFAVTSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHN
HYTQKTISLSPGK

具有SrtA识别基序的轻链:

METDTLLLWVLLLWVPGSTGEPVLTQPPSVSVAPGETATIPCGGDSLGSKIVHWYQQRPGQAPLLVVYD
DAARPSGIPERFSGSKSGTTATLTISSVEAGDEADYFCQVYDYHSDVEVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLPFPPSSEE
LQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHKSYSCQVTHEGST
VEKTVAPTECSLPETGS

e) α MET抗体的氨基酸序列。遗传修饰以粗体字体进行标记。

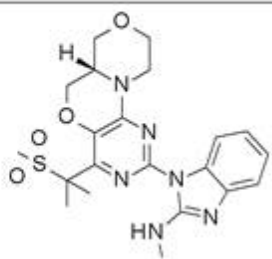
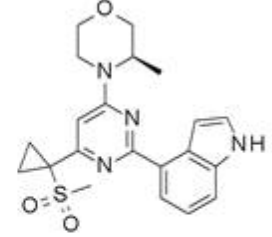
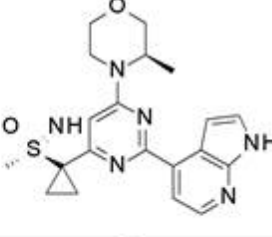
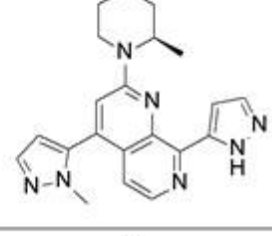
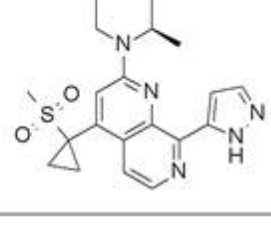
[0157] 具有SrtA识别基序的轻链:

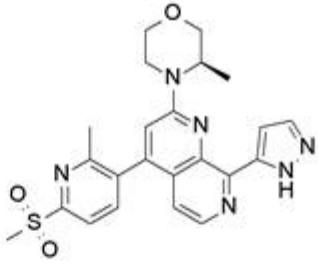
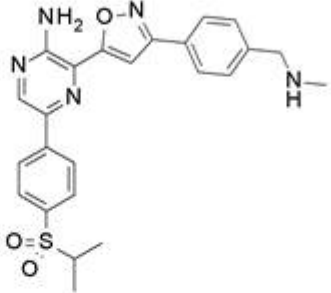
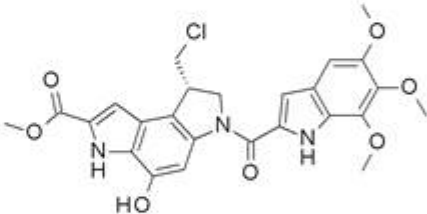
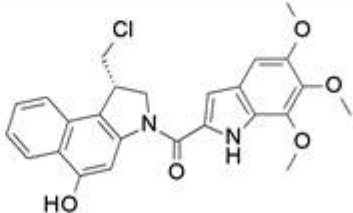
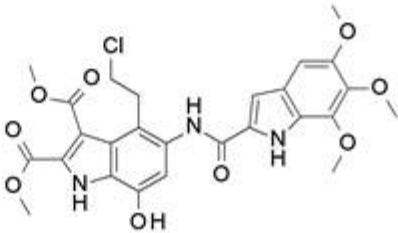
METDTLLLWVLLLWVPGSTGEPVLTQPPSVSVAPGETATIPCGGDSLGSKIVHWYQQRPGQAPLLVVYD
DAARPSGIPERFSGSKSGTTATLTISSVEAGDEADYFCQVYDYHSDVEVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLPFPPSSEE
LQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHKSYSCQVTHEGST
VEKTVAPTECSLPETGS

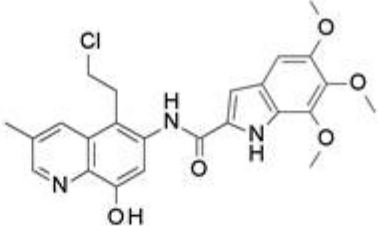
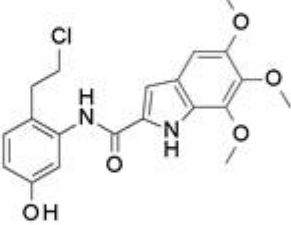
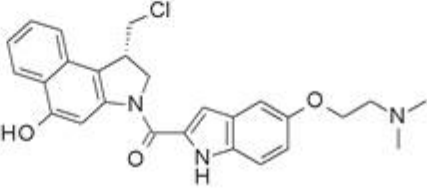
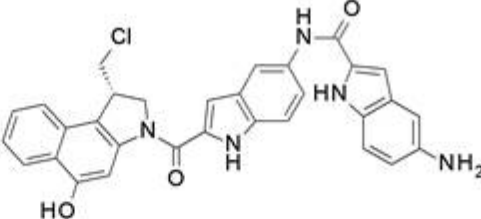
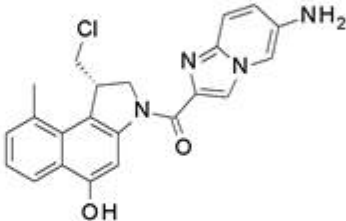
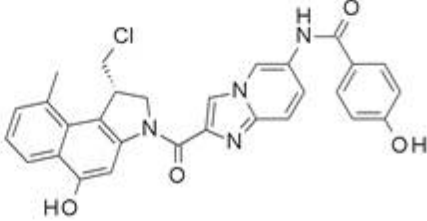
重链:

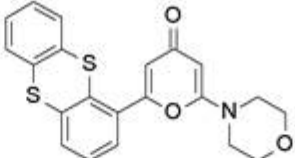
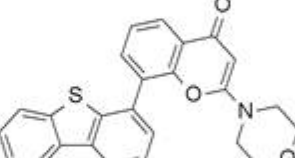
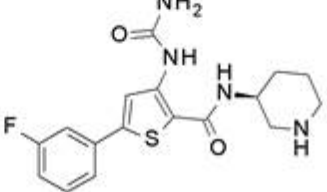
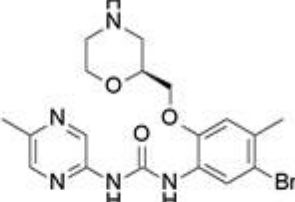
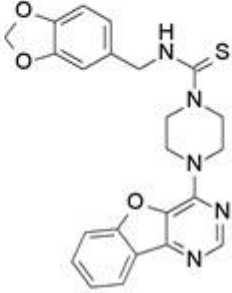
EVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFT
ISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDRRIHTHYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV
KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKT
HTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

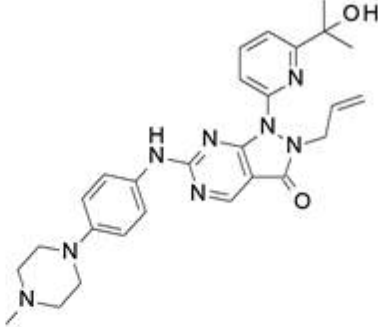
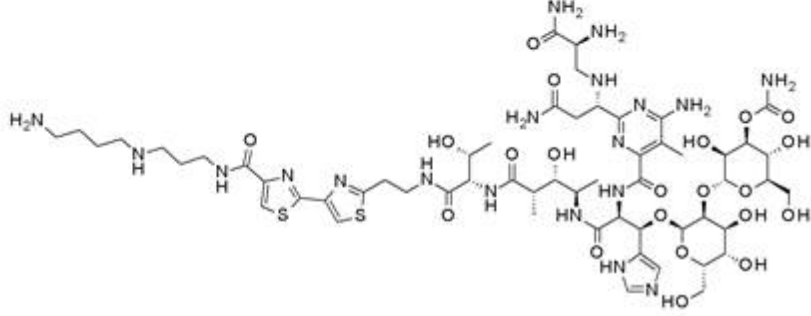
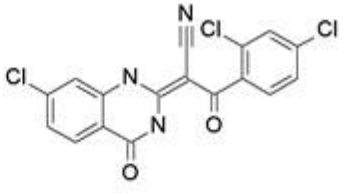
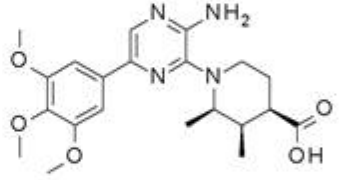
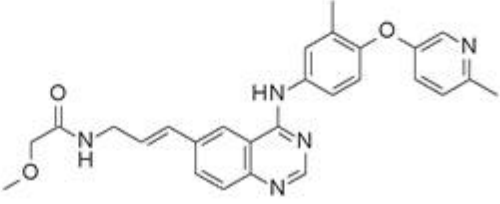
表1用于本发明中的药物活性化合物

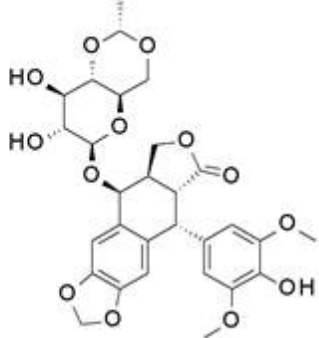
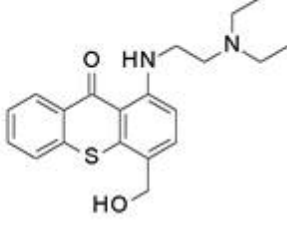
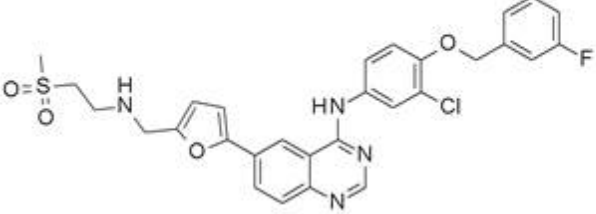
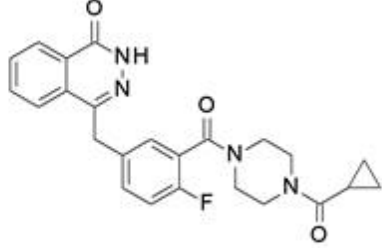
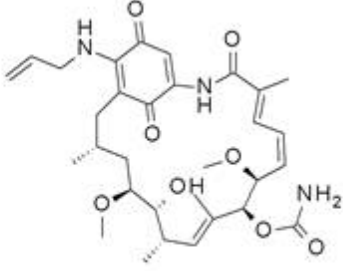
名称	编号	结构
ATRi 1	1	
AZ20	2	
AZD673 8	3	
BAY189 5344	4	
BAY286	5	

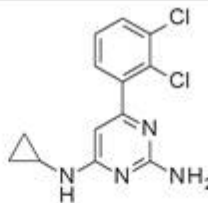
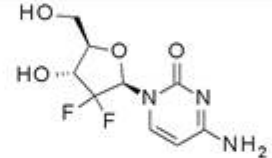
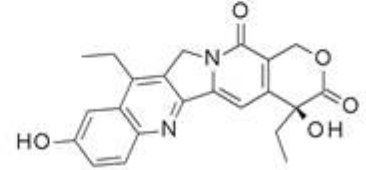
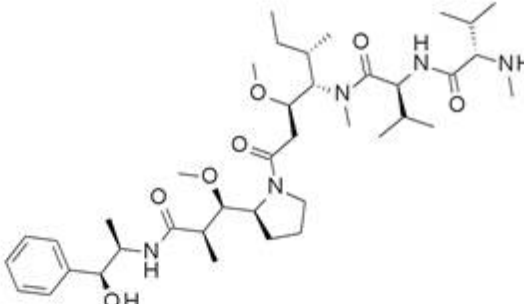
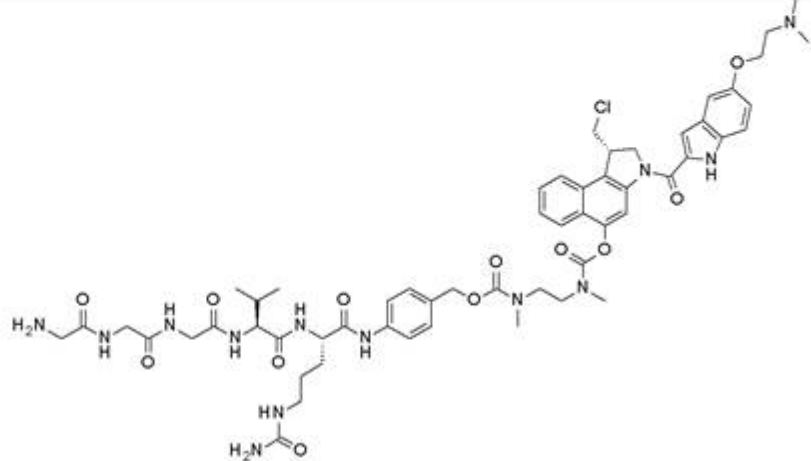
BAY73	6	 <p>Chemical structure of BAY73, a pyridine derivative. It features a central pyridine ring substituted with a methylsulfonyl group, a morpholine ring, and a 1H-imidazole ring.</p>
VE-822 (VX-970, M6620 Berzosertib)	7	 <p>Chemical structure of VE-822 (VX-970, M6620, Berzosertib), a pyrimidine derivative. It features a central pyrimidine ring substituted with an amino group, a nitro group, and a benzyl group.</p>
	13	 <p>Chemical structure of compound 13, a complex heterocyclic molecule. It features a central benzimidazole ring system substituted with a chlorine atom, a hydroxyl group, and a methoxy group.</p>
	24	 <p>Chemical structure of compound 24, a complex heterocyclic molecule. It features a central benzimidazole ring system substituted with a chlorine atom, a hydroxyl group, and a methoxy group.</p>
	29	 <p>Chemical structure of compound 29, a complex heterocyclic molecule. It features a central benzimidazole ring system substituted with a chlorine atom, a hydroxyl group, and a methoxy group.</p>

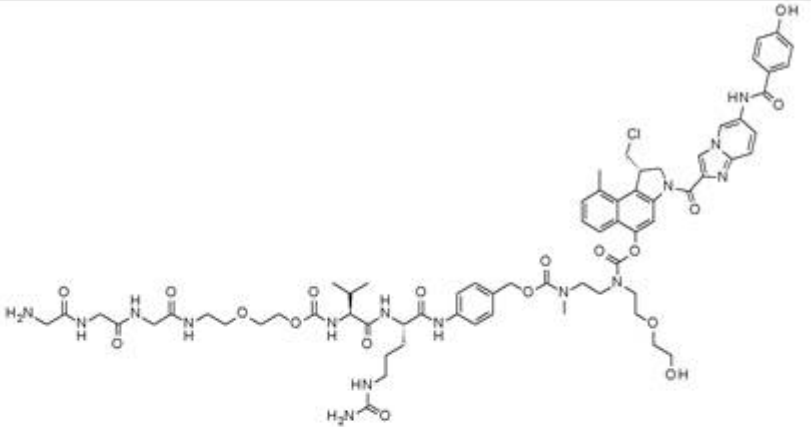
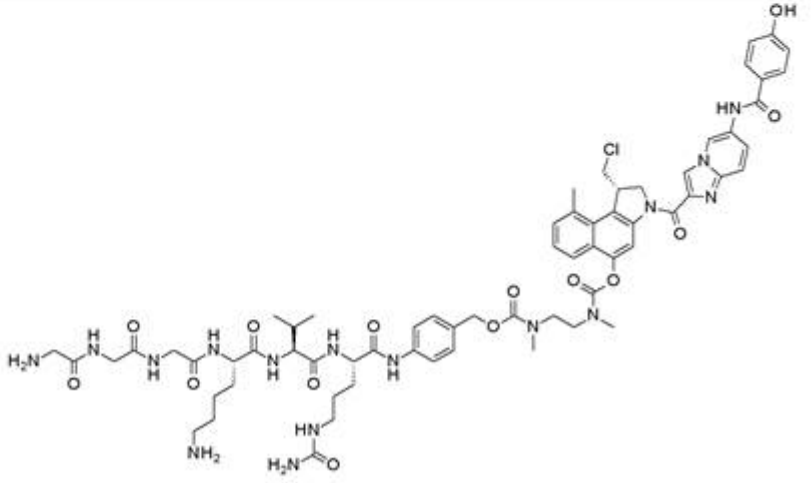
	30	
	31	
	32	
	33	
	34	
	10	

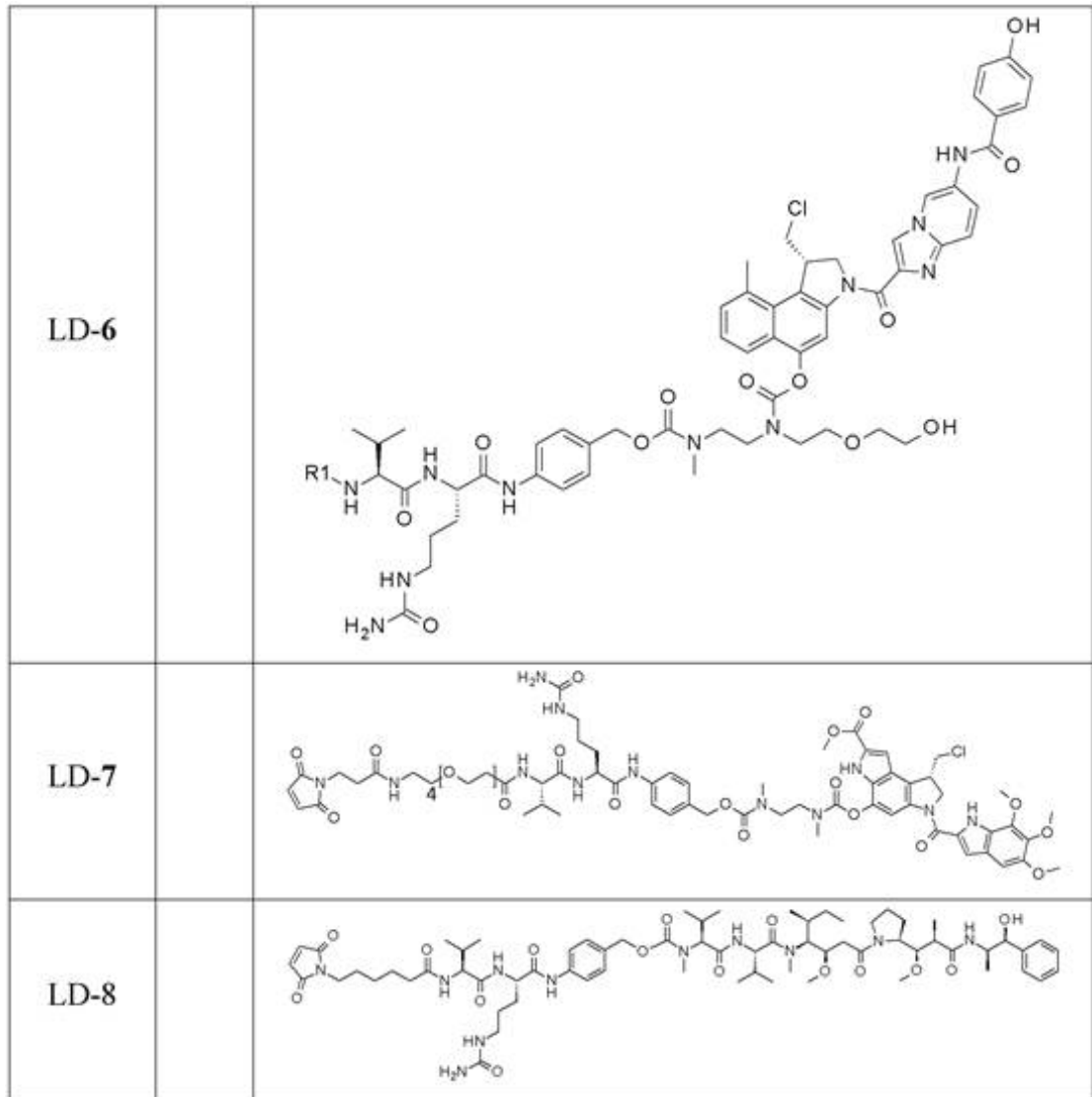
KU-55933		
NU7441		
AZD7762		
LY2603618		
Amuvatinib		

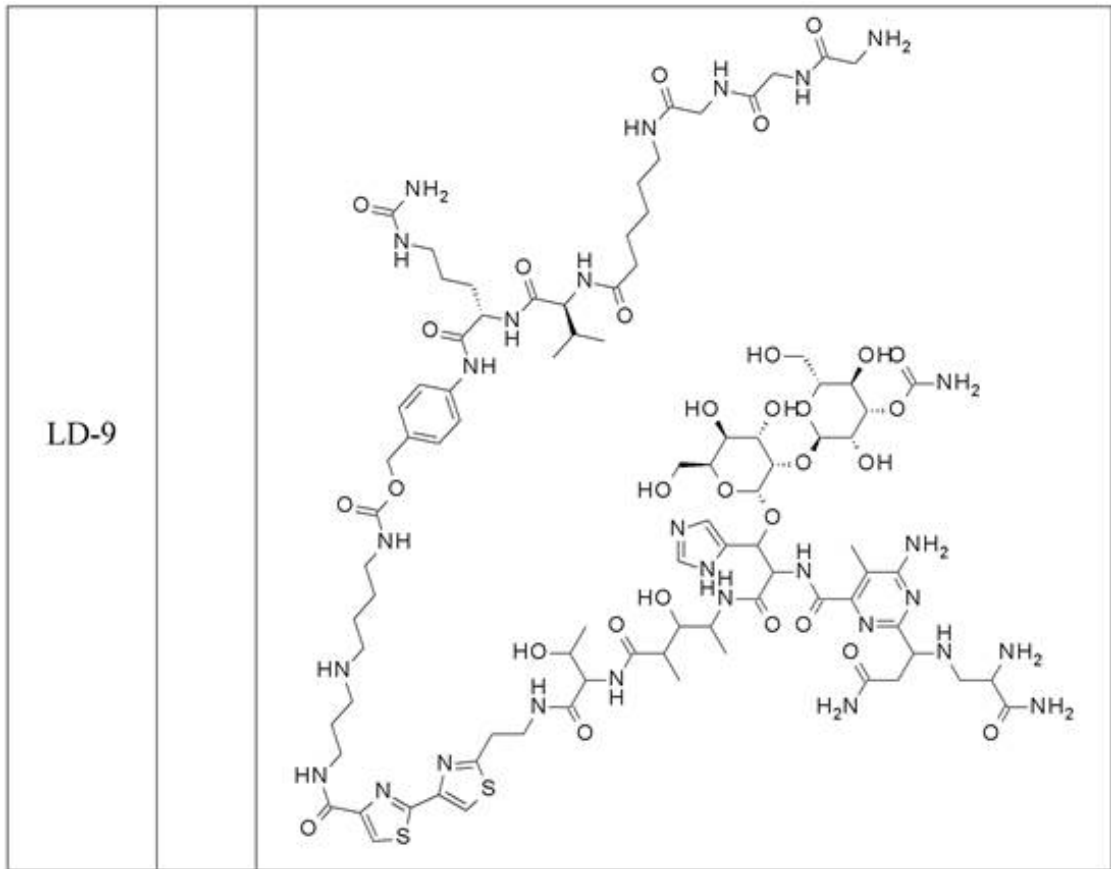
AZD1775	 <p>The structure of AZD1775 features a central pyrazolo[1,5-a]pyridin-2(1H)-one core. It is substituted with a 4-(1-methylpiperidin-4-yl)phenylamino group at the 5-position, a 2-allyl-2-(2-hydroxypropan-2-yl)ethylamino group at the 7-position, and a carbonyl group at the 3-position.</p>
Bleomycin in A5	 <p>The structure of Bleomycin in A5 is a complex glycosaminoglycan. It consists of a central bleomycin core linked to a long-chain polyamine (H₂N-(CH₂)₄-NH-(CH₂)₄-NH₂) and a complex sugar moiety containing multiple hydroxyl, amino, and hydroxamic acid groups.</p>
Ciliobrev in D	 <p>The structure of Ciliobrev in D is a pyrazolo[1,5-a]pyridin-2(1H)-one derivative. It has a 4-chlorophenyl group at the 5-position, a 4-chlorophenyl group at the 7-position, and a cyano group at the 3-position.</p>
Cmpd31	 <p>The structure of Cmpd31 is a pyrazolo[1,5-a]pyridin-2(1H)-one derivative. It features a 3,4,5-trimethoxyphenyl group at the 5-position, a 2-aminoethylamino group at the 7-position, and a 2-hydroxypropanoic acid group at the 3-position.</p>
CP724714	 <p>The structure of CP724714 is a pyrazolo[1,5-a]pyridin-2(1H)-one derivative. It has a 4-(4-methoxyphenyl)phenylamino group at the 5-position, a 2-(4-methylpyridin-2-yl)ethylamino group at the 7-position, and a 2-methoxyacetamido group at the 3-position.</p>

