



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104857534 A

(43) 申请公布日 2015. 08. 26

(21) 申请号 201510160314. 2

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2010. 07. 30

A61K 51/08(2006. 01)

(30) 优先权数据

A61K 51/04(2006. 01)

61/230595 2009. 07. 31 US

A61P 35/00(2006. 01)

61/346444 2010. 05. 19 US

G01N 33/574(2006. 01)

61/351022 2010. 06. 03 US

(62) 分案原申请数据

201080043460. 2 2010. 07. 30

(71) 申请人 恩多塞特公司

地址 美国印第安那州

(72) 发明人 C. P. 利蒙 R. 梅斯曼

D. 摩尔金斯特恩

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

司 72001

代理人 李慧惠 石克虎

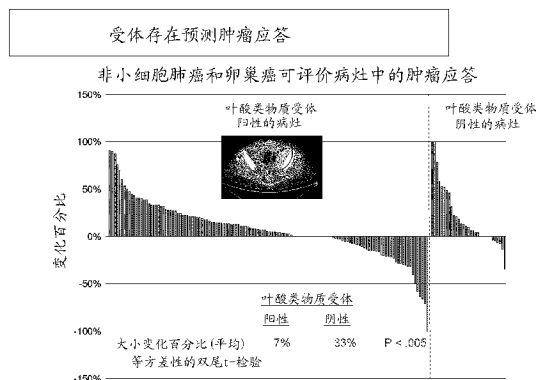
权利要求书2页 说明书50页 附图14页

(54) 发明名称

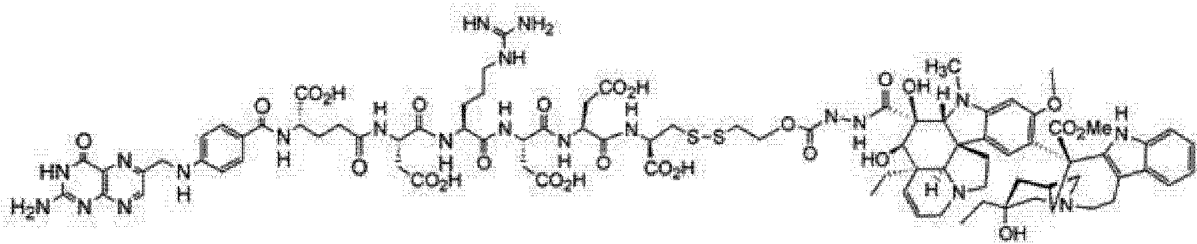
叶酸盐靶向的诊断和治疗

(57) 摘要

描述了叶酸盐靶向的诊断和治疗,具体描述了检测和评估肿瘤上的功能活性的叶酸盐受体的方法与与那些肿瘤有关的治疗。还描述了通过鉴别患者的肿瘤上的功能活性的叶酸盐受体,为使用叶酸盐-长春胺缀合物的疗法选择卵巢癌和肺癌患者的方法。还描述了用于治疗表达叶酸盐受体的上皮肿瘤的方法和组合物,其中与多柔比星(诸如聚乙二醇化的脂质体多柔比星)联合施用叶酸盐-长春胺缀合物,其中所述肿瘤包括卵巢肿瘤、子宫内膜肿瘤或非小细胞肺癌肿瘤,包括铂抗性的卵巢肿瘤和铂敏感的卵巢肿瘤。还描述了治疗铂抗性的卵巢癌的方法,其中在通过鉴别患者的肿瘤上的功能活性的叶酸盐受体来选择患者或不如此选择患者的情况下,使用叶酸盐靶向的药物。



1. 下式的化合物或其药学上可接受的盐在制备用于治疗患者中表达叶酸类物质受体的肺癌的方法的药物中的用途，



其中所述肺癌包含一个或多个病灶，且所述方法包括通过成像确定所述患者的叶酸类物质受体状态的步骤。

2. 根据权利要求 1 的用途，其中所述肺癌是非小细胞肺癌。

3. 根据前述权利要求任一项的用途，其中所述叶酸类物质受体状态基于所述患者中叶酸类物质受体阳性的可评价病灶的百分比的测量。

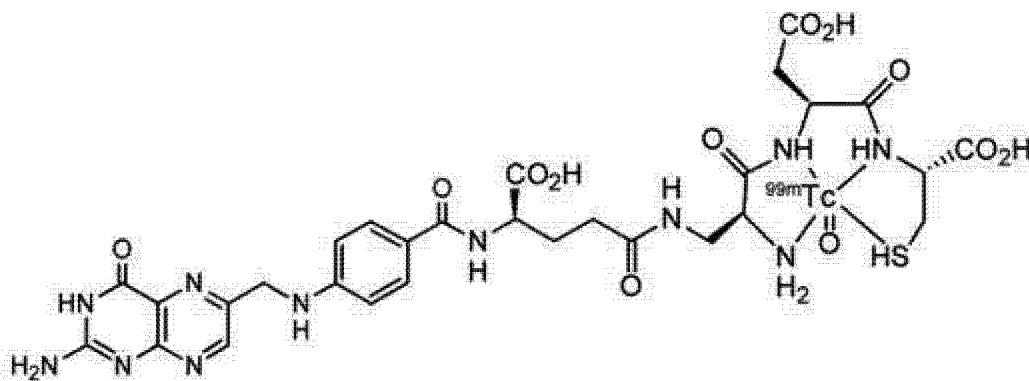
4. 根据前述权利要求任一项的用途，其中所述患者的叶酸类物质受体状态是 EC20+ 或 EC20++。

5. 根据权利要求 4 的用途，其中所述叶酸类物质受体状态是 EC20++，并且其中 EC20++ 状态与对患者的临床益处相关。

6. 根据权利要求 4 的用途，其中所述叶酸类物质受体状态是 EC20+，并且其中 EC20+ 状态与对患者的临床益处相关。

7. 根据权利要求 5 或 6 的用途，其中所述临床益处选自患者的无进展存活、肿瘤生长的抑制、稳定的疾病、部分应答和完全应答。

8. 根据前述权利要求任一项的用途，其中所述确定所述患者的叶酸类物质受体状态的步骤包括：在给所述患者施用所述化合物或其药学上可接受的盐之前，给所述患者施用下式缀合物或其药学上可接受的盐



9. 根据权利要求 8 的用途，其中所述缀合物或其药学上可接受的盐施用给所述患者用于检测功能活性的叶酸类物质受体。

10. 根据权利要求 8 或 9 的用途，其中所述方法另外包括下述步骤：在给所述患者施用所述缀合物或其药学上可接受的盐之前，给所述患者施用未标记的叶酸或其盐。

11. 根据前述权利要求任一项的用途，其中所述确定所述患者的叶酸类物质受体状态的步骤包括视觉地评估所述病灶的叶酸类物质受体状态。

12. 根据权利要求 8-11 中任一项的用途,其中所述化合物或其药学上可接受的盐和所述缀合物或其药学上可接受的盐各自是在肠胃外剂型中。

13. 根据权利要求 12 的用途,其中所述剂型选自:真皮内的、皮下的、肌肉内的、腹膜内的、静脉内的和鞘内的剂型。

14. 根据权利要求 8-13 中任一项的用途,其中所述化合物或其药学上可接受的盐和所述缀合物或其药学上可接受的盐各自是在组合物中,且所述组合物另外包含药学上可接受的载体。

15. 根据前述权利要求任一项的用途,其中所述患者的叶酸类物质受体状态指示用所述化合物或其药学上可接受的盐治疗。

16. 根据前述权利要求任一项的用途,其中所述确定所述患者的叶酸类物质受体状态的步骤包括对所述患者成像,且其中所述图像用来视觉地评估所述病灶以确定所述患者的叶酸类物质受体状态。

17. 根据前述权利要求任一项的用途,其中所述患者的叶酸类物质受体状态基于所述患者中 EC20++ 的可评价病灶的百分比的测量。

18. 根据权利要求 16 的用途,其中所述图像是 SPECT/CT 图像。

19. 根据前述权利要求任一项的用途,其中所述化合物或其药学上可接受的盐具有至少 97% 的纯度。

20. 根据前述权利要求任一项的用途,其中所述缀合物或其药学上可接受的盐具有至少 97% 的放射化学纯度。

## 叶酸盐靶向的诊断和治疗

[0001] 本申请是申请日为 2010 年 7 月 30 日的中国专利申请 201080043460.2“叶酸盐靶向的诊断和治疗”的分案申请。

[0002] 本申请要求 2009 年 7 月 31 日提交的美国临时申请 61/230,595、2010 年 5 月 19 日提交的美国临时申请 61/346,444 和 2010 年 6 月 3 日提交的美国临时申请 61/351,022 的权益,它们各自通过引用整体并入本文。

### 技术领域

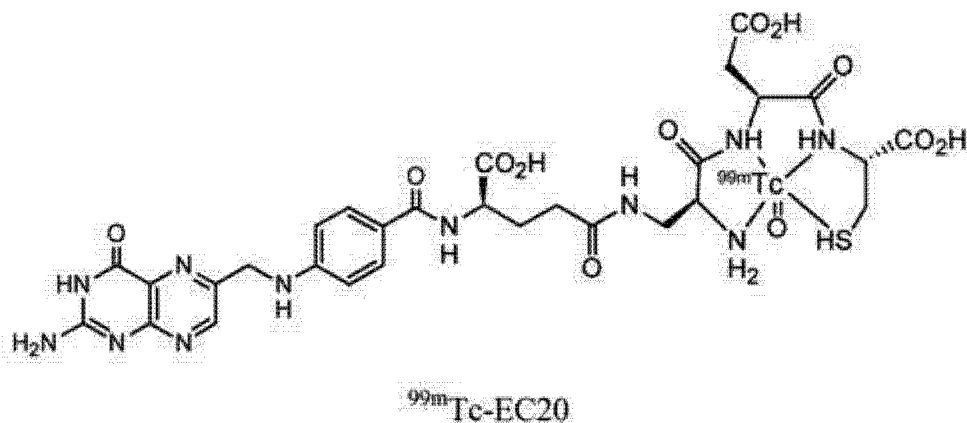
[0003] 本发明涉及用于检测和评估肿瘤上的功能活性的叶酸盐受体的方法和组合物以及那些肿瘤有关的治疗。本发明另外涉及通过鉴别患者的肿瘤上的功能活性的叶酸盐受体,为使用叶酸盐-长春胺缀合物的疗法选择卵巢癌和肺癌患者的方法和组合物。本发明也涉及用于治疗表达叶酸盐受体的上皮肿瘤的方法和组合物,其中与多柔比星(诸如聚乙二醇化的脂质体多柔比星)联合施用叶酸盐-长春胺缀合物,其中所述肿瘤包括卵巢肿瘤、子宫内膜肿瘤或非小细胞肺癌肿瘤,包括铂抗性的卵巢肿瘤和铂敏感的卵巢肿瘤。本发明也涉及用于治疗铂抗性的卵巢癌的方法和组合物,其中在通过鉴别患者的肿瘤上的功能活性的叶酸盐受体来选择患者或不如此选择患者的情况下,使用叶酸盐靶向的药物。

### 背景技术

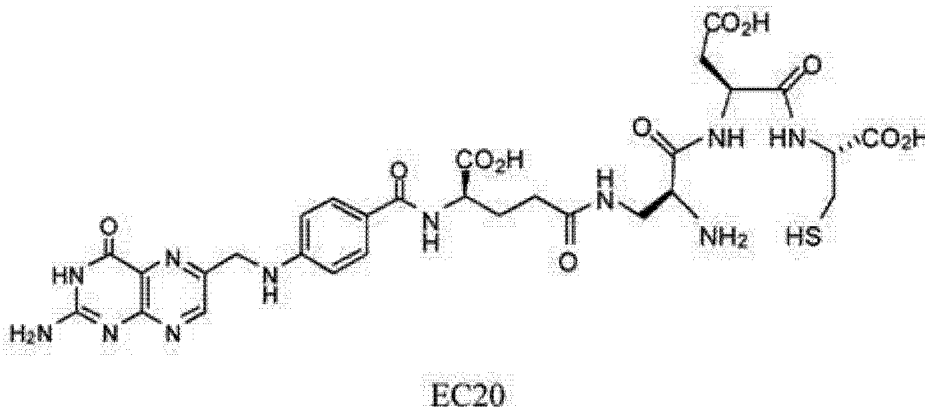
[0004] 靶向药物疗法的一个重要附加条件是,用于提供关于目标分子靶物的存在与否的信息的诊断试验的共同开发。例如,对使用赫赛汀®(曲妥单抗)的疗法的选择由这样的诊断试验 HercepTest® 引导,所述 HercepTest® 是一个半定量免疫组织化学(IHC)试验,其测量人表皮生长因子受体 2 (HER2) 表达,以辅助选择患者进行赫赛汀®治疗。但是,所述 HercepTest® 不检测功能活性的表皮生长因子受体(即,结合表皮生长因子的受体),因为针对表皮生长因子受体的抗体被用于检测表皮生长因子受体在固定组织上的存在,而不是检测那些受体的结合表皮生长因子的能力。

[0005] 在使用  $^{111}\text{In}$ -DTPA-叶酸盐来检测卵巢癌患者的肿瘤上的叶酸盐受体的研究之后,开始了开发基于镓-99m ( $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ) 的叶酸盐连接的放射药物的研究。基于镓的药剂的优点包括:1) 钼/镓-99m 发生器的容易可用性,2) 在  $\gamma$  计数器中的检测的最佳能量(140 keV),和 3) 短半衰期。在这点上,开发了具有下式的  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -EC20 (EC20)。镓-99m-标记的 EC20 ( $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -EC20) 会提供表达叶酸盐受体(其能够结合叶酸盐)的组织的实时非侵入性检测。



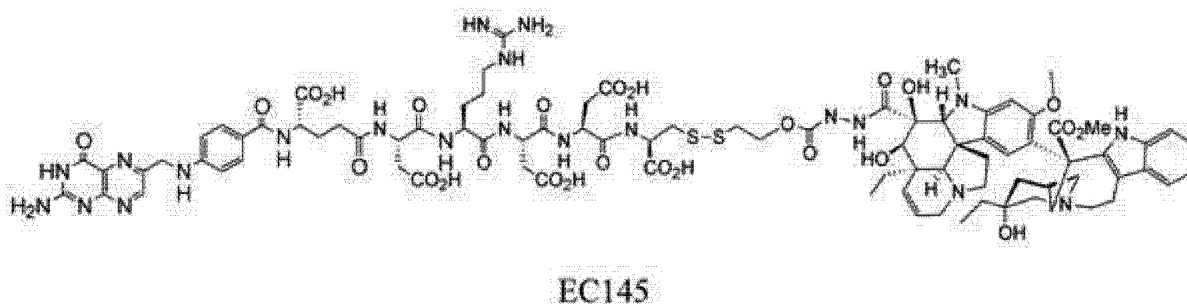


[0006] 术语 EC20 通常用于表示缺少放射性核素的非放射性的试剂：



但是,EC20 也通常用于表示放射性药物物质  $^{99m}\text{Tc-EC20}$ ,它是给患者施用的物质。参见下面的实施例 2 和 3。在为了检测和评估表达叶酸受体(其能够结合叶酸)的组织而施用给患者的背景下,EC20 在本文中用于表示放射性药物物质  $^{99m}\text{Tc-EC20}$  或其药学上可接受的盐。应当理解,所述物质可以以离子化形式(包括去质子化形式)存在于溶液或悬浮液中。

[0007] 已经开发了叶酸靶向的药物,并正在临床试验中作为癌症治疗剂进行测试。EC145 包括与叶酸缀合的非常有效的长春花生物碱细胞毒性化合物去乙酰长春碱酰胺(DAVLBH)。EC145 分子会靶向在上皮肿瘤的表面上以高水平存在的叶酸受体,所述上皮肿瘤包括非小细胞肺癌(NSCLC)、卵巢癌、子宫内膜癌和肾癌和其它癌,包括输卵管癌和原发性腹膜癌。不受理论的约束,据信,EC145 会结合表达叶酸受体的肿瘤,将长春胺部分直接地递送至癌细胞,同时避开正常组织。在结合后,EC145 通过胞吞作用进入癌细胞中,释放出 DAVLBH,并通过抑制细胞分裂所需的有丝分裂装配的形成而造成细胞死亡。EC145 具有化学文摘登记号(Cheical Abstracts Registry Number) 742092-03-1 和下式。



[0008] 在治疗的背景下,本文使用的术语 EC145 是指上述的化合物或其药学上可接受的

盐；所述化合物可以以离子化形式（包括质子化形式）存在于溶液或悬浮液中。

## 发明内容

[0009] 申请人已经证实，能够结合叶酸受体叶酸盐-放射性成像剂缀合物可以用于将放射性核素靶向肿瘤（包括卵巢肿瘤）或肺肿瘤，并进一步在肿瘤中浓缩放射性核素。令人惊奇地，申请人已经发现，功能活性的叶酸受体的阈值水平的存在，可以指示对患者的临床益处。因而，根据本发明，本文描述了一种测定活性叶酸受体在患者肿瘤上的存在的方法。另外，描述了为 EC145 疗法选择患者的方法，其中可以基于预测的对患者的临床益处来为疗法选择患者，所述预测的对患者的临床益处源自患者的肿瘤上的功能活性的叶酸受体的阈值水平的检测。对患者的临床益处包括：患者的无进展存活、接受 4 个或更多个 EC145 治疗周期的能力、肿瘤生长的抑制、稳定的疾病、肿瘤对治疗的部分应答和 / 或肿瘤对治疗的完全应答。因此，功能活性的叶酸受体的检测（这可以包括、但不限于：测定功能活性的叶酸受体的表达的阈值水平）可以用于确定 EC145 是否适用于治疗具有卵巢癌或肺癌的患者。在为使用叶酸-药物缀合物的疗法选择患者时，该非侵入性的方法可以被医护人员用作辅助手段，其中卵巢肿瘤或肺肿瘤携带有关的功能活性的叶酸受体分子靶物。

[0010] 申请人已经进一步证实了使用 EC145 和聚乙二醇化的脂质体多柔比星的组合治疗患者的铂抗性的卵巢肿瘤（包括转移性肿瘤）。申请人已经证实，该联合治疗优于使用聚乙二醇化的脂质体多柔比星（不使用 EC145）治疗患者。EC20 可以与该治疗联合地或不联合地使用。

[0011] 在本发明的一个方面，提供了一种用于检测具有肿瘤的患者功能活性的叶酸受体的方法。

[0012] 在本发明的另一个方面，提供了一种用于测定功能活性的叶酸受体在患者的肿瘤（诸如卵巢肿瘤或肺肿瘤，包括原发性和转移性肿瘤）上的存在的方法，所述方法包括下述步骤：给所述患者施用包含 EC20 的组合物。

[0013] 在本发明的另一个方面，提供了一种测定 EC145 是否适用于治疗具有肿瘤（诸如卵巢肿瘤或肺肿瘤）的患者的方法，所述方法包括下述步骤：测定功能活性的叶酸受体在患者的肿瘤上是否存在，其中如果功能活性的叶酸受体在肿瘤（包括原发性和转移性肿瘤）上存在，则 EC145 适用于治疗具有所述肿瘤的患者。

[0014] 在另一个方面，提供了一种测定 EC145 是否适用于治疗具有卵巢肿瘤或肺肿瘤的患者方法，所述方法包括下述步骤：给所述患者施用 EC20，其中如果患者的肿瘤具有功能活性的叶酸受体，其中所述功能活性的叶酸受体能够用 EC20 检测到，则 EC145 适用于治疗具有所述肿瘤的患者。

[0015] 在本发明的另一个方面，提供了一种测定 EC145 是否适用于治疗具有卵巢肿瘤或肺肿瘤的患者方法，所述方法包括下述步骤：给所述患者施用 EC20，其中如果与由 EC20 产生的背景放射性信号相比，在结合肿瘤以后由 EC20 产生的放射性信号指示对患者的临床益处，则 EC145 适用于治疗具有所述肿瘤的患者。

[0016] 在本发明的另一个方面，提供了一种预测患者的卵巢肿瘤或肺肿瘤对 EC145 疗法的应答的方法，所述方法包括下述步骤：

- a) 给所述患者施用 EC20, 其中 EC20 产生放射性信号;
- b) 定量在 EC20 与肿瘤结合以后由 EC20 产生的放射性信号;
- c) 定量由 EC20 产生的背景放射性信号;
- d) 对比在 EC20 与肿瘤结合以后产生的放射性信号和背景放射性信号;和
- e) 基于所述对比, 预测所述肿瘤对所述疗法的应答。

[0017] 在本发明的另一个方面, 提供了一种治疗有此需要的患者的表达叶酸受体上的上皮肿瘤的方法, 所述方法包括: 施用与治疗量的多柔比星相组合的治疗量的 EC145。

[0018] 在本发明的另一个方面, 提供了一种治疗有此需要的患者的表达叶酸受体上的上皮肿瘤的方法, 所述方法包括: 施用与治疗量的聚乙二醇化的脂质体多柔比星相组合的治疗量的 EC145。

[0019] 在本发明的另一个方面, 提供了一种治疗有此需要的患者的铂抗性的卵巢癌的方法, 所述方法包括: 施用与治疗量的聚乙二醇化的脂质体多柔比星相组合的治疗量的 EC145。

[0020] 在本发明的另一个方面, 提供了一种治疗有此需要的患者的铂敏感的卵巢癌的方法, 所述方法包括: 施用与治疗量的聚乙二醇化的脂质体多柔比星相组合的治疗量的 EC145。

[0021] 在本发明的另一个方面, 提供了一种在有此需要的患者的铂抗性的卵巢癌的治疗中与使用治疗量的聚乙二醇化的脂质体多柔比星的治疗相比获得临床益处的方法, 所述方法包括: 施用与治疗量的聚乙二醇化的脂质体多柔比星相组合的治疗量的 EC145。

[0022] 在另一个方面, 提供了一种测定具有肿瘤的患者是否具有在其肿瘤上的功能活性的叶酸受体的方法。所述方法包括下述步骤: 给所述患者施用有效量的 EC20, 用于检测功能活性的叶酸受体。在另一个方面, 所述肿瘤是卵巢肿瘤或肺肿瘤。在另一个示例方面, 所述肿瘤是原发性肿瘤或转移性肿瘤。在另一个实施方案中, 所述功能活性的叶酸受体可视觉地检测到。在另一个方面, 功能活性的叶酸受体的视觉检测被用于测定患者的叶酸受体状态。例证性地, 所述患者的叶酸受体状态选自: EC20<sup>++</sup>、EC20<sup>+</sup> 和 EC20<sup>-</sup>。在该示例方面, 所述叶酸受体状态可以是 EC20<sup>++</sup>, 并指示使用 EC145 的治疗。在另一个方面, EC20<sup>++</sup> 状态与对患者的临床益处相关联, 且所述临床益处可以是疾病控制率或总疾病应答率。

#### 附图说明

[0023] 图 1. 在施用 <sup>99m</sup>Tc-EC20<sup>-</sup> 叶酸以后患者的平面图像。在 <sup>99m</sup>Tc-EC20 成像操作之前, 患者接受 1 次 0.5 mg 叶酸的静脉内注射, 随后在 1-3 分钟内, 注射 1-2 mL 用 20-25 mCi 的钼-99m 标记的 0.1 mg EC20。在 <sup>99m</sup>Tc-EC20 注射后大约 1-2 小时, 获取大腿中部至头的前后平面图像。箭头指示肿瘤 (病灶) 的近似位置。在该实施例中, 指示了 2 个含有叶酸受体阳性的肿瘤的区域。

[0024] 图 2. 在施用 <sup>99m</sup>Tc-EC20<sup>-</sup> 叶酸以后患者的平面图像。在 <sup>99m</sup>Tc-EC20 成像操作之前, 患者接受 1 次 0.5 mg 叶酸的静脉内注射, 随后在 1-3 分钟内, 注射 1-2 mL 用 20-25 mCi 的钼-99m 标记的 0.1 mg EC20。在 <sup>99m</sup>Tc-EC20 注射后大约 1-2 小时, 获取大腿中部至头的前后平面图像。箭头指示肿瘤 (病灶) 的近似位置。在该实施例中, 指示了 2 个含有叶酸

盐受体阳性的肿瘤的区域。

[0025] 图 3. 在施用  $^{99m}\text{Tc}$ -EC20- 叶酸盐以后患者的平面图像。在  $^{99m}\text{Tc}$ -EC20 成像操作之前,患者接受 1 次 0.5 mg 叶酸的静脉内注射,随后在 1-3 分钟内,注射 1-2 mL 用 20-25 mCi 的锝-99m 标记的 0.1 mg EC20。在  $^{99m}\text{Tc}$ -EC20 注射后大约 1-2 小时,获取大腿中部至头的前后平面图像。箭头指示肿瘤(病灶)的近似位置。在该实施例中,指示了 2 个含有叶酸盐受体阳性的肿瘤的区域。

[0026] 图 4. 在施用  $^{99m}\text{Tc}$ -EC20- 叶酸盐以后患者的平面图像。在  $^{99m}\text{Tc}$ -EC20 成像操作之前,患者接受 1 次 0.5 mg 叶酸的静脉内注射,随后在 1-3 分钟内,注射 1-2 mL 用 20-25 mCi 的锝-99m 标记的 0.1 mg EC20。在  $^{99m}\text{Tc}$ -EC20 注射后大约 1-2 小时,获取大腿中部至头的前后平面图像。箭头指示肿瘤(病灶)的近似位置。在该实施例中,指示了 1 个含有叶酸盐受体阳性的肿瘤的区域。

[0027] 图 5. 在施用  $^{99m}\text{Tc}$ -EC20- 叶酸盐以后患者的平面图像。在  $^{99m}\text{Tc}$ -EC20 成像操作之前,患者接受 1 次 0.5 mg 叶酸的静脉内注射,随后在 1-3 分钟内,注射 1-2 mL 用 20-25 mCi 的锝-99m 标记的 0.1 mg EC20。在  $^{99m}\text{Tc}$ -EC20 注射后大约 1-2 小时,获取大腿中部至头的前后平面图像。箭头指示肿瘤(病灶)的近似位置。在该实施例中,指示了 6 个叶酸盐受体阳性的病灶。

[0028] 图 6. 患者的 CT 扫描图像,相同患者的平面图像显示在图 5 中。用 2 个椭圆形指示目标区域(在肿瘤病灶内的高强度图像区)。在开始 EC145 治疗之前测量图像,得到下述大小:肿瘤 1 - 34 mm,肿瘤 2 - 25 mm。

[0029] 图 7. 患者的 CT 扫描图像,相同患者的平面图像显示在图 5 中。用 2 个椭圆形指示目标区域(在肿瘤病灶内的高强度图像区)。在 EC145 治疗 8 周(2 个周期)之后测量图像,得到下述肿瘤大小(大小变化百分比):肿瘤 1 - 15 mm (-56%),肿瘤 2 - 10 mm (-60%)。

[0030] 图 8. 使用 EC145 的示例性的 16 周治疗方案。

[0031] 图 9. 非小细胞肺癌和卵巢癌肿瘤对治疗的肿瘤应答。基于在施用  $^{99m}\text{Tc}$ -EC20 以后的成像结果,根据在实施例 16 中所述的方法,将肿瘤分成 2 组:叶酸盐受体阳性的和叶酸盐受体阴性的(被图中的垂直虚线分开)。图中的单个条指示在通过实施例 18 或实施例 19 的方法治疗以后每个肿瘤的大小的变化。如在实施例 21 中所述,基于在实施例 16 中所述的方法,叶酸盐受体阳性的所有肿瘤的大小平均增加明显小于叶酸盐受体阴性的所有肿瘤的大小平均增加,分别是 7% 和 33%。

[0032] 图 10. 显示 EC20 在靶病灶中的摄入的 SPECT 和平面图像。 $^{99m}\text{Tc}$ -EC20 允许医师得到受体表达的实时评估。图 A、B 和 C 对比了来自卵巢癌患者(患者 035,研究 EC-FV-02)的 CT、SPECT 和平面图像,显示了  $^{99m}\text{Tc}$ -EC20 在腹部肿块中的摄入(白色箭头)。图 A - CT 扫描;图 B - 显示  $^{99m}\text{Tc}$ -EC20 摄入的 SPECT 图像;图 C - 显示  $^{99m}\text{Tc}$ -EC20 摄入的平面图像。

[0033] 图 11 显示了下述患者在研究 EC-FV-04 的中间分析时的无进展存活(PFS)的卡普兰-迈耶曲线:用与聚乙二醇化的脂质体多柔比星相组合的 EC145(EC145 + PLD) 治疗的患者,和用单独的聚乙二醇化的脂质体多柔比星(单独的 PLD) 治疗的患者。

[0034] 图 12 显示了下述受试者在研究 EC-FV-04(正在具有铂抗性的卵巢癌的女性中进行的 II 期试验)的中间分析时的无进展存活(PFS)时间的卡普兰-迈耶曲线:所述受试者

在具有核成像能力的场所登记,在研究治疗之前用 EC20 扫描她们,并在研究治疗(与 PLD 组合的 EC145 相对于单独的 PLD)之前被评估为 EC20 阳性的(EC20++ 状态)。

[0035] 图 13 显示了在研究 EC-FV-02 中总存活(OS)时间的卡普兰-迈耶曲线,所述研究 EC-FV-02 是在具有晚期卵巢癌和子宫内膜癌的女性中的试验,在研究治疗之前用 EC20 扫描她们,并在研究治疗之前被评估为 EC20 阳性的(EC20++ 状态,与被评估为 EC20+ 状态或 EC20- 状态的那些相比)。该曲线显示了在非常难治的卵巢癌患者中选择从单一药剂 EC145 受益的患者的实用性。

