(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 119405832 A
(43)申请公布日 2025.02.11

(21)申请号 202411513187.5

(22)申请日 2019.05.31

(30)优先权数据
62/679,631 2018.06.01 US
62/679,672 2018.06.01 US
62/779,324 2018.12.13 US

(62)分案原申请数据
201980036786.3 2019.05.31

(71)申请人 卫材R&D管理有限公司
地址 日本东京都

(72)发明人 E·帕佐利 S·波纳米西 T·萨马拉科恩 S·普拉加帕蒂 N·菲什金 J·帕拉西诺 M·塞勒 P·朱 A·库克 P·史密斯 X·刘 S·埃勒里 D·雷诺尔德斯 L·于 Z·吴 S·彭 N·卡兰德拉 M·希恩 Y·肖

(74)专利代理机构 北京市金杜律师事务所 11256
专利代理师 牛蔚然

(51)Int.Cl.
A61K 47/68(2017.01)
A61K 31/496(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)

权利要求书1页 说明书349页 附图34页

(54)发明名称

剪接调节抗体-药物缀合物及其使用方法

(57)摘要

本申请涉及剪接调节抗体-药物缀合物及其使用方法。披露了结合至人肿瘤靶标的接头-药物化合物和抗体-药物缀合物。这些接头-药物化合物和抗体-药物缀合物包含剪接调节剂药物部分。本披露进一步涉及通过施用本文所提供的抗体-药物缀合物而用于治疗赘生性病症的方法和组合物。在一些实施例中,该剪接调节剂包含普拉二烯内酯或普拉二烯内酯衍生物。

CN 119405832 A

1.一种具有式(I)的抗体-药物缀合物,

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

其中

Ab是靶向赘生性细胞的抗体或抗原结合片段;

D是D2;

L是将Ab共价连接至D的接头;并且

p是1至15的整数。

2.如权利要求1所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段靶向表达HER2的细胞。

3.如权利要求2所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段是抗HER2抗体或抗原结合片段。

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

5.如权利要求2至4中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:19的氨基酸序列的重链可变区和含有SEQ ID NO:20的氨基酸序列的轻链可变区。

6.如权利要求2至5中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段包含人IgG1重链恒定区。

7.如权利要求2至6中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段包含人Igκ轻链恒定区。

8.如权利要求1所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段靶向表达CD138的细胞。

9.如权利要求8所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段是抗CD138抗体或抗原结合片段。

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

剪接调节抗体-药物缀合物及其使用方法

[0001] 本申请是申请日为2019年5月31日、发明名称为“剪接调节抗体-药物缀合物及其使用方法”的中国发明专利申请No.201980036786.3(PCT申请号为PCT/US2019/035015)的分案申请。

[0002] 本披露要求以下项的优先权权益:2018年6月1日提交的美国临时专利申请号62/679,672;2018年6月1日提交的美国临时专利申请号62/679,631;以及2018年12月13日提交的美国临时专利申请号62/779,324;前述所有申请均通过引用以全文引用并入本文。

[0003] 本披露涉及抗体-药物缀合物(ADC),其包含剪接调节剂和结合人肿瘤学抗原靶标的抗体或其抗原结合片段。本披露进一步涉及可用于治疗或诊断癌症的方法和组合物,以及制备这些组合物的方法,所述癌症表达靶抗原和/或适合于通过破坏RNA剪接进行治疗。

[0004] 人类基因组中的大多数蛋白质编码基因是由内含子(非编码区)隔开的多个外显子(编码区)构成。基因表达产生单一前体信使RNA(pre-mRNA)。随后,通过称为剪接的方法从pre-mRNA移除内含子序列,产生成熟信使RNA(mRNA)。通过包括不同外显子组合,可变剪接产生编码不同蛋白质异形体的mRNA。

[0005] RNA剪接由剪接体催化,剪接体是由五个核内小RNA(snRNA U1、U2、U4、U5及U6)及相关蛋白构成的动态多蛋白质-RNA复合体。该剪接体组装在pre-mRNA上以建立催化内含子的切除和外显子的连接的多种RNA和蛋白质相互作用的动态级联(Matera和Wang(2014)Nat Rev Mol Cell Biol.[自然分子细胞生物学评论]15(2):108-21)。越来越多的证据已将人类疾病与影响许多基因的RNA剪接的调节异常联系起来(Scotti和Swanson(2016)Nat Rev Genet.[遗传学自然评论]17(1):19-32)。

[0006] 剪接体是癌症生物学中的重要靶标。若干研究现已证明癌细胞剪接谱以及剪接因子本身的显著变化(Agrawal等人(2018)Curr Opin Genet Dev.[遗传学与发育新见]48:67-74)。可变剪接会引起不同的外显子包含/排除、内含子保留或隐蔽剪接位点的使用(Seiler等人(2018)Cell Rep.[细胞报告]23(1):282-296)。总而言之,这些事件造成功能变化,功能变化可引起肿瘤发生或对治疗的抗性(Siegfried和Karni(2018)Curr Opin Genet Dev.[遗传学与发育新见]48:16-21)。

[0007] 某些天然产物可以结合SF3b剪接体复合物。这些小分子通过促进内含子保留和/或外显子跳跃来调节剪接(Teng等人(2017)Nat Commun.[自然通讯]8:15522)。所得的转录物中有很大一部分含有提前终止密码子,触发了无义介导的mRNA衰变(NMD)。另外,由于典型剪接受损,典型转录物大幅减少,这可能不利地影响细胞功能和活力。出于这个原因,剪接调节剂已经成为用于治疗癌症的一类颇具前景的药物(Puthenveetil等人(2016)Bioconjugate Chem.[生物共轭化学]27:1880-8)。

[0008] 原癌基因人表皮生长因子受体2(HER2)编码跨膜酪氨酸激酶受体,该跨膜酪氨酸激酶受体属于人表皮生长因子受体(EGFR)家族(King等人(1985)Science[科学]229:974-6)。HER2的过度表达能够组成性激活生长因子信号传导途径,如PI3K-AKT-mTOR途径,并由此用作若干癌症类型(包括约20%的浸润性乳腺癌)的致癌驱动子(Slamon等人(1989)Science[科学]244:707-12;Gajria和Chandarlapaty(2011)Expert Rev Anticancer

Ther.[抗癌治疗专家评论]11:263-75)。鉴于HER2扩增介导转化的表型,且由于HER2表达主要局限于恶性细胞,所以HER2是一种用于靶向某些癌症和/或递送新颖癌症治疗的颇具前景的抗原(Parakh等人(2017)Cancer Treat Rev.[癌症治疗评论]59:1-21)。靶向递送癌症疗法的额外抗原包括但不限于CD138(又称为多配体聚糖-1)和肝配蛋白A型受体2(EPHA2)。

[0009] CD138是一种细胞表面硫酸乙酰肝素蛋白聚糖,其是维持细胞形态以及与周围微环境相互作用必不可少的(Akl等人(2015)Oncotarget[肿瘤靶标]6(30):28693-715;Szatmári等人(2015)Dis Markers[疾病标志物]2015:796052)。通常,癌细胞中CD138表达的损失降低了细胞对细胞外基质的粘附并增强了细胞运动性和侵袭性(Teng等人(2012)Matrix Biol.[基质生物学]31:3-16)。基质CD138表达增加还改变了纤连蛋白的产生和细胞外基质的组织(Yang等人(2011)Am J Pathol.[美国病理学杂志]178:325-35)。另外,基质纤维母细胞中CD138的表达增加与血管生成和癌症进展相关(Maeda等人(2006)Oncogene[癌基因]25:1408-12)。在B细胞发育期间,CD138表达增加,且其存在是浆细胞的标志(Ribatti(2017)Immunol Lett.[免疫学快报]188:64-7)。CD138表达在多发性骨髓瘤(浆细胞的恶性肿瘤)中得以维持。因此,CD138是靶向治疗若干癌症以及其他血液恶性病的引人注目的抗原(Sherbenou等人(2015)Blood Rev.[血液评论]29(2):81-91;Wijdenes等人(1996)Br J Haematol.[英国血液杂志]94(2):318-23)。

[0010] EPHA2是一种在若干恶性癌症源性细胞系和晚期癌症形式中大量过度表达的跨膜醣蛋白(Wykosky和Debinski(2008)Mol Cancer Ref.[分子癌症研究]6(12):1795-1806)。例如,EPHA2在约61%的GBM患者肿瘤(Wykosky等人(2008)Clin Cancer Res.[临床癌症研究]14:199-208)、76%的卵巢癌(Thaker等人(2004)Clin Cancer Res.[临床癌症研究]10:5145-50)和85%的前列腺腺癌(Zeng等人(2003)Am J Pathol.[美国病理学杂志]163:2271-6)中强烈过度表达。就患者肿瘤的百分比和肿瘤内细胞的百分比而言,EPHA2蛋白高度过度表达,并且其是可在配体结合时内化的质膜定位的受体(Walker-Daniels等人(2002)Mol Cancer Res.[分子癌症研究]1:79-87)。另外,EPHA2的表达与预后不良、转移增加和存活率降低相关。因此,EPHA2因其表达模式、定位和在癌症患者的结果中的功能重要性而成为靶向递送新颖抗癌疗法的另一引人注目的抗原。

[0011] 在不同实施例中,本披露部分地提供了对赘生性细胞具有生物活性的新颖化合物。这些化合物可减慢、抑制和/或逆转哺乳动物中的肿瘤生长,且可用于治疗人类癌症患者。在不同实施例中,本披露提供了采用这些新颖化合物或其他功能性剪接抑制剂分子的新颖抗体-药物缀合物。

[0012] 更具体而言,在不同实施例中,本披露涉及能够结合并杀伤赘生性细胞的抗体-药物缀合物(ADC)复合物。在不同实施例中,本文所披露的ADC复合物包含将剪接调节剂连接至全长抗体或抗原结合片段的接头。在不同实施例中,这些ADC复合物还能够在结合之后内化到靶细胞中。

[0013] 在不同实施例中,ADC复合物可由式(I)表示:

[0014] $Ab-(L-D)_p$ (I)

[0015] 其中Ab是靶向赘生性细胞或另一肿瘤相关靶标的抗体或其抗原结合片段;

[0016] D是剪接调节剂;

[0017] L是将Ab共价连接至D的接头;并且

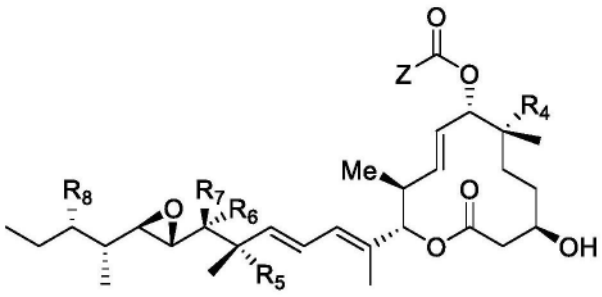
[0018] p是1至15的整数。

[0019] 在不同实施例中,ADC复合物可由式(I)表示:

[0020] $Ab-(L-D)_p$ (I)

[0021] 其中Ab是靶向赘生性细胞的抗体或其抗原结合片段;

[0022] D是具有式(II)的剪接调节剂:

[0023]  (II),或其药学上可接受的盐,其中:

[0024] R^1选自不存在、氢、C_1-C_6烷基基团、C_1-C_6烷基烷氧基基团、C_1-C_6烷基氨基基团、C_1-C_6烷基羧酸基团、C_1-C_6烷基羟基基团、C_3-C_8环烷基基团、苄基基团、C_3-C_8杂环基基团、-O-C(=O)-(C_1-C_6烷基)基团和-CD_3;

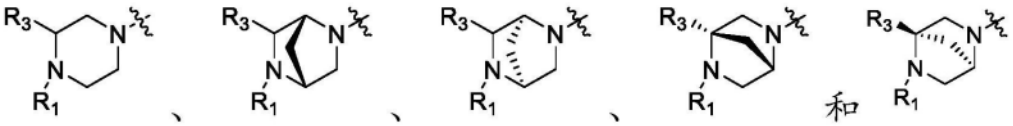
[0025] R^3选自氢、C_1-C_6烷基基团、C_1-C_6烷基烷氧基基团、C_1-C_6烷基氨基基团、C_1-C_6烷基羧酸基团、C_1-C_6烷基羟基基团、C_3-C_8环烷基基团、苄基基团、C_3-C_8杂环基基团和-O-C(=O)-(C_1-C_6烷基)基团;并且

[0026] R^4、R^5和R^8各自独立地选自氢、羟基基团、-O-(C_1-C_6烷基)基团、-O-C(=O)-(C_1-C_6烷基)基团和C_1-C_6烷基基团;

[0027] R^6和R^7各自独立地选自氢、-O-R^{17}、-O-C(=O)-R^{17}、-O-C(=O)-$NR^{15}R^{16}$、C_1-C_6烷基基团和-$NR^{15}R^{16}$;

[0028] R^{15}和R^{16}各自独立地选自氢、R^{17}、-C(=O)-R^{17}和-C(=O)-O-R^{17};

[0029] R^{17}选自氢、C_1-C_6烷基基团、C_3-C_8环烷基基团、苄基基团和C_3-C_8杂环基基团;并且

[0030] Z选自  ;

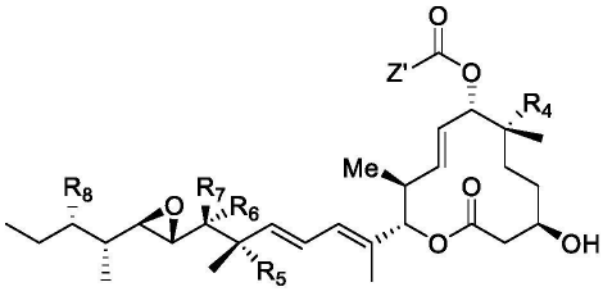
[0031] 其中R^1、R^3、R^4、R^5、R^6、R^7、R^8、R^{15}、R^{16}和R^{17}各自独立地被0至3个独立地选自以下的基团取代:卤素、羟基基团、C_1-C_6烷基基团、-O-(C_1-C_6烷基)基团、-$NR^{15}R^{16}$、C_3-C_8环烷基基团、C_1-C_6烷基羟基基团、C_1-C_6烷基烷氧基基团、苄基基团和C_3-C_8杂环基基团,

[0032] 其中R^6和R^7中至少一个是氢;

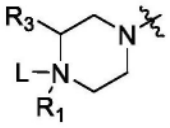
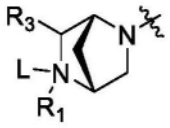
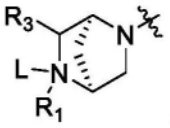
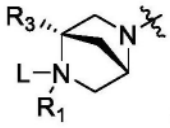
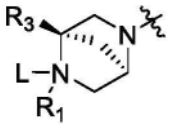
[0033] 并且其中L是将Ab共价连接至D的接头;并且

[0034] p是1至15的整数。

[0035] 在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段能够内化至靶细胞中。在一些实施例中,该接头共价连接至式(II)的剪接调节剂("L-D"),且L-D具有式(II-A)的结构:

[0036]  或其药学上可接受的盐，

(II-A)，

[0037] 其中Z'选自  、  、  、  和  并且；

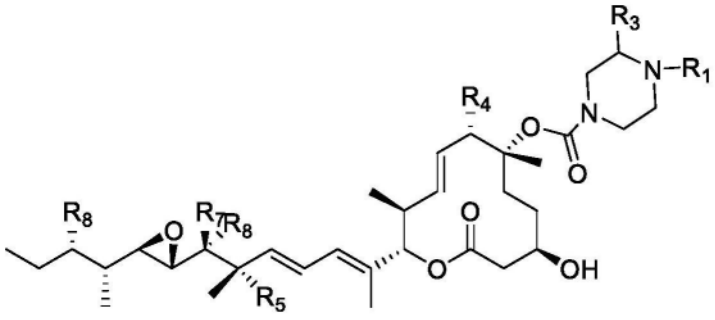
[0038] 其中所有其他变量是如关于式(II)所定义。

[0039] 在各种其他实施例中,ADC复合物可由式(I)表示：

[0040] $Ab-(L-D)_p$ (I)

[0041] 其中Ab是靶向赘生性细胞的抗体或其抗原结合片段；

[0042] D是具有式(IV)的剪接调节剂：

[0043]  或其药学上可接受

(IV)，

的盐,其中：

[0044] R^1选自氢、C_1-C_6烷基基团、C_1-C_6烷基烷氧基基团、C_1-C_6烷基氨基基团、C_1-C_6烷基羧酸基团、C_1-C_6烷基羟基基团、C_3-C_8环烷基基团、苄基基团、C_3-C_8杂环基基团、-O-C(=O)-(C_1-C_6烷基)基团和-CD_3；

[0045] R^3选自氢、C_1-C_6烷基基团、C_1-C_6烷基烷氧基基团、C_1-C_6烷基氨基基团、C_1-C_6烷基羧酸基团、C_1-C_6烷基羟基基团、C_3-C_8环烷基基团、苄基基团、C_3-C_8杂环基基团和-O-C(=O)-(C_1-C_6烷基)基团；并且

[0046] R^4、R^5和R^8各自独立地选自氢、羟基基团、-O-(C_1-C_6烷基)基团、-O-C(=O)-(C_1-C_6烷基)基团和C_1-C_6烷基基团；

[0047] R^6和R^7各自独立地选自氢、-O-R^{17}、-O-C(=O)-R^{17}、-O-C(=O)-$NR^{15}R^{16}$、C_1-C_6烷基基团和-$NR^{15}R^{16}$；

[0048] R^{15}和R^{16}各自独立地选自氢、R^{17}、-C(=O)-R^{17}和-C(=O)-O-R^{17}；并且

[0049] R^{17}选自氢、C_1-C_6烷基基团、C_3-C_8环烷基基团、苄基基团和C_3-C_8杂环基基团；

[0050] 其中R^1、R^3、R^4、R^5、R^6、R^7、R^8、R^{15}、R^{16}和R^{17}各自独立地被0至3个独立地选自以下的基

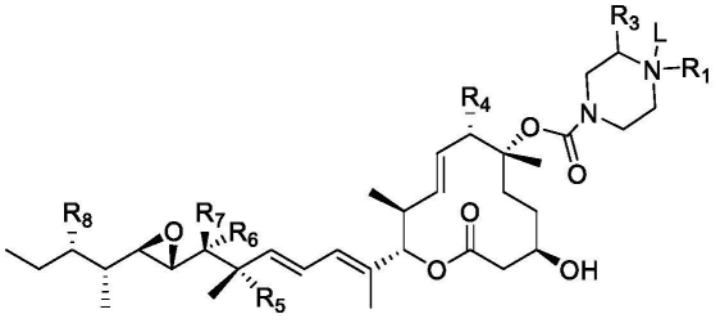
团取代:卤素、羟基基团、C1-C6烷基基团、-O-(C_1-C_6烷基)基团、-$NR^{15}R^{16}$、C_3-C_8环烷基基团、C_1-C_6烷基羟基基团、C_1-C_6烷基烷氧基基团、苄基基团和C_3-C_8杂环基基团,

[0051] 其中R^6和R^7中至少一个是氢;

[0052] 并且其中L是将Ab共价连接至D的接头;并且

[0053] p是1至15的整数。

[0054] 在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段能够内化至靶细胞中。在一些实施例中,该接头共价连接至剪接调节剂("L-D"),且L-D具有式(IV-A)的结构:

[0055]  (IV-A),

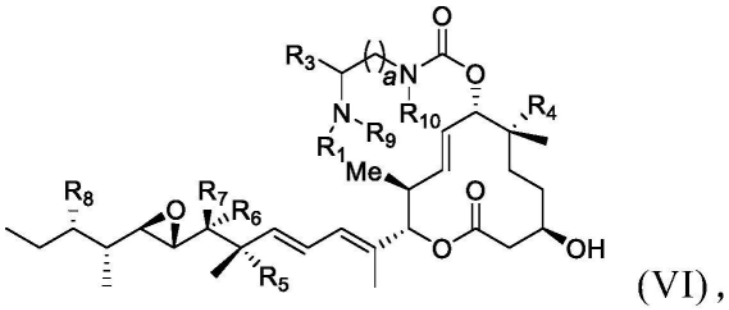
或其药学上可接受的盐。

[0056] 在各种其他实施例中,ADC复合物可由式(I)表示:

[0057] Ab-$(L\text{-}D)_p$ (I)

[0058] 其中Ab是靶向赘生性细胞的抗体或其抗原结合片段;

[0059] D是具有式(VI)的剪接调节剂:

[0060]  (VI),

或其药学上可接受的盐,其中:

[0061] R^1和R^9各自独立地选自氢、C_1-C_6烷基基团、C_1-C_6烷基烷氧基基团、C_1-C_6烷基氨基基团、C_1-C_6烷基羧酸基团、C_1-C_6烷基羟基基团、C_3-C_8环烷基基团、苄基基团、C_3-C_8杂环基基团、-O-C(=O)-(C_1-C_6烷基)基团和-CD_3;

[0062] R^3选自氢、C_1-C_6烷基基团、C_1-C_6烷基烷氧基基团、C_1-C_6烷基氨基基团、C_1-C_6烷基羧酸基团、C_1-C_6烷基羟基基团、C_3-C_8环烷基基团、苄基基团、C_3-C_8杂环基基团和-O-C(=O)-(C_1-C_6烷基)基团;

[0063] R^4、R^5和R^8各自独立地选自氢、羟基基团、-O-(C_1-C_6烷基)基团、-O-C(=O)-(C_1-C_6烷基)基团和C_1-C_6烷基基团;

[0064] R^6和R^7各自独立地选自氢、-O-R^{17}、-O-C(=O)-R^{17}、-O-C(=O)-$NR^{15}R^{16}$、C_1-C_6烷基基团、-$NR^{15}R^{16}$和接头;

[0065] R^{10}选自氢、C_1-C_6烷基基团、-C(=O)-(C_1-C_6烷基)基团和-CD_3;

[0066] R^{15}和R^{16}各自独立地选自氢、R^{17}、-C(=O)-R^{17}和

[0067] -C(=O)-O-R^{17};

[0068] R^{17}选自氢、C_1-C_6烷基基团、C_3-C_8环烷基基团、苄基基团和C_3-C_8杂环基基团;并且

[0069] a是1、2、3、4、5、6、7、8、9或10;

[0070] 其中R^1、R^3、R^4、R^5、R^6、R^7、R^8、R^9、R^{10}、R^{15}、R^{16}和R^{17}各自独立地被0至3个独立地选自以下的基团取代:卤素、羟基基团、C_1-C_6烷基基团、-O-(C_1-C_6烷基)基团、-$NR^{15}R^{16}$、C_3-C_8环烷基基团、C_1-C_6烷基羟基基团、C_1-C_6烷基烷氧基基团、苄基基团和C_3-C_8杂环基基团;

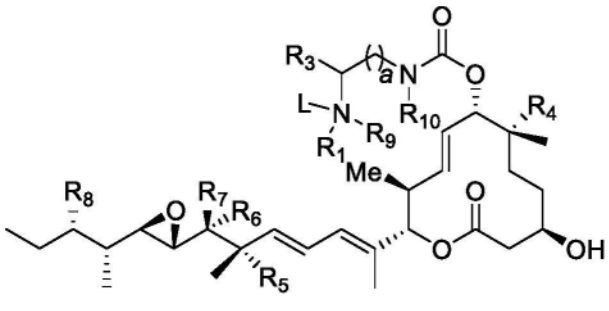
[0071] 其中R^6和R^7中至少一个是氢;并且

[0072] 其中R^1和R^9不能同时不存在;

[0073] 并且其中L是将Ab共价连接至D的接头;并且

[0074] p是1至15的整数。

[0075] 在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段能够内化至靶细胞中。在一些实施例中,该接头共价连接至剪接调节剂("L-D"),且L-D具有式(VI-A)的结构:

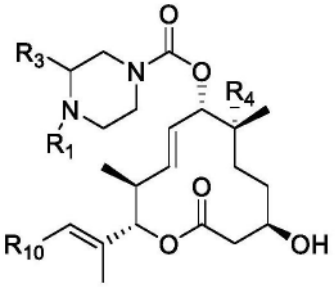
[0076]  (VI-A), 或其药学上可接受的盐。

[0077] 在各种其他实施例中,ADC复合物可由式(I)表示:

[0078] Ab-$(L\text{-}D)_p$ (I)

[0079] 其中Ab是靶向赘生性细胞的抗体或其抗原结合片段;

[0080] D是具有式(VIII)的剪接调节剂:

[0081]  (VIII), 或其药学上可接受的盐,其中:

[0082] R^1选自不存在、氢、C_1-C_6烷基基团、C_1-C_6烷基烷氧基基团、C_1-C_6烷基氨基基团、C_1-C_6烷基羧酸基团、C_1-C_6烷基羟基基团、C_3-C_8环烷基基团、苄基基团、C_3-C_8杂环基基团、-O-C(=O)-(C_1-C_6烷基)基团和-CD_3;

[0083] R^3选自氢、C_1-C_6烷基基团、C_1-C_6烷基烷氧基基团、C_1-C_6烷基氨基基团、C_1-C_6烷基羧酸基团、C_1-C_6烷基羟基基团、C_3-C_8环烷基基团、苄基基团、C_3-C_8杂环基基团和-O-C(=O)-(C_1-C_6烷基)基团;

[0084] R^4选自氢、羟基基团、-O-(C_1-C_6烷基)基团、-O-C(=O)-(C_1-C_6烷基)基团和C_1-C_6烷基基团;并且

[0085] R^{10}选自3至10元碳环和3至10元杂环,其各自被0至3个R^a取代,其中每个R^a独立地

选自卤素、C_1-C_6烷基基团、-O-(C_1-C_6)烷基基团、C_1-C_6烷基烷氧基基团、C_1-C_6烷基羟基基团、-S(=O)$_w$-(4至7元杂环)、4至7元碳环和4至7元杂环;

[0086] R^{15}和R^{16}各自独立地选自氢、R^{17}、-C(=O)-R^{17}和-C(=O)-O-R^{17};并且

[0087] R^{17}选自氢、C_1-C_6烷基基团、C_3-C_8环烷基基团、苄基基团和C_3-C_8杂环基基团;

[0088] 其中R^1、R^3、R^4、R^{10}、R^{15}、R^{16}和R^{17}各自独立地被0至3个独立地选自以下的基团取代:卤素、羟基基团、C_1-C_6烷基基团、-O-(C_1-C_6烷基)基团、-$NR^{15}R^{16}$、C_3-C_8环烷基基团、C_1-C_6烷基羟基基团、C_1-C_6烷基烷氧基基团、苄基基团和C_3-C_8杂环基基团;并且

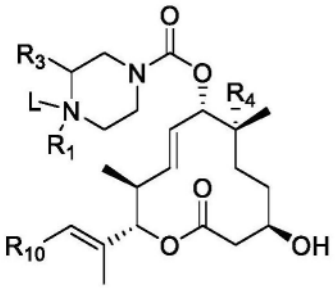
[0089] 其中每个R^a独立地被0至3个独立地选自以下的基团取代:卤素、羟基基团、-$NR^{15}R^{16}$、C_1-C_6烷基基团、-(C=O)-(C_1-C_6烷基)基团、-(C=O)-(C_1-C_6烷基)-(C_3-C_{10}杂环基基团)、-S(=O)$_w$-(C_3-C_8杂环基)基团和C_1-C_6烷基羧酸基团,其各自被0、1或2个独立地选自以下的基团取代:卤素、羟基基团、-$NR^{15}R^{16}$和C_1-C_3烷基基团;并且

[0090] w是0、1或2;

[0091] 并且其中L是将Ab共价连接至D的接头;并且

[0092] p是1至15的整数。

[0093] 在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段能够内化至靶细胞中。在一些实施例中,该接头共价连接至剪接调节剂("L-D"),且L-D具有式(VIII-A)的结构:

[0094] 

(VIII-A),

或其药学上可接受的盐。

[0095] 在一些实施例中,该剪接调节剂包含SF3b复合体的调节剂。

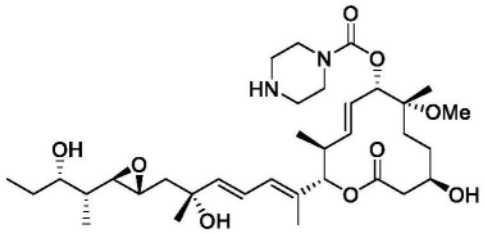
[0096] 在一些实施例中,该剪接调节剂包含普拉二烯内酯(pladienolide)或普拉二烯内酯衍生物。在一些实施例中,该剪接调节剂包含普拉二烯内酯D或普拉二烯内酯D衍生物。在一些实施例中,该普拉二烯内酯D或衍生物包含D2、D1、D4、D8、D10、D11(E7107)、D20、D21、D22、D12或D25。在一些实施例中,该普拉二烯内酯D或衍生物包含D2。在一些实施例中,该普拉二烯内酯D或衍生物包含D1。在一些实施例中,该普拉二烯内酯D或衍生物包含D4。在一些实施例中,该普拉二烯内酯D或衍生物包含D12。

[0097] 在一些实施例中,该普拉二烯内酯D或衍生物是两性离子型普拉二烯内酯D或衍生物。在一些实施例中,该两性离子型普拉二烯内酯D或衍生物包含D22或D25。

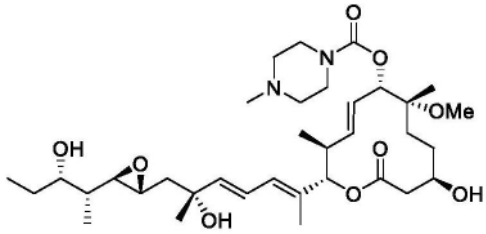
[0098] 在一些其他实施例中,该剪接调节剂包含普拉二烯内酯B或普拉二烯内酯B衍生物。在一些实施例中,该普拉二烯内酯B或衍生物包含D9、D18、D19或D13。

[0099] 在一些实施例中,该剪接调节剂包含芳基普拉二烯内酯。在一些实施例中,该芳基普拉二烯内酯包含D15、D14、D16、D17、D26或D33。在一些实施例中,该芳基普拉二烯内酯包含D15。在一些实施例中,该芳基普拉二烯内酯是两性离子型芳基普拉二烯内酯。在一些实施例中,该两性离子型芳基普拉二烯内酯包含D33。

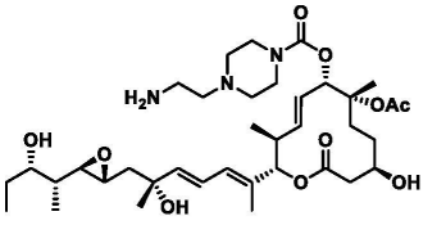
[0100] 在一些实施例中,该剪接调节剂包含D1:

[0101]  (D1)。

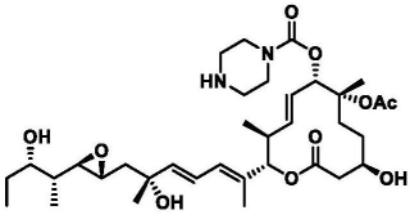
[0102] 在一些实施例中,该剪接调节剂包含D2:

[0103]  (D2)。

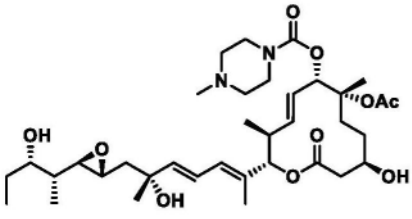
[0104] 在一些实施例中,该剪接调节剂包含D3:

[0105]  (D3)。

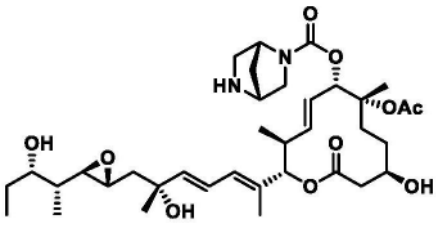
[0106] 在一些实施例中,该剪接调节剂包含D4:

[0107]  (D4)。

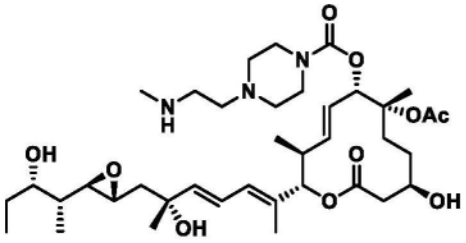
[0108] 在一些实施例中,该剪接调节剂包含D4':

[0109]  (D4')。

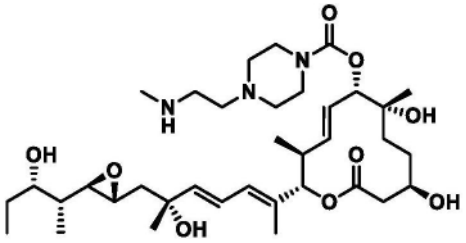
[0110] 在一些实施例中,该剪接调节剂包含D5:

[0111]  (D5)。

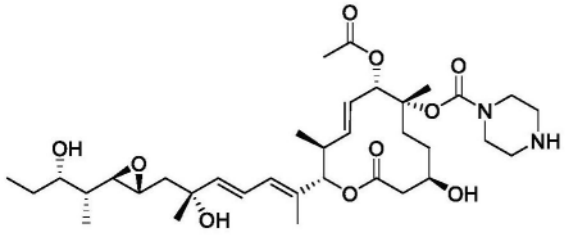
[0112] 在一些实施例中,该剪接调节剂包含D6:

[0113] 
(D6)。

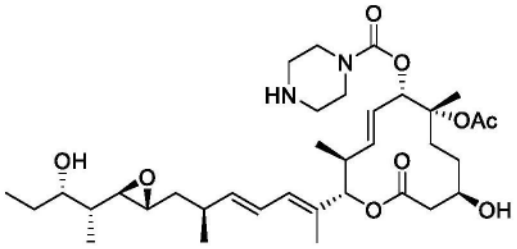
[0114] 在一些实施例中,该剪接调节剂包含D7:

[0115] 
(D7)。

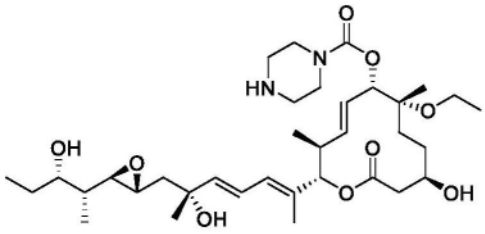
[0116] 在一些实施例中,该剪接调节剂包含D8:

[0117] 
(D8)。

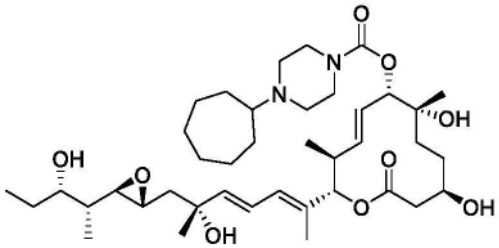
[0118] 在一些实施例中,该剪接调节剂包含D9:

[0119] 
(D9)。

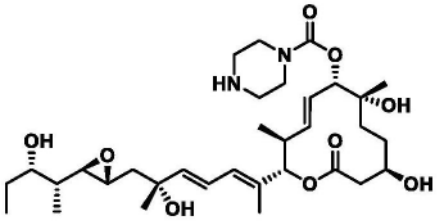
[0120] 在一些实施例中,该剪接调节剂包含D10:

[0121] 
(D10)。

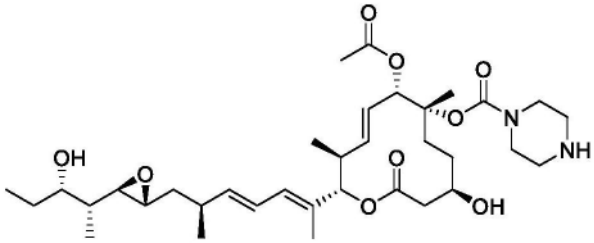
[0122] 在一些实施例中,该剪接调节剂包含D11:

[0123] 
(D11)。

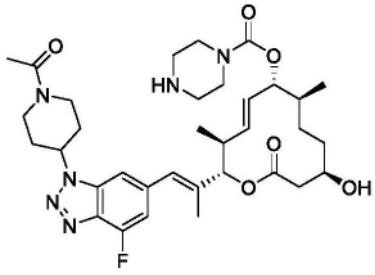
[0124] 在一些实施例中,该剪接调节剂包含D12:

[0125]  (D12)。

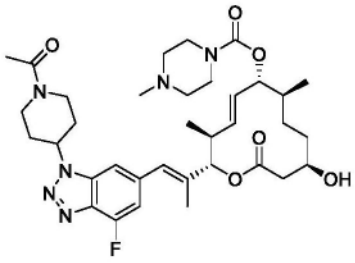
[0126] 在一些实施例中,该剪接调节剂包含D13:

[0127]  (D13)。

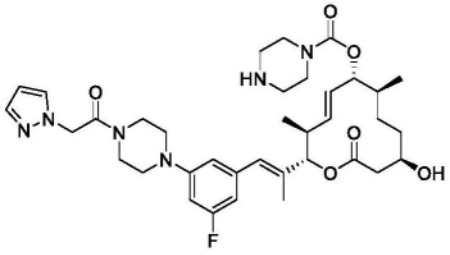
[0128] 在一些实施例中,该剪接调节剂包含D14:

[0129]  (D14)。

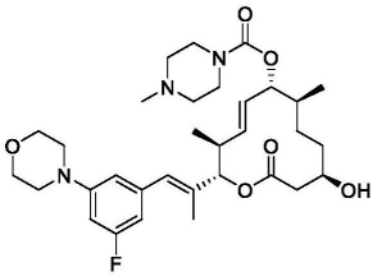
[0130] 在一些实施例中,该剪接调节剂包含D15:

[0131]  (D15)。

[0132] 在一些实施例中,该剪接调节剂包含D16:

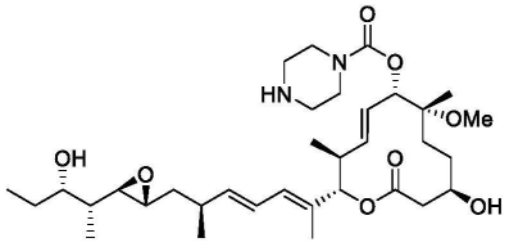
[0133]  (D16)。

[0134] 在一些实施例中,该剪接调节剂包含D17:

[0135] 

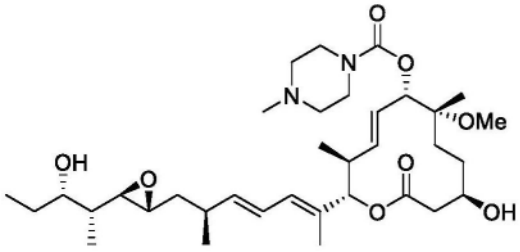
(D17)。

[0136] 在一些实施例中,该剪接调节剂包含D18:

[0137] 

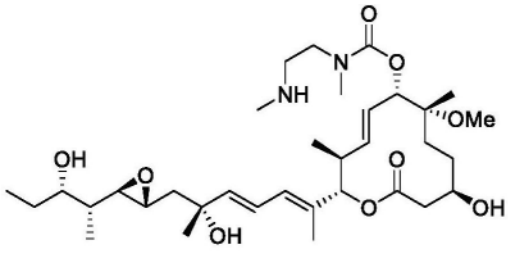
(D18)。

[0138] 在一些实施例中,该剪接调节剂包含D19:

[0139] 

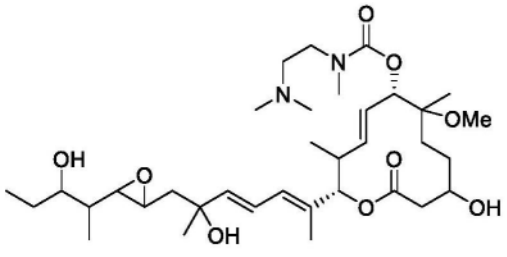
(D19)。

[0140] 在一些实施例中,该剪接调节剂包含D20:

[0141] 

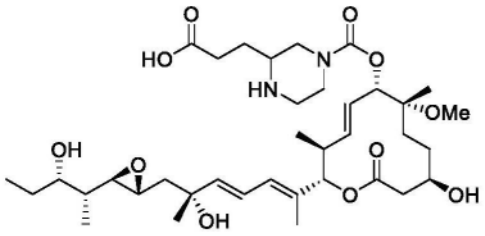
(D20)。

[0142] 在一些实施例中,该剪接调节剂包含D21:

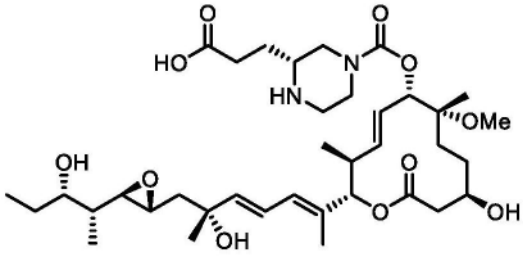
[0143] 

(D21)。

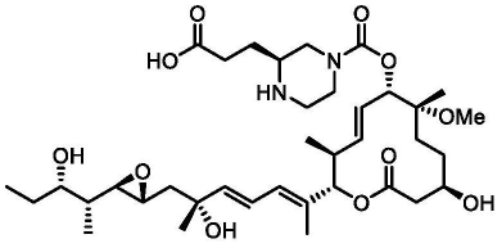
[0144] 在一些实施例中,该剪接调节剂包含D22:

[0145]  (D22)。

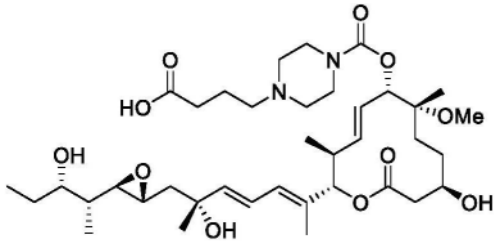
[0146] 在一些实施例中,该剪接调节剂包含D23:

[0147]  (D23)。

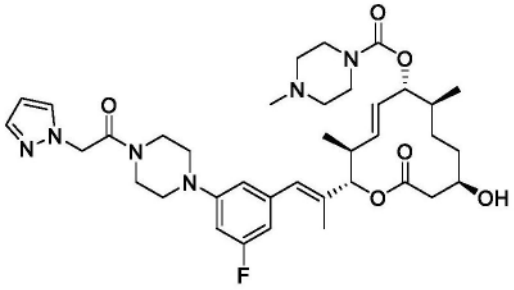
[0148] 在一些实施例中,该剪接调节剂包含D24:

[0149]  (D24)。

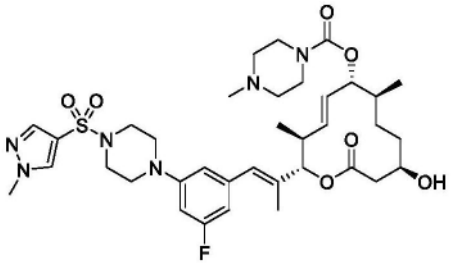
[0150] 在一些实施例中,该剪接调节剂包含D25:

[0151]  (D25)。

[0152] 在一些实施例中,该剪接调节剂包含D26:

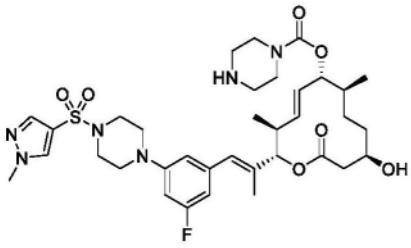
[0153]  (D26)。

[0154] 在一些实施例中,该剪接调节剂包含D27:

[0155] 

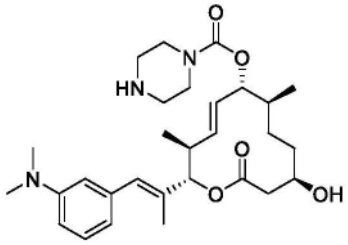
(D27)。

[0156] 在一些实施例中,该剪接调节剂包含D28:

[0157] 

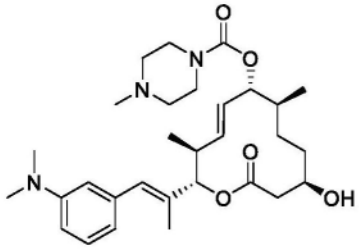
(D28)。

[0158] 在一些实施例中,该剪接调节剂包含D29:

[0159] 

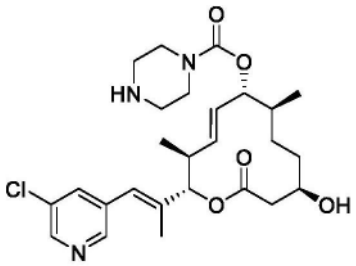
(D29)。

[0160] 在一些实施例中,该剪接调节剂包含D30:

[0161] 

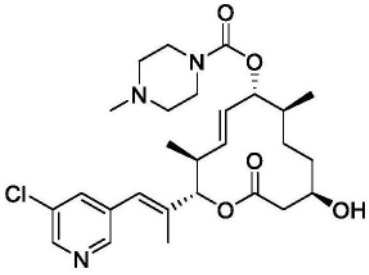
(D30)。

[0162] 在一些实施例中,该剪接调节剂包含D31:

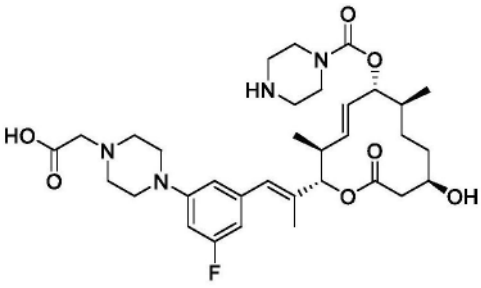
[0163] 

(D31)。

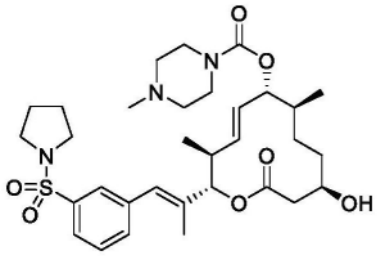
[0164] 在一些实施例中,该剪接调节剂包含D32:

[0165] 
(D32)。

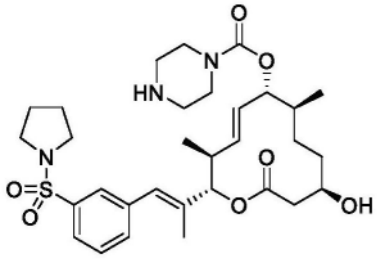
[0166] 在一些实施例中,该剪接调节剂包含D33:

[0167] 
(D33)。

[0168] 在一些实施例中,该剪接调节剂包含D34:

[0169] 
(D34)。

[0170] 在一些实施例中,该剪接调节剂包含D35:

[0171] 
(D35)。

[0172] 在一些实施例中,该剪接调节剂包含表7中所列药物部分中的一个。在一些实施例中,该剪接调节剂包含D1、D2、D3、D4、D4’、D5、D6、D7、D8、D9、D10、D11、D12、D13、D14、D15、D16、D17、D18、D19、D20、D21、D22、D23、D24、D25、D26、D27、D28、D29、D30、D31、D32、D33、D34和/或D35。

[0173] 在一些实施例中,披露了剪接调节剂,以及其单独或作为ADC的一部分用作治疗剂的用途。在一些实施例中,该剪接调节剂包含D4、D4’、D12、D15、D8、D9、D10、D13、D18、D19、D20、D21、D22、D25或D33。

[0174] 在一些实施例中,该剪接调节剂包含D4且该接头包含MC-Val-Cit-pABC。在一些实施例中,该剪接调节剂包含D4且该接头包含MC-β-葡萄糖醛酸苷。在一些实施例中,该剪接调节剂包含D12且该接头包含MC-Val-Cit-pABC。在一些实施例中,该剪接调节剂包含D12且该接头包含MC-β-葡萄糖醛酸苷。在一些实施例中,该剪接调节剂包含D15且该接头包含MC-

Val-Ala-pAB。

[0175] 在不同实施例中,本文所披露的ADC中使用的接头在细胞外是稳定,使得该ADC当存在于细胞外条件中时保持完整,但在内化至细胞(例如肿瘤或癌症细胞)中时能够被裂解。在一些实施例中,当该ADC进入细胞(该细胞表达该ADC中的抗体或抗原结合片段所靶向的抗原)时,该剪接调节剂自该抗体或抗原结合片段裂解。在一些实施例中,该接头是可裂解接头。

[0176] 在一些实施例中,该接头包含可裂解肽部分。在一些实施例中,该可裂解肽部分可被酶裂解。在一些实施例中,该可裂解肽部分或接头包含氨基酸单元。在一些实施例中,该氨基酸单元包含缬氨酸-瓜氨酸("Val-Cit"或"VC")。在一些其他实施例中,该氨基酸单元包含缬氨酸-丙氨酸("Val-Ala"或"VA")。在一些其他实施例中,该氨基酸单元包含谷氨酸-缬氨酸-瓜氨酸("Glu-Val-Cit"或"EVC")。在一些其他实施例中,该氨基酸单元包含丙氨酸-丙氨酸-天冬酰胺("Ala-Ala-Asn"或"AAN")。

[0177] 在一些实施例中,该接头包含可裂解葡萄糖醛酸苷部分。在一些实施例中,该可裂解葡萄糖醛酸苷部分可被酶裂解。在一些实施例中,该可裂解葡萄糖醛酸苷部分可被葡萄糖醛酸苷酶裂解。在一些实施例中,该可裂解葡萄糖醛酸苷部分可被β-葡萄糖醛酸苷酶裂解。

[0178] 在一些实施例中,该接头包含至少一个间隔子单元。在一些实施例中,该间隔子单元或接头包含聚乙二醇(PEG)部分。在一些实施例中,该PEG部分包含-$(PEG)_m$-且m是1至10的整数。在一些实施例中,m是2。在一些其他实施例中,该间隔子单元或接头包含烷基部分。在一些实施例中,该烷基部分包含-$(CH_2)_n$-且n是1至10的整数。在一些实施例中,n是2。在一些实施例中,n是5。在一些实施例中,n是6。

[0179] 在一些实施例中,该间隔子单元经由马来酰亚胺(Mal)部分("Mal-间隔子单元")连接至该抗体或抗原结合片段。在一些实施例中,该Mal-间隔子单元可与该抗体或抗原结合片段上的半胱氨酸残基反应。在一些实施例中,该Mal-间隔子单元经由该抗体或抗原结合片段上的半胱氨酸残基接合至该抗体或抗原结合片段。

[0180] 在一些实施例中,该接头包含该Mal-间隔子单元和可裂解肽部分。在一些实施例中,该可裂解肽部分包含氨基酸单元。在一些实施例中,该可裂解肽部分或氨基酸单元包含Val-Cit。在一些实施例中,该可裂解肽部分或氨基酸单元包含Val-Ala。在一些实施例中,该可裂解肽部分或氨基酸单元包含Glu-Val-Cit。在一些实施例中,该可裂解肽部分或氨基酸单元包含Ala-Ala-Asn。在一些实施例中,该Mal-间隔子单元包含烷基部分。在一些实施例中,该Mal-间隔子单元包含PEG部分。在一些实施例中,该Mal-间隔子单元包含马来酰亚胺基己酰基(MC)。

[0181] 在一些实施例中,该Mal-间隔子单元将该抗体或抗原结合片段连接至该接头中的可裂解部分。在一些实施例中,该接头中的可裂解部分包含可裂解肽部分。在一些实施例中,该可裂解肽部分包含氨基酸单元。在一些实施例中,该可裂解肽部分或氨基酸单元包含Val-Cit、Val-Ala、Glu-Val-Cit或Ala-Ala-Asn。在一些实施例中,该接头包含MC-Val-Cit。在一些实施例中,该接头包含MC-Val-Ala。在一些实施例中,该接头包含MC-Glu-Val-Cit。在一些实施例中,该接头包含MC-Ala-Ala-Asn。在一些实施例中,该Mal-间隔子单元包含烷基部分。在一些实施例中,该Mal-间隔子单元包含PEG部分。在一些实施例中,该Mal-间隔子

单元包含马来酰亚胺基己酰基(MC)。

[0182] 在一些实施例中,该接头中的可裂解部分直接地接合至该剪接调节剂,或间隔子单元将该接头中的可裂解部分连接至该剪接调节剂。在一些实施例中,该缀合物的裂解使该剪接调节剂自该抗体或抗原结合片段和接头释放。在一些实施例中,将该接头中的可裂解部分连接至该剪接调节剂的间隔子单元是自消融型的(self-immolative)。

[0183] 在一些实施例中,将该接头中的可裂解部分连接至该剪接调节剂的间隔子单元包含对氨基苄氧基羰基(pABC)。在一些实施例中,pABC将该接头中的可裂解部分连接至该剪接调节剂。在一些实施例中,该接头中的可裂解部分包含可裂解肽部分。在一些实施例中,该可裂解肽部分包含氨基酸单元。在一些实施例中,该可裂解肽部分或氨基酸单元包含Val-Cit、Val-Ala、Glu-Val-Cit或Ala-Ala-Asn。在一些实施例中,该接头包含Val-Cit-pABC。在一些其他实施例中,该接头包含Val-Ala-pABC。在一些实施例中,该接头包含Glu-Val-Cit-pABC。在一些实施例中,该接头包含Ala-Ala-Asn-pABC。

[0184] 在一些实施例中,将该接头中的可裂解部分连接至该剪接调节剂的间隔子单元包含对氨基苄基(pAB)。在一些实施例中,pAB将该接头中的可裂解部分连接至该剪接调节剂。在一些实施例中,该接头中的可裂解部分包含可裂解肽部分。在一些实施例中,该可裂解肽部分包含氨基酸单元。在一些实施例中,该可裂解肽部分或氨基酸单元包含Val-Cit、Val-Ala、Glu-Val-Cit或Ala-Ala-Asn。在一些实施例中,该接头包含Val-Cit-pAB。在一些其他实施例中,该接头包含Val-Ala-pAB。在一些其他实施例中,该接头包含Glu-Val-Cit-pAB。在一些其他实施例中,该接头包含Ala-Ala-Asn-pAB。

[0185] 在不同实施例中,该接头是不可裂解接头。在一些实施例中,该ADC中的剪接调节剂通过该抗体或抗原结合片段的降解而释放。在一些实施例中,当被靶细胞内化且在靶细胞内降解时,该接头保持与该抗体的至少一个氨基酸以及药物共价缔合。

[0186] 在一些实施例中,该接头是包含至少一个间隔子单元的不可裂解接头。在一些实施例中,该间隔子单元或接头包含聚乙二醇(PEG)部分。在一些实施例中,该PEG部分包含-$(PEG)_m$-且m是1至10的整数。在一些实施例中,m是2。在一些其他实施例中,该间隔子单元或接头包含烷基部分。在一些实施例中,该烷基部分包含-$(CH_2)_n$-或-$(CH_2)_n$-O-$(CH_2)_n$且n是1至10的整数。在一些实施例中,n是2。在一些实施例中,n是5。在一些实施例中,n是6。

[0187] 在一些实施例中,不可裂解接头中的间隔子单元经由马来酰亚胺(Mal)部分("Mal-间隔子单元")连接至该抗体或抗原结合片段。在一些实施例中,该Mal-间隔子单元可与该抗体或抗原结合片段上的半胱氨酸残基反应。在一些实施例中,该Mal-间隔子单元经由该抗体或抗原结合片段上的半胱氨酸残基接合至该抗体或抗原结合片段。在一些实施例中,该Mal-间隔子单元包含烷基部分。在一些实施例中,该Mal-间隔子单元包含PEG部分。在一些实施例中,该接头或Mal-间隔子单元包含马来酰亚胺基己酰基(MC)。在一些实施例中,该接头或Mal-间隔子单元包含马来酰亚胺基己酰基(MC)和至少一个额外间隔子单元。在一些实施例中,该接头或Mal-间隔子单元包含MC-$(PEG)_2$。在一些实施例中,该接头或Mal-间隔子单元包含MC-$(PEG)_2$和至少一个额外间隔子单元。在一些实施例中,该接头或Mal-间隔子单元包含Mal-Hex。在一些实施例中,该接头或Mal-间隔子单元包含Mal-Hex和至少一个额外间隔子单元。在一些实施例中,该接头或Mal-间隔子单元包含Mal-Et。在一些实施例中,该接头或Mal-间隔子单元包含Mal-Et和至少一个额外间隔子单元。在一些实施

例中,该接头或Mal-间隔子单元包含Mal-Et-O-Et。在一些实施例中,该接头或Mal-间隔子单元包含Mal-Et-O-Et和至少一个额外间隔子单元。在一些实施例中,该Mal-间隔子单元将该抗体或抗原结合片段连接至该剪接调节剂。

[0188] 在不同实施例中,ADC复合物可由式(I)表示:

[0189] $Ab-(L-D)_p$ (I)

[0190] 其中Ab是靶向赘生性细胞或另一肿瘤相关靶标(如癌症抗原)的抗体或其抗原结合片段(例如本文所披露的抗体或结合结构域序列中任一个);D是适合于治疗癌症的任何小分子(例如剪接调节剂,例如本文所披露的剪接调节剂中的任一种);L是将Ab共价连接至D的接头(例如本文所披露的接头中的任一种);且p是1至15的整数。

[0191] 在一些实施例中,Ab选自本文所披露的抗体或结合结构域序列中的任一种。在一些实施例中,Ab是靶向HER2和/或表达HER2的赘生性细胞的抗体或结合结构域序列。在一些实施例中,Ab是靶向CD138和/或表达CD138的赘生性细胞的抗体或结合结构域序列。在一些实施例中,Ab是靶向EPHA2和/或表达EPHA2的赘生性细胞的抗体或结合结构域序列。在一些实施例中,Ab是靶向MSLN和/或表达MSLN的赘生性细胞的抗体或结合结构域序列。在一些实施例中,Ab是靶向FOLH1和/或表达FOLH1的赘生性细胞的抗体或结合结构域序列。在一些实施例中,Ab是靶向CDH6和/或表达CDH6的赘生性细胞的抗体或结合结构域序列。在一些实施例中,Ab是靶向CEACAM5和/或表达CEACAM5的赘生性细胞的抗体或结合结构域序列。在一些实施例中,Ab是靶向CFC1B和/或表达CFC1B的赘生性细胞的抗体或结合结构域序列。在一些实施例中,Ab是靶向ENPP3和/或表达ENPP3的赘生性细胞的抗体或结合结构域序列。在一些实施例中,Ab是靶向FOLR1和/或表达FOLR1的赘生性细胞的抗体或结合结构域序列。在一些实施例中,Ab是靶向HAVCR1和/或表达HAVCR1的赘生性细胞的抗体或结合结构域序列。在一些实施例中,Ab是靶向KIT和/或表达KIT的赘生性细胞的抗体或结合结构域序列。在一些实施例中,Ab是靶向MET和/或表达MET的赘生性细胞的抗体或结合结构域序列。在一些实施例中,Ab是靶向MUC16和/或表达MUC16的赘生性细胞的抗体或结合结构域序列。在一些实施例中,Ab是靶向SLC39A6和/或表达SLC39A6的赘生性细胞的抗体或结合结构域序列。在一些实施例中,Ab是靶向SLC44A4和/或表达SLC44A4的赘生性细胞的抗体或结合结构域序列。在一些实施例中,Ab是靶向STEAP1和/或表达STEAP1的赘生性细胞的抗体或结合结构域序列。在一些实施例中,Ab是靶向另一癌症抗原的抗体或结合结构域序列。

[0192] 在一些实施例中,D是剪接调节剂。在一些实施例中,D选自本文所披露的剪接调节剂中的任一种。在一些实施例中,D是选自以下的剪接调节剂:D2、D1、D4、D8、D10、D11(E7107)、D20、D21、D22、D12、D25、D9、D18、D19、D13、D15、D14、D16、D17、D26和D33,或其任何衍生物。在一些实施例中,D是选自以下的剪接调节剂:D4、D12、D15、D8、D9、D10、D13、D18、D19、D20、D21、D22、D25和D33,或其任何衍生物。在一些实施例中,D是包含D2或其任何衍生物的剪接调节剂。在一些实施例中,D是包含D1或其任何衍生物的剪接调节剂。

[0193] 在一些实施例中,L选自本文所披露的接头中的任一种,或本文所披露的接头组分的任何组合。在一些实施例中,L是包含MC-Val-Cit-pABC、Mal-$(PEG)_2$-CO、MC-Val-Ala-pAB、MC-Val-Ala-pABC、MC-Val-Cit-pAB、Mal-Hex、Mal-Et或Mal-Et-O-Et的接头。在一些实施例中,该接头还可包含一个或多个额外间隔子单元。在一些实施例中,L是ADL1、ADL2、ADL5、ADL6、ADL7、ADL10、ADL12、ADL13、ADL14、ADL15、ADL21、ADL22或ADL23接头。在一些实

施例中,L是ADL1、ADL2、ADL5、ADL6、ADL7、ADL12、ADL13、ADL14、ADL21、ADL23或ADL15接头。在一些实施例中,L是ADL12、ADL14或ADL15接头。在一些实施例中,ADL1、ADL2、ADL5、ADL6、ADL7、ADL12、ADL13、ADL14、ADL21、ADL23或ADL15接头还可包含一个或多个额外间隔子单元。在一些实施例中,L是ADL1接头且可任选地包含一个或多个额外间隔子单元。在一些实施例中,L是ADL2接头且可任选地包含一个或多个额外间隔子单元。在一些实施例中,L是ADL5接头且可任选地包含一个或多个额外间隔子单元。在一些实施例中,L是ADL6接头且可任选地包含一个或多个额外间隔子单元。在一些实施例中,L是ADL7接头且可任选地包含一个或多个额外间隔子单元。在一些实施例中,L是ADL12接头且可任选地包含一个或多个额外间隔子单元。在一些实施例中,L是ADL14接头且可任选地包含一个或多个额外间隔子单元。在一些实施例中,L是ADL15接头且可任选地包含一个或多个额外间隔子单元。在本文所描述的ADC的不同实施例中,p是1至10。在不同实施例中,p是2至8。在不同实施例中,p是4至8。在一些实施例中,p是4。在一些实施例中,p是8。

[0194] 在一些实施例中,具有式(I)的L-D是ADL1-D1。在一些实施例中,具有式(I)的L-D是ADL6-D1。在一些实施例中,具有式(I)的L-D是ADL5-D2。在一些实施例中,具有式(I)的L-D是ADL1-D18。在一些实施例中,具有式(I)的L-D是ADL5-D19。在一些实施例中,具有式(I)的L-D是ADL14-D1。在一些实施例中,具有式(I)的L-D是ADL12-D1。在一些实施例中,具有式(I)的L-D是ADL15-D1。在一些实施例中,具有式(I)的L-D是ADL12-D20。在一些实施例中,具有式(I)的L-D是ADL10-D1。在一些实施例中,具有式(I)的L-D是ADL12-D2。在一些实施例中,具有式(I)的L-D是ADL15-D2。在一些实施例中,具有式(I)的L-D是ADL12-D21。在一些实施例中,具有式(I)的L-D是ADL6-D9。在一些实施例中,具有式(I)的L-D是ADL1-D4。在一些实施例中,具有式(I)的L-D是ADL1-D3。在一些实施例中,具有式(I)的L-D是ADL1-D12。在一些实施例中,具有式(I)的L-D是ADL1-D7。在一些实施例中,具有式(I)的L-D是ADL1-D6。在一些实施例中,具有式(I)的L-D是ADL1-D5。在一些实施例中,具有式(I)的L-D是ADL22-D4。在一些实施例中,具有式(I)的L-D是ADL5-D10。在一些实施例中,具有式(I)的L-D是ADL5-D11。在一些实施例中,具有式(I)的L-D是ADL1-D13。在一些实施例中,具有式(I)的L-D是ADL1-D8。在一些实施例中,具有式(I)的L-D是ADL1-D22。在一些实施例中,具有式(I)的L-D是ADL5-D25。在一些实施例中,具有式(I)的L-D是ADL12-D22。在一些实施例中,具有式(I)的L-D是ADL5-D15。在一些实施例中,具有式(I)的L-D是ADL1-D14。在一些实施例中,具有式(I)的L-D是ADL5-D26。在一些实施例中,具有式(I)的L-D是ADL1-D16。在一些实施例中,具有式(I)的L-D是ADL5-D17。在一些实施例中,具有式(I)的L-D是ADL1-D33。在一些实施例中,具有式(I)的L-D是ADL1-D28。在一些实施例中,具有式(I)的L-D是ADL1-D31。在一些实施例中,具有式(I)的L-D是ADL1-D29。在一些实施例中,具有式(I)的L-D是ADL1-D35。在一些实施例中,具有式(I)的L-D是ADL5-D32。在一些实施例中,具有式(I)的L-D是ADL5-D27。在一些实施例中,具有式(I)的L-D是ADL12-D35。在一些实施例中,具有式(I)的L-D是ADL12-D28。在一些实施例中,具有式(I)的L-D是ADL1-D23。在一些实施例中,具有式(I)的L-D是ADL1-D24。

[0195] 在一些实施例中,提供ADC池,由此发生随机缀合,且该池中的平均p是在约2与约8之间。在一些实施例中,提供ADC池,由此发生随机缀合,且该池中的平均p是在约4与约8之间。在一些实施例中,提供ADC池,由此发生随机缀合,且该池中的平均p是约4。在一些实施

例中,提供ADC池,由此发生随机缀合,且该池中的平均p是约8。本文提供包含所述ADC中的任一种的多个拷贝的组合物(例如药物组合物),其中该组合物中ADC的平均药物负载(平均p)是约3.5至约5.5(例如约4)、或约7至约9(例如约8)。

[0196] 在一些实施例中,该ADC中的抗体或抗原结合片段(Ab)靶向源自血液恶性病或实体瘤的赘生性细胞。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段靶向源自血液恶性病的赘生性细胞。在一些实施例中,该血液恶性病选自B细胞恶性病、白血病(例如急性骨髓性白血病)、淋巴瘤和骨髓瘤(例如多发性骨髓瘤)。在一些实施例中,该血液恶性病选自急性骨髓性白血病和多发性骨髓瘤。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段靶向源自实体瘤的赘生性细胞。在一些实施例中,该实体瘤选自乳腺癌(例如HER2阳性乳腺癌)、胃癌(例如胃腺癌)、前列腺癌、卵巢癌、肺癌(例如肺腺癌)、子宫癌(例如子宫浆液性子宫内膜癌)、涎腺导管癌、黑素瘤、结肠癌、宫颈癌、胰腺癌、肾癌、结肠直肠癌和食道癌。在一些实施例中,该实体瘤选自HER2阳性乳腺癌、胃腺癌、前列腺癌和骨肉瘤。

[0197] 在不同实施例中,该ADC中的抗体或抗原结合片段(Ab)是抗HER2抗体或其抗原结合片段。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段结合至HER2且靶向表达HER2的赘生性细胞(即,该ADC靶向表达HER2的赘生性细胞)。在一些实施例中,该ADC中的抗体或抗原结合片段是内化性抗HER2抗体或其内化性抗原结合片段。

[0198] 在一些实施例中,该抗HER2抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:1(HCDR1)、SEQ ID NO:2(HCDR2)和SEQ ID NO:3(HCDR3)的氨基酸序列的三个重链互补决定区(HCDR1、HCDR2和HCDR3);以及含有SEQ ID NO:4(LCDR1)、SEQ ID NO:5(LCDR2)和SEQ ID NO:6(LCDR3)的氨基酸序列的三个轻链互补决定区(LCDR1、LCDR2和LCDR3)。在一些实施例中,该抗HER2抗体或抗原结合片段是内化性抗体或内化性抗原结合片段。在一些实施例中,该抗HER2抗体或抗原结合片段包含人框架序列。在一些实施例中,该抗HER2抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:19的氨基酸序列的重链可变区和含有SEQ ID NO:20的氨基酸序列的轻链可变区。在一些实施例中,该抗HER2抗体或抗原结合片段包含人IgG重链恒定区。在一些实施例中,该抗HER2抗体或抗原结合片段包含人IgG1重链恒定区。在一些实施例中,该抗HER2抗体或抗原结合片段包含人Igκ或λ轻链恒定区。在一些实施例中,该抗HER2抗体或抗原结合与包含SEQ ID NO:19的重链可变结构域和SEQ ID NO:20的轻链可变结构域的抗体竞争结合和/或与其结合相同的表位。

[0199] 在不同实施例中,该ADC中的抗体或抗原结合片段(Ab)是抗CD138抗体或其抗原结合片段。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段结合至CD138且靶向表达CD138的赘生性细胞(即,该ADC靶向表达CD138的赘生性细胞)。在一些实施例中,该ADC中的抗体或抗原结合片段是内化性抗CD138抗体或其内化性抗原结合片段。

[0200] 在一些实施例中,该抗CD138抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:7(HCDR1)、SEQ ID NO:8(HCDR2)和SEQ ID NO:9(HCDR3)的氨基酸序列的三个重链互补决定区(HCDR1、HCDR2和HCDR3);以及含有SEQ ID NO:10(LCDR1)、SEQ ID NO:11(LCDR2)和SEQ ID NO:12(LCDR3)的氨基酸序列的三个轻链互补决定区(LCDR1、LCDR2和LCDR3)。在一些实施例中,该抗CD138抗体或抗原结合片段是内化性抗体或内化性抗原结合片段。在一些实施例中,该抗CD138抗体或抗原结合片段包含人框架序列。在一些实施例中,该抗CD138抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:21的氨基酸序列的重链可变区和含有SEQ ID NO:22的氨基酸序

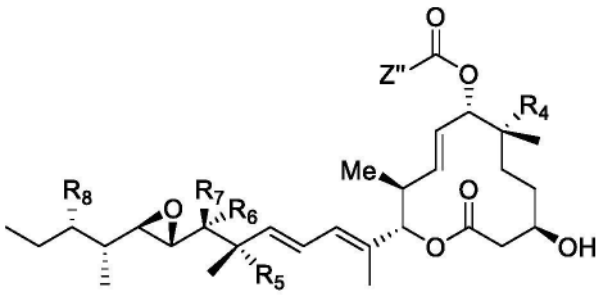
列的轻链可变区。在一些实施例中,该抗CD138抗体或抗原结合片段包含鼠IgG2a重链恒定区。在一些实施例中,该抗CD138抗体或抗原结合片段包含鼠Igκ轻链恒定区。在一些实施例中,该抗CD138抗体或抗原结合片段包含人IgG重链恒定区。在一些实施例中,该抗CD138抗体或抗原结合片段包含人IgG2a重链恒定区。在一些实施例中,该抗CD138抗体或抗原结合片段包含人Igκ或λ轻链恒定区。在一些实施例中,该抗CD138抗体或抗原结合与包含SEQ ID NO:21的重链可变结构域和SEQ ID NO:22的轻链可变结构域的抗体竞争结合和/或与其结合相同的表位。

[0201] 在不同实施例中,该ADC中的抗体或抗原结合片段(Ab)是抗EPHA2抗体或其抗原结合片段。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段结合至EPHA2且靶向表达EPHA2的赘生性细胞(即,该ADC靶向表达EPHA2的赘生性细胞)。在一些实施例中,该ADC中的抗体或抗原结合片段是内化性抗EPHA2抗体或其内化性抗原结合片段。

[0202] 在一些实施例中,该抗EPHA2抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:13(HCDR1)、SEQ ID NO:14(HCDR2)和SEQ ID NO:15(HCDR3)的氨基酸序列的三个重链互补决定区(HCDR1、HCDR2和HCDR3);以及含有SEQ ID NO:16(LCDR1)、SEQ ID NO:17(LCDR2)和SEQ ID NO:18(LCDR3)的氨基酸序列的三个轻链互补决定区(LCDR1、LCDR2和LCDR3)。在一些实施例中,该抗EPHA2抗体或抗原结合片段是内化性抗体或内化性抗原结合片段。在一些实施例中,该抗EPHA2抗体或抗原结合片段包含人框架序列。在一些实施例中,该抗EPHA2抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:23的氨基酸序列的重链可变区和含有SEQ ID NO:24的氨基酸序列的轻链可变区。在一些实施例中,该抗EPHA2抗体或抗原结合片段包含人IgG重链恒定区。在一些实施例中,该抗EPHA2抗体或抗原结合片段包含人IgG1重链恒定区。在一些实施例中,该抗EPHA2抗体或抗原结合片段包含人Igκ或λ轻链恒定区。在一些实施例中,该抗EPHA2抗体或抗原结合与包含SEQ ID NO:23的重链可变结构域和SEQ ID NO:24的轻链可变结构域的抗体竞争结合和/或与其结合相同的表位。

[0203] 在不同实施例中,本文还提供了包含由以下通式定义的接头-药物的化合物:L-D,其中L=接头部分,且D=药物部分(例如剪接调节剂药物部分)。在不同实施例中,本文所披露的接头-药物(L-D)化合物可连接至抗体或抗原结合片段和/或适用于本文所披露的ADC中,例如具有式(I)的ADC中。

[0204] 在不同实施例中,本文所披露的接头-药物(L-D)化合物包含根据式(III)的接头-药物结构。在不同实施例中,本披露提供了具有式(III)的接头-药物(L-D)化合物:

[0205] 

(III),

或其药学上可接受的盐,其中:

[0206] R^1选自不存在、氢、C_1-C_6烷基基团、C_1-C_6烷基烷氧基基团、C_1-C_6烷基氨基基团、C_1-C_6烷基羧酸基团、C_1-C_6烷基羟基基团、C_3-C_8环烷基基团、苄基基团、C_3-C_8杂环基基团、-O-C

(=O)-(C_1-C_6烷基)基团和-CD_3;

[0207] R^2不存在或为接头;

[0208] R^3选自氢、C_1-C_6烷基基团、C_1-C_6烷基烷氧基基团、C_1-C_6烷基氨基基团、C_1-C_6烷基羧酸基团、C_1-C_6烷基羟基基团、C_3-C_8环烷基基团、苄基基团、C_3-C_8杂环基基团和-O-C(=O)-(C_1-C_6烷基)基团;并且

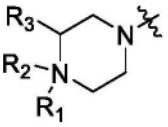
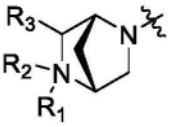
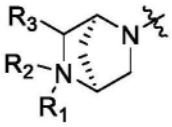
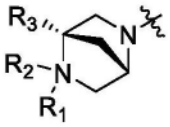
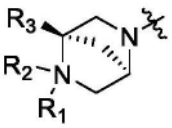
[0209] R^4、R^5和R^8各自独立地选自氢、羟基基团、-O-(C_1-C_6烷基)基团、-O-C(=O)-(C_1-C_6烷基)基团和C_1-C_6烷基基团;

[0210] R^6和R^7各自独立地选自氢、-O-R^{17}、-O-C(=O)-R^{17}、-O-C(=O)-$NR^{15}R^{16}$、C_1-C_6烷基基团、-$NR^{15}R^{16}$和接头;

[0211] R^{15}和R^{16}各自独立地选自氢、R^{17}、-C(=O)-R^{17}和

[0212] -C(=O)-O-R^{17};

[0213] R^{17}选自氢、C_1-C_6烷基基团、C_3-C_8环烷基基团、苄基基团和C_3-C_8杂环基基团;并且

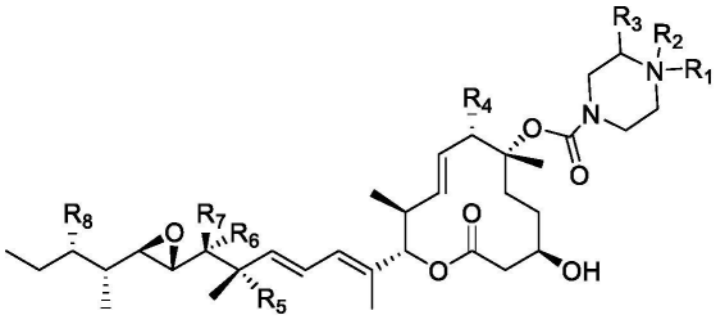
[0214] Z"选自  、  、  、  和  ;

[0215] 其中R^1、R^2、R^3、R^4、R^5、R^6、R^7、R^8、R^{15}、R^{16}和R^{17}各自独立地被0至3个独立地选自以下的基团取代:卤素、羟基基团、C_1-C_6烷基、-O-(C_1-C_6烷基)基团、-$NR^{15}R^{16}$、C_3-C_8环烷基基团、C_1-C_6烷基羟基基团、C_1-C_6烷基烷氧基基团、苄基基团和C_3-C_8杂环基基团;

[0216] 其中R^6和R^7中至少一个是氢;并且

[0217] 其中如果R^2是接头,则R^6和R^7均不为接头,且如果R^6或R^7是接头,则R^2不存在。

[0218] 在各种其他实施例中,本文所披露的接头-药物(L-D)化合物包含根据式(V)的接头-药物结构。在不同实施例中,本披露提供了具有式(V)的接头-药物(L-D)化合物:

[0219]  (V),或其药学上可接受的盐,其中:

[0220] R^1选自不存在、氢、C_1-C_6烷基基团、C_1-C_6烷基烷氧基基团、C_1-C_6烷基氨基基团、C_1-C_6烷基羧酸基团、C_1-C_6烷基羟基基团、C_3-C_8环烷基基团、苄基基团、C_3-C_8杂环基基团、-O-C(=O)-(C_1-C_6烷基)基团和-CD_3;

[0221] R^2不存在或为接头;

[0222] R^3选自氢、C_1-C_6烷基基团、C_1-C_6烷基烷氧基基团、C_1-C_6烷基氨基基团、C_1-C_6烷基羧

酸基团、C_1-C_6烷基羟基基团、C_3-C_8环烷基基团、苄基基团、C_3-C_8杂环基基团和-O-C(=O)-(C_1-C_6烷基)基团;并且

[0223] R^4、R^5和R^8各自独立地选自氢、羟基基团、-O-(C_1-C_6烷基)基团、-O-C(=O)-(C_1-C_6烷基)基团和C_1-C_6烷基基团;

[0224] R^6和R^7各自独立地选自氢、-O-R^{17}、-O-C(=O)-R^{17}、-O-C(=O)-$NR^{15}R^{16}$、C_1-C_6烷基基团、-$NR^{15}R^{16}$和接头;

[0225] R^{15}和R^{16}各自独立地选自氢、R^{17}、-C(=O)-R^{17}和-C(=O)-O-R^{17};并且

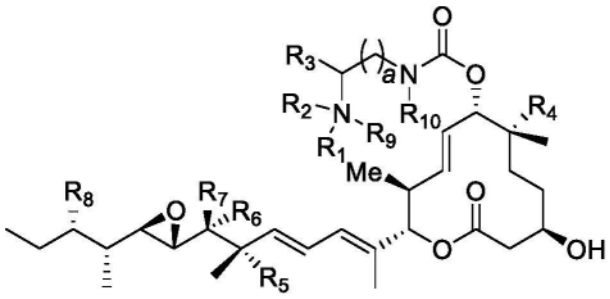
[0226] R^{17}选自氢、C_1-C_6烷基基团、C_3-C_8环烷基基团、苄基基团和C_3-C_8杂环基基团;

[0227] 其中R^1、R^2、R^3、R^4、R^5、R^6、R^7、R^8、R^{15}、R^{16}和R^{17}各自独立地被0至3个独立地选自以下的基团取代:卤素、羟基基团、C_1-C_6烷基、-O-(C_1-C_6烷基)基团、-$NR^{15}R^{16}$、C_3-C_8环烷基基团、C_1-C_6烷基羟基基团、C_1-C_6烷基烷氧基基团、苄基基团和C_3-C_8杂环基基团;

[0228] 其中R^6和R^7中至少一个是氢;并且

[0229] 其中如果R^2是接头,则R^6和R^7均不为接头,且如果R^6或R^7是接头,则R^2不存在。

[0230] 在各种其他实施例中,本文所披露的接头-药物(L-D)化合物包含根据式(VII)的接头-药物结构。在不同实施例中,本披露提供了具有式(VII)的接头-药物(L-D)化合物:

[0231] 
(VII),

或其药学上可接受的盐,其中:

[0232] R^1和R^9各自独立地选自不存在、氢、C_1-C_6烷基基团、C_1-C_6烷基烷氧基基团、C_1-C_6烷基氨基基团、C_1-C_6烷基羧酸基团、C_1-C_6烷基羟基基团、C_3-C_8环烷基基团、苄基基团、C_3-C_8杂环基基团、-O-C(=O)-(C_1-C_6烷基)基团和-CD_3;

[0233] R^2不存在或为接头;

[0234] R^3选自氢、C_1-C_6烷基基团、C_1-C_6烷基烷氧基基团、C_1-C_6烷基氨基基团、C_1-C_6烷基羧酸基团、C_1-C_6烷基羟基基团、C_3-C_8环烷基基团、苄基基团、C_3-C_8杂环基基团和-O-C(=O)-(C_1-C_6烷基)基团;

[0235] R^4、R^5和R^8各自独立地选自氢、羟基基团、-O-(C_1-C_6烷基)基团、-O-C(=O)-(C_1-C_6烷基)基团和C_1-C_6烷基基团;

[0236] R^6和R^7各自独立地选自氢、-O-R^{17}、-O-C(=O)-R^{17}、-O-C(=O)-$NR^{15}R^{16}$、C_1-C_6烷基基团、-$NR^{15}R^{16}$和接头;

[0237] R^{10}选自氢、C_1-C_6烷基基团、-C(=O)-(C_1-C_6烷基)基团和-CD_3;

[0238] R^{15}和R^{16}各自独立地选自氢、R^{17}、-C(=O)-R^{17}和

[0239] -C(=O)-O-R^{17};

[0240] R^{17}选自氢、C_1-C_6烷基基团、C_3-C_8环烷基基团、苄基基团和C_3-C_8杂环基基团;并且

[0241] a是1、2、3、4、5、6、7、8、9或10;

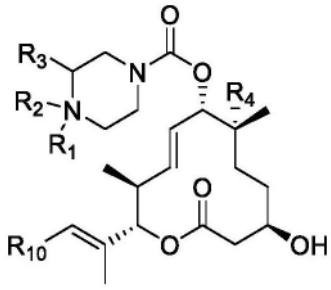
[0242] 其中R^1、R^2、R^3、R^4、R^5、R^6、R^7、R^8、R^9、R^{10}、R^{15}、R^{16}和R^{17}各自独立地被0至3个独立地选自以下的基团取代:卤素、羟基基团、C_1-C_6烷基基团、-O-(C_1-C_6烷基)基团、-$NR^{15}R^{16}$、C_3-C_8环烷基基团、C_1-C_6烷基羟基基团、C_1-C_6烷基烷氧基基团、苄基基团和C_3-C_8杂环基基团;

[0243] 其中R^6和R^7中至少一个是氢;

[0244] 其中如果R^2是接头,则R^6和R^7均不为接头,且如果R^6或R^7是接头,则R^2不存在;并且

[0245] 其中R^1和R^9不能同时不存在。

[0246] 在各种其他实施例中,本文所披露的接头-药物(L-D)化合物包含根据式(IX)的接头-药物结构。在不同实施例中,本披露提供了具有式(IX)的接头-药物(L-D)化合物:

[0247]  (IX),或其药学上可接受的盐,其中:

[0248] R^1选自不存在、氢、C_1-C_6烷基基团、C_1-C_6烷基烷氧基基团、C_1-C_6烷基氨基基团、C_1-C_6烷基羧酸基团、C_1-C_6烷基羟基基团、C_3-C_8环烷基基团、苄基基团、C_3-C_8杂环基基团、-O-C(=O)-(C_1-C_6烷基)基团和-CD_3;

[0249] R^2是接头;

[0250] R^3选自氢、C_1-C_6烷基基团、C_1-C_6烷基烷氧基基团、C_1-C_6烷基氨基基团、C_1-C_6烷基羧酸基团、C_1-C_6烷基羟基基团、C_3-C_8环烷基基团、苄基基团、C_3-C_8杂环基基团和-O-C(=O)-(C_1-C_6烷基)基团;

[0251] R^4选自氢、羟基基团、-O-(C_1-C_6烷基)基团、-O-C(=O)-(C_1-C_6烷基)基团和C_1-C_6烷基基团;

[0252] R^{10}选自3至10元碳环和3至10元杂环,其各自被0至3个R^a取代,其中每个R^a独立地选自卤素、C_1-C_6烷基基团、-O-(C_1-C_6)烷基基团、C_1-C_6烷基烷氧基基团、C_1-C_6烷基羟基基团、-S(=O)$_w$-(4至7元杂环)、4至7元碳环和4至7元杂环;

[0253] R^{15}和R^{16}各自独立地选自氢、R^{17}、-C(=O)-R^{17}和-C(=O)-O-R^{17};并且

[0254] R^{17}选自氢、C_1-C_6烷基基团、C_3-C_8环烷基基团、苄基基团和C_3-C_8杂环基基团;

[0255] 其中R^1、R^2、R^3、R^4、R^{10}、R^{15}、R^{16}和R^{17}各自独立地被0至3个独立地选自以下的基团取代:卤素、羟基基团、C_1-C_6烷基基团、-O-(C_1-C_6烷基)基团、-$NR^{15}R^{16}$、C_3-C_8环烷基基团、C_1-C_6烷基羟基基团、C_1-C_6烷基烷氧基基团、苄基基团和C_3-C_8杂环基基团;并且

[0256] 其中每个R^a独立地被0至3个独立地选自以下的基团取代:卤素、羟基基团、-$NR^{15}R^{16}$、C_1-C_6烷基基团、-(C=O)-(C_1-C_6烷基)基团、-(C=O)-(C_1-C_6烷基)-(C_3-C_{10}杂环基)基团和C_1-C_6烷基羧酸基团,其各自被0、1或2个独立地选自以下的基团取代:卤素、羟基基团、-$NR^{15}R^{16}$和C_1-C_3烷基基团;并且

[0257] w是0、1或2。

[0258] 另外,在不同实施例中,本文提供了所述ADC复合物和组合物例如在治疗赘生性病症(例如癌症)中的治疗用途。在某些方面中,本披露提供了治疗赘生性病症的方法,该赘生

性病症例如表达该ADC中的抗体或抗原结合片段所靶向的抗原的癌症,该抗原例如HER2、CD138、EPHA2、MSLN、FOLH1、CDH6、CEACAM5、CFC1B、ENPP3、FOLR1、HAVCR1、KIT、MET、MUC16、SLC39A6、SLC44A4或STEAP1。

[0259] 在某些方面中,本披露提供了通过向受试者施用治疗有效量和/或方案的所述ADC或组合物中的任一种来治疗患有或疑似患有赘生性病症的受试者的方法。在一些实施例中,该赘生性病症是血液恶性病或实体瘤。在一些实施例中,该赘生性病症是血液恶性病。在一些实施例中,该血液恶性病选自B细胞恶性病、白血病、淋巴瘤和骨髓瘤。在一些实施例中,该血液恶性病选自急性骨髓性白血病和多发性骨髓瘤。在一些实施例中,该赘生性病症是实体瘤。在一些实施例中,该实体瘤选自乳腺癌(例如HER2阳性乳腺癌)、胃癌(例如胃腺癌)、前列腺癌、卵巢癌、肺癌(例如肺腺癌)、子宫癌(例如子宫浆液性子宫内膜癌)、涎腺导管癌、黑素瘤、结肠癌、宫颈癌、胰腺癌、肾癌、结肠直肠癌和食道癌。在一些实施例中,该实体瘤选自HER2阳性乳腺癌、胃腺癌、前列腺癌和骨肉瘤。

[0260] 在一些实施例中,用该抗体-药物缀合物或组合物进行治疗诱导了对不表达靶抗原但与表达靶抗原的赘生性细胞邻近的赘生性细胞的旁观者杀伤。在一些实施例中,该受试者具有一个或多个表达靶抗原的赘生性细胞。

[0261] 在一些实施例中,该靶抗原是HER2。在一些实施例中,该一个或多个赘生性细胞源自表达HER2的乳腺癌、卵巢癌、胃癌、肺癌(例如肺腺癌)、子宫癌(例如子宫浆液性子宫内膜癌)、骨肉瘤或涎腺导管癌。在一些实施例中,该受试者对用(a)单独施用时的抗HER2抗体和/或(b)单独施用时的剪接调节剂进行的治疗无响应或响应不良。在一些实施例中,该受试者对用单独施用时的剪接调节剂进行的治疗不耐受、无响应或响应不良。

[0262] 在一些实施例中,该靶抗原是CD138。在一些实施例中,该一个或多个赘生性细胞源自表达CD138的多发性骨髓瘤。在一些实施例中,该受试者对用(a)单独施用时的抗CD138抗体和/或(b)单独施用时的剪接调节剂进行的治疗无响应或响应不良。在一些实施例中,该受试者对用单独施用时的剪接调节剂进行的治疗不耐受、无响应或响应不良。

[0263] 在一些实施例中,该靶抗原是EPHA2。在一些实施例中,该一个或多个赘生性细胞源自表达EPHA2的乳腺癌、前列腺癌、卵巢癌、肺癌、黑素瘤、结肠癌或食道癌。在一些实施例中,该受试者对用(a)单独施用时的抗EPHA2抗体和/或(b)单独施用时的剪接调节剂进行的治疗无响应或响应不良。在一些实施例中,该受试者对用单独施用时的剪接调节剂进行的治疗不耐受、无响应或响应不良。

[0264] 在一些实施例中,该靶抗原是MSLN。在一些实施例中,该一个或多个赘生性细胞源自表达MSLN的卵巢癌、宫颈癌、胰腺癌或肺癌(例如肺腺癌)。在一些实施例中,该受试者对用(a)单独施用时的抗MSLN抗体和/或(b)单独施用时的剪接调节剂进行的治疗无响应或响应不良。在一些实施例中,该受试者对用单独施用时的剪接调节剂进行的治疗不耐受、无响应或响应不良。

[0265] 在一些实施例中,该靶抗原是FOLH1。在一些实施例中,该一个或多个赘生性细胞源自表达FOLH1的前列腺癌。在一些实施例中,该受试者对用(a)单独施用时的抗FOLH1抗体和/或(b)单独施用时的剪接调节剂进行的治疗无响应或响应不良。在一些实施例中,该受试者对用单独施用时的剪接调节剂进行的治疗不耐受、无响应或响应不良。

[0266] 在一些实施例中,该靶抗原是CDH6。在一些实施例中,该一个或多个赘生性细胞源

自表达CDH6的肾癌。在一些实施例中,该受试者对用(a)单独施用时的抗CDH6抗体和/或(b)单独施用时的剪接调节剂进行的治疗无响应或响应不良。在一些实施例中,该受试者对用单独施用时的剪接调节剂进行的治疗不耐受、无响应或响应不良。

[0267] 在一些实施例中,该靶抗原是CEACAM5。在一些实施例中,该一个或多个赘生性细胞源自表达CEACAM5的结肠直肠癌。在一些实施例中,该受试者对用(a)单独施用时的抗CEACAM5抗体和/或(b)单独施用时的剪接调节剂进行的治疗无响应或响应不良。在一些实施例中,该受试者对用单独施用时的剪接调节剂进行的治疗不耐受、无响应或响应不良。

[0268] 在一些实施例中,该靶抗原是CFC1B。在一些实施例中,该一个或多个赘生性细胞源自表达CFC1B的胰腺癌。在一些实施例中,该受试者对用(a)单独施用时的抗CFC1B抗体和/或(b)单独施用时的剪接调节剂进行的治疗无响应或响应不良。在一些实施例中,该受试者对用单独施用时的剪接调节剂进行的治疗不耐受、无响应或响应不良。

[0269] 在一些实施例中,该靶抗原是ENPP3。在一些实施例中,该一个或多个赘生性细胞源自表达ENPP3的肾癌。在一些实施例中,该受试者对用(a)单独施用时的抗ENPP3抗体和/或(b)单独施用时的剪接调节剂进行的治疗无响应或响应不良。在一些实施例中,该受试者对用单独施用时的剪接调节剂进行的治疗不耐受、无响应或响应不良。

[0270] 在一些实施例中,该靶抗原是FOLR1。在一些实施例中,该一个或多个赘生性细胞源自表达FOLR1的卵巢癌。在一些实施例中,该受试者对用(a)单独施用时的抗FOLR1抗体和/或(b)单独施用时的剪接调节剂进行的治疗无响应或响应不良。在一些实施例中,该受试者对用单独施用时的剪接调节剂进行的治疗不耐受、无响应或响应不良。

[0271] 在一些实施例中,该靶抗原是HAVCR1。在一些实施例中,该一个或多个赘生性细胞源自表达HAVCR1的肾癌或食道癌。在一些实施例中,该受试者对用(a)单独施用时的抗HAVCR1抗体和/或(b)单独施用时的剪接调节剂进行的治疗无响应或响应不良。在一些实施例中,该受试者对用单独施用时的剪接调节剂进行的治疗不耐受、无响应或响应不良。

[0272] 在一些实施例中,该靶抗原是KIT。在一些实施例中,该一个或多个赘生性细胞源自表达KIT的肾癌。在一些实施例中,该受试者对用(a)单独施用时的抗KIT抗体和/或(b)单独施用时的剪接调节剂进行的治疗无响应或响应不良。在一些实施例中,该受试者对用单独施用时的剪接调节剂进行的治疗不耐受、无响应或响应不良。

[0273] 在一些实施例中,该靶抗原是MET。在一些实施例中,该一个或多个赘生性细胞源自表达MET的肾癌或食道癌。在一些实施例中,该受试者对用(a)单独施用时的抗MET抗体和/或(b)单独施用时的剪接调节剂进行的治疗无响应或响应不良。在一些实施例中,该受试者对用单独施用时的剪接调节剂进行的治疗不耐受、无响应或响应不良。

[0274] 在一些实施例中,该靶抗原是MUC16。在一些实施例中,该一个或多个赘生性细胞源自表达MUC16的卵巢癌、宫颈癌或乳腺癌。在一些实施例中,该受试者对用(a)单独施用时的抗MUC16抗体和/或(b)单独施用时的剪接调节剂进行的治疗无响应或响应不良。在一些实施例中,该受试者对用单独施用时的剪接调节剂进行的治疗不耐受、无响应或响应不良。

[0275] 在一些实施例中,该靶抗原是SLC39A6。在一些实施例中,该一个或多个赘生性细胞源自表达SLC39A6的乳腺癌或前列腺癌。在一些实施例中,该受试者对用(a)单独施用时的抗SLC39A6抗体和/或(b)单独施用时的剪接调节剂进行的治疗无响应或响应不良。在一些实施例中,该受试者对用单独施用时的剪接调节剂进行的治疗不耐受、无响应或响应不

良。

[0276] 在一些实施例中,该靶抗原是SLC44A4。在一些实施例中,该一个或多个赘生性细胞源自表达SLC44A4的前列腺癌。在一些实施例中,该受试者对用(a)单独施用时的抗SLC44A4抗体和/或(b)单独施用时的剪接调节剂进行的治疗无响应或响应不良。在一些实施例中,该受试者对用单独施用时的剪接调节剂进行的治疗不耐受、无响应或响应不良。

[0277] 在一些实施例中,该靶抗原是STEAP1。在一些实施例中,该一个或多个赘生性细胞源自表达STEAP1的前列腺癌。在一些实施例中,该受试者对用(a)单独施用时的抗STEAP1抗体和/或(b)单独施用时的剪接调节剂进行的治疗无响应或响应不良。在一些实施例中,该受试者对用单独施用时的剪接调节剂进行的治疗不耐受、无响应或响应不良。

[0278] 在某些其他方面中,本披露提供了通过向受试者施用治疗有效量和/或方案的所述ADC或组合物中的任一种来减少或抑制患有或疑似患有赘生性病症的受试者中的肿瘤生长的方法。

[0279] 在一些实施例中,用该抗体-药物缀合物或组合物进行治疗诱导了对不表达靶抗原但与表达靶抗原的赘生性肿瘤细胞邻近的赘生性肿瘤细胞的旁观者杀伤。在一些实施例中,该肿瘤包含一个或多个表达靶抗原的赘生性细胞。

[0280] 在一些实施例中,该靶抗原是HER2。在一些实施例中,该一个或多个赘生性细胞源自表达HER2的乳腺癌、卵巢癌、胃癌、肺癌(例如肺腺癌)、子宫癌(例如子宫浆液性子宫内膜癌)、骨肉瘤或涎腺导管癌。在一些实施例中,该肿瘤对用(a)单独施用时的抗HER2抗体和/或(b)单独施用时的剪接调节剂进行的治疗具有抗性或难治性。

[0281] 在一些实施例中,该靶抗原是CD138。在一些实施例中,该一个或多个赘生性细胞源自表达CD138的多发性骨髓瘤。在一些实施例中,该肿瘤对用(a)单独施用时的抗CD138抗体和/或(b)单独施用时的剪接调节剂进行的治疗具有抗性或难治性。

[0282] 在一些实施例中,该靶抗原是EPHA2。在一些实施例中,该一个或多个赘生性细胞源自表达EPHA2的乳腺癌、前列腺癌、卵巢癌、肺癌、黑素瘤、结肠癌或食道癌。在一些实施例中,该肿瘤对用(a)单独施用时的抗EPHA2抗体和/或(b)单独施用时的剪接调节剂进行的治疗具有抗性或难治性。

[0283] 在一些实施例中,该靶抗原是MSLN。在一些实施例中,该一个或多个赘生性细胞源自表达MSLN的卵巢癌、宫颈癌、胰腺癌或肺癌(例如肺腺癌)。在一些实施例中,该肿瘤对用(a)单独施用时的抗MSLN抗体和/或(b)单独施用时的剪接调节剂进行的治疗具有抗性或难治性。

[0284] 在一些实施例中,该靶抗原是FOLH1。在一些实施例中,该一个或多个赘生性细胞源自表达FOLH1的前列腺癌。在一些实施例中,该肿瘤对用(a)单独施用时的抗FOLH1抗体和/或(b)单独施用时的剪接调节剂进行的治疗具有抗性或难治性。

[0285] 在一些实施例中,该靶抗原是CDH6。在一些实施例中,该一个或多个赘生性细胞源自表达CDH6的肾癌。在一些实施例中,该肿瘤对用(a)单独施用时的抗CDH6抗体和/或(b)单独施用时的剪接调节剂进行的治疗具有抗性或难治性。

[0286] 在一些实施例中,该靶抗原是CEACAM5。在一些实施例中,该一个或多个赘生性细胞源自表达CEACAM5的结肠直肠癌。在一些实施例中,该肿瘤对用(a)单独施用时的抗CEACAM5抗体和/或(b)单独施用时的剪接调节剂进行的治疗具有抗性或难治性。

[0287] 在一些实施例中,该靶抗原是CFC1B。在一些实施例中,该一个或多个赘生性细胞源自表达CFC1B的胰腺癌。在一些实施例中,该肿瘤对用(a)单独施用时的抗CFC1B抗体和/或(b)单独施用时的剪接调节剂进行的治疗具有抗性或难治性。

[0288] 在一些实施例中,该靶抗原是ENPP3。在一些实施例中,该一个或多个赘生性细胞源自表达ENPP3的肾癌。在一些实施例中,该肿瘤对用(a)单独施用时的抗ENPP3抗体和/或(b)单独施用时的剪接调节剂进行的治疗具有抗性或难治性。

[0289] 在一些实施例中,该靶抗原是FOLR1。在一些实施例中,该一个或多个赘生性细胞源自表达FOLR1的卵巢癌。在一些实施例中,该肿瘤对用(a)单独施用时的抗FOLR1抗体和/或(b)单独施用时的剪接调节剂进行的治疗具有抗性或难治性。

[0290] 在一些实施例中,该靶抗原是HAVCR1。在一些实施例中,该一个或多个赘生性细胞源自表达HAVCR1的肾癌或食道癌。在一些实施例中,该肿瘤对用(a)单独施用时的抗HAVCR1抗体和/或(b)单独施用时的剪接调节剂进行的治疗具有抗性或难治性。

[0291] 在一些实施例中,该靶抗原是KIT。在一些实施例中,该一个或多个赘生性细胞源自表达KIT的肾癌。在一些实施例中,该肿瘤对用(a)单独施用时的抗KIT抗体和/或(b)单独施用时的剪接调节剂进行的治疗具有抗性或难治性。

[0292] 在一些实施例中,该靶抗原是MET。在一些实施例中,该一个或多个赘生性细胞源自表达MET的肾癌或食道癌。在一些实施例中,该肿瘤对用(a)单独施用时的抗MET抗体和/或(b)单独施用时的剪接调节剂进行的治疗具有抗性或难治性。

[0293] 在一些实施例中,该靶抗原是MUC16。在一些实施例中,该一个或多个赘生性细胞源自表达MUC16的卵巢癌、宫颈癌或乳腺癌。在一些实施例中,该肿瘤对用(a)单独施用时的抗MUC16抗体和/或(b)单独施用时的剪接调节剂进行的治疗具有抗性或难治性。

[0294] 在一些实施例中,该靶抗原是SLC39A6。在一些实施例中,该一个或多个赘生性细胞源自表达SLC39A6的乳腺癌或前列腺癌。在一些实施例中,该肿瘤对用(a)单独施用时的抗SLC39A6抗体和/或(b)单独施用时的剪接调节剂进行的治疗具有抗性或难治性。

[0295] 在一些实施例中,该靶抗原是SLC44A4。在一些实施例中,该一个或多个赘生性细胞源自表达SLC44A4的前列腺癌。在一些实施例中,该肿瘤对用(a)单独施用时的抗SLC44A4抗体和/或(b)单独施用时的剪接调节剂进行的治疗具有抗性或难治性。

[0296] 在一些实施例中,该靶抗原是STEAP1。在一些实施例中,该一个或多个赘生性细胞源自表达STEAP1的前列腺癌。在一些实施例中,该肿瘤对用(a)单独施用时的抗STEAP1抗体和/或(b)单独施用时的剪接调节剂进行的治疗具有抗性或难治性。

[0297] 在仍其他方面中,本披露提供了通过提供来自受试者的生物样品并使该生物样品与所述ADC或组合物接触来确定患有或疑似患有赘生性病症的受试者是否会对用该ADC或组合物中的任一种进行的治疗有响应的方法。在一些实施例中,该生物样品是肿瘤样品。在一些实施例中,该肿瘤样品是肿瘤活检或血液样品。在一些实施例中,该血液样品选自血液、血液级分或自该血液或血液级分获得的细胞。在一些实施例中,该受试者具有一个或多个表达靶抗原的赘生性细胞。在一些实施例中,该靶抗原是HER2。在一些实施例中,该一个或多个赘生性细胞源自表达HER2的乳腺癌、卵巢癌、胃癌、肺癌(例如肺腺癌)、子宫癌(例如子宫浆液性子宫内膜癌)、骨肉瘤或涎腺导管癌。在一些实施例中,该靶抗原是CD138。在一些实施例中,该一个或多个赘生性细胞源自表达CD138的多发性骨髓瘤。在一些实施例中,

该靶抗原是EPHA2。在一些实施例中,该一个或多个赘生性细胞源自表达EPHA2的乳腺癌、前列腺癌、卵巢癌、肺癌、黑素瘤、结肠癌或食道癌。在一些实施例中,该靶抗原是MSLN。在一些实施例中,该一个或多个赘生性细胞源自表达MSLN的卵巢癌、宫颈癌、胰腺癌或肺癌(例如肺腺癌)。在一些实施例中,该靶抗原是FOLH1。在一些实施例中,该一个或多个赘生性细胞源自表达FOLH1的前列腺癌。在一些实施例中,该靶抗原是CDH6。在一些实施例中,该一个或多个赘生性细胞源自表达CDH6的肾癌。在一些实施例中,该靶抗原是CEACAM5。在一些实施例中,该一个或多个赘生性细胞源自表达CEACAM5的结肠直肠癌。在一些实施例中,该靶抗原是CFC1B。在一些实施例中,该一个或多个赘生性细胞源自表达CFC1B的胰腺癌。在一些实施例中,该靶抗原是ENPP3。在一些实施例中,该一个或多个赘生性细胞源自表达ENPP3的肾癌。在一些实施例中,该靶抗原是FOLR1。在一些实施例中,该一个或多个赘生性细胞源自表达FOLR1的卵巢癌。在一些实施例中,该靶抗原是HAVCR1。在一些实施例中,该一个或多个赘生性细胞源自表达HAVCR1的肾癌或食道癌。在一些实施例中,该靶抗原是KIT。在一些实施例中,该一个或多个赘生性细胞源自表达KIT的肾癌。在一些实施例中,该靶抗原是MET。在一些实施例中,该一个或多个赘生性细胞源自表达MET的肾癌或食道癌。在一些实施例中,该靶抗原是MUC16。在一些实施例中,该一个或多个赘生性细胞源自表达MUC16的卵巢癌、宫颈癌或乳腺癌。在一些实施例中,该靶抗原是SLC39A6。在一些实施例中,该一个或多个赘生性细胞源自表达SLC39A6的乳腺癌或前列腺癌。在一些实施例中,该靶抗原是SLC44A4。在一些实施例中,该一个或多个赘生性细胞源自表达SLC44A4的前列腺癌。在一些实施例中,该靶抗原是STEAP1。在一些实施例中,该一个或多个赘生性细胞源自表达STEAP1的前列腺癌。

[0298] 在不同实施例中,本文进一步提供了包含ADC和药学上可接受的稀释剂、载体和/或赋形剂的药物组合物。还披露了制造所述ADC复合物和组合物的方法。

[0299] 本申请涉及下述项:

[0300] 项1.一种具有式(I)的抗体-药物缀合物,

[0301] $Ab-(L-D)_p$ (I)

[0302] 其中

[0303] Ab是靶向赘生性细胞的抗体或抗原结合片段;

[0304] D是剪接调节剂;

[0305] L是将Ab共价连接至D的接头;并且

[0306] p是1至15的整数。

[0307] 项2.如项1所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段靶向源自血液恶性病或实体瘤的赘生性细胞。

[0308] 项3.如项1或项2所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段靶向源自血液恶性病的赘生性细胞。

[0309] 项4.如项3所述的抗体-药物缀合物,其中该血液恶性病选自B细胞恶性病、白血病、淋巴瘤和骨髓瘤。

[0310] 项5.如项3或项4所述的抗体-药物缀合物,其中该血液恶性病选自急性骨髓性白血病和多发性骨髓瘤。

[0311] 项6.如项1或项2所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段靶向源自实体瘤的赘生性细胞。

[0312] 项7.如项6所述的抗体-药物缀合物,其中该实体瘤选自乳腺癌、胃癌、前列腺癌、卵巢癌、肺癌、子宫癌、涎腺导管癌、黑素瘤、结肠癌、宫颈癌、胰腺癌、肾癌、结肠直肠癌和食道癌。

[0313] 项8.如项1至7中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段靶向表达HER2的细胞。

[0314] 项9.如项8所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段是抗HER2抗体或抗原结合片段。

[0315] 项10.如项8或项9所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:1(HCDR1)、SEQ ID NO:2(HCDR2)和SEQ ID NO:3(HCDR3)的氨基酸序列的三个重链互补决定区(HCDR1、HCDR2和HCDR3);以及含有SEQ ID NO:4(LCDR1)、SEQ ID NO:5(LCDR2)和SEQ ID NO:6(LCDR3)的氨基酸序列的三个轻链互补决定区(LCDR1、LCDR2和LCDR3)。

[0316] 项11.如项8至10中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:19的氨基酸序列的重链可变区和含有SEQ ID NO:20的氨基酸序列的轻链可变区。

[0317] 项12.如项8至11中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段包含人IgG1重链恒定区。

[0318] 项13.如项8至12中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段包含人Igκ轻链恒定区。

[0319] 项14.如项1至7中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段靶向表达CD138的细胞。

[0320] 项15.如项14所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段是抗CD138抗体或抗原结合片段。

[0321] 项16.如项14或项15所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:7(HCDR1)、SEQ ID NO:8(HCDR2)和SEQ ID NO:9(HCDR3)的氨基酸序列的三个重链互补决定区(HCDR1、HCDR2和HCDR3);以及含有SEQ ID NO:10(LCDR1)、SEQ ID NO:11(LCDR2)和SEQ ID NO:12(LCDR3)的氨基酸序列的三个轻链互补决定区(LCDR1、LCDR2和LCDR3)。

[0322] 项17.如项14至16中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:21的氨基酸序列的重链可变区和含有SEQ ID NO:22的氨基酸序列的轻链可变区。

[0323] 项18.如项14至17中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段包含人IgG2a重链恒定区。

[0324] 项19.如项14至18中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段包含人Igκ轻链恒定区。

[0325] 项20.如项1至7中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段靶向表达EPHA2的细胞。

[0326] 项21.如项20所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段是抗EPHA2抗体或抗原结合片段。

[0327] 项22.如项20或项21所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:13(HCDR1)、SEQ ID NO:14(HCDR2)和SEQ ID NO:15(HCDR3)的氨基酸序列的三个重链互补决定区(HCDR1、HCDR2和HCDR3);以及含有SEQ ID NO:16(LCDR1)、SEQ ID NO:17(LCDR2)和SEQ ID NO:18(LCDR3)的氨基酸序列的三个轻链互补决定区(LCDR1、LCDR2和LCDR3)。

[0328] 项23.如项20至22中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:23的氨基酸序列的重链可变区和含有SEQ ID NO:24的氨基酸序列的轻链可变区。

[0329] 项24.如项20至23中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段包含人IgG1重链恒定区。

[0330] 项25.如项20至24中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段包含人Igκ轻链恒定区。

[0331] 项26.如项1至25中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该接头是可裂解接头。

[0332] 项27.如项26所述的抗体-药物缀合物,其中该接头包含可裂解肽部分。

[0333] 项28.如项27所述的抗体-药物缀合物,其中该可裂解肽部分可被酶裂解。

[0334] 项29.如项26至28中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该可裂解肽部分或接头包含氨基酸单元。

[0335] 项30.如项29所述的抗体-药物缀合物,其中该氨基酸单元包含缬氨酸-瓜氨酸(Val-Cit)。

[0336] 项31.如项29所述的抗体-药物缀合物,其中该氨基酸单元包含缬氨酸-丙氨酸(Val-Ala)。

[0337] 项32.如项26所述的抗体-药物缀合物,其中该接头包含可裂解葡萄糖醛酸苷部分。

[0338] 项33.如项32所述的抗体-药物缀合物,其中该可裂解葡萄糖醛酸苷部分可被酶裂解。

[0339] 项34.如项32或项33所述的抗体-药物缀合物,其中该可裂解葡萄糖醛酸苷部分可被葡萄糖醛酸苷酶裂解。

[0340] 项35.如项32至34中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该可裂解葡萄糖醛酸苷部分可被β-葡萄糖醛酸苷酶裂解。

[0341] 项36.如项1至35中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该接头包含至少一个间隔子单元。

[0342] 项37.如项36所述的抗体-药物缀合物,其中该间隔子单元或接头包含聚乙二醇(PEG)部分。

[0343] 项38.如项37所述的抗体-药物缀合物,其中该PEG部分包含-$(PEG)_m$-且m是1至10的整数。

[0344] 项39.如项38所述的抗体-药物缀合物,其中m是2。

[0345] 项40.如项36所述的抗体-药物缀合物,其中该间隔子单元或接头包含烷基部分。

[0346] 项41.如项40所述的抗体-药物缀合物,其中该烷基部分包含-$(CH_2)_n$-且n是1至10的整数。

[0347] 项42.如项41所述的抗体-药物缀合物,其中n是2。

[0348] 项43.如项41所述的抗体-药物缀合物,其中n是5。

[0349] 项44.如项41所述的抗体-药物缀合物,其中n是6。

[0350] 项45.如项36至44中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该间隔子单元经由马来酰亚胺(Mal)部分(“Mal-间隔子单元”)连接至该抗体或抗原结合片段。

[0351] 项46.如项45所述的抗体-药物缀合物,其中该Mal-间隔子单元可与该抗体或抗原结合片段上的半胱氨酸残基反应。

[0352] 项47.如项45或项46所述的抗体-药物缀合物,其中该Mal-间隔子单元经由该抗体或抗原结合片段上的半胱氨酸残基接合至该抗体或抗原结合片段。

[0353] 项48.如项45至47中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该接头包含该Mal-间隔子单元和可裂解肽部分。

[0354] 项49.如项48所述的抗体-药物缀合物,其中该可裂解肽部分包含氨基酸单元。

[0355] 项50.如项48或项49所述的抗体-药物缀合物,其中该可裂解肽部分或氨基酸单元包含Val-Cit。

[0356] 项51.如项48或项49所述的抗体-药物缀合物,其中该可裂解肽部分或氨基酸单元包含Val-Ala。

[0357] 项52.如项45至51中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该Mal-间隔子单元包含烷基部分。

[0358] 项53.如项45至51中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该Mal-间隔子单元包含PEG部分。

[0359] 项54.如项45至52中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该Mal-间隔子单元包含马来酰亚胺基己酰基(MC)。

[0360] 项55.如项45至54中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该Mal-间隔子单元将该抗体或抗原结合片段连接至该接头中的可裂解部分。

[0361] 项56.如项55所述的抗体-药物缀合物,其中该接头中的可裂解部分包含可裂解肽部分。

[0362] 项57.如项56所述的抗体-药物缀合物,其中该可裂解肽部分包含氨基酸单元。

[0363] 项58.如项56或项57所述的抗体-药物缀合物,其中该可裂解肽部分或氨基酸单元包含Val-Cit、Val-Ala、Glu-Val-Cit或Ala-Ala-Asn。

[0364] 项59.如项55至58中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该接头包含MC-Val-Cit。

[0365] 项60.如项55至58中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该接头包含MC-Val-Ala。

[0366] 项61.如项55至60中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该Mal-间隔子单元包含烷基部分。

[0367] 项62.如项55至60中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该Mal-间隔子单元包含PEG部分。

[0368] 项63.如项55至61中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该Mal-间隔子单元包含马来酰亚胺基己酰基(MC)。

[0369] 项64.如项36至63中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该接头中的可裂解部分直接地接合至该剪接调节剂,或其中间隔子单元将该接头中的可裂解部分连接至该剪接调节剂。

[0370] 项65.如项64所述的抗体-药物缀合物,其中该缀合物的裂解使该剪接调节剂自该抗体或抗原结合片段和该接头释放。

[0371] 项66.如项64或项65所述的抗体-药物缀合物,其中将该接头中的可裂解部分连接至该剪接调节剂的该间隔子单元是自消融型的。

[0372] 项67.如项64至66中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中将该接头中的可裂解部分连接至该剪接调节剂的该间隔子单元包含对氨基苄氧基羰基(pABC)。

[0373] 项68.如项67所述的抗体-药物缀合物,其中该pABC将该接头中的可裂解部分连接至该剪接调节剂。

[0374] 项69.如项67或项68所述的抗体-药物缀合物,其中该接头中的可裂解部分包含可裂解肽部分。

[0375] 项70.如项69所述的抗体-药物缀合物,其中该可裂解肽部分包含氨基酸单元。

[0376] 项71.如项69或项70所述的抗体-药物缀合物,其中该可裂解肽部分或氨基酸单元包含Val-Cit、Val-Ala、Glu-Val-Cit或Ala-Ala-Asn。

[0377] 项72.如项67至71中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该接头包含Val-Cit-pABC。

[0378] 项73.如项67至71中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该接头包含Val-Ala-pABC。

[0379] 项74.如项64至66中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中将该接头中的可裂解部分连接至该剪接调节剂的该间隔子单元包含对氨基苄基(pAB)。

[0380] 项75.如项74所述的抗体-药物缀合物,其中该pAB将该接头中的可裂解部分连接至该剪接调节剂。

[0381] 项76.如项74或项75所述的抗体-药物缀合物,其中该接头中的可裂解部分包含可裂解肽部分。

[0382] 项77.如项76所述的抗体-药物缀合物,其中该可裂解肽部分包含氨基酸单元。

[0383] 项78.如项76或项77所述的抗体-药物缀合物,其中该可裂解肽部分或氨基酸单元包含Val-Cit、Val-Ala、Glu-Val-Cit或Ala-Ala-Asn。

[0384] 项79.如项74至78中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该接头包含Val-Cit-pAB。

[0385] 项80.如项74至78中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该接头包含Val-Ala-pAB。

[0386] 项81.如项1至25中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该接头是不可裂解接头。

[0387] 项82.如项81所述的抗体-药物缀合物,其中该接头包含至少一个间隔子单元。

[0388] 项83.如项81或项82所述的抗体-药物缀合物,其中该间隔子单元或接头包含聚乙二醇(PEG)部分。

[0389] 项84.如项83所述的抗体-药物缀合物,其中该PEG部分包含-$(PEG)_m$-且m是1至10的整数。

[0390] 项85.如项84所述的抗体-药物缀合物,其中m是2。

[0391] 项86.如项81或项82所述的抗体-药物缀合物,其中该间隔子单元或接头包含烷基部分。

[0392] 项87.如项86所述的抗体-药物缀合物,其中该烷基部分包含-$(CH_2)_n$-且n是1至10的整数。

[0393] 项88.如项87所述的抗体-药物缀合物,其中n是2。

[0394] 项89.如项87所述的抗体-药物缀合物,其中n是5。

[0395] 项90.如项87所述的抗体-药物缀合物,其中n是6。

[0396] 项91.如项81至90中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该间隔子单元经由马来酰亚胺(Mal)部分("Mal-间隔子单元")连接至该抗体或抗原结合片段。

[0397] 项92.如项91所述的抗体-药物缀合物,其中该Mal-间隔子单元可与该抗体或抗原结合片段上的半胱氨酸残基反应。

[0398] 项93.如项91或项92所述的抗体-药物缀合物,其中该Mal-间隔子单元经由该抗体或抗原结合片段上的半胱氨酸残基接合至该抗体或抗原结合片段。

[0399] 项94.如项91至93中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该Mal-间隔子单元包含烷基部分。

[0400] 项95.如项91至93中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该Mal-间隔子单元包含PEG部分。

[0401] 项96.如项91至95中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该接头或Mal-间隔子单元包含马来酰亚胺基己酰基(MC)。

[0402] 项97.如项96所述的抗体-药物缀合物,其中该接头或Mal-间隔子单元包含马来酰亚胺基己酰基(MC)和至少一个额外间隔子单元。

[0403] 项98.如项91至95中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该接头或Mal-间隔子单元包含MC-$(PEG)_2$。

[0404] 项99.如项98所述的抗体-药物缀合物,其中该接头或Mal-间隔子单元包含MC-$(PEG)_2$和至少一个额外间隔子单元。

[0405] 项100.如项91至95中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该接头或Mal-间隔子单元包含Mal-Hex。

[0406] 项101.如项100所述的抗体-药物缀合物,其中该接头或Mal-间隔子单元包含MC-Hex和至少一个额外间隔子单元。

[0407] 项102.如项91至95中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该接头或Mal-间隔子单元包含Mal-Et。

[0408] 项103.如项102所述的抗体-药物缀合物,其中该接头或Mal-间隔子单元包含Mal-Et和至少一个额外间隔子单元。

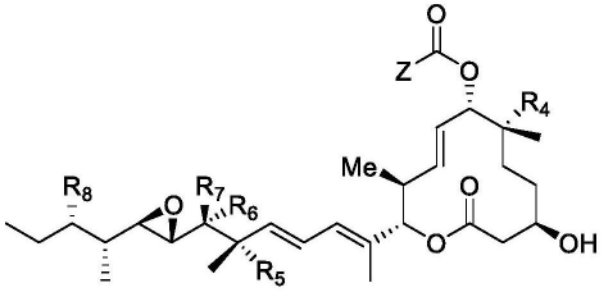
[0409] 项104.如项91至95中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该接头或Mal-间隔子单元包含Mal-Et-O-Et。

[0410] 项105.如项104所述的抗体-药物缀合物,其中该接头或Mal-间隔子单元包含Mal-Et-O-Et和至少一个额外间隔子单元。

[0411] 项106.如项91至105中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该Mal-间隔子单元将

该抗体或抗原结合片段连接至该剪接调节剂。

[0412] 项107.如项1至106中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该剪接调节剂包含具有式(II)的剪接调节剂:

[0413]  (II),或其药学上可接受的盐,其中:

[0414] R^1选自不存在、氢、C_1-C_6烷基基团、C_1-C_6烷基烷氧基基团、C_1-C_6烷基氨基基团、C_1-C_6烷基羧酸基团、C_1-C_6烷基羟基基团、C_3-C_8环烷基基团、苄基基团、C_3-C_8杂环基基团、-O-C(=O)-(C_1-C_6烷基)基团和-CD_3;

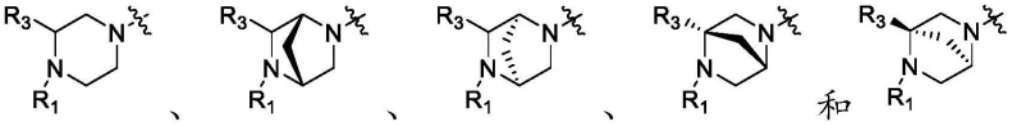
[0415] R^3选自氢、C_1-C_6烷基基团、C_1-C_6烷基烷氧基基团、C_1-C_6烷基氨基基团、C_1-C_6烷基羧酸基团、C_1-C_6烷基羟基基团、C_3-C_8环烷基基团、苄基基团、C_3-C_8杂环基基团和-O-C(=O)-(C_1-C_6烷基)基团;并且

[0416] R^4、R^5和R^8各自独立地选自氢、羟基基团、-O-(C_1-C_6烷基)基团、-O-C(=O)-(C_1-C_6烷基)基团和C_1-C_6烷基基团;

[0417] R^6和R^7各自独立地选自氢、-O-R^{17}、-O-C(=O)-R^{17}、-O-C(=O)-$NR^{15}R^{16}$、C_1-C_6烷基基团和-$NR^{15}R^{16}$;

[0418] R^{15}和R^{16}各自独立地选自氢、R^{17}、-C(=O)-R^{17}和-C(=O)-O-R^{17};

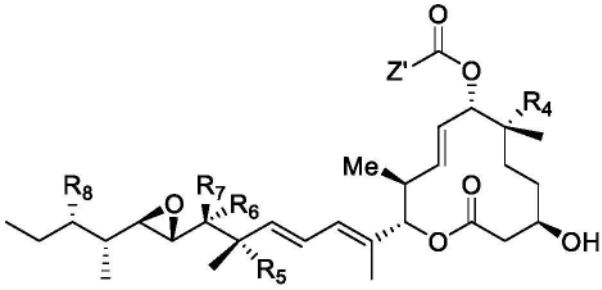
[0419] R^{17}选自氢、C_1-C_6烷基基团、C_3-C_8环烷基基团、苄基基团和C_3-C_8杂环基基团;并且

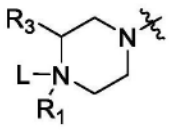
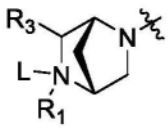
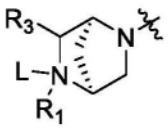
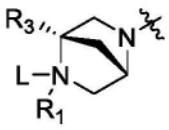
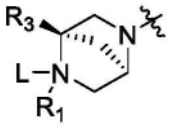
[0420] Z选自  ;

[0421] 其中R^1、R^3、R^4、R^5、R^6、R^7、R^8、R^{15}、R^{16}和R^{17}各自独立地被0至3个独立地选自以下的基团取代:卤素、羟基基团、C_1-C_6烷基基团、-O-(C_1-C_6烷基)基团、-$NR^{15}R^{16}$、C_3-C_8环烷基基团、C_1-C_6烷基羟基基团、C_1-C_6烷基烷氧基基团、苄基基团和C_3-C_8杂环基基团,

[0422] 其中R^6和R^7中至少一个是氢。

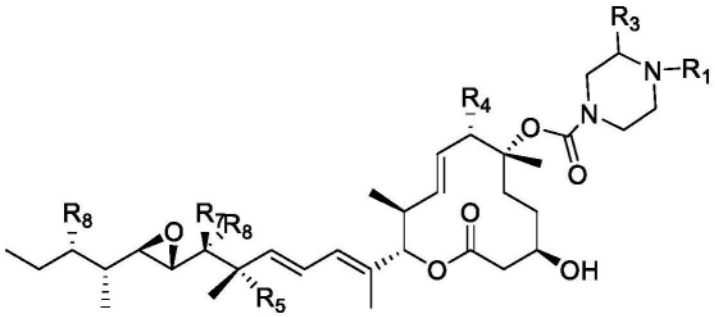
[0423] 项108.如项107所述的抗体-药物缀合物,其中该接头共价连接至该剪接调节剂(“L-D”),且L-D具有式(II-A)的结构:

[0424]  (II-A),或其药学上可接受的盐,

[0425] 其中Z'选自  、  、  、  和  并且;

[0426] 其中所有其他变量是如关于式(II)所定义。

[0427] 项109.如项1至106中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该剪接调节剂是具有式(IV)的剪接调节剂:

[0428]  或其药学上可接受的盐,其中:

[0429] R^1选自氢、C_1-C_6烷基基团、C_1-C_6烷基烷氧基基团、C_1-C_6烷基氨基基团、C_1-C_6烷基羧酸基团、C_1-C_6烷基羟基基团、C_3-C_8环烷基基团、苄基基团、C_3-C_8杂环基基团、-O-C(=O)-(C_1-C_6烷基)基团和-CD_3;

[0430] R^3选自氢、C_1-C_6烷基基团、C_1-C_6烷基烷氧基基团、C_1-C_6烷基氨基基团、C_1-C_6烷基羧酸基团、C_1-C_6烷基羟基基团、C_3-C_8环烷基基团、苄基基团、C_3-C_8杂环基基团和-O-C(=O)-(C_1-C_6烷基)基团;并且

[0431] R^4、R^5和R^8各自独立地选自氢、羟基基团、-O-(C_1-C_6烷基)基团、-O-C(=O)-(C_1-C_6烷基)基团和C_1-C_6烷基基团;

[0432] R^6和R^7各自独立地选自氢、-O-R^{17}、-O-C(=O)-R^{17}、-O-C(=O)-$NR^{15}R^{16}$、C_1-C_6烷基基团和-$NR^{15}R^{16}$;

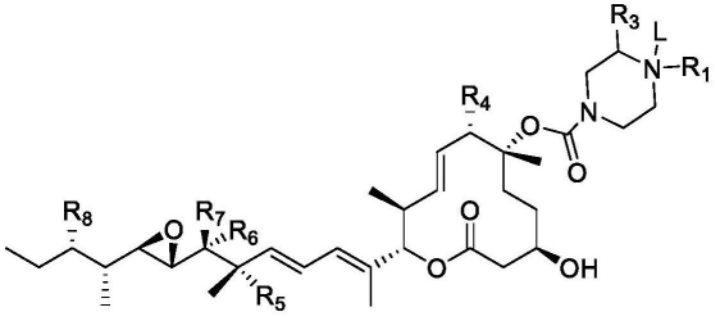
[0433] R^{15}和R^{16}各自独立地选自氢、R^{17}、-C(=O)-R^{17}和-C(=O)-O-R^{17};并且

[0434] R^{17}选自氢、C_1-C_6烷基基团、C_3-C_8环烷基基团、苄基基团和C_3-C_8杂环基基团;

[0435] 其中R^1、R^3、R^4、R^5、R^6、R^7、R^8、R^{15}、R^{16}和R^{17}各自独立地被0至3个独立地选自以下的基团取代:卤素、羟基基团、C_1-C_6烷基基团、-O-(C_1-C_6烷基)基团、-$NR^{15}R^{16}$、C_3-C_8环烷基基团、C_1-C_6烷基羟基基团、C_1-C_6烷基烷氧基基团、苄基基团和C_3-C_8杂环基基团,

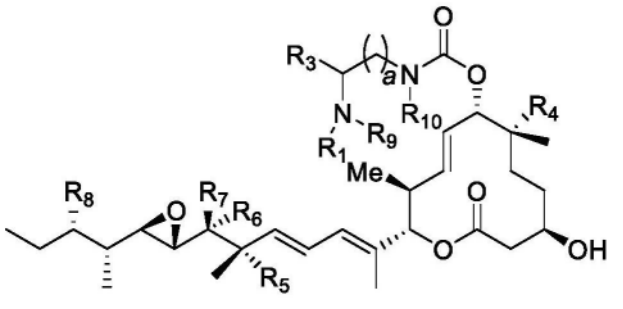
[0436] 其中R^6和R^7中至少一个是氢。

[0437] 项110.如项109所述的抗体-药物缀合物,其中该接头共价连接至该剪接调节剂("L-D"),且L-D具有式(IV-A)的结构:

[0438]  (IV-A),

或其药学上可接受的盐。

[0439] 项111.如项1至106中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该剪接调节剂是具有式(VI)的剪接调节剂:

[0440]  (VI),

或其药学上可接受的盐,其中:

[0441] R^1和R^9各自独立地选自氢、C_1-C_6烷基基团、C_1-C_6烷基烷氧基基团、C_1-C_6烷基氨基基团、C_1-C_6烷基羧酸基团、C_1-C_6烷基羟基基团、C_3-C_8环烷基基团、苄基基团、C_3-C_8杂环基基团、-O-C(=O)-(C_1-C_6烷基)基团和-CD_3;

[0442] R^3选自氢、C_1-C_6烷基基团、C_1-C_6烷基烷氧基基团、C_1-C_6烷基氨基基团、C_1-C_6烷基羧酸基团、C_1-C_6烷基羟基基团、C_3-C_8环烷基基团、苄基基团、C_3-C_8杂环基基团和-O-C(=O)-(C_1-C_6烷基)基团;

[0443] R^4、R^5和R^8各自独立地选自氢、羟基基团、-O-(C_1-C_6烷基)基团、-O-C(=O)-(C_1-C_6烷基)基团和C_1-C_6烷基基团;

[0444] R^6和R^7各自独立地选自氢、-O-R^{17}、-O-C(=O)-R^{17}、-O-C(=O)-$NR^{15}R^{16}$、C_1-C_6烷基基团、-$NR^{15}R^{16}$和接头;

[0445] R^{10}选自氢、C_1-C_6烷基基团、-C(=O)-(C_1-C_6烷基)基团和-CD_3;

[0446] R^{15}和R^{16}各自独立地选自氢、R^{17}、-C(=O)-R^{17}和-C(=O)-O-R^{17};

[0447] R^{17}选自氢、C_1-C_6烷基基团、C_3-C_8环烷基基团、苄基基团和C_3-C_8杂环基基团;并且

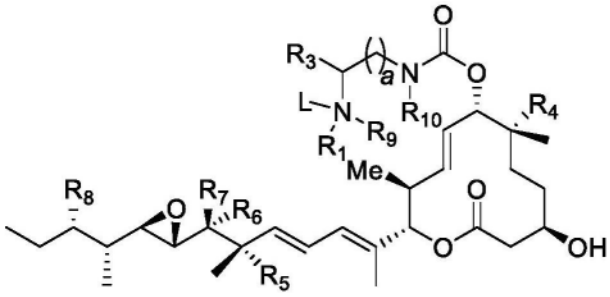
[0448] a是1、2、3、4、5、6、7、8、9或10;

[0449] 其中R^1、R^3、R^4、R^5、R^6、R^7、R^8、R^9、R^{10}、R^{15}、R^{16}和R^{17}各自独立地被0至3个独立地选自以下的基团取代:卤素、羟基基团、C_1-C_6烷基基团、-O-(C_1-C_6烷基)基团、-$NR^{15}R^{16}$、C_3-C_8环烷基基团、C_1-C_6烷基羟基基团、C_1-C_6烷基烷氧基基团、苄基基团和C_3-C_8杂环基基团;

[0450] 其中R^6和R^7中至少一个是氢;并且

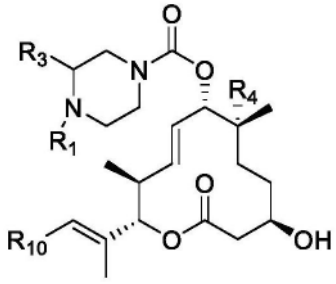
[0451] 其中R^1和R^9不能同时不存在。

[0452] 项112.如项111所述的抗体-药物缀合物,其中该接头共价连接至该剪接调节剂("L-D"),且L-D具有式(VI-A)的结构:

[0453]  或其药学上可接受的盐。

(VI-A),

[0454] 项113.如项1至106中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该剪接调节剂是具有式(VIII)的剪接调节剂:

[0455]  或其药学上可接受的盐,其中:

(VIII),

[0456] R^1选自不存在、氢、C_1-C_6烷基基团、C_1-C_6烷基烷氧基基团、C_1-C_6烷基氨基基团、C_1-C_6烷基羧酸基团、C_1-C_6烷基羟基基团、C_3-C_8环烷基基团、苄基基团、C_3-C_8杂环基基团、-O-C(=O)-(C_1-C_6烷基)基团和-CD_3;

[0457] R^3选自氢、C_1-C_6烷基基团、C_1-C_6烷基烷氧基基团、C_1-C_6烷基氨基基团、C_1-C_6烷基羧酸基团、C_1-C_6烷基羟基基团、C_3-C_8环烷基基团、苄基基团、C_3-C_8杂环基基团和-O-C(=O)-(C_1-C_6烷基)基团;

[0458] R^4选自氢、羟基基团、-O-(C_1-C_6烷基)基团、-O-C(=O)-(C_1-C_6烷基)基团和C_1-C_6烷基基团;并且

[0459] R^{10}选自3至10元碳环和3至10元杂环,其各自被0至3个R^a取代,其中每个R^a独立地选自卤素、C_1-C_6烷基基团、-O-(C_1-C_6)烷基基团、C_1-C_6烷基烷氧基基团、C_1-C_6烷基羟基基团、-S(=O)$_w$-(4至7元杂环)、4至7元碳环和4至7元杂环;

[0460] R^{15}和R^{16}各自独立地选自氢、R^{17}、-C(=O)-R^{17}和-C(=O)-O-R^{17};并且

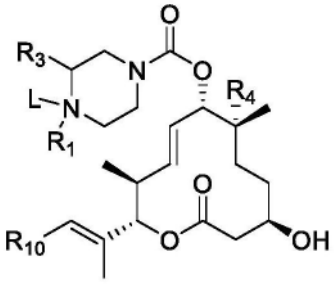
[0461] R^{17}选自氢、C_1-C_6烷基基团、C_3-C_8环烷基基团、苄基基团和C_3-C_8杂环基基团;

[0462] 其中R^1、R^3、R^4、R^{10}、R^{15}、R^{16}和R^{17}各自独立地被0至3个独立地选自以下的基团取代:卤素、羟基基团、C_1-C_6烷基基团、-O-(C_1-C_6烷基)基团、-$NR^{15}R^{16}$、C_3-C_8环烷基基团、C_1-C_6烷基羟基基团、C_1-C_6烷基烷氧基基团、苄基基团和C_3-C_8杂环基基团;并且

[0463] 其中每个R^a独立地被0至3个独立地选自以下的基团取代:卤素、羟基基团、-$NR^{15}R^{16}$、C_1-C_6烷基基团、-(C=O)-(C_1-C_6烷基)基团、-(C=O)-(C_1-C_6烷基)-(C_3-C_{10}杂环基)基团、-S(=O)$_w$-(C_3-C_8杂环基基团)和C_1-C_6烷基羧酸基团,其各自被0、1或2个独立地选自以下的基团取代:卤素、羟基基团、-$NR^{15}R^{16}$和C_1-C_3烷基基团;并且

[0464] w是0、1或2。

[0465] 项114.如项113所述的抗体-药物缀合物,其中该接头共价连接至该剪接调节剂(“L-D”),且L-D具有式(VIII-A)的结构:

[0466]  或其药学上可接受的盐。

(VIII-A),

[0467] 项115.如项1至106中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该剪接调节剂包含SF3b复合体的调节剂。

[0468] 项116.如项115所述的抗体-药物缀合物,其中该剪接调节剂包含普拉二烯内酯或普拉二烯内酯衍生物。

[0469] 项117.如项115或项116所述的抗体-药物缀合物,其中该剪接调节剂包含普拉二烯内酯D或普拉二烯内酯D衍生物。

[0470] 项118.如项117所述的抗体-药物缀合物,其中该普拉二烯内酯D或衍生物包含D2、D1、D4、D8、D10、D11(E7107)、D20、D21、D22、D12或D25。

[0471] 项119.如项117或项118所述的抗体-药物缀合物,其中该普拉二烯内酯D或衍生物包含D2。

[0472] 项120.如项117或项118所述的抗体-药物缀合物,其中该普拉二烯内酯D或衍生物包含D1。

[0473] 项121.如项117或项118所述的抗体-药物缀合物,其中该普拉二烯内酯D或衍生物是两性离子型普拉二烯内酯D或衍生物。

[0474] 项122.如项121所述的抗体-药物缀合物,其中该两性离子型普拉二烯内酯D或衍生物包含D22或D25。

[0475] 项123.如项115或项116所述的抗体-药物缀合物,其中该剪接调节剂包含普拉二烯内酯B或普拉二烯内酯B衍生物。

[0476] 项124.如项123所述的抗体-药物缀合物,其中该普拉二烯内酯B或衍生物包含D9、D18、D19或D13。

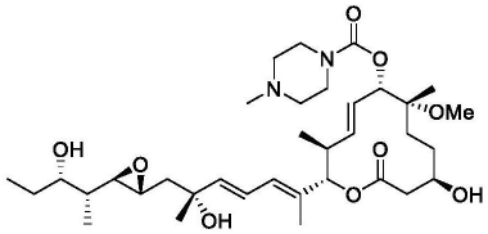
[0477] 项125.如项115或项116所述的抗体-药物缀合物,其中该剪接调节剂包含芳基普拉二烯内酯。

[0478] 项126.如项125所述的抗体-药物缀合物,其中该芳基普拉二烯内酯包含D15、D14、D16、D17、D26或D33。

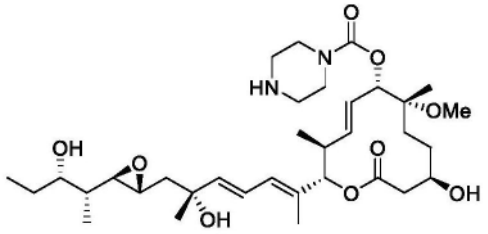
[0479] 项127.如项125或项126所述的抗体-药物缀合物,其中该芳基普拉二烯内酯是两性离子型芳基普拉二烯内酯。

[0480] 项128.如项127所述的抗体-药物缀合物,其中该两性离子型芳基普拉二烯内酯包含D33。

[0481] 项129.如项1至106中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该剪接调节剂包含D2:

[0482]  (D2)。

[0483] 项130.如项1至106中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该剪接调节剂包含D1:

[0484]  (D1)。

[0485] 项131.如项1至106中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该剪接调节剂包含D4、D12、D15、D8、D9、D10、D13、D18、D19、D20、D21、D22、D25或D33。

[0486] 项132.如项1至131中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中p是1至10。

[0487] 项133.如项1至132中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中p是2至8。

[0488] 项134.如项1至133中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中p是4至8。

[0489] 项135.如项1至134中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中p是4。

[0490] 项136.如项1至134中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中p是8。

[0491] 项137.一种具有式(I)的抗体-药物缀合物,

[0492] $Ab-(L-D)_p$ (I)

[0493] 其中

[0494] Ab是靶向赘生性细胞的抗体或抗原结合片段;

[0495] D是D2;

[0496] L是将Ab共价连接至D的接头;并且

[0497] p是1至15的整数。

[0498] 项138.如项137所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段靶向表达HER2的细胞。

[0499] 项139.如项138所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段是抗HER2抗体或抗原结合片段。

[0500] 项140.如项138或项139所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:1(HCDR1)、SEQ ID NO:2(HCDR2)和SEQ ID NO:3(HCDR3)的氨基酸序列的三个重链互补决定区(HCDR1、HCDR2和HCDR3);以及含有SEQ ID NO:4(LCDR1)、SEQ ID NO:5(LCDR2)和SEQ ID NO:6(LCDR3)的氨基酸序列的三个轻链互补决定区(LCDR1、LCDR2和LCDR3)。

[0501] 项141.如项138至140中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:19的氨基酸序列的重链可变区和含有SEQ ID NO:20的氨基酸序列的轻链可变区。

[0502] 项142.如项138至141中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合

片段包含人IgG1重链恒定区。

[0503] 项143.如项138至142中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段包含人Igκ轻链恒定区。

[0504] 项144.如项137所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段靶向表达CD138的细胞。

[0505] 项145.如项144所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段是抗CD138抗体或抗原结合片段。

[0506] 项146.如项144或项145所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:7(HCDR1)、SEQ ID NO:8(HCDR2)和SEQ ID NO:9(HCDR3)的氨基酸序列的三个重链互补决定区(HCDR1、HCDR2和HCDR3);以及含有SEQ ID NO:10(LCDR1)、SEQ ID NO:11(LCDR2)和SEQ ID NO:12(LCDR3)的氨基酸序列的三个轻链互补决定区(LCDR1、LCDR2和LCDR3)。

[0507] 项147.如项144至146中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:21的氨基酸序列的重链可变区和含有SEQ ID NO:22的氨基酸序列的轻链可变区。

[0508] 项148.如项144至147中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段包含人IgG2a重链恒定区。

[0509] 项149.如项144至148中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段包含人Igκ轻链恒定区。

[0510] 项150.如项137所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段靶向表达EPHA2的细胞。

[0511] 项151.如项150所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段是抗EPHA2抗体或抗原结合片段。

[0512] 项152.如项150或项151所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:13(HCDR1)、SEQ ID NO:14(HCDR2)和SEQ ID NO:15(HCDR3)的氨基酸序列的三个重链互补决定区(HCDR1、HCDR2和HCDR3);以及含有SEQ ID NO:16(LCDR1)、SEQ ID NO:17(LCDR2)和SEQ ID NO:18(LCDR3)的氨基酸序列的三个轻链互补决定区(LCDR1、LCDR2和LCDR3)。

[0513] 项153.如项150至152中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:23的氨基酸序列的重链可变区和含有SEQ ID NO:24的氨基酸序列的轻链可变区。

[0514] 项154.如项150至153中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段包含人IgG1重链恒定区。

[0515] 项155.如项150至154中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段包含人Igκ轻链恒定区。

[0516] 项156.一种具有式(I)的抗体-药物缀合物,

[0517] $Ab-(L-D)_p$ (I)

[0518] 其中

[0519] Ab是靶向赘生性细胞的抗体或抗原结合片段;

[0520] D是D1;

[0521] L是将Ab共价连接至D的接头;并且

[0522] p是1至15的整数。

[0523] 项157.如项156所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段靶向表达HER2的细胞。

[0524] 项158.如项157所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段是抗HER2抗体或抗原结合片段。

[0525] 项159.如项157或项158所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:1(HCDR1)、SEQ ID NO:2(HCDR2)和SEQ ID NO:3(HCDR3)的氨基酸序列的三个重链互补决定区(HCDR1、HCDR2和HCDR3);以及含有SEQ ID NO:4(LCDR1)、SEQ ID NO:5(LCDR2)和SEQ ID NO:6(LCDR3)的氨基酸序列的三个轻链互补决定区(LCDR1、LCDR2和LCDR3)。

[0526] 项160.如项157至159中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:19的氨基酸序列的重链可变区和含有SEQ ID NO:20的氨基酸序列的轻链可变区。

[0527] 项161.如项157至160中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段包含人IgG1重链恒定区。

[0528] 项162.如项157至161中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段包含人Igκ轻链恒定区。

[0529] 项163.如项156所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段靶向表达CD138的细胞。

[0530] 项164.如项163所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段是抗CD138抗体或抗原结合片段。

[0531] 项165.如项163或项164所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:7(HCDR1)、SEQ ID NO:8(HCDR2)和SEQ ID NO:9(HCDR3)的氨基酸序列的三个重链互补决定区(HCDR1、HCDR2和HCDR3);以及含有SEQ ID NO:10(LCDR1)、SEQ ID NO:11(LCDR2)和SEQ ID NO:12(LCDR3)的氨基酸序列的三个轻链互补决定区(LCDR1、LCDR2和LCDR3)。

[0532] 项166.如项163至165中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:21的氨基酸序列的重链可变区和含有SEQ ID NO:22的氨基酸序列的轻链可变区。

[0533] 项167.如项163至166中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段包含人IgG2a重链恒定区。

[0534] 项168.如项163至167中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段包含人Igκ轻链恒定区。

[0535] 项169.如项156所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段靶向表达EPHA2的细胞。

[0536] 项170.如项169所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段是抗EPHA2抗体或抗原结合片段。

[0537] 项171.如项169或项170所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:13(HCDR1)、SEQ ID NO:14(HCDR2)和SEQ ID NO:15(HCDR3)的氨基酸序列的三个重链互补决定区(HCDR1、HCDR2和HCDR3);以及含有SEQ ID NO:16(LCDR1)、SEQ ID NO:17(LCDR2)和SEQ ID NO:18(LCDR3)的氨基酸序列的三个轻链互补决定区(LCDR1、LCDR2和LCDR3)。

[0538] 项172.如项169至171中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:23的氨基酸序列的重链可变区和含有SEQ ID NO:24的氨基酸序列的轻链可变区。

[0539] 项173.如项169至172中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段包含人IgG1重链恒定区。

[0540] 项174.如项169至173中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段包含人Igκ轻链恒定区。

[0541] 项175.一种具有式(I)的抗体-药物缀合物,

[0542] $Ab-(L-D)_p$ (I)

[0543] 其中

[0544] Ab是抗HER2抗体或抗原结合片段,其包含含有SEQ ID NO:1(HCDR1)、SEQ ID NO:2(HCDR2)和SEQ ID NO:3(HCDR3)的氨基酸序列的三个重链互补决定区(HCDR1、HCDR2和HCDR3);以及含有SEQ ID NO:4(LCDR1)、SEQ ID NO:5(LCDR2)和SEQ ID NO:6(LCDR3)的氨基酸序列的三个轻链互补决定区(LCDR1、LCDR2和LCDR3);

[0545] D是D2、D1、D4、D12或D15;

[0546] L是将Ab共价连接至D的接头;并且

[0547] p是1至15的整数。

[0548] 项176.如项175所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:19的氨基酸序列的重链可变区和含有SEQ ID NO:20的氨基酸序列的轻链可变区。

[0549] 项177.一种具有式(I)的抗体-药物缀合物,

[0550] $Ab-(L-D)_p$ (I)

[0551] 其中

[0552] Ab是抗CD138抗体或抗原结合片段,其包含含有SEQ ID NO:7(HCDR1)、SEQ ID NO:8(HCDR2)和SEQ ID NO:9(HCDR3)的氨基酸序列的三个重链互补决定区(HCDR1、HCDR2和HCDR3);以及含有SEQ ID NO:10(LCDR1)、SEQ ID NO:11(LCDR2)和SEQ ID NO:12(LCDR3)的氨基酸序列的三个轻链互补决定区(LCDR1、LCDR2和LCDR3);

[0553] D是D2、D1、D4、D12或D15;

[0554] L是将Ab共价连接至D的接头;并且

[0555] p是1至15的整数。

[0556] 项178.如项177所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:21的氨基酸序列的重链可变区和含有SEQ ID NO:22的氨基酸序列的轻链可变区。

[0557] 项179.一种具有式(I)的抗体-药物缀合物,

[0558] $Ab-(L-D)_p$(I)

[0559] 其中

[0560] Ab是抗EPHA2抗体或抗原结合片段,其包含含有SEQ IDNO:13(HCDR1)、SEQ ID NO:14(HCDR2)和SEQ ID NO:15(HCDR3)的氨基酸序列的三个重链互补决定区(HCDR1、HCDR2和HCDR3);以及含有SEQ ID NO:16(LCDR1)、SEQ ID NO:17(LCDR2)和SEQ ID NO:18(LCDR3)的氨基酸序列的三个轻链互补决定区(LCDR1、LCDR2和LCDR3);

[0561] D是D2、D1、D4、D12或D15;

[0562] L是将Ab共价连接至D的接头;并且

[0563] p是1至15的整数。

[0564] 项180.如项179所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:23的氨基酸序列的重链可变区和含有SEQ ID NO:24的氨基酸序列的轻链可变区。

[0565] 项181.如项156至180中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该接头是可裂解接头。

[0566] 项182.如项181所述的抗体-药物缀合物,其中该可裂解接头包含MC-Val-Cit-pABC。

[0567] 项183.如项181所述的抗体-药物缀合物,其中该可裂解接头包含MC-Val-Ala-pABC。

[0568] 项184.如项181所述的抗体-药物缀合物,其中该可裂解接头包含MC-Val-Ala-pAB。

[0569] 项185.如项156至180中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该接头是不可裂解接头。

[0570] 项186.如项185所述的抗体-药物缀合物,其中该不可裂解接头包含Mal-Hex。

[0571] 项187.如项185所述的抗体-药物缀合物,其中该不可裂解接头包含Mal-Et。

[0572] 项188.如项185所述的抗体-药物缀合物,其中该不可裂解接头包含Mal-Et-O-Et。

[0573] 项189.如项156至188中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中p是1至10。

[0574] 项190.如项156至189中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中p是2至8。

[0575] 项191.如项156至190中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中p是4至8。

[0576] 项192.如项156至191中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中p是4。

[0577] 项193.如项156至191中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中p是8。

[0578] 项194.一种组合物,该组合物包含如项1至193中任一项所述的抗体-药物缀合物的多个拷贝,其中该组合物中抗体-药物缀合物的平均p是约3.5至约5.5。

[0579] 项195.如项194所述的组合物,其中该组合物中抗体-药物缀合物的平均p是约4。

[0580] 项196.一种组合物,该组合物包含如项1至193中任一项所述的抗体-药物缀合物的多个拷贝,其中该组合物中抗体-药物缀合物的平均p是约7至约9。

[0581] 项197.如项196所述的组合物,其中该组合物中抗体-药物缀合物的平均p是约8。

[0582] 项198.一种治疗患有或疑似患有赘生性病症的受试者的方法,该方法包括向该受试者施用治疗有效量的如项1至193中任一项所述的抗体-药物缀合物或如项194至197中任一项所述的组合物。

[0583] 项199.如项198所述的方法,其中该赘生性病症是血液恶性病或实体瘤。

[0584] 项200.如项198或项199所述的方法,其中该赘生性病症是血液恶性病。

[0585] 项201.如项199或项200所述的方法,其中该血液恶性病选自急性骨髓性白血病和多发性骨髓瘤。

[0586] 项202.如项198或项199所述的方法,其中该赘生性病症是实体瘤。

[0587] 项203.如项199或项202所述的方法,其中该实体瘤选自乳腺癌、胃癌、前列腺癌、卵巢癌、肺癌、子宫癌、涎腺导管癌、黑素瘤、结肠癌、宫颈癌、胰腺癌、肾癌、结肠直肠癌和食道癌。

[0588] 项204.如项198至203中任一项所述的方法,其中用该抗体-药物缀合物或组合物进行治疗诱导了对不表达靶抗原但与表达靶抗原的赘生性细胞邻近的赘生性细胞的旁观者杀伤。

[0589] 项205.如项198至204中任一项所述的方法,其中该受试者具有一个或多个表达靶抗原的赘生性细胞。

[0590] 项206.如项205所述的方法,其中该靶抗原是HER2。

[0591] 项207.如项206所述的方法,其中该一个或多个赘生性细胞源自表达HER2的乳腺癌、卵巢癌、胃癌、肺癌、子宫癌、骨肉瘤或涎腺导管癌。

[0592] 项208.如项207所述的方法,其中该肺癌是肺腺癌和/或该子宫癌是子宫浆液性子宫内膜癌。

[0593] 项209.如项206至208中任一项所述的方法,其中该受试者对用(a)单独施用时的抗HER2抗体和/或(b)单独施用时的剪接调节剂进行的治疗无响应或响应不良。

[0594] 项210.如项206至209中任一项所述的方法,其中该受试者对用单独施用时的剪接调节剂进行的治疗不耐受、无响应或响应不良。

[0595] 项211.如项205所述的方法,其中该靶抗原是CD138。

[0596] 项212.如项211所述的方法,其中该一个或多个赘生性细胞源自表达CD138的多发性骨髓瘤。

[0597] 项213.如项211或项212所述的方法,其中该受试者对用(a)单独施用时的抗CD138抗体和/或(b)单独施用时的剪接调节剂进行的治疗无响应或响应不良。

[0598] 项214.如项211至213中任一项所述的方法,其中该受试者对用单独施用时的剪接调节剂进行的治疗不耐受、无响应或响应不良。

[0599] 项215.如项205所述的方法,其中该靶抗原是EPHA2。

[0600] 项216.如项215所述的方法,其中该一个或多个赘生性细胞源自表达EPHA2的乳腺癌、前列腺癌、卵巢癌、肺癌、黑素瘤、结肠癌或食道癌。

[0601] 项217.如项215或项216所述的方法,其中该受试者对用(a)单独施用时的抗EPHA2抗体和/或(b)单独施用时的剪接调节剂进行的治疗无响应或响应不良。

[0602] 项218.如项215至217中任一项所述的方法,其中该受试者对用单独施用时的剪接调节剂进行的治疗不耐受、无响应或响应不良。

[0603] 项219.一种减少或抑制患有或疑似患有赘生性病症的受试者中的肿瘤生长的方法,该方法包括向该受试者施用治疗有效量的如项1至193中任一项所述的抗体-药物缀合物或如项194至197中任一项所述的组合物。

[0604] 项220.如项219所述的方法,其中用该抗体-药物缀合物或组合物进行治疗诱导了对不表达靶抗原但与表达靶抗原的赘生性肿瘤细胞邻近的赘生性肿瘤细胞的旁观者杀伤。

[0605] 项221.如项219或项220所述的方法,其中该肿瘤包含一个或多个表达靶抗原的赘生性细胞。

[0606] 项222.如项221所述的方法,其中该靶抗原是HER2。

[0607] 项223.如项222所述的方法,其中该一个或多个赘生性细胞源自表达HER2的乳腺癌、卵巢癌、胃癌、肺癌、子宫癌、骨肉瘤或涎腺导管癌。

[0608] 项224.如项223所述的方法,其中该肺癌是肺腺癌和/或该子宫癌是子宫浆液性子宫内膜癌。

[0609] 项225.如项222至224中任一项所述的方法,其中该肿瘤对用(a)单独施用时的抗HER2抗体和/或(b)单独施用时的剪接调节剂进行的治疗具有抗性或难治性。

[0610] 项226.如项221所述的方法,其中该靶抗原是CD138。

[0611] 项227.如项226所述的方法,其中该一个或多个赘生性细胞源自表达CD138的多发性骨髓瘤。

[0612] 项228.如项226或项227所述的方法,其中该肿瘤对用(a)单独施用时的抗CD138抗体和/或(b)单独施用时的剪接调节剂进行的治疗具有抗性或难治性。

[0613] 项229.如项221所述的方法,其中该靶抗原是EPHA2。

[0614] 项230.如项229所述的方法,其中该一个或多个赘生性细胞源自表达EPHA2的乳腺癌、前列腺癌、卵巢癌、肺癌、黑素瘤、结肠癌或食道癌。

[0615] 项231.如项229或项230所述的方法,其中该肿瘤对用(a)单独施用时的抗EPHA2抗体和/或(b)单独施用时的剪接调节剂进行的治疗具有抗性或难治性。

[0616] 项232.一种确定患有或疑似患有赘生性病症的受试者是否会对用如项1至193中任一项所述的抗体-药物缀合物或如项194至197中任一项所述的组合物进行的治疗有响应的方法,该方法包括提供来自该受试者的生物样品以及使该生物样品与如项1至193中任一项所述的抗体-药物缀合物或如项194至197中任一项所述的组合物接触。

[0617] 项233.如项232所述的方法,其中该生物样品是肿瘤样品。

[0618] 项234.如项233所述的方法,其中该肿瘤样品是肿瘤活检或血液样品。

[0619] 项235.如项234所述的方法,其中该血液样品选自血液、血液级分或自该血液或血液级分获得的细胞。

[0620] 项236.如项232至235中任一项所述的方法,其中该受试者具有一个或多个表达靶抗原的赘生性细胞。

[0621] 项237.如项236所述的方法,其中该靶抗原是HER2。

[0622] 项238.如项237所述的方法,其中该一个或多个赘生性细胞源自表达HER2的乳腺癌、卵巢癌、胃癌、肺癌、子宫癌、骨肉瘤或涎腺导管癌。

[0623] 项239.如项238所述的方法,其中该肺癌是肺腺癌和/或该子宫癌是子宫浆液性子宫内膜癌。

[0624] 项240.如项236所述的方法,其中该靶抗原是CD138。

[0625] 项241.如项240所述的方法,其中该一个或多个赘生性细胞源自表达CD138的多发性骨髓瘤。

[0626] 项242.如项236所述的方法,其中该靶抗原是EPHA2。

[0627] 项243.如项242所述的方法,其中该一个或多个赘生性细胞源自表达EPHA2的乳腺癌、前列腺癌、卵巢癌、肺癌、黑素瘤、结肠癌或食道癌。

[0628] 项244.如项1至193中任一项所述的抗体-药物缀合物或如项194至197中任一项所述的组合物,其用于治疗赘生性病症。

[0629] 项245.用于如项244所述使用的抗体-药物缀合物,其中该赘生性病症由具有一个或多个表达靶抗原的赘生性细胞表征。

[0630] 项246.用于如项245所述使用的抗体-药物缀合物,其中该靶抗原是HER2。

[0631] 项247.用于如项246所述使用的抗体-药物缀合物,其中该赘生性病症是表达HER2的乳腺癌、卵巢癌、胃癌、肺癌、子宫癌、骨肉瘤或涎腺导管癌。

[0632] 项248.如项247所述的抗体-药物缀合物,其中该肺癌是肺腺癌和/或该子宫癌是子宫浆液性子宫内膜癌。

[0633] 项249.用于如项245所述使用的抗体-药物缀合物,其中该靶抗原是CD138。

[0634] 项250.用于如项249所述使用的抗体-药物缀合物,其中该赘生性病症是表达CD138的多发性骨髓瘤。

[0635] 项251.用于如项245所述使用的抗体-药物缀合物,其中该靶抗原是EPHA2。

[0636] 项252.用于如项251所述使用的抗体-药物缀合物,其中该赘生性病症是表达EPHA2的乳腺癌、前列腺癌、卵巢癌、肺癌、黑素瘤、结肠癌或食道癌。

[0637] 项253.如项1至193中任一项所述的抗体-药物缀合物或如项194至197中任一项所述的组合物在治疗赘生性病症中的用途。

[0638] 项254.如项253所述的用途,其中该赘生性病症由具有一个或多个表达靶抗原的赘生性细胞表征。

[0639] 项255.如项254所述的用途,其中该靶抗原是HER2。

[0640] 项256.如项255所述的用途,其中该赘生性病症是表达HER2的乳腺癌、卵巢癌、胃癌、肺癌、子宫癌、骨肉瘤或涎腺导管癌。

[0641] 项257.如项256所述的用途,其中该肺癌是肺腺癌和/或该子宫癌是子宫浆液性子宫内膜癌。

[0642] 项258.如项254所述的用途,其中该靶抗原是CD138。

[0643] 项259.如项258所述的用途,其中该赘生性病症是表达CD138的多发性骨髓瘤。

[0644] 项260.如项254所述的用途,其中该靶抗原是EPHA2。

[0645] 项261.如项260所述的用途,其中该赘生性病症是表达EPHA2的乳腺癌、前列腺癌、卵巢癌、肺癌、黑素瘤、结肠癌或食道癌。

[0646] 项262.如项1至193中任一项所述的抗体-药物缀合物或如项194至197中任一项所述的组合物在制造用于治疗赘生性病症的药剂的方法中的用途。

[0647] 项263.如项262所述的用途,其中该赘生性病症由具有一个或多个表达靶抗原的赘生性细胞表征。

[0648] 项264.如项263所述的用途,其中该靶抗原是HER2。

[0649] 项265.如项264所述的用途,其中该赘生性病症是表达HER2的乳腺癌、卵巢癌、胃癌、肺癌、子宫癌、骨肉瘤或涎腺导管癌。

[0650] 项266.如项265所述的用途,其中该肺癌是肺腺癌和/或该子宫癌是子宫浆液性子宫内膜癌。

[0651] 项267.如项263所述的用途,其中该靶抗原是CD138。

[0652] 项268.如项267所述的用途,其中该赘生性病症是表达CD138的多发性骨髓瘤。

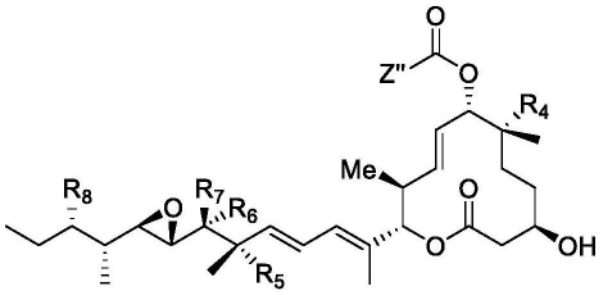
[0653] 项269.如项263所述的用途,其中该靶抗原是EPHA2。

[0654] 项270.如项269所述的用途,其中该赘生性病症是表达EPHA2的乳腺癌、前列腺癌、卵巢癌、肺癌、黑素瘤、结肠癌或食道癌。

[0655] 项271.一种药物组合物,该药物组合物包含如项1至193中任一项所述的抗体-药物缀合物或如项194至197中任一项所述的组合物、以及药学上可接受的载体。

[0656] 项272.一种生产如项1至193中任一项所述的抗体-药物缀合物的方法,该方法包括使抗体或抗原结合片段与接合至剪接调节剂的接头在允许缀合的条件下反应。

[0657] 项273.一种具有式(III)的化合物:

[0658]  或其药学上可接受的盐,其中:

[0659] R^1选自不存在、氢、C_1-C_6烷基基团、C_1-C_6烷基烷氧基基团、C_1-C_6烷基氨基基团、C_1-C_6烷基羧酸基团、C_1-C_6烷基羟基基团、C_3-C_8环烷基基团、苄基基团、C_3-C_8杂环基基团、-O-C(=O)-(C_1-C_6烷基)基团和-CD_3;

[0660] R^2不存在或为接头;

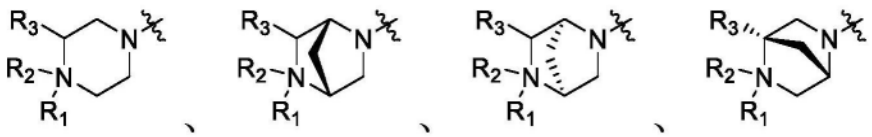
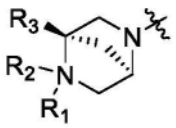
[0661] R^3选自氢、C_1-C_6烷基基团、C_1-C_6烷基烷氧基基团、C_1-C_6烷基氨基基团、C_1-C_6烷基羧酸基团、C_1-C_6烷基羟基基团、C_3-C_8环烷基基团、苄基基团、C_3-C_8杂环基基团和-O-C(=O)-(C_1-C_6烷基)基团;并且

[0662] R^4、R^5和R^8各自独立地选自氢、羟基基团、-O-(C_1-C_6烷基)基团、-O-C(=O)-(C_1-C_6烷基)基团和C_1-C_6烷基基团;

[0663] R^6和R^7各自独立地选自氢、-O-R^{17}、-O-C(=O)-R^{17}、-O-C(=O)-$NR^{15}R^{16}$、C_1-C_6烷基基团、-$NR^{15}R^{16}$和接头;

[0664] R^{15}和R^{16}各自独立地选自氢、R^{17}、-C(=O)-R^{17}和-C(=O)-O-R^{17};

[0665] R^{17}选自氢、C_1-C_6烷基基团、C_3-C_8环烷基基团、苄基基团和C_3-C_8杂环基基团;

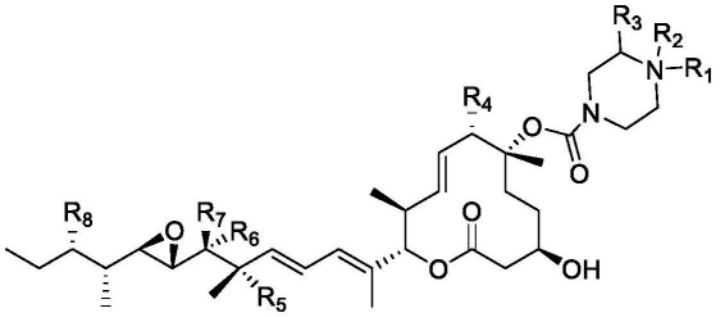
[0666] Z”选自  和  ;

[0667] 其中R^1、R^2、R^3、R^4、R^5、R^6、R^7、R^8、R^{15}、R^{16}和R^{17}各自独立地被0至3个独立地选自以下的基团取代:卤素、羟基基团、C_1-C_6烷基、-O-(C_1-C_6烷基)基团、-$NR^{15}R^{16}$、C_3-C_8环烷基基团、C_1-C_6烷基羟基基团、C_1-C_6烷基烷氧基基团、苄基基团和C_3-C_8杂环基基团;

[0668] 其中R^6和R^7中至少一个是氢;并且

[0669] 其中如果R^2是接头,则R^6和R^7均不为接头,且如果R^6或R^7是接头,则R^2不存在。

[0670] 项274.一种具有式(V)的化合物:

[0671] 

(V),

或其药学上可接受的盐,其中:

[0672] R^1选自不存在、氢、C_1-C_6烷基基团、C_1-C_6烷基烷氧基基团、C_1-C_6烷基氨基基团、C_1-C_6烷基羧酸基团、C_1-C_6烷基羟基基团、C_3-C_8环烷基基团、苄基基团、C_3-C_8杂环基基团、-O-C(=O)-(C_1-C_6烷基)基团和-CD_3;

[0673] R^2不存在或为接头;

[0674] R^3选自氢、C_1-C_6烷基基团、C_1-C_6烷基烷氧基基团、C_1-C_6烷基氨基基团、C_1-C_6烷基羧酸基团、C_1-C_6烷基羟基基团、C_3-C_8环烷基基团、苄基基团、C_3-C_8杂环基基团和-O-C(=O)-(C_1-C_6烷基)基团;并且

[0675] R^4、R^5和R^8各自独立地选自氢、羟基基团、-O-(C_1-C_6烷基)基团、-O-C(=O)-(C_1-C_6烷基)基团和C_1-C_6烷基基团;

[0676] R^6和R^7各自独立地选自氢、-O-R^{17}、-O-C(=O)-R^{17}、-O-C(=O)-$NR^{15}R^{16}$、C_1-C_6烷基基团、-$NR^{15}R^{16}$和接头;

[0677] R^{15}和R^{16}各自独立地选自氢、R^{17}、-C(=O)-R^{17}和-C(=O)-O-R^{17};并且

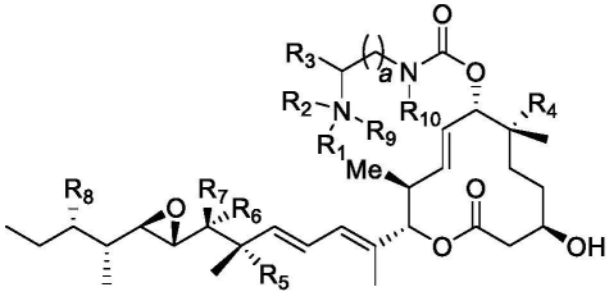
[0678] R^{17}选自氢、C_1-C_6烷基基团、C_3-C_8环烷基基团、苄基基团和C_3-C_8杂环基基团;

[0679] 其中R^1、R^2、R^3、R^4、R^5、R^6、R^7、R^8、R^{15}、R^{16}和R^{17}各自独立地被0至3个独立地选自以下的基团取代:卤素、羟基基团、C_1-C_6烷基、-O-(C_1-C_6烷基)基团、-$NR^{15}R^{16}$、C_3-C_8环烷基基团、C_1-C_6烷基羟基基团、C_1-C_6烷基烷氧基基团、苄基基团和C_3-C_8杂环基基团;

[0680] 其中R^6和R^7中至少一个是氢;并且

[0681] 其中如果R^2是接头,则R^6和R^7均不为接头,且如果R^6或R^7是接头,则R^2不存在。

[0682] 项275.一种具有式(VII)的化合物:

[0683]  (VII),

或其药学上可接受的盐,其中:

[0684] R^1和R^9各自独立地选自不存在、氢、C_1-C_6烷基基团、C_1-C_6烷基烷氧基基团、C_1-C_6烷基氨基基团、C_1-C_6烷基羧酸基团、C_1-C_6烷基羟基基团、C_3-C_8环烷基基团、苄基基团、C_3-C_8杂环基基团、-O-C(=O)-(C_1-C_6烷基)基团和-CD_3;

[0685] R^2不存在或为接头;

[0686] R^3选自氢、C_1-C_6烷基基团、C_1-C_6烷基烷氧基基团、C_1-C_6烷基氨基基团、C_1-C_6烷基羧酸基团、C_1-C_6烷基羟基基团、C_3-C_8环烷基基团、苄基基团、C_3-C_8杂环基基团和-O-C(=O)-(C_1-C_6烷基)基团;

[0687] R^4、R^5和R^8各自独立地选自氢、羟基基团、-O-(C_1-C_6烷基)基团、-O-C(=O)-(C_1-C_6烷基)基团和C_1-C_6烷基基团;

[0688] R^6和R^7各自独立地选自氢、-O-R^{17}、-O-C(=O)-R^{17}、-O-C(=O)-$NR^{15}R^{16}$、C_1-C_6烷基基团、-$NR^{15}R^{16}$和接头;

[0689] R^{10}选自氢、C_1-C_6烷基基团、-C(=O)-(C_1-C_6烷基)基团和-CD_3;

[0690] R^{15}和R^{16}各自独立地选自氢、R^{17}、-C(=O)-R^{17}和-C(=O)-O-R^{17};

[0691] R^{17}选自氢、C_1-C_6烷基基团、C_3-C_8环烷基基团、苄基基团和C_3-C_8杂环基基团;并且

[0692] a是1、2、3、4、5、6、7、8、9或10;

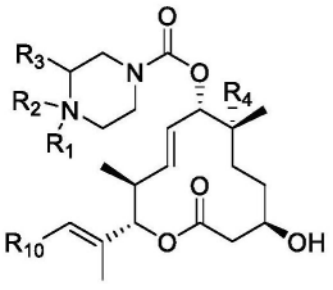
[0693] 其中R^1、R^2、R^3、R^4、R^5、R^6、R^7、R^8、R^9、R^{10}、R^{15}、R^{16}和R^{17}各自独立地被0至3个独立地选自以下的基团取代:卤素、羟基基团、C_1-C_6烷基基团、-O-(C_1-C_6烷基)基团、-$NR^{15}R^{16}$、C_3-C_8环烷基基团、C_1-C_6烷基羟基基团、C_1-C_6烷基烷氧基基团、苄基基团和C_3-C_8杂环基基团;

[0694] 其中R^6和R^7中至少一个是氢;

[0695] 其中如果R^2是接头,则R^6和R^7均不为接头,且如果R^6或R^7是接头,则R^2不存在;并且

[0696] 其中R^1和R^9不能同时不存在。

[0697] 项276.一种具有式(IX)的化合物:

[0698]  (IX),

或其药学上可接受的盐,其中:

[0699] R^1选自不存在、氢、C_1-C_6烷基基团、C_1-C_6烷基烷氧基基团、C_1-C_6烷基氨基基团、C_1-C_6烷基羧酸基团、C_1-C_6烷基羟基基团、C_3-C_8环烷基基团、苄基基团、C_3-C_8杂环基基团、-O-C(=O)-(C_1-C_6烷基)基团和-CD_3;

[0700] R^2是接头；

[0701] R^3选自氢、C_1-C_6烷基基团、C_1-C_6烷基烷氧基基团、C_1-C_6烷基氨基基团、C_1-C_6烷基羧酸基团、C_1-C_6烷基羟基基团、C_3-C_8环烷基基团、苄基基团、C_3-C_8杂环基基团和-O-C(=O)-(C_1-C_6烷基)基团；

[0702] R^4选自氢、羟基基团、-O-(C_1-C_6烷基)基团、-O-C(=O)-(C_1-C_6烷基)基团和C_1-C_6烷基基团；

[0703] R^{10}选自3至10元碳环和3至10元杂环，其各自被0至3个R^a取代，其中每个R^a独立地选自卤素、C_1-C_6烷基基团、-O-(C_1-C_6)烷基基团、C_1-C_6烷基烷氧基基团、C_1-C_6烷基羟基基团、-S(=O)$_w$-(4至7元杂环)、4至7元碳环和4至7元杂环；

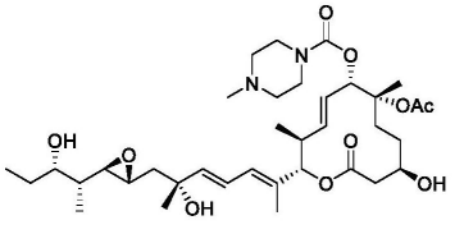
[0704] R^{15}和R^{16}各自独立地选自氢、R^{17}、-C(=O)-R^{17}和-C(=O)-O-R^{17}；并且