<p>依托泊苷</p>		
<p>海恩酮</p>		
<p>拉帕替尼</p>		
<p>奥拉帕尼</p>		
<p>坦螺旋霉素</p>		

TH588	
吉西他滨	
SN-38	
MMAE	
LD-1	

<p>LD-2</p>		 <p>The chemical structure of LD-2 is a complex molecule. It features a central chain of amide bonds. From left to right, it includes: a primary amide group (H₂N-CH₂-C(=O)-NH-), a secondary amide group (-NH-CH₂-C(=O)-NH-), another secondary amide group (-NH-CH₂-C(=O)-NH-), a chain of three amide bonds with side chains of -CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂-O-, -CH₂-CH₂-N(CH₃)-CH₂-CH₂-O-, and -CH₂-CH₂-N(CH₃)-CH₂-CH₂-OH. This chain is connected to a piperazine ring system, which is further substituted with a chlorine atom and a hydroxyphenyl group.</p>
<p>LD-3</p>		 <p>The chemical structure of LD-3 is similar to LD-2 but with several modifications. It lacks the hydroxyphenyl group and the chlorine atom on the piperazine ring. The side chain on the left is a primary amide group (H₂N-CH₂-C(=O)-NH-). The chain of amide bonds includes: a secondary amide group (-NH-CH₂-C(=O)-NH-), a secondary amide group (-NH-CH₂-C(=O)-NH-), a secondary amide group (-NH-CH₂-C(=O)-NH-), a secondary amide group (-NH-CH₂-C(=O)-NH-), a secondary amide group (-NH-CH₂-C(=O)-NH-), a secondary amide group (-NH-CH₂-C(=O)-NH-), and a secondary amide group (-NH-CH₂-C(=O)-NH-). The chain continues with -CH₂-CH₂-N(CH₃)-CH₂-CH₂-O-, -CH₂-CH₂-N(CH₃)-CH₂-CH₂-O-, and -CH₂-CH₂-N(CH₃)-CH₂-CH₂-O-. The piperazine ring system is substituted with a chlorine atom and a hydroxyphenyl group.</p>





在下文中描述了在导致本发明的研究背景下使用的方法。一般而言,这些方法是本领域众所周知的,并且为了完整性起见在此处呈现。

[0158] a) 抗体表达

抗体的表达基于ExpiFectamine™ 293 Transfection Kit (Life Technologies Corp.) 供应的方案。将1250 μL Opti-MEM与80 μL Expifectamine混合,并且温育最多5分钟。然后,在1250 μL Opti-MEM中稀释12.5 μg 重链和轻链质粒。SEED抗体携带两条不同的重链。关于GA和AG链的重链质粒和轻链以质量比1:1:1混合。将两种溶液合并,形成反应混合物,并温育30分钟。同时,使用ViCell细胞计数器(Beckman Coulter)确定Expi293™细胞的细胞密度。如果活力大于95%,则使用细胞。将细胞在总体积为21 mL的Expi293™表达培养基中稀释至 3.0×10^6 个细胞 mL^{-1} ,将温度调至 37°C 。将反应混合物在振荡的同时加入细胞悬浮液中。使细胞在 37°C 和5% CO_2 下振荡。在16-18小时后,添加150 μL 增强剂1和1.5 mL增强剂2。表达在 37°C 和5% CO_2 下振荡四天的同时发生。通过在离心(6000 g/10分钟/ 4°C)后收集上清液来分离抗体。使用Steritop 0.22 μm 或Steriflip 0.22 μm 过滤器(Merck Millipore, Merck KGaA),将上清液无菌过滤。通过进行蛋白A层析来纯化抗体。这个程序可以通过保持试剂的比率相等进行按比例扩大。

[0159] b) 转化

使用50 μL 化学感受态细胞执行转化,使所述细胞在冰上解冻,并且随后与50 ng质粒溶液混合。在冰上的30分钟温育后,将细胞在 42°C 下回温30秒。然后加入250 μL SOC培养基,随后为在振荡的同时在 37°C 下的45分钟温育。将细胞悬浮液以16 krcf离心1分钟。弃去上清液,而将细胞重悬浮于剩余溶液中。将悬浮液在含有抗生素的琼脂平板上铺平板。使

板在37°C下温育过夜。

[0160] c) 质粒扩增

通过One Shot TOP10化学感受态大肠杆菌的转化来扩增质粒。如果对于蛋白质表达需要高质粒产率,则使用JetStar™ 2.0 Plasmid Purification Kit执行纯化。纯化程序从过夜培养物的收获开始。使细胞裂解,随后为沉淀和离心。将上清液应用到预装的阴离子交换柱上。由于脱氧核糖核酸(DNA)主链是带负电的,因此DNA由带正电的柱基质结合。低盐洗涤步骤去除核糖核酸(RNA)、碳水化合物和蛋白质。然后在高盐条件下洗脱DNA。通过使用乙醇沉淀DNA,使DNA脱盐。对于用于测序目的的质粒的扩增,使用QIAprep Spin Miniprep Kit。纯化程序与JetStar™ 2.0 Plasmid Purification Kit程序相当,但DNA在高盐浓度下吸附到QiaPrep柱的硅胶膜上,并且在低盐浓度下洗脱。

[0161] d) ADC生成和纯化

接头-药物的缀合可以使用几种技术来实现。这些技术中的一些需要抗体的先前修饰。使用的抗体形式在图1中进行描绘。形式A、B和C设计用于使用分选酶A的酶促修饰。在形式A和B的情况下,常规IgG分子通过(G4S)3-间隔基和分选酶A识别序列LPETGS、或仅通过分选酶A识别序列LPETGS在C末端上延长。形式C是使用链交换改造结构域(SEED)技术生成的双特异性抗体形式。这允许将结合不同抗原的scFv和Fab部分组合。另外,Fab通过分选酶A识别基序LPETGS在C末端上延长。形式D允许产生具有至多四个药物/mAb的ADC。因此,LC含有(G4S)3-间隔基和分选酶A识别序列LPETGS,而HC通过SrtA识别基序LPETGS在C末端上延伸。对于含有马来酰亚胺的接头-药物的缀合,可以利用天然mAb(形式E)。

[0162] 使用了几种纯化方法。在使用硫醇偶联或经由SrtA的酶促缀合的mAb缀合后,粗制ADC混合物需要进行纯化,以耗尽过量的接头-药物、缀合试剂或酶。方便的策略是经由制备型SEC的纯化,其直接得到纯化的ADC。蛋白A层析的使用始终暗示另外的纯化步骤,其交换缓冲液以确保ADC贮存于适当缓冲液中。因此,蛋白A层析随后为脱盐。然而,这种方法进一步稀释样品,其可能需要浓缩步骤。另一种途径使用蛋白A层析,随后为脱盐。如果存在聚集物,则可以使用制备型SEC来耗尽高分子种类。由于样品的稀释,浓缩得到纯化的ADC。

[0163] e) 分选酶A介导的缀合反应

使用10当量的寡聚甘氨酸细胞毒性底物/抗体的SrtA识别基序进行反应。与抗体相比,施加0.37当量的分选酶A。分选酶A具有钙离子的结合位点。钙离子的结合减慢了分选酶A的运动,从而允许底物与分选酶A结合。这导致活性的八倍增加。

[0164] 13.5 μM (1当量) 抗体构建体

5 mM (375当量) CaCl₂

133 μM (10当量) 寡聚甘氨酸底物/SrtA识别基序

5 μM (0.37当量) eSrtA

试剂和缓冲液以所述方式进行混合。反应混合物用反应缓冲液进行稀释,以调整给定浓度。通过在22°C下温育混合物30分钟来执行反应。SrtA的添加标志着反应的起始。通过添加750当量EDTA来终止反应,所述EDTA通过形成络合物从溶液中去除游离钙离子。通过添加足够量的缓冲液,将溶液中的最终抗体浓度调整为13.5 μM。

[0165] f) 蛋白A层析

用于IgG抗体纯化的基础是金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)蛋白A对

IgG型抗体的Fc区的高结合亲和力。蛋白A和IgG抗体之间的结合在生理pH和离子强度下发生,而结合在低pH下被破坏,导致抗体的洗脱。显示了IgG分子通常在pH 3.0下洗脱。

[0166] 抗体纯化:在使用HiTrap™ 1 mL的5 mL蛋白A HP柱(GE Healthcare)的ÄKTAXpress (GE Healthcare)层析系统上,执行制备性蛋白A亲和层析。在抗体与柱结合后,将它用结合缓冲液洗涤。然后,通过用100%洗脱缓冲液洗涤柱,在一个步骤中执行洗脱。将抗体以1.5 mL级分洗脱到96深孔板内的100 µL中和缓冲液上。级分使用SDS-PAGE关于纯度进行分析,并且相应地合并。

[0167] ADC纯化:如先前所述纯化ADC,但在使用HiTrap™ 1 mL 5 mL蛋白A HP柱(GE Healthcare)的ÄKTA Purifier (GE Healthcare)层析系统上。使用SunChrom的自动进样器,将样品施加到柱上。将1 mL的级分洗脱到含有100 µL中和缓冲液的1.5 mL管内。合并含有ADC的级分。

[0168] g) 制备型SEC

SEC的分离原理基于通过分析物大小中的差异而引起的分析物洗脱时间差异。SEC柱的固定相由具有孔的球形颗粒组成。小分子可以扩散到孔内,而大分子则不能进入孔并直接穿过基质。这导致首先洗脱最大的分子,随后为按其大小次序的较小分子。在这项工作的过程中,SEC用于去除来自抗体制剂的聚集物,以及将ADC与缀合试剂例如分选酶A和过量的毒素分开。在Agilent 1260 HPLC系统(Agilent Technologies)上进行SEC纯化。流速为0.5 mL/分钟,并且使用Superdex 200 10/30增加柱(GE Healthcare)将样品分开。将样品以0.5 mL的级分洗脱并合并,以得到最终产物。在使用HiLoad™ 16/600 Superdex™ 200 µg柱的ÄKTAXpress (GE Healthcare)层析系统上,执行用于制备经由途径D纯化的αHER2-1的制备型SEC。因此,将柱用水洗涤,伴随用流动相的随后平衡。在进样后,样品以1 mL分钟⁻¹的流速等度洗脱,并且收集峰级分。

[0169] h) 分析型HIC

可以使用疏水作用层析(HIC)来确定ADC的药物/抗体比(DAR)。因此,将蛋白质施加于含有高浓度离液盐的水性流动相中。各个蛋白质基于其疏水性与固定相结合,并且通过盐含量的逐渐降低,按最不疏水到最疏水的次序洗脱。¹²³不同的ADC种类和未反应的mAb基于药物载荷进行分开。层析图的加权曲线下面积可以用于计算ADC的DAR。

[0170] 通过使用样品制备缓冲液稀释至为1.5 M硫酸铵的最终浓度,来制备所有样品。使用配备有MAB PAK Butyl、4.6x50 mm柱(Thermo Scientific)的HPLC系统(Agilent Technologies),来执行分选酶A生成的ADC的分析型HIC。UV-VIS检测器使用220 nm和280 nm的波长。在20分钟内以1 mL分钟⁻¹的流速施加0至100%缓冲液B的梯度来执行测量。HPLC运行在30°C下执行。随后用100%缓冲液B洗涤柱。使用LC 3D系统的ChemStation (Agilent Technologies)处理数据。

[0171] i) 分析型SEC

mAb和ADC样品的单体含量通过分析型SEC进行确定。它在具有TSK-GEL Super SW 3000 SEC 4.6 x 300 mm柱、Agilent Technologies的Infinity 1260 HPLC系统上执行。以0.35 mL分钟⁻¹的流速等度执行洗脱。

[0172] j) 缓冲液更换

使用含有Sephadex G-25 Medium的PD-10脱盐柱(GE Healthcare)执行缓冲液的

更换。基础的层析方法是尺寸排阻层析,其中基于分子的大小将样品分开。¹²²蛋白质的洗脱经常使用苛刻的缓冲条件,其可能导致蛋白质样品质量降低。因此,必须更换缓冲液用于贮存。对于脱盐,通过施加三个柱体积的贮存缓冲液来平衡柱。然后将2.5 mL蛋白质溶液施加到柱上,随后为使用3.5 mL贮存缓冲液洗脱到新鲜的falcon内。

[0173] k) 哺乳动物癌细胞的解冻

作为在-80℃下的冷冻小瓶提供的细胞在37℃下的水浴中进行解冻,直到冰溶解。将细胞重悬浮并转移至50 mL falcon管中。将细胞悬浮液离心(5分钟/500 rpm/RT)。在真空中去除上清液,并且将沉淀重悬浮于5 mL细胞培养基中。此时,将细胞直接用于细胞毒性测定法,或放入含有10 mL细胞培养基的T75烧瓶内。

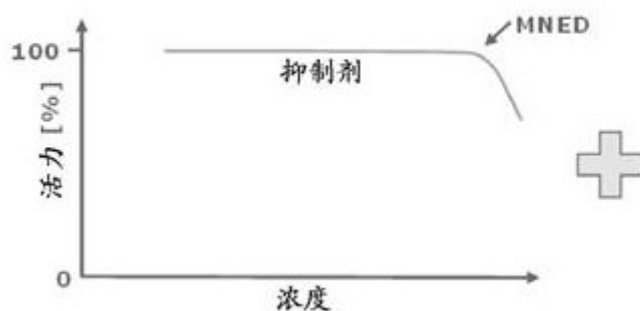
[0174] 1) 哺乳动物癌细胞的培养

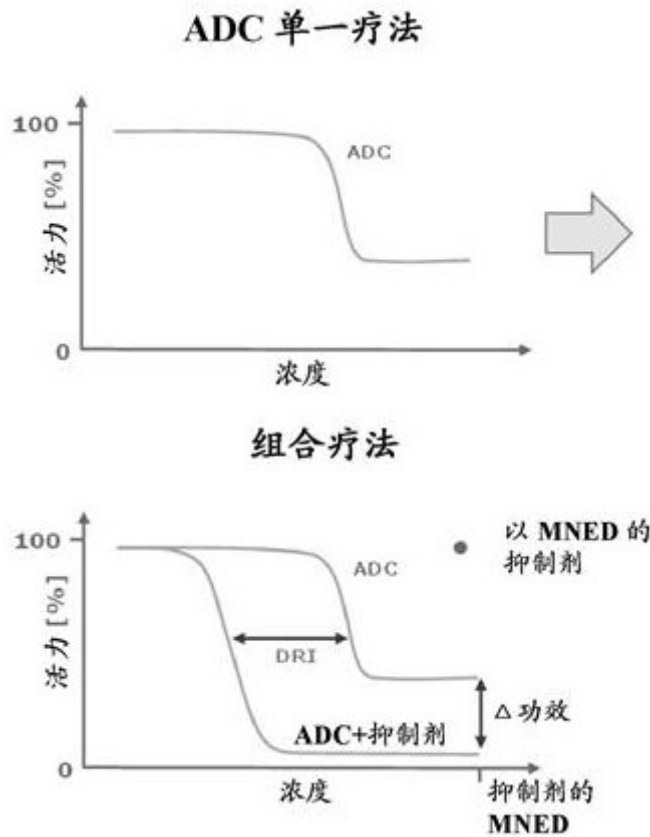
细胞通常在培养箱中的T75细胞培养瓶中、在37℃下、在5% CO₂的潮湿大气中进行培养,并且每3至4天进行传代。对于传代,在真空中去除培养基,将细胞用PBS洗涤(3x),并加入1 mL 0.05%胰蛋白酶-EDTA。目视检查解离反应的完成。当所有细胞解离时,将9 mL培养基加入细胞中,以终止解离反应。取决于细胞的生长速率,将它们以1:2至1:4拆分,并且重新接种到含有10 mL培养基的新鲜T75烧瓶内。然后,使细胞在培养箱中、在37℃下、在5% CO₂的潮湿大气中温育。

[0175] m) 曲线位移测定法

研究了荷有倍癌毒素的ADC与ATRi的强化效应,以进一步阐明协同效应。因此,建立了曲线移位测定法系统。在第一步中,通过用抑制剂治疗某种细胞系来获得剂量应答曲线(DRC)。可以由此DRC得出最大非有效剂量(MNED)。MNED是可以加入某种细胞系中,而不影响活力的最高剂量。ADC的活性在分开的实验中以确认。最后,可以进行组合实验。因此,将以MNED的ADC和ADC加上抑制剂加入细胞中。抑制剂以MNED并行进行测试作为对照。由于以MNED的抑制剂施加,因此预计没有通过抑制剂引起的细胞活力的降低。三种结果是可能的:1) ADC加上抑制剂的组合等效于仅ADC。这仅提示加性效应。2) ADC加上抑制剂的组合比单独的ADC效力更低。此类结果被解释为去强化效应。3) ADC加上抑制剂的组合比单独的ADC更有效。在这种情况下,ADC的效力是强化的。

抑制剂滴定





[0176] 强化效应表示为剂量降低指数 (DRI), 其可以根据等式1, 通过将ADC的 IC_{50} 值除以ADC加上抑制剂的 IC_{50} 值进行计算

$$DRI = \frac{\text{ADC 的 } IC_{50}}{\text{ADC 加上抑制剂的 } IC_{50}} \quad \text{等式 1}$$

如下进行曲线移位测定法: 细胞数目和活力使用ViCell™-XR (Beckman Coulter) 进行确定, 并且接种到不透明的96孔板中 (10k个活细胞/孔)。在接种后, 使板在潮湿腔室中温育 (37°C、5% CO₂) 过夜。将化合物在适当的培养基中稀释, 加入细胞中, 并且使板在潮湿腔室中温育 (37°C、5% CO₂、6天)。在室温下30分钟平衡后, 加入CellTiter-Glo试剂 (Promega)。在将板振荡 (3分钟, 550 rpm, rt) 后, 使其温育 (10分钟, rt), 并且在协同作用4板阅读器 (BioTek) 上读取发光。使用GraphPad Prism版本6.05执行评估。因此, 发光值针对未治疗细胞的发光值进行标准化, 并且剂量应答用4点逻辑拟合进行拟合。

[0177] n) 剂量矩阵测定法

剂量-矩阵组合测定法如上所述执行, 但在不透明的384孔板 (2k个活细胞/孔) 中执行。使用Tecan D300e液体添加化合物。蛋白质溶液补充有0.3% Tween-20 (最终) 并稀释至1 μM。所有孔针对最大量的DMSO (最多0.4%) 或添加的Tween-20进行标准化。在Envision 2104 Multilabel Reader (Perkin Elmer) 上执行发光的读出, 并且使用Genedata Screener® 版本14.0.6-Standard (Genedata AG) 来评估数据。发光值针对未治疗细胞的发光进行标准化, 并且剂量应答使用Smart Fit进行拟合。使用LOEWE协同作用模型来计算协同作用评分。

[0178] o) 敲减实验

将 0.7×10^6 个活细胞接种到T25烧瓶中,加入5 mL培养基,并且使细胞在37°C和5% CO₂下温育过夜。转染如下进行:用247.5 μL OptiMEM稀释2.5 μL Lipofectamine RNAiMAX,并且在OptiMEM中制备0.3 μM siRNA (ATR、CHK1或非靶向siRNA)溶液,以得到250 μL最终体积。将溶液混合并在室温下温育20分钟,随后加入500 μL细胞培养基。从细胞中去除细胞培养基,用PBS (3x)洗涤,并且将转染混合物加入细胞中。在37°C和5% CO₂下的4小时温育后,在真空中去除转染混合物。用培养基(3x)洗涤细胞,加入5 mL培养基,并且使细胞在37°C和5% CO₂下温育60小时。然后将细胞解离,并且接种到384孔板内。然后如前所述执行细胞毒性测定法,但仅用一种化合物

p) 统计分析

假设方差不等,使用Microsoft Excel中的双侧T.TEST公式来执行统计分析。曲线移位测定法的零假设是两种化合物的组合与单独的单一药剂具有同等细胞毒性。协同作用实验的零假设是两种组合具有同等协同作用。图注释:* : P<.05,** : P<.01,*** : P<.001,**** : P<.0001。

[0179] q) 异种移植实验

6-8周龄的雌性H2d Rag2小鼠得自Taconic Biosciences,LLC。通过从细胞培养物中收获NCI-N87细胞,将细胞与Matrigel 1:1混合,并且将 2.5×10^6 个细胞皮下注射到小鼠的肋腹内,来建立异种移植。通过使用卡尺在二个维度中的长度测量,每周两次评价肿瘤体积。体积遵循等式3进行计算,其中长度L是最长的肿瘤长度,且W是最短的肿瘤长度。

