



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108383893 A

(43)申请公布日 2018.08.10

---

(21)申请号 201810059355.6	<i>C07K 5/065</i> (2006.01)
(22)申请日 2012.08.30	<i>C07K 5/083</i> (2006.01)
(30)优先权数据	<i>C07K 5/087</i> (2006.01)
61/528824 2011.08.30 US	<i>C07K 5/097</i> (2006.01)
(62)分案原申请数据	<i>C07K 5/107</i> (2006.01)
201280052940.4 2012.08.30	<i>A61K 38/07</i> (2006.01)
(71)申请人 塔夫茨大学信托人	<i>A61K 45/06</i> (2006.01)
地址 美国麻萨诸塞州	<i>A61P 35/00</i> (2006.01)
(72)发明人 W.W.巴乔夫钦 H-S.赖	<i>A61P 17/06</i> (2006.01)
S.E.波普拉夫斯基	<i>A61P 9/10</i> (2006.01)
(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公 司 72001	
代理人 任晓华 万雪松	
(51)Int. Cl.	
<i>C07K 5/062</i> (2006.01)	

---

权利要求书5页 说明书41页 附图24页

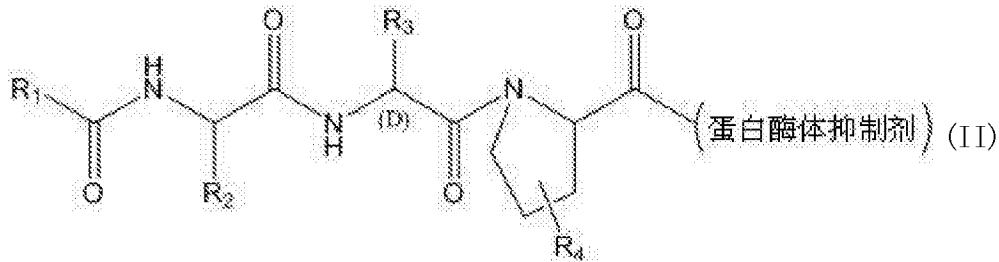
(54)发明名称

用于治疗实体瘤的FAP-活化的蛋白酶体抑制剂

(57)摘要

本发明公开了蛋白酶体抑制剂、蛋白酶体抑制剂的FAP-活化的前药,和所述抑制剂和前药的药学可接受的盐。还公开了相关的药物组合物,和使用所述抑制剂和前药及其组合物,例如,治疗癌症和其他细胞增殖性疾病的方法。还公开了分别定量在活检样品和哺乳动物中的FAP表达的体外和体内方法。

1. 成纤维细胞活化蛋白 (FAP)-活化的蛋白酶体抑制剂, 由式II表示:



其中:

R<sub>1</sub>-C(=O)-表示酰基N-末端封端基团, 其选自甲酰基; 乙酰基; 苯甲酰基; 三氟乙酰基; 琥珀酰基; 甲氧琥珀酰基; -C(=O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-10</sub>-C(=O)-OH; 芳基 (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) 酰基, 其中芳基选自苯、萘、菲、苯酚和苯胺; 杂芳基 (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>) 酰基, 其中杂芳基选自吡咯、呋喃、噻吩、咪唑、噁唑、噻唑、三唑、吡唑、吡啶、吡嗪、哒嗪和嘧啶; 和由在生理pH下离子化的一个或多个官能团取代的 (C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>) 烷基-C(=O)-;

R<sub>2</sub>表示H、(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>) 烷基, 或单-或双-羟基取代的 (C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>) 烷基;

R<sub>3</sub>表示 (C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>) 烷基;

R<sub>4</sub>不存在或表示 (C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>) 烷基、-OH、-NH<sub>2</sub>, 或卤素; 和

所述FAP活化的蛋白酶体抑制剂通过FAP切割而释放所述蛋白酶体抑制剂。

2. 权利要求1的FAP-活化的蛋白酶体抑制剂, 其中所述蛋白酶体抑制剂是共价抑制剂。

3. 权利要求2的FAP-活化的蛋白酶体抑制剂, 其中所述蛋白酶体抑制剂属于选自以下的类型: 醛类、硼酸类, 环氧酮类、β-内酯类、乙烯基砜类, 和α,β-不饱和羰基化合物。

4. 权利要求3的FAP-活化的蛋白酶体抑制剂, 其中所述蛋白酶体抑制剂是醛类蛋白酶体抑制剂, 其选自: MG-132、PSI和fellutamide B。

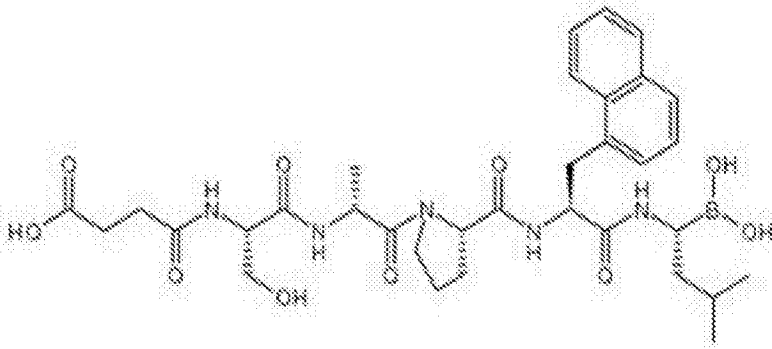
5. 权利要求3的FAP-活化的蛋白酶体抑制剂, 其中所述蛋白酶体抑制剂是硼酸类蛋白酶体抑制剂, 其选自: 硼替佐米、CEP-18770、MLN-2238和MLN-9708。

6. 权利要求3的FAP-活化的蛋白酶体抑制剂, 其中所述蛋白酶体抑制剂是环氧酮类蛋白酶体抑制剂, 其选自: 环氧酶素、卡非佐米 (PR-171)、NC-005、YU-101、LU-005、YU-102、NC-001、LU-001、NC-022、PR-957 (LMP7)、CPSI (β5)、LMP2-sp-ek、BODIPY-NC-001、叠氮基-NC-002和ONX-0912。

7. 权利要求3的FAP-活化的蛋白酶体抑制剂, 其中所述蛋白酶体抑制剂是β-内酯类蛋白酶体抑制剂, 其选自: omuralide、PS-519、marizomib和belactosin A。

8. 权利要求3的FAP-活化的蛋白酶体抑制剂, 其中所述蛋白酶体抑制剂是乙烯基砜类蛋白酶体抑制剂, 其选自: <sup>125</sup>I-NIP-L<sub>3</sub>VS、NC-005-VS和MV151。

9. 权利要求3的FAP-活化的蛋白酶体抑制剂, 其由下述表示:



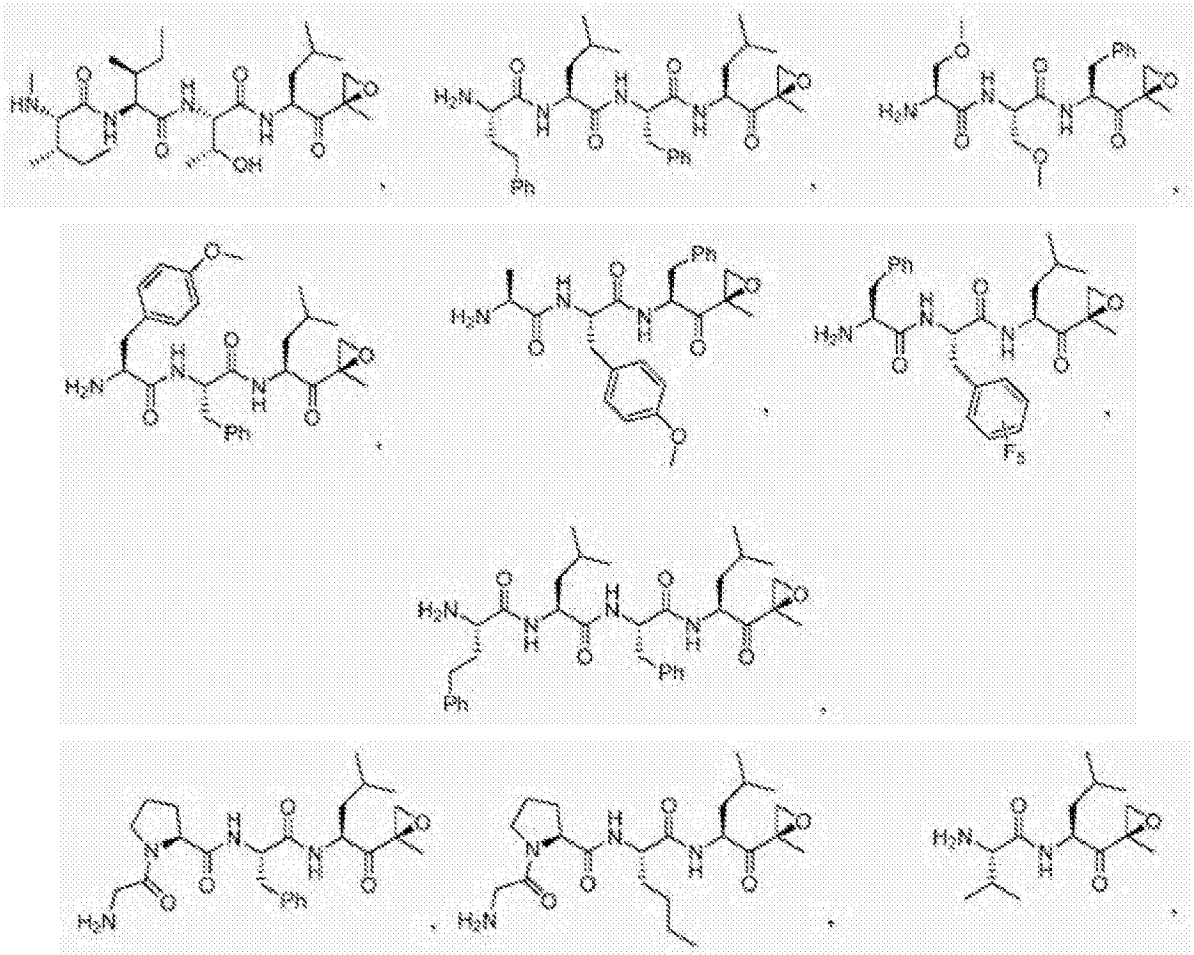
10. 权利要求2的FAP-活化的蛋白酶体抑制剂,其中所述蛋白酶体抑制剂选自:硼替佐米、卡非佐米和marizomib。

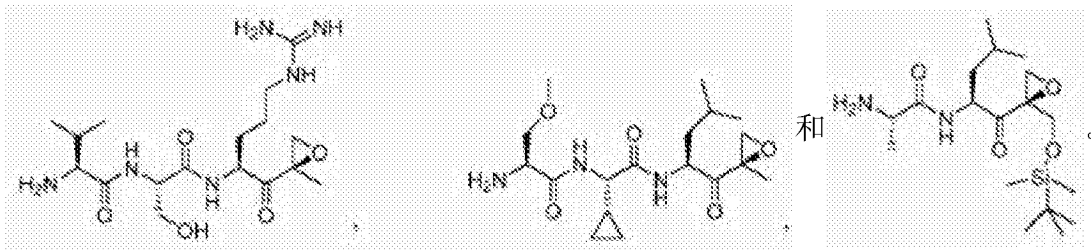
11. 权利要求10的FAP-活化的蛋白酶体抑制剂,其中所述蛋白酶体抑制剂是硼替佐米。

12. 权利要求10的FAP-活化的蛋白酶体抑制剂,其中所述蛋白酶体抑制剂是卡非佐米。

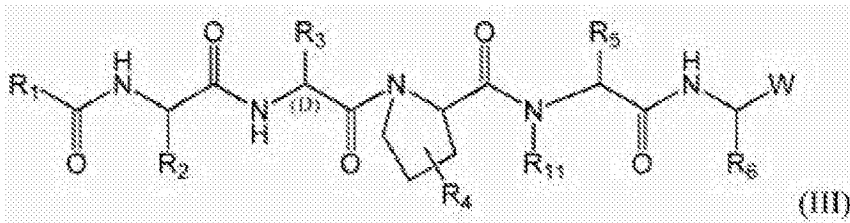
13. 权利要求10的FAP-活化的蛋白酶体抑制剂,其中所述蛋白酶体抑制剂是marizomib。

14. 权利要求1的FAP-活化的蛋白酶体抑制剂,其中所述蛋白酶体抑制剂选自:





15. 权利要求1的FAP-活化的蛋白酶体抑制剂,由式III表示:



其中:

R<sub>1</sub>-C(=O)-表示酰基N-末端封端基团,其选自甲酰基;乙酰基;苯甲酰基;三氟乙酰基;琥珀酰基;甲氧琥珀酰基;-C(=O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-10</sub>-C(=O)-OH;芳基(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)酰基,其中芳基选自苯、萘、菲、苯酚和苯胺;杂芳基(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)酰基,其中杂芳基选自吡咯、呋喃、噻吩、咪唑、噁唑、噻唑、三唑、吡唑、吡啶、吡嗪、哒嗪和嘧啶;和由在生理pH下离子化的一个或多个官能团取代的(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)烷基-C(=O)-;

R<sub>2</sub>表示H、(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)烷基,或单-或双-羟基取代的(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)烷基;

R<sub>3</sub>表示(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)烷基;

R<sub>4</sub>不存在或表示(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)烷基、-OH、-NH<sub>2</sub>,或卤素;

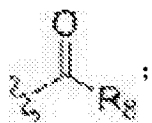
R<sub>5</sub>表示大的疏水氨基酸侧链;

R<sub>6</sub>表示烷基、环烷基、芳基、杂环,或-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-R<sub>7</sub>;

R<sub>7</sub>表示芳基、芳烷基、环烷基、烷氧基、烷基硫基、-OH,或-SH;

R<sub>11</sub>表示H或(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)烷基;

W表示-CN、环氧酮、-CH=NR<sub>8</sub>、, , , , , 或



R<sub>8</sub>表示H、烷基、烯基、炔基、-C(X<sub>1</sub>)(X<sub>2</sub>)X<sub>3</sub>、-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-R<sub>9</sub>、-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-OH、-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-O-烷基、-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-O-烯基、-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-O-炔基、-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-R<sub>9</sub>、-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-SH、-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-S-烷基、-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-S-烯基、-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-S-炔基、-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-S-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-R<sub>9</sub>、-C(=O)C(=O)NH<sub>2</sub>、-C(=O)C(=O)OR<sub>10</sub>;

R<sub>9</sub>对于每次出现独立地表示取代或未取代的芳基、芳烷基、环烷基、环烯基,或杂环;

R<sub>10</sub>对于每次出现独立地表示氢,或取代或未取代的烷基、烯基、芳基、芳烷基、环烷基、环烯基,或杂环;

Y<sub>1</sub>和Y<sub>2</sub>可独立地或一起是OH,或能够水解成羟基的基团,包括环的衍生物,其中Y<sub>1</sub>和Y<sub>2</sub>通过在环结构中具有5-8个原子的环连接;

R<sub>50</sub>表示O或S;

R<sub>51</sub>表示N<sub>3</sub>、SH<sub>2</sub>、NH<sub>2</sub>、NO<sub>2</sub>,或-OR<sub>10</sub>;

R<sub>52</sub>表示氢、(C<sub>1</sub>-C<sub>10</sub>)烷基、胺、-OR<sub>10</sub>,或药学上可接受的盐,或R<sub>51</sub>和R<sub>52</sub>和与它们相连的磷原子一起组成具有在环结构中具有5-8个原子的杂环;

X<sub>1</sub>是卤素;

X<sub>2</sub>和X<sub>3</sub>各自表示H或卤素;

m是零或在1-8范围内的整数;且n是在1-8范围内的整数。

16. 药物组合物,其包含权利要求1-15中任一项所述的FAP-活化的蛋白酶体抑制剂;和药学可接受的赋形剂。

17. 抑制细胞中的蛋白酶体功能的体外方法,包括使所述细胞接触有效量的权利要求1-15中任一项的FAP-活化的蛋白酶体抑制剂。

18. 降低细胞中的肌肉蛋白降解速率的体外方法,包括使所述细胞接触有效量的权利要求1-15中任一项的FAP-活化的蛋白酶体抑制剂。

19. 降低细胞中的NF-κB活性的体外方法,包括使所述细胞接触有效量的权利要求1-15中任一项的FAP-活化的蛋白酶体抑制剂。

20. 降低蛋白酶体依赖性细胞内蛋白分解速率的体外方法,包括使所述细胞接触有效量的权利要求1-15中任一项的FAP-活化的蛋白酶体抑制剂。

21. 降低细胞中的p53蛋白降解速率的体外方法,包括使所述细胞接触有效量的权利要求1-15中任一项的FAP-活化的蛋白酶体抑制剂。

22. 抑制细胞中的细胞周期蛋白降解的体外方法,包括使所述细胞接触有效量的权利要求1-15中任一项的FAP-活化的蛋白酶体抑制剂。

23. 抑制细胞中的抗原呈递的体外方法,包括使所述细胞接触有效量的权利要求1-15中任一项的FAP-活化的蛋白酶体抑制剂。

24. 权利要求1-15中任一项的FAP-活化的蛋白酶体抑制剂用于制备治疗哺乳动物中的癌症、银屑病、再狭窄或其他细胞增殖性疾病的药物的用途。

25. 权利要求1-15中任一项的FAP-活化的蛋白酶体抑制剂和化疗剂共同用于制备治疗哺乳动物中的癌症、银屑病、再狭窄或其他细胞增殖性疾病的药物的用途。

26. 权利要求25的用途,其中所述化疗剂是多西他赛、紫杉醇、甲磺酸伊马替尼、吉西他滨、顺铂、卡铂、5-氟尿嘧啶、培美曲塞、甲氨蝶呤、阿霉素、来那度胺、地塞米松、或单甲基奥莉丝汀。

27. 权利要求25的用途,其中所述化疗剂是多西他赛、吉西他滨、卡铂,或阿霉素。

28. 权利要求25的用途,其中所述化疗剂是MG-132、PSI、fellutamide B、硼替佐米、CEP-18770、MLN-2238、MLN-9708、环氧霉素、卡非佐米(PR-171)、NC-005、YU-101、LU-005、YU-102、NC-001、LU-001、NC-022、PR-957 (LMP7)、CPSI (β5)、LMP2-sp-ek、BODIPY-NC-001、叠氮基-NC-002、ONX-0912、omuralide、PS-519、marizomib、belactosin A、<sup>125</sup>I-NIP-L<sub>3</sub>VS、NC-005-VS,或MV151。

29. 权利要求1-15中任一项的FAP-活化的蛋白酶体抑制剂用于制备治疗哺乳动物中的癌症的药物的用途。

30. 权利要求29的用途,其中所述癌症是实体瘤。

31. 权利要求29的用途,其中所述药物进一步包括治疗有效量的化疗剂。

32. 权利要求31的用途,其中所述癌症是实体瘤。

33. 权利要求32的用途,其中所述化疗剂是多西他赛、紫杉醇、甲磺酸伊马替尼、吉西他滨、顺铂、卡铂、5-氟尿嘧啶、培美曲塞、甲氨蝶呤、阿霉素、来那度胺、地塞米松、或单甲基奥莉丝汀。

34. 权利要求33的用途,其中所述化疗剂是多西他赛、吉西他滨、卡铂,或阿霉素。

35. 权利要求32的用途,其中所述化疗剂是MG-132、PSI、felltamide B、硼替佐米、CEP-18770、MLN-2238、MLN-9708、环氧酶素、卡非佐米(PR-171)、NC-005、YU-101、LU-005、YU-102、NC-001、LU-001、NC-022、PR-957 (LMP7)、CPSI ( $\beta$ 5)、LMP2-sp-ek、BODIPY-NC-001、叠氮基-NC-002、ONX-0912、omuralide、PS-519、marizomib、belactosin A、 $^{125}$ I-NIP-L<sub>3</sub>VS、NC-005-VS,或MV151。

36. 权利要求1-15中任一项的FAP-活化的蛋白酶体抑制剂用于制备降低哺乳动物中肌肉量损失速率的药物的用途。

37. 权利要求1-15中任一项的FAP-活化的蛋白酶体抑制剂用于制备降低哺乳动物中的NF- $\kappa$ B活性的药物的用途。

38. 权利要求1-15中任一项的FAP-活化的蛋白酶体抑制剂用于制备降低哺乳动物中的蛋白酶体依赖性细胞内蛋白分解速率的药物的用途。

39. 权利要求1-15中任一项的FAP-活化的蛋白酶体抑制剂用于制备降低哺乳动物中的p53蛋白降解速率的药物的用途。

40. 权利要求1-15中任一项的FAP-活化的蛋白酶体抑制剂用于制备抑制哺乳动物中的细胞周期蛋白降解的药物的用途。

41. 权利要求1-15中任一项的FAP-活化的蛋白酶体抑制剂用于制备抑制哺乳动物中的抗原呈递的药物的用途。

42. 权利要求1-15中任一项的FAP-活化的蛋白酶体抑制剂用于制备抑制哺乳动物中的可诱导的NF- $\kappa$ B依赖性细胞粘着的药物的用途。

43. 权利要求1-15中任一项的FAP-活化的蛋白酶体抑制剂用于制备抑制哺乳动物中的HIV感染的药物的用途。

44. 权利要求1-15中任一项的FAP-活化的蛋白酶体抑制剂在制造药物中的用途,所述药物用于治疗其中抑制蛋白酶体活性提供治疗益处的病变。

45. 包装的药物,其包含配制在药学上可接受的赋形剂中的权利要求1-15中任一项的FAP-活化的蛋白酶体抑制剂,连同描述推荐剂量和/或制剂向患者施用的成文和/或图示的说明书。

## 用于治疗实体瘤的FAP-活化的蛋白酶体抑制剂

[0001] 本申请是申请日为2012年8月30日,申请号为201280052940.4,发明名称为“用于治疗实体瘤的FAP-活化的蛋白酶体抑制剂”的发明专利申请的分案申请。本申请要求在2011年8月30日提交的美国临时专利申请序号61/528,824的优先权,其整体通过引用并入。

### 技术领域

[0002] 本发明涉及癌症治疗的领域,具体涉及用于治疗实体瘤的FAP-活化的蛋白酶体抑制剂。

### 背景技术

[0003] 美国每四名死者中有一名死于癌症,是仅次于心脏病的第二致死原因。肺癌是癌症中的最主要的致死原因,并且大部分患者在诊断时具有局部晚期的或转移的非小细胞肺癌(NSCLC)。在女性中,乳腺癌是最流行的癌症,并且是癌症相关死亡的第二主导原因。

[0004] 用于实体瘤治疗的目前标准护理具有的功效有限。例如,在NSCLC中,尽管通过向一线铂基化疗添加靶向试剂实现了改进,但生存仍然不佳。在转移性乳腺癌中,曲妥珠单抗的功效受到肿瘤抗性的局限。当NSCLC进行到一线治疗之后,批准的二线试剂仅实现适度的存活率。

[0005] 显然需要更有效的抗癌剂。很多批准的癌症药物,例如硼替佐米(Velcade®),是杀死正常细胞和肿瘤细胞的细胞毒性剂。这些药物的治疗益处依赖于肿瘤细胞比正常细胞更敏感,从而允许在相对安全的药物剂量实现临床反应;然而,对正常组织的破坏是无法避免的并且常常限制治疗。硼替佐米在治疗多发性骨髓瘤(MM)中成功之后,蛋白酶体复合物的抑制成为有前途的新化疗途径。由于其在治疗多发性骨髓瘤中的显著功效,硼替佐米已在实体瘤中进行测试;遗憾的是,它一般无法产生临床反应。

[0006] 硼替佐米抑制被称作蛋白酶体的细胞内蛋白复合物。蛋白酶体是有吸引力的药物靶标,这是因为它参与细胞周期和凋亡的调控,这些程序在癌症细胞中失调时,导致肿瘤进展、药物抗性和改变的免疫监视。通过抑制选择性降解参与细胞内稳态的蛋白的20S蛋白酶体,硼替佐米稳定Bcl-2家族的促凋亡成员,抑制导致NF- $\kappa$ B活化的两个主要途径,并导致错误折叠蛋白的细胞内累积;所有这些作用均有助于杀死肿瘤细胞。NF- $\kappa$ B活化的阻断增加凋亡,减少血管生成细胞因子的产生,抑制癌细胞对基质的粘附,并且缓解免疫抑制。

[0007] 然而,硼替佐米用于治疗癌症的更广泛的应用看起来受到系统毒性的抑制。硼替佐米分布到健康组织,导致腹泻、疲乏、体液潴留、低血钾症、低血钠症、低血压、不适、恶心,姿位性低血压(orthostasis)、硼替佐米引起的周围神经病变(BIPN)和血液学毒性,其中血小板减少症是最严重的。在硼替佐米的推荐剂量下,有用于治疗MM的治疗窗口,其通过对MM细胞的独特选择性提供,以抑制核因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)并诱导未折叠的蛋白反应。然而,实体瘤(例如,前列腺癌、胰腺癌和乳腺癌)看起来敏感性较低,并且通过提高硼替佐米剂量而实现功效的尝试已受到剂量-限制性毒性(DLTs)的阻挠。硼替佐米对于肿瘤的不良定位看起来导致其在实体瘤中的低治疗指数(TI)。在带有PC3前列腺癌的小鼠中,暴露于<sup>14</sup>C-硼替佐

米的健康器官是肿瘤暴露的9倍以上,并且在健康组织中的蛋白酶体抑制看起来比在实体瘤中更多。因此,有必要设计选择性靶向肿瘤细胞中的蛋白酶体的化合物,以克服由于在健康组织中的蛋白酶体抑制而导致的DLT的障碍。

[0008] 过去数十年的大量努力集中于针对具体患者调整的疗法,即所谓个体化药物。由于遗传测序技术中的进展,现在可以并且日益成本有效地进行癌组织的基因分型,以鉴定癌症的个体遗传概况,并由此鉴定可导致肿瘤生长的特异突变或功能失常的蛋白。随后,可使用阻断其功能并由此杀死癌症的试剂靶向这样的“驱动”蛋白。尽管概念上是正确的,但这种方法受到预想不到的遗传多样性和癌症的染色体组不稳定性的阻碍。癌症的显著不同的基因型可存在于单个肿瘤中,导致靶向治疗对很多患者无效。即便肿瘤中的大多数癌细胞共享足够类似的遗传组成以使单靶向治疗有效时,带有抗性突变的少数癌细胞可在治疗后幸存,导致在初始改进后的复发。

[0009] 需要使用其作用不依赖于癌症的遗传组成的细胞毒性试剂的选择性靶向肿瘤及其微环境的疗法。然而,这样的疗法仍难于定义。

## 发明内容

[0010] 本发明的一个方面涉及由A-B表示的蛋白酶体抑制剂的FAP-活化的前药,或其药学上可接受的盐,其中:

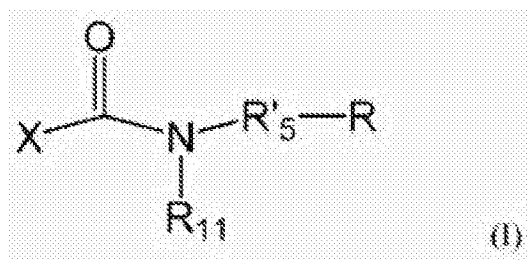
A表示成纤维细胞活化蛋白(FAP)的底物;

B表示蛋白酶体抑制剂部分,其在作为FAP切割的产物以游离形式从所述前药释放时,以500 nM或更小的 $K_i$ 抑制蛋白酶体的蛋白水解活性;

A和B通过键共价连接,所述键通过FAP酶促切割而释放出所述游离形式的B;和

所述前药具有比对于脯氨酰基内肽酶EC 3.4.21.26 (PREP)高至少10倍的对于连接A和B的键的FAP切割的 $k_{cat}/K_m$ 。

[0011] 本发明的另一方面涉及由式I表示的FAP-活化的蛋白酶体抑制剂:



或其药学上可接受的盐,

其中:

$\text{X}-\text{C}(=\text{O})\text{NR}_{11}-\text{R}'_5-\text{R}$ 表示FAP底物序列,X是N-酰基肽基基团, $-\text{NR}_{11}-\text{R}'_5-\text{R}$ 是结合FAP的 $\text{P}'_1$ 特异性亚位点的氨基酸残基或其类似物,并且所述FAP底物序列通过FAP切割而释放 $\text{NHR}_{11}-\text{R}'_5-\text{R}$ ;和

$\text{NHR}_{11}-\text{R}'_5-\text{R}$ 是蛋白酶体抑制剂。

[0012] 本发明的另一方面涉及由下式表示的化合物或其药学可接受的盐:

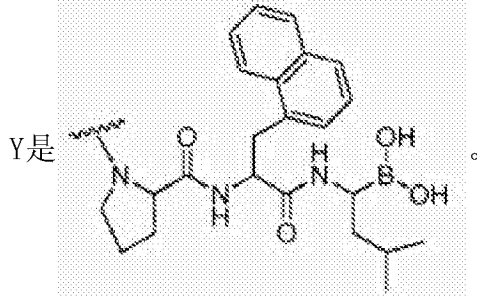


其中:

R是酰基基团；

Xaa<sub>1</sub>选自Ala、Cys、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp、和Tyr；

Xaa<sub>2</sub>选自Ala、Cys、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp、和Tyr；和



[0013] 本发明的另一方面涉及药物组合物,和使用所述化合物和组合物,例如,治疗癌症或其他细胞增殖性疾病的方法。

### 附图说明

[0014] 图1显示了ARI-2727D和ARI-3996的合成。使用了以下试剂：(a) HATU/DMF/DIPEA, 95%；(b) 4 M HCl/二噁烷, 100%；(c) HATU/DMF/DIPEA, 90%；(d) 4M HCl/二噁烷, 100%；(e) tBu-Suc-Ser(tBu)-OH, HATU/DMF/DIPEA, 90%；(f) Pd(OH)<sub>2</sub>-C/H<sub>2</sub>/甲醇, 90%；(g) 2727D, HATU/DMF/DIPEA, 85%；(h) TFA/DCM, 90%；(i) PhB(OH)<sub>2</sub>, 戊烷-水-乙腈, 70%。

