



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109475558 A

(43)申请公布日 2019.03.15

(21)申请号 201780046536.9

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

(22)申请日 2017.05.25

72001

(30)优先权数据

代理人 任晓华 李志强

62/341587 2016.05.25 US

(51)Int.Cl.

A61K 31/519(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

A61K 51/04(2006.01)

2019.01.25

A61K 38/07(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2017/034537 2017.05.25

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/205661 EN 2017.11.30

(71)申请人 普渡研究基金会

地址 美国印第安纳州

申请人 恩多塞特公司

(72)发明人 P.S.罗 B.王 C.P.利蒙 Y.J.卢

L.W.惠勒二世

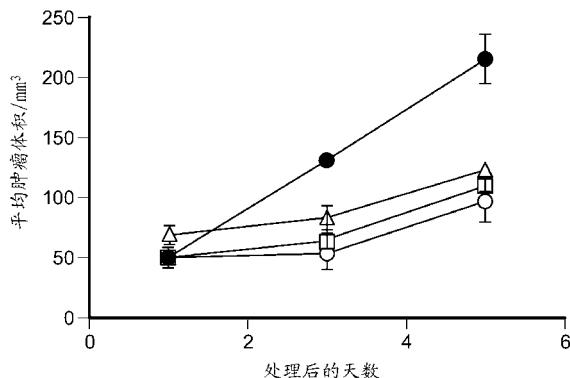
权利要求书4页 说明书38页 附图42页

(54)发明名称

通过靶向骨髓衍生的抑制细胞而治疗癌症的方法

(57)摘要

本文描述的发明涉及使用一种或多种化合物治疗癌症的方法,所述化合物包含经由接头连接至药物的叶酸受体结合配体。更具体地,本文描述的发明涉及使用一种或多种化合物治疗癌症的方法,所述化合物包含经由接头连接至药物的叶酸受体结合配体以靶向骨髓衍生的抑制细胞。



1. 用于治疗叶酸受体阴性癌症的方法,其包括向宿主动物施用治疗有效量的一种或多种化合物,所述化合物包含经由接头连接至药物的叶酸受体结合配体,其中骨髓衍生的抑制细胞被抑制或耗尽。

2. 用于治疗叶酸受体阴性癌症的方法,其包括向宿主动物施用治疗有效量的一种或多种化合物,所述化合物包含经由接头连接至药物的叶酸受体结合配体,以耗尽或抑制骨髓衍生的抑制细胞。

3. 用于治疗宿主动物中的叶酸受体阴性癌症的方法,其中骨髓衍生的抑制细胞处于所述癌症中,所述方法包括向所述宿主动物施用治疗有效量的一种或多种包含经由接头连接至药物的叶酸受体结合配体的化合物,并且治疗具有骨髓衍生的抑制细胞的癌症。

4. 用于治疗癌症的方法,其包括鉴定骨髓衍生的抑制细胞在宿主动物中的癌症中的存在,并且向所述宿主动物施用治疗有效量的一种或多种化合物,所述化合物包含经由接头连接至药物的叶酸受体结合配体。

5. 用于治疗宿主动物中的癌症的方法,所述方法包括向所述宿主动物施用治疗有效量的一种或多种化合物,所述化合物包含经由接头连接至药物的叶酸受体结合配体,以抑制或耗尽骨髓衍生的抑制细胞。

6. 用于靶向宿主动物中的骨髓衍生的抑制细胞的方法,所述方法包括向所述宿主动物施用治疗或诊断有效量的一种或多种化合物,所述化合物包含经由接头连接至药物的叶酸受体结合配体,以靶向骨髓衍生的抑制细胞。

7. 权利要求4-6中任一项的方法,其中所述癌症是叶酸受体阴性的。

8. 权利要求4-6中任一项的方法,其中所述癌症是叶酸受体阳性的。

9. 权利要求1-8中任一项的方法,其中所述叶酸受体结合配体是叶酸受体 $\beta$ 特异性的,并且其中所述叶酸受体结合配体结合所述骨髓衍生的抑制细胞上的叶酸受体 $\beta$ 。

10. 权利要求1-9中任一项的方法,其中所述骨髓衍生的抑制细胞具有CD11b标记物。

11. 权利要求1-10中任一项的方法,其中所述骨髓衍生的抑制细胞具有Gr1标记物。

12. 权利要求1-11中任一项的方法,其中所述癌症选自非小细胞肺癌、头颈癌、三阴性乳腺癌、乳腺癌、卵巢癌、结肠癌、前列腺癌、肺癌、子宫内膜癌和肾癌。

13. 权利要求1-12中任一项的方法,其中所述药物选自CI307、BEZ235、渥曼青霉素、AMT、PF-04691502、CpG寡核苷酸、BLZ945、来那度胺、NLG919、5,15-DPP、吡咯并苯并二氮杂草、氨甲蝶呤、依维莫司、tubulysin、GDC-0980、AS1517499、BIRB796、n-乙酰基-5-羟基色胺和2,4-二氨基-6-羟基嘧啶。

14. 权利要求1-13中任一项的方法,其中所述药物是微管抑制剂。

15. 权利要求14的方法,其中所述药物杀死骨髓衍生的抑制细胞。

16. 权利要求1-13中任一项的方法,其中所述药物选自PI3K抑制剂、STAT6抑制剂、MAPK抑制剂、iNOS抑制剂和抗炎药物。

17. 权利要求16的方法,其中所述药物使骨髓衍生的抑制细胞失活。

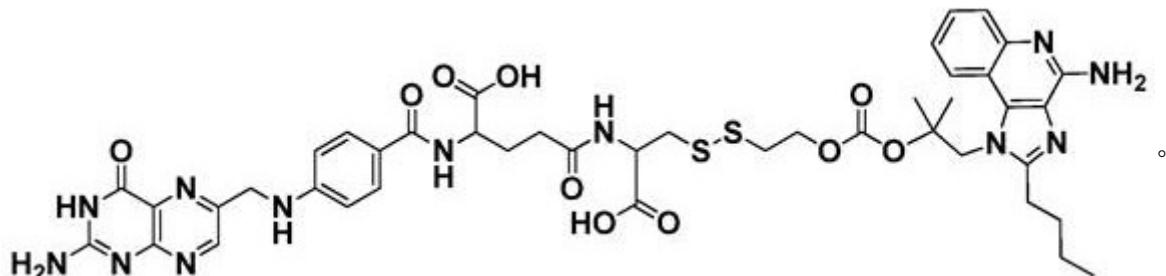
18. 权利要求1-13中任一项的方法,其中所述药物是TLR激动剂。

19. 权利要求18的方法,其中所述TLR激动剂选自TLR7激动剂和TLR9激动剂。

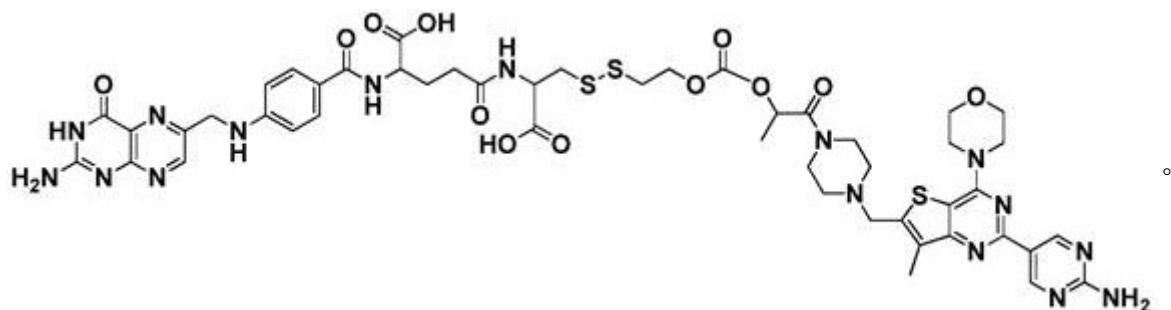
20. 权利要求18或19的方法,其中所述药物使骨髓衍生的抑制细胞重编程。

21. 权利要求14或15的方法,其中所述药物是tubulysin。

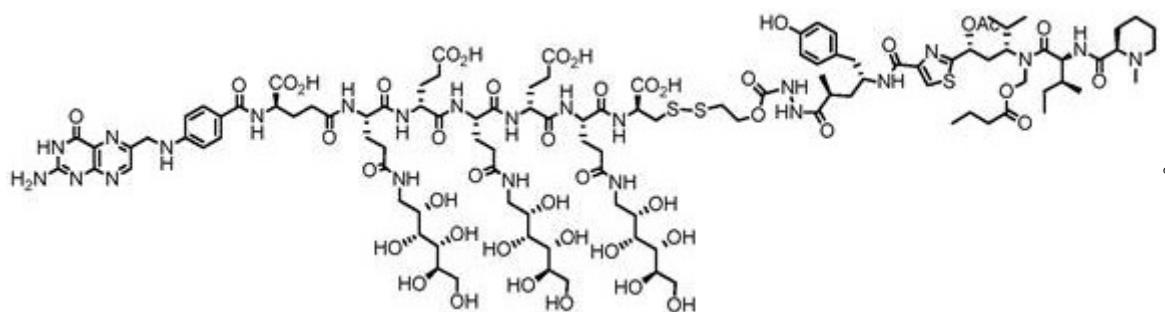
22. 权利要求16的方法,其中所述药物是PI3K抑制剂。
23. 权利要求22的方法,其中所述药物选自GDC-0980、渥曼青霉素和PF-04691502。
24. 权利要求16的方法,其中所述药物是STAT6抑制剂。
25. 权利要求24的方法,其中所述药物是AS1517499。
26. 权利要求16的方法,其中所述药物是MAPK抑制剂。
27. 权利要求26的方法,其中所述药物是BIRB796。
28. 权利要求16的方法,其中所述药物是iNOS抑制剂。
29. 权利要求28的方法,其中所述药物是AMT。
30. 权利要求16的方法,其中所述药物是抗炎药物。
31. 权利要求30的方法,其中所述药物是氨甲蝶呤。
32. 权利要求18-20中任一项的方法,其中所述药物选自CI307、CpG寡核苷酸和TLR7A。
33. 权利要求1-13中任一项的方法,其中施用多于一种化合物,并且所述化合物包含不同的药物。
34. 权利要求33的方法,其中所述不同的药物是TLR7激动剂和PI3K抑制剂。
35. 权利要求1-32中任一项的方法,其中施用一种或多种化合物,并且还施用未缀合的药物。
36. 权利要求35的方法,其中所述化合物中的药物是TLR7激动剂,并且未缀合的药物是PI3K抑制剂。
37. 权利要求1-12中任一项的方法,其中所述化合物具有下式:



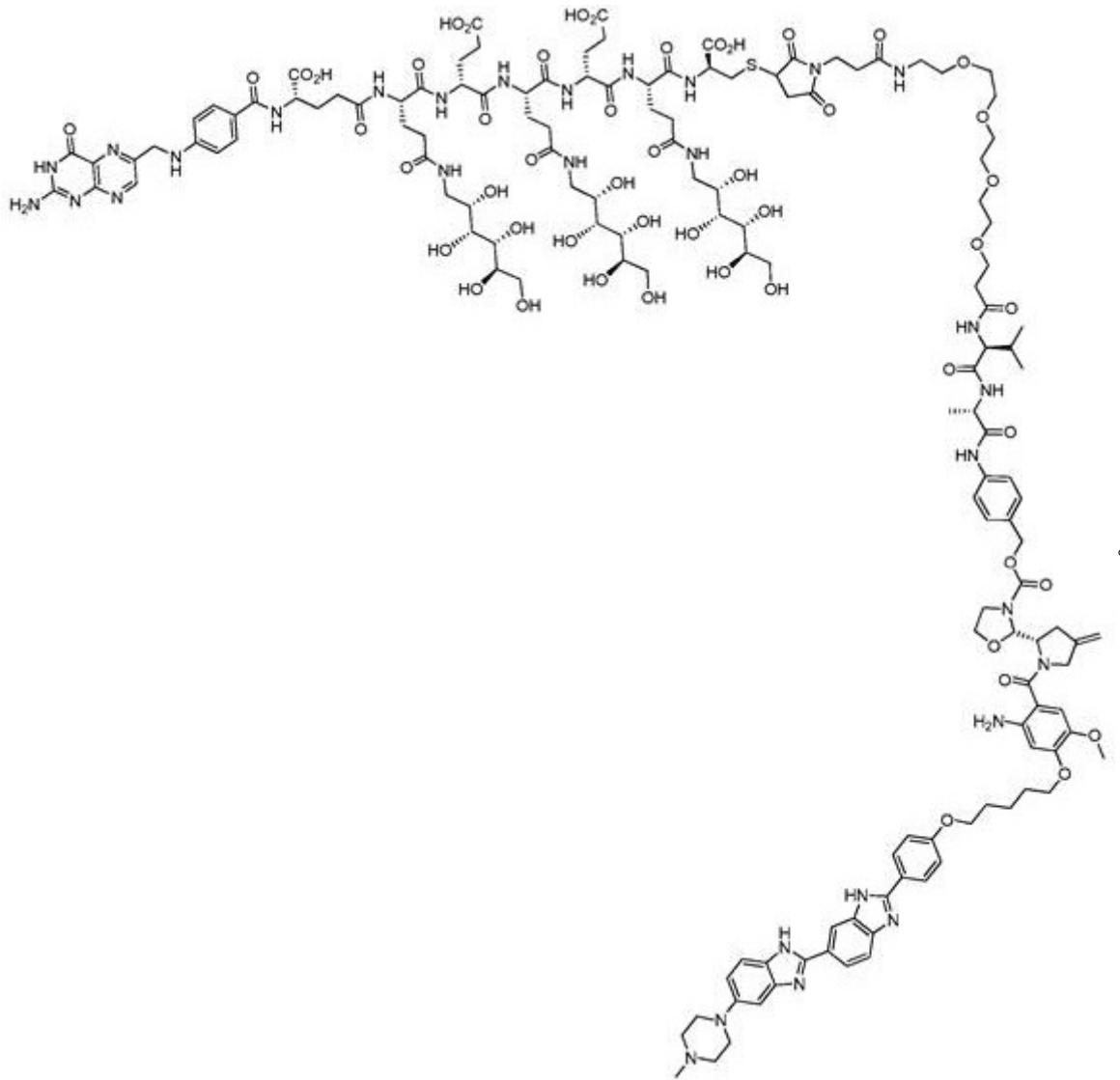
38. 权利要求1-12中任一项的方法,其中所述化合物具有下式:



39. 权利要求1-12中任一项的方法,其中所述化合物具有下式:



40. 权利要求1-12中任一项的方法,其中所述化合物具有下式:



41. 权利要求1-40中任一项的方法,其中向所述宿主动物施用所述一种或多种化合物,或任何所述一种或多种化合物的药学上可接受的盐。

42. 权利要求1-41中任一项的方法,其中所述施用呈胃肠外剂型。

43. 权利要求42的方法,其中所述胃肠外剂型选自皮内剂型、皮下剂型、肌内剂型、腹膜内剂型、静脉内剂型和鞘内剂型。

44. 权利要求1-43中任一项的方法,其中所述治疗有效量或诊断有效量是约0.5 mg/m<sup>2</sup>至约6.0 mg/m<sup>2</sup>。

45. 权利要求1-44中任一项的方法,其中所述治疗有效量或诊断有效量是约0.5 mg/m<sup>2</sup>至约4.0 mg/m<sup>2</sup>。

46. 权利要求1-45中任一项的方法,其中所述治疗有效量或诊断有效量是约0.5 mg/m<sup>2</sup>至约2.0 mg/m<sup>2</sup>。

47. 权利要求1-7或9-46中任一项的方法,其中所述癌症是叶酸受体阴性的,并且所述癌症选自结肠癌、肺癌、前列腺癌和乳腺癌。

## 通过靶向骨髓衍生的抑制细胞而治疗癌症的方法

### [0001] 相关申请的交叉引用

根据35 U.S.C. § 119(e), 本申请要求2016年5月25日提交的美国临时申请序列号62/341,587的优先权, 该申请通过引用以其整体并入本文。

### [0002] 公开领域

本文描述的发明涉及使用一种或多种化合物治疗癌症的方法, 所述化合物包含经由接头连接至药物的叶酸受体结合配体。更具体地, 本文描述的发明涉及使用一种或多种化合物治疗癌症的方法, 所述化合物包含经由接头连接至药物的叶酸受体结合配体以靶向骨髓衍生的抑制细胞。

### [0003] 背景和概述

尽管存在抗癌技术(例如放射疗法、化学疗法和激素疗法)已有显著发展的事实, 但癌症在美国仍然保持是心脏病之后的第二大死因。最经常地, 以利用高强效的药物(例如丝裂霉素、紫杉醇和喜树碱)的化学疗法治疗癌症。在很多病例中, 这些化疗剂显示剂量响应作用, 并且肿瘤抑制与药物剂量成正比。因此, 使用激进给药方案来治疗肿瘤; 然而, 高剂量化疗法受到对癌细胞的选择性差以及对正常细胞的毒性的阻碍。缺少肿瘤特异性是化学疗法需要克服的很多障碍之一。

[0004] 目前化学疗法限制的一个解决方案是以非常高特异性递送有效浓度的抗癌剂。为了达到这个目标, 已经投入大量努力, 通过将抗癌药物缀合至激素、抗体和维生素来开发肿瘤选择性药物。例如, 作为叶酸受体阳性癌症的靶向剂, 低分子量维生素、叶酸和其他叶酸受体结合配体特别有用。

[0005] 叶酸是B族维生素的成员, 并且通过参与核酸和氨基酸的生物合成, 在细胞存活中发挥重要作用。这种必需维生素也是高亲和力配体, 其通过靶向叶酸受体阳性的癌细胞, 增强缀合的抗癌药物的特异性。已发现叶酸受体(FR)在多于90%的非粘液性卵巢癌中上调。还在肾、脑、肺和乳腺癌中发现高至中水平的叶酸受体。与之相比, 已报道叶酸受体在大多数正常组织中以低水平存在, 从而产生了选择性靶向癌细胞的机制。尽管叶酸受体可以用于以非常高的特异性向肿瘤组织递送药剂, 但有多种癌症根本不表达叶酸受体或不足以提供期望的特异性的数量表达叶酸受体。因此, 需要开发治疗此类叶酸受体阴性癌症的疗法。

[0006] 骨髓衍生的抑制细胞(MDSCs)与肿瘤相关, 并且可以通过抑制此类细胞, 如T细胞、NK细胞、DC巨噬细胞和NKT细胞, 增强肿瘤环境中的免疫抑制。因此, MDSCs可以促进肿瘤生长、血管生成和转移。这些细胞在肿瘤环境中的丰度与癌症患者的存活负相关。因此, 耗尽MDSCs的疗法可以是有用的。

[0007] 本申请人已经发现, 因为MDSCs表达叶酸受体 $\beta$ , 所以可以通过将药物靶向至MDSCs来治疗表达叶酸受体的肿瘤, 或不足以足够的数量表达叶酸受体或根本不表达叶酸受体的肿瘤。因此, 本文描述了通过使用经由接头连接至药物的叶酸受体结合配体靶向MDSCs而治疗癌症的方法。可以使用叶酸作为靶向配体来靶向MDSCs, 以将药物递送至MDSCs, 从而耗尽或抑制MDSCs, 并治疗具有癌症的宿主动物, 无论所述癌症是否表达叶酸受体。因此, 应理解, 本文所述的方法可以用于治疗不表达叶酸受体的癌症, 以及确实表达叶酸受体的癌症。

[0008] 在一个实施方式中,提供了用于治疗叶酸受体阴性癌症的方法。所述方法包括向宿主动物施用治疗有效量的一种或多种化合物,所述化合物包含经由接头连接至药物的叶酸受体结合配体,其中抑制或耗尽骨髓衍生的抑制细胞。

[0009] 在另一个实施方式中,提供了用于治疗叶酸受体阴性癌症的方法。所述方法包括向宿主动物施用治疗有效量的一种或多种化合物,所述化合物包含经由接头连接至药物的叶酸受体结合配体,以耗尽或抑制骨髓衍生的抑制细胞。

[0010] 在又另一个实施方式中,提供了用于治疗宿主动物中的叶酸受体阴性癌症的方法,其中骨髓衍生的抑制细胞处于癌症中,所述方法包括向宿主动物施用治疗有效量的一种或多种包含经由接头连接至药物的叶酸受体结合配体的化合物,并且治疗具有所述骨髓衍生的抑制细胞的癌症。

[0011] 在仍另一个实施方式中,提供了用于治疗癌症的方法。所述方法包括鉴定骨髓衍生的抑制细胞在宿主动物中的癌症中的存在,并且向宿主动物施用治疗有效量的一种或多种化合物,所述化合物包含经由接头连接至药物的叶酸受体结合配体。

[0012] 在另一个说明性实施方式中,提供了用于治疗宿主动物中的癌症的方法。所述方法包括向宿主动物施用治疗有效量的一种或多种化合物,所述化合物包含经由接头连接至药物的叶酸受体结合配体,以抑制或耗尽骨髓衍生的抑制细胞。

[0013] 在另一个实施方式中,提供了用于靶向宿主动物中的骨髓衍生的抑制细胞的方法。所述方法包括向宿主动物施用治疗或诊断有效量的一种或多种化合物,所述化合物包含经由接头连接至药物的叶酸受体结合配体,以靶向骨髓衍生的抑制细胞。

[0014] 以下枚举条款中描述了本发明的额外的说明性且非限定性实施方式。以下条款的所有组合被理解为本文所述的发明的额外的实施方式。这些实施方式与本申请的“说明性实施方式的详述”部分中描述的实施方式的所有适当组合也是本发明的实施方式。

[0015] 1. 用于治疗叶酸受体阴性癌症的方法,其包括向宿主动物施用治疗有效量的一种或多种化合物,所述化合物包含经由接头连接至药物的叶酸受体结合配体,其中骨髓衍生的抑制细胞被抑制或耗尽。

[0016] 2. 用于治疗叶酸受体阴性癌症的方法,其包括向宿主动物施用治疗有效量的一种或多种化合物,所述化合物包含经由接头连接至药物的叶酸受体结合配体,以耗尽或抑制骨髓衍生的抑制细胞。

[0017] 3. 用于治疗宿主动物中的叶酸受体阴性癌症的方法,其中骨髓衍生的抑制细胞处于所述癌症中,所述方法包括向所述宿主动物施用治疗有效量的一种或多种包含经由接头连接至药物的叶酸受体结合配体的化合物,并且治疗具有骨髓衍生的抑制细胞的癌症。

[0018] 4. 用于治疗癌症的方法,其包括鉴定骨髓衍生的抑制细胞在宿主动物中的癌症中的存在,并且向宿主动物施用治疗有效量的一种或多种化合物,所述化合物包含经由接头连接至药物的叶酸受体结合配体。

[0019] 5. 用于治疗宿主动物中的癌症的方法,所述方法包括向宿主动物施用治疗有效量的一种或多种化合物,所述化合物包含经由接头连接至药物的叶酸受体结合配体,以抑制或耗尽骨髓衍生的抑制细胞。

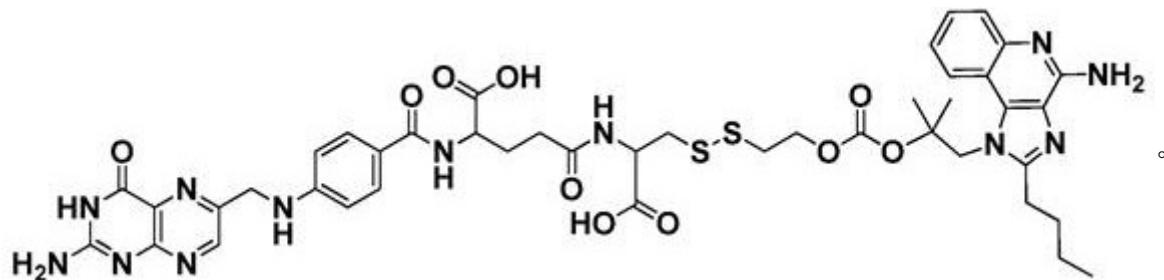
[0020] 6. 用于靶向宿主动物中的骨髓衍生的抑制细胞的方法,所述方法包括向宿主动物施用治疗或诊断有效量的一种或多种化合物,所述化合物包含经由接头连接至药物的叶酸

受体结合配体,以靶向骨髓衍生的抑制细胞。

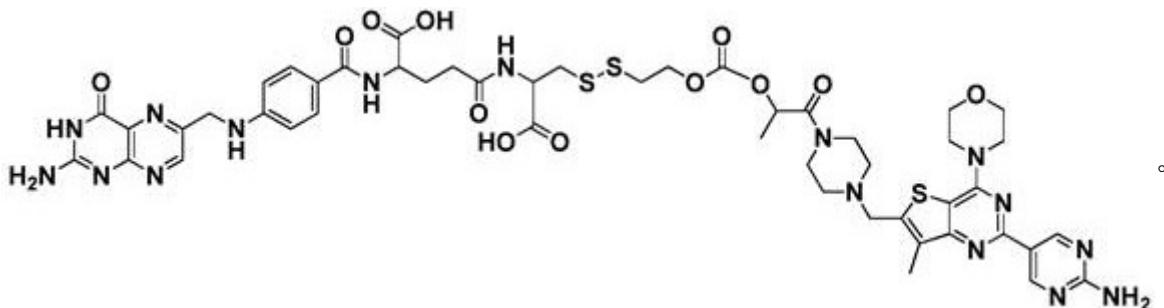
- [0021] 7. 条款4-6中任一项的方法,其中所述癌症是叶酸受体阴性的。
- [0022] 8. 条款4-6中任一项的方法,其中所述癌症是叶酸受体阳性的。
- [0023] 9. 条款1-8中任一项的方法,其中所述叶酸受体结合配体是叶酸受体 $\beta$ 特异性的,并且其中所述叶酸受体结合配体结合所述骨髓衍生的抑制细胞上的叶酸受体 $\beta$ 。
- [0024] 10. 条款1-9中任一项的方法,其中所述骨髓衍生的抑制细胞具有CD11b标记物。
- [0025] 11. 条款1-10中任一项的方法,其中所述骨髓衍生的抑制细胞具有Gr1标记物。
- [0026] 12. 条款1-11中任一项的方法,其中所述癌症选自非小细胞肺癌、头颈癌、三阴性乳腺癌、乳腺癌、卵巢癌、结肠癌、前列腺癌、肺癌、子宫内膜癌和肾癌。
- [0027] 13. 条款1-12中任一项的方法,其中所述药物选自CI307、BEZ235、渥曼青霉素、AMT、PF-04691502、CpG寡核苷酸、BLZ945、来那度胺、NLG919、5,15-DPP、吡咯并苯并二氮杂草、氨甲蝶呤、依维莫司、tubulysin、GDC-0980、AS1517499、BIRB796、n-乙酰基-5-羟基色胺和2,4-二氨基-6-羟基嘧啶。
- [0028] 14. 条款1-13中任一项的方法,其中所述药物是微管抑制剂。
- [0029] 15. 条款14的方法,其中所述药物杀死骨髓衍生的抑制细胞。
- [0030] 16. 条款1-13中任一项的方法,其中所述药物选自PI3K抑制剂、STAT6抑制剂、MAPK抑制剂、iNOS抑制剂和抗炎药物。
- [0031] 17. 条款16的方法,其中所述药物使骨髓衍生的抑制细胞失活。
- [0032] 18. 条款1-13中任一项的方法,其中所述药物是TLR激动剂。
- [0033] 19. 条款18的方法,其中所述TLR激动剂选自TLR7激动剂和TLR9激动剂。
- [0034] 20. 条款18或19的方法,其中所述药物使骨髓衍生的抑制细胞重编程。
- [0035] 21. 条款14或15的方法,其中所述药物是tubulysin。
- [0036] 22. 条款16的方法,其中所述药物是PI3K抑制剂。
- [0037] 23. 条款22的方法,其中所述药物选自GDC-0980、渥曼青霉素和PF-04691502。
- [0038] 24. 条款16的方法,其中所述药物是STAT6抑制剂。
- [0039] 25. 条款24的方法,其中所述药物是AS1517499。
- [0040] 26. 条款16的方法,其中所述药物是MAPK抑制剂。
- [0041] 27. 条款26的方法,其中所述药物是BIRB796。
- [0042] 28. 条款16的方法,其中所述药物是iNOS抑制剂。
- [0043] 29. 条款28的方法,其中所述药物是AMT。
- [0044] 30. 条款16的方法,其中所述药物是抗炎药物。
- [0045] 31. 条款30的方法,其中所述药物是氨甲蝶呤。
- [0046] 32. 条款18-20中任一项的方法,其中所述药物选自CI307、CpG寡核苷酸和TLR7A。
- [0047] 33. 条款1-13中任一项的方法,其中施用多于一种化合物,并且所述化合物包含不同的药物。
- [0048] 34. 权利要求33的方法,其中所述不同的药物是TLR7激动剂和PI3K抑制剂。
- [0049] 35. 条款1-32中任一项的方法,其中施用一种或多种化合物,并且还施用未缀合的药物。
- [0050] 36. 条款35的方法,其中所述化合物中的药物是TLR7激动剂,并且未缀合的药物是

PI3K抑制剂。

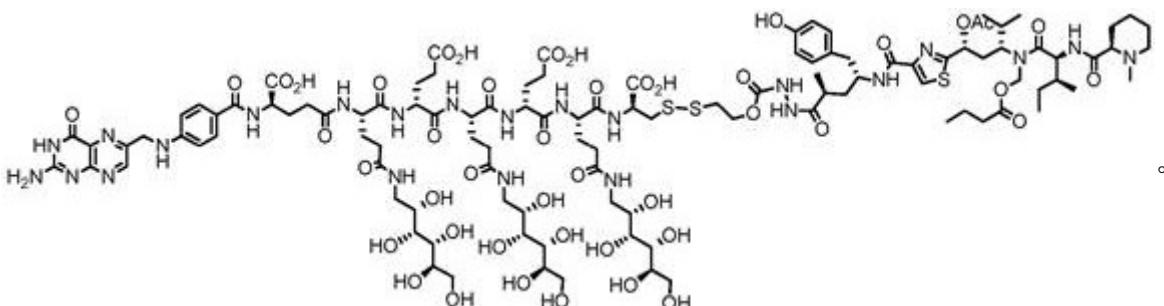
[0051] 37. 条款1-12中任一项的方法,其中所述化合物具有下式:



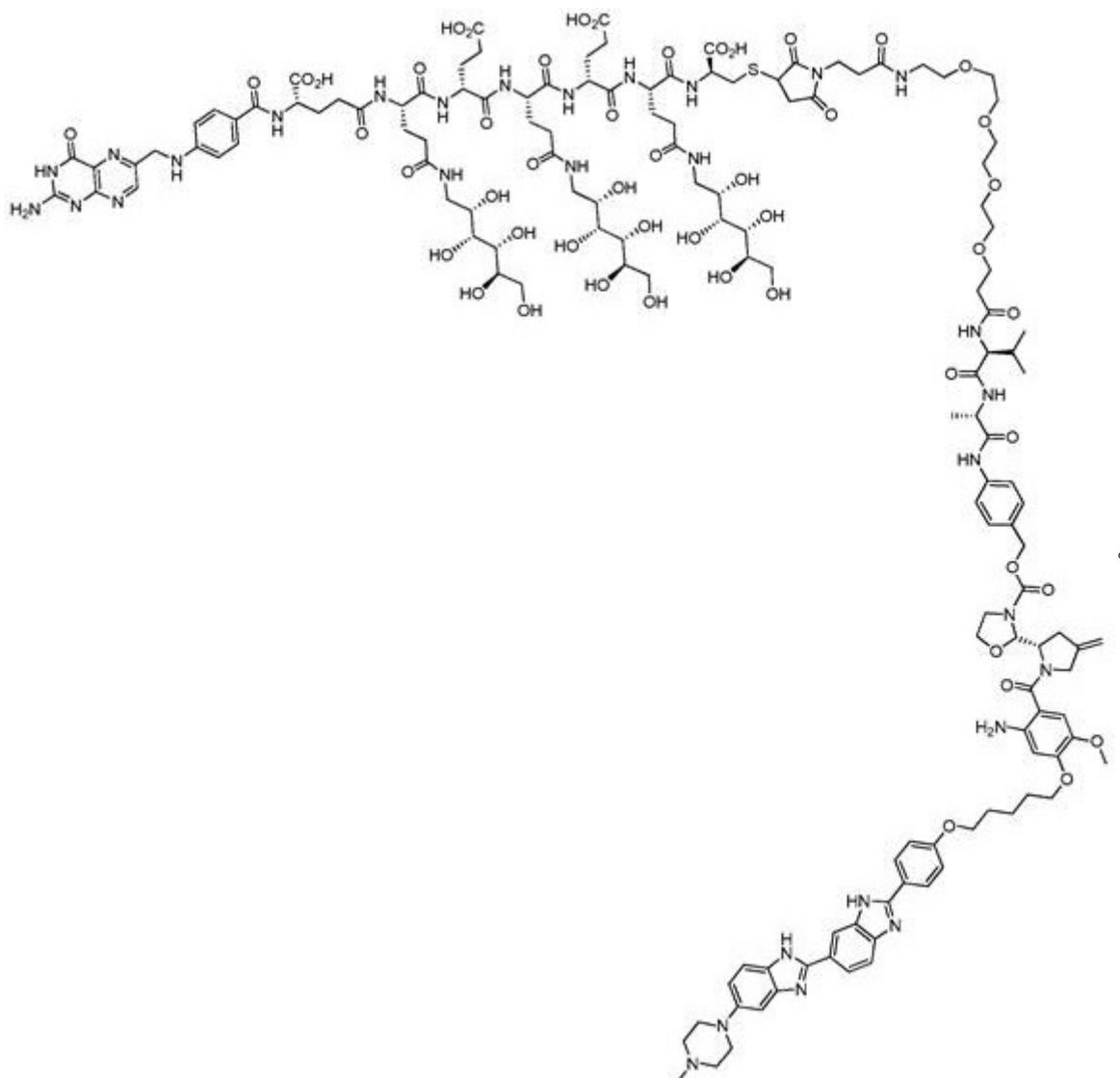
[0052] 38. 条款1-12中任一项的方法,其中所述化合物具有下式:



[0053] 39. 条款1-12中任一项的方法,其中所述化合物具有下式:



[0054] 40. 条款1-12中任一项的方法,其中所述化合物具有下式:



[0055] 41. 条款1-40中任一项的方法,其中向所述宿主动物施用所述一种或多种化合物,或任何所述一种或多种化合物的药学上可接受的盐。

[0056] 42. 条款1-41中任一项的方法,其中所述施用呈胃肠外剂型。

[0057] 43. 条款42的方法,其中所述胃肠外剂型选自皮内剂型、皮下剂型、肌内剂型、腹膜内剂型、静脉内剂型和鞘内剂型。

[0058] 44. 条款1-43中任一项的方法,其中所述治疗有效量或诊断有效量是约 $0.5\text{ mg}/\text{m}^2$ 至约 $6.0\text{ mg}/\text{m}^2$ 。

[0059] 45. 条款1-44中任一项的方法,其中所述治疗有效量或诊断有效量是约 $0.5\text{ mg}/\text{m}^2$ 至约 $4.0\text{ mg}/\text{m}^2$ 。

[0060] 46. 条款1-45中任一项的方法,其中所述治疗有效量或诊断有效量是约 $0.5\text{ mg}/\text{m}^2$ 至约 $2.0\text{ mg}/\text{m}^2$ 。

[0061] 47. 条款1-7或9-46中任一项的方法,其中所述癌症是叶酸受体阴性的,并且所述癌症选自结肠癌、肺癌、前列腺癌和乳腺癌。

[0062] 附图简述

图1显示以下各种人肿瘤上的FR-α表达的苏木精和曙红染色:肝癌(图1a);头颈癌(图

1b) ; 胸腺瘤(图1c)。

[0063] 图2显示以下各种人肿瘤上的FR-β表达的苏木精和曙红染色:肝癌(图2a) ; 头颈癌(图2b) ; 胸腺瘤(图2c)。

[0064] 图3显示以下各种人肿瘤上的FR-β表达的苏木精和曙红染色:膀胱癌(图3a) ; 脑癌(图3b) ; 肝癌(图3c)。

[0065] 图4显示以下各种人肿瘤上的FR-β表达的苏木精和曙红染色:肾癌(图4a) ; 皮肤癌(图4b) ; 胸腺癌(图4c)。

[0066] 图5显示在小鼠MDSCs (CD11b+Gr1+) 上的FR-β表达。图5a:在肝细胞上门控的MDSCs群体;图5b:门控的MDSC群体上的FR-β表达。

[0067] 图6显示在小鼠TAMs (CD11b+F4/80) 上的FR-β表达。图6a:在肝细胞上门控的TAMs群体;图6b:门控的TAM群体上的FR-β表达。

[0068] 图7显示在与各种药物共培养后TAMs/MDSCs的体外精氨酸酶产生。图7a: (●) CL307; (■) BEZ235; (▲) 涅曼青霉素; (▼) AMT。图7b: (◆) CpG; (○) BIZ945; (□) 来那度胺; (Δ) NLG919。图7c: (▽) N-乙酰基-5-羟基色胺; (◇) 2,4-二氨基-6-羟基嘧啶; (■) 5,15-DPP; (x) 氨甲蝶呤。图7d: (+) 依维莫司; (◀) tubulysin; (■) AS1517499; (●) BIRB796 (达马莫德)。

[0069] 图8显示在与各种药物共培养后TAMs/MDSCs的体外IL-10产生。图8a: (■) BEZ235; (▲) 涅曼青霉素; (▼) AMT。图8b: (○) BIZ945; (□) 来那度胺; (Δ) NLG919。图8c: (▽) N-乙酰基-5-羟基色胺; (◇) 2,4-二氨基-6-羟基嘧啶; (■) 5,15-DPP; (x) 氨甲蝶呤。图8d: (+) 依维莫司; (◀) tubulysin; (■) AS1517499; (●) BIRB796 (达马莫德)。

[0070] 图9显示在与各种药物共培养后TAMs/MDSCs的体外一氧化氮产生。图9a: (■) BEZ235; (▲) 涅曼青霉素; (▼) AMT。图9b: (○) BIZ945; (□) 来那度胺; (Δ) NLG919。图9c: (▽) N-乙酰基-5-羟基色胺; (◇) 2,4-二氨基-6-羟基嘧啶; (■) 5,15-DPP; (x) 氨甲蝶呤。图9d: (+) 依维莫司; (◀) tubulysin; (■) AS1517499; (●) BIRB796 (达马莫德)。

[0071] 图10:在图10a中显示与不同浓度的两种TLR激动剂: (●) CpG (TLR9 激动剂) 和 (◆) CL307 (TLR7 激动剂) 共培养后TAMs/MDSCs的一氧化氮产生。黑色虚线表示来自未处理的对照的一氧化氮水平;在图10b中显示在与不同的TLR激动剂:雷西莫特(TLR7/8 激动剂)、CpG ODN (TLR9激动剂)、聚IC (TLR3激动剂)、酵母聚糖(TLR2激动剂) 共培养后,通过流式细胞术测量的MDSCs上的CD86表达。

[0072] 图11显示通过TAMs/MDSCs与不同浓度的两种药物共培养,在体外测试的两种TLR7激动剂(■) CL307和(●) TLR7A的精氨酸酶(图11a) 和一氧化氮(图11b) 产生。图11a中的黑色虚线表示未处理的对照中的精氨酸酶水平。图11a中的黑色实线表示背景的精氨酸酶水平。

[0073] 图12显示在与三种PI3K抑制剂(BEZ235、PF-04691502 和GDC-0980) 共培养后, TAMs/MDSCs的精氨酸酶产生,以鉴定有效地抑制TAMs/MDSCs功能的PI3K抑制剂活性。

[0074] 图13显示在与三种PI3K抑制剂(BEZ235、PF-04691502 和GDC-0980) 共培养后, TAMs/MDSCs的IL-10产生,以鉴定有效地抑制TAMs/MDSCs功能的PI3K抑制剂活性。

[0075] 图14显示在与三种PI3K抑制剂(BEZ235、PF-04691502 和GDC-0980)共培养后, TAMs/MDSCs的一氧化氮产生,以鉴定有效地抑制TAMs/MDSCs功能的PI3K抑制剂活性。

[0076] 图15显示通过用TLR7激动剂(CL307)和PI3K抑制剂(BEZ235)体外组合处理TAMs/MDSCs的精氨酸酶产生的协同曲线; (■) 单处理, (●) 组合处理。

[0077] 图16显示在4T1实体瘤模型中的FA-TLR7激动剂(FA-TLR7A)的剂量研究。图16a显示来自未处理的对照(●)、2 nmol 处理(■)和5 nmol (三角形)处理的组的肿瘤生长。图16b显示来自未处理的对照(●)、10 nmol (▼) 处理和20 nmol (◆) 处理的组的肿瘤生长。

[0078] 图17显示在图16中所示的4T1实体瘤模型中的剂量研究的不同组的动物体重。从第6天开始处理起,每天测量体重。图17a显示来自未处理的对照(●)、2 nmol 处理(■)和5 nmol (三角形)处理的组的体重。图17b显示来自未处理的对照(●)、10 nmol (▼) 处理和20 nmol (◆) 处理的组的体重。

[0079] 图18显示在4T1实体瘤模型中的FA-TLR7激动剂的体内治疗研究。图18a显示在处理开始后,每天测量的肿瘤生长, (●) 未处理的对照, (■) FA-TLR7激动剂, (○) 竞争-FA-TLR7激动剂。图18b显示在处理开始后,每天测量的动物体重, (●) 未处理的对照, (■) FA-TLR7激动剂, (○) 竞争-FA-TLR7激动剂。

[0080] 图19显示在4T1实体瘤模型中的FA-tubulysin的体内治疗研究。图19a显示在处理开始后,每天测量的肿瘤生长, (●) 未处理的对照, (▲) FA-tubulysin, (□) 竞争-FA-tubulysin。图19b显示在处理开始后,每天测量的动物体重, (●) 未处理的对照, (▲) FA-TLR7激动剂, (□) 竞争-FA-tubulysin。

[0081] 图20显示在4T1实体瘤模型中的FA-PI3K抑制剂的体内治疗研究。图20a显示在处理开始后,每天测量的肿瘤生长, (●) 未处理的对照, (▼) FA-PI3K抑制剂, (△) 竞争-FA-PI3K抑制剂。图20b显示在处理开始后,每天测量的动物体重, (●) 未处理的对照, (▼) FA-PI3K抑制剂, (△) 竞争-FA-PI3K抑制剂。