[0180] $V_{\text{肿瘤}} = (L \cdot W^2) / 2$ 等式3

在最初的肿瘤生长阶段后,将小鼠随机化且分配到包括10只动物的治疗组。当治疗起始时,初始肿瘤体积达到大约100 mm³。媒介物治疗的小鼠获得0.5% Methocel、0.25% Tween-20的水溶液。将溶解在10 mM组氨酸、8%海藻糖、0.05% Tween-20,pH 6.0缓冲液中的单一剂量的1.0 mg/kg ADC αHER2-6静脉内给予到尾静脉内。溶解在0.5% Methocel、0.25% Tween-20的水溶液中的50 mg/kg AZD6738和ATRi 1口服给予,每天一次,共两周。小鼠每周称重两次,以评价在治疗期过程中的体重。终止单只动物的研究的标准是皮肤溃疡、肿瘤长度超过15 mm或肿瘤超过体重的10%。另外,如果体重减轻超过20%伴有憔悴的外表、连续三天体重减轻超过20%或体重减轻超过调整体重的25%,则体重减轻是终止的标准。如果留下少于八只动物/组,并且因此无法执行统计分析,则治疗组完全终止。肿瘤应答标准如下:1) 如果与治疗起始相比,肿瘤体积的变化在观察期结束时>73%,则治疗结果被称为肿瘤进展。2) 如果在治疗结束时,肿瘤体积变化为初始肿瘤大小的-66%至73%,则达到肿瘤停滞。3) 在治疗结束时多于66%的肿瘤缩小被称为消退。4) 如果肿瘤在治疗结束时不可触及或< 20 mm³,则治疗结果被称为完全消退。该研究由Louisa Huettel执行,且由Ana Hecht指导。

[0181] r) 细胞CHK1磷酸化抑制

3500个HT29细胞(培养基参见附录1)/孔以30 μL接种到黑色384孔板内。使细胞在22°C下温育1小时,随后为在37°C、10% CO₂和90%相对湿度下的过夜温育。将ATRi的系列稀释物与最终浓度为3 mM的羟基脲同时加入细胞中。添加5 μL 7X PBS/HEPES和DMSO,得到0.5%最终浓度。使板在37°C、10% CO₂和90%相对湿度下温育4小时。使用Tecan-Powerwasher去除上清液。通过加入30 μL/孔4%多聚甲醛的PBS溶液,并且随后在22°C下温育15分钟来固定细胞。细胞用80 μL PBS洗涤一次,并且使用Tecan Powerwasher去除上清液。加入40 μL/

孔的-20℃冷甲醇,并且使它在22℃下温育10分钟。细胞用80 μL PBS洗涤一次,并且使用Tecan Powerwasher去除上清液。将30 μL/孔的0.2% Triton PBS溶液加入细胞中,并且使它在22℃下温育10分钟。细胞用80 μL PBS洗涤一次,并且使用Tecan Powerwasher去除上清液。加入25 μL 10%山羊血清、1% BSA、0.1% Tween-20、0.1%叠氮化钠/PBS,并且使它在37℃下温育60分钟。去除上清液,并且它用1% BSA、0.1%叠氮化钠/PBS中的25 μL 1°抗体(磷酸化-CHK1 (Ser345,133D3)兔mAb)在4-8℃下染色过夜。它用80 μL PBS洗涤三次,并去除上清液。加入在1% BSA、0.1%叠氮化钠/PBS中的25 μL 2°抗体(Alexa Fluor® 488山羊抗兔F(ab')₂片段)和0.2 μg/mL碘化丙啶。使板在37℃下温育60-90分钟。它用80 μL PBS洗涤三次,并且加入补充有0.1%叠氮化钠的80 μL PBS。板用透明的粘性密封件进行密封。在IMX Ultra上获取图像,并且使用Metaexpress 5.3分析图像。

[0182] 实施例1:倍癌霉素的协同药物组合配偶体的筛选

协同药物组合的筛选可以通过执行剂量矩阵测定法来完成。因此,两种药物在每一个剂量水平系列稀释且混合,得到剂量矩阵。如果组合的效应与单一药剂的相加效应等同,则药物组合可以是可加的。然而,组合的效应也可能强于单一药剂的活性。这种情形被称为协同作用,而与单一药剂相比更弱的组合效应被称为拮抗作用。剂量矩阵测定法在图2中示意性地进行描绘,所述图2示出了剂量矩阵测定法的结果:可加性、拮抗作用和协同作用。

[0183] 通过将倍癌霉素衍生物DUBA (10) 和DDR抑制剂系列稀释来进行筛选。随后将系列稀释物单独或组合加入HCC-1954或MDA-MB-468细胞中。DUBA在剂量矩阵测定法中与海恩酮组合。使用CellTiter-Glo测定法试剂盒,在治疗6天后测量细胞活力。细胞活力测定法的信号针对未治疗的细胞进行标准化并拟合。随后,基于单一药剂活性,对于DUBA和DDRi的每一个剂量对,计算了根据Loewe可加性模型的加性效应预测。通过从拟合数据中减去建模数据,生成了额外矩阵(excess matrix)。额外矩阵可以被视为模型和实际数据之间的差异的可视化,其也突出显示了高协同作用或拮抗作用的点。然而,组合效应的定量通过计算协同作用评分来执行。因此,根据Krueger等人22的协同作用评分的定义,使用GeneData Screener软件来计算模型和拟合的实际数据之间的加权体积,其表示为协同作用评分(S)。在DUBA和海恩酮的组合的情况下,协同作用评分达到0.1,指示了可加性。对于DUBA和AZD6738的组合重复相同的程序。额外矩阵在160至630 nM AZD6738和0.16至0.039 nM DUBA的浓度下鉴定了另外的细胞毒性热点。在这个范围内,组合的活性杀死比如果组合是可加的,则组合将杀死的多高达69%的癌细胞。该组合的另外细胞的细胞毒性转换成7.6的协同作用评分。除了协同作用评分外,药物在单一疗法中的效力也从这些实验中获得。当针对相应浓度绘制药物DUBA和AZD6738的活性数据时,得到使用逻辑函数拟合的剂量应答。从该剂量应答曲线获得效力。

[0184] S的散射是在假对照实验中进行确定,以定义用于将组合分类为真正协同或拮抗的截断。因此,七种不同的化合物与其自身组合用于四种不同的细胞系,并且计算在测量的平均值周围的三σ置信区间。根据这些实验,具有在0.6至-0.7范围内的S的组合具有99.7%的概率是可加的。为了方便起见,截断设定为±1的值。

[0185] 如果模型和实际应答相等,则从指示可加性($-1 < S < +1$)的组合实验获得协同作用评分(S)。如果实际应答超过模型,则组合是协同作用的($S > 1$),而如果用组合治疗的细胞与

单一药剂相比应答弱于组合治疗,则组合是拮抗作用的($S < 1$)。评分的量级决定了组合效应的程度。

[0186] 执行低通量筛选以鉴定倍癌毒素的协同组合配偶体。因此,选择了17种小分子DNA损伤应答抑制剂(DDRi),其或者干扰DNA损伤修复、细胞周期调节、DNA重塑,或者基于文献数据诱导DNA损伤,指示了在倍癌毒素诱导的病损修复中的潜在作用。表2中概括了抑制剂与相应靶和作用模式。

[0187] 首先,选择直接涉及DNA修复的抑制剂。由于倍癌毒素诱导的复制叉停顿导致的叉塌陷可能导致双链断裂。因此,假设涉及修复双链断裂的修复途径的抑制剂可能与倍癌毒素协同作用。因此,将amuvatinib,同源重组修复的下调剂或DNA PK抑制剂NU7441与倍癌毒素组合。KU-55933加上DUBA的协同作用评分几乎没有超过对HCC-1954细胞的协同作用的截断($S = 2.1 \pm 1.2$),指示了脱靶抑制或由于倍癌毒素治疗的双链断裂形成。倍癌毒素变体DUBA与DNA-PKi NU7441或amuvatinib的组合并未得到超过截断的协同作用评分。

[0188] 除了抑制双链修复外,将博来霉素A5和拓扑异构酶II抑制剂依托泊苷与DUBA组合,以使修复能力过载。对于HCC-1954细胞,与DUBA组合的博来霉素A5几乎没有超过截断($S = 1.6 \pm 1.0$),而组合对于MDA-MB-468细胞在可加性的范围内($S = 0.4 \pm 1.0$)。依托泊苷与DUBA的组合导致对于HCC-1954 ($S = 0.7 \pm 0.5$)和MDA-MB-468细胞($S = -0.3 \pm 0.2$)两者的加性效应。

[0189] 第二组选择的DNA修复抑制剂涉及损伤碱基的修复。碱基切除修复是大量DNA病损的直接去除所需要的。显示了蜡状芽孢杆菌(*Bacillus cereus*)的碱基切除修复酶DNA糖基化酶A1kD,介导了由倍癌毒素类似物谷田霉素引起的病损的去除。因此,研究了使用O6-烷基鸟嘌呤-DNA-烷基转移酶抑制剂洛美瓜特抑制人糖基化酶的效应。当洛美瓜特与倍癌毒素组合用于细胞系MDA-MB-468 ($S = 2.8 \pm 2.3$)时,仅观察到具有高方差的弱协同效应,而对于HCC-1954细胞观察到可加性($S = 0.1 \pm 1.3$)。除洛美瓜特之外,将另一种BER抑制剂TH588与DUBA组合。TH588抑制涉及氧化损伤碱基的切除的MTH1。然而,对于HCC-1954 ($S = -0.2 \pm 0.3$)和MDA-MB-468细胞($S = -0.4 \pm 0.3$),观察到加性效应。

[0190] 用于去除损伤核碱基的修复途径是核苷酸切除修复(NER)。它在倍癌毒素烷基化病损的修复中起作用。在解旋酶II和DNA聚合酶I的存在下,CC-1065 (15)病损被ABC切除核酶切除。然而,NER不是从NER熟练的(NER-proficient) HeLa细胞的细胞提取物中募集的。仅少数NER抑制剂是商购可得的,因此在组合实验中研究了HSP90抑制剂坦螺旋霉素。该抑制剂下调NER中的关键酶ERCC1的表达。对于HCC-1954,DUBA与坦螺旋霉素的组合($S = 1.4 \pm 0.4$)超过了截断。

[0191] 损害DNA损伤修复的更一般方法是减少细胞将DNA损伤应答蛋白输入核的能力。微管靶向剂如长春新碱抑制了DNA修复酶易位至核,导致蛋白质在细胞质中的累积。假定在倍癌毒素治疗后,动力蛋白抑制剂ciliobrevin D可能阻碍DNA损伤应答酶转运至核,且从而增加DNA损伤的累积。然而,ciliobrevin D与倍癌毒素衍生物DUBA的组合对于细胞系HCC-1954仅勉强超过截断($S = 1.2 \pm 0.6$),而对于MDA-MB-468细胞观察到加性效应($S = 0.2 \pm 0.5$)。这些结果与微管抑制ADC Kadcyla加上AZD6738的组合实验一致。与AZD6738组合的Kadcyla的协同作用评分对于MDA-M为 $S = 1.1 \pm 0.3$,并且对于NCI-N87细胞为 $S = 0.3 \pm 0.2$,仅指示了可加性。

[0192] 第三组研究的抑制剂包括取消检查点调控的药物。WEE1激酶涉及检查点调控。WEE1的活性延长了G2期,为S期中累积的DNA损伤修复赢得时间。当WEE1被AZD1775抑制时,G2/M检查点被取消,其导致细胞进入有丝分裂。WEE1抑制在小鼠中的患者衍生的异种移植模型中与CHK1/2抑制协同作用,并且一般使细胞对于用DNA损伤剂的治疗敏感。在我们对HCC-1954 ($S=0.8\pm 0.1$)和MDA-MB-468 ($S=0.1\pm 0.4$)细胞的研究中,DUBA和AZD1775的组合是可加的。酶PARP1在几种修复途径中起重要作用,如同源重组修复、非同源末端连接以及碱基切除修复。此外,它与停滞复制叉(SRF)结合,并且通过SRF的存在被激活。缺乏PARP1的细胞对用羟基脲和过量胸苷的处理是敏感的,所述羟基脲和过量胸苷分别引起复制叉塌陷或停滞。由于用倍癌霉素的治疗导致停滞复制叉的形成,这提示了在倍癌霉素诱导的DNA病损感测方面的潜在作用。在这项研究中,与DUBA组合的奥拉帕尼展示对于HCC-1954的加性效应($S=0.6\pm 0.4$)、以及对于MDA-MB-468细胞的较少协同效应($S=1.1\pm 0.1$)。

[0193] ATR和CHK1激酶是细胞周期以及DNA损伤应答调控中的关键酶。ATRⁱ AZD6738和CHK1ⁱ LY2603618以及AZD7762被鉴定为DUBA的协同组合配偶体。对于HCC-1954细胞($S=6.9\pm 0.7$)和MDA-MB-468细胞($S=5.7\pm 1.0$),ATRⁱ AZD6738与DUBA强烈协同作用。对于HCC-1954 ($S=4.1\pm 0.3, P=.00002$)和MDA-MB-468细胞($S=4.4\pm 1.7, P=.3$),协同作用对于ATRⁱ AZD6738加上DUBA强于LY2603618加上DUBA。再次,对于HCC-1954 ($S=3.6\pm 0.4, P=.0002$)和MDA-MB-468细胞($S=2.6\pm 0.2, P=.01$),AZD6738与DUBA的组合也超过了对于与DUBA组合的AZD7762观察到的协同作用。

[0194] 功能性HER2被描述为对于在MCF7细胞照射之后的G2/M检查点激活所必需的。在用照射处理MCF7之后,HER2抑制导致取消的ATR和CHK1信号传导。显示了ATR和CHK1与DUBA协同作用,研究了双重表皮生长因子受体和HER2抑制剂拉帕替尼或HER2抑制剂CP724714是否与DUBA协同作用。两种抑制剂与DUBA的组合导致对于HCC-1954和MDA-MB-468细胞的加性效应。

[0195] NEK1是与ATR和ATRIP相关的激酶,其调控这两种激酶之间的互相作用。尽管最初设计用于抑制NEK2,但cmpd31以0.17 μM 的效力抑制NEK1。因此,将cmpd31与DUBA组合。对于HCC-1954 ($S=0.3\pm 0.1$)和MDA-MB-468细胞($S=0.4\pm 0.2$),仅观察到可加性。剂量矩阵测定法的结果在图3中进行描绘。

[0196] 表2:筛选中使用的抑制剂。列出了每种抑制剂的靶酶和作用模式,并且根据酶的功能指定类别。

抑制剂	靶	作用模式	类别
Amuvatinib	多重酪氨酸激酶	减少 Rad51 表达, 因此损害 HR	DNA 修复
洛美瓜特	O ⁶ -烷基鸟嘌呤-DNA-烷基转移酶	去除在鸟嘌呤的 O ⁶ 处的烷基化加合物	
NU7441	DNA-PK	双链修复	
奥拉帕尼	PARP	SSB 感测 ⁹⁷	
坦螺旋霉素		在 NER 中需要的 ERCC1 mRNA 的下调	
TH588	MTH1	氧化损伤修复	
AZD1775	WEE1	用于延长 DNA 修复时间段的 G2/M 过渡的阻断	细胞周期
AZD6738	ATR	细胞周期和 DNA 损伤应答调控	
AZD7762	CHK1	细胞周期停滞, DNA 修复调控	
cmpd31	NEK1	ATR 活性所必需的	
LY2603618	CHK1	细胞周期停滞, DNA 修复调控	
博来霉素 A5		诱导双链断裂	DNA 损伤
依托泊苷	TOP2	双链断裂	DNA 重塑
CP-724714	HER2	HER2 抑制损害 ATR 激活	其它
海恩酮		RNA 合成抑制剂	其它
拉帕替尼	HER2/EGFR	HER2 抑制损害 ATR 激活	其它
Cilobrevin D	细胞质动力蛋白	细胞内运输阻碍修复酶的递送	蛋白质转运

[0197] 由于激酶抑制剂经常展示脱靶效应, 因此使用 siRNA 敲减来减少 ATR 和 CHK1 水平, 以证明这些酶对于用倍癌霉素治疗的细胞存活的必要作用。因此, 将 HCC-1954 细胞接种到 T25 烧瓶内, 并且静置粘附过夜。然后将细胞用 PBS 洗涤, 并且随后加入 ATR、CHK1 和非靶向 siRNA。使细胞温育 4 小时, 用培养基洗涤并温育 3 天。将细胞解离并接种到 384 孔板内。它们用倍癌霉素治疗 6 天。经由 CellTiter-Glo 测定法试剂盒测定了细胞活力, 并且使用 GraphPad Prism 评估数据。使用定量 PCR 评估敲减效率。

[0198] 表 3: 如通过定量 PCR 确定的, ATR 和 CHK1 的敲减效率。注明了各个实验的效率

细胞	敲减效率 [%]
ATR KD	90, 74
CHK1 KD	63, 15

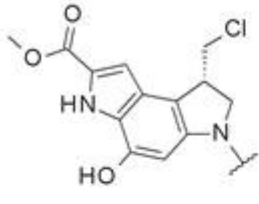
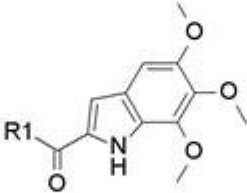
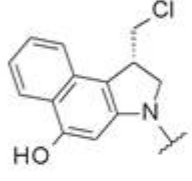
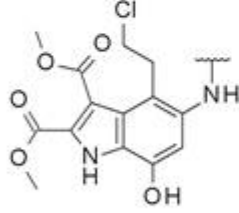
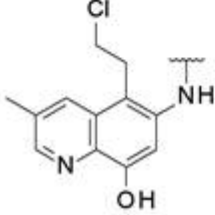
结果展示于图4中。与用非靶向siRNA (IC₅₀=1.5 nM) 治疗的细胞相比,DUBA对于ATR敲减(IC₅₀=0.25 nM) 和CHK1敲减的细胞(IC₅₀=1.1 nM) 更有效。对于DDM,获得了类似的结果,与对照细胞(IC₅₀=0.23 nM) 相比,所述DDM再次对于ATR (IC₅₀=0.014 nM) 和CHK1 (IC₅₀=0.133 nM) 敲减细胞更有效。CHK1和非靶向siRNA治疗的细胞之间的差异很小,但与对照细胞相比,对于ATR敲减细胞,DUBA的效力是5.8倍,而DDM的效力是17.3倍。

[0199] 总而言之,与DUBA加上CHK1 LY2603618或AZD7762相比,DUBA与ATRi AZD6738的组合得到了优异的协同效应。另外,相对于CHK1敲减细胞,倍癌毒素的强化作用对于ATR敲减细胞更强。综上所述,由于其一致地更强的协同效应,继续研究倍癌毒素与ATR抑制剂的药物组合。

[0200] 实施例2:倍癌毒素文库与ATR抑制剂AZD6738的协同药物组合

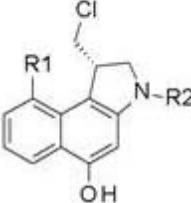
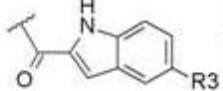
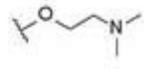
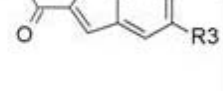
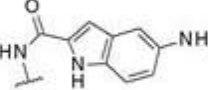
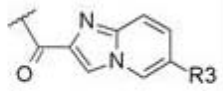

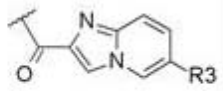
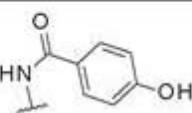
在鉴定了协同药物组合DUBA加上AZD6738后,研究了一系列倍癌毒素变体。这能够验证观察到的协同作用不是由DUBA引起的效应,而是总体上由倍癌毒素引起的效应。因此,倍癌毒素变体根据其结构特征聚类成两组。在三甲氧基吡啶(TMI) 系列中,倍癌毒素的结合单元保持恒定,而烷基化单元变化。倍癌毒素 SA (13) 和CBI-TMI (24) 的烷基化单元由三环(tricyclus) 组成,然而,具有不同的立体电子性质。后者的烷基化单元具有手性中心。与此相反,调查了三种非手性倍癌毒素变体。从这些中,两种变体倍癌毒素35和36具有双环烷基化单元,而37具有单环烷基化单元。表4中概括了TMI系列的结构。

[0201] 表4:来自TMI系列的倍癌毒素的化学结构。在三甲氧基吡啶(TMI) 系列中,结合单元保持恒定,而烷基化单元变化。通过用化合物治疗HCC-1954细胞,确定了倍癌毒素变体的细胞毒性。倍癌毒素变体的效力表示为N=3个生物学重复的IC₅₀±SD的平均值,除了在变体35的情况下之外,其中注明了平均值和各个IC₅₀值。通过用倍癌毒素变体和AZD6738组合治疗HCC-1954细胞,获得协同作用评分。协同作用评分描绘为N=3个生物学重复的S±SD。

烷基化单元	结合单元	编号	IC ₅₀ [nM]	S
		13	0.3±0.1	4.1±0.4
		24	24±32	6.1±1.2
		35	43.5 (44, 43)	5.2±0.2
		36	3.0±0.4	6.7±0.8

[0202] TMI系列可能阐明了烷基化单元对倍癌霉素和ATR抑制剂之间协同作用的影响。环丙苯并吲哚(CBI, cyclopropabenzindole)系列(表5)用于研究结合单元对倍癌霉素变体与ATRi之间协同作用的影响。在CBI系列中,烷基化单元保持恒定,仅具有较小的修饰,如R1中的甲基或氢,并且结合单元变化。

[0203] 表5:来自CBI系列的倍癌霉素的化学结构。在该系列中,烷基化单元是在烷基化单元的位置R1中具有甲基或氢的CBI单元。位置R2中的结合单元变化。通过用倍癌霉素治疗HCC-1954确定细胞毒性。通过用倍癌霉素变体和AZD6738组合治疗HCC-1954细胞,获得协同作用评分。10和38的数据分别为N=7或N=9个生物学重复的IC₅₀±SD和S±SD。对于具有N=2个生物学重复的实验,括号中注明了平均值和各个IC₅₀值。

烷基化单元		结合单元		编号	IC ₅₀ [nM]	S
	R1	R2	R3			
	H			38	0.11±0.05	5.6±1.7
	H			39	0.16 (0.21, 0.11)	5.1 (4.8, 5.3)
	M e			40	1.6 (1.7, 1.5)	6.7 (6.3, 7.2)
	M e			10	0.3±0.1	6.9±0.7

[0204] 为了研究与ATRi AZD6738组合的倍癌霉素变体的协同效应,用单一药剂或两种分别药物的组合治疗HCC-1954细胞。在治疗6天后,执行CellTiter-Glo发光测定法,并且在Envision Reader上读取发光。如前所述,使用GeneData Screener分析结果。该测定法的结果是倍癌霉素变体的效力,以及与AZD6738组合的每种变体的协同作用评分。