[0015] 图2显示了作为ARI-3996浓度的函数的,通过FAP和PREP体外切割ARI-3996的速率。使用LCMS,通过“弹头”ARI-2727释放测定监测切割。

[0016] 图3显示了通过FAP在体外切割ARI-3144 ((N-喹啉-4-羰基)-D-Ala-Pro-AMC), 而通过DPP IV、DPP 8、DPP 9或PREP没有切割。通过测量AMC离去基团的荧光(激发355 nm;发射460 nm)监测切割。

[0017] 图4显示了在人和小鼠中对于胰腺肿瘤组织和血浆的FAP蛋白水解活性的比例。使用ARI-3144荧光底物,在肿瘤匀浆和血浆中离体测定FAP活性。

[0018] 图5显示了在FAP转染的HEK293细胞和HPAF-11细胞的异种移植物中的FAP蛋白水解活性。FAP活性使用ARI-3144测定进行测定。

[0019] 图6显示了在带有移植的(~200 mm<sup>3</sup>) HPAF-II肿瘤异种移植物的SCID小鼠中, ARI-3996和硼替佐米(Velcade®)在各自MTDs的抗癌活性的比较。ARI-3996和硼替佐米每周施用2次(第1天(D1)/D4方案),并且还在第1天至第5天连续5天给予ARI-3996(QDx5方案)。星号表示与对照相比,在ARI-3996处理的小鼠中的肿瘤大小显著( $p < 0.05$ )减小。

[0020] 图7显示在静脉内注射后1小时, [<sup>14</sup>C]硼替佐米向组织和肿瘤的分布。图形和数据取自于Adams等人(71)。数据为平均dpm/100 mg组织和平均dpm/100 μL血液。

[0021] 图8显示ARI-3996和弹头2727D在带有HPAF-II皮下肿瘤的SCID小鼠中的组织分布。荷瘤小鼠皮下注射50 mg/kg ARI-3996。在施用ARI-3996后1小时(A, B)、2小时(C, D)和3小时( $n = 2$ )收集组织,并通过LCMS测定组织提取物中的药物浓度。

[0022] 图9显示通过腹腔内(IP)和皮下(SQ)途径在第1日和第4日以50 mg/kg每日两次

(b.i.d)施用给带有HPAF-II异种移植物的SCID小鼠的ARI-3996的抗肿瘤作用。进行单因素ANOVA和Dunnnett事后测试,用于测试物与赋形剂的比较( $P < 0.0001$ )。

[0023] 图10显示了带有或没有6 mg/kg吉西他滨的50 mg/kg ARI-3996的抗肿瘤活性。每周施用两次:ARI-3996每日两次,皮下施用,和吉西他滨每日一次,腹腔内施用。平均值  $\pm$  SEM。两种化合物在一起施用时显示强的协同作用。

[0024] 图11显示了诊断性荧光底物ARI-3144的草图。FAP识别位点特异性结合FAP,并且被该酶切割以释放出荧光香豆素部分。

[0025] 图12显示在与FAP结合后的ARI-3144的草图。FAP识别位点被切割以释放出荧光香豆素部分。

[0026] 图13显示ARI-3144是FAP的极好的底物。

[0027] 图14显示通过PREP、DPPIV、DPP8、DPP9,和DPPII切割ARI-3144的速率的荧光测量。ARI-3144具有对FAP的高度选择性。

[0028] 图15显示前药ARI-3996的草图,其包含化学结合至ARI-2727D的FAP识别位点,ARI-2727D是在结合至FAP识别位点(上图)时保持无活性的蛋白酶体抑制剂;和在FAP切割后发生事项的草图;活性“弹头”ARI-2727D从FAP识别位点释放(下图)。

[0029] 图16显示了在癌组织和正常小鼠组织中的FAP活性。肿瘤中和肿瘤周围的高得多的FAP活性表明FAP在这些组织中上调。

[0030] 图17显示在人肿瘤细胞系和HPAF-II小鼠肿瘤异种移植物中的FAP活性。FAP活性在人肿瘤细胞系中通常高于在小鼠肿瘤异种移植物中。由于在样品收集和处理期间的FAP某些失活,FAP活性很可能比显示的甚至更高。

[0031] 图18显示了在多种组织中的FAP活性的图示。对于FAP含量,FAP转染的HEK肿瘤异种移植物与人胰腺肿瘤组织匹配。

[0032] 图19显示使用赋形剂对照或使用ARI-3996处理的小鼠的平均肿瘤体积。ARI-3996在免疫活性小鼠中诱导肿瘤退缩。

[0033] 图20显示ARI-3996在FAP转染的HEK肿瘤异种移植物中的抗癌活性。

[0034] 图21显示FAP敲除小鼠血浆没有活化ARI-3996以释放ARI-2727。

[0035] 图22显示Velcade<sup>®</sup>对比ARI-3996在小鼠中的组织分布。

[0036] 图23显示Velcade<sup>®</sup>对比ARI-2727D在小鼠中的组织分布。ARI-3996在肿瘤中和肿瘤周围被切割成ARI-2727D,因此促进ARI-2727D在肿瘤中的累积。

[0037] 图24显示在直接施用对比作为前药形式ARI-3996施用后1小时的ARI-2727D组织分布(上图);和ARI-2727D在肿瘤对比在肝中累积的平均比例。

[0038] 图25显示在多发性骨髓瘤、正常细胞和实体瘤中Velcade<sup>®</sup>对比ARI-2727D的细胞毒性。

[0039] 图26显示在多发性骨髓瘤、正常细胞和实体瘤中Velcade<sup>®</sup>对比ARI-2727D对比ARI-3996的细胞毒性。

[0040] 图27显示在多种人癌症细胞系中的FAP活性。

[0041] 图28显示蛋白酶体抑制剂Velcade<sup>®</sup>和ARI-3996在带有U266肿瘤小鼠中的抗癌作用。

[0042] 图29显示多种已知蛋白酶体抑制剂的化学结构和名称。

## 具体实施方式

[0043] 本发明涉及设计为选择性靶向实体瘤,并具有降低的毒性谱的化合物。硼替佐米 (Velcade®) 是用于多发性骨髓瘤的有效治疗剂,但其作用机理导致周围神经病和血小板损失的剂量限制性毒性 (DLTs),这抑制了普通实体瘤的治疗。本发明的化合物设计为在健康器官中保持无活性,并且通过被称作成纤维细胞活化蛋白 (FAP) 的肿瘤相关的酶活化,在肿瘤中释放细胞毒性的硼替佐米-样弹头,从而降低抑制使用硼替佐米的实体瘤安全治疗的毒性副作用。

[0044] 本发明化合物的选择性靶向和降低的毒性允许治疗实体瘤而不依赖于它们的遗传组成。此外,所述化合物在肿瘤附近区域的选择性活化导致在肿瘤中细胞毒性试剂的高浓度,但在身体其他部分中的浓度低。高局部浓度以低于此前可能的药物剂量杀死肿瘤,因为缺少选择性递送能力的药物在全身循环,导致系统性毒性,通常在用于治疗癌症的次优的剂量。

[0045] 本发明还允许抵消肿瘤的免疫抑制性。因为实体瘤通常被癌性基质细胞环绕,保护它们免于受到患者免疫系统的影响。这种免疫抑制能够通过杀死基质细胞而除去,但常规的化疗,包括Velcade®,不能这样做。本发明能够杀死基质细胞,因为基质细胞过表达FAP并且因此活化本发明的化合物,以释放弹头。因此,本发明可具有多种作用机理,例如直接杀死肿瘤,或在杀死抑制性基质组织后重新活化患者的免疫反应,导致通过天然免疫反应杀死肿瘤。

[0046] 本发明的FAP寻址部分 (address moiety),或FAP结合部分可化学连接到多种细胞毒性弹头。因此,具有确认靶标和作用模式的任何蛋白酶体抑制剂均可获益于本发明要求的用途。将具有抗癌活性的确认的蛋白酶体抑制剂缀合 (化学连接) 到FAP寻址部分赋予了选择性递送、提高的效力,以及降低的脱靶毒性。

[0047] FAP寻址部分与已知的蛋白酶体抑制剂的缀合类似于但在概念上不同于前药,因为FAP寻址部分设计为结合并且选择性地被FAP切割,超出体内存在的其他蛋白酶,特别是DPPII、DPP8、DPP9、DPPIV,和PREP。这种对酶亚型的特异性是递送释放的细胞毒性试剂至肿瘤的期望作用所必需的。

[0048] 具有抗癌活性的很多蛋白酶体抑制剂是本领域中已知的,并且可相应地分成共价抑制剂和非共价抑制剂,并且共价抑制剂进一步分成醛类、硼酸类,环氧酮类、 $\beta$ -内酯类、乙烯基砜类,和 $\alpha,\beta$ -不饱和羰基化合物,等。醛类中的实例包括MG-132、PSI和fellutamide B。硼酸类中的实例包括硼替佐米 (Velcade®)、CEP-18770、MLN2238,和MLN9708。环氧酮类中的实例包括环氧酶素 (epoxomicin)、卡非佐米 (carfilzomib; PR-171)、NC-005、YU-101、LU-005、YU-102、NC-001、LU-001、NC-022、PR-957 (LMP7)、CPSI ( $\beta$ 5)、LMP2-sp-ek、BODIPY-NC-001、叠氨基-NC-002,和ONX 0912 (oprozomib)。 $\beta$ -内酯类中的实例包括omuralide、PS-519、marizomib,和belactosin A。乙烯基砜类中的实例包括<sup>125</sup>I-NIP-L<sub>3</sub>VS、NC-005-VS,和MV151。这些抑制剂等的讨论和确认可见于,例如,Kisselev等人,“Proteasome Inhibitors: An Expanding Army Attacking a Unique Target,” *Chemistry and Biology* 19, January 27, 2012, 99-115 (通过引用并入)中。

[0049] 预期这些蛋白酶体抑制剂中的任一种与如本发明中所述的FAP寻址部分的化学缀

合可选择性地递送细胞毒性试剂到实体瘤和周围的基质细胞。因为FAP寻址部分是FAP的选择性底物,所以连接到所述FAP寻址部分的细胞毒性试剂本体对于选择性递送并不重要。FAP将切割连接寻址部分至弹头的化学键;这样的化学键可以是,例如酯键或酰胺键,等。

[0050] 本发明的一个方面涉及由A-B表示的蛋白酶体抑制剂的FAP-活化的前药,或其药学上可接受的盐,其中:

A表示成纤维细胞活化蛋白(FAP)的底物;

B表示蛋白酶体抑制剂部分,其在作为FAP切割的产物以游离形式从所述前药释放时,以500 nM或更小的 $K_i$ 抑制蛋白酶体的蛋白水解活性;

A和B通过键共价连接,所述键通过FAP酶促切割而释放出所述游离形式的B;和

所述前药具有比对于脯氨酰基内肽酶EC 3.4.21.26 (PREP)高至少10倍的对于连接A和B的键的FAP切割的 $k_{cat}/K_m$ 。

[0051] 在某些实施方式中,所述蛋白酶体抑制剂部分的游离形式具有相对于所述前药低至少10倍的对于抑制体外细胞的蛋白酶体活性的 $IC_{50}$ 。

[0052] 在某些实施方式中,其中所述蛋白酶体抑制剂部分的游离形式具有相对于所述前药低至少10倍的对于抑制蛋白酶体活性的 $K_i$ 。

[0053] 在某些实施方式中,其中所述蛋白酶体抑制剂部分的游离形式具有比所述前药高至少5倍的进入人细胞的细胞渗透性。

[0054] 在某些实施方式中,所述前药具有比所述蛋白酶体抑制剂部分的所述游离形式高至少5倍的体内治疗指数。

[0055] 在某些实施方式中,所述前药具有至少10的体内治疗指数。

[0056] 在某些实施方式中,所述前药具有比[(1R)-3-甲基-1-((2S)-3-苯基-2-(吡嗪-2-基羰基)氨基)丙酰基)氨基]丁基]硼酸高至少10倍的最大耐受剂量。

[0057] 在某些实施方式中,所述蛋白酶体抑制剂部分的所述游离形式是二肽基部分,其在作为FAP切割的开链产物从所述前药释放时,经历随时间的依赖于环化作用的失活。

[0058] 在某些实施方式中,所述开链产物经历依赖于环化作用的失活,且 $T_{1/2}$ 为5小时或更短。

[0059] 在某些实施方式中,A表示是FAP底物的肽或肽类似物,其中所述肽或肽类似物包括N-末端封端基团。

[0060] 在某些实施方式中,所述肽或肽类似物的长度为2-10个氨基酸残基。

[0061] 在某些实施方式中,所述肽或肽类似物在C-末端连接到B。

[0062] 在某些实施方式中,所述肽或肽类似物的至少一个氨基酸残基是非天然发生的氨基酸类似物。

[0063] 在某些实施方式中,所述N-末端封端基团是在生理pH下,相对于所述蛋白酶体抑制剂的所述游离形式,降低所述前药的细胞渗透性的部分。

[0064] 在某些实施方式中,所述N-末端封端基团包括在生理pH下离子化的一个或多个官能团。

[0065] 在其他实施方式中,所述N-末端封端基团是由在生理pH下离子化的一个或多个官能团取代的(低级烷基)-C(=O)-。

[0066] 在某些其他实施方式中,所述N-末端封端基团由式-C(=O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-10</sub>-C(=O)-OH表

示。

[0067] 在某些实施方式中,所述N-末端封端基团包括一个或多个羧基基团。在另一个实施方式中,所述N-末端封端基团是琥珀酰基。

[0068] 在某些实施方式中,B是共价或非共价的蛋白酶体抑制剂。

[0069] 在某些其他实施方式中,B是共价蛋白酶体抑制剂。

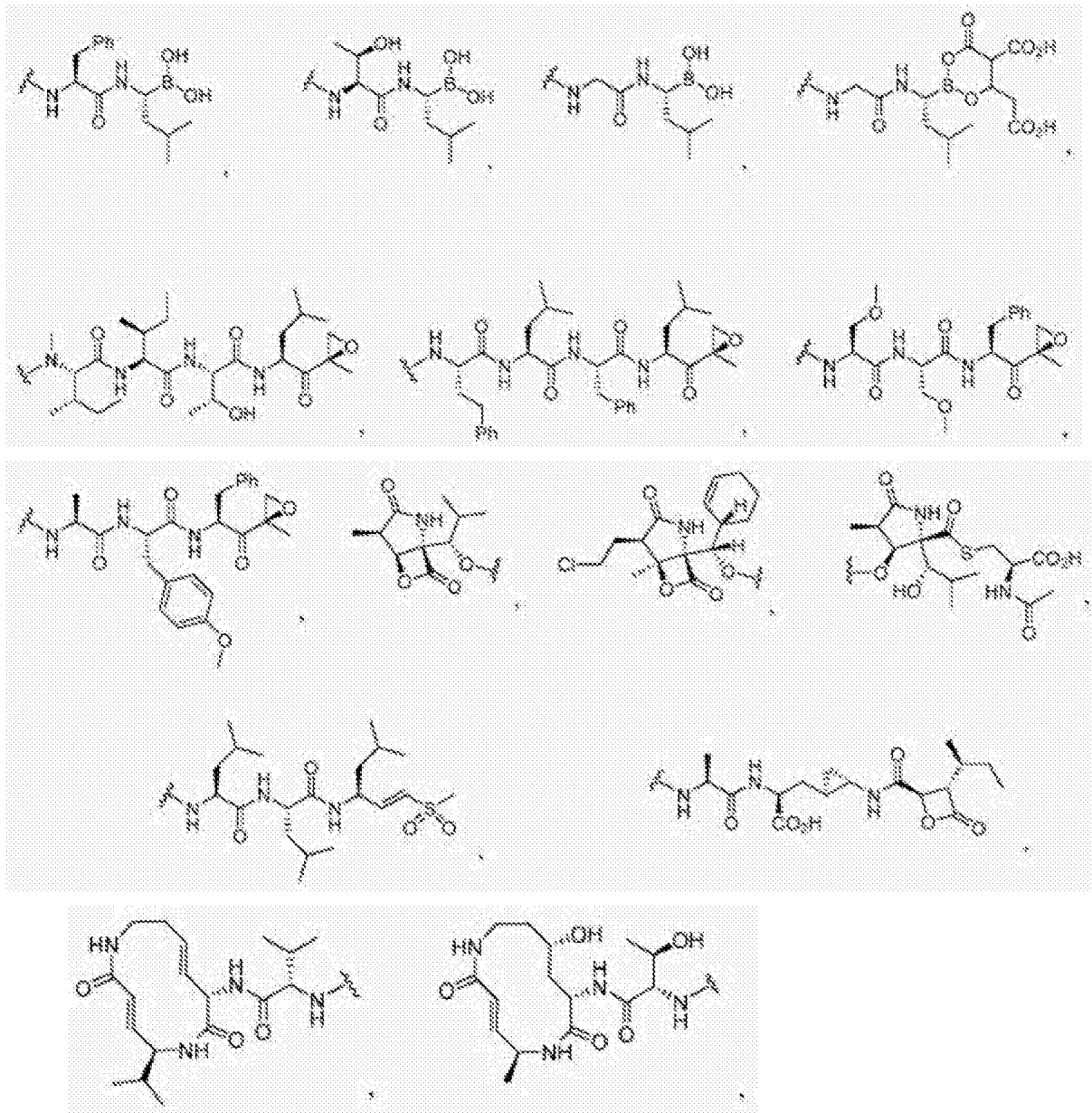
[0070] 在某些实施方式中,B是在其羧基末端具有亲电子官能团的二肽基部分,所述亲电子官能团能够与蛋白酶体的活性位点中的氨基酸残基形成共价加合物。

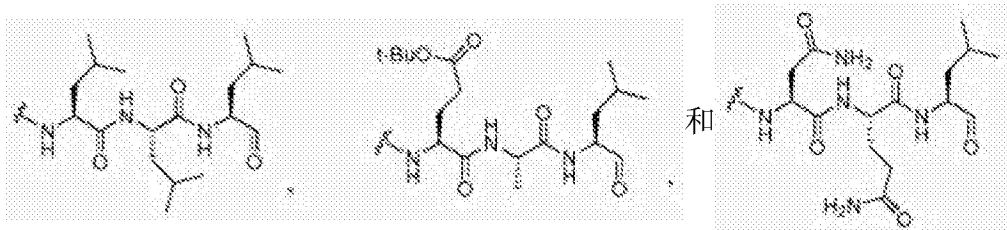
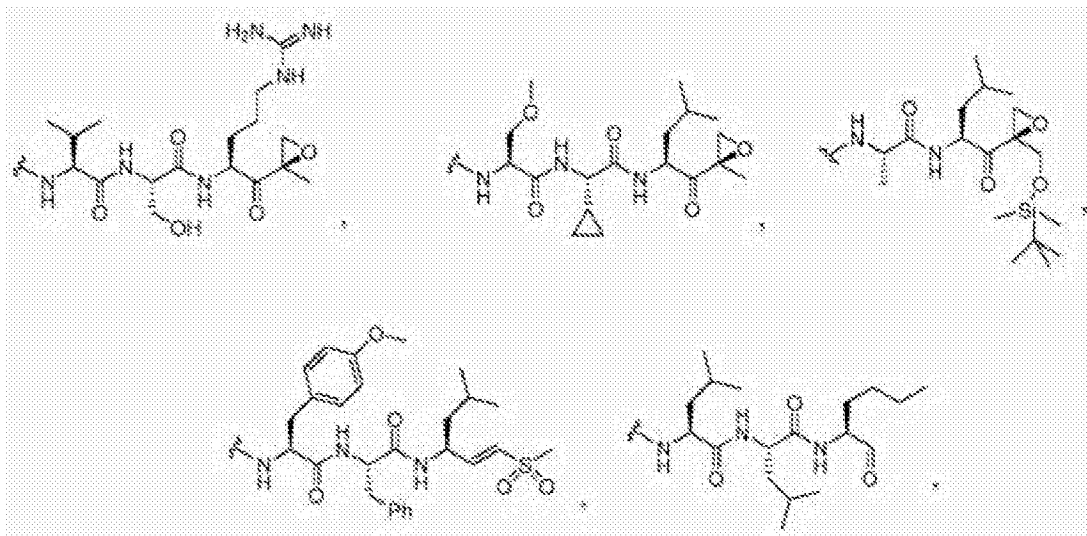
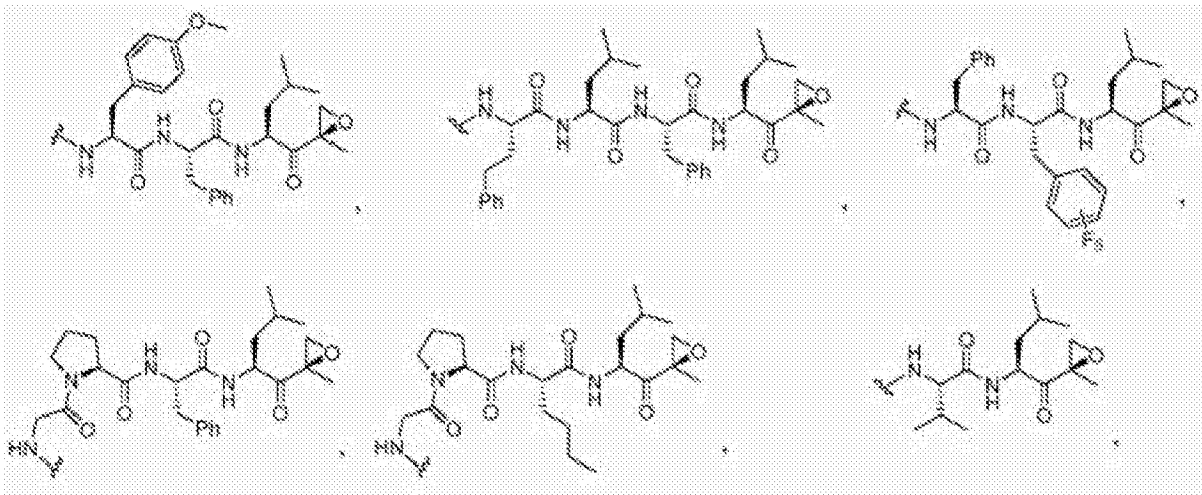
[0071] 在某些实施方式中,所述亲电子官能团是醛、硼酸、硼酸酯、环氧酮、 $\beta$ -内酯、乙烯基砜,或 $\alpha,\beta$ -不饱和羰基。

[0072] 在某些实施方式中,所述亲电子官能团是醛、硼酸,或环氧酮。

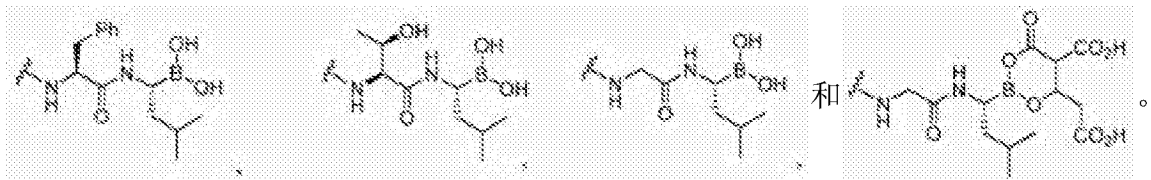
[0073] 在另一个实施方式中,所述亲电子官能团是环氧酮。

[0074] 在某些实施方式中,B选自:

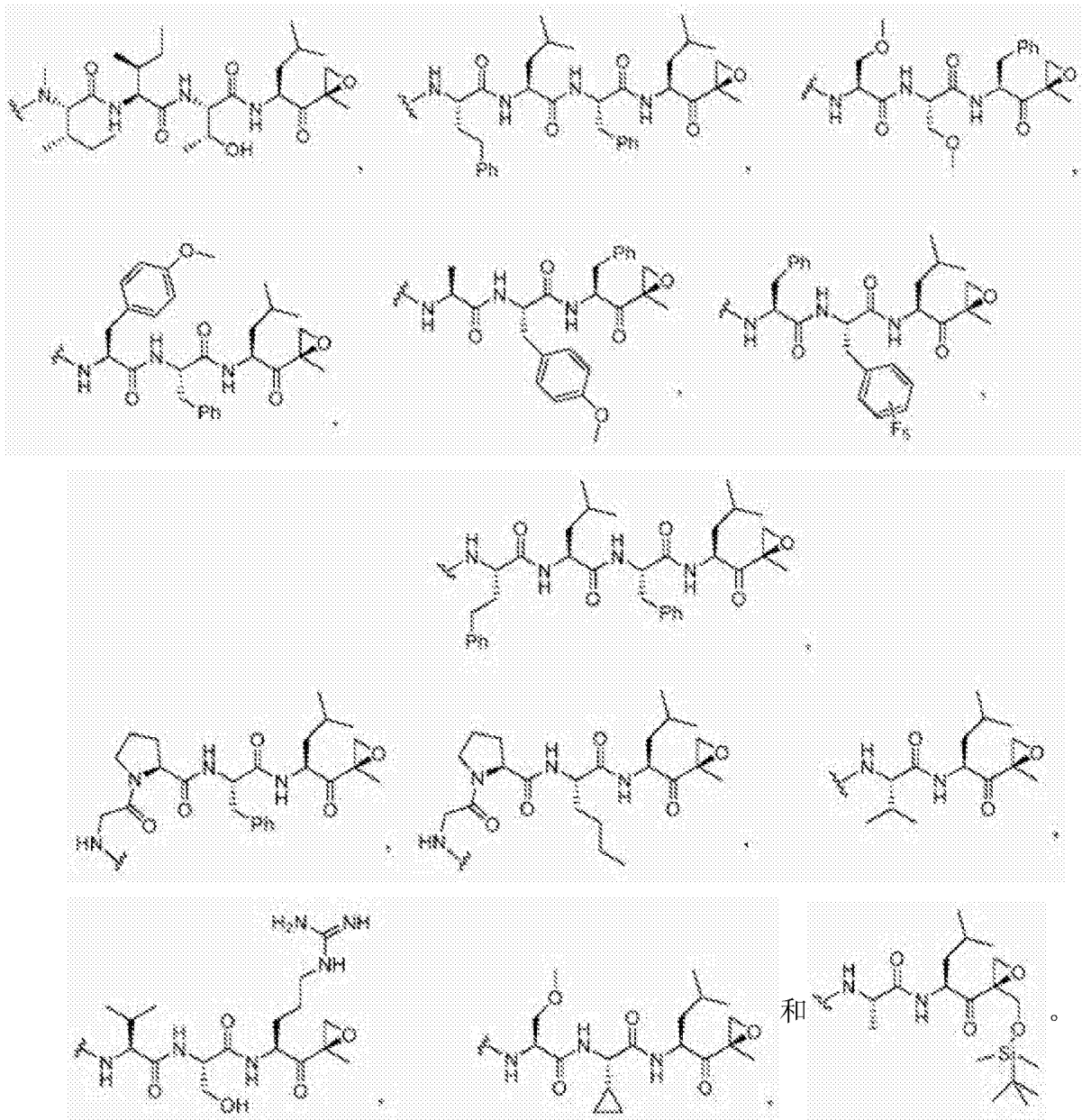




[0075] 在某些实施方式中,B选自:



[0076] 在某些其他实施方式中,B选自:



[0077] 本发明的另一个方面涉及上述化合物,其中A进一步包含通过化学键连接到B的自我消除的接头。

[0078] 在某些实施方式中,所述自我消除的接头是对氨基苄氧羰基(PABC),或2,4-双(羟甲基)苯胺。

[0079] 本发明的另一方面涉及由下式表示的化合物或其药学可接受的盐:

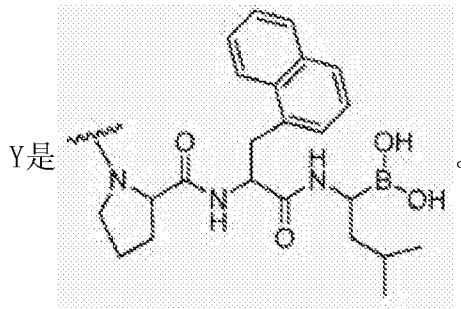


其中:

R是酰基基团;

Xaa<sub>1</sub>选自Ala、Cys、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp,和Tyr;

Xaa<sub>2</sub>选自Ala、Cys、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp,和Tyr;和



[0080] 在某些实施方式中,所述化合物进一步包含与Xaa<sub>2</sub>的羧基末端成化学键且与Y成化学键的自我消除的接头。

[0081] 在某些实施方式中,所述自我消除的接头是对氨基苄氧羰基(PABC),或2,4-双(羟甲基)苯胺。

[0082] 在某些实施方式中,R选自甲酰基、乙酰基、苯甲酰基、三氟乙酰基、琥珀酰基,和甲氧琥珀酰基。

[0083] 在某些其他实施方式中,R是琥珀酰基或甲氧琥珀酰基。

[0084] 在另一个实施方式中,R是琥珀酰基。

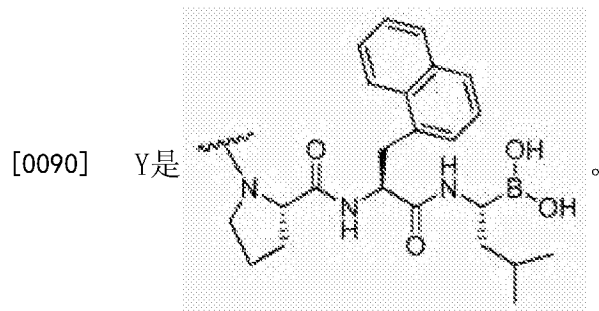
[0085] 在某些实施方式中,Xaa<sub>1</sub>是Cys、Met、Ser,或Thr。