[0082] 图21显示在4T1实体瘤模型中, 使用FA-TLR7激动剂和非靶向的PI3K抑制剂(BEZ235)的组合处理的体内治疗研究。图21a显示在处理开始后,每天测量的肿瘤生长, (●) 未处理的对照, (◆) 组合, (▽) 竞争-组合。图21b显示在处理开始后,每天测量的动物体重, (●) 未处理的对照, (◆) 组合, (▽) 竞争-组合。

[0083] 图22显示在4T1实体瘤模型中, FA-TLR7激动剂和非靶向的PI3K抑制剂(BEZ235)的体内治疗研究。图22a显示在处理开始后,每天测量的肿瘤生长, (●) 未处理的对照, (■) FA-TLR7 激动剂, (◇) PI3K 抑制剂。图22b显示在处理开始后,每天测量的动物体重, (●) 未处理的对照, (■) FA-TLR7 激动剂, (◇) PI3K 抑制剂。

[0084] 图23显示对于未处理的对照、FA-TLR7激动剂、FA-tubulysin、FA-PI3K抑制剂, 以及FA-TLR7激动剂和非靶向的PI3K抑制剂(BEZ235)的组合的每一种,对于治疗组的处理最后一天时的平均肿瘤体积.\*和\*\*\*表示统计学上显著的结果。

[0085] 图24显示在未处理对照、FA-TLR7激动剂(图24a)、FA-PI3K抑制剂(图24c)、FA-Tubulysin (图24b) 和组合(图24d)的组以及竞争组中测试的F4/80+巨噬细胞上的精氨酸酶的细胞内染色.\*表示统计学上显著的结果,ns表示不是统计学上显著的结果。

[0086] 图25显示在未处理对照、FA-TLR7激动剂(图25a)、FA-PI3K抑制剂(图25c)、FA-

Tubulysin (图25b) 和组合 (图25d) 的组以及竞争组中测试的M1与M2巨噬细胞的比例 (F4/80+CD86+: F4/80+CD206+) 。\*表示统计学上显著的结果,ns表示不是统计学上显著的结果。

[0087] 图26显示在未处理对照、FA-TLR7激动剂 (图26a) 、FA-PI3K抑制剂 (图26c) 、FA-Tubulysin (图26b) 和组合 (图26d) 的组以及竞争组中测试的MDSCs群体 (CD11b+Gr1+) 。\*表示统计学上显著的结果,ns表示不是统计学上显著的结果。

[0088] 图27显示在未处理的对照、FA-TLR7激动剂、FA-PI3K抑制剂,FA-tubulysin以及组合组的组中,从4T1实体瘤分离的肝细胞中测试的CD4 (图27a) 和CD8 (图27b) T细胞群体的百分比。

[0089] 图28显示体外诱导的人MDSCs通过减少IL-10产生对选择药物的响应。(●) 长春花碱; (■) GDC0980; (▼) BEZ235; (◆) tubulysin。

[0090] 图29A-B显示在使用3类药物处理后,对于MDSCs的人T细胞抑制的抑制作用。图29A显示在使用0.1  $\mu$ M药物的药物处理后的结果。图29B显示在使用1.0  $\mu$ M药物的药物处理后的结果。

[0091] 图30A-C显示4T1细胞对3类药物的抗性。使用3种药物培养4T1细胞36小时。通过LDH测定评估细胞毒性。图30A显示各种浓度的TLR激动剂的结果;图30B显示各种浓度的PI3K抑制剂的结果;图30C显示各种浓度的tubulysin的结果。

[0092] 图31A-C显示4T1细胞对3类FA-缀合物的抗性。使用FA-缀合物培养4T1细胞3小时。使用PBS洗涤细胞并与培养基温育36小时。图31A显示各种浓度的TLR激动剂缀合物的结果;图31B显示各种浓度的PI3K抑制剂缀合物的结果;图31C显示各种浓度的tubulysin缀合物的结果。

[0093] 图32:通过使用FA-缀合物连续处理2周的4T1的肿瘤生长。(●) 对照小鼠1; (■) 对照小鼠2; (▲) 对照小鼠3; (○) FA-PI3K抑制剂缀合物小鼠1; (□) FA-PI3K 抑制剂缀合物小鼠2; ( $\Delta$ ) FA-PI3K抑制剂缀合物小鼠3; (◎) FA-TLR7激动剂小鼠1; (□) FA-TLR7激动剂小鼠2; (◎) FA-TLR7激动剂小鼠3。

[0094] 图33显示在使用叶酸药物缀合物连续处理2周后,来自4T1肿瘤的MDSCs和TAMs中测量的精氨酸酶水平。(▨) MDSC; (▨) TAMs。

[0095] 图34显示在使用三类FA-缀合物处理2周(7天/周)的带有4T1实体瘤的Balb/c小鼠中的肺转移评估。在研究结束时摘除肺,并按照实施例15中描述的标准程序评估转移。

[0096] 图35显示通过靶向MDSCs/TAMs,4T1肿瘤模型中的肺转移的概述。

[0097] 图36显示在肿瘤生长存活研究中的监测:在三种叶酸-药物缀合物的4T1存活研究中监测肿瘤体积,直到在第5天手术摘除肿瘤。(●) 对照; (○) FA-TLR7激动剂缀合物; ( $\Delta$ ) FA-PI3K抑制剂缀合物; (□) FA-tubulysin缀合物。

[0098] 图37显示具有4T1实体瘤的小鼠的存活曲线(对于FA-TLR7激动剂,n=2;对于FA-PI3K抑制剂和疾病对照,n=3;对于FA-tubulysin,n=4)。(■) 对照; ( $\Delta$ ) FA-TLR7激动剂缀合物; (○) FA-PI3K抑制剂缀合物; (□) FA-tubulysin缀合物。在100%的41-天时间点包括除了对照的符号之外的所有符号。

[0099] 说明性实施方式的详述

将理解,本文所述的发明的每个实施方式可以,在适当的情况下,与本文所述的任何其他实施方式组合。例如,本文所述的概述和/或枚举条款中的任何实施方式,或其任何适当

的组合,可以与本专利申请的“说明性实施方式的详述”部分中描述的任何实施方式组合。

[0100] 如本文使用的术语“骨髓衍生的抑制细胞”(MDSCs)是指存在于癌症(例如肿瘤)的微环境中的细胞是免疫抑制性的,并且具有标记物CD11b和Gr1中的一种或多种。MDSCs可以通过本领域中已知的方法(例如,通过使用MDSCs特异性的标记物,例如CD11b和Gr1的流式细胞术)鉴定。

[0101] 如本文使用的短语“其中骨髓衍生的抑制细胞处于癌症中”通常是指存在于癌症(例如肿瘤)的微环境中,或者例如见于癌组织(例如肿瘤组织)中的MDSCs。

[0102] 如本文使用的术语“施用”通常是指将本文所述的化合物引入宿主动物的任何和所有方式,包括但不限于通过口服(po)、静脉内(iv)、肌内(im)、皮下(sc)、透皮、吸入、经颊、经眼、舌下、阴道、直肠等施用途径。本文所述的化合物可以在单位剂型和/或含有一种或多种药学上可接受的载体、助剂、稀释剂、赋形剂和/或媒介物及其组合的组合物中施用。

[0103] 如本文使用的术语“组合物”通常是指包含多于一种成分(包括本文所述的化合物)的任何产品。将理解,本文所述的组合物可以从分离的本文所述的化合物,或本文所述的化合物的盐、溶液、水合物、溶剂化物以及其他形式制备。意识到,在各种物理形式的化合物中,某些官能团,例如羟基、氨基等基团可以与水和/或各种溶剂形成络合物。还将理解,可以从本文所述的化合物的各种无定形、非无定形、部分结晶、结晶和/或其他形态形式制备组合物。还将理解,可以从本文所述的化合物的各种水合物和/或溶剂化物制备组合物。因此,描述本文所述的化合物的此类药物组合物将被理解为包含本文所述的化合物的各种形态形式和/或溶剂化物或水合物形式的每一种,或任何组合,或单独形式。

[0104] 本申请人已经发现因为MDSCs表达叶酸受体 $\beta$ ,所以可以通过将药物靶向至MDSCs而治疗表达叶酸受体的肿瘤,或不足以数量表达叶酸受体或根本不表达叶酸受体的肿瘤。因此,本文描述了通过使用经由接头连接至药物的叶酸受体结合配体靶向MDSCs而治疗癌症的方法。可以使用叶酸作为靶向配体来靶向MDSCs,从而将药物递送至MDSCs以耗尽或抑制MDSCs并治疗具有癌症的宿主动物,无论所述癌症是否表达叶酸受体。因此,将理解,本文所述的方法可以用于治疗不表达叶酸受体的癌症,以及确实表达叶酸受体的癌症。

[0105] 在一个实施方式中,提供了用于治疗叶酸受体阴性癌症的方法。所述方法包括向宿主动物施用治疗有效量的一种或多种化合物,所述化合物包含经由接头连接至药物的叶酸受体结合配体,其中抑制或耗尽骨髓衍生的抑制细胞。

[0106] 在另一个实施方式中,提供了用于治疗叶酸受体阴性癌症的方法。所述方法包括向宿主动物施用治疗有效量的一种或多种化合物,所述化合物包含经由接头连接至药物的叶酸受体结合配体,以耗尽或抑制骨髓衍生的抑制细胞。

[0107] 在又另一个实施方式中,提供了用于治疗宿主动物中的叶酸受体阴性癌症的方法,其中骨髓衍生的抑制细胞处于癌症中,所述方法包括向宿主动物施用治疗有效量的一种或多种包含经由接头连接至药物的叶酸受体结合配体的化合物,并且治疗具有所述骨髓衍生的抑制细胞的叶酸受体阴性癌症。

[0108] 在仍另一个实施方式中,提供了用于治疗癌症的方法。所述方法包括鉴定骨髓衍生的抑制细胞在宿主动物中的癌症中的存在,并且向宿主动物施用治疗有效量的一种或多种化合物,所述化合物包含经由接头连接至药物的叶酸受体结合配体。

[0109] 在另一个说明性实施方式中,提供了用于治疗宿主动物中的癌症的方法。所述方

法包括向宿主动物施用治疗有效量的一种或多种化合物,所述化合物包含经由接头连接至药物的叶酸受体结合配体,以抑制或耗尽骨髓衍生的抑制细胞。

[0110] 在另一个实施方式中,提供了用于靶向宿主动物中的骨髓衍生的抑制细胞的方法。所述方法包括向宿主动物施用治疗或诊断有效量的一种或多种化合物,所述化合物包含经由接头连接至药物的叶酸受体结合配体,以靶向骨髓衍生的抑制细胞。

[0111] 以下枚举条款中描述了本发明的额外的说明性且非限定性实施方式。

[0112] 1. 用于治疗叶酸受体阴性癌症的方法,其包括向宿主动物施用治疗有效量的一种或多种化合物,所述化合物包含经由接头连接至药物的叶酸受体结合配体,其中骨髓衍生的抑制细胞被抑制或耗尽。

[0113] 2. 用于治疗叶酸受体阴性癌症的方法,其包括向宿主动物施用治疗有效量的一种或多种化合物,所述化合物包含经由接头连接至药物的叶酸受体结合配体,以耗尽或抑制骨髓衍生的抑制细胞。

[0114] 3. 用于治疗宿主动物中的叶酸受体阴性癌症的方法,其中骨髓衍生的抑制细胞处于所述癌症中,所述方法包括向所述宿主动物施用治疗有效量的一种或多种包含经由接头连接至药物的叶酸受体结合配体的化合物,并且治疗具有骨髓衍生的抑制细胞的癌症。

[0115] 4. 用于治疗癌症的方法,其包括鉴定骨髓衍生的抑制细胞在宿主动物中的癌症中的存在,并且向宿主动物施用治疗有效量的一种或多种化合物,所述化合物包含经由接头连接至药物的叶酸受体结合配体。

[0116] 5. 用于治疗宿主动物中的癌症的方法,所述方法包括向宿主动物施用治疗有效量的一种或多种化合物,所述化合物包含经由接头连接至药物的叶酸受体结合配体,以抑制或耗尽骨髓衍生的抑制细胞。

[0117] 6. 用于靶向宿主动物中的骨髓衍生的抑制细胞的方法,所述方法包括向宿主动物施用治疗或诊断有效量的一种或多种化合物,所述化合物包含经由接头连接至药物的叶酸受体结合配体,以靶向骨髓衍生的抑制细胞。

[0118] 7. 条款4-6中任一项的方法,其中所述癌症是叶酸受体阴性的。

[0119] 8. 条款4-6中任一项的方法,其中所述癌症是叶酸受体阳性的。

[0120] 9. 条款1-8中任一项的方法,其中所述叶酸受体结合配体是叶酸受体 $\beta$ 特异性的,并且其中所述叶酸受体结合配体结合所述骨髓衍生的抑制细胞上的叶酸受体 $\beta$ 。

[0121] 10. 条款1-9中任一项的方法,其中所述骨髓衍生的抑制细胞具有CD11b标记物。

[0122] 11. 条款1-10中任一项的方法,其中所述骨髓衍生的抑制细胞具有Gr1标记物。

[0123] 12. 条款1-11中任一项的方法,其中所述癌症选自非小细胞肺癌、头颈癌、三阴性乳腺癌、乳腺癌、卵巢癌、结肠癌、前列腺癌、肺癌、子宫内膜癌和肾癌。

[0124] 13. 条款1-12中任一项的方法,其中所述药物选自CI307、BEZ235、渥曼青霉素、AMT、PF-04691502、CpG寡核苷酸、BLZ945、来那度胺、NLG919、5,15-DPP、吡咯并苯并二氮杂草、氨甲蝶呤、依维莫司、tubulysin、GDC-0980、AS1517499、BIRB796、n-乙酰基-5-羟基色胺和2,4-二氨基-6-羟基嘧啶。

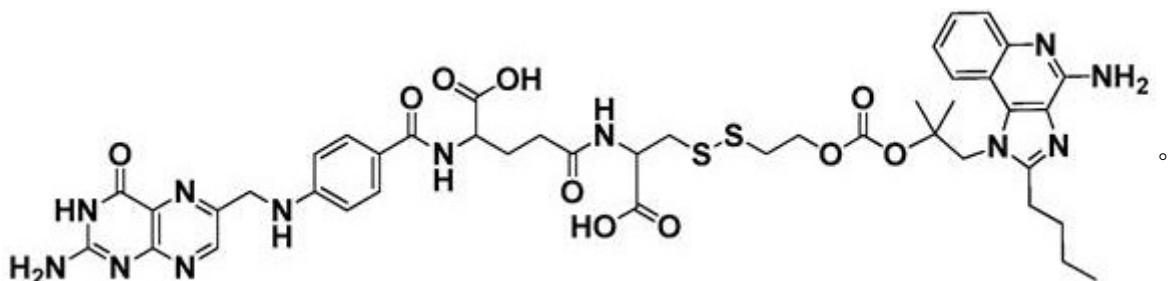
[0125] 14. 条款1-13中任一项的方法,其中所述药物是微管抑制剂。

[0126] 15. 条款14的方法,其中所述药物杀死骨髓衍生的抑制细胞。

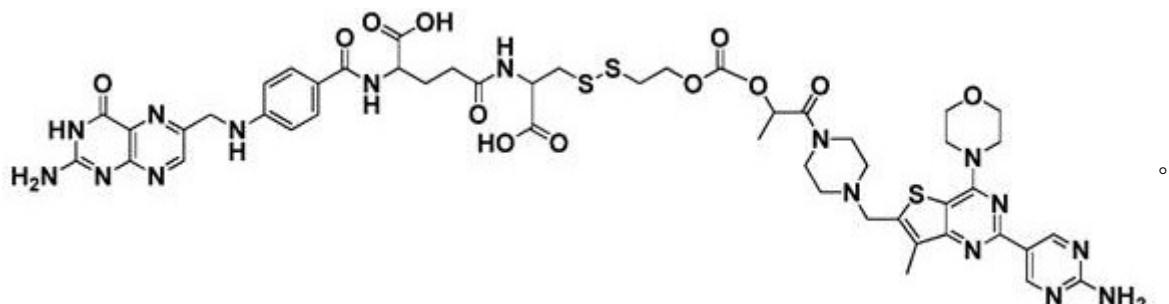
[0127] 16. 条款1-13中任一项的方法,其中所述药物选自PI3K抑制剂、STAT6抑制剂、MAPK

抑制剂、iNOS抑制剂和抗炎药物。

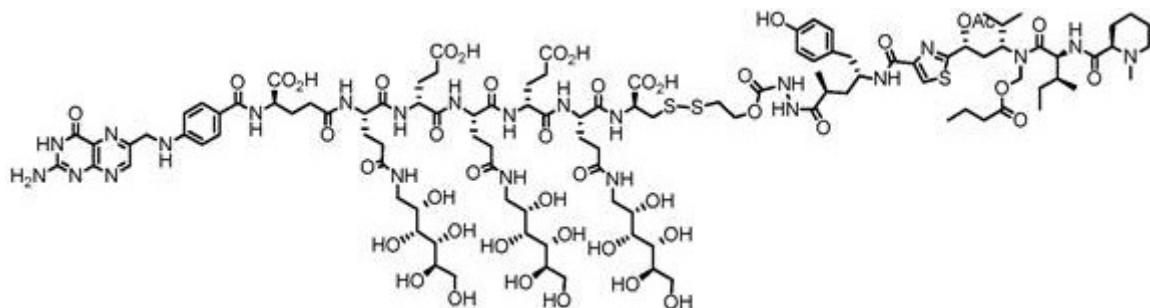
- [0128] 17. 条款16的方法,其中所述药物使骨髓衍生的抑制细胞失活。
- [0129] 18. 条款1-13中任一项的方法,其中所述药物是TLR激动剂。
- [0130] 19. 条款18的方法,其中所述TLR激动剂选自TLR7激动剂和TLR9激动剂。
- [0131] 20. 条款18或19的方法,其中所述药物使骨髓衍生的抑制细胞重编程。
- [0132] 21. 条款14或15的方法,其中所述药物是tubulysin。
- [0133] 22. 条款16的方法,其中所述药物是PI3K抑制剂。
- [0134] 23. 条款22的方法,其中所述药物选自GDC-0980、渥曼青霉素和PF-04691502。
- [0135] 24. 条款16的方法,其中所述药物是STAT6抑制剂。
- [0136] 25. 条款24的方法,其中所述药物是AS1517499。
- [0137] 26. 条款16的方法,其中所述药物是MAPK抑制剂。
- [0138] 27. 条款26的方法,其中所述药物是BIRB796。
- [0139] 28. 条款16的方法,其中所述药物是iNOS抑制剂。
- [0140] 29. 条款28的方法,其中所述药物是AMT。
- [0141] 30. 条款16的方法,其中所述药物是抗炎药物。
- [0142] 31. 条款30的方法,其中所述药物是氨甲蝶呤。
- [0143] 32. 条款18-20中任一项的方法,其中所述药物选自CI307、CpG寡核苷酸和TLR7A。
- [0144] 33. 条款1-13中任一项的方法,其中施用多于一种化合物,并且所述化合物包含不同的药物。
- [0145] 34. 权利要求33的方法,其中所述不同的药物是TLR7激动剂和PI3K抑制剂。
- [0146] 35. 条款1-32中任一项的方法,其中施用一种或多种化合物,并且还施用未缀合的药物。
- [0147] 36. 条款35的方法,其中所述化合物中的药物是TLR7激动剂,并且未缀合的药物是PI3K抑制剂。
- [0148] 37. 条款1-12中任一项的方法,其中所述化合物具有下式:



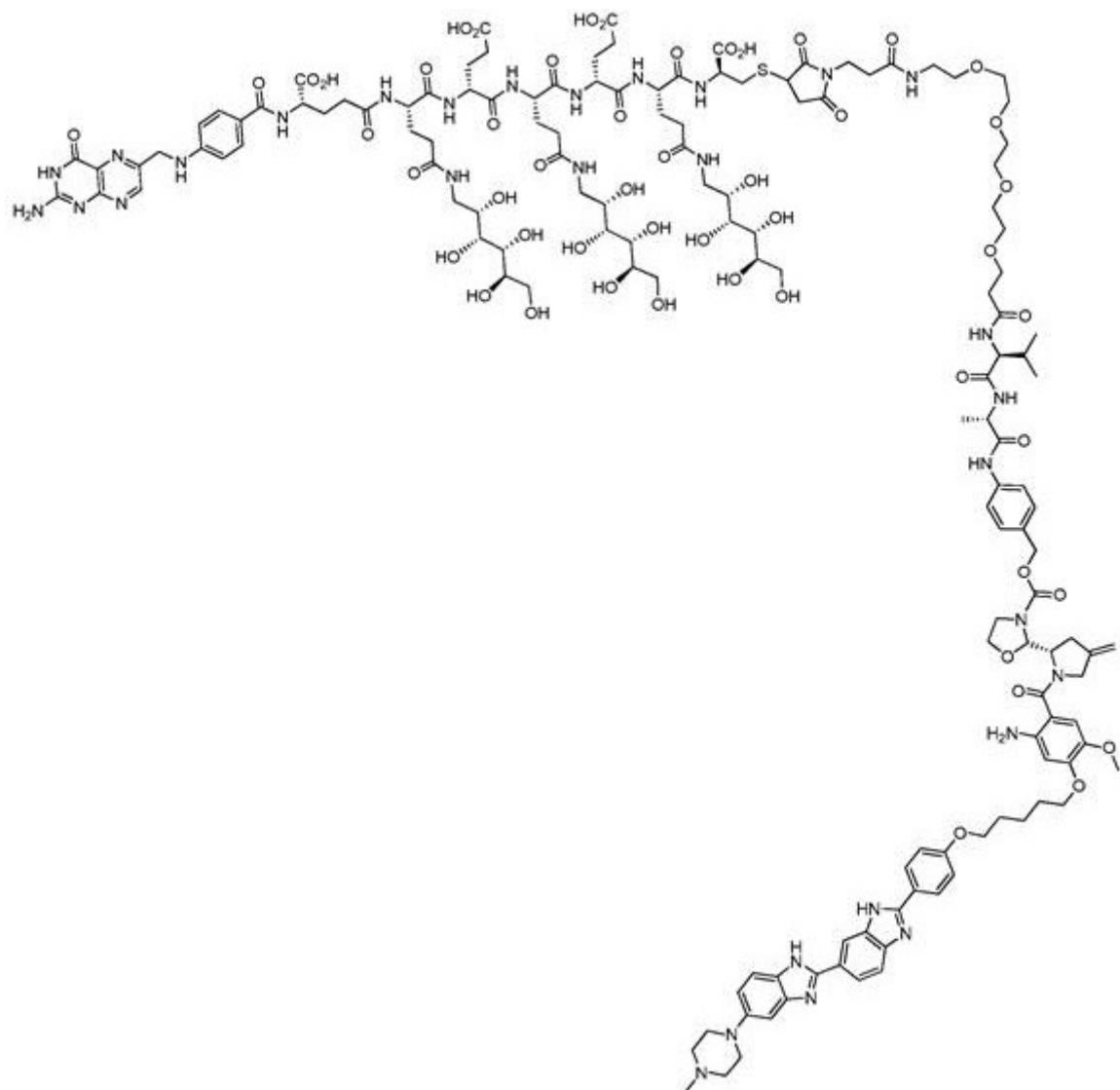
- [0149] 38. 条款1-12中任一项的方法,其中所述化合物具有下式:



[0150] 39. 条款1-12中任一项的方法,其中所述化合物具有下式:



[0151] 40. 条款1-12中任一项的方法,其中所述化合物具有下式:



[0152] 41. 条款1-40中任一项的方法,其中向所述宿主动物施用所述一种或多种化合物,或任何所述一种或多种化合物的药学上可接受的盐。

[0153] 42. 条款1-41中任一项的方法,其中所述施用呈胃肠外剂型。

[0154] 43. 条款42的方法,其中所述胃肠外剂型选自皮内剂型、皮下剂型、肌内剂型、腹膜内剂型、静脉内剂型和鞘内剂型。

[0155] 44. 条款1-43中任一项的方法,其中所述治疗有效量或诊断有效量是约0.5 mg/m<sup>2</sup>

至约6.0 mg/m<sup>2</sup>。

[0156] 45. 条款1-44中任一项的方法,其中所述治疗有效量或诊断有效量是约0.5 mg/m<sup>2</sup>至约4.0 mg/m<sup>2</sup>。

[0157] 46. 条款1-45中任一项的方法,其中所述治疗有效量或诊断有效量是约0.5 mg/m<sup>2</sup>至约2.0 mg/m<sup>2</sup>。

[0158] 47. 条款1-7或9-46中任一项的方法,其中所述癌症是叶酸受体阴性的,并且所述癌症选自结肠癌、肺癌、前列腺癌和乳腺癌。

[0159] 在一个实施方式中,靶向MDSCs以耗尽或抑制MDSCs的活性可以导致肿瘤生长的抑制,肿瘤的完全或部分消除,稳定疾病,杀死肿瘤细胞等对宿主动物的治疗作用。如本文使用的,“耗尽”或“抑制”MDSCs是指杀死部分或全部的MDSCs群体,抑制或消除MDSCs的活性(例如,减少或消除MDSCs刺激肿瘤组织中的血管生成的能力),使MDSCs重编程,从而使MDSCs抑制而不是支持肿瘤存活,防止MDSCs数量增加或减少MDSCs数量,或具有对MDSCs的任何其他作用,其导致对宿主动物的抗癌治疗作用。

[0160] 本文所述的方法用于治疗需要此类治疗的患有癌症的“宿主动物”。在一个实施方式中,本文所述的方法可以用于人类临床医学或兽医应用。因此,可以向“宿主动物”施用本文所述(下文所述)的一种或多种化合物或叶酸-成像剂缀合物,并且宿主动物可以是人(例如,人患者),或者在兽医应用的情况下,可以是实验室、农业、家养或野生动物。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,家养动物,例如犬、猫和兔,农业动物,例如牛、马、猪、绵羊、山羊,和圈养的野生动物,例如熊、熊猫、狮、虎、豹、大象、斑马、长颈鹿、猩猩、海豚和鲸鱼。

[0161] 在各种实施方式中,本文所述的癌症可以是致瘤的癌症,包括良性瘤和恶性瘤,或者所述癌症可以是非致瘤的。在一个实施方式中,癌症可以自发产生,或通过如存在于宿主动物的种系中的突变的过程或通过体细胞突变产生,或者癌症可以是化学、病毒或辐射诱导的。在另一个实施方式中,适用于本文所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。

[0162] 在一些方面,癌症可以是肺癌、骨癌、胰腺癌、皮肤癌、头部癌、颈部癌、皮肤黑色素瘤、眼内黑色素瘤子宫癌、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、子宫颈癌、霍奇金病、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、胸腺癌、胸腺癌、白血病、淋巴瘤、胸膜间皮瘤、膀胱癌、伯基特淋巴瘤、输尿管癌、肾癌、中枢神经系统肿瘤、脑癌、垂体腺瘤或胃食管连接处的腺癌。

[0163] 在一些方面,癌症可以选自非小细胞肺癌、间变性甲状腺癌、胰腺导管腺癌、头颈癌、表皮生长因子受体阴性乳腺癌、间皮瘤、成人经典霍奇金淋巴瘤、葡萄膜黑色素瘤、胶质母细胞瘤、肾癌、平滑肌肉瘤和色素沉着绒毛结节性滑膜炎。

[0164] 在另一实施方式中,癌症选自非小细胞肺癌、头颈癌、三阴性乳腺癌、乳腺癌、卵巢癌、结肠癌、前列腺癌、肺癌、子宫内膜癌和肾癌。

[0165] 在另一实施方式中,癌症是叶酸受体阴性的,并且所述癌症选自结肠癌、肺癌、前列腺癌和乳腺癌。可以根据本文所述的方法治疗任何具有与之相关的MDSCs的癌症。

[0166] 作为叶酸受体结合配体的一部分的“叶酸”的说明性实施方式包括叶酸,以及叶酸

的类似物和衍生物,例如亚叶酸,蝶酰聚谷氨酸,蝶酰-D-谷氨酸,以及结合叶酸受体的蝶啶,例如四氢蝶呤、二氢叶酸、四氢叶酸及其脱氮和二脱氮类似物。术语“脱氮”和“二脱氮”类似物是指本领域认可的类似物,其具有取代天然存在的叶酸结构或其类似物或衍生物中的一个或两个氮原子的碳原子。例如,脱氮类似物包括叶酸、亚叶酸、蝶酰聚谷氨酸,以及结合叶酸受体的蝶啶,例如四氢蝶呤、二氢叶酸和四氢叶酸的1-脱氮、3-脱氮、5-脱氮、8-脱氮和10-脱氮类似物。二脱氮类似物包括例如叶酸、亚叶酸、蝶酰聚谷氨酸,以及结合叶酸受体的蝶啶,例如四氢蝶呤、二氢叶酸和四氢叶酸的1,5-二脱氮、5,10-二脱氮、8,10-二脱氮和5,8-二脱氮类似物。可用作本发明的络合物形成配体的其他叶酸是叶酸受体结合类似物氨基蝶呤、氨甲蝶呤(amethopterin)(也称为氨甲蝶呤(methotrexate))、N<sup>10</sup>-甲基叶酸、2-脱氨基-羟基叶酸,脱氮类似物,如1-脱氮甲基蝶呤或3-脱氮甲基蝶呤和3',5'-二氯-4-氨基-4-脱氧-N<sup>10</sup>-甲基蝶酰谷氨酸(二氯氨甲蝶呤)。结合叶酸受体的其他叶酸(例如,叶酸类似物)描述于美国专利申请公开号2005/0227985和2004/0242582中,其公开内容通过引用并入本文。叶酸,以及前述类似物和/或衍生物也称作“叶酸”(“a folate”,“the folate”,或“folates”),反映其结合叶酸受体的能力,并且此类配体在与外源分子缀合时,有效地增强跨膜运输,例如经由叶酸介导的胞吞作用。前述可以用于本文所述的叶酸受体结合配体中。

[0167] 在一个实施方式中,本文所述的叶酸受体结合配体可以经由接头连接至药物,以制备在本文所述的方法中使用的化合物。根据本文所述的方法,可以使用适合用于耗尽或抑制MDSCs的任何药物。在一个实施方式中,所述药物选自CI307、长春花碱、GDC0980、BEZ235、渥曼青霉素、AMT、PF-04691502、CpG寡核苷酸、BLZ945、来那度胺、NLG919、5,15-DPP、吡咯并苯并二氮杂草、氨甲蝶呤、依维莫司、tubulysin、GDC-0980、AS1517499、BIRB796、n-乙酰基-5-羟基色胺和2,4-二氨基-6-羟基嘧啶。

[0168] 在一个方面,所述药物可以是微管抑制剂。在这个实施方式中,所述药物可以杀死骨髓衍生的抑制细胞,并且所述药物可以是tubulysin。

[0169] 在另一实施方式中,所述药物选自PI3K抑制剂、STAT6抑制剂、MAPK抑制剂、iNOS抑制剂和抗炎药物。在这个实施方式中,所述药物可以使骨髓衍生的抑制细胞失活。在这个实施方式中,所述药物可以是PI3K抑制剂,其选自GDC-0980、渥曼青霉素,和PF-04691502,STAT6抑制剂(例如AS1517499)、MAPK抑制剂(例如BIRB796)、iNOS抑制剂(例如AMT),或抗炎药物(例如氨甲蝶呤)。

[0170] 在又另一实施方式中,所述药物可以是TLR激动剂,例如TLR7激动剂、TLR9激动剂、TLR3激动剂(例如聚:IC),或TLR7/8激动剂(例如咪喹莫特)。所述TLR激动剂可以选自例如CI307、CpG寡核苷酸和TLR7A。在这个实施方式中,所述药物可以使骨髓衍生的抑制细胞重编程。

[0171] 在仍另一实施方式中,所述药物可以选自DNA-烷化剂或DNA-嵌入剂(例如PBD、前PBD或Hoechst染色剂)、曲贝替定、多柔比星、吉西他滨、双膦酸盐(例如游离或脂质体形式)和促凋亡肽。在又另一实施方式中,所述药物可以选自单磷酰脂质A(例如脱毒LPS)、mTOR抑制剂(例如,依维莫司或雷帕霉素)、PPAR $\gamma$ 激动剂和PPAR $\delta$ 激动剂。

[0172] 在另一方面,所述药物可以选自水飞蓟宾、src激酶抑制剂、MerTK抑制剂和Stat3抑制剂。在这个实施方式中,所述药物可以是src激酶抑制剂(例如达沙替尼)。在另一实施方式中,所述药物可以是MerTK抑制剂(例如UNC1062)。在又另一实施方式中,所述药物可以

是Stat3抑制剂(例如选自舒尼替尼和索拉非尼)。

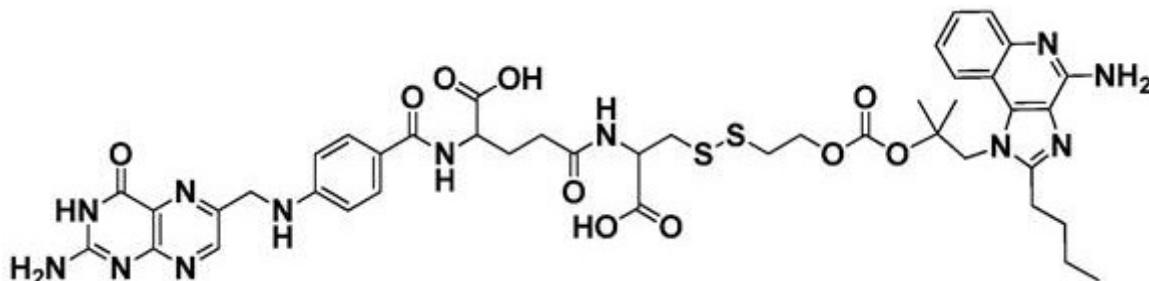
[0173] 将理解,本文所述的药物的类似物或衍生物也可以用于本文所述的化合物中。所述药物也可以是经由接头连接至叶酸受体结合配体的成像剂。

[0174] 在另一方面,可以施用多于一种化合物,并且所述化合物可以包含不同的药物。在一个实施方式中,不同的药物可以选自例如TLR7激动剂和PI3K抑制剂。在又另一实施方式中,可以施用一种或多种化合物,连同一种或多种未缀合的药物(即,没有连接至叶酸受体结合配体)。对于组合疗法实施方式,可以使用任何本文所述的化合物和药物,或者可以根据本文所述的方法可以使用耗尽或抑制MDSCs的其他药物。对于组合疗法实施方式,可以产生如本文所述的协同作用。

[0175] 在一个实施方式中,在使用本文所述的方法处理宿主动物以耗尽或抑制MDSCs之前,可以通过向宿主动物施用叶酸-成像剂缀合物来处理所述宿主动物,以测定宿主动物的叶酸受体状态,如美国申请公开号20140140925中所述,该申请通过引用并入本文。在这个实施方式中,宿主动物的叶酸受体状态可以被测定为阳性或阴性的,并且可以使用叶酸受体状态来测定应向宿主动物施用的化合物。

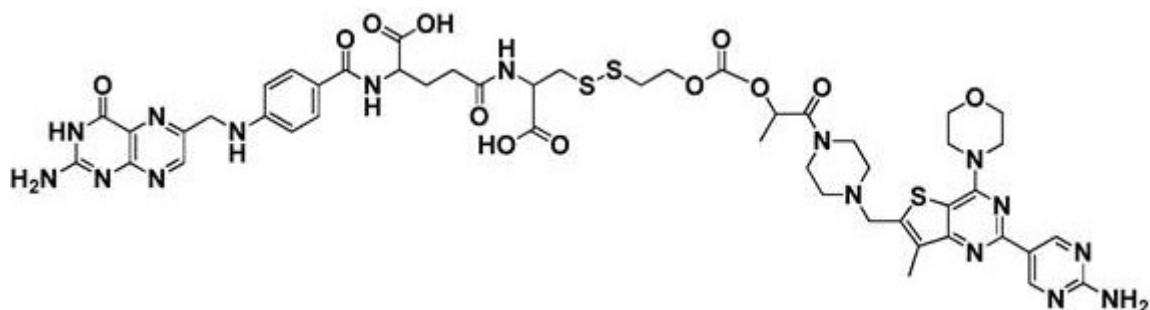
[0176] 在本文所述的方法的进一步的方面,一种或多种化合物中的叶酸选自对叶酸受体- $\alpha$ 特异性的叶酸和对叶酸受体- $\beta$ 特异性的叶酸。在此方面,可以施用至少两种化合物,并且一种化合物中的叶酸是对叶酸受体- $\alpha$ 特异性的叶酸,且另一化合物中的叶酸是对叶酸受体- $\beta$ 特异性的叶酸。在这个说明性的方面,可以通过经由化合物与肿瘤的结合而直接治疗肿瘤,以及通过另一化合物与MDSCs的结合以抑制或耗尽MDSCs而间接治疗肿瘤,从而治疗叶酸受体阳性的癌症。

[0177] 在另一实施方式中,所述化合物具有下式:



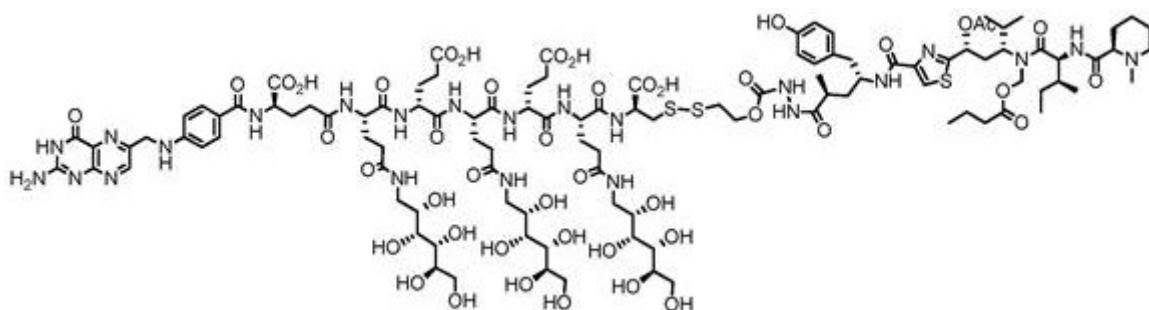
(本文也称作FA-TLR7),或其药学上可接受的盐。

[0178] 在另一实施方式中,所述化合物具有下式:



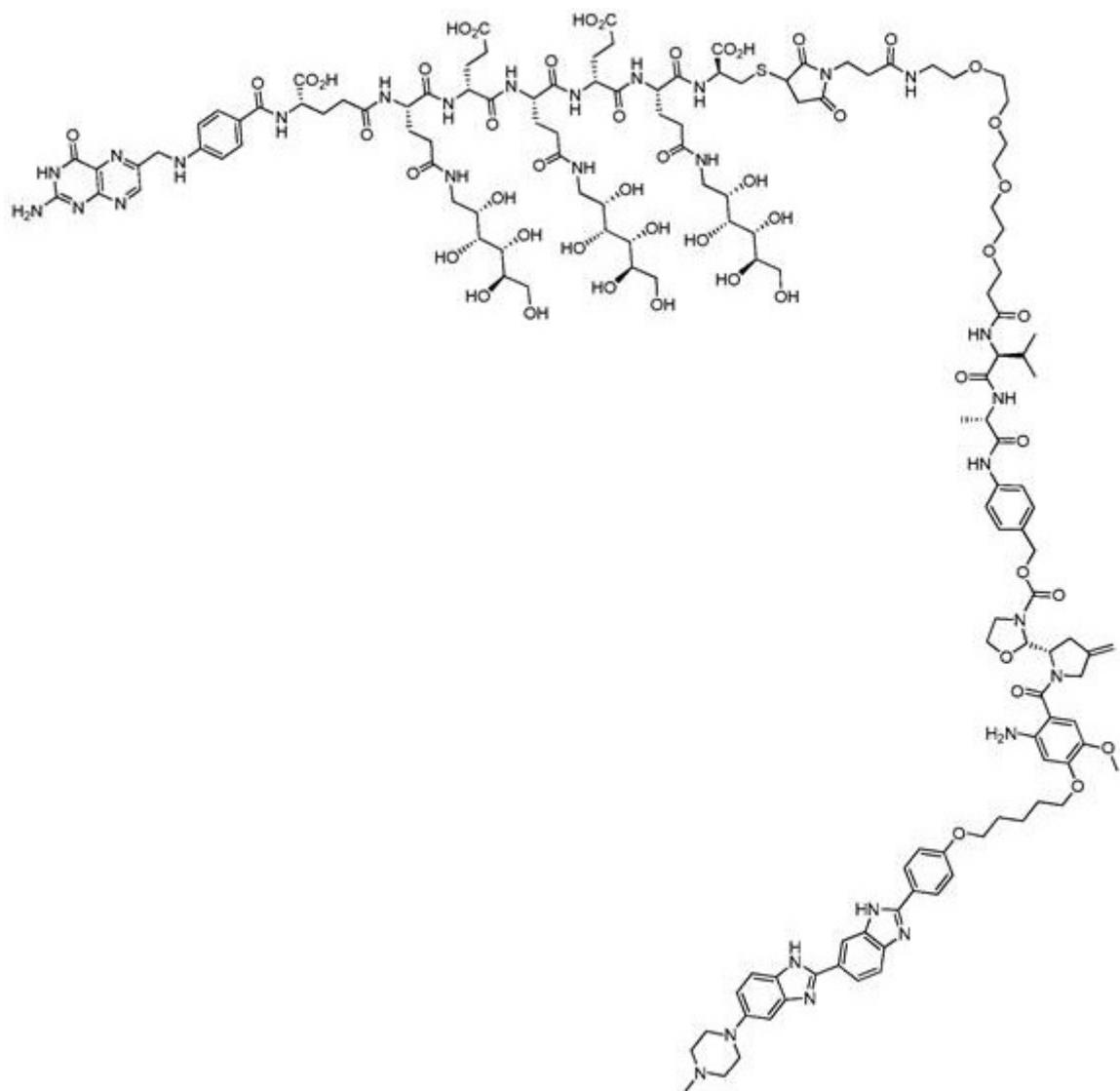
(本文也称作FA-PI3K),或其药学上可接受的盐。

[0179] 在另一实施方式中,所述化合物具有下式:



(本文也称作FA-tubulysin),或其药学上可接受的盐。

[0180] 在另一实施方式中,所述化合物具有下式:



(本文也称作FA-PBD),或其药学上可接受的盐。

[0181] 如本文使用的术语“药学上可接受的盐”是指具有可用于药物中的抗衡离子的那些盐。此类盐包括(1)酸加成盐,其可以通过母体化合物的游离碱与无机酸,例如盐酸、氢溴酸、硝酸、磷酸、硫酸和高氯酸等,或与有机酸,例如乙酸、草酸、(D)或(L)苹果酸、马来酸、甲磺酸、乙磺酸、对甲苯磺酸、水杨酸、酒石酸、柠檬酸、琥珀酸或丙二酸等的反应而获得;或(2)当母体化合物中存在的酸性质子被金属离子,例如碱金属离子、碱土金属离子或铝离子