[0205] TMI系列对HCC-1954细胞的效力是强烈分散的(表4)。虽然DSA (13)具有0.3±0.1 nM的亚纳摩尔IC₅₀值,但具有单环烷基化单元的倍癌霉素变体37具有1.2±0.5 μM的微摩尔IC₅₀值。TMI系列中剩余的倍癌霉素变体的效力介于两者之间。倍癌霉素 36具有在3.0±0.5 nM的个位数纳摩尔浓度范围内的效力,而24和35分别具有24±32 nM和43.5 nM的IC₅₀值。CBI系列中倍癌霉素的效力更均匀地分布(表5)。倍癌霉素 DM (38)具有0.12±0.03 nM的IC₅₀值,且DUBA (10)具有0.2±0.1 nM的IC₅₀值。化合物39具有0.16 nM的效力,且倍癌霉素40具有1.6 nM的效力。

[0206] 所有测试的化合物都超过了先前确定的协同作用评分截断1。然而,在TMI系列中,协同作用评分强烈变化。虽然具有双环、非手性烷基化单元的倍癌霉素36与AZD6738组合达到6.7±0.8的协同作用评分,它随后为具有三环、手性烷基化单元CBI-TMI (24) (S=6.1±1.2)和DSA (13) (S=4.1±0.4)的倍癌霉素。当连同AZD6738一起给予时,具有双环、非手性烷基化单元的药物35具有5.2±0.2的评分。用包含单环、非手性烷基化单元的倍癌霉素37达到最弱的协同效应(S=2.8±0.5)。差异在CBI系列中较不明显。倍癌霉素DDM (38)和39具有彼此接近的协同作用评分(分别为S=5.6±1.7和S=5.1)。具有甲基-CBI单元作为烷基化单元的倍癌霉素也具有可比较的协同作用评分。虽然DUBA (10)当与AZD6738组合时具有S=6.9±0.7的协同作用评分,但DUBA-前体40与AZD6738的组合达到S=6.7。

[0207] 选择药物DDM (38)和DUBA (10)用于进一步实验。不管其结构特征如何,倍癌霉素与ATRi AZD6738协同作用。调查了倍癌霉素变体DUBA是否也与其它ATR抑制剂协同作用。

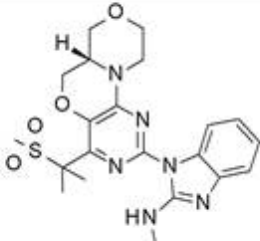
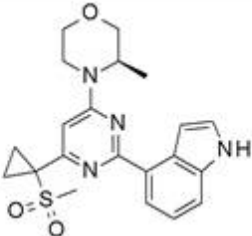
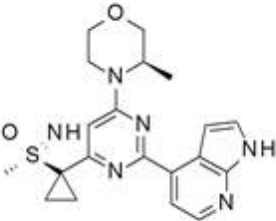
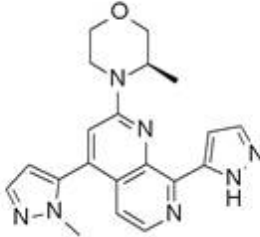
[0208] 实施例3:ATR抑制剂的生物活性

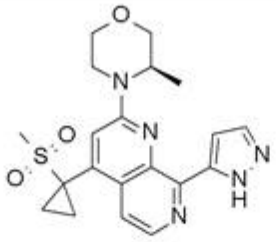
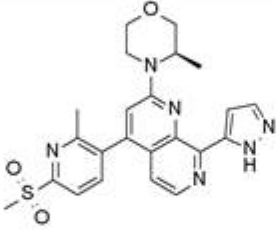
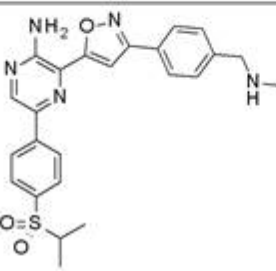
在与AZD6738的组合实验中,确认了倍癌霉素变体在协同效应的范围内起作用。在这项工作中,调查了几种不同的ATR抑制剂,以阐明ATRi对组合效应的影响。这项报告中研究的ATRi的化学结构概述在图5中给出。ATRi聚类成四组。来自Astra Zeneca的ATRi AZ20和AZD6378与等同的核心单元密切相关。Bayer ATR抑制剂也具有等同的核心单元。三种Bayer ATRi的区别仅在于R1。I期ATRi BAY1895344携带吡唑残基,而ATRi BAY73在R1中携带甲砒吡啶残基。Bayer ATRi BAY286在R1中携带甲砒部分。VE-822在结构上与剩余聚类无关。

[0209] 表6概括了ATRi的特有性质和化学结构。研究了由Astra Zeneca开发的两种化合物,即AZ20 (ATRi 2)和I期ATRi AZD6738 (ATRi 3)。此外,还包括来自Bayer的化合物。研究了I期ATRi BAY1895344 (ATRi 1),以及分别被称为BAY73 (6)和BAY286 (ATRi 5)的两种ATRi,其分别由Bayer AG149在专利中作为实施例73或实施例286公开。另外,还调查了ATRi 1和Merck的I期ATRi VE-822 (ATRi 7)。细胞毒性通过对于HCC-1954细胞的抗增殖效力来表示。

[0210] AZD6738是实验对象组中效力最低的ATRi ($2.2 \pm 0.7 \mu\text{M}$),随后为具有IC50值 $1.6 \pm 0.5 \mu\text{M}$ 的AZ20。VE-822在亚微摩尔范围内是有效的,具有 $0.9 \pm 0.4 \mu\text{M}$ 的效力。对于ATRi 1 ($0.4 \pm 0.2 \mu\text{M}$),以及来自Bayer的药物BAY1895344 ($0.05 \pm 0.02 \mu\text{M}$)、BAY73 ($0.12 \pm 0.03 \mu\text{M}$)、BAY286 ($0.08 \pm 0.02 \mu\text{M}$),效力是增加的。另外,对于NCI-N87和MDA-MB-453细胞测定了细胞毒性。尽管ATRi 1对于NCI-N87 ($0.36 \pm 0.07 \text{ nM}$)和MDA-MB-453 ($0.32 \pm 0.5 \text{ nM}$)细胞,在与HCC-1954相同的范围内有效,但BAY1895344的效力在细胞系之间更强烈地变化。当与HCC-1954细胞相比时,它对于NCI-N87 ($0.3 \pm 0.3 \text{ nM}$)和MDA-MB-453 ($0.2 \pm 0.2 \text{ nM}$)明显效力更低。另一方面,与对于HCC-1954细胞的效力相比,AZD6738对于NCI-N87 ($0.98 \pm 0.09 \text{ nM}$)和MDA-MB-453 ($1.1 \pm 0.3 \text{ nM}$)细胞的效力是两倍左右。

[0211] 表6:ATR抑制剂的概括。描绘了俗名和结构。对HCC-1954、NCI-N87和MDA-MB-453细胞,细胞毒性注明为IC50值的平均值 \pm SD。数据展示为平均值 \pm SD,并且各个实验的数目在括号内注明。

ATRi	编号	结构	细胞毒性 IC ₅₀		
			HCC-1954	NCI-N87	MDA-MB-453
			μM		
ATRi 1	1		0.4±0.2 (9)	0.36±0.0 7 (3)	0.32±0. 5 (3)
AZ20	2		1.6±0.5 (7)	-	-
AZD6738	3		2.2±0.7 (21)	0.98±0.0 9 (3)	1.1±0.3 (6)
BAY189534 4	4		0.05±0.0 2 (9)	0.3±0.3 (3)	0.2±0.2 (4)

BAY286	5		0.08±0.0 2 (5)	-	-
BAY73	6		0.12±0.0 3 (7)	-	-
VE-822 (VX-970, M6620 Berzosertib)	7		0.9±0.4 (7)	-	-

[0212] 实施例4 ADC生成

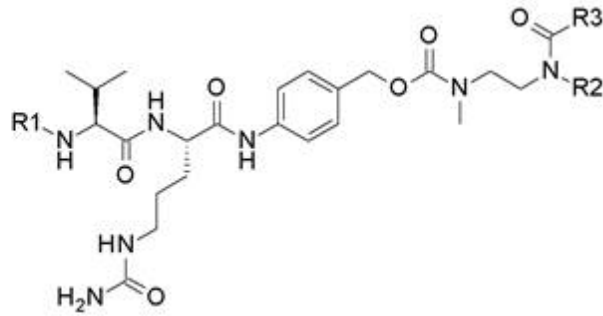
荷有倍癌毒素的ADC的生成

在这项工作中,基于靶向癌症相关受体酪氨酸激酶HER2、EGFR和间充质-上皮转化(MET)的抗体,生成了几种荷有倍癌毒素的ADC。与这些抗体偶联的接头-药物通过标签LD X指定,其中X指特定结构的索引号。所得到的ADC的名称由靶或抗体名称以及接头-药物索引号组成。例如,由接头-药物1 (LD-1)和抗EGFR (α EGFR)抗体或抗HER2 (α HER2)组成的ADC分别命名为 α EGFR-1或 α HER2-1。

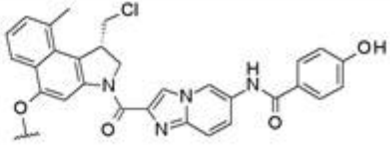
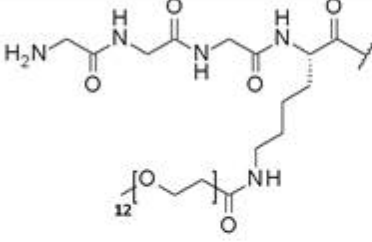
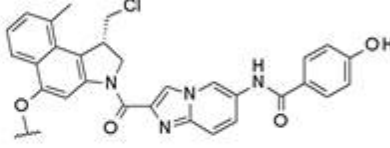
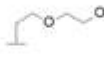
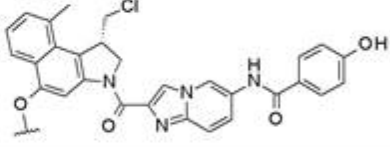
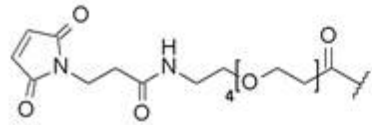
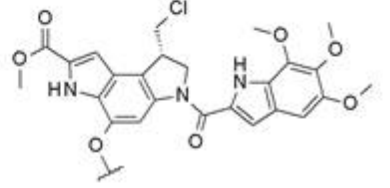
[0213] 表7中概括了用于生成荷有倍癌毒素的ADC的接头-药物。接头-药物的基本结构利用二肽缬氨酸-瓜氨酸接头,其可以被组织蛋白酶B切割。二肽随后为自降解模块(self-immolative module),其确保切割后的有效药物释放。自降解模块在R2位置中携带甲基或二甘醇部分。基本结构在R1处进行N末端延长。接头-药物LD-1至LD-5含有N末端三甘氨酸序列,以使分选酶A (SrtA)介导的缀合成为可能。引入了几种修饰以增加接头-药物的溶解度。LD-2和LD-5用乙二醇进行修饰。由于电荷还可以介导溶解性,因此LD-3含有在生理pH下带正电的赖氨酸。LD-6经由化学缀合技术进行缀合。LD-7通过马来酰亚胺基序在N末端上进行修饰,用于与硫醇缀合。在两个接头中,掺入了乙二醇单元以增加溶解度。倍癌毒素变体DDM (LD-1)、DUBA (LD-2至LD-6)和DSA (LD-7)在R3中用作药物(参见图6)。

[0214] 表7:用于ADC制备的基于倍癌毒素的接头-药物。R1:接头-药物LD-1至LD-5用被SrtA识别的三甘氨酸基序在N末端上进行修饰。LD-2至LD-5含有增加亲水性的修饰。因此,将乙二醇单元引入LD-2和LD-5中。LD-3包含赖氨酸残基,并且因此在生理pH下带正电。LD-6通过与 α HER2抗体的化学缀合进行制备。LD-7携带用于使用硫醇偶联缀合的N末端马来酰亚胺残基,以及用于增加溶解度的乙二醇单元。R2:使用甲基或二甘醇。二甘醇增加溶解度。

R3:接头-药物含有倍癌霉素 DM (LD-1)、DUBA (LD-2至LD-6)或DSA (LD-7)。



接头- 药物	R1	R2	R3
1		Me	
2			
3		Me	

4	未公开	Me	
5		Me	
6	未公开		
7		Me	

[0215] 使用SrtA缀合执行LD-1与 α HER2 mAb的缀合。因此,将用 $(G_4S)_3$ -LPETGS在C末端上进行修饰的抗体与LD-1、 $CaCl_2$ 溶液和缓冲液混合。然后添加SrtA以起始反应。在22°C下振荡30分钟后,通过添加过量的EDTA终止反应。然后使样品经受蛋白A层析。将流通物弃去,并且在洗涤段后,使用酸性pH转变来洗脱ADC。在缓冲液更换和浓缩后,通过分析型HIC和SEC来分析所得到的纯化的ADC。

[0216] α HER2 mAb在这项工作的过程中用作工具抗体,以研究倍癌霉素接头-药物对ADC的生产性的影响。因此,首先在分析规模反应中,经由SrtA介导的缀合,使LD-1至LD-5与 α HER2 mAb缀合。LD-4无法与 α HER2 mAb缀合,因为所得到的产物沉淀。在分析规模的反应中,LD-5成功地与 α HER2 mAb缀合。然而,缀合反应是不完全的,导致DAR为大约1的ADC。在制备规模中,使用抗体-形式A,使接头-药物LD-1、LD-2和LD-3成功地与 α HER2 mAb偶联。在这种设置中,制备了DAR>1.85的同质ADC,并且ADC的单体含量为至少95%。尽管基于DUBA的接头-药物LD-2和LD-3分别以极佳或非常好的产率与 α HER2 mAb缀合,但 α HER2-1制备的产率表现为弱至良好。

[0217] 除此之外,LD-1还与 α EGFR mAb西妥昔单抗以及mAb α MET、 α METxEGFR和 α HEL (鸡蛋溶菌酶,同种型对照)缀合。所得到的ADC以可接受的产率进行制备。虽然在 α HEL-1的制备中达到1.90的DAR,但 α EGFR-1和 α MET-1的制备分别得到DAR为1.70和1.68的ADC。在 α METxEGFR-1的情况下,分别达到DAR为0.89和0.95的ADC。这些ADC的单体含量是可接受的,除了其中单体含量是最低(为93.6%)的 α MET-1之外。

[0218] 表8:使用SrtA缀合所生成的基于倍癌霉素的ADC的概述。“App.”列含有附录编号,在其下可以找到数据如HIC和SEC概况。

mAb	mAb形式	接头-药物	纯化路径	产率[μg] (%)	产率[%]	DAR	单体[%]
αHER2	A	1	D/C/C	2760/1443/ 2850	34.4/28.8/ 71.0	1.97/1.89/ 1.96	98.8/95.6/ 96.7
αEGFR	B	1	C	1350	66.5	1.70	98.2
αMET	B	1	B	1064	52.4	1.68	93.6
α METxEG FR	C	1	A/A	503/620	57%/74.3	0.95/0.89	98.4/98.4
αHEL	A	1	C	2400	47.8	1.90	97.2
αHER2	A	2	B	1984	97.8	1.85	97.4
αHER2	A	3	A	2150	81.1	1.93	99.3
αHER2	A	4	-	-	-	沉淀的	-
αHER2	A	5	-	-	-	0.99	-
$\alpha\text{-GP}$	B	1	D	1215	60.0	1.57	89.4

[0219] 使用化学缀合技术生成ADC $\alpha\text{HER2-6}$,导致DAR为1.90的ADC。 $\alpha\text{EGFR-7}$ 通过LD-7与链间半胱氨酸的缀合而产生。达到1.54的DAR。两种ADC均仅含有可忽略不计的聚集物量。

[0220] 实施例5:基于倍癌毒素的ADC的细胞毒性

在本章中,描述了基于倍癌毒素的ADC的抗增殖效应。对于HER2阳性细胞研究了ADC $\alpha\text{HER2-1}$ 的细胞毒性。细胞实验对象组包括乳腺癌细胞系BT-474、HCC-1954、JIMT-1、MDA-MB-361、MDA-MB-453和SK-BR-3,以及肺腺癌细胞系Calu-3。此外,对于HER2阴性乳腺癌细胞系MDA-MB-468测试了ADC。对于HER2阳性细胞系, $\alpha\text{HER2-1}$ 在两位数皮摩尔至个位数纳摩尔范围内是活性的,并且对于HER2阴性细胞系MDA-MB-468,仅显示了在较低的三位数纳摩尔范围内的弱细胞毒性。对于Calu-3、HCC-1954和SK-BR-3细胞,ADC $\alpha\text{HER2-2}$ 和 $\alpha\text{HER2-3}$ 与 $\alpha\text{HER2-1}$ 一样是细胞毒性的。然而,与基于倍癌毒素的ADC相比,Kadcyla对于Calu-3的效力是1/5至1/45。对于抗原阴性细胞,Kadcyla以及 $\alpha\text{HER2-2}$ 和 $\alpha\text{HER2-3}$ 在两位数纳摩尔范围内有效。对于HER2阳性细胞,非靶向ADC $\alpha\text{HEL-1}$ 显示出在两位数至三位数纳摩尔范围内的弱抗增殖效应。对于NCI-N87和MDA-MB-453,ADC $\alpha\text{HER2-6}$ 具有亚纳摩尔的IC₅₀值,其与Kadcyla的效应可比较。对于NCI-N87细胞, $\alpha\text{HER2-6}$ 与 $\alpha\text{HER2-2}$ 可比较地有效。

[0221] 表9: $\alpha\text{HER2-倍癌毒素 ADC } \alpha\text{HER2-1}$ 、 $\alpha\text{HER2-2}$ 和 $\alpha\text{HER2-3}$ 对于HER2阳性细胞系和HER2阴性细胞系MDA-MB-468的细胞杀死效力。平行测试了对照ADC Kadcyla和 $\alpha\text{HEL-1}$ 。HER2阳性细胞系通过加号指示,不依赖于表面上的受体总量。数据: $N \geq 3$ 个生物学重复的IC₅₀ \pm SD,或者如果执行了少于三个的独立实验,则在括号中的平均值和各个IC₅₀值。细胞毒性数据得自以96孔形式的测定法。a:以384孔形式执行的测定法。

以 nM 的 IC₅₀

	H E R2	以 nM 的 IC ₅₀							
		αHER 2-1	αHER 2-2	αHER 2-3	αHE R2-6	Kadcyl a	αHEL -1	DDM (38)	DUBA (10)
BT-474	+	1.0 (1.2, 0.70)	-	-	-	-	-	-	-
Calu-3	+	0.9±0. 4	4±2	1.5±0. 9	-	41±22	-	-	-
HCC-1954	+	1±1	2±1	1±1	-	0.50±0. .03	230± 35	0.11±0. .07 ^a	0.30±0. .07 ^a
JIMT-1	+	0.41±0. .07	-	-	-	-	-	0.14 (0.20 , 0.074) ^a	3±2 ^a
MDA-MB-361	+	0.1±0. 02	-	-	-	-	29±3	-	-
MDA-MB-453	+	0.3±0. 1	-	-	0.5±0. .4 ^a	0.23±0. .04 ^a	339± 179	0.14 (0.15 , 0.13) ^a	0.3±0. 1 ^a
NCI-N87	+	-	0.15±0. .03 ^a	-	0.3±0. .4 ^a	0.10±0. .02 ^a	-	-	1.2±0. 5 ^a
SK-BR-3	+	0.08±0. .03	0.16±0. .05	0.15±0. .05	-	0.2±0. 1	42±1 4	-	-
SK-OV-3	+	0.2±0. 1	-	-	-	-	-	-	-
MDA-MB-468	-	140±4 7	28±7	17±4	-	43±9	56	0.02±0. .01 ^a	0.06±0. .02 ^a

[0222] 在其中仅体外数据可用的早期药物开发阶段,治疗指数可以基于中靶和脱靶选择性进行评价。尽管靶选择性不一定与体内增加的治疗指数相关联,但存在其中较高的靶选择性也导致改善的治疗窗口的许多实例。因此,根据等式4计算ADC针对抗原表达细胞的选择性指数(SI),以对ADC进行排序。通过将对于靶阴性细胞的IC₅₀除以对于靶阳性细胞的IC₅₀,来确定各个ADC的选择性指数。

$$\text{选择性指数} = \frac{\text{ADC 对于靶阴性细胞的 IC}_{50}}{\text{ADC 对于靶阳性细胞的 IC}_{50}} \quad \text{等式 2}$$

[0223] 关于各种ADC的选择性指数在图7中进行描绘。ADC αHER2-1是测试的最具选择性的ADC,具有639的平均选择性指数。平均选择性指数分别为67和43的ADC αHER2-2和αHER2-3比平均选择性指数为110的Kadcyla的选择性更弱。非靶向ADC αHEL-1具有大约一的平均选择性指数,其指示了αHEL-1发挥了靶不依赖性的细胞杀死性质。与研究的其它细胞系相比,小分子药物DDM和DUBA在更低的剂量下杀死MDA-MB-468细胞,导致分别为0.15和0.14的选择性指数。

[0224] 除了αHER2和αEGFR mAb外,αMET和双特异性αMETxEGFR mAb也用于ADC生成。就其抗增殖性质研究了所得到的ADC (表10)。受体EGFR和MET的表面表达对于1至10万个拷贝/细胞被分类为阳性,对于100至1000个拷贝/细胞被分类为双阳性,并且对于>1000个拷贝/细胞被分类为三阳性。对于EGFR和MET阳性细胞,ADC αEGFR-1和αMET-1在亚纳摩尔范围内是有效的,除了对于MKN-45的αEGFR-1之外,其中ADC具有45 nM的IC₅₀值。αMETxEGFR-1对于所研究的细胞系较不有效,具有在个位数纳摩尔范围内的IC₅₀值。ADC αEGFR-7在亚纳摩尔范围内杀死A431和MDA-MB-468细胞。对于EGFR阴性的MCF7细胞,荷有倍癌霉素DM的ADC αEGFR-1和携带DSA的αEGFR-7在个位数至两位数纳摩尔范围内明显效力更低。不管表面受体状态如何,游离药物DDM和DSA对于所有细胞系在亚纳摩尔范围内有效。

[0225] 表10:αMET-1、αEGFR-1和αMETxEGFR-1 ADC对于具有EGFR和MET的差异表达的细胞系的细胞杀死效力。对于N<3个生物学重复,效力报告为IC₅₀的平均值,伴随在括号中的各个测量。星号指示执行了测定法,但拟合是模糊的,并且未获得IC₅₀值。10x10³-100x10³个拷贝的受体密度被分类为“+”,100x10³-1000x10³被分类为“++”,并且>1000x10³的密度被分类为“+++”。a:从内部数据获得的受体密度。表9中已经呈现了DDM的IC₅₀值。