[0086] 在某些其他实施方式中,Xaa<sub>1</sub>是Ser。

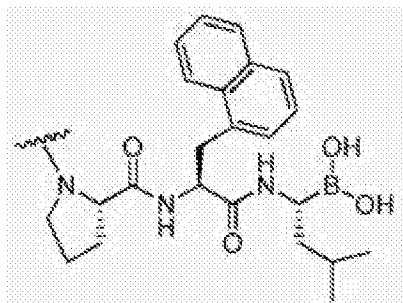
[0087] 在某些实施方式中,Xaa<sub>2</sub>是Ala、Gly、Ile、Leu,或Val。

[0088] 在某些实施方式中,Xaa<sub>2</sub>是Ala。

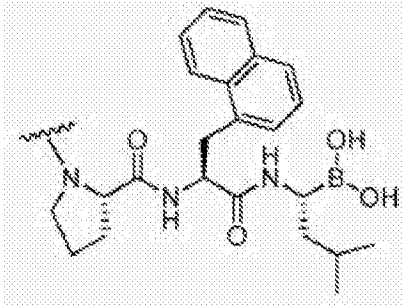
[0089] 在某些其他实施方式中,Xaa<sub>2</sub>是(D)-Ala。



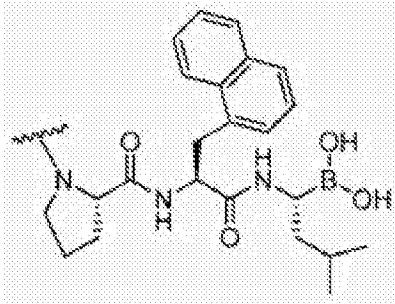
[0091] 在某些实施方式中,R选自甲酰基、乙酰基、苯甲酰基、三氟乙酰基、琥珀酰基,和甲氧琥珀酰基;Xaa<sub>1</sub>是Cys、Met、Ser,或Thr;Xaa<sub>2</sub>是Ala、Gly、Ile、Leu,或Val;和Y是



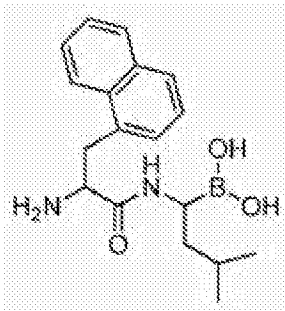
[0092] 在某些实施方式中,R是琥珀酰基或甲氧琥珀酰基;Xaa<sub>1</sub>是Ser;Xaa<sub>2</sub>是Ala;和Y是



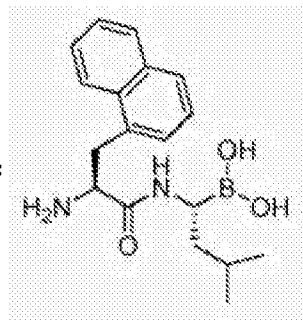
[0093] 在某些实施方式中, R是琥珀酰基; Xaa<sub>1</sub>是Ser; Xaa<sub>2</sub>是(D)-Ala; 和Y是



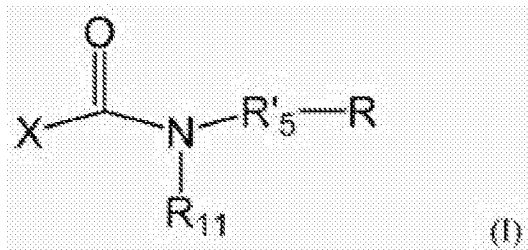
[0094] 在某些实施方式中, 本发明涉及由下式表示的化合物或其药学上可接受的盐:



[0095] 在某些实施方式中, 所述化合物表示为:



[0096] 本发明的另一方面涉及由式I表示的FAP-活化的蛋白酶体抑制剂:



或其药学上可接受的盐,

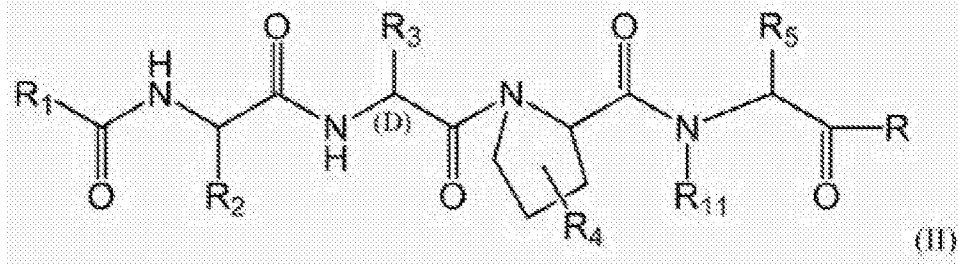
其中:

X-C(=O)NR<sub>11</sub>-R'<sub>5</sub>-表示FAP底物序列, X是N-酰基肽基基团, -NR<sub>11</sub>-R'<sub>5</sub>是结合FAP的P'<sub>1</sub>特

异性亚位点的氨基酸残基或其类似物,并且所述FAP底物序列通过FAP切割而释放NHR<sub>11</sub>-R'<sub>5</sub>-R;R<sub>11</sub>表示H或低级烷基;和

NHR<sub>11</sub>-R'<sub>5</sub>-R是蛋白酶体抑制剂。

[0097] 在某些实施方式中,本发明涉及上述FAP-活化的蛋白酶体抑制剂,由式II表示:



其中:

R<sub>1</sub>- (C=O)-表示酰基N-末端封端基团;

R<sub>2</sub>表示H、低级烷基,或单-或双-羟基取代的低级烷基;

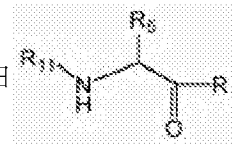
R<sub>3</sub>表示H、卤素,或低级烷基;

R<sub>4</sub>不存在或表示低级烷基、-OH、-NH<sub>2</sub>,或卤素;

R<sub>5</sub>表示大的疏水氨基酸侧链;

R<sub>11</sub>表示H或低级烷基;和

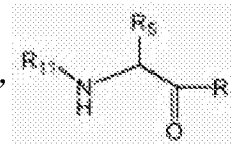
所述FAP活化的蛋白酶体抑制剂通过FAP切割而释放出



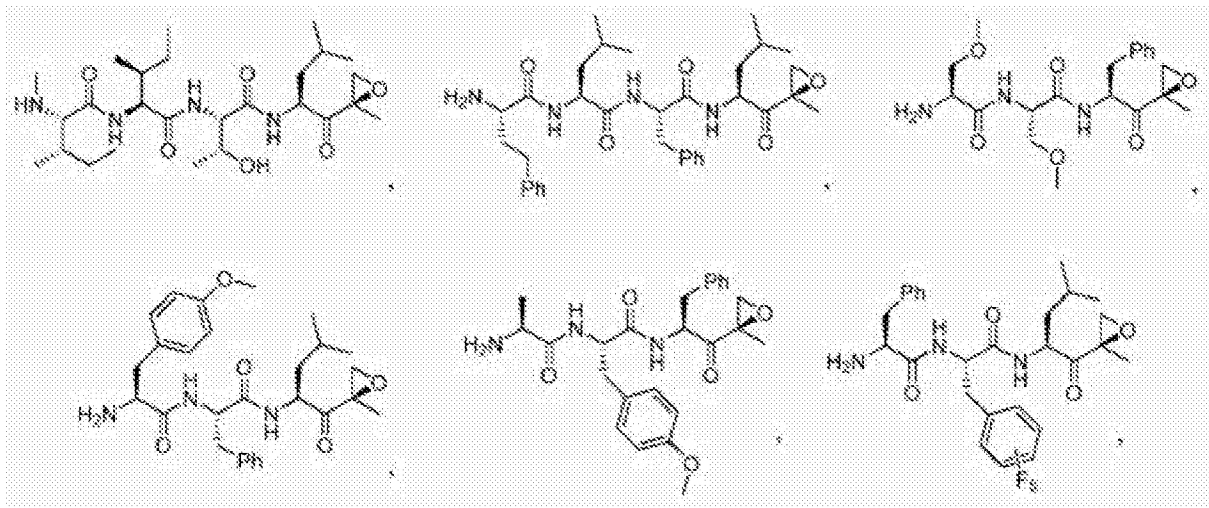
表示的蛋白酶

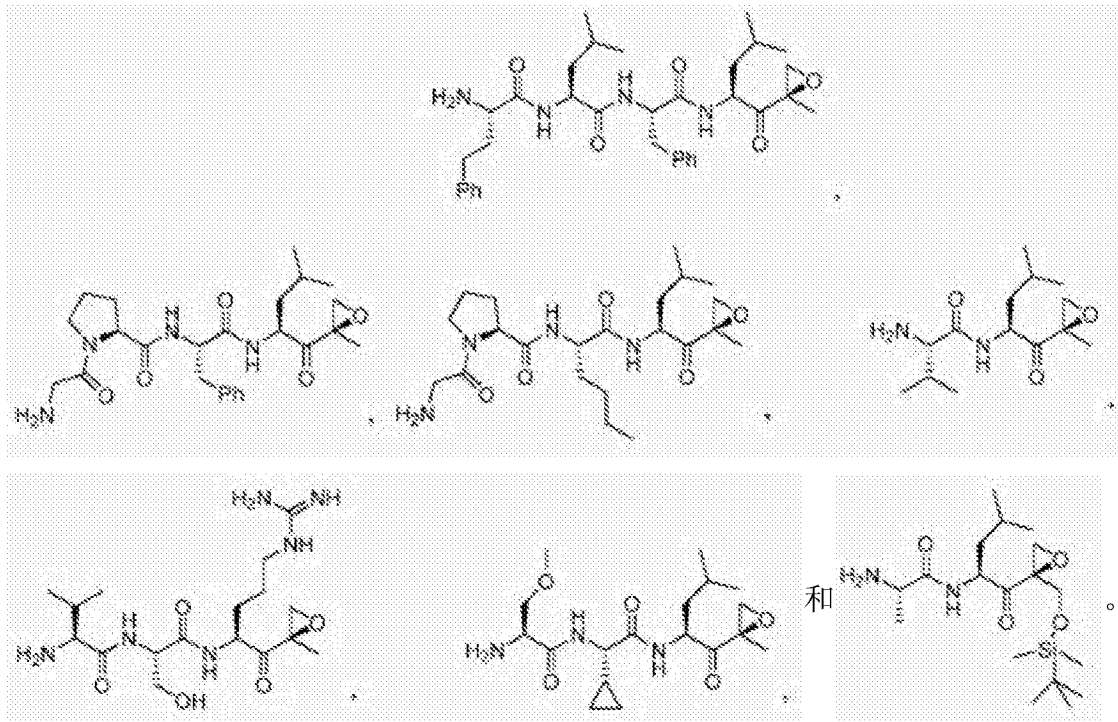
体抑制剂。

[0098] 在所述FAP活化的蛋白酶体抑制剂的某些实施方式中,

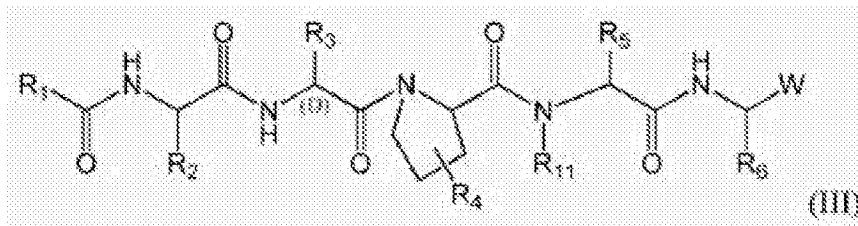


选自:





[0099] 在某些实施方式中,所述FAP活化的蛋白酶抑制剂由式III表示:



其中:

- R<sub>1</sub>- (C=O)-表示酰基N-末端封端基团;
- R<sub>2</sub>表示H、低级烷基,或单-或双-羟基取代的低级烷基;
- R<sub>3</sub>表示H、卤素,或低级烷基;
- R<sub>4</sub>不存在或表示低级烷基、-OH、-NH<sub>2</sub>,或卤素;
- R<sub>5</sub>表示大的疏水氨基酸侧链;
- R<sub>6</sub>表示烷基、环烷基、芳基、杂环,或-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-R<sub>7</sub>;
- R<sub>7</sub>表示烷基、芳烷基、环烷基、烷氧基、烷基硫基、-OH,或-SH;
- R<sub>11</sub>表示H或低级烷基;

W表示-CN、环氧酮、-CH=NR<sub>8</sub>、、、、、、或



R<sub>8</sub>表示H、烷基、烯基、炔基、-C(X<sub>1</sub>)(X<sub>2</sub>)X<sub>3</sub>、-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-R<sub>9</sub>、-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-OH、-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-O-烷基、-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-O-烯基、-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-O-炔基、-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-R<sub>9</sub>、-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-SH、-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-S-烷基、-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-S-烯基、-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-S-炔基、-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-S-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-R<sub>9</sub>、-C(=O)C(=O)NH<sub>2</sub>、-C(=O)C(=O)OR<sub>10</sub>;



[0110] 本发明的另一方面涉及治疗癌症、银屑病、再狭窄或其他细胞增殖性疾病的方法，包括向有此需要的哺乳动物共施用治疗有效量的本文所述的化合物；和治疗有效量的化疗剂。

[0111] 在某些实施方式中，所述化疗剂是多西他赛、紫杉醇、甲磺酸伊马替尼、吉西他滨、顺铂、卡铂、5-氟尿嘧啶、培美曲塞、甲氨蝶呤、阿霉素、来那度胺、地塞米松、或单甲基奥莉丝汀 (monomethyl auristatin)。

[0112] 在某些其他实施方式中，所述化疗剂是多西他赛、吉西他滨、卡铂，或阿霉素。

[0113] 在仍其他的实施方式中，所述化疗剂是MG-132、PSI、felltamide B、硼替佐米、CEP-18770、MLN-2238、MLN-9708、环氧酶素、卡非佐米 (PR-171)、NC-005、YU-101、LU-005、YU-102、NC-001、LU-001、NC-022、PR-957 (LMP7)、CPSI ( $\beta 5$ )、LMP2-sp-ek、BODIPY-NC-001、叠氮基-NC-002、ONX-0912、omuralide、PS-519、marizomib、belactosin A、 $^{125}\text{I}$ -NIP-L<sub>3</sub>VS、NC-005-VS，或MV151。

[0114] 本发明的另一方面涉及治疗癌症的方法，包括向有此需要的哺乳动物施用治疗有效量的本文所述的化合物。

[0115] 在某些实施方式中，所述癌症是实体瘤。

[0116] 在某些其他实施方式中，所述方法进一步包括向有此需要的哺乳动物施用治疗有效量的化疗剂。

[0117] 在又其他的实施方式中，所述癌症是实体瘤。

[0118] 在仍又其他的实施方式中，所述化疗剂是多西他赛、紫杉醇、甲磺酸伊马替尼、吉西他滨、顺铂、卡铂、5-氟尿嘧啶、培美曲塞、甲氨蝶呤、阿霉素、来那度胺、地塞米松、或单甲基奥莉丝汀。

[0119] 在另一个实施方式中，所述化疗剂是多西他赛、吉西他滨、卡铂，或阿霉素。

[0120] 在某些实施方式中，所述化疗剂是MG-132、PSI、felltamide B、硼替佐米、CEP-18770、MLN-2238、MLN-9708、环氧酶素、卡非佐米 (PR-171)、NC-005、YU-101、LU-005、YU-102、NC-001、LU-001、NC-022、PR-957 (LMP7)、CPSI ( $\beta 5$ )、LMP2-sp-ek、BODIPY-NC-001、叠氮基-NC-002、ONX-0912、omuralide、PS-519、marizomib、belactosin A、 $^{125}\text{I}$ -NIP-L<sub>3</sub>VS、NC-005-VS，或MV151。

[0121] 本发明的另一方面涉及降低哺乳动物中肌肉量损失速率的方法，包括向有此需要的哺乳动物施用治疗有效量的本文所述的化合物。

[0122] 本发明的另一方面涉及降低哺乳动物中的NF- $\kappa$ B活性的方法，包括向有此需要的哺乳动物施用治疗有效量的本文所述的化合物。

[0123] 本发明的另一方面涉及降低哺乳动物中的依赖于蛋白酶体的细胞内蛋白分解速率的方法，包括向有此需要的哺乳动物施用治疗有效量的本文所述的化合物。

[0124] 本发明的另一方面涉及降低哺乳动物中的p53蛋白降解速率的方法，包括向有此需要的哺乳动物施用治疗有效量的本文所述的化合物。

[0125] 本发明的另一方面涉及抑制哺乳动物中的细胞周期蛋白降解的方法，包括向有此需要的哺乳动物施用治疗有效量的本文所述的化合物。

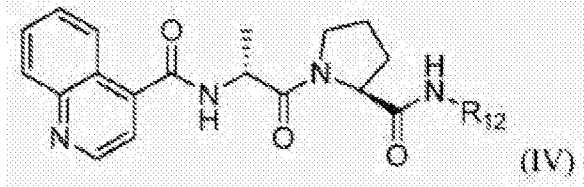
[0126] 本发明的另一方面涉及抑制哺乳动物中的抗原呈递的方法，包括向有此需要的哺乳动物施用治疗有效量的本文所述的化合物。

[0127] 本发明的另一方面涉及抑制哺乳动物中的可诱导的NF- $\kappa$ B依赖性细胞粘着的方法,包括向有此需要的哺乳动物施用治疗有效量的本文所述的化合物。

[0128] 本发明的另一方面涉及抑制哺乳动物中的HIV感染的方法,包括向有此需要的哺乳动物施用治疗有效量的本文所述的化合物。

[0129] 本发明的另一方面涉及定量由哺乳动物中的肿瘤附近区域表达或在肿瘤附近区域中表达的FAP的量的方法,所述方法包括以下步骤:

向所述哺乳动物施用有效量的式IV表示的化合物:

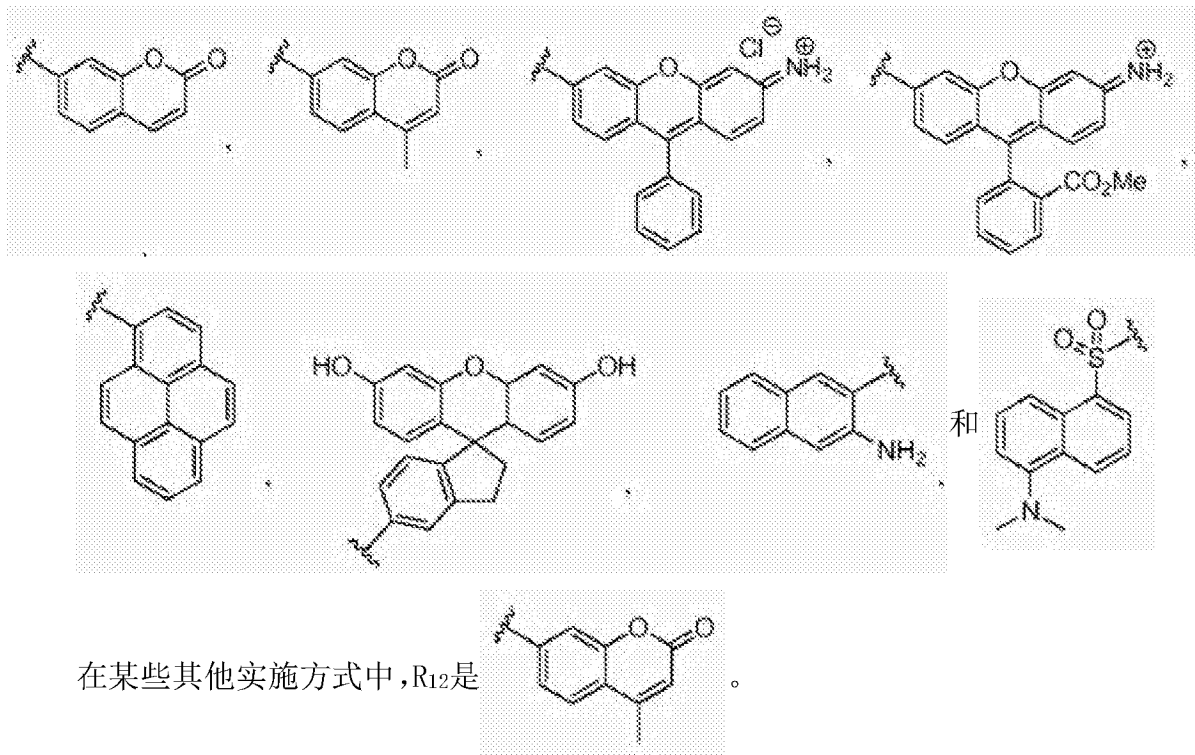


其中R<sub>12</sub>是荧光团或生色团;

照射所述哺乳动物的肿瘤的附近区域;和

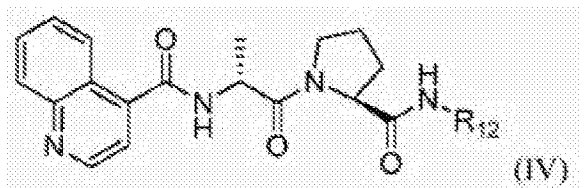
测量所述肿瘤的附近区域中的荧光的量。

[0130] 在某些实施方式中,R<sub>12</sub>选自:



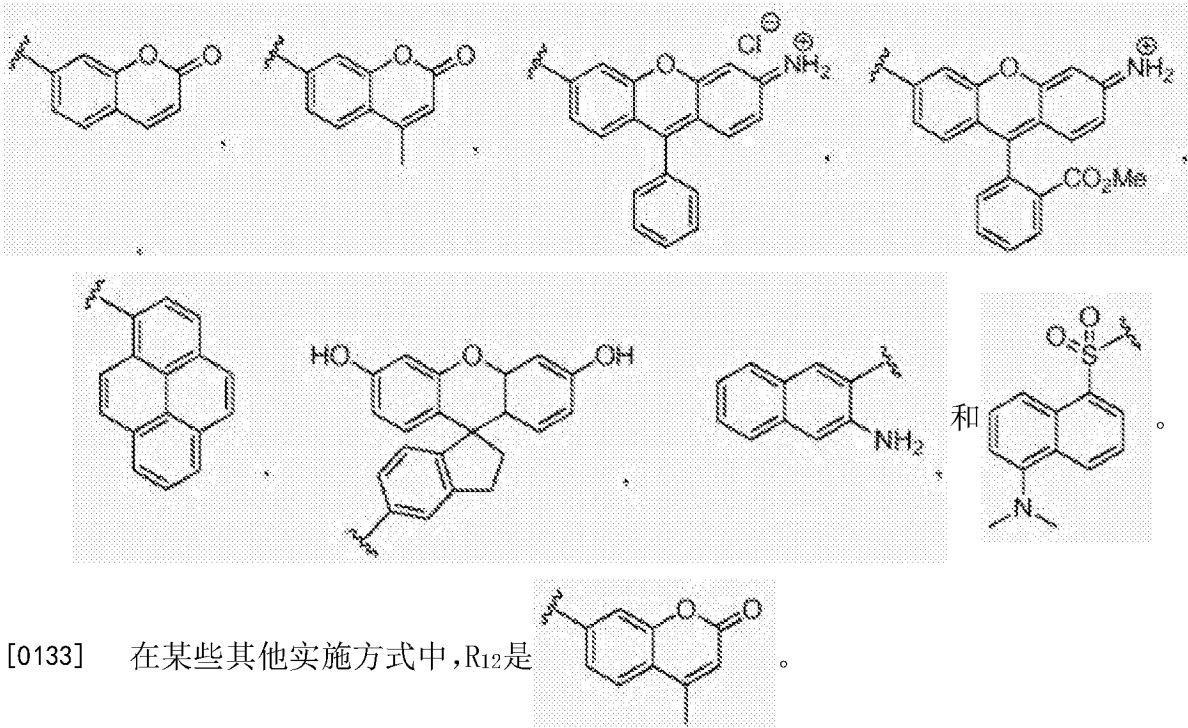
[0131] 本发明的另一方面涉及定量由肿瘤活检样本表达的FAP的量的方法,所述方法包括以下步骤:

将所述肿瘤活检样本与有效量的式IV表示的化合物组合,从而形成混合物:

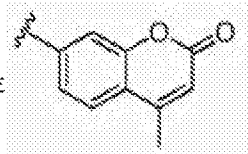


其中R<sub>12</sub>是荧光团或生色团；  
照射所述混合物；和  
测量所述混合物中的荧光的量。

[0132] 在某些实施方式中，R<sub>12</sub>选自：



[0133] 在某些其他实施方式中，R<sub>12</sub>是



[0134] 本发明的另一方面涉及本文所述的方法，其中所述哺乳动物是灵长类动物、马科动物、犬科动物、猫科动物，或牛科动物。

[0135] 本发明的另一方面涉及本文所述的方法，其中所述哺乳动物是人。

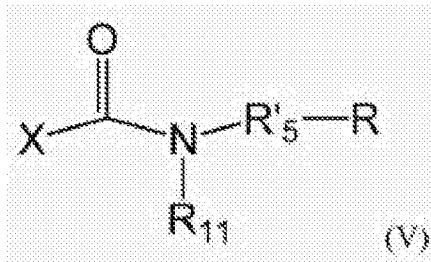
[0136] 本发明的另一方面涉及本文所述的方法，其中所述化合物通过吸入、口服、静脉内、舌下、经眼、经皮肤、直肠、阴道、局部、肌肉内、动脉内、鞘内、皮下、口腔，或鼻内施用于所述哺乳动物。

[0137] 本发明的另一方面涉及本文所述的方法，其中所述化合物经静脉内施用于所述哺乳动物。

[0138] 本申请的另一方面涉及用于减少由FAP+基质细胞介导的局部免疫抑制和/或肿瘤支持活性的方法，包括向有此需要的患者施用治疗有效量的活性剂的前药，其中所述活性剂对于所述FAP+基质细胞具有细胞毒性或抑制所述FAP+基质细胞的蛋白表达或分泌，并且对所述FAP+基质细胞的细胞毒性比所述前药高至少2倍；并且所述前药：(i) 包含FAP底物序列；(ii) 通过FAP对所述FAP底物序列的切割转化成所述活性剂，其中所述底物序列具有比对于脯氨酰内肽酶EC 3.4.21.26 (PREP) 的切割高至少10倍的对于FAP切割的 $k_{cat}/K_m$ ；和(iii) 在体内通过FAP+基质细胞选择性地转化成所述活性剂。

[0139] 本发明的另一方面涉及本文所述的方法，其中所述FAP底物序列具有比对于其他S9脯氨酰内肽酶切割高至少10倍的对于FAP切割的 $k_{cat}/K_m$ 。

[0140] 本发明的另一方面涉及本文所述的方法，其中所述前药如式V所示：



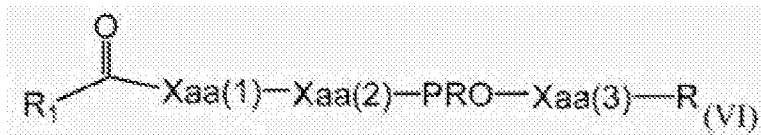
或其药学上可接受的盐，

其中：

$R_1-C(=O)-NR_{11}-R'_5$ -表示FAP底物序列，X是N-酰基肽酰基团， $-NR_{11}-R'_5$ 是结合FAP的P'<sub>1</sub>特异性亚位点的氨基酸残基或其类似物，并且所述FAP底物序列通过FAP切割而释放 $NHR_{11}-R'_5-R$ ； $R_{11}$ 表示H或低级烷基；和

$R'_5$ 和R一起形成细胞毒性剂，或在FAP+基质细胞的位置进一步代谢形成细胞毒性剂的部分。

[0141] 本发明的另一方面涉及本文所述的方法，其中所述前药如式VI所示：



或其药学上可接受的盐，

其中：

$R_1-C(=O)-$ 表示酰基N-末端封端基团；

Xaa (1) 是氨基酸残基；

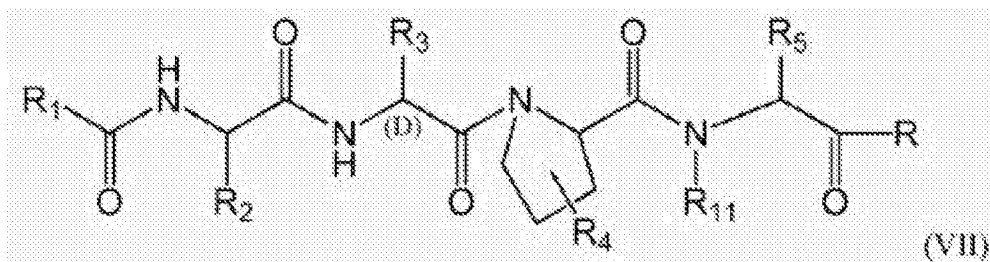
Xaa (2) 是甘氨酸，或(D)-氨基酸残基；

PRO表示脯氨酸残基或其类似物；

Xaa (3) 是大的疏水氨基酸残基；和

所述前药通过FAP切割释放出Xaa (3) -R，并且Xaa (3) -R是细胞毒性剂。

[0142] 本发明的另一方面涉及本文所述的方法，其中所述前药如式VII所示：



或其药学上可接受的盐，

其中：

$R_1-C(=O)-$ 表示酰基N-末端封端基团；

$R_2$ 表示H、低级烷基，或单-或双-羟基取代的低级烷基；

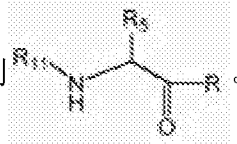
$R_3$ 表示H、卤素，或低级烷基；

$R_4$ 不存在或表示低级烷基、-OH、-NH<sub>2</sub>，或卤素；

$R_5$ 表示大的疏水氨基酸侧链；

R<sub>11</sub>表示H或低级烷基；和

所述前药通过FAP切割释放出细胞毒性剂



[0143] 在某些实施方式中，所述N-末端封端基团是在生理pH下，相对于所述细胞毒性剂，降低所述前药的细胞渗透性的部分。

[0144] 在某些实施方式中，所述酰基N-末端封端基团选自甲酰基、乙酰基、苯甲酰基、三氟乙酰基、琥珀酰基，和甲氧琥珀酰基。

[0145] 在某些实施方式中，所述酰基N-末端封端基团包括在生理pH下离子化的一个或多个官能团。

[0146] 在某些实施方式中，所述酰基N-末端封端基团包括一个或多个羧基基团。

[0147] 在某些实施方式中，所述酰基N-末端封端基团是由在生理pH下离子化的一个或多个官能团取代的(低级烷基)-C(=O)-。

[0148] 在某些实施方式中，所述酰基N-末端封端基团选自芳基(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)酰基，和杂芳基(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)酰基。