[0705] R^{17}选自氢、C_1-C_6烷基基团、C_3-C_8环烷基基团、苄基基团和C_3-C_8杂环基基团；

[0706] 其中R^1、R^2、R^3、R^4、R^{10}、R^{15}、R^{16}和R^{17}各自独立地被0至3个独立地选自以下的基团取代：卤素、羟基基团、C_1-C_6烷基基团、-O-(C_1-C_6烷基)基团、-$NR^{15}R^{16}$、C_3-C_8环烷基基团、C_1-C_6烷基羟基基团、C_1-C_6烷基烷氧基基团、苄基基团和C_3-C_8杂环基基团；并且

[0707] 其中每个R^a独立地被0至3个独立地选自以下的基团取代：卤素、羟基基团、-$NR^{15}R^{16}$、C_1-C_6烷基基团、-(C=O)-(C_1-C_6烷基)基团、-(C=O)-(C_1-C_6烷基)-(C_3-C_{10}杂环基)基团、-S(=O)$_w$-(C_3-C_8杂环基基团和C_1-C_6烷基羧酸基团，其各自被0、1或2个独立地选自以下的基团取代：卤素、羟基基团、-$NR^{15}R^{16}$和C_1-C_3烷基基团。

[0708] 项277.一种化合物，该化合物选自具有式

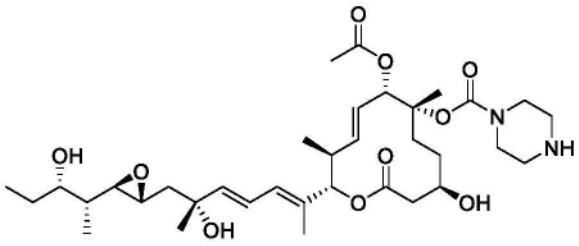
[0709] 

(D4)

的化合物、及其药学上可接受的盐。

[0710] 项278.一种药物组合物，该药物组合物包含如项277所述的化合物或其药学上可接受的盐、以及药学上可接受的载体。

[0711] 项279.一种化合物，该化合物选自具有式

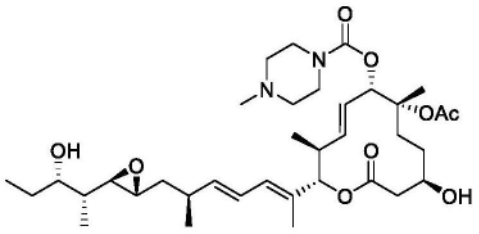
[0712] 

(D8)

的化合物、及其药学上可接受的盐。

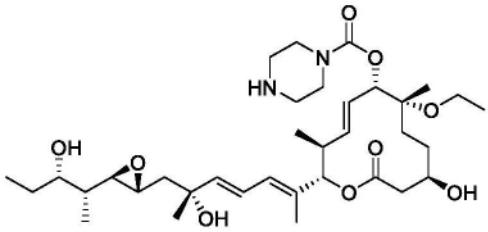
[0713] 项280.一种药物组合物，该药物组合物包含如项279所述的化合物或其药学上可接受的盐、以及药学上可接受的载体。

[0714] 项281.一种化合物，该化合物选自具有式

[0715]  (D9) 的化合物、及其药学上可接受的盐。

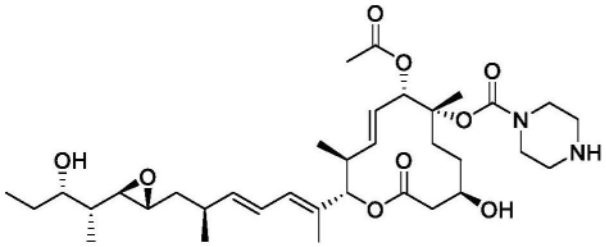
[0716] 项282.一种药物组合物,该药物组合物包含如项281所述的化合物或其药学上可接受的盐、以及药学上可接受的载体。

[0717] 项283.一种化合物,该化合物选自具有式

[0718]  (D10) 的化合物、及其药学上可接受的盐。

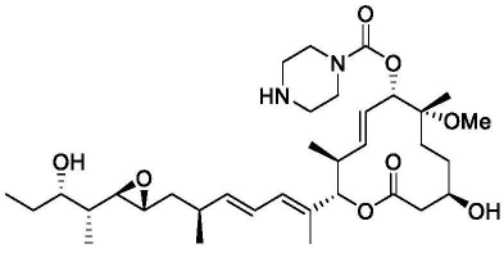
[0719] 项284.一种药物组合物,该药物组合物包含如项283所述的化合物或其药学上可接受的盐、以及药学上可接受的载体。

[0720] 项285.一种化合物,该化合物选自具有式

[0721]  (D13) 的化合物、及其药学上可接受的盐。

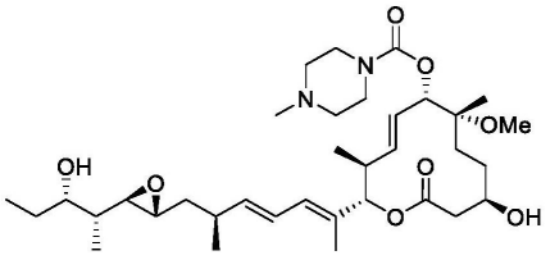
[0722] 项286.一种药物组合物,该药物组合物包含如项285所述的化合物或其药学上可接受的盐、以及药学上可接受的载体。

[0723] 项287.一种化合物,该化合物选自具有式

[0724]  (D18) 的化合物、及其药学上可接受的盐。

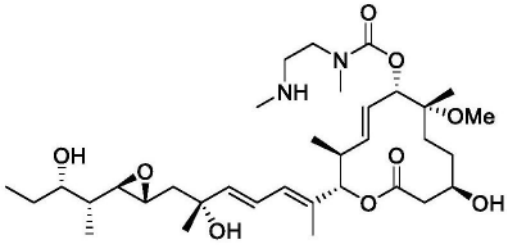
[0725] 项288.一种药物组合物,该药物组合物包含如项287所述的化合物或其药学上可接受的盐、以及药学上可接受的载体。

[0726] 项289.一种化合物,该化合物选自具有式

[0727]  (D19) 的化合物、及其药学上可接受的盐。

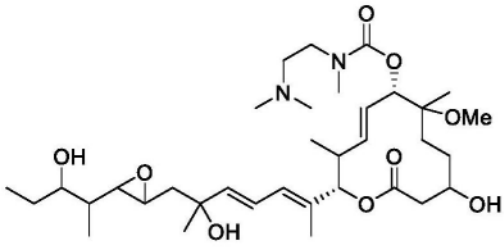
[0728] 项290.一种药物组合物,该药物组合物包含如项289所述的化合物或其药学上可接受的盐、以及药学上可接受的载体。

[0729] 项291.一种化合物,该化合物选自具有式

[0730]  (D20) 的化合物、及其药学上可接受的盐。

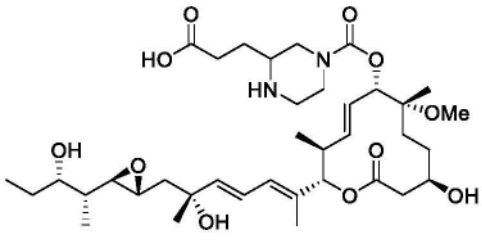
[0731] 项292.一种药物组合物,该药物组合物包含如项291所述的化合物或其药学上可接受的盐、以及药学上可接受的载体。

[0732] 项293.一种化合物,该化合物选自具有式

[0733]  (D21) 的化合物、及其药学上可接受的盐。

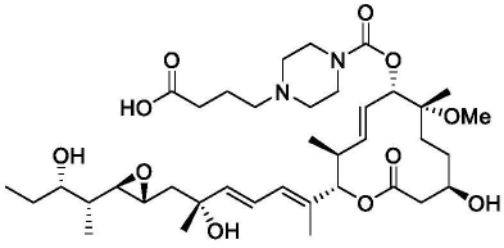
[0734] 项294.一种药物组合物,该药物组合物包含如项293所述的化合物或其药学上可接受的盐、以及药学上可接受的载体。

[0735] 项295.一种化合物,该化合物选自具有式

[0736]  (D22) 的化合物、及其药学上可接受的盐。

[0737] 项296.一种药物组合物,该药物组合物包含如项295所述的化合物或其药学上可接受的盐、以及药学上可接受的载体。

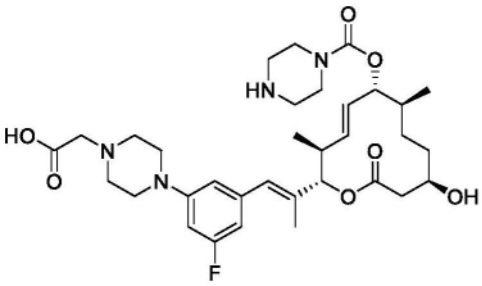
[0738] 项297.一种化合物,该化合物选自具有式

[0739]  的化合物、及其药学上可接受的盐。

(D25)

[0740] 项298.一种药物组合物,该药物组合物包含如项297所述的化合物或其药学上可接受的盐、以及药学上可接受的载体。

[0741] 项299.一种化合物,该化合物选自具有式

[0742]  的化合物、及其药学上可接受的盐。

(D33)

[0743] 项300.一种药物组合物,该药物组合物包含如项299所述的化合物或其药学上可接受的盐、以及药学上可接受的载体。

[0744] 项301.一种治疗患有或疑似患有赘生性病症的受试者的方法,该方法包括向该受试者施用治疗有效量的如项273至300中任一项所述的化合物或药物组合物。

[0745] 项302.一种减少或抑制患有或疑似患有赘生性病症的受试者中的肿瘤生长的方法,该方法包括向该受试者施用治疗有效量的如项273至300中任一项所述的化合物或药物组合物。

[0746] 项303.一种诱导至少一种新抗原的方法,该方法包括使赘生性细胞与有效量的剪接调节剂、如项1至193中任一项所述的抗体-药物缀合物、或如项194至197中任一项所述的组合物接触,由此诱导产生至少一种新抗原。

[0747] 项304.如项303所述的方法,其中该至少一种新抗原包含SEQ ID NO:37-65中任一个的氨基酸序列。

[0748] 项305.如项304所述的方法,其中该至少一种新抗原包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列。

[0749] 项306.如项304所述的方法,其中该至少一种新抗原包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列。

[0750] 项307.如项304所述的方法,其中该至少一种新抗原包含SEQ ID NO:46-49中任一个的氨基酸序列。

[0751] 项308.如项303至307中任一项所述的方法,其中该赘生性细胞存在于体外细胞培养物中。

[0752] 项309.如项308所述的方法,其中该赘生性细胞获得自受试者。

[0753] 项310.如项303至307中任一项所述的方法,其中该赘生性细胞存在于受试者中。

[0754] 项311.如项303至310中任一项所述的方法,其中该赘生性细胞源自血液恶性病或实体瘤。

[0755] 项312.如项311所述的方法,其中该血液恶性病选自B细胞恶性病、白血病、淋巴瘤和骨髓瘤。

[0756] 项313.如项311或项312所述的方法,其中该血液恶性病选自急性骨髓性白血病和多发性骨髓瘤。

[0757] 项314.如项311所述的方法,其中该实体瘤选自乳腺癌、胃癌、前列腺癌、卵巢癌、肺癌、子宫癌、涎腺导管癌、黑素瘤、结肠癌、宫颈癌、胰腺癌、肾癌、结肠直肠癌和食道癌。

[0758] 项315.一种在患有或疑似患有赘生性病症的受试者中诱导至少一种新抗原和/或T细胞应答的方法,该方法包括向该受试者施用有效量的剪接调节剂、如项1至193中任一项所述的抗体-药物缀合物、或如项194至197中任一项所述的组合物。

[0759] 项316.一种治疗患有或疑似患有赘生性病症的受试者的方法,该方法包括向该受试者施用有效量的剪接调节剂、如项1至193中任一项所述的抗体-药物缀合物、或如项194至197中任一项所述的组合物,其中施用该剪接调节剂、抗体-药物缀合物、或组合物诱导至少一种新抗原和/或T细胞应答。

[0760] 项317.如项315或项316所述的方法,其中该至少一种新抗原包含SEQ ID NO:37-65中任一个的氨基酸序列。

[0761] 项318.如项317所述的方法,其中该至少一种新抗原包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列。

[0762] 项319.如项317所述的方法,其中该至少一种新抗原包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列。

[0763] 项320.如项317所述的方法,其中该至少一种新抗原包含SEQ ID NO:46-49中任一个的氨基酸序列。

[0764] 项321.如项315至320中任一项所述的方法,其中与该剪接调节剂、抗体-药物缀合物、或组合物的标准剂量相比,该剪接调节剂、抗体-药物缀合物、或组合物的施用量因至少一种新抗原和/或T细胞应答的诱导而减少。

[0765] 项322.如项315至321中任一项所述的方法,其中该剪接调节剂、抗体-药物缀合物、或组合物的施用量相较于该剪接调节剂、抗体-药物缀合物、或组合物的标准剂量减少10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、75%或90%。

[0766] 项323.如项315至322中任一项所述的方法,其中该剪接调节剂、抗体-药物缀合物、或组合物的施用频率比该剪接调节剂、抗体-药物缀合物、或组合物的标准给药方案低至少10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、75%或90%。

[0767] 项324.如项315至323中任一项所述的方法,其中该剪接调节剂、抗体-药物缀合物、或组合物的施用量和/或剂量导致较低的全身性毒性和/或改善的耐受性。

[0768] 项325.如项315至324中任一项所述的方法,该方法进一步包括施用至少一种额外疗法。

[0769] 项326.如项325所述的方法,其中与该剪接调节剂、抗体-药物缀合物、组合物、和/或该至少一种额外疗法的标准剂量相比,该剪接调节剂、抗体-药物缀合物、组合物、和/或该至少一种额外疗法的施用量因至少一种新抗原和/或T细胞应答的诱导而减少。

[0770] 项327.如项325或项326所述的方法,其中该剪接调节剂、抗体-药物缀合物、组合物、和/或该至少一种额外疗法的施用量相较于该剪接调节剂、抗体-药物缀合物、组合物、

和/或该至少一种额外疗法的标准剂量减少10％、15％、20％、25％、30％、35％、40％、45％、50％、75％或90％。

[0771] 项328.如项325至327中任一项所述的方法，其中该剪接调节剂、抗体-药物缀合物、组合物、和/或该至少一种额外疗法的施用频率比该剪接调节剂、抗体-药物缀合物、组合物、和/或该至少一种额外疗法的标准给药方案低至少10％、15％、20％、25％、30％、35％、40％、45％、50％、75％或90％。

[0772] 项329.如项325至328中任一项所述的方法，其中该剪接调节剂、抗体-药物缀合物、组合物、和/或该至少一种额外疗法的施用量和/或剂量导致较低的全身性毒性和/或改善的耐受性。

[0773] 项330.如项325至329中任一项所述的方法，其中该剪接调节剂、抗体-药物缀合物、或组合物的施用是在施用该至少一种额外疗法之前起始。

[0774] 项331.如项325至329中任一项所述的方法，其中该剪接调节剂、抗体-药物缀合物、或组合物的施用是在施用该至少一种额外疗法之后起始。

[0775] 项332.如项325至329中任一项所述的方法，其中该剪接调节剂、抗体-药物缀合物、或组合物的施用是与该至少一种额外疗法的施用同时起始。

[0776] 项333.如项315至332中任一项所述的方法，其中在初始施用之后，重复施用该剪接调节剂、抗体-药物缀合物、或组合物至少一次。

[0777] 项334.如项333所述的方法，其中用于重复施用的该剪接调节剂、抗体-药物缀合物、或组合物的量相较于用于初始施用的量有所减少。

[0778] 项335.如项333或项334所述的方法，其中用于重复施用的该剪接调节剂、抗体-药物缀合物、或组合物的量相较于该剪接调节剂、抗体-药物缀合物、或组合物的标准剂量有所减少。

[0779] 项336.如项333至335中任一项所述的方法，其中用于重复施用的该剪接调节剂、抗体-药物缀合物、或组合物的量相较于该剪接调节剂、抗体-药物缀合物、或组合物的标准剂量减少10％、15％、20％、25％、30％、35％、40％、45％、50％、75％或90％。

[0780] 项337.如项325至336中任一项所述的方法，其中在初始施用后，重复施用该至少一种额外疗法至少一次。

[0781] 项338.如项337所述的方法，其中用于重复施用的该至少一种额外疗法的量相较于用于初始施用的量有所减少。

[0782] 项339.如项337或项338所述的方法，其中用于重复施用的该至少一种额外疗法的量相较于该至少一种额外疗法的标准剂量有所减少。

[0783] 项340.如项337至339中任一项所述的方法，其中用于重复施用的该至少一种额外疗法的量相较于该至少一种额外疗法的标准剂量减少10％、15％、20％、25％、30％、35％、40％、45％、50％、75％或90％。

[0784] 项341.如项337至340中任一项所述的方法，其中该剪接调节剂、抗体-药物缀合物、或组合物的重复施用是与该至少一种额外疗法的重复施用同时进行。

[0785] 项342.如项337至340中任一项所述的方法，其中该剪接调节剂、抗体-药物缀合物、或组合物的重复施用是与该至少一种额外疗法的重复施用依序或错开进行。

[0786] 项343.如项325至342中任一项所述的方法，其中该至少一种额外疗法包括施用检

查点抑制剂。

[0787] 项344.如项343所述的方法,其中该受试者对单独施用时的该检查点抑制剂不耐受、无响应或响应不良。

[0788] 项345.如项343或项344所述的方法,其中该检查点抑制剂靶向CTLA4、PD1、PDL1、OX40、CD40、GITR、LAG3、TIM3和/或KIR。

[0789] 项346.如项343至345中任一项所述的方法,其中该检查点抑制剂靶向CTLA4、OX40、CD40和/或GITR。

[0790] 项347.如项343至346中任一项所述的方法,其中该检查点抑制剂包含细胞毒性T淋巴细胞相关抗原4途径(CTLA4)抑制剂。

[0791] 项348.如项347所述的方法,其中该CTLA4抑制剂是抗CTLA4抗体。

[0792] 项349.如项348所述的方法,其中该抗CTLA4抗体是伊匹单抗。

[0793] 项350.如项343至346中任一项所述的方法,其中该检查点抑制剂包含程序性死亡-1途径(PD1)抑制剂。

[0794] 项351.如项350所述的方法,其中该PD1抑制剂是抗PD1抗体。

[0795] 项352.如项351所述的方法,其中该抗PD1抗体是纳武单抗。

[0796] 项353.如项350所述的方法,其中该PD1抑制剂是抗PDL1抗体。

[0797] 项354.如项353所述的方法,其中该抗PDL1抗体是阿特珠单抗。

[0798] 项355.如项343至346中任一项所述的方法,其中该检查点抑制剂包含CTLA4抑制剂和PD1抑制剂。

[0799] 项356.如项355所述的方法,其中该CTLA4抑制剂是抗CTLA4抗体。

[0800] 项357.如项356所述的方法,其中该抗CTLA4抗体是伊匹单抗。

[0801] 项358.如项355所述的方法,其中该PD1抑制剂是抗PD1抗体。

[0802] 项359.如项358所述的方法,其中该抗PD1抗体是纳武单抗。

[0803] 项360.如项355所述的方法,其中该PD1抑制剂是抗PDL1抗体。

[0804] 项361.如项360所述的方法,其中该抗PDL1抗体是阿特珠单抗。

[0805] 项362.如项325至342中任一项所述的方法,其中该至少一种额外疗法包括施用新抗原疫苗。

[0806] 项363.如项362所述的方法,其中该剪接调节剂、抗体-药物缀合物、或组合物是在施用该新抗原疫苗之前施用。

[0807] 项364.如项362所述的方法,其中该剪接调节剂、抗体-药物缀合物、或组合物是在施用该新抗原疫苗之后施用。

[0808] 项365.如项362所述的方法,其中该剪接调节剂、抗体-药物缀合物、或组合物是与该新抗原疫苗的施用同时施用。

[0809] 项366.如项362至365中任一项所述的方法,其中在初始施用之后,重复施用该剪接调节剂、抗体-药物缀合物、或组合物至少一次。

[0810] 项367.如项366所述的方法,其中用于重复施用的该剪接调节剂、抗体-药物缀合物、或组合物的量相较于用于初始施用的量有所减少。

[0811] 项368.如项362至367中任一项所述的方法,其中该新抗原疫苗包含至少一种新抗原肽。

[0812] 项369.如项368所述的方法,其中该至少一种新抗原肽的长度在约10个至约50个或约10个至约35个氨基酸范围内。

[0813] 项370.如项368或项369所述的方法,其中该至少一种新抗原肽的长度在约15个至约25个氨基酸范围内。

[0814] 项371.如项368至370中任一项所述的方法,其中该至少一种新抗原肽包含一个或超过一个新抗原序列。

[0815] 项372.如项371所述的方法,其中该新抗原序列是该受试者特有的新抗原序列。

[0816] 项373.如项371所述的方法,其中该新抗原序列是通用新抗原序列。

[0817] 项374.如项371至373中任一项所述的方法,其中该新抗原序列包含SEQ ID NO:37-65中任一个的氨基酸序列。

[0818] 项375.如项374所述的方法,其中该新抗原序列包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列。

[0819] 项376.如项374所述的方法,其中该新抗原序列包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列。

[0820] 项377.如项374所述的方法,其中该新抗原序列包含SEQ ID NO:46-49中任一个的氨基酸序列。

[0821] 项378.如项371至373中任一项所述的方法,其中该新抗原序列包含SEQ ID NO:66-93中任一个的氨基酸序列、或SEQ ID NO:66-93中任一个的抗原部分。

[0822] 项379.如项378所述的方法,其中该新抗原序列包含SEQ ID NO:66的氨基酸序列、或SEQ ID NO:66的抗原部分。

[0823] 项380.如项378所述的方法,其中该新抗原序列包含SEQ ID NO:74-77中任一个的氨基酸序列、或SEQ ID NO:74-77中任一个的抗原部分。

[0824] 项381.如项374至380中任一项所述的方法,其中该新抗原序列和/或抗原部分的长度在约10个至约50个、约10个至约35个、约15个至约25个、或约10个至约20个氨基酸范围内。

[0825] 项382.如项374至381中任一项所述的方法,其中该新抗原序列和/或抗原部分是针对该受试者的个性化新抗原疫苗。

[0826] 项383.如项382所述的方法,其中该新抗原序列和/或抗原部分已通过对该受试者中由施用有效量的该剪接调节剂、抗体-药物缀合物、或组合物而诱导的至少一种新抗原进行测序来鉴定。

[0827] 项384.如项382或项383所述的方法,其中该新抗原序列和/或抗原部分能够结合至该受试者中表达的至少一个HLA等位基因。

[0828] 项385.如项374至381中任一项所述的方法,其中该新抗原序列和/或抗原部分是通用新抗原疫苗。

[0829] 项386.如项385所述的方法,其中该新抗原序列和/或抗原部分能够与罹患该赘生性病症的受试者群体中至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%或至少45%的受试者体内表达的至少一个HLA等位基因结合。

[0830] 项387.如项385或项386所述的方法,其中该新抗原序列和/或抗原部分能够针对存在于罹患该赘生性病症的受试者群体的至少1%、至少5%或至少10%中的肿瘤引起T细胞应答。

[0831] 项388.如项385至387中任一项所述的方法,其中该至少一种新抗原肽包含通过使

赘生性细胞与有效量的该剪接调节剂、抗体-药物缀合物、或组合物接触而诱导的新抗原序列。

[0832] 项389.如项362至367中任一项所述的方法,其中该新抗原疫苗包含至少一种新抗原肽和药学上可接受的载体。

[0833] 项390.如项389所述的方法,其中该至少一种新抗原肽连接至该药学上可接受的载体。

[0834] 项391.如项389或项390所述的方法,其中该药学上可接受的载体选自肽、血清白蛋白、钥孔戚血蓝蛋白、免疫球蛋白、甲状腺球蛋白、卵白蛋白、类毒素或减毒的类毒素衍生物、细胞因子和趋化因子。

[0835] 项392.如项389至391中任一项所述的方法,其中该新抗原肽和该药学上可接受的载体经由接头共价连接。

[0836] 项393.如项389至391中任一项所述的方法,其中该新抗原肽和该药学上可接受的载体表达为融合蛋白。

[0837] 项394.如项362至367中任一项所述的方法,其中该新抗原疫苗包含至少一种新抗原肽和药学上可接受的稀释剂。

[0838] 项395.如项362至367中任一项所述的方法,其中该新抗原疫苗包含至少一种新抗原肽和药学上可接受的佐剂。

[0839] 项396.如项388所述的方法,其中该赘生性细胞存在于体外细胞培养物中。

[0840] 项397.如项396所述的方法,其中该赘生性细胞获得自该受试者。

[0841] 项398.如项388所述的方法,其中该赘生性细胞存在于该受试者中。

[0842] 项399.如项362至367中任一项所述的方法,其中该新抗原疫苗包含至少一种新抗原mRNA。

[0843] 项400.如项399所述的方法,其中该至少一种新抗原mRNA编码一个或超过一个新抗原序列。

[0844] 项401.如项400所述的方法,其中该新抗原序列是该受试者特有的新抗原序列。

[0845] 项402.如项400所述的方法,其中该新抗原序列是通用新抗原序列。

[0846] 项403.如项400至402中任一项所述的方法,其中该新抗原序列包含SEQ ID NO:37-65中任一个的氨基酸序列。

[0847] 项404.如项403所述的方法,其中该新抗原序列包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列。

[0848] 项405.如项403所述的方法,其中该新抗原序列包含SEQ IDNO:39的氨基酸序列。

[0849] 项406.如项403所述的方法,其中该新抗原序列包含SEQ ID NO:46-49中任一个的氨基酸序列。

[0850] 项407.如项400至402中任一项所述的方法,其中该新抗原序列包含SEQ ID NO:66-93中任一个的氨基酸序列、或SEQ ID NO:66-93中任一个的抗原部分。

[0851] 项408.如项407所述的方法,其中该新抗原序列包含SEQ ID NO:66的氨基酸序列、或SEQ ID NO:66的抗原部分。

[0852] 项409.如项407所述的方法,其中该新抗原序列包含SEQ ID NO:74-77中任一个的氨基酸序列、或SEQ ID NO:74-77中任一个的抗原部分。

[0853] 项410.如项403至409中任一项所述的方法,其中该新抗原序列和/或抗原部分的

长度在约10个至约50个、约10个至约35个、约15个至约25个、或约10个至约20个氨基酸范围内。

[0854] 项411.如项403至410中任一项所述的方法,其中该新抗原序列和/或抗原部分是针对该受试者的个性化新抗原疫苗。

[0855] 项412.如项411所述的方法,其中该新抗原序列和/或抗原部分已通过对该受试者中由施用有效量的该剪接调节剂、抗体-药物缀合物、或组合物而诱导的至少一种新抗原进行测序来鉴定。

[0856] 项413.如项411或项412所述的方法,其中该新抗原序列和/或抗原部分能够结合至该受试者中表达的至少一个HLA等位基因。

[0857] 项414.如项403至410中任一项所述的方法,其中该新抗原序列和/或抗原部分是通用新抗原疫苗。

[0858] 项415.如项414所述的方法,其中该新抗原序列和/或抗原部分能够与罹患该赘生性病症的受试者群体中至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%或至少45%的受试者体内表达的至少一个HLA等位基因结合。

[0859] 项416.如项414或项415所述的方法,其中该新抗原序列和/或抗原部分能够针对存在于罹患该赘生性病症的受试者群体的至少1%、至少5%或至少10%中的肿瘤引起T细胞应答。

[0860] 项417.如项414至416中任一项所述的方法,其中该至少一种新抗原mRNA编码通过使赘生性细胞与有效量的该剪接调节剂、抗体-药物缀合物、或组合物接触而诱导的新抗原序列。

[0861] 项418.如项362至367中任一项所述的方法,其中该新抗原疫苗包含至少一种新抗原mRNA和药学上可接受的载体。

[0862] 项419.如项418所述的方法,其中该至少一种新抗原mRNA连接至该药学上可接受的载体。

[0863] 项420.如项418或项419所述的方法,其中该药学上可接受的载体选自肽、血清白蛋白、钥孔戚血蓝蛋白、免疫球蛋白、甲状腺球蛋白、卵白蛋白、类毒素或减毒的类毒素衍生物、细胞因子和趋化因子。

[0864] 项421.如项362至367中任一项所述的方法,其中该新抗原疫苗包含至少一种新抗原mRNA和药学上可接受的稀释剂。

[0865] 项422.如项362至367中任一项所述的方法,其中该新抗原疫苗包含至少一种新抗原mRNA和药学上可接受的佐剂。

[0866] 项423.如项399至422中任一项所述的方法,其中该新抗原mRNA通过包封剂包封。

[0867] 项424.如项423所述的方法,其中该包封剂是脂质体。

[0868] 项425.如项423所述的方法,其中该包封剂是纳米颗粒。

[0869] 项426.如项417所述的方法,其中该赘生性细胞存在于体外细胞培养物中。

[0870] 项427.如项426所述的方法,其中该赘生性细胞获得自该受试者。

[0871] 项428.如项417所述的方法,其中该赘生性细胞存在于该受试者中。

[0872] 项429.如项325至342中任一项所述的方法,其中该至少一种额外疗法包括施用细胞因子或细胞因子类似物。

[0873] 项430.如项429所述的方法,其中该受试者对单独施用时的该细胞因子或细胞因子类似物不耐受、无响应或响应不良。

[0874] 项431.如项429或项430所述的方法,其中该细胞因子或细胞因子类似物包含T细胞增强子。

[0875] 项432.如项429至431中任一项所述的方法,其中该细胞因子或细胞因子类似物包含IL-2、IL-10、IL-12、IL-15、IFNγ和/或TNFα。

[0876] 项433.如项325至342中任一项所述的方法,其中该至少一种额外疗法包括施用工程化的肿瘤靶向性T细胞。

[0877] 项434.如项315至433中任一项所述的方法,该方法进一步包括在施用该剪接调节剂、抗体-药物缀合物、或组合物之后,在该受试者中检测一种或多种新抗原和/或T细胞应答。

[0878] 项435.如项434所述的方法,该方法进一步包括如果检测到一种或多种新抗原和/或T细胞应答,则继续施用该剪接调节剂、抗体-药物缀合物、或组合物。

[0879] 项436.如项434或项435所述的方法,该方法进一步包括如果检测到一种或多种新抗原和/或T细胞应答,则以较低频率和/或以降低的剂量继续施用该剪接调节剂、抗体-药物缀合物、或组合物。

[0880] 项437.如项434至436中任一项所述的方法,其中在该受试者中检测到一种或多种新抗原和/或T细胞应答表明用该剪接调节剂、抗体-药物缀合物、或组合物治疗的功效。

[0881] 项438.如项315至437中任一项所述的方法,其中该受试者具有约150个突变或更少的非同义突变负担。

[0882] 项439.如项315至438中任一项所述的方法,其中该受试者具有约100个突变或更少的非同义突变负担。

[0883] 项440.如项315至439中任一项所述的方法,其中该受试者具有约50个突变或更少的非同义突变负担。

[0884] 项441.如项315至440中任一项所述的方法,其中该赘生性病症是血液恶性病或实体瘤。

[0885] 项442.如项441所述的方法,其中该血液恶性病选自B细胞恶性病、白血病、淋巴瘤和骨髓瘤。

[0886] 项443.如项441或项442所述的方法,其中该血液恶性病选自急性骨髓性白血病和多发性骨髓瘤。

[0887] 项444.如项441所述的方法,其中该实体瘤选自乳腺癌、胃癌、前列腺癌、卵巢癌、肺癌、子宫癌、涎腺导管癌、黑素瘤、结肠癌、宫颈癌、胰腺癌、肾癌、结肠直肠癌和食道癌。

[0888] 项445.一种治疗患有或疑似患有赘生性病症的受试者的方法,该方法包括:

[0889] (a)向该受试者施用有效量的剪接调节剂、如项1至193中任一项所述的抗体-药物缀合物、或如项194至197中任一项所述的组合物,其中施用该剪接调节剂、抗体-药物缀合物、或组合物诱导至少一种新抗原和/或T细胞应答;

[0890] (b)在施用该剪接调节剂、抗体-药物缀合物、或组合物之后,在该受试者中检测一种或多种新抗原和/或T细胞应答;以及

[0891] (c)如果检测到一种或多种新抗原和/或T细胞应答,则继续施用该剪接调节剂、抗

体-药物缀合物、或组合物。

[0892] 项446.如项445所述的方法,其中在该受试者中检测到一种或多种新抗原和/或T细胞应答表明用该剪接调节剂、抗体-药物缀合物、或组合物治疗的功效。

[0893] 项447.如项445或项446所述的方法,其中该一种或多种新抗原包含SEQ ID NO:37-65中任一个的氨基酸序列。

[0894] 项448.如项447所述的方法,其中该一种或多种新抗原包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列。

[0895] 项449.如项447所述的方法,其中该一种或多种新抗原包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列。

[0896] 项450.如项447所述的方法,其中该一种或多种新抗原包含SEQ ID NO:46-49中任一个的氨基酸序列。

[0897] 项451.一种治疗患有或疑似患有赘生性病症的受试者的方法,该方法包括向该受试者施用有效量的剪接调节剂、如项1至193中任一项所述的抗体-药物缀合物、或如项194至197中任一项所述的组合物;以及至少一种额外疗法。

[0898] 项452.如项451所述的方法,其中该至少一种额外疗法包含至少一种、至少两种、至少三种、至少四种或至少五种额外疗法。

[0899] 项453.如项451或项452所述的方法,其中施用该剪接调节剂、抗体-药物缀合物、或组合物诱导至少一种新抗原和/或T细胞应答。

[0900] 项454.如项451至453中任一项所述的方法,其中该剪接调节剂、抗体-药物缀合物、或组合物、和/或该至少一种额外疗法的施用量相较于该剪接调节剂、抗体-药物缀合物、或组合物、和/或该至少一种额外疗法的标准剂量减少10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、75%或90%。

[0901] 项455.如项451至454中任一项所述的方法,其中该剪接调节剂、抗体-药物缀合物、或组合物、和/或该至少一种额外疗法的施用频率比该剪接调节剂、抗体-药物缀合物、或组合物、和/或该至少一种额外疗法的标准给药方案低至少10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、75%或90%。

[0902] 项456.如项451至455中任一项所述的方法,其中该剪接调节剂、抗体-药物缀合物、或组合物、和/或该至少一种额外疗法的施用量和/或剂量导致较低的全身性毒性和/或改善的耐受性。

[0903] 项457.如项451至456中任一项所述的方法,其中该剪接调节剂、抗体-药物缀合物、或组合物的施用是在施用该至少一种额外疗法之前起始。

[0904] 项458.如项451至456中任一项所述的方法,其中该剪接调节剂、抗体-药物缀合物、或组合物的施用是在施用该至少一种额外疗法之后起始。

[0905] 项459.如项451至456中任一项所述的方法,其中该剪接调节剂、抗体-药物缀合物、或组合物的施用是与该至少一种额外疗法的施用同时起始。

[0906] 项460.如项451至460中任一项所述的方法,其中在初始施用之后,重复施用该剪接调节剂、抗体-药物缀合物、或组合物至少一次。

[0907] 项461.如项460所述的方法,其中用于重复施用的该剪接调节剂、抗体-药物缀合物、或组合物的量相较于用于初始施用的量有所减少。

[0908] 项462.如项460或项461所述的方法,其中用于重复施用的该剪接调节剂、抗体-药物缀合物、或组合物的量相较于该剪接调节剂、抗体-药物缀合物、或组合物的标准剂量有所减少。

[0909] 项463.如项460至462中任一项所述的方法,其中用于重复施用的该剪接调节剂、抗体-药物缀合物、或组合物的量相较于该剪接调节剂、抗体-药物缀合物、或组合物的标准剂量减少10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、75%或90%。

[0910] 项464.如项451至463中任一项所述的方法,其中在初始施用后,重复施用该至少一种额外疗法至少一次。

[0911] 项465.如项464所述的方法,其中用于重复施用的该至少一种额外疗法的量相较于用于初始施用的量有所减少。

[0912] 项466.如项464或项465所述的方法,其中用于重复施用的该至少一种额外疗法的量相较于该至少一种额外疗法的标准剂量有所减少。

[0913] 项467.如项464至466中任一项所述的方法,其中用于重复施用的该至少一种额外疗法的量相较于该至少一种额外疗法的标准剂量减少10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、75%或90%。

[0914] 项468.如项464至467中任一项所述的方法,其中该剪接调节剂、抗体-药物缀合物、或组合物的重复施用是与该至少一种额外疗法的重复施用同时进行。

[0915] 项469.如项464至467中任一项所述的方法,其中该剪接调节剂、抗体-药物缀合物、或组合物的重复施用是与该至少一种额外疗法的重复施用依序或错开进行。

[0916] 项470.如项451至469中任一项所述的方法,其中该至少一种额外疗法包括施用检查点抑制剂。

[0917] 项471.如项470所述的方法,其中该受试者对单独施用时的该检查点抑制剂不耐受、无响应或响应不良。

[0918] 项472.如项470或项471所述的方法,其中该检查点抑制剂靶向CTLA4、PD1、PDL1、OX40、CD40、GITR、LAG3、TIM3和/或KIR。

[0919] 项473.如项470至472中任一项所述的方法,其中该检查点抑制剂靶向CTLA4、OX40、CD40和/或GITR。

[0920] 项474.如项470至473中任一项所述的方法,其中该检查点抑制剂包含细胞毒性T淋巴细胞相关抗原4途径(CTLA4)抑制剂。

[0921] 项475.如项474所述的方法,其中该CTLA4抑制剂是抗CTLA4抗体。

[0922] 项476.如项475所述的方法,其中该抗CTLA4抗体是伊匹单抗。

[0923] 项477.如项470至473中任一项所述的方法,其中该检查点抑制剂包含程序性死亡-1途径(PD1)抑制剂。

[0924] 项478.如项477所述的方法,其中该PD1抑制剂是抗PD1抗体。

[0925] 项479.如项478所述的方法,其中该抗PD1抗体是纳武单抗。

[0926] 项480.如项477所述的方法,其中该PD1抑制剂是抗PDL1抗体。

[0927] 项481.如项480所述的方法,其中该抗PDL1抗体是阿特珠单抗。

[0928] 项482.如项470至473中任一项所述的方法,其中该检查点抑制剂包含CTLA4抑制剂和PD1抑制剂。

[0929] 项483.如项482所述的方法,其中该CTLA4抑制剂是抗CTLA4抗体。

[0930] 项484.如项483所述的方法,其中该抗CTLA4抗体是伊匹单抗。

[0931] 项485.如项482所述的方法,其中该PD1抑制剂是抗PD1抗体。

[0932] 项486.如项485所述的方法,其中该抗PD1抗体是纳武单抗。

[0933] 项487.如项482所述的方法,其中该PD1抑制剂是抗PDL1抗体。

[0934] 项488.如项487所述的方法,其中该抗PDL1抗体是阿特珠单抗。

[0935] 项489.如项451至469中任一项所述的方法,其中该至少一种额外疗法包括施用新抗原疫苗。

[0936] 项490.如项489所述的方法,其中该剪接调节剂、抗体-药物缀合物、或组合物是在施用该新抗原疫苗之前施用。

[0937] 项491.如项489所述的方法,其中该剪接调节剂、抗体-药物缀合物、或组合物是在施用该新抗原疫苗之后施用。

[0938] 项492.如项489所述的方法,其中该剪接调节剂、抗体-药物缀合物、或组合物是与该新抗原疫苗的施用同时施用。

[0939] 项493.如项489至492中任一项所述的方法,其中在初始施用之后,重复施用该剪接调节剂、抗体-药物缀合物、或组合物至少一次。

[0940] 项494.如项493所述的方法,其中用于重复施用的该剪接调节剂、抗体-药物缀合物、或组合物的量相较于用于初始施用的量有所减少。

[0941] 项495.如项489至494中任一项所述的方法,其中该新抗原疫苗包含至少一种新抗原肽。

[0942] 项496.如项495所述的方法,其中该至少一种新抗原肽的长度在约10个至约50个或约10个至约35个氨基酸范围内。

[0943] 项497.如项495或项496所述的方法,其中该至少一种新抗原肽的长度在约15个至约25个氨基酸范围内。

[0944] 项498.如项495至497中任一项所述的方法,其中该至少一种新抗原肽包含一个或超过一个新抗原序列。

[0945] 项499.如项498所述的方法,其中该新抗原序列是该受试者特有的新抗原序列。

[0946] 项500.如项498所述的方法,其中该新抗原序列是通用新抗原序列。

[0947] 项501.如项498至500中任一项所述的方法,其中该新抗原序列包含SEQ ID NO:37-65中任一个的氨基酸序列。

[0948] 项502.如项501所述的方法,其中该新抗原序列包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列。

[0949] 项503.如项501所述的方法,其中该新抗原序列包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列。

[0950] 项504.如项501所述的方法,其中该新抗原序列包含SEQ ID NO:46-49中任一个的氨基酸序列。

[0951] 项505.如项498至500中任一项所述的方法,其中该新抗原序列包含SEQ ID NO:66-93中任一个的氨基酸序列、或SEQ ID NO:66-93中任一个的抗原部分。

[0952] 项506.如项505所述的方法,其中该新抗原序列包含SEQ ID NO:66的氨基酸序列、或SEQ ID NO:66的抗原部分。

[0953] 项507.如项505所述的方法,其中该新抗原序列包含SEQ ID NO:74-77中任一个的

氨基酸序列、或SEQ ID NO:74-77中任一个的抗原部分。

[0954] 项508.如项501至507中任一项所述的方法,其中该新抗原序列和/或抗原部分的长度在约10个至约50个、约10个至约35个、约15个至约25个、或约10个至约20个氨基酸范围内。

[0955] 项509.如项501至508中任一项所述的方法,其中该新抗原序列和/或抗原部分是针对该受试者的个性化新抗原疫苗。

[0956] 项510.如项509所述的方法,其中该新抗原序列和/或抗原部分已通过对该受试者中由施用有效量的该剪接调节剂、抗体-药物缀合物、或组合物而诱导的至少一种新抗原进行测序来鉴定。

[0957] 项511.如项509或项510所述的方法,其中该新抗原序列和/或抗原部分能够结合至该受试者中表达的至少一个HLA等位基因。

[0958] 项512.如项501至508中任一项所述的方法,其中该新抗原序列和/或抗原部分是通用新抗原疫苗。

[0959] 项513.如项512所述的方法,其中该新抗原序列和/或抗原部分能够与罹患该赘生性病症的受试者群体中至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%或至少45%的受试者体内表达的至少一个HLA等位基因结合。

[0960] 项514.如项512或项513所述的方法,其中该新抗原序列和/或抗原部分能够针对存在于罹患该赘生性病症的受试者群体的至少1%、至少5%或至少10%中的肿瘤引起T细胞应答。

[0961] 项515.如项512至514中任一项所述的方法,其中该至少一种新抗原肽包含通过使赘生性细胞与有效量的该剪接调节剂、抗体-药物缀合物、或组合物接触而诱导的新抗原序列。

[0962] 项516.如项489至494中任一项所述的方法,其中该新抗原疫苗包含至少一种新抗原肽和药学上可接受的载体。

[0963] 项517.如项516所述的方法,其中该至少一种新抗原肽连接至该药学上可接受的载体。

[0964] 项518.如项516或项517所述的方法,其中该药学上可接受的载体选自肽、血清白蛋白、钥孔戚血蓝蛋白、免疫球蛋白、甲状腺球蛋白、卵白蛋白、类毒素或减毒的类毒素衍生物、细胞因子和趋化因子。

[0965] 项519.如项516至518中任一项所述的方法,其中该新抗原肽和该药学上可接受的载体经由接头共价连接。

[0966] 项520.如项516至518中任一项所述的方法,其中该新抗原肽和该药学上可接受的载体表达为融合蛋白。

[0967] 项521.如项489至494中任一项所述的方法,其中该新抗原疫苗包含至少一种新抗原肽和药学上可接受的稀释剂。

[0968] 项522.如项489至494中任一项所述的方法,其中该新抗原疫苗包含至少一种新抗原肽和药学上可接受的佐剂。

[0969] 项523.如项515所述的方法,其中该赘生性细胞存在于体外细胞培养物中。

[0970] 项524.如项523所述的方法,其中该赘生性细胞获得自该受试者。

[0971] 项525.如项515所述的方法,其中该赘生性细胞存在于该受试者中。

[0972] 项526.如项489至494中任一项所述的方法,其中该新抗原疫苗包含至少一种新抗原mRNA。

[0973] 项527.如项526所述的方法,其中该至少一种新抗原mRNA编码一个或超过一个新抗原序列。

[0974] 项528.如项527所述的方法,其中该新抗原序列是该受试者特有的新抗原序列。

[0975] 项529.如项527所述的方法,其中该新抗原序列是通用新抗原序列。

[0976] 项530.如项527至529中任一项所述的方法,其中该新抗原序列包含SEQ ID NO:37-65中任一个的氨基酸序列。

[0977] 项531.如项530所述的方法,其中该新抗原序列包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列。

[0978] 项532.如项530所述的方法,其中该新抗原序列包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列。

[0979] 项533.如项530所述的方法,其中该新抗原序列包含SEQ ID NO:46-49中任一个的氨基酸序列。

[0980] 项534.如项527至529中任一项所述的方法,其中该新抗原序列包含SEQ ID NO:66-93中任一个的氨基酸序列、或SEQ ID NO:66-93中任一个的抗原部分。

[0981] 项535.如项534所述的方法,其中该新抗原序列包含SEQ ID NO:66的氨基酸序列、或SEQ ID NO:66的抗原部分。

[0982] 项536.如项534所述的方法,其中该新抗原序列包含SEQ ID NO:74-77中任一个的氨基酸序列、或SEQ ID NO:74-77中任一个的抗原部分。

[0983] 项537.如项530至536中任一项所述的方法,其中该新抗原序列和/或抗原部分的长度在约10个至约50个、约10个至约35个、约15个至约25个、或约10个至约20个氨基酸范围内。

[0984] 项538.如项530至537中任一项所述的方法,其中该新抗原序列和/或抗原部分是针对该受试者的个性化新抗原疫苗。

[0985] 项539.如项538所述的方法,其中该新抗原序列和/或抗原部分已通过对该受试者中由施用有效量的该剪接调节剂、抗体-药物缀合物、或组合物而诱导的至少一种新抗原进行测序来鉴定。

[0986] 项540.如项538或项539所述的方法,其中该新抗原序列和/或抗原部分能够结合至该受试者中表达的至少一个HLA等位基因。

[0987] 项541.如项530至537中任一项所述的方法,其中该新抗原序列和/或抗原部分是通用新抗原疫苗。

[0988] 项542.如项541所述的方法,其中该新抗原序列和/或抗原部分能够与罹患该赘生性病症的受试者群体中至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%或至少45%的受试者体内表达的至少一个HLA等位基因结合。

[0989] 项543.如项541或项542所述的方法,其中该新抗原序列和/或抗原部分能够针对存在于罹患该赘生性病症的受试者群体的至少1%、至少5%或至少10%中的肿瘤引起T细胞应答。

[0990] 项544.如项541至543中任一项所述的方法,其中该至少一种新抗原mRNA编码通过使赘生性细胞与有效量的该剪接调节剂、抗体-药物缀合物、或组合物接触而诱导的新抗原

序列。

[0991] 项545.如项489至494中任一项所述的方法,其中该新抗原疫苗包含至少一种新抗原mRNA和药学上可接受的载体。

[0992] 项546.如项545所述的方法,其中该至少一种新抗原mRNA连接至该药学上可接受的载体。

[0993] 项547.如项545或项546所述的方法,其中该药学上可接受的载体选自肽、血清白蛋白、钥孔戚血蓝蛋白、免疫球蛋白、甲状腺球蛋白、卵白蛋白、类毒素或减毒的类毒素衍生物、细胞因子和趋化因子。

[0994] 项548.如项489至494中任一项所述的方法,其中该新抗原疫苗包含至少一种新抗原mRNA和药学上可接受的稀释剂。

[0995] 项549.如项489至494中任一项所述的方法,其中该新抗原疫苗包含至少一种新抗原mRNA和药学上可接受的佐剂。

[0996] 项550.如项526至549中任一项所述的方法,其中该新抗原mRNA通过包封剂包封。

[0997] 项551.如项550所述的方法,其中该包封剂是脂质体。

[0998] 项552.如项550所述的方法,其中该包封剂是纳米颗粒。

[0999] 项553.如项544所述的方法,其中该赘生性细胞存在于体外细胞培养物中。

[1000] 项554.如项553所述的方法,其中该赘生性细胞获得自该受试者。

[1001] 项555.如项544所述的方法,其中该赘生性细胞存在于该受试者中。

[1002] 项556.如项451至469中任一项所述的方法,其中该至少一种额外疗法包括施用细胞因子或细胞因子类似物。

[1003] 项557.如项556所述的方法,其中该受试者对单独施用时的该细胞因子或细胞因子类似物不耐受、无响应或响应不良。

[1004] 项558.如项556或项557所述的方法,其中该细胞因子或细胞因子类似物包含T细胞增强子。

[1005] 项559.如项556至558中任一项所述的方法,其中该细胞因子或细胞因子类似物包含IL-2、IL-10、IL-12、IL-15、IFNγ和/或TNFα。

[1006] 项560.如项451至469中任一项所述的方法,其中该至少一种额外疗法包括施用工程化的肿瘤靶向性T细胞。

[1007] 项561.如项451至560中任一项所述的方法,其中该受试者具有约150个突变或更少的非同义突变负担。

[1008] 项562.如项451至561中任一项所述的方法,其中该受试者具有约100个突变或更少的非同义突变负担。

[1009] 项563.如项451至562中任一项所述的方法,其中该受试者具有约50个突变或更少的非同义突变负担。

[1010] 项564.如项451至563中任一项所述的方法,其中该赘生性病症是血液恶性病或实体瘤。

[1011] 项565.如项564所述的方法,其中该血液恶性病选自B细胞恶性病、白血病、淋巴瘤和骨髓瘤。

[1012] 项566.如项564或项565所述的方法,其中该血液恶性病选自急性骨髓性白血病和

多发性骨髓瘤。

[1013] 项567.如项564所述的方法,其中该实体瘤选自乳腺癌、胃癌、前列腺癌、卵巢癌、肺癌、子宫癌、涎腺导管癌、黑素瘤、结肠癌、宫颈癌、胰腺癌、肾癌、结肠直肠癌和食道癌。

[1014] 项568.一种鉴定至少一种新抗原的方法,该方法包括:

[1015] (a)使赘生性细胞与有效量的剪接调节剂、如项1至193中任一项所述的抗体-药物缀合物、或如项194至197中任一项所述的组合物接触;

[1016] (b)在该赘生性细胞与该剪接调节剂、抗体-药物缀合物、或组合物接触之后,检测至少一种可变剪接的mRNA转录物;

[1017] (c)预测该至少一种可变剪接的mRNA转录物翻译成至少一种肽;以及

[1018] (d)将该至少一种肽与参考蛋白质组进行比较,其中如果该至少一种肽不匹配该参考蛋白质组中的任何肽,则鉴定出至少一种新抗原。

[1019] 项569.如项568所述的方法,其中检测至少一种可变剪接的mRNA转录物包括RNAseq。

[1020] 项570.如项568或项569所述的方法,其中预测该至少一种可变剪接的mRNA转录物的翻译包括对该至少一种转录物的剪接百分比变化(dPSI)值进行定量。

[1021] 项571.如项568至570中任一项所述的方法,其中预测该至少一种可变剪接的mRNA转录物的翻译包括RiboSeq和/或核糖体图谱分析。

[1022] 项572.如项568至571中任一项所述的方法,其中该方法进一步包括评价该至少一种肽的预测的主要组织相容性复合体(MHC)结合。

[1023] 项573.如项572所述的方法,其中通过测量该至少一种肽的原始亲和力预测结合强度来确定预测的MHC结合。

[1024] 项574.如项573所述的方法,其中约500nM或更高的原始亲和力预测结合强度指示MHC结合。

[1025] 项575.如项572所述的方法,其中预测的MHC结合通过以下来确定:鉴定一系列随机肽的预测结合强度的分布;以及将该至少一种肽的预测结合强度与该分布进行比较。

[1026] 项576.如项575所述的方法,其中在该分布的前2.0%中的预测结合强度指示弱的MHC结合。

[1027] 项577.如项575所述的方法,其中在该分布的前0.5%中的预测结合强度指示强的MHC结合。

[1028] 项578.如项568至577中任一项所述的方法,其中该赘生性细胞存在于体外细胞培养物中。

[1029] 项579.如项578所述的方法,其中该赘生性细胞获得自该受试者。

[1030] 项580.如项568至577中任一项所述的方法,其中该赘生性细胞存在于该受试者中。

[1031] 项581.如项568至580中任一项所述的方法,该方法进一步包括接触一种或多种额外赘生性细胞以鉴定至少一种通用新抗原。

[1032] 项582.一种鉴定至少一种新抗原的方法,该方法包括:

[1033] (a)使赘生性细胞与有效量的剪接调节剂、如项1至193中任一项所述的抗体-药物缀合物、或如项194至197中任一项所述的组合物接触;

[1034] (b)在该赘生性细胞与该剪接调节剂、抗体-药物缀合物、或组合物接触之后,检测包含可能的新抗原序列的至少一种肽;以及以及

[1035] (c)将该至少一种肽与参考蛋白质组进行比较,其中如果该至少一种肽不匹配该参考蛋白质组中的任何肽,则鉴定出至少一种新抗原。

[1036] 项583.如项582所述的方法,其中该方法进一步包括评价该至少一种肽的预测的主要组织相容性复合体(MHC)结合。

[1037] 项584.如项583所述的方法,其中通过测量该至少一种肽的原始亲和力预测结合强度来确定预测的MHC结合。

[1038] 项585.如项584所述的方法,其中约500nM或更高的原始亲和力预测结合强度指示MHC结合。

[1039] 项586.如项583所述的方法,其中预测的MHC结合通过以下来确定:鉴定一系列随机肽的预测结合强度的分布;以及将该至少一种肽的预测结合强度与该分布进行比较。

[1040] 项587.如项586所述的方法,其中在该分布的前2.0%中的预测结合强度指示弱的MHC结合。

[1041] 项588.如项586所述的方法,其中在该分布的前0.5%中的预测结合强度指示强的MHC结合。

[1042] 项589.如项582至588中任一项所述的方法,其中该赘生性细胞存在于体外细胞培养物中。

[1043] 项590.如项589所述的方法,其中该赘生性细胞获得自该受试者。

[1044] 项591.如项582至588中任一项所述的方法,其中该赘生性细胞存在于该受试者中。

[1045] 项592.如项582至591中任一项所述的方法,该方法进一步包括接触一种或多种额外赘生性细胞以鉴定至少一种通用新抗原。

[1046] 项593.一种制造新抗原疫苗的方法,该方法包括:

[1047] (a)使用如项568至592中任一项所述的方法鉴定至少一种新抗原;以及

[1048] (b)将该至少一种新抗原与药学上可接受的载体、稀释剂或佐剂一起配制。

[1049] 项594.如项593所述的方法,其中该至少一种新抗原包含SEQ ID NO:37-65中任一个的氨基酸序列。

[1050] 项595.如项594所述的方法,其中该至少一种新抗原包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列。

[1051] 项596.如项594所述的方法,其中该至少一种新抗原包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列。

[1052] 项597.如项594所述的方法,其中该至少一种新抗原包含SEQ ID NO:46-49中任一个的氨基酸序列。

[1053] 项598.如项593所述的方法,其中该至少一种新抗原包含SEQ ID NO:66-93中任一个的氨基酸序列、或SEQ ID NO:66-93中任一个的抗原部分。

[1054] 项599.如项598所述的方法,其中该至少一种新抗原包含SEQ ID NO:66的氨基酸序列、或SEQ ID NO:66的抗原部分。

[1055] 项600.如项598所述的方法,其中该至少一种新抗原包含SEQ ID NO:74-77中任一

个的氨基酸序列、或SEQ ID NO:74-77中任一个的抗原部分。

[1056] 项601.如项593至600中任一项所述的方法,其中该至少一种新抗原和/或抗原部分的长度在约10个至约50个、约10个至约35个、约15个至约25个、或约10个至约20个氨基酸范围内。

[1057] 项602.如项593至601中任一项所述的方法,其中该至少一种新抗原和/或抗原部分连接至该药学上可接受的载体。

[1058] 项603.如项593至602中任一项所述的方法,其中该药学上可接受的载体选自肽、血清白蛋白、钥孔戚血蓝蛋白、免疫球蛋白、甲状腺球蛋白、卵白蛋白、类毒素或减毒的类毒素衍生物、细胞因子和趋化因子。

[1059] 项604.一种治疗患有或疑似患有赘生性病症的受试者的方法,该方法包括:

[1060] (a)向该受试者施用有效量的剪接调节剂、如项1至193中任一项所述的抗体-药物缀合物、或如项194至197中任一项所述的组合物;

[1061] (b)在施用该剪接调节剂、抗体-药物缀合物、或组合物之后,在该受试者中检测一种或多种新抗原;

[1062] (c)将该一种或多种新抗原与一组通用新抗原进行比较;以及

[1063] (d)向该受试者施用包含存在于该受试者中的至少一种通用新抗原的通用新抗原疫苗。

[1064] 项605.如项604所述的方法,其中将该通用新抗原疫苗单独施用或与至少一种额外疗法组合施用。

[1065] 项606.如项605所述的方法,其中该至少一种额外疗法包含至少一种、至少两种、至少三种、至少四种或至少五种额外疗法。

[1066] 项607.如项605或项606所述的方法,其中该至少一种额外疗法包括重复施用该剪接调节剂、抗体-药物缀合物、或组合物。

[1067] 项608.如项607所述的方法,其中该剪接调节剂、抗体-药物缀合物、或组合物的重复施用是在施用该通用新抗原疫苗之前起始。

[1068] 项609.如项607所述的方法,其中该剪接调节剂、抗体-药物缀合物、或组合物的重复是在施用该通用新抗原疫苗之后起始。

[1069] 项610.如项607所述的方法,其中该剪接调节剂、抗体-药物缀合物、或组合物的重复施用是与该通用新抗原疫苗的施用同时起始。

[1070] 项611.如项607至610中任一项所述的方法,其中用于重复施用的该剪接调节剂、抗体-药物缀合物、或组合物的量相较于用于初始施用的量有所减少。

[1071] 项612.如项607至611中任一项所述的方法,其中用于重复施用的该剪接调节剂、抗体-药物缀合物、或组合物的量相较于该剪接调节剂、抗体-药物缀合物、或组合物的标准剂量有所减少。

[1072] 项613.如项607至612中任一项所述的方法,其中用于重复施用的该剪接调节剂、抗体-药物缀合物、或组合物的量相较于该剪接调节剂、抗体-药物缀合物、或组合物的标准剂量减少10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、75%或90%。

[1073] 项614.如项605至613中任一项所述的方法,其中该至少一种额外疗法包括施用检查点抑制剂。

[1074] 项615.如项614所述的方法,其中该检查点抑制剂的施用是在施用该通用新抗原疫苗和/或重复施用该剪接调节剂、抗体-药物缀合物、或组合物之前起始。

[1075] 项616.如项614所述的方法,其中该检查点抑制剂的施用是在施用该通用新抗原疫苗和/或重复该剪接调节剂、抗体-药物缀合物、或组合物之后起始。

[1076] 项617.如项614所述的方法,其中该检查点抑制剂的施用是与该通用新抗原疫苗的施用和/或该剪接调节剂、抗体-药物缀合物、或组合物的重复施用同时起始。

[1077] 项618.如项614至617中任一项所述的方法,其中在初始施用之后,重复施用该检查点抑制剂至少一次。

[1078] 项619.如项618所述的方法,其中用于重复施用的该检查点抑制剂的量相较于用于初始施用的量有所减少。

[1079] 项620.如项618或项619所述的方法,其中用于重复施用的该检查点抑制剂的量相较于该检查点抑制剂的标准剂量有所减少。

[1080] 项621.如项618至620中任一项所述的方法,其中用于重复施用的该检查点抑制剂的量相较于该检查点抑制剂的标准剂量减少10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、75%或90%。

[1081] 项622.如项614至621中任一项所述的方法,其中该受试者对单独施用时的该检查点抑制剂不耐受、无响应或响应不良。

[1082] 项623.如项614至622中任一项所述的方法,其中该检查点抑制剂靶向CTLA4、PD1、PDL1、OX40、CD40、GITR、LAG3、TIM3和/或KIR。

[1083] 项624.如项614至623中任一项所述的方法,其中该检查点抑制剂靶向CTLA4、OX40、CD40和/或GITR。

[1084] 项625.如项614至624中任一项所述的方法,其中该检查点抑制剂包含细胞毒性T淋巴细胞相关抗原4途径(CTLA4)抑制剂。

[1085] 项626.如项625所述的方法,其中该CTLA4抑制剂是抗CTLA4抗体。

[1086] 项627.如项626所述的方法,其中该抗CTLA4抗体是伊匹单抗。

[1087] 项628.如项614至624中任一项所述的方法,其中该检查点抑制剂包含程序性死亡-1途径(PD1)抑制剂。

[1088] 项629.如项628所述的方法,其中该PD1抑制剂是抗PD1抗体。

[1089] 项630.如项629所述的方法,其中该抗PD1抗体是纳武单抗。

[1090] 项631.如项628所述的方法,其中该PD1抑制剂是抗PDL1抗体。

[1091] 项632.如项631所述的方法,其中该抗PDL1抗体是阿特珠单抗。

[1092] 项633.如项614至624中任一项所述的方法,其中该检查点抑制剂包含CTLA4抑制剂和PD1抑制剂。

[1093] 项634.如项633所述的方法,其中该CTLA4抑制剂是抗CTLA4抗体。

[1094] 项635.如项634所述的方法,其中该抗CTLA4抗体是伊匹单抗。

[1095] 项636.如项633所述的方法,其中该PD1抑制剂是抗PD1抗体。

[1096] 项637.如项636所述的方法,其中该抗PD1抗体是纳武单抗。

[1097] 项638.如项633所述的方法,其中该PD1抑制剂是抗PDL1抗体。

[1098] 项639.如项638所述的方法,其中该抗PDL1抗体是阿特珠单抗。

[1099] 项640.如项604至639中任一项所述的方法,其中该通用新抗原疫苗包含至少一种新抗原肽。

[1100] 项641.如项640所述的方法,其中该至少一种新抗原肽的长度在约10个至约50个或约10个至约35个氨基酸范围内。

[1101] 项642.如项640或项641所述的方法,其中该至少一种新抗原肽的长度在约15个至约25个氨基酸范围内。

[1102] 项643.如项640至642中任一项所述的方法,其中该至少一种新抗原肽包含一个或超过一个通用新抗原序列。

[1103] 项644.如项643所述的方法,其中该通用新抗原序列包含SEQ ID NO:37-65中任一个的氨基酸序列。

[1104] 项645.如项644所述的方法,其中该通用新抗原序列包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列。

[1105] 项646.如项644所述的方法,其中该通用新抗原序列包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列。

[1106] 项647.如项644所述的方法,其中该通用新抗原序列包含SEQ ID NO:46-49中任一个的氨基酸序列。

[1107] 项648.如项643所述的方法,其中该通用新抗原序列包含SEQ ID NO:66-93中任一个的氨基酸序列、或SEQ ID NO:66-93中任一个的抗原部分。

[1108] 项649.如项648所述的方法,其中该通用新抗原序列包含SEQ ID NO:66的氨基酸序列、或SEQ ID NO:66的抗原部分。

[1109] 项650.如项648所述的方法,其中该通用新抗原序列包含SEQ ID NO:74-77中任一个的氨基酸序列、或SEQ ID NO:74-77中任一个的抗原部分。

[1110] 项651.如项643至650中任一项所述的方法,其中该通用新抗原序列和/或抗原部分的长度在约10个至约50个、约10个至约35个、约15个至约25个、或约10个至约20个氨基酸范围内。

[1111] 项652.如项643至651中任一项所述的方法,其中该通用新抗原序列和/或抗原部分能够与罹患该赘生性病症的受试者群体中至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%或至少45%的受试者体内表达的至少一个HLA等位基因结合。

[1112] 项653.如项643至652中任一项所述的方法,其中该通用新抗原序列和/或抗原部分能够针对存在于罹患该赘生性病症的受试者群体的至少1%、至少5%或至少10%中的肿瘤引起T细胞应答。

[1113] 项654.如项604至639中任一项所述的方法,其中该通用新抗原疫苗包含至少一种新抗原肽和药学上可接受的载体。

[1114] 项655.如项654所述的方法,其中该至少一种新抗原肽连接至该药学上可接受的载体。

[1115] 项656.如项654或项655所述的方法,其中该药学上可接受的载体选自肽、血清白蛋白、钥孔戚血蓝蛋白、免疫球蛋白、甲状腺球蛋白、卵白蛋白、类毒素或减毒的类毒素衍生物、细胞因子和趋化因子。

[1116] 项657.如项654至656中任一项所述的方法,其中该新抗原肽和该药学上可接受的

载体经由接头共价连接。

[1117] 项658.如项654至656中任一项所述的方法,其中该新抗原肽和该药学上可接受的载体表达为融合蛋白。

[1118] 项659.如项604至639中任一项所述的方法,其中该通用新抗原疫苗包含至少一种新抗原肽和药学上可接受的稀释剂。

[1119] 项660.如项604至639中任一项所述的方法,其中该通用新抗原疫苗包含至少一种新抗原肽和药学上可接受的佐剂。

[1120] 项661.如项604至639中任一项所述的方法,其中该通用新抗原疫苗包含至少一种新抗原mRNA。

[1121] 项662.如项661所述的方法,其中该至少一种新抗原mRNA编码一个或超过一个通用新抗原序列。

[1122] 项663.如项662所述的方法,其中该通用新抗原序列包含SEQ ID NO:37-65中任一个的氨基酸序列。

[1123] 项664.如项663所述的方法,其中该通用新抗原序列包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列。

[1124] 项665.如项663所述的方法,其中该通用新抗原序列包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列。

[1125] 项666.如项663所述的方法,其中该通用新抗原序列包含SEQ ID NO:46-49中任一个的氨基酸序列。

[1126] 项667.如项662所述的方法,其中该通用新抗原序列包含SEQ ID NO:66-93中任一个的氨基酸序列、或SEQ ID NO:66-93中任一个的抗原部分。

[1127] 项668.如项667所述的方法,其中该通用新抗原序列包含SEQ ID NO:66的氨基酸序列、或SEQ ID NO:66的抗原部分。

[1128] 项669.如项667所述的方法,其中该通用新抗原序列包含SEQ ID NO:74-77中任一个的氨基酸序列、或SEQ ID NO:74-77中任一个的抗原部分。

[1129] 项670.如项662至669中任一项所述的方法,其中该通用新抗原序列和/或抗原部分的长度在约10个至约50个、约10个至约35个、约15个至约25个、或约10个至约20个氨基酸范围内。

[1130] 项671.如项662至670中任一项所述的方法,其中该通用新抗原序列和/或抗原部分能够与罹患该赘生性病症的受试者群体中至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%或至少45%的受试者体内表达的至少一个HLA等位基因结合。

[1131] 项672.如项662至671中任一项所述的方法,其中该通用新抗原序列和/或抗原部分能够针对存在于罹患该赘生性病症的受试者群体的至少1%、至少5%或至少10%中的肿瘤引起T细胞应答。

[1132] 项673.如项604至639中任一项所述的方法,其中该通用新抗原疫苗包含至少一种新抗原mRNA和药学上可接受的载体。

[1133] 项674.如项673所述的方法,其中该至少一种新抗原mRNA连接至该药学上可接受的载体。

[1134] 项675.如项673或项674所述的方法,其中该药学上可接受的载体选自肽、血清白

蛋白、钥孔戚血蓝蛋白、免疫球蛋白、甲状腺球蛋白、卵白蛋白、类毒素或减毒的类毒素衍生物、细胞因子和趋化因子。

[1135] 项676.如项604至639中任一项所述的方法,其中该通用新抗原疫苗包含至少一种新抗原mRNA和药学上可接受的稀释剂。

[1136] 项677.如项604至639中任一项所述的方法,其中该通用新抗原疫苗包含至少一种新抗原mRNA和药学上可接受的佐剂。

[1137] 项678.如项661至677中任一项所述的方法,其中该新抗原mRNA通过包封剂包封。

[1138] 项679.如项678所述的方法,其中该包封剂是脂质体。

[1139] 项680.如项678所述的方法,其中该包封剂是纳米颗粒。

[1140] 项681.如项604至680中任一项所述的方法,其中该受试者具有约150个突变或更少的非同义突变负担。

[1141] 项682.如项604至681中任一项所述的方法,其中该受试者具有约100个突变或更少的非同义突变负担。

[1142] 项683.如项604至682中任一项所述的方法,其中该受试者具有约50个突变或更少的非同义突变负担。

[1143] 项684.如项604至683中任一项所述的方法,其中该赘生性病症是血液恶性病或实体瘤。

[1144] 项685.如项684所述的方法,其中该血液恶性病选自B细胞恶性病、白血病、淋巴瘤和骨髓瘤。

[1145] 项686.如项684或项685所述的方法,其中该血液恶性病选自急性骨髓性白血病和多发性骨髓瘤。

[1146] 项687.如项684所述的方法,其中该实体瘤选自乳腺癌、胃癌、前列腺癌、卵巢癌、肺癌、子宫癌、涎腺导管癌、黑素瘤、结肠癌、宫颈癌、胰腺癌、肾癌、结肠直肠癌和食道癌。

[1147] 项688.如项303至687中任一项所述的方法,其中该抗体-药物缀合物包含具有式(I)的抗体-药物缀合物:

[1148] $Ab-(L-D)_p$ (I)

[1149] 其中

[1150] Ab是靶向赘生性细胞的抗体或抗原结合片段;

[1151] D是D2、D1、D4、D12或D15;

[1152] L是将Ab共价连接至D的接头;并且

[1153] p是1至15的整数。

[1154] 项689.如项688所述的方法,其中该抗体或抗原结合片段靶向表达HER2的细胞。

[1155] 项690.如项689所述的方法,其中该抗体或抗原结合片段是抗HER2抗体或抗原结合片段。

[1156] 项691.如项689或项690所述的方法,其中该抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:1(HCDR1)、SEQ ID NO:2(HCDR2)和SEQ ID NO:3(HCDR3)的氨基酸序列的三个重链互补决定区(HCDR1、HCDR2和HCDR3);以及含有SEQ ID NO:4(LCDR1)、SEQ ID NO:5(LCDR2)和SEQ ID NO:6(LCDR3)的氨基酸序列的三个轻链互补决定区(LCDR1、LCDR2和LCDR3)。

[1157] 项692.如项689至691中任一项所述的方法,其中该抗体或抗原结合片段包含含有

SEQ ID NO:19的氨基酸序列的重链可变区和含有SEQ ID NO:20的氨基酸序列的轻链可变区。

[1158] 项693.如项688所述的方法,其中该抗体或抗原结合片段靶向表达CD138的细胞。

[1159] 项694.如项693所述的方法,其中该抗体或抗原结合片段是抗CD138抗体或抗原结合片段。

[1160] 项695.如项693或项694所述的方法,其中该抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:7(HCDR1)、SEQ ID NO:8(HCDR2)和SEQ ID NO:9(HCDR3)的氨基酸序列的三个重链互补决定区(HCDR1、HCDR2和HCDR3);以及含有SEQ ID NO:10(LCDR1)、SEQ ID NO:11(LCDR2)和SEQ ID NO:12(LCDR3)的氨基酸序列的三个轻链互补决定区(LCDR1、LCDR2和LCDR3)。

[1161] 项696.如项693至695中任一项所述的方法,其中该抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:21的氨基酸序列的重链可变区和含有SEQ ID NO:22的氨基酸序列的轻链可变区。

[1162] 项697.如项688所述的方法,其中该抗体或抗原结合片段靶向表达EPHA2的细胞。

[1163] 项698.如项697所述的方法,其中该抗体或抗原结合片段是抗EPHA2抗体或抗原结合片段。

[1164] 项699.如项697或项698所述的方法,其中该抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:13(HCDR1)、SEQ ID NO:14(HCDR2)和SEQ ID NO:15(HCDR3)的氨基酸序列的三个重链互补决定区(HCDR1、HCDR2和HCDR3);以及含有SEQ ID NO:16(LCDR1)、SEQ ID NO:17(LCDR2)和SEQ ID NO:18(LCDR3)的氨基酸序列的三个轻链互补决定区(LCDR1、LCDR2和LCDR3)。

[1165] 项700.如项697至699中任一项所述的方法,其中该抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:23的氨基酸序列的重链可变区和含有SEQ ID NO:24的氨基酸序列的轻链可变区。

[1166] 项701.如项688至700中任一项所述的方法,其中该接头是可裂解接头。

[1167] 项702.如项701所述的方法,其中该可裂解接头包含MC-Val-Cit-pABC。

[1168] 项703.如项701所述的方法,其中该可裂解接头包含MC-Val-Ala-pABC。

[1169] 项704.如项701所述的方法,其中该可裂解接头包含MC-Val-Ala-pAB。

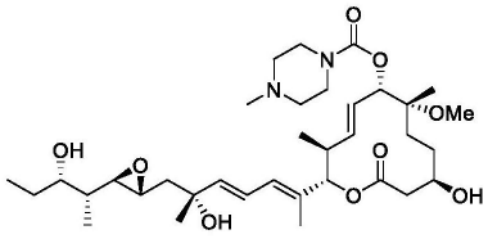
[1170] 项705.如项688至700中任一项所述的方法,其中该接头是不可裂解接头。

[1171] 项706.如项705所述的方法,其中该不可裂解接头包含Mal-Hex。

[1172] 项707.如项705所述的方法,其中该不可裂解接头包含Mal-Et。

[1173] 项708.如项705所述的方法,其中该不可裂解接头包含Mal-Et-O-Et。

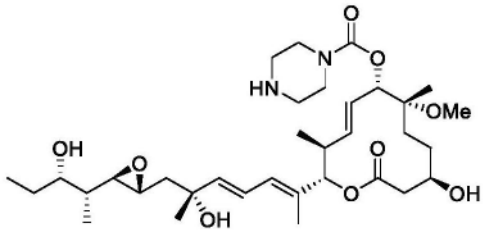
[1174] 项709.如项688至708中任一项所述的方法,其中该剪接调节剂包含D2:

[1175] 

(D2)。

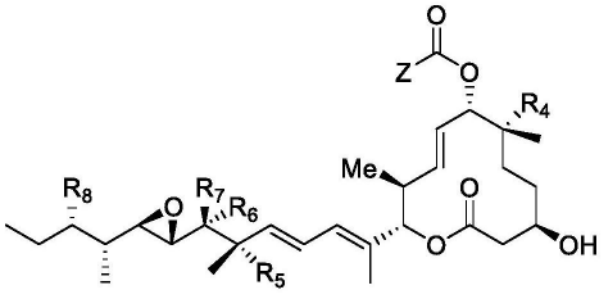
[1176] 项710.如项709所述的方法,其中该剪接调节剂包含D2且该接头包含MC-Val-Ala-pAB。

[1177] 项711.如项688至708中任一项所述的方法,其中该剪接调节剂包含D1:

[1178]  (D1)。

[1179] 项712.如项711所述的方法,其中该剪接调节剂包含D1且该接头包含MC-Val-Cit-pABC。

[1180] 项713.如项688至708中任一项所述的方法,其中该剪接调节剂包含具有式(II)的剪接调节剂:

[1181]  (II),或其药学上可接受的盐,其中:

[1182] R^1选自不存在、氢、C_1-C_6烷基基团、C_1-C_6烷基烷氧基基团、C_1-C_6烷基氨基基团、C_1-C_6烷基羧酸基团、C_1-C_6烷基羟基基团、C_3-C_8环烷基基团、苄基基团、C_3-C_8杂环基基团、-O-C(=O)-(C_1-C_6烷基)基团和-CD_3;

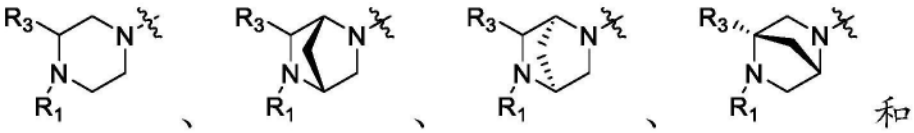
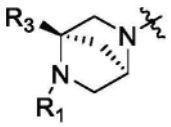
[1183] R^3选自氢、C_1-C_6烷基基团、C_1-C_6烷基烷氧基基团、C_1-C_6烷基氨基基团、C_1-C_6烷基羧酸基团、C_1-C_6烷基羟基基团、C_3-C_8环烷基基团、苄基基团、C_3-C_8杂环基基团和-O-C(=O)-(C_1-C_6烷基)基团;并且

[1184] R^4、R^5和R^8各自独立地选自氢、羟基基团、-O-(C_1-C_6烷基)基团、-O-C(=O)-(C_1-C_6烷基)基团和C_1-C_6烷基基团;

[1185] R^6和R^7各自独立地选自氢、-O-R^{17}、-O-C(=O)-R^{17}、-O-C(=O)-$NR^{15}R^{16}$、C_1-C_6烷基基团和-$NR^{15}R^{16}$;

[1186] R^{15}和R^{16}各自独立地选自氢、R^{17}、-C(=O)-R^{17}和-C(=O)-O-R^{17};

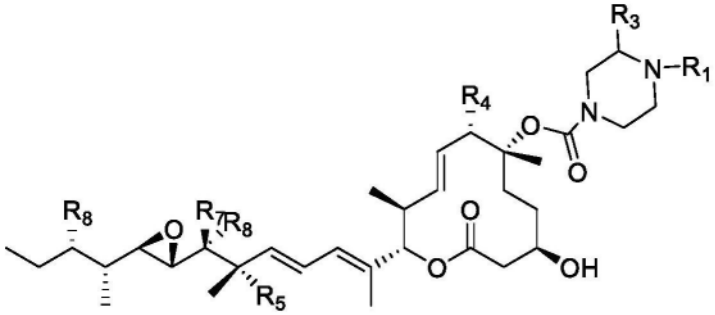
[1187] R^{17}选自氢、C_1-C_6烷基基团、C_3-C_8环烷基基团、苄基基团和C_3-C_8杂环基基团;并且

[1188] Z 选 自  和  ;

[1189] 其中R^1、R^3、R^4、R^5、R^6、R^7、R^8、R^{15}、R^{16}和R^{17}各自独立地被0至3个独立地选自以下的基团取代:卤素、羟基基团、C_1-C_6烷基基团、-O-(C_1-C_6烷基)基团、-$NR^{15}R^{16}$、C_3-C_8环烷基基团、C_1-C_6烷基羟基基团、C_1-C_6烷基烷氧基基团、苄基基团和C_3-C_8杂环基基团,

[1190] 其中R^6和R^7中至少一个是氢。

[1191] 项714.如项688至708中任一项所述的方法,其中该剪接调节剂包含具有式(IV)的剪接调节剂:

[1192]  (IV),

或其药学上可接受的盐,其中:

[1193] R^1选自氢、C_1-C_6烷基基团、C_1-C_6烷基烷氧基基团、C_1-C_6烷基氨基基团、C_1-C_6烷基羧酸基团、C_1-C_6烷基羟基基团、C_3-C_8环烷基基团、苄基基团、C_3-C_8杂环基基团、-O-C(=O)-(C_1-C_6烷基)基团和-CD_3;

[1194] R^3选自氢、C_1-C_6烷基基团、C_1-C_6烷基烷氧基基团、C_1-C_6烷基氨基基团、C_1-C_6烷基羧酸基团、C_1-C_6烷基羟基基团、C_3-C_8环烷基基团、苄基基团、C_3-C_8杂环基基团和-O-C(=O)-(C_1-C_6烷基)基团;并且

[1195] R^4、R^5和R^8各自独立地选自氢、羟基基团、-O-(C_1-C_6烷基)基团、-O-C(=O)-(C_1-C_6烷基)基团和C_1-C_6烷基基团;

[1196] R^6和R^7各自独立地选自氢、-O-R^{17}、-O-C(=O)-R^{17}、-O-C(=O)-$NR^{15}R^{16}$、C_1-C_6烷基基团和-$NR^{15}R^{16}$;

[1197] R^{15}和R^{16}各自独立地选自氢、R^{17}、-C(=O)-R^{17}和

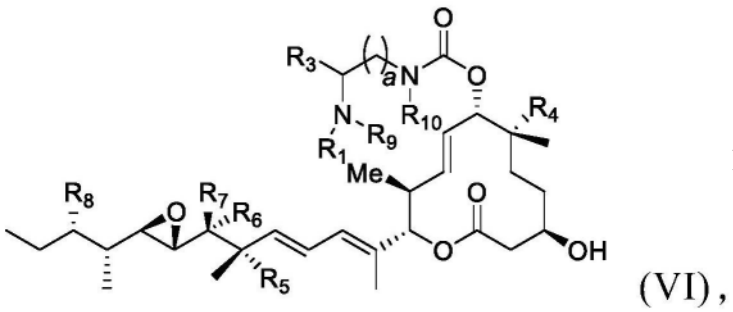
[1198] -C(=O)-O-R^{17};并且

[1199] R^{17}选自氢、C_1-C_6烷基基团、C_3-C_8环烷基基团、苄基基团和C_3-C_8杂环基基团;

[1200] 其中R^1、R^3、R^4、R^5、R^6、R^7、R^8、R^{15}、R^{16}和R^{17}各自独立地被0至3个独立地选自以下的基团取代:卤素、羟基基团、C1-C6烷基基团、-O-(C_1-C_6烷基)基团、-$NR^{15}R^{16}$、C_3-C_8环烷基基团、C_1-C_6烷基羟基基团、C_1-C_6烷基烷氧基基团、苄基基团和C_3-C_8杂环基基团,

[1201] 其中R^6和R^7中至少一个是氢。

[1202] 项715.如项688至708中任一项所述的方法,其中该剪接调节剂包含具有式(VI)的剪接调节剂:

[1203]  (VI),

或其药学上可接受的盐,其中:

[1204] R^1和R^9各自独立地选自氢、C_1-C_6烷基基团、C_1-C_6烷基烷氧基基团、C_1-C_6烷基氨基基

团、C_1-C_6烷基羧酸基团、C_1-C_6烷基羟基基团、C_3-C_8环烷基基团、苄基基团、C_3-C_8杂环基基团、-O-C(=O)-(C_1-C_6烷基)基团和-CD_3;

[1205] R^3选自氢、C_1-C_6烷基基团、C_1-C_6烷基烷氧基基团、C_1-C_6烷基氨基基团、C_1-C_6烷基羧酸基团、C_1-C_6烷基羟基基团、C_3-C_8环烷基基团、苄基基团、C_3-C_8杂环基基团和-O-C(=O)-(C_1-C_6烷基)基团;

[1206] R^4、R^5和R^8各自独立地选自氢、羟基基团、-O-(C_1-C_6烷基)基团、-O-C(=O)-(C_1-C_6烷基)基团和C_1-C_6烷基基团;

[1207] R^6和R^7各自独立地选自氢、-O-R^{17}、-O-C(=O)-R^{17}、-O-C(=O)-$NR^{15}R^{16}$、C_1-C_6烷基基团、-$NR^{15}R^{16}$和接头;

[1208] R^{10}选自氢、C_1-C_6烷基基团、-C(=O)-(C_1-C_6烷基)基团和-CD_3;

[1209] R^{15}和R^{16}各自独立地选自氢、R^{17}、-C(=O)-R^{17}和-C(=O)-O-R^{17};

[1210] R^{17}选自氢、C_1-C_6烷基基团、C_3-C_8环烷基基团、苄基基团和C_3-C_8杂环基基团;并且

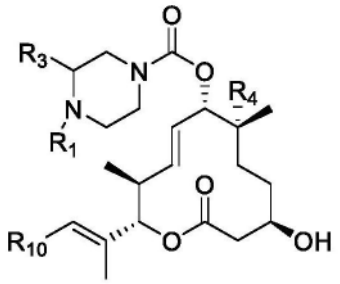
[1211] a是1、2、3、4、5、6、7、8、9或10;

[1212] 其中R^1、R^3、R^4、R^5、R^6、R^7、R^8、R^9、R^{10}、R^{15}、R^{16}和R^{17}各自独立地被0至3个独立地选自以下的基团取代:卤素、羟基基团、C_1-C_6烷基基团、-O-(C_1-C_6烷基)基团、-$NR^{15}R^{16}$、C_3-C_8环烷基基团、C_1-C_6烷基羟基基团、C_1-C_6烷基烷氧基基团、苄基基团和C_3-C_8杂环基基团;

[1213] 其中R^6和R^7中至少一个是氢;并且

[1214] 其中R^1和R^9不能同时不存在。

[1215] 项716.如项688至708中任一项所述的方法,其中该剪接调节剂包含具有式(VIII)的剪接调节剂:

[1216] 

(VIII),

或其药学上可接受的盐,其中:

[1217] R^1选自不存在、氢、C_1-C_6烷基基团、C_1-C_6烷基烷氧基基团、C_1-C_6烷基氨基基团、C_1-C_6烷基羧酸基团、C_1-C_6烷基羟基基团、C_3-C_8环烷基基团、苄基基团、C_3-C_8杂环基基团、-O-C(=O)-(C_1-C_6烷基)基团和-CD_3;

[1218] R^3选自氢、C_1-C_6烷基基团、C_1-C_6烷基烷氧基基团、C_1-C_6烷基氨基基团、C_1-C_6烷基羧酸基团、C_1-C_6烷基羟基基团、C_3-C_8环烷基基团、苄基基团、C_3-C_8杂环基基团和-O-C(=O)-(C_1-C_6烷基)基团;

[1219] R^4选自氢、羟基基团、-O-(C_1-C_6烷基)基团、-O-C(=O)-(C_1-C_6烷基)基团和C_1-C_6烷基基团;并且

[1220] R^{10}选自3至10元碳环和3至10元杂环,其各自被0至3个R^a取代,其中每个R^a独立地选自卤素、C_1-C_6烷基基团、-O-(C_1-C_6)烷基基团、C_1-C_6烷基烷氧基基团、C_1-C_6烷基羟基基团、-S(=O)$_w$-(4至7元杂环)、4至7元碳环和4至7元杂环;

[1221] R^{15}和R^{16}各自独立地选自氢、R^{17}、-C(=O)-R^{17}和-C(=O)-O-R^{17};并且

[1222] R^{17}选自氢、C_1-C_6烷基基团、C_3-C_8环烷基基团、苄基基团和C_3-C_8杂环基基团;

[1223] 其中R^1、R^3、R^4、R^{10}、R^{15}、R^{16}和R^{17}各自独立地被0至3个独立地选自以下的基团取代:卤素、羟基基团、C_1-C_6烷基基团、-O-(C_1-C_6烷基)基团、-$NR^{15}R^{16}$、C_3-C_8环烷基基团、C_1-C_6烷基羟基基团、C_1-C_6烷基烷氧基基团、苄基基团和C_3-C_8杂环基基团;并且

[1224] 其中每个R^a独立地被0至3个独立地选自以下的基团取代:卤素、羟基基团、-$NR^{15}R^{16}$、C_1-C_6烷基基团、-(C=O)-(C_1-C_6烷基)基团、-(C=O)-(C_1-C_6烷基)-(C_3-C_{10}杂环基)基团、-S(=O)$_w$-(C_3-C_8杂环基基团)和C_1-C_6烷基羧酸基团,其各自被0、1或2个独立地选自以下的基团取代:卤素、羟基基团、-$NR^{15}R^{16}$和C_1-C_3烷基基团;并且

[1225] w是0、1或2。

[1226] 项717.如项688至708中任一项所述的方法,其中该剪接调节剂包含SF3b复合体的调节剂。

[1227] 项718.如项717所述的方法,其中该剪接调节剂包含普拉二烯内酯或普拉二烯内酯衍生物。

[1228] 项719.如项717或项718所述的方法,其中该剪接调节剂包含普拉二烯内酯D或普拉二烯内酯D衍生物。

[1229] 项720.如项719所述的方法,其中该普拉二烯内酯D或衍生物包含D2、D1、D4、D8、D10、D11(E7107)、D20、D21、D22、D12或D25。

[1230] 项721.如项719或项720所述的方法,其中该普拉二烯内酯D或衍生物包含D2。

[1231] 项722.如项719或项720所述的方法,其中该普拉二烯内酯D或衍生物包含D1。

[1232] 项723.如项719或项720所述的方法,其中该普拉二烯内酯D或衍生物是两性离子型普拉二烯内酯D或衍生物。

[1233] 项724.如项723所述的方法,其中该两性离子型普拉二烯内酯D或衍生物包含D22或D25。

[1234] 项725.如项717或项718所述的方法,其中该剪接调节剂包含普拉二烯内酯B或普拉二烯内酯B衍生物。

[1235] 项726.如项725所述的方法,其中该普拉二烯内酯B或衍生物包含D9、D18、D19或D13。

[1236] 项727.如项717或项718所述的方法,其中该剪接调节剂包含芳基普拉二烯内酯。

[1237] 项728.如项727所述的方法,其中该芳基普拉二烯内酯包含D15、D14、D16、D17、D26或D33。

[1238] 项729.如项727或项728所述的方法,其中该芳基普拉二烯内酯是两性离子型芳基普拉二烯内酯。

[1239] 项730.如项729所述的方法,其中该两性离子型芳基普拉二烯内酯包含D33。

[1240] 项731.如项688至708中任一项所述的方法,其中该剪接调节剂包含D4、D12、D15、D8、D9、D10、D13、D18、D19、D20、D21、D22、D25或D33。

[1241] 项732.如项688至731中任一项所述的方法,其中p是2至8。

[1242] 项733.如项688至732中任一项所述的方法,其中p是4至8。

[1243] 项734.如项688至733中任一项所述的方法,其中p是4或8。

[1244] 项735.一种新抗原疫苗,该新抗原疫苗包含至少一种新抗原肽,其中该至少一种

新抗原肽包含通过使赘生性细胞与有效量的剪接调节剂、如项1至193中任一项所述的抗体-药物缀合物、或如项194至197中任一项所述的组合物接触而诱导的经修饰或新颖的新抗原序列。

[1245] 项736.如项735所述的新抗原疫苗,其中该至少一种新抗原肽的长度在约10个至约50个或约10个至约35个氨基酸范围内。

[1246] 项737.如项735或项736所述的新抗原疫苗,其中该至少一种新抗原肽的长度在约15个至约25个氨基酸范围内。

[1247] 项738.如项735至737中任一项所述的新抗原疫苗,其中该经修饰或新颖的新抗原序列包含SEQ ID NO:37-65中任一个的氨基酸序列。

[1248] 项739.如项738所述的新抗原疫苗,其中该经修饰或新颖的新抗原序列包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列。

[1249] 项740.如项738所述的新抗原疫苗,其中该经修饰或新颖的新抗原序列包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列。

[1250] 项741.如项738所述的新抗原疫苗,其中该经修饰或新颖的新抗原序列包含SEQ ID NO:46-49中任一个的氨基酸序列。

[1251] 项742.如项735至737中任一项所述的新抗原疫苗,其中该经修饰或新颖的新抗原序列包含SEQ ID NO:66-93中任一个的氨基酸序列、或SEQ ID NO:66-93中任一个的抗原部分。

[1252] 项743.如项742所述的新抗原疫苗,其中该经修饰或新颖的新抗原序列包含SEQ ID NO:66的氨基酸序列、或SEQ ID NO:66的抗原部分。

[1253] 项744.如项742所述的新抗原疫苗,其中该经修饰或新颖的新抗原序列包含SEQ ID NO:74-77中任一个的氨基酸序列、或SEQ IDNO:74-77中任一个的抗原部分。

[1254] 项745.如项735至744中任一项所述的新抗原疫苗,其中该经修饰或新颖的新抗原序列和/或抗原部分的长度在约10个至约50个、约10个至约35个、约15个至约25个、或约10个至约20个氨基酸范围内。

[1255] 项746.如项735至745中任一项所述的新抗原疫苗,该新抗原疫苗进一步包含药学上可接受的载体。

[1256] 项747.如项746所述的新抗原疫苗,其中该至少一种新抗原肽连接至该药学上可接受的载体。

[1257] 项748.如项746或项747所述的新抗原疫苗,其中该药学上可接受的载体选自肽、血清白蛋白、钥孔戚血蓝蛋白、免疫球蛋白、甲状腺球蛋白、卵白蛋白、类毒素或减毒的类毒素衍生物、细胞因子和趋化因子。

[1258] 项749.如项746至748中任一项所述的新抗原疫苗,其中该新抗原肽和该药学上可接受的载体经由接头共价连接。

[1259] 项750.如项746至748中任一项所述的新抗原疫苗,其中该新抗原肽和该药学上可接受的载体表达为融合蛋白。

[1260] 项751.如项735至745中任一项所述的新抗原疫苗,该新抗原疫苗进一步包含药学上可接受的稀释剂。

[1261] 项752.如项735至745中任一项所述的新抗原疫苗,该新抗原疫苗进一步包含药学

上可接受的佐剂。

[1262] 项753.如项735至752中任一项所述的新抗原疫苗,其中该赘生性细胞存在于体外细胞培养物中。

[1263] 项754.如项753所述的新抗原疫苗,其中该赘生性细胞获得自受试者。

[1264] 项755.如项735至752中任一项所述的新抗原疫苗,其中该赘生性细胞存在于受试者中。

[1265] 项756.一种新抗原疫苗,该新抗原疫苗包含至少一种新抗原mRNA,其中该至少一种新抗原mRNA编码通过使赘生性细胞与有效量的剪接调节剂、如项1至193中任一项所述的抗体-药物缀合物、或如项194至197中任一项所述的组合物接触而诱导的经修饰或新颖的新抗原序列。

[1266] 项757.如项756所述的新抗原疫苗,其中该经修饰或新颖的新抗原序列包含SEQ ID NO:37-65中任一个的氨基酸序列。

[1267] 项758.如项757所述的新抗原疫苗,其中该经修饰或新颖的新抗原序列包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列。

[1268] 项759.如项757所述的新抗原疫苗,其中该经修饰或新颖的新抗原序列包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列。

[1269] 项760.如项757所述的新抗原疫苗,其中该经修饰或新颖的新抗原序列包含SEQ ID NO:46-49中任一个的氨基酸序列。

[1270] 项761.如项756所述的新抗原疫苗,其中该经修饰或新颖的新抗原序列包含SEQ ID NO:66-93中任一个的氨基酸序列、或SEQ ID NO:66-93中任一个的抗原部分。

[1271] 项762.如项761所述的新抗原疫苗,其中该经修饰或新颖的新抗原序列包含SEQ ID NO:66的氨基酸序列、或SEQ ID NO:66的抗原部分。

[1272] 项763.如项761所述的新抗原疫苗,其中该经修饰或新颖的新抗原序列包含SEQ ID NO:74-77中任一个的氨基酸序列、或SEQ ID NO:74-77中任一个的抗原部分。

[1273] 项764.如项756至763中任一项所述的新抗原疫苗,其中该经修饰或新颖的新抗原序列和/或抗原部分的长度在约10个至约50个、约10个至约35个、约15个至约25个、或约10个至约20个氨基酸范围内。

[1274] 项765.如项756至764中任一项所述的新抗原疫苗,该新抗原疫苗进一步包含药学上可接受的载体。

[1275] 项766.如项765所述的新抗原疫苗,其中该至少一种新抗原mRNA连接至该药学上可接受的载体。

[1276] 项767.如项765或项766所述的新抗原疫苗,其中该药学上可接受的载体选自肽、血清白蛋白、钥孔戚血蓝蛋白、免疫球蛋白、甲状腺球蛋白、卵白蛋白、类毒素或减毒的类毒素衍生物、细胞因子和趋化因子。

[1277] 项768.如项756至764中任一项所述的新抗原疫苗,该新抗原疫苗进一步包含药学上可接受的稀释剂。

[1278] 项769.如项756至764中任一项所述的新抗原疫苗,该新抗原疫苗进一步包含药学上可接受的佐剂。

[1279] 项770.如项756至769中任一项所述的新抗原疫苗,其中该新抗原mRNA通过包封剂

包封。

[1280] 项771.如项770所述的新抗原疫苗,其中该包封剂是脂质体。

[1281] 项772.如项770所述的新抗原疫苗,其中该包封剂是纳米颗粒。

[1282] 项773.如项756至772中任一项所述的新抗原疫苗,其中该赘生性细胞存在于体外细胞培养物中。

[1283] 项774.如项773所述的新抗原疫苗,其中该赘生性细胞获得自受试者。

[1284] 项775.如项756至772中任一项所述的新抗原疫苗,其中该赘生性细胞存在于受试者中。

[1285] 项776.如项1至7中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段靶向表达MSLN的细胞。

[1286] 项777.如项776所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段是抗MSLN抗体或抗原结合片段。

[1287] 项778.如项1至7中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段靶向表达FOLH1的细胞。

[1288] 项779.如项778所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段是抗FOLH1抗体或抗原结合片段。

[1289] 项780.如项1至7中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段靶向表达CDH6的细胞。

[1290] 项781.如项780所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段是抗CDH6抗体或抗原结合片段。

[1291] 项782.如项1至7中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段靶向表达CEACAM5的细胞。

[1292] 项783.如项782所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段是抗CEACAM5抗体或抗原结合片段。

[1293] 项784.如项1至7中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段靶向表达CFC1B的细胞。

[1294] 项785.如项784所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段是抗CFC1B抗体或抗原结合片段。

[1295] 项786.如项1至7中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段靶向表达ENPP3的细胞。

[1296] 项787.如项786所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段是抗ENPP3抗体或抗原结合片段。

[1297] 项788.如项1至7中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段靶向表达FOLR1的细胞。

[1298] 项789.如项788所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段是抗FOLR1抗体或抗原结合片段。

[1299] 项790.如项1至7中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段靶向表达HAVCR1的细胞。

[1300] 项791.如项790所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段是抗HAVCR1

抗体或抗原结合片段。

[1301] 项792.如项1至7中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段靶向表达KIT的细胞。

[1302] 项793.如项792所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段是抗KIT抗体或抗原结合片段。

[1303] 项794.如项1至7中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段靶向表达MET的细胞。

[1304] 项795.如项794所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段是抗MET抗体或抗原结合片段。

[1305] 项796.如项1至7中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段靶向表达MUC16的细胞。

[1306] 项797.如项796所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段是抗MUC16抗体或抗原结合片段。

[1307] 项798.如项1至7中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段靶向表达SLC39A6的细胞。

[1308] 项799.如项798所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段是抗SLC39A6抗体或抗原结合片段。

[1309] 项800.如项1至7中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段靶向表达SLC44A4的细胞。

[1310] 项801.如项800所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段是抗SLC44A4抗体或抗原结合片段。

[1311] 项802.如项1至7中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段靶向表达STEAP1的细胞。

[1312] 项803.如项802所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段是抗STEAP1抗体或抗原结合片段。

[1313] 项804.如项29所述的抗体-药物缀合物,其中该氨基酸单元包含谷氨酰胺-缬氨酸-瓜氨酸(Glu-Val-Cit)。

[1314] 项805.如项29所述的抗体-药物缀合物,其中该氨基酸单元包含丙氨酸-丙氨酸-天冬酰胺(Ala-Ala-Asn)。

[1315] 项806.如项48或项49所述的抗体-药物缀合物,其中该可裂解肽部分或氨基酸单元包含Glu-Val-Cit。

[1316] 项807.如项48或项49所述的抗体-药物缀合物,其中该可裂解肽部分或氨基酸单元包含Ala-Ala-Asn。

[1317] 项808.如项55至58中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该接头包含MC-Glu-Val-Cit。

[1318] 项809.如项55至58中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该接头包含MC-Ala-Ala-Asn。

[1319] 项810.如项67至71中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该接头包含Glu-Val-Cit-pABC。

[1320] 项811.如项67至71中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该接头包含Ala-Ala-Asn-pABC。

[1321] 项812.如项74至78中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该接头包含Glu-Val-Cit-pAB。

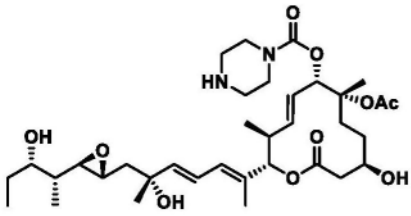
[1322] 项813.如项74至78中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该接头包含Ala-Ala-Asn-pAB。

[1323] 项814.如项117或项118所述的抗体-药物缀合物,其中该普拉二烯内酯D或衍生物包含D4。

[1324] 项815.如项117或项118所述的抗体-药物缀合物,其中该普拉二烯内酯D或衍生物包含D12。

[1325] 项816.如项125或项126所述的抗体-药物缀合物,其中该芳基普拉二烯内酯包含D15。

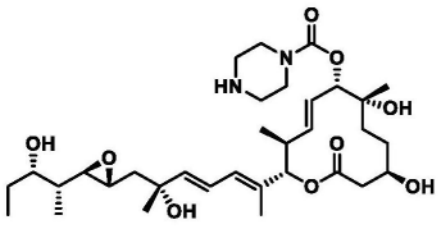
[1326] 项817.如项1至106中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该剪接调节剂包含D4:

[1327]  (D4)。

[1328] 项818.如项817所述的抗体-药物缀合物,其中该剪接调节剂包含D4且该接头包含MC-Val-Cit-pABC。

[1329] 项819.如项817所述的抗体-药物缀合物,其中该剪接调节剂包含D4且该接头包含MC-β-葡萄糖醛酸苷。

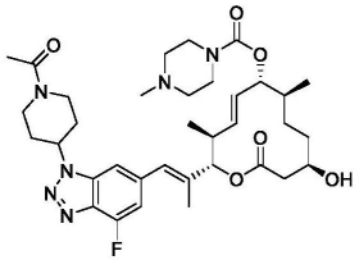
[1330] 项820.如项1至106中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该剪接调节剂包含D12:

[1331]  (D12)。

[1332] 项821.如820所述的抗体-药物缀合物,其中该剪接调节剂包含D12且该接头包含MC-Val-Cit-pABC。

[1333] 项822.如项820所述的抗体-药物缀合物,其中该剪接调节剂包含D12且该接头包含MC-β-葡萄糖醛酸苷。

[1334] 项823.如项1至106中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该剪接调节剂包含D15:

[1335] 

(D15)。

[1336] 项824.如823所述的抗体-药物缀合物,其中该剪接调节剂包含D15且该接头包含MC-Val-Ala-pAB。

[1337] 项825.如项137所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段靶向表达HER2、CD138、EPHA2、MSLN、FOLH1、CDH6、CEACAM5、CFC1B、ENPP3、FOLR1、HAVCR1、KIT、MET、MUC16、SLC39A6、SLC44A4和/或STEAP1的细胞。

[1338] 项826.如项156所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段靶向表达HER2、CD138、EPHA2、MSLN、FOLH1、CDH6、CEACAM5、CFC1B、ENPP3、FOLR1、HAVCR1、KIT、MET、MUC16、SLC39A6、SLC44A4和/或STEAP1的细胞。

[1339] 项827.一种具有式(I)的抗体-药物缀合物,

[1340] $Ab-(L-D)_p$ (I)

[1341] 其中

[1342] Ab是靶向赘生性细胞的抗体或抗原结合片段;

[1343] D是D4;

[1344] L是将Ab共价连接至D的接头;并且

[1345] p是1至15的整数。

[1346] 项828.如项827所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段靶向表达HER2的细胞。

[1347] 项829.如项828所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段是抗HER2抗体或抗原结合片段。

[1348] 项830.如项828或项829所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:1(HCDR1)、SEQ ID NO:2(HCDR2)和SEQ ID NO:3(HCDR3)的氨基酸序列的三个重链互补决定区(HCDR1、HCDR2和HCDR3);以及含有SEQ ID NO:4(LCDR1)、SEQ ID NO:5(LCDR2)和SEQ ID NO:6(LCDR3)的氨基酸序列的三个轻链互补决定区(LCDR1、LCDR2和LCDR3)。

[1349] 项831.如项828至830中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:19的氨基酸序列的重链可变区和含有SEQ ID NO:20的氨基酸序列的轻链可变区。

[1350] 项832.如项828至831中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段包含人IgG1重链恒定区。

[1351] 项833.如项828至832中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段包含人Igκ轻链恒定区。

[1352] 项834.如项827所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段靶向表达HER2、CD138、EPHA2、MSLN、FOLH1、CDH6、CEACAM5、CFC1B、ENPP3、FOLR1、HAVCR1、KIT、MET、

MUC16、SLC39A6、SLC44A4和/或STEAP1的细胞。

[1353] 项835.一种具有式(I)的抗体-药物缀合物,

[1354] $Ab-(L-D)_p$ (I)

[1355] 其中

[1356] Ab是靶向赘生性细胞的抗体或抗原结合片段;

[1357] D是D12;

[1358] L是将Ab共价连接至D的接头;并且

[1359] p是1至15的整数。

[1360] 项836.如项835所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段靶向表达HER2的细胞。

[1361] 项837.如项836所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段是抗HER2抗体或抗原结合片段。

[1362] 项838.如项836或项837所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:1(HCDR1)、SEQ ID NO:2(HCDR2)和SEQ ID NO:3(HCDR3)的氨基酸序列的三个重链互补决定区(HCDR1、HCDR2和HCDR3);以及含有SEQ ID NO:4(LCDR1)、SEQ ID NO:5(LCDR2)和SEQ ID NO:6(LCDR3)的氨基酸序列的三个轻链互补决定区(LCDR1、LCDR2和LCDR3)。

[1363] 项839.如项836至838中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:19的氨基酸序列的重链可变区和含有SEQ ID NO:20的氨基酸序列的轻链可变区。

[1364] 项840.如项836至839中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段包含人IgG1重链恒定区。

[1365] 项841.如项836至840中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段包含人Igκ轻链恒定区。

[1366] 项842.如项835所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段靶向表达HER2、CD138、EPHA2、MSLN、FOLH1、CDH6、CEACAM5、CFC1B、ENPP3、FOLR1、HAVCR1、KIT、MET、MUC16、SLC39A6、SLC44A4和/或STEAP1的细胞。

[1367] 项843.一种具有式(I)的抗体-药物缀合物,

[1368] $Ab-(L-D)_p$ (I)

[1369] 其中

[1370] Ab是靶向赘生性细胞的抗体或抗原结合片段;

[1371] D是D15;

[1372] L是将Ab共价连接至D的接头;并且

[1373] p是1至15的整数。

[1374] 项844.如项843所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段靶向表达HER2的细胞。

[1375] 项845.如项844所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段是抗HER2抗体或抗原结合片段。

[1376] 项846.如项844或项845所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段包

含含有SEQ ID NO:1(HCDR1)、SEQ ID NO:2(HCDR2)和SEQ ID NO:3(HCDR3)的氨基酸序列的三个重链互补决定区(HCDR1、HCDR2和HCDR3);以及含有SEQ ID NO:4(LCDR1)、SEQ ID NO:5(LCDR2)和SEQ ID NO:6(LCDR3)的氨基酸序列的三个轻链互补决定区(LCDR1、LCDR2和LCDR3)。

[1377] 项847.如项844至846中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:19的氨基酸序列的重链可变区和含有SEQ ID NO:20的氨基酸序列的轻链可变区。

[1378] 项848.如项844至847中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段包含人IgG1重链恒定区。

[1379] 项849.如项844至848中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段包含人Igκ轻链恒定区。

[1380] 项850.如项843所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段靶向表达HER2、CD138、EPHA2、MSLN、FOLH1、CDH6、CEACAM5、CFC1B、ENPP3、FOLR1、HAVCR1、KIT、MET、MUC16、SLC39A6、SLC44A4和/或STEAP1的细胞。

[1381] 项851.如项827至850中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该接头是可裂解接头。

[1382] 项852.如项851所述的抗体-药物缀合物,其中该可裂解接头包含MC-Val-Cit-pABC。

[1383] 项853.如项851所述的抗体-药物缀合物,其中该可裂解接头包含MC-Val-Ala-pABC。

[1384] 项854.如项851所述的抗体-药物缀合物,其中该可裂解接头包含MC-Val-Ala-pAB。

[1385] 项855.如项851所述的抗体-药物缀合物,其中该可裂解接头包含MC-Glu-Val-Cit-pABC。

[1386] 项856.如项851所述的抗体-药物缀合物,其中该可裂解接头包含MC-Ala-Ala-Asn-pABC。

[1387] 项857.如项851所述的抗体-药物缀合物,其中该可裂解接头包含MC-β-葡萄糖醛酸苷。

[1388] 项858.如项827至850中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该接头是不可裂解接头。

[1389] 项859.如项858所述的抗体-药物缀合物,其中该不可裂解接头包含Mal-Hex。

[1390] 项860.如项858所述的抗体-药物缀合物,其中该不可裂解接头包含Mal-Et。

[1391] 项861.如项858所述的抗体-药物缀合物,其中该不可裂解接头包含Mal-Et-O-Et。

[1392] 项862.如项827至861中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中p是1至10。

[1393] 项863.如项827至862中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中p是2至8。

[1394] 项864.如项827至863中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中p是4至8。

[1395] 项865.如项827至864中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中p是4。

[1396] 项866.如项827至864中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中p是8。

[1397] 项867.如项181所述的抗体-药物缀合物,其中该可裂解接头包含MC-Glu-Val-

Cit-pABC。

[1398] 项868.如项181所述的抗体-药物缀合物,其中该可裂解接头包含MC-Ala-Ala-Asn-pABC。

[1399] 项869.一种组合物,该组合物包含如项776至868中任一项所述的抗体-药物缀合物的多个拷贝,其中该组合物中抗体-药物缀合物的平均p是约3.5至约5.5。

[1400] 项870.一种组合物,该组合物包含如项776至868中任一项所述的抗体-药物缀合物的多个拷贝,其中该组合物中抗体-药物缀合物的平均p是约7至约9。

[1401] 项871.一种治疗患有或疑似患有赘生性病症的受试者的方法,该方法包括向该受试者施用治疗有效量的如项776至868中任一项所述的抗体-药物缀合物或如项869或项870所述的组合物。

[1402] 项872.一种减少或抑制患有或疑似患有赘生性病症的受试者中的肿瘤生长的方法,该方法包括向该受试者施用治疗有效量的如项776至868中任一项所述的抗体-药物缀合物或如项869或项870所述的组合物。

[1403] 项873.一种确定患有或疑似患有赘生性病症的受试者是否会对用如项776至868中任一项所述的抗体-药物缀合物或如项869或项870所述的组合物进行的治疗有响应的方法,该方法包括提供来自该受试者的生物样品以及使该生物样品与如项776至868中任一项所述的抗体-药物缀合物或如项869或项870所述的组合物接触。

[1404] 项874.如项776至868中任一项所述的抗体-药物缀合物或如项869或项870所述的组合物,其用于治疗赘生性病症。

[1405] 项875.如项776至868中任一项所述的抗体-药物缀合物或如项869或项870所述的组合物在治疗赘生性病症中的用途。

[1406] 项876.如项776至868中任一项所述的抗体-药物缀合物或如项869或项870所述的组合物在制造用于治疗赘生性病症的药剂的方法中的用途。

[1407] 项877.一种药物组合物,该药物组合物包含如项776至868中任一项所述的抗体-药物缀合物或如项869或项870所述的组合物、以及药学上可接受的载体。

[1408] 项878.一种生产如项776至868中任一项所述的抗体-药物缀合物的方法,该方法包括使抗体或抗原结合片段与接合至剪接调节剂的接头在允许缀合的条件下反应。

[1409] 项879.如项303至687中任一项所述的方法,其中该抗体-药物缀合物包含如项776至868中任一项所述的抗体-药物缀合物。

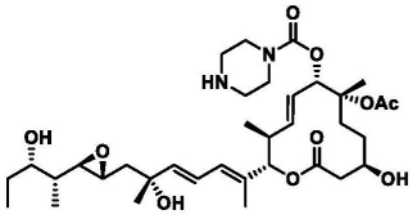
[1410] 项880.如项688所述的方法,其中该抗体或抗原结合片段靶向表达HER2、CD138、EPHA2、MSLN、FOLH1、CDH6、CEACAM5、CFC1B、ENPP3、FOLR1、HAVCR1、KIT、MET、MUC16、SLC39A6、SLC44A4和/或STEAP1的细胞。

[1411] 项881.如项701所述的方法,其中该可裂解接头包含MC-Glu-Val-Cit-pABC。

[1412] 项882.如项701所述的方法,其中该可裂解接头包含MC-Ala-Ala-Asn-pABC。

[1413] 项883.如项701所述的方法,其中该可裂解接头包含MC-β-葡萄糖醛酸苷。

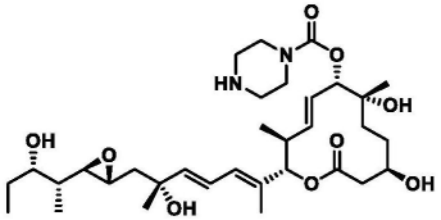
[1414] 项884.如项688至708中任一项所述的方法,其中该剪接调节剂包含D4:

[1415]  (D4)。

[1416] 项885.如项884所述的方法,其中该剪接调节剂包含D4且该接头包含MC-Val-Cit-pABC。

[1417] 项886.如项884所述的方法,其中该剪接调节剂包含D4且该接头包含MC-β-葡萄糖醛酸苷。

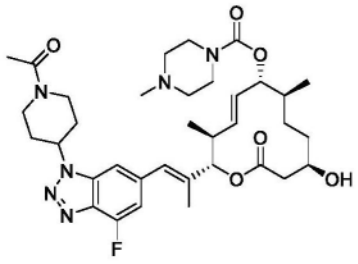
[1418] 项887.如项688至708中任一项所述的方法,其中该剪接调节剂包含D12:

[1419]  (D12)。

[1420] 项888.如项887所述的方法,其中该剪接调节剂包含D12且该接头包含MC-Val-Cit-pABC。

[1421] 项889.如项887所述的方法,其中该剪接调节剂包含D12且该接头包含MC-β-葡萄糖醛酸苷。

[1422] 项890.如项688至708中任一项所述的方法,其中该剪接调节剂包含D15:

[1423]  (D15)。

[1424] 项891.如项890所述的方法,其中该剪接调节剂包含D15且该接头包含MC-Val-Ala-pAB。

[1425] 项892.如项719或项720所述的方法,其中该普拉二烯内酯D或衍生物包含D4。

[1426] 项893.如项719或项720所述的方法,其中该普拉二烯内酯D或衍生物包含D12。

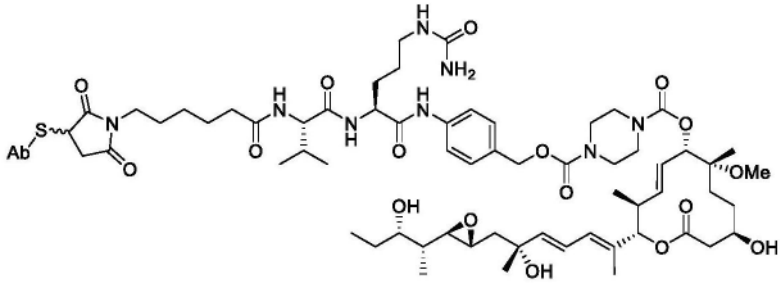
[1427] 项894.如项727或项728所述的方法,其中该芳基普拉二烯内酯包含D15。

[1428] 项895.一种新抗原疫苗,该新抗原疫苗包含至少一种新抗原肽,其中该至少一种新抗原肽包含通过使赘生性细胞与有效量的剪接调节剂、如项776至868中任一项所述的抗体-药物缀合物、或如项869或项870所述的组合物接触而诱导的经修饰或新颖的新抗原序列。

[1429] 项896.一种新抗原疫苗,该新抗原疫苗包含至少一种新抗原mRNA,其中该至少一种新抗原mRNA编码通过使赘生性细胞与有效量的剪接调节剂、如项776至868中任一项所述的抗体-药物缀合物、或如项869或项870所述的组合物接触而诱导的经修饰或新颖的新抗

原序列。

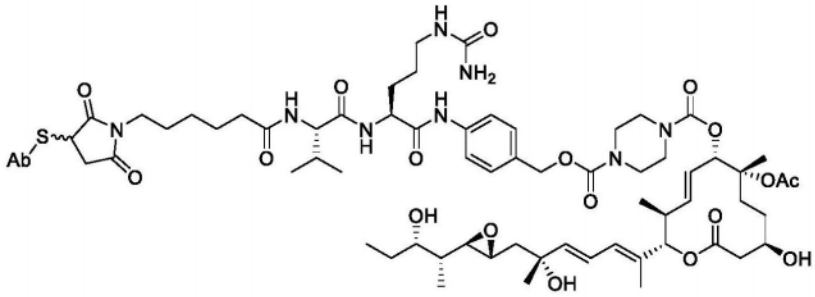
[1430] 项897.一种抗体-药物缀合物,该抗体-药物缀合物具有结构

[1431] 

(Ab-ADL1-D1),

[1432] 其中Ab是抗体或抗原结合片段,该抗体或抗原结合片段通过该抗体或抗原结合片段上的硫醇基团的硫原子共价结合至ADL1-D1的马来酰亚胺基团。

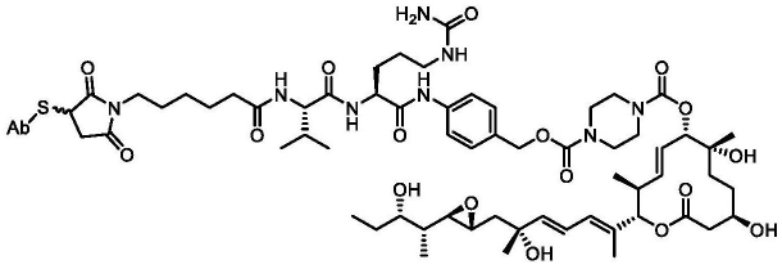
[1433] 项898.一种抗体-药物缀合物,该抗体-药物缀合物具有结构

[1434] 

(Ab-ADL1-D4),

[1435] 其中Ab是抗体或抗原结合片段,该抗体或抗原结合片段通过该抗体或抗原结合片段上的硫醇基团的硫原子共价结合至ADL1-D4的马来酰亚胺基团。

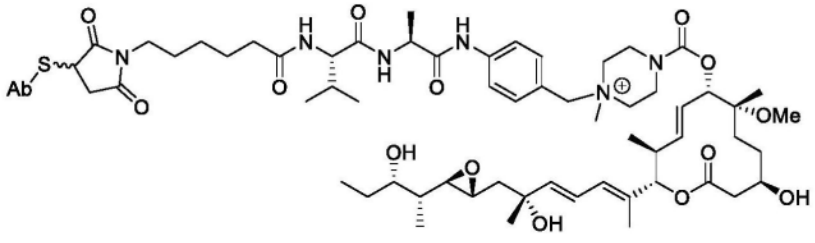
[1436] 项899.一种抗体-药物缀合物,该抗体-药物缀合物具有结构

[1437] 

(Ab-ADL1-D12),

[1438] 其中Ab是抗体或抗原结合片段,该抗体或抗原结合片段通过该抗体或抗原结合片段上的硫醇基团的硫原子共价结合至ADL1-D12的马来酰亚胺基团。

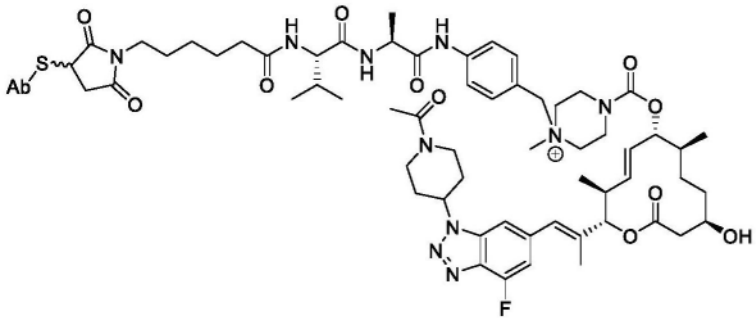
[1439] 项900.一种抗体-药物缀合物,该抗体-药物缀合物具有结构

[1440] 

(Ab-ADL5-D2),

[1441] 其中Ab是抗体或抗原结合片段,该抗体或抗原结合片段通过该抗体或抗原结合片段上的硫醇基团的硫原子共价结合至ADL5-D2的马来酰亚胺基团。

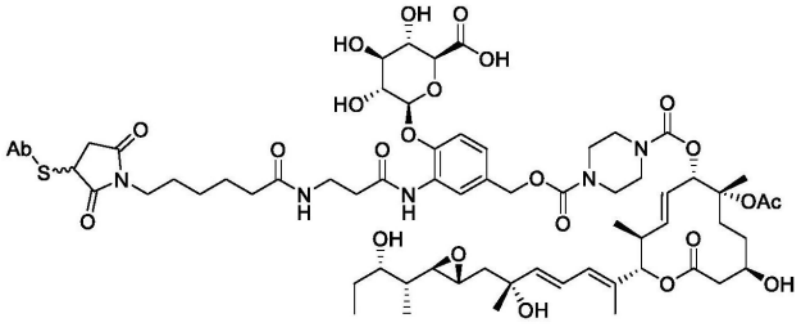
[1442] 项901.一种抗体-药物缀合物,该抗体-药物缀合物具有结构

[1443] 

(Ab-ADL5-D15),

[1444] 其中Ab是抗体或抗原结合片段,该抗体或抗原结合片段通过该抗体或抗原结合片段上的硫醇基团的硫原子共价结合至ADL5-D15的马来酰亚胺基团。

[1445] 项902.一种抗体-药物缀合物,该抗体-药物缀合物具有结构

[1446] 

(Ab-ADL13-D4),

[1447] 其中Ab是抗体或抗原结合片段,该抗体或抗原结合片段通过该抗体或抗原结合片段上的硫醇基团的硫原子共价结合至ADL13-D4的马来酰亚胺基团。

[1448] 项903.如项897至902中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段靶向表达HER2的细胞。

[1449] 项904.如项903所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段是抗HER2抗体或抗原结合片段。

[1450] 项905.如项903或项904所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:1(HCDR1)、SEQ ID NO:2(HCDR2)和SEQ ID NO:3(HCDR3)的氨基酸序列的三个重链互补决定区(HCDR1、HCDR2和HCDR3);以及含有SEQ ID NO:4(LCDR1)、SEQ ID NO:5(LCDR2)和SEQ ID NO:6(LCDR3)的氨基酸序列的三个轻链互补决定区(LCDR1、LCDR2和LCDR3)。

[1451] 项906.如项903至905中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:19的氨基酸序列的重链可变区和含有SEQ ID NO:20的氨基酸序列的轻链可变区。

[1452] 项907.如项903至906中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段包含人IgG1重链恒定区。

[1453] 项908.如项903至907中任一项所述的抗体-药物缀合物,其中该抗体或抗原结合片段包含人Igκ轻链恒定区。

附图说明

[1454] 图1显示在竞争性结合测定中示例性有效负载化合物的剂量响应。用抗SF3B1抗体

和闪烁近接分析(SPA)珠粒混合物对来自过度表达flag标记的野生型SF3B1的293F细胞的核提取物进行免疫沉淀。结合反应含有抗体-珠粒混合物和浓度增加的化合物,随后包含与^{3}H标记的普拉二烯内酯B(PB)探针的竞争。y轴表示相对于DMSO对照(0%)的特异性结合的变化百分比(响应%)。数据表示为平均值±标准偏差(SD)。

[1455] 图2显示在体外剪接测定中由示例性有效负载化合物进行的剪接调节。将来自HeLa S3细胞的核提取物与Ad2.2 pre-mRNA和浓度增加的化合物一起孵育,随后经由RT-PCR对剪接调节进行定量。Ad2.2序列源自在分支点序列周围具有修饰的腺病毒Ad2 pre-mRNA底物。y轴表示相对于DMSO对照(0%)的剪接的变化百分比(响应%)。数据表示为平均值±SD。

[1456] 图3显示在HER2扩增的乳腺癌细胞(HCC1954)中示例性有效负载化合物的活力剂量响应。将细胞与化合物一起孵育144小时(6天)并在CellTiter-Glo®试剂中读取活力。数据表示为平均值±SD。

[1457] 图4显示细胞结合测定的结果。通过流式细胞术评估示例性HER2-ADC与JIMT1细胞的结合。测量平均荧光强度值以确定缀合物的结合,随后确定PE标记的二级抗体的结合。数据表示为平均值±SD。

[1458] 图5A显示在HER2扩增的乳腺癌细胞(HCC1954)中示例性HER2-ADC的活力剂量响应。图5B显示在HER2扩增的胃癌细胞(N87)中示例性HER2-ADC的活力剂量响应。图5C显示在HER2扩增的乳腺癌细胞(SKBR3)中示例性HER2-ADC的活力剂量响应。将细胞与缀合物一起孵育144小时(6天)并在CellTiter-Glo®试剂中读取活力。数据表示为平均值±SD。

[1459] 图6显示在不表达HER2的乳腺癌细胞(MCF7)中示例性HER2-ADC的活力剂量响应。将细胞与缀合物一起孵育144小时(6天)并在CellTiter-Glo®试剂中读取活力。数据表示为平均值±SD。

[1460] 图7显示在HER2扩增的乳腺癌细胞(HCC1954)中SLC25A19剪接测定的结果。将细胞与缀合物一起孵育24小时,并在实时qPCR反应中,用特异性Taqman引物-探针集测量SLC25A19转录物的剪接。y轴表示相对于DMSO对照(0%)的响应百分比(%)。数据表示为平均值±SD。

[1461] 图8显示旁观者杀伤测定的结果。用示例性HER2-ADC处理过度表达HER2的H1568细胞(靶标阳性)或荧光素酶标记的H1568细胞(靶标阴性),这些细胞单独铺板或在共培养物中一起孵育144小时(6天)。用OneGlo®试剂读取板。y轴表示相对于PBS对照(100%)的响应百分比(%)。数据表示为平均值±SD。

[1462] 图9显示用单次静脉内剂量的示例性HER2-ADC或相应剂量匹配的有效负载治疗的每组植入HCC1954的CB17-SCID小鼠(6-10只动物/组)的肿瘤生长动力学。在治疗后,每周两次测量肿瘤体积。数据表现为平均值±平均值的标准误差(SEM)。

[1463] 图10显示在表达CD138的多发性骨髓瘤细胞系中示例性CD138-ADC的活力剂量响应。将MOLP8细胞与缀合物一起孵育144小时(6天)并在CellTiter-Glo®试剂中读取活力。数据表示为平均值±SD。

[1464] 图11显示在表达EPHA2的前列腺癌细胞系中示例性EPH2A-ADC的活力剂量响应。将PC3细胞与缀合物一起孵育144小时(6天)并在CellTiter-Glo®试剂中读取活力。数据表

示为平均值±SD。

[1465] 图12A和图12B显示示例性抗HER2 ADC,即AB185-ADL1-D1的体外稳定性测定的结果。y轴表示总抗体(图12A)和经缀合的(完整)有效负载(图12B)的浓度;x轴表示在37℃下以小时测量的时间。

[1466] 图13显示在CD17-SCID N87荷瘤小鼠中在单次静脉内剂量之后示例性抗HER2 ADC,即AB185-ADL1-D1的血浆浓度。

[1467] 图14显示示例性RNA测序和蛋白质配体组(ligandome)实验的示意图。

[1468] 图15显示示例性T细胞致敏(T-cell priming)实验的示意图。

[1469] 图16显示FACS分析的结果。从外周血单核细胞(PBMC)分离单核细胞并通过在细胞因子混合物中培养,诱导其分化成树突状细胞(DC)。进行FACS以验证来自单核细胞的DC的成熟情况。

[1470] 图17A-17D显示ELISpot测定的结果。图17A显示ELISpot板,其指示新抗原1引发CD8+T细胞活化。通过IFNγ的分泌来监测对CD8+T细胞的刺激。图17B显示新抗原1ELISpot板(图17A)中IFNγ斑点的定量(斑点数)。图17C显示ELISpot板,其指示新抗原3引发CD8+T细胞活化。通过IFNγ的分泌来监测对CD8+T细胞的刺激。图17D显示新抗原3ELISpot板(图17C)中IFNγ斑点的定量(倍数变化)。

[1471] 图18显示将HCC1954乳腺癌细胞中示例性抗HER2 ADC的剪接效力(IC50 qPCR)与细胞效力(GI50 CTG)进行比较的图。所示值根据细胞致死率确定大小且根据可变剪接响应的深度设定阴影。

[1472] 图19显示将N87胃癌细胞中示例性抗HER2 ADC的剪接效力(IC50 qPCR)与细胞效力(GI50 CTG)进行比较的图。所示值根据细胞致死率确定大小且根据可变剪接响应的深度设定阴影。

[1473] 图20显示将示例性抗HER2 ADC(在HCC1954乳腺癌细胞中)的效力和致死率与相应有效负载的稳定性和渗透性进行比较的图。所示值根据有效负载稳定性确定大小且根据有效负载渗透性设定阴影。

[1474] 图21显示用媒介物或10mg/kg曲妥珠单抗、TDM1或示例性HER2-ADC Q7D静脉内治疗2个周期的每组植入N87的CB17-SCID小鼠(N=8只/组)的肿瘤生长动力学。数据表现为平均值±平均值的标准误差(SEM)(mm^3)。

[1475] 图22显示用媒介物或10mg/kg曲妥珠单抗、TDM1或示例性HER2-ADC Q7D静脉内治疗2个周期的每组植入N87的CB17-SCID小鼠(N=8只/组)的体重变化。数据表现为平均值±平均值的标准误差(SEM)(%)。

[1476] 图23显示用媒介物或10mg/kg曲妥珠单抗、TDM1或示例性HER2-ADC Q7D静脉内治疗2个周期的每组植入N87的CB17-SCID小鼠(N=8只/组)的肿瘤生长动力学(左图)和体重变化(右图)。数据表示为平均值±SEM(肿瘤体积,mm^3)或平均值±SEM(体重,%)。

[1477] 图24A-24D显示用媒介物或10mg/kg曲妥珠单抗、TDM1或示例性HER2-ADC Q7D静脉内治疗2个周期的植入N87的CB17-SCID小鼠中mRNA接合的药效学(PD)调节。监测FBXW5(成熟mRNA转录物)的RT-qPCR并显示于图24A和图24C中。监测TAOK1(新接合转录物)的RT-qPCR并显示于图24B和图24D中。在48小时(图24A和图24B)或在指定时间(图24C和图24D)时收集动物(N=4只/组)。分离肿瘤用于RNA提取和RT-qPCR。

[1478] 图25显示示例性靶标适应症分析的示意图。

[1479] 图26示出了使用剪接调节剂制备ADC的示例性生物缀合方案。

具体实施方式

[1480] 结合附图,通过参考以下详细描述可更容易地理解所披露的组合物和方法,这些附图形成本披露的一部分。

[1481] 在全文中,这些描述是指组合物和使用这些组合物的方法。当本披露描述或要求保护与组合物相关联的特征或实施例时,此类特征或实施例同样适用于使用该组合物的方法。同样,当本披露描述或要求保护与使用组合物的方法相关联的特征或实施例时,此类特征或实施例同样适用于该组合物。

[1482] 当表示值的范围时,其包括使用该范围内的任何特定值的实施例。此外,提及以范围内陈述的值包括在该范围内的每一个值。所有范围均包括其端点且可组合。当通过使用先行词“约”将值表示为近似值时,将理解该特定值形成另一个实施例。除非上下文另外明确指示,否则提及特定数值至少包括该特定值。除非另外指示其使用的具体环境,否则使用“或”将意指“和/或”。本文中引用的所有参考文献均通过引用并入而用于任何目的。在参考文献与本说明书矛盾的情况下,将以本说明书为准。

[1483] 应理解,本文中为清楚起见而在单独实施例的上下文中描述的所披露的组合物和方法的某些特征还可以单个实施例的组合形式提供。相反,为简洁起见而在单个实施例的上下文中描述的所披露的组合物和方法的各种特征还可单独或以任何子组合形式提供。

[1484] 定义

[1485] 在整个说明书和权利要求书使用与描述方面相关的各种术语。除非另外指明,否则此类术语将具有其在本领域中的普通含义。其他具体定义的术语应以符合本文所提供的定义的方式解释。

[1486] 如本文所使用,单数形式“一种/一个(a/an)”和“该(the)”包括复数形式,除非上下文中另外明确指明。

[1487] 如技术人员从本文中所包含的教导而看出的,在数值和范围的上下文中,术语“约(about/approximately)”是指近似或接近所述值或范围的值或范围,使得实施例可根据预期执行,如在反应混合物中具有所需量的核酸或多肽。在一些实施例中,约意指数字量±10%。

[1488] 术语“抗体-药物缀合物”、“抗体缀合物”、“缀合物”、“免疫缀合物”和“ADC”可互换使用,且是指连接至一种或多种抗体或抗原结合片段的一种或多种治疗性化合物(例如剪接调节剂)且其由以下通式定义:$Ab-(L-D)_p$(式I),其中Ab=抗体或抗原结合片段,L=接头部分,D=药物部分(例如剪接调节剂药物部分),且p=药物部分的数量/抗体或抗原结合片段。包含剪接调节剂药物部分的ADC在本文中还可更具体地称为“装载剪接调节剂的抗体”或“SMLA”。在包含剪接调节剂药物部分的ADC中,“p”是指连接至该抗体或抗原结合片段的剪接调节剂化合物的数量。在一些实施例中,接头L可以包括在该抗体或抗原结合片段与该治疗性化合物之间的可裂解部分。在一些实施例中,接头L可以包括可通过一个或多个间隔子单元连接至该抗体或抗原结合片段和治疗性化合物之一或这两者的可裂解部分。在一些实施例中,当间隔子单元将可裂解部分连接至治疗性化合物时,其是自消融型间隔子单元。

在其他实施例中,接头L不包括可裂解部分,且为不可裂解接头。在一些实施例中,接头L可以包括至少一个间隔子单元,该间隔子单元可以直接地连接至该抗体或抗原结合片段以及该治疗性化合物。在本文中描述并举例说明了示例性可裂解和不可裂解接头。

[1489] 术语“抗体”以最广泛的含义用来是指通过免疫球蛋白分子的可变区内的至少一个抗原识别位点识别且特异性结合靶标(如蛋白质、多肽、碳水化合物、多核苷酸、脂质或前述的组合)的免疫球蛋白分子。抗体的重链由重链可变结构域(V_H)和重链恒定区(C_H)构成。轻链由轻链可变结构域(V_L)和轻链恒定结构域(C_L)构成。出于本申请的目的,成熟的重链和轻链可变结构域各自包含从N-末端至C-末端排列的四个框架区(FR1、FR2、FR3和FR4)内的三个互补决定区(CDR1、CDR2和CDR3):FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3和FR4。“抗体”可以是天然存在的或人造的,如通过常规杂交瘤技术产生的单克隆抗体。术语“抗体”包括全长单克隆抗体和全长多克隆抗体,以及抗体片段,如Fab、Fab'、$F(ab')_2$、Fv,以及单链抗体。抗体可以是免疫球蛋白的五种主要类别中的任一种:IgA、IgD、IgE、IgG、以及IgM,或其亚类(例如,同种型IgG1、IgG2、IgG3、IgG4)。该术语进一步涵盖人抗体、嵌合抗体、人源化抗体和含有抗原识别位点的任何经修饰的免疫球蛋白分子,只要它展示出所希望的生物学活性(例如,结合靶抗原、在表达靶抗原的细胞内内化)。

[1490] 如本文所使用,术语“单克隆抗体”是指从基本上均质抗体群体中获得的抗体,即,除可能少量存在的可能天然存在的突变以外,构成该群体的各个抗体是相同的。单克隆抗体针对单一抗原性表位具有高度特异性。相反,常规的(多克隆)抗体制剂通常包括针对(或特异于)不同表位的多种抗体。修饰语“单克隆”指示当获得自基本上均一的抗体群体的抗体的特征,并且不应理解为要求通过任何具体方法产生抗体。例如,根据本披露使用的单克隆抗体可通过Kohler等人(1975)Nature[自然]256:495最先描述的杂交瘤方法制得,或可通过重组DNA方法(参见例如美国专利号4,816,567)制得。单克隆抗体还可使用例如Clackson等人(1991)Nature[自然]352:624-8和Marks等人(1991)J.Mol.Biol.[分子生物学杂志]222:581-97中描述的技术从噬菌体抗体文库分离。

[1491] 本文所描述的单克隆抗体特定地包括“嵌合”抗体,其中重链和/或轻链的一部分与衍生自一个特定种类或属于一个特定抗体种类或亚类的抗体的对应序列相同或同源,而该一个或多个链的其余部分是与衍生自另一个种类或属于另一个抗体种类或亚类的抗体连同此种抗体的片段中的对应序列相同或同源,只要它们特异性结合靶抗原和/或表现出所需的生物活性即可。

[1492] 如本文所使用,术语“人抗体”是指由人产生的抗体或具有由人产生的抗体的氨基酸序列的抗体。

[1493] 如本文所使用,术语“嵌合抗体”是指其中免疫球蛋白分子的氨基酸序列源自两种或更多种物种的抗体。在一些情况下,重链和轻链的可变区对应于源自具有所需特异性、亲和力和活性的一个物种的抗体的可变区,而恒定区与源自另一物种(例如人)的抗体同源,以使后一物种中的免疫应答最少化。

[1494] 如本文所使用,术语“人源化抗体”是指含有来自非人(例如鼠)抗体以及人抗体的序列的抗体形式。此类抗体是含有源自非人免疫球蛋白的最小序列的嵌合抗体。通常,人源化抗体将包含基本上所有的至少一个、并且典型地两个可变结构域,其中所有或基本上所有的高变环与非人免疫球蛋白的那些高变环对应,并且所有或基本上所有的框架(FR)区是

人免疫球蛋白序列的这些区域。人源化抗体任选地还将包含免疫球蛋白恒定区(Fc)(典型地是人免疫球蛋白恒定区)的至少一部分。人源化抗体可通过Fv框架区中和/或所替代的非人残基内残基的取代而进一步修饰,以改进和优化抗体特异性、亲和力和/或活性。

[1495] 如本文所使用,术语抗体的“抗原结合片段”或“抗原结合部分”是指抗体或蛋白质中保持与抗原(例如HER2、CD138、EPHA2、MSLN、FOLH1、CDH6、CEACAM5、CFC1B、ENPP3、FOLR1、HAVCR1、KIT、MET、MUC16、SLC39A6、SLC44A4、STEAP1)特异性结合的能力的一个或多个片段。抗原结合片段还可保持内化至表达抗原的细胞中的能力。在一些实施例中,抗原结合片段还保持免疫效应子活性。已显示,全长抗体的片段可以执行全长抗体的抗原结合功能。术语抗体的“抗原结合片段”或“抗原结合部分”内所涵盖的结合片段的实例包括(i)Fab片段,一种由V_L、V_H、C_L和C_{H1}结构域组成的单价片段;(ii)F(ab')$_2$片段,一种包含由铰链区处的二硫键连接的两个Fab片段的二价片段;(iii)由V_H和C_{H1}结构域组成的Fd片段;(iv)由抗体单臂的V_L和V_H结构域组成的Fv片段;(v)dAb片段,其包含单一可变结构域,例如V_H结构域(参见例如Ward等人(1989)Nature[自然]341:544-6;以及国际公开号WO 1990/005144);以及(vi)分离的互补决定区(CDR)。此外,尽管Fv片段的两个结构域V_L和V_H由独立基因编码,但可以使用重组方法通过使它们能够以单一蛋白质链形式制造的合成接头而使它们接合,其中V_L与V_H区域配对形成单价分子(称为单链Fv(scFv))。参见例如Bird等人(1988)Science[科学]242:423-6;和Huston等人(1988)Proc Natl Acad Sci.USA[美国科学院院刊]85:5879-83。此类单链抗体还意欲涵盖在术语抗体的“抗原结合片段”或“抗原结合部分”内,且其在本领域中已知为当结合时可内化至细胞中的示例性结合片段类型(参见例如Zhu等人(2010)9:2131-41;He等人(2010)J Nucl Med.[核医学杂志]51:427-32;和Fitting等人(2015)MAbs 7:390-402)。在某些实施例中,scFv分子可以掺入融合蛋白中。还涵盖其他形式的单链抗体,如双抗体。双抗体是二价双特异性抗体,其中V_H和V_L结构域是在单一多肽链上表达,但使用太短而不允许同一链上的两个结构域之间配对的接头,由此迫使这些结构域与另一链的互补结构域配对且产生两个抗原结合位点(参见例如Holliger等人(1993)Proc Natl Acad Sci.USA[美国科学院院刊]90:6444-8;和Poljak等人(1994)Structure[结构]2:1121-3)。抗原结合片段是使用本领域技术人员已知的常规技术获得的,且这些结合片段是以与完整抗体相同的方式进行效用(例如结合亲和力、内化)筛选。抗原结合片段可通过裂解完整蛋白质,例如通过蛋白酶或化学裂解来制备。

[1496] 如本文关于抗体或抗原结合片段所使用,“内化”是指抗体或抗原结合片段当结合至细胞时能够穿过细胞的脂质双层膜进入内部隔室(即,“内化”),优选地进入细胞中的降解隔室中。例如,内化性抗HER2抗体是能够在结合至细胞膜上的HER2之后进入细胞中的抗体。在一些实施例中,本文所披露的ADC中使用的抗体或抗原结合片段靶向细胞表面抗原(例如HER2)且是内化性抗体或内化性抗原结合片段(即,ADC在抗原结合之后转移穿过细胞膜)。在一些实施例中,该内化性抗体或抗原结合片段结合细胞表面上的受体。靶向细胞膜上的受体的内化性抗体或内化性抗原结合片段可以诱导受体介导的内吞作用。在一些实施例中,该内化性抗体或内化性抗原结合片段经由受体介导的内吞作用进入细胞中。

[1497] 如本文关于抗体或抗原结合片段所使用的“非内化”是指抗体或抗原结合片段当结合至细胞时保留在细胞表面处。在一些实施例中,本文所披露的ADC中使用的抗体或抗原结合片段靶向细胞表面抗原且为非内化性抗体或非内化性抗原结合片段(即,ADC在抗原结

合之后保留在细胞表面处且不转移穿过细胞膜)。在一些实施例中,非内化性抗体或抗原结合片段结合非内化性受体或其他细胞表面抗原。示例性非内化性细胞表面抗原包括但不限于CA125和CEA,且结合至非内化性抗原靶标的抗体也是本领域已知的(参见例如Bast等人(1981)J Clin Invest.[临床研究杂志]68(5):1331-7;Scholler和Urban(2007)Biomark Med.[医学中的生物标志物]1(4):513-23;和Boudousq等人(2013)PLoS One[公共科学图书馆期刊]8(7):e69613)。

[1498] 如本文所使用,术语"人表皮生长因子受体2"、"HER2"或"HER2/NEU"是指任何天然形式的人HER2。该术语涵盖全长HER2(例如UniProt参考序列:P04626;SEQ ID NO:31),以及可以由细胞加工得到的任何形式的人HER2。该术语还涵盖人HER2的功能性变体或片段,包括但不限于保持人HER2的一种或多种生物功能的剪接变体、等位基因变体和同种型(即,除非上下文指示该术语仅用于指野生型蛋白质,否则涵盖变体和片段)。HER2可分离自人类,或可以重组地或通过合成方法产生。

[1499] 术语"抗HER2抗体"或"结合至HER2的抗体"是指结合(例如特异性结合)至HER2的任何形式抗体或其片段,且涵盖单克隆抗体(包括全长单克隆抗体)、多克隆抗体和生物功能抗体片段,只要它们结合(例如特异性结合)至HER2即可。美国专利号5,821,337提供了示例性HER2结合序列,包括示例性抗HER2抗体序列,且将该专利通过引用并入本文。在一些实施例中,本文所披露的ADC中使用的抗HER2抗体是内化性抗体或内化性抗体片段。曲妥珠单抗(美国专利号5,821,337;Molina等人(2001)Cancer Res.[癌症研究]61(12):4744-9)是示例性抗人HER2抗体。

[1500] 如本文所使用,术语"多配体聚糖-1"、"SDC1"或"CD138"是指任何天然形式的人CD138。该术语涵盖全长CD138(例如UniProt参考序列:P18827;SEQ ID NO:32),以及可由细胞加工得到的任何形式的人CD138。该术语还涵盖人CD138的功能性变体或片段,包括但不限于保持人CD138的一种或多种生物功能的剪接变体、等位基因变体和同种型(即,除非上下文指示该术语仅用于指野生型蛋白质,否则涵盖变体和片段)。CD138可分离自人类,或可以重组地或通过合成方法产生。

[1501] 术语"抗CD138抗体"或"结合至CD138的抗体"是指结合(例如特异性结合)至CD138的任何形式抗体或其片段,且涵盖单克隆抗体(包括全长单克隆抗体)、多克隆抗体和生物功能抗体片段,只要它们结合(例如特异性结合)至CD138即可。在一些实施例中,本文所披露的ADC中使用的抗CD138抗体是内化性抗体或内化性抗体片段。B-B4(Tassone等人(2004)Blood[血液]104:3688-96)是示例性抗人CD138抗体。

[1502] 如本文所使用,术语"肝配蛋白A型受体2"或"EPHA2"是指任何天然形式的人类EPHA2。该术语涵盖全长EPHA2(例如UniProt参考序列:P29317;SEQ ID NO:33),以及可由细胞加工得到的任何形式的人EPHA2。该术语还涵盖人EPHA2的功能性变体或片段,包括但不限于保持人EPHA2的一种或多种生物功能的剪接变体、等位基因变体和同种型(即,除非上下文指示该术语仅用于指野生型蛋白质,否则涵盖变体和片段)。EPHA2可分离自人类,或可以重组地或通过合成方法产生。

[1503] 术语"抗EPHA2抗体"或"结合至EPHA2的抗体"是指结合(例如特异性结合)至EPHA2的任何形式抗体或其片段,且涵盖单克隆抗体(包括全长单克隆抗体)、多克隆抗体和生物功能抗体片段,只要它们结合(例如特异性结合)至EPHA2即可。WO 2007/030642提供了示例

性EPHA2结合序列,包括示例性抗EPHA2抗体序列,且将该文献通过引用并入本文。在一些实施例中,本文所披露的ADC中使用的抗EPHA2抗体是内化性抗体或内化性抗体片段。1C1(WO 2007/030642;Jackson等人(2008)Cancer Res.[癌症研究]68(22):9367-74)是示例性抗人EPHA2抗体。

[1504] 如本文所使用,术语"间皮素"或"MSLN"是指任何天然形式的人MSLN。该术语涵盖全长MSLN(例如UniProt参考序列:Q13421;SEQ ID NO:43),以及可由细胞加工得到的任何形式的人MSLN。该术语还涵盖人MSLN的功能性变体或片段,包括但不限于保持人MSLN的一种或多种生物功能的剪接变体、等位基因变体和同种型(即,除非上下文指示该术语仅用于指野生型蛋白质,否则涵盖变体和片段)。MSLN可分离自人类,或可以重组地或通过合成方法产生。

[1505] 术语"抗MSLN抗体"或"结合至MSLN的抗体"是指结合(例如特异性结合)至MSLN的任何形式的抗体或其片段,且涵盖单克隆抗体(包括全长单克隆抗体)、多克隆抗体和生物功能抗体片段,只要它们结合(例如特异性结合)至MSLN即可。WO 2011/074621提供了示例性MSLN结合序列,包括示例性抗MSLN抗体序列,且将该文献通过引用并入本文。在一些实施例中,本文所披露的ADC中使用的抗MSLN抗体是内化性抗体或内化性抗体片段。11-25、IC14-30、IC7-4、IC17-35和2-9是示例性抗人MSLN抗体。

[1506] 如本文所使用,术语"谷氨酸羧肽酶2"或"FOLH1"是指任何天然形式的人FOLH1。该术语涵盖全长FOLH1(例如UniProt参考序列:Q04609;SEQ ID NO:44),以及可由细胞加工得到的任何形式的人FOLH1。该术语还涵盖人FOLH1的功能性变体或片段,包括但不限于保持人FOLH1的一种或多种生物功能的剪接变体、等位基因变体和同种型(即,除非上下文指示该术语仅用于指野生型蛋白质,否则涵盖变体和片段)。FOLH1可分离自人类,或可以重组地或通过合成方法产生。

[1507] 术语"抗FOLH1抗体"或"结合至FOLH1的抗体"是指结合(例如特异性结合)至FOLH1的任何形式抗体或其片段,且涵盖单克隆抗体(包括全长单克隆抗体)、多克隆抗体和生物功能抗体片段,只要它们结合(例如特异性结合)至FOLH1即可。WO 2019/012260和WO 2017/212250提供了示例性FOLH1结合序列,包括示例性抗FOLH1抗体序列,且将这些文献通过引用并入本文。在一些实施例中,本文所披露的ADC中使用的抗FOLH1抗体是内化性抗体或内化性抗体片段。J591(脱免疫型)是示例性抗人FOLH1抗体。

[1508] 如本文所使用,术语"钙粘素-6"或"CDH6"是指任何天然形式的人CDH6。该术语涵盖全长CDH6(例如UniProt参考序列:P55285;SEQ ID NO:45),以及可由细胞加工得到的任何形式的人CDH6。该术语还涵盖人CDH6的功能性变体或片段,包括但不限于保持人CDH6的一种或多种生物功能的剪接变体、等位基因变体和同种型(即,除非上下文指示该术语仅用于指野生型蛋白质,否则涵盖变体和片段)。CDH6可分离自人类,或可以重组地或通过合成方法产生。

[1509] 术语"抗CDH6抗体"或"结合至CDH6的抗体"是指结合(例如特异性结合)至CDH6的任何形式抗体或其片段,且涵盖单克隆抗体(包括全长单克隆抗体)、多克隆抗体和生物功能抗体片段,只要它们结合(例如特异性结合)至CDH6即可。WO 2018/185618提供了示例性CDH6结合序列,包括示例性抗CDH6抗体序列,且将该文献通过引用并入本文。在一些实施例中,本文所披露的ADC中使用的抗CDH6抗体是内化性抗体或内化性抗体片段。

[1510] 如本文所使用,术语“癌胚抗原相关细胞粘附分子5”或“CEACAM5”是指任何天然形式的人CEACAM5。该术语涵盖全长CEACAM5(例如UniProt参考序列:P06731;SEQ ID NO:46),以及可由细胞加工得到的任何形式的人CEACAM5。该术语还涵盖人CEACAM5的功能性变体或片段,包括但不限于保持人CEACAM5的一种或多种生物功能的剪接变体、等位基因变体和同种型(即,除非上下文指示该术语仅用于指野生型蛋白质,否则涵盖变体和片段)。CEACAM5可分离自人类,或可以重组地或通过合成方法产生。

[1511] 术语“抗CEACAM5抗体”或“结合至CEACAM5的抗体”是指结合(例如特异性结合)至CEACAM5的任何形式抗体或其片段,且涵盖单克隆抗体(包括全长单克隆抗体)、多克隆抗体和生物功能抗体片段,只要它们结合(例如特异性结合)至CEACAM5即可。US2015/0125386提供了示例性CEACAM5结合序列,包括示例性抗CEACAM5抗体序列,且将该文献通过引用并入本文。在一些实施例中,本文所披露的ADC中使用的抗CEACAM5抗体是内化性抗体或内化性抗体片段。hMN14是示例性抗人CEACAM5抗体。

[1512] 如本文所使用,术语“隐蔽家族蛋白质(cryptic family protein)1B”或“CFC1B”是指任何天然形式的人CFC1B。该术语涵盖全长CFC1B(例如UniProt参考序列:P0CG36;SEQ ID NO:47),以及可由细胞加工得到的任何形式的人CFC1B。该术语还涵盖人CFC1B的功能性变体或片段,包括但不限于保持人CFC1B的一种或多种生物功能的剪接变体、等位基因变体和同种型(即,除非上下文指示该术语仅用于指野生型蛋白质,否则涵盖变体和片段)。CFC1B可分离自人类,或可以重组地或通过合成方法产生。

[1513] 术语“抗CFC1B抗体”或“结合至CFC1B的抗体”是指结合(例如特异性结合)至CFC1B的任何形式抗体或其片段,且涵盖单克隆抗体(包括全长单克隆抗体)、多克隆抗体和生物功能抗体片段,只要它们结合(例如特异性结合)至CFC1B即可。WO 2002/088170提供了示例性CFC1B结合序列,包括示例性抗CFC1B抗体序列,且将该文献通过引用并入本文。在一些实施例中,本文所披露的ADC中使用的抗CFC1B抗体是内化性抗体或内化性抗体片段。

[1514] 如本文所使用,术语“外核苷酸焦磷酸酶/磷酸二酯酶家族成员3”或“ENPP3”是指任何天然形式的人ENPP3。该术语涵盖全长ENPP3(例如UniProt参考序列:O14638;SEQ ID NO:48),以及可由细胞加工得到的任何形式的人ENPP3。该术语还涵盖人ENPP3的功能性变体或片段,包括但不限于保持人ENPP3的一种或多种生物功能的剪接变体、等位基因变体和同种型(即,除非上下文指示该术语仅用于指野生型蛋白质,否则涵盖变体和片段)。ENPP3可分离自人类,或可以重组地或通过合成方法产生。

[1515] 术语“抗ENPP3抗体”或“结合至ENPP3的抗体”是指结合(例如特异性结合)至ENPP3的任何形式抗体或其片段,且涵盖单克隆抗体(包括全长单克隆抗体)、多克隆抗体和生物功能抗体片段,只要它们结合(例如特异性结合)至ENPP3即可。Donate等人((2016)Clin Cancer Res.[临床癌症研究]22(8):1989-99)提供了示例性ENPP3结合序列,包括示例性抗ENPP3抗体序列,且将该文献通过引用并入本文。在一些实施例中,本文所披露的ADC中使用的抗ENPP3抗体是内化性抗体或内化性抗体片段。

[1516] 如本文所使用,术语“叶酸受体α”或“FOLR1”是指任何天然形式的人FOLR1。该术语涵盖全长FOLR1(例如UniProt参考序列:P15328;SEQ ID NO:49),以及可由细胞加工得到的任何形式的人FOLR1。该术语还涵盖人FOLR1的功能性变体或片段,包括但不限于保持人FOLR1的一种或多种生物功能的剪接变体、等位基因变体和同种型(即,除非上下文指示该

术语仅用于指野生型蛋白质,否则涵盖变体和片段)。FOLR1可分离自人类,或可以重组地或通过合成方法产生。

[1517] 术语“抗FOLR1抗体”或“结合至FOLR1的抗体”是指结合(例如特异性结合)至FOLR1的任何形式抗体或其片段,且涵盖单克隆抗体(包括全长单克隆抗体)、多克隆抗体和生物功能抗体片段,只要它们结合(例如特异性结合)至FOLR1即可。WO 2005/080431和Coney等人((1991)Cancer Res.[癌症研究]51(22):6125-32)提供了示例性FOLR1结合序列,包括示例性抗FOLR1抗体序列,且将这些文献通过引用并入本文。在一些实施例中,本文所披露的ADC中使用的抗FOLR1抗体是内化性抗体或内化性抗体片段。法乐妥珠单抗(Farletuzumab)和MOv19是示例性抗人FOLR1抗体。

[1518] 如本文所使用,术语“甲型肝炎病毒细胞受体1”或“HAVCR1”是指任何天然形式的人HAVCR1。该术语涵盖全长HAVCR1(例如UniProt参考序列:Q96D42;SEQ ID NO:50),以及可由细胞加工得到的任何形式的人HAVCR1。该术语还涵盖人HAVCR1的功能性变体或片段,包括但不限于保持人HAVCR1的一种或多种生物功能的剪接变体、等位基因变体和同种型(即,除非上下文指示该术语仅用于指野生型蛋白质,否则涵盖变体和片段)。HAVCR1可分离自人类,或可以重组地或通过合成方法产生。

[1519] 术语“抗HAVCR1抗体”或“结合至HAVCR1的抗体”是指结合(例如特异性结合)至HAVCR1的任何形式抗体或其片段,且涵盖单克隆抗体(包括全长单克隆抗体)、多克隆抗体和生物功能抗体片段,只要它们结合(例如特异性结合)至HAVCR1即可。Thomas等人((2016)Mol Cancer Ther.[分子癌症治疗]15(12):2946-54)提供了示例性HAVCR1结合序列,包括示例性抗HAVCR1抗体序列,且将该文献通过引用并入本文。在一些实施例中,本文所披露的ADC中使用的抗HAVCR1抗体是内化性抗体或内化性抗体片段。

[1520] 如本文所使用,术语“肥大细胞/干细胞生长因子受体Kit”或“KIT”是指任何天然形式的人KIT。该术语涵盖全长KIT(例如UniProt参考序列:P10721;SEQ ID NO:51),以及可由细胞加工得到的任何形式的人KIT。该术语还涵盖人KIT的功能性变体或片段,包括但不限于保持人KIT的一种或多种生物功能的剪接变体、等位基因变体和同种型(即,除非上下文指示该术语仅用于指野生型蛋白质,否则涵盖变体和片段)。KIT可分离自人类,或可以重组地或通过合成方法产生。

[1521] 术语“抗KIT抗体”或“结合至KIT的抗体”是指结合(例如特异性结合)至KIT的任何形式的抗体或其片段,且涵盖单克隆抗体(包括全长单克隆抗体)、多克隆抗体和生物功能抗体片段,只要它们结合(例如特异性结合)至KIT即可。Shi等人((2016)Proc Natl Acad Sci USA[美国科学院院刊]113(33):E4784-93)和Abrams等人((2018)Clin Cancer Res.[临床癌症研究]24(17):4297-308)提供了示例性KIT结合序列,包括示例性抗KIT抗体序列,且将这些文献通过引用并入本文。在一些实施例中,本文所披露的ADC中使用的抗KIT抗体是内化性抗体或内化性抗体片段。

[1522] 如本文所使用,术语“肝细胞生长因子受体”或“MET”是指任何天然形式的人MET。该术语涵盖全长MET(例如UniProt参考序列:P08581;SEQ ID NO:52),以及可由细胞加工得到的任何形式的人MET。该术语还涵盖人MET的功能性变体或片段,包括但不限于保持人MET的一种或多种生物功能的剪接变体、等位基因变体和同种型(即,除非上下文指示该术语仅用于指野生型蛋白质,否则涵盖变体和片段)。MET可分离自人类,或可以重组地或通过合成

方法产生。

[1523] 术语“抗MET抗体”或“结合至MET的抗体”是指结合(例如特异性结合)至MET的任何形式的抗体或其片段,且涵盖单克隆抗体(包括全长单克隆抗体)、多克隆抗体和生物功能抗体片段,只要它们结合(例如特异性结合)至MET即可。Yang等人((2019)Acta Pharmacol Sin.[中国药理学报])提供了示例性MET结合序列,包括示例性抗MET抗体序列,且将该文献通过引用并入本文。在一些实施例中,本文所披露的ADC中使用的抗MET抗体是内化性抗体或内化性抗体片段。

[1524] 如本文所使用,术语“粘蛋白-16”或“MUC16”是指任何天然形式的人MUC16。该术语涵盖全长MUC16(例如UniProt参考序列:Q8WXI7;SEQ ID NO:53),以及可由细胞加工得到的任何形式的人MUC16。该术语还涵盖人MUC16的功能性变体或片段,包括但不限于保持人MUC16的一种或多种生物功能的剪接变体、等位基因变体和同种型(即,除非上下文指示该术语仅用于指野生型蛋白质,否则涵盖变体和片段)。MUC16可分离自人类,或可以重组地或通过合成方法产生。

[1525] 术语“抗MUC16抗体”或“结合至MUC16的抗体”是指结合(例如特异性结合)至MUC16的任何形式抗体或其片段,且涵盖单克隆抗体(包括全长单克隆抗体)、多克隆抗体和生物功能抗体片段,只要它们结合(例如特异性结合)至MUC16即可。Liu等人((2016)Ann Oncol.[肿瘤学年鉴]27(11):2124-30)提供了示例性MUC16结合序列,包括示例性抗MUC16抗体序列,且将该文献通过引用并入本文。在一些实施例中,本文所披露的ADC中使用的抗MUC16抗体是内化性抗体或内化性抗体片段。

[1526] 如本文所使用,术语“锌转运蛋白ZIP6”或“SLC39A6”是指任何天然形式的人SLC39A6。该术语涵盖全长SLC39A6(例如UniProt参考序列:Q13433;SEQ ID NO:54),以及可由细胞加工得到的任何形式的人SLC39A6。该术语还涵盖人SLC39A6的功能性变体或片段,包括但不限于保持人SLC39A6的一种或多种生物功能的剪接变体、等位基因变体和同种型(即,除非上下文指示该术语仅用于指野生型蛋白质,否则涵盖变体和片段)。SLC39A6可分离自人类,或可以重组地或通过合成方法产生。

[1527] 术语“抗SLC39A6抗体”或“结合至SLC39A6的抗体”是指结合(例如特异性结合)至SLC39A6的任何形式抗体或其片段,且涵盖单克隆抗体(包括全长单克隆抗体)、多克隆抗体和生物功能抗体片段,只要它们结合(例如特异性结合)至SLC39A6即可。Sussman等人((2014)Mol Cancer Ther.[分子癌症治疗]13(12):2991-3000)提供了示例性SLC39A6结合序列,包括示例性抗SLC39A6抗体序列,且将该文献通过引用并入本文。在一些实施例中,本文所披露的ADC中使用的抗SLC39A6抗体是内化性抗体或内化性抗体片段。

[1528] 如本文所使用,术语“胆碱转运蛋白样蛋白4”或“SLC44A4”是指任何天然形式的人SLC44A4。该术语涵盖全长SLC44A4(例如UniProt参考序列:Q53GD3;SEQ ID NO:55),以及可由细胞加工得到的任何形式的人SLC44A4。该术语还涵盖人SLC44A4的功能性变体或片段,包括但不限于保持人SLC44A4的一种或多种生物功能的剪接变体、等位基因变体和同种型(即,除非上下文指示该术语仅用于指野生型蛋白质,否则涵盖变体和片段)。SLC44A4可分离自人类,或可以重组地或通过合成方法产生。

[1529] 术语“抗SLC44A4抗体”或“结合至SLC44A4的抗体”是指结合(例如特异性结合)至SLC44A4的任何形式抗体或其片段,且涵盖单克隆抗体(包括全长单克隆抗体)、多克隆抗体

和生物功能抗体片段,只要它们结合(例如特异性结合)至SLC44A4即可。Mattie等人((2016)Mol Cancer Ther.[分子癌症治疗]15(11):2679-87)提供了示例性SLC44A4结合序列,包括示例性抗SLC44A4抗体序列,且将该文献通过引用并入本文。在一些实施例中,本文所披露的ADC中使用的抗SLC44A4抗体是内化性抗体或内化性抗体片段。

[1530] 如本文所使用,术语“金属还原酶STEAP1”或“STEAP1”是指任何天然形式的人STEAP1。该术语涵盖全长STEAP1(例如UniProt参考序列:Q9UHE8;SEQ ID NO:56),以及可由细胞加工得到的任何形式的人STEAP1。该术语还涵盖人STEAP1的功能性变体或片段,包括但不限于保持人STEAP1的一种或多种生物功能的剪接变体、等位基因变体和同种型(即,除非上下文指示该术语仅用于指野生型蛋白质,否则涵盖变体和片段)。STEAP1可分离自人类,或可以重组地或通过合成方法产生。

[1531] 术语“抗STEAP1抗体”或“结合至STEAP1的抗体”是指结合(例如特异性结合)至STEAP1的任何形式抗体或其片段,且涵盖单克隆抗体(包括全长单克隆抗体)、多克隆抗体和生物功能抗体片段,只要它们结合(例如特异性结合)至STEAP1即可。WO 2008/052187提供了示例性STEAP1结合序列,包括示例性抗STEAP1抗体序列,且将该文献通过引用并入本文。在一些实施例中,本文所披露的ADC中使用的抗STEAP1抗体是内化性抗体或内化性抗体片段。

[1532] 如本文所使用,术语“特异性”、“特异性结合(specifically binds/binds specifically)”是指抗体或抗原结合片段(例如抗HER2抗体)与蛋白质及其他生物制品的异质群体中的靶抗原(例如HER2)之间的结合反应。可通过在一组给定条件下将同适当抗原的结合与同不相关抗原或抗原混合物的结合进行比较来测试抗体的结合特异性。如果该抗体结合至适当抗原的亲和力是与不相关抗原或抗原混合物的结合亲和力的至少2、5、7倍且优选10倍或更高倍数,则认为其具有特异性。“特异性抗体”或“靶标特异性抗体”是仅结合靶抗原(例如HER2)但不结合其他抗原(或展现出最小结合)的抗体。在某些实施例中,特异性结合靶抗原(例如HER2)的抗体或抗原结合片段的K_D小于1×10^{-6}M、小于1×10^{-7}M、小于1×10^{-8}M、小于1×10^{-9}M、小于1×10^{-10}M、小于1×10^{-11}M、小于1×10^{-12}M或小于1×10^{-13}M。在一些实施例中,K_D是1pM至500pM。在一些实施例中,K_D是在500pM至1μM、1μM至100nM或100mM至10nM之间。

[1533] 术语“表位”是指抗原中能够被抗体识别且特异性结合的部分。当抗原是多肽时,表位可由连续氨基酸或通过该多肽的三级折叠而靠近的非连续氨基酸形成。抗体所结合的表位可以使用本领域已知的任何表位作图技术鉴定,包括通过直接目测抗原-抗体复合体、以及监测抗体与抗原的片段或突变型变异体的结合、或监测抗体和抗原的不同部分的溶剂可及性来进行表位鉴定的X射线结晶学。用于给抗体表位作图的示例性策略包括但不限于基于阵列的寡肽扫描、限制性蛋白水解、定点诱变、高通量诱变作图、氢-氘交换和质谱法(参见例如Gershoni等人(2007)21:145-56;以及Hager-Braun和Tomer(2005)Expert Rev Proteomics[蛋白质组学专家评论]2:745-56)。

[1534] 还可使用竞争性结合和表位分组(epitope binning)来确定共享相同或重叠表位的抗体。竞争性结合可以使用交叉阻断测定,如在“Antibodies,A Laboratory Manual[抗体:实验室手册]”,Cold Spring Harbor Laboratory[冷泉港实验室],Harlow和Lane(1988年第1版,2014年第2版)中所描述的测定来评价。在一些实施例中,当在交叉阻断测定中,测

试抗体或结合蛋白使参考抗体或结合蛋白(例如,包含CDR和/或选自表2-4中所鉴定的可变结构域的结合蛋白)与靶抗原如HER2的结合降低至少约50％(例如50％、60％、70％、80％、90％、95％、99％、99.5％或更高,或其间的任何百分比)时,鉴定出竞争性结合,和/或反之亦然。在一些实施例中,竞争性结合可归因于共享的或相似的(例如部分重叠的)表位,或归因于抗体或结合蛋白在邻近表位结合处的位阻(参见例如Tzartos,Methods in Molecular Biology[分子生物学方法](Morris编(1998)第66卷,第55-66页))。在一些实施例中,可使用竞争性结合来对共享相似表位的结合蛋白组进行分选。例如,进行竞争结合的结合蛋白可“分组”为具有重叠或邻近表位的结合蛋白组,而不竞争的那些结合蛋白归入不具有重叠或邻近表位的独立结合蛋白组。

[1535] 术语“k_{on}”或“k_a”是指抗体与抗原缔合形成抗体/抗原复合体的缔合速率常数。该速率可使用标准测定,如表面等离子体共振、生物膜层干涉法或ELISA测定来确定。

[1536] 术语“k_{off}”或“k_d”是指抗体自抗体/抗原复合体解离的解离速率常数。该速率可使用标准测定,如表面等离子体共振、生物膜层干涉法或ELISA测定来确定。

[1537] 术语“K_D”是指特定抗体-抗原相互作用的平衡解离常数。K_D由k_a/k_d计算。该速率可使用标准测定,如表面等离子体共振、生物膜层干涉法或ELISA测定来确定。

[1538] 术语“p”或“药物负载”或“药物:抗体比率”或“药物与抗体比率”或“DAR”是指药物部分的数量/抗体或抗原结合片段,即药物负载,或具有式(I)的ADC中-L-D部分的数量/抗体或抗原结合片段(Ab)。在包含剪接调节剂药物部分的ADC中,“p”是指连接至该抗体或抗原结合片段的剪接调节剂化合物的数量。例如,如果有两种剪接调节剂化合物(例如,各自具有D1的结构的两种化合物)连接至抗体或抗原结合片段,则p＝2。在包含具有式(I)的ADC的多个拷贝的组合物中,“平均p”是指-L-D部分的平均数量/抗体或抗原结合片段,也称为“平均药物负载”。

[1539] 在本文中使用“接头”或“接头部分”用于指能够将化合物(通常为药物部分,如剪接调节剂药物部分)共价接合至另一部分(如抗体或抗原结合片段)的任何化学部分。在使化合物或抗体保持活性的条件下,接头可易感于或基本上抵抗酸诱导的裂解、肽酶诱导的裂解、基于光的裂解、酯酶诱导的裂解和/或二硫键裂解。

[1540] 在本文中使用术语“试剂”用于指化学化合物、化学化合物的混合物、生物大分子或由生物材料制成的提取物。术语“治疗剂”或“药物”是指能够调节生物过程和/或具有生物活性的试剂。本文所描述的剪接调节剂化合物是示例性治疗剂。

[1541] 在本文中使用术语“化学治疗剂”或“抗癌剂”用于指有效治疗癌症的所有试剂,不管其作用机制如何。抑制转移或血管生成通常是化学治疗剂的特性。化学治疗剂包括抗体、生物分子和小分子,且涵盖本文所描述的剪接调节剂化合物。化学治疗剂可以为细胞毒性剂或细胞生长抑制剂。术语“细胞生长抑制剂”是指抑制或遏止细胞生长和/或细胞增殖的试剂。术语“细胞毒性剂”是指主要通过干扰细胞的表达活性和/或功能来引起细胞死亡的物质。

[1542] 如本文所使用,术语“剪接调节剂(splicing modulator)”、“剪接体调节剂”或“剪接调节剂(splice modulator)”是指通过与剪接体各组分相互作用而具有抗癌活性的化合物。在一些实施例中,剪接调节剂改变靶细胞中的剪接速率或形式。充当抑制剂的剪接调节剂例如能够减少不受控制的细胞增殖。在一些实施例中,剪接调节剂可通过结合至SF3b剪

接体复合物起作用。此类调节剂可以为天然化合物或合成化合物。剪接调节剂的非限制性实例和此类调节剂的类别包括普拉二烯内酯(例如普拉二烯内酯D或普拉二烯内酯B)、普拉二烯内酯衍生物(例如普拉二烯内酯D或普拉二烯内酯B衍生物)、赫伯西地(herboxidiene)、赫伯西地衍生物、思普力西欧他汀(spliceostatin)、思普力西欧他汀衍生物、苏地霉素(sudemycin)或苏地霉素衍生物。如本文所使用,当提及剪接调节剂或类似物时,术语“衍生物”和“类似物”意指保持与原始化合物基本上相同、相似或增强的生物功能或活性但具有改变的化学或生物结构的任何此类化合物。在一些实施例中,该剪接调节剂是普拉二烯内酯或普拉二烯内酯衍生物。

[1543] 如本文所使用,“普拉二烯内酯衍生物”是指结构上与称为普拉二烯内酯的天然产物家族的成员相关且保持该起始化合物的一种或多种生物功能的化合物。普拉二烯内酯最先在细菌普拉特链霉菌(Streptomyces platensis)中鉴定(Mizui等人(2004)J Antibiot.[抗生素杂志]57:188-96)为具有强效的细胞毒性且导致细胞周期停滞于细胞周期的G1和G2/M期(例如Bonnal等人(2012)Nat Rev Drug Dis[自然评论:药物发现]11:847-59)。有七种天然存在的普拉二烯内酯,即普拉二烯内酯A-G(Mizui等人(2004)J Antibiot.[抗生素杂志]57:188-96;Sakai等人(2004)J Antibiotics[抗生素杂志]57:180-7)。美国专利号7,884,128和7,816,401描述了合成普拉二烯内酯B和D的示例性方法,并且将这些文献各自关于这些方法通过引用并入本文。普拉二烯内酯B和D的合成还可使用Kanada等人((2007)Angew Chem Int Ed.[应用化学国际版]46:4350-5)中所描述的示例性方法进行。Kanada等人和国际公开号WO 2003/099813描述了自普拉二烯内酯D(WO 2003/099813的11107D)合成E7107(D11)(WO 2003/099813的化合物45)的示例性方法。对应的美国专利号为Kotake等人的7,550,503。将这些参考文献的每一个关于所述合成方法并入本文。

[1544] 如本文所使用,“剪接调节剂药物部分”是指ADC或组合物中提供剪接调节剂化合物的结构的组分,例如具有式(I)的ADC中或包含-L-D的组合物中的剪接调节剂(D)组分。