替换时形成的盐；或与有机碱，例如乙醇胺、二乙醇胺、三乙醇胺、三甲胺、N-甲基葡萄糖胺等配位时形成的盐。药学上可接受的盐是本领域技术人员熟知的，并且预期任何此类药学上可接受的盐与本文所述的实施方式相关。

[0182] 适合的酸加成盐由形成非毒性盐的酸形成。说明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、葡萄糖酸盐、葡萄糖醛酸盐、六氟磷酸盐、海苯酸盐、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、2-萘磺酸盐、烟酸盐、硝酸盐、乳清酸盐、草酸盐、棕榈酸盐、双羟萘酸盐、磷酸盐/磷酸氢盐/磷酸二氢盐、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。

[0183] 本文所述的化合物的适合的碱式盐由形成非毒性盐的碱形成。说明性的实例包括精氨酸盐、苄星青霉素盐、钙盐、胆碱盐、二乙胺盐、二乙醇胺盐、甘氨酸盐、赖氨酸盐、镁盐、葡甲胺盐、乙醇胺盐、钾盐、钠盐、氨丁三醇盐和锌盐。也可以形成酸和碱的半盐，例如半硫酸盐和半钙盐。

[0184] 在一方面，将本文所述的化合物直接施用至血流中，肌肉中，或内脏器官中。用于此类胃肠外施用的适合途径包括静脉内、动脉内、腹膜内、鞘内、硬膜外、脑室内、尿道内、胸骨内、颅内、肿瘤内、肌内和皮下递送。用于胃肠外施用的适合方式包括针（包括微针）注射器、无针注射器和输注技术。

[0185] 在一个说明性方面，胃肠外组合物通常是水溶液，其可以含有载体或赋形剂，例如盐、碳水化合物和缓冲试剂（优选在pH 3-9），但对于一些应用，它们可以更适当地配制成无菌非水溶液或配制成干燥形式，以连同适当的媒介物（例如无菌、无热原水或磷酸缓冲盐水）使用。在其他实施方式中，含有本文所述的化合物的任何组合物可以适合于本文所述的化合物的胃肠外施用。胃肠外组合物在无菌条件下的制备，例如通过无菌条件下的冻干，可以使用本领域技术人员熟知的标准制药技术容易地完成。在一个实施方式中，通过使用适当的配制技术，例如并入增强溶解度的试剂，可以提高在胃肠外组合物的制备中使用的化合物的溶解度。

[0186] 化合物的剂量可以显著改变，其取决于宿主动物的病况、所治疗的癌症、化合物的施用途径和组织分布，以及共同使用其他治疗处理（例如放射疗法或组合疗法中的其他药物）的可能性。待向宿主动物施用的治疗有效量（即化合物）或诊断有效量（例如，叶酸-成像剂缀合物，如美国申请公开号20140140925中所述，该申请通过引用并入本文），是基于宿主动物的体表面积、质量和病况的医生评估。治疗有效或诊断有效量可以范围在例如约0.05 mg/kg患者体重至约30.0 mg/kg患者体重，或约0.01 mg/kg患者体重至约5.0 mg/kg患者体重，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，所有这些都是患者体重的kg数。化合物的总治疗或诊断有效量可以以单个或分开的剂量施用，并且根据医生自行决定，可以落在本文给出的典型范围之外。

[0187] 在另一实施方式中，可以施用治疗或诊断有效量的化合物或叶酸-成像剂缀合物，所述治疗或诊断有效量从约0.5 μg/m<sup>2</sup>至约500 mg/m<sup>2</sup>，从约0.5 μg/m<sup>2</sup>至约300 mg/m<sup>2</sup>，或从

约100  $\mu\text{g}/\text{m}^2$ 至约200  $\text{mg}/\text{m}^2$ 。在其他实施方式中,所述量可以从约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  $\text{mg}/\text{m}^2$ 。所述总量可以以单个或分开的剂量施用,并且根据医生自行决定,可以落在本文给出的典型范围之外。这些量是基于体表面积的 $\text{m}^2$ 数。

[0188] 本文所述的化合物可以含有一个或多个手性中心,或者可以另外能够作为多种立体异构体存在。将理解,在一个实施方式中,本文所述的发明不受限于任何具体的立体化学要求,并且所述化合物可以是光学纯的,或者可以是多种的立体异构体混合物中的任一种,包括对映异构体的外消旋和其他混合物,非对映异构体的其他混合物等。还将理解,此类的立体异构体混合物可以包括在一个或多个手性中心处的单立体化学构型,同时包括在一个或多个其他手性中心处的立体化学构型的混合物。

[0189] 类似地,本文所述的化合物可以包括几何中心,例如顺式、反式、E和Z双键。将理解,在另一实施方式中,本文所述的发明不受限于任何具体的几何异构体要求,并且所述化合物可以是纯的,或者可以是多种的几何异构体混合物中的任一种。还将理解,此类的几何异构体混合物可以包括在一个或多个双键处的单一构型,同时包括在一个或多个其他双键处的几何结构的混合物。

[0190] 如本文使用的术语“接头”包括连接分子的两个或更多官能部分以形成本发明的化合物的原子链。说明性地,原子链选自C、N、O、S、Si和P,或C、N、O、S,和P、C、N、O和S。原子链共价连接化合物的不同官能能力,例如叶酸和药物。接头可以具有宽泛的各种长度,例如在连续骨架中约2至约100个原子的范围。

[0191] 如本文使用的术语“可释放接头”或“可释放的接头”是指包括可以在生理条件下断裂的至少一个键(例如pH不稳定、酸不稳定、碱不稳定、氧化不稳定、代谢不稳定、生物化学不稳定或酶不稳定的键)的接头。认识到,导致键断裂的此类生理条件不一定包括生物或代谢过程,并且反而可以包括标准化学反应,例如水解反应,例如在生理pH下,或者由于隔室化进入细胞器,例如具有比胞质pH更低的pH的内体。

[0192] 理解到,可切割键可以连接可释放接头内的两个相邻原子和/或在可释放接头的一端或两端处连接其他接头部分或叶酸和/或药物,如本文所述。在可切割键连接可释放接头内的两个相邻原子的情况下,在键断裂后,可释放接头断裂成两个或更多的片段。或者,在可切割键位于可释放接头和另一部分之间的情况下,在键断裂后,可释放接头与所述其他部分分离。

[0193] 在另一实施方式中,用于施用化合物的组合物由具有至少约90%,或约95%,或约96%,或约97%,或约98%,或约99%,或约99.5%的纯度的化合物制备。在另一实施方式中,用于施用化合物的组合物由具有至少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%的纯度的化合物制备。

## 实施例

[0194] 化学品和试剂:

Fmoc-Glu-OtBu购自AAPTEC Inc.。4-氯-3-硝基喹啉购自Matrix Scientific Inc.。

Fmoc-8-氨基-3,6-二氧杂辛酸购自PolyPeptide Inc.。N10-(三氟乙酰基)蝶酸, tubulysin由Endocyte Inc. 提供。固相合成监测试剂盒购自ANASPEC Inc.。2,2-二甲基环氧乙烷、氢氧化铵、二碳酸二叔丁酯、三氟乙酸、甲苯、2-丙醇、甲醇、Pd/C、1,2-二氨基乙烷三苯甲基(聚合物结合树脂)、三乙胺、戊酰氯、乙酸乙酯、己烷、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、氧化钙、二氯甲烷、3-氯过氧苯甲酸、异氰酸苯甲酰酯、H-cys (Trt)-2-氯三苯甲基树脂、甲醇钠、二甲基氨基吡啶、乙腈、DMSO、4-氯-3-硝基-a,a,a-三氟甲苯、水合肼、乙醇、Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>、NaHCO<sub>3</sub>、浓HCl、乙醚、氯甲酸三氯甲酯、磺酰氯、2-巯基吡啶、2-巯基乙醇、DMF、PyBOP、DIPEA、乙二硫醇、三异丙基硅烷(thiisoprolylsilane)、20%哌啶DMF溶液、4-氯-3-硝基-a,a,a-三氟甲苯、水合肼、5,15-DPP、雷西莫特、2,4-二氨基-6-羟基嘧啶、N-乙酰基-5-羟基色胺、氨甲蝶呤、依维莫司、酵母聚糖、MnCl<sub>2</sub>、L-精氨酸、杜氏磷酸盐缓冲盐水(PBS)、来自溶组织梭菌的胶原酶、来自牛胰腺的脱氧核糖核酸酶I、来自牛睾丸的透明质酸酶、牛血清白蛋白(BSA)、甘氨酸、叠氮化钠、OPD底物购自Sigma。氢气、氩气、氮气的压缩气体购自Indiana Oxygen Company。BEZ235、PF-04691502、GDC-0980、渥曼青霉素、BLZ945、来那度胺、NLG 919、AS1517499和BIRB796购自Selleckchem。AMT购自Tocris Bioscience。CL307、CpG和聚IC购自InvivoGen Inc.。Greiss试剂购自Lifetechnology Inc.。10% Triton X-100购自Pierce Inc.。蛋白酶抑制剂购自Research Products International。QuantiChrom™ 尿素测定试剂盒购自BioAssay Systems。小鼠IL-10 DuoSet和抗小鼠FITC-精氨酸酶购自R&D systems。RPMI 1640培养基, 缺乏叶酸的RPMI 1640培养基购自Gibco Inc.。青霉素链霉素溶液(50x)、L-谷氨酰胺(200 mM)、带有2.21 mM EDTA (1x) 的0.25%胰蛋白酶购自Corning Inc.。胎牛血清(FBS)购自Atlanta biologicals Inc.。缺乏叶酸的动物饮食购自Envigo Inc.。小鼠叶酸受体-β抗体(F3IgG2a)由NIH的Dimitrov博士提供。小鼠Fc封闭剂(CD16/CD32)、抗小鼠FITC-CD11b、抗小鼠PE-F4/80、抗小鼠PE-Gr1、抗小鼠PE-CD4、抗小鼠FITC-CD8、7-AAD生存力染色溶液、红细胞裂解缓冲液(10X)购自Biologend Inc.。可固定的生存力染料eFluor® 660购自eBioscience, Inc.。Pierce™ 16%福尔马林(w/v) (无甲醇) 购自Thermo Fischer Scientific。异氟烷购自VetOne Inc.。Andy Fluor™ 647 NHS酯(琥珀酰亚胺酯) 购自Applied Bioprobes。小鼠GM-CSF购自Miltenyi Biotec Inc.。叶酸-tubulysin按照文献程序(参见例如W02014/062697中描述的程序)制备。抗人APC-CD33抗体购自Biologend Inc.。人T细胞培养基(TexMACS培养基)、人IL-2购自Miltenyi Biotech。人T细胞分离试剂盒(人T细胞富集试剂盒)购自STEMMCELL。Ficoll-PaqueTM Plus购自GE Healthcare。6-硫鸟嘌呤和亚甲基蓝购自Sigma。

#### [0195] 生物学实施例

##### 实施例1:细胞培养和动物饲养

不表达叶酸受体的4T1细胞由Endocyte Inc. 提供。将细胞在完全RPMI 1640培养基(补充10%胎牛血清、1%青霉素链霉素和2 mM L-谷氨酰胺的RPMI 1640培养基)中, 在37°C, 在加湿的95%空气5%CO<sub>2</sub>气氛中培养。每3-4天, 将带有2.21 mM EDTA的0.25%胰蛋白酶掺入细胞培养基。6-8周龄的雌性balb/c小鼠得自Envigo Inc.。在研究持续期间, 动物以正常啮齿动物食物或缺乏叶酸的饮食维持, 并圈养在标准的12小时光照和黑暗周期的无菌环境中。所有动物程序都由Purdue动物护理和使用委员会根据NIH指南批准。

#### [0196] 实施例2:肿瘤模型

**4T1实体瘤模型:**将6-8周龄的雌性balb/c小鼠以缺乏叶酸的饮食饲养2周。在肿瘤植入前,通过电动修剪器,除去小鼠身体左侧的皮毛。将悬浮在50  $\mu$ L完全RPMI 1640培养基中的5万4T1细胞皮下植入到乳房脂肪垫附近。在第6天当肿瘤体积达到约20-50  $\text{mm}^3$ 时,开始处理。对于FR<sup>+</sup> TAMs/MDSCs的表征,当体积达到300-500  $\text{mm}^3$ 时,消化肿瘤。开发导致对细胞表面蛋白的最少损伤的肿瘤消化。消化混合物由10 mL无血清的缺乏叶酸的RPMI 1640培养基中的1 mg/mL胶原酶IV、0.1 mg/mL来自牛睾丸的透明质酸酶和0.2 mg/mL脱氧核糖核酸酶I构成。在温和振荡下,在37°C消化1小时后,通过添加包含10%热失活的FBS的缺乏叶酸的RPMI 1640培养基来终止消化反应,并且使分解的肿瘤通过40  $\mu$ m细胞滤网以收集单独的细胞。随后,旋下分离的细胞,以除去消化混合物,并在5-10 mL红细胞裂解缓冲液(1x)中在冰上重悬5分钟。添加30-40 mL PBS以终止细胞裂解反应。随后,旋下细胞以除去上清,并重悬在流式染色培养基(其为含有2% FBS的PBS)中。计数细胞,并随后准备好用于流式细胞术染色。

[0197] **4T1腹膜模型:**以正常啮齿动物食物饲养6-8周龄的雌性balb/c小鼠。将300  $\mu$ L PBS中的1千万4T1细胞注射到腹膜腔中。在第7天和第10天之间,通过腹膜灌洗收集腹膜腹水。旋下细胞以除去上清,并在5-10 mL红细胞裂解缓冲液(1x)中在冰上重悬5分钟。添加30-40 mL PBS以终止细胞裂解反应。随后,旋下细胞以除去上清,并重悬在补充10 ng/mL小鼠GM-CSF的完全RPMI 1640培养基中。计数细胞,并准备好用于流式细胞术染色和体外筛选。

[0198] **RM1实体瘤模型:**将6-8周龄的雄性C57BL/6小鼠以缺乏叶酸的饮食饲养2周。在肿瘤植入前,通过电动修剪器,除去小鼠颈部上的皮毛。皮下植入悬浮在50  $\mu$ L完全RPMI 1640培养基中的2百万RM1细胞。在肿瘤植入后,每隔一天监测动物。当肿瘤大小达到约500  $\text{mm}^3$ 时,将小鼠安乐死。使用与4T1肿瘤模型类似的混合物,消化肿瘤。在温和振荡下,在37°C消化1小时后,通过添加包含10%热失活的FBS的缺乏叶酸的RPMI 1640培养基来终止消化反应,并且使分解的肿瘤通过40  $\mu$ m细胞滤网以收集单独的细胞。随后,旋下分离的细胞,以除去消化混合物,并在5-10 mL红细胞裂解缓冲液(1x)中在冰上重悬5分钟。添加30-40 mL PBS以终止细胞裂解反应。随后,旋下细胞以除去上清,并重悬在流式染色培养基(其为含有2% FBS的PBS)中。计数细胞,并随后准备好用于流式细胞术染色。

[0199] **CT26实体瘤模型:**将6-8周龄的雌性Balb/C小鼠以缺乏叶酸的饮食饲养2周。在肿瘤植入前,通过电动修剪器,除去小鼠颈部上的皮毛。皮下植入悬浮在50  $\mu$ L完全RPMI 1640培养基中的2百万CT26细胞。在肿瘤植入后,每隔一天监测动物。当肿瘤大小达到约500  $\text{mm}^3$ 时,将小鼠安乐死。使用与4T1肿瘤模型中类似的混合物,消化肿瘤。在温和振荡下,在37°C消化1小时后,通过添加包含10%热失活的FBS的缺乏叶酸的RPMI 1640培养基来终止消化反应,并且使分解的肿瘤通过40  $\mu$ m细胞滤网以收集单独的细胞。随后,旋下分离的细胞,以除去消化混合物,并在5-10 mL红细胞裂解缓冲液(1x)中在冰上重悬5分钟。添加30-40 mL PBS以终止细胞裂解反应。随后,旋下细胞以除去上清,并重悬在流式染色培养基(其为含有2% FBS的PBS)中。计数细胞,并随后准备好用于流式细胞术染色。

[0200] **EMT6实体瘤模型:**将6-8周龄的雌性Balb/C小鼠以缺乏叶酸的饮食饲养2周。在肿瘤植入前,通过电动修剪器,除去小鼠颈部上的皮毛。皮下植入悬浮在50  $\mu$ L完全RPMI 1640培养基中的2百万EMT6细胞。在肿瘤植入后,每隔一天监测动物。当肿瘤大小达到约500  $\text{mm}^3$

时,将小鼠安乐死。使用与4T1肿瘤模型中类似的混合物,消化肿瘤。在温和振荡下,在37℃消化1小时后,通过添加包含10%热失活的FBS的缺乏叶酸的RPMI 1640培养基来终止消化反应,并且使分解的肿瘤通过40  $\mu\text{m}$ 细胞滤网以收集单独的细胞。随后,旋下分离的细胞,以除去消化混合物,并在5-10 mL红细胞裂解缓冲液(1x)中在冰上重悬5分钟。添加30-40 mL PBS以终止细胞裂解反应。随后,旋下细胞以除去上清,并重悬在流式染色培养基(其为含有2% FBS的PBS)中。计数细胞,并随后准备好用于流式细胞术染色。

**[0201] 实施例3:流式细胞术分析**

**细胞表面标记物染色:**如前所述,制备从实体瘤模型或腹膜肿瘤模型获得的单细胞悬浮液。将100  $\mu\text{L}$ 流式染色培养基中的1百万细胞与0.7  $\mu\text{L}$ 小鼠Fc封闭剂一起在冰上温育5分钟。在与Fc封闭剂温育后,添加用于MDSCs (CD11b, Gr1)、TAMs (CD11b, F4/80)和叶酸受体- $\beta$  (F3IgG2a)的表面标记物。表1和2列出了用于表面标记物染色的抗体体积。在冰上温育1小时后,使用500  $\mu\text{L}$  PBS洗涤细胞并重悬在200  $\mu\text{L}$ 流式染色培养基中。向各样品添加死/活细胞标记物(3  $\mu\text{l}$ 的7-AAD或1  $\mu\text{l}$ 的BV421死/活),并在室温下避光温育。15分钟后,使用BD Accuri C6TM流式细胞仪分析细胞,而不洗涤(表1染色)。对于表2染色,进行一次洗涤,并使用BD Forteassa流式细胞仪分析细胞。结果显示在图5和图6中。如图5和图6中所示,可以分别通过CD11b+Gr1+和CD11b+F4/80+标记物鉴定4T1实体瘤中的小鼠MDSCs和TAMs群体。在这两个细胞群体中设门控后,可以在这两个群体的大多数上观察到FR- $\beta$ 表达(MDSCs上61.2%和TAMs上95%)。

**[0202] 表1:用于PDL-1和FR- $\beta$ 的流式细胞术染色的100  $\mu\text{L}$ 细胞悬浮液中的抗体体积**

抗体	BV605-Ly6C	FITC-CD11b	PerCp/Cy5.5-Gr1	Alexa Fluor 647-F3IgG2a	BV421死/活	AF594-F4/80
体积	0.5 $\mu\text{L}$	1 $\mu\text{L}$	0.5 $\mu\text{L}$	0.5 $\mu\text{L}$	1 $\mu\text{L}$	0.5 $\mu\text{L}$

**细胞内精氨酸酶染色:**遵循前述程序,标记TAMs/MDSCs的细胞表面标记物。0.1  $\mu\text{L}$ 可固定的生存力染料eFluor<sup>®</sup> 660与抗体混合物一起添加。在用PBS洗涤后,使用500  $\mu\text{L}$  PBS中的4%福尔马林,在4℃固定细胞15分钟。旋下细胞以除去固定溶液。使用500  $\mu\text{L}$ 含有0.1 M甘氨酸和0.05%叠氮化钠的洗涤缓冲液,洗涤细胞两次。在最后一次旋下后,将细胞添加于1 mL含有0.1 M甘氨酸、0.05%叠氮化钠和0.1% triton-100的透化溶液。在室温下进行透化5分钟。将透化细胞以1500 rpm旋下1分钟,并使用1 mL包含0.05 M甘氨酸、0.05%叠氮化钠和0.2%明胶的封闭缓冲液洗涤细胞三次。随后,在4℃,将细胞在1 mL封闭缓冲液中重悬过夜,以封闭非特异性细胞内结合。随后,将细胞以1500 rpm旋下1分钟以除去上清,并添加另一100  $\mu\text{L}$ 包含1  $\mu\text{L}$  FITC-精氨酸酶的封闭缓冲液。将细胞在4℃避光保持过夜。在以1500 rpm旋下1分钟后,使用1 mL封闭缓冲液洗涤细胞,并且随后准备好用于流式细胞术分析(BD Accuri C6<sup>TM</sup>流式细胞仪)。

**[0204] 实施例4:体外TAMs/MDSCs筛选**

将从腹膜模型分离的细胞重悬在补充10 ng/mL小鼠GM-CSF的完全RPMI 1640培养基中,并接种到96孔板中。将不同浓度的表2中列出的筛选药物溶解在相同的培养基中,并添加至包含300  $\mu\text{L}$ 培养基中的50万细胞的每个孔中。保留没有添加药物的包含300  $\mu\text{L}$ 培养基中的50万细胞的孔作为未处理的对照。三个额外孔充入没有细胞和药物的300  $\mu\text{L}$ 培养基,以保留作为背景对照。随后,将细胞在37℃,在加湿的95%空气5%CO<sub>2</sub>气氛中温育24小时至48小时。在温育结束时,收集上清用于IL-10 ELISA和一氧化氮测定。使用300  $\mu\text{L}$  PBS洗涤细

胞两次，并且随后准备好用于精氨酸酶测定。

[0205] 表2: 用于体外筛选的化合物和功能的列表

名称	功能	分类	名称	功能	分类
CL307	TLR7激动剂激动剂	III	5,15-DPP	STAT3抑制剂	II
BEZ235	PI3K抑制剂	II	氨甲蝶呤	抗炎	II
渥曼青霉素	PI3K抑制剂	II	依维莫司	mTOR抑制剂	II
AMT	iNOS抑制剂	II	Tubulysin	微管抑制剂	I
PF-04691502	PI3K抑制剂	II	GDC-0980	PI3K抑制剂	II
CpG	TLR9激动剂	III	AS1517499	STAT6抑制剂	II
BLZ945	CSF-1R抑制剂	II	BIRB796	p38 $\alpha$ MAPK抑制剂	II
来那度胺	TNF- $\alpha$ 分泌抑制剂	II	N-乙酰基-5-羟基色胺	BH4抑制剂	II
NLG 919	IDO途径抑制剂	II	2,4-二氨基-6-羟基嘧啶 (DAHP)	GTP环化水解酶I抑制剂	II
聚I:C	TLR3激动剂	III	长春花碱	微管抑制剂	I
酵母聚糖	TLR5激动剂	III	Am-9-79	拓扑异构酶I抑制剂	I

[0206] 实施例5: 精氨酸酶测定

如I.M. Corraliza, M.L. Campo, G. Soler, M. Modolell, 'Determination of arginase activity in macrophages: a micromethod', Journal of Immunological Methods 174 (1994) 231-235中所述, 测量细胞裂解物中的精氨酸酶活性。简言之, 在将分离的TAMs/MDSCs与不同药物在96孔板中体外温育后, 使用300  $\mu$ L PBS洗涤细胞两次。随后, 使用100  $\mu$ L带有蛋白酶抑制剂(1x)的0.1% Triton X-100, 在室温下裂解细胞30分钟。随后, 将50  $\mu$ L的裂解物溶液转入新的V-型96孔板。将50  $\mu$ L的精氨酸酶活化溶液(10 mM MnCl<sub>2</sub>/50 mM Tris·Cl (pH 7.5))添加至细胞裂解物。通过在56°C加热10分钟活化酶。通过在温和震荡下, 将25  $\mu$ L的活化溶液与25  $\mu$ L的精氨酸酶底物溶液(0.5 M L-精氨酸 (pH 9.7))在37°C温育60分钟, 进行精氨酸水解。在冷却至室温后, 则将10  $\mu$ L反应溶液稀释至90  $\mu$ L PBS中。将10  $\mu$ L此稀释的溶液转入96孔平底透明板。向每个孔添加200  $\mu$ L的尿素试剂。在室温避光温育10分钟后, 通过读板器, 在520 nm测量尿素浓度。结果显示在图7、图11、图12、图15和图24中。

[0207] 如图7中所示, 发现几种药物可以有效地降低TAMs/MDSCs在体外的精氨酸酶产生, 包括CL307、BEZ235、渥曼青霉素、CpG、tubulysin、AS1517499和BIRB796。精氨酸酶的浓度与520 nm的吸光度成正比。每幅图中的黑色虚线表示未处理的对照的精氨酸酶水平。黑色实线表示背景的精氨酸酶水平。将每个样品在520 nm的吸光度相对于0.1  $\mu$ M至100  $\mu$ M的测试药物的浓度作图。

[0208] 如图11中所示, 为了测试新合成的TLR7激动剂(TLR7A)影响TAMs/MDSCs的精氨酸酶产生的效力, 将不同浓度的TLR7A和C1307与TAMs/MDSCs共培养。从图11可以发现, TLR7A比可商购的TLR7激动剂(C1307)更有效地减少精氨酸酶。

[0209] 如图12中所示, 通过比较三种PI3K抑制剂在减少TAMs/MDSCs在体外的精氨酸酶产生的作用, 发现GDC-0980是可以有效地减少TAMs/MDSCs产生的精氨酸酶的最佳候选物。

[0210] 如图15中所示, 将得自4T1腹膜肿瘤模型的TAMs/MDSCs与不同浓度的TLR7激动剂(C1307)、PI3K抑制剂(BEZ235)和/或两种药物的组合一起培养。绘制两种药物之间的每种组合的EC50, 如图15中所示。正方形符号表示使用C1307或BEZ235的单处理的EC50。发现通过组合可以单独地影响精氨酸酶产生的两种不同药物, 观察到协同作用, 其可以进一步减少TAMs/MDSCs的精氨酸酶产生。

[0211] 如图24中所示,在未处理的对照、FA-TLR7激动剂、FA-PI3K抑制剂、FA-Tubulysin 和组合的组以及竞争组中,测试F4/80+巨噬细胞上的精氨酸酶的细胞内染色。如前文方法部分中所述,在治疗研究结束时肿瘤消化后,通过巨噬细胞表面标记物(F4/80)和M2巨噬细胞功能标记物(精氨酸酶),将分离的细胞染色以测试F4/80+巨噬细胞上的精氨酸酶表达水平。已经确定,精氨酸酶上调是TAMs/MDSCs的重要抑制标记物,因为通过精氨酸酶耗尽L-精氨酸可以抑制细胞毒性T细胞增殖。将来自处理和竞争组的活细胞中的精氨酸酶+F4/80+细胞群体与来自未处理的对照组的相同群体比较。如图24中所示,与未处理的对照相比,来自处理组的精氨酸酶+F4/80+细胞群体剧烈减少,并且这种作用可以被竞争剂(FA-PEG-NH<sub>2</sub>)的额外添加所竞争。因此,可以得出结论,通过靶向4T1实体瘤中的FR+ TAMs/MDSCs,三种类型的FA-缀合的SMDCs能够影响TAMs/MDSCs的免疫抑制。

#### [0212] 实施例6: IL-10 ELISA测定

遵循R&D Systems提供的小鼠IL-10 DuoSet ELISA的方案,通过ELISA测定来测量在与不同化合物体外温育后,TAMs/MDSCs的IL-10产生。简言之,使用100  $\mu$ L的稀释的捕获抗体/孔包被高亲和力的96孔板,其中PBS中的工作浓度为4  $\mu$ g/mL,没有载体蛋白。将平板密封,并在室温下温育过夜。抽吸每个孔,并使用喷瓶用400  $\mu$ L的洗涤缓冲液(PBS中0.05% Tween<sup>®</sup> 20, pH 7.2-7.4)洗涤三次。在末次洗涤后,通过倒转平板来除去剩余的洗涤缓冲液,并将其针对清洁的纸巾进行印迹。通过向每个孔添加300  $\mu$ L的试剂稀释液(PBS中1% BSA, pH 7.2-7.4)来封闭平板,并在室温下温育1小时。以如前文所述相同的方式,重复抽吸/洗涤三次。平板准备好用于样品添加。向每个孔添加来自TAMs/MDSCs体外筛选的100  $\mu$ L的样品上清。将平板以胶带覆盖,并在室温下温育2小时。将前述抽吸/洗涤程序重复三次。向每个孔添加100  $\mu$ L的检测抗体,浓度为试剂稀释液中的300 ng/mL。将平板以新胶带覆盖,并在室温下温育2小时。将前述抽吸/洗涤程序重复三次。向每个孔添加100  $\mu$ L链霉亲和素-HRP的工作稀释液(在试剂稀释液中1-40倍稀释)。将平板覆盖,并在室温下避光温育20分钟。将前述抽吸/洗涤程序重复三次。向每个孔添加200  $\mu$ L的底物溶液(一袋OPD的银色和金色片剂,在20 mL DI水中)。将平板在室温下避光温育20分钟。向每个孔添加50  $\mu$ L的终止溶液(3M HCl)。温和地敲打平板以确保彻底混合。IL-10浓度与微板读数器在492 nm测定的光密度成正比。结果显示在图8和图13中。

[0213] 如图8中所示,发现几种药物可以有效地降低TAMs/MDSCs在体外的IL-10产生,包括BEZ235、渥曼青霉素、tubulysin、来那度胺、AS1517499和BIRB796。IL-10浓度与492 nm的吸光度成正比。每幅图中的黑色虚线表示未处理的对照的IL-10水平。黑色实线表示背景的IL-10水平。将每个样品在492 nm的吸光度相对于0.1  $\mu$ M至100  $\mu$ M的测试药物的浓度作图。

[0214] 如图13中所示,通过比较三种PI3K抑制剂在减少TAMs/MDSCs在体外的IL-10产生的作用,发现GDC-0980是可以有效地减少TAMs/MDSCs产生的IL-10的最佳候选物。

#### [0215] 实施例7:一氧化氮测定

如Je-In Youn, Srinivas Nagaraj, Michelle Collazo, and Dmitry I. Gabrilovich, 'Subsets of Myeloid-Derived Suppressor Cells in Tumor Bearing Mice', J Immunol. 2008 Oct 15; 181(8): 5791-5802中所报道的,使用Greiss试剂测量一氧化氮产生。简言之,在TAMs/MDSCs与不同药物体外温育后,将来自每个孔的50  $\mu$ L上清转入96孔平底透明平板中。向具有50  $\mu$ L上清的每个孔,添加20  $\mu$ L的Greiss试剂和30  $\mu$ L的

DI水。在读板器测量前,将反应溶液在室温下避光保持30分钟。548 nm的吸光度与TAMs/MDSCs产生的一氧化氮浓度相关。结果显示在图9、图10、图11和图14中。

[0216] 如图9中所示,发现几种药物可以有效地降低TAMs/MDSCs在体外的一氧化氮产生,包括BEZ235、渥曼青霉素、AMT、氨甲蝶呤、tubulysin、AS1517499、依维莫司和BIRB796。一氧化氮的浓度与548 nm的吸光度成正比。每幅图中的黑色虚线表示未处理的对照的一氧化氮水平。黑色实线表示背景的一氧化氮水平。将每个样品在548 nm的吸光度相对于0.1  $\mu$ M至100  $\mu$ M的测试药物的浓度作图。

[0217] 如图10中所示,在将TAMs/MDSCs与不同的TLR激动剂体外共培养后,显示一氧化氮的产生剧烈增加以及CD86的上调,并且表明TAMs/MDSCs重编程为具有抗肿瘤功能的M1巨噬细胞。

[0218] 如图11中所示,为了测试新合成的TLR7激动剂(TLR7A)影响TAMs/MDSCs的一氧化氮产生的效力,将不同浓度的TLR7A和C1307与TAMs/MDSCs共培养。从图11可以发现,TLR7A比可商购的TLR7激动剂(C1307)更有效地增加一氧化氮。

[0219] 如图14中所示,通过比较三种PI3K抑制剂在减少TAMs/MDSCs在体外的一氧化氮产生的作用,发现GDC-0980是可以有效地减少TAMs/MDSCs产生的一氧化氮的最佳候选物。

[0220] 实施例8:统计学分析

通过Student t-检验测定数值之间的统计学显著性。所有数据表示为平均值± SD。认为p ≤ 0.05的概率值是显著的。

[0221] 实施例9:M1与M2巨噬细胞的比例

在未处理的对照、FA-TLR7激动剂、FA-PI3K抑制剂、FA-Tubulysin和组合的组以及竞争组中,测试M1与M2巨噬细胞的比例(F4/80+CD86+:F4/80+CD206+)。

[0222] 如前文方法部分中所述,在治疗研究结束时肿瘤消化后,通过F4/80巨噬细胞标记物和M1 (CD86)、M2 (CD206)标记物,将分离的细胞染色。研究4T1实体瘤中M1与M2巨噬细胞的比例并概述于图25中。肿瘤环境中的巨噬细胞已经被认为主要为M2巨噬细胞功能,其可以支持肿瘤生长并抑制免疫反应。另一方面,已经认为M1巨噬细胞能够消除肿瘤细胞并刺激抗癌免疫反应。因此,研究M1与M2巨噬细胞的比例,对于靶向FR-β阳性TAMs/MDSCs非常重要。如图25中所示,将来自处理和竞争组的M1与M2巨噬细胞的比例(F4/80+CD86+细胞群体:F4/80+CD206+细胞群体)与来自未处理的对照的比例进行比较。结果,与未处理的对照相比,三个处理组(FA-TLR7激动剂、FA-PI3K抑制剂和组合)中的比例剧烈增加,并且这种作用可以被竞争剂(FA-PEG-NH<sub>2</sub>)的额外添加所竞争。因此,可以得出结论,通过靶向4T1实体瘤中的FR+ TAMs/MDSCs,三种类型的FA-缀合的MDSCs能够将免疫抑制M2巨噬细胞环境转化成抗癌的M1巨噬细胞环境,这将有助于肿瘤的缓慢生长。

[0223] 实施例10:MDSCs群体

在未处理的对照、FA-TLR7激动剂、FA-PI3K抑制剂、FA-Tubulysin和组合的组以及竞争组中,测试MDSCs群体(CD11b+Gr1+)。

[0224] 如前文方法部分中所述,在治疗研究结束时肿瘤消化后,通过MDSCs标记物CD11b+ Gr1+,将分离的细胞染色,参见图26。仅FA-TLR7激动剂和组合组显示剧烈减少的MDSCs群体。FA-Tubulysin和FA-PI3K抑制剂的处理组中的MDSCs群体显示与未处理的对照和竞争组相比,没有差异。TLR7激动剂处理(FA-TLR7激动剂和组合组)中MDSCs群体减少可能是MDSCs

重编程为抑制肿瘤存活的功能的结果,这可能导致MDSCs的表型变化。尽管体外数据表明tubulysin对TAMs/MDSCs的毒性,但体内肿瘤环境可能能够抑制tubulysin的杀死功能,因为肿瘤细胞可能能够释放可以支持MDSCs在毒性tubulysin存在下存活的生长因子和细胞因子。结果,对于FA-tubulysin处理,MDSCs的群体没有变化。然而,通过将图24、25和26中的结果组合,可以发现即使没有改变MDSCs的表型,FA-tubulysin和FA-PI3K抑制剂组中的TAMs/MDSCs功能(精氨酸酶水平)和肿瘤环境(M1与M2巨噬细胞的比例)也已经被改变。

#### [0225] 实施例11:CD4和CD8 T细胞群体的百分比

在未处理的对照、FA-TLR7激动剂、FA-PI3K抑制剂、FA-Tubulysin和组合的组以及竞争组中,测试从4T1实体瘤分离的活细胞中CD4和CD8 T细胞群体的百分比(参见图27)。

[0226] 叶酸SMDCs处理对于提高CD4+ T细胞群体比提高CD8+ T细胞具有更显著的作用。应提及,因为PI3K在T细胞增殖和活化中是重要的,组合组中的CD4+和CD8+ T细胞两者都显示与未处理的对照相比没有差异或显示群体减少。

#### [0227] 实施例12:体内研究

在4T1实体瘤模型中进行FA-TLR7A的剂量研究,其中每组两只小鼠。通过在肿瘤植入(皮下,5万细胞/小鼠)后第6天开始,每周5天i.v.注射不同剂量的FA-TLR7A进行处理。继续处理2周。每天测量肿瘤体积。从这个研究可见,通过使用TLR7激动剂通过叶酸受体-β靶向TAMs/MDSCs,肿瘤生长减慢,特别是在5 nmol、10 nmol和20 nmol的组中。结果显示在图16和17中。

[0228] 在4T1实体瘤模型中进行FA-TLR7激动剂的治疗研究,其中每组3只小鼠。通过在肿瘤植入(皮下,5万细胞/小鼠)后第6天开始,每周5天i.v.注射100  $\mu$ l的PBS中的10 nmol FA-TLR7激动剂进行处理。继续处理2周。竞争组通过共注射200倍更多的竞争剂(FA-PEG-NH<sub>2</sub>)和10 nmol的FA-TLR7激动剂,以相同的时间表进行。总注射体积为100  $\mu$ l。每天测量肿瘤体积。从这个研究可见,通过使用TLR7激动剂通过叶酸受体-β靶向TAMs/MDSCs,肿瘤生长减慢。并且这种作用可以被添加额外FA-PEG-NH<sub>2</sub>竞争,这证实了FA-TLR7激动剂的抗癌活性通过FR-β介导。结果显示在图18中。

[0229] 在4T1实体瘤模型中进行FA-tubulysin的治疗研究,其中每组3只小鼠。通过在肿瘤植入(皮下,5万细胞/小鼠)后第6天开始,每周5天i.v.注射100  $\mu$ l的PBS中的30 nmol FA-tubulysin进行处理。继续处理2周。竞争组通过共注射200倍更多的竞争剂(FA-PEG-NH<sub>2</sub>)和30 nmol FA-tubulysin,以相同的时间表进行。总注射体积为100  $\mu$ l。每天测量肿瘤体积。从这个研究可见,通过使用tubulysin通过叶酸受体-β靶向TAMs/MDSCs,肿瘤生长减慢。并且这种作用可以被添加额外FA-PEG-NH<sub>2</sub>竞争,这证实了FA-tubulysin的抗癌活性通过FR-β介导。结果显示在图19中。

[0230] 在4T1实体瘤模型中进行FA-PI3K抑制剂的治疗研究,其中每组3只小鼠。通过在肿瘤植入(皮下,5万细胞/小鼠)后第6天开始,每周5天i.v.注射100  $\mu$ l的PBS中的10 nmol FA-PI3K抑制剂进行处理。继续处理2周。竞争组通过共注射200倍更多的竞争剂(FA-PEG-NH<sub>2</sub>)和10 nmol FA-PI3K抑制剂,以相同的时间表进行。总注射体积为100  $\mu$ l。每天测量肿瘤体积。从这个研究可见,通过使用PI3K抑制剂通过叶酸受体-β靶向TAMs/MDSCs,肿瘤生长减慢。并且这种抗癌作用可以被添加额外FA-PEG-NH<sub>2</sub>竞争,这证实了FA-PI3K抑制剂的抗癌活性通过FR-β介导。结果显示在图20中。

[0231] 在4T1实体瘤模型中进行FA-TLR7激动剂和非靶向的PI3K抑制剂(BEZ235)的组合治疗研究,其中每组3只小鼠。通过在肿瘤植入(皮下,5万细胞/小鼠)后第6天开始,每周5天i.v.注射100  $\mu$ l的PBS中的10 nmol FA-TLR7激动剂,组合0.27 mg/小鼠的口服给药BEZ235进行处理。继续处理2周。竞争组通过共注射200倍更多的竞争剂(FA-PEG-NH<sub>2</sub>)和10 nmol的FA-TLR7激动剂,组合0.27 mg/小鼠的口服给药BEZ235,以相同的时间表进行。总注射体积为100  $\mu$ l。每天测量肿瘤体积。从这个研究可见,通过FA-TLR7激动剂与非靶向PI3K抑制剂的组合,肿瘤生长显著减慢。并且这种作用可以被添加额外FA-PEG-NH<sub>2</sub>竞争,这证实了组合处理的抗癌活性通过FR- $\beta$ 介导。然而,通过引入PI3K抑制剂BEZ235,由动物体重降低可以在早期给药时观察到某些毒性。结果显示在图21中。

[0232] 如前所提及,进行FA-TLR7激动剂的体内治疗研究。通过每周5天,口服施用0.27 mg/小鼠,以类似的给药时间表进行PI3K抑制剂(BEZ235)的非靶向疗法。继续研究2周。通过比较图21和22,可见对于组合处理对减慢肿瘤生长的协同作用,其证实了此前通过将TAMs/MDSCs与TLR7激动剂和PIK3抑制剂共培养对精氨酸酶产生的协同作用的体外研究。结果显示在图22中。

[0233] 图23显示对于治疗组在处理最后一天的平均肿瘤体积。

[0234] 实施例13:从PBMCs体外诱导人MDSCs

遵循标准程序,通过密度梯度离心从健康供体分离人PBMCs:

血液是用PBS稀释的血液(1:2稀释)。将15 ml的Ficoll转移到50 ml管。将35 ml的稀释血液小心地放在Ficoll介质上。将管在24°C,以400g离心30分钟,且没有减速。在离心机停止后,小心地将管从离心机取出,同时不干扰分层。小心地从管取出PBMCs,并转移到新的50 mL圆锥管。用PBS洗涤分离的PBMCs,并以300 g离心10分钟。倾去上清。将沉淀再一次在PBS中洗涤,并以200 g离心15分钟。使用血球计数分离的PBMCs。

[0235] 通过在37°C,以 $3 \times 10^6$ 个细胞/ml的密度在无血清培养基中粘附4小时,进一步纯化分离的PBMCs。在除去悬浮细胞后,将粘附的PBMCs在补充10 ng/ml的IL-6和GM-CSF的完全RPMI-1640中培养7天。随后,通过流动将人MDSCs作为CD33+细胞分选。通过将PBMCs与完全RPMI-1640培养基共培养7天,分化正常的人巨噬细胞。

[0236] 将人MDSCs与选择的药物一起培养2天。测量MDSCs的IL-10产生,并相对于药物浓度作图。人MDSCs显示对这些药物的类似反应和减少的IL-10,这可能促成对MDSCs的免疫抑制的抑制。结果显示在图28中。