[0149] 在某些实施方式中，所述酰基N-末端封端基团是芳基(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)酰基，其中芳基(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)酰基是由选自苯、萘、菲、酚和苯胺的芳基取代的(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)酰基。

[0150] 在某些实施方式中，所述酰基N-末端封端基团是杂芳基(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)酰基，其中杂芳基(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)酰基是由选自吡咯、呋喃、噻吩、咪唑、噁唑、噻唑、三唑、吡唑、吡啶、吡嗪、哒嗪和嘧啶的杂芳基取代的(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)酰基。

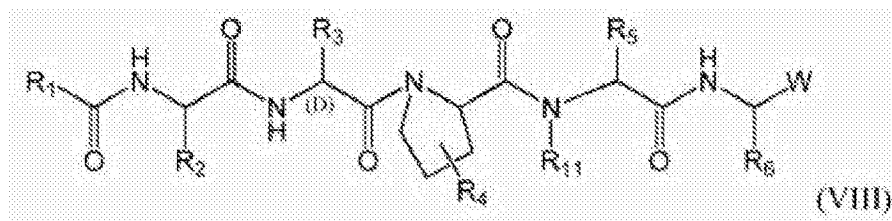
[0151] 在某些其他实施方式中，所述酰基N-末端封端基团由式-C(=O)-(CH<sub>2</sub>)<sub>1-10</sub>-C(=O)-OH表示。

[0152] 在另一个实施方式中，所述酰基N-末端封端基团是琥珀酰基。

[0153] 在某些实施方式中，Xaa(1)、Xaa(2)和Xaa(3)中的至少一个是非天然发生的氨基酸类似物。

[0154] 本发明的另一方面涉及本文所述的方法，其中所述细胞毒性剂是蛋白酶体抑制剂。

[0155] 本发明的另一方面涉及本文所述的方法，其中所述蛋白酶体抑制剂如式VIII所示：



或其药学上可接受的盐，

其中：

R<sub>1</sub>-C(=O)-表示酰基N-末端封端基团；

R<sub>2</sub>表示H、低级烷基，或单-或双-羟基取代的低级烷基；

R<sub>3</sub>表示H、卤素，或低级烷基；

R<sub>4</sub>不存在或表示低级烷基、-OH、-NH<sub>2</sub>，或卤素；

R<sub>5</sub>表示大的疏水氨基酸侧链；

R<sub>6</sub>是烷基、环烷基、芳基、杂环，或-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-R<sub>7</sub>；

R<sub>7</sub>是烷基、芳烷基、环烷基、烷氧基、烷基硫基、-OH，或-SH；

R<sub>11</sub>表示H或低级烷基；

W表示-CN、环氧酮、-CH=NR<sub>8</sub>、、、、、、，或



R<sub>8</sub>表示H、烷基、烯基、炔基、-C(X<sub>1</sub>)(X<sub>2</sub>)X<sub>3</sub>、-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-R<sub>9</sub>、-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-OH、-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-O-烷基、-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-O-烯基、-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-O-炔基、-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-R<sub>9</sub>、-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-SH、-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-S-烷基、-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-S-烯基、-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-S-炔基、-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-S-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-R<sub>9</sub>、-C(=O)C(=O)NH<sub>2</sub>、-C(=O)C(=O)OR<sub>10</sub>；

R<sub>9</sub>对于每次出现独立地表示取代或未取代的芳基、芳烷基、环烷基、环烯基，或杂环；

R<sub>10</sub>对于每次出现独立地表示氢，或取代或未取代的烷基、烯基、芳基、芳烷基、环烷基、环烯基，或杂环；

Y<sub>1</sub>和Y<sub>2</sub>可独立地或一起是OH，或能够水解成羟基的基团，包括环的衍生物，其中Y<sub>1</sub>和Y<sub>2</sub>通过在环结构中具有5-8个原子的环连接；

R<sub>50</sub>表示O或S；

R<sub>51</sub>表示N<sub>3</sub>、SH<sub>2</sub>、NH<sub>2</sub>、NO<sub>2</sub>，或-OR<sub>10</sub>；

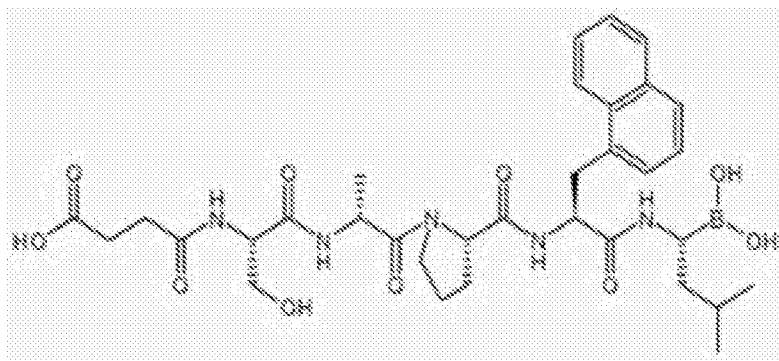
R<sub>52</sub>表示氢、低级烷基、胺、-OR<sub>10</sub>，或药学上可接受的盐，或R<sub>51</sub>和R<sub>52</sub>和与它们相连的磷原子一起组成具有在环结构中具有5-8个原子的杂环；

X<sub>1</sub>是卤素；

X<sub>2</sub>和X<sub>3</sub>各自表示H或卤素；和

m是零或在1-8范围内的整数；且n是在1-8范围内的整数。

[0156] 在某些实施方式中，所述蛋白酶体抑制剂是：



[0157] 在某些实施方式中，在单独施用，所述前药具有比所述蛋白酶体抑制剂的治疗指数高至少2倍的治疗指数。

[0158] 本发明的另一方面涉及本文所述的方法，其中所述前药作为单独试剂治疗施用。

[0159] 本发明的另一方面涉及本文所述的方法，其中所述前药与一种或多种抗癌剂一起

在组合治疗中施用。

[0160] 本发明的另一方面涉及本文所述的方法,其中所述抗癌剂是共价蛋白酶体抑制剂。

[0161] 本发明的另一方面涉及本文所述的方法,其中所述抗癌剂是化疗剂。

[0162] 本发明的另一方面涉及本文所述的方法,其中所述化疗剂是多西他赛、紫杉醇、甲磺酸伊马替尼、吉西他滨、顺铂、卡铂、5-氟尿嘧啶、培美曲塞、甲氨蝶呤、阿霉素、来那度胺、地塞米松、或单甲基奥莉丝汀。

[0163] 本发明的另一方面涉及本文所述的方法,其中所述化疗剂是多西他赛、吉西他滨、卡铂,或多柔比星。

[0164] 本发明的另一方面涉及本文所述的方法,其中所述化疗剂是MG-132、PSI、fellutamide B、硼替佐米、CEP-18770、MLN-2238、MLN-9708、环氧酶素、卡非佐米(PR-171)、NC-005、YU-101、LU-005、YU-102、NC-001、LU-001、NC-022、PR-957 (LMP7)、CPSI ( $\beta$ 5)、LMP2-sp-ek、BODIPY-NC-001、叠氮基-NC-002、ONX-0912、omuralide、PS-519、marizomib、belactosin A、 $^{125}$ I-NIP-L<sub>3</sub>VS、NC-005-VS,或MV151。

[0165] 本发明的另一方面涉及本文所述的方法,其中所述抗癌剂是免疫治疗剂。

[0166] 本发明的另一方面涉及本文所述的方法,其中所述免疫治疗剂是抗癌抗体。

[0167] 本发明的另一方面涉及本文所述的方法,其中所述免疫治疗剂是肿瘤抗原疫苗或抗癌树突细胞疫苗。

[0168] 本发明的另一方面涉及本文所述的化合物在制造药物中的用途,所述药物用于治疗抑制蛋白酶体活性提供治疗益处的病变。

[0169] 本发明的另一方面涉及包装的药物,其包含配制在药学上可接受的赋形剂中的本文所述的前药,连同描述推荐剂量和/或制剂向患者施用的说明书(成文和/或图示)。

[0170] 在某些实施方式中,本发明的化合物和组合物也可与化疗组合。化疗(癌的标准护理的主要部分)的功效受限于由化疗剂活化NF- $\kappa$ B导致的化学抵抗,导致对肿瘤细胞凋亡反应的抑制。肿瘤细胞还通过Bcl-2和P-糖蛋白的过表达而抵抗化疗。蛋白酶体抑制剂(PIs)通过抑制NF- $\kappa$ B的活化,诱导Bcl-2切割成促凋亡片段,和抑制P-糖蛋白成熟为将化疗剂从癌细胞除去的活性形式,阻遏这些作用。因此,PIs可充当化疗的辅助剂。与硼替佐米的这种作用相比,本文公开的化合物和组合物可降低复合毒性:例如,与硼替佐米和吉西他滨、多西紫杉醇或卡铂相关的增加的3/4级血液学毒性。化疗剂通常在穿插暂停期的循环中,以高剂量施用。最近,已启动化疗剂的更连续施用(节律化疗)以延长癌细胞对于药物的暴露,并抑制血管发生。由于毒性降低,本文公开的化合物和组合物将理想地适合与节律化疗组合的更长期的施用。

[0171] 定义

术语“氨基酸”旨在涵盖包括氨基官能和酸官能的所有化合物,无论是天然还是合成的,包括氨基酸类似物和衍生物。在某些实施方式中,本发明预期的氨基酸是见于蛋白中的那些天然发生的氨基酸,或这样的氨基酸的天然发生的合成代谢或分解代谢产物,其包含氨基和羧基基团。天然发生的氨基酸全都通过常规的三字母和/或单字母缩写标记,对应于氨基酸的俗名,与以下列表一致。除非另有说明,本文所述的所有氨基酸预期为(D)-和(L)-异构体二者。所述缩写是在肽领域中接受的,并且是IUPAC-IUB生物化学命名委员会推荐

的。

[0172] 术语“氨基酸残基”是指氨基酸。在本文中用于命名天然发生氨基酸的缩写通常是基于IUPAC-IUB生物化学命名委员会的推荐。参见Biochemistry (1972) 11:1726-1732)。例如, Met、Ile、Leu、Ala和Gly分别表示蛋氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、丙氨酸和甘氨酸的“残基”。所述“残基”是指通过除去羧基的OH部分和 $\alpha$ -氨基的H部分而从相应的 $\alpha$ -氨基酸衍生的原子团(radical)。

[0173] 术语“氨基酸侧链”是除骨架外的氨基酸残基的部分,如K. D. Kopple所定义,“Peptides and Amino Acids”, W. A. Benjamin Inc., New York and Amsterdam, 1966, 2和33页;常见氨基酸的这样的侧链的实例为 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SCH}_3$  (蛋氨酸的侧链)、 $-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2\text{CH}_3$  (异亮氨酸的侧链)、 $-\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)_2$  (亮氨酸的侧链),或H- (甘氨酸的侧链)。这些侧链悬吊于骨架 $\text{C}\alpha$ 碳。

[0174] 术语“氨基酸类似物”是指在结构上类似于天然发生的氨基酸的化合物,其中C-末端羧基,N-末端氨基或侧链官能团已经过化学修饰。例如,天冬氨酸-( $\beta$ -甲基酯)是天冬氨酸的氨基酸类似物;N-乙基甘氨酸是甘氨酸的氨基酸类似物;或丙氨酸甲酰胺是丙氨酸的氨基酸类似物。

[0175] 如本文使用的短语“保护基团”是指保护反应性官能团免于不期望的化学反应的取代基。这样的保护基团的实例包括羧酸和硼酸的酯,醇类的醚,和醛类和酮类的缩醛和缩酮。例如,如本文使用的短语“N-末端保护基团”或“氨基保护基团”是指各种氨基保护基团,其能够用于保护氨基酸或肽的N-末端抵抗合成过程中的不期望的反应。适合基团的实例包括酰基保护基团,例如,用于举例说明,甲酰基、乙酰基、苯甲酰基、三氟乙酰基、琥珀酰基,和甲氧琥珀酰基;芳香族氨基甲酸酯保护基团如,例如,苄氧羰基(Cbz);和脂肪族氨基甲酸酯保护基团,例如,叔丁氧羰基(Boc)或9-苄氧羰基(Fmoc)。

[0176] 如本文使用的术语“氨基末端保护基团”是指末端氨基保护基团,其通常用于有机合成中,特别是肽合成中。可采用任何已知类型的保护基团,包括酰基保护基团,例如乙酰基和苯甲酰基;芳香族氨基甲酸酯保护基团,例如苄氧羰基;和脂肪族氨基甲酸酯保护基团,例如,叔丁氧羰基。参见例如,Gross和Mienhoffer, Eds., *The Peptides*, Academic Press: New York, 1981; , Vol. 3, 3-88;和Green, T. W.; Wuts, P. G. M., *Protective Groups in Organic Synthesis*, 第二版,Wiley: New York, 1991。优选的保护基团包括芳基-、芳烷基-、杂芳基-和杂芳基烷基-羰基和磺酰基团。

[0177] 如本文使用的术语“生理条件”是指与活生物相容,和/或通常存在于活哺乳动物细胞的细胞内的温度、pH、离子强度、粘度等生物化学参数。

[0178] 如本文使用的术语“前药”涵盖在生理条件下转化成治疗活性剂的化合物。制备前药的常见方法包括在生理条件下水解以释放期望分子的所选部分。在其他实施方式中,所述前药通过宿主动物的酶促活性转化。

[0179] 如本文使用的短语“药学上可接受的赋形剂”或“药学上可接受的载体”是指参与将对象化学物从身体的一个器官或部分携带或转移到身体的另一个器官或部分的药学上可接受的材料、组合物或媒介物,例如液体或固体填料、稀释剂、赋形剂、溶剂或包封材料。每种载体必须在与制剂的其他成分相容、不对患者有害,并且基本无热原的意义上是“可接受的”。可充当药学可接受的载体的材料的一些实例包括:(1) 糖,如乳糖、葡萄糖,和蔗糖;

(2) 淀粉,如玉米淀粉和马铃薯淀粉;(3) 纤维素及其衍生物,如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素,和乙酸纤维素;(4) 粉末状黄芪胶;(5) 麦芽;(6) 明胶;(7) 滑石;(8) 赋形剂,如可可脂和栓剂蜡;(9) 油,如花生油、棉籽油、红花油、芝麻油、橄榄油、玉米油和大豆油;(10) 二元醇,如丙二醇;(11) 多元醇,例如甘油、山梨糖醇、甘露糖醇,和聚乙二醇;(12) 酯类,如油酸乙酯和月桂酸乙酯;(13) 琼脂;(14) 缓冲剂,如氢氧化镁和氢氧化铝;(15) 海藻酸;(16) 无热原水;(17) 等渗盐水;(18) 林格氏溶液;(19) 乙醇;(20) 磷酸盐缓冲溶液;和(21) 在药物制剂中使用的其它无毒的相容物质。在某些实施方式中,本发明的药物组合物是无热原的,即在施用至患者时不诱导显著的温度升高。

[0180] 术语“药学可接受的盐”是指所述抑制剂的相对无毒的无机或有机酸加成盐。这些盐可以在所述抑制剂的最终分离和纯化期间原位制备,或通过游离碱形式的纯化抑制剂与适合的有机酸或无机酸单独反应,和分离由此形成盐而制备。代表性的盐包括氢溴酸盐、盐酸盐、硫酸盐、硫酸氢盐、磷酸盐、硝酸盐、乙酸盐、戊酸盐、油酸盐、棕榈酸盐、硬脂酸盐、月桂酸盐、苯甲酸盐、乳酸盐、磷酸盐、甲磺酸盐、柠檬酸盐、马来酸盐、富马酸盐、琥珀酸盐、酒石酸盐、萘酸盐、甲磺酸盐、葡庚糖酸盐、乳糖酸盐,和月桂基磺酸盐等。参见,例如Berge等人,(1977) “Pharmaceutical Salts”, *J. Pharm. Sci.* 66:1-19。

[0181] 在其他情况下,可用于本发明方法的化合物可包含一个或多个酸性官能团,并且因此能够与药学可接受的碱形成药学可接受的盐。在这些情况下,术语“药学可接受的盐”是指所述抑制剂的相对无毒的无机或有机碱加成盐。这些盐同样可以在所述抑制剂的最终分离和纯化期间原位配制,或通过游离酸形式的纯化抑制剂与适合的有机碱单独反应而制备,例如药学上可接受的金属阳离子的氢氧化物、碳酸盐或碳酸氢盐,与氨,或与药学上可接受的有机伯胺,仲胺或叔胺反应。代表性的碱或碱土盐包括锂、钠、钾、钙、镁,和铝盐等。可用于形成碱加成盐的代表性有机胺包括乙胺、二乙胺、乙二胺、乙醇胺、二乙醇胺、哌嗪等(例如,参见Berge等人,如上)。

[0182] 关于在治疗中的用途,化合物的“治疗有效量”是指在作为期望的给药方案的一部分施用(至哺乳动物,优选人)时,根据待治疗的病变或病症或对于美容目的的临床可接受的标准,例如在对于任何医疗处理适合的合理的效益/风险比,缓解症状、改善病症,或延缓疾病症状的发作的制品中的化合物的量。

[0183] 术语“预防性或治疗性”处理是本领域公认的,并且包括向宿主施用一种或多种对象组合物。如果在不良病症的临床表现(例如宿主动物的疾病或其他不良状态)之前施用,则处理是预防性(即保护宿主免于发展出所述不良病症),而如果在不良病症的临床表现之后施用,则处理是治疗性(即旨在消除、改善或稳定现存的不不良病症或其副作用)。

[0184] 术语“自我消除的接头”或“自消接头”是指通过化学键将两个或更多分子连接在一起的临时性延伸单元、间隔单元,或占位单元,所化学键在限定条件下被切割而释放出所述两个分子。自我消除的接头的实例包括但不限于对氨基苄氧羰基(PABC)和2,4-双(羟甲基)苯胺。所述自我消除的接头或自消接头可以是线性或分支的,并且可以将两个或更多个相同的分子连接在一起,或可将两个或更多个不同的分子连接在一起。所述自我消除的接头或自消接头可以在,例如生理条件、酸性条件、碱性条件下或在特异化学试剂的存在下,降解、分解或片段化。

[0185] 如上所述,本发明的某些化合物可以具体几何或立体异构形式存在。本发明预期

所有这样的化合物,包括顺式-和反式-异构体,*R*-和*S*-对映体、(D)-异构体、(L)-异构体,其消旋混合物,及它们的其他混合物,均落入本发明的范围内。其他不对称的碳原子可存在于取代基中,例如烷基。期望所有这样的异构体,及其混合物包括在本发明中。

[0186] 如果例如本发明的化合物的具体对映体是期望的,它可通过不对称合成或通过使用手性辅助剂的衍生化制备,其中将所得的非对映异构的混合物分离,并将辅助基团切割以提供纯的期望的对映体。或者,在所述分子包含碱性官能团(例如氨基)或酸性官能团(例如羧基)的情况下,使用适当的光学活性的酸或碱形成非对映异构的盐,随后通过本领域中熟知的分步结晶或色谱方式拆分由此形成非对映异构体,并随后回收纯的对映体。

[0187] 脂肪链包含下文定义的烷基、烯基和炔基的类型。直链脂肪链限定为不分支的碳链部分。如本文使用的术语“脂肪族基团”是指直链、支链或环状脂肪族烃基团,并且包括饱和和不饱和的脂肪族基团,例如烷基、烯基或炔基。

[0188] “烷基”是指具有指定的碳原子数量,或者如果没有进行指明,则具有多达30个碳原子的,完全饱和的环状或无环的,分支或不分支的碳链部分。例如,1至8个碳原子的烷基是指例如甲基、乙基、丙基、丁基、戊基、己基、庚基和辛基的基团,以及是这些基团的位置异构体的那些基团。10至30个碳原子的烷基包括癸基、十一烷基、十二烷基、十三烷基、十四烷基、十五烷基、十六烷基、十七烷基、十八烷基、十九烷基、二十烷基、二十一烷基、二十二烷基、二十三烷基和二十四烷基。在某些实施方式中,直链或支链烷基在其骨架中具有30或更少的碳原子(例如,对于直链 $C_1-C_{30}$ ;对于支链 $C_3-C_{30}$ ),且更优选20或更少的碳原子。

[0189] “环烷基”是指单-或双环的或桥接的饱和碳环,每个环具有3-12个碳原子。同样,优选的环烷基在其环结构中具有5-12个碳原子,并且更优选在环结构中具有6-10个碳。

[0190] 除非碳的数量另有说明,如本文使用的“低级烷基”是指如上限定的烷基,但在其骨架结构中具有1-10个碳,更优选1-6个碳原子,例如甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、仲丁基和叔丁基。同样,“低级烯基”和“低级炔基”具有类似的链长度。在本申请全文中,优选的烷基是低级烷基。在某些实施方式中,本文中命名为烷基取代基是低级烷基。

[0191] “烯基”是指具有指定的碳原子数量,或者如果没有指明碳原子数量的限定,则具有多达26个碳原子;并且在该部分中具有一个或更多双键的,任何环状或无环的,分支或不分支的不饱和碳链部分。6-26个碳原子的烯基示例为其各种异构体形式的己烯基、庚烯基、辛烯基、壬烯基、癸烯基、十一烯基、十二烯基、十三烯基、十四烯基、十五烯基、十六烯基、十七烯基、十八烯基、十九烯基、二十烯基、二十一烯基、二十二烯基、二十三烯基,和二十四烯基,其中所述一个或多个不饱和键可位于所述部分中的任何位置,并且可具有双键的(Z)或(E)构型。

[0192] “炔基”是指烯基范围的烃部分,但在所述部分中具有一个或更多个三键。

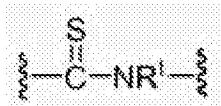
[0193] 术语“烷基硫基”是指具有与其连接的硫部分的如上定义的烷基。在某些实施方式中,“烷基硫基”基团表示为-(S)-烷基、-(S)-烯基、-(S)-炔基,和-(S)-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-R<sup>1</sup>之一,其中m和R<sup>1</sup>在下文定义。代表性的烷基硫基包括甲基硫基、乙基硫基等。

[0194] 如本文使用的术语“烷氧基的”或“烷氧基”是指具有与其连接的氧部分的如上文定义的烷基。代表性的烷氧基包括甲氧基、乙氧基、丙氧基、叔丁氧基等。“醚”是通过氧共价连接的两个烃。因此,导致烷基成为醚的该烷基的取代基是或者类似于烷氧基,例如可表示为-O-烷基、-O-烯基、-O-炔基,和-O-(CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>-R<sup>1</sup>之一,其中m和R<sup>1</sup>在下文定义。



常,当上式的氧原子替换为硫的情况下,该式表示“硫代羰基”基团。当X是硫且R<sup>7</sup>或R<sup>8</sup>不是氢的情况下,该式表示“硫酯”基团。当X是硫且R<sup>7</sup>是氢的情况下,该式表示“硫代羧酸”基团。当X是硫且R<sup>8</sup>是氢的情况下,该式表示“硫代甲酸酯”基团。另一方面,当X是键且R<sup>7</sup>不是氢的情况下,上式表示“酮”基团。当X是键且R<sup>7</sup>是氢的情况下,上式表示“醛”基团。

[0199] 如本文使用的术语“硫代酰胺”是指可由下式表示的部分:

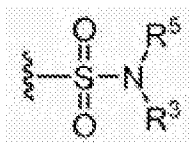


其中,R<sup>1</sup>选自氢、烷基、环烷基、芳烷基或芳基,优选氢或烷基。此外,“硫代酰胺-衍生的”化合物或“硫代酰胺类似物”是指其中一个或多个酰胺基团已替换为一个或多个对应的硫代酰胺基团的化合物。硫代酰胺在本领域中还被称作“硫代酰胺”(thioxamides/thioamides)。

[0200] 如本文使用的术语“取代的”预期包括有机化合物的所有可允许的取代基。在宽泛的方面,所述可允许的取代基包括有机化合物的无环的和环状的,分支的和无分支的,碳环的和杂环的,芳香族和非芳香族的取代基。示例性的取代基包括,例如上文所述的那些。对于适合的有机化合物,可允许的取代基可以是一个或多个并且是相同或不同的。出于本发明的目的,杂原子,例如氮,可以具有氢取代基和/或本文所述的有机化合物的任何可允许的取代基,其满足所述杂原子的化合价。本发明绝不希望受限于有机化合物的可允许的取代基。可理解,“取代”或“取代之”包括隐含的条件,即这样的取代符合取代原子和取代基的允许的化合价,并且所述取代产生稳定的化合物,例如,其不自发地发生转化,例如重排、环化、消除等。

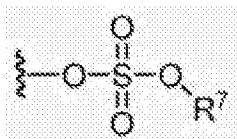
[0201] 如本文使用的术语“硝基”是指-NO<sub>2</sub>;术语“卤素”是指-F、-Cl、-Br,或-I;术语“巯基”是指-SH;术语“羟基”是指-OH;术语“磺酰基”是指-SO<sub>2</sub>-;术语“叠氮基”是指-N<sub>3</sub>;术语“氰基”是指-CN;术语“异氰酸根合”是指-NCO;术语“氰硫基”是指-SCN;术语“异硫氰酸根合”是指-NCS;且术语“氰氧基”是指-OCN。

[0202] 术语“氮磺酰”是本领域公认的,并且包括如可由下式表示的部分:



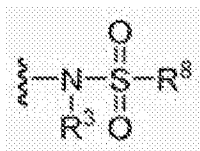
其中,R<sup>3</sup>和R<sup>5</sup>如上文定义。

[0203] 术语“硫酸酯”是本领域公认的,并且包括如可由下式表示的部分:



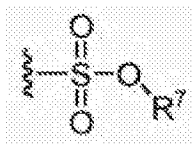
其中,R<sup>7</sup>如上文定义。

[0204] 术语“氮磺酰”是本领域公认的,并且包括如可由下式表示的部分:



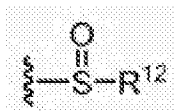
其中,  $R^3$  和  $R^8$  如上文定义。

[0205] 术语“磺酸酯”是本领域公认的, 并且包括如可由下式表示的部分:



其中,  $R^7$  是电子对、氢、烷基、环烷基或芳基。

[0206] 如本文使用的术语“亚砷基”或“亚磺酰基”是指可由下式表示的部分:



其中,  $R^{12}$  选自氢、烷基、烯基、炔基、环烷基、杂环基、芳烷基或芳基。

[0207] 如本文使用的每个表述的定义, 例如烷基、 $m$ 、 $n$  等, 当在任何结构中出现多于一次时, 期望它独立于它在相同结构他处的定义。

[0208] 出于本发明的目的, 化学元素根据元素周期表, CAS版, *Handbook of Chemistry and Physics*, 第67版, 1986-87, 内封页确定。

## 实施例

[0209] 通过参考以下实施例将更容易地理解在此概况描述的本发明, 所包括的实施例仅出于说明本发明的某些方面和实施方式的目的, 且并非用于限定本发明。

[0210] **实施例1: 本发明的ARI-3996和蛋白酶体抑制剂**

使用此前描述用于获得肽硼酸的合成和分析方法, 合成如图1中所示的ARI-3996及其PI弹头ARI-2727D。硼替佐米购自 Selleck Chemicals或ChemieTek。通过如本文所述的FAP对比PREP的选择性切割, 确认ARI-3996的每个批次。

[0211] 使用以下试剂: (a) HATU/DMF/DIPEA, 95%产率; (b) 4 M HCl/二噁烷, 100%产率; (c) HATU/DMF/DIPEA, 90%产率; (d) 4M HCl/二噁烷, 100%产率; (e) tBu-Suc-Ser(tBu)-OH, HATU/DMF/DIPEA, 90%产率; (f) Pd(OH)<sub>2</sub>-C/H<sub>2</sub>/甲醇, 90%产率; (g) 2727D, HATU/DMF/DIPEA, 85%产率; (h) TFA/DCM, 90%产率; (i) PhB(OH)<sub>2</sub>, 戊烷-水-乙腈, 70%产率。肽(特别是短肽, 例如二肽和三肽, 例如本文描述的那些)的化学合成是本领域中熟知的并且由于其模块性质是充分可预期的。因此, 如应用于肽的表1的合成方法或标准固相合成方法将成功地供应式I的任何化合物。

[0212] ARI-3996是设计为更选择性地靶向实体瘤中的蛋白酶体的硼替佐米-样细胞毒性剂的前药形式(图15)。ARI-3996设计为通过在被上皮性肿瘤的反应性基底成纤维细胞表面上的成纤维细胞活化蛋白(FAP)切割之前保持无活性, 而减少与蛋白酶体抑制相关的基于机理的DLT。因为FAP在上皮性肿瘤中产生, 但通常不在健康组织中产生(FAP表达在很多常见的上皮性肿瘤: 肺癌、结肠癌、乳腺癌和胰腺癌的基质中), ARI-3996不应在神经组织或产生血小板的骨髓中活化。ARI-3996对于所有细胞相对无毒, 并且在通过FAP活化之前不能杀

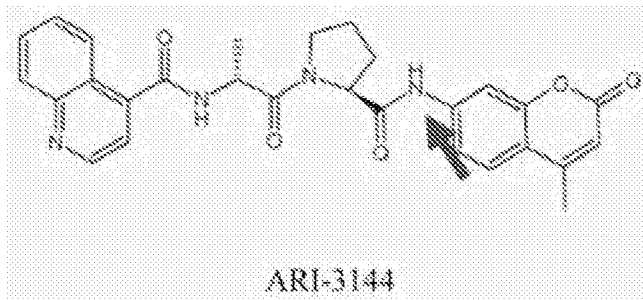
死肿瘤细胞。因此,ARI-3996应杀死产生FAP的肿瘤,并且PN和血小板减少的严重性低于与硼替佐米相关的PN和血小板减少。

