



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110678204 A

(43)申请公布日 2020.01.10

(21)申请号 201780091404.8

H.K.R. 斯塔普拉姆 S.J. 哈恩

(22)申请日 2017.09.14

J.A. 雷迪 Y.J. 卢 L.W. 惠勒二世

(30)优先权数据

PCT/US2017/024770 2017.03.29 US

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

代理人 初明明 彭昶

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.11.29

(51)Int.Cl.

A61K 45/06(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2017/051662 2017.09.14

A61P 35/00(2006.01)

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/182776 EN 2018.10.04

(71)申请人 恩多塞特公司

地址 美国印第安那州

(72)发明人 I.R. 弗拉霍夫 C.P. 利蒙 L. 齐

N. 邹 K.Y. 王 A.E. 费尔滕

G.L. 帕勒姆 F. 游

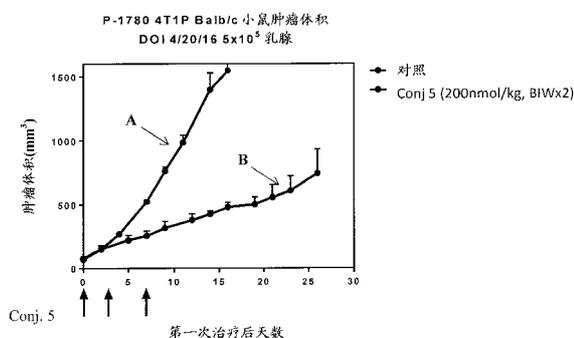
权利要求书2页 说明书33页 附图22页

(54)发明名称

用于靶向肿瘤相关巨噬细胞的叶酸缀合物

(57)摘要

提供了使用本文称为缀合物5的缀合物或其药学上可接受的盐治疗癌症的方法。还描述了使用靶向肿瘤相关巨噬细胞的缀合物5或其药学上可接受的盐治疗癌症的方法。



1. 一种治疗叶酸受体阴性癌症的方法,其包括给予宿主动物治疗有效量的缀合物5或其药学上可接受的盐,其中肿瘤-相关巨噬细胞被抑制或耗尽。
2. 一种治疗叶酸受体阴性癌症的方法,其包括给予宿主动物治疗有效量的缀合物5或其药学上可接受的盐,以耗尽肿瘤-相关巨噬细胞。
3. 一种治疗叶酸受体阴性癌症的方法,其包括给予宿主动物治疗有效量的缀合物5或其药学上可接受的盐,和治疗具有肿瘤-相关巨噬细胞的叶酸受体阴性癌症。
4. 一种治疗宿主动物的叶酸受体阴性癌症的方法,其包括给予宿主动物治疗有效量的缀合物5或其药学上可接受的盐,以靶向肿瘤相关巨噬细胞。
5. 一种治疗癌症的方法,其包括以下步骤:鉴定肿瘤-相关巨噬细胞在宿主动物的癌症中的存在,并给予宿主动物治疗有效量的缀合物5或其药学上可接受的盐。
6. 一种治疗宿主动物的癌症的方法,该方法包括以下步骤:给予宿主动物治疗有效量的缀合物5或其药学上可接受的盐,以抑制或耗尽宿主动物中的肿瘤-相关巨噬细胞。
7. 一种靶向宿主动物的肿瘤-相关巨噬细胞的方法,该方法包括以下步骤:给予宿主动物治疗有效量的缀合物5或其药学上可接受的盐,以靶向肿瘤-相关巨噬细胞。
8. 一种治疗宿主动物的癌症的方法,其中肿瘤-相关巨噬细胞在癌症中和/或形成组织或肿瘤的一部分,该方法包括以下步骤:给予宿主动物治疗有效量的缀合物5或其药学上可接受的盐,和治疗具有肿瘤-相关巨噬细胞的癌症。
9. 权利要求1-8的任一项的方法,其中肿瘤相关巨噬细胞在癌症中和肿瘤-相关巨噬细胞具有促肿瘤M2-偏向的CD163(+)表型。
10. 权利要求1-8的任一项的方法,其中肿瘤-相关巨噬细胞在癌症中和肿瘤-相关巨噬细胞具有促肿瘤M2-偏向的CD163(+)和TGF- $\beta$ (+)表型。
11. 权利要求1-8的任一项的方法,其中肿瘤-相关巨噬细胞在癌症中和肿瘤-相关巨噬细胞具有促肿瘤M2-偏向的CD11b(+)表型。
12. 权利要求1-8的任一项的方法,其中肿瘤-相关巨噬细胞在癌症中和肿瘤-相关巨噬细胞具有促肿瘤M2-偏向的CD163(+)和CD11b(+)表型。
13. 权利要求1-8的任一项的方法,其中肿瘤-相关巨噬细胞在癌症中和肿瘤-相关巨噬细胞具有促肿瘤M2-偏向的F480(+)表型。
14. 权利要求1-8的任一项的方法,其中肿瘤-相关巨噬细胞在癌症中和肿瘤-相关巨噬细胞具有促肿瘤M2-偏向的F480(+)和CD11b(+)表型。
15. 权利要求1-8的任一项的方法,其中肿瘤-相关巨噬细胞在癌症中和肿瘤-相关巨噬细胞是促肿瘤M2-偏向的并表达一个或多个选自以下的标记:CD163(+)、IL10(+)、Arg1(+)、TGF- $\beta$ (+)、VEGF(+)、CD206(+)、CD11b(+)和F480(+)表型。
16. 权利要求1-8的任一项的方法,其中肿瘤-相关巨噬细胞在癌症中和/或形成组织或肿瘤的一部分,并且肿瘤-相关巨噬细胞是促肿瘤M2-偏向的并表达一个或多个选自以下的标记:CD163(+)、IL10(+)、Arg1(+)、TGF- $\beta$ (+)、VEGF(+)、CD206(+)、CD11b(+)和F480(+)表型。
17. 权利要求1-16的任一项的方法,其中癌症选自非小细胞肺癌、间变性甲状腺癌、胰管腺癌、头颈部癌、表皮生长因子受体阴性乳腺癌、间皮瘤、成人经典霍奇金氏淋巴瘤、葡萄膜黑素瘤、成胶质细胞瘤、肾癌、平滑肌肉瘤和色素沉着绒毛结节性滑膜炎。

18. 权利要求1-17的任一项的方法,其中缀合物5或其药学上可接受的盐能够耗尽或耗尽宿主动物中的肿瘤-相关巨噬细胞。

19. 权利要求1-18的任一项的方法,其中缀合物5或其药学上可接受的盐能够抑制或抑制宿主动物中的肿瘤-相关巨噬细胞的活性。

20. 权利要求1-19的任一项的方法,其中缀合物5或其药学上可接受的盐以胃肠外剂型给予宿主动物。

21. 权利要求20的方法,其中胃肠外剂型选自皮内、皮下、肌肉内、腹膜内、静脉内和鞘内剂型。

22. 权利要求1-21的任一项的方法,其中治疗有效量是从约0.05  $\mu\text{mol}/\text{kg}$ 至约6.0  $\mu\text{mol}/\text{kg}$ 宿主动物体重。

23. 权利要求1-22的任一项的方法,其中治疗有效量是从约0.05  $\mu\text{mol}/\text{kg}$ 至约4.0  $\mu\text{mol}/\text{kg}$ 宿主动物体重。

24. 权利要求1-23的任一项的方法,其中治疗有效量是从约0.05  $\mu\text{mol}/\text{kg}$ 至约2.0  $\mu\text{mol}/\text{kg}$ 宿主动物体重。

25. 权利要求1-24的任一项的方法,其中治疗有效量是从约0.05  $\mu\text{mol}/\text{kg}$ 至约1.0  $\mu\text{mol}/\text{kg}$ 宿主动物体重。

26. 权利要求1-8的任一项的方法,其中肿瘤-相关巨噬细胞在癌症中和肿瘤-相关巨噬细胞具有促肿瘤M2-偏向的CD163 (+)、IL10 (+)、Arg1 (+)、TGF- $\beta$  (+)、VEGF (+)、CD206 (+)、CD11b (+) 和F480 (+) 表型。

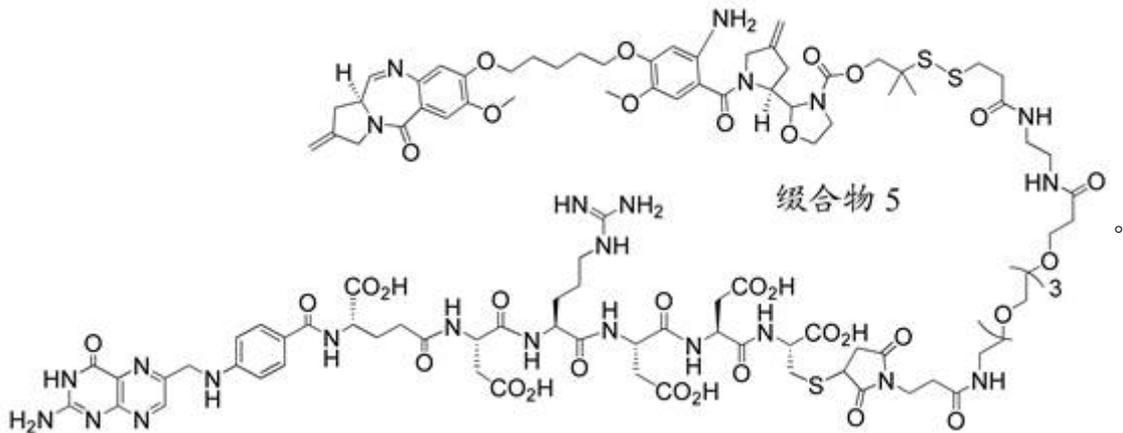
## 用于靶向肿瘤相关巨噬细胞的叶酸缀合物

[0001] 相关申请的交叉参照

本申请要求2017年3月29日提交的PCT国际申请号PCT/US2017/024770的优先权,其通过引用以其整体并入本文。

## 发明领域

[0002] 在此描述的发明涉及使用具有下式的缀合物(此后称为“缀合物5”)治疗癌症的方法:



[0003] 在此描述的发明还涉及使用靶向肿瘤相关巨噬细胞的缀合物5治疗癌症的方法。

## [0004] 发明背景和概述

尽管抗癌技术(如放疗、化疗和激素治疗)有了重大发展的事实,但癌症在美国仍然是继心脏病之后的第二大死亡原因。大多数情况下,癌症是通过化疗使用高效药物,如丝裂霉素、紫杉醇和喜树碱来治疗的。在许多情况下,这些化疗剂显示出剂量应答效应,且细胞杀灭与药物剂量成比例。因此,极具侵略性的给药方式是根除肿瘤所必需的;然而,高剂量化疗由于对癌细胞的选择性差和对正常细胞的严重毒性而受阻。肿瘤-特异性治疗的这种缺乏是当前化疗需要克服的许多障碍之一。

[0005] 目前化疗局限性的一个解决方案是以很高特异性向肿瘤组织递送生物有效浓度的药物。为了达到这一目标,人们做出了很大努力,通过将抗癌药物与激素、抗体和维生素缀合,开发出肿瘤选择性药物。例如,低分子量维生素、叶酸和其它叶酸受体结合化合物和配体尤其可用作叶酸受体阳性癌细胞和肿瘤的靶向剂。

[0006] 叶酸是B族维生素中的一员,通过参与核酸和氨基酸的生物合成,对细胞的存活起着至关重要的作用。这种必需的维生素也是高亲和力配体,其通过靶向叶酸受体-阳性癌细胞增强缀合的抗癌药物的特异性。已经发现在90%以上的非粘液性卵巢癌中,叶酸受体(FR)上调。在肾、脑、肺和乳腺癌中也发现了高到中等水平的叶酸受体。同时,据报道叶酸受体以低水平出现在大多数正常组织中,导致一种选择性靶向癌细胞的机制。虽然叶酸受体可用来以很高特异性向肿瘤组织递送药物,但许多癌症根本不表达叶酸受体,或数量不足以提供所需的特异性。因此,有必要开发靶向疗法,将药物递送到这样的叶酸受体阳性癌症。

[0007] 存在为致癌原性的肿瘤-相关巨噬细胞(TAM)。这些巨噬细胞存在于肿瘤微环境

中,并可通过引起应答例如抑制B和T细胞活化、抑制肿瘤相关抗原呈递、抑制细胞毒性颗粒释放和促进血管生成而为致癌原性的。因此,耗尽TAM或抑制其活性的疗法将是有用的。

[0008] 申请人已经发现,过度表达叶酸受体或没有表达足够数量的叶酸受体,或者根本不表达叶酸受体的肿瘤和癌症,可以通过使药物靶向TAM来治疗。本文介绍了使用缀合物5或其药学上可接受的盐,作为TAM-靶向剂靶向TAM的治疗癌症的方法。申请人已经发现,致癌原性的TAM子集表达叶酸受体 $\beta$ ,也称为叶酸受体2。因此,申请人已经发现,可以使用叶酸作为靶向配体以将缀合物递送到这些致癌原性TAM来靶向这些TAM,以耗尽或抑制致癌原性TAM来治疗宿主动物中的癌症,无论癌细胞本身是否表达叶酸受体。应该理解,本文描述的方法可以用来治疗不表达叶酸受体的癌症,以及表达叶酸受体的癌症。

[0009] 在一个实施方案中,提供了治疗癌症的方法。该方法包括以下步骤:鉴定肿瘤-相关巨噬细胞在宿主动物的癌症中的存在,并给予宿主动物治疗有效量的缀合物5或其药学上可接受的盐。

[0010] 在另一个实施方案中,提供了治疗癌症的方法。该方法包括以下步骤:给予宿主动物治疗有效量的缀合物5或其药学上可接受的盐,其中宿主动物此前已被给予叶酸成像剂缀合物和宿主动物的叶酸受体状态已被确定为阴性。

[0011] 在另一个实施方案中,提供一种通过抑制或耗尽宿主动物中的肿瘤-相关巨噬细胞治疗宿主动物的癌症的方法。该方法包括给予宿主动物治疗有效量的缀合物5或其药学上可接受的盐的步骤,其中肿瘤-相关巨噬细胞被抑制或耗尽。

[0012] 在另一个实施方案中,提供一种靶向宿主动物的肿瘤-相关巨噬细胞的方法。该方法包括给予宿主动物治疗有效量的缀合物5或其药学上可接受的盐的步骤,其中肿瘤-相关巨噬细胞被靶向。

[0013] 在另一个实施方案中,提供一种治疗宿主动物的癌症的方法,其中肿瘤-相关巨噬细胞是癌症、组织或肿瘤的一部分。该方法包括以下步骤:给予宿主动物治疗有效量的缀合物5或其药学上可接受的盐,和治疗具有肿瘤-相关巨噬细胞的癌症。在一个实施方案中,缀合物5或其药学上可接受的盐,包括结合至叶酸受体- $\alpha$ 和/或叶酸受体- $\beta$ 的叶酸。

[0014] 在另一个实施方案中,提供一种治疗叶酸受体阴性癌症的方法。该方法包括给予宿主动物治疗有效量的缀合物5或其药学上可接受的盐,其中肿瘤-相关巨噬细胞被抑制或耗尽。

[0015] 在另一个实施方案中,提供一种治疗叶酸受体阴性癌症的方法。该方法包括给予宿主动物治疗有效量的缀合物5或其药学上可接受的盐,以耗尽肿瘤-相关巨噬细胞。

[0016] 在另一个实施方案中,提供一种治疗叶酸受体阴性癌症的方法。该方法包括给予宿主动物治疗有效量的缀合物5或其药学上可接受的盐,和治疗具有肿瘤-相关巨噬细胞的叶酸受体阴性癌症。

[0017] 在另一个实施方案中,提供一种治疗宿主动物的叶酸受体阴性癌症的方法。该方法包括给予宿主动物治疗有效量的缀合物5或其药学上可接受的盐,以靶向肿瘤相关巨噬细胞。

[0018] 在以下列举的条款中描述了本发明的另外的示例性和非限制性的实施方案。以下条款的所有组合都被理解为在此描述的本发明的另外实施方案。

[0019] 1. 一种治疗叶酸受体阴性癌症的方法,该方法包括给予宿主动物治疗有效量的

缀合物5或其药学上可接受的盐,其中肿瘤-相关巨噬细胞被抑制或耗尽。

[0020] 2. 一种治疗叶酸受体阴性癌症的方法,该方法包括给予宿主动物治疗有效量的缀合物5或其药学上可接受的盐,以耗尽肿瘤-相关巨噬细胞。

[0021] 3. 一种治疗叶酸受体阴性癌症的方法,该方法包括给予宿主动物治疗有效量的缀合物5或其药学上可接受的盐,和治疗具有肿瘤-相关巨噬细胞的叶酸受体阴性癌症。

[0022] 4. 一种治疗宿主动物的叶酸受体阴性癌症的方法,该方法包括给予宿主动物治疗有效量的缀合物5或其药学上可接受的盐,以靶向肿瘤相关巨噬细胞。

[0023] 5. 一种治疗癌症的方法,其包括以下步骤:鉴定肿瘤-相关巨噬细胞在宿主动物的癌症中的存在,并给予宿主动物治疗有效量的缀合物5或其药学上可接受的盐。

[0024] 6. 一种治疗宿主动物的癌症的方法,该方法包括给予宿主动物治疗有效量的缀合物5或其药学上可接受的盐的步骤,以抑制或耗尽宿主动物中的肿瘤-相关巨噬细胞。

[0025] 7. 一种靶向宿主动物的肿瘤-相关巨噬细胞的方法,该方法包括给予宿主动物治疗有效量的缀合物5或其药学上可接受的盐的步骤,以靶向肿瘤-相关巨噬细胞。

[0026] 8. 一种治疗宿主动物的癌症的方法,其中肿瘤-相关巨噬细胞在癌症中和/或形成组织或肿瘤的一部分,该方法包括以下步骤:给予宿主动物治疗有效量的缀合物5或其药学上可接受的盐,和治疗具有肿瘤-相关巨噬细胞的癌症。

[0027] 9. 条款1-8的任一项的方法,其中肿瘤相关巨噬细胞在癌症中和肿瘤-相关巨噬细胞具有促肿瘤M2-偏向的CD163(+)表型。

[0028] 10. 条款1-8的任一项的方法,其中肿瘤-相关巨噬细胞在癌症中和肿瘤-相关巨噬细胞具有促肿瘤M2-偏向的CD163(+)和TGF- $\beta$ (+)表型。

[0029] 11. 条款1-8的任一项的方法,其中肿瘤-相关巨噬细胞在癌症中和肿瘤-相关巨噬细胞具有促肿瘤M2-偏向的CD11b(+)表型。

[0030] 12. 条款1-8的任一项的方法,其中肿瘤-相关巨噬细胞在癌症中和肿瘤-相关巨噬细胞具有促肿瘤M2-偏向的CD163(+)和CD11b(+)表型。

[0031] 13. 条款1-8的任一项的方法,其中肿瘤-相关巨噬细胞在癌症中和肿瘤-相关巨噬细胞具有促肿瘤M2-偏向的F480(+)表型。

[0032] 14. 条款1-8的任一项的方法,其中肿瘤-相关巨噬细胞在癌症中和肿瘤-相关巨噬细胞具有促肿瘤M2-偏向的F480(+)和CD11b(+)表型。

[0033] 15. 条款1-8的任一项的方法,其中肿瘤-相关巨噬细胞在癌症中和肿瘤-相关巨噬细胞是促肿瘤M2-偏向的并表达一个或多个选自以下的标记:CD163(+)、IL10(+)、Arg1(+)、TGF- $\beta$ (+)、VEGF(+)、CD206(+)、CD11b(+)和F480(+)表型。

[0034] 16. 条款1-8的任一项的方法,其中肿瘤-相关巨噬细胞在癌症中和/或形成组织或肿瘤的一部分和肿瘤-相关巨噬细胞是促肿瘤M2-偏向的并表达一个或多个选自以下的标记:CD163(+)、IL10(+)、Arg1(+)、TGF- $\beta$ (+)、VEGF(+)、CD206(+)、CD11b(+)和F480(+)表型。

[0035] 17. 条款1-16的任一项的方法,其中癌症选自非小细胞肺癌、间变性甲状腺癌、胰腺腺癌、头颈部癌、表皮生长因子受体阴性乳腺癌、间皮瘤、成人经典霍奇金氏淋巴瘤、葡萄膜黑素瘤、成胶质细胞瘤、肾癌、平滑肌肉瘤和色素沉着绒毛结节性滑膜炎。

[0036] 18. 条款1-17的任一项的方法,其中缀合物5或其药学上可接受的盐,能够耗尽或

耗尽宿主动物中的肿瘤-相关巨噬细胞。

[0037] 19. 条款1-18的任一项的方法,其中缀合物5或其药学上可接受的盐,能够抑制或抑制宿主动物中的肿瘤-相关巨噬细胞的活性。

[0038] 20. 条款1-19的任一项的方法,其中缀合物5或其药学上可接受的盐,以胃肠外剂型给予宿主动物。

[0039] 21. 条款20的方法,其中胃肠外剂型选自皮内、皮下、肌肉内、腹膜内、静脉内和鞘内剂型。

[0040] 22. 条款1-21的任一项的方法,其中治疗有效量是从约0.05  $\mu\text{mol}/\text{kg}$ 至约6.0  $\mu\text{mol}/\text{kg}$ 宿主动物体重。

[0041] 23. 条款1-22的任一项的方法,其中治疗有效量是从约0.05  $\mu\text{mol}/\text{kg}$ 至约4.0  $\mu\text{mol}/\text{kg}$ 宿主动物体重。

[0042] 24. 条款1-23的任一项的方法,其中治疗有效量是从约0.05  $\mu\text{mol}/\text{kg}$ 至约2.0  $\mu\text{mol}/\text{kg}$ 宿主动物体重。

[0043] 25. 条款1-24的任一项的方法,其中治疗有效量是从约0.05  $\mu\text{mol}/\text{kg}$ 至约1.0  $\mu\text{mol}/\text{kg}$ 宿主动物体重。

[0044] 26. 条款1-8的任一项的方法,其中肿瘤-相关巨噬细胞在癌症中和肿瘤-相关巨噬细胞具有促肿瘤M2-偏向的CD163(+)、IL10(+)、Arg1(+)、TGF- $\beta$ (+)、VEGF(+)、CD206(+)、CD11b(+)和F480(+)表型。

[0045] 在本文描述的任何实施方案中,癌症可表达叶酸受体,或可以不表达叶酸受体。在前述段落中的任何实施方案中,肿瘤相关巨噬细胞在癌症中,肿瘤-相关巨噬细胞可具有促肿瘤M2-偏向的CD163(+)表型,促肿瘤M2-偏向的CD163(+)和TGF- $\beta$ (+)表型,促肿瘤M2-偏向的CD163(+)、IL10(+)、Arg1(+)、TGF- $\beta$ (+)、VEGF(+)和CD206(+)表型,或肿瘤-相关巨噬细胞是促肿瘤M2-偏向的并可表达一个或多个选自以下的标记:CD163(+)、IL10(+)、Arg1(+)、TGF- $\beta$ (+)、VEGF(+)、CD206(+)、CD11b(+)、F480(+)、CD163(+)CD11b(+)和F480(+)CD11b(+)。

[0046] 在本文描述的任何实施方案中,癌症可选自非小细胞肺癌、间变性甲状腺癌、胰腺腺癌、头颈部癌、表皮生长因子受体阴性乳腺癌、间皮瘤、成人经典霍奇金氏淋巴瘤、葡萄膜黑素瘤、成胶质细胞瘤、肾癌、平滑肌肉瘤和色素沉着绒毛结节性滑膜炎。

[0047] 在本文描述的任何实施方案中,缀合物5或其药学上可接受的盐,可以以胃肠外剂型给予宿主动物。胃肠外剂型选自皮内、皮下、肌肉内、腹膜内、静脉内和鞘内。在本文描述的任何实施方案中,治疗有效量可以是从约0.1  $\mu\text{mol}/\text{kg}$ 至约6.0  $\mu\text{mol}/\text{kg}$ 缀合物5或其药学上可接受的盐;从约0.1  $\mu\text{mol}/\text{kg}$ 至约4.0  $\mu\text{mol}/\text{kg}$ 缀合物5或其药学上可接受的盐;或从约0.1  $\mu\text{mol}/\text{kg}$ 至约2.0  $\mu\text{mol}/\text{kg}$ 缀合物5或其药学上可接受的盐。

[0048] 附图简述

图1是一个图表,显示了 $^3\text{H}$ -胸苷掺入用缀合物5 (●)和用缀合物5和过量叶酸(■)处理的KB细胞的百分比。

[0049] 图2A是一个图表,显示与未处理的对照(■)比较,以0.5  $\mu\text{mol}/\text{kg}$  SIW给予缀合物5达2周(▲)在试验小鼠中降低了KB肿瘤大小。虚线表示最后给药日。

[0050] 图2B是一个图表,显示与未处理的对照(■)比较,以0.5  $\mu\text{mol}/\text{kg}$  缀合物5 SIW给予2周(▲)的试验小鼠的%重量变化。

[0051] 图3是一个图表,显示与未处理的对照(■)比较,用缀合物5 (▲)以0.5  $\mu\text{mol}/\text{kg}$  SIW给予2周的荷载紫杉醇耐药性KB肿瘤的小鼠减少了肿瘤大小。虚线表示最后给药日。 $n = 5$ ,缀合物5 {0、1、4}作为{部分响应、完全响应、治愈}。

[0052] 图4是一个图表,显示与未处理的对照(●)比较,用缀合物5 (■)以0.5  $\mu\text{mol}/\text{kg}$  SIW给予2周,和用EC1456 (▼)以2.0  $\mu\text{mol}/\text{kg}$  BIW给予2周的荷载铂耐药性KB肿瘤的小鼠减少了肿瘤大小。虚线表示最后给药日。 $n = 4$ ,缀合物5 {0、0、4};EC1446 {0、2、2}作为{部分响应、完全响应、治愈}。

[0053] 图5是一个图表,显示与未处理的对照(■)比较,用缀合物5 (▲)以0.3  $\mu\text{mol}/\text{kg}$  BIW给予2周的荷载ST502 TNBC PDX肿瘤的小鼠减少了肿瘤大小,而用EC1456 (●)以2.0  $\mu\text{mol}/\text{kg}$  BIW给予2周的小鼠与未处理的对照(■)比较,未减少肿瘤大小。虚线表示最后给药日。 $n = 7$ ,缀合物5 {0、0、7}作为{部分响应、完全响应、治愈}。

[0054] 图6是一个图表,显示与未处理的对照(■)比较,用缀合物5 (●)以0.5  $\mu\text{mol}/\text{kg}$  SIW给予2周的荷载ST070卵巢PDX肿瘤的小鼠减少了肿瘤大小,而用EC1456 (▲)以4.0  $\mu\text{mol}/\text{kg}$  SIW给予2周或用紫杉醇(▼)以15.0  $\text{mg}/\text{kg}$  SIW给予2周的小鼠未减少肿瘤大小。虚线表示最后给药日。 $n = 7$ ,缀合物5 {0、0、7}作为{部分响应、完全响应、治愈}。

[0055] 图7是一个图表,显示缀合物5对叶酸受体的相对结合亲和力。实验表明,缀合物5的相对结合亲和力是叶酸的 $\sim 1/1.9$ 。(■)叶酸(对照);(●)缀合物5。

[0056] 图8是一个图表,显示完整的缀合物5不能交联DNA,而还原形式(用DTT处理)释放活性PBD分子,该分子然后可以与DNA交联。(●)缀合物5加DTT;(■)无DTT的缀合物1。

[0057] 图9A是一个图表,显示与未处理的对照(●)比较,以0.1  $\mu\text{mol}/\text{kg}$  SIW给予缀合物5达2周(■)和以0.15  $\mu\text{mol}/\text{kg}$  SIW给予缀合物5达2周(▲)减少了试验大鼠的KB肿瘤大小。虚线表示最后给药日。

[0058] 图9B是一个图表,显示了以0.1  $\mu\text{mol}/\text{kg}$ 缀合物5 SIW给予2周的试验大鼠(■)和以0.15  $\mu\text{mol}/\text{kg}$ 缀合物5 SIW给予2周的试验小鼠(▲)与未处理的对照(●)比较的%重量变化。

[0059] 图10是一个图表,显示与未处理的对照(■)比较,以0.27  $\mu\text{mol}/\text{kg}$  BIW给予2周的缀合物5 (●)减少了试验小鼠的TNBC PDX肿瘤大小,而以1.0  $\mu\text{mol}/\text{kg}$  SIW给予2周的甲磺酸艾日布林(erubulin mesylate) (▲)未减少TNBC PDX肿瘤大小。

[0060] 图11是一个图表,显示与未处理的对照(■)比较,以0.27  $\mu\text{mol}/\text{kg}$  BIW给予2周的缀合物5 (●)在试验小鼠的子宫内膜PDX肿瘤大小方面产生部分响应,而以15.0  $\text{mg}/\text{kg}$  SIW给予2周的紫杉醇(▲)未产生部分响应。

[0061] 图12是一个图表,显示在用缀合物5处理的ID8-CI15卵巢癌细胞中,有效剂量依赖性抑制细胞增殖,其相对 $\text{IC}_{50}$ 值为 $\sim 0.52$  (72 h)、0.61 (96 h)和0.17 (120 h)。