[0237] 实施例14:人T细胞的体外活化和对T细胞抑制的抑制

如实施例13中所述,通过密度梯度离心分离人PBMCs。将分离的PBMCs以 $5 \times 10^7$ 个细胞/ml的浓度重悬在15 ml管中的1 ml带有2% FBS和1mM EDTA的PBS中。将人T细胞富集试剂盒的50 $\mu$ l混合物溶液添加到悬浮液中。将细胞在室温下温育10分钟。添加50  $\mu$ l的磁珠(人T细胞富集试剂盒),并在室温下温育5分钟。在室温下,将具有T细胞和磁珠的管放入磁体5分钟。上清包含负选择的人T细胞,将其收集并计数。将分离的T细胞以 $1 \times 10^6$ 个细胞/ml的密度与50 U/ml的IL-2培养3天。随后,使用吸液管将细胞溶液充分混合,并在磁体旁边放置5分钟以除去珠。收集包含活化的人T细胞的悬浮液,用于悬浮液测定。

[0238] 将与浓度为0.1或1  $\mu$ M的三种类型的药物共培养2天的人MDSCs与活化的人T细胞以8:1的比例混合18小时。测量作为T细胞活化标记物的IFN- $\gamma$ 的产生。与巨噬细胞相比,

MDSCs显示T细胞活化的50%抑制。对于0.1  $\mu\text{M}$ 的药物浓度, T细胞的IFN- $\gamma$ 产生没有显著变化。然而, 在1  $\mu\text{M}$ 的浓度下, TLR7激动剂处理的MDSCs显示来自T细胞的IFN- $\gamma$ 剧烈增加, 表明MDSCs的抑制功能可能被体外TLR7激动剂刺激抑制或逆转。结果显示在图29中。

#### [0239] 实施例15:肺转移测定

当肿瘤大小达到50  $\text{mm}^3$ 时, 使用三种类型的FA-缀合物处理移植4T1细胞的Balb/c小鼠2周(7天/周)。在2周处理后, 将动物安乐死, 并在37°C使用5 ml的胶原酶IV PBS溶液(1 mg/ml)消化肺2小时。使悬浮液通过70  $\mu\text{m}$ 细胞滤网以获得单细胞悬浮液。将细胞与10 ml包含60  $\mu\text{M}$  6-硫鸟嘌呤的完全RPMI-1640培养基共培养10-14天。在培养结束时, 除去培养基。在室温下用5 ml甲醇固定细胞5分钟, 并使用DI水洗涤一次。添加5 ml的亚甲基蓝(0.03%, v/v), 将细胞在室温下染色5分钟。在用水清洗后, 将细胞风干以评估转移。

[0240] 4T1细胞显示对FA-缀合物和释放的药物二者的抗性。因此, 可能认为FA-缀合物的体内抗癌活性应归因于通过对免疫抑制功能的抑制或重编程, 对FR- $\beta$ 阳性骨髓细胞的靶向。结果显示在图30和图31中。

[0241] FA-缀合物的施用从每周5天变为每周7天, 以查看是否可达到改进的治疗作用。向4T1实体瘤连续施用FA-缀合物可以减少肿瘤生长。结果显示在图32中。

[0242] 通过靶向MDSCs/TAMs, 这三个处理组中的精氨酸酶水平急剧降低, 这可能促成T细胞抑制的消除。结果显示在图33中。

[0243] MDSCs通过参与转移前小生境的形成, 促进血管生成和肿瘤细胞侵袭, 直接参与促进肿瘤转移。我们的假设是消除MDSCs/TAMs可防止癌症转移。此前的研究显示TLR7刺激/PI3K抑制可以减少MDSCs群体, 或将免疫抑制MDSCs/TAMs转化成M1样巨噬细胞, 或抑制免疫抑制功能, 例如精氨酸酶和IL-10。因此, 可促进T细胞活化, 并且可改进全身免疫性。转移数据显示处理组中与未处理的疾病对照相比减少的肺转移。结果显示在图34和35中。

#### [0244] 实施例16:存活研究

使用5  $\times$  10<sup>4</sup>个细胞, s.q.植入Balb/c小鼠。当肿瘤大小达到~50  $\text{mm}^3$ 时, 开始FA-缀合物的处理, 并以每周7天继续2周。当大小达到150-200  $\text{mm}^3$ 时, 通过手术取出肿瘤。监测动物存活。

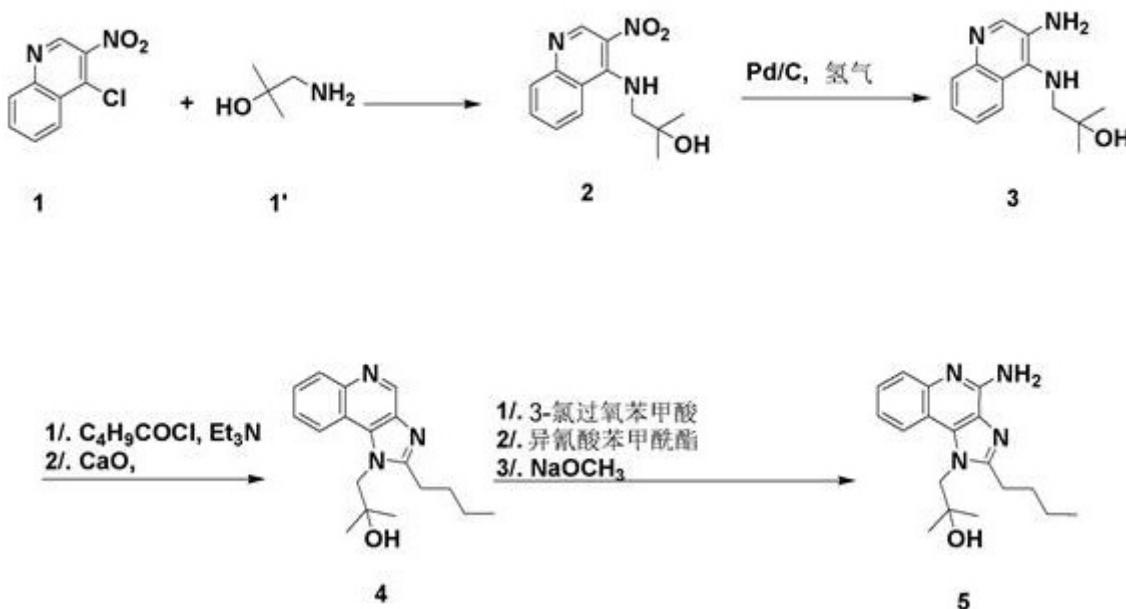
[0245] 当肿瘤大小达到50  $\text{mm}^3$ 时, 使用FA-缀合物处理携带4T1实体瘤的小鼠, 以靶向MDSCs/TAMs。当大小达到150-200  $\text{mm}^3$ 时, 取出肿瘤。继续处理总共2周(7天/周)。监测小鼠的存活。可见, 在消除MDSCs/TAMs的免疫抑制功能后, 动物存活显著增加。此研究仍在进行中, 以监测动物存活和血液血清细胞因子。结果显示在图36和图37中。

#### [0246] 化学实施例

##### 实施例1:TLR7激动剂(TLR7A)的合成

如Nikunj M. Shukla, Cole A. Mutz, Subbalakshmi S. Malladi, Hemamali J. Warshakoon, Rajalakshmi Balakrishna, 和Sunil A. David, 'Regioisomerism-dependent TLR7 agonism and antagonism in an imidazoquinoline; Structure-Activity Relationships in Human Toll-Like Receptor 7-Active Imidazoquinoline Analogues', J Med Chem. 2012 Feb 9; 55(3): 1106-1116所报道, 按照流程1中的程序合成TLR7激动剂(TLR7A)。

## 流程 1



## [0247] 步骤1:1-氨基-2-甲基丙-2-醇(化合物1')的合成

将2,2-二甲基环氧乙烷(0.1 g, 1.388 mmol)滴加到20 mL氢氧化铵的冰冷溶液。将反应混合物在室温下搅拌12小时。在真空下除去溶剂，并将残余物溶解在甲醇中。向反应混合物添加二碳酸二叔丁酯(0.75 g, 3.47 mmol)，并搅拌4小时。使用柱色谱(24% EtOAc/己烷)纯化混合物，以获得2-羟基-2-甲基丙基氨基甲酸叔丁基酯。将纯的2-羟基-2-甲基丙基氨基甲酸叔丁基酯溶解在5 mL的三氟乙酸中，并搅拌35分钟。减压除去溶剂，以获得作为三氟乙酸盐1'的1-氨基-2-甲基丙-2-醇。<sup>1</sup>H NMR 500 MHz (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>, δ, 以ppm计): δ 8.62 (s, 2H), 3.02 (d, 2H), 2.06-2.04 (m, 2H), 1.37-1.34 (s, 6H)。

## [0248] 步骤2:2-甲基-1-(3-硝基喹啉-4-基氨基)丙-2-醇(化合物2)的合成

将1-氨基-2-甲基丙-2-醇的三氟乙酸盐(化合物1') (450 mg, 2.4 mmol)添加到4-氯-硝基喹啉(化合物1) (250 mg, 1.2 mmol)和Et<sub>3</sub>N (0.5 mL, 3 mmol)在甲苯和2-丙醇的4:1混合物中的溶液。将混合物加热至70℃，进行半小时直到固体开始沉淀。随后，冷却反应混合物，过滤，并使用甲苯/2-丙醇(7:3)、乙醚和冷水洗涤。将残余物在80℃干燥以获得2-甲基-1-(3-硝基喹啉-4-基氨基)丙-2-醇(化合物2)。LCMS: [M+H]<sup>+</sup> m/z=261。

## [0249] 步骤3:1-(3-氨基喹啉-4-基氨基)-2-甲基丙-2-醇(化合物3)的合成

将2-甲基-1-(3-硝基喹啉-4-基氨基)丙-2-醇(化合物2) (450 mg, 1.72 mmol)溶解在甲醇中，并使用氢气球在作为催化剂的Pd/C上氢化4小时。随后使用硅藻土过滤溶液，随后减压蒸发溶剂，以获得1-(3-氨基喹啉-4-基氨基)-2-甲基丙-2-醇(化合物3)。LCMS: [M+H]<sup>+</sup> m/z=231。<sup>1</sup>H NMR 500 MHz (CDCl<sub>3</sub>, δ, 以ppm计): δ 8.12 (s, 1H), 7.61-7.58 (m, 1H), 7.48-7.40 (m, 2H), 4.90 (s, 2H), 3.47 (2H), 1.35-1.21 (s, 6H)。

## [0250] 步骤4:1-(4-氨基-2-丁基-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-1-基)-2-甲基丙-2-醇(化合物5, TLR7A)的合成

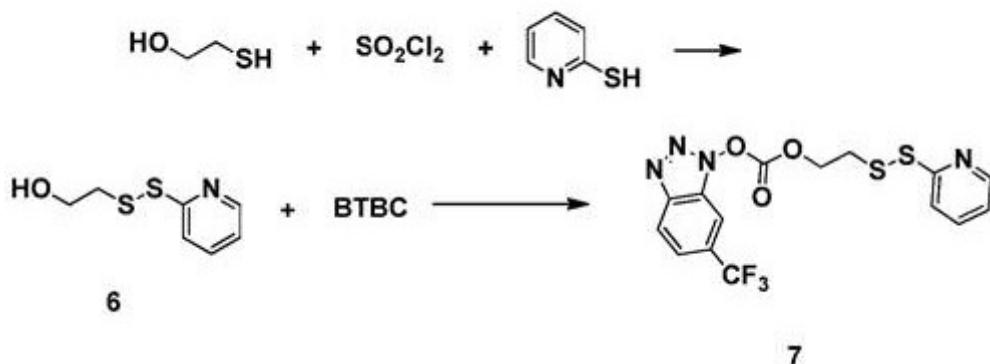
向化合物3 (100 mg, 0.43 mmol)在无水THF中的溶液中，添加三乙胺(66 mg, 0.65 mmol)和戊酰氯(62 mg, 0.52 mmol)。随后，将反应混合物搅拌6-8小时，之后在真空下除去

溶剂。将残余物溶解在EtOAc中,用水和盐水洗涤,并且随后在Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>上干燥以获得中间体酰胺化合物。将其溶解在MeOH中,随后添加氧化钙,并且在微波中在110℃加热1小时。随后,除去溶剂,并且使用柱色谱(9% MeOH/二氯甲烷)纯化残余物,以获得化合物4 (58 mg)。向化合物4在MeOH:二氯甲烷:氯仿(0.1:1:1)的溶剂混合物中的溶液,添加3-氯过氧苯甲酸(84 mg, 0.49 mmol),并且将溶液在45-50℃回流40分钟。随后,除去溶剂,并使用柱色谱(20% MeOH/二氯甲烷)纯化残余物,以获得氧化物衍生物(55 mg)。随后,将其溶解在无水二氯甲烷中,随后添加异氰酸苯甲酰酯(39 mg, 0.26 mmol),并在45℃加热15分钟。随后在真空下除去溶剂,并将残余物溶解在无水MeOH中,随后添加过量的甲醇钠。随后,将反应混合物在80℃加热1小时。在真空下除去溶剂,并且使用柱色谱(11% MeOH/二氯甲烷)纯化残余物,以获得化合物5。LCMS: [M+H]<sup>+</sup> m/z=312。<sup>1</sup>H NMR 500 MHz (CDCl<sub>3</sub>, δ, 以ppm计): δ 8.16-8.15 (d, 1H), 7.77-7.46 (d, 1H), 7.46-7.43 (m, 1H), 7.33-7.26 (m, 1H), 3.00-2.97 (m, 2H), 1.84-1.78 (m, 2H), 1.47-1.41 (m, 2H), 1.36 (s, 6H), 0.98-0.95 (m, 3H)。

### [0251] 实施例2: 异双官能二硫化物接头(化合物7)的合成

按照Satyam A., 'Design and synthesis of releasable folate-drug conjugates using a novel heterobifunctional disulfide-containing linker', Bioorg. Med. Chem. Lett. 2008 Jun 1;18(11):3196-9所述的程序,合成异双官能二硫化物接头(化合物7),如流程2中所示。

## 流程2



### [0252] 步骤1: 异双官能二硫化物接头(化合物7)的合成

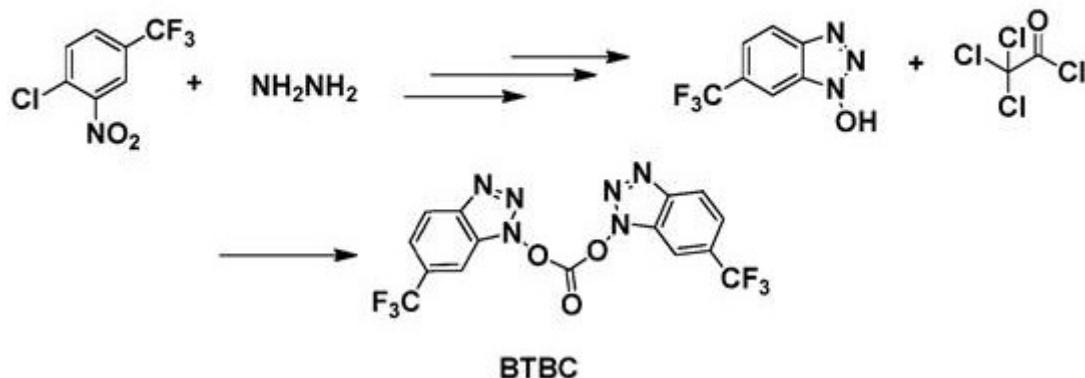
经20分钟的时段,在0-5°C,氮气气氛下,向2-巯基吡啶(2.5 g, 22.5 mmol)在25 mL的干燥二氯甲烷中的搅拌溶液,添加硫酰氯(25 mL在二氯甲烷中的1M溶液)。沉淀出黄色固体。将混合物在室温下搅拌2小时并通过旋转蒸发仪浓缩,并将由此获得的颗粒固体分散在50 mL的干燥二氯甲烷中并在冰浴中冷却。在0-5°C,氮气气氛下,经5分钟向此搅拌的悬浮液添加2-巯基乙醇(1.7 mL, 24.2 mmol)在30 mL的干燥二氯甲烷中的溶液。首先,悬浮液溶解,从而形成透明溶液。然而,在15-20分钟内,开始分离出淡黄色颗粒状固体。将混合物在室温下搅拌过夜。过滤沉淀物,用HPLC级二氯甲烷洗涤,并在真空干燥器中干燥数小时。可以通过将其盐酸盐在二氯甲烷中的悬浮液与稍多于等摩尔量的二甲基氨基吡啶混合,并使用在二氯甲烷中的5%甲醇作为洗脱剂,使所述混合物通过短硅胶柱,而释放化合物的游离碱(化合物6)。经2分钟,在室温下,将化合物6(游离碱,1 g, 5.4 mmol)在10 mL乙腈中的溶液添加

到BTBC (2.5g, 5.7 mmol) 在50 mL乙腈中的搅拌溶液。将所得混合物在室温下搅拌38小时。真空浓缩混合物，并将残余物在乙酸乙酯(50 mL)和1N NaHCO<sub>3</sub> (25 mL)之间分层。分离有机层，进一步用1N NaHCO<sub>3</sub> (10 mL)洗涤，干燥(无水Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)，过滤并真空浓缩以获得化合物7。LCMS: [M+H]<sup>+</sup> m/z=416。<sup>1</sup>H NMR 500 MHz (CDCl<sub>3</sub>, δ, 以ppm计): δ 8.38-8.32 (m, 3H), 8.09-8.07 (m, 1H), 7.77-7.75 (m, 1H), 7.70-7.69 (m, 1H), 7.14-7.13 (m, 1H), 4.81-4.78 (m, 2H), 3.33-3.31 (m, 2H)。

[0253] 实施例3:BTBC (化合物8)的合成

按照Takeda, K.; Tsuboyama, K.; Hoshino, M.; Kishino, M.; Ogura, H. 'A Synthesis of a New Type of Alkoxy carbonylating Reagents from 1,1-Bis[6-(trifluoromethyl)benzotriazolyl] Carbonate (BTBC) and Their Reactions', *Synthesis*, 1987, 557-560所述的程序,合成BTBC,如流程3中所示。

流程3



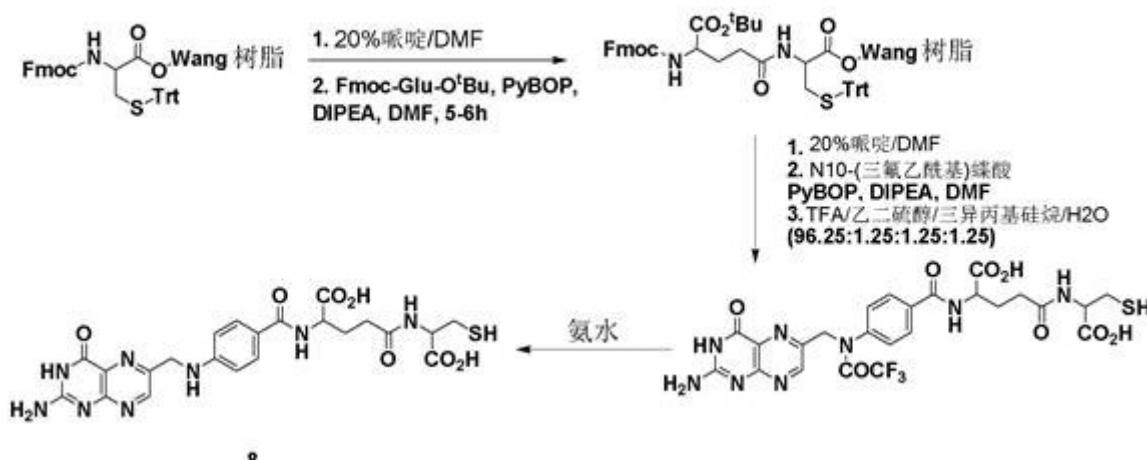
[0254] 将4-氯-3-硝基-a,a,a-三氟甲苯(2.5 g, 0.011 mol)和水合肼(1.65 g, 0.033 mol)在99%乙醇(20 mL)中的混合物回流24小时。在减压除去溶剂后,将残余物溶解在10% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>水溶液中。用乙醚洗涤溶液以除去起始材料并使用浓HCl酸化以沉淀产物,将所述产物用水洗涤并干燥以获得1-羟基-6-(三氟甲基)苯并三唑。在室温下,向1-羟基-6-(三氟甲基)苯并三唑(1 g, 5 mmol)在干燥乙醚(50 mL)中的搅拌溶液,添加氯甲酸三氯甲酯(0.26 g, 1.23 mmol)。在10分钟后,向混合物添加进一步量的氯甲酸三氯甲酯(0.26 g, 1.23 mmol),温和回流1小时,并收集形成的沉淀物并用干燥的乙醚洗涤。获得几乎纯的BTBC晶体。LCMS: [M+H]<sup>+</sup> m/z=432。

[0255] 实施例4:叶酸-半胱氨酸(化合物9)通过固相合成的合成

将H-Cys (Trt)-2-氯三苯甲基树脂(100 mg)分散在12 mL二氯甲烷中,并鼓入氩气10分钟。在除去二氯甲烷后,添加10 mL DMF 10 mL,并鼓气5分钟。三次添加5 mL的20%哌啶在DMF中的溶液,每次10分钟。使用10 mL DMF洗涤树脂3次,每次5分钟。加入10 mL异丙醇以洗涤树脂3次,每次5分钟。在空气中干燥数分钟后,通过固相合成监测试剂盒测试游离胺,其中蓝色珠表示胺的完全脱保护。将溶解在DMF中的Fmoc-Glu-0tBu (64 mg, 0.15 mol)、DIPEA (0.105 mL, 0.6 mol)、PyBOP (79 mg, 0.15 mol)添加到DMF溶液中的珠。反应5-6小时后,进行使用DMF/IPA的重复三次洗涤。通过添加5 mL的20%哌啶DMF溶液三次,进行胺的脱保护。在使用DMF洗涤三次后,将2 mL具有N10-(三氟乙酰基)蝶酸(62 mg, 0.15 mol)、DIPEA (0.105 mL, 0.6 mol)、PyBOP (79 mg, 0.15 mol)的DMF溶液添加到DMF溶液中的

珠。反应在氩气下持续5-6小时。添加8 mL体积比为96.25/1.25/1.25/1.25的TFA/乙二硫醇/三异丙基硅烷/H<sub>2</sub>O的混合溶液三次,每次30分钟,以从树脂切割化合物。通过HPLC纯化三氟乙酰基-保护的化合物8。在室温下,通过铵溶液(5 mL, 0.5 M)除去三氟乙酰基保护2小时后,获得化合物8。LCMS: [M+H]<sup>+</sup> m/z=544。

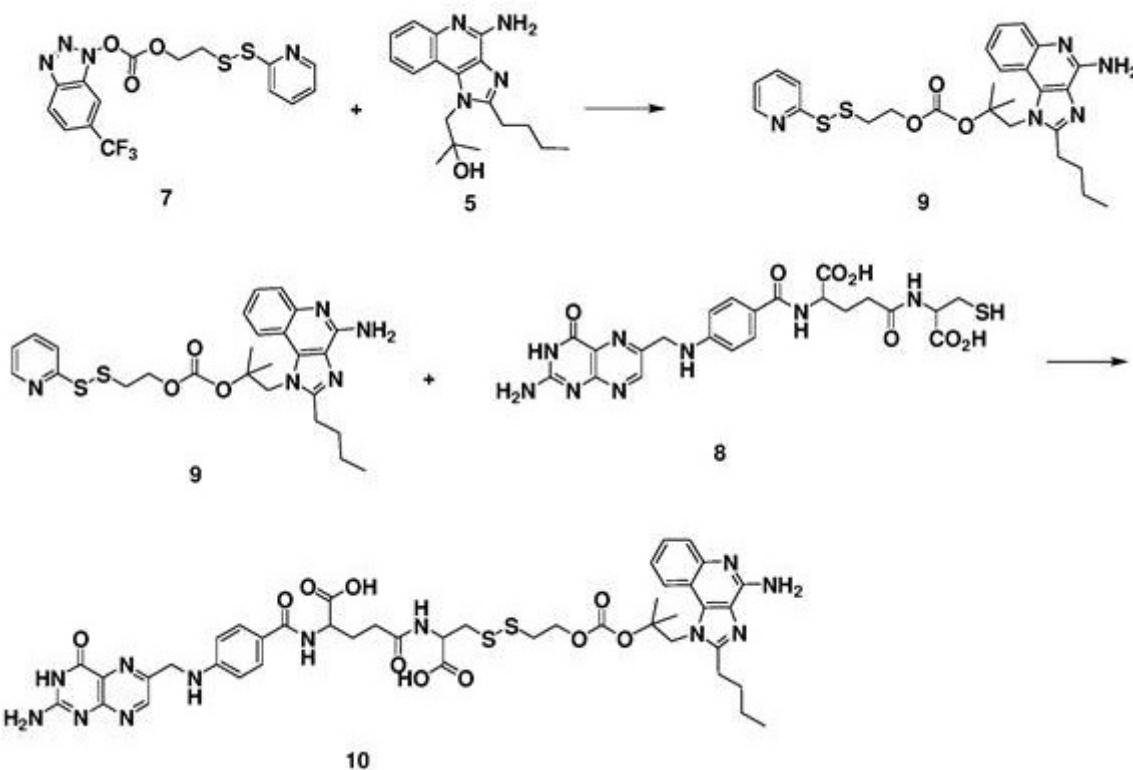
#### 流程 4



#### [0256] 实施例5: TLR7激动剂(TLR7A)的叶酸缀合物的合成

如流程5中所示,合成TLR7激动剂(TLR7A)的叶酸缀合物。

#### 流程5



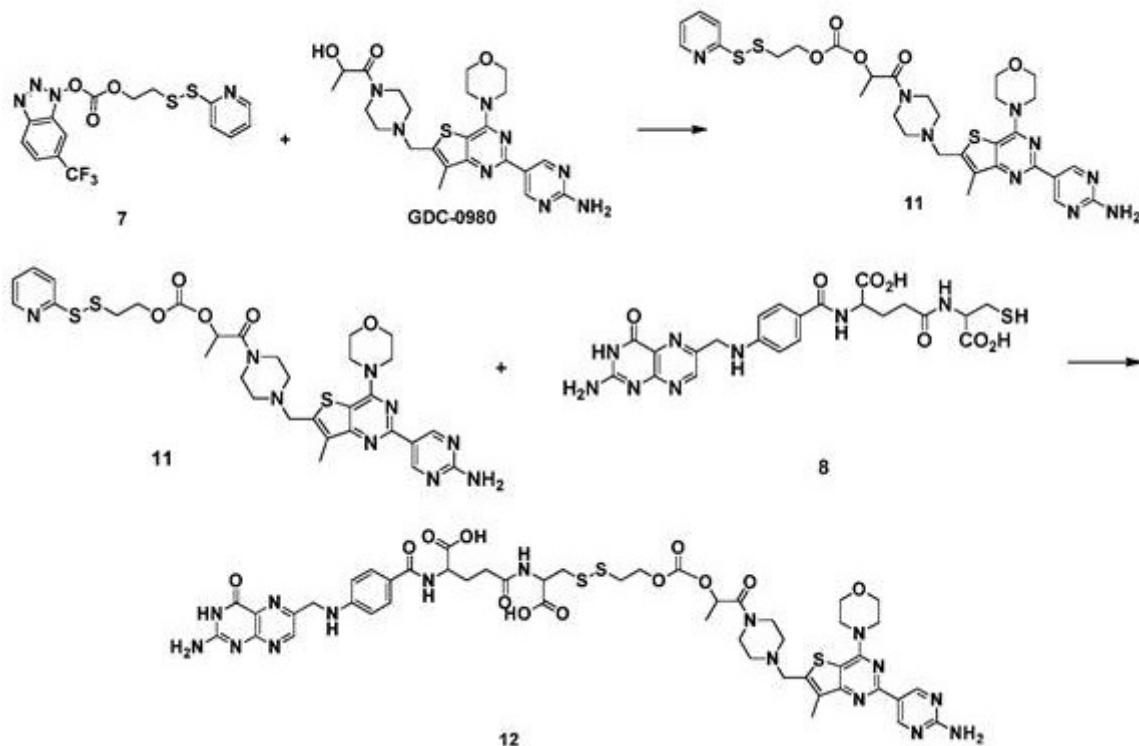
[0257] 在室温,氮气气氛下,将异双官能接头7 (88 mg, 0.213 mmol)添加到化合物5 (33 mg, 0.106 mmol)和二甲基氨基吡啶(39 mg, 0.319 mmol)在4 mL的二氯甲烷中的溶液,并且在回流温度下搅拌混合物7小时,此时,混合物的TLC分析表示>80%转化。浓缩混合物,并

通过使用二氯甲烷中的10%乙腈作为洗脱剂的柱色谱纯化。获得作为淡黄色固体的纯产物化合物9。将化合物8 (1当量) 在DMSO中的溶液分三份以20分钟的间隔添加到含有二甲基氨基吡啶 (1当量) 的药物-接头中间体化合物9 (1.0-1.5当量) 在DMSO中的溶液。在室温, 氩气下搅拌1-2小时后, 混合物的LCMS分析表示形成作为主要产物的期望的叶酸-药物缀合物 (化合物10)。通过制备型HPLC纯化混合物。LCMS:  $[M+H]^+$   $m/z=959$ 。

**[0258] 实施例6:FA-PI3K抑制剂(化合物12)的合成**

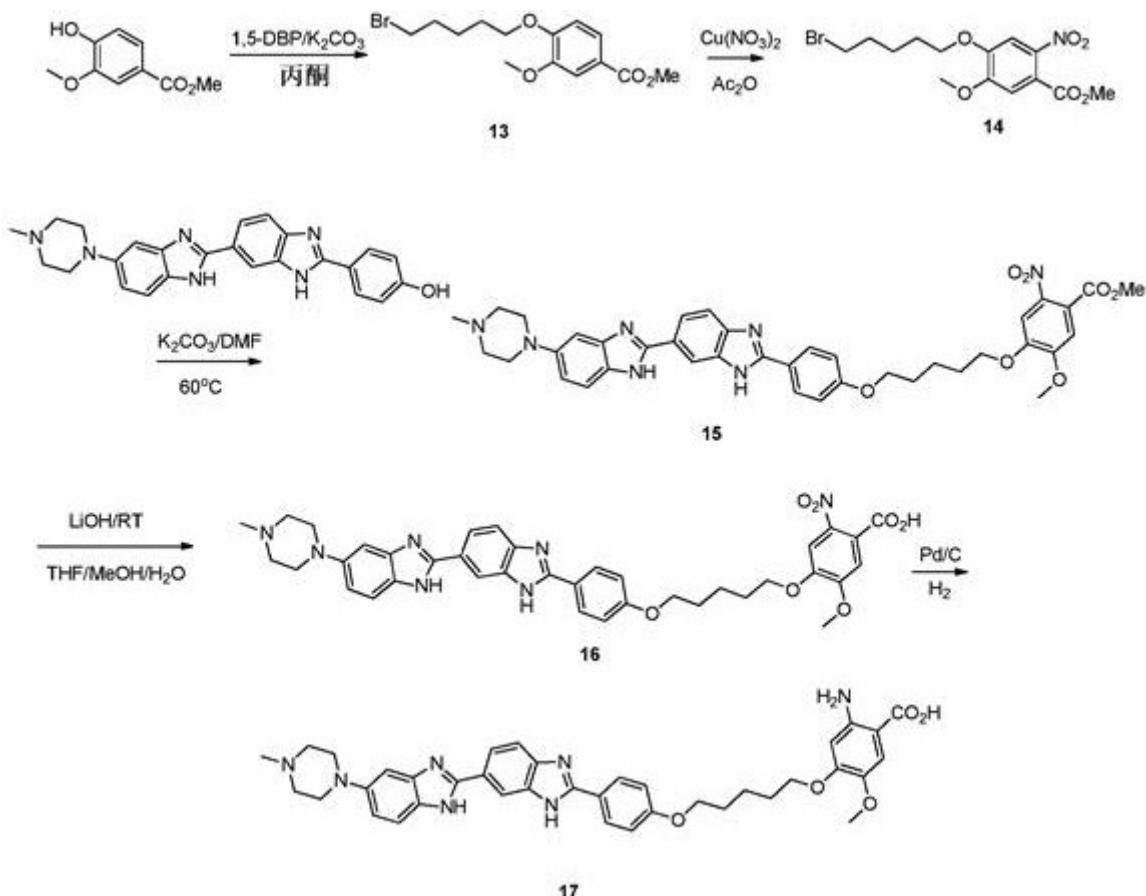
如流程6中所示,合成PI3K抑制剂(GDC-0980)的叶酸缀合物。

流程6



**[0259]** 在室温,氮气气下,将异双官能接头7 (50 mg, 0.12 mmol)添加到GDC-0980 (5 mg, 0.01 mmol)和二甲基氨基吡啶 (5 mg, 0.03 mmol)在4 mL的二氯甲烷中的溶液,并且在回流温度下搅拌混合物7小时,此时,混合物的TLC分析表示>80%转化。浓缩混合物,并通过使用二氯甲烷中的10%乙腈作为洗脱剂的柱色谱纯化。获得作为淡黄色固体的纯产物化合物9。将化合物8 (1当量) 在DMSO中的溶液分三份以20分钟的间隔添加到含有二甲基氨基吡啶 (1当量) 的药物-接头中间体化合物9 (1.0-1.5当量) 在DMSO中的溶液。在室温,氩气下搅拌1-2小时后,混合物的LCMS分析表示形成作为主要产物的期望的叶酸-药物缀合物化合物12。通过制备型HPLC纯化混合物。LCMS:  $[M+H]^+$   $m/z=1145$ 。

**[0260] 实施例7:FA-PBD抑制剂(化合物25)的合成**



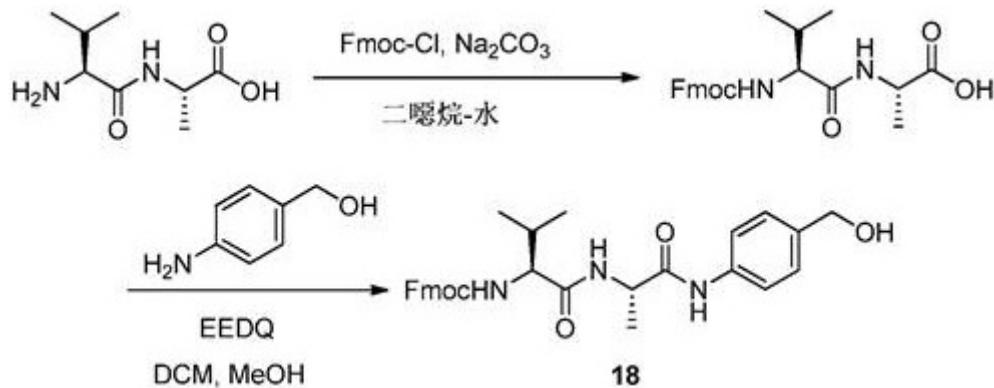
将苯酚化合物 (2.20 g, 12.1 mmol) 溶解在丙酮 (通过Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>垫干燥, 48.4 mL) 中, 并且向此溶液添加1,5-二溴戊烷 (49.4 mL, 36.3 mmol) 和K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (6.69 g, 48.4 mmol)。在Ar下, 将反应加热至回流6小时。将反应冷却至室温并滤出固体。浓缩滤液并使用0-30% EtOAc/石油醚中的CombiFlash纯化, 以获得作为固体的化合物13 (3.3893 g, 产率84.5%)。LCMS: [M+H]<sup>+</sup> m/z =331。<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, δ, 以ppm计): 7.65 (dd, J = 8.5, 2.0 Hz, 1H), 7.54 (d, J = 2.0 Hz, 1H), 6.86 (d, J = 8.50 Hz, 1H), 4.08 (t, J = 6.50 Hz, 2H), 3.91 (s, 3H), 3.89 (s, 3H), 3.44 (t, J = 6.5 Hz, 2H), 1.95 (m, 4H), 1.65 (m, 2H)。

[0261] 将Ac<sub>2</sub>O (52 mL) 中的化合物13 (3.3893 g, 10.23 mmol) 冷却至0°C, 并通过缓慢添加用Cu(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·3H<sub>2</sub>O (2.967 g, 12.28 mmol) 处理。将反应在0°C搅拌1小时, 随后在室温搅拌2小时。反应完成后, 将反应混合物倾入冰水并搅拌1小时。通过过滤收集所得的沉淀物。将产物用水洗涤(3 x), 并风干作为化合物14 (3.7097 g, 产率96%)。LCMS: [M+H]<sup>+</sup> m/z = 376。<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, δ, 以ppm计): 7.41 (s, 1H), 7.05 (s, 1H), 4.08 (t, J = 6.50 Hz, 2H), 3.94 (s, 3H), 3.89 (s, 3H), 3.42 (t, J = 7.0 Hz, 2H), 1.93 (m, 4H), 1.63 (m, 2H)。

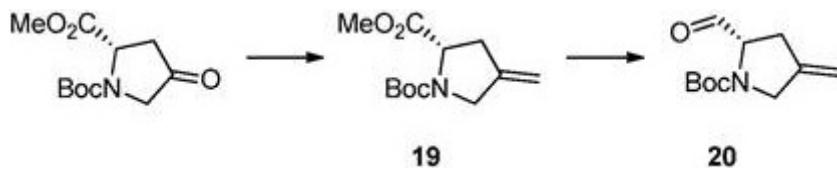
[0262] 在室温, Ar下, 使用K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>处理化合物14 (37.6 mg, 0.1 mmol) 和Hochest染料 (53.3 mg, 0.1 mmol) 在DMF (1.5 mL) 中的溶液。将反应加热至60°C并保持过夜。随后, 将反应冷却至室温, 并滤出固体。使用制备型HPLC (移动相A:50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>缓冲液, pH 7.0; B = ACN。方法:10-100 B%, 30分钟内) 纯化残余物, 以获得化合物15 (13.1 mg, 产率18%)。LCMS: [M+H]<sup>+</sup> m/z =720.71。

[0263] 在室温,Ar下,将化合物15 (13.1 mg, 0.0182 mmol) 溶解在THF/MeOH/H<sub>2</sub>O (3/1/1, 0.2 mL) 中,并使用LiOH水溶液(1 M, 36  $\mu$ L) 处理4小时。真空除去大部分溶剂,并将水相用浓HCl酸化至pH 2-3,通过过滤收集作为固体的沉淀物(化合物16,12.8 mg,没有纯化)。将滤液用水洗涤(3 x),并风干用于下一步骤。LCMS: [M+H]<sup>+</sup> m/z = 706。

[0264] 在Parr振荡器中,对MeOH (10 mL) 中的化合物16 (15.7 mg, 0.022 mmol) 进行氢化(10%湿Pd/C, 5% wt, 7.85 mg, H<sub>2</sub> 41 PSI) 2小时。通过过滤通过硅藻土垫,分离产物。真空除去溶剂以得到粗化合物17,LCMS: [M+H]<sup>+</sup> m/z = 676.79。



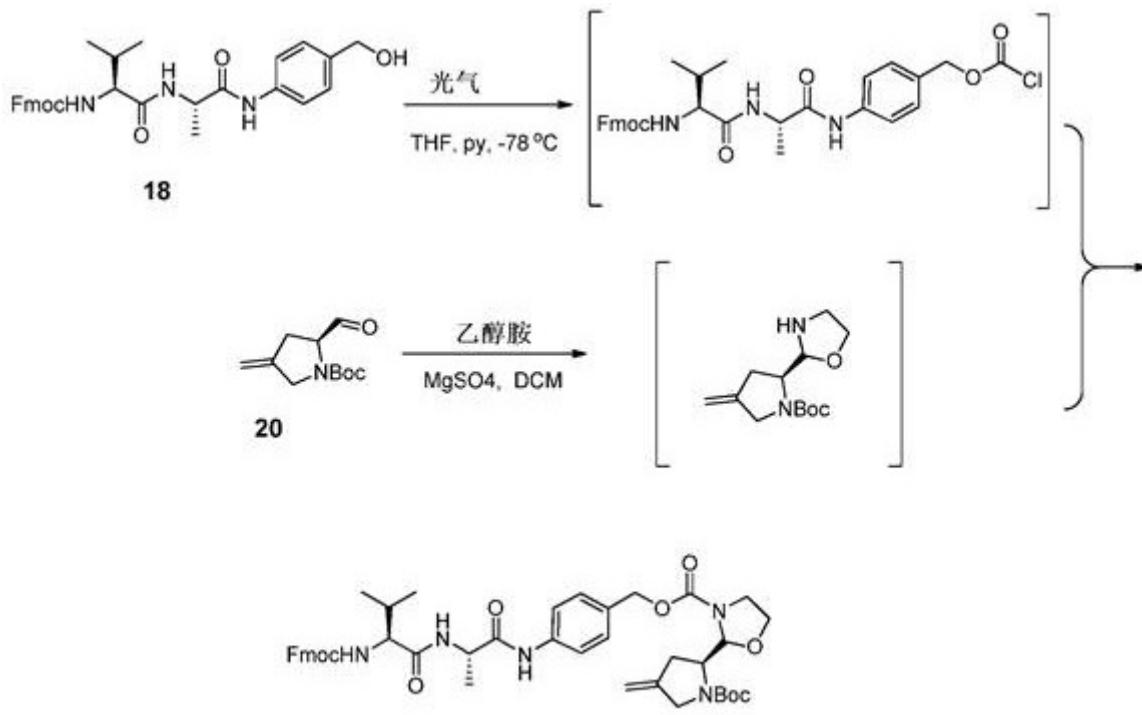
[0265] 向Val-Ala-OH (1 g, 5.31 mM) 在水(40 mL) 中的溶液添加Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (1.42 g, 13.28 mM),并冷却至0℃,然后添加二噁烷(40 mL)。在0℃,经10分钟,滴加Fmoc-Cl (1.44 g, 5.58 mM) 在二噁烷(40 mL) 中的溶液。将反应混合物在0℃搅拌2小时,随后允许在室温下搅拌16小时。在真空下除去二噁烷,用水(450 mL)稀释反应混合物,使用1N HCl调节pH至2,并使用EtOAc (3 x 250 mL) 提取。用盐水洗涤合并的有机层,在MgSO<sub>4</sub>上干燥,过滤,减压浓缩,并干燥以产生Fmoc-Val-Ala-OH。将此产物悬浮在干燥DCM (25 mL) 中,添加PABA (0.785 g, 6.38 mM) 和EEDQ (1.971 g, 7.97mM)。在氩气下,使用甲醇处理所得的混合物,直到获得澄清溶液。将反应搅拌过夜并过滤。将滤液用乙醚洗涤(4x),并在高真空下干燥以获得化合物18 (1.85 g,68%)。<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  7.79 (d,  $J_1$ = 8.0 Hz, 2H), 7.65 (t,  $J_1$ = 7.0 Hz,  $J_2$ = 7.5 Hz, 2H), 7.54 (d,  $J_1$ = 8.0 Hz, 2H), 7.38 (t,  $J_1$ = 7.5 Hz,  $J_2$ = 7.5 Hz, 2H), 7.33-7.24 (m, 4H), 4.54 (s, 2H), 4.48 (q,  $J_1$ = 14.0 Hz,  $J_2$ = 7.0 Hz, 1H), 4.42-4.32 (m, 2H), 4.22 (t,  $J_1$ = 7.0 Hz,  $J_2$ = 6.5 Hz, 1H), 3.94 (d,  $J_1$ = 7.0 Hz, 1H), 2.07 (m, 1H), 1.43 (d,  $J_1$ = 7.5 Hz, 3H), 0.97 (d,  $J_1$ = 7.0 Hz, 3H), 0.95 (d,  $J_1$ = 7.0 Hz, 3H); LCMS (ESI): (M + H)<sup>+</sup> = 对C<sub>30</sub>H<sub>33</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>计算为516.24;发现为516.24。



