



(10) 授权公告号 CN 113226323 B

(45) 授权公告日 2024.12.31

(21) 申请号 201980074485.X

(22) 申请日 2019.11.15

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 113226323 A

(43) 申请公布日 2021.08.06

(30) 优先权数据  
18306499.7 2018.11.15 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日  
2021.05.12

(86) PCT国际申请的申请数据  
PCT/EP2019/081516 2019.11.15

(87) PCT国际申请的公布数据  
W02020/099650 EN 2020.05.22

(73) 专利权人 法国古斯塔柏罗斯学院  
地址 法国维勒瑞夫市  
专利权人 法国国家卫生及研究医学协会  
法国国家科学研究中心  
巴黎-萨克雷大学

(72) 发明人 塞巴斯蒂安·阿普谢  
穆阿德·阿拉米  
罗曼·达里格朗德  
萨米尔·梅萨奥迪  
瓦莱丽·萨尔格斯

扎菲亚里索亚·多罗·伦科  
埃克斯佩迪特·延-庞

(74) 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限  
责任公司 11219  
专利代理师 金海霞 刘慧

(51) Int.Cl.  
C07D 239/84 (2006.01)  
A61K 31/517 (2006.01)  
A61K 31/5377 (2006.01)  
A61K 31/675 (2006.01)  
A61K 31/7064 (2006.01)  
A61K 45/06 (2006.01)  
A61P 35/00 (2006.01)  
A61P 35/02 (2006.01)  
A61P 35/04 (2006.01)

(56) 对比文件  
WO 2017165495 A1, 2017.09.28  
Maayan Salton等.Small Molecule  
Modulators of Pre-mRNA Splicing in Cancer  
Therapy.《Trends in Molecular Medicine》  
.2015,第22卷(第1期),28-37.

审查员 李瑶

权利要求书1页 说明书32页  
序列表1页 附图22页

(54) 发明名称

马德辛衍生化合物、组合物及其用于治疗癌症的用途

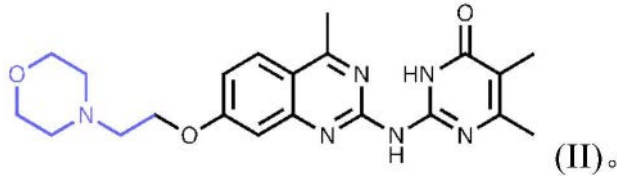
(57) 摘要

本发明涉及医学、特别是癌症治疗领域。更具体来说,本发明涉及通常用作药物的新化合物。具体来说,本发明涉及这些新化合物用于提高细胞、特别是癌细胞对先行翻译产物(PTP)来源抗原的呈递、通常是产生和呈递,或在对象中改变免疫肽组以及在所述对象中诱导或刺激免疫应答的用途。本公开还涉及此类化合物的用途,特别是用于制备药物组合物和/或在需要的

对象中允许或提高疗法的效率。本发明还公开了用于在对象中治疗疾病、特别是癌症,预防或治疗癌转移和/或癌症复发的方法。此外,本发明还提供了适合用于制备根据本发明所述的组合物和/或用于执行本文描述的方法的试剂盒。

1. 式 (II) 的化合物, 其为:

5,6-二甲基-2-((4-甲基-7-(2-吗啉基乙氧基)喹唑啉-2-基)氨基)嘧啶-4(3H)-酮



2. 根据权利要求1所述的化合物在制备用于在对象中治疗癌症的药物中的用途, 其中所述癌症是肉瘤或黑素瘤。

3. 根据权利要求2所述的用途, 其中所述化合物与至少一种不同的抗癌药剂和/或与放疗相组合。

4. 根据权利要求3所述的用途, 其中所述至少一种不同的抗癌药剂选自化疗药剂、免疫检查点阻断剂和抗癌疫苗。

5. 根据权利要求1所述的化合物在制备用于在需要的对象中刺激抗癌免疫应答的药物中的用途, 其中所述癌症是肉瘤或黑素瘤。

6. 根据权利要求1所述的化合物在制备用于在对象中诱导或提高癌细胞对先行翻译产物(PTP)来源抗原的产生和呈递或改变免疫肽组的药物中的用途, 其中所述癌细胞是肉瘤或黑素瘤的细胞。

7. 根据权利要求2至6中的任一项所述的用途, 其中所述对象是哺乳动物。

8. 根据权利要求7所述的用途, 其中所述对象是人类。

9. 一种组合物, 其包含根据权利要求1所述的化合物和可药用载体。

10. 根据权利要求9所述的组合物, 其中所述组合物还包含同时、分开或顺序地使用的至少一种不同的抗癌药剂。

11. 根据权利要求9或10所述的组合物, 其用于在对象中治疗癌症, 其中所述癌症是肉瘤或黑素瘤。

12. 根据权利要求11所述的组合物, 其中所述对象是哺乳动物。

13. 根据权利要求12所述的组合物, 其中所述对象是人类。

14. 一种试剂盒, 其在不同的容器中包含根据权利要求1所述的化合物和至少一种不同的抗癌药剂。

15. 根据权利要求14所述的试剂盒用于制备根据权利要求10所述的组合物的用途。

## 马德辛衍生化合物、组合物及其用于治疗癌症的用途

### 技术领域

[0001] 本公开总的来说涉及医学、特别是癌症治疗领域。更具体来说,本发明涉及作为马德辛(Madrasin)的衍生物并且各自通常用作药物的新化合物。具体来说,本发明涉及这些新化合物提高细胞、特别是癌细胞对(抗原)肽、优选为先行翻译产物(PTP)来源抗原的呈递、通常是产生和呈递,或在对象中改变免疫肽组以及在所述对象中诱导或刺激免疫应答的用途。所述免疫应答通常针对肿瘤抗原,更通常针对所述对象正患有的癌性肿瘤。

[0002] 本公开还涉及此类化合物的用途,特别是用于制备药物组合物和/或在需要的对象中允许或提高疗法、特别是癌症疗法的效率。事实上,每种本发明的化合物在有利情况下均可与至少一种不同的抗癌药剂、通常为化学治疗剂和/或与放疗相组合,用于在对象中治疗癌症、预防或治疗癌转移和/或预防癌症复发。

[0003] 本发明还公开了用于在对象中治疗疾病、特别是癌症以及用于在对象中预防或治疗癌转移和/或癌症复发的方法。此外,本发明还提供了适合用于制备根据本发明所述的组合物和/或用于执行本文描述的方法的试剂盒。

### 背景技术

[0004] 所有有核细胞均通过I类主要组织相容性复合物(MHC-I)途径在它们的表面呈递抗原肽(AP)。AP长为8至10个氨基酸,并反映出固有细胞活性(Caron等)。由于它们的呈递指导免疫细胞、主要是细胞毒性CD8<sup>+</sup>T细胞(CTL)和CD4<sup>+</sup>T辅助细胞对潜在危险元件的监督,因此AP是目前开发的治疗性抗癌疫苗的靶点。尽管前景乐观,但使用靶向肿瘤相关抗原(TAA)的治疗性疫苗的临床试验结果仍未达到预期。主要的失败与免疫抑制机制和抗原的选择未达最佳有关(Mellman等;Burg等)。驱动肿瘤免疫选择并与不良预后相关的重要事件之一是肿瘤细胞的I类MHC抗原呈递丧失或下调(Watson等;Liu等)。由于I类MHC途径的组分的缺陷,所述肿瘤细胞可以避开CTL和自然杀伤细胞的识别(Leone等)。随着I类MHC抗原呈递的整体下降,在细胞表面呈递的抗原即I类MHC免疫肽组(MIP)的性质,对免疫识别来说至关重要。在特定TAA例如乳腺癌中的Her/neu或结肠癌中的CEA已被鉴定并通过免疫疗法靶向的癌症中,这种TAA在肿瘤细胞表面的表达缺失会导致免疫逃避(Lee等;Kmieciak等)。为了抵消这一点,当前的策略旨在扩大被靶向的癌症肽的范围并恢复MHC抗原呈递。

[0005] 为了了解MIP的动态,人们可以将重点放在用于I类MHC呈递途径的AP的来源上。最初,内源AP被认为严格地来自于衰老蛋白的降解。然而,提出可选来源的模型对这一概念发起了挑战。在1996年,J.Yewde11的研究组引入了缺陷型核糖体产物(DRIP)的概念(Yewde11等),其最初被描述为由于其不稳定的构象而被快速降解的产物。更近些时候,本发明人从不同的角度探索了这一概念,显示出AP的主要来源源自于先行翻译事件,所述事件发生在内含子被剪接掉之前,并且独立于全长蛋白的翻译事件(Apcher等)。因此,产生的非规范肽可以源自于内含子序列、3'或5' UTR区以及可选阅读框。这些多肽被称为先行翻译产物(PTP)。PTP的发现表明存在复杂的核翻译机制,所述机制部分旨在通过为I类MHC途径产生相关且适合的多肽来塑造MIP。此外,PTP似乎在癌症发展的动态中发挥作用。当接种在小鼠

中时,已显示在其表面呈递PTP来源抗原的癌细胞可以被特异性T细胞识别,导致肿瘤生长减少。另外,当作为肽疫苗注射到小鼠中时,含有模型表位的纯化的PTP高效促进抗癌免疫应答(Duvallet等)。

[0006] 在核中,前体-mRNA (pre-mRNA) 剪接由剪接体催化,所述剪接体是由与超过200种蛋白质复合的五种小核RNA (snRNA) U1、U2、U4、U5和U6构成的保守且动态的多蛋白复合体。越来越多的研究报道了在许多癌症中,剪接体复合体的失调势必带来异常的剪接模式,造成了异常的肿瘤细胞增殖和进展。自从2011年以来,已在几种癌症中报道了反复发生的剪接体突变,所述癌症包括骨髓单核细胞性白血病、髓系白血病、慢性淋巴细胞性白血病、乳腺癌或多发性骨髓瘤。

[0007] Darrigrand等(药物发现和新的治疗剂(Drug Discovery and new Therapeutics),巴黎萨克雷大学的第一次国际会议,2018年4月)教导了剪接体是基于表位的免疫疗法的可药物治疗的靶点。WO2017/165495描述了PIM激酶抑制剂与RNA剪接调节剂/抑制剂相组合用于治疗癌症。Salton等公开了小分子Pre-mRNA剪接调节剂在癌症疗法中的用途。近年中,已报道了几种抑制剪接体的微生物天然产物及其合成类似物,包括pladienolide B和D、spliceostatin A、FR901464、E7107、异银杏素和马德辛。本发明人测试了每一类中的一些化合物作为抗原呈递的调节剂的潜在效果。

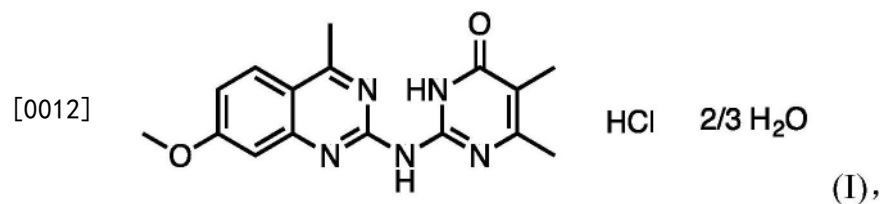
[0008] 在本文中,他们显示马德辛以及他们产生的某些衍生物可以用作对抗癌症的正免疫调节剂。他们研究了在小鼠癌细胞系中表达的PTP来源抗原模型的抗原呈递,并观察到用马德辛和本文描述的不同衍生物进行的体外处理增加了所述抗原的呈递。此外,他们还显示,用溶解在水中的马德辛盐酸盐(在本文中也被称为“Madr.HCl”、“EYP34”或“式I的化合物”)对带有肉瘤的小鼠进行的体内治疗,以免疫依赖性方式减缓了肿瘤生长。为了改善其效果,他们测试了可溶或不溶于水的不同马德辛衍生物,并观察到某些衍生物与马德辛本身相比是小鼠肉瘤生长的更有效的抑制剂。由于在免疫缺陷的Nu/Nu小鼠中,所述天然产物和衍生物对肿瘤生长无影响,因此他们得出结论,它们的效果依赖于免疫应答。这些结果表明,PTP来源的抗原呈递可以通过治疗来调节,并且剪接的抑制可以增强抗癌应答。本发明人在本文中描述了剪接抑制剂的另一种作用机理,其可以用作正免疫调节剂以增强抗肿瘤免疫应答。

[0009] 现在,本发明人在本文中描述了新的化合物,其用于在对象中治疗疾病、特别是治疗癌症,预防癌转移和/或预防癌症复发。

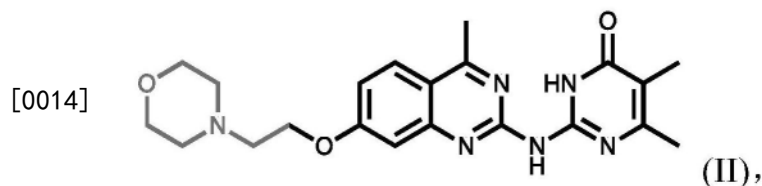
## 发明内容

[0010] 本发明人生产了源自于马德辛的下述特定化合物并在本文中首次描述了它们的结构式:

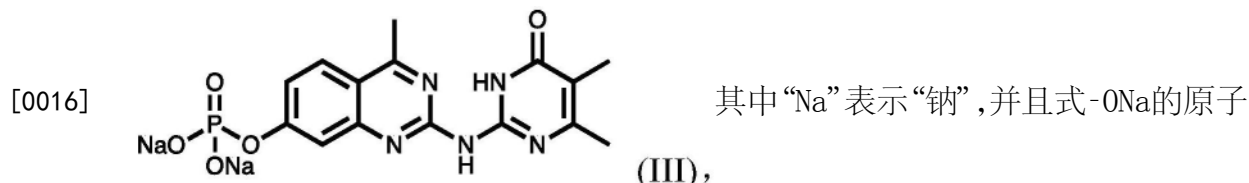
[0011] -马德辛盐酸盐(在本文中也被称为“Madr.HCl”、“EYP34”或“式I的化合物”)



[0013] -5,6-二甲基-2-((4-甲基-7-(2-吗啉基乙氧基)喹唑啉-2-基)氨基)嘧啶-4(3H)-酮(在本文中也被称为“EYP201”、“化合物6”或“式II的化合物”)

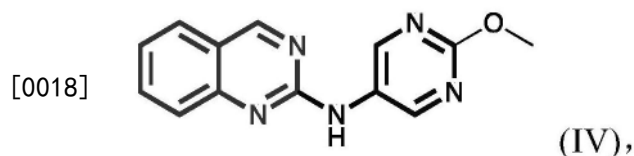


[0015] -2-((4,5-二甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-2-基)氨基)-4-甲基喹唑啉-7-基磷酸钠(在本文中也被称为“EYP59”、“化合物7”或“式III的化合物”)

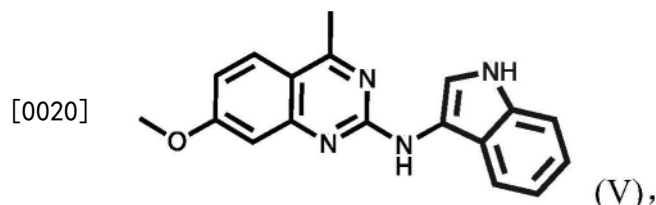


团表示“氢氧化钠”,

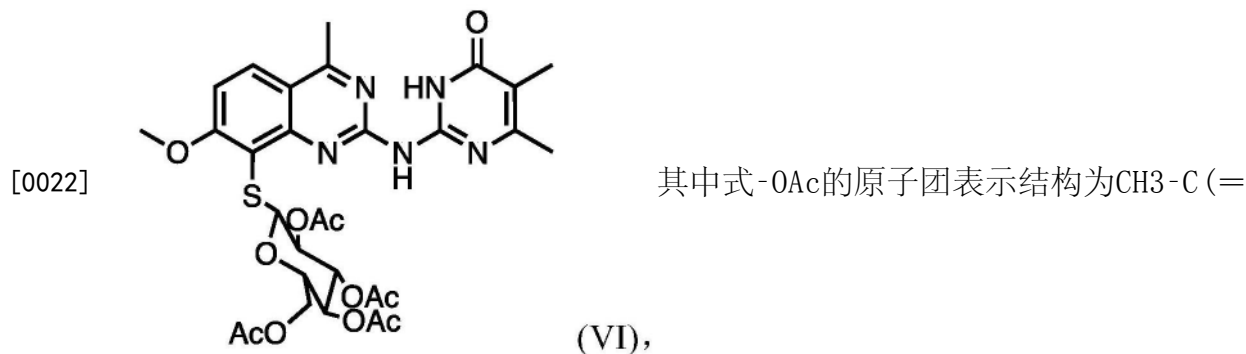
[0017] -N-(2-甲氧基嘧啶-5-基)喹唑啉-2-胺(在本文中也被称为“EYP281”、“化合物32”或“式IV的化合物”)



[0019] -N-(1H-吡咯-3-基)-7-甲氧基-4-甲基喹唑啉-2-胺(在本文中也被称为“EYP165”、“化合物57”或“式V的化合物”)



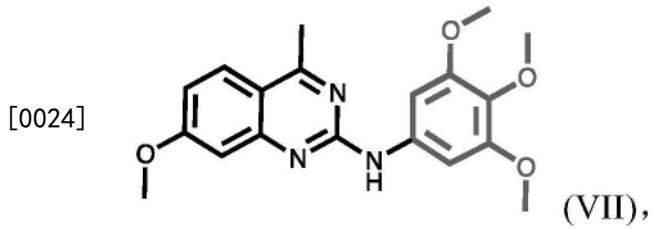
[0021] -((1S,2S,4R,5S,6S)-5-乙酰氧基-7,8-二乙酰基-4-((2-((4,5-二甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-2-基)氨基)-7-甲氧基-4-甲基喹唑啉-8-基)硫代)-3,7λ3,8λ3-三氧杂双环[4.2.0]辛-2-基)甲基乙酸酯(在本文中也被称为“EYP86”、“化合物10”或“式VI的化合物”)



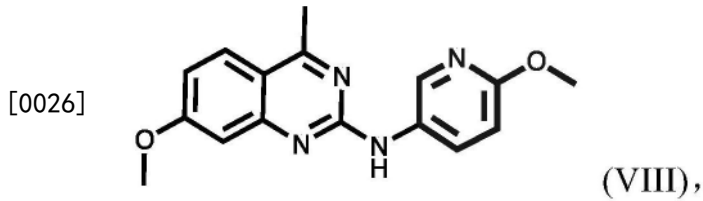
O)-O-的“乙酰氧基”,

[0023] -7-甲氧基-4-甲基-N-(3,4,5-三甲氧基苯基)喹唑啉-2-胺(在本文中也被称为

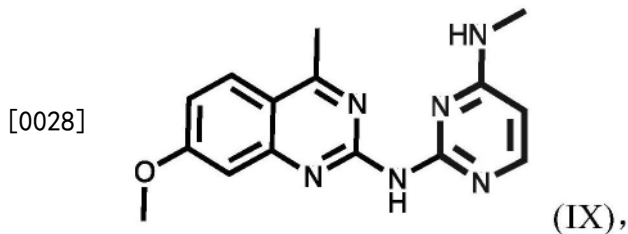
“EYP188”、“化合物42”或“式VII的化合物”)



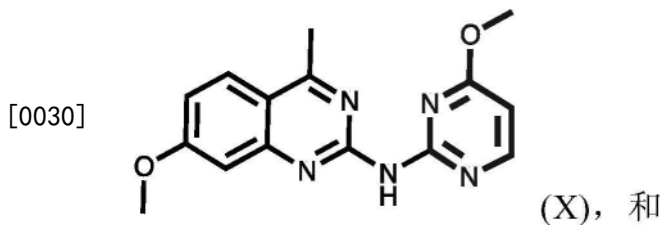
[0025] -7-甲氧基-N-(6-甲氧基吡啶-3-基)-4-甲基喹唑啉-2-胺(在本文中也被称为“EYP174”、“化合物41”或“式VIII的化合物”)



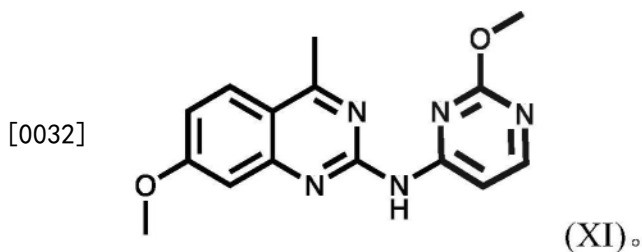
[0027] -N2-(7-甲氧基-4-甲基喹唑啉-2-基)-N4-甲基嘧啶-2,4-二胺(在本文中也被称为“EYP181”、“化合物49”或“式IX的化合物”)



[0029] -7-甲氧基-N-(4-甲氧基嘧啶-2-基)-4-甲基喹唑啉-2-胺(在本文中也被称为“EYP179”、“化合物50”或“式X的化合物”)



[0031] -7-甲氧基-N-(2-甲氧基嘧啶-4-基)-4-甲基喹唑啉-2-胺(在本文中也被称为“EYP190”、“化合物54”或“式XI的化合物”)



[0033] 在本文中描述了这些化合物中的每一者及其任何组合作为药物。

[0034] 这些化合物中的任一者及其可药用盐,可以有利地用作药物。

[0035] 在本文中描述的优选情况下,上文中描述的式(I)至(XI)的化合物中的任一者或其可药用盐或其任何组合,用于在对象中治疗疾病,特别是用于治疗癌症,用于预防癌转移

和/或用于预防癌症复发。

[0036] 还描述了具有选自式 (I) 至 (XI) 的结构式的化合物的体内、体外或离体用途,其用于在对象中诱导或增加细胞、特别是癌细胞对 (抗原) 肽、优选为先行翻译产物 (PTP) 来源抗原的呈递、通常为产生和呈递,或改变免疫肽组。

[0037] 具有选自式 (I) 至 (XI) 的结构式的化合物通过刺激对象的免疫系统,允许医生阻止或控制、优选地减少癌细胞增殖。此外,在有利情况下,它还能够提高其他癌症治疗的有效性。本发明人在本文中证实了这种化合物另外还能降低癌转移和/或癌症复发的风险。

[0038] 本文中描述了一种组合物,其包含此类具有选自式 (I) 至 (XI) 的结构式的化合物和可药用载体,优选地与至少一种不同的抗癌药剂一起同时、分开或顺序地使用。这种化合物通常用于在对象中治疗疾病、特别是治疗癌症,预防癌转移和/或预防癌症复发。