[0062] 图13是一个图表,显示了在2小时暴露和9-天跟踪后,缀合物5在所有的测试浓度(1 nM、10 nM和100 nM)均显示出有效的活性。在1 nM和10 nM两个浓度下,在过量叶酸的存在下,缀合物5的抗肿瘤活性明显降低。

[0063] 图14是显示在IGROV1人卵巢癌细胞上测量功能FR水平的图表:(a) hHLA+ CD45-腹水癌细胞[FR+ = 6.04%];(b) 腹水F480+ CD11+ macs [FR+ = 52.6%];(c) IGROV细胞系对照[FR+ = 98.5%]。

[0064] 图15A是显示在小鼠卵巢细胞系ID8-CL15的IP注射后以7天间隔,在免疫活性的C57BL6小鼠的总腹膜细胞中定量的CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>T细胞的存在图表(图15A)。CD45<sup>+</sup> CD3e<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> CD4<sup>-</sup> T细胞(■)数目在植入后第7天-第42天缓慢增加。CD45<sup>+</sup> CD3e<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> CD8<sup>-</sup> T细胞(▲)数目在第7天-第35天也增加。

[0065] 图15B是一个图表,显示了来自ID8-CL15植入的小鼠的CD45<sup>-</sup>非骨髓衍生的腹水细胞表达非常少的功能FR(见图15B(■)),而腹水巨噬细胞表达大量的功能FR(见图15B(●))。

[0066] 图15C是显示腹水巨噬细胞表达大量的功能FR的图表。

[0067] 图16A是一个图表,显示了与未处理的对照(●)和以250 μg/剂量BIW给予单独的抗-CTLA-5(5个剂量)比较,以100 nmol/kg BIW给予的缀合物5(6个剂量,在第7天第一个剂量)(▲)增加了试验小鼠的存活时间,而与显著更高剂量的比较化合物EC1456(▼)2000 nmol/kg BIW(6个剂量,在第7天第一个剂量)相当。图16A还显示与所有其它试验动物相比,在第11天开始用抗-CTLA-5给予的缀合物5(○)增加试验小鼠的存活时间。虚线表示最后给药日。

[0068] 图16B是一个图表,显示与未处理的对照(●)比较,用缀合物5(▲)、缀合物5 + 抗-CTLA-5(■)、EC1456(▼)和抗-CTLA-5(○)给予的试验小鼠的%重量变化。

[0069] 图17A是一个图表,显示与以2 μmol/kg, BIW x 3给予的显著更高剂量的比较化合物EC1456(6个剂量,在第7天第一个剂量)(▼)和未处理的对照(●)比较,以0.1 μmol/kg, BIW x 3给予的缀合物5(6个剂量,在第7天第一个剂量)(○)增加试验小鼠的存活时间。

[0070] 图17B是一个图表,显示了如在1A中描述的,用缀合物5(○)、EC1456(▼)给予的试验小鼠和未处理的对照(●)的%重量变化。

[0071] 图18A是一个图表,显示了与以2 μmol/kg, D0-2 x 3给予的显著更高剂量的比较化合物EC1456, n=2只小鼠(3例因严重皮炎于第44天施行安乐死),第一个剂量在21天(▼)和未处理的对照(●)比较,以0.1 μmol/kg, D0-2 x 3给予的缀合物5, n=5只小鼠(动物表现为轻度共济失调),第一个剂量在21天(○),增加了试验小鼠的存活时间。

[0072] 图18B是一个图表,显示了如在图18A中所述,用缀合物5(○)、EC1456(▼)给予的试验小鼠和未处理的对照(●)的%重量变化。

[0073] 图19A是一个图表,显示与以2 μmol/kg, D0-2 x 2给予的显著更高剂量的比较化合物EC1456(▼)和未处理的对照(●)比较,以0.3 μmol/kg, D35, D42, SIW x 2给予的缀合物5(○)增加试验小鼠的存活时间。

[0074] 图19B是一个图表,显示了如在图19A中所述,用缀合物5(○)、EC1456(▼)给予的试验小鼠和未处理的对照(●)的%重量变化。

[0075] 图20A是一个图表,显示与以2 μmol/kg, D0-2 x 1给予的显著更高剂量的比较化合物EC1456(▼)和未处理的对照(●)比较,以0.3 μmol/kg, SIW x 2给予的缀合物5(○)增加试验小鼠的存活时间。

[0076] 图20B是一个图表,显示了如在图20A中所述,用缀合物5(○)、EC1456(▼)给予的试验小鼠和未处理的对照(●)的%重量变化。

[0077] 图21是缀合物5和EC1456针对各个阶段的荷载ID8-CL15肿瘤小鼠的比较。

- [0078] 图22A是缀合物5针对4T1-C12肿瘤细胞的体外活性的比较。
- [0079] 图22B是缀合物5针对4T1p肿瘤细胞的体外活性的比较。
- [0080] 图23是在2小时暴露和9-天跟踪后,缀合物5和EC1456针对人IGROV细胞的体外活性的比较。
- [0081] 图24A是对4T1p和4T1-C12肿瘤中的肿瘤-相关巨噬细胞的评估。
- [0082] 图24B显示在4T1p肿瘤中发现的肿瘤-相关巨噬细胞表达FR $\beta$ ,而其它非巨噬细胞髓系细胞(MDSC)为FR $\beta$ -阴性。
- [0083] 图24C显示在4T1p肿瘤中发现的肿瘤-相关巨噬细胞表达FR $\beta$ ,而其它非巨噬细胞髓系细胞(MDSC)为FR $\beta$ -阴性。
- [0084] 图25A是显示用200 nmol/kg (BIW x 2)的缀合物5治疗(A)对比未处理的对照(B)的P-1780 4T1P Balb/c小鼠肿瘤体积DOI 4/20/16 5x10<sup>5</sup>乳腺癌的图表。
- [0085] 图25B是显示如在4A中所述,用缀合物5给予的试验小鼠(A)和未处理的对照(B)的%重量变化的图表。
- [0086] 图26A是显示用200 nmol/kg (BIW x 2)的缀合物5治疗(A)对比未处理的对照(B)的P-1780 4T1P Balb/c小鼠肿瘤体积DOI 4/7/16 5x10<sup>6</sup>乳腺癌的图表。
- [0087] 图26B是显示如在5A中所述,用缀合物5给予的试验小鼠(A)和未处理的对照(B)的%重量变化的图表。
- [0088] 图27包括显示未处理的对照(●)、缀合物5(■)、缀合物5 + EC0923(▲)和EC0923(▼)处理时的凋亡CD163-CD11b-、CD163-CD11b+和CD163+CD11b+的图表。
- [0089] 示例性实施方案的详细描述

应当理解,在此描述的本发明的每个实施方案可以(在适用时)与在此描述的任何其它实施方案组合。例如,概述中的任何实施方案和/或此处描述的任何枚举条款,或其任何组合,可以与详细描述中所描述的任何实施方案组合。

[0090] 申请人已经发现了通过使用缀合物5或其药学上可接受的盐作为TAM-靶向剂靶向TAM(例如,促肿瘤M2-偏向的TAM)治疗癌症的方法。申请人已经发现,致癌原性的TAM子集表达叶酸受体 $\beta$ ,其可用于使用叶酸作为靶向剂,用缀合物5或其药学上可接受的盐靶向TAM。在一个实施方案中,靶向致癌原性的TAM以耗尽TAM或抑制TAM的活性,可导致抑制肿瘤生长、消除肿瘤或稳定疾病,并对宿主动物产生类似的治疗效果。本文描述的方法可用于治疗不表达叶酸受体的癌症,以及表达叶酸受体的癌症。

[0091] 在一个实施方案中,本文描述的肿瘤-相关巨噬细胞是促肿瘤和M2-倾向的,并且如果被耗尽或抑制,宿主动物的病况可能得到改善。这样的TAM可具有由一个或多个选自以下的标记的表达而产生的表型:CD163(+)、IL10(+)、Arg1(+)、TGF- $\beta$ (+)、VEGF(+)、CD206(+)、CD11b(+)、F480(+)、CD163(+)/CD11b(+)、F480(+)/CD11b(+),及其组合。在另一个示例说明方面,本文描述的促肿瘤和M2-倾向的肿瘤-相关巨噬细胞具有CD163(+)表型。在又一个实施方案中,本文描述的促肿瘤和M2-倾向的肿瘤-相关巨噬细胞具有CD163(+)和TGF- $\beta$ (+)表型。在另一个实施方案中,本文描述的促肿瘤和M2-倾向的肿瘤-相关巨噬细胞具有CD163(+)和CD11b(+)表型。在又一个实施方案中,本文描述的促肿瘤和M2-倾向的肿瘤-相关巨噬细胞具有F480(+)和CD11b(+)表型。在另一方面,本文描述的促肿瘤和M2-倾向的肿瘤-相关巨噬细胞具有由CD163(+)、IL10(+)、Arg1(+)、TGF- $\beta$ (+)、VEGF(+)、CD206(+)、CD11b(+)和

F480 (+) 标记的表达产生的表型。在另一个实施方案中,本文描述的促肿瘤和M2-倾向的肿瘤-相关巨噬细胞具有由一个或多个选自以下的标记的表达而产生的表型:CD163 (+)、IL10 (+)、Arg1 (+)、TGF- $\beta$  (+)、VEGF (+) 和CD206 (+)、CD11b (+) 和F480 (+)。在一个方面,肿瘤-相关巨噬细胞(例如,促肿瘤M2-偏向的TAM)在肿瘤中的存在表明对于没有本文描述的治疗的宿主动物的预后差。

[0092] 在本文描述的通过靶向TAM治疗癌症的方法的一个实施方案中,该方法包括以下步骤:鉴定肿瘤-相关巨噬细胞(例如,促肿瘤M2-偏向的TAM)在宿主动物的癌症中的存在,并给予宿主动物治疗有效量的缀合物5或其药学上可接受的盐。

[0093] 在另一个实施方案中,提供了一种通过靶向TAM(例如,促肿瘤M2-偏向的TAM)治疗癌症的方法。该方法包括给予宿主动物治疗有效量的缀合物5或其药学上可接受的盐的步骤,其中宿主动物此前已被给予叶酸成像剂缀合物和宿主动物的叶酸受体状态已被确定为阴性。

[0094] 在又一个实施方案中,提供了一种通过抑制或耗尽宿主动物中肿瘤-相关巨噬细胞(例如,促肿瘤M2-偏向的TAM)来治疗宿主动物的癌症的方法。该方法包括给予宿主动物治疗有效量的缀合物5或其药学上可接受的盐的步骤,其中肿瘤-相关巨噬细胞被抑制或耗尽。

[0095] 在另一方面,提供了一种靶向宿主动物中肿瘤-相关巨噬细胞(例如,促肿瘤M2-偏向的TAM)的方法。该方法包括给予宿主动物治疗有效量的缀合物5或其药学上可接受的盐的步骤,其中肿瘤-相关巨噬细胞被靶向。

[0096] 在又一个示例说明方面,提供了一种治疗宿主动物的癌症的方法,其中肿瘤-相关巨噬细胞在癌症中。该方法包括以下步骤:给予宿主动物治疗有效量的缀合物5或其药学上可接受的盐,和治疗具有肿瘤-相关巨噬细胞(例如,促肿瘤M2-偏向的TAM)的癌症。在另一个实施方案中,缀合物5包含结合叶酸受体- $\alpha$ 和/或叶酸受体- $\beta$ 的叶酸。

[0097] 本文所用的短语“其中肿瘤-相关巨噬细胞在癌症中”一般是指存在于癌症(例如肿瘤)的微环境中,或例如在癌组织(例如肿瘤组织)中发现的肿瘤相关巨噬细胞(例如,促肿瘤M2-偏向的TAM)。

[0098] 本文描述的方法被用来治疗需要这种治疗的患有癌症的“宿主动物”。在一个实施方案中,本文描述的方法可被用于人类临床医学和兽医应用。因此,“宿主动物”可被给予本文描述的缀合物或叶酸成像剂缀合物(下文描述),宿主动物可以是人(例如,人患者),或在兽医应用的情况下,可以是实验室动物、农业动物、家畜或野生动物。在一个方面,宿主动物可以是人、实验室动物例如啮齿动物(例如,小鼠、大鼠、仓鼠等)、兔、猴、黑猩猩、家畜(例如狗、猫和兔)、农业动物(例如牛、马、猪、绵羊、山羊)和圈养的野生动物,如熊、熊猫、狮子、老虎、豹、大象、斑马、长颈鹿、大猩猩、海豚和鲸鱼。

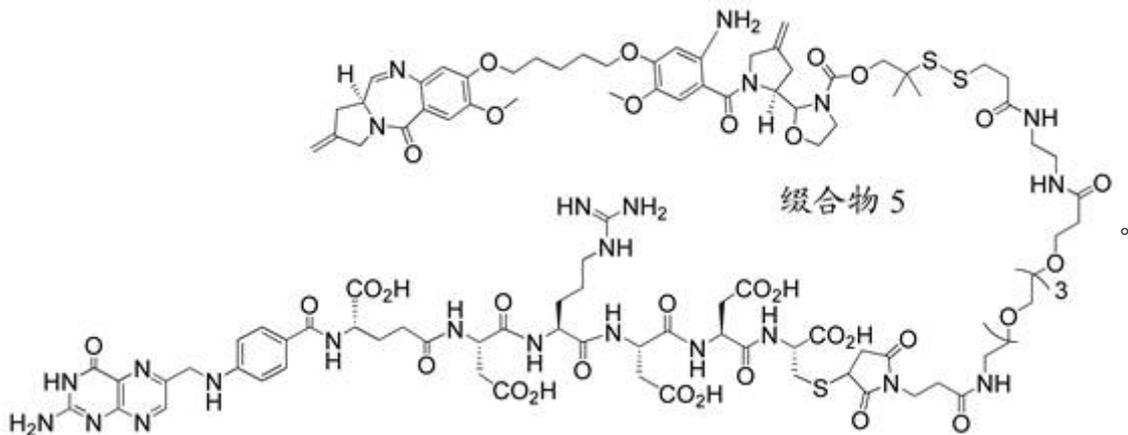
[0099] 在各个实施方案中,在此描述的癌症可以是致瘤的癌细胞群,包括良性肿瘤和恶性肿瘤,或癌症可以是非致瘤的。在另一个实施方案中,癌症可以是自发发生的,或者可以通过过程诸如宿主动物的生殖细胞中存在的突变或体细胞突变引起,或者癌症可以是化学、病毒或者辐射引起的。适用于在此描述的发明的癌症包括但不限于癌、肉瘤、淋巴瘤、黑色素瘤、间皮瘤、鼻咽癌、白血病、腺癌和骨髓瘤。

[0100] 在一些方面,癌症可以是肺癌、骨癌、胰腺癌、皮肤癌、头癌、颈癌、皮肤黑素瘤、眼

内黑素瘤、子宫癌、卵巢癌、子宫内膜癌、直肠癌、胃癌、结肠癌、乳腺癌、三阴性乳腺癌、输卵管癌、子宫内膜癌、宫颈癌、霍奇金氏病、食道癌、小肠癌、内分泌系统癌、甲状腺癌、甲状旁腺癌、非小细胞肺癌、肾上腺癌、软组织肉瘤、尿道癌、前列腺癌、白血病、淋巴瘤、胸膜间皮瘤、膀胱癌、伯基特氏淋巴瘤、输尿管癌、肾癌、中枢神经系统肿瘤、脑癌、垂体腺瘤或胃食管交界腺癌。

[0101] 在一些方面,癌症可选自非小细胞肺癌、间变性甲状腺癌、胰管腺癌、头颈部癌、表皮生长因子受体阴性乳腺癌、间皮瘤、成人经典霍奇金氏淋巴瘤、葡萄膜黑素瘤、成胶质细胞瘤、肾癌、平滑肌肉瘤和色素沉着绒毛结节性滑膜炎。具有肿瘤-相关巨噬细胞(例如,促肿瘤M2-偏向的TAM)的任何癌症可根据本发明治疗。

[0102] 应该理解,在此描述的缀合物5是具有下式的化合物:



[0103] 也可使用缀合物5的药学上可接受的盐。

[0104] 本发明的另外的示例性和非限制性的实施方案在以下列举的条款中描述。以下条款的所有组合都被理解为在此描述的发明的另外实施方案。

[0105] 1. 一种治疗叶酸受体阴性癌症的方法,该方法包括给予宿主动物治疗有效量的缀合物5或其药学上可接受的盐,其中肿瘤-相关巨噬细胞被抑制或耗尽。

[0106] 2. 一种治疗叶酸受体阴性癌症的方法,该方法包括给予宿主动物治疗有效量的缀合物5或其药学上可接受的盐,以耗尽肿瘤-相关巨噬细胞。

[0107] 3. 一种治疗叶酸受体阴性癌症的方法,该方法包括给予宿主动物治疗有效量的缀合物5或其药学上可接受的盐,和治疗具有肿瘤-相关巨噬细胞的叶酸受体阴性癌症。

[0108] 4. 一种治疗宿主动物的叶酸受体阴性癌症的方法,该方法包括给予宿主动物治疗有效量的缀合物5或其药学上可接受的盐,以靶向肿瘤相关巨噬细胞。

[0109] 5. 一种治疗癌症的方法,其包括以下步骤:鉴定肿瘤-相关巨噬细胞在宿主动物的癌症中的存在,并给予宿主动物治疗有效量的缀合物5或其药学上可接受的盐。

[0110] 6. 一种治疗宿主动物的癌症的方法,该方法包括给予宿主动物治疗有效量的缀合物5或其药学上可接受的盐的步骤,以抑制或耗尽宿主动物中的肿瘤-相关巨噬细胞。

[0111] 7. 一种靶向宿主动物的肿瘤-相关巨噬细胞的方法,该方法包括给予宿主动物治疗有效量的缀合物5或其药学上可接受的盐的步骤,以靶向肿瘤-相关巨噬细胞。

[0112] 8. 一种治疗宿主动物的癌症的方法,其中肿瘤-相关巨噬细胞在癌症中和/或形成组织或肿瘤的一部分,该方法包括以下步骤:给予宿主动物治疗有效量的缀合物5或其药

学上可接受的盐,和治疗具有肿瘤-相关巨噬细胞的癌症。

[0113] 9. 条款1-8的任一项的方法,其中肿瘤相关巨噬细胞在癌症中和肿瘤-相关巨噬细胞具有促肿瘤M2-偏向的CD163(+)表型。

[0114] 10. 条款1-8的任一项的方法,其中肿瘤-相关巨噬细胞在癌症中和肿瘤-相关巨噬细胞具有促肿瘤M2-偏向的CD163(+)和TGF- $\beta$ (+)表型。

[0115] 11. 条款1-8的任一项的方法,其中肿瘤-相关巨噬细胞在癌症中和肿瘤-相关巨噬细胞具有促肿瘤M2-偏向的CD11b(+)表型。

[0116] 12. 条款1-8的任一项的方法,其中肿瘤-相关巨噬细胞在癌症中和肿瘤-相关巨噬细胞具有促肿瘤M2-偏向的CD163(+)和CD11b(+)表型。

[0117] 13. 条款1-8的任一项的方法,其中肿瘤-相关巨噬细胞在癌症中和肿瘤-相关巨噬细胞具有促肿瘤M2-偏向的F480(+)表型。

[0118] 14. 条款1-8的任一项的方法,其中肿瘤-相关巨噬细胞在癌症中和肿瘤-相关巨噬细胞具有促肿瘤M2-偏向的F480(+)和CD11b(+)表型。

[0119] 15. 条款1-8的任一项的方法,其中肿瘤-相关巨噬细胞在癌症中和肿瘤-相关巨噬细胞是促肿瘤M2-偏向的并表达一个或多个选自以下的标记:CD163(+)、IL10(+)、Arg1(+)、TGF- $\beta$ (+)、VEGF(+)、CD206(+)、CD11b(+)和F480(+)表型。

[0120] 16. 条款1-8的任一项的方法,其中肿瘤-相关巨噬细胞在癌症中和/或形成组织或肿瘤的一部分和肿瘤-相关巨噬细胞是促肿瘤M2-偏向的并表达一个或多个选自以下的标记:CD163(+)、IL10(+)、Arg1(+)、TGF- $\beta$ (+)、VEGF(+)、CD206(+)、CD11b(+)和F480(+)表型。

[0121] 17. 条款1-16的任一项的方法,其中癌症选自非小细胞肺癌、间变性甲状腺癌、胰管腺癌、头颈部癌、表皮生长因子受体阴性乳腺癌、间皮瘤、成人经典霍奇金氏淋巴瘤、葡萄膜黑色素瘤、成胶质细胞瘤、肾癌、平滑肌肉瘤和色素沉着绒毛结节性滑膜炎。

[0122] 18. 条款1-17的任一项的方法,其中缀合物5或其药学上可接受的盐,能够耗尽或耗尽宿主动物中的肿瘤-相关巨噬细胞。

[0123] 19. 条款1-18的任一项的方法,其中缀合物5或其药学上可接受的盐,能够抑制或抑制宿主动物中的肿瘤-相关巨噬细胞的活性。

[0124] 20. 条款1-19的任一项的方法,其中缀合物5或其药学上可接受的盐,以胃肠外剂型给予宿主动物。

[0125] 21. 条款20的方法,其中胃肠外剂型选自皮内、皮下、肌肉内、腹膜内、静脉内和鞘内剂型。

[0126] 22. 条款1-21的任一项的方法,其中治疗有效量是从约0.05  $\mu\text{mol}/\text{kg}$ 至约6.0  $\mu\text{mol}/\text{kg}$ 宿主动物体重。

[0127] 23. 条款1-22的任一项的方法,其中治疗有效量是从约0.05  $\mu\text{mol}/\text{kg}$ 至约4.0  $\mu\text{mol}/\text{kg}$ 宿主动物体重。

[0128] 24. 条款1-23的任一项的方法,其中治疗有效量是从约0.05  $\mu\text{mol}/\text{kg}$ 至约2.0  $\mu\text{mol}/\text{kg}$ 宿主动物体重。

[0129] 25. 条款1-24的任一项的方法,其中治疗有效量是从约0.05  $\mu\text{mol}/\text{kg}$ 至约1.0  $\mu\text{mol}/\text{kg}$ 宿主动物体重。

[0130] 26. 条款1-8的任一项的方法,其中肿瘤-相关巨噬细胞在癌症中和肿瘤-相关巨噬细胞具有促肿瘤M2-偏向的CD163(+)、IL10(+)、Arg1(+)、TGF- $\beta$ (+)、VEGF(+)、CD206(+)、CD11b(+)和F480(+)表型。

[0131] 缀合物5或其药学上可接受的盐的剂量,根据宿主动物的病症,正在治疗的癌症,缀合物5或其药学上可接受的盐的给药途径,和组织分布,以及其它治疗方法(如放射疗法或联合疗法中的其它药物)共同使用的可能性,可能会有很大的差异。要给予宿主动物的治疗有效量基于宿主动物的体表面积、质量和医生的病情评估。治疗有效量的范围可以是例如从约0.05 mg/kg宿主动物体重至约30.0 mg/kg宿主动物体重,或从约0.01 mg/kg宿主动物体重至约5.0 mg/kg宿主动物体重,包括但不限于0.01 mg/kg、0.02 mg/kg、0.03 mg/kg、0.04 mg/kg、0.05 mg/kg、0.1 mg/kg、0.2 mg/kg、0.3 mg/kg、0.4 mg/kg、0.5 mg/kg、1.0 mg/kg、1.5 mg/kg、2.0 mg/kg、2.5 mg/kg、3.0 mg/kg、3.5 mg/kg、4.0 mg/kg、4.5 mg/kg和5.0 mg/kg,其全部为kg宿主动物体重。缀合物5或其药学上可接受的盐的总治疗有效量,可以单剂量或分剂量给予,并可由医生考虑,在本文给出的典型范围之外。

[0132] 在另一个实施方案中,缀合物5或其药学上可接受的盐,可以以下治疗有效量给予:从约0.5  $\mu\text{g}/\text{m}^2$ 至约500  $\text{mg}/\text{m}^2$ ,从约0.5  $\mu\text{g}/\text{m}^2$ 至约300  $\text{mg}/\text{m}^2$ ,或从约100  $\mu\text{g}/\text{m}^2$ 至约200  $\text{mg}/\text{m}^2$ 。在其它实施方案中,所述量可以是:从约0.5  $\text{mg}/\text{m}^2$ 至约500  $\text{mg}/\text{m}^2$ ,从约0.5  $\text{mg}/\text{m}^2$ 至约300  $\text{mg}/\text{m}^2$ ,从约0.5  $\text{mg}/\text{m}^2$ 至约200  $\text{mg}/\text{m}^2$ ,从约0.5  $\text{mg}/\text{m}^2$ 至约100  $\text{mg}/\text{m}^2$ ,从约0.5  $\text{mg}/\text{m}^2$ 至约50  $\text{mg}/\text{m}^2$ ,从约0.5  $\text{mg}/\text{m}^2$ 至约600  $\text{mg}/\text{m}^2$ ,从约0.5  $\text{mg}/\text{m}^2$ 至约6.0  $\text{mg}/\text{m}^2$ ,从约0.5  $\text{mg}/\text{m}^2$ 至约4.0  $\text{mg}/\text{m}^2$ ,或从约0.5  $\text{mg}/\text{m}^2$ 至约2.0  $\text{mg}/\text{m}^2$ 。总量可以单剂量或分剂量给予,并可由医生考虑,在本文给出的典型范围之外。这些量是以 $\text{m}^2$ 宿主动物表面积为基础的。

[0133] 在另一个实施方案中,缀合物5或其药学上可接受的盐,可以以下治疗有效量给予:从约0.05  $\mu\text{mol}/\text{kg}$ 至约6.0  $\mu\text{mol}/\text{kg}$ ,从约0.05  $\mu\text{mol}/\text{kg}$ 至约5.0  $\mu\text{mol}/\text{kg}$ ,从约0.05  $\mu\text{mol}/\text{kg}$ 至约4.0  $\mu\text{mol}/\text{kg}$ ,从约0.05  $\mu\text{mol}/\text{kg}$ 至约3.0  $\mu\text{mol}/\text{kg}$ ,从约0.05  $\mu\text{mol}/\text{kg}$ 至约2.0  $\mu\text{mol}/\text{kg}$ ,从约0.05  $\mu\text{mol}/\text{kg}$ 至约1.0  $\mu\text{mol}/\text{kg}$ ,从约0.05  $\mu\text{mol}/\text{kg}$ 至约0.5  $\mu\text{mol}/\text{kg}$ ,从约0.05  $\mu\text{mol}/\text{kg}$ 至约0.4  $\mu\text{mol}/\text{kg}$ ,从约0.05  $\mu\text{mol}/\text{kg}$ 至约0.3  $\mu\text{mol}/\text{kg}$ ,从约0.05  $\mu\text{mol}/\text{kg}$ 至约0.2  $\mu\text{mol}/\text{kg}$ ,或从约0.05  $\mu\text{mol}/\text{kg}$ 至约0.1  $\mu\text{mol}/\text{kg}$ 。缀合物5或其药学上可接受的盐的总治疗有效量,可以单剂量或分剂量给予,并可由医生考虑,在本文给出的典型范围之外。在每种情况下,这些量是“kg”宿主动物体重。

[0134] 任何给予缀合物5或其药学上可接受的盐的有效方案都可以使用。例如,缀合物5或其药学上可接受的盐,可作为单剂量给予,或它可被分开并作为多-剂量每日方案给予。此外,交错方案,例如,每周一至三天可以作为每日治疗的替代方案使用,这种间歇性或交错的每日方案被认为等同于每天的治疗,并且在本公开内容的范围内。在一个实施方案中,宿主动物用缀合物5或其药学上可接受的盐的多次注射来治疗。在一个实施方案中,宿主动物例如,可用缀合物5或其药学上可接受的盐多次注射,例如,以12-72小时间隔或以48-72小时间隔。缀合物5或其药学上可接受的盐的额外注射,可在初次注射后间隔数天或数月给予宿主动物,和额外注射防止疾病复发。

[0135] 在另一个实施方案中,缀合物5或其药学上可接受的盐,可给予宿主动物,例如,至少1小时、至少4小时、至少6小时、至少8小时、至少10小时、至少12小时,或至少24小时,或可每日或每周给予,例如一天一次,一天两次,一天三次,每天,每隔一天,每周两次,每周3次,

或可采用任何其它合适的方案。

[0136] 在一个实施方案中,连接于叶酸的成像剂可用于确定叶酸受体的状态和/或癌症是否表达叶酸受体和/或识别与癌症相关的TAM的存在。示例性叶酸-连接的成像剂描述于美国专利号7,128,893和9,731,035中,通过引用并入本文。

[0137] 如本文所用的,术语“肿瘤相关巨噬细胞”(TAM)通常指存在于癌症(例如肿瘤)的微环境中并具有一个或多个与TAM一致的标记的巨噬细胞。

[0138] 如本文所用的,术语“抑制肿瘤相关巨噬细胞”通常指减少TAM的活性或消除TAM的活性,例如通过减少或消除TAM刺激肿瘤组织中血管生成的能力。

[0139] 如本文所用的,术语“耗尽肿瘤相关巨噬细胞”通常指减少TAM的数量,消除TAM,或使TAM再极化,包括使TAM从M2变为M1表型。

[0140] 如本文所用的,与TAM有关的术语“促肿瘤”通常指例如通过抑制B和/或T细胞活化、抑制肿瘤相关抗原呈递、抑制细胞毒性颗粒释放和/或增加血管生成来促进肿瘤发生的TAM。