	以 nM 的 IC ₅₀							
	EG FR	M ET	αMET-1	αMETxEGFR-1	C-1	C-7	DDM	DSA (13)
A431	++	+	-	-	0.17±0.04	0.21±0.02	0.055±0.005	0.21±0.02
A549	+	+	-	-	*	*	0.1±0.1	0.33±0.07
HepG2	-	(+)	-	-	*	*	-	-
MCF7	- ^a	- ^a	-	-	27±8	9±5	0.164±0.004	0.06±0.02
MKN-45	+	++	0.80 (1.2, 0.41)	2.7 (3.8, 1.6)	45 (0.72, 88)	-	-	-
MDA-MB-468	+++	+	0.91 (0.12, 0.59)	1.9±0.2	0.12±0.08	0.06±0.02	0.02±0.01	0.14±0.07
NCI-H1975	+	+	0.14 (0.20, 0.077)	7.7 (9.3, 6.2)	0.11 (0.15, 0.058)	-	-	-

[0226] 为了进一步阐明各个西妥昔单抗-倍癌霉素ADC之间的差异,使用ADC α EGFR-1和 α EGFR-7以及分别的小分子配对物对于EGFR阳性细胞系和EGFR阴性细胞系MCF7的 IC_{50} 值,根据等式2计算选择性指数。结果在图8中进行描绘。与ADC α EGFR-7 (对于A431的SI=40和对于MDA-MB-468的SI=148)相比,ADC α EGFR-1针对细胞系A431 (SI=162)和MDA-MB-468 (SI=222)更具选择性。 α EGFR-1针对NCI-H1975细胞是选择性的(SI=257),但对于MKN-45细胞没有显示选择性(SI=0.6)。 α EGFR-1的平均选择性指数达到161,并且 α EGFR-7达到94。对于过表达EGFR的细胞系,小分子倍癌霉素DDM和DSA没有显示选择性(分别为 $SI_{平均值} = 0.5$ 和 0.3)。

[0227] 实施例6:倍癌霉素-ADC与ATRi的协同作用

α HER2-倍癌霉素ADC和ATRi的组的协同作用

用与AZD6738组合的DDM、DUBA以及相应的荷有DDM的 α HER2-1和携带DUBA的ADC α HER2-2 (图9),对HCC-1954治疗6天。然后,使用CellTiter-Glo试剂盒测定细胞的细胞毒性。在Envision阅读器上读取发光,并且使用GeneData Screener评估数据。DDM与AZD6738的组合($S=5.6 \pm 1.7$)与相应的ADC α HER2-1 ($S=5.1 \pm 2.0$)是可比较地协同作用的。对于DUBA与AZD6738 (6.9 ± 0.7)以及 α HER2-2加上AZD6738 (7.2 ± 1.0)的组合,可以得出相同的结论。

[0228] 作为阳性对照,将SN-38和吉西他滨与AZD6738组合用于HCC-1954细胞。SN-38以及吉西他滨与AZD6738协同作用($S=7.2 \pm 0.8$ 和 $S=6.9 \pm 0.3$)。然而,对于HCC-1954细胞,微管抑制剂MMAE与ATRi AZD6738 ($S=2.2 \pm 0.1$)、以及与AZD6738组合的微管抑制性ADC Kadcylla ($S=1.3 \pm 0.7$),是弱协同作用的。在这种情况下,排除了得到协同作用评分6.4的一项测量。因此,将 α HER2 mAb曲妥珠单抗和DM1与AZD6738组合,以阐明两个分子部分对协同效应的影响。曲妥珠单抗对于HCC-1954细胞并不与AZD6738协同作用($S=-0.2 \pm 0.2$),而DM1和AZD6738导致协同性细胞杀死($S=2.8 \pm 0.5$)。

[0229] 此外,对于HCC-1954细胞研究了不同ATRi对与ADC α HER2-2或相应的小分子DUBA组合的协同效应的影响。对于HCC-1954细胞, α HER2-2与ATRi 1的组合具有 12.5 ± 1.7 的评分,明显强于($P=.03$) α HER2-2与AZD6738的组合。当将ADC α HER2-2与BAY1895344组合时,它具有 13.1 ± 1.0 的协同作用评分,也明显强于($P=.003$)与AZD6738组合的 α HER2-2。ATRi VE-822和AZ20与 α HER2-2的协同作用与AZD6738可比较,分别具有 5.7 ± 0.3 和 5.8 ± 0.4 的协同作用评分。与 α HER2-2组合的BAY73具有 14.4 ± 1.1 的最高协同作用评分。BAY286加上 α HER2-2具有在 10.4 ± 0.2 的中间范围内的协同作用评分。对于HCC-1954细胞,与ATRi AZ20 ($S=5.1 \pm 0.5$)、ATRi 1 ($S=12.0 \pm 0.6$)、BAY1895344 ($S=12.8 \pm 0.5$)、BAY73 ($S=12.4 \pm 0.8$)、BAY286 ($S=9.5 \pm 0.8$)和VE-822 ($S=5.3 \pm 0.6$)组合的DUBA的协同作用评分,处于与分别的相同ATRi组合的ADC α HER2-2的良好比较中。

[0230] 在下一个实验中,将ADC α HER2-2和 α HER2-6与三种ATR抑制剂AZD6738、ATRi 1和BAY1895344组合用于NCI-N87和MDA-MB-453细胞。作为对照,将小分子DUBA和吉西他滨以及作为ADC对照的Kadcylla与ATRi AZD6738组合(图10)。对于NCI-N87细胞, α HER2-2以渐增的次序与ATRi AZD6738 ($S=3.7 \pm 0.7$)、ATRi 1 ($S=7.1 \pm 0.8$)和BAY1895344 ($S=7.6 \pm 0.4$)协同作用。与ADC加上ATRi AZD6738的组合相比, α HER2-2加上ATRi 1 ($P=.008$)和BAY1895344 ($P=.0007$)的组合明显更具协同作用。对于另一种DUBA-ADC α HER2-6的组合,观察到相同的趋势。再次,与AZD6738 ($S=3.0 \pm 0.05$)的组合显示最低评分,ATRi 1 ($S=6.1$

± 0.4) 显示中间范围,而BAY1895344 ($S=7.0 \pm 0.2$) 显示最高评分。在直接比较中, α HER2-6与AZD6378的组合的S明显低于 α HER2-6与ATRi 1 ($P=.009$)和BAY1895344 ($P=.0002$) 的组合。作为阳性对照,将DUBA与ATRi AZD6738组合。 $S=3.1 \pm 0.6$ 的协同作用评分证明了倍癌霉素衍生物与ATRi之间的协同作用。 α HER2-6与AZD6738的组合与其小分子配对物DUBA和AZD6738的组合是可比较地协同作用的 ($P=.3$)。当与AZD6738组合时,阴性对照Kadcyla仅显示加性效应 ($S=0.3 \pm 0.2$),而当与ATRi AZD6738组合时,基准吉西他滨几乎没有超过截断 ($S=1.1 \pm 0.5$)。与阴性对照Kadcyla ($P=.003$)和阳性对照吉西他滨 ($P=.001$) 相比,倍癌霉素-ADC α HER2-6与ATRi AZD6738明显更强地协同作用。

[0231] 对于MDA-MB-453细胞,获得了类似的结果。此处, α HER2-2以渐增的次序与ATRi AZD6738 ($S=9.1 \pm 2.1$)、ATRi 1 ($S=13.3 \pm 0.3$)和BAY1895344 ($S=14.7 \pm 2.3$) 协同作用。对于 α HER2-6加上AZD6738 ($S=9.5 \pm 0.9$)、ATRi 1 ($S=11.4 \pm 1.4$)和BAY1895344 ($S=15.8 \pm 0.5$),观察到相同的趋势。对于MDA-MB-453 ($S=1.6 \pm 1.2$),吉西他滨与AZD6738的协同作用略强于NCI-N87。Kadcyla与AZD6738的阴性对照组合达到 1.1 ± 0.3 的协同作用评分,其刚好高于截断评分,指示了非常弱的协同作用。阳性对照DUBA对于MDA-MB-453细胞也与AZD6738协同作用 ($S=5.0 \pm 0.5$),但明显弱于 α HER2-6与相应ATRi的组合 ($P=.01$)。

[0232] 在这项研究中调查了总共七种ATRi,以阐明对于HCC-1954、MDA-MB-453和NCI-N87细胞,ATRi对与倍癌霉素和基于倍癌霉素的ADC的组合效应的作用。与倍癌霉素DUBA或基于DUBA的ADC组合的各种ATRi (如图9和图10中呈现的)的协同作用评分,针对其抑制磷酸化的效力进行绘图,并且因此通过用羟基脲处理对在HT29后的CHK1活化施加压力。该图在图11中进行描绘。在HCC-1954中,对于小分子DUBA与ATRi,观察到ATRi效力与协同作用评分之间的相关性。对于HCC-1954,用与ATRi文库组合的ADC α HER2-2确认了这一发现。对于MDA-MB-453和NCI-N87细胞,对于与ATRi的子集组合的 α HER2-2和 α HER2-6,观察到相同的相关性。

[0233] α EGFR-倍癌霉素ADC和ATRi的组合的协同作用

为了验证将倍癌霉素修饰的ADC与ATRi组合的概念可以转化至另外的抗体,调查了基于西妥昔单抗的倍癌霉素ADC。因此,EGFR阳性细胞系A549、A431和MDA-MB-468,以及EGFR阴性MCF7细胞,分别用与AZD6738组合的基于DDM的 α EGFR-1、基于DSA的 α EGFR-7进行治疗。作为对照,细胞还用MMAE-ADC α EGFR以及小分子倍癌霉素DDM和DSA进行治疗。在治疗6天后,使用CellTiter-Glo试剂测定了细胞活力。在Envision阅读器上读取发光,并且使用GeneData Screener进行评估。数据在图12中进行描绘。阴性对照ADC α EGFR具有在可加性范围内的协同作用评分。阳性对照DDM具有范围从对于A549的 2.0 ± 1.1 到对于MDA-MB-468细胞的 6.0 ± 1.0 的协同作用评分。小分子DSA的协同作用评分对于A431、MDA-MB-468和MCF7是可比较的。然而,DSA对于A549细胞并不与AZD6738协同作用,而是显示加性效应。虽然对于A549 ($S=3.9 \pm 1.0$)、A431 ($S=3.9 \pm 0.3$)和MDA-MB-468 ($S=4.2 \pm 0.3$) 细胞, α EGFR-1加上AZD6738的组合的协同作用是非常类似的,但与对于MDA-MB-468 ($P=.006$)或A431 ($P=.01$)的和AZD6738组合的 α EGFR-1相比,对于MCF7的协同作用评分 ($S=2.2 \pm 0.1$) 显著更低。然而,对于与ATRi组合的DSA-ADC α EGFR-7的组合,效应较不明显。C-7加上AZD6738的协同作用评分对于A431达到 4.4 ± 0.6 ,对于A549达到 2.9 ± 1.1 ,且对于MDA-MB-468细胞达到 3.2 ± 0.4 。这个组合对于EGFR阴性细胞系MCF7达到 2.3 ± 0.1 的协同作用评分,其显著低于给予

A431细胞的组合 (P=.03)。

[0234] 与ATRi组合的 α HER2-倍癌毒素的剂量降低

组合疗法的改善安全性的策略是施用剂量的降低。在前面的章节中证实了,与ATRi组合的荷有倍癌毒素的ADC展示针对癌细胞的协同毒性效应。但就协同作用评分而言,协同效应的呈现无法估计在维持相同细胞效应的同时,组合中的药物剂量可以降低多少。因此,研究了当以亚有效剂量添加ATRi时,荷有倍癌毒素的ADC的效力增强了多少。

[0235] 如图13中示例性描绘的,在最大非有效剂量 (MNED) 曲线位移测定法中的剂量降低指数 (DRI) 的确定是3步方法。ADC的细胞毒性在初始步骤中的细胞活力测定法中加以确认。此处,HCC-1954细胞用 α HER2-1、 α HER2 mAb曲妥珠单抗 (T) 和对照ADC α HEL-1治疗6天,并且使用CellTiter-Glo试剂盒测量了细胞活力。尽管 α HER2-1具有1.1 nM的 IC_{50} 值,但裸露的mAb并未显示任何抗增殖效应。同种型对照ADC α HEL-1在250 nM下将细胞活力降低至75%,但细胞毒性明显低于 α HER2-1。在第二步中,确定ATRi的MNED。因此,细胞用ATRi 1进行治疗,并且绘制剂量应答曲线 (DRC) 以鉴定MNED,其在这种情况下为40 nM。用这些数据进行至最后一步,MNED曲线位移测定法。因此,用 α HER2-1的系列稀释物或补充有40 nM ATRi 1的 α HER2-1的系列稀释物治疗HCC-1954细胞。为了获得组合的完全DRC,与步骤1中的实验相比,降低了ADC的起始浓度。 α HER2-1的 IC_{50} 值为2.5 nM。 α HER2-1与40 nM ATRi 1的组合具有0.059 nM的效力。与单独的ADC相比,组合的强化作用可以表示为42的DRI。ATRi 1在40 nM下并未降低细胞活力。

[0236] 对于HER2阳性细胞系的实验对象组和HER2阴性细胞系MDA-MB-468,确定了AZD6738和VE-822的MNED,因为细胞系可能不同地响应 α HER2-1和ATRi的组合治疗。另外,对于HCC-1954细胞,确定了BAY73和ATRi 1的MNED。表11表中概括了HER2阳性细胞系和HER2阴性细胞系MDA-MB-468的MNED。

[0237] 表11:对于HER2阳性细胞系和HER2阴性细胞系MDA-MB-468的最大非有效剂量的概括。

以 nM 的 MNED

细胞系	AZD6738	BAY73	ATRi 1	VE-822
BT-474	1000	-	-	1000
Calu-3	400	-	-	80
HCC-1954	250	14	40	250
JIMT-1	80	-	-	80
MDA-MB-361	111	-	-	-
MDA-MB-453	111	-	-	40
MDA-MB-468	300	-	-	300
SK-OV-3	150	-	-	125
SK-BR-3	150	-	-	125

[0238] 然后,细胞用单独ADC或 α HER2-1与以相应MNED的AZD6738或VE-822的组合进行治疗。表12中概括了单一治疗和组合治疗的 IC_{50} 值。尽管在所有情况下,组合的 IC_{50} 值都低于单独ADC的 IC_{50} 值,但仅在少数情况下,差异是显著的。单独ADC的效力对于HCC-1954细胞为 1 ± 1 nM。在与250 nM AZD6738或250 nM VE-822的组合中,组合的效力分别降低至 0.3 ± 0.3 nM或 0.3 ± 0.2 nM。在两种情况下,强化效应均为显著的(分别为 $P=.03$ 和 $P=.03$)。 α HER2-1对于JIMT-1的 IC_{50} 值为 0.41 ± 0.07 nM。 α HER2-1与80 nM ATRi AZD6738的组合导致显著更高的效力,具有 0.19 ± 0.03 nM ($P=.03$)的 IC_{50} 值。与用 α HER2-1的单一治疗($IC_{50}=0.10 \pm 0.02$)相比, α HER2-1与111 nM AZD6738的组合对于MDA-MB-361的效力($IC_{50}=0.03 \pm 0.01$)也明显更有效。还研究了对于HER2阴性细胞系MDA-MB-468的强化效应。单独ADC的效力为 140 ± 47 nM。如果添加300 nM AZD6738或300 nM VE-822,则效力为 19 ± 4 nM或 44 ± 17 nM。与用单独的 α HER2-1的单一疗法相比, α HER2-1与AZD6738或VE-822的组合明显更有效(分别为 $P=.00009$ 或 $P=.0004$)。

[0239] 表12:单独或与AZD6738和VE-822组合的ADC α HER2-1对于HER2阳性细胞实验对象组和HER2阴性细胞系MDA-MB-468的效力。将ATRi以恒定浓度加入ADC α HER2-1中(MNED,参见表11)。表9中已经列出了ADC α HER2-1对于细胞实验对象组的效力,但为了比较而重复。数据为 $N \geq 3$ 个生物学重复的平均值 \pm SD (除了其中进行了两次实验的BT-474之外)。如果组合治疗比单一治疗明显更有效,则添加P值。

	HER 2	以 nM 的 IC_{50}		
		α HER2-1	α HER2-1+AZD6738	α HER2-1+VE-822
BT-474	+	1.0 (1.2, 0.70)	0.086 (0.095, 0.077)	0.079 (0.10, 0.057)
Calu-3	+	0.9 ± 0.4	0.3 ± 0.1	0.6 ± 0.2
HCC-1954	+	1 ± 1	0.3 ± 0.3 ($P=.03$)	0.3 ± 0.2 ($P=.03$)
JIMT-1	+	0.41 ± 0.07	0.19 ± 0.03 ($P=.03$)	0.24 ± 0.02
MDA-MB-361	+	0.10 ± 0.02	0.03 ± 0.01 ($P=.02$)	N/D
MDA-MB-453	+	0.3 ± 0.1	0.05 ± 0.01	0.13 ± 0.03
SK-BR-3	+	0.08 ± 0.03	0.036 ± 0.006	0.05 ± 0.02
SK-OV-3	+	0.2 ± 0.1	0.07 ± 0.04	0.05 ± 0.02
MDA-MB-468	-	140 ± 47	19 ± 4 ($P=.00009$)	44 ± 17 ($P=.0004$)

[0240] 通过使用等式1计算剂量降低指数,可以更详细地阐明组合治疗相对于单一治疗的强化效应。与具有渐增DRI的单一疗法相比,组合的效力是增强的。这一计算的结果在图14中展示。 α HER2-1加上VE-822的组合对于Calu-3、JIMT-1和SK-BR-3的DRI低于2。在大多数情况下,达到2至5的DRI。对于HCC-1954 (DRI=5.4)、MDA-MB-453 (DRI=6.4)和MDA-MB-468

(DRI=7.4), α HER2-1与AZD6738的组合超过了DRI 5。对于BT-474细胞,与AZD6738 (DRI=11.1)和VE-822 (DRI=12.0)组合的 α HER2-1达到大于十的DRI。

[0241] 此外,HCC-1954细胞用ADC α HER2-1以及ATRi AZD6738、VE-822、ATRi 1和BAY73进行共治疗,以研究ATRi对DRI的作用(图15)。单独的ADC具有 1.4 ± 1.2 nM的 IC_{50} 值,而ADC与250 nM AZD6738的组合的效力是5.4倍,具有 $IC_{50}=0.26 \pm 0.33$ nM ($P=.03$)。 α HER2-1与VE-822的组合是可比较地有效的($IC_{50}=0.33 \pm 0.17$ nM),并且再次比用 α HER2-1的单一治疗明显更有效($P=.03$)。对于与HER-822组合的 α HER2-1获得4.3的DRI。ADC与40 nM ATRi 1或14 nM BAY73的组合强烈强化ADC效力(分别为 $IC_{50}=0.074 \pm 0.022$ nM和 $IC_{50}=0.030 \pm 0.008$ nM)。 α HER2-1和ATRi 1的组合达到了27.1的DRI,而ADC与BAY73的组合导致了47.1倍的强化。基于这些数据可以说明, α HER2-1加上BAY73或ATRi 1比单独的 α HER2-1明显更有效(分别为 $P=.01$ 和 $P=.01$)。为了清楚起见,图15 B中描绘了 α HER2-1与四种不同的ATRi AZD6738、VE-822、ATRi 1和BAY73的组合的DRI。

[0242] 当将小分子倍癌霉素与AZD6738组合时,观察到协同作用评分的重大差异。因此,当与不同的ATRi组合时,应该将基于DUBA的ADC的强化效应与携带DDM的ADC的强化效应进行比较。表12中已经概括了单独或与AZD6738和VE-822组合的基于DDM的ADC α HER2-1的效力。除这些实验之外,对于HER2阳性细胞系HCC-1954、Calu-3和SK-BR-3,以及HER2阴性细胞系MDA-MB-468,研究了单独或与AZD6738和VE-822组合的基于DUBA的ADC α HER2-2和 α HER2-3的效力。尽管对于HCC-1954和Calu-3细胞, α HER2-2和 α HER2-3具有在个位数纳摩尔范围内的 IC_{50} 值,但对于SK-BR-3细胞,ADC在亚纳摩尔范围内有效。与HER2阳性细胞系相比,对于MDA-MB-468细胞,基于DUBA的ADC明显效力更低,具有在两位数纳摩尔范围内的 IC_{50} 值。当AZD6738或VE-822以其对于每一种细胞系的分别MNED加入ADC中时,ADC的效应得到强化。尽管对于 α HER2-2和 α HER2-3与AZD6738和VE-822的所有组合观察到这种趋势,但该效应仅对于 α HER2-2加上AZD6738 ($P=.04$)和VE-822 ($P=.04$)的强化效应是显著的。

[0243] 表13:单独或与以MNED的恒定剂量的AZD6738和VE-822组合、荷有DUBA的ADC α HER2-2和 α HER2-3以及对照ADC Kadcylla的效力。表11表中概括了ATD6738和VE-822关于每种MNED。数据是 $N \geq 3$ 个生物学重复的平均值 \pm SD。

		以 nM 的 IC ₅₀								
		αHER2-2			αHER2-3			Kadcyla		
HE	R2	AZD6738	VE-822	AZD6738	VE-822	AZD6738	VE-822	AZD6738	VE-822	
HCC-1954	+	2±1	0.10±0.02	0.097±0.006	2±1	0.09±0.02	0.15±0.04	0.50±0.03	0.4±0.2	0.3±0.2
Calu-3	+	4±2	0.7±0.4	0.931±0.164	1.5±0.9	0.4±0.1	0.6±0.2	41±22	37±22	41±23
SK-BR-3	+	0.16±0.05	0.035±0.007	0.061±0.015	0.15±0.05	0.039±0.001	0.071±0.005	0.2±0.1	0.19±0.02	0.12±0.07
MDA-MB-468	-	28±6	2.3±0.4	5.14±2.056	17±4	1.4±0.3	5±3	43±9	30±1	31±1

[0244] 对于HCC-1954、SK-BR-3和MDA-MB-468,对照ADC Kadcyla是可比较地有效的。对于Calu-3,与携带倍癌毒素的ADC αHER2-2和αHER2-3相比,Kadcyla明显效力更低。然而,这种效应是不显著的。

[0245] 对于HCC-1954、Calu-3、SK-BR-3和MDA-MB-468,与以恒定剂量的AZD6738和VE-822组合的荷有DDM的ADC αHER2-1、携带DUBA的αHER2-2和αHER2-3以及对照ADC Kadcyla的DRI概括在图16中展示。对于HCC-1954细胞,用DUBA-ADC达到了最高的DRI。αHER2-2的效力通过AZD6738 (21.5倍)或VE-822 (22.9倍)的添加得到强烈增强。通过将αHER2-3与以MNED的AZD6738 (18.5倍)或VE-822 (11.7倍)组合,获得更弱的强化效应。当添加AZD6738或VE-822时,荷有DDM的ADC αHER2-1与AZD6738的组合分别达到相当低的DRI 5.4或4.3。当与AZD6738或VE-822组合时,阴性对照ADC Kadcyla分别具有1.4和1.5的DRI。对于Calu-3、SK-BR-3和MDA-MB-468,再现了与ATRi组合的荷有DUBA的ADC优于荷有DDM的ADC αHER2-1加上ATRi的趋势,尽管不太明显。Kadcyla与ATRi的组合具有一致地DRI<2。