[0036] 图 14 显示了下述患者在研究 EC-FV-04(正在具有铂抗性的卵巢癌的女性中进行的 II 期试验)的中间分析时的总存活(OS)时间的卡普兰-迈耶曲线:用与聚乙二醇化的脂质体多柔比星相组合的 EC145(EC145 + PLD)治疗的患者,和用单独的聚乙二醇化的脂质体多柔比星(单独的 PLD)治疗的患者。

[0037] 图 15 显示了 EC145 和多柔比星之间在抑制 KB 肿瘤细胞体内生长方面的协同关系(如实施例 7 所述);在该线下面的数据点表示协同作用。

[0038] 图 16 显示了对肿瘤生长和应答(PR = 部分应答,CR = 完全应答,治愈)的影响,其来自下述组在实施例 8 中所述的携带 M109 肿瘤的小鼠研究:(a) M109 对照;(b) EC145, 2  $\mu\text{mol}/\text{kg}$ ;(c) DOXIL, 7 mg/kg;(d) EC145, 2  $\mu\text{mol}/\text{kg}$  + DOXIL, 7 mg/kg;(e) DOXIL, 4 mg/kg;和 (f) EC145, 2  $\mu\text{mol}/\text{kg}$  + DOXIL, 4 mg/kg。

[0039] 图 17 显示了对重量变化的影响,其来自下述组在实施例 8 中所述的携带 M109 肿瘤的小鼠研究:(a) M109 对照;(b) EC145, 2  $\mu\text{mol}/\text{kg}$ ;(c) DOXIL, 7 mg/kg;(d) EC145, 2  $\mu\text{mol}/\text{kg}$  + DOXIL, 7 mg/kg;(e) DOXIL, 4 mg/kg;和 (f) EC145, 2  $\mu\text{mol}/\text{kg}$  + DOXIL, 4 mg/kg。

#### [0040] 定义

根据本发明,“功能活性的叶酸受体”是指,以至少约 1.2 或更大的肿瘤与背景之比在卵巢肿瘤或肺肿瘤上表达的叶酸受体。该术语也可以用于表示来自视觉可检测的肿瘤的信号(例如,用于鉴别下述的 EC20++ 患者)。“功能活性的叶酸受体”(即,至少约 1.2 或更大的肿瘤与背景之比,或来自视觉可检测的肿瘤的信号)的存在,与为 EC145 疗法选择的患者的临床益处相关联,所述临床益处包括:患者的无进展存活、患者的总存活时间、接受 4 个或更多个 EC145 治疗周期的能力、肿瘤生长的抑制、稳定的疾病、部分应答和 / 或完全应答。

[0041] 根据本发明,“肿瘤与背景之比”是指,在结合肿瘤以后由 EC20 产生的放射性信号与叶酸-放射性成像剂在患者中产生的背景放射性信号之比。

[0042] 根据本发明,“临床益处”是指患者对 EC145 治疗的应答,其中所述应答包括:患者的无进展存活、患者的总存活时间、接受 4 个或更多个 EC145 治疗周期(例如,4 周治疗)的能力、肿瘤生长的抑制、稳定的疾病、部分应答和 / 或完全应答。

[0043] 根据本发明,“肿瘤生长的抑制”是指,肿瘤大小缩小、肿瘤完全消失或在 EC145 疗程中患者肿瘤生长小于 30%。

[0044] 根据本发明,“稳定的疾病”是指,在 EC145 疗程中患者的疾病没有实质进展。

[0045] 根据本发明,“部分应答”是指,在用 EC145 治疗的患者中肿瘤大小减小了 30% 或更大。

[0046] 根据本发明,“完全应答”是指,在用 EC145 治疗的患者中可检测的疾病消失。

### 具体实施方式

[0047] 在任意上述的不同公开内容中,在适当时可以存在下述特征,从而提供本发明的其它实施方案。

[0048] 描述了另一个实施方案,其中所述方法另外包括下述步骤:在施用 EC20 之前,给所述患者施用未标记的叶酸盐,诸如叶酸或其盐,其为与放射性核素的复合物的形式。

[0049] 描述了另一个实施方案,其中如果与由 EC20 产生的背景放射性信号相比,在结合肿瘤以后由 EC20 产生的放射性信号指示对患者的临床益处,则 EC145 适用于治疗具有所述肿瘤的患者。

[0050] 描述了另一个实施方案,其中所述临床益处是患者的无进展存活。

[0051] 描述了另一个实施方案,其中所述临床益处是肿瘤生长的抑制。

[0052] 描述了另一个实施方案,其中所述临床益处选自:稳定的疾病、部分应答和完全应答。

[0053] 描述了另一个实施方案,其中基于由 EC20 产生的放射性信号相对于背景放射性信号的肿瘤与背景之比,定量功能活性的叶酸盐受体的表达水平。

[0054] 描述了另一个实施方案,其中所述肿瘤与背景之比是至少约 1.2。

[0055] 描述了另一个实施方案,其中所述肿瘤与背景之比是至少约 1.3。

[0056] 描述了另一个实施方案,其中所述肿瘤与背景之比是至少约 1.4。

[0057] 描述了另一个实施方案,其中所述肿瘤是卵巢肿瘤。

[0058] 描述了另一个实施方案,其中所述肿瘤是铂抗性的卵巢肿瘤。

[0059] 描述了另一个实施方案,其中所述肿瘤是肺肿瘤。

[0060] 描述了另一个实施方案,其中所述肿瘤是非小细胞肺癌。

[0061] 描述了另一个实施方案,其中 EC145、EC20 或二者是在肠胃外剂型中。

[0062] 描述了另一个实施方案,其中所述剂型选自:真皮内的、皮下的、肌肉内的、腹膜内的、静脉内的和鞘内的剂型。

[0063] 描述了另一个实施方案,其中 EC145 是在组合物中,且其中所述组合物另外包含药学上可接受的载体。

[0064] 描述了另一个实施方案,其中所述包含 EC20 的组合物另外包含药学上可接受的载体。

[0065] 描述了另一个实施方案,其中所述药学上可接受的载体是液体载体。

[0066] 描述了另一个实施方案,其中所述液体载体选自:盐水、葡萄糖、醇类、二醇类、酯类、酰胺类和它们的组合。

[0067] 描述了另一个实施方案,其中 EC145 以治疗有效量施用。

[0068] 描述了另一个实施方案,其中 EC20 以治疗有效量施用。对于 EC20,治疗有效量表示诊断上有效的量。

[0069] 描述了另一个实施方案,其中所述有效量的范围是约 1 ng 至约 1 mg/ 千克体重。

[0070] 描述了另一个实施方案,其中所述有效量的范围是约 100 ng 至约 500  $\mu$ g/ 千克体重。

[0071] 描述了另一个实施方案,其中所述有效量的范围是约 100 ng 至约 50 μg/ 千克体重。

[0072] 描述了另一个实施方案,其中所述肿瘤是原发性肿瘤。

[0073] 描述了另一个实施方案,其中所述肿瘤是转移性肿瘤。

[0074] 描述了另一个实施方案,其中使用螯合剂和还原剂放射性地标记 EC20。

[0075] 描述了另一个实施方案,其中所述螯合剂是 α-D- 葡庚糖酸钠。

[0076] 描述了另一个实施方案,其中所述还原剂是二水合氯化亚锡 (II)。

[0077] 另外描述了另一个实施方案,其包括下述步骤:给所述患者施用多柔比星。一个实施方案是,其中所述多柔比星是聚乙二醇化的脂质体多柔比星 (PLD) 的形式。

[0078] 对于本文所述的 EC20 或其药学上可接受的盐的任意方法或应用,一个替代实施方案是叶酸盐-放射性成像剂缀合物,所述缀合物具有选自下述的放射性核素的阳离子作为复合的放射性核素:镓、铟、铜、锝和铯的同位素。

[0079] 对于所有实施方案,也预见到实施方案的任意可适用的组合。认为上述实施方案的任意可适用的组合是根据本发明。

[0080] 根据本发明,EC20 可以用于将放射性核素靶向卵巢肿瘤或肺肿瘤,并进一步在肿瘤中浓缩放射性核素,用于检测肿瘤上的功能活性的叶酸盐受体。令人惊奇地,申请人已经发现,在肿瘤上的叶酸盐受体表达的阈值水平(即,功能活性的叶酸盐受体在肿瘤上的存在),与为 EC145 疗法选择的患者的临床益处相关联。因而,根据本发明,本文描述了一种测定功能活性的叶酸盐受体在患者肿瘤上的存在的方法。另外,提供了为 EC145 疗法选择患者的方法,其中可以基于预测的临床益处来为疗法选择患者,所述预测的临床益处源自患者的肿瘤上的功能活性的叶酸盐受体的阈值水平的检测。对患者的临床益处包括:患者的无进展存活、患者的总存活时间、接受 4 个或更多个 EC145 治疗周期的能力、肿瘤生长的抑制、稳定的疾病、肿瘤对治疗的部分应答和/或肿瘤对治疗的完全应答。叶酸盐受体表达的阈值水平可以是,例如,至少约 1.2、至少约 1.3 或至少约 1.4 的肿瘤与背景之比,或可以视觉地检测到(例如,用于鉴别下述的 EC20++ 患者的视觉检测)。因此,功能活性的叶酸盐受体的检测(即,例如被检测为肿瘤与背景之比或可视觉地检测到的叶酸盐受体表达的阈值水平)可以用于确定 EC145 是否适用于治疗具有卵巢肿瘤或肺肿瘤的患者。

[0081] 在一个实施方案中,所述方法适用于具有功能活性的叶酸盐受体的肿瘤类型,包括卵巢肿瘤或肺肿瘤。在另一个示例性的实施方案中,所述方法适用于铂抗性的卵巢肿瘤。在另一个实施方案中,所述方法适用于非小细胞肺癌。在另一个示例性的实施方案中,所述肿瘤可以是原发性肿瘤。在另一个实施方案中,所述肿瘤可以是转移性肿瘤。

[0082] 在一个实施方案中,本文所述的方法被用于定量功能活性的叶酸盐受体。

[0083] 在另一个实施方案中,本文所述的方法被用于定量功能活性的叶酸盐受体,以确定 EC145 是否适用于治疗具有卵巢肿瘤或肺肿瘤的患者。在一个实施方案中,所述患者任选地可以预注射未标记的叶酸盐,然后注射 <sup>99m</sup>Tc-EC20,以测定肿瘤与背景之比。在该实施方案中,肿瘤与背景之比是,在结合肿瘤以后由 <sup>99m</sup>Tc-EC20 产生的放射性信号(例如,通过 SPECT/CT 或 SPECT 成像)与叶酸盐-放射性成像剂在患者中产生的背景放射性信号之比。在该实施方案中,肿瘤与背景之比可以是,例如,至少约 1.2。或者,可以视觉地测定功能活性的叶酸盐受体的阈值水平的存在,例如,以鉴别下述的 EC20++ 患者。

[0084] 功能活性的叶酸盐受体的表达阈值水平可以与对患者的临床益处相关联。所述临床益处可以包括：患者的无进展存活、患者的总存活时间、接受 4 个或更多个 EC145 治疗周期的能力、肿瘤生长的抑制、稳定的疾病、肿瘤对治疗的部分应答和 / 或肿瘤对治疗的完全应答。功能活性的叶酸盐受体的检测（例如，反映为 1.2 的肿瘤与背景之比或可视觉地测定的叶酸盐受体表达的阈值水平，例如，用于鉴别下述的 EC20++ 患者的视觉检测）可以用于确定 EC145 是否适用于治疗具有卵巢肿瘤或肺肿瘤的患者。

[0085] 在上述的实施方案中，肿瘤与背景之比可以是，例如，1.2、1.3 或 1.4，或可视觉地检测到。在另一个示例性的实施方案中，可以如下测定功能活性的叶酸盐受体的阈值水平：视觉检查例如 SPECT/CT 或 SPECT 图像的预定区域，并将 <sup>99m</sup>Tc-EC20 摄入的强度编码为例如无摄入、轻度摄入或显著摄入，并选择具有轻度摄入或显著摄入的患者进行治疗。

[0086] 在另一个实施方案中，描述了为使用缀合物的疗法选择具有卵巢肿瘤或肺肿瘤的患者的方法，所述缀合物包含与长春胺化合物相连的叶酸盐。所述方法包括下述步骤：测定功能活性的叶酸盐受体是否在患者的肿瘤上存在，其中如果在肿瘤上检测到功能活性的叶酸盐受体，则将所述患者选择用于使用叶酸盐 - 长春胺化合物缀合物的疗法。

[0087] 在另一个实施方案中，描述了为使用缀合物的疗法选择具有卵巢肿瘤或肺肿瘤的患者的方法，所述缀合物包含与长春胺化合物相连的叶酸盐。所述方法包括下述步骤：给所述患者施用包含与放射性成像剂相连的叶酸盐的组合物，其中如果患者的肿瘤具有功能活性的叶酸盐受体，则将所述患者选择用于使用包含与长春胺化合物相连的叶酸盐的缀合物的疗法，其中所述功能活性的叶酸盐受体能够用 EC20 检测出。

[0088] 在另一个实施方案中，描述了为使用缀合物的疗法选择具有卵巢肿瘤或肺肿瘤的患者的方法，所述缀合物包含与长春胺化合物相连的叶酸盐。所述方法包括下述步骤：给所述患者施用包含与放射性成像剂相连的叶酸盐的缀合物，其中如果在结合肿瘤以后由 EC20 产生的放射性信号与由 EC20 产生的背景放射性信号相比指示对患者的临床益处，则选择所述患者进行治疗。

[0089] 在本发明的一个实施方案中，EC20 可以与未标记的叶酸盐联合地施用给患者。“与……联合地”是指，未标记的维生素可以与 EC20 共同施用，或者可以在施用 EC20 之前预注射未标记的叶酸盐，以提高图像质量。例如，EC20 可以与下述量的叶酸盐联合地施用：约 0.5 ng 未标记的叶酸盐 /kg 体重至约 100 mg 未标记的叶酸盐 /kg 体重、或约 1 μg 未标记的叶酸盐 /kg 体重至约 100 mg 未标记的叶酸盐 /kg 体重、或约 100 μg 未标记的叶酸盐 /kg 体重至约 100 mg 未标记的叶酸盐 /kg 体重、或约 100 μg 未标记的叶酸盐 /kg 体重至约 700 μg 未标记的叶酸盐 /kg 体重，患者平均体重为约 70 kg。

[0090] 另一个实施方案是，一种测定具有肿瘤的患者是否具有在其肿瘤上存在的功能活性的叶酸盐受体的方法。在一个实施方案中，所述肿瘤是卵巢肿瘤或肺肿瘤。在另一个实施方案中，所述肿瘤是原发性肿瘤或转移性肿瘤。在另一个实施方案中，所述方法包括：给患者施用有效量的 Tc-EC20，用于检测功能活性的叶酸盐受体。

[0091] 在本文所述方法的其它实施方案中，描述了本文所述缀合物的药学上可接受的盐。本文所述缀合物的药学上可接受的盐包括酸加成盐和其碱盐。

[0092] 合适的酸加成盐是从形成无毒盐的酸形成。例证性的实例包括：乙酸盐、天冬氨酸盐、苯甲酸盐、苯磺酸盐、碳酸氢盐 / 碳酸盐、硫酸氢盐 / 硫酸盐、硼酸盐、樟脑磺酸



盐、柠檬酸盐、乙二磺酸盐、乙磺酸盐、甲酸盐、富马酸盐、葡庚糖酸盐、葡糖酸盐、葡糖醛酸盐、六氟磷酸盐、羟苯酰苯酸盐、盐酸盐 / 氯化物、氢溴酸盐 / 溴化物、氢碘酸盐 / 碘化物、羟乙基磺酸盐、乳酸盐、苹果酸盐、马来酸盐、丙二酸盐、甲磺酸盐、甲基硫酸盐、萘酸盐 (naphthylate)、2-萘磺酸盐、烟酸盐、硝酸盐、乳清酸盐、草酸盐、棕榈酸盐、扑酸盐、磷酸盐 / 磷酸氢盐 / 磷酸二氢盐、蔗糖酸盐、硬脂酸盐、琥珀酸盐、酒石酸盐、甲苯磺酸盐和三氟乙酸盐。

[0093] 本文所述缀合物的合适的碱盐是从形成无毒盐的碱形成。例证性的实例包括：精氨酸、苜蓿青霉素、钙、胆碱、二乙胺、二乙醇胺、甘氨酸、赖氨酸、镁、葡甲胺、乙醇胺、钾、钠、氨丁三醇和锌盐。也可以形成酸和碱的半盐，例如，半硫酸盐和半钙盐。

[0094] 在本文所述方法的不同实施方案中，EC145 可以单独施用，或与一种或多种其它药物联合地（或作为它们的任意组合）施用。在一个示例性的实施方案中，EC145 可以与多柔比星联合地施用。在一个示例性的实施方案中，EC145 与聚乙二醇化的脂质体多柔比星联合地施用，如在实施例 20 中所述。

[0095] 在一个实施方案中，本文所述的缀合物可以作为与一种或多种药学上可接受的载体相组合的制剂来施用。所述载体可以是赋形剂。载体的选择在很大程度上取决于下述因素：诸如具体给药模式、载体对溶解度和稳定性的影响和剂型的性质。本领域技术人员可容易地明白适合递送本文所述缀合物的药物组合物和它们的制备方法。这样的组合物和它们的制备方法可以参见，例如，Remington: The Science & Practice of Pharmacy, 第 21 版 (Lippincott Williams & Wilkins, 2005)，它通过引用并入本文。

[0096] 在一个示例方面，药学上可接受的载体包括生理上相容的任意的和所有的溶剂、分散介质、包衣剂、抗菌剂和抗真菌剂等制剂和吸收延迟剂等和它们的组合。在有些实施方案中，所述载体适合肠胃外给药。药学上可接受的载体包括无菌水溶液或分散物和无菌粉末，它们用于临时制备无菌注射溶液或分散物。补充性的活性化合物也可以掺入本发明的组合物中。

[0097] 在不同的实施方案中，液体制剂可以包括混悬液和溶液。这样的制剂可以包含载体（例如，水、乙醇、聚乙二醇、丙二醇、甲基纤维素或合适的油）以及一种或多种乳化剂和 / 或助悬剂。液体制剂也可以通过固体（例如，来自药囊）的重构来制备。

[0098] 在一个实施方案中，水性混悬液可以含有与适当赋形剂相混合的活性物质。这样的赋形剂是助悬剂，例如，羧甲基纤维素钠、甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、海藻酸钠、聚乙烯吡咯烷酮、黄蓍树胶和金合欢树胶；分散剂或润湿剂，其可以是天然存在的磷脂，例如，卵磷脂；烯烃氧化物与脂肪酸的缩合产物，例如，聚氧乙烯硬脂酸酯；环氧乙烷与长链脂肪醇的缩合产物，例如，十七烯氧基鲸蜡醇；环氧乙烷与源自脂肪酸和己糖醇的部分酯的缩合产物，例如聚氧乙烯山梨醇单油酸酯；或环氧乙烷与源自脂肪酸和己糖醇的部分酯的缩合产物，例如，聚氧乙烯脱水山梨糖醇单油酸酯。水性混悬液也可以含有：一种或多种防腐剂，例如，抗坏血酸、对羟基苯甲酸乙酯、对羟基苯甲酸正丙酯或对羟基苯甲酸酯；或一种或多种着色剂。

[0099] 在一个示例性的实施方案中，适合通过加入水来制备水性混悬液的可分散的粉末和颗粒，会提供与分散剂或润湿剂、助悬剂和一种或多种防腐剂相混合的活性成分。也可以存在其它赋形剂，例如，着色剂。

[0100] 合适的乳化剂可以是：天然存在的树胶，例如，金合欢树胶或黄蓍树胶；天然存在的磷脂，例如，大豆卵磷脂；和酯类，包括源自脂肪酸和己糖醇酐的部分酯，例如，脱水山梨糖醇单油酸酯，和所述部分酯与环氧乙烷的缩合产物，例如，聚氧乙烯脱水山梨糖醇单油酸酯。

[0101] 在其它实施方案中，在组合物中可以包括等张剂，例如糖类、多元醇类（诸如甘露醇、山梨醇）或氯化钠。通过在组合物中包括延迟吸收的药剂（例如，单硬脂酸酯盐和明胶），可以实现可注射的组合物延长吸收。

[0102] 在一个方面，本文所述的缀合物可以直接地施用进血流中、肌肉中或内部器官中。这种肠胃外给药的合适途径包括：静脉内的、动脉内的、腹膜内的、鞘内的、硬膜外的、脑室内的、尿道内的、胸骨内的、颅内的、瘤内的、肌肉内的和皮下的递送。适合肠胃外给药的装置包括包括针（包括显微操作针）注射器、无针注射器和输注技术。

[0103] 在一个示例方面，肠胃外制剂通常是水溶液，所述水溶液可以含有载体或赋形剂，诸如盐、碳水化合物和缓冲剂（优选地，在 3-9 的 pH），但是对于有些用途，它们可以更合适地配制成无菌的非水性溶液或干燥形式，所述干燥形式将与合适的媒介物（诸如无菌的、无热原的水）联合使用。在其它实施方案中，本文所述的任意液体制剂可以适合本文所述缀合物的肠胃外给药。使用本领域技术人员众所周知的标准制药技术，可以容易地在无菌条件下制备肠胃外制剂，例如，通过无菌条件下的低压冻干法。在一个实施方案中，通过使用适当的制剂技术，诸如掺入溶解度增加剂，可以增加在肠胃外制剂的制备中使用的缀合物的溶解度。

[0104] 在不同的实施方案中，可以将用于肠胃外给药的制剂配制成用于立即释放和 / 或缓和释放。在一个示例方面，本发明的活性剂可以在延时释放制剂中施用，例如在包括缓释聚合物的组合物中。可以用保护化合物免于迅速释放的载体来制备活性化合物，诸如控释制剂，包括植入物和微型胶囊化的递送系统。可以使用可生物降解的、生物相容的聚合物，诸如乙烯醋酸乙烯酯、聚酐、聚乙醇酸、胶原、聚原酸酯、聚乳酸和聚乳酸聚乙醇酸共聚物（PGLA）。用于制备这种制剂的方法是本领域技术人员普遍已知的。在另一个实施方案中，本文所述的缀合物或包含所述缀合物的组合物在适当时可以连续地施用。

[0105] 在一个实施方案中，提供了一种试剂盒。通过要施用活性化合物的组合，可以以适合组合物的相继施用或共同施用的试剂盒的形式，组合 2 种或更多种药物组合物。这样的试剂盒包括 2 种或更多种单独的药物组合物，其中至少一种含有本文所述的缀合物和用于分别保留所述组合物的装置，诸如容器、分隔的瓶子或分隔的箔包。在另一个实施方案中，提供了包含一种或多种本文所述缀合物的组合物，所述组合物是在容器中，所述容器具有标签，所述标签提供使用所述缀合物进行患者选择和 / 或治疗的说明书。

[0106] 在一个实施方案中，可以如下制备无菌注射溶液：将需要的量的活性剂掺入适当溶剂中，所述溶剂含有需要的一种或多种上述的成分，随后过滤除菌。通常，如下制备分散物：将活性化合物掺入无菌的媒介物中，所述媒介物含有分散介质和来自上述那些的任意额外成分。在用于制备无菌注射溶液的无菌粉末的情况下，优选的制备方法是真空干燥和冷冻干燥，其产生活性成分和来自其以前的无菌过滤溶液的任意额外目标成分的粉末，或者所述成分可以一起无菌过滤。

[0107] 所述组合物可以配制成溶液、微乳剂、脂质体或适合高药物浓度的其它有序结构。

所述载体可以是溶剂或分散介质,其含有例如水、乙醇、多元醇(例如,甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)和它们的合适的混合物。在一个实施方案中,通过例如使用包衣剂诸如卵磷脂,通过维持需要的粒度(在分散物的情况下)和通过使用表面活性剂,可以维持适当的流动性。

[0108] 可以使用任何有效的施用 EC145 的方案。例如,EC145 可以作为单次剂量施用,或可以分开并作为每天多次剂量方案施用。此外,交错的方案(例如,每周 1-5 天)可以用作每天治疗的替代方案,且为了本文所述方法的目的,认为这样的间断的或交错的每天方案与每天治疗等效,并在预料之中。在一个示例性的实施方案中,通过多次注射 EC145 来治疗患者,以消除肿瘤。在一个实施方案中,给患者注射多次(优选约 2 次至约 50 次) EC145,例如,以 12-72 小时间隔或以 48-72 小时间隔。在初次注射以后,可以以数天或数个月的间隔给患者施用额外的 EC145 注射,所述额外注射可以防止癌的复发。

[0109] 可以使用任意合适的 EC145 疗程。在一个实施方案中,选择单个剂量和剂量方案,以提供在一个月内容施用的约 15 mg 的总剂量。在一个示例性实施例中,在每 4 周循环的第 1、2 和 3 周,在每周 5 天施用的单日剂量中施用 EC145,在第 4 周不施用剂量。在一个替代实施例中,在每 4 周循环的第 1 和 3 周,在每周 3 天施用的单日剂量中施用 EC145,在第 2 和 4 周不施用剂量。

[0110] EC145 的单位日剂量可以随下述因素显著变化:患者状况、待治疗的疾病状态、EC145 的分子量、它的给药途径和组织分布以及共同使用其它治疗性处理(诸如在联合治疗中的放射疗法或其它药物)的可能性。要施用给患者的有效量是基于体表面积、质量和医师对患者状况的评估。有效剂量的范围可以是,例如,约 1 ng/kg 至约 1 mg/kg、约 1 μg/kg 至约 500 μg/kg 和约 1 μg/kg 至约 100 μg/kg。这些剂量是基于约 70 kg 的平均患者体重。

[0111] 本文所述缀合物可以以下述剂量施用:约 1.0 ng/kg 至约 1000 μg/kg、约 10 ng/kg 至约 1000 μg/kg、约 50 ng/kg 至约 1000 μg/kg、约 100 ng/kg 至约 1000 μg/kg、约 500 ng/kg 至约 1000 μg/kg、约 1 ng/kg 至约 500 μg/kg、约 1 ng/kg 至约 100 μg/kg、约 1 μg/kg 至约 50 μg/kg、约 1 μg/kg 至约 10 μg/kg、约 5 μg/kg 至约 500 μg/kg、约 10 μg/kg 至约 100 μg/kg、约 20 μg/kg 至约 200 μg/kg、约 10 μg/kg 至约 500 μg/kg、或约 50 μg/kg 至约 500 μg/kg。总剂量可以单次剂量或分份剂量中施用,且根据医师的判断,可以在本文给出的典型范围之外。这些剂量是基于约 70 kg 的平均患者体重。医师能够容易地确定体重在该范围之外的受试者(诸如婴儿和老年人)的剂量。

[0112] 本文所述缀合物可以含有一个或多个手性中心,或可以以其它方式能够作为多个立体异构体存在。因此,应当理解,本发明包括纯的立体异构体以及立体异构体的混合物,诸如对映异构体、非对映异构体和对映异构地或非对映异构地富集的混合物。本文所述缀合物可以能够作为几何异构体存在。因此,应当理解,本发明包括纯的几何异构体或几何异构体的混合物。

[0113] 应当理解,本文所述缀合物可以以未溶剂化形式以及溶剂化形式(包括水合形式)存在。一般而言,溶剂化形式与未溶剂化形式等效,且被包括在本发明范围内。本文所述缀合物可以以多种结晶形式或无定形形式存在。一般而言,对于本发明预见到的应用而言,所有物理形式是等效的,且意图在本发明范围内。

[0114] 在另一个实施方案中,从具有至少约 90% 或约 95% 或约 96% 或约 97% 或约 98% 或

约 99% 或约 99.5% 的纯度的 EC145, 制备用于施用 EC145 的组合物和 / 或剂型。在另一个实施方案中, 从具有至少 90% 或 95% 或 96% 或 97% 或 98% 或 99% 或 99.5% 的纯度的 EC145, 制备用于施用 EC145 的组合物和 / 或剂型。

[0115] 在另一个实施方案中, 从具有至少约 90% 或约 95% 或约 96% 或约 97% 或约 98% 或约 99% 或约 99.5% 的纯度的 EC20, 制备用于施用 EC20 的组合物和 / 或剂型。在另一个实施方案中, 从具有至少 90% 或 95% 或 97% 或 98% 或 99% 或 99.5% 的纯度的 EC20, 制备用于施用 EC20 的组合物和 / 或剂型。

[0116] 在另一个实施方案中, 从具有至少约 90% 或约 95% 或约 96% 或约 97% 或约 98% 或约 99% 或约 99.5% 的放射化学纯度的 EC20, 制备用于施用放射性标记的 EC20 的组合物和 / 或剂型。在另一个实施方案中, 从具有至少 90% 或 95% 或 96% 或 97% 或 98% 或 99% 或 99.5% 的纯度的 EC20, 制备用于施用 EC20 的组合物和 / 或剂型。

[0117] 本文使用的纯度测定可以基于重量百分比、摩尔百分比等。另外, 纯度测定可以基于某些预定组分的缺失或实质缺失, 所述组分例如、但不限于: 叶酸、不含有长春胺药物的含有二硫化物的组分、氧化产物、不含有叶酸盐的二硫化物组分等。还会理解, 纯度测定适用于通过本文所述方法纯化的化合物和组合物的溶液。在那些情况下, 纯度测量(包括重量百分比和摩尔百分比测量)与溶液的组分(不包括溶剂)有关。