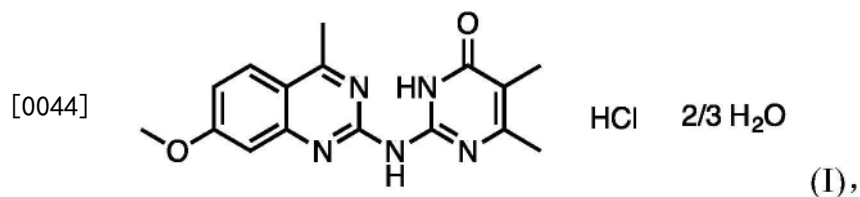
[0039] 本文中描述了一种在对象中治疗疾病、特别是治疗癌症的方法,所述方法包括向所述对象给药本文中描述的化合物、通常是具有选自式 (I) 至 (XI) 的结构式的化合物或组合物的步骤。

[0040] 本文中描述了一种试剂盒,其在不同的容器中包含具有选自式 (I) 至 (XI) 的结构式的化合物和优选地至少一种不同的抗癌药剂,还描述了所述试剂盒的用途,特别是用于制备本文中所描述的组合物。

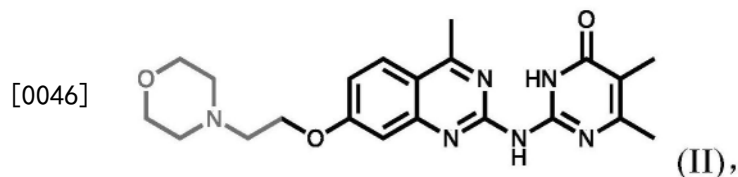
[0041] 发明详述

[0042] 本发明人产生了在本发明的上下文中首次描述的马德辛衍生物,并且它们被更确切地鉴定为下述式 (I) 至 (XI) 的化合物:

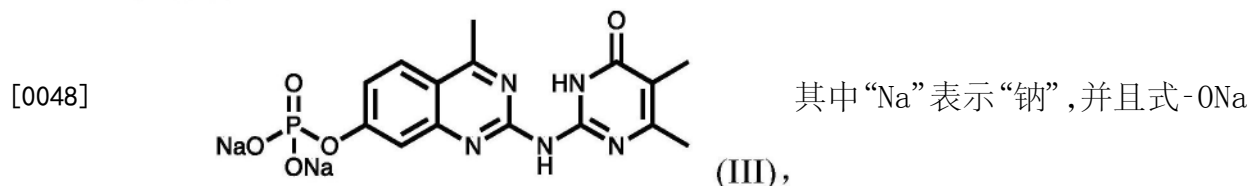
[0043] -马德辛盐酸盐 (在本文中也称为“Madr.HCl”、“EYP34”或“式I化合物”)



[0045] -5,6-二甲基-2-((4-甲基-7-(2-吗啉基乙氧基)喹唑啉-2-基)氨基)嘧啶-4(3H)-酮 (在本文中也称为“EYP201”、“化合物6”或“式II的化合物”)



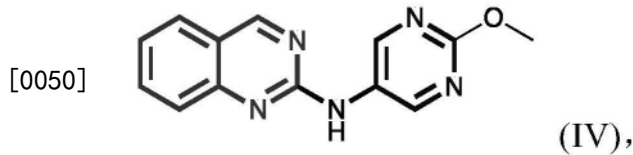
[0047] -2-((4,5-二甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-2-基)氨基)-4-甲基喹唑啉-7-基磷酸钠 (在本文中也称为“EYP59”、“化合物7”或“式III的化合物”)



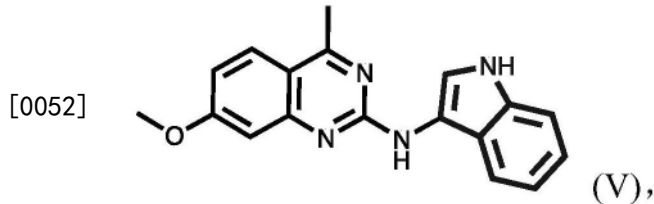
的原子团表示“氢氧化钠”,

[0049] -N-(2-甲氧基嘧啶-5-基)喹唑啉-2-胺 (在本文中也称为“EYP281”、“化合物32”)

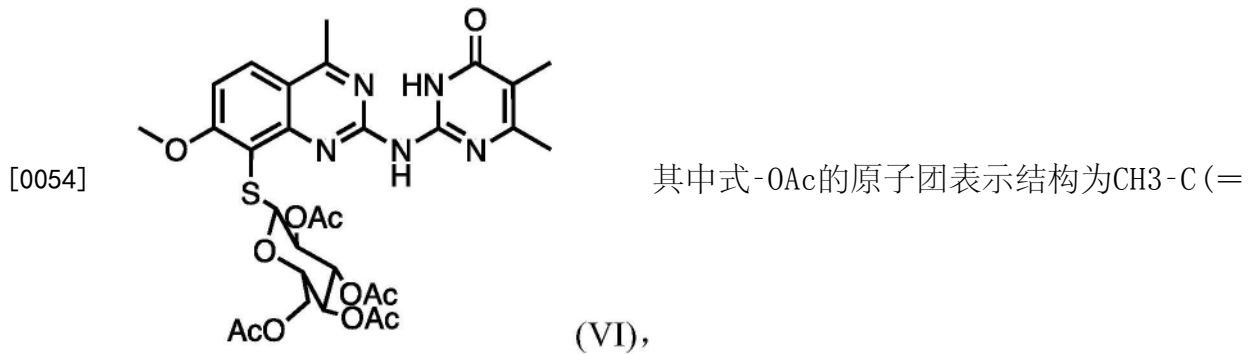
或“式IV的化合物”)



[0051] -N-(1H-吡啶-3-基)-7-甲氧基-4-甲基喹唑啉-2-胺(在本文中也被称为“EYP165”、“化合物57”或“式V的化合物”)

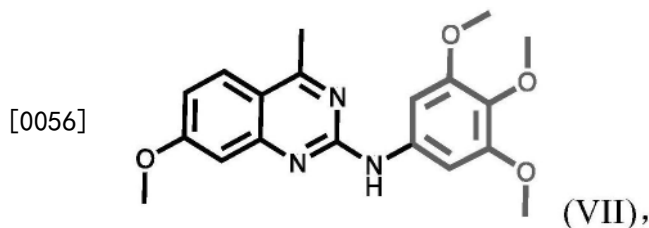


[0053] -((1S,2S,4R,5S,6S)-5-乙酰氧基-7,8-二乙酰基-4-((2-((4,5-二甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-2-基)氨基)-7-甲氧基-4-甲基喹唑啉-8-基)硫代)-3,7λ3,8λ3-三氧杂双环[4.2.0]辛-2-基)甲基乙酸酯(在本文中也被称为“EYP86”、“化合物10”或“式VI的化合物”)

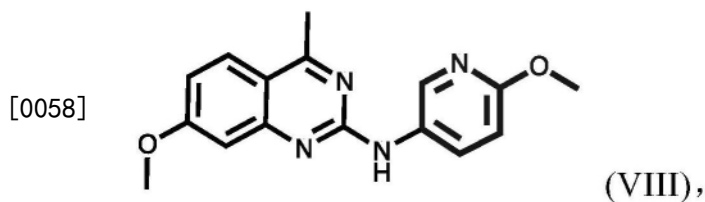


O)-O-的“乙酰氧基”，

[0055] -7-甲氧基-4-甲基-N-(3,4,5-三甲氧基苯基)喹唑啉-2-胺(在本文中也被称为“EYP188”、“化合物42”或“式VII的化合物”)

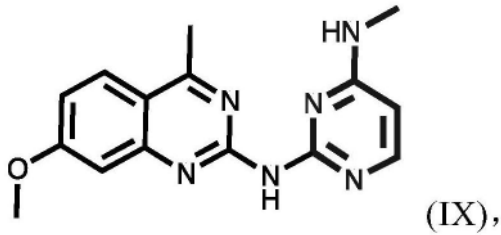


[0057] -7-甲氧基-N-(6-甲氧基吡啶-3-基)-4-甲基喹唑啉-2-胺(在本文中也被称为“EYP174”、“化合物41”或“式VIII的化合物”)



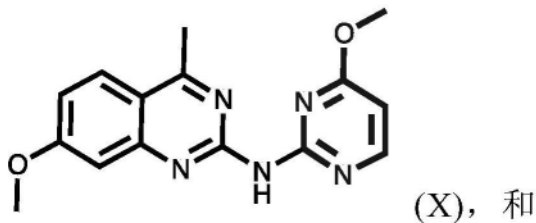
[0059] -N<sub>2</sub>-(7-甲氧基-4-甲基喹唑啉-2-基)-N<sub>4</sub>-甲基嘧啶-2,4-二胺(在本文中也被称为“EYP181”、“化合物49”或“式IX的化合物”)

[0060]



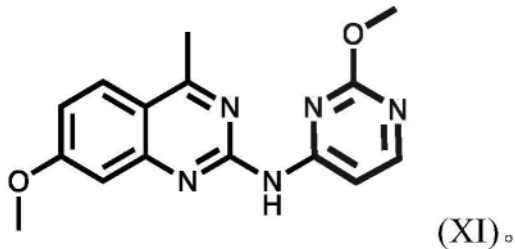
[0061] -7-甲氧基-N-(4-甲氧基嘧啶-2-基)-4-甲基喹唑啉-2-胺(在本文中也被称为“EYP179”、“化合物50”或“式X的化合物”)

[0062]



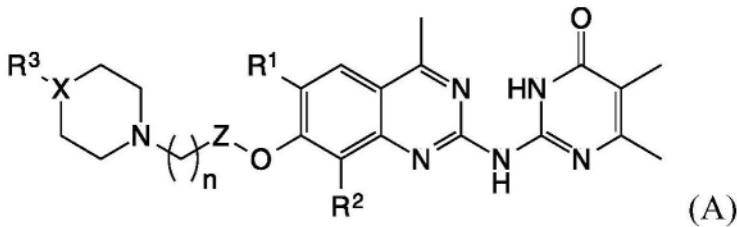
[0063] -7-甲氧基-N-(2-甲氧基嘧啶-4-基)-4-甲基喹唑啉-2-胺(在本文中也被称为“EYP190”、“化合物54”或“式XI的化合物”)

[0064]



[0065] 在特定情况下,本发明人在本文中描述了一种式(A)的化合物:

[0066]



[0067] 其中:

[0068]  $R^1$ 和 $R^2$ 独立地选自H、 $CH_3$ (甲基)和Cl(氯),

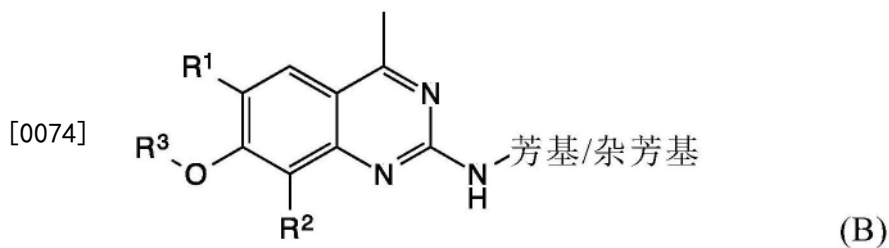
[0069]  $R^3$ 是H、 $CH_3$ (甲基)、 $C_2H_5$ (乙基)、正丙基、 $N(CH_2)_4$ 或 $N(CH_2)_5$ , Z是 $CH_2$ 或 $C=O$ ,

[0070] n是1、2或3,并且

[0071] X是O、N或CH。

[0072] 在特定且优选的情况下,所述式(A)的化合物是式II的化合物(也被称为“EYP201”或“化合物6”)。

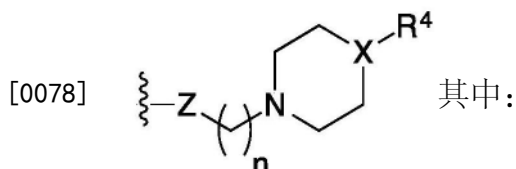
[0073] 在另一种特定情况下,本发明人在本文中描述了一种式(B)的化合物:



[0075] 其中:

[0076]  $R^1$ 和 $R^2$ 独立地选自H、 $CH_3$  (甲基)、Cl (氯) 和硫糖, 并且

[0077]  $R^3$ 是P(O)(ONa)<sub>2</sub>或



[0079]  $R^4$ 是H、 $CH_3$  (甲基)、 $C_2H_5$  (乙基)、正丙基、 $N(CH_2)_4$ 或 $N(CH_2)_5$ ,

[0080] Z是 $CH_2$ 或C=O,

[0081] n是1、2或3, 并且

[0082] X是O、N或CH。

[0083] 所述芳基可以是例如3,4,5-三甲氧基苯基、2-氯-3,4,5-三甲氧基苯基、3,5-三甲氧基苯基或2-氯-3,5-三甲氧基苯基。

[0084] 所述杂芳基可以是例如3-吡啶基、2-吡啶基、2-咪唑基、2-苯并咪唑基、咪唑基、N-甲基嘧啶、甲氧基嘧啶-2-基、甲氧基嘧啶-4-基、甲氧基吡啶-2-基或甲氧基吡啶-4-基。

[0085] 在特定情况下, 所述式(B)的化合物选自式(III)的化合物、式(V)的化合物、式(VI)的化合物、式(VII)的化合物、式(VIII)的化合物、式(IX)的化合物、式(X)的化合物和式(XI)的化合物。

[0086] 上文中描述的式(A)和(B)或(I)至(XI)的化合物中的任一者及其可药用盐, 可以有利地用作药物。

[0087] 当在本文中使用时, 术语“可药用”是指以下组合物、化合物、盐等, 它们在健全的医学判断范围内适合于与对象的组织接触, 或者可以给药到对象而没有过多毒性或其他并发症, 具有合理的利益/风险比。例如, 可药用盐涵盖了钠盐、钾盐、氯化物、铵盐、乙酸盐等。

[0088] 本发明人在本文中证实了式(A)、(B)和(I)至(XI)的化合物可以有利地用作正免疫调节剂, 特别是对抗癌症。

[0089] 本发明人研究了在小鼠癌细胞系中表达的PTP来源抗原模型的抗原呈递, 并观察到用马德辛、更优选为具有选自式(A)和(B)或(I)至(XI)的结构式的化合物对它们进行体外处理增加了这种抗原的呈递。此外, 他们显示用溶解在DMSO中的马德辛对带有肉瘤的小鼠进行体内治疗, 以免疫依赖性方式减缓了肿瘤生长。为了改善其效果, 他们测试了可溶于水的本文中描述的马德辛衍生物, 并令人吃惊地观察到它们与马德辛本身相比是更加有效得多的癌生长抑制剂。由于在免疫缺陷的Nu/Nu小鼠中所述天然产物和衍生物对肿瘤生长无影响, 因此他们得出结论, 它们的效果依赖于免疫应答。这些结果证实, PTP来源的抗原呈递可以被调节, 并且本发明人提供了可用于市场开发的新的有希望的分子, 它们与马德辛

的其他衍生物相反,可用于增强特别是抗癌应答并治疗癌症。

[0090] 在本文中描述的优选情况下,所述具有选自式(A)和(B)或(I)至(XI)的结构式的化合物、特别是式(I)、(II)、(III)、(V)、(VI)、(VII)、(VIII)、(IX)、(X)或(XI)的化合物(在本文中也被称为“感兴趣的化合物”),用于在对象中治疗疾病、特别是癌症,用于预防癌转移和/或用于预防癌症复发。

[0091] 在本文中描述的另一种优选情况下,所述具有选自式(A)和(B)或(I)至(XI)的结构式的化合物用于在需要的对象中刺激抗癌免疫应答。

[0092] 在另一种优选情况下,所述具有选自式(A)和(B)或(I)至(XI)的结构式的化合物用于在对象中诱导或增加癌细胞对先行翻译产物(PTP)来源抗原的呈递、通常为产生和呈递,或改变免疫肽组。

[0093] 本发明的化合物可以通过专业技术人员公知的方法例如半合成或全合成来获得。用于生产感兴趣的化合物的方法的实例在本文中被描述在实验部分中,并在图9和10上进一步说明。式(A)、(B)和(I)至(XI)的化合物是本身在自然界中未发现的人造产物。

[0094] 式(A)、(I)至(III)和(VI)的化合物通常可以从已被描述为pre-mRNA剪接的渗透抑制剂的马德辛制备。式(IV)、(V)、(VII)至(XI)的化合物可以使用常规化学反应通过化学合成来制备。

[0095] 本发明的另一个目的是具有选自式(A)和(B)或(I)至(XI)的结构式的化合物(或其可药用盐)用于降低癌症或患有癌症的对象对不同的抗癌药剂、通常为不同的化疗药剂的抗性的用途。

[0096] 本文中描述还描述了根据本发明所述的具有选自式(A)和(B)或(I)至(XI)的结构式的化合物(或其可药用盐)或包含此类化合物和可药用载体的组合物,与至少一种不同的抗癌药剂、通常为不同的化学治疗药物和/或与放疗相组合,用于在对象中治疗疾病、特别是治疗癌症,预防癌转移和/或预防癌症复发。

[0097] 术语“对象”是指任何对象,优选为哺乳动物。

[0098] 哺乳动物的实例包括人类和非人类动物,例如但不限于驯养动物(例如奶牛、绵羊、猫、狗和马)、非人类灵长动物(例如猴)、兔和啮齿动物(例如小鼠和大鼠)。所述治疗优选地用于需要的人类,无论其年龄或性别。

[0099] 术语“对象”通常是指患者,特别是具有肿瘤的患者。除非在本公开中另有指明,否则肿瘤是癌性或恶性肿瘤。在特定情况下,所述对象是经历癌症治疗例如化疗和/或放疗的对象,或具有或被怀疑具有发生癌症的风险的对象。

[0100] 所述对象是例如患有癌症并对癌症治疗、通常为化疗具有抗性的人类。

[0101] 所述对象可能已暴露于完整常规治疗方案的一部分,例如已暴露于全部治疗方案的至少一个周期,例如全部治疗方案的两个周期。

[0102] 所述癌症或肿瘤可以是任何种类的癌症或赘生物。所述肿瘤通常是实体肿瘤,特别是是上皮、神经外胚层或间充质起源的实体肿瘤。所述癌症通常还选自上皮癌、肉瘤、淋巴瘤、生殖细胞肿瘤、母细胞瘤、白血病和多发性骨髓瘤,优选地选自上皮癌、肉瘤、母细胞瘤、淋巴瘤、白血病和多发性骨髓瘤。所述癌症可以是转移性癌症,也可以不是。

[0103] 所述癌症可以例如选自但不限于慢性髓系白血病、急性成淋巴细胞白血病、费城染色体阳性急性成淋巴细胞白血病( $\text{Ph}^+$ ALL)、霍奇金病、霍奇金或非霍奇金淋巴瘤、鳞状细

胞上皮癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、神经胶质瘤、胃肠癌、肾癌、卵巢癌、肝癌、结肠直肠癌、子宫内膜癌、肾癌、前列腺癌、甲状腺癌、神经母细胞瘤、脑癌、中枢神经系统癌症、胰腺癌、多形性成胶质细胞瘤、宫颈癌、胃癌、膀胱癌、恶性肝细胞瘤、乳腺癌、结肠上皮癌、头颈癌、胃癌、生殖细胞肿瘤、小儿肉瘤、横纹肌肉瘤、尤因氏肉瘤、骨肉瘤、软组织肉瘤、鼻窦NK/T-细胞淋巴瘤、骨髓瘤、黑素瘤、多发性骨髓瘤、急性髓系白血病(AML)和慢性淋巴细胞性白血病。

[0104] 在优选实施方式中,所述癌症选自肺癌、乳腺癌、生殖泌尿道癌(例如前列腺癌、膀胱癌、睾丸癌、宫颈癌或卵巢癌)和肉瘤(例如骨肉瘤或软组织肉瘤,包括小儿软组织肉瘤、神经母细胞瘤、骨髓瘤和黑素瘤)。

[0105] 在特定实施方式中,所述癌症是肉瘤。

[0106] 更优选地,所述癌症选自黑素瘤、肺癌(包括非小细胞肺上皮癌(或NSCLC)和小细胞肺上皮癌(或SCLC))和乳腺癌。

[0107] 甚至更优选地,所述癌是黑素瘤或肺癌。

[0108] 在一种情况下,所述癌症是肺癌,通常为小细胞肺癌或非小细胞肺癌。

[0109] 在另一种情况下,所述癌症是白血病,通常为急性髓系白血病(AML)或慢性淋巴细胞性白血病。

[0110] 在另一种情况下,所述癌症是结肠癌,通常为结肠上皮癌。所述癌症也可以是结肠直肠癌。

[0111] 在另一种情况下,所述癌症是小儿癌症,通常为小儿肉瘤、淋巴瘤、白血病、神经母细胞瘤、脑癌或中枢神经系统癌。

[0112] 在本文中描述的特定情况下,所述抗癌药剂选自化疗药剂、免疫检查点阻断剂和抗癌疫苗(在本文中也称为“癌症疫苗”)。这些药剂通常被认为是用于治疗癌症的“常规”药剂。

[0113] 所述化疗药剂通常是例如选自抗肿瘤/细胞毒性抗生素、烷化剂、抗代谢物、拓扑异构酶抑制剂、有丝分裂抑制剂、基于铂的组分、特异性激酶抑制剂、激素、细胞因子、抗血管生成剂、抗体、DNA甲基转移酶抑制剂和血管破坏剂的药剂。

[0114] 所述抗肿瘤药剂或细胞毒性抗生素可以例如选自蒽环霉素(例如多柔比星、道诺霉素、阿霉素、伊达比星、表柔比星、米托蒽醌、戊柔比星)、放线菌素、博来霉素、丝裂霉素C、普卡霉素和羟基脲。

[0115] 所述烷化剂可以例如选自氮芥、环磷酰胺、美法仑、苯丁酸氮芥、异环磷酰胺、替莫唑胺白消安、N-亚硝基-N-甲基脲(MNU)、卡莫司汀(BCNU)、洛莫司汀(CCNU)、司莫司汀(MeCCNU)、福莫司汀、链脲佐菌素、达卡巴嗪、米托唑胺、噻替哌、自力霉素、亚丝醌(AZQ)、丙卡巴肼、六甲基蜜胺和乌拉莫司汀。

[0116] 所述抗代谢物可以例如选自嘧啶类似物(例如氟代嘧啶类似物、5-氟尿嘧啶(5-FU)、氟尿苷(FUDR)、胞嘧啶阿拉伯糖苷(阿糖胞苷)、吉西他滨(Gemzar®)、卡培他滨)、嘌呤类似物(例如硫唑嘌呤、巯基嘌呤、硫鸟嘌呤、氟达拉滨、喷司他丁、克拉屈滨、氯法拉滨)、叶酸类似物(例如甲氨蝶呤、叶酸、培美曲塞、氨基蝶呤、雷替曲塞、甲氧苄啶、乙胺嘧啶)。