[0213] 成纤维细胞活化蛋白 (FAP) 是属于(二肽基肽酶) DPP-IV-样亚家族的脯氨酰基后切割的丝氨酸蛋白酶,其中FAP和脯氨酰基内肽酶 (PREP) 是仅有的能够在内部脯氨酸的C-末端侧上进行切割的哺乳动物蛋白酶。与FAP不同,PREP组成型且广泛地表达。本发明人解决了制备通过FAP选择性活化前药所需的FAP相对于PREP切割的特异性问题。FAP的P<sub>4</sub>-P<sub>1</sub>切割特异性需要脯氨酸在P<sub>1</sub>,甘氨酸或D-氨基酸在P<sub>2</sub>,优选小的不带电的氨基酸在P<sub>3</sub>,并且容忍大多数氨基酸在P<sub>4</sub>。本发明人发现在P<sub>2</sub>的D-丙氨酸允许如预期的FAP切割,但抑制PREP切割。因此,通过C-末端肽键连接三肽Suc-Ser-D-Ala-Pro至硼替佐米-样的氨基硼酸酯二肽Ala(1-NaI)-boroLeu (ARI-2727D) 产生前药ARI-3996,其中,通过Pro-Ala(1-NaI) 键的FAP切割选择性地释放蛋白酶体抑制活性。在体外,ARI-3996被FAP切割,但被PREP切割的程度低很多,从而如通过质谱(图2)和通过荧光Cell-titer Blue (Promega)的体外杀癌细胞测定(表1)证实,产生细胞毒性“弹头”ARI-2727D:

细胞系	ARI-3996 与以下温育 <sup>b</sup> 的细胞毒性 EC <sub>50</sub> <sup>a</sup> (μm):		
	空	FAP	PREP
RPMI 8226	5.8	0.18	3.1
KG-1	22.0	0.30	13.0
RPMI 1788	6.2	0.13	3.6
BxPC-3	34.0	0.80	21.0

<sup>a</sup> 杀死50%细胞的药物浓度  
<sup>b</sup> 在37°C 24小时, 但BxPC-3例外, 为48小时

[0214] 实施例2:ARI-3144作为诊断/患者分层工具的用途

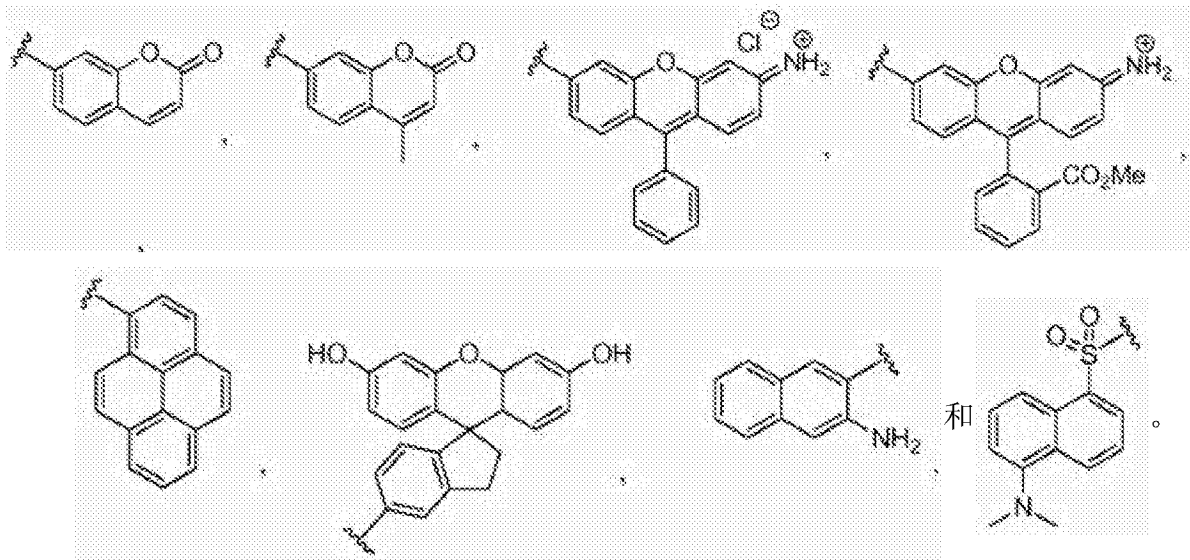


以上显示了ARI-3144的结构,并且包括标明FAP切割的化学键的箭头。图11显示了这种化合物的诊断用途的基本原理的草图。FAP识别位点化学连接到荧光香豆素 (AMC) 部分。在ARI-3144与FAP结合后,发生化学键切割(图12)以从AMC释放FAP识别位点。一旦释放,AMC立刻显现荧光并且可通过测量其光谱性质定量其浓度。

[0215] 在荧光底物(N-(喹啉-4-羰基)-D-Ala-Pro-AMC [AMC = 7-氨基-4-甲基香豆素]

(ARI-3144)) P<sub>2</sub>的D-丙氨酸赋予对FAP的选择性,从而被重组FAP切割而释放出荧光AMC,但不被其他DPP-IV-样蛋白酶切割(图3)。如图13中所示,ARI-3144是FAP的优异底物,并且检测没有PREP、DPPIV、DPP8、DPP9,或DPPII的切割(图14)。据报道,除子宫内膜外,FAP不在健康组织中组成型表达,尽管在血浆中可检测到FAP蛋白水解活性。除卵巢和前列腺肿瘤之外,已通过免疫组织化学和mRNA分析证实了在常见的上皮性肿瘤(肺、结肠、乳腺和胰腺)的基底成纤维细胞中FAP表达的诱导。需要在肿瘤中测量FAP蛋白水解活性的能力以评估ARI-3996作为化疗剂的有效性。迄今,尚未在人或小鼠肿瘤中定量FAP活性。本发明人已使用ARI-3144离体测定以证实人胰腺癌中相对于健康组织和血浆增加的FAP蛋白水解活性。本发明人将使用所述测定选择用于研究ARI-3996的活性的小鼠肿瘤模型,其中肿瘤相关的FAP活性相对于血浆的增加与在人上皮癌中的相等。

[0216] 除基于香豆素的发色团之外,其他广泛使用的发色团也可恰当发挥作用,只要可使用酰胺键用于连接(即,发色团具有可用于连接至FAP识别位点的脯氨酸的伯氨基基团)。这样的常用的发色团为,例如:



[0217] 实施例3:上皮癌的小鼠模型,其中肿瘤组织的FAP蛋白水解活性与人癌症患者中的相等

如此前所述,在标准连续荧光测定中,使用FAP特异性荧光底物ARI-3144测量组织匀浆和血浆中的FAP蛋白水解活性。

[0218] 在来自Fox Chase癌症中心的14名胰腺癌患者的组织样本中,本发明人确定癌组织中的平均( $\pm$  SE) FAP活性为 $903.7 \pm 161.4$ ,表示为荧光单位变化( $\Delta$  FU)/min/mg蛋白。FAP活性在患者之间变化,并且4名高表达者的FAP活性在1,200至3,000之间。与之相比,在scid小鼠中的HPAF-II胰腺癌异种移植植物显示的平均活性仅为 $200 \pm 12.5$ 。本发明人发现在小鼠中血浆FAP活性的循环水平比在人中高约6倍,与哪个物种带有肿瘤无关。因此,FAP活性的肿瘤:血浆比例在人中是至少100:1;但在HPAFII异种移植的小鼠中仅为3:1(图4和16)。

[0219] FAP-活化的前药(例如ARI-3996)的TI预期依赖于FAP蛋白水解活性的系统水平与肿瘤组织中的水平之间的差异。ARI-3996已在HPAF-II小鼠中展示了显著的抗肿瘤活性(见下文)。然而,HPAF-II模型没有正确反映人胰腺癌患者中的FAP活性的肿瘤:系统比例(图16

和17)。为了测试ARI-3996作为在实体肿瘤中比硼替佐米更安全且更有效的PI的可行性,需要癌模型,其中肿瘤FAP活性比在HPAF-II异种移植物中高~35倍。因为FAP在肿瘤发生期间在反应性基质成纤维细胞中诱导,在重演人癌症中基质发育模式的小鼠模型中,肿瘤FAP活性的水平应比在细胞系的异种移植物中更高。两种不同的模型看起来是有希望的。在*Lox-Stop-Lox (LSL)-K-ras<sup>G12D</sup>*小鼠中的Cre-重组酶诱导的肺腺癌模型中,内生肿瘤发育诱导在组织学上紧密类似于人癌症的FAP<sup>+</sup>基质。通过直接移植到免疫缺陷小鼠中的患者肿瘤提供可选的模型。报道移植的人肿瘤保持原始肿瘤的基质组织和脉管系统。通过Oncotest <http://www.oncotest.de/for-pharma/index.php>,在具有充分发育的基质的人上皮癌的异种移植物样品中测定FAP活性。

[0220] 如图5中所示,FAP转染的HEK293异种移植物模型可用于模拟过表达FAP的人肿瘤,达到如见于人癌症患者中的肿瘤中类似的程度。HEK293细胞系的FAP转染变体在*scid*小鼠中形成FAP<sup>+</sup>上皮细胞的肿瘤(69)。本发明人已证实了体内FAP-HEK293肿瘤中6,000至12,500 ΔFU/min/mg的FAP活性水平(图5)。因此,FAP-HEK293模型适合用于研究ARI-3996的TI。然而,不同于*K-ras<sup>G12D</sup>*-驱动的肺癌和直接患者移植模型,HEK293模型没有模拟FAP在人癌症中的基质表达。

[0221] 此外,如图18中所示,FAP转染的HEK肿瘤异种移植物具有匹配人胰腺癌肿瘤的FAP活性。一系列的人胰腺癌样品具有从可忽略的至高于250的FAP活性水平(肿瘤FAP/血浆FAP)。图18右手侧显示,HEK小鼠异种移植物样品显示150-270的肿瘤FAP/血浆FAP的比例。

#### [0222] 实施例4:HEK肿瘤异种移植物小鼠模型的有效性

在测定了HEK异种移植物模型中的FAP表达水平后,在40天的研究中评估ARI-3996的抗癌活性。图20显示了结果。令人难忘地,尽管Velcade®几乎没有延缓肿瘤的生长,但ARI-2727D和ARI-3996都展示了强效的肿瘤抑制。预期ARI-2727D的功效低于ARI-3996,因为它缺少FAP识别位点或寻址部分。它还受到随时间的构象依赖性失活的影响。虽然如此,ARI-2727显示了显著高于Velcade®的抑制作用。

[0223] 在25 mg/kg的剂量,ARI-3996显示几乎完全抑制肿瘤生长。甚至在HEK-模拟模型(图20下部)中,在50 mg/kg剂量,ARI-3996耐受良好,并且显示高于对照的抑制作用。

[0224] 作为其功效的进一步测试,将ARI-3996施用于免疫活性的WT BALB/c小鼠。如图19所示,在30天的试验期间观察到肿瘤消退。

#### [0225] 实施例5:ARI-3996、ARI-2727D和硼替佐米在FAP<sup>+</sup>癌症模型中的最大耐受剂量(MTD)和最低有效剂量(MED)

向带有HPAF-II细胞系异种移植物的的小鼠施用(i.p.)的ARI-3996在其100 mg/kg的MTD显著降低了肿瘤生长(图6)。确认了作为单个试剂以及与吉西他滨的组合物ARI-3996的抗癌作用(图9 & 10)。具体地,当ARI-3996经皮下而非腹腔内施用时,观察到高度显著的抗癌作用(图9)。与之相比,硼替佐米在其1 mg/kg的MTD难以治疗HPAF-II肿瘤(图6)。因此,在上皮癌的模型中,基于MTD,ARI-3996看起来比硼替佐米安全100倍,并且胜过硼替佐米。然而,ARI-3996的抗癌作用可能受到HPAF-II肿瘤中活化前药所需的FAP活性水平相对低的限制。如上所述,对于人胰腺癌,FAP肿瘤:血浆比例是≥100:1;相比之下,在HPAFII异种移植的小鼠中为3:1(图4)。因此,为了更好地判断ARI-3996用于在耐受剂量水平下在癌症患者中产生抗癌作用的潜力,将在选择的肿瘤相关FAP活性与在人癌症中相等的小鼠模型中比较

ARI-3996、硼替佐米和ARI-2727D的MTDs和MEDs。

[0226] 通过每周两次(第1和第4日),向正常小鼠和荷瘤小鼠的组( $n = 2$ 雌 + 2雄)施用(i.p.)增加剂量的化合物,测定MTDs。在荷瘤小鼠与非荷瘤小鼠中毒性的比较将确定通过肿瘤FAP对ARI-3996的活化是否导致系统毒性。每日监测小鼠的健康,并且每周两次称量小鼠体重。在亚致死剂量水平,导致没有健康状况不佳且不超过10%体重损失的最高剂量定义为MTD。MEDs由每周两次施用化合物的荷瘤小鼠( $n = 5-7$ /处理组)中的抗癌作用的剂量反应测定。MED定义为如用于比较测试和对照小鼠之间肿瘤大小的非配对,双尾学生t检验测定的,产生肿瘤生长的显著降低的最小剂量。试验细节将依赖于试验1中选择的模型。研究设计类似于对于用于证实FAP-靶向抗癌试剂Glu-boroPro的抗癌作用的此前描述。通过下式:  $TI = MTD \div MED$  计算ARI-3996、硼替佐米和“弹头”ARI-2727D的TIs。如果 $LSL-K-ras^{G12D}$ 或Oncotest小鼠的可用性有限,可在FAP-HEK293异种移植的 $scid$ 小鼠中研究毒性和MTD(图5)。

[0227] 实施例6:通过研究20S蛋白酶体的抑制、凋亡的诱导和FAP<sup>+</sup>肿瘤中血管发生的减少,表征ARI-3996的抗癌作用的机理

在实施例5结束时的末次药物施用后1小时,收集外周血、肿瘤、脾和肝。从速冻样品制备组织裂解物,用于蛋白酶体抑制的测定。将组织学组织样本在福尔马林中固定并在适合组织染色和凋亡测定的条件下包埋在石蜡中,并切片。

[0228] 使用荧光底物succ-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC (Enzo Life Science)测定20S蛋白酶体的糜蛋白酶亚基活性。硼替佐米和ARI-2727D将分布到所有组织,并且预期以剂量依赖的方式在所有组织中均匀地抑制蛋白酶体活性。此测定将使用用于每个动物中肿瘤和非肿瘤组织(例如,脾)的配对样品之间的比较的配对,双尾学生t检验,测试ARI-3996是否更有选择性地靶向肿瘤蛋白酶体活性。通过使用小鼠CD34特异性抗体(BD-PharMingen)的免疫染色,比较对药物处理反应最佳的肿瘤的组织切片和对照的微血管密度(MVD)。使用ApoTag过氧化物酶原位凋亡检测试剂盒(Millipore),通过末端脱氧核苷酸转移酶介导的缺口末端标记(TUNEL)量化凋亡。在显微镜下以盲测的方式计数事件,并通过用于每个处理组至少5只小鼠的非配对,双尾学生t检验测定媒介物-和药物-处理肿瘤之间的差异的显著性。还使用H&E将组织染色,用于系统毒性的研究。

[0229] 本发明人已发现血浆的FAP蛋白水解活性显示在小鼠中( $\sim 60 \Delta FU/min$ )比在人中( $\sim 10 \Delta FU/min$ )高约6倍,与肿瘤状态无关。与癌症患者中的可能情况相比,小鼠模型可能过度报道了ARI-3996的系统毒性。这进一步得到了使用ARI-3996处理的FAP敲除小鼠的证实。在敲除小鼠中(图21),没有发生ARI-3996释放ARI-2727的活化,而在FAP+小鼠中,达到150 ng/mL的释放的弹头ARI-2727浓度。

[0230] 小鼠外周血中更多的前药活化可导致比在人中更多的ARI-2727D“弹头”系统暴露。如果小鼠毒性阻止达到ARI-3996相比于硼替佐米10倍更大的TI的目标,本发明人将研究在FAP遗传缺陷( $Fap^{LacZ/LacZ}$ )小鼠(70)中的毒性。本发明人已证实,使用FAP特异性底物ARI-3144(图1),FAP缺陷小鼠不具有显著的可测量蛋白水解活性。因此,在FAP-充足小鼠对比FAP-缺陷小鼠中ARI-3996的MTD的比较将确定血浆FAP活性如何影响毒性。如果本发明人发现ARI-3996具有高度显著的临床前抗癌活性,但TI由于小鼠中的血浆FAP活性基线水平而受到损害,本发明人可考虑待满足的可行性测试。

**[0231] 实施例7:通过FAP活化的前药ARI-3996的ARI-2727D的肿瘤递送的证据**

剂量限制性毒性 (DLT) 阻止施用在实体瘤中产生肿瘤反应的足够高剂量的硼替佐米。在皮下异种移植人PC-3前列腺癌的小鼠中的临床前结果表明,DLT是由于相对于非癌症组织的暴露,实体瘤对硼替佐米的暴露低(图7)。ARI-3996是设计为通过成纤维细胞活化蛋白(FAP)的蛋白水解活性的切割,在肿瘤位点释放硼替佐米-样PI,即ARI-2727D的前药。因为FAP主要表达在人上皮癌的基质中,所以,相对于硼替佐米,ARI-3996应提高肿瘤对PI的暴露并降低健康组织中的暴露。

[0232] 在异种移植人HPAF-II胰腺癌的SCID小鼠中,本发明人比较了在单次皮下注射50 mg/kg剂量的ARI-3996后,ARI-3996和ARI-2727D在肝、外周血细胞(PBC)和肿瘤中的组织分布。在施用后的1、3和6小时,对于硼替佐米(图7),对完整ARI-3996的肝暴露大于肿瘤暴露(图8A、C、E),并且在3小时,PBC和肿瘤对前药的暴露类似。然而,在所有时间点,对活性“弹头”ARI-3996的肿瘤暴露超出肝或PBC暴露(图8B、D、F)。

[0233] 在小鼠中Velcade®相比ARI-3996的组织分布的进一步评估(图22和23)显示Velcade®在心脏、肾、肝、脾和肺中达到比在肿瘤中高很多的浓度,表明药物针对药物的无效性是由其在肿瘤中的低浓度导致的。Velcade®的高毒性也由于以损害肿瘤中累积为代价的药物在器官中的累积而导致。与之相比,ARI-3996最初主要在肝中累积;FAP活化/切割以形成ARI-2727D,导致ARI-2727D在肿瘤中形成高得多的相对浓度,并且在肺和血浆中的量较少。因此,通过ARI-3996的FAP活化,ARI-2727D选择性地递送到实体瘤。

[0234] 最后,FAP活化证实为通过发生了ARI-2727D肿瘤累积的模式。在图24中,比较了在注射后1小时的ARI-2727D浓度和注射前药形式(ARI-3996)后1小时的ARI-2727D浓度。ARI-2727D的直接注射导致在肾和肺中的药物累积的最高浓度;当注射ARI-3996时,ARI-2727D的最高浓度见于肿瘤中,随后是肺和血浆。

[0235] 显然,结果表明ARI-3996提高了肿瘤对活性PI的暴露,同时不伤害非肿瘤组织。令人感兴趣的是,在HPAF-II肿瘤模型中,本发明人发现硼替佐米在小鼠中的最大耐受剂量1 mg/kg下缺少显著的抗癌活性(图6),而ARI-3996在50 mg/kg耐受良好并且产生肿瘤大小的显著减小(图9和10)。HPAF-II肿瘤对ARI-3996的反应巩固了本发明的假设,即实体瘤能够响应蛋白酶体抑制。FAP活性的肿瘤:血浆比例在HPAF-II小鼠中仅为3:1,而在胰腺癌患者中,所述比例为100:1或更高。因此,本发明人预期ARI-3996的显著更多的活化,并且因此,将在进一步研究中确认在具有更高的肿瘤:血浆FAP的小鼠模型中的进一步改进的肿瘤反应。

**[0236] 实施例8:在多发性骨髓瘤、正常细胞和实体瘤中Velcade®相比于ARI-2727D和ARI-3996的细胞毒性**

尽管Velcade®在MM患者中具有强力的临床活性,在最初响应处理的所有患者中发生药物抗性。上皮性肿瘤中的基质成纤维细胞通过重建细胞外基质促进肿瘤进展和转移,并且作为旁分泌生长因子的来源,例如成纤维细胞生长因子,表皮生长因子和转化生长因子-β。通过靶向肿瘤微环境的蛋白酶体抑制,ARI-3996可杀死基质成纤维细胞和恶性上皮细胞。这可提供通过杀死比肿瘤细胞本身发生药物抗性的可能性低的细胞类型,而攻击肿瘤的机会。

[0237] 图25和26显示了ARI-2727D和ARI-3996相比于Velcade®针对多发性骨髓瘤(MM)、

正常细胞和各种实体瘤的细胞毒性的进一步生物评估。图25显示Velcade®和ARI-2727D都具有针对各种MM细胞系的极高的功效和对正常细胞的略低的毒性。它们的毒性对实体瘤低得多。在图26中,将ARI-3996与ARI-2727D和Velcade®进行比较。它的细胞毒性全面地低很多,特别是在实体瘤中。

[0238] 这些结果着重说明了选择性递送在解决常规癌症化疗中的现有挑战中的重要性。不将细胞毒性剂选择性递送至癌细胞,它们常常以同样的方式对正常细胞和癌细胞展示相同的毒性。

#### [0239] 实施例9:人癌症的FAP活性

确定哪种癌症将获益于使用本发明化合物的治疗的一个重要的方面。如上所述,FAP在正常人组织中具有非常低的表达。收集来自肿瘤的大量组织样品,并测量它们的FAP活性,而不是表达水平。如图27所示,几乎所有的样品都显示在肿瘤中相比于血清高得多的FAP活性水平。因此,预期对于蛋白酶体抑制剂易感的大多数实体瘤响应使用本发明的FAP-活化的前药的治疗。如图4中所示,人肿瘤具有平均100:1的正常人组织的FAP活性水平。

#### [0240] 实施例10:蛋白酶体抑制剂在U266荷瘤小鼠中的抗癌作用

ARI-3996在小鼠MM模型中一贯胜过Velcade®。使用媒介物、ARI-3996或Velcade®,每周两次(第1和第4日)处理带有U266肿瘤异种移植物的老鼠(2雌,2雄),进行2周。如图28中所示,ARI-3996剂量为50 mg/kg (MTD的 $\frac{1}{2}$ ),且Velcade®为0.5 mg/kg (也是MTD的 $\frac{1}{2}$ )。使用ELISA ( $\mu\text{g/mL}$ )和生物发光评估肿瘤的抑制。ARI-3996显示高于Velcade®的明显优势。在Velcade®组发生1例死亡的同时,ARI-3996组中的所有小鼠幸存,并且具有相比于Velcade®组改进的结果。

#### [0241] 实施例11:FAP识别位点与已知的蛋白酶体抑制剂的缀合

由于上述实施例证实了FAP识别位点(赋予FAP特异性的短肽链)在连接至ARI-2727D时,赋予弹头向肿瘤和周围基质细胞的选择性递送,合理地推断相同的FAP识别序列可连接到其他蛋白酶体抑制剂以产生相同的作用。已知很多短肽和肽类似物序列抑制蛋白酶体。将这些序列通过抑制剂/弹头的N-末端酰胺连接到FAP识别位点将形成与ARI-3996类似的功效、特异性和(低)毒性的前药。

[0242] 很多最强效的蛋白酶体抑制剂包含2-4肽或肽类似物,和替换或附加至羧基末端的亲电子部分。这种亲电子部分是共价修饰蛋白酶体的亲核残基,破坏其催化活性的反应性种类。这样使酶失活的方法在文献中通常称作“自杀式抑制”。成功确认的亲电子部分的实例包括硼酸类、环氧酮类、醛类、氰酸酯类、乙烯基砜、 $\alpha,\beta$ -不饱和羰基,和酮醛。

[0243] 多种临床相关或另外确认的蛋白酶体抑制剂的结构显示在图29中。化学结构的仔细考虑揭示了某些类似性。大多数是二-,三-或四肽,带有连接到羧基末端的亲电子部分。在氨基末端通常是酰基或芳族酰基基团(硼替佐米、CEP-18770、MLN2238、MLN9708、MG-132、PSI、 $^{125}\text{I}$ -NIP-L<sub>3</sub>VS、卡非佐米、oprozomib、环氧酶素、PR-957、NC-005、NC-005-VS、YU-101、LU-005、YU-102、NC-001、NC-022、CPSI,和IPSI-001)。这些酰基或芳族酰基的存在提高了蛋白酶体抑制剂对抗否则可降解短肽的非特异性蛋白酶的抗性。

[0244] 如果将连接到图29中所示各种蛋白酶体抑制剂的这些N-末端酰基或芳族酰基基团除去或替换成本文所述的FAP识别位点,所得到的是新型FAP-活化的蛋白酶体抑制剂,其特异性和毒性极大改进,优于其亲本分子。

## [0245] 引用的参考文献

1. Dolznig, H., N. Schweifer, C. Puri, N. Kraut, W.J. Rettig, D. Kerjaschki, and P. Garin-Chesa. 2005. Characterization of cancer stroma markers: in silico analysis of an mRNA expression database for fibroblast activation protein and endosialin. *Cancer Immun* 5:10.
2. Lee, K.N., K.W. Jackson, V.J. Christiansen, C.S. Lee, J.G. Chun, and P.A. McKee. 2006. Antiplasmin-cleaving enzyme is a soluble form of fibroblast activation protein. *Blood* 107:1397-1404.
3. Orłowski, R.Z., and D.J. Kuhn. 2008. Proteasome inhibitors in cancer therapy: lessons from the first decade. *Clin Cancer Res* 14:1649-1657.
4. Orłowski, R.Z., and A.S. Baldwin, Jr. 2002. NF-kappaB as a therapeutic target in cancer. *Trends Mol Med* 8:385-389.
5. Hideshima, T., P. Richardson, D. Chauhan, V.J. Palombella, P.J. Elliott, J. Adams, and K.C. Anderson. 2001. The proteasome inhibitor PS-341 inhibits growth, induces apoptosis, and overcomes drug resistance in human multiple myeloma cells. *Cancer Res* 61:3071-3076.
6. LeBlanc, R., L.P. Catley, T. Hideshima, S. Lentzsch, C.S. Mitsiades, N. Mitsiades, D. Neuberg, O. Goloubeva, C.S. Pien, J. Adams, D. Gupta, P.G. Richardson, N.C. Munshi,

- and K.C. Anderson. 2002. Proteasome inhibitor PS-341 inhibits human myeloma cell growth in vivo and prolongs survival in a murine model. *Cancer Res* 62:4996-5000.
7. Orlowski, R.Z., J.R. Eswara, A. Lafond-Walker, M.R. Grever, M. Orlowski, and C.V. Dang. 1998. Tumor growth inhibition induced in a murine model of human Burkitt's lymphoma by a proteasome inhibitor. *Cancer Res* 58:4342-4348.
  8. Richardson, P.G., T. Hideshima, and K.C. Anderson. 2003. Bortezomib (PS-341): a novel, first-in-class proteasome inhibitor for the treatment of multiple myeloma and other cancers. *Cancer Control* 10:361-369.
  9. Bross, P.F., R. Kane, A.T. Farrell, S. Abraham, K. Benson, M.E. Brower, S. Bradley, J.V. Gobburu, A. Goheer, S.-L. Lee, J. Leighton, C.Y. Liang, R.T. Lostritto, W.D. McGuinn, D.E. Morse, A. Rahman, L.A. Rosario, S.L. Verbois, G. Williams, Y.-C. Wang, and R. Pazdur. 2004. Approval summary for bortezomib for injection in the treatment of multiple myeloma. *Clin Cancer Res* 10:3954-3964.
  10. Chauhan, D., H. Uchiyama, Y. Akbarali, M. Urashima, K. Yamamoto, T.A. Libermann, and K.C. Anderson. 1996. Multiple myeloma cell adhesion-induced interleukin-6 expression in bone marrow stromal cells involves activation of NF-kappa B. *Blood* 87:1104-1112.
  11. Obeng, E.A., L.M. Carlson, D.M. Gutman, W.J. Harrington, Jr., K.P. Lee, and L.H. Boise. 2006. Proteasome inhibitors induce a terminal unfolded protein response in multiple myeloma cells. *Blood* 107:4907-4916.
  12. McConkey, D.J., and K. Zhu. 2008. Mechanisms of proteasome inhibitor action and resistance in cancer. *Drug Resist Updat* 11:164-179.
  13. Engel, R.H., J.A. Brown, J.H. Von Roenn, R.M. O'Regan, R. Bergan, S. Badve, A. Rademaker, and W.J. Gradishar. 2007. A phase II study of single agent bortezomib in patients with metastatic breast cancer: a single institution experience. *Cancer Invest* 25:733-737.
  14. Dees, E.C., and R.Z. Orlowski. 2006. Targeting the ubiquitin-proteasome pathway in breast cancer therapy. *Future Oncol* 2:121-135.
  15. Hamilton, A.L., J.P. Eder, A.C. Pavlick, J.W. Clark, L. Liebes, R. Garcia-Carbonero, A. Chachoua, D.P. Ryan, V. Soma, K. Farrell, N. Kinchla, J. Boyden, H. Yee, A. Zeleniuch-Jacquotte, J. Wright, P. Elliott, J. Adams, and F.M. Muggia. 2005. Proteasome inhibition with bortezomib (PS-341): a phase I study with pharmacodynamic end points using a day 1 and day 4 schedule in a 14-day cycle. *J Clin Oncol* 23:6107-6116.