[0118] 使用任意常规技术, 包括各种色谱法或光谱技术, 诸如高压或高效液相色谱法(HPLC)、核磁共振波谱学、薄层色谱法(TLC)、紫外吸收波谱学、荧光波谱学等, 可以测量 EC145 或 EC20 的纯度。

[0119] 在一个方面, 使用实体瘤中的应答评价标准 (RECIST) 标准, 表征患者对治疗的应答。例证性地, 所述标准已经从最初的 *WHO Handbook (3)* 改进而来, 并考虑了所有靶病灶的最大直径的测量: 完全应答 (CR) ——所有靶病灶消失; 部分应答 (PR) ——采用基线最大直径总和作为参照, 靶病灶的最大直径总和减小了至少 30%; 稳定的疾病 (SD) ——采用从治疗开始以后的最大直径的最小总和作为参照, 病灶的缩小既不足以达到部分应答, 病灶的增加也不足以达到渐进性疾病; 渐进性疾病 (PD) ——采用从治疗开始以后记录的最大直径的最小总和作为参照, 靶病灶的最大直径总和增加了至少 20%, 或出现一个或多个新病灶。将总疾病应答率 (ORR) 计算为, 实现 CR 或 PR 的最好应答的患者的百分比。将总疾病控制率 (DCR) 计算为, 实现 CR、PR 或 SD 的最好应答的患者的百分比。

[0120] 在另一个实施方案中, EC145 提供在无菌的容器或包中。在另一个实施方案中, EC20 提供在无菌的容器或包中。

[0121] 在一个实施方案中, 提供了一种测定 EC145 是否适用于治疗具有一个或多个卵巢肿瘤或一个或多个肺肿瘤的患者, 所述方法包括下述步骤: 测定具有卵巢癌的患者叶酸盐受体状态, 其中如果患者的叶酸盐受体状态是阳性的, 则 EC145 适用于治疗所述患者。

[0122] 当用于患者中时, 本文使用的术语“EC20”表示 EC20 或蝶酰基- $\gamma$ -D-谷氨酰基- $\beta$ -L-2,3-二氨基丙酰基-L-天冬氨酰基-L-半胱氨酸或与  $^{99m}\text{Tc}$  形成复合物的蝶酰基- $\gamma$ -D-谷氨酰基- $\beta$ -L-2,3-二氨基丙酰基-L-天冬氨酰基-L-半胱氨酸; 例如, 术语“ $^{99m}\text{Tc}$ -EC20”明确地表示含有放射性的  $^{99m}\text{Tc}$  的复合物。

[0123] 如果患者中的一个或多个肿瘤具有能够结合 EC20 的叶酸盐受体, 或如果患者中

的所有肿瘤能够结合 EC20, 则患者中的叶酸盐受体状态是阳性的。在一个示例性实施例中, 叶酸盐-放射性成像剂缀合物是  $^{99m}\text{Tc}$ -EC20。在下面实施例 25 所述的中间分析时, 用 EC20 扫描的所有卵巢癌患者中的 91.3% 已经是“阳性的”(由具有至少一个结合 EC20 的肿瘤病灶/区域指示), 与此相比, 8.7% 的患者是完全 EC20 “阴性的”。

[0124] 在一个实施方案中, 提供了一种评估 EC145 是否适用于治疗具有一个或多个卵巢肿瘤或一个或多个肺肿瘤的患者方法。所述方法包括下述步骤: 视觉地测定患者的叶酸盐受体状态(例如, EC20++、EC20+ 或 EC20-), 其中叶酸盐受体状态是基于患者中评价的叶酸盐受体阳性的肿瘤的百分比的测量, 且其中当所述患者的叶酸盐受体状态是 EC20++ 时, 则 EC145 适用于治疗所述患者。在一个示例性的实施方案中, EC20++ 状态是指, 患者中评价的叶酸盐受体阳性的肿瘤的百分比是约 100%。在其它示例方面, EC20++ 状态是指, 患者中评价的叶酸盐受体阳性的肿瘤的百分比是约 90%、约 80% 或约 70%。在另一个方面, EC20 是半定量成像剂。

[0125] 在该视觉评估实施方案(视觉检测)中, 视觉地评价病灶, 以确定所述患者是否具有指示对患者的临床益处的功能活性的叶酸盐受体的阈值水平。在一个方面, 根据 RECIST (v1.0) 标准, 由辐射学家选择在每位患者中用于分析的病灶(即, 肿瘤)。随后, 核医学医师(即解读者)视觉地评估每个可评价的靶病灶的 EC20 摄入, 并将所述摄入分类为“EC20 阳性的”(显著摄入/轻度摄入)或“EC20 阴性的”(无摄入)。在一个示例性实施例中, 所述叶酸盐-放射性成像剂缀合物是  $^{99m}\text{Tc}$ -EC20。术语“无摄入”是指, 与附近组织相比, 靶病灶的视觉检查指示, EC20 在靶病灶中的摄入和 EC20 在附近组织中的摄入是不可辨别的。术语“轻度摄入”是指, 与附近组织相比, 靶病灶的视觉检查指示, EC20 在靶病灶中的摄入和 EC20 在附近组织中的摄入是可辨别的。术语“显著摄入”是指, 与附近组织相比, 靶病灶的视觉检查指示, EC20 在靶病灶中的摄入和 EC20 在附近组织中的摄入是明显可辨别的。

[0126] 在该实施方案中, 病灶可以是可评价的或不可评价的。在一个实施方案中, 其最大尺寸(LD)小于 1.5 cm 的病灶被认为是“不可评价的”, 除非核医学解读者将它们鉴别为具有明确的 EC20 摄入, 在该情况下, 它们被表征为“阳性的”。此外, 某些器官(例如, 肝、脾、膀胱和肾)具有固有的高 EC20 摄入。位于这些器官中的靶病灶被认为是“不可评价的”。

[0127] 在另一个实施方案中, EC20 不可评价的病灶满足下述标准之一: 1) 被定义为在  $^{99m}\text{Tc}$ -EC20 SPECT 靶病灶评价中“未成像”或“不适用”, 2) 是 EC20 摄入阴性的, 且直径小于 15 mm, 或 3) 位于肝、肾/肾上腺、脾或膀胱中的病灶。EC20 可评价的病灶满足下述标准之一: 1) 被定义为 EC20 摄入阳性的, 2) 被定义为 EC20 摄入阴性的, 且直径大于或等于 15 mm。

[0128] 在一个实施方案中, 基于患者中 EC20 阳性病灶、EC20 阴性病灶和/或不可评价病灶的观察, 将患者分组(即指定状态)。如下计算每位患者中 EC20 阳性的病灶的百分比: %EC20 阳性病灶 = (EC20 阳性病灶的数目 / EC20 阴性病灶的数目 + 不可评价病灶的数目)。在一个示例性实施例中, 将患者分配至 3 个命名为 EC20++、EC20+ 和 EC20- 的组, 其中分配至 EC20++ 组的患者的病灶中的约 100% 是 EC20 阳性的; 分配至 EC20+ 组的患者的病灶中的约 1% 至约 99% 是 EC20 阳性的; 分配至 EC20- 组的患者的病灶中的约 0% 是 EC20 阳性的。在另一个示例性实施例中, 将患者分配至 3 个命名为 EC20++、EC20+ 和 EC20- 的组, 其中分配至 EC20++ 组的患者的病灶中的约 90% 是 EC20 阳性的; 分配至 EC20+ 组的患者的

病灶中的约 11% 至约 89% 是 EC20 阳性的；分配至 EC20- 组的患者的病灶中的约 0 至约 10% 是 EC20 阳性的。

[0129] 在上述的实施方案中,如果患者是在 EC20++ 组中,指示 EC145 治疗的临床益处。对患者的临床益处包括:患者的无进展存活、患者的总存活时间、接受 4 个或更多个 EC145 治疗周期的能力、肿瘤生长的抑制、稳定的疾病、患者对治疗的部分应答、患者对治疗的完全应答、疾病控制(即,得到的最佳结果是完全应答、部分应答或稳定的疾病)和/或总疾病应答(即,得到的最佳结果是完全应答或部分应答)。在一个示例性实施例中,在开始治疗以后 4 个月时,测定治疗其非小细胞肺癌的患者的临床益处。在另一个示例性实施例中,在开始治疗以后 6 个月时,测定治疗其卵巢癌的患者临床益处。

[0130] 在一个示例性实施例中,总存活时间是给定的患者至死亡时的时间,其定义为从患者接受方案治疗首日(C1D1)至患者死亡当天的天数。可以包括所有死亡事件,无论所述事件发生在患者仍然服用研究药物期间,还是发生在患者中断研究药物以后。如果患者尚未死亡,则可以在下述时间检查数据:最近的研究就诊,或最近的联系日,或最近获知患者仍然存活的日期,以最近者为准。

[0131] 在下面在实施例 7 中描述的体外研究中,已经证实 EB145 和多柔比星会协同地抑制人癌 KB 肿瘤细胞的生长。

[0132] 在携带 Madison 109 肺癌(M109)的小鼠的研究中,(过)表达叶酸盐受体(FR)的上皮肿瘤对下面在实施例 8 中描述的化学疗法是相对耐受性的,已经证实,与聚乙二醇化的脂质体多柔比星(PLD,商品名 Doxil<sup>®</sup>和 Caelyx<sup>®</sup>)相组合的 EC145 表现出优良的抗肿瘤效应和治愈率,具有轻度的体重减轻。因此,在一个实施方案中,提供了一种在有此需要的患者中治疗表达叶酸盐受体的上皮肿瘤的方法,所述方法包括:施用与治疗量的多柔比星相组合的治疗量的 EC145。另一个实施方案是,与多柔比星相组合的 EC145 用于治疗患者的表达叶酸盐受体的上皮肿瘤的应用。另一个实施方案是,EC145 用于药物生产的应用,所述药物用于与多柔比星联合地治疗患者的表达叶酸盐受体的上皮肿瘤。

[0133] 另一个实施方案是,在有此需要的患者中实现治疗表达叶酸盐受体的上皮肿瘤的临床益处的方法,所述方法包括:施用与治疗量的多柔比星相组合的治疗量的 EC145。在一个实施方案中,所述临床益处是无进展存活。在另一个实施方案中,所述临床益处是总存活时间。

[0134] 对于上述方法或应用中的任一个,在一个实施方案中,所述多柔比星是聚乙二醇化的脂质体多柔比星的形式。

[0135] 对于上述方法或应用中的任一个,表达叶酸盐受体的上皮肿瘤的一个实施方案是卵巢、子宫内膜或非小细胞肺癌(NSCLC)肿瘤。对于上述方法或应用中的任一个,表达叶酸盐受体的上皮肿瘤的另一实施方案是卵巢肿瘤。

[0136] 按照惯例,认为对最初的含有铂的全身治疗做出应答的卵巢癌患者(仅在小于 6 个月的无治疗间期以后经历疾病进展)具有铂抗性的疾病。认为这些患者具有失败的初期铂治疗。另一组患者可能对最初的含有铂的全身治疗做出应答,并在治疗以后超过 6 个月进展。这些患者可以接受额外的含有铂的治疗,仅在第二铂治疗期间或在已经接受第二铂治疗的 6 个月内进展。如果认为这些患者具有失败的第二铂治疗,也视作铂抗性的。

[0137] 具有铂抗性的疾病的患者具有有限数目的治疗选择,经常接受药剂诸如托泊替

康、吉西他滨和聚乙二醇化的脂质体多柔比星 (PLD) ;最后一种在美国在商品名 Doxil<sup>®</sup>下被批准,在别的国家在商品名 Caelyx<sup>®</sup>下被批准,用于治疗具有卵巢癌的患者,所述患者的疾病在基于铂的化学疗法以后已经进展或复发。实际上,PLD 经常被用于治疗具有复发的铂抗性的卵巢癌的患者。PLD 是聚乙二醇脂质体包囊的多柔比星,所述多柔比星是一种蒽环类抗生素拓扑异构酶抑制剂,已知其具有广泛的抗肿瘤活性。脂质体包囊会提供胜过母体化合物的改变的药代动力学,包括延长的循环半衰期(参见 Doxil<sup>®</sup>包装说明书)。

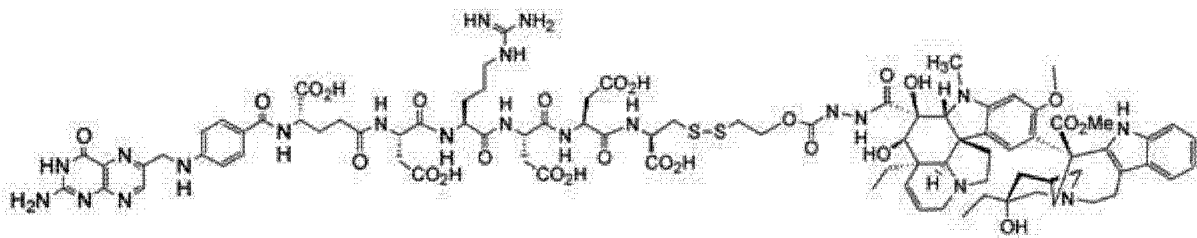
[0138] 在一个实施方案中,提供了一种治疗有此需要的患者的铂抗性的卵巢癌的方法,所述方法包括:施用与治疗量的聚乙二醇化的脂质体多柔比星相组合的治疗量的 EC145。另一个实施方案是,与聚乙二醇化的脂质体多柔比星相组合的 EC145 用于治疗患者的铂抗性的卵巢癌的应用。另一个实施方案是,EC145 用于生产药物的应用,所述药物用于与聚乙二醇化的脂质体多柔比星组合地治疗患者的铂抗性的卵巢癌。

[0139] 另一个实施方案是,在以此需要的患者的铂抗性的卵巢癌的治疗中实现临床益处的方法,所述方法包括:施用与治疗量的聚乙二醇化的脂质体多柔比星相组合的治疗量的 EC145。在一个实施方案中,所述临床益处是无进展存活。在另一个实施方案中,所述临床益处是总存活时间。

[0140] 在本发明的另一个实施方案中,提供了一种治疗有此需要的患者的铂敏感的卵巢癌的方法,所述方法包括:与治疗量的聚乙二醇化的脂质体多柔比星或不是聚乙二醇化的脂质体形式的多柔比星相组合地,施用治疗量的 EC145。另一个实施方案是,EC145 用于生产药物的应用,所述药物用于与聚乙二醇化的脂质体多柔比星或不是聚乙二醇化的脂质体形式的多柔比星相组合地治疗患者的铂敏感的卵巢癌。

[0141] 另一个实施方案是,一种试剂盒,所述试剂盒包含在分开的容器中的治疗量的 EC145 和治疗量的聚乙二醇化的脂质体多柔比星。

[0142] 在另一个实施方案中,对于任意方法、应用或试剂盒,EC145 是具有下式的化合物或其药学上可接受的盐。



[0143] 本文使用的 EC145 可以以离子化形式(包括质子化形式)存在于溶液或混悬液中。

[0144] 在一个实施方案中,提供了一种治疗有此需要的患者的铂抗性的卵巢癌的方法,所述方法包括:施用与治疗量的聚乙二醇化的脂质体多柔比星相组合的治疗量的 EC145。在另一个实施方案中,提供了与聚乙二醇化的脂质体多柔比星相组合的 EC145 用于治疗患者的铂抗性的卵巢癌的应用。在另一个实施方案中,提供了 EC145 用于生产药物的应用,所述药物用于与聚乙二醇化的脂质体多柔比星组合地治疗患者的铂抗性的卵巢癌。

[0145] 在另一个实施方案中,提供了一种在以此需要的患者的铂抗性的卵巢癌的治疗中与使用治疗量的聚乙二醇化的脂质体多柔比星的治疗相比获得临床益处的方法,所述方法包括:施用与治疗量的聚乙二醇化的脂质体多柔比星相组合的治疗量的 EC145。在一个实施方案中,所述临床益处是无进展存活。在另一个实施方案中,所述临床益处是总存活时

间。

[0146] 在下面的实施例中以及在附图中提供的临床试验结果,证实了与聚乙二醇化的脂质体多柔比星相组合的 EC145 在治疗铂抗性的卵巢癌中的实用性。

[0147] 对于上述的关于使用与聚乙二醇化的脂质体多柔比星相组合的 EC145 治疗铂抗性的卵巢癌的任意方法或应用,一个实施方案是这样的方案,其中 EC145 的纯度是至少 90%。另一个实施方案是这样的方案,其中 EC145 提供在水性无菌液体制剂中,所述制剂的组分包括一水合磷酸二氢钠,二水合磷酸氢二钠,氯化钠,氯化钾和注射用水。

[0148] 另一个实施方案是这样的方案,其中所述治疗另外包含肠方案。从 Carney MT, Meier DE. Palliative care and end-of-life issues. *Anaesthesiol Clin North America* 2000;18:183,可以修改出一个提议的渐进性肠方案。

[0149] 在一个实施方案中,所述肠方案包括:施用多库酯(100 mg,每天 2 次 (b. i. d.))和番泻叶(1 片,每天 1 次 (q. d.) 或每天 2 次)。

[0150] 在一个实施方案中,所述肠方案包括:施用多库酯(100 mg,每天 2 次)、番泻叶(2 片,每天 2 次)和比沙可啶直肠栓剂(早餐后 1-2 个)。

[0151] 在一个实施方案中,所述肠方案包括:施用多库酯(100 mg,每天 2 次)、番泻叶(3 片,每天 2 次)和比沙可啶直肠栓剂(早餐后 3-4 个)。

[0152] 在一个实施方案中,所述肠方案包括:施用多库酯(100 mg,每天 2 次)、番泻叶(4 片,每天 2 次)、乳果糖或山梨醇(15 mL,每天 2 次)和比沙可啶直肠栓剂(早餐后 3-4 个)。

[0153] 在一个实施方案中,所述肠方案包括:施用多库酯(100 mg,每天 2 次)、番泻叶(4 片,每天 2 次)、乳果糖或山梨醇(30 mL,每天 2 次)和比沙可啶直肠栓剂(早餐后 3-4 个)。

[0154] 在一个实施方案中,所述肠方案包括:施用多库酯(100 mg,每天 2 次)、番泻叶(4 片,每天 2 次)、乳果糖或山梨醇(30 mL,每天 2 次)和比沙可啶直肠栓剂(早餐后 3-4 个)。

[0155] 对于上述的关于使用与聚乙二醇化的脂质体多柔比星相组合的 EC145 治疗铂抗性的卵巢癌的任意方法或应用,一个额外的实施方案是这样的方案,其另外包括:在治疗之前,将 EC20 施用给患者,并评估患者具有 EC20++ 状态。

[0156] 在另一个实施方案中,提供了一种为在上述的关于使用与聚乙二醇化的脂质体多柔比星相组合的 EC145 治疗铂抗性的卵巢癌的任意方法或应用中所述的治疗选择患者的方法,所述方法包括:在治疗之前,将 EC20 施用给患者,并评估患者具有 EC20++ 状态。

[0157] 在另一个实施方案中,提供了一种药物组合物,所述药物组合物包含在水性无菌液体制剂中的 EC145,所述制剂的组分包括一水合磷酸二氢钠、二水合磷酸氢二钠、氯化钠、氯化钾和注射用水。

[0158] 在另一个实施方案中,提供了一种剂量单位,所述剂量单位包含 EC145 药物产品,所述 EC145 药物产品用于作为 2.0 mL 水性无菌液体制剂(pH 7.4)进行静脉内给药,所述剂量单位含有 1.4 mg/mL EC145。在一个实施方案中,上述的剂量单位是安瓿、密封的管形瓶或预充的注射器。在另一个实施方案中,上述的剂量单位是密封的管形瓶。

[0159] 下面列举的项目进一步描述了本发明的实施方案:

1. 一种测定 EC145 是否适用于治疗具有卵巢肿瘤或肺肿瘤的患者,所述方法包括下述步骤:测定功能活性的叶酸受体在患者的肿瘤上是否存在,其中如果功能活性的叶酸受体在肿瘤上存在,则 EC145 适用于治疗具有所述肿瘤的患者。

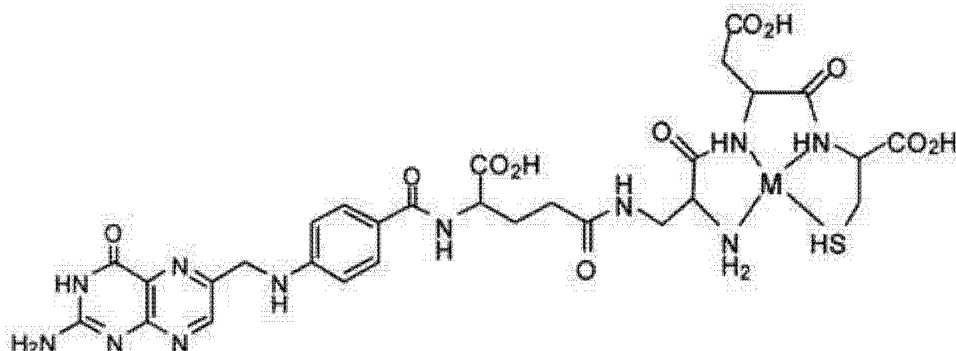


- [0160] 2. 如项目 1 所述的方法,所述方法另外包括下述步骤:给所述患者施用 EC20,用于检测功能活性的叶酸盐受体。
- [0161] 3. 如项目 2 所述的方法,所述方法另外包括下述步骤:在施用 EC20 之前,给所述患者施用未标记的叶酸盐。
- [0162] 4. 如项目 2 或项目 3 所述的方法,其中如果在结合肿瘤以后由 EC20 产生的放射性信号与由 EC20 产生的背景放射性信号相比指示对患者的临床益处,则 EC145 适用于治疗具有所述肿瘤的患者。
- [0163] 5. 如项目 4 所述的方法,其中所述临床益处是患者的无进展存活。
- [0164] 6. 如项目 4 所述的方法,其中所述临床益处是肿瘤生长的抑制。
- [0165] 7. 如项目 4 所述的方法,其中所述临床益处选自:稳定的疾病、部分应答和完全应答。
- [0166] 8. 如项目 4 所述的方法,其中基于由 EC20 产生的放射性信号相对于背景放射性信号的肿瘤与背景之比,定量功能活性的叶酸盐受体的表达水平。
- [0167] 9. 如项目 8 所述的方法,其中所述肿瘤与背景之比是至少约 1.2。
- [0168] 10. 如项目 8 所述的方法,其中所述肿瘤与背景之比是至少约 1.3。
- [0169] 11. 如项目 8 所述的方法,其中所述肿瘤与背景之比是至少约 1.4。
- [0170] 12. 如项目 1-11 中任一条所述的方法,其中所述肿瘤是卵巢肿瘤。
- [0171] 13. 如项目 12 所述的方法,其中所述肿瘤是铂抗性的卵巢肿瘤。
- [0172] 14. 如项目 1-11 中任一条所述的方法,其中所述肿瘤是肺肿瘤。
- [0173] 15. 如项目 14 所述的方法,其中所述肿瘤是非小细胞肺癌。
- [0174] 16. 如项目 1-15 中任一条所述的方法,其中 EC145、EC20 或二者是在肠胃外剂型中。
- [0175] 17. 如项目 16 所述的方法,其中所述剂型选自:真皮内的、皮下的、肌肉内的、腹膜内的、静脉内的和鞘内的剂型。
- [0176] 18. 如项目 1-17 中任一条所述的方法,其中 EC145 是在组合物中,且其中所述组合物另外包含药学上可接受的载体。
- [0177] 19. 如项目 2-18 中任一条所述的方法,其中所述包含 EC20 的组合物另外包含药学上可接受的载体。
- [0178] 19a. 如项目 18 或 19 所述的方法,其中所述药学上可接受的载体是液体载体。
- [0179] 19b. 如项目 19a 所述的方法,其中所述液体载体选自:盐水、葡萄糖、醇类、二醇类、酯类、酰胺类和它们的组合。
- [0180] 20. 如项目 1-19b 中任一条所述的方法,其中 EC145 以治疗有效量施用。
- [0181] 21. 如项目 2-20 中任一条所述的方法,其中 EC20 以治疗有效量施用。
- [0182] 21a. 如项目 20 或 21 所述的方法,其中所述有效量的范围是约 1 ng 至约 1 mg/千克体重。
- [0183] 21b. 如项目 21a 所述的方法,其中所述有效量的范围是约 100 ng 至约 500  $\mu$ g/千克体重。
- [0184] 21c. 如项目 21b 所述的方法,其中所述有效量的范围是约 100 ng 至约 50  $\mu$ g/千克体重。

[0185] 21d. 如项目 1-21c 中任一条所述的方法,其中所述肿瘤是原发性肿瘤。

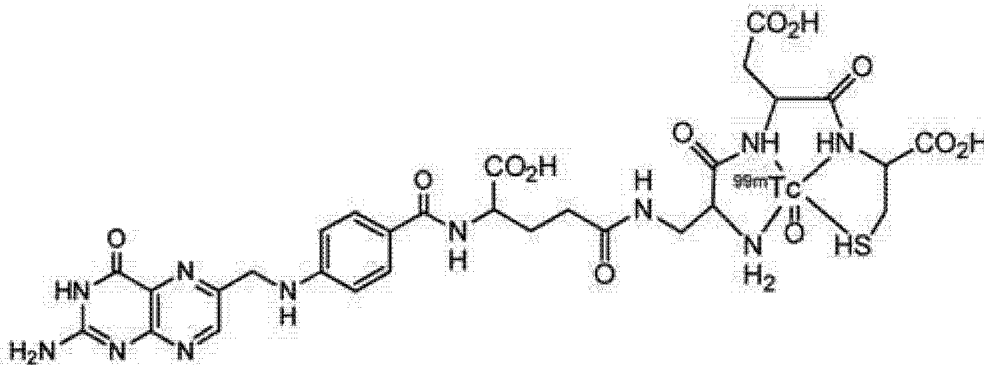
[0186] 21e. 如项目 1-21c 中任一条所述的方法,其中所述肿瘤是转移性肿瘤。

[0187] 21f. 如项目 1-21e 或项目 24-25y 中任一条所述的方法,其中作为叶酸盐-放射性成像剂缀合物的 EC20 被具有下式的化合物或其药学上可接受的盐替换;

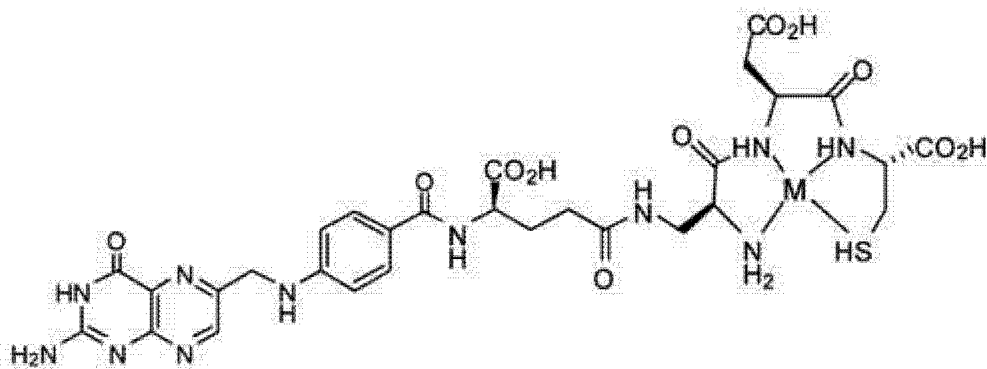


其中 M 是放射性核素的阳离子。

[0188] 21g. 如项目 21f 所述的方法,其中所述叶酸盐-放射性成像剂缀合物是具有下式的化合物或其药学上可接受的盐。



[0189] 21h. 如项目 21f 所述的方法,其中所述叶酸盐-放射性成像剂缀合物是具有下式的化合物或其药学上可接受的盐。



[0190] 21i. 如项目 21f 或 21h 所述的方法,其中 M 选自:镓、铟、铜、镉和铯的同位素。

[0191] 21j. 如项目 21i 所述的方法,其中 M 是镉的同位素。

[0192] 21k. 如项目 21g 或 21h 所述的方法,其中使用螯合剂和还原剂放射性地标记所述叶酸盐-放射性成像剂缀合物。

[0193] 21l. 如项目 21k 所述的方法,其中所述螯合剂是  $\alpha$ -D-葡庚糖酸钠。

[0194] 21m. 如项目 21k 或 21l 所述的方法,其中所述还原剂是二水合氯化亚锡(II)。

[0195] 21n. 如项目 1-21m 或项目 24-25y 中任一条所述的方法,所述方法另外包括下述步骤:给所述患者施用聚乙二醇化的脂质体多柔比星。

[0196] 22. 如项目 1-21n 中任一条所述的方法,所述方法另外包括下述步骤:给所述患者施用多柔比星。

[0197] 23. 如项目 22 所述的方法,其中所述多柔比星是聚乙二醇化的脂质体多柔比星的形式。

[0198] 24. 一种测定 EC145 是否适用于治疗具有卵巢肿瘤或肺肿瘤的患者,所述方法包括下述步骤:给所述患者施用包含 EC20 的组合物,其中如果所述患者的肿瘤具有功能活性的叶酸受体,则 EC145 适用于治疗具有所述肿瘤的患者,其中所述功能活性的叶酸受体能够用 EC20 检测到。