[1545] 如本文所使用,“剪接体”是从自一个或多个RNA区段(如pre-mRNA区段)中去除内含子的核糖核蛋白复合体。

[1546] 术语“同源物”是指通过例如在相应位置处具有相同或相似化学残基序列而与另一分子展现同源性的分子。

[1547] 如本文所使用,术语“抑制(inhibit/inhibition of)”意指减少可测量的量,且可包括但不需要完全防止或抑制。

[1548] 术语“靶标阴性”、“靶抗原阴性”或“抗原阴性”是指细胞或组织中不存在靶抗原表达。术语“靶标阳性”、“靶抗原阳性”或“抗原阳性”是指存在靶抗原表达。例如,不表达靶抗原的细胞或细胞系可以描述为靶标阴性的,而表达靶抗原的细胞或细胞系可以描述为靶标阳性的。

[1549] 术语“旁观者杀伤”或“旁观者效应”是指在靶标阳性细胞存在下对靶标阴性细胞的杀伤,其中在靶标阳性细胞不存在下未观察到靶标阴性细胞的杀伤。细胞间接触、或至少靶标阳性与靶标阴性细胞之间邻近能够进行旁观者杀伤。这种类型的杀伤可与“脱靶杀伤”相区分,脱靶杀伤是指对靶标阴性细胞的无差别杀伤。在靶标阳性细胞不存在下可以观察到“脱靶杀伤”。

[1550] 术语“赘生性病症”和“癌症”在本文中可互换使用,是指存在具有致癌细胞特有的

特征(如不受控制的增殖、不灭性、转移可能性、快速的生长和增殖速率、和/或某些形态特征)的细胞。通常,癌细胞可呈肿瘤或团块形式,但此类细胞可单独存在于受试者内,或可在血流中作为独立细胞(如白血病细胞或淋巴瘤细胞)循环。术语“赘生性病症”和“癌症”包括所有类型的癌症和癌症转移,包括血液恶性病、实体瘤、肉瘤、癌以及其他实体瘤和非实体瘤癌症。血液恶性病可以包括B细胞恶性病、血液癌症(白血病)、浆细胞癌症(骨髓瘤,例如多发性骨髓瘤)或淋巴结癌症(淋巴瘤)。示例性B细胞恶性病包括慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、滤泡性淋巴瘤、套细胞淋巴瘤和弥漫性大B细胞淋巴瘤。白血病可以包括急性淋巴母细胞性白血病(ALL)、急性骨髓性白血病(AML)、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、慢性骨髓性白血病(CML)、慢性骨髓单核细胞性白血病(CMML)、急性单核细胞性白血病(AMoL)等。淋巴瘤可以包括霍奇氏金淋巴瘤和非霍奇金氏淋巴瘤。其他血液恶性病可包括骨髓增生异常综合症(MDS)。实体瘤可以包括癌,如腺癌,例如乳腺癌、胰腺癌、前列腺癌、结肠癌或结肠直肠癌、肺癌、胃癌、宫颈癌、子宫内膜癌、卵巢癌、胆管癌、神经胶质瘤、黑素瘤等。

[1551] 术语“肿瘤”和“赘生物”是指由过量细胞生长或增殖引起的任何组织团块,可为良性或恶性的,包括癌前病变。

[1552] 术语“肿瘤细胞”与“赘生性细胞”可互换使用且是指源自肿瘤或赘生物的单个细胞或总细胞群,包括非致瘤细胞和癌干细胞两种。如本文所使用,当术语“肿瘤细胞”仅指缺乏更新和分化能力的肿瘤细胞时,该术语“肿瘤细胞”将由术语“非致瘤”修饰以区分肿瘤细胞与癌干细胞。

[1553] 术语“受试者”和“患者”在本文中可互换地使用,是指任何动物,如任何哺乳动物,包括但不限于人、非人灵长类动物、啮齿动物等。在一些实施例中,哺乳动物是小鼠。在一些实施例中,哺乳动物是人。在一些实施例中,受试者是小鼠。在一些实施例中,受试者是人。

[1554] 术语“共施用”或“组合”施用一种或多种治疗剂包括同时施用和按任何顺序连续施用。

[1555] “药物组合物”是指以下制剂,该制剂呈允许施用一种或多种活性成分且随后提供一种或多种活性成分的预期生物活性和/或实现治疗作用的形式,且不含对将施用该配制剂的受试者具有不可接受毒性的额外组分。该药物组合物可为无菌的。

[1556] “药物赋形剂”包含例如如佐剂、载体、pH调节剂和缓冲剂、张力调节剂、润湿剂、防腐剂等材料。

[1557] “药学上可接受的”意指联邦或洲政府的管理结构批准或可批准,或美国药典(U.S.Pharmacopeia)或在其他一般公认的药典中列出,可用于动物且更特定地用于人。

[1558] “药学上可接受的盐”是保留母体化合物所希望的生物活性并且不赋予不希望的毒理学作用的盐。此类盐的实例是:(a)与无机酸例如盐酸、氢溴酸、硫酸、磷酸、硝酸等形成的酸加成盐;以及与有机酸例如乙酸、草酸、酒石酸、琥珀酸、马来酸、富马酸、葡萄糖酸、柠檬酸、苹果酸、抗坏血酸、苯甲酸、鞣酸、棕榈酸、海藻酸、聚谷氨酸、萘磺酸、甲磺酸、对甲苯磺酸、萘二磺酸、聚半乳糖醛酸等形成的盐;以及(b)由元素阴离子如氯、溴和碘形成的盐。参见例如Haynes等人,“Commentary:Occurrence of Pharmaceutically Acceptable Anions and Cations in the Cambridge Structural Database[评论:剑桥结构数据库中药学上可接受的阴离子和阳离子的存在]”,JPharmaceutical Sciences[药物科学杂志],第94卷,第10期(2005);和Berge等人,“Pharmaceutical Salts[药用盐]”,J

Pharmaceutical Sciences[药物科学杂志],第66卷,第1期(1977),将这些文献通过引用并入本文。

[1559] 如本文所使用,术语“有效量”是指足以执行特别陈述的目的,例如在施用之后产生治疗作用,如减小肿瘤生长速率或肿瘤体积、减少癌症症状、或治疗功效的某些其他指标的本文所描述的化合物、ADC或组合物(例如剪接调节剂或ADC)的量。有效量能以与所述目的相关的常规方式测定。术语“治疗有效量”是指可有效检测杀伤肿瘤细胞、减少和/或抑制肿瘤细胞的生长或扩散、肿瘤的尺寸或数量、和/或癌症的水平、分期、进展和/或严重程度的其他量度的本文所描述的化合物、ADC或组合物的量。治疗有效量可根据预期应用(体外或体内)或所治疗的受试者和疾病病况,例如受试者的体重和年龄、疾病病况的严重程度、施用方式等而变化,其可由本领域普通技术人员容易地确定。该术语还适用于会在靶细胞中诱导特定响应(例如抑制细胞生长)的剂量。具体剂量可根据例如特定药物组合物、受试者及其年龄和现有健康状况或健康状况的风险、遵循的给药方案、疾病的严重程度、其是否与其他试剂组合施用、施用时间安排、其所施用的组织以及载运其的物理递送系统而变化。在癌症的情况下,治疗有效量的ADC可以减少癌细胞的数量、减小肿瘤尺寸、抑制(例如减慢或停止)肿瘤转移、抑制(例如减慢或停止)肿瘤生长、和/或缓解一种或多种症状。

[1560] “预防有效量”是指在必需剂量下且在必需时间段内有效达成所需预防结果的量。典型地,由于预防剂量是在疾病之前或在疾病早期在受试者体内使用的,所以预防有效量将小于治疗有效量。

[1561] 如本文所使用,“用于治疗(to treat)”或“治疗的(therapeutic)”以及语法相关术语是指疾病的任何后果的任何改善,如延长存活期、较低发病率、和/或减轻由替代性治疗模式引起的副作用。如本领域中容易理解的,治疗行为涵盖但不需要疾病的完全根除。如本文所使用,“治疗(treatment/treat)”是指将所述ADC或组合物施用于受试者,例如患者。治疗可为治愈、痊愈、减轻、缓解、改变、补救、改良、缓和、改善或影响病症、病症的症状或患该病症(例如癌症)的倾向性。在一些实施例中,除治疗患有病况的受试者外,还可预防性提供本文所披露的组合物以预防或降低发展该病况的可能性。

[1562] 在一些实施例中,使用经标记的ADC。合适的“标记”包括放射性核素、酶、底物、辅因子、抑制剂、荧光部分、化学发光部分、磁性粒子等。

[1563] 如本文所使用,“蛋白质”意指至少两个共价连接的氨基酸。该术语涵盖多肽、寡肽和肽。在一些实施例中,该两个或更多个共价连接的氨基酸通过肽键连接。蛋白质可以由天然存在的氨基酸和肽键组成,例如当使用表达系统和宿主细胞以重组方式制备该蛋白质时。可替代地,该蛋白质可以包括合成氨基酸(例如高苯丙氨酸、瓜氨酸、鸟氨酸和正亮氨酸)、或模拟肽结构,即“肽或蛋白质类似物”,如类肽。类肽是一类示例性肽模拟物,其侧链连接至肽主链的氮原子,而不是连接至α-碳(当它们在氨基酸中时),且具有不同于肽的氢键结和构象特征(参见例如Simon等人(1992)Proc Natl Acad Sci.USA[美国科学院院刊]89:9367)。因此,类肽可对蛋白水解或其他生理或储存条件具有抗性,并有效渗透细胞膜。特别是当在体外通过本领域中熟知的常规方法合成抗体时,可以并入此类合成氨基酸。此外,还可使用肽模拟的、合成和天然存在的残基/结构的任何组合。“氨基酸”还包括亚氨基酸残基,如脯氨酸和羟脯氨酸。氨基酸“R基团”或“侧链”可呈(L)-或(S)-构型。在一个具体实施例中,氨基酸呈(L)-或(S)-构型。

[1564] “重组蛋白”是使用重组技术,使用本领域已知的任何技术和方法,即,经由表达重组核酸制备的蛋白质。用于产生重组蛋白的方法和技术是本领域中熟知的。

[1565] “经分离”蛋白质未伴随通常以其天然状态与其缔合的至少某种材料,例如构成给定样品中按总蛋白质重量计的至少约5%或至少约50%的某种材料。应理解,视情况而定,经分离蛋白质可构成按总蛋白质重量计的5%至99.9%。例如,可经由使用诱导型启动子或高表达启动子而以显著较高的浓度制备蛋白质,使得以增加的浓度水平制得该蛋白质。该定义包括在本领域已知的多种生物体和/或宿主细胞中产生抗体。

[1566] 对于氨基酸序列,序列同一性和/或相似性可使用本领域已知的标准技术测定,包括但不限于Smith和Waterman(1981)Adv Appl Math.[应用数学进展]2:482的局部序列同一性算法;Needleman和Wunsch(1970)J Mol Biol.[分子生物学杂志]48:443的序列同一性比对算法;Pearson和Lipman(1988)Proc Nat Acad Sci.USA[美国科学院院刊]85:2444的相似性检索方法;这些算法的计算机化实施(威斯康星遗传学软件包中的GAP、BESTFIT、FASTA和TFASTA;Genetics Computer Group[遗传学计算机集团],科学大道575号,麦迪逊,威斯康星州);由Devereux等人(1984)Nucl Acid Res.[核酸研究]12:387-95所描述的最佳拟合序列程序,优选使用默认设置或通过检查。优选地,通过FastDB,基于以下参数计算同一性百分比:错配罚分为1;空位罚分为1;空位大小罚分为0.33;以及接合罚分为30(“Current Methods in Sequence Comparison and Analysis[当前序列比较和分析方法]”,Macromolecule Sequencing and Synthesis,Selected Methods and Applications[大分子测序与合成,选择方法及应用],第127-149页(1988),Alan R.Liss,Inc)。

[1567] 有用算法的一个实例是PILEUP。PILEUP使用渐进的、两两比对创建了来自一组相关序列的多个序列比对。它还可以绘制显示用于创建该比对的聚类关系的一个树。PILEUP使用Feng和Doolittle(1987)J Mol Evol.[分子进化杂志]35:351-60的渐进性比对方法的简化形式;该方法类似于Higgins和Sharp(1989)CABIOS 5:151-3所描述的方法。有用的PILEUP参数包括为3.00的默认空位权重,为0.10的默认空位长度权重,以及加权的末端空位。

[1568] 有用算法的另一实例是以下中描述的BLAST算法:Altschul等人(1990)J Mol Biol.[分子生物学杂志]215:403-10;Altschul等人(1997)Nucl Acid Res.[核酸研究]25:3389-402;和Karin等人(1993)Proc Natl Acad Sci.USA[美国科学院院刊]90:5873-87。特别有用的BLAST程序是WU-BLAST-2程序,其是自Altschul等人(1996)Methods in Enzymology[酶学方法]266:460-80获得。WU-BLAST-2使用若干个搜索参数,其中大部分设置为默认值。使用以下值设置可调参数:重叠跨度=1、重叠分数=0.125、字阈值(T)=II。HSP S和HSP S2参数是动态值,且由程序本身根据特定序列的组成和针对目的序列所检索的特定数据库的组成来确定;然而,可以调整这些值以增加灵敏度。

[1569] 另外一种有用的算法是如Altschul等人(1997)Nucl Acid Res.[核酸研究]25:3389-402所报道的空位BLAST。空位BLAST使用BLOSUM-62替换得分;阈值T参数设置为9;两次命中法(two-hit method)用于触发无空位的延伸部分,加入空位长度k,代价为10+k;Xu设置为16,Xg在数据库检索阶段设置为40且在算法输出阶段设置为67。空位比对由对应于约22位的分值触发。

[1570] 通常,本文所披露的蛋白质及其变体(包括靶抗原(如HER2、CD138、EPHA2、MSLN、

FOLH1、CDH6、CEACAM5、CFC1B、ENPP3、FOLR1、HAVCR1、KIT、MET、MUC16、SLC39A6、SLC44A4或STEAP1)的变体以及抗体可变结构域的变体(包括各个变体CDR))与本文中所描绘的序列之间的氨基酸同源性、相似性或同一性是至少80％,例如同源性或同一性是至少85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％、近似100％或100％。

[1571] 以类似方式,关于抗体和本文中所鉴定的其他蛋白质的核酸序列的“核酸序列同一性百分比(％)”被定义为候选序列中与抗原结合蛋白的编码序列中的核苷酸残基相同的核苷酸残基的百分比。一种具体方法利用WU-BLAST-2的BLASTN模块,其设置了默认参数,其中重叠跨度和重叠分数分别设置为1和0.125。

[1572] 虽然引入氨基酸序列变化的位点或区域是预先确定的,而突变本身无需预先确定。例如,为了优化给定位点处突变的效能,可以在靶标密码子或区域处进行随机诱变,并筛选所表达的抗原结合蛋白CDR变体的所需活性的最佳组合。在具有已知序列的DNA中的预定位点处进行取代突变的技术为人所熟知,例如MI3引物诱变和PCR诱变。

[1573] 如本文所使用,“烷基”或“烷基基团”意指完全饱和的直链、支链或环状烃链。在某些实施例中,烷基基团可含有1-8个碳原子(“C_1-C_8烷基”)。在某些实施例中,烷基基团可含有1-6个碳原子(“C_1-C_6烷基”)。在某些实施例中,烷基基团含有1-3个碳原子。在还其他实施例中,烷基基团含有2-3个碳原子,并且在又其他实施例中,烷基基团含有1-2个碳原子。

[1574] 如本文所使用,“烷基烷氧基”意指被烷氧基取代的烷基基团。如本文所使用,“烷氧基”是指经由氧(“烷氧基”)原子连接至主碳链的如先前所定义的烷基基团。

[1575] 如本文所使用,“烷基氨基”意指被氨基取代的烷基基团。如本文所使用,“氨基”是指-NH_2、-NH(烷基)或-N(烷基)(烷基)。

[1576] 如本文所使用,“烷基羟基”意指被氨基基团取代的烷基基团。如本文所使用,“羟基(hydroxy/hydroxyl)”是指-OH。

[1577] “亚烷基”是指烷基基团的二价基基团。例如,-CH_2-、-CH_2CH_2-、-$CH_2CH_2CH_2$-、-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-、-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-和-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-分别是指亚甲基、亚乙基、亚正丙基、亚正丁基、亚正戊基和亚正己基。

[1578] 如本文所使用,“碳环”包括芳族基团(例如芳基)和非芳族基团(例如环烷基)两者。在某些实施例中,碳环基团含有3-10个碳原子(“3至10元碳环”)。在某些实施例中,碳环基团含有3-8个碳原子(“3至8元碳环”)。在某些实施例中,碳环基团含有3-6个碳原子(“3至6元碳环”)。在某些实施例中,碳环基团含有3-5个碳原子(“3至5元碳环”)。

[1579] “卤素”是指任一卤素的基团,例如-F、-Cl、-Br或-I。

[1580] 如本文所使用,术语“杂环”、“杂环基”和“杂环的”意指在环中含有至少一个杂原子的单环杂环、双环杂环或三环杂环。

[1581] 单环杂环是含有至少一个独立地选自O、N和S的杂原子的3元、4元、5元、6元、7元或8元环。在一些实施例中,该杂环是含有一个选自O、N和S的杂原子的3元或4元环。在一些实施例中,该杂环是含有零个或一个双键和一个、两个或三个选自O、N和S的杂原子的5元环。在一些实施例中,该杂环是含有零个、一个或两个双键和一个、两个或三个选自O、N和S的杂原子的6元、7元或8元环。单环杂环的代表性实例包括但不限于氮杂环丁烷基、氮杂环庚烷基、吖丙啶基、二氮杂环庚烷基、1,3-二噁烷基、1,3-二氧戊环基、二氢吡喃基(包括3,4-二氢-2H-吡喃-6-基)、1,3-二硫杂环戊烷基、1,3-二噻烷基、咪唑啉基、咪唑烷基、异噻唑啉

基、异噻唑烷基、异噁唑啉基、异噁唑烷基、吗啉基、噁二唑啉基、噁二唑烷基、噁唑啉基、噁唑烷基、哌嗪基、哌啶基、吡喃基、吡唑啉基、吡唑烷基、吡咯啉基、吡咯烷基、四氢呋喃基、四氢吡喃基(包括四氢-2H-吡喃-4-基)、四氢噻吩基、噻二唑啉基、噻二唑烷基、噻唑啉基、噻唑烷基、硫代吗啉基、1,1-二氧化硫代吗啉基(硫代吗啉砜)、硫代吡喃基和三噻烷基。

[1582] 本披露的双环杂环可以包括与芳基基团稠合的单环杂环,或与单环环烷基稠合的单环杂环,或与单环环烯基稠合的单环杂环,或与具有总计5至12个环原子的单环杂环稠合的单环杂环。双环杂环的实例包括但不限于3,4-二氢-2H-吡喃基、1,3-苯并间二氧杂环戊烯基、1,3-苯并二硫杂环戊烯基、2,3-二氢-1,4-苯并二噁英基(benzodioxinyl)、2,3-二氢-1-苯并呋喃基、2,3-二氢-1-苯并噻吩基、2,3-二氢-1H-吲哚基、以及1,2,3,4-四氢喹啉基。

[1583] 术语“杂环”、“杂环基”和“杂环的”涵盖杂芳基。“杂芳基”是指具有一个或多个闭合环(在这些环的至少一个中具有一个或多个杂原子(氧、氮或硫))的环状部分,其中这些环的至少一个是芳族的,并且其中这个环或这些环可以独立地稠合和/或桥连。实例包括但不限于苯基、噻吩基、三唑基、吡啶基、嘧啶基、哒嗪基和吡嗪基。

[1584] 如本文所描述,本披露的化合物可含有“任选地经取代的”部分。通常,术语“经取代的”无论前面是否有术语“任选地”均意指指定部分中的一个或多个氢被合适的取代基替代。除非另有说明,否则“任选地经取代的”基团可在该基团的每一可取代位置处具有合适的取代基,且在任一给定结构中的一个以上的位置可被一个以上的选自指定基团的取代基取代时,在每个位置处的取代基可相同或不同。本披露所设想的取代基的组合优选地是导致形成稳定的或化学上可行的化合物的那些。

[1585] 本领域技术人员应理解,“取代”或“被……取代”或“不存在”包括隐含条件:此类取代或不存在是根据经取代原子和取代基的容许化合价,且该取代或不存在产生稳定化合物,例如该化合物不会自发地经历转变,如通过重排、环化、消除等。出于本披露的目的,杂原子(如氮)可以具有本文描述的有机化合物的氢取代基和/或任何可容许的取代基,这些取代基将满足杂原子的化合价。

[1586] “稳定的”是指如下化合物:在出于本文所披露的一个或多个目的而经受允许其生产、检测以及在某些实施例中其回收、纯化和使用的条件时,它们在化学上和/或物理上基本上不改变。在一些实施例中,稳定的化合物或化学上可行的化合物是如下化合物:其在40℃或以下的温度下、在不存在水分或其他化学反应条件下保持至少一周时基本上不改变。在一些实施例中,本文所披露的化合物是稳定的。

[1587] 本文所传授的对映异构体可以包括“对映异构体纯的”异构体,其在一个或多个特定不对称中心处基本上包含单一对映异构体,例如,大于或等于90%、92%、95%、98%、或99%、或等于100%的单一对映异构体。“不对称中心”或“手性中心”是指包含四个不同取代基的四面体碳原子。

[1588] 本文所描述的化合物还可在构成此类化合物的一个或多个原子处含有非天然比例的原子同位素。例如,这些化合物可被放射性同位素,例如氘(^{2}H)、氚(^{3}H)、碳-13(^{13}C)或碳-14(^{14}C)放射性标记。本文所披露的化合物的所有同位素变异(无论是否具有放射性)均意欲涵盖在本披露的范围内。此外,本文所描述的化合物的所有互变异构形式均意欲涵盖在本披露的范围内。

[1589] 抗体-药物缀合物

[1590] 本披露的抗体-药物缀合物(ADC)复合物包括具有抗癌活性的复合物。特别地,这些ADC复合物包括缀合(即,通过接头共价连接)至药物部分(例如剪接调节剂)的抗体或抗原结合片段(包括其抗原结合片段),其中该药物部分当未缀合至抗体或抗原结合片段时具有细胞毒性作用或细胞生长抑制作用。在不同实施例中,该药物部分当未缀合至抗体或抗原结合片段时能够与SF3b剪接体复合物结合和/或相互作用。在不同实施例中,该药物部分当未缀合至抗体或抗原结合片段时能够调节体外和/或体内RNA剪接。在不同实施例中,通过靶向RNA剪接,本文所披露的药物部分和ADC是强效抗增殖剂。在不同实施例中,本文所披露的药物部分和ADC可以靶向积极分裂的细胞和休眠细胞。

[1591] 在不同实施例中,本披露至少部分地基于以下发现:某些生物活性剪接调节剂当用于ADC中时可以提供改善的特性。尽管剪接调节剂当单独使用时可以表现出合意地改善的特征(例如,稳固的SF3b剪接体复合物结合、对RNA剪接的强效调节),但在不同实施例中,该剪接调节剂当缀合至抗体或抗原结合片段时可以展现少量这些合意地改善的特征。因此,用作人类治疗剂,例如用作肿瘤药剂的ADC的开发和生产可能不仅仅需要鉴定能够结合至一个或多个所需靶标且连接至单独使用以治疗癌症的药物的抗体。抗体与药物的连接可对该抗体和该药物中的一者或两者的活性具有显著影响,该影响将根据所选接头和/或药物的类型而变化。因此,在一些实施例中,对ADC的组分进行选择以(i)保持分离的抗体和药物部分所展现的一种或多种治疗特性;(ii)维持抗体或抗原结合片段的特异性结合特性;(iii)优化药物负载以及药物与抗体比率;(iv)允许经由稳定连接至抗体或抗原结合片段而递送(例如细胞内递送)药物部分;(v)保持ADC作为完整缀合物的稳定性,直至转运或递送至靶位点;(vi)在施用之前或之后使ADC的聚集最小化;(vii)在细胞环境中的裂解或其他释放机制之后,允许实现药物部分的治疗作用,例如细胞毒性作用;(viii)展现类似于或优于分离的抗体和药物部分的体内抗癌治疗功效;(ix)使药物部分引起的脱靶杀伤最小化;和/或(x)展现所需的药代动力学和药效学特性、可配制性和毒理/免疫特征。可能需要这些特性中的每一种以鉴定用于治疗用途的改善的ADC(Ab等人(2015)Mol Cancer Ther.[分子癌症治疗学]14:1605-13)。

[1592] 在不同实施例中,本文所披露的ADC出乎意料地展现出有利的、上文所列类别中的一些或每种特性。例如,在一些实施例中,相较于包含替代性接头和/或药物部分(例如替代性剪接调节剂)的ADC,本文所披露的ADC构建体令人惊讶地展现出有利的药物负载、聚集和/或稳定性特征,和/或保持抗体结合功能、药物活性和/或改善的旁观者杀伤,同时减少脱靶杀伤。在一些实施例中,相较于使用替代性接头和/或药物部分(例如替代性剪接调节剂)的ADC,本文所披露的ADC构建体展示优异的稳定性、活性、效力或其他作用(在体内或体外测量)。在一些实施例中,本文所披露的ADC构建体当以单次剂量施用时展现体内治疗功效。在一些实施例中,相较于使用替代性接头和/或药物部分(例如替代性剪接调节剂)的ADC,本文所披露的ADC构建体出奇地稳定。

[1593] 本披露的ADC复合物可以将有效剂量的细胞毒性剂或细胞生长抑制剂选择性递送至癌细胞或肿瘤组织。已发现,所披露的ADC针对表达各个靶抗原(例如HER2、CD138、EPHA2、MSLN、FOLH1、CDH6、CEACAM5、CFC1B、ENPP3、FOLR1、HAVCR1、KIT、MET、MUC16、SLC39A6、SLC44A4、STEAP1)的细胞具有强效细胞毒性活性和/或细胞生长抑制活性。在一些实施例

中,ADC的细胞毒性活性和/或细胞生长抑制活性取决于细胞中的靶抗原表达。在一些实施例中,所披露的ADC在杀伤表达靶抗原的癌细胞方面特别有效,同时使脱靶杀伤最小化。在一些实施例中,所披露的ADC不会对不表达靶抗原的癌细胞展现细胞毒性作用和/或细胞生长抑制作用。

[1594] 示例性表达HER2的癌症包括但不限于乳腺癌、胃癌、膀胱癌、尿路上皮细胞癌、食道癌、肺癌(例如肺腺癌)、子宫癌(例如子宫浆液性子宫内膜癌)、涎腺导管癌、宫颈癌、子宫内膜癌和卵巢癌(English等人(2013)Mol Diagn Ther.[分子诊断与治疗]17:85-99)。

[1595] 示例性表达CD138的癌症包括但不限于胸内癌症(例如肺癌、间皮瘤)、皮肤癌(例如基底细胞癌、鳞状细胞癌)、头颈癌(例如喉癌、下咽癌、鼻咽癌)、乳腺癌、泌尿生殖癌(例如宫颈癌、卵巢癌、子宫内膜癌、前列腺癌、膀胱癌、尿路上皮癌)、血液恶性病(例如,骨髓瘤如多发性骨髓瘤、B细胞恶性病、霍奇金氏淋巴瘤)和甲状腺癌(Szatmári等人(2015)Dis Markers[疾病标志物]2015:796052)。

[1596] 示例性表达EPHA2的癌症包括乳腺癌、脑癌、卵巢癌、膀胱癌、胰腺癌、食道癌、肺癌、前列腺癌、黑素瘤、食道癌和胃癌(Tandon等人(2011)Expert Opin Ther Targets[治疗靶标专家意见]15(1):31-51)。

[1597] 在一些实施例中,ADC的裂解使剪接调节剂自抗体或抗原结合片段和接头释放。在一些实施例中,接头和/或剪接调节剂被设计成用于促进旁观者杀伤(邻近细胞杀伤)。在一些实施例中,接头和/或剪接调节剂被设计成在接头-药物部分和/或单独药物部分经细胞内化并扩散至邻近细胞之后经由裂解而促进旁观者杀伤。在一些实施例中,接头促进细胞内化。在一些实施例中,接头被设计成使细胞外环境中的裂解最小化且由此降低针对脱靶组织(例如非癌组织)的毒性,同时保持ADC结合至靶标组织以及对以下癌组织的旁观者杀伤,该癌组织不表达由ADC中的抗体或抗原结合片段靶向的抗原但包围表达该抗原的靶标癌组织。在一些实施例中,由ADC裂解产生的药物部分或药物部分的分解代谢物被设计成促进被靶细胞或邻近细胞摄取(即,细胞可渗透的)。此类药物部分和分解代谢物在本文中可称为“旁观者活跃(bystander active)”,而细胞渗透性降低的药物部分或分解代谢物可以称为“旁观者不活跃(bystander inactive)”。

[1598] 在一些实施例中,所披露的ADC还展示旁观者杀伤活性,但展示较低的脱靶细胞毒性。不受理论束缚,在ADC向实体瘤中的穿透受到限制和/或肿瘤细胞中的靶抗原表达呈现异质性时,ADC的旁观者杀伤活性可为特别有益的。在一些实施例中,相对于用包含不可裂解接头的ADC进行的可比治疗,包含可裂解接头的ADC对旁观者杀伤特别有效和/或展示出改善的旁观者杀伤活性。在一些实施例中,本文所披露的ADC相对于单独药物部分展现出改善的溶解度和靶细胞渗透性。在一些实施例中,本文所披露的ADC相对于单独药物部分展现出改善的细胞毒性。在一些实施例中,本文所披露的ADC使用当作为单独药物评价时展现较低细胞毒性的药物部分,但其又意外地优于包含当作为单独药物评价时具有较高细胞毒性的其他药物部分的ADC。在一些实施例中,相对于用包含不可裂解接头的ADC进行的可比治疗,剪接调节剂的裂解和释放使ADC的细胞毒性得以改善。在其他实施例中,剪接调节剂的裂解和释放并不是ADC具有所需生物活性所需的。在一些实施例中,包含具有增加的间隔子长度的不可裂解接头的ADC(例如ADL12)相对于用包含可裂解接头的ADC(例如ADL1、ADL5)进行的可比治疗提供了相同或相似的细胞毒性,并且相对于用包含较短不可裂解接头的

ADC进行的可比治疗提供了出奇优异的细胞毒性。在一些实施例中,包含具有增加的间隔子长度但不具有羰基基团的不可裂解接头的ADC(例如ADL12)相对于用包含可裂解接头的ADC(例如ADL1、ADL5)进行的可比治疗提供了相同或相似的细胞毒性,并且相对于用包含具有相同或相似间隔子长度且具有羰基基团的不可裂解接头的ADC(例如ADL10)进行的可比治疗提供了出奇优异的细胞毒性。在一些实施例中,自不可裂解MC接头(例如ADL12)移除羰基基团可导致细胞毒性相对于用包含未修饰的不可裂解MC接头的ADC(例如ADL10)进行的可比治疗增加超过50倍、超过75倍、超过100倍、超过150倍或超过200倍。在一些实施例中,自不可裂解MC接头(例如ADL12)移除羰基基团和增加间隔子长度(例如添加至少一个间隔子单元)可导致细胞毒性相对于用包含未修饰的不可裂解MC接头的ADC(例如ADL10)进行的可比治疗增加超过50倍、超过75倍、超过100倍、超过150倍或超过200倍。

[1599] 本文提供ADC复合物,其包含靶向肿瘤细胞的抗体或其抗原结合片段(Ab)、剪接调节剂药物部分(D)以及将Ab共价连接至D的接头部分(L)。在某些方面中,该抗体或抗原结合片段能够以高特异性和高亲和力结合至肿瘤相关抗原(例如HER2、CD138、EPHA2、MSLN、FOLH1、CDH6、CEACAM5、CFC1B、ENPP3、FOLR1、HAVCR1、KIT、MET、MUC16、SLC39A6、SLC44A4、STEAP1)。在某些实施例中,该抗体或抗原结合片段在结合时内化至靶细胞中,例如内化至该细胞中的降解隔室中。在不同实施例中,可以使用在结合至靶细胞时内化、经历降解、并释放剪接调节剂药物部分以杀伤癌细胞的ADC。剪接调节剂药物部分可通过酶促作用、水解、氧化或任何其他机制从该ADC中的抗体和/或接头部分释放。

[1600] 示例性ADC具有式(I):

[1601] $Ab-(L-D)_p$ (I)

[1602] 其中Ab=抗体或抗原结合片段,L=接头部分,D=剪接调节剂药物部分,且p=剪接调节剂药物部分的数量/抗体或抗原结合片段。

[1603] 在某些优选实施例中,用于所述ADC和组合物中的药物靶向部分是抗体或抗原结合片段。本文还提供并描述了用于所述ADC和组合物中的其他示例性药物靶向部分。在一些实施例中,药物靶向部分可以为多种细胞结合剂和非抗体支架中的任一种。在一些实施例中,该药物靶向部分是细胞结合剂。如本文所使用,术语“细胞结合剂”是指能够结合至动物(例如人)细胞并递送药物部分(例如,如本文所披露的剪接调节剂药物部分)的任何试剂。该术语涵盖本文所披露的示例性抗体和抗原结合片段(例如,单克隆抗体及其片段,如Fab和scFV)。该术语进一步涵盖示例性细胞结合剂,如DARPin、duobody、双环肽、奈米抗体、centyrin、MSH(促黑素细胞激素)、受体-Fc融合分子、T细胞受体结构、类固醇激素(如雄激素和雌激素)、生长因子、集落刺激因子(如EGF)、以及其他非抗体支架。在不同实施例中,非抗体支架可以大致分为二个结构种类,即结构域大小确定(domain-sized)的化合物(约6-20kDa)和限制性肽(约2-4kDa)。示例性结构域大小确定的支架包括但不限于affibody、affilin、anticalin、atrimer、DARPin、FN3支架(例如adnectin和centyrin)、fynomer、库尼茨(Kunitz)结构域、pronectin、O-body和受体-Fc融合蛋白,而示例性限制性肽包括avimer、双环肽和Cys结(Cys-knot)。在一些实施例中,用于所述ADC和组合物中的药物靶向部分选自affibody、affilin、anticalin、atrimer、DARPin、FN3支架(如adnectin或centyrin)、fynomer、库尼茨结构域、pronectin、O-body、avimer、双环肽和Cys结。在一些实施例中,用于所述ADC和组合物中的药物靶向部分是受体-Fc融合蛋白,例如HER2-Fc嵌合融

合蛋白。非抗体支架评述于例如Vazquez-Lombardi等人(2015)Drug Dis Today[今日药物发现]20(10):1271-83中。

[1604] 抗体

[1605] 式(I)中的抗体或抗原结合片段(Ab)在其范围内包括特异性结合至癌细胞上的靶抗原的任何抗体或抗原结合片段。该抗体或抗原结合片段可以结合至靶抗原,其中解离常数(K_D)≤1mM、≤100nM或≤10nM、或其间任何量,如通过例如BIAcore®测定所测量的。在某些实施例中,K_D是1pM至500pM。在一些实施例中,K_D是在500pM至1μM、1μM至100nM或100mM至10nM之间。

[1606] 在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段是包含两条重链和两条轻链的四链抗体(也称为免疫球蛋白或者全长或完整抗体)。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段是双链半抗体(一条轻链和一条重链)、或免疫球蛋白的抗原结合片段。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段是免疫球蛋白中保持结合靶标癌症抗原的能力和/或提供免疫球蛋白的功能的抗原结合片段。

[1607] 在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段是抗体或其抗原结合片段。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段是内化性抗体或其内化性抗原结合片段。在一些实施例中,该内化性抗体或其内化性抗原结合片段结合至细胞表面上表达的靶标癌症抗原并在结合后进入细胞。在一些实施例中,在ADC进入表达靶标癌症抗原的细胞并存在于该细胞中之后(即,在ADC内化之后),ADC中的剪接调节剂药物部分例如通过裂解、通过降解抗体或抗原结合片段、或通过任何其他合适的释放机制从该ADC中的抗体或抗原结合片段释放。

[1608] 表2-4列出了本披露的示例性抗体的氨基酸序列。

[1609] 表1.抗体

[1610]

mAb	类型	靶标
曲妥珠单抗（AB185）	人源化	HER2/NEU
B-B4（AB205）	鼠	CD138（多配体聚糖-1）
1C1（AB206）	人源化	EPHA2

[1611] 表2.mAb可变区的氨基酸序列

[1612]

mAb	IgG 链	SEQ ID NO	氨基酸序列
曲妥珠单抗（AB185）	重链	19	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF NIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPT NGYTRYADSVKGRFTISADTSKNTAYL QMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMD YWGQGTLVTVSS
曲妥珠单抗（AB185）	轻链	20	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQ DVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFL YSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPE DFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKR T
B-B4（AB205）	重链	21	QVQLQQSGSELMMPGASVKISCKATGY TFSNYWIQRPGHGLEWIGEILPGTGRT IYNEKFKGKATFTADISSNTVQMQLSS LTSEDSAVYYCARRDYYGNFYYAMDYW GQGTSVTVSS
B-B4（AB205）	轻链	22	DIQMTQSTSSLSASLGDRVTISCSASQ GINNYLNWYQQKPDGTVELLIYYTSTL QSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEPE DIGTYYCQQYSKLPRTFGGGTKLEIK
1C1（AB206）	重链	23	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF TFSHYMMAWVRQAPGKGLEWVSRIGPS GGPTHYADSVKGRFTISRDNSKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCAGYDSGYDYVAV AGPAE-YFQHWGQGTLVTVSS
1C1（AB206）	轻链	24	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQ SISTWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASNL HTGVPSRFSGSGSGTEFSLTISGLQPD DFATYYCQQYNSYS-RTFGQGTKVEIK

[1613] 表3.mAb CDR的氨基酸序列

[1614]

mAb	IgG 链	SEQ ID NO	氨基酸序列
曲妥珠单抗（AB185）	HCDR1	1	GFNIKDTYIH
曲妥珠单抗（AB185）	HCDR2	2	RIYPTNGYTRYADSVKG
曲妥珠单抗（AB185）	HCDR3	3	WGGDGFYAMDV
曲妥珠单抗（AB185）	LCDR1	4	RASQDVNTAVAW
曲妥珠单抗（AB185）	LCDR2	5	SASFLES
曲妥珠单抗（AB185）	LCDR3	6	QQHYTTPPT
B-B4（AB205）	HCDR1	7	NYWIE
B-B4（AB205）	HCDR2	8	ILPGTGRTIYNEKFKGKA
B-B4（AB205）	HCDR3	9	RDYYGNFYYAMDY
B-B4（AB205）	LCDR1	10	ASQGINNYLN
B-B4（AB205）	LCDR2	11	TSTLQS
B-B4（AB205）	LCDR3	12	QQYSKLPRT
1C1（AB206）	HCDR1	13	HYMMA
1C1（AB206）	HCDR2	14	RIGPSGGPTHYADSVKG
1C1（AB206）	HCDR3	15	YDSGYDYVAVAGPAE-YFQH
1C1（AB206）	LCDR1	16	RASWSISTWLA
1C1（AB206）	LCDR2	17	KASNLHT

[1615]

1C1（AB206）	LCDR3	18	QQYNSYS-RT

[1616] 表4.全长mAb Ig链的氨基酸序列

[1617]

mAb	IgG 链	类别	SEQ ID NO	氨基酸序列
曲妥珠单抗（AB185）	重链	IgG1	25	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWV ARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISA DTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC SRWGGDGFYAMDYWGQGTLVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPPKSCDKTHTCPPCPAPELLG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
曲妥珠单抗（AB185）	轻链	κ	26	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCR ASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLI YSASFLYSGVPSRFSGSRSGTDFT LTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPP TFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
B-B4（AB205）	重链	IgG2a	27	QVQLQQSGSELMMPGASVKISCKA TGYTFSNYWIQRPGHGLEWIGEIL PGTGRTIYNEKFKGKATFTADISS NTVQMQLSSLTSEDSAVYYCARRD YYGNFYYAMDYWGQGTSVTVSSAK TTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLG CLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGV HTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSST WPSETVTCNVAHPASSTKVDKKIV PRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPP KPKDVLTITLTPKVTCVVVDISKD DPEVQFSWFVDDVEVHTAQTQPRE EQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGK EFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTKG RPKAPQVYTIPPPKEQMAKDKVSL

[1618]

				TCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAE NYKNTQPIMDTDGSYFVYSKLNVQ KSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHT EKSLSHSPG
B-B4 （AB205）	轻链	κ	28	DIQMTQSTSSLSASLGDRVTISCS ASQGINNYLNWYQQKPDGTVELLI YYTSTLQSGVPSRFSGSGSGTDYS LTISNLEPEDIGTYYCQQYSKLPR TFGGGTKLEIKRADAAPTVSIFPP SSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDI NVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDS KDSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSY TCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC
1C1 （AB206）	重链	IgG1	29	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFTFSHYMMAWVRQAPGKGLEWV SRIGPSGGPTHYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC AGYDSGYDYVAVAGPAEYFQHWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPC PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP G
1C1 （AB206）	轻链	κ	30	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCR ASQSISTWLAWYQQKPGKAPKLLI YKASNLHTGVPSRFSGSGSGTEFS LTISGLQPDDFATYYCQQYNSYSR TFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[1619] 表5.示例性靶抗原氨基酸序列

[1620]

抗原	SEQ ID NO	氨基酸序列
HER2/NEU	31	MELAALCRWGLLLALLPPGAASTQVCTGTDMKLRLPASPETHLDM LRHLYQGCQVVQGNLELTYLPTNASLSFLQDIQEVQGYVLIAHNQ VRQVPLQRLRIVRGTQLFEDNYALAVLDNGDPLNNTTPVTGASPG GLRELQLRSLTEILKGGVLIQRNPQLCYQDTILWKDIFHKNNQLA LTLIDTNRSRACHPCSPMCKGSRCWGESSEDCQSLTRTVCAGGCA

[1621]

		RCKGPLPTDCCHEQCAAGCTGPKHSDCLACLHFNHSGICELHCPA LVTYNTDTFESMPNPEGRYTFGASCVTACPYNYLSTDVGSCTLVC PLHNQEVTAEDGTQRCEKCSKPCARVCYGLGMEHLREVRAVTSAN IQEFAGCKKIFGSLAFLPESFDGDPASNTAPLQPEQLQVFETLEE ITGYLYISAWPDSLPDLSVFQNLQVIRGRILHNGAYSLTLQGLGI SWLGLRSLRELGSGLALIHHNTHLCFVHTVPWDQLFRNPHQALLH TANRPEDECVGEGLACHQLCARGHCWGPGPTQCVNCSQFLRGQEC VEECRVLQGLPREYVNARHCLPCHPECQPQNGSVTCFGPEADQCV ACAHYKDPPFCVARCPSGVKPDLSYMPIWKFPDEEGACQPCPINC THSCVDLDDKGCPAEQRASPLTSIISAVVGILLVVVLGVVFGILI KRRQQKIRKYTMRRLLQETELVEPLTPSGAMPNQAQMRILKETEL RKVKVLGSGAFGTVYKGIWIPDGENVKIPVAIKVLRENTSPKANK EILDEAYVMAGVGSPYVSRLLGICLTSTVQLVTQLMPYGCLLDHV RENRGRLGSQDLLNWCMQIAKGMSYLEDVRLVHRDLAARNVLVKS PNHVKITDFGLARLLDIDETEYHADGGKVPIKWMALESILRRRFT HQSDVWSYGVTVWELMTFGAKPYDGIPAREIPDLLEKGERLPQPP ICTIDVYMIMVKCWMIDSECRPRFRELVSEFSRMARDPQRFVVIQ NEDLGPASPLDSTFYRSLLEDDDMGDLVDAEEYLVPQQGFFCPDP APGAGGMVHHRHRSSSTRSGGGDLTLGLEPSEEEAPRSPLAPSEG AGSDVFDGDLGMGAAKGLQSLPTHDPSPLQRYSEDPTVPLPSETD GYVAPLTCSPQPEYVNQPDVRPQPPSPREGPLPAARPAGATLERP KTLSPGKNGVVKDVFAFGGAVENPEYLTPQGGAAPQPHPPPAFSP AFDNLYYWDQDPPERGAPPSTFKGTPTAENPEYLGLDVPV
CD138	32	MRRAALWLWLCALALSLQPALPQIVATNLPPEDQDGSGDDSDNFS GSGAGALQDITLSQQTPSTWKDTQLLTAIPTSPEPTGLEATAAST STLPAGEGPKEGEAVVLPEVEPGLTAREQEATPRPRETTQLPTTH LASTTTATTAQEPATSHPHRDMQPGHHETSTPAGPSQADLHTPHT EDGGPSATERAAEDGASSQLPAAEGSGEQDFTFETSGENTAVVAV EPDRRNQSPVDQGATGASQGLLDRKEVLGGVIAGGLVGLIFAVCL VGFMLYRMKKKDEGSYSLEEPKQANGGAYQKPTKQEEFYA
EPHA2	33	MELQAARACFALLWGCALAAAAAAQGKEVVLLDFAAAGGELGWLT HPYGKGWDLMQNIMNDMPIYMYSVCNVMSGDQDNWLRTNWVYRGE AERIFIELKFTVRDCNSFPGGASSCKETFNLYYAESDLDYGTNFQ KRLFTKIDTIAPDEITVSSDFEARHVKLNVEERSVGPLTRKGFYL AFQDIGACVALLSVRVYYKKCPELLQGLAHFPETIAGSDAPSLAT VAGTCVDHAVVPPGGEEPRMHCAVDGEWLVPIGQCLCQAGYEKVE DACQACSPGFFKFEASESPCLECPEHTLPSPEGATSCECEEGFFR APQDPASMPCTRPPSAPHYLTAVGMGAKVELRWTPPQDSGGREDI VYSVTCEQCWPESGECGPCEASVRYSEPPHGLTRTSVTVSDLEPH MNYTFTVEARNGVSGLVTSRSFRTASVSINQTEPPKVRLEGRSTT SLSVSWSIPPPQQSRVWKYEVTYRKKGDSNSYNVRRTEGFSVTLD DLAPDTTYLVQVQALTQEGQGAGSKVHEFQTLSPEGSGNLAVIGG VAVGVVLLLVLAGVGFFIHRRRKNQRARQSPEDVYFSKSEQLKPL KTYVDPHTYEDPNQAVLKFTTEIHPSCVTRQKVIGAGEFGEVYKG MLKTSSGKKEVPVAIKTLKAGYTEKQRVDFLGEAGIMGQFSHHNI IRLEGVISKYKPMMIITEYMENGALDKFLREKDGEFSVLQLVGML RGIAAGMKYLANMNYVHRDLAARNILVNSNLVCKVSDFGLSRVLE DDPEATYTTSGGKIPIRWTAPEAISYRKFTSASDVWSFGIVMWEV MTYGERPYWELSNHEVMKAINDGFRLPTPMDCPSAIYQLMMQCWQ QERARRPKFADIVSILDKLIRAPDSLKTLADFDPRVSIRLPSTSG SEGVPFRTVSEWLESIKMQQYTEHFMAAGYTAIEKVVQMTNDDIK RIGVRLPGHQKRIAYSLLGLKDQVNTVGIPI
MSLN	43	MALPTARPLLGSCGTPALGSLLFLLFSLGWVQPSRTLAGETGQEA APLDGVLANPPNISSLSPRQLLGFPCAEVSGLSTERVRELAVALA QKNVKLSTEQLRCLAHRLSEPPEDLDALPLDLLLFLNPDAFSGPQ ACTRFFSRITKANVDLLPRGAPERQRLLPAALACWGVRGSLLSEA

[1622]

		DVRALGGLACDLPGRFVAESAEVLLPRLVSCPGPLDQDQQEAARA ALQGGGPPYGPPSTWSVSTMDALRGLLPVLGQPIIRSIPQGIVAA WRQRSSRDPSWRQPERTILRPRFRREVEKTACPSGKKAREIDESL IFYKKWELEACVDAALLATQMDRVNAIPFTYEQLDVLKHKLDELY PQGYPESVIQHLGYLFLKMSPEDIRKWNVTSLETLKALLEVNKGH EMSPQAPRRPLPQVATLIDRFVKGRGQLDKDTLDTLTAFYPGYLC SLSPEELSSVPPSSIWAVRPQDLDTCDPRQLDVLYPKARLAFQNM NGSEYFVKIQSFLGGAPTEDLKALSQQNVSMDLATFMKLRTDAVL PLTVAEVQKLLGPHVEGLKAEERHRPVRDWILRQRQDDLDTLGLG LQGGIPNGYLVLDLSMQEALSGTPCLLGPGPVLTVLALLLASTLA
FOLH1	44	MWNLLHETDSAVATARRPRWLCAGALVLAGGFFLLGFLFGWFIKS SNEATNITPKHNMKAFLDELKAENIKKFLYNFTQIPHLAGTEQNF QLAKQIQSQWKEFGLDSVELAHYDVLLSYPNKTHPNYISIINEDG NEIFNTSLFEPPPPGYENVSDIVPPFSAFSPQGMPEGDLVYVNYA RTEDFFKLERDMKINCSGKIVIARYGKVFRGNKVKNAQLAGAKGV ILYSDPADYFAPGVKSYPDGWNLPGGGVQRGNILNLNGAGDPLTP GYPANEYAYRRGIAEAVGLPSIPVHPIGYYDAQKLLEKMGGSAPP DSSWRGSLKVPYNVGPGFTGNFSTQKVKMHIHSTNEVTRIYNVIG TLRGAVEPDRYVILGGHRDSWVFGGIDPQSGAAVVHEIVRSFGTL KKEGWRPRRTILFASWDAEEFGLLGSTEWAEENSRLLQERGVAYI NADSSIEGNYTLRVDCTPLMYSLVHNLTKELKSPDEGFEGKSLYE SWTKKSPSPEFSGMPRISKLGSGNDFEVFFQRLGIASGRARYTKN WETNKFSGYPLYHSVYETYELVEKFYDPMFKYHLTVAQVRGGMVF ELANSIVLPFDCRDYAVVLRKYADKIYSISMKHPQEMKTYSVSFD SLFSAVKNFTEIASKFSERLQDFDKSNPIVLRMMNDQLMFLERAF IDPLGLPDRPFYRHVIYAPSSHNKYAGESFPGIYDALFDIESKVD PSKAWGEVKRQIYVAAFTVQAAAETLSEVA
CDH6	45	MRTYRYFLLLFWVGQPYPTLSTPLSKRTSGFPAKKRALELSGNSK NELNRSKRSWMWNQFFLLEEYTGSDYQYVGKLHSDQDRGDGSLKY ILSGDGAGDLFIINENTGDIQATKRLDREEKPVYILRAQAINRRT GRPVEPESEFIIKIHDINDNEPIFTKEVYTATVPEMSDVGTFVVQ VTATDADDPTYGNSAKVVYSILQGQPYFSVESETGIIKTALLNMD RENREQYQVVIQAKDMGGQMGGLSGTTTVNITLTDVNDNPPRFPQ STYQFKTPESSPPGTPIGRIKASDADVGENAEIEYSITDGEGLDM FDVITDQETQEGIITVKKLLDFEKKKVYTLKVEASNPYVEPRFLY LGPFKDSATVRIVVEDVDEPPVFSKLAYILQIREDAQINTTIGSV TAQDPDAARNPVKYSVDRHTDMDRIFNIDSGNGSIFTSKLLDRET LLWHNITVIATEINNPKQSSRVPLYIKVLDVNDNAPEFAEFYETF VCEKAKADQLIQTLHAVDKDDPYSGHQFSFSLAPEAASGSNFTIQ DNKDNTAGILTRKNGYNRHEMSTYLLPVVISDNDYPVQSSTGTVT VRVCACDHHGNMQSCHAEALIHPTGLSTGALVAILLCIVILLVTV VLFAALRRQRKKEPLIISKEDIRDNIVSYNDEGGGEEDTQAFDIG TLRNPEAIEDNKLRRDIVPEALFLPRRTPTARDNTDVRDFINQRL KENDTDPTAPPYDSLATYAYEGTGSVADSLSSLESVTTDADQDYD YLSDWGPRFKKLADMYGGVDSDKDS
CEACAM5	46	MESPSAPPHRWCIPWQRLLLTASLLTFWNPPTTAKLTIESTPFNV AEGKEVLLLVHNLPQHLFGYSWYKGERVDGNRQIIGYVIGTQQAT PGPAYSGREIIYPNASLLIQNIIQNDTGFYTLHVIKSDLVNEEAT GQFRVYPELPKPSISSNNSKPVEDKDAVAFTCEPETQDATYLWWV NNQSLPVSPRLQLSNGNRTLTLFNVTRNDTASYKCETQNPVSARR SDSVILNVLYGPDAPTISPLNTSYRSGENLNLSCHAASNPPAQYS WFVNGTFQQSTQELFIPNITVNNSGSYTCQAHNSDTGLNRTTVTT ITVYAEPPKPFITSNNSNPVEDEDAVALTCEPEIQNTTYLWWVNN QSLPVSPRLQLSNDNRTLTLLSVTRNDVGPYECGIQNKLSVDHSD PVILNVLYGPDDPTISPSYTYYRPGVNLSLSCHAASNPPAQYSWL IDGNIQQHTQELFISNITEKNSGLYTCQANNSASGHSRTTVKTIT

[1623]

		VSAELPKPSISSNNSKPVEDKDAVAFTCEPEAQNTTYLWWVNGQS LPVSPRLQLSNGNRTLTLFNVTRNDARAYVCGIQNSVSANRSDPV TLDVLYGPDTPIISPPDSSYLSGANLNLSCHSASNPSPQYSWRIN GIPQQHTQVLFIAKITPNNNGTYACFVSNLATGRNNSIVKSITVS ASGTSPGLSAGATVGIMIGVLVGVALI
CFC1B	47	MTWRHHVRLLFTVSLALQIINLGNSYQREKHNGGREEVTKVATQK HRQSPLNWTSSHFGEVTGSAEGWGPEEPLPYSWAFGEGASARPRC CRNGGTCVLGSFCVCPAHFTGRYCEHDQRRSECGALEHGAWTLRA CHLCRCIFGALHCLPLQTPDRCDPKDFLASHAHGPSAGGAPSLLL LLPCALLHRLLRPDAPAHPRSLVPSVLQRERRPCGRPGLGHRL
ENPP3	48	MESTLTLATEQPVKKNTLKKYKIACIVLLALLVIMSLGLGLGLGL RKLEKQGSCRKKCFDASFRGLENCRCDVACKDRGDCCWDFEDTCV ESTRIWMCNKFRCGETRLEASLCSCSDDCLQRKDCCADYKSVCQG ETSWLEENCDTAQQSQCPEGFDLPPVILFSMDGFRAEYLYTWDTL MPNINKLKTCGIHSKYMRAMYPTKTFPNHYTIVTGLYPESHGIID NNMYDVNLNKNFSLSSKEQNNPAWWHGQPMWLTAMYQGLKAATYF WPGSEVAINGSFPSIYMPYNGSVPFEERISTLLKWLDLPKAERPR FYTMYFEEPDSSGHAGGPVSARVIKALQVVDHAFGMLMEGLKQRN LHNCVNIILLADHGMDQTYCNKMEYMTDYFPRINFFYMYEGPAPR IRAHNIPHDFFSFNSEEIVRNLSCRKPDQHFKPYLTPDLPKRLHY AKNVRIDKVHLFVDQQWLAVRSKSNTNCGGGNHGYNNEFRSMEAI FLAHGPSFKEKTEVEPFENIEVYNLMCDLLRIQPAPNNGTHGSLN HLLKVPFYEPSHAEEVSKFSVCGFANPLPTESLDCFCPHLQNSTQ LEQVNQMLNLTQEEITATVKVNLPFGRPRVLQKNVDHCLLYHREY VSGFGKAMRMPMWSSYTVPQLGDTSPLPPTVPDCLRADVRVPPSE SQKCSFYLADKNITHGFLYPPASNRTSDSQYDALITSNLVPMYEE FRKMWDYFHSVLLIKHATERNGVNVVSGPIFDYNYDGHFDAPDEI TKHLANTDVPIPTHYFVVLTSCKNKSHTPENCPGWLDVLPFIIPH RPTNVESCPEGKPEALWVEERFTAHIARVRDVELLTGLDFYQDKV QPVSEILQLKTYLPTFETTI
FOLR1	49	MAQRMTTQLLLLLVWVAVVGEAQTRIAWARTELLNVCMNAKHHKE KPGPEDKLHEQCRPWRKNACCSTNTSQEAHKDVSYLYRFNWNHCG EMAPACKRHFIQDTCLYECSPNLGPWIQQVDQSWRKERVLNVPLC KEDCEQWWEDCRTSYTCKSNWHKGWNWTSGFNKCAVGAACQPFHF YFPTPTVLCNEIWTHSYKVSNYSRGSGRCIQMWFDPAQGNPNEEV ARFYAAAMSGAGPWAAWPFLLSLALMLLWLLS
HAVCR1	50	MHPQVVILSLILHLADSVAGSVKVGGEAGPSVTLPCHYSGAVTSM CWNRGSCSLFTCQNGIVWTNGTHVTYRKDTRYKLLGDLSRRDVSL TIENTAVSDSGVYCCRVEHRGWFNDMKITVSLEIVPPKVTTTPIV TTVPTVTTVRTSTTVPTTTTVPMTTVPTTTVPTTMSIPTTTTVLT TMTVSTTTSVPTTTSIPTTTSVPVTTTVSTFVPPMPLPRQNHEPV ATSPSSPQPAETHPTTLQGAIRREPTSSPLYSYTTDGNDTVTESS DGLWNNNQTQLFLEHSLLTANTTKGIYAGVCISVLVLLALLGVII AKKYFFKKEVQQLSVSFSSLQIKALQNAVEKEVQAEDNIYIENSL YATD
KIT	51	MRGARGAWDFLCVLLLLLRVQTGSSQPSVSPGEPSPPSIHPGKSD LIVRVGDEIRLLCTDPGFVKWTFEILDETNENKQNEWITEKAEAT NTGKYTCTNKHGLSNSIYVFVRDPAKLFLVDRSLYGKEDNDTLVR CPLTDPEVTNYSLKGCQGKPLPKDLRFIPDPKAGIMIKSVKRAYH RLCLHCSVDQEGKSVLSEKFILKVRPAFKAVPVVSVSKASYLLRE GEEFTVTCTIKDVSSSVYSTWKRENSQTKLQEKYNSWHHGDFNYE RQATLTISSARVNDSGVFMCYANNTFGSANVTTTLEVVDKGFINI FPMINTTVFVNDGENVDLIVEYEAFPKPEHQQWIYMNRTFTDKWE DYPKSENESNIRYVSELHLTRLKGTEGGTYTFLVSNSDVNAAIAF NVYVNTKPEILTYDRLVNGMLQCVAAGFPEPTIDWYFCPGTEQRC SASVLPVDVQTLNSSGPPFGKLVVQSSIDSSAFKHNGTVECKAYN

[1624]

		DVGKTSAYFNFAFKGNNKEQIHPHTLFTPLLIGFVIVAGMMCIIV MILTYKYLQKPMYEVQWKVVEEINGNNYVYIDPTQLPYDHKWEFP RNRLSFGKTLGAGAFGKVVEATAYGLIKSDAAMTVAVKMLKPSAH LTEREALMSELKVLSYLGNHMNIVNLLGACTIGGPTLVITEYCCY GDLLNFLRRKRDSFICSKQEDHAEAALYKNLLHSKESSCSDSTNE YMDMKPGVSYVVPTKADKRRSVRIGSYIERDVTPAIMEDDELALD LEDLLSFSYQVAKGMAFLASKNCIHRDLAARNILLTHGRITKICD FGLARDIKNDSNYVVKGNARLPVKWMAPESIFNCVYTFESDVWSY GIFLWELFSLGSSPYPGMPVDSKFYKMIKEGFRMLSPEHAPAEMY DIMKTCWDADPLKRPTFKQIVQLIEKQISESTNHIYSNLANCSPN RQKPVVDHSVRINSVGSTASSSQPLLVHDDV
MET	52	MKAPAVLAPGILVLLFTLVQRSNGECKEALAKSEMNVNMKYQLPN FTAETPIQNVILHEHHIFLGATNYIYVLNEEDLQKVAEYKTGPVL EHPDCFPCQDCSSKANLSGGVWKDNINMALVVDTYYDDQLISCGS VNRGTCQRHVFPHNHTADIQSEVHCIFSPQIEEPSQCPDCVVSAL GAKVLSSVKDRFINFFVGNTINSSYFPDHPLHSISVRRLKETKDG FMFLTDQSYIDVLPEFRDSYPIKYVHAFESNNFIYFLTVQRETLD AQTFHTRIIRFCSINSGLHSYMEMPLECILTEKRKKRSTKKEVFN ILQAAYVSKPGAQLARQIGASLNDDILFGVFAQSKPDSAEPMDRS AMCAFPIKYVNDFFNKIVNKNNVRCLQHFYGPNHEHCFNRTLLRN SSGCEARRDEYRTEFTTALQRVDLFMGQFSEVLLTSISTFIKGDL TIANLGTSEGRFMQVVVSRSGPSTPHVNFLLDSHPVSPEVIVEHT LNQNGYTLVITGKKITKIPLNGLGCRHFQSCSQCLSAPPFVQCGW CHDKCVRSEECLSGTWTQQICLPAIYKVFPNSAPLEGGTRLTICG WDFGFRRNNKFDLKKTRVLLGNESCTLTLSESTMNTLKCTVGPAM NKHFNMSIIISNGHGTTQYSTFSYVDPVITSISPKYGPMAGGTLL TLTGNYLNSGNSRHISIGGKTCTLKSVSNSILECYTPAQTISTEF AVKLKIDLANRETSIFSYREDPIVYEIHPTKSFISGGSTITGVGK NLNSVSVPRMVINVHEAGRNFTVACQHRSNSEIICCTTPSLQQLN LQLPLKTKAFFMLDGILSKYFDLIYVHNPVFKPFEKPVMISMGNE NVLEIKGNDIDPEAVKGEVLKVGNKSCENIHLHSEAVLCTVPNDL LKLNSELNIEWKQAISSTVLGKVIVQPDQNFTGLIAGVVSISTAL LLLLGFFLWLKKRKQIKDLGSELVRYDARVHTPHLDRLVSARSVS PTTEMVSNESVDYRATFPEDQFPNSSQNGSCRQVQYPLTDMSPIL TSGDSDISSPLLQNTVHIDLSALNPELVQAVQHVVIGPSSLIVHF NEVIGRGHFGCVYHGTLLDNDGKKIHCAVKSLNRITDIGEVSQFL TEGIIMKDFSHPNVLSLLGICLRSEGSPLVVLPYMKHGDLRNFIR NETHNPTVKDLIGFGLQVAKGMKYLASKKFVHRDLAARNCMLDEK FTVKVADFGLARDMYDKEYYSVHNKTGAKLPVKWMALESLQTQKF TTKSDVWSFGVLLWELMTRGAPPYPDVNTFDITVYLLQGRRLLQP EYCPDPLYEVMLKCWHPKAEMRPSFSELVSRISAIFSTFIGEHYV HVNATYVNVKCVAPYPSLLSSEDNADDEVDTRPASFWETS
MUC16	53	MLKPSGLPGSSSPTRSLMTGSRSTKATPEMDSGLTGATLSPKTST GAIVVTEHTLPFTSPDKTLASPTSSVVGRTTQSLGVMSSALPEST SRGMTHSEQRTSPSLSPQVNGTPSRNYPATSMVSGLSSPRTRTSS TEGNFTKEASTYTLTVETTSGPVTEKYTVPTETSTTEGDSTETPW DTRYIPVKITSPMKTFADSTASKENAPVSMTPAETTVTDSHTPGR TNPSFGTLYSSFLDLSPKGTPNSRGETSLELILSTTGYPFSSPEP GSAGHSRISTSAPLSSSASVLDNKISETSIFSGQSLTSPLSPGVP EARASTMPNSAIPFSMTLSNAETSAERVRSTISSLGTPSISTKQT AETILTFHAFAETMDIPSTHIAKTLASEWLGSPGTLGGTSTSALT TTSPSTTLVSEETNTHHSTSGKETEGTLNTSMTPLETSAPGEESE MTATLVPTLGFTTLDSKIRSPSQVSSSHPTRELRTTGSTSGRQSS STAAHGSSDILRATTSSTSKASSWTSESTAQQFSEPQHTQWVETS PSMKTERPPASTSVAAPITTSVPSVVSGFTTLKTSSTKGIWLEET SADTLIGESTAGPTTHQFAVPTGISMTGGSSTRGSQGTTHLLTRA

[1625]

		TASSETSADLTLATNGVPVSVSPAVSKTAAGSSPPGGTKPSYTMV SSVIPETSSLQSSAFREGTSLGLTPLNTRHPFSSPEPDSAGHTKI STSIPLLSSASVLEDKVSATSTFSHHKATSSITTGTPEISTKTKP SSAVLSSMTLSNAATSPERVRNATSPLTHPSPSGEETAGSVLTLS TSAETTDSPNIHPTGTLTSESSESPSTLSLPSVSGVKTTFSSSTP STHLFTSGEETEETSNPSVSQPETSVSRVRTTLASTSVPTPVFPT MDTWPTRSAQFSSSHLVSELRATSSTSVTNSTGSALPKISHLTGT ATMSQTNRDTFNDSAAPQSTTWPETSPRFKTGLPSATTTVSTSAT SLSATVMVSKFTSPATSSMEATSIREPSTTILTTETTNGPGSMAV ASTNIPIGKGYITEGRLDTSHLPIGTTASSETSMDFTMAKESVSM SVSPSQSMDAAGSSTPGRTSQFVDTFSDDVYHLTSREITIPRDGT SSALTPQMTATHPPSPDPGSARSTWLGILSSSPSSPTPKVTMSST FSTQRVTTSMIMDTVETSRWNMPNLPSTTSLTPSNIPTSGAIGKS TLVPLDTPSPATSLEASEGGLPTLSTYPESTNTPSIHLGAHASSE SPSTIKLTMASVVKPGSYTPLTFPSIETHIHVSTARMAYSSGSSP EMTAPGETNTGSTWDPTTYITTTDPKDTSSAQVSTPHSVRTLRTT ENHPKTESATPAAYSGSPKISSSPNLTSPATKAWTITDTTEHSTQ LHYTKLAEKSSGFETQSAPGPVSVVIPTSPTIGSSTLELTSDVPG EPLVLAPSEQTTITLPMATWLSTSLTEEMASTDLDISSPSSPMST FAIFPPMSTPSHELSKSEADTSAIRNTDSTTLDQHLGIRSLGRTG DLTTVPITPLTTTWTSVIEHSTQAQDTLSATMSPTHVTQSLKDQT SIPASASPSHLTEVYPELGTQGRSSSEATTFWKPSTDTLSREIET GPTNIQSTPPMDNTTTGSSSSGVTLGIAHLPIGTSSPAETSTNMA LERRSSTATVSMAGTMGLLVTSAPGRSISQSLGRVSSVLSESTTE GVTDSSKGSSPRLNTQGNTALSSSLEPSYAEGSQMSTSIPLTSSP TTPDVEFIGGSTFWTKEVTTVMTSDISKSSARTESSSATLMSTAL GSTENTGKEKLRTASMDLPSPTPSMEVTPWISLTLSNAPNTTDSL DLSHGVHTSSAGTLATDRSLNTGVTRASRLENGSDTSSKSLSMGN STHTSMTYTEKSEVSSSIHPRPETSAPGAETTLTSTPGNRAISLT LPFSSIPVEEVISTGITSGPDINSAPMTHSPITPPTIVWTSTGTI EQSTQPLHAVSSEKVSVQTQSTPYVNSVAVSASPTHENSVSSGSS TSSPYSSASLESLDSTISRRNAITSWLWDLTTSLPTTTWPSTSLS EALSSGHSGVSNPSSTTTEFPLFSAASTSAAKQRNPETETHGPQN TAASTLNTDASSVTGLSETPVGASISSEVPLPMAITSRSDVSGLT SESTANPSLGTASSAGTKLTRTISLPTSESLVSFRMNKDPWTVSI PLGSHPTTNTETSIPVNSAGPPGLSTVASDVIDTPSDGAESIPTV SFSPSPDTEVTTISHFPEKTTHSFRTISSLTHELTSRVTPIPGDW MSSAMSTKPTGASPSITLGERRTITSAAPTTSPIVLTASFTETST VSLDNETTVKTSDILDARKTNELPSDSSSSSDLINTSIASSTMDV TKTASISPTSISGMTASSSPSLFSSDRPQVPTSTTETNTATSPSV SSNTYSLDGGSNVGGTPSTLPPFTITHPVETSSALLAWSRPVRTF STMVSTDTASGENPTSSNSVVTSVPAPGTWTSVGSTTDLPAMGFL KTSPAGEAHSLLASTIEPATAFTPHLSAAVVTGSSATSEASLLTT SESKAIHSSPQTPTTPTSGANWETSATPESLLVVTETSDTTLTSK ILVTDTILFSTVSTPPSKFPSTGTLSGASFPTLLPDTPAIPLTAT EPTSSLATSFDSTPLVTIASDSLGTVPETTLTMSETSNGDALVLK TVSNPDRSIPGITIQGVTESPLHPSSTSPSKIVAPRNTTYEGSIT VALSTLPAGTTGSLVFSQSSENSETTALVDSSAGLERASVMPLTT GSQGMASSGGIRSGSTHSTGTKTFSSLPLTMNPGEVTAMSEITTN RLTATQSTAPKGIPVKPTSAESGLLTPVSASSSPSKAFASLTTAP PTWGIPQSTLTFEFSEVPSLDTKSASLPTPGQSLNTIPDSDASTA SSSLSKSPEKNPRARMMTSTKAISASSFQSTGFTETPEGSASPSM AGHEPRVPTSGTGDPRYASESMSYPDPSKASSAMTSTSLASKLTT LFSTGQAARSGSSSSPISLSTEKETSFLSPTASTSRKTSLFLGPS MARQPNILVHLQTSALTLSPTSTLNMSQEEPPELTSSQTIAEEEG TTAETQTLTFTPSETPTSLLPVSSPTEPTARRKSSPETWASSISV PAKTSLVETTDGTLVTTIKMSSQAAQGNSTWPAPAEETGSSPAGT

[1626]

		SPGSPEMSTTLKIMSSKEPSISPEIRSTVRNSPWKTPETTVPMET TVEPVTLQSTALGSGSTSISHLPTGTTSPTKSPTENMLATERVSL SPSPPEAWTNLYSGTPGGTRQSLATMSSVSLESPTARSITGTGQQ SSPELVSKTTGMEFSMWHGSTGGTTGDTHVSLSTSSNILEDPVTS PNSVSSLTDKSKHKTETWVSTTAIPSTVLNNKIMAAEQQTSRSVD EAYSSTSSWSDQTSGSDITLGASPDVTNTLYITSTAQTTSLVSLP SGDQGITSLTNPSGGKTSSASSVTSPSIGLETLRANVSAVKSDIA PTAGHLSQTSSPAEVSILDVTTAPTPGISTTITTMGTNSISTTTP NPEVGMSTMDSTPATERRTTSTEHPSTWSSTAASDSWTVTDMTSN LKVARSPGTISTMHTTSFLASSTELDSMSTPHGRITVIGTSLVTP SSDASAVKTETSTSERTLSPSDTTASTPISTFSRVQRMSISVPDI LSTSWTPSSTEAEDVPVSMVSTDHASTKTDPNTPLSTFLFDSLST LDWDTGRSLSSATATTSAPQGATTPQELTLETMISPATSQLPFSI GHITSAVTPAAMARSSGVTFSRPDPTSKKAEQTSTQLPTTTSAHP GQVPRSAATTLDVIPHTAKTPDATFQRQGQTALTTEARATSDSWN EKEKSTPSAPWITEMMNSVSEDTIKEVTSSSSVLRTLNTLDINLE SGTTSSPSWKSSPYERIAPSESTTDKEAIHPSTNTVETTGWVTSS EHASHSTIPAHSASSKLTSPVVTTSTREQAIVSMSTTTWPESTRA RTEPNSFLTIELRDVSPYMDTSSTTQTSIISSPGSTAITKGPRTE ITSSKRISSSFLAQSMRSSDSPSEAITRLSNFPAMTESGGMILAM QTSPPGATSLSAPTLDTSATASWTGTPLATTQRFTYSEKTTLFSK GPEDTSQPSPPSVEETSSSSSLVPIHATTSPSNILLTSQGHSPSS TPPVTSVFLSETSGLGKTTDMSRISLEPGTSLPPNLSSTAGEALS TYEASRDTKAIHHSADTAVTNMEATSSEYSPIPGHTKPSKATSPL VTSHIMGDITSSTSVFGSSETTEIETVSSVNQGLQERSTSQVASS ATETSTVITHVSSGDATTHVTKTQATFSSGTSISSPHQFITSTNT FTDVSTNPSTSLIMTESSGVTITTQTGPTGAATQGPYLLDTSTMP YLTETPLAVTPDFMQSEKTTLISKGPKDVSWTSPPSVAETSYPSS LTPFLVTTIPPATSTLQGQHTSSPVSATSVLTSGLVKTTDMLNTS MEPVTNSPQNLNNPSNEILATLAATTDIETIHPSINKAVTNMGTA SSAHVLHSTLPVSSEPSTATSPMVPASSMGDALASISIPGSETTD IEGEPTSSLTAGRKENSTLQEMNSTTESNIILSNVSVGAITEATK MEVPSFDATFIPTPAQSTKFPDIFSVASSRLSNSPPMTISTHMTT TQTGSSGATSKIPLALDTSTLETSAGTPSVVTEGFAHSKITTAMN NDVKDVSQTNPPFQDEASSPSSQAPVLVTTLPSSVAFTPQWHSTS SPVSMSSVLTSSLVKTAGKVDTSLETVTSSPQSMSNTLDDISVTS AATTDIETTHPSINTVVTNVGTTGSAFESHSTVSAYPEPSKVTSP NVTTSTMEDTTISRSIPKSSKTTRTETETTSSLTPKLRETSISQE ITSSTETSTVPYKELTGATTEVSRTDVTSSSSTSFPGPDQSTVSL DISTETNTRLSTSPIMTESAEITITTQTGPHGATSQDTFTMDPSN TTPQAGIHSAMTHGFSQLDVTTLMSRIPQDVSWTSPPSVDKTSSP SSFLSSPAMTTPSLISSTLPEDKLSSPMTSLLTSGLVKITDILRT RLEPVTSSLPNFSSTSDKILATSKDSKDTKEIFPSINTEETNVKA NNSGHESHSPALADSETPKATTQMVITTTVGDPAPSTSMPVHGSS ETTNIKREPTYFLTPRLRETSTSQESSFPTDTSFLLSKVPTGTIT EVSSTGVNSSSKISTPDHDKSTVPPDTFTGEIPRVFTSSIKTKSA EMTITTQASPPESASHSTLPLDTSTTLSQGGTHSTVTQGFPYSEV TTLMGMGPGNVSWMTTPPVEETSSVSSLMSSPAMTSPSPVSSTSP QSIPSSPLPVTALPTSVLVTTTDVLGTTSPESVTSSPPNLSSITH ERPATYKDTAHTEAAMHHSTNTAVTNVGTSGSGHKSQSSVLADSE TSKATPLMSTTSTLGDTSVSTSTPNISQTNQIQTEPTASLSPRLR ESSTSEKTSSTTETNTAFSYVPTGAITQASRTEISSSRTSISDLD RPTIAPDISTGMITRLFTSPIMTKSAEMTVTTQTTTPGATSQGIL PWDTSTTLFQGGTHSTVSQGFPHSEITTLRSRTPGDVSWMTTPPV EETSSGFSLMSPSMTSPSPVSSTSPESIPSSPLPVTALLTSVLVT TTNVLGTTSPEPVTSSPPNLSSPTQERLTTYKDTAHTEAMHASMH TNTAVANVGTSISGHESQSSVPADSHTSKATSPMGITFAMGDTSV

[1627]

		STSTPAFFETRIQTESTSSLIPGLRDTRTSEEINTVTETSTVLSE VPTTTTTEVSRTEVITSSRTTISGPDHSKMSPYISTETITRLSTF PFVTGSTEMAITNQTGPIGTISQATLTLDTSSTASWEGTHSPVTQ RFPHSEETTTMSRSTKGVSWQSPPSVEETSSPSSPVPLPAITSHS SLYSAVSGSSPTSALPVTSLLTSGRRKTIDMLDTHSELVTSSLPS ASSFSGEILTSEASTNTETIHFSENTAETNMGTTNSMHKLHSSVS IHSQPSGHTPPKVTGSMMEDAIVSTSTPGSPETKNVDRDSTSPLT PELKEDSTALVMNSTTESNTVFSSVSLDAATEVSRAEVTYYDPTF MPASAQSTKSPDISPEASSSHSNSPPLTISTHKTIATQTGPSGVT SLGQLTLDTSTIATSAGTPSARTQDFVDSETTSVMNNDLNDVLKT SPFSAEEANSLSSQAPLLVTTSPSPVTSTLQEHSTSSLVSVTSVP TPTLAKITDMDTNLEPVTRSPQNLRNTLATSEATTDTHTMHPSIN TAVANVGTTSSPNEFYFTVSPDSDPYKATSAVVITSTSGDSIVST SMPRSSAMKKIESETTFSLIFRLRETSTSQKIGSSSDTSTVFDKA FTAATTEVSRTELTSSSRTSIQGTEKPTMSPDTSTRSVTMLSTFA GLTKSEERTIATQTGPHRATSQGTLTWDTSITTSQAGTHSAMTHG FSQLDLSTLTSRVPEYISGTSPPSVEKTSSSSSLLSLPAITSPSP VPTTLPESRPSSPVHLTSLPTSGLVKTTDMLASVASLPPNLGSTS HKIPTTSEDIKDTEKMYPSTNIAVTNVGTTTSEKESYSSVPAYSE PPKVTSPMVTSFNIRDTIVSTSMPGSSEITRIEMESTFSLAHGLK GTSTSQDPIVSTEKSAVLHKLTTGATETSRTEVASSRRTSIPGPD HSTESPDISTEVIPSLPISLGITESSNMTIITRTGPPLGSTSQGT FTLDTPTTSSRAGTHSMATQEFPHSEMTTVMNKDPEILSWTIPPS IEKTSFSSSLMPSPAMTSPPVSSTLPKTIHTTPSPMTSLLTPSLV MTTDTLGTSPEPTTSSPPNLSSTSHEILTTDEDTTAIEAMHPSTS TAATNVETTSSGHGSQSSVLADSEKTKATAPMDTTSTMGHTTVST SMSVSSETTKIKRESTYSLTPGLRETSISQNASFSTDTSIVLSEV PTGTTAEVSRTEVTSSGRTSIPGPSQSTVLPEISTRTMTRLFASP TMTESAEMTIPTQTGPSGSTSQDTLTLDTSTTKSQAKTHSTLTQR FPHSEMTTLMSRGPGDMSWQSSPSLENPSSLPSLLSLPATTSPPP ISSTLPVTISSSPLPVTSLLTSSPVTTTDMLHTSPELVTSSPPKL SHTSDERLTTGKDTTNTEAVHPSTNTAASNVEIPSSGHESPSSAL ADSETSKATSPMFITSTQEDTTVAISTPHFLETSRIQKESISSLS PKLRETGSSVETSSAIETSAVLSEVSIGATTEISRTEVTSSSRTS ISGSAESTMLPEISTTRKIIKFPTSPILAESSEMTIKTQTSPPGS TSESTFTLDTSTTPSLVITHSTMTQRLPHSEITTLVSRGAGDVPR PSSLPVEETSPPSSQLSLSAMISPSPVSSTLPASSHSSSASVTSL LTPGQVKTTEVLDASAEPETSSPPSLSSTSVEILATSEVTTDTEK IHPFSNTAVTKVGTSSSGHESPSSVLPDSETTKATSAMGTISIMG DTSVSTLTPALSNTRKIQSEPASSLTTRLRETSTSEETSLATEAN TVLSKVSTGATTEVSRTEAISFSRTSMSGPEQSTMSQDISIGTIP RISASSVLTESAKMTITTQTGPSESTLESTLNLNTATTPSWVETH SIVIQGFPHPEMTTSMGRGPGGVSWPSPPFVKETSPPSSPLSLPA VTSPHPVSTTFLAHIPPSPLPVTSLLTSGPATTTDILGTSTEPGT SSSSSLSTTSHERLTTYKDTAHTEAVHPSTNTGGTNVATTSSGYK SQSSVLADSSPMCTTSTMGDTSVLTSTPAFLETRRIQTELASSLT PGLRESSGSEGTSSGTKMSTVLSKVPTGATTEISKEDVTSIPGPA QSTISPDISTRTVSWFSTSPVMTESAEITMNTHTSPLGATTQGTS TLDTSSTTSLTMTHSTISQGFSHSQMSTLMRRGPEDVSWMSPPLL EKTRPSFSLMSSPATTSPSPVSSTLPESISSSPLPVTSLLTSGLA KTTDMLHKSSEPVTNSPANLSSTSVEILATSEVTTDTEKTHPSSN RTVTDVGTSSSGHESTSFVLADSQTSKVTSPMVITSTMEDTSVST STPGFFETSRIQTEPTSSLTLGLRKTSSSEGTSLATEMSTVLSGV PTGATAEVSRTEVTSSSRTSISGFAQLTVSPETSTETITRLPTSS IMTESAEMMIKTQTDPPGSTPESTHTVDISTTPNWVETHSTVTQR FSHSEMTTLVSRSPGDMLWPSQSSVEETSSASSLLSLPATTSPSP VSSTLVEDFPSASLPVTSLLNPGLVITTDRMGISREPGTSSTSNL

[1628]

		SSTSHERLTTLEDTVDTEDMQPSTHTAVTNVRTSISGHESQSSVL SDSETPKATSPMGTTYTMGETSVSISTSDFFETSRIQIEPTSSLT SGLRETSSSERISSATEGSTVLSEVPSGATTEVSRTEVISSRGTS MSGPDQFTISPDISTEAITRLSTSPIMTESAESAITIETGSPGAT SEGTLTLDTSTTTFWSGTHSTASPGFSHSEMTTLMSRTPGDVPWP SLPSVEEASSVSSSLSSPAMTSTSFFSTLPESISSSPHPVTALLT LGPVKTTDMLRTSSEPETSSPPNLSSTSAEILATSEVTKDREKIH PSSNTPVVNVGTVIYKHLSPSSVLADLVTTKPTSPMATTSTLGNT SVSTSTPAFPETMMTQPTSSLTSGLREISTSQETSSATERSASLS GMPTGATTKVSRTEALSLGRTSTPGPAQSTISPEISTETITRIST PLTTTGSAEMTITPKTGHSGASSQGTFTLDTSSRASWPGTHSAAT HRSPHSGMTTPMSRGPEDVSWPSRPSVEKTSPPSSLVSLSAVTSP SPLYSTPSESSHSSPLRVTSLFTPVMMKTTDMLDTSLEPVTTSPP SMNITSDESLATSKATMETEAIQLSENTAVTQMGTISARQEFYSS YPGLPEPSKVTSPVVTSSTIKDIVSTTIPASSEITRIEMESTSTL TPTPRETSTSQEIHSATKPSTVPYKALTSATIEDSMTQVMSSSRG PSPDQSTMSQDISTEVITRLSTSPIKTESTEMTITTQTGSPGATS RGTLTLDTSTTFMSGTHSTASQGFSHSQMTALMSRTPGDVPWLSH PSVEEASSASFSLSSPVMTSSSPVSSTLPDSIHSSSLPVTSLLTS GLVKTTELLGTSSEPETSSPPNLSSTSAEILAITEVTTDTEKLEM TNVVTSGYTHESPSSVLADSVTTKATSSMGITYPTGDTNVLTSTP AFSDTSRIQTKSKLSLTPGLMETSISEETSSATEKSTVLSSVPTG ATTEVSRTEAISSSRTSIPGPAQSTMSSDTSMETITRISTPLTRK ESTDMAITPKTGPSGATSQGTFTLDSSSTASWPGTHSATTQRFPQ SVVTTPMSRGPEDVSWPSPLSVEKNSPPSSLVSSSSVTSPSPLYS TPSGSSHSSPVPVTSLFTSIMMKATDMLDASLEPETTSAPNMNIT SDESLAASKATTETEAIHVFENTAASHVETTSATEELYSSSPGFS EPTKVISPVVTSSSIRDNMVSTTMPGSSGITRIEIESMSSLTPGL RETRTSQDITSSTETSTVLYKMPSGATPEVSRTEVMPSSRTSIPG PAQSTMSLDISDEVVTRLSTSPIMTESAEITITTQTGYSLATSQV TLPLGTSMTFLSGTHSTMSQGLSHSEMTNLMSRGPESLSWTSPRF VETTRSSSSLTSLPLTTSLSPVSSTLLDSSPSSPLPVTSLILPGL VKTTEVLDTSSEPKTSSSPNLSSTSVEIPATSEIMTDTEKIHPSS NTAVAKVRTSSSVHESHSSVLADSETTITIPSMGITSAVDDTTVF TSNPAFSETRRIPTEPTFSLTPGFRETSTSEETTSITETSAVLYG VPTSATTEVSMTEIMSSNRIHIPDSDQSTMSPDIITEVITRLSSS SMMSESTQMTITTQKSSPGATAQSTLTLATTTAPLARTHSTVPPR FLHSEMTTLMSRSPENPSWKSSLFVEKTSSSSSLLSLPVTTSPSV SSTLPQSIPSSSFSVTSLLTPGMVKTTDTSTEPGTSLSPNLSGTS VEILAASEVTTDTEKIHPSSSMAVTNVGTTSSGHELYSSVSIHSE PSKATYPVGTPSSMAETSISTSMPANFETTGFEAEPFSHLTSGFR KTNMSLDTSSVTPTNTPSSPGSTHLLQSSKTDFTSSAKTSSPDWP PASQYTEIPVDIITPFNASPSITESTGITSFPESRFTMSVTESTH HLSTDLLPSAETISTGTVMPSLSEAMTSFATTGVPRAISGSGSPF SRTESGPGDATLSTIAESLPSSTPVPFSSSTFTTTDSSTIPALHE ITSSSATPYRVDTSLGTESSTTEGRLVMVSTLDTSSQPGRTSSSP ILDTRMTESVELGTVTSAYQVPSLSTRLTRTDGIMEHITKIPNEA AHRGTIRPVKGPQTSTSPASPKGLHTGGTKRMETTTTALKTTTTA LKTTSRATLTTSVYTPTLGTLTPLNASMQMASTIPTEMMITTPYV FPDVPETTSSLATSLGAETSTALPRTTPSVFNRESETTASLVSRS GAERSPVIQTLDVSSSEPDTTASWVIHPAETIPTVSKTTPNFFHS ELDTVSSTATSHGADVSSAIPTNISPSELDALTPLVTISGTDTST TFPTLTKSPHETETRTTWLTHPAETSSTIPRTIPNFSHHESDATP SIATSPGAETSSAIPIMTVSPGAEDLVTSQVTSSGTDRNMTIPTL TLSPGEPKTIASLVTHPEAQTSSAIPTSTISPAVSRLVTSMVTSL AAKTSTTNRALTNSPGEPATTVSLVTHPAQTSPTVPWTTSIFFHS KSDTTPSMTTSHGAESSSAVPTPTVSTEVPGVVTPLVTSSRAVIS

[1629]

		TTIPILTLSPGEPETTPSMATSHGEEASSAIPTPTVSPGVPGVVT SLVTSSRAVTSTTIPILTFSLGEPETTPSMATSHGTEAGSAVPTV LPEVPGMVTSLVASSRAVTSTTLPTLTLSPGEPETTPSMATSHGA EASSTVPTVSPEVPGVVTSLVTSSSGVNSTSIPTLILSPGELETT PSMATSHGAEASSAVPTPTVSPGVSGVVTPLVTSSRAVTSTTIPI LTLSSSEPETTPSMATSHGVEASSAVLTVSPEVPGMVTSLVTSSR AVTSTTIPTLTISSDEPETTTSLVTHSEAKMISAIPTLAVSPTVQ GLVTSLVTSSGSETSAFSNLTVASSQPETIDSWVAHPGTEASSVV PTLTVSTGEPFTNISLVTHPAESSSTLPRTTSRFSHSELDTMPST VTSPEAESSSAISTTISPGIPGVLTSLVTSSGRDISATFPTVPES PHESEATASWVTHPAVTSTTVPRTTPNYSHSEPDTTPSIATSPGA EATSDFPTITVSPDVPDMVTSQVTSSGTDTSITIPTLTLSSGEPE TTTSFITYSETHTSSAIPTLPVSPGASKMLTSLVISSGTDSTTTF PTLTETPYEPETTAIQLIHPAETNTMVPRTTPKFSHSKSDTTLPV AITSPGPEASSAVSTTTISPDMSDLVTSLVPSSGTDTSTTFPTLS ETPYEPETTATWLTHPAETSTTVSGTIPNFSHRGSDTAPSMVTSP GVDTRSGVPTTTIPPSIPGVVTSQVTSSATDTSTAIPTLTPSPGE PETTASSATHPGTQTGFTVPIRTVPSSEPDTMASWVTHPPQTSTP VSRTTSSFSHSSPDATPVMATSPRTEASSAVLTTISPGAPEMVTS QITSSGAATSTTVPTLTHSPGMPETTALLSTHPRTETSKTFPAST VFPQVSETTASLTIRPGAETSTALPTQTTSSLFTLLVTGTSRVDL SPTASPGVSAKTAPLSTHPGTETSTMIPTSTLSLGLLETTGLLAT SSSAETSTSTLTLTVSPAVSGLSSASITTDKPQTVTSWNTETSPS VTSVGPPEFSRTVTGTTMTLIPSEMPTPPKTSHGEGVSPTTILRT TMVEATNLATTGSSPTVAKTTTTFNTLAGSLFTPLTTPGMSTLAS ESVTSRTSYNHRSWISTTSSYNRRYWTPATSTPVTSTFSPGISTS SIPSSTAATVPFMVPFTLNFTITNLQYEEDMRHPGSRKFNATERE LQGLLKPLFRNSSLEYLYSGCRLASLRPEKDSSATAVDAICTHRP DPEDLGLDRERLYWELSNLTNGIQELGPYTLDRNSLYVNGFTHRS SMPTTSTPGTSTVDVGTSGTPSSSPSPTTAGPLLMPFTLNFTITN LQYEEDMRRTGSRKFNTMESVLQGLLKPLFKNTSVGPLYSGCRLT LLRPEKDGAATGVDAICTHRLDPKSPGLNREQLYWELSKLTNDIE ELGPYTLDRNSLYVNGFTHQSSVSTTSTPGTSTVDLRTSGTPSSL SSPTIMAAGPLLVPFTLNFTITNLQYGEDMGHPGSRKFNTTERVL QGLLGPIFKNTSVGPLYSGCRLTSLRSEKDGAATGVDAICIHHLD PKSPGLNRERLYWELSQLTNGIKELGPYTLDRNSLYVNGFTHRTS VPTSSTPGTSTVDLGTSGTPFSLPSPATAGPLLVLFTLNFTITNL KYEEDMHRPGSRKFNTTERVLQTLLGPMFKNTSVGLLYSGCRLTL LRSEKDGAATGVDAICTHRLDPKSPGVDREQLYWELSQLTNGIKE LGPYTLDRNSLYVNGFTHWIPVPTSSTPGTSTVDLGSGTPSSLPS PTTAGPLLVPFTLNFTITNLKYEEDMHCPGSRKFNTTERVLQSLL GPMFKNTSVGPLYSGCRLTLLRSEKDGAATGVDAICTHRLDPKSP GVDREQLYWELSQLTNGIKELGPYTLDRNSLYVNGFTHQTSAPNT STPGTSTVDLGTSGTPSSLPSPTSAGPLLVPFTLNFTITNLQYEE DMHHPGSRKFNTTERVLQGLLGPMFKNTSVGLLYSGCRLTLLRPE KNGAATGMDAICSHRLDPKSPGLNREQLYWELSQLTHGIKELGPY TLDRNSLYVNGFTHRSSVAPTSTPGTSTVDLGTSGTPSSLPSPTT AVPLLVPFTLNFTITNLQYGEDMRHPGSRKFNTTERVLQGLLGPL FKNSSVGPLYSGCRLISLRSEKDGAATGVDAICTHHLNPQSPGLD REQLYWQLSQMTNGIKELGPYTLDRNSLYVNGFTHRSSGLTTSTP WTSTVDLGTSGTPSPVPSPTTTGPLLVPFTLNFTITNLQYEENMG HPGSRKFNITESVLQGLLKPLFKSTSVGPLYSGCRLTLLRPEKDG VATRVDAICTHRPDPKIPGLDRQQLYWELSQLTHSITELGPYTLD RDSLYVNGFTQRSSVPTTSTPGTFTVQPETSETPSSLPGPTATGP VLLPFTLNFTITNLQYEEDMRRPGSRKFNTTERVLQGLLMPLFKN TSVSSLYSGCRLTLLRPEKDGAATRVDAVCTHRPDPKSPGLDRER LYWKLSQLTHGITELGPYTLDRHSLYVNGFTHQSSMTTTRTPDTS

[1630]

		TMHLATSRTPASLSGPMTASPLLVLFTINFTITNLRYEENMHHPG SRKFNTTERVLQGLLRPVFKNTSVGPLYSGCRLTLLRPKKDGAAT KVDAICTYRPDPKSPGLDREQLYWELSQLTHSITELGPYTLDRDS LYVNGFTQRSSVPTTSIPGTPTVDLGTSGTPVSKPGPSAASPLLV LFTLNFTITNLRYEENMQHPGSRKFNTTERVLQGLLRSLFKSTSV GPLYSGCRLTLLRPEKDGTATGVDAICTHHPDPKSPRLDREQLYW ELSQLTHNITELGPYALDNDSLFVNGFTHRSSVSTTSTPGTPTVY LGASKTPASIFGPSAASHLLILFTLNFTITNLRYEENMWPGSRKF NTTERVLQGLLRPLFKNTSVGPLYSGCRLTLLRPEKDGEATGVDA ICTHRPDPTGPGLDREQLYLELSQLTHSITELGPYTLDRDSLYVN GFTHRSSVPTTSTGVVSEEPFTLNFTINNLRYMADMGQPGSLKFN ITDNVMQHLLSPLFQRSSLGARYTGCRVIALRSVKNGAETRVDLL CTYLQPLSGPGLPIKQVFHELSQQTHGITRLGPYSLDKDSLYLNG YNEPGPDEPPTTPKPATTFLPPLSEATTAMGYHLKTLTLNFTISN LQYSPDMGKGSATFNSTEGVLQHLLRPLFQKSSMGPFYLGCQLIS LRPEKDGAATGVDTTCTYHPDPVGPGLDIQQLYWELSQLTHGVTQ LGFYVLDRDSLFINGYAPQNLSIRGEYQINFHIVNWNLSNPDPTS SEYITLLRDIQDKVTTLYKGSQLHDTFRFCLVTNLTMDSVLVTVK ALFSSNLDPSLVEQVFLDKTLNASFHWLGSTYQLVDIHVTEMESS VYQPTSSSSTQHFYLNFTITNLPYSQDKAQPGTTNYQRNKRNIED ALNQLFRNSSIKSYFSDCQVSTFRSVPNRHHTGVDSLCNFSPLAR RVDRVAIYEEFLRMTRNGTQLQNFTLDRSSVLVDGYSPNRNEPLT GNSDLPFWAVILIGLAGLLGVITCLICGVLVTTRRRKKEGEYNVQ QQCPGYYQSHLDLEDLQ
SLC39A6	54	MARKLSVILILTFALSVTNPLHELKAAAFPQTTEKISPNWESGIN VDLAISTRQYHLQQLFYRYGENNSLSVEGFRKLLQNIGIDKIKRI HIHHDHDHHSDHEHHSDHERHSDHEHHSEHEHHSDHDHHSHHNHA ASGKNKRKALCPDHDSDSSGKDPRNSQGKGAHRPEHASGRRNVKD SVSASEVTSTVYNTVSEGTHFLETIETPRPGKLFPKDVSSSTPPS VTSKSRVSRLAGRKTNESVSEPRKGFMYSRNTNENPQECFNASKL LTSHGMGIQVPLNATEFNYLCPAIINQIDARSCLIHTSEKKAEIP PKTYSLQIAWVGGFIAISIISFLSLLGVILVPLMNRVFFKFLLSF LVALAVGTLSGDAFLHLLPHSHASHHHSHSHEEPAMEMKRGPLFS HLSSQNIEESAYFDSTWKGLTALGGLYFMFLVEHVLTLIKQFKDK KKKNQKKPENDDDVEIKKQLSKYESQLSTNEEKVDTDDRTEGYLR ADSQEPSHFDSQQPAVLEEEEVMIAHAHPQEVYNEYVPRGCKNKC HSHFHDTLGQSDDLIHHHHDYHHILHHHHHQNHHPHSHSQRYSRE ELKDAGVATLAWMVIMGDGLHNFSDGLAIGAAFTEGLSSGLSTSV AVFCHELPHELGDFAVLLKAGMTVKQAVLYNALSAMLAYLGMATG IFIGHYAENVSMWIFALTAGLFMYVALVDMVPEMLHNDASDHGCS RWGYFFLQNAGMLLGFGIMLLISIFEHKIVFRINF
SLC44A4	55	MGGKQRDEDDEAYGKPVKYDPSFRGPIKNRSCTDVICCVLFLLFI LGYIVVGIVAWLYGDPRQVLYPRNSTGAYCGMGENKDKPYLLYFN IFSCILSSNIISVAENGLQCPTPQVCVSSCPEDPWTVGKNEFSQT VGEVFYTKNRNFCLPGVPWNMTVITSLQQELCPSFLLPSAPALGR CFPWTNVTPPALPGITNDTTIQQGISGLIDSLNARDISVKIFEDF AQSWYWILVALGVALVLSLLFILLLRLVAGPLVLVLILGVLGVLA YGIYYCWEEYRVLRDKGASISQLGFTTNLSAYQSVQETWLAALIV LAVLEAILLLMLIFLRQRIRIAIALLKEASKAVGQMMSTMFYPLV TFVLLLICIAYWAMTALYLATSGQPQYVLWASNISSPGCEKVPIN TSCNPTAHLVNSSCPGLMCVFQGYSSKGLIQRSVFNLQIYGVLGL FWTLNWVLALGQCVLAGAFASFYWAFHKPQDIPTFPLISAFIRTL RYHTGSLAFGALILTLVQIARVILEYIDHKLRGVQNPVARCIMCC FKCCLWCLEKFIKFLNRNAYIMIAIYGKNFCVSAKNAFMLLMRNI VRVVVLDKVTDLLLFFGKLLVVGGVGVLSFFFFSGRIPGLGKDFK SPHLNYYWLPIMTSILGAYVIASGFFSVFGMCVDTLFLCFLEDLE

[1631]

		RNNGSLDRPYYMSKSLLKILGKKNEAPPDNKKRKK
STEAP1	56	MESRKDITNQEELWKMKPRRNLEEDDYLHKDTGETSMLKRPVLLH LHQTAHADEFDCPSELQHTQELFPQWHLPIKIAAIIASLTFLYTL LREVIHPLATSHQQYFYKIPILVINKVLPMVSITLLALVYLPGVI AAIVQLHNGTKYKKFPHWLDKWMLTRKQFGLLSFFFAVLHAIYSL SYPMRRSYRYKLLNWAYQQVQQNKEDAWIEHDVWRMEIYVSLGIV GLAILALLAVTSIPSVSDSLTWREFHYIQSKLGIVSLLLGTIHAL IFAWNKWIDIKQFVWYTPPTFMIAVFLPIVVLIFKSILFLPCLRK KILKIRHGWEDVTKINKTEICSQL

[1632] 在不同实施例中,本文所披露的ADC可以包含以上表中所列重链和轻链可变结构域的任何集合,或来自该重链和轻链集合的六个CDR序列的集合,例如通过将六个CDR移植至所选人供体抗体框架中。在不同实施例中,本文所披露的ADC可以包含与以上表中所列序列同源的氨基酸序列,只要该ADC保持结合至其靶标癌症抗原的能力(例如,其K_D小于1×10^{-8}M)并保持本文所披露的ADC的一种或多种功能特性(例如,内化、调节RNA剪接、抑制细胞生长等的能力)。

[1633] 在一些实施例中,ADC进一步包含人重链和轻链恒定结构域或其片段。例如,ADC可以包含人IgG重链恒定结构域(如IgG1)和人κ或λ轻链恒定结构域。在不同实施例中,所述ADC中的抗体或抗原结合片段包含人免疫球蛋白G亚型1(IgG1)重链恒定结构域和人Igκ轻链恒定结构域。

[1634] 在各种其他实施例中,ADC的靶标癌症抗原是人表皮生长因子受体2(HER2)。

[1635] 在不同实施例中,抗HER2抗体或其抗原结合片段包含如下三个重链CDR和三个轻链CDR:由SEQ ID NO:1组成的重链CDR1(HCDR1)、由SEQ ID NO:2组成的重链CDR2(HCDR2)、由SEQ ID NO:3组成的重链CDR3(HCDR3);由SEQ ID NO:4组成的轻链CDR1(LCDR1)、由SEQ ID NO:5组成的轻链CDR2(LCDR2)和由SEQ ID NO:6组成的轻链CDR3(LCDR3),如由Kabat编号系统所定义。

[1636] 在不同实施例中,抗HER2抗体或其抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:19的氨基酸序列的重链可变区和含有SEQ ID NO:20的氨基酸序列的轻链可变区。在一些实施例中,抗HER2抗体或其抗原结合片段包含SEQ ID NO:19的重链可变区氨基酸序列和SEQ ID NO:20的轻链可变区氨基酸序列,或与所披露序列具有至少95%同一性的序列。在一些实施例中,抗HER2抗体或其抗原结合片段具有与SEQ ID NO:19具有至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的重链可变区氨基酸序列和/或与SEQ ID NO:20具有至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的轻链可变区氨基酸序列。

[1637] 在不同实施例中,抗HER2抗体或其抗原结合片段是内化性抗体或内化性抗原结合片段。在不同实施例中,抗HER2抗体包含人IgG1重链恒定结构域和人Igκ轻链恒定结构域。

[1638] 在不同实施例中,抗HER2抗体包含SEQ ID NO:19的重链氨基酸序列或与SEQ ID NO:19具有至少95%同一性的序列,和SEQ ID NO:20的轻链氨基酸序列或与SEQ ID NO:20具有至少95%同一性的序列。在特定实施例中,抗HER2抗体包含SEQ ID NO:19的重链氨基酸序列和SEQ ID NO:20的轻链氨基酸序列,或与所披露序列具有至少95%同一性的序列。在一些实施例中,抗HER2抗体具有与SEQ ID NO:19具有至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的重链氨基酸序列以及与SEQ ID NO:20具有至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的轻链氨基酸序列。在不同实施例中,抗HER2抗体是曲妥珠单抗或其抗原结合片段。

[1639] 在不同实施例中,抗HER2抗体或其抗原结合片段包含曲妥珠单抗的三个重链CDR和三个轻链CDR,或其中这些CDR包括HCDR1(SEQ ID NO:1)、HCDR2(SEQ ID NO:2)、HCDR3(SEQ ID NO:3);LCDR1(SEQ ID NO:4)、LCDR2(SEQ ID NO:5)和LCDR3(SEQ ID NO:6)中的不超过一个、二个、三个、四个、五个或六个氨基酸添加、缺失或取代。

[1640] 在各种其他实施例中,ADC的靶标癌症抗原是人多配体聚糖-1(CD138)。

[1641] 在不同实施例中,抗CD138抗体或其抗原结合片段包含如下三个重链CDR和三个轻链CDR:由SEQ ID NO:7组成的重链CDR1(HCDR1)、由SEQ ID NO:8组成的重链CDR2(HCDR2)、由SEQ ID NO:9组成的重链CDR3(HCDR3);由SEQ ID NO:10组成的轻链CDR1(LCDR1)、由SEQ ID NO:11组成的轻链CDR2(LCDR2)和由SEQ ID NO:12组成的轻链CDR3(LCDR3),如由Kabat编号系统所定义。

[1642] 在不同实施例中,抗CD138抗体或其抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:21的氨基酸序列的重链可变区和含有SEQ ID NO:22的氨基酸序列的轻链可变区。在一些实施例中,抗CD138抗体或其抗原结合片段包含SEQ ID NO:21的重链可变区氨基酸序列和SEQ ID NO:22的轻链可变区氨基酸序列,或与所披露序列具有至少95%同一性的序列。在一些实施例中,抗CD138抗体或其抗原结合片段具有与SEQ ID NO:21具有至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的重链可变区氨基酸序列和/或与SEQ ID NO:22具有至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的轻链可变区氨基酸序列。

[1643] 在不同实施例中,抗CD138抗体或其抗原结合片段是内化性抗体或内化性抗原结合片段。在不同实施例中,抗CD138抗体包含鼠IgG2a重链恒定结构域和鼠Igκ轻链恒定结构域。在不同实施例中,抗CD138抗体包含人IgG2a重链恒定结构域和人Igκ轻链恒定结构域。

[1644] 在不同实施例中,抗CD138抗体包含SEQ ID NO:21的重链氨基酸序列或与SEQ ID NO:21具有至少95%同一性的序列,和SEQ ID NO:22的轻链氨基酸序列或与SEQ ID NO:22具有至少95%同一性的序列。在特定实施例中,抗CD138抗体包含SEQ ID NO:21的重链氨基酸序列和SEQ ID NO:22的轻链氨基酸序列,或与所披露序列具有至少95%同一性的序列。在一些实施例中,抗CD138抗体具有与SEQ ID NO:21具有至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的重链氨基酸序列以及与SEQ ID NO:22具有至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的轻链氨基酸序列。在不同实施例中,抗CD138抗体是B-B4或其抗原结合片段。

[1645] 在不同实施例中,抗CD138抗体或其抗原结合片段包含B-B4的三个重链CDR和三个轻链CDR,或其中这些CDR包括HCDR1(SEQ ID NO:7)、HCDR2(SEQ ID NO:8)、HCDR3(SEQ ID NO:9);LCDR1(SEQ ID NO:10)、LCDR2(SEQ ID NO:11)和LCDR3(SEQ ID NO:12)中的不超过一个、二个、三个、四个、五个或六个氨基酸添加、缺失或取代。

[1646] 在各种其他实施例中,ADC的靶标癌症抗原是人肝配蛋白A型受体2(EPHA2)。

[1647] 在不同实施例中,抗EPHA2抗体或其抗原结合片段包含如下三个重链CDR和三个轻链CDR:由SEQ ID NO:13组成的重链CDR1(HCDR1)、由SEQ ID NO:14组成的重链CDR2(HCDR2)、由SEQ ID NO:15组成的重链CDR3(HCDR3);由SEQ ID NO:16组成的轻链CDR1(LCDR1)、由SEQ ID NO:17组成的轻链CDR2(LCDR2)和由SEQ ID NO:18组成的轻链CDR3(LCDR3),如由Kabat编号系统所定义。

[1648] 在不同实施例中,抗EPHA2抗体或其抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:23的氨基

酸序列的重链可变区和含有SEQ ID NO:24的氨基酸序列的轻链可变区。在一些实施例中,抗EPHA2抗体或其抗原结合片段包含SEQ ID NO:23的重链可变区氨基酸序列和SEQ ID NO:24的轻链可变区氨基酸序列,或与所披露序列具有至少95%同一性的序列。在一些实施例中,抗EPHA2抗体或其抗原结合片段具有与SEQ ID NO:23具有至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的重链可变区氨基酸序列和/或与SEQ ID NO:24具有至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的轻链可变区氨基酸序列。

[1649] 在不同实施例中,抗EPHA2抗体或其抗原结合片段是内化性抗体或内化性抗原结合片段。在不同实施例中,抗EPHA2抗体包含人IgG1重链恒定结构域和人Igκ轻链恒定结构域。

[1650] 在不同实施例中,抗EPHA2抗体包含SEQ ID NO:23的重链氨基酸序列或与SEQ ID NO:23具有至少95%同一性的序列,和SEQ ID NO:24的轻链氨基酸序列或与SEQ ID NO:24具有至少95%同一性的序列。在特定实施例中,抗EPHA2抗体包含SEQ ID NO:23的重链氨基酸序列和SEQ ID NO:24的轻链氨基酸序列,或与所披露序列具有至少95%同一性的序列。在一些实施例中,抗EPHA2抗体具有与SEQ ID NO:23具有至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的重链氨基酸序列以及与SEQ ID NO:24具有至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的轻链氨基酸序列。在一些实施例中,抗EPHA2抗体包含由SEQ ID NO:23的核苷酸序列编码的重链;以及由SEQ ID NO:24的核苷酸序列编码的轻链。在不同实施例中,抗EPHA2抗体是1C1或其抗原结合片段。

[1651] 在不同实施例中,抗EPHA2抗体或其抗原结合片段包含1C1的三个重链CDR和三个轻链CDR,或其中这些CDR包括HCDR1(SEQ ID NO:13)、HCDR2(SEQ ID NO:14)、HCDR3(SEQ ID NO:15);LCDR1(SEQ ID NO:16)、LCDR2(SEQ ID NO:17)和LCDR3(SEQ ID NO:18)中的不超过一个、二个、三个、四个、五个或六个氨基酸添加、缺失或取代。

[1652] 在不同实施例中,氨基酸取代是单个残基的氨基酸取代。插入通常将近似为约1至约20个氨基酸残基,但相当大的插入也可为被容许,只要保留生物功能(例如结合至靶抗原)即可。缺失通常在约1至约20个氨基酸残基的范围内,但在一些情况下,缺失可能要大得多。取代、缺失、插入或其任何组合均可用于获得最终衍生物或变体。通常,对几个氨基酸进行这些变化以使该分子,特别是抗原结合蛋白的免疫原性和特异性的改变最小化。然而,在某些情况下,更大的变化可被容许。保守取代通常是根据下表6所描绘的图表进行。

[1653] 表6

[1654] 原始残基 示例性取代

[1655] Ala Ser

[1656] Arg Lys

[1657] Asn Gln、His

[1658] Asp Glu

[1659] Cys Ser

[1660] Gln Asn

[1661] Glu Asp

[1662] Gly Pro

[1663] His Asn、Gln

[1664]	Ile	Leu、Val
[1665]	Leu	Ile、Val
[1666]	Lys	Arg、Gln、Glu
[1667]	Met	Leu、Ile
[1668]	Phe	Met、Leu、Tyr
[1669]	Ser	Thr
[1670]	Thr	Ser
[1671]	Trp	Tyr
[1672]	Tyr	Trp、Phe
[1673]	Val	Ile、Leu

[1674] 通过选择保守性低于表6中所示取代的取代来实现功能或免疫属性的显著变化。例如,可以进行较明显地影响以下的取代:在改变区域中的多肽主链的结构,例如α-螺旋或β-折叠结构;靶位点处分子的电荷或疏水性;或侧链的体积。通常可在多肽性质上产生最大变化的取代是在以下取代,其中:(a)亲水性残基(例如丝氨酰基或苏氨酰基)被取代为(或被以下取代)疏水性残基(例如亮氨酰基、异亮氨酰基、苯丙氨酰基、缬氨酰基或丙氨酰基);(b)半胱氨酸或脯氨酸被取代为(或被以下取代)任何其他残基;(c)具有正电性侧链的残基(例如赖氨酰基、精氨酰基或组氨酰基)被取代为(或被以下取代)负电性残基(例如谷氨酰基或天冬氨酰基);或(d)具有大体积侧链的残基(例如苯丙氨酸)被取代为(或被以下取代)不具有侧链的残基(例如甘氨酸)。

[1675] 在ADC中使用变异抗体序列的各种实施例中,这些变体通常展现相同的定性生物活性且会引起相同的免疫应答,不过还可根据需要选择变体以改变抗原结合蛋白的特征。可替代地,可以设计该变体使得抗原结合蛋白的生物活性发生改变。例如,可以改变或移除糖基化位点。

[1676] 各种抗体可以与本文所使用的ADC一起使用以靶向癌细胞。如下文所示,在不同的靶向肿瘤抗原的抗体存在下,本文所披露的ADC中的接头-有效负载出奇有效。在肿瘤细胞而非健康细胞上表达或在肿瘤细胞上的表达水平高于健康细胞的合适抗原、以及针对这些抗原的抗体是本领域已知的。这些抗体可以与本文所披露的接头和剪接调节剂有效负载一起使用。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段靶向HER2,且该靶向HER2的抗体或抗原结合片段是曲妥珠单抗。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段靶向CD138,且该靶向CD138的抗体或抗原结合片段是B-B4。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段靶向EPHA2,且该靶向EPHA2的抗体或抗原结合片段是1C1。在一些实施例中,所披露的接头和剪接调节剂有效负载在若干不同靶向肿瘤的抗体存在下出奇有效,这些抗体是靶向HER2的抗体(如曲妥珠单抗)、靶向CD138的抗体(如B-B4)和靶向EPHA2的抗体(如1C1),它们提供特别改善的药物:抗体比率、聚集水平、稳定性(即,体外和体内稳定性)、肿瘤靶向(即,细胞毒性、效力)和/或治疗功效。改善的治疗功效可在体外或体内测量,且可包括降低的肿瘤生长速率和/或减小的肿瘤体积。

[1677] 在某些实施例中,使用针对相同靶标的替代抗体或针对不同抗原靶标的抗体,且它们提供以上描述的至少一些有利功能特性(例如改善的稳定性、改善的肿瘤靶向、改善的治疗功效等)。在一些实施例中,当所披露的接头和剪接调节剂有效负载缀合至靶向HER2、

CD138或EPHA2的替代性抗体或抗原结合片段时,观察到这些有利功能特性中的一些或全部。在一些其他实施例中,当所披露的接头和剪接调节剂有效负载缀合至靶向HER2的抗体或抗原结合片段时,观察到这些有利功能特性中的一些或全部。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段靶向HER2。在一些实施例中,靶向HER2的抗体或抗原结合片段是曲妥珠单抗。在一些其他实施例中,当所披露的接头和剪接调节剂有效负载缀合至靶向CD138的抗体或抗原结合片段时,观察到这些有利功能特性中的一些或全部。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段靶向CD138。在一些实施例中,靶向CD138的抗体或抗原结合片段是B-B4。在一些其他实施例中,当所披露的接头和剪接调节剂有效负载缀合至靶向EPHA2的抗体或抗原结合片段时,观察到这些有利功能特性中的一些或全部。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段靶向EPHA2。在一些实施例中,靶向EPHA2的抗体或抗原结合片段是1C1。

[1678] 接头

[1679] 在不同实施例中,ADC中的接头在细胞外以一种足以在治疗上有效的方式稳定。在一些实施例中,该接头在细胞外是稳定的,使得ADC当存在于细胞外条件中时(例如在转运或递送至细胞中之前)保持完整。在ADC的上下文中使用的术语"完整"意指抗体或抗原结合片段保持连接至药物部分(例如剪接调节剂)。如本文所使用,在接头或包含接头的ADC的上下文中,"稳定"意指当ADC存在于细胞外条件中时,ADC样品中的不超过20%、不超过约15%、不超过约10%、不超过约5%、不超过约3%或不超过约1%(或其间任何百分比)的接头被裂解(或在总体ADC的情况下是不完整的)。在一些实施例中,相较于替代性接头、和/或具有替代性接头和/或剪接调节剂有效负载的ADC,本文所披露的接头和/或ADC出奇稳定。在一些实施例中,本文所披露的ADC可以保持完整超过约48小时、超过60小时、超过约72小时、超过约84小时或超过约96小时。

[1680] 可以例如通过在血浆中包括ADC持续预定时间段(例如2、4、6、8、16、24、48或72小时)然后定量血浆中存在的游离药物部分的量来确定接头在细胞外是否稳定。稳定性可允许ADC靶向肿瘤细胞的定位时间且防止药物部分过早释放,否则可能因无差别地损害正常组织和肿瘤组织而降低ADC的治疗指数。在一些实施例中,该接头在靶细胞外是稳定的,并且一旦进入细胞内后就从ADC释放药物部分,使得该药物可以结合至其靶标(例如SF3b剪接体复合物)。因此,有效接头将:(i)维持抗体或抗原结合片段的特异性结合特性;(ii)允许经由稳定连接至抗体或抗原结合片段而递送(例如细胞内递送)药物部分;(iii)保持稳定和完整性直至ADC已经转运或递送至靶位点;以及(iv)在裂解或替代性释放机制之后,允许实现药物部分的治疗作用,例如细胞毒性作用。

[1681] 接头可能影响ADC的物理-化学特性。由于许多细胞毒性剂本质上是疏水性的,因此将它们连接至具有额外疏水性部分的抗体可能引起聚集。ADC聚集物是不溶性的且通常限制抗体上可获得的药物负载,这可能不利地影响ADC的效力。通常,生物制品的蛋白质聚集物还与免疫原性增加相关联。如下文所示,本文所披露的接头使ADC具有较低的聚集水平和所需的药物负载水平。

[1682] 接头可为"可裂解的"或"不可裂解的"(Ducry和Stump(2010)Bioconjugate Chem.[生物共轭化学]21:5-13)。可裂解接头被设计成当经受某些环境因素(例如当内化至靶细胞中)时释放出药物部分(例如剪接调节剂),而不可裂解接头通常依赖于抗体或抗原结合片段本身的降解。

[1683] 在一些实施例中,该接头是不可裂解接头。在一些实施例中,ADC的剪接调节剂药物部分通过抗体或抗原结合片段的降解而释放。当被靶细胞内化且在靶细胞内降解时,不可裂解接头往往会保持与抗体的至少一个氨基酸以及药物共价缔合。本文描述了多种示例性不可裂解接头,且其他接头也是本领域已知的。示例性不可裂解接头可以包含硫醚;环己基;N-琥珀酰亚胺基4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1甲酸酯(SMCC);或N-羟基琥珀酰亚胺(NHS);一个或多个聚乙二醇(PEG)部分,例如1、2、3、4、5或6个PEG部分;或一个或多个烷基部分。

[1684] 在一些实施例中,该接头是可裂解接头。可裂解接头是指包含可裂解部分的任何接头。如本文所使用,术语"可裂解部分"是指可被裂解的任何化学键。合适的可裂解化学键是本领域熟知的且包括但不限于酸不稳定性键、蛋白酶/肽酶不稳定性键、光不稳定性键、二硫键和酯酶不稳定性键。包含可裂解部分的接头可经由在该接头中的特定位点处裂解而允许剪接调节剂药物部分从ADC释放。

[1685] 在一些实施例中,接头可在细胞内条件下裂解,接头的裂解使剪接调节剂药物部分在细胞内环境中充分地从抗体或抗原结合片段释放,以激活药物和/或使药物在治疗上有效。在一些实施例中,直至ADC进入表达对ADC中的抗体或抗原结合片段具有特异性的抗原的细胞,剪接调节剂药物部分才从抗体或抗原结合片段裂解,且在进入细胞后,该剪接调节剂药物部分从该抗体或抗原结合片段裂解。在一些实施例中,该接头包含可裂解部分,该可裂解部分被固定放置使得接头的任何部分或抗体或抗原结合片段在裂解后都不会与剪接调节剂药物部分保持结合。示例性可裂解接头包括酸不稳定性接头、蛋白酶/肽酶敏感性接头、光不稳定性接头、含二甲基接头、含二硫化物接头或含磺酰胺接头。

[1686] 在一些实施例中,该接头是pH敏感性接头,且在某些pH值下对水解敏感。通常,pH敏感性接头可在酸性条件下裂解。此裂解策略通常利用细胞内核内体(pH约5-6)和溶酶体(pH约4.8)隔室中比细胞溶质(pH约7.4)低的pH值,以触发接头中酸不稳定性基团(如腙)的水解(Jain等人(2015)Pharm Res[药学研究]32:3526-40)。在一些实施例中,该接头是酸不稳定性和/或可水解接头。例如,可以使用可在溶酶体中水解且含有酸不稳定性基团(例如腙、缩氨基脲(semicarbazone)、缩氨基硫脲(thiosemicarbazone)、顺式乌头酰胺、原酸酯、缩醛、缩酮或类似物)的酸不稳定性接头。参见例如,美国专利号5,122,368;5,824,805;5,622,929;Dubowchik和Walker(1999)Pharm Therapeutics[药理学和治疗学]83:67-123;Neville等人(1989)Biol Chem.[生物化学]264:14653-61。此类接头在中性pH值条件(如血液中的那些)下相对稳定,但在低于pH 5.5或5.0(溶酶体的近似pH值)下不稳定。在某些实施例中,可水解接头是硫醚接头(例如,经由酰腙键连接至治疗剂的硫醚)(参见例如美国专利号5,622,929)。

[1687] 在一些实施例中,接头可在还原条件下裂解。在一些实施例中,接头可在还原剂(如谷胱甘肽或二硫苏糖醇)存在下裂解。在一些实施例中,接头是可裂解二硫化物接头或可裂解磺酰胺接头。

[1688] 在一些实施例中,接头是可裂解二硫化物接头。多种二硫化物接头是本领域已知的,包括例如可使用SATA(N-琥珀酰亚胺基-5-乙酰基硫代乙酸酯)、SPDP(N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯)、SPDB(N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫代)丁酸酯)和SMPT(N-琥珀酰亚胺基氧基羰基-α-甲基-α-(2-吡啶基-二硫代)甲苯)、SPDB和SMPT形成的接头。

参见例如,Thorpe等人(1987)Cancer Res.[癌症研究]47:5924-31;Wawrzynczak等人,在Immunoconjugates:Antibody Conjugates in Radioimagery and Therapy of Cancer[免疫缀合物:在放射成像和癌症治疗中的抗体缀合物](C.W.Vogel编辑,Oxford U.Press[牛津大学出版社],1987)。还参见美国专利号4,880,935。通常使用二硫化物接头来利用细胞内硫醇的丰度,这可以促进其二硫键的裂解。最丰富的细胞内硫醇(即还原型谷胱甘肽)的细胞内浓度通常在1-10nM范围内,其比血液中最丰富的低分子硫醇(即,半胱氨酸)的约5μM的细胞内浓度要高约1,000倍(Goldmacher等人,在Cancer Drug Discovery and Development:Antibody-Drug Conjugates and Immunotoxins[癌症药物的发现与开发:抗体-药物缀合物和免疫毒素](G.L.Phillips编辑,Springer[施普林格出版社],2013))。蛋白质二硫化物异构酶家族的细胞内酶还可促进二硫化物接头的细胞内裂解。如本文所使用,可裂解二硫化物接头是指包含可裂解二硫化物部分的任何接头。术语"可裂解二硫化物部分"是指可以例如通过硫醇或酶裂解和/或还原的二硫键。

[1689] 在一些实施例中,接头是可裂解磺酰胺接头。如本文所使用,可裂解磺酰胺接头是指包含可裂解磺酰胺部分的任何接头。术语"可裂解磺酰胺部分"是指磺酰胺基团,即连接至胺基团的磺酰基基因,其中硫-氮键可被裂解。

[1690] 在一些实施例中,接头可为树突型接头,其经由分支的多功能接头部分将超过一个药物部分共价连接至抗体或抗原结合片段。参见例如Sun等人(2002)Bioorg Med Chem Lett.[生物有机化学与药物化学快报]12:2213-5;Sun等人(2003)Bioorg Med Chem.[生物有机化学与药物化学]11:1761-8。树突状接头可增加药物与抗体的摩尔比,即药物负载,其与ADC的效力有关。因此,在抗体或抗原结合片段只具有一个反应性半胱氨酸硫醇基团的情况下,例如多个剪接调节剂药物部分可经由树突状接头连接。在一些实施例中,接头部分或接头-药物部分可以经由还原的二硫桥连化学物质或限制性赖氨酸利用技术连接至抗体或抗原结合片段。参见例如国际公开号WO 2013/173391和WO 2013/173393。

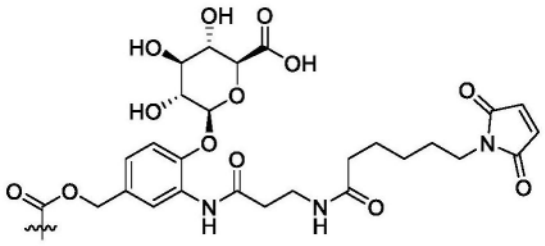
[1691] 在一些实施例中,接头可被细胞内环境(例如溶酶体或核内体或小凹)中存在的裂解剂(例如酶)裂解。接头可以例如为被细胞内肽酶或蛋白酶(包括但不限于溶酶体或核内体蛋白酶)裂解的肽接头。

[1692] 在一些实施例中,接头是可裂解肽接头。如本文所使用,可裂解肽接头是指包含可裂解肽部分的任何接头。术语"可裂解肽部分"是指可以被细胞内环境中存在的试剂裂解的任何化学键连接的氨基酸(天然或合成氨基酸衍生物)。例如,接头可以包含缬氨酸-丙氨酸(Val-Ala)序列、或缬氨酸-瓜氨酸(Val-Cit)序列,这些序列可被肽酶(如组织蛋白酶,例如组织蛋白酶B)裂解。在一些实施例中,接头可以包含谷氨酸-缬氨酸-瓜氨酸(Glu-Val-Cit)序列。在一些实施例中,接头是酶可裂解接头,且该接头中的可裂解肽部分可被酶裂解。在一些实施例中,该可裂解肽部分可被溶酶体酶(例如组织蛋白酶)裂解。在一些实施例中,接头是组织蛋白酶可裂解的接头。在一些实施例中,接头中的可裂解肽部分可被溶酶体半胱氨酸组织蛋白酶(如组织蛋白酶B、C、F、H、K、L、O、S、V、X或W)裂解。在一些实施例中,该可裂解肽部分可被组织蛋白酶B裂解。可以被组织蛋白酶B裂解的示例性二肽是缬氨酸-瓜氨酸(Val-Cit)(Dubowchik等人(2002)Bioconjugate Chem.[生物共轭化学]13:855-69)。

[1693] 在一些实施例中,接头或接头中的可裂解肽部分包含氨基酸单元。在一些实施例中,该氨基酸单元使接头可被蛋白酶裂解,由此在暴露于一种或多种细胞内蛋白酶(如一种

或多种溶酶体酶)时,促进剪接调节剂药物部分从该ADC释放(Doronina等人(2003)Nat Biotechnol.[自然生物技术]21:778-84;Dubowchik和Walker(1999)Pharm Therapeutics [药理学和治疗学]83:67-123)。示例性氨基酸单元包括但不限于二肽、三肽、四肽和五肽。示例性二肽包括但不限于缬氨酸-丙氨酸(Val-Ala)、缬氨酸-瓜氨酸(Val-Cit)、丙氨酸-天冬酰胺(Ala-Asn)、丙氨酸-苯丙氨酸(Ala-Phe)、苯丙氨酸-赖氨酸(Phe-Lys)、丙氨酸-赖氨酸(Ala-Lys)、丙氨酸-缬氨酸(Ala-Val)、缬氨酸-赖氨酸(Val-Lys)、赖氨酸-赖氨酸(Lys-Lys)、苯丙氨酸-瓜氨酸(Phe-Cit)、亮氨酸-瓜氨酸(Leu-Cit)、异亮氨酸-瓜氨酸(Ile-Cit)、色氨酸-瓜氨酸(Trp-Cit)和苯丙氨酸-丙氨酸(Phe-Ala)。示例性三肽包括但不限于丙氨酸-丙氨酸-天冬酰胺(Ala-Ala-Asn)、甘氨酸-缬氨酸-瓜氨酸(Gly-Val-Cit)、甘氨酸-甘氨酸-甘氨酸(Gly-Gly-Gly)、苯丙氨酸-苯丙氨酸-赖氨酸(Phe-Phe-Lys)、谷氨酸-缬氨酸-瓜氨酸(Glu-Val-Cit)(参见例如Anami等人(2018)Nat Comm.[自然通讯]9:2512,将该文献关于包含Glu-Val-Cit的示例性接头通过引用并入本文)和甘氨酸-苯丙氨酸-赖氨酸(Gly-Phe-Lys)。其他示例性氨基酸单元包括但不限于Gly-Phe-Gly-Gly(SEQ ID NO:34)、Gly-Phe-Leu-Gly(SEQ ID NO:35)、Ala-Leu-Ala-Leu(SEQ ID NO:36)、Phe-N^9-甲苯磺酰基-Arg和Phe-N^9-硝基-Arg,如例如美国专利号6,214,345中所述。在一些实施例中,接头中的氨基酸单元包含Val-Ala。在一些实施例中,接头中的氨基酸单元包含Val-Cit。在一些实施例中,接头中的氨基酸单元包含Glu-Val-Cit。氨基酸单元可包含天然存在的氨基酸残基、和/或次要氨基酸、和/或非天然存在的氨基酸类似物(如瓜氨酸)。氨基酸单元可针对被特定酶酶裂解进行设计和优化,该特定酶例如为肿瘤相关蛋白酶、溶酶体蛋白酶(如组织蛋白酶B、C、D或S)、或纤溶酶蛋白酶。

[1694] 在一些实施例中,接头是可裂解β-葡萄糖醛酸苷接头。如本文所使用,可裂解β-葡萄糖醛酸苷接头是指包含可裂解β-葡萄糖醛酸苷部分的任何接头。示例性可裂解β-葡萄糖醛酸苷接头包含以下结构:

[1695] 

[1696] 术语“可裂解β-葡萄糖醛酸苷部分”是指可被具有β-葡萄糖醛酸苷酶活性的试剂裂解的糖苷键。在一些实施例中,该接头包含可被β-葡萄糖醛酸苷酶裂解的糖苷键。β-葡萄糖醛酸苷酶是催化具有β-构型的葡萄糖醛酸苷的糖苷键水解的UDP-葡萄糖醛酸基转移酶。

[1697] 在一些实施例中,本文所披露的ADC包含接头中的可裂解β-葡萄糖醛酸苷部分,该部分可被酶裂解。在一些实施例中,该接头中的可裂解β-葡萄糖醛酸苷部分可被溶酶体酶(例如β-葡萄糖醛酸苷酶)裂解。在一些实施例中,该接头是β-葡萄糖醛酸苷酶可裂解的接头。在一些实施例中,该接头中的可裂解β-葡萄糖醛酸苷部分允许在ADC内化之后被β-葡萄糖醛酸苷酶裂解该接头,由此促进在细胞环境中药物部分从ADC释放。

[1698] 在一些实施例中,在任何本文所披露的ADC中的接头可以包含至少一个间隔子单元,该间隔子单元将抗体或抗原结合片段接合至药物部分(例如剪接调节剂药物部分)。在一些实施例中,在抗体或抗原结合片段与可裂解部分之间的间隔子单元当存在时,将接头

中的裂解位点(例如可裂解肽部分)接合至抗体或抗原结合片段。在一些实施例中,在药物部分与可裂解部分之间的间隔子单元当存在时,将接头中的裂解位点(例如可裂解肽部分)接合至药物部分。在一些实施例中,不存在裂解位点,且使用间隔子单元将抗体或抗原结合片段连接至药物部分。

[1699] 在一些实施例中,接头和/或接头中的间隔子单元是基本上亲水的。亲水性接头可用于降低可经由多药耐药性(MDR)或功能上类似的转运蛋白从抗性癌细胞泵出药物的程度。在一些实施例中,亲水性接头可以包括一个或多个聚乙二醇(PEG)部分,例如1、2、3、4、5或6个PEG部分。在一些实施例中,该接头包含2个PEG部分。

[1700] 在一些实施例中,接头中的间隔子单元包含一个或多个PEG部分。在一些实施例中,该间隔子单元包含一个或多个-$(PEG)_m$-,且m是1至10的整数(即,m可以为1、2、3、4、5、6、7、8、9或10)。在一些实施例中,m在1至10范围内;在2至8范围内;在2至6范围内;在2至5范围内;在2至4范围内;或在2至3范围内。在一些实施例中,m是2。在一些实施例中,该间隔子单元包含$(PEG)_2$、$(PEG)_3$、$(PEG)_4$、$(PEG)_5$、$(PEG)_6$、$(PEG)_7$、$(PEG)_8$、$(PEG)_9$或$(PEG)_{10}$。在一些实施例中,该间隔子单元包含$(PEG)_2$。

[1701] 在一些实施例中,接头中的间隔子单元包含烷基部分。在一些实施例中,该间隔子单元包含一个或多个-$(CH_2)_n$-,且n是1至10的整数(即,n可以为1、2、3、4、5、6、7、8、9或10)。在一些实施例中,n在1至10范围内;在2至8范围内;在2至6范围内;在2至5范围内;在2至4范围内;或在2至3范围内。在一些实施例中,n是2。在一些实施例中,n是5。在一些实施例中,n是6。在一些实施例中,该间隔子单元包含$(CH_2)_2$、$(CH_2)_3$、$(CH_2)_4$、$(CH_2)_5$、$(CH_2)_6$、$(CH_2)_7$、$(CH_2)_8$、$(CH_2)_9$或$(CH_2)_{10}$。在一些实施例中,该间隔子单元包含$(CH_2)_2$("Et")。在一些实施例中,该间隔子单元包含$(CH_2)_6$("Hex")。在一些实施例中,该间隔子单元包含$(CH_2)_2$-O-$(CH_2)_2$("Et-O-Et")。

[1702] 可以例如使用间隔子单元来将抗体或抗原结合片段直接地或间接地连接至药物部分。在一些实施例中,该间隔子单元将抗体或抗原结合片段直接地连接至剪接调节剂药物部分。在一些实施例中,抗体或抗原结合片段和剪接调节剂药物部分经由包含一个或多个PEG部分(例如$(PEG)_2$)或一个或多个烷基部分(例如$(CH_2)_2$、$(CH_2)_6$或$(CH_2)_2$-O-$(CH_2)_2$)的间隔子单元连接。在一些实施例中,该间隔子单元将抗体或抗原结合片段间接地连接至剪接调节剂药物部分。在一些实施例中,该间隔子单元经由可裂解部分(例如可裂解肽或可裂解β-葡萄糖醛酸苷)和/或用于将间隔子单元接合至抗体或抗原结合片段的连接部分(例如马来酰亚胺部分)将抗体或抗原结合片段间接地连接至剪接调节剂药物部分。

[1703] 在不同实施例中,该间隔子单元经由马来酰亚胺(Mal)部分连接至抗体或抗原结合片段(即,该抗体或抗原结合片段)。

[1704] 经由Mal连接至抗体或抗原结合片段的间隔子单元在本文中称为"Mal-间隔子单元"。如本文所使用,术语"Mal"或"马来酰亚胺部分"意指含有马来酰亚胺基团且可与巯基基团(例如抗体或抗原结合片段上的半胱氨酸残基的巯基基团)反应的化合物。可与巯基基团(硫醇)反应的其他官能基团包括但不限于碘乙酰胺、溴乙酰胺、乙烯基吡啶、二硫化物、吡啶基二硫化物、异氰酸酯和异硫氰酸酯。在一些实施例中,该Mal-间隔子单元可与该抗体或抗原结合片段上的半胱氨酸残基反应。在一些实施例中,该Mal-间隔子单元经由半胱氨酸残基接合至抗体或抗原结合片段。在一些实施例中,该Mal-间隔子单元包含PEG部分。在

一些实施例中,该Mal-间隔子单元包含烷基部分。

[1705] 在一些实施例中,该接头包含Mal-间隔子单元和可裂解肽部分。在一些实施例中,该可裂解肽部分包含氨基酸单元。在一些实施例中,该氨基酸单元包含Val-Cit。在一些实施例中,该氨基酸单元包含Val-Ala。在一些实施例中,该氨基酸单元包含Glu-Val-Cit。在一些实施例中,该接头包含Mal-间隔子单元和Val-Cit。在一些实施例中,该接头包含Mal-间隔子单元和Val-Ala。在一些实施例中,该接头包含Mal-间隔子单元和Val-Cit,其中该Mal-间隔子单元包含马来酰亚胺基己酰基(MC)。在一些实施例中,该接头包含Mal-间隔子单元和Val-Ala,其中该Mal-间隔子单元包含马来酰亚胺基己酰基(MC)。在一些实施例中,该接头包含Mal-间隔子单元和可裂解β-葡萄糖醛酸苷部分。

[1706] 在一些实施例中,该接头包含以下结构:Mal-间隔子单元。在一些实施例中,该Mal-间隔子单元包含马来酰亚胺基己酰基(MC)。在一些实施例中,该接头包含以下结构:MC。在一些实施例中,该接头包含以下结构:Mal-$(CH_2)_2$(“Mal-Et”)。在一些实施例中,该接头包含以下结构:Mal-$(CH_2)_6$(“Mal-Hex”)。在一些实施例中,该接头包含以下结构:Mal-$(CH_2)_2$-O-$(CH_2)_2$(“Mal-Et-O-Et”)。在一些实施例中,该接头包含以下结构:Mal-$(PEG)_2$。在一些实施例中,该接头包含以下结构:Mal-$(PEG)_2$-CO。

[1707] 在不同实施例中,该Mal-间隔子单元将抗体或抗原结合片段连接至可裂解肽部分。在一些实施例中,该接头包含Mal-间隔子单元-肽。在一些实施例中,该接头包含以下结构:Mal-间隔子单元-Val-Cit。在一些实施例中,该Mal-间隔子单元包含马来酰亚胺基己酰基(MC)。在一些实施例中,该接头包含以下结构:MC-Val-Cit。

[1708] 在一些实施例中,该接头包含以下结构:Mal-间隔子单元-Val-Ala。在一些实施例中,该Mal-间隔子单元包含马来酰亚胺基己酰基(MC)。在一些实施例中,该接头包含以下结构:MC-Val-Ala。

[1709] 在不同实施例中,该Mal-间隔子单元将抗体或抗原结合片段连接至可裂解β-葡萄糖醛酸苷部分。在一些实施例中,该接头包含Mal-间隔子单元-β-葡萄糖醛酸苷。在一些实施例中,该接头包含MC-β-葡萄糖醛酸苷。

[1710] 在不同实施例中,该接头中的可裂解部分直接地接合至剪接调节剂药物部分。在其他实施例中,该间隔子单元用于将接头中的可裂解部分连接至剪接调节剂药物部分。在不同实施例中,剪接调节剂通过间隔子单元连接至接头中的可裂解部分。

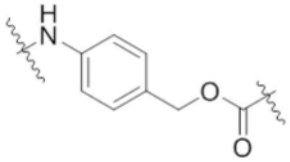
[1711] 间隔子单元可以为“自消融型”或“非自消融型”。“非自消融型”间隔子单元是在接头裂解时间隔子单元的一部分或全部仍结合至剪接调节剂药物部分的间隔子单元。非自消融型间隔子单元的实例包括但不限于甘氨酸间隔子单元和甘氨酸-甘氨酸间隔子单元。非自消融型间隔子单元最终可随时间降解,但在细胞条件下不会容易地完全释放出所连接的原生药物部分。“自消融型”间隔子单元允许在细胞内条件下释放出原生药物部分。“原生药物”或“原生药物部分”是在间隔子单元裂解/降解之后不剩余任何间隔子单元部分或其他化学修饰的药物或药物部分。

[1712] 自消融型化学物质是本领域已知的且可针对所披露的ADC容易地选择。在不同实施例中,将接头中的可裂解部分连接至剪接调节剂药物部分的间隔子单元是自消融型的,且在细胞内条件下裂解可裂解部分的同时或之前/之后不久经历自消融。在一些实施例中,剪接调节剂通过自消融型间隔子单元连接至接头中的可裂解部分。在某些实施例中,剪接

调节剂通过自消融型间隔子单元连接至接头中的可裂解部分,该可裂解部分包含Val-Cit,且马来酰亚胺基己酰基(MC)将该可裂解部分接合至抗体或抗原结合片段。在某些实施例中,剪接调节剂通过自消融型间隔子单元连接至接头中的可裂解部分,该可裂解部分包含Val-Ala,且马来酰亚胺基己酰基(MC)将该可裂解部分接合至抗体或抗原结合片段。在某些实施例中,剪接调节剂通过自消融型间隔子单元连接至接头中的可裂解部分,该可裂解部分包含Glu-Val-Cit,且马来酰亚胺基己酰基(MC)将该可裂解部分接合至抗体或抗原结合片段。在某些实施例中,剪接调节剂经由接头中的Mal-间隔子单元(例如MC)接合至抗体或抗原结合片段,该接头接合至Val-Cit可裂解部分和pABC或pAB自消融型间隔子单元。在某些其他实施例中,剪接调节剂经由接头中的Mal-间隔子单元(例如MC)接合至抗体或抗原结合片段,该接头接合至Val-Ala可裂解部分和pABC或pAB自消融型间隔子单元。在某些其他实施例中,剪接调节剂经由接头中的Mal-间隔子单元(例如MC)接合至抗体或抗原结合片段,该接头接合至Glu-Val-Cit可裂解部分和pABC或pAB自消融型间隔子单元。

[1713] 在某些实施例中,接头中的自消融型间隔子单元包含对氨基苄基单元。在一些实施例中,对氨基苯甲醇(pABOH)经由酰胺键连接至接头中的氨基酸单元或其他可裂解部分,且在pABOH与药物部分之间形成氨基甲酸酯、氨基甲酸甲酯或碳酸酯(Hamann等人(2005)Expert Opin Ther Patents[治疗专利专家意见]15:1087-103)。在一些实施例中,自消融型间隔子单元是或包含对氨基苄氧基羰基(pABC)。不受理论束缚,认为pABC的自消融涉及自发的1,6-消除反应(Jain等人(2015)Pharm Res.[药学研究]32:3526-40)。

[1714] 在不同实施例中,所披露的ADC中使用的对氨基苄氧基羰基(pABC)的结构显示于下:

[1715] 

[1716] 在不同实施例中,自消融型间隔子单元将接头中的可裂解部分连接至剪接调节剂。在一些实施例中,自消融型间隔子单元是pABC。在一些实施例中,pABC将该接头中的可裂解部分连接至该剪接调节剂。在一些实施例中,pABC在可裂解部分裂解后经历自消融,且剪接调节剂以其天然、活性形式从ADC释放。

[1717] 在一些实施例中,抗HER2抗体或抗原结合片段通过包含MC-Val-Cit-pABC的接头接合至剪接调节剂。在其他实施例中,抗HER2抗体或抗原结合片段通过包含MC-Val-Ala-pABC的接头接合至剪接调节剂。

[1718] 在一些实施例中,抗CD138抗体或抗原结合片段通过包含MC-Val-Cit-pABC的接头接合至剪接调节剂。在其他实施例中,抗CD138抗体或抗原结合片段通过包含MC-Val-Ala-pABC的接头接合至剪接调节剂。

[1719] 在一些实施例中,抗EPHA2抗体或抗原结合片段通过包含MC-Val-Cit-pABC的接头接合至剪接调节剂。在其他实施例中,抗EPHA2抗体或抗原结合片段通过包含MC-Val-Ala-pABC的接头接合至剪接调节剂。

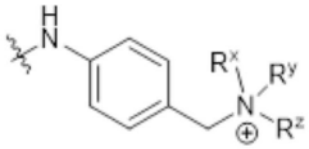
[1720] 在一些实施例中,在接头中的可裂解肽部分裂解后,pABC经历自消融。在一些实施例中,该可裂解肽部分包含氨基酸单元。在一些实施例中,该接头包含氨基酸单元-pABC。在

一些实施例中,该氨基酸单元是Val-Cit。在一些实施例中,该接头包含Val-Cit-pABC。在一些实施例中,该氨基酸单元是Val-Ala。在一些实施例中,该接头包含Val-Ala-pABC。在一些实施例中,该氨基酸单元是Glu-Val-Cit。在一些实施例中,该接头包含Glu-Val-Cit-pABC。在一些实施例中,该氨基酸单元是Ala-Ala-Asn。在一些实施例中,该接头包含Ala-Ala-Asn-pABC。

[1721] 在一些实施例中,在接头中的可裂解β-葡萄糖醛酸苷部分裂解后,pABC经历自消融。在一些实施例中,该接头包含β-葡萄糖醛酸苷-pABC。

[1722] 在某些实施例中,接头中的自消融型间隔子单元包含对氨基苄基单元。在一些实施例中,接头中的自消融型间隔子单元包含对氨基苄基(pAB)。在一些实施例中,pAB的自消融涉及自发的1,6-消除反应。

[1723] 在不同实施例中,所披露的ADC中使用的对氨基苄基(pAB)的结构显示于下:

[1724] 

[1725] 在不同实施例中,自消融型间隔子单元将接头中的可裂解部分连接至剪接调节剂。在一些实施例中,自消融型间隔子单元是pAB。在一些实施例中,pAB将该接头中的可裂解部分连接至该剪接调节剂。在一些实施例中,pAB在可裂解部分裂解后经历自消融,且剪接调节剂以其天然、活性形式从ADC释放。

[1726] 在一些实施例中,抗HER2抗体或抗原结合片段通过包含MC-Val-Cit-pAB的接头接合至剪接调节剂。在其他实施例中,抗HER2抗体或抗原结合片段通过包含MC-Val-Ala-pAB的接头接合至剪接调节剂。

[1727] 在一些实施例中,抗CD138抗体或抗原结合片段通过包含MC-Val-Cit-pAB的接头接合至剪接调节剂。在其他实施例中,抗CD138抗体或抗原结合片段通过包含MC-Val-Ala-pAB的接头接合至剪接调节剂。

[1728] 在一些实施例中,抗EPHA2抗体或抗原结合片段通过包含MC-Val-Cit-pAB的接头接合至剪接调节剂。在其他实施例中,抗EPHA2抗体或抗原结合片段通过包含MC-Val-Ala-pAB的接头接合至剪接调节剂。

[1729] 在一些实施例中,在接头中的可裂解肽部分裂解后,pAB经历自消融。在一些实施例中,该可裂解肽部分包含氨基酸单元。在一些实施例中,该接头包含氨基酸单元-pAB。在一些实施例中,该氨基酸单元是Val-Cit。在一些实施例中,该接头包含Val-Cit-pAB。在一些实施例中,该氨基酸单元是Val-Ala。在一些实施例中,该接头包含Val-Ala-pAB。在一些实施例中,该氨基酸单元是Glu-Val-Cit。在一些实施例中,该接头包含Glu-Val-Cit-pAB。在一些实施例中,该氨基酸单元是Ala-Ala-Asn。在一些实施例中,该接头包含Ala-Ala-Asn-pAB。

[1730] 在一些实施例中,在接头中的可裂解β-葡萄糖醛酸苷部分裂解后,pAB经历自消融。在一些实施例中,该接头包含β-葡萄糖醛酸苷-pAB。

[1731] 在一些其他实施例中,剪接调节剂通过非自消融型间隔子单元连接至接头中的可裂解部分。在某些实施例中,剪接调节剂通过非自消融型间隔子单元连接至接头中的可裂解部分,该可裂解部分包含Val-Cit,且马来酰亚胺基己酰基(MC)将该可裂解部分接合至抗

体或抗原结合片段。在某些实施例中,剪接调节剂通过非自消融型间隔子单元连接至接头中的可裂解部分,该可裂解部分包含Val-Ala,且马来酰亚胺基己酰基(MC)将该可裂解部分接合至抗体或抗原结合片段。

[1732] 在各个方面,ADC中的抗体或抗原结合片段经由接头缀合至剪接调节剂药物部分,其中该接头包含Mal-间隔子单元(例如MC)、可裂解氨基酸单元和pABC。在一些实施例中,该间隔子单元包含烷基部分。在一些实施例中,该Mal-间隔子单元包含马来酰亚胺基己酰基(MC)。在一些实施例中,该接头包含Mal-间隔子单元-氨基酸单元-pABC。在一些实施例中,该接头包含MC-氨基酸单元-pABC。在一些实施例中,该接头包含MC-Val-Cit-pABC。在一些实施例中,该接头包含MC-Val-Ala-pABC。在一些实施例中,该接头包含MC-Glu-Val-Cit-pABC。在一些实施例中,该接头包含MC-Ala-Ala-Asn-pABC。

[1733] 在各个其他方面,ADC中的抗体或抗原结合片段经由接头缀合至剪接调节剂药物部分,其中该接头包含Mal-间隔子单元(例如MC)、可裂解氨基酸单元和pAB。在一些实施例中,该间隔子单元包含烷基部分。在一些实施例中,该Mal-间隔子单元包含马来酰亚胺基己酰基(MC)。在一些实施例中,该接头包含Mal-间隔子单元-氨基酸单元-pAB。在一些实施例中,该接头包含MC-氨基酸单元-pAB。在一些实施例中,该接头包含MC-Val-Cit-pAB。在一些实施例中,该接头包含MC-Val-Ala-pAB。在一些实施例中,该接头包含MC-Glu-Val-Cit-pAB。在一些实施例中,该接头包含MC-Ala-Ala-Asn-pAB。

[1734] 在各个其他方面,ADC中的抗体或抗原结合片段经由接头缀合至剪接调节剂药物部分,其中该接头包含Mal-间隔子单元(例如MC)、可裂解β-葡萄糖醛酸苷和pABC。在一些实施例中,该接头包含Mal-间隔子单元-β-葡萄糖醛酸苷-pABC。在一些实施例中,该接头包含MC-β-葡萄糖醛酸苷-pABC。

[1735] 在仍其他方面,ADC中的抗体或抗原结合片段经由接头缀合至剪接调节剂药物部分,其中该接头包含Mal-间隔子单元(例如MC)、可裂解β-葡萄糖醛酸苷和pAB。在一些实施例中,该接头包含Mal-间隔子单元-β-葡萄糖醛酸苷-pAB。在一些实施例中,该接头包含MC-β-葡萄糖醛酸苷-pAB。

[1736] 在不同实施例中,ADC复合物具有式(I):

[1737] $Ab-(L-D)_p$ (I)

[1738] 其中Ab是靶向赘生性细胞的抗体或抗原结合片段;

[1739] D是剪接调节剂;

[1740] L是将Ab共价连接至D的接头;并且

[1741] p是1至15的整数。

[1742] 在一些实施例中,ADC中的抗体或抗原结合片段(Ab)经由接头缀合至剪接调节剂药物部分,其中该接头是所披露或通过引用并入本文的接头中的任一种、或包含所披露或通过引用并入本文的接头中的任一种的一种或多种组分。

[1743] 在一些实施例中,该接头包含可裂解部分,该可裂解部分被固定放置使得接头的任何部分或抗体或抗原结合片段在裂解后都不会与剪接调节剂保持结合。在一些实施例中,该可裂解部分是可裂解肽部分,例如氨基酸单元,如Val-Cit或Val-Ala。在一些实施例中,该氨基酸单元或接头包含Val-Cit。在一些实施例中,该氨基酸单元或接头包含Val-Ala。在一些实施例中,该氨基酸单元或接头包含Glu-Val-Cit。

[1744] 在一些实施例中,该接头包含至少一个间隔子单元,该间隔子单元将抗体或抗原结合片段接合至可裂解部分。在一些实施例中,该接头包含至少一个间隔子单元,该间隔子单元将抗体或抗原结合片段接合至药物部分。在一些实施例中,该间隔子单元或接头包含至少一个烷基部分。

[1745] 在一些实施例中,接头中的间隔子单元经由Mal部分("Mal-间隔子单元")连接至抗体或抗原结合片段。在一些实施例中,该Mal-间隔子单元包含至少一个烷基部分。在一些实施例中,该接头包含马来酰亚胺基己酰基(MC)。在一些实施例中,该接头包含Mal-$(CH_2)_2$("Mal-Et")。在一些实施例中,该接头包含Mal-$(CH_2)_6$("Mal-Hex")。在一些实施例中,该接头包含Mal-$(CH_2)_2$-O-$(CH_2)_2$("Mal-Et-O-Et")。在一些实施例中,该接头包含Mal-$(PEG)_2$-CO。在一些实施例中,该Mal-间隔子单元将抗体或抗原结合片段连接至药物部分。

[1746] 在一些实施例中,该Mal-间隔子单元或接头包含Mal-$(PEG)_2$、Mal-$(PEG)_3$、Mal-$(PEG)_4$、Mal-$(PEG)_5$、Mal-$(PEG)_6$、Mal-$(PEG)_7$或Mal-$(PEG)_8$。在一些实施例中,该Mal-间隔子单元或接头包含Mal-$(PEG)_2$。在一些实施例中,该Mal-间隔子单元或接头包含Mal-$(PEG)_2$-CO、Mal-$(PEG)_3$-CO、Mal-$(PEG)_4$-CO、Mal-$(PEG)_5$-CO、Mal-$(PEG)_6$-CO、Mal-$(PEG)_7$-CO或Mal-$(PEG)_8$-CO。在一些实施例中,该Mal-间隔子单元或接头包含Mal-$(PEG)_2$-CO。在一些实施例中,该Mal-间隔子单元或接头包含Mal-$(PEG)_2$-CO和至少一个额外间隔子单元。在一些实施例中,Mal-$(PEG)_2$-CO将抗体或抗原结合片段连接至药物部分。在一些实施例中,该接头包含Mal-$(PEG)_2$-CO或由其组成。"Mal-$(PEG)_2$-CO"接头的实例在本文中也称为"ADL2"或"ADL2"接头。

[1747] 在一些实施例中,该Mal-间隔子单元或接头包含MC。在一些实施例中,该Mal-间隔子单元或接头包含MC和至少一个额外间隔子单元。在一些实施例中,MC将抗体或抗原结合片段连接至药物部分。在一些实施例中,该接头包含MC或由其组成。"MC"接头的实例在本文中也称为"ADL10"或"ADL10"接头。

[1748] 在一些实施例中,该Mal-间隔子单元或接头包含Mal-$(CH_2)_6$("Mal-Hex")。在一些实施例中,该Mal-间隔子单元或接头包含Mal-Hex和至少一个额外间隔子单元。在一些实施例中,Mal-Hex将抗体或抗原结合片段连接至药物部分。在一些实施例中,该接头包含Mal-Hex。"Mal-Hex"接头的实例在本文中也称为"ADL12"或"ADL12"接头。

[1749] 在一些实施例中,该Mal-间隔子单元或接头包含Mal-$(CH_2)_2$("Mal-Et")。在一些实施例中,该Mal-间隔子单元或接头包含Mal-Et和至少一个额外间隔子单元。在一些实施例中,Mal-Et将抗体或抗原结合片段连接至药物部分。在一些实施例中,该接头包含Mal-Et。"Mal-Et"接头的实例在本文中也称为"ADL14"或"ADL14"接头。

[1750] 在一些实施例中,该Mal-间隔子单元或接头包含Mal-$(CH_2)_2$-O-$(CH_2)_2$("Mal-Et-O-Et")。在一些实施例中,该Mal-间隔子单元或接头包含Mal-Et-O-Et和至少一个额外间隔子单元。在一些实施例中,Mal-Et-O-Et将抗体或抗原结合片段连接至药物部分。在一些实施例中,该接头包含Mal-Et-O-Et。"Mal-Et-O-Et"接头的实例在本文中也称为"ADL15"或"ADL15"接头。

[1751] 在一些其他实施例中,该Mal-间隔子单元将抗体或抗原结合片段连接至接头中的可裂解部分。在一些实施例中,该接头中的可裂解部分是可裂解肽部分,例如氨基酸单元。在一些实施例中,该可裂解肽部分是Val-Cit或Val-Ala。在一些实施例中,该Mal-间隔子单

元或接头包含MC。在一些实施例中,该接头包含MC-Val-Cit。在一些实施例中,该接头包含MC-Val-Ala。在一些实施例中,该接头包含MC-Glu-Val-Cit。在一些实施例中,该接头包含MC-Ala-Ala-Asn。

[1752] 在一些实施例中,该间隔子单元将接头中的可裂解部分连接至剪接调节剂。在一些实施例中,将可裂解部分连接至剪接调节剂的间隔子单元是自消融型的。

[1753] 在一些实施例中,该间隔子单元包含pABC。在一些实施例中,pABC将可裂解部分连接至剪接调节剂。在一些实施例中,该可裂解部分是可裂解肽部分,例如氨基酸单元。在一些实施例中,该接头包含氨基酸单元-pABC。

[1754] 在一些实施例中,该接头包含Val-Cit-pABC。在一些实施例中,该接头包含Val-Cit-pABC以及将该接头接合至抗体或抗原结合片段的MC Mal-间隔子单元。在一些实施例中,该接头包含MC-Val-Cit-pABC。在一些实施例中,该接头包含MC-Val-Cit-pABC和至少一个额外间隔子单元。MC-Val-Cit-pABC接头的实例在本文中也称为“ADL1”或“ADL1”接头。

[1755] 在一些实施例中,该接头包含Val-Ala-pABC。在一些实施例中,该接头包含Val-Ala-pABC以及将该接头接合至抗体或抗原结合片段的MC Mal-间隔子单元。在一些实施例中,该接头包含MC-Val-Ala-pABC。在一些实施例中,该接头包含MC-Val-Ala-pABC和至少一个额外间隔子单元。MC-Val-Ala-pABC接头的实例在本文中也称为“ADL6”或“ADL6”接头。

[1756] 在一些实施例中,该接头包含Glu-Val-Cit-pABC。在一些实施例中,该接头包含Glu-Val-Cit-pABC以及将该接头接合至抗体或抗原结合片段的MC Mal-间隔子单元。在一些实施例中,该接头包含MC-Glu-Val-Cit-pABC。在一些实施例中,该接头包含MC-Glu-Val-Cit-pABC和至少一个额外间隔子单元。MC-Glu-Val-Cit-pABC接头的实例在本文中也称为“ADL23”或“ADL23”接头。

[1757] 在一些实施例中,该接头包含Ala-Ala-Asn-pABC。在一些实施例中,该接头包含Ala-Ala-Asn-pABC以及将该接头接合至抗体或抗原结合片段的MC Mal-间隔子单元。在一些实施例中,该接头包含MC-Ala-Ala-Asn-pABC。在一些实施例中,该接头包含MC-Ala-Ala-Asn-pABC和至少一个额外间隔子单元。MC-Ala-Ala-Asn-pABC接头的实例在本文中也称为“ADL21”或“ADL21”接头。

[1758] 在一些其他实施例中,该间隔子单元包含pAB。在一些实施例中,pAB将可裂解部分连接至剪接调节剂。在一些实施例中,该可裂解部分是可裂解肽部分,例如氨基酸单元。在一些实施例中,该接头包含氨基酸单元-pAB。

[1759] 在一些实施例中,该接头包含Val-Ala-pAB。在一些实施例中,该接头包含Val-Ala-pAB以及将该接头接合至抗体或抗原结合片段的MC Mal-间隔子单元。在一些实施例中,该接头包含MC-Val-Ala-pAB。在一些实施例中,该接头包含MC-Val-Ala-pAB和至少一个额外间隔子单元。MC-Val-Ala-pAB接头的实例在本文中也称为“ADL5”或“ADL5”接头。

[1760] 在一些实施例中,该接头包含Val-Cit-pAB。在一些实施例中,该接头包含Val-Cit-pAB以及将该接头接合至抗体或抗原结合片段的MC Mal-间隔子单元。在一些实施例中,该接头包含MC-Val-Cit-pAB。在一些实施例中,该接头包含MC-Val-Cit-pAB和至少一个额外间隔子单元。MC-Val-Cit-pAB接头的实例在本文中也称为“ADL7”或“ADL7”接头。

[1761] 在一些实施例中,该接头包含β-葡萄糖醛酸苷-pABC。在一些实施例中,该接头包含β-葡萄糖醛酸苷-pABC以及将该接头接合至抗体或抗原结合片段的MC Mal-间隔子单元。

在一些实施例中,该接头包含MC-β-葡萄糖醛酸苷-pABC。在一些实施例中,该接头包含MC-β-葡萄糖醛酸苷-pABC和至少一个额外间隔子单元。MC-β-葡萄糖醛酸苷-pABC接头的实例在本文中也称为“ADL13”或“ADL13”接头。

[1762] 在一些实施例中,该接头包含β-葡萄糖醛酸苷-pAB。在一些实施例中,该接头包含β-葡萄糖醛酸苷-pAB以及将该接头接合至抗体或抗原结合片段的MC Mal-间隔子单元。在一些实施例中,该接头包含MC-β-葡萄糖醛酸苷-pAB。

[1763] 在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段经由ADL1、ADL2、ADL5、ADL6、ADL7、ADL12、ADL13、ADL14、ADL21、ADL23或ADL15接头缀合至剪接调节剂药物部分。已发现,在不同实施例中,包含ADL1、ADL2、ADL5、ADL6、ADL7、ADL12、ADL13、ADL14、ADL21、ADL23或ADL15接头和本文所披露的剪接调节剂药物部分的ADC展示出治疗性ADC的所需特性。在不同实施例中,这些特性包括但不限于药物负载的有效水平、低聚集水平、在储存条件下或当在体内循环时的稳定性(例如血清稳定性)、对靶标表达细胞保持与未缀合抗体相当的亲和力、针对靶标表达细胞的强效细胞毒性、较低的脱靶细胞杀伤水平、较高的旁观者杀伤水平和/或有效的体内抗癌活性,所有这些特性均与使用其他接头-有效负载的ADC相比较。例如,在不同实施例中,相较于使用其他接头-有效负载(例如ADL10接头和剪接调节剂药物部分)的ADC,包含ADL1、ADL2、ADL5、ADL6、ADL7、ADL12、ADL13、ADL14、ADL21、ADL23或ADL15接头和本文所披露的剪接调节剂药物部分的ADC展现出增加的抑制靶标表达细胞生长和/或增殖的能力。在不同实施例中,相较于基于其他剪接调节剂的ADC(例如基于泰兰他汀A(thailanstatin A)的ADC,例如,如Puthenveetil等人Bioconjugate Chem.[生物共轭化学](2016)27:1880-8中所报导的),包含ADL1、ADL2、ADL5、ADL6、ADL7、ADL12、ADL13、ADL14、ADL21、ADL23或ADL15接头和本文所披露的剪接调节剂药物部分的ADC展现出令人惊讶地增加的体内稳定性(例如血浆稳定性)。

[1764] 在一些实施例中,利用接头-有效负载与例如抗HER2抗体(如曲妥珠单抗)、抗CD138抗体(如B-B4)、或抗EPHA2抗体(如1C1)的缀合可观察到由ADL1、ADL2、ADL5、ADL6、ADL7、ADL12、ADL13、ADL14、ADL21、ADL23或ADL15接头和本文所披露的剪接调节剂药物部分的特定组合所提供的良好或优良功能特性。

[1765] 在一些实施例中,ADC包含ADL1-剪接调节剂和抗体或抗原结合片段,该抗体或抗原结合片段包含保持靶向赘生性细胞并内化于赘生性细胞的能力的抗体或其抗原结合片段。在一些实施例中,ADC包含ADL2-剪接调节剂和抗体或抗原结合片段,该抗体或抗原结合片段包含保持靶向赘生性细胞并内化于赘生性细胞的能力的抗体或其抗原结合片段。在一些实施例中,ADC包含ADL5-剪接调节剂和抗体或抗原结合片段,该抗体或抗原结合片段包含保持靶向赘生性细胞并内化于赘生性细胞的能力的抗体或其抗原结合片段。在一些实施例中,ADC包含ADL6-剪接调节剂和抗体或抗原结合片段,该抗体或抗原结合片段包含保持靶向赘生性细胞并内化于赘生性细胞的能力的抗体或其抗原结合片段。在一些实施例中,ADC包含ADL7-剪接调节剂和抗体或抗原结合片段,该抗体或抗原结合片段包含保持靶向赘生性细胞并内化于赘生性细胞的能力的抗体或其抗原结合片段。在一些实施例中,ADC包含ADL12-剪接调节剂和抗体或抗原结合片段,该抗体或抗原结合片段包含保持靶向赘生性细胞并内化于赘生性细胞的能力的抗体或其抗原结合片段。在一些实施例中,ADC包含ADL13-剪接调节剂和抗体或抗原结合片段,该抗体或抗原结合片段包含保持靶向赘生性细胞并内

化于赘生性细胞的能力的抗体或其抗原结合片段。在一些实施例中,ADC包含ADL14-剪接调节剂和抗体或抗原结合片段,该抗体或抗原结合片段包含保持靶向赘生性细胞并内化于赘生性细胞的能力的抗体或其抗原结合片段。在一些实施例中,ADC包含ADL15-剪接调节剂和抗体或抗原结合片段,该抗体或抗原结合片段包含保持靶向赘生性细胞并内化于赘生性细胞的能力的抗体或其抗原结合片段。

[1766] 在一些实施例中,ADC包含ADL1-剪接调节剂和靶向表达HER2的赘生性细胞的抗体或其抗原结合片段。在一些实施例中,ADC包含ADL2-剪接调节剂和靶向表达HER2的赘生性细胞的抗体或其抗原结合片段。在一些实施例中,ADC包含ADL5-剪接调节剂和靶向表达HER2的赘生性细胞的抗体或其抗原结合片段。在一些实施例中,ADC包含ADL6-剪接调节剂和靶向表达HER2的赘生性细胞的抗体或其抗原结合片段。在一些实施例中,ADC包含ADL7-剪接调节剂和靶向表达HER2的赘生性细胞的抗体或其抗原结合片段。在一些实施例中,ADC包含ADL12-剪接调节剂和靶向表达HER2的赘生性细胞的抗体或其抗原结合片段。在一些实施例中,ADC包含ADL13-剪接调节剂和靶向表达HER2的赘生性细胞的抗体或其抗原结合片段。在一些实施例中,ADC包含ADL14-剪接调节剂和靶向表达HER2的赘生性细胞的抗体或其抗原结合片段。在一些实施例中,ADC包含ADL15-剪接调节剂和靶向表达HER2的赘生性细胞的抗体或其抗原结合片段。

[1767] 在一些实施例中,靶向表达HER2的赘生性细胞的抗体或其抗原结合片段是内化性抗体或内化性抗原结合片段。在一些实施例中,靶向表达HER2的赘生性细胞的抗体或抗原结合片段包含含有SEQ IDNO:1(HCDR1)、SEQ ID NO:2(HCDR2)和SEQ ID NO:3(HCDR3)的氨基酸序列的三个重链互补决定区(HCDR);以及含有SEQ ID NO:4(LCDR1)、SEQ ID NO:5(LCDR2)和SEQ ID NO:6(LCDR3)的氨基酸序列的三个轻链互补决定区(LCDR)。

[1768] 在一些实施例中,ADC具有式(I):

[1769] $Ab-(L-D)_p$ (I)

[1770] 其中:

[1771] (i)Ab是抗HER2抗体或其抗原结合片段,其包含含有SEQ ID NO:1(HCDR1)、SEQ ID NO:2(HCDR2)和SEQ ID NO:3(HCDR3)的氨基酸序列的三个重链互补决定区(HCDR);以及含有SEQ ID NO:4(LCDR1)、SEQ ID NO:5(LCDR2)和SEQ ID NO:6(LCDR3)的氨基酸序列的三个轻链互补决定区(LCDR);

[1772] (ii)D是剪接调节剂;

[1773] (iii)L是包含ADL1、ADL2、ADL5、ADL6、ADL7、ADL12、ADL13、ADL14、ADL21、ADL23或ADL15的接头;并且

[1774] (iv)p是1至15的整数。

[1775] 在一些实施例中,靶向表达HER2的赘生性细胞的抗体或其抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:19的氨基酸序列的重链可变区和含有SEQ ID NO:20的氨基酸序列的轻链可变区。在一些实施例中,靶向表达HER2的赘生性细胞的抗体或其抗原结合片段包含人IgG1重链恒定结构域和人Igκ轻链恒定结构域。在一些实施例中,该抗体是曲妥珠单抗。在一些实施例中,p是1至10、2至8或4至8的整数。在一些实施例中,p是4。在一些实施例中,p是8。

[1776] 在一些实施例中,ADC包含ADL1-剪接调节剂和靶向表达CD138的赘生性细胞的抗体或其抗原结合片段。在一些实施例中,ADC包含ADL2-剪接调节剂和靶向表达CD138的赘生

性细胞的抗体或其抗原结合片段。在一些实施例中,ADC包含ADL5-剪接调节剂和靶向表达CD138的赘生性细胞的抗体或其抗原结合片段。在一些实施例中,ADC包含ADL6-剪接调节剂和靶向表达CD138的赘生性细胞的抗体或其抗原结合片段。在一些实施例中,ADC包含ADL7-剪接调节剂和靶向表达CD138的赘生性细胞的抗体或其抗原结合片段。在一些实施例中,ADC包含ADL12-剪接调节剂和靶向表达CD138的赘生性细胞的抗体或其抗原结合片段。在一些实施例中,ADC包含ADL13-剪接调节剂和靶向表达CD138的赘生性细胞的抗体或其抗原结合片段。在一些实施例中,ADC包含ADL14-剪接调节剂和靶向表达CD138的赘生性细胞的抗体或其抗原结合片段。在一些实施例中,ADC包含ADL15-剪接调节剂和靶向表达CD138的赘生性细胞的抗体或其抗原结合片段。

[1777] 在一些实施例中,靶向表达CD138的赘生性细胞的抗体或其抗原结合片段是内化性抗体或内化性抗原结合片段。在一些实施例中,靶向表达CD138的赘生性细胞的抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:7(HCDR1)、SEQ ID NO:8(HCDR2)和SEQ ID NO:9(HCDR3)的氨基酸序列的三个重链互补决定区(HCDR);以及含有SEQ ID NO:10(LCDR1)、SEQ ID NO:11(LCDR2)和SEQ ID NO:12(LCDR3)的氨基酸序列的三个轻链互补决定区(LCDR)。

[1778] 在一些实施例中,ADC具有式(I):

[1779] $Ab-(L-D)_p$ (I)

[1780] 其中:

[1781] (i)Ab是抗CD138抗体或其抗原结合片段,其包含含有SEQ ID NO:7(HCDR1)、SEQ ID NO:8(HCDR2)和SEQ ID NO:9(HCDR3)的氨基酸序列的三个重链互补决定区(HCDR);以及含有SEQ ID NO:10(LCDR1)、SEQ ID NO:11(LCDR2)和SEQ ID NO:12(LCDR3)的氨基酸序列的三个轻链互补决定区(LCDR);

[1782] (ii)D是剪接调节剂;

[1783] (iii)L是包含ADL1、ADL2、ADL5、ADL6、ADL7、ADL12、ADL13、ADL14、ADL21、ADL23或ADL15的接头;并且

[1784] (iv)p是1至15的整数。

[1785] 在一些实施例中,靶向表达CD138的赘生性细胞的抗体或其抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:21的氨基酸序列的重链可变区和含有SEQ ID NO:22的氨基酸序列的轻链可变区。在一些实施例中,靶向表达CD138的赘生性细胞的抗体或其抗原结合片段包含鼠IgG2a重链恒定结构域和鼠Igκ轻链恒定结构域。在一些实施例中,靶向表达CD138的赘生性细胞的抗体或其抗原结合片段包含人IgG2a重链恒定结构域和人Igκ轻链恒定结构域。在一些实施例中,该抗体是B-B4。在一些实施例中,p是1至10、2至8或4至8的整数。在一些实施例中,p是4。在一些实施例中,p是8。

[1786] 在一些实施例中,ADC包含ADL1-剪接调节剂和靶向表达EPHA2的赘生性细胞的抗体或其抗原结合片段。在一些实施例中,ADC包含ADL2-剪接调节剂和靶向表达EPHA2的赘生性细胞的抗体或其抗原结合片段。在一些实施例中,ADC包含ADL5-剪接调节剂和靶向表达EPHA2的赘生性细胞的抗体或其抗原结合片段。在一些实施例中,ADC包含ADL6-剪接调节剂和靶向表达EPHA2的赘生性细胞的抗体或其抗原结合片段。在一些实施例中,ADC包含ADL7-剪接调节剂和靶向表达EPHA2的赘生性细胞的抗体或其抗原结合片段。在一些实施例中,ADC包含ADL12-剪接调节剂和靶向表达EPHA2的赘生性细胞的抗体或其抗原结合片段。在一

些实施例中,ADC包含ADL13-剪接调节剂和靶向表达EPHA2的赘生性细胞的抗体或其抗原结合片段。在一些实施例中,ADC包含ADL14-剪接调节剂和靶向表达EPHA2的赘生性细胞的抗体或其抗原结合片段。在一些实施例中,ADC包含ADL15-剪接调节剂和靶向表达EPHA2的赘生性细胞的抗体或其抗原结合片段。

[1787] 在一些实施例中,靶向表达EPHA2的赘生性细胞的抗体或其抗原结合片段是内化性抗体或内化性抗原结合片段。在一些实施例中,靶向表达EPHA2的赘生性细胞的抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:13(HCDR1)、SEQ ID NO:14(HCDR2)和SEQ ID NO:15(HCDR3)的氨基酸序列的三个重链互补决定区(HCDR);以及含有SEQ ID NO:16(LCDR1)、SEQ ID NO:17(LCDR2)和SEQ IDNO:18(LCDR3)的氨基酸序列的三个轻链互补决定区(LCDR)。

[1788] 在一些实施例中,ADC具有式(I):