[0117] 所述拓扑异构酶抑制剂可以例如选自喜树碱、伊立替康、拓扑替康、安吡啶、依托泊苷、磷酸依托泊苷和替尼泊苷。

[0118] 所述有丝分裂抑制剂可以例如选自紫杉烷[紫杉醇(PG-紫杉醇和DHA-紫杉醇)(Taxol®)、多西他赛(Taxotère®)、拉洛他赛、卡巴他赛、沃塔紫杉醇、替司他赛或taxoprexin]、纺锤体毒素或长春花生物碱(例如长春新碱、长春碱、长春瑞滨、长春地辛或长春氟宁)、甲苯达唑和秋水仙素。

[0119] 所述基于铂的组分可以例如选自铂、顺铂、卡铂、奈达铂、奥沙利铂、沙铂和四硝酸三铂。

[0120] 所述特异性激酶抑制剂可以例如选自BRAF激酶抑制剂如维罗非尼、MAPK抑制剂(例如达拉菲尼)、MEK抑制剂(例如曲美替尼)和酪氨酸激酶抑制剂例如伊马替尼、吉非替尼、埃罗替尼、舒尼替尼或卡博替尼。

[0121] 他莫昔芬这种抗芳香化酶或抗雌激素药物通常也可用于激素疗法的情形中。

[0122] 可以在免疫疗法的情形中使用的细胞因子可以例如选自IL-2(白介素-2)、IL-11(白介素-11)、IFN(干扰素) $\alpha$ (IFN $\alpha$ )和粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)。

[0123] 所述抗血管生成剂可以例如选自贝伐单抗、索拉非尼、舒尼替尼、帕唑帕尼和依维莫司。

[0124] 所述抗体、特别是单克隆抗体(mAb)可以选自抗CD20抗体(抗所有B细胞抗原抗体)、抗Her2/Neu(人类表皮生长因子受体-2/NEU)抗体、靶向癌细胞表面的抗体(例如利妥昔单抗和阿仑单抗)、靶向生长因子的抗体(例如贝伐单抗、西妥昔单抗、帕尼单抗和曲妥珠单抗)、激动性抗体(例如抗ICOS mAb、抗OX40 mAb、抗41BB mAb)和免疫偶联物(例如90Y-替伊莫单抗、131I-托西莫单抗或曲妥珠单抗美坦新)。

[0125] DNA甲基转移酶抑制剂可以例如选自2'-脱氧-5-氮杂胞苷(DAC)、5-氮杂胞苷、5-氮杂-2'-脱氧胞苷、1-[ $\beta$ ]-D-呋喃阿拉伯糖基-5-氮杂胞嘧啶和二氢-5-氮杂胞苷。

[0126] 血管破坏剂可以例如选自黄酮乙酸衍生物、5,6-二甲基咕吨酮-4-乙酸(DMXAA)和黄酮乙酸(FAA)。

[0127] 其他化疗药物包括蛋白酶体抑制剂(例如硼替佐米)、DNA链断裂化合物(例如替拉扎明)、硫氧还蛋白还原酶和核糖核苷酸还原酶两者的抑制剂(例如xycytrin)和Th1免疫应答的增强剂(例如胸腺法新)。

[0128] 在优选实施方式中,所述化疗药物或药剂选自抗肿瘤/细胞毒性抗生素、烷化剂、抗代谢物、拓扑异构酶抑制剂、有丝分裂抑制剂、基于铂的组分、特异性激酶抑制剂、抗血管生成剂、抗体和DNA甲基转移酶抑制剂。

[0129] 免疫检查点阻断剂通常是靶向免疫检查点的抗体。这种免疫检查点阻断剂在有利情况下可以选自抗CTLA4抗体(伊匹单抗和曲美单抗)、抗PD-1抗体(纳武单抗和派姆单抗)、抗PD-L1抗体(阿特珠单抗、杜鲁伐单抗和Avelumab)、抗PD-L2抗体和抗Tim3抗体。

[0130] 所述癌症疫苗可以例如选自包含(抗原)肽、特别是PTP的疫苗组合物,人类乳头瘤病毒(HPV)疫苗(例如Gardasil®、Gardasil9®和Cervarix®),刺激对前列腺酸性磷酸酶(PAP)的免疫应答的疫苗西普鲁塞-T(Provenge®),溶瘤病毒,以及talimogene laherparepvec(T-VEC或Imlygic®)。

[0131] 在另一种特定情况下,所述(“常规”)癌症治疗是辐射(在本文中也称为“放疗”)。所述放疗通常涉及选自X-射线(“XR”)、 $\gamma$ 射线和/或UVC射线的射线。

[0132] 所述可以包括几种抗癌药剂的治疗由癌症学家根据待预防或治疗的具体癌症来选择。

[0133] 特定的黑素瘤是常规使用伊匹单抗、纳武单抗、派姆单抗、IFN $\alpha$ 、达卡巴嗪、BRAF抑制剂、达拉菲尼、曲美替尼、索拉非尼、替莫唑胺、电化学疗法、TNF $\alpha$ 和/或福莫司汀治疗的黑素瘤。

[0134] 在特定实施方式中,所述黑素瘤是对上述细胞毒性常规疗法有抗性的黑素瘤。

[0135] 特定的乳腺癌是在移除乳腺肿瘤的手术步骤之前或之后,优选地在这种手术步骤之前常规使用蒽环霉素、紫杉烷、曲妥珠单抗、抗PARP(聚ADP-核糖聚合酶)抗体、抗PI3K(磷酸肌醇3-激酶)抗体、mTOR(哺乳动物的雷帕霉素靶蛋白)抑制剂、长春瑞滨、吉西他滨、抗雌激素和/或抗芳香化酶剂治疗的乳腺癌。

[0136] 在特定实施方式中,所述乳腺癌是对上述常规疗法有抗性的乳腺癌。

[0137] 特定的肺癌是常规使用XR和铂或培美曲塞中的任一者治疗的肺癌。

[0138] 特定的早期NSCLC是常规使用紫杉醇、多西他赛、吉西他滨、长春瑞滨、依托泊苷、紫杉烷、安维汀[抗VEGF(血管内皮生长因子)抗体]、埃罗替尼和/或吉非替尼治疗的NSCLC。在特定实施方式中,所述肺癌对常规疗法具有抗性。

[0139] 特定的结肠癌,也被称为结肠直肠癌或肠癌,在移除乳腺肿瘤的手术步骤后常规用抗代谢物(5-FU、雷替曲塞)、基于铂的组分(奥沙利铂)、拓扑异构酶抑制剂(伊立替康)、靶向生长因子的抗体(贝伐单抗、西妥昔单抗、帕尼单抗)治疗。

[0140] 本公开还涉及根据本发明所述的具有选自式(A)和(B)或(I)至(XI)的结构式的化合物(或其可药用盐)用于制备药物组合物或药物的用途,所述组合物能够在需要的对象中通过刺激所述对象的免疫系统来治疗疾病、特别是癌症,或提高疗法的效率。

[0141] 在特定情况下,所述化合物选自式(A)、(B)、II、III、IV、V、VI和VII的化合物,并且所述癌症是肉瘤。

[0142] 在另一种特定情况下,所述化合物选自式II、III、IV、V、VIII、IX、X和XI的化合物,并且所述上皮癌是黑素瘤。

[0143] 特别地,本发明的化合物可以有利地与以前描述的至少一种不同的抗癌药剂或任何其他治疗活性化合物和/或与放疗相组合,用于在对象中治疗疾病、特别是治疗癌症,预防癌转移和/或预防癌症复发。

[0144] 因此,本文中描述了一种组合物,其包含通常作为组合制剂的具有选自式(A)和(B)或(I)至(XI)的结构式的化合物和可药用载体,并优选地与至少一种不同的治疗药剂、特别是抗癌药剂一起,同时、分开或顺序地用于治疗疾病、特别是癌症。

[0145] 本文中描述了(i)一种治疗疾病、特别是癌症的方法,(ii)一种提高疾病、特别是癌症对治疗/抗癌药剂的敏感性的方法,和(iii)一种降低疾病/癌症对治疗/抗癌药剂的抗性的方法,每种所述方法包括向需要的对象给药有效量、通常为治疗有效量的如上所定义的至少一种具有选自式(A)和(B)或(I)至(XI)的结构式的化合物或药物组合物,并优选地与本文中所描述的常规用于治疗所述疾病/癌症的另一种治疗/抗癌药剂一起给药(作为组合制剂)。

[0146] 在另一种特定情况下,所述方法还包括给药有效量的另一种治疗活性化合物,用于治疗疾病/癌症或用于预防或治疗疾病/癌症治疗的副作用。

[0147] 当在本文中使用时，“治疗”是指试图改变被治疗对象的自然病程的治疗性干预，并且通常出于治愈目的而进行。理想的治疗效果包括但不限于预防疾病的复发、症状的减轻以及疾病的任何直接或间接病理后果的减轻，降低疾病的进展速度，疾病状态的缓解或减轻以及缓解或改善预后。在优选实施方式中，本发明的组合物和方法用于延迟癌症的发生或减缓癌症、通常是肿瘤生长的进展。

[0148] 通常，所述治疗将诱导所述对象的免疫系统的治疗性应答，通常为CD4<sup>+</sup>和/或CD8<sup>+</sup>T细胞应答。

[0149] 诱导T细胞应答在本文中通常意味着引发针对某种抗原的T细胞应答。在所述诱导之前，所述T细胞应答不存在或低于检测水平或不起作用。增强T细胞应答在本文中意味着与所述增强之前所述T细胞的总体作用相比，使针对某种抗原的T细胞的总体作用更高和/或更有效。例如，在所述增强之后，可以产生更多针对所述抗原的T细胞。结果，所述额外产生的T细胞的作用增加了针对所述抗原的总体作用。可选地，所述增强可以包括针对所述抗原的T细胞的作用的增加。所述T细胞可能例如与所述抗原更强和/或更快地反应。当然，所述增强的结果可以是额外T细胞的产生以及所述T细胞作用的增加。可选地，所述增强可以仅包括额外T细胞的产生或仅包括T细胞作用的增加。

[0150] 本文描述的另一个目标涉及一种在对象中产生通常针对特定靶点、优选为肿瘤抗原或癌/肿瘤细胞或组织的免疫应答的方法，所述方法包括向所述对象注射通常为有效量的根据本发明所述的具有选自式(A)和(B)或(I)至(XI)的结构式的化合物或根据本发明所述的包含这种化合物的组合物。

[0151] 凭借诸如ELISA、ELISPOT、迟发型超敏反应、细胞内细胞因子染色和/或细胞外细胞因子染色的技术，本领域技术人员可以容易地确定治疗性免疫应答的检测。

[0152] 当在本文中使用时，“有效量或剂量”或“治疗有效量或剂量”是指在对象中除去、减缓疾病、特别是癌症，或减轻或延迟由所述疾病引起或与所述疾病相关的一种或几种症状或障碍，或在对象、优选为人类中诱导可测量的免疫应答的本发明的化合物的量。本发明的化合物及其药物组合物的有效量、更通常为剂量方案，可以由本领域技术人员确定并改变。有效剂量可以利用常规技术并通过观察在类似环境下获得的结果来确定。本发明的化合物的治疗有效剂量随着待治疗的疾病、其严重程度、给药途径、所涉及的任何联合疗法、患者的年龄、体重、总体医疗状况、病史等而变。

[0153] 通常，对于人类患者来说，待给药到患者的化合物的量可以在约0.01mg/kg至500mg/kg体重的范围内。在特定实施方式中，根据本发明所述的药物组合物包含0.1mg/kg至100mg/kg、例如0.5mg/kg至10mg/kg的本发明的化合物。

[0154] 在特定情况下，本发明的感兴趣的化合物可以通过肠胃外途径、口服途径或静脉内(IV)、肿瘤内(IT)或腹膜内(IP)注射给药到所述对象。本发明的化合物可以在连续的几天例如连续的2至10天、优选地连续的3至6天期间，每天(一天一次)给药到所述对象。所述治疗可以在1、2、3、4、5、6或7周或每2或3周或每1、2或3个月期间重复。或者可以进行几个治疗周期例如1、2、3、4或5周，任选地在两个治疗周期之间具有中断期。本文中描述的本发明的化合物中的任一者可以例如作为单一药剂每周一次、每两周一次或每月一次给药。所述治疗可以每年重复一次或几次。

[0155] 药剂可以由专业技术人员确定的适当间隔给药。所选的量取决于多种因素，包

括给药途径、给药持续时间、给药时间、具有选自式(A)和(B)或(I)至(XI)的结构式的所选化合物或与所述化合物组合使用的各种不同产品的消除速率、所述患者的年龄、体重和身体状况及其病史,以及在医学中已知的任何其他信息。

[0156] 所述给药途径可以通过各种不同途径来进行。例如,它可以是口服或肠胃外途径。它通常通过系统性注射例如静脉内、肌肉内、腹膜内、肿瘤内、皮下注射等来进行。所述药物组合物被改造以适应于一种或几种上述途径。所述药物组合物优选地通过适合的无菌溶液的注射或静脉内输注或以液体或固体药剂的形式通过消化道给药。

[0157] 所述药物组合物可以以本领域中已知的方式,可能通过提供持续和/或延迟释放的剂型或装置,被配制在药物相容性溶剂或介质中的溶液,或含有固体介质的丸剂、片剂、胶囊、粉剂、栓剂等。对于这类剂型来说,可以有利地使用诸如纤维素、脂质、碳酸盐或淀粉的试剂。

[0158] 可用于所述剂型(液体和/或注射剂和/或固体)的试剂或介质是赋形剂或惰性介质,即无药物活性且无毒的介质。

[0159] 可以提到的是例如与制药用途相容并且为本领域技术人员所知的盐水、生理、等渗和/或缓冲溶液。所述组合物可以含有选自分散剂、增溶剂、稳定剂、防腐剂等的一种或多种试剂或介质。

[0160] 适合于口服给药的本发明的剂型可以采取作为胶囊、囊剂、片剂或含片的分立单位的形式,其各自含有预定量的活性成分;可以采取粉剂或颗粒剂的形式;可以采取在水性液体或非水性液体中的溶液或悬液的形式;或者可以采取水包油乳液或油包水乳液的形式。

[0161] 适合于肠胃外给药的剂型方便地包含所述活性成分的无菌油性或水性制剂,其优选地与接受者的血液等渗。每种此类剂型还可以含有其他药物相容且无毒的辅助剂,例如稳定剂、抗氧化剂、粘合剂、染料、乳化剂或调味物质。

[0162] 本发明的剂型包含活性成分,即根据本发明所述的具有选自式(A)和(B)或(I)至(XI)的结构式的化合物(或其可药用盐),其与可药用载体并任选地与其他活性或治疗性成分联合。所述载体在与剂型中的其他成分相容并且对其接受者无害的意义上必须是“可接受的”。用于大多数这些抗癌药剂的安全有效的给药的方法对于本领域技术人员来说是已知的。此外,它们的给药也描述在标准文献中。

[0163] 本发明的另一个目的是一种试剂盒,其在不同的容器中包含至少一种根据本发明所述的具有选自式(A)和(B)或(I)至(XI)的结构式的化合物(或其可药用盐),和优选地至少一种不同的治疗剂、特别是抗癌药剂、通常为化疗药物。所述试剂盒还可以包含用于制备根据本发明所述的组合物,用于执行本文中描述的任一方法,例如用于在对象中治疗疾病、特别是癌症,用于预防或治疗癌转移和/或预防或治疗癌症复发的说明书。

[0164] 在特定实施方式中,本发明涉及根据本发明所述的试剂盒用于制备本文中所描述的组合物的用途。

[0165] 在另一个特定实施方式中,所述试剂盒适合于执行本文中描述的任一方法,特别是用于在对象中治疗癌症、预防癌转移和/或预防癌症复发的方法。

[0166] 本发明的其他方面和优点将在下面应该被当作仅仅是说明性的实验部分和图中公开。

## 附图说明

[0167] 图1A和1B:在癌细胞中马德辛和Madra.HC1处理增加了内含子来源的抗原呈递。

[0168] 在用5 $\mu$ M或10 $\mu$ M (A) 马德辛和 (B) Madra.HC1处理后,表达内含子来源的SL8抗原的MCA205肉瘤细胞和B16F10黑素瘤细胞中的B3Z特异性T-细胞活化。在每种条件下添加游离的SL8肽,以确保T-细胞测定法在非饱和条件下进行并且在结果中MHC-I分子的表达被考虑在内。每张图代表了至少三个独立实验。数据作为平均值 $\pm$ SEM给出。 $*P<0.05$ , $**P<0.01$ , $***P<0.001$ (未配对student t检验)。

[0169] 图1C-1F:Madra.HC1减缓带有内含子来源的SL8表位的肿瘤的生长

[0170] 将野生型MCA205肉瘤细胞或表达珠蛋白-SL8-内含子构建物的MCA205肉瘤细胞(MCA205珠蛋白-SL8-内含子)皮下接种到免疫活性C57BL/6小鼠的肋部中,随后在肿瘤接种后第4、7、10和14天,腹膜内注射20mg/kg或40mg/kg的Madra.HC1。每3至4天评估肿瘤尺寸,直至达到既定的伦理学终点。图C表示表达珠蛋白-SL8-内含子构建物的MCA205肉瘤细胞(MCA205珠蛋白-SL8-内含子)的生长曲线,图D表示第25天的肿瘤尺寸。图E表示野生型MCA205肉瘤细胞(MCA205 WT)的生长曲线,图F表示第21天的肿瘤尺寸。数据作为平均值 $\pm$ SEM给出。 $*p<0.05$ , $**p<0.01$ (ANOVA和比较所有组的Tukey's多重比较检验)。

[0171] 图1G:Madra.HC1延长了带有表达内含子来源的SL8的肿瘤的小鼠的总生存期

[0172] 用MCA205珠蛋白-SL8-内含子皮下注射并随后在肿瘤接种后4、7、10和14天用20mg/kg或40mg/kg的Madra.HC1腹膜内治疗的小鼠的Kaplan-Meier生存曲线。

[0173] 图1H:Madra.HC1诱导长期持续的特异性抗肿瘤应答

[0174] 在第100天分别接种到C57BL/6小鼠的右肋和左肋中的MCA205珠蛋白-SL8-内含子细胞和B16F10 WT细胞的生长曲线,所述小鼠在用Madra.HC1治疗后经历了完全的肿瘤消退。

[0175] 图2:每种马德辛衍生物的试验MTT

[0176] 对用增加剂量的不同马德辛衍生物处理的MCA205 (A) 或B16F10 (B) 细胞进行MTT测定法。数据被表示成所述不同衍生物的半最高抑制浓度(IC50)。所述IC50代表了与对照条件相比使细胞存活率抑制50%所需的测试化合物的浓度。指定的阈值为60 $\mu$ m。它是对于所有化合物来说未显示出任何细胞死亡的最高剂量。

[0177] 图3:在两种鼠类细胞系中增加抗原呈递的马德辛衍生物

[0178] 在用60 $\mu$ M (A) EYP59 (化合物7)、20 $\mu$ M (B) EYP201 (化合物6)、60 $\mu$ M (C) EYP165 (化合物57) 或50 $\mu$ M (D) EYP281 (化合物32) 处理后,表达内含子来源的SL8抗原的MCA205和B16F10中的B3Z特异性T-细胞活化。在每种条件下添加游离的SL8肽,以确保T-细胞测定法在非饱和条件下进行并且在结果中MHC-I分子的表达被考虑在内。每张图代表了至少三个独立实验。数据作为平均值 $\pm$ SEM给出。 $*P<0.05$ , $**P<0.01$ , $***P<0.001$ (未配对student t检验)。

[0179] 图4:仅在MCA205肉瘤细胞系中增加抗原呈递的马德辛衍生物

[0180] 在用60 $\mu$ M (A) EYP188 (化合物42)、50 $\mu$ M (B) EYP86 (化合物10) 处理后,表达内含子来源的SL8抗原的MCA205中的B3Z特异性T-细胞活化。在每种条件下添加游离的SL8肽,以确保T-细胞测定法在非饱和条件下进行并且在结果中MHC-I分子的表达被考虑在内。每张图代表了至少三个独立实验。数据作为平均值 $\pm$ SEM给出。 $*P<0.05$ , $**P<0.01$ , $***P<0.001$ (未配对student t检验)。

[0181] 图5:仅在B16F10黑素瘤细胞系中增加抗原呈递的马德辛衍生物

[0182] 在用20 $\mu$ M(A)EYP174(化合物41)、20 $\mu$ M(B)EYP179(化合物50)、60 $\mu$ M(C)EYP190(化合物54)和10 $\mu$ M(D)EYP181(化合物49)处理后,表达内含子来源的SL8抗原的MCA205中的B3Z特异性T-细胞活化。在每种条件下添加游离的SL8肽,以确保T-细胞测定法在非饱和条件下进行并且在结果中MHC-I分子的表达被考虑在内。每张图代表了至少三个独立实验。数据作为平均值 $\pm$ SEM给出。 $*P<0.05$ , $**P<0.01$ , $***P<0.001$ (未配对student t检验)。

[0183] 图6:在两种肿瘤细胞系中均不增加抗原呈递的马德辛衍生物

[0184] 在用60 $\mu$ M(A)EYP177(化合物46)、60 $\mu$ M(B)EYP156(化合物43)、10 $\mu$ M(C)EYP113(化合物11)和20 $\mu$ M(D)EYP102(化合物9)处理后,表达内含子来源的SL8抗原的MCA205中的B3Z特异性T-细胞活化。在每种条件下添加游离的SL8肽,以确保T-细胞测定法在非饱和条件下进行并且在结果中MHC-I分子的表达被考虑在内。每张图代表了至少三个独立实验。数据作为平均值 $\pm$ SEM给出。 $*P<0.05$ , $**P<0.01$ , $***P<0.001$ (未配对student t检验)。