[0246] 为了比较荷有DDM的ADC与携带DUBA的ADC和阴性对照Kadcyla的强化效应,将DRI缩减并在图17 A中描绘。与基于DDM的αHER2-1与ATRi组合的强化作用(DRI=3.6)相比,当与ATRi组合时,基于DUBA的ADC αHER2-2和αHER2-3的强化效应更强(分别为DRI=9.8和7.2)。Kadcyla加上ATRi的平均DRI达到1.3。此外,比较了当加入荷有倍癌毒素的ADC时,ATRi AZD6738和VE-822对于不同细胞系的强化效应(图17 B)。在所有情况下,与VE-822和基于倍癌毒素的ADC的组合相比,AZD6738与倍癌毒素-ADC的组合的DRI平均值更高。

[0247] 此处研究的细胞系具有ATR抑制剂的差异耐受性,其通过不同的MNED反映出来。引入了允许比较不同ADC的选择性指数。然而,在组合治疗的情况下,不同的恒定浓度的ATRi

连同倍癌霉素-ADC一起加入细胞中。这损害了关于药物组合的选择性指数的计算。结果,有必要确定与恒定浓度的ATRi组合的ADC对于MDA-MB-468的效力。在下述实验中,调查了组合实验中DRI对加入ADC中的恒定剂量ATRi的依赖性。图18示出了,通过VE-822或AZD6738的添加,单独ADC的 IC_{50} 值以剂量依赖性方式减少。

[0248] 图18中呈现的数据使得能够根据等式2计算选择性指数。因此,将与恒定浓度的111 nM AZD6378组合的 α HER2-1对于MDA-MB-468的 IC_{50} 值(53 ± 16 nM),除以与111 nM AZD6738组合的 α HER2-1对于MDA-MB-453的 IC_{50} 值(0.05 ± 0.01 nM)。这得到在ATRi的该具体剂量下,对于组合治疗1010的选择性指数。与此相比,使用 α HER2-1的单一疗法的选择性指数达到414。图19中描绘了关于单一疗法、 α HER2-1与AZD6738或VE-822的组合治疗的选择性指数。因为ATRi对于BT-474的MNED以及AZD6738对于Calu-3的MNED超过了HER2阴性细胞系MDA-MB-468的MNED,所以在这些情况下并未计算选择性指数。此外,没有用40 nM VE-822治疗MDA-MB-468细胞,因此对于这种情况没有计算SI。

[0249] α HER2-1的选择性针对Calu-3细胞为153,针对HCC-1954细胞为138,且针对JIMT-1细胞为337。 α HER2-1对于MDA-MB-453 (SI=460)和SK-OV-3 (SI=690)达到更高的选择性指数。当用 α HER2-1治疗MDA-MB-361细胞或SK-BR-3细胞时,获得三位数指数(分别为SI=1380或1725)。当同时用 α HER2-1和AZD6738治疗HCC-1954、SK-BR-3和SK-OV-3细胞时,与单一疗法相比,SI减少。当用该组合治疗时,针对HCC-1954的SI达到100,针对SK-BR-3达到1105,且针对SK-OV-3细胞达到571。当 α HER2-1和AZD6738同时给予JIMT-1 (SI=379)、MDA-MB-361 (SI=1749)或MDA-MB-453细胞(SI=1060)时,选择性增加。与单一疗法相比,用VE-822和 α HER2-1组合治疗Calu-3细胞具有针对Calu-3略微增加的选择性(SI=172)。对于HCC-1954细胞,单一疗法(SI=138)和组合疗法(SI=140)的选择性是相等的。对于JIMT-1细胞,与用单独 α HER2-1的治疗相比, α HER2-1与VE-822的组合针对抗原阳性细胞更具选择性(SI=429),而对于SK-BR-3细胞,当与单一疗法相比时,对于组合获得1640的较低SI。与单独的ADC相比,与VE-822组合的 α HER2-1针对SK-OV-3细胞明显更具选择性(SI=1640)。

[0250] 当与ATRi组合时,糖蛋白结合-倍癌霉素DM ADC的强化效应

此外,研究了用基于 α HER2的ADC对于HER2阳性细胞观察到的强化效应是否可以转化至其它靶向抗原,两种表达糖蛋白(GP)的细胞系用单独的GP结合ADC α GP-1、或与其分别MNED的ATRi AZD6738和VE-822组合的ADC治疗6天。然后,使用CellTiter-Glo测定法测定了细胞活力。细胞活力测定法的效力概括于图20中。作为单一药剂的ADC对于表达GP的细胞系1具有 5 ± 2 nM的 IC_{50} 值,且对于表达GP的细胞系2具有 1.4 ± 0.6 nM的 IC_{50} 值。通过添加300 nM AZD6738,ADC α GP-1的效力对于表达GP的细胞系1增强了7.5倍,其导致 0.7 ± 0.3 nM的 IC_{50} 值。300 nM VE-822的添加将组合的效力减少至 1.1 ± 0.5 nM,其是单一药剂的4.7倍效力。对于表达GP的细胞系2,获得了类似的结果。与300 nM AZD6738组合的 α GP-1具有 0.3 ± 0.2 nM的 IC_{50} 值,其等价于剂量降低至1/4.2。300 nM VE-822对ADC的添加使效力减少到1/4.5,导致 0.3 ± 0.2 nM的效力。

[0251] 实施例8: α HER2-6与ATR抑制剂AZD6738和ATRi 1组合的体内功效和耐受性

在成功地确认了当与抗体缀合时,倍癌霉素也与ATRi协同作用后,该组合在体内进行调查,以研究组合治疗的功效和耐受性。在NCI-N87细胞皮下注射到H2d Rag2小鼠内后10天,将动物随机化,并且用媒介物、单次静脉内剂量的 1.0 mg kg^{-1} α HER2-6、或者50 mg

kg^{-1} ATRi AZD6738或ATRi 1进行治疗,经过14天,每天口服给予一次。通过以与单一药剂相同的剂量和时间表,给予与AZD6738组合的 $\alpha\text{HER2-6}$ 或 $\alpha\text{HER2-6}$ 加上ATRi 1来研究组合效应。

[0252] 媒介物组在第24天时终止,因为肿瘤体积符合终止标准。用AZD6738的治疗与媒介物治疗的组并无统计学不同 ($P=.2$)。在ATR抑制剂ATRi 1的情况下,诱导暂时的肿瘤停滞直至第8天,但肿瘤迅速进展以达到终点。然而,与媒介物组相比,肿瘤生长抑制是统计学显著更强的 ($P=.003$)。单一药剂 $\alpha\text{HER2-6}$ 的施用导致暂时的肿瘤停滞,直到第9天时肿瘤进展。与接受媒介物的组 ($P=.0002$)、以及用AZD6738 ($P=9\times 10^{-9}$) 和ATRi 1 ($P=.006$) 治疗的ATRi单一疗法组相比,ADC治疗导致肿瘤体积的统计学显著降低。

[0253] 然而,与媒介物治疗的组相比,组合疗法组 $\alpha\text{HER-6}$ 加上AZD6738或ATRi 1诱导统计学显著更强的抗肿瘤效应(分别为 $P=.00003$ 或 $P=.00002$)。组合 $\alpha\text{HER-6}$ 加上AZD6738诱导肿瘤停滞,直至第66天时,由于三只动物具有肿瘤上的皮肤病损,该组终止。用 $\alpha\text{HER-6}$ 和ATRi 1的组合治疗小鼠导致肿瘤消退,直到第63天时肿瘤再次开始进展。值得注意的是,在接受 $\alpha\text{HER-6}$ 加上AZD6738的组合疗法组中,一只小鼠显示了完全应答 ($V_{\text{肿瘤}} < 20 \text{ mm}^3$),其持续直到该组终止(第66天)。在用 $\alpha\text{HER-6}$ 加上ATRi 1治疗的组中,总共观察到三个完全应答。在一只小鼠中,这种效应是暂时的,持续约90天直到肿瘤进展,而在另外两只小鼠的情况下,动物显示无肿瘤存活,直到观察期结束(15周)。数据在图21中以治疗组水平(图21 A)和组合组中个别动物的水平(图21 B)展示。

[0254] 考虑到动物的总体状况以及小鼠的体重变化,评价了抗癌治疗的耐受性(图22)。在所有时间点下,用ADC $\alpha\text{HER2-6}$ 治疗的小鼠的体重并未减少,且与媒介物治疗组的体重可比较。然而,与媒介物组相比,用ATRi AZD6738和ATRi 1治疗的小鼠减轻重量,但体重减轻仍低于5%。接受用 $\alpha\text{HER2-6}$ 和AZD6738或ATRi 1的组合治疗的小鼠,显示了与用ATRi AZD6738或ATRi 1作为单一药剂治疗的小鼠可比较的体重概况。

[0255] 可以得出结论,ADC $\alpha\text{HER2-6}$ 、ATRi AZD6738和ATRi 1以及组合治疗是良好耐受的。

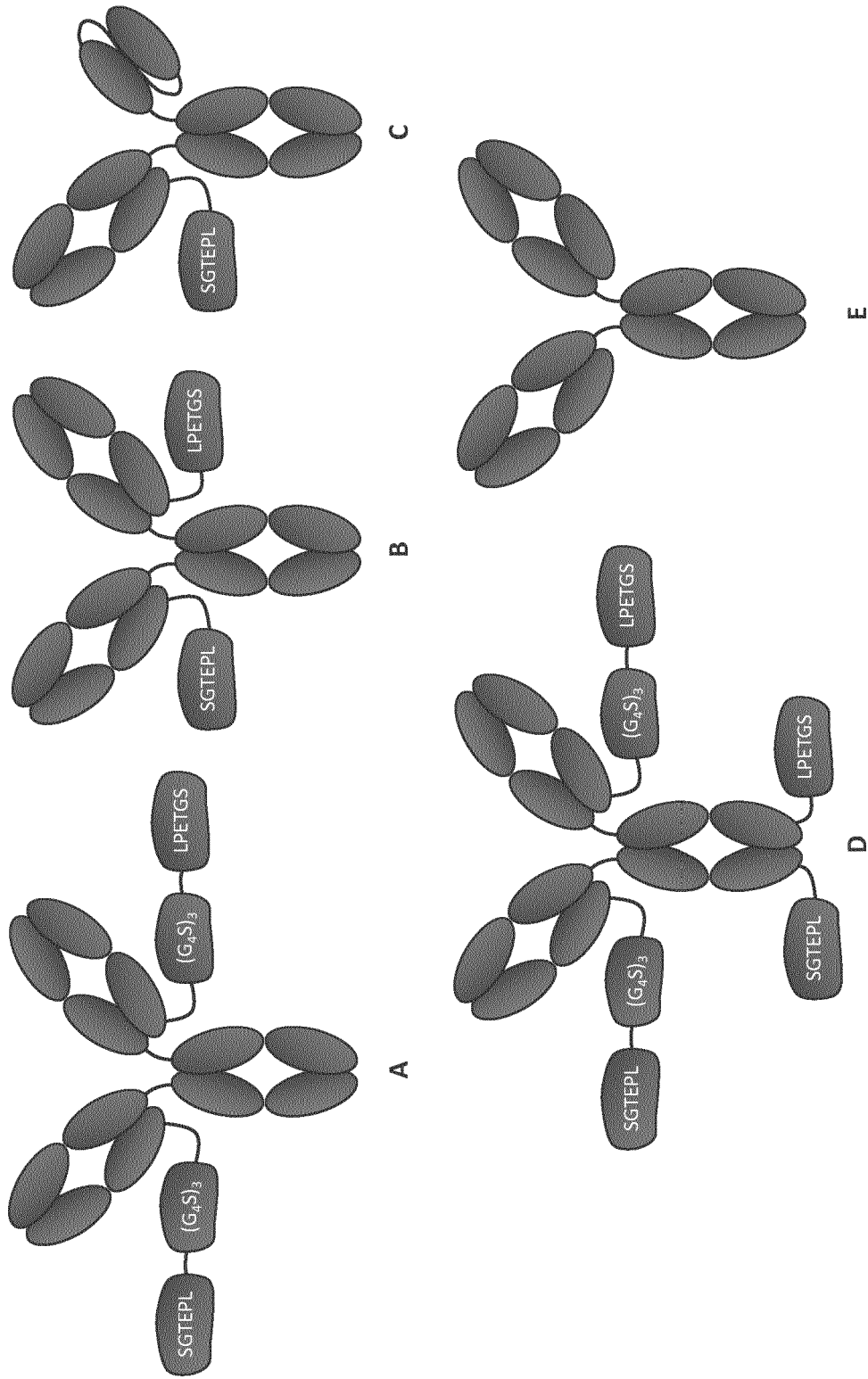


图 1

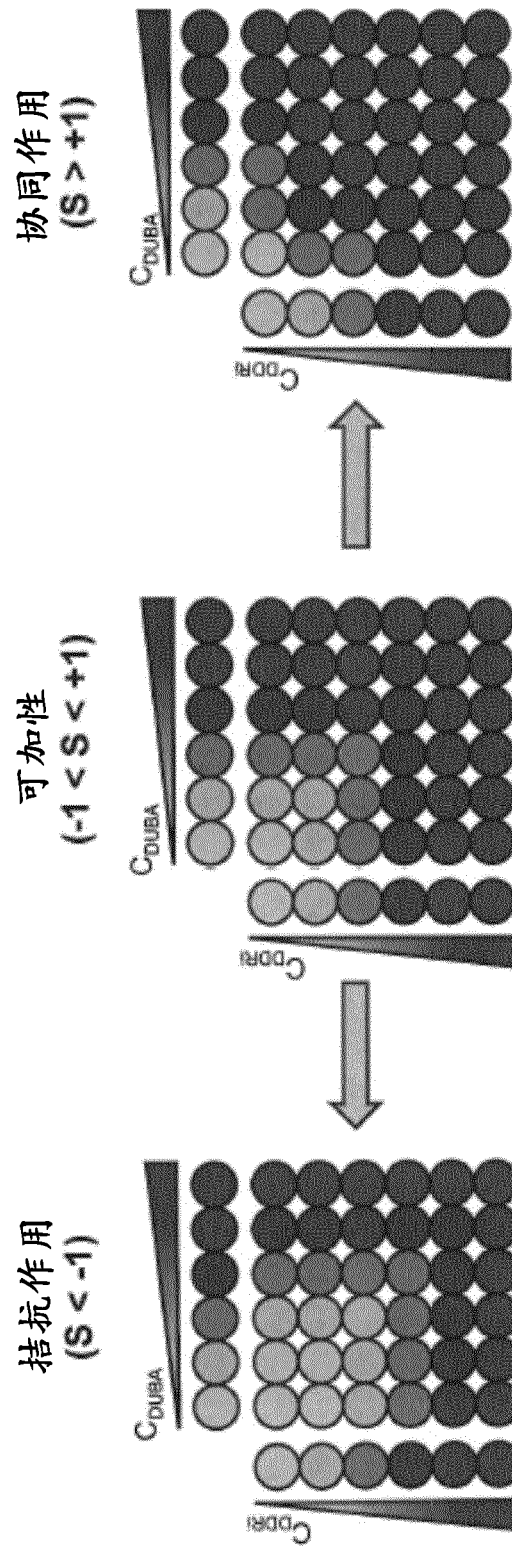


图 2

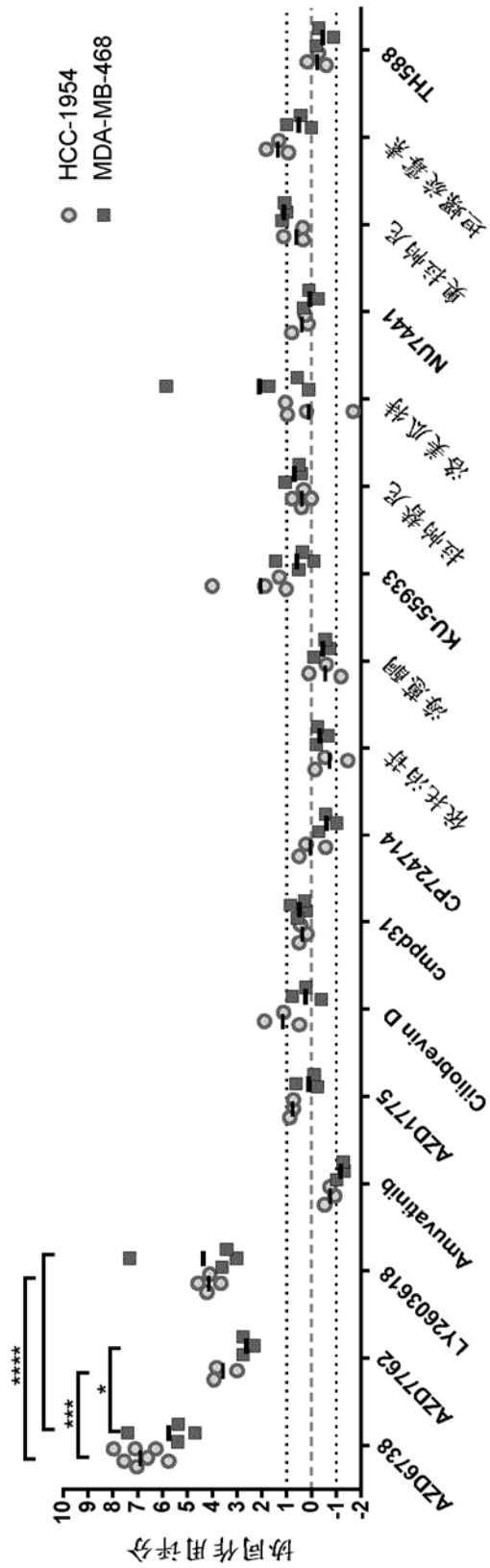


图 3

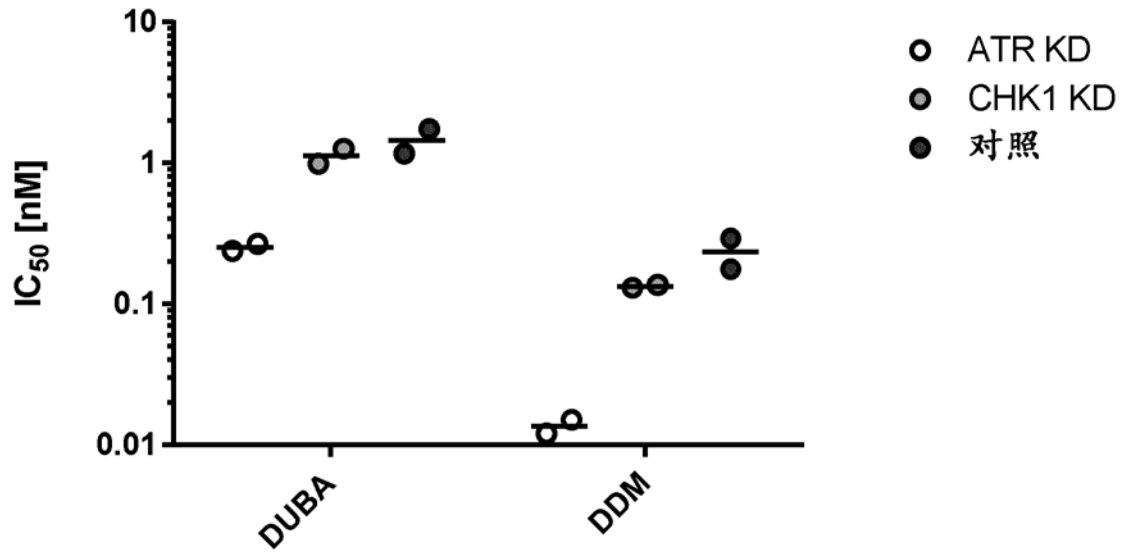


图 4

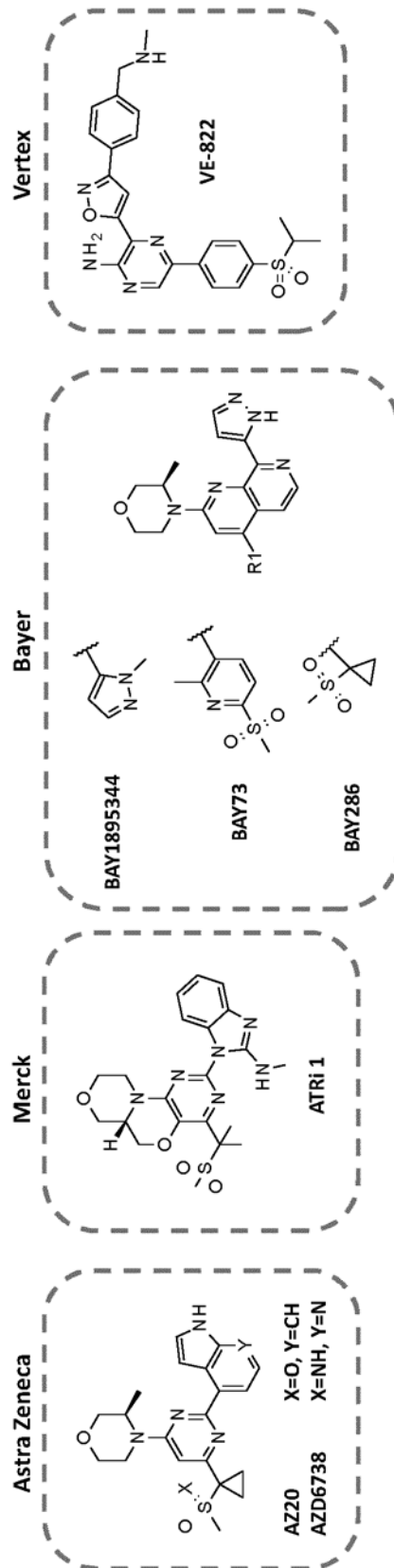


图 5

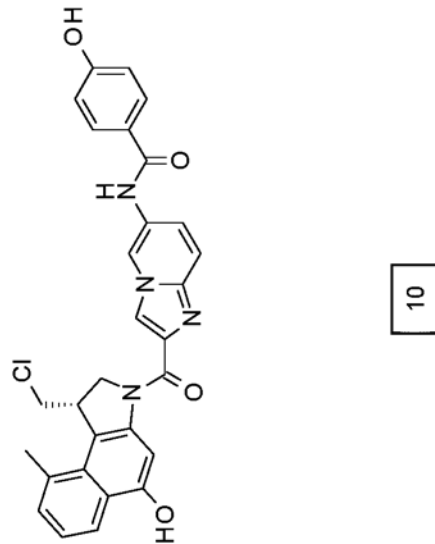
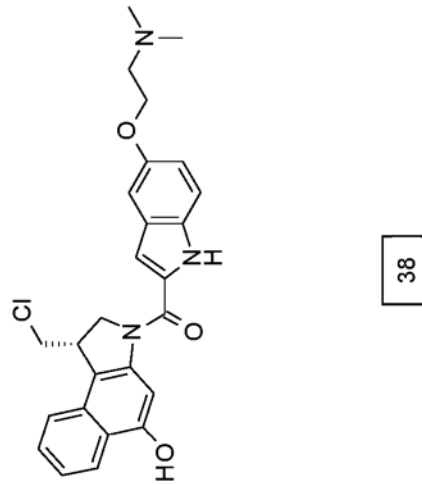
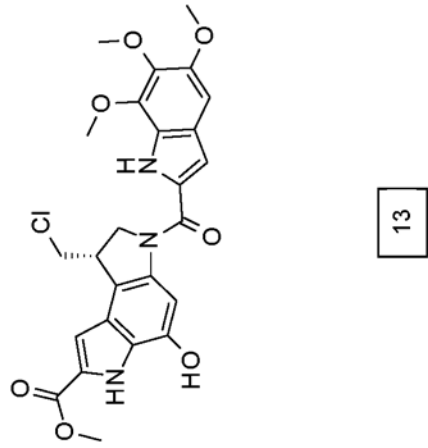