[1789] $Ab-(L-D)_p$ (I)

[1790] 其中:

[1791] (i)Ab是抗EPHA2抗体或其抗原结合片段,其包含含有SEQ ID NO:13(HCDR1)、SEQ ID NO:14(HCDR2)和SEQ ID NO:15(HCDR3)的氨基酸序列的三个重链互补决定区(HCDR);以及含有SEQ ID NO:16(LCDR1)、SEQ ID NO:17(LCDR2)和SEQ ID NO:18(LCDR3)的氨基酸序列的三个轻链互补决定区(LCDR);

[1792] (ii)D是剪接调节剂;

[1793] (iii)L是包含ADL1、ADL2、ADL5、ADL6、ADL7、ADL12、ADL13、ADL14、ADL21、ADL23或ADL15的接头;并且

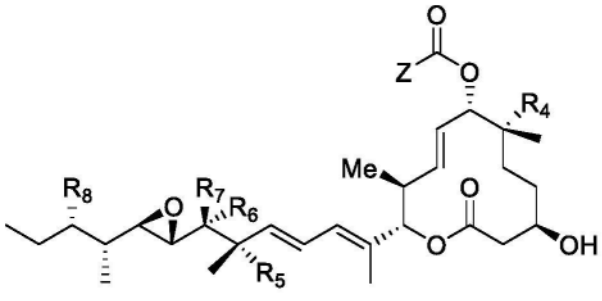
[1794] (iv)p是1至15的整数。

[1795] 在一些实施例中,靶向表达EPHA2的赘生性细胞的抗体或其抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:23的氨基酸序列的重链可变区和含有SEQ ID NO:24的氨基酸序列的轻链可变区。在一些实施例中,靶向表达EPHA2的赘生性细胞的抗体或其抗原结合片段包含人IgG1重链恒定结构域和人Igκ轻链恒定结构域。在一些实施例中,该抗体是1C1。在一些实施例中,p是1至10、2至8或4至8的整数。在一些实施例中,p是4。在一些实施例中,p是8。

[1796] 药物部分

[1797] 本文所描述的ADC中的药物部分(D)可以为任何化学治疗剂。有用的化学治疗剂种类包括例如RNA剪接调节剂。在某些优选实施例中,该药物部分是剪接调节剂。本文中描述并举例说明了示例性剪接调节剂化合物。

[1798] 在不同实施例中,该药物部分是具有式(II)的剪接调节剂化合物:

[1799] 

(II),

或其药学上可接受的盐,其中:

[1800] R^1选自不存在、氢、C_1-C_6烷基基团、C_1-C_6烷基烷氧基基团、C_1-C_6烷基氨基基团、C_1-

C_6烷基羧酸基团、C_1-C_6烷基羟基基团、C_3-C_8环烷基基团、苄基基团、C_3-C_8杂环基基团、-O-C(=O)-(C_1-C_6烷基)基团和-CD_3;

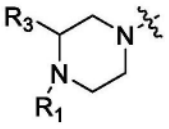
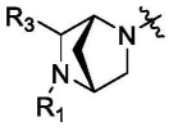
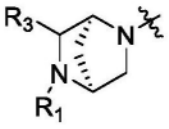
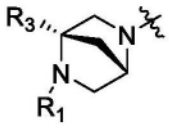
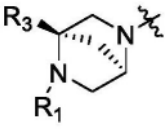
[1801] R^3选自氢、C_1-C_6烷基基团、C_1-C_6烷基烷氧基基团、C_1-C_6烷基氨基基团、C_1-C_6烷基羧酸基团、C_1-C_6烷基羟基基团、C_3-C_8环烷基基团、苄基基团、C_3-C_8杂环基基团和-O-C(=O)-(C_1-C_6烷基)基团;并且

[1802] R^4、R^5和R^8各自独立地选自氢、羟基基团、-O-(C_1-C_6烷基)基团、-O-C(=O)-(C_1-C_6烷基)基团和C_1-C_6烷基基团;

[1803] R^6和R^7各自独立地选自氢、-O-R^{17}、-O-C(=O)-R^{17}、-O-C(=O)-$NR^{15}R^{16}$、C_1-C_6烷基基团和-$NR^{15}R^{16}$;

[1804] R^{15}和R^{16}各自独立地选自氢、R^{17}、-C(=O)-R^{17}和-C(=O)-O-R^{17};

[1805] R^{17}选自氢、C_1-C_6烷基基团、C_3-C_8环烷基基团、苄基基团和C_3-C_8杂环基基团;并且

[1806] Z 选 自  、  、  、  和  ;

[1807] 其中R^1、R^3、R^4、R^5、R^6、R^7、R^8、R^{15}、R^{16}和R^{17}各自独立地被0至3个独立地选自以下的基团取代:卤素、羟基基团、C_1-C_6烷基基团、-O-(C_1-C_6烷基)基团、-$NR^{15}R^{16}$、C_3-C_8环烷基基团、C_1-C_6烷基羟基基团、C_1-C_6烷基烷氧基基团、苄基基团和C_3-C_8杂环基基团,

[1808] 其中R^6和R^7中至少一个是氢。

[1809] 在一些实施例中,R^1选自氢、C_1-C_4烷基基团、C_1-C_4烷基羧酸基团和C_3-C_8环烷基基团。在一些实施例中,R^1是氢。在一些实施例中,R^1是C_1-C_4烷基基团。在一些实施例中,R^1是甲基。在一些实施例中,R^1是乙基。在一些实施例中,R^1是C_1-C_4烷基羧酸基团。在一些实施例中,R^1是-$CH_2CH_2CH_2CO_2H$。在一些实施例中,R^1是C_3-C_8环烷基基团。在一些实施例中,R^1是环庚基。

[1810] 在一些实施例中,R^3选自氢、C_1-C_4烷基基团、C_1-C_4烷基烷氧基基团、C_1-C_4烷基羧酸基团和C_1-C_4烷基羟基基团。在一些实施例中,R^3选自氢和C_1-C_4烷基羧酸基团。在一些实施例中,R^3是氢。在一些实施例中,R^3是C_1-C_4烷基羧酸基团。在一些实施例中,R^3是-$CH_2CH_2CO_2H$。

[1811] 在一些实施例中,R^4选自氢、羟基基团、-O-(C_1-C_4烷基)基团、-O-C(=O)-(C_1-C_4烷基)基团和C_1-C_4烷基基团。在一些实施例中,R^4是氢。在一些实施例中,R^4是羟基。在一些实施例中,R^4是-O-(C_1-C_4烷基)基团。在一些实施例中,R^4是-OCH_3。在一些实施例中,R^4是-OCH_2CH_3。在一些实施例中,R^4是-O-C(=O)-(C_1-C_4烷基)基团。在一些实施例中,R^4是-O-C(=O)-CH_3。在一些实施例中,R^4是-O-C(=O)-CH_2CH_3。在一些实施例中,R^4是C_1-C_4烷基基团。在一些实施例中,R^4是甲基。在一些实施例中,R^4是乙基。

[1812] 在一些实施例中,R^5选自氢、羟基基团、-O-(C_1-C_4烷基)基团和C_1-C_4烷基基团。在一些实施例中,R^5是氢。在一些实施例中,R^5是羟基。在一些实施例中,R^5是-O-(C_1-C_4烷基)基团。在一些实施例中,R^5是C_1-C_4烷基基团。

[1813] 在一些实施例中,R^6是氢。在一些实施例中,R^7是氢。在一些实施例中,R^6是氢且R^7

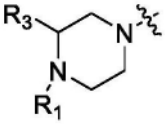
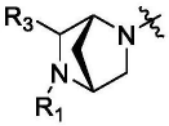
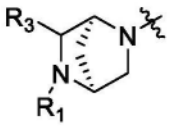
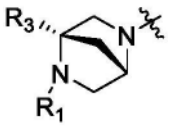
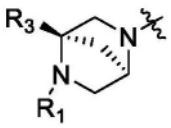
是-O-R^{17}。在一些实施例中,R^6是氢且R^7是-OR^{17},其中R^{17}选自氢和C^1-C^4烷基基团。在一些实施例中,R^6是氢且R^7是-O-R^{17},其中R^{17}是氢。在一些实施例中,R^6是-O-R^{17}且R^7是氢。在一些实施例中,R^6是-O-R^{17}且R^7是氢,其中R^{17}选自氢和C^1-C^4烷基基团。在一些实施例中,R^6是-O-R^{17}且R^7是氢,其中R^{17}是氢。在一些实施例中,R^6是氢且R^7是-$NR^{15}R^{16}$。在一些实施例中,R^6是氢且R^7是-$NR^{15}R^{16}$,其中R^{15}是H且R^{16}选自氢、R^{17}、-C(=O)-R^{17}和-C(=O)-O-R^{17}。在一些实施例中,R^6是氢且R^7是-$NR^{15}R^{16}$,其中R^{15}是H且R^{16}选自氢、R^{17}、-C(=O)-R^{17}和-C(=O)-O-R^{17},且其中R^{17}选自氢、C_1-C_6烷基基团、C_3-C_8环烷基基团和C_3-C_8杂环基基团。在一些实施例中,R^6是-O-R^{17}。在一些实施例中,R^6是-O-C(=O)-R^{17}。在一些实施例中,R^6是C_1-C_6烷基。在一些实施例中,R^6是C_1-C_4烷基。在一些实施例中,R^6是C_1烷基。在一些实施例中,R^6是-$NR^{15}R^{16}$。在一些实施例中,R^7是-O-R^{17}。在一些实施例中,R^7是-O-C(=O)-R^{17}。在一些实施例中,R^7是C_1-C_6烷基。在一些实施例中,R^7是C_1-C_4烷基。在一些实施例中,R^7是C_1烷基。在一些实施例中,R^7是-$NR^{15}R^{16}$。

[1814] 在一些实施例中,R^8选自氢、羟基基团、-O-(C_1-C_4烷基)基团和(C_1-C_4烷基)。在一些实施例中,R^8是氢。在一些实施例中,R^8是羟基基团。在一些实施例中,R^8是-O-(C_1-C_4烷基)基团。在一些实施例中,R^8是-O-(C_1烷基)基团。

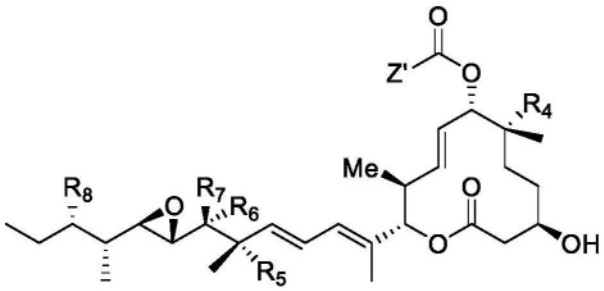
[1815] 在一些实施例中,R^{15}是氢。在一些实施例中,R^{15}是R^{17}。在一些实施例中,R^{15}是-C(=O)-R^{17}。在一些实施例中,R^{15}是-C(=O)-O-R^{17}。

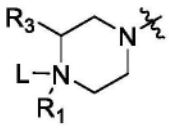
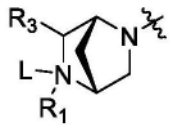
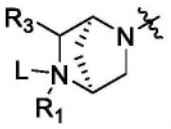
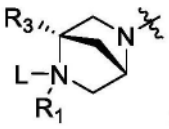
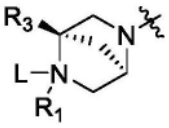
[1816] 在一些实施例中,R^{16}是氢。在一些实施例中,R^{16}是R^{17}。在一些实施例中,R^{16}是-C(=O)-R^{17}。在一些实施例中,R^{16}是-C(=O)-O-R^{17}。

[1817] 在一些实施例中,R^{17}选自氢、C_1-C_4烷基基团、C_3-C_6环烷基基团和C_3-C_8杂环基基团。在一些实施例中,R^{17}是氢。在一些实施例中,R^{17}是C_1-C_4烷基。在一些实施例中,R^{17}是C_1烷基。在一些实施例中,R^{17}是C_3-C_6环烷基基团。在一些实施例中,R^{17}是C_3环烷基基团。在一些实施例中,R^{17}是C_4环烷基基团。在一些实施例中,R^{17}是C_5环烷基基团。在一些实施例中,R^{17}是C_6环烷基基团。在一些实施例中,R^{17}是C_3-C_8杂环基基团。在一些实施例中,R^{17}是C_3杂环基基团。在一些实施例中,R^{17}是C_4杂环基基团。在一些实施例中,R^{17}是C_5杂环基基团。在一些实施例中,R^{17}是C_6杂环基基团。在一些实施例中,R^{17}是C_7杂环基基团。在一些实施例中,R^{17}是C_8杂环基基团。

[1818] 在一些实施例中,Z是  。在一些实施例中,Z是  。在一些实施例中,Z是  。在一些实施例中,Z是  。在一些实施例中,Z是  。

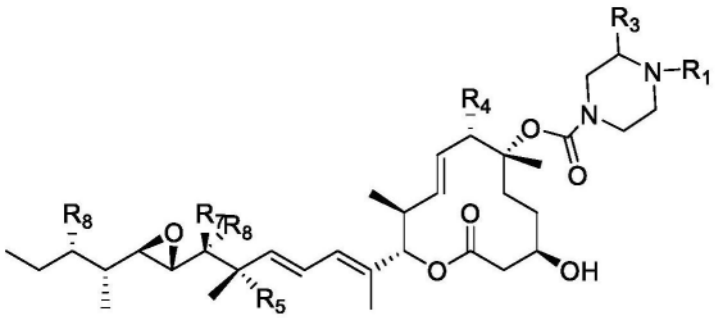
[1819] 在一些实施例中,具有式(II)的剪接调节剂化合物连接至例如具有式(I)的ADC中的接头L,如以下式(II-A)所示:

[1820] 
(II-A),

[1821] 其中Z'选自  、  、  、  和  并且;

[1822] 其中所有其他变量是如关于式(II)所定义。

[1823] 在各种其他实施例中,该药物部分是具有式(IV)的剪接调节剂化合物:

[1824] 
(IV),
或其药学上可接受的盐,其中:

[1825] R^1选自氢、C_1-C_6烷基基团、C_1-C_6烷基烷氧基基团、C_1-C_6烷基氨基基团、C_1-C_6烷基羧酸基团、C_1-C_6烷基羟基基团、C_3-C_8环烷基基团、苄基基团、C_3-C_8杂环基基团、-O-C(=O)-(C_1-C_6烷基)基团和-CD_3;

[1826] R^3选自氢、C_1-C_6烷基基团、C_1-C_6烷基烷氧基基团、C_1-C_6烷基氨基基团、C_1-C_6烷基羧酸基团、C_1-C_6烷基羟基基团、C_3-C_8环烷基基团、苄基基团、C_3-C_8杂环基基团和-O-C(=O)-(C_1-C_6烷基)基团;并且

[1827] R^4、R^5和R^8各自独立地选自氢、羟基基团、-O-(C_1-C_6烷基)基团、-O-C(=O)-(C_1-C_6烷基)基团和C_1-C_6烷基基团;

[1828] R^6和R^7各自独立地选自氢、-O-R^{17}、-O-C(=O)-R^{17}、-O-C(=O)-$NR^{15}R^{16}$、C_1-C_6烷基基团和-$NR^{15}R^{16}$;

[1829] R^{15}和R^{16}各自独立地选自氢、R^{17}、-C(=O)-R^{17}和

[1830] -C(=O)-O-R^{17};并且

[1831] R^{17}选自氢、C_1-C_6烷基基团、C_3-C_8环烷基基团、苄基基团和C_3-C_8杂环基基团;

[1832] 其中R^1、R^3、R^4、R^5、R^6、R^7、R^8、R^{15}、R^{16}和R^{17}各自独立地被0至3个独立地选自以下的基团取代:卤素、羟基基团、C_1-C_6烷基基团、-O-(C_1-C_6烷基)基团、-$NR^{15}R^{16}$、C_3-C_8环烷基基团、C_1-C_6烷基羟基基团、C_1-C_6烷基烷氧基基团、苄基基团和C_3-C_8杂环基基团,

[1833] 其中R^6和R^7中至少一个是氢。

[1834] 在一些实施例中,R^1选自氢、C_1-C_4烷基基团、C_1-C_4烷基羧酸基团和C_3-C_8环烷基基团。在一些实施例中,R^1是氢。在一些实施例中,R^1是C_1-C_4烷基基团。在一些实施例中,R^1是甲基。在一些实施例中,R^1是乙基。在一些实施例中,R^1是C_1-C_4烷基羧酸基团。在一些实施例中,R^1是-$CH_2CH_2CH_2CO_2H$。在一些实施例中,R^1是C_3-C_8环烷基基团。在一些实施例中,R^1是环庚基。

[1835] 在一些实施例中,R^3选自氢、C_1-C_4烷基基团、C_1-C_4烷基烷氧基基团、C_1-C_4烷基羧酸基团和C_1-C_4烷基羟基基团。在一些实施例中,R^3选自氢和C_1-C_4烷基羧酸基团。在一些实施例中,R^3是氢。在一些实施例中,R^3是C_1-C_4烷基羧酸基团。在一些实施例中,R^3是-$CH_2CH_2CO_2H$。

[1836] 在一些实施例中,R^4选自氢、羟基基团、-O-(C_1-C_4烷基)基团、-O-C(=O)-(C_1-C_4烷基)基团和C_1-C_4烷基基团。在一些实施例中,R^4是氢。在一些实施例中,R^4是羟基。在一些实施例中,R^4是-O-(C_1-C_4烷基)基团。在一些实施例中,R^4是-OCH_3。在一些实施例中,R^4是-OCH_2CH_3。在一些实施例中,R^4是-O-C(=O)-(C_1-C_4烷基)基团。在一些实施例中,R^4是-O-C(=O)-CH_3。在一些实施例中,R^4是-O-C(=O)-CH_2CH_3。在一些实施例中,R^4是C_1-C_4烷基基团。在一些实施例中,R^4是甲基。在一些实施例中,R^4是乙基。

[1837] 在一些实施例中,R^5选自氢、羟基基团、-O-(C_1-C_4烷基)基团和C_1-C_4烷基基团。在一些实施例中,R^5是氢。在一些实施例中,R^5是羟基。在一些实施例中,R^5是-O-(C_1-C_4烷基)基团。在一些实施例中,R^5是C_1-C_4烷基基团。

[1838] 在一些实施例中,R^6是氢。在一些实施例中,R^7是氢。在一些实施例中,R^6是氢且R^7是-O-R^{17}。在一些实施例中,R^6是氢且R^7是-OR^{17},其中R^{17}选自氢和C^1-C^4烷基基团。在一些实施例中,R^6是氢且R^7是-O-R^{17},其中R^{17}是氢。在一些实施例中,R^6是-O-R^{17}且R^7是氢。在一些实施例中,R^6是-O-R^{17}且R^7是氢,其中R^{17}选自氢和C^1-C^4烷基基团。在一些实施例中,R^6是-O-R^{17}且R^7是氢,其中R^{17}是氢。在一些实施例中,R^6是氢且R^7是-$NR^{15}R^{16}$。在一些实施例中,R^6是氢且R^7是-$NR^{15}R^{16}$,其中R^{15}是H且R^{16}选自氢、R^{17}、-C(=O)-R^{17}和-C(=O)-O-R^{17}。在一些实施例中,R^6是氢且R^7是-$NR^{15}R^{16}$,其中R^{15}是H且R^{16}选自氢、R^{17}、-C(=O)-R^{17}和-C(=O)-O-R^{17},且其中R^{17}选自氢、C_1-C_6烷基基团、C_3-C_8环烷基基团和C_3-C_8杂环基基团。在一些实施例中,R^6是-O-R^{17}。在一些实施例中,R^6是-O-C(=O)-R^{17}。在一些实施例中,R^6是C_1-C_6烷基。在一些实施例中,R^6是C_1-C_4烷基。在一些实施例中,R^6是C_1烷基。在一些实施例中,R^6是-$NR^{15}R^{16}$。

[1839] 在一些实施例中,R^7是-O-R^{17}。在一些实施例中,R^7是-O-C(=O)-R^{17}。在一些实施例中,R^7是C_1-C_6烷基。在一些实施例中,R^7是C_1-C_4烷基。在一些实施例中,R^7是C_1烷基。在一些实施例中,R^7是-$NR^{15}R^{16}$。

[1840] 在一些实施例中,R^8选自氢、羟基基团、-O-(C_1-C_4烷基)基团和(C_1-C_4烷基)。在一些实施例中,R^8是氢。在一些实施例中,R^8是羟基基团。在一些实施例中,R^8是-O-(C_1-C_4烷基)基团。在一些实施例中,R^8是-O-(C_1烷基)基团。

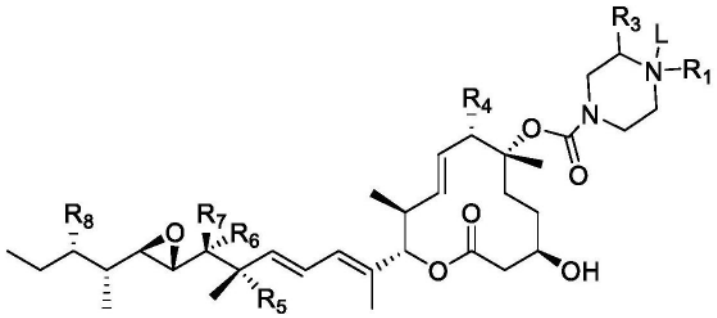
[1841] 在一些实施例中,R^{15}是氢。在一些实施例中,R^{15}是R^{17}。在一些实施例中,R^{15}是-C(=O)-R^{17}。在一些实施例中,R^{15}是-C(=O)-O-R^{17}。

[1842] 在一些实施例中,R^{16}是氢。在一些实施例中,R^{16}是R^{17}。在一些实施例中,R^{16}是-C(=O)-R^{17}。在一些实施例中,R^{16}是-C(=O)-O-R^{17}。

[1843] 在一些实施例中,R^{17}选自氢、C_1-C_4烷基基团、C_3-C_6环烷基基团和C_3-C_8杂环基基团。

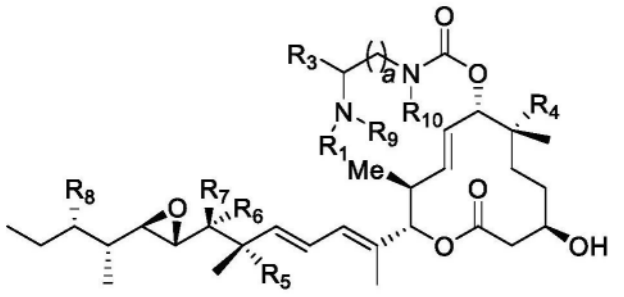
在一些实施例中,R^{17}是氢。在一些实施例中,R^{17}是C_1-C_4烷基基团。在一些实施例中,R^{17}是C_1烷基基团。在一些实施例中,R^{17}是C_3-C_6环烷基基团。在一些实施例中,R^{17}是C_3环烷基基团。在一些实施例中,R^{17}是C_4环烷基基团。在一些实施例中,R^{17}是C_5环烷基基团。在一些实施例中,R^{17}是C_6环烷基基团。在一些实施例中,R^{17}是C_3-C_8杂环基基团。在一些实施例中,R^{17}是C_3杂环基基团。在一些实施例中,R^{17}是C_4杂环基基团。在一些实施例中,R^{17}是C_5杂环基基团。在一些实施例中,R^{17}是C_6杂环基基团。在一些实施例中,R^{17}是C_7杂环基基团。在一些实施例中,R^{17}是C_8杂环基基团。

[1844] 在一些实施例中,具有式(IV)的剪接调节剂化合物连接至例如具有式(I)的ADC中的接头L,如以下式(IV-A)所示:

[1845] 

(IV-A)。

[1846] 在各种其他实施例中,该药物部分是具有式(VI)的剪接调节剂化合物:

[1847] 

或其药学上可接受的盐,其

(VI),

中:

[1848] R^1和R^9各自独立地选自氢、C_1-C_6烷基基团、C_1-C_6烷基烷氧基基团、C_1-C_6烷基氨基基团、C_1-C_6烷基羧酸基团、C_1-C_6烷基羟基基团、C_3-C_8环烷基基团、苄基基团、C_3-C_8杂环基基团、-O-C(=O)-(C_1-C_6烷基)基团和-CD_3;

[1849] R^3选自氢、C_1-C_6烷基基团、C_1-C_6烷基烷氧基基团、C_1-C_6烷基氨基基团、C_1-C_6烷基羧酸基团、C_1-C_6烷基羟基基团、C_3-C_8环烷基基团、苄基基团、C_3-C_8杂环基基团和-O-C(=O)-(C_1-C_6烷基)基团;

[1850] R^4、R^5和R^8各自独立地选自氢、羟基基团、-O-(C_1-C_6烷基)基团、-O-C(=O)-(C_1-C_6烷基)基团和C_1-C_6烷基基团;

[1851] R^6和R^7各自独立地选自氢、-O-R^{17}、-O-C(=O)-R^{17}、-O-C(=O)-$NR^{15}R^{16}$、C_1-C_6烷基基团、-$NR^{15}R^{16}$和接头;

[1852] R^{10}选自氢、C_1-C_6烷基基团、-C(=O)-(C_1-C_6烷基)基团和-CD_3;

[1853] R^{15}和R^{16}各自独立地选自氢、R^{17}、-C(=O)-R^{17}和-C(=O)-O-R^{17};

[1854] R^{17}选自氢、C_1-C_6烷基基团、C_3-C_8环烷基基团、苄基基团和C_3-C_8杂环基基团;并且

[1855] a是1、2、3、4、5、6、7、8、9或10;

[1856] 其中R^1、R^3、R^4、R^5、R^6、R^7、R^8、R^9、R^{10}、R^{15}、R^{16}和R^{17}各自独立地被0至3个独立地选自以下的基团取代:卤素、羟基基团、C_1-C_6烷基基团、-O-(C_1-C_6烷基)基团、-$NR^{15}R^{16}$、C_3-C_8环烷基基团、C_1-C_6烷基羟基基团、C_1-C_6烷基烷氧基基团、苄基基团和C_3-C_8杂环基基团;

[1857] 其中R^6和R^7中至少一个是氢;并且

[1858] 其中R^1和R^9不能同时不存在。

[1859] 在一些实施例中,R^1选自氢、C_1-C_4烷基基团、C_1-C_4烷基羧酸基团和C_3-C_8环烷基基团。在一些实施例中,R^1是氢。在一些实施例中,R^1是C_1-C_4烷基基团。在一些实施例中,R^1是甲基。在一些实施例中,R^1是乙基。在一些实施例中,R^1是C_1-C_4烷基羧酸基团。在一些实施例中,R^1是-$CH_2CH_2CH_2CO_2H$。在一些实施例中,R^1是C_3-C_8环烷基基团。在一些实施例中,R^1是环庚基。

[1860] 在一些实施例中,R^3选自氢、C_1-C_4烷基基团、C_1-C_4烷基烷氧基基团、C_1-C_4烷基羧酸基团和C_1-C_4烷基羟基基团。在一些实施例中,R^3选自氢和C_1-C_4烷基羧酸基团。在一些实施例中,R^3是氢。在一些实施例中,R^3是C_1-C_4烷基羧酸基团。在一些实施例中,R^3是-$CH_2CH_2CO_2H$。

[1861] 在一些实施例中,R^4选自氢、羟基基团、-O-(C_1-C_4烷基)基团、-O-C(=O)-(C_1-C_4烷基)基团和C_1-C_4烷基基团。在一些实施例中,R^4是氢。在一些实施例中,R^4是羟基。在一些实施例中,R^4是-O-(C_1-C_4烷基)基团。在一些实施例中,R^4是-OCH_3。在一些实施例中,R^4是-OCH_2CH_3。在一些实施例中,R^4是-O-C(=O)-(C_1-C_4烷基)基团。在一些实施例中,R^4是-O-C(=O)-CH_3。在一些实施例中,R^4是-O-C(=O)-CH_2CH_3。在一些实施例中,R^4是C_1-C_4烷基基团。在一些实施例中,R^4是甲基。在一些实施例中,R^4是乙基。

[1862] 在一些实施例中,R^5选自氢、羟基基团、-O-(C_1-C_4烷基)基团和C_1-C_4烷基基团。在一些实施例中,R^5是氢。在一些实施例中,R^5是羟基。在一些实施例中,R^5是-O-(C_1-C_4烷基)基团。在一些实施例中,R^5是C_1-C_4烷基基团。

[1863] 在一些实施例中,R^9选自不存在、氢、C_1-C_4烷基基团、-(C=O)-(C_1-C_4烷基)基团和-CD_3。在一些实施例中,R^9不存在。在一些实施例中,R^9是氢。在一些实施例中,R^9是C_1-C_4烷基基团。在一些实施例中,该C_1-C_4烷基是甲基。在一些实施例中,该C_1-C_4烷基是乙基。在一些实施例中,R^9是-(C=O)-(C_1-C_4烷基)基团。在一些实施例中,该-(C=O)-(C_1-C_4烷基)基团是-(C=O)-甲基。在一些实施例中,R^9是-CD_3。

[1864] 在一些实施例中,R^{10}选自氢、C_1-C_4烷基基团、-(C=O)-(C_1-C_4烷基)基团和-CD_3。在一些实施例中,R^{10}是氢。在一些实施例中,R^{10}是C_1-C_4烷基基团。在一些实施例中,该C_1-C_4烷基是甲基。在一些实施例中,该C_1-C_4烷基是乙基。在一些实施例中,R^{10}是-(C=O)-(C_1-C_4烷基)基团。在一些实施例中,该-(C=O)-(C_1-C_4烷基)基团是-(C=O)-甲基。在一些实施例中,R^{10}是-CD_3。

[1865] 在一些实施例中,R^6是氢。在一些实施例中,R^7是氢。在一些实施例中,R^6是氢且R^7是-O-R^{17}。在一些实施例中,R^6是氢且R^7是-OR^{17},其中R^{17}选自氢和C^1-C^4烷基基团。在一些实施例中,R^6是氢且R^7是-O-R^{17},其中R^{17}是氢。在一些实施例中,R^6是-O-R^{17}且R^7是氢。在一些实施例中,R^6是-O-R^{17}且R^7是氢,其中R^{17}选自氢和C^1-C^4烷基基团。在一些实施例中,R^6是-O-R^{17}且R^7是氢,其中R^{17}是氢。在一些实施例中,R^6是氢且R^7是-$NR^{15}R^{16}$。在一些实施例中,R^6是氢且R^7是-$NR^{15}R^{16}$,其中R^{15}是H且R^{16}选自氢、R^{17}、-C(=O)-R^{17}和-C(=O)-O-R^{17}。在一些实施例中,R^6是氢且R^7是-$NR^{15}R^{16}$,其中R^{15}是H且R^{16}选自氢、R^{17}、-C(=O)-R^{17}和-C(=O)-O-R^{17},且其中R^{17}

选自氢、C_1-C_6烷基基团、C_3-C_8环烷基基团和C_3-C_8杂环基基团。在一些实施例中，R^6是-O-R^{17}。在一些实施例中，R^6是-O-C(=O)-R^{17}。在一些实施例中，R^6是C_1-C_6烷基。在一些实施例中，R^6是C_1-C_4烷基。在一些实施例中，R^6是C_1烷基。在一些实施例中，R^6是-$NR^{15}R^{16}$。

[1866] 在一些实施例中，R^7是-O-R^{17}。在一些实施例中，R^7是-O-C(=O)-R^{17}。在一些实施例中，R^7是C_1-C_6烷基。在一些实施例中，R^7是C_1-C_4烷基。在一些实施例中，R^7是C_1烷基。在一些实施例中，R^7是-$NR^{15}R^{16}$。

[1867] 在一些实施例中，R^8选自氢、羟基基团、-O-(C_1-C_4烷基)基团和(C_1-C_4烷基)。在一些实施例中，R^8是氢。在一些实施例中，R^8是羟基基团。在一些实施例中，R^8是-O-(C_1-C_4烷基)基团。在一些实施例中，R^8是-O-(C_1烷基)基团。

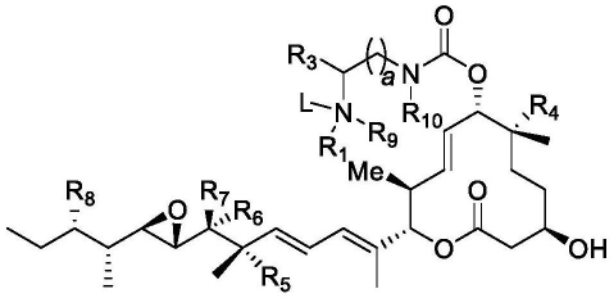
[1868] 在一些实施例中，R^{15}是氢。在一些实施例中，R^{15}是R^{17}。在一些实施例中，R^{15}是-C(=O)-R^{17}。在一些实施例中，R^{15}是-C(=O)-O-R^{17}。

[1869] 在一些实施例中，R^{16}是氢。在一些实施例中，R^{16}是R^{17}。在一些实施例中，R^{16}是-C(=O)-R^{17}。在一些实施例中，R^{16}是-C(=O)-O-R^{17}。

[1870] 在一些实施例中，R^{17}选自氢、C_1-C_4烷基基团、C_3-C_6环烷基基团和C_3-C_8杂环基基团。在一些实施例中，R^{17}是氢。在一些实施例中，R^{17}是C_1-C_4烷基基团。在一些实施例中，R^{17}是C_1烷基基团。在一些实施例中，R^{17}是C_3-C_6环烷基基团。在一些实施例中，R^{17}是C_3环烷基基团。在一些实施例中，R^{17}是C_4环烷基基团。在一些实施例中，R^{17}是C_5环烷基基团。在一些实施例中，R^{17}是C_6环烷基基团。在一些实施例中，R^{17}是C_3-C_8杂环基基团。在一些实施例中，R^{17}是C_3杂环基基团。在一些实施例中，R^{17}是C_4杂环基基团。在一些实施例中，R^{17}是C_5杂环基基团。在一些实施例中，R^{17}是C_6杂环基基团。在一些实施例中，R^{17}是C_7杂环基基团。在一些实施例中，R^{17}是C_8杂环基基团。

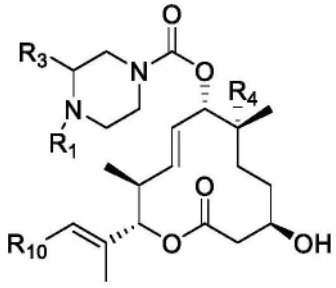
[1871] 在一些实施例中，a是1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。在一些实施例中，a是1、2、3、4、5或6。在一些实施例中，a是1、2、3、4或5。在一些实施例中，a是1、2、3或4。在一些实施例中，a是1、2或3。在一些实施例中，a是1或2。在一些实施例中，a是1。在一些实施例中，a是2。在一些实施例中，a是3。在一些实施例中，a是4。在一些实施例中，a是5。在一些实施例中，a是6。在一些实施例中，a是7。在一些实施例中，a是8。在一些实施例中，a是9。在一些实施例中，a是10。

[1872] 在一些实施例中，具有式(VI)的剪接调节剂化合物连接至例如具有式(I)的ADC中的接头L，如以下式(VI-A)所示：

[1873] 

(VI-A)。

[1874] 在各种其他实施例中，该药物部分是具有式(VIII)的剪接调节剂化合物：

[1875]  或其药学上可接受的盐,其中:

(VIII),

[1876] R^1选自不存在、氢、C_1-C_6烷基基团、C_1-C_6烷基烷氧基基团、C_1-C_6烷基氨基基团、C_1-C_6烷基羧酸基团、C_1-C_6烷基羟基基团、C_3-C_8环烷基基团、苄基基团、C_3-C_8杂环基基团、-O-C(=O)-(C_1-C_6烷基)基团和-CD_3;

[1877] R^3选自氢、C_1-C_6烷基基团、C_1-C_6烷基烷氧基基团、C_1-C_6烷基氨基基团、C_1-C_6烷基羧酸基团、C_1-C_6烷基羟基基团、C_3-C_8环烷基基团、苄基基团、C_3-C_8杂环基基团和-O-C(=O)-(C_1-C_6烷基)基团;

[1878] R^4选自氢、羟基基团、-O-(C_1-C_6烷基)基团、-O-C(=O)-(C_1-C_6烷基)基团和C_1-C_6烷基基团;并且

[1879] R^{10}选自3至10元碳环和3至10元杂环,其各自被0至3个R^a取代,其中每个R^a独立地选自卤素、C_1-C_6烷基基团、-O-(C_1-C_6)烷基基团、C_1-C_6烷基烷氧基基团、C_1-C_6烷基羟基基团、-S(=O)$_w$-(4至7元杂环)、4至7元碳环和4至7元杂环;

[1880] R^{15}和R^{16}各自独立地选自氢、R^{17}、-C(=O)-R^{17}和-C(=O)-O-R^{17};并且

[1881] R^{17}选自氢、C_1-C_6烷基基团、C_3-C_8环烷基基团、苄基基团和C_3-C_8杂环基基团;

[1882] 其中R^1、R^3、R^4、R^{10}、R^{15}、R^{16}和R^{17}各自独立地被0至3个独立地选自以下的基团取代:卤素、羟基基团、C_1-C_6烷基基团、-O-(C_1-C_6烷基)基团、-$NR^{15}R^{16}$、C_3-C_8环烷基基团、C_1-C_6烷基羟基基团、C_1-C_6烷基烷氧基基团、苄基基团和C_3-C_8杂环基基团;并且

[1883] 其中每个R^a独立地被0至3个独立地选自以下的基团取代:卤素、羟基基团、-$NR^{15}R^{16}$、C_1-C_6烷基基团、-(C=O)-(C_1-C_6烷基)基团、-(C=O)-(C_1-C_6烷基)-(C_3-C_{10}杂环基基团)和C_1-C_6烷基羧酸基团,其各自被0、1或2个独立地选自以下的基团取代:卤素、羟基基团、-$NR^{15}R^{16}$和C_1-C_3烷基基团;并且

[1884] w是0、1或2。

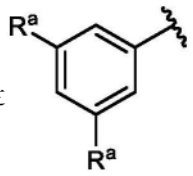
[1885] 在一些实施例中,R^1选自不存在、氢、C_1-C_4烷基基团、C_1-C_4烷基羧酸基团和C_3-C_8环烷基基团。在一些实施例中,R^1是氢。在一些实施例中,R^1是C_1-C_4烷基基团。在一些实施例中,R^1是甲基。在一些实施例中,R^1是乙基。在一些实施例中,R^1是C_1-C_4烷基羧酸基团。在一些实施例中,R^1是-$CH_2CH_2CH_2CO_2H$。在一些实施例中,R^1是C_3-C_8环烷基基团。在一些实施例中,R^1是环庚基。

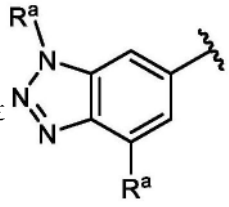
[1886] 在一些实施例中,R^3选自氢、C_1-C_4烷基基团、C_1-C_4烷基烷氧基基团、C_1-C_4烷基羧酸基团和C_1-C_4烷基羟基基团。在一些实施例中,R^3选自氢和C_1-C_4烷基羧酸基团。在一些实施例中,R^3是氢。在一些实施例中,R^3是C_1-C_4烷基羧酸基团。在一些实施例中,R^3是-$CH_2CH_2CO_2H$。

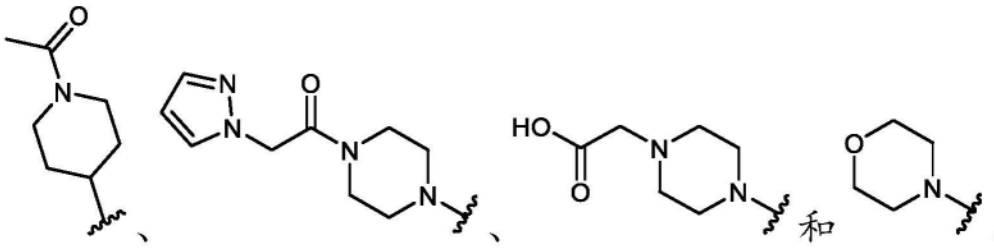
[1887] 在一些实施例中,R^4选自氢、羟基基团、-O-(C_1-C_4烷基)基团、-O-C(=O)-(C_1-C_4烷基)基团和C_1-C_4烷基基团。在一些实施例中,R^4是氢。在一些实施例中,R^4是羟基。在一些实施例中,R^4是-O-(C_1-C_4烷基)基团。在一些实施例中,R^4是-OCH_3。在一些实施例中,R^4是-

OCH_2CH_3。在一些实施例中，R^4是-O-C(=O)-(C_1-C_4烷基)基团。在一些实施例中，R^4是-O-C(=O)-CH_3。在一些实施例中，R^4是-O-C(=O)-CH_2CH_3。在一些实施例中，R^4是C_1-C_4烷基基团。在一些实施例中，R^4是甲基。在一些实施例中，R^4是乙基。

[1888] 在一些实施例中，R^{10}选自6至9元碳环和6至9元杂环，其各自被0至2个R^a取代，其中每个R^a独立地被0至3个独立地选自以下的基团取代：卤素、羟基基团、C_1-C_6烷基基团、-(C=O)-(C_1-C_6烷基)基团、-(C=O)-(C_1-C_6烷基)-(3至10元杂环)基团和C_1-C_6烷基羧酸基团。

[1889] 在一些实施例中，该碳环是被0至2个R^a取代的苯基，其中每个R^a独立地被0至3个独立地选自以下的基团取代：卤素、羟基基团、C_1-C_6烷基基团、-(C=O)-(C_1-C_6烷基)基团、-(C=O)-(C_1-C_6烷基)-(3至10元杂环)基团和C_1-C_6烷基羧酸基团。在一些实施例中，该苯基被2个R^a取代，其中每个R^a独立地被0至3个独立地选自以下的基团取代：卤素、羟基基团、C_1-C_6烷基基团、-(C=O)-(C_1-C_6烷基)基团、-(C=O)-(C_1-C_6烷基)-(3至10元杂环)基团和C_1-C_6烷基羧酸基团。在一些实施例中，该苯基是  。

[1890] 在一些实施例中，该杂环是被0至2个R^a取代的9元杂环，其中每个R^a独立地被0至3个独立地选自以下的基团取代：卤素、羟基基团、C_1-C_6烷基基团、-(C=O)-(C_1-C_6烷基)基团、-(C=O)-(C_1-C_6烷基)-(3至10元杂环)基团和C_1-C_6烷基羧酸基团。在一些实施例中，该9元杂环是  。

[1891] 在一些实施例中，R^a选自卤素、3至10元碳环和3至10元杂环，其中每个R^a独立地被0至3个独立地选自以下的基团取代：卤素、羟基基团、C_1-C_6烷基基团、-(C=O)-(C_1-C_6烷基)基团、-(C=O)-(C_1-C_6烷基)-(3至10元杂环)基团和C_1-C_6烷基羧酸基团。在一些实施例中，R^a选自卤素、  和。

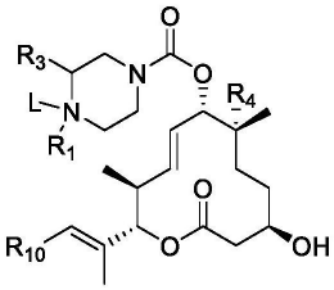
[1892] 在一些实施例中，R^{15}是氢。在一些实施例中，R^{15}是R^{17}。在一些实施例中，R^{15}是-C(=O)-R^{17}。在一些实施例中，R^{15}是-C(=O)-O-R^{17}。

[1893] 在一些实施例中，R^{16}是氢。在一些实施例中，R^{16}是R^{17}。在一些实施例中，R^{16}是-C(=O)-R^{17}。在一些实施例中，R^{16}是-C(=O)-O-R^{17}。

[1894] 在一些实施例中，R^{17}选自氢、C_1-C_4烷基基团、C_3-C_6环烷基基团和C_3-C_8杂环基基团。在一些实施例中，R^{17}是氢。在一些实施例中，R^{17}是C_1-C_4烷基基团。在一些实施例中，R^{17}是C_1烷基基团。在一些实施例中，R^{17}是C_3-C_6环烷基基团。在一些实施例中，R^{17}是C_3环烷基基团。在一些实施例中，R^{17}是C_4环烷基基团。在一些实施例中，R^{17}是C_5环烷基基团。在一些实施例

中,R^{17}是C_6环烷基基团。在一些实施例中,R^{17}是C_3-C_8杂环基基团。在一些实施例中,R^{17}是C_3杂环基基团。在一些实施例中,R^{17}是C_4杂环基基团。在一些实施例中,R^{17}是C_5杂环基基团。在一些实施例中,R^{17}是C_6杂环基基团。在一些实施例中,R^{17}是C_7杂环基基团。在一些实施例中,R^{17}是C_8杂环基基团。

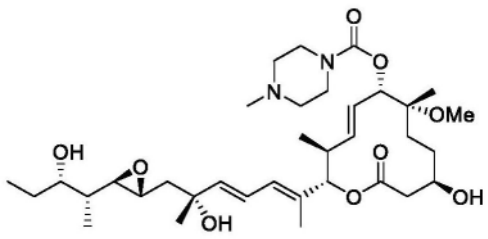
[1895] 在一些实施例中,具有式(VIII)的剪接调节剂化合物连接至例如具有式(I)的ADC中的接头L,如以下式(VIII-A)所示:

[1896] 

(VIII-A)。

[1897] 在不同实施例中,该药物部分是选自D2和D1的剪接调节剂。

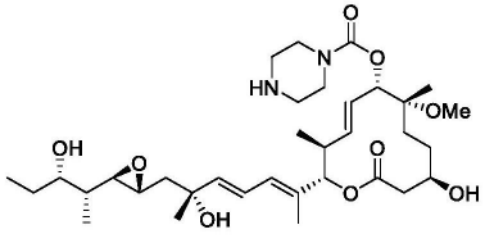
[1898] 在不同实施例中,该药物部分是D2。在不同实施例中,所披露的ADC中使用的D2药物部分的结构显示于下:

[1899] 

D2

[1900] 在不同实施例中,本文所描述的ADC(例如,具有式(I)的ADC)中的接头经由哌嗪基团上的胺共价连接至D2药物部分。在不同实施例中,该药物部分是D2衍生物。在不同实施例中,D2衍生物保持D2的至少一种生物功能或活性(例如SF3b复合体结合、体外剪接活性、细胞毒性),但具有改变的化学结构。

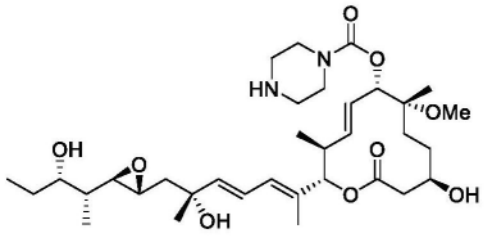
[1901] 在不同实施例中,该药物部分是D1或其药学上可接受的盐。在不同实施例中,所披露的ADC中使用的D1药物部分的结构显示于下:

[1902] 

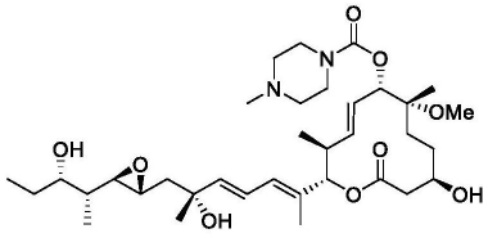
D1

[1903] 在不同实施例中,本文所描述的ADC(例如,具有式(I)的ADC)中的接头经由哌嗪基团上的胺共价连接至D1药物部分。在不同实施例中,该药物部分是D1衍生物。在不同实施例中,D1衍生物保持D1的至少一种生物功能或活性(例如SF3b复合体结合、体外剪接活性、细胞毒性),但具有改变的化学结构。

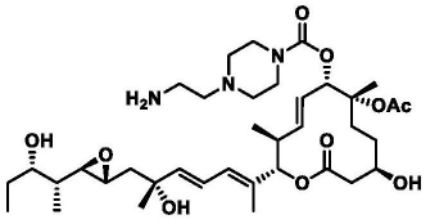
[1904] 在一些实施例中,该剪接调节剂包含D1:

[1905]  (D1)。

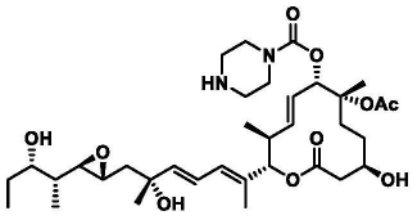
[1906] 在一些实施例中,该剪接调节剂包含D2:

[1907]  (D2)。

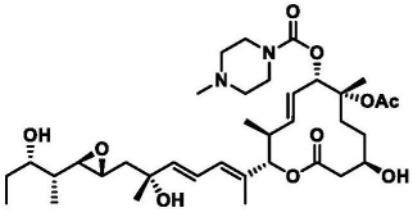
[1908] 在一些实施例中,该剪接调节剂包含D3:

[1909]  (D3)。

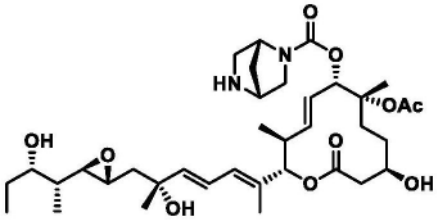
[1910] 在一些实施例中,该剪接调节剂包含D4:

[1911]  (D4)。

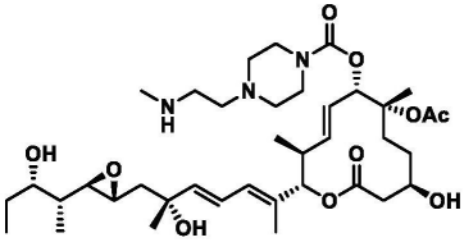
[1912] 在一些实施例中,该剪接调节剂包含D4':

[1913]  (D4')。

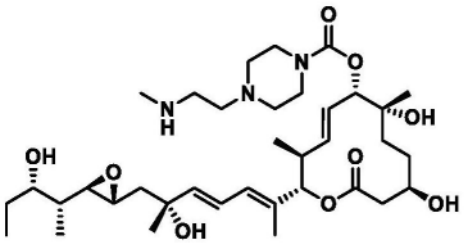
[1914] 在一些实施例中,该剪接调节剂包含D5:

[1915]  (D5)。

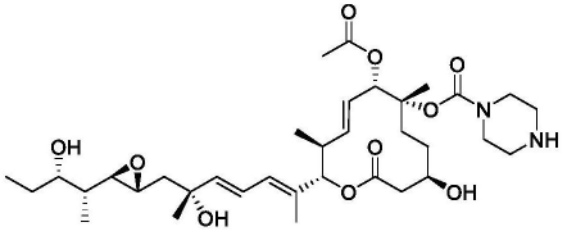
[1916] 在一些实施例中,该剪接调节剂包含D6:

[1917]  (D6)。

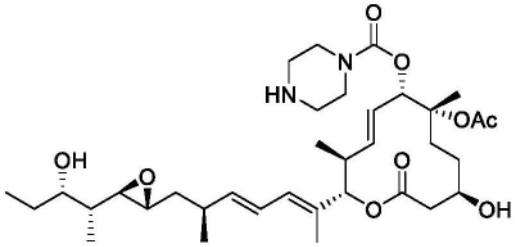
[1918] 在一些实施例中,该剪接调节剂包含D7:

[1919]  (D7)。

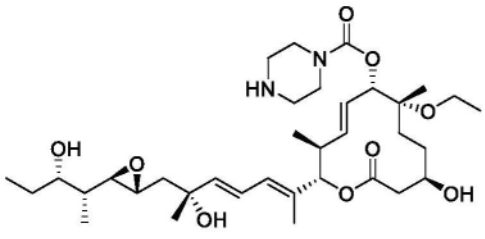
[1920] 在一些实施例中,该剪接调节剂包含D8:

[1921]  (D8)。

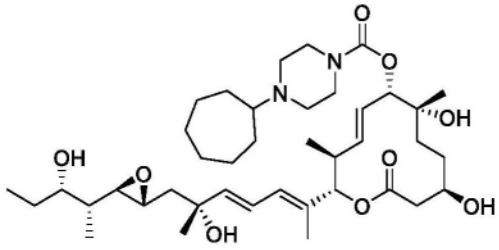
[1922] 在一些实施例中,该剪接调节剂包含D9:

[1923]  (D9)。

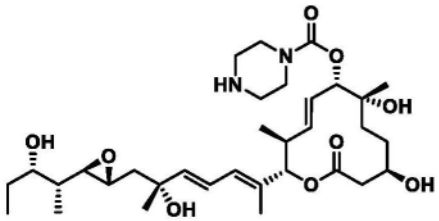
[1924] 在一些实施例中,该剪接调节剂包含D10:

[1925]  (D10)。

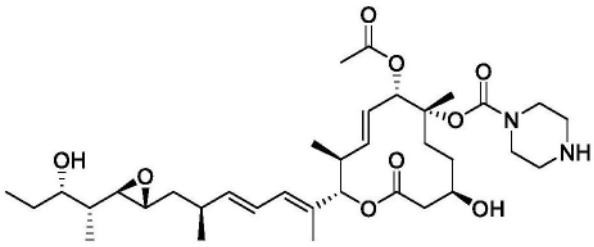
[1926] 在一些实施例中,该剪接调节剂包含D11:

[1927]  (D11)。

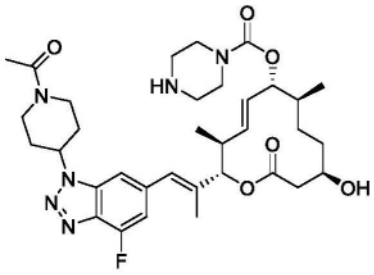
[1928] 在一些实施例中,该剪接调节剂包含D12:

[1929]  (D12)。

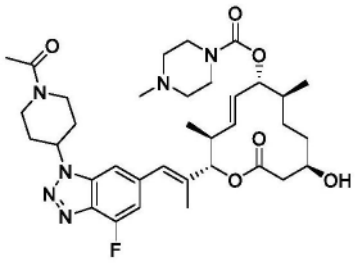
[1930] 在一些实施例中,该剪接调节剂包含D13:

[1931]  (D13)。

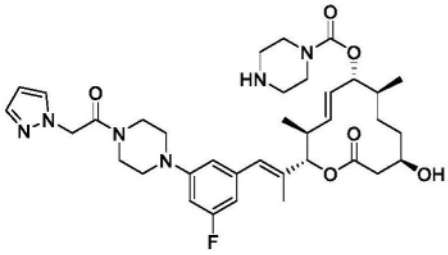
[1932] 在一些实施例中,该剪接调节剂包含D14:

[1933]  (D14)。

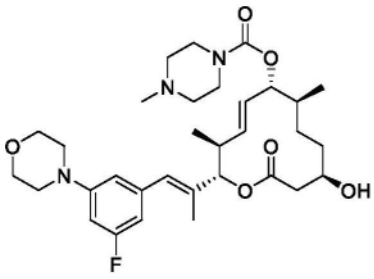
[1934] 在一些实施例中,该剪接调节剂包含D15:

[1935]  (D15)。

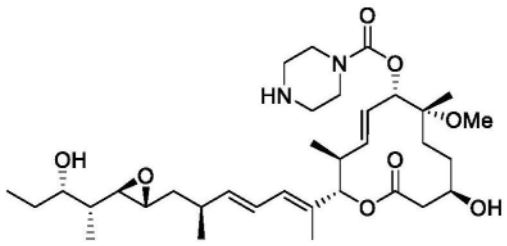
[1936] 在一些实施例中,该剪接调节剂包含D16:

[1937]  (D16)。

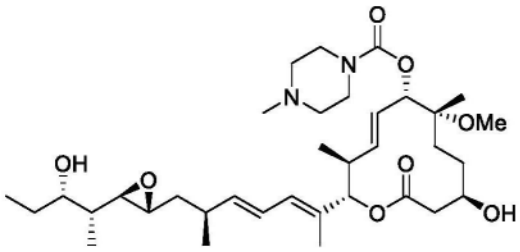
[1938] 在一些实施例中,该剪接调节剂包含D17:

[1939]  (D17)。

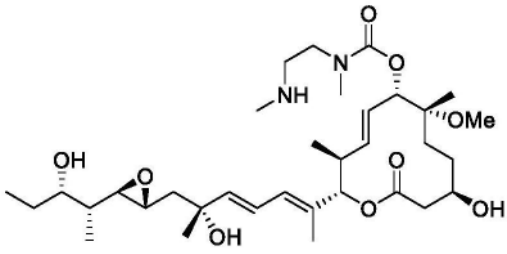
[1940] 在一些实施例中,该剪接调节剂包含D18:

[1941]  (D18)。

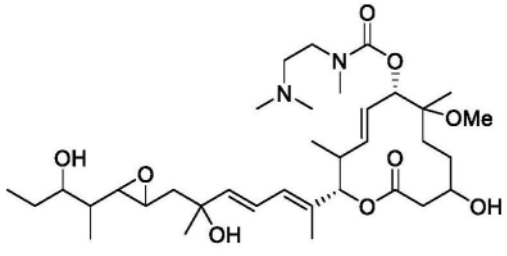
[1942] 在一些实施例中,该剪接调节剂包含D19:

[1943]  (D19)。

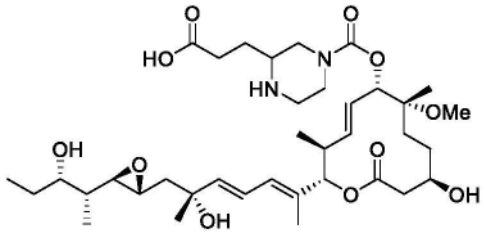
[1944] 在一些实施例中,该剪接调节剂包含D20:

[1945]  (D20)。

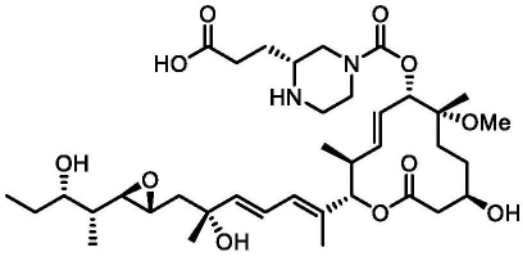
[1946] 在一些实施例中,该剪接调节剂包含D21:

[1947]  (D21)。

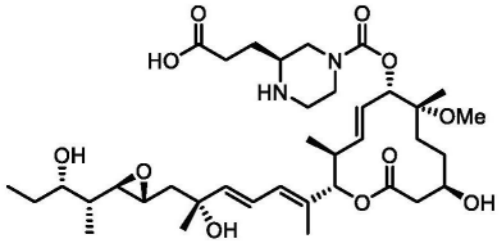
[1948] 在一些实施例中,该剪接调节剂包含D22:

[1949]  (D22)。

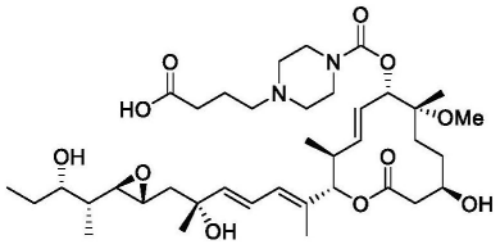
[1950] 在一些实施例中,该剪接调节剂包含D23:

[1951]  (D23)。

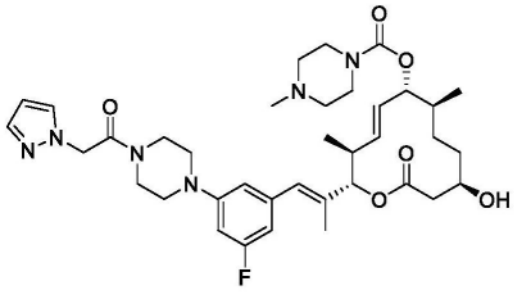
[1952] 在一些实施例中,该剪接调节剂包含D24:

[1953]  (D24)。

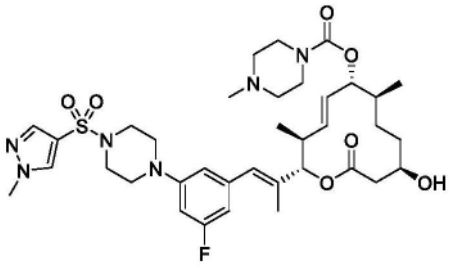
[1954] 在一些实施例中,该剪接调节剂包含D25:

[1955]  (D25)。

[1956] 在一些实施例中,该剪接调节剂包含D26:

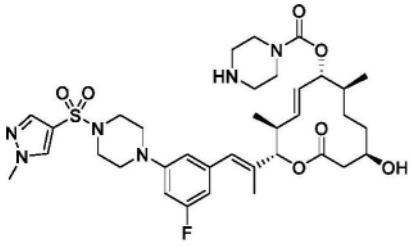
[1957]  (D26)。

[1958] 在一些实施例中,该剪接调节剂包含D27:

[1959] 

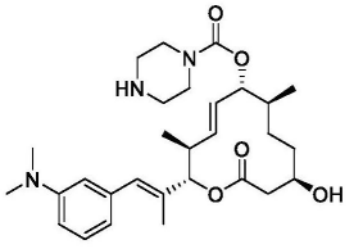
(D27)。

[1960] 在一些实施例中,该剪接调节剂包含D28:

[1961] 

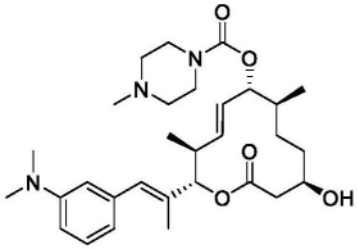
(D28)。

[1962] 在一些实施例中,该剪接调节剂包含D29:

[1963] 

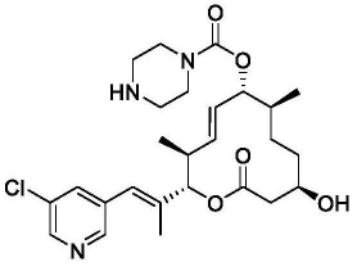
(D29)。

[1964] 在一些实施例中,该剪接调节剂包含D30:

[1965] 

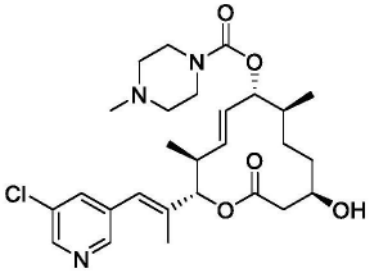
(D30)。

[1966] 在一些实施例中,该剪接调节剂包含D31:

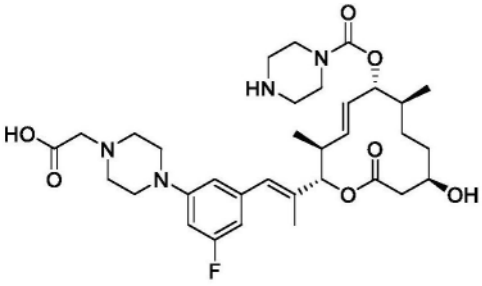
[1967] 

(D31)。

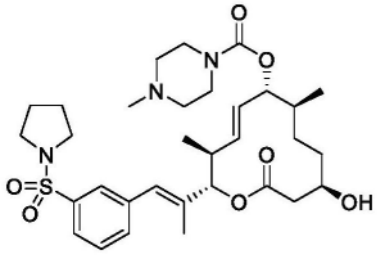
[1968] 在一些实施例中,该剪接调节剂包含D32:

[1969] 
(D32)。

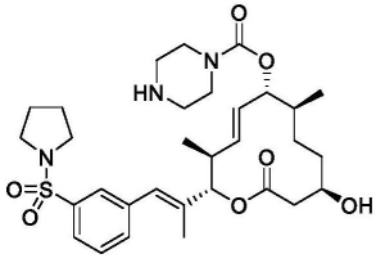
[1970] 在一些实施例中,该剪接调节剂包含D33:

[1971] 
(D33)。

[1972] 在一些实施例中,该剪接调节剂包含D34:

[1973] 
(D34)。

[1974] 在一些实施例中,该剪接调节剂包含D35:

[1975] 
(D35)。

[1976] 示例性ADC具有式(I):

[1977] $Ab-(L-D)_p$ (I)

[1978] 其中

[1979] Ab是靶向赘生性细胞的抗体或抗原结合片段;

[1980] D是D2;

[1981] L是将Ab共价连接至D的接头;并且

[1982] p是1至15的整数。

[1983] 在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段靶向表达HER2、CD138、EPHA2、MSLN、FOLH1、CDH6、CEACAM5、CFC1B、ENPP3、FOLR1、HAVCR1、KIT、MET、MUC16、SLC39A6、SLC44A4和/或STEAP1的细胞。

[1984] 在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段靶向表达HER2的细胞。在一些实施例中,

该抗体或抗原结合片段是抗HER2抗体或抗原结合片段。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:1(HCDR1)、SEQ ID NO:2(HCDR2)和SEQ ID NO:3(HCDR3)的氨基酸序列的三个重链互补决定区(HCDR1、HCDR2和HCDR3);以及含有SEQ ID NO:4(LCDR1)、SEQ ID NO:5(LCDR2)和SEQ ID NO:6(LCDR3)的氨基酸序列的三个轻链互补决定区(LCDR1、LCDR2和LCDR3)。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:19的氨基酸序列的重链可变区和含有SEQ ID NO:20的氨基酸序列的轻链可变区。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段包含人IgG1重链恒定区。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段包含人Igκ轻链恒定区。

[1985] 在一些其他实施例中,该抗体或抗原结合片段靶向表达CD138的细胞。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段是抗CD138抗体或抗原结合片段。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:7(HCDR1)、SEQ ID NO:8(HCDR2)和SEQ ID NO:9(HCDR3)的氨基酸序列的三个重链互补决定区(HCDR1、HCDR2和HCDR3);以及含有SEQ ID NO:10(LCDR1)、SEQ ID NO:11(LCDR2)和SEQ ID NO:12(LCDR3)的氨基酸序列的三个轻链互补决定区(LCDR1、LCDR2和LCDR3)。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:21的氨基酸序列的重链可变区和含有SEQ ID NO:22的氨基酸序列的轻链可变区。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段包含鼠IgG2a重链恒定区。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段包含鼠Igκ轻链恒定区。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段包含人IgG2a重链恒定区。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段包含人Igκ轻链恒定区。

[1986] 在一些其他实施例中,该抗体或抗原结合片段靶向表达EPHA2的细胞。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段是抗EPHA2抗体或抗原结合片段。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:13(HCDR1)、SEQ ID NO:14(HCDR2)和SEQ ID NO:15(HCDR3)的氨基酸序列的三个重链互补决定区(HCDR1、HCDR2和HCDR3);以及含有SEQ ID NO:16(LCDR1)、SEQ ID NO:17(LCDR2)和SEQ ID NO:18(LCDR3)的氨基酸序列的三个轻链互补决定区(LCDR1、LCDR2和LCDR3)。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:23的氨基酸序列的重链可变区和含有SEQ ID NO:24的氨基酸序列的轻链可变区。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段包含人IgG1重链恒定区。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段包含人Igκ轻链恒定区。

[1987] 在一些其他实施例中,该抗体或抗原结合片段靶向表达MSLN的细胞。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段是抗MSLN抗体或抗原结合片段。

[1988] 在一些其他实施例中,该抗体或抗原结合片段靶向表达FOLH1的细胞。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段是抗FOLH1抗体或抗原结合片段。

[1989] 在一些其他实施例中,该抗体或抗原结合片段靶向表达CDH6的细胞。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段是抗CDH6抗体或抗原结合片段。

[1990] 在一些其他实施例中,该抗体或抗原结合片段靶向表达CEACAM5的细胞。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段是抗CEACAM5抗体或抗原结合片段。

[1991] 在一些其他实施例中,该抗体或抗原结合片段靶向表达CFC1B的细胞。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段是抗CFC1B抗体或抗原结合片段。

[1992] 在一些其他实施例中,该抗体或抗原结合片段靶向表达ENPP3的细胞。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段是抗ENPP3抗体或抗原结合片段。

[1993] 在一些其他实施例中,该抗体或抗原结合片段靶向表达FOLR1的细胞。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段是抗FOLR1抗体或抗原结合片段。

[1994] 在一些其他实施例中,该抗体或抗原结合片段靶向表达HAVCR1的细胞。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段是抗HAVCR1抗体或抗原结合片段。

[1995] 在一些其他实施例中,该抗体或抗原结合片段靶向表达KIT的细胞。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段是抗KIT抗体或抗原结合片段。

[1996] 在一些其他实施例中,该抗体或抗原结合片段靶向表达MET的细胞。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段是抗MET抗体或抗原结合片段。

[1997] 在一些其他实施例中,该抗体或抗原结合片段靶向表达MUC16的细胞。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段是抗MUC16抗体或抗原结合片段。

[1998] 在一些其他实施例中,该抗体或抗原结合片段靶向表达SLC39A6的细胞。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段是抗SLC39A6抗体或抗原结合片段。

[1999] 在一些其他实施例中,该抗体或抗原结合片段靶向表达SLC44A4的细胞。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段是抗SLC44A4抗体或抗原结合片段。

[2000] 在一些其他实施例中,该抗体或抗原结合片段靶向表达STEAP1的细胞。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段是抗STEAP1抗体或抗原结合片段。

[2001] 在一些实施例中,L选自本文所披露的接头中的任一种,或本文所披露的接头组分的任何组合。在一些实施例中,L是包含MC-Val-Cit-pABC、Mal-$(PEG)_2$-CO、MC-Val-Ala-pAB、MC-Val-Ala-pABC、MC-Val-Cit-pAB、Mal-Hex、Mal-Et或Mal-Et-O-Et的接头。在一些实施例中,该接头还可包含一个或多个额外间隔子单元。在一些实施例中,L是ADL1、ADL2、ADL5、ADL6、ADL7、ADL12、ADL13、ADL14、ADL21、ADL23或ADL15接头。在一些实施例中,L是ADL12、ADL14或ADL15接头。在一些实施例中,ADL1、ADL2、ADL5、ADL6、ADL7、ADL12、ADL13、ADL14、ADL21、ADL23或ADL15接头还可包含一个或多个额外间隔子单元。

[2002] 另一示例性ADC具有式(I):

[2003] $Ab-(L-D)_p$ (I)

[2004] 其中

[2005] Ab是靶向赘生性细胞的抗体或抗原结合片段;

[2006] D是D1;

[2007] L是将Ab共价连接至D的接头;并且

[2008] p是1至15的整数。

[2009] 在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段靶向表达HER2、CD138、EPHA2、MSLN、FOLH1、CDH6、CEACAM5、CFC1B、ENPP3、FOLR1、HAVCR1、KIT、MET、MUC16、SLC39A6、SLC44A4和/或STEAP1的细胞。

[2010] 在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段靶向表达HER2的细胞。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段是抗HER2抗体或抗原结合片段。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:1(HCDR1)、SEQ ID NO:2(HCDR2)和SEQ ID NO:3(HCDR3)的氨基酸序列的三个重链互补决定区(HCDR1、HCDR2和HCDR3);以及含有SEQ ID NO:4(LCDR1)、SEQ ID NO:5(LCDR2)和SEQ ID NO:6(LCDR3)的氨基酸序列的三个轻链互补决定区(LCDR1、LCDR2和LCDR3)。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:19的氨基酸

序列的重链可变区和含有SEQ ID NO:20的氨基酸序列的轻链可变区。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段包含人IgG1重链恒定区。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段包含人Igκ轻链恒定区。

[2011] 在一些其他实施例中,该抗体或抗原结合片段靶向表达CD138的细胞。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段是抗CD138抗体或抗原结合片段。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:7(HCDR1)、SEQ ID NO:8(HCDR2)和SEQ ID NO:9(HCDR3)的氨基酸序列的三个重链互补决定区(HCDR1、HCDR2和HCDR3);以及含有SEQ ID NO:10(LCDR1)、SEQ ID NO:11(LCDR2)和SEQ ID NO:12(LCDR3)的氨基酸序列的三个轻链互补决定区(LCDR1、LCDR2和LCDR3)。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:21的氨基酸序列的重链可变区和含有SEQ ID NO:22的氨基酸序列的轻链可变区。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段包含鼠IgG2a重链恒定区。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段包含鼠Igκ轻链恒定区。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段包含人IgG2a重链恒定区。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段包含人Igκ轻链恒定区。

[2012] 在一些其他实施例中,该抗体或抗原结合片段靶向表达EPHA2的细胞。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段是抗EPHA2抗体或抗原结合片段。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:13(HCDR1)、SEQ ID NO:14(HCDR2)和SEQ ID NO:15(HCDR3)的氨基酸序列的三个重链互补决定区(HCDR1、HCDR2和HCDR3);以及含有SEQ ID NO:16(LCDR1)、SEQ ID NO:17(LCDR2)和SEQ ID NO:18(LCDR3)的氨基酸序列的三个轻链互补决定区(LCDR1、LCDR2和LCDR3)。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:23的氨基酸序列的重链可变区和含有SEQ ID NO:24的氨基酸序列的轻链可变区。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段包含人IgG1重链恒定区。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段包含人Igκ轻链恒定区。

[2013] 在一些其他实施例中,该抗体或抗原结合片段靶向表达MSLN的细胞。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段是抗MSLN抗体或抗原结合片段。

[2014] 在一些其他实施例中,该抗体或抗原结合片段靶向表达FOLH1的细胞。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段是抗FOLH1抗体或抗原结合片段。

[2015] 在一些其他实施例中,该抗体或抗原结合片段靶向表达CDH6的细胞。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段是抗CDH6抗体或抗原结合片段。

[2016] 在一些其他实施例中,该抗体或抗原结合片段靶向表达CEACAM5的细胞。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段是抗CEACAM5抗体或抗原结合片段。

[2017] 在一些其他实施例中,该抗体或抗原结合片段靶向表达CFC1B的细胞。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段是抗CFC1B抗体或抗原结合片段。

[2018] 在一些其他实施例中,该抗体或抗原结合片段靶向表达ENPP3的细胞。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段是抗ENPP3抗体或抗原结合片段。

[2019] 在一些其他实施例中,该抗体或抗原结合片段靶向表达FOLR1的细胞。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段是抗FOLR1抗体或抗原结合片段。

[2020] 在一些其他实施例中,该抗体或抗原结合片段靶向表达HAVCR1的细胞。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段是抗HAVCR1抗体或抗原结合片段。

[2021] 在一些其他实施例中,该抗体或抗原结合片段靶向表达KIT的细胞。在一些实施例

中,该抗体或抗原结合片段是抗KIT抗体或抗原结合片段。

[2022] 在一些其他实施例中,该抗体或抗原结合片段靶向表达MET的细胞。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段是抗MET抗体或抗原结合片段。

[2023] 在一些其他实施例中,该抗体或抗原结合片段靶向表达MUC16的细胞。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段是抗MUC16抗体或抗原结合片段。

[2024] 在一些其他实施例中,该抗体或抗原结合片段靶向表达SLC39A6的细胞。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段是抗SLC39A6抗体或抗原结合片段。

[2025] 在一些其他实施例中,该抗体或抗原结合片段靶向表达SLC44A4的细胞。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段是抗SLC44A4抗体或抗原结合片段。

[2026] 在一些其他实施例中,该抗体或抗原结合片段靶向表达STEAP1的细胞。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段是抗STEAP1抗体或抗原结合片段。

[2027] 另一示例性ADC具有式(I):

[2028] $Ab-(L-D)_p$ (I)

[2029] 其中

[2030] Ab是靶向赘生性细胞的抗体或抗原结合片段;

[2031] D是D4;

[2032] L是将Ab共价连接至D的接头;并且

[2033] p是1至15的整数。

[2034] 在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段靶向表达HER2、CD138、EPHA2、MSLN、FOLH1、CDH6、CEACAM5、CFC1B、ENPP3、FOLR1、HAVCR1、KIT、MET、MUC16、SLC39A6、SLC44A4和/或STEAP1的细胞。

[2035] 在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段靶向表达HER2的细胞。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段是抗HER2抗体或抗原结合片段。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:1(HCDR1)、SEQ ID NO:2(HCDR2)和SEQ ID NO:3(HCDR3)的氨基酸序列的三个重链互补决定区(HCDR1、HCDR2和HCDR3);以及含有SEQ ID NO:4(LCDR1)、SEQ ID NO:5(LCDR2)和SEQ ID NO:6(LCDR3)的氨基酸序列的三个轻链互补决定区(LCDR1、LCDR2和LCDR3)。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:19的氨基酸序列的重链可变区和含有SEQ ID NO:20的氨基酸序列的轻链可变区。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段包含人IgG1重链恒定区。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段包含人Igκ轻链恒定区。

[2036] 在一些其他实施例中,该抗体或抗原结合片段靶向表达CD138的细胞。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段是抗CD138抗体或抗原结合片段。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:7(HCDR1)、SEQ ID NO:8(HCDR2)和SEQ ID NO:9(HCDR3)的氨基酸序列的三个重链互补决定区(HCDR1、HCDR2和HCDR3);以及含有SEQ ID NO:10(LCDR1)、SEQ ID NO:11(LCDR2)和SEQ ID NO:12(LCDR3)的氨基酸序列的三个轻链互补决定区(LCDR1、LCDR2和LCDR3)。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:21的氨基酸序列的重链可变区和含有SEQ ID NO:22的氨基酸序列的轻链可变区。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段包含鼠IgG2a重链恒定区。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段包含鼠Igκ轻链恒定区。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段包含人

IgG2a重链恒定区。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段包含人Igκ轻链恒定区。

[2037] 在一些其他实施例中,该抗体或抗原结合片段靶向表达EPHA2的细胞。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段是抗EPHA2抗体或抗原结合片段。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:13(HCDR1)、SEQ ID NO:14(HCDR2)和SEQ ID NO:15(HCDR3)的氨基酸序列的三个重链互补决定区(HCDR1、HCDR2和HCDR3);以及含有SEQ ID NO:16(LCDR1)、SEQ ID NO:17(LCDR2)和SEQ ID NO:18(LCDR3)的氨基酸序列的三个轻链互补决定区(LCDR1、LCDR2和LCDR3)。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:23的氨基酸序列的重链可变区和含有SEQ ID NO:24的氨基酸序列的轻链可变区。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段包含人IgG1重链恒定区。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段包含人Igκ轻链恒定区。

[2038] 在一些其他实施例中,该抗体或抗原结合片段靶向表达MSLN的细胞。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段是抗MSLN抗体或抗原结合片段。

[2039] 在一些其他实施例中,该抗体或抗原结合片段靶向表达FOLH1的细胞。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段是抗FOLH1抗体或抗原结合片段。

[2040] 在一些其他实施例中,该抗体或抗原结合片段靶向表达CDH6的细胞。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段是抗CDH6抗体或抗原结合片段。

[2041] 在一些其他实施例中,该抗体或抗原结合片段靶向表达CEACAM5的细胞。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段是抗CEACAM5抗体或抗原结合片段。

[2042] 在一些其他实施例中,该抗体或抗原结合片段靶向表达CFC1B的细胞。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段是抗CFC1B抗体或抗原结合片段。

[2043] 在一些其他实施例中,该抗体或抗原结合片段靶向表达ENPP3的细胞。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段是抗ENPP3抗体或抗原结合片段。

[2044] 在一些其他实施例中,该抗体或抗原结合片段靶向表达FOLR1的细胞。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段是抗FOLR1抗体或抗原结合片段。

[2045] 在一些其他实施例中,该抗体或抗原结合片段靶向表达HAVCR1的细胞。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段是抗HAVCR1抗体或抗原结合片段。

[2046] 在一些其他实施例中,该抗体或抗原结合片段靶向表达KIT的细胞。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段是抗KIT抗体或抗原结合片段。

[2047] 在一些其他实施例中,该抗体或抗原结合片段靶向表达MET的细胞。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段是抗MET抗体或抗原结合片段。

[2048] 在一些其他实施例中,该抗体或抗原结合片段靶向表达MUC16的细胞。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段是抗MUC16抗体或抗原结合片段。

[2049] 在一些其他实施例中,该抗体或抗原结合片段靶向表达SLC39A6的细胞。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段是抗SLC39A6抗体或抗原结合片段。

[2050] 在一些其他实施例中,该抗体或抗原结合片段靶向表达SLC44A4的细胞。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段是抗SLC44A4抗体或抗原结合片段。

[2051] 在一些其他实施例中,该抗体或抗原结合片段靶向表达STEAP1的细胞。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段是抗STEAP1抗体或抗原结合片段。

[2052] 另一示例性ADC具有式(I):

[2053] $Ab-(L-D)_p(I)$

[2054] 其中

[2055] Ab是靶向赘生性细胞的抗体或抗原结合片段;

[2056] D是D12;

[2057] L是将Ab共价连接至D的接头;并且

[2058] p是1至15的整数。

[2059] 在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段靶向表达HER2、CD138、EPHA2、MSLN、FOLH1、CDH6、CEACAM5、CFC1B、ENPP3、FOLR1、HAVCR1、KIT、MET、MUC16、SLC39A6、SLC44A4和/或STEAP1的细胞。

[2060] 在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段靶向表达HER2的细胞。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段是抗HER2抗体或抗原结合片段。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:1(HCDR1)、SEQ ID NO:2(HCDR2)和SEQ ID NO:3(HCDR3)的氨基酸序列的三个重链互补决定区(HCDR1、HCDR2和HCDR3);以及含有SEQ ID NO:4(LCDR1)、SEQ ID NO:5(LCDR2)和SEQ ID NO:6(LCDR3)的氨基酸序列的三个轻链互补决定区(LCDR1、LCDR2和LCDR3)。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:19的氨基酸序列的重链可变区和含有SEQ ID NO:20的氨基酸序列的轻链可变区。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段包含人IgG1重链恒定区。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段包含人Igκ轻链恒定区。

[2061] 在一些其他实施例中,该抗体或抗原结合片段靶向表达CD138的细胞。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段是抗CD138抗体或抗原结合片段。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:7(HCDR1)、SEQ ID NO:8(HCDR2)和SEQ ID NO:9(HCDR3)的氨基酸序列的三个重链互补决定区(HCDR1、HCDR2和HCDR3);以及含有SEQ ID NO:10(LCDR1)、SEQ ID NO:11(LCDR2)和SEQ ID NO:12(LCDR3)的氨基酸序列的三个轻链互补决定区(LCDR1、LCDR2和LCDR3)。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:21的氨基酸序列的重链可变区和含有SEQ ID NO:22的氨基酸序列的轻链可变区。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段包含鼠IgG2a重链恒定区。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段包含鼠Igκ轻链恒定区。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段包含人IgG2a重链恒定区。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段包含人Igκ轻链恒定区。

[2062] 在一些其他实施例中,该抗体或抗原结合片段靶向表达EPHA2的细胞。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段是抗EPHA2抗体或抗原结合片段。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:13(HCDR1)、SEQ ID NO:14(HCDR2)和SEQ ID NO:15(HCDR3)的氨基酸序列的三个重链互补决定区(HCDR1、HCDR2和HCDR3);以及含有SEQ ID NO:16(LCDR1)、SEQ ID NO:17(LCDR2)和SEQ ID NO:18(LCDR3)的氨基酸序列的三个轻链互补决定区(LCDR1、LCDR2和LCDR3)。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:23的氨基酸序列的重链可变区和含有SEQ ID NO:24的氨基酸序列的轻链可变区。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段包含人IgG1重链恒定区。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段包含人Igκ轻链恒定区。

[2063] 在一些其他实施例中,该抗体或抗原结合片段靶向表达MSLN的细胞。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段是抗MSLN抗体或抗原结合片段。

[2064] 在一些其他实施例中,该抗体或抗原结合片段靶向表达FOLH1的细胞。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段是抗FOLH1抗体或抗原结合片段。

[2065] 在一些其他实施例中,该抗体或抗原结合片段靶向表达CDH6的细胞。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段是抗CDH6抗体或抗原结合片段。

[2066] 在一些其他实施例中,该抗体或抗原结合片段靶向表达CEACAM5的细胞。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段是抗CEACAM5抗体或抗原结合片段。

[2067] 在一些其他实施例中,该抗体或抗原结合片段靶向表达CFC1B的细胞。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段是抗CFC1B抗体或抗原结合片段。

[2068] 在一些其他实施例中,该抗体或抗原结合片段靶向表达ENPP3的细胞。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段是抗ENPP3抗体或抗原结合片段。

[2069] 在一些其他实施例中,该抗体或抗原结合片段靶向表达FOLR1的细胞。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段是抗FOLR1抗体或抗原结合片段。

[2070] 在一些其他实施例中,该抗体或抗原结合片段靶向表达HAVCR1的细胞。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段是抗HAVCR1抗体或抗原结合片段。

[2071] 在一些其他实施例中,该抗体或抗原结合片段靶向表达KIT的细胞。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段是抗KIT抗体或抗原结合片段。

[2072] 在一些其他实施例中,该抗体或抗原结合片段靶向表达MET的细胞。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段是抗MET抗体或抗原结合片段。

[2073] 在一些其他实施例中,该抗体或抗原结合片段靶向表达MUC16的细胞。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段是抗MUC16抗体或抗原结合片段。

[2074] 在一些其他实施例中,该抗体或抗原结合片段靶向表达SLC39A6的细胞。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段是抗SLC39A6抗体或抗原结合片段。

[2075] 在一些其他实施例中,该抗体或抗原结合片段靶向表达SLC44A4的细胞。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段是抗SLC44A4抗体或抗原结合片段。

[2076] 在一些其他实施例中,该抗体或抗原结合片段靶向表达STEAP1的细胞。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段是抗STEAP1抗体或抗原结合片段。

[2077] 另一示例性ADC具有式(I):

[2078] $Ab-(L-D)_p$ (I)

[2079] 其中

[2080] Ab是靶向赘生性细胞的抗体或抗原结合片段;

[2081] D是D15;

[2082] L是将Ab共价连接至D的接头;并且

[2083] p是1至15的整数。

[2084] 在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段靶向表达HER2、CD138、EPHA2、MSLN、FOLH1、CDH6、CEACAM5、CFC1B、ENPP3、FOLR1、HAVCR1、KIT、MET、MUC16、SLC39A6、SLC44A4和/或STEAP1的细胞。

[2085] 在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段靶向表达HER2的细胞。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段是抗HER2抗体或抗原结合片段。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:1(HCDR1)、SEQ ID NO:2(HCDR2)和SEQ ID NO:3(HCDR3)的氨基

酸序列的三个重链互补决定区(HCDR1、HCDR2和HCDR3);以及含有SEQ ID NO:4(LCDR1)、SEQ ID NO:5(LCDR2)和SEQ ID NO:6(LCDR3)的氨基酸序列的三个轻链互补决定区(LCDR1、LCDR2和LCDR3)。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:19的氨基酸序列的重链可变区和含有SEQ ID NO:20的氨基酸序列的轻链可变区。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段包含人IgG1重链恒定区。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段包含人Igκ轻链恒定区。

[2086] 在一些其他实施例中,该抗体或抗原结合片段靶向表达CD138的细胞。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段是抗CD138抗体或抗原结合片段。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:7(HCDR1)、SEQ ID NO:8(HCDR2)和SEQ ID NO:9(HCDR3)的氨基酸序列的三个重链互补决定区(HCDR1、HCDR2和HCDR3);以及含有SEQ ID NO:10(LCDR1)、SEQ ID NO:11(LCDR2)和SEQ ID NO:12(LCDR3)的氨基酸序列的三个轻链互补决定区(LCDR1、LCDR2和LCDR3)。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:21的氨基酸序列的重链可变区和含有SEQ ID NO:22的氨基酸序列的轻链可变区。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段包含鼠IgG2a重链恒定区。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段包含鼠Igκ轻链恒定区。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段包含人IgG2a重链恒定区。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段包含人Igκ轻链恒定区。

[2087] 在一些其他实施例中,该抗体或抗原结合片段靶向表达EPHA2的细胞。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段是抗EPHA2抗体或抗原结合片段。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:13(HCDR1)、SEQ ID NO:14(HCDR2)和SEQ ID NO:15(HCDR3)的氨基酸序列的三个重链互补决定区(HCDR1、HCDR2和HCDR3);以及含有SEQ ID NO:16(LCDR1)、SEQ ID NO:17(LCDR2)和SEQ ID NO:18(LCDR3)的氨基酸序列的三个轻链互补决定区(LCDR1、LCDR2和LCDR3)。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:23的氨基酸序列的重链可变区和含有SEQ ID NO:24的氨基酸序列的轻链可变区。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段包含人IgG1重链恒定区。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段包含人Igκ轻链恒定区。

[2088] 在一些其他实施例中,该抗体或抗原结合片段靶向表达MSLN的细胞。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段是抗MSLN抗体或抗原结合片段。

[2089] 在一些其他实施例中,该抗体或抗原结合片段靶向表达FOLH1的细胞。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段是抗FOLH1抗体或抗原结合片段。

[2090] 在一些其他实施例中,该抗体或抗原结合片段靶向表达CDH6的细胞。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段是抗CDH6抗体或抗原结合片段。

[2091] 在一些其他实施例中,该抗体或抗原结合片段靶向表达CEACAM5的细胞。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段是抗CEACAM5抗体或抗原结合片段。

[2092] 在一些其他实施例中,该抗体或抗原结合片段靶向表达CFC1B的细胞。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段是抗CFC1B抗体或抗原结合片段。

[2093] 在一些其他实施例中,该抗体或抗原结合片段靶向表达ENPP3的细胞。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段是抗ENPP3抗体或抗原结合片段。

[2094] 在一些其他实施例中,该抗体或抗原结合片段靶向表达FOLR1的细胞。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段是抗FOLR1抗体或抗原结合片段。

[2095] 在一些其他实施例中,该抗体或抗原结合片段靶向表达HAVCR1的细胞。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段是抗HAVCR1抗体或抗原结合片段。

[2096] 在一些其他实施例中,该抗体或抗原结合片段靶向表达KIT的细胞。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段是抗KIT抗体或抗原结合片段。

[2097] 在一些其他实施例中,该抗体或抗原结合片段靶向表达MET的细胞。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段是抗MET抗体或抗原结合片段。

[2098] 在一些其他实施例中,该抗体或抗原结合片段靶向表达MUC16的细胞。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段是抗MUC16抗体或抗原结合片段。

[2099] 在一些其他实施例中,该抗体或抗原结合片段靶向表达SLC39A6的细胞。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段是抗SLC39A6抗体或抗原结合片段。

[2100] 在一些其他实施例中,该抗体或抗原结合片段靶向表达SLC44A4的细胞。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段是抗SLC44A4抗体或抗原结合片段。

[2101] 在一些其他实施例中,该抗体或抗原结合片段靶向表达STEAP1的细胞。在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段是抗STEAP1抗体或抗原结合片段。

[2102] 在一些实施例中,L选自本文所披露的接头中的任一种,或本文所披露的接头组分的任何组合。在一些实施例中,L是可裂解接头。在一些实施例中,L是不可裂解接头。在一些实施例中,L是包含MC-Val-Cit-pABC、MC-Val-Ala-pABC、MC-Val-Ala-pAB、MC-Glu-Val-Cit-pABC、Ala-Ala-Asn-pABC或β-葡萄糖醛酸苷的接头。在一些实施例中,L是包含Mal-Hex、Mal-Et或Mal-Et-O-Et的接头。在一些实施例中,L是包含MC-Val-Cit-pABC、Mal-$(PEG)_2$-CO、MC-Val-Ala-pAB、MC-Val-Ala-pABC、MC-Val-Cit-pAB、Mal-Hex、Mal-Et或Mal-Et-O-Et的接头。在一些实施例中,该接头还可包含一个或多个额外间隔子单元。在一些实施例中,L是ADL1、ADL2、ADL5、ADL6、ADL7、ADL12、ADL13、ADL14、ADL21、ADL23或ADL15接头。在一些实施例中,L是ADL12、ADL14或ADL15接头。在一些实施例中,ADL1、ADL2、ADL5、ADL6、ADL7、ADL12、ADL13、ADL14、ADL21、ADL23或ADL15接头还可包含一个或多个额外间隔子单元。

[2103] 在一些实施例中,p是1至10。在一些实施例中,p是2至8。在一些实施例中,p是4至8。在一些实施例中,p是4。在一些实施例中,p是8。

[2104] 另一示例性ADC具有式(I):

[2105] Ab-(L-D)p(I)

[2106] 其中Ab是抗HER2抗体或抗原结合片段,其包含含有SEQ ID NO:1(HCDR1)、SEQ ID NO:2(HCDR2)和SEQ ID NO:3(HCDR3)的氨基酸序列的三个重链互补决定区(HCDR1、HCDR2和HCDR3);以及含有SEQ ID NO:4(LCDR1)、SEQ ID NO:5(LCDR2)和SEQ ID NO:6(LCDR3)的氨基酸序列的三个轻链互补决定区(LCDR1、LCDR2和LCDR3);

[2107] D是D2、D1、D4、D12或D15;

[2108] L是将Ab共价连接至D的接头;并且

[2109] p是1至15的整数。

[2110] 在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:19的氨基酸序列的重链可变区和含有SEQ ID NO:20的氨基酸序列的轻链可变区。

[2111] 在一些实施例中,L选自本文所披露的接头中的任一种,或本文所披露的接头组分

的任何组合。在一些实施例中,L是包含MC-Val-Cit-pABC、Mal-$(PEG)_2$-CO、MC-Val-Ala-pAB、MC-Val-Ala-pABC、MC-Val-Cit-pAB、Mal-Hex、Mal-Et或Mal-Et-O-Et的接头。在一些实施例中,该接头还可包含一个或多个额外间隔子单元。在一些实施例中,L是ADL1、ADL2、ADL5、ADL6、ADL7、ADL12、ADL13、ADL14、ADL21、ADL23或ADL15接头。在一些实施例中,L是ADL12、ADL14或ADL15接头。在一些实施例中,ADL1、ADL2、ADL5、ADL6、ADL7、ADL12、ADL13、ADL14、ADL21、ADL23或ADL15接头还可包含一个或多个额外间隔子单元。

[2112] 另一示例性ADC具有式(I):

[2113] Ab-$(L-D)_p$(I)

[2114] 其中Ab是抗CD138抗体或抗原结合片段,其包含含有SEQ ID NO:7(HCDR1)、SEQ ID NO:8(HCDR2)和SEQ ID NO:9(HCDR3)的氨基酸序列的三个重链互补决定区(HCDR1、HCDR2和HCDR3);以及含有SEQ ID NO:10(LCDR1)、SEQ ID NO:11(LCDR2)和SEQ ID NO:12(LCDR3)的氨基酸序列的三个轻链互补决定区(LCDR1、LCDR2和LCDR3);

[2115] D是D2、D1、D4、D12或D15;

[2116] L是将Ab共价连接至D的接头;并且

[2117] p是1至15的整数。

[2118] 在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:21的氨基酸序列的重链可变区和含有SEQ ID NO:22的氨基酸序列的轻链可变区。

[2119] 在一些实施例中,L选自本文所披露的接头中的任一种,或本文所披露的接头组分的任何组合。在一些实施例中,L是包含MC-Val-Cit-pABC、Mal-$(PEG)_2$-CO、MC-Val-Ala-pAB、MC-Val-Ala-pABC、MC-Val-Cit-pAB、Mal-Hex、Mal-Et或Mal-Et-O-Et的接头。在一些实施例中,该接头还可包含一个或多个额外间隔子单元。在一些实施例中,L是ADL1、ADL2、ADL5、ADL6、ADL7、ADL12、ADL13、ADL14、ADL21、ADL23或ADL15接头。在一些实施例中,L是ADL12、ADL14或ADL15接头。在一些实施例中,ADL1、ADL2、ADL5、ADL6、ADL7、ADL12、ADL13、ADL14、ADL21、ADL23或ADL15接头还可包含一个或多个额外间隔子单元。

[2120] 另一示例性ADC具有式(I):

[2121] Ab-$(L-D)_p$(I)

[2122] 其中Ab是抗EPHA2抗体或抗原结合片段,其包含含有SEQ ID NO:13(HCDR1)、SEQ ID NO:14(HCDR2)和SEQ ID NO:15(HCDR3)的氨基酸序列的三个重链互补决定区(HCDR1、HCDR2和HCDR3);以及含有SEQ ID NO:16(LCDR1)、SEQ ID NO:17(LCDR2)和SEQ ID NO:18(LCDR3)的氨基酸序列的三个轻链互补决定区(LCDR1、LCDR2和LCDR3);

[2123] D是D2、D1、D4、D12或D15;

[2124] L是将Ab共价连接至D的接头;并且

[2125] p是1至15的整数。

[2126] 在一些实施例中,该抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:23的氨基酸序列的重链可变区和含有SEQ ID NO:24的氨基酸序列的轻链可变区。

[2127] 在一些实施例中,L选自本文所披露的接头中的任一种,或本文所披露的接头组分的任何组合。在一些实施例中,L是包含MC-Val-Cit-pABC、Mal-$(PEG)_2$-CO、MC-Val-Ala-pAB、MC-Val-Ala-pABC、MC-Val-Cit-pAB、Mal-Hex、Mal-Et或Mal-Et-O-Et的接头。在一些实施例中,该接头还可包含一个或多个额外间隔子单元。在一些实施例中,L是ADL1、ADL2、

ADL5、ADL6、ADL7、ADL12、ADL13、ADL14、ADL21、ADL23或ADL15接头。在一些实施例中,L是ADL12、ADL14或ADL15接头。在一些实施例中,ADL1、ADL2、ADL5、ADL6、ADL7、ADL12、ADL13、ADL14、ADL21、ADL23或ADL15接头还可包含一个或多个额外间隔子单元。

[2128] 在不同实施例中,包含D2或D1药物部分的ADC可以包括可裂解或不可裂解接头。

[2129] 在不同实施例中,该接头是可裂解接头。在不同实施例中,该可裂解接头包含MC-Val-Cit-pABC。在不同实施例中,该可裂解接头包含MC-Val-Ala-pABC。在不同实施例中,该可裂解接头包含MC-Val-Ala-pAB。在不同实施例中,该可裂解接头包含MC-Glu-Val-Cit-pABC。在不同实施例中,该可裂解接头包含MC-Ala-Ala-Asn-pABC。

[2130] 在各种其他实施例中,该接头是不可裂解接头。在不同实施例中,该不可裂解接头包含单独的或与至少一个额外间隔子单元组合的MC。在不同实施例中,该不可裂解接头包含单独的或与至少一个额外间隔子单元组合的Mal-Hex。在不同实施例中,该不可裂解接头包含单独的或与至少一个额外间隔子单元组合的Mal-Et。在不同实施例中,该不可裂解接头包含单独的或与至少一个额外间隔子单元组合的Mal-Et-O-Et。

[2131] 在不同实施例中,在包含D2或D1药物部分的ADC中,p是1至10。在不同实施例中,p是2至8。在不同实施例中,p是4至8。在不同实施例中,p是4。在不同实施例中,p是8。

[2132] 在不同实施例中,相对于包含替代性药物部分(例如替代性剪接调节剂药物部分)的ADC,包含如本文所披露的D2或D1药物部分的ADC表现出改善的药物:抗体比率、较低聚集水平、增加的稳定性、增加的对癌细胞的中靶杀伤、降低的对非癌细胞的脱靶杀伤、和/或增加的细胞毒性和/或效力。在一些实施例中,包含如本文所披露的D2或D1药物部分的ADC提供良好或优异的上文所列类别中的一种或多种特性、或治疗性ADC的一系列功能特性。在一些实施例中,相较于包含替代性药物部分(例如替代性剪接调节剂药物部分)的ADC,包含D2或D1药物部分的ADC展现出令人惊讶地有效的效力以及对表达该ADC所靶向的抗原的细胞的细胞生长和/或增殖的增加的抑制。在一些实施例中,效力可以根据引起细胞增殖减少50%的化合物的浓度(GI_{50})进行测量。在不同实施例中,相较于具有替代性药物部分(例如替代性剪接调节剂药物部分,例如泰兰他汀A)的ADC,包含D2或D1药物部分的ADC展现出令人惊讶地增加的体内稳定性(例如血浆稳定性)。参见例如Puthenveetil等人描述的ADC(Bioconjugate Chem.[生物共轭化学](2016)27:1880-8),该ADC在72小时内显示有效负载的完全生物转化(即,乙酸酯完全水解)。

[2133] 在某些实施例中,作为接头部分的前体的中间体与药物部分(例如剪接调节剂)在适当条件下反应。在某些实施例中,在该药物和/或该中间体或接头上使用反应性基团。药物与中间体之间的反应产物、或衍生化药物(药物加接头)随后与抗体或抗原结合片段在适当条件下反应。可替代地,该中间体或接头可先与抗体或抗原结合片段、或衍生化抗体或抗原结合片段反应,然后与该药物或衍生化药物反应。

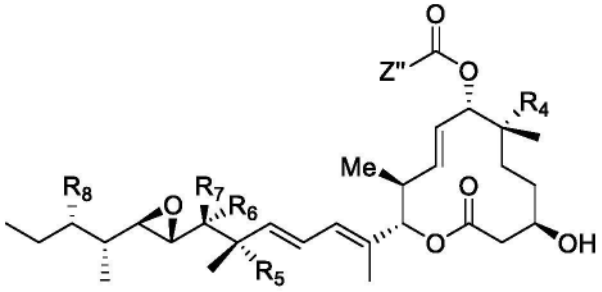
[2134] 多种不同反应可用于将药物部分和/或接头部分共价连接至抗体或抗原结合片段。这通常通过使抗体或抗原结合片段的一个或多个氨基酸残基(包括赖氨酸的胺基团、谷氨酸和天冬氨酸的游离羧酸基团、半胱氨酸的巯基基团和芳族氨基酸的各种部分)进行反应来实现。例如,非特异性共价连接可以使用碳二亚胺反应进行,以将药物部分上的羧基(或氨基)基团连接至抗体或抗原结合片段上的氨基(或羧基)基团。另外,还可使用双官能试剂(如二醛或亚氨酸酯)将药物部分上的氨基基团连接至抗体或抗原结合片段上的氨基

基团。希夫碱(Schiff base)反应还可用于将药物(例如剪接调节剂)连接至结合剂。此方法涉及过碘酸盐氧化含有二醇或羟基基团的药物,由此形成随后与结合剂反应的醛。连接经由与结合剂的氨基基团形成希夫碱而发生。还可使用异硫氰酸酯作为偶合剂,用于将药物共价连接至结合剂。其他技术是技术人员已知的且在本披露的范围内。可使用本领域已知的各种化学物质产生且连接至抗体或抗原结合片段的药物部分的实例包括剪接调节剂,例如本文中描述和举例说明的剪接调节剂。

[2135] 接头-药物/药物化合物

[2136] 本文进一步披露了示例性接头-药物(L-D)化合物,以及包含此类化合物的多个拷贝的组合物。在不同实施例中,本文所披露的接头-药物化合物可由以下通式定义:L-D,其中L=接头部分,且D=药物部分(例如剪接调节剂药物部分)。在某些实施例中,所披露的L-D化合物适用于本文所述的ADC中,例如具有式(I)的ADC中。

[2137] 在不同实施例中,本文所披露的接头-药物(L-D)化合物包含根据式(III)的接头-药物结构。在不同实施例中,本披露提供了具有式(III)的接头-药物(L-D)化合物:

[2138]  (III),或其药学上可接受的盐,其中:

[2139] R^1选自不存在、氢、C_1-C_6烷基基团、C_1-C_6烷基烷氧基基团、C_1-C_6烷基氨基基团、C_1-C_6烷基羧酸基团、C_1-C_6烷基羟基基团、C_3-C_8环烷基基团、苄基基团、C_3-C_8杂环基基团、-O-C(=O)-(C_1-C_6烷基)基团和-CD_3;

[2140] R^2不存在或为接头;

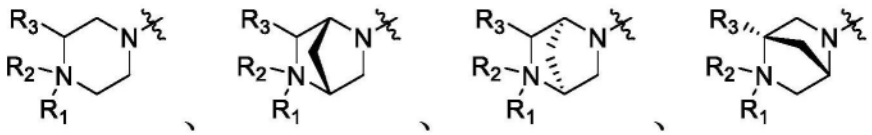
[2141] R^3选自氢、C_1-C_6烷基基团、C_1-C_6烷基烷氧基基团、C_1-C_6烷基氨基基团、C_1-C_6烷基羧酸基团、C_1-C_6烷基羟基基团、C_3-C_8环烷基基团、苄基基团、C_3-C_8杂环基基团和-O-C(=O)-(C_1-C_6烷基)基团;并且

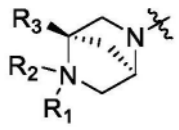
[2142] R^4、R^5和R^8各自独立地选自氢、羟基基团、-O-(C_1-C_6烷基)基团、-O-C(=O)-(C_1-C_6烷基)基团和C_1-C_6烷基基团;

[2143] R^6和R^7各自独立地选自氢、-O-R^{17}、-O-C(=O)-R^{17}、-O-C(=O)-$NR^{15}R^{16}$、C_1-C_6烷基基团、-$NR^{15}R^{16}$和接头;

[2144] R^{15}和R^{16}各自独立地选自氢、R^{17}、-C(=O)-R^{17}和-C(=O)-O-R^{17};

[2145] R^{17}选自氢、C_1-C_6烷基基团、C_3-C_8环烷基基团、苄基基团和C_3-C_8杂环基基团;并且

[2146] Z”选自  和



;

[2147] 其中R^1、R^2、R^3、R^4、R^5、R^6、R^7、R^8、R^{15}、R^{16}和R^{17}各自独立地被0至3个独立地选自以下的基团取代:卤素、羟基基团、C_1-C_6烷基、-O-(C_1-C_6烷基)基团、-$NR^{15}R^{16}$、C_3-C_8环烷基基团、C_1-C_6烷基羟基基团、C_1-C_6烷基烷氧基基团、苄基基团和C_3-C_8杂环基基团;

[2148] 其中R^6和R^7中至少一个是氢;并且

[2149] 其中如果R^2是接头,则R^6和R^7均不为接头,且如果R^6或R^7是接头,则R^2不存在。

[2150] 在一些实施例中,R^1选自不存在、氢、C_1-C_4烷基基团、C_1-C_4烷基羧酸基团和C_3-C_8环烷基基团。在一些实施例中,R^1不存在。在一些实施例中,R^1是氢。在一些实施例中,R^1是C_1-C_4烷基基团。在一些实施例中,R^1是甲基。在一些实施例中,R^1是乙基。在一些实施例中,R^1是C_1-C_4烷基羧酸基团。在一些实施例中,R^1是-$CH_2CH_2CH_2CO_2H$。在一些实施例中,R^1是C_3-C_8环烷基基团。在一些实施例中,R^1是环庚基。

[2151] 在一些实施例中,R^3选自氢、C_1-C_4烷基基团、C_1-C_4烷基烷氧基基团、C_1-C_4烷基羧酸基团和C_1-C_4烷基羟基基团。在一些实施例中,R^3选自氢和C_1-C_4烷基羧酸基团。在一些实施例中,R^3是氢。在一些实施例中,R^3是C_1-C_4烷基羧酸基团。在一些实施例中,R^3是-$CH_2CH_2CO_2H$。

[2152] 在一些实施例中,R^4选自氢、羟基基团、-O-(C_1-C_4烷基)基团、-O-C(=O)-(C_1-C_4烷基)基团和C_1-C_4烷基基团。在一些实施例中,R^4是氢。在一些实施例中,R^4是羟基。在一些实施例中,R^4是-O-(C_1-C_4烷基)基团。在一些实施例中,R^4是-OCH_3。在一些实施例中,R^4是-OCH_2CH_3。在一些实施例中,R^4是-O-C(=O)-(C_1-C_4烷基)基团。在一些实施例中,R^4是-O-C(=O)-CH_3。在一些实施例中,R^4是-O-C(=O)-CH_2CH_3。在一些实施例中,R^4是C_1-C_4烷基基团。在一些实施例中,R^4是甲基。在一些实施例中,R^4是乙基。

[2153] 在一些实施例中,R^5选自氢、羟基基团、-O-(C_1-C_4烷基)基团和C_1-C_4烷基基团。在一些实施例中,R^5是氢。在一些实施例中,R^5是羟基。在一些实施例中,R^5是-O-(C_1-C_4烷基)基团。在一些实施例中,R^5是C_1-C_4烷基基团。

[2154] 在一些实施例中,R^2不存在且R^6是接头。在一些实施例中,R^2不存在且R^7是接头。在一些实施例中,R^2是接头。在一些实施例中,R^6是氢。在一些实施例中,R^7是氢。

[2155] 在一些实施例中,R^6是氢且R^7是-O-R^{17}。在一些实施例中,R^6是氢且R^7是-OR^{17},其中R^{17}选自氢和C^1-C^4烷基基团。在一些实施例中,R^6是氢且R^7是-O-R^{17},其中R^{17}是氢。在一些实施例中,R^6是-O-R^{17}且R^7是氢。在一些实施例中,R^6是-O-R^{17}且R^7是氢,其中R^{17}选自氢和C^1-C^4烷基基团。在一些实施例中,R^6是-O-R^{17}且R^7是氢,其中R^{17}是氢。在一些实施例中,R^6是氢且R^7是-$NR^{15}R^{16}$。在一些实施例中,R^6是氢且R^7是-$NR^{15}R^{16}$,其中R^{15}是H且R^{16}选自氢、R^{17}、-C(=O)-R^{17}和-C(=O)-O-R^{17}。在一些实施例中,R^6是氢且R^7是-$NR^{15}R^{16}$,其中R^{15}是H且R^{16}选自氢、R^{17}、-C(=O)-R^{17}和-C(=O)-O-R^{17},且其中R^{17}选自氢、C_1-C_6烷基基团、C_3-C_8环烷基基团和C_3-C_8杂环基基团。在一些实施例中,R^6是-O-R^{17}。在一些实施例中,R^6是-O-C(=O)-R^{17}。在一些实施例中,R^6是C_1-C_6烷基。在一些实施例中,R^6是C_1-C_4烷基。在一些实施例中,R^6是C_1烷基。在一些实施例中,R^6是-$NR^{15}R^{16}$。

[2156] 在一些实施例中,R^7是-O-R^{17}。在一些实施例中,R^7是-O-C(=O)-R^{17}。在一些实施例中,R^7是C_1-C_6烷基。在一些实施例中,R^7是C_1-C_4烷基。在一些实施例中,R^7是C_1烷基。在一些实

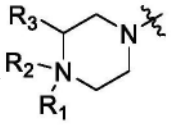
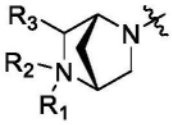
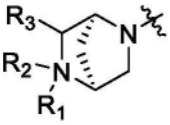
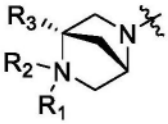
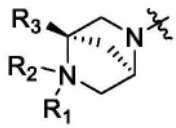
施例中，R^7是-$NR^{15}R^{16}$。

[2157] 在一些实施例中，R^8选自氢、羟基基团、-O-(C_1-C_4烷基)基团和(C_1-C_4烷基)。在一些实施例中，R^8是氢。在一些实施例中，R^8是羟基基团。在一些实施例中，R^8是-O-(C_1-C_4烷基)基团。在一些实施例中，R^8是-O-(C_1烷基)基团。

[2158] 在一些实施例中，R^{15}是氢。在一些实施例中，R^{15}是R^{17}。在一些实施例中，R^{15}是-C(=O)-R^{17}。在一些实施例中，R^{15}是-C(=O)-O-R^{17}。

[2159] 在一些实施例中，R^{16}是氢。在一些实施例中，R^{16}是R^{17}。在一些实施例中，R^{16}是-C(=O)-R^{17}。在一些实施例中，R^{16}是-C(=O)-O-R^{17}。

[2160] 在一些实施例中，R^{17}选自氢、C_1-C_4烷基基团、C_3-C_6环烷基基团和C_3-C_8杂环基基团。在一些实施例中，R^{17}是氢。在一些实施例中，R^{17}是C_1-C_4烷基基团。在一些实施例中，R^{17}是C_1烷基基团。在一些实施例中，R^{17}是C_3-C_6环烷基基团。在一些实施例中，R^{17}是C_3环烷基基团。在一些实施例中，R^{17}是C_4环烷基基团。在一些实施例中，R^{17}是C_5环烷基基团。在一些实施例中，R^{17}是C_6环烷基基团。在一些实施例中，R^{17}是C_3-C_8杂环基基团。在一些实施例中，R^{17}是C_3杂环基基团。在一些实施例中，R^{17}是C_4杂环基基团。在一些实施例中，R^{17}是C_5杂环基基团。在一些实施例中，R^{17}是C_6杂环基基团。在一些实施例中，R^{17}是C_7杂环基基团。在一些实施例中，R^{17}是C_8杂环基基团。

[2161] 在一些实施例中，Z'是  。在一些实施例中，Z'是  。在一些实施例中，Z'是  。在一些实施例中，Z'是  。在一些实施例中，Z'是  。

[2162] 在一些实施例中，R^2是接头。在一些实施例中，该接头包含至少一个可裂解肽部分。在一些实施例中，该至少一个可裂解肽部分可被酶裂解。在一些实施例中，该接头或可裂解肽部分包含至少一个氨基酸单元。在一些实施例中，该至少一个氨基酸单元选自精氨酸、组氨酸、赖氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、丝氨酸、苏氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、半胱氨酸、硒半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、丙氨酸、缬氨酸、异亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸和瓜氨酸。在一些实施例中，该至少一个氨基酸单元选自丙氨酸、瓜氨酸和缬氨酸。在一些实施例中，该接头包含瓜氨酸和缬氨酸。在一些实施例中，该接头包含丙氨酸和缬氨酸。

[2163] 在一些实施例中，该接头包含选自磺酰胺、β-葡萄糖醛酸苷、二硫化物和羰基的部分。在一些实施例中，该接头包含磺酰胺。在一些实施例中，该接头包含β-葡萄糖醛酸苷。在一些实施例中，该接头包含二硫化物。在一些实施例中，该接头包含羰基。

[2164] 在一些实施例中，该接头包含间隔子单元。在一些实施例中，该间隔子单元选自烷基基团和聚乙二醇(PEG)部分。在一些实施例中，该烷基基团是C_1-C_{12}烷基基团。在一些实施例中，该烷基基团是C_1-C_6烷基基团。在一些实施例中，该烷基基团是亚甲基。在一些实施例中，该烷基基团是亚乙基。在一些实施例中，该烷基基团是亚正丙基。在一些实施例中，该烷

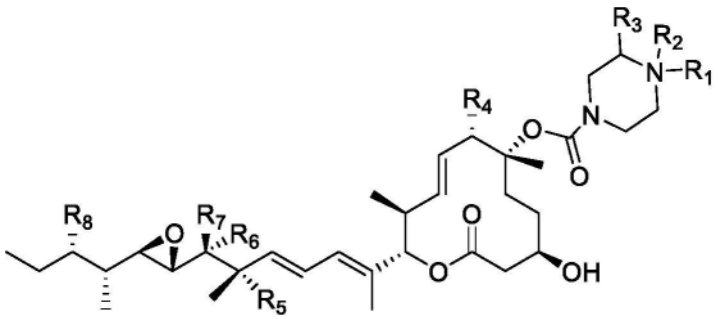
基是亚正丁基。在一些实施例中,该烷基是亚正戊基。在一些实施例中,该烷基是亚正己基。在一些实施例中,PEG部分包含-(PEG)$_m$-,其中m是1至10的整数。在一些实施例中,m是1。在一些实施例中,m是2。在一些实施例中,m是3。在一些实施例中,m是4。在一些实施例中,m是5。在一些实施例中,m是6。

[2165] 在一些实施例中,该接头包含马来酰亚胺(Mal)部分("Mal-间隔子单元")。在一些实施例中,该接头包含自消融型间隔子单元。在一些实施例中,该自消融型间隔子单元选自对氨基苄氧基羰基(pABC)和对氨基苄基(pAB)。

[2166] 在一些实施例中,该接头包含Mal-间隔子单元、烷基基团、至少一个氨基酸单元和自消融型间隔子。在一些实施例中,至少一个氨基酸单元选自丙氨酸、瓜氨酸和缬氨酸。在一些实施例中,该至少一个氨基酸单元包含丙氨酸和缬氨酸。在一些实施例中,该至少一个氨基酸单元包含瓜氨酸和缬氨酸。在一些实施例中,该自消融型间隔子选自pAB和pABC。在一些实施例中,该自消融型间隔子包含pAB。在一些实施例中,该自消融型间隔子包含pABC。在一些实施例中,该烷基基团包含C_1-C_6烷基基团。

[2167] 在一些实施例中,该接头包含Mal-间隔子单元、PEG部分、至少一个氨基酸单元和自消融型间隔子。在一些实施例中,至少一个氨基酸单元选自丙氨酸、瓜氨酸和缬氨酸。在一些实施例中,该至少一个氨基酸单元包含丙氨酸和缬氨酸。在一些实施例中,该至少一个氨基酸单元包含瓜氨酸和缬氨酸。在一些实施例中,该自消融型间隔子选自pAB和pABC。在一些实施例中,该自消融型间隔子包含pAB。在一些实施例中,该自消融型间隔子包含pABC。在一些实施例中,PEG部分包含-(PEG)$_m$-,其中m是1至6的整数。

[2168] 在各种其他实施例中,本文所披露的接头-药物(L-D)化合物包含根据式(V)的接头-药物结构。在不同实施例中,本披露提供了具有式(V)的接头-药物(L-D)化合物:

[2169] 

(V),

或其药学上可接受的盐,其中:

[2170] R^1选自不存在、氢、C_1-C_6烷基基团、C_1-C_6烷基烷氧基基团、C_1-C_6烷基氨基基团、C_1-C_6烷基羧酸基团、C_1-C_6烷基羟基基团、C_3-C_8环烷基基团、苄基基团、C_3-C_8杂环基基团、-O-C(=O)-(C_1-C_6烷基)基团和-CD_3;

[2171] R^2不存在或为接头;

[2172] R^3选自氢、C_1-C_6烷基基团、C_1-C_6烷基烷氧基基团、C_1-C_6烷基氨基基团、C_1-C_6烷基羧酸基团、C_1-C_6烷基羟基基团、C_3-C_8环烷基基团、苄基基团、C_3-C_8杂环基基团和-O-C(=O)-(C_1-C_6烷基)基团;并且

[2173] R^4、R^5和R^8各自独立地选自氢、羟基基团、-O-(C_1-C_6烷基)基团、-O-C(=O)-(C_1-C_6烷基)基团和C_1-C_6烷基基团;

[2174] R^6和R^7各自独立地选自氢、-O-R^{17}、-O-C(=O)-R^{17}、-O-C(=O)-$NR^{15}R^{16}$、C_1-C_6烷基基

团、-$NR^{15}R^{16}$和接头；

[2175] R^{15}和R^{16}各自独立地选自氢、R^{17}、-C(=O)-R^{17}和-C(=O)-O-R^{17}；并且

[2176] R^{17}选自氢、C_1-C_6烷基基团、C_3-C_8环烷基基团、苄基基团和C_3-C_8杂环基基团；

[2177] 其中R^1、R^2、R^3、R^4、R^5、R^6、R^7、R^8、R^{15}、R^{16}和R^{17}各自独立地被0至3个独立地选自以下的基团取代：卤素、羟基基团、C_1-C_6烷基、-O-(C_1-C_6烷基)基团、-$NR^{15}R^{16}$、C_3-C_8环烷基基团、C_1-C_6烷基羟基基团、C_1-C_6烷基烷氧基基团、苄基基团和C_3-C_8杂环基基团；

[2178] 其中R^6和R^7中至少一个是氢；并且

[2179] 其中如果R^2是接头，则R^6和R^7均不为接头，且如果R^6或R^7是接头，则R^2不存在。

[2180] 在一些实施例中，R^1选自不存在、氢、C_1-C_4烷基基团、C_1-C_4烷基羧酸基团和C_3-C_8环烷基基团。在一些实施例中，R^1不存在。在一些实施例中，R^1是氢。在一些实施例中，R^1是C_1-C_4烷基基团。在一些实施例中，R^1是甲基。在一些实施例中，R^1是乙基。在一些实施例中，R^1是C_1-C_4烷基羧酸基团。在一些实施例中，R^1是-$CH_2CH_2CH_2CO_2H$。在一些实施例中，R^1是C_3-C_8环烷基基团。在一些实施例中，R^1是环庚基。

[2181] 在一些实施例中，R^3选自氢、C_1-C_4烷基基团、C_1-C_4烷基烷氧基基团、C_1-C_4烷基羧酸基团和C_1-C_4烷基羟基基团。在一些实施例中，R^3选自氢和C_1-C_4烷基羧酸基团。在一些实施例中，R^3是氢。在一些实施例中，R^3是C_1-C_4烷基羧酸基团。在一些实施例中，R^3是-$CH_2CH_2CO_2H$。

[2182] 在一些实施例中，R^4选自氢、羟基基团、-O-(C_1-C_4烷基)基团、-O-C(=O)-(C_1-C_4烷基)基团和C_1-C_4烷基基团。在一些实施例中，R^4是氢。在一些实施例中，R^4是羟基。在一些实施例中，R^4是-O-(C_1-C_4烷基)基团。在一些实施例中，R^4是-OCH_3。在一些实施例中，R^4是-OCH_2CH_3。在一些实施例中，R^4是-O-C(=O)-(C_1-C_4烷基)基团。在一些实施例中，R^4是-O-C(=O)-CH_3。在一些实施例中，R^4是-O-C(=O)-CH_2CH_3。在一些实施例中，R^4是C_1-C_4烷基基团。在一些实施例中，R^4是甲基。在一些实施例中，R^4是乙基。

[2183] 在一些实施例中，R^5选自氢、羟基基团、-O-(C_1-C_4烷基)基团和C_1-C_4烷基基团。在一些实施例中，R^5是氢。在一些实施例中，R^5是羟基。在一些实施例中，R^5是-O-(C_1-C_4烷基)基团。在一些实施例中，R^5是C_1-C_4烷基基团。

[2184] 在一些实施例中，R^2不存在且R^6是接头。在一些实施例中，R^2不存在且R^7是接头。在一些实施例中，R^2是接头。在一些实施例中，R^6是氢。在一些实施例中，R^7是氢。

[2185] 在一些实施例中，R^6是氢且R^7是-O-R^{17}。在一些实施例中，R^6是氢且R^7是-OR^{17}，其中R^{17}选自氢和C^1-C^4烷基基团。在一些实施例中，R^6是氢且R^7是-O-R^{17}，其中R^{17}是氢。在一些实施例中，R^6是-O-R^{17}且R^7是氢。在一些实施例中，R^6是-O-R^{17}且R^7是氢，其中R^{17}选自氢和C^1-C^4烷基基团。在一些实施例中，R^6是-O-R^{17}且R^7是氢，其中R^{17}是氢。在一些实施例中，R^6是氢且R^7是-$NR^{15}R^{16}$。在一些实施例中，R^6是氢且R^7是-$NR^{15}R^{16}$，其中R^{15}是H且R^{16}选自氢、R^{17}、-C(=O)-R^{17}和-C(=O)-O-R^{17}。在一些实施例中，R^6是氢且R^7是-$NR^{15}R^{16}$，其中R^{15}是H且R^{16}选自氢、R^{17}、-C(=O)-R^{17}和-C(=O)-O-R^{17}，且其中R^{17}选自氢、C_1-C_6烷基基团、C_3-C_8环烷基基团和C_3-C_8杂环基基团。在一些实施例中，R^6是-O-R^{17}。在一些实施例中，R^6是-O-C(=O)-R^{17}。在一些实施例中，R^6是C_1-C_6烷基。在一些实施例中，R^6是C_1-C_4烷基。在一些实施例中，R^6是C_1烷基。在一些实施例中，R^6是-$NR^{15}R^{16}$。

[2186] 在一些实施例中，R^7是-O-R^{17}。在一些实施例中，R^7是-O-C(=O)-R^{17}。在一些实施例中，R^7是C_1-C_6烷基。在一些实施例中，R^7是C_1-C_4烷基。在一些实施例中，R^7是C_1烷基。在一些实

施例中,R^7是-$NR^{15}R^{16}$。

[2187] 在一些实施例中,R^8选自氢、羟基基团、-O-(C_1-C_4烷基)基团和(C_1-C_4烷基)。在一些实施例中,R^8是氢。在一些实施例中,R^8是羟基基团。在一些实施例中,R^8是-O-(C_1-C_4烷基)基团。在一些实施例中,R^8是-O-(C_1烷基)基团。

[2188] 在一些实施例中,R^{15}是氢。在一些实施例中,R^{15}是R^{17}。在一些实施例中,R^{15}是-C(=O)-R^{17}。在一些实施例中,R^{15}是-C(=O)-O-R^{17}。

[2189] 在一些实施例中,R^{16}是氢。在一些实施例中,R^{16}是R^{17}。在一些实施例中,R^{16}是-C(=O)-R^{17}。在一些实施例中,R^{16}是-C(=O)-O-R^{17}。

[2190] 在一些实施例中,R^{17}选自氢、C_1-C_4烷基基团、C_3-C_6环烷基基团和C_3-C_8杂环基基团。在一些实施例中,R^{17}是氢。在一些实施例中,R^{17}是C_1-C_4烷基基团。在一些实施例中,R^{17}是C_1烷基基团。在一些实施例中,R^{17}是C_3-C_6环烷基基团。在一些实施例中,R^{17}是C_3环烷基基团。在一些实施例中,R^{17}是C_4环烷基基团。在一些实施例中,R^{17}是C_5环烷基基团。在一些实施例中,R^{17}是C_6环烷基基团。在一些实施例中,R^{17}是C_3-C_8杂环基基团。在一些实施例中,R^{17}是C_3杂环基基团。在一些实施例中,R^{17}是C_4杂环基基团。在一些实施例中,R^{17}是C_5杂环基基团。在一些实施例中,R^{17}是C_6杂环基基团。在一些实施例中,R^{17}是C_7杂环基基团。在一些实施例中,R^{17}是C_8杂环基基团。

[2191] 在一些实施例中,R^2是接头。在一些实施例中,该接头包含至少一个可裂解肽部分。在一些实施例中,该至少一个可裂解肽部分可被酶裂解。在一些实施例中,该接头或可裂解肽部分包含至少一个氨基酸单元。在一些实施例中,该至少一个氨基酸单元选自精氨酸、组氨酸、赖氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、丝氨酸、苏氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、半胱氨酸、硒半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、丙氨酸、缬氨酸、异亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸和瓜氨酸。在一些实施例中,该至少一个氨基酸单元选自丙氨酸、瓜氨酸和缬氨酸。在一些实施例中,该接头包含瓜氨酸和缬氨酸。在一些实施例中,该接头包含丙氨酸和缬氨酸。

[2192] 在一些实施例中,该接头包含选自磺酰胺、β-葡萄糖醛酸苷、二硫化物和羰基的部分。在一些实施例中,该接头包含磺酰胺。在一些实施例中,该接头包含β-葡萄糖醛酸苷。在一些实施例中,该接头包含二硫化物。在一些实施例中,该接头包含羰基。

[2193] 在一些实施例中,该接头包含间隔子单元。在一些实施例中,该间隔子单元选自烷基基团和聚乙二醇(PEG)部分。在一些实施例中,该烷基基团是C_1-C_{12}烷基基团。在一些实施例中,该烷基基团是C_1-C_6烷基基团。在一些实施例中,该烷基基团是亚甲基。在一些实施例中,该烷基基团是亚乙基。在一些实施例中,该烷基基团是亚正丙基。在一些实施例中,该烷基是亚正丁基。在一些实施例中,该烷基是亚正戊基。在一些实施例中,该烷基是亚正己基。在一些实施例中,PEG部分包含-$(PEG)_m$-,其中m是1至10的整数。在一些实施例中,m是1。在一些实施例中,m是2。在一些实施例中,m是3。在一些实施例中,m是4。在一些实施例中,m是5。在一些实施例中,m是6。

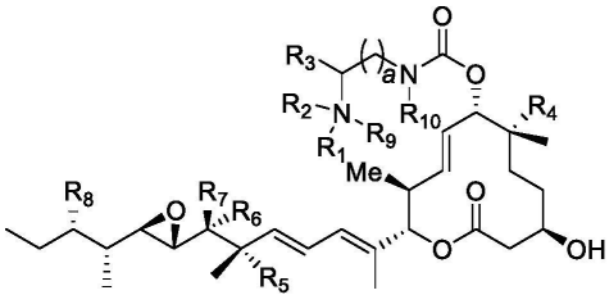
[2194] 在一些实施例中,该接头包含马来酰亚胺(Mal)部分(“Mal-间隔子单元”)。在一些实施例中,该接头包含自消融型间隔子单元。在一些实施例中,该自消融型间隔子单元选自对氨基苄氧基羰基(pABC)和对氨基苄基(pAB)。

[2195] 在一些实施例中,该接头包含Mal-间隔子单元、烷基基团、至少一个氨基酸单元和自消融型间隔子。在一些实施例中,至少一个氨基酸单元选自丙氨酸、瓜氨酸和缬氨酸。在

一些实施例中,该至少一个氨基酸单元包含丙氨酸和缬氨酸。在一些实施例中,该至少一个氨基酸单元包含瓜氨酸和缬氨酸。在一些实施例中,该自消融型间隔子选自pAB和pABC。在一些实施例中,该自消融型间隔子包含pAB。在一些实施例中,该自消融型间隔子包含pABC。在一些实施例中,该烷基基团包含C_1-C_6烷基基团。

[2196] 在一些实施例中,该接头包含Mal-间隔子单元、PEG部分、至少一个氨基酸单元和自消融型间隔子。在一些实施例中,至少一个氨基酸单元选自丙氨酸、瓜氨酸和缬氨酸。在一些实施例中,该至少一个氨基酸单元包含丙氨酸和缬氨酸。在一些实施例中,该至少一个氨基酸单元包含瓜氨酸和缬氨酸。在一些实施例中,该自消融型间隔子选自pAB和pABC。在一些实施例中,该自消融型间隔子包含pAB。在一些实施例中,该自消融型间隔子包含pABC。在一些实施例中,PEG部分包含-$(PEG)_m$-,其中m是1至6的整数。

[2197] 在各种其他实施例中,本文所披露的接头-药物(L-D)化合物包含根据式(VII)的接头-药物结构。在不同实施例中,本披露提供了具有式(VII)的接头-药物(L-D)化合物:

[2198]  (VII),或其药学上可接受的盐,其中:

[2199] R^1和R^9各自独立地选自不存在、氢、C_1-C_6烷基基团、C_1-C_6烷基烷氧基基团、C_1-C_6烷基氨基基团、C_1-C_6烷基羧酸基团、C_1-C_6烷基羟基基团、C_3-C_8环烷基基团、苄基基团、C_3-C_8杂环基基团、-O-C(=O)-(C_1-C_6烷基)基团和-CD_3;

[2200] R^2不存在或为接头;

[2201] R^3选自氢、C_1-C_6烷基基团、C_1-C_6烷基烷氧基基团、C_1-C_6烷基氨基基团、C_1-C_6烷基羧酸基团、C_1-C_6烷基羟基基团、C_3-C_8环烷基基团、苄基基团、C_3-C_8杂环基基团和-O-C(=O)-(C_1-C_6烷基)基团;

[2202] R^4、R^5和R^8各自独立地选自氢、羟基基团、-O-(C_1-C_6烷基)基团、-O-C(=O)-(C_1-C_6烷基)基团和C_1-C_6烷基基团;

[2203] R^6和R^7各自独立地选自氢、-O-R^{17}、-O-C(=O)-R^{17}、-O-C(=O)-$NR^{15}R^{16}$、C_1-C_6烷基基团、-$NR^{15}R^{16}$和接头;

[2204] R^{10}选自氢、C_1-C_6烷基基团、-C(=O)-(C_1-C_6烷基)基团和-CD_3;

[2205] R^{15}和R^{16}各自独立地选自氢、R^{17}、-C(=O)-R^{17}和-C(=O)-O-R^{17};

[2206] R^{17}选自氢、C_1-C_6烷基基团、C_3-C_8环烷基基团、苄基基团和C_3-C_8杂环基基团;并且

[2207] a是1、2、3、4、5、6、7、8、9或10;

[2208] 其中R^1、R^2、R^3、R^4、R^5、R^6、R^7、R^8、R^9、R^{10}、R^{15}、R^{16}和R^{17}各自独立地被0至3个独立地选自以下的基团取代:卤素、羟基基团、C_1-C_6烷基基团、-O-(C_1-C_6烷基)基团、-$NR^{15}R^{16}$、C_3-C_8环烷基基团、C_1-C_6烷基羟基基团、C_1-C_6烷基烷氧基基团、苄基基团和C_3-C_8杂环基基团;

[2209] 其中R^6和R^7中至少一个是氢;

[2210] 其中如果R^2是接头,则R^6和R^7均不为接头,且如果R^6或R^7是接头,则R^2不存在;并且

[2211] 其中R^1和R^9不能同时不存在。

[2212] 在一些实施例中,R^1选自不存在、氢、C_1-C_4烷基基团、C_1-C_4烷基羧酸基团和C_3-C_8环烷基基团。在一些实施例中,R^1不存在。在一些实施例中,R^1是氢。在一些实施例中,R^1是C_1-C_4烷基基团。在一些实施例中,R^1是甲基。在一些实施例中,R^1是乙基。在一些实施例中,R^1是C_1-C_4烷基羧酸基团。在一些实施例中,R^1是-$CH_2CH_2CH_2CO_2H$。在一些实施例中,R^1是C_3-C_8环烷基基团。在一些实施例中,R^1是环庚基。

[2213] 在一些实施例中,R^3选自氢、C_1-C_4烷基基团、C_1-C_4烷基烷氧基基团、C_1-C_4烷基羧酸基团和C_1-C_4烷基羟基基团。在一些实施例中,R^3选自氢和C_1-C_4烷基羧酸基团。在一些实施例中,R^3是氢。在一些实施例中,R^3是C_1-C_4烷基羧酸基团。在一些实施例中,R^3是-$CH_2CH_2CO_2H$。

[2214] 在一些实施例中,R^4选自氢、羟基基团、-O-(C_1-C_4烷基)基团、-O-C(=O)-(C_1-C_4烷基)基团和C_1-C_4烷基基团。在一些实施例中,R^4是氢。在一些实施例中,R^4是羟基。在一些实施例中,R^4是-O-(C_1-C_4烷基)基团。在一些实施例中,R^4是-OCH_3。在一些实施例中,R^4是-OCH_2CH_3。在一些实施例中,R^4是-O-C(=O)-(C_1-C_4烷基)基团。在一些实施例中,R^4是-O-C(=O)-CH_3。在一些实施例中,R^4是-O-C(=O)-CH_2CH_3。在一些实施例中,R^4是C_1-C_4烷基基团。在一些实施例中,R^4是甲基。在一些实施例中,R^4是乙基。

[2215] 在一些实施例中,R^5选自氢、羟基基团、-O-(C_1-C_4烷基)基团和C_1-C_4烷基基团。在一些实施例中,R^5是氢。在一些实施例中,R^5是羟基。在一些实施例中,R^5是-O-(C_1-C_4烷基)基团。在一些实施例中,R^5是C_1-C_4烷基基团。

[2216] 在一些实施例中,R^9选自不存在、氢、C_1-C_4烷基基团、-(C=O)-(C_1-C_4烷基)基团和-CD_3。在一些实施例中,R^9不存在。在一些实施例中,R^9是氢。在一些实施例中,R^9是C_1-C_4烷基基团。在一些实施例中,该C_1-C_4烷基是甲基。在一些实施例中,该C_1-C_4烷基是乙基。在一些实施例中,R^9是-(C=O)-(C_1-C_4烷基)基团。在一些实施例中,该-(C=O)-(C_1-C_4烷基)基团是-(C=O)-甲基。在一些实施例中,R^9是-CD_3。

[2217] 在一些实施例中,R^{10}选自氢、C_1-C_4烷基基团、-(C=O)-(C_1-C_4烷基)基团和-CD_3。在一些实施例中,R^{10}是氢。在一些实施例中,R^{10}是C_1-C_4烷基基团。在一些实施例中,该C_1-C_4烷基是甲基。在一些实施例中,该C_1-C_4烷基是乙基。在一些实施例中,R^{10}是-(C=O)-(C_1-C_4烷基)基团。在一些实施例中,该-(C=O)-(C_1-C_4烷基)基团是-(C=O)-甲基。在一些实施例中,R^{10}是-CD_3。

[2218] 在一些实施例中,R^2不存在且R^6是接头。在一些实施例中,R^2不存在且R^7是接头。在一些实施例中,R^2是接头。在一些实施例中,R^6是氢。在一些实施例中,R^7是氢。在一些实施例中,R^6是氢且R^7是-O-R^{17}。在一些实施例中,R^6是氢且R^7是-OR^{17},其中R^{17}选自氢和C^1-C^4烷基基团。在一些实施例中,R^6是氢且R^7是-O-R^{17},其中R^{17}是氢。在一些实施例中,R^6是-O-R^{17}且R^7是氢。在一些实施例中,R^6是-O-R^{17}且R^7是氢,其中R^{17}选自氢和C^1-C^4烷基基团。在一些实施例中,R^6是-O-R^{17}且R^7是氢,其中R^{17}是氢。在一些实施例中,R^6是氢且R^7是-$NR^{15}R^{16}$。在一些实施例中,R^6是氢且R^7是-$NR^{15}R^{16}$,其中R^{15}是H且R^{16}选自氢、R^{17}、-C(=O)-R^{17}和-C(=O)-O-R^{17}。在一些实施例中,R^6是氢且R^7是-$NR^{15}R^{16}$,其中R^{15}是H且R^{16}选自氢、R^{17}、-C(=O)-R^{17}和-C(=O)-O-R^{17},且其中R^{17}选自氢、C_1-C_6烷基基团、C_3-C_8环烷基基团和C_3-C_8杂环基基团。在一些实施例中,R^6是-O-R^{17}。在一些实施例中,R^6是-O-C(=O)-R^{17}。在一些实施例中,R^6是C_1-C_6烷基。在

一些实施例中，R^6是C_1-C_4烷基。在一些实施例中，R^6是C_1烷基。在一些实施例中，R^6是-$NR^{15}R^{16}$。

[2219] 在一些实施例中，R^7是-O-R^{17}。在一些实施例中，R^7是-O-C(=O)-R^{17}。在一些实施例中，R^7是C_1-C_6烷基。在一些实施例中，R^7是C_1-C_4烷基。在一些实施例中，R^7是C_1烷基。在一些实施例中，R^7是-$NR^{15}R^{16}$。

[2220] 在一些实施例中，R^8选自氢、羟基基团、-O-(C_1-C_4烷基)基团和(C_1-C_4烷基)。在一些实施例中，R^8是氢。在一些实施例中，R^8是羟基基团。在一些实施例中，R^8是-O-(C_1-C_4烷基)基团。在一些实施例中，R^8是-O-(C_1烷基)基团。

[2221] 在一些实施例中，R^{15}是氢。在一些实施例中，R^{15}是R^{17}。在一些实施例中，R^{15}是-C(=O)-R^{17}。在一些实施例中，R^{15}是-C(=O)-O-R^{17}。

[2222] 在一些实施例中，R^{16}是氢。在一些实施例中，R^{16}是R^{17}。在一些实施例中，R^{16}是-C(=O)-R^{17}。在一些实施例中，R^{16}是-C(=O)-O-R^{17}。

[2223] 在一些实施例中，R^{17}选自氢、C_1-C_4烷基基团、C_3-C_6环烷基基团和C_3-C_8杂环基基团。在一些实施例中，R^{17}是氢。在一些实施例中，R^{17}是C_1-C_4烷基基团。在一些实施例中，R^{17}是C_1烷基基团。在一些实施例中，R^{17}是C_3-C_6环烷基基团。在一些实施例中，R^{17}是C_3环烷基基团。在一些实施例中，R^{17}是C_4环烷基基团。在一些实施例中，R^{17}是C_5环烷基基团。在一些实施例中，R^{17}是C_6环烷基基团。在一些实施例中，R^{17}是C_3-C_8杂环基基团。在一些实施例中，R^{17}是C_3杂环基基团。在一些实施例中，R^{17}是C_4杂环基基团。在一些实施例中，R^{17}是C_5杂环基基团。在一些实施例中，R^{17}是C_6杂环基基团。在一些实施例中，R^{17}是C_7杂环基基团。在一些实施例中，R^{17}是C_8杂环基基团。

[2224] 在一些实施例中，a是1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。在一些实施例中，a是1、2、3、4、5或6。在一些实施例中，a是1、2、3、4或5。在一些实施例中，a是1、2、3或4。在一些实施例中，a是1、2或3。在一些实施例中，a是1或2。在一些实施例中，a是1。在一些实施例中，a是2。在一些实施例中，a是3。在一些实施例中，a是4。在一些实施例中，a是5。在一些实施例中，a是6。在一些实施例中，a是7。在一些实施例中，a是8。在一些实施例中，a是9。在一些实施例中，a是10。

[2225] 在一些实施例中，R^2是接头。在一些实施例中，该接头包含至少一个可裂解肽部分。在一些实施例中，该至少一个可裂解肽部分可被酶裂解。在一些实施例中，该接头或可裂解肽部分包含至少一个氨基酸单元。在一些实施例中，该至少一个氨基酸单元选自精氨酸、组氨酸、赖氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、丝氨酸、苏氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、半胱氨酸、硒半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、丙氨酸、缬氨酸、异亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸和瓜氨酸。在一些实施例中，该至少一个氨基酸单元选自丙氨酸、瓜氨酸和缬氨酸。在一些实施例中，该接头包含瓜氨酸和缬氨酸。在一些实施例中，该接头包含丙氨酸和缬氨酸。

[2226] 在一些实施例中，该接头包含选自磺酰胺、β-葡萄糖醛酸苷、二硫化物和羰基的部分。在一些实施例中，该接头包含磺酰胺。在一些实施例中，该接头包含β-葡萄糖醛酸苷。在一些实施例中，该接头包含二硫化物。在一些实施例中，该接头包含羰基。

[2227] 在一些实施例中，该接头包含间隔子单元。在一些实施例中，该间隔子单元选自烷基基团和聚乙二醇(PEG)部分。在一些实施例中，该烷基基团是C_1-C_{12}烷基基团。在一些实施例中，该烷基基团是C_1-C_6烷基基团。在一些实施例中，该烷基基团是亚甲基。在一些实施例

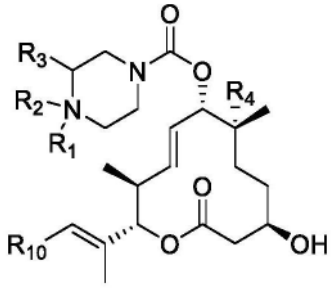
中,该烷基基团是亚乙基。在一些实施例中,该烷基基团是亚正丙基。在一些实施例中,该烷基是亚正丁基。在一些实施例中,该烷基是亚正戊基。在一些实施例中,该烷基是亚正己基。在一些实施例中,PEG部分包含-(PEG)$_m$-,其中m是1至10的整数。在一些实施例中,m是1。在一些实施例中,m是2。在一些实施例中,m是3。在一些实施例中,m是4。在一些实施例中,m是5。在一些实施例中,m是6。

[2228] 在一些实施例中,该接头包含马来酰亚胺(Mal)部分("Mal-间隔子单元")。在一些实施例中,该接头包含自消融型间隔子单元。在一些实施例中,该自消融型间隔子单元选自对氨基苄氧基羰基(pABC)和对氨基苄基(pAB)。

[2229] 在一些实施例中,该接头包含Mal-间隔子单元、烷基基团、至少一个氨基酸单元和自消融型间隔子。在一些实施例中,至少一个氨基酸单元选自丙氨酸、瓜氨酸和缬氨酸。在一些实施例中,该至少一个氨基酸单元包含丙氨酸和缬氨酸。在一些实施例中,该至少一个氨基酸单元包含瓜氨酸和缬氨酸。在一些实施例中,该自消融型间隔子选自pAB和pABC。在一些实施例中,该自消融型间隔子包含pAB。在一些实施例中,该自消融型间隔子包含pABC。在一些实施例中,该烷基基团包含C_1-C_6烷基基团。

[2230] 在一些实施例中,该接头包含Mal-间隔子单元、PEG部分、至少一个氨基酸单元和自消融型间隔子。在一些实施例中,至少一个氨基酸单元选自丙氨酸、瓜氨酸和缬氨酸。在一些实施例中,该至少一个氨基酸单元包含丙氨酸和缬氨酸。在一些实施例中,该至少一个氨基酸单元包含瓜氨酸和缬氨酸。在一些实施例中,该自消融型间隔子选自pAB和pABC。在一些实施例中,该自消融型间隔子包含pAB。在一些实施例中,该自消融型间隔子包含pABC。在一些实施例中,PEG部分包含-(PEG)$_m$-,其中m是1至6的整数。

[2231] 在各种其他实施例中,本文所披露的接头-药物(L-D)化合物包含根据式(IX)的接头-药物结构。在不同实施例中,本披露提供了具有式(IX)的接头-药物(L-D)化合物:

[2232]  (IX),

或其药学上可接受的盐,其中:

[2233] R^1选自不存在、氢、C_1-C_6烷基基团、C_1-C_6烷基烷氧基基团、C_1-C_6烷基氨基基团、C_1-C_6烷基羧酸基团、C_1-C_6烷基羟基基团、C_3-C_8环烷基基团、苄基基团、C_3-C_8杂环基基团、-O-C(=O)-(C_1-C_6烷基)基团和-CD_3;

[2234] R^2是接头;

[2235] R^3选自氢、C_1-C_6烷基基团、C_1-C_6烷基烷氧基基团、C_1-C_6烷基氨基基团、C_1-C_6烷基羧酸基团、C_1-C_6烷基羟基基团、C_3-C_8环烷基基团、苄基基团、C_3-C_8杂环基基团和-O-C(=O)-(C_1-C_6烷基)基团;

[2236] R^4选自氢、羟基基团、-O-(C_1-C_6烷基)基团、-O-C(=O)-(C_1-C_6烷基)基团和C_1-C_6烷基基团;

[2237] R^{10}选自3至10元碳环和3至10元杂环,其各自被0至3个R^a取代,其中每个R^a独立地

选自卤素、C_1-C_6烷基基团、-O-(C_1-C_6)烷基基团、C_1-C_6烷基烷氧基基团、C_1-C_6烷基羟基基团、-S(=O)$_w$-(4至7元杂环)、4至7元碳环和4至7元杂环;

[2238] R^{15}和R^{16}各自独立地选自氢、R^{17}、-C(=O)-R^{17}和-C(=O)-O-R^{17};并且

[2239] R^{17}选自氢、C_1-C_6烷基基团、C_3-C_8环烷基基团、苄基基团和C_3-C_8杂环基基团;

[2240] 其中R^1、R^2、R^3、R^4、R^{10}、R^{15}、R^{16}和R^{17}各自独立地被0至3个独立地选自以下的基团取代:卤素、羟基基团、C_1-C_6烷基基团、-O-(C_1-C_6烷基)基团、-$NR^{15}R^{16}$、C_3-C_8环烷基基团、C_1-C_6烷基羟基基团、C_1-C_6烷基烷氧基基团、苄基基团和C_3-C_8杂环基基团;并且

[2241] 其中每个R^a独立地被0至3个独立地选自以下的基团取代:卤素、羟基基团、-$NR^{15}R^{16}$、C_1-C_6烷基基团、-(C=O)-(C_1-C_6烷基)基团、-(C=O)-(C_1-C_6烷基)-(C_3-C_{10}杂环基基团)和C_1-C_6烷基羧酸基团,其各自被0、1或2个独立地选自以下的基团取代:卤素、羟基基团、-$NR^{15}R^{16}$和C_1-C_3烷基基团;并且

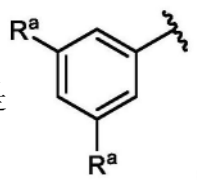
[2242] w是0、1或2。

[2243] 在一些实施例中,R^1选自不存在、氢、C_1-C_4烷基基团、C_1-C_4烷基羧酸基团和C_3-C_8环烷基基团。在一些实施例中,R^1不存在。在一些实施例中,R^1是氢。在一些实施例中,R^1是C_1-C_4烷基基团。在一些实施例中,R^1是甲基。在一些实施例中,R^1是乙基。在一些实施例中,R^1是C_1-C_4烷基羧酸基团。在一些实施例中,R^1是-$CH_2CH_2CH_2CO_2H$。在一些实施例中,R^1是C_3-C_8环烷基基团。在一些实施例中,R^1是环庚基。

[2244] 在一些实施例中,R^3选自氢、C_1-C_4烷基基团、C_1-C_4烷基烷氧基基团、C_1-C_4烷基羧酸基团和C_1-C_4烷基羟基基团。在一些实施例中,R^3选自氢和C_1-C_4烷基羧酸基团。在一些实施例中,R^3是氢。在一些实施例中,R^3是C_1-C_4烷基羧酸基团。在一些实施例中,R^3是-$CH_2CH_2CO_2H$。

[2245] 在一些实施例中,R^4选自氢、羟基基团、-O-(C_1-C_4烷基)基团、-O-C(=O)-(C_1-C_4烷基)基团和C_1-C_4烷基基团。在一些实施例中,R^4是氢。在一些实施例中,R^4是羟基。在一些实施例中,R^4是-O-(C_1-C_4烷基)基团。在一些实施例中,R^4是-OCH_3。在一些实施例中,R^4是-OCH_2CH_3。在一些实施例中,R^4是-O-C(=O)-(C_1-C_4烷基)基团。在一些实施例中,R^4是-O-C(=O)-CH_3。在一些实施例中,R^4是-O-C(=O)-CH_2CH_3。在一些实施例中,R^4是C_1-C_4烷基基团。在一些实施例中,R^4是甲基。在一些实施例中,R^4是乙基。

[2246] 在一些实施例中,R^{10}选自6至9元碳环和6至9元杂环,其各自被0至2个R^a取代,其中每个R^a独立地被0至3个独立地选自以下的基团取代:卤素、羟基基团、C_1-C_6烷基基团、-(C=O)-(C_1-C_6烷基)基团、-(C=O)-(C_1-C_6烷基)-(3至10元杂环)基团和C_1-C_6烷基羧酸基团。

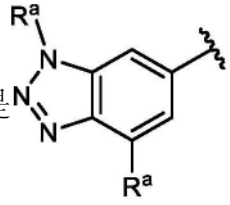
[2247] 在一些实施例中,该碳环是被0至2个R^a取代的苯基,其中每个R^a独立地被0至3个独立地选自以下的基团取代:卤素、羟基基团、C_1-C_6烷基基团、-(C=O)-(C_1-C_6烷基)基团、-(C=O)-(C_1-C_6烷基)-(3至10元杂环)基团和C_1-C_6烷基羧酸基团。在一些实施例中,该苯基被2个R^a取代,其中每个R^a独立地被0至3个独立地选自以下的基团取代:卤素、羟基基团、C_1-C_6烷基基团、-(C=O)-(C_1-C_6烷基)基团、-(C=O)-(C_1-C_6烷基)-(3至10元杂环)基团和C_1-C_6烷基羧酸基团。在一些实施例中,该苯基是 

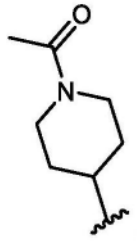
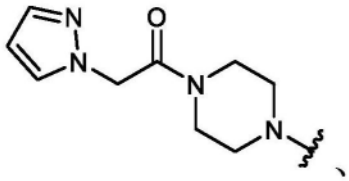
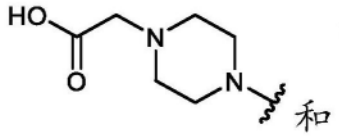
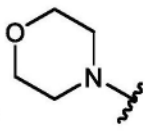
。

[2248] 在一些实施例中,该杂环是被0至2个R^a取代的9元杂环,其中每个R^a独立地被0至3

个独立地选自以下的基团取代:卤素、羟

[2249] 基基团、C_1-C_6烷基基团、-(C=O)-(C_1-C_6烷基)基团、-(C=O)-(C_1-C_6烷5基)-(3至10元杂环)基团和C_1-C_6烷基羧酸基团。在一些实施例中,

[2250] 该9元杂环是  。

[2251] 在一些实施例中,R^a选自卤素、3至10元碳环和3至10元杂环,其中每个R^a独立地被0至3个独立地选自以下的基团取代:卤素、羟基基团、C_1-C_6烷基基团、-(C=O)-(C_1-C_6烷基)基团、-(C=O)-(C_1-C_6烷基)-(3至10元杂环)基团和C_1-C_6烷基羧酸基团。在一些实施例中,R^a选自卤素、  、  、  和  。在一些实施例中,R^{15}是氢。在一些实施例中,R^{15}是R^{17}。在一些实施例中,R^{15}是-C(=O)-R^{17}。在一些实施例中,R^{15}是-C(=O)-O-R^{17}。

[2252] 在一些实施例中,R^{16}是氢。在一些实施例中,R^{16}是R^{17}。在一些实施例中,R^{16}是-C(=O)-R^{17}。在一些实施例中,R^{16}是-C(=O)-O-R^{17}。

[2253] 在一些实施例中,R^{17}选自氢、C_1-C_4烷基基团、C_3-C_6环烷基基团和C_3-C_8杂环基基团。在一些实施例中,R^{17}是氢。在一些实施例中,R^{17}是C_1-C_4烷基基团。在一些实施例中,R^{17}是C_1烷基基团。在一些实施例中,R^{17}是C_3-C_6环烷基基团。在一些实施例中,R^{17}是C_3环烷基基团。在一些实施例中,R^{17}是C_4环烷基基团。在一些实施例中,R^{17}是C_5环烷基基团。在一些实施例中,R^{17}是C_6环烷基基团。在一些实施例中,R^{17}是C_3-C_8杂环基基团。在一些实施例中,R^{17}是C_3杂环基基团。在一些实施例中,R^{17}是C_4杂环基基团。在一些实施例中,R^{17}是C_5杂环基基团。在一些实施例中,R^{17}是C_6杂环基基团。在一些实施例中,R^{17}是C_7杂环基基团。在一些实施例中,R^{17}是C_8杂环基基团。

[2254] 在一些实施例中,R^2是接头。在一些实施例中,该接头包含至少一个可裂解肽部分。在一些实施例中,该至少一个可裂解肽部分可被酶裂解。在一些实施例中,该接头或可裂解肽部分包含至少一个氨基酸单元。在一些实施例中,该至少一个氨基酸单元选自精氨酸、组氨酸、赖氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、丝氨酸、苏氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、半胱氨酸、硒半胱氨酸、甘氨酸、脯氨酸、丙氨酸、缬氨酸、异亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸和瓜氨酸。在一些实施例中,该至少一个氨基酸单元选自丙氨酸、瓜氨酸和缬氨酸。在一些实施例中,该接头包含瓜氨酸和缬氨酸。在一些实施例中,该接头包含丙氨酸和缬氨酸。

[2255] 在一些实施例中,该接头包含选自磺酰胺、β-葡萄糖醛酸苷、二硫化物和羰基的部分。在一些实施例中,该接头包含磺酰胺。在一些实施例中,该接头包含β-葡萄糖醛酸苷。在一些实施例中,该接头包含二硫化物。在一些实施例中,该接头包含羰基。

[2256] 在一些实施例中,该接头包含间隔子单元。在一些实施例中,该间隔子单元选自烷

基基团和聚乙二醇(PEG)部分。在一些实施例中,该烷基基团是C_1-C_{12}烷基基团。在一些实施例中,该烷基基团是C_1-C_6烷基基团。在一些实施例中,该烷基基团是亚甲基。在一些实施例中,该烷基基团是亚乙基。在一些实施例中,该烷基基团是亚正丙基。在一些实施例中,该烷基是亚正丁基。在一些实施例中,该烷基是亚正戊基。在一些实施例中,该烷基是亚正己基。在一些实施例中,PEG部分包含-$(PEG)_m$-,其中m是1至10的整数。在一些实施例中,m是1。在一些实施例中,m是2。在一些实施例中,m是3。在一些实施例中,m是4。在一些实施例中,m是5。在一些实施例中,m是6。

[2257] 在一些实施例中,该接头包含马来酰亚胺(Mal)部分("Mal-间隔子单元")。在一些实施例中,该接头包含自消融型间隔子单元。在一些实施例中,该自消融型间隔子单元选自对氨基苄氧基羰基(pABC)和对氨基苄基(pAB)。

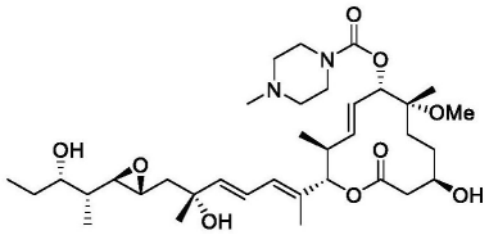
[2258] 在一些实施例中,该接头包含Mal-间隔子单元、烷基基团、至少一个氨基酸单元和自消融型间隔子。在一些实施例中,至少一个氨基酸单元选自丙氨酸、瓜氨酸和缬氨酸。在一些实施例中,该至少一个氨基酸单元包含丙氨酸和缬氨酸。在一些实施例中,该至少一个氨基酸单元包含瓜氨酸和缬氨酸。在一些实施例中,该自消融型间隔子选自pAB和pABC。在一些实施例中,该自消融型间隔子包含pAB。在一些实施例中,该自消融型间隔子包含pABC。在一些实施例中,该烷基基团包含C_1-C_6烷基基团。

[2259] 在一些实施例中,该接头包含Mal-间隔子单元、PEG部分、至少一个氨基酸单元和自消融型间隔子。在一些实施例中,至少一个氨基酸单元选自丙氨酸、瓜氨酸和缬氨酸。在一些实施例中,该至少一个氨基酸单元包含丙氨酸和缬氨酸。在一些实施例中,该至少一个氨基酸单元包含瓜氨酸和缬氨酸。在一些实施例中,该自消融型间隔子选自pAB和pABC。在一些实施例中,该自消融型间隔子包含pAB。在一些实施例中,该自消融型间隔子包含pABC。在一些实施例中,PEG部分包含-$(PEG)_m$-,其中m是1至6的整数。

[2260] 在一些实施例中,该药物部分是选自以下的剪接调节剂:D1、D2、D3、D4、D4'、D5、D6、D7、D8、D9、D10、D11、D12、D13、D14、D15、D16、D17、D18、D19、D20、D21、D22、D23、D24、D25、D26、D27、D28、D29、D30、D31、D32、D33、D34和D35。

[2261] 在不同实施例中,该药物部分是选自D2和D1的剪接调节剂。

[2262] 在不同实施例中,该药物部分是D2。在不同实施例中,所披露的接头-药物(L-D)化合物中所使用的D2药物部分的结构显示于下:

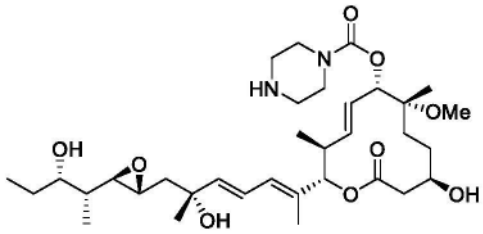
[2263] 

D2

[2264] 在不同实施例中,本文所描述的接头-药物(L-D)化合物中的接头经由哌嗪基团上的胺共价连接至D2药物部分。在不同实施例中,该药物部分是D2衍生物。在不同实施例中,D2衍生物保持D2的至少一种生物功能或活性(例如SF3b复合体结合、体外剪接活性、细胞毒性),但具有改变的化学结构。

[2265] 在不同实施例中,该药物部分是D1。在不同实施例中,所披露的接头-药物(L-D)化

合物中所使用的D1药物部分的结构显示于下：

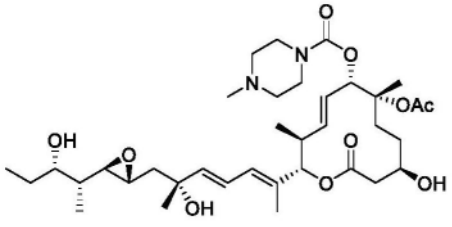
[2266] 

D1

[2267] 在不同实施例中，本文所描述的接头-药物(L-D)化合物中的接头经由哌嗪基团上的胺共价连接至D1药物部分。在不同实施例中，该药物部分是D1衍生物。在不同实施例中，D1衍生物保持D1的至少一种生物功能或活性(例如SF3b复合体结合、体外剪接活性、细胞毒性)，但具有改变的化学结构。

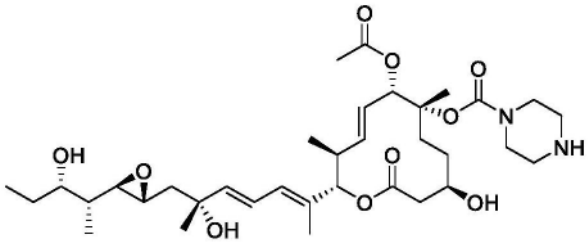
[2268] 本文还披露了单独使用或作为本文所披露的ADC中的药物部分使用的示例性剪接调节剂药物化合物。在不同实施例中，本披露进一步提供了包含这些化合物的多个拷贝的组合物，例如包含剪接调节剂药物化合物和药学上可接受的载体的药物组合物。

[2269] 在不同实施例中，本披露提供了化合物，该化合物选自具有下式的化合物：

[2270] 

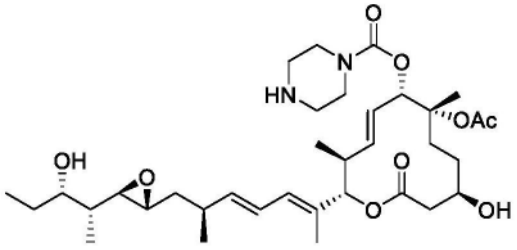
(D4)，及其药学上可接受的盐。在不同实施例中，本披露进一步提供了包含该化合物或其药学上可接受的盐以及药学上可接受的载体的药物组合物。

[2271] 在各种其他实施例中，本披露提供了化合物，该化合物选自具有下式的化合物：

[2272] 

(D8)，及其药学上可接受的盐。在不同实施例中，本披露进一步提供了包含该化合物或其药学上可接受的盐以及药学上可接受的载体的药物组合物。

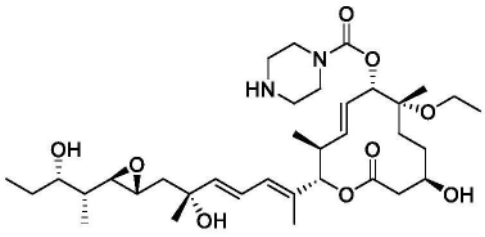
[2273] 在各种其他实施例中，本披露提供了化合物，该化合物选自具有下式的化合物：

[2274] 

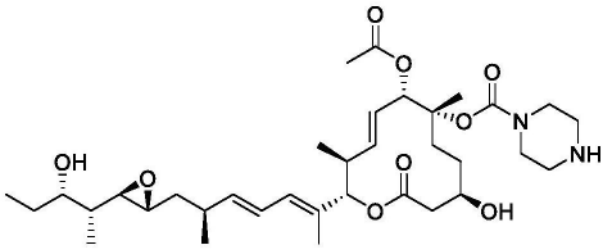
(D9)，及其药学上可接受的盐。在不同实施例中，本披露进一步提供了包含该化合物或其药学上可接受的盐以及药学上可接受的载

体的药物组合物。

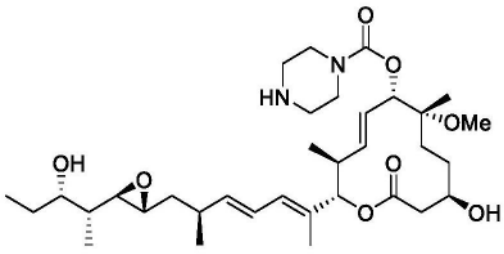
[2275] 在各种其他实施例中,本披露提供了化合物,该化合物选自具有下式的化合物:

[2276]  (D10),及其药学上可接受的盐。在不同实施例中,本披露进一步提供了包含该化合物或其药学上可接受的盐以及药学上可接受的载体的药物组合物。

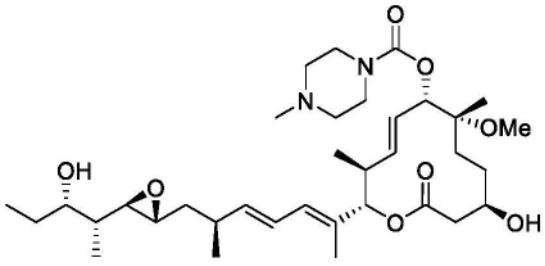
[2277] 在各种其他实施例中,本披露提供了化合物,该化合物选自具有下式的化合物:

[2278]  (D13),及其药学上可接受的盐。在不同实施例中,本披露进一步提供了包含该化合物或其药学上可接受的盐以及药学上可接受的载体的药物组合物。

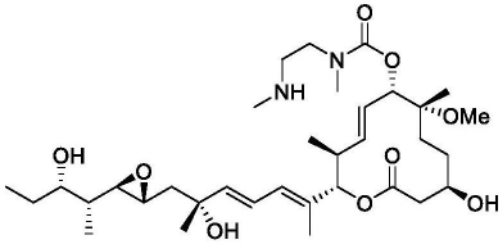
[2279] 在各种其他实施例中,本披露提供了化合物,该化合物选自具有下式的化合物:

[2280]  (D18),及其药学上可接受的盐。在不同实施例中,本披露进一步提供了包含该化合物或其药学上可接受的盐以及药学上可接受的载体的药物组合物。

[2281] 在各种其他实施例中,本披露提供了化合物,该化合物选自具有下式的化合物:

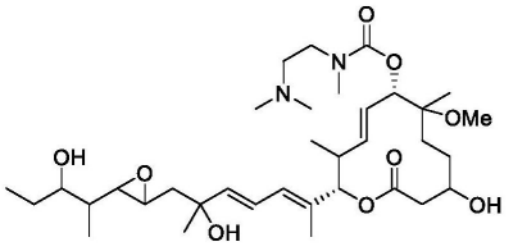
[2282]  (D19),及其药学上可接受的盐。在不同实施例中,本披露进一步提供了包含该化合物或其药学上可接受的盐以及药学上可接受的载体的药物组合物。

[2283] 在各种其他实施例中,本披露提供了化合物,该化合物选自具有下式的化合物:

[2284]  及其药学上可接受的盐。在不同实施例中，本披露进一步提供了包含该化合物或其药学上可接受的盐以及药学上可接受的载体的药物组合物。

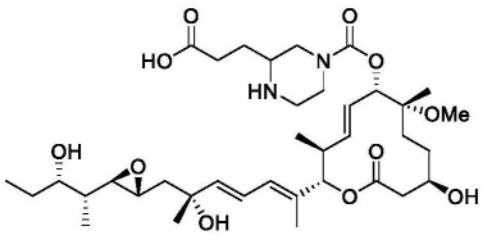
(D20),

[2285] 在各种其他实施例中，本披露提供了化合物，该化合物选自具有下式的化合物：

[2286]  及其药学上可接受的盐。在不同实施例中，本披露进一步提供了包含该化合物或其药学上可接受的盐以及药学上可接受的载体的药物组合物。

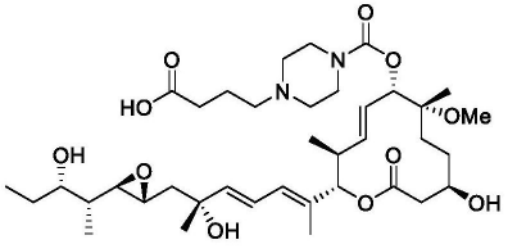
(D21),

[2287] 在各种其他实施例中，本披露提供了化合物，该化合物选自具有下式的化合物：

[2288]  及其药学上可接受的盐。在不同实施例中，本披露进一步提供了包含该化合物或其药学上可接受的盐以及药学上可接受的载体的药物组合物。

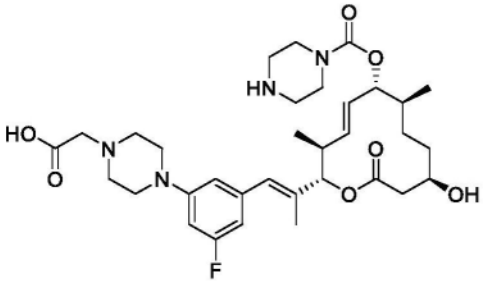
(D22),

[2289] 在各种其他实施例中，本披露提供了化合物，该化合物选自具有下式的化合物：

[2290]  及其药学上可接受的盐。在不同实施例中，本披露进一步提供了包含该化合物或其药学上可接受的盐以及药学上可接受的载体的药物组合物。

(D25),

[2291] 在各种其他实施例中，本披露提供了化合物，该化合物选自具有下式的化合物：

[2292]  及其药学上可接受的盐。在不同实

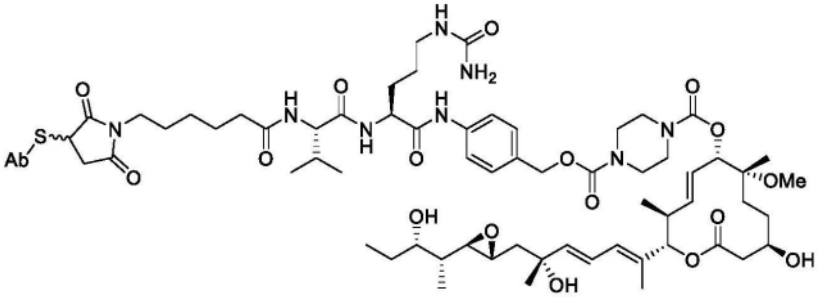
(D33),

施例中,本披露进一步提供了包含该化合物或其药学上可接受的盐以及药学上可接受的载体的药物组合物。

[2293] 生物缀合

[2294] 在一些实施例中,可以根据图26所示的示例性方案,将接头-药物化合物缀合至抗体或抗原结合片段。简言之,在一些实施例中,抗体或抗原结合片段可以用试剂(例如还原剂,例如三(2-羧乙基)膦)处理,以通过还原一个或多个二硫键来激活抗体或抗原结合片段。在一些实施例中,然后将活化的抗体或抗原结合片段用接头-药物化合物以预定的化学计量处理。随后,在一些实施例中,使混合物经受纯化技术,例如尺寸排阻树脂或超滤,以提供所需的抗体-药物缀合物。

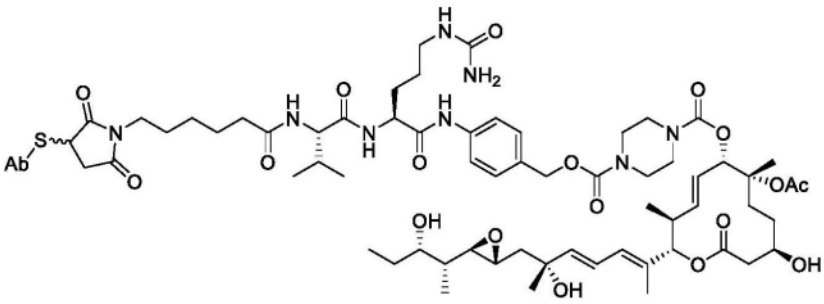
[2295] 在一些实施例中,本文提供了具有以下结构



(Ab-ADL1-D1)

的抗体-药物缀合物,其中Ab是抗体或抗原结合片段,其经由抗体或抗原结合片段上的硫醇基团的硫原子共价结合至接头-药物化合物(ADL1-D1)的马来酰亚胺基团。

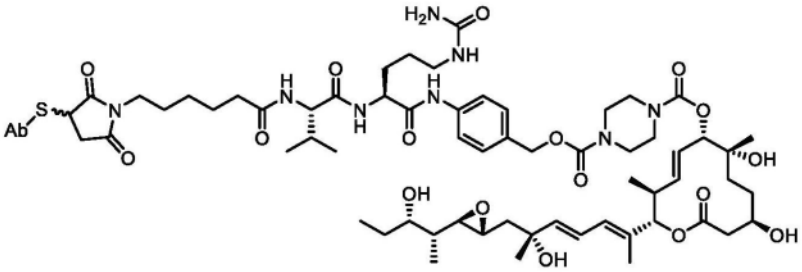
[2296] 在一些实施例中,本文提供了具有以下结构



(Ab-ADL1-D4)