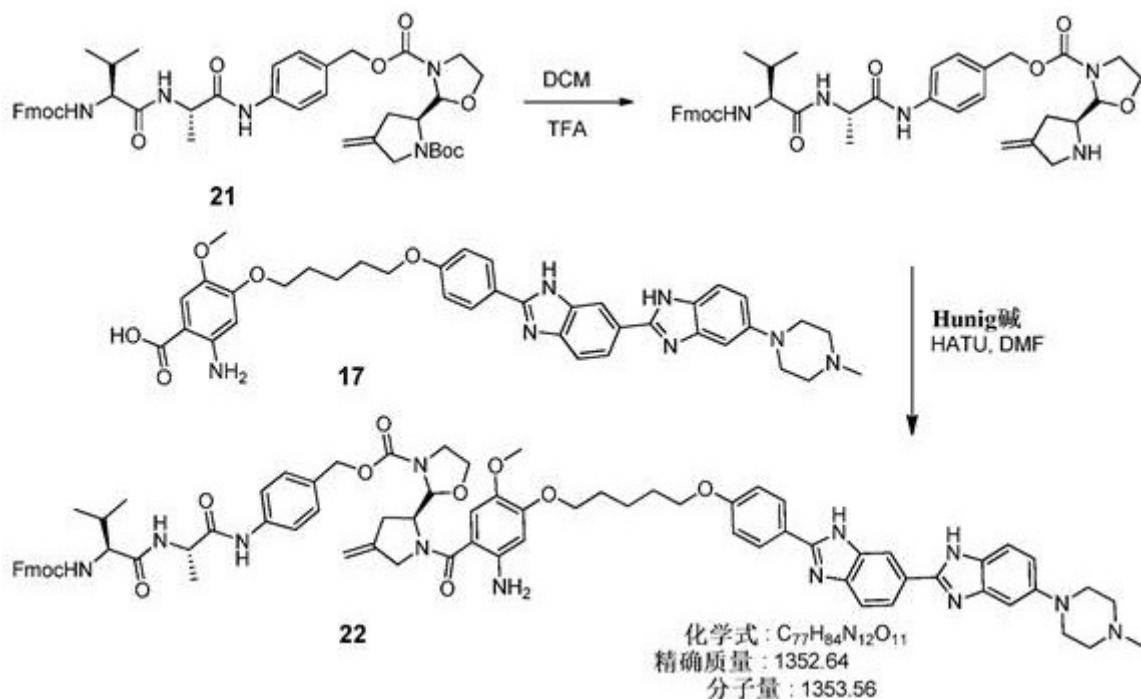
[0266] 化合物19:通过维蒂希反应,将(S)-4-氧化吡咯烷-1,2-二甲酸1-叔丁酯2-甲酯转化为化合物19。在0℃,使用KOTBu (1 M, THF中, 2.57  $\mu$ L, 2.57 mmol),通过滴加处理THF (30 mL) 中的Ph<sub>3</sub>PCH<sub>3</sub>Br (917.8 mg, 2.57 mmol)。将反应在室温下保持2小时。在0-10℃,向搅拌的溶液添加THF (20 mL) 中的丙酮(250 mg, 1.028 mmol)。随后,将反应在室温下搅拌过夜。使用H<sub>2</sub>O/EtOAc (1:1, 40 mL) 猥灭反应,并在减压下除去大部分THF。使用EtOAc (20

mL, 3 x) 提取水相, 并依次使用H<sub>2</sub>O和盐水洗涤有机相, 并在无水Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>上干燥并浓缩。使用0–50% EtOAc/石油醚中的CombiFlash纯化残余物以得到化合物19 (77.2 mg, 31%)。LCMS: [M–Boc+H]<sup>+</sup> m/z =142。

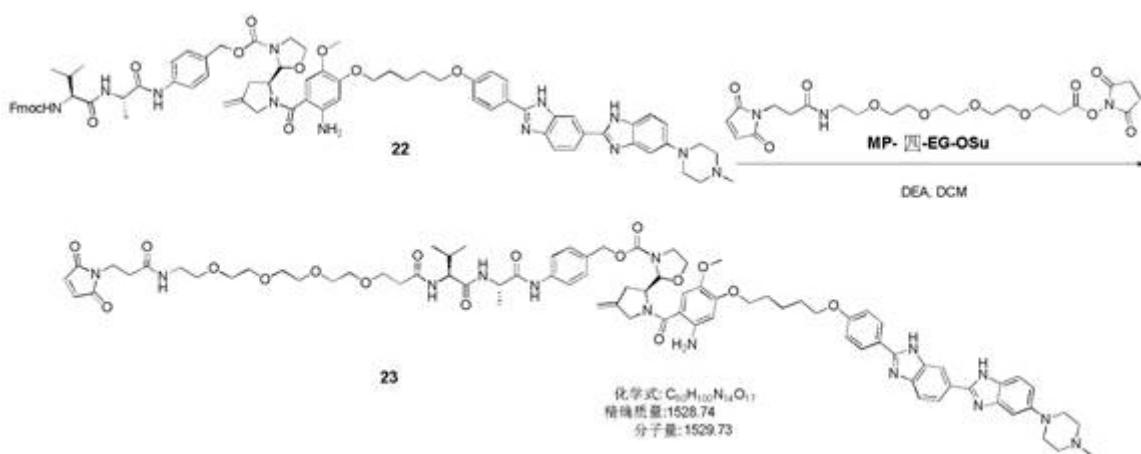
[0267] 化合物20:在-78°C, 氩气下, 使用DIBAL (1 M, 甲苯中, 2当量, 2.92 mmol) 逐滴处理DCM/甲苯 (1:3, 9.8 mL) 中的 (S)-4-亚甲基吡咯烷-1,2-二甲酸1-叔丁酯2-甲酯 (353.2 mg, 1.46 mmol)。将反应在-78°C搅拌约4小时。随后, 在-78°C添加60 μL MeOH, 随后添加5% HCl (0.5 mL) 和EtOAc (18 mL), 猝灭反应。除去冰浴, 并将反应搅拌30分钟。分离EtOAc层, 并用盐水洗涤, 在无水Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>上干燥, 并浓缩以得到化合物20。



[0268] 将化合物20 (550 mg, 2.6 mmol) 溶解于DCM (10 mL) 中, 并添加MgSO<sub>4</sub> (3 g), 随后滴加DCM (10 mL) 中的乙醇胺 (0.16 mL, 2.6 mmol)。将反应在室温下搅拌1小时。在真空下的过滤和浓缩得到噁唑啉中间体。在另一烧瓶中, 将化合物18 (516 mg, 1.0 mmol) 溶解于THF (40 mL) 中, 并添加吡啶 (0.8 mL, 10 mmol)。将溶液冷却至-78°C, 并添加双光气 (0.16 mL, 1.5 mmol)。将反应在-78°C搅拌1小时, 滴加DCM (20 mL) 和噁唑啉中间体的溶液。允许反应混合物经数小时温热至-20°C。LC-MS和TLC显示产物形成。使用硅胶浓缩反应混合物, 并通过快速色谱 (120 gold Redisep柱, 0–100% EtOAc/石油醚) 纯化以得到化合物21 (0.59 g, 74%)。LCMS (ESI): (M + H)<sup>+</sup> = 对C<sub>44</sub>H<sub>53</sub>N<sub>5</sub>O<sub>9</sub>计算为796.38; 发现为796.74。

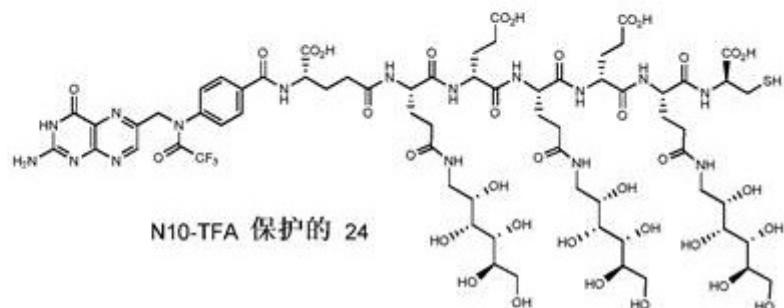


[0269] 在室温下,将化合物21 (101.0 mg, 0.127 mmol) 在TFA/DCM (各0.5 mL) 中搅拌30分钟。LC-MS显示完全除去Boc基团。在高真空下浓缩反应混合物以除去TFA和DCM,重新溶解在DMF (1.0 mL) 中,并通过添加Hunig碱 (0.3 mL) 调节pH至8-9。添加化合物17 (86.0 mg, 0.127 mmol),随后添加PyBoP (84 mg, 0.16 mmol),并将反应在室温下搅拌2小时。在90分钟的LC-MS显示主峰具有期望的产物。将反应混合物上载至硅胶筒上,并通过快速色谱 (12g gold, 0-30% MeOH/DCM) 纯化以获得期望的产物化合物22 (140 mg, 81%)。LCMS (ESI):  $(M + H)^+$  = 对 $C_{77}H_{84}N_{12}O_{11}$ 计算为1353.64;发现为1354.18。

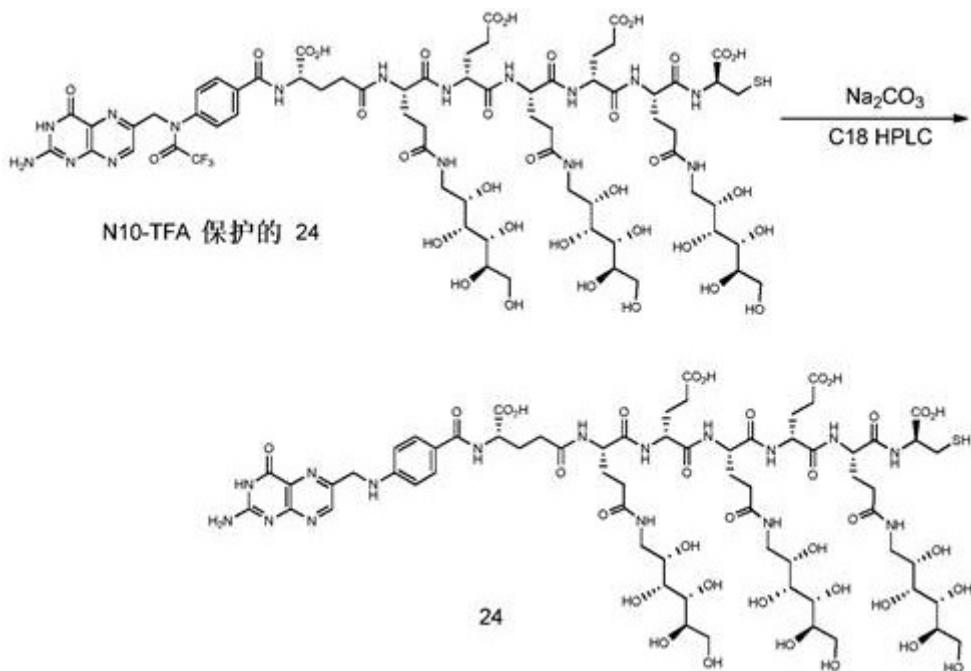


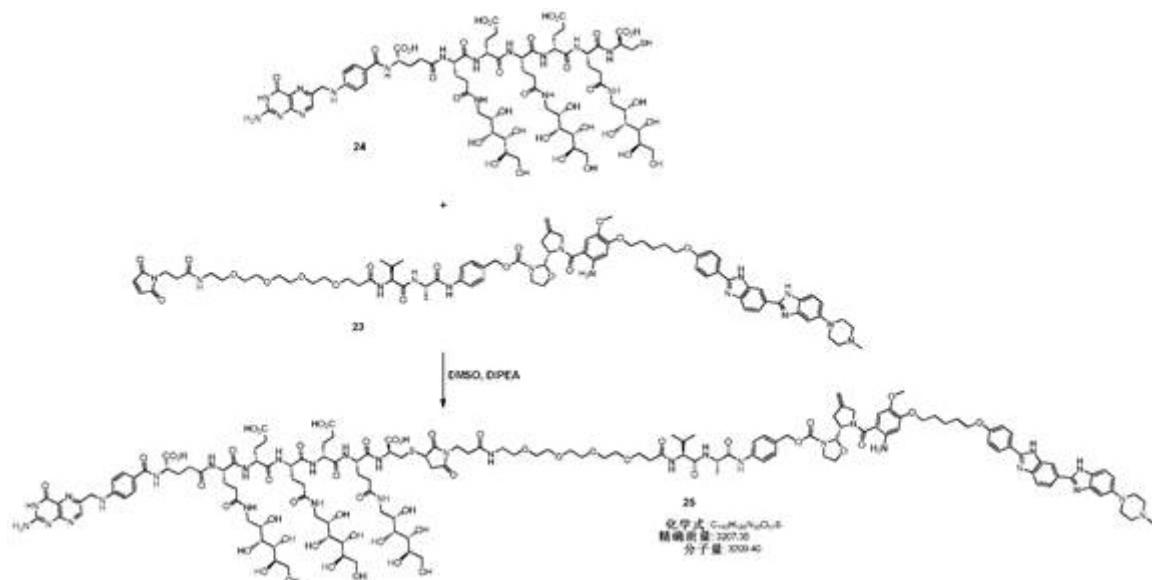
[0270] 将化合物22 (140 mg, 0.10 mmol) 溶解在DEA/DCM (12/18 mL) 中,并在室温下搅拌30分钟。LC-MS显示完全除去Fmoc基团。将反应混合物在高真空下浓缩以除去过量的二乙胺,并重新溶解在DCM (5 mL) 中。添加可商购的 $\alpha$ -马来酰亚胺丙酰基- $\omega$ -琥珀酰亚胺基-4(乙二醇) (Mal-PEG<sub>4</sub>-NHS) (62 mg, 0.12 mmol),并将反应在室温下搅拌1小时。将反应混合物浓缩,重新溶解在DMSO中,直接上载至HPLC柱并通过制备型HPLC (C18柱,5-80% ACN/pH7缓冲液) 纯化,获得期望的产物化合物23 (55.8 mg, 36%)。LCMS:  $[M+2H]^{2+} m/z$  = 对 $C_{80}H_{100}N_{14}O_{17}$ 计算为765.37;发现为765.74。

[0271]  $\text{N}^{10}$ -TFA保护的化合物24。根据以下方法制备 $\text{N}^{10}$ -TFA保护的化合物24。



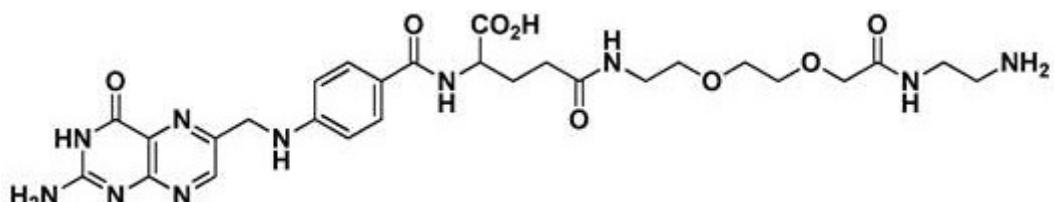
[0272] 如W02014/062679中所述,制备化合物24。根据以下方法制备化合物24。





[0273] 将化合物24 (9.85 mg, 0.006 mmol) 在DMSO (2 mL) 中搅拌直到溶解。添加DIPEA (50  $\mu$ L), 随后添加DMSO (2 mL) 中的化合物23 (6.24 mg, 0.004 mmol)。将反应在室温下搅拌50分钟。在10分钟的LC-MS分析显示完全转化。将反应混合物直接上载至制备型HPLC柱上, 并纯化 (10–100% MeCN/碳酸氢铵, pH 7缓冲液) 以获得期望的产物实施例25 (5.5 mg, 42%)。<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-D<sub>6</sub> + D<sub>2</sub>O) (选择的数据):  $\delta$  8.60 (s, 1H), 8.44–8.08 (m\*, 1H), 8.07 (d,  $J$ =8.5 Hz, 2H), 8.06–7.84 (m\*, 2H), 7.80–7.57 (m\*, 2H), 7.57 (d,  $J$ =8 Hz, 2H), 7.51 (d,  $J$ =6.5 Hz, 2H), 7.44 (m\*, 1H), 7.22 (m\*, 2H), 7.08 (d,  $J$ =8 Hz, 2H), 6.93 (d,  $J$ =8.5 Hz, 1H), 6.60 (d,  $J$ =8.5 Hz, 2H), 6.33 (s, 1H), 4.95 (m\*, 4H), 4.45 (m\*, 3H); LCMS: [M+4H]<sup>4+</sup> m/z = 对C<sub>145</sub>H<sub>198</sub>N<sub>30</sub>O<sub>51</sub>S计算为803.34; 发现为803.80。

[0274] 比较例1:



(在本文中也称作竞争剂或竞争)。

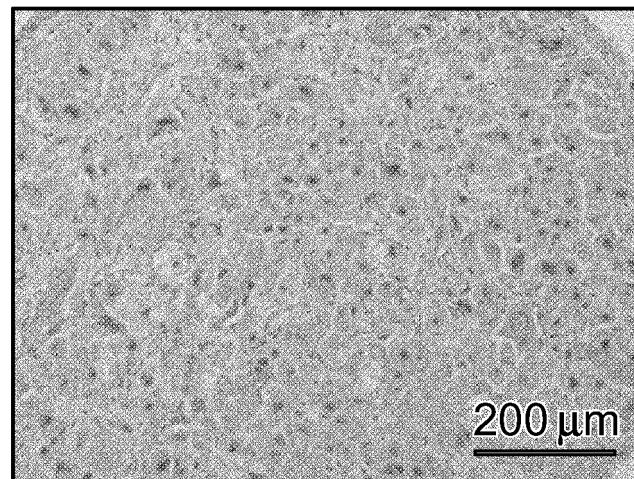


图 1A

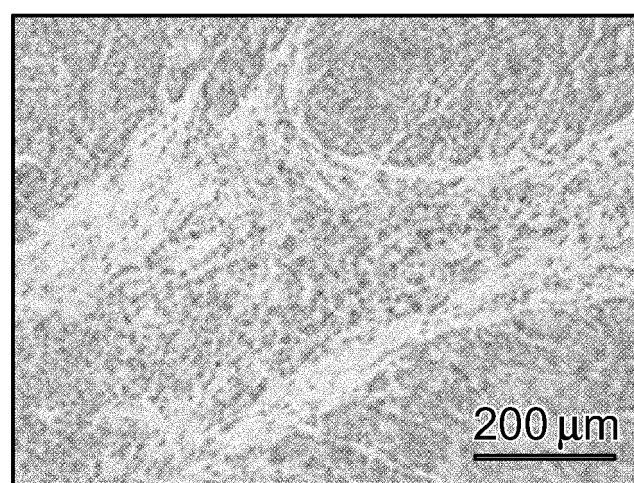


图 1B

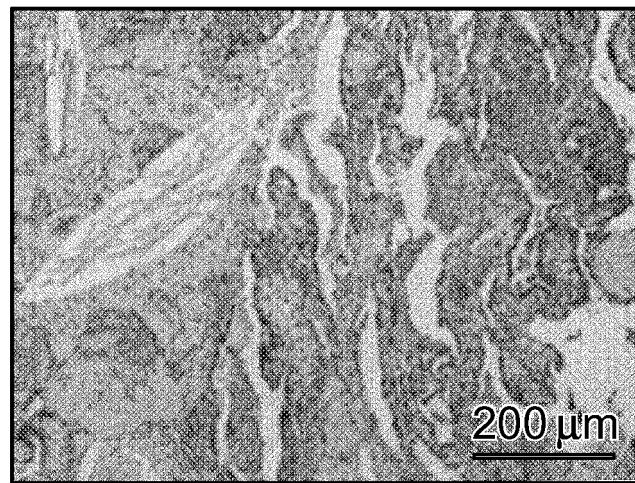


图 1C

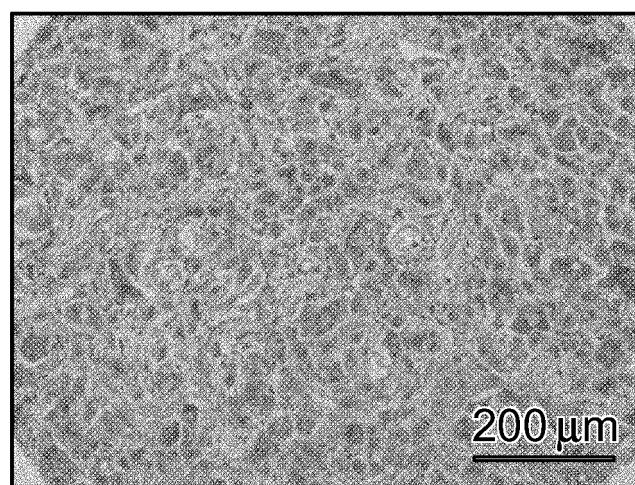


图 2A

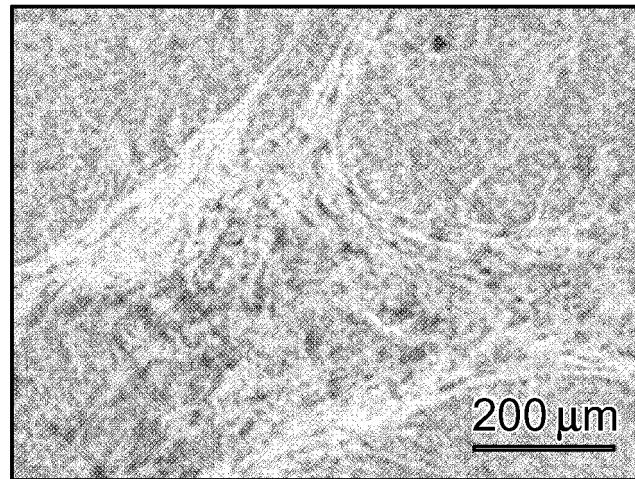


图 2B

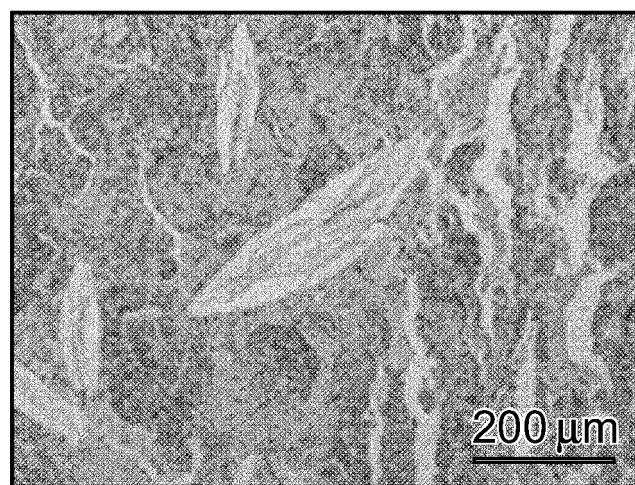


图 2C

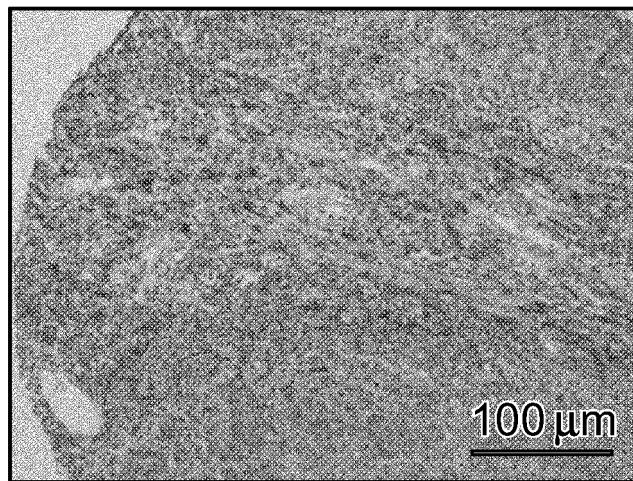


图 3A

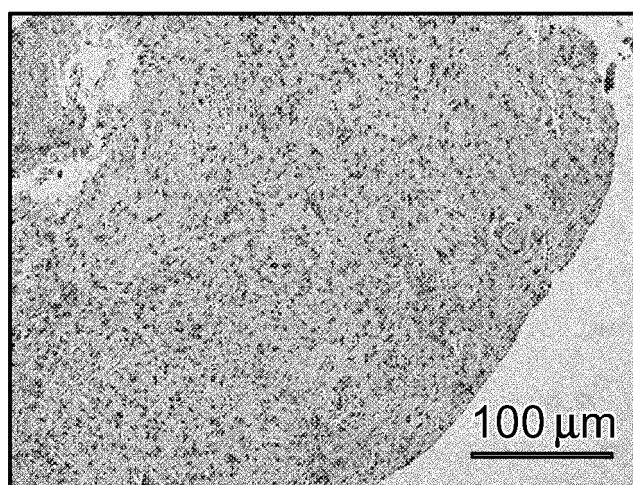


图 3B

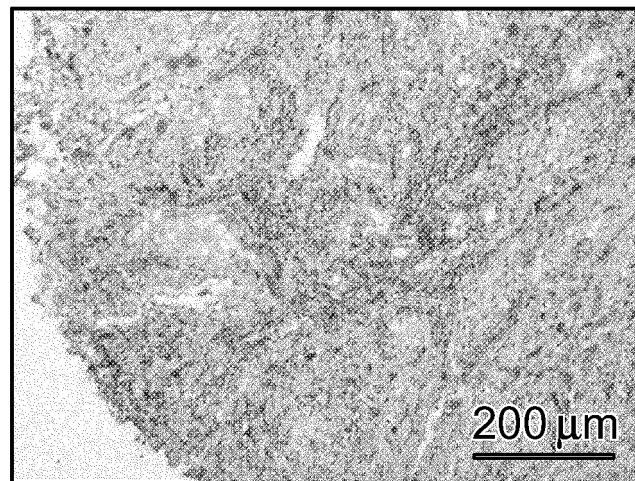


图 3C

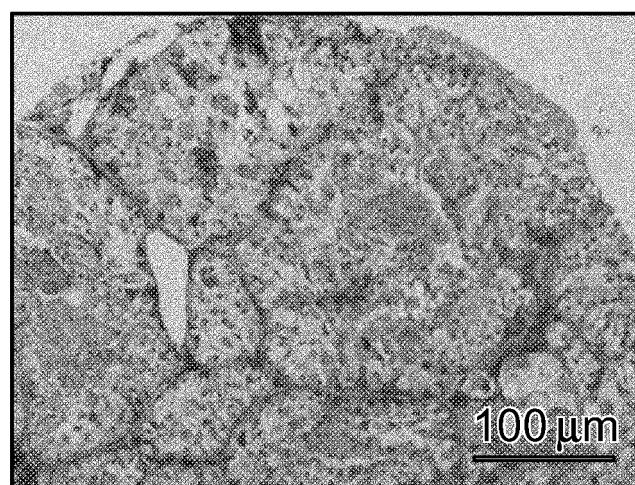


图 4A

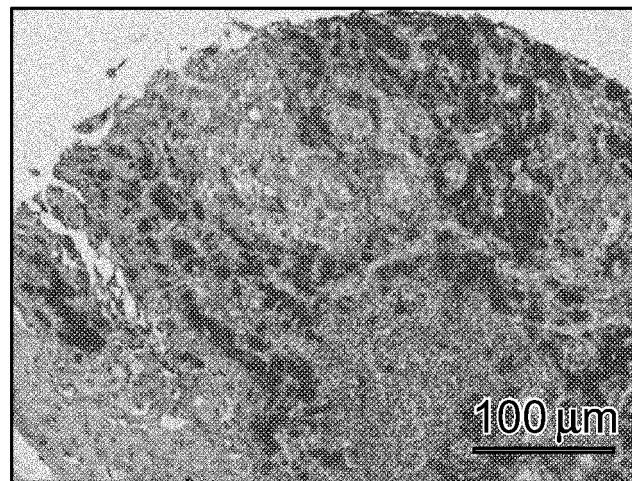


图 4B

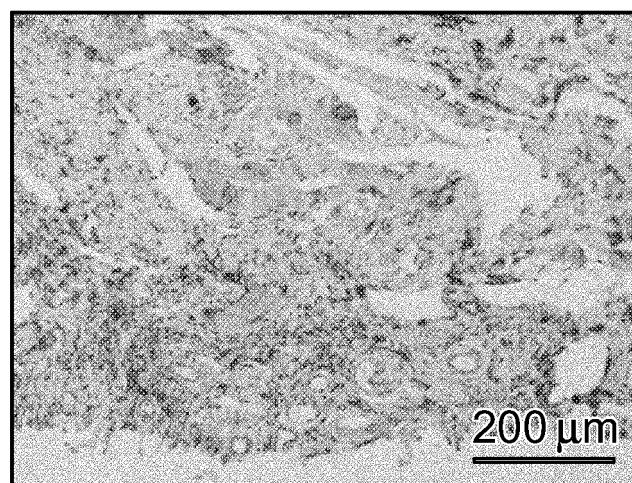


图 4C

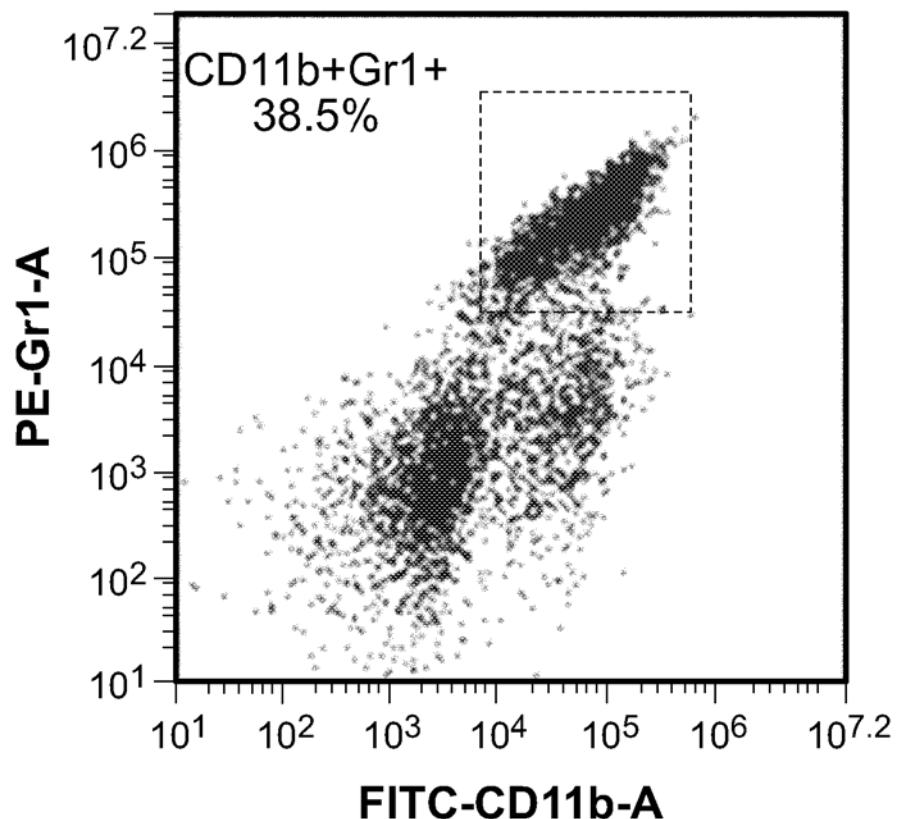


图 5A

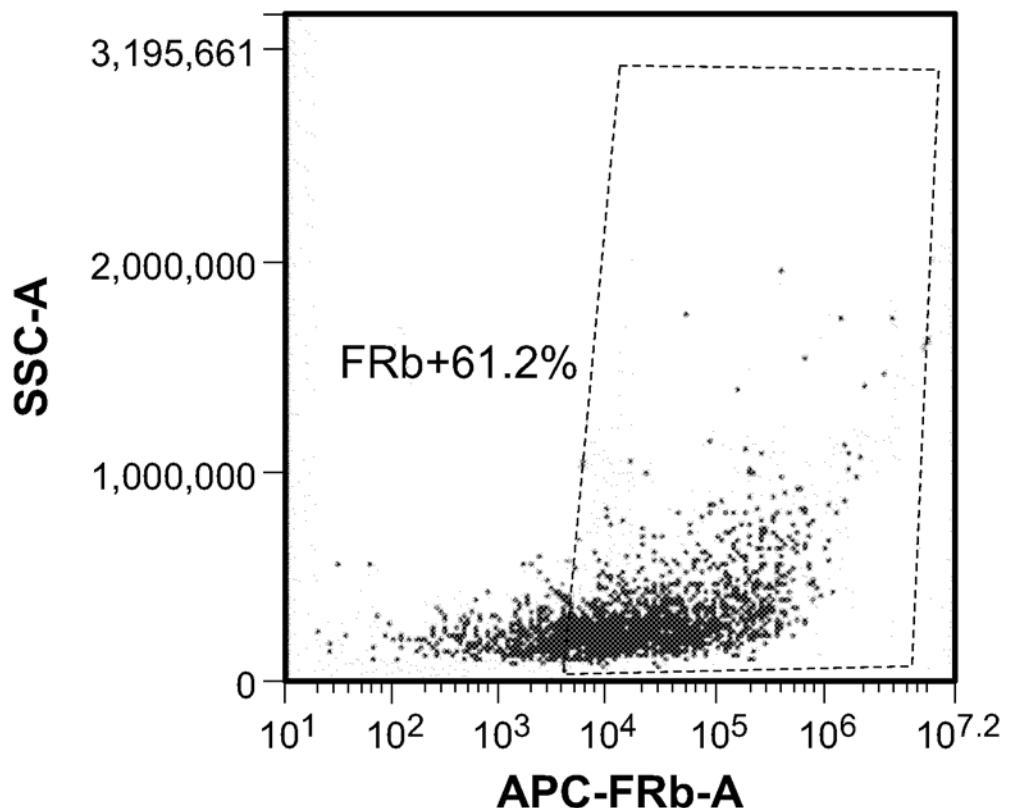


图 5B

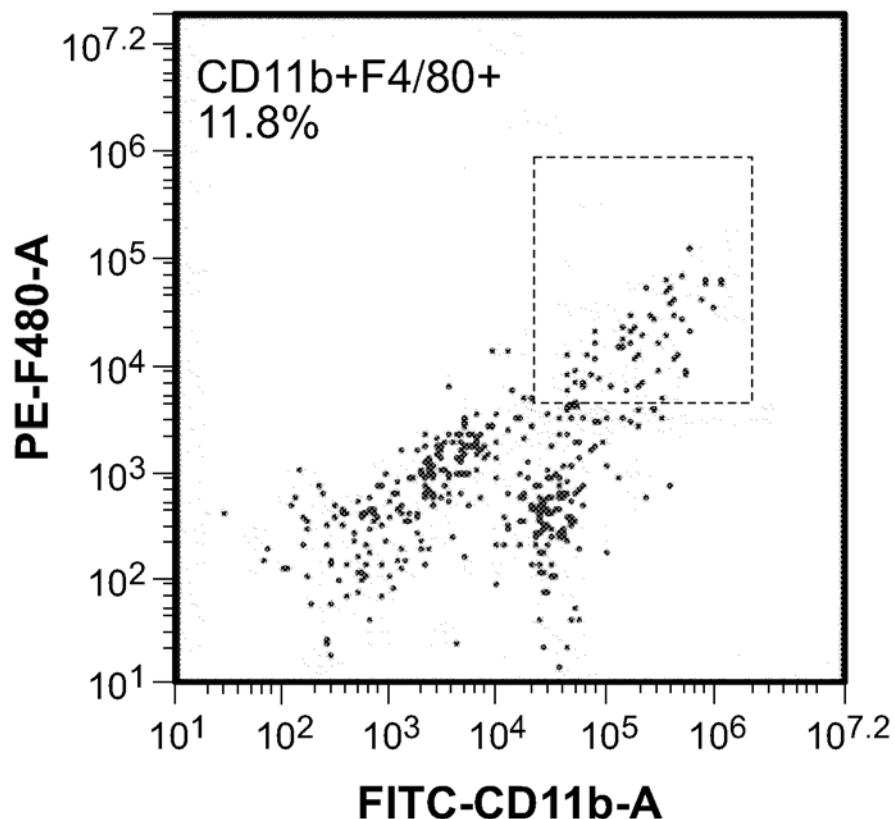


图 6A

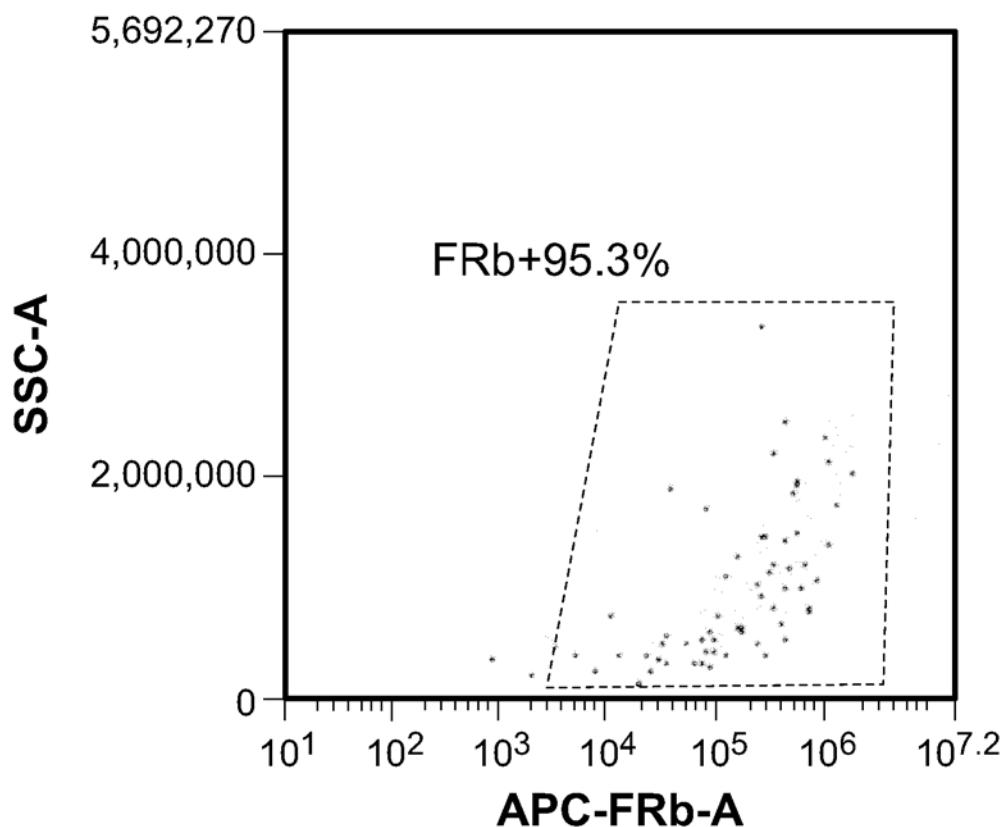


图 6B

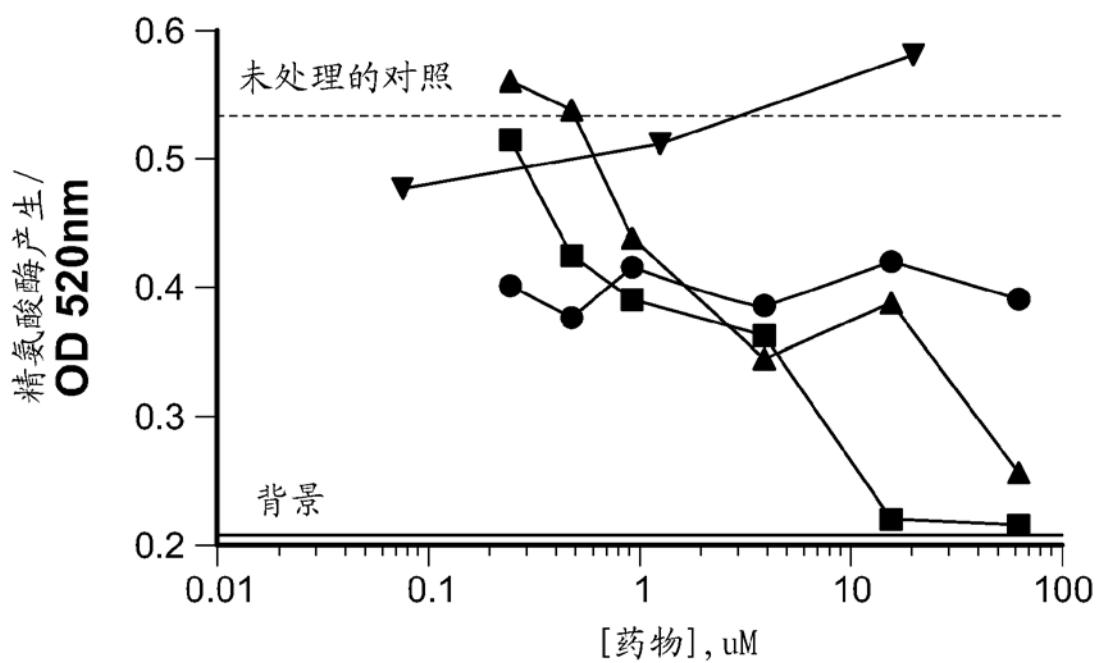
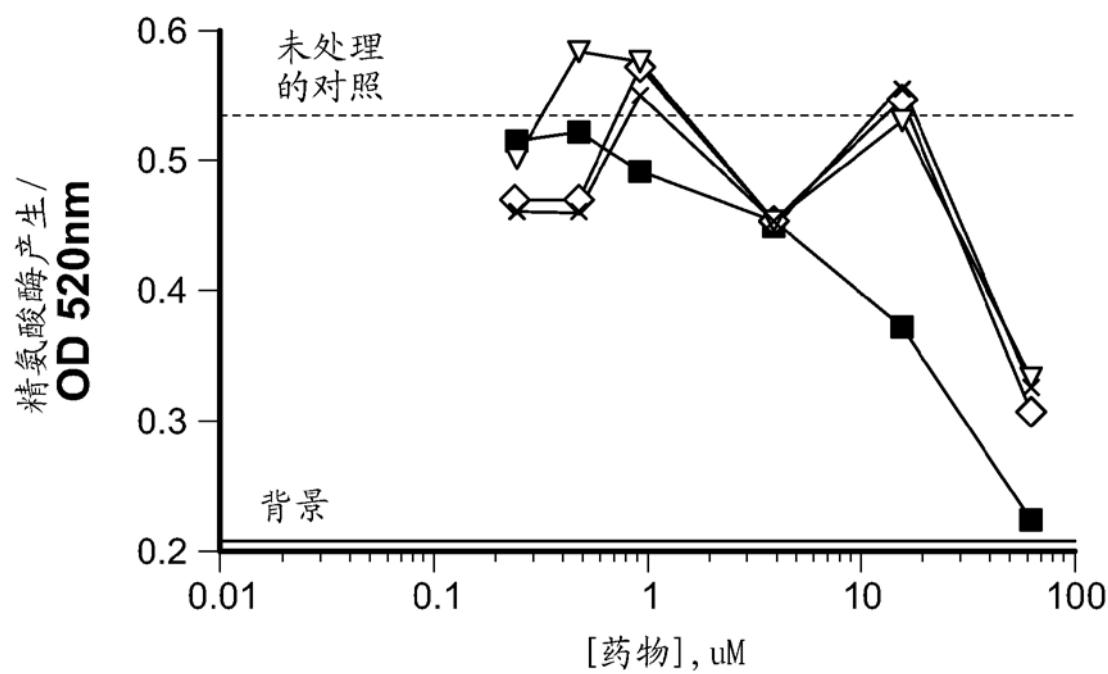
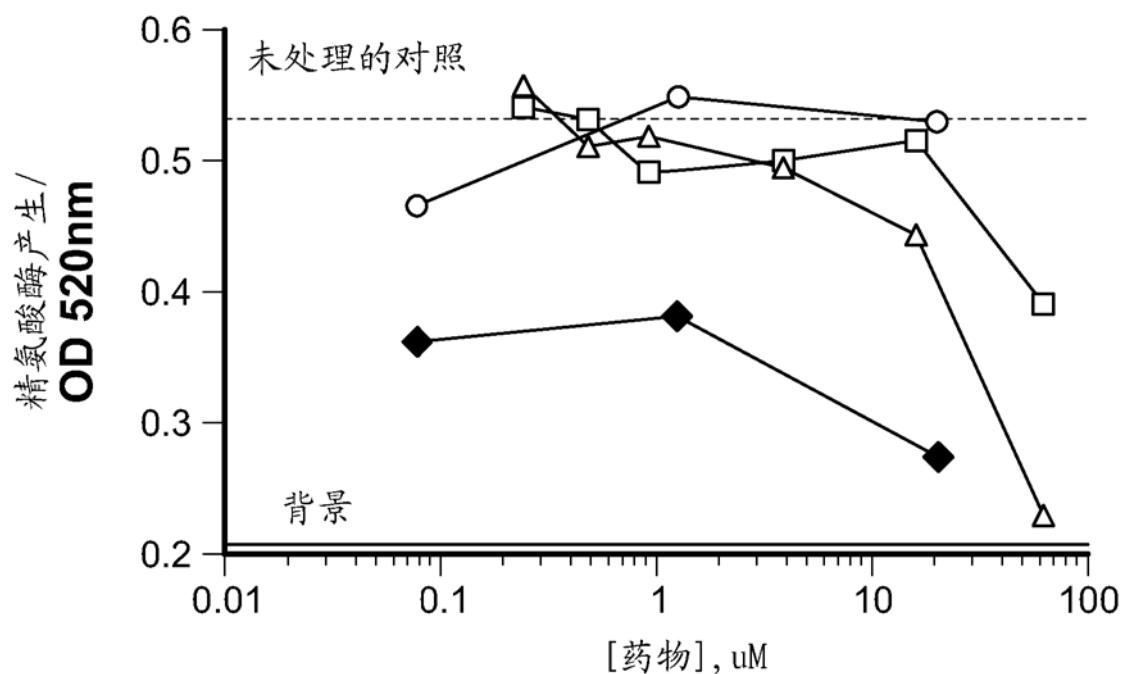