[0141] 如本文所用的,术语“M2-偏向的”通常指作为促肿瘤TAM的TAM,其可包括为M1并可从M1变为M2表型的TAM。

[0142] 如本文所用的,术语“组合物”通常指任何包含一种以上成分的产品。应该理解,本文描述的组合物可以由本文所述的分离的缀合物5或从本文所述的缀合物5的盐、溶液、水合物、溶剂合物和其它形式制备。要认识到,在缀合物5的各种物理形式中,某些官能团,如羟基、氨基等基团,可与水和/或各种溶剂形成复合物。还应该理解,组合物可由本文所述的各种无定形、非无定形、部分晶体、晶体和/或其它形态形式的缀合物5或其药学上可接受的盐制备。还应该理解,组合物可由本文描述的缀合物5或其药学上可接受的盐的各种水合物和/或溶剂合物制备。因此,列举本文描述的缀合物5或其药学上可接受的盐的此类药物组合物,应被理解为包括在此描述的缀合物5或其药学上可接受的盐的各种形态形式和/或溶剂合物或水合物形式的每一种或任何组合。

[0143] 如本文所用的,术语“治疗有效量”指在受试者(即组织系统、动物或人)中引起生物学或医学反应的缀合物5或其药学上可接受的盐的量,所述反应是研究者、兽医、医生或其它临床医师所寻求的,其包括,但不限于缓解所治疗的疾病或病症的症状。在一个方面,治疗有效量是指可以适用于任何医学治疗的合理利益/风险比治疗或减轻疾病或疾病症状的活性剂的量。在另一方面,治疗有效量是指缀合物5的无活性前体药物的量,其在通过正常代谢过程转化以产生一定量的活性缀合物5或其药学上可接受的盐时,能够在受试者中引起所寻求的生物学或医学反应。

[0144] 还应该意识到,缀合物5或其药学上可接受的盐的剂量,无论涉及单一治疗还是联合疗法,根据在给予本文描述的缀合物5或其药学上可接受的盐的过程中可能出现的任何毒性或其它不良副作用而有利地进行选择。此外,应意识到,本文描述的共同疗法可能允许给予较低剂量的缀合物5或其药学上可接受的盐(其显示这样的毒性或其它不良副作用),其中这些较低剂量低于毒性阈值,或在治疗窗口中低于在没有共同疗法的情况下否则将给予的剂量。

[0145] 如本文所用的,“给予”包括向宿主动物引入本文描述的缀合物5或其药学上可接受的盐的所有手段,包括但不限于口服(po)、静脉内(iv)、肌肉内(im)、皮下(sc)、经皮、吸

入、含服、眼、舌下、阴道、直肠等。本文描述的缀合物和组合物可以单位剂型和/或含有常规无毒的药学上可接受的载体、辅助剂和/或媒介的制剂给予。

[0146] 如本文所用的“药物组合物”或“组合物”指本文描述的缀合物5或其药学上可接受的盐、溶剂合物、水合物与其它化学成分,例如药学上可接受的赋形剂的混合物。药物组合物的目的是促进给予宿主动物缀合物。适于递送本文描述的缀合物5或其药学上可接受的盐的药物组合物,以及它们的制备方法对于本领域技术人员来说将是显而易见的。这样的组合物和它们的制备方法可例如在Remington's Pharmaceutical Sciences, 第19版(Mack Publishing Company, 1995)中发现。

[0147] “药学上可接受的赋形剂”指加入到药物组合物中惰性物质,以进一步促进缀合物5或其药学上可接受的盐的给予,例如稀释剂或载体。

[0148] 本文描述的缀合物5或其药学上可接受的盐可用于治疗癌症,例如癌、肉瘤、淋巴瘤、霍奇金氏病、黑素瘤、间皮瘤、伯基特氏淋巴瘤、鼻咽癌、白血病和骨髓瘤;包括对治疗方式(如治疗剂)有耐药性的相关癌症。耐药性癌症包括,但不限于紫杉醇耐药性癌症和铂耐药性癌症,例如对铂药物(例如顺铂、卡铂、奥沙利铂、奈达铂等)有耐药性的那些癌症。癌细胞群可包括,但不限于口腔、甲状腺、内分泌、皮肤、胃、食管、喉、胰腺、结肠、膀胱、骨、卵巢、宫颈、子宫、乳房、睾丸、前列腺、直肠、肾、肝、胃和肺癌。在一些实施方案中,癌细胞群产生癌症,例如肺癌、骨癌、胰腺癌、皮肤癌、头颈部癌、皮肤或眼内黑素瘤、卵巢癌、直肠癌、肛门区癌、胃癌、结肠癌、乳腺癌、三阴性乳腺癌、子宫癌、输卵管癌、子宫内膜癌、子宫颈癌、阴道癌、外阴癌、霍奇金氏病、食道癌、小肠癌、内分泌系统癌、甲状腺癌、甲状旁腺癌、肾上腺癌、软组织肉瘤、尿道癌、阴茎癌、前列腺癌、慢性或急性白血病、淋巴细胞淋巴瘤、膀胱癌、肾癌或输尿管癌、肾细胞癌、肾盂癌、中枢神经系统(CNS)肿瘤、原发性CNS淋巴瘤、脊柱轴瘤、脑干胶质瘤和垂体腺瘤。

[0149] 本文描述的缀合物5或其药学上可接受的盐或组合物可口服给予。口服给予可涉及吞咽,以使缀合物5或其药学上可接受的盐或组合物进入胃肠道,或者可采用含服或舌下给药,借此使缀合物5或其药学上可接受的盐或组合物直接从口腔进入血流。

[0150] 适用于口服给药的制剂包括固体制剂,例如片剂;含有颗粒、液体或粉末的胶囊剂;锭剂(包括液体填充的);咀嚼片;多颗粒和纳米颗粒;凝胶;固溶体;脂质体;薄膜;胚珠剂(ovules);喷雾剂和液体制剂。

[0151] 液体制剂包括悬浮液、溶液、糖浆和酏剂。这样的制剂可用作软或硬胶囊中的填料,并且通常包括载体,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/或悬浮剂。液体制剂也可以通过例如来自袋中的固体的重新构成来制备。

[0152] 本文描述的缀合物5或其药学上可接受的盐也可用于快速溶解、快速崩解的剂型,如由Liang和Chen (2001)在Expert Opinion in Therapeutic Patents, 11 (6), 981-986中所描述的那些。对于片剂剂型,取决于剂量,缀合物5或其药学上可接受的盐,可占剂型的1重量%-80重量%,更通常占剂型的5重量%-6重量%。除了本文描述的缀合物5或其药学上可接受的盐和组合物外,片剂通常含有崩解剂。崩解剂的实例包括淀粉乙醇酸钠、羧甲基纤维素钠、羧甲基纤维素钙、交联羧甲基纤维素钠、交聚维酮、聚乙烯吡咯烷酮、甲基纤维素、微晶纤维素、低级烷基-取代的羟丙基纤维素、淀粉、预胶化淀粉和藻酸钠。一般来说,崩解剂将占剂型的1重量%-25重量%,优选5重量%-20重量%。

[0153] 粘合剂通常用来赋予片剂制剂粘合性。合适的粘合剂包括微晶纤维素、明胶、糖、聚乙二醇、天然和合成树胶、聚乙烯吡咯烷酮、预胶化淀粉、羟丙基纤维素和羟丙基甲基纤维素。片剂也可含有稀释剂,如乳糖(一水合物、喷雾干燥的一水合物、无水乳糖等)、甘露醇、木糖醇、葡萄糖、蔗糖、山梨醇、微晶纤维素、淀粉和磷酸氢钙二水合物。

[0154] 片剂还可任选地包含表面活性剂,例如月桂基硫酸钠和聚山梨醇酯80,和助流剂如二氧化硅和滑石。当存在时,表面活性剂可占片剂的0.2重量%-5重量%,和助流剂可占片剂的0.2重量%-1重量%。

[0155] 片剂还通常含有润滑剂如硬脂酸镁、硬脂酸钙、硬脂酸锌、硬脂酰富马酸钠和硬脂酸镁与月桂基硫酸钠的混合物。润滑剂一般占片剂的0.25重量%-10重量%,优选0.5重量%-3重量%。

[0156] 其它可能的成分包括抗氧化剂、着色剂、调味剂、防腐剂和味觉掩蔽剂。示例性片剂含有至多约80%的药物,从约10重量%到约90重量%的粘合剂,从约0重量%到约85重量%的稀释剂,从约2重量%到约10重量%的崩解剂,和从约0.25重量%到约10重量%的润滑剂。

[0157] 片剂共混物可直接或者通过滚筒压制成片。片剂共混物或共混物的部分可选地可以是湿的,干的,或熔体-颗粒化的,熔体凝固的,或在制片前挤出的。最终制剂可包含一或多层并可被包衣或不包衣,甚至它可以被包封。片剂的配制在Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets, 第1卷,H. Lieberman和L. Lachman (Marcel Dekker, New York, 1980)中进行了讨论。

[0158] 用于人或兽医用途的可消耗口腔膜通常是柔韧的水溶性或水可溶胀的薄膜剂型,其可以是快速溶解或粘膜粘附的,并且通常包含如在此描述的缀合物5或其药学上可接受的盐、成膜聚合物、粘合剂、溶剂、保湿剂、增塑剂、稳定剂或乳化剂、粘度调节剂和溶剂。该制剂的某些成分可执行多于一种功能。

[0159] 用于口服给药的固体制剂可被配制为立即释放和/或改进释放制剂。改进释放制剂包括延迟释放、持续释放、脉冲释放、控制释放、靶向释放和程序释放。

[0160] 因此本文描述的缀合物5或其药学上可接受的盐,可配制成固体、半固体或触变液体(用于作为植入贮库给予,提供活性化合物的改进释放)。这样的制剂的例子包括药物-涂层支架和聚(乳酸-乙醇酸共聚物)(PGLA)微球。用于本公开目的的其它合适的改进释放制剂描述于美国专利号6,106,864中。其它合适的释放技术的细节,如高能分散体和渗透和包衣颗粒,可在Pharmaceutical Technology On-line, 25(2), 1-14, Verma et al (2001)中找到。使用口香糖实现控释的情况在WO 00/35298中描述。

[0161] 本文描述的缀合物5或其药学上可接受的盐,也可以直接给予至血流、肌肉或内部器官。适宜的胃肠外给药方式包括静脉内、动脉内、腹膜内、鞘内、心室内、尿道内、胸骨内、颅内、肌肉内和皮下。

[0162] 适合于胃肠外给药的装置包括针式(包括微针)注射器、无针注射器和输液技术。胃肠外制剂通常是水性溶液,其可含有赋形剂,如盐、碳水化合物和缓冲剂(优选pH值在3至9之间),但对于某些应用,它们可能更适合配制成无菌的非水溶液或干燥的形式(与合适的媒介例如无菌、无热原的水一起使用)。

[0163] 在无菌条件下制备胃肠外制剂,例如通过冻干,可容易地使用本领域技术人员熟知的标准制药技术来完成。本文描述的用于制备胃肠外溶液的缀合物5或其药学上可接受

的盐的溶解度可以通过使用适当的制剂技术来增加,例如掺入溶解度增强剂。

[0164] 本文描述的缀合物5或其药学上可接受的盐,也可以局部给予皮肤或粘膜,即皮肤或经皮。用于此目的的典型制剂包括凝胶、水凝胶、洗液、溶液、霜剂、软膏、粉尘剂、敷料、泡沫、薄膜、皮肤贴片、糯米纸、植入物、海绵、纤维、绷带和微乳剂。也可以使用脂质体。典型的载体包括醇、水、矿物油、液体矿脂、白矿脂、甘油、聚乙二醇和丙二醇。可以加入渗透促进剂-见例如, *J. Pharm Sci*, 88 (10), 955-958, Finnin和Morgan (1999年10月)。其它局部给药方式包括通过电穿孔、离子电渗疗法、超声透入疗法、超音波导入和微针或无针(例如 Powderject™, Bioject™ 等)注射递送。

[0165] 用于局部给药的制剂可被配制为立即释放和/或改进释放制剂。改进释放制剂包括延迟释放、持续释放、脉冲释放、控制释放、靶向释放和程序释放。本文描述的缀合物5或其药学上可接受的盐,还可以鼻内给药或通过吸入给药,其通常从干粉吸入器以干粉形式(单独,作为混合物,例如与乳糖的干燥共混物,或者作为混合组分颗粒,例如与磷脂例如磷脂酰胆碱混合)或从加压容器、泵、喷射器、雾化器(优选使用电流体动力学产生细水雾的雾化器)或喷雾器作为气溶胶喷雾剂,使用或不使用合适的推进剂,例如1,1,1,2-四氟乙烷或1,1,1,2,3,3,3-七氟丙烷。对于鼻内使用,粉末可以包含生物粘合剂,例如壳聚糖或环糊精。加压容器、泵、喷射器、雾化器或喷雾器包含本公开内容的缀合物5或其药学上可接受的盐的溶液或悬浮液,其包含例如乙醇、含水乙醇或用于分散、增溶或延长释放活性物质的合适的替代试剂、作为溶剂的推进剂和任意的表面活性剂,例如脱水山梨醇三油酸酯、油酸或低聚乳酸。在以干粉或悬浮制剂使用之前,可将缀合物5或其药学上可接受的盐微粉化至适于通过吸入(通常小于5微米)递送的大小。这可以通过任何适当的粉碎方法来实现,例如螺旋喷射研磨、流化床喷射研磨、超临界流体处理以形成纳米颗粒、高压均化或喷雾干燥。用于吸入器或吹入器的胶囊(例如由明胶或羟丙基甲基纤维素制成)、泡罩和药筒可被配制成含有本文描述的缀合物5或其药学上可接受的盐的粉末混合物,合适的粉末基质例如乳糖或淀粉以及性能调节剂例如异亮氨酸、甘露醇或硬脂酸镁。

[0166] 乳糖可以是无水的,或者是一水合物的形式,优选为后者。其它合适的赋形剂包括葡聚糖、葡萄糖、麦芽糖、山梨醇、木糖醇、果糖、蔗糖和海藻糖。典型的制剂可包含本公开内容的缀合物5或其药学上可接受的盐、丙二醇、无菌水、乙醇或氯化钠。可用于替代丙二醇的替代溶剂包括甘油和聚乙二醇。

[0167] 本文描述的缀合物5或其药学上可接受的盐,可与可溶性大分子实体,例如环糊精及其合适的衍生物或含聚乙二醇的聚合物组合,以改进它们在上述任何一种给药方式中使用的溶解度、溶出率、味道掩蔽、生物利用度和/或稳定性。

[0168] 应该理解,在本文公开的每一个实例中,对任何变量的整数范围的列举描述了所列举的范围、该范围内的每个成员,以及该变量的每一个可能的子范围。例如,n是从0到8的整数的列举,描述了该范围,0、1、2、3、4、5、6、7和8各个和可选择的值,例如n是0,或n是1,或n是2等。此外,n是从0到8的整数的列举也描述每一个和所有子范围,其中的每一个可为进一步的实施方案的基础,例如n是从1到8,从1到7,从1到6,从2到8,从2到7,从1到3,从2到4等的整数。

[0169] 应当意识到,本文描述的缀合物5或其药学上可接受的盐,可以非溶剂化形式以及溶剂化形式,包括水化形式存在。通常,溶剂化形式等同于非溶剂化形式,并且包含在本发

明的范围内。

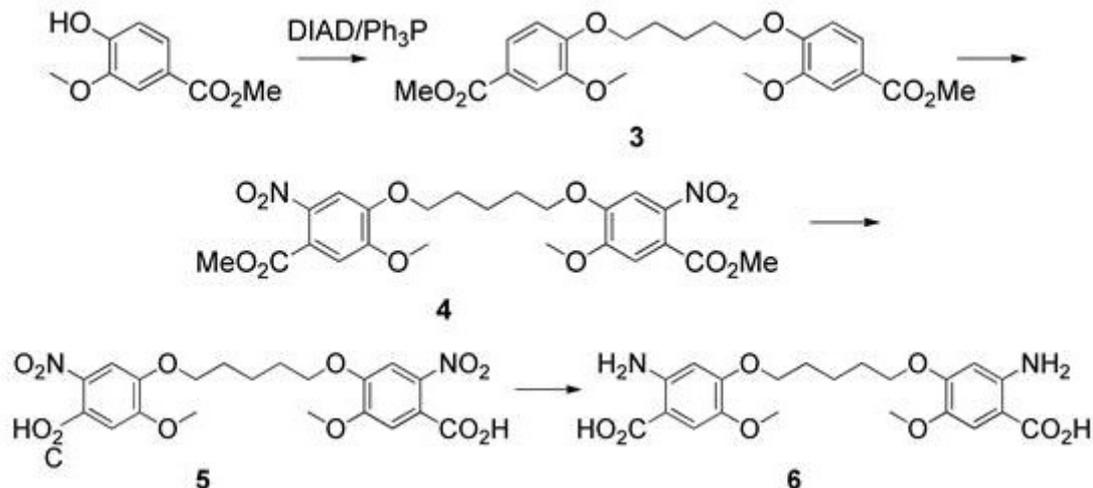
[0170] 在另一个实施方案中,用于给予缀合物5或其药学上可接受的盐的组合物和/或剂型,从具有至少约90%,或约95%,或约96%,或约97%,或约98%,或约99%,或约99.5%纯度的缀合物5或其药学上可接受的盐制备。在另一个实施方案中,用于给予缀合物5或其药学上可接受的盐的组合物和/或剂型,从具有至少90%,或至少95%,或至少96%,或至少97%,或至少98%,或至少99%,或至少99.5%纯度的缀合物5或其药学上可接受的盐制备。

## 实施例

### [0171] 化学实施例

应该理解,本文描述的缀合物和化合物根据本文描述的方法和/或常规方法制备。举例说明,本文描述的缀合物的立体中心可以在任何不对称碳原子上为基本上纯的(S),基本上纯的(R),或(S)和(R)的任何混合物,每个都可以在本文描述的方法中使用。同样,这些说明性实施例中描述的方法可以通过对本文描述的方法进行更改,并常规选择替代的起始材料和试剂,而适合于制备本文描述的其它缀合物。

### [0172] 实施例1:化合物6的制备



#### 步骤1:化合物3的制备

将香草酸甲酯(2.18g, 11.98 mmol)和 $\text{Ph}_3\text{P}$ (4.71 g, 17.97 mmol)在THF(20 mL)中冷却至 $0^\circ\text{C}$ ,向其中滴加入DIAD(2.59 mL, 13.18 mmol)。于 $0^\circ\text{C}$ 搅拌反应物1 hr。经30 min加入在THF(20 mL)中的1,5-戊二醇(0.6 mL, 5.75 mmol)。将反应物搅拌过夜,形成沉淀并用过滤收集。浓缩滤液以形成更多固体。合并固体并用MeOH(5 mL)研磨,得到清洁产物化合物3 1.74 g,得率为70%。 $^1\text{H}$  NMR(CDCl<sub>3</sub>,  $\delta$  in ppm): 7.66(m, 2H), 7.62(m, 2H), 6.87(m, 2H), 4.10(m, 4H), 3.89(m, 12H), 1.95(m, 4H), 1.69(m, 2H)。 $^{13}\text{C}$  NMR: 166.88, 152.50, 148.86, 132.12, 132.04, 131.88, 128.52, 128.42, 123.50, 122.55, 112.35, 111.46, 68.67, 56.03, 51.93, 28.73, 22.52, 21.92。

#### [0173] 步骤2:化合物4的制备

将化合物3(201.2 mg, 0.465 mmol)在 $\text{Ac}_2\text{O}$ (1.2 mL)中冷却至 $0^\circ\text{C}$ ,然后缓慢加入 $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (280.3 mg, 1.16 mmol),1 hr后,移去冰浴。于室温下搅拌反应物4小时。将反应物倒入冰水中并搅拌1小时,直至形成黄色沉淀,用过滤收集。用更多的冷水(2 mL, 3

x) 洗涤固体并风干。获得198.4 mg化合物4,得率为82%。LCMS:  $[M+NH_4]^{++}$   $m/z = 540$ 。

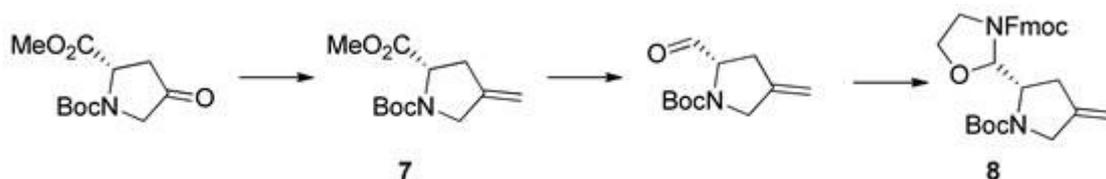
#### [0174] 步骤3:化合物5的制备

使化合物4 (198.4 mg)溶于THF (2 mL)并用aq. NaOH (2 mL, 1 M)处理,加热至40°C 3小时。真空除去溶剂。用浓HCl将水相酸化至pH 1以形成沉淀,其通过过滤收集并用H<sub>2</sub>O (1 mL, 3 x)洗涤。风干固体,以定量得率得到酸性187.7 mg化合物5。LCMS:  $[M+NH_4]^+$   $m/z = 512$ 。

#### [0175] 步骤4:化合物6的制备

使酸性化合物5溶于0.5 M aq. NaOH (6 mL)并在H<sub>2</sub> (45 PSI)下在加氢parr反应器中用Pd/C (10%, 4.82 mg)进行加氢。振摇反应物5小时,通过硅藻土垫过滤,用浓HCl将滤液调节至pH 2-3同时搅拌。形成的沉淀通过过滤分离并用H<sub>2</sub>O (1 mL, 3 x)洗涤。在有P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>存在的干燥器中,在高真空下干燥固体过夜。获得为棕色固体的34.2 mg化合物6,得率为81%。LCMS:  $[M-H]^-$   $m/z = 433$ 。

#### [0176] 实施例2:化合物8的制备



#### 步骤1:化合物7的制备

通过Wittig反应,将4-氧代吡咯烷-1,2-二甲酸(S)-1-叔丁基酯2-甲基酯转化为化合物7:于0°C通过逐滴加入,用KO<sup>t</sup>Bu (1 M,在THF中, 2.57 μL, 2.57 mmol)处理在THF (30 mL)中的Ph<sub>3</sub>PCH<sub>3</sub>Br (917.8 mg, 2.57 mmol)。将反应物保持于室温2小时。于0-10°C,在搅拌的溶液中加入在THF (20 mL)中的甲酮(250 mg, 1.028 mmol)。然后于室温下搅拌反应过夜。在真空除去大部分的THF后,用H<sub>2</sub>O/EtOAc (1:1, 40 mL)猝灭反应。用EtOAc (20 mL, 3 x)萃取水相并用H<sub>2</sub>O接着盐水洗涤有机相,经无水Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥并浓缩。残留物用CombiFlash在0-50% EtOAc/p-醚中纯化,得到化合物7 77.2 mg,得率为31%。LCMS:  $[M-Boc+H]^+$   $m/z = 142$ 。

#### [0177] 步骤2:醛中间体的制备

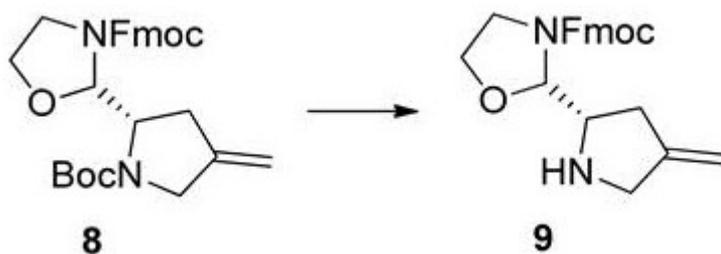
于-78°C、氩气下,滴加入Dibal (1 M在甲苯中, 2 eq, 2.92 mmol)处理在DCM/甲苯 (1:3, 9.8 mL)中的4-亚甲基吡咯烷-1,2-二甲酸(S)-1-叔丁基酯2-甲基酯(353.2 mg, 1.46 mmol)。于-78°C搅拌反应物约4小时。然后于-78°C,加入60 μL MeOH猝灭反应,接着加入5% HCl (.5 mL)和EtOAc (18 mL)。移去冷浴并搅拌反应30分钟。分离EtOAc层并用盐水洗涤,经无水Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥并浓缩,得到粗醛中间体。

#### [0178] 步骤3:化合物8的制备

使粗醛再溶于无水DCM (10 mL)并于r.t. (室温)、氩气下,在无水MgSO<sub>4</sub> (5 mmol, mg)的存在下,用乙醇胺(106 μL, 1.75 mmol)处理。搅拌反应1小时。然后向该反应混合物中加入FmocCl (755.4 mg, 2.92 mmol)和TEA (611 μL, 4.38 mmol),于室温、氩气下,将该反应物搅拌过夜。反应物用CombiFlash在0-50% EtOAc/石油醚中纯化,3步提供化合物8 334.2 mg,46%。LCMS:  $[M+H]^+$   $m/z = 477$ 。<sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD, δ in ppm): 7.81 (d, J=7.5Hz, 2H), 7.60 (d, J=7Hz, 2H), 7.40 (m, 2H), 7.32 (m, 2H), 4.96 (br, 2H), 4.60 (br, 1H),

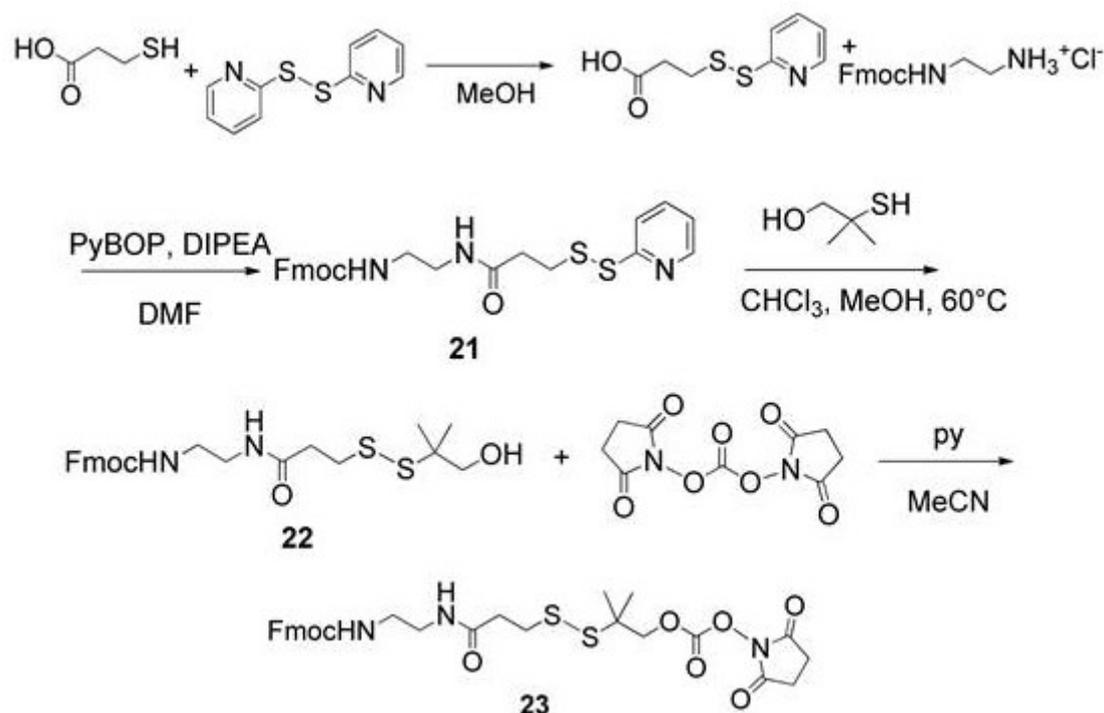
4.23 (t, J=5.5 Hz, 1H), 3.97 (br, 2H), 3.73 (br, m, 3H), 2.50 (br, 2H), 1.47 (s, 1H), 1.39 (s, 9H)。

[0179] 实施例3:化合物9的制备



于室温下,使化合物8在TFA/DCM (1:1)中去保护30 min,真空除去溶剂。

[0180] 实施例4:化合物23的制备



步骤1:3-(2-吡啶二硫)丙酸的制备

使2,2'-二吡啶二硫化物(8.70 g, 39.5 mmol)溶于MeOH (150 mL)并用氩气吹洗20分钟。使3-巯基丙酸(2.10 g, 19.8 mmol)溶于MeOH (35 mL)并用氩气吹洗15分钟。使用加液漏斗,将3-巯基丙酸溶液缓慢加入到2,2'-二吡啶二硫化物溶液。通过LC/MS监测反应,3-巯基丙酸完全消耗后,浓缩反应混合物并加载到120 g C18柱中。用MeCN/H<sub>2</sub>O (0 - 100%)进行纯化。在LC/MS上分析流分,合并含有所需产物的流分并在减压下蒸发。在浓缩期间观察到烧瓶底部的油相。将这种油性残留物与水相分离并在高真空下干燥,得到为无色固体的所需产物(2.4 g)。用EtOAc萃取水相以分离另外的产物。用盐水洗涤有机萃取物,经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,并真空浓缩,得到所需产物(0.5g)。分离为白色固体的3-(2-吡啶二硫)丙酸(2.9 g, 68%); LC/MS (ESI-QMS):  $m/z = 216.25$  (M + H), <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD): 8.39 (m, 1H), 7.84 (m, 1H), 7.79 (m, 1H), 7.21 (m, 1H), 4.87 (br, 1H), 3.03 (t, J = 6.8 Hz, 2H), 2.70 (t, J = 6.8 Hz, 2H)。<sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>OD): 173.53, 159.82, 148.97, 137.74, 120.99, 119.81, 33.50, 32.96。