的抗体-药物缀合物,其中Ab是抗体或抗原结合片段,其经由抗体或抗原结合片段上的硫醇基团的硫原子共价结合至接头-药物化合物(ADL1-D4)的马来酰亚胺基团。

[2297] 在一些实施例中,本文提供了具有以下结构

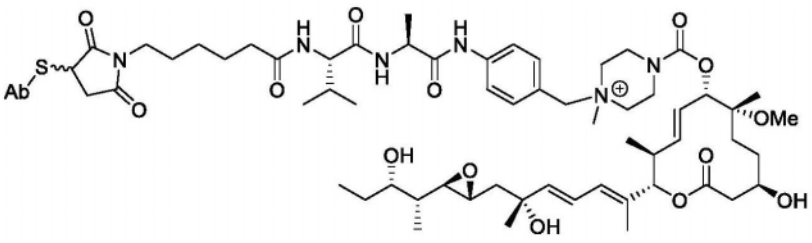


的抗体-

（Ab-ADL1-D12）

药物缀合物,其中Ab是抗体或抗原结合片段,其经由抗体或抗原结合片段上的硫醇基团的硫原子共价结合至接头-药物化合物(ADL1-D12)的马来酰亚胺基团。

[2298] 在一些实施例中,本文提供了具有以下结构

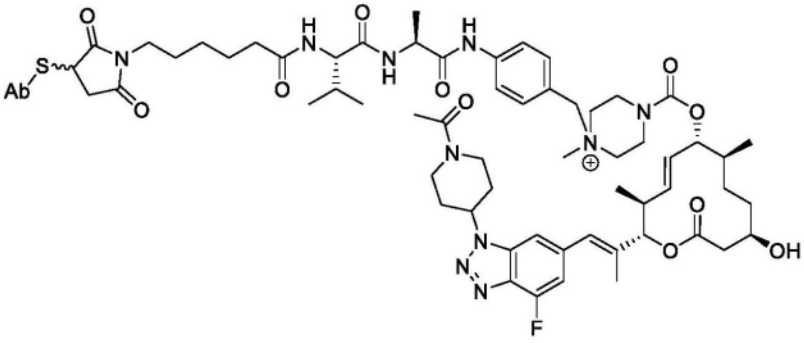


的抗体-

（Ab-ADL5-D2）

药物缀合物,其中Ab是抗体或抗原结合片段,其经由抗体或抗原结合片段上的硫醇基团的硫原子共价结合至接头-药物化合物(ADL5-D2)的马来酰亚胺基团。

[2299] 在一些实施例中,本文提供了具有以下结构

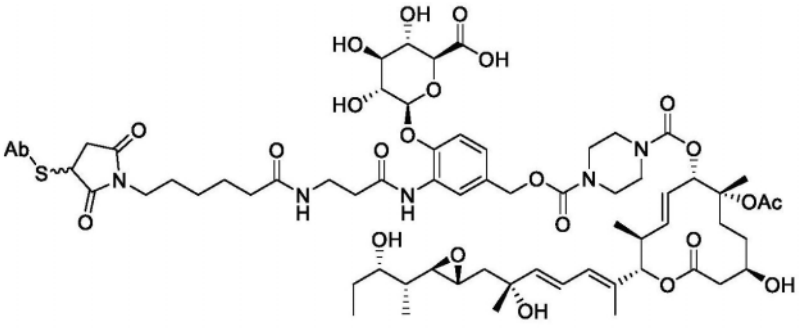


的抗体-

（Ab-ADL5-D15）

药物缀合物,其中Ab是抗体或抗原结合片段,其经由抗体或抗原结合片段上的硫醇基团的硫原子共价结合至接头-药物化合物(ADL5-D15)的马来酰亚胺基团。

[2300] 在一些实施例中,本文提供了具有以下结构



的抗体-

（Ab-ADL13-D4）

药物缀合物,其中Ab是抗体或抗原结合片段,其经由抗体或抗原结合片段上的硫醇基团的硫原子共价结合至接头-药物化合物(ADL13-D4)的马来酰亚胺基团。

[2301] 在一些实施例中,该Ab是抗HER2抗体或其抗原结合片段。在一些实施例中,该Ab结合至HER2且靶向表达HER2的赘生性细胞(即,该ADC靶向表达HER2的赘生性细胞)。在一些实

施例中,该Ab是内化性抗HER2抗体或其内化性抗原结合片段。

[2302] 在一些实施例中,该抗HER2抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:1(HCDR1)、SEQ ID NO:2(HCDR2)和SEQ ID NO:3(HCDR3)的氨基酸序列的三个重链互补决定区(HCDR1、HCDR2和HCDR3);以及含有SEQ ID NO:4(LCDR1)、SEQ ID NO:5(LCDR2)和SEQ ID NO:6(LCDR3)的氨基酸序列的三个轻链互补决定区(LCDR1、LCDR2和LCDR3)。在一些实施例中,该抗HER2抗体或抗原结合片段是内化性抗体或内化性抗原结合片段。在一些实施例中,该抗HER2抗体或抗原结合片段包含人框架序列。在一些实施例中,该抗HER2抗体或抗原结合片段包含含有SEQ ID NO:19的氨基酸序列的重链可变区和含有SEQ ID NO:20的氨基酸序列的轻链可变区。在一些实施例中,该抗HER2抗体或抗原结合片段包含人IgG1重链恒定区。在一些实施例中,该抗HER2抗体或抗原结合片段包含人Igκ轻链恒定区。

[2303] 药物负载

[2304] 药物负载由p表示,且在本文中也称为药物与抗体比率(DAR)。药物负载可在1至10个药物部分/抗体或抗原结合片段的范围内。在一些实施例中,p是1至10的整数。在一些实施例中,p是1至10、1至9、1至8、1至7、1至6、1至5、1至4、1至3或1至2的整数。在一些实施例中,p是2至10、2至9、2至8、2至7、2至6、2至5、2至4或2至3的整数。在一些实施例中,p是1至8的整数。在一些实施例中,p是2至4的整数。在其他实施例中,p是4至8的整数。在其他实施例中,p是1、2、3、4、5、6、7或8,优选地为4或8。

[2305] 药物负载可受抗体或抗原结合片段上连接位点的数量的限制。在一些实施例中,ADC的接头部分(L)经由抗体或抗原结合片段上一个或多个氨基酸残基上的化学活性基团连接至抗体或抗原结合片段。例如,接头可经由游离氨基、亚氨基、羟基、硫醇或羧基基团连接至抗体或抗原结合片段(例如,连接至N-末端或C-末端、一个或多个赖氨酸残基的ε氨基基团、一个或多个谷氨酸或天冬氨酸残基的游离羧酸基团、或一个或多个半胱氨酸残基的巯基基团)。接头所连接的位点可为抗体或抗原结合片段的氨基酸序列中的天然残基,或其可例如通过DNA重组技术(例如通过将半胱氨酸残基引入氨基酸序列中)或通过蛋白质生物化学(例如通过还原、pH调整或水解)而引入抗体或抗原结合片段中。

[2306] 在一些实施例中,可缀合至抗体或抗原结合片段的药物部分的数量受游离半胱氨酸残基的数量限制。例如,在该连接是半胱氨酸硫醇基团的情况下,抗体可具有仅一个或数个半胱氨酸硫醇基团,或可具有仅一个或数个具有足够反应性的硫醇基团(接头可经由其连接)。通常,抗体不含有许多可连接至药物部分的游离和反应性半胱氨酸硫醇基团。实际上,抗体中的大部分半胱氨酸硫醇残基包含在链间或链内二硫键中。因此,在一些实施例中,缀合至半胱氨酸可能需要至少部分还原抗体。接头-毒素与抗体的过量连接可通过还原可用于形成二硫键的半胱氨酸残基而使抗体不稳定。因此,最佳药物:抗体比率应当增加ADC的效力(通过增加每个抗体连接的药物部分的数量),而不会使抗体或抗原结合片段不稳定。在一些实施例中,最佳比率可以为2、4、6或8。

[2307] 在一些实施例中,使抗体或抗原结合片段在缀合之前暴露于还原条件,以产生一个或多个游离半胱氨酸残基。在一些实施例中,抗体可在部分或总体还原条件下用还原剂(如二硫苏糖醇(DTT)或三(2-羧乙基)膦(TCEP))还原,以产生反应性半胱氨酸硫醇基团。未配对半胱氨酸可经由用限定摩尔当量的TCEP进行部分还原来产生,这可减少连接轻链和重链(每个H-L配对有一对)以及铰链区中的二条重链(在人IgG1的情况下,每个H-H配对有两

对)的链间二硫键,同时留下完整的链内二硫键(Stefano等人(2013)Methods Mol Biol.[分子生物学方法]1045:145-71)。在实施例中,例如通过采用施加交替的还原和氧化电压的工作电极,以电化学方式还原抗体内的二硫键。此方法可允许二硫键还原与分析装置(例如电化学检测装置、NMR波谱仪或质谱仪)或化学分离装置(例如液相色谱(例如HPLC))或电泳装置(参见例如美国公开号20140069822)的在线偶合。在某些实施例中,使抗体经受变性条件,以显出氨基酸残基(如半胱氨酸)上的反应性亲核基团。

[2308] ADC的药物负载可通过不同方式控制,例如:(i)限制药物-接头中间体或接头试剂相对于抗体的摩尔过量;(ii)限制缀合反应时间或温度;(iii)用于半胱氨酸硫醇修饰的部分或限制性还原条件;和/或(iv)通过重组技术工程改造抗体的氨基酸序列,使得半胱氨酸残基的数量和位置被改变以控制接头-药物连接的数量和/或位置。

[2309] 在一些实施例中,将游离半胱氨酸残基引入抗体或抗原结合片段的氨基酸序列中。例如,可以制备半胱氨酸工程化的抗体,其中亲本抗体的一个或多个氨基酸被半胱氨酸氨基酸替代。任何形式的抗体均可如此被工程化,即突变。例如,亲本Fab抗体片段可被工程化以形成半胱氨酸工程化的Fab,称为“ThioFab”。类似地,亲本单克隆抗体可被工程化以形成“ThioMab”。单位点突变在ThioFab中产生单个工程化的半胱氨酸残基,而由于IgG抗体的二聚体性质,单位点突变在ThioMab中产生二个工程化的半胱氨酸残基。编码亲本多肽的氨基酸序列变体的DNA可通过本领域已知的多种方法制备(参见例如,国际公开号WO 2006/034488中所描述的方法)。这些方法包括但不限于通过先前制备的编码该多肽的DNA的定点(或寡核苷酸介导的)诱变、PCR诱变和盒式诱变来制备。重组抗体的变体还可通过限制性片段操作或通过利用合成寡核苷酸的重叠延伸PCR来构建。具有式(I)的ADC包括但不限于具有1、2、3或4个工程化半胱氨酸氨基酸的抗体(Lyon等人(2012)Methods Enzymol.[酶学方法]502:123-38)。在一些实施例中,一个或多个游离半胱氨酸残基已存在于抗体或抗原结合片段中,无需使用工程改造,在此情况下,可使用现有游离半胱氨酸残基将抗体或抗原结合片段缀合至药物部分。

[2310] 在超过一个亲核基团与药物-接头中间体或接头部分试剂反应、随后与药物部分试剂反应的情况下,在包含抗体或抗原结合片段和接头部分的多个拷贝的反应混合物中,所得产物可为ADC复合物的混合物,其具有以下分布:一个或多个药物部分连接至该混合物中的抗体或抗原结合片段的每一拷贝。在一些实施例中,由缀合反应得到的ADC的混合物中的药物负载在每个抗体或抗原结合片段连接1至10个药物部分的范围内。药物部分的平均数量/抗体或抗原结合片段(即,平均药物负载或平均p)可以通过本领域已知的任何常规方法,例如通过质谱法(例如反相LC-MS)和/或高效液相色谱法(例如HIC-HPLC)来计算。在一些实施例中,通过疏水相互作用色谱法-高效液相色谱法(HIC-HPLC)测定药物部分的平均数量/抗体或抗原结合片段。在一些实施例中,通过反相液相色谱法-质谱法(LC-MS)测定药物部分的平均数量/抗体或抗原结合片段。在一些实施例中,药物部分的平均数量/抗体或抗原结合片段是约1.5至约3.5、约2.5至约4.5、约3.5至约5.5、约4.5至约6.5、约5.5至约7.5、约6.5至约8.5、或约7.5至约9.5。在一些实施例中,药物部分的平均数量/抗体或抗原结合片段是约2至约4、约3至约5、约4至约6、约5至约7、约6至约8、约7至约9、约2至约8、或约4至约8。

[2311] 在一些实施例中,药物部分的平均数量/抗体或抗原结合片段是约2。在一些实施

例中,药物部分的平均数量/抗体或抗原结合片段是约1.5、约1.6、约1.7、约1.8、约1.9、约2、约2.1、约2.2、约2.3、约2.4或约2.5。在一些实施例中,药物部分的平均数量/抗体或抗原结合片段是2。

[2312] 在一些实施例中,药物部分的平均数量/抗体或抗原结合片段是约4。在一些实施例中,药物部分的平均数量/抗体或抗原结合片段是约3.5、约3.6、约3.7、约3.8、约3.9、约4、约4.1、约4.2、约4.3、约4.4或约4.5。在一些实施例中,药物部分的平均数量/抗体或抗原结合片段是4。

[2313] 在一些实施例中,药物部分的平均数量/抗体或抗原结合片段是约8。在一些实施例中,药物部分的平均数量/抗体或抗原结合片段是约7.5、约7.6、约7.7、约7.8、约7.9、约8、约8.1、约8.2、约8.3、约8.4或约8.5。在一些实施例中,药物部分的平均数量/抗体或抗原结合片段是8。

[2314] 在不同实施例中,如关于药物部分的平均数量/抗体或抗原结合片段所使用的术语“约”意指±10%。

[2315] 单个ADC复合物或“种类”可在混合物中通过质谱法鉴定且通过UPLC或HPLC(例如疏水性相互作用色谱法(HIC-HPLC))分离。在某些实施例中,具有单一负载值的均质或接近均质的ADC产物可例如通过电泳或色谱法从缀合混合物分离出来。

[2316] 在一些实施例中,较高药物负载(例如p>8)可能引起某些抗体-药物缀合物的聚集、不可溶性、毒性或细胞渗透性丧失。较高的药物负载还可能不利地影响某些ADC的药代动力学(例如清除率)。在一些实施例中,较低的药物负载(例如p<2)可降低某些ADC针对靶标表达细胞和/或旁观者细胞的效力。在一些实施例中,本披露的ADC的药物负载在约2至约8;约2至约6;约2至约5;约3至约5;约2至约4;或约4至约8的范围内。

[2317] 在一些实施例中,例如使用抗体或抗原结合片段上链内二硫键的部分还原实现了约2的药物负载和/或平均药物负载,并且该药物负载提供有益的特性。在一些实施例中,例如使用抗体或抗原结合片段上链内二硫键的部分还原实现了约4的药物负载和/或平均药物负载,并且该药物负载提供有益的特性。在一些实施例中,例如使用抗体或抗原结合片段上链内二硫键的部分还原实现了约8的药物负载和/或平均药物负载,并且该药物负载提供有益的特性。在一些实施例中,小于约2的药物负载和/或平均药物负载可能产生不可接受地高水平的未缀合抗体种类,该种类可与ADC竞争结合至靶抗原和/或提供降低的治疗功效。在一些实施例中,大于约8的药物负载和/或平均药物负载可能产生不可接受地高水平的产物异质性和/或ADC聚集。大于约8的药物负载和/或平均药物负载还可能因使抗体或抗原结合片段稳定所需的一个或多个化学键丧失而影响ADC的稳定性。

[2318] 本披露包括生产所述ADC的方法。简言之,ADC包含作为该抗体或抗原结合片段的抗体或抗原结合片段、药物部分(例如剪接调节剂)以及接合该药物部分和该抗体或抗原结合片段的接头。在一些实施例中,ADC可使用具有反应性官能团的接头制备,该接头用于共价连接至药物部分和抗体或抗原结合片段。例如,在一些实施例中,抗体或抗原结合片段的半胱氨酸硫醇可与接头或药物-接头中间体的反应性官能基团(例如马来酰亚胺部分)形成一个键以制备ADC。ADC可通过技术人员已知的任何技术产生。

[2319] 在一些实施例中,通过以下产生ADC:使抗体或抗原结合片段与接头和药物部分(例如剪接调节剂)以顺序方式接触,使得抗体或抗原结合片段先共价连接至接头,然后预

先形成的抗体-接头中间体与药物部分反应。抗体-接头中间体在接触药物部分之前可经历或可不经历纯化步骤。在其他实施例中,通过使抗体或抗原结合片段与接头-药物化合物接触来产生ADC,该接头-药物化合物由接头与药物部分反应而预先形成。预先形成的接头-药物化合物在接触抗体或抗原结合片段之前可经历或可不经历纯化步骤。在其他实施例中,抗体或抗原结合片段接触一种反应混合物中的接头和药物部分,从而允许在抗体或抗原结合片段与接头之间、以及接头与药物部分之间同时形成共价键。该产生ADC的方法可以包括以下反应,其中在将接头添加至反应混合物中之前,抗体或抗原结合片段与抗体或抗原结合片段接触,且反之还然。在某些实施例中,通过以下产生ADC:使抗体或抗原结合片段与接合至药物部分的接头(如ADL1-剪接调节剂(例如ADL1-D1)或ADL5-剪接调节剂(例如ADL5-D2))在允许缀合的条件下反应。

[2320] 根据以上所描述的方法制备的ADC可经历纯化步骤。该纯化步骤可涉及本领域中已知用于纯化蛋白质的任何生物化学方法,或其任何方法的组合。这些方法包括但不限于切向流过滤(TFF)、亲和色谱法、离子交换色谱法、基于电荷或等电点的任何色谱法、混合模式色谱法(例如CHT(陶瓷羟磷灰石))、疏水相互作用色谱法、尺寸排阻色谱法、透析、过滤、选择性沉淀或其任何组合。

[2321] 治疗用途和组合物

[2322] 本文披露了使用所披露的ADC和组合物治疗受试者的病症(例如赘生性病症)的方法。ADC可单独或与第二治疗剂组合施用,且能以药学上可接受的配制剂、剂量和给药方案施用。可针对毒性以及功效指标评价ADC的治疗功效并相应地调整。功效量度包括但不限于在体外或体内观察到的细胞生长抑制作用和/或细胞毒性作用、肿瘤体积减小、肿瘤生长抑制和/或存活期延长。

[2323] 确定ADC是否对细胞发挥细胞生长抑制作用和/或细胞毒性作用的方法是已知的。例如,ADC的细胞毒性活性或细胞生长抑制活性可通过以下测量:使表达ADC的靶蛋白的哺乳动物细胞暴露于细胞培养基;培养这些细胞约6小时至约6天的时间;以及测量细胞活力。基于细胞的体外测定还可用于测量ADC的活力(增殖)、细胞毒性以及对细胞凋亡的诱导(半胱天冬酶活化)。

[2324] 为确定ADC是否发挥细胞生长抑制作用,可使用胸苷掺入测定。例如,可将以5,000个细胞/孔的密度铺板于96孔板的表达靶抗原的癌细胞培养72小时的时间,并在72小时的时间的最后8小时内,使其暴露于0.5μCi的^{3}H-胸苷。在ADC存在和不存在下,测量培养的细胞中^{3}H-胸苷的掺入量。

[2325] 为测定细胞毒性,可测量坏死或细胞凋亡(程序性细胞死亡)。坏死通常伴随质膜渗透性的增加、细胞膨胀和质膜破裂。细胞凋亡可例如通过测量DNA断裂来定量。用于定量体外测定DNA断裂的市售光度测量方法是可用的。此类测定的实例,包括TUNEL(其检测断裂的DNA中经标记核苷酸的掺入)和基于ELISA的测定,描述于Biochemica(1999)第2期,第34-37页(Roche Molecular Biochemicals[罗氏分子生物化学品公司])。

[2326] 细胞凋亡还可通过测量细胞的形态变化来测定。例如,与坏死相同,质膜完整性的丧失可通过测量对某些染料(例如荧光染料,如吖啶橙或溴化乙锭)的吸收来测定。用于测量凋亡细胞数量的方法描述于Duke和Cohen,Current Protocols in Immunology[免疫学实验指南]Coligan等人编辑(1992)3.17.1-3.17.16页)中。细胞还可用DNA染料(例如吖啶

橙、溴化乙锭或碘化丙锭)标记且观察细胞的沿核内膜的染色质凝聚和边集情况。在一些实施例中,细胞凋亡还可通过针对半胱天冬酶活性进行筛选来测定。在一些实施例中,可使用Caspase-Glo®测定来测量半胱天冬酶-3和半胱天冬酶-7的活性。在一些实施例中,该测定在针对半胱天冬酶活性、荧光素酶活性和细胞溶解而优化的试剂中提供了发光的半胱天冬酶-3/7底物。在一些实施例中,以"添加-混合-测量"方式添加Caspase-Glo®3/7试剂可引起细胞溶解,随后引起半胱天冬酶对底物的裂解并产生由荧光素酶制造的"辉光型(glow-type)"发光信号。在一些实施例中,发光可与存在的半胱天冬酶活性的量成比例,且可以充当细胞凋亡的指标。可经测量以测定细胞凋亡的其他形态变化包括例如细胞质凝聚、膜起泡增加和细胞收缩。对癌细胞的任何这些作用的测定表明ADC可用于治疗癌症。

[2327] 细胞活力可例如通过测定细胞对染料(如中性红、锥虫蓝、结晶紫或ALAMAR™蓝)的吸收来测量(参见例如Page等人(1993)Intl J Oncology[国际肿瘤学杂志]3:473-6)。在这种测定中,在含有染料的培养基中孵育细胞,洗涤细胞,且以分光光度法测量剩余染料(其反映细胞对染料的吸收)。还可例如通过定量ATP(有代谢活性的细胞的指标)测量细胞活力。在某些实施例中,如本文所提供的实例中所描述,可以使用CellTiter-Glo®发光细胞活力测定来评估所制备的ADC或剪接调节剂化合物的体外效力和/或细胞活力。在此测定中,在某些实施例中,将单一试剂(CellTiter-Glo®试剂)直接添加至在补充血清的培养基中培养的细胞中。试剂的添加引起细胞溶解并产生与所存在的ATP的量成正比的发光信号。ATP的量与存在于培养物中的细胞的数量成正比。还可使用蛋白质结合的染料磺酰罗丹明B(SRB)测量细胞毒性(Skehan等人(1990)J Natl Cancer Inst.[美国国立癌症研究所杂志]82:1107-12)。

[2328] 还可评价所披露的ADC的旁观者杀伤活性。旁观者杀伤活性可以例如通过采用两个细胞系的测定来确定,该两个细胞系之一对靶抗原呈阳性且另一个对靶抗原呈阴性。在某些实施例中,该测定的设计允许仅追踪靶标阴性细胞。在某些实施例中,在以下三个条件下铺板细胞:(i)单独的靶标阴性细胞(加标签或经标记);(ii)单独的靶标阳性细胞;(iii)靶标阴性细胞与靶标阳性细胞的共培养物。然后,用ADC处理细胞并监测细胞毒性。当在CellTiter-Glo®试剂存在下读取板时,可监测所有细胞群的活力。当在OneGlo®试剂存在下读取板时,仅加标签或经标记的靶标阴性细胞产生信号。当将靶标阴性细胞与靶标阳性细胞混合时,靶标阴性细胞的杀伤指示旁观者杀伤,而在无靶标阳性细胞存在下靶标阴性细胞的杀伤指示脱靶杀伤。

[2329] 在某些方面中,本披露的特征在于一种通过破坏RNA剪接而杀伤癌细胞或组织、抑制或调节癌细胞或组织的生长、或干扰癌细胞或组织的代谢的方法。该方法可以用于破坏RNA剪接会提供治疗益处的任何受试者。可以得益于破坏RNA剪接的受试者包括但不限于患有赘生性病症(如血液恶性病或实体瘤)、或者有患赘生性病症的风险的受试者。在某些实施例中,该血液恶性病是B细胞恶性病、血液癌症(白血病)、浆细胞癌症(骨髓瘤,例如多发性骨髓瘤)或淋巴结癌症(淋巴瘤)。在某些实施例中,血液恶性病是急性骨髓性白血病或多发性骨髓瘤。在某些实施例中,白血病是急性淋巴母细胞性白血病(ALL)、急性骨髓性白血病(AML)、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、慢性骨髓性白血病(CML)、慢性骨髓单核细胞性白血病(CMML)、或急性单核细胞性白血病(AMoL)。在某些实施例中,淋巴瘤是霍奇金氏淋巴瘤

或非霍奇金氏淋巴瘤。在某些实施例中,血液恶性病是骨髓增生异常综合症(MDS)。在某些实施例中,实体瘤是癌,如乳腺癌、胰腺癌、前列腺癌、结肠或结肠直肠癌、肺癌、胃癌、宫颈癌、子宫内膜癌、卵巢癌、胆管癌、神经胶质瘤或黑素瘤。在一些实施例中,实体瘤是乳腺癌、胃癌、前列腺癌、卵巢癌、肺癌(例如肺腺癌)、子宫癌(例如子宫浆液性子宫内膜癌)、涎腺导管癌、黑素瘤、结肠癌、宫颈癌、胰腺癌、肾癌、结肠直肠癌和食道癌。在某些实施例中,肺癌是肺腺癌。在某些实施例中,子宫癌是子宫浆液性子宫内膜癌。

[2330] 在不同实施例中,可将所披露的ADC施用于表达HER2的任何细胞或组织,如表达HER2的赘生性细胞或组织。示例性实施例包括抑制HER2介导的细胞信号传导的方法或杀伤细胞的方法。该方法可以用于表达HER2的任何细胞或组织,如癌细胞或转移性病变。表达HER2的癌症的非限制性实例包括乳腺癌、胃癌、膀胱癌、尿路上皮细胞癌、食道癌、肺癌(例如肺腺癌)、子宫癌(例如子宫浆液性子宫内膜癌)、涎腺导管癌、宫颈癌、子宫内膜癌和卵巢癌(English等人(2013)Mol Diagn Ther.[分子诊断与治疗]17:85-99)。表达HER2的细胞的非限制性实例包括HCC1954和SKBR3人乳腺导管癌细胞、N87人胃癌细胞、以及包含编码HER2的重组核酸或其一部分的细胞。

[2331] 在不同实施例中,可将所披露的ADC施用于表达CD138的任何细胞或组织,如表达CD138的赘生性细胞或组织。示例性实施例包括抑制CD138介导的细胞信号传导的方法或杀伤细胞的方法。该方法可以用于表达CD138的任何细胞或组织,如癌细胞或转移性病变。表达CD138的癌症的非限制性实例包括胸内癌症(例如肺癌、间皮瘤)、皮肤癌(例如基底细胞癌、鳞状细胞癌)、头颈癌(例如喉癌、下咽癌、鼻咽癌)、乳腺癌、泌尿生殖癌(例如宫颈癌、卵巢癌、子宫内膜癌、前列腺癌、膀胱癌、尿路上皮癌)、血液恶性病(例如,骨髓瘤如多发性骨髓瘤、霍奇金氏淋巴瘤)和甲状腺癌(Szatmári等人(2015)Dis Markers[疾病标志物]2015:796052)。表达CD138的细胞的非限制性实例包括MOLP8人多发性骨髓瘤细胞、以及包含编码CD138的重组核酸或其一部分的细胞。

[2332] 在不同实施例中,可将所披露的ADC施用于表达EPHA2的任何细胞或组织,如表达EPHA2的赘生性细胞或组织。示例性实施例包括抑制EPHA2介导的细胞信号传导的方法或杀伤细胞的方法。该方法可以用于表达EPHA2的任何细胞或组织,如癌细胞或转移性病变。表达EPHA2的癌症的非限制性实例包括乳腺癌、脑癌、卵巢癌、膀胱癌、胰腺癌、食道癌、肺癌、前列腺癌、黑素瘤、食道癌和胃癌(Tandon等人(2011)Expert Opin Ther Targets[治疗靶标专家意见]15(1):31-51)。表达EPHA2的细胞的非限制性实例包括PC3人前列腺癌细胞、以及包含编码EPHA2的重组核酸或其一部分的细胞。

[2333] 示例性方法包括使细胞与有效量(即,足以杀伤细胞的量)的如本文所描述的ADC接触的步骤。该方法可以用于例如在体外、体内、离体或原位培养的细胞。例如,可以在体外于培养基中培养表达HER2的细胞(例如通过对肿瘤或转移性病变进行活检而收集的细胞;来自确定的癌细胞系的细胞;或重组细胞),且可以通过将ADC添加至该培养基中来影响该接触步骤。该方法将引起对表达HER2的细胞(特别包括表达HER2的肿瘤细胞)的杀伤。可替代地,可通过任何合适的施用途径(例如静脉内、皮下或与肿瘤组织直接接触)将ADC施用于受试者以在体内产生作用。此方法可以用于靶向其他细胞表面抗原(例如CD138、EPHA2)的抗体。

[2334] 所披露的ADC治疗性组合物的体内作用可以在合适的动物模型中评价。例如,可以

使用异种癌症模型,其中将癌症外植体或传代的异种移植组织引入免疫受损的动物,如裸小鼠或SCID小鼠(Klein等人(1997)Nature Med.[自然医学]3:402-8)。可使用测量对肿瘤形成、肿瘤消退或转移等的抑制作用的测定来预测功效。

[2335] 还可使用体内测定,其通过如细胞凋亡等机制来评价对肿瘤死亡的促进作用。在一个实施例中,可以检查来自用该治疗性组合物治疗的荷瘤小鼠的异种移植物中细胞凋亡病灶的存在,并与未治疗的带有异种移植物的对照小鼠相比较。在经治疗小鼠的肿瘤中发现的细胞凋亡病灶的程度提供了该组合物的治疗功效的指示。

[2336] 本文进一步提供了治疗赘生性病症(例如癌症)的方法。本文所披露的ADC可以施用于非人哺乳动物或人类受试者以用于治疗目的。这些治疗方法需要向患有或疑似患有赘生性病症的受试者施用治疗有效量的ADC或组合物,该ADC或组合物包含连接至靶向抗体的剪接调节剂,该靶向抗体结合至癌细胞表面上表达的抗原、可实现结合或定位于癌细胞表面上。在一些实施例中,用该抗体-药物缀合物或组合物进行治疗诱导了对不表达靶抗原但与表达靶抗原的赘生性细胞邻近的赘生性细胞的旁观者杀伤。

[2337] 一个示例性实施例是将剪接调节剂递送至表达HER2的细胞的方法,该方法包括使剪接调节剂与免疫特异性结合至HER2表位的抗体缀合并使该细胞暴露于该ADC。适用本披露的ADC的表达HER2的示例性肿瘤细胞包括胃癌细胞和乳腺导管癌细胞。

[2338] 另一示例性实施例是将剪接调节剂递送至表达CD138的细胞的方法,该方法包括使剪接调节剂与免疫特异性结合至CD138表位的抗体缀合并使该细胞暴露于该ADC。适用本披露的ADC的表达CD138的示例性肿瘤细胞包括多发性骨髓瘤细胞。

[2339] 另一示例性实施例是将剪接调节剂递送至表达EPHA2的细胞的方法,该方法包括使剪接调节剂与免疫特异性结合至EPHA2表位的抗体缀合并使该细胞暴露于该ADC。适用本披露的ADC的表达EPHA2的示例性肿瘤细胞包括前列腺癌细胞。

[2340] 另一示例性实施例是减少或抑制肿瘤(例如表达HER2的肿瘤、表达CD138的肿瘤、表达EPHA2的肿瘤)生长的方法,该方法包括施用治疗有效量的ADC或包含ADC的组合物。在一些实施例中,该治疗足以减少或抑制患者的肿瘤生长、减少转移性病变的数量或大小、减小肿瘤负荷、减小原发性肿瘤负荷、降低侵袭性、延长存活时间和/或维持或改善生活质量。在一些实施例中,肿瘤对单独施用时的ADC中的抗体或抗原结合片段(例如抗HER2抗体、抗CD138抗体、抗EPHA2抗体)进行的治疗具有抗性或难治性,和/或肿瘤对单独施用时的剪接调节剂药物部分进行的治疗具有抗性或难治性。

[2341] 在某些方面中,本披露提供了减少或抑制表达HER2的肿瘤的生长的方法。在某些实施例中,用该抗体-药物缀合物或组合物进行治疗诱导了对不表达HER2但与表达HER2的赘生性肿瘤细胞邻近的肿瘤细胞的旁观者杀伤。示例性表达HER2的肿瘤类型包括但不限于源自以下癌症的肿瘤:表达HER2的乳腺癌、胃癌、膀胱癌、尿路上皮细胞癌、食道癌、肺癌(例如肺腺癌)、子宫癌(例如子宫浆液性子宫内膜癌)、涎腺导管癌、宫颈癌、子宫内膜癌和卵巢癌。在一些实施例中,表达HER2的肿瘤是源自以下癌症的肿瘤:表达HER2的乳腺癌、卵巢癌、胃癌、肺癌(例如肺腺癌)、子宫癌(例如子宫浆液性子宫内膜癌)、骨肉瘤或涎腺导管癌。在某些实施例中,表达HER2的肿瘤是肺腺癌或子宫浆液性子宫内膜癌。

[2342] 在某些方面中,本披露提供了减少或抑制表达CD138的肿瘤的生长的方法。在某些实施例中,用该抗体-药物缀合物或组合物进行治疗诱导了对不表达CD138但与表达CD138

的赘生性肿瘤细胞邻近的肿瘤细胞的旁观者杀伤。示例性表达CD138的肿瘤类型包括但不限于源自以下癌症的肿瘤:表达CD138的胸内癌症(例如肺癌、间皮瘤)、皮肤癌(例如基底细胞癌、鳞状细胞癌)、头颈癌(例如喉癌、下咽癌、鼻咽癌)、乳腺癌、泌尿生殖癌(例如宫颈癌、卵巢癌、子宫内膜癌、前列腺癌、膀胱癌、尿路上皮癌)和甲状腺癌。

[2343] 在某些方面中,本披露提供了减少或抑制表达EPHA2的肿瘤的生长的方法。在某些实施例中,用该抗体-药物缀合物或组合物进行治疗诱导了对不表达EPHA2但与表达EPHA2的赘生性肿瘤细胞邻近的肿瘤细胞的旁观者杀伤。示例性表达EPHA2的肿瘤类型包括但不限于源自以下癌症的肿瘤:表达EPHA2的乳腺癌、脑癌、卵巢癌、膀胱癌、胰腺癌、食道癌、肺癌、前列腺癌、黑素瘤、食道癌和胃癌。在某些实施例中,表达EPHA2的肿瘤是源自以下癌症的肿瘤:表达EPHA2的乳腺癌、前列腺癌、卵巢癌、肺癌、黑素瘤、结肠癌或食道癌。

[2344] 另外,可以将本披露的抗体施用于表达ADC能够结合的抗原的非人哺乳动物,该非人哺乳动物用于兽医目的或作为人类疾病的动物模型。就后者而言,此类动物模型可用于评价所披露的ADC的治疗功效(例如,测试剂量和施用时程)。

[2345] 本文进一步提供了所披露的ADC和组合物的治疗用途。一个示例性实施例是ADC在治疗赘生性病症(例如表达HER2的癌症、表达CD138的癌症、表达EPHA2的癌症)中的用途。另一示例性实施例是用于治疗赘生性病症(例如表达HER2的癌症、表达CD138的癌症、表达EPHA2的癌症)的ADC。用于鉴定患有表达靶抗原(例如HER2、CD138、EPHA2、MSLN、FOLH1、CDH6、CEACAM5、CFC1B、ENPP3、FOLR1、HAVCR1、KIT、MET、MUC16、SLC39A6、SLC44A4、STEAP1)的癌症的受试者的方法是本领域已知的,且其可用于鉴定适合用所披露的ADC进行治疗的患者。

[2346] 另一示例性实施例是ADC在制造用于治疗赘生性病症(例如表达HER2的癌症、表达CD138的癌症、表达EPHA2的癌症)的药剂的方法中的用途。

[2347] 用于实践前述方法的治疗性组合物可以配制成包含适合于所需递送方法的药学上可接受的载体的药物组合物。一个示例性实施例是包含本披露的ADC和药学上可接受的载体的药物组合物。合适的载体包括当与治疗性组合物组合时保持该治疗性组合物的抗肿瘤功能且通常不与患者的免疫系统反应的任何材料。药学上可接受的载体包括生理上相容的任何和所有溶剂、分散介质、包衣、抗细菌剂和抗真菌剂、等张剂和吸收延迟剂等。药学上可接受的载体的实例包括以下一种或多种:水、生理盐水、磷酸盐缓冲盐水、右旋糖、甘油、乙醇、甲磺酸盐等,以及其组合。在许多情况下,该组合物中包括等张剂,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进一步包含少量的辅助物质,如润湿剂或乳化剂、防腐剂或缓冲剂,它们可增加ADC的保质期或有效性。

[2348] 治疗性配制剂可经溶解且经由能够将治疗性组合物递送至肿瘤部位的任何途径施用。潜在有效的施用途径包括但不限于静脉内、肠胃外、腹膜内、肌肉内、肿瘤内、皮内、器官内、原位等。治疗性蛋白质制剂可经冻干并以无菌粉末形式例如在真空下储存,然后在注射之前于抑菌水(含有例如苯甲醇防腐剂)中或无菌水中重构。治疗性配制剂可以包含ADC或其药学上可接受的盐,例如甲磺酸盐。

[2349] 在一些实施例中,每天、每两月一次或其间任何时间段向患者施用ADC。使用前述方法治疗癌症的剂量和施用方案将随该方法和靶标癌症而变化,且通常将根据本领域中所理解的多种其他因素而变化。

[2350] 已知各种递送系统,且其可用于施用一种或多种本披露的ADC。施用ADC的方法包括但不限于肠胃外施用(例如皮内、肌肉内、腹膜内、静脉内和皮下)、硬膜外施用、肿瘤内施用和黏膜施用(例如鼻内和口腔途径)。此外,可采用经肺施用,例如通过使用吸入器或喷雾器、以及具有雾化剂的配制剂。参见例如,美国专利号6,019,968、5,985,320、5,985,309、5,934,272、5,874,064、5,855,913、5,290,540和4,880,078;以及国际公开号WO 1992/019244、WO 1997/032572、WO 1997/044013、WO 1998/031346和WO 1999/066903中所描述的用于经肺施用的组合物和方法。可以通过任何方便的途径施用ADC,例如通过输注或快速注射(bolus injection),或通过经由上皮或皮肤黏膜内层(例如口腔黏膜、直肠和肠黏膜等)吸收。施用可为全身或局部的。

[2351] 本文所披露的治疗性组合物可在制造和储存条件下无菌且稳定。在一些实施例中,这些ADC或药物组合物中的一种或多种是以干燥无菌冻干粉末或无水浓缩物形式提供于气密密封式容器中,且其可重构(例如用水或生理盐水)至适当浓度以向受试者施用。在一些实施例中,这些预防剂或治疗剂或药物组合物中的一种或多种是以至少5mg、至少10mg、至少15mg、至少25mg、至少35mg、至少45mg、至少50mg、至少75mg或至少100mg、或其间任何量的单位剂量,以干燥无菌冻干粉末形式提供于气密密封式容器中。在一些实施例中,冻干的ADC或药物组合物是在原有容器中在2℃与8℃之间储存。在一些实施例中,本文所描述的ADC或药物组合物中的一种或多种是以液体形式提供于气密密封式容器(例如指示试剂的数量和浓度的容器)中。在一些实施例中,液体形式的所施用的组合物是以至少0.25mg/mL、至少0.5mg/mL、至少1mg/mL、至少2.5mg/mL、至少5mg/mL、至少8mg/mL、至少10mg/mL、至少15mg/mL、至少25mg/mL、至少50mg/mL、至少75mg/mL或至少100mg/mL ADC提供于气密密封式容器中。该液体形式可以在原有容器中在2℃与8℃之间储存。

[2352] 在一些实施例中,所披露的ADC可以掺入适合于肠胃外施用的药物组合物中。可注射溶液可以由在燧石(flint)或琥珀色小瓶、安瓿或预填充注射器、或其他已知的递送或储存装置中的液体或冻干剂型构成。

[2353] 本文所描述的组合物可呈多种形式。这些形式包括例如液体、半固体和固体剂型,如液体溶液(例如可注射溶液和可输注溶液)、分散液或悬浮液、片剂、丸剂、粉末、脂质体和栓剂。优选形式取决于预期的施用模式和治疗应用。

[2354] 在不同实施例中,治疗涉及经由可接受的施用途径单次快速注射或重复施用ADC制剂。

[2355] 可针对给定样品中靶抗原的水平(例如靶抗原表达细胞的水平)评价患者,以帮助确定最有效的给药方案等。一个示例性实施例是确定患者是否对用本披露的ADC进行的治疗有响应的方法,该方法包括提供来自该患者的生物样品并使该生物样品与ADC接触。示例性生物样品包括组织或体液,如炎性渗出液、血液、血清、肠液、粪便样品或肿瘤活检(例如源自患有表达靶抗原的癌症(例如表达HER2的癌症、表达CD138的癌症、表达EPHA2的癌症)、或有患表达靶抗原的癌症的风险的患者的肿瘤活检)。在一些实施例中,样品(例如组织和/或体液)可以自受试者获得,且可以使用合适的免疫学方法检测和/或测量靶抗原(例如HER2、CD138、EPHA2、MSLN、FOLH1、CDH6、CEACAM5、CFC1B、ENPP3、FOLR1、HAVCR1、KIT、MET、MUC16、SLC39A6、SLC44A4、STEAP1)的蛋白质表达。此类评价还在整个疗法中用于监测目的,且可用于估计治疗成功性并评价其他参数。

[2356] 在一些实施例中,可通过使来自受试者的肿瘤样品与ADC接触并评价肿瘤生长速率或体积来评价ADC的功效。在一些实施例中,当已确定ADC有效时,可将其施用于受试者。

[2357] 以上治疗方法可以与多种其他手术、化学疗法或放射疗法方案中的任一种组合。在一些实施例中,本文所披露的ADC或组合物与一种或多种额外治疗剂(例如一种或多种化学治疗剂)共配制和/或共施用。化学治疗剂的非限制性实例包括烷基化剂,例如氮芥、乙撑亚胺化合物和烷基磺酸酯;抗代谢物,例如叶酸、嘌呤或嘧啶拮抗剂;抗有丝分裂剂,例如抗微管蛋白剂,如艾日布林(eribulin)或甲磺酸艾日布林(Halaven™)、长春花生物碱(vinca alkaloid)和奥瑞他汀(auristatin);细胞毒性抗生素;损害或干扰DNA表达或复制的化合物,例如DNA小沟结合剂;以及生长因子受体拮抗剂。在一些实施例中,化学治疗剂可以是细胞毒性剂或细胞生长抑制剂。细胞毒性剂的实例包括但不限于抗有丝分裂剂,如艾日布林或甲磺酸艾日布林(Halaven™)、奥瑞他汀(例如单甲基奥瑞他汀E(MMAE)、单甲基奥瑞他汀F(MMAF))、美登木素生物碱(maytansinoid)(例如美登素(maytansine))、尾海兔素(dolastatin)、多司他汀(duostatin)、念珠藻素(cryptophycin)、长春花生物碱(例如长春新碱(vincristine)、长春碱(vinblastine))、紫杉烷(taxane)、紫杉醇(taxol)和秋水仙碱(colchicine);蒽环霉素(anthracycline)(例如道诺霉素(daunorubicin)、多柔比星(doxorubicin)、二羟基蒽二酮(dihydroxyanthracindione));细胞毒性抗生素(例如丝裂霉素(mitomycin)、放射菌素(actinomycin)、倍癌霉素(duocarmycin)(例如CC-1065)、金霉素(auromycin)、金霉素(duomycin)、卡奇霉素(calicheamicin)、内霉素(endomycin)、酚霉素(phenomycin));烷基化剂(例如顺铂(cisplatin));嵌入剂(例如溴化乙锭);拓扑异构酶抑制剂(例如依托泊苷(etoposide)、替尼泊苷(tenoposide));放射性同位素,如At^{211}、I^{131}、I^{125}、Y^{90}、Re^{186}、Re^{188}、Sm^{153}、Bi^{212}或^{213}、P^{32}以及镥的放射性同位素(例如Lu^{177});以及细菌、真菌、植物或动物来源的毒素(例如蓖麻毒素(ricin)(例如蓖麻毒素A链)、白喉毒素(diphtheria toxin)、假单胞菌外毒素(Pseudomonas exotoxin)A(例如PE40)、内毒素、有丝分裂素(mitogellin)、康普瑞汀(combrestatin)、局限曲菌素(restrictocin)、白树毒素(gelonin)、α-帚曲霉素(alpha-sarcin)、相思子毒素(abrin)(例如相思子毒素A链)、蒴莲根毒素(modeccin)(例如蒴莲根毒素A链)、麻疯树毒蛋白(curicin)、巴豆毒素(crotin)、肥皂草(Sapaonaria officinalis)抑制剂、糖皮质激素)。

[2358] 本文还披露了一种或多种所披露的ADC在制造用于治疗癌症(例如根据以上所描述的方法)的药剂中的用途。在一些实施例中,使用本文所披露的ADC(例如根据以上所描述的方法)来治疗癌症。

[2359] 在不同实施例中,用于本文所描述的实验室和治疗应用中的试剂盒在本披露的范围内。此类试剂盒可以包含载体、包装、或经分隔以接纳一个或多个容器(如小瓶、管等,每个容器包含用于本文所披露的方法中的独立元素之一)的容器、以及包含使用说明书(如本文所描述的用途)的标签或插页。试剂盒可以包含含有药物部分的容器。本披露还提供了包装在气密密封式容器(如安瓿或药囊)中的一种或多种ADC或其药物组合物,该气密密封式容器指示药剂的数量。

[2360] 试剂盒可以包含以上描述的容器、以及与其相联的一个或多个其他容器,该一个或多个其他容器包含从商业和使用者观点看合意的材料,包括缓冲剂、稀释剂、过滤器、针、注射器;列出内含物和/或使用说明书的载体、包装、容器、小瓶和/或管标签;以及具有使用

说明书的包装插页。

[2361] 标签可存在于容器上或与容器一起存在以表明该组合物是用于特定疗法或非治疗性应用,如预后、预防、诊断或实验室应用。标签还可指示关于体内或体外用途(如本文所描述的那些用途)的指导。在一个或多个插页或标签上还可包括指导和或其他信息,该插页或标签包括在试剂盒中或试剂盒上。标签可位于容器上或与容器相关联。当将形成标签的字母、数字或其他字符模制或蚀刻至容器本身中时,标签可以位于容器上。当标签存在于也固持容器的贮器或载体内时,标签可例如以包装插页形式与容器相关联。标签可指示该组合物是用于诊断或治疗病症,如本文所描述的癌症。

[2362] 新抗原和使用方法

[2363] 在不同实施例中,本文还披露了通过在肿瘤细胞中诱导新抗原而治疗患者的方法,这些肿瘤细胞可由患者的免疫系统靶向进而清除。不受理论束缚,在不同实施例中,施用单独的和/或作为ADC或组合物的一部分的剪接调节剂可以产生诱导免疫应答、诱导双链RNA免疫应答(例如,由于重新表达的内含子保留的内源性逆转录病毒)的新抗原,和/或产生诱导免疫原性细胞死亡的新抗原。

[2364] 如本文所使用,术语"新抗原"是指先前未使免疫系统暴露的、由一个或多个肿瘤特异性突变产生的和/或由肿瘤暴露于药物(例如单独的和/或作为ADC或组合物的一部分的本文所披露的剪接调节剂中的任一种或多种)产生的任何抗原。肿瘤特异性突变可包括错义突变、移码、易位和mRNA剪接变体,以及影响翻译后加工(如磷酸化和糖基化)的突变。在不同实施例中,这些示例性突变可源自非同义编码变化和/或改变mRNA加工(例如剪接)的突变。在不同实施例中,所有这些示例性突变均可导致分子变化,这些分子变化可由适当T细胞受体辨别。在不同优选实施例中,示例性新抗原是通过递送单独的和/或作为ADC或组合物的一部分的剪接调节剂所诱导的新抗原。在不同实施例中,递送剪接调节剂(例如本文所披露的剪接调节剂中的任一种或多种)可以诱导新颖mRNA剪接,其导致翻译出免疫系统先前未暴露过的、含有一个或多个新颖肽结构域的蛋白质。在不同实施例中,肿瘤特异性突变可以是由递送或施用剪接调节剂、ADC或者包含剪接调节剂或ADC的组合物产生的mRNA剪接变体。

[2365] 不受理论束缚,在不同实施例中,递送单独的和作为ADC或组合物的一部分的剪接调节剂可以诱导新颖mRNA剪接(例如外显子跳跃、内含子保留),其导致各种基因的开放阅读框和/或编码序列的改变。在不同实施例中,这些改变的基因被翻译成由免疫系统识别为外源的、含有一个或多个新颖肽结构域的蛋白质。在不同实施例中,在不存在剪接调节剂处理的情况下,该一个或多个新颖肽结构域不存在于该蛋白质或人类蛋白质组的任何其他部分中。在不同实施例中,含有该一个或多个新颖肽结构域的蛋白质可被蛋白酶体降解以产生新颖肽片段,这些新颖肽片段充当例如经由MHC呈递进行的免疫肽呈递机制的底物。在不同实施例中,代表新抗原的新颖肽片段可呈递到例如肿瘤细胞上的MHC1结合的肽组中。

[2366] 在不同实施例中,递送单独的和作为ADC或组合物的一部分的剪接调节剂可能导致一个或多个肿瘤细胞内在事件(例如细胞生长停滞)。在不同实施例中,该一个或多个肿瘤细胞内在事件可能导致:(1)吞噬细胞的参与增强(Bracci等人(2014)Cell Death Differ.[细胞死亡与分化]21(1):15-25);(2)将新颖肽片段转运到肿瘤引流淋巴结以与抗原呈递细胞接合;(3)抗原呈递细胞加工来自吞噬的肿瘤细胞的新颖肽片段,且将这些片段

作为新抗原呈递给循环的初始T细胞群;(4)新颖肽片段与表达将这些片段识别为新抗原的受体的T细胞相互作用;(5)效应T细胞应答的成熟和激活(例如CD4+和/或CD8+T细胞);和/或(6)T细胞与暴露于剪接调节剂治疗的额外肿瘤细胞接合且将代表新抗原的新颖肽片段呈递于其表面MHC1复合体上。在不同实施例中,一个或多个肿瘤细胞内在事件可直接地或间接地导致效应子功能的T细胞接合和/或呈递新抗原的肿瘤细胞的杀伤。

[2367] 另外,不受理论束缚,在不同实施例中,递送单独的和作为ADC或组合物的一部分的剪接调节剂可引起内含子保留的内源性逆转录病毒的重新表达,这引起双链RNA免疫应答。

[2368] 此外,不受理论束缚,在不同实施例中,递送单独的和作为ADC或组合物的一部分的剪接调节剂可导致通过剪接调节剂诱导的突变源性新抗原的释放所触发的免疫原性细胞死亡。在不同实施例中,递送单独的和作为ADC或组合物的一部分的剪接调节剂可诱导双链RNA免疫应答。在不同实施例中,双链RNA免疫应答可由内含子保留的内源性逆转录病毒的重新表达引起。在不同实施例中,双链RNA免疫应答可导致肿瘤细胞死亡。在不同实施例中,递送单独的和作为ADC或组合物的一部分的剪接调节剂可诱导免疫原性细胞死亡。在不同实施例中,免疫原性细胞死亡可由突变源性新抗原的释放和/或针对肿瘤细胞的宿主免疫应答引起。

[2369] 因此,在不同实施例中,披露了治疗方法,该方法包括通过施用一种或多种剪接调节剂和/或ADC和/或包含剪接调节剂或ADC的组合物(例如本文所披露的任何剪接调节剂、ADC或组合物)来诱导新抗原。在不同实施例中,该方法包括施用剂量低于不诱导新抗原所需的剂量的剪接调节剂、ADC或组合物。在一些实施例中,该方法包括施用一个或多个初始诱导剂量以产生新抗原并诱导免疫应答(例如将初始T细胞转化成记忆细胞),随后施用降低的剂量或施用频率(即,由于剪接调节剂、ADC或组合物的组合作用和新抗原的免疫靶向)。在一些实施例中,治疗可包括施用剪接调节剂、ADC或组合物以诱导基于新抗原的免疫应答与施用至少一种额外疗法(例如第二抗癌疗法)的组合。例如,在一些实施例中,治疗可包括施用剪接调节剂、ADC或组合物以诱导基于新抗原的免疫应答与施用一种或多种检查点抑制剂的组合。在一些实施例中,治疗可包括施用剪接调节剂、ADC或组合物以诱导基于新抗原的免疫应答与施用一种或多种细胞因子或细胞因子类似物的组合。在一些实施例中,治疗可包括施用剪接调节剂、ADC或组合物以诱导基于新抗原的免疫应答与施用一种或多种新抗原疫苗的组合。在一些其他实施例中,治疗可包括施用剪接调节剂、ADC或组合物以诱导基于新抗原的免疫应答与施用一种或多种工程化肿瘤靶向性T细胞(例如CAR-T)的组合。

[2370] 在一些实施例中,新抗原可以用于监测剪接调节剂、ADC或组合物治疗的有效性。例如,在施用剪接调节剂、ADC或组合物之后,可以获得患者样品(例如肿瘤活检)并针对新抗原或针对免疫或炎症应答的标识物进行筛选。如果检测到新抗原和/或免疫应答,则可例如以降低的剂量提供进一步的治疗。

[2371] 在不同实施例中,披露了治疗方法,该方法包括通过施用一种或多种剪接调节剂和/或ADC和/或包含剪接调节剂或ADC的组合物(例如本文所披露的任何剪接调节剂、ADC或组合物)来诱导双链RNA免疫应答。

[2372] 在不同实施例中,披露了治疗方法,该方法包括通过施用一种或多种剪接调节剂

和/或ADC和/或包含剪接调节剂或ADC的组合物(例如本文所披露的任何剪接调节剂、ADC或组合物)来诱导免疫原性细胞死亡。

[2373] 在不同实施例中,剪接调节剂、ADC、或包含剪接调节剂的组合物的施用可以与任何已知抗癌疗法组合。可用于肿瘤治疗的当前免疫活化策略的实例包括但不限于用免疫检查点抑制剂(ICI)分子治疗、用细胞因子或细胞因子类似物治疗、用肿瘤相关疫苗进行疫苗接种以及工程化肿瘤靶向性T细胞(例如扩增肿瘤浸润性淋巴细胞或CAR-T)。这些技术主要集中于增强或诱导对已有肿瘤抗原(细胞表面蛋白的突变或异常表达)的免疫应答。这些策略中的一种或多种可能涉及一种或多种能够诱导抗原性T细胞应答的突变。例如,患者对检查点抑制的应答可能与非同义突变负担相关。此外,可以使用依赖于先前存在的突变和这些突变的抗原性的癌症疫苗方法。

[2374] 剪接调节剂和/或包含此类调节剂的ADC可诱导发生在多个谱系中的、转录组的大范围变化。这些mRNA变化的翻译可产生稳健且可再现的蛋白质变化,这些蛋白质变化产生在多个HLA同种型中具有高亲和力的MHC1结合新肽。不受理论束缚,由于转录组和蛋白质组的大量变化,用剪接调节剂和/或ADC的治疗可以富集潜在反应性新抗原的数量以增强适应性免疫应答的参与。

[2375] 如本文所描述,术语“剪接调节剂(splicing modulator)”、“剪接体调节剂”或“剪接调节剂(splice modulator)”是指通过与剪接体各组分相互作用而具有抗癌活性的化合物。在一些实施例中,剪接调节剂改变靶细胞中的剪接速率或形式。充当抑制剂的剪接调节剂例如能够减少不受控制的细胞增殖。特别地,在一些实施例中,剪接调节剂可通过抑制SF3b剪接体复合物起作用。在一些实施例中,剪接调节剂选自本文所披露的剪接调节剂中的任一种或多种。在一些实施例中,剪接调节剂作为单独药剂使用、递送至细胞和/或施用于受试者。在一些其他实施例中,剪接调节剂作为ADC(例如选自本文所披露的示例性ADC中的任一种)的一部分使用、递送至细胞和/或施用于受试者。在一些其他实施例中,剪接调节剂作为包含剪接调节剂的多个拷贝或携带剪接调节剂的ADC的多个拷贝的组合物的一部分使用、递送至细胞和/或施用于受试者。本文中披露了此类组合物。

[2376] 在一些实施例中,作为ADC(例如选自本文所披露的示例性ADC中的任一种的ADC)的一部分使用、递送至细胞和/或施用于受试者的剪接调节剂相对于作为单独药剂使用、递送至细胞、和/或施用于受试者的剪接调节剂提供了增加的治疗益处。例如,在一些实施例中,作为ADC的一部分使用、递送至细胞、和/或施用于受试者的剪接调节剂使剪接调节剂靶向递送至表达靶抗原(即,由ADC中的抗体部分所靶向的抗原)的赘生性细胞。在一些实施例中,剪接调节剂的此类靶向递送使脱靶治疗和/或脱靶细胞毒性减少。在一些实施例中,此类靶向递送促进肿瘤选择性新抗原在赘生性细胞上呈递,而不在不表达靶抗原的健康细胞上呈递。在一些实施例中,此类靶向递送导致在经靶向的赘生性细胞而非脱靶细胞中代表新抗原的新颖mRNA和MHC相关肽的例如至少75%、80%、85%、90%、95%或99%的可变剪接和诱导。因此,不受理论束缚,在一些实施例中,在效应T细胞致敏和/或扩增(例如使用新抗原疫苗)之后,由于在用如本文所披露的ADC治疗之后肿瘤细胞上新抗原的优先表达,免疫系统可优先攻击呈递新抗原的赘生性细胞而非健康细胞。

[2377] 免疫诱导和治疗方案:

[2378] 在不同实施例中,本披露提供了诱导至少一种新抗原的方法,该方法通过使赘生

性细胞与有效量的剪接调节剂、基于剪接调节剂的抗体-药物缀合物(ADC)、或包含剪接调节剂或ADC的组合物接触而实现。在不同实施例中,本披露提供了诱导双链RNA免疫应答的方法,该方法通过使赘生性细胞与有效量的剪接调节剂、基于剪接调节剂的抗体-药物缀合物(ADC)、或包含剪接调节剂或ADC的组合物接触而实现。在不同实施例中,本披露提供了诱导免疫原性细胞死亡的方法,该方法通过使赘生性细胞与有效量的剪接调节剂、基于剪接调节剂的抗体-药物缀合物(ADC)、或包含剪接调节剂或ADC的组合物接触而实现。

[2379] 在一些实施例中,该至少一种新抗原包含SEQ ID NO:37-65中任一个的氨基酸序列。在一些实施例中,该至少一种新抗原包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列。在一些实施例中,该至少一种新抗原包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列。在一些实施例中,该至少一种新抗原包含SEQ ID NO:46-49中任一个的氨基酸序列。

[2380] 在一些实施例中,该赘生性细胞存在于体外细胞培养物中。在一些实施例中,该赘生性细胞获得自受试者。在一些实施例中,该赘生性细胞存在于受试者体内。在一些实施例中,该赘生性细胞源自血液恶性病或实体瘤。在一些实施例中,该血液恶性病选自B细胞恶性病、白血病、淋巴瘤和骨髓瘤。在一些实施例中,该血液恶性病选自急性骨髓性白血病和多发性骨髓瘤。在一些实施例中,该实体瘤选自乳腺癌(例如HER2阳性乳腺癌)、胃癌(例如胃腺癌)、前列腺癌、卵巢癌、肺癌(例如肺腺癌)、子宫癌(例如子宫浆液性子宫内膜癌)、涎腺导管癌、黑素瘤、结肠癌、宫颈癌、胰腺癌、肾癌、结肠直肠癌和食道癌。在一些实施例中,该实体瘤选自HER2阳性乳腺癌、胃腺癌、前列腺癌和骨肉瘤。

[2381] 在不同实施例中,本披露进一步提供了在患有或疑似患有赘生性病症的受试者中诱导至少一种新抗原和/或T细胞应答的方法,该方法通过向该受试者施用有效量的剪接调节剂、ADC、或包含剪接调节剂或ADC的组合物来实现。在不同实施例中,本文还提供了治疗患有或疑似患有赘生性病症的受试者的方法,该方法通过向该受试者施用有效量的剪接调节剂、ADC、或包含剪接调节剂或ADC的组合物来实现,其中该剪接调节剂、抗体-药物缀合物、或组合物的施用诱导至少一种新抗原和/或T细胞应答。

[2382] 在各种其他实施例中,本披露提供了在患有或疑似患有赘生性病症的受试者中诱导双链RNA免疫应答的方法,该方法通过向该受试者施用有效量的剪接调节剂、ADC、或包含剪接调节剂或ADC的组合物来实现。在不同实施例中,本文还提供了治疗患有或疑似患有赘生性病症的受试者的方法,该方法通过向该受试者施用有效量的剪接调节剂、ADC、或包含剪接调节剂或ADC的组合物来实现,其中该剪接调节剂、抗体-药物缀合物、或组合物的施用诱导双链RNA免疫应答。

[2383] 在仍其他实施例中,本披露提供了在患有或疑似患有赘生性病症的受试者中诱导免疫原性细胞死亡的方法,该方法通过向该受试者施用有效量的剪接调节剂、ADC、或包含剪接调节剂或ADC的组合物来实现。在不同实施例中,本文进一步提供了治疗患有或疑似患有赘生性病症的受试者的方法,该方法通过向该受试者施用有效量的剪接调节剂、ADC、或包含剪接调节剂或ADC的组合物来实现,其中该剪接调节剂、抗体-药物缀合物、或组合物的施用诱导免疫原性细胞死亡。

[2384] 在本文所描述的治疗方法的一些实施例中,该至少一种新抗原包含SEQ ID NO:37-65中任一个的氨基酸序列。在一些实施例中,该至少一种新抗原包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列。在一些实施例中,该至少一种新抗原包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列。在一些实

施例中,该至少一种新抗原包含SEQ ID NO:46-49中任一个的氨基酸序列。

[2385] 在一些实施例中,本披露进一步提供了治疗患有或疑似患有赘生性病症的受试者的方法,该方法通过向该受试者施用有效量的剪接调节剂、ADC、或包含剪接调节剂或ADC的组合物来实现,其中该剪接调节剂、抗体-药物缀合物、或组合物的施用与一种或多种包含第二药剂的额外疗法的组合诱导免疫原性细胞死亡。

[2386] 在本文所描述的治疗方法的一些实施例中,相较于该剪接调节剂、抗体-药物缀合物、组合物或第二药剂的标准剂量,该剪接调节剂、抗体-药物缀合物、组合物或第二药剂的施用量因至少一种新抗原和/或T细胞应答的诱导而减少。在一些实施例中,该剪接调节剂、抗体-药物缀合物、组合物或第二药剂的施用量相较于该剪接调节剂、抗体-药物缀合物、组合物或第二药剂的标准剂量减少10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、75%或90%。在一些实施例中,该剪接调节剂、抗体-药物缀合物、组合物或第二药剂的施用频率比该剪接调节剂、抗体-药物缀合物、组合物或第二药剂的标准给药方案低至少10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、75%或90%。在一些实施例中,该剪接调节剂、抗体-药物缀合物、组合物或第二药剂的施用量和/或剂量导致较低的全身性毒性和/或改善的耐受性。

[2387] 如本文所使用,术语"标准剂量"或"标准给药方案"是指治疗剂的任何常用或常规给药方案,例如由制造商提出、经管理机构批准或以其他方式在人类受试者中经测试满足平均患者需求的方案。在一些实施例中,该治疗剂是具有抗癌活性的剪接调节剂、抗体、或抗体-药物缀合物。

[2388] 例如,曲妥珠单抗(本文所披露的示例性抗HER2抗体)的标准给药方案可为经90分钟静脉内施用8mg/kg(第1周),随后每3周(第4周至治疗周期结束时)经30-90分钟静脉内施用6mg/kg(Herceptin®(曲妥珠单抗)FDA标签补充,2017)。

[2389] 作为另一实例,伊匹单抗(ipilimumab,示例性抗CTLA4检查点抑制剂抗体)的标准给药方案可为每3周经90分钟静脉内施用3mg/kg,持续4次剂量(Yervoy®(伊匹单抗)FDA标签补充,2018)。伊匹单抗的另一种标准给药方案可为每3周经90分钟静脉内施用10mg/kg,持续4次剂量,随后每12周施用10mg/kg,持续长达3年(Yervoy®(伊匹单抗)FDA标签补充,2018)。

[2390] 作为另一实例,纳武单抗(nivolumab,示例性抗PD1检查点抑制剂抗体)的标准给药方案可为每2周经60分钟静脉内施用3mg/kg(Opdivo®(纳武单抗)FDA标签补充,2015)。

[2391] 作为另一实例,阿特珠单抗(atezolizumab,示例性抗PDL1检查点抑制剂抗体)的标准给药方案可为每3周经60分钟静脉内施用1200mg(Tecentriq®(阿特珠单抗)FDA标签补充,2018)。

[2392] 作为又另一实例,T-DM1(示例性抗HER2抗体-药物缀合物)的标准给药方案可为每3周经90分钟静脉内施用3.6mg/kg(Kadcyla®(T-DM1)FDA标签补充,2016)。

[2393] 在一些实施例中,本文所描述的方法可进一步包括施用至少一种额外疗法(例如检查点抑制剂、新抗原疫苗、细胞因子或细胞因子类似物、CAR-T等)。在一些实施例中,相较

于该剪接调节剂、抗体-药物缀合物、组合物、和/或该至少一种额外疗法的标准剂量，该剪接调节剂、抗体-药物缀合物、组合物、和/或该至少一种额外疗法的施用量因至少一种新抗原和/或T细胞应答的诱导而减少。在一些实施例中，相较于该剪接调节剂、抗体-药物缀合物、组合物、和/或该至少一种额外疗法的标准剂量，该剪接调节剂、抗体-药物缀合物、组合物、和/或该至少一种额外疗法的施用量因双链RNA免疫应答的诱导而减少。在一些实施例中，相较于该剪接调节剂、抗体-药物缀合物、组合物、和/或该至少一种额外疗法的标准剂量，该剪接调节剂、抗体-药物缀合物、组合物、和/或该至少一种额外疗法的施用量因免疫原性细胞死亡的诱导而减少。在一些实施例中，该剪接调节剂、抗体-药物缀合物、组合物、和/或该至少一种额外疗法的施用量相较于该剪接调节剂、抗体-药物缀合物、组合物、和/或该至少一种额外疗法的标准剂量减少10％、15％、20％、25％、30％、35％、40％、45％、50％、75％或90％。在一些实施例中，该剪接调节剂、抗体-药物缀合物、组合物、和/或该至少一种额外疗法的施用频率比该剪接调节剂、抗体-药物缀合物、组合物、和/或该至少一种额外疗法的标准给药方案低至少10％、15％、20％、25％、30％、35％、40％、45％、50％、75％或90％。在一些实施例中，该剪接调节剂、抗体-药物缀合物、组合物、和/或该至少一种额外疗法的施用量和/或剂量导致较低的全身性毒性和/或改善的耐受性。

[2394] 在一些实施例中，该剪接调节剂、抗体-药物缀合物、或组合物的施用是在施用该至少一种额外疗法之前起始。在其他实施例中，该剪接调节剂、抗体-药物缀合物、或组合物的施用是在施用该至少一种额外疗法之后起始。在又其他实施例中，该剪接调节剂、抗体-药物缀合物、或组合物的施用是与该至少一种额外疗法的施用同时起始。

[2395] 在一些实施例中，在初始施用之后，重复施用该剪接调节剂、抗体-药物缀合物、或组合物至少一次。在一些实施例中，用于重复施用的该剪接调节剂、抗体-药物缀合物、或组合物的量相较于用于初始施用的量有所减少。在一些实施例中，用于重复施用的该剪接调节剂、抗体-药物缀合物、或组合物的量相较于该剪接调节剂、抗体-药物缀合物、或组合物的标准剂量有所减少。在一些实施例中，用于重复施用的该剪接调节剂、抗体-药物缀合物、或组合物的量相较于该剪接调节剂、抗体-药物缀合物、或组合物的标准剂量或初始剂量减少10％、15％、20％、25％、30％、35％、40％、45％、50％、75％或90％。

[2396] 在一些实施例中，在初始施用后，重复施用该至少一种额外疗法至少一次。在一些实施例中，用于重复施用的该至少一种额外疗法的量相较于用于初始施用的量有所减少。在一些实施例中，用于重复施用的该至少一种额外疗法的量相较于该至少一种额外疗法的标准剂量有所减少。在一些实施例中，用于重复施用的该至少一种额外疗法的量相较于该至少一种额外疗法的标准剂量或初始剂量减少10％、15％、20％、25％、30％、35％、40％、45％、50％、75％或90％。

[2397] 在一些实施例中，该剪接调节剂、抗体-药物缀合物、或组合物的重复施用是与该至少一种额外疗法的重复施用同时进行。在一些实施例中，该剪接调节剂、抗体-药物缀合物、或组合物的重复施用是与该至少一种额外疗法的重复施用依序或错开进行。

[2398] 在一些实施例中，该至少一种额外疗法包括施用检查点抑制剂，例如本文所披露的任何检查点抑制剂。在一些实施例中，该受试者对单独施用时的检查点抑制剂不耐受、无响应或响应不良。在一些实施例中，该检查点抑制剂靶向PD1/PDL1、CTLA4、OX40、CD40、LAG3、TIM3、GITR和/或KIR。在一些实施例中，该检查点抑制剂靶向CTLA4、OX40、CD40和/或

GITR。在一些实施例中,该检查点抑制剂是对其靶标具有抑制或激动活性的抗体。在一些实施例中,检查点抑制剂与抑制性抗体或其他类似抑制性分子一起靶向。在其他实施例中,检查点抑制剂与激动剂抗体或其他类似激动剂分子一起靶向。

[2399] 在一些其他实施例中,该至少一种额外疗法包括施用新抗原疫苗,例如本文所披露的任何新抗原疫苗。在一些实施例中,该剪接调节剂、ADC或组合物是在施用该新抗原疫苗之前施用。在一些实施例中,该剪接调节剂、ADC或组合物是在施用该新抗原疫苗之后施用。在一些实施例中,该剪接调节剂、ADC或组合物的施用是与该新抗原疫苗的施用同时进行。在一些实施例中,在初始施用之后,重复施用该剪接调节剂、ADC或组合物至少一次。在一些实施例中,用于重复施用的该剪接调节剂、ADC或组合物的量相较于用于初始施用的量有所减少。

[2400] 在一些实施例中,该新抗原疫苗包含至少一种新抗原肽。在一些实施例中,该至少一种新抗原肽的长度在约10个至约50个氨基酸范围内。在一些实施例中,该至少一种新抗原肽的长度在约10个至约35个氨基酸范围内。在一些实施例中,该至少一种新抗原肽的长度在约15个至约25个氨基酸范围内。在一些实施例中,该至少一种新抗原肽包含一个或超过一个新抗原序列。

[2401] 在一些实施例中,该新抗原序列包含SEQ ID NO:37-65中任一个的氨基酸序列。在一些实施例中,该新抗原序列包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列。在一些实施例中,该新抗原序列包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列。在一些实施例中,该新抗原序列包含SEQ ID NO:46-49中任一个的氨基酸序列。

[2402] 在一些其他实施例中,该新抗原序列包含SEQ ID NO:66-93中任一个的氨基酸序列、或SEQ ID NO:66-93中任一个的抗原部分。在一些实施例中,该新抗原序列包含SEQ ID NO:66的氨基酸序列、或SEQ ID NO:66的抗原部分。在一些实施例中,该新抗原序列包含SEQ ID NO:74-77中任一个的氨基酸序列、或SEQ ID NO:74-77中任一个的抗原部分。在一些实施例中,该新抗原序列和/或抗原部分的长度在约10个至约50个氨基酸范围内。在一些实施例中,该新抗原序列和/或抗原部分的长度在约10个至约35个氨基酸范围内。在一些实施例中,该新抗原序列和/或抗原部分的长度在约15个至约25个氨基酸范围内。在一些实施例中,该新抗原序列和/或抗原部分的长度在约10个至约20个氨基酸范围内。在一些实施例中,该新抗原序列和/或抗原部分不排他性地与典型肽序列重叠或由典型肽序列组成(例如,表21中加下划线的任何示例性典型肽序列)。

[2403] 如本文所使用,术语新抗原序列的“抗原部分”或“抗原片段”是指新抗原序列中保持诱导T细胞应答(例如,抗原特异性扩增和/或一个或多个效应T细胞群的成熟)的能力的一个或多个片段。在一些实施例中,抗原部分还可保留被抗原呈递细胞(例如树突状细胞)内化、加工和/或呈递的能力。在一些实施例中,抗原部分还保留T细胞致敏功能。在一些实施例中,新抗原序列的抗原部分的长度在约10个至约50个氨基酸范围内。在一些实施例中,新抗原序列的抗原部分的长度在约10个至约35个氨基酸范围内。在一些实施例中,新抗原序列的抗原部分的长度在约15个至约25个氨基酸范围内。在一些实施例中,新抗原序列的抗原部分的长度在约10个至约20个氨基酸范围内。在一些实施例中,将新抗原序列的抗原部分(例如SEQ ID NO:66-93中任一个的抗原部分)或其编码mRNA配制为新抗原疫苗。

[2404] 抗原部分的一个示例性实施例是侧接SEQ ID NO:66的氨基酸45-53的一个或多个

区域。抗原部分的另一示例性实施例是侧接SEQ ID NO:66的氨基酸82-90的一个或多个区域。在一些实施例中,该抗原部分能够结合至受试者体内表达的至少一个HLA等位基因(例如HLA-A*02:01)。在一些其他实施例中,该抗原部分能够结合至罹患赘生性病症的受试者群体中至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%或至少45%的受试者体内表达的至少一个HLA等位基因。在一些实施例中,该抗原部分能够针对存在于罹患赘生性病症的受试者群体的至少1%、至少5%或至少10%中的肿瘤引起T细胞应答。

[2405] 在一些实施例中,抗原部分不排他性地与典型肽序列重叠或由典型肽序列组成。如本文所使用,术语"典型肽序列"是指在不与剪接调节剂接触的情况下(例如,在不与单独的和/或作为ADC或组合物的一部分的剪接调节剂接触的情况下),存在于人类蛋白质组中和/或先前已暴露于免疫的任何连续肽序列。在一些实施例中,该典型肽序列源自典型转录物开放阅读框和/或由典型转录物开放阅读框编码。示例性典型肽序列在表21中加下划线。

[2406] 在一些实施例中,当施用剪接调节剂(例如单独的和/或作为ADC或组合物的一部分)时,典型肽序列可源自紧邻在剪接调节剂所诱导的异常剪接事件之前的5'框内24个核苷酸和/或由其编码。因此,在一些实施例中,典型肽序列包含紧邻剪接调节剂所诱导的新抗原序列的N-末端的8个氨基酸或由其组成。在一些实施例中,当5'外显子序列以密码子的末端核苷酸终止时,典型肽序列终止于该外显子的末端。在一些其他实施例中,当5'外显子序列以密码子的三个核苷酸中的一个或两个终止时,典型肽序列源自该不完整密码子之前的24个核苷酸和/或由其编码。在一些实施例中,在异常剪接事件的3'处的mRNA序列可在源自5'外显子的相同开放阅读框中翻译,直至达到终止密码子,之后可终止翻译。在一些实施例中,当异常剪接事件(例如外显子跳跃)导致典型转录物开放阅读框的保守时,可翻译C-末端序列的另外24个核苷酸(其编码8个C-末端氨基酸)。在此上下文中,在一些实施例中,仅跨异常外显子接合点的区域可编码新抗原序列。在一些实施例中,当开放阅读框移位(例如内含子保留)时,完整C-末端序列(由3'mRNA编码)可编码新抗原序列。

[2407] 在一些实施例中,通过比较新抗原序列与典型肽序列,以及选择不排他性地与典型肽序列重叠、由典型肽序列组成和/或与典型肽序列对准的新抗原序列的一部分来选择新抗原序列的抗原部分。在一些实施例中,可以以与全长新抗原序列(例如从其得到抗原部分的新抗原序列)相同的方式,针对抗原性和/或T细胞致敏功能筛选新抗原序列的抗原部分。在一些实施例中,使用T细胞致敏测定,如本文所描述的示例性T细胞致敏实验,评价新抗原序列的抗原部分的抗原性和/或T细胞致敏功能。

[2408] 在一些实施例中,该新抗原序列是受试者特有的新抗原序列。在一些实施例中,该新抗原序列是针对受试者的个性化新抗原疫苗。在一些实施例中,用于产生针对受试者的个性化新抗原疫苗的新抗原序列能够结合至受试者体内表达的至少一个HLA等位基因。在一些实施例中,通过例如在施用剪接调节剂或ADC之后,鉴定受试者的肿瘤中表达的新抗原,并选择在患者的肿瘤中所观察到的包含新抗原序列的疫苗,例如在肿瘤中观察到的包含SEQ ID NO:37-65中任一个的氨基酸序列的疫苗,来选择个性化新抗原疫苗。

[2409] 术语"个性化"当用于描述新抗原疫苗时是指通过以下产生的疫苗:鉴定在患者体内产生的一种或多种新抗原,优选地在暴露于剪接调节剂、ADC或组合物之后于患者体内鉴定的新抗原,然后使用这些新抗原中的一种或多种作为针对同一患者的疫苗的基础。因此,

在一些实施例中,给予患者剪接调节剂、ADC或组合物并筛选由该治疗产生的新抗原。在一些实施例中,所选新抗原疫苗包含本文所披露的并确定在暴露于剪接调节剂、ADC或组合物之后存在于患者体内的新抗原肽或mRNA。在一些实施例中,可向患者施用一次或重复施用剪接调节剂、ADC或组合物和/或肽或mRNA疫苗。随后,在一些实施例中,使用这些新抗原中的一种或多种产生给予患者的个性化疫苗。在一些实施例中,用于产生个性化疫苗的一种或多种新抗原对一个或多个患者特异性HLA等位基因具有结合亲和力。在一些实施例中,患者表达结合至一种或多种新抗原的一个或多个MHC1等位基因。可使用本领域已知的任何计算预测方法来确定有关给定新抗原是否会结合至特定MHC1等位基因的预测。示例性计算预测方法披露于例如Meydan等人(2013)BMC Bioinformatics[BMC生物信息学]14(增刊2):S13,将该文献关于此类方法通过引用并入本文。

[2410] 在一些其他实施例中,该新抗原序列是通用新抗原序列。在一些实施例中,该新抗原序列是通用新抗原疫苗。

[2411] 术语“通用”当用于描述新抗原疫苗时是指具有基于一种或多种常见或已知新抗原的肽或mRNA序列的疫苗,该肽或mRNA序列是通过对多个患者和/或患者组织样品中产生的新抗原进行测序(优选地在暴露于剪接调节剂、ADC或组合物之后)所观察到的。该疫苗中使用的肽或mRNA序列不必存在于每个患者体内,而是在至少几个患者或患者组织样品中观察到。在一些实施例中,可向患者施用一次或重复施用剪接调节剂、ADC或组合物和/或肽或mRNA疫苗。随后,在一些实施例中,使用该肽或mRNA序列对其他患者进行疫苗接种。在一些实施例中,给予患者剪接调节剂、ADC或组合物,然后给予已知新抗原的肽或mRNA疫苗,以增强针对由该剪接调节剂、ADC或组合物产生的新抗原的免疫应答。在一些实施例中,给予患者通用肽或mRNA疫苗,然后给予一次或重复给予剪接调节剂、ADC或组合物。在一些实施例中,基于给定患者群体中总体MHC1等位基因频率选择用于产生通用新抗原疫苗的新抗原序列(或多个序列)(Maiers等人(2007)Hum.Immunol.[人类免疫学]68(9):779-88)。

[2412] 在一些实施例中,该新抗原(例如通用新抗原)序列能够结合至罹患赘生性病症的受试者群体中至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%或至少45%的受试者体内表达的至少一个HLA等位基因。在一些实施例中,该新抗原序列能够针对存在于罹患赘生性病症的受试者群体的至少1%、至少5%或至少10%中的肿瘤引起T细胞应答。

[2413] 在一些实施例中,已通过对受试者中由施用有效量的剪接调节剂、抗体-药物缀合物、或组合物诱导的至少一种新抗原肽或其编码mRNA进行测序而鉴定了新抗原序列。在一些实施例中,该至少一种新抗原肽包含通过使赘生性细胞与有效量的剪接调节剂、抗体-药物缀合物、或组合物接触而诱导的新抗原序列。在一些实施例中,该赘生性细胞存在于体外细胞培养物中。在一些实施例中,该赘生性细胞获得自受试者。在一些实施例中,该赘生性细胞存在于受试者体内。

[2414] 在一些实施例中,该新抗原疫苗包含至少一种新抗原肽和药学上可接受的载体(例如本文所描述的任何示例性载体)。在一些实施例中,该至少一种新抗原肽与药学上可接受的载体连接。在一些实施例中,该药学上可接受的载体选自肽、血清白蛋白、钥孔戚血蓝蛋白、免疫球蛋白、甲状腺球蛋白、卵白蛋白、类毒素或减毒的类毒素衍生物、细胞因子和趋化因子。在一些实施例中,该新抗原肽和该药学上可接受的载体经由接头共价连接。在一

些实施例中,该新抗原肽和该药学上可接受的载体表达为融合蛋白。在一些实施例中,该新抗原疫苗包含至少一种新抗原肽和药学上可接受的稀释剂。在一些实施例中,该新抗原疫苗包含至少一种新抗原肽和药学上可接受的佐剂。

[2415] 在一些实施例中,该新抗原疫苗包含至少一种新抗原mRNA。在一些实施例中,该至少一种新抗原mRNA编码一个或超过一个新抗原序列。在一些实施例中,该新抗原序列包含SEQ ID NO:37-65中任一个的氨基酸序列。在一些实施例中,该新抗原序列包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列。在一些实施例中,该新抗原序列包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列。在一些实施例中,该新抗原序列包含SEQ ID NO:46-49中任一个的氨基酸序列。

[2416] 在一些其他实施例中,该新抗原序列包含SEQ ID NO:66-93中任一个的氨基酸序列、或SEQ ID NO:66-93中任一个的抗原部分。在一些实施例中,该新抗原序列包含SEQ ID NO:66的氨基酸序列、或SEQ ID NO:66的抗原部分。在一些实施例中,该新抗原序列包含SEQ ID NO:74-77中任一个的氨基酸序列、或SEQ ID NO:74-77中任一个的抗原部分。在一些实施例中,该新抗原序列和/或抗原部分的长度在约10个至约50个氨基酸范围内。在一些实施例中,该新抗原序列和/或抗原部分的长度在约10个至约35个氨基酸范围内。在一些实施例中,该新抗原序列和/或抗原部分的长度在约15个至约25个氨基酸范围内。在一些实施例中,该新抗原序列和/或抗原部分的长度在约10个至约20个氨基酸范围内。在一些实施例中,该新抗原序列和/或抗原部分不排他性地与典型肽序列重叠或由典型肽序列组成(例如,表21中加下划线的任何示例性典型肽序列)。

[2417] 在一些实施例中,该新抗原序列是受试者特有的新抗原序列。在一些实施例中,该新抗原序列是针对受试者的个性化新抗原疫苗。在一些实施例中,该新抗原序列能够结合至受试者体内表达的至少一个HLA等位基因。

[2418] 在一些其他实施例中,该新抗原序列是通用新抗原序列。在一些实施例中,该新抗原序列是通用新抗原疫苗。在一些实施例中,该新抗原序列能够结合至罹患赘生性病症的受试者群体中至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%或至少45%的受试者体内表达的至少一个HLA等位基因。在一些实施例中,该新抗原序列能够针对存在于罹患赘生性病症的受试者群体的至少1%、至少5%或至少10%中的肿瘤引起T细胞应答。

[2419] 在一些实施例中,已通过对至少一种新抗原的蛋白质序列进行测序而鉴定了新抗原序列。在一些实施例中,已通过对编码受试者中由施用有效量的剪接调节剂、抗体-药物缀合物、或组合物诱导的新抗原的至少一个mRNA进行测序而鉴定了新抗原序列。在一些实施例中,该至少一种新抗原mRNA编码通过使赘生性细胞与有效量的剪接调节剂、抗体-药物缀合物、或组合物接触而诱导的新抗原序列。在一些实施例中,该赘生性细胞存在于体外细胞培养物中。在一些实施例中,该赘生性细胞获得自受试者。在一些实施例中,该赘生性细胞存在于受试者体内。

[2420] 在一些实施例中,该新抗原疫苗包含至少一种新抗原mRNA和药学上可接受的载体(例如本文所描述的任何示例性载体)。在一些实施例中,该至少一种新抗原mRNA与药学上可接受的载体连接。在一些实施例中,该药学上可接受的载体选自肽、血清白蛋白、钥孔戚血蓝蛋白、免疫球蛋白、甲状腺球蛋白、卵白蛋白、类毒素或减毒的类毒素衍生物、细胞因子和趋化因子。在一些实施例中,该新抗原疫苗包含至少一种新抗原mRNA和药学上可接受的

稀释剂。在一些实施例中,该新抗原疫苗包含至少一种新抗原mRNA和药学上可接受的佐剂。在一些实施例中,该新抗原mRNA通过包封剂包封。在一些实施例中,该包封剂是脂质体。在一些实施例中,该包封剂是纳米颗粒。

[2421] 在一些实施例中,该至少一种额外疗法包括施用细胞因子或细胞因子类似物,例如本文所披露的任何细胞因子或细胞因子类似物。在一些实施例中,该受试者对单独施用时的该细胞因子或细胞因子类似物不耐受、无响应或响应不良。在一些实施例中,该细胞因子或细胞因子类似物包含T细胞增强子。在一些实施例中,该细胞因子或细胞因子类似物包含IL-2、IL-10、IL-12、IL-15、IFNγ和/或TNFα。在一些实施例中,该细胞因子或细胞因子类似物包含IL-2、IL-10、IL-12和/或IL-15。在一些实施例中,在施用剪接调节剂、抗体-药物缀合物、或组合物之后,由于新抗原的诱导和呈递,施用该细胞因子或细胞因子类似物使T细胞致敏增强。

[2422] 在一些实施例中,该至少一种额外疗法包括施用工程化的肿瘤靶向性T细胞(即,CAR-T),例如本文所披露的任何CAR-T疗法。

[2423] 在一些实施例中,本文所描述的方法可进一步包括在施用该剪接调节剂、抗体-药物缀合物、或组合物之后,检测该受试者中的一种或多种新抗原和/或T细胞应答,且如果检测到一种或多种新抗原和/或T细胞应答,则任选地继续施用该剪接调节剂、抗体-药物缀合物、或组合物。在一些实施例中,在该受试者中检测到一种或多种新抗原和/或T细胞应答表明用该剪接调节剂、抗体-药物缀合物、或组合物治疗的功效。在一些实施例中,如果检测到一种或多种新抗原和/或T细胞应答,则继续用该额外疗法以及剪接调节剂、抗体-药物缀合物、或组合物进行治疗。在一些实施例中,如果检测到一种或多种新抗原和/或T细胞应答,则以降低的剂量和/或频率继续治疗。

[2424] 在一些实施例中,本文所描述的方法可进一步包括在施用该剪接调节剂、抗体-药物缀合物、或组合物之后,检测该受试者中的双链RNA免疫应答,且如果检测到双链RNA免疫应答,则任选地继续施用该剪接调节剂、抗体-药物缀合物、或组合物。在一些实施例中,检测到该受试者中的双链RNA免疫应答表明用该剪接调节剂、抗体-药物缀合物、或组合物治疗的功效。在一些实施例中,如果检测到双链RNA免疫应答,则继续用该额外疗法以及剪接调节剂、抗体-药物缀合物、或组合物进行治疗。在一些实施例中,如果检测到双链RNA免疫应答,则以降低的剂量和/或频率继续治疗。

[2425] 在一些实施例中,本文所描述的方法可进一步包括在施用该剪接调节剂、抗体-药物缀合物、或组合物之后,检测该受试者中的免疫原性细胞死亡,且如果检测到免疫原性细胞死亡,则任选地继续施用该剪接调节剂、抗体-药物缀合物、或组合物。在一些实施例中,检测到该受试者中的免疫原性细胞死亡表明用该剪接调节剂、抗体-药物缀合物、或组合物治疗的功效。在一些实施例中,如果检测到免疫原性细胞死亡,则继续用该额外疗法以及剪接调节剂、抗体-药物缀合物、或组合物进行治疗。在一些实施例中,如果检测到免疫原性细胞死亡,则以降低的剂量和/或频率继续治疗。

[2426] 在一些实施例中,该受试者具有约150个突变或更少的非同义突变负荷。在一些实施例中,该受试者具有约100个突变或更少的非同义突变负荷。在一些实施例中,该受试者具有约50个突变或更少的非同义突变负荷。在一些实施例中,该受试者患有或疑似患有赘生性病症,例如血液恶性病或实体瘤。在一些实施例中,该血液恶性病选自B细胞恶性病、白

血病、淋巴瘤和骨髓瘤。在一些实施例中,该血液恶性病选自急性骨髓性白血病和多发性骨髓瘤。在一些实施例中,该实体瘤选自乳腺癌、胃癌、前列腺癌、卵巢癌、肺癌、子宫癌、涎腺导管癌、黑素瘤、结肠癌、宫颈癌、胰腺癌、肾癌、结肠直肠癌和食道癌。在一些实施例中,该实体瘤选自HER2阳性乳腺癌、胃腺癌、前列腺癌和骨肉瘤。

[2427] 在不同实施例中,本披露进一步提供了治疗患有或疑似患有赘生性病症的受试者的方法,该方法包括:(a)向该受试者施用有效量的剪接调节剂、ADC、或包含剪接调节剂或ADC的组合物,其中施用该剪接调节剂、抗体-药物缀合物、或组合物诱导至少一种新抗原和/或T细胞应答;(b)在施用该剪接调节剂、抗体-药物缀合物、或组合物之后,在该受试者中检测一种或多种新抗原和/或T细胞应答;以及(c)如果检测到一种或多种新抗原和/或T细胞应答,则继续施用该剪接调节剂、抗体-药物缀合物、或组合物。在一些实施例中,在该受试者中检测到一种或多种新抗原和/或T细胞应答表明用该剪接调节剂、抗体-药物缀合物、或组合物治疗的功效。在一些实施例中,该一种或多种新抗原包含SEQ ID NO:37-65中任一个的氨基酸序列。在一些实施例中,该一种或多种新抗原包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列。在一些实施例中,该一种或多种新抗原包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列。在一些实施例中,该一种或多种新抗原包含SEQ ID NO:46-49中任一个的氨基酸序列。

[2428] 剪接调节剂/ADC与免疫检查点抑制的组合:

[2429] 在不同实施例中,患有如本文中所描述的癌症的患者可以用剪接调节剂、ADC或组合物与检查点抑制剂疗法的组合进行治疗。免疫检查点是减慢或终止免疫反应且防止免疫细胞不受控制的活性造成过度组织损伤的抑制性途径。如本文所使用,术语“检查点抑制剂”意指抑制一个或多个抑制性途径,由此允许更广泛的免疫活性的任何治疗剂,包括任何小分子化合物、抗体、核酸分子或多肽、或其任何片段。

[2430] 已显示用免疫检查点抑制治疗患者在某些临床适应症中具有稳健功效。最近,FDA批准在具有展现高微卫星不稳定性、对组织谱系不可知的肿瘤的患者中使用检查点抑制剂。此批准部分基于应答率与突变负担正相关的观察结果(Rizvi等人(2015)Science[科学]348(6230):124-8;Hellmann等人(2018)Cancer Cell[癌细胞]33(5):853-861)。来自文献的估计值在绝对数量和谱系上有所不同,但通常都支持高于约150-250个突变的阈值,应答几率增加。TCGA数据的分析表明,大百分比成年发作型肿瘤谱系具有相对较低的非同义突变负担(Vogelstein等人(2013)Science[科学]339:1549-58)。大多数谱系的中位非同义突变率为每位患者约30-80个,远低于对检查点抑制剂的提高的应答几率的阈值。

[2431] 例如,已显示HER2阳性乳腺癌具有每个患者样品约60个非同义突变的中位值。然而,如上文所提及,检查点抑制剂治疗功效的阈值估计在约150-250个非同义突变范围内,即高于此阈值的患者更可能显示完全缓解、部分缓解、和/或稳定疾病,而低于此阈值的患者更可能表现出进行性疾病。因此,提高肿瘤细胞上呈递的非同义突变和/或新抗原的表观数目的策略是希望的,并且可提高例如对检查点抑制剂疗法的总应答几率。由于细胞因子(及其类似物)经由相似的作用机制起作用,因此此类策略也可提高对基于细胞因子的疗法的总应答几率。

[2432] HER2阳性乳腺癌的当前应答率为约15%-25%(CTI NCT 02129556)。在本文所披露的不同实施例中,用剪接调节剂、ADC或组合物与检查点抑制剂和/或细胞因子疗法的组合进行的治疗可以改善这种应答率。在不同实施例中,用剪接调节剂、ADC或组合物与检查

点抑制剂和/或细胞因子疗法的组合进行的治疗可适用于任何成年发作型肿瘤,特别是中值非同义突变率低于所估计的约150个突变阈值的肿瘤。在不同实施例中,适合于用单独的或与额外疗法(例如检查点抑制剂疗法、细胞因子疗法)组合的本披露的剪接调节剂、ADC或组合物治疗的示例性癌症类型包括但不限于食道癌、非霍奇金氏淋巴瘤、结肠直肠癌、头颈癌、胃癌、子宫内膜癌、胰腺癌、卵巢癌、前列腺癌、肝细胞癌、胶质母细胞瘤、乳腺癌(例如HER2阳性乳腺癌)、肺癌(例如非小细胞肺癌)、慢性淋巴细胞性白血病和急性骨髓性白血病。其他示例性的合适的癌症类型例如在Vogelstein等人(2013)Science[科学]339:1549-58中鉴别,将该文献以其全文通过引用并入本文。

[2433] 由于许多检查点抑制剂疗法均基于肿瘤相关抗原的慢性表达,因此需要定期治疗加强功效和"再加强"反应性T细胞群。本文所描述的剪接调节剂源性或ADC源性的新抗原的可诱导性提供了治疗性给药方案,这些给药方案可设计成用于增强新抗原反应性T细胞的免疫应答,同时限制通常由慢性抗原刺激引起的T细胞耗竭。例如,在一些实施例中,将初始剂量的剪接调节剂、ADC或组合物施用于受试者以触发异常剪接和新抗原肽的产生。在允许蛋白质产生和抗原呈递一段时间之后,在一些实施例中,然后向受试者施用初始剂量的检查点抑制剂以加强和/或增强效应T细胞致敏和扩增。在一些实施例中,剪接调节剂、ADC或组合物与检查点抑制剂的剂量之间的等待期是约2天、约3天、约4天、约5天、约6天或约7天。在一些实施例中,等待期是在约3天与约5天之间。在一些实施例中,该检查点抑制剂靶向CTLA4、OX40、CD40和/或GITR。在一些实施例中,剪接调节剂、ADC或组合物与检查点抑制剂的组合治疗益处可为加和性的或超加性的。

[2434] 在一些实施例中,在允许T细胞致敏和扩增的一段时间之后,然后向受试者施用剪接调节剂、ADC或组合物的第二或后续剂量以触发新抗原肽的重新呈递。在一些实施例中,检查点抑制剂的初始剂量与剪接调节剂、ADC或组合物的第二或后续剂量之间的等待期是约2周、约3周、约4周或约5周。在一些实施例中,等待期是约3周。在剪接调节剂、ADC或组合物的第二或后续剂量之后,在一些实施例中,免疫系统可以与呈递新抗原的肿瘤细胞接合和/或引起肿瘤细胞杀伤。在一些实施例中,然后向受试者施用第二或后续剂量的检查点抑制剂,以在允许二次T细胞致敏和扩增之后进一步扩增记忆效应T细胞群。

[2435] 在一些实施例中,在此示例性初始治疗方案之后给予剪接调节剂、ADC或组合物可为脉冲式的,即,可以较长时间间隔(例如约每4周、约每5周、约每6周)给予剪接调节剂、ADC或组合物,以允许抗原呈递、T细胞接合和/或肿瘤细胞杀伤、和/或记忆T细胞群的恢复。在随后的时间点,在一些实施例中,剪接调节剂、ADC或组合物的治疗可以与一种或多种旨在恢复针对耗竭的T细胞群的效应子功能的检查点抑制剂组合。例如,在一些实施例中,在随后的时间点,剪接调节剂、ADC或组合物的治疗可以与一种或多种靶向PD1/PDL1、LAG3和/或TIM3的检查点抑制剂组合。在一些实施例中,新抗原呈递和致敏的脉冲性质可允许以较低频率和/或以较低剂量施用检查点抑制剂和/或剪接调节剂、ADC或组合物。在一些实施例中,相较于不与剪接调节剂、ADC或组合物的治疗同时施用的检查点抑制剂,新抗原呈递的脉冲性可以例如通过降低用检查点抑制剂的标准给药方案通常所观察到的不良反应的可能风险而使检查点抑制剂(例如抗CTLA4抗体,如伊匹单抗)具有一种或多种治疗益处。

[2436] 在某些实施例中,该检查点抑制剂是细胞毒性T淋巴细胞相关抗原(CTLA4)途径的抑制剂。CTLA4,也称为CD152,是下调免疫应答的蛋白质受体。CTLA4在调节性T细胞中组成

性表达,但在活化后仅在常规T细胞中上调。如本文所使用,术语“CTLA4抑制剂”意指CTLA4和/或CTLA4途径的任何抑制剂。示例性CTLA4抑制剂包括但不限于抗CTLA4抗体。基于在抗肿瘤免疫的小鼠模型中所见的临床前活性,开发了用于人类的CTLA4阻断抗体。示例性抗CTLA4抗体包括但不限于伊匹单抗(MDX-010)和曲美木单抗(tremelimumab)(CP-675,206),两者均为完全人抗体。伊匹单抗是血浆半衰期为约12-14天的IgG1;曲美木单抗是血浆半衰期为约22天的IgG2。参见例如Phan等人(2003)Proc Natl Acad Sci USA.[美国科学院院刊]100:8372-7;Ribas等人(2005)J Clin Oncol.[临床肿瘤学杂志]23:8968-77;Weber等人(2008)J Clin Oncol.[临床肿瘤学杂志]26:5950-6。在一些实施例中,该抗CTLA4抗体是伊匹单抗。

[2437] 在某些实施例中,该检查点抑制剂是程序性死亡-1(PD1)途径的抑制剂。程序性细胞死亡1(PD1)途径代表了主要的免疫控制开关,其可与肿瘤细胞接合以克服活性T细胞免疫监视。PD1的配体(PDL1和PDL2)是组成性表达的或可在各种肿瘤中诱导。已发现PDL1在肿瘤细胞上的高表达(PDL2的程度较低)与各种其他实体瘤类型中的不良预后和存活相关。此外,PD1已显示可调节恶性黑素瘤患者的肿瘤特异性T细胞扩增。这些观察结果表明,PD1/PDL1途径在肿瘤免疫逃避中起关键作用,并可被认为是治疗性干预的有吸引力的靶标。如本文所使用,术语“PD1抑制剂”意指PD1和/或PD1途径的任何抑制剂。示例性PD1抑制剂包括但不限于抗PD1抗体和抗PDL1抗体。在某些实施例中,该检查点抑制剂是抗PD1抗体。示例性抗PD1抗体包括但不限于纳武单抗和派姆单抗(pembrolizumab)(MK-3475)。例如,纳武单抗是完全人免疫球蛋白G4(IgG4)PD1免疫检查点抑制剂抗体,其破坏PD1受体与其配体PDL1和PDL2的相互作用,从而抑制细胞免疫应答(Guo等人(2017)J Cancer[癌症杂志]8(3):410-6)。在一些实施例中,该抗PD1抗体是纳武单抗。例如,派姆单抗是IgG4/κ同种型的有效且高度选择性的人源化mAb,其被设计为用于直接阻断PD1与其配体PDL1和PDL2之间的相互作用。派姆单抗强烈增强来自健康人供体、癌症患者以及灵长类动物的培养血细胞中的T淋巴细胞免疫应答。还已报导,派姆单抗调节白介素2(IL-2)、肿瘤坏死因子α(TNFα)、干扰素γ(IFNγ)和其他细胞因子的水平。示例性抗PDL1抗体包括但不限于阿特珠单抗、阿维鲁单抗(avelumab)和德瓦鲁单抗(durvalumab)。例如,阿特珠单抗是IgG1人源化mAb,据报导,其通过靶向多种恶性细胞上表达的PDL1来阻断PD1/PDL1相互作用。PD1/PDL1途径的这种阻断可能刺激针对肿瘤的免疫防御机制(Abdin等人(2018)Cancers[癌症](巴塞尔)10(2):32)。在一些实施例中,该抗PDL1抗体是阿特珠单抗。

[2438] 在某些实施例中,该检查点抑制剂靶向PD1/PDL1、CTLA4、OX40、CD40、LAG3、TIM3、GITR和/或KIR。在某些实施例中,该检查点抑制剂靶向CTLA4、OX40、CD40和/或GITR。在某些实施例中,该检查点抑制剂与抑制性抗体或其他类似抑制性分子(例如抑制性抗CTLA4或抗PD1/PDL1抗体)一起靶向。在某些其他实施例中,检查点抑制剂与针对靶标的激动剂一起靶向;此类别的实例包括刺激性靶标OX40、CD40和/或GITR。在一些实施例中,靶向OX40、CD40和/或GITR的检查点抑制剂是激动剂抗体。针对OX40的激动剂抗体可具有双重作用,即,抑制调节性T细胞遏止作用,同时增强效应T细胞功能。也已显示,激动剂抗GITR抗体使效应T细胞对由调节性T细胞诱导的抑制更具抗性(Karaki等人(2016)Vaccines[疫苗](巴塞尔)4(4):37)。同样,激动剂CD40抗体展示出T细胞依赖性抗肿瘤活性。树突状细胞上CD40的活化使肿瘤抗原的交叉呈递增加并因此使活化的肿瘤定向效应T细胞的数量增加(Ellmark等人

(2015)Oncoimmunol.[肿瘤免疫学]4(7):e1011484)。

[2439] 在某些实施例中,该检查点抑制剂靶向CTLA4(例如抗CTLA4抗体)。在某些实施例中,靶向CTLA4促进初始T细胞的致敏和活化。在某些实施例中,该检查点抑制剂靶向OX40(例如抗OX40抗体)。在某些实施例中,靶向OX40增强效应T细胞的扩增。在某些实施例中,该检查点抑制剂靶向CD40(例如抗CD40抗体)。在某些实施例中,靶向CD40抑制T细胞的"致耐受性"致敏和/或调节性T细胞的形成。在某些实施例中,该检查点抑制剂靶向GITR(例如抗GITR抗体)。在某些实施例中,靶向GITR抑制调节性T细胞的活性。在某些实施例中,使用剪接调节剂、ADC或组合物与靶向CTLA4、OX40、CD40和/或GITR的药剂的组合疗法的益处(例如,对至少一种症状或疾病进展风险/速率的影响)是加和性的。在一些实施例中,使用剪接调节剂、ADC或组合物与靶向CTLA4、OX40、CD40和/或GITR的药剂的组合疗法的益处是超加性的(即,协同性的)。

[2440] 检查点抑制剂治疗策略基于以下假设:治疗促进和/或增强针对弱或不良抗原性肿瘤(例如,CTLA4)的T细胞应答的致敏,或治疗恢复和/或再激活对肿瘤抗原有应答、但由于抗原呈递(例如,PD1、PDL1)的慢性性质已变得"耗竭"的T细胞(Chen和Mellman(2013)Immunity[免疫]39(1):1-10)。合适的检查点抑制疗法和药剂的实例,例如抗PD1、抗PDL1或抗CTLA4抗体,是本领域已知的。参见例如WO 2001/014424、WO 2013/173223、WO 2016/007235。

[2441] 将在检查点抑制剂疗法之后出现的这些致敏的T细胞应答与在可与致敏的免疫系统反应的肿瘤细胞中诱导新抗原的治疗相组合可以提供有益的协同作用。由于剪接调节剂源性或ADC源性的新抗原尚未呈现T细胞致敏,所以与CTLA4抑制剂组合可能是特别有益的。在一些实施例中,治疗包括在初始施用CTLA4抑制剂以刺激CD8 T细胞致敏之前、同时或之后,施用一种或多种剪接调节剂、ADC或组合物以诱导新抗原的产生。在一些实施例中,向患者额外施用CTLA4抑制剂,例如以进一步刺激新抗原反应性CD8群体的致敏和/或活化。在一些实施例中,可向患者额外施用剪接调节剂、ADC或组合物以增加肿瘤的新抗原呈递。剪接调节剂、ADC或组合物和检查点抑制剂疗法的重复施用可以同时进行或以错开的时间间隔进行。在一些实施例中,治疗进一步包括施用PD1/PDL1抑制剂共治疗,例如以恢复肿瘤微环境内耗竭的靶向新抗原的T细胞的效应子功能。

[2442] 如本文所使用,术语"组合"或"组合疗法"是指施用一种或多种剪接调节剂、ADC或组合物以及额外药剂或疗法(例如检查点抑制剂、细胞因子或细胞因子类似物、新抗原疫苗、CAR-T),作为旨在由一种或多种所施用的药剂的共同作用提供有益(即,加和性或协同性的)作用的治疗方案的一部分。在一些实施例中,该组合还可包括一种或多种额外药剂,包括但不限于化学治疗剂、抗血管生成剂和减少免疫遏止作用的药剂(例如第二检查点抑制剂)。该组合的有益作用包括但不限于由治疗剂的组合产生的药代动力学或药效学共同作用。典型地在限定的时间段(例如,数分钟,数小时,数天或数周,取决于所选择的组合)内进行这些治疗剂的组合施用。

[2443] 如本文所使用,"组合"施用或"共施用"意指在受试者罹患医学病症(例如赘生性病症)期间,将两种或更多种不同治疗递送给该受试者。例如,在一些实施例中,在受试者已诊断患有疾病或病症之后且在该疾病或病症已治愈或消除之前,或当受试者鉴定为有患病风险但在受试者出现疾病症状之前,递送该两种或更多种治疗。在一些实施例中,一种治疗

的递送在第二治疗的递送开始时仍存在,于是存在重叠。在一些实施例中,第一治疗与第二治疗同时起始。这些类型的递送在本文中有时称为“同时(simultaneous/concurrent)”或“伴随(concomitant)”递送。在其他实施例中,一种治疗的递送在第二治疗的递送开始之前结束。这种类型的递送在本文中有时称为“连续”或“依序”递送。

[2444] 在一些实施例中,该两种治疗(例如剪接调节剂、ADC或组合物和检查点抑制剂)包含在同一组合物中。此类组合物可以任何适当形式且通过任何合适途径施用。在其他实施例中,该两种治疗(例如剪接调节剂、ADC或组合物和检查点抑制剂)以独立组合物、以任何适当形式且通过任何合适途径施用。例如,在一些实施例中,包含剪接调节剂或ADC的组合物和包含检查点抑制剂的组合物可在不同时间点以任何顺序同时或依序施用;在任一情况下,它们应当在时间上充分接近地施用,以便提供所希望的治疗或预防作用。

[2445] 在同时或依序递送的实施例中,由于组合施用,治疗可能更有效。在一些实施例中,第一治疗比在不存在第二治疗的情况下施用第一治疗时所观察到的作用更有效,例如在较少第一治疗(例如较低剂量)的情况下观察到等效的作用。在一些实施例中,第一治疗更有效,使得症状或与疾病或病症相关的其他参数的减少大于在不存在第二治疗的情况下递送第一治疗所观察到的。在其他实施例中,在第二治疗存在下观察到类似情况。在一些实施例中,组合疗法的益处(例如对至少一种症状或疾病进展的风险/速率的影响)是加和性的。在一些实施例中,组合疗法的益处是超加性的。

[2446] 在不同实施例中,本披露提供了治疗患有或疑似患有赘生性病症的受试者的方法,该方法通过向该受试者施用有效量的剪接调节剂、ADC、或包含剪接调节剂或ADC的组合物;以及至少一种额外疗法(例如检查点抑制剂疗法、细胞因子或细胞因子类似物、新抗原疫苗、CAR-T)来实现。在一些实施例中,施用该剪接调节剂、ADC或组合物诱导至少一种新抗原和/或T细胞应答。在一些实施例中,施用该剪接调节剂、ADC或组合物诱导双链RNA免疫应答。在一些实施例中,施用该剪接调节剂、ADC或组合物诱导免疫原性细胞死亡。在一些实施例中,该至少一种额外疗法可包含至少一种、至少两种、至少三种、至少四种或至少五种额外疗法。例如,在一些实施例中,剪接调节剂、ADC或组合物可与两种检查点疗法(即,使用两种不同检查点抑制剂)组合施用。在一些其他实施例中,剪接调节剂、ADC或组合物可以与检查点抑制剂疗法和新抗原疫苗组合施用。

[2447] 在组合疗法的一些实施例中,该剪接调节剂、抗体-药物缀合物、或组合物、和/或该至少一种额外疗法的施用量相较于该剪接调节剂、抗体-药物缀合物、或组合物、和/或该至少一种额外疗法的标准剂量减少10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、75%或90%。在一些实施例中,该剪接调节剂、抗体-药物缀合物、或组合物、和/或该至少一种额外疗法的施用频率比该剪接调节剂、抗体-药物缀合物、或组合物、和/或该至少一种额外疗法的标准给药方案低至少10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、75%或90%。在一些实施例中,该剪接调节剂、抗体-药物缀合物、或组合物、和/或该至少一种额外疗法的施用量和/或剂量导致较低的全身性毒性和/或改善的耐受性。

[2448] 在一些实施例中,该剪接调节剂、抗体-药物缀合物、或组合物的施用是在施用该至少一种额外疗法之前起始。在一些实施例中,该剪接调节剂、抗体-药物缀合物、或组合物的施用是在施用该至少一种额外疗法之后起始。在一些实施例中,该剪接调节剂、抗体-药物缀合物、或组合物的施用是与该至少一种额外疗法的施用同时起始。

[2449] 在一些实施例中,在初始施用之后,重复施用该剪接调节剂、抗体-药物缀合物、或组合物至少一次。在一些实施例中,用于重复施用的该剪接调节剂、抗体-药物缀合物、或组合物的量相较于用于初始施用的量有所减少。在一些实施例中,用于重复施用的该剪接调节剂、抗体-药物缀合物、或组合物的量相较于该剪接调节剂、抗体-药物缀合物、或组合物的标准剂量有所减少。在一些实施例中,用于重复施用的该剪接调节剂、抗体-药物缀合物、或组合物的量相较于该剪接调节剂、抗体-药物缀合物、或组合物的标准剂量减少10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、75%或90%。

[2450] 在一些实施例中,在初始施用后,重复施用该至少一种额外疗法至少一次。在一些实施例中,用于重复施用的该至少一种额外疗法的量相较于用于初始施用的量有所减少。在一些实施例中,用于重复施用的该至少一种额外疗法的量相较于该至少一种额外疗法的标准剂量有所减少。在一些实施例中,用于重复施用的该至少一种额外疗法的量相较于该至少一种额外疗法的标准剂量减少10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、75%或90%。

[2451] 在一些实施例中,该剪接调节剂、抗体-药物缀合物、或组合物的重复施用是与该至少一种额外疗法的重复施用同时进行。在一些实施例中,该剪接调节剂、抗体-药物缀合物、或组合物的重复施用是与该至少一种额外疗法的重复施用依序或错开进行。

[2452] 在不同实施例中,本披露提供了治疗患有或疑似患有赘生性病症的受试者的方法,该方法通过向该受试者施用有效量的剪接调节剂、ADC、或包含剪接调节剂或ADC的组合物;以及检查点抑制剂疗法来实现。在一些实施例中,该检查点抑制剂疗法包括施用至少一种检查点抑制剂。在一些实施例中,该受试者对单独施用时的该至少一种检查点抑制剂不耐受、无响应或响应不良。在一些实施例中,如使用例如免疫相关应答标准(irRC)和/或实体瘤中的免疫相关应答评价标准(irRECIST)所确定的,受试者可视为对该至少一种检查点抑制剂无响应或响应不良。参见例如,Wolchok等人(2009)Clin Cancer Res.[临床癌症研究]15(23):7412-20;Bohnsack等人,“Adaptation of the Immune-Related Response Criteria:irRECIST[免疫相关应答标准:irRECIST的改编]”(摘要4958)ESMO 2014。示例性标准可包括本领域中用来定义当所评价的治疗是免疫-肿瘤学药物(例如检查点抑制剂)时,在治疗期间癌症患者的肿瘤何时改善(“应答”)、保持不变(“稳定”)或恶化(“进展”)的那些标准。在一些实施例中,如果受试者表现出针对至少一种检查点抑制剂(例如伊匹单抗)所鉴定的一种或超过一种不良(2+级)事件,则该受试者可被认为对该相应的检查点抑制剂不耐受。在一些实施例中,例如,如果受试者表现出选自小肠结肠炎、肝炎、皮炎(包括中毒性表皮坏死溶解)、神经病变和内分泌病中的一个或多个不良事件,则该受试者可被认为对伊匹单抗治疗不耐受(Yervoy® (伊匹单抗)FDA标签补充,2018)。

[2453] 在一些实施例中,该检查点抑制剂靶向PD1/PDL1、CTLA4、OX40、CD40、LAG3、TIM3、GITR和/或KIR。在一些实施例中,该检查点抑制剂靶向CTLA4、OX40、CD40和/或GITR。在一些实施例中,该检查点抑制剂与抑制性抗体或其他类似抑制性分子一起靶向。在一些其他实施例中,该检查点抑制剂与激动剂抗体或其他类似激动剂分子一起靶向。在一些实施例中,该检查点抑制剂包含细胞毒性T淋巴细胞相关抗原4途径(CTLA4)抑制剂。在一些实施例中,该CTLA4抑制剂是抗CTLA4抗体。在一些实施例中,该抗CTLA4抗体是伊匹单抗。在一些实施例中,该检查点抑制剂包含程序性死亡-1途径(PD1)抑制剂。在一些实施例中,该PD1抑制剂

是抗PD1抗体。在一些实施例中,该抗PD1抗体是纳武单抗。在一些实施例中,该PD1抑制剂是抗PDL1抗体。在一些实施例中,该抗PDL1抗体是阿特珠单抗。在一些实施例中,该检查点抑制剂包含CTLA4抑制剂和PD1抑制剂。在一些实施例中,该检查点抑制剂靶向OX40。在一些实施例中,该检查点抑制剂靶向CD40。在一些实施例中,该检查点抑制剂靶向GITR。在一些实施例中,使用剪接调节剂、ADC或组合物和检查点抑制剂(例如靶向CTLA4、PD1/PDL1、OX40、CD40和/或GITR的抗体或分子)的组合疗法的益处(例如,对至少一种症状或疾病进展的风险/速率的影响)是加和性的。在一些实施例中,使用剪接调节剂、ADC或组合物和检查点抑制剂(例如靶向CTLA4、PD1/PDL1、OX40、CD40和/或GITR的抗体或分子)的组合疗法的益处是超加性的(即,协同性的)。

[2454] 在不同实施例中,本披露提供了治疗患有或疑似患有赘生性病症的受试者的方法,该方法通过向该受试者施用有效量的剪接调节剂、ADC、或包含剪接调节剂或ADC的组合物;以及细胞因子或细胞因子类似物疗法来实现。在一些实施例中,该细胞因子或细胞因子类似物疗法包括施用至少一种细胞因子或细胞因子类似物。在一些实施例中,该受试者对单独施用时的该至少一种细胞因子或细胞因子类似物不耐受、无响应或响应不良。

[2455] 在一些实施例中,该细胞因子或细胞因子类似物包含T细胞增强子。在一些实施例中,该细胞因子或细胞因子类似物包含IL-2、IL-10、IL-12、IL-15、IFNγ和/或TNFα。在一些实施例中,该细胞因子或细胞因子类似物包含IL-2、IL-10、IL-12和/或IL-15。在一些实施例中,在施用剪接调节剂、抗体-药物缀合物、或组合物之后,由于新抗原的诱导和呈递,施用该细胞因子或细胞因子类似物使T细胞致敏增强。

[2456] 在一些实施例中,该细胞因子或细胞因子类似物包含IL-2。在一些实施例中,IL-2加强针对效应细胞的信号,从而促进其扩增(Rosenberg(2014)J Immunol.[免疫学杂志]192(12):5451-8)。在一些实施例中,该细胞因子或细胞因子类似物包含IL-10。在一些实施例中,IL-10加强CD8+T细胞致敏和活化(Mumm等人(2011)Cancer Cell[癌细胞]20(6):781-96)。在一些实施例中,该细胞因子或细胞因子类似物包含IL-12。在一些实施例中,IL-12组合先天性和适应性免疫应答以加强抗原特异性致敏和靶向(Tugues等人(2015)Cell Death Differ.[细胞死亡与分化]22(2):237-46)。在一些实施例中,该细胞因子或细胞因子类似物包含IL-15。在一些实施例中,IL-15加强T效应(CD8)细胞致敏和/或活化。在一些实施例中,该细胞因子或细胞因子类似物包含IFNγ。在一些实施例中,IFNγ补充IFNγ的T效应细胞分泌。在一些实施例中,该细胞因子或细胞因子类似物包含TNFα。在一些实施例中,TNFα补充TNFα的T效应细胞分泌。

[2457] 在一些实施例中,将初始剂量的剪接调节剂、ADC或组合物施用于受试者以触发异常剪接和新抗原肽的产生。在允许蛋白质产生和抗原呈递一段时间之后,在一些实施例中,然后向受试者施用初始剂量的细胞因子或细胞因子类似物以加强和/或增强效应T细胞致敏和扩增。在一些实施例中,在剪接调节剂、ADC或组合物与细胞因子或细胞因子类似物的剂量之间的等待期是约2天、约3天、约4天、约5天、约6天或约7天。在一些实施例中,等待期是在约3天与约5天之间。在一些实施例中,该细胞因子或细胞因子类似物是IL-2、IL-10、IL-12、IL-15、IFNγ和/或TNFα。在一些实施例中,剪接调节剂、ADC或组合物与细胞因子或细胞因子类似物的组合治疗益处可为加和性的或超加性的。

[2458] 在一些其他实施例中,将初始剂量的细胞因子或细胞因子类似物施用于受试者以

加强和/或增强效应T细胞致敏和扩增。在等待期后,在一些实施例中,然后向受试者施用初始剂量的剪接调节剂、ADC或组合物以触发异常剪接和新抗原肽的产生。在一些实施例中,在细胞因子或细胞因子类似物与剪接调节剂、ADC或组合物的剂量之间的等待期是约2天、约3天、约4天、约5天、约6天或约7天。在一些实施例中,等待期是在约3天与约5天之间。在一些实施例中,该细胞因子或细胞因子类似物是IL-2、IL-10、IL-12、IL-15、IFNγ和/或TNFα。在一些实施例中,细胞因子或细胞因子类似物与剪接调节剂、ADC或组合物的组合治疗益处可为加和性的或超加性的。

[2459] 在一些实施例中,在允许T细胞致敏和扩增的一段时间之后,然后向受试者施用剪接调节剂、ADC或组合物的第二或后续剂量以触发新抗原肽的重新呈递。在一些实施例中,细胞因子或细胞因子类似物的初始剂量与剪接调节剂、ADC或组合物的第二或后续剂量之间的等待期是约2周、约3周、约4周或约5周。在一些实施例中,等待期是约3周。在一些实施例中,可例如在剪接调节剂、ADC或组合物的后续剂量之间穿插施用细胞因子或细胞因子类似物之后续剂量。在剪接调节剂、ADC或组合物的第二或后续剂量之后,在一些实施例中,免疫系统可以与呈递新抗原的肿瘤细胞接合和/或引起肿瘤细胞杀伤。在一些实施例中,在此示例性初始治疗方案之后给予剪接调节剂、ADC或组合物可为脉冲式的,即,可以较长时间间隔(例如约每4周、约每5周、约每6周)给予剪接调节剂、ADC或组合物,以允许抗原呈递、T细胞接合和/或肿瘤细胞杀伤、和/或记忆T细胞群的恢复。

[2460] 在一些实施例中,该受试者具有约150个突变或更少的非同义突变负荷。在一些实施例中,该受试者具有约100个突变或更少的非同义突变负荷。在一些实施例中,该受试者具有约50个突变或更少的非同义突变负荷。在一些实施例中,该受试者患有或疑似患有赘生性病症,例如血液恶性病或实体瘤。在一些实施例中,该血液恶性病选自B细胞恶性病、白血病、淋巴瘤和骨髓瘤。在一些实施例中,该血液恶性病选自急性骨髓性白血病和多发性骨髓瘤。在一些实施例中,该实体瘤选自乳腺癌、胃癌、前列腺癌、卵巢癌、肺癌、子宫癌、涎腺导管癌、黑素瘤、结肠癌、宫颈癌、胰腺癌、肾癌、结肠直肠癌和食道癌。在一些实施例中,该实体瘤选自HER2阳性乳腺癌、胃腺癌、前列腺癌和骨肉瘤。

[2461] 剪接调节剂/ADC与新抗原疫苗的组合:

[2462] 在不同实施例中,患有如本文中所描述的癌症的患者可以用剪接调节剂、ADC或组合物与新抗原疫苗的组合进行治疗。不受理论束缚,单独或与免疫检查点抑制剂(ICI)分子组合使用的疫苗在早期试验中显示出前景(Ott等人(2017)Nature[自然]547(7662):217-21;Sahin等人(2017)Nature[自然]547(7662):222-6),但一般需要对患者肿瘤突变进行测序(Ott等人(2017)Nature[自然]547(7662):217-21;Aldous和Dong(2018)Bioorg.Med.Chem.[生物有机化学与药物化学]26(10):2842-9)。因此,疫苗通常取决于足够数量的抗原性非同义突变。通常,突变负担非常低的肿瘤提供很少的候选抗原,且快速生长的肿瘤提供有限的时间来鉴别和产生患者特异性疫苗。

[2463] 迄今为止,开发在大百分比患者中具有广泛免疫原性的疫苗的尝试已集中于频繁突变、异位过表达或扩增的蛋白质和/或在生物体内以“自身”蛋白质形式存在的蛋白质。此外,这些蛋白质通常在免疫受限的组织中表达(例如,在神经内分泌肿瘤类型中表达的神经元标记),而其他蛋白质可在胚胎发生期间正常表达(例如,癌胚抗原)。因此,使用此类蛋白质作为抗原的疫苗的效用通常受限于其中呈递这些抗原中的一种或多种的特定肿瘤谱系

或亚群。还需要通过对患者肿瘤样品进行测序来确定疫苗效用,这可能是耗时的。

[2464] 此外,如果这些抗原以“自身”蛋白质形式存在,则免疫系统有可能被致敏以将这些抗原识别为“自身”的且因此无应答。或,可替代地,如果免疫系统能够对这些抗原产生效应子应答,则它可能在可表达抗原的组织中产生中靶副作用。在这两种情况中,关键挑战之一是大多数抗原肽源自“过客”基因(即,在肿瘤发生过程中突变或扩增,但在肿瘤本身的继续存活或增殖中不发挥重要作用的基因)。因此,可使这些基因沉默而对肿瘤进展无显著影响,且因此将允许肿瘤“逃避”针对这些抗原的免疫应答。不希望受理论束缚,此机制可能在肿瘤进化中起作用,其中在肿瘤发生的早期阶段期间,肿瘤通常“选择”具有强抗原性的随机突变(Dunn等人(2004)Annu.Rev.Immunol.[免疫学年鉴]22:329-60)。

[2465] 此外,某些证据还表明,慢性抗原呈递和免疫刺激可能导致免疫细胞无反应性和耗竭(Pardoll(2012)Nat.Rev.Cancer[癌症自然评论]12(4):252-64)。这些表型构成当前ICI治疗背后的治疗原理的基础,因为已显示ICI抑制耗竭的免疫细胞表型(α-PD1/PD-L1)或促进另外的免疫细胞应答(α-CTLA4)。值得注意的是,对于α-CTLA4疗法,据报道某些患者亚群表现出严重的免疫相关不良事件,其可能归因于促进T细胞活化以及打破限制自身反应性免疫应答的免疫耐受机制。

[2466] 这两种方法(即,触发或增强对新抗原的从头免疫应答或抑制现有免疫应答的无反应性或耗竭)均与慢性免疫活化相关。因此,这些方法对无反应性、编辑和经设计以遏止免疫接合的其他肿瘤介导的机制是敏感的。

[2467] 相比之下,用本文所披露的剪接调节剂、ADC或组合物的治疗可以诱导对代表新抗原的新颖序列的免疫应答。在一些实施例中,新抗原的呈递为适应性免疫系统提供更多与其接合并活化的不同靶标。在一些实施例中,剪接调节剂、ADC或组合物强烈诱导可变剪接的能力以及由此得到的新抗原可降低由慢性暴露于突变驱动的新抗原引起的免疫系统疲劳的风险和/或限制肿瘤细胞适应逃避疗法的能力。在一些实施例中,施用剪接调节剂、ADC或组合物与新抗原疫苗的组合将增强对由该剪接调节剂、ADC或组合物产生的新抗原的免疫应答。在一些实施例中,该剪接调节剂、ADC或组合物是在疫苗接种之前、期间或之后施用。在一些实施例中,在治疗过程期间,可施用该剪接调节剂、ADC或组合物和/或疫苗一次或超过一次。在一些实施例中,在治疗过程期间,施用该疫苗一次且施用该剪接调节剂、ADC或组合物超过一次。在一些实施例中,在治疗过程期间,施用该疫苗一次然后施用一种或多种加强剂。

[2468] 如本文所使用,术语“新抗原疫苗”是指一种或多种免疫原性新抗原肽或mRNA(例如至少两种、至少三种、至少四种、至少五种或更多种新抗原肽)的汇集样品。术语“疫苗”是指用于产生免疫性以预防和/或治疗疾病(例如赘生性病症,例如血液恶性病或实体瘤)的组合物。因此,疫苗是包含免疫原性试剂的药剂,且意欲用于人类或动物以在疫苗接种后产生特异性免疫防御和保护性物质。新抗原疫苗可另外包括药学上可接受的载体、稀释剂、赋形剂和/或佐剂。

[2469] 如本文所使用,术语“免疫原性”是指可引起免疫应答(例如T细胞应答)的任何药剂或组合物。免疫应答可为抗体介导的或细胞介导的,或两者皆有。

[2470] 在一些实施例中,给予患者剪接调节剂、ADC或组合物,然后给予已知新抗原的肽或mRNA疫苗,以增强针对由该剪接调节剂、ADC或组合物产生的新抗原的免疫应答。在一些

其他实施例中,给予患者剪接调节剂、ADC或组合物并筛选由该治疗产生的新抗原。随后,使用这些新抗原中的一种或多种产生给予患者的个性化疫苗。在这些实施例的任一个中,可向患者施用一次或重复施用剪接调节剂、ADC或组合物和/或肽或mRNA疫苗。

[2471] 在不同实施例中,用于疫苗的合适新抗原可通过筛选来自患者的一个或多个组织样品(例如来自肿瘤活检)的、具有改变的剪接和稳健表达的一组转录物来鉴定。在一些实施例中,基于整个异常剪接的mRNA接合点的翻译,在筛选的样品中鉴定变异蛋白质序列,同时保留侧接跨接合点的氨基酸变化的蛋白质序列的部分(至多12个氨基酸)。在一些实施例中,例如使用如NetMHC1等工具,针对结合至MHC1等位基因的高亲和力,扫描这些跨接合点的肽片段(Nielsen等人(2003)Protein Sci[蛋白质科学]12(5):1007-17;Andreatta和Neilsen(2016)Bioinformatics[生物信息学]32(4):511-7)。这些结果允许过滤这些新肽以得到针对独特患者HLA等位基因组成所预测的高亲和力结合物的新肽,以及组装预测将与不同群体中以高频率存在的HLA等位基因广泛结合的新肽池(Maiers等人(2007)Hum Immunol[人体免疫学]68(9):779-88)。在不同实施例中,然后例如通过与合适的载体或佐剂缀合,将所鉴定的新肽配制为疫苗(Ott等人(2017)Nature[自然]547(7662):217-21),或以mRNA形式递送(Sahin等人(2017)Nature[自然]547(7662):222-6)。

[2472] 在一些实施例中,所选新抗原基于以下:筛选单个患者针对剪接调节剂、ADC或组合物的肿瘤应答以鉴定一种或多种由治疗产生的新抗原,以用于后续疫苗接种中。在其他实施例中,新抗原是例如基于以下来选择的:筛选来自不同患者的一组样品以鉴定由该剪接调节剂、ADC或组合物产生的共同新抗原,然后将该新抗原作为未来患者的通用疫苗。

[2473] 不受理论束缚,在一些实施例中,使用通用新抗原疫苗将避免对每一患者的肿瘤的特有突变状态进行测序和分析的需求,因为所选新抗原不取决于肿瘤突变,而是模拟由剪接调节剂、ADC或组合物产生的新抗原,且通常被身体识别为外来的。此外,在一些实施例中,由于相较于模拟由剪接调节剂、ADC或组合物产生的新抗原的突变,患者的肿瘤细胞更可能突变而不产生取决于肿瘤突变的一种或多种新抗原,所以使用新抗原疫苗可以是特别有效的。这可能允许配制原液疫苗(bulk vaccine),其在大百分比的患者中具有广泛免疫原性,从而加速治疗方案的开始。可根据本文概述的时间表对患者进行疫苗接种,且在完成疫苗接种之前,可进一步用剪接调节剂、ADC或组合物治疗以例如诱导新抗原肽的表达。在一些实施例中,可在疫苗接种之前、同时或之后,向患者施用剪接调节剂、ADC或组合物。在一些实施例中,向患者施用剪接调节剂、ADC或组合物,筛选在一组通用新抗原中发现的一种或多种新抗原,并用包含至少一种在该受试者中鉴定的通用新抗原的通用新抗原疫苗进行疫苗接种。在一些实施例中,在疫苗接种之后,可向患者施用剪接调节剂、ADC或组合物一次或超过一次。在治疗过程期间,可施用剪接调节剂或ADC或组合物和/或疫苗一次或超过一次。

[2474] 在不同实施例中,疫苗可包含一种或超过一种新抗原肽或mRNA。在不同实施例中,疫苗可包含一种或超过一种长的新抗原肽。在不同实施例中,此类“长的”新抗原肽在专职抗原呈递细胞(如树突状细胞)中经历高效内化、加工和交叉呈递。类似地,在其他情况下,已显示长的疫苗肽在人体中诱导细胞毒性T细胞(Melief和van der Burg(2008)Nat Rev Cancer[癌症自然评论]8(5):351-60)。在不同实施例中,使新抗原肽延伸以包含该新抗原肽序列本身以及侧接氨基酸序列。在不同实施例中,延伸的肽序列促进抗原呈递细胞(例如

树突状细胞)对蛋白质的吸收。在不同实施例中,延伸的肽序列能够在具有不同HLA同种型的模型中实现高效抗原呈递和T细胞致敏。在不同实施例中,相较于较短新抗原肽和/或较短肽序列(例如长度小于约10个或小于约5个氨基酸的肽序列),较长的新抗原肽和/或延伸的肽序列表现出抗原呈递细胞(例如树突状细胞)的吸收增加、抗原呈递增加和/或T细胞致敏增加。在一些实施例中,长的新抗原肽的长度在约5个至约50个氨基酸范围内。在一些实施例中,长的新抗原肽的长度在约10个至约50个氨基酸范围内。在一些实施例中,长的新抗原肽的长度在约10个至约35个氨基酸范围内。在一些实施例中,长的新抗原肽的长度在约15个至约25个氨基酸范围内。表21列出了示例性的长的新抗原肽的氨基酸序列。

[2475] 如本文所使用,新抗原肽或mRNA疫苗涵盖使用新抗原肽或其编码mRNA的片段,只要该片段保留免疫原性潜能即可。

[2476] 在一些实施例中,新抗原疫苗包含至少一种新抗原肽。在一些实施例中,新抗原疫苗包含至少2种、至少3种、至少4种、至少5种、至少6种、至少7种、至少8种、至少9种、至少10种、至少12种、至少15种或至少20种新抗原肽。在一些实施例中,该一种或多种新抗原肽的长度在约5至约50个氨基酸范围内。在一些实施例中,该一种或多种新抗原肽的长度在约10至约50个氨基酸范围内。在一些实施例中,该一种或多种新抗原肽的长度在约10至约35个氨基酸范围内。在一些实施例中,该一种或多种新抗原肽的长度在约15至约25个氨基酸范围内。

[2477] 在不同实施例中,本披露提供了治疗患有或疑似患有赘生性病症的受试者的方法,该方法通过向该受试者施用有效量的剪接调节剂、ADC、或包含剪接调节剂或ADC的组合物;以及新抗原疫苗来实现。新抗原疫苗可以是例如肽或mRNA新抗原疫苗。在一些实施例中,该剪接调节剂、ADC或组合物是在施用该新抗原疫苗之前施用。在一些实施例中,该剪接调节剂、ADC或组合物是在施用该新抗原疫苗之后施用。在一些实施例中,该剪接调节剂、ADC或组合物的施用是与该新抗原疫苗的施用同时进行。在一些实施例中,在初始施用之后,重复施用该剪接调节剂、ADC或组合物至少一次。在一些实施例中,用于重复施用的该剪接调节剂、ADC或组合物的量相较于用于初始施用的量有所减少。

[2478] 在不同实施例中,本披露进一步提供了用于治疗患有或疑似患有赘生性病症的受试者的组合,该组合包含剪接调节剂、ADC、或包含剪接调节剂或ADC的组合物;以及新抗原疫苗(例如通用新抗原疫苗)。在一些实施例中,该新抗原疫苗是肽或mRNA新抗原疫苗。在一些实施例中,该组合进一步包含至少一种额外疗法。在一些实施例中,该至少一种额外疗法包含至少一种、至少两种、至少三种、至少四种或至少五种额外疗法。

[2479] 在不同实施例中,本披露进一步提供了治疗患有或疑似患有赘生性病症的受试者的方法,该方法通过(a)向该受试者施用有效量的剪接调节剂、ADC、或包含剪接调节剂或ADC的组合物;(b)在施用该剪接调节剂、ADC或组合物之后,在该受试者中检测一种或多种新抗原;(c)将该一种或多种新抗原与一组通用新抗原进行比较;以及(d)向该受试者施用包含存在于该受试者中的至少一种通用新抗原的通用新抗原疫苗。在一些实施例中,将该通用新抗原疫苗单独施用或与至少一种额外疗法组合施用。在一些实施例中,该至少一种额外疗法包含至少一种、至少两种、至少三种、至少四种或至少五种额外疗法。

[2480] 在一些实施例中,该至少一种额外疗法包括重复施用该剪接调节剂、ADC或组合物。在一些实施例中,该剪接调节剂、ADC或组合物的重复施用是在施用该通用新抗原疫苗

之前起始。在一些实施例中,该剪接调节剂、ADC或组合物的重复是在施用该通用新抗原疫苗之后起始。在一些实施例中,该剪接调节剂、ADC或组合物的重复施用是与该通用新抗原疫苗的施用同时起始。在一些实施例中,用于重复施用的该剪接调节剂、ADC或组合物的量相较于用于初始施用的量有所减少。在一些实施例中,用于初始和/或重复施用的该剪接调节剂、ADC或组合物的量相较于当在没有疫苗治疗的情况下使用的该剪接调节剂、ADC或组合物的标准剂量有所减少。在一些实施例中,用于初始和/或重复施用的该剪接调节剂、ADC或组合物的量相较于该剪接调节剂、ADC或组合物的标准剂量减少10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、75%或90%。

[2481] 在一些实施例中,该至少一种额外疗法包括施用检查点抑制剂(例如本文所描述的任何示例性检查点抑制剂)。在一些实施例中,该检查点抑制剂的施用是在施用该通用新抗原疫苗和/或重复施用该剪接调节剂、ADC或组合物之前起始。在一些实施例中,该检查点抑制剂的施用是在施用该通用新抗原疫苗和/或重复该剪接调节剂、ADC或组合物之后起始。在一些实施例中,该检查点抑制剂的施用是与该通用新抗原疫苗的施用和/或该剪接调节剂、ADC或组合物的重复施用同时起始。在一些实施例中,在初始施用之后,重复施用该检查点抑制剂至少一次。在一些实施例中,用于重复施用的该检查点抑制剂的量相较于用于初始施用的量有所减少。在一些实施例中,用于重复施用的该检查点抑制剂的量相较于该检查点抑制剂的标准剂量有所减少。在一些实施例中,用于重复施用的检查点抑制剂的量相较于该检查点抑制剂的标准剂量减少10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、75%或90%。在一些实施例中,该受试者对单独施用时的检查点抑制剂不耐受、无响应或响应不良。

[2482] 在不同实施例中,本文还提供了新抗原疫苗,其包含至少一种新抗原肽或至少一种新抗原mRNA。在一些实施例中,新抗原疫苗包含至少一种新抗原肽。在一些其他实施例中,新抗原疫苗包含至少一种新抗原mRNA。

[2483] 在不同实施例中,本文还提供了试剂盒,其包含剪接调节剂、ADC、或包含剪接调节剂或ADC的组合物;以及新抗原疫苗(例如通用新抗原疫苗)。在一些实施例中,该新抗原疫苗是肽或mRNA新抗原疫苗。在一些实施例中,该试剂盒进一步包含一种或多种额外组分,包括但不限于:使用说明书;其他试剂,例如一种或多种额外治疗剂;用于制备进行治疗性施用的该剪接调节剂、ADC、组合物和/或新抗原疫苗的装置、容器或其他材料;药学上可接受的载体;以及用于向患者施用该剪接调节剂、ADC、组合物和/或新抗原疫苗的装置、容器或其他材料。使用说明书可包括有关治疗性应用的指导,其包括例如在患有或疑似患有赘生性病症的患者中的推荐剂量和/或施用模式。在不同实施例中,该试剂盒进一步含有关于治疗用途的说明,例如使用该剪接调节剂、ADC或组合物和该新抗原疫苗来治疗或预防患者的赘生性病症。在不同实施例中,该试剂盒进一步含有至少一种额外治疗剂(例如用于与该剪接调节剂、ADC或组合物以及该新抗原疫苗一起施用,例如检查点抑制剂)。在不同实施例中,将该剪接调节剂、ADC、组合物和/或新抗原疫苗配制为药物组合物形式。

[2484] 在本文所披露的方法和组合物的一些实施例中,该新抗原疫苗包含至少一种新抗原肽。在一些实施例中,该至少一种新抗原肽的长度在约10个至约50个氨基酸范围内。在一些实施例中,该至少一种新抗原肽的长度在约10个至约35个氨基酸范围内。在一些实施例中,该至少一种新抗原肽的长度在约15个至约25个氨基酸范围内。

[2485] 在一些实施例中,该至少一种新抗原肽包含一个或超过一个新抗原序列。在一些实施例中,该新抗原序列包含SEQ ID NO:37-65中任一个的氨基酸序列。在一些实施例中,该新抗原序列包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列。在一些实施例中,该新抗原序列包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列。在一些实施例中,该新抗原序列包含SEQ ID NO:46-49中任一个的氨基酸序列。

[2486] 在一些其他实施例中,该新抗原序列包含SEQ ID NO:66-93中任一个的氨基酸序列、或SEQ ID NO:66-93中任一个的抗原部分。在一些实施例中,该新抗原序列包含SEQ ID NO:66的氨基酸序列、或SEQ ID NO:66的抗原部分。在一些实施例中,该新抗原序列包含SEQ ID NO:74-77中任一个的氨基酸序列、或SEQ ID NO:74-77中任一个的抗原部分。在一些实施例中,该新抗原序列和/或抗原部分的长度在约10个至约50个氨基酸范围内。在一些实施例中,该新抗原序列和/或抗原部分的长度在约10个至约35个氨基酸范围内。在一些实施例中,该新抗原序列和/或抗原部分的长度在约15个至约25个氨基酸范围内。在一些实施例中,该新抗原序列和/或抗原部分的长度在约10个至约20个氨基酸范围内。在一些实施例中,该新抗原序列和/或抗原部分不排他性地与典型肽序列重叠或由典型肽序列组成(例如,表21中加下划线的任何示例性典型肽序列)。

[2487] 在一些实施例中,该新抗原序列是受试者特有的新抗原序列。在一些实施例中,该新抗原序列是针对受试者的个性化新抗原疫苗。在一些实施例中,该新抗原序列能够结合至受试者体内表达的至少一个HLA等位基因。

[2488] 在一些其他实施例中,该新抗原序列是通用新抗原序列。在一些实施例中,该新抗原序列是通用新抗原疫苗。在一些实施例中,该新抗原序列能够结合至罹患赘生性病症的受试者群体中至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%或至少45%的受试者体内表达的至少一个HLA等位基因。在一些实施例中,该新抗原序列能够针对存在于罹患赘生性病症的受试者群体的至少1%、至少5%或至少10%中的肿瘤引起T细胞应答。

[2489] 在一些实施例中,已通过对受试者中由施用有效量的剪接调节剂、抗体-药物缀合物、或组合物诱导的至少一种新抗原肽进行测序而鉴定了新抗原序列。在一些实施例中,该至少一种新抗原肽包含通过使赘生性细胞与有效量的剪接调节剂、抗体-药物缀合物、或组合物接触而诱导的新抗原序列。在一些实施例中,该赘生性细胞存在于体外细胞培养物中。在一些实施例中,该赘生性细胞获得自受试者。在一些实施例中,该赘生性细胞存在于受试者体内。

[2490] 在一些实施例中,该新抗原疫苗包含至少一种新抗原肽或mRNA和药学上可接受的载体。在一些实施例中,新抗原肽或mRNA可与合适的载体连接以帮助引发免疫应答。用于与免疫原性试剂(例如新抗原肽或mRNA)连接的示例性载体包括血清白蛋白、钥孔戚血蓝蛋白、免疫球蛋白分子、甲状腺球蛋白、卵白蛋白、破伤风类毒素或来自其他病原菌(如白喉、大肠杆菌(E.coli)、霍乱或幽门螺旋杆菌(H.pylori))的类毒素、或减毒的毒素衍生物。用于刺激或增强免疫应答的其他载体包括细胞因子,如IL-1、IL-1α和IL-1β肽、IL-2、γINF、IL-10、GM-CSF;以及趋化因子,如M1P1α和β、以及RANTES。免疫原性试剂还可与增强跨组织转运的肽连接,如例如WO 97/17613和WO 97/17614中所述。在一些实施例中,该药学上可接受的载体选自肽、血清白蛋白、钥孔戚血蓝蛋白、免疫球蛋白、甲状腺球蛋白、卵白蛋白、类

毒素或减毒的类毒素衍生物、细胞因子和趋化因子。

[2491] 在一些实施例中,该新抗原肽或mRNA可与药学上可接受的载体连接。免疫原性试剂可通过化学交联与载体连接。用于将免疫原性肽与载体连接的技术包括使用N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基-硫代)丙酸酯(SPDP)和琥珀酰亚胺基4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-甲酸酯(SMCC)形成二硫键(如果该肽缺乏巯基基团,则其可通过添加半胱氨酸残基来提供)。这些试剂在其本身与一种蛋白质的肽半胱氨酸残基之间产生二硫键,且经由赖氨酸上的ε-氨基或其他氨基酸中的其他游离氨基基团产生酰胺键。多种此类二硫化物/酰胺形成试剂描述于Jansen等人((1982)Immun Rev.[免疫学评论]62:185)中。其他双官能偶合剂形成硫醚而非二硫键。这些硫醚形成剂中的许多是可商购的,且包括6-马来酰亚胺基己酸、2-溴乙酸和2-碘乙酸、4-(N-马来酰亚胺基-甲基)环己烷-1-甲酸的反应性酯。羧基基团可通过将其与琥珀酰亚胺或1-羟基-2-硝基-4-磺酸钠盐组合来活化。在一些实施例中,该新抗原肽和该药学上可接受的载体经由接头共价连接。

[2492] 新抗原和其他此类免疫原性肽还可与载体一起表达为融合蛋白。免疫原性肽可以在氨基末端、羧基末端或肽内(内部)任何位点处与载体连接。在一些实施例中,该免疫原性肽的多个重复序列可存在于融合蛋白中。在一些实施例中,该新抗原肽和该药学上可接受的载体表达为融合蛋白。

[2493] 在一些实施例中,该新抗原疫苗包含至少一种新抗原肽或其编码mRNA和药学上可接受的稀释剂。在一些实施例中,该新抗原疫苗包含至少一种新抗原肽或其编码mRNA和药学上可接受的佐剂(例如本文所描述的佐剂)。

[2494] 在本文所披露的方法和组合物的一些实施例中,该新抗原疫苗包含至少一种新抗原mRNA。在一些实施例中,该至少一种新抗原mRNA编码一个或超过一个新抗原序列。在一些实施例中,该新抗原序列包含SEQ ID NO:37-65中任一个的氨基酸序列。在一些实施例中,该新抗原序列包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列。在一些实施例中,该新抗原序列包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列。在一些实施例中,该新抗原序列包含SEQ ID NO:46-49中任一个的氨基酸序列。

[2495] 在一些其他实施例中,该新抗原序列包含SEQ ID NO:66-93中任一个的氨基酸序列、或SEQ ID NO:66-93中任一个的抗原部分。在一些实施例中,该新抗原序列包含SEQ ID NO:66的氨基酸序列、或SEQ ID NO:66的抗原部分。在一些实施例中,该新抗原序列包含SEQ IDNO:74-77中任一个的氨基酸序列、或SEQ ID NO:74-77中任一个的抗原部分。在一些实施例中,该新抗原序列和/或抗原部分的长度在约10个至约50个氨基酸范围内。在一些实施例中,该新抗原序列和/或抗原部分的长度在约10个至约35个氨基酸范围内。在一些实施例中,该新抗原序列和/或抗原部分的长度在约15个至约25个氨基酸范围内。在一些实施例中,该新抗原序列和/或抗原部分的长度在约10个至约20个氨基酸范围内。在一些实施例中,该新抗原序列和/或抗原部分不排他性地与典型肽序列重叠或由典型肽序列组成(例如,表21中加下划线的任何示例性典型肽序列)。

[2496] 在一些实施例中,该新抗原序列是受试者特有的新抗原序列。在一些实施例中,该新抗原序列是针对受试者的个性化新抗原疫苗。在一些实施例中,该新抗原序列能够结合至受试者体内表达的至少一个HLA等位基因。

[2497] 在一些其他实施例中,该新抗原序列是通用新抗原序列。在一些实施例中,该新抗

原序列是通用新抗原疫苗。在一些实施例中,该新抗原序列能够结合至罹患赘生性病症的受试者群体中至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%或至少45%的受试者体内表达的至少一个HLA等位基因。在一些实施例中,该新抗原序列能够针对存在于罹患赘生性病症的受试者群体的至少1%、至少5%或至少10%中的肿瘤引起T细胞应答。

[2498] 在一些实施例中,已通过对受试者中由施用有效量的剪接调节剂、抗体-药物缀合物、或组合物诱导的至少一种新抗原mRNA进行测序而鉴定了新抗原序列。在一些实施例中,该至少一种新抗原mRNA编码通过使赘生性细胞与有效量的剪接调节剂、抗体-药物缀合物、或组合物接触而诱导的新抗原序列。在一些实施例中,该赘生性细胞存在于体外细胞培养物中。在一些实施例中,该赘生性细胞获得自受试者。在一些实施例中,该赘生性细胞存在于受试者体内。

[2499] 在一些实施例中,该新抗原疫苗包含至少一种新抗原mRNA和药学上可接受的载体。在一些实施例中,该至少一种新抗原mRNA与药学上可接受的载体连接。在一些实施例中,该药学上可接受的载体选自肽、血清白蛋白、钥孔戚血蓝蛋白、免疫球蛋白、甲状腺球蛋白、卵白蛋白、类毒素或减毒的类毒素衍生物、细胞因子和趋化因子。

[2500] 在一些实施例中,该新抗原疫苗包含至少一种新抗原mRNA和药学上可接受的稀释剂。在一些实施例中,该新抗原疫苗包含至少一种新抗原mRNA和药学上可接受的佐剂(例如本文所描述的佐剂)。

[2501] 在一些实施例中,该新抗原mRNA通过包封剂包封。在一些实施例中,该包封剂保护该新抗原mRNA免于降解并改善疫苗递送(McNamara等人(2015)J Immunol Res.[免疫学研究杂志]2015:794528)。在一些实施例中,该包封剂是脂质体。在一些实施例中,该脂质体是阳离子脂质体,如N-[1-(2,3-二油酰氧基)丙基]-N,N,N-三甲基氯化铵1(DOTAP)。在一些实施例中,该包封剂是纳米颗粒。在一些实施例中,纳米颗粒保护新抗原mRNA免受核酸酶降解和/或增强细胞吸收和/或递送效率。在一些实施例中,纳米颗粒可工程改造成可完全降解。在一些实施例中,纳米颗粒是呈可生物降解核-壳结构的纳米颗粒,其中pH反应性聚-(b-氨基酯)(PBAE)核被磷脂壳包封(Su等人(2011)Mol Pharm.[分子药剂学]8(3):774-87)。在一些实施例中,此类纳米颗粒在体内递送mRNA和引发抗肿瘤免疫应答方面特别有效。

[2502] 在一些实施例中,该受试者具有约150个突变或更少的非同义突变负荷。在一些实施例中,该受试者具有约100个突变或更少的非同义突变负荷。在一些实施例中,该受试者具有约50个突变或更少的非同义突变负荷。在一些实施例中,该受试者患有或疑似患有赘生性病症,例如血液恶性病或实体瘤。在一些实施例中,该血液恶性病选自B细胞恶性病、白血病、淋巴瘤和骨髓瘤。在一些实施例中,该血液恶性病选自急性骨髓性白血病和多发性骨髓瘤。在一些实施例中,该实体瘤选自乳腺癌、胃癌、前列腺癌、卵巢癌、肺癌、子宫癌、涎腺导管癌、黑素瘤、结肠癌、宫颈癌、胰腺癌、肾癌、结肠直肠癌和食道癌。在一些实施例中,该实体瘤选自HER2阳性乳腺癌、胃腺癌、前列腺癌和骨肉瘤。

[2503] 如本文所使用,“佐剂”是指能够增加、放大或调节针对伴随性免疫原性试剂(例如新抗原肽或mRNA)的免疫应答的物质。在某些实施例中,本披露的新抗原可与佐剂(即,本身不引起适应性免疫应答但放大或调节针对伴随性新抗原的应答的物质)组合施用。多种佐剂可与所披露的新抗原组合使用以引发免疫应答。在一些实施例中,选择一种或多种佐剂

以增强对新抗原的固有应答,而不会引起新抗原的构象变化,这些构象变化将影响应答的定性形式。在一些实施例中,选择一种或多种佐剂以增强T效应(例如,CD8)细胞致敏和/或活化。

[2504] 在某些实施例中,佐剂是铝盐(矾),如氢氧化铝、磷酸铝和硫酸铝。此类佐剂可与或不与其他特异性免疫刺激剂一起使用,这些免疫刺激剂例如3脱-O-酰化单磷酰基脂质A(MPL)或3-DMP、聚合的或单体的氨基酸,如聚谷氨酸或聚赖氨酸。此类佐剂可与或不与其他特异性免疫刺激剂一起使用,这些免疫刺激剂例如胞壁肽(例如,N-乙酰基胞壁酰基-L-苏氨酰基-D-异谷氨酰胺(thr-MDP)、N-乙酰基-去甲胞壁酰基-L-丙氨酰基-D-异谷氨酰胺(nor-MDP)、N-乙酰基胞壁酰基-L-丙氨酰基-D-异谷氨酰胺基-L-丙氨酸-2-(1'-2'二棕榈酰基-sn-甘油基-3-羟基磷酰基氧基)-乙胺(MTP-PE)、N-乙酰基葡萄糖胺基-N-乙酰基胞壁酰基-L-Al-D-异glu-L-Ala-二棕榈酰氧基丙酰胺(DTP-DPP))或其他细菌细胞壁组分。其他佐剂是水包油乳液,且包括(a)MF59(WO 90/14837),其含有5%角鲨烯、0.5% Tween 80和0.5% Span 85(任选地含有各种量的MTP-PE),其使用微流化床如110Y型微流化床(Microfluidics公司)配制成亚微米颗粒,(b)SAF,其含有10%角鲨烯、0.4% Tween 80、5%pluronic嵌段聚合物L121和thr-MDP,其被微流化成亚微米乳液或被涡旋以产生较大粒度的乳液,以及(c)Ribi™佐剂系统(RAS)(Ribi ImmunoChem公司),其含有2%角鲨烯、0.2% Tween 80以及一种或多种来自由以下组成的组的细菌细胞壁组分:单磷酰基脂质A(MPL)、海藻糖二霉菌酸酯(TDM)和细胞壁骨架(CWS)(例如MPL-FCWS(Detox™))。在一些实施例中,该佐剂是皂苷(如Stimulon™(QS21))或由其产生的颗粒(如ISCOM(免疫刺激复合物)和ISCOMATRIX)。其他佐剂包括完全弗氏佐剂(Complete Freund's Adjuvant,CFA)和不完全弗氏佐剂(Incomplete Freund's Adjuvant,IFA);细胞因子,如白细胞介素(IL-1、IL-2和IL-12);巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF);以及肿瘤坏死因子(TNF)。

[2505] 佐剂可与免疫原性试剂(例如新抗原肽或mRNA)一起以单一组合物施用,或可在施用免疫原性试剂之前、同时或之后施用。在一些实施例中,免疫原性试剂和佐剂可在同一小瓶中包装和供应,或可包装在独立小瓶中且在使用之前混合。在一些实施例中,免疫原性试剂和佐剂可包装有标签,指示预期的治疗应用。在一些实施例中,如果免疫原性试剂和佐剂是独立包装的,则该包装可包括有关在使用前混合的说明书。佐剂和/或载体的选择取决于含有佐剂的免疫原性配制剂的稳定性、施用途径、给药时程、佐剂对经疫苗接种的物种的功效,且对于人类而言,药学上可接受的佐剂是已获相关监管机构批准或可批准用于人类施用的佐剂。例如,完全弗氏佐剂不适合人类施用。然而,单独或任选地与矾、QS21和MPL中的任一种及其所有组合相组合的矾、MPL或不完全弗氏佐剂(Chang等人(1998)Adv Drug Deliv Rev.[先进药物递送综述]32:173-186)适合于人类施用。

[2506] 在一些实施例中,本披露进一步提供了筛选和鉴定至少一种新抗原的方法。更具体而言,在不同实施例中,本披露提供了鉴定至少一种新抗原的方法,该方法通过以下实现:(a)使赘生性细胞与有效量的剪接调节剂、ADC、或包含剪接调节剂或ADC的组合物接触;(b)在该赘生性细胞与该剪接调节剂、ADC或组合物接触之后,检测至少一种可变剪接的mRNA转录物;(c)预测该至少一种可变剪接的mRNA转录物翻译成至少一种肽;以及(d)将该至少一种肽与参考蛋白质组进行比较,其中如果该至少一种肽不匹配该参考蛋白质组中的任何肽,则鉴定出至少一种新抗原。在不同实施例中,该方法进一步包括接触一种或多种额

外赘生性细胞以鉴定至少一种通用新抗原。在不同实施例中,对一种或多种额外赘生性细胞或样品(例如组织活检)重复该方法以确定合适的新抗原(例如用于新抗原疫苗中)和/或以鉴定一种或多种通用新抗原。

[2507] 在各种其他实施例中,本披露提供了鉴定至少一种新抗原的方法,该方法通过以下实现:(a)使赘生性细胞与有效量的剪接调节剂、ADC、或包含剪接调节剂或ADC的组合物接触;(b)在该赘生性细胞与该剪接调节剂、ADC或组合物接触之后,检测至少一种包含潜在新抗原序列的肽;以及(c)将该至少一种肽与参考蛋白质组进行比较,其中如果该至少一种肽不匹配该参考蛋白质组中的任何肽,则鉴定出至少一种新抗原。在不同实施例中,该方法进一步包括接触一种或多种额外赘生性细胞以鉴定至少一种通用新抗原。在不同实施例中,对一种或多种额外赘生性细胞或样品(例如组织活检)重复该方法以确定合适的新抗原(例如用于新抗原疫苗中)和/或以鉴定一种或多种通用新抗原。

[2508] 在本文所描述的新抗原鉴定方法的一些实施例中,检测至少一种可变剪接的mRNA转录物包括RNAseq。在一些实施例中,预测该至少一种可变剪接的mRNA转录物的翻译包括对该至少一种转录物的剪接百分比变化(dPSI)值进行定量。在一些实施例中,预测该至少一种可变剪接的mRNA转录物的翻译包括RiboSeq和/或核糖体图谱分析。

[2509] 在本文所描述的新抗原鉴定方法的一些实施例中,这些方法进一步包括评价该至少一种肽的预测的主要组织相容性复合体(MHC)结合。在一些实施例中,通过测量该至少一种肽的原始亲和力预测结合强度来确定预测的MHC结合。在一些实施例中,约500nM或更高的原始亲和力预测结合强度指示MHC结合。在一些实施例中,预测的MHC结合通过以下来确定:鉴定一系列随机肽的预测结合强度的分布;以及将该至少一种肽的预测结合强度与该分布进行比较。在一些实施例中,在该分布的前2.0%中的预测结合强度指示弱的MHC结合。在一些实施例中,在该分布的前0.5%中的预测结合强度指示强的MHC结合。

[2510] 在本文所描述的新抗原鉴定方法的一些实施例中,该赘生性细胞存在于体外细胞培养物中。在一些实施例中,该赘生性细胞获得自受试者。在一些实施例中,该赘生性细胞存在于受试者体内。

[2511] 在不同实施例中,本文还提供了制造新抗原疫苗的方法,这些方法通过以下实现:(a)使用本文所披露的示例性鉴定方法中的任一种鉴定至少一种新抗原(例如至少一种新抗原肽或其编码mRNA);和(b)将该至少一种新抗原与药学上可接受的载体、稀释剂或佐剂(例如本文所描述的任何药学上可接受的载体、稀释剂或佐剂)一起配制。在一些实施例中,该疫苗中使用的至少一种新抗原包含SEQ ID NO:37-65中任一个的氨基酸序列。在一些实施例中,该疫苗中使用的至少一种新抗原包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列。在一些实施例中,该疫苗中使用的至少一种新抗原包含SEQ ID NO:39的氨基酸序列。在一些实施例中,该疫苗中使用的至少一种新抗原包含SEQ ID NO:46-49中任一个的氨基酸序列。

[2512] 在一些其他实施例中,该疫苗中使用的至少一种新抗原包含SEQ ID NO:66-93中任一个的氨基酸序列、或SEQ ID NO:66-93中任一个的抗原部分。在一些实施例中,该疫苗中使用的至少一种新抗原包含SEQ ID NO:66的氨基酸序列、或SEQ ID NO:66的抗原部分。在一些实施例中,该疫苗中使用的至少一种新抗原包含SEQ ID NO:74-77中任一个的氨基酸序列、或SEQ ID NO:74-77中任一个的抗原部分。在一些实施例中,该至少一种新抗原和/或抗原部分的长度在约10个至约50个氨基酸范围内。在一些实施例中,该至少一种新抗原

和/或抗原部分的长度在约10个至约35个氨基酸范围内。在一些实施例中,该至少一种新抗原和/或抗原部分的长度在约15个至约25个氨基酸范围内。在一些实施例中,该至少一种新抗原和/或抗原部分的长度在约10个至约20个氨基酸范围内。在一些实施例中,该至少一种新抗原和/或抗原部分不排他性地与典型肽序列重叠或由典型肽序列组成(例如,表21中加下划线的任何示例性典型肽序列)。

[2513] 在一些实施例中,该疫苗中使用的至少一种新抗原与药学上可接受的载体连接。在一些实施例中,该药学上可接受的载体选自肽、血清白蛋白、钥孔戚血蓝蛋白、免疫球蛋白、甲状腺球蛋白、卵白蛋白、类毒素或减毒的类毒素衍生物、细胞因子和趋化因子。

[2514] 剪接调节剂/ADC与工程化T细胞(CAR-T)的组合:

[2515] 在不同实施例中,患有如本文所描述的癌症的患者可以用剪接调节剂、ADC或组合物与一种或多种工程化的肿瘤靶向性T细胞(即,CAR-T)的组合进行治疗。因此,在不同实施例中,本披露提供了治疗患有或疑似患有赘生性病症的受试者的方法,该方法通过向该受试者施用有效量的剪接调节剂、ADC、或包含剪接调节剂或ADC的组合物;以及工程化的肿瘤靶向性T细胞(即,CAR-T)来实现。在不同实施例中,可以使用与鉴定的新抗原起反应的抗原识别序列来工程化嵌合T细胞受体。

[2516] 例如,在不同实施例中,为了靶向细胞表面蛋白质的细胞外结构域中剪接调节剂诱导的或ADC诱导的变化,可以通过识别细胞表面表达的新抗原蛋白质结构域的首先确定的抗体来工程化嵌合抗原反应性T细胞受体(CAR)。然后可以将此类抗体的抗原识别序列与T细胞受体结构域融合,以进行选择性靶向和活化。

[2517] 在各种其他实施例中,采用将肿瘤细胞的抗原呈递机制与剪接调节剂源性或ADC源性的新抗原相结合的策略。在一些实施例中,可以使用剪接调节剂、ADC或组合物处理含有已知且常常表现HLA等位基因(例如HLA-A*02:01)的细胞,并通过配体组学(ligandomics)鉴定MHC1结合的新抗原。在一些实施例中,这些肽可用于致敏和/或扩增来自表达相同HLA等位基因的健康供体的T细胞。在一些实施例中,可分离此类T细胞且对T细胞受体(TCR)α和β链进行测序以鉴定同源抗原识别区域/可变区域。在一些实施例中,然后可以工程化同源CAR。

[2518] 在一些实施例中,将这些CAR序列克隆到患者来源的T细胞群中,并使用当前可用的方案进行扩增。在一些实施例中,在用剪接调节剂、ADC或组合物处理之后,然后将工程化的T细胞输回到患者的循环中。在一些实施例中,在用剪接调节剂、ADC或组合物处理之后,肿瘤细胞可开始呈现抗原。在一些实施例中,工程化的T细胞群可与呈递抗原的肿瘤细胞接合且杀伤这些呈递抗原的肿瘤细胞。

[2519] 对于本领域技术人员将显而易见的是,本文所描述的本披露的方法的其他合适修改和改编是明显的,且在不脱离本披露的范围或本文所披露的实施例的情况下,可以使用合适的等价方案进行这些修改和改编。现在已经详细描述了本披露,通过参考以下实例将更清楚地理解本披露,这些实例仅出于说明目的而被包括,并且不旨在具有限制性。

[2520] 实例

[2521] 实例1

[2522] 描述了具有表7-9中所示结构的有效负载、接头和可缀合接头-有效负载(接头-药物,即L-D)化合物的合成方法。可缀合接头-有效负载用于制备抗体-药物缀合物(ADC)。示

例性ADC描述于实例3-5中。

[2523] 1.1试剂和材料

[2524] 以下合成方法中所使用的起始物质是可商购的或可通过标准方法从已知材料容易地制备。所披露的可缀合接头-有效负载可使用本文所描述的反应和技术制备。在以下描述的合成方法的描述中,应当理解,所有提出的反应条件,包括溶剂、反应气氛、反应温度、实验的持续时间和处理程序的选择,都可以选择作为该反应的条件标准,除非另有说明。有机合成领域的技术人员应理解,存在于分子的不同部分上的官能团应与所提出的试剂和反应相容。与反应条件不相容的取代基对于本领域技术人员是显而易见的,并且因此本文示出了替代方法。

[2525] 制备型液相色谱-质谱(LC/MS)使用Waters自动纯化系统和XTerra MS C18柱(5μm,19mmx100mm)在酸性流动相条件下进行。在400MHz下,使用Varian仪器(安捷伦科技公司(Agilent Technologies))记录核磁共振(NMR)谱。使用Biotage Emrys Liberator或Initiator微波进行微波加热。使用Teledyne Isco Combiflash Rf200d进行柱色谱法。使用Büchi旋转式蒸发器或Genevac离心式蒸发器进行溶剂移除。

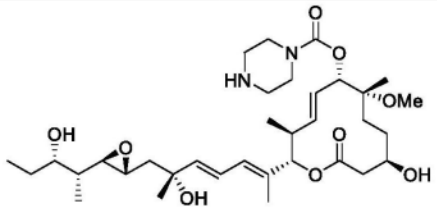
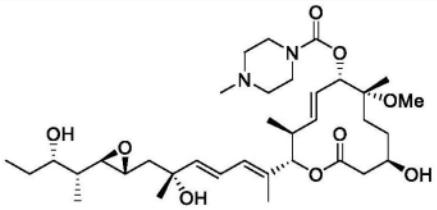
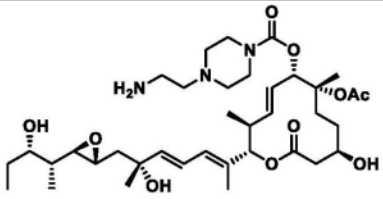
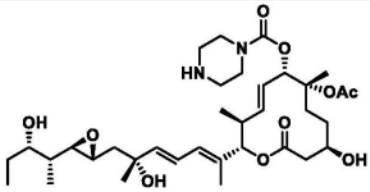
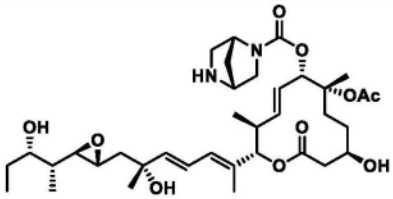
[2526] 术语/缩写:如本文所使用,术语“惰性”是指用基本上不含水分的惰性气体(如氮气或氩气)置换反应器(例如反应容器、烧瓶、玻璃反应器)中的空气。本文中使用以下缩写:DCM=二氯甲烷,DMF=二甲基甲酰胺,HPLC=高效液相色谱法,KHMDS=双(三甲基甲硅烷基)酰胺钾,LC/MS=液相色谱-质谱法,MeOH=甲醇,RT=室温,TBSCl=叔丁基二甲基氯硅烷,THF=四氢呋喃,TLC=薄层色谱法。使用以下缩写表示多重性:s=单峰,d=二重峰,t=三重峰,q=四重峰,quint=五重峰,sxt=六重峰,m=多重峰,dd=双二重峰,ddd=双重双二重峰,dt=双三重峰,br s=宽单峰。

[2527] LC/MS:流动相=A(0.1%甲酸,在H2O中)和B(0.1%甲酸,在乙腈中)。梯度=在1.8分钟内5%至95% B。柱=Waters Acquity BEH C18柱(1.7μm,2.1x50mm)。

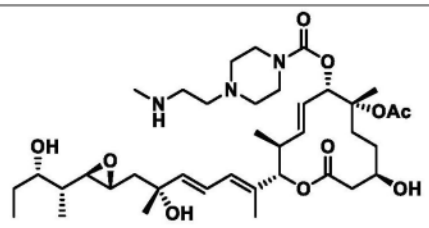
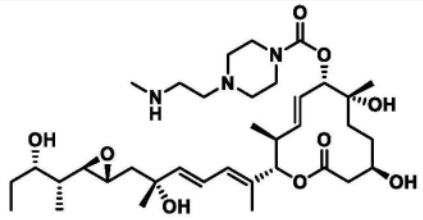
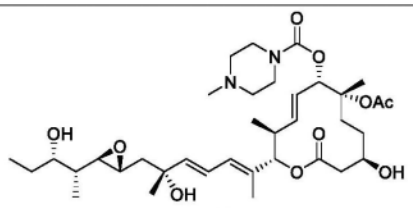
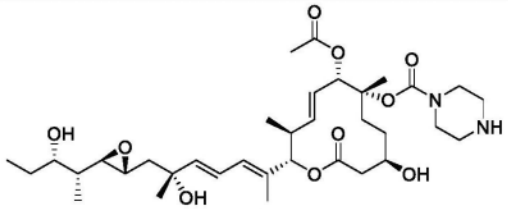
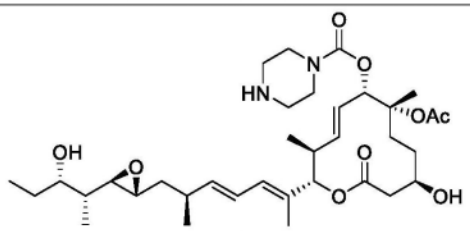
[2528] 参考文献:美国专利号7,884,128和7,816,401描述了合成普拉二烯内酯B和D的示例性方法,并且将这些文献各自关于这些方法通过引用并入本文。普拉二烯内酯B和D的合成还可使用Kanada等人((2007)Angew Chem Int Ed.[应用化学国际版]46:4350-5)中所描述的示例性方法进行。Kanada等人和国际公开号WO 2003/099813描述了自普拉二烯内酯D(WO 2003/099813的11107D)合成E7107(D11)(WO 2003/099813的化合物45)的示例性方法。对应的美国专利号为Kotake等人的7,550,503。将这些参考文献的每一个关于所述合成方法并入本文。

[2529] 表7.示例性药物部分(有效负载)的结构

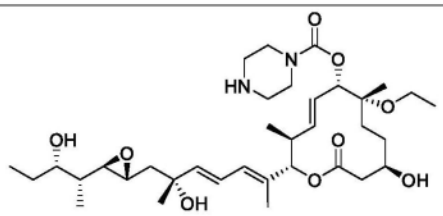
[2530]

有效负载结构/ID （有效负载系列）
 D1 （普拉二烯内酯 D）
 D2 （普拉二烯内酯 D）
 D3 （普拉二烯内酯 D）
 D4 （普拉二烯内酯 D）
 D5 （普拉二烯内酯 D）

[2531]

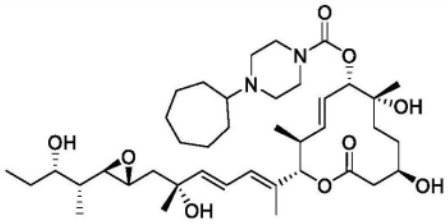
 D6 （普拉二烯内酯 D）
 D7 （普拉二烯内酯 D）
 D4’ （普拉二烯内酯 D）
 D8 （普拉二烯内酯 D）
 D9 （普拉二烯内酯 D）

[2532]



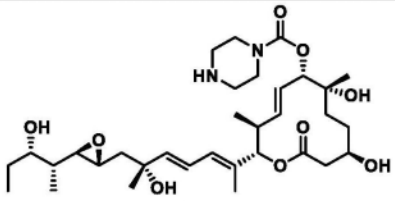
D10

（普拉二烯内酯 D）



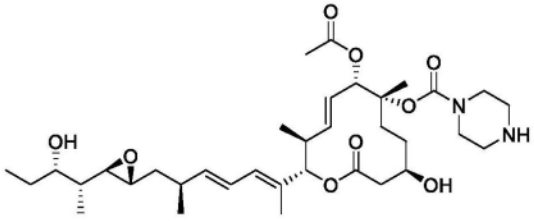
D11（E7107）

（普拉二烯内酯 D）



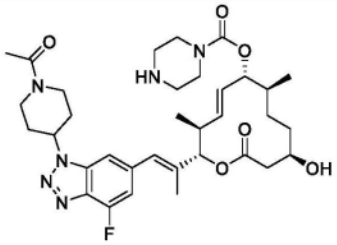
D12

（普拉二烯内酯 D）



D13

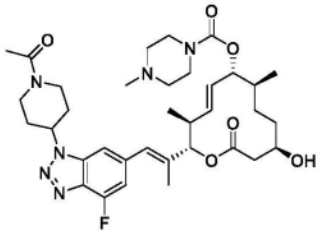
（普拉二烯内酯 D）



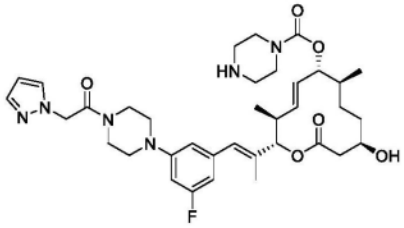
D14

（芳基普拉二烯内酯）

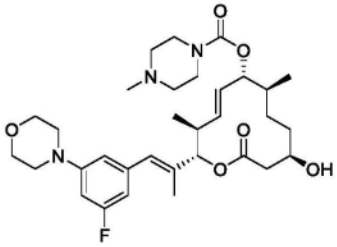
[2533]



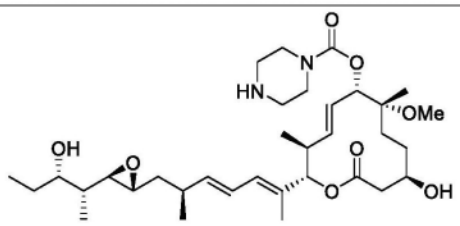
D15
（芳基普拉二烯内酯）



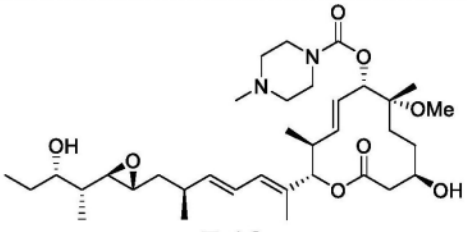
D16
（芳基普拉二烯内酯）



D17
（芳基普拉二烯内酯）

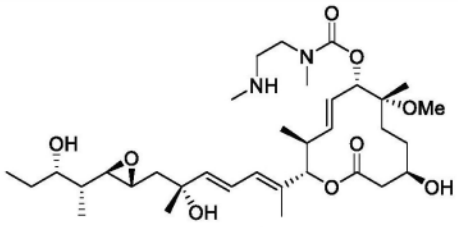


D18
（普拉二烯内酯 B）



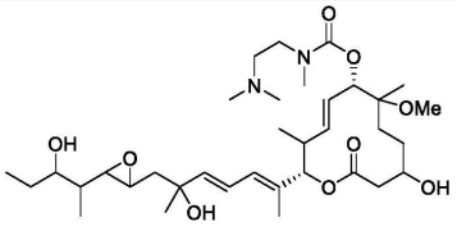
D19
（普拉二烯内酯 B）

[2534]