[0199] 25. 如项目 24 所述的方法,所述方法另外包括下述步骤:在施用 EC20 之前,给所述患者施用未标记的叶酸。

[0200] 25a. 如项目 25 所述的方法,其中如果与由 EC20 产生的背景放射性信号相比,在结合肿瘤以后由 EC20 产生的放射性信号指示对患者的临床益处,则 EC145 适用于治疗具有所述肿瘤的患者。

[0201] 25b. 如项目 25a 所述的方法,其中所述临床益处是患者的无进展存活。

[0202] 25c. 如项目 25a 所述的方法,其中所述临床益处是肿瘤生长的抑制。

[0203] 25d. 如项目 25a 所述的方法,其中所述临床益处选自:稳定的疾病、部分应答和完全应答。

[0204] 25e. 如项目 25a 所述的方法,其中基于由 EC20 产生的放射性信号相对于背景放射性信号的肿瘤与背景之比,定量功能活性的叶酸受体的表达水平。

[0205] 25f. 如项目 25e 所述的方法,其中所述肿瘤与背景之比是至少约 1.2。

[0206] 25g. 如项目 25e 所述的方法,其中所述肿瘤与背景之比是至少约 1.3。

[0207] 25h. 如项目 25e 所述的方法,其中所述肿瘤与背景之比是至少约 1.4。

[0208] 25i. 如项目 24-25h 中任一条所述的方法,其中所述肿瘤是卵巢肿瘤。

[0209] 25j. 如项目 25i 所述的方法,其中所述肿瘤是铂抗性的卵巢肿瘤。

[0210] 25k. 如项目 24-25h 中任一条所述的方法,其中所述肿瘤是肺肿瘤。

[0211] 25l. 如项目 24-25i 中任一条所述的方法,其中所述肿瘤是非小细胞肺癌。

[0212] 25m. 如项目 24-25l 中任一条所述的方法,其中 EC145、EC20 或二者是在肠胃外剂型中。

[0213] 25n. 如项目 25m 所述的方法,其中所述剂型选自:真皮内的、皮下的、肌肉内的、腹膜内的、静脉内的和鞘内的剂型。

[0214] 25o. 如项目 24-25n 中任一条所述的方法,其中 EC145 是在组合物中,且其中所述组合物另外包含药学上可接受的载体。

[0215] 25p. 如项目 24-25o 中任一条所述的方法,其中 EC20 另外包含药学上可接受的载体。

[0216] 25q. 如项目 25o 或 25p 所述的方法,其中所述药学上可接受的载体是液体载体。

[0217] 25r. 如项目 25q 所述的方法,其中所述液体载体选自:盐水、葡萄糖、醇类、二醇类、酯类、酰胺类和它们的组合。

- [0218] 25s. 如项目 24-25r 中任一条所述的方法,其中 EC145 以治疗有效量施用。
- [0219] 25t. 如项目 24-25s 中任一条所述的方法,其中 EC20 以治疗有效量施用。
- [0220] 25u. 如项目 25s 或 25t 所述的方法,其中所述有效量的范围是约 1 ng 至约 1 mg/ 千克体重。
- [0221] 25v. 如项目 25u 所述的方法,其中所述有效量的范围是约 100 ng 至约 500  $\mu$ g/ 千克体重。
- [0222] 25w. 如项目 25v 所述的方法,其中所述有效量的范围是约 100 ng 至约 50  $\mu$ g/ 千克体重。
- [0223] 25x. 如项目 24-25w 中任一条所述的方法,其中所述肿瘤是原发性肿瘤。
- [0224] 25y. 如项目 24-25w 中任一条所述的方法,其中所述肿瘤是转移性肿瘤。
- [0225] 26. 如项目 24 或 25 所述的方法,所述方法另外包括下述步骤:给所述患者施用多柔比星。
- [0226] 27. 如项目 26 所述的方法,其中所述多柔比星是聚乙二醇化的脂质体多柔比星的形式。
- [0227] 28. 一种预测患者的卵巢肿瘤或肺肿瘤对 EC145 疗法的应答的方法,所述方法包括下述步骤:
- a) 给所述患者施用 EC20,其中 EC20 产生放射性信号;
  - b) 定量在 EC20 与肿瘤结合以后由 EC20 产生的放射性信号;
  - c) 定量由 EC20 产生的背景放射性信号;
  - d) 对比在 EC20 与肿瘤结合以后产生的放射性信号和背景放射性信号;和
  - e) 基于所述对比,预测所述肿瘤对所述疗法的应答。
- [0228] 29. 如项目 1-28 中任一条所述的方法,其中施用 15 mg/ 月的 EC145。
- [0229] 30. 一种治疗有此需要的患者的铂抗性的卵巢癌的方法,所述方法包括:施用与治疗量的聚乙二醇化的脂质体多柔比星相组合的治疗量的 EC145。
- [0230] 31. 与聚乙二醇化的脂质体多柔比星相组合的 EC145 用于治疗患者的铂抗性的卵巢癌的应用。
- [0231] 32. EC145 用于生产药物的应用,所述药物用于与聚乙二醇化的脂质体多柔比星组合地治疗患者的铂抗性的卵巢癌。
- [0232] 33. 一种在有此需要的患者的铂抗性的卵巢癌的治疗中与使用治疗量的聚乙二醇化的脂质体多柔比星的治疗相比获得临床益处的方法,所述方法包括:施用与治疗量的聚乙二醇化的脂质体多柔比星相组合的治疗量的 EC145。
- [0233] 34. 如项目 33 所述的方法,其中所述临床益处是无进展存活。
- [0234] 35. 如项目 33 所述的方法,其中所述临床益处是总存活时间。
- [0235] 36. 如项目 30-35 中任一条所述的方法或应用,其中 EC145 的纯度是至少 90%。
- [0236] 37. 如项目 30-35 中任一条所述的方法或应用,其中 EC145 提供在水性无菌液体制剂中,所述制剂的组分包括一水合磷酸二氢钠、二水合磷酸氢二钠、氯化钠、氯化钾和注射用水。
- [0237] 38. 如项目 30-35 中任一条所述的方法或应用,其中所述治疗另外包含肠方案。
- [0238] 39. 如项目 30-38 中任一条所述的方法或应用,其中 EC145 作为推注剂在约 10-20

秒内施用。

[0239] 40. 如项目 30-39 中任一条所述的方法或应用,其另外包括:在治疗之前,将 EC20 施用给患者,并评估患者具有 EC20++ 状态。

[0240] 41. 一种为在项目 30-39 中任一条所述的治疗选择患者的方法,所述方法包括:在治疗之前,将 EC20 施用给患者,并评估患者具有 EC20++ 状态。

[0241] 42. 一种药物组合物,所述药物组合物包含在水性无菌液体制剂中的 EC145,所述制剂的组分包括一水合磷酸二氢钠、二水合磷酸氢二钠、氯化钠、氯化钾和注射用水。

[0242] 43. 一种剂量单位,所述剂量单位包含 EC145 药物产品,所述 EC145 药物产品用于作为 2.0 mL 水性无菌液体制剂 pH 7.4 进行静脉内给药,所述剂量单位含有 1.4 mg/mL EC145。

[0243] 44. 如项目 43 所述的剂量单位,它是安瓿、密封的管形瓶或预充的注射器。

[0244] 45. 如项目 44 所述的剂量单位,它是密封的管形瓶。

[0245] 46. 一种测定具有肿瘤的患者是否具有在患者的肿瘤上存在的功能活性的叶酸盐受体的方法,所述方法包括下述步骤:给所述患者施用有效量的 EC20,用于检测功能活性的叶酸盐受体。

[0246] 47. 如项目 46 所述的方法,其中所述肿瘤是卵巢肿瘤或肺肿瘤。

[0247] 48. 如项目 46 所述的方法,其中所述肿瘤是原发性肿瘤或转移性肿瘤。

[0248] 49. 如项目 1-3、24-27 或 46-48 中任一条所述的方法,其中所述功能活性的叶酸盐受体可视觉地检测到。

[0249] 50. 如项目 49 所述的方法,其中功能活性的叶酸盐受体的视觉检测被用于测定患者的叶酸盐受体状态。

[0250] 51. 如项目 50 所述的方法,其中所述患者的叶酸盐受体状态选自:EC20++、EC20+ 和 EC20-。

[0251] 52. 如项目 51 所述的方法,其中所述叶酸盐受体状态是 EC20++。

[0252] 53. 如项目 52 所述的方法,其中指示 EC145 治疗。

[0253] 54. 如项目 52 所述的方法,其中 EC20++ 状态与对患者的临床益处相关联。

[0254] 55. 如项目 54 所述的方法,其中所述临床益处是疾病控制率。

[0255] 56. 如项目 54 所述的方法,其中所述临床益处是总疾病应答率。

[0256] 57. 如项目 54 所述的方法,其中所述临床益处是总存活时间。

[0257] 58. 一种在有此需要的患者中治疗表达叶酸盐受体的上皮肿瘤的方法,所述方法包括:施用与治疗量的多柔比星相组合的治疗量的 EC145。

[0258] 59. 与聚乙二醇化的脂质体多柔比星相组合的 EC145 用于治疗患者的表达叶酸盐受体的上皮肿瘤的应用。

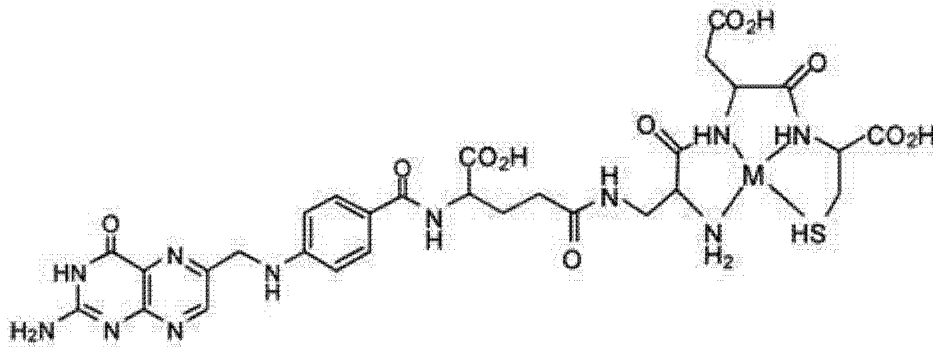
[0259] 60. EC145 用于生产药物的应用,所述药物用于与聚乙二醇化的脂质体多柔比星组合地治疗患者的表达叶酸盐受体的上皮肿瘤。

[0260] 61. 一种在有此需要的患者中实现治疗表达叶酸盐受体的上皮肿瘤的临床益处的方法,所述方法包括:施用与治疗量的聚乙二醇化的脂质体多柔比星相组合的治疗量的 EC145。

[0261] 62. 如项目 61 所述的方法,其中所述临床益处是无进展存活。

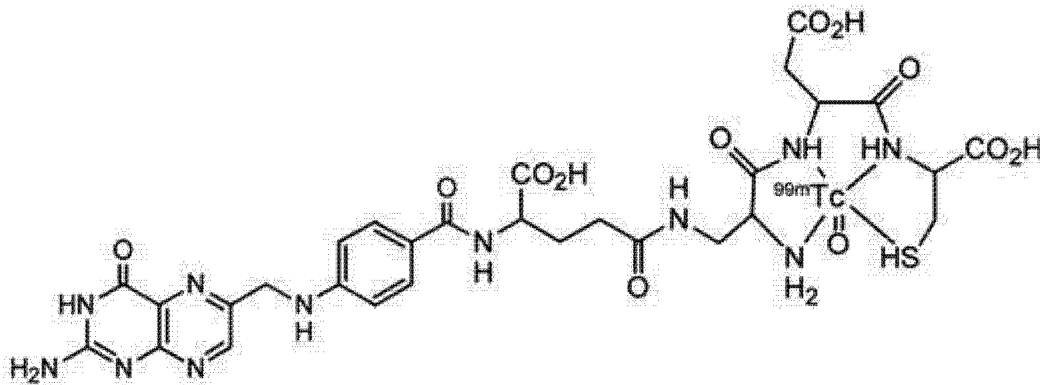
- [0262] 63. 如项目 61 所述的方法,其中所述临床益处是总存活时间。
- [0263] 64. 如项目 58-63 中任一条所述的方法或应用,其中所述多柔比星是聚乙二醇化的脂质体多柔比星的形式。
- [0264] 65. 如项目 58-64 中任一条所述的方法或应用,其中所述表达叶酸盐受体的上皮肿瘤是卵巢肿瘤、子宫内膜肿瘤或非小细胞肺癌 (NSCLC) 肿瘤。
- [0265] 66. 如项目 65 所述的方法或应用,其中所述表达叶酸盐受体的上皮肿瘤是卵巢肿瘤。
- [0266] 67. 如项目 64 所述的方法或应用,其中所述表达叶酸盐受体的上皮肿瘤是卵巢肿瘤、子宫内膜肿瘤或非小细胞肺癌 (NSCLC) 肿瘤。
- [0267] 68. 如项目 67 所述的方法或应用,其中所述表达叶酸盐受体的上皮肿瘤是卵巢肿瘤。
- [0268] 80A. 一种测定 EC145 或其药学上可接受的盐是否适用于治疗具有卵巢肿瘤或肺肿瘤的患者,所述方法包括下述步骤:给所述患者施用包含 EC20 的组合物,其中如果与由 EC20 产生的背景放射性信号相比,在结合肿瘤以后由 EC20 产生的放射性信号指示对患者的临床益处,则 EC145 适用于治疗具有所述肿瘤的患者。
- [0269] 80B. 一种为 EC145 疗法选择具有卵巢肿瘤或肺肿瘤的患者,所述方法包括下述步骤:测定功能活性的叶酸盐受体是否在患者的肿瘤上存在,其中如果在肿瘤上检测到功能活性的叶酸盐受体,则将所述患者选择用于 EC145 疗法。
- [0270] 80C. 一种为 EC145 疗法选择具有卵巢肿瘤或肺肿瘤的患者,所述方法包括下述步骤:给所述患者施用包含 EC20 的组合物,其中如果患者的肿瘤具有功能活性的叶酸盐受体,则将所述患者选择用于 EC145 疗法,其中所述功能活性的叶酸盐受体能够用 EC20 检测到。
- [0271] 80D. 一种为 EC145 疗法选择具有卵巢肿瘤或肺肿瘤的患者,所述方法包括下述步骤:给所述患者施用 EC20,其中如果与由 EC20 产生的背景放射性信号相比,在结合肿瘤以后由 EC20 产生的放射性信号指示对患者的临床益处,则选择所述患者进行治疗。
- [0272] 81. 如项目 80A、80B、80C 或 80D 所述的方法,所述方法另外包括下述步骤:在施用叶酸盐-放射性成像剂缀合物之前,给所述患者施用未标记的叶酸盐。
- [0273] 82. 如项目 81 所述的方法,其中如果与由 EC20 产生的背景放射性信号相比,在结合肿瘤以后由 EC20 产生的放射性信号指示对患者的临床益处,则 EC145 适用于治疗具有所述肿瘤的患者。
- [0274] 83. 如项目 82 所述的方法,其中所述临床益处是患者的无进展存活。
- [0275] 84. 如项目 82 所述的方法,其中所述临床益处是肿瘤生长的抑制。
- [0276] 85. 如项目 82 所述的方法,其中所述临床益处选自:稳定的疾病、部分应答和完全应答。
- [0277] 86. 如项目 82 所述的方法,其中基于由 EC20 产生的放射性信号相对于背景放射性信号的肿瘤与背景之比,定量功能活性的叶酸盐受体的表达水平。
- [0278] 87. 如项目 86 所述的方法,其中所述肿瘤与背景之比是至少约 1.2。
- [0279] 88. 如项目 86 所述的方法,其中所述肿瘤与背景之比是至少约 1.3。
- [0280] 89. 如项目 86 所述的方法,其中所述肿瘤与背景之比是至少约 1.4。

- [0281] 90. 如项目 80A、80B、80C、80D-89 中任一条所述的方法,其中所述肿瘤是卵巢肿瘤。
- [0282] 91. 如项目 90 所述的方法,其中所述肿瘤是铂抗性的卵巢肿瘤。
- [0283] 92. 如项目 80A、80B、80C、80D-89 中任一条所述的方法,其中所述肿瘤是肺肿瘤。
- [0284] 93. 如项目 80A、80B、80C、80D-89 中任一条所述的方法,其中所述肿瘤是非小细胞肺癌。
- [0285] 94. 如项目 80A、80B、80C、80D-93 中任一条所述的方法,其中 EC145、EC20 或二者是在肠胃外剂型中。
- [0286] 95. 如项目 94 所述的方法,其中所述剂型选自:真皮内的、皮下的、肌肉内的、腹膜内的、静脉内的和鞘内的剂型。
- [0287] 96. 如项目 80A、80B、80C、80D-95 中任一条所述的方法,其中 EC145 是在组合物中,且其中所述组合物另外包含药学上可接受的载体。
- [0288] 97. 如项目 80A、80B、80C、80D-96 中任一条所述的方法,其中所述包含 EC20 的组合物另外包含药学上可接受的载体。
- [0289] 98. 如项目 96 或 97 所述的方法,其中所述药学上可接受的载体是液体载体。
- [0290] 99. 如项目 98 所述的方法,其中所述液体载体选自:盐水、葡萄糖、醇类、二醇类、酯类、酰胺类和它们的组合。
- [0291] 100. 如项目 80A、80B、80C、80D-99 中任一条所述的方法,其中 EC145 以治疗有效量施用。
- [0292] 101. 如项目 80A、80B、80C、80D-100 中任一条所述的方法,其中 EC20 以治疗有效量施用。
- [0293] 102. 如项目 80A、80B、80C、80D 或 101 所述的方法,其中所述有效量的范围是约 1 ng 至约 1 mg/ 千克体重。
- [0294] 103. 如项目 102 所述的方法,其中所述有效量的范围是约 100 ng 至约 500  $\mu$ g/ 千克体重。
- [0295] 104. 如项目 102 所述的方法,其中所述有效量的范围是约 100 ng 至约 50  $\mu$ g/ 千克体重。
- [0296] 105. 如项目 80A、80B、80C、80D-104 中任一条所述的方法,其中所述肿瘤是原发性肿瘤。
- [0297] 106. 如项目 80A、80B、80C、80D-104 中任一条所述的方法,其中所述肿瘤是转移性肿瘤。
- [0298] 110. 如项目 80A、80B、80C、80D-109 中任一条所述的方法,其中作为叶酸盐-放射性成像剂缀合物的 EC20 被具有下式的化合物或其药学上可接受的盐替换;

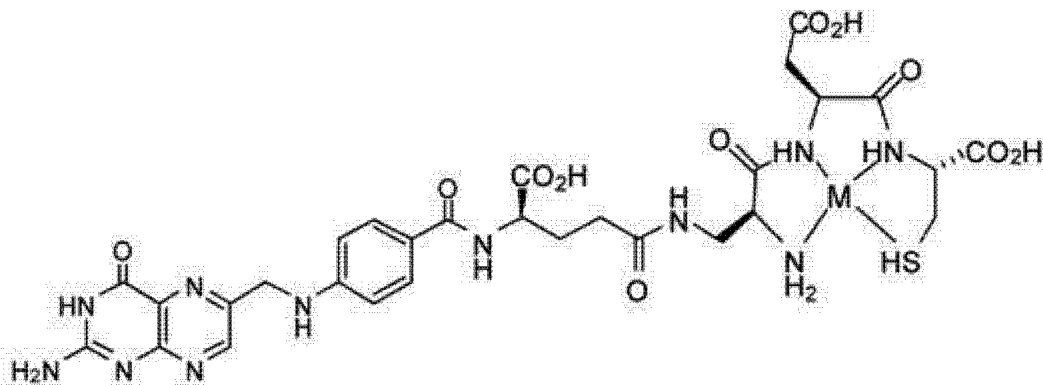


其中 M 是放射性核素的阳离子。

[0299] 111. 如项目 110 所述的方法,其中所述叶酸盐-放射性成像剂缀合物是具有下式的化合物或其药学上可接受的盐。



[0300] 112. 如项目 110 所述的方法,其中所述叶酸盐-放射性成像剂缀合物是具有下式的化合物或其药学上可接受的盐。



[0301] 113. 如项目 110 或 112 所述的方法,其中 M 选自:镓、铟、铜、镉和铯的同位素。

[0302] 114. 如项目 113 所述的方法,其中 M 是镉的同位素。

[0303] 115. 如项目 111 或 112 所述的方法,其中使用螯合剂和还原剂放射性地标记所述叶酸盐-放射性成像剂缀合物。

[0304] 116. 如项目 115 所述的方法,其中所述螯合剂是 α-D- 葡庚糖酸钠。

[0305] 117. 如项目 115 或 116 所述的方法,其中所述还原剂是二水合氯化亚锡 (II)。

[0306] 118. 如项目 80A、80B、80C、80D-117 中任一条所述的方法,所述方法另外包括下述步骤:给所述患者施用聚乙二醇化的脂质体多柔比星。

[0307] 119. 如项目 80A、80B、80C、80D-118 中任一条所述的方法,其中施用 15 mg/ 月的



叶酸盐 - 长春胺缀合物。

[0308] 在另一个实施方案中,本文所述的方法包括下述实施例。所述实施例进一步例证了本文所述的本发明的不同实施方案的其它特征。但是,应当理解,所述实施例是例证性的,不应解释为限制本文所述的本发明的其它实施方案。另外,应当理解,在本文所述的本发明的不同实施方案中,包括所述实施例的其它变体。

## 实施例

### [0309] 实施例 1

#### 材料

$N^{10}$ -三氟乙酰基蝶酸购自 Eprova AG, Schaffhausen, Switzerland。肽合成试剂购自 NovaBiochem and Bachem。 $^{99m}\text{Tc}$  过锝酸钠由 Syncor 供应。根据 Rouschias (Rouschias, G., Chem. Rev., 74: 531 (1974)), 制备  $[\text{ReO}_2(\text{en})_2]\text{Cl}$ 。纤维素平板和 DEAE 离子交换平板购自 J. T. Baker。从 Ortho Biotech Products, LP, Raritan, NJ 得到 DOXIL®。

### [0310] 实施例 2

#### EC20 的制备

使用 Fmoc-策略 (Fmoc = 9-芴甲氧羰基; Boc = 叔丁氧羰基; Dap = 二氨基丙酸; DMF = 二甲基甲酰胺; DIPEA = 二异丙基乙胺), 通过聚合物支持的连续方案, 制备 EC20。在装载了 Fmoc-L-Cys(Trt)-OH 的酸敏感的 Wang 树脂上, 合成 EC20。施加苯并三唑-1-基-氧-三-吡咯烷子基-磷鎓六氟磷酸盐 (PyBOP) 作为活化剂, 以确保使用低当量的氨基酸的有效偶联。在每个偶联步骤以后, 在标准条件下 (在 DMF 中的 20% 哌啶), 去除 Fmoc 保护基。偶联反应: i.) Fmoc-Asp(OtBu)-OH, PyBop, DIPEA, DMF; ii) Boc-Dap(Fmoc)-OH, PyBop, DIPEA, DMF; iii) Fmoc-D-Glu-OtBu, PyBop, DIPEA, DMF; iv)  $N^{10}$ -TFA-Pte-OH, DIPEA, DMSO。在最后一个装配步骤以后, 通过用含有 2.5% 乙烷双硫醇、2.5% 三异丙基硅烷和 2.5% 去离子水的 92.5% 三氟醋酸处理, 从聚合的支持物去除肽。该反应也导致 t-Bu、Boc 和三苯甲基保护基的同时去除。最后, 在氢氧化铵水溶液中去除三氟乙酰基部分, 得到 EC20。

[0311] 如下通过 HPLC 纯化 EC20 产物: 使用 Xterra RP18 30 x 300 mm, 7  $\mu\text{m}$  柱 (Waters); 流动相 32 mM HCl (A), MeOH (B); 梯度条件从 99%A 和 1%B 开始, 在 37 min 时达到 89%A 和 11%B, 流速为 20 mL/min。在这些条件下, EC20 单体通常在 14.38 min 洗脱, 而 EC20 二硫化物二聚体 (小量污染物) 在 16.83 min 洗脱。通过电喷雾-质谱法分析 EC20。主阳离子峰 (m/z, 相对强度): 746.1, 100; 747.1, 44; 556.8, 32; 570.8, 16。

### [0312] 实施例 3

非放射性的试剂瓶和  $^{99m}\text{Tc}$ -EC20 的制备。

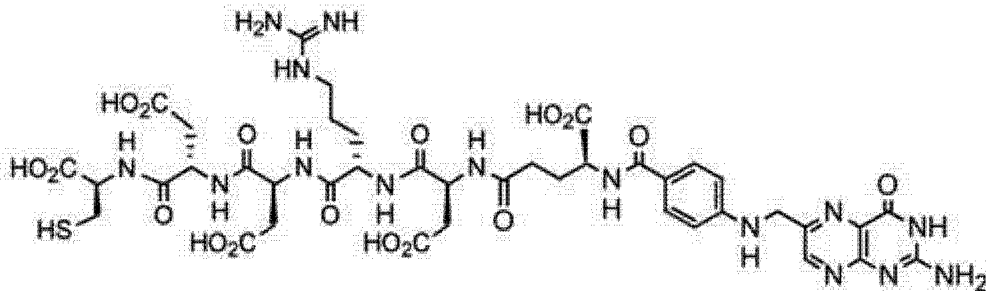
[0313] 将 EC20 试剂盒用于制备  $^{99m}\text{Tc}$ -EC20 放射性药物物质。每个试剂盒含有 0.1 mg EC20、80 mg  $\alpha$ -D-葡庚糖酸钠、80 mg 二水合氯化亚锡 (II) 的无菌的、无热原的低压冻干的混合物, 并在低压冻干之前用足够的氢氧化钠或盐酸调节 pH 至  $6.8 \pm 0.2$ 。在氩气氛下, 将低压冻干的粉末密封在 5 mL 管形瓶中。然后在  $-20^\circ\text{C}$  冷冻储存试剂盒, 直到使用或过期 (目前的贮存期限是  $> 2$  年)。存在氯化亚锡 (II) 组分, 用于还原加入的  $^{99m}\text{Tc}$ -过锝酸盐, 同时存在  $\alpha$ -D-葡庚糖酸钠组分, 用于在还原的  $^{99m}\text{Tc}$  最终与 EC20 化合物螯合之前使它稳

定化。

[0314] 如下制备  $^{99m}\text{Tc}$ -EC20 (即,  $^{99m}\text{Tc}$  与 EC20 螯合)。首先, 制备含有部分浸没的铅管形瓶屏蔽罩的沸水浴。用 70% 乙醇擦拭 EC20 管形瓶的顶部, 以对表面消毒, 并将管形瓶放在合适的屏蔽容器中。使用具有 27- 计量注射针的屏蔽的注射器, 将在 0.9% 氯化钠中的 1 mL 无菌过钨酸钠  $^{99m}\text{Tc}$  注射液 (15-20 mCi) 注射进屏蔽的管形瓶中。在从管形瓶取出注射器之前, 从管形瓶中抽取与加入的过钨酸盐等体积的气体体积, 以便使管形瓶内的压力正常化。轻柔地将管形瓶涡旋 30 秒, 以确保低压冻干的粉末完全溶解。然后将管形瓶放入在沸水浴中的铅屏蔽罩中。将溶液加热约 18 分钟, 然后冷却至室温最少 15 min。可以在室温 (15-25°C) 避光保藏该溶液, 但是它应当在制备的 6 小时内使用。

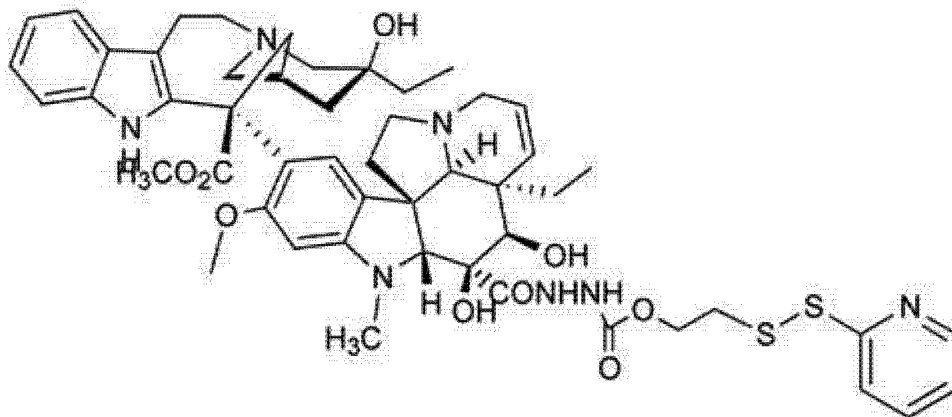
[0315] 实施例 4

EC0119 的制备



根据下述次序, 反应 Wang 树脂结合的 4- 甲氧基三苯甲基 (MTT)- 保护的 Cys-NH<sub>2</sub>:1) a. Fmoc-Asp(OtBu)-OH, PyBOP, DIPEA; b. 20% 哌啶 /DMF; 2) a. Fmoc-Asp(OtBu)-OH, PyBOP, DIPEA; b. 20% 哌啶 /DMF; 3) a. Fmoc-Arg(Pbf)-OH, PyBOP, DIPEA; b. 20% 哌啶 /DMF; 4) a. Fmoc-Asp(OtBu)-OH, PyBOP, DIPEA; b. 20% 哌啶 /DMF; 5) a. Fmoc-Glu-OtBu, PyBOP, DIPEA; b. 20% 哌啶 /DMF; 6) N10-TFA- 蝶酸, PyBOP, DIPEA。用 TFA/H<sub>2</sub>O/TIPS/EDT (92.5:2.5:2.5:2.5) 去除 MTT、tBu 和 Pbf 保护基, 并用 pH =9.3 的 NH<sub>4</sub>OH 水溶液, 去除 TFA 保护基。选择的 <sup>1</sup>H NMR (D<sub>2</sub>O) δ (ppm) 8.68 (s, 1H, FA H-7), 7.57 (d, 2H, J = 8.4 Hz, FA H-12 &16), 6.67 (d, 2H, J = 9 Hz, FA H-13 &15), 4.40-4.75 (m, 5H), 4.35 (m, 2H), 4.16 (m, 1H), 3.02 (m, 2H), 2.55-2.95 (m, 8H), 2.42 (m, 2H), 2.00-2.30 (m, 2H), 1.55-1.90 (m, 2H), 1.48 (m, 2H); MS (ESI, m+H<sup>+</sup>) 1046。