图 6

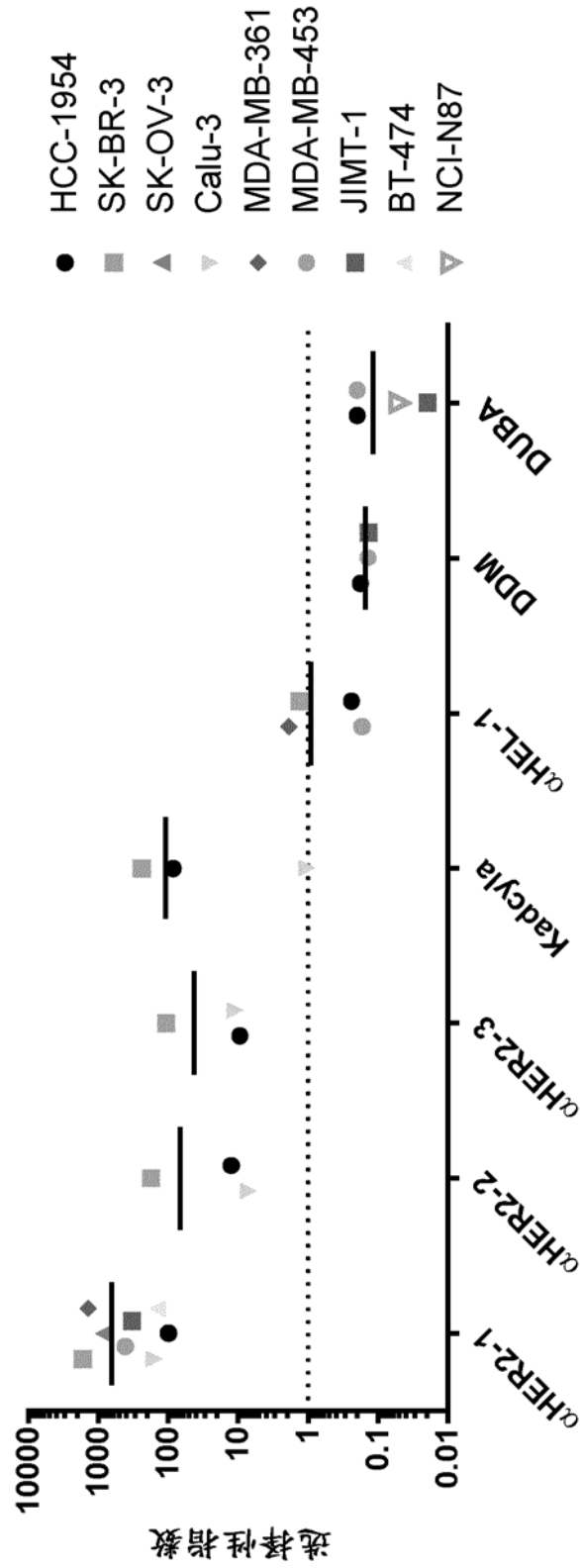


图 7

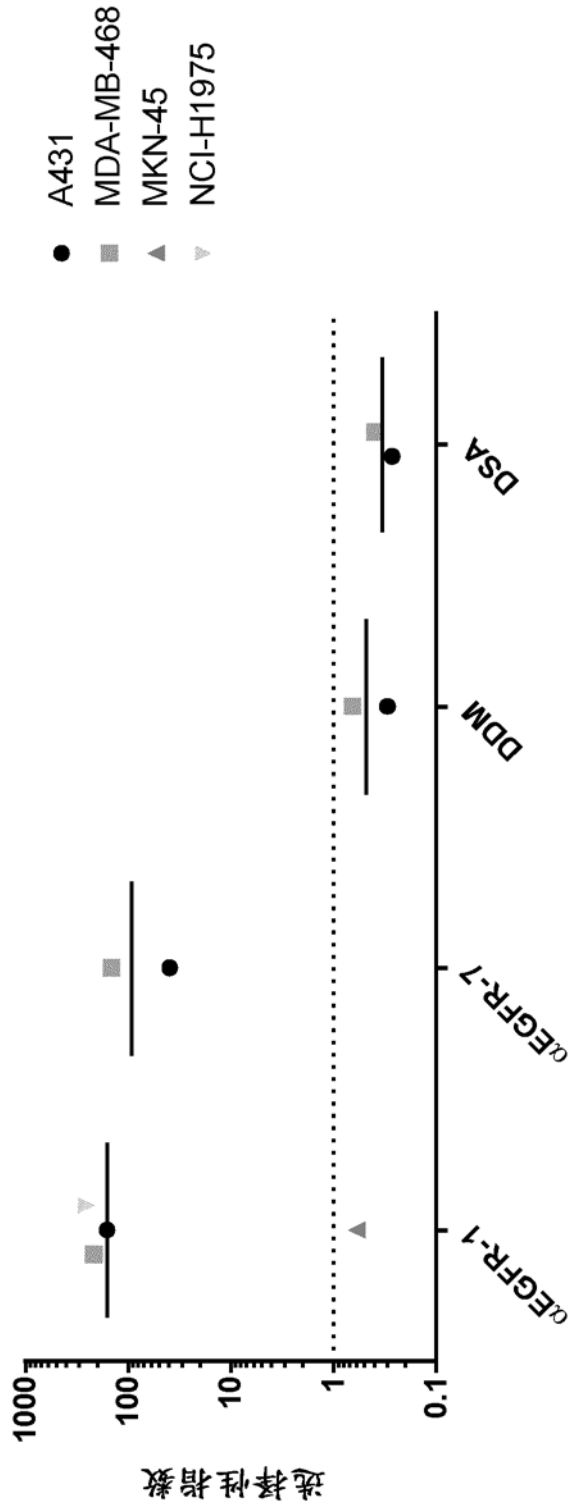


图 8

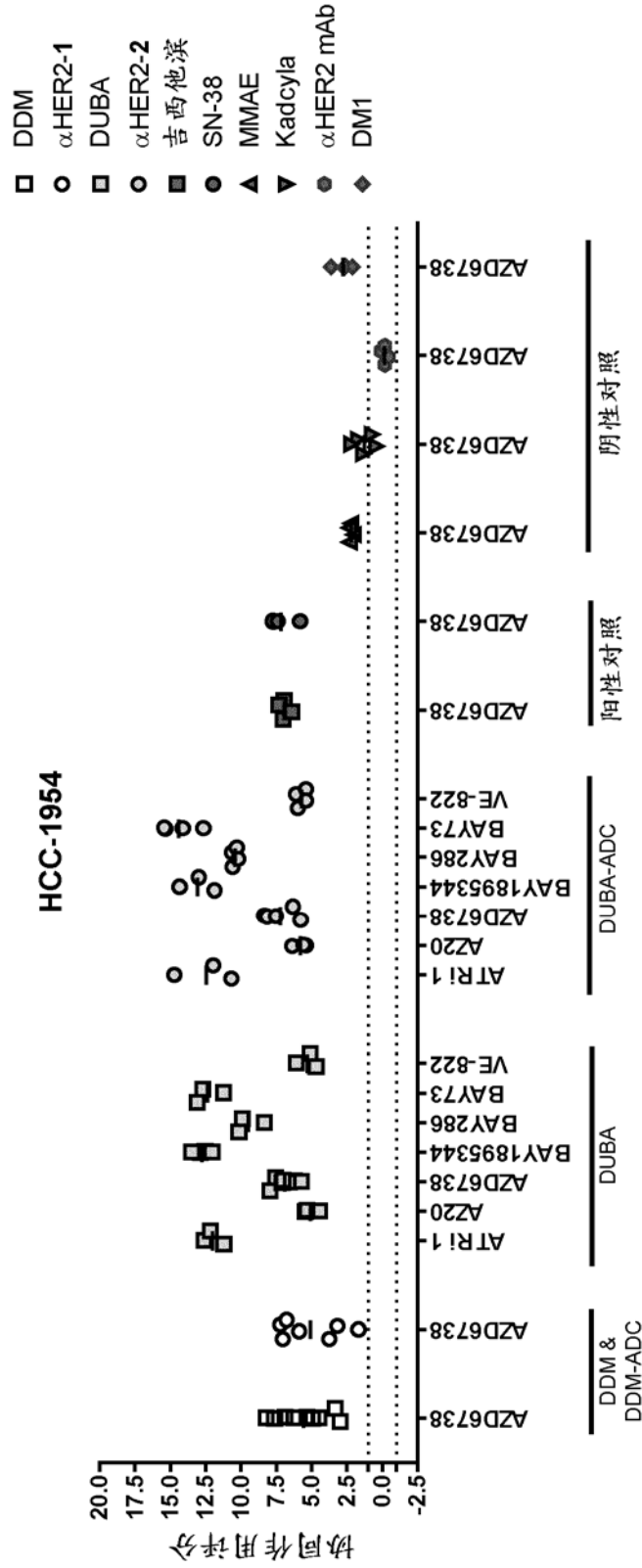


图 6

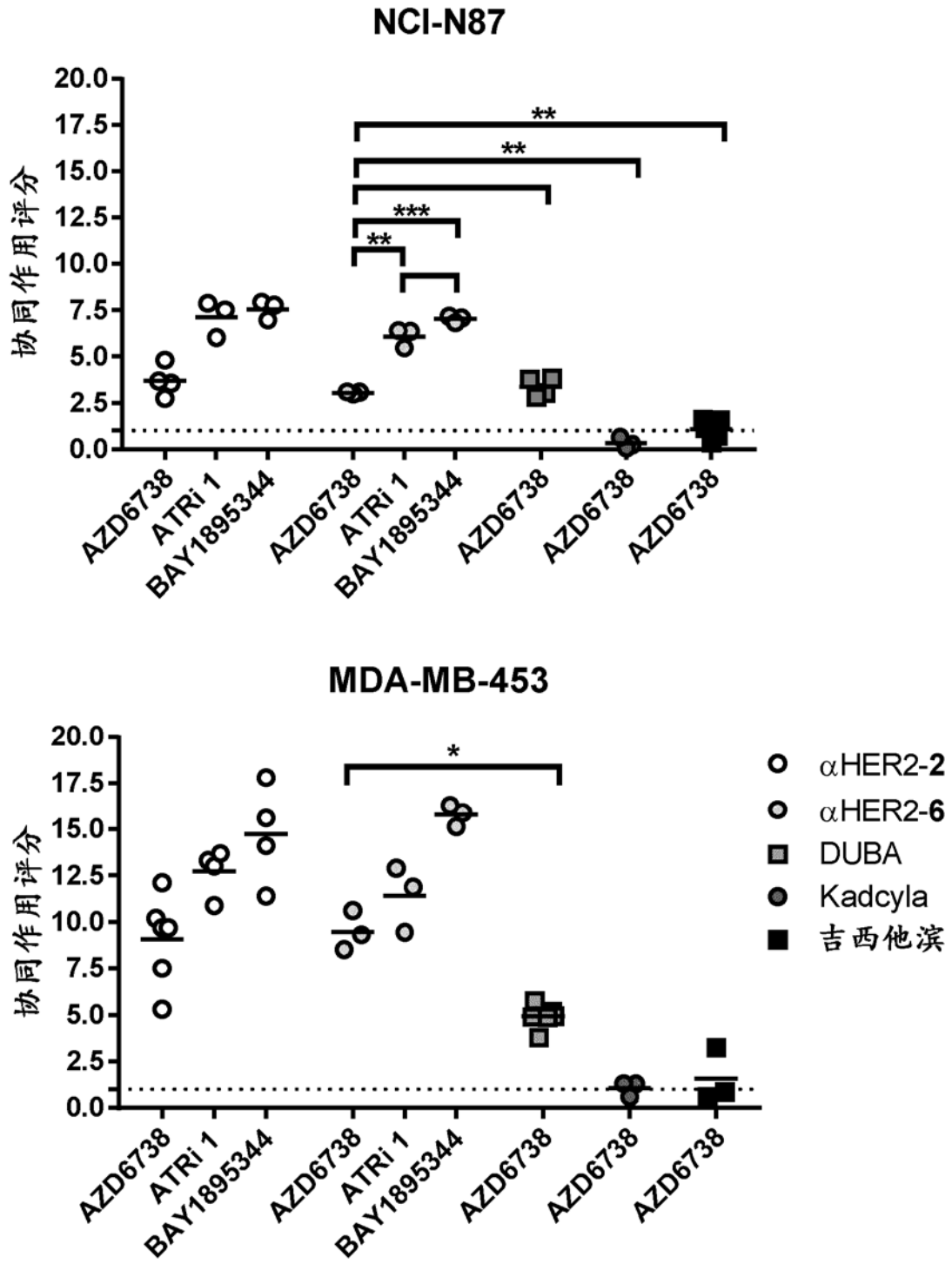


图 10

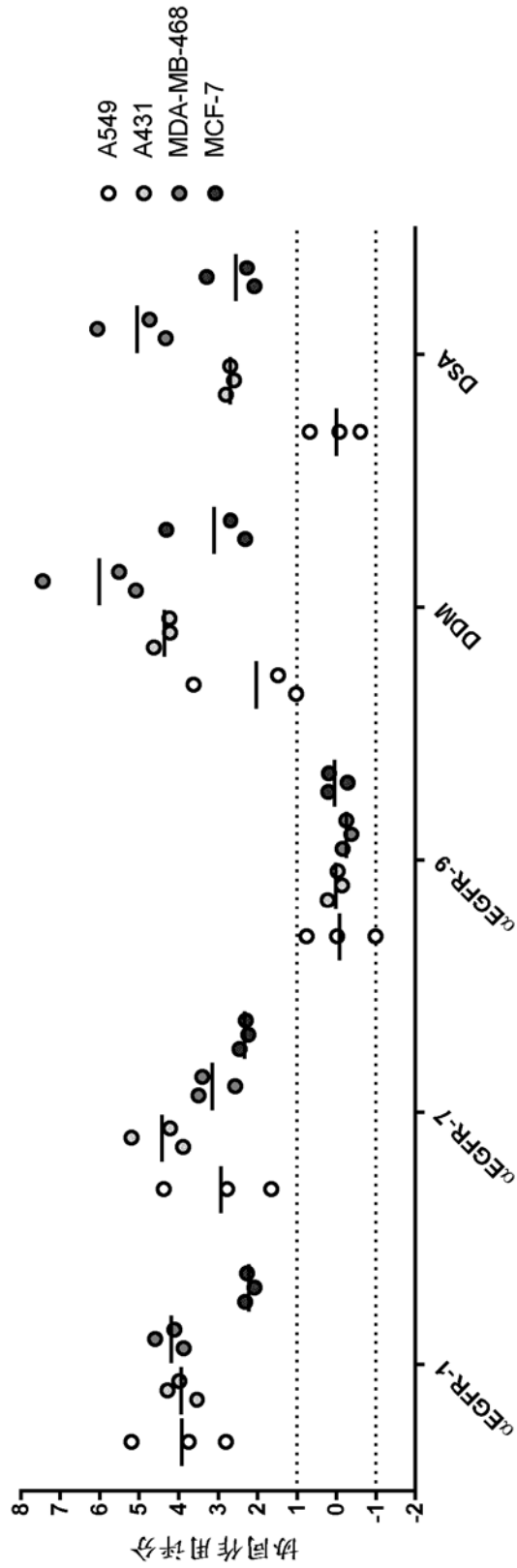


图 12

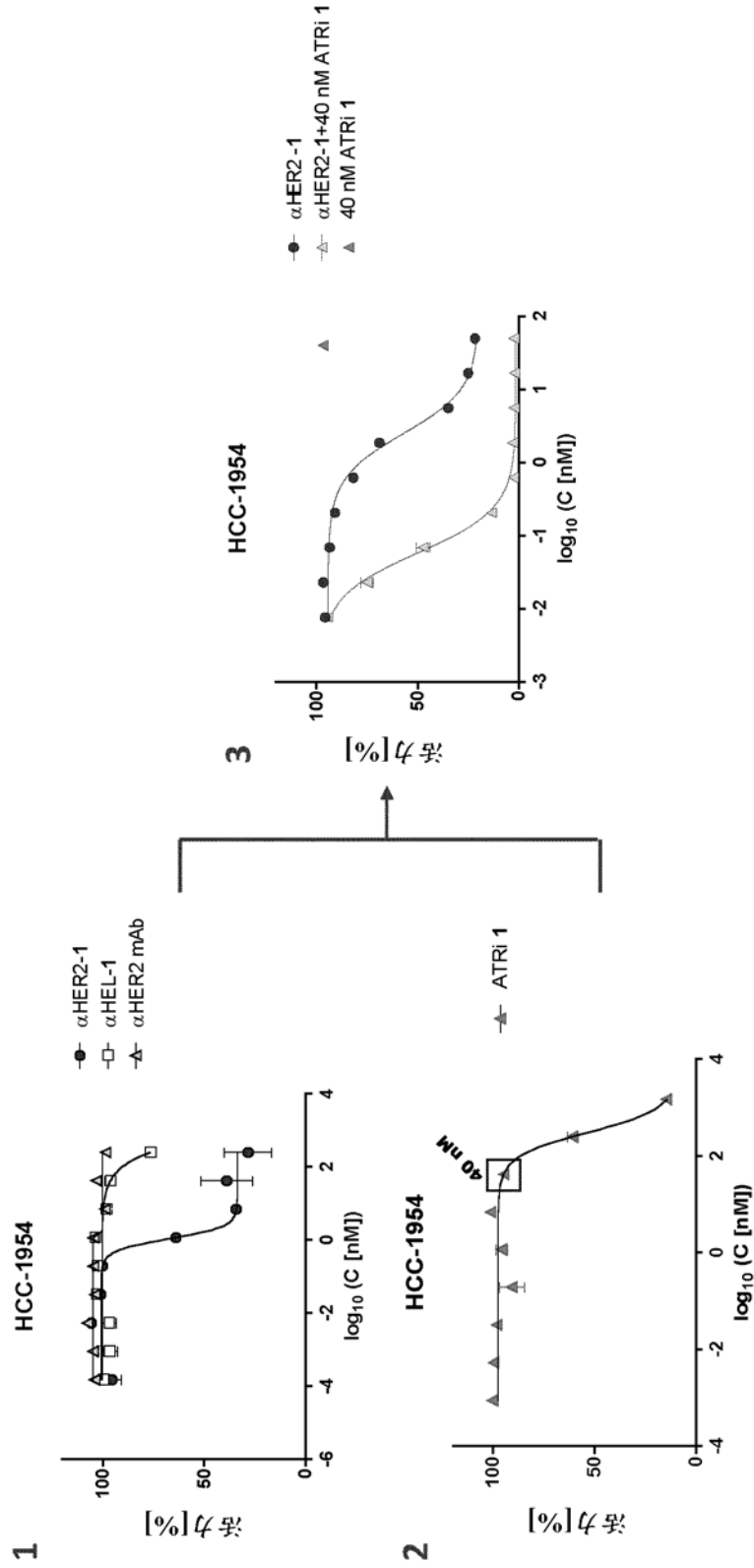


图 13

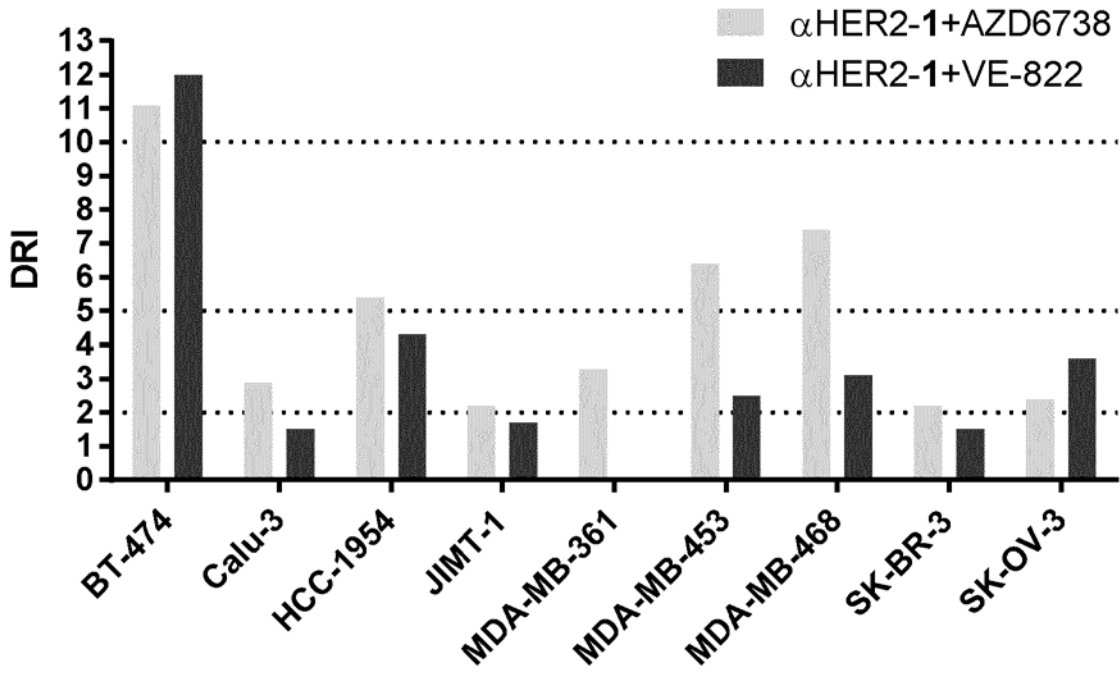


图 14

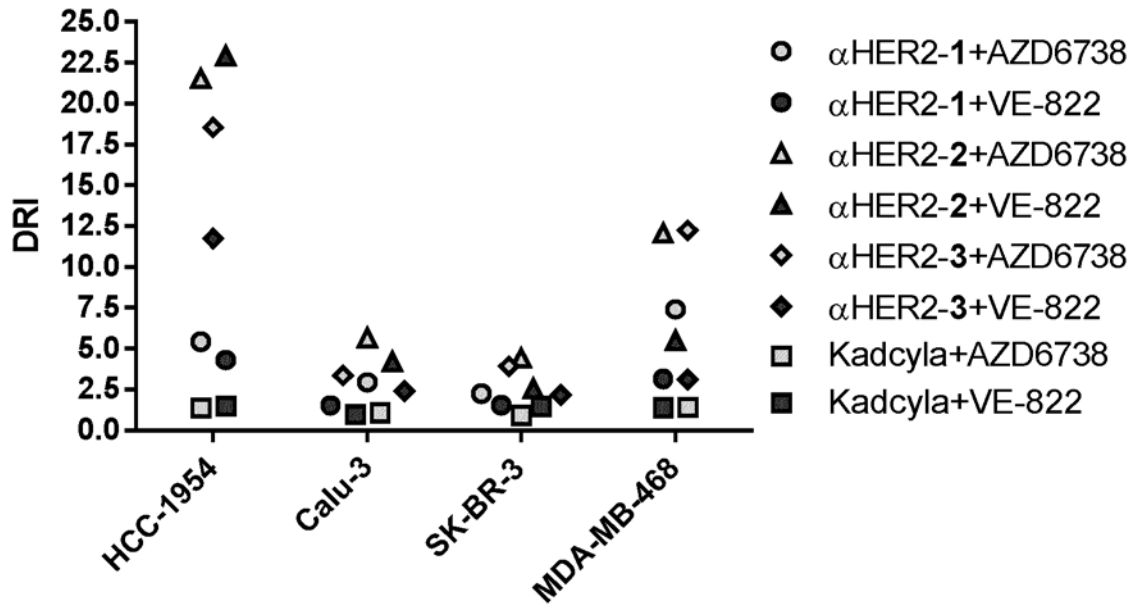