**[0181] 步骤2:化合物21的制备**

向N-Fmoc-乙二胺盐酸盐(500 mg, 1.57 mmol)、3-(2-吡啶二硫)丙酸(338 mg, 1.57 mmol)和<sup>t</sup>Pr<sub>2</sub>NEt (839  $\mu$ L, 4.71 mmol)在DMF (7.85 mL)中的溶液中一次性加入PyBOP (950 mg, 1.57 mmol)。于室温下搅拌反应混合物5分钟,然后在高真空下浓缩。将水加入到粗混合物(50 mL)中并用乙酸乙酯(3 x 30 mL)萃取。经硫酸钠干燥合并的有机层,过滤,并蒸发至干燥,得到淡黄色油。产物经硅胶色谱(0 - 80% EtOAc/石油醚)进一步纯化。分离为白色固体的产物,根据HPLC为86%纯度(633 mg, 84.1%): LC/MS (ESI-QMS):  $m/z$  = 480.56 (M+H), <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  8.44 (d, J = 4.9, 1H), 7.75 (d, J = 7.3, 2H), 7.59 (m, 3H), 7.40 (t, J = 7.3, 2H), 7.30 (t, J = 7.3, 2H), 7.09 (t, J = 5.9, 1H), 6.98 (s, 1H), 4.56 (d, J = 6.8, 2H), 4.17 (t, J = 6.8, 1H), 3.43 (m, 2H), 3.40 (m, 2H), 3.08 (t, J = 6.4, 2H), 2.60 (t, J = 6.4, 2H)。

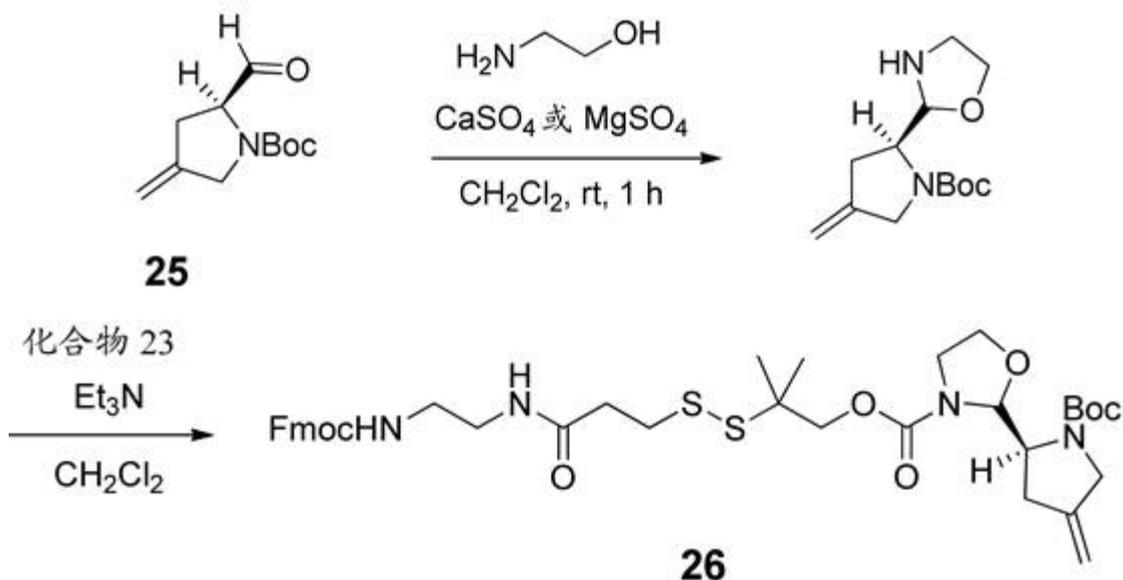
**[0182] 步骤3:化合物22的制备**

在干燥烧瓶中,使化合物21 (318 mg, 0.664 mmol, 1.0当量)和2-巯基-2-甲基-丙-1-醇(92 mg, 0.863 mmol, 1.3当量)溶于CHCl<sub>3</sub>:MeOH (1:3, 20 mL)。于60°C将该反应混合物搅拌4小时,经LC/MS监测直至完全。在减压下除去溶剂,得到油性残留物,接着加入水,随后用EtOAc (3x)萃取。合并有机萃取物,经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,过滤并在减压下浓缩。使用硅胶色谱(CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH, 0 - 4%)进一步纯化产物,得到化合物22 (285 mg, 90%): LC/MS (ESI-QMS):  $m/z$  = 475.18 (M+H), <sup>1</sup>H NMR (500 MHz CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7.78 (d, J = 7.3 Hz, 2H), 7.67 (d, J = 7.3 Hz, 2H), 7.40 (dd, J = 14.7, 7.9 Hz, 2H), 7.32 (dd, J = 14.7, 7.9 Hz, 2H), 6.38 (s, 1H), 5.35 (s, 1H), 4.40 (d, J = 6.9 Hz, 2H), 4.21 (dd, J = 13.7, 6.8 Hz, 1H), 3.47 (s, 2H), 3.42-3.31 (m, 4H), 2.82 (t, J = 6.9 Hz, 2H), 2.58 (t, J = 6.9 Hz, 2H), 1.25 (s, 6H)。

**[0183] 步骤4:化合物23的制备**

在氩气下,向化合物22 (0.552 mg, 1.16 mmol)在无水MeCN (12 mL)中的悬浮液中分别加入N,N'-二琥珀酰亚胺基碳酸酯(0.358 g, 1.40 mmol)和吡啶(0.118 mL, 1.45 mmol)。于室温下搅拌反应15小时,其中反应物转变为澄清的溶液。LC/MS分析证实反应完成。浓缩反应混合物并经硅胶色谱(0 - 5% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH)纯化,得到化合物23 (0.68 g, 95%): LC/MS (ESI-QMS):  $m/z$  = 616.24 (M + H), <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  7.79 (d, J<sub>1</sub>= 7.5 Hz, 2H), 7.64 (d, J<sub>1</sub>= 7.0 Hz, 2H), 7.38 (dd, J<sub>1</sub>= 8.0 Hz, J<sub>2</sub>= 7.5 Hz, 2H), 7.30 (dd, J<sub>1</sub>= 7.0 Hz, J<sub>2</sub>= 7.5 Hz, 2H), 4.33 (d, J<sub>1</sub>= 7.0 Hz, 2H), 4.28 (s, 2H), 4.19 (t, J<sub>1</sub>= 7.0 Hz, J<sub>2</sub>= 6.5 Hz, 1H), 3.20-3.30 (m, 4H), 2.91 (t, J<sub>1</sub>= 7.0 Hz, J<sub>2</sub>= 7.0 Hz, 2H), 2.80 (s, 4H), 2.56 (t, J<sub>1</sub>= 7.5 Hz, J<sub>2</sub>= 7.5 Hz, 2H), 1.31 (s, 6H); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  172.41, 169.81 (2C), 157.60, 151.59, 143.92 (2C), 141.19 (2C), 127.37 (2C), 126.74 (2C), 124.79 (2C), 119.53 (2C), 75.90, 66.40, 48.39 (2C), 39.83, 39.05, 35.58, 35.12, 24.98 (2C), 23.05 (2C)。

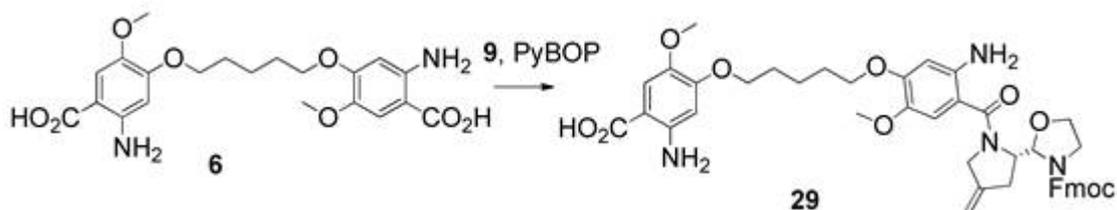
**[0184] 实施例5:化合物26的制备**



向N-Boc-4-亚甲基-L-脯氨酸(44.36 mg, 0.2099 mmol)的无水CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1 mL)溶液中分别加入无水CaSO<sub>4</sub> (22 mg, 0.16 mmol)和乙醇胺(10.56 μL, 0.1750 mmol)。于室温下搅拌反应1小时。在另一个烧瓶中,使化合物23 (108 mg, 0.180 mmol)溶于无水CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (1 mL)。过滤先前的吡咯烷溶液并缓慢加入到化合物23溶液中。将Et<sub>3</sub>N (0.037 mL, 0.26 mmol)加入到反应混合物中,通过LC/MS监测生成的混合物。搅拌2小时后,反应混合物用CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>稀释,用饱和NH<sub>4</sub>Cl (aq)洗涤,经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,并真空浓缩。残留物经硅胶色谱(0 - 10% CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH)进一步纯化,得到纯的化合物26 (83 mg, 63%): LC/MS (ESI-QMS): *m/z* = 755.38 (M + H), <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 7.79 (d, J<sub>1</sub> = 8.0 Hz, 2H), 7.64 (d, J<sub>1</sub> = 7.5 Hz, 2H), 7.38 (dd, J<sub>1</sub> = 7.5 Hz, J<sub>2</sub> = 7.5 Hz, 2H), 7.30 (dd, J<sub>1</sub> = 7.5 Hz, J<sub>2</sub> = 7.5 Hz, 2H), 5.13-5.20 (m\*, 1H), 4.88-5.05 (m\*, 2H), 4.36-4.60 (m\*, 1H), 4.33 (d, J<sub>1</sub> = 7.0 Hz, 2H), 4.20 (t, J<sub>1</sub> = 7.0 Hz, J<sub>2</sub> = 7.0 Hz, 1H), 3.98-4.10 (m\*, 3H), 3.72-3.94 (m\*, 4H), 3.36-3.50 (m\*, 1H), 3.18-3.30 (m\*, 4H), 2.91 (t, J<sub>1</sub> = 7.5 Hz, J<sub>2</sub> = 7.0 Hz, 2H), 2.70-2.40 (m\*, 2H), 2.54 (t, J<sub>1</sub> = 7.0 Hz, J<sub>2</sub> = 7.0 Hz, 2H), 1.40-1.50 (m\*, 9H), 1.26-1.38 (m\*, 6H)。

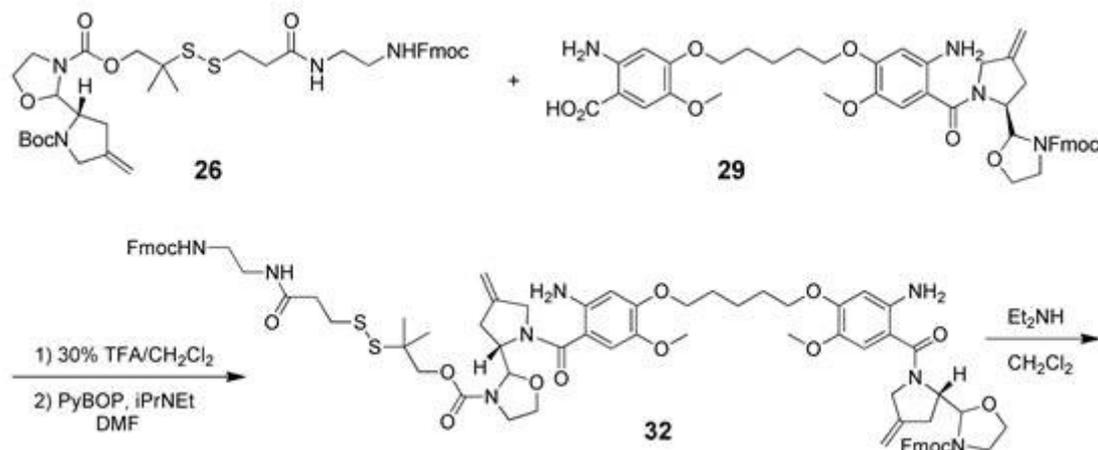
[0185] \*由于化合物的非对映体和/或旋转体性质

#### 实施例16:化合物29的制备



使化合物6 (42.0 mg, 0.097 mmol)、化合物9 (0.053 mmol)和PyBOP (29.0 mg, 0.056 mmol)溶于DMF/DCM (0.5 mL/0.5 mL)并于室温、氩气下,用DIPEA (74 μL, 0.43 mmol)处理。反应在1 hr内完成,然后加载到CombiFlash柱(在0-20% MeOH/DCM中),得到纯的产物化合物29 (25.5 mg, 60%)。LCMS: [M+H]<sup>+</sup> *m/z* = 793。

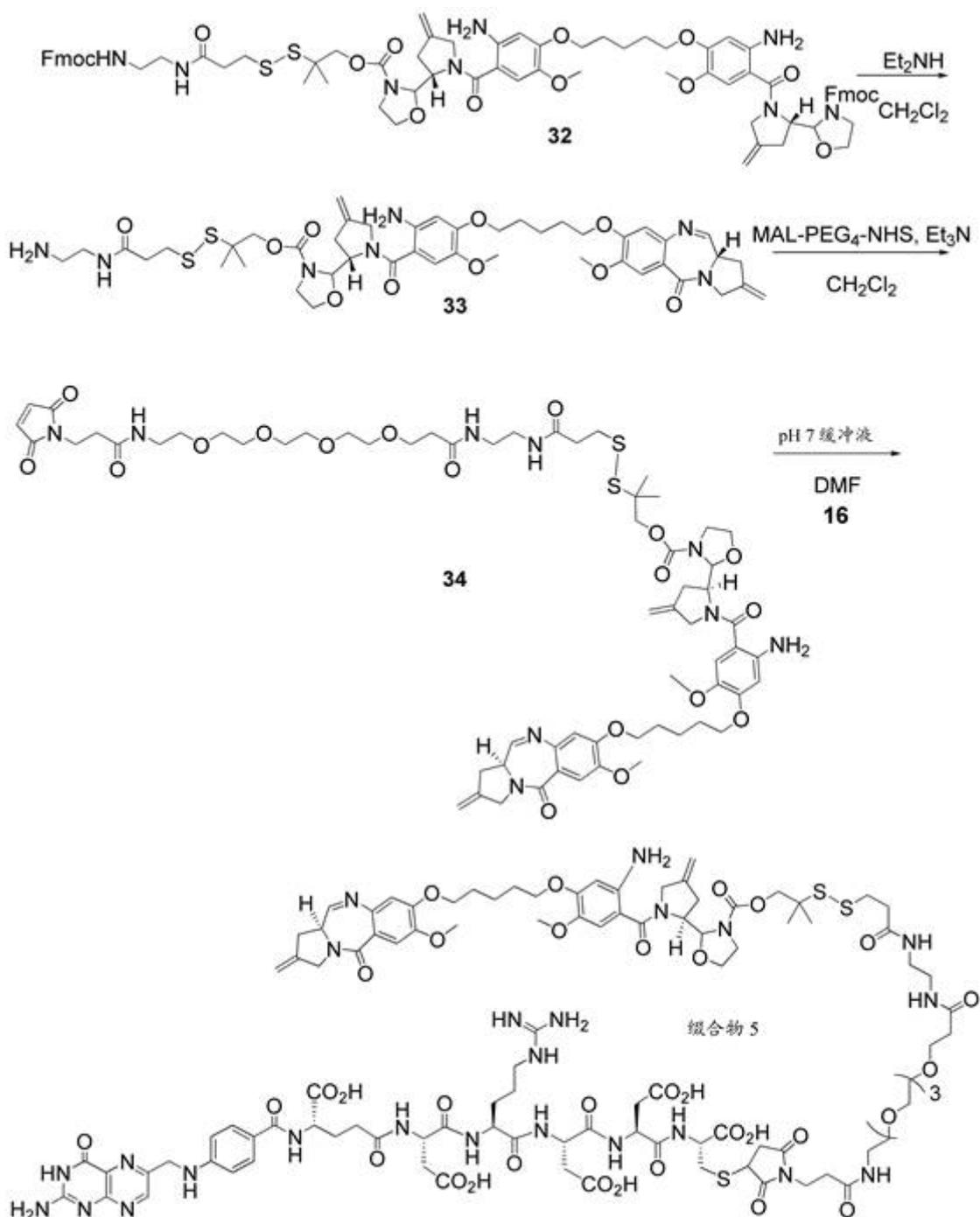
[0186] 实施例6:化合物32的制备



### 步骤1: 化合物32的制备

在烧瓶中,于0℃,使化合物26 (95.0 mg, 0.126 mmol)溶于30% TFA/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (10 mL)。使反应混合物温热至室温并搅拌1小时。完全除去Boc保护基后,减压下除去溶剂,将粗残留物置于高真空下3小时。在干燥烧瓶中,在氩气下,使粗TFA盐和化合物29 (100 mg, 0.126 mmol)溶于无水DMF (2.5 mL)。向反应混合物中先后加入PyBOP (131 mg, 0.252 mmol)和<sup>i</sup>Pr<sub>2</sub>NEt (67 μl, 0.378 mmol)。3小时后,通过加入饱和NH<sub>4</sub>Cl<sub>(aq)</sub>猝灭反应并用EtOAc (3x)萃取。经Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥合并的有机层,过滤,并在减压下浓缩。使用硅胶色谱(0 - 8% MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)纯化产物,得到化合物32 (153 mg, 84.9%): LC/MS (ESI-QMS): *m/z* = 1429.78 (M + H), <sup>1</sup>H NMR (500 MHz CDCl<sub>3</sub>) δ 枢轴信号: δ 7.75-7.66 (m, 4H), 7.58-7.47 (m, 4H), 7.75-7.66 (m, 4H), 7.39-7.31 (m, 4H), 7.29-7.22 (m, 4H), 7.02-6.51 (m, 4H), 5.31-5.14 (m, 1H), 5.04-4.74 (m, 5H), 1.28-1.12 (m, 6H)。

### [0187] 实施例21: 缀合物5的制备



使化合物32 (23 mg, 0.016 mmol) 和二乙胺 (0.25 mL, 2.4 mmol) 溶于CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (0.6 mL), 在室温、氩气下, 将反应混合物搅拌3小时。通过LC/MS监测反应, 在完全消耗化合物32后, 在减压下除去溶剂。得到的残留物与CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>一起共蒸发两次, 在高真空下干燥15分钟。使得到的残留物溶于CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (0.5 mL), 加入Mal-PEG<sub>4</sub>-NHS醚 (10.9mg, 0.021 mmol) 和Et<sub>3</sub>N (3.0  $\mu$ L, 0.021 mmol)。在室温、氩气下, 搅拌反应物, 并通过LC/MS监测化合物34的产生 ( $m/z = 1323$ 和 $662$ )。1 h后, 蒸发反应混合物, 使得到的残留物溶于DMF (2 mL)。用氩气吹洗溶液。化合物16 (22 mg, 0.021 mmol), 其根据在PCT/US2011/037134 (W02011146707) (通过引用并入本文用于制备化合物16) 中公开的方法制备, 溶于pH 7缓冲液 (2 mL, 50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>), 用氩气吹洗, 并加入到以上的化合物34溶液中。于室温下搅拌反应同时用氩气吹

洗。通过LC/MS监测反应中缀合物5的产生( $m/z = 791$ )。2小时后,经制备型HPLC (10 - 100% MeCN/50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  pH 7缓冲液)纯化,得到两组异构体:1.9 mg的第一组异构体,具有较短的保留时间以及7.4 mg的第二组异构体,具有较长的保留时间。经3个步骤,以24%的得率获得所需产物:LC/MS (ESI-QMS):  $m/z = 791.25$  ( $M + 3H$ ), 主要产物: $^1\text{H}$  NMR (DMSO- $\text{D}_6$ , 选择的数据): 8.61 (s, 1H), 7.72 (d, NH), 7.55 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H), 7.30 (s, NH), 7.15 (s, ArH), 7.01 (s, ArH), 6.81 (s, NH), 6.60 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H+1H重叠), 6.54 (s, ArH), 6.34 (s, N=CH), 6.32 (s, ArH), 5.11+5.06 (m, 2 H), 4.96 + 4.92 + 4.85 (m, 3H), 3.66 + 3.62 (s+s, 3 H), 3.61 (s, 3H), 3.55 (t, 3H), 3.35 (t, 3H), 1.21 (s, br, 6H)。次要产物: $^1\text{H}$  NMR (DMSO- $\text{D}_6$ , 选择的数据): 8.61 (s, 1H), 7.72 (d, NH), 7.55 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H), 7.29 (s, NH), 7.15 (s, ArH), 7.01 (s, ArH), 6.80 (s, NH), 6.60 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H+1H重叠), 6.53 (s, ArH), 6.32 (s, N=CH), 6.31 (s, ArH), 5.11+ 5.06 (m, 2H), 4.94 - 4.85 (m, 3 H), 3.66 + 3.62 (s+s, 3 H), 3.61 (s, 3H), 3.55 (t, 3H), 3.35 (t, 3H), 1.20 (s, br, 6H)。

#### [0188] 生物实施例

##### 概述

本文使用以下缩写:部分响应(PR);完全响应(CR),每周1次(SIW),每周2次(M/F)(BIW),每周3次(M/W/F)(TIW)。如本文定义的,肿瘤体积在观察期间从以前的高度下降时,观察到PR,尽管可能发生再生长。如本文定义的,肿瘤体积在观察期间下降到零时,观察到CR,尽管可能发生再生长。如本文定义的,肿瘤体积在观察期间减少到零并且没有再生长时,观察到治愈。

#### [0189] 方法1. 细胞DNA合成的抑制

本文所描述的缀合物用体外细胞毒性试验进行评估,该试验预测了药物抑制相应目标细胞生长的能力,所述细胞例如,但不限于以下

细胞系	
KB	人宫颈癌
NC1/ADR-RES-C1 <sub>2</sub>	人卵巢癌
IGROV1	人卵巢腺癌
MDA-MB-231	人乳腺癌(三阴性)
A549	人肺癌
H23	人肺腺癌
HepG2	人肝细胞癌
AN3CA	人子宫内膜腺癌
4T1p	小鼠乳腺癌
4T1-C12	转染人FR $\alpha$ 的4T1p
ID8-C115	转染鼠FR- $\alpha$ 的卵巢癌

应该理解,细胞类型的选择可根据那些选择的细胞对形成缀合物的药物的敏感性以及细胞表面受体或靶抗原的相对表达进行。试验缀合物是细胞表面受体或靶抗原结合化合物

和PBD前药、聚-PBD前药和混合的PBD的缀合物,如本文描述的。将试验细胞暴露于不同浓度的缀合物,并且任选还在不存在或存在至少100-倍过量的用于竞争研究的非缀合的细胞表面受体或靶抗原结合化合物的情况下,以评估活性为对细胞表面受体或靶抗原的特异性。

#### [0190] 方法2:叶酸缀合物的体外叶酸受体特异性活性试验

KB细胞在单个24孔Falcon板中接种,并在无叶酸的Roswell Park Memorial Institute (FFRPMI)/热灭活的胎牛血清(HIFCS)中过夜形成近汇合的单层。在加入叶酸缀合物前30分钟,将用过的培养基从所有孔中吸出,并用新鲜的FFRPMI或者补充有100  $\mu$ M叶酸的FFRPMI替换。然后,每孔接收1 mL的含有递增浓度的叶酸缀合物的培养基(每个样本3孔)。细胞在37 $^{\circ}$ C下脉冲2小时,用0.5 mL培养基冲洗4次,然后在1 mL新鲜培养基中跟踪达到72 h。从所有的孔中吸出用过的培养基并用含5  $\mu$ Ci/mL的 $^3$ H-胸苷的新鲜培养基替换。于37 $^{\circ}$ C培养2小时后,细胞用0.5 mL PBS洗涤3次,然后用0.5 mL冰冷的5%三氯乙酸/每孔处理。15分钟后,吸出三氯乙酸,通过加入0.5 mL 0.25 N氢氧化钠,在室温下溶解细胞15分钟。将450  $\mu$ L的各溶解样品转移到装有3 mL Ecolume闪烁合剂的闪烁瓶中,并在液体闪烁计数器中计数。最终结果表示为 $^3$ H-胸苷掺入相对于未处理对照的百分比。对于本文描述的缀合物,剂量-依赖性细胞毒性一般是可测量的,并且在大多数情况下,IC<sub>50</sub>值(将掺入到新合成的DNA中的 $^3$ H-胸苷降低50%所需的药物缀合物浓度)是在皮摩尔到低纳摩尔范围内。

#### [0191] 实施例1:缀合物5体外活性

在图1中,显示了掺入用缀合物5 (●)和用缀合物5和过量叶酸(■)处理的KB细胞的 $^3$ H-胸苷的百分比。

#### [0192] 实施例2:相对亲和力试验

将FR-阳性KB细胞接种于24-孔Falcon板中并允许在FFRPMI/HIFCS中形成贴壁单层(>90%汇合)过夜。在不存在和存在递增浓度的未标记FA或试验缀合物的情况下,用补充有10% HIFCS和含有100 nmol/L [ $^3$ H]FA的FFRPMI替换用过的培养基。于37 $^{\circ}$ C培养细胞1小时,然后用0.5 mL PBS洗涤3次。将500微升的1% SDS/PBS加入到各孔中;5 min后,收集细胞裂解液,转移到含有5 mL闪烁合剂的单个小瓶中,然后计数放射性。

[0193] 仅暴露于FFRPMI中的[ $^3$ H]FA(无竞争剂)的细胞被指定为阴性对照,而暴露于[ $^3$ H]FA加1 mmol/L未标记的FA的细胞用作阳性对照。后者样品(表示标签的非特异性结合)中测量的每分钟的衰变量(DPM)从所有样品的DPM值中减去。值得注意的是,相对亲和力被定义为在KB细胞上置换与FR结合的50% [ $^3$ H]FA所需化合物的反摩尔比,并将FA对FR的相对亲和力设置为1。

[0194] 对于缀合物5的结果示于图7中。结果表明,大药物分子的连接并不会从根本上改变维生素与其受体的内在结合亲和力。

#### [0195] 实施例3:缀合物5的DNA交联试验

小牛胸腺DNA(CT-DNA)与递增浓度的缀合物5(1.1-75  $\mu$ M)或缀合物5 +/- DTT组合。将这些溶液于37 $^{\circ}$ C孵育2小时。然后将溶液与溴化乙锭混合并在室温下孵育2小时。来自这些样品的荧光(Ex: 535 nm, Em: 605 nm)在Fluoroskan II荧光仪上测量。然后,将样品加热到104 $^{\circ}$ C 5分钟,在冰上冷却5分钟,在RT下保持15分钟,并测量荧光。使用来自阳性和阴性对照的荧光值计算每个样品的%交联。结果显示于图8中。

#### [0196] 实施例4:缀合物5针对肿瘤的体内活性

如在图2A中所示,与未处理的对照(■)比较,在试验小鼠中以0.5  $\mu\text{mol}/\text{kg}$  SIW给予2周的缀合物5 (▲)降低了KB肿瘤大小。用0.5  $\mu\text{mol}/\text{kg}$ 缀合物5治疗(一周一次,持续两周)还产生最大的抗-肿瘤活性,治愈率100%。以0.5  $\mu\text{mol}/\text{kg}$ 缀合物5 SIW给予2周的试验小鼠(▲)与未处理的对照(■)比较的重量变化示于图2B中。

[0197] 实施例5:缀合物5针对紫杉醇耐药性肿瘤的体内活性

维持小鼠并根据方法3测量肿瘤体积。

[0198] 在每只小鼠右侧皮下接种KB-PR10 (紫杉醇耐药性)肿瘤细胞。小鼠在无菌条件下通过侧尾静脉在200 mL体积的磷酸盐缓冲盐水(PBS)中给药。

[0199] 如在图3中所示,与未处理的对照(■)比较,以0.5  $\mu\text{mol}/\text{kg}$  SIW给予2周的缀合物5 (▲)降低了试验小鼠的紫杉醇耐药性KB肿瘤大小。

[0200] 实施例6:缀合物5针对铂耐药性肿瘤的体内活性

维持小鼠并根据方法3测量肿瘤体积。

[0201] KB-CR2000 (铂耐药性)肿瘤细胞在每只小鼠右侧皮下接种。小鼠在无菌条件下通过侧尾静脉在200 mL体积的磷酸盐缓冲盐水(PBS)中给药。

[0202] 如图4中所示,与未处理的对照(●)比较,以0.5  $\mu\text{mol}/\text{kg}$  SIW给予2周的缀合物5 (■)和以2.0  $\mu\text{mol}/\text{kg}$  BIW给予2周的EC1456 (EC1456是本领域已知的与tubulysin连接的缀合物叶酸) (▼)降低了试验小鼠的紫杉醇耐药性KB肿瘤大小。

[0203] 实施例7:缀合物5针对三阴性乳腺癌的体内活性

维持小鼠并根据方法3测量肿瘤体积。

[0204] 在每只小鼠右侧皮下接种原代人TNBC模型ST502 (直径2-4 mm)或原代人TNBC模型ST738 (直径2-4 mm)。小鼠随机分为实验组,每组7只,在无菌条件下通过侧尾静脉注入在200 mL体积的磷酸盐缓冲盐水(PBS)中的试验品。