[0316] 实施例 5

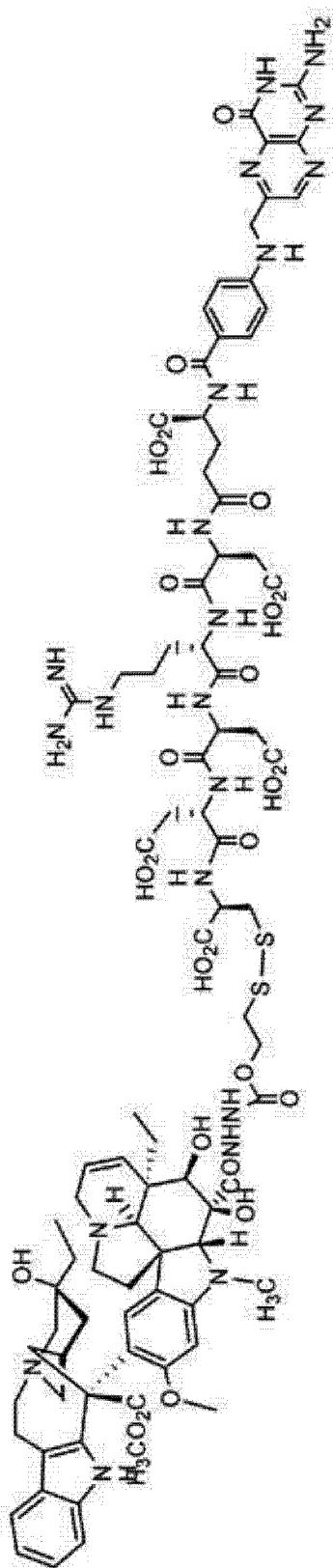


在 0°C, 将 2-[( 苯并三唑 -1- 基 -( 氧基羰基氧基 )- 乙基二硫烷基 ]- 吡啶 HCl (601

mg) 和 378  $\mu$ L DIPEA 顺序地加入去乙酰基长春碱酰肼 (根据 Barnett 等人, *J. Med. Chem.* 21:88-96 (1978) 制备, 前述文献的公开内容通过引用整体并入本文中。另外, 在本文中引用的每篇出版物的整个公开内容也通过引用并入本文) (668 mg) 在 5 ml DCM 中的溶液中。使反应物温热至室温, 并搅拌 3 小时。TLC (在 DCM 中的 15%MeOH) 表明完全转化。通过硅胶色谱法 (1:9 MeOH/DCM), 纯化混合物。蒸发合并的级分, 重新溶解于 DCM 中, 并用 10%Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>、盐水洗涤, 干燥 (MgSO<sub>4</sub>), 并蒸发至 550 mg (80%); HPLC-RT 12.651 min., 91% 纯的, <sup>1</sup>H NMR 谱与指定的结构一致, MS (ESI<sup>+</sup>): 984.3, 983.3, 982.4, 492.4, 491.9, 141.8。

[0317] 实施例 6

EC145 的制备



在氩下,用硫代磺酸盐或吡啶基二硫-活化的长春碱(实施例5)处理在THF中的肽基片段Pte-Glu-Asp-Arg-Asp-Asp-Cys-OH(实施例4),成为黄色溶液,导致溶解在0.1 M NaHCO<sub>3</sub>(pH > 6.5)中。低压冻干法和HPLC得到70%产率;选择的<sup>1</sup>H NMR (D<sub>2</sub>O) δ 8.67 (s, 1H, FA H-7), 7.50 (br s, 1H, VLB H-11'), 7.30-7.40 (br s, 1H, VLB H-14'), 7.35 (d, 2H, J = 7.8 Hz, FA H-12 & 16), 7.25 (m, 1H, VLB H-13'), 7.05 (br s, 1H, VLB

H-12'), 6.51 (d, 2H, J = 8.7 Hz, FA H-13 &15), 6.4 (s, 2H, VLB H-14 & 17), 5.7 (m, 1H, VLB 烯烃), 5.65 (m, 1H, VLB H-7), 5.5 (d, 1H, VLB 烯烃), 5.5 (m, 1H, VLB H-6), 4.15(m, 1H, VLB H-8'), 3.82 (s, 3H, VLB C<sub>18</sub>-CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 3.69 (s, 3H, VLB C<sub>16</sub>-OCH<sub>3</sub>), 2.8 (s, 3H, VLB N-CH<sub>3</sub>), 1.35 (br s, 1H, VLB H-3'), 1.15 (m, 1H, VLB H-2'), 0.9 (t, 3H, J= 7 Hz, VLB H-21'), 0.55 (t, 3H, J = 6.9 Hz, VLB H-21); LCMS (ESI, m+H<sup>+</sup>) 1918。

#### [0318] 实施例 7

使用 EC145 和多柔比星的体外药物 - 药物组合试验

在第 1 天,用胰蛋白酶处理 KB 肿瘤细胞,悬浮于叶酸盐缺乏的 -RPMI (FDRPMI) + 5% 胎牛血清中,使用血球计数器计数。将细胞悬浮液稀释至 0.5 x 10<sup>5</sup>细胞 /mL 的终浓度,将稀释的悬浮液用于装载 6 个 24- 孔平板,每个孔 1 mL 细胞悬浮液。然后将孔分成实验组,每个样品一式四份,并在 37°C、5%CO<sub>2</sub>下附着平板过夜。

[0319] 在第 2 天,以 2X 终浓度,分别从 0.731 mM 和 2.9 mM 无菌储备溶液制备 EC145 和多柔比星浓度,然后在它们的对应孔中与 FDRPMI 或替代药物相混合,终体积为 500 μL。EC145 在每个单个孔中的终浓度是 0 nM、2 nM、4 nM、8 nM、16 nM 或 32 nM。多柔比星在每个单个孔中的终浓度是 0 nM、12.5 nM、25 nM、50 nM、100 nM 或 200 nM。测试了 EC145 浓度和多柔比星浓度的 36 种组合中的每一个的 4 个副本。将含有 EC145 的样品温育 2 小时,用 FDRPMI 或适当浓度的多柔比星替换,然后温育共 72 小时。将多柔比星的样品仅不间断地温育 72 小时。此后,将每个孔中的用完的温育培养基替换为 500 μL 在 FDRPMI 中的 1 μCi/mL 3H- 胸苷;将细胞温育另外 4 小时。温育以后,抽吸标记溶液,并用 PBS 洗涤细胞 2 次。然后将 500 μL 10% 三氯醋酸 (TCA) 加入每个孔中,将平板保藏在 4°C,直到处理它们。

[0320] 通过抽吸 TCA 和加入 500 μL 0.25 M NaOH,处理细胞。然后将来自每个孔的 450 μL 样品转移至单独标记的液体闪烁瓶,与 3 mL Ecolite 混合液一起涡旋,然后在液体闪烁计数器中计数。然后将 CPM 结果制成表,并计算对照值百分比。

#### [0321] 等效线图解法 - 药物协同作用方法

通过等效线图解方法,测定药物协同作用。在该方法在和,从对照值的百分比,预测 IC<sub>60</sub> 值。通过将每种单一药剂的 IC<sub>60</sub> 设定为等于 1,将所有组合的 IC<sub>60</sub> 设定为其分数,可以将这些数据图示为 nM 值或当量。落在线上的组合数据点表示额外的药物 - 药物相互作用,而落在线之下或之上的数据点分别表示协同作用或拮抗作用。如图 15 中的图所示,EC145/ 多柔比星组合的 IC<sub>60</sub> 值刚好落在线之下,提示 EC145 和多柔比星在 KB 细胞中具有强协同关系。

#### [0322] 实施例 8

单独的或组合的 EC145 和 DOXIL®(PDL) 在用叶酸盐缺乏饮食维持的携带皮下 M109 肿瘤的 Balb/c- 小鼠中的研究

将购自 Harlan (Indianapolis, IN.) 的 Balb/c- 雌性小鼠圈养 (5 只动物 / 笼) 在标准的聚碳酸酯鞋盒笼中,所述鞋盒笼具有 sani-chips 垫层和丝顶部。每 2 周,将笼子更换为洁净的笼子。贯穿研究期间,在环境受控室中圈养动物。室温设置范围是 70 °F 至 74 °F。房间的相对湿度范围是 30% 至 70%。将光定时器设定为提供 12- 小时光照 /12- 小时黑暗光周期。每天观察动物的健康。

[0323] 最初给动物饲喂由 Harlan Teklad (Madison, WI) 生产的试验饮食 #00434。从给药后 1 周开始,将动物转换至由 PMI Labdiet(Richmond, IN) 生产的标准啮齿动物饮食 PMI 5000。贯穿研究期间,无限制地提供动物饲料和引用水。

#### [0324] 肿瘤植入

在 37°C 在 5%CO<sub>2</sub> 控湿气氛下,在含有 5%FBS 的叶酸盐 - 缺乏的 RPMI 1640 中,培养 M109 (Madison-109 肺癌细胞) 肿瘤细胞。在开始叶酸盐缺乏饮食以后 9 天,皮下地接种 M109 肿瘤细胞 (1 x 10<sup>6</sup> 细胞 / 动物)。在肿瘤达到 70-100 mm<sup>3</sup> 以后,给小鼠给药。

#### [0325] 给药的药物溶液的制备和给药

如下制备给药溶液:称量适当量的每种化合物,重构 / 溶解在 PBS (pH 7.4) 中,穿过 0.22 μm PVDF 注射器式滤器无菌过滤该药物溶液,并在 -20°C 冷冻用于每天给药的等分试样。以 200 μL 的体积,静脉内施用剂量。

#### [0326] 评价

每周 3 次地监测肿瘤大小和测量体重。注意总的动物形态和行为。如果小鼠体重减轻 > 20%,或当肿瘤达到 1500 mm<sup>3</sup> 的大小时,进行安乐死。根据研究人员的判断,如果小鼠在短时间内体重大幅减轻,或当小鼠接近垂死情况时,也进行安乐死。

#### [0327] 结果和结论

分别地,在图 16 中图解了下述组对肿瘤生长和应答 (PR = 部分应答, CR = 完全应答, 治愈) 的影响,在图 17 中图解了下述组对重量变化的影响:(a) M109 对照;(b) EC145, 2 μmol/kg;(c) DOXIL, 7 mg/kg;(d) EC145, 2 μmol/kg + DOXIL, 7 mg/kg;(e) DOXIL, 4 mg/kg;和 (f) EC145, 2 μmol/kg + DOXIL, 4 mg/kg。下面进一步描述了每个组的结果:

(b) EC0145 (2 μmol/kg, 每周 3 次 x 2 剂量) 表现出良好的抗肿瘤效应,5 只小鼠中的 3 只治愈了可见的肿瘤。在该组中的小鼠在给药期间没有体重减轻。

[0328] (c) Doxil (7 mg/kg, 每周 1 次 x 2 剂量) 表现出显著的抗肿瘤效应,5 只小鼠中的 4 只治愈。在该组中的小鼠在给药期间发生了轻微的体重减轻 (2- 8%)。

[0329] (d) 与 Doxil (7 mg/kg, 每周 1 次 x 2 剂量) 组合的 EC0145 (2 μmol/kg, 每周 3 次 x 2 剂量) 也表现出良好的抗肿瘤效应,5 只小鼠中的 3 只治愈。在该组中的小鼠在给药期间具有轻微的体重减轻 (1- 6%)。1 只动物在第 5 剂量期间死亡,原因不明。该动物在该时间具有部分应答。

[0330] (e) Doxil (4 mg/kg, 每周 1 次 x 3 剂量) 表现出显著的抗肿瘤效应,1/5 完全应答, 3/5 治愈。在该组中的 3 只小鼠在给药结束后也发生了延长的体重减轻 (2-10%), 但是最终恢复了它们的体重。

[0331] (f) 与 Doxil (4 mg/kg, 每周 1 次 x 3 剂量) 组合的 EC0145 (2 μmol/kg, 每周 3 次 x 2 剂量) 表现出优良的抗肿瘤效应,5 只小鼠中的 5 只治愈。在该组中的小鼠在给药期间和之后,具有 0-5% 的轻度体重减轻。

#### [0332] 实施例 14

EC145 在具有晚期卵巢癌和子宫内膜癌的患者中的研究

在 <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00507741?term=Endocyte&rank=3> (它通过引用并入本文),总结了该研究的方案 (EC-FV-02)。

**[0333] 实施例 15**

EC145 在具有渐进性肺腺癌的患者中的研究

在 <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00511485?term=Endocyte&rank=7> (它通过引用并入本文), 总结了该研究的方案 (EC-FV-03)。

**[0334] 实施例 16**

使用  $^{99m}\text{Tc}$ -EC20 的肿瘤成像方法

在开始 EC145 治疗之前 21 天内, 但是不小于 7 天, 进行  $^{99m}\text{Tc}$ -EC20 给药和成像。

**[0335]  $^{99m}\text{Tc}$ -EC20 的施用。**

**[0336]** 在  $^{99m}\text{Tc}$ -EC20 成像操作之前, 患者接受一次 0.5 mg 叶酸静脉内注射, 随后在 1-3 分钟内, 注射 1-2 mL 用 20-25 mCi 的镓- $^{99m}\text{Tc}$  标记的 0.1 mg EC20。如果可能的话, 在施用  $^{99m}\text{Tc}$ -EC20 的一周内, 中断叶酸补充。

**[0337]** 在施用  $^{99m}\text{Tc}$ -EC20 之前大约 1-3 分钟, 通过静脉内注射来施用叶酸。通过在上肢静脉 (例如, 肘窝) 中的自由流动的内在静脉内导管或适当的内在静脉内入口, 注射叶酸作为缓慢静脉内推注, 随后注射 5-10 mL 生理盐水。

**[0338]** 通过自由流动的内在静脉内导管, 以大约 1-2 mL 的体积施用  $^{99m}\text{Tc}$ -EC20。可以在与叶酸相同的管道内, 施用  $^{99m}\text{Tc}$ -EC20。在大约 30 秒的时段内, 施用  $^{99m}\text{Tc}$ -EC20, 随后注射 5-10 mL 生理盐水。注射的放射性剂量是 20-25 mCi。

**[0339] 图像获取**

在  $^{99m}\text{Tc}$ -EC20 注射后大约 1-2 小时, 获取大腿中部至头的前后平面图像。在获取平面图像以后, 立即获取已知含有肿瘤 (通过患者的常规图像鉴别) 的解剖区域的 SPECT (或 SPECT/CT) 图像。如果以前没有鉴别出含有肿瘤的解剖区域, 则获取胸部 / 腹部和腹部 / 骨盆的 SPECT (或 SPECT/CT) 图像。

**[0340] 平面成像**

根据下述需要的参数, 获取大腿中部至头的前后平面图像: 1.) 成像区域: 大腿中部至头, 2.) 照相机: 双头或三头检测器大视野 (FOV) LEHR 平行孔型准直器, 3.) 矩阵: 最小 256 x 1024, 4.) 能量窗: 15%-20%, 5.) 能量 keV: 140, 和 6.) 扫描速度: 8 - 10 cm/分钟。

**[0341]** 在图 1、2、3、4 和 5 中显示了代表性的平面图像。通过在图像中添加的箭头, 指示肿瘤位置。

**[0342] SPECT 成像**

为了身体的最佳成像, 如果患者耐受的话, 将臂举过头顶。为了头和颈的最佳成像, 将臂置于体侧。在获取平面图像以后, 立即得到已知含有靶病灶 (通过患者的常规图像鉴别) 的区域的图像。

**[0343]** 如果所有靶病灶不在第一次图像获取的 FOV 中, 进行额外的成像, 以获得所有靶病灶的图像。使用下面列出的衰减校正参数, 可以使用 SPECT/CT 替代简单的 SPECT。使用迭代重建法 (推荐最少 6 次迭代), 在最高像素分辨率重建数据。将 SPECT 重建成 3 个正交平面: 横向断面、矢状面和冠状面。

**[0344]** 根据下述需要的参数, 获取已知含有靶病灶的区域的图像: 1.) 照相机: 双头或三头检测器大 FOV LEHR 平行孔型准直器, 2.) 总投射: 120 - 128, 3.) 矩阵: 128 x 128, 4.) 轨道类型: 圆形或椭圆形, 5.) 轨道: 180 度 (每个具有双检测器照相机的头) 或 120 度 (每个

具有三检测器照相机的头),6.) 每次停止的时间:每次停止 40 秒,7.) 停止总数:60-64 投影(每个具有双头照相机的头)或 40-43 投影(每个具有三头照相机的头),8.) 能量窗:15%-20%9.) 能量 keV:140。

#### [0345] SPECT/CT成像

按照核医学学会的 SPECT/CT 成像操作指南(Society of Nuclear Medicine Procedure Guideline for SPECT/CT Imaging),使用 SPECT/CT 装置,获取 CT 图像。

[0346] 仅仅为了衰减校正/解剖定位(AC/AL)的目的而获取 CT 图像,除非组合的 SPECT/CT 系统的 CT 组件能够提供这样的诊断图像:所述图像的图像质量和分辨率满足或超过可得到的专用诊断性 CT 装置的对应值。

[0347] 在正常的(起伏的)呼吸过程中,使用 256 x 256 最小矩阵、最大 7.5-mm 切片厚度、螺旋获取,在 140 kVp 和 80 mA,获取 CT 图像。在全 FOV,用滤过的背投影重建 AC/AL CT 窦腔造影摄片。滤过的背投影是 2 维的(在将螺旋 CT 数据的适当部分收集进轴向平面或倾斜平面中以后)或全维的。使用标准核进行衰减校正。可以将 CT 重新格式化成 3 个正交平面:横向断面、矢状面和冠状面。参见图 6 和 7。

#### [0348] 实施例 17

肿瘤与背景之比测量

##### EC20 3-编码的比例尺

对于平面图像和 SPECT/CT 或 SPECT 图像,核医学医师为每个靶病灶(例如,T1、T2、T3)编码摄入强度。如果病灶不是在 SPECT 区域中,将它编码为未成像。

[0349] 1. 无摄入:与背景相比,无摄入。

[0350] 2. 轻度摄入:与背景相比,摄入轻微增加。

[0351] 3. 显著摄入:与背景相比,摄入显著增加。

[0352] 对于表现出不与放射摄影异常相对应的摄入的任意区域(包括器官),核医学医师使用相同的 3-编码的比例尺,记录该位置,并编码摄入强度。

#### [0353] 肿瘤与背景之比

使用肿瘤与背景(T/B)之比,半定量地分析 SPECT 图像。对于每个靶病灶(例如,T1、T2、T3),在与放射摄影异常相对应的病灶内的最大活性区域上绘制目标区域(ROI)。所述区域用于提供肿瘤测量。对于每个靶病灶,绘制在正常外观的对侧区域中可得到的对应镜像位置的 ROI。如果所述区域是显示出摄入的区域,绘制邻近病灶的正常组织的 ROI。该区域用于提供背景测量。

[0354] 对于表现出不与放射摄影异常相对应的摄入的任意区域(包括器官),记录该位置,并在摄入区域内的最大活性区域上绘制 ROI。绘制在正常外观的对侧解剖学中可得到的对应镜像位置的 ROI。如果对侧部位是显示出摄入的区域,绘制邻近病灶的正常组织的 ROI。

[0355] 从源自每个 ROI 对的测量结果,计算每个病灶的肿瘤与正常组织背景(T/B)之比。

#### [0356] 实施例 18

患者选择和 EC145 治疗方案,肺肿瘤

##### 患者选择标准

患者具有晚期渐进性肺腺癌,以前已经接受含有 2 种或更多种细胞毒性剂的化疗方



案,具有东方合作肿瘤学集团 (Eastern Cooperative Oncology Group, ECOG) 等级为 0-2 的表现状态,离以前的治疗至少 4 周,并从有关的急性毒性恢复 (至基线)。患者也具有可测量疾病的放射摄影证据和超过一个也被鉴别为“EC20 阳性的”(即,肿瘤与背景之比  $\geq 1.2$ ) 的肿瘤区域。

#### [0357] 治疗方案

在每个 4- 周循环中的第 1-3 周,在星期一、星期二、星期三、星期四和星期五,静脉内地施用 EC145 (1 mg/ 注射) 作为快速浓注。在第 4 周不施用治疗 (施用给患者的总剂量是 15 mg/ 月)。在诱导期,重复该循环 2 次。该时期之后是维持期,所述维持期由在 4- 周循环的第 1 和 3 周的星期一、星期三和星期五作为快速浓注静脉内地施用的 2.5 mg/ 注射的注射组成。在第 2 和 4 周不施用治疗 (施用给患者的总剂量是 15 mg/ 月)。关于给药方案的图形描述,参见图 8。

#### [0358] 实施例 19

与  $^{99m}\text{Tc}$ -EC20 监测组合地用 EC145 治疗患者

在开始施用 EC145 之前,使用实施例 16 的方法,筛选患者。按照在实施例 18 中所述的方案,给患者施用 EC145。

#### [0359] 表 1

人群	完全合格的患者 (在开始 EC145 治疗的 28 天内,对所有患者进行筛选 CT)	所有治疗的患者 (包括在接受 EC145 之前具有 > 28 天(范围是 29-39 天)的筛选 CT 的 11 位患者)
终点	n = 29	n = 42
临床益处	31%(9)	25%(11)
在 8 周时的疾病控制率	41%(12)	35.7%(15)
RECIST 应答	1 PR	1 PR

表 1 表明,用 EC145 治疗的患者以大于 20% 的速率衍生出临床益处 (定义为接受 4 个或更多个治疗周期的能力),因而达到了研究的主要终点。

#### [0360] • RECIST, 完全应答 (CR): 所有靶病灶消失

• RECIST, 部分应答 (PR): 采用基线总和 LD 作为参照,靶病灶的最大尺寸 (LD) 的总和减小了至少 30%

• RECIST, 稳定的疾病 (SD): 采用从治疗开始以后的最小总和 LD 作为参照,病灶的缩小既不足以达到 PR,病灶的增加也不足以达到 PD

• RECIST, 渐进性疾病 (PD): 采用从治疗开始以后记录的最小总和 LD 作为参照,靶病灶的 LD 总和增加了至少 20%,或出现一个或多个新病灶

#### 表 2

人群	所有患者接受 EC145 作为第 3 线或第 4 线静脉内治疗	第 3 线/第 4 线患者的 100% 肿瘤表现出 EC20 摄入
终点	n = 20	n = 11
临床益处	40%(8)	45%(5)
在 8 周时的疾病控制率	50%(10)	63.6%(7)
RECIST 应答	1 PR	1 PR

主要终点标准需要  $\geq 20\%$  的应答率

接受 EC145 作为第 3 线或第 4 线治疗的患者的子集分析, 指示 40% 的临床有效率。

[0361] 在所有肿瘤具有 EC20 摄入 (指示 FR 表达) 的患者中, 临床有效率增加至 45%。

[0362] 表 3

人群	第 3 线/第 4 线患者的 100% 肿瘤表现出 EC20 摄入	具有异源 EC20 摄入 (即, 至少一个 EC20-阴性的肿瘤块) 的第 3 线/第 4 线患者
终点	n = 11	n = 6
临床益处	45%(5)	33%(2)
在 8 周时的疾病控制率	63.6%(7)	33%(2)
RECIST 应答	1 PR	

主要终点 标准需要  $\geq 20\%$  的应答率

实施例 20

使用 EC145 和 DOXIL®(PDL) 的治疗方案, 卵巢癌

治疗方案 (EC145 和 PLD)

在受试者接受 EC145 和聚乙二醇化的脂质体多柔比星 (PLD) 的当天, 在施用 PLD 之前至少 45 分钟, 施用 EC145。在施用 EC145 以后, 冲洗静脉内插孔, 在已经过去至少 45 分钟时, 通过用于施用 EC145 的相同静脉内插孔, 施用 PLD。

[0363] EC145

通过静脉内管线 (周边的或内在的导管是可接受的), 在大约 10-20 秒内施用 EC145, 作为快速浓注。在给药过程中, EC145 没有与任意其它药物溶液混合, 并在 EC145 施用之前和施用之后立即用大约 10 cc 的无菌生理盐水溶液 (或按照建立的护理标准的冲洗量) 冲洗静脉内插孔。在每个 4-周循环的第 1 和 3 周的星期一、星期三和星期五, 施用 EC145 (2.5 mg)。在第 2 和 4 周不施用治疗。在第 1 个循环以后的每个后续循环的方案与第一个循环的方案相同。

[0364] PLD 剂量的计算和递送

以  $50 \text{ mg/m}^2$  的剂量, 静脉内地施用 PLD。对于测量体重大于她们的理想体重的受试者, 基于理想体重 (IBW) 计算 PLD 的剂量。在测定按厘米计算的受试者身高以后, 如下计算 IBW:

$\text{IBW} = 45.5 \text{ kg} + 0.9 \text{ kg/ 超过 } 152 \text{ cm 的每厘米}$

然后如下计算按平方米计算的体表面积 (BSA):

$\text{BSA (m}^2\text{)} = ([\text{身高 (cm)} \times \text{IBW (kg)}] / 3600)^{1/2}$ , 或者,

$BSA (m^2) = ([\text{身高 (cm)} \times \text{IBW (kg)}] / 3600)$  的平方根

以 1 mg/min 的速率施用 PLD, 以使输注反应的风险最小化。如果没有观察到输注有关的不良反应, 则增加输注速率, 以在 1 小时内结束给药。心脏毒性的风险随着多柔比星的累积剂量而增加。常规多柔比星的推荐终生最大剂量如下:

成年人 < 550 mg/m<sup>2</sup>

> 70 岁的成年人, 考虑 < 300 mg/m<sup>2</sup> 的累积剂量

(Cancer Chemotherapy Manual, Walters Kluwer Health©University of Utah 出版, 2006 年 8 月)

在每 28 天的第 1 天 (对于推荐的最小 4 个疗程), 受试者接受一定剂量的 PLD 一次, 直到达到最大可允许的累积剂量 550 mg/m<sup>2</sup>, 只要受试者没有表现出疾病进展, 没有表现出心脏毒性的证据, 并继续耐受治疗。

[0365] 在该研究中使用的聚乙二醇化的脂质体多柔比星是一种混合物, 所述混合物包含有多柔比星或其盐的脂质体, 其中所述脂质体包含聚乙二醇修饰的表面。在示例性的实施例中, 所述聚乙二醇化的脂质体多柔比星是 DOXIL®。DOXIL® 是包囊在 STEALTH® 脂质体载体中的盐酸多柔比星。STEALTH® 脂质体载体由下述组分组成: N-(羰基-甲氧基聚乙二醇 2000)-1, 2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺钠盐 (MPEG-DSPE), 3.19 mg/mL; 完全氢化的大豆磷脂酰胆碱 (HSPC), 9.58 mg/mL; 和胆固醇, 3.19 mg/mL。每 mL 还含有: 硫酸铵, 大约 2 mg; 组氨酸, 作为缓冲剂; 盐酸和 / 或氢氧化钠, 用于 pH 控制; 和蔗糖, 用于维持等张性。大于 90% 的药物被包囊在 STEALTH® 脂质体中。

[0366] 实施例 21

在 NSCLC 和卵巢癌可评价病灶中的肿瘤应答

使用在实施例 16 中描述的成像方法, 在实施例 18 或实施例 19 中描述的治疗过程中, 对肿瘤成像。在图 9 中显示了每个成像的肿瘤的大小变化百分比。数据表明, 与叶酸受体阴性的肿瘤 (病灶) 所表现出的 33% 的大小平均增加相比, 叶酸受体阳性的肿瘤 (基于本文所述的 <sup>99m</sup>Tc-E20 成像方法的应用来选择) 具有仅 7% 的大小平均增加。

[0367] 尽管上面已经描述和 / 或例证了本发明的某些实施方案, 预见到, 它们的大量变化和修改是可能的。因此, 本发明不限于本文描述和 / 或例证的具体实施方案。

[0368] 实施例 22

用于注射的 EC145 (EC145 药物产品), 规范和代表性的结果。

[0369] 贮存 / 处理指导: 贮存在 -20°C ± 5°C, 避光

测试	规范	结果
外观	黄色溶液	黄色溶液
鉴别	在 $959.4 \pm 1.0$ , $M+2H^+$	959.5
纯度	$\geq 90.0\%$	95.6%
最大单个氧化产物	$< 7\%$	0.4%
最大单个相关物	$< 4\%$	1.0%
EC145 含量	90-110%标签含量	105%
总相关物	$\leq 10\%$	4.4%
pH	6.7 - 7.8	7.6
渗透压	TBM <sup>1</sup>	282 mOsmol
无菌度	通过	通过
内毒素	NMT 119 EU/管形瓶	$< 11$ EU/管形瓶
不溶性微粒	$\geq 10$ 微米 NMT 6000/管形瓶 $\geq 25$ 微米 NMT 600/管形瓶	108/管形瓶 5/管形瓶
残余溶剂	$\leq 1\%$	$< 1\%$
在容器中的体积	$\geq 1.8$ mL/管形瓶	$> 2.0$ mL/管形瓶