图 7A



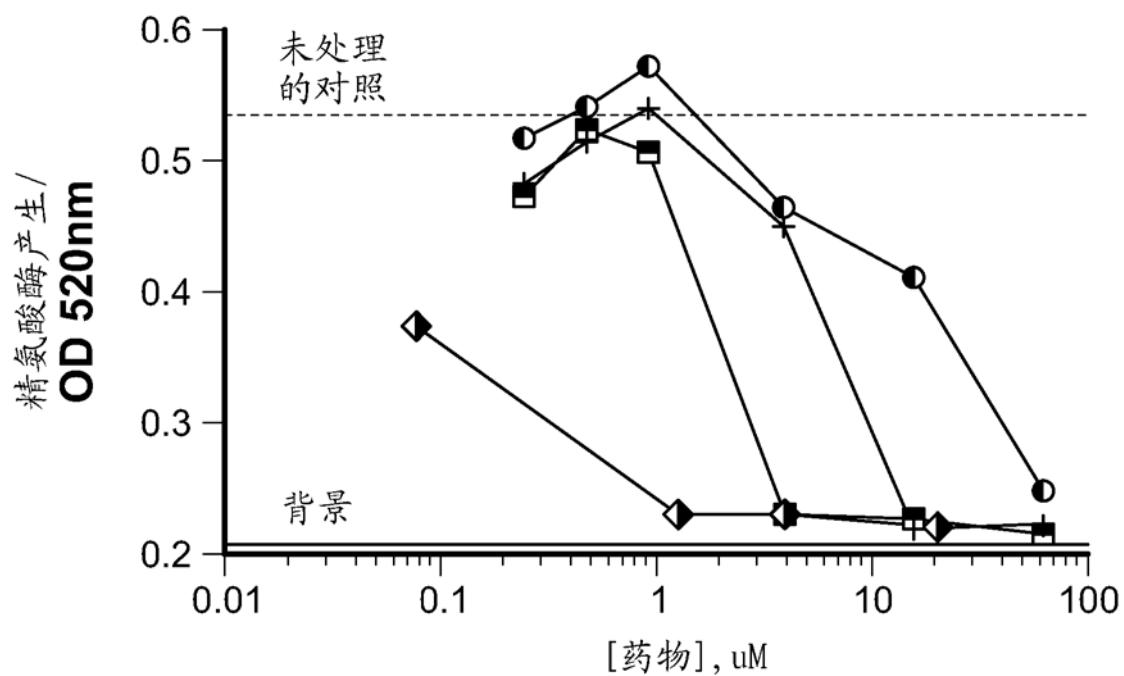


图 7D

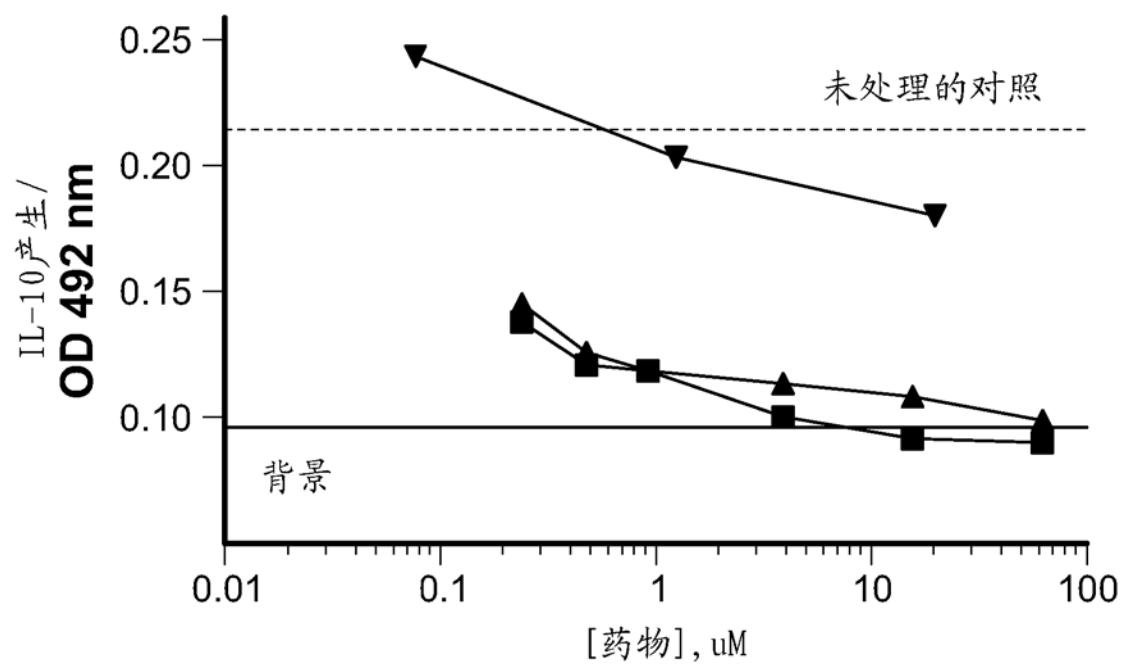
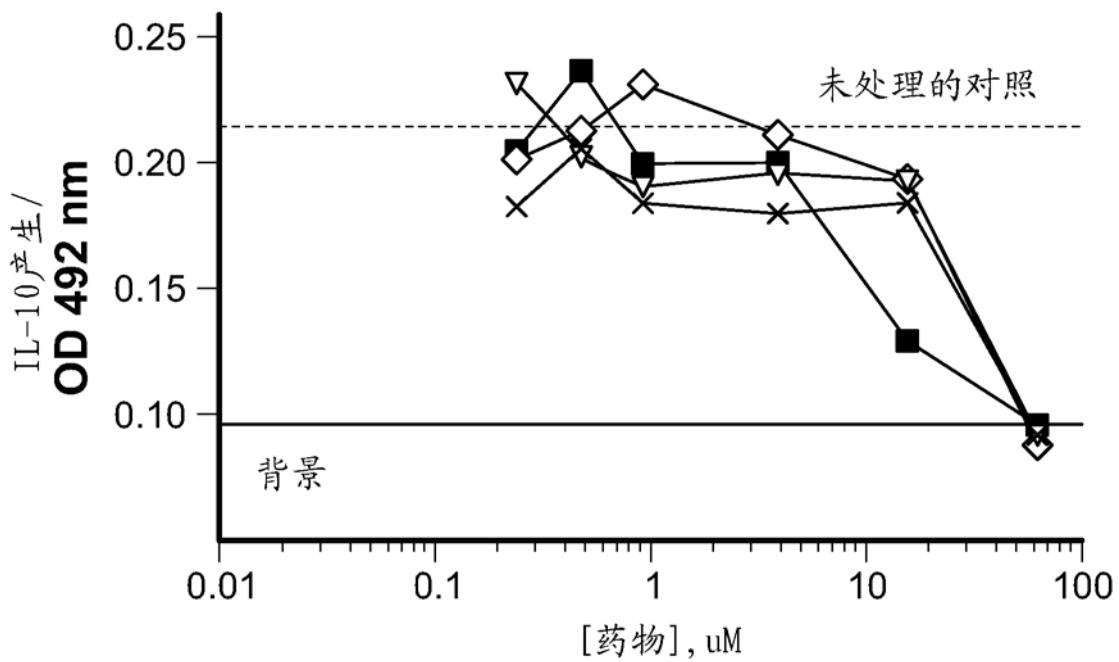
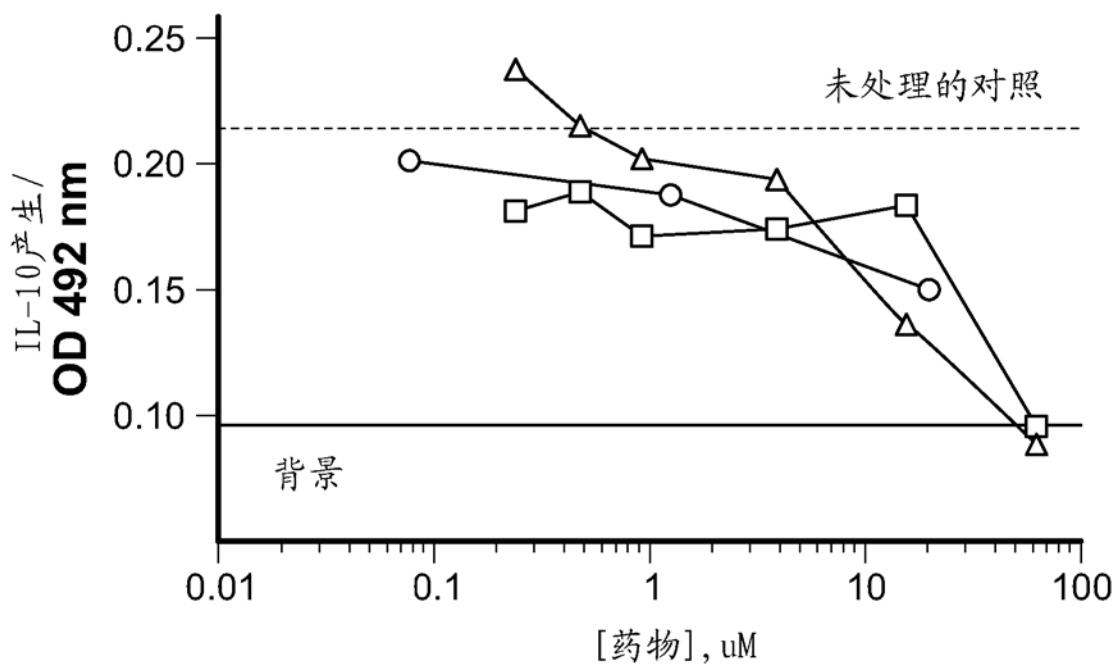