16. Aghajanian, C., J.A. Blessing, K.M. Darcy, G. Reid, K. DeGeest, S.C. Rubin, R.S. Mannel, J. Rotmensch, R.J. Schilder, and W. Riordan. 2009. A phase II evaluation of bortezomib in the treatment of recurrent platinum-sensitive ovarian or primary peritoneal cancer: a Gynecologic Oncology Group study. *Gynecol Oncol* 115:215-220.
17. Lonial, S., E.K. Waller, P.G. Richardson, S. Jagannath, R.Z. Orlowski, C.R. Giver, D.L. Jaye, D. Francis, S. Giusti, C. Torre, B. Barlogie, J.R. Berenson, S. Singhal, D.P. Schenkein, D.L. Esseltine, J. Anderson, H. Xiao, L.T. Heffner, and K.C. Anderson. 2005. Risk factors and kinetics of thrombocytopenia associated with bortezomib for relapsed, refractory multiple myeloma. *Blood* 106:3777-3784.
18. Richardson, P.G., H. Briemberg, S. Jagannath, P.Y. Wen, B. Barlogie, J. Berenson, S. Singhal, D.S. Siegel, D. Irwin, M. Schuster, G. Srkalovic, R. Alexanian, S.V. Rajkumar, S. Limentani, M. Alsina, R.Z. Orlowski, K. Najarian, D. Esseltine, K.C. Anderson, and A.A. Amato. 2006. Frequency, characteristics, and reversibility of peripheral neuropathy during treatment of advanced multiple myeloma with bortezomib. *J Clin Oncol* 24:3113-3120.
19. Groll, M., R. Huber, and L. Moroder. 2009. The persisting challenge of selective and specific proteasome inhibition. *J Pept Sci* 15:58-66.
20. Park, J.E., M.C. Lenter, R.N. Zimmermann, P. Garin-Chesa, L.J. Old, and W.J. Rettig. 1999. Fibroblast activation protein, a dual specificity serine protease expressed in reactive human tumor stromal fibroblasts. *J Biol Chem* 274:36505-36512.
21. Scanlan, M.J., B.K. Raj, B. Calvo, P. Garin-Chesa, M.P. Sanz-Moncasi, J.H. Healey, L.J. Old, and W.J. Rettig. 1994. Molecular cloning of fibroblast activation protein alpha, a member of the serine protease family selectively expressed in stromal fibroblasts of epithelial cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:5657-5661.
22. Jemal, A., R. Siegel, E. Ward, Y. Hao, J. Xu, and M.J. Thun. 2009. Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J Clin* 59:225-249.
23. Stinchcombe, T.E., and M.A. Socinski. 2009. Current treatments for advanced stage non-small cell lung cancer. *Proc Am Thorac Soc* 6:233-241.
24. Pennell, N.A., and T. Mekhail. 2009. Investigational agents in the management of non-small cell lung cancer. *Curr Oncol Rep* 11:275-284.
25. Di Costanzo, F., F. Mazzoni, M. Micol Mela, L. Antonuzzo, D. Checcacci, and M. Saggese. 2008. Bevacizumab in non-small cell lung cancer. *Drugs* 68:737-746.

26. Baselga, J., D. Tripathy, J. Mendelsohn, S. Baughman, C.C. Benz, L. Dantis, N.T. Sklarin, A.D. Scidman, C.A. Hudis, J. Moore, P.P. Rosen, T. Twaddell, I.C. Henderson, and L. Norton. 1996. Phase II study of weekly intravenous recombinant humanized anti-p185HER2 monoclonal antibody in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 14:737-744.
27. Cobleigh, M.A., C.L. Vogel, D. Tripathy, N.J. Robert, S. Scholl, L. Fehrenbacher, J.M. Wolter, V. Paton, S. Shak, G. Lieberman, and D.J. Slamon. 1999. Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease. *J Clin Oncol* 17:2639-2648.
28. Vogel, C.L., M.A. Cobleigh, D. Tripathy, J.C. Gutheil, L.N. Harris, L. Fehrenbacher, D.J. Slamon, M. Murphy, W.F. Novotny, M. Burchmore, S. Shak, S.J. Stewart, and M. Press. 2002. Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 20:719-726.
29. Nahta, R., and F.J. Esteva. 2006. HER2 therapy: molecular mechanisms of trastuzumab resistance. *Breast Cancer Res* 8:215.
30. Richardson, P.G., C. Mitsiades, T. Hideshima, and K.C. Anderson. 2006. Bortezomib: proteasome inhibition as an effective anticancer therapy. *Annu Rev Med* 57:33-47.
31. Milano, A., R.V. Jaffaioli, and F. Caponigro. 2007. The proteasome: a worthwhile target for the treatment of solid tumours? *Eur J Cancer* 43:1125-1133.
32. Caravita, T., P. de Fabritiis, A. Palumbo, S. Amadori, and M. Boccardo. 2006. Bortezomib: efficacy comparisons in solid tumors and hematologic malignancies. *Nat Clin Pract Oncol* 3:374-387.
33. Gilardini, A., P. Marmioli, and G. Cavaletti. 2008. Proteasome inhibition: a promising strategy for treating cancer, but what about neurotoxicity? *Curr Med Chem* 15:3025-3035.
34. Sterz, J., I. von Metzler, J.C. Hahne, B. Lamotte, J. Rademacher, U. Heider, E. Terpos, and O. Sezer. 2008. The potential of proteasome inhibitors in cancer therapy. *Expert Opin Investig Drugs* 17:879-895.
35. Zavrski, I., L. Kleeberg, M. Kaiser, C. Fleissner, U. Heider, J. Sterz, C. Jakob, and O. Sezer. 2007. Proteasome as an emerging therapeutic target in cancer. *Curr Pharm Des* 13:471-485.

36. Spataro, V., C. Norbury, and A.L. Harris. 1998. The ubiquitin-proteasome pathway in cancer. *Br J Cancer* 77:448-455.
37. Windebank, A.J., and W. Grisold. 2008. Chemotherapy-induced neuropathy. *J Peripher Nerv Syst* 13:27-46.
38. Adams, J., V.J. Palombella, E.A. Sausville, J. Johnson, A. Destree, D.D. Lazarus, J. Maas, C.S. Pien, S. Prakash, and P.J. Elliott. 1999. Proteasome inhibitors: a novel class of potent and effective antitumor agents. *Cancer Res* 59:2615-2622.
39. Wang, C.Y., M.W. Mayo, and A.S. Baldwin, Jr. 1996. TNF- and cancer therapy-induced apoptosis: potentiation by inhibition of NF-kappaB. *Science* 274:784-787.
40. Wang, C.Y., J.C. Cusack, Jr., R. Liu, and A.S. Baldwin, Jr. 1999. Control of inducible chemoresistance: enhanced anti-tumor therapy through increased apoptosis by inhibition of NF-kappaB. *Nat Med* 5:412-417.
41. Cusack, J.C., Jr., R. Liu, M. Houston, K. Abendroth, P.J. Elliott, J. Adams, and A.S. Baldwin, Jr. 2001. Enhanced chemosensitivity to CPT-11 with proteasome inhibitor PS-341: implications for systemic nuclear factor-kappaB inhibition. *Cancer Res* 61:3535-3540.
42. Ling, Y.H., L. Liebes, B. Ng, M. Buckley, P.J. Elliott, J. Adams, J.D. Jiang, F.M. Muggia, and R. Perez-Soler. 2002. PS-341, a novel proteasome inhibitor, induces Bcl-2 phosphorylation and cleavage in association with G2-M phase arrest and apoptosis. *Mol Cancer Ther* 1:841-849.
43. Loo, T.W., and D.M. Clarke. 1998. Superfolding of the partially unfolded core-glycosylated intermediate of human P-glycoprotein into the mature enzyme is promoted by substrate-induced transmembrane domain interactions. *J Biol Chem* 273:14671-14674.
44. Messersmith, W.A., S.D. Baker, L. Lassiter, R.A. Sullivan, K. Dinh, V.I. Almuete, J.J. Wright, R.C. Donehower, M.A. Carducci, and D.K. Armstrong. 2006. Phase I trial of bortezomib in combination with docetaxel in patients with advanced solid tumors. *Clin Cancer Res* 12:1270-1275.
45. Lieu, C., L. Chow, A.S. Pierson, S.G. Eckhardt, C.L. O'Bryant, M. Morrow, Z.V. Tran, J.J. Wright, and L. Gore. 2009. A phase I study of bortezomib, etoposide and carboplatin in patients with advanced solid tumors refractory to standard therapy. *Invest New Drugs* 27:53-62.
46. Ryan, D.P., L.J. Appleman, T. Lynch, J.G. Supko, P. Fidas, J.W. Clark, M. Fishman, A.X. Zhu, P.C. Enzinger, O. Kashala, J. Cusack, Jr., and J.P. Eder. 2006. Phase I

- clinical trial of bortezomib in combination with gemcitabine in patients with advanced solid tumors. *Cancer* 107:2482-2489.
47. Voortman, J., E.F. Smit, R. Honeywell, B.C. Kuenen, G.J. Peters, H. van de Velde, and G. Giaccone. 2007. A parallel dose-escalation study of weekly and twice-weekly bortezomib in combination with gemcitabine and cisplatin in the first-line treatment of patients with advanced solid tumors. *Clin Cancer Res* 13:3642-3651.
48. Emmenegger, U., G. Francia, Y. Shaked, and R.S. Kerbel. Metronomic chemotherapy: principles and lessons learned from applications in the treatment of metastatic prostate cancer. *Recent Results Cancer Res* 180:165-183.
49. Mutsaers, A.J. 2009. Metronomic chemotherapy. *Top Companion Anim Med* 24:137-143.
50. Navon, A., and A. Ciechanover. 2009. The 26 S proteasome: from basic mechanisms to drug targeting. *J Biol Chem* 284:33713-33718.
51. Adams, J. 2002. Development of the proteasome inhibitor PS-341. *Oncologist* 7:9-16.
52. Sayers, T. 2008. Productively combining proteasome inhibition with the immunotherapy of cancer. *J Mol Med* 86:857-860.
53. Landowski, T.H., C.J. Megli, K.D. Nullmeyer, R.M. Lynch, and R.T. Dorr. 2005. Mitochondrial-mediated dysregulation of Ca<sup>2+</sup> is a critical determinant of Velcade® (PS-341/bortezomib) cytotoxicity in myeloma cell lines. *Cancer Res* 65:3828-3836.
54. Pei, X.Y., Y. Dai, and S. Grant. 2004. Synergistic induction of oxidative injury and apoptosis in human multiple myeloma cells by the proteasome inhibitor bortezomib and histone deacetylase inhibitors. *Clin Cancer Res* 10:3839-3852.
55. Pinciro-Sanchez, M.L., L.A. Goldstein, J. Dodt, L. Howard, Y. Yeh, H. Tran, W.S. Argraves, and W.T. Chen. 1997. Identification of the 170-kDa melanoma membrane-bound gelatinase (seprase) as a serine integral membrane protease. *J Biol Chem* 272:7595-7601.
56. Rosenblum, J.S., and J.W. Kozarich. 2003. Prolyl peptidases: a serine protease subfamily with high potential for drug discovery. *Curr Opin Chem Biol* 7:496-504.
57. Edosada, C.Y., C. Quan, T. Tran, V. Pham, C. Wiesmann, W. Fairbrother, and B.B. Wolf. 2006. Peptide substrate profiling defines fibroblast activation protein as an endopeptidase of strict Gly(2)-Pro(1)-cleaving specificity. *FEBS Lett* 580:1581-1586.

58. Garin-Chesa, P., L.J. Old, and W.J. Rettig. 1990. Cell surface glycoprotein of reactive stromal fibroblasts as a potential antibody target in human epithelial cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:7235-7239.
59. Rettig, W.J., P. Garin-Chesa, J.H. Healey, S.L. Su, H.L. Ozer, M. Schwab, A.P. Albino, and L.J. Old. 1993. Regulation and heteromeric structure of the fibroblast activation protein in normal and transformed cells of mesenchymal and neuroectodermal origin. *Cancer Res* 53:3327-3335.
60. Rettig, W.J., P. Garin-Chesa, H.R. Beresford, H.F. Oettgen, M.R. Melamed, and L.J. Old. 1988. Cell-surface glycoproteins of human sarcomas: differential expression in normal and malignant tissues and cultured cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:3110-3114.
61. Bhowmick, N.A., E.G. Neilson, and H.L. Moses. 2004. Stromal fibroblasts in cancer initiation and progression. *Nature* 432:332-337.
62. Orłowski, R.Z., K. Stewart, M. Vallone, and e. al. 2007. Safety and antitumor efficacy of the proteasome inhibitor carfilzomib (PR-171) dosed for five consecutive days in hematologic malignancies: phase I result [abstract 409]. *Blood* 110:127a.
63. Alsina, M., S. Trudel, M. Vallone, and e. al. 2007. Phase I single agent antitumor activity of twice weekly-consecutive day dosing of the proteasome inhibitor carfilzomib (PR-171) in hematologic malignancies [abstract 411]. *Blood* 110:128a.
64. Ciechanover, A. 1998. The ubiquitin-proteasome pathway: on protein death and cell life. *EMBO J* 17:7151-7160.
65. Bachovchin, W.W., A.G. Plaut, G.R. Flentke, M. Lynch, and C.A. Kettner. 1990. Inhibition of IgA1 proteinases from *Neisseria gonorrhoeae* and *Haemophilus influenzae* by peptide prolyl boronic acids. *J Biol Chem* 265:3738-3743.
66. Connolly, B.A., D.G. Sanford, A.K. Chiluwal, S.E. Healey, D.E. Peters, M.T. Dimare, W. Wu, Y. Liu, H. Maw, Y. Zhou, Y. Li, Z. Jin, J.L. Sudmeier, J.H. Lai, and W.W. Bachovchin. 2008. Dipeptide boronic acid inhibitors of dipeptidyl peptidase IV: determinants of potency and in vivo efficacy and safety. *J Med Chem* 51:6005-6013.
67. Jackson, E.L., N. Willis, K. Mercer, R.T. Bronson, D. Crowley, R. Montoya, T. Jacks, and D.A. Tuveson. 2001. Analysis of lung tumor initiation and progression using conditional expression of oncogenic K-ras. *Genes Dev* 15:3243-3248.
68. Santos, A.M., J. Jung, N. Aziz, J.L. Kissil, and E. Pure. 2009. Targeting fibroblast activation protein inhibits tumor stromagenesis and growth in mice. *J Clin Invest* 119:3613-3625.

69. Cheng, J.D., M. Valianou, A.A. Canutescu, E.K. Jaffe, H.O. Lee, H. Wang, J.H. Lai, W.W. Bachovchin, and L.M. Weiner. 2005. Abrogation of fibroblast activation protein enzymatic activity attenuates tumor growth. *Mol Cancer Ther* 4:351-360.
70. Niedermeyer, J., M. Kriz, F. Hilberg, P. Garin-Chesa, U. Bamberger, M.C. Lenter, J. Park, B. Viertel, H. Puschner, M. Mauz, W.J. Rettig, and A. Schnapp. 2000. Targeted disruption of mouse fibroblast activation protein. *Mol Cell Biol* 20:1089-1094.
71. Adams, J., V.J. Palombella, E.A. Sausville, J. Johnson, A. Destree, D.D. Lazarus, J. Maas, C.S. Pien, S. Prakash, and P.J. Elliott. 1999. Proteasome inhibitors: a novel class of potent and effective antitumor agents. *Cancer Res* 59:2615-2622.
72. McConkey, D.J., and K. Zhu. 2008. Mechanisms of proteasome inhibitor action and resistance in cancer. *Drug Resist Update* 11:164-179.
73. Dolznig, H., N. Schweifer, C. Puri, N. Kraut, W.J. Rettig, D. Kerjaschki, and P. Garin-Chesa. 2005. Characterization of cancer stroma markers: in silico analysis of an mRNA expression database for fibroblast activation protein and endosialin. *Cancer Immun* 5:10.

[0246] 等同方式

本领域技术人员将认识到或能够使用不超过常规的试验确定,本文所述的本发明具体实施方式的很多等同方式。期望这些等同方式包含在后附的权利要求书之内。

[0247] 通过引用并入

本文引用的所有美国专利和美国专利申请通过引用并入本文。

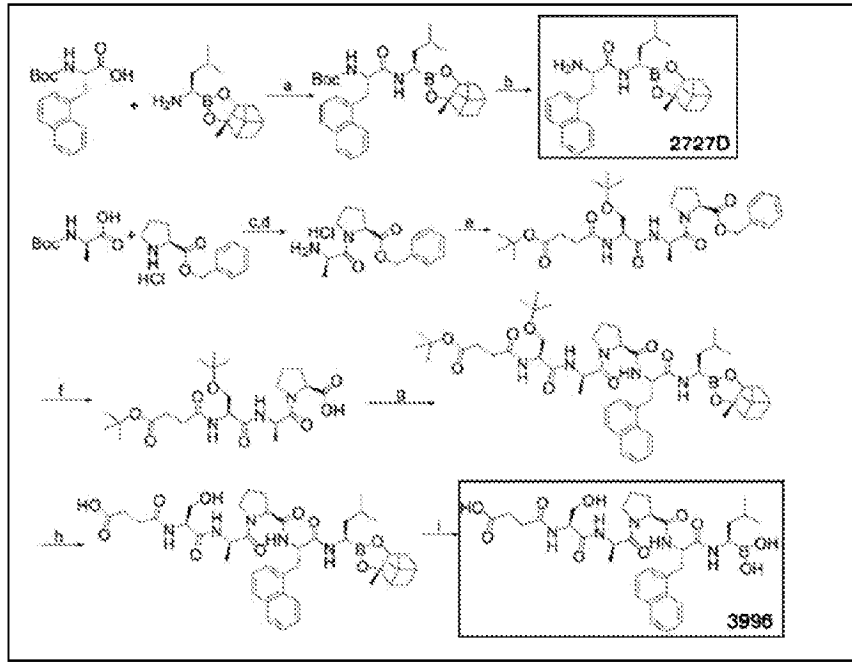


图 1

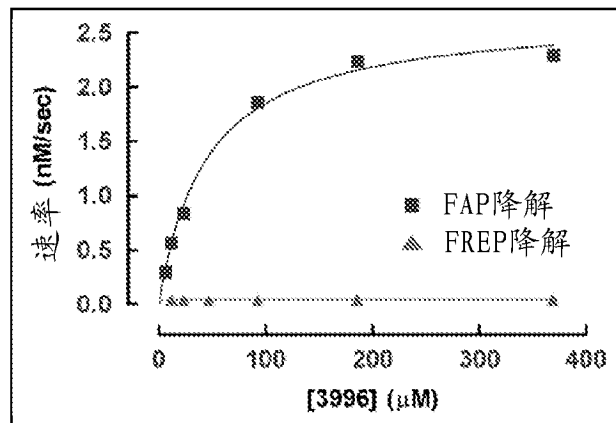


图 2

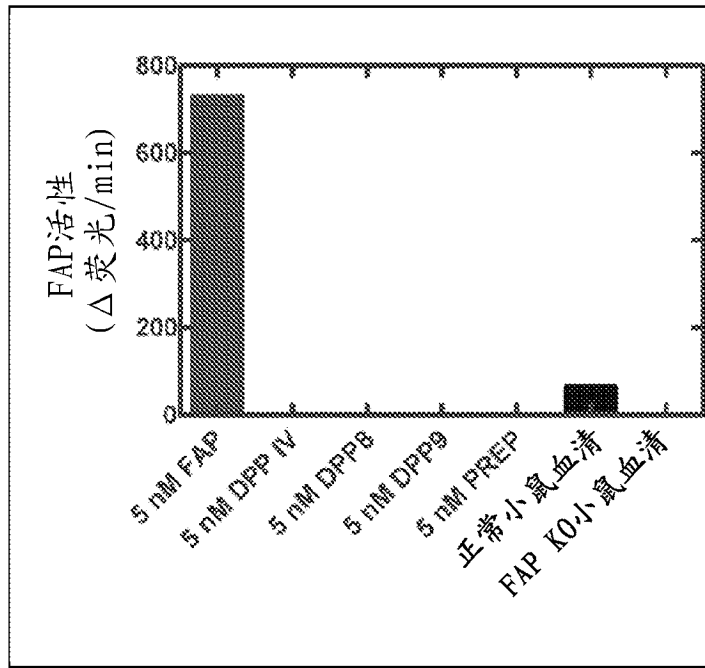


图 3

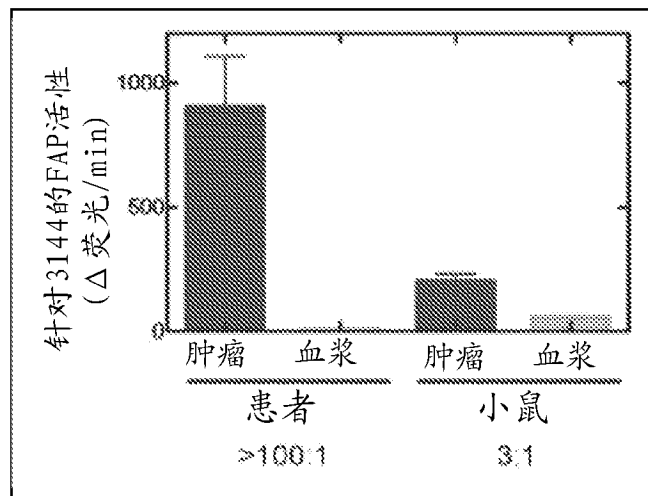


图 4

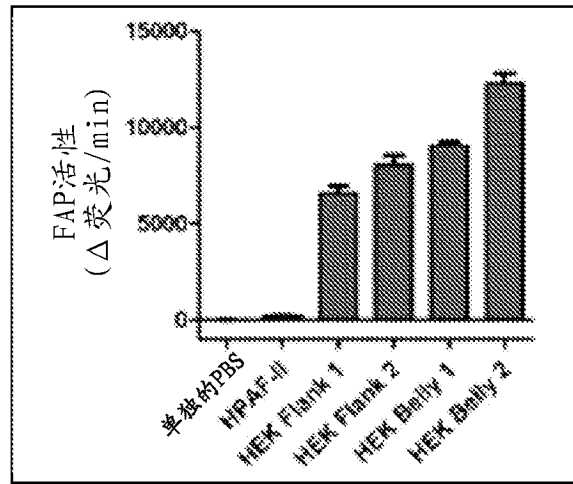


图 5

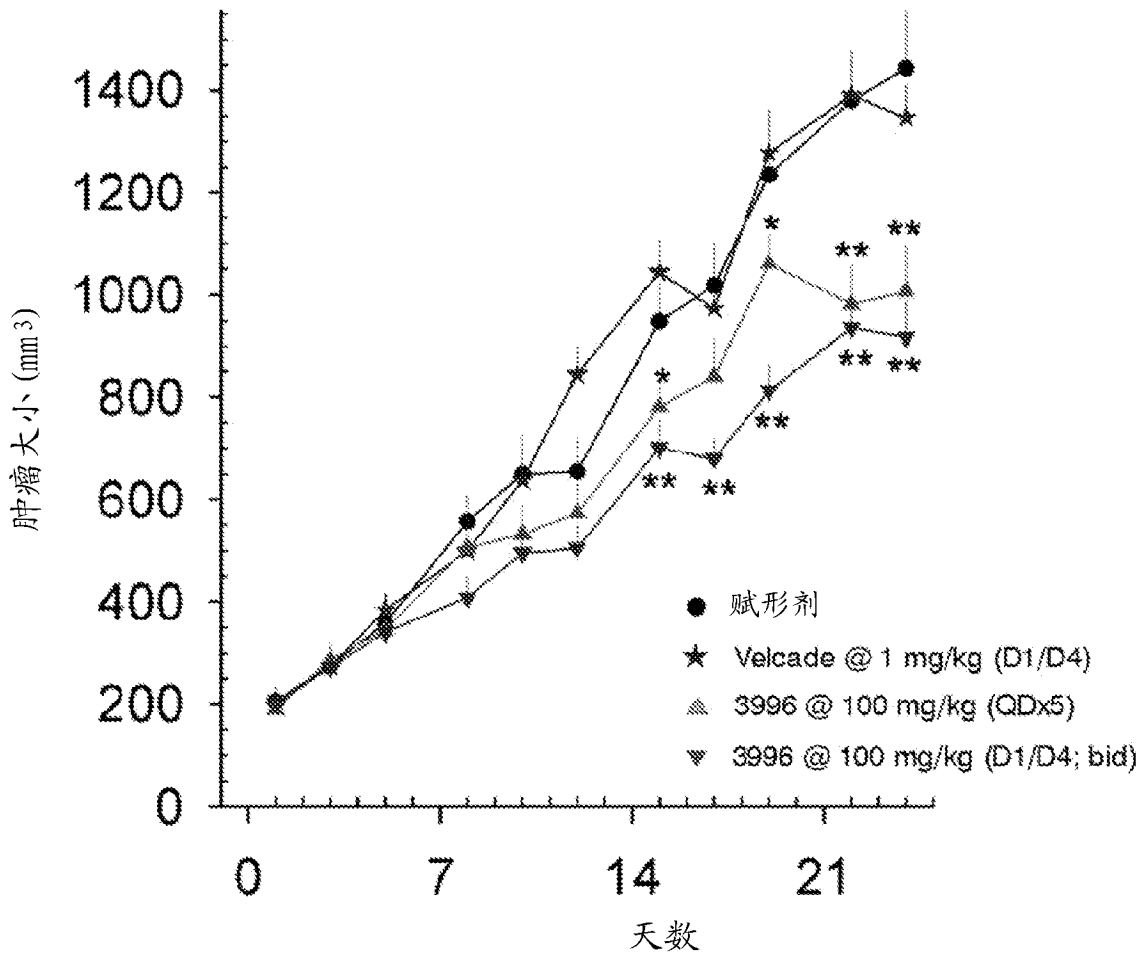


图 6

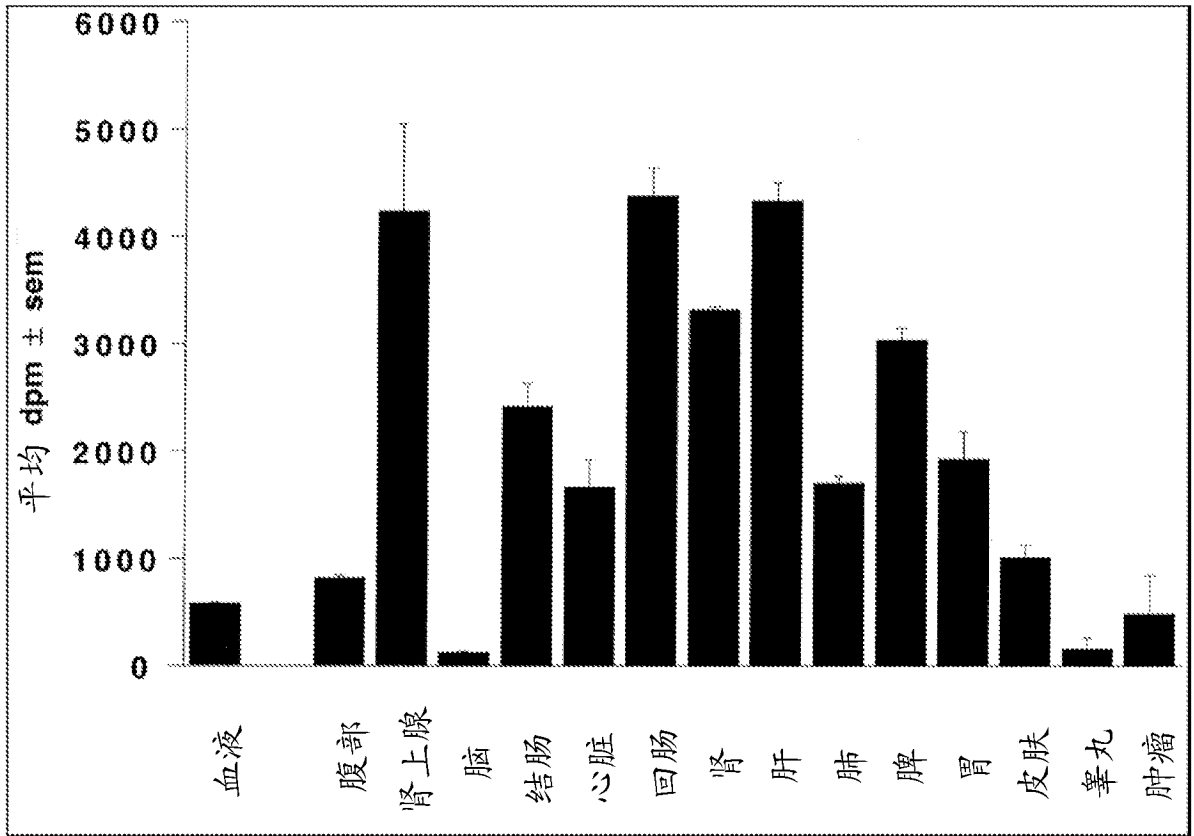


图 7



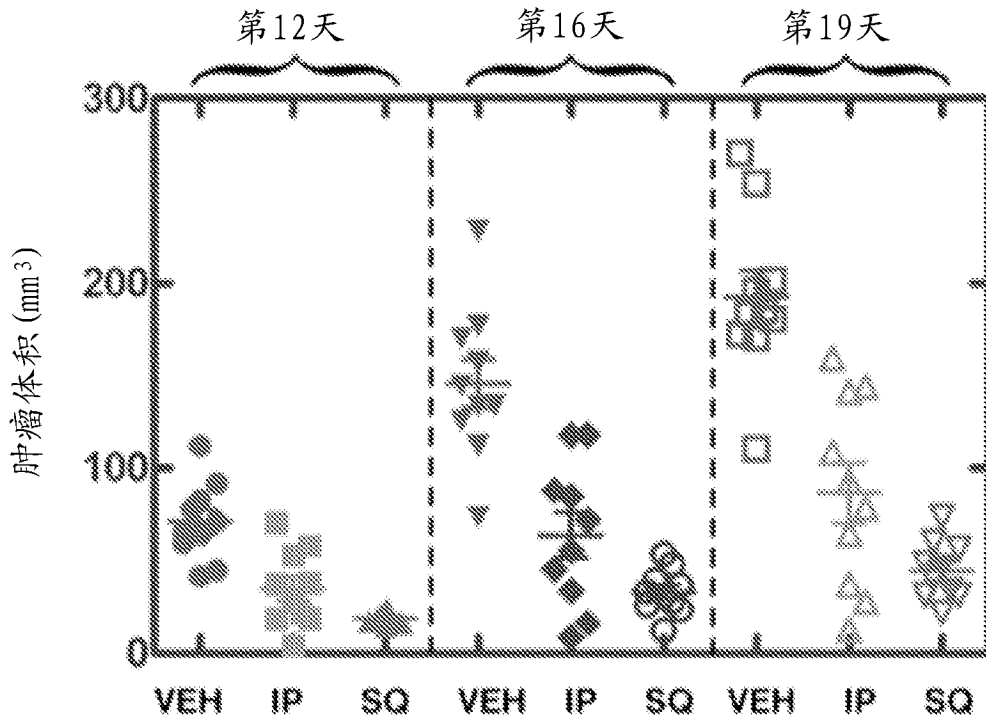
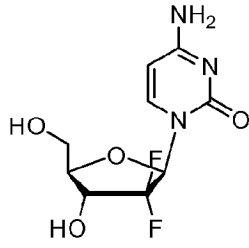