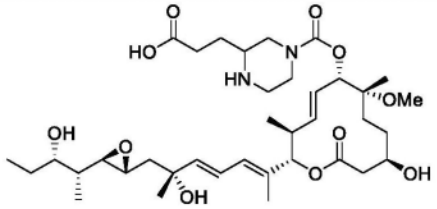
D20

（普拉二烯内酯 D）



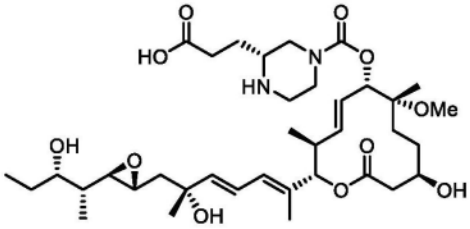
D21

（普拉二烯内酯 D）



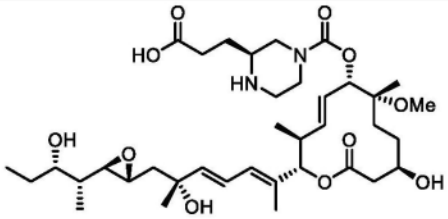
D22

（两性离子型普拉二烯内酯 D）



D23

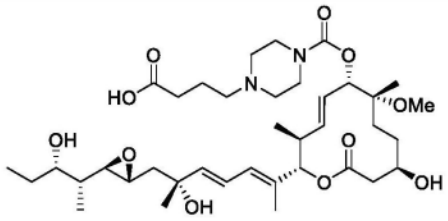
（两性离子型普拉二烯内酯 D）



D24

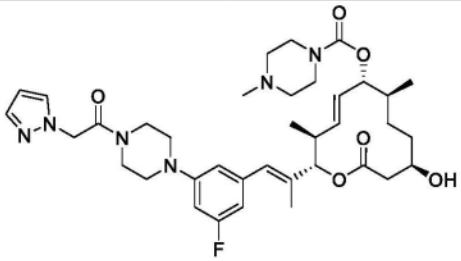
（两性离子型普拉二烯内酯 D）

[2535]



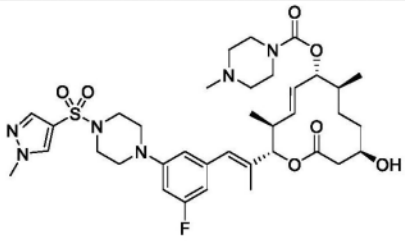
D25

（两性离子型普拉二烯内酯 D）



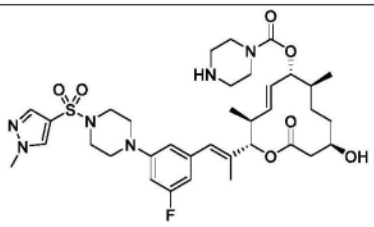
D26

（芳基普拉二烯内酯）



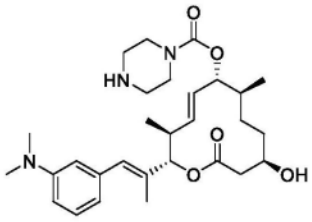
D27

（芳基普拉二烯内酯）



D28

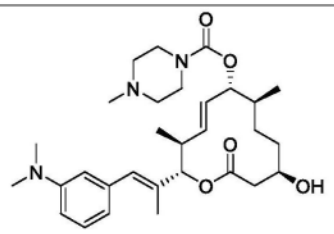
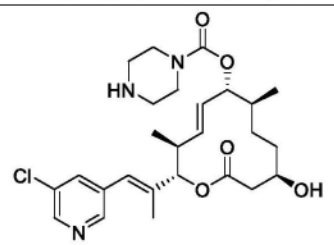
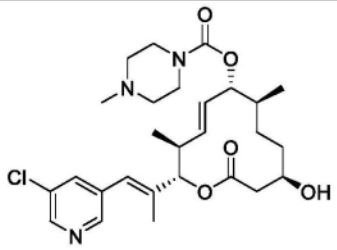
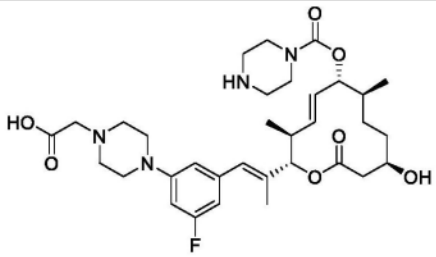
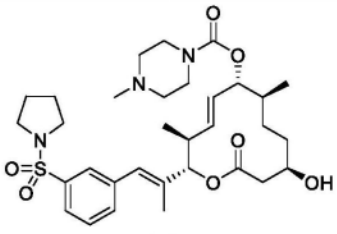
（芳基普拉二烯内酯）



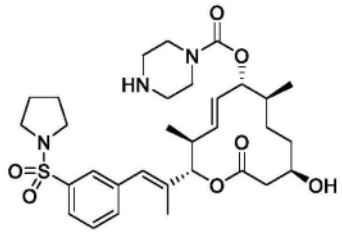
D29

（芳基普拉二烯内酯）

[2536]

 D30 （芳基普拉二烯内酯）
 D31 （芳基普拉二烯内酯）
 D32 （芳基普拉二烯内酯）
 D33 （两性离子型芳基普拉二烯内酯）
 D34 （两性离子型芳基普拉二烯内酯）

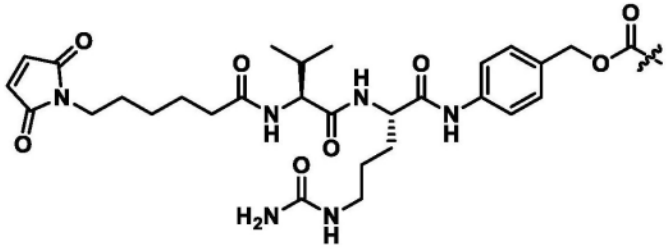
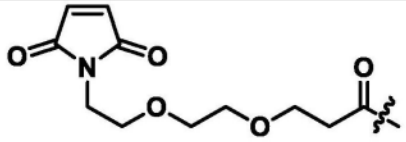
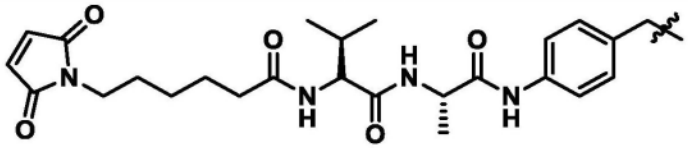
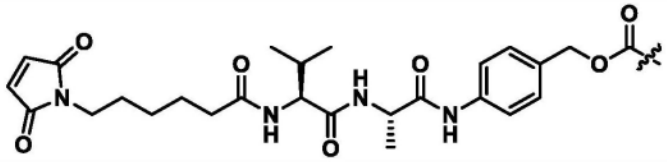
[2537]



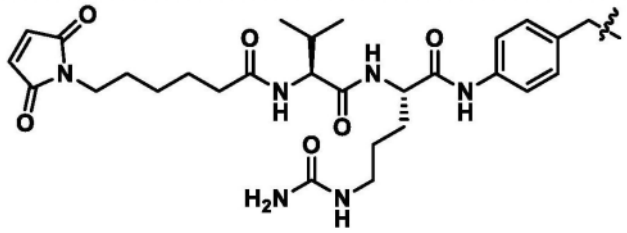
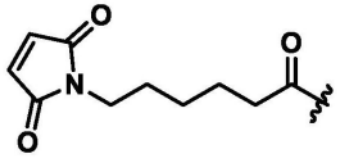
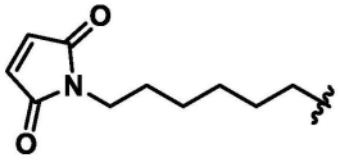
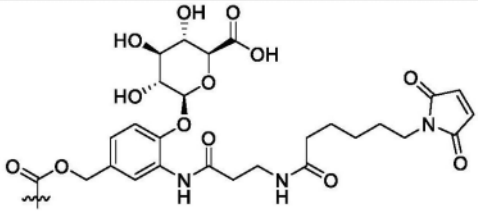
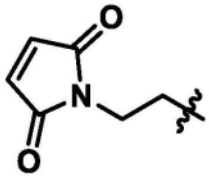
D35

（两性离子型芳基普拉二烯内酯）

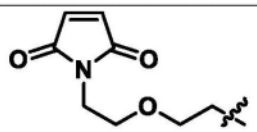
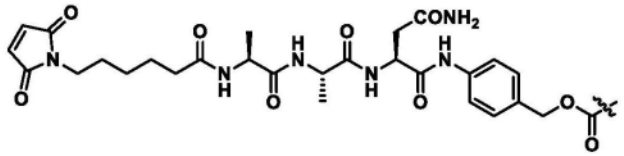
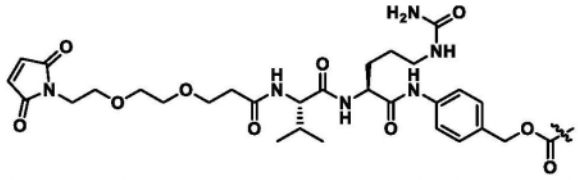
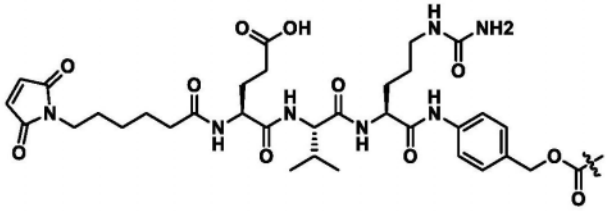
[2538] 表8.示例性接头的结构

接头结构/ID （IUPAC 名称）
 ADL1-“MC-Val-Cit-pABC” （{4-[(2S)-5-(氨甲酰基氨基)-2-[(2S)-2-[6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酰胺基]-3-甲基丁酰胺基]戊酰胺基]苯基}甲酸甲酯）
 ADL2-“MC-$(PEG)_2$-CO” （3-{2-[2-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)乙氧基]乙氧基}丙醛）
 ADL5-“MC-Val-Ala-pAB” （6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)-N-[(1S)-2-甲基-1-{[(1S)-1-[(4-甲基苯基)氨甲酰基]乙基]氨甲酰基}丙基]己酰胺）


[2539]

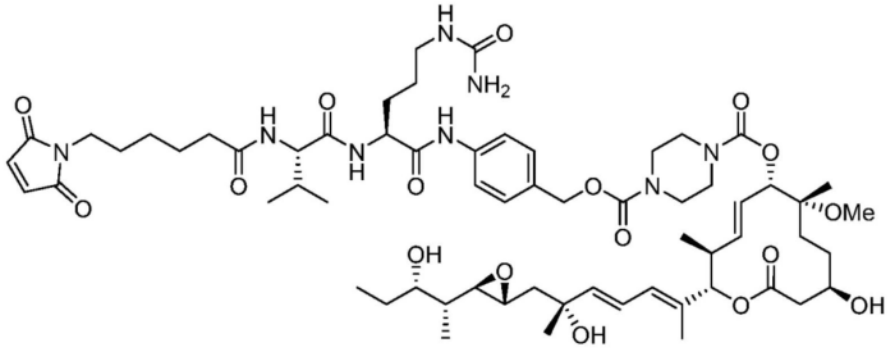
ADL6-“MC-Val-Ala-pABC” （{4-[(2S)-2-[(2S)-2-[6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酰胺基]-3-甲基丁酰胺基]丙酰胺基]苯基}甲酸甲酯）
 ADL7-“MC-Val-Cit-pAB” （N-[(1S)-1-{[(1S)-4-(氨甲酰基氨基)-1-[(4-甲基苯基)氨甲酰基]丁基]氨甲酰基}-2-甲基丙基]-6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酰胺）
 ADL10-“MC” （6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己醛）
[2540]  ADL12-“Mal-Hex” （1-己基-2,5-二氢-1H-吡咯-2,5-二酮）
 ADL13-“MC-β-葡萄糖醛酸苷” （(2S,3S,4S,5R,6S)-6-(2-{3-[6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酰胺基]丙酰胺基}-4-[(甲酰氧基)甲基]苯氧基)-3,4,5-三羟基噁烷-2-甲酸）
 ADL14-“Mal-Et”

[2541]

（1-乙基-2,5-二氢-1H-吡咯-2,5-二酮）
 ADL15-“Mal-Et-O-Et” （1-(2-乙氧基乙基)-2,5-二氢-1H-吡咯-2,5-二酮）
 ADL21-“MC-Ala-Ala-Asp-pABC”
 ADL22-“Mc-PEG2-Val-Cit-pABC”
 ADL23-“MC-Glu-Val-Cit-pABC”

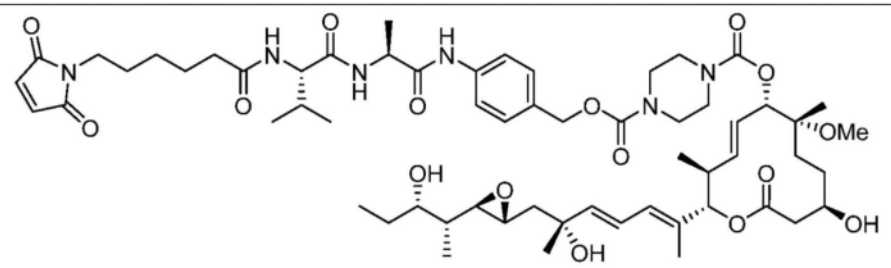
[2542] 表9.示例性可缀合接头-有效负载(L-D)化合物的结构

[2543]

 化学式：$C_{63}H_{94}N_8O_{17}$ 精确质量：1234.67 分子量：1235.48

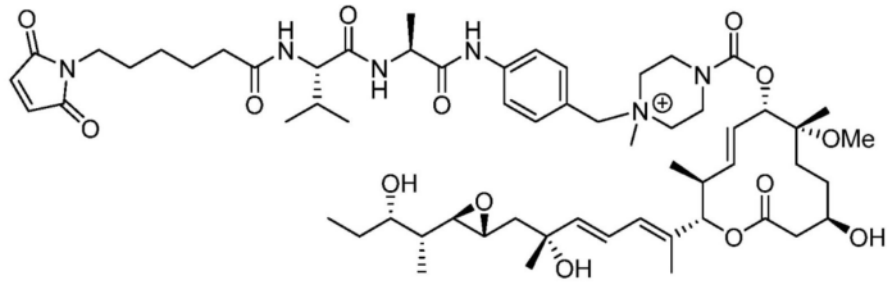
[2544]

ADL1-D1



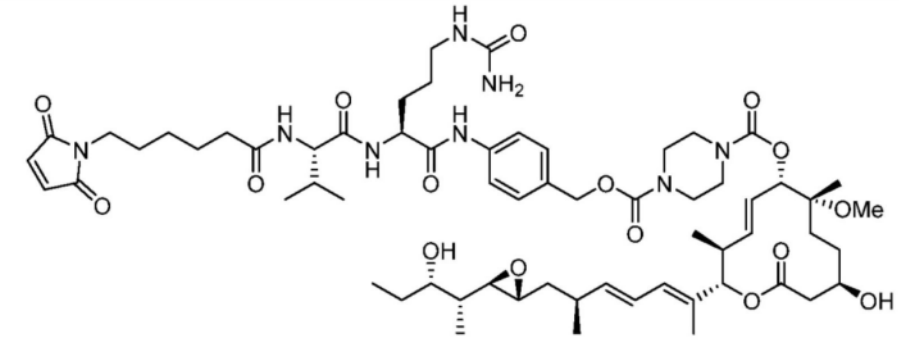
化学式：$C_{60}H_{88}N_6O_{16}$
精确质量：1148.63
分子量：1149.39

ADL6-D1



化学式：$C_{60}H_{91}N_6O_{14}^+$
精确质量：1119.66
分子量：1120.42

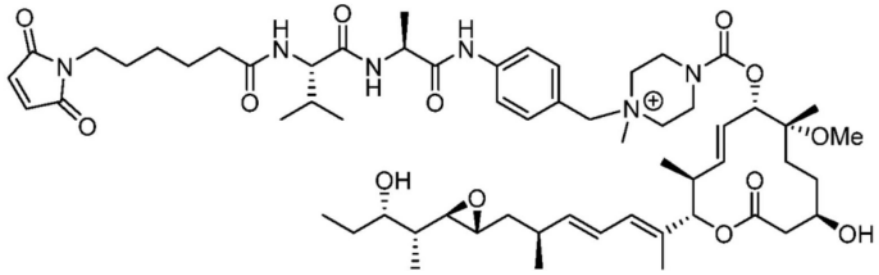
ADL5-D2



化学式：$C_{63}H_{94}N_8O_{16}$
精确质量：1218.68
分子量：1219.49

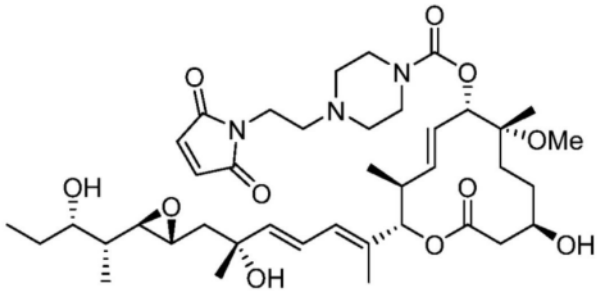
ADL1-D18

[2545]



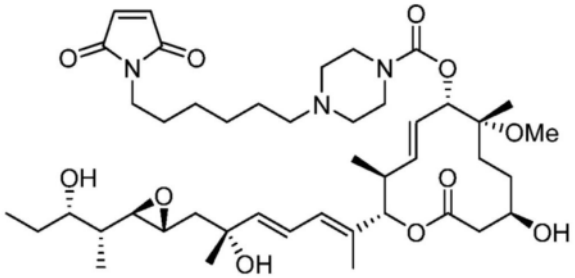
化学式：$C_{60}H_{91}N_6O_{13}^+$
精确质量：1103.66
分子量：1104.42

ADL5-D19



化学式：$C_{40}H_{61}N_3O_{11}$
精确质量：759.43
分子量：759.94

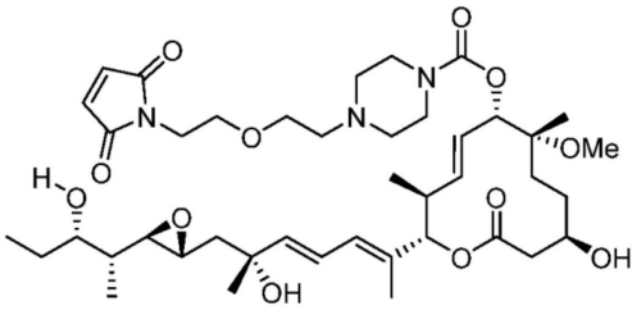
ADL14-D1



化学式：$C_{44}H_{69}N_3O_{11}$
精确质量：815.49
分子量：816.05

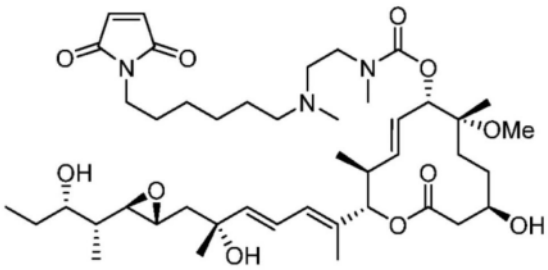
ADL12-D1

[2546]



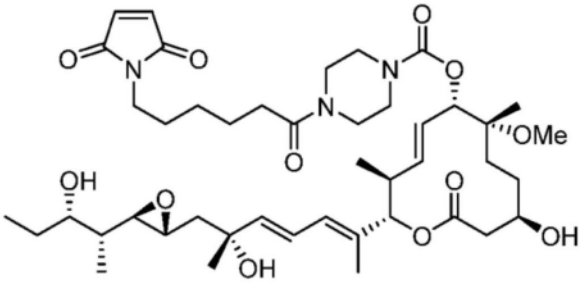
化学式: $C_{42}H_{65}N_3O_{12}$
精确质量: 803.46
分子量: 803.99

ADL15-D1



化学式: $C_{44}H_{71}N_3O_{11}$
精确质量: 817.51
分子量: 818.06

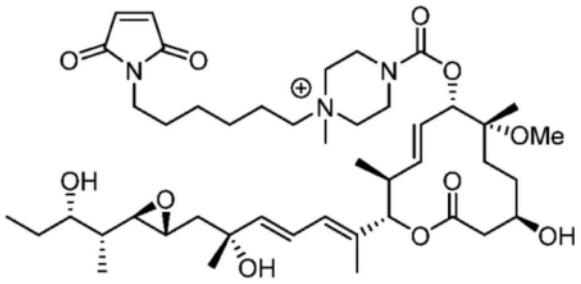
ADL12-D20



化学式: $C_{44}H_{67}N_3O_{12}$
精确质量: 829.47
分子量: 830.03

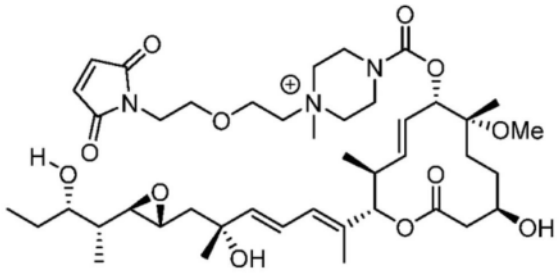
ADL10-D1

[2547]



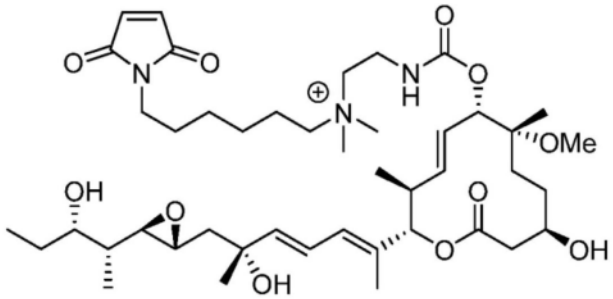
化学式: $C_{45}H_{72}N_3O_{11}^+$
精确质量: 830.52
分子量: 831.08

ADL12-D2



化学式: $C_{43}H_{68}N_3O_{12}^+$
精确质量: 818.48
分子量: 819.03

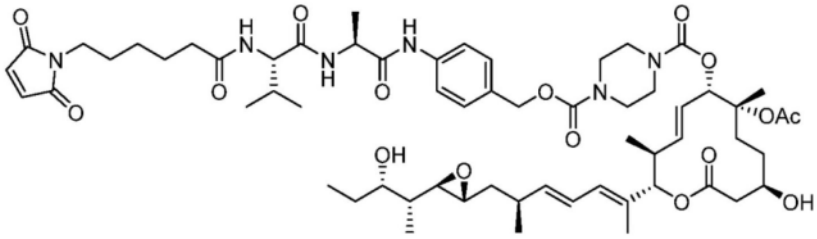
ADL15-D2



化学式: $C_{44}H_{72}N_3O_{11}^+$
精确质量: 818.52
分子量: 819.07

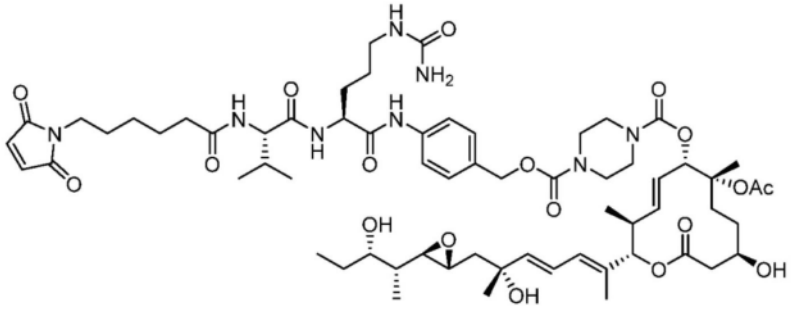
ADL12-D21

[2548]



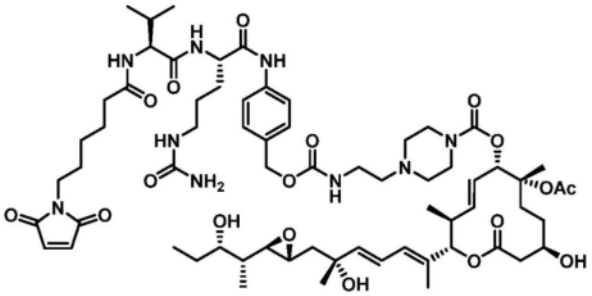
化学式：$C_{61}H_{88}N_6O_{16}$
精确质量：1160.63
分子量：1161.40

ADL6-D9



化学式：$C_{64}H_{94}N_8O_{18}$
精确质量：1262.67
分子量：1263.49

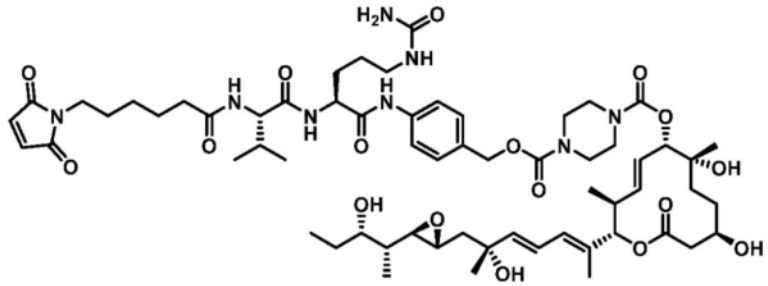
ADL1-D4



化学式：$C_{66}H_{99}N_9O_{18}$
分子量：1306.56

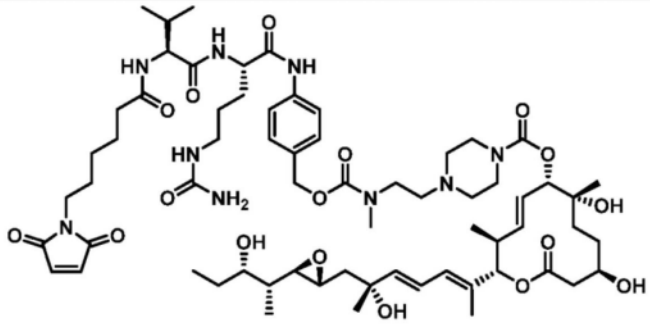
ADL1-D3

[2549]



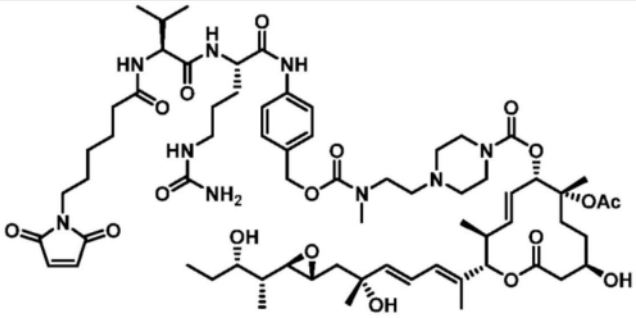
化学式：$C_{62}H_{92}N_8O_{17}$
分子量：1221.46

ADL1-D12



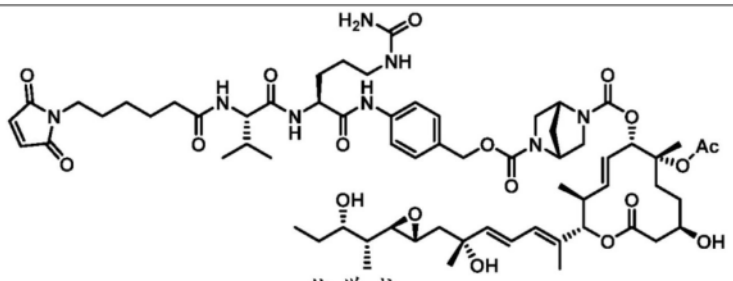
化学式：$C_{65}H_{99}N_9O_{17}$
分子量：1278.55

ADL1-D7



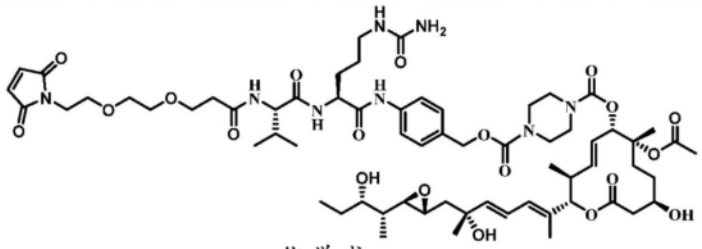
化学式：$C_{67}H_{101}N_9O_{18}$
分子量：1320.59

ADL1-D6



化学式：$C_{65}H_{94}N_8O_{18}$
分子量：1275.51

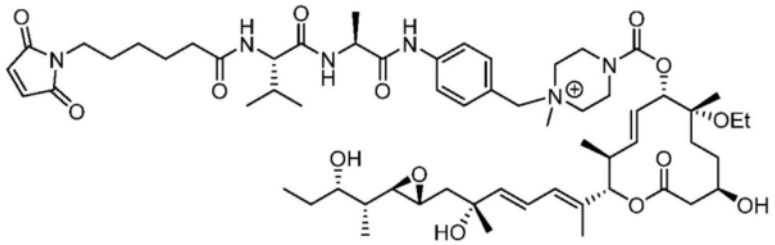
ADL1-D5



化学式：$C_{65}H_{96}N_8O_{20}$
分子量：1309.52

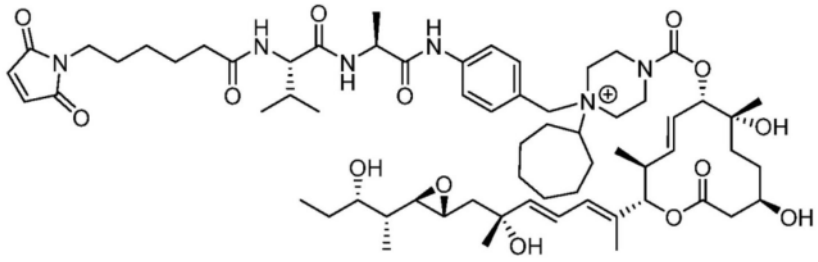
ADL22-D4

[2550]



化学式：$C_{61}H_{93}N_6O_{14}^+$
精确质量：1133.67
分子量：1134.44

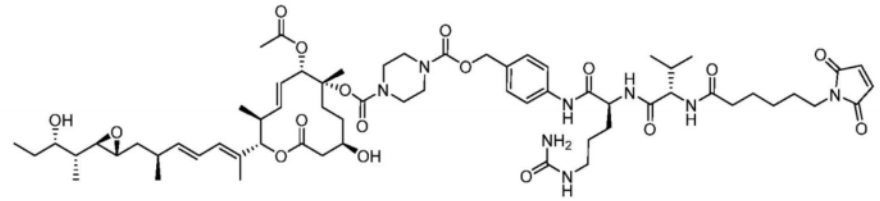
ADL5-D10



化学式：$C_{65}H_{99}N_6O_{14}^+$
精确质量：1187.72
分子量：1188.53

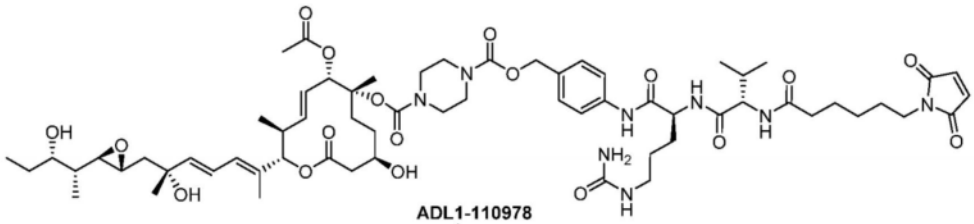
ADL5-D11

[2551]



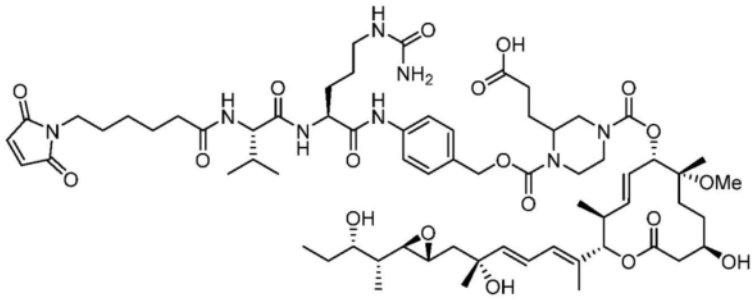
化学式：$C_{64}H_{94}N_8O_{17}$
精确质量：1246.67
分子量：1247.50

ADL1-D13



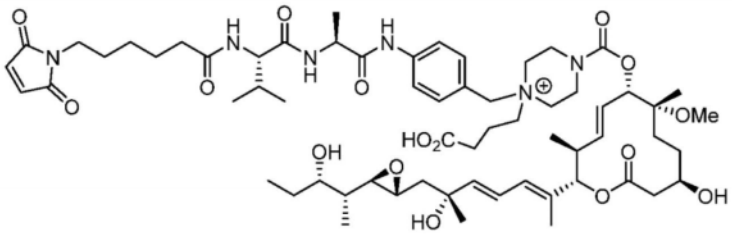
ADL1-110978
化学式：$C_{64}H_{94}N_8O_{18}$
精确质量：1262.67
分子量：1263.49

ADL1-D8



化学式：$C_{66}H_{98}N_8O_{19}$
精确质量：1306.69
分子量：1307.55

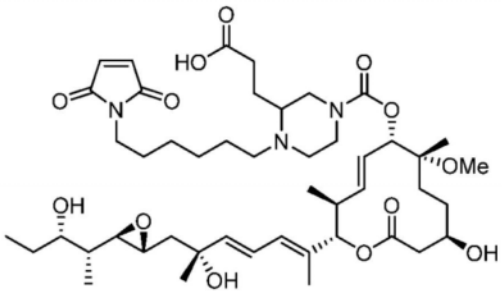
ADL1-D22



化学式：$C_{63}H_{95}N_6O_{16}^+$
精确质量：1191.68
分子量：1192.48

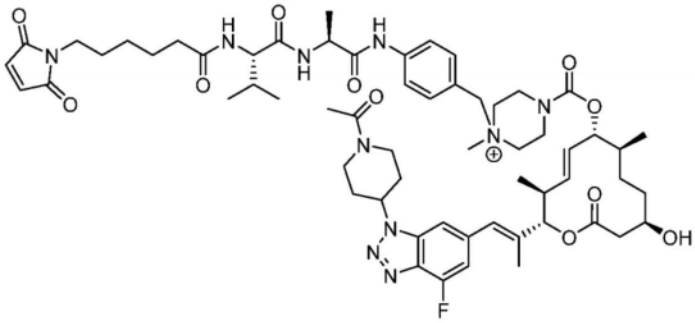
ADL5-D25

[2552]



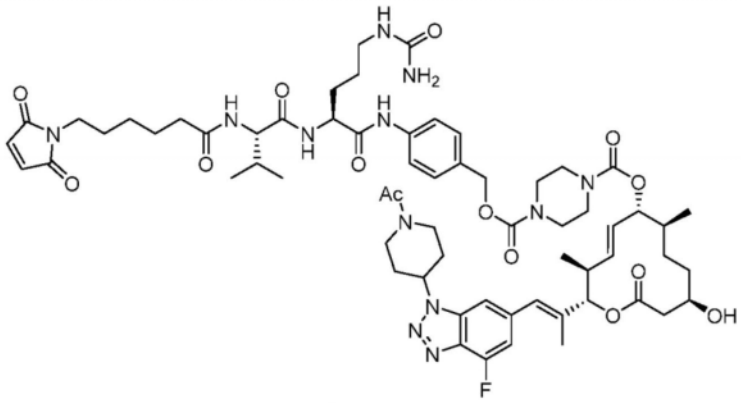
化学式：$C_{47}H_{73}N_3O_{13}$
精确质量：887.51
分子量：888.11

ADL12-D22



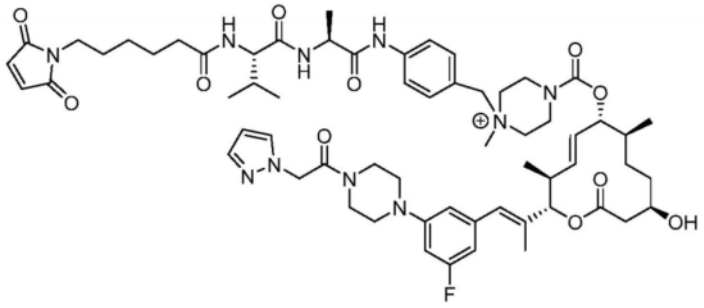
化学式：$C_{60}H_{82}FN_{10}O_{11}^{+}$
精确质量：1137.61
分子量：1138.37

ADL5-D15



化学式：$C_{63}H_{85}FN_{12}O_{14}$
精确质量：1252.63
分子量：1253.44

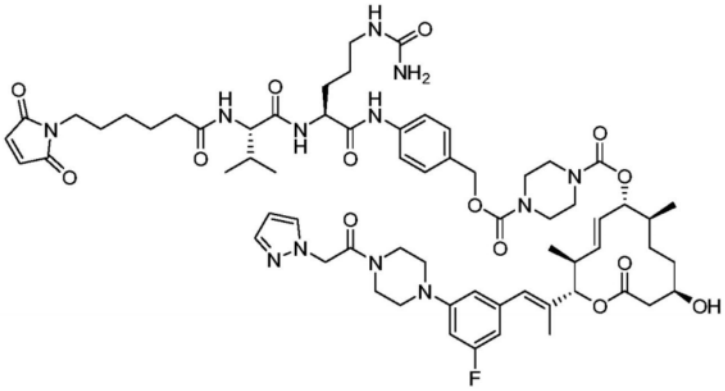
ADL1-D14



化学式：$C_{62}H_{84}FN_{10}O_{11}^{+}$
精确质量：1163.63
分子量：1164.41

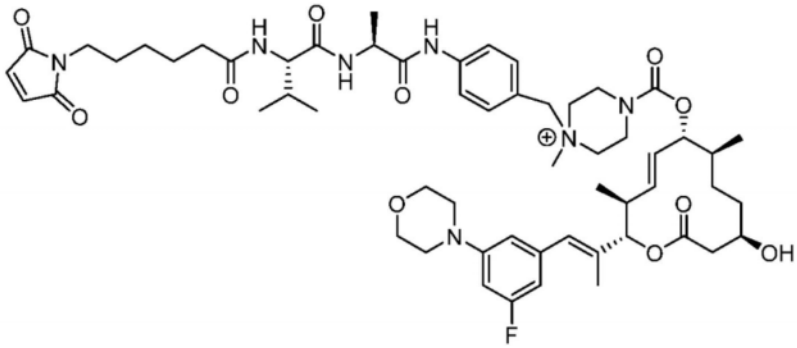
ADL5-D26

[2553]



化学式：$C_{85}H_{87}FN_{12}O_{14}$
精确质量：1278.64
分子量：1279.48

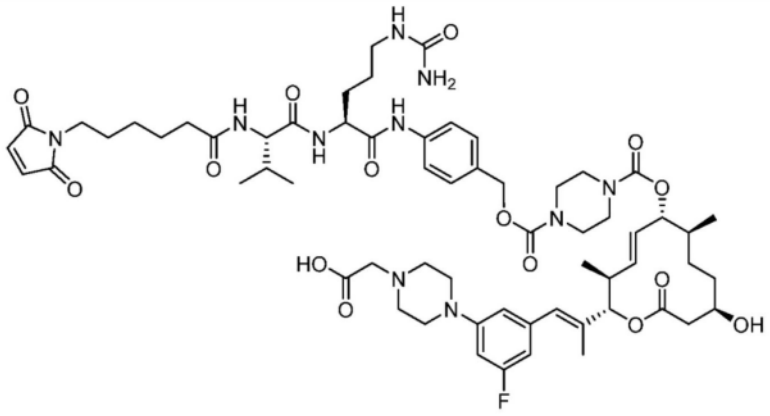
ADL1-D16



化学式：$C_{57}H_{79}FN_{7}O_{11}^{+}$
精确质量：1056.58
分子量：1057.29

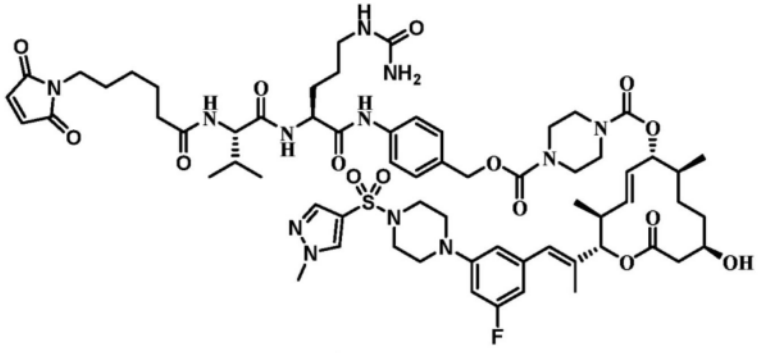
ADL5-D17

[2554]



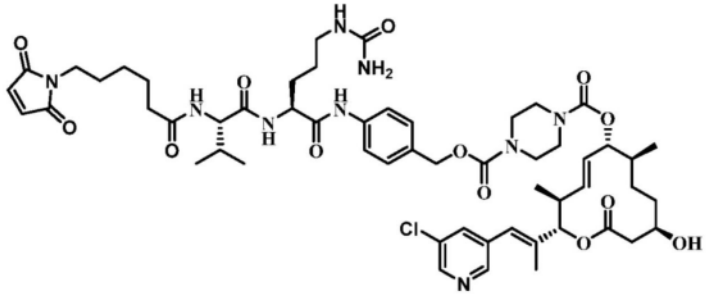
化学式: $C_{62}H_{85}FN_{10}O_{15}$
精确质量 : 1228.62
分子量 : 1229.42

ADL1-D33



化学式 : $C_{64}H_{87}FN_{12}O_{15}S$
分子量 : **1315.53**

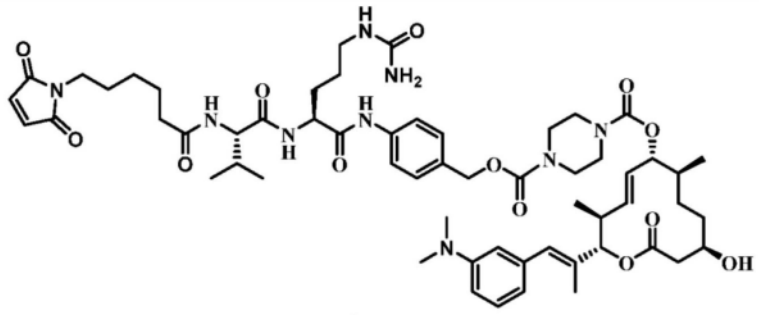
ADL1-D28



化学式 : $C_{55}H_{74}ClN_9O_{13}$
分子量: **1104.70**

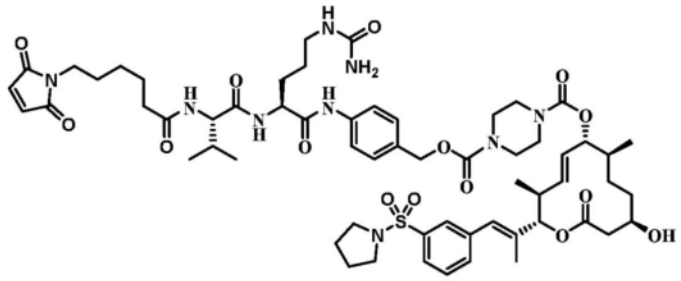
ADL1-D31

[2555]



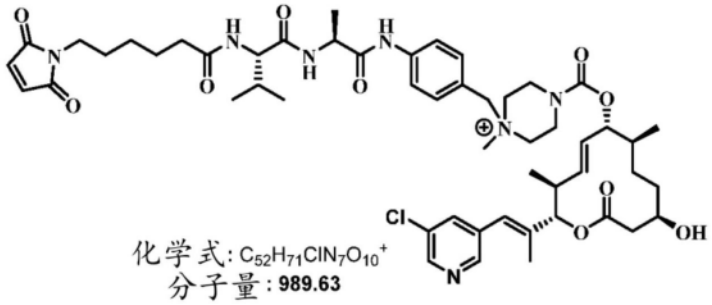
化学式：$C_{58}H_{81}N_9O_{13}$
分子量：1112.34

ADL1-D29



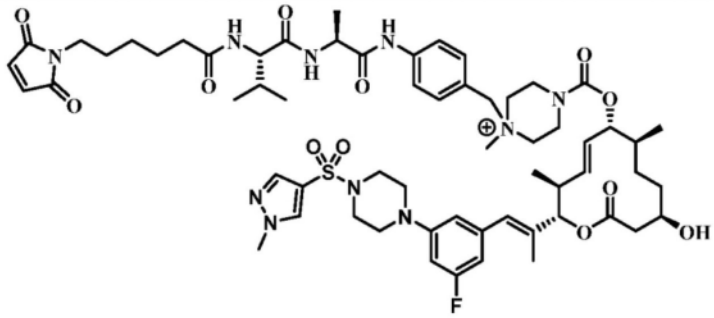
化学式：$C_{60}H_{83}N_9O_{15}S$
分子量：1202.43

ADL1-D35



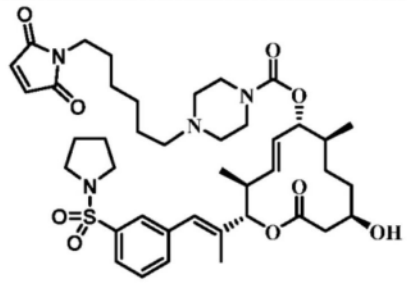
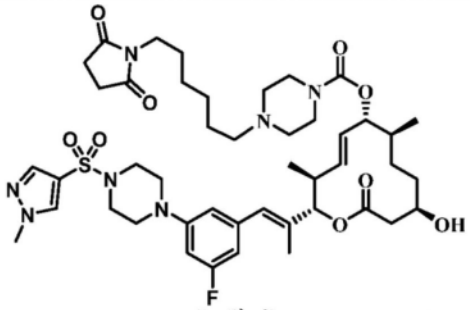
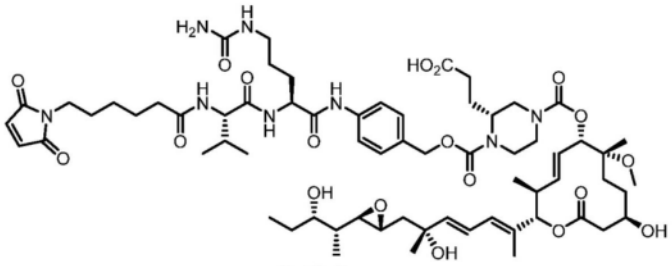
化学式：$C_{52}H_{71}ClN_7O_{10}^+$
分子量：989.63

ADL5-D32

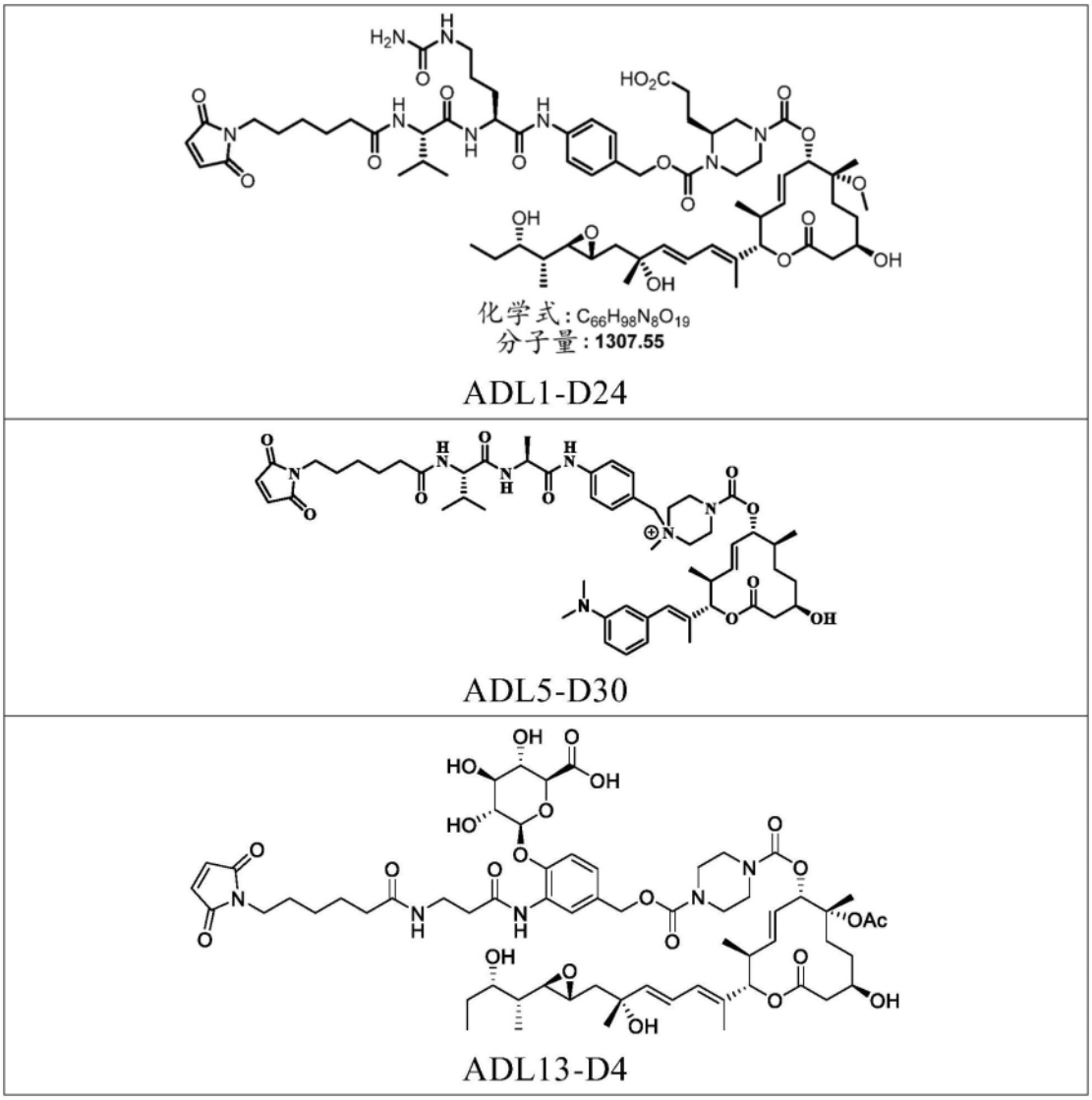


化学式：$C_{61}H_{84}FN_{10}O_{12}S^+$
分子量：1200.46

[2556]

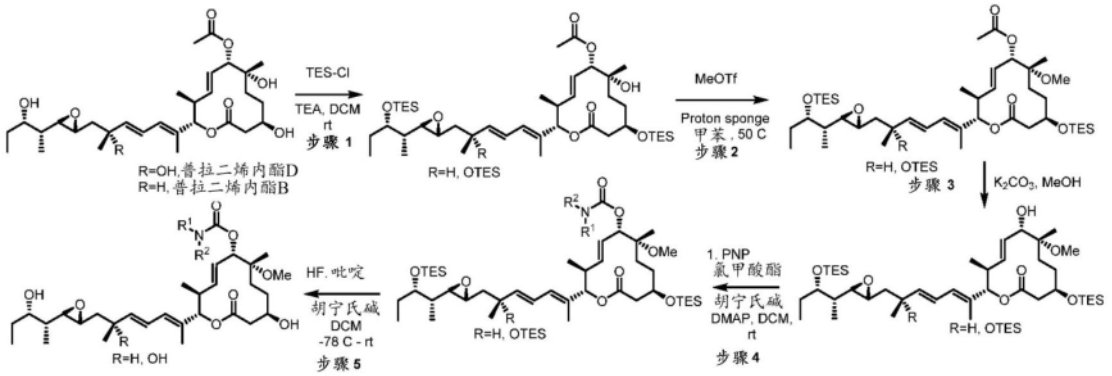
ADL5-D27
 化学式：$C_{41}H_{58}N_4O_9S$ 分子量：**782.99** ADL12-D35
 化学式：$C_{45}H_{64}FN_7O_9S$ 分子量：**898.11** ADL12-D28
 化学式：$C_{66}H_{98}N_8O_{19}$ 分子量：**1307.55** ADL1-D23

[2557]



[2558] 1.2基于普拉二烯内酯的有效负载的制备1.2.1概述-通用程序1

[2559]



[2560] 方案1

[2561] 步骤1:将(2S,3S,6S,7R,10R,E)-7,10-二羟基-2-((R,2E,4E)-6-羟基-7-((2S,3S)-3-((2R,3S)-3-羟基戊-2-基)环氧乙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-3,7-二甲基-12-氧代氧杂环十二碳-4-烯-6-基乙酸酯(1.7g,3.154mmol)、三乙胺(4.40mL,31.536mmol)、1,2-二氯乙烷(31.5mL,3.154mmol)组合并在室温下搅拌。添加三乙基氯硅烷(2.1mL,12.615mmol)并搅拌过夜。将盐水倒入反应混合物中并搅拌30分钟,且分离有机层。

将水层用DCM(3X)反萃取。将有机层合并,干燥(无水Na_2SO_4),浓缩至干,并色谱分离,得到(2S,3S,6S,7R,10R,E)-7-羟基-3,7-二甲基-2-((R,2E,4E)-6-甲基-6-((三乙基甲硅烷基)氧基)-7-((2S,3S)-3-((2S,3S)-3-((三乙基甲硅烷基)氧基)戊-2-基)环氧乙烷-2-基)庚-2,4-二烯-2-基)-12-氧代-10-((三乙基甲硅烷基)氧基)氧杂环十二碳-4-烯-6-基乙酸酯(1.274g,1.423mmol,45.1%产率)。

[2562] ^{1}H-NMR(400MHz,DMSO-d6):δppm 0.51-0.64(m,18H)0.74-0.84(m,9H)0.90-0.97(m,26H)1.04(s,3H)1.18(s,4H)1.37(s,3H)1.41-1.57(m,4H)1.69(s,3H)1.84-1.93(m,1H)2.00-2.05(m,3H)2.24-2.35(m,1H)2.38-2.45(m,1H)2.72-2.80(m,1H)3.28-3.30(m,1H)3.62-3.70(m,1H)3.80-3.90(m,1H)4.56(s,1H)4.81-4.93(m,2H)5.41-5.52(m,1H)5.63-5.73(m,1H)5.77-5.87(m,1H)6.01-6.12(m,1H)6.42(dd,J=15.12,11.11Hz,1H)。

[2563] 步骤2:在0℃下,向(2S,3S,6S,7R,10R,E)-7-羟基-3,7-二甲基-2-((R,2E,4E)-6-甲基-6-((三乙基甲硅烷基)氧基)-7-((2S,3S)-3-((2S,3S)-3-((三乙基甲硅烷基)氧基)戊-2-基)环氧乙烷-2-基)庚-2,4-二烯-2-基)-12-氧代-10-((三乙基甲硅烷基)氧基)氧杂环十二碳-4-烯-6-基乙酸酯(0.7g,0.782mmol)于甲苯(4.16mL,39.085mmol)中的溶液中添加N,N,N',N'-四甲基-1,8-萘二胺(1.173g,5.472mmol),随后添加三氟甲烷磺酸甲酯(0.354mL,3.127mmol)。然后,使反应混合物升温至50℃并加热3小时。蒸发溶剂。通过柱色谱法纯化,得到呈无色油状物的(2S,3S,6S,7R,10R,E)-7-甲氧基-3,7-二甲基-2-((R,2E,4E)-6-甲基-6-((三乙基甲硅烷基)氧基)-7-((2S,3S)-3-((2S,3S)-3-((三乙基甲硅烷基)氧基)戊-2-基)环氧乙烷-2-基)庚-2,4-二烯-2-基)-12-氧代-10-((三乙基甲硅烷基)氧基)氧杂环十二碳-4-烯-6-基乙酸酯(467mg,0.513mmol,65.7%产率)。

[2564] ^{1}H-NMR(400MHz,MeOH-d4):δppm 0.62-0.70(m,18H)0.83-0.95(m,13H)0.99-1.07(m,27H)1.22(s,3H)1.24-1.36(m,2H),1.28-1.28(m,1H)1.45(s,3H)1.47-1.65(m,8H)1.78(d,J=0.88Hz,3H)1.91-2.00(m,1H)2.07(s,3H)2.37-2.45(m,1H)2.51-2.68,(m,3H)2.88-2.92(m,1H)3.20-3.24(m,1H)3.35(s,3H)3.74-3.82(m,1H)3.93-4.02(m,1H)4.94-4.99(m,1H)5.08-5.14(m,1H),5.53-5.64(m,1H)5.70-5.79(m,1H)5.81-5.88(m,1H)6.12-6.18(m,1H)6.47-6.58(m,1H)。

[2565] 步骤3:将(2S,3S,6S,7R,10R,E)-7-羟基-3,7-二甲基-2-((R,2E,4E)-6-甲基-6-((三乙基甲硅烷基)氧基)-7-((2R,3R)-3-((2S,3S)-3-((三乙基甲硅烷基)氧基)戊-2-基)环氧乙烷-2-基)庚-2,4-二烯-2-基)-12-氧代-10-((三乙基甲硅烷基)氧基)氧杂环十二碳-4-烯-6-基乙酸酯(500mg,0.558mmol)溶解于MeOH(6009μL,148.524mmol)中并添加碳酸钾(232mg,1.675mmol)。在室温下搅拌反应混合物1小时并显示反应完成。将反应混合物用水稀释并用EtOAc(3X)萃取。将合并的有机层用盐水洗涤,经硫酸钠干燥,过滤并浓缩。通过柱色谱法纯化,得到(4R,7R,8S,11S,12S,E)-7,8-二羟基-7,11-二甲基-12-((R,2E,4E)-6-甲基-6-((三乙基甲硅烷基)氧基)-7-((2R,3R)-3-((2S,3S)-3-((三乙基甲硅烷基)氧基)戊-2-基)环氧乙烷-2-基)庚-2,4-二烯-2-基)-4-((三乙基甲硅烷基)氧基)氧杂环十二碳-9-烯-2-酮(305mg,0.357mmol,64.0%产率)。

[2566] ^{1}H-NMR(400MHz,MeOH-d4):δppm 0.61-0.72(m,18H)0.82-0.92(m,7H)0.92-1.06(m,30H)1.19-1.40(m,7H)1.42-1.66(m,8H)1.51-1.52(m,1H)1.75-1.81(m,3H)1.91-2.01(m,1H)2.34-2.45(m,1H)2.51-2.61(m,2H)2.61-2.69(m,1H)2.86-2.94(m,1H)3.67-3.73

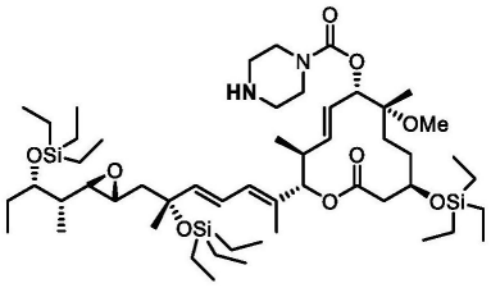
(m,1H)3.73-3.80(m,1H)3.89-3.96(m,1H)4.08-4.17(m,1H)4.93-4.99(m,1H)5.36-5.47(m,1H)5.67-5.78(m,1H)5.80-5.88(m,1H)6.10-6.19(m,1H)6.47-6.58(m,1H)。

[2567] 步骤4:将(4R,7R,8S,11S,12S,E)-8-羟基-7-甲氧基-7,11-二甲基-12-((R,2E,4E)-6-甲基-6-((三乙基甲硅烷基)氧基)-7-((2S,3S)-3-((2S,3S)-3-((三乙基甲硅烷基)氧基)戊-2-基)环氧乙烷-2-基)庚-2,4-二烯-2-基)-4-((三乙基甲硅烷基)氧基)氧杂环十二碳-9-烯-2-酮(0.386g,0.445mmol)、DCM(0.1M)、DMAP(1.0当量)、胡宁氏碱(5.0当量)、4-硝基苯基氯甲酸酯(1.8当量)组合并搅拌过夜。然后,用1N NaOH萃取反应混合物。干燥(无水Na_2SO_4)有机层并浓缩至干。将残余物与DCM(0.1M)、胡宁氏碱(5.0当量)、胺(2.0当量)混合,组合并搅拌1小时。将反应混合物浓缩并色谱分离,得到三TES-普拉二烯内酯氨基甲酸酯。

[2568] 步骤5:将三TES-普拉二烯内酯氨基甲酸酯(1当量)、DCM(0.04M)和DIPEA(191当量)组合并冷却至-78℃。添加氟化氢-吡啶(6.2当量)且使反应升温至室温并搅拌过夜。在冰浴中冷却反应混合物,然后添加饱和$NaHCO_3$,搅拌,并用DCM萃取。合并有机层,经无水Na_2SO_4干燥,浓缩,并色谱分离,得到普拉二烯内酯氨基甲酸酯。

[2569] 1.2.1.1D1

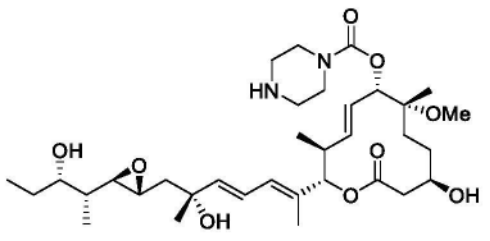
[2570] 采用通用程序1(如1.2.1部分中所概述)合成D1。

[2571] 

[2572] (2S,3S,6S,7R,10R,E)-7-甲氧基-3,7-二甲基-2-((R,2E,4E)-6-甲基-6-((三乙基甲硅烷基)氧基)-7-((2S,3S)-3-((2S,3S)-3-((三乙基甲硅烷基)氧基)戊-2-基)环氧乙烷-2-基)庚-2,4-二烯-2-基)-12-氧代-10-((三乙基甲硅烷基)氧基)氧杂环十二碳-4-烯-6-基哌嗪-1-甲酸酯(240mg,0.245mmol,55.1%产率)。LC/MS(ESI,m/z),980.4$[M+H]^+$。

[2573] ^{1}H-NMR(400MHz,$CDCl_3$-d):δppm 0.56-0.66(m,18H)0.78-0.91(m,9H)0.96(t,J=7.91Hz,27H)1.18-1.22(m,3H)1.23-1.28(m,1H)1.37-1.41(m,3H)1.41-1.63(m,7H)1.69-1.74(m,3H)1.89(dd,J=13.87,4.96Hz,1H)2.33-2.62(m,4H)2.78-2.89(m,5H),3.35(s,3H)3.43-3.52(m,4H)3.73(td,J=6.40,3.51Hz,1H)3.86(br dd,J=7.84,3.95Hz,1H)4.94-5.13(m,2H)5.58-5.76(m,3H)6.12,(br d,J=0.75Hz,1H)6.41(dd,J=15.06,11.04Hz,1H)。

[2574] D1

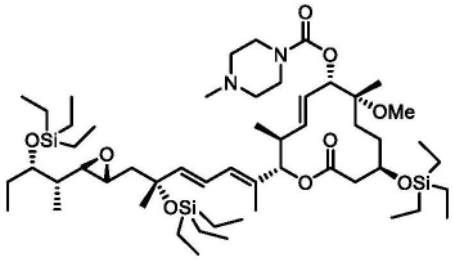
[2575] 

[2576] (2S,3S,6S,7R,10R,E)-10-羟基-2-((R,2E,4E)-6-羟基-7-((2R,3R)-3-((2R,3S)-3-羟基戊-2-基)环氧乙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-7-甲氧基-3,7-二甲基-12-氧代氧杂环十二碳-4-烯-6-基哌嗪-1-甲酸酯。

[2577] ^{1}H-NMR(400MHz,MeOH-d4):δppm 0.83-1.01(m,10H)1.23(s,3H)1.25-1.32(m,1H)1.35(s,3H)1.40-1.61(m,6H)1.61-1.71(m,2H)1.79(d,J=0.75Hz,3H)1.84-1.93(m,1H)2.45-2.63(m,3H)2.63-2.72(m,1H)2.77-2.85(m,4H)2.86-2.94(m,1H)3.33-3.37(m,3H)3.40-3.57(m,5H)3.77-3.89(m,1H)4.38-4.42(m,1H)5.01-5.12(m,2H)5.52-5.65(m,1H)5.69-5.80(m,1H)5.84-5.92(m,1H)6.09-6.18(m,1H)6.49-6.60(m,1H)。

[2578] 1.2.1.2D2

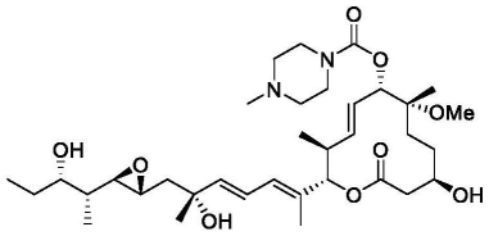
[2579] 采用通用程序1(如1.2.1部分中所概述)合成D2。

[2580] 

[2581] (2S,3S,6S,7R,10R,E)-7-甲氧基-3,7-二甲基-2-((R,2E,4E)-6-甲基-6-((三乙基甲硅烷基)氧基)-7-((2R,3R)-3-((2S,3S)-3-((三乙基甲硅烷基)氧基)戊-2-基)环氧乙烷-2-基)庚-2,4-二烯-2-基)-12-氧代-10-((三乙基甲硅烷基)氧基)氧杂环十二碳-4-烯-6-基4-甲基哌嗪-1-甲酸酯(413mg,0.416mmol,90%产率)。LC/MS(ESI,m/z),994[M+H]$^+$。

[2582] ^{1}H-NMR(400MHz,MeOH-d4):δppm 0.61-0.71(m,18H)0.83-0.94(m,9H)0.98-1.07(m,28H)1.23(s,3H)1.41-1.48(m,3H)1.48-1.65(m,7H)1.72-1.81(m,3H)1.93-1.99(m,1H)2.03(s,3H)2.32(s,3H)2.38-2.48(m,5H)2.52-2.67(m,3H)2.87-2.93(m,1H)3.47-3.61(m,4H)3.72-3.81(m,1H)3.96-4.04(m,1H)4.53-4.62(m,1H)4.93-5.07(m,2H)5.51-5.64(m,1H)5.69-5.79(m,1H)5.81-5.92(m,1H)6.09-6.21(m,1H)6.46-6.60(m,1H)。

[2583] D2

[2584] 

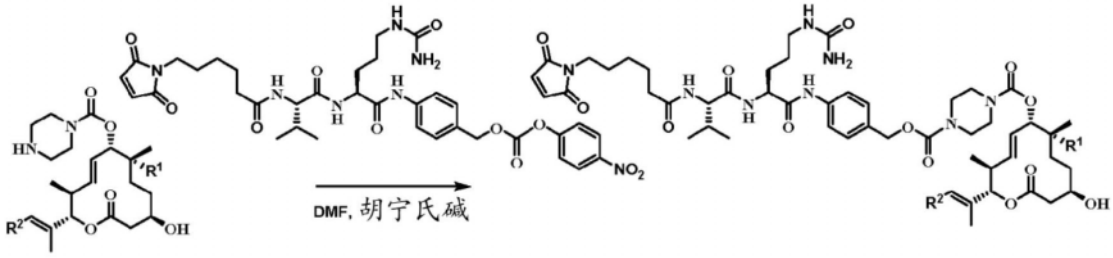
[2585] (2S,3S,6S,7R,10R,E)-10-羟基-2-((R,2E,4E)-6-羟基-7-((2R,3R)-3-((2R,3S)-3-羟基戊-2-基)环氧乙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-7-甲氧基-3,7-二甲基-12-氧代氧杂环十二碳-4-烯-6-基4-甲基哌嗪-1-甲酸酯(37.8mg,0.058mmol,24.05%产率)。LC/MS(ESI,m/z),651.69[M+H]$^+$。

[2586] ^{1}H-NMR(400MHz,DMSO-d6):δppm 0.76-0.89(m,9H)1.10(s,3H)1.20-1.26(m,3H)1.30-1.42(m,4H)1.42-1.55(m,2H)1.66-1.75(m,3H)1.75-1.82(m,1H)2.13-2.21(m,3H)2.25(br s,4H)2.31-2.41(m,2H)2.54-2.60(m,2H)2.72-2.82(m,1H)3.22(s,3H)3.36-3.40(m,3H)3.66-3.76(m,1H)4.36-4.46(m,1H)4.53-4.60(m,1H)4.78-4.85(m,1H)4.86-4.96

(m,2H)5.36-5.50(m,1H)5.60-5.74(m,1H)5.80-5.92(m,1H)6.02-6.11(m,1H)6.34-6.46(m,1H)。

[2587] 1.3MC-Val-Cit-pABC接头-有效负载的制备

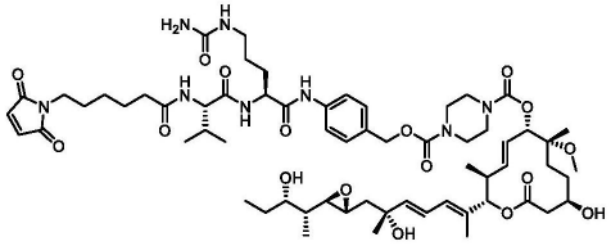
[2588] 1.3.1概述-通用程序1

[2589] 

[2590] 方案2

[2591] 将有效负载(1.0当量)、胡宁氏碱(3.0当量)、DMF(0.1M)和4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酰胺基)-3-甲基丁酰胺基)-5-脲基戊酰胺基)苄基(4-硝基苯基)碳酸酯(1.2当量)组合并在室温下搅拌过夜。然后,浓缩反应混合物并经由柱色谱法(MeOH在DCM中)或反相HPLC纯化,得到产物。

[2592] 1.3.1.1ADL1-D1

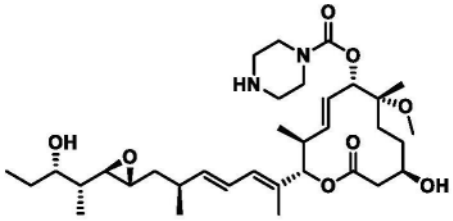
[2593] 

[2594] 接头-有效负载(ADL1-D1):采用通用程序1(如1.3.1部分中所概述)合成1-(4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酰胺基)-3-甲基丁酰胺基)-5-脲基戊酰胺基)苄基)4-((2S,3S,6S,7R,10R,E)-10-羟基-2-((R,2E,4E)-6-羟基-7-((2R,3R)-3-((2R,3S)-3-羟基戊-2-基)环氧乙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-7-甲氧基-3,7-二甲基-12-氧代氧杂环十二碳-4-烯-6-基)哌嗪-1,4-二甲酸酯(50mg,0.040mmol,42%产率)。LC/MS(ESI,m/z),1258.5[M+Na]$^+$。

[2595] ^{1}H-NMR(400MHz,MeOH-d4):δppm 0.85-1.04(m,16H)1.18-1.26(m,3H)1.26-1.38(m,6H)1.40-1.71(m,14H)1.80(s,3H)1.85-1.98(m,2H)2.02-2.15(m,1H)2.24-2.34(m,2H)2.44-2.64(m,3H)2.65-2.72(m,1H)2.87-2.96(m,1H)3.06 -3.27(m,2H)3.37(s,6H)3.43-3.61(m,12H)3.79-3.90(m,1H)4.12-4.21(m,1H)4.48-4.55(m,1H)5.02-5.14(m,4H)5.55-5.65(m,1H),5.69-5.81(m,1H)5.85-5.93(m,1H)6.12-6.19(m,1H)6.49-6.60(m,1H)6.81(s,2H)7.29-7.38(m,2H)7.57-7.65(m,2H)。

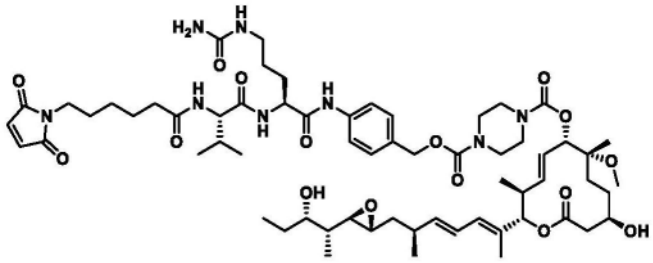
[2596] 1.3.1.2ADL1-D18

[2597] 有效负载D18是使用1.2.1部分中所概述的程序,采用普拉二烯内酯B作为起始物质(SM)制备(R=H;方案1)。

[2598] 

[2599] (2S,3S,6S,7R,10R,E)-10-羟基-2-((S,2E,4E)-7-((2R,3R)-3-((2R,3S)-3-羟基戊-2-基)环氧乙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-7-甲氧基-3,7-二甲基-12-氧代氧杂环十二碳-4-烯-6-基哌嗪-1-甲酸酯(205mg,0.330mmol,77％产率)。LC/MS(ESI,m/z),621.6[M+H]$^+$。

[2600] ^{1}H-NMR(400MHz,MeOH-d4):δppm 0.88-0.99(m,9H)1.10(d,J＝6.78Hz,3H)1.24(s,4H)1.42-1.69(m,8H)1.77(d,J＝0.88Hz,3H)2.43-2.63(m,4H)2.64-2.70(m,1H)2.71-2.82(m,5H)3.34(br s,3H)3.37(s,2H)3.42-3.57(m,5H)3.79-3.89(m,1H)5.06(s,2H),5.54-5.63(m,1H)5.64-5.80(m,2H)6.07-6.16(m,1H)6.29-6.40(m,1H)。

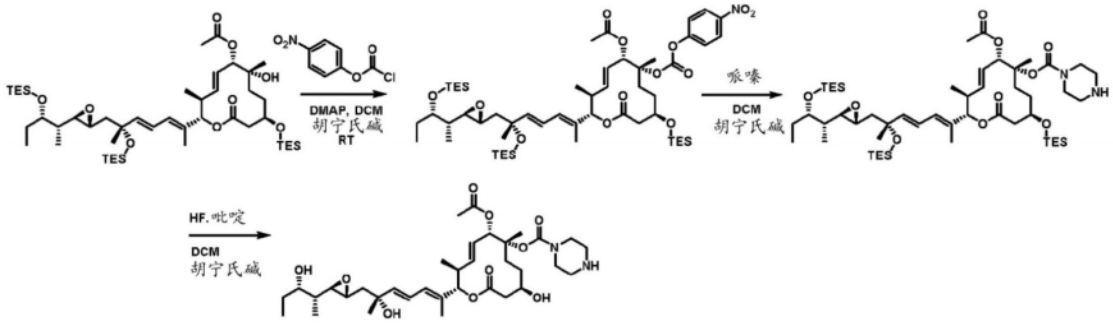
[2601] 

[2602] 接头-有效负载(ADL1-D18):采用通用程序1(如1.3.1部分中所概述)合成1-(4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酰胺基)-3-甲基丁酰胺基)-5-脲基戊酰胺基)苄基)4-((2S,3S,6S,7R,10R,E)-10-羟基-2-((S,2E,4E)-7-((2R,3R)-3-((2R,3S)-3-羟基戊-2-基)环氧乙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-7-甲氧基-3,7-二甲基-12-氧代氧杂环十二碳-4-烯-6-基)哌嗪-1,4-二甲酸酯(72mg,0.059mmol,54.7％产率)。LC/MS(ESI,m/z),1220.08[M+H]$^+$。

[2603] ^{1}H-NMR(400MHz,MeOH-d4):δppm 0.87-1.02(m,15H)1.10(d,J＝6.78Hz,3H)1.23(s,4H)1.29-1.38(m,2H)1.44-1.68(m,13H),1.54-1.55(m,1H)1.77(d,J＝0.75Hz,4H)1.87-1.95(m,1H)2.05-2.15(m,1H)2.24-2.32(m,2H)2.45-2.62(m,4H)2.65-2.70(m,1H),2.71-2.78(m,1H)3.13-3.18(m,2H)3.46-3.58(m,11H)3.79-3.90(m,1H)4.13-4.21(m,1H)4.47-4.56(m,1H)5.11(s,4H)5.53-5.81(m,3H)6.06-6.16(m,1H)6.29-6.40(m,1H)6.81(s,2H)7.34(d,J＝8.53Hz,2H)7.60(d,J＝8.53Hz,2H)。

[2604] 1.3.1.3ADL1-D8和ADL6-D8

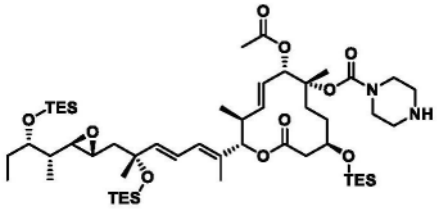
[2605] 有效负载D8是根据以下概述的程序合成:

[2606] 

[2607] 方案3

[2608] 步骤1:在0℃下,向三-TES-普拉二烯内酯D(200mg,0.223mmol)于二氯甲烷(2mL)中的溶液中添加DMAP(409mg,3.35mmol)和4-硝基苯基氯甲酸酯(338mg,1.675mmol)。在室温下搅拌反应混合物7天,用EtOAc和水萃取,然后分离各层。用EtOAc(2X)萃取水层,并将合并的有机萃取物用盐水洗涤。将合并的有机层经Na_2SO_4干燥,过滤并在真空中浓缩。快速色谱法得到(2S,3S,6S,7R,10R,E)-3,7-二甲基-2-((R,2E,4E)-6-甲基-6-((三乙基甲硅烷基)氧基)-7-((2R,3R)-3-((2S,3S)-3-((三乙基甲硅烷基)氧基)戊-2-基)环氧乙烷-2-基)庚-2,4-二烯-2-基)-7-(((4-硝基苯氧基)羰基)氧基)-12-氧代-10-((三乙基甲硅烷基)氧基)氧杂环十二碳-4-烯-6-基乙酸酯(170mg,72%产率)。

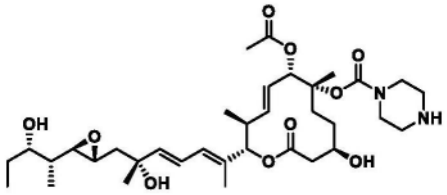
[2609] ^{1}H-NMR(400MHz,$CHCl_3$-d):δppm 0.54-0.67(m,18H)0.78-1.03(m,36H)1.19-1.32(m,1H)1.39(s,3H)1.43-1.52(m,3H)1.55-1.63(m,3H)1.64(s,3H)1.74(s,3H)1.88(dd,J=13.80,5.02Hz,1H)2.13(s,3H)2.23-2.37(m,1H)2.39-2.48(m,2H)2.51-2.63(m,2H)2.84(s,1H)3.69-3.77(m,1H)3.82-4.00(m,1H)5.04(d,J=10.79Hz,1H)5.24(d,J=9.03Hz,1H)5.67-5.84(m,3H)6.12(d,J=10.16Hz,1H)6.42(dd,J=15.06,11.04Hz,1H)7.42(d,J=9.29Hz,2H)8.29(d,J=9.16Hz,2H)。

[2610] 

[2611] 步骤2:向(2S,3S,6S,7R,10R,E)-3,7-二甲基-2-((R,2E,4E)-6-甲基-6-((三乙基甲硅烷基)氧基)-7-((2R,3R)-3-((2S,3S)-3-((三乙基甲硅烷基)氧基)戊-2-基)环氧乙烷-2-基)庚-2,4-二烯-2-基)-7-(((4-硝基苯氧基)羰基)氧基)-12-氧代-10-((三乙基甲硅烷基)氧基)氧杂环十二碳-4-烯-6-基乙酸酯(100mg,0.094mmol)于DCM中的溶液中添加哌嗪和DMAP。搅拌所得浅黄色悬浮液6小时。浓缩反应混合物,得到粗产物。快速色谱法得到(2S,3S,6S,7R,10R,E)-6-乙酰氧基-3,7-二甲基-2-((R,2E,4E)-6-甲基-6-((三乙基甲硅烷基)氧基)-7-((2R,3R)-3-((2S,3S)-3-((三乙基甲硅烷基)氧基)戊-2-基)环氧乙烷-2-基)庚-2,4-二烯-2-基)-12-氧代-10-((三乙基甲硅烷基)氧基)氧杂环十二碳-4-烯-7-基哌嗪-1-甲酸酯(95mg,100%)。LC/MS(ESI,m/z),1008.8$[M+H]^+$。

[2612] ^{1}H-NMR(400MHz,$CHCl_3$-d):δppm 0.42-0.70(m,22H)0.79-0.84(m,7H)0.86-0.91(m,4H)0.92-1.03(m,30H)1.15-1.30(m,2H)1.37-1.42(m,3H)1.44-1.52(m,3H)1.56-1.62(m,2H)1.62-1.68(m,1H)1.71-1.76(m,3H)1.83-1.93(m,1H)2.03-2.11(m,4H)2.36-2.45

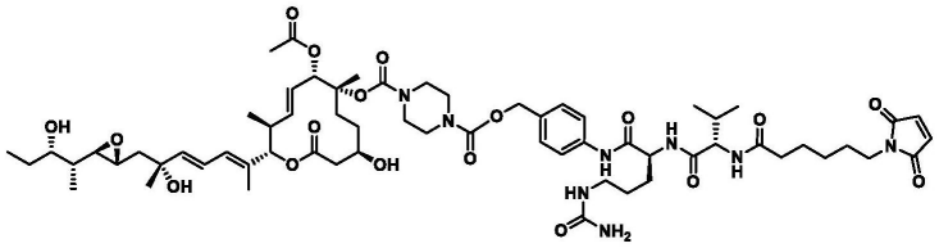
(m,2H)2.45-2.53(m,2H)2.54-2.64(m,1H)2.78-2.86(m,1H)2.86-3.07(m,4H)3.32-3.45(m,1H)3.45-3.64(m,3H)3.69-3.78(m,1H)3.79-3.94(m,1H)5.00(d,J＝10.54Hz,1H)5.18(s,1H)5.54-5.79(m,3H)5.98-6.21(m,1H)6.33-6.57(m,1H)6.84-6.96(m,3H)8.02-8.35(m,2H)8.06-8.08(m,1H)。

[2613] 

[2614] 步骤3:向(2S,3S,6S,7R,10R,E)-6-乙酰氧基-3,7-二甲基-2-((R,2E,4E)-6-甲基-6-((三乙基甲硅烷基)氧基)-7-((2R,3R)-3-((2S,3S)-3-((三乙基甲硅烷基)氧基)戊-2-基)环氧乙烷-2-基)庚-2,4-二烯-2-基)-12-氧代-10-((三乙基甲硅烷基)氧基)氧杂环十二碳-4-烯-7-基哌嗪-1-甲酸酯(95mg,0.094mmol)于THF(3mL)中的溶液中添加TBAF(0.424mL,1M,0.424mmol)并在室温下搅拌10小时。浓缩混合物并用EtOAc稀释,用水和盐水洗涤。分离有机层并用Na_2SO_4干燥,过滤并在真空中浓缩。HPLC纯化得到(2S,3S,6S,7R,10R,E)-6-乙酰氧基-10-羟基-2-((R,2E,4E)-6-羟基-7-((2R,3R)-3-((2R,3S)-3-羟基戊-2-基)环氧乙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-3,7-二甲基-12-氧代氧杂环十二碳-4-烯-7-基哌嗪-1-甲酸酯(16mg,26%)。LC/MS(ESI,m/z),665.6$[M+H]^+$。

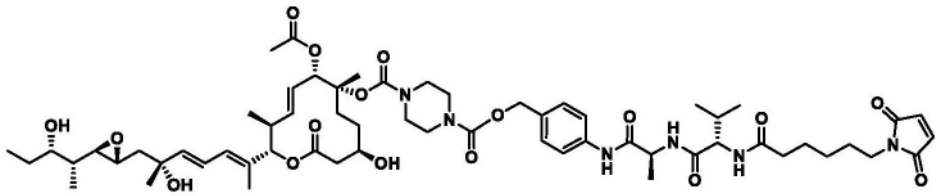
[2615] ^{1}H-NMR(400MHz,$CHCl_3$-d):δppm 0.90(dd,J＝6.84,2.20Hz,6H)0.94(t,J＝7.40Hz,3H)1.20-1.30(m,1H)1.34(s,3H)1.39-1.54(m,3H)1.55(s,3H)1.59-1.73(m,3H)1.78(d,J＝0.88Hz,3H)1.86(dd,J＝13.99,5.46Hz,1H)2.05(s,3H)2.39-2.53(m,3H)2.55-2.65(m,1H)2.67(dd,J＝8.03,2.26Hz,1H)2.89(s,1H)3.22(br s,4H)3.50-3.57(m,1H)3.58-3.90(m,5H)5.08(d,J＝10.67Hz,1H)5.18(d,J＝9.03Hz,1H)5.58-5.78(m,2H)5.88(d,J＝15.31Hz,1H)6.10-6.23(m,1H)6.53(dd,J＝15.25,10.98Hz,1H)。

[2616] 步骤4:

[2617] 

[2618] 接头-有效负载(ADL1-D8):向于DMF(315μL,4.066mmol)中的4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酰胺基)-3-甲基丁酰胺基)-5-脲基戊酰胺基)苄基(4-硝基苯基)碳酸酯(7.5mg,10.166μmol)中添加胡宁氏碱(5.33μL,0.03mmol)。将反应物冷却至0℃,并添加(2S,3S,6S,7R,10R,E)-6-乙酰氧基-10-羟基-2-((R,2E,4E)-6-羟基-7-((2R,3R)-3-((2R,3S)-3-羟基戊-2-基)环氧乙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-3,7-二甲基-12-氧代氧杂环十二碳-4-烯-7-基哌嗪-1-甲酸酯(7.50mg,0.011mmol)。在室温下搅拌反应混合物,直至起始物质消耗。在真空中浓缩反应混合物。快速色谱法得到ADL1-D8(7.2mg,5.70μmol,56.1%产率)。LC/MS(ESI,m/z),1263.8$[M+H]^+$。通用程序1(1.3.1)还可用于制备ADL1-110987。

[2619] ^{1}H-NMR(400MHz,氯仿-d):δppm 0.80-1.02(m,16H)1.20-1.35(m,6H)1.38-1.48(m,2H)1.57-1.69(m,7H)1.74-1.81(m,4H)1.86-1.96(m,2H)2.00-2.11(m,4H)2.31(br d,J=6.02Hz,2H)2.45-2.55(m,2H)2.59-2.74(m,2H)2.85-2.96(m,1H)3.05-3.25(m,5H)3.40-3.59(m,9H)3.62-3.88(m,1H)4.15(d,J=7.53Hz,1H)5.05-5.22(m,5H)5.56-5.77(m,2H)5.84-5.98(m,1H)6.11-6.22(m,1H)6.47-6.61(m,1H)7.31-7.40(m,2H)7.56-7.65(m,2H)。

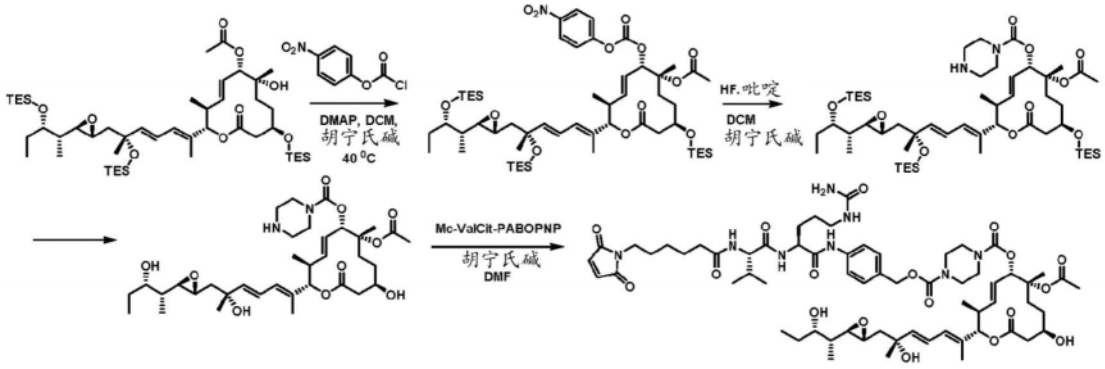
[2620] 

[2621] 接头-有效负载(ADL6-D8):向于DMF(238μL,3.069mmol)中的4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酰胺基)-3-甲基丁酰胺基)丙酰胺基)苄基(4-硝基苯基)碳酸酯(5mg,7.673μmol)中添加胡宁氏碱(4.02μL,.023mmol)。将反应混合物冷却至0℃,并添加(2S,3S,6S,7R,10R,E)-6-乙酰氧基-10-羟基-2-((R,2E,4E)-6-羟基-7-((2R,3R)-3-((2R,3S)-3-羟基戊-2-基)环氧乙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-3,7-二甲基-12-氧代氧杂环十二碳-4-烯-7-基哌嗪-1-甲酸酯。在室温下搅拌反应混合物,直至起始物质消耗。在真空中浓缩反应混合物。HPLC纯化得到ADL6-D8(1.2mg,1.019μmol,13.28%产率)。LC/MS(ESI,m/z),1199.9[M+Na]$^{+}$。

[2622] ^{1}H NMR(400MHz,$CHCl_3$-d):δppm 0.78-1.04(m,18H)1.15-1.52(m,58H)1.64-1.72(m,3H)1.78(d,J=6.53Hz,4H)2.04-2.19(m,3H)2.21-2.30(m,1H)2.44-2.67(m,4H)2.76(dd,J=6.09,2.95Hz,1H)2.90-3.02(m,1H)3.42-3.57(m,8H)3.61-3.70(m,1H)3.77(br s,1H)4.10-4.27(m,1H)4.58(br d,J=6.65Hz,1H)5.01-5.26(m,4H)5.52-5.70(m,2H)5.88(s,1H)5.93-6.02(m,1H)6.08-6.18(m,1H)6.47-6.58(m,1H)7.29-7.35(m,2H)7.55(d,J=8.66Hz,1H)。

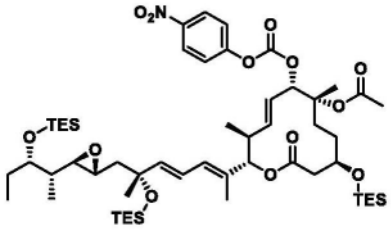
[2623] 1.3.1.4ADL1-D4

[2624] ADL1-D4是使用以下概述的程序合成。

[2625] 

[2626] 方案4

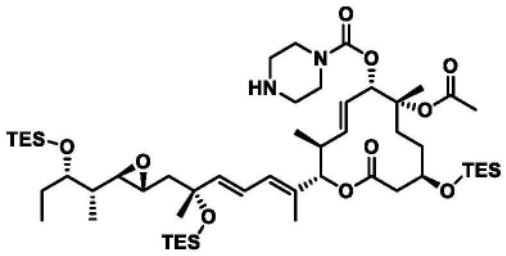
[2627] 步骤1:(2S,3S,6S,7R,10R,E)-3,7-二甲基-2-((R,2E,4E)-6-甲基-6-((三乙基甲硅烷基)氧基)-7-((2R,3R)-3-((2S,3S)-3-((三乙基甲硅烷基)氧基)戊-2-基)环氧乙烷-2-基)庚-2,4-二烯-2-基)-6-(((4-硝基苯氧基)羰基)氧基)-12-氧代-10-((三乙基甲硅烷基)氧基)氧杂环十二碳-4-烯-7-基乙酸酯。

[2628] 

[2629] 在20℃下,向三-TES普拉二烯内酯D(160mg,0.179mmol)于1,2-二氯乙烷(5mL)中的溶液中添加DMAP(32.7mg,0.268mmol)、三乙胺(0.75mL,5.36mmol)和4-硝基苯基氯甲酸酯(360mg,1.787mmol)。在40℃下搅拌反应混合物4天,并在60℃下搅拌2小时。用EtOAc稀释反应混合物并用水洗涤,然后分离各层。用EtOAc(2X)萃取水层。将合并的有机萃取物依次用水和盐水洗涤,经$MgSO_4$干燥,过滤,并在真空中浓缩。快速色谱法得到(2S,3S,6S,7R,10R,E)-7-乙酰氧基-3,7-二甲基-2-((R,2E,4E)-6-甲基-6-((三乙基甲硅烷基)氧基)-7-((2R,3R)-3-((2S,3S)-3-((三乙基甲硅烷基)氧基)戊-2-基)环氧乙烷-2-基)庚-2,4-二烯-2-基)-12-氧代-10-((三乙基甲硅烷基)氧基)氧杂环十二碳-4-烯-6-基哌嗪-1-甲酸酯(150mg,79%产率)。

[2630] ^{1}H-NMR(400MHz,$CHCl_3$-d):δppm 0.48-0.71(m,24H)0.78-0.85(m,7H)0.86-0.93(m,5H)0.94-1.03(m,34H)1.18-1.22(m,2H)1.22-1.26(m,2H)1.35-1.43(m,4H)1.43-1.52(m,4H)1.54(s,4H)1.56-1.65(m,3H)1.68-1.72(m,3H)1.75(br d,J=0.75Hz,2H)1.84-1.95(m,1H)2.01-2.06(m,2H)2.09(s,2H)2.11(s,2H)2.33-2.52(m,4H)2.57(dd,J=8.09,2.07Hz,2H)2.80-2.90(m,1H)3.66-3.80(m,1H)3.82-3.93(m,2H)4.92-5.13(m,2H)5.63-5.68(m,1H)5.69-5.74(m,1H)5.75-5.83(m,2H)6.12(br d,J=10.67Hz,1H)6.41(ddd,J=15.15,11.01,5.08Hz,1H)7.50(d,J=9.41Hz,2H)8.35(d,J=9.29Hz,2H)。

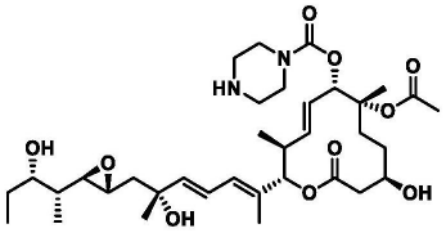
[2631] 步骤2:(2S,3S,6S,7R,10R,E)-7-乙酰氧基-3,7-二甲基-2-((R,2E,4E)-6-甲基-6-((三乙基甲硅烷基)氧基)-7-((2R,3R)-3-((2S,3S)-3-((三乙基甲硅烷基)氧基)戊-2-基)环氧乙烷-2-基)庚-2,4-二烯-2-基)-12-氧代-10-((三乙基甲硅烷基)氧基)氧杂环十二碳-4-烯-6-基哌嗪-1-甲酸酯。

[2632] 

[2633] 向(2S,3S,6S,7R,10R,E)-3,7-二甲基-2-((R,2E,4E)-6-甲基-6-((三乙基甲硅烷基)氧基)-7-((2R,3R)-3-((2S,3S)-3-((三乙基甲硅烷基)氧基)戊-2-基)环氧乙烷-2-基)庚-2,4-二烯-2-基)-6-(((4-硝基苯氧基)羰基)氧基)-12-氧代-10-((三乙基甲硅烷基)氧基)氧杂环十二碳-4-烯-7-基乙酸酯于DCM(1mL)中的溶液中添加哌嗪(0.447g,5.195mmol)和胡宁氏碱(0.9mL,5.195mmol)。搅拌所得浅黄色悬浮液6小时。浓缩反应混合物并在硅胶上色谱分离,得到(2S,3S,6S,7R,10R,E)-7-乙酰氧基-3,7-二甲基-2-((R,2E,4E)-6-甲基-6-((三乙基甲硅烷基)氧基)-7-((2R,3R)-3-((2S,3S)-3-((三乙基甲硅烷基)氧基)戊-2-基)环氧乙烷-2-基)庚-2,4-二烯-2-基)-12-氧代-10-((三乙基甲硅烷基)氧基)氧杂环十

二碳-4-烯-6-基哌嗪-1-甲酸酯(1.0g,0.844mmol,81%产率)。LC/MS(ESI,m/z),1008.1[M+H]$^+$。

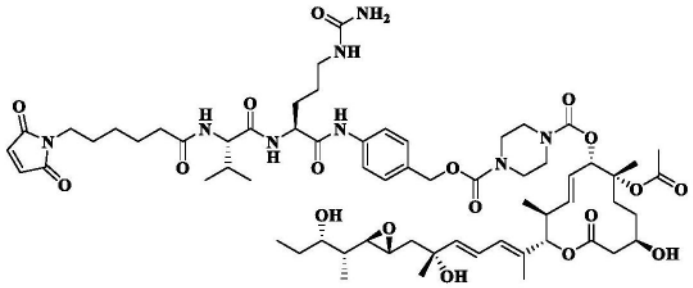
[2634] D4

[2635] 

[2636] 步骤3:将(2S,3S,6S,7R,10R,E)-7-乙酰氧基-3,7-二甲基-2-((R,2E,4E)-6-甲基-6-((三乙基甲硅烷基)氧基)-7-((2S,3S)-3-((2S,3S)-3-((三乙基甲硅烷基)氧基)戊-2-基)环氧乙烷-2-基)庚-2,4-二烯-2-基)-12-氧代-10-((三乙基甲硅烷基)氧基)氧杂环十二碳-4-烯-6-基哌嗪-1-甲酸酯(1.09g,0.92mmol)、DCM(20.71mL,321.826mmol)和DIPEA(19.91mL,114.018mmol)组合并冷却至-78℃。添加氟化氢-吡啶(0.518g,5.232mmol)并使反应物升温至室温且搅拌过夜。LC/MS表明脱硅烷化。在冰浴中冷却反应混合物。添加饱和$NaHCO_3$并搅拌,且用DCM萃取。合并有机层,经无水Na_2SO_4干燥并浓缩,且色谱分离,得到(2S,3S,6S,7R,10R,E)-7-乙酰氧基-10-羟基-2-((R,2E,4E)-6-羟基-7-((2R,3R)-3-((2R,3S)-3-羟基戊-2-基)环氧乙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-3,7-二甲基-12-氧代氧杂环十二碳-4-烯-6-基哌嗪-1-甲酸酯(225mg,36.8%)。LC/MS(ESI,m/z),665.6[M+H]$^+$。

[2637] ^{1}H-NMR(400MHz,$CHCl_3$-d):δppm 0.87-0.92(m,6H)0.94(t,J=7.40Hz,3H)1.16-1.31(m,1H)1.35(s,3H)1.40-1.56(m,4H)1.59(s,3H)1.66(br dd,J=14.68,7.03Hz,3H)1.76-1.80(m,3H)1.87(dd,J=14.12,5.46Hz,1H)2.05(s,3H)2.30-2.41(m,1H)2.50(d,J=3.76Hz,2H)2.56-2.72(m,2H)2.90(br d,J=2.01Hz,1H)3.19(br t,J=5.14Hz,4H)3.50-3.59(m,1H)3.71(br s,4H)3.77-3.89(m,1H)5.01-5.13(m,2H)5.58-5.71(m,1H)5.71-5.81(m,1H)5.88(d,J=15.31Hz,1H)6.15(br d,J=10.79Hz,1H)6.53(dd,J=15.18,10.92Hz,1H)。

[2638] AD1-D4

[2639] 

[2640] 在圆底烧瓶中,向于DMF(966μL)中的4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酰胺基)-3-甲基丁酰胺基)-5-脲基戊酰胺基)苄基(4-硝基苯基)碳酸酯(23mg,0.031mmol)中添加胡宁氏碱(16.33μL,0.094mmol)。将反应混合物冷却至0℃,并添加D4(22.80mg,0.034mmol)并在室温下搅拌。在真空中浓缩反应混合物。快速色谱法得到ADL1-D4(30.5mg,0.024mmol,77%产率)。LC/MS(ESI,m/z),1263.8[M+H]$^+$。

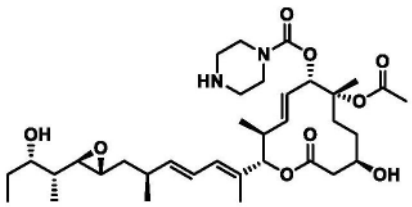
[2641] ^{1}H-NMR(400MHz,MeOH-d_4):δppm 0.87-0.93(m,7H)0.93-1.01(m,8H)1.19-1.34(m,

4H)1.50(s,3H)1.57(s,5H)1.58-1.70(m,6H)1.70-1.77(m,1H)1.78(s,3H)1.83-1.95(m,2H)2.04(s,3H)2.05-2.13(m,1H)2.27(t,J＝7.40Hz,2H)2.32-2.42(m,1H)2.50(d,J＝3.64Hz,2H)2.55-2.74(m,2H)2.90(td,J＝5.83,2.26Hz,1H)3.03-3.26(m,2H)3.35(s,13H)3.42-3.61(m,11H)3.80(br dd,J＝9.85,3.58Hz,1H)4.16(d,J＝7.40Hz,1H)4.50(dd,J＝8.91,5.14Hz,1H)4.56(s,1H)5.05(dd,J＝14.37,10.10Hz,2H)5.09(s,2H)5.49(s,1H)5.59-5.69(m,1H)5.72-5.80(m,1H)5.87(d,J＝15.18Hz,1H)6.09-6.22(m,1H)6.44-6.60(m,1H)7.32(d,J＝8.66Hz,2H)7.58(d,J＝8.53Hz,2H)。

[2642] 1.3.1.5ADL1-D9、ADL6-D9和ADL1-D13

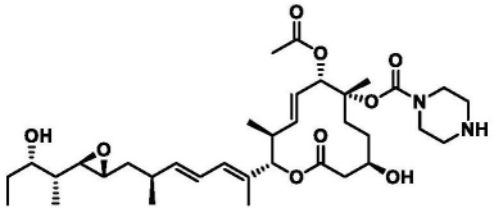
[2643] D9和D13

[2644] 采用D4的合成(方案4)中概述的程序,利用三-TES普拉二烯内酯B,以3:1异构体混合物形式合成D9和D13。

[2645] 

[2646] 有效负载(D9):LC/MS(ESI,m/z),649.7$[M+H]^+$。

[2647] ^{1}H-NMR(400MHz,$CHCl_3$-d):δppm 0.87-1.01(m,10H)1.08(d,J＝6.78Hz,3H)1.27-1.63(m,12H)1.66-1.74(m,1H)1.76(s,3H)1.97-2.10(m,3H)2.35-2.57(m,5H)2.58-2.65(m,1H)2.65-2.71(m,1H)2.77(td,J＝5.93,2.32Hz,1H)2.89-3.05(m,4H)3.07-3.34(m,8H)3.50-3.68(m,5H)3.72-3.88(m,1H)4.88-5.09(m,1H)5.18(d,J＝10.67Hz,1H)5.50-5.84(m,3H)6.01-6.13(m,1H)6.19-6.36(m,1H)。

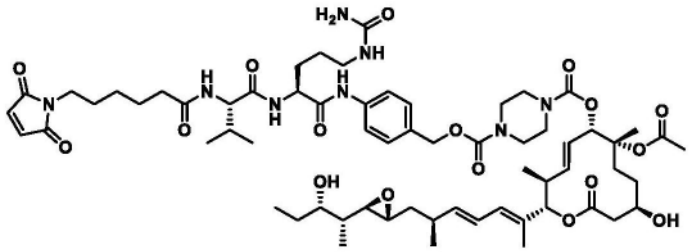
[2648] 

[2649] 有效负载(D13):LC/MS(ESI,m/z),649.6$[M+H]^+$。

[2650] ^{1}H NMR(400MHz,$CHCl_3$-d)δppm 0.84-1.01(m,11H)1.08(d,J＝6.78Hz,3H)1.29-1.64(m,10H)1.63-1.73(m,1H)1.76(s,3H)1.94-2.12(m,4H)2.37-2.58(m,4H)2.59-2.65(m,1H)2.68(dd,J＝7.40,2.26Hz,1H)2.77(td,J＝5.93,2.32Hz,1H)3.01-3.30(m,4H)3.49(s,1H)3.54-3.67(m,2H)3.69-3.92(m,5H)4.13-4.78(m,11H)5.13-5.24(m,2H)5.48-5.61(m,1H)5.62-5.74(m,2H)6.04-6.13(m,1H)6.18-6.32(m,1H)。

[2651] ADL1-D9

[2652] 采用通用程序1(如1.3.1部分中所概述)合成ADL1-D9。

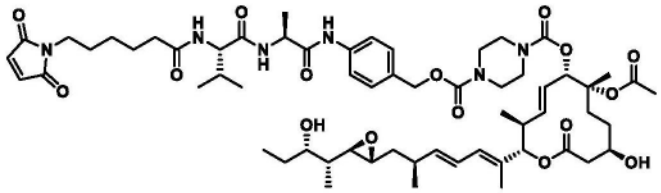
[2653] 

[2654] 接头-有效负载(ADL1-D9):(30.5mg,0.024mmol,77%产率)。LC/MS(ESI,m/z),1263.8[M+H]$^+$。

[2655] ^{1}H-NMR(400MHz,MeOH-d_4):δppm 0.87-0.93(m,7H)0.93-1.01(m,8H)1.19-1.34(m,4H)1.50(s,3H)1.57(s,5H)1.58-1.70(m,6H)1.70-1.77(m,1H)1.78(s,3H)1.83-1.95(m,2H)2.04(s,3H)2.05-2.13(m,1H)2.27(t,J=7.40Hz,2H)2.32-2.42(m,1H)2.50(d,J=3.64Hz,2H)2.55-2.74(m,2H)2.90(td,J=5.83,2.26Hz,1H)3.03-3.26(m,2H)3.35(s,13H)3.42-3.61(m,11H)3.80(br dd,J=9.85,3.58Hz,1H)4.16(d,J=7.40Hz,1H)4.50(dd,J=8.91,5.14Hz,1H)4.56(s,1H)5.05(dd,J=14.37,10.10Hz,2H)5.09(s,2H)5.49(s,1H)5.59-5.69(m,1H)5.72-5.80(m,1H)5.87(d,J=15.18Hz,1H)6.09-6.22(m,1H)6.44-6.60(m,1H)7.32(d,J=8.66Hz,2H)7.58(d,J=8.53Hz,2H)。

[2656] ADL6-D9

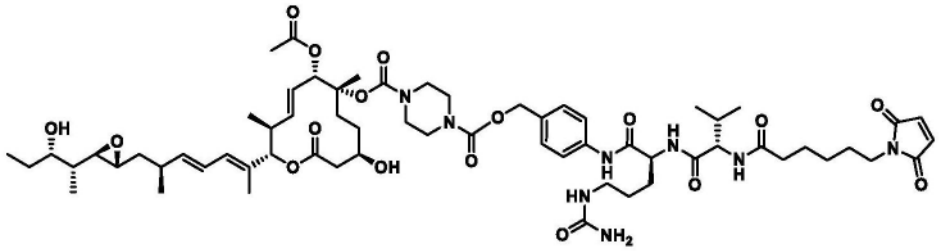
[2657] 采用通用程序1(如1.3.1部分中所概述)合成ADL6-D9。

[2658] 

[2659] 接头-有效负载(ADL6-D9):向于DMF(784μL)中稀释的4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酰胺基)-3-甲基丁酰胺基)丙酰胺基)苄基(4-硝基苯基)碳酸酯(16.5mg,0.025mmol)中添加胡宁氏碱(13.27μL,0.076mmol)。将反应混合物冷却至0℃,并添加D9。在室温下搅拌反应混合物,直至LC/MS显示反应完成。在真空中浓缩反应混合物。在硅胶上,利用DCM/MeOH对残余物进行快速色谱,得到标题化合物(16.7mg,57%产率)。LC/MS(ESI,m/z),1184.6[M+Na]$^+$。

[2660] ^{1}H-NMR(400MHz,MeOH-d_4):δppm 0.80-1.02(m,16H)1.05-1.12(m,4H)1.13-1.34(m,5H)1.38-1.51(m,7H)1.53-1.68(m,11H)1.71-1.80(m,4H)1.97-2.16(m,4H)2.24-2.32(m,2H)2.32-2.42(m,1H)2.43-2.55(m,3H)2.56-2.69(m,3H)2.73(br d,J=2.13Hz,1H)3.07-3.18(m,1H)3.42-3.61(m,17H)3.75-3.91(m,1H)4.11-4.24(m,1H)4.43(s,2H)5.59-5.88(m,4H)6.06-6.17(m,1H)6.29-6.39(m,1H)7.24-7.39(m,2H)7.52-7.64(m,2H)。

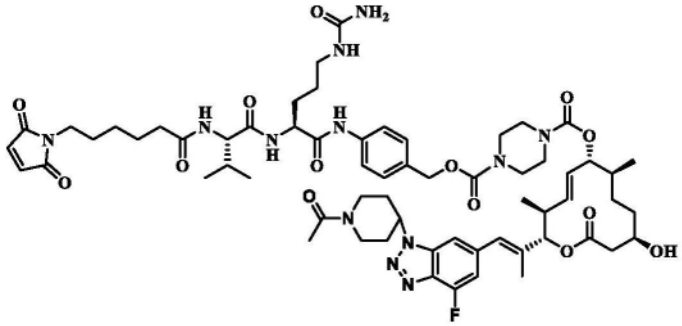
[2661] ADL1-D13

[2662] 

[2663] 接头-有效负载(AD1-D13):向于DMF(176μL,2.277mmol)中的4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酰胺基)-3-甲基丁酰胺基)-5脲基戊酰胺基)苄基(4-硝基苯基)碳酸酯(4.2mg,5.693μmol)中添加胡宁氏碱(2.98μL,0.017mmol)。将反应混合物冷却至0℃,并添加D13(4.06mg,6.262μmol)。在室温下搅拌反应混合物,直至LC/MS显示反应完成。在真空中浓缩反应混合物。在硅胶上,利用DCM/MeOH对残余物进行快速色谱,得到标题化合物(4.8mg,68%产率)。LC/MS(ESI,m/z),1248.0[M+H]$^+$。

[2664] ^{1}H-NMR(400MHz,$CHCl_3$-d):δppm 0.58-0.98(m,10H)0.99-1.06(m,2H)1.11-1.31(m,6H)1.57-1.75(m,3H)2.11-2.26(m,1H)2.30-2.73(m,2H)3.28-3.80(m,7H)4.14-4.33(m,1H)4.44-4.55(m,1H)4.63-4.81(m,1H)4.92-5.06(m,1H)5.09(s,1H)5.49-5.74(m,1H)5.88-6.09(m,1H)6.14-6.36(m,1H)6.99-7.08(m,1H)7.21-7.38(m,2H)7.53-7.67(m,1H)7.95(s,1H)。

[2665] 1.3.1.6ADL1-D14

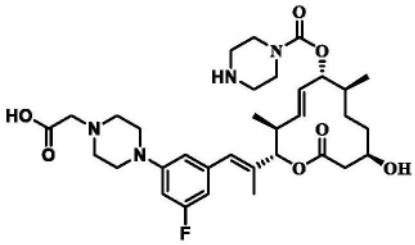
[2666] 

[2667] 采用通用程序1(如1.3.1部分中所概述)合成1-((2S,3S,6R,7S,10R,E)-2-((E)-1-(1-(1-乙酰基哌啶-4-基)-4-氟-1H-苯并[d][1,2,3]三唑-6-基)丙-1-烯-2-基)-10-羟基-3,7-二甲基-12-氧代氧杂环十二碳-4-烯-6-基)4-(4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酰胺基)-3-甲基丁酰胺基)-5-脲基戊酰胺基)苄基)哌嗪-1,4-二甲酸酯(30mg,0.024mmol,39.2%产率)。LC/MS(ESI,m/z),1254.5[M+H]$^+$。

[2668] ^{1}H-NMR(400MHz,DMSO-d6):δppm 0.75-1.00(m,12H),1.06-1.26(m,4H),1.26-1.77(m,13H),1.75-2.02(m,7H),2.08(s,8H),2.23-2.35(m,2H),2.54-2.70(m,2H),2.78-3.10(m,4H),3.36(br s,13H),3.66-3.79(m,1H),3.95-4.08(m,1H),4.11-4.25(m,1H),4.28-4.46(m,1H),4.46-4.58(m,1H),4.58-4.66(m,1H),4.66-4.77(m,1H),5.01(s,3H),5.14-5.27(m,1H),5.39(s,4H),5.71-5.79(m,1H),5.87-6.00(m,1H),6.63-6.75(m,1H),6.99(s,2H),7.13-7.24(m,1H),7.24-7.34(m,2H),7.52-7.62(m,2H),7.65-7.74(m,1H),7.75-7.82(m,1H),7.98-8.13(m,1H)。

[2669] 1.3.1.7ADL1-D33

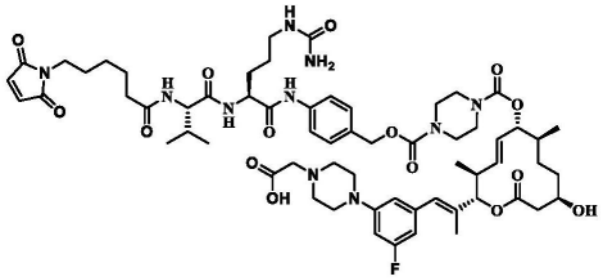
[2670] D33

[2671] 

[2672] 在0℃下,向(2S,3S,6R,7S,10R,E)-2-((E)-1-(3-氟-5-(4-(2-甲氧基-2-氧代乙基)哌嗪-1-基)苯基)丙-1-烯-2-基)-10-羟基-3,7-二甲基-12-氧代氧杂环十二碳-4-烯-6-基哌嗪-1-甲酸酯(27mg,0.042mmol)于THF/H_2O(3mL/1mL)中的搅拌溶液中添加LiOH,并使反应混合物缓慢升温至25℃。使用国际申请号PCT/US2019/026992中概述的程序(参见例如程序17和19)合成(2S,3S,6R,7S,10R,E)-2-((E)-1-(3-氟-5-(4-(2-甲氧基-2-氧代乙基)哌嗪-1-基)苯基)丙-1-烯-2-基)-10-羟基-3,7-二甲基-12-氧代氧杂环十二碳-4-烯-6-基哌嗪-1-甲酸酯,将该文献通过引用并入本文。6小时后,用磷酸盐缓冲液(NaH_2PO_4,1.0M,3mL)中和反应混合物,并分离各相。用乙酸乙酯(3x2mL)萃取水层,且将合并的有机层用无水硫酸钠干燥并在真空中浓缩。反相柱色谱,得到标题化合物(19.4mg,0.031mmol,73.4%产率)。LC/MS(ESI,m/z),631.4$[M+H]^+$。

[2673] ^{1}H-NMR(400MHz,$CHCl_3$-d):δppm 0.85-1.16(m,2H)1.23-1.52(m,1H)1.57-1.77(m,1H)1.87(s,1H)1.92-2.13(m,1H)2.35-2.55(m,1H)2.50-2.74(m,1H)3.11(br s,1H)3.36-3.54(m,2H)3.64(br d,J=10.42Hz,2H)3.77-3.90(m,1H)4.76(br s,4H)5.07-5.19(m,1H)5.38-5.68(m,1H)6.40-6.76(m,1H)8.02-8.66(m,1H)。

[2674] ADL1-D33

[2675] 

[2676] 接头-有效负载(ADL1-D33):向于DMF(714μL,9.217mmol)中的4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酰胺基)-3-甲基丁酰胺基)-5-脲基戊酰胺基)苄基(4-硝基苯基)碳酸酯(17mg,.023mmol)中添加胡宁氏碱(12.07μL,0.069mmol)。将反应混合物冷却至0℃,并添加2-(4-(3-氟-5-((E)-2-((2S,3S,6R,7S,10R,E)-10-羟基-3,7-二甲基-12-氧代-6-((哌嗪-1-羰基)氧基)氧杂环十二碳-4-烯-2-基)丙-1-烯-1-基)苯基)哌嗪-1-基)乙酸(16.71mg,0.026mmol)。在室温下搅拌反应混合物,直至LC/MS显示反应完成。在真空中浓缩反应混合物。在硅胶上进行快速色谱且进一步进行HPLC纯化,得到标题化合物(13.5mg,10.98μmol,47.7%产率)。LC/MS(ESI,m/z),1229.5$[M+H]^+$。

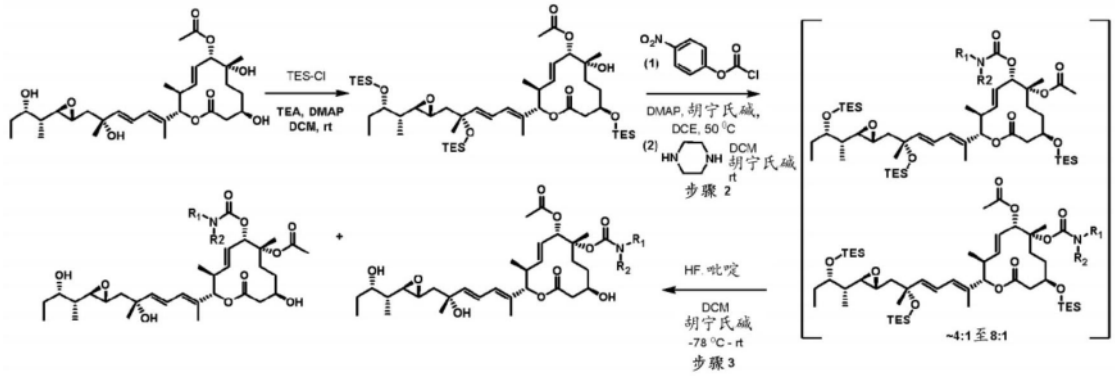
[2677] ^{1}H-NMR(400MHz,MeOH-d_4):δppm 0.92-0.99(m,10H)1.01(d,J=6.78Hz,3H)1.24-1.46(m,9H)1.52-1.70(m,10H)1.70-1.82(m,1H)1.87(d,J=1.00Hz,4H)1.89-2.00(m,2H)2.01-2.23(m,2H)2.27(t,J=7.40Hz,2H)2.46(dd,J=14.31,5.27Hz,1H)2.57-2.71(m,2H)2.86(d,J=0.63Hz,1H)3.00(s,1H)3.06-3.27(m,4H)3.35(s,5H)3.41-3.53(m,19H)3.66

(s,2H)3.76-3.90(m,1H)4.07-4.21(m,1H)4.39-4.69(m,37H)5.09(s,3H)5.13(d,J＝10.54Hz,1H)5.52(dd,J＝14.56,9.03Hz,2H)6.55(br s,2H)6.69(d,J＝1.38Hz,2H)7.33(d,J＝8.66Hz,2H)7.59(d,J＝8.53Hz,2H)7.88-8.04(m,1H)8.16-8.33(m,1H)。

[2678] 1.3.2ADL1-D4、ADL1-D5、ADL21-D4、ADL22-D4、ADL23-D4、ADL13-D4

[2679] 1.3.2.1用于制备D4和D5的通用程序

[2680] 采用以下概述的4步程序合成标题化合物。

[2681] 

[2682] 步骤2

[2683] 在20℃下,向三-TES普拉二烯内酯D(1.0当量)于1,2-二氯乙烷(0.2M)中的溶液中添加DMAP(1.5当量)、三乙胺(30当量)和4-硝基苯基氯甲酸酯(10当量)。在40℃下搅拌混合物4天,然后在60℃下搅拌2小时。用EtOAc稀释反应混合物并用水洗涤,然后分离各层,并用EtOAc(2x)萃取水层。将合并的有机萃取物依次用水和盐水洗涤,经硫酸镁干燥,过滤并在真空中浓缩。将所得残余物通过硅胶色谱法(EtOAc在己烷中)纯化,得到中间体碳酸酯。将碳酸酯(1.0当量)、DCM(0.2M)、三乙胺(3.0当量)和胺(2.0当量)组合并在室温下搅拌1小时。在真空中浓缩所得混合物并色谱分离(DCM/MeOH),得到呈位置异构体混合物形式的氨基甲酸酯中间体。

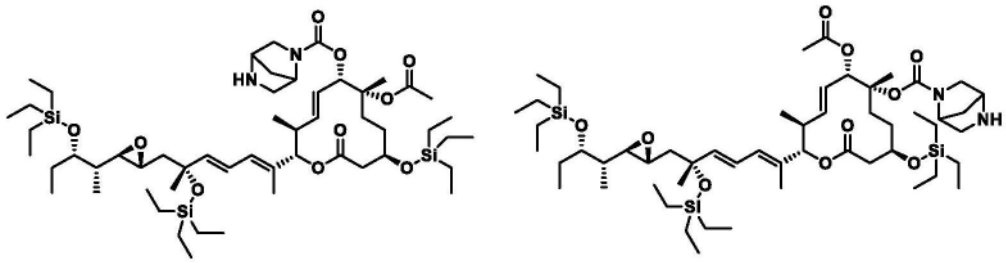
[2684] 步骤3

[2685] 将步骤2中获得的位置异构体氨基甲酸酯混合物(1.0当量)溶解于DCM(0.04M)中。添加胡宁氏碱(124当量)并将所得混合物冷却至-78℃。逐滴添加HF吡啶(30当量)并使混合物升温至室温,且在室温下搅拌过夜。然后,将混合物冷却至-78℃,并将饱和碳酸氢钠逐滴添加至反应混合物中,且使混合物升温至室温。分配有机层,并用DCM(3X)萃取水层。将合并的有机层经无水硫酸钠干燥,过滤,并在真空中浓缩。所得残余物经历反相HPLC纯化,得到每一所希望的位置异构体产物。

[2686] D5

[2687] 经由通用程序1.3.2.1的步骤2和3,使用步骤2中的2,5-二氮杂双环[2.2.1]庚烷制备标题化合物。

[2688] 步骤2

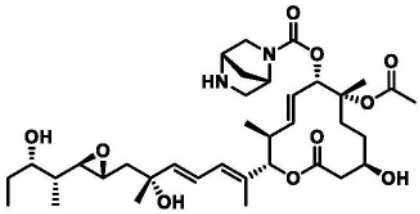
[2689] 

[2690] 获得呈无色油状物的(2S,3S,6S,7R,10R,E)-7-乙酰氧基-3,7-二甲基-2-((R,2E,4E)-6-甲基-6-((三乙基甲硅烷基)氧基)-7-((2R,3R)-3-((2S,3S)-3-((三乙基甲硅烷基)氧基)戊-2-基)环氧乙烷-2-基)庚-2,4-二烯-2-基)-12-氧代-10-((三乙基甲硅烷基)氧基)氧杂环十二碳-4-烯-6-基2,5-二氮杂双环[2.2.1]庚烷-2-甲酸酯和(2S,3S,6S,7R,10R,E)-6-乙酰氧基-3,7-二甲基-2-((R,2E,4E)-6-甲基-6-((三乙基甲硅烷基)氧基)-7-((2R,3R)-3-((2S,3S)-3-((三乙基甲硅烷基)氧基)戊-2-基)环氧乙烷-2-基)庚-2,4-二烯-2-基)-12-氧代-10-((三乙基甲硅烷基)氧基)氧杂环十二碳-4-烯-7-基2,5-二氮杂双环[2.2.1]庚烷-2-甲酸酯的混合物(21.7mg,45.1%)。LCMS(ESI,m/z),$[M+H]^+$1020.6

[2691] ^{1}H NMR(400MHz,甲醇-d)δppm 0.61-0.70(m,19H)0.82-0.95(m,10H)0.95-1.04(m,29H)1.23(br dd,J=7.15,4.64Hz,1H)1.30(s,1H)1.42-1.64(m,12H)1.78(s,4H)1.88-2.01(m,2H)2.06(br d,J=10.92Hz,3H)2.14(br s,1H)2.43(br d,J=4.64Hz,2H)2.49(br s,1H)2.63(dd,J=8.16,2.13Hz,2H)2.86-2.91(m,1H)3.47-3.66(m,2H)3.76(td,J=6.37,3.33Hz,1H)3.95(br d,J=4.27Hz,1H)4.34(br s,1H)6.15(br d,J=10.92Hz,1H)6.52(dd,J=15.12,10.98Hz,1H)

[2692] 步骤3

[2693] D5

[2694] 

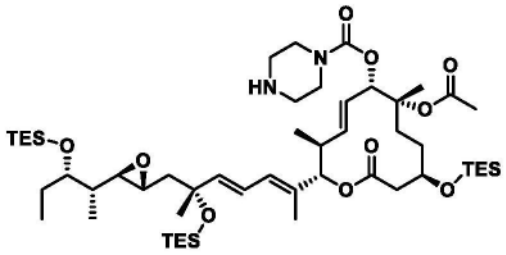
[2695] HPLC纯化得到呈白色固体的(2S,3S,6S,7R,10R,E)-7-乙酰氧基-10-羟基-2-((R,2E,4E)-6-羟基-7-((2R,3R)-3-((2R,3S)-3-羟基戊-2-基)环氧乙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-3,7-二甲基-12-氧代氧杂环十二碳-4-烯-6-基(1S,4S)-2,5-二氮杂双环[2.2.1]庚烷-2-甲酸酯(5mg,34.7%)。LCMS(ESI,m/z),$[M+H]^+$677.6

[2696] 1H NMR(400MHz,甲醇-d4)δppm 0.85-0.98(m,9H)1.25(td,J=7.40,4.14Hz,1H)1.34(s,3H)1.42-1.69(m,9H)1.79(s,4H)1.82-1.96(m,2H)2.04(d,J=9.29Hz,3H)2.33(br d,J=10.04Hz,1H)2.47-2.54(m,2H)2.57-2.72(m,2H)2.87-2.92(m,1H)3.03(br s,2H)3.33-3.43(m,2H)3.43-3.57(m,2H)3.77-3.84(m,1H)3.86-3.94(m,1H)4.50(br s,1H)4.97-5.11(m,2H)5.60-5.68(m,1H)5.73-5.82(m,1H)5.88(d,J=15.31Hz,1H)6.15(br d,J=11.04Hz,1H)6.53(dd,J=15.25,10.98Hz,1H)8.54(s,1H)

[2697] D4

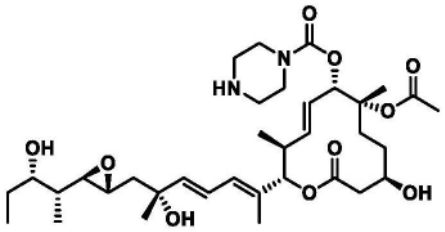
[2698] 经由通用程序1.3.2.1的步骤2和3,使用步骤2中的哌嗪制备标题化合物。

[2699] 步骤2:

[2700] 

[2701] 通用程序1.3.2.1的步骤2,采用哌嗪,得到(2S,3S,6S,7R,10R,E)-7-乙酰氧基-3,7-二甲基-2-((R,2E,4E)-6-甲基-6-((三乙基甲硅烷基)氧基)-7-((2R,3R)-3-((2S,3S)-3-((三乙基甲硅烷基)氧基)戊-2-基)环氧乙烷-2-基)庚-2,4-二烯-2-基)-12-氧代-10-((三乙基甲硅烷基)氧基)氧杂环十二碳-4-烯-6-基哌嗪-1-甲酸酯(1.0g,0.844mmol,81%产率)。LC/MS(ESI,m/z),1008.1[M+H]$^+$。

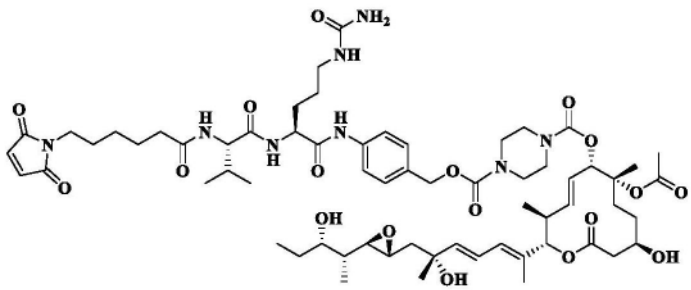
[2702] 步骤3:D4

[2703] 

[2704] HPLC纯化得到(2S,3S,6S,7R,10R,E)-7-乙酰氧基-10-羟基-2-((R,2E,4E)-6-羟基-7-((2R,3R)-3-((2R,3S)-3-羟基戊-2-基)环氧乙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-3,7-二甲基-12-氧代氧杂环十二碳-4-烯-6-基哌嗪-1-甲酸酯(225mg,36.8%)。LC/MS(ESI,m/z),665.6[M+H]$^+$。

[2705] ^{1}H-NMR(400MHz,$CHCl_3$-d):δppm 0.87-0.92(m,6H)0.94(t,J=7.40Hz,3H)1.16-1.31(m,1H)1.35(s,3H)1.40-1.56(m,4H)1.59(s,3H)1.66(br dd,J=14.68,7.03Hz,3H)1.76-1.80(m,3H)1.87(dd,J=14.12,5.46Hz,1H)2.05(s,3H)2.30-2.41(m,1H)2.50(d,J=3.76Hz,2H)2.56-2.72(m,2H)2.90(br d,J=2.01Hz,1H)3.19(br t,J=5.14Hz,4H)3.50-3.59(m,1H)3.71(br s,4H)3.77-3.89(m,1H)5.01-5.13(m,2H)5.58-5.71(m,1H)5.71-5.81(m,1H)5.88(d,J=15.31Hz,1H)6.15(br d,J=10.79Hz,1H)6.53(dd,J=15.18,10.92Hz,1H)。

[2706] ADL1-D4

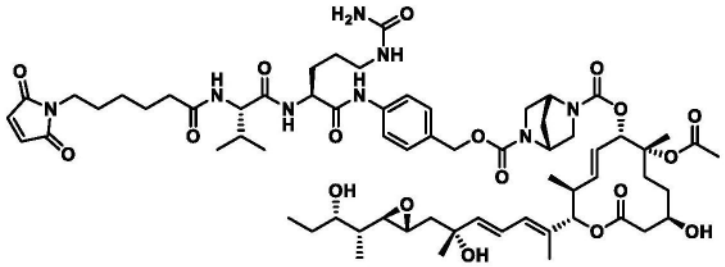
[2707] 

[2708] 采用通用程序1(1.3.1)制备ADL1-D4。快速色谱法得到ADL1-D4(30.5mg,0.024mmol,77%产率)。

[2709] LC/MS(ESI,m/z),1263.8[M+H]$^+$。

[2710] ^{1}H-NMR(400MHz,MeOH-d_4):δppm 0.87-0.93(m,7H)0.93-1.01(m,8H)1.19-1.34(m,4H)1.50(s,3H)1.57(s,5H)1.58-1.70(m,6H)1.70-1.77(m,1H)1.78(s,3H)1.83-1.95(m,2H)2.04(s,3H)2.05-2.13(m,1H)2.27(t,J=7.40Hz,2H)2.32-2.42(m,1H)2.50(d,J=3.64Hz,2H)2.55-2.74(m,2H)2.90(td,J=5.83,2.26Hz,1H)3.03-3.26(m,2H)3.35(s,13H)3.42-3.61(m,11H)3.80(br dd,J=9.85,3.58Hz,1H)4.16(d,J=7.40Hz,1H)4.50(dd,J=8.91,5.14Hz,1H)4.56(s,1H)5.05(dd,J=14.37,10.10Hz,2H)5.09(s,2H)5.49(s,1H)5.59-5.69(m,1H)5.72-5.80(m,1H)5.87(d,J=15.18Hz,1H)6.09-6.22(m,1H)6.44-6.60(m,1H)7.32(d,J=8.66Hz,2H)7.58(d,J=8.53Hz,2H)。

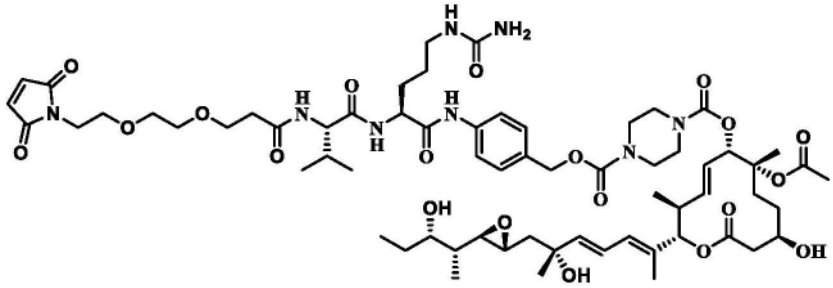
[2711] ADL1-D5

[2712] 

[2713] 采用通用程序1(1.3.1),使用D5制备ADL1-D5。快速色谱得到(14mg,51.6%产率)。LCMS(ESI,m/z),1276.43[M+H]$^+$

[2714] 1H NMR(400MHz,甲醇-d4)δppm 0.86-1.00(m,16H)1.23-1.40(m,7H)1.42-1.69(m,16H)1.73-1.80(m,4H)1.84-1.96(m,4H)1.98-2.10(m,4H)2.27(t,J=7.40Hz,2H)2.31-2.41(m,1H)2.50(br d,J=3.39Hz,2H)2.56-2.64(m,1H)2.64-2.72(m,1H)2.80-2.93(m,1H)3.12(br d,J=6.90Hz,1H)3.16-3.26(m,1H)3.35-3.56(m,7H)3.76-3.86(m,1H)4.16(d,J=7.40Hz,1H)4.48-4.58(m,3H)4.93-5.16(m,4H)5.65(br d,J=9.91Hz,1H)5.70-5.82(m,1H)5.88(d,J=15.18Hz,1H)6.14(br d,J=11.04Hz,1H)6.50-6.58(m,1H),6.79(s,2H)7.26-7.36(m,2H)7.56-7.63(m,2H)

[2715] 1.3.3ADL22-D4的合成

[2716] 

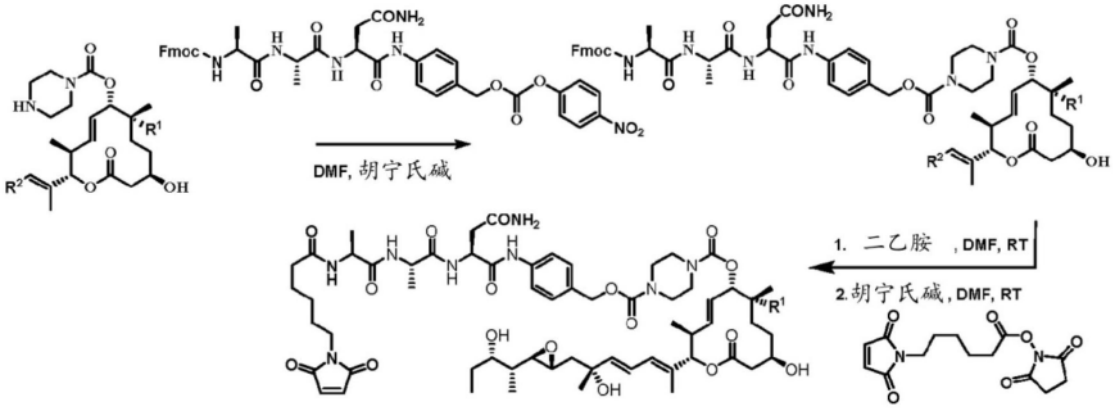
[2717] 向(2S,3S,6S,7R,10R,E)-7-乙酰氧基-10-羟基-2-((R,2E,4E)-6-羟基-7-((2R,3R)-3-((2R,3S)-3-羟基戊-2-基)环氧乙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-3,7-二甲基-12-氧代氧杂环十二碳-4-烯-6-基哌嗪-1-甲酸酯(12mg,0.018mmol)于DMF(2mL)中的溶液中添加4-((2S,5S)-15-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)-5-异丙基-4,7-二氧代-2-(3-脲基丙基)-10,13-二氧杂-3,6-二氮杂十五烷酰胺基)苄基(4-硝基苯基)碳酸酯(16.98mg,.022mmol)和胡宁氏碱(7.00mg,.054mmol)。在20℃下搅拌混合物1小时。将混合物直接在真空中浓缩至硅胶上并通过柱色谱法(MeOH/DCM 0-20%)纯化,得到呈白色固体的1-((2S,3S,6S,7R,10R,E)-7-乙酰氧基-10-羟基-2-((R,2E,4E)-6-羟基-7-((2R,3R)-3-

((2R,3S)-3-羟基戊-2-基)环氧乙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-3,7-二甲基-12-氧代氧杂环十二碳-4-烯-6-基)4-(4-((2S,5S)-15-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)-5-异丙基-4,7-二氧代-2-(3-脲基丙基)-10,13-二氧杂-3,6-二氮杂十五烷酰胺基)苄基)哌嗪-1,4-二甲酸酯(12mg,9.16μmol,50.8%产率)。LCMS(ESI,m/z),1310.2[M+H]$^+$

[2718] 化学式:C65H96N8O20,分子量:1309.52

[2719] 1H NMR(400MHz,DMSO-d6)δppm 0.73-0.89(m,17H)1.03-1.13(m,1H)1.21-1.25(m,4H)1.25-1.40(m,5H)1.42-1.47(m,4H)1.48,(br s,3H)1.69(s,4H)1.73-1.83(m,1H)1.99(s,2H)2.10-2.25(m,1H)2.36(br s,3H)2.40-2.48(m,2H)2.54-2.66(m,2H)2.72-2.80,(m,1H)2.88-3.08(m,2H)3.34-3.44(m,9H)3.44-3.48(m,3H)3.48-3.52(m,2H)3.52-3.59(m,3H)3.64-3.75(m,1H)4.24(s,1H),4.40(br d,J=5.65Hz,2H)4.62(d,J=5.02Hz,1H)4.80-4.85(m,1H)4.90(br d,J=9.03Hz,2H)5.01(s,2H)5.40(s,2H)5.48-5.57(m,1H),5.66-5.76(m,1H)5.81-5.91(m,1H)5.94-6.01(m,1H)6.02-6.11(m,1H)6.36-6.45(m,1H)7.02(s,2H)7.27-7.33(m,2H)7.58(s,2H)7.81-7.89(m,1H)8.11(br d,J=7.40Hz,1H)9.96-10.02(m,1H)

[2720] 1.3.4用于合成ADL21-D12、ADL21-D1、ADL21-D4的通用程序:

[2721] 

[2722] 步骤1

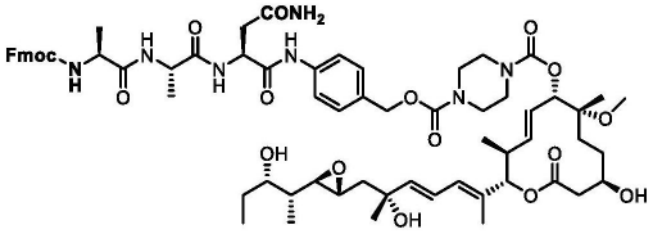
[2723] 将有效负载(1.0当量)和(9H-芴-9-基)甲基((S)-1-(((S)-1-(((S)-4-氨基-1-((4-((((4-硝基苯氧基)羰基)氧基)甲基)苯基)氨基)-1,4-二氧代丁-2-基)氨基)-1-氧代丙-2-基)氨基)-1-氧代丙-2-基)氨基甲酸酯(1.0当量)溶解于DMF(0.1M)中并添加胡宁氏碱(3.0当量)。在室温下搅拌反应混合物30分钟,这之后,在真空中浓缩反应物并对所得残余物进行色谱分离(MeOH/DCM),得到所希望的产物。

[2724] 步骤2和3

[2725] 将fmoc-Ala-Ala-天冬酰胺PABC有效负载(1.0当量)溶解于N,N-二甲基甲酰胺(0.05M)中,然后添加二乙胺(6.0当量)。在室温下搅拌反应1小时,并使混合物蒸发至干。将粗产物用N,N-二甲基甲酰胺(0.05M)稀释。将2,5-二氧代吡咯烷-1-基6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酸酯(1.2当量)和胡宁氏碱(2.5当量)添加至混合物中并在室温下搅拌1小时。然后,真空浓缩混合物,并将所得残余物经由反相HPLC纯化,得到所希望的马来酰亚胺基己酰基Ala-Ala-天冬酰胺PABC接头有效负载。

[2726] 1.3.4.1ADL21-D1

[2727] 步骤1:

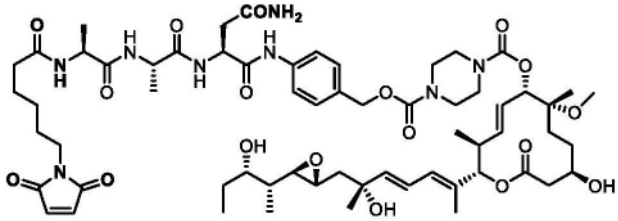
[2728] 

[2729] 1-(4-((5S,8S,11S)-11-(2-氨基-2-氧代乙基)-1-(9H-芴-9-基)-5,8-二甲基-3,6,9-三氧代-2-氧杂-4,7,10-三氮杂十二烷-12-酰胺基)苄基)4-((2S,3S,6S,7R,10R,E)-10-羟基-2-((R,2E,4E)-6-羟基-7-((2R,3R)-3-((2R,3S)-3-羟基戊-2-基)环氧乙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-7-甲氧基-3,7-二甲基-12-氧代氧杂环十二碳-4-烯-6-基)哌嗪-1,4-二甲酸酯(140.2mg,71.9%)。LCMS(ESI,m/z)1265.6[M+H]$^+$

[2730] 化学式:$C_{67}H_{89}N_7O_{17}$

[2731] 分子量:1264.48

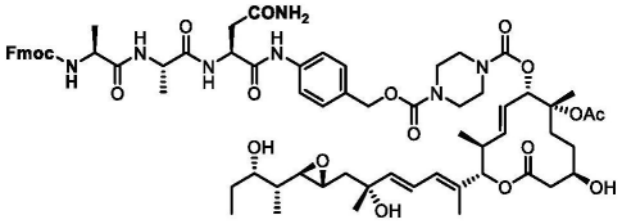
[2732] 步骤2和3:

[2733] 

[2734] 1-(4-((S)-4-氨基-2-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酰胺基)丙酰胺基)丙酰胺基)-4-氧代丁酰胺基)苄基)4-((2S,3S,6S,7R,10R,E)-10-羟基-2-((R,2E,4E)-6-羟基-7-((2R,3R)-3-((2R,3S)-3-羟基戊-2-基)环氧乙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-7-甲氧基-3,7-二甲基-12-氧代氧杂环十二碳-4-烯-6-基)哌嗪-1,4-二甲酸酯(49.1mg,35.8%)。LCMS(ESI,m/z)1258.19[M+Na]$^+$

[2735] ^{1}H NMR(400MHz,甲醇-d4)δppm 0.85-0.98(m,10H)1.22(s,4H)1.26-1.45(m,14H)1.45-1.69(m,12H)1.79(s,3H)1.90(s,2H)2.20-2.27(m,2H)2.52(br dd,J＝10.10,3.70Hz,3H)2.67(br d,J＝2.13Hz,1H)2.85(t,J＝6.15Hz,3H)3.14(t,J＝1.57Hz,1H)3.41-3.57,(m,14H)3.78-3.88(m,1H)4.27(dd,J＝12.36,7.09Hz,2H)4.77(s,1H)4.97-5.13(m,6H)5.51-5.64(m,1H)5.72(br d,J＝9.66Hz,1H),5.88(d,J＝15.43Hz,1H)6.12-6.17(m,1H)6.47-6.61(m,1H)6.79(s,2H)7.33(m,J＝8.66Hz,2H),7.68(m,J＝8.66Hz,2H)1.3.4.2ADL21-D4

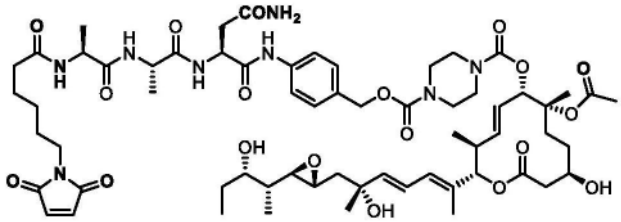
[2736] 步骤1

[2737] 

[2738] 1-((2S,3S,6S,7R,10R,E)-7-乙酰氧基-10-羟基-2-((R,2E,4E)-6-羟基-7-((2R,3R)-3-((2R,3S)-3-羟基戊-2-基)环氧乙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-3,7-二甲基-12-氧代氧杂环十二碳-4-烯-6-基)酯4-(4-((5S,8S,11S)-11-(2-氨基-2-氧代乙基)-

1-(9H-芴-9-基)-5,8-二甲基-3,6,9-三氧代-2-氧杂-4,7,10-三氮杂十二烷-12-酰胺基)苄基)哌嗪-1,4-二甲酸酯(125mg,85.6%)。LCMS(ESI,m/z)1293.4[M+H]$^+$

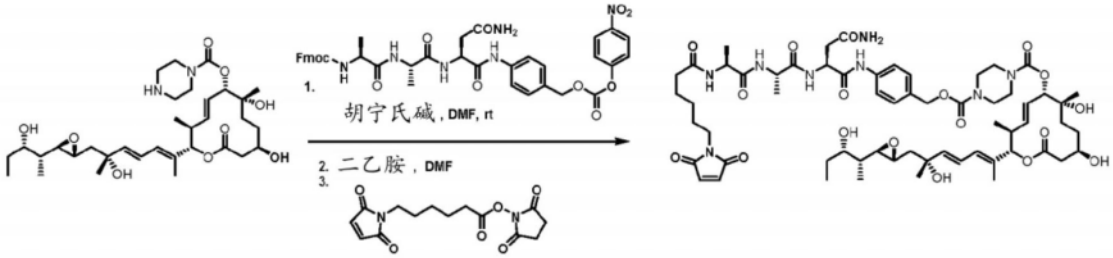
[2739] 步骤2和3

[2740] 

[2741] 1-((2S,3S,6S,7R,10R,E)-7-乙酰氧基-10-羟基-2-((R,2E,4E)-6-羟基-7-((2R,3R)-3-((2R,3S)-3-羟基戊-2-基)环氧乙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-3,7-二甲基-12-氧代氧杂环十二碳-4-烯-6-基)4-(4-((S)-4-氨基-2-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酰胺基)丙酰胺基)丙酰胺基)-4-氧代丁酰胺基)苄基)哌嗪-1,4-二甲酸酯(35mg,80%)。LCMS(ESI,m/z)1285.0[M+Na]$^+$

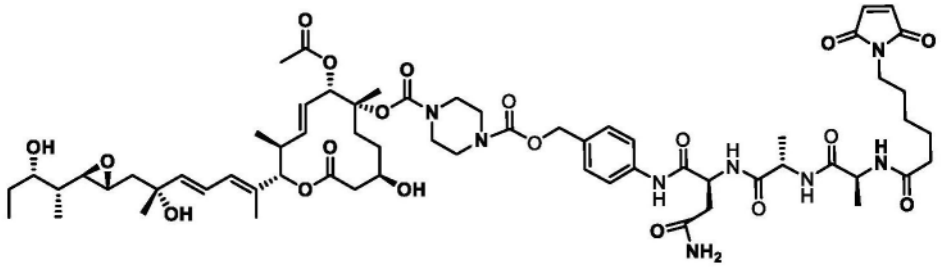
[2742] ^{1}H NMR(400MHz,DMSO-d6)δppm 0.71-0.87(m,9H)1.04-1.12(m,1H)1.14-1.26(m,13H)1.27-1.40(m,3H)1.40-1.52(m,9H)1.52-1.62(m,1H)1.69(s,3H)1.74-1.83(m,1H)1.99(d,J=4.27Hz,4H)2.03-2.14(m,2H)2.15-2.26(m,1H)2.31-2.41(m,2H)2.54-2.65(m,4H)2.72-2.80(m,1H)3.17(d,J=5.27Hz,3H)3.36(br s,9H)3.63-3.74(m,1H)3.99-4.12(m,2H)4.14-4.22(m,1H)4.23-4.30(m,1H)4.40(d,J=5.65Hz,1H)4.55-4.65(m,2H)4.82(s,1H)4.87-4.93(m,2H)5.01(s,2H)5.47-5.57(m,1H)5.66-5.77(m,1H)6.01-6.09(m,1H)6.35-6.45(m,1H)6.89-6.96(m,1H)6.99(s,2H)7.30(d,J=8.66Hz,2H)7.36-7.42(m,1H)7.62(s,2H)7.97-8.21(m,3H),9.62-9.72(m,1H)。

[2743] 1.3.5ADL21-D12

[2744] 

[2745] 向(2S,3S,6S,7R,10R,E)-7,10-二羟基-2-((R,2E,4E)-6-羟基-7-((2R,3R)-3-((2R,3S)-3-羟基戊-2-基)环氧乙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-3,7-二甲基-12-氧代氧杂环十二碳-4-烯-6-基哌嗪-1-甲酸酯(50mg,0.08mmol)于DMF(1mL)中的溶液中添加(9H-芴-9-基)甲基((S)-1-(((S)-1-(((S)-4-氨基-1-((4-((((4-硝基苯氧基)羰基)氧基)甲基)苯基)氨基)-1,4-二氧代丁-2-基)氨基)-1-氧代丙-2-基)氨基)-1-氧代丙-2-基)氨基甲酸酯(73.9mg,0.096mmol),随后添加N-乙基-N-异丙基丙-2-胺(104mg,0.803mmol)。搅拌反应混合物1小时。将反应混合物浓缩至干并通过硅胶柱色谱法纯化。将含有所希望的化合物的级分浓缩,得到透明油状物,假定100%产率,将其直接进行后续步骤。然后,将所得油状物溶解于DMF(2mL)中,并装入二乙胺(58.7mg,0.803mmol)。在20℃下搅拌所得混合物1小时并在真空中浓缩。将残余物再溶解于DMF(1mL)中,然后添加2,5-二氧代吡咯烷-1-基6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酸酯(32.2mg,0.104mmol)和N-乙基-N-异丙

基丙-2-胺(104mg,0.803mmol)。搅拌所得混合物1小时。将反应混合物浓缩至干并在反相HPLC下纯化,得到呈白色固体的1-(4-((S)-4-氨基-2-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酰胺基)丙酰胺基)丙酰胺基)-4-氧代丁酰胺基)苄基)4-((2S,3S,6S,7R,10R,E)-7,10-二羟基-2-((R,2E,4E)-6-羟基-7-((2R,3R)-3-((2R,3S)-3-羟基戊-2-基)环氧乙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-3,7-二甲基-12-氧代氧杂环十二碳-4-烯-6-基)哌嗪-1,4-二甲酸酯(7.5mg,6.14μmol,7.65%产率)。LCMS(ESI,m/z)1222.28[M+H]$^+$1.3.6ADL21-D8

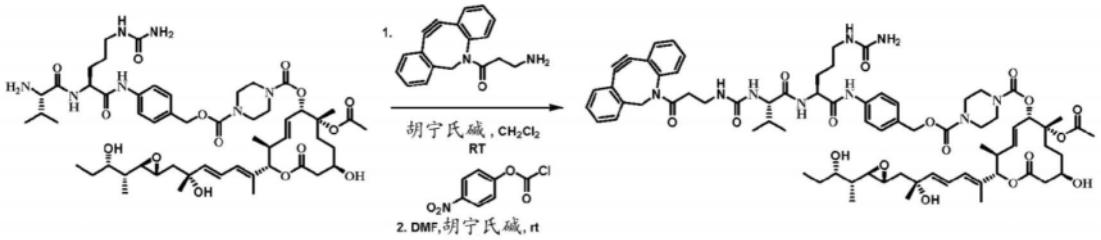
[2746] 

[2747] 向(2S,3S,6S,7R,10R,E)-6-乙酰氧基-10-羟基-2-((R,2E,4E)-6-羟基-7-((2R,3R)-3-((2R,3S)-3-羟基戊-2-基)环氧乙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-3,7-二甲基-12-氧代氧杂环十二碳-4-烯-7-基哌嗪-1-甲酸酯(27.0mg,.041mmol)于DMF中的溶液中添加(9H-芴-9-基)甲基((S)-1-(((S)-1-(((S)-4-氨基-1-((4((((4硝基苯氧基)羰基)氧基)甲基)苯基)氨基)-1,4-二氧代丁-2-基)氨基)-1-氧代丙-2-基)氨基)-1-氧代丙-2-基)氨基甲酸酯(40.5mg,.053mmol),随后添加胡宁氏碱(36.2μl,0.203mmol)。在室温下搅拌20分钟后,然后在真空中浓缩混合物并将所得残余物通过柱色谱法(0-20% MeOH/DCM)纯化,得到所希望的中间体。然后,将残余物与DMF(2mL)和二乙胺(29.7mg,0.406mmol)组合并在室温下搅拌20分钟。随后,在真空中浓缩混合物,并将所得残余物再溶解于DMF(2ml)中并用2,5-二氧代吡咯烷-1-基6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酸酯(16.28mg,.053mmol)和胡宁氏碱(36.2μl,0.203mmol)处理。搅拌所得混合物20分钟,然后浓缩至干并通过柱色谱法纯化所得残余物,其中以0-20%MeOH/DCM梯度洗脱中间体。然后,所得残余物经历反相HPLC纯化,得到分离为白色固体的1-((2S,3S,6S,7R,10R,E)-6-乙酰氧基-10-羟基-2-((R,2E,4E)-6-羟基-7-((2R,3R)-3-((2R,3S)-3-羟基戊-2-基)环氧乙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-3,7-二甲基-12-氧代氧杂环十二碳-4-烯-7-基)4-(4-((S)-4-氨基-2-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酰胺基)丙酰胺基)丙酰胺基)-4-氧代丁酰胺基)苄基)哌嗪-1,4-二甲酸酯(3.5mg,2.77μmol,6.82%产率)。1-((2S,3S,6S,7R,10R,E)-6-乙酰氧基-10-羟基-2-((R,2E,4E)-6-羟基-7-((2R,3R)-3-((2R,3S)-3-羟基戊-2-基)环氧乙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-3,7-二甲基-12-氧代氧杂环十二碳-4-烯-7-基)4-(4-((S)-4-氨基-2-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酰胺基)丙酰胺基)丙酰胺基)-4-氧代丁酰胺基)苄基)哌嗪-1,4-二甲酸酯(3.5mg,6.8%)。LCMS(ESI,m/z)1285.60[M+Na]$^+$

[2748] ^{1}H NMR:0.68-0.90(m,11H)1.03-1.13(m,2H)1.15-1.26(m,14H)1.24-1.38(m,4H)1.40-1.63(m,12H),1.69(s,3H)1.74-1.83(m,1H)2.03(s,3H)2.06-2.12(m,2H)2.24-2.41(m,3H)2.53-2.63(m,4H),3.79-3.80(m,1H)4.13-4.30(m,2H)4.32-4.33(m,1H)4.33-4.47(m,1H)4.44-4.48(m,1H)4.52-4.73(m,2H)4.74-4.97(m,2H)5.03(s,3H)5.47-5.61(m,1H)

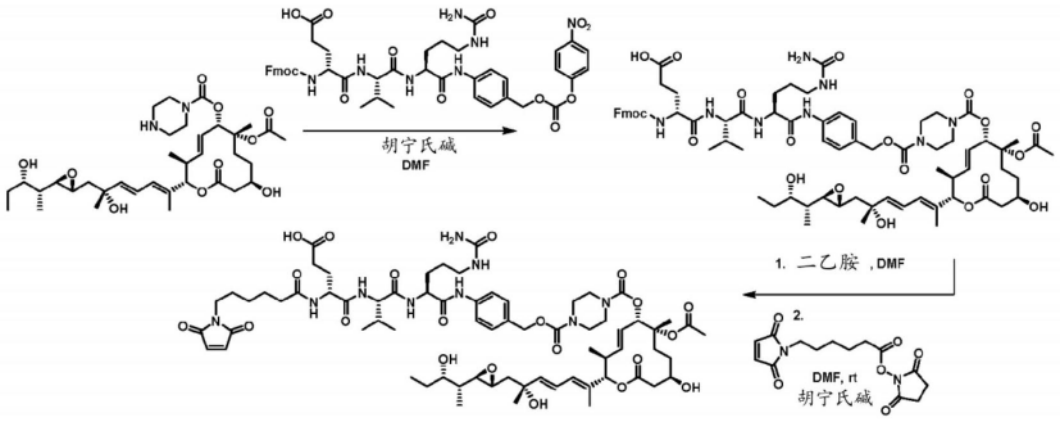
5.65-5.77(m,1H)5.79-5.92(m,1H)5.98-6.12(m,1H)6.30-6.46(m,1H)6.75-6.85(m,1H)6.90-6.95(m,1H)6.99(s,1H)7.26-7.36(m,2H)7.37-7.46(m,1H)7.56-7.73(m,2H)7.90-8.09(m,1H)8.07-8.22(m,2H)8.46(s,1H)9.59-9.78(m,1H)

[2749] 1.3.7DBCO-Val-Cit-pABC接头-有效负载,即ADL25-D4的制备

[2750] 

[2751] 在0℃下,向3-氨基-1-(11,12-二氢二苯并[b,f]吖辛因-5(6H)-基)丙-1-酮(19.36mg,0.07mmol)于DCM(5mL)中的溶液中添加胡宁氏碱(10.26mg,0.079mmol),随后添加4-硝基苯基氯甲酸酯(14.12mg,0.07mmol)。使反应升温至20℃并搅拌2小时。然后,将混合物浓缩至干并用DMF稀释。向所得混合物中装入胡宁氏碱(10.26mg,.079mmol)和1-((2S,3S,6S,7R,10R,E)-7-乙酰氧基-10-羟基-2-((R,2E,4E)-6-羟基-7-((2R,3R)-3-((2R,3S)-3-羟基戊-2-基)环氧乙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-3,7-二甲基-12-氧代氧杂环十二碳-4-烯-6-基)4-(4-((S)-2-((S)-2-氨基-3-甲基丁酰胺基)-5-脲基戊酰胺基)苄基)哌嗪-1,4-二甲酸酯(50mg,.047mmol)并搅拌1小时。然后,将混合物浓缩至干并通过柱色谱法纯化,随后反相纯化,得到1-((2S,3S,6S,7R,10R,E)-7-乙酰氧基-10-羟基-2-((R,2E,4E)-6-羟基-7-((2R,3R)-3-((2R,3S)-3-羟基戊-2-基)环氧乙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-3,7-二甲基-12-氧代氧杂环十二碳-4-烯-6-基)4-(4-((9S,12S)-9-异丙基-3,7,10-三氧代-12-(3-脲基丙基)-2,6,8,11-四氮杂十三烷-13-二苯环辛炔酰胺基)苄基)哌嗪-1,4-二甲酸酯(5.3mg,8.27%)。LCMS(ESI,m/z)1372.7[M]$^+$

[2752] 1.3.8.马来酰亚胺基-Glu-Val-Cit-pABC接头-有效负载的制备

[2753] 

[2754] 向(2S,3S,6S,7R,10R,E)-7-乙酰氧基-10-羟基-2-((R,2E,4E)-6-羟基-7-((2R,3R)-3-((2R,3S)-3-羟基戊-2-基)环氧乙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-3,7-二甲基-12-氧代氧杂环十二碳-4-烯-6-基哌嗪-1-甲酸酯(20mg,0.03mmol)于DMF(1mL)中的溶液中添加(S)-4-((((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-5-(((S)-3-甲基-1-(((S)-1-((4-((((4-硝基苯氧基)羰基)氧基)甲基)苯基)氨基)-1-氧代-5-脲基戊-2-基)氨基)-1-氧代丁-2-基)氨基)-5-氧代戊酸(32.3mg,0.036mmol)和胡宁氏碱(11.66mg,0.09mmol)并在20

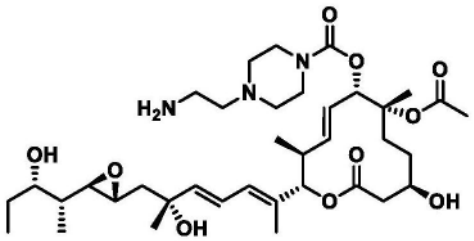
℃下搅拌1小时。然后,添加二乙胺(110mg,1.504mmol)且在20℃下将混合物再搅拌30分钟。然后,将混合物用乙酸乙酯稀释并在真空中浓缩。将所得残余物用DMF(1mL)稀释,2,5-二氧代吡咯烷-1-基-6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酸酯(13.91mg,0.045mmol)和胡宁氏碱(11.66mg,0.09mmol),并搅拌反应50分钟。然后,将反应混合物用乙酸乙酯稀释,浓缩至干并使用反相HPLC纯化,得到呈白色固体的(S)-5-(((S)-1-(((S)-1-((4-(((4-((((2S,3S,6S,7R,10R,E)-7-乙酰氧基-10-羟基-2-((R,2E,4E)-6-羟基-7-((2R,3R)-3-((2R,3S)-3-羟基戊-2-基)环氧乙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-3,7-二甲基-12-氧代氧杂环十二碳-4-烯-6-基)氧基)羰基)哌嗪-1-羰基)氧基)甲基)苯基)氨基)-1-氧代-5-脲基戊-2-基)氨基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)氨基)-4-(6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酰胺基)-5-氧代戊酸(9.3mg,6.68μmol,22.20%产率);LCMS(ESI,m/z)1393.4[M+H]$^+$

[2755] ^{1}H NMR(400MHz,DMSO-d6)δppm 0.74-0.89(m,16H)1.03-1.66(m,25H)1.69(s,4H)1.74-1.94(m,2H)2.00(s,4H)2.09(br d,J=4.39Hz,2H)2.21(br d,J=7.53Hz,3H)2.31-2.42(m,2H)2.53-2.84(m,3H)2.89-3.09(m,2H)3.34-3.48(m,10H)3.65-3.74(m,1H)4.19,(dd,J=8.47,6.59Hz,1H)4.26-4.45(m,3H)4.57-4.64(m,1H)4.79-4.85(m,1H)4.90(br d,J=9.03Hz,2H)5.01(s,2H)5.43(br s,2H),5.47-5.59(m,1H)5.67-5.80(m,1H)5.81-5.93(m,1H)5.94-6.14(m,2H)6.35-6.47(m,1H)6.99(s,2H)7.30(d,J=8.66Hz,2H)7.58,(d,J=8.53Hz,2H)7.63-7.71(m,1H)7.98-8.06(m,1H)8.15-8.27(m,1H)9.99-10.09(m,1H)

[2756] 1.3.10.ADL1-D3、ADL10-D3

[2757] 有效负载D3是经由以下给出的程序制备

[2758] D3

[2759] 

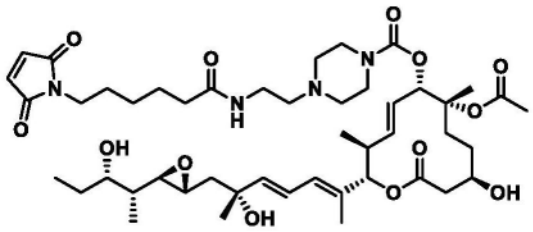
[2760] 向(2S,3S,6S,7R,10R,E)-7-乙酰氧基-10-羟基-2-((R,2E,4E)-6-羟基-7-((2R,3R)-3-((2R,3S)-3-羟基戊-2-基)环氧乙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-3,7-二甲基-12-氧代氧杂环十二碳-4-烯-6-基哌嗪-1-甲酸酯(55mg,0.083mmol)于DCM(3mL)中的混合物中添加(9H-芴-9-基)甲基(2-氧代乙基)胺基甲酸酯(46.5mg,0.165mmol)和三乙酰氧基硼氢化钠(52.6mg,0.248mmol)。在室温下搅拌反应20分钟。然后,将反应混合物浓缩至干并通过硅胶柱色谱法(0-10%MeOH/DCM)纯化。将纯化的材料溶解于DMF(3mL)中。然后,向混合物中装入二乙胺(121mg,1.655mmol)并在室温下搅拌。然后,在真空中浓缩混合物并经由反相HPLC纯化法纯化,得到呈白色固体的(2S,3S,6S,7R,10R,E)-7-乙酰氧基-10-羟基-2-((R,2E,4E)-6-羟基-7-((2R,3R)-3-((2R,3S)-3-羟基戊-2-基)环氧乙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-3,7-二甲基-12-氧代氧杂环十二碳-4-烯-6-基4-(2-氨基乙基)哌嗪-1-甲酸酯(6mg,8.48μmol,10.25%产率)。

[2761] LCMS(ESI,m/z),708.2[M+H]$^+$

[2762] ^{1}H NMR(400MHz,DMSO-d6)δppm 0.74-0.86(m,9H)1.04-1.15(m,1H)1.23(s,3H)

1.26-1.40(m,3H)1.45(s,4H)1.47-1.51(m,1H),1.52-1.63(m,1H)1.69(s,3H)1.73-1.82(m,1H)1.99(s,3H)2.13-2.42(m,9H)2.53-2.65(m,4H)2.72-2.80(m,1H),3.35-3.41(m,3H)3.65-3.76(m,1H)4.36-4.46(m,1H)4.57-4.66(m,1H)4.79-4.85(m,1H)4.87-4.95(m,2H)5.43-5.56(m,1H)5.64-5.77(m,1H)5.80-5.91(m,1H)6.01-6.12(m,1H)6.33-6.49(m,1H)。

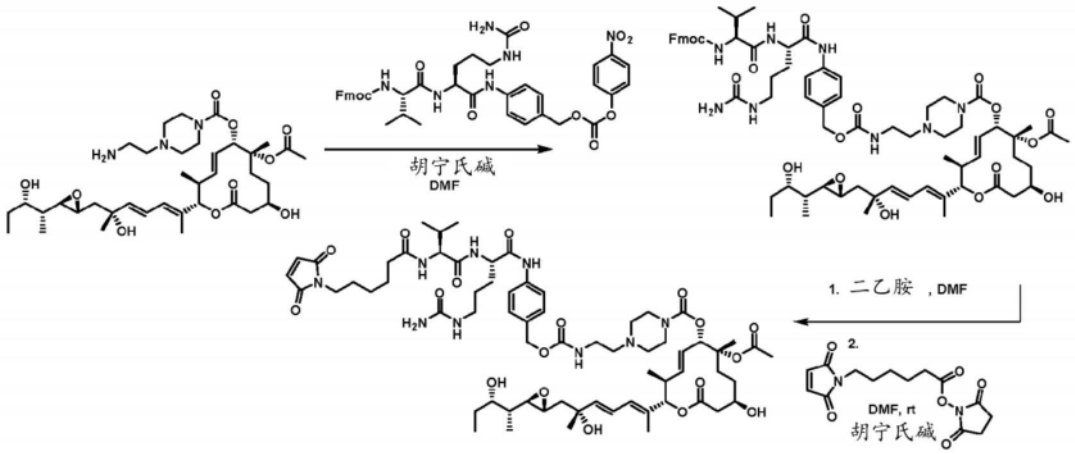
[2763] 1.3.10.1ADL10-D3

[2764] 

[2765] 向(2S,3S,6S,7R,10R,E)-7-乙酰氧基-10-羟基-2-((R,2E,4E)-6-羟基-7-((2R,3R)-3-((2R,3S)-3-羟基戊-2-基)环氧乙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-3,7-二甲基-12-氧代氧杂环十二碳-4-烯-6-基4-(2-氨基乙基)哌嗪-1-甲酸酯(40mg,.057mmol)于DMF(2mL)中的溶液中添加2,5-二氧代吡咯烷-1-基6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酸酯(27.9mg,0.09mmol),随后添加胡宁氏碱(36.5mg,0.283mmol)并搅拌20分钟。然后,将所得混合物浓缩至硅胶上并经由柱色谱法(0-20% MeOH/DCM)纯化,得到呈浅黄色固体状的(2S,3S,6S,7R,10R,E)-7-乙酰氧基-10-羟基-2-((R,2E,4E)-6-羟基-7-((2R,3R)-3-((2R,3S)-3-羟基戊-2-基)环氧乙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-3,7-二甲基-12-氧代氧杂环十二碳-4-烯-6-基4-(2-(6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酰胺基)乙基)哌嗪-1-甲酸酯(22mg,43.2%产率)。LCMS(ESI,m/z)902.1$[M+H]^+$

[2766] ^{1}H NMR(400MHz,DMSO-d6)δppm 0.73-0.89(m,10H)0.99-1.29(m,10H)1.30-1.38(m,2H)1.40-1.49(m,9H)1.52-1.64(m,1H),1.69(s,3H)1.74-1.83(m,1H)1.93-2.07(m,5H)2.34(br d,J=16.94Hz,9H)2.59(s,3H)3.07-3.21(m,2H)3.36(br d,J=14.05Hz,3H)3.66-3.78(m,1H)4.37-4.45(m,1H)4.57-4.66(m,1H)4.79-4.86(m,1H)4.87-4.97(m,2H)5.46-5.57(m,1H)5.66-5.75(m,1H)5.81-5.91(m,1H)5.99-6.13(m,1H)6.31-6.47(m,1H)7.00(s,2H)7.62-7.71(m,1H)

[2767] 1.3.10.2ADL1-D3

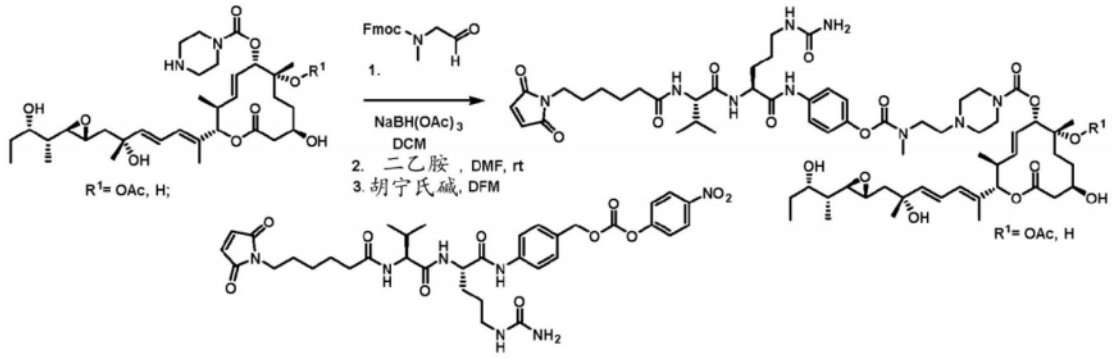
[2768] 

[2769] 向(2S,3S,6S,7R,10R,E)-7-乙酰氧基-10-羟基-2-((R,2E,4E)-6-羟基-7-((2R,3R)-3-((2R,3S)-3-羟基戊-2-基)环氧乙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-3,7-二甲

基-12-氧代氧杂环十二碳-4-烯-6-基4-(2-氨基乙基)哌嗪-1-甲酸酯(30mg,0.042mmol)于DMF(2mL)中的溶液中添加(9H-芴-9-基)甲基((S)-3-甲基-1-(((S)-1-((4-((((4-硝基苯氧基)羰基)氧基)甲基)苯基)氨基)-1-氧代-5-脲基戊-2-基)氨基)-1-氧代丁-2-基)氨基甲酸酯(35.7mg,0.047mmol),随后添加胡宁氏碱(16.43mg,0.127mmol)并搅拌混合物1小时。将所得混合物直接浓缩至硅胶上并通过硅胶柱色谱法纯化,得到(2S,3S,6S,7R,10R,E)-7-乙酰氧基-10-羟基-2-((R,2E,4E)-6-羟基-7-((2R,3R)-3-((2R,3S)-3-羟基戊-2-基)环氧乙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-3,7-二甲基-12-氧代氧杂环十二碳-4-烯-6-基4-(2-((((4-((S)-2-((S)-2-((((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-3-甲基丁酰胺基)-5-脲基戊酰胺基)苄基)氧基)羰基)氨基)乙基)哌嗪-1-甲酸酯,将其直接进行后续步骤。向(2S,3S,6S,7R,10R,E)-7-乙酰氧基-10-羟基-2-((R,2E,4E)-6-羟基-7-((2R,3R)-3-((2R,3S)-3-羟基戊-2-基)环氧乙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-3,7-二甲基-12-氧代氧杂环十二碳-4-烯-6-基4-(2-((((4-((S)-2-((S)-2-((((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-3-甲基丁酰胺基)-5-脲基戊酰胺基)苄基)氧基)羰基)氨基)乙基)哌嗪-1-甲酸酯(30mg,0.022mmol)于DMF(2mL)中的溶液中添加二乙胺(82mg,1.123mmol)并在20℃下搅拌混合物1小时。将所得混合物用乙酸乙酯稀释并在真空中浓缩。然后,将所得残余物再溶解于DMF中并装入2,5-二氧代吡咯烷-1-基6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酸酯(8.31mg,0.027mmol)和胡宁氏碱(8.71mg,.067mmol)。在20℃下搅拌所得混合物1小时。然后,将溶液浓缩至硅胶上并通过柱色谱法(0-20% MeOH/DCM)纯化,得到呈白色固体的(2S,3S,6S,7R,10R,E)-7-乙酰氧基-10-羟基-2-((R,2E,4E)-6-羟基-7-((2R,3R)-3-((2R,3S)-3-羟基戊-2-基)环氧乙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-3,7-二甲基-12-氧代氧杂环十二碳-4-烯-6-基4-(2-((((4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酰胺基)-3-甲基丁酰胺基)-5-脲基戊酰胺基)苄基)氧基)羰基)氨基)乙基)哌嗪-1-甲酸酯(25mg,0.019mmol,85%产率);LC/MS(ESI,m/z),1306.2[M]$^+$。