[0185] 图7:EYP59(化合物7)减缓MCA-WT肉瘤和MCA-内含子-SL8的生长

[0186] 将野生型MCA205肉瘤细胞或表达珠蛋白-SL8-内含子构建物的MCA205肉瘤细胞(MCA205珠蛋白-SL8-内含子)皮下接种到免疫活性C57BL/6小鼠的肺部中,随后在肿瘤接种后第4、7、10和14天,腹膜内注射20mg/kg的EYP59。每3至4天评估肿瘤尺寸,直至达到既定的伦理学终点(A)。上图B表示表达珠蛋白-SL8-内含子构建物的MCA205肉瘤细胞(MCA205珠蛋白-SL8-内含子)的生长曲线,下图B表示第23天的肿瘤尺寸。上图C表示野生型MCA205肉瘤细胞(MCA205 WT)的生长曲线,下图C表示第19天的肿瘤尺寸。图D表示在具有与前文为免疫活性小鼠所描述的相同的设置的免疫缺陷nu/nu小鼠中,野生型MCA205肉瘤细胞(MCA205 WT)的生长曲线。数据作为平均值 $\pm$ SEM给出。 $*p<0.05$ , $**p<0.01$ (ANOVA和比较所有组的Tukey's多重比较检验)。

[0187] 图8:马德辛衍生物EYP59(化合物7)在以肿瘤内或静脉内方式注射时在体内有效降低肿瘤生长

[0188] 将野生型MCA205肉瘤细胞皮下接种到免疫活性C57BL/6小鼠的肺部中,随后在肿瘤接种后第4、7、10和14天肿瘤内注射2,5mg/kg的EYP59或在肿瘤接种后第4、7、10和14天静脉内注射5mg/kg的EYP59。上图A表示野生型MCA205肉瘤细胞的生长曲线,下图A表示第21天的肿瘤尺寸。上图B表示野生型MCA205肉瘤细胞的生长曲线,下图B表示第25天的肿瘤尺寸。数据作为平均值 $\pm$ SEM给出。 $*p<0.05$ , $**p<0.01$ (ANOVA和比较所有组的Tukey's多重比较检验)。

[0189] 图9:马德辛和马德辛盐酸盐(Madra.HCl)的合成

[0190] 图10:马德辛的药物调配和马德辛衍生物的合成

## 实施例

[0191] 材料和方法

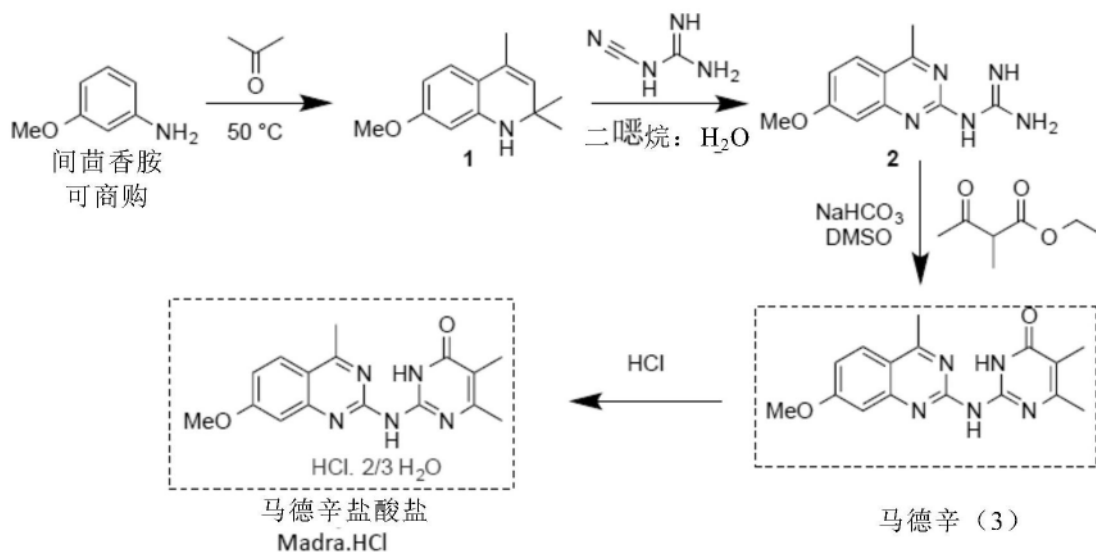
[0192] 细胞培养

[0193] MCA205小鼠肉瘤细胞系在37 $^{\circ}$ C和5%CO<sub>2</sub>下,在1%谷氨酰胺、1%丙酮酸钠、1%非必需氨基酸、1%青霉素/链霉素和10%FBS(Life Technologies)存在下,在RPMI 1640培养基(Life Technologies)中培养。B16F10小鼠黑素瘤细胞系在37 $^{\circ}$ C和5%CO<sub>2</sub>下,在含有1%

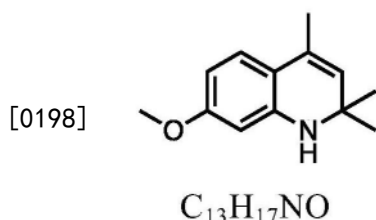
谷氨酰胺、1%青霉素/链霉素和10%FCS的DMEM培养基(Life Technologies)中,在标准条件下培养。稳定的MCA205-珠蛋白-SL8-内含子细胞系在与MCA205细胞系相同的条件下培养,并添加500 $\mu\text{g}/\text{ml}$  G418(Life Technologies)用于选择。稳定的B16F10-珠蛋白-SL8-内含子细胞系在与B16F10细胞系相同的条件下培养,并添加500 $\mu\text{g}/\text{ml}$  G418(Life Technologies)用于选择。SL8/Kb-特异性(B3Z) T-细胞报告杂交瘤在37 $^{\circ}\text{C}$ 和5% $\text{CO}_2$ 下,在1%谷氨酰胺、1%青霉素/链霉素、50 $\mu\text{M}$  $\beta$ -巯基乙醇和10%FCS存在下,在RPMI 1640培养基(Life Technologies)中培养。

[0194] 马德辛和所有衍生化合物的合成反应路线

[0195] 1) 马德辛和马德辛盐酸盐(Madra.HCL)的合成



[0197] a. 7-甲氧基-2,2,4-三甲基-1,2-二氢喹啉(化合物1) (参考Org.Lett.2015,17,4125)

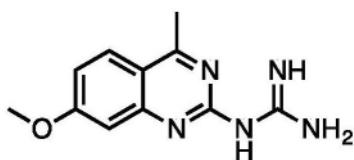


[0199] 203,2850 g/mol

[0200] 在氩气下,将丙酮(30mL)中的间茴香胺(2.3mL,20.3mmol)和 $\text{InCl}_3$ (232mg,1.03mmol)在50 $^{\circ}\text{C}$ 加热14h。除去溶剂,并将粗产物在DCM与 $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 饱和水溶液之间分配。将有机层在 $\text{MgSO}_4$ 上干燥,过滤并浓缩。通过柱层析进行纯化(环己烷/EtOAc 100:0 $\rightarrow$ 99:1),产生作为微黄色固体的所需化合物。图谱数据与文献一致(Tamariz,J.等,J.Org.Chem.2013,78,9614-9626)。得率:61%(2.51g,12.3mmol)。Mp 68.8 $^{\circ}\text{C}$ 。TLC Rf:0.5(环己烷/EtOAc 9:1)。 $^1\text{H}$  NMR(300MHz, $\text{CDCl}_3$ ) $\delta$ 6.97(d, $J=8.4\text{Hz}$ ,1H),6.20(dd, $J=8.4,2.5\text{Hz}$ ,1H),6.01(d, $J=2.5\text{Hz}$ ,1H),5.19(s,1H),3.75(s,3H),1.96(d, $J=1.5\text{Hz}$ ,3H),1.26(s,6H)。对于 $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{NO}$ ,HRMS(ESI)(M+H) $^+m/z$ 的计算值为204.1388,实测值为204.1385。

[0201] b. 1-(7-甲氧基-4-甲基喹啉-2-基)胍(化合物2)

[0202]

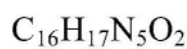
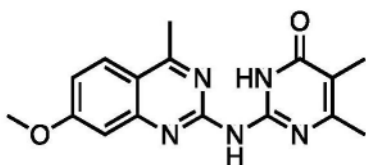


231,2590 g/mol

[0203] 将7-甲氧基-2,2,4-三甲基-1,2-二氢喹啉(化合物1)(2.0g,0.98mmol)和HCl(0.25mL,0.98mmol,4M,在二噁烷中)在室温搅拌30min。然后添加H<sub>2</sub>O(95mL)和双氰胺(831mg,0.98mmol),并将所述混合物回流48h。在60°C下冷却后,将油状物过滤,并用NaHCO<sub>3</sub>饱和水溶液将pH调整到11。过滤出形成的沉淀物并真空干燥。化合物2作为灰白色粉末被分离到。得率:78%(1.76g,0.76mmol)。Mp 235-236°C。<sup>1</sup>H NMR(300MHz,DMSO-d<sub>6</sub>) δ7.95(d,J=9.1Hz,1H),7.82(s,2H),7.11(d,J=2.5Hz,1H),7.00(dd,J=9.0,2.5Hz,1H),3.90(s,3H),2.70(s,3H)。对于C<sub>11</sub>H<sub>14</sub>N<sub>5</sub>O,HRMS(ESI)(M+H)<sup>+</sup>m/z的计算值为232.1198,实测值为232.1193。

[0204] c.2-((7-甲氧基-4-甲基喹啉-2-基)氨基)-5,6-二甲基嘧啶-4(3H)-酮(马德辛,化合物3)

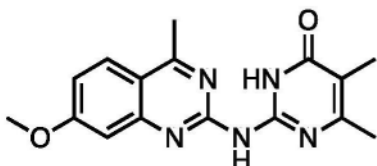
[0205]



311,3450 g/mol

[0206] 将1-(7-甲氧基-4-甲基喹啉-2-基)胍(化合物2)(3.2g,13.8mmol)、2-甲基-3-氧代丁酸乙酯(2.3mL,16.2mmol)、NaHCO<sub>3</sub>(1.43g,17mmol)在DMSO(22mL)中的溶液在110°C加热48h。在室温冷却后添加冷水。过滤出形成的沉淀物,并通过柱层析进行纯化(DCM/MeOH 100:0→98:2),得到作为浅棕色粉末的马德辛3。得率:83%(3.58g,11.5mmol)。Mp 216.4-217.5°C。TLC Rf:0.26(DCM/MeOH98:2)。<sup>1</sup>H NMR(300MHz,CDCl<sub>3</sub>) δ13.25(s,1H),8.54(s,1H),7.86(d,J=9.1Hz,1H),7.17(d,J=2.5Hz,1H),7.07(dd,J=9.1,2.5Hz,1H),3.98(s,3H),2.80(s,3H),2.27(s,3H),2.06(s,3H)。对于C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>,HRMS(ESI)(M+H)<sup>+</sup>m/z的计算值为312.1462,实测值为312.1458。d. 马德辛盐酸盐(Madr.HCl,EYP34)

[0207]

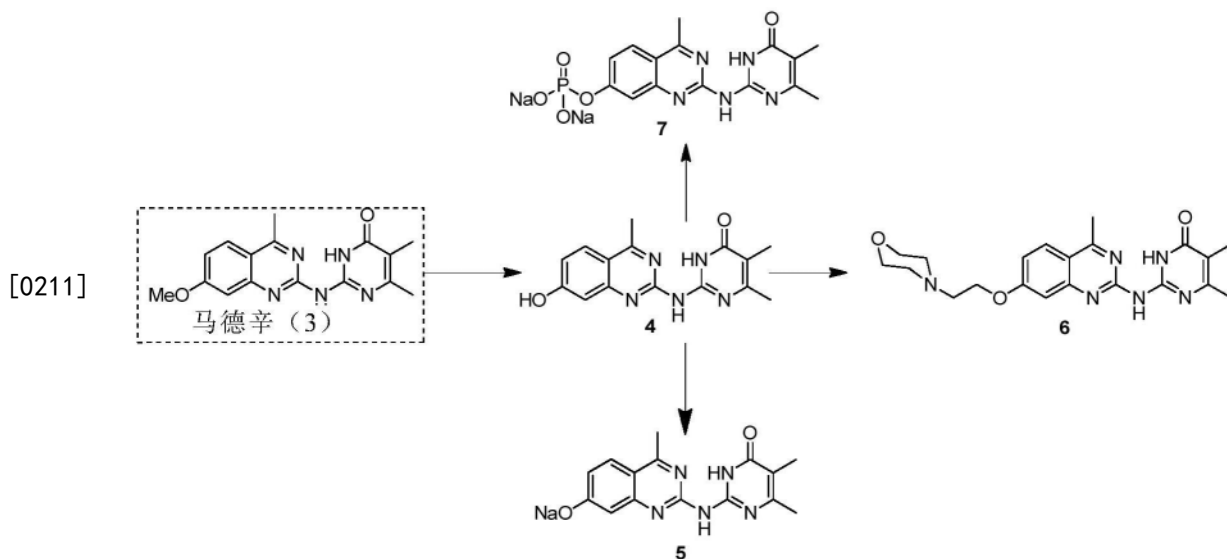
HCl 2/3 H<sub>2</sub>O

[0208] 向马德辛(化合物3)(600mg,1.98mmol)在无水二噁烷(10mL)中的溶液添加HCl(0.5mL,2mmol,4M,在二噁烷中)。允许所述混合物在室温搅拌10min。过滤出形成的沉淀物并真空干燥,得到作为透明绿色粉末的马德辛盐酸盐(565mg,1.68mmol,85%)。<sup>1</sup>H NMR(300MHz,氧化氙) δ7.76(s,1H),6.88(s,1H),6.80(s,1H),3.87(s,3H),2.71(s,3H),2.11(s,3H),1.74(s,3H)。Mp>330°C(分解)。对于C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>,HRMS(ESI)(M+H)<sup>+</sup>m/z的计算值为

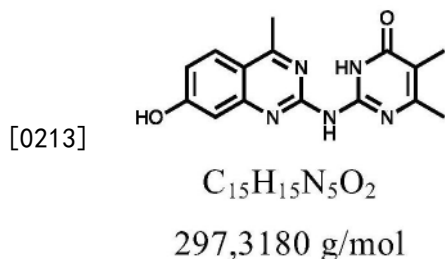
312.1462, 实测值为312.1460。对于 $C_{16}H_{18}ClN_5O_2 \cdot 2/3H_2O$ , Anal. 的计算值为:C, 53.41; H, 5.42。实测值为:C, 53.40; H, 5.47。

[0209] 2) 马德辛的药物调配

[0210] 部分1:

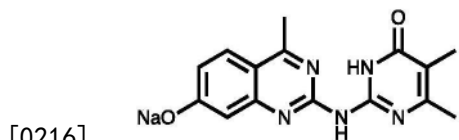


[0212] a. 2-((7-羟基-4-甲基喹唑啉-2-基)氨基)-5,6-二甲基咪唑-4(3H)-酮(化合物4, EYP107)



[0214] 在氩气和 $-78^{\circ}C$ 下,向马德辛(化合物3)(250mg,0.8mmol)在DCE(15mL)中的溶液逐滴添加 $BBr_3$ (12mL,12mmol)。允许所述溶液升温至室温,并在 $60^{\circ}C$ 加热20h。在淬灭后,在减压下除去溶剂。用EtOAc收取粗产物,并用 $NaHCO_3$ 饱和水溶液洗涤。将水性层用EtOAc萃取10次。将合并的有机层在 $MgSO_4$ 上干燥,过滤并浓缩。在DCM中沉淀所需化合物4,过滤,并用DCM洗涤几次。得率:42%(1.0g,0.34mmol)。Mp  $348.8-349.9^{\circ}C$ 。TLC Rf:0.18(DCM/MeOH97:3)。 $^1H$  NMR(300MHz,DMSO)  $\delta$ 13.52(s,1H),10.93(s,2H),8.05(d,J=9.0Hz,1H),7.03(dd,J=9.8,1.1Hz,1H),6.94(d,J=2.2Hz,1H),2.77(s,3H),2.18(s,3H),1.90(s,3H)。对于 $C_{15}H_{16}N_5O_2$ , HRMS(ESI)(M+H) $^+_{m/z}$ 的计算值为298.1304,实测值为298.1312。

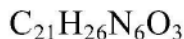
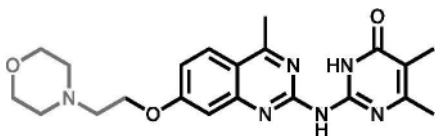
[0215] b. 2-((4,5-二甲基-6-氧代-1,6-二氢咪唑-2-基)氨基)-4-甲基喹唑啉-7-醇钠(化合物5,EYP112)



319,2998 g/mol

[0217] 向2-((7-羟基-4-甲基喹唑啉-2-基)氨基)-5,6-二甲基嘧啶-4(3H)-酮(化合物4) (15mg, 0.05mmol) 在水 (1.5mL) 中的悬液添加NaOH (50 $\mu$ L, 0.05mmol, 1M, 在H<sub>2</sub>O中)。将搅拌继续5分钟, 直至获得透明溶液。在蒸发至干后, 获得黄色固体。得率: >99% (15mg, 0.05mmol)。<sup>1</sup>H NMR (300MHz, D<sub>2</sub>O)  $\delta$  7.51 (d, J=8.8Hz, 1H), 6.67 (d, J=8.8Hz, 1H), 6.40 (s, 1H), 2.49 (s, 3H), 2.03 (s, 3H), 1.71 (s, 3H)。对于C<sub>15</sub>H<sub>16</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>, HRMS (ESI) (M+H)<sup>+</sup>m/z的计算值为298.1304, 实测值为298.1259。

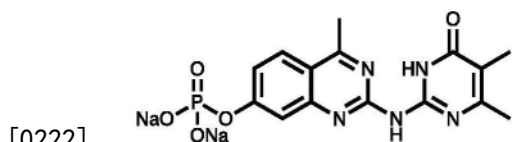
[0218] c. 5,6-二甲基-2-((4-甲基-7-(2-吗啉基乙氧基)喹唑啉-2-基)氨基)嘧啶-4(3H)-酮(化合物6, EYP201)



410,4780 g/mol

[0220] 在惰性气氛下, 将化合物4 (35mg, 0.118mmol) 悬浮在DMF (1mL) 中, 并添加KOH (13mg, 0.23mmol)。将所述混合物在室温搅拌1h, 直至它变得透明。然后添加2-氯-N-乙基吗啉 (22mg, 0.12mmol), 并将混合物在室温搅拌14h。在真空中除去溶剂。在柱层析 (DCM/MeOH 100:0->97:3) 后获得作为灰白色粉末的化合物6。得率: 19% (9.1mg, 0.022mmol)。TLC Rf: 0.2 (DCM/MeOH 96:4)。<sup>1</sup>H NMR (300MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  13.26 (s, 1H), 7.85 (d, J=9.0Hz, 1H), 7.19 (s, 1H), 7.08 (d, J=9.0Hz, 1H), 4.29 (t, J=5.6Hz, 2H), 3.76 (t, J=4.7Hz, 4H), 2.89 (t, J=5.7Hz, 2H), 2.80 (s, 3H), 2.62 (t, J=4.6Hz, 4H), 2.26 (s, 3H), 2.05 (s, 3H)。对于C<sub>21</sub>H<sub>27</sub>N<sub>6</sub>O<sub>3</sub>, HRMS (ESI) (M+H)<sup>+</sup>m/z的计算值为411.2145, 实测值为411.2152。

[0221] d. 2-((4,5-二甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-2-基)氨基)-4-甲基喹唑啉-7-基磷酸钠(化合物7, EYP59)



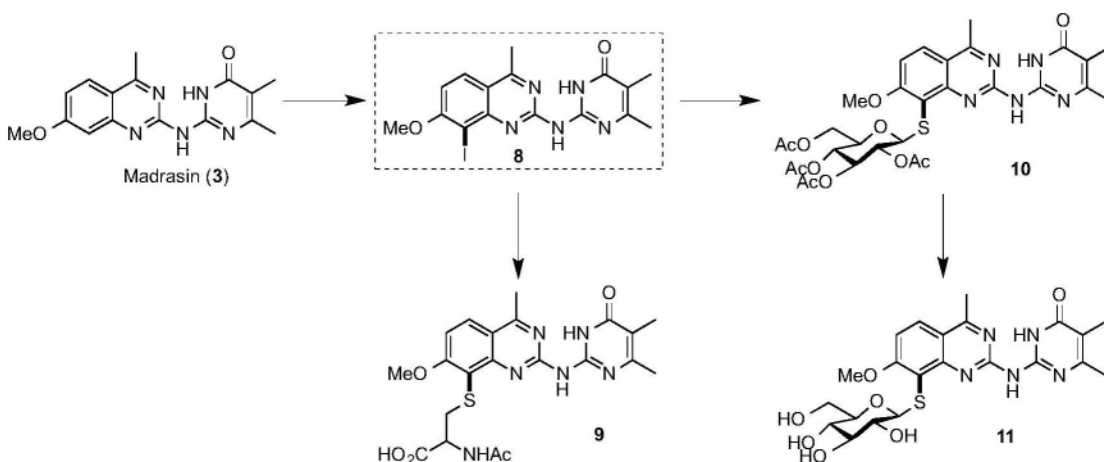
421,2603 g/mol

[0223] 将化合物4 (100.4mg, 0.33mmol) 和KOH (25mg, 0.44mmol) 在H<sub>2</sub>O (5mL) 中的悬液在室温搅拌30min。然后添加DCM (5mL), 随后是(EtO)<sub>2</sub>P(O)Cl (0.064mL, 0.44mmol) 和TBAB (141mg, 0.44mmol)。将所述混合物在室温搅拌2h。分离有机层, 并将水性层用DCM萃取。将合

并的有机层在MgSO<sub>4</sub>上干燥,过滤并真空浓缩。在柱层析(DCM/MeOH 100:0→97:3)后获得中间体二乙基磷酸酯衍生物。得率:38%(55mg,0.12mmol)。<sup>1</sup>H NMR(300MHz,CDCl<sub>3</sub>) δ13.16(s,1H),7.98(d,J=9.0Hz,1H),7.66(d,J=2.3Hz,1H),7.42(dd,J=9.0,2.4Hz,1H),4.28(p,J=7.4Hz,4H),2.84(s,3H),2.27(s,3H),2.05(s,3H),1.39(t,J=7.0Hz,6H)。

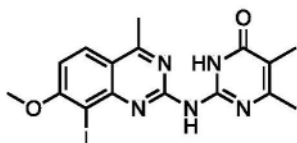
[0224] 然后将纯化的二乙基磷酸酯(55mg,0.12mmol)化合物溶解在DCM(2.5mL)中;添加TMSI,并将所述反应在室温搅拌3h。蒸发掉溶剂,并将粗产物用DCM研磨,过滤,然后悬浮在H<sub>2</sub>O中。缓慢添加NaOH水溶液(0.250mL,0.254mmol),所述混合物在搅拌30min后变得清澈。在真空下除去溶剂,得到马德辛-磷酸酯(化合物7)。得率:93%(50mg,0.11mmol)。<sup>1</sup>H NMR(300MHz,D<sub>2</sub>O) δ7.97(d,J=9.1Hz,1H),7.47-7.38(m,2H),2.73(s,3H),2.26(s,3H),1.87(s,3H)。<sup>31</sup>P NMR(81MHz,D<sub>2</sub>O) δ-174.17。对于C<sub>15</sub>H<sub>16</sub>N<sub>5</sub>NaO<sub>5</sub>P,HRMS(ESI)(M+H)<sup>+</sup>m/z的计算值为400.0787,实测值为400.0792。