图 9



吉西他滨

\* 吉西他滨是目前用于胰腺癌的标准护理

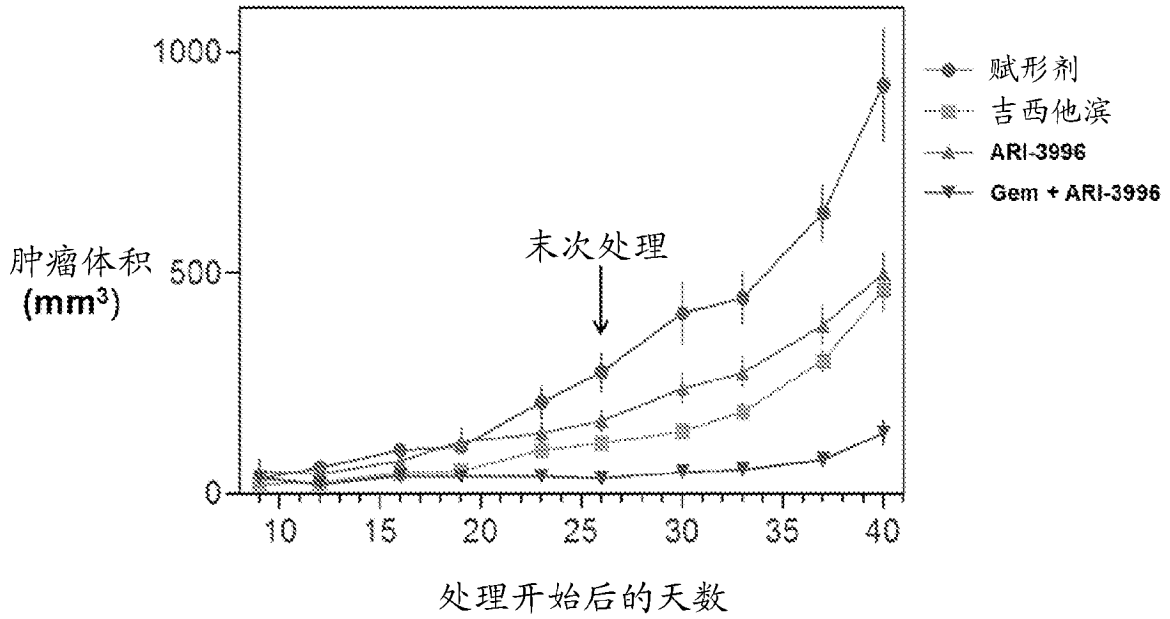


图 10

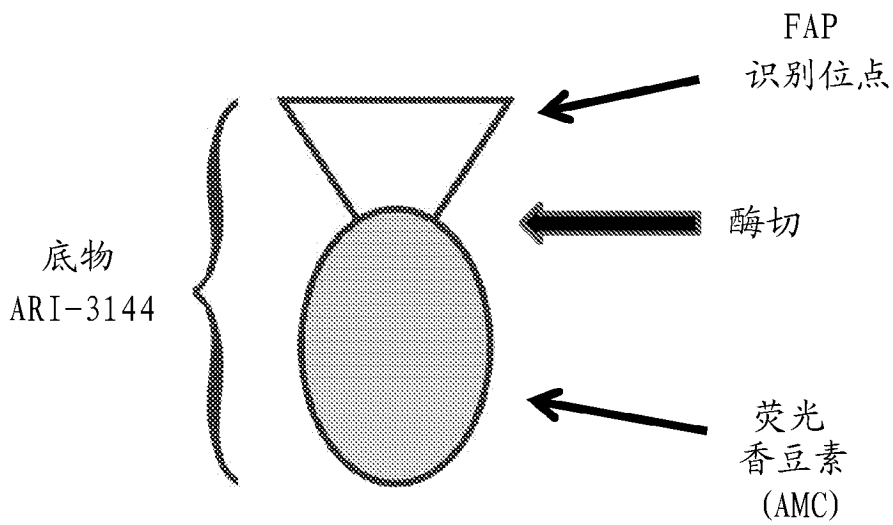


图 11

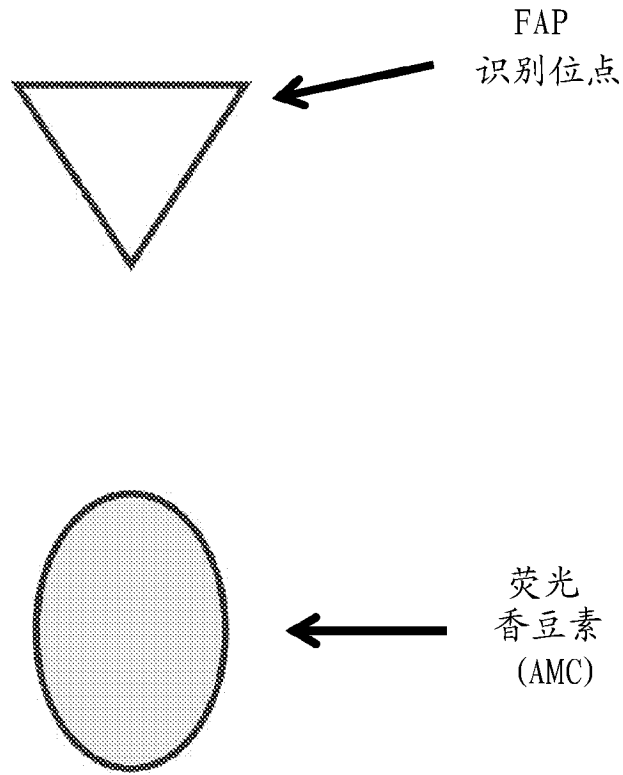


图 12

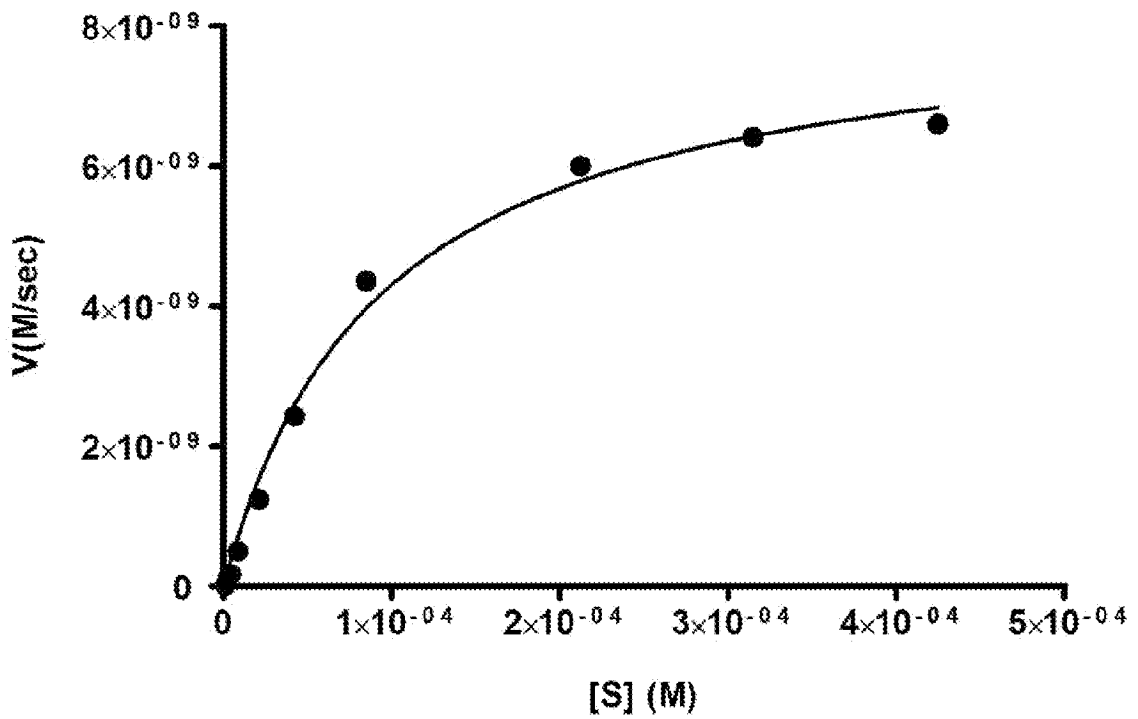


图 13

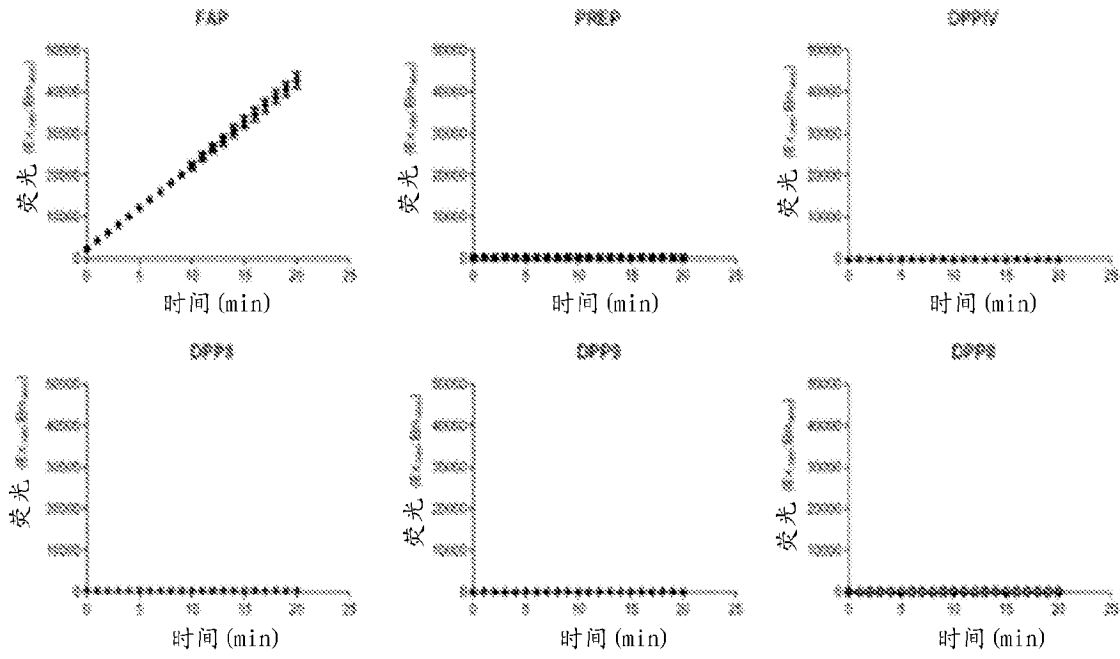


图 14

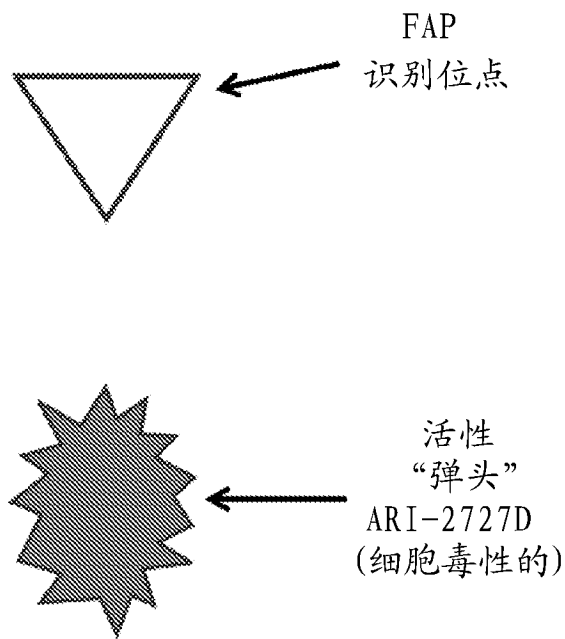
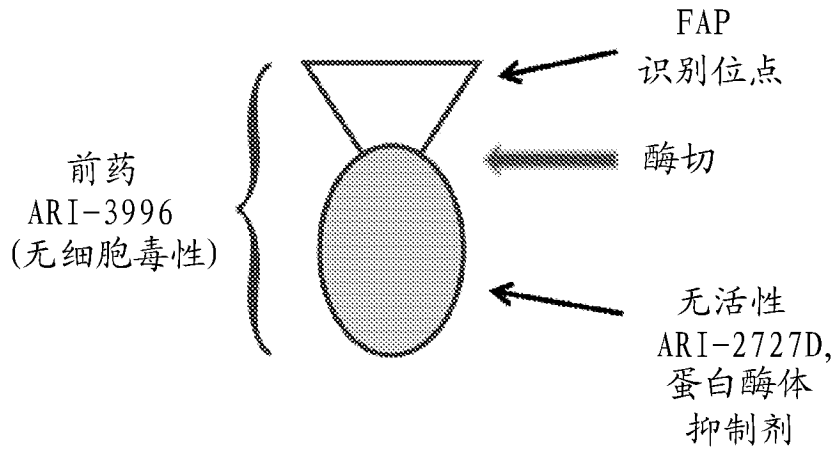


图 15

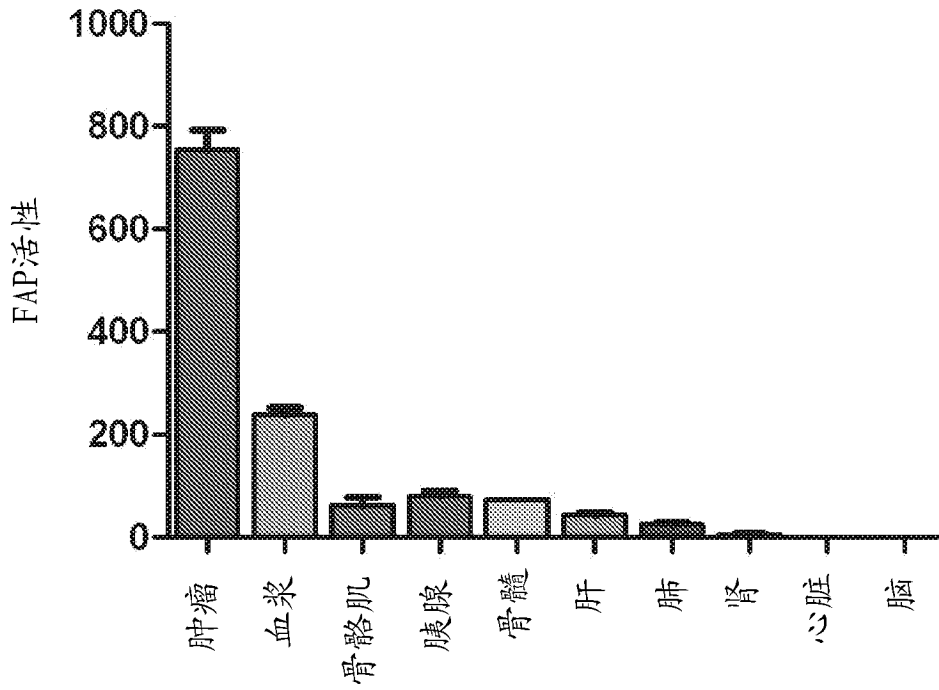


图 16

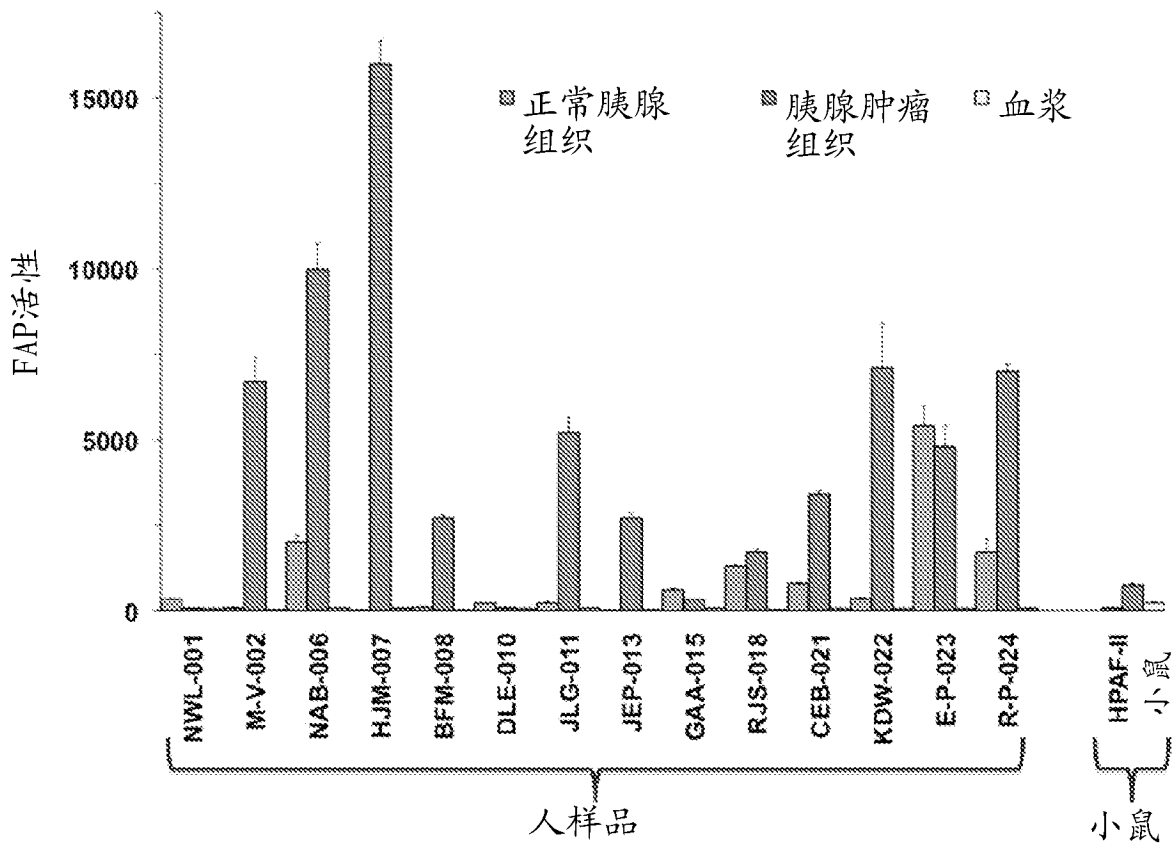


图 17

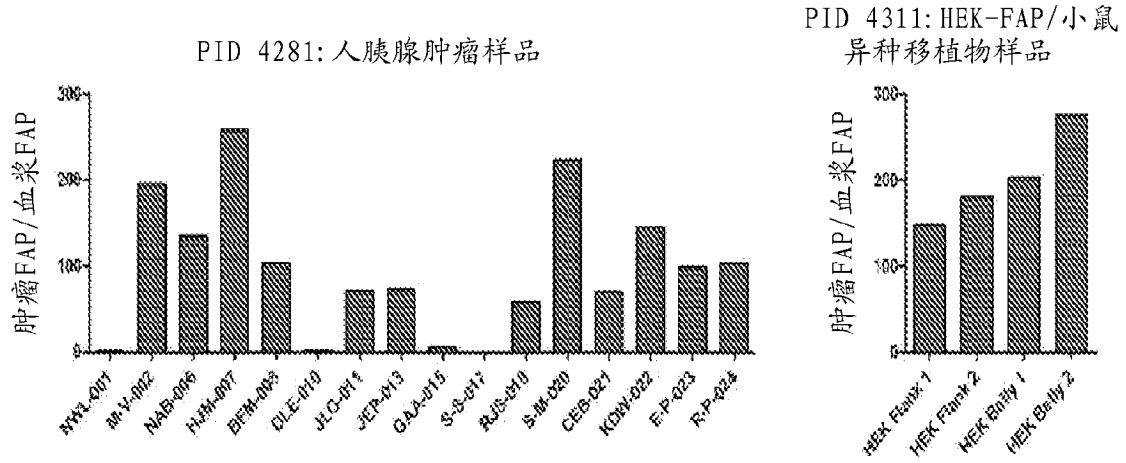


图 18

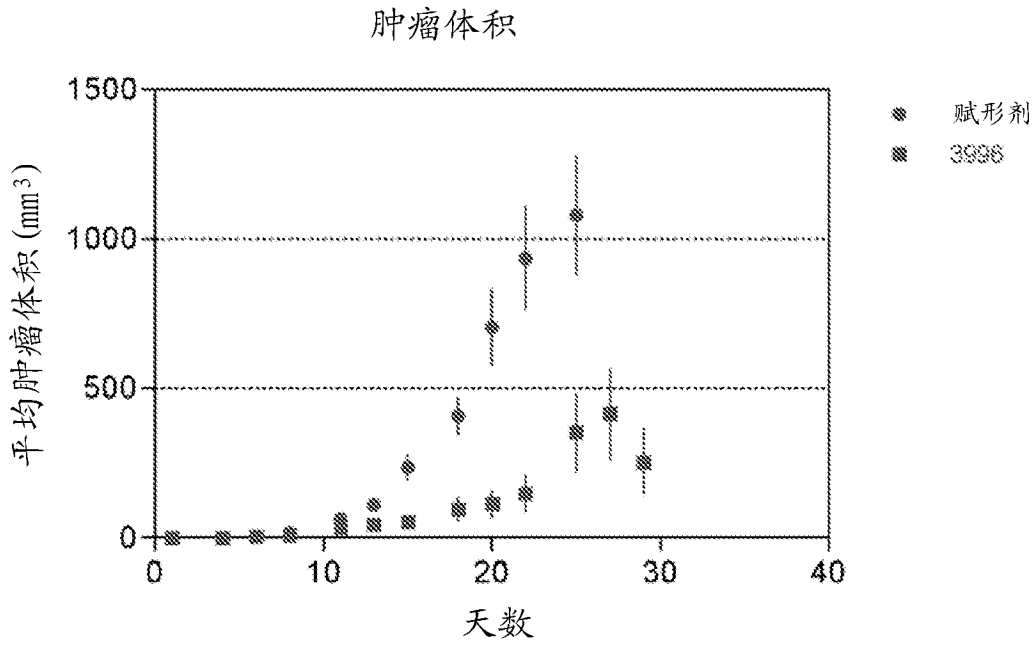
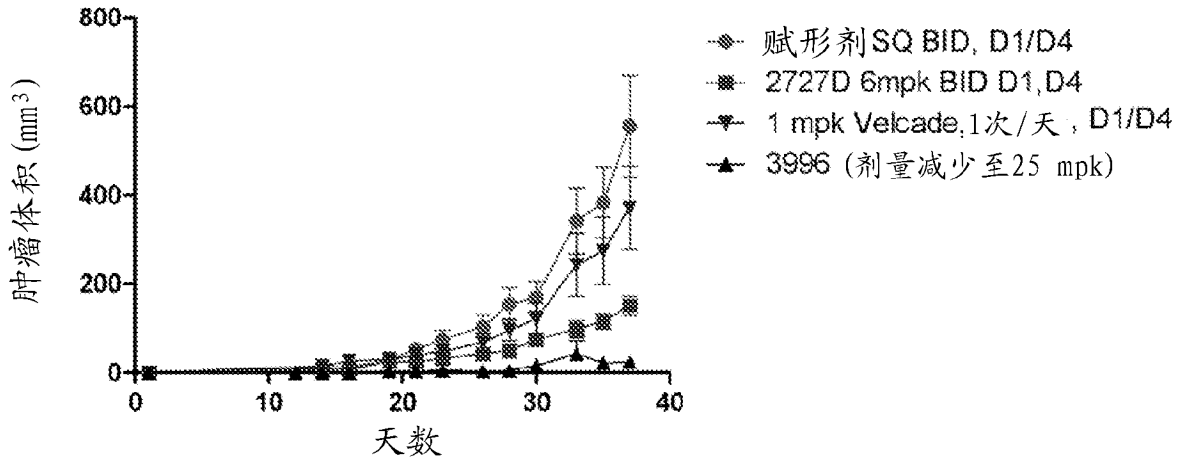


图 19

3619-3996在HEK-FAP模型中的功效  
初步结果: 5/18/2012



3619-3996在HEK-模拟模型中的功效  
初步结果: 5/17/2012

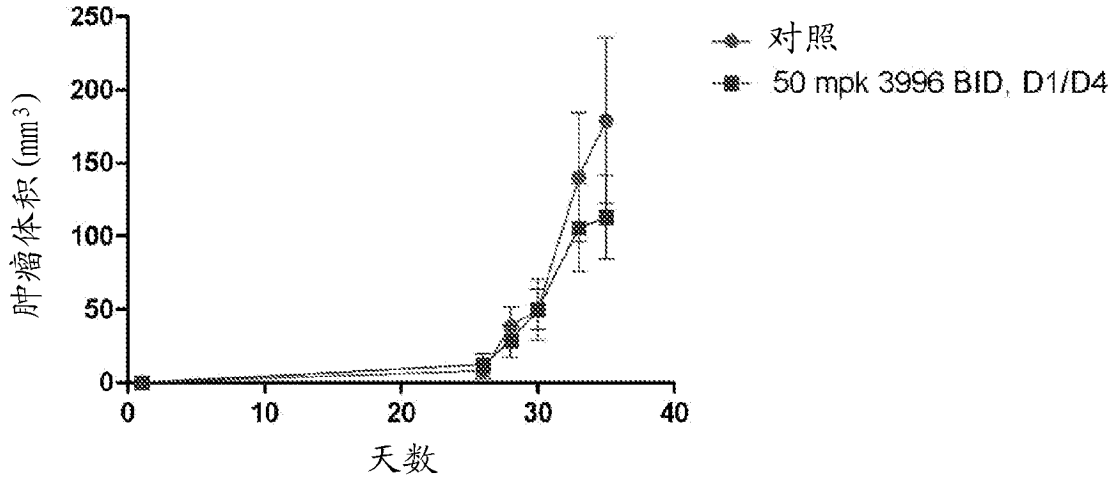


图 20

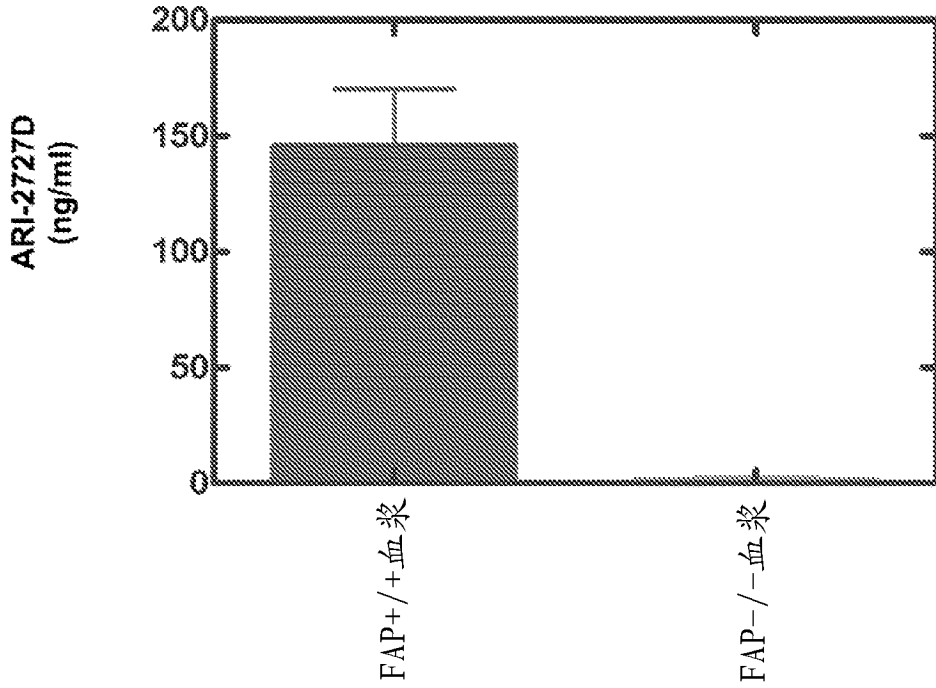
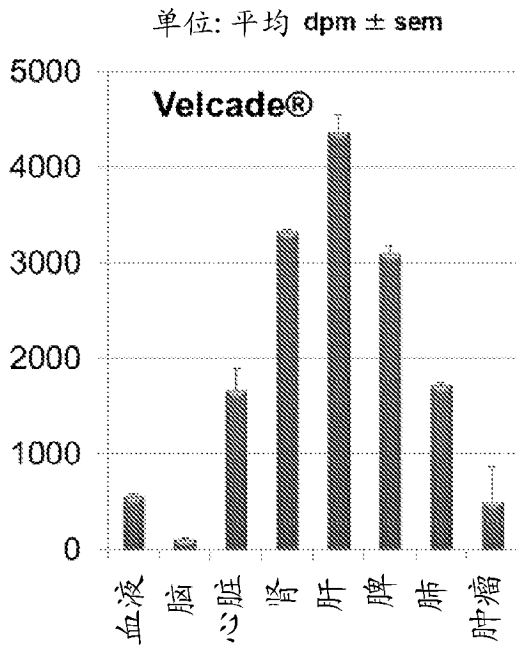
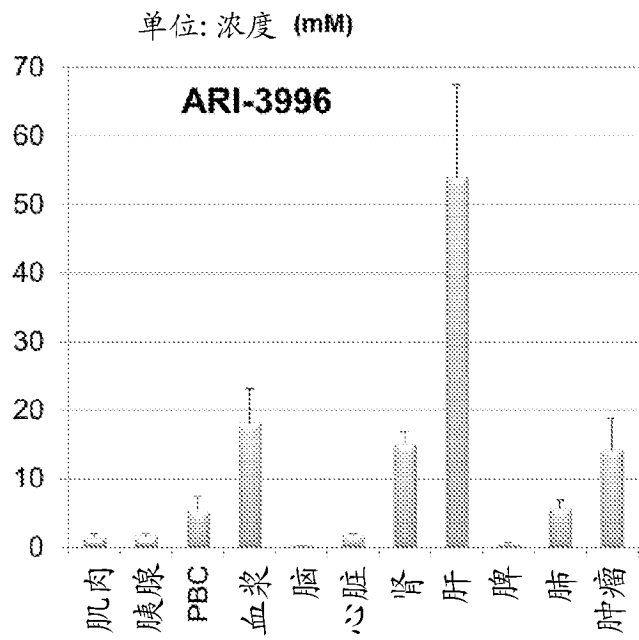