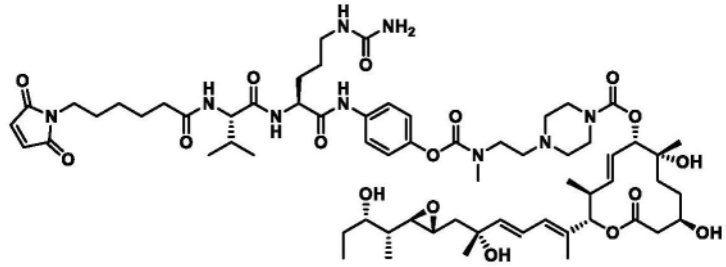
[2770] ^{1}H NMR(400MHz,DMSO-d_6)δppm 0.75-0.89(m,18H)1.05-1.12(m,1H)1.15-1.20(m,1H)1.21-1.26(m,4H)1.26-1.39(m,5H)1.40-1.40(m,1H)1.42-1.47(m,5H)1.57(br s,3H)1.69(s,4H)1.73-1.81(m,1H)1.92-1.98(m,1H)1.99(d,J=4.39Hz,4H)2.14-2.26(m,1H)2.29-2.42(m,4H)2.42-2.47(m,1H)2.53-2.64(m,2H)2.73-2.78(m,1H)2.88-3.08(m,2H)3.35-3.60(m,19H)3.65-3.75(m,1H)4.22(dd,J=8.47,6.71Hz,1H)4.32-4.45(m,2H)4.60-4.65(m,1H)4.79-4.85(m,1H)4.90(br d,J=9.03Hz,2H)5.01(s,2H)5.40(s,2H)5.47-5.58(m,1H)5.66-5.77(m,1H)5.87(s,1H)5.97(s,1H)6.03-6.13(m,1H)6.35-6.45(m,1H)7.02(s,2H)7.30(d,J=8.53Hz,2H)7.59(d,J=8.53Hz,2H)7.81-7.88(m,1H),8.09-8.15(m,1H)9.90-10.09(m,1H)

[2771] 1.3.11经由以下通用程序制备ADL1-D6和ADL1-D7

[2772] 

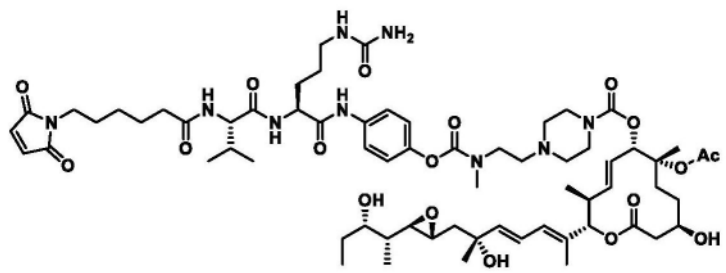
[2773] 向(2S,3S,6S,7R,10R,E)-7-乙酰氧基-10-羟基-2-((R,2E,4E)-6-羟基-7-((2R,3R)-3-((2R,3S)-3-羟基戊-2-基)环氧乙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-3,7-二甲基-12-氧代氧杂环十二碳-4-烯-6-基哌嗪-1-甲酸酯(30mg,0.045mmol)于DCM(0.1M)中的溶液中添加(9H-芴-9-基)甲基甲基(2-氧代乙基)胺基甲酸酯(5当量)和三乙酰氧基硼氢化钠(10当量)并搅拌30分钟。然后,将混合物用乙酸乙酯稀释,并用水和盐水洗涤。将有机层经无水Na_2SO_4干燥,浓缩并通过柱色谱法(0-10% MeOH/DCM梯度)纯化,以分离出所希望的产物。然后,将所得材料用DMF(0.1M)稀释,装入二乙胺(20当量)并搅拌20分钟。然后,将混合物浓缩至干且再次在DMF中稀释,并装入4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酰胺基)-3-甲基丁酰胺基)-5-脲基戊酰胺基)苄基(4-硝基苯基)碳酸酯(1.2当量),然后装入胡宁氏碱(3.0当量)。搅拌混合物30分钟,在真空中浓缩,并经由制备型HPLC纯化法纯化,得到目标产物。

[2774] 1.3.11.2ADL1-D7

[2775] 

[2776] 通用程序1(1.3.11)给出(2S,3S,6S,7R,10R,E)-7,10-二羟基-2-((R,2E,4E)-6-羟基-7-((2R,3R)-3-((2R,3S)-3-羟基戊-2-基)环氧乙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-3,7-二甲基-12-氧代氧杂环十二碳-4-烯-6-基4-(2-(((4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酰胺基)-3-甲基丁酰胺基)-5-脲基戊酰胺基)苯氧基)羰基)(甲基)氨基)乙基)哌嗪-1-甲酸酯(3.1mg,5.03%产率)。LC/MS(ESI,m/z),1278.4[M+H]$^+$。

[2777] 1.3.11.2ADL1-D6

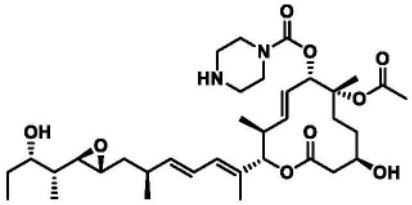
[2778] 

[2779] 通用程序1(1.3.11)给出(2S,3S,6S,7R,10R,E)-7-乙酰氧基-10-羟基-2-((R,2E,4E)-6-羟基-7-((2R,3R)-3-((2R,3S)-3-羟基戊-2-基)环氧乙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-3,7-二甲基-12-氧代氧杂环十二碳-4-烯-6-基4-(2-(((4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酰胺基)-3-甲基丁酰胺基)-5-脲基戊酰胺基)苯氧基)羰基)(甲基)氨基)乙基)哌嗪-1-甲酸酯(2mg,3.36%产率)。LC/MS(ESI,m/z),1321.37[M+H]$^+$。

[2780] 1.3.1.5ADL1-D9、ADL6-D9和ADL1-D13

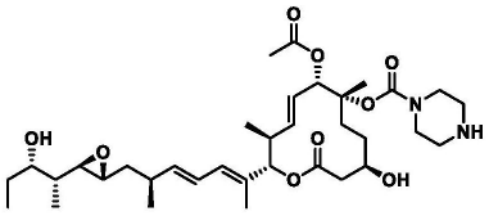
[2781] D9和D13

[2782] 采用D4的合成(方案4)中概述的程序,利用三-TES普拉二烯内酯B,以3:1异构体混合物形式合成D9和D13。

[2783] 

[2784] 有效负载(D9):LC/MS(ESI,m/z),649.7[M+H]$^+$。

[2785] ^{1}H-NMR(400MHz,$CHCl_3$-d):δppm 0.87-1.01(m,10H)1.08(d,J=6.78Hz,3H)1.27-1.63(m,12H)1.66-1.74(m,1H)1.76(s,3H)1.97-2.10(m,3H)2.35-2.57(m,5H)2.58-2.65(m,1H)2.65-2.71(m,1H)2.77(td,J=5.93,2.32Hz,1H)2.89-3.05(m,4H)3.07-3.34(m,8H)3.50-3.68(m,5H)3.72-3.88(m,1H)4.88-5.09(m,1H)5.18(d,J=10.67Hz,1H)5.50-5.84(m,3H)6.01-6.13(m,1H)6.19-6.36(m,1H)。

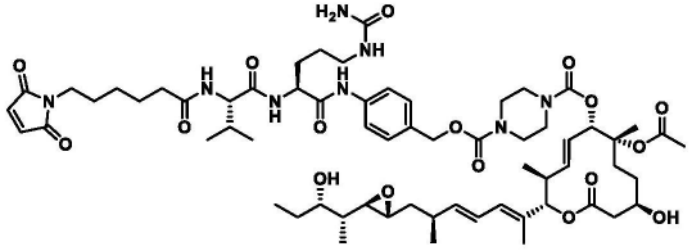
[2786] 

[2787] 有效负载(D13):LC/MS(ESI,m/z),649.6[M+H]$^+$。

[2788] ^{1}H NMR(400MHz,$CHCl_3$-d)δppm 0.84-1.01(m,11H)1.08(d,J=6.78Hz,3H)1.29-1.64(m,10H)1.63-1.73(m,1H)1.76(s,3H)1.94-2.12(m,4H)2.37-2.58(m,4H)2.59-2.65(m,1H)2.68(dd,J=7.40,2.26Hz,1H)2.77(td,J=5.93,2.32Hz,1H)3.01-3.30(m,4H)3.49(s,1H)3.54-3.67(m,2H)3.69-3.92(m,5H)4.13-4.78(m,11H)5.13-5.24(m,2H)5.48-5.61(m,1H)5.62-5.74(m,2H)6.04-6.13(m,1H)6.18-6.32(m,1H)。

[2789] ADL1-D9

[2790] 采用通用程序1(如1.3.1部分中所概述)合成ADL1-D9。

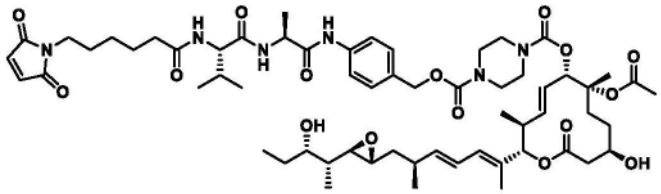
[2791] 

[2792] 接头-有效负载(ADL1-D9):(30.5mg,0.024mmol,77%产率)。LC/MS(ESI,m/z),1263.8[M+H]$^+$。

[2793] ^{1}H-NMR(400MHz,MeOH-d_4):δppm 0.87-0.93(m,7H)0.93-1.01(m,8H)1.19-1.34(m,4H)1.50(s,3H)1.57(s,5H)1.58-1.70(m,6H)1.70-1.77(m,1H)1.78(s,3H)1.83-1.95(m,2H)2.04(s,3H)2.05-2.13(m,1H)2.27(t,J=7.40Hz,2H)2.32-2.42(m,1H)2.50(d,J=3.64Hz,2H)2.55-2.74(m,2H)2.90(td,J=5.83,2.26Hz,1H)3.03-3.26(m,2H)3.35(s,13H)3.42-3.61(m,11H)3.80(br dd,J=9.85,3.58Hz,1H)4.16(d,J=7.40Hz,1H)4.50(dd,J=8.91,5.14Hz,1H)4.56(s,1H)5.05(dd,J=14.37,10.10Hz,2H)5.09(s,2H)5.49(s,1H)5.59-5.69(m,1H)5.72-5.80(m,1H)5.87(d,J=15.18Hz,1H)6.09-6.22(m,1H)6.44-6.60(m,1H)7.32(d,J=8.66Hz,2H)7.58(d,J=8.53Hz,2H)。

[2794] ADL6-D9

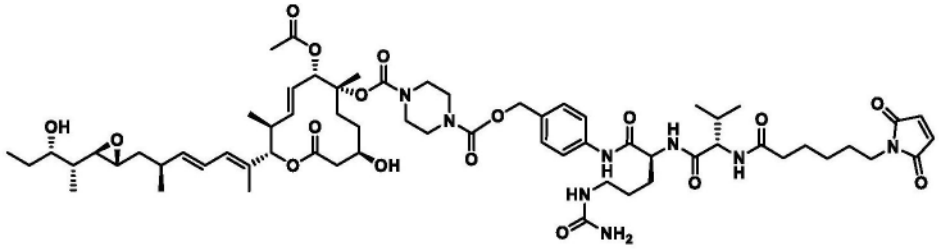
[2795] 采用通用程序1(如1.3.1部分中所概述)合成ADL6-D9。

[2796] 

[2797] 接头-有效负载(ADL6-D9):向于DMF(784μL)中稀释的4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酰胺基)-3-甲基丁酰胺基)丙酰胺基)苄基(4-硝基苯基)碳酸酯(16.5mg,0.025mmol)中添加胡宁氏碱(13.27μL,0.076mmol)。将反应混合物冷却至0℃,并添加D9。在室温下搅拌反应混合物,直至LC/MS显示反应完成。在真空中浓缩反应混合物。在硅胶上,利用DCM/MeOH对残余物进行快速色谱,得到标题化合物(16.7mg,57%产率)。LC/MS(ESI,m/z),1184.6[M+Na]$^+$。

[2798] ^{1}H-NMR(400MHz,MeOH-d_4):δppm 0.80-1.02(m,16H)1.05-1.12(m,4H)1.13-1.34(m,5H)1.38-1.51(m,7H)1.53-1.68(m,11H)1.71-1.80(m,4H)1.97-2.16(m,4H)2.24-2.32(m,2H)2.32-2.42(m,1H)2.43-2.55(m,3H)2.56-2.69(m,3H)2.73(br d,J=2.13Hz,1H)3.07-3.18(m,1H)3.42-3.61(m,17H)3.75-3.91(m,1H)4.11-4.24(m,1H)4.43(s,2H)5.59-5.88(m,4H)6.06-6.17(m,1H)6.29-6.39(m,1H)7.24-7.39(m,2H)7.52-7.64(m,2H)。

[2799] ADL1-D13

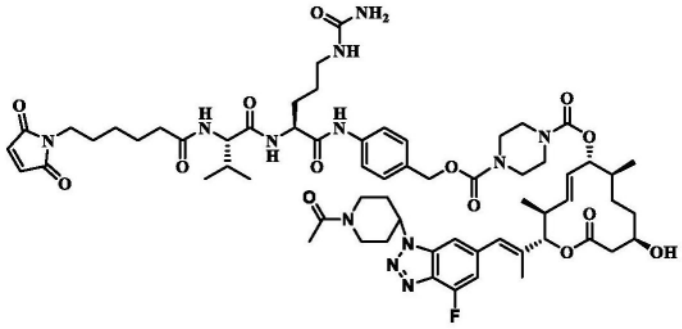
[2800] 

[2801] 接头-有效负载(AD1-D13):向于DMF(176μL,2.277mmol)中的4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酰胺基)-3-甲基丁酰胺基)-5脲基戊酰胺基)苄基(4-硝基苯基)碳酸酯(4.2mg,5.693μmol)中添加胡宁氏碱(2.98μL,0.017mmol)。将反应混合物冷却至0℃,并添加D13(4.06mg,6.262μmol)。在室温下搅拌反应混合物,直至LC/MS显示反应完成。在真空中浓缩反应混合物。在硅胶上,利用DCM/MeOH对残余物进行快速色

谱,得到标题化合物(4.8mg,68%产率)。LC/MS(ESI,m/z),1248.0[M+H]$^+$。

[2802] ^{1}H-NMR(400MHz,$CHCl_3$-d):δppm 0.58-0.98(m,10H)0.99-1.06(m,2H)1.11-1.31(m,6H)1.57-1.75(m,3H)2.11-2.26(m,1H)2.30-2.73(m,2H)3.28-3.80(m,7H)4.14-4.33(m,1H)4.44-4.55(m,1H)4.63-4.81(m,1H)4.92-5.06(m,1H)5.09(s,1H)5.49-5.74(m,1H)5.88-6.09(m,1H)6.14-6.36(m,1H)6.99-7.08(m,1H)7.21-7.38(m,2H)7.53-7.67(m,1H)7.95(s,1H)。

[2803] 1.3.1.6ADL1-D14

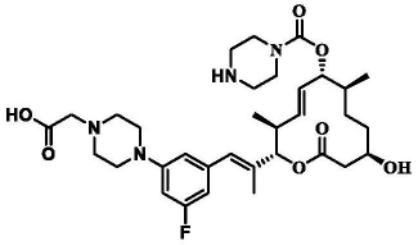
[2804] 

[2805] 采用通用程序1(如1.3.1部分中所概述)合成1-((2S,3S,6R,7S,10R,E)-2-((E)-1-(1-(1-乙酰基哌啶-4-基)-4-氟-1H-苯并[d][1,2,3]三唑-6-基)丙-1-烯-2-基)-10-羟基-3,7-二甲基-12-氧代氧杂环十二碳-4-烯-6-基)4-(4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酰胺基)-3-甲基丁酰胺基)-5-脲基戊酰胺基)苄基)哌嗪-1,4-二甲酸酯(30mg,0.024mmol,39.2%产率)。LC/MS(ESI,m/z),1254.5[M+H]$^+$。

[2806] ^{1}H-NMR(400MHz,DMSO-d_6):δppm 0.75-1.00(m,12H),1.06-1.26(m,4H),1.26-1.77(m,13H),1.75-2.02(m,7H),2.08(s,8H),2.23-2.35(m,2H),2.54-2.70(m,2H),2.78-3.10(m,4H),3.36(br s,13H),3.66-3.79(m,1H),3.95-4.08(m,1H),4.11-4.25(m,1H),4.28-4.46(m,1H),4.46-4.58(m,1H),4.58-4.66(m,1H),4.66-4.77(m,1H),5.01(s,3H),5.14-5.27(m,1H),5.39(s,4H),5.71-5.79(m,1H),5.87-6.00(m,1H),6.63-6.75(m,1H),6.99(s,2H),7.13-7.24(m,1H),7.24-7.34(m,2H),7.52-7.62(m,2H),7.65-7.74(m,1H),7.75-7.82(m,1H),7.98-8.13(m,1H)。

[2807] 1.3.1.7ADL1-D33

[2808] D33

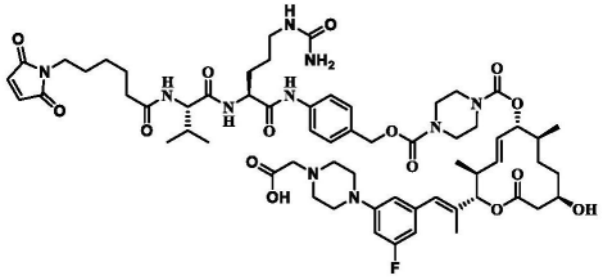
[2809] 

[2810] 在0℃下,向(2S,3S,6R,7S,10R,E)-2-((E)-1-(3-氟-5-(4-(2-甲氧基-2-氧代乙基)哌嗪-1-基)苯基)丙-1-烯-2-基)-10-羟基-3,7-二甲基-12-氧代氧杂环十二碳-4-烯-6-基哌嗪-1-甲酸酯(27mg,0.042mmol)于THF/H_2O(3mL/1mL)中的搅拌溶液中添加LiOH,并使反应混合物缓慢升温至25℃。使用国际申请号PCT/US2019/026992中概述的程序(参见例如程序17和19)合成(2S,3S,6R,7S,10R,E)-2-((E)-1-(3-氟-5-(4-(2-甲氧基-2-氧代乙

基)哌嗪-1-基)苯基)丙-1-烯-2-基)-10-羟基-3,7-二甲基-12-氧代氧杂环十二碳-4-烯-6-基哌嗪-1-甲酸酯,将该文献通过引用并入本文。6小时后,用磷酸盐缓冲液(NaH_2PO_4,1.0M,3mL)中和反应混合物,并分离各相。用乙酸乙酯(3x2mL)萃取水层,且将合并的有机层用无水硫酸钠干燥并在真空中浓缩。反相柱色谱,得到标题化合物(19.4mg,0.031mmol,73.4%产率)。LC/MS(ESI,m/z),631.4$[M+H]^+$。

[2811] ^{1}H-NMR(400MHz,$CHCl_3$-d):δppm 0.85-1.16(m,2H)1.23-1.52(m,1H)1.57-1.77(m,1H)1.87(s,1H)1.92-2.13(m,1H)2.35-2.55(m,1H)2.50-2.74(m,1H)3.11(br s,1H)3.36-3.54(m,2H)3.64(br d,J=10.42Hz,2H)3.77-3.90(m,1H)4.76(br s,4H)5.07-5.19(m,1H)5.38-5.68(m,1H)6.40-6.76(m,1H)8.02-8.66(m,1H)。

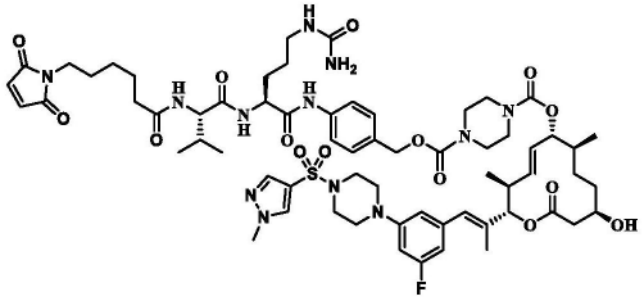
[2812] ADL1-D33

[2813] 

[2814] 接头-有效负载(ADL1-D33):向于DMF(714μL,9.217mmol)中的4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酰胺基)-3-甲基丁酰胺基)-5-脲基戊酰胺基)苄基(4-硝基苯基)碳酸酯(17mg,.023mmol)中添加胡宁氏碱(12.07μL,0.069mmol)。将反应混合物冷却至0℃,并添加2-(4-(3-氟-5-((E)-2-((2S,3S,6R,7S,10R,E)-10-羟基-3,7-二甲基-12-氧代-6-((哌嗪-1-羰基)氧基)氧杂环十二碳-4-烯-2-基)丙-1-烯-1-基)苯基)哌嗪-1-基)乙酸(16.71mg,0.026mmol)。在室温下搅拌反应混合物,直至LC/MS显示反应完成。然后,在真空中浓缩反应混合物。在硅胶上进行快速色谱且进一步进行HPLC纯化,得到标题化合物(13.5mg,10.98μmol,47.7%产率)。LC/MS(ESI,m/z),1229.5$[M+H]^+$。

[2815] ^{1}H-NMR(400MHz,MeOH-d_4):δppm 0.92-0.99(m,10H)1.01(d,J=6.78Hz,3H)1.24-1.46(m,9H)1.52-1.70(m,10H)1.70-1.82(m,1H)1.87(d,J=1.00Hz,4H)1.89-2.00(m,2H)2.01-2.23(m,2H)2.27(t,J=7.40Hz,2H)2.46(dd,J=14.31,5.27Hz,1H)2.57-2.71(m,2H)2.86(d,J=0.63Hz,1H)3.00(s,1H)3.06-3.27(m,4H)3.35(s,5H)3.41-3.53(m,19H)3.66(s,2H)3.76-3.90(m,1H)4.07-4.21(m,1H)4.39-4.69(m,37H)5.09(s,3H)5.13(d,J=10.54Hz,1H)5.52(dd,J=14.56,9.03Hz,2H)6.55(br s,2H)6.69(d,J=1.38Hz,2H)7.33(d,J=8.66Hz,2H)7.59(d,J=8.53Hz,2H)7.88-8.04(m,1H)8.16-8.33(m,1H)。

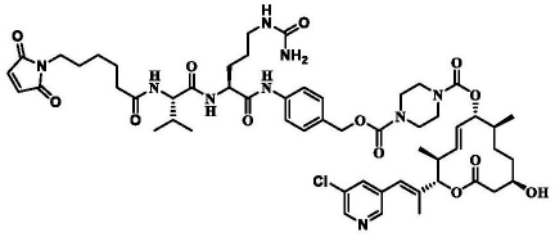
[2816] ADL1-D28

[2817] 

[2818] 将4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酰胺基)-3-甲基丁酰胺基)-5-脲基戊酰胺基)苄基(4-硝基苯基)碳酸酯(6.17mg,8.37μmol)和(2S,3S,6R,7S,10R,E)-2-((E)-1-(3-氟-5-(4-((1-甲基-1H-咪唑-4-基)磺酰基)哌嗪-1-基)苯基)丙-1-烯-2-基)-10-羟基-3,7-二甲基-12-氧代氧杂环十二碳-4-烯-6-基哌嗪-1-甲酸酯(6mg,8.37μmol)溶解于DMF(0.3ml)中并添加胡宁氏碱(4.39μL,0.025mmol)。在室温下搅拌反应混合物过夜。蒸发溶剂并进行反相HPLC纯化,得到1-(4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酰胺基)-3-甲基丁酰胺基)-5-脲基戊酰胺基)苄基)4-((2S,3S,6R,7S,10R,E)-2-((E)-1-(3-氟-5-(4-((1-甲基-1H-咪唑-4-基)磺酰基)哌嗪-1-基)苯基)丙-1-烯-2-基)-10-羟基-3,7-二甲基-12-氧代氧杂环十二碳-4-烯-6-基)哌嗪-1,4-二甲酸酯(1.5mg,13.6%)。LC/MS(ESI,m/z),1315.66[M+H]$^+$。

[2819] ^{1}H NMR(400MHz,甲醇-d4)d ppm 0.85-0.93(m,12H)1.16-1.31(m,6H)1.43-1.57(m,9H)1.62-1.70(m,1H)1.75(s,3H)1.77-1.90(m,2H)1.96-2.03(m,1H)2.13-2.20(m,2H)2.31-2.40(m,1H)2.46-2.55(m,2H)2.97-3.06(m,2H)3.08-3.10(m,1H)3.15(br d,J=6.27Hz,9H)3.33-3.43(m,10H)3.71(s,4H)4.03-4.09(m,1H)4.37-4.44(m,1H)4.44-4.53(m,1H)4.96-5.06(m,3H)5.33-5.51(m,2H)6.36-6.44(m,2H)6.45-6.53(m,2H)6.69(s,2H)7.19-7.25(m,2H)7.47-7.52(m,2H)7.63-7.70(m,2H)

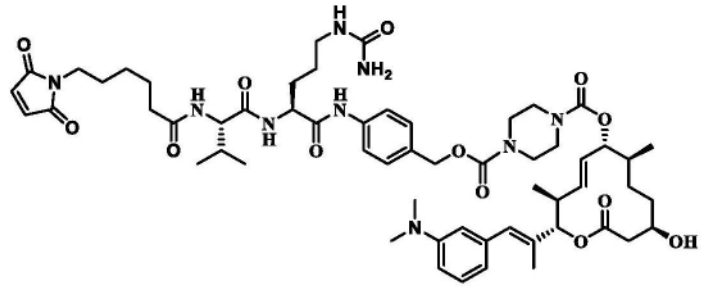
[2820] ADL1-D31

[2821] 

[2822] 将4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酰胺基)-3-甲基丁酰胺基)-5-脲基戊酰胺基)苄基(4-硝基苯基)碳酸酯(13.12mg,.018mmol)和(2S,3S,6R,7S,10R,E)-2-((E)-1-(5-氯吡啶-3-基)丙-1-烯-2-基)-10-羟基-3,7-二甲基-12-氧代氧杂环十二碳-4-烯-6-基哌嗪-1-甲酸酯(9mg,.018mmol)溶解于DMF(179μl,2.312mmol)中并添加胡宁氏碱(9.32μl,0.053mmol)。在室温下搅拌反应混合物过夜。蒸发溶剂并经由反相HPLC纯化,得到1-((2S,3S,6R,7S,10R,E)-2-((E)-1-(5-氯吡啶-3-基)丙-1-烯-2-基)-10-羟基-3,7-二甲基-12-氧代氧杂环十二碳-4-烯-6-基)4-(4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酰胺基)-3-甲基丁酰胺基)-5-脲基戊酰胺基)苄基)哌嗪-1,4-二甲酸酯(6.9mg,34.09%)。LC/MS(ESI,m/z),1105.59[M+H]$^+$。

[2823] 1H NMR(400MHz,甲醇-d4)d ppm 0.88(s,12H)1.17-1.31(m,4H)1.43-1.57(m,8H)1.61-1.70(m,1H)1.80(d,J=1.25Hz,5H),1.92-2.01(m,1H)2.14-2.20(m,2H)2.32-2.42(m,1H)2.48-2.59(m,2H)2.96-3.14(m,3H)3.38(s,10H)3.36-3.36(m,1H)3.38-3.40(m,3H)3.67-3.75(m,1H)4.03-4.07(m,1H)4.37-4.42(m,1H)4.97-5.01(m,2H)5.04-5.11(m,1H)5.35-5.51(m,2H)6.46-6.52,(m,1H)6.69(s,2H)7.18-7.26(m,2H)7.45-7.54(m,2H)7.68-7.74(m,1H)8.29-8.34(m,2H)。

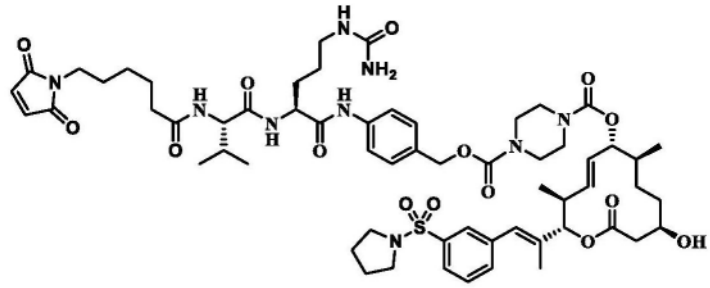
[2824] ADL1-D29

[2825] 

[2826] 将4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酰胺基)-3-甲基丁酰胺基)-5-脲基戊酰胺基)苄基(4-硝基苯基)碳酸酯(8.62mg,0.012mmol)和(2S,3S,6R,7S,10R,E)-2-((E)-1-(3-(二甲基氨基)苯基)丙-1-烯-2-基)-10-羟基-3,7-二甲基-12-氧代氧杂环十二碳-4-烯-6-基哌嗪-1-甲酸酯(6mg,0.012mmol)溶解于DMF(118μl,1.518mmol)和胡宁氏碱(6.12μl,0.035mmol)中。在室温下搅拌反应混合物过夜。蒸发溶剂并经由反相HPLC纯化,得到1-((2S,3S,6R,7S,10R,E)-2-((E)-1-(3-(二甲基氨基)苯基)丙-1-烯-2-基)-10-羟基-3,7-二甲基-12-氧代氧杂环十二碳-4-烯-6-基)4-(4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酰胺基)-3-甲基丁酰胺基)-5-脲基戊酰胺基)苄基)哌嗪-1,4-二甲酸酯(4.0mg,30.79%)。LC/MS(ESI,m/z),1112.59$[M+H]^+$。

[2827] ^{1}H NMR(400MHz,甲醇-d_4)δppm 0.87(s,12H)1.17-1.23(m,3H)1.26-1.32(m,1H)1.44-1.57(m,8H)1.63-1.69(m,1H)1.74-1.81(m,4H)1.83-1.88(m,1H)1.93-2.03(m,1H)2.13-2.20(m,2H)2.34-2.42(m,1H)2.48-2.57(m,2H)2.81(s,5H)2.98-3.05(m,2H)3.08-3.14(m,1H)3.38(br s,9H)3.65-3.75(m,1H)4.03-4.07(m,1H)4.35-4.43(m,1H)4.44-4.52(m,1H)4.96-5.01(m,2H)5.02-5.08(m,1H)5.34-5.51(m,2H)6.43-6.48(m,1H)6.51-6.61(m,3H)6.69(s,2H)7.03-7.10(m,1H)7.20-7.26(m,2H)7.46-7.51(m,2H)。

[2828] ADL1-D35

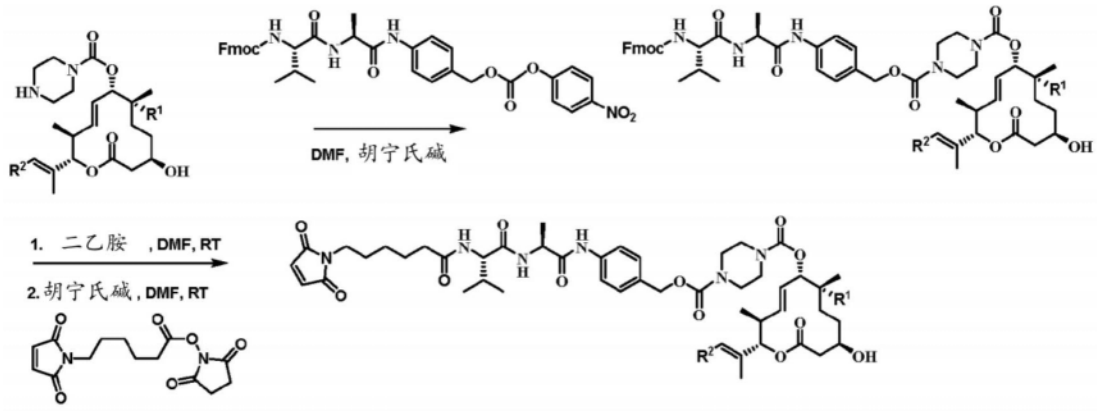
[2829] 

[2830] 将4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酰胺基)-3-甲基丁酰胺基)-5-脲基戊酰胺基)苄基(4-硝基苯基)碳酸酯(9.78mg,.013mmol)和(2S,3S,6R,7S,10R,E)-10-羟基-3,7-二甲基-12-氧代-2-((E)-1-(3-(吡咯烷-1-基磺酰基)苯基)丙-1-烯-2-基)氧杂环十二碳-4-烯-6-基哌嗪-1-甲酸酯(8mg,0.013mmol)溶解于DMF(133μl,1.722mmol)中并添加胡宁氏碱(6.94μl,0.04mmol)[两滴]。在室温下搅拌所得混合物过夜,在真空中浓缩,并经由反相HPLC纯化,得到产物1-(4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酰胺基)-3-甲基丁酰胺基)-5-脲基戊酰胺基)苄基)4-((2S,3S,6R,7S,10R,E)-10-羟基-3,7-二甲基-12-氧代-2-((E)-1-(3-(吡咯烷-1-基磺酰基)苯基)丙-1-烯-2-基)氧杂环十二碳-4-烯-6-基)哌嗪-1,4-二甲酸酯(8.2mg,51.47%)。LC/MS(ESI,m/z),1203.53$[M+H]^+$。

[2831] 1H NMR(400MHz,甲醇-d4)d ppm 0.85-0.93(m,12H)1.17-1.34(m,4H)1.42-1.57(m,8H)1.61-1.69(m,5H)1.79(s,4H)1.83-1.90(m,1H)1.94-2.03(m,1H)2.12-2.20(m,2H)2.33-2.43(m,1H)2.48-2.59(m,2H)2.96-3.05(m,2H)3.06-3.17(m,6H)3.31-3.41(m,10H)3.67-3.77(m,1H)4.02-4.10(m,1H)4.36-4.43(m,1H)4.96-5.02(m,2H)5.04-5.11(m,1H)5.35-5.51(m,2H)6.59(s,1H)6.69(s,2H)7.20-7.27(m,2H)7.45-7.52(m,4H)7.58-7.65(m,2H)。

[2832] 1.4MC-Val-Ala-pABC接头-有效负载的制备

[2833] 1.4.1概述

[2834] 

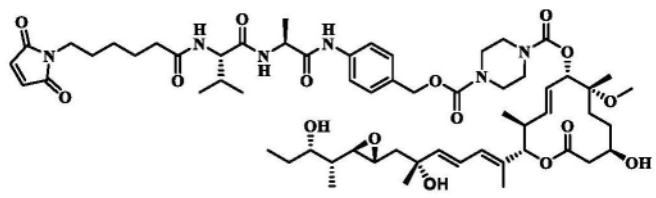
[2835] 方案5

[2836] 步骤1:将大环有效负载(1.0当量)、DMF(0.1M)、(9H-芴-9-基)甲基((S)-3-甲基-1-(((S)-1-((4-((((4-硝基苯氧基)羰基)氧基)甲基)苯基)氨基)-1-氧代丙-2-基)氨基)-1-氧代丁-2-基)氨基甲酸酯(1.5当量;使用WO 2012/153193中所述的程序制备)和胡宁氏碱(3.0当量)组合并搅拌过夜。将反应混合物浓缩至干并色谱分离,得到fmocVal-Ala-pABC-有效负载。

[2837] 步骤2:将溶解于DMF(0.1M)中的铵fmoc-Val-Ala-pABC有效负载(1.0当量)和二乙胺(10当量)组合并搅拌30分钟。在高真空下将反应混合物浓缩至干。将粗产物溶解于DMF(0.1M)中,并添加胡宁氏碱(2当量),这之后,添加2,5-二氧代吡咯烷-1-基6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酸酯(3当量)并搅拌过夜。然后,将反应混合物浓缩至干并色谱分离(0-30% MeOH在DCM中),得到所希望的MC-Val-Ala-pABC-有效负载。

[2838] 1.4.1.1ADL6-D1

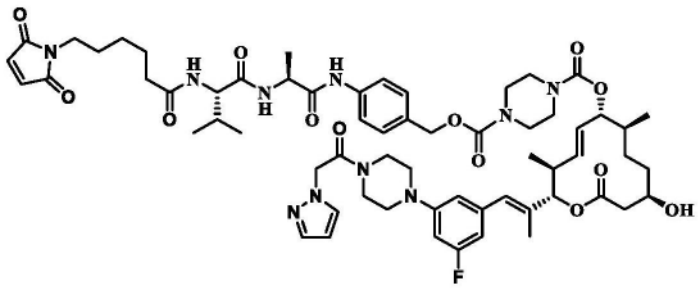
[2839] 方案5-步骤1:按照以上概述的通用程序(1.4.1部分),得到1-(4-((S)-2-((S)-2-((((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-3-甲基丁酰胺基)丙酰胺基)苄基)4-((2S,3S,6S,7R,10R,E)-10-羟基-2-((R,2E,4E)-6-羟基-7-((2S,3S)-3-((2R,3S)-3-羟基戊-2-基)环氧乙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-7-甲氧基-3,7-二甲基-12-氧代氧杂环十二碳-4-烯-6-基)哌嗪-1,4-二甲酸酯(32mg,0.027mmol,27.9%产率)。LC/MS(ESI,m/z),$[M+Na]^+$ 1200.5。

[2840] 

[2841] 方案5-步骤2:按照以上概述的通用程序(1.4.1部分),得到1-(4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酰胺基)-3-甲基丁酰胺基)丙酰胺基)苄基)4-((2S,3S,6S,7R,10R,E)-10-羟基-2-((R,2E,4E)-6-羟基-7-((2R,3R)-3-((2R,3S)-3-羟基戊-2-基)环氧乙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-7-甲氧基-3,7-二甲基-12-氧代氧杂环十二碳-4-烯-6-基)哌嗪-1,4-二甲酸酯(24mg,0.021mmol,77%产率)。LC/MS(ESI,m/z),1149.2[M+H]$^+$。

[2842] ^{1}H-NMR(400MHz,MeOH-d4):δppm 0.85-1.02(m,16H),1.20-1.23(m,3H)1.23-1.32(m,3H)1.34(s,3H)1.41-1.46(m,4H)1.46-1.72(m,11H)1.78(s,3H)1.87(dd,J=14.05,5.40Hz,1H)2.08(dq,J=13.77,6.83Hz,1H)2.27(t,J=7.40Hz,2H)2.43-2.63(m,3H)2.64-2.70(m,1H)2.90(td,J=5.83,2.26Hz,1H)3.32-3.33(m,4H)3.42-3.57(m,11H)3.82(br dd,J=8.66,3.89Hz,1H)4.15(d,J=7.15Hz,1H),4.47(q,J=7.15Hz,1H)4.99-5.12(m,4H)5.57(dd,J=15.18,9.79Hz,1H)5.69-5.78(m,1H)5.87(d,J=15.18Hz,1H)6.13(d,J=10.92Hz,1H),6.53(dd,J=15.31,10.92Hz,1H)6.78(s,2H)7.32(d,J=8.53Hz,2H)7.58(d,J=8.53Hz,2H)。

[2843] 1.4.1.2ADL6-D16

[2844] 

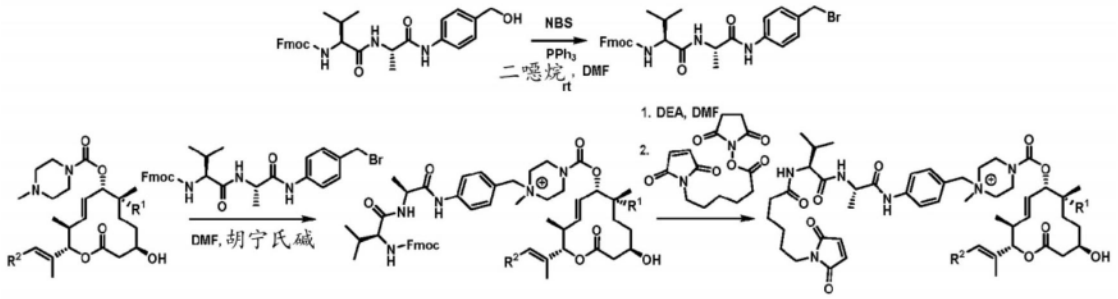
[2845] 方案5-步骤1:按照以上概述的通用程序(1.4.1部分),得到1-((2S,3S,6R,7S,10R,E)-2-((E)-1-(3-(4-(2-(1H-吡唑-1-基)乙酰基)哌嗪-1-基)-5-氟苯基)丙-1-烯-2-基)-10-羟基-3,7-二甲基-12-氧代氧杂环十二碳-4-烯-6-基)4-(4-((S)-2-((S)-2-((((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-3-甲基丁酰胺基)丙酰胺基)苄基)哌嗪-1,4-二甲酸酯(0.060g,0.049mmol,60.8%产率)。LC/MS(ESI,m/z),1223.68[M+H]。

[2846] 方案5-步骤2:按照以上概述的通用程序(1.4.1部分),得到1-((2S,3S,6R,7S,10R,E)-2-((E)-1-(3-(4-(2-(1H-吡唑-1-基)乙酰基)哌嗪-1-基)-5-氟苯基)丙-1-烯-2-基)-10-羟基-3,7-二甲基-12-氧代氧杂环十二碳-4-烯-6-基)4-(4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酰胺基)-3-甲基丁酰胺基)丙酰胺基)苄基)哌嗪-1,4-二甲酸酯(11.50mg,9.64μmol,12.05%产率)。LC/MS(ESI,m/z),1194.82[M+H]$^+$。

[2847] ^{1}H-NMR(400MHz,$CHCl_3$-d):δppm 0.97(br d,J=1.25Hz,12H),1.24-1.41(m,5H),1.41-1.47(m,3H),1.52-1.69(m,6H),1.84-1.90(m,3H),1.92-2.01(m,1H),2.02-2.16(m,1H),2.23-2.30(m,2H),2.42-2.51(m,1H),2.57-2.65(m,2H),3.19-3.28(m,4H),3.35(s,4H),3.40-3.54(m,11H),3.69-3.77(m,4H),3.78-3.85(m,1H),4.12-4.18(m,1H),4.43-4.51(m,1H),5.07-5.16(m,3H),5.20(s,2H),5.42 -5.62(m,2H),6.29-6.38(m,1H),6.46-6.58(m,2H),6.59-6.68(m,2H),7.28-7.37(m,2H),7.50-7.67(m,4H)。

[2848] 1.5MC-Val-Ala-pAB接头-有效负载的制备

[2849] 1.5.1概述



[2850]

[2851] 方案6

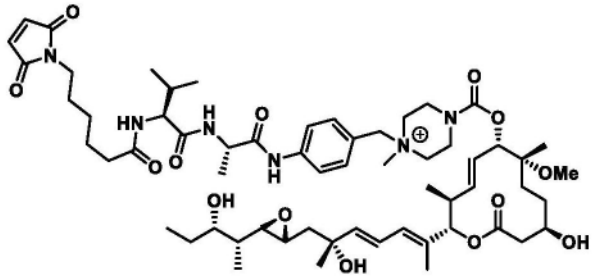
[2852] 步骤1:将(9H-芴-9-基)甲基((S)-1-(((S)-1-((4-(羟基甲基)苯基)氨基)-1-氧代丙-2-基)氨基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)氨基甲酸酯(0.5g,0.97mmol)、1,4-二噁烷(9.70mL,0.97mmol)、三苯基膦(0.509g,1.939mmol)、N-溴代琥珀酰亚胺(0.345g,1.939mmol)和DMF(2.424mL,0.97mmol)组合并在室温下搅拌3小时。浓缩反应混合物并色谱分离,得到(9H-芴-9-基)甲基((S)-1-(((S)-1-((4-(溴甲基)苯基)氨基)-1-氧代丙-2-基)氨基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)氨基甲酸酯(116mg,0.201mmol,20.68%产率)。LC/MS(ESI,m/z),580.14[M+H]。

[2853] 步骤2:将有效负载(1.0当量)、(9H-芴-9-基)甲基((S)-1-(((S)-1-((4-(溴甲基)苯基)氨基)-1-氧代丙-2-基)氨基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)氨基甲酸酯(0.069g,0.12mmol)、N,N-二甲基甲酰胺(0.1M)和胡宁氏碱(1.5当量)组合并搅拌过夜。将反应混合物浓缩至干并色谱分离(0-10% MeOH在DCM中),得到四级铵fmoc-Val-Ala-pAB有效负载。

[2854] 步骤3:将溶解于DMF(0.1M)中的四级铵fmoc-Val-Ala-pAB有效负载(1.0当量)和二乙胺(10当量)组合并搅拌30分钟。在高真空下将反应混合物浓缩至干。将粗产物溶解于DMF(0.1M)中并添加胡宁氏碱(2当量),这之后,添加2,5-二氧代吡咯烷-1-基6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酸酯(3当量)并搅拌过夜。然后,将反应混合物浓缩至干并色谱分离(0-30% MeOH在DCM中),得到所希望的四级铵接头-有效负载。

[2855] 1.5.1.1ADL5-D2

[2856]



[2857] 方案6-步骤2:1-(4-((S)-2-((S)-2-((((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-3-甲基丁酰胺基)丙酰胺基)苄基)-4-((((2S,3S,6S,7R,10R,E)-10-羟基-2-((R,2E,4E)-6-羟基-7-((2S,3S)-3-((2R,3S)-3-羟基戊-2-基)环氧乙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-7-甲氧基-3,7-二甲基-12-氧代氧杂环十二碳-4-烯-6-基)氧基)羰基)-1-甲基哌嗪-1-鎓溴化物(30mg,0.024mmol,26.5%产率)。LC/MS(ESI,m/z),1149.77$[M+H]^+$。

[2858] 方案6-步骤3:单(1-(4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酰胺基)-3-甲基丁酰胺基)丙酰胺基)苄基)-4-((((2S,3S,6S,7R,10R,E)-10-羟基-2-((R,2E,4E)-6-羟基-7-((2S,3S)-3-((2R,3S)-3-羟基戊-2-基)环氧乙烷-2-基)-6-甲基

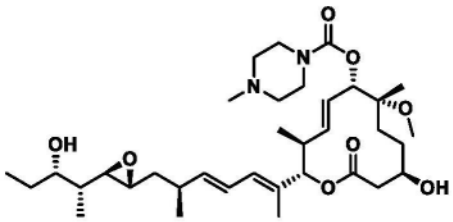
庚-2,4-二烯-2-基)-7-甲氧基-3,7-二甲基-12-氧代氧杂环十二碳-4-烯-6-基)氧基)羰基)-1-甲基哌嗪-1-鎓-2-基鎓)单溴化物(4.8mg,15.33%产率)。LC/MS(ESI,m/z),1120.99[M+H]$^+$。

[2859] ^{1}H-NMR(400MHz,MeOH-d4):δppm 0.88(s,15H),1.09-1.26(m,9H),1.31-1.58(m,14H),1.42-1.44(m,1H),1.68(s,3H),1.73-1.81(m,1H),1.91-2.03(m,1H),2.14-2.22(m,2H),2.35-2.52(m,3H),2.53-2.60(m,1H),2.74-2.83(m,1H),2.97(s,3H),3.25(s,1H),3.28-3.46(m,8H),3.52-3.66(m,2H),3.70-3.78(m,1H),3.97-4.11(m,3H),4.32-4.41(m,1H),4.45-4.54(m,2H),4.91-5.01(m,2H),5.44-5.55(m,1H),5.57-5.70(m,1H),5.72-5.82(m,1H),6.00-6.08(m,1H),6.43(dd,J=15.25,10.98Hz,1H),6.69(s,2H),7.36-7.47(m,2H),7.67 -7.75(m,2H)。

[2860] 1.5.1.2ADL5-D19

[2861] 采用以上概述的通用程序(1.5.1部分)合成ADL5-D19。使用如1.2.1部分中所概述的程序合成有效负载D19。

[2862] D19

[2863] 

[2864] (2S,3S,6S,7R,10R,E)-10-羟基-2-((S,2E,4E)-7-((2R,3R)-3-((2R,3S)-3-羟基戊-2-基)环氧乙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-7-甲氧基-3,7-二甲基-12-氧代氧杂环十二碳-4-烯-6-基4-甲基哌嗪-1-甲酸酯(114.2mg,0.180mmol,82%产率)。LC/MS(ESI,m/z),635.8[M+H]。

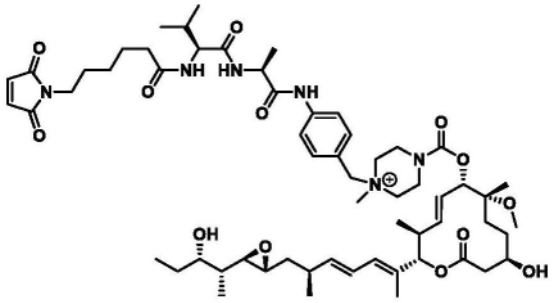
[2865] ^{1}H-NMR(400MHz,MeOH-d4):δppm 0.88-1.00(m,9H)1.10(d,J=6.65Hz,3H)1.16-1.27(m,4H)1.40-1.70(m,8H)1.77(d,J=0.88Hz,3H)2.28-2.36(m,3H)2.42(br t,J=5.08Hz,3H)2.47-2.61(m,4H)2.68(dd,J=8.22,2.20Hz,1H)2.74(td,J=5.99,2.20Hz,1H)3.13 -3.17(m,1H)3.34-3.38(m,3H)3.47-3.58(m,5H)3.81-3.87(m,1H)5.01-5.10(m,2H)5.54-5.81(m,3H)6.06-6.15(m,1H)6.34(dd,J=15.00,10.98Hz,1H)。

[2866] 1-(4-((S)-2-((S)-2-((((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-3-甲基丁酰胺基)丙酰胺基)苄基)-4-((((2S,3S,6S,7R,10R,E)-10-羟基-2-((S,2E,4E)-7-((2R,3R)-3-((2R,3S)-3-羟基戊-2-基)环氧乙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-7-甲氧基-3,7-二甲基-12-氧代氧杂环十二碳-4-烯-6-基)氧基)羰基)-1-甲基哌嗪-1-鎓(25mg,45.6%)。LC/MS(ESI,m/z),1133.1[M+]$^+$。

[2867] ^{1}H-NMR(400MHz,MeOH-d4):δppm 0.94(br dd,J=18.45,7.15Hz,18H)1.10(d,J=6.78Hz,3H)1.25(s,4H)1.28-1.35(m,1H)1.46(br d,J=7.03Hz,9H)1.59-1.70(m,2H)1.77(s,3H)2.05-2.12(m,1H)2.44-2.60(m,4H)2.63-2.72(m,1H)2.70-2.77(m,1H)3.06(s,3H)3.40-3.44(m,1H)3.50(br d,J=1.63Hz,4H)3.64-3.75(m,1H)3.80-3.88(m,1H)3.91-3.99(m,1H)4.04-4.20(m,1H)4.21-4.28(m,1H)4.37-4.43(m,1H)4.59(br s,2H)4.93-4.95(m,2H)5.06-5.08(m,2H)5.57-5.80(m,4H)6.05-6.16(m,1H)6.27-6.41(m,1H)7.28-7.37(m,

2H)7.38-7.45(m,2H)7.47-7.53(m,2H)7.65-7.72(m,2H)7.74-7.86(m,4H)。

[2868] ADL5-D19

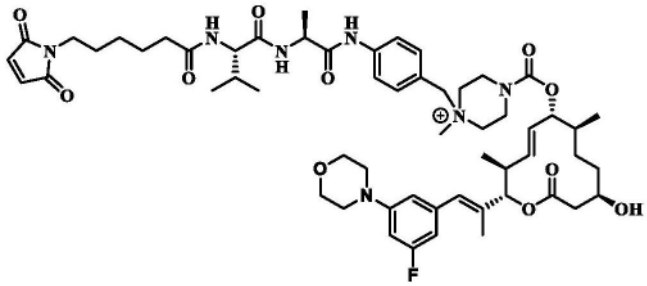
[2869] 

[2870] 接头-有效负载(ADL5-D19):1-(4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酰胺基)-3-甲基丁酰胺基)丙酰胺基)苄基)-4-((((2S,3S,6S,7R,10R,E)-10-羟基-2-((S,2E,4E)-7-((2R,3R)-3-((2R,3S)-3-羟基戊-2-基)环氧乙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-7-甲氧基-3,7-二甲基-12-氧代氧杂环十二碳-4-烯-6-基)氧基)羰基)-1-甲基哌嗪-1-鎓(19.4mg,0.018mmol,80%产率)。LC/MS(ESI,m/z),1105.9[M+H]。

[2871] ^{1}H NMR(400MHz,MeOH-d4):δppm 0.85-1.03(m,16H)1.10(d,J=6.78Hz,3H)1.17-1.27(m,4H)1.29-1.37(m,3H)1.44-1.70,(m,15H)1.74-1.80(m,3H)2.04-2.14(m,1H)2.30(t,J=7.47Hz,2H)2.44-2.61(m,4H)2.64-2.69(m,1H)2.72-2.78(m,1H)3.09(s,3H)3.40-3.59(m,9H)3.62-3.77(m,2H)3.82-3.89(m,1H)4.12-4.21(m,3H)4.40-4.55(m,1H)4.56-4.66(m,3H)5.03-5.12(m,2H)5.55-5.81(m,3H)6.06-6.16(m,1H)6.26-6.41(m,1H)6.81(s,2H)7.48-7.57(m,2H)7.78-7.86(m,2H)。

[2872] 1.5.1.3ADL5-D17

[2873] 采用以上概述的通用程序(1.5.1部分)合成ADL5-D17。使用国际申请号PCT/US2019/026992中概述的程序(参见例如程序2、程序3和程序4或5)合成有效负载D17,该文献通过引用并入本文。

[2874] 

[2875] 步骤1:1-(4-((S)-2-((S)-2-((((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-3-甲基丁酰胺基)丙酰胺基)苄基)-4-((((2S,3S,6R,7S,10R,E)-2-((E)-1-(3-氟-5-吗啉代苯基)丙-1-烯-2-基)-10-羟基-3,7-二甲基-12-氧代氧杂环十二碳-4-烯-6-基)氧基)羰基)-1-甲基哌嗪-1-鎓(12.9mg,69.8%)。LC/MS(ESI,m/z),1086.43[M+H]。

[2876] ^{1}H-NMR(400MHz,MeOH-d4):δppm 0.96-1.07(m,12H),1.27-1.42(m,3H),1.46(d,J=7.15Hz,3H),1.62-1.72(m,2H),1.88(d,J=1.13Hz,3H),1.97-2.06(m,1H),2.04-2.14(m,1H),2.44-2.53(m,1H),2.58-2.69(m,2H),3.08(s,3H),3.13-3.19(m,4H),3.38-3.56(m,4H),3.61-3.75(m,2H),3.79-3.88(m,5H),3.90-3.98(m,1H),4.07-4.18(m,2H),4.20-4.29(m,1H),4.35-4.45(m,2H),4.45-4.54(m,1H),4.61(s,2H),4.86-4.92(m,2H),5.15(d,

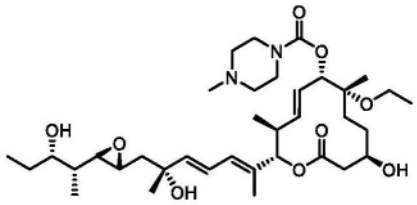
J＝10.67Hz,1H),5.46-5.65(m,2H),6.46-6.67(m,4H),7.28-7.37(m,2H),7.37-7.45(m,2H),7.47-7.53(m,2H),7.66-7.71(m,2H),7.74-7.84(m,4H)。

[2877] 步骤2:1-(4-((R)-2-((R)-2-(6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酰胺基)-3-甲基丁酰胺基)丙酰胺基)苄基)-4-((((2S,3S,6R,7S,10R,E)-2-((E)-1-(3-氟-5-吗啉代苯基)丙-1-烯-2-基)-10-羟基-3,7-二甲基-12-氧代氧杂环十二碳-4-烯-6-基)氧基)羰基)-1-甲基哌嗪-1-鎓溴化物(7.6mg,60.5%产率)。LC/MS(ESI,m/z),1057.62[M+H]。

[2878] ^{1}H-NMR(400MHz,MeOH-d4):δppm 0.95-1.08(m,12H),1.24-1.42(m,5H),1.47(d,J＝7.15Hz,3H),1.52-1.71(m,6H),1.89(d,J＝1.13Hz,3H),1.95-2.05(m,1H),2.05-2.15(m,1H),2.26-2.34(m,2H),2.46-2.53(m,1H),2.58-2.69(m,2H),3.07-3.12(m,3H),3.14-3.19(m,4H),3.39-3.58(m,6H),3.61-3.76(m,2H),3.80-3.86(m,5H),4.09-4.18(m,3H),4.43-4.51(m,1H),4.62(s,2H),4.87-4.93(m,2H),5.12-5.19(m,1H),5.46-5.65(m,2H),6.47-6.66(m,4H),6.80(s,2H),7.53(d,J＝8.66Hz,2H),7.82(d,J＝8.66Hz,2H)。

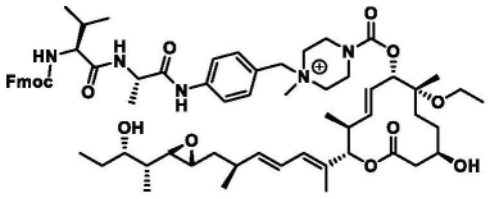
[2879] 1.5.1.4ADL5-D10

[2880] 采用以上概述的通用程序(1.5.1部分)合成ADL5-D10。使用如1.2.1部分中所概述的程序合成有效负载D10。

[2881] 

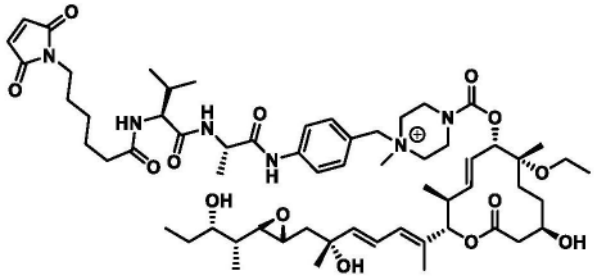
[2882] (2S,3S,6S,7R,10R,E)-7-乙氧基-10-羟基-2-((R,2E,4E)-6-羟基-7-((2R,3R)-3-((2R,3S)-3-羟基戊-2-基)环氧乙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-3,7-二甲基-12-氧代氧杂环十二碳-4-烯-6-基4-甲基哌嗪-1-甲酸酯(16.6mg,0.025mmol,38.7%产率)。LC/MS(ESI,m/z),665.7[M+H]$^+$。

[2883] ^{1}H-NMR(400MHz,甲醇-d):δppm 0.76-0.87(m,9H),1.03-1.09(m,3H),1.10-1.13(m,3H)1.13-1.19(m,1H)1.20-1.27(m,3H),1.29-1.48(m,6H)1.51-1.59(m,1H)1.65-1.71(m,3H)1.73-1.81(m,1H)2.20(s,3H),2.27-2.34(m,4H)2.34-2.44(m,2H)2.44-2.53(m,1H)2.53-2.59(m,1H)2.76-2.83(m,1H)3.23-3.26(m,1H)3.34-3.52(m,7H)3.67-3.75(m,1H)4.86-4.92(m,1H)4.92-4.99(m,1H),5.41-5.51(m,1H),5.60-5.71(m,1H),5.72-5.82(m,1H),6.00-6.07(m,1H),6.37-6.48(m,1H)

[2884] 

[2885] 步骤1:呈无色釉状的1-(4-((S)-2-((S)-2-((((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-3-甲基丁酰胺基)丙酰胺基)苄基)-4-((((2S,3S,6S,7R,10R,E)-7-乙氧基-10-羟基-2-((R,2E,4E)-6-羟基-7-((2R,3R)-3-((2R,3S)-3-羟基戊-2-基)环氧乙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-3,7-二甲基-12-氧代氧杂环十二碳-4-烯-6-基)氧基)羰基)-1-甲基哌嗪-1-鎓(18.6mg,0.016mmol,87%产率)。LC/MS(ESI,m/z),1163.01[M]$^+$。

[2886] ^{1}H-NMR(400MHz,MeOH-d4):δppm 0.86-1.03(m,16H),1.20(s,3H),1.25(s,4H),1.36(s,3H),1.43-1.72(m,10H),1.81(s,3H),1.84 -1.92(m,1H),2.06-2.14(m,1H),2.46-2.63(m,3H),2.67-2.72(m,1H),2.88-2.94(m,1H),3.03-3.09(m,3H),3.38-3.45(m,3H),3.54(s,6H),3.63-3.79(m,2H),3.81-3.88(m,1H),3.92-3.98(m,1H),4.07-4.18(m,2H),4.21-4.28(m,1H),4.36-4.44(m,2H),4.47-4.53(m,1H),4.55-4.63(m,3H),5.02-5.11(m,3H),5.56-5.66(m,1H),5.75-5.84(m,1H),5.86-5.92(m,1H),6.12-6.19(m,1H),6.49-6.61(m,1H),7.29-7.36(m,2H),7.38-7.44(m,2H),7.47-7.53(m,2H),7.64-7.71(m,2H),7.80(dd,J=15.06,7.91Hz,4H)。

[2887] 

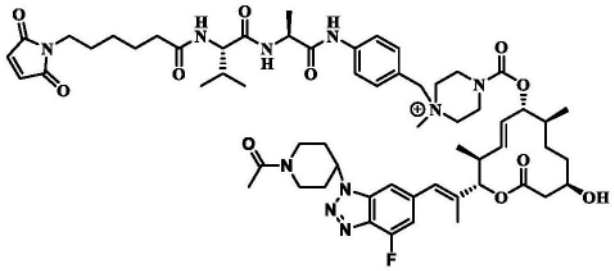
[2888] 步骤2:1-(4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酰胺基)-3-甲基丁酰胺基)丙酰胺基)苄基)-4-((((2S,3S,6S,7R,10R,E)-7-乙氧基-10-羟基-2-((R,2E,4E)-6-羟基-7-((2R,3R)-3-((2R,3S)-3-羟基戊-2-基)环氧乙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-3,7-二甲基-12-氧代氧杂环十二碳-4-烯-6-基)氧基)羰基)-1-甲基哌嗪-1-鎓(14.09mg,82%产率)。LC/MS(ESI,m/z),1057.62[M+H]$^{+}$。

[2889] ^{1}H-NMR(400MHz,MeOH-d4):δppm 0.87-1.03(m,15H),1.20(s,3H),1.22-1.29(m,4H),1.37(s,6H),1.45-1.72(m,14H),1.81(s,3H),1.84-1.95(m,1H),2.05-2.16(m,1H),2.26-2.36(m,2H),2.47-2.62(m,3H),2.66-2.74(m,1H),2.86-2.95(m,1H),3.11(s,3H),3.42-3.51(m,4H),3.51-3.62(m,5H),3.64-3.78(m,2H),3.81-3.89(m,1H),4.09-4.20(m,3H),4.43-4.52(m,1H),4.54-4.59(m,1H),4.55-4.67(m,2H),4.60-4.68(m,2H),5.01-5.12(m,2H),5.54-5.65(m,1H),5.75-5.86(m,1H),5.86-5.94(m,1H),6.10-6.21(m,1H),6.47-6.62(m,1H),6.81(s,2H),7.49-7.60(m,2H)7.76-7.89(m,2H)。

[2890] 1.5.1.5ADL5-D15

[2891] 采用以上概述的通用程序(1.5.1部分)合成ADL5-D15。使用国际申请号PCT/US2019/026992中概述的程序合成有效负载D15,该文献通过引用并入本文。

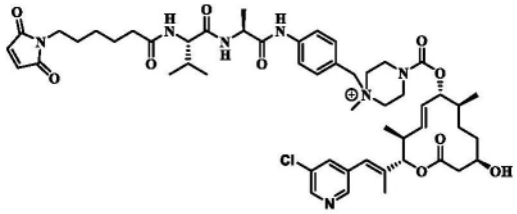
[2892] 步骤1:1-(4-((S)-2-((S)-2-((((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-3-甲基丁酰胺基)丙酰胺基)苄基)-4-((((2S,3S,6R,7S,10R,E)-2-((E)-1-(1-(1-乙酰基哌啶-4-基)-4-氟-1H-苯并[d][1,2,3]三唑-6-基)丙-1-烯-2-基)-10-羟基-3,7-二甲基-12-氧代氧杂环十二碳-4-烯-6-基)氧基)羰基)-1-甲基哌嗪-1-鎓(100mg,0.086mmol,57.3%产率)。LC/MS(ESI,m/z),1167.76[M+H]。

[2893] 

[2894] 步骤2:4-((((2S,3S,6R,7S,10R,E)-2-((E)-1-(1-(1-乙酰基哌啶-4-基)-4-氟-1H-苯并[d][1,2,3]三唑-6-基)丙-1-烯-2-基)-10-羟基-3,7-二甲基-12-氧代氧杂环十二碳-4-烯-6-基)氧基)羰基)-1-(4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酰胺基)-3-甲基丁酰胺基)丙酰胺基)苄基)-1-甲基哌嗪-1-鎓(32mg,0.028mmol,32.8%产率)。LC/MS(ESI,m/z),1138.64[M+H]。

[2895] ^{1}H-NMR(400MHz,MeOH-d4):δppm 0.99(s,10H),1.26-1.40(m,5H),1.42-1.49(m,3H),1.67(br s,6H),1.96(d,J=1.00Hz,3H),2.00-2.13(m,2H),2.16-2.42(m,7H),2.44-2.55(m,1H),2.59-2.76(m,2H),2.98-3.26(m,4H),3.38-3.59(m,7H),3.60-3.76(m,2H),3.78-3.90(m,1H),4.13(br d,J=7.15Hz,3H),4.41-4.52(m,1H),4.53-4.71(m,3H),4.89-4.97(m,1H),5.10-5.27(m,2H),5.48-5.67(m,2H),6.79(s,2H)7.07-7.17(m,1H),7.48-7.61(m,3H),7.78-7.84(m,2H)。

[2896] 1.5.1.5ADL5-D32

[2897] 

[2898] 采用以上概述的通用程序(1.5.1部分)合成ADL5-D32。使用国际申请号PCT/US2019/026992中概述的程序合成有效负载D15,该文献通过引用并入本文。

[2899] 步骤1:1-(4-((S)-2-((S)-2-((((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-3-甲基丁酰胺基)丙酰胺基)苄基)-4-((((2S,3S,6R,7S,10R,E)-2-((E)-1-(5-氯吡啶-3-基)丙-1-烯-2-基)-10-羟基-3,7-二甲基-12-氧代氧杂环十二碳-4-烯-6-基)氧基)羰基)-1-甲基哌嗪-1-鎓(15mg,0.015mmol,69.6%产率)。LC/MS(ESI,m/z),1018.4[M]$^+$

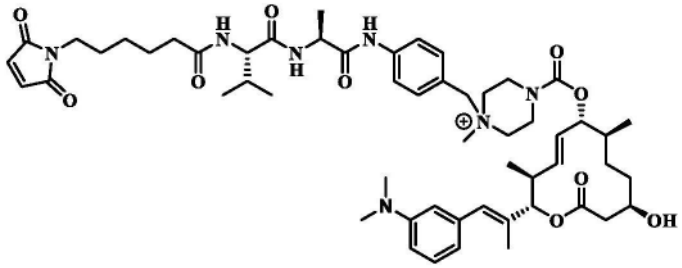
[2900] 1H NMR(400MHz,甲醇-d4)d ppm 0.99(s,14H)1.29-1.41(m,3H)1.44-1.49(m,3H)1.61-1.71(m,2H)1.92(d,J=1.25Hz,3H),1.95-2.13(m,2H)2.45-2.53(m,1H)2.60-2.70(m,2H)3.04-3.09(m,3H)3.37(s,3H)3.39-3.47(m,1H)3.47-3.54(m,2H)3.61-3.75,(m,2H)3.78-3.87(m,1H)3.93-3.99(m,1H)4.08-4.18(m,2H)4.22-4.29(m,1H)4.39-4.45(m,2H)4.45-4.53(m,1H)4.56-4.63(m,3H)5.17-5.23(m,1H)5.48-5.64(m,2H)6.57-6.64(m,1H)7.28-7.36(m,2H)7.37-7.45(m,2H)7.47-7.54(m,2H)7.64-7.70(m,2H)7.75-7.84(m,5H)8.41-8.48(m,2H)

[2901] 步骤2:4-((((2S,3S,6R,7S,10R,E)-2-((E)-1-(5-氯吡啶-3-基)丙-1-烯-2-基)-10-羟基-3,7-二甲基-12-氧代氧杂环十二碳-4-烯-6-基)氧基)羰基)-1-(4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酰胺基)-3-甲基丁酰胺基)丙酰胺基)苄

基)-1-甲基哌嗪-1-鎓(6.2mg,42.5%产率)。LC/MS(ESI,m/z),990.34[M+H]。

[2902] 1H NMR(400MHz,甲醇-d4)d ppm 0.97-1.09(m,12H)1.24-1.41(m,5H)1.47(d,J=7.15Hz,3H)1.55-1.71(m,6H)1.92(d,J=1.13Hz,3H)1.98-2.15(m,2H)2.27-2.36(m,2H)2.46-2.53(m,1H)2.60-2.71(m,2H)3.06-3.13(m,3H)3.35-3.38(m,1H)3.41-3.58(m,6H)3.62-3.76(m,2H)3.80-3.88(m,1H)4.08-4.19(m,3H)4.43-4.52(m,1H)4.57-4.66(m,2H)5.16-5.24(m,1H)5.49-5.68,(m,2H)6.62(s,1H)6.81(s,2H)7.49-7.57(m,2H)7.76-7.87(m,3H)8.39-8.49(m,2H)

[2903] 1.5.1.5ADL5-D30

[2904] 

[2905] 采用以上概述的通用程序(1.5.1部分)合成ADL5-D30。使用国际申请号PCT/US2019/026992中概述的程序合成有效负载D30,该文献通过引用并入本文。

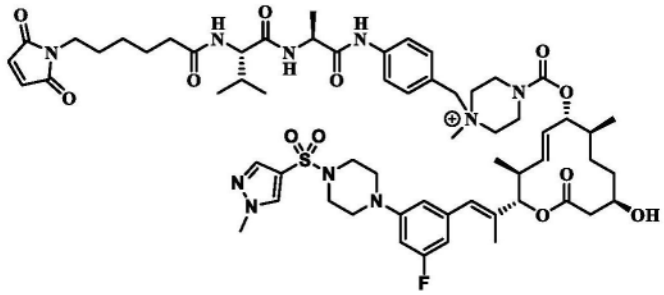
[2906] 步骤1:1-(4-((S)-2-((S)-2-((((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-3-甲基丁酰胺基)丙酰胺基)苄基)-4-((((2S,3S,6R,7S,10R,E)-2-((E)-1-(3-(二甲基氨基)苯基)丙-1-烯-2-基)-10-羟基-3,7-二甲基-12-氧代氧杂环十二碳-4-烯-6-基)氧基)羰基)-1-甲基哌嗪-1-鎓(16mg,0.016mmol,51.4%产率)。LC/MS(ESI,m/z),1027.50$[M+H]^+$

[2907] 1H NMR(400MHz,甲醇-d_4)d ppm 0.95-1.07(m,13H)1.31-1.42(m,2H)1.44-1.50(m,3H)1.63-1.71(m,2H)1.84-1.92(m,3H)1.98-2.14(m,2H)2.47-2.56(m,1H)2.60-2.67(m,2H)2.93(s,6H)3.03-3.09(m,3H)3.37(s,4H)3.47-3.56(m,2H)3.63-3.75(m,2H)3.79-3.88(m,1H)3.92-3.98(m,1H)4.08-4.19(m,2H)4.21-4.27(m,1H)4.37-4.44(m,2H)4.45-4.54(m,1H)4.57-4.62(m,2H)4.91-4.94(m,2H)5.15-5.20(m,1H)5.47-5.55(m,1H)5.56-5.65(m,1H)6.58(s,1H)6.67(d,J=1.51Hz,3H)7.15-7.24(m,1H),7.28-7.36(m,2H)7.38-7.45(m,2H)7.47-7.54(m,2H)7.64-7.73(m,2H)7.75-7.85(m,4H)

[2908] 步骤2:4-((((2S,3S,6R,7S,10R,E)-2-((E)-1-(5-氯吡啶-3-基)丙-1-烯-2-基)-10-羟基-3,7-二甲基-12-氧代氧杂环十二碳-4-烯-6-基)氧基)羰基)-1-(4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酰胺基)-3-甲基丁酰胺基)丙酰胺基)苄基)-1-甲基哌嗪-1-鎓(6.2mg,42.5%产率)。LC/MS(ESI,m/z),990.34[M+H]。

[2909] 1H NMR(400MHz,甲醇-d4)d ppm 0.88(d,J=6.65Hz,12H)1.16-1.30(m,4H)1.32-1.38(m,3H)1.43-1.58(m,6H)1.75-1.80,(m,3H)1.84-1.92(m,1H)1.93-2.02(m,1H)2.14-2.21(m,2H)2.35-2.42(m,1H)2.48-2.57(m,2H)2.82(s,6H)2.94-3.02(m,3H),3.27-3.32(m,1H)3.35-3.45(m,4H)3.50-3.64(m,2H)3.68-3.76(m,1H)3.97-4.07(m,3H)4.31-4.40(m,1H)4.47-4.53(m,2H)5.03-5.09(m,1H)5.35-5.44(m,1H)5.45-5.55(m,1H)6.42-6.50(m,1H)6.51-6.62(m,3H)6.69(s,2H)7.03-7.12(m,1H)7.38-7.44(m,2H)7.66-7.75(m,2H)8.42-8.47(m,1H)。

[2910] 1.5.1.5ADL5-D27

[2911] 

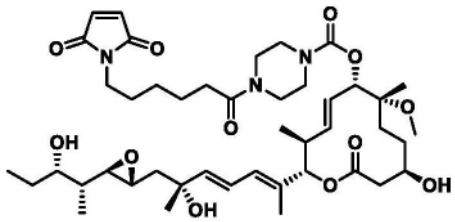
[2912] 采用以上概述的通用程序(1.5.1部分)合成ADL5-D27。使用国际申请号PCT/US2019/026992中概述的程序合成有效负载D27,该文献通过引用并入本文。

[2913] 步骤1:1-(4-((S)-2-((S)-2-((((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-3-甲基丁酰胺基)丙酰胺基)苄基)-4-((((2S,3S,6R,7S,10R,E)-2-((E)-1-(3-氟-5-(4-((1-甲基-1H-吡唑-4-基)磺酰基)哌嗪-1-基)苯基)丙-1-烯-2-基)-10-羟基-3,7-二甲基-12-氧代氧杂环十二碳-4-烯-6-基)氧基)羰基)-1-甲基哌嗪-1-鎓(25.2mg,0.020mmol,83%产率)。LC/MS(ESI,m/z),1230.54[M+H]$^+$

[2914] 步骤2:1-(4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酰胺基)-3-甲基丁酰胺基)丙酰胺基)苄基)-4-((((2S,3S,6R,7S,10R,E)-2-((E)-1-(3-氟-5-(4-((1-甲基-1H-吡唑-4-基)磺酰基)哌嗪-1-基)苯基)丙-1-烯-2-基)-10-羟基-3,7-二甲基-12-氧代氧杂环十二碳-4-烯-6-基)氧基)羰基)-1-甲基哌嗪-1-鎓(5.2mg,4.33μmol,21.13%产率)。LC/MS(ESI,m/z),1201.68[M+H]$^+$

[2915] ^{1}H NMR(400MHz,甲醇-d_4)d ppm 0.87(d,J=6.78Hz,12H)1.13-1.29(m,4H)1.31-1.38(m,3H)1.43-1.59(m,6H)1.71-1.79,(m,3H)1.83-2.02(m,2H)2.14-2.21(m,2H)2.34-2.41(m,1H)2.56(s,8H)2.94-3.01(m,3H)3.12-3.18(m,8H)3.28-3.45(m,5H),3.48-3.63(m,2H)3.70(s,4H)3.97-4.07(m,3H)4.29-4.41(m,1H)4.49(s,2H)4.98-5.06(m,1H)5.34-5.54(m,2H)6.37-6.45(m,2H)6.51(s,2H)6.69(s,2H)7.37-7.43(m,2H)7.63-7.73(m,4H)

[2916] 1.5.1.6ADL10-D1

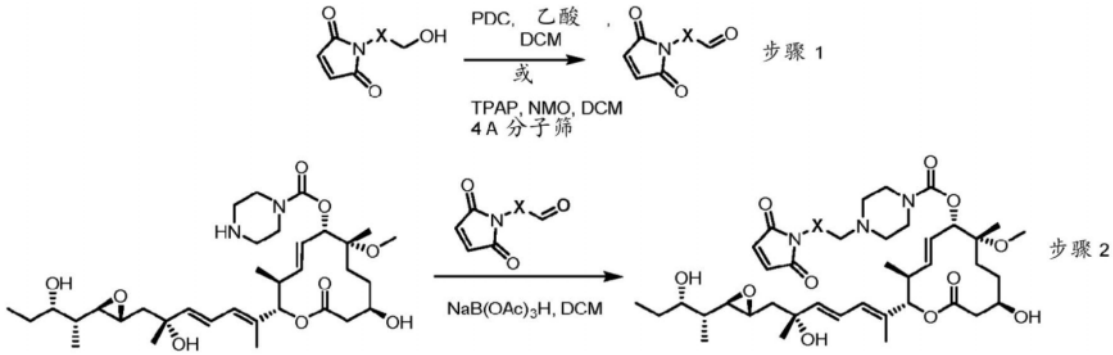
[2917] 

[2918] 将(2S,3S,6S,7R,10R,E)-10-羟基-2-((R,2E,4E)-6-羟基-7-((2S,3S)-3-((2R,3S)-3-羟基戊-2-基)环氧乙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-7-甲氧基-3,7-二甲基-12-氧代氧杂环十二碳-4-烯-6-基哌嗪-1-甲酸酯(0.012g,0.019mmol)、2,5-二氧代吡咯烷-1-基6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酸酯(0.012g,0.038mmol)和DCM(0.188ml,0.019mmol)组合并搅拌过夜。将混合物直接装载至硅胶柱上并色谱分离,得到(2S,3S,6S,7R,10R,E)-10-羟基-2-((R,2E,4E)-6-羟基-7-((2R,3R)-3-((2R,3S)-3-羟基戊-2-基)环氧乙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-7-甲氧基-3,7-二甲基-12-氧代氧杂环十二碳-4-烯-6-基4-(6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酰基)哌嗪-1-甲酸酯(8.4mg,10.12μmol,53.7%产率)。LC/MS[M+Na]853.5。

[2919] ^{1}H-NMR(400MHz,MeOH-d4):δppm 0.89(s,9H)1.21-1.39(m,9H)1.41-1.56(m,5H)1.57-1.71(m,6H)1.69-1.71(m,1H)1.79,(d,J＝0.88Hz,3H)1.82-1.90(m,1H)2.34-2.43(m,1H)2.41-2.41(m,1H)2.46-2.63(m,3H)2.65-2.68(m,2H)2.68(s,3H)2.86-2.92(m,1H)3.33(s,3H)3.51(br d,J＝7.03Hz,6H)3.54-3.60(m,5H)3.77-3.88(m,1H)5.06(s,2H)5.53-5.63(m,1H)5.70-5.80(m,1H),5.83-5.94(m,1H)6.08-6.19(m,1H)6.47-6.59(m,1H)6.80(s,2H)。

[2920] 1.6ADL12-D1、ADL14-D1和ADL15-D1的制备

[2921] 1.6.1概述-通用程序1

[2922] 

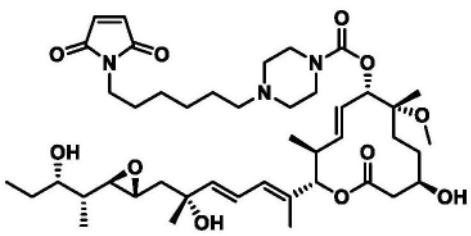
[2923] 方案7

[2924] 对于ADL12-D1-步骤1:向1-(6-羟基己基)-1H-吡咯-2,5-二酮(0.200g,1.014mmol)于DCM(20.28mL,1.014mmol)中的搅拌溶液中添加PDC(3.81g,10.14mmol)和乙酸(0.1mL)。在室温下搅拌反应混合物3小时。然后,经由二氧化硅垫过滤反应混合物并浓缩至干,得到6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己醛(40mg,0.205mmol,20.21%产率)。

[2925] 对于ADL14-D1和ADL15-D1-步骤1:向马来酰亚胺醇(1.0当量)于DCM(0.05M)中的搅拌溶液中依序添加预活化的粉末状MS-4A(2.6mg/1mg醇)、N-甲基吗啉-N-氧化物(1.2当量)和TPAP(0.1当量)。在室温下搅拌反应混合物60分钟。然后,经由硅胶垫过滤反应混合物并浓缩至干。未纯化的产物直接用于下一步骤(步骤2)。

[2926] 步骤2:将(2S,3S,6S,7R,10R,E)-10-羟基-2-((R,2E,4E)-6-羟基-7-((2S,3S)-3-((2R,3S)-3-羟基戊-2-基)环氧乙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-7-甲氧基-3,7-二甲基-12-氧代氧杂环十二碳-4-烯-6-基哌嗪-1-甲酸酯(1.0当量)、2-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)乙醛(2.0-3.0当量)、DCM(0.1M)、三乙酰氧基硼氢化钠(3.0当量)混合并搅拌10分钟。然后,将反应混合物直接装载至硅胶柱上并色谱分离,得到所希望的接头-有效负载。

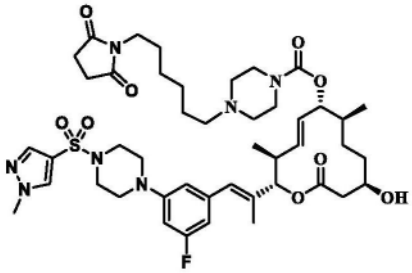
[2927] 1.6.1.1ADL12-D1

[2928] 

[2929] 接头-有效负载(ADL12-D1):采用1.6.1部分中所概述的通用程序合成(2S,3S,6S,

7R,10R,E)-10-羟基-2-((R,2E,4E)-6-羟基-7-((2R,3R)-3-((2R,3S)-3-羟基戊-2-基)环氧乙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-7-甲氧基-3,7-二甲基-12-氧代氧杂环十二碳-4-烯-6-基4-(6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己基)哌嗪-1-甲酸酯(41mg,0.050mmol,80%产率)。LC/MS[M+]$^+$816.75。

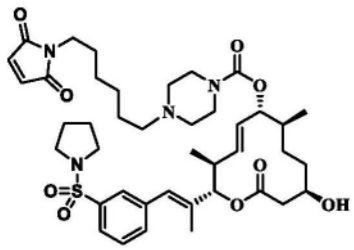
[2930] ^{1}H-NMR(400MHz,MeOH-d4):δppm 0.86-0.98(m,9H)1.20-1.23(m,3H)1.23-1.40(m,8H)1.41-1.70(m,12H)1.79(d,J=0.63Hz,3H)1.83-1.91(m,1H)2.33-2.40(m,2H)2.43(br t,J=4.77Hz,4H)2.48-2.64(m,3H)2.65-2.69(m,1H)2.87-2.92(m,1H)3.32(s,3H)3.41-3.60(m,7H)3.79-3.87(m,1H)5.04(dd,J=19.39,10.23Hz,2H)5.57(dd,J=15.18,9.79Hz,1H)5.69-5.79(m,1H)5.87(d,J=15.31Hz,1H)6.11-6.17(m,1H)6.49-6.58(m,1H)6.80(s,2H)。1.6.1.X ADL12-D28

[2931] 

[2932] 接头-有效负载(ADL12-D28):采用1.6.1部分中所概述的通用程序合成(2S,3S,6R,7S,10R,E)-2-((E)-1-(3-氟-5-(4-((1-甲基-1H-吡唑-4-基)磺酰基)哌嗪-1-基)苯基)丙-1-烯-2-基)-10-羟基-3,7-二甲基-12-氧代氧杂环十二碳-4-烯-6-基4-(6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己基)哌嗪-1-甲酸酯(2.3mg,30.7%)。LC/MS[M+]$^+$897.32

[2933] ^{1}H NMR(400MHz,甲醇-d_4)δppm 0.85-0.93(m,6H)1.16-1.34(m,6H)1.37-1.58(m,6H)1.72-1.77(m,3H)1.80-1.88(m,1H),2.23-2.41(m,7H)2.47-2.57(m,2H)3.08-3.19(m,9H)3.33-3.42(m,5H)3.70(s,4H)4.67-4.72(m,1H)4.98-5.07(m,1H)5.33-5.50(m,2H)6.36-6.43(m,2H)6.44-6.53(m,2H)6.70(s,2H)7.62-7.69(m,2H)

[2934] 1.6.1.X ADL12-D35

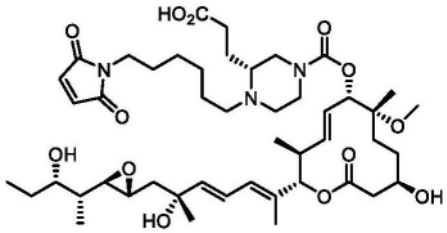
[2935] 

[2936] 接头-有效负载(ADL12-D35):采用1.6.1部分中所概述的通用程序合成(2S,3S,6R,7S,10R,E)-10-羟基-3,7-二甲基-12-氧代-2-((E)-1-(3-(吡咯烷-1-基磺酰基)苯基)丙-1-烯-2-基)氧杂环十二碳-4-烯-6-基4-(6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己基)哌嗪-1-甲酸酯(4.0mg,5.11μmol,28.8%产率)。LC/MS[M+H]$^+$783.5

[2937] 1H NMR(400MHz,甲醇-d4)d ppm 0.91(dd,J=6.78,2.51Hz,6H)1.17-1.33(m,6H)1.38-1.59(m,6H)1.65(s,4H)1.80(s,3H),1.82-1.91(m,1H)2.23-2.41(m,7H)2.49-2.61(m,2H)3.14(s,4H)3.38(br d,J=7.15Hz,6H)3.67-3.76(m,1H)4.68-4.73(m,1H)5.03-5.11(m,1H)5.34-5.52(m,2H)6.55-6.62(m,1H)6.70(s,2H)7.46-7.54(m,2H)7.58-7.65(m,

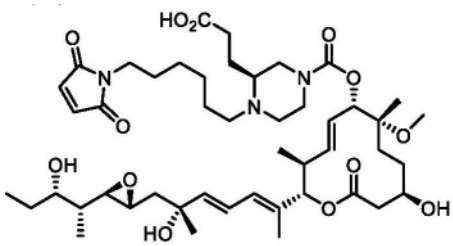
2H)

[2938] 1.6.1.X ADL12-D22(R)

[2939] 

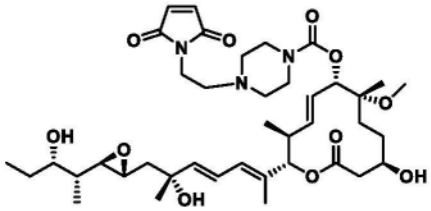
[2940] 接头-有效负载(ADL12-D28):采用1.6.1部分中所概述的通用程序合成3-((R)-1-(6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己基)-4-((((2S,3S,6S,7R,10R,E)-10-羟基-2-((R,2E,4E)-6-羟基-7-((2R,3R)-3-((2R,3S)-3-羟基戊-2-基)环氧乙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-7-甲氧基-3,7-二甲基-12-氧代氧杂环十二碳-4-烯-6-基)氧基)羰基)哌嗪-2-基)丙酸(3.2mg,3.60μmol,15.39%产率)。LC/MS[M+]$^+$888.5

[2941] 1.6.1.X ADL12-D22(S)

[2942] 

[2943] 接头-有效负载(ADL12-D28):采用1.6.1部分中所概述的通用程序合成3-((S)-1-(6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己基)-4-((((2S,3S,6S,7R,10R,E)-10-羟基-2-((R,2E,4E)-6-羟基-7-((2R,3R)-3-((2R,3S)-3-羟基戊-2-基)环氧乙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-7-甲氧基-3,7-二甲基-12-氧代氧杂环十二碳-4-烯-6-基)氧基)羰基)哌嗪-2-基)丙酸(3.6mg,3.60μmol,28.7%产率)。LC/MS[M+]$^+$888.56

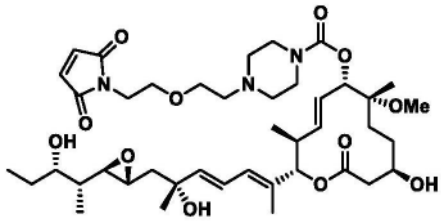
[2944] 1.6.1.2ADL14-D1

[2945] 

[2946] 接头-有效负载(ADL14-D1):采用1.6.1部分中所概述的通用程序合成(2S,3S,6S,7R,10R,E)-10-羟基-2-((R,2E,4E)-6-羟基-7-((2R,3R)-3-((2R,3S)-3-羟基戊-2-基)环氧乙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-7-甲氧基-3,7-二甲基-12-氧代氧杂环十二碳-4-烯-6-基4-(2-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)乙基)哌嗪-1-甲酸酯(8mg,10.53μmol,33.5%产率)。LC/MS[M+H]760.3。

[2947] ^{1}H-NMR(400MHz,MeOH-d4):δppm 0.85-1.01(m,9H),1.17-1.33(m,5H),1.36(s,3H),1.41-1.71(m,7H),1.80(s,3H),1.83-1.95(m,1H),2.48(br s,10H),2.89-2.98(m,1H),3.40-3.57(m,5H),3.61-3.72(m,2H),3.78-3.91(m,1H),4.98-5.14(m,2H),5.50-5.52(m,1H),5.52-5.65(m,1H),5.69-5.82(m,1H),5.86-5.96(m,1H),6.09-6.21(m,1H),6.47-6.60(m,1H),6.79-6.90(m,2H)。

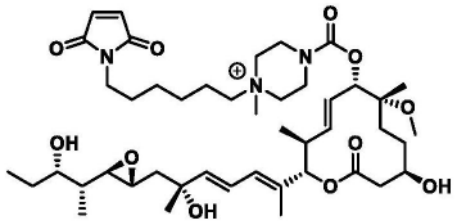
[2948] 1.6.1.3ADL15-D1

[2949] 

[2950] 接头-有效负载(ADL15-D1):采用1.6.1部分中所概述的通用程序合成(2S,3S,6S,7R,10R,E)-10-羟基-2-((R,2E,4E)-6-羟基-7-((2R,3R)-3-((2R,3S)-3-羟基戊-2-基)环氧乙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-7-甲氧基-3,7-二甲基-12-氧代氧杂环十二碳-4-烯-6-基4-(2-(2-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)乙氧基)乙基)哌嗪-1-甲酸酯(7mg,8.71μmol,23.10%产率)。LC/MS[M=+H]804.1。

[2951] ^{1}H-NMR(400MHz,MeOH-d4):δppm 0.85-1.02(m,9H),1.18-1.32(m,4H),1.36(s,3H),1.40-1.72(m,7H),1.78-1.83(m,3H),1.85-1.93(m,1H),2.42-2.65(m,9H),2.67-2.73(m,1H),2.89-2.96(m,1H),3.37(s,5H),3.41-3.58(m,5H),3.59-3.67(m,4H),3.68-3.75(m,2H),3.81-3.89(m,1H),4.94-5.15(m,2H),5.61(br d,J=10.04Hz,1H),5.69-5.82(m,1H),5.89(br d,J=15.18Hz,1H),6.16(br d,J=10.92Hz,1H),6.56(br s,1H),6.77-6.91(m,2H)。

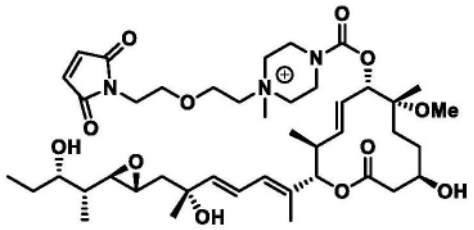
[2952] 1.7ADL12-D2

[2953] 

[2954] 将(2S,3S,6S,7R,10R,E)-10-羟基-2-((R,2E,4E)-6-羟基-7-((2S,3S)-3-((2R,3S)-3-羟基戊-2-基)环氧乙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-7-甲氧基-3,7-二甲基-12-氧代氧杂环十二碳-4-烯-6-基4-(6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己基)哌嗪-1-甲酸酯(26mg,0.032mmol)、乙腈(319μL,.032mmol)、碘甲烷(19.92μL,.319mmol)组合并搅拌过夜。将反应混合物浓缩至干并色谱分离(0-30%MeOH在DCM中),得到1-(6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己基)-4-((((2S,3S,6S,7R,10R,E)-10-羟基-2-((R,2E,4E)-6-羟基-7-((2R,3R)-3-((2R,3S)-3-羟基戊-2-基)环氧乙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-7-甲氧基-3,7-二甲基-12-氧代氧杂环十二碳-4-烯-6-基)氧基)羰基)-1-甲基哌嗪-1-鎓(14mg,0.017mmol,52.9%产率)。LC/MS[M+]831.6。

[2955] ^{1}H-NMR(400MHz,MeOH-d4):δppm 0.86-0.98(m,9H)1.26(s,4H)1.36(s,3H)1.40-1.58(m,9H)1.60-1.71(m,4H)1.80(d,J=0.88Hz,4H)1.85-1.91(m,1H)1.87-1.88(m,1H)2.48-2.63(m,3H)2.65-2.72(m,1H)2.88-2.94(m,1H)3.18(s,3H)3.34-3.41(m,3H)3.53(s,10H)3.73-3.90(m,3H)3.90-4.06(m,2H)5.02-5.11(m,2H)5.56-5.66(m,1H)5.70-5.81(m,1H)5.84-5.94(m,1H)6.11-6.20(m,1H)6.50-6.60(m,1H)6.83(s,2H)。

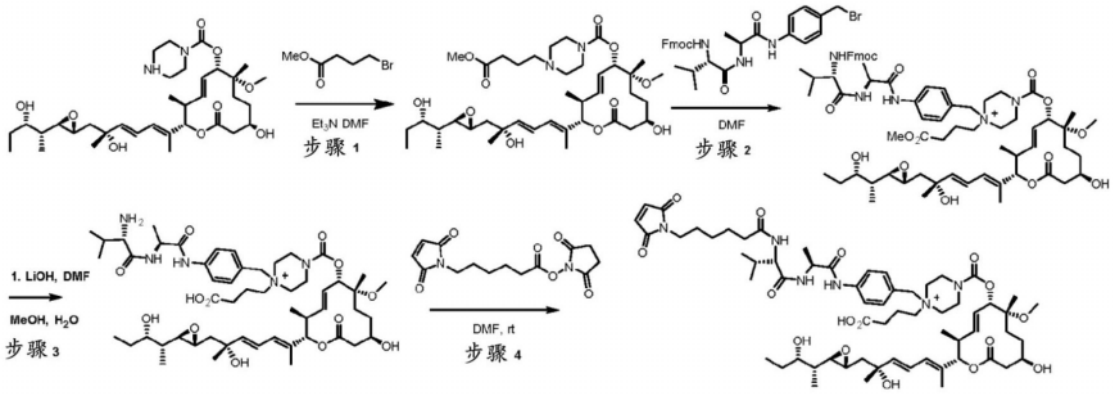
[2956] 1.8ADL15-D2

[2957] 

[2958] 将(2S,3S,6S,7R,10R,E)-10-羟基-2-((R,2E,4E)-6-羟基-7-((2S,3S)-3-((2R,3S)-3-羟基戊-2-基)环氧乙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-7-甲氧基-3,7-二甲基-12-氧代氧杂环十二碳-4-烯-6-基4-(2-(2-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)乙氧基)乙基)哌嗪-1-甲酸酯(6mg,7.463μmol)、碘甲烷(0.467μL,7.463μmol)和乙腈(0.390μL,7.463μmol)组合并在室温下搅拌。将反应混合物浓缩至干,得到(2S,3S,6S,7R,10R,E)-10-羟基-2-((R,2E,4E)-6-羟基-7-((2R,3R)-3-((2R,3S)-3-羟基戊-2-基)环氧乙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-7-甲氧基-3,7-二甲基-12-氧代氧杂环十二碳-4-烯-6-基4-(2-(2-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)乙氧基)乙基)-4-甲基-414-哌嗪-1-甲酸酯(6mg,7.33μmol,98%产率)。LC/MS[M+]$^+$819.28。

[2959] ^{1}H-NMR(400MHz,MeOH-d4):δppm 0.74-0.88(m,9H)1.18(br d,J=4.27Hz,5H)1.23-1.27(m,3H)1.28-1.49(m,5H)1.51-1.61(m,2H)1.66-1.71(m,3H)1.73-1.80(m,1H)2.36-2.53(m,3H)2.55-2.60(m,1H)2.78-2.83(m,1H)3.10-3.14(m,3H)3.23-3.25(m,3H)3.32-3.51(m,5H)3.52-3.67(m,6H)3.67-3.87(m,7H)4.93-5.01(m,2H)5.44-5.55(m,1H)5.61-5.70(m,1H)6.00-6.07(m,1H)6.38-6.48(m,1H)6.75(s,2H)。

[2960] 1.9ADL5-D25

[2961] 

[2962] 方案8

[2963] 步骤1:将D1(40mg,0.063mmol)溶解于N,N-二甲基甲酰胺(730μl,9.422mmol)中,并添加溴丁酸甲酯(23.69μL,0.188mmol),随后添加三乙胺(35.0μL,0.251mmol)。在室温下搅拌溶液2天。蒸发溶剂。通过柱色谱法纯化,得到呈无色油状物的(2S,3S,6S,7R,10R,E)-10-羟基-2-((R,2E,4E)-6-羟基-7-((2R,3R)-3-((2R,3S)-3-羟基戊-2-基)环氧乙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-7-甲氧基-3,7-二甲基-12-氧代氧杂环十二碳-4-烯-6-基4-(4-甲氧基-4-氧代丁基)哌嗪-1-甲酸酯(51mg,0.069mmol,约100%产率)。LC/MS(ESI,m/z),737.4[M+H]$^+$。

[2964] ^{1}H-NMR(400MHz,MeOH-d4):δppm 0.76-0.86(m,9H),1.12(s,3H),1.14-1.19(m,1H),1.24(s,3H),1.34-1.50(m,5H),1.52-1.60(m,1H),1.69(s,6H),2.27(s,8H),2.37-

2.49(m,3H),2.54-2.61(m,1H),2.77-2.83(m,1H),3.35-3.47(m,5H),3.56(s,3H),3.67-3.76(m,1H),4.46(s,3H),4.89-5.00(m,3H),5.42-5.52(m,1H),5.57-5.70(m,1H),5.73-5.81(m,1H),5.98-6.08(m,1H),6.43(dd,J＝15.25,10.98Hz,1H)。

[2965] 步骤2:使Fmoc-ValAla-PAB溴化物(88mg,0.152mmol)和(2S,3S,6S,7R,10R,E)-10-羟基-2-((R,2E,4E)-6-羟基-7-((2R,3R)-3-((2R,3S)-3-羟基戊-2-基)环氧乙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-7-甲氧基-3,7-二甲基-12-氧代氧杂环十二碳-4-烯-6-基4-(4-甲氧基-4-氧代丁基)哌嗪-1-甲酸酯(51mg,0.069mmol)悬浮于N,N-二甲基甲酰胺(670μL,8.651mmol)中。在室温下搅拌反应过夜。蒸发溶剂。通过柱色谱法纯化,得到呈蜡状固体的1-(4-((S)-2-((S)-2-((((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-3-甲基丁酰胺基)丙酰胺基)苄基)-4-((((2S,3S,6S,7R,10R,E)-10-羟基-2-((R,2E,4E)-6-羟基-7-((2R,3R)-3-((2R,3S)-3-羟基戊-2-基)环氧乙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-7-甲氧基-3,7-二甲基-12-氧代氧杂环十二碳-4-烯-6-基)氧基)羰基)-1-(4-甲氧基-4-氧代丁基)哌嗪-1-鎓(42mg,0.034mmol,49.1%产率)。LC/MS(ESI,m/z),1235.4[M]$^+$。

[2966] 步骤3:将1-(4-((S)-2-((S)-2-((((9H-芴-9-基)甲氧基)羰基)氨基)-3-甲基丁酰胺基)丙酰胺基)苄基)-4-((((2S,3S,6S,7R,10R,E)-10-羟基-2-((R,2E,4E)-6-羟基-7-((2R,3R)-3-((2R,3S)-3-羟基戊-2-基)环氧乙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-7-甲氧基-3,7-二甲基-12-氧代氧杂环十二碳-4-烯-6-基)氧基)羰基)-1-(4-甲氧基-4-氧代丁基)哌嗪-1-鎓(42mg,0.034mmol)溶解于5:2:1比率的THF(600μL,7.322mmol)、MeOH(250μL,6.179mmol)、水(125μL,6.939mmol)中,并添加氢氧化锂(1.221mg,0.051mmol)。在室温下搅拌混合物1小时。将混合物用乙酸(5.84μL,0.102mmol)淬灭并蒸发溶剂,且通过RP HPLC纯化,得到呈蜡状固体的1-(4-((S)-2-((S)-2-氨基-3-甲基丁酰胺基)丙酰胺基)苄基)-1-(3-羧基丙基)-4-((((2S,3S,6S,7R,10R,E)-10-羟基-2-((R,2E,4E)-6-羟基-7-((2R,3R)-3-((2R,3S)-3-羟基戊-2-基)环氧乙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-7-甲氧基-3,7-二甲基-12-氧代氧杂环十二碳-4-烯-6-基)氧基)羰基)哌嗪-1-鎓(18.4mg,0.018mmol,54.2%产率)。LC/MS(ESI,m/z),998.5[M]$^+$。

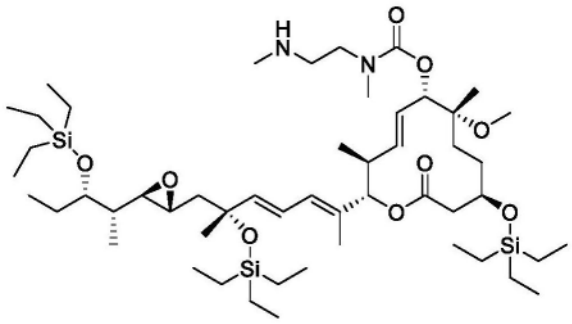
[2967] 步骤4:将1-(4-((S)-2-((S)-2-氨基-3-甲基丁酰胺基)丙酰胺基)苄基)-1-(3-羧基丙基)-4-((((2S,3S,6S,7R,10R,E)-10-羟基-2-((R,2E,4E)-6-羟基-7-((2R,3R)-3-((2R,3S)-3-羟基戊-2-基)环氧乙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-7-甲氧基-3,7-二甲基-12-氧代氧杂环十二碳-4-烯-6-基)氧基)羰基)哌嗪-1-鎓(18.4mg,0.018mmol)溶解于N,N-二甲基甲酰胺(356μL,4.603mmol)中,并添加2,5-二氧代吡咯烷-1-基6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酸酯(6.81mg,0.022mmol),随后添加胡宁氏碱(8.04μL,0.046mmol)。在室温下搅拌反应溶液30分钟。蒸发溶剂且将粗产物通过RP HPLC纯化,得到呈白色冻干固体的(1-(3-羧基丙基)-1-(4-((S)-2-((R)-2-(6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酰胺基)-3-甲基丁酰胺基)丙酰胺基)苄基)-4-((((2S,3S,6S,7R,10R,E)-10-羟基-2-((R,2E,4E)-6-羟基-7-((2R,3R)-3-((2R,3S)-3-羟基戊-2-基)环氧乙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-7-甲氧基-3,7-二甲基-12-氧代氧杂环十二碳-4-烯-6-基)氧基)羰基)哌嗪-1-鎓(8.8mg,7.38μmol,40.1%产率)。LC/MS(ESI,m/z),1191.5[M]$^+$。

[2968] ^{1}H-NMR(400MHz,DMSO-d6):δppm 0.68-0.81(m,18H),0.98-1.07(m,4H),1.07-1.14(m,3H),1.16(br d,J＝3.89Hz,5H),1.22-1.33(m,8H),1.36-1.47(m,7H),1.62(s,3H)

1.66-1.73(m,1H),1.83-1.92(m,5H),1.98-2.13(m,2H),2.26(dt,J＝3.54,1.80Hz,1H),2.27-2.33(m,1H),2.47-2.51(m,2H),2.58-2.62(m,1H),2.66-2.72(m,1H),3.15(s,3H)3.45-3.58(m,3H),3.60-3.68(m,2H)3.77-3.86(m,2H),4.06-4.13(m,1H),4.27-4.37(m,2H),4.46-4.54(m,3H),4.72-4.78(m,1H),4.80-4.87(m,2H),5.32-5.48(m,1H),5.53-5.67(m,1H),5.73-5.86(m,1H),5.93-6.05(m,1H),6.16-6.26(m,1H),6.20(s,1H),6.23-6.41(m,1H),6.27-6.38(m,1H),6.93(s,2H),6.98-7.06(m,2H),7.43-7.50(m,2H),7.62-7.69(m,2H),7.74-7.80(m,1H),8.22-8.27(m,1H),8.44-8.49(m,4H),10.15-10.22(m,1H)。

[2969] 1.10ADL12-D20和ADL12-D21

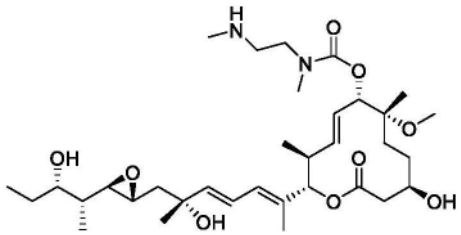
[2970] 采用1.2.1部分中所概述的通用程序1合成D20。

[2971] 

[2972] 呈无色油状物的(2S,3S,6S,7R,10R,E)-7-甲氧基-3,7-二甲基-2-((R,2E,4E)-6-甲基-6-((三乙基甲硅烷基)氧基)-7-((2R,3R)-3-((2S,3S)-3-((三乙基甲硅烷基)氧基)戊-2-基)环氧乙烷-2-基)庚-2,4-二烯-2-基)-12-氧代-10-((三乙基甲硅烷基)氧基)氧杂环十二碳-4-烯-6-基甲基(2-(甲基氨基)乙基)氨基甲酸酯(43mg,0.044mmol,90％产率)。LC/MS(ESI,m/z),981.4[M+H]$^+$。

[2973] ^{1}H-NMR(400MHz,MeOH-d4):δppm 0.62-0.73(m,18H),0.82-0.93(m,9H),0.95-1.06(m,27H),1.24(br s,4H),1.45(br s,10H),1.78(br s,3H),1.92-2.00(m,1H),2.46(br s,4H),2.51-2.67(m,3H),2.76-2.84(m,2H),2.86-2.93(m,1H),2.93-3.02(m,3H),3.34-3.38(m,3H),3.43-3.49(m,2H),3.72-3.82(m,1H),3.93-4.04(m,1H),4.94-5.07(m,2H),5.53-5.64(m,1H),5.72-5.89(m,2H),6.07-6.21(m,1H),6.44-6.61(m,1H)。

[2974] D20

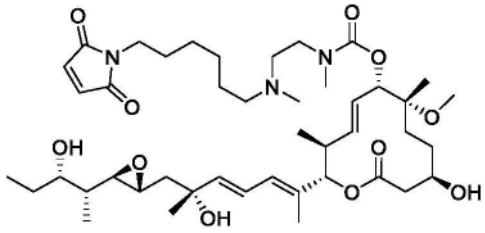
[2975] 

[2976] 呈无色油状物的(2S,3S,6S,7R,10R,E)-10-羟基-2-((R,2E,4E)-6-羟基-7-((2R,3R)-3-((2R,3S)-3-羟基戊-2-基)环氧乙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-7-甲氧基-3,7-二甲基-12-氧代氧杂环十二碳-4-烯-6-基甲基(2-(甲基氨基)乙基)氨基甲酸酯(16.4mg,0.026mmol,58.6％产率)。LC/MS(ESI,m/z),639.7[M+H]$^+$。

[2977] ^{1}H-NMR(400MHz,MeOH-d4):δppm 0.92(br d,J＝6.53Hz,9H),1.25(br s,4H),1.36(s,3H),1.41-1.74(m,6H),1.45-1.59(m,1H),1.64-1.72(m,1H),1.80(s,3H),1.85-1.94(m,1H),2.42(s,3H),2.50-2.63(m,3H),2.65-2.73(m,1H),2.73-2.80(m,2H),2.88-

3.01(m,4H),3.35-3.38(m,3H),3.35-3.40(m,3H),3.41-3.48(m,2H),3.52-3.57(m,1H),3.78-3.89(m,1H),5.00-5.13(m,2H),5.53-5.64(m,1H),5.71-5.82(m,1H),5.84-5.94(m,1H),6.12-6.19(m,1H),6.49-6.61(m,1H)。

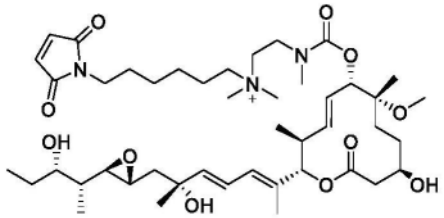
[2978] ADL12-D20

[2979] 

[2980] 采用1.6.1部分中所概述的通用程序合成ALD12-D20并得到无色油状物(13.0mg,0.016mmol,67.7%)。LC/MS(ESI,m/z),818.3[M+H]$^+$。

[2981] ^{1}H-NMR(400MHz,MeOH-d4):δppm 0.91(br s,9H),1.21-1.31(m,4H),1.36(br s,7H),1.46-1.73(m,11H),1.80(s,3H),1.84-1.93(m,1H),2.50-2.72(m,7H),2.75-2.85(m,1H),2.87-3.09(m,7H),3.48-3.68(m,6H)3.80-3.89(m,1H),5.02-5.13(m,2H),5.55-5.66(m,1H),5.71-5.82(m,1H),5.85-5.94(m,1H),6.11-6.22(m,1H),6.49-6.61(m,1H),6.83(br d,J=1.13Hz,2H)。

[2982] ADL12-D21

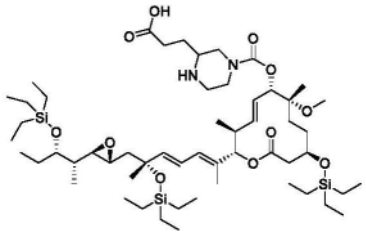
[2983] 

[2984] 将((2S,3S,6S,7R,10R,E)-10-羟基-2-((R,2E,4E)-6-羟基-7-((2R,3R)-3-((2R,3S)-3-羟基戊-2-基)环氧乙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-7-甲氧基-3,7-二甲基-12-氧代氧杂环十二碳-4-烯-6-基(2-((6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己基)(甲基)氨基)乙基)(甲基)氨基甲酸酯(7mg,8.557μmol)溶解于N,N-二甲基甲酰胺(99μl,1.284mmol)中并添加碘甲烷(2.68μL,0.043mmol)。在室温下搅拌溶液过夜。蒸发溶剂。通过柱色谱法纯化,得到6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)-N-(2-(((((2S,3S,6S,7R,10R,E)-10-羟基-2-((R,2E,4E)-6-羟基-7-((2R,3R)-3-((2R,3S)-3-羟基戊-2-基)环氧乙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-7-甲氧基-3,7-二甲基-12-氧代氧杂环十二碳-4-烯-6-基)氧基)羰基)(甲基)氨基)乙基)-N,N-二甲基己-1-铵(7mg,8.40μmol,98%产率)。LC/MS(ESI,m/z),832.7[M+H]$^+$。

[2985] ^{1}H-NMR(400MHz,MeOH-d4):δppm 0.75-0.87(m,9H),1.14(s,4H),1.25(s,3H),1.27-1.45(m,9H),1.48-1.61(m,4H),1.69(s,4H),1.72-1.79(m,2H),2.35-2.53(m,3H),2.53-2.60(m,1H),2.75-2.83(m,1H),2.85-2.95(m,3H),3.06(br d,J=10.42Hz,6H),3.15-3.20(m,2H),3.25(br d,J=2.38Hz,3H),3.42(br d,J=6.90Hz,5H),3.53-3.69(m,2H),3.69-3.78(m,1H),4.88-5.01(m,2H),5.44-5.56(m,1H),5.59-5.72(m,1H),5.73-5.83(m,1H),5.99-6.10(m,1H),6.40(s,1H),6.72(s,2H)。

[2986] 1.11ADL12-D22

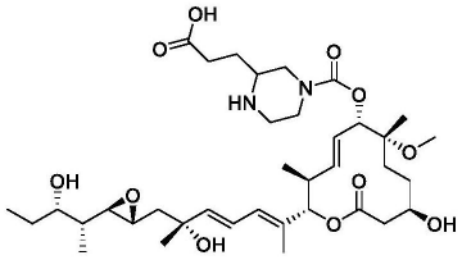
[2987] 采用1.2.1部分中所概述的通用程序1合成D22。

[2988] 

[2989] 呈无色油状物的3-(4-((((2S,3S,6S,7R,10R,E)-7-甲氧基-3,7-二甲基-2-((R,2E,4E)-6-甲基-6-((三乙基甲硅烷基)氧基)-7-((2R,3R)-3-((2S,3S)-3-((三乙基甲硅烷基)氧基)戊-2-基)环氧乙烷-2-基)庚-2,4-二烯-2-基)-12-氧代-10-((三乙基甲硅烷基)氧基)氧杂环十二碳-4-烯-6-基)氧基)羰基)哌嗪-2-基)丙酸(48mg,0.046mmol,34.4%产率)。LC/MS(ESI,m/z),1051.4[M+H]$^+$。

[2990] ^{1}H-NMR(400MHz,MeOH-d4):δppm 0.62-0.70(m,18H),0.82-0.94(m,9H),1.01(tt,J=7.92,3.18Hz,27H),1.22-1.28(m,4H),1.45(s,3H),1.47-1.66(m,7H),1.76-1.87(m,5H),1.92-1.99(m,1H),2.36-2.47(m,3H),2.50-2.68(m,3H),2.86-2.93(m,1H),2.98-3.08(m,2H),3.10-3.18(m,1H),3.18-3.26(m,2H),3.27-3.31(m,1H),3.34-3.36(m,3H),3.36-3.37(m,1H)3.72-3.81(m,1H),3.95-4.19(m,3H),4.93-5.00(m,1H),5.01-5.07(m,1H),5.54-5.66(m,1H)5.72-5.81(m,1H)5.81-5.90(m,1H),6.12-6.19(m,1H),6.47-6.58(m,1H)。

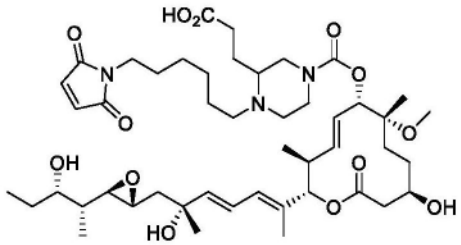
[2991] D22

[2992] 

[2993] N-乙基-N-异丙基丙-3-(4-((((2S,3S,6S,7R,10R,E)-10-羟基-2-((R,2E,4E)-6-羟基-7-((2R,3R)-3-((2R,3S)-3-羟基戊-2-基)环氧乙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-7-甲氧基-3,7-二甲基-12-氧代氧杂环十二碳-4-烯-6-基)氧基)羰基)哌嗪-2-基)丙酸(23.5mg,0.031mmol,68.2%产率)。LC/MS(ESI,m/z),709.5[M+H]$^+$。

[2994] ^{1}H-NMR(400MHz,DMSO-d6):δppm 0.71-0.77(m,9H),1.03(s,5H),1.14-1.20(m,6H),1.23-1.33(m,5H),1.36-1.48(m,5H),1.63(s,3H),1.67-1.75(m,1H),2.13-2.24(m,4H),2.58-2.64(m,1H),2.68-2.81(m,2H),3.20-3.20(m,3H),3.61-3.77(m,4H),4.28-4.39(m,1H),4.44-4.53(m,1H),4.79-4.88(m,2H),5.28-5.43(m,1H),5.52-5.66(m,1H),5.73-5.85(m,1H),5.94-6.04(m,1H),6.27-6.41(m,1H),6.43-6.53(m,2H),8.19-8.29(m,1H)。

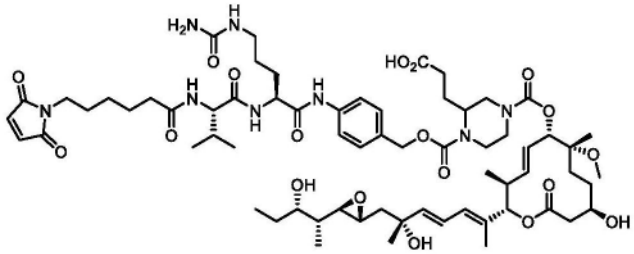
[2995] ADL12-D22

[2996] 

[2997] 采用1.6.1部分中所概述的通用程序合成ADL12-D22(3.6mg,4.05μmol,34.4%产率)。LC/MS(ESI,m/z),888.7[M+H]$^+$。

[2998] ^{1}H-NMR(400MHz,MeOH-d4):δppm 0.77-0.89(m,9H),1.08-1.31(m,13H),1.35-1.60(m,12H),1.69(s,3H),1.73-1.83(m,1H),1.85-1.97(m,1H),2.15-2.27(m,1H),2.27-2.83(m,11H),2.84-2.98(m,1H),3.39(s,7H),3.67-3.77(m,1H),4.89-5.01(m,2H),5.40-5.53(m,1H),5.59-5.69(m,1H),5.72-5.83(m,1H),5.99-6.11(m,1H),6.37-6.49(m,1H),6.69(s,2H)。

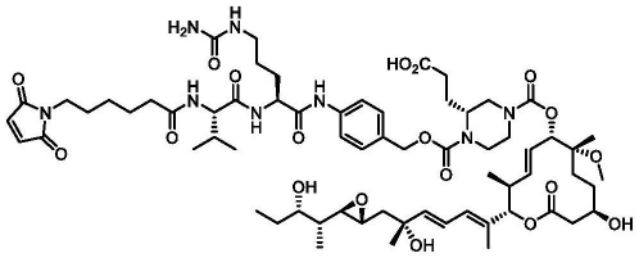
[2999] ADL1-D22

[3000] 

[3001] 采用1.2.1部分中所概述的通用程序1合成呈白色冻干固体的ADL1-D22(4.7mg,3.59μmol,38.6%产率)。LC/MS(ESI,m/z),1307.6[M+H]$^+$。

[3002] ^{1}H NMR(400MHz,DMSO-d6):δppm 0.68-0.79(m,16H),1.03(s,3H),1.16(s,5H),1.23-1.44(m,13H),1.48-1.55(m,1H),1.62(s,4H),1.68-1.74(m,1H),1.86-1.93(m,1H),2.02(s,4H),2.24-2.37(m,3H),2.46-2.51(m,2H),2.66-2.73(m,1H),2.79-2.99(m,4H),3.15(s,3H),3.21-3.22(m,2H),3.30(s,4H),3.61-3.67(m,1H),3.73-3.88(m,3H),4.01-4.08(m,1H),4.09-4.16(m,1H),4.29-4.38(m,2H),4.43-4.51(m,1H),4.73-4.78(m,1H),4.79-4.88(m,2H),4.91-4.98(m,2H),5.29-5.43(m,3H),5.54-5.67(m,1H),5.74-5.83(m,1H),5.95-6.07(m,1H),6.28-6.40(m,1H),6.54-6.62(m,1H),6.93(s,2H),7.17-7.26(m,2H),7.44-7.57(m,2H),7.66-7.76(m,1H),7.95-8.03(m,1H),8.42-8.49(m,1H),9.89-9.96(m,1H)。

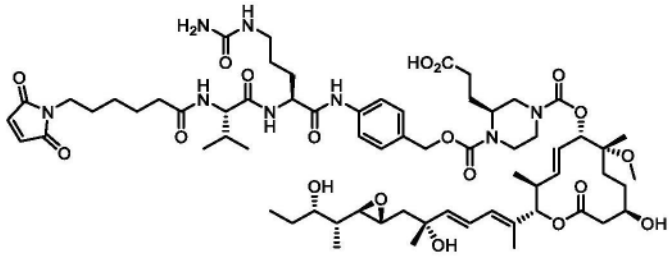
[3003] ADL1-D23

[3004] 

[3005] 将4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酰胺基)-3-甲基丁酰胺基)-5-脲基戊酰胺基)苄基(4-硝基苯基)碳酸酯(16.76mg,.023mmol)和3-((R)-

4-((((2S,3S,6S,7R,10R,E)-10-羟基-2-((R,2E,4E)-6-羟基-7-((2R,3R)-3-((2R,3S)-3-羟基戊-2-基)环氧乙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-7-甲氧基-3,7-二甲基-12-氧代氧杂环十二碳-4-烯-6-基)氧基)羰基)哌嗪-2-基)丙酸(16.1mg,0.023mmol)溶解于DMF(229μl,2.953mmol)中并添加胡宁氏碱(11.90μl,0.068mmol)。在室温下搅拌反应混合物过夜。然后蒸发溶剂并进行反相HPLC纯化,得到3-((R)-1-(((4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酰胺基)-3-甲基丁酰胺基)-5-脲基戊酰胺基)苄基)氧基)羰基)-4-((((2S,3S,6S,7R,10R,E)-10-羟基-2-((R,2E,4E)-6-羟基-7-((2R,3R)-3-((2R,3S)-3-羟基戊-2-基)环氧乙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-7-甲氧基-3,7-二甲基-12-氧代氧杂环十二碳-4-烯-6-基)氧基)羰基)哌嗪-2-基)丙酸(3.9mg,2.98μmol,13.13%产率)。LC/MS(ESI,m/z),1308.6[M+H]$^+$。

[3006] ADL1-D24(S)

[3007] 

[3008] 将3-((S)-4-((((2S,3S,6S,7R,10R,E)-10-羟基-2-((R,2E,4E)-6-羟基-7-((2R,3R)-3-((2R,3S)-3-羟基戊-2-基)环氧乙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-7-甲氧基-3,7-二甲基-12-氧代氧杂环十二碳-4-烯-6-基)氧基)羰基)哌嗪-2-基)丙酸(10mg,.014mmol)、N,N-二甲基甲酰胺(141μl,0.014mmol)、胡宁氏碱(5μl,0.028mmol)、4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酰胺基)-3-甲基丁酰胺基)-5-脲基戊酰胺基)苄基(4-硝基苯基)碳酸酯(20.8mg,.028mmol)组合并搅拌2小时。色谱分离($MeOH/CH_2Cl_2$),得到3-((S)-1-(((4-((S)-2-((S)-2-(6-(2,5-二氧代-2,5-二氢-1H-吡咯-1-基)己酰胺基)-3-甲基丁酰胺基)-5-脲基戊酰胺基)苄基)氧基)羰基)-4-((((2S,3S,6S,7R,10R,E)-10-羟基-2-((R,2E,4E)-6-羟基-7-((2R,3R)-3-((2R,3S)-3-羟基戊-2-基)环氧乙烷-2-基)-6-甲基庚-2,4-二烯-2-基)-7-甲氧基-3,7-二甲基-12-氧代氧杂环十二碳-4-烯-6-基)氧基)羰基)哌嗪-2-基)丙酸(5mg,3.82μmol,27.1%产率)。LC/MS(ESI,m/z),1308.4[M+H]$^+$。

[3009] 实例2

[3010] 剖析了用于制备ADC的示例性剪接体调节剂有效负载。评价有效负载与SF3b复合体的结合、体外剪接活性和抑制细胞生长的能力。2.1SF3B1结合/闪烁近接分析(SPA)

[3011] 执行闪烁近接分析以测量化合物(“有效负载”)与SF3b复合体的结合亲和力。如下制备抗SF3B1抗体(MBL)在抗小鼠PVT SPA闪烁珠粒(珀金埃尔默公司(PerkinElmer))上的批量固定:对于每2.5mg核提取物,将5μg抗SF3B1抗体和1.5mg珠粒混合在150μLPBS中。将抗体-珠粒混合物在室温下孵育30分钟并以18,000g离心5分钟。每1.5mg抗体-珠粒混合物使用150μL PBS再悬浮。使珠粒悬浮并将其添加至所制备的核提取物中。在4℃下,在轻柔混合下将浆液孵育2小时。然后通过以18,000g离心5分钟来收集珠粒,并用PBS+0.1% Triton X-100洗涤两次。在最后一个离心步骤之后,每1.5mg珠粒用150μL PBS悬浮。测试SF3b复合

体与如先前所述合成的[^{3}H]标记的普拉二烯内酯B探针([^{3}H]-PB)的结合(Kotake等人(2007)Nat Chem Biol.[自然化学生物学]3(9):570-5)。用50μL珠粒浆液并通过添加不同浓度的PB或PB-OH制备100μL结合反应物,且在30分钟预孵育之后,添加2.5nM[^{3}H]-PB。将该混合物孵育30分钟,并使用MicroBeta2板计数器(珀金埃尔默公司)读取发光信号。使用Prism 7(Graphpad)对数据进行非线性回归曲线拟合。

[3012] 所有测试的有效负载均观察到类似结合曲线(图1)。通常,特异性结合是在低纳摩尔范围内,这表明所有测试的有效负载均为强效SF3b复合体结合剂且为用于ADC中的有前景的候选化合物。

[3013] 2.2体外剪接(IVS)

[3014] 为了评价有效负载在无细胞系统中的活性,进行体外剪接测定。将有效负载与核提取物和pre-mRNA底物小基因一起孵育。

[3015] HeLa核提取物的制备:使HeLa S3细胞团块再悬浮于低渗缓冲液(10mM HEPES pH 7.9、1.5mM $MgCl_2$、10mM KCl、0.2mM PMSF、0.5mM DTT)中,且使悬浮液达到总计5个红细胞压积(packed cell volume,PCV)。离心之后,丢弃上清液,并用低渗缓冲液使细胞达到3PCV且在冰上孵育10分钟。使用dounce匀浆器溶解细胞然后离心。丢弃上清液,并且用1/2核压积(packed nuclear volume,PNV)的低盐缓冲液(20mM HEPES pH 7.9、1.5mM $MgCl_2$、20mM KCl、0.2mM EDTA、25%甘油、0.2mM PMSF、0.5mM DTT)使团块再悬浮,随后用1/2PNV的高盐缓冲液(除添加1.4M KCl之外,其余与低盐缓冲液相同)再悬浮。轻柔地混合核30分钟,随后离心。然后,将上清液(核提取物)透析至储存缓冲液(20mM HEPES pH 7.9、100mM KCl、0.2mM EDTA、20%甘油、0.2mM PMSF、0.5mM DTT)中。使用NanoDrop 8000UV-Vis分光光度计(赛默飞世尔科技公司(ThermoFisher Scientific))测定蛋白质浓度。

[3016] IVS:使用5'EcoRI和3'XbaI限制性位点,将所有Ad2源性序列(Pellizzoni等人(1998)Cell[细胞]95(5):615-24)克隆至pcDNA3.1(+)载体(普洛麦格公司(Promega))中。使用XbaI使质粒线性化,并用作体外转录反应中的DNA模板。使用EcoRI使无内含子的FtzΔi质粒(Luo和Reed(1999)96(26):14937-42)线性化。所有RNA均进行体外转录并且然后分别使用MEGAScript T7(英杰公司(Invitrogen))和MegaClear(英杰公司)试剂盒进行纯化。对于使用Ad2变异pre-mRNA进行的剪接反应,使用由HeLa S3、2ng pre-mRNA、0.2ng FTZΔi和不同浓度的化合物或DMSO制备的8μg核提取物来制备1μL反应物。在30℃下预孵育15分钟之后,添加1μL剪接活化缓冲液(0.5mM ATP、20mM磷酸肌酸、1.6mM $MgCl_2$),并在30℃下孵育反应物90分钟。然后,用13μL DMSO淬灭反应,并使用25nL进行RT-qPCR。使用以下制备RT-qPCR反应:TaqMan RNA-至-C_T 1-步骤试剂盒(生命技术公司(Life Technologies)),来自剪接反应的RNA,Ad2(正向:ACTCTCTTCCGCATCGCTGT;反向:CCGACGGGTTTCCGATCCAA;探针:CTGTTGGGCTCGCGGTTG)和Ftz(正向:TGGCATCAGATTGCAAAGAC;反向:ACGCCGGGTGATGTATCTAT;探针:CGAAACGCACCCGTCAGACG)mRNA引物-探针集。将Prism 7(Graphpad)用于所形成的剪接产物的非线性回归曲线拟合,并相对于对照(DMSO)样品标准化。鉴于所有测试的有效负载特异性结合至SF3b复合体且展示类似的结合曲线(图1),所以假设所有的有效负载还应将剪接调节到类似的程度。所有的有效负载均明显地调节Ad2.2 pre-mRNA的剪接(图2)。在有效负载存在下,观察到剪接产物的量减少。

[3017] 2.3细胞活力

[3018] 将HCC1954(美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection,ATCC))乳腺导管癌细胞以2000个细胞/孔铺板于平底96孔组织培养板(康宁公司(Corning))中,总体积为90μL的补充有10%胎牛血清(赛默飞世尔科技公司)的组织培养基中。将细胞用200nM至0.03nM的化合物的3倍连续稀释液处理。以一式三份测试每一浓度。在处理时,使用CellTiter-Glo®2.0发光细胞活力测定,根据制造商的建议(普洛麦格公司;#G9241)评价具有未处理细胞的板。将CellTiter-Glo®2.0试剂添加至培养基中,孵育,并在EnVision多标签读取器(珀金埃尔默公司)上进行测定。数值表示时间零(T0)。在化合物处理144小时(T144)之后,还使用CellTiter-Glo®2.0发光细胞活力测定来确定活细胞的数目。使用在时间零(T0)时的发光值、DMSO对照生长(C)和在化合物存在下的测试生长(T144),计算在各化合物浓度水平下的生长百分比。生长抑制百分比计算如下:对于T144>/=T0的浓度,[(T144-T0)/(C-T0)]x100;或对于T144<T0的浓度,[(T144-T0)/T0]x100。使用Prism 7(Graphpad)生成剂量响应曲线图,并使用非线性回归分析和log(抑制剂)对响应—可变斜率(四参数)进行拟合。

[3019] 在HER2扩增的HCC1954乳腺癌细胞中测定所有有效负载的细胞活力剂量响应。除渗透性较弱的有效负载如D25之外,大多数测试的有效负载表现出在单数位纳摩尔范围内的GI_{50}值(即,引起细胞增殖减少50%的化合物的浓度)(图3)。示例性渗透性数据显示于表14中。

[3020] 实例3

[3021] 经由抗体上的半胱氨酸残基,使实例2中评价的示例性有效负载与示例性抗HER2抗体(曲妥珠单抗)缀合。以下描述了示例性抗HER2 ADC的制备和评价。

[3022] 3.1抗体

[3023] 使用曲妥珠单抗抗体(“AB185”)(Molina等人(2001)Cancer Res.[癌症研究]61(12):4744-9)制备抗HER2 ADC(在本文中也称为SMLA)。

[3024] 3.2生物缀合

[3025] 将在PBS缓冲液(pH 7.0)中10mg/mL的抗体(曲妥珠单抗)与5mM TCEP(2-4摩尔当量)(赛默飞世尔科技公司;#77720)混合以使链间二硫键断裂。在22℃下轻柔地混合反应物3小时。然后添加丙二醇(15%v/v),随后添加8摩尔当量的接头-有效负载(6mM于DMSO中的储备液),并充分地混合溶液。在22℃下,将反应物放置于培养箱中的旋转板上。在2小时的缀合之后,通过AKTA GE M150(HiTrapTM 26/10脱盐柱;流速:3mL/min)(GE医疗生物科学集团(GE Healthcare Bio-Sciences))纯化反应混合物以将未缀合的有效负载移至DPBS(pH 7.5)中。经由Amicon超滤器(30kDa,Ultra-4)(EMD密理博公司(EMD Millipore))浓缩所得缀合物并经由0.22μm PVDF一次性过滤器(EMD密理博公司)进行无菌过滤。通过UV-VIS测量最终的澄清溶液,以根据Beer-Lambert定律(A=E*c*l)和以下公式测定抗体浓度([mAb];mole/L)和经缀合的有效负载的浓度([LD];mole/L):

[3026] $A_{280\ nm}=E^{mAb}_{280\ nm}*[mAb]*l+E^{LD}_{280\ nm}*[LD]*l$

[3027] $A_{252\ nm}=E^{mAb}_{252\ nm}*[mAb]*l+E^{LD}_{252nm}*[LD]*l$

[3028] $E^{mAb}_{280\ nm}$:曲妥珠单抗=213,380$cm^{-1}M^{-1}$

[3029] $E^{mAb}_{252\ nm}$:曲妥珠单抗=79,112$cm^{-1}M^{-1}$

[3030] $E^{LD}_{280\ nm}=800cm^{-1}M^{-1}$

[3031] $E^{LD}_{252\ nm}=31,000cm^{-1}M^{-1}$

[3032] 缩写:c-摩尔浓度;l-光路长度(Nanodrop:0.1cm);E-摩尔消光系数;A-吸光度。

[3033] 3.3生物物理学表征

[3034] 分别通过液相色谱-质谱法(LC/MS)、尺寸排阻色谱法(SEC)和反相高效液相色谱法(HPLC)分析示例性抗HER2 ADC的药物与抗体比率(DAR)、聚集百分比和未缀合的有效负载的百分比。通常,缀合物含有少于2%的游离药物且含有少于10%的聚集物。

[3035] 3.3.1LC/MS分析-DAR

[3036] 使用与Agilent G6224A精确质量TOF质谱仪连接的Agilent 1290UPLC系统进行LC/MS分析。在37℃下,用PNGase F(新英格兰实验室(New England Biolabs);#P0705L)使缀合物脱糖基化4小时,用8M Gdn-HCl(西格玛公司(Sigma);#G9284)使其变性,且最后使用DTT(5mM最终浓度)(普洛麦格公司;#V3151)将其分成轻链和重链结构域。将所制备的样品注射至Agilent PLRP-S柱(2.1x150,8μm)上并在室温(RT)下,经28分钟用25% B至50% B的梯度洗脱。流动相A是含0.05% TFA的水,流动相B是含0.04% TFA的乙腈,且流速是1mL/min。由解卷积的质谱,通过对关于轻链(L0或L1)和重链(H0、H1、H2和H3)的未缀合峰和药物缀合峰的强度求加权平均值来计算DAR。使用以下公式计算完整缀合物的总DAR:$(DAR_{LC}*2)+(DAR_{HC}*2)$=总DAR。示例性抗HER2 ADC的DAR值报告于表10-14中。

[3037] 3.3.2SEC分析-聚集

[3038] 使用TOSON-G3000SWXL(#008541)柱,在含0.25mM氯化钾和15%(v/v)IPA的0.2M磷酸钾(pH 7)中以0.75mL/min的流速进行尺寸排阻色谱。通过曲线下面积积分测定高分子量且单体的缀合物组分在280nm下的峰面积吸光度。示例性抗HER2 ADC的单体百分比报告于表10中。

[3039] 3.3.3HPLC分析-游离药物

[3040] 用10体积乙腈使缀合物在冰上沉淀2小时并短暂离心。然后,将含有残留的未缀合的有效负载的上清液注射至Agilent Poroshell120SB-C18 120A柱(4.6x100mm,2.7μm)上,并在室温下经10分钟用45% B至70% B的梯度洗脱。流动相A是100%水,流动相B是100%乙腈,且流速是0.6mL/min,并在252nm处检测。经由UV检测来定量残留的游离药物的量,并与未缀合的接头-有效负载的外标曲线相比较。示例性抗HER2 ADC的游离药物百分比报告于表10中。

[3041] 3.4结合表征

[3042] 3.4.1FACS结合至靶标阳性细胞

[3043] 通过流式细胞术,使用间接免疫荧光法评价未缀合的抗HER2抗体和抗HER2 ADC与靶标阳性细胞的结合。将内源性表达HER2的乳腺癌细胞系JIMT1细胞(DSMZ)铺板($5x10^4$个细胞/孔)于v型底的96孔板(格瑞纳集团(Greiner Bio-One))中,并在4℃下,将其与在测定培养基(补充有10%(w/v)胎牛血清白蛋白(赛默飞世尔科技公司)的RPMI-1640)中稀释至各种浓度的测试化合物一起孵育2小时。然后,将细胞用PBS+2% FBS(FACS缓冲液)洗涤,并在4℃下,在暗处用藻红蛋白(PE)标记的山羊抗人免疫球蛋白G(IgG)抗体(英杰公司)染色40分钟。将细胞用冷FACS缓冲液洗涤,并在室温下,用FluroFix缓冲液(百进生技公司(Biolegend))固定30分钟。用FACS缓冲液洗掉固定剂。使用LSRFortessa流式细胞仪(BD生物科学公司(BD Bioscience))分析固定细胞中PE的几何平均荧光。曲妥珠单抗和T-DM1(与

曲妥珠单抗缀合的DM1)作为对照。

[3044] 所有抗HER2 ADC均展示稳固结合至JIMT1细胞中的HER2。ADC结合与曲妥珠单抗和T-DM1的结合相当(图4)。这表明与有效负载的缀合不影响该抗体的抗原结合亲和力。

[3045] 3.5体外分析

[3046] 3.5.1细胞活力

[3047] 在多种HER2扩增的细胞系中测试抗HER2 ADC抑制细胞生长的能力。使用HCC1954(ATCC,2000个细胞/孔)、N87(ATCC,4000个细胞/孔)、SKBR3(ATCC,3000个细胞/孔)和MCF7(ATCC,1500个细胞/孔)细胞系。如2.3部分中所描述进行细胞活力分析。

[3048] 令人惊讶地,并非所有ADC在HCC1954细胞中均具有活性,尽管这些ADC具有类似的结合曲线(图1)和生物化学特性类似的有效负载。具有某些接头(例如ADL10)和/或某些有效负载(例如D14)的ADC抑制细胞生长的能力较弱,而具有替代性接头(ADL1、ADL5、ADL12)和/或有效负载(例如D1、D25、D2、D4)的ADC在HCC1954细胞中较为强效(图5A以及表10、11和14)。通常在所有细胞系(HCC1954、N87和SKBR3)以及适应症中都观察到这些趋势(HCC1954和SKBR3是高HER2乳腺癌细胞系;N87是高HER2胃癌细胞系)(图5B-5C以及表11和12)。另外,通常,传统的不可裂解接头(如ADL10)不能高效地递送剪接调节剂有效负载。然而,对这些接头的长度的微小改变将使ADC变得更强效,例如比较AB185-ADL10-D1与AB185-ADL12-D1的细胞活力剂量响应(图5A-5C)。

[3049] 为了确保抗HER2 ADC的活性是抗原依赖性的,对HER2阴性MCF7细胞进行处理。没有一个测试的ADC在稳固地靶向HER2阳性细胞的相同的浓度下具有活性(图6和表13)。这表明抗HER2 ADC活性是抗原依赖性的。

[3050]

表10. 示例性抗HER2 ADC的表征

SMLA 批次 ID	有效负载类别	接头	接头名称	DAR	单体百分比	游离药物（%）	浓度 (mg/ml)	CTGlo GMean GI50 (nM) HCC 1954.1	CTGlo GMean LD50 (nM) HCC1954.1	CTGlo 平均响应深度% HCC1954.1
AB185-ADL10-D8	Plad D	ADL0010-01	马来酰亚胺己酰基	2.000	99.000	<1	0.730	>200.000	>200.000	58.601
AB185-ADL10-D1	Plad D	ADL0010-01	马来酰亚胺己酰基	3.600	97.000	<1	3.600	25.502	>200.000	23.963
AB185-ADL5-D17	芳基 Plad	ADL0005-01	mc-Val-Ala-PAB (Qamine)	3.960	98.000	<1	1.400	2.668	>160.000	14.873
AB185-ADL1-D16	芳基 Plad	ADL0001-01	mc-Val-Cit-PABC	4.400	95.000	<1	0.550	2.086	158.245	
AB185-ADL5-D26	芳基 Plad	ADL0005-01	mc-Val-Ala-PAB (Qamine)	4.400	98.000	<1	1.200	0.943	>200.000	
AB185-ADL1-D14	芳基 Plad	ADL0001-01	mc-Val-Cit-PABC	4.340	88.000	<1	4.200	0.925	>200.000	1.271
AB185-ADL5-D15	芳基 Plad	ADL0005-01	mc-Val-Ala-PAB (Qamine)	4.000	98.000	<1	0.780	0.912	>200.000	-45.388

[3051]

表10（续）.示例性抗HER2 ADC的表征

SMLA 批次 ID	有效负载类别	接头	接头名称	DAR	单体百分比	游离药物（%）	浓度 (mg/ml)	CTGlo GMean GI50 (nM) HCC 1954.1	CTGlo GMean LD50 (nM) HCC1954.1	CTGlo 平均响应深度% HCC1954.1
AB185-ADL5-D11	Plad D	ADL0005-01	mc-Val-Ala-PAB (Qamine)	3.700	96.000	<1	0.880	0.806	>93.000	-30.929
AB185-ADL1-D33	芳基 Plad	ADL0001-01	mc-Val-Cit-PABC	8.000	95.000	<1	0.570	0.466	>200.000	-25.859
AB185-ADL1-D22	Plad D	ADL0001-01	mc-Val-Cit-PABC	3.000	99.000	<1	0.840	0.443	>200.000	-7.520
AB185-ADL12-D2	Plad D	ADL0012-01	mal-(CH2)6-（不可裂解）	3.600	98.600	<1	1.060	0.432	>200.000	18.569
AB185-ADL1-D13	Plad B	ADL0001-01	mc-Val-Cit-PABC	5.000	98.000	<1	1.200	0.289	18.948	-94.860
AB185-ADL5-D19	Plad B	ADL0005-01	mc-Val-Ala-PAB (Qamine)	6.600	97.000	<1	3.230	0.278	>200.000	-47.381
AB185-ADL5-D10	Plad D	ADL0005-01	mc-Val-Ala-PAB (Qamine)	4.020	97.000	<1	0.650	0.254	>200.000	-2.273

[3052]

表10（续）.示例性抗HER2 ADC的表征

SMLA 批次 ID	有效负载类别	接头	接头名称	DAR	单体百分比	游离药物（%）	浓度 (mg/ml)	CTGlo GMean GI50 (nM) HCC 1954.1	CTGlo GMean LD50 (nM) HCC1954.1	CTGlo 平均响应深度% HCC1954.1
AB185-ADL6-D9	Plad D	ADL0006-01	mc-Val-Ala-PABC	5.200	98.000	<1	0.500	0.244	4.206	-94.511
AB185-ADL5-D2	Plad D	ADL0005-01	mc-Val-Ala-PAB (Qamine)	4.140	99	<1	4.5	0.206	>200.000	-12.239
AB185-ADL1-D8	Plad D	ADL0001-01	mc-Val-Cit-PABC	7.200	97.000	<1	3.410	0.188	>200.000	-55.079
AB185-ADL5-D2	Plad D	ADL0005-01	mc-Val-Ala-PAB (Qamine)	4.300	99.000	<1	5.440	0.179	>200.000	-18.586
AB185-ADL15-D2	Plad D	ADL0015-01	mal-CH2CH2-O-CH2CH2-（不可裂解）	3.300	98.800	<1	1.600	0.170	>200.000	-23.513
AB185-ADL12-D20	Plad D	ADL0012-01	mal-(CH2)6-（不可裂解）	3.200	98.600	<1	1.390	0.142	>200.000	-57.399
AB185-ADL12-D1	Plad D	ADL0012-01	mal-(CH2)6-（不可裂解）	3.300	98.800	<1	1.620	0.126	>200.000	-34.649

[3053]

表10（续）.示例性抗HER2 ADC的表征

SMLA 批次 ID	有效负载类别	接头	接头名称	DAR	单体百分比	游离药物（%）	浓度 (mg/ml)	CTGlo GMean GI50 (nM) HCC1954.1	CTGlo GMean LD50 (nM) HCC1954.1	CTGlo 平均响应深度% HCC1954.1
T-DM1	DM1	ADL0019-01	SMCC	3.300	98.000	<1	3.300	0.118	2.759	-47.952
AB185-ADL5-D2	Plad D	ADL0005-01	mc-Val-Ala-PAB (Qamine)	8.500	98	<1	5.1	0.086	2.918	-63.909
AB185-ADL6-D1	Plad D	ADL0006-01	mc-Val-Ala-PABC	8.000	97.000	<1	1.200	0.081	2.877	-85.692
AB185-ADL12-D1	Plad D	ADL0012-01	mal-(CH2)6-（不可裂解）	3.000	98.000	<1	2.860	0.081	2.148	-68.999
AB185-ADL12-D22	Plad D	ADL0012-01	mal-(CH2)6-（不可裂解）	4.300	97.000	<1	0.120	0.078	>80.000	28.071
AB185-ADL1-D4	Plad D	ADL0001-01	mc-Val-Cit-PABC	8.000	98.000	<1	3.600	0.073	1.949	-67.199
AB185-ADL15-D1	Plad D	ADL0015-01	mal-CH2CH2-O-CH2CH2-（不可裂解）	3.200	98.800	<1	0.950	0.062	>200.000	-57.829

[3054]

表10（续）. 示例性抗HER2 ADC的表征

SMLA 批次 ID	有效负载类别	接头	接头名称	DAR	单体百分比	游离药物（%）	浓度 (mg/ml)	CTGlo GMean GI50 (nM) HCC 1954.1	CTGlo GMean LD50 (nM) HCC1954.1	CTGlo 平均响应深度% HCC1954.1
AB185-ADL14-D1	Plad D	ADL0014-01	mal-CH2CH2-（不可裂解）	3.500	98.600	<1	0.740	0.055	>200.000	-56.889
AB185-ADL1-D4	Plad D	ADL0001-01	mc-Val-Cit-PABC	2.800	98.000	<1	1.200	0.050	>200.000	-57.212
AB185-ADL1-D1	Plad D	ADL0001-01	mc-Val-Cit-PABC	3.900	99	<1	5.2	0.046	0.374	-78.519
AB185-ADL1-D1	Plad D	ADL0001-01	mc-Val-Cit-PABC	4.000	98.000	<1	3.500	0.042	0.447	-77.970
AB185-ADL5-D25	Plad D 2wtt	ADL0005-01	mc-Val-Ala-PAB (Qamine)	6.000	98.000	<1	0.170	0.038	>113.000	-46.265
AB185-ADL1-D1	Plad D	ADL0001-01	mc-Val-Cit-PABC	7.700	98.000	<1	4.200	0.034	0.120	-87.001

表 11. 示例性抗 HER2 ADC-HCC1954 细胞

[3055]

	ADC				有效负载		
样品	DAR	GI50(nM)	LD50(nM)	Rmin(%)	GI50(nM)	LD50(nM)	Rmin(%)
AB185-ADL12-D1	3.1	0.064	4.86	-78.393	1.853	5.485	-75.579
AB185-ADL1-D8	7.2	0.075	1.01	-72.765	2.638	11.175	-80.463
T-DM1	3.3	0.083	>200	-64.227			
AB185-ADL1-D1	4.04	0.089	2.078	-74.165	1.853	5.485	-75.579
AB185-ADL1-D4	4.9	0.145	1.217	-75.638	1.699	6.374	-81.34
AB185-ADL5-D2	4.1	0.18	>200	-36.513	0.6	2.758	-78.732
AB185-ADL5-D15	4	0.503	>200	-20.387	0.358	2.037	-84.412
AB185-ADL1-D18	3.8	5.994	>200	-8.011	0.208	0.787	-90.055
AB185-ADL12-D2	3.6	6.129	>200	18.763	0.6	2.758	-78.732
AB185-ADL10-D1	3.5	6.642	>200	8.138	1.853	5.485	-75.579
AB185-ADL5-D25	6.3	0.038	>113.000	-51.503	167.54	>200	26.882
AB185	N/A	>200	>200	76.916			

[3056] 表12.示例性抗HER2 ADC-N87细胞

[3057]

	SMLA				有效负载		
样品	DAR	GI50(nM)	LD50(nM)	Rmin(%)	GI50(nM)	LD50(nM)	Rmin(%)
AB185-ADL1-D4	4.9	0.093	>200	-40.056	3.241	38.774	-81.775
AB185-ADL5-D15	4	0.106	>200	-50.886	0.41	>200	-68.045
AB185-ADL5-D25	6.3	0.11	133	-43.398	>200	>200	40.364
AB185-ADL12-D1	3.1	0.111	>200	-41.228	7.041	>200	-40.041
AB185-ADL1-D18	3.8	0.113	>200	-39.509	0.275	2.993	-92.127
AB185-ADL1-D1	4.04	0.163	>200	-41.075	7.041	>200	-40.041
T-DM1	3.3	0.168	>200	-20.785			
AB185-ADL1-D8	7.2	0.172	>200	-31.708	8.844	>200	-34.052
AB185-ADL5-D2	4.1	0.206	>200	-51.328	0.749	>200	-72.706
AB185-ADL12-D2	3.6	0.243	>200	-9.79	0.749	>200	-72.706
AB185-ADL1-D14	4.3	0.296	>200	-26.143	2.925	>200	-52.662
AB185-ADL10-D1	3.5	1.531	>200	30.759	7.041	>200	-40.041
AB185	N/A	>200	>200	77.029			

[3058] 表13.示例性抗HER2 ADC-MCF7细胞

[3059]

	SMLA				有效负载		
样品	DAR	GI50 (nM)	LD50 (nM)	Rmin (%)	GI50 (nM)	LD50 (nM)	Rmin (%)
T-DM1	3.3	38.503	>200	3.876			
AB185-ADL12-D1	3.1	57.818	>200	-30.172	16.998	135.42	-63.414
AB185-ADL5-D25	6.3	80.856	113	28.12	>200	>200	65.639
AB185-ADL1-D4	4.9	189.392	>200	43.848	11.416	96.46	-60.923
AB185-ADL5-D2	4.1	>200	>200	56.182	2.851	30.318	-66.915
AB185-ADL1-D8	7.2	>200	>200	61.169	29.614	181.521	-62.957
AB185-ADL1-D18	3.8	>200	>200	48.851	0.883	7.697	-68.226
AB185-ADL5-D15	4	>200	>200	49.619	0.961	130.398	-68.503
AB185-ADL12-D2	3.6	>200	>200	48.868	2.851	30.318	-66.915
AB185-ADL10-D1	3.5	>200	>200	52.699	16.998	135.42	-63.414
AB185-ADL1-D14	4.3	>200	>200	49.325	5.288	77.198	-61.886
AB185-ADL1-D1	4.04	>200	>200	59.181	16.998	135.42	-63.414
AB185	N/A	>200	>200	72.747			

[3060] 3.5.2ADC有效负载的Caco-2渗透性

[3061] 在37℃、95％湿度、5％ CO_2下,在transwell 24孔板中培养Caco-2细胞21天。通过TEER(跨上皮电阻)和荧光黄确定细胞单层的完整性。以一式两份,将10μM有效负载分别掺加于细胞单层的两侧上。通过紧接地在处理之后(t＝0)和孵育2小时之后,从两个腔室获取等分试样,来测定自顶部至底外侧(A-B)方向和自底外侧至顶部(B-A)方向的渗透速率。用含内标的有机溶剂使样品中的蛋白质沉淀并通过LC-MS/MS(SCIEX;API 5500)分析。使用在两个方向上有效负载/内标的面积比响应随时间的变化生成渗透率(cm/sec)值。通过B-A/A-B相除来计算外排率。对照化合物的低和高渗透以及外排表现正如预期。渗透率值报告于表14中。

[3062] 3.5.3ADC有效负载的化学稳定性

[3063] 在Mcilvane(柠檬酸盐-磷酸盐)缓冲液pH 5.5(波士顿生物制品公司(Boston Bioproducts);#BB-2466)中孵育有效负载,最终浓度为20μM(低于储备溶液中的0.5％DMSO)。将有效负载溶液和内标抽移液入96孔板中,在UPLC(Waters Aquity H类别)上运行,并分析初始色谱信号(t＝0)。柱是Waters UPLC HSS T3 1.8μm 2.1x50mm柱(#186003538)。经1分钟采用流动相A的从95％至10％的梯度,其中A是0.1％甲酸在水中,流动相B是0.1％甲酸在乙腈中(流速0.9mL/min)。在37℃下,将有效负载溶液的其余部分保持在板振荡器(Eppendorf ThermoMixer)中。在37℃下孵育24小时、72小时和96小时后,重复通过UPLC进行的样品分析。测定在以下三个时间点的有效负载和内标的面积比响应:时间0、第1天、以及第3天或第4天。时间0设定为100。将以后时间点的面积比响应与时间0相比较。残余物百分比计算如下:(第X天的面积比/时间0的面积比)*100＝％残余物。在Excel中,通过比较％残余物的对数和时间点计算直线的斜率。在Excel中,通过In(2)/斜率计算半衰期并报告于表14中。

[3064]

表14. 示例性抗HER2 ADC和相应有效负载的表征

SMLA 批次 ID	接头	DAR	SMLA 活性			有效负载类别	质量	有效负载SF3B1结合与mRNA剪接调节			有效负载细胞与致死率			有效负载细胞渗透性			有效负载化学稳定性
			CTGlo GMean GI50 (nM) HCC1954.1	CTGlo GMean LD50 (nM) HCC1954.1	Rmin (%)（最大致死率）			SPA-ATS GMean IC50 (nM) SF3B1 (WT) HELA.2	qPCR-IVS-ATS GMean IC50 (nM) Ad2.1 HELA.2	qPCR-IVS-ATS GMean IC50 (nM) Ad2.2 HELA.2	CTGlo-ATS GMean GI50 (nM) 72h THP1.1	CTGlo-ATS GMean LD50 (nM) 72h THP1.1	CTGlo-ATS 平均响应深度 % 72h THP1.1	渗透性平均值 Caco-2 A-B Perm (10e-6 cm/s)	渗透性平均值 Caco-2 B-A Perm (10e-6 cm/s)	外排率	稳定性平均值 稳定性 t1/2 pH5.5 (d)
AB185-ADL5-D25	ADL0005-01	6.3	0.038	>113.000	-51.503	Pld D Zwitt	722.917	14.557	243.749	50.858	348.114	2078.811	-77.246	0.137	0.349	2.547	5
AB185-ADL1-D1	ADL0001-01	4	0.042	0.447	-78.554	Pld D	636.827	6.085	17.568	15.853	11.085	41.408	-100.615	0.14	2.05	14.643	3.95
AB185-ADL1-D4	ADL0001-01	2.8	0.05	>200.000	-75.774	Pld D	664.837	8.778	20.887	17.321	10.943	33.329	-99.957	0.1	1.79	17.9	4.4
AB185-ADL14-D1	ADL0014-01	3.5	0.055	>200.000	-59.225	Pld D	636.827	6.085	17.568	15.853	11.085	41.408	-100.615	0.14	2.05	14.643	3.95
AB185-ADL15-D1	ADL0015-01	3.2	0.062	>200.000	-60.34	Pld D	636.827	6.085	17.568	15.853	11.085	41.408	-100.615	0.14	2.05	14.643	3.95
AB185-ADL1-D8	ADL0001-01	7.2	0.075	1.01	-72.765	Pld D	664.837	5.921	11.403	9.034	8.745	38.969	-99.92	0.128	2.027	15.875	3.525
AB185-ADL12-D22	ADL0012-01	4.3	0.078	>80.000	27.157	Pld D Zwitt	708.89	29.188	66.293	49.131	223.348	1594.636	-78.119	0.14	0.16	1.143	
AB185-ADL12-D1	ADL0012-01	3.1	0.081	2.148	-85.136	Pld D	636.827	6.085	17.568	15.853	11.085	41.408	-100.615	0.14	2.05	14.643	3.95
AB185-ADL6-D1	ADL0006-01	3.8	0.081	2.877	-98.59	Pld D	636.827	6.085	17.568	15.853	11.085	41.408	-100.615	0.14	2.05	14.643	3.95
T-DM1	SMCC	3.3	0.118	2.759	-56	DM1	738.29	>1200.000	>25000.000	>25000.000	0.503	3.287	-93.785	0.38	28.6	75.283	1.3
AB185-ADL12-D21	ADL0012-01	3.3	0.126	>200.000	-39.566	Pld D	652.87										

[3065]

表14（续）. 示例性抗HER2 ADC和相应有效负载的表征

SMLA批次ID	接头	DAR	SMLA 活性			有效负载类别	质量	有效负载SF3B1结合与mRNA剪接调节			有效负载细胞效力与致死率			有效负载细胞渗透性			有效负载化学稳定性
			CTGlo GMean GI50 (nM) IICC1054.1	CTGlo GMean LD50 (nM) IICC1054.1	Rmin (%最大致死率)			SPA-ATS GMean IC50 (nM) SF3B1 (WT) HELA.2	qPCR-IVS-ATS GMean IC50 (nM) Ad2.1 HELA.2	qPCR-IVS-ATS GMean IC50 (nM) Ad2.2 HELA.2	CTGlo-ATS GMean GI50 (nM) 72h THP1.1	CTGlo-ATS GMean LD50 (nM) 72h THP1.1	CTGlo-ATS 平均响应深度 %72h THP1.1	渗透性平均值 Caco-2 A-B Perm (10e-6 cm/s)	渗透性平均值 Caco-2 B-A Perm (10e-6 cm/s)	外排率	稳定性平均值 稳定性 t1/2 pH5.5 (d)
AB185-ADL12-D20	ADL0012-01	3.2	0.142	>200.000	-61.497	Pld D	638.843	18.251	10.929	8.748	28.336	113.557	-100.664	0.16	0.38	2.375	>7.000
AB185-ADL15-D2	ADL0015-01	3.3	0.17	>200.000	-25.778	Pld D	650.854	15.533	19.133	15.342	2.015	11.708	-100.218	0.624	14.2	22.756	4
AB185-ADL5-D2	ADL0005-01	4.1	0.179	>200.000	-19.945	Pld D	650.854	15.533	19.133	15.342	2.015	11.708	-100.218	0.624	14.2	22.756	4
AB185-ADL6-D9	ADL0006-01	5.2	0.244	4.206	-95.509	Pld B	648.838	2.117	20.224	18.121	0.87	3.56	-99.938	1.15	16.11	14.009	<1.000
AB185-ADL5-D10	ADL0005-01	4	0.254	>200.000	-7.125	Pld D	664.881	9.228	16.317	14.658	1.819	8.454	-99.951	1.81	23.5	12.983	>7.000
AB185-ADL1-D13	ADL0001-01	5	0.289	18.948	-95.484	Pld B	648.838	2.085	11.287	8.816	0.892	3.368	-99.941	0.9	17.17	19.078	<1.000
AB185-ADL12-D2	ADL0012-01	3.6	0.432	>200.000	17.824	Pld D	650.854	15.533	19.133	15.342	2.015	11.708	-100.218	0.624	14.2	22.756	4
AB185-ADL1-D22	ADL0001-01	2.9	0.443	>200.000	27.157	Pld D Zwitt	708.89	29.188	66.293	49.131	223.348	1594.636	-78.119	0.14	0.16	1.143	

[3066]

表14（续）.示例性抗HER2 ADC和相应有效负载的表征

SMLA批次 ID	接头	DAR	SMLA 活性			有效负载类别	质量	有效负载SF3B1结合与mRNA剪接调节			有效负载细胞与致死率			有效负载细胞渗透性			有效负载化学稳定性
			CTGlo GMean GI50 (nM) HCC1954.1	CTGlo GMean LD50 (nM) HCC1954.1	Rmin (%)（最大致死率）			SPA-ATS GMean IC50 (nM) SF3B1 (WT) HELA.2	qPCR-IVS-ATS GMean IC50 (nM) Ad2.1 HELA.2	qPCR-IVS-ATS GMean IC50 (nM) Ad2.2 HELA.2	CTGlo-ATS GMean GI50 (nM) 72h THP1.1	CTGlo-ATS GMean LD50 (nM) 72h THP1.1	CTGlo-ATS 平均响应深度 % 72h THP1.1	渗透性平均值 Caco-2 A-B Perm (10e-6 cm/s)	渗透性平均值 Caco-2 B-A Perm (10e-6 cm/s)	外排率	稳定性平均值稳定性 t1/2 pH5.5 (d)
AB185-ADL1-D33	ADL0001-01	8	0.466	>200.000	-34.274	ArPlad Zwitt	630.758	35.694	33.402	72.404	195.752	5202.992	-53.128	0.13	0.53	4.077	
AB185-ADL5-D11	ADL0005-01	3.7	0.806	>93.000	-57.844	Plad D	718.973	5.99	10.545	9.364	1.352	8.086	-100.481	0.87	10.56	12.138	3.75
AB185-ADL5-D15	ADL0005-01	4	0.912	>200.000	-50.337	ArPlad	668.811	1.648	4.632	4.928	1.017	11.038	-99.595	3.43	28.9	7.843	>7.000
AB185-ADL1-D14	ADL0001-01	4.3	0.925	>200.000	3.753	ArPlad	654.784	1.924	10.022	8.598	3.584	25.594	-99.209	0.06	12.13	202.167	>7.000
AB185-ADL5-D26	ADL0005-01	4.3	0.943	>200.000	-29	ArPlad	694.849	5.505	18.838	14.314	3.719	28.483	-99.401	15.955	41.125	2.578	>7.000
AB185-ADL1-D16	ADL0001-01	4.3	2.086	158.245	-55	ArPlad	660.822	5.564	16.01	15.144	2.975	21.46	-99.681	0.72	23.3	32.361	>7.000
AB185-ADL5-D17	ADL0005-01	4	2.668	>160.000	12.42	ArPlad	587.733	1.82	17.943	9.44	2.827	24.908	-99.033	20.25	18.18	0.898	
AB185-ADL1-D18	ADL0001-01	3.8	5.994	>200	-8.011	Plad B	620.828	0.99	12.686	12.709	0.883	4.365	-99.621	1.19	27.4	23.025	
AB185-ADL10-D1	ADL0010-01	3.5	6.642	>200	8.138	Plad D	636.827	6.085	17.568	15.853	11.085	41.408	-100.615	0.14	2.05	14.643	3.95

[3067] 3.5.4细胞内剪接PD测定

[3068] 为了探寻示例性抗HER2 ADC的作用机制,在用递增浓度的ADC处理的HCC1954细胞中检查SLC25A19成熟转录物的剪接情况。

[3069] 将HCC1954细胞(ATCC)以1x10^{5}个细胞/孔、90μL/孔铺板于无酚红的RPMI+10％

FBS培养基(ATCC)中。在3倍稀释剂量响应中,用缀合物处理细胞。分别在24小时或6小时之后,用含有25μL/mL RNAsin(普洛麦格公司)的50μL CL缓冲液(IgePal CA-630、5M NaCl、1M Tris HCl 1M pH 7.4于水中)溶解细胞,并在室温下在振荡器上孵育45分钟。根据制造商的建议,使用所得混合物(0.5μL)评估Taqman快速病毒1步主混合物(应用生物系统公司(Applied Biosystems))逆转录PCR反应中的剪接调节,该反应使用以下Taqman引物:SLC25A19(英杰公司,Hs00222265_m1);RPLP0(英杰公司,Hs99999902_m1);18S(英杰公司,Hs99999901_s1)。

[3070] T-DM1对照(曲妥珠单抗与作为有效负载的微管破坏剂)并不影响SLC25A19剪接(图7)。相比之下,在不同测试细胞系中展示强效生长抑制活性的抗HER2 ADC(图5)还表现出强效剪接调节,这表明了中靶作用机制(图7)。同样,在细胞活力测定中展现较低效力的抗HER2 ADC在剪接调节方面效力较弱。

[3071] 3.5.5旁观者细胞杀伤测定

[3072] 在旁观者细胞杀伤测定中测量示例性抗HER2缀合物杀伤靶标阳性细胞和邻近的靶标阴性细胞的能力。将非小细胞肺癌细胞NCI-H1568(ATCC)工程化以表达荧光素酶。在GeneArt(赛默飞世尔科技公司)合成cDNA,并将其克隆至pLVX-EF1a目的载体(赛默飞世尔科技公司)中。单独地,根据制造商的说明书利用TransIT®病毒转染系统(米卢斯生物有限公司(Mirus Bio LLC);#MIR6003),将NCI-H1568工程化以表达人HER2(克隆到pLenti6.3/V5-DEST中,赛默飞世尔科技公司)。为评估缀合物的旁观者活性,将2000个靶标阳性(经HER2转导)NCI-H1568细胞和2000个靶标阴性(luc标记的)NCI-H1568细胞一起铺板于透明96孔圆底板(康宁公司)中,并与以一式三份以30-0.005nM的3倍连续稀释液给予的缀合物一起孵育。在处理时,根据制造商的建议,使用OneGlo®荧光素酶测定系统(普洛麦格公司)和CellTiter-Glo®2.0发光细胞活力测定系统(普洛麦格公司)分析具有未处理细胞的板,以建立时间零(T0)。在培养6天之后,通过OneGlo®荧光素酶测定系统(普洛麦格公司)分析残留细胞群,以测量靶标阴性细胞的存活率。通过CellTiter-Glo®2.0发光细胞活力测定系统(T144)测量总体活力。如2.3部分中所描述计算剂量响应曲线。

[3073] 旁观者杀伤测定的设计允许仅追踪靶标阴性细胞,这些细胞的消除依赖于由邻近的靶标阳性细胞所释放的分解代谢物的吸收。如上文所论述,在以下三个条件下铺板细胞:(1)单独的靶标阴性(luc标记的)细胞;(2)单独的靶标阳性细胞;以及(3)靶标阴性细胞与靶标阳性细胞的共培养物。当用CellTiter-Glo®试剂读取板时,可追踪所有细胞群的活力以确定抗原依赖性ADC活性。相比之下,当使用OneGlo®试剂时,仅靶标阴性(luc标记的)细胞会具有信号。

[3074] 靶标阴性(luc标记的)细胞当独立地培养时对用抗HER2 ADC进行的处理不敏感(图8)。然而,当将靶标阴性细胞与靶标阳性细胞一起培养时,用抗HER2 ADC进行处理导致对靶标阴性细胞的杀伤增加。这些数据表明,靶标阴性细胞当与靶标阳性细胞共培养时更有效地被抗HER2 ADC杀伤,在本文中称为旁观者杀伤。旁观者杀伤可与脱靶杀伤相区分,脱靶杀伤定义为在无靶标阳性细胞存在且不依赖于与靶标阳性细胞共培养下独立地杀伤靶标(抗原)阴性细胞。

[3075] 在本实验中,AB185-ADL5-D2相较于AB185-ADL1-D1展示出增加的杀伤抗原异质癌

细胞群的能力。不希望受理论束缚,此效力差异可归因于D2中一个甲基基团的添加,这使得有效负载的细胞效力和渗透性相较于D1增加三倍(参见表14)。D2 ADC处理抗原异质癌细胞群的有效性与AB185-MC-Val-Cit-MMAE对照ADC相当。

[3076] 3.6体内分析

[3077] 在体内评估展现强效剪接调节和细胞生长抑制的示例性抗HER2ADC。

[3078] 3.6.1HCC1954异种移植物功效研究

[3079] 为了研究示例性抗HER2 ADC在小鼠异种移植模型中的功效,将HCC1954(ATCC)乳腺导管癌细胞(10×10^6个细胞/100μL/1:1RPMI:人工基底膜体积)皮下植入雌性CB17-SCID小鼠的侧腹中。用单次IV快速注射剂量的缀合物(在pH 7.4的DPBS中配制)或媒介物对照治疗小鼠。以图9中指示的量给予动物。每周两次监测所有动物的肿瘤生长和体重,直至它们达到以下端点中任一个:(1)过量肿瘤体积(通过使用椭球体公式计算:(长度×宽度^2)/2);或(2)出现任何健康问题,如过量体重减轻。所有动物研究均根据关于实验室动物的护理和使用的H3生物医学指导(H3 Biomedicine Guide for the Care and Use of Laboratory Animals)进行。

[3080] 用低至2mg/kg的单次剂量的抗HER2 ADC(AB185-ADL5-D2或AB185-ADL1-D1)进行的治疗导致肿瘤显著消退(图9)。还观察到经缀合的有效负载的剂量响应,使得具有较高DAR值(DAR为约4)的抗HER2 ADC展示出相对于剂量相配的抗体T-DM1对照增加的功效和减慢的肿瘤再生长。另外,经由ADC靶向肿瘤的有效负载相对于相应未缀合的有效负载更有效。

[3081] 实例4

[3082] 为了确定实例3中所描述的示例性抗HER2 ADC的特性是否能外推至靶向替代性抗原和/或适应症的其他ADC,将所选有效负载与示例性抗CD138抗体(B-B4)和示例性抗EPH2A抗体(1C1)缀合。CD138是在恶性浆细胞上,例如多发性骨髓瘤中表达,而EPH2A更通常在多种恶性病中表达。以下描述了示例性抗CD138 ADC和抗EPH2A ADC的制备和评价。

[3083] 4.1抗体

[3084] 分别使用B-B4抗体(“AB205”)(Tassone等人(2004)Blood[血液]104:3688-96)和1C1抗体(“AB206”)(Jackson等人(2008)Cancer Res.[癌症研究]68(22):9367-74)来制备抗CD138 ADC和抗EPH2A ADC。

[3085] 4.2生物缀合

[3086] 将在PBS缓冲液(pH 7.0)中10mg/mL的抗体(B-B4或1C1)与5mM TCEP(2-4摩尔当量)(赛默飞世尔科技公司;#77720)混合以使链间二硫键断裂。在22℃下轻柔地混合反应物3小时。然后添加丙二醇(15%v/v),随后添加8摩尔当量的接头-有效负载(6mM于DMSO中的储备液),并充分地混合溶液。在22℃下,将反应物放置于培养箱中的旋转板上。在2小时的缀合之后,通过AKTA GE M150(HiTrapTM 26/10脱盐柱;流速:3mL/min)(GE医疗生物科学集团)纯化反应混合物以将未缀合的有效负载移至DPBS(pH 7.5)中。经由Amicon超滤器(30kDa,Ultra-4)(EMD密理博公司(EMD Millipore))浓缩所得缀合物并经由0.22μm PVDF一次性过滤器(EMD密理博公司)进行无菌过滤。通过UV-VIS测量最终的澄清溶液,以根据Beer-Lambert定律(A=E*c*l)和以下公式测定抗体浓度([mAb];mole/L)和经缀合的有效负载的浓度([LD];mole/L):

[3087] $A_{280\ nm}=E^{mAb}_{280\ nm}*[mAb]*l+E^{LD}_{280\ nm}*[LD]*l$

[3088] $A_{252\ nm}=E^{mAb}_{252\ nm}*[mAb]*l+E^{LD}_{252\ nm}*[LD]*l$

[3089] $E^{mAb}_{280\ nm}$:B-B4＝224,320$cm^{-1}M^{-1}$

[3090] 1C1＝215,380$cm^{-1}M^{-1}$

[3091] $E^{mAb}_{252\ nm}$:B-B4＝83,670$cm^{-1}M^{-1}$

[3092] 1C1＝80,337$cm^{-1}M^{-1}$;

[3093] $E^{LD}_{280\ nm}$＝800$cm^{-1}M^{-1}$

[3094] $E^{LD}_{252\ nm}$＝31,000$cm^{-1}M^{-1}$

[3095] 缩写:c-摩尔浓度;l-光路长度(Nanodrop:0.1cm);E-摩尔消光系数;A-吸光度。

[3096] 4.3生物物理学表征

[3097] 分别通过液相色谱-质谱法(LC/MS)、尺寸排阻色谱法(SEC)和反相高效液相色谱法(HPLC)分析示例性抗CD138 ADC和抗EPHA2 ADC的DAR、聚集百分比和未缀合的有效负载的百分比。本文所描述的所有缀合物均含有少于2%的游离药物且含有少于10%的聚集物。

[3098] 4.3.1LC/MS分析-DAR

[3099] 如3.3.1部分中所描述进行LC/MS分析。示例性抗CD138 ADC和抗EPHA2 ADC的DAR值报告于表15-18中。

[3100] 4.3.2SEC分析-聚集

[3101] 如3.3.2部分中所描述进行SEC分析。示例性抗CD138 ADC和抗EPHA2 ADC的单体百分比报告于表15和17中。

[3102] 4.3.3HPLC分析-游离药物

[3103] 如3.3.3部分中所描述进行HPLC分析。示例性抗CD138 ADC和抗EPHA2 ADC的游离药物百分比报告于表15和17中。

[3104] 4.4体外分析

[3105] 4.4.1细胞活力

[3106] 在表达CD138的MOLP8多发性骨髓瘤细胞系中测试抗CD138ADC。类似地,在表达EPHA2的PC3前列腺癌细胞系中测试抗EPHA2ADC。如2.3部分中所描述进行细胞活力分析。