[0205] 如图5中所示,与未处理的对照(■)比较,以0.3  $\mu\text{mol}/\text{kg}$  BIW给予2周的缀合物5 (▲)减少了试验小鼠的TNBC PDX肿瘤大小,而以2.0  $\mu\text{mol}/\text{kg}$  BIW给予2周的EC1456 (●)未减少TNBC PDX肿瘤大小。

[0206] 如图10中所示,与未处理的对照(■)比较,以0.27  $\mu\text{mol}/\text{kg}$  BIW给予2周的缀合物5 (■)减少了试验小鼠的TNBC PDX肿瘤大小,而以1.0  $\mu\text{mol}/\text{kg}$  SIW给予2周的甲磺酸艾日布林(▲)未减少TNBC PDX肿瘤大小。

[0207] 实施例8:缀合物5针对卵巢肿瘤的体内活性

维持小鼠并根据方法3测量肿瘤体积。

[0208] 在每只小鼠右侧皮下接种原代人卵巢模型ST070片段(直径2-4 mm)。小鼠随机分为实验组,每组7只小鼠,在无菌条件下通过侧尾静脉注入在200 mL体积的磷酸盐缓冲盐水(PBS)中的试验品。

[0209] 如图6中所示,与未处理的对照(■)比较,以0.5  $\mu\text{mol}/\text{kg}$  SIW给予2周的缀合物5 (■)减少了试验小鼠的卵巢PDX肿瘤大小,而以4.0  $\mu\text{mol}/\text{kg}$  SIW给予2周的EC1456 (▲)和以15 mg/kg SIW给予2周的紫杉醇(▼)未减少卵巢PDX肿瘤大小。

[0210] 实施例9:缀合物5在KB大鼠肿瘤模型中的体内活性

在实验持续期间,给雌性Balb/c nu/nu大鼠随意饲喂叶酸缺乏的饲料(Harlan diet # TD01013)。在每只大鼠右侧皮下接种KB-肿瘤细胞。大鼠在无菌条件下通过侧尾静脉在200

mL体积的磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 中给药。

[0211] 每周测量肿瘤2次来跟踪每个s.c.肿瘤的生长。用游标卡尺在两个垂直方向测量肿瘤,并计算其体积为 $0.5 \times L \times W^2$ ,其中L =最长轴的测量(mm)和W =垂直于L的轴的测量(mm)。肿瘤体积的结果示于图9A中。毒性测量为动物重量增加或减少的函数,如图9B所示。

[0212] 实施例10:缀合物5针对子宫内膜肿瘤的体内活性

在实验持续期间,给雌性Balb/c *nu/nu*小鼠随意饲喂叶酸缺乏的饲料(Harlan diet # TD01013)。在每只小鼠右侧皮下接种原代人子宫内膜模型ST040片段(直径2-4 mm)。小鼠随机分为实验组,每组7只小鼠,在无菌条件下通过侧尾静脉注入在200 mL体积的磷酸盐缓冲盐水(PBS)中的试验品。这些研究是在South Texas Accelerated Research Therapeutics, 4383 Medical Drive, San Antonio, TX 78229进行的。

[0213] 每周测量肿瘤2次来跟踪每个s.c.肿瘤的生长,直至达到1200 mm<sup>3</sup>的体积。用游标卡尺在两个垂直方向测量肿瘤,并计算其体积为 $0.5 \times L \times W^2$ ,其中L =最长轴的测量(mm)和W =垂直于L的轴的测量(mm)。

[0214] 图11显示,以15 mg/kg SIW给予紫杉醇2周的治疗产生0%的部分响应受试者,而以0.27 mmol/kg BIW给予2周的化合物5产生43%的部分响应受试者。

[0215] 实施例11:缀合物5在卵巢癌细胞系中的体外研究

试剂

小鼠和人叶酸结合蛋白1 (FBP1, FOLR1) PicoKine™ ELISA试剂盒购自Boster Biological Technology (Pleasanton, CA)。用于表面标记染色的抗体购自eBioscience: PD-L1 (克隆MIH5; cat# 25-5982), F4/80 (克隆BM8; cat# 12-4801), CD11b (克隆M1/70; cat# 48-0112), CD3ε (克隆145-2C11; cat# 25-0031), CD4 (克隆GK1.5; cat# 46-0041)和CD8β (克隆H3517.2; cat# 11-0083)。

[0216] 细胞系

用来评价缀合物5在体外和离体研究中的活性的FR-α表达细胞系是(1) ID8-C115,一种用鼠FR-α转染的卵巢癌细胞系,和(2) IGROV1,一种表达人FR-α的人卵巢癌细胞系。FR-α阴性ID8亲代(ID8p)细胞系被用作体内对照。ID8p和ID8-C115细胞分别在含10%热灭活胎牛血清(HIFCS)和抗生素的富含叶酸或缺乏叶酸的RPMI1640培养基(Gibco BRL) (FFRPMI)中生长,并在5%的CO<sub>2</sub>气氛下用标准细胞培养技术维持。IGROV1细胞在与ID8-C115相同的培养基中生长,除了使用Corning® 超低贴壁培养瓶(VWR, Cat. #89089-878)外。

[0217] ELISA分析

按照制造商的指示,标准品和试验样品被加入到96-孔ELISA板上,这些板用大鼠抗-FOLR1单克隆抗体预包被。添加生物素化山羊抗-FOLR1多克隆抗体,然后用缓冲液洗涤。然后加入抗生物素蛋白-生物素-过氧化物酶复合物,将未结合的缀合物洗掉。随后,加入辣根过氧化物酶底物,3,3',5,5'-四甲基联苯胺,并催化产生蓝色产物。至少在两个不同的时间点,在微板阅读器中读出在375 nm处的吸光度。

[0218] 克隆形成试验

使在6-孔板(1000个细胞/孔)中接种的IGROV1细胞暴露于1、10和100 nM的缀合物5达2小时,接着在无药物培养基中跟踪9天。此后,用PBS洗涤细胞并在3:1甲醇:乙酸溶液中固定5分钟。然后细胞用0.5%结晶紫/甲醇溶液染色15分钟并用自来水洗涤。干燥步骤后,利用

ImageJ软件对集落进行拍照和计数。

#### [0219] 流式细胞术

将从腹水制备的单细胞悬液在冰上,在FACS染色溶液中封闭20分钟,然后进行流式细胞术染色。FACS染色溶液由在PBS中的1%牛血清白蛋白级分V (Fisher scientific, cat# BP1600)、0.5 mg/mL人免疫球蛋白 (Equitech-Bio, cat# SLH66)和0.05%叠氮化钠组成。对于表面标记检测 (PD-L1, F4/80, CD11b, CD3, CD4, CD8),肿瘤细胞在含有最佳浓度 (0.4-2.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )的各种荧光团缀合抗体 (从eBioscience购买)的FACS染色溶液中染色。在冰上20分钟后,用PBS洗涤肿瘤细胞,再次悬浮于含有3  $\mu\text{M}$ 碘化丙啶的PBS中,用于死亡细胞排除。数据收集在Gallios流式细胞仪 (Beckman Coulter)上并使用Kaluzza v1.2软件 (Beckman Coulter)分析。用内部合成的小分子,通过将叶酸与Alexa Fluor 647偶联,测量功能叶酸受体。

#### [0220] 结果

使用XTT细胞成活力试验评价缀合物5针对ID8-C115肿瘤细胞的活性。使细胞暴露于缀合物5的10-倍系列稀释液 (至多1  $\mu\text{M}$ ) 2小时,接着在无药物培养基中跟踪72-120小时。如由XTT试验测定的,缀合物5显示出对细胞增殖的有效剂量依赖性抑制,相对 $\text{IC}_{50}$ 值为~0.52 (72 h)、0.61 (96 h)和0.17 (120 h) (图12)。重要的是,在96-120小时跟踪后观察到最大细胞杀灭,支持该类DNA-交联化合物的作用机制。

[0221] 缀合物5针对缓慢-生长的IGROV肿瘤细胞的活性使用克隆形成试验评估。在2小时暴露和9天跟踪 (图13)后,缀合物5在测试的所有浓度 (1-100 nM)均显示出很强的活性。更重要的是,在1和10 nM两个浓度下,在过量叶酸的存在下,缀合物5抗-肿瘤活性显著降低。

#### [0222] 实施例12:缀合物5在卵巢肿瘤模型中的体内研究

##### 小鼠

雌性C57BL/6 (ID8p, ID8-C115)和nu/nu (IGROV1)小鼠购自Envigo (Indianapolis, IN)且当它们达到6-8周龄时使用。小鼠在到达当日被喂食叶酸缺乏的食物 (TestDiet, St. Louis, MO)。

#### [0223] 肿瘤植入

小鼠腹水肿瘤分别在C57BL/6 (ID8p, ID8-C115)和nu/nu (IGROV1)小鼠中通过腹膜内植入培养的细胞 ( $5 \times 10^6$ )而产生。

#### [0224] 来自荷瘤小鼠的单细胞悬液的制备

通过I.P.注射含有5 mM EDTA的5 mL冷PBS收集腹水,然后取出含腹水肿瘤细胞的腹膜内液体。然后用5分钟400 x g离心收集细胞,然后进行RBC溶解步骤,然后用冷PBS洗涤,最后用40  $\mu\text{m}$ 尼龙过滤以去除组织和大的细胞聚集物。

#### [0225] 从具有腹水的小鼠制备无细胞腹水

安乐死后,通过I.P.灌注含腹水肿瘤细胞的腹膜内液体,收集全部腹水。经5分钟2200 x g离心获得腹水中的无细胞部分,并在-80 $^{\circ}\text{C}$ 保存直至以后使用。

#### [0226] 缀合物5加抗-CTLA-4组合研究

为检测缀合物5单独及联合抗-CTLA-4抗体的作用,在到达之日并开始叶酸缺乏喂食后13天腹膜内接种ID8-C115肿瘤细胞 ( $5 \times 10^6$ 个细胞/动物,在1%同基因小鼠血清/叶酸缺乏的RPMI1640培养基中)。作为对照,还对EC1456单独和与抗-CTLA-4抗体的相同方案的组合

进行了评价。肿瘤植入后7天开始,用0.1  $\mu\text{mol}/\text{kg}$ 缀合物5或2  $\mu\text{mol}/\text{kg}$ 的EC1456静脉内给予(BIW,共6个剂量)小鼠。抗-CTLA-4抗体给予溶液通过将储备液(BioXcell,克隆UC10-4F10-11)在PBS, pH 7.4中稀释至1.25 mg/mL来制备。肿瘤植入后11天开始i.p.给予(BIW,总共5个剂量)抗-CTLA-4 (250  $\mu\text{g}/\text{剂}$ 量)。在缀合物5加抗-CTLA-4和EC1456加抗-CTLA-4联合组中,所有化合物的剂量和时间表均与单剂给药组相匹配。每周给小鼠称重3次,并评估任何显示腹水形成的腹部肿胀的临床迹象,以及毒性诸如呼吸窘迫、活动能力、体重减轻、腹泻、驼背姿势和不进食的证据。一旦动物出现腹水,它们每天都受到监测,和当腹水变得严重(以脚尖转圈行走)时被实施安乐死。用来自同一群小鼠的健康动物作为正常体重增加的对照。

#### [0227] 结果

##### 小鼠腹水中FBP1的定量

对从ID8p、ID8-C115和IGROV1荷瘤小鼠在安乐死时收集的无细胞腹水样品检测可溶性鼠(ID8p、ID8-C115)和人(IGROV1) FBP1水平。从用ID8-C115肿瘤细胞(0.93-4.6 nM)腹膜内植入的小鼠获得的腹水中检测鼠FBP1 (表1)。同样,从用IGROV1肿瘤细胞(0.70-2.8 nM)腹膜内植入的小鼠获得的腹水中检测人FBP1 (表1)。作为对比,在从ID8p荷瘤小鼠获得的腹水中发现了可以忽略量的鼠FBP1 (表1)。这表明恶性腹水微环境使FOLR1从癌细胞脱落。

#### [0228] 功能FR在卵巢癌小鼠模型中的评估

用叶酸-荧光团缀合物在nu/nu小鼠的腹腔中生长的IGROV1人卵巢癌细胞上测定功能FR水平(图14; HLA+ CD45-; 标签a),并与腹腔巨噬细胞(F480+ CD11b+; 标签b)和刚从体外培养收获的IGROV1细胞(标签c)进行比较。只有一小部分小鼠腹腔腹水IGROV1细胞(~6%)的FA-Alexa Fluor染色阳性,表明通过脱落或下调或者两者组合丢失了FR- $\alpha$ 。由IGROV1和ID8-C115腹水细胞脱落FR- $\alpha$ 很可能发生,因为通过ELISA分析在无细胞腹水中检测到可溶性人和小鼠FR- $\alpha$  (FBP1, FOLR1) (表1)。ID8p细胞系衍生的腹水用作FR $\alpha$ 阴性对照,并且确实非常少的可溶性鼠FR- $\alpha$ 通过ELISA检测到(表1)。

#### [0229] 表1

肿瘤模型 (腹膜内)	小鼠品系 (雌性)	腹水 ELISA 分析	结果(nM)
IGROV1	Nu/Nu	hFBP1	0.70 - 2.8
ID8-C115	C57BL/6	mFBP1	0.93 - 4.6
ID8p (FR $\alpha$ -对照)	C57BL/6	mFBP1	0.066 - 0.092

还在IP注射小鼠卵巢细胞系ID8-CL15后以7天间隔,在免疫活性C57BL6小鼠的腹腔总细胞中对CD4+和CD8+ T细胞的存在进行了定量(图15A)。在植入后从第7到42天,CD45+ CD3e+ CD8+ CD4- T细胞(■)数量缓慢增加。在植入后从第7到35天,CD45+ CD3e+ CD4+ CD8- T细胞(▲)数量也有增加,而从第35到42天有更加显著的增加,提示对卵巢癌细胞的免疫反应已经发生。此外,来自ID8-CL15植入的小鼠的CD45-非骨髓衍生的腹水细胞表达极少的功能FR (见图15B (■)),而腹水巨噬细胞(见图15B (●)和15C (插入盒图))表达显著量的功能FR (可能地,FR $\beta$ )。这些提示FR- $\beta$ +卵巢癌基质细胞例如腹水巨噬细胞的靶向可能是化合物例如缀合物5的备选作用机制。

### [0230] 缀合物5单独和与抗-CTLA-4组合的体内活性

CTLA-4 (CD152) 是一种蛋白受体,其起免疫检查点的作用以下调免疫反应。CTLA-4与CD28竞争结合抗原呈递细胞上的B7,以阻断T-细胞的活化。最近的研究显示,CTLA4拮抗剂可增强化疗在某些肿瘤类型中的活性。为检查缀合物5单独和与抗-CTLA-4抗体组合的抗肿瘤作用,发明人利用同基因腹膜内ID8-C115荷瘤小鼠(图16A)。为了比较,也测试了作为单一药剂或与抗-CTLA-4抗体组合的EC1456。在此,未处理的对照小鼠的中位存活时间为肿瘤植入后约46天。EC1456单独(i.v. 2  $\mu\text{mol}/\text{kg}$ , BIW x 6剂量)和缀合物5单独(i.v. 0.1  $\mu\text{mol}/\text{kg}$ , BIW x 6剂量)在每组5只动物中均产生明显的抗肿瘤作用,中位存活时间延长约67% (肿瘤植入后约77天,  $P = 0.0018$ , Log-Rank检验)。抗-CTLA-4抗体单独(i.p. 250  $\mu\text{g}/\text{剂量}$ , BIW x 5剂量)在5只动物中未显示出明显的抗-肿瘤作用,中位存活时间延长约11% (肿瘤植入后约51天)。EC1456 (i.v. 2  $\mu\text{mol}/\text{kg}$ , BIW x 6剂量)加抗-CTLA-4抗体(i.p. 250  $\mu\text{g}/\text{剂量}$ , BIW x 5剂量)在5只动物中未显示出额外的益处,中位存活时间为肿瘤植入后约81天。在另一方面,缀合物5 (i.v. 0.1  $\mu\text{mol}/\text{kg}$ , BIW x 6剂量)加抗-CTLA-4抗体(i.p. 250  $\mu\text{g}/\text{剂量}$ , BIW x 5剂量),在5只动物中显示出额外的治疗益处,中位存活时间为肿瘤植入后约102天。

### [0231] 实施例13:缀合物5和EC1456针对各个阶段的ID8-C115腹水荷瘤小鼠的比较

#### 材料

缀合物5 (M.W. 2369) 和EC1456 (M.W. 2626) 在内部合成。

### [0232] 体内方法

#### 细胞系

ID8-C115细胞在含有10%热灭活胎牛血清(HIFCS)和抗生素的无叶酸RPMI1640培养基(Gibco BRL) (FFRPMI)中生长,并使用标准细胞培养技术,在5%  $\text{CO}_2$ 气氛中维持。

### [0233] 小鼠

雌性C57BL/6小鼠购自Envigo (Indianapolis, IN) 并当它们达到6-8周龄时使用。小鼠在到达当日被喂食叶酸缺乏的食物(TestDiet, St. Louis, MO)。

### [0234] 肿瘤植入

小鼠腹水肿瘤在C57BL/6小鼠中通过腹膜内植入培养的细胞( $5 \times 10^6$ )而产生。

### [0235] 缀合物5对比EC1456针对ID8-C115腹水肿瘤的体内活性

在第一个实验(P-1836)中,所有的治疗在肿瘤植入后7天开始。小鼠被静脉内给予0.1  $\mu\text{mol}/\text{kg}$ 的缀合物5,每周两次,共6个剂量(BIW x 3)。为了比较,EC1456以2  $\mu\text{mol}/\text{kg}$ 的剂量给予,每周两次,共6个剂量(BIW x 3)。在第二个实验(P-1846)中,缀合物5治疗在肿瘤植入后21天开始。小鼠被静脉内给予0.1  $\mu\text{mol}/\text{kg}$ 的缀合物5,每周连续3天,共3周(D0-2 x 3, 9个剂量)。为了比较,EC1456以2  $\mu\text{mol}/\text{kg}$ 的剂量给予,每周连续3天,共3周(D0-2 x 3, 9个剂量)。在第三个实验(P-1861)中,缀合物5治疗在肿瘤植入后35天开始。小鼠被静脉内给予0.3  $\mu\text{mol}/\text{kg}$ 的缀合物5,每周一次,连续2周(SIW x 2, 2个剂量)。为了比较,EC1456以2  $\mu\text{mol}/\text{kg}$ 的剂量给予,每周连续3天,共2周(D0-2 x 2, 6个剂量)。在第四个实验(P-1836)中,缀合物5治疗在肿瘤植入后43天开始。小鼠被静脉内给予0.3  $\mu\text{mol}/\text{kg}$ 的缀合物5,每周一次,连续2周(SIW x 2, 2个剂量)。由于疾病的晚期,EC1456治疗的小鼠仅接受2  $\mu\text{mol}/\text{kg}$ 的剂量,连续3天,持续1周(D0-2 x 1, 3个剂量)。所有小鼠每周称体重3次,并评估任何显示

腹水形成的腹部肿胀的临床迹象,以及毒性的证据,包括诸如呼吸窘迫、活动能力、体重减轻、腹泻、驼背姿势和不进食。一旦动物出现腹水,它们每天都受到监测,和当腹水变得严重(以脚尖转圈行走)时被实施安乐死。

#### [0236] 数据和结果

缀合物5在7-天龄ID8-C115腹水荷瘤小鼠中的活性

如在图17A和17B中所示,未处理的对照小鼠的中位存活时间为肿瘤植入后约46天。缀合物5 (0.1  $\mu\text{mol}/\text{kg}$ 、BIW x 6个剂量)和EC1456 (2  $\mu\text{mol}/\text{kg}$ 、BIW x 6个剂量)在每组5只动物中均产生类似的抗肿瘤作用,中位存活时间延长约67% (肿瘤植入后约77天)。

#### [0237] 缀合物5在21-天龄ID8-C115腹水荷瘤小鼠中的活性

如图18A和18B中所示,未处理的对照小鼠的中位存活时间为肿瘤植入后约46天。缀合物5 (0.1  $\mu\text{mol}/\text{kg}$ , D0-2 x 3, 9个剂量)在每组5只动物中产生明显的抗肿瘤作用,中位存活时间延长约65% (肿瘤植入后约76天)。值得注意的是,所有缀合物5治疗的动物在研究结束时都表现出轻度共济失调,有一只动物没有出现腹水(异常情况)。EC1456 (2  $\mu\text{mol}/\text{kg}$ , D0-2 x, 9个剂量)治疗的小鼠发生重度皮炎和2只动物因皮肤状况在第44天被实施安乐死。剩余的两只动物出现腹水,中位存活时间为59天,比未处理的对照增加约28%。

#### [0238] 缀合物5在35-天龄ID8-C115腹水荷瘤小鼠中的活性

如图19A和19B中所示,未处理的对照小鼠的中位存活时间为肿瘤植入后约42天。缀合物5 (0.3  $\mu\text{mol}/\text{kg}$ , SIW x 2, 2个剂量)在每组5只动物中产生明显的抗肿瘤作用,中位存活时间延长约52% (肿瘤植入后约64天)。EC1456 (2  $\mu\text{mol}/\text{kg}$ , D0-2 x 2, 4个剂量)未产生抗肿瘤作用,中位存活时间为肿瘤植入后约44天,类似于未处理对照的中位存活时间。

#### [0239] 缀合物5在43-天龄ID8-C115腹水荷瘤小鼠中的活性

如图20A和20B中所示,未处理的对照小鼠的中位存活时间为肿瘤植入后约46天。缀合物5 (0.3  $\mu\text{mol}/\text{kg}$ , SIW x 2, 2个剂量)在每组5只动物中产生明显的抗肿瘤作用,中位存活时间延长约24% (肿瘤植入后约57天)。EC1456 (2  $\mu\text{mol}/\text{kg}$ , D0-2 x 1, 3个剂量)的中位存活时间延长约13% (肿瘤植入后约52天),这与未处理的对照相比,差异无显著性。

#### [0240] 缀合物5和EC1456针对各个阶段的ID8-C115的比较

图21总结每个实验的结果,其中ID8-C115荷瘤小鼠在疾病的不同阶段以各自的给药方案用缀合物5和EC1456治疗(观察到如上文所述的一些毒性)。然而,随着在ID8-C115腹水肿瘤的晚期阶段EC1456逐渐丧失其强度,缀合物5始终是更有效的。更重要的是,从腹水开始(第35天)到未治疗动物需要安乐死的疾病末期(第43天),缀合物5提供了治疗效果,而EC1456则完全不起作用。

#### [0241] 实施例14:体外和体内试验

材料

试剂

EC1456 (M.W. 2626)和缀合物5 (M.W. 2369)在内部合成。用于表面标记染色的抗体购自eBioscience: F4/80 (克隆BM8; cat# 12-4801)、CD11b (克隆M1/70; cat# 48-0112)。

#### [0242] 体外方法

细胞系

用来评价缀合物5在体外和/或离体研究中的活性的FR $\alpha$ -和FR $\alpha$ +表达细胞系是(1) 4T1p,一种类似于人三阴性乳腺癌的小鼠乳腺癌细胞系,(2) 4T1-C12,用小鼠FR $\alpha$ 稳定转染的4T1p,和(3) IGROV1,一种表达人FR $\alpha$ 的人卵巢癌细胞系。4T1p和4T1-C12细胞分别在含有10%热灭活胎牛血清(HIFCS)和抗生素的富含叶酸或缺乏叶酸的RPMI1640培养基(Gibco BRL) (FFRPMI)中生长,并使用标准细胞培养技术维持在5% CO<sub>2</sub>气氛中。IGROV1细胞在与4T1-C12相同的培养基中生长。

#### [0243] 细胞成活力测定

4T1p和4T1-C12肿瘤细胞在96-孔板(20,000个细胞/孔)中用在FFRPMI培养基中10-倍系列稀释的缀合物5( $\leq 100$  nM)处理。2小时暴露后,替换含药物的培养基并洗涤细胞,允许进一步培养96小时。根据制造商的指示,通过将XTT(2,3-双(2-甲氧基-4-硝基-5-磺基-苯基)-2H-四唑鎓-5-甲苯胺)加入培养基中2小时,评估细胞成活力。所有的结果表示为相对于未处理的对照细胞的%吸光度(减去背景)。

#### [0244] 克隆形成试验

在6-孔板中接种的IGROV1细胞(1000个细胞/孔)暴露于1、10、100和1000 nM的缀合物5和EC1456达2小时,接着在无药物培养基中跟踪9天。此后,细胞用PBS洗涤并在3:1甲醇:乙酸溶液中固定5分钟。然后细胞用0.5%结晶紫/甲醇溶液染色15分钟并用自来水洗涤。干燥步骤后,利用ImageJ软件对集落进行拍照和计数。

#### [0245] 流式细胞术

在流式细胞术染色前,将从4T1p和4T1-C12肿瘤制备的单细胞悬液在冰上用FACS染色溶液封闭20分钟。FACS染色溶液由在PBS中的1%牛血清白蛋白级分V(Fisher scientific, cat# BP1600)、0.5 mg/mL人免疫球蛋白(Equitech-Bio, cat# SLH66)和0.05%叠氮化钠组成。对于表面标记检测(F4/80、CD11b),肿瘤细胞在含有最佳浓度(0.4-2.5  $\mu$ g/mL)的各种荧光团缀合抗体(从eBioscience购买)的FACS染色溶液中染色。在冰上20分钟后,用PBS洗涤肿瘤细胞,再次悬浮于含有3  $\mu$ M碘化丙啶的PBS中,用于死亡细胞排除。数据收集在Gallios流式细胞仪(Beckman Coulter)上并使用Kaluzza v1.2软件(Beckman Coulter)分析。

#### [0246] 体内方法

##### 小鼠

雌性Balb/c小鼠(4T1p, 4T1-C12)购自Envigo (Indianapolis, IN)且当它们达到6-8周龄时使用。小鼠在到达当日被喂食叶酸缺乏的食物(TestDiet, St. Louis, MO)。

#### [0247] 肿瘤植入

Balb/c小鼠中的实体瘤通过在乳腺区中皮下植入每只动物 $5 \times 10^5$  (4T1p)和 $2 \times 10^6$  (4T1-C12)个培养的细胞生成。

#### [0248] 从荷瘤小鼠制备单细胞悬液

通过加入IV型胶原酶(Sigma cat# C5138,最终0.5mg/mL)、透明质酸酶(Sigma cat# H3506,最终0.5mg/mL)和DNase I (Sigma cat# DN25,最终0.1mg/mL),在无血清和叶酸的RPMI1640中制备肿瘤消化溶液,然后加热到37 $^{\circ}$ C。通过从Balb/c小鼠中切除每个肿瘤并在冷PBS中洗涤,制备4T1和4T1-CL2原位肿瘤的单细胞制备物。在冷PBS清洗后,皮下脂肪在切除的肿瘤的表面上变得清晰可见,并且在肿瘤消化之前被小心地剥离掉。去除可见脂肪后,

将实体瘤切碎,用10 mL肿瘤消化溶液于37°C,伴随剧烈摇动下孵育1h。消化后,将单细胞制备物以400 X g沉淀5分钟,弃去上清液。用5mL室温无菌1X RBC裂解溶液(VWR cat# 420301-BL)处理沉淀5分钟,以溶解任何红细胞。在溶液中加入等体积的冷PBS,以400 x g再次沉淀肿瘤细胞5分钟,并丢弃上清液。最后的沉淀被重新悬浮在10 mL的冷PBS中,然后用40 $\mu$ m Falcon® Cell Strainers, Sterile, Corning (VWR cat# 21008-949)过滤,以清除任何组织碎片和未消化的肿瘤。滤过的细胞溶液再次沉淀,并再悬浮于FACS染色液中,然后加入荧光标记抗体以供流式细胞术分析。

#### [0249] 缀合物5单药的体内活性

在第0天起,患有乳腺4T1p ( $\sim 78.3 \pm 12.1 \text{ mm}^3$ )和4T1-C12 ( $\sim 70.1 \pm 14.1 \text{ mm}^3$ )的小鼠预定接收200 nmol/kg的缀合物5,每周两次,共2周。4T1p荷瘤小鼠仅接受总共3个剂量和4T1-C12荷瘤小鼠按计划共接受4个剂量。每周3次给小鼠称重,并测量肿瘤大小。肿瘤体积通过下式计算: $V = 0.5 \times a \times b^2$ ,其中a是跨越肿瘤的最长轴,b是垂直于a的较短轴。当肿瘤体积达到约1500  $\text{mm}^3$ 时,安乐死动物。还密切监测小鼠的毒性证据,如呼吸窘迫、活动能力、体重减轻、腹泻、驼背姿势和不进食。由于体重减轻,4T1p荷瘤小鼠的最后一次缀合物5剂量被跳过。

#### [0250] 数据和结果

缀合物5针对4T1-C12和4T1p肿瘤细胞的体外活性

缀合物5针对4T1-C12和4T1p肿瘤细胞的活性使用XTT细胞成活力测定评估。使细胞暴露于10-倍系列稀释的缀合物5 (至多100 nM) 2小时,接着在无药物培养基中跟踪96小时。在FR $\alpha$ -阳性4T1-C12肿瘤细胞系中,缀合物5显示出对细胞增殖的剂量依赖性抑制,相对IC<sub>50</sub>值为 $\sim 8.7 \text{ nM}$  (图22A和22B)。在此测试条件下,在过量叶酸的存在下,针对4T1-C12的活性是部分可逆的。相比之下,发现缀合物5在体外针对FR $\alpha$ -阴性4T1p肿瘤完全无活性。