[0225] 部分2:

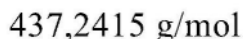


[0226]

[0227] a. 2-((8-碘-7-甲氧基-4-甲基喹唑啉-2-基)氨基)-5,6-二甲基嘧啶-4(3H)-酮(化合物8)

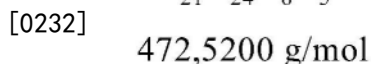
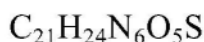
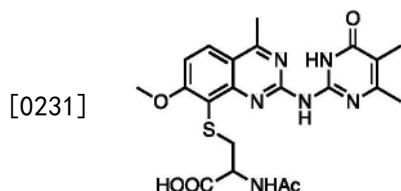


[0228]



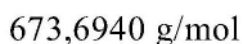
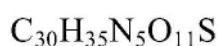
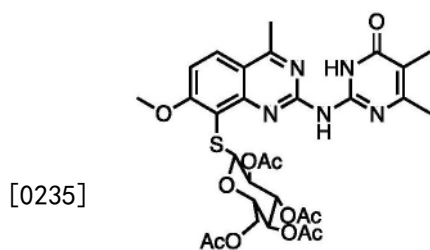
[0229] 向马德辛(化合物3)(360mg,1.16mmol)在浓H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>(1.2mL)中的冷却的溶液添加(在黑暗中)NIS(248mg,1.10mmol)。将所述溶液在室温搅拌5h。将混合物倾倒在冷水中,并将pH调整到5。在用DCM萃取后,将合并的有机层在MgSO<sub>4</sub>上干燥,过滤并浓缩。通过柱层析进行纯化(DCM/MeOH 100:0→98:2),得到所需化合物8。得率:25%(127mg,0.29mmol)。TLC Rf:0.22(DCM/MeOH 98:2)。<sup>1</sup>H NMR(300MHz,CDCl<sub>3</sub>) δ13.50(s,1H),8.88(s,1H),7.96(d,J=9.1Hz,1H),7.09(d,J=9.1Hz,1H),4.08(s,3H),2.83(s,3H),2.28(s,3H),2.07(s,3H)。对于C<sub>16</sub>H<sub>17</sub>N<sub>5</sub>O<sub>2</sub>,HRMS(ESI)(M+H)<sup>+</sup>m/z的计算值为438.0427,实测值为438.0427。

[0230] b. N-乙酰基-S-(2-((4,5-二甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-2-基)氨基)-7-甲氧基-4-甲基喹唑啉-8-基)半胱氨酸(化合物9,EYP102)



[0233] 在惰性气氛下,在可密封的小瓶中添加2-((8-碘-7-甲氧基-4-甲基喹唑啉-2-基)氨基)-5,6-二甲基嘧啶-4(3H)-酮化合物8(10.6mg,0.025mmol)、半胱氨酸NHAc(7mg,0.04mmol)、PdG<sub>3</sub>Xantphos(5mg,0.005mmol)和THF(0.1mL)。将所述混合物用氩气吹扫,并添加NEt<sub>3</sub>(10μL,0.07mmol)。将所述混合物在50℃搅拌18h并在70℃搅拌6h。除去溶剂,通过柱层析进行纯化(DCM/MeOH 100:0→70:30),得到所需化合物9。通过制备TLC进行的第二次纯化(DCM/MeOH75:25)对于提供作为白色粉末的纯化合物9来说是必需的。得率:48%(5.7mg,0.012mmol)。TLC Rf:0.1(DCM/MeOH 8:2)。<sup>1</sup>H NMR(300MHz,MeOD) δ8.11(d,J=9.1Hz,1H),7.32(d,J=9.0Hz,1H),4.08(s,3H),3.70-3.55(m,2H),2.80(s,3H),2.70(s,1H),2.23-1.98(m,6H),1.73(s,3H)。对于C<sub>21</sub>H<sub>25</sub>N<sub>6</sub>O<sub>5</sub>S,HRMS(ESI)(M+H)<sup>+</sup>m/z的计算值为473.1607,实测值为473.1608。

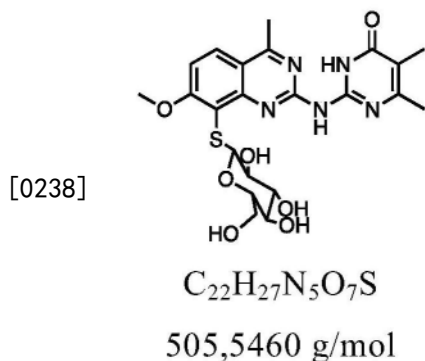
[0234] c. ((1S,2S,4R,5S,6S)-5-乙酰氧基-7,8-二乙酰基-4-((2-((4,5-二甲基-6-氧代-1,6-二氢嘧啶-2-基)氨基)-7-甲氧基-4-甲基喹唑啉-8-基)硫代)-3,7λ<sup>3</sup>,8λ<sup>3</sup>-三氧杂双环[4.2.0]辛-2-基)甲基乙酸酯(化合物10,EYP86)



[0236] 在惰性气氛下,将2-((8-碘-7-甲氧基-4-甲基喹唑啉-2-基)氨基)-5,6-二甲基嘧啶-4(3H)-酮化合物8(25mg,0.055mmol)和硫代葡萄糖(22mg,0.06mmol)在THF(0.5mL)中的溶液用氩气吹扫。添加催化剂PdG<sub>3</sub>Xantphos(10mg,0.01mmol)和Et<sub>3</sub>N(20μL,0.14mmol),并将反应混合物在50℃加热3h。在真空中除去溶剂,通过柱层析进行纯化(DCM/MeOH 100:0→97:3)得到作为橙色固体的所需化合物10。得率:41%(15.4mg,0.022mmol)。TLC Rf:0.3(DCM/MeOH 96:4)。<sup>1</sup>H NMR(300MHz,MeOD) δ8.18(d,J=9.1Hz,1H),7.34(d,J=9.5Hz,1H),5.17(t,J=9.3Hz,1H),4.75-4.66(m,1H),4.07(s,3H),3.99-3.89(m,1H),3.62-3.52(m,2H),2.83(s,3H),2.62(s,2H),2.10(s,6H),1.94(d,J=9.4Hz,6H),1.66(s,3H)。对于C<sub>30</sub>H<sub>35</sub>N<sub>5</sub>O<sub>11</sub>NaS,HRMS(ESI)(M+Na)<sup>+</sup>m/z的计算值为696.1651,实测值为696.1657。

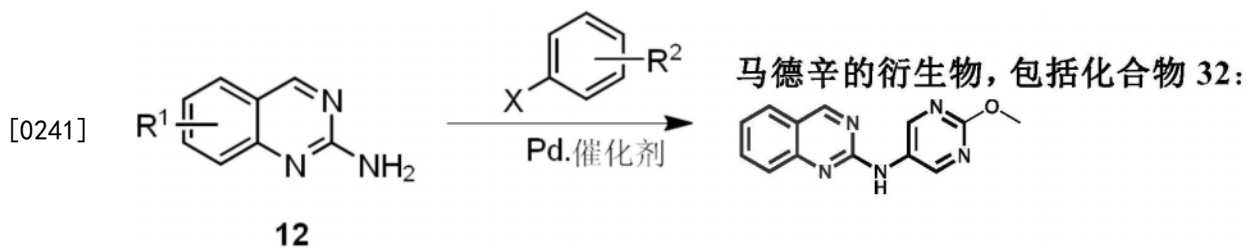
[0237] d. 2-((7-甲氧基-4-甲基-8-(((2R,3S,4R,5R,6S)-3,4,5-三羟基-6-(羟基甲基)四氢-2H-吡喃-2-基)硫代)喹唑啉-2-基)氨基)-5,6-二甲基嘧啶-4(3H)-酮(化合物11,

EYP113)



[0239] 将化合物10在MeONa (0.19mL, 0.038mmol, 0.2M, 在MeOH中) 中的溶液在室温搅拌1h。在真空中蒸发掉溶剂后, 获得作为黄色粉末的化合物11。得率: >99% (7mg, 0.014mmol)。 $^1H$  NMR (300MHz, MeOD)  $\delta$  7.88 (d,  $J=9.0$ Hz, 1H), 7.02 (d,  $J=9.1$ Hz, 1H), 3.87 (s, 3H), 3.53-3.28 (m, 5H), 2.98-2.91 (m, 2H), 2.58 (s, 2H), 2.10 (s, 3H), 1.80 (s, 3H)。对于 $C_{22}H_{28}N_5O_7S$ , HRMS (ESI) (M+H) $^+$  $m/z$ 的计算值为506.1709, 实测值为506.1729。

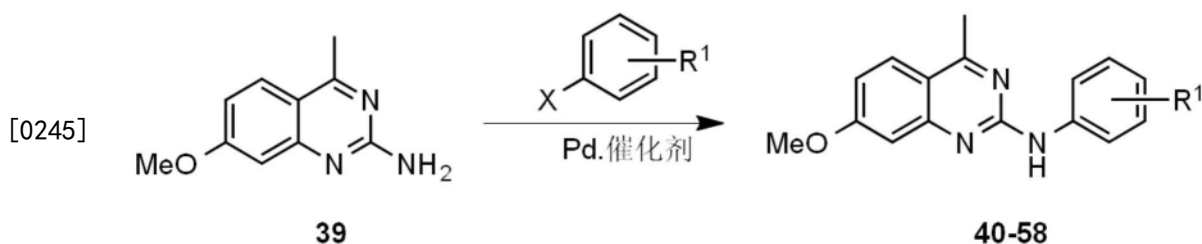
[0240] 3) 通用程序A:



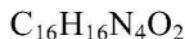
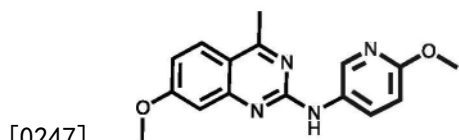
[0242] 在惰性气氛下添加2-氨基喹唑啉衍生物 (1当量) (化合物12)、芳基卤 (1.5当量; 除非另有陈述)、 $Pd_2dba_3$  (7.5mol% 或 10mol%)、Xantphos (15mol% 或 20mol%) 和 $Cs_2CO_3$  (2当量)。将所述混合物用氩气吹扫。添加THF。将小瓶密封, 并将反应混合物在80°C 搅拌14h。在室温冷却后, 在真空下除去溶剂, 并将粗产物通过柱层析进行纯化, 得到所需化合物。

[0243] N-(2-甲氧基嘧啶-5-基) 喹唑啉-2-胺 (化合物32, EYP281,  $C_{13}H_{11}N_5O$ , 253, 2650g/mol): 遵照通用程序A, 从2-氨基喹唑啉 (21mg, 0.13mmol)、5-溴-2-甲氧基嘧啶 (26mg, 0.19mmol)、 $Pd_2dba_3$  (9mg, 0.01mmol)、Xantphos (12mg, 0.02mmol)、 $Cs_2CO_3$  (84mg, 0.26mmol)、THF (0.65mL) 开始。得率: 42% (13mg, 0.05mmol)。浅棕色粉末。Mp 210.9-211.7°C。TLC Rf: 0.2 (DCM/MeOH 98:2)。 $^1HNMR$  (300MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  9.11 (s, 1H), 9.03 (s, 2H), 7.77 (d,  $J=7.4$ Hz, 3H), 7.38 (t,  $J=7.3$ Hz, 1H), 7.21 (s, 1H), 4.04 (s, 3H)。

[0244] 4) 来自于所述方法学部分的另一个系列



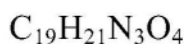
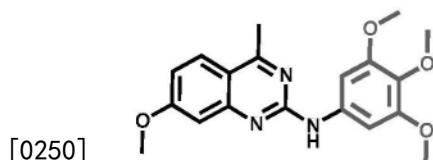
[0246] a. 7-甲氧基-N-(6-甲氧基吡啶-3-基)-4-甲基喹唑啉-2-胺 (化合物41, EYP174)



296,3300 g/mol

[0248] 遵照通用程序A (区别在于仅使用1.1当量的杂芳基溴), 从2-氨基-4-甲基-7-甲氧基喹唑啉(化合物39) (25mg, 0.13mmol)、2-甲氧基-5-溴吡啶(0.017mL, 0.14mmol)、Pd<sub>2</sub>dba<sub>3</sub> (12mg, 0.013mmol)、Xantphos (15mg, 0.026mmol)、Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (84mg, 0.26mmol)、THF (0.65mL) 开始。得率: 76% (29mg, 0.10mmol)。橙色粉末。Mp 172.1-173.0°C。TLC Rf: 0.6 (DCM/MeOH 98:2)。<sup>1</sup>H NMR (300MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.59 (d, J=2.8Hz, 1H), 8.04 (dd, J=8.8, 2.8Hz, 1H), 7.75 (d, J=9.1Hz, 1H), 7.36 (s, 1H), 6.98 (d, J=2.5Hz, 1H), 6.89 (dd, J=9.0, 2.5Hz, 1H), 6.76 (d, J=8.8Hz, 1H), 3.93 (s, 3H), 3.89 (s, 3H), 2.72 (s, 3H)。对于C<sub>16</sub>H<sub>17</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>, HRMS (ESI) (M+H)<sup>+</sup>m/z 的计算值为297.1352, 实测值为297.1328。

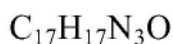
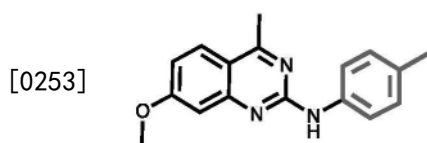
[0249] b. 7-甲氧基-4-甲基-N-(3,4,5-三甲氧基苯基)喹唑啉-2-胺(化合物42, EYP188)



355,3940 g/mol

[0251] 遵照通用程序A, 从2-氨基-4-甲基-7-甲氧基喹唑啉(化合物39) (25mg, 0.13mmol)、1-溴-3,4,5-三甲氧基苯(47mg, 0.19mmol)、Pd<sub>2</sub>dba<sub>3</sub> (12mg, 0.013mmol)、Xantphos (15mg, 0.026mmol)、Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (84mg, 0.26mmol)、THF (0.65mL) 开始。得率: 58% (26mg, 0.07mmol)。浅黄色粉末。Mp 159.5-160.1°C。TLC Rf: 0.8 (DCM/MeOH 98:2)。<sup>1</sup>H NMR (300MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.78 (d, J=9.0Hz, 1H), 7.39 (s, 1H), 7.11 (s, 2H), 6.97 (d, J=2.6Hz, 1H), 6.92 (dt, J=9.0, 2.4Hz, 1H), 3.91 (s, 3H), 3.89 (s, 6H), 3.83 (s, 3H), 2.75 (s, 3H)。对于C<sub>19</sub>H<sub>22</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, HRMS (ESI) (M+H)<sup>+</sup>m/z 的计算值为356.1610, 实测值为356.1546。

[0252] c. 7-甲氧基-4-甲基-N-(对甲苯基)喹唑啉-2-胺(化合物43, EYP156)



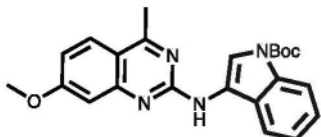
[0254]

279,3430 g/mol

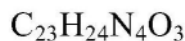
[0255] 遵照通用程序A, 从2-氨基-4-甲基-7-甲氧基喹唑啉(化合物39) (25mg, 0.13mmol)、4-溴甲苯(32mg, 0.19mmol)、Pd<sub>2</sub>dba<sub>3</sub> (12mg, 0.013mmol)、Xantphos (15mg, 0.026mmol)、Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (84mg, 0.26mmol)、THF (0.65mL) 开始。得率: 39% (14.0mg, 0.05mmol)。灰白色固体。Mp 142.8-143.3°C。TLC Rf: 0.7 (DCM 100%)。<sup>1</sup>H NMR (300MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.77 (d, J

=9.0Hz, 1H), 7.68 (d, J=8.2Hz, 2H), 7.24-7.12 (m, 3H), 7.05 (d, J=2.5Hz, 1H), 6.90 (dd, J=9.1, 2.5Hz, 1H), 3.93 (s, 3H), 2.75 (s, 3H), 2.34 (s, 3H)。对于 $C_{17}H_{18}N_3O$ , HRMS (ESI) (M+H)<sup>+</sup> m/z的计算值为280.1450, 实测值为280.1444。

[0256] d. 3-((7-甲氧基-4-甲基喹唑啉-2-基)氨基)-1H-吡啶-1-甲酸叔丁酯(化合物46, EYP177)



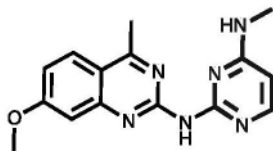
[0257]



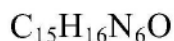
404,4700 g/mol

[0258] 遵照通用程序A(区别在于仅使用1.1当量的杂芳基溴), 从2-氨基-4-甲基-7-甲氧基喹唑啉(化合物39)(25mg, 0.13mmol)、3-溴吡啶衍生物(41mg, 0.14mmol)、 $Pd_2dba_3$ (12mg, 0.013mmol)、Xantphos(15mg, 0.026mmol)、 $Cs_2CO_3$ (84mg, 0.26mmol)、THF(0.65mL)开始。得率: 31% (16mg, 0.04mmol)。橙色粉末。Mp 114-116°C。TLC Rf: 0.55 (DCM/MeOH 98:2)。<sup>1</sup>H NMR (300MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  8.57 (s, 1H), 8.17 (s, 1H), 7.82 (d, J=9.0Hz, 1H), 7.58 (d, J=7.7Hz, 1H), 7.40-7.27 (m, 4H), 7.09 (d, J=2.5Hz, 1H), 6.94 (dd, J=9.1, 2.5Hz, 1H), 3.95 (s, 3H), 2.80 (s, 3H), 1.73 (s, 9H)。对于 $C_{23}H_{25}N_4O_3$ , HRMS (ESI) (M+H)<sup>+</sup> m/z的计算值为405.1927, 实测值为405.1932。

[0259] e. N<sup>2</sup>-(7-甲氧基-4-甲基喹唑啉-2-基)-N<sup>4</sup>-甲基嘧啶-2,4-二胺(化合物49, EYP181)



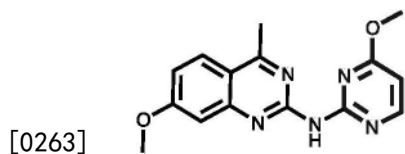
[0260]



296,3340 g/mol

[0261] 遵照通用程序A(区别在于仅使用1.1当量的杂芳基氯), 从2-氨基-4-甲基-7-甲氧基喹唑啉(化合物39)(25mg, 0.13mmol)、2-氯-N-甲基嘧啶-4-胺(20mg, 0.14mmol)、 $Pd_2dba_3$ (12mg, 0.013mmol)、Xantphos(15mg, 0.026mmol)、 $Cs_2CO_3$ (84mg, 0.26mmol)、THF(0.65mL)开始。得率: 31% (11mg, 0.04mmol)。灰色粉末。Mp 247.4-249.1°C。TLC Rf: 0.45 (DCM/MeOH 9:1)。<sup>1</sup>H NMR (300MHz, MeOD)  $\delta$  8.02 (d, J=9.2Hz, 2H), 7.49 (s, 1H), 7.13 (d, J=9.2Hz, 1H), 6.39 (d, J=6.5Hz, 1H), 4.00 (s, 3H), 3.07 (s, 3H), 2.85 (s, 3H)。对于 $C_{15}H_{17}N_6O$ , HRMS (ESI) (M+H)<sup>+</sup> m/z的计算值为297.1464, 实测值为297.1473。

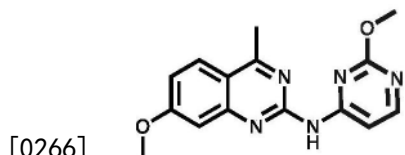
[0262] f. 7-甲氧基-N-(4-甲氧基嘧啶-2-基)-4-甲基喹唑啉-2-胺(化合物50, EYP179)



297,3180 g/mol

[0264] 遵照通用程序A(区别在于仅使用1.1当量的杂芳基氯),从2-氨基-4-甲基-7-甲氧基喹唑啉(化合物39)(25mg,0.13mmol)、2-氯-4-甲氧基嘧啶(20mg,0.14mmol)、 $\text{Pd}_2\text{dba}_3$ (12mg,0.013mmol)、Xantphos(15mg,0.026mmol)、 $\text{Cs}_2\text{CO}_3$ (84mg,0.26mmol)、THF(0.65mL)开始。得率:62%(23mg,0.08mmol)。黄色粉末。Mp160.8-161.5°C。TLC Rf:0.3(DCM/MeOH 98:2)。 $^1\text{H}$  NMR(300MHz, $\text{CDCl}_3$ ) $\delta$ 8.42-8.33(m,1H),8.28-8.16(m,1H),7.84(d,J=9.0Hz,1H),7.23(s,1H),7.01(dd,J=9.0,2.3Hz,1H),6.35(d,J=5.6Hz,1H),3.97(s,3H),3.92(s,3H),2.81(s,3H)。对于 $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{N}_5\text{O}_2$ ,HRMS(ESI)(M+H) $^+$ m/z的计算值为298.1304,实测值为298.1302。

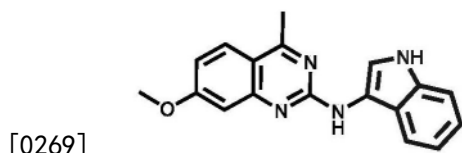
[0265] g.7-甲氧基-N-(2-甲氧基嘧啶-4-基)-4-甲基喹唑啉-2-胺(化合物54,EYP190)



297,3180 g/mol

[0267] 向化合物53(EYP193)(10mg,0.033mmol)在MeOH(0.5mL)中的溶液添加NaOMe(0.15mL,0.075mmol)。将所述混合物在80°C加热6h。然后在真空中除去溶剂,通过柱层析进行纯化(DCM/MeOH100:0→99:1),得到作为白色固体的所需化合物54。得率:61%(6mg,0.02mmol)。Mp 173.9-174.3°C。TLC Rf:0.27(DCM/MeOH 98:2)。 $^1\text{H}$ NMR(300MHz, $\text{CDCl}_3$ ) $\delta$ 8.41(d,J=5.7Hz,1H),8.35(d,J=5.8Hz,1H),7.96(s,1H),7.86(d,J=9.0Hz,1H),7.12(d,J=2.6Hz,1H),7.05(dd,J=9.1,2.5Hz,1H),3.98(s,3H),3.97(s,3H),2.81(s,3H)。对于 $\text{C}_{15}\text{H}_{16}\text{N}_5\text{O}_2$ ,HRMS(ESI)(M+H) $^+$ m/z的计算值为298.1304,实测值为298.1309。