图 8A



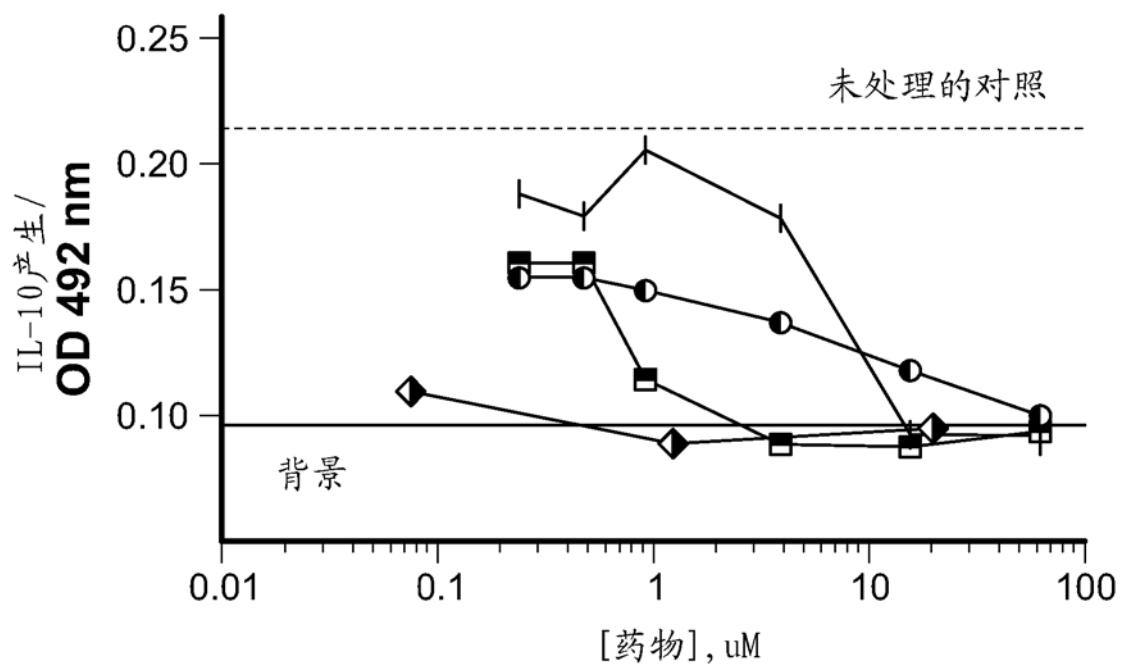


图 8D

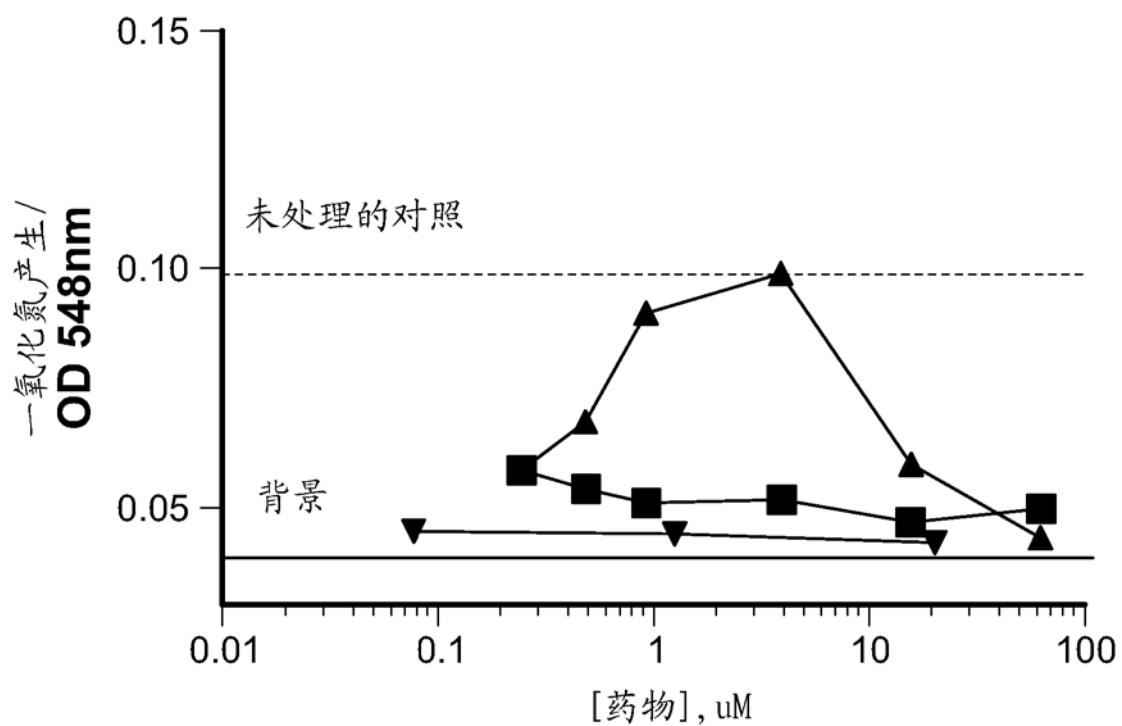


图 9A

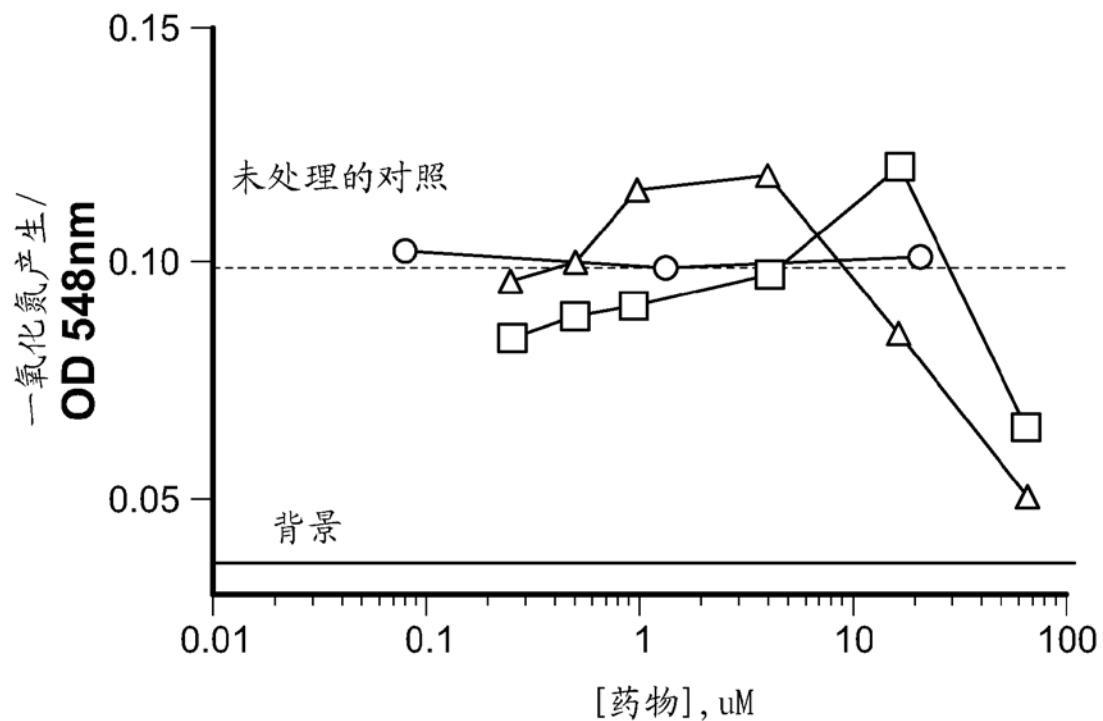


图 9B

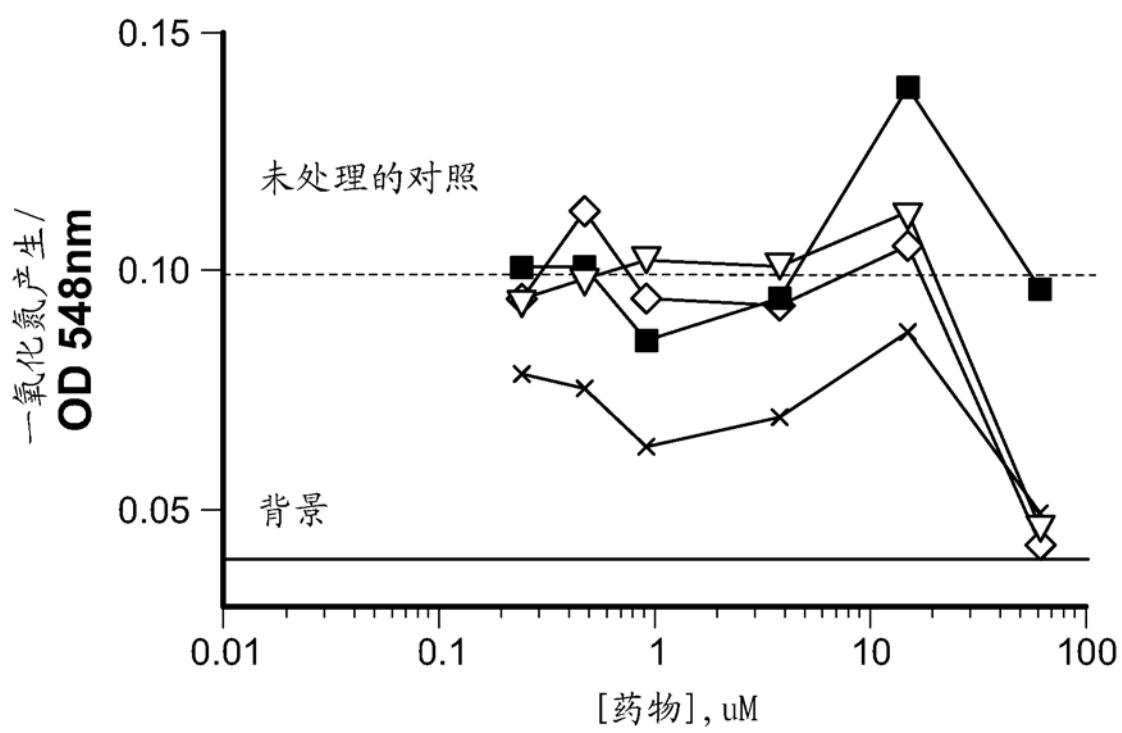


图 9C

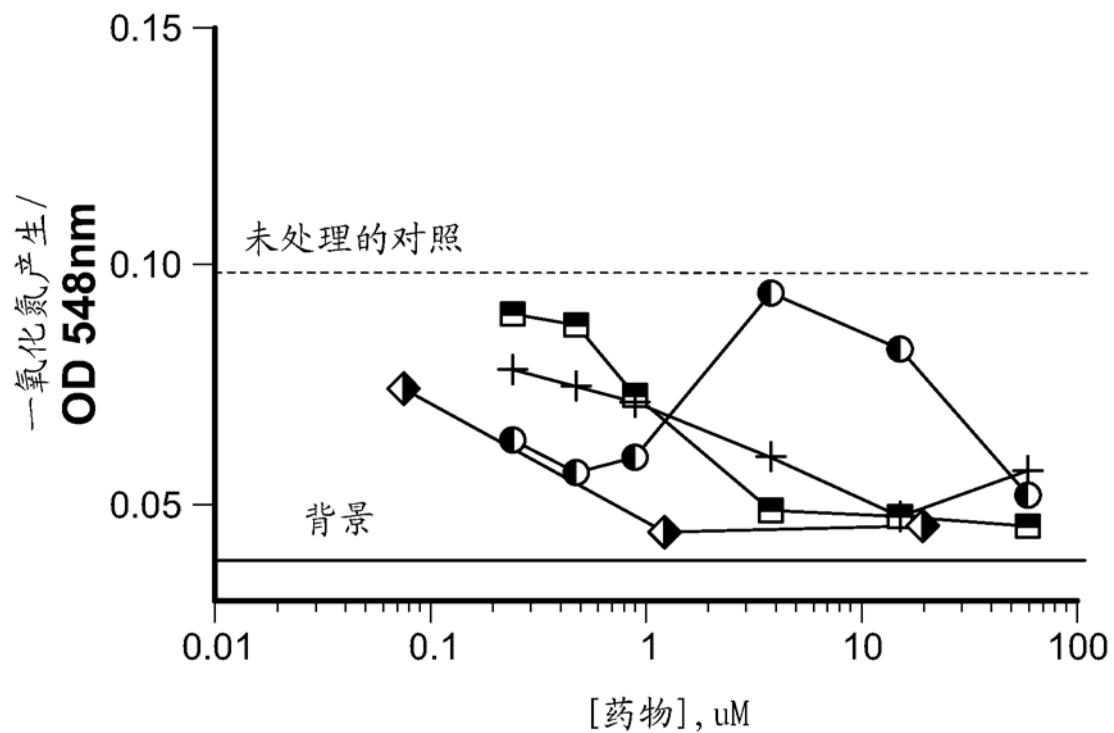


图 9D

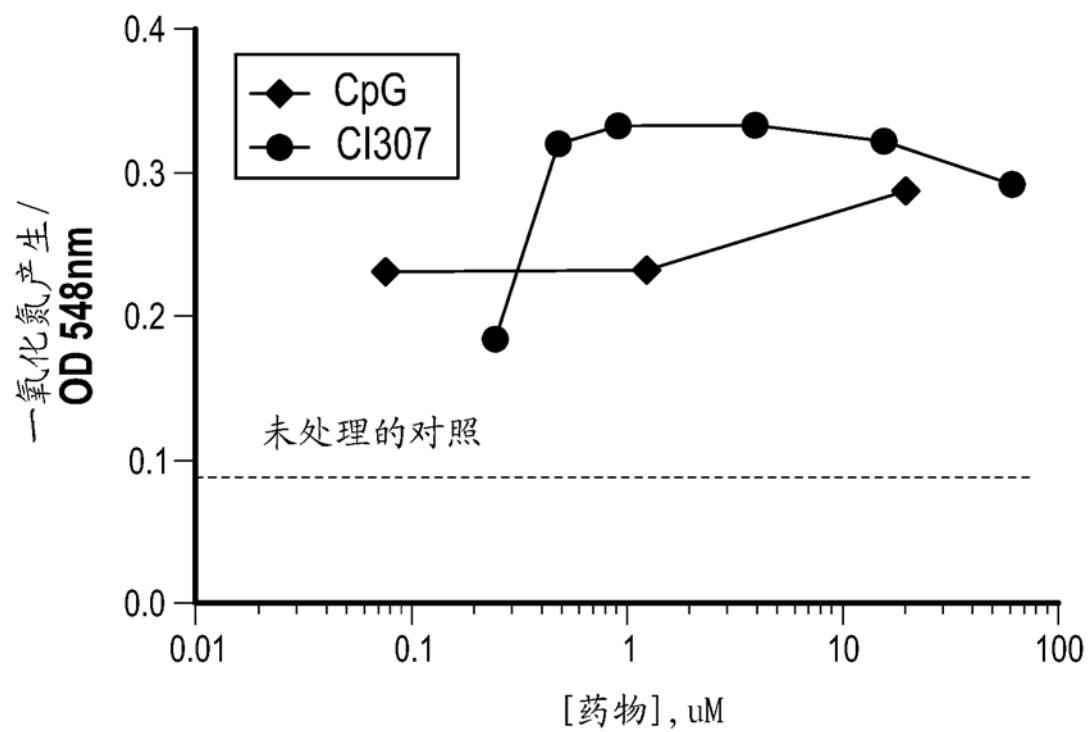


图 10A

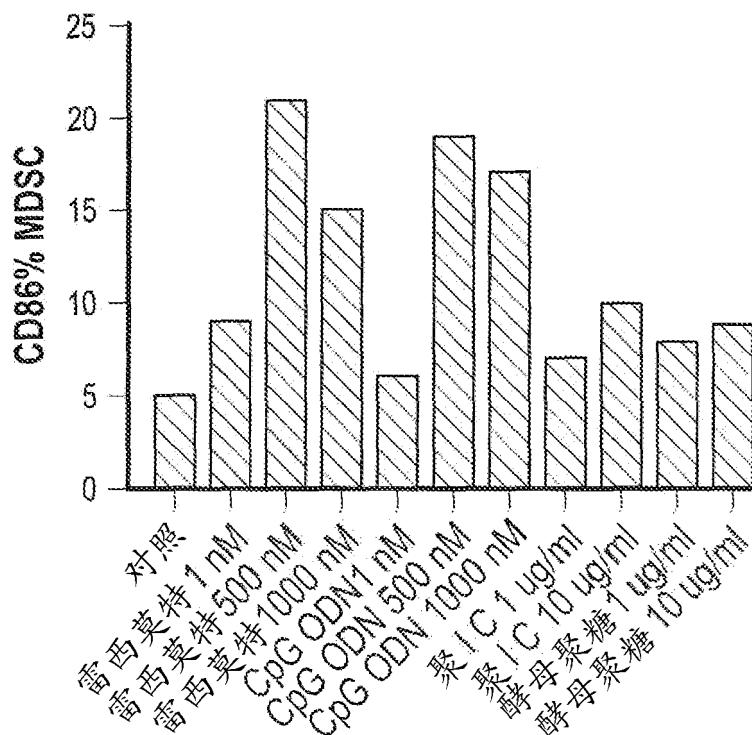


图 10B

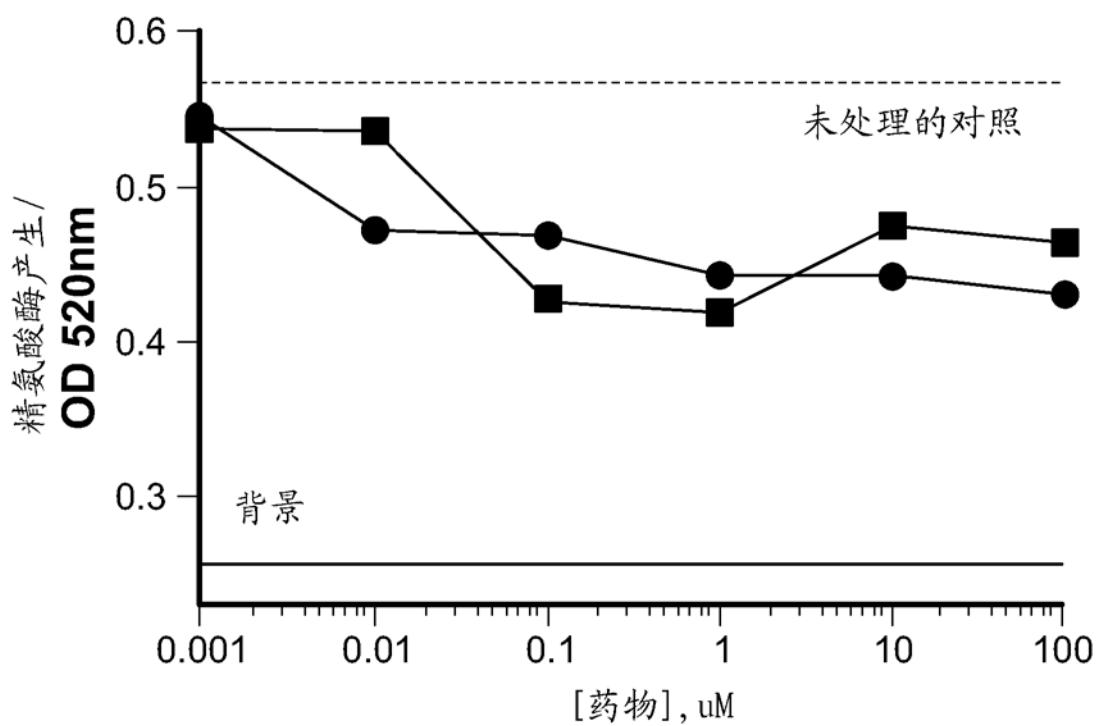


图 11A

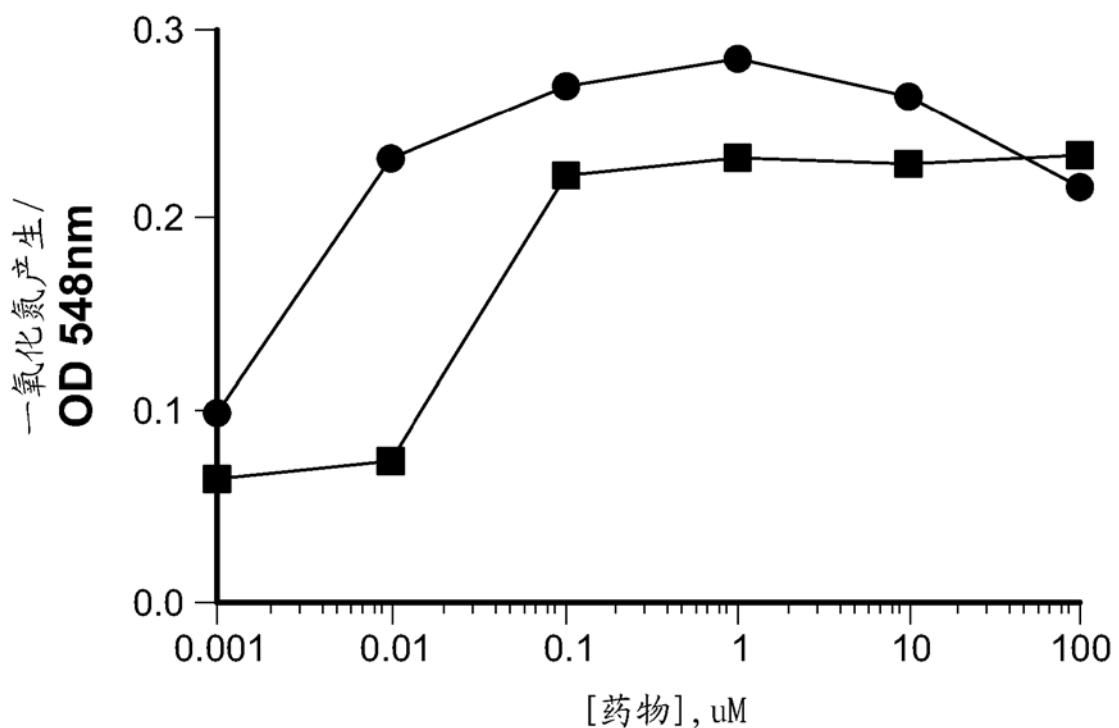


图 11B

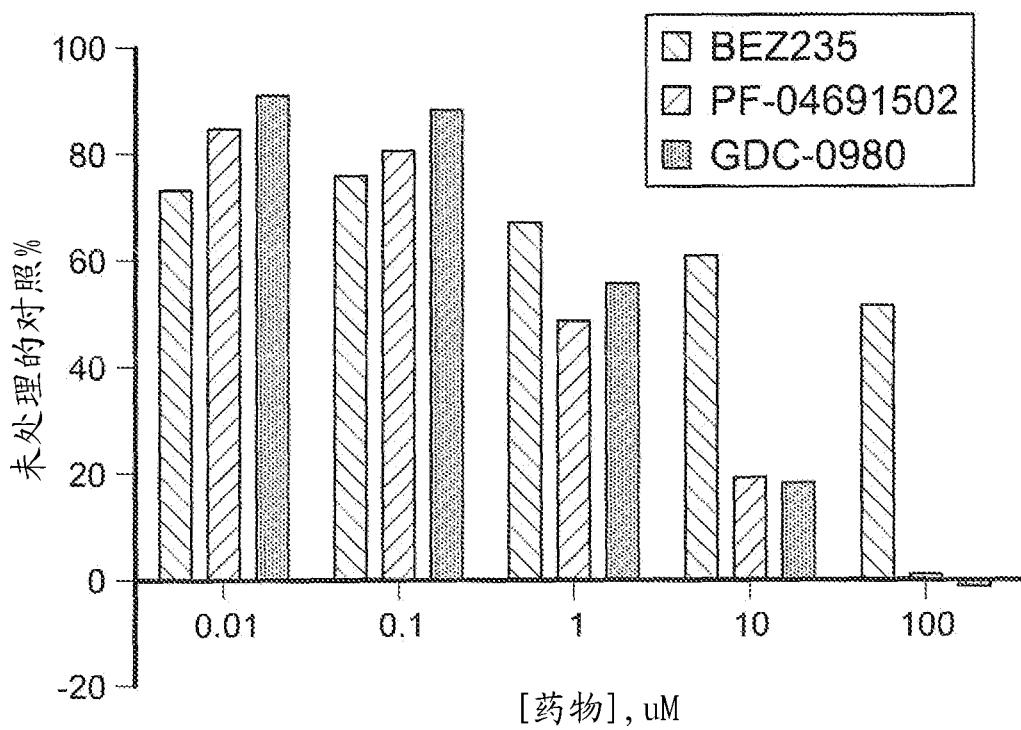


图 12

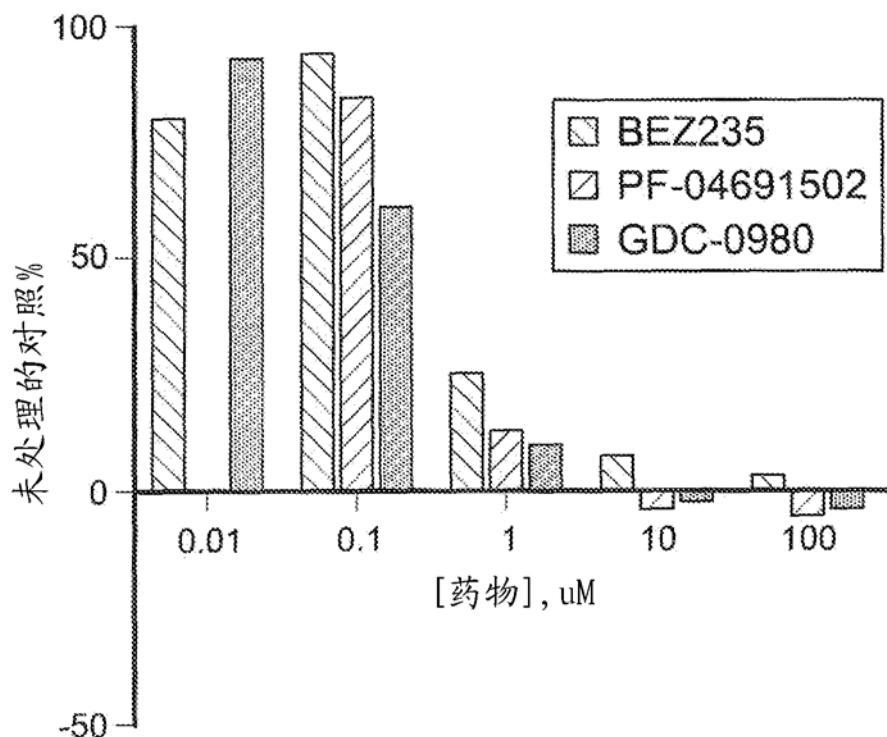


图 13

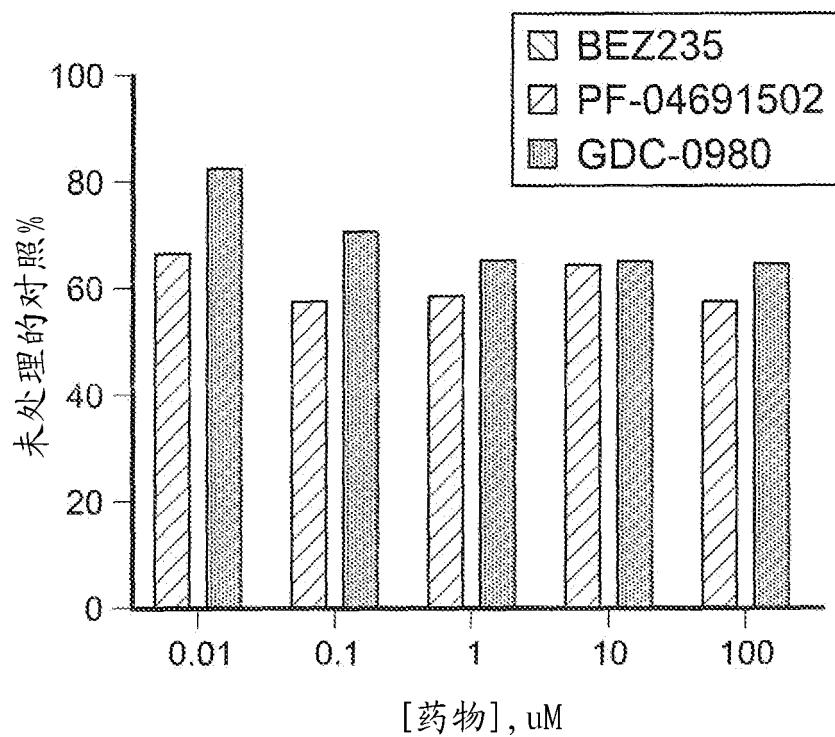


图 14

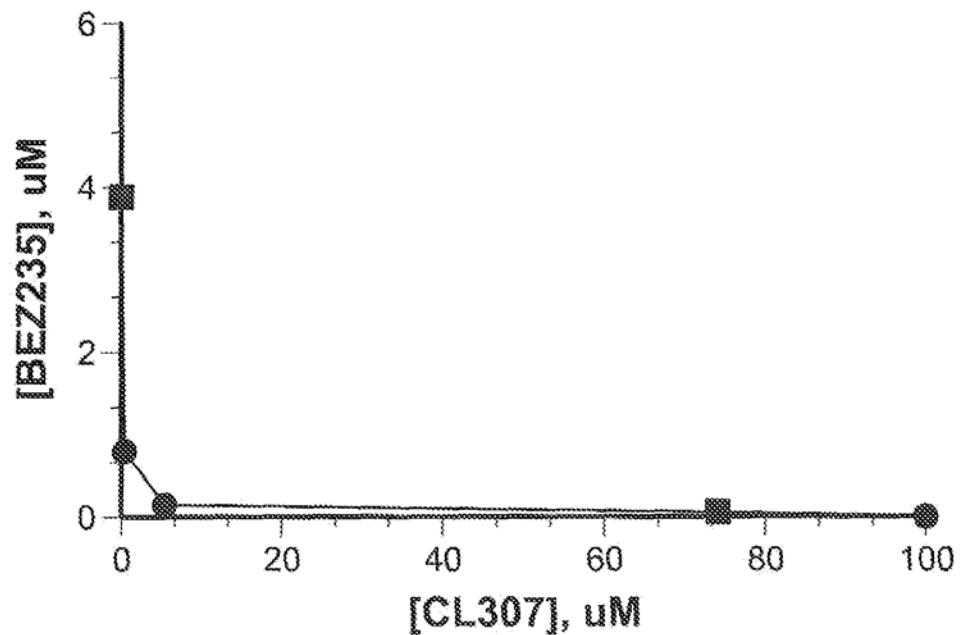


图 15

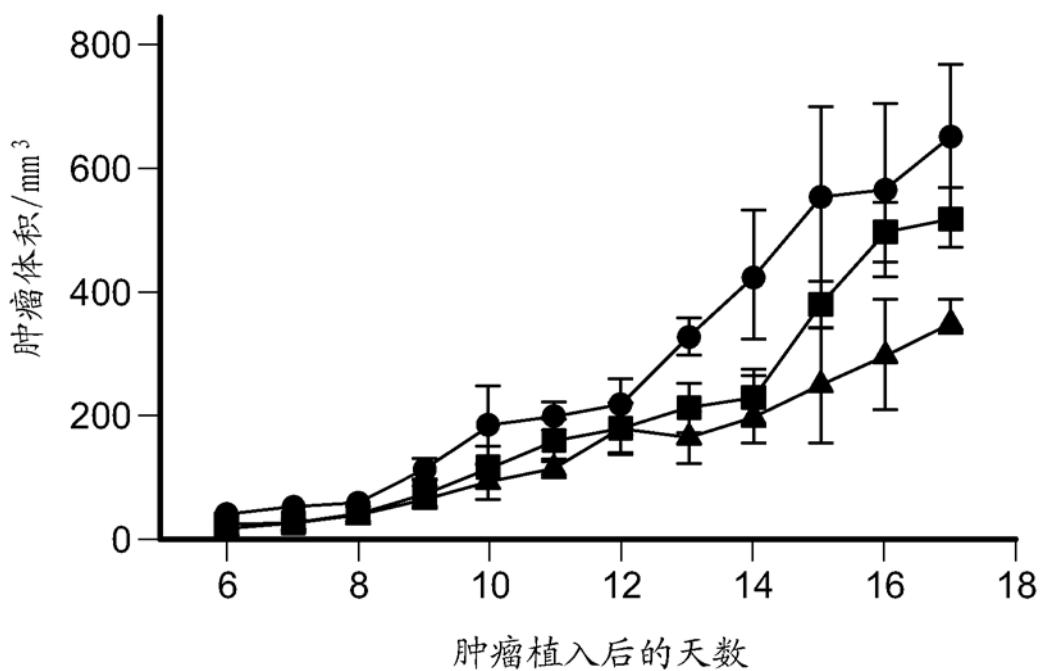


图 16A

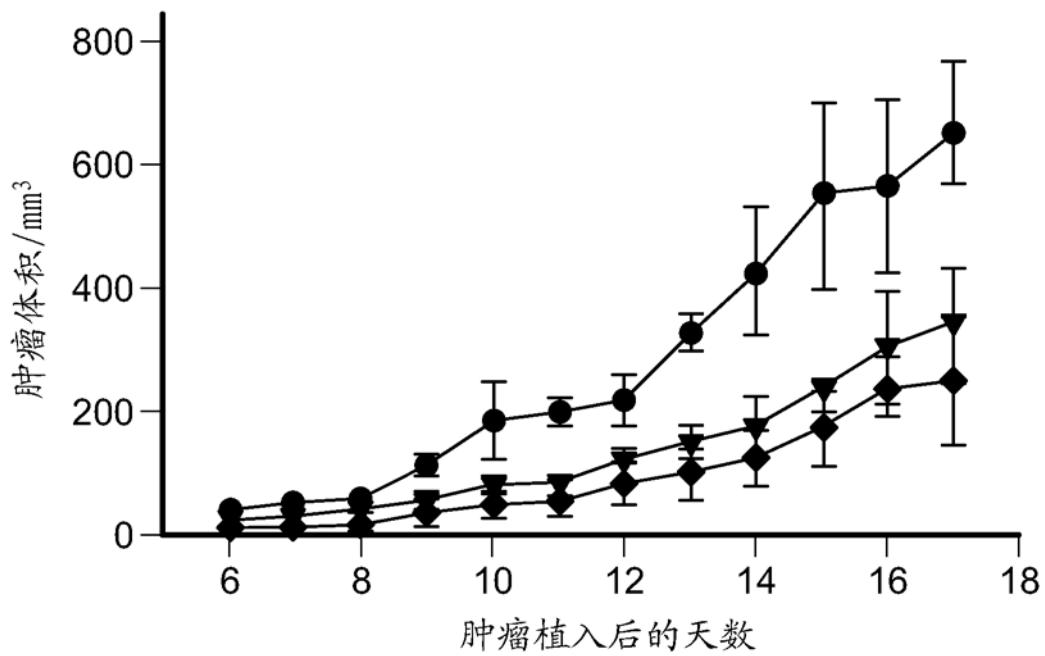


图 16B

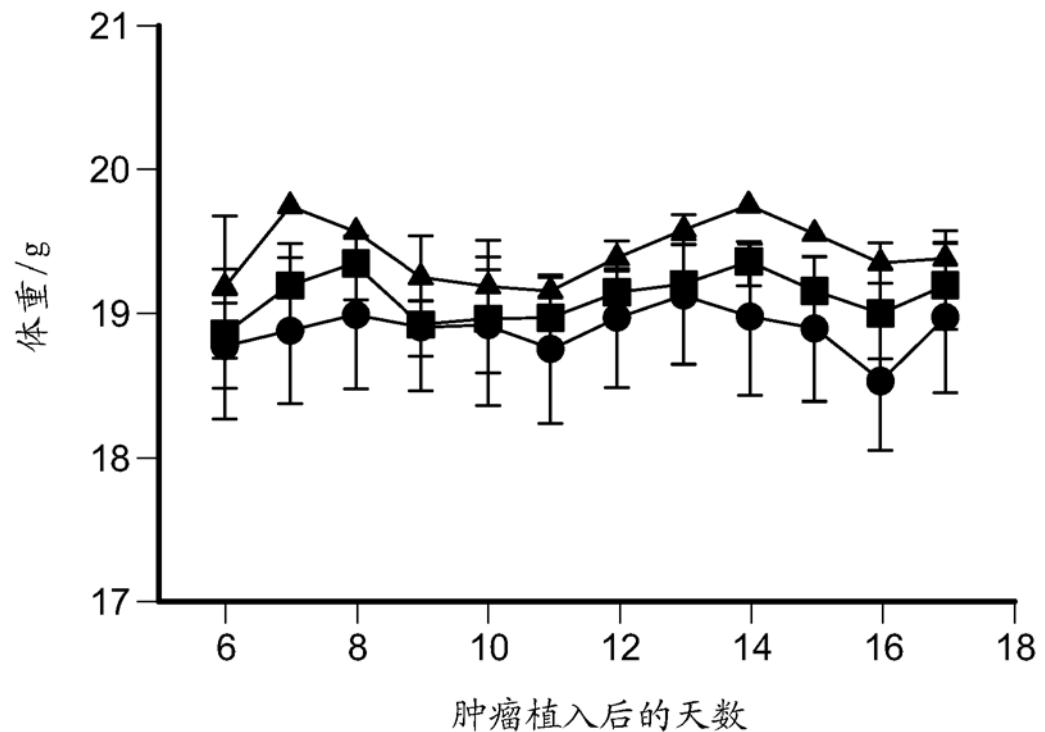


图 17A

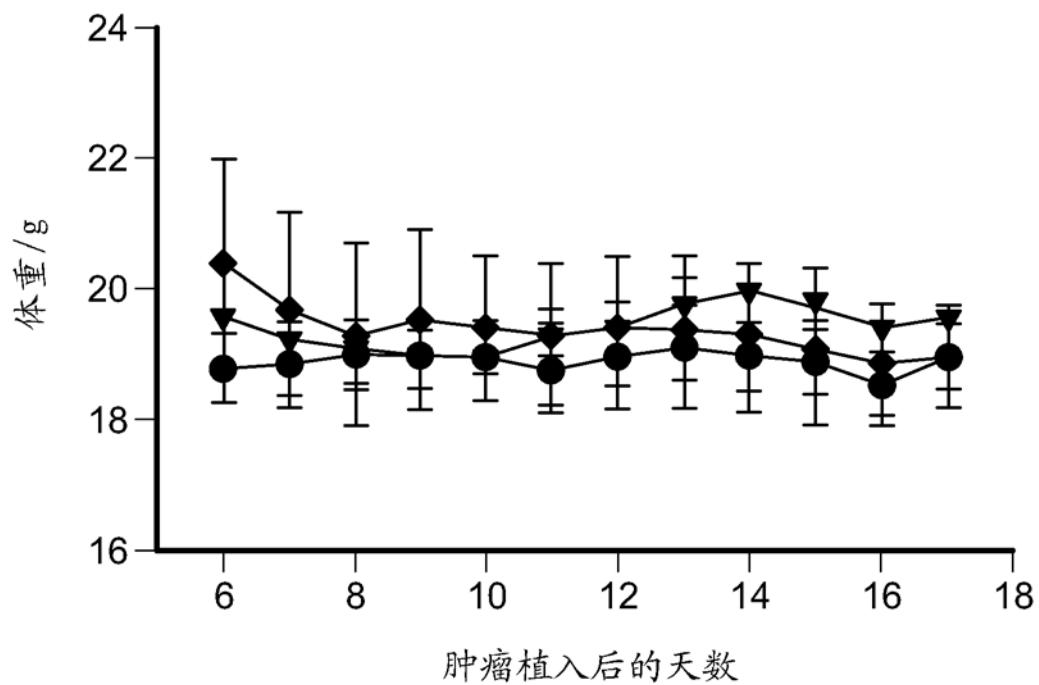


图 17B

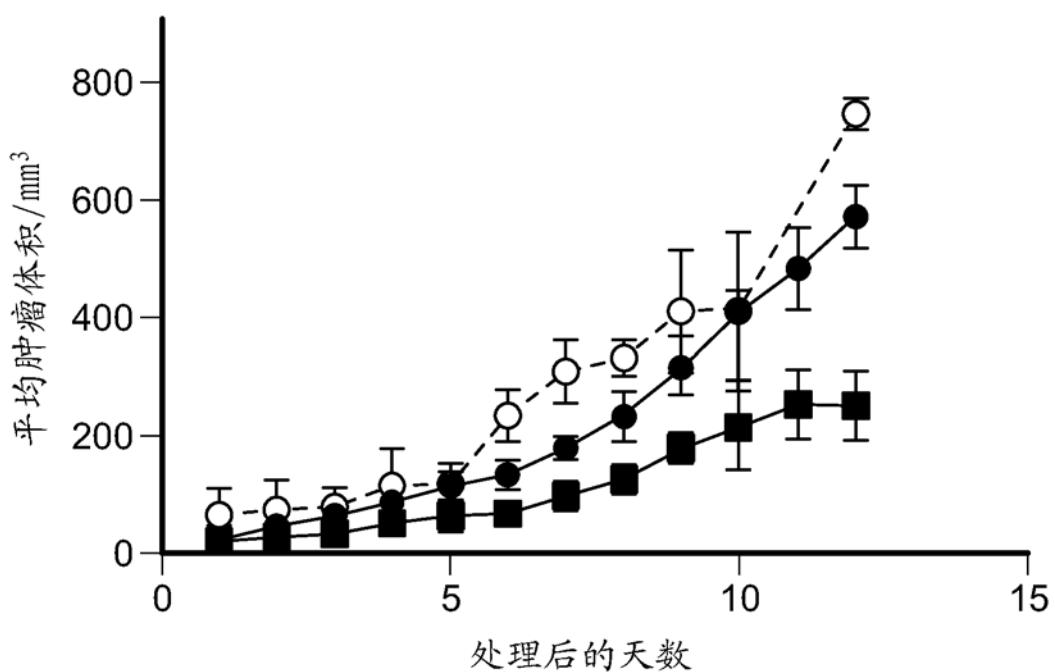


图 18A

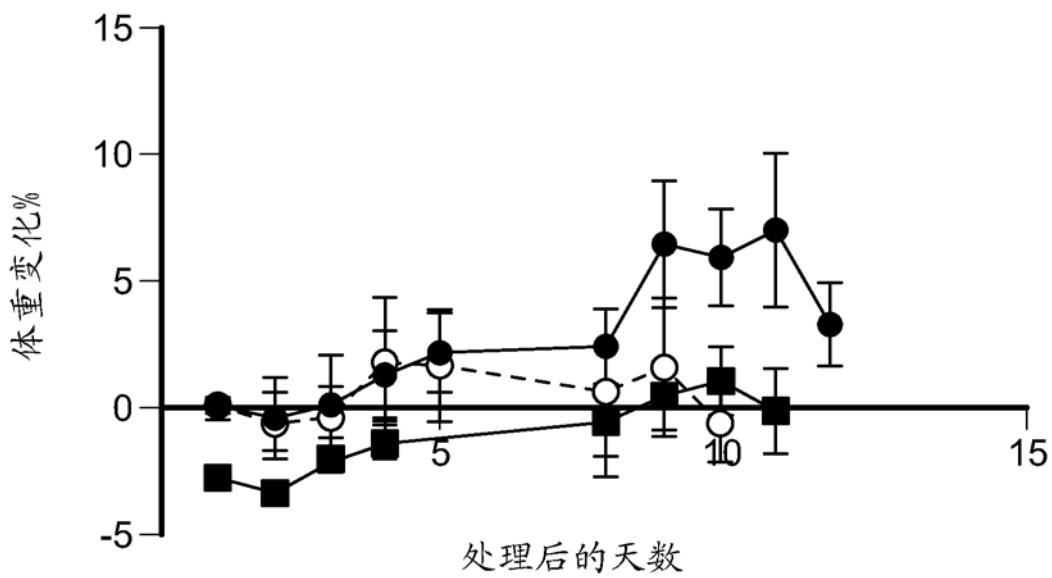


图 18B

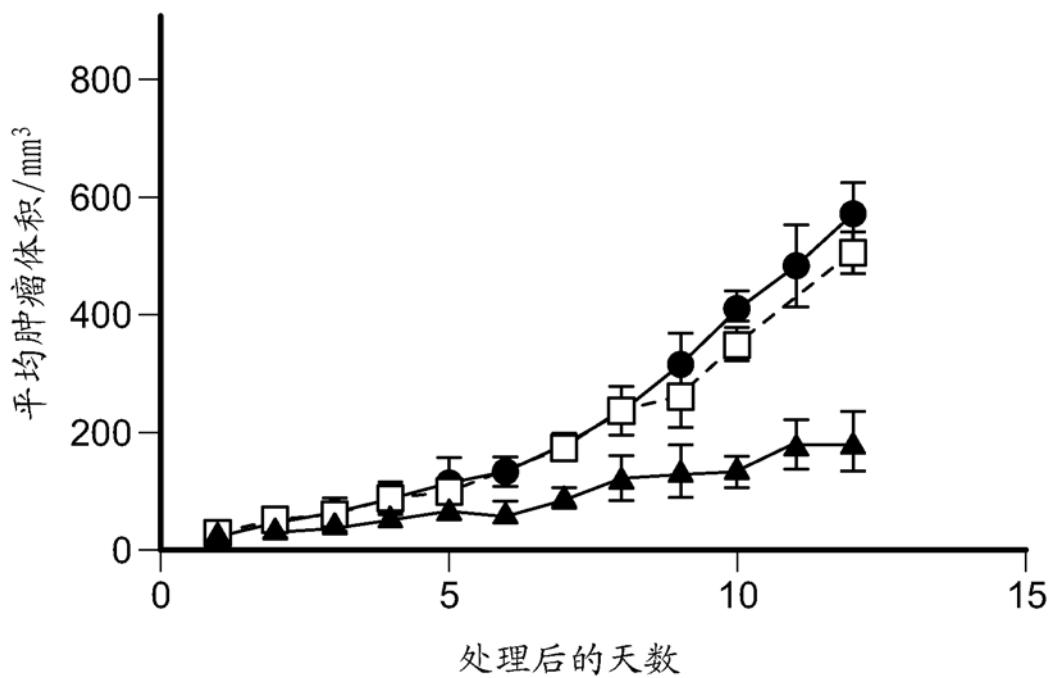


图 19A

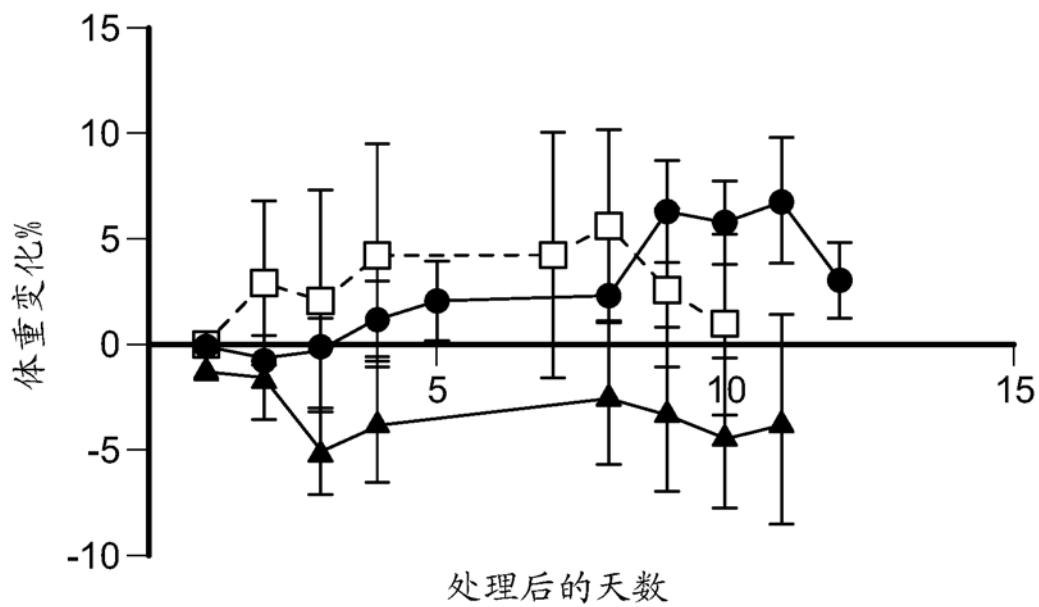


图 19B

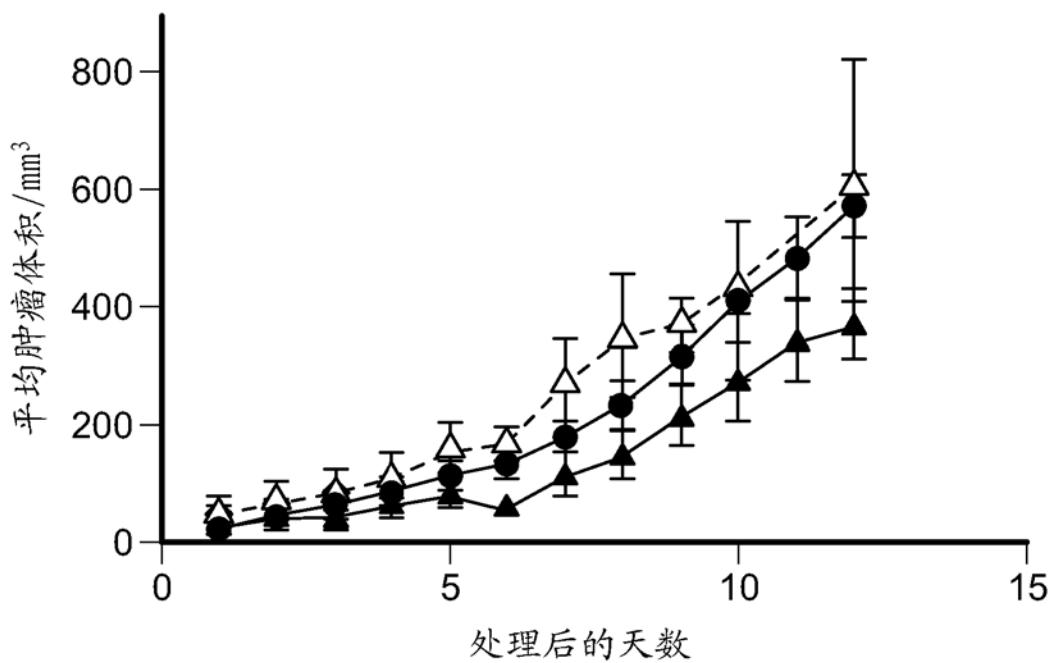


图 20A

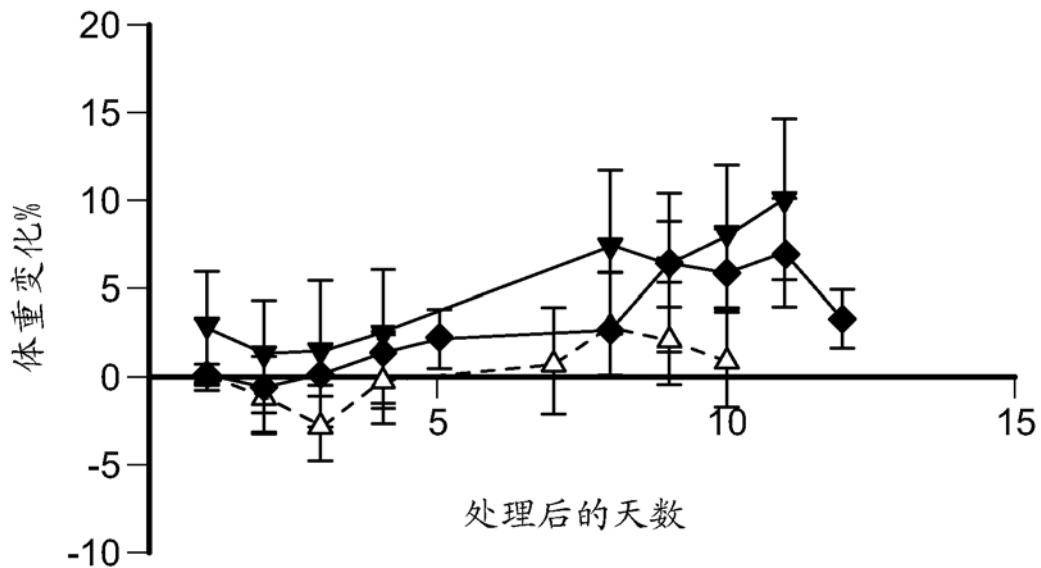


图 20B

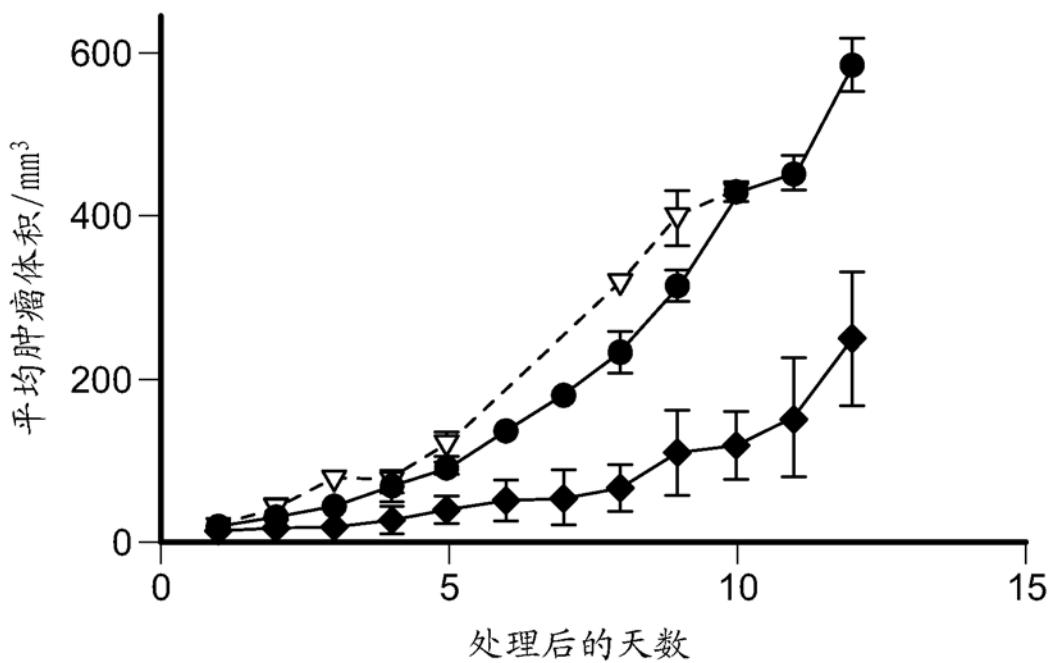


图 21A

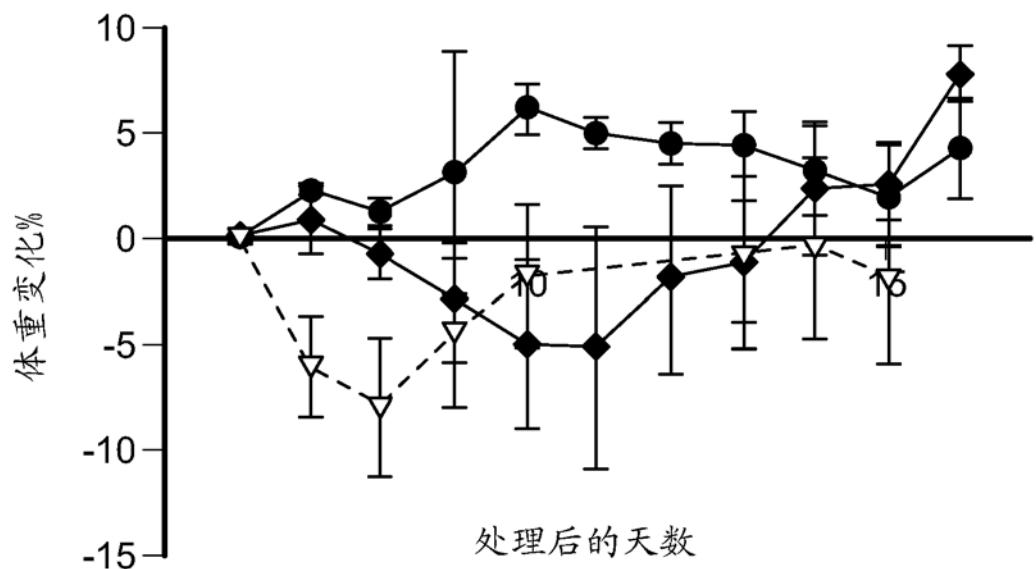


图 21B

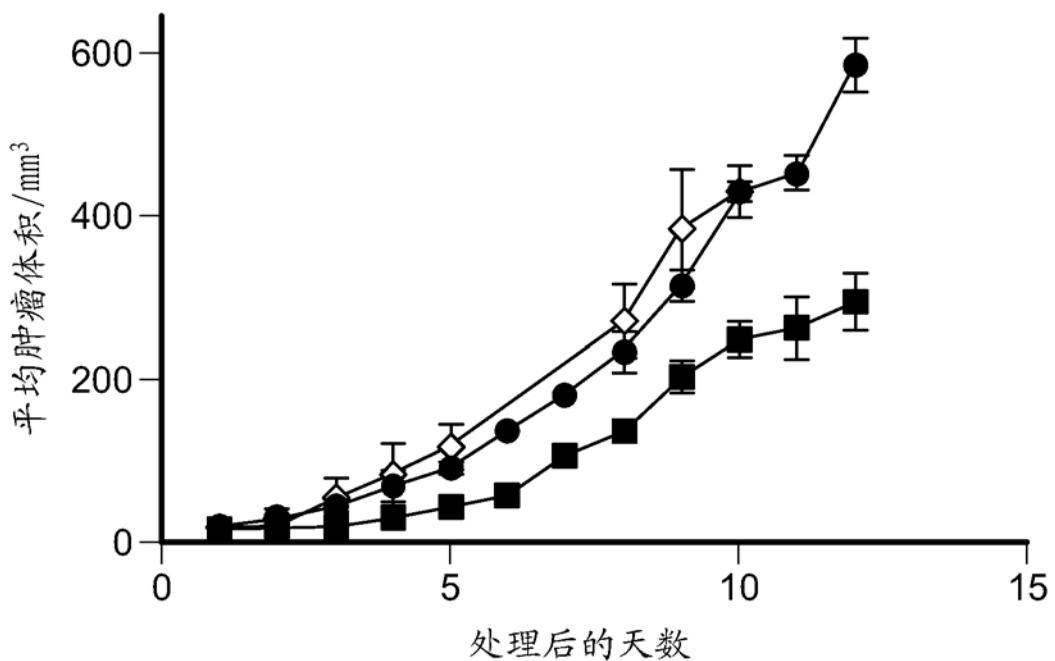


图 22A

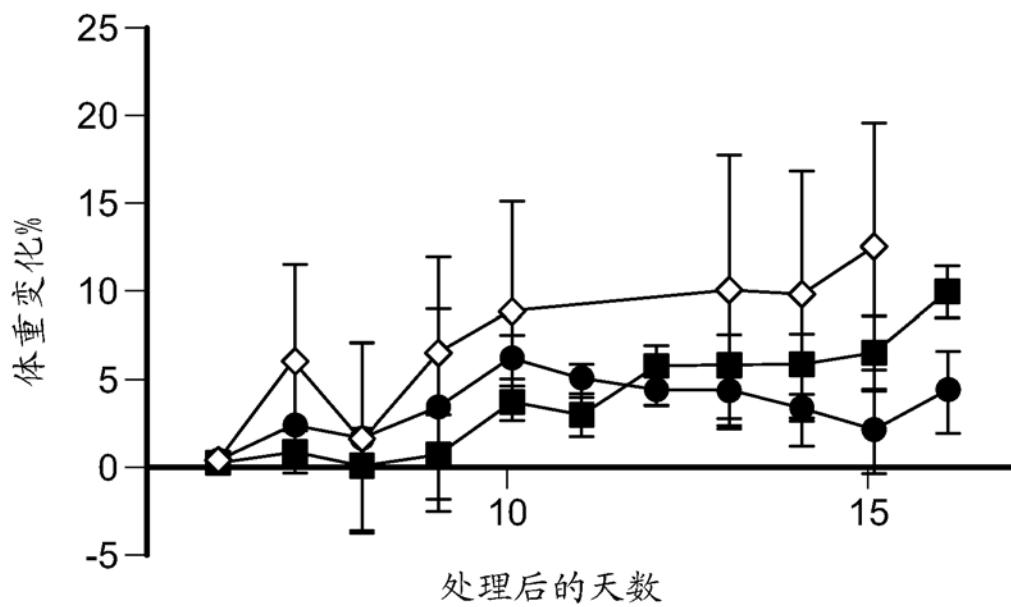


图 22B

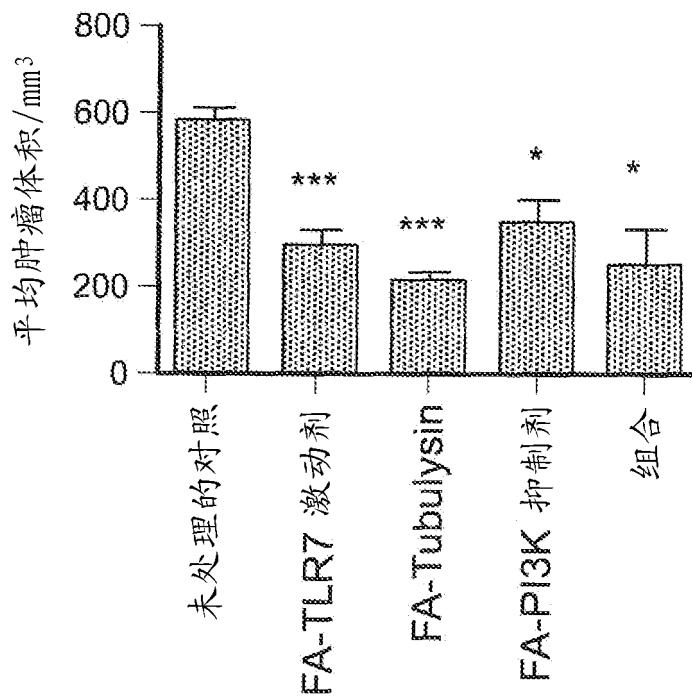


图 23