图 21



根据 Adams, J. et al (1999) *Cancer Res.* **59**, 2615



PBC=压积的血细胞

图 22

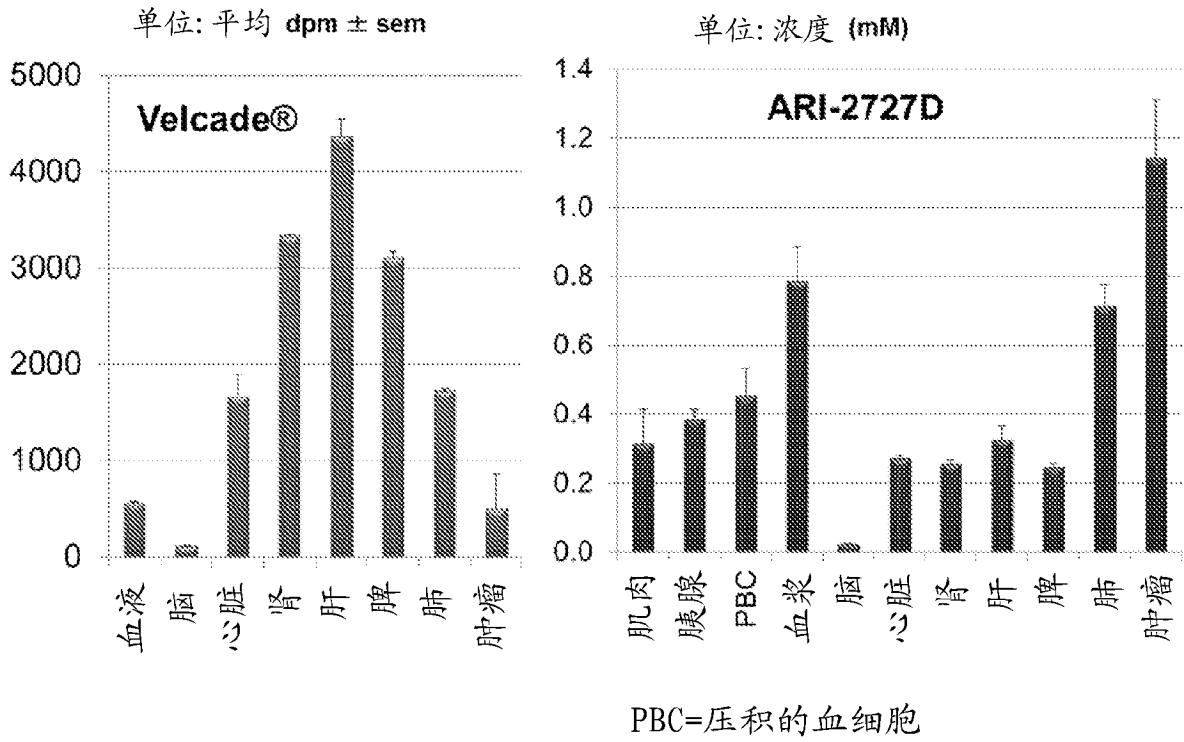
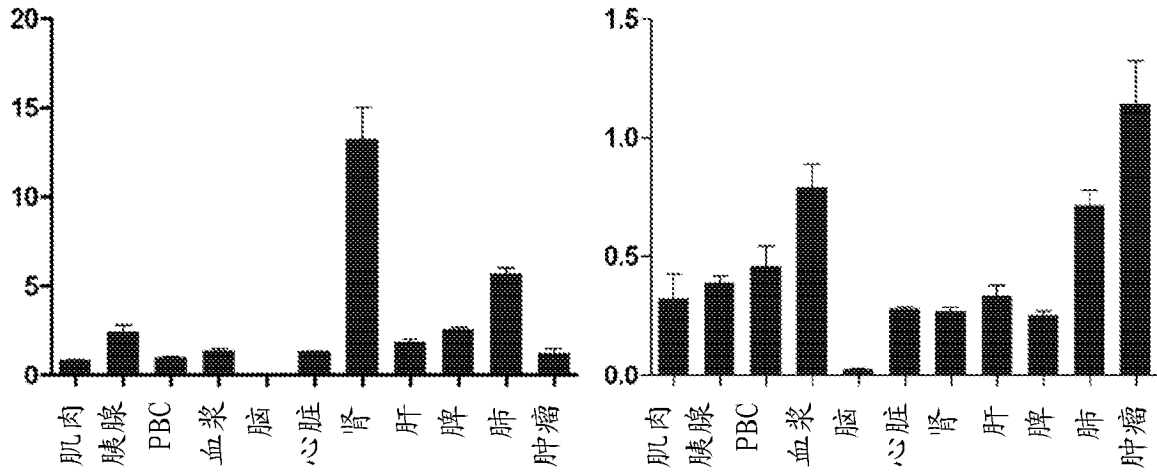


图 23

在皮下注射ARI-2727D (8mpk)  
后1小时的ARI-2727D浓度 ( $\mu\text{M}$ )

在皮下注射ARI-3996 (50mpk)  
后1小时的ARI-2727D浓度 ( $\mu\text{M}$ )



试剂	肿瘤浓度/肝浓度
Velcade®	0.11
ARI-3996	0.26
ARI-2727D	3.5

图 24

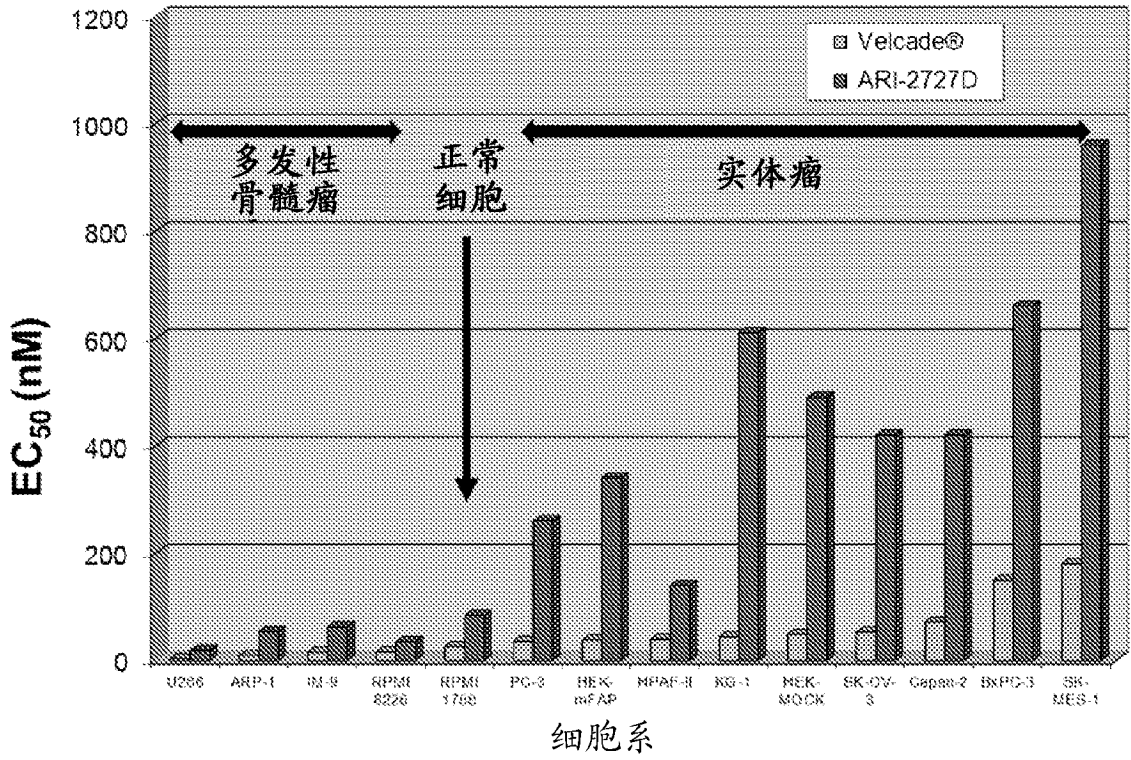


图 25

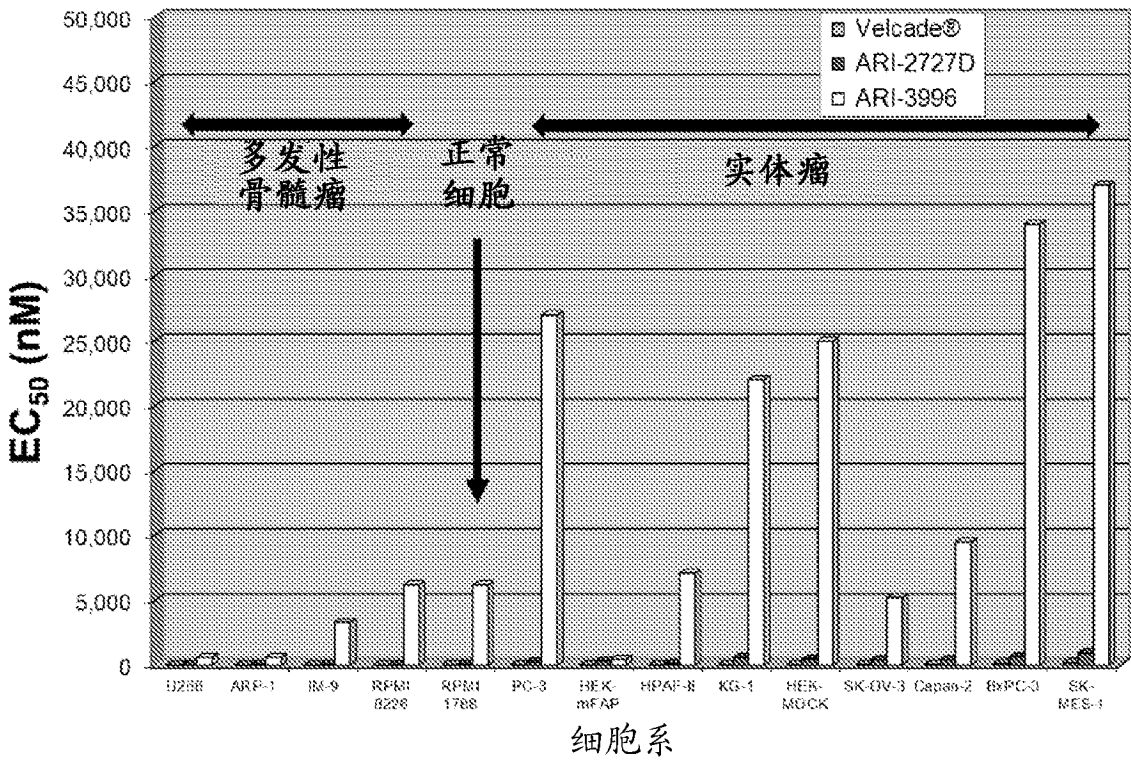


图 26

组织来源	组织样本编号	血清条码	FAP活性 ( $\Delta$ FL/min/mg蛋白)	
			组织	血清
膀胱	1007526	113388	1969	50
膀胱	1005013	106958	1182	33
膀胱	1005636	109017	474	42
膀胱	1006129	110335	4104	68
膀胱	1007027	110340	1847	87
乳腺	1005395	108343	98	85
乳腺	1005451	108499	1598	59
乳腺	1008772	112035	1648	65
乳腺	1009328	118686	1073	57
乳腺	1009649	119507	360	64
结肠	1006685	111639	643	50
结肠	1006857	112000	1413	74
结肠	1006879	112112	1988	46
结肠	1007172	112887	569	45
结肠	1007407	113270	835	45
肺	1009959	120228	118	56
肺	1010842	122636	1374	55
肺	1010756	122466	104	53
肺	1009309	117908	313	58
肺	1010231	120826	135	46

图 27

组织来源	组织样本编号	血清条码	FAP活性 ( $\Delta$ FL/min/mg蛋白)	
			组织	血清
卵巢	1005120	107660	5241	90
卵巢	1005431	108462	9	94
卵巢	1005817	109521	345	96
卵巢	1005896	109675	42	46
卵巢	1006594	111511	588	63
肾	1005560	108834	29	56
肾	1009391	118759	553	31
肾	1009454	118987	471	52
肾	1009526	119039	53	51
肾	1009522	119183	101	35
肉瘤	1005042	107420	309	59
肉瘤	1005118	107612	21	117
肉瘤	1005228	107376	1982	69
肉瘤	1005746	109227	353	61
肉瘤	1005744	109270	302	68
子宫	1006279	110607	1840	46
子宫	1010225	120790	1325	37
子宫	1008368	116201	780	67
子宫	1008591	116699	1606	75
子宫	1009314	118623	230	61

图 27(续)

样品ID	FAP活性 ( $\Delta$ FL/min/mg蛋白)						
	胰腺组织		血浆				
	正常	肿瘤	基线	手术前实验室	手术前	随访后立即	随访
HWL-001	333	57		43	46	40	31
MAV-002	74	6700	34		33	35	32
E-G-003			35		33	35	44
HSE-004				40	41		
L-K-005				41	41		
NAB-006	2181	9378	75		65	71	129
HMM-007	21	16528	65		69	53	61
BPM-008	105	2726	29		32	21	23
JLG-009			49		43		
DCE-010	216	85	49		42	41	26
HLS-011	223	5400	71		69	71	54
JFP-012			49		50		
JEP-013	22	2713	36	30	27	13	
G-F-014			35		32	29	35
GAA-015	553	319	69		71	43	75
R-H-016			27			22	30
S-S-017	1818		56		55	41	49
RJS-018	1266	1678	32		31	21	
D-T-019			23		22		
S-L-020		7423	32		31	26	43
CEB-021	506	3430	51		50	35	52
EDW-022	340	7033	43		40	41	39
E-P-023	5269	4732	49		45	40	33
R-P-024	1773	6972	61		57	47	44

图 27(续)

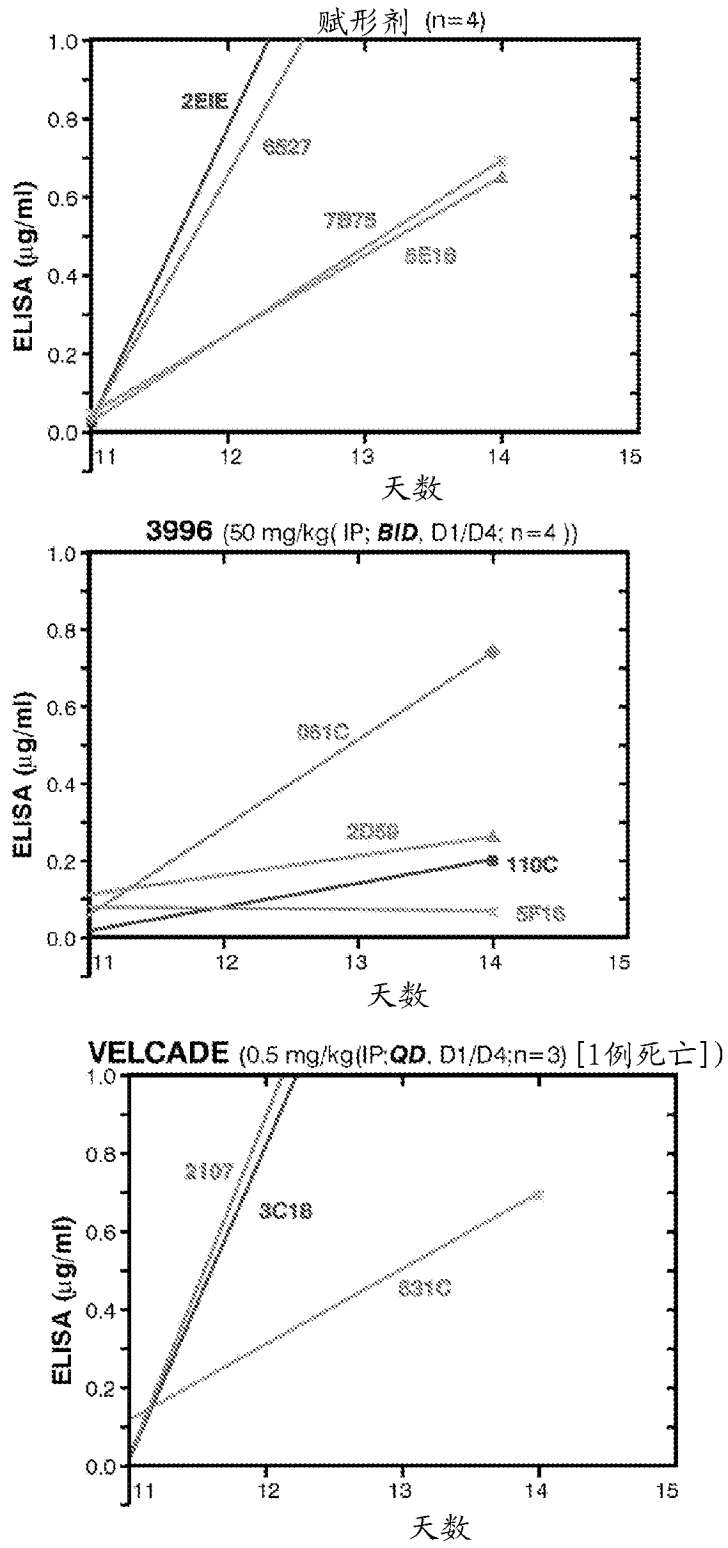


图 28

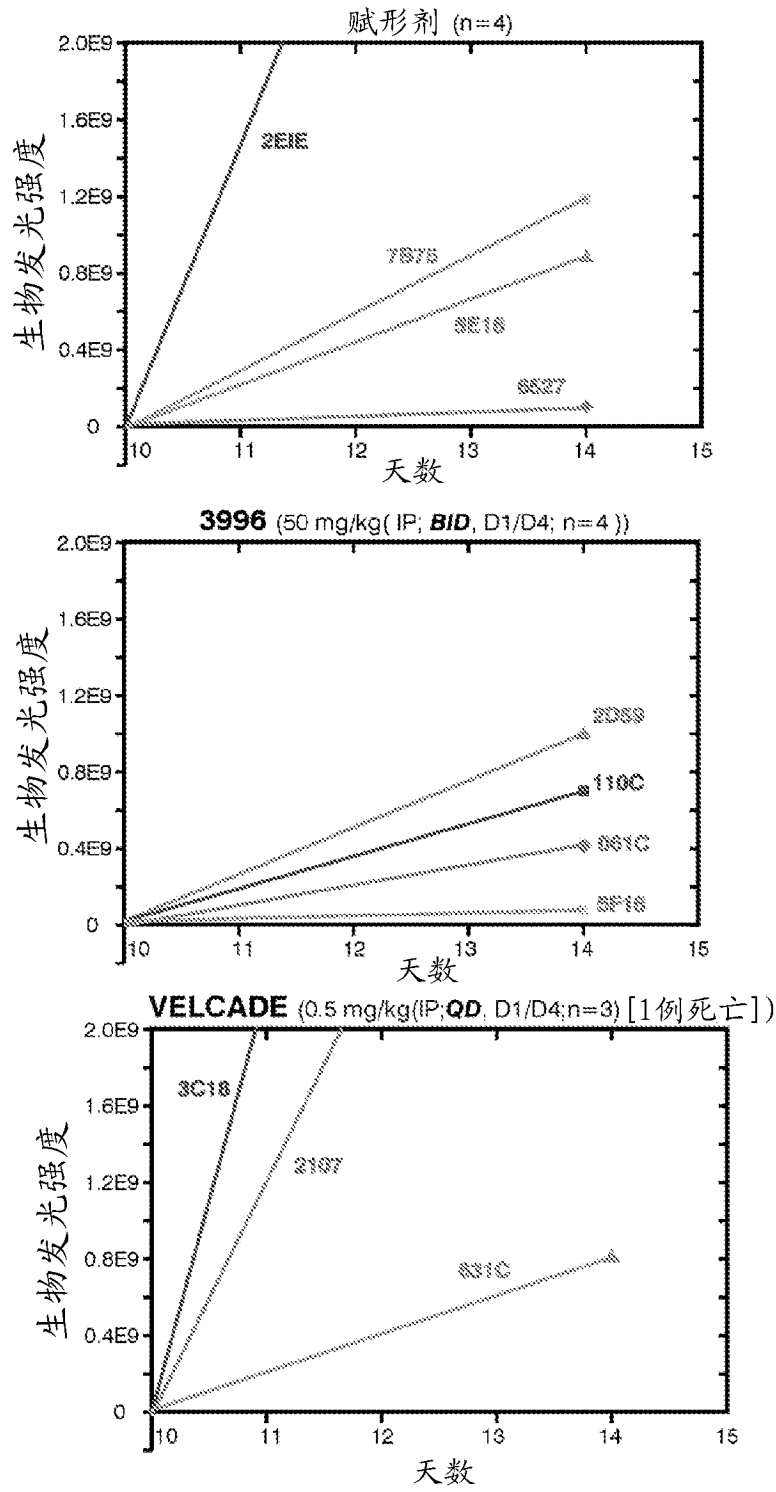


图 28(续)

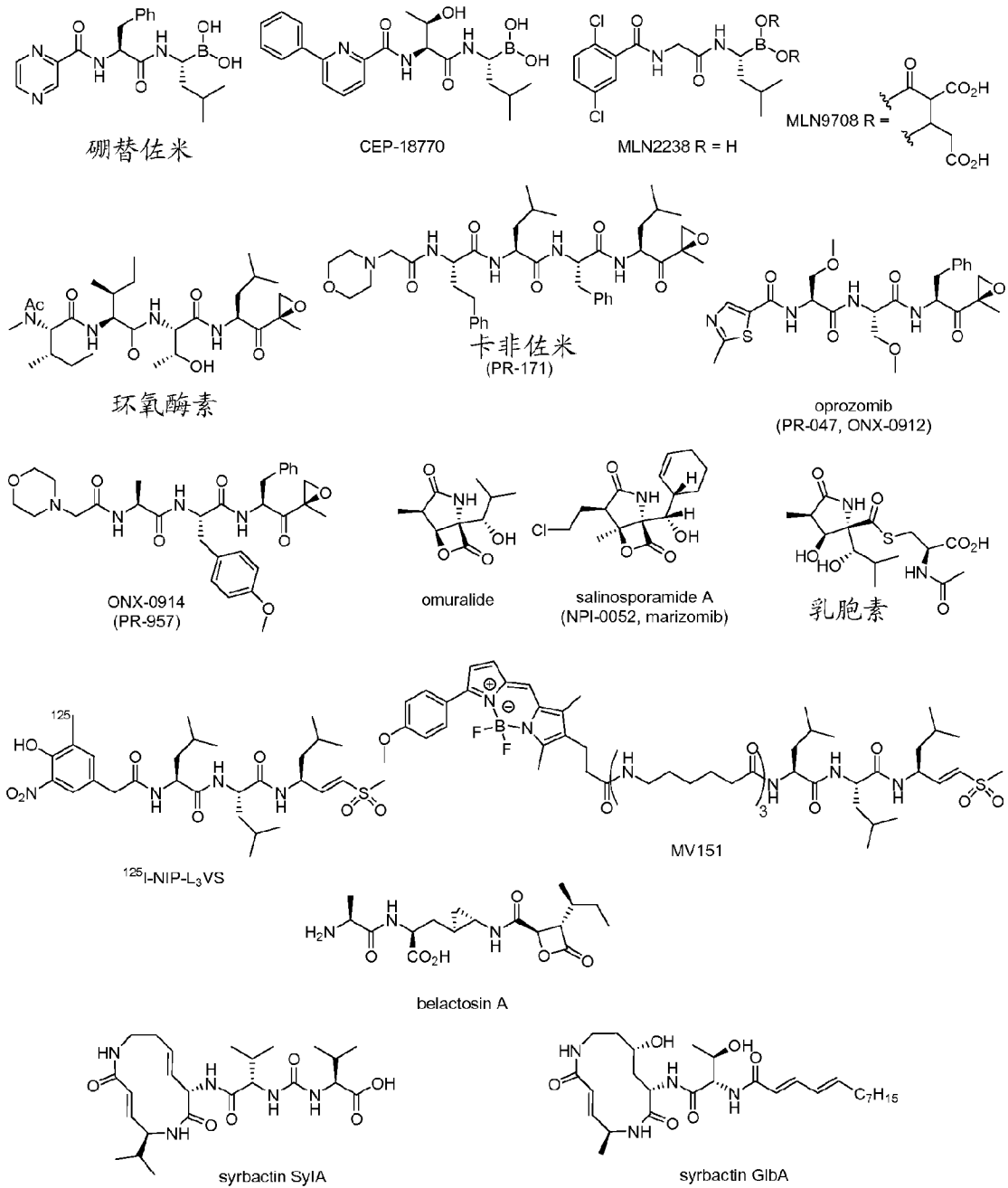


图 29

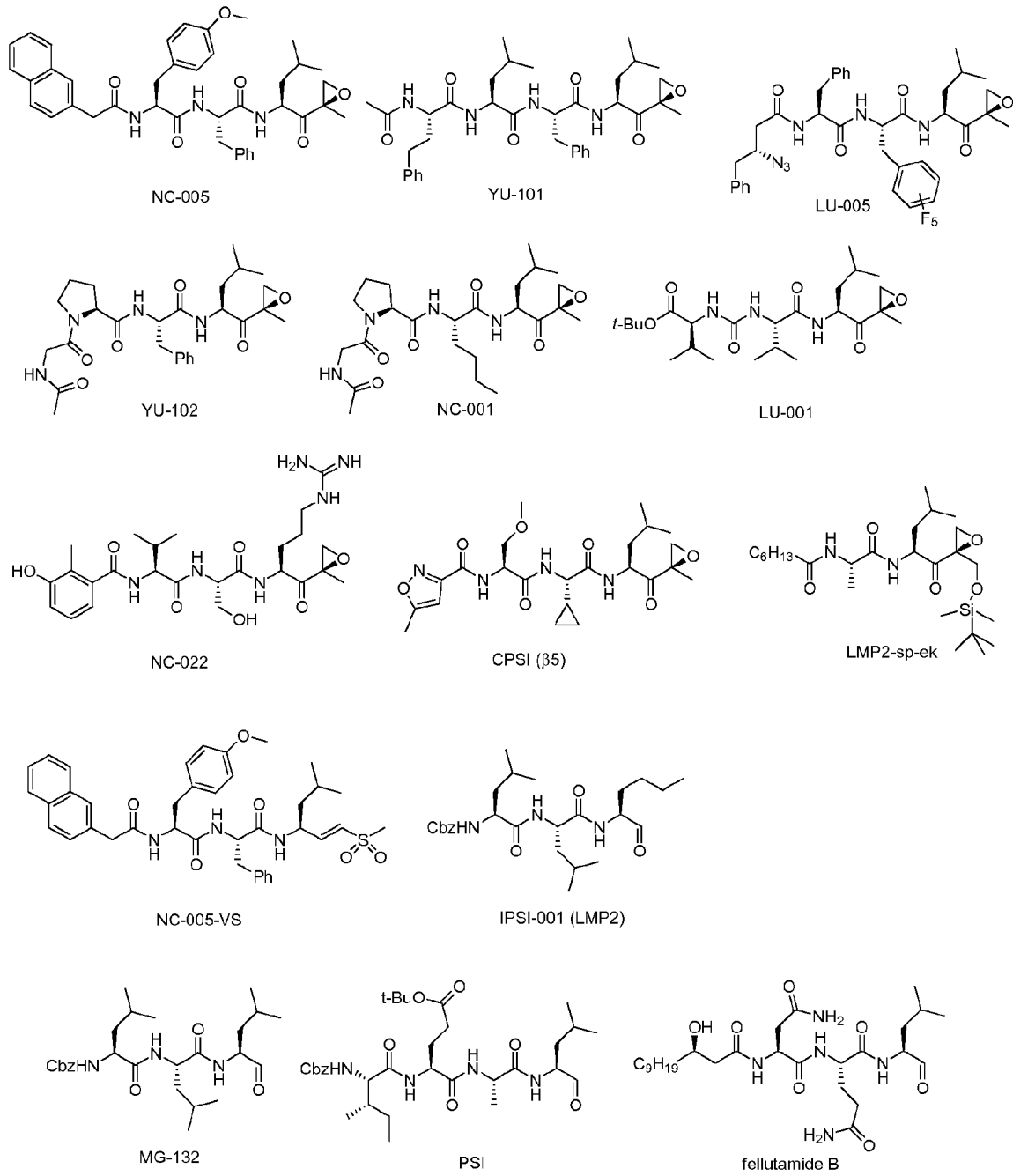


图 29(续)