[0268] h.N-(1H-吡啶-3-基)-7-甲氧基-4-甲基喹唑啉-2-胺(化合物57,EYP165)



304,3530 g/mol

[0270] 向化合物46(EYP177)(35mg,0.08mmol)在DCM(2mL)中的溶液添加TFA(0.1mL,1.3mmol)。将所述溶液在室温搅拌2h。在添加 $\text{NaHCO}_3$ 饱和水溶液并用DCM萃取后,将有机层在 $\text{MgSO}_4$ 上干燥,过滤并浓缩至干。通过柱层析进行纯化(DCM/MeOH 100:1→200:1),得到作

为白色固体的所需化合物57。得率:48% (11mg, 0.04mmol)。白色粉末。TLC Rf:0.6 (DCM/MeOH 98:2)。<sup>1</sup>H NMR (300MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ10.69 (s, 1H), 9.51 (s, 1H), 8.17 (s, 1H), 8.01 (d, J=8.0Hz, 1H), 7.91 (d, J=8.9Hz, 1H), 7.34 (d, J=8.1Hz, 1H), 7.09 (t, J=7.5Hz, 1H), 7.01 (d, J=2.4Hz, 1H), 6.96 (t, J=7.5Hz, 1H), 6.88 (dd, J=9.0, 2.5Hz, 1H), 3.91 (s, 3H), 2.73 (s, 3H)。对于C<sub>18</sub>H<sub>17</sub>N<sub>4</sub>O, HRMS (ESI) (M+H)<sup>+</sup>m/z的计算值为305.1402, 实测值为305.1408。

#### [0271] T-细胞测定法

[0272] 按照各自制造商的流程, 使用转染试剂jetPRIME (Ozyme) 或GeneJuice (Millipore), 将MCA205和B16F10小鼠细胞系分别用质粒YFP-珠蛋白-SL8-内含子或PCDNA3空质粒(阴性对照)转染。转染后24小时, 将细胞用不同剂量的马德辛(Sigma SML 1409)、Madra.HCl (3.HCl) 或本文中引用的不同化合物处理。然后将细胞用PBS 1X清洗三次, 并将5x10<sup>4</sup>个肿瘤细胞与1x10<sup>5</sup>个B3Z杂交瘤在96孔板中共培养。在阳性对照孔中, 添加4μg/ml的合成肽SL8。然后将细胞在37°C和5%CO<sub>2</sub>下温育过夜。将板以1200rpm离心5min, 将细胞用PBS 1X清洗两次, 并在0.2% TritonX-100、0.2% DTT、0.5MK<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、0.5M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>中, 在振荡下, 在4°C裂解5min。将裂解物以3000rpm离心10min, 并将上清液转移到96孔optiplaque (OptiPlaque-96, PerkinElmer) 中。添加在PBS中含有10mM MgCl<sub>2</sub>、11.2mMβ-巯基乙醇、0.0015% IGEPAL®CA-630和40μM 4-甲基伞形酮基β-D-吡喃半乳糖苷(MUG)的显影缓冲液, 并将板在室温温育3小时。最后, 使用FLUOstar OPTIMA (BMG LABTECH GmbH, 300ffenburg, 德国) 测量β-半乳糖苷酶活性。结果被表示为平均值±SEM。\*P<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001 (未配对student t检验)。

#### [0273] 肿瘤激惹和治疗

[0274] C57Bl/6J雌性小鼠从瑞士的Harlan Laboratories Ltd获得。将7周龄小鼠用1x10<sup>5</sup>个MCA205肉瘤或B16F10黑素瘤细胞或1.5x10<sup>5</sup>个MCA205珠蛋白-SL8-内含子或B16F10珠蛋白-SL8-内含子细胞皮下注射到右肋中。肉瘤细胞在100μL无菌PBS中注射, 而黑素瘤细胞在50:50PBS:基质胶中注射, 以防止肿瘤细胞散播。在肿瘤接种后4、7、10和14天, 注射在100μL H<sub>2</sub>O+30% (2-羟基丙基)-β-环糊精(w/v)中的Madra.HCl。以同样的方式, 在肿瘤接种后4、7、10和14天注射在100μL H<sub>2</sub>O中的EYP59(化合物7)。每3至4天记录肿瘤的面积, 直至所述肿瘤达到伦理学终点。所有动物实验均遵照法国和欧洲法律和法规进行。结果被表示成平均值±SEM。\*p<0.05, \*\*P<0.01, \*\*\*P<0.001 (ANOVA和比较所有组的Tukey's多重比较检验)。

#### [0275] 结果

[0276] 在癌细胞中马德辛处理增加PTP来源抗原的抗原呈递

[0277] 在最近的研究中, 本发明人已显示, 在体外PTP是内源I类MHC途径的主要肽来源。为了调节癌细胞表面处PTP来源抗原的呈递, 本发明人测试了马德辛处理对小鼠肿瘤细胞系的影响, 所述肿瘤细胞系是一种黑素瘤(B16F10)和一种肉瘤(MCA205)细胞系。两种鼠类细胞系瞬时表达源自于β-珠蛋白基因构建物中的内含子的PTP-SL8表位, 或保持不被转染。马德辛在两种小鼠细胞系中引发PTP依赖性抗原呈递的增加, 并具有剂量依赖性效应(图1A)。这些结果显示, 在癌细胞系中, 在马德辛处理后PTP来源抗原的产生和呈递可以被正调节。它们支持了下述假说, 即这种分子可以用作正免疫调节剂, 以增强依赖于PTP产生和呈递的特异性抗肿瘤免疫应答。

[0278] 合成的马德辛盐酸盐 (Madra.HCl) 处理在体外增加PTP来源抗原的抗原呈递并在体内减缓肿瘤生长

[0279] 上述结果证实马德辛能够在体外增加由内含子序列编码的PTP依赖性抗原在被处理的肿瘤细胞系的细胞表面上的产生和呈递。接下来的问题是研究只能溶解在DMSO中的马德辛是否可以在体内对肿瘤生长和CD8<sup>+</sup>T细胞增殖具有相同的影响。不幸的是, 由于其在DMSO中的浓度低, 本发明人未能进行使用马德辛的体内实验。由于这第一个结果令人鼓舞, 因此他们决定产生马德辛的衍生物, 以便提高癌症免疫应答。事实上, 马德辛不溶于水, 并且只能溶解在DMSO溶剂中, 使得其在小鼠中的药代动态效率较低。

[0280] 为了在不使用有毒载体或助溶剂 (DMSO) 的情况下使马德辛可用于更广泛的体外和体内验证, 本发明人认为有必要找到一种策略来合成马德辛和某些衍生物以增强它们的溶解性和免疫调节剂活性。

[0281] 为此目的, 例如磷酸酯前体药物通常可以表现出优异的水溶性、化学稳定性和通过磷酸酶快速生物转化回母体药物的能力。磷酸酯前体药物的形成已被用于提高包括抗肿瘤酚类天然产物及其衍生物例如康普瑞汀A-4在内的各种不同分子的水溶性。

[0282] 为了测试所述新化合物作为针对肿瘤细胞系的正免疫调节剂, 本发明人首先决定在体外测定法中测试它们。正如预期, 在本文中被称为“Madra.HCl”的新化合物能够溶解在水中。在用5 $\mu$ M或10 $\mu$ M的Madra.HCl处理瞬时表达源自于 $\beta$ -珠蛋白基因中的内含子的PTP-SL8表位(珠蛋白-内含子-SL8)的鼠类细胞系MCA205或B16F10两者后, 本发明人观察到PTP依赖性抗原呈递以剂量依赖性方式增加(图1B)。将1 $\times 10^5$ 个稳定表达来自于 $\beta$ -珠蛋白基因中的内含子的SIINFEKL (SL8) 表位(珠蛋白-内含子-SL8)的MCA205肉瘤细胞皮下接种到小鼠中。在该接种后4天, 将所述小鼠用确定剂量的Madra.HCl腹膜内疫苗接种。然后每3天注射20或40mg/kg的Madra.HCl。在此期间, 每2至3天监测肿瘤生长(图1C)。本发明人观察到在用20mg/kg Madra.HCl治疗的小鼠中在激惹后第27天肿瘤生长显著降低50% (图1D), 并且用40mg/kg Madra.HCl治疗的小鼠中在激惹后第27天肿瘤生长更是降低60至70% (图1D)。对表达所述珠蛋白-内含子-SL8构建物的B16F10肿瘤细胞进行了相同的实验。

[0283] 通过相同的方式, 将1 $\times 10^5$ 个未转染的MCA肉瘤细胞皮下接种到小鼠中。在该接种后4天, 将所述小鼠用确定剂量的Madra.HCl腹膜内疫苗接种。然后, 每3天再次注射相同的剂量。在此期间, 每2至3天监测肿瘤生长(图1E)。本发明人观察到在用20mg/kg或40mg/kg的Madra.HCl治疗的小鼠中在激惹后第21天肿瘤生长显著降低40% (图1F)。

[0284] 此外, 已显示Madra.HCl治疗延长了小鼠的生存期, 当小鼠用40mg/kg Madra.HCl治疗时, 在肿瘤接种后120天存在大约25%的存活者, 当小鼠用20mg/kg Madra.HCl治疗时在肿瘤接种后120天存在大约15%的存活者(图1G)。

[0285] 最后, 将如上所述用表达珠蛋白-内含子-SL8构建物的MCA205肿瘤细胞接种, 并在用Madra.HCl治疗后经历完全的肿瘤消退的小鼠, 在100天后用表达珠蛋白-内含子-SL8构建物的MCA205肿瘤细胞在右肋上并用B16F10肿瘤细胞在左肋上重新激惹。尽管B16F10肿瘤随时间生长, 但MCA205肿瘤在小鼠中不生长(图1H)。这些结果证实, 在Madra.HCl治疗后, 小鼠发展出特异性针对MCA205肿瘤的长期抗肿瘤应答。

[0286] 马德辛衍生物在体外有效增加内含子来源抗原的I类MHC呈递

[0287] 为了提高Madra.HCl的免疫调节活性, 以便在不使用有毒载体或助溶剂 (DMSO) 的

情况下进行更广泛的体外和体内验证, 本发明人认为有必要找到一种策略来改变其结构并同时保留其活性。如上文所述, 制备了接下来的本发明的化合物。

[0288] 为了测试所述新化合物作为对抗肿瘤细胞系的正免疫调节剂, 本发明人首先决定在体外测定法中对它们进行测试。正如预期, Madra.HCl的几种衍生物可溶于水, 一些其他衍生物则不能。使用MTT测试, 他们鉴定了每种化合物在MCA肉瘤和B16F10黑素瘤细胞系中的IC<sub>25</sub>和IC<sub>50</sub> (图2)。对于其余的实验来说, 他们决定用可溶或不溶于水的每种化合物的IC<sub>50</sub>处理两种细胞系。为此目的, 将瞬时表达源自于 $\beta$ -珠蛋白基因中的内含子的PTP-SL8表位(珠蛋白-内含子-SL8)的两种鼠类肿瘤细胞系用每种化合物处理过夜。对每种化合物的免疫调节活性有四个不同观察:

[0289] 第一个观察是, 他们注意到使用某些化合物时在两种鼠类肿瘤细胞系中均存在PTP依赖性抗原呈递的增加(图3)。在用EYP59(化合物7) (A)、EYP201(化合物6) (B)、EYP165(化合物57) (C)和EYP281(化合物32) (D)分别处理鼠类细胞系后, 他们可以看到PTP-SL8呈递的增加。

[0290] 第二个观察是, 某些化合物只能在瞬时表达源自于 $\beta$ -珠蛋白基因中的内含子的PTP-SL8表位的MCA细胞系中正向增加它们的PTP来源抗原的呈递(图4)。在用EYP188(化合物42) (A)和EYP86(化合物10) (B)分别处理鼠类肉瘤细胞系后, 他们可以看到PTP-SL8呈递的增加。

[0291] 此外, 第三个观察是, 某些化合物只能在在瞬时表达源自于 $\beta$ -珠蛋白基因中的内含子的PTP-SL8表位的B16F10细胞系中正向增加我们的PTP来源抗原的呈递(图5)。在用EYP174(化合物41) (A)、EYP179(化合物50) (B)、EYP190(化合物54) (C)和EYP181(化合物49) (D)分别处理鼠类黑素瘤细胞系后, 本发明人可以看到PTP-SL8呈递的增加。

[0292] 最后, 第四个观察是某些化合物在测试的两种鼠类细胞系均不能正向增加我们的PTP来源抗原的呈递(图6)。在用EYP177(化合物46) (A)、EYP156(化合物43) (B)、EYP113(化合物11) (C)和EYP102(化合物9) (D)分别处理两种鼠类细胞系后, 本发明人未能看到PTP-SL8呈递的任何增加。

[0293] 马德辛衍生物EYP59(化合物7)在体内以免疫依赖性方式有效降低肿瘤生长

[0294] 将 $1 \times 10^5$ 个稳定表达来自于 $\beta$ -珠蛋白基因中的内含子的SIINFEKL(SL8)表位(珠蛋白-内含子-SL8)的MCA205肉瘤细胞皮下接种到小鼠中。在该接种后4天, 将所述小鼠用确定剂量的EYP59腹膜内疫苗接种。然后, 每3天注射20mg/kg。在此期间每2至3天监测肿瘤生长(图7A)。本发明人观察到在用20mg/kg的EYP59治疗的小鼠中在激惹后第23天肿瘤生长显著降低85%(图7B)。以同样方式, 将 $1 \times 10^5$ 个未转染的MCA205肉瘤细胞皮下接种到小鼠中。在该接种后4天, 将所述小鼠用确定剂量的EYP59腹膜内疫苗接种。然后, 每3天再次注射相同的剂量。在此期间每2至3天监测肿瘤生长。本发明人观察到在用20mg/kg的EYP59治疗的小鼠中在激惹后第19天肿瘤生长显著降低70%(图7C)。

[0295] 为了评估这种效应对免疫应答的需要, 本发明人在具有与上述相同的设置的免疫缺陷nu/nu小鼠中测试了20mg/kg EYP59的影响, 并观察到它对肿瘤生长没有影响(图7D)。这些结果显示, EYP59治疗后肿瘤尺寸的减小要求在体内存在活跃的免疫应答。

[0296] 当以肿瘤内或静脉内方式注射时马德辛衍生物EYP59(化合物7)在体内有效降低肿瘤生长

[0297] 将 $1 \times 10^5$ 个野生型MCA205肉瘤细胞皮下接种到小鼠中。在该接种后4天,将所述小鼠用确定剂量的EYP59肿瘤内(2.5mg/kg)或静脉内(5mg/kg)注射。然后,每3天分别以相应的给药方式注射相同量的产物。在此期间,每2至3天监测肿瘤生长。本发明人观察到在用2.5mg/kg的EYP59肿瘤内治疗的小鼠中,在激惹后第21天肿瘤生长显著减少75%(图8A)。此外,本发明人观察到在用5mg/kg的EYP59静脉内治疗的小鼠中,在激惹后第25天肿瘤生长显著减少80%(图8B)。

[0298] 讨论

[0299] 本发明揭示出特异性剪接体抑制剂对抗肿瘤免疫应答具有正面效应并因此对肿瘤生长具有正面效应。剪接异常作为癌症的特异性特点出现,并作为患者生存的预测性标志物以及使用剪接抑制剂治疗癌症的靶点而被研究,一些剪接抑制剂目前在急性髓系白血病中正在开发。在本发明中,发明人证实了马德辛的某些特定衍生物在肉瘤和黑素瘤肿瘤细胞系中是体外抗肿瘤免疫应答的有效刺激剂。他们还证实了某些马德辛衍生物在肉瘤癌模型中特异性增加PTP依赖性抗原呈递,并且某些其他衍生物与所述第一组不同,也能在黑素瘤癌模型中增加PTP依赖性抗原呈递。通过强调原始的生物分子谱,它们为靶向分子疗法框架内的新应用开辟了道路。

[0300] PTP模型描述了通过发生在细胞核中的可选翻译事件使预先剪接的mRNA成为PTP的模板。在描述了这种可选翻译的研究中,本发明人证实了编码内含子SL8肽的mRNA的强制核保留导致SL8抗原呈递的增加。除此之外,已显示pladienolide和spliceostatin A(SSA)通过靶向SF3b这种剪接体中U2核内小核糖核蛋白(snRNP)的子复合体来抑制剪接,并已被描述为促进pre-RNA在核中的积累。马德辛通过在U2 snRNP固定后立即阻止稳定的U4/U6/U5 tri-snRNP召集,以不同方式抑制剪接。然而,可能它也诱导pre-RNA在核中的积累,导致抗原呈递的增加。pre-mRNA核积累与抗原呈递增加之间的联系是未知的。极具诱惑力的是假设pre-mRNA在核中的积累为PTP的生产提供了更多模板,导致含有SL8的PTP的富集,其被用作SL8直接呈递的主要来源。

[0301] 此外,pre-mRNA剪接是所有哺乳动物细胞的正常功能所需的必不可少的机制。在最近几年中,几项研究报道了在各种不同癌症中存在与异常剪接活性相关的主要剪接体因子的突变和过表达。几年前,本发明人还提供了剪接体的抑制增加I类MHC PTP依赖性抗原呈递的一些证据。这些发现将重点放在作为抗癌治疗的潜在靶点的剪接体上。

[0302] 正如已经提到的,已报道几种小分子抑制剪接体,特别是抑制剪接体因子SF3B1的功能。尽管这些小分子的确切机制尚未被完全了解,但据报道,通过依赖所使用的化合物将肿瘤尺寸降低40%至80%,它们可以在癌症疗法中有效。迄今为止唯一在人类中测试过的化合物是E7107。它由于毒性问题已停止使用。已知这种化合物通过与SF3B1相互作用来抑制剪接体。

[0303] 此外,细胞毒性T淋巴细胞不能排斥肿瘤的原因可以部分由CTL被pAPC的最初不适合的活化来解释。已描述了在肿瘤微环境(TME)中确定的一部分树突状细胞(DC)能够迁移到引流肿瘤的淋巴结,传递在TME中遇到的完整抗原,并直接或间接致敏幼稚CD8<sup>+</sup>T细胞。此外,已提出某些DC能够在TME中直接致敏幼稚CD8<sup>+</sup>T细胞。本发明人最近证实,肿瘤相关PTP是通过DC交叉致敏CD8<sup>+</sup>T细胞的源材料,并且可能主要通过携带PTP的外泌体从肿瘤细胞转移到DC。除此之外,他们提供了暗示,即用于内源和交叉呈递的PTP由相同的翻译事件

产生,然后所述两个途径迅速分开。PTP是稀有产物,并且已显示PTP疫苗或含外泌体的PTP疫苗的效率依赖于先前PTP蛋白酶体抑制剂对PTP的富集。本发明人相信,剪接抑制剂马德辛及其不同的衍生物除了为直接抗原呈递提供更多源材料之外,还富集充当肿瘤内DC摄取和交叉呈递的源材料的含有SL8的PTP的库,诱导增强的SL8特异性CD8<sup>+</sup>T细胞增殖。

[0304] 在本说明书中,本发明人提供了体外和体内两方面的证据,证实了通过使用来自于马德辛的特定衍生化合物调节剪接体活性,可以诱导针对不同癌症模型的特异性抗肿瘤免疫应答。已报道马德辛干涉剪接体组装的早期步骤。事实上,已证实马德辛抑制剪接体前体的A复合体形成更大的催化性剪接体前体B复合体。我们证实了通过在体外和体内尽可能早地使用马德辛衍生物抑制剪接体的形成,通过特异性诱导针对PTP依赖性表位的CD8<sup>+</sup>T细胞增殖,显著增加了抗肿瘤抗原呈递。他们报道了这些衍生物可用作针对黑素瘤和肉瘤的化疗药剂。

[0305] 参考文献

[0306] -Apcher,S.等,用于I类MHC途径的抗原肽的主要来源在先行轮次的mRNA翻译期间产生(Major source of antigenic peptides for the MHC class I pathway is produced during the pioneer round of mRNA translation), Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.108,11572-7(2011)。

[0307] -Burg,S.H.等,用于确诊癌症的疫苗:克服由免疫逃逸带来的挑战(Vaccines for established cancer:overcoming the challenges posed by immune evasion), Nat.Publ.Gr.16,219-233(2016)。

[0308] -Caron,E.等,MHC I免疫肽组将细胞调控的整体视图传达到细胞表面(The MHC I immunopeptidome conveys to the cell surface an integrative view of cellular regulation),Mol Syst Biol.7,533(2011)。

[0309] -Duvallet,E.等,用于I类MHC交叉呈递途径的肿瘤相关先行翻译产物(TA-PTP)的外泌体驱动的转移(Exosome-driven transfer of tumor-associated Pioneer Translation Products(TA-PTPs)for the MHC class I cross-presentation pathway), Oncoimmunology 5,e1198865(2016)。

[0310] -Kmieciak,M.等,HER-2/neu抗原丧失和乳腺上皮癌的复发由T细胞介导的抗肿瘤免疫应答主动诱导(HER-2/neu antigen loss and relapse of mammary carcinoma are actively induced by T cell-mediated anti-tumor immune responses), Eur.J.Immunol.37,675-685(2007)。

[0311] -Lee,S.&Sin,J.,在结肠癌模型中MC32肿瘤细胞通过CEA的丧失获得抗原特异性CTL抗性(MC32 tumor cells acquire Ag-specific CTL resistance through the loss of CEA in a colon cancer model),Hum Vaccin Immunother 11,2012-2020(2015)。

[0312] -Leone,P.等,I类MHC抗原加工和呈递机构:组织、功能和在肿瘤细胞中的缺陷(MHC class I antigen processing and presenting machinery:organization, function,and defects in tumor cells),J.Natl.Cancer Inst.105,1172-87(2013)。

[0313] -Liu,Y.等,在乳腺癌的脑转移中抗原加工和呈递分子的表达(Expression of antigen processing and presenting molecules in brain metastasis of breast cancer),Cancer Immunol.Immunother.61,789-801(2012)。。