#### [0251] 缀合物5和EC1456针对人IGROV细胞的体外活性

在标准克隆形成试验中比较缀合物5与EC1456针对缓慢生长的IGROV肿瘤细胞的活性。2小时暴露和9天跟踪(图23)后,缀合物5在所有测试浓度(1-1000 nM)均显示出有效的活性。在另一方面,仅在1  $\mu$ M观察到显著的EC1456活性。

#### [0252] 评估4T1p和4T1-C12肿瘤中的肿瘤-相关巨噬细胞

如图24A-C中所示,来自4T1小鼠乳腺癌细胞系(空心正方形)的原位肿瘤(A)具有很少可检测到的功能FR,而从FR $\alpha$ 转导的4T1亚克隆(4T1-C12;实心正方形)生长的肿瘤包含显著水平。在4T1亲代(B,  $\sim 16\%$ )和4T1-C12(C,  $\sim 24\%$ )肿瘤中发现的肿瘤-相关巨噬细胞(TAM)表达FR $\beta$ ,而其它非-巨噬细胞髓系细胞(MDSC)是FR $\beta$ -阴性的。

#### [0253] 缀合物5抗-TAM和抗-肿瘤的体内活性

在FR $\alpha$ -阴性4T1p肿瘤模型中评估了单独缀合物5抗-TAM活性。缀合物5抗-肿瘤和抗-TAM双重活性在FR $\alpha$ -阳性4T1-C12肿瘤模型中评估。流式细胞术分析表明,在Balb/c小鼠中建立的4T1p和4T1-C12乳腺癌中的TAM含量相似。尽管在体外缺乏活性(图22A),4T1p肿瘤显示出对0.2  $\mu$ mol/kg (i.v., BIW x 3个剂量)的缀合物5有部分敏感性,肿瘤生长显著延迟(图25A和25B)。然而,在该FR $\alpha$ -阴性模型中没有完全的应答者。在另一方面,0.2  $\mu$ mol/kg的缀合物5 (i.v., BIW x 4个剂量)在FR $\alpha$ -阳性4T1-C12肿瘤模型中产生3/5的完全应答者(图26A和26B)。在两种情况下,缀合物5治疗导致动物体重显著下降。但是数据提示,缀合物

5针对FR $\alpha$ -阳性肿瘤模型的活性可因FR $\beta$ -阳性TAM的存在而增强。

[0254] 实施例15:缀合物5针对4T1 TAM的体内活性

喂食叶酸缺乏的饮食的雌性Foxn1<sup>nu</sup>裸大鼠 (Harlan, Inc., Indianapolis, IN) 在乳腺区中皮下植入 $1 \times 10^6$ 个4T1肿瘤细胞。当肿瘤达到 $\sim 1088 \text{ mm}^3$ 时,动物(n = 3)不给予任何药物(对照),静脉内给予254 nmol/kg缀合物5,254 nmol/kg缀合物5加127  $\mu\text{mol/kg}$  EC0923,或127  $\mu\text{mol/kg}$  EC0923。4天后,收获整个肿瘤,酶消化,并进行FACS分析。对巨噬细胞标记(CD 163、CD11b)、细胞成活力(碘化丙啶)以及晚期和早期凋亡(膜联蛋白V),染色肿瘤细胞悬液。

[0255] 缀合物5对FR+ 4T1 TAM显示出超过FR- 4T1肿瘤细胞的体内选择性(图27)。以单一给予,缀合物5显示在这些4T1肿瘤中显著减少CD163+CD11b+ TAM群体。虽然叶酸竞争剂EC0923 (与药物不相连的叶酸)单独对4T1 TAM没有任何影响,但缀合物5抗-TAM活性也未被500-倍过量的EC0923阻断。进一步的分析表明,缀合物5对FR-细胞群(包括CD163-CD11b+ 4T1 TAM和4T1肿瘤细胞本身)没有影响。这些数据显示,用缀合物5治疗出现TAM的最大凋亡(杀死)。