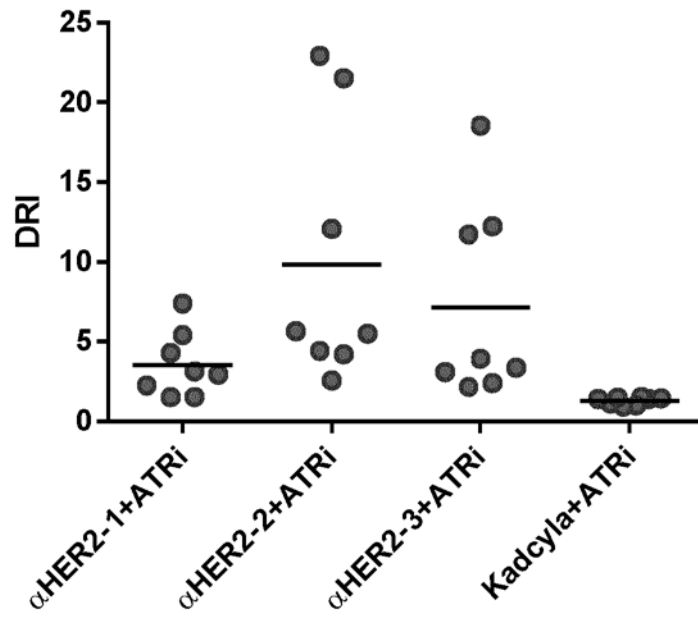


图 16

A



B

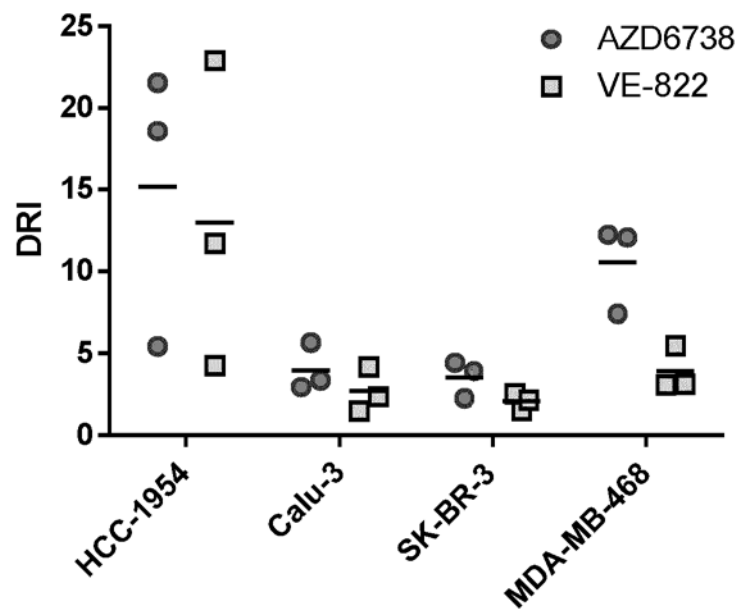


图 17

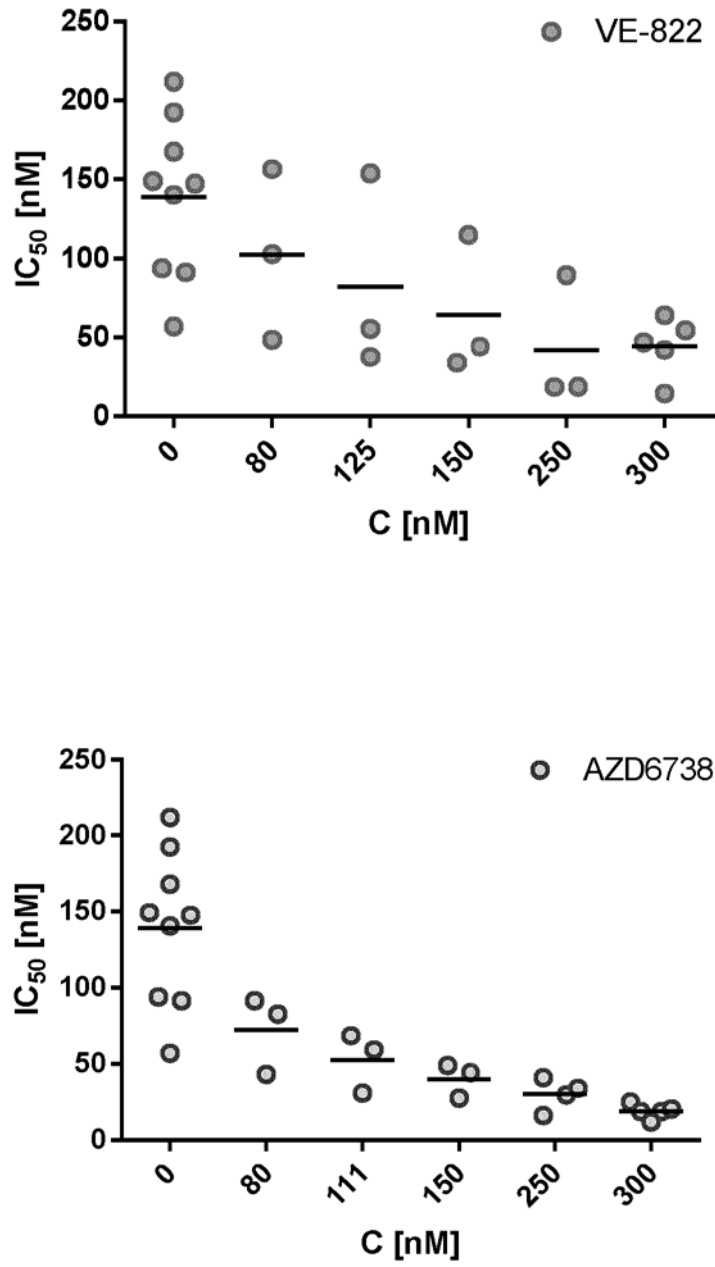


图 18

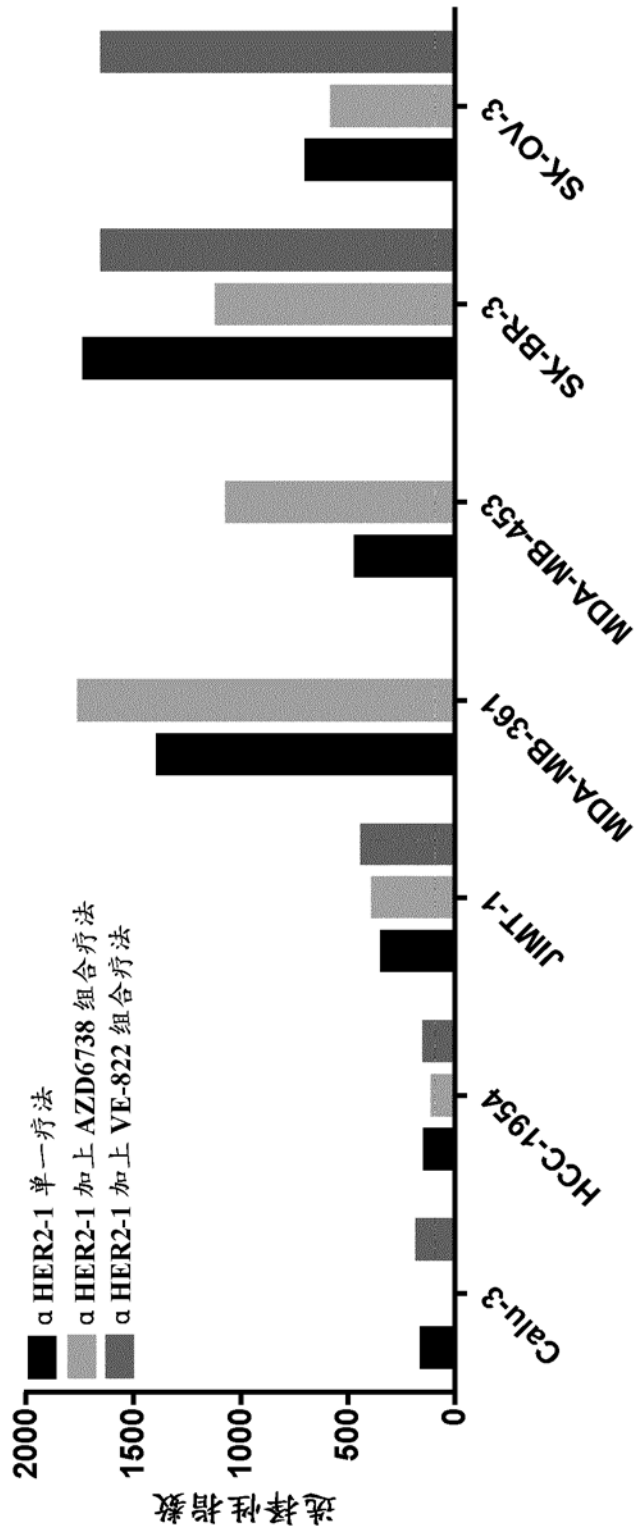


图 19

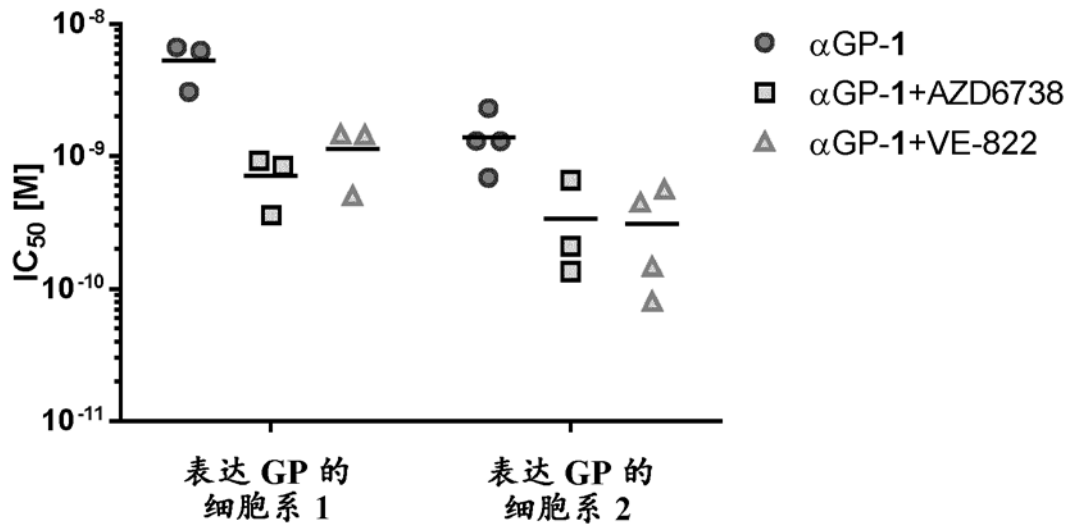


图 20

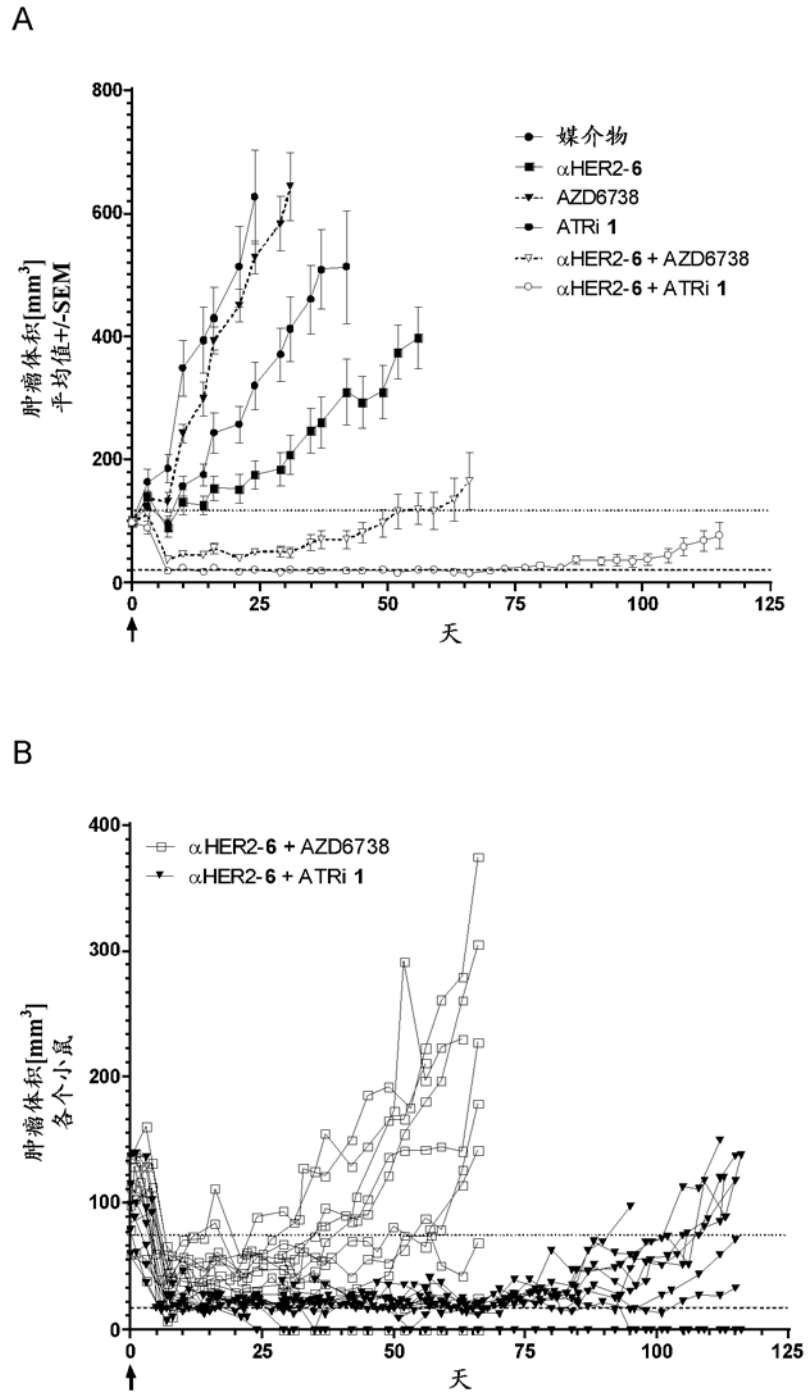


图 21

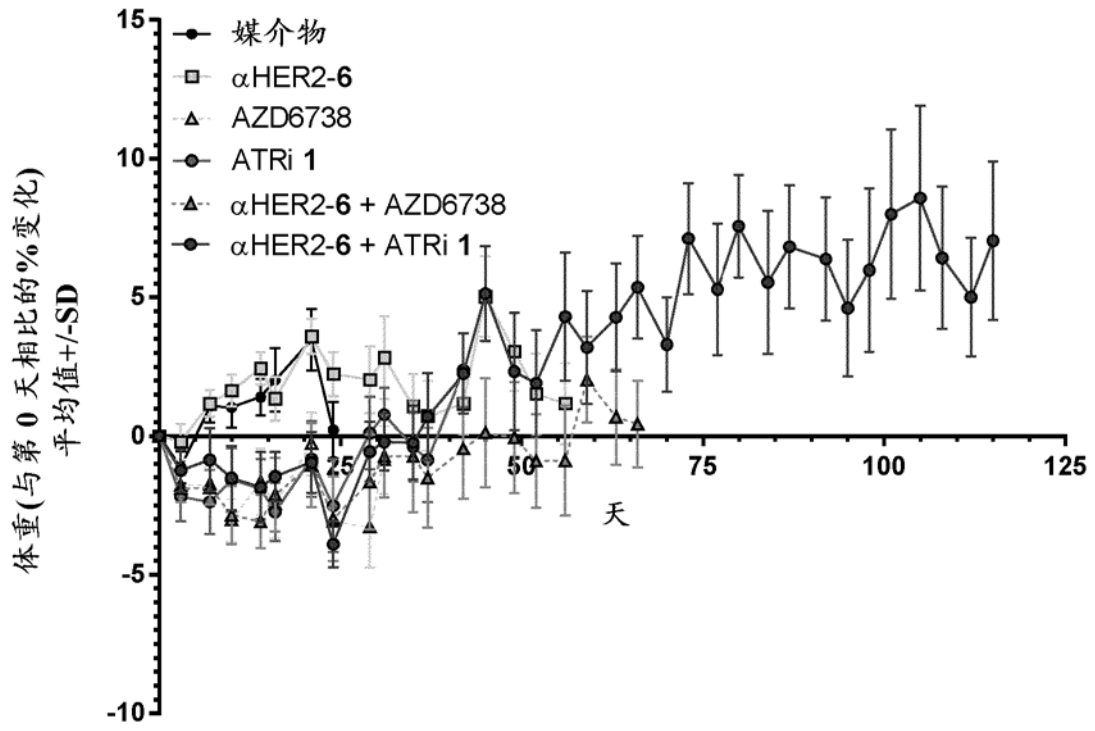


图 22

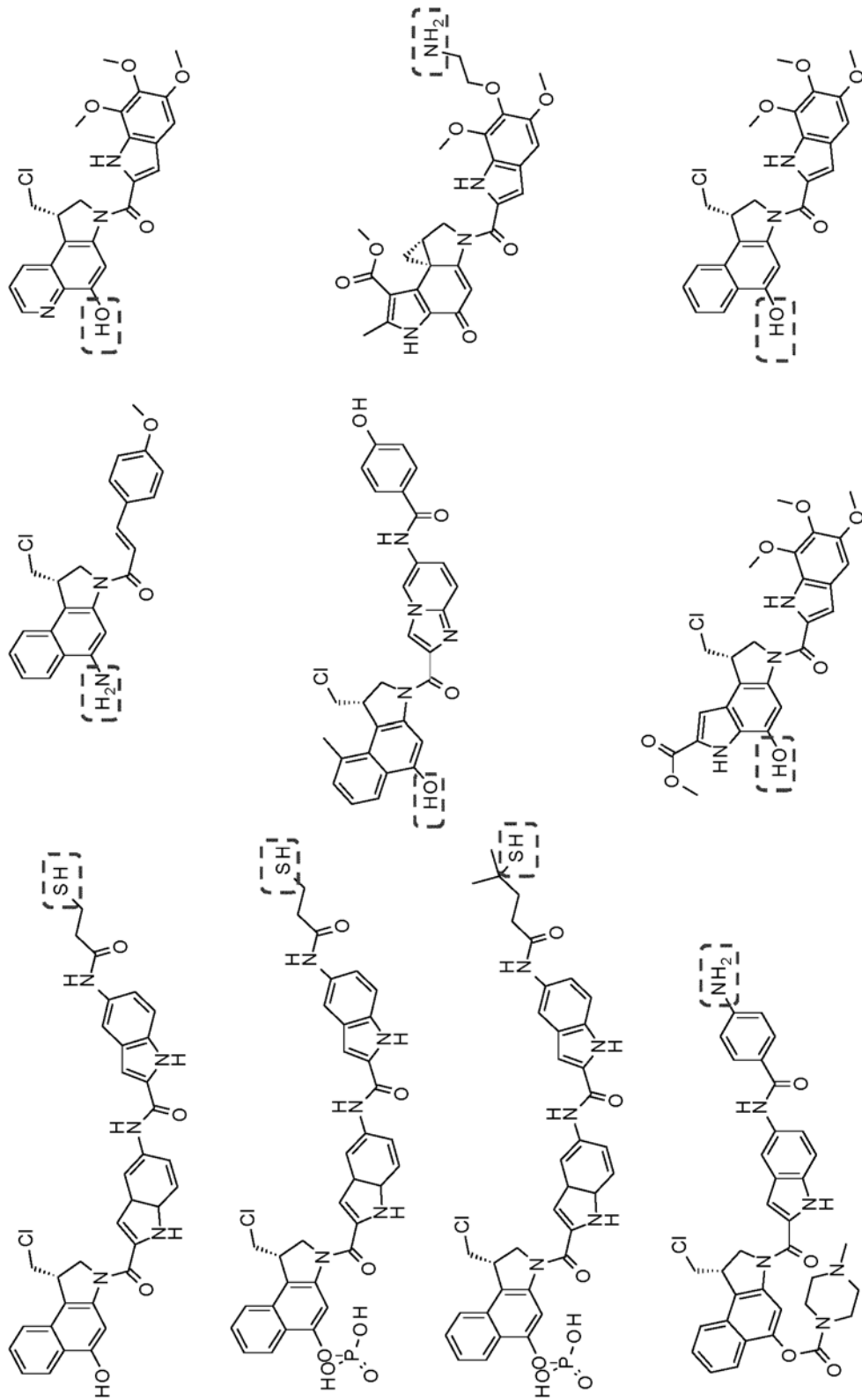


图 23