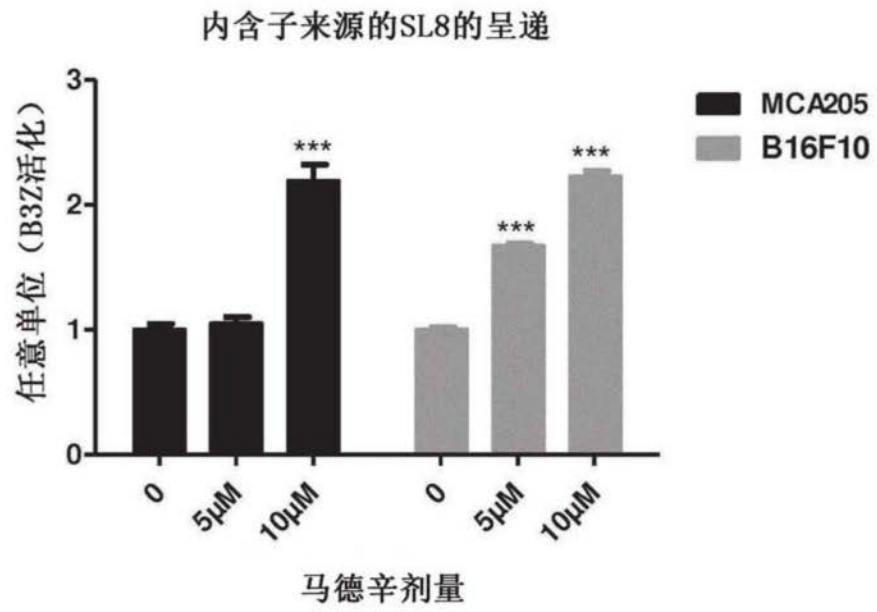
[0314] -Mellman,I.等,癌症免疫疗法时代来临(Cancer immunotherapy comes of age),Nature 480,480-489(2014)。

[0315] -Watson,N.F.S.等,在结肠直肠癌中免疫监督是活跃的,因为I类MHC表达的下调但不是完全丧失与不良预后相关(Immunosurveillance is active in colorectal cancer as downregulation but not complete loss of MHC class I expression correlates with a poor prognosis),Int.J.Cancer 118,6-10(2006)。

[0316] -Yewdell,JW.等,缺陷型核糖体产物(DRiP):用于I类MHC分子的抗原肽的主要来源?(Defective ribosomal products (DRiPs): a major source of antigenic peptides for MHC class I molecules?),JImmunol 157(5):1823-6(1996)。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 法国古斯塔柏罗斯学院 (INSTITUT GUSTAVE ROUSSY)
- [0003] <120> 马德辛衍生化合物、组合物及其用于治疗癌症的用途
- [0004] <130> B2887PC00
- [0005] <160> 1
- [0006] <170> PatentIn version 3.5
- [0007] <210> 1
- [0008] <211> 8
- [0009] <212> PRT
- [0010] <213> 人工序列
- [0011] <220>
- [0012] <223> 表位
- [0013] <400> 1
- [0014] Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu
- [0015] 1 5

A



B

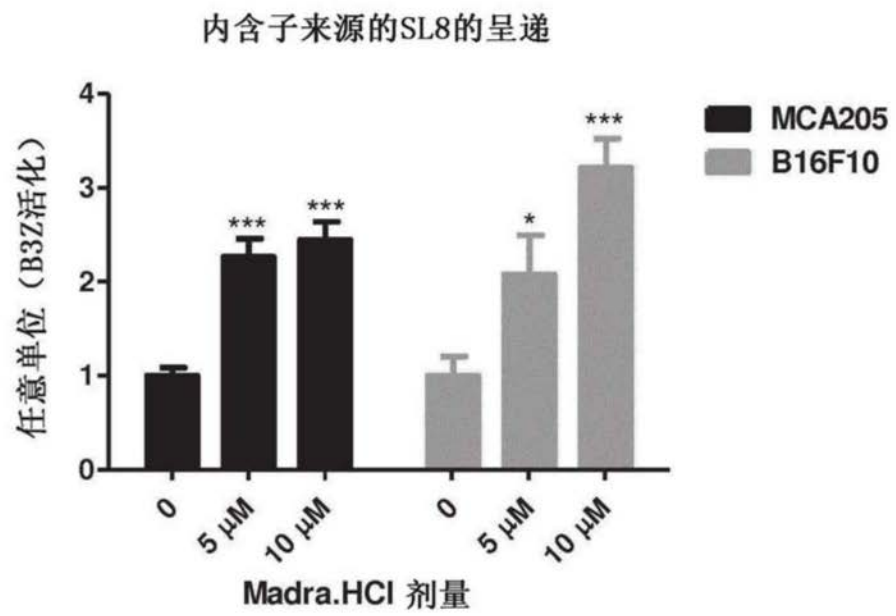


图1

C

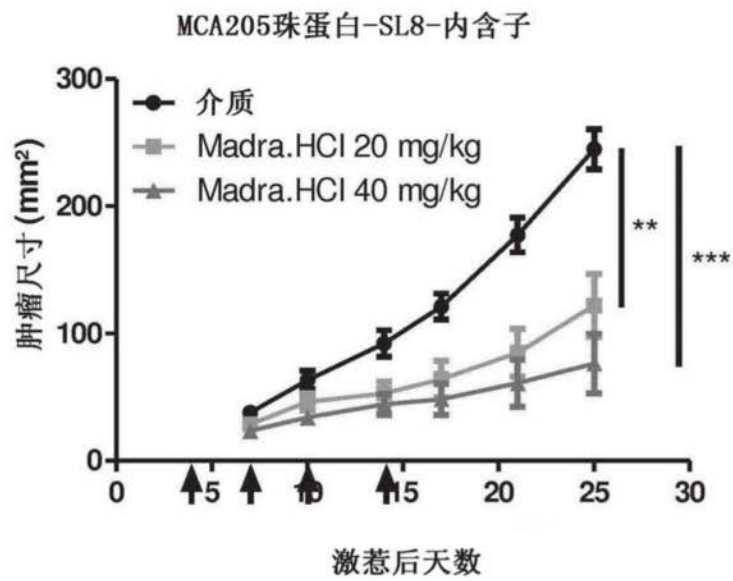
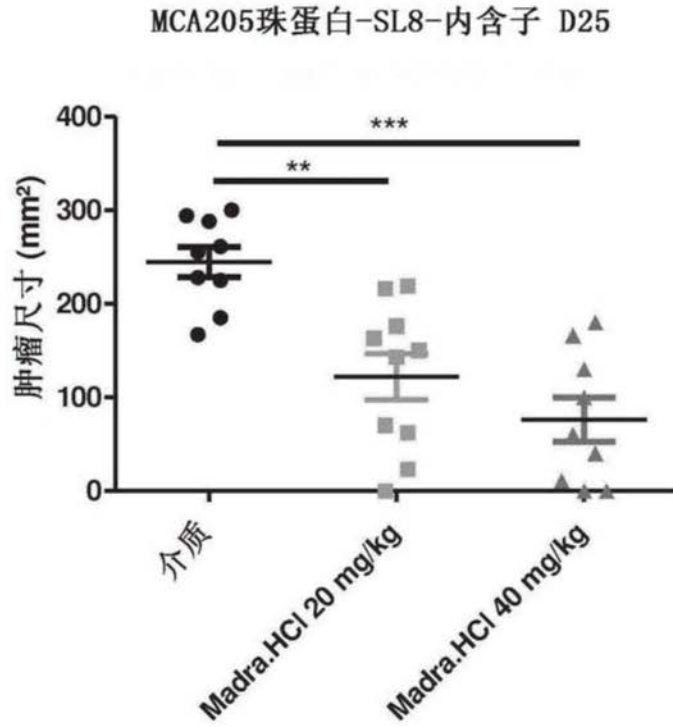
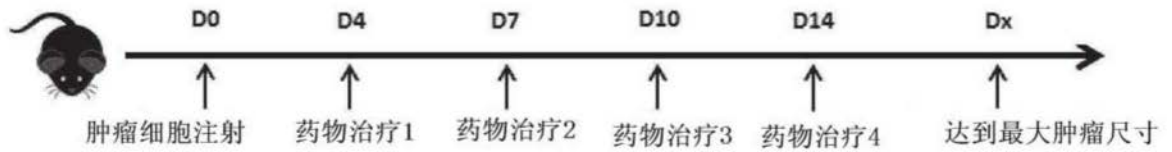


图1 (续)

D



E



MCA205 WT

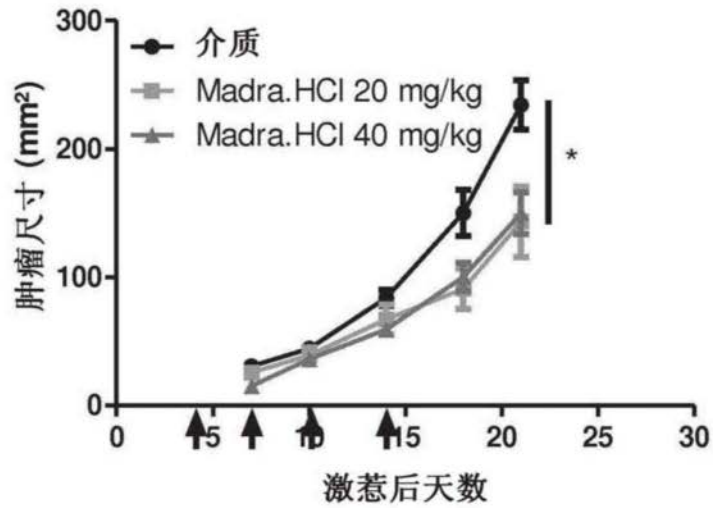
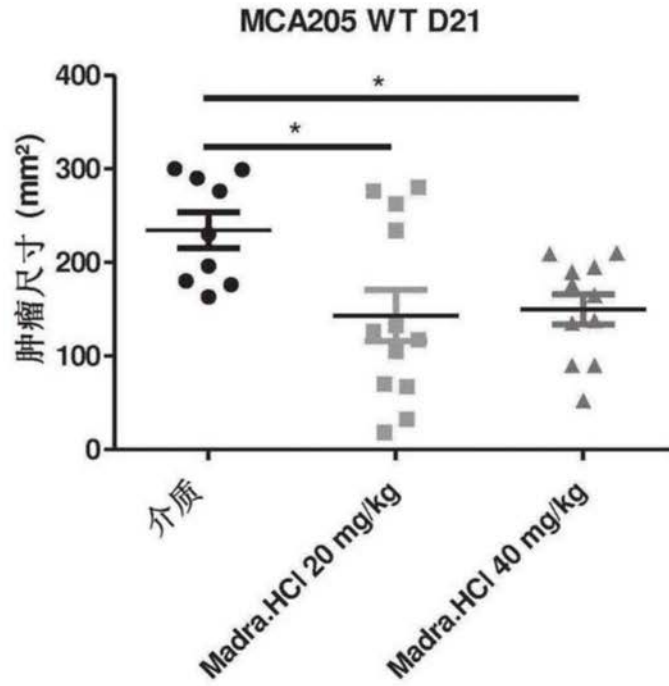


图1 (续)

F



G

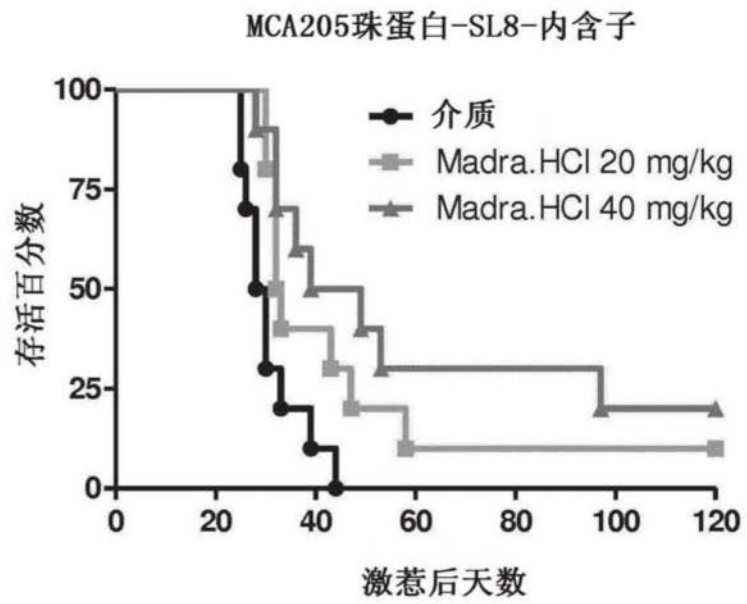


图1 (续)

H

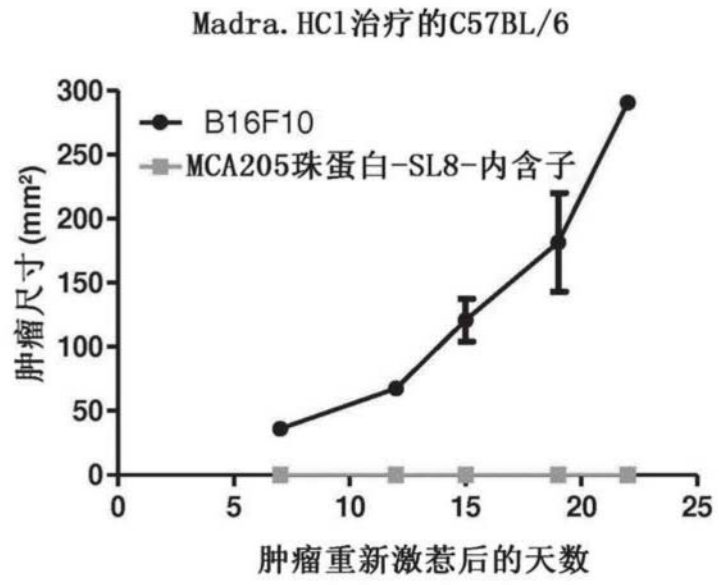


图1 (续)

A

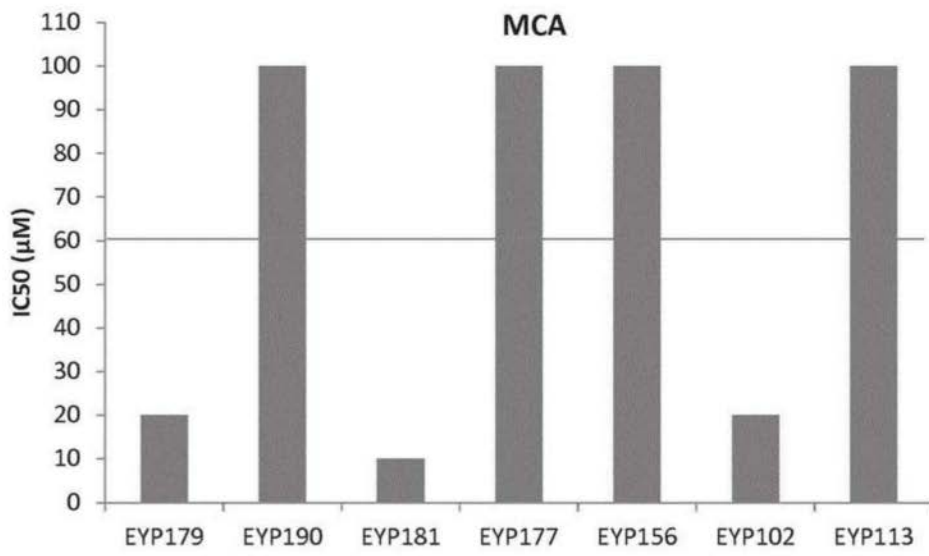
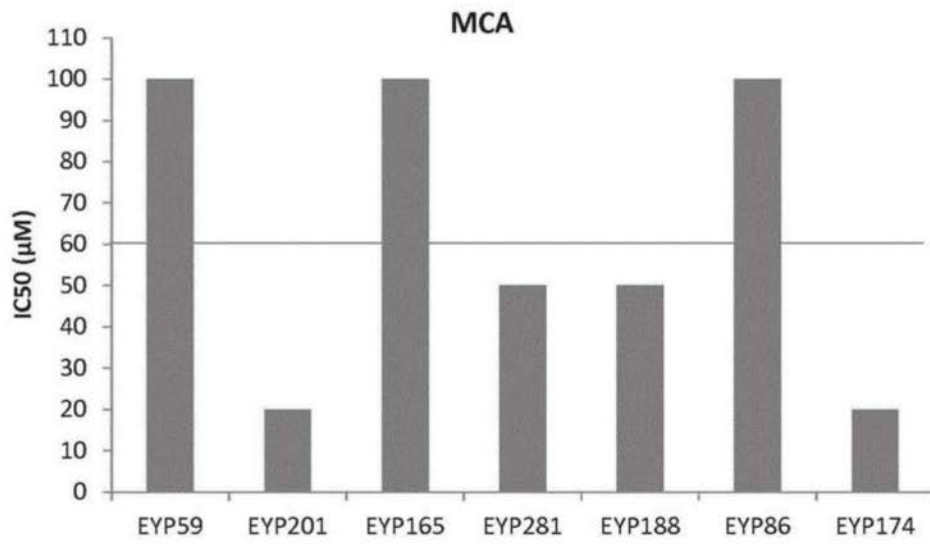


图2

B

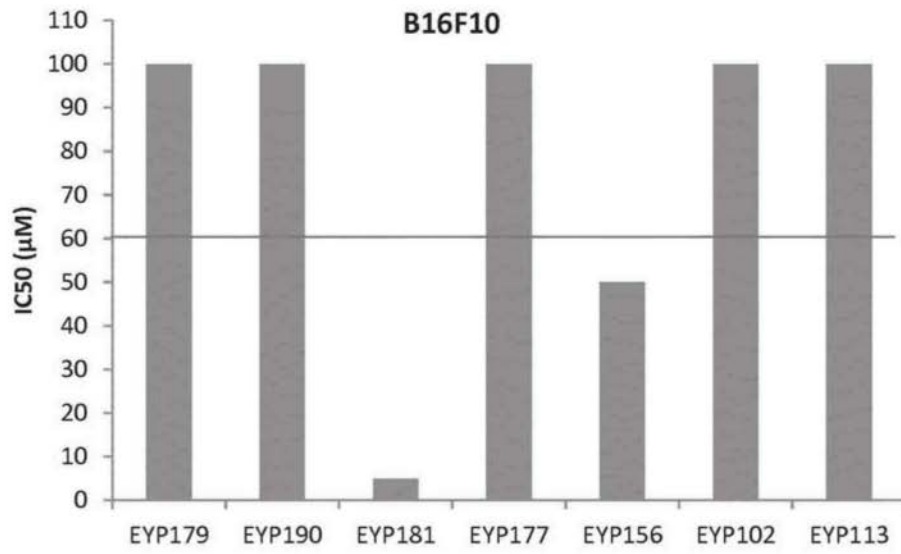
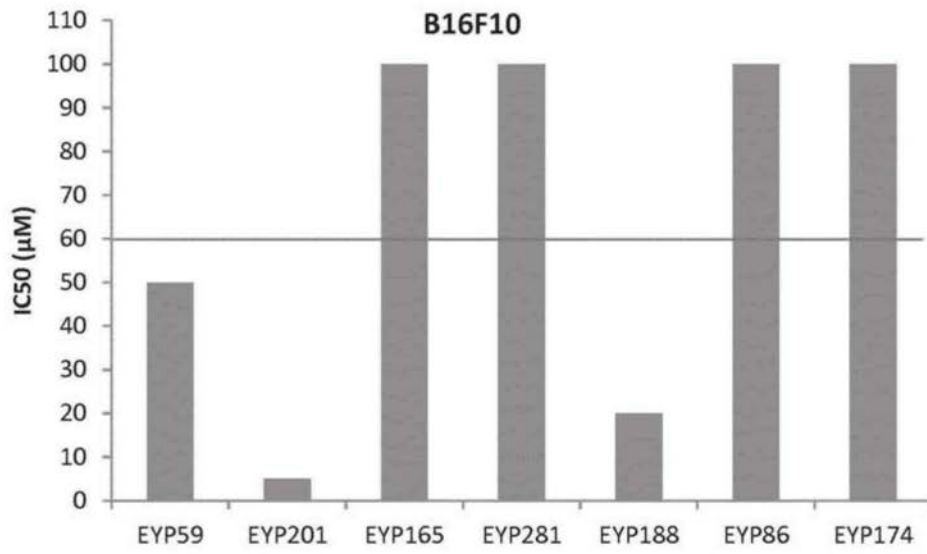
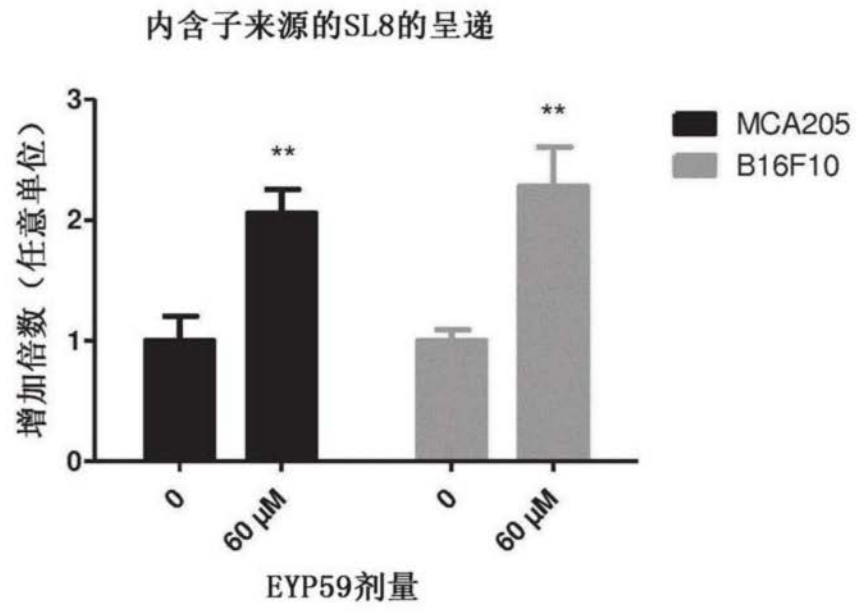


图2(续)