<sup>1</sup>要监测 TBM。

#### [0370] 实施例 23

将用于静脉内 (IV) 给药的 EC145 药物产品 (DP) 提供为 2.0 mL 水性无菌液体制剂 pH 7.4, 其在一次性使用的清洁玻璃管形瓶中, 所述管形瓶具有 Flurotech™ - 包被的橡皮塞, 并在氩下冷冻保存。每个管形瓶含有 1.4 mg/mL EC145。在下表中显示了药物产品的定量组合物。使用单个管形瓶来提供 2.5 mg 推注剂量的 EC145。

#### [0371] EC145 药物产品 组分

	功能	等级	每个管形瓶的量(mg)
EC145	活性成分	自制	2.8
一水合磷酸二氢钠	pH 控制 张度	美国药典	1.1
二水合磷酸氢二钠	pH 控制 张度	美国药典	2.14
氯化钠	张度	美国药典	16.12
氯化钾	张度	美国药典	0.4
注射用水	溶剂	注射用水	定容至 2.0 mL

#### [0372] 实施例 24

用于治疗 / 预防便秘的代表性的肠方案

便秘 / 肠梗阻被认为是在 EC145 的 I 期试验中的潜在严重不利事件, 特别是在接受并行的阿片样镇痛剂的那些受试者中。

[0373] 对于接受 EC145 疗法的受试者, 一个提议的渐进性肠方案 (从 Carney MT, Meier DE. Palliative care and end-of-life issues. Anaesthesiol Clin North America 2000; 18:183 修改出) 应当与接受阿片样物质疗法的受试者的方案平行, 其中临床医师可以前进至更高的步骤, 直到发现有效的方案:

步骤 1: 多库酯(100 mg 每天 2 次 (b. i. d.)) 和番泻叶(1 片, 每天 1 次 (q. d.)) 或每天 2 次)。

[0374] 步骤 2: 多库酯(100 mg, 每天 2 次)、番泻叶(2 片, 每天 2 次)和比沙可啶直肠栓剂(早餐后 1-2 个)。

[0375] 步骤 3: 多库酯(100 mg, 每天 2 次)、番泻叶(3 片, 每天 2 次)和比沙可啶直肠栓剂(早餐后 3-4 个)。

[0376] 步骤 4: 多库酯(100 mg, 每天 2 次)、番泻叶(4 片, 每天 2 次)、乳果糖或山梨醇(15 mL, 每天 2 次) 和比沙可啶直肠栓剂(早餐后 3-4 个)。

[0377] 步骤 5: 多库酯(100 mg, 每天 2 次)、番泻叶(4 片, 每天 2 次)、乳果糖或山梨醇(30 mL, 每天 2 次) 和比沙可啶直肠栓剂(早餐后 3-4 个)。

[0378] 步骤 6: 多库酯(100 mg, 每天 2 次)、番泻叶(4 片, 每天 2 次)、乳果糖或山梨醇(30 mL, 每天 2 次) 和比沙可啶直肠栓剂(早餐后 3-4 个)。

[0379] 实施例 25

前言: 在具有铂抗性的卵巢癌的受试者中, 与单独的 PLD 相比, 包含组合的 EC145 和聚乙二醇化的脂质体多柔比星 (PLD) 的随机化的 II 期试验 (EC-FV-04)。

[0380] 背景: EC145 (叶酸和去乙酰长春碱酰胺的一种缀合物) 以高亲和力结合在 > 90% 的上皮卵巢癌上发现的叶酸盐受体 (FR)。该实施例报告了, 在具有铂抗性的卵巢癌的女性中, 与单独的 PLD 相比, EC145 + PLD 的国际随机化的 2 期研究的中间数据。一个独立的数据安全性监测委员会 (DSMB) 已经对 PFS 和安全性进行了预定的中间分析, 结果报告在本文中。

[0381] 方法: 将具有 0-2 的 ECOG 表现状态 (PS) 和 < 2 先前全身细胞毒性方案的 ≥ 18 岁的女性随机化, 以接受 EC145 (2.5 mg 静脉内, 在第 1 和 3 周) + PLD (50 mg/m<sup>2</sup> IBW 静脉内, 每 28 天 1 次) 或单独的 PLD (50 mg/m<sup>2</sup> IBW 静脉内, 每 28 天 1 次), 直到进展或死亡。

[0382] 结果: 在计划的共 95 个进展或死亡的研究中的第 46 个事件以后, 进行中间分析。在两组 (arms) 之间平衡在筛选时的人口统计特征, 诸如年龄、癌类型、减小体积 (debulking) 以后的残余肿瘤、先前治疗、CA-125 和从诊断以后的时间。RECIST 意味着组合组的总肿瘤长度更长 (122.7mm 相对于 81.3mm)。关于总不利事件、严重不利事件或报告至少一个治疗引起的药物相关的严重不利事件 (导致中断) 的受试者的数目, 在研究组之间没有统计差异。下表显示了 PFS 的中间分析的结果, 卡普兰 - 迈耶曲线可以参见图 11。

患者 人群	EC145 + PLD PFS (周)	PLD PFS (周)	危害比	P-值
EC-FV-04 研究	24.0	11.7	0.497	0.014

[0383] 在中间时, 组合组也存在有益于总存活时间的趋势, HR = 0.425 (P- 值为 0.064)。

[0384] 结论: 结果表明, 与接受单独的 PLD 的那些相比, 接受 EC145 和 PLD 的具有铂抗性的卵巢癌的女性的中间 PFS 增加超过 1 倍。这些中间数据提示, 在具有铂抗性的卵巢癌的女性中, EC145 和 PLD 是与标准疗法相比表现出无进展存活的统计上显著的第一组合。

[0385] 图 12 显示了下述受试者在具有铂抗性的卵巢癌的女性的进行的 II 期试验中在中间分析时的无进展存活时间的卡普兰 - 迈耶曲线: 所述受试者在具有核成像能力的场所登

记,在研究治疗之前用 EC20 扫描她们,并在研究治疗(与 PLD 组合的 EC145 相对于单独的 PLD)之前被评估为 EC20 阳性的(EC20++ 状态)。

[0386] 在下表中显示了在中间时根据 RECIST (1.0 版)的对治疗的应答。对于每个组,扫描频率和评估时机是相同的(在 24 周中每 6 周,然后为了研究参与的平衡,每 8 周)。

RECIST <sub>v1.0</sub> 证实的 对治疗的应答	EC145/PLD n=54	PLD n=17
完全应答 (CR)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
部分应答 (PR)	9 (16.7%)	4 (14.8%)
稳定的疾病 (SD)	33 (61.1%)	12 (44.4%)
渐进性疾病 (PD)	12 (22.2%)	11 (40.7%)
总疾病控制 (SD+PR+CR)	42 (77.8%)	16 (59.3%)

[0387] 图 14 显示了与接受单独的 PLD 的那些相比,用与 PLD 组合的 EC145 治疗的患者的总存活时间(OS)的卡普兰-迈耶图。在预定的中间分析时,中间总存活时间倾向于统计显著性,危害比为 0.425 (细节见图)。

[0388] 在 <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00722592?term=platinum+resistant+ovarian+cancer&rank=2> (它通过引用并入本文),总结了该试验的方案。

[0389] 实施例 26

图 13 显示了在研究 EC-FV-02 中总存活时间的卡普兰-迈耶曲线,所述研究 EC-FV-02 是在具有晚期卵巢癌和子宫内膜癌的女性中的试验,在研究治疗之前用 EC20 扫描她们,并在研究治疗之前被评估为 EC20 阳性的(EC20++ 状态,与被评估为 EC20+ 状态或 EC20- 状态的那些相比)。该曲线检查了在非常难治的卵巢癌患者中选择从单一药剂 EC145 受益的患者的实用性。

[0390] 实施例 27

EC20 患者扫描规程。在结束筛查操作和证实合格以后,所有受试者接受一次静脉内注射 0.5 mg 叶酸,随后在 1-3 分钟内,注射 1-2 mL 用 20-25 mCi 的镓-99m 标记的 0.1 mg EC20。然后在注射 EC20 以后 1-2 小时,对患者进行 SPECT 成像(大腿中部至头,前面和后面图像)。辐射学家根据 RECIST (v1.0) 标准来选择靶病灶。随后,核医学医师视觉地评估每个靶病灶的 EC20 摄入,并将所述摄入分类为“阳性的”(显著摄入/轻度摄入)或“阴性的”(无摄入)。

[0391] 实施例 28

EC20 病灶评分规程。其最大尺寸(LD)小于 1.5 cm 的病灶被认为是“不可评价的”,除非核医学解读者将它们鉴别为具有明确的 EC20 摄入,在该情况下,它们被表征为“阳性的”。由于某些器官(即肝、脾、膀胱和肾)具有固有的高 EC20 摄入,位于这些器官中的靶病灶被认为是“不可评价的”。

[0392] 将所有可评价病灶分类成 2 个互相排斥的组:1) EC20+ (EC20 摄入)和 2) EC20- (阴性) (无 EC20 摄入)。使用方差分析(ANOVA),对比 2 个组之间的病灶大小的变化。对于每个病灶,测定治疗应答。将具有至少 20% 的大小减小的病灶分类为应答者(mPR),。将具有至少 20% 的大小增加的病灶分类为渐进性疾病(PD)。将不满足 mPR 或 PD 标准的病灶分类为稳定的疾病(SD)。使用 Fisher 氏精确检验,在 EC20+ 和 EC20- (阴性) 组之间对

比 mPR、SD 和 PD 病灶的百分比。使用 Pearson 相关系数,测量肿瘤大小的数量百分比变化。

#### [0393] 实施例 29

EC20 患者评分规程。通过将 EC20+ 病灶的总数除以病灶 (可评价的和不可评价的) 的总数,计算受试者评分。将患者分类成 3 个互相排斥的组:

组 1: EC20++ (100%EC20- 阳性的靶病灶)

组 2: EC20+ (1-99%EC20- 阳性的靶病灶)

组 3: EC20-( 阴性) (0% 或没有 EC20 阳性的靶病灶)。

[0394] 例如,具有 1 个 EC20+ 病灶和 2 个 EC20-( 阴性) 病灶 (共 3 个靶病灶) 的受试者的“受试者评分”是 33%(3 个病灶中的 1 个是阳性的),将该受试者放入 EC20+ 组中。所有靶病灶为 EC20 阳性的受试者被分类为 EC20++ (3 个病灶中的 3 个是阳性的)。

[0395] 使用 RECIST v1.0 (Therasse, 2000),测定每位受试者的最好总应答。为 3 个人群中的每一个,计算 RECIST 总应答率 (ORR) 和疾病控制率 (CR/PR/SD)。对于这些分析,在评价之前脱离研究的受试者视作无应答者。使用 Kaplan-Meier 技术和 Cox 比例危害模型 (Kaplan, 1958; Mantel, 1966),分析总存活时间。由于样品大小的考虑,为存活分析合并 EC20+ 和 EC20-( 阴性)。

[0396] 用于 ORR 和 DCR 的样品集合包括所有可评价的受试者 (意图治疗) 以及在小于或等于 3 个在先治疗系中失败的受试者子集。由于样品大小的限制,仅包括意图治疗 (ITT) 用于存活分析。

#### [0397] 实施例 30

患者人口统计数据。评价了 45 位卵巢癌受试者。在下表中显示了关键的人口统计学和疾病特征。在进入 EC-FV-02 研究之前,用中间数目的 4 个在先化疗方案 (范围是 1-14 个方案),高度预处理全体受试者。80% 的受试者具有  $LD_{sum} > 5$  cm 的肿瘤负荷。

[0398] 用 EC20 治疗的患者的人口统计数据:EC-FV-02

特征	N (%)
受试者的数目	45
中间年龄 (岁)	62
ECOG 表现状态	
0	17 (37.8%)
1	24 (53.3%)
2	4 (8.9%)
癌的类型, n (%)	
子宫内膜	4 (8.9%)
卵巢	34 (75.6%)
腹膜	7 (15.6%)
疾病负荷	
> 5cm	36 (80%)
≤ 5cm	9 (20%)

#### 实施例 31

##### 病灶评估

在该回顾分析中包括了 45 位方案合格的受试者,她们具有共 216 个 RECIST- 定义的靶

肿瘤（即“病灶”）（下表）。所述病灶中的 145 个（145/216；67%）被认为是 EC20 “可评价的”。在它们中，111（77%）具有 EC20 “阳性的”摄入。在 71 个认为“不可评价的”病灶中，45 个病灶存在于具有高背景摄入的器官中；15 个病灶不具有足够的 SPECT 数据用于解释；11 个大小小于 1.5 cm 的病灶被编码为“无”摄入。

[0399] 如下表所示，145 个病灶被分类为 EC20 的明确的“阳性的”或“阴性的”摄入。这些病灶被包括在病灶分析中。111 个病灶是 EC20+，且 34 个病灶是 EC20-（阴性）。

[0400] 可评价的和不可评价病灶

病灶分组	N (%)
<b>RECIST-定义的病灶的总数</b>	<b>216 (100%)</b>
不可评价病灶	71 (33%)
无 SPECT 数据	15 (21%)
大小 < 1.5 cm 的阴性病灶	11 (15%)
在具有高背景的器官中发现的病灶	45 (63%)
肝	32/45
脾	9/45
肾	4/45
可评价病灶	145 (67%)
阳性的 (EC20+)	111 (77%)
阴性的 (EC20-(阴性))	34 (23%)

87% 的受试者具有在至少 1 个靶病灶中视觉地观察到的 EC20 摄入。EC20-（阴性）病灶的大小稍微大于 EC20+ 病灶（分别是 2.8 cm 和 2.4 cm [p = 0.01]）。

[0401] 实施例 32

#### EC20 病灶评分分析

如下表所示，与 EC20-（阴性）人群中的 27%SD 率相比，59% (n=65) 的 EC20+ 病灶表现出稳定的疾病 (SD) 或修改的部分应答 (PR)。这些发现提示，EC20 摄入会区分开在暴露于 EC145 以后表现出修改的 PR 或 SD (p=.0022) 的病灶和在最佳时表现出 SD 的病灶。在修改的 PR 组中的所有病灶都是 EC20+。

[0402] 通过 EC20 摄入区分的病灶对 EC145 治疗的应答

病灶大小的变化	EC20+ n (%)	EC20- n (%)
<b>可评价病灶的数目</b>	<b>111 (100%)</b>	<b>34 (100%)</b>
<b>mPR</b>	<b>11 (10%)</b>	<b>0 (0%)</b>
<b>SD</b>	<b>54 (49%)</b>	<b>9 (27%)</b>
<b>PD</b>	<b>46 (41%)</b>	<b>25 (73%)</b>
<b>mPR + SD</b>	<b>65 (59%)</b>	<b>9 (27%)</b>

实施例 33

#### EC20 患者评分分析

不论 EC20 状态，所有可评价的受试者的 DCR 是 42.2%（下表）。DCR 随着 EC20 阳性而增加。EC20++ 受试者具有最高的 DCR，其次是 EC20+ 和 EC20-（阴性）受试者：分别是 57%、



36% 和 33%。在所有受试者中的 ORR 是 5%。与 DCR 分析相一致, EC20++ 子集中的 ORR 最高为 14%, 其它 2 组为 0%。在已经在  $\leq 3$  个在先治疗中失败的治疗程度更低的受试者子集中, EC20++ 组的 DCR 是 86%, 与此相比, 在 EC20+ 和 EC20-( 阴性 ) 组中分别是 50% 和 0%。

[0403] EC20 阳性的百分比

	所有合格的患者 (n=45)	所有合格的患者 (ITT)			在 $\leq 3$ 个在先治疗中失败		
		EC20++ 100% 阳性的 (n=14)	EC20+ 1-99%阳 性的 (n=24)	EC20-(阴 性) 0%阳性的 (n=7)	EC20++ 100%阳 性的 (n=7)	EC20+ 1-99%阳 性的 (n=8)	EC20-(阴 性) 0% 阳性的 (n=2)
CR/PR	4%(2)	7%(1)	4%(1)	0%(0)	14%(1)	13%(1)	0%(0)
SD	38%(16)	50%(7)	33%(8)	29%(2)	71%(5)	37%(3)	0%(0)
PD	58%(26)	43%(6)	63%(15)	71%(5)	14%(1)	50%(4)	100%(2)
DCR	42%(19)	57%(8)	36%(9)	33%(2)	86%(6)	50%(4)	0%(0)

来自用 EC145 治疗的受试者的该探查研究的结果, 证实了在具有 100% 阳性病灶的组中更大存活率的趋势。这些受试者中的中间总存活时间是 63.4 周, 与此相比, 在具有小于 100% 阳性的肿瘤的受试者中是 23.1 周 (危害比 = 0.46,  $p = 0.071$ )。

[0404] 实施例 34

EC20: 化学生产和控制  
生产

使用如上面和在下面的简图中所述的标准的基于 Fmoc 的固相肽合成化学法, 合成 EC20。从树脂结合的半胱氨酸开始, 去除保护基以后, 使用标准试剂偶联氨基酸残基。在最后的偶联步骤和脱保护以后, 从树脂切下肽。使粗产物沉淀, 并通过过滤进行分离。粗 EC20 的纯度是约 90%。

[0405] 通过制备型柱色谱法, 纯化粗 EC20。使 EC20 沉淀, 并通过过滤进行分离。最终的药用物质的纯度是  $\geq 97\%$ 。

[0406] 工艺流程图解

第 1 个偶联	<p style="text-align: center;">H-Cys(Trt)-2-氯三苯甲基树脂</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">添加 Fmoc-Asp-(OtBu)-OH 和试剂, 以偶联</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">用 Kaiser 检验证实偶联</p>
第 2、3 和 4 个偶联 (3 个周期)	<p style="text-align: center;">用碱脱保护</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">添加下一个氨基酸残基和试剂, 以偶联</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">用 Kaiser 检验证实偶联</p> <p style="text-align: center;">用下一个残基重复</p>
脱保护 从树脂切下肽	<p style="text-align: center;">脱保护和切割</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">过滤, 洗涤, 并干燥</p>
EC20 的纯化	<p style="text-align: center;">纯化粗固体</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">洗脱 EC20, 合并级分</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">沉淀, 过滤, 并干燥</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p style="text-align: center;">在氮下在 -20°C 保存</p>

### 表征

通过  $^1\text{H}$  和  $^{13}\text{C}$  NMR 分析, 通过电喷雾 - 质谱法、氨基酸分析和肽含量, 已经表征了 EC20 药用物质。所有方法证实了上述结构。

### [0407] 工艺相关的杂质

通过色谱法纯化 EC20, 以确保在 EC20 的制备中使用的原料或试剂在 EC20 药用物质中不存在。通过 GC 分析分离的药用物质, 评估残余溶剂水平。

### [0408] 在下表中显示了 EC20 药用物质的规范。

属性	测试方法	限度
外观	视觉检查	黄色/灰白色粉末
鉴别	ESI-MS	$M+H^+$ 746.2± 0.5
纯度	RP-HPLC	≥ 95.0%
		A ≤ 1.0%
		F ≤ 1.0%
单个指定的杂质	RP-HPLC	H ≤ 1.0%
		L ≤ 1.0%
		PI ≤ 1.5%
		T ≤ 1.0%
单个未指定的杂质	RP-HPLC	≤ 1.0%
总杂质	RP-HPLC	≤ 5.0%
肽含量	%氮	≥ 88.0%
水分	Karl Fischer	≤ 10.0%
内毒素	美国药典 <85>	< 2.0 EU/mg
微生物计数	美国药典 <61>	< 10 CFU/100 mg
甲醇	气相色谱法	≤ 0.5 µg MeOH/mg API
乙腈	GC	≤ 1.0 µg ACN/ mg API
胂	HPLC	< 1.5 微克/mg API

[0409] 在具有丁基橡皮塞的棕色玻璃瓶中,在 -20℃ 保存 EC20 药用物质。稳定性数据证实,药用物质在这些条件下稳定超过 24 个月。

[0410] 实施例 35

研究的药用药物产品的描述和组成

药用产品是用于制备  $^{99m}\text{Tc}$ -EC20 的试剂盒。产品是低压冻干的、无菌的、浅黄色固体。

[0411] 每瓶 EC20 药物产品的量

成分	每瓶的量 (mg)
EC20 药用物质	0.100
二水合 $\alpha$ -D-葡庚糖酸钠(葡庚糖酸盐)	80
二水合氯化亚锡(II) ( $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	0.080

根据基于  $^{99m}\text{Tc}$  的诊断剂的标准实践,在临床试验场所制备最终剂型,即注射用  $^{99m}\text{Tc}$ -EC20。

[0412] EC20 药物产品是一次性使用的管形瓶,其含有通过添加无菌过锝酸钠制备有效的成像剂所必需的所有组分。以下表所示的量,用氯化亚锡(II)和  $\alpha$ -D-葡庚糖酸钠配制药用物质。该制剂是使用相对稳定的锝作为放射性来源的药剂的代表。EC20 药物产品会螯合锝,且当新鲜制备的相对稳定的锝的水溶液被用于重构 EC20 时,锝会被螯合,并形成成像剂。

[0413] EC20 DP 组分

组分	质量或活性	Mol	重构以后的浓度	摩尔比
<b>EC20</b>	<b>100 µg</b>	<b><math>1.3 \times 10^{-7}</math></b>	<b><math>1.3 \times 10^{-4}</math> M</b>	<b>255</b>
<b>α-D-葡庚糖酸钠</b>	<b>80 mg</b>	<b><math>2.8 \times 10^{-4}</math></b>	<b>0.28 M</b>	<b>550,000</b>
<b>氯化亚锡(II)</b>	<b>80 µg</b>	<b><math>3.5 \times 10^{-7}</math></b>	<b><math>3.5 \times 10^{-4}</math> M</b>	<b>686</b>
<b><math>^{99m}\text{Tc}/^{99}\text{Tc}(1:4)</math></b>	<b>30 mCi</b>	<b><math>5.1 \times 10^{-10}</math></b>	<b><math>5.1 \times 10^{-7}</math> M</b>	<b>1</b>

#### 批次配方

对于典型的 2000 瓶批次的 EC20 药物产品, 下表提供了批次配方:

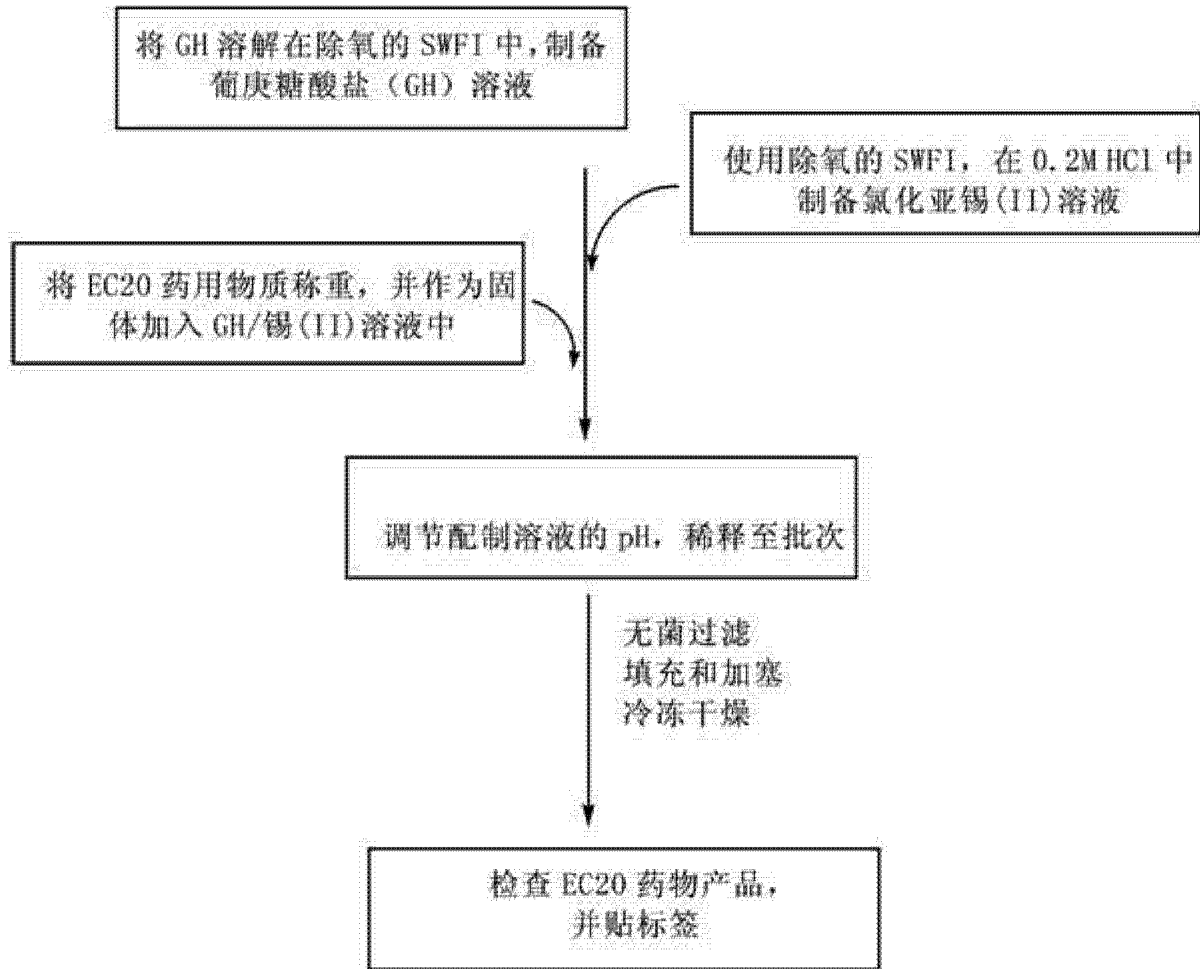
#### EC20 批次配方

成分	量
<b>EC20 药用物质</b>	<b>0.20 g</b>
<b>二水合 α-D-葡庚糖酸钠(葡庚糖酸盐)</b>	<b>160 g</b>
<b>二水合氯化亚锡(II) (<math>\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}</math>)</b>	<b>0.16 g</b>
<b>无菌注射用水 (SWFI)</b>	<b>5L</b>
<b>氮 (惰性气氛)</b>	<b>根据需要</b>
<b>盐酸</b>	<b>4.3 mL</b>
<b>氢氧化钠</b>	<b>10 g</b>

#### EC20 DP 填充工艺

在氮或氩气氛下进行生产工艺。

[0414] EC20 药物产品生产工艺和控制



**葡庚糖酸盐溶液的制备:**将空配制罐与合适的搅拌棒一起称重。将除氧的 SWFI 加入预称重的配制罐中。使用玻璃漏斗,将葡庚糖酸盐加入配制罐中。用除氧的 SWFI 冲洗称量容器和漏斗,并将冲洗液加入制剂溶液中。

[0415]  **$\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 溶液的制备:**将  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  称量进适当大小的烧瓶中。将  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  溶解在除氧的 0.2M HCl 中。

[0416] **EC20溶液的制备:**在连续搅拌下,将  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  溶液缓慢地转移至制备的葡庚糖酸盐溶液。将适当量的 EC20 (从已知的肽含量计算)转移至葡庚糖酸盐/ $\text{SnCl}_2$ 溶液。缓慢地加入 1.0M NaOH 和/或 0.2M HCl,直到 pH 达到  $6.8 \pm 0.2$ 。用除氧的 SWFI,将溶液稀释至希望的靶重量  $\pm 0.25\%$ ,并搅拌最小 5 分钟。使用无菌技术,从配制罐抽出预过滤的生物负荷的样品,并放入具有无菌帽封闭的无菌容器中。安置过滤装置(2个串联的无菌过滤器)和接受罐,使用蠕动泵,通过 0.22 微米无菌滤器,将 EC20 制剂溶液过滤进适当的接受罐中。进行过滤后滤器完整性检验。如果记录的压力失败,重复检验一次。如果再次失败,可以安装新的滤器,并可以重复该过程。

[0417] **填充和加塞:**在 100 级填充区中,无菌地进行填充和加塞。将接触产品或进入产品中的材料的所有容器、罐、混合装置和器具适当地清洁、灭菌或去热原。基于计算的密度,通过重量分析进行装配和填充检查。填充管形瓶,并加塞。在从工作站取出管形瓶之前,将塞子置于冷冻干燥位置(半固定)。将冷冻干燥器托盘装载进室中的架子上,然后冷冻至  $-45^\circ\text{C} \pm 3^\circ\text{C}$ 。在产品被冷冻以后,真空泵将该室抽空。在保持  $30^\circ\text{C} - 35^\circ\text{C}$  的架子

温度  $\geq 10$  小时以后,通过关闭真空泵阀门,手工地终止干燥循环。在用过滤的氮将室换气至 7 - 10 mmHg 以后,启动架子加塞机构。当所有管形瓶都被加塞时,用过滤的氮将室回充至大气压,并从室取出产物托盘,并盖上铝封条。在加盖以后,给管形瓶贴上标签,并在  $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$  保存。