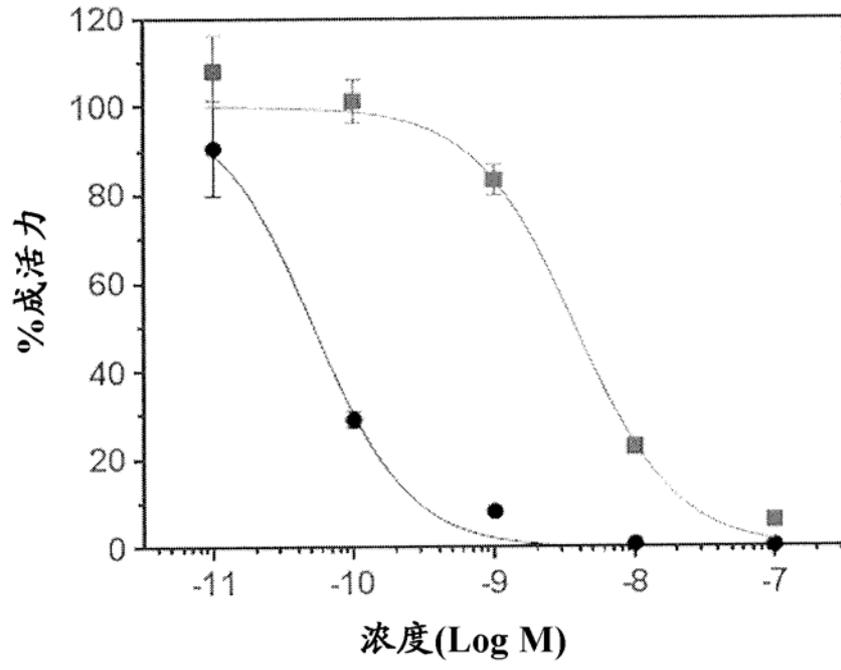


图 1

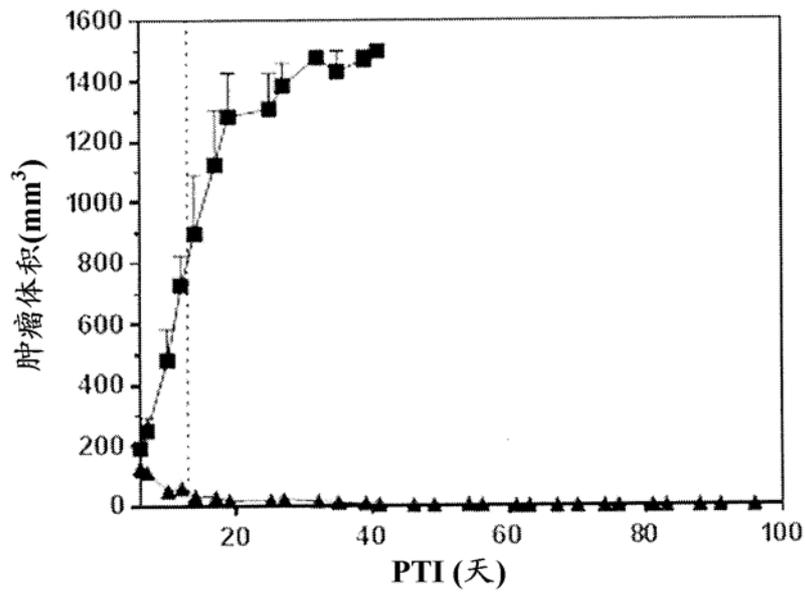


图 2A

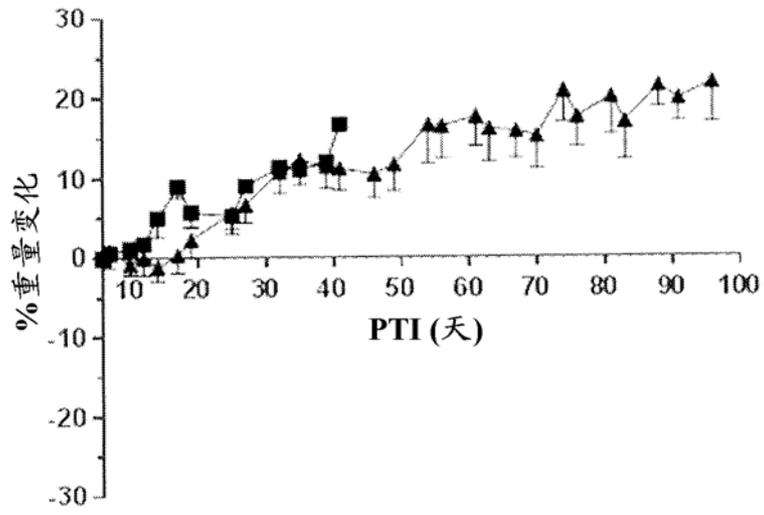


图 2B

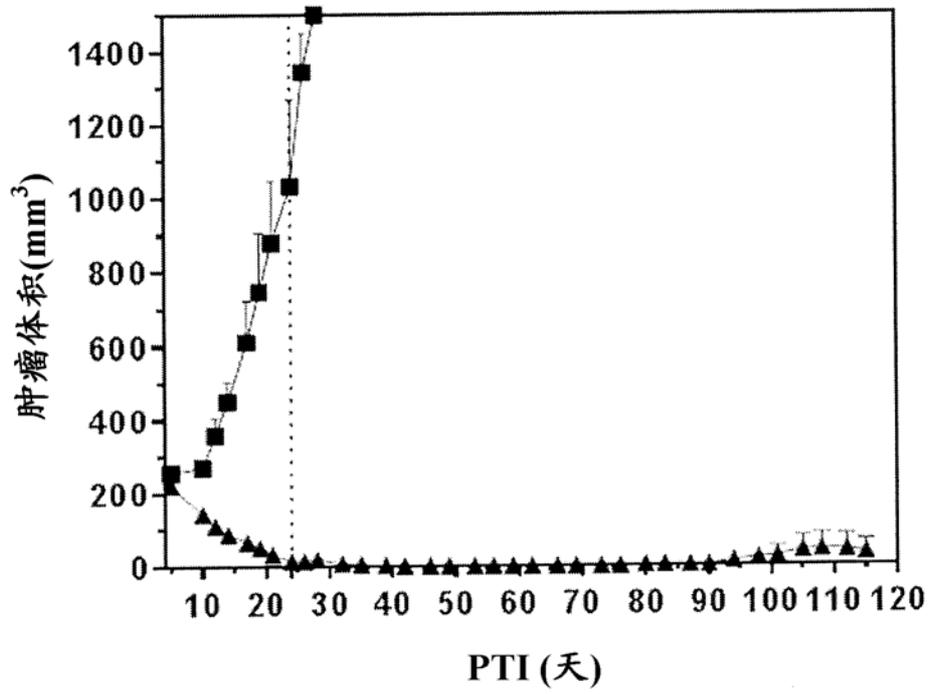


图 3

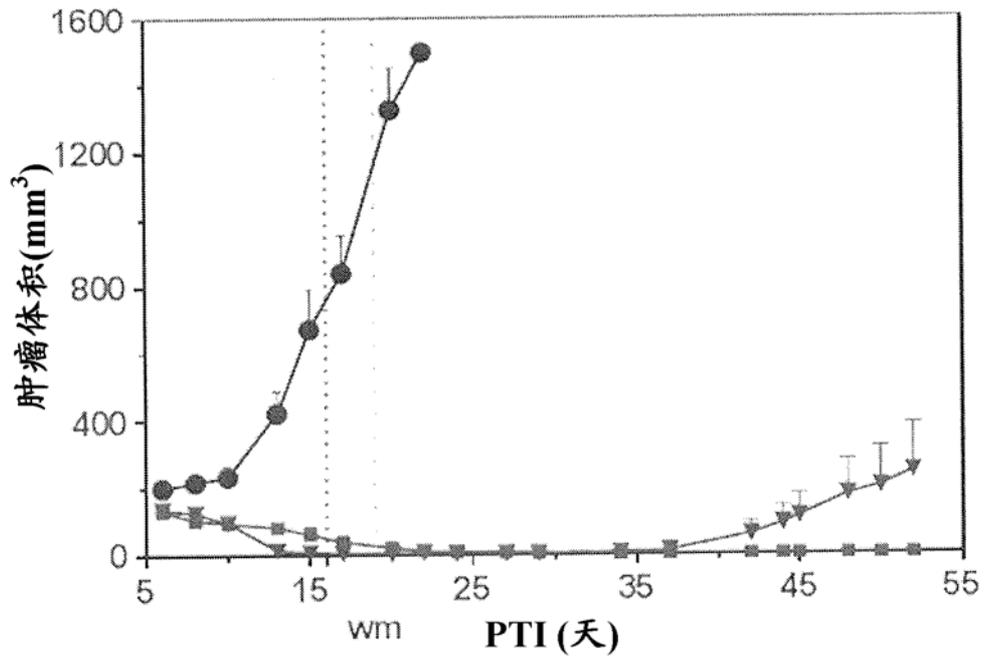


图 4

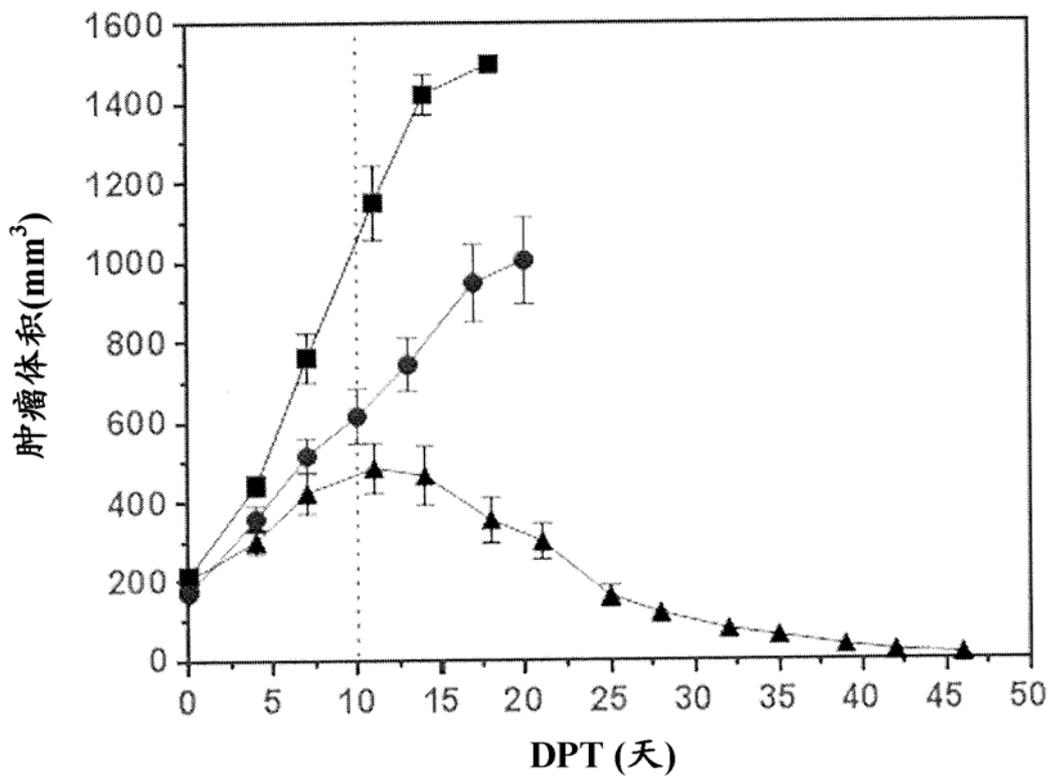


图 5

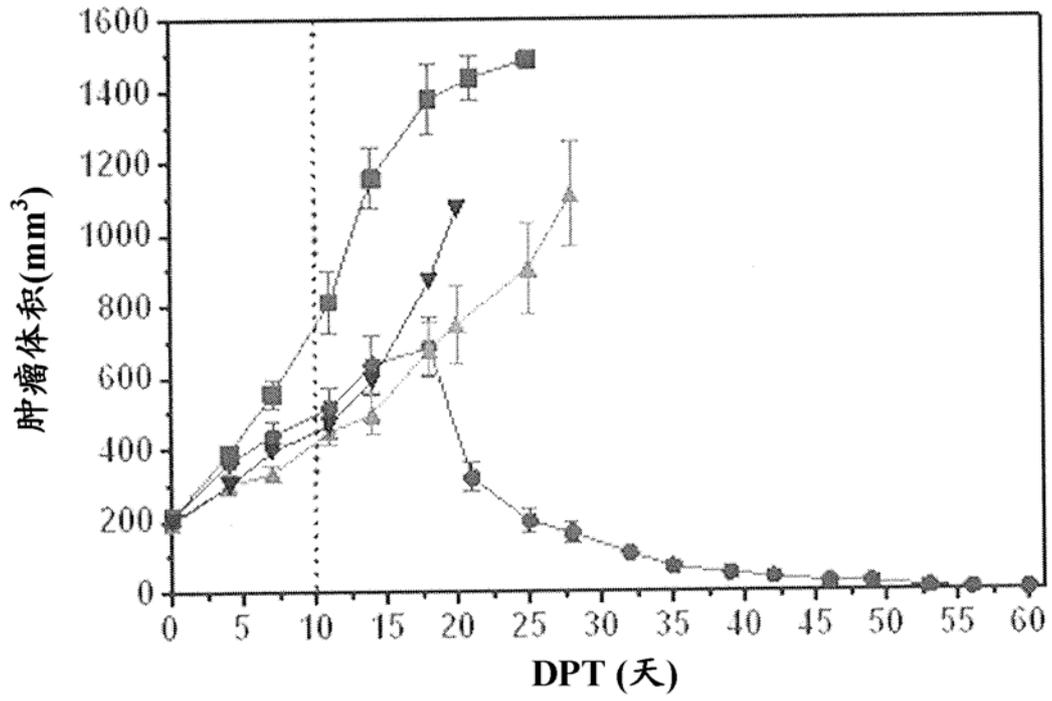


图 6

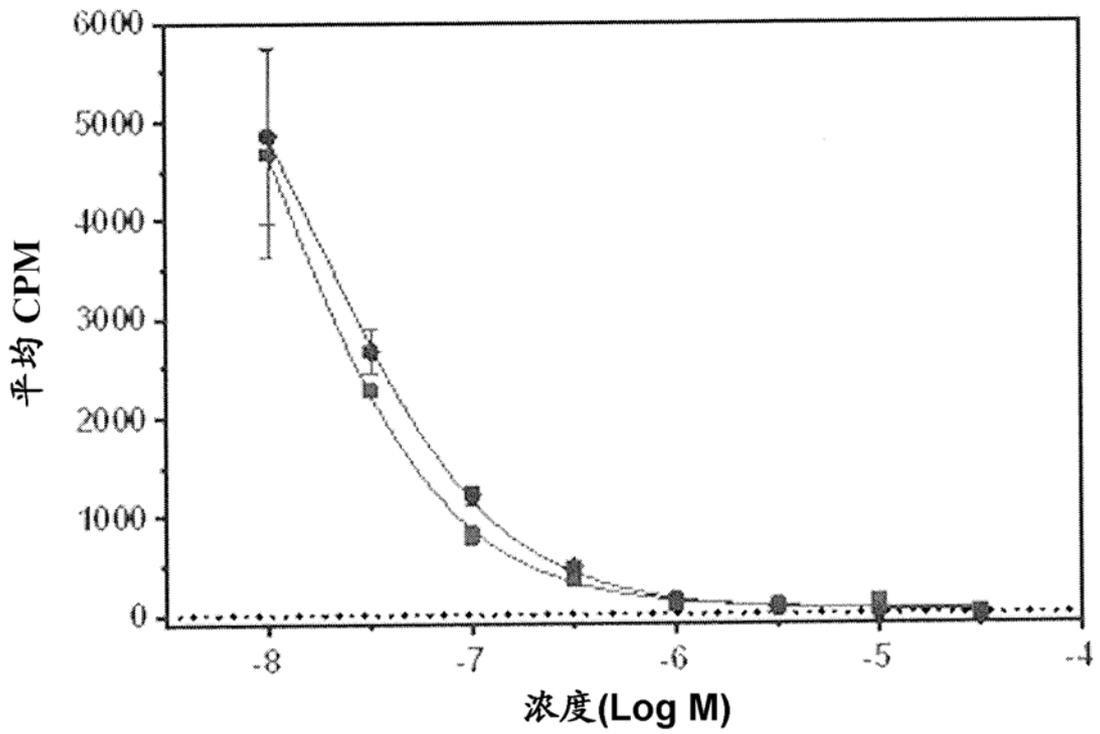


图 7

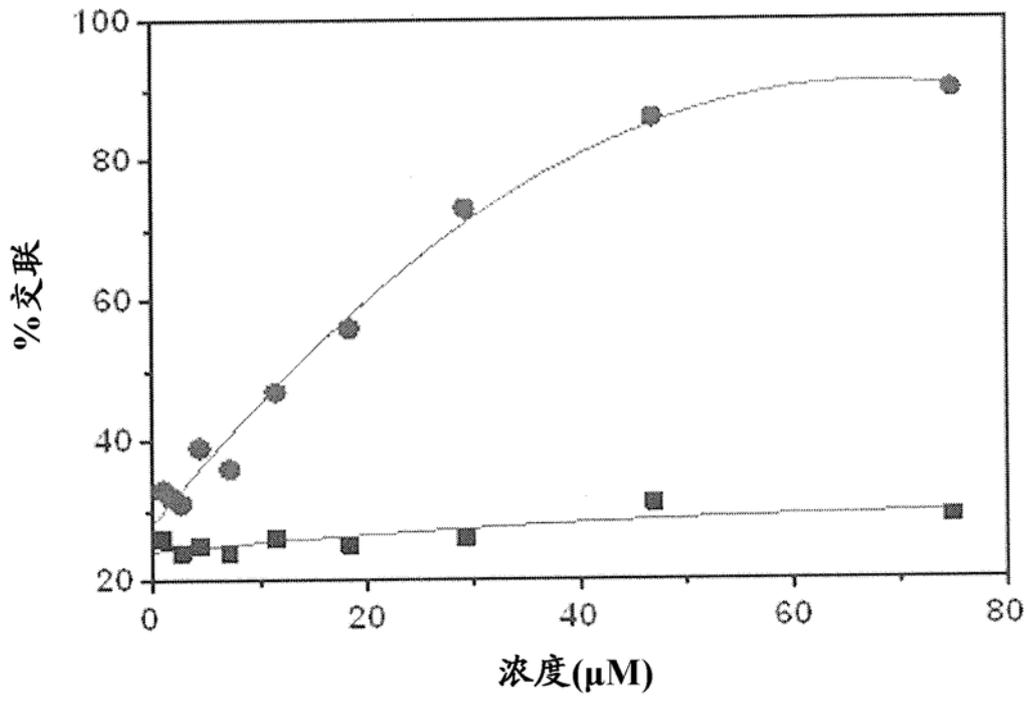


图 8

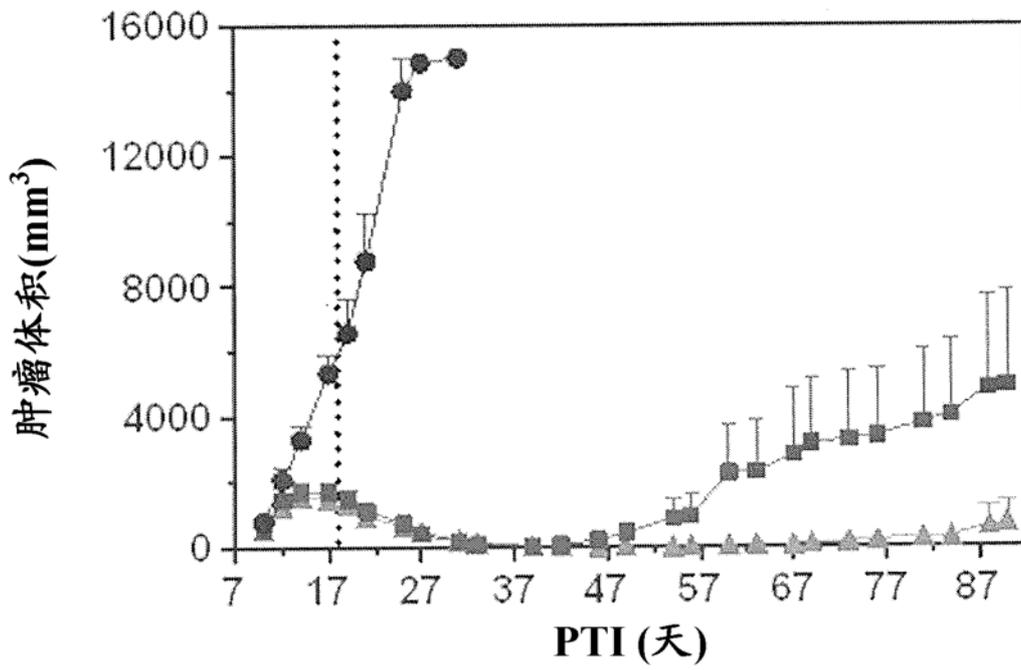


图 9A

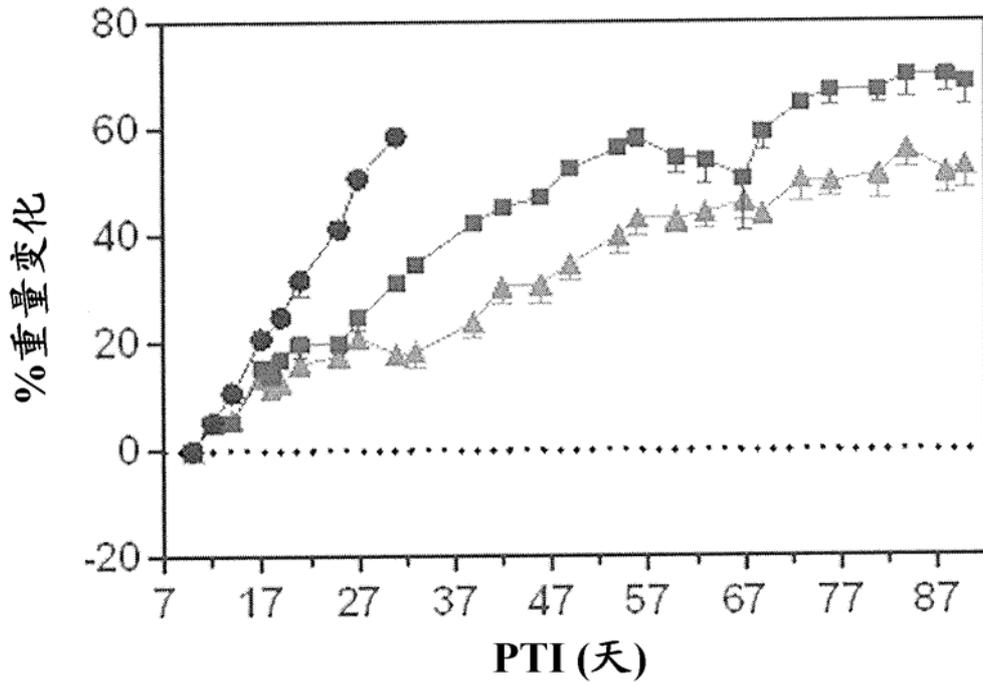


图 9B

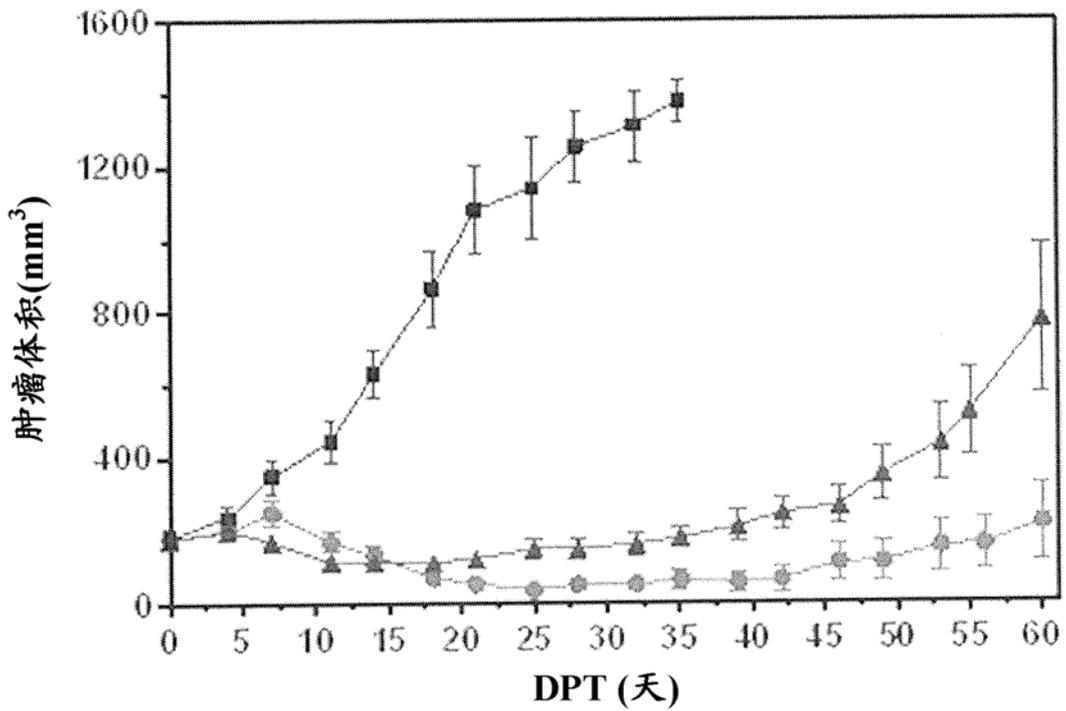


图 10

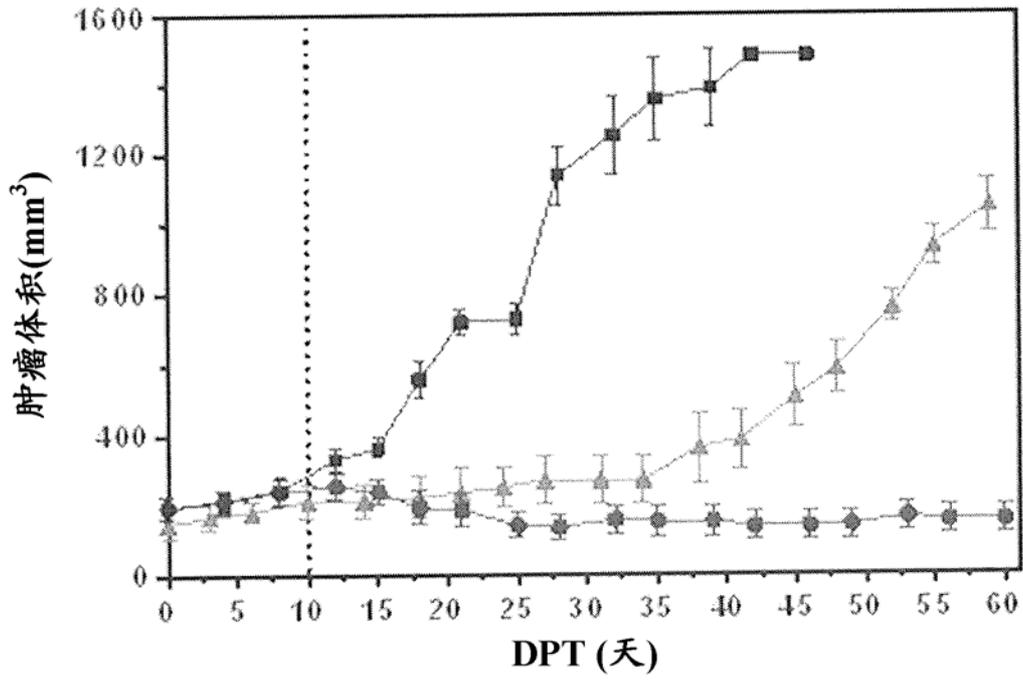


图 11

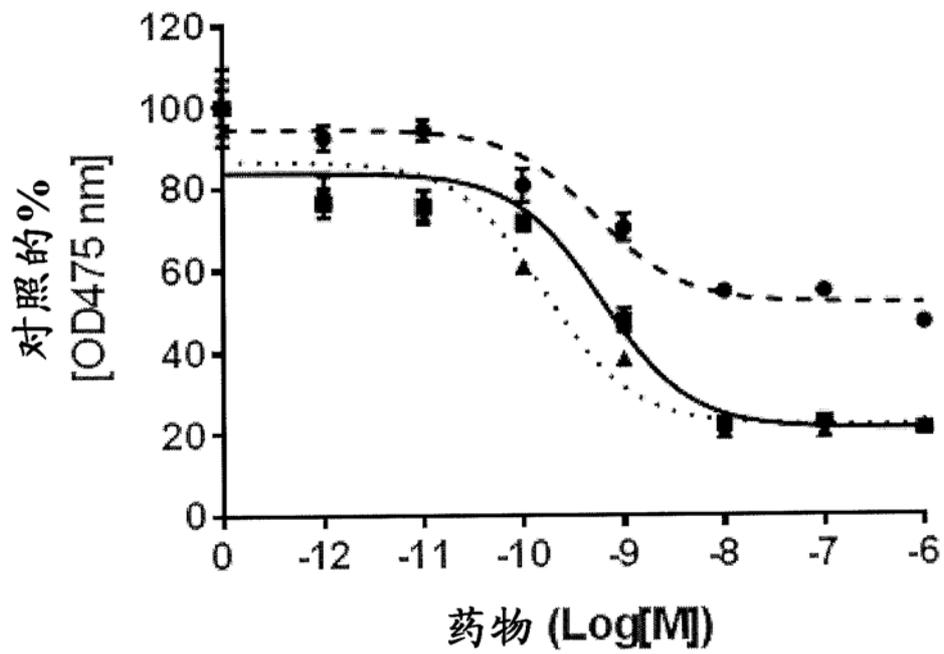


图 12

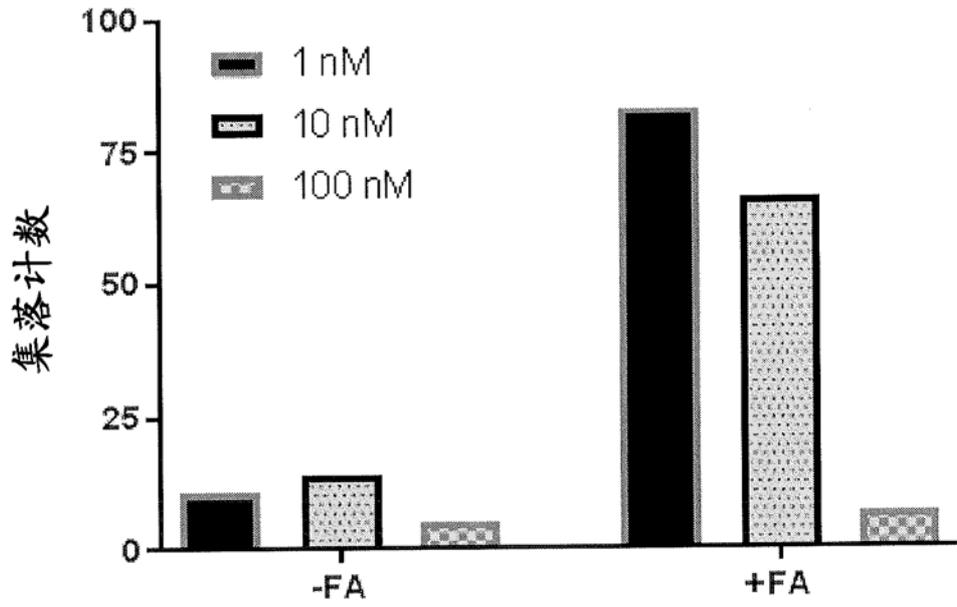


图 13

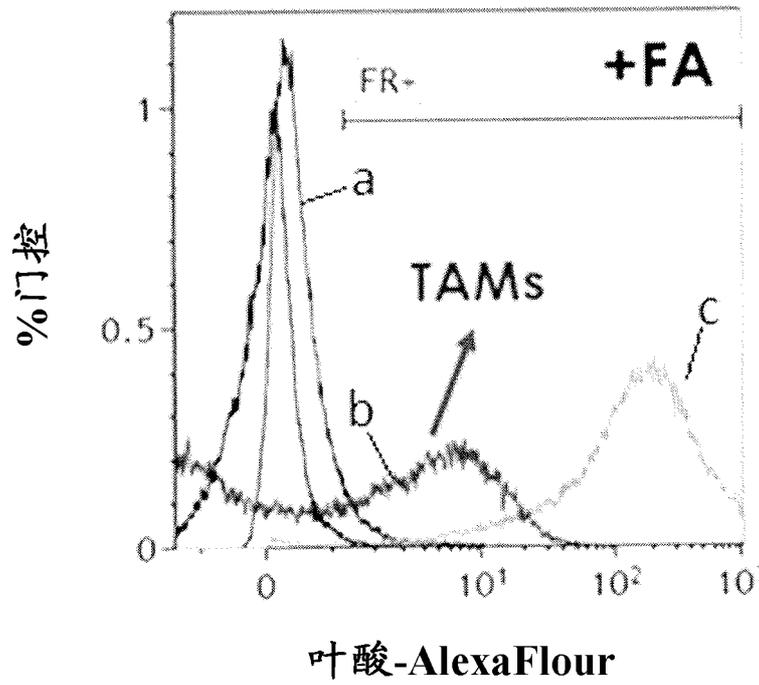


图 14

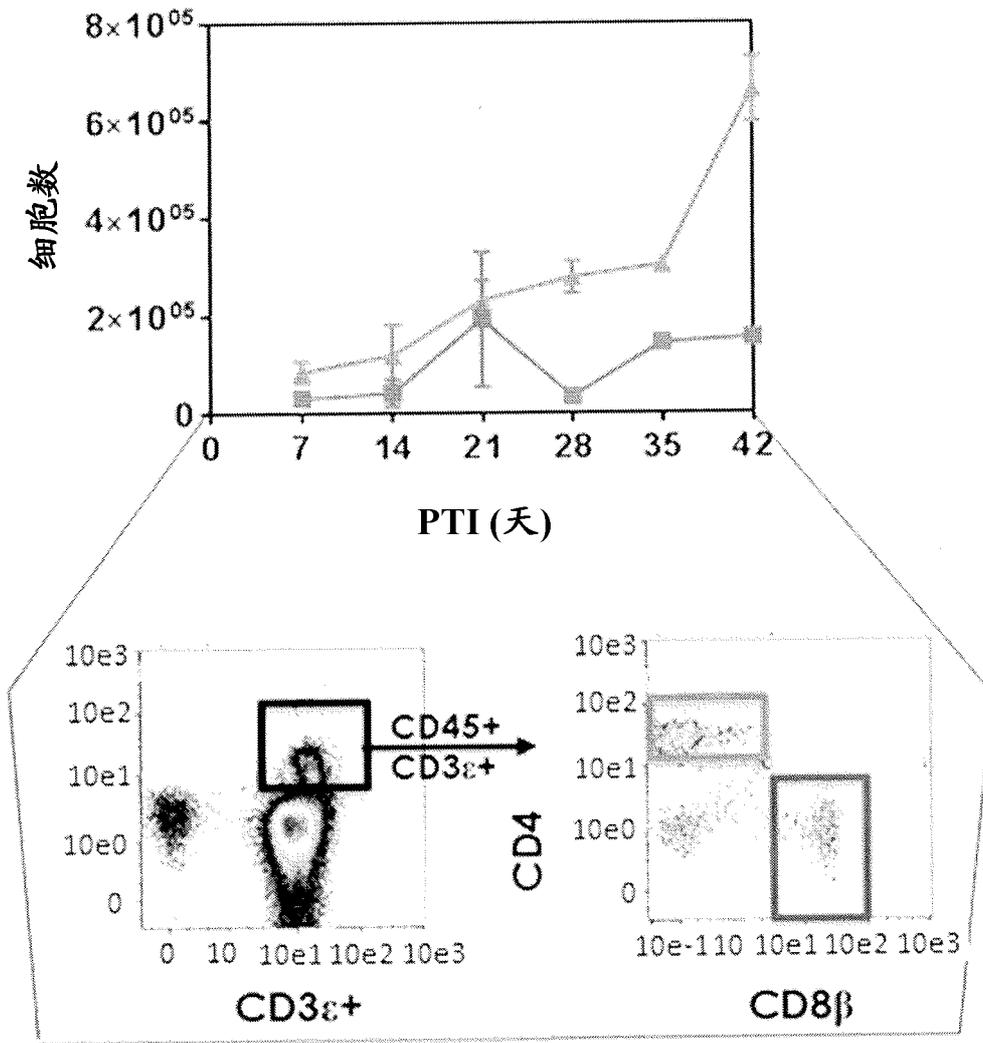


图 15A

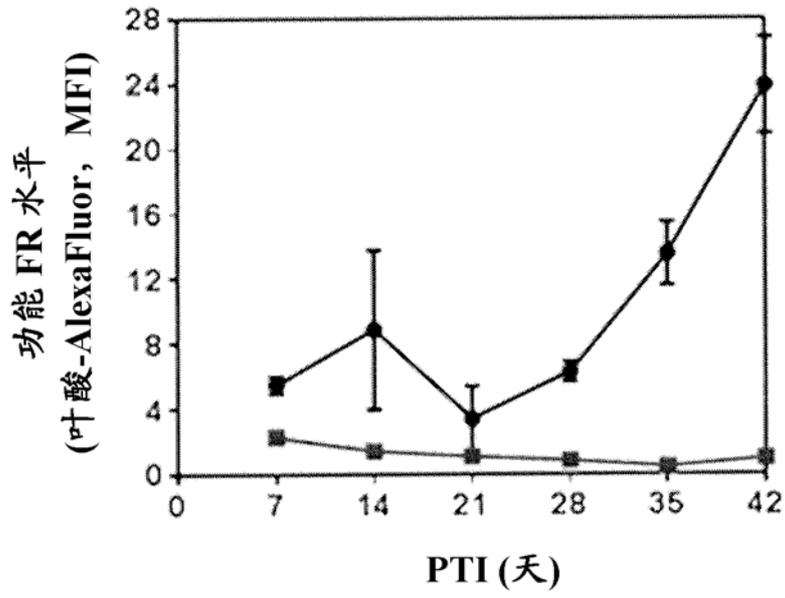


图 15B

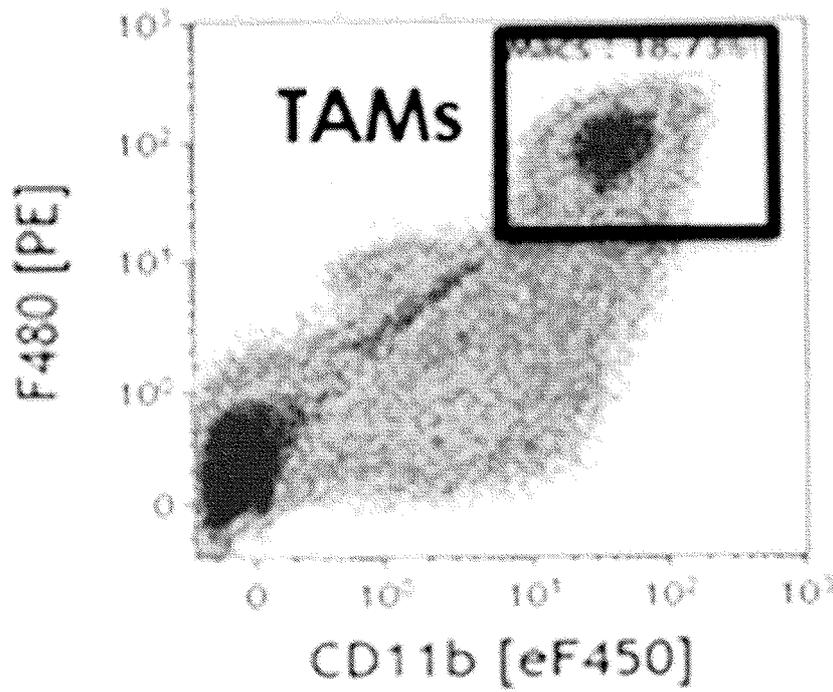


图 15C

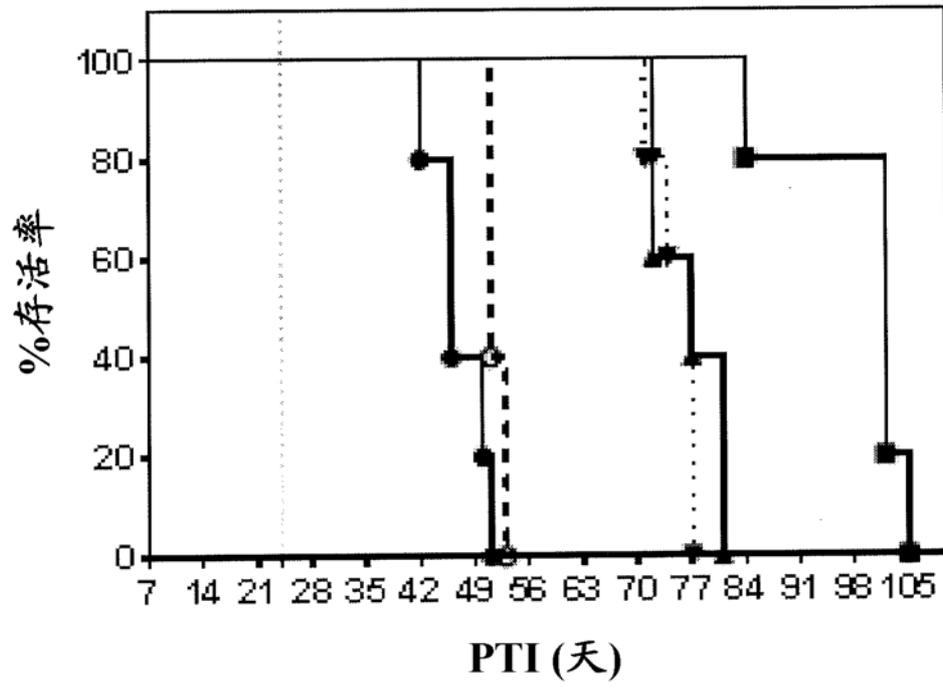


图 16A

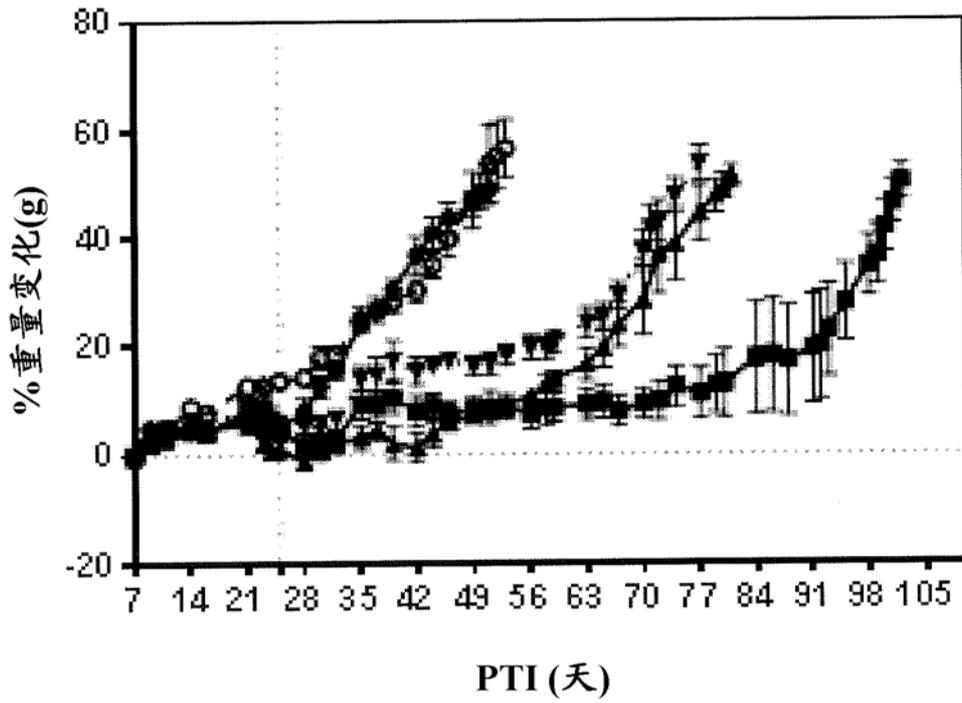


图 16B

图 17B

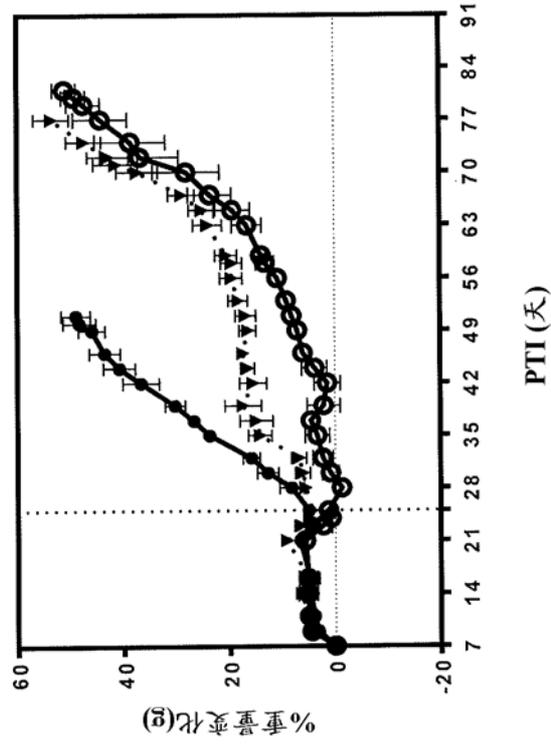
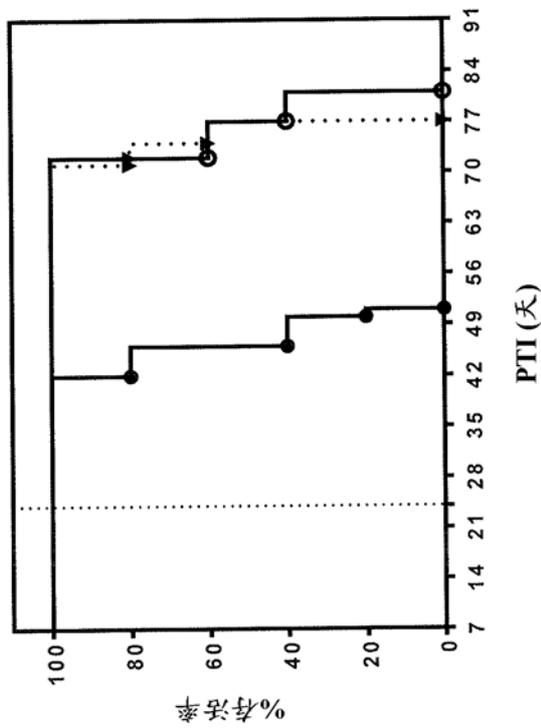


图 17A



- 对照
- ▼ EC1456 (2 μmol/kg, BIW x 3, 6个剂量, 第一个剂量=D7)
- Conj.5 (0.1 μmol/kg, BIW x 3, 6个剂量, 第一个剂量=D7)

图 18A

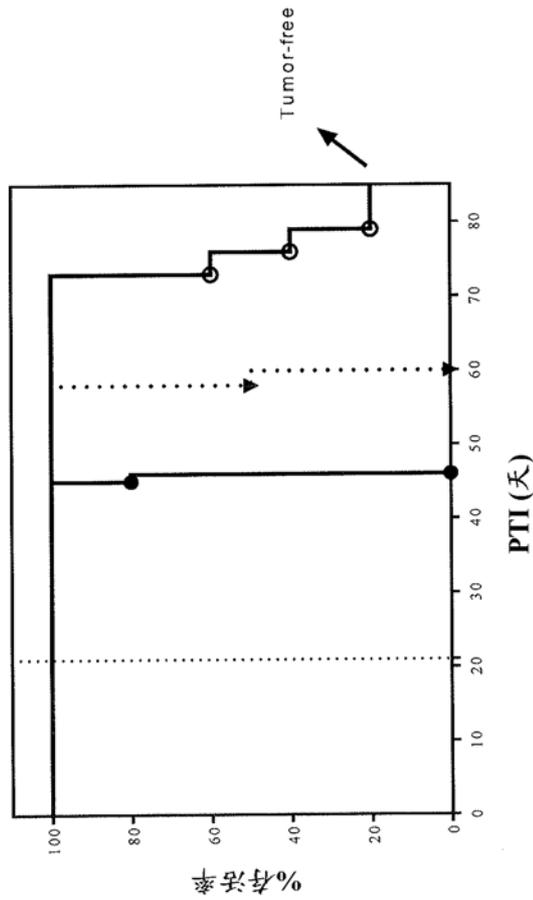
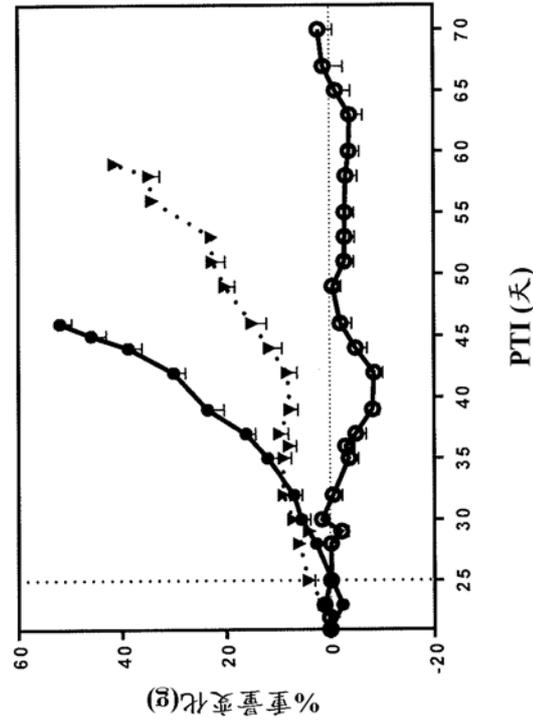


图 18B



- 对照(MST: 46 天)
- ▼ EC1456 2 μmol/kg D0-2 x 3 (n=2, 3 例因严重皮炎于第 44 天施行安乐死, MST: 59 天)
- Conji.5 0.1 μmol/kg D0-2 x 3 (n=5) 动物表现轻度共济失调

图 19B

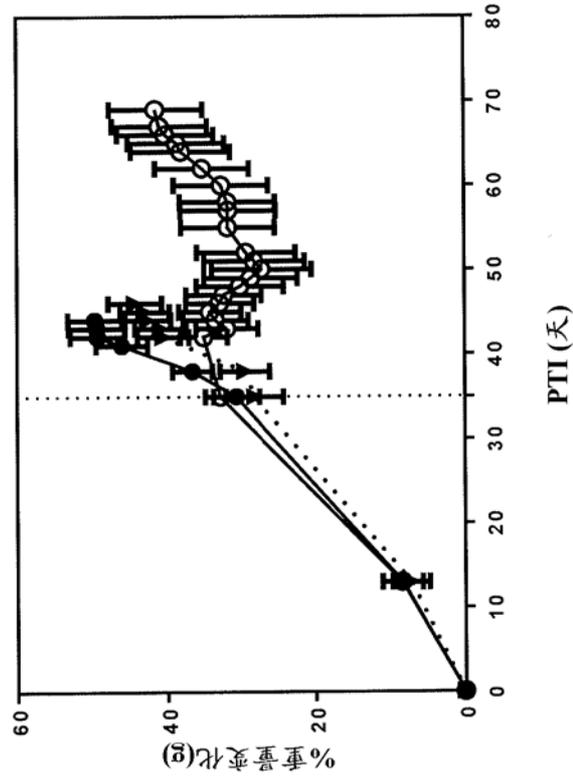
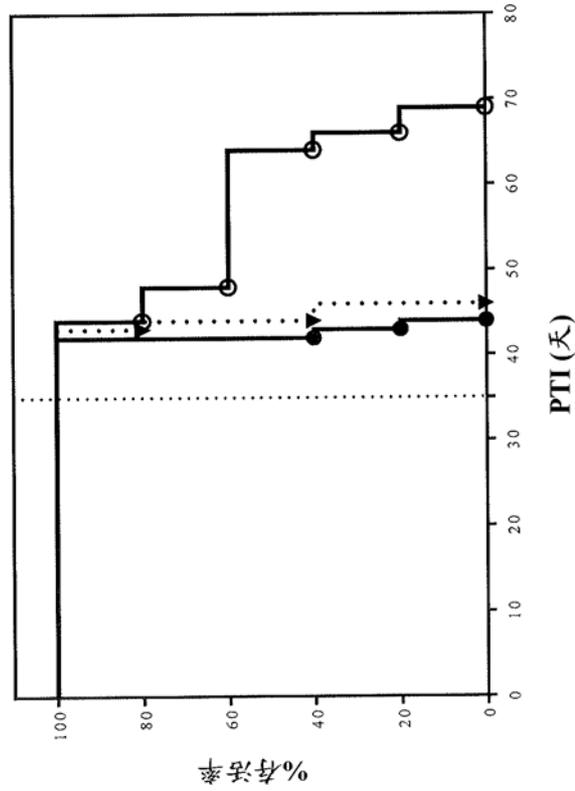


图 19A



- 对照 (MST: 42 天)
- ▼ EC1456 2  $\mu\text{mol/kg}$  D0-2 x 2 (MST: 44 天)
- Conj.5 (0.3  $\mu\text{mol/kg}$ , D35, D42 (SIW x 2) (MST: 64 天)