[3107] 有效负载与抗CD138抗体(图10和表16)和抗EPHA2抗体(图11和表18)的缀合引起与3.5.1部分中关于抗HER2 ADC所论述类似的趋势。特别地,具有某些接头(例如ADL12)和/或有效负载(例如D1、D25、D4)的ADC在表达抗原的细胞中展示最高效力。一致地,替代性有效负载(例如D14)尽管为强效小分子,但经由抗体介导的递送而抑制细胞生长的能力较弱。

[3108] 表15.示例性抗CD138 ADC的表征

[3109]

SMLA 批次 ID	有效负载类别	接头	DAR	单体百分比	游离药物（%）	浓度 (mg/ml)
AB205-ADL1-D14	芳基Plad	ADL0001	2.900	92.000	<2	1.010
AB205-ADL5-D15	芳基Plad	ADL0005	2.800	95.000	<2	1.060
AB205-ADL5-D19	Plad B	ADL0005	4.900	95.000	<2	0.880
AB205-ADL1-D1	Plad D	ADL0001	5.000	98.000	<2	0.620
AB205-ADL1-D4	Plad D	ADL0001	4.800	98.000	<2	1.010
AB205-ADL5-D25	Plad D Zwitt	ADL0005	6.400	98.000	<2	0.890
AB205-ADL10-D1	Plad D	ADL0010	3.400	96.000	<2	0.750

[3110] 表15(续).示例性抗CD138 ADC的表征

[3111]

SMLA 批次 ID	有效负载类别	接头	DAR	单体百分比	游离药物（%）	浓度 (mg/ml)
AB205-ADL12-D1	Plad D	ADL0012	3.800	97.000	<2	0.830
AB205-ADL12-D2	Plad D	ADL0012	3.300	97.000	<2	0.970

[3112] 表16.示例性抗CD138 ADC-MOLP8细胞

[3113]

	SMLA				有效负载		
样品	DAR	GI50 (nM)	LD50 (nM)	Rmin (%)	GI50 (nM)	LD50 (nM)	Rmin (%)
AB205-ADL1-D1	5	<0.061	0.656	-100.099	6.885	25.712	-100.248
AB205-ADL5-D15	2.8	0.268	>400	2.419	0.776	9.178	-100.198
AB205-ADL5-D19	4.9	<0.061	>400	-46.23	0.84	4.58	-62.2
AB205-ADL10-D1	3.4	0.08	>400	-25.099	6.885	25.712	-100.248
AB205-ADL12-D1	3.8	<0.061	0.168	-99.851	6.885	25.712	-100.248
AB205-ADL12-D2	3.3	<0.061	>400	-53.125	0.316	5.035	-100.198
AB205-ADL1-D14	3	<0.061	>400	-74.008	1.9	8.5	-61
AB205-ADL1-D4	4.8	<0.061	0.535	-99.306	1.151	12.99	-101.935
AB205-ADL5-D25	6.4	<0.061	11.669	-76.736	149.874	>400	5.94

[3114] 表17.示例性抗EPHA2 ADC的表征

[3115]

SMLA 批次 ID	有效负载类别	接头	DAR	单体百分比	游离药物（%）	浓度 (mg/ml)
AB206-ADL1-D1	Plad D	ADL0001	5.600	99.000	<2	2.060
AB206-ADL5-D2	Plad D	ADL0005	6.300	99.000	<2	1.900
AB206-ADL1-D4	Plad D	ADL0001	6.000	95.000	<2	1.140
AB206-ADL1-D8	Plad D	ADL0001	6.500	95.000	<2	1.660
AB206-ADL1-D14	芳基Plad	ADL0001	3.600	80.000	<2	1.620
AB206-ADL5-D19	Plad B	ADL0005	4.600	97.000	<2	0.960
AB206-ADL5-D15	芳基Plad	ADL0005	4.200	95.000	<2	0.820

[3116] 表17(续).示例性抗EPHA2 ADC的表征

[3117]

SMLA 批次 ID	有效负载类别	接头	DAR	单体百分比	游离药物（%）	浓度 (mg/ml)
AB206-ADL5-D25	Plad D Zwitt	ADL0005	5.000	96.000	<2	1.130
AB206-ADL10-D1	Plad D	ADL0010	2.700	97.000	<2	1.620
AB206-ADL12-D1	Plad D	ADL0012	6.400	90.000	<2	0.670
AB206-ADL12-D2	Plad D	ADL0012	6.300	90.000	<2	0.850

[3118] 表18.示例性抗EPHA2 ADC-PC3细胞

[3119]

	SMLA				有效负载		
样品	DAR	GI50 (nM)	LD50 (nM)	Rmin (%)	GI50 (nM)	LD50 (nM)	Rmin (%)
AB206-ADL1-D8	6.5	0.175	95.51	-68.678	16.622	177.783	-68.37
AB206-ADL1-D4	6	<0.061	2.732	-69.096	11.057	>400	-55.97
AB206-ADL1-D14	3.6	3.046	>400	-49.267	3.877	>400	-79.835
AB206-ADL12-D1	6.4	0.808	>400	-64.516	13.291	>400	-71.987
AB206-ADL12-D2	6.3	78.977	>400	17.376	2.391	>400	-68.803
AB206-ADL5-D19	4.6	71.73	>400	19.765	1.41	>400	-29.33
AB206-ADL10-D1	2.7	>400	>400	43.796	13.291	>400	-71.987
AB206-ADL5-D15	4.2	9.959	>400	2.441	3.877	>400	-79.835
AB206-ADL5-D25	5	28.078	>400	20.041	>400	>400	77.524
AB206-ADL1-D1	5.6	<0.061	>400	-59.643	13.291	>400	-71.987
AB206-ADL5-D2	6.3	1.003	>400	16.465	2.391	>400	-68.803

[3120] 实例5

[3121] 如下所述评估示例性抗HER2 ADC的体外和/或体内稳定性。

[3122] 5.1血浆中AB185-ADL1-D1的总抗体和经缀合的有效负载

[3123] 在用AB185-ADL1-D1体外治疗(5.1.1部分)或体内治疗(5.1.2部分)后,通过免疫沉淀LC/MS/MS技术定量血浆中总抗体(TAb)和经缀合的有效负载(CP)的水平。在小鼠血浆中,在分别0.5-100μg/mL和0.5-500ng/mL的$1/x^2$加权下,TAb和CP的定量拟合呈线性。将血浆样品与稳定同位素标记的通用单克隆人抗体内标(SIu^{TM}MAB,西格玛公司,圣路易斯,密苏里州)和10mM PBS(pH7.4)混合并在室温下孵育一小时。将Dynabeads^{R} MyOne^{TM}链霉抗生物素蛋白T1磁珠(赛默飞世尔科技公司)添加至混合物中并在室温下再孵育30分钟。使用磁力

架结合珠粒,顺序地用CHAPS缓冲液然后PBS缓冲液洗涤。用30mM HCl自珠粒洗脱出目的分析物。使用单独的洗脱液等分试样定量TAb或CP。对于TAb,添加pH 8.3的Tris-HCl,随后添加胰蛋白酶并在37℃下孵育过夜。对于CP,添加1M乙酸铵,随后添加氘化的有效负载内标和组织蛋白酶B,并在25℃下孵育过夜。通过LC/MS/MS分析样品并使用分析物与内标的面积比来定量,且与各自的校准曲线相比较。为计算CP浓度,针对有效负载的分子量、AB185-ADL1-D1的分子量和DAR(药物与抗体比率)校正TAb的浓度。

[3124] 5.1.1AB185-ADL1-D1在小鼠、大鼠和猴血浆中的体外稳定性

[3125] 向来自小鼠、大鼠和猴的汇集的血浆(生物再生公司(Bioreclamation))和PBS中掺加AB185-ADL1-D1(4.81mg/mL)以达到50μg/mL的最终浓度。在37℃、95%湿度、5% CO_2下以以下方式孵育样品4天,该方式使得pH稳定并使非特异性结合和蒸发最小化。在4小时、24小时、48小时、72小时和96小时取出等分试样并在-70℃下储存直至加工。将样品解冻并加工以使用以上关于总抗体和经缀合的有效负载所描述的方法(5.1部分)进行生物分析。对于每一基质,时间0设定为100%。对于每一基质,将以后时间点的面积比响应分别与时间0相比较。残余物百分比计算如下:(第X天的面积比/时间0的面积比)*100=%残余物。在Excel中,通过比较%残余物的对数和时间点计算直线的斜率。在Excel中,通过In(2)/斜率计算半衰期。

[3126] 发现来自AB185-ADL1-D1的总抗体在缓冲液中以及在所有物种的血浆中稳定,在4天内仅展现适度的沉淀(图12A)。在4天内维持经缀合的(完整)有效负载D1水平(图12B)。

[3127] 5.1.2在单次IV剂量的AB185-ADL1-D1之后,小鼠血浆中的Snapshot药代动力学(PK)

[3128] 用10mg/kg或20mg/kg单次IV剂量的AB185-ADL1-D1治疗小鼠(CB17-SCID),随后在给药后24小时、48小时和72小时,在肝素锂管(n=3个/时间点/剂量组)中进行终末收集(心脏穿刺)。在4℃下,以5000rpm离心血液5分钟以移除红细胞,并在-80℃下储存血浆直至加工。将样品解冻并加工以使用以上关于总抗体和经缀合的有效负载所描述的方法(5.1部分)进行生物分析。

[3129] 在单次IV剂量的AB185-ADL1-D1之后,超过400ng/mL的完整D1有效负载在给药后72小时保持与AB185抗体缀合(图13)。相较于携带具有类似作用机制的有效负载的替代性ADC,AB185-ADL1-D1 ADC展示改善的稳定性。Puthenveetil等人(Bioconjugate Chem.[生物共轭化学](2016)27:1880-8)中所报导的基于泰兰他汀A的ADC相对不太稳定,且在72小时内显示有效负载的完全生物转化(即,乙酸酯完全水解)。

[3130] 5.2AB185-ADL14-D1和AB185-ADL5-D25的加速稳定性测试

[3131] 将新鲜产生的SMLA(在Eppendorf管中各自约1mg,4-5mg/mL)离心并在280nm下通过UV吸收(NanoDrop)测量以测定蛋白质浓度。然后,在37℃水浴中孵育样品并在以下四个时间点取样:0(新鲜制备时)、1天、2天和4天。在-80℃下储存在不同时间点获取的样品,直至完成最后一次取样。在22℃下解冻之后,用SEC、疏水相互作用色谱法(HIC)和反相MS(RP-HPLC)分析样品以定量抗体聚集物/片段和DAR。在四个时间点的AB185-ADL14-D1和AB185-ADL5-D25的聚集百分比、浓度和DAR值(HIC和RP-HPLC)显示于表19中。

[3132] 表19.所选抗HER2 ADC的加速稳定性测试

[3133]

ADC	储存缓冲液	天数@37C	聚集 (%)	浓度 (mg/mL)	DAR	
					HIC	RP-HPLC
AB185-ADL14-D1	DPBS(pH 7.5)	0	0.68	4.99	4.3	4.32
		1	1.18	4.98	4.29	4.31
		2	1.31	5.12	4.33	4.32
		4	2.08	5.02	4.28	4.27
AB185-ADL5-D25	DPBS(pH 7.5)	0	0.84	5.05	4.54	4.22
		1	1.14	4.16	4.44	4.19
		2	1.41	4.52	4.74	4.19
		4	2.43	3.98	4.64	4.12

[3134] 实例6

[3135] 为确定用基于剪接调节剂的ADC(即,本文所描述的示例性ADC)处理的细胞是否能产生新抗原(这些新抗原适合于使初始T细胞致敏而转变成效应细胞(即,能够靶向新抗原的效应细胞)),进行以下实验。

[3136] 6.1RNA测序和蛋白质配体组实验

[3137] 6.1.1概述

[3138] 探寻在ADC处理之后转录组的变化。用意图触发稳健的异常mRNA剪接的浓度(分别为4nM和1.3nM)的ADC(AB185-ADL1-D1)处理两个过度表达HER2的细胞系,这两个细胞系中一个为工程化的非小细胞肺癌细胞系(NCI-H1568)且一个为HER2扩增的乳腺癌细胞系(HCC1954)。在处理后24小时,进行RNAseq实验。这些实验展示,多种mRNA转录物表现出改变的剪接模式。

[3139] 然后,为探寻所鉴定的转录物是否能翻译且作为新抗原呈递到肿瘤细胞MHC1复合体上,选择允许mRNA转录物翻译、但尚未出现广泛细胞毒性作用(因为这些作用可能损害供分析的细胞材料的收集)的时间点。然后,用3nM ADC处理NCI-H1568和HCC1954细胞系48小时,并通过LC-MS/MS分析MHC1结合的肽组。根据达到8-14个氨基酸的片段的初级肽尺寸(定义为关于结合至MHC1的尺寸限制标准)过滤肽组数据,然后针对已知人类蛋白质进行过滤。所鉴定的肽被表征为自身抗原,不管检测到这些肽的条件和细胞系如何。针对RNAseq数据的3框翻译对所有残留肽序列进行绘图。使用用于评价肽序列的严格标准(包括排除以下:在任何未处理样品中鉴定的任何肽、在典型开放阅读框中未编码的任何肽、以及不由mRNA的跨外显子接合点部分编码的任何肽,其中外显子接合点通过用AB185-ADL1-D1处理而改变),鉴定了四个MHC1结合的新肽。关于示例性RNA测序和蛋白质配体组实验的示意图,参见图14。

[3140] 6.1.2详细方法

[3141] 6.1.2.1ADC处理的细胞的RNA测序

[3142] 将HCC1954细胞和过度表达HER2的NCI-H1568(ATCC)细胞以1×10^5个细胞/孔铺板于6孔组织培养板(康宁公司)的各个孔中。分别用磷酸盐缓冲盐水或1.3nM和4nM的AB185-ADL1-D1处理细胞24小时。使用RNAeasy微型试剂盒(凯杰公司(Qiagen))自细胞提取总RNA,并评估质量和数量(2100生物分析仪上的RNA 6000Nano LabChip试剂盒,均来自安捷伦公司(Agilent))。根据标准Illumina方案,制备Poly-A选择的RNA-Seq文库。使用DNA-1000试剂盒,在2100生物分析仪(二者均来自安捷伦公司)上检查cDNA文库的质量并进行定量。汇

集文库并在HiSeq2000(依诺米那公司(Illumina))上测序以获得101个碱基的双端读数。

[3143] 使用两遍比对(two-pass alignment)35,通过STAR 2.4.2a将原始序列读数与人参考序列hg19进行比对,并使用Kallisto 0.42.4(Bray等人(2016)Nat Biotechnol.[自然生物技术]34(5):525-7),针对映射至GRCh37的GENCODE注释v 25进行同种型定量。通过界定6nt(距剪接位点-3nt且在剪接位点之后+3)外显子-内含子边界区域并对与这些区域完全重叠的比对进行计数来估算保留的内含子计数。汇集每组所有技术重复实验内的所有原始接合点计数,包括来自外显子-内含子边界的那些计数。使用二项z测试,针对经处理与未处理样品池之间比例的差异评估差异性接合点使用。基于共享剪接位点的所有剪接接合点(和外显子-内含子边界)计算比例,其类似于剪接百分比(PSI)测量结果。为保持高斯假设(Gaussian assumption),仅考虑将经处理组与未处理组中共享剪接位点且总接合点计数(共享剪接位点的所有接合点的原始计数总和)大于或等于10个读数的那些用于分析。与假发现率(FDR)校正的q值(对于经处理('异常')接合点,为≤0.05;且对于未处理('典型')接合点,为≤0.20)对应的z分数视为是显著的。

[3144] 将共享剪接位点且具有至少一个在经处理样品中明显上调的接合点或至少一个在未处理样品中明显上调的接合点的两个或更多剪接接合点分别视为异常或典型接合点。在视为差异性剪接的事件中,需要异常和典型接合点同时存在。在内含子保留事件的情况下,两个外显子-内含子边界(5′和3′剪接位点)以及桥连这两个边界的接合点需要是显著的。

[3145] 6.1.2.2ADC处理的细胞的MHC1结合的肽组

[3146] 将HCC1954细胞和过度表达HER2的NCI-H1568(ATCC)细胞以1×10^8个细胞铺板于15cm^2的组织培养板(康宁公司)上。用磷酸盐缓冲盐水或3nM AB185-ADL1-D1处理细胞48小时。以机械方式自这些板移出细胞,并根据Bassani-Sternberg等人((2015)Mol Cell Proteomics[分子与细胞蛋白质组学]14(3):658-73)所述进行加工。简言之,该程序涉及溶解来自细胞膜中的MHC-1蛋白质复合体,通过免疫沉淀富集MHC-1蛋白质及其结合的肽,选择性洗脱并纯化经结合肽,且通过LC/MS/MS分析鉴定并定量肽。使用从其杂交瘤细胞系HB-95TM纯化的单克隆抗体W6/32进行免疫沉淀。在Q Exactive HF仪器上进行质谱分析。使用MaxQuant软件套件(1.5.7.13版)处理在本研究中获取的原始文件,以使用人类蛋白质序列数据库(22017版)进行肽和蛋白质的鉴定和定量。除此数据库外,还包括基于对AB185-ADL1-D1处理的HCC1954和NCI-H1568细胞进行RNAseq实验而预测的转录物变体。MaxQuant执行6框翻译并整合所获得的肽序列以与MS2谱图进行匹配。进一步针对AB185-ADL1-D1处理的样品所特有的肽序列以及针对由AB185-ADL1-D1处理调节的mRNA剪接接合点所编码的肽手动地过滤数据(图14)。通过高严格度过滤RNAseq和MHC-1结合的配体组数据鉴定了四种新肽。这些新肽由四个基因编码。使在本文中称为新抗原1、新抗原2、新抗原3和新抗原4的四种新肽的蛋白质序列延伸,以用于以下触发免疫细胞致敏的实验中。除侧接氨基酸序列之外,经延伸的蛋白质序列还掺入新肽序列本身。延伸的蛋白质序列更好地促进树突状细胞对蛋白质的吸收,且能够在具有不同HLA同种型的模型中进行抗原呈递和T细胞致敏。

[3147] 6.2T细胞致敏实验

[3148] 6.2.1概述

[3149] 本实验是在体外重建在正常人类次级淋巴器官(例如肿瘤引流淋巴结)中发生的

相互作用。在该实验中,从外周血单核细胞(PBMC)分离单核细胞并通过在细胞因子混合物中培养,诱导其分化成树突状细胞(DC)。在分化成为成熟DC之后,将成熟DC与经延伸的新肽序列一起培养。在培养期间,成熟DC吸收这些肽,将其加工成片段,并将其呈递到MHC1上以使CD8 T细胞致敏。然后,将DC与来自同一供体的额外PBMC混合并在细胞因子混合物中孵育约2周以刺激CD8 T细胞的活化。孵育后,将细胞转移至再涂布有用于致敏的这些肽的ELISpot板上,并通过IFNγ的分泌来监测对CD8 T细胞的重新刺激。然后,对ELISpot板进行处理并获取图像,且对IFNγ斑点进行计数以估算活性CD8 T细胞的数量。关于示例性T细胞致敏实验的示意图,参见图15。

[3150] 6.2.2详细方法

[3151] 6.2.2.1新抗原介导的T细胞致敏以及ELISpot活化

[3152] 整体外周血单核细胞(PBMC)购自多位供应商(StemExpress、HemaCare、精准医疗公司(Precision Medicine)),并按照Wölfl和Greenberg((2014)Nat Prot.[自然实验手册]9(4):950-66)所述将其用于产生抗原反应性CD8+T细胞(图15)。简言之,将冷冻的PBMC($5x10^7$个细胞)解冻并铺板于T-75组织培养塑料器具(康宁公司)上的补充有5%人AB血清和1%青霉素/链霉素的RPMI1640中,保持2-3小时。移除并丢弃非粘附细胞,并在补充有20ng/mL GM-CSF和20ng/mL IL-4的RPMI1640/5%人血清中培养粘附细胞5天。在第6天,培养基进一步补充有20ng/mL TNF-α。在第7天,收集成熟DC,计数并装载由MHC1-肽组实验所鉴定的新肽(图16)。分离细胞,并以10μg/10^6个细胞/mL的最终浓度装载各肽且孵育1天。在第8天,用20μg/mL丝裂霉素C处理DC达30分钟并充分地洗涤。在处理DC的同时,解冻10^8个匹配的PBMC并用RPMI1640洗涤。然后,在T25烧瓶中,将PBMC与DC以10:1的比率混合于补充有30ng/mL IL-21的10mL RPMI1640/5%人AB血清中。在共培养3天(第11天)之后,再添加10mL新鲜培养基并补充5ng/mL最终浓度的IL-7和IL-15。又共培养3天(第14天)之后,再添加补充有5ng/mL最终浓度的IL-7和IL-15的10mL新鲜培养基,并将共培养物移至T-75烧瓶中。在第17天,再添加补充有10ng/mL最终浓度的IL-7和IL-15的20mL培养基,并将细胞转移至T-175烧瓶中。在第20天,收集细胞并按照制造商的说明书(R&D系统公司(R&D Systems))进行ELISpot测定。使用每孔10μg/mL最终浓度的肽预装载各孔,细胞密度为$2x10^5$个细胞/孔,以一式两份接种并孵育过夜。显现IFNγ斑点,并按照制造商的说明书,在AID ELISpot读取器上读取(图17A-17D)。

[3153] 由抗原致敏实验得到的示例性数据显示于图17A-17D中。如图15中所概述,使供体来源的PBMC批料分化成DC并用新肽致敏。分析ELISpot数据显示,在健康供体PBMC中,通过DC呈递新肽而初始T细胞致敏可引起效应(CD8)T细胞群的抗原特异性扩增和成熟。如通过IFNγ分泌证实,这些T细胞群仅在抗原肽存在下展现抗原特异性重新活化,而在非致敏肽存在下则不展现。

[3154] RT-qPCR

[3155] 根据制造商的说明书,使用RNeasy Mini,使用DNA酶I处理剂(凯杰公司)和20μL的使用Superscript VILO逆转录酶(赛默飞世尔科技公司)逆转录的1-2μg RNA,从细胞系中纯化出RNA。分离出RNA溶解产物,并根据制造商的说明书,使用TaqMan基因表达细胞-至-CT试剂盒(赛默飞世尔科技公司)将其逆转录。使用TaqMan基因表达主混合物(赛默飞世尔科技公司),使用靶向新抗原接合点的、与GAPDH RNA VIC-PL(赛默飞世尔科技公司)形成双螺

旋的转录物探针进行定量PCR,并使用ΔΔCt方法定量。

[3156] 实例7

[3157] 7.1RNA测序和蛋白质配体组实验

[3158] 7.1.1方法

[3159] 如实例6(6.1部分)中所描述进行RNA测序和蛋白质配体组实验。关于示例性RNA测序和MHC1配体组实验的示意图,参见图14。

[3160] 7.1.2结果

[3161] 通过高严格度过滤RNAseq和MHC1结合的配体组数据鉴定了二十九种新肽(表20)。选出四种新肽并延伸以进行以下的触发免疫细胞致敏的实验。这四种所选新肽在表20中以粗体显示。

[3162] 表20.新肽

[3163]

新肽		SEQ ID NO	接合点(HG19)	基因	事件类型	于以下观察到
1	SPTLPPRSL	37	chr12: 49663470 - 49663610: +	TUBA1C	内含子保留	H1568

2	HPSIKRGLSSL	38	chr12: 42729776 - 42781257: +	PPHLN1	外显子跳跃	H1568
3	LLLPHHVL	39	chr12: 49663470 - 49663610: +	TUBA1C	内含子保留	H1568
4	RTAPGVRPPF	40	chr14: 35182767 - 35183743: -	CFL2	内含子保留	H1568
5	RPQKSIQAL	41	chr10: 28822963 - 28823162: +	WAC	内含子保留	H1568
6	APAPPPLPA	42	chr17: 80009840 - 80011149: +	GPS1	内含子保留	H1568
7	RPRPSFPVSL	43	chr7: 55087058 - 55134942: +	EGFR	内含子保留	H1568
8	RPKHGDGFSL	44	chr11: 57472287 - 57472444: -	MED19	内含子保留	H1568
9	GPAPGKTGL	45	chr7: 75932393 - 75933118: +	HSBP1	内含子保留	H1568
10	**EAARKGNSL**	**46**	**chr1: 53480715 - 53504588: +**	**SCP2**	**外显子跳跃**	**H1568**
11	**RIKEKIEEL**	**47**	**chr9: 72897499 - 72912881: +**	**SMC5**	**外显子跳跃**	**H1568**
12	**EIKKRFRQF**	**48**	**chr1: 28531860 - 28541450: -**	**DNAJC8**	**外显子跳跃**	**H1568**
13	**HESAAMAET**	**49**	**chr11: 102272937 - 102323254: -**	**TMEM123**	**外显子跳跃**	**HCC1954**
14	ALKLKQVGV	50	chr1: 153610924 - 153617539: +	CHTOP	外显子跳跃	H1568
15	DLKKRHITF	51	chr13: 41323417 - 41331008: -	MRPS31	外显子跳跃	H1568
16	DVKRNDIAM	52	chr1: 41213277 - 41218822: +	NFYC	外显子跳跃	H1568
17	IPSDHILTPA	53	chr6: 149718900 - 149720239: +	TAB2	外显子跳跃	H1568
18	TVFSTSSLK	54	chr11: 61197654 - 61213412: +	SDHAF2	外显子跳跃	H1568
19	ITSCLLNF	55	chr5: 137892555 - 137893090: -	HSPA9	内含子保留	H1568
20	RASPVRGQL	56	chr7: 75677544 - 75677893: +	MDH2	内含子保留	H1568
21	VVRKPVIAL	57	chr1: 36923582 - 36929406: -	MRPS15	外显子跳跃	H1568
22	LLSEKKKIS	58	chr6: 31750622 - 31750872: -	VARS	内含子保留	H1568
23	APASKPRPRL	59	chr19: 3573798 - 3574380: +	HMG20B	内含子保留	H1568
24	RYGQLSEKF	60	chr19: 33076813 - 33078158: +	PDCD5	外显子跳跃	HCC1954
25	VYISNVSKL	61	chr3: 53920961 - 53925796: -	SELK	外显子跳跃	HCC1954
26	LPTKETPSF	62	chr2: 85133241 - 85133394: +	TMSB10	Alt 3'ss	HCC1954

[3164]

27	GEAPPPPPA	63	chr17: 80223672 - 80231181: -	CSNK1D	内含子保留	HCC1954
28	LEEISKQEI	64	chr17: 27804724 - 27807385: +	TAOK1	外显子跳跃	HCC1954
29	IYNHITVKI	65	chr4: 2886393 - 2896308: +	ADD1	外显子跳跃	HCC1954

[3165]

[3166] 使这二十九种新肽的蛋白质序列延伸。除侧接氨基酸序列之外，经延伸的蛋白质序列还掺入新肽序列本身。延伸的蛋白质序列更好地促进树突状细胞对蛋白质的吸收，且能够在具有不同HLA同种型的模型中进行抗原呈递和T细胞致敏。表21中列出了这二十九种延伸的新肽的氨基酸序列。

[3167] 表21.延伸的新肽的氨基酸序列

[3168]

基因	SEQ ID NO	延伸的新肽氨基酸序列*
TUBA1C	66	VDLEPTVIGELTSVTQVRSQGAGTGGLSWGGSAGHSPTLPPRSLSLLLL PHHVLQMKFALALTASSSTLSNSSQARKMLPITMPEGTTPLARRSLTSC WTEFASWLTSAPVFRASWFSTALVGELVLGSPRCSWNVSQLIMARSPSW SSPFTRRPRFPQL
PPHLN1	67	APPRSHPSIKRGLSSL
CFL2	68	MVRRARWPGGRGEARKAPRTAPGVRPPF
WAC	69	WVNCLFVSGRAAAGGGGGGAVPPYLELAGPPFLLLTLIRIGLGRRSGRA GGRAGTQCGGERGPGFAAFRPLRPFRRLRVCAVCVRGSALGRSVGLPRG GAAGAPFSSSPAPHPRRVLCRCLLFLFFSCHDRRGDSQPYQVPAEAGVE GLEGAGGGREGLLLERRPQKSIQALRCNTSETSTADPLKIPGLVPLALS SKV
GPS1	70	MPLPVQVFNLQVTSRGRPGPPRPRAPRHWGRAEVEQGRGACARSRSGTL RAGPPRAARVGGCRAEGASPPWLRAAIGGRRAAPAPPPLPAAHGRGSRP PRR
EGFR	71	QPAQPRTGAPARRPRPRPSFPVSLRSAAPPTGTAGGTGRFVLRPGESGA GGGGDAWDTGLQARRGTAAGTSGAPNRSQLSSLTFPAQLRRIGVSGRKP GAGGRLGPGSRTCAPRCLPRARRGPGAHPRGGRCPPAETALFREAEEGT QKYSLPSDPAGQAAF
MED19	72	FRLHTGPVSPVGGRRQMGRPKHGDGFSLQVCSFIMEQNG
HSBP1	73	GVVEITGEPPCSCRGEEEASRAGRAGGVRLKRGSRGPGELNVGPAPGKT GLLIPLLRNWECGSLLRALSAL
SCP2	74	KMGFPEAARKGNSL
SMC5	75	LEARIKEKIEELQQALI
DNAJC8	76	EIKKRFRQFKQAVYKQ
TMEM123	77	AHESAAMAETLQHVPS
CHTOP	78	NRPSVQAALKLKQVGV
MRPS31	79	KTDDLKKRHITFTLGCGIC
NFYC	80	MKLDEDVKRNDIAMAI
TAB2	81	NSISQIPSDHILTPALFITFMTILDL

[3169]

SDHAF2	82	TVFSTSSLKLNQPQKYLKMKSWPC
HSPA9	83	AEEDRRKKVITSCLLNFNLSKAQS
MDH2	84	RSFSTSAQVGQTRGGLQAEAPRPGPRASPVRGQL
MRPS15	85	RGYVVRKPVIALSVKI
VARS	86	VDMDFGTGGQGAGPVGRGKDWSCTLAVHLLSEKKKISFSQIDRAWGGSQ GTVLDKWGPGVVSELHPSAKEVSVGRNSVESLMTWAS
HMG20B	87	EKGSHEEEVRVPALSWGRPRAPAPASKPRPRLDLNCLWLRPQPIFLWKL RPRPVPAATPLTGPLPL
PDCD5	88	RYGQLSEKFNRRKVMDS
SELK	89	MVYISNVSKLCFSKM
TMSB10	90	NTLPTKETPSFLLNPHTSWVPRPHREAPRLRVGVAAPLQRPLPALHSH
CSNK1D	91	FGDIYLGEAPPPPPAARRPGPCGCQDQARSRKEVVAPAGSPRKSRHRRI VARTQRPLG
TAOK1	92	GSASDLLEEISKQEISF
ADD1	93	QLIYNHITVKINLQGD

[3170] *下划线表示源自典型转录物开放阅读框的氨基酸(即，典型肽序列)。

[3171] 7.2T细胞致敏实验

[3172] 7.2.1概述

[3173] 关于示例性T细胞致敏实验的示意图,参见图15。

[3174] 7.2.2材料

[3175] 用于T细胞致敏的材料:

[3176] • RPMI 1640培养基(赛默飞世尔科技公司,目录号A10491-01)

[3177] • 青霉素/链霉素(100x,赛默飞世尔科技公司,目录号15140122)

[3178] • 人血清AB型(西格玛公司,目录号H3667-100ML)

[3179] • 重组人IL-4(派普泰克公司(Peprotech),目录号200-04)

[3180] • 重组人GM-CSF(派普泰克公司,目录号300-03)

[3181] • 重组人TNF-α(派普泰克公司,目录号300-01A)

[3182] • 人IL-7(派普泰克公司,目录号200-07)

[3183] • 人IL-15(派普泰克公司,目录号200-15)

[3184] • 人IL-21(派普泰克公司,目录号200-21)

[3185] • 肽(新英格兰肽公司(New England Peptide)-95%纯度,溶解于DMSO中得到10μg/μL浓度的1000X储备液)

[3186] • 关于人IFN-y的ELISpot试剂盒(R&D系统公司,目录号EL285)

[3187] 7.2.3方法

[3188] 7.2.3.1人单核细胞源性树突状细胞的产生和成熟以及新肽的装载

[3189] 将冷冻或新鲜PBMC解冻并在预温热的RPMI培养基中洗涤一次,且保留非粘附细胞的等分试样用于基线TCR测序。使PBMC以5×10^6个细胞/mL再悬浮于10mL树突状细胞(DC)培养基(RPMI1640,补充有5%人AB血清和1%青霉素/链霉素)中,总计5000万个细胞。将细胞转移至T-75组织培养塑料器具中并在37℃、5%CO_2下孵育2-3小时。在轻柔振荡后,移除并丢弃非粘附细胞,且用预温热的DC培养基洗涤粘附(富含单核细胞)细胞三次。将补充有20ng/mL最终浓度的GM-CSF和20ng/mL IL-4的10mL DC培养基添加至粘附细胞中。在37℃、5% CO_2和100%湿度下孵育粘附细胞5天。在第6天,添加重组TNF-α达到20ng/mL的最终浓度,再保持48小时。在第7天,收集DC并计数,然后装载新肽(各自为10μg/1×10^6个细胞/mL)或无新肽对照。在第8天,收获细胞作为成熟DC。在37℃下,用20μg/mL最终浓度的丝裂霉素C处理成熟DC达30分钟,随后彻底洗涤,然后与T细胞共孵育以进行致敏。

[3190] 7.2.3.2开始与自体T细胞的共培养

[3191] 在第0天,将冷冻或新鲜解冻并在预温热的培养基中洗涤一次。然后,在T25烧瓶中,使PBMC再悬浮并与DC以10:1($10x10^6$:$1x10^6$个细胞)的比率混合于补充有30ng/mL IL-21的10mL RPMI1640/5%人AB血清中。在共培养3天(第3天)之后,再添加10mL新鲜培养基并补充5ng/mL最终浓度的IL-7和IL-15。又共培养3天(第6天)之后,再添加补充有5ng/mL最终浓度的IL-7和IL-15的10mL新鲜培养基,并将共培养物移至T-75烧瓶中。在第9天,再添加补充有10ng/mL最终浓度的IL-7和IL-15的20mL培养基,并将细胞转移至T-175烧瓶中。在第11-12天,收集细胞,按照制造商的说明书(R&D系统公司)进行ELISpot测定,并进行TCR测序($1x10^6$个细胞)。使用每孔10μg/mL最终浓度的肽预装载各孔,细胞密度为$2x10^5$个细胞/孔,以一式两份接种并孵育过夜。显现IFNγ斑点,并按照制造商的说明书,在AID ELISpot读取

器上读取。

[3192] 7.2.4结果

[3193] 由抗原致敏实验得到的示例性数据提供于表22中。

[3194] 表22.T细胞致敏数据

[3195]

供体	ELISpot 响应	基因	SEQ ID NO	HLA （预测的结合）
1	+++	DNAJC8	76	A*31: 01/B*40: 13
1	+	TMEM123	77	A*02: 01
2	+++	TMEM123	77	A*02: 01
2	+	SCP2	74	B*39: 06
6	+	DNAJC8	76	C*07: 01/B*27
7	+++	DNAJC8	76	C*07: 02/C*06: 02
8	+++	DNAJC8	76	C*07: 01
8	+	SMC5	75	C*07: 01/B*08: 02
8	+++	SCP2	74	C*03: 03

[3196] 如图15中所概述,使供体来源的PBMC批料分化成DC并用新肽致敏。分析ELISpot数据显示,在健康供体PBMC中,通过DC呈递新肽而初始T细胞致敏可引起效应(CD8)T细胞群的抗原特异性扩增和成熟。如通过IFNγ分泌证实,这些T细胞群仅在抗原肽存在下展现抗原特异性重新活化,而在非致敏肽存在下则不展现。数据还表明,不一定基于HLA来预测对新肽的应答。

[3197] 实例8

[3198] 8.1新肽的鉴定

[3199] 8.1.1概述

[3200] 为鉴定由剪接调节得到的新肽,使用标准靶标-诱饵方法,将来自典型和剪接调节的蛋白质组的、长度为8至11个氨基酸且预测结合至I类MHC的肽分别针对串联质谱进行匹配。首先,使可变剪接的mRNA转录物翻译并与参考蛋白质组相比较。接下来,搜索不匹配参考蛋白质组的谱图以匹配新颖肽。有关用于鉴定由剪接调节得到的新颖肽的示例性方法的示意图,参见图14。

[3201] 8.1.2方法

[3202] 8.1.2.1创建潜在新肽的数据库

[3203] 为了生成潜在新肽的数据库,鉴定未在参考蛋白质组中发现的跨接合点肽或含内含子的肽(参见Li等人(2011)Mol.Cell Proteomics[分子与细胞蛋白质组学]10(5):M110.006536)。从手动审查的蛋白质序列选择源自参考蛋白质组的肽并下载。此外,针对在正常组织中发现的接合点过滤蛋白质。作为替代方法,可以自剪接事件翻译完整蛋白质,搜索跨接合点肽或含内含子的肽,然后通过BLAST与参考蛋白质组相匹配。

[3204] 为避免不必要的统计测试,仅使用预测可能结合至MHC的肽。使用NetMHCPan和/或MHCnuggets软件评价蛋白质序列(来自参考蛋白质组以及具有外显子跳跃或内含子保留的转录物的预测翻译)与MHC1等位基因的高亲和力结合。对于这两个软件包,(i)通过原始亲和力结合预测强度(较弱结合的阈值为500nM),或(ii)通过选择大量随机真实肽并鉴定针对这些肽的预测结合强度的分布,来选择具有较强或较弱结合的匹配(hit)。然后,将任何新颖肽的预测结合强度与该分布进行匹配。通过后一方法(方法(ii))测量的较强和较弱结合的阈值分别是在这些随机真实肽的前0.5%或前2.0%内的预测结合强度(参见Nielsen和Andreatta(2016)Genome Med.[基因组医学]8(1):33)。当前,MHC预测受限于长度为8至11个氨基酸且包含在免疫表位数据库(IEDB)中的肽序列。

[3205] 8.1.2.2通过RNAseq和RiboSeq鉴定剪接调节源性转录物

[3206] 一些新肽源自较大肽结构域(例如TUBA1C),而来自其余翻译区域的肽片段可能有无法检测到的风险。这可能是由于未检测区域的增强的降解、MHC1结合亲和力或与通过质谱法(MS)检测相关联的技术难题。通常,RNAseq分析会过高估计预测的新肽的数量(因为并非所有可变剪接的转录物均被翻译),而MHC1-配体组会低估预测的新肽的数量。

[3207] 为确定新肽的清单,鉴定出作为翻译成蛋白质的标记物的、结合核糖体的、可用的剪接调节源性变体剪接接合点(Andreev等人(2017)Nucleic Acids Res.[核酸研究]45(2):513-26)。RiboSeq或核糖体图谱分析允许检测如通过结合至转录物的核糖体的存在所证实的、正进行活性翻译的mRNA序列(以及变异结构域),以及特定外显子接合点结构域。

[3208] 实例9

[3209] 9.1示例性抗HER2 ADC的体外分析

[3210] 9.1.1方法

[3211] 将HCC1954、NCI-N87或MCF7细胞(ATCC)以2.5x10^3个细胞/孔、90μL/孔铺板于不含酚红的RPMI+10% FBS(ATCC)或EMEM+10% FBS+胰岛素(0.01mg/mL)(对于MCF7)中。在3倍稀释剂量响应中,用缀合物处理细胞(n=3个孔/条件)。在24小时之后,用含有25μL/mL RNAsin(普洛麦格公司)的50μL CL缓冲液(IgePal CA-630、5M NaCl、1M Tris HCl 1M pH 7.4于水中)溶解细胞,并在室温下在振荡器上孵育45分钟。根据制造商的建议,使用所得混合物(1μL)评估Taqman快速病毒1步主混合物(应用生物系统公司)逆转录PCR反应中的剪接调节,该反应使用以下Taqman引物:SLC25A19(英杰公司,Hs00222265_m1);FBXW5(IDT,正向引物:CACACCAGATCGGCATCAA(SEQ ID NO:37),反向引物:CGATGATGTGTCCGTGTATGT(SEQ ID NO:38),探针:ATCCTGCCACACCAGATGACCAC(SEQ ID NO:39),染料:FAM,猝灭剂:ZEN/Iowa Black FQ);TAOK1(IDT,正向引物:CTGCTTCGGATTTACTAGAAGAGATA(SEQ ID NO:40),反向引物:GCGTTCCCACAAAGGAATTG(SEQ ID NO:41),探针:TGCTGACTTTGGCTCTGCTTCCAT(SEQ ID NO:42),染料:FAM,猝灭剂:ZEN/Iowa Black FQ);RPLP0(英杰公司,Hs99999902_m1)。9.2示例性抗HER2 ADC的体内功效和药效学(PD)

[3212] 9.2.1方法-在NCI-N87异种移植模型中的体内功效

[3213] 根据有关动物研究的联邦、州、市和AAALAC认证政策,在马萨诸塞州剑桥市饲养了CB17-SCID小鼠(查尔斯河实验室(Charles River Laboratories))。NCI-N87人胃癌细胞系购自美国典型培养物保藏中心(ATCC号CRL-5822)。将第14代细胞用于肿瘤实验。最后在2016年9月测试细胞中的鼠类病原体且在2018年12月测试支原体。

[3214] 使用带有25Ga针头的注射器将含500万个细胞/0.1mL的单细胞悬浮液(50% ATCC改良型RPMI-1640培养基,目录号A10491-01(赛默飞世尔科技公司);以及50% Corning人工基底膜,目录号356254(VWR科技公司(VWR Scientific)))皮下注射于右侧腹上。在第0天,将小鼠以180-183mm^3的平均肿瘤体积随机分组,n=8只/组进行功效研究且n=4只/组进行药效学(PD)研究。在第1天,每7天静脉内施用5mL/kg体积的测试物(10mg/kg),持续2个周期,以进行功效研究;使用单一疗程进行PD评估。在给予单次剂量后24小时、48小时、72小时和/或96小时(这取决于测试物),对PD组中的动物实施安乐死。每周测量肿瘤体积和体重一次或两次,直至研究终止(第61天)。使用公式长度x宽度^2/2计算肿瘤体积。在研究期间,移除达到端点(在任何方向上肿瘤尺寸≥20mm^3或肿瘤体积≥起始体重x100)或出现肿瘤溃疡或眼睛感染的小鼠。

[3215] 在生物学安全工作橱中配制化合物。测试物媒介物是pH 7.4的磷酸盐缓冲盐水(目录号A10010-049(赛默飞世尔科技公司))。如表23中所述分组。

[3216] 抗肿瘤活性计算如下:

[3217] %T/C公式=治疗组/对照组*100

[3218] %TGI公式=(媒介物组平均值$_{第X天}$-治疗组平均值$_{第X天}$)/媒介物组平均值$_{第X天}$*100,其中第X天是第22天。

[3219] 9.2.2方法-体内PD(RT-qPCR)

[3220] 使用微阵列试剂盒中的MagMAX-96以及MagMAX Express-96深孔磁性粒子处理器(赛默飞世尔科技公司)从肿瘤样品中纯化RNA。将肿瘤样品(大小50-100mg)收集于RNAlater缓冲液中并保持在-80℃直至RNA分离。通过将2-3个陶瓷珠粒和1mL Tri试剂添加至含有肿瘤的管中,随后在Omni Bead Ruptor 24仪器(欧姆尼国际公司(Omni International))上破坏来进行组织均质化。根据制造商的说明书进行RNA分离。

[3221] 分离出RNA溶解产物,并根据制造商的说明书,使用TaqMan快速病毒1步主混合物(赛默飞世尔科技公司)进行逆转录。

[3222] 使用TaqMan基因表达主混合物(赛默飞世尔科技公司),使用靶向FBXW5或TAOK1接合点的、与RPLP0 RNA VIC-PL(赛默飞世尔科技公司)形成双螺旋的转录物探针,从cDNA进行定量PCR并使用ΔΔCt方法定量。

[3223] 表23.组

[3224]

测试物(功效)	测试物(PD)
媒介物(PBS)	媒介物(PBS)
TDM1	TDM1
曲妥珠单抗(AB185)	曲妥珠单抗(AB185)
AB185-ADL5-D2	AB185-ADL5-D2
AB185-ADL1-D4	AB185-ADL1-D4

[3225]

AB185-ADL5-D15	AB185-ADL5-D15
AB185-ADL14-D1	AB185-ADL14-D1

[3226] 9.3结果

[3227] 体外分析:

[3228] 在不同谱系的二个HER2阳性细胞系(HCC1954乳腺癌和N87胃癌)、以及一个HER2阴性细胞系(MCF7)中测量示例性抗HER2ADC的抗增殖活性。测量生长抑制的效率(GI50效力)以及响应深度(R min,相较于对照)。在ADC处理之后,通过qPCR测量指定细胞系上代表性管家基因SLC25A19中的可变剪接。测量GI50和剪接响应的深度。体外分析的结果显示于表25中。

[3229] 通常,经测试的抗HER2 ADC对抗原阳性细胞系显示出有利的效力且对抗原阴性细胞系中的活力和剪接显示出最低响应。ADC在细胞杀伤和SLC25A19的可变接合点剪接的完全性方面的响应深度不同。ADC针对各抗原阳性细胞系分为以下四个类别之一:1)高响应深度/致死率和高剪接响应;2)高响应深度/致死率和低剪接响应;3)低响应深度/致死率和高剪接响应;或4)低细胞致死率和低剪接响应。几个ADC对N87胃癌细胞系显示出有利的第3类行为。AB185-ADL13-D4在HCC1954和N87细胞中具有一致的致死率且显示较强的剪接响应深度。该一致的抗原特异性致死率通常是ADC所希望的,且水溶性接头将允许良好缀合物规格下的甚至更高的药物负载。接头转换成ADL23(EVC三肽)出人意料地改变了这两种细胞系的特征。AB185-ADL1-D12的独特之处还在于,其对HCC1954具有高度致死性,但该有效负载对多种实体瘤和血液肿瘤细胞系的细胞效力始终较低。D12还是此系列中的唯一有效负载,具有较低的外排率。因此,释放该有效负载的ADC可针对表达靶抗原的多药耐药性癌症具有活性。

[3230] 当在HCC1954乳腺癌细胞中比较剪接效力(IC50 qPCR)与细胞效力(GI50 CTG)时,葡萄糖醛酸苷接头和D12有效负载显示有利的特性。C6/C7氨基甲酸酯转换(D8)有效负载和二碱性有效负载(D5)显示出细胞效力,但未展示最高效的可变剪接。在D4或D1有效负载下,从二肽转换成三肽接头使可变剪接效率降低,但仍保持较高的细胞活性。参见图18(根据细胞致死率确定大小,根据可变剪接响应的深度设定阴影)。

[3231] 当在N87胃癌细胞中比较剪接效力(IC50 qPCR)与细胞效力(GI50 CTG)时,葡萄糖醛酸苷接头(在D4下)和D12有效负载显示有利的特性,与HCC1954中相同。总体而言,所有ADC均对HER2阴性细胞系MCF7显示最小剪接和效力。尽管D12有效负载的细胞效力相对较低,但利用该有效负载的抗HER2 ADC的活性较高且该有效负载显示较低的外排率。这些特性在多药耐药性癌症环境中可以潜在地转变为更佳的功效。参见图19(根据细胞致死率确定大小,根据可变剪接响应的深度设定阴影)。

[3232] 对其他抗HER2 ADC进行体外分析。抗HER2 ADC与相应有效负载之间的比较显示于表26中。当将抗HER2 ADC的效力和致死率与相应有效负载的稳定性和渗透性相比较(图20)时,AB185-ADL5-D15展示效力、致死率、化学稳定性和分解代谢物渗透性(例如针对推定的旁观者杀伤)的有利平衡。如下所述,AB185-ADL5-D15在体内也具有活性且在NCI-N87异种移植模型中展示强效抗肿瘤活性。

[3233] 体内功效:

[3234] 通过将NCI-N87细胞接种于SCID小鼠中,产生了表达HER2的人NCI-N87胃癌细胞系及其异种移植模型,以评价示例性抗HER2ADC的抗肿瘤活性。使用曲妥珠单抗和TDM1作为比较物。

[3235] 静脉内曲妥珠单抗、TDM1和四种HER2 ADC于NCI-N87胃癌异种移植模型中的抗肿瘤作用显示于图21和图23中。体重影响显示于图22和图23中。Q7D静脉内(IV)给予测试物或

媒介物,持续2个周期。数据表示为平均值±SEM(肿瘤体积,mm^3)或±SEM(体重,%)(N=8)。*p<0.0001,相对于媒介物组,在第22天,使用单向方差分析测试。

[3236] 有关在NCI-N87中的体外和体内功效的表格数据提供于表24中。表格数据表示肿瘤生长抑制(肿瘤体积的TGI)百分比(%)或%T/C(肿瘤体积)(N=8)。AB185-ADL5-D2尽管在体外具有极低致死性,但在体内具有令人惊讶的活性,且展示相较于例如AB185-ADL14-D1的改善的体内功效。

[3237] 表24.示例性抗HER2 ADC在NCI-N87中的功效

[3238]

	第22天(体内)		NCI-N87(体外)		
	TGI(%)	T/C(%)	GI_{50} (nM)	LD_{50} (nM)	R_{min}%
媒介物/IV/ Q7D × 2	-	-	-	-	-
TDM1/10 mg/kg/ IV/ Q7D x 2	71	29	0.1	40	-37
曲妥珠单抗/10 mg/kg/IV/Q7D × 2	4	96	> 200	> 200	98
AB185-ADL5-D2/10 mg/kg/IV/ Q7D x 2	73	27	0.2	> 200	0
AB185-ADL1-D4/10 mg/kg/IV/ Q7D x 2	68	32	0.1	> 200	-22
AB185-ADL5-D15/10 mg/kg/ IV/Q7D x 2	67	33	0.1	> 200	-37
AB185-ADL14-D1/10 mg/kg/ IV/Q7Dx2	-7	107	0.1	> 200	-40

[3239] 曲妥珠单抗,即一种抗人HER2抗体且作为HER2阳性乳腺癌的标准护理疗法,在该模型中并不展示抗肿瘤活性。然而,作为含有曲妥珠单抗加共价连接的DM1(细胞毒性剂)的二线治疗的TDM1显示明显优于单独的曲妥珠单抗(TGI 4%)的抗肿瘤活性(TGI 71%)。在所测试的四种ADC中,ABL185-ADL5-D2、AB185-ADL5-D15和AB185-ADL1-D4显示强效抗肿瘤活性且肿瘤生长抑制(TGI)分别为73%、67%和68%。所有响应组的肿瘤最终又开始生长。在任何组中均未观察到完全响应,且以下各组中的八只动物之一显示部分响应:TDM1、ABL185-ADL5-D2和AB185-ADL5-D15。小鼠对所有试剂和测试物均具有良好耐受性,且观察到最小的体重减轻。总体而言,4种测试的抗HER2 ADC中有3种在NCI-N87肿瘤模型中展示与TDM1类似的强效抗肿瘤活性,并且无显著体重减轻。

[3240] 体内PD:

[3241] 在NCI-N87胃癌异种移植模型中通过静脉内曲妥珠单抗、TDM1和四种抗HER2 ADC进行的mRNA接合的PD调节显示于图24A-24D中。监测FBXW5(成熟mRNA转录物)和TAOK1(新接合转录物)的RT-qPCR。静脉内(IV)给予10mg/kg测试物或媒介物。在48小时(图24A和图24B)或在指定时间(图24C和图24D)时收集动物(N=4只/组)。分离肿瘤用于RNA提取和RT-qPCR。*p<0.05,相对于媒介物,使用单向方差分析(图24A和图24B)或双向方差分析(图24C和图24D)。

[3242] 曲妥珠单抗和TDM1均未在所观察的FBXW5或TAOK1的剪接中展现显著变化。AB185缀合物ADL5-D2/ADL1-D4/ADL5-D15均展现FBXW5的显著耗尽,AB185缀合物ADL5-D2/ADL1-D4展现TAOK1的显著增加。ADL5-D15显示TAOK1的增加,但未达到统计显著性。ADL14-D1未展现任一mRNA转录物的丰度的统计学显著变化。

[3243]

表25. 示例性抗HER2 ADC和相应有效负载的表征

特性 - HER2 ADCs															
							抗增殖活性 抗原 (+) 细胞 #1			抗增殖活性 抗原 (+) 细胞 #2			抗增殖活性 抗原 (-) 细胞		
ADC批次 Id	接头	致死率/剪接类别 (HCC1954,N87)	DAR	单体百分比	游离药物	浓度	CTGlo GMean GI50 (nM) HER2 SMLA 筛选 HCC1954.1	CTGlo GMean LD50 (nM) HER2 SMLA 筛选 HCC1954.1	CTGlo-平均响应深度 % HER2 SMLA 筛选 HCC1954.1	CTGlo GMean GI50 (nM) HER2 SMLA 筛选 NCIN87	CTGlo GMean LD50 (nM) HER2 SMLA 筛选 NCIN87	CTGlo-平均响应深度 % HER2 SMLA 筛选 NCIN87	CTGlo GMean GI50 (nM) HER2 SMLA 筛选 MCF7	CTGlo GMean LD50 (nM) HER2 SMLA 筛选 MCF7	CTGlo-平均响应深度 % HER2 SMLA 筛选 MCF7
AB185-ADL1-D12	mc-Val-Cit-PABC	1,3	6.25	99%	<1%	0.82	0.032	0.09	-78.471	<0.015	>100.000	-35.162	>100.000	>100.000	53.606
AB185-ADL13-D4	b-葡萄糖醛酸苷	1,1	4.47	99%	<1%	0.78	0.059	0.275	-80.145	0.029	3.436	-55.322	>100.000	>100.000	87.451
AB185-ADL1-D5	mc-Val-Cit-PABC	1,3	6.14	99%	<1%	1.1	0.079	0.298	-81.189	0.04	>100.000	-32.663	>100.000	>100.000	93.099
AB185-ADL23-D4	mc-Glu-Val-Cit-PABC	2,3	5.84	99%	<1%	1.03	0.175	1.526	-68.762	0.049	>100.000	-49.316	>100.000	>100.000	91.248
AB185-ADL1-D3	mc-Val-Cit-PABC	2,3	6.75	99%	<1%	1.13	0.117	0.741	-77.982	0.049	>100.000	-15.629	>100.000	>100.000	91.495
AB185-ADL22-D4	mal-PEG2-Val-Cit-PABC	1,3	6.12	99%	<1%	1.01	0.134	0.797	-75.134	0.057	>100.000	-25.808	>100.000	>100.000	79.996
AB185-ADL21-D1	mc-Ala-Ala-Asn-PABC	2,3	5.51	99%	<1%	1.35	0.207	2.65	-72.894	0.072	>100.000	-46.965	>100.000	>100.000	74.018
AB185-ADL21-D8	mc-Ala-Ala-Asn-PABC	4,3	6.4	99%	<1%	1.67	0.493	>100.000	-37.547	0.138	>100.000	-40.873	>100.000	>100.000	94.772
AB185-ADL21-D4	mc-Ala-Ala-Asn-PABC		1.55	99%	<1%	1.11	1.174	>100.000	14.652	0.235	>100.000	-36.848	>100.000	>100.000	96.18
AB185-ADL15-D2	mal-CH2CH2-O-CH2CH2-(不可裂解)	3,ND	3.25	98.80%	<1%	1.6	0.24	>200.000	-13.023	0.115	>100.000	-15.056			

[3244]

表25（续）.示例性抗HER2 ADC和相应有效负载的表征

							特性 - HER2 ADCs				
							剪接 (+) 抗原 细胞			剪接 (-) 抗原 细胞	
ADC 批次 Id	接头	致死率/剪接类别 (HCC1954,N87)	DAR	单体百分比	游离药物	浓度	qPCR-细胞筛选 GMean IC50 (nM) HER2 SMLA 筛选 SLC25A19 HCC1954.1 无效	qPCR-细胞筛选 平均响应深度% HER2 SMLA 筛选 SLC25A19 HCC1954.1 无效	qPCR-细胞筛选 GMean IC50 (nM) HER2 SMLA 筛选 SLC25A19 NCIN87无效	qPCR-细胞筛选 平均响应深度% HER2 SMLA 筛选 SLC25A19 NCIN87无效	qPCR-细胞筛选 GMean IC50 (nM) HER2 SMLA 筛选 SLC25A19 MCF7无效	qPCR-细胞筛选 平均响应深度% HER2 SMLA 筛选 SLC25A19 MCF7 无效
AB185-ADL1-D12	mc-Val-Cit-PABC	1,3	6.25	99%	<1%	0.82	0.144	-85.744	0.095	-93.185	>100.000	-12.254
AB185-ADL13-D4	b-葡萄糖醛酸苷	1,1	4.47	99%	<1%	0.78	0.45	-72.455	0.177	-93.984	>100.000	-28.389
AB185-ADL1-D5	mc-Val-Cit-PABC	1,3	6.14	99%	<1%	1.1	0.624	-65.799	0.095	-91.243	>100.000	-10.455
AB185-ADL23-D4	mc-Glu-Val-Cit-PABC	2,3	5.84	99%	<1%	1.03	>100.000	-40.549	0.249	-89.841	>100.000	-16.033
AB185-ADL1-D3	mc-Val-Cit-PABC	2,3	6.75	99%	<1%	1.13	>100.000	-38.621	0.199	-78.218	>100.000	-24.342
AB185-ADL22-D4	mal-PEG2-Val-Cit-PABC	1,3	6.12	99%	<1%	1.01	2.302	-58.063	0.17	-91.266	>100.000	-23.433
AB185-ADL21-D1	mc-Ala-Ala-Asn-PABC	2,3	5.51	99%	<1%	1.35	>100.000	-37.396	0.201	-84.588	>100.000	-15.463
AB185-ADL21-D8	mc-Ala-Ala-Asn-PABC	4,3	6.4	99%	<1%	1.67	>100.000	-27.319	0.577	-70.144	>100.000	-12.798
AB185-ADL21-D4	mc-Ala-Ala-Asn-PABC		1.55	99%	<1%	1.11	>100.000	-16.088	5.097	-54.535	>100.000	-12.096
AB185-ADL15-D2	mal-CH2CH2-O-CH2CH2-(不可裂解)	3,ND	3.25	98.80%	<1%	1.6			0.296	-83.148		

[3245]

表25（续）.示例性抗HER2 ADC和相应有效负载的表征

							特性-相应的游离有效负载													
						靶标结合	生物化学剪接测定			细胞效力细胞系#1		细胞效力细胞系#2		细胞效力细胞系#3		细胞渗透性		
ADC批次Id	接头	致死率/剪接类别(HCC1954,N87)	DAR	单体百分比	游离药物	浓度	SPA-ATS GMean IC50 (nM) SF3B1 (WT) HELA.2	qPCR-IVS-ATS GMean IC50 (nM) Ad2.1 HELA.2	qPCR-IVS-ATS GMean IC50 (nM) Ad2.2 HELA.2	比率 Ad2.1/2.2	CTGlo-ATS GMean GI50 (nM) 72h NCIH1650.1	CTGlo-ATS GMean LD50 (nM) 72h NCIH1650.1	CTGlo-ATS GMean GI50 (nM) 72h NCIH1568.1	CTGlo-ATS GMean LD50 (nM) 72h NCIH1568.1	CTGlo-ATS GMean GI50 (nM) 72h THP1.1	CTGlo-ATS GMean LD50 (nM) 72h THP1.1	渗透性平均Caco-2 A-B渗透性(10e-6 cm/s)	渗透性平均Caco-2 B-A渗透性(10e-6 cm/s)	ER
AB185-ADL1-D12	mc-Val-Cit-PABC	1,3	6.25	99%	<1%	0.82		16.528	25.09	0.659	257.925	>10000.00	163.604	1193.037	202.487	900.227	0.17	0.23	1.353
AB185-ADL13-D4	b-葡萄糖醛酸苷	1,1	4.47	99%	<1%	0.78	8.778	20.887	17.321	1.206	11.941	1960.398	6.369	45.485	10.943	33.329	0.1	1.79	17.9
AB185-ADL1-D5	mc-Val-Cit-PABC	1,3	6.14	99%	<1%	1.1		17.392	23.943	0.726									
AB185-ADL23-D4	mc-Glu-Val-Cit-PABC	2,3	5.84	99%	<1%	1.03	8.778	20.887	17.321	1.206	11.941	1960.398	6.369	45.485	10.943	33.329	0.1	1.79	17.9
AB185-ADL1-D3	mc-Val-Cit-PABC	2,3	6.75	99%	<1%	1.13		9.326	10.928	0.853									
AB185-ADL22-D4	mal-PEG2-Val-Cit-PABC	1,3	6.12	99%	<1%	1.01	8.778	20.887	17.321	1.206	11.941	1960.398	6.369	45.485	10.943	33.329	0.1	1.79	17.9
AB185-ADL21-D1	mc-Ala-Ala-Asn-PABC	2,3	5.51	99%	<1%	1.35	6.085	17.568	15.853	1.108	12.121	>10000.00	7.363	65.737	11.085	41.408	0.14	2.05	14.64
AB185-ADL21-D8	mc-Ala-Ala-Asn-PABC	4,3	6.4	99%	<1%	1.67	5.921	11.403	9.034	1.262	19.15	>10000.00	6.568	68.125	8.745	38.969	0.128	2.027	15.88
AB185-ADL21-D4	mc-Ala-Ala-Asn-PABC		1.55	99%	<1%	1.11	8.778	20.887	17.321	1.206	11.941	1960.398	6.369	45.485	10.943	33.329	0.1	1.79	17.9
AB185-ADL15-D2	mal-CH2CH2-O-CH2CH2-(不可裂解)	3,ND	3.25	98.80%	<1%	1.6													

[3246] 表26.示例性抗HER2 ADC-HCC1954细胞

[3247]

					特性 - HER2 ADCs	
					抗增殖活性 抗原 (+) 细胞 #1	
ADC 批次 Id	接头	DAR	渗透性 Caco-2 A-B (10e-6 cm/s)	pH 5.5 稳定性 (t1/2, 37C)	CTGlo GMean GI50 (nM) HER2 SMLA 筛选 HCC1954.1	CTGlo 平均 响应深度% HER2 SMLA 筛选 HCC1954.1
AB185-ADL5-D19	QVal-Ala	6.600	16	0.8	0.278	-47.381
AB185-ADL5-D25	QVal-Ala	6.000	0.14	3.4	0.038	-46.265
AB185-ADL5-D2	QVal-Ala	4.140	0.6	4	0.206	-12.239
AB185-ADL1-04	Val-Cit	2.800	0.1	4.5	0.050	-57.212
AB185-ADL5-D10	QVal-Ala	4.020	1.8	5	0.254	-2.273
AB185-ADL1-D16	Val-Cit	4.400	0.72	7	2.086	
AB185-ADL5-D17	QVal-Ala	3.960	20	7	2.668	14.873
AB185-ADL5-D34	QVal-Ala		26	7	3.325	-38.285
AB185-ADL5-D15	QVal-Ala	4.000	3.4	7	0.912	-45.388

[3248] 实例10

[3249] 10.1生物信息学-驱动的适应症/靶标选择

[3250] 为鉴定相较于正常组织在低肿瘤突变负荷(TMB)肿瘤中高度表达的靶抗原,进行生物信息学预测分析。该实例解释1)如何定义每一过滤器;以及2)如何使用抗原/适应症表来鉴定合适靶标/肿瘤对。有关示例性靶标适应症分析的示意图,参见图25。

[3251] 10.1.1概述

[3252] 使用生物信息学预测分析来鉴定靶抗原和适应症。针对肿瘤突变负荷(TMB)、用于ADC递送的靶抗原的表达和肿瘤免疫浸润,处理来自TCGA的数据。使用公开的TMB和浸润的截止值对免疫检查点抑制剂(ICI)的预测反应者与无反应者进行分层来执行分析,以鉴定

适应症和相配的抗原。进一步过滤表面抗原表达以评估抗原表达比任何正常组织高至少2倍(如由GTEx组织表达数据库评价)的概率群体。进一步针对突变和免疫度量分析合适百分比的具有一个或多个靶抗原的患者的适应症(或TCGA谱系亚组)。评估肿瘤突变负荷低于具有10个突变/兆碱基的聚集且T细胞浸润分数高于0.5的抗原阳性患者的百分比。将估计约50％的满足这些标准的患者的适应症列于表27中。这些组(但不限于这些组)中的患者可对用剪接调节剂ADC(例如本文所描述的剪接调节剂ADC)的治疗有应答。

[3253] 10.1.2方法

[3254] 肿瘤学年鉴中适应症预测的抗原表注释:

[3255] 抗原:抗原基因名称,根据肿瘤学年鉴文献综述(参见Moek等人(2017)Annals of Oncology[肿瘤学年鉴],28:3083-3091),仅59个可能作为良好的ADC靶标的基因包括在该表中(初始全分析包括所有计算机模拟的表面组(surfaceome)基因)

[3256] 组:TCGA组名称

[3257] SUBTYPE:TCGA肿瘤亚型信息

[3258] Cases_Total:病例总数

[3259] Cases.by.subtype:根据亚型的病例数量

[3260] LTPM_median:由Log2(TPM+1)得到的表达中值

[3261] LTPM_median_LowTMB:对于低TMB(<350)病例,通过Log2(TPM+1)得到的表达中值

[3262] LTMB_Median:Log10(TMB)的中值

[3263] LTMB_MAD:由Log10(TMB)的MAD值进行的标准偏差的稳固测量

[3264] Infil_Median:根据PLoS One T细胞标签,浸润分数的中值

[3265] Infil_MAD:根据PLoS One T细胞标签,由浸润分数的MAD值进行的标准偏差的稳固测量

[3266] Cor.with.Purity:表达与肿瘤纯度的相关性

[3267] GTEX_Tissue:具有最高表达中值的GTEx组织名称

[3268] GTEX_LTPM_Median:在具有最高表达中值的GTEx组织中抗原的中位表达值

[3269] Surfaceome.Filter*:在施用表面组过滤器之后的患者群:表达>具有最高中值的GTEx正常组织的2倍

[3270] LowTMB.Filter:在施用低TMB过滤器之后的患者群:<350个/外显子组序列(10个/兆碱基2)

[3271] LowTMB.Surfaceome.Filter:在施用表面组过滤器和tmb过滤器之后的患者群

[3272] HiInfil.LowTMB.Surfaceome.Filter:在施用以下三个过滤器之后的患者群:表面组表达过滤器、低tmb过滤器和高浸润过滤器

[3273] Surfaceome.Filter.Perc:在施用表面组过滤器之后的群体的百分比:表达>具有最高中值的GTEx正常组织的2倍

[3274] LowTMB.Filter.Perc:在施用低TMB过滤器之后群体的百分比:<350

[3275] LowTMB.Surfaceome.Filter.Perc:在施用表面组过滤器和tmb过滤器之后群体的百分比

[3276] HiInfil.LowTMB.Surfaceome.Filter.Perc:在施用以下三个过滤器之后群体的百分比:表面组表达过滤器、低tmb过滤器和高浸润过滤器

[3277] 患者群的概率估计：

[3278] 编译资源：

[3279] 1.泛癌免疫全景论文(Pan-can immune landscape paper)(Ready等人(2019)Journal of Clinical Oncology[临床肿瘤学杂志],37:992-1000)

[3280] 2.来自Omicsoft的TCGA RNA序列/外显子组序列数据包3.免疫基因标签(Thorsson等人(2018)Immunity[免疫力],48,812-830)

[3281] 4.GTEx数据v7

[3282] 使用Omicsoft数据,由TCGA外显子组序列突变调用来计算肿瘤突变负荷。使用PLoS One T细胞标签(CD3D、CD3E、CD2)对样品免疫浸润进行定量。使用log2(TPM+1)值,从TCGA RNA序列数据生成Z分数。

[3283] Surfaceome.Filter:各个患者相较于具有最高中值的GTEx正常组织具有>2倍的表达(log2(TPM+1))值的几率计算如下：

[3284] 1.鉴定所有GTEx正常组织中对此基因具有最高中值的GTEx正常组织,采用其作为T_h

[3285] 2.使用合成少数类过采样技术(Synthetic Minority Over-sampling Technique,SMOTE)(Siemers等人(2017)PLoS One[公共科学图书馆期刊],12(7):e0179726)维持组织的数据分布,对每一组织使用1000位患者合成此基因的GTEx数据

[3286] 3.对此患者将>该组织T_h的GTEx合成数据的2倍的倍数(n倍)计数,此患者的将>GTEx正常值的2倍的几率是n/1000

[3287] 4.计算每位患者的该几率

[3288] 5.各个几率的总和是比GTEx正常值高>2倍的该组群体的概率估计值

[3289] 6.当与其他过滤器一起应用时,各个几率的总和将仅针对通过其他过滤器的患者

[3290] 10.1.3实例

[3291] 表27列出了使用以上描述的示例性生物信息学预测分析而鉴定的靶抗原和适应症。

[3292] 表27.示例性靶抗原和适应症

[3293]

靶抗原	适应症
MSLN	卵巢癌 宫颈癌 胰腺癌 肺腺癌
EPHA2	食道癌
FOLH1	前列腺癌
CDH6	肾癌
CEACAM5	结肠直肠癌
CFC1B	胰腺癌
ENPP3	肾癌
FOLR1	卵巢癌
HAVCR1	肾癌 食道癌
KIT	肾癌
MET	肾癌 食道癌
MUC16	卵巢癌 宫颈癌 乳腺癌
SLC39A6	乳腺癌 前列腺癌
SLC44A4	前列腺癌
STEAP1	前列腺癌

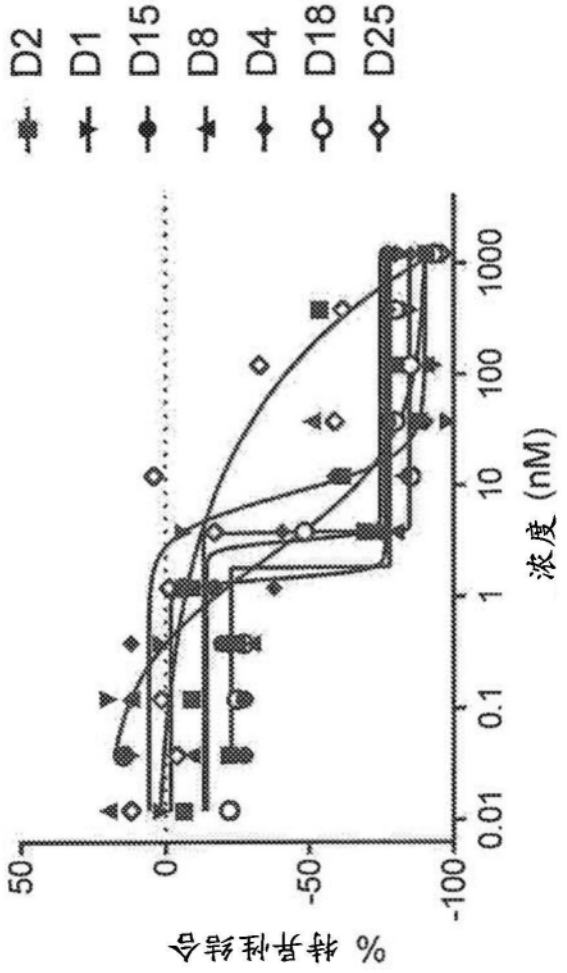


图1

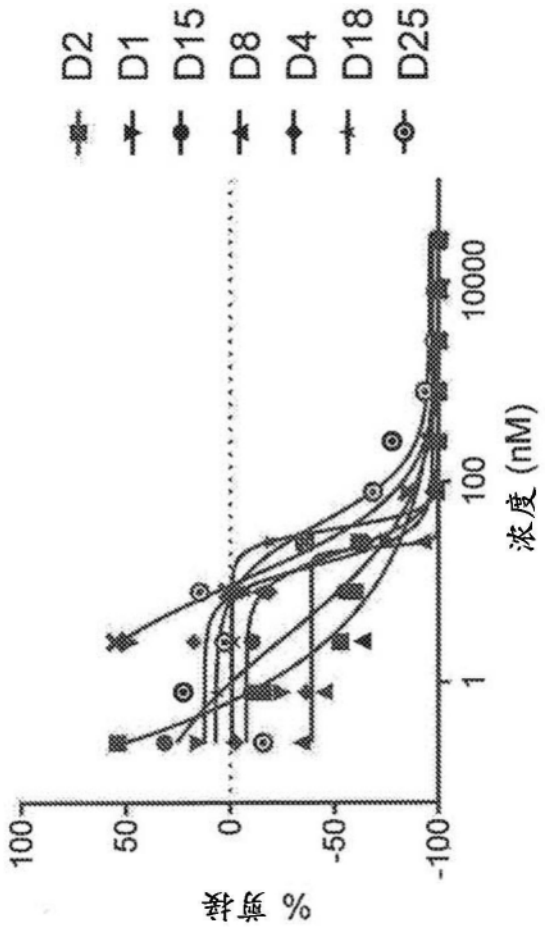


图2

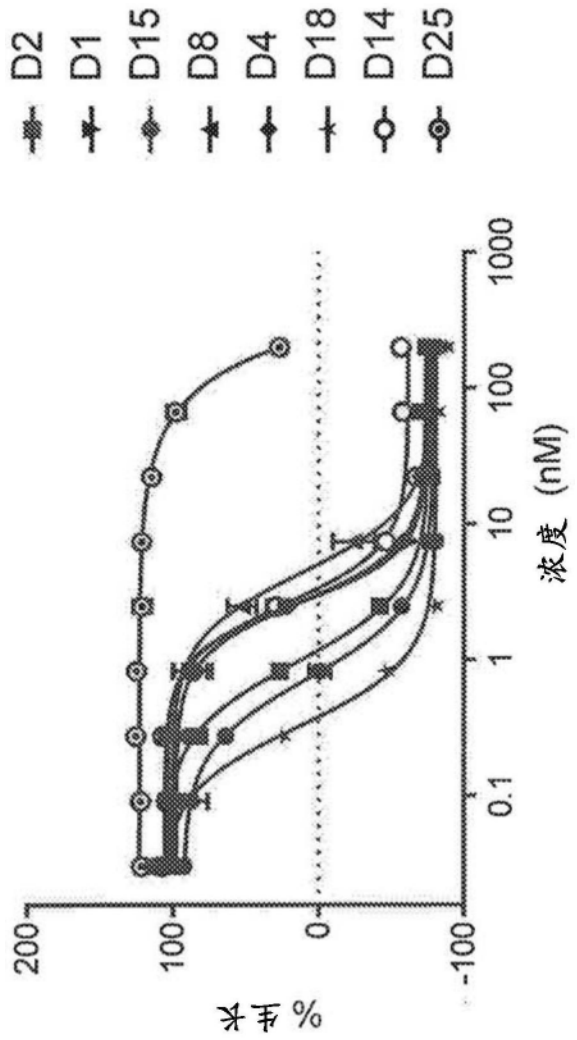


图3

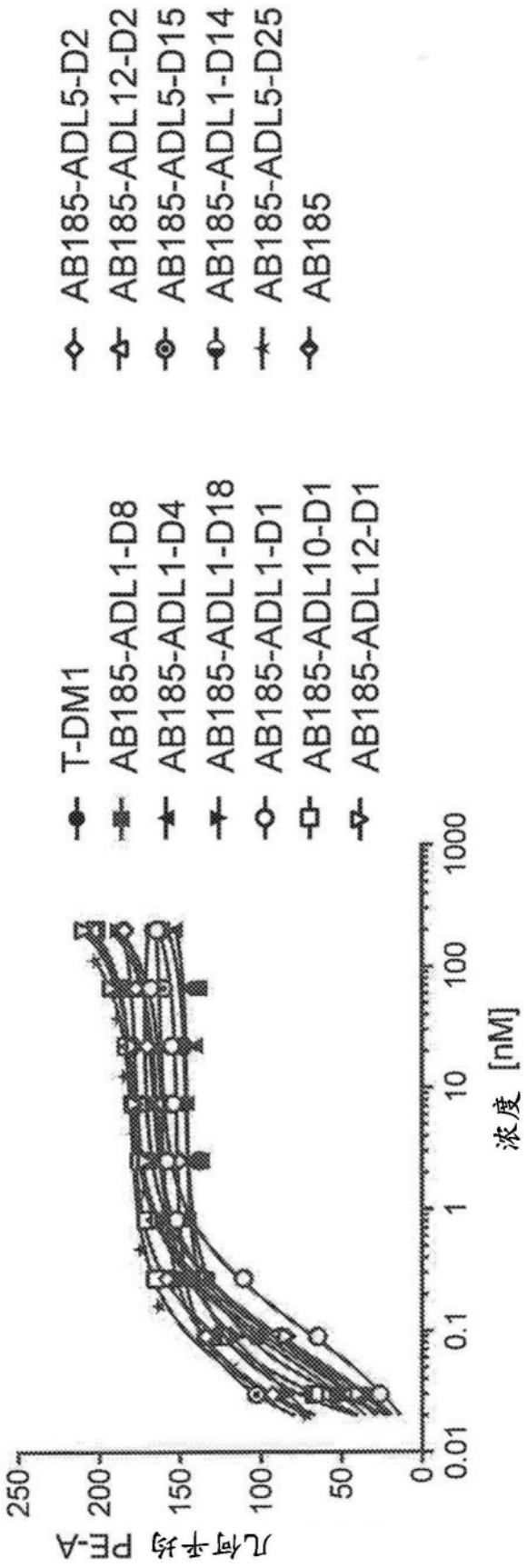

AB185-ADL5-D2
AB185-ADL12-D2
AB185-ADL5-D15
AB185-ADL1-D14
AB185-ADL5-D25
AB185
T-DM1
AB185-ADL1-D8
AB185-ADL1-D4
AB185-ADL1-D18
AB185-ADL1-D1
AB185-ADL10-D1
AB185-ADL12-D1
几何平均 PE-A
250
200
150
100
50
0
0.01
0.1
1
10
100
1000
浓度 [nM]

图4

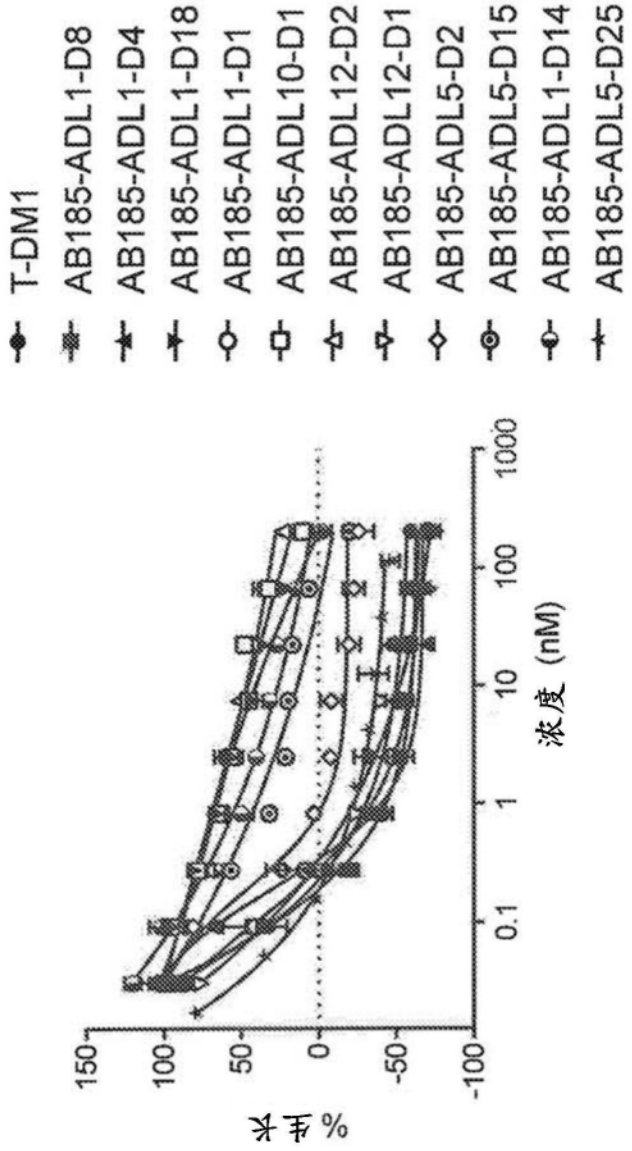

T-DM1
AB185-ADL1-D8
AB185-ADL1-D4
AB185-ADL1-D18
AB185-ADL1-D1
AB185-ADL10-D1
AB185-ADL12-D2
AB185-ADL12-D1
AB185-ADL5-D2
AB185-ADL5-D15
AB185-ADL1-D14
AB185-ADL5-D25
150
100
50
0
-50
-100
% 生长
0.1
1
10
100
1000
浓度 (nM)

图5A

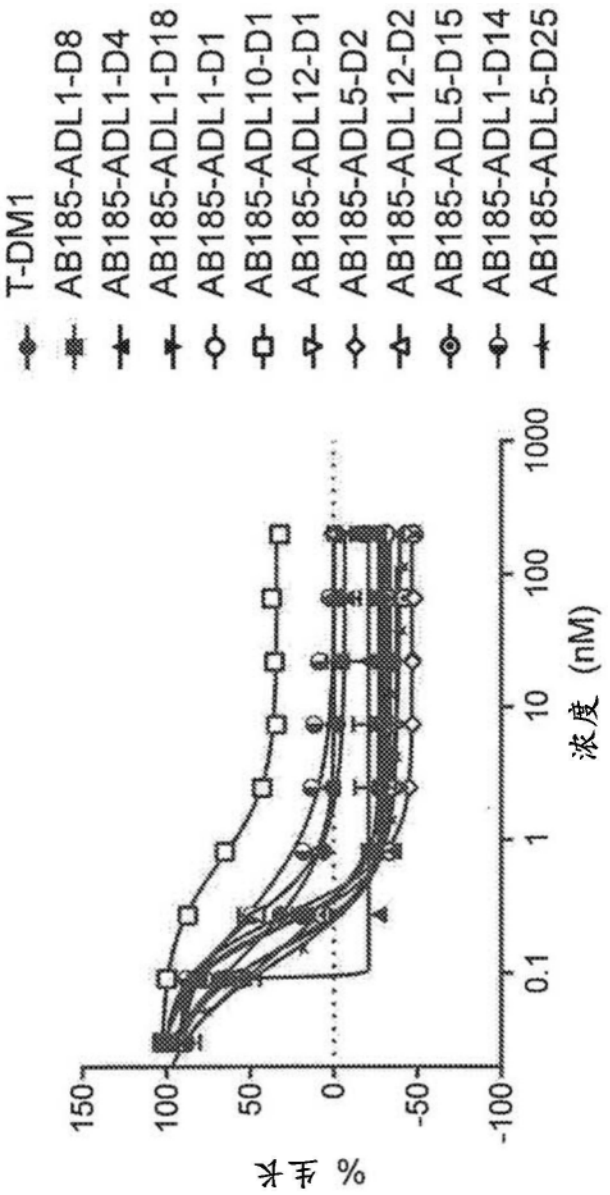

T-DM1
AB185-ADL1-D8
AB185-ADL1-D4
AB185-ADL1-D18
AB185-ADL1-D1
AB185-ADL10-D1
AB185-ADL12-D1
AB185-ADL5-D2
AB185-ADL12-D2
AB185-ADL5-D15
AB185-ADL1-D14
AB185-ADL5-D25
150
100
50
0
-50
-100
% 生长
0.1
1
10
100
1000
浓度 (nM)

图5B

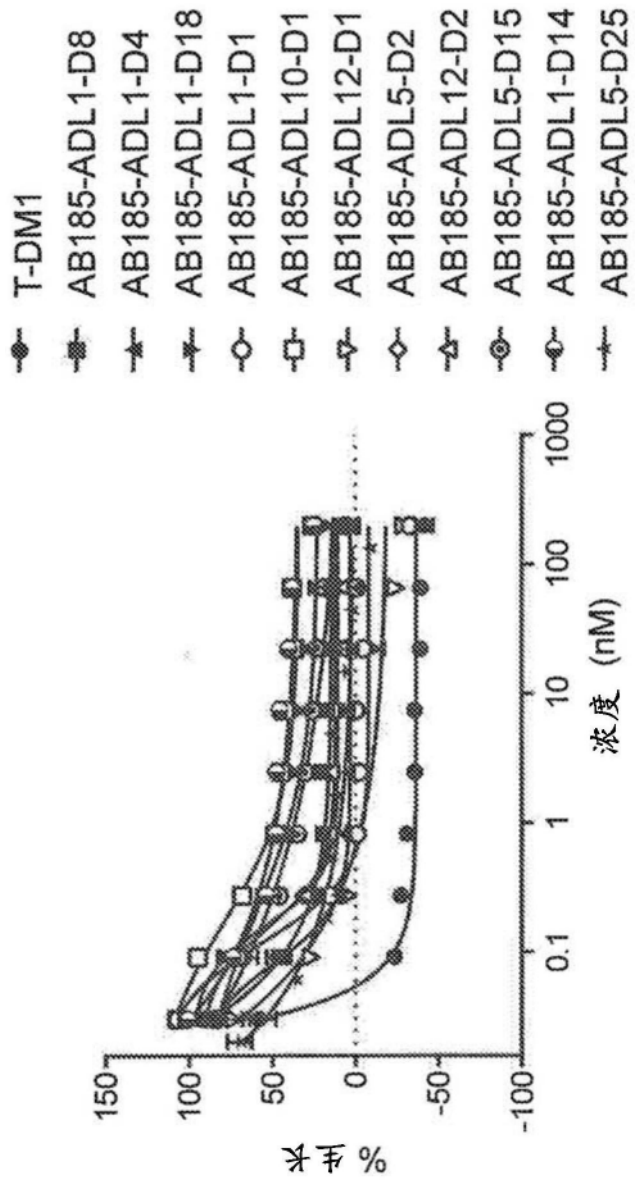

T-DM1
AB185-ADL1-D8
AB185-ADL1-D4
AB185-ADL1-D18
AB185-ADL1-D1
AB185-ADL10-D1
AB185-ADL12-D1
AB185-ADL5-D2
AB185-ADL12-D2
AB185-ADL5-D15
AB185-ADL1-D14
AB185-ADL5-D25
150
100
50
0
-50
-100
% 生长
0.1
1
10
100
1000
浓度 (nM)

图5C

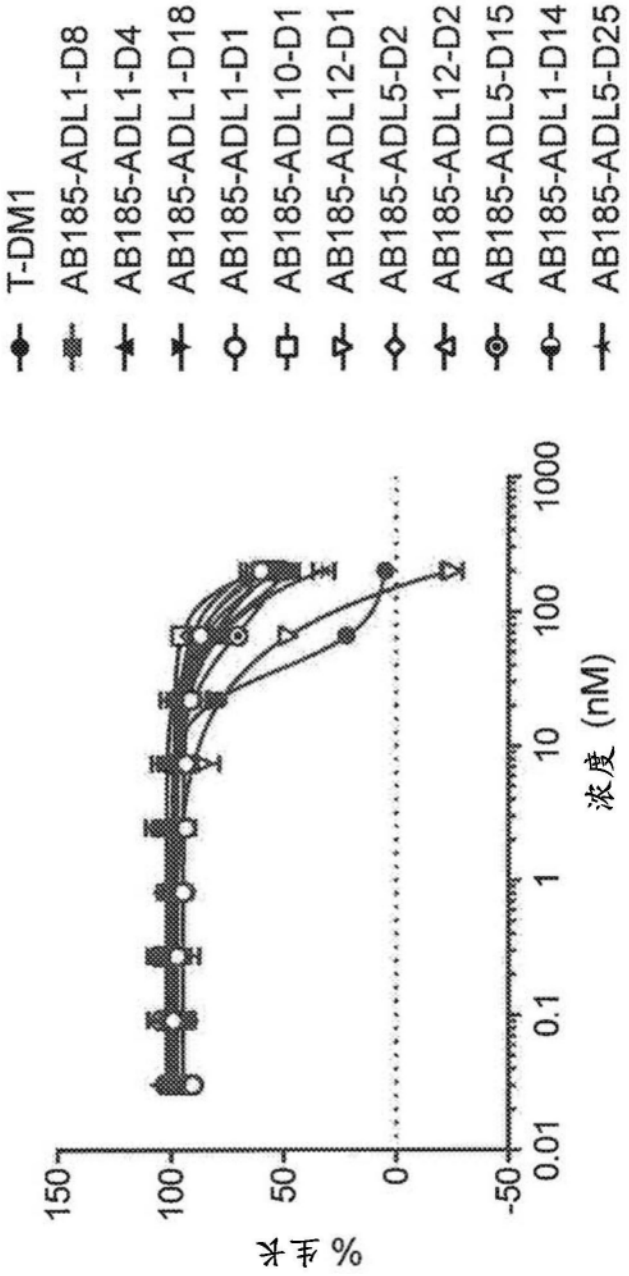

T-DM1
AB185-ADL1-D8
AB185-ADL1-D4
AB185-ADL1-D18
AB185-ADL1-D1
AB185-ADL10-D1
AB185-ADL12-D1
AB185-ADL5-D2
AB185-ADL12-D2
AB185-ADL5-D15
AB185-ADL1-D14
AB185-ADL5-D25
150
100
50
0
-50
% 生长
0.01
0.1
1
10
100
1000
浓度 (nM)

图6

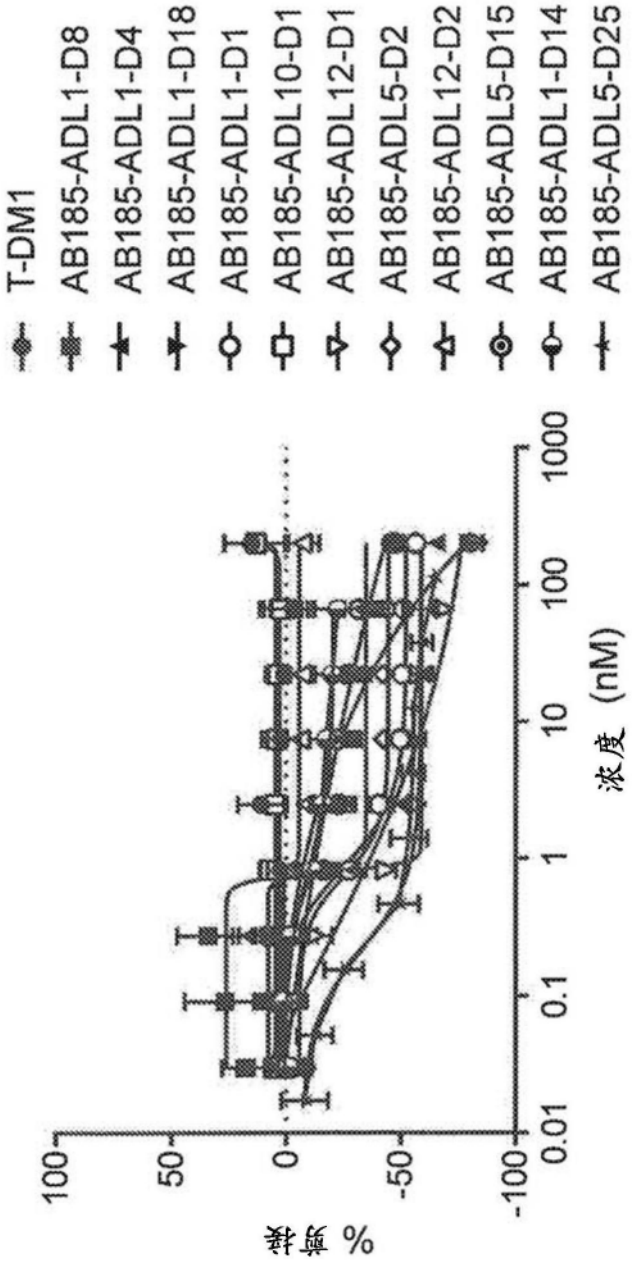

T-DM1
AB185-ADL1-D8
AB185-ADL1-D4
AB185-ADL1-D18
AB185-ADL1-D1
AB185-ADL10-D1
AB185-ADL12-D1
AB185-ADL5-D2
AB185-ADL12-D2
AB185-ADL5-D15
AB185-ADL1-D14
AB185-ADL5-D25
% 剪接
100
50
0
-50
-100
0.01
0.1
1
10
100
1000
浓度 (nM)

图7

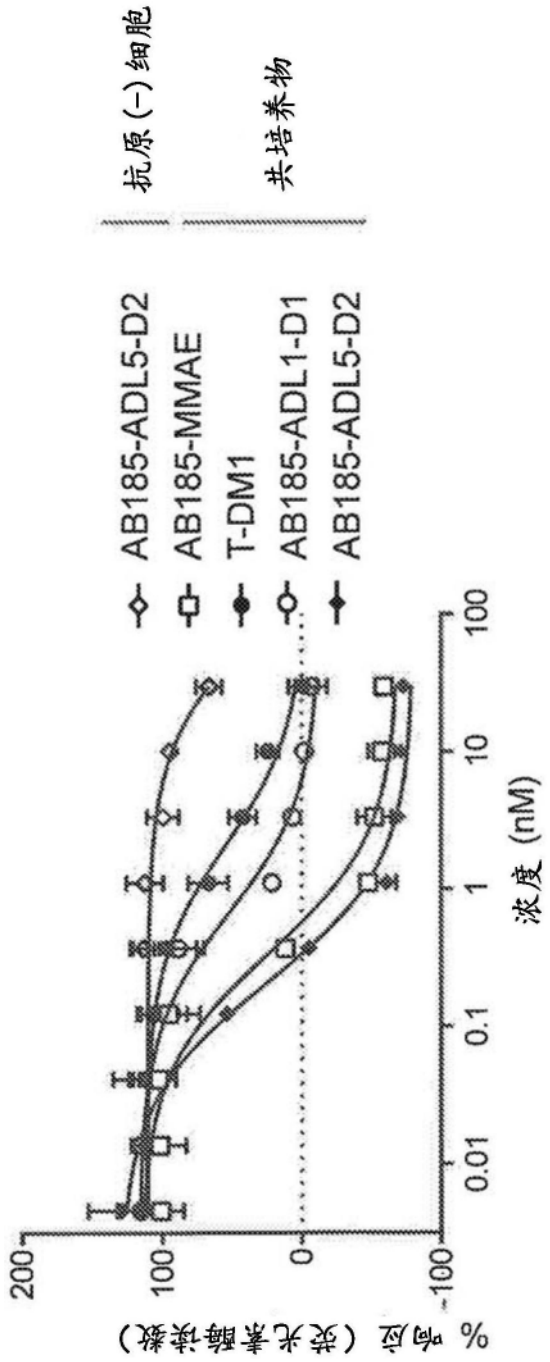

抗原(-)细胞
共培养物
AB185-ADL5-D2
AB185-MMAE
T-DM1
AB185-ADL1-D1
AB185-ADL5-D2
200
100
0
-100
0.01
0.1
1
10
100
浓度 (nM)
% 响应 (荧光素酶读数)

图8

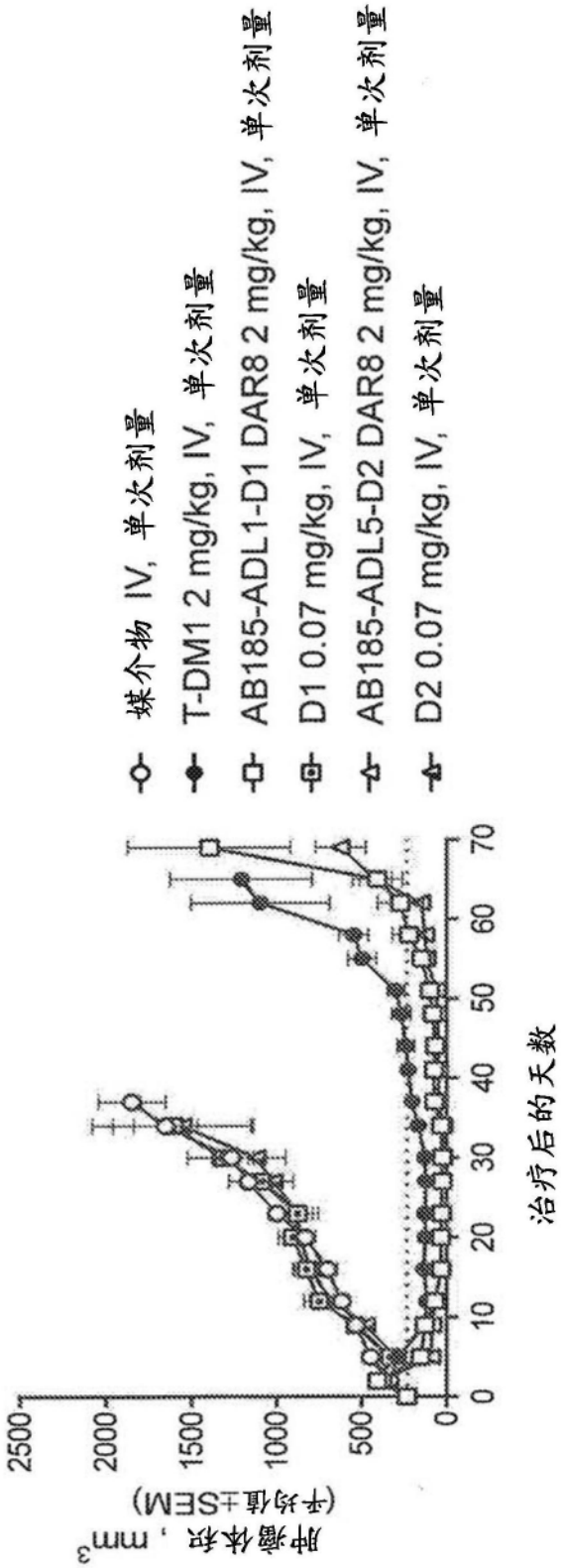

媒介物 IV, 单次剂量
T-DM1 2 mg/kg, IV, 单次剂量
AB185-ADL1-D1 DAR8 2 mg/kg, IV, 单次剂量
D1 0.07 mg/kg, IV, 单次剂量
AB185-ADL5-D2 DAR8 2 mg/kg, IV, 单次剂量
D2 0.07 mg/kg, IV, 单次剂量
肿瘤体积，mm3
(平均值±SEM)
2500
2000
1500
1000
500
0
0
10
20
30
40
50
60
70
治疗后的天数

图9

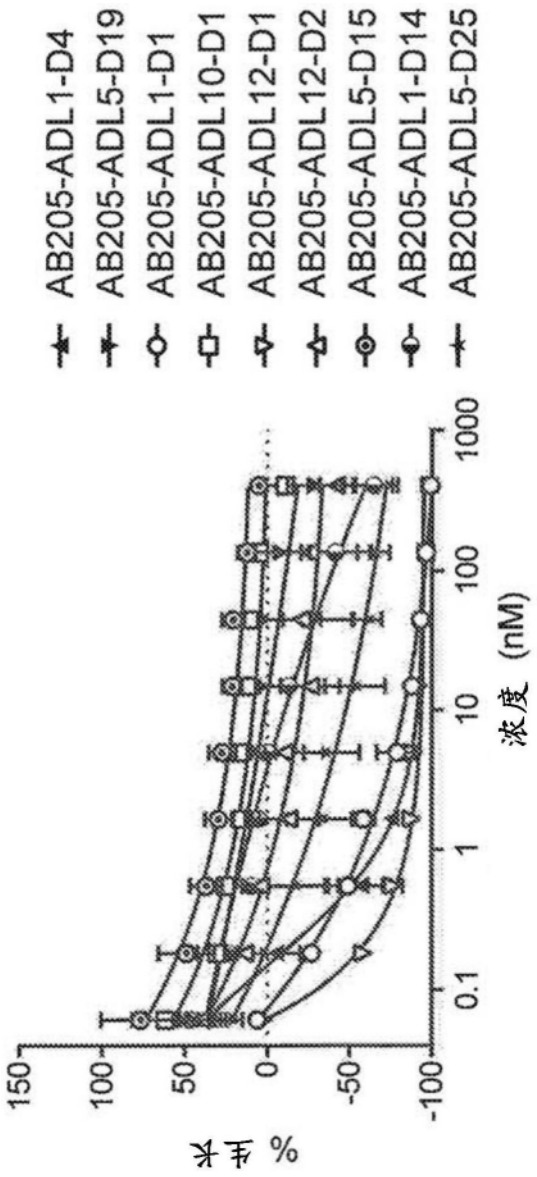

AB205-ADL1-D4
AB205-ADL5-D19
AB205-ADL1-D1
AB205-ADL10-D1
AB205-ADL12-D1
AB205-ADL12-D2
AB205-ADL5-D15
AB205-ADL1-D14
AB205-ADL5-D25
150
100
50
0
-50
-100
0.1
1
10
100
1000
浓度 (nM)
% 生长

图10

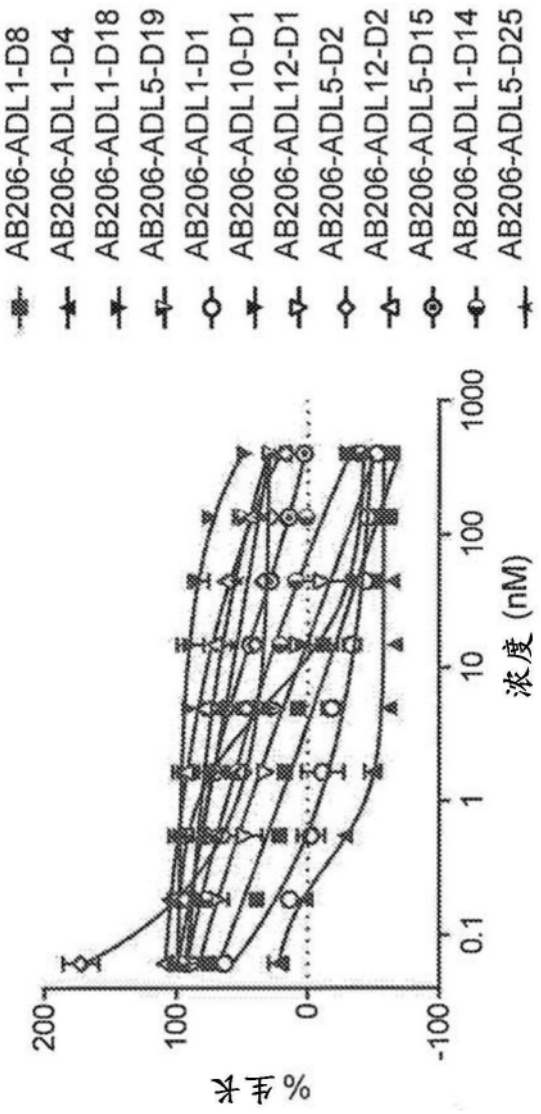

AB206-ADL1-D8
AB206-ADL1-D4
AB206-ADL1-D18
AB206-ADL5-D19
AB206-ADL1-D1
AB206-ADL10-D1
AB206-ADL12-D1
AB206-ADL5-D2
AB206-ADL12-D2
AB206-ADL5-D15
AB206-ADL1-D14
AB206-ADL5-D25
200
100
0
-100
% 生长
0.1
1
10
100
1000
浓度 (nM)

图11

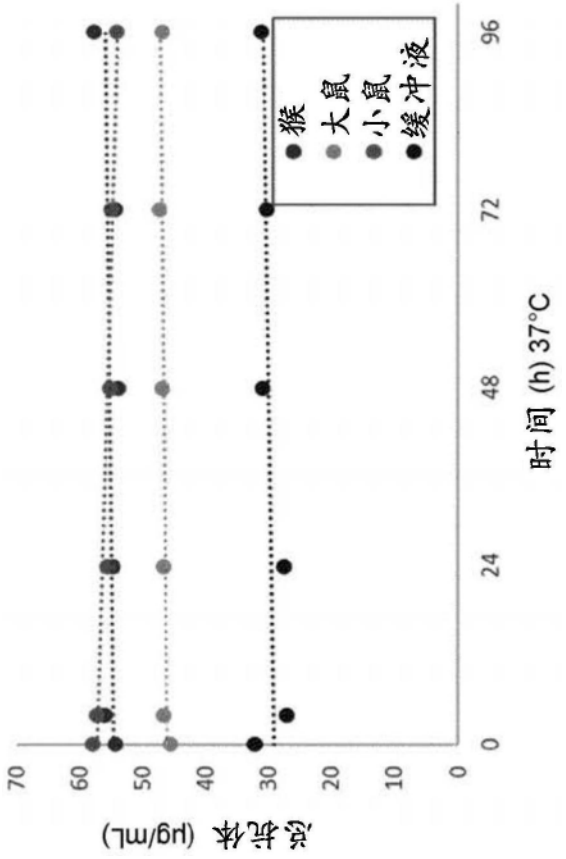


图12A

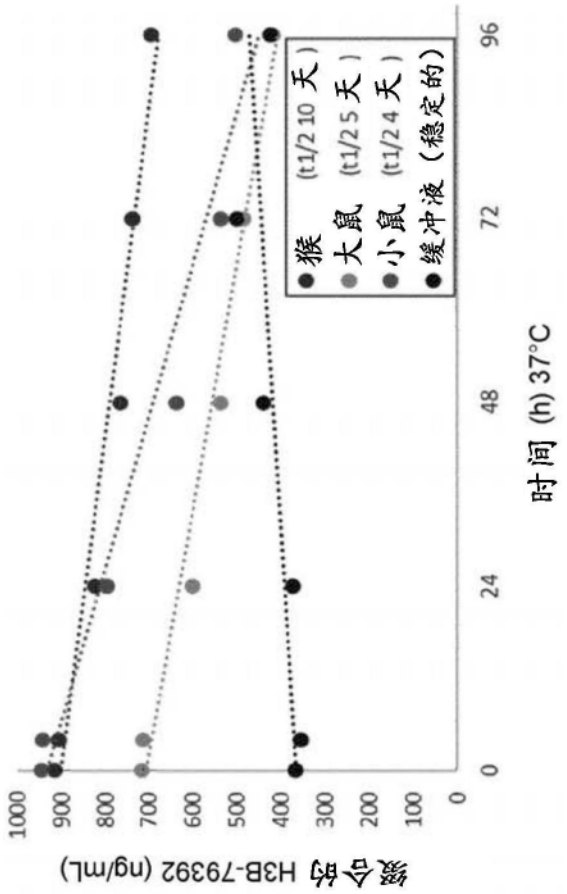

缓冲液（稳定的）
小鼠 (t1/2 4 天)
大鼠 (t1/2 5 天)
猴 (t1/2 10 天)
时间 (h) 37°C
0
24
48
72
96
0
100
200
300
400
500
600
700
800
900
1000

图12B

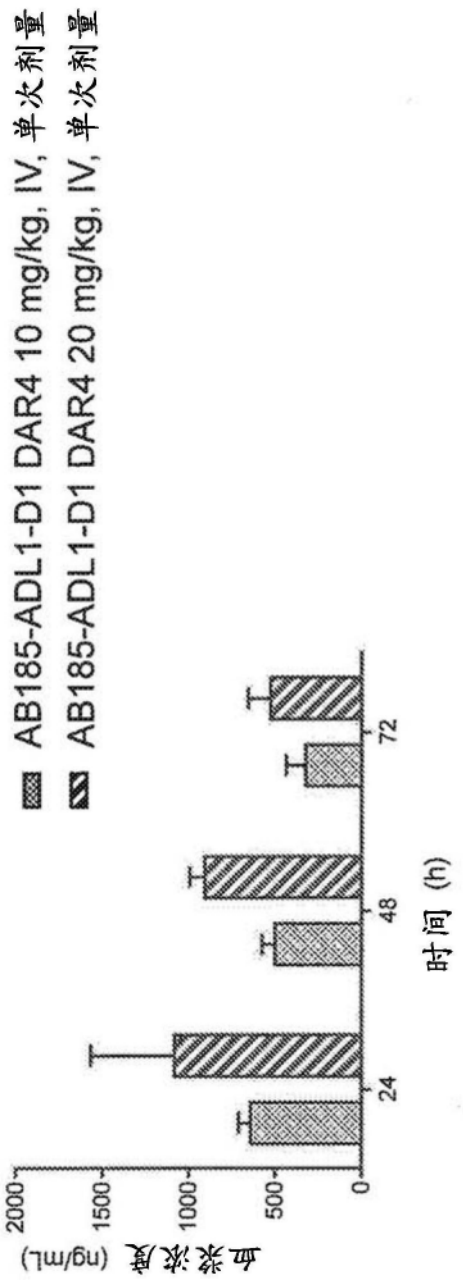

AB185-ADL1-D1 DAR4 10 mg/kg, IV, 单次剂量
AB185-ADL1-D1 DAR4 20 mg/kg, IV, 单次剂量
血浆浓度 (ng/mL)
2000
1500
1000
500
0
24
48
72
时间 (h)

图13

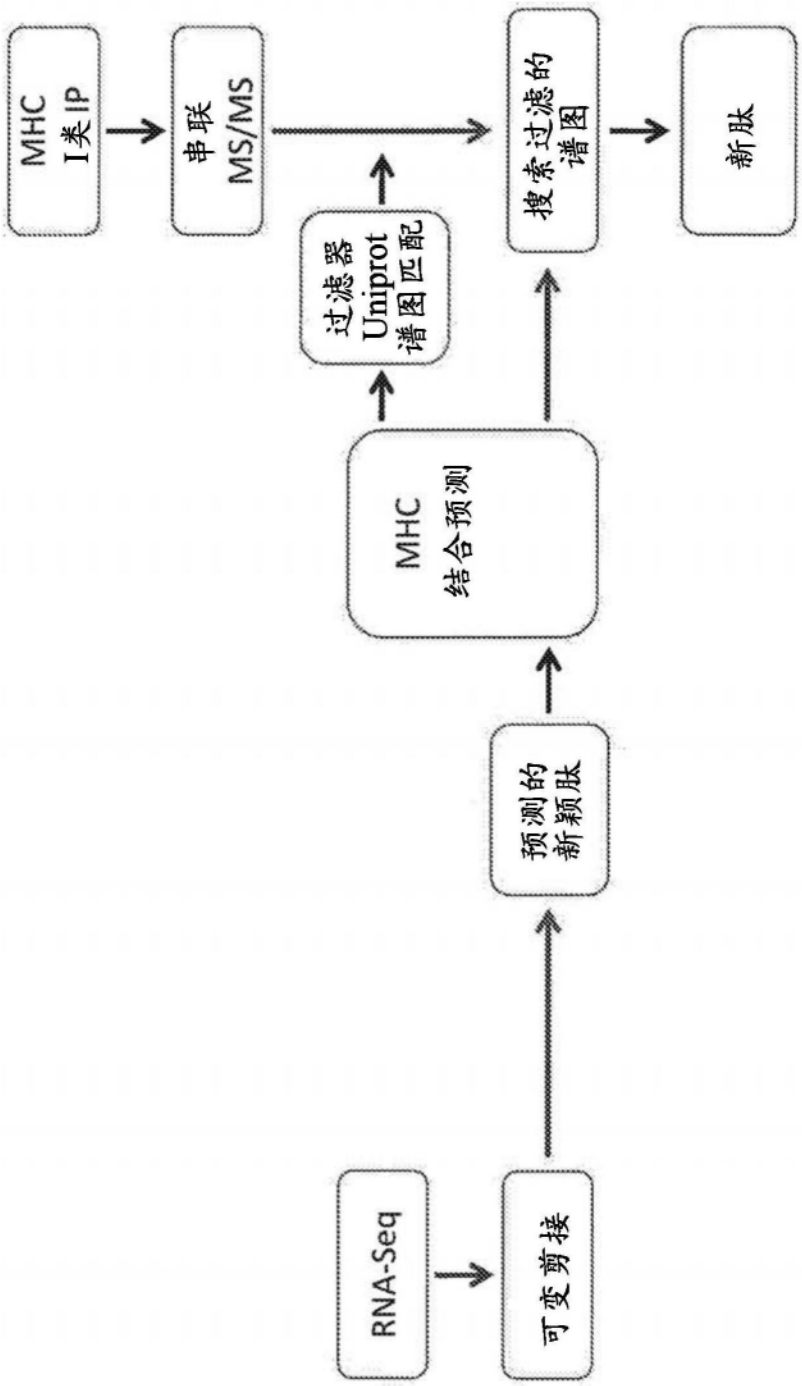

RNA-Seq
可变剪接
预测的新颖肽
MHC 结合预测
过滤器 Uniprot 谱图匹配
MHC I类IP
串联 MS/MS
搜索过滤的谱图
新肽

图14

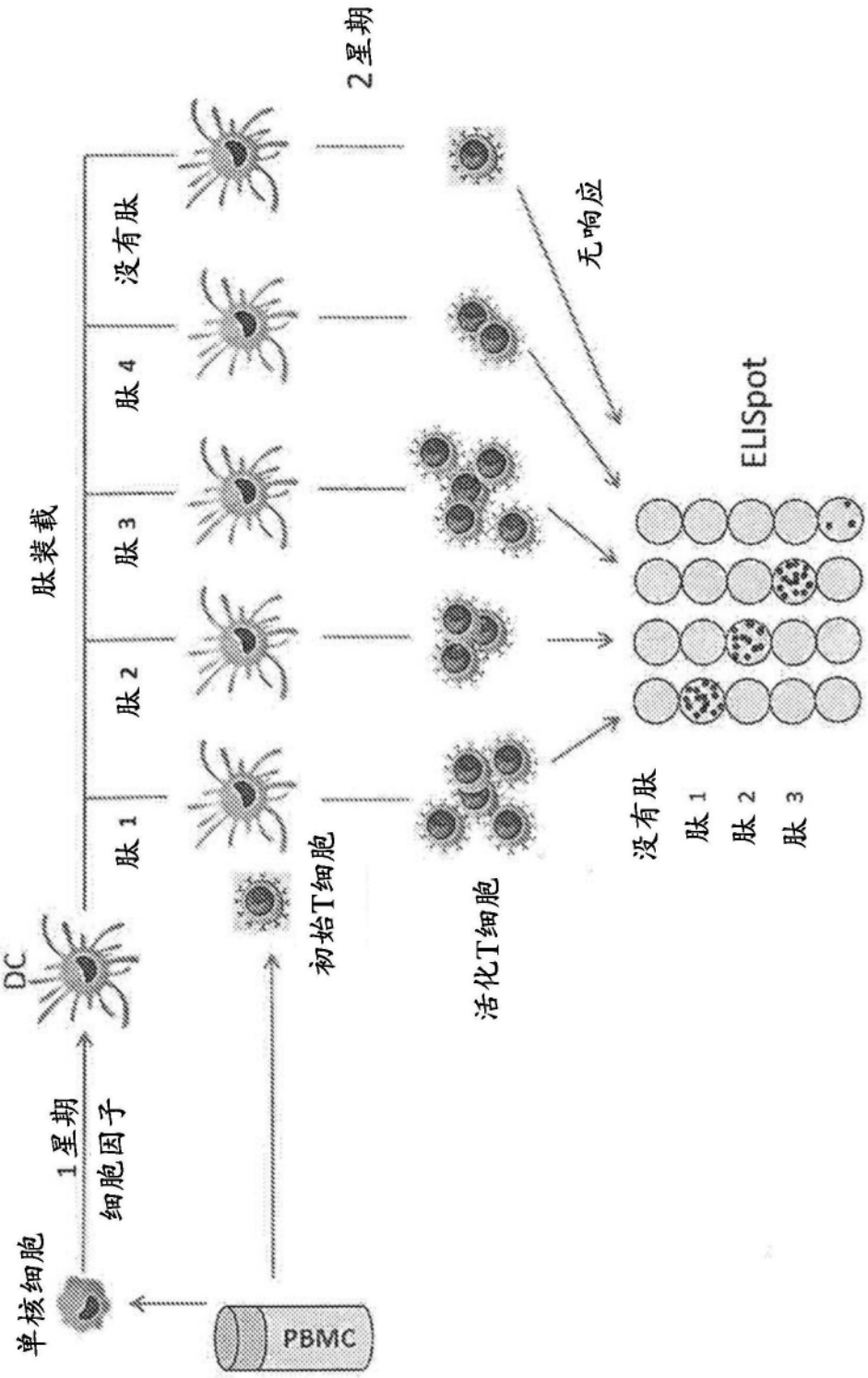

单核细胞
1星期
细胞因子
DC
肽装载
肽 1
肽 2
肽 3
肽 4
没有肽
2星期
PBMC
初始T细胞
活化T细胞
无响应
ELISpot
没有肽
肽 1
肽 2
肽 3

图15

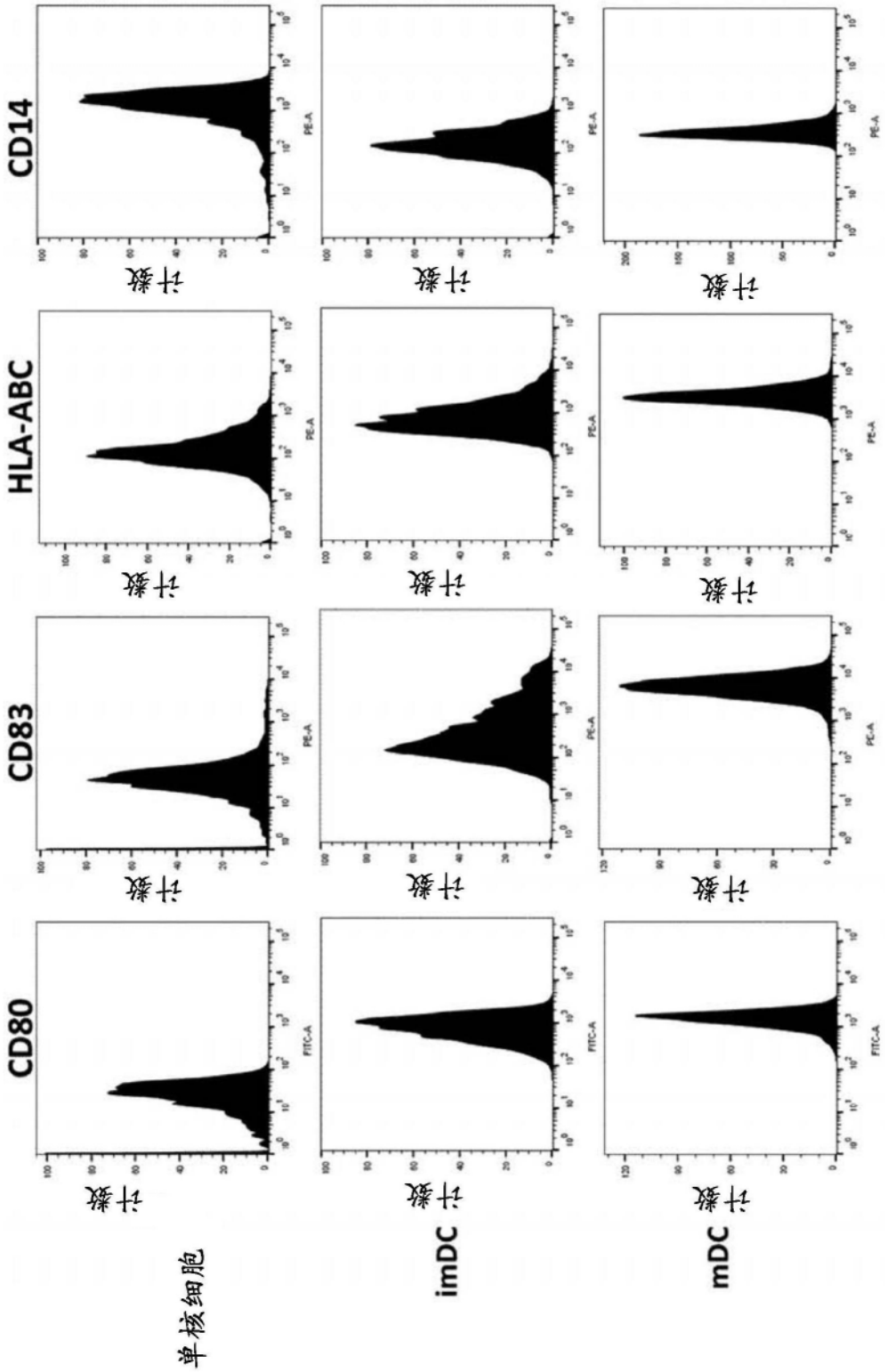


图16

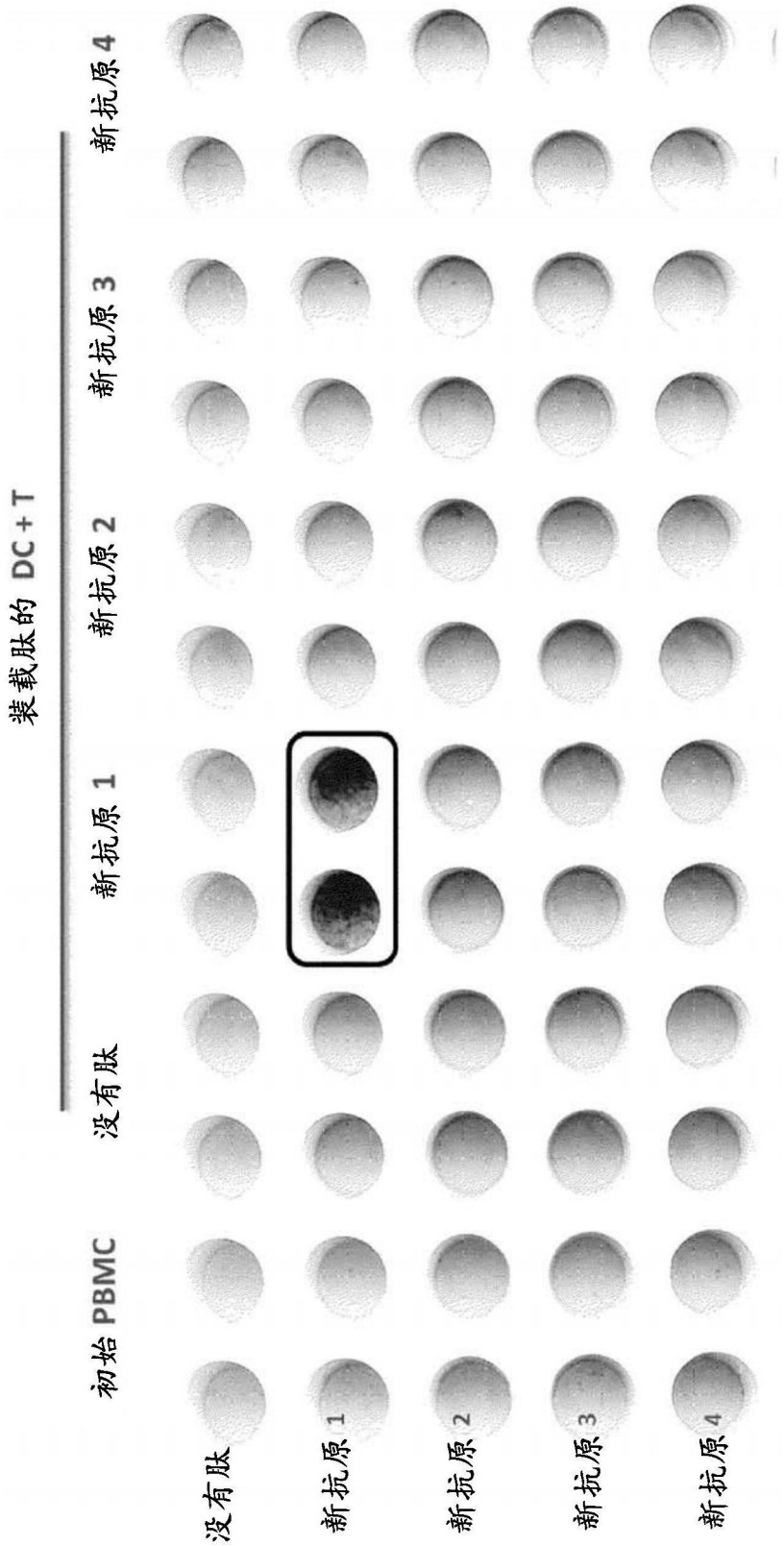

装载肽的 DC + T
初始 PBMC
没有肽
新抗原 1
新抗原 2
新抗原 3
新抗原 4
没有肽
新抗原 1
新抗原 2
新抗原 3
新抗原 4

图17A

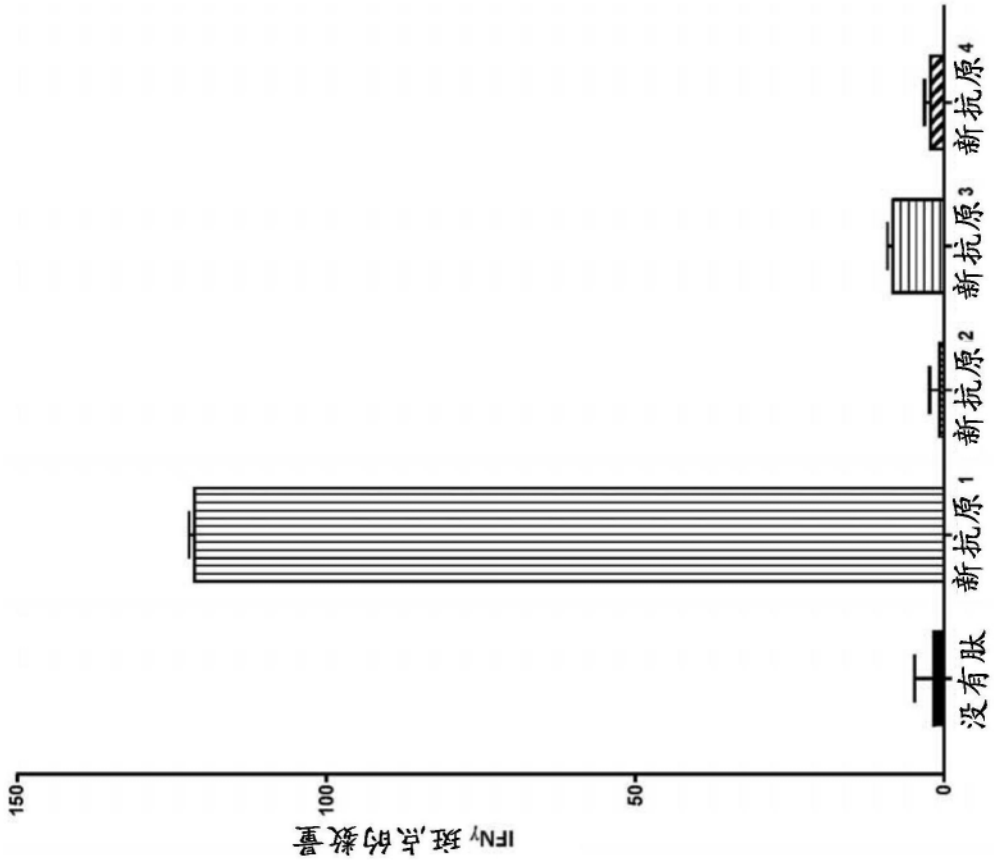


图17B

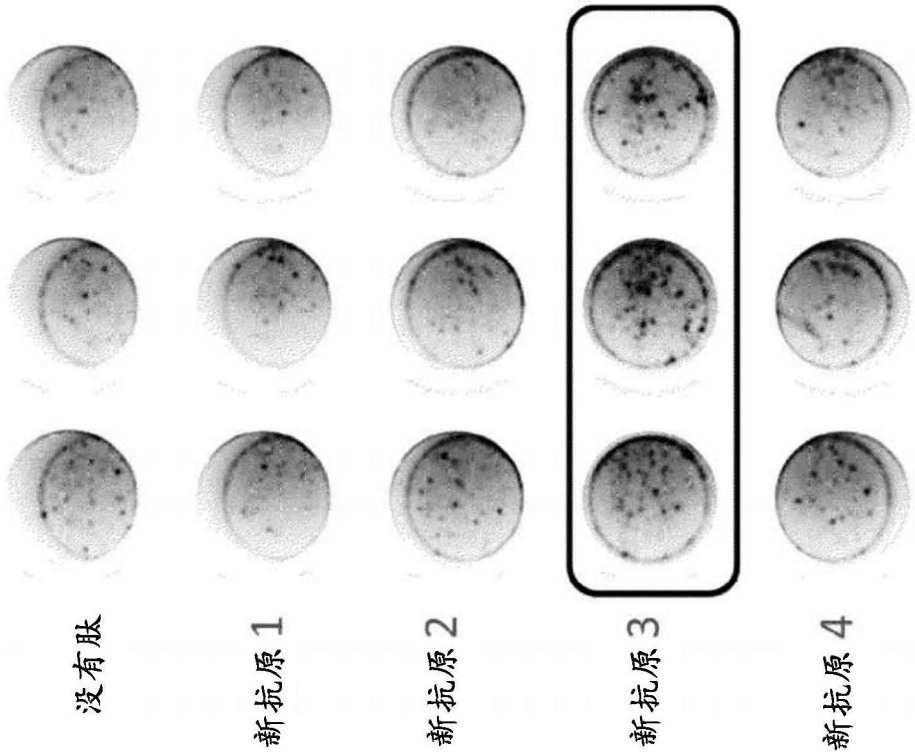


图17C

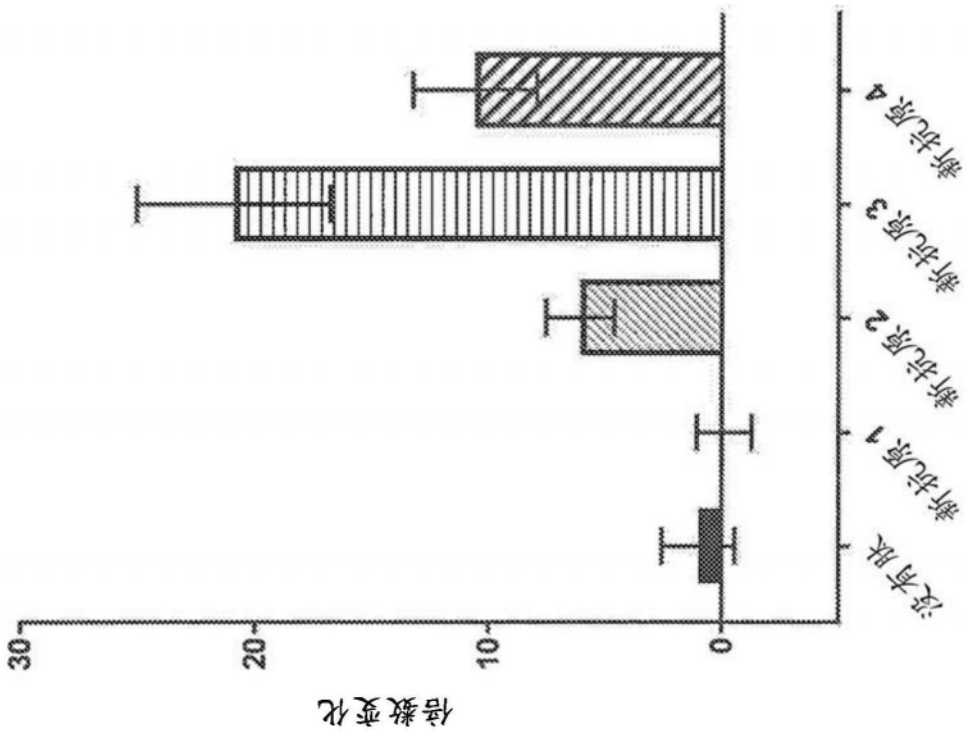


图17D

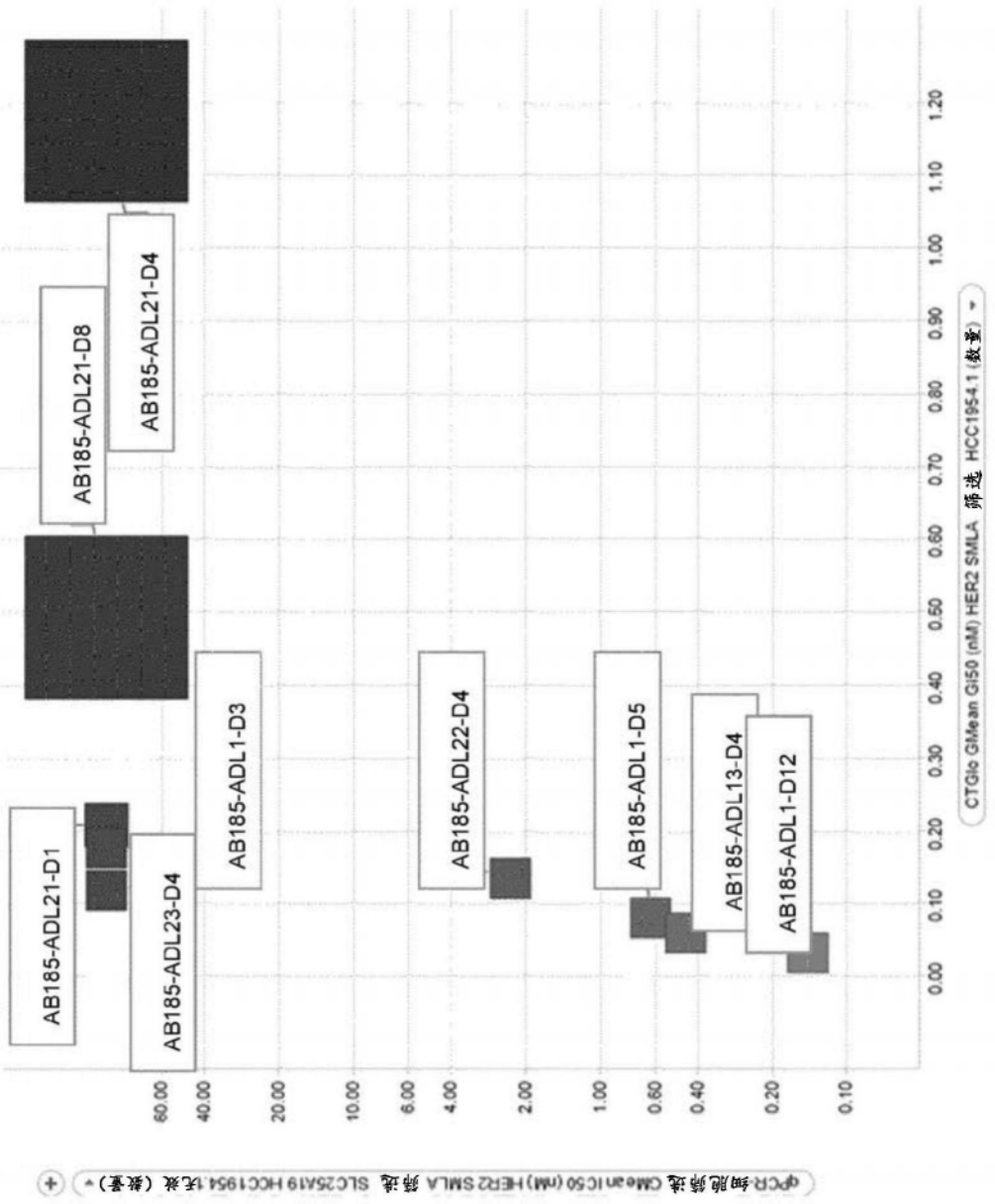

AB185-ADL21-D1
AB185-ADL23-D4
AB185-ADL1-D3
AB185-ADL21-D8
AB185-ADL21-D4
AB185-ADL22-D4
AB185-ADL1-D5
AB185-ADL13-D4
AB185-ADL1-D12
60.00
40.00
20.00
10.00
6.00
4.00
2.00
1.00
0.60
0.40
0.20
0.10
0.00
0.10
0.20
0.30
0.40
0.50
0.60
0.70
0.80
0.90
1.00
1.10
1.20
CTGlo GMean GI50 (nM) HER2 SMLA 筛选 HCC1954.1 (数量)

图18

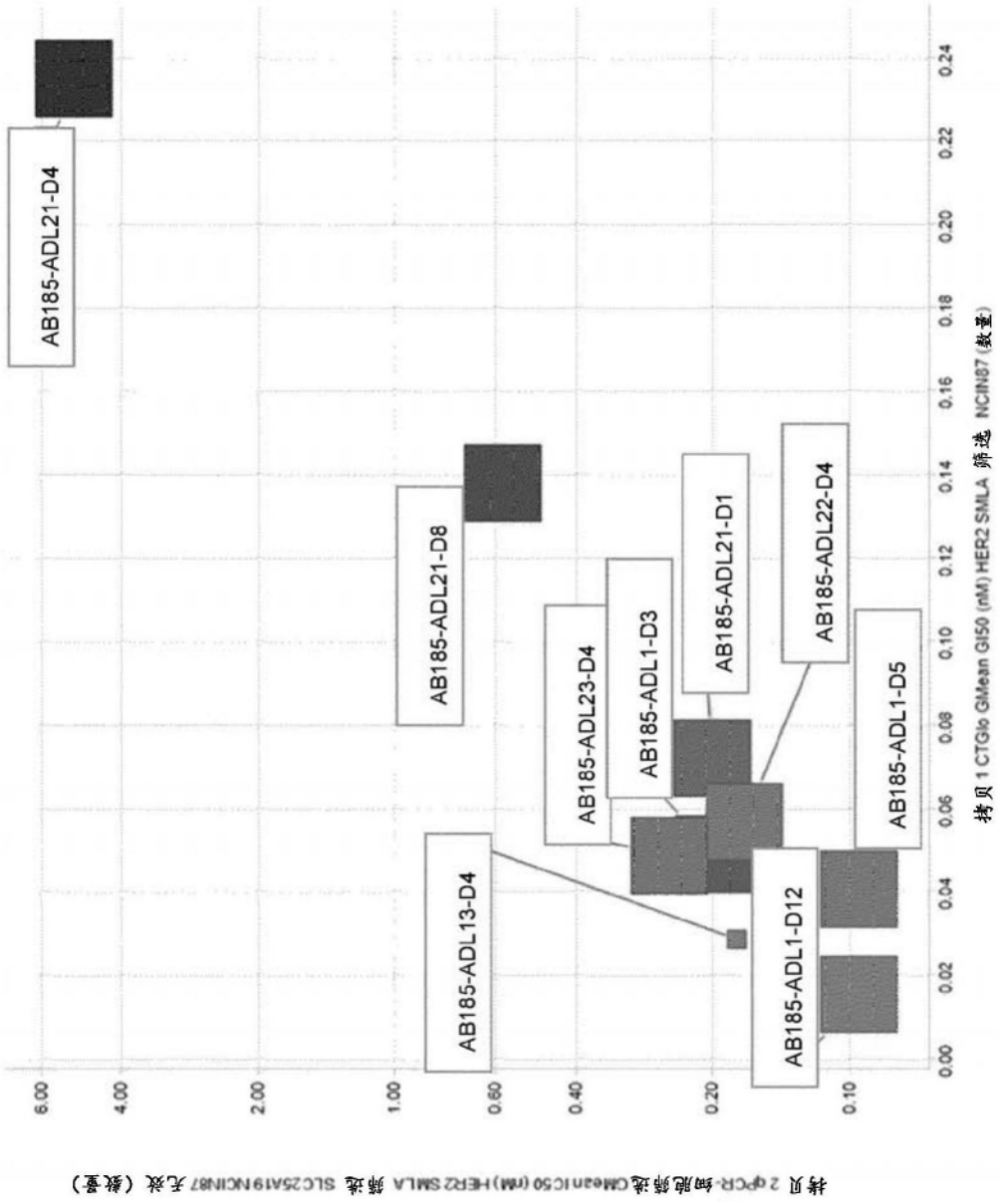

AB185-ADL21-D4
AB185-ADL21-D8
AB185-ADL23-D4
AB185-ADL1-D3
AB185-ADL21-D1
AB185-ADL22-D4
AB185-ADL1-D5
AB185-ADL13-D4
AB185-ADL1-D12
拷贝 1 CTGlo GMean GI50 (nM) HER2 SMLA 筛选 NCIN87 (数量)
0.00
0.02
0.04
0.06
0.08
0.10
0.12
0.14
0.16
0.18
0.20
0.22
0.24
6.00
4.00
2.00
1.00
0.60
0.40
0.20
0.10

图19

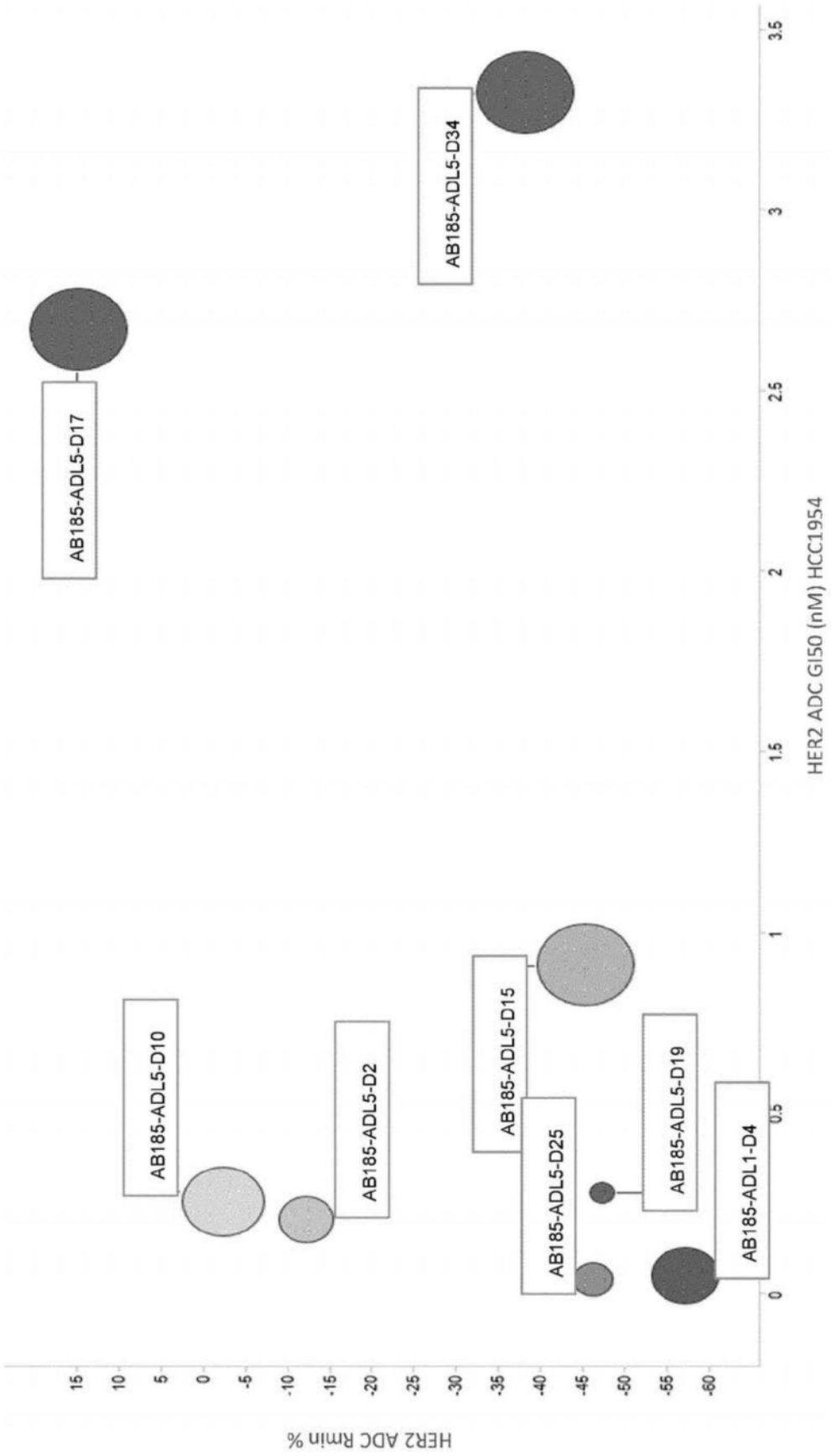

AB185-ADL5-D17
AB185-ADL5-D34
AB185-ADL5-D10
AB185-ADL5-D2
AB185-ADL5-D15
AB185-ADL5-D25
AB185-ADL5-D19
AB185-ADL1-D4
HER2 ADC GI50 (nM) HCC1954
0
0.5
1
1.5
2
2.5
3
3.5
HER2 ADC Rmin %
15
10
5
0
-5
-10
-15
-20
-25
-30
-35
-40
-45
-50
-55
-60

图20

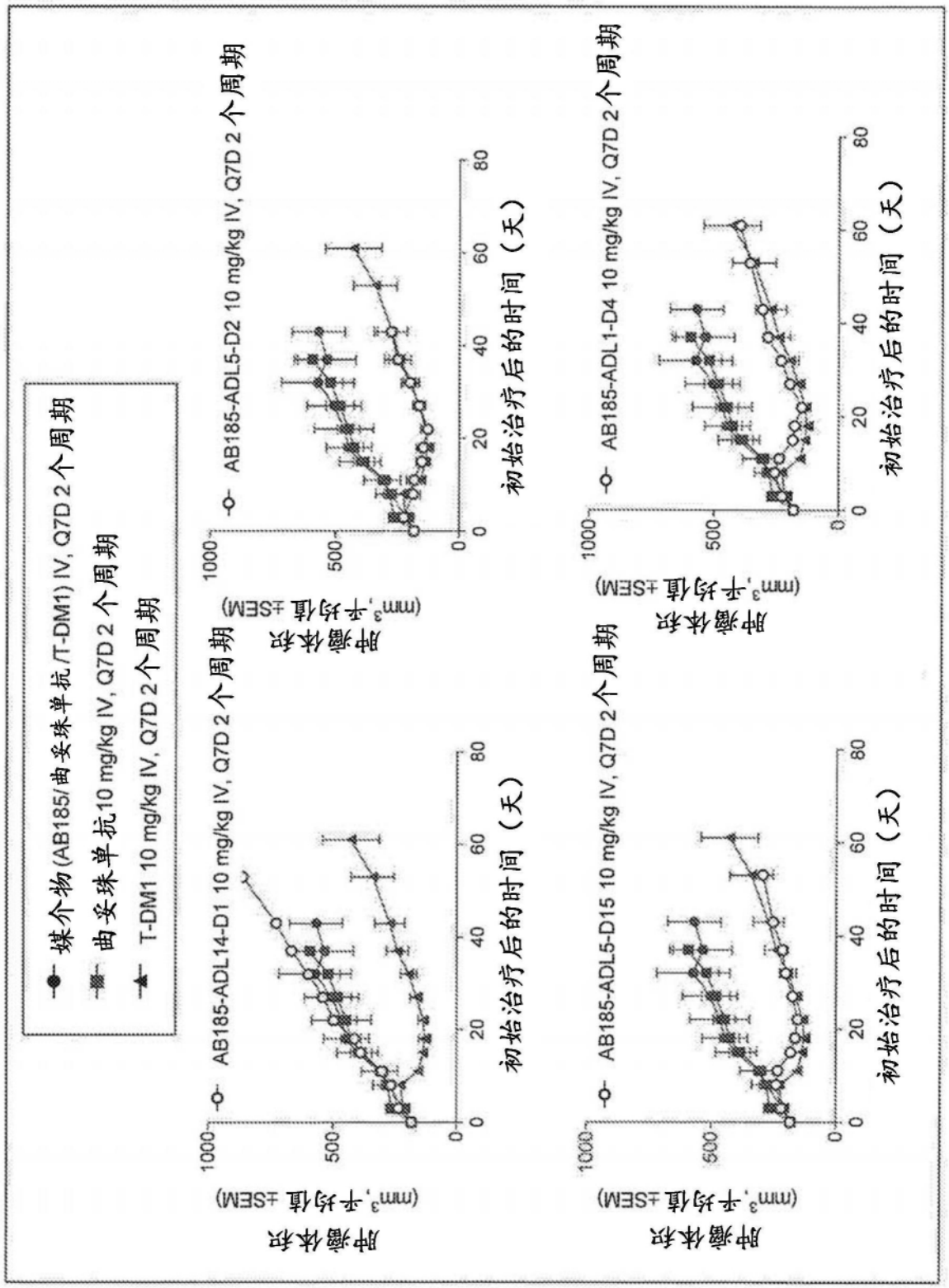

媒介物 (AB185/曲妥珠单抗 /T-DM1) IV, Q7D 2 个周期
曲妥珠单抗10 mg/kg IV, Q7D 2 个周期
T-DM1 10 mg/kg IV, Q7D 2 个周期
AB185-ADL14-D1 10 mg/kg IV, Q7D 2 个周期
AB185-ADL5-D2 10 mg/kg IV, Q7D 2 个周期
AB185-ADL5-D15 10 mg/kg IV, Q7D 2个周期
AB185-ADL1-D4 10 mg/kg IV, Q7D 2个周期
肿瘤体积
(mm³, 平均值 ±SEM)
初始治疗后的时间（天）
0
20
40
60
80
500
1000

图21

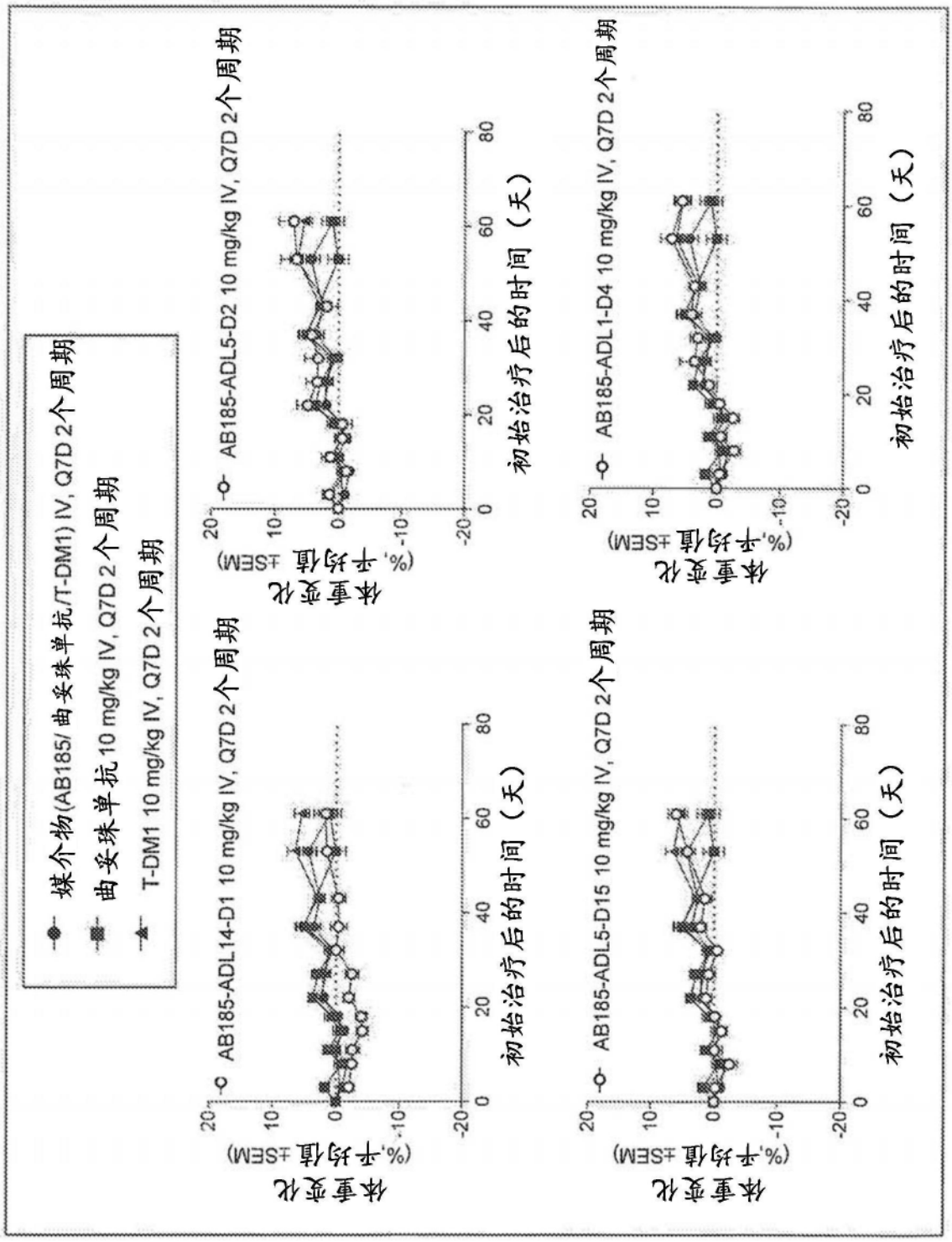

媒介物(AB185/曲妥珠单抗/T-DM1) IV, Q7D 2个周期
曲妥珠单抗 10 mg/kg IV, Q7D 2个周期
T-DM1 10 mg/kg IV, Q7D 2个周期
AB185-ADL14-D1 10 mg/kg IV, Q7D 2个周期
AB185-ADL5-D2 10 mg/kg IV, Q7D 2个周期
AB185-ADL5-D15 10 mg/kg IV, Q7D 2个周期
AB185-ADL1-D4 10 mg/kg IV, Q7D 2个周期
体重变化
(%, 平均值 ±SEM)
初始治疗后的时间（天）

图22

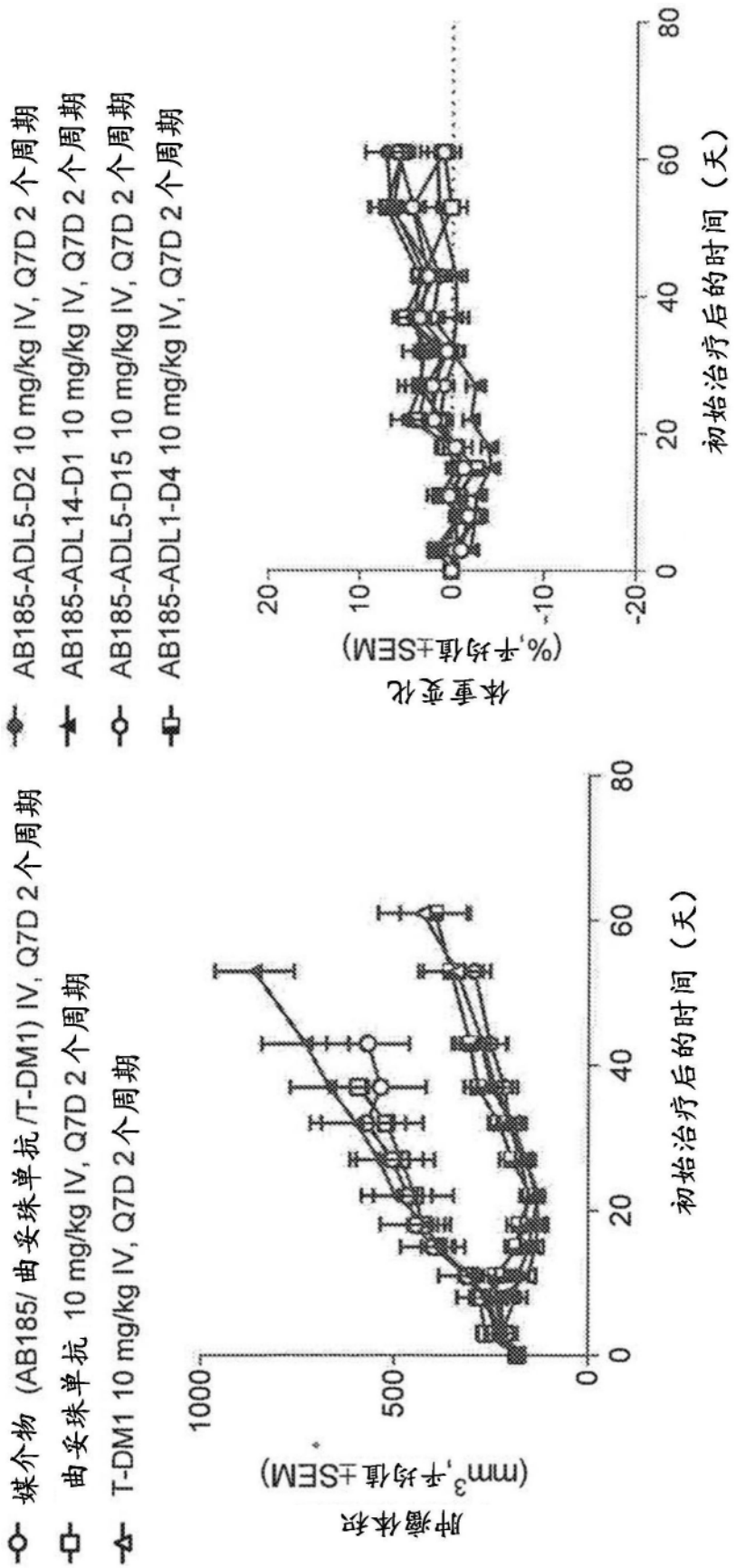

媒介物 (AB185/ 曲妥珠单抗 /T-DM1) IV, Q7D 2 个周期
曲妥珠单抗 10 mg/kg IV, Q7D 2 个周期
T-DM1 10 mg/kg IV, Q7D 2 个周期
AB185-ADL5-D2 10 mg/kg IV, Q7D 2 个周期
AB185-ADL14-D1 10 mg/kg IV, Q7D 2 个周期
AB185-ADL5-D15 10 mg/kg IV, Q7D 2 个周期
AB185-ADL1-D4 10 mg/kg IV, Q7D 2 个周期
肿瘤体积
(mm3,平均值±SEM)
1000
500
0
0
20
40
60
80
初始治疗后的时间（天）
体重变化
(%,平均值±SEM)
20
10
0
-10
-20
0
20
40
60
80
初始治疗后的时间（天）

图23

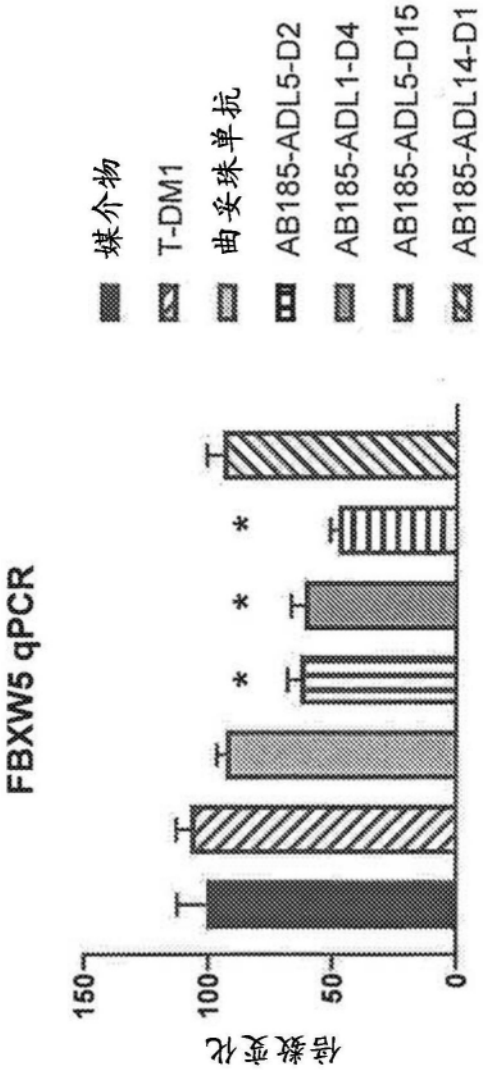

FBXW5 qPCR
倍数变化
150
100
50
0
*
*
*
媒介物
T-DM1
曲妥珠单抗
AB185-ADL5-D2
AB185-ADL1-D4
AB185-ADL5-D15
AB185-ADL14-D1

图24A

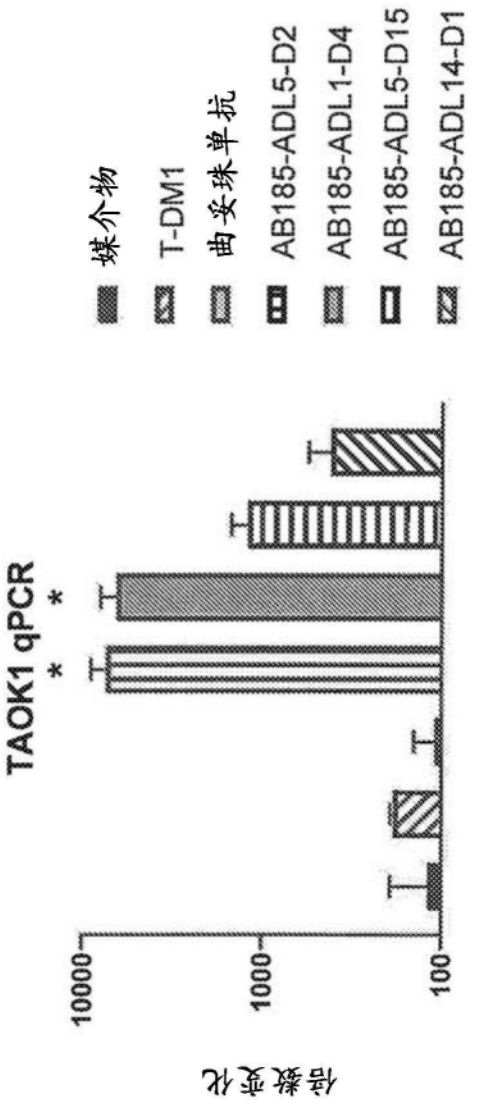

TAOK1 qPCR
* *
10000
1000
100
倍数变化
媒介物
T-DM1
曲妥珠单抗
AB185-ADL5-D2
AB185-ADL1-D4
AB185-ADL5-D15
AB185-ADL14-D1

图24B

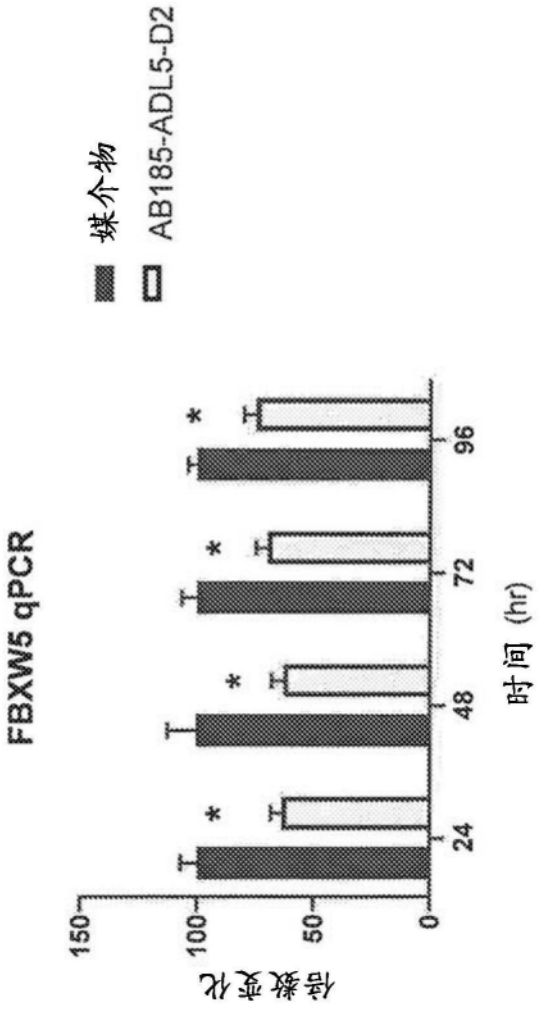


图24C

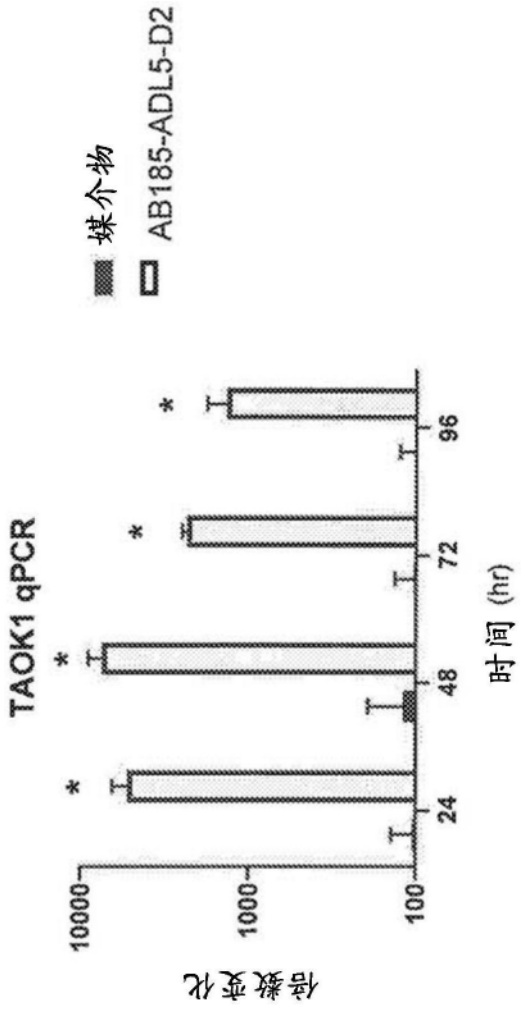

TAOK1 qPCR
培养基
AB185-ADL5-D2
倍数变化
10000
1000
100
24
48
72
96
时间 (hr)
*
*
*
*

图24D

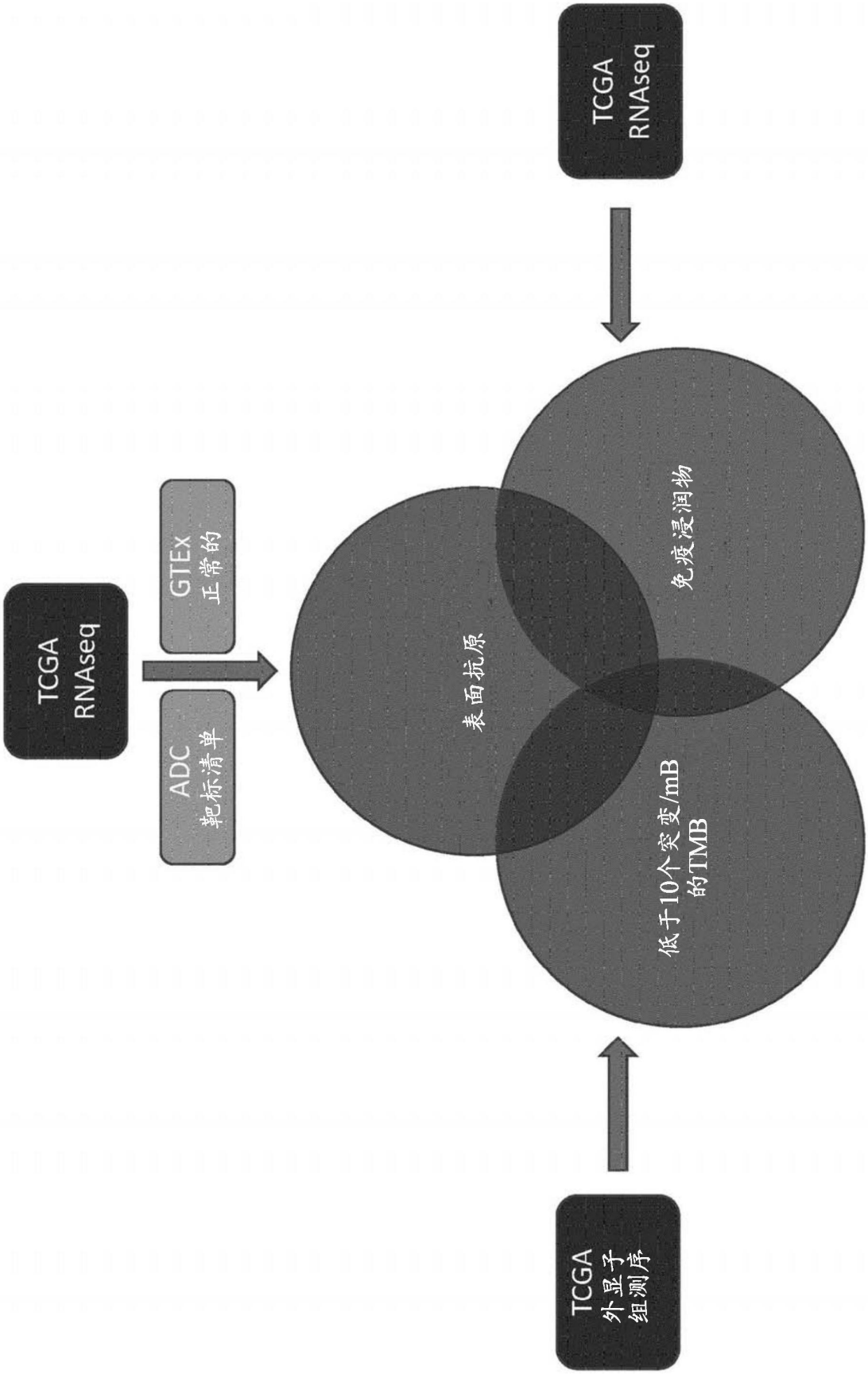

TCGA
RNAseq
GTEX
正常的
ADC
靶标清单
表面抗原
免疫浸润物
低于10个突变/mB
的TMB
TCGA
外显子
组测序
TCGA
RNAseq

图25

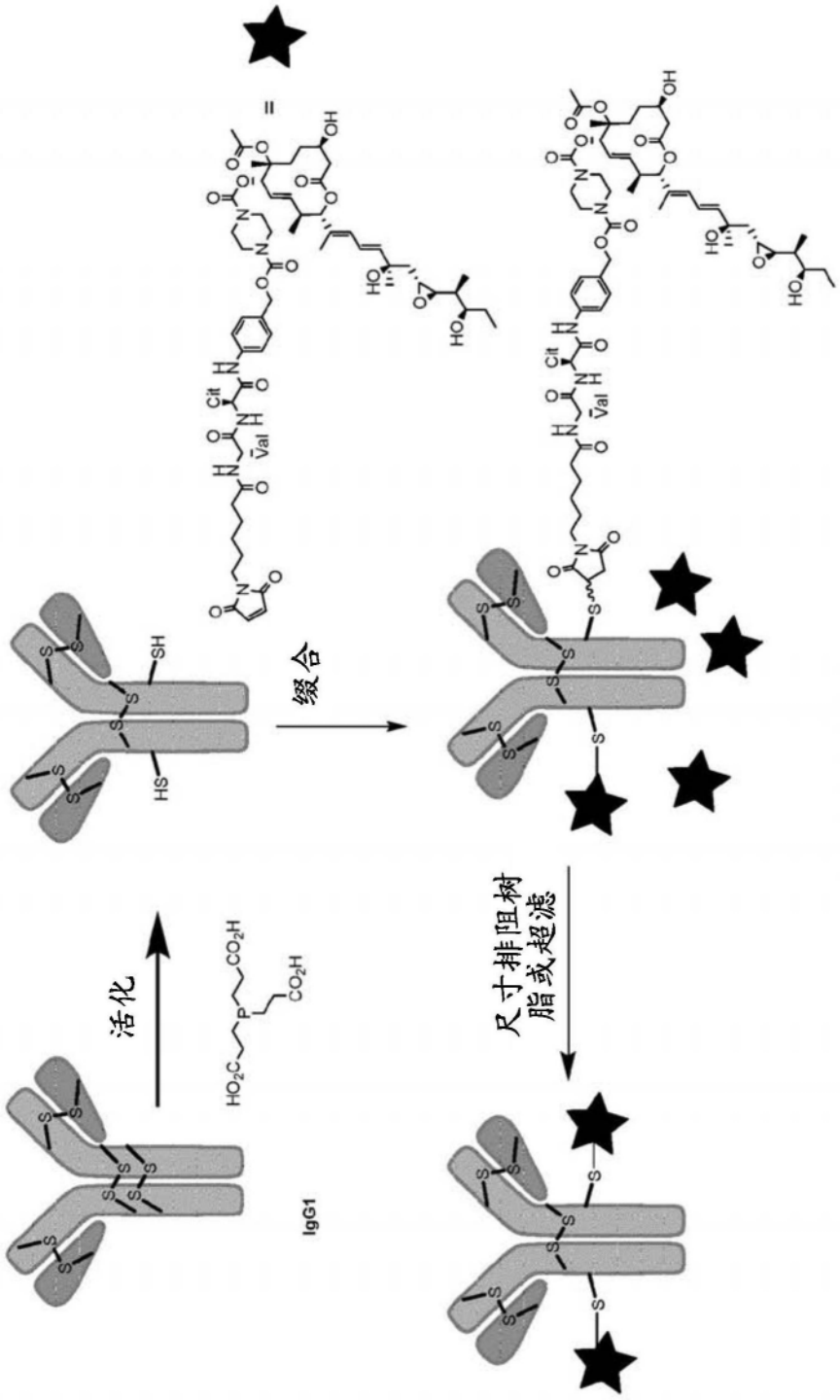


图26