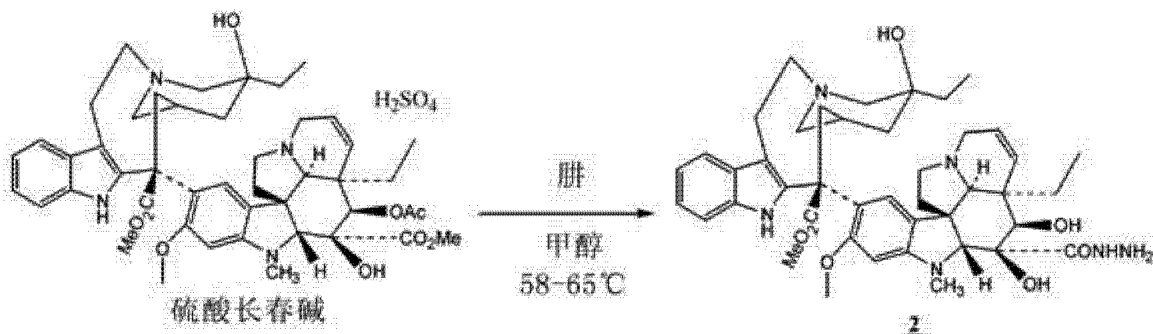
[0418] EC20 药物产品赋形剂规范

成分	规范	限度	结果
无菌注射用水	美国药典	不适用	不适用
二水合氯化亚锡(II) ( $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )	美国药典	不适用	不适用
二水合 $\alpha$ -D-葡庚糖酸钠 (葡庚糖酸盐)	测定, HPLC 溶液 pH LOD, TGA 生物负荷 <sup>a</sup> 内毒素 <sup>a</sup>	98-102% 10%水溶液是澄清且无色的 6.5 - 9.0 $\leq 12.8\%$ $< 200 \text{ CFU/克}$ $< 1100 \text{ EU/克}$	100% 通过 8.7 8.0% $< 10 \text{ CFU/克}$ $< 1.2 \text{ EU/克}$

<sup>a</sup>在使用葡庚糖酸盐作为赋形剂之前,测定生物负荷和内毒素。从供应商的分析证明,得到所有其它测定结果。

[0419] 实施例 36

硫酸长春碱向去乙酰长春碱酰胺的典型转化



材料

硫酸长春碱:美国药典;FW = 909.05 g/mol;甲醇:无水;肼:无水;FW = 32 g/mol;去离子水;乙酸乙酯:LC/GC级;甲苯:LC/GC级;磷酸二氢钠: $\geq 99.0\%$ ;FW = 120 g/mol;磷酸氢二钠: $\geq 99.0\%$ ;FW = 142 g/mol;氯化钠:试剂级;FW = 58.4 g/mol;硫酸钠:无水;5-降冰片烯-2-羧酸。

[0420] 规程

反应、萃取操作和分离在氮或氩气氛下进行。使用压滤器去除硫酸钠和捕获产物。用氮或氩在用于猝灭和洗涤的氯化钠溶液中鼓泡,直到溶解氧水平不超过 0.9 ppm。

[0421] 将硫酸长春碱和无水甲醇装入氩净化的反应器中。将 5-降冰片烯-2-羧酸和无水肼加入反应器中。搅拌混合物,在固体溶解以后,加热混合物至约  $60^{\circ}\text{C}$ 。通过 HPLC 分析,当反应结束时,将它冷却,猝灭,并萃取进乙酸乙酯中。干燥以后,从乙酸乙酯和甲苯中结晶产物。在真空下在室温干燥固体过夜。

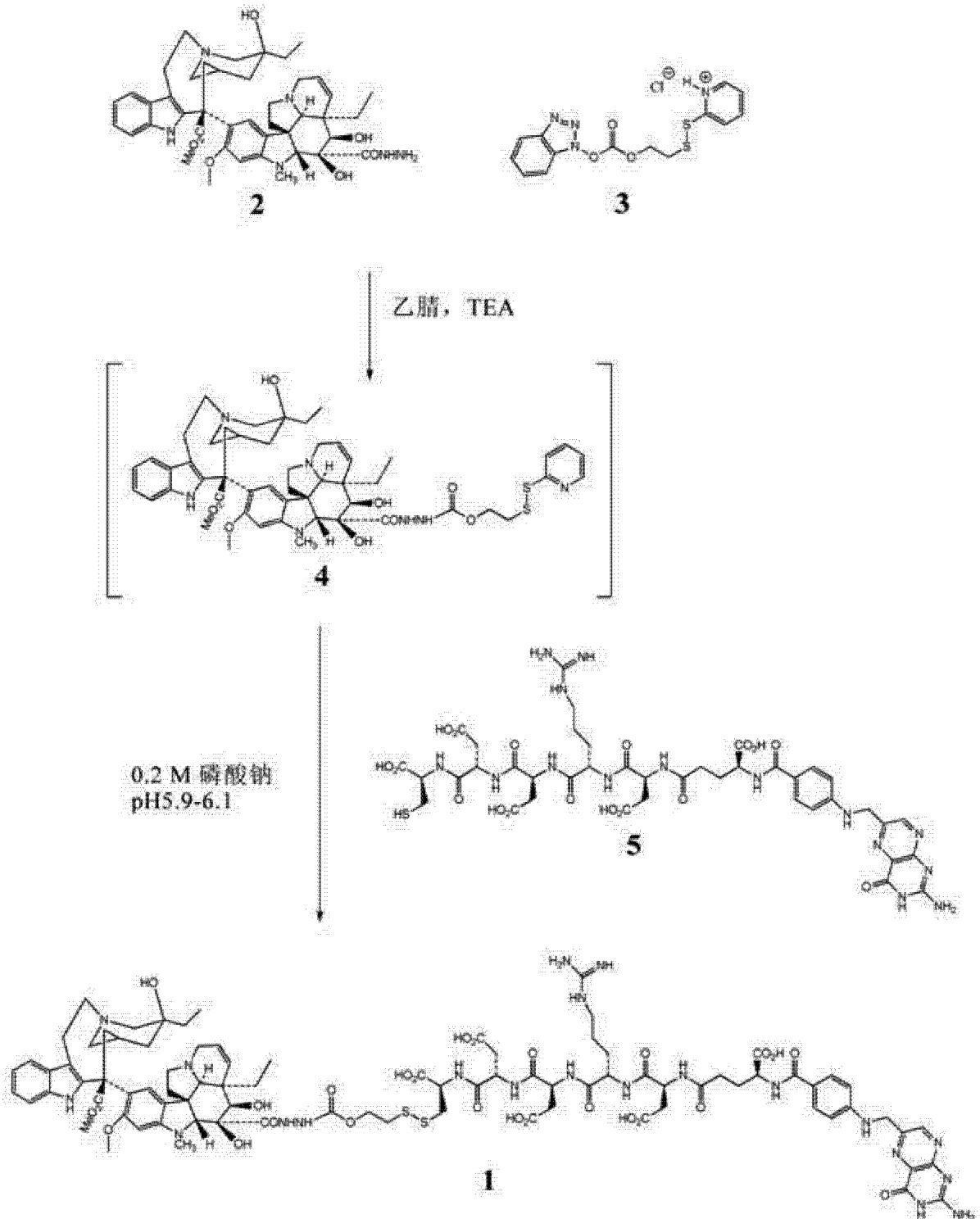
[0422] 缓冲的 NaCl 含有:10.0 g NaCl, 7.10 - 7.30 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 4.40 - 4.60 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$

和 90 mL 水。用氩或氮在溶液中鼓泡（溶解氧含量 < 0.9 ppm）。

[0423] 典型的分离产率是理论最高限度的 50 - 60%。

[0424] 实施例 36

EC145 工艺的步骤 2 和 3



步骤 2 和步骤 3 工艺

材料

去乙酰长春碱酰胺: FW=768.9 g/mol ; 20.5 g, 26.7 mmol ; 混合的碳酸盐 (3) : FW=384.9 g/mol ; 10.7 g, 27.8 mmol ; 乙腈 : 适量 ; 三乙胺 : FW=101.2 g/mol ; 2.67 g, 26.4 mmol ;

$\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ :47.84 g;EC119:29.9 g/28.6 mmol;0.5 N HCl:适量;WFI:适量。

#### [0425] 规程

应当指出,在该工艺中使用的所有水都是 WFI。

[0426] 用氩净化适当的罐。装入  $20.5 \pm 0.3$  g 去乙酰基长春碱酰肼;对该装载量进行效价调节,即如果效价是 90.0%,则装载量是 22.8 g。装载  $10.7 \pm 0.2$  g 混合的碳酸盐(效价调节过)。装载  $800 \pm 30$  mL 乙腈和  $2.67 \pm 0.11$  g 三乙胺。在氩下在  $10-14^\circ\text{C}$  混合 20-28 小时。取样用于 HPLC (EC145-CMC-AM-0001, 2.3 版)。预期的结果是 CDSI 与酰肼之比  $\geq 25:1$ 。如果不是,继续在氩下在  $10-14^\circ\text{C}$  混合 2-4 小时,并再次取样。

[0427] 用氩鼓泡 780-820 mL 水,直到溶解氧水平小于 0.9 ppm;记录溶解氧水平。将  $47.8 \pm 0.5$  g 七水合磷酸氢二钠溶解在除氧的水中。向合适的容器中,加入  $29.8 \pm 0.5$  g EC119 (对装载量进行效价调节)。将磷酸钠溶液加入 EC119 中,并在氩下混合。测量溶液的 pH,如果必要的话,用 0.5 N HCl 调节 pH 至 5.8 - 6.2。

[0428] 将缓冲的 EC119 溶液加入反应混合物中。在氩下在  $20-25^\circ\text{C}$  混合 60-75 分钟。取样用于 HPLC (EC145-CMC-AM-0001, 2.3 版)。如果 EC145 与 CDSI 之比  $\geq 25:1$ ,继续。如果不是,继续在氩下在  $20-25^\circ\text{C}$  混合,并再次取样。如果 EC145 与 CDSI 之比  $\geq 25:1$ ,继续。如果不是,加入额外的 1 g EC119,并在氩下在  $20-25^\circ\text{C}$  混合 30 分钟,并再次取样。

[0429] 从用氩鼓泡的水,制备 6.9 L - 7.1 L 25 mM 磷酸盐缓冲液、185 - 195 mM NaCl、pH 7.2 - 7.5,直到溶解氧水平小于 0.9 ppm。用该缓冲液稀释反应混合物。如果混合物产生大量浑浊,需要过滤(Whatman Polycap TC75 或 TC150, 0.45 或 1.0 微米)产物溶液;可以在将产物装载上 Biotage 柱的同时,进行该过滤。

#### [0430] 液体色谱法纯化

使用 Biotage 150M、C18 筒。该尺寸的筒可以容纳的反应混合物是目前描述的混合物的尺寸的 2 倍。

#### [0431] 柱准备:

用下述溶液冲洗柱:

- i. 12 - 13 L 乙腈
- ii. 12 - 13 L 80% 乙腈和 20% 水 (v/v)
- iii. 12 - 13 L 50% 乙腈和 50% 水 (v/v)
- iv. 12 - 13 L 10% 乙腈和 90% 水 (v/v)

纯化:

制备 25 mM 磷酸盐缓冲液, (185 - 195 mmol) NaCl, pH 7.3 - 7.5

用氩鼓泡缓冲液,直到溶解氧含量  $\leq 0.9$  ppm。

[0432] 制备:41 L 在缓冲盐水中的 10% 乙腈 (v/v);13 L 在缓冲盐水中的 16% 乙腈 (v/v),52 L 在缓冲盐水中的 27% 乙腈 (v/v)。

[0433] 检查流动相溶液的溶解氧含量。如果溶解氧含量大于 0.9 ppm,用氩或氮鼓泡流动相,直到溶解氧水平  $\leq 0.9$  ppm。

[0434] 用 26 -27 L 10% 乙腈流动相冲洗柱。

[0435] 将产物溶液装载上柱。

[0436] 使用下述流动相次序,洗脱产物:



i. 13 -14 L 10% 乙腈流动相。

[0437] ii. 13 L 16% 乙腈流动相。

[0438] iii. 51 -52 L 27% 乙腈流动相。

[0439] 注：线内紫外检测器是有用的；产物会在 15 - 19 L 27% 乙腈流动相时洗脱，带宽度为 8 -13 L。

[0440] 级分评价

i. HPLC 方法 EC145-CMC-IP-0001

ii. 通过级分 =  $\geq 97.0\%$ EC145, 且没有杂质  $\geq 0.8\%$

运行后柱处理：

该柱可以重复使用 1 次。如果该柱要用于第二次运行, 进行 ii - iv。

[0441] i. 用 12 -13 L 1:1 乙腈 - 水冲洗柱。

[0442] ii. 用 20 -22 L 乙腈冲洗柱。

[0443] iii. 重复柱准备步骤 ii - iv。

[0444] 超滤

用氩或氮鼓泡适量水, 直到溶解氧水平小于 0.9 ppm。合并通过色谱法的级分, 并用等体积的鼓泡过的水稀释。使用 Millipore 再生纤维素膜(具有 1000 的标称分子量截止, 目录号 CDUF002LA), 装配超滤装置, 并用 9 L 除氧的水冲洗它。开始超滤产物溶液。维持 30-50 psi 的反压。继续超滤, 直到渗余物体积是 2-3 L。加入 11-12 L 除氧的水。继续超滤, 直到渗余物体积是 2-3 L。加入 11-12 L 除氧的水。继续超滤, 直到渗余物体积是 2-3 L。加入 8 to 10 L 除氧的水。继续超滤, 直到渗余物体积是 2 L。必须通过 GC 和浓度来分析渗余物样品, 确定超滤终点。规范是  $\leq 50$  微克乙腈 / 毫克 EC145。如果未达到, 进行另一个超滤循环。

[0445] 必须调节 API 溶液的浓度, 使得包装的物质是 6-12 mg/mL。在超滤结束时, 用 1 升水冲洗装置。因此, 根据需要, 继续超滤或加入水。一旦产物溶液流出超滤装置, 用 1 L 除氧的水冲洗超滤装置, 并与产物溶液合并。