图 20B

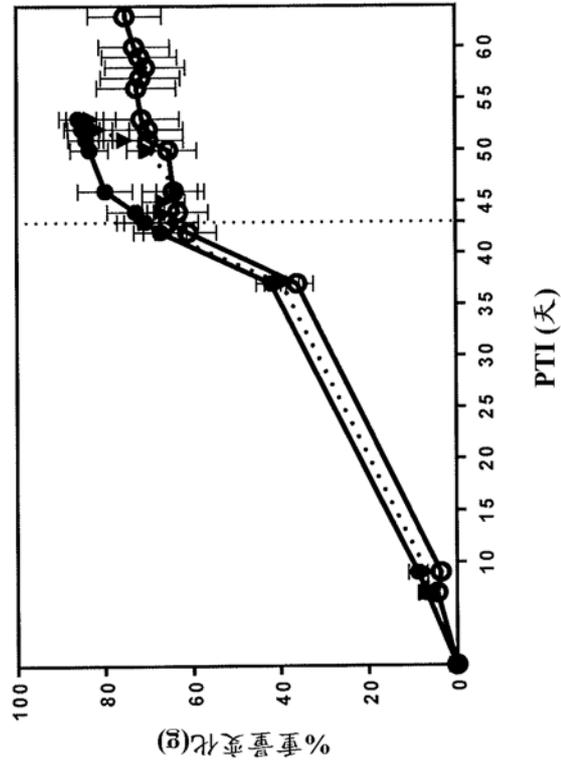
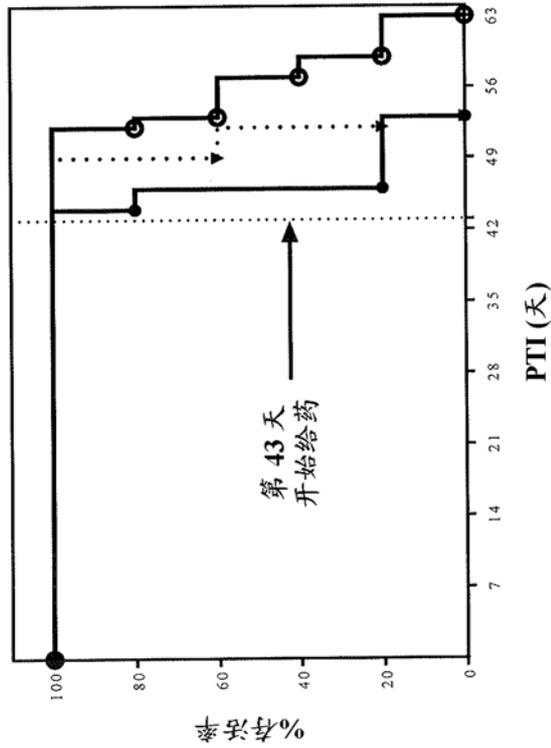


图 20A



- 对照 (MST: 46 天)
- ▼ EC-1456 (2 μmol/kg D0-2 x 1 周) (MST: 52 天)
- Conj.5 (0.3 μmol/kg SIW x 2) (MST: 57 天)

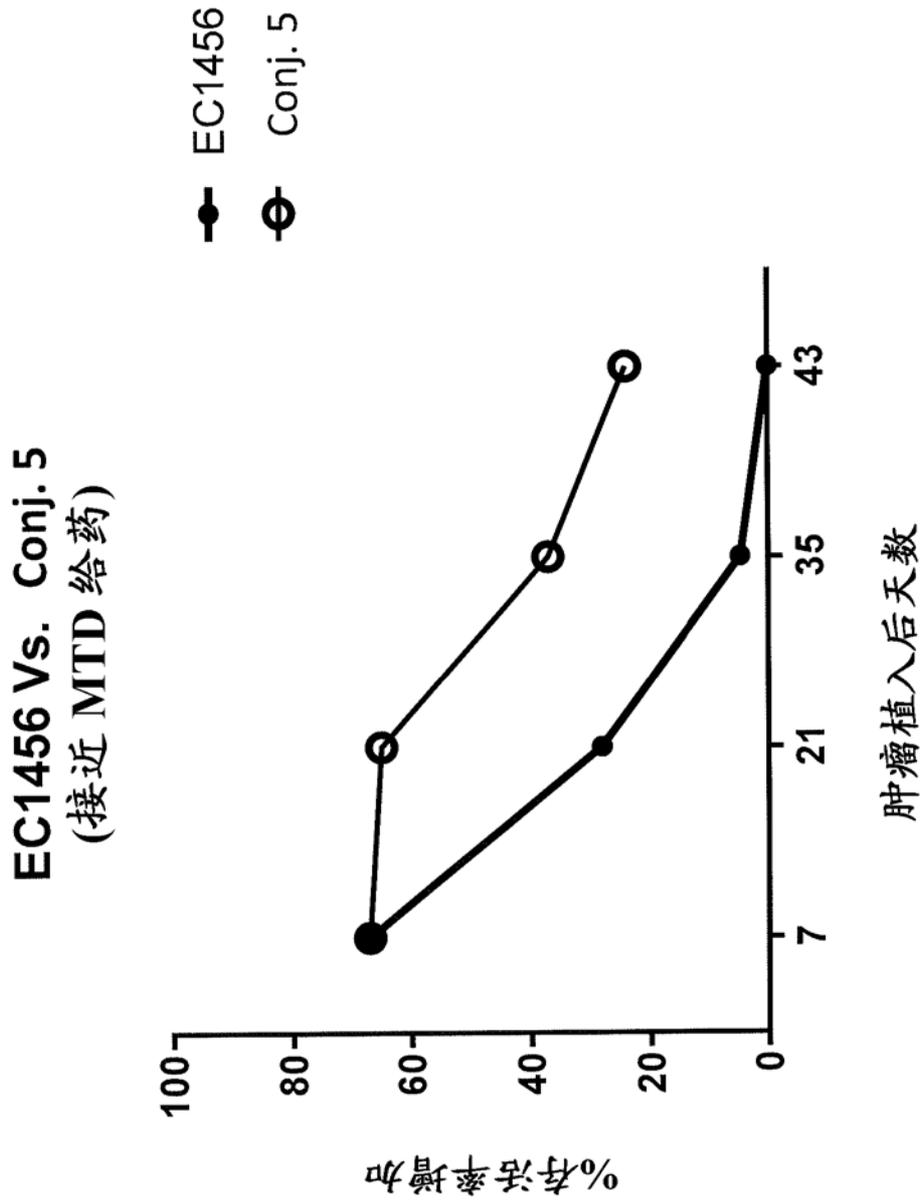


图 21

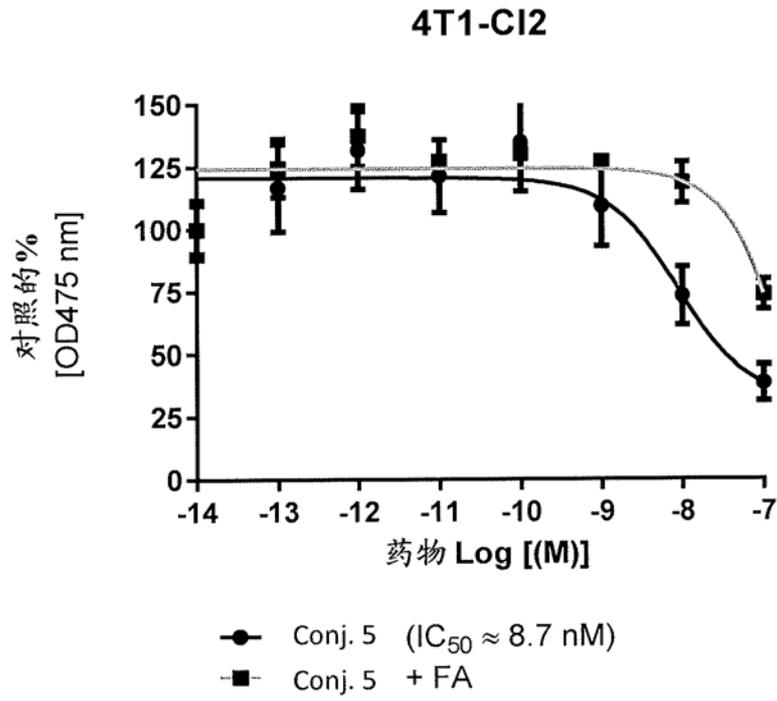


图 22A

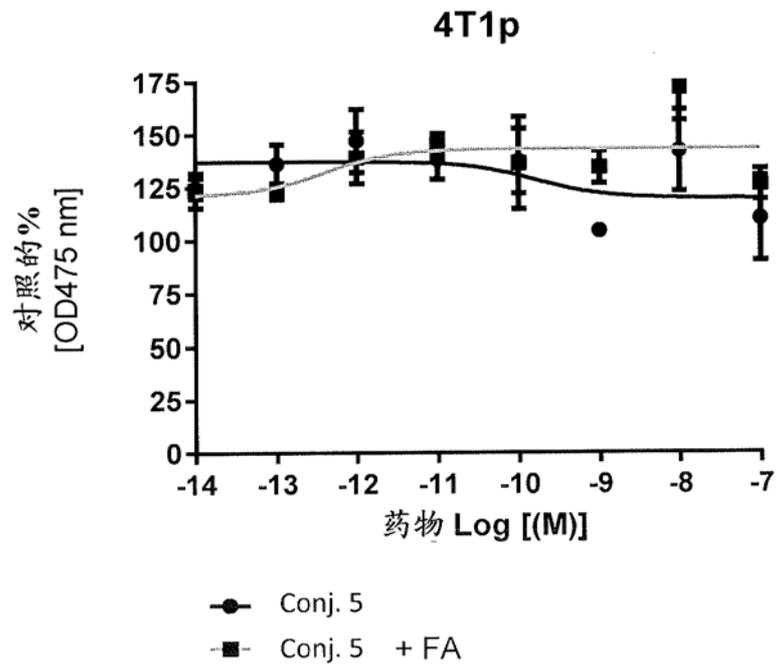


图 22B

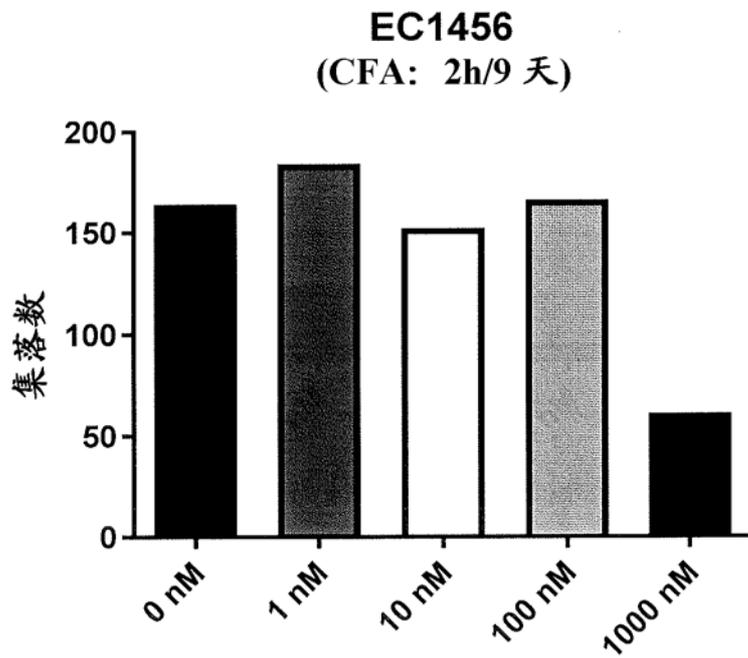
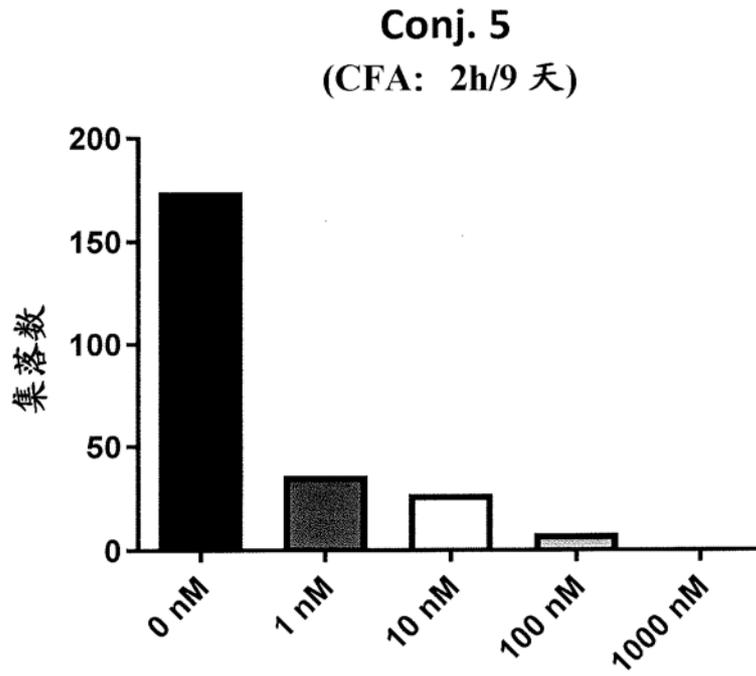
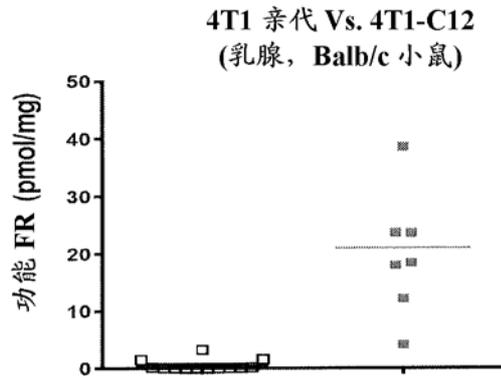
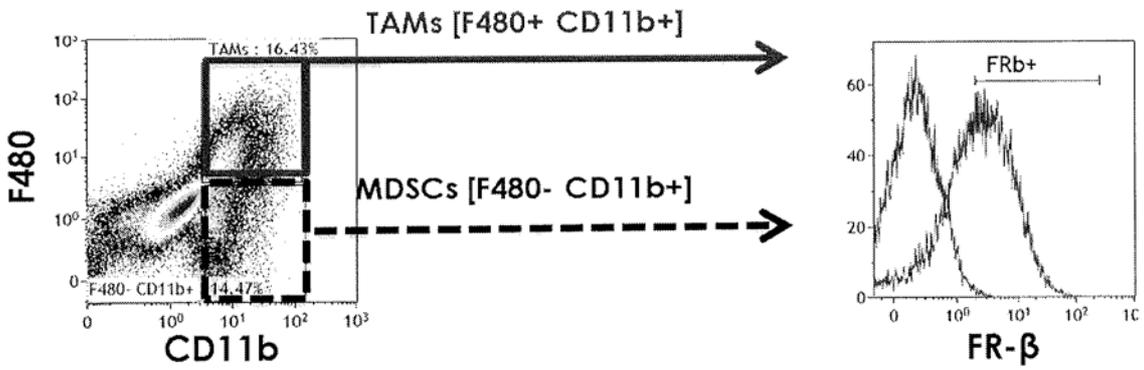


图 23

### A. 等基因肿瘤



### B. 4T1p (FR $\alpha$ - 肿瘤 )



### C. 4T1-CL2 (FR $\alpha$ + 肿瘤 )

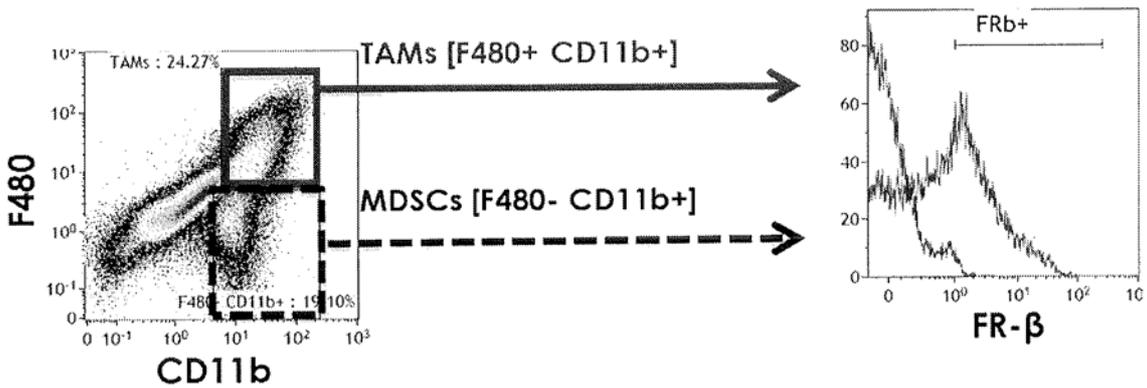


图 24

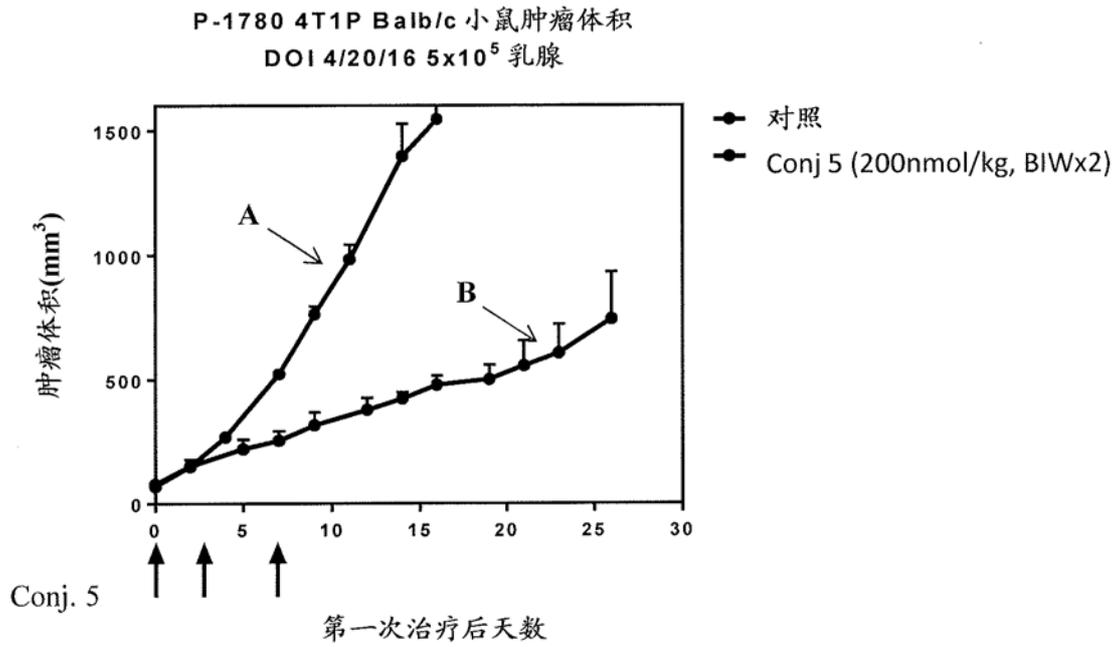


图 25A

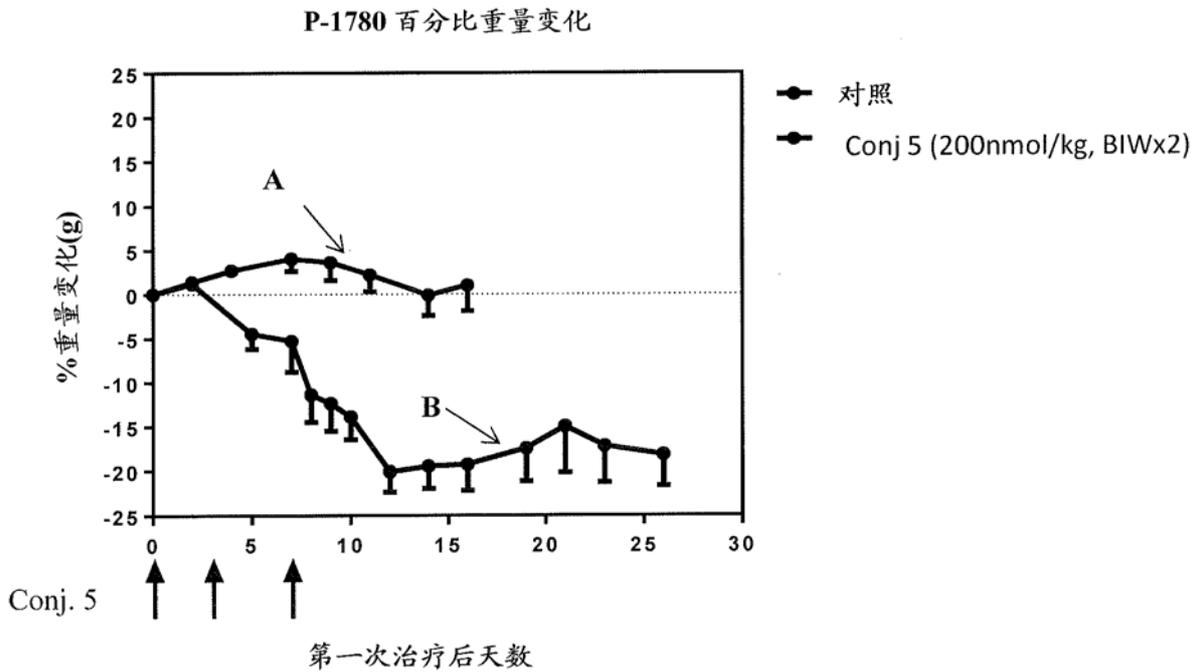


图 25B

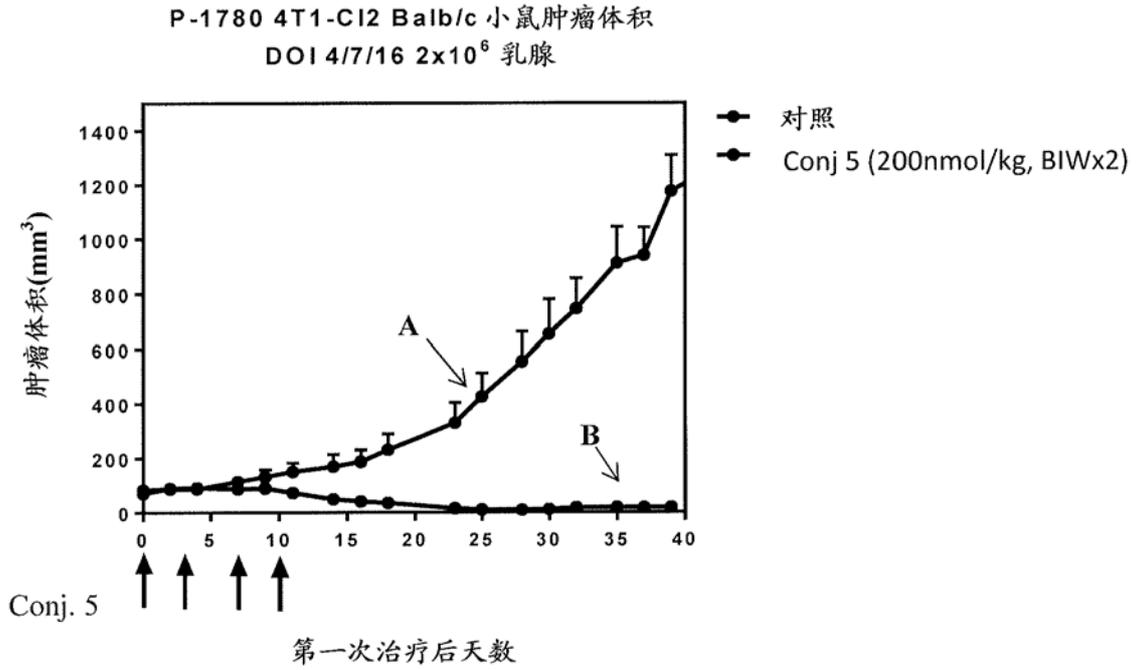


图 26

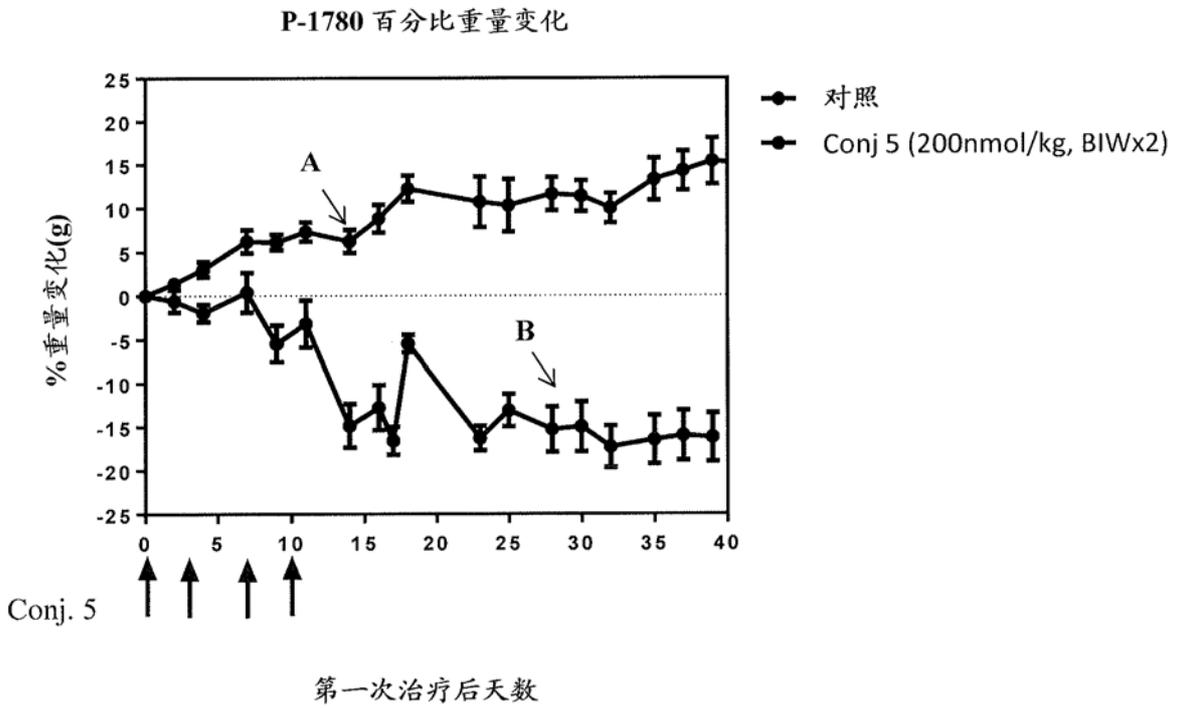


图 26B

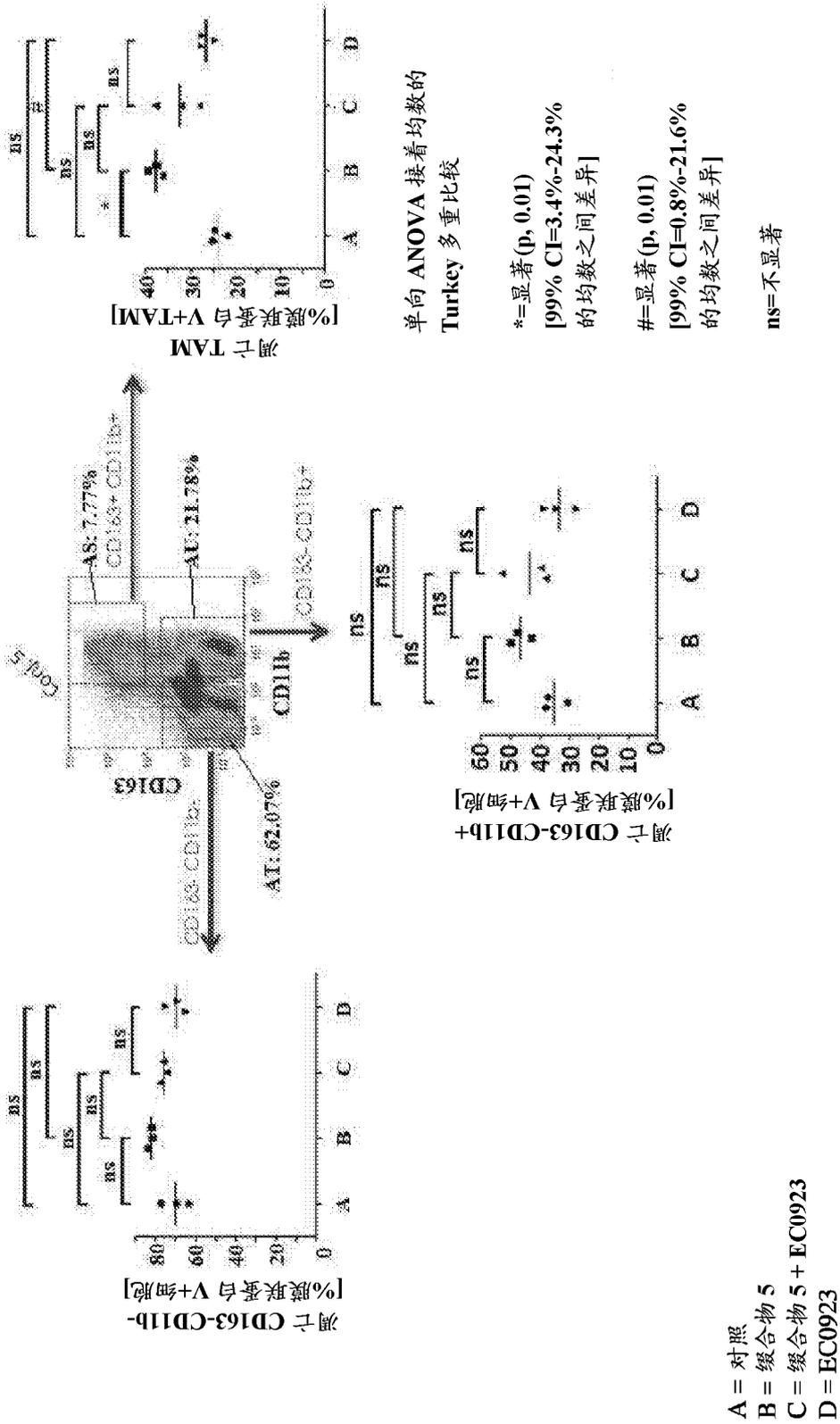


图 27