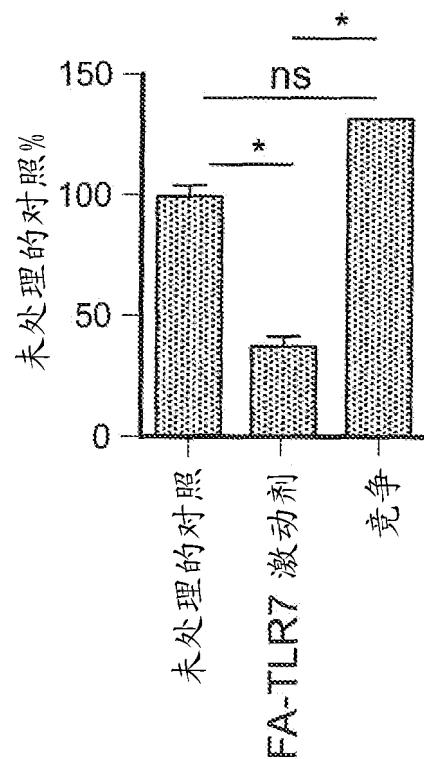


图 24A

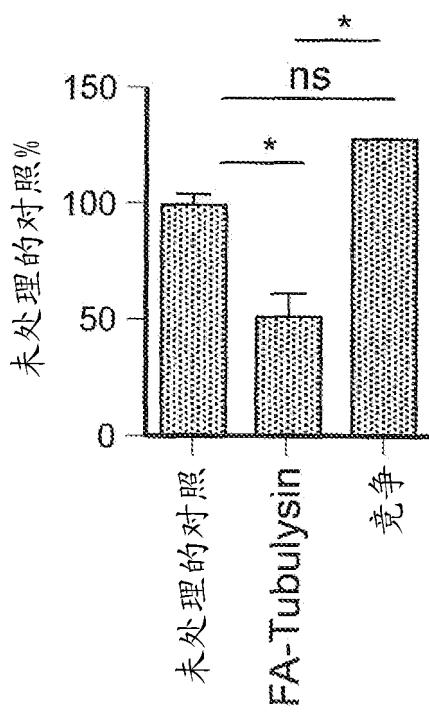


图 24B

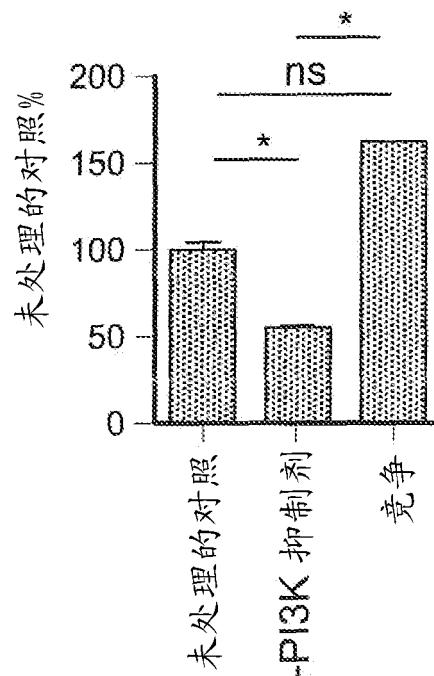


图 24C

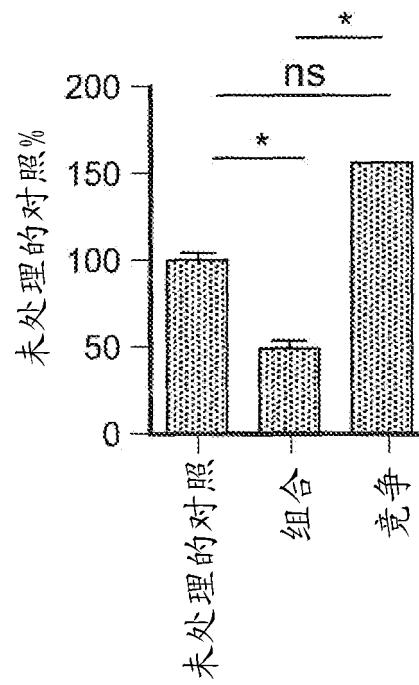


图 24D

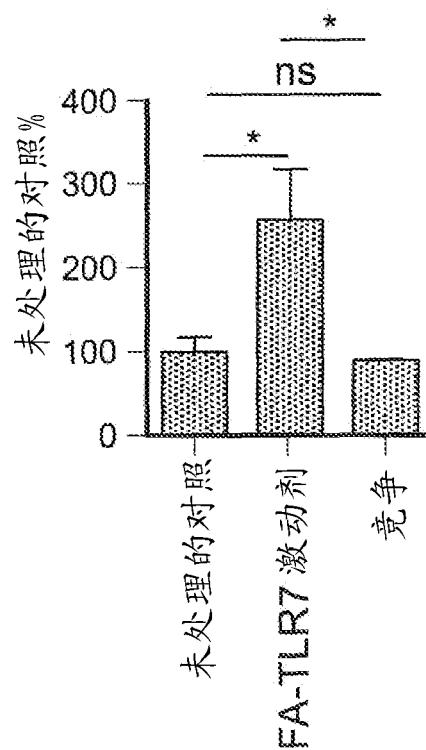


图 25A

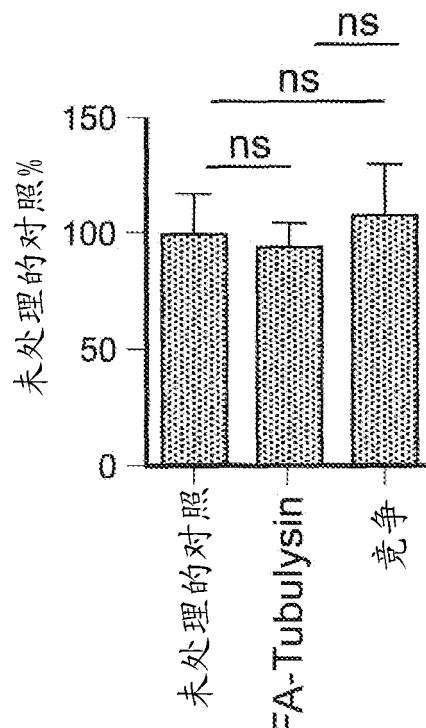


图 25B

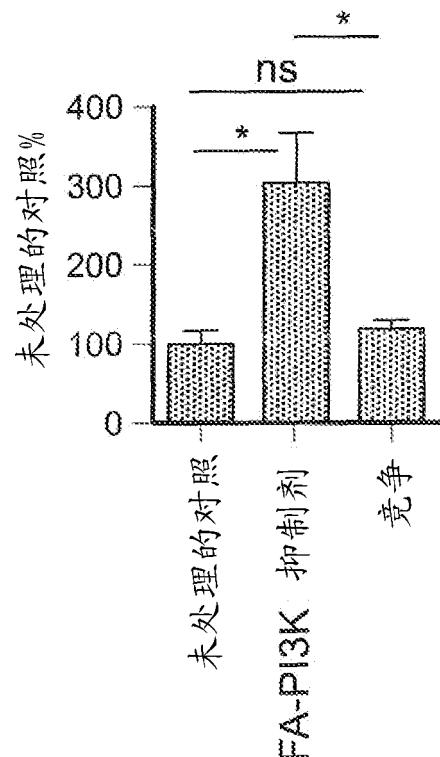


图 25C

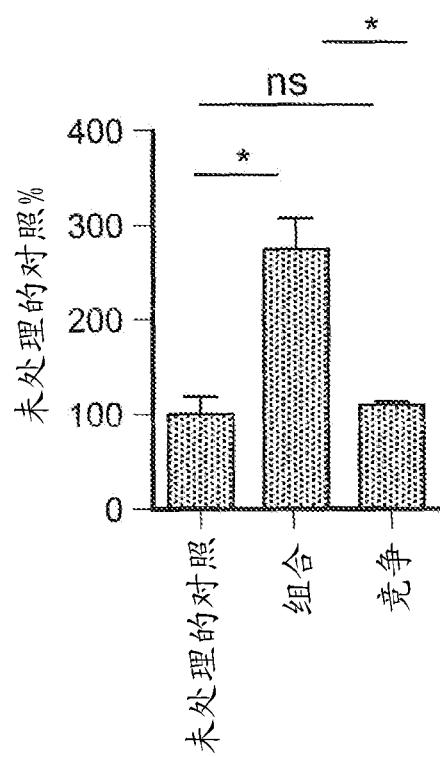


图 25D

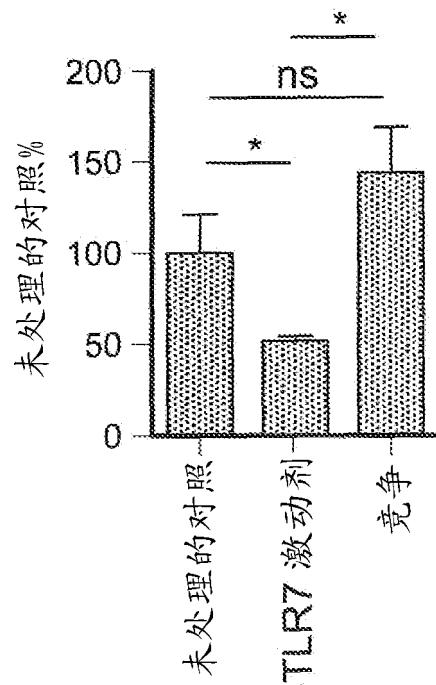


图 26A

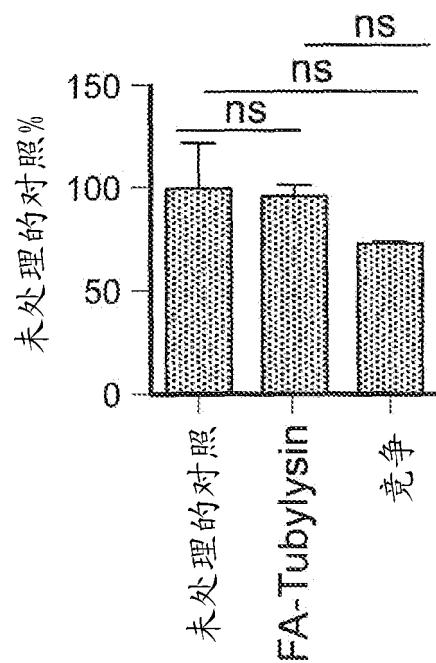


图 26B

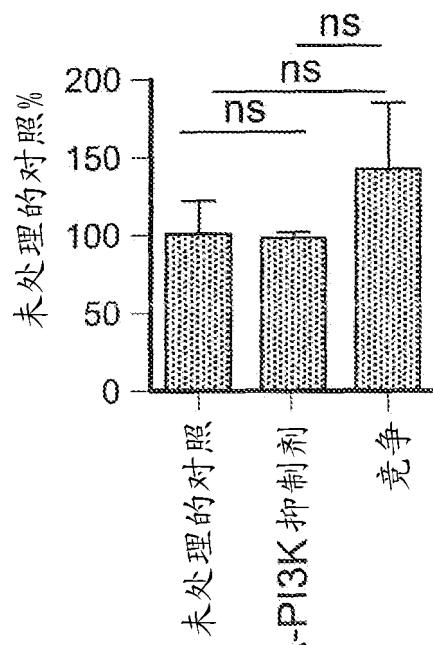


图 26C

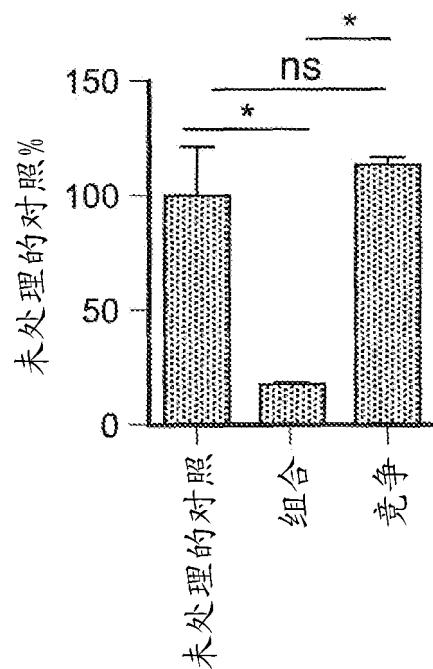


图 26D

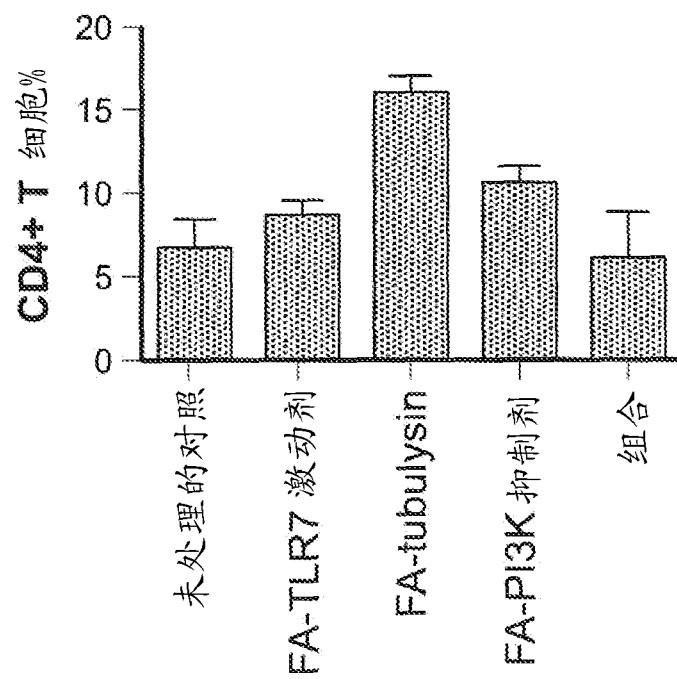


图 27A

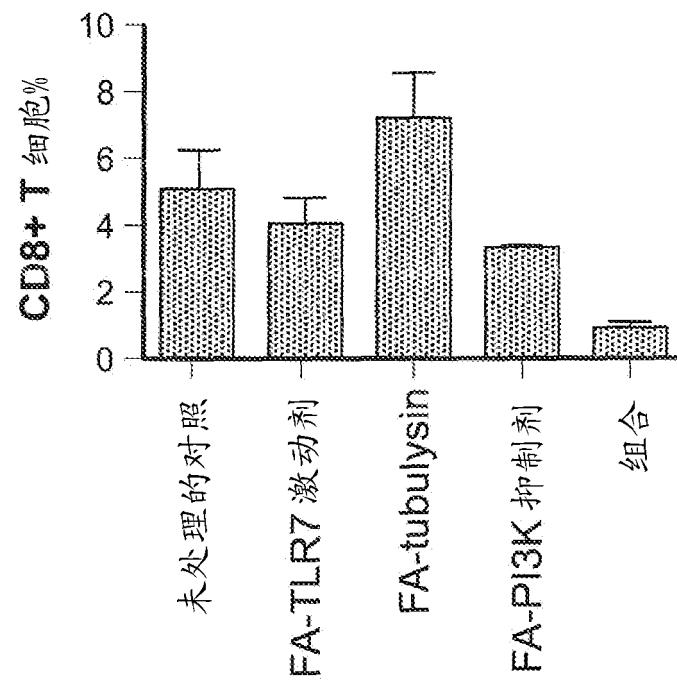


图 27B

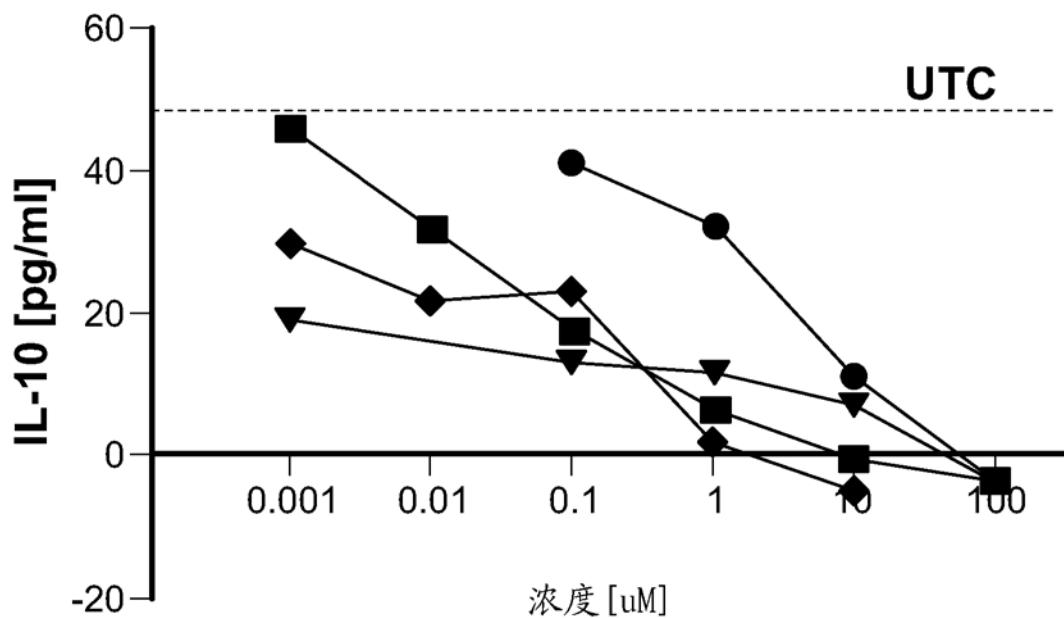


图 28

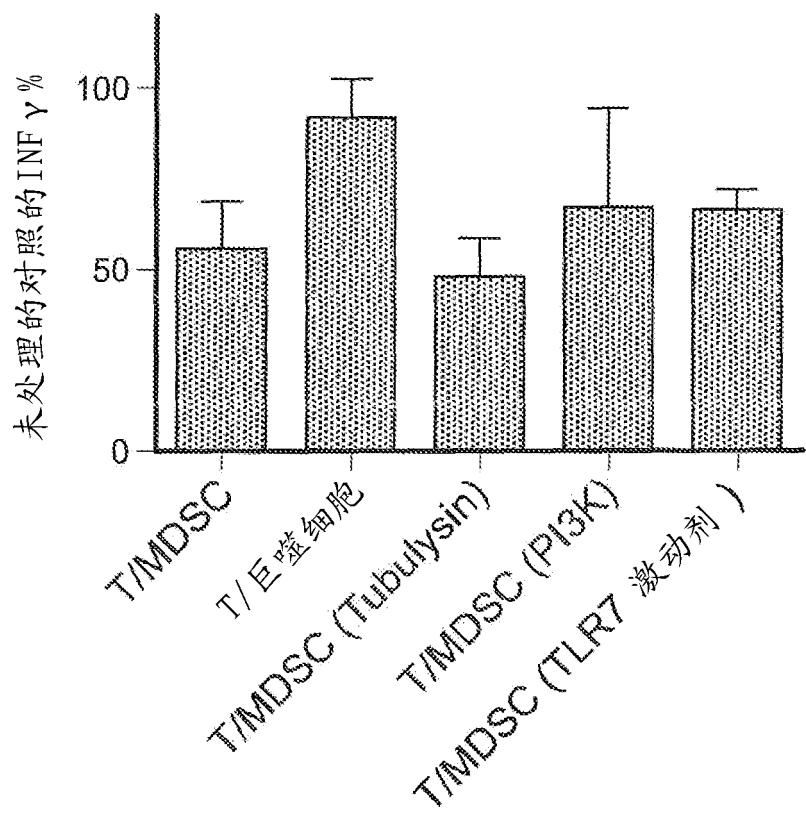


图 29A

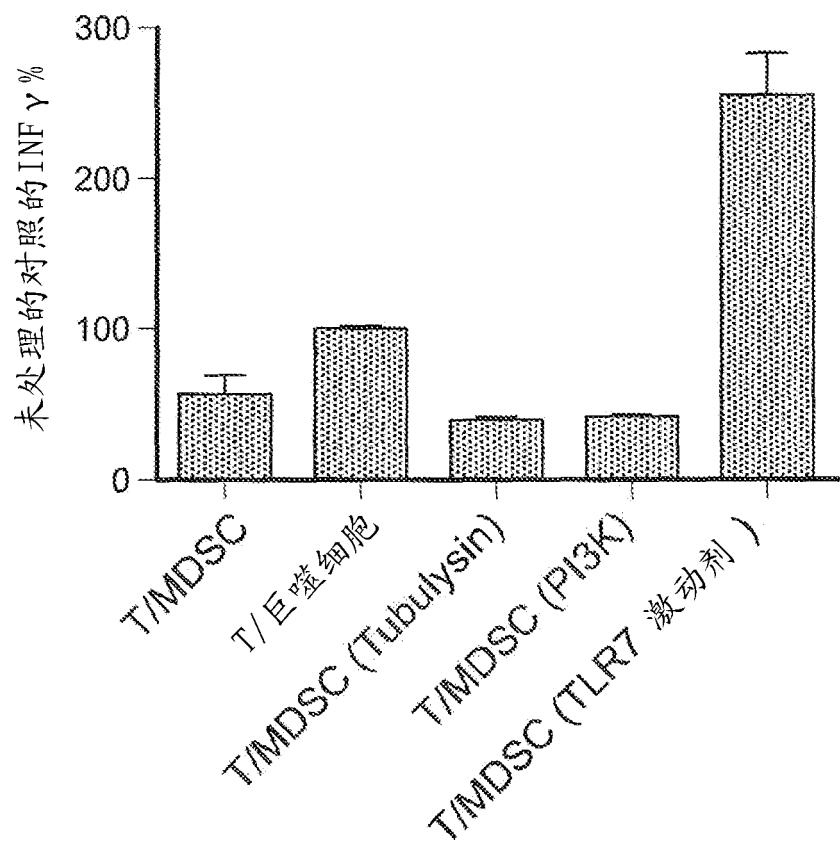


图 29B

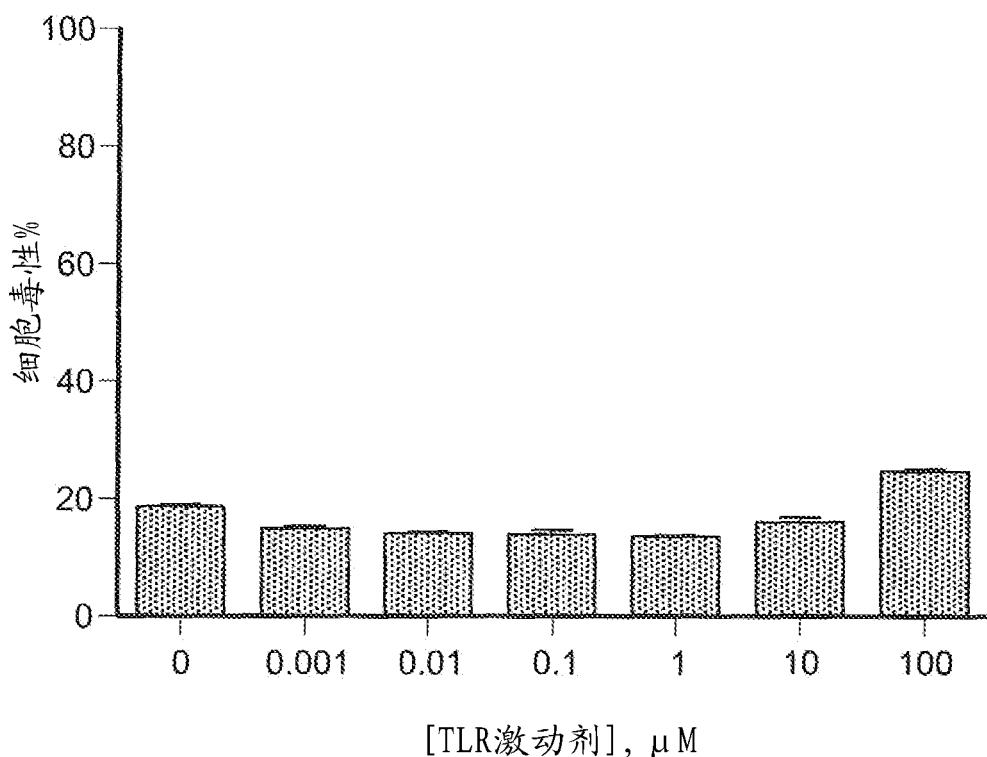


图 30A

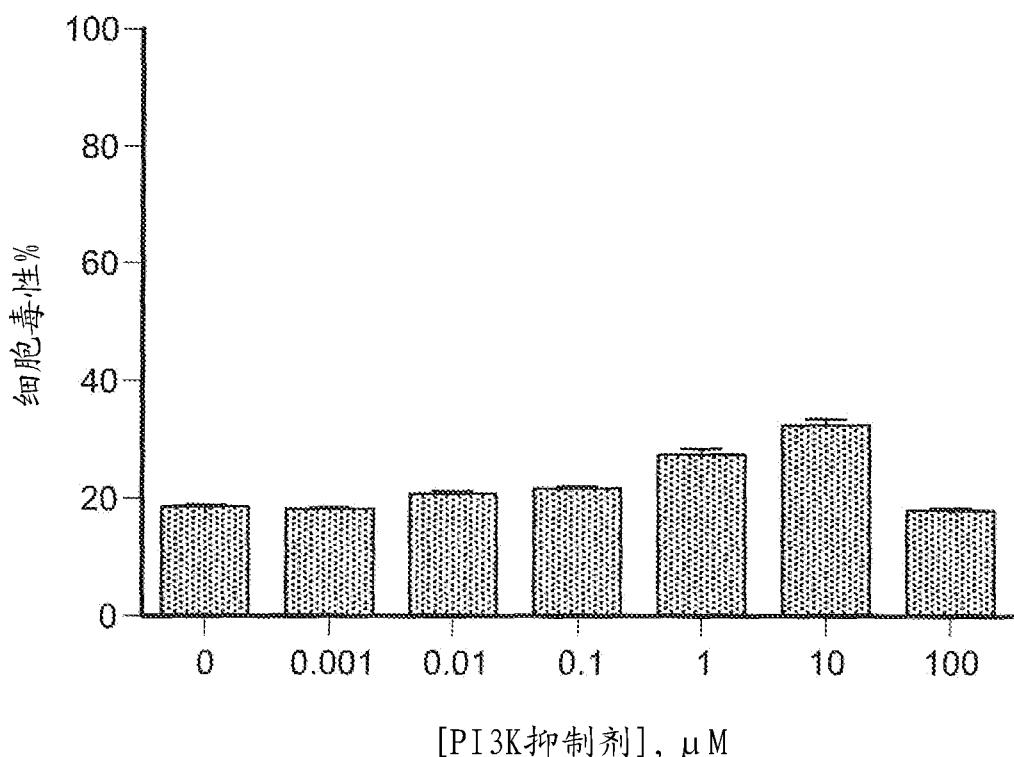


图 30B

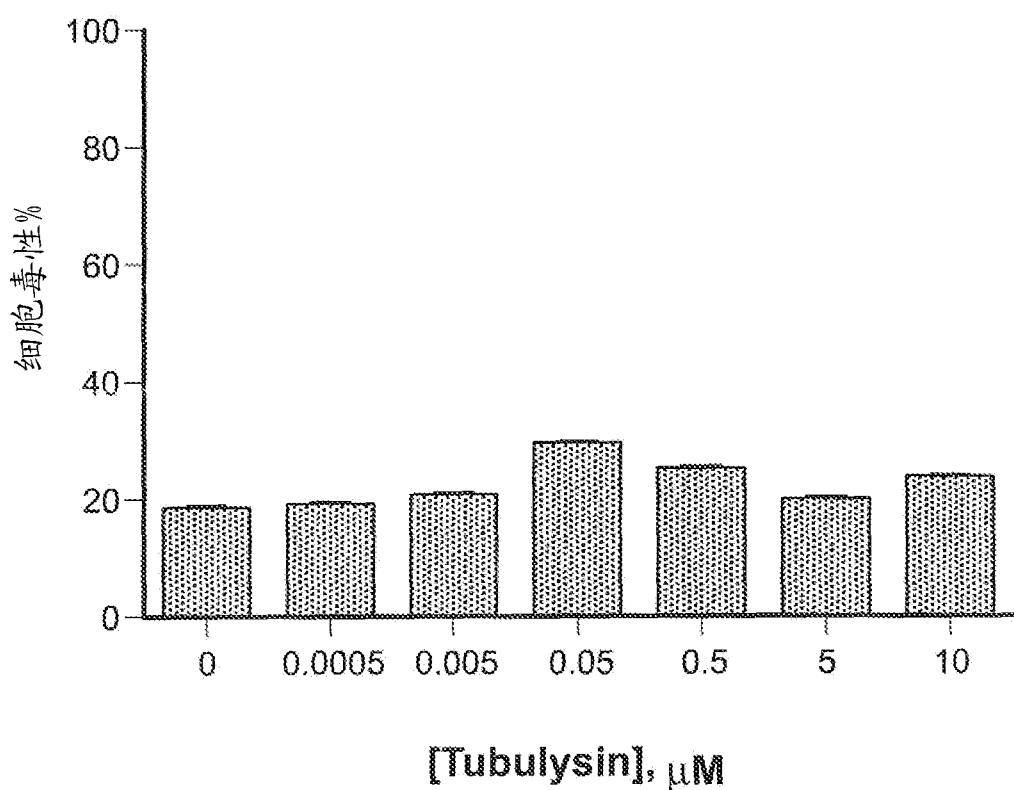


图 30C

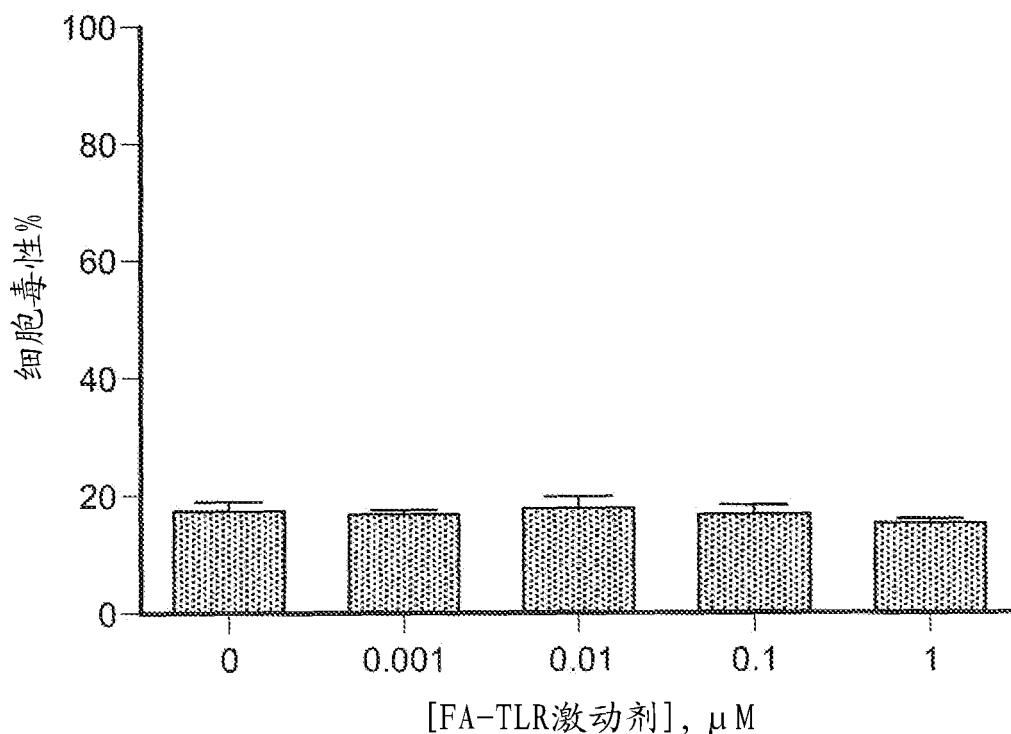


图 31A

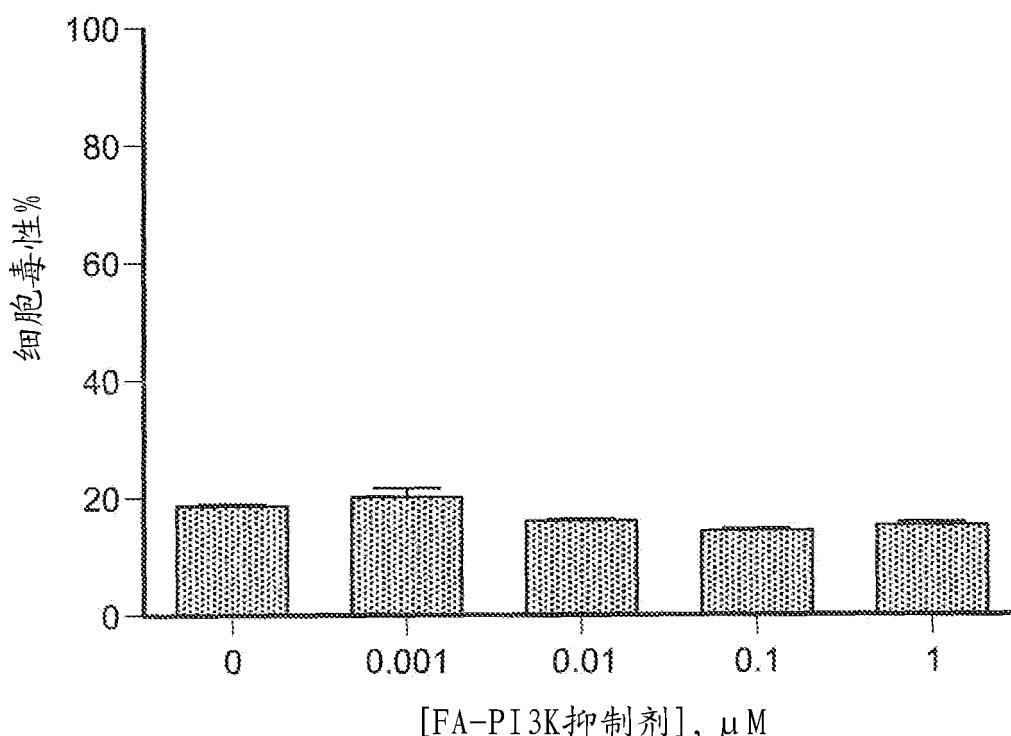


图 31B

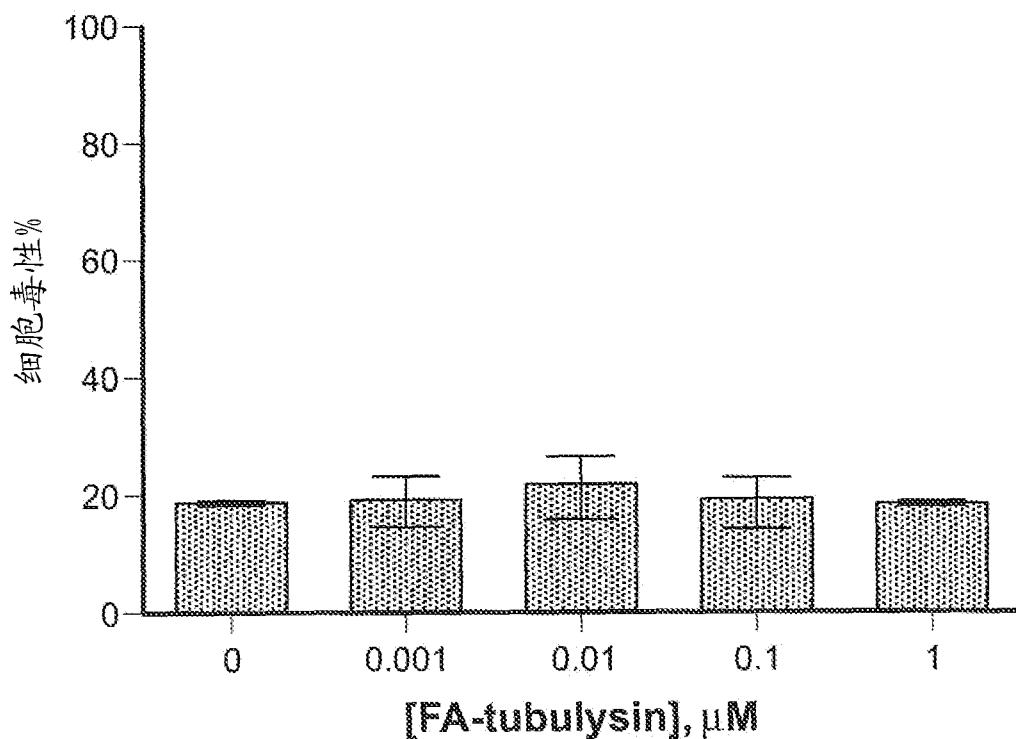


图 31C

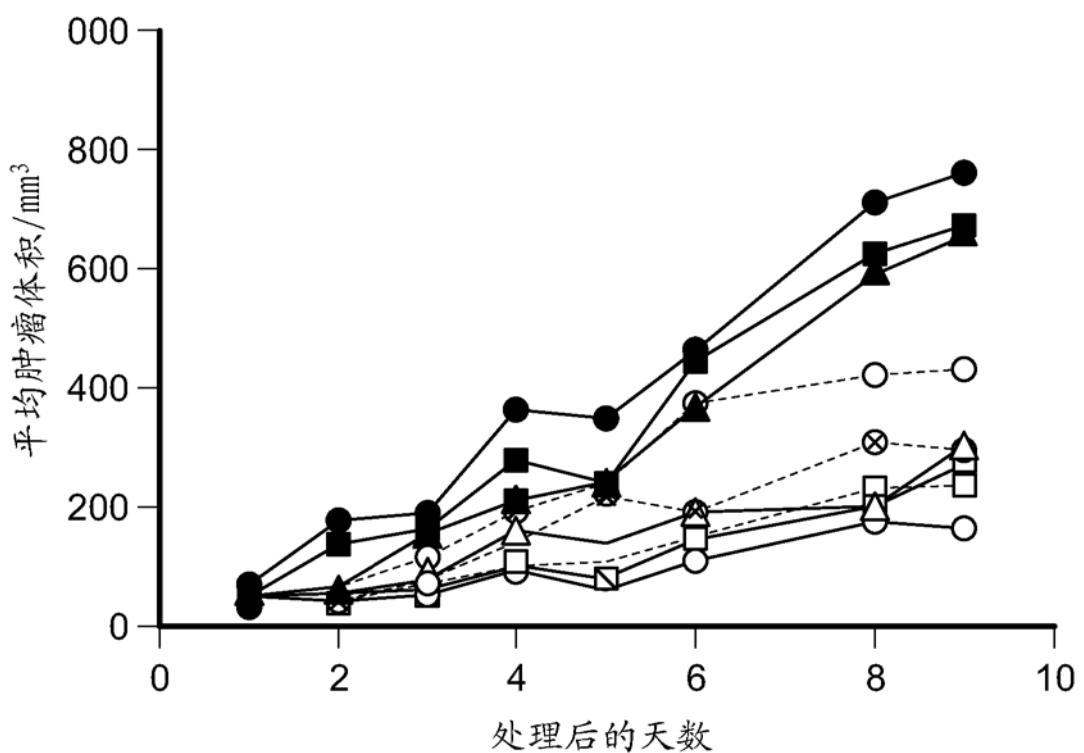


图 32

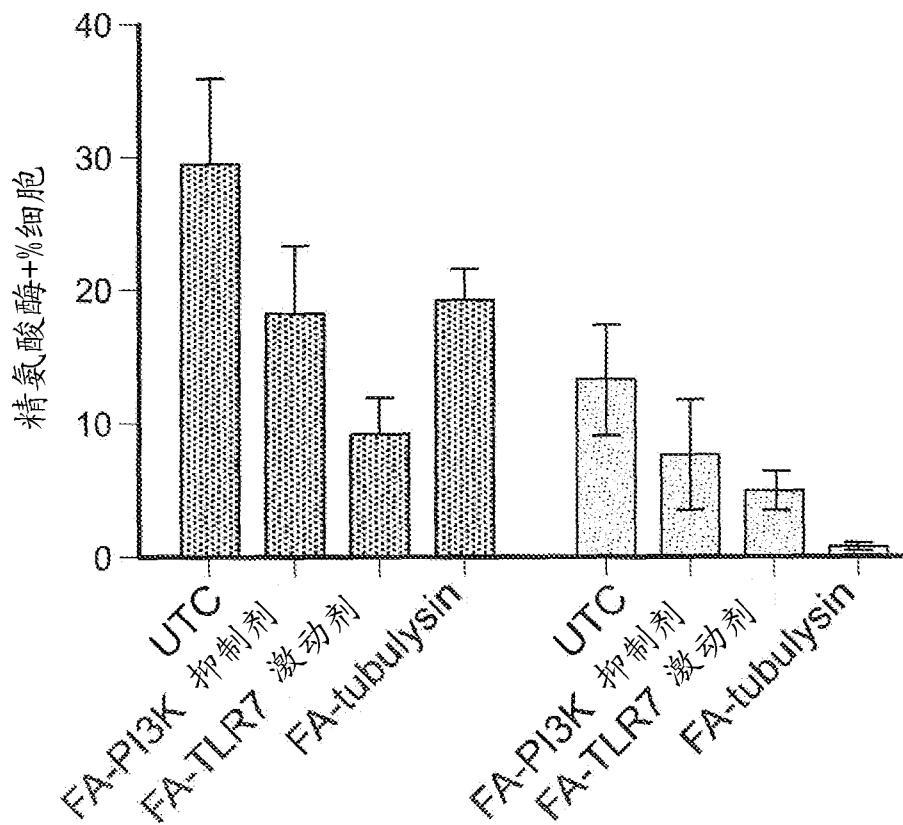


图 33

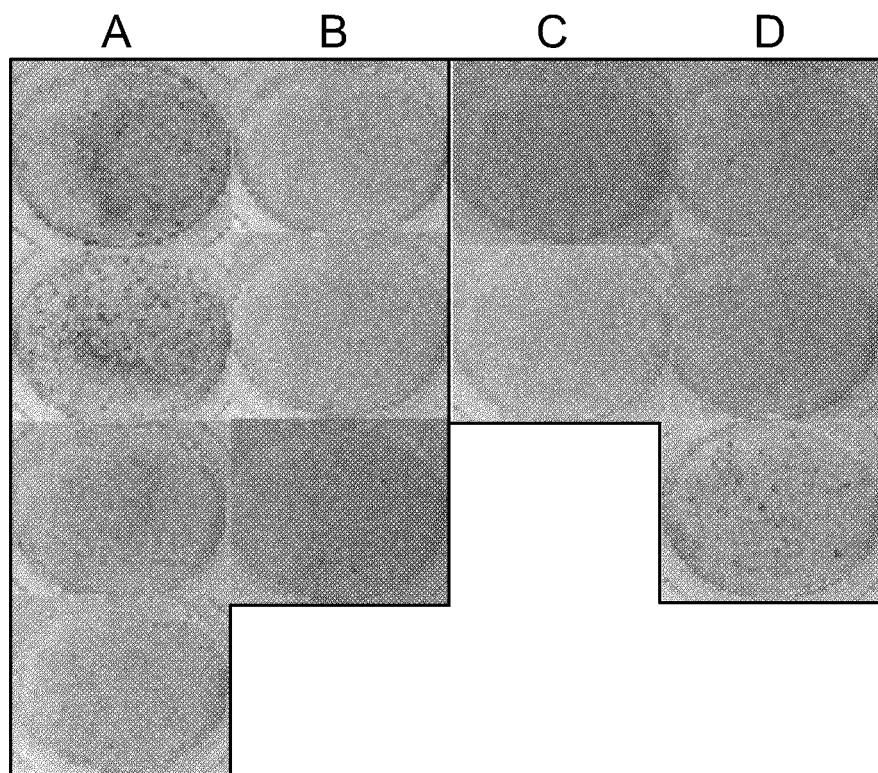


图 34

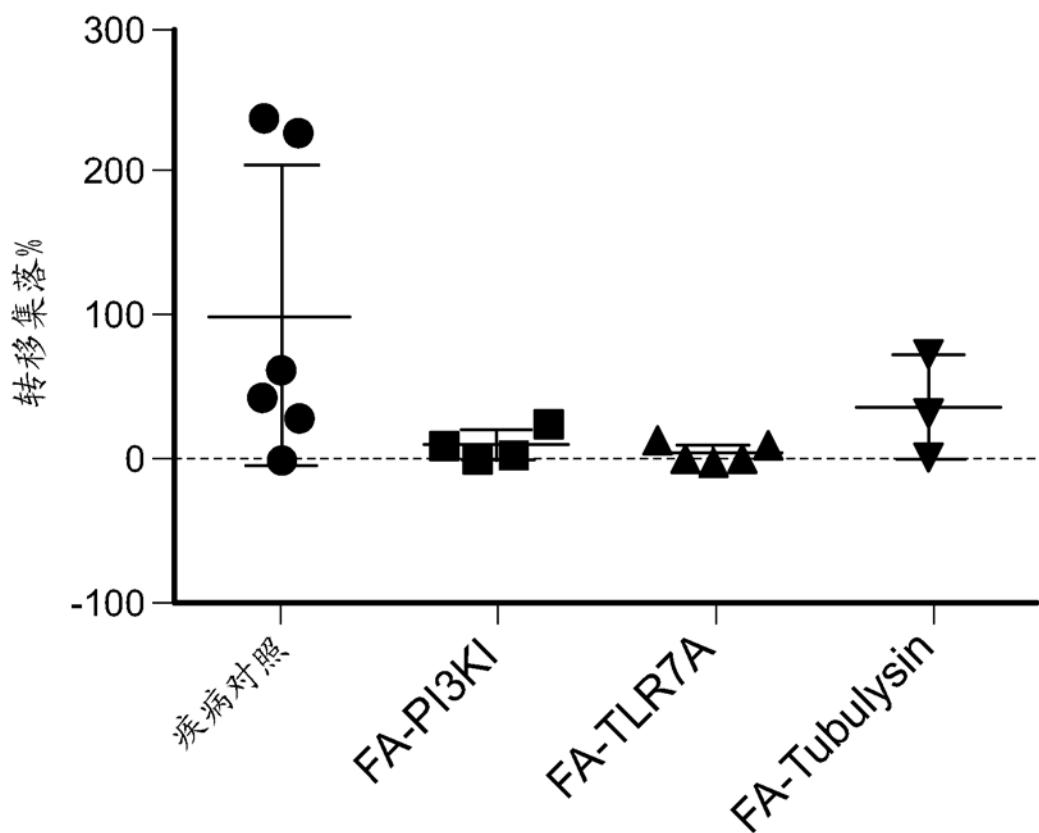


图 35

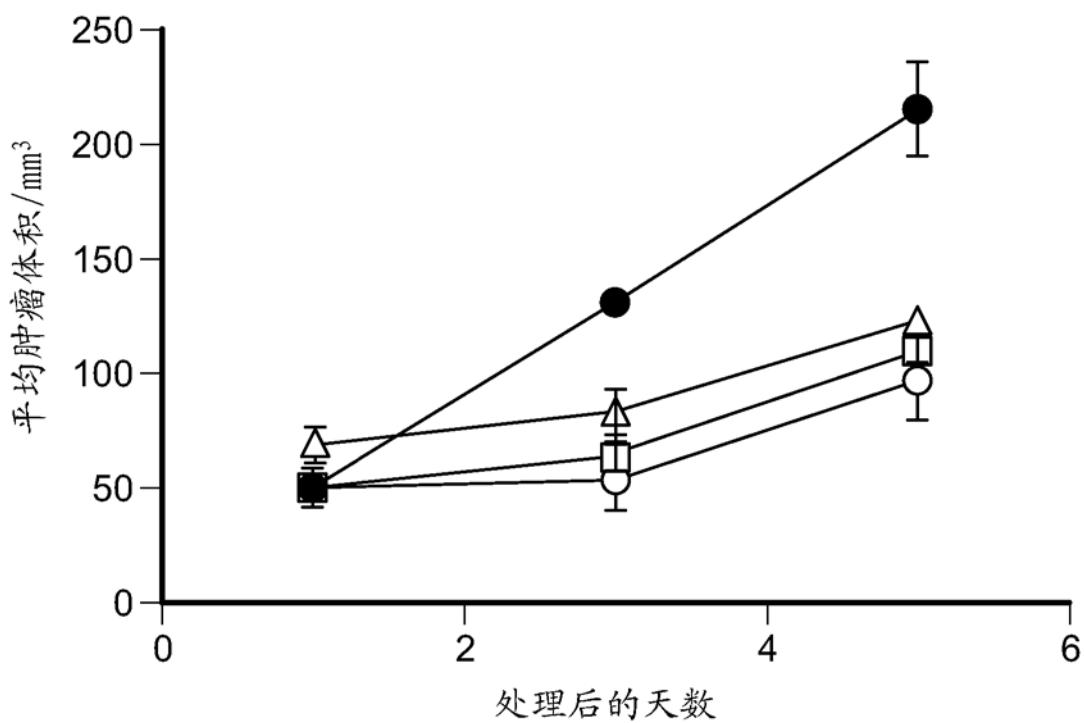


图 36

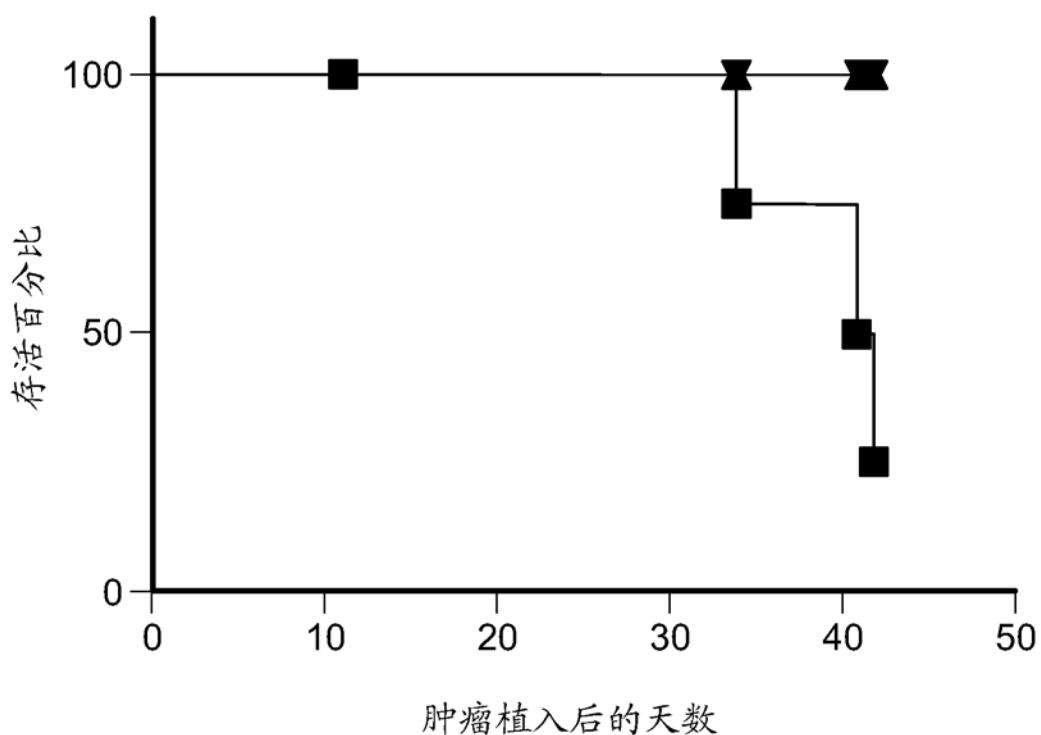


图 37