[0446] 在冲洗液与产物溶液合并以后, 必须通过 0.2 微米绝对过滤器过滤该溶液, 并包装该滤液(在惰性气氛下进行)。

[0447] 分离的产物的产率是理论最高限度的 50 - 60%。

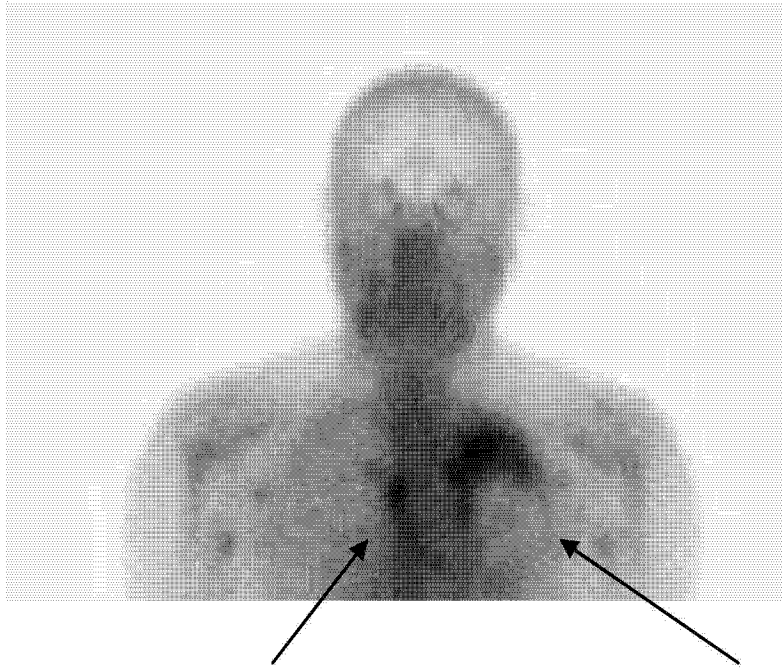


图 1

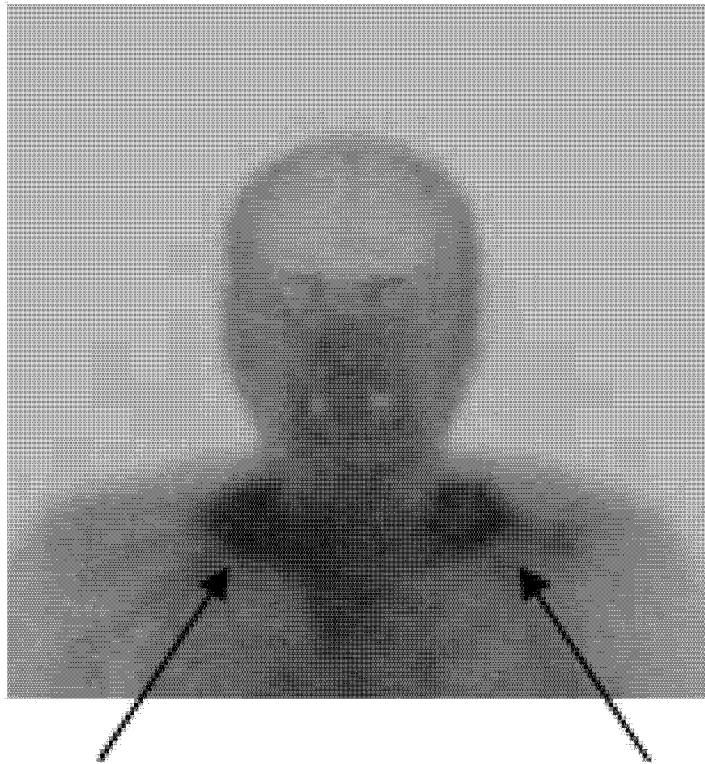


图 2

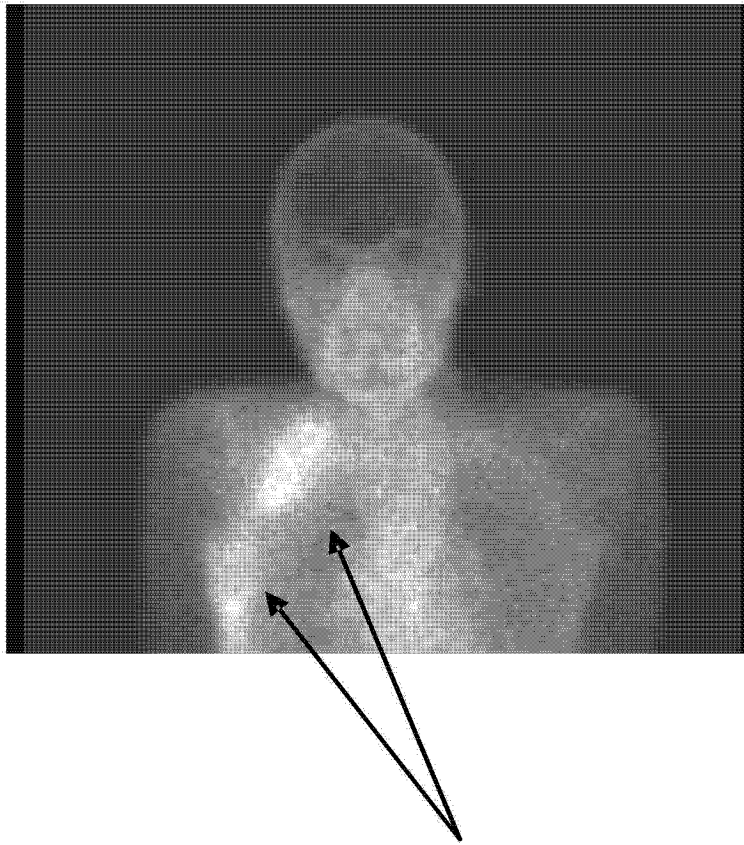


图 3

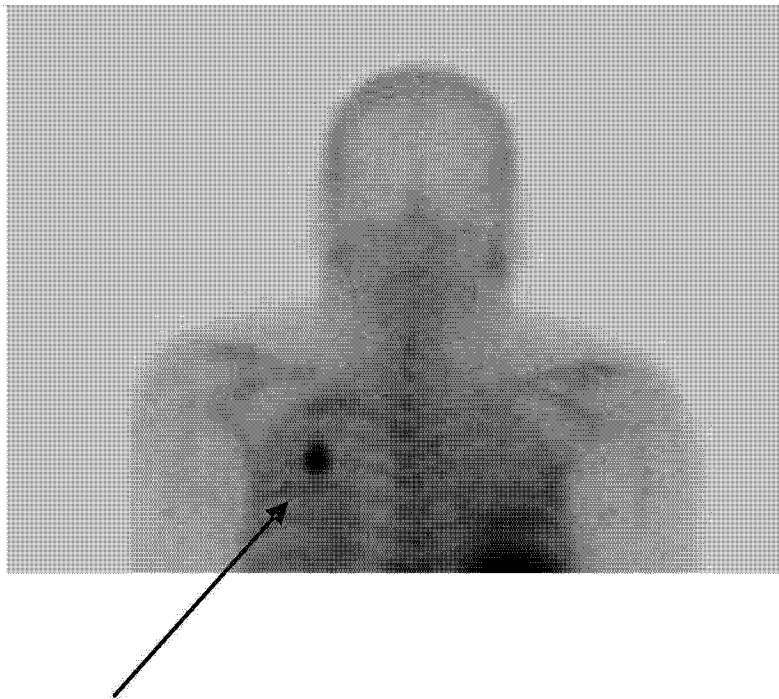


图 4

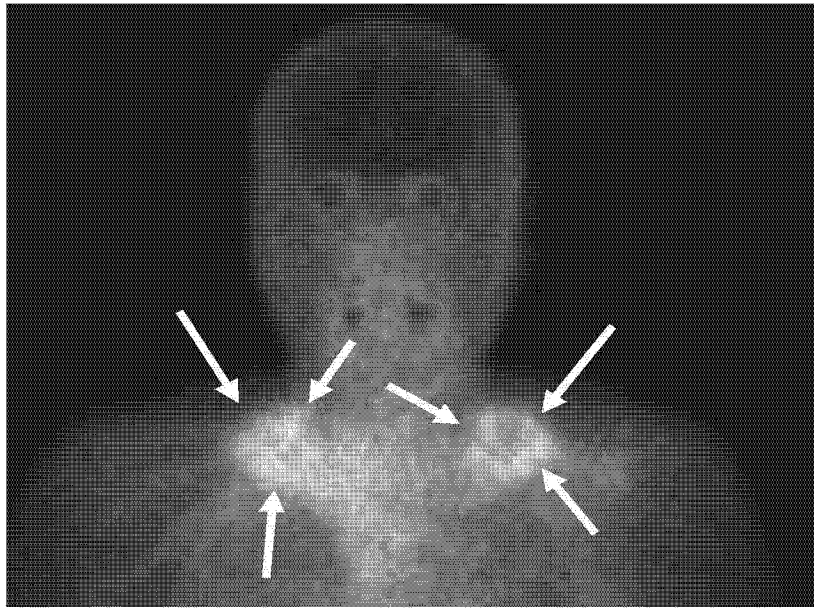


图 5

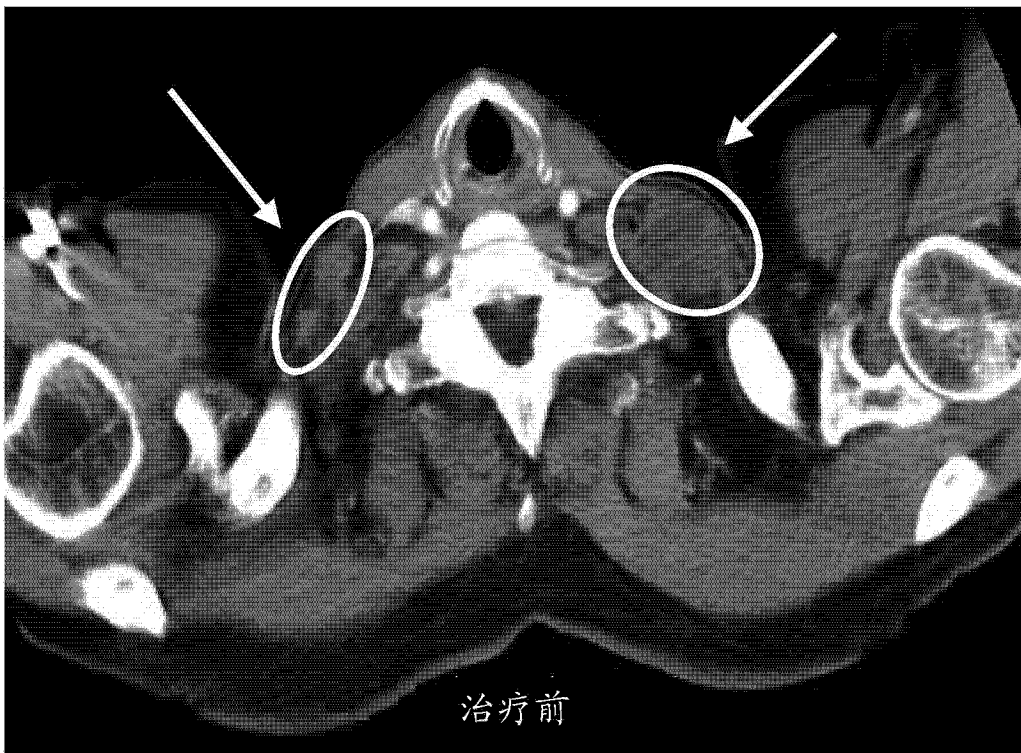


图 6

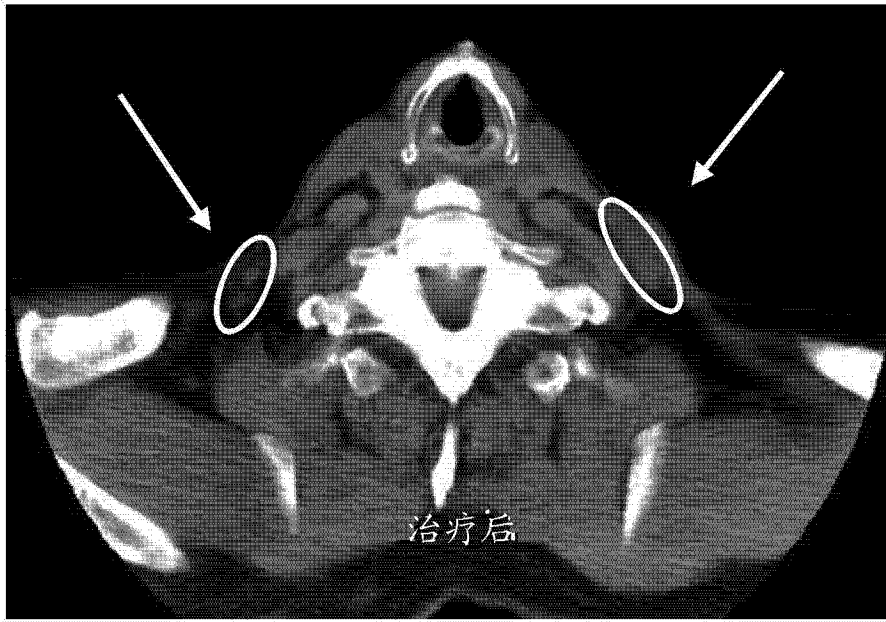


图 7

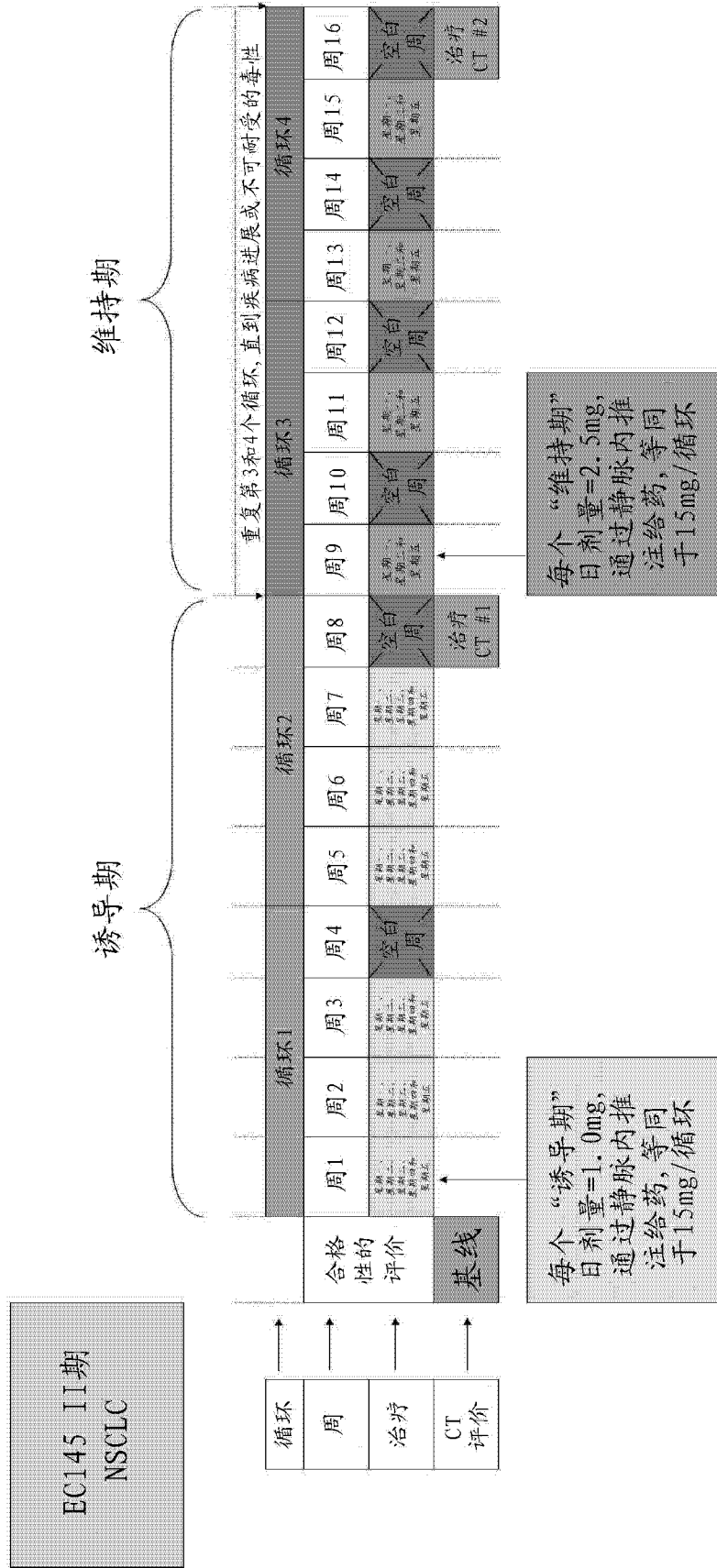


图 8

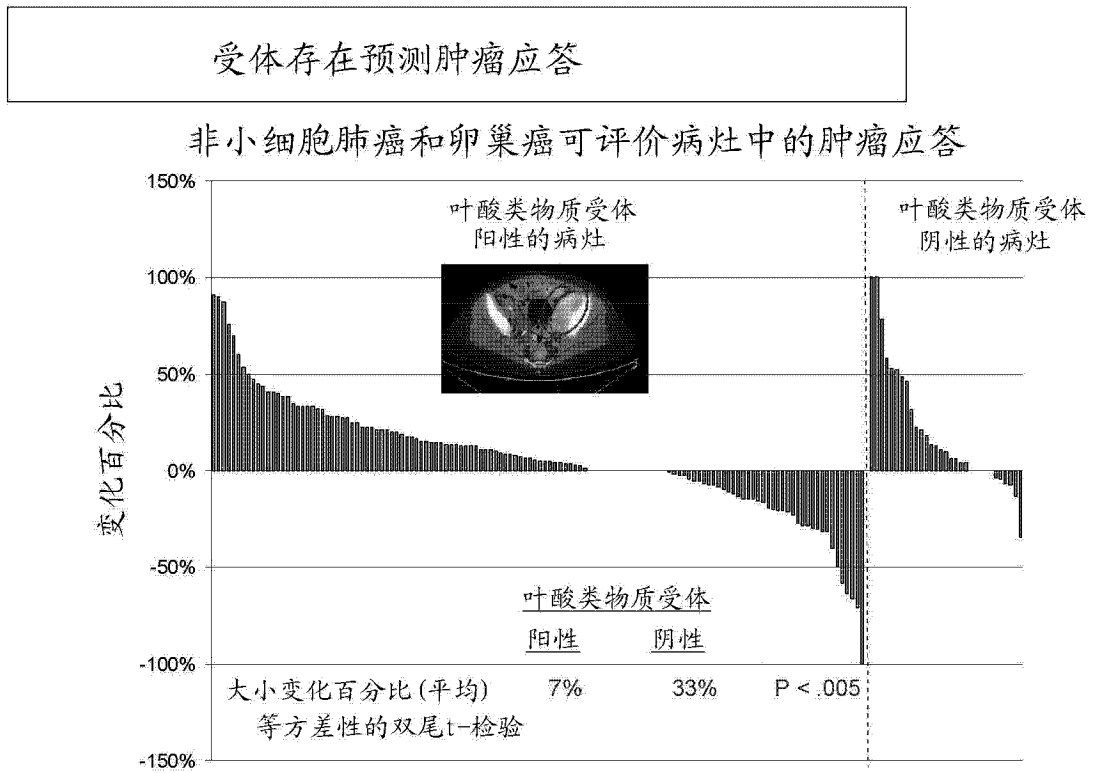
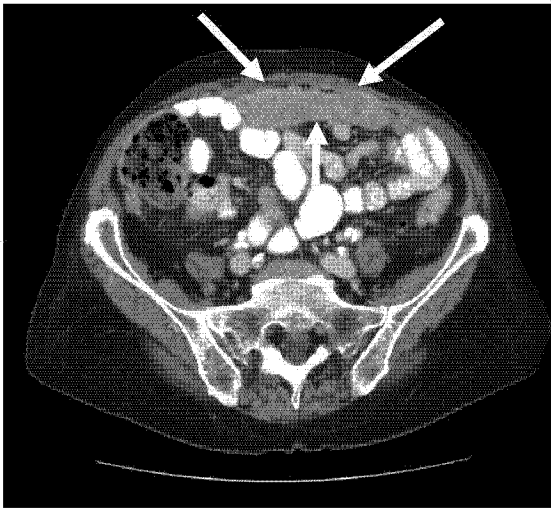
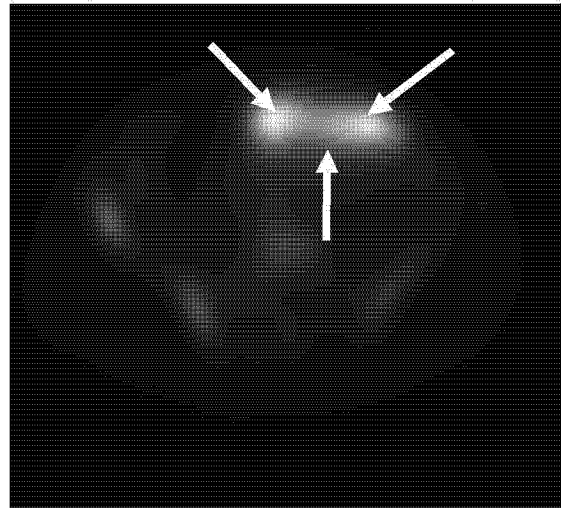


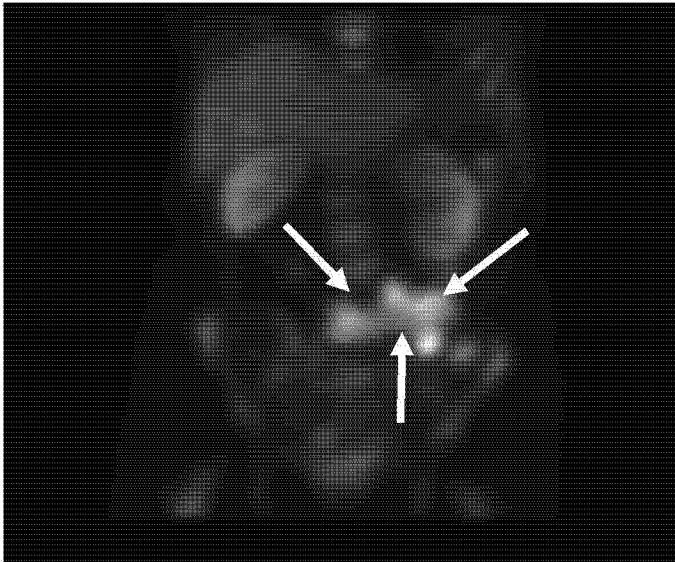
图 9



图A



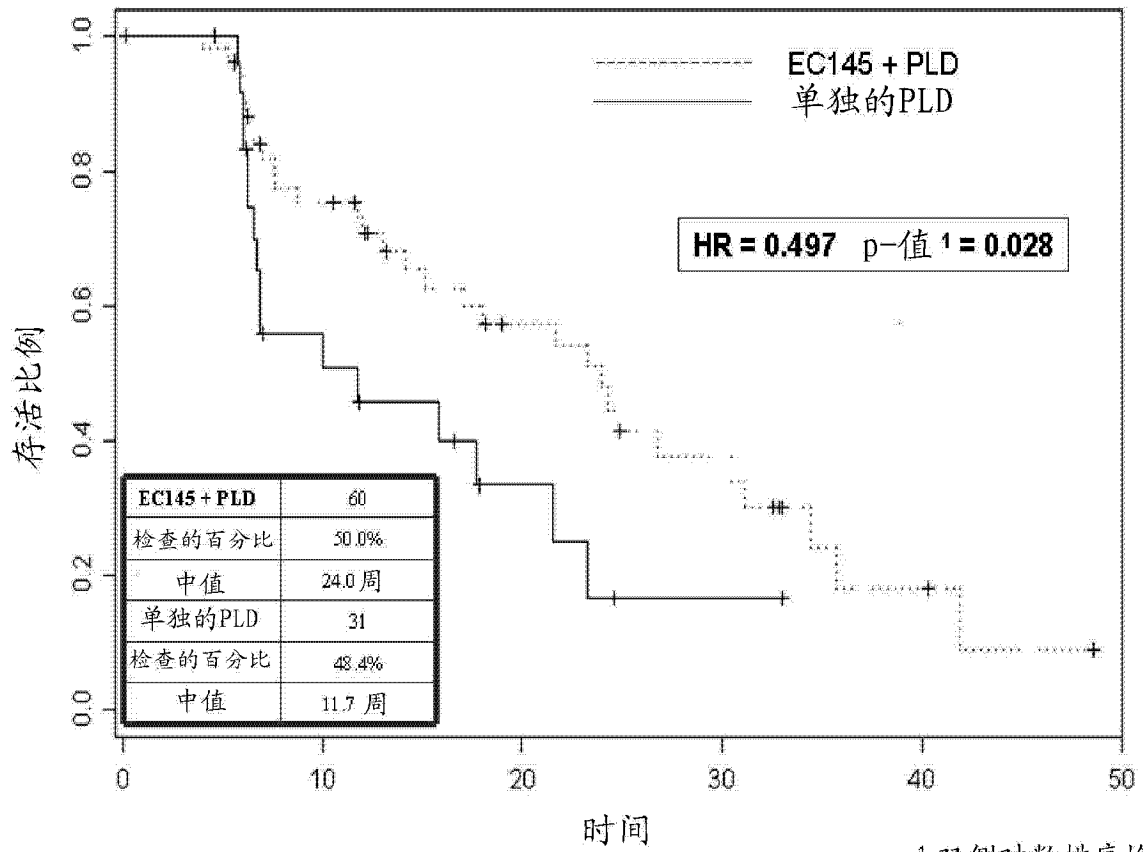
图B



图C

图 10





<sup>1</sup> 双侧对数排序检验

无进展存活时间(周)

图 11

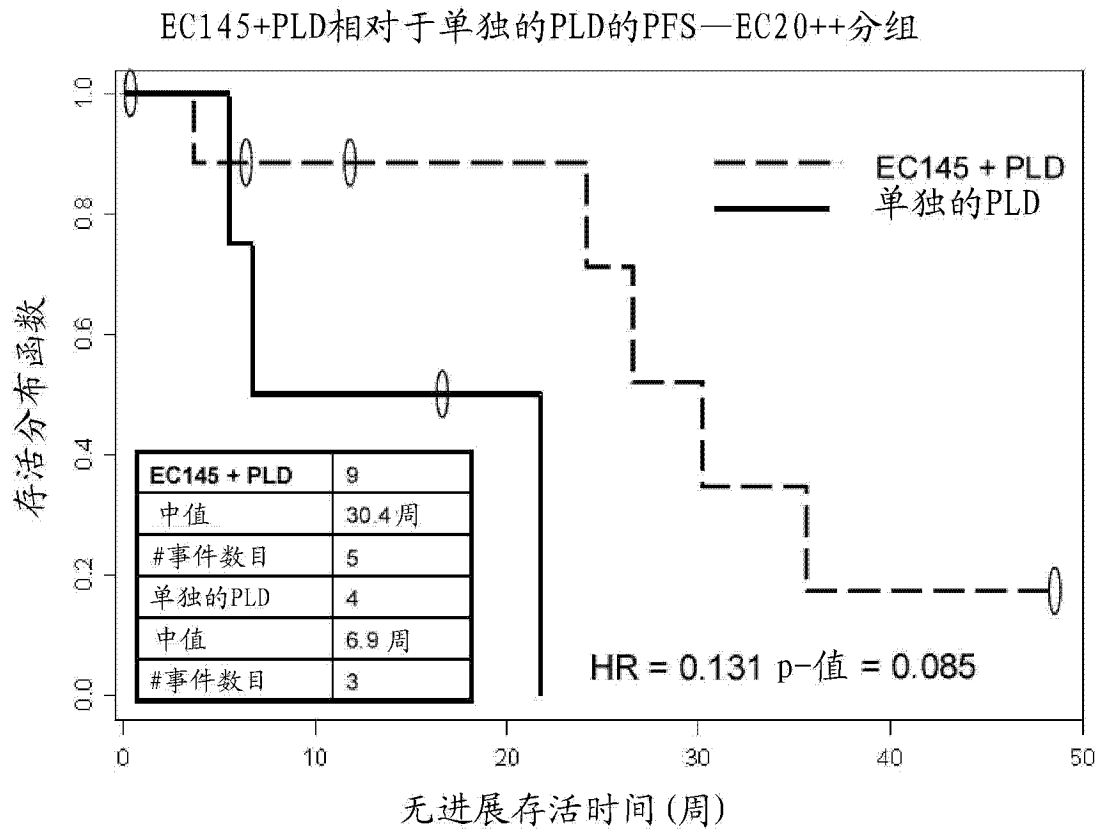


图 12

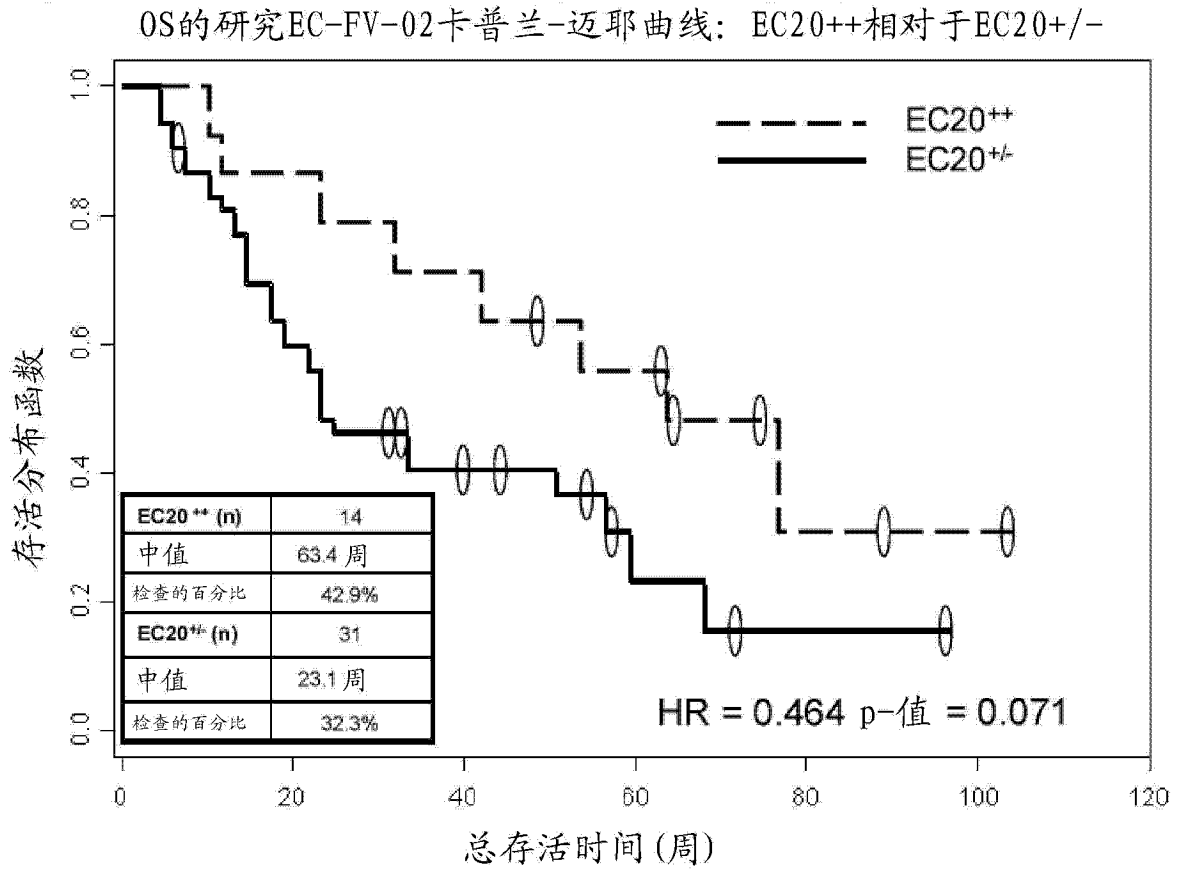


图 13

中间分析的OS曲线— EC-FV-04  
按照方案患者人群

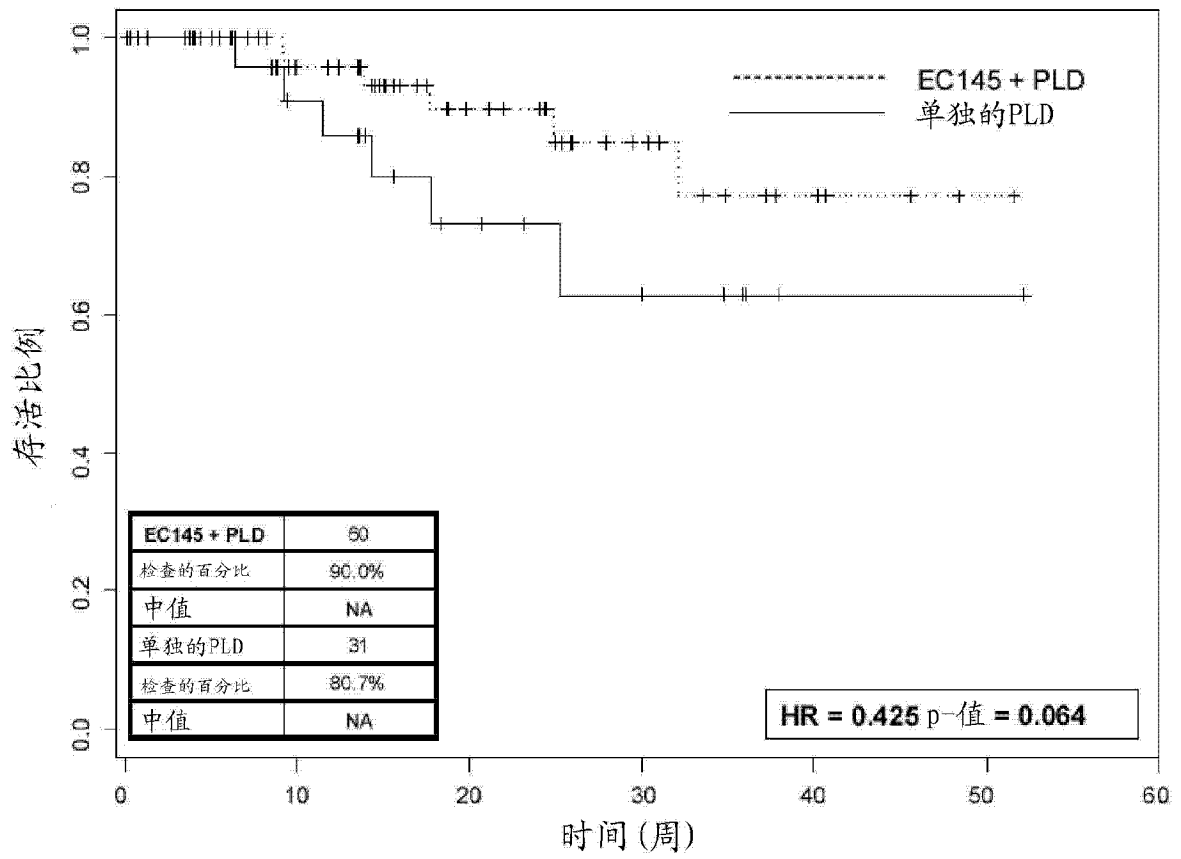


图 14

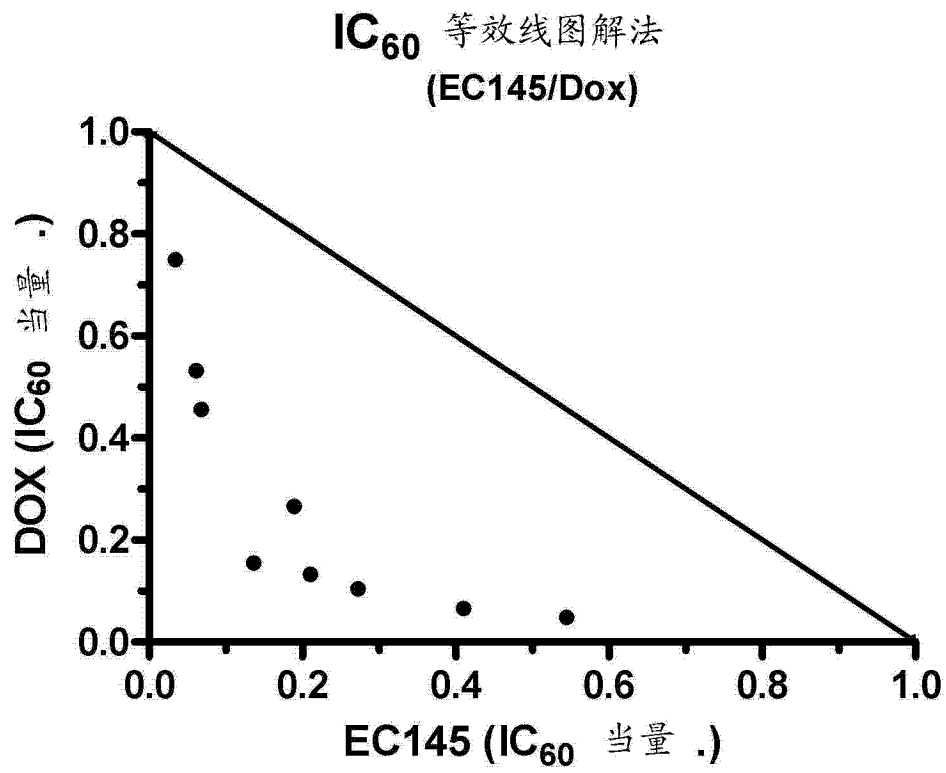
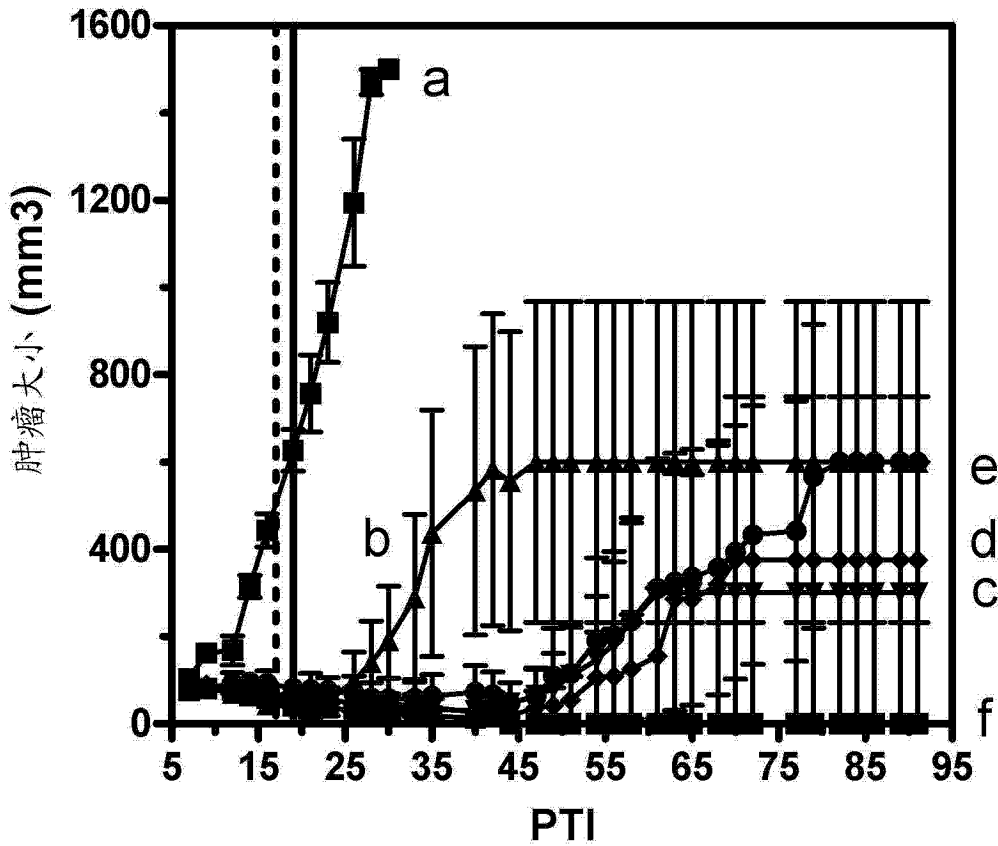


图 15

肿瘤生长, EC145 + Doxil

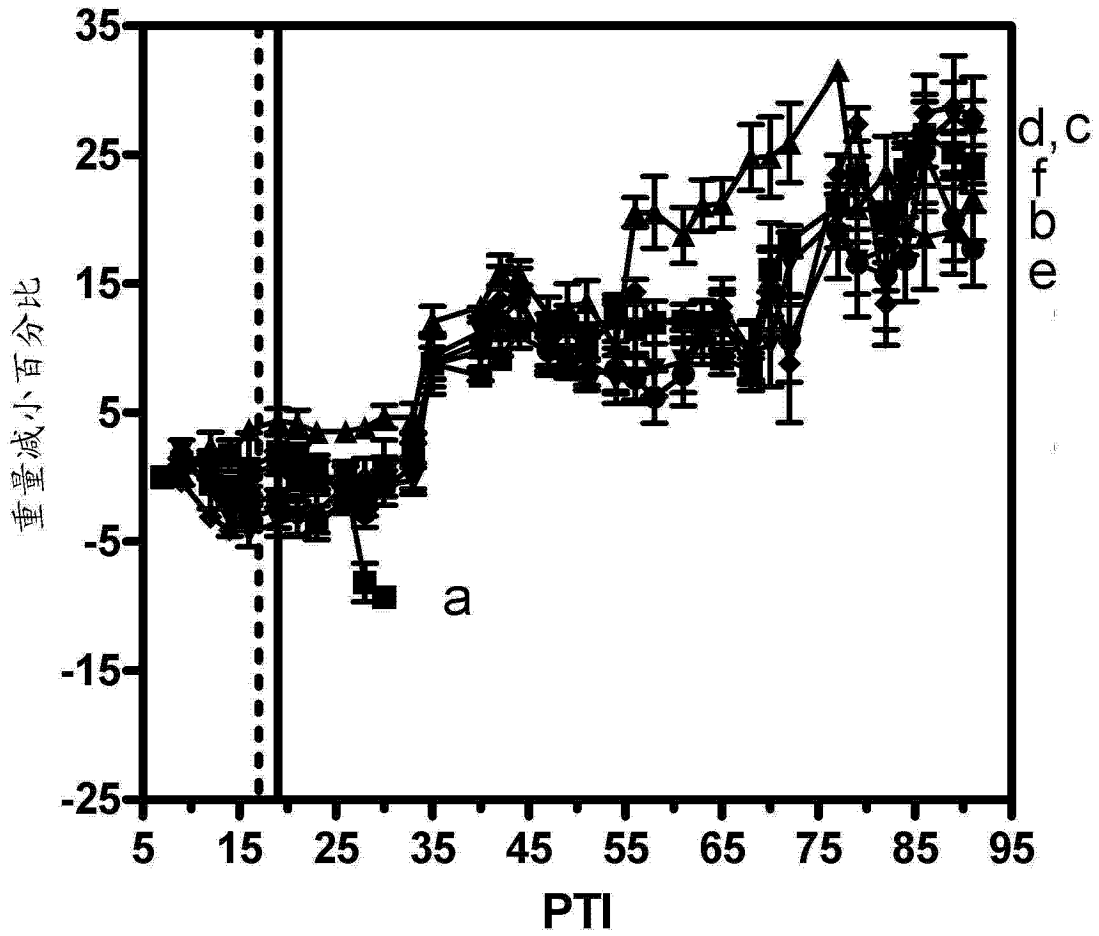


在 { } 中的数字是该组中的 {PR、CR、治愈} 的数目

- a ■ M109 对照
- b ▲ EC145 2 μmol/kg {0,0,3}
- c ▼ Doxil 7 mg/kg {0,0,4}
- d ◆ EC145 + Doxil 2 μmol/kg+7 mg/kg {1,0,3}
- e ● Doxil 4 mg/kg {0,1,3}
- f ■ EC145 + Doxil 2 μmol/kg + 4 mg/kg {0,0,5}

图 16

### 重量变化, EC145 + Doxil



- a —■— M109 对照
- b —▲— EC145 2 μmol/kg
- c —▼— Doxil 7 mg/kg
- d —◆— EC145 + Doxil 2 μmol/kg + 7 mg/kg
- e —●— Doxil 4 mg/kg
- f —■— EC145 + Doxil 2 μmol/kg + 4 mg/kg

图 17