A



B

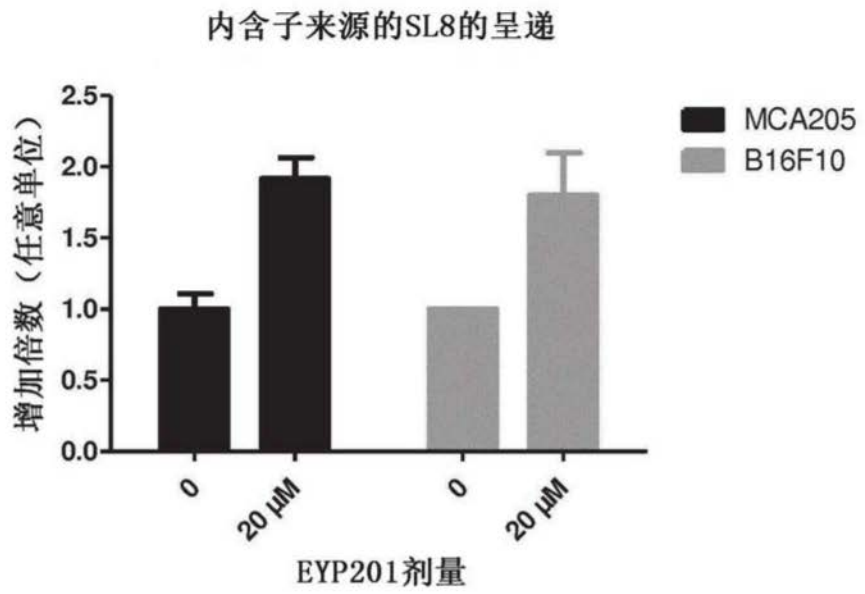
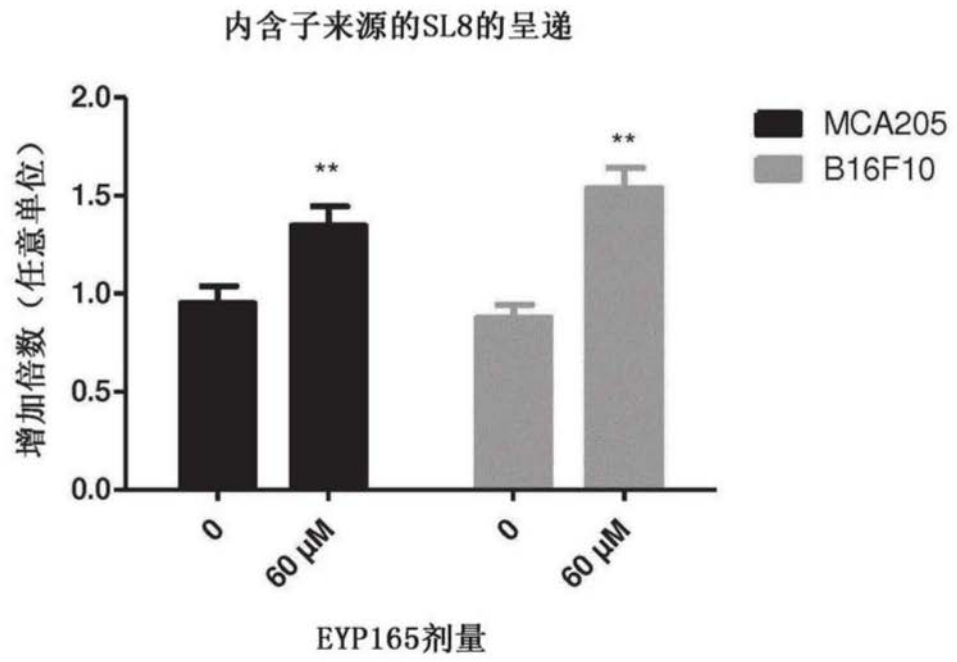


图3

C



D

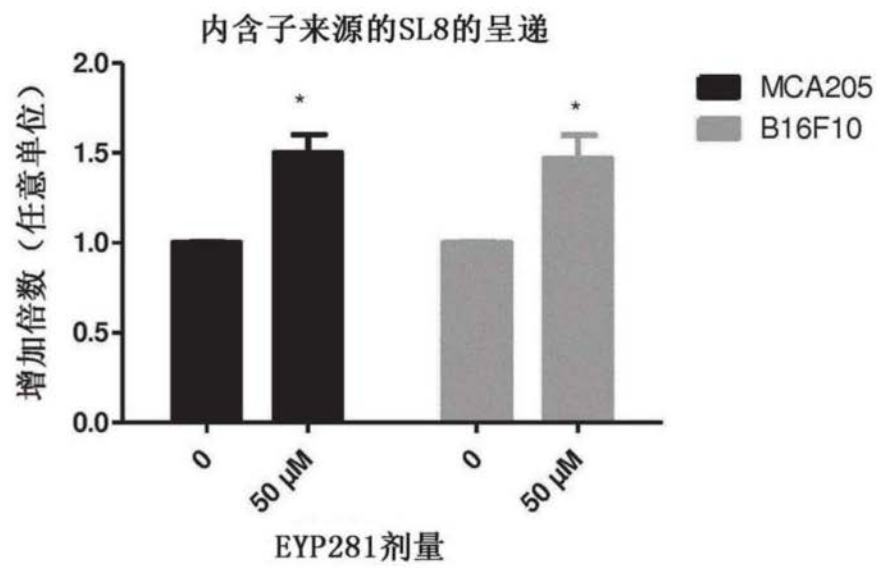
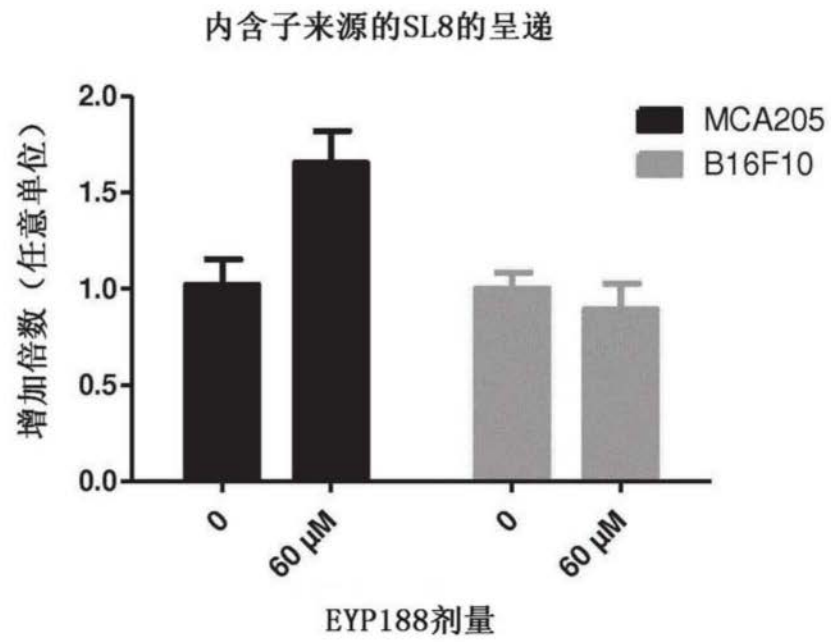


图3 (续)

A



B

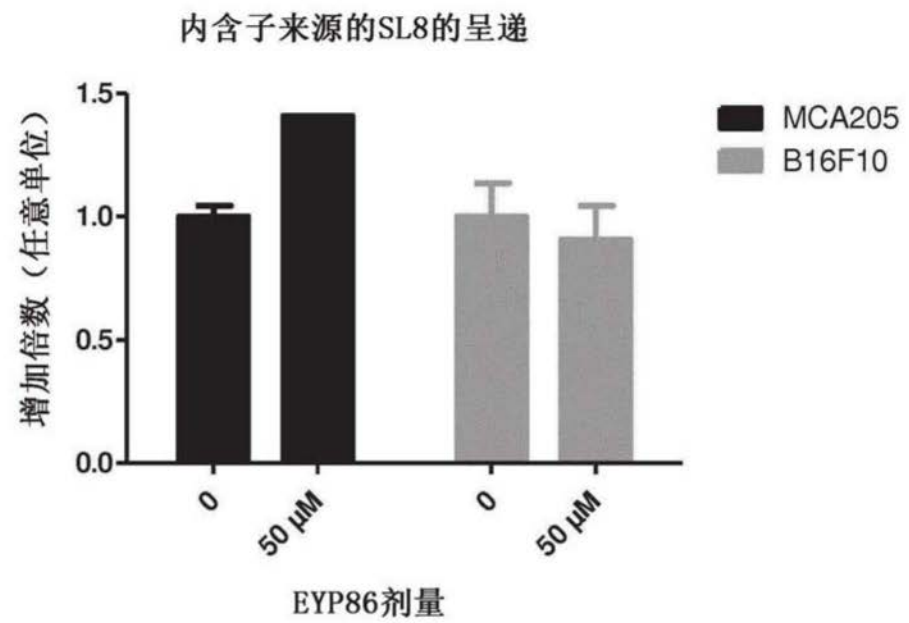
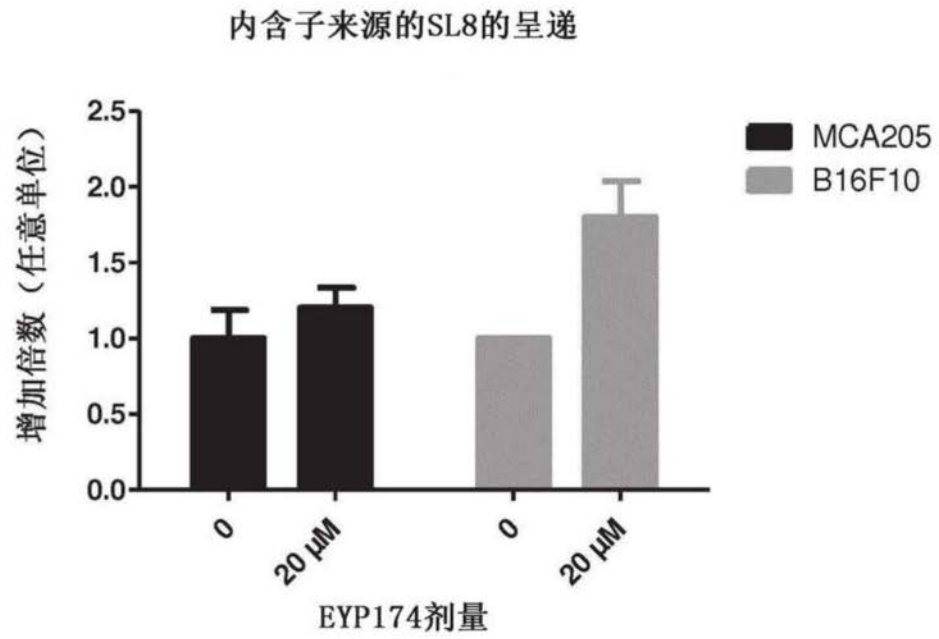


图4

A



B

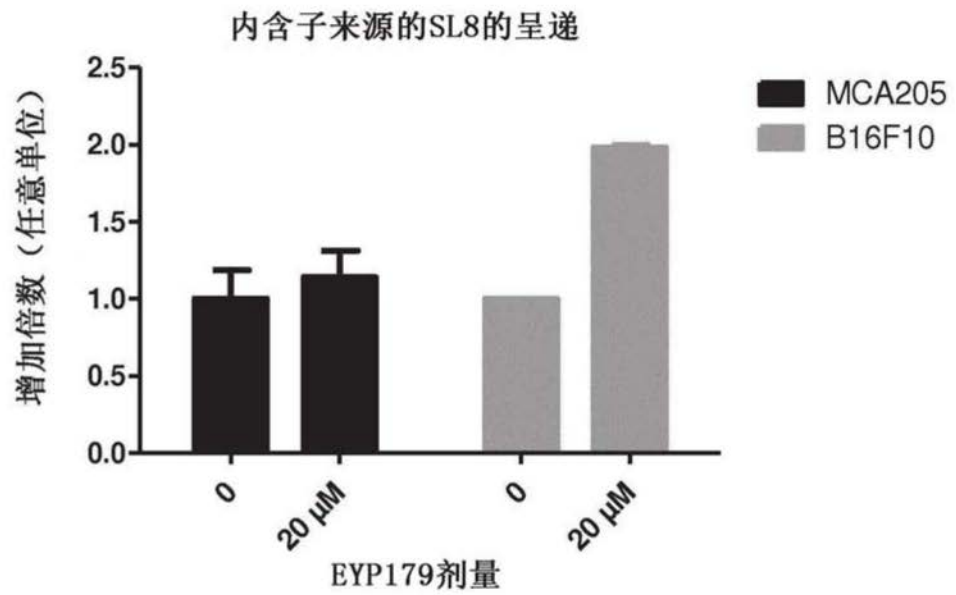
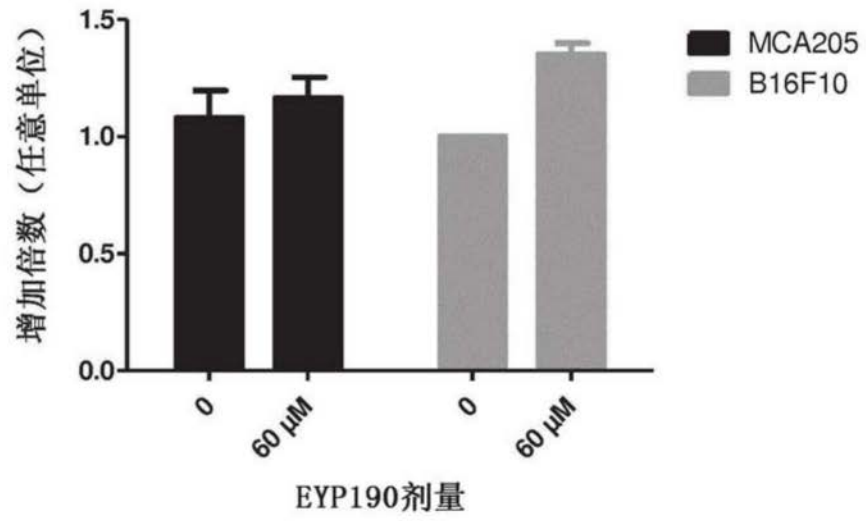


图5

C

内含子来源的SL8的呈递



D

内含子来源的SL8的呈递

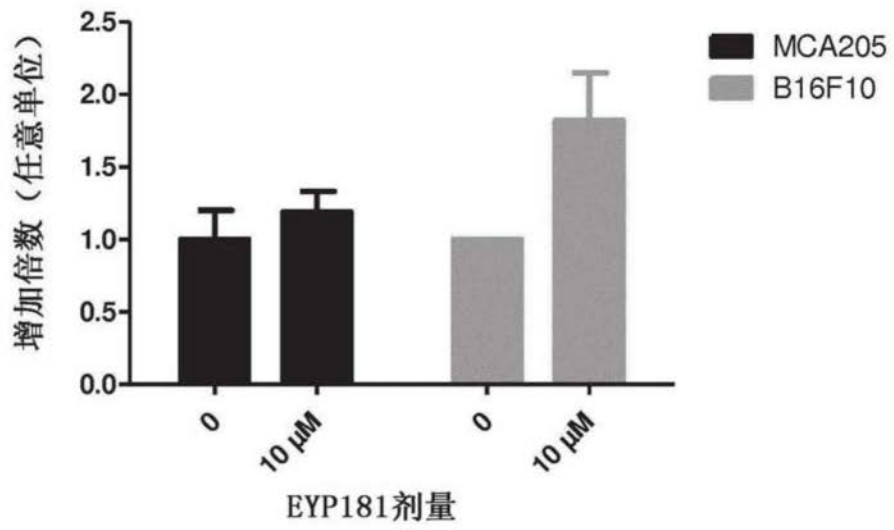
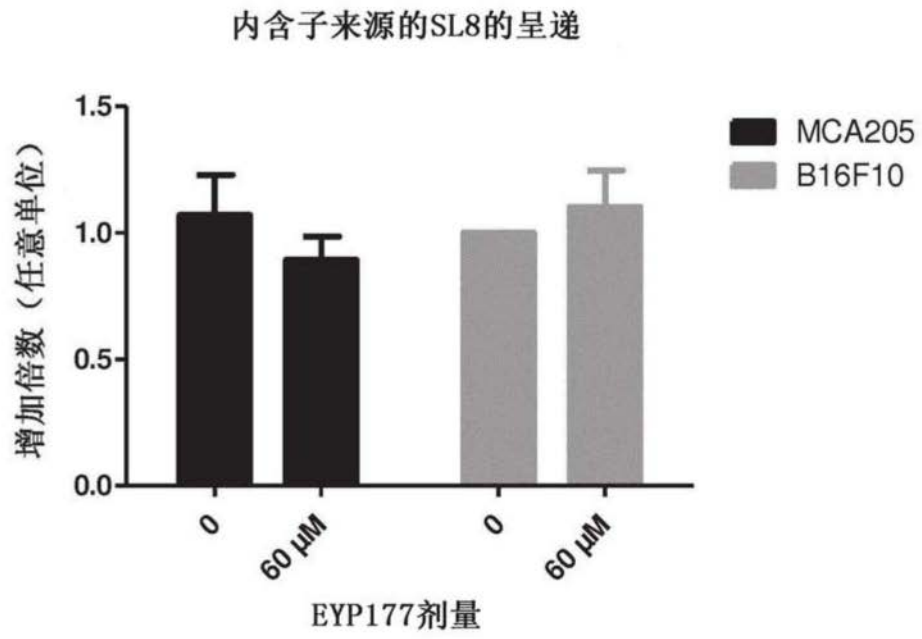


图5(续)

A



B

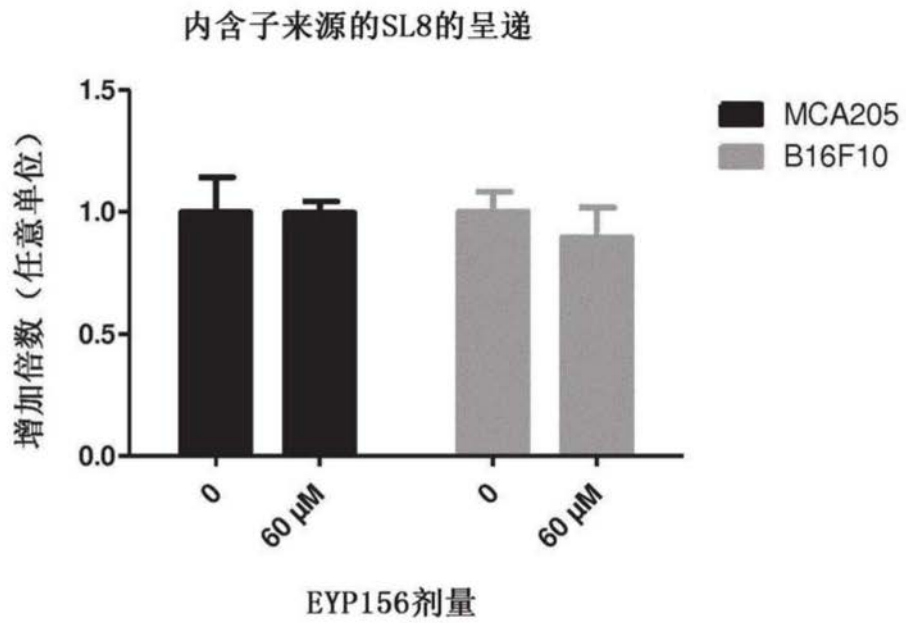
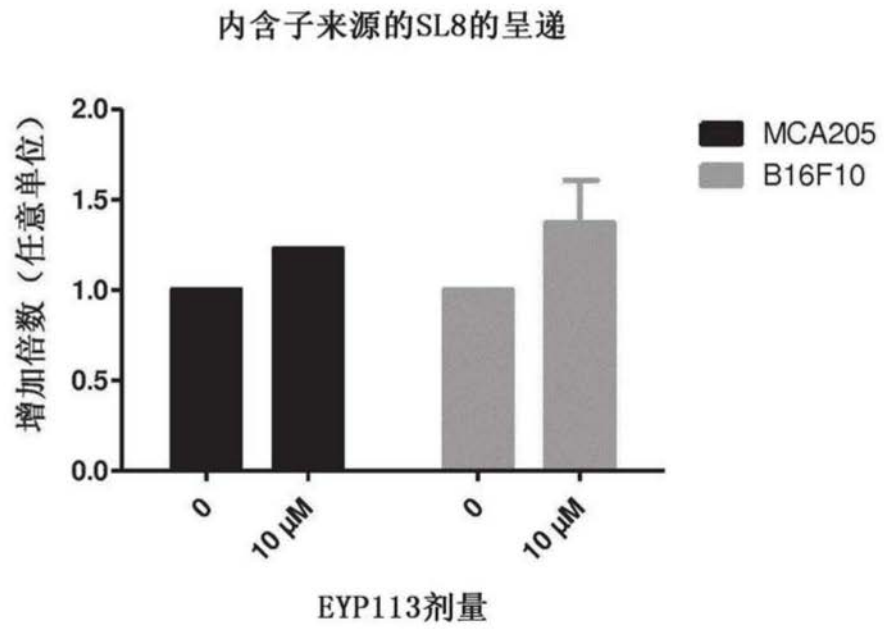


图6

C



D

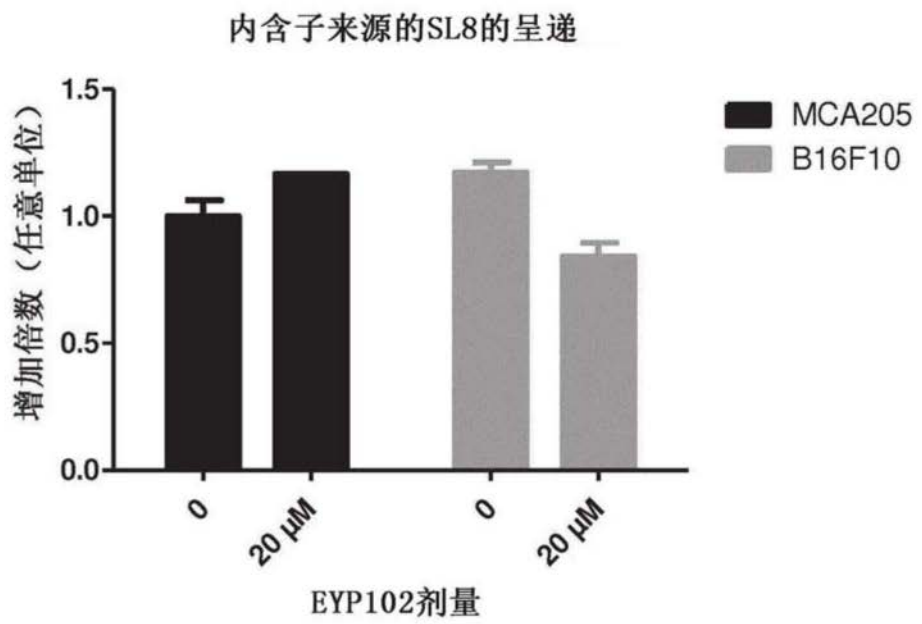


图6(续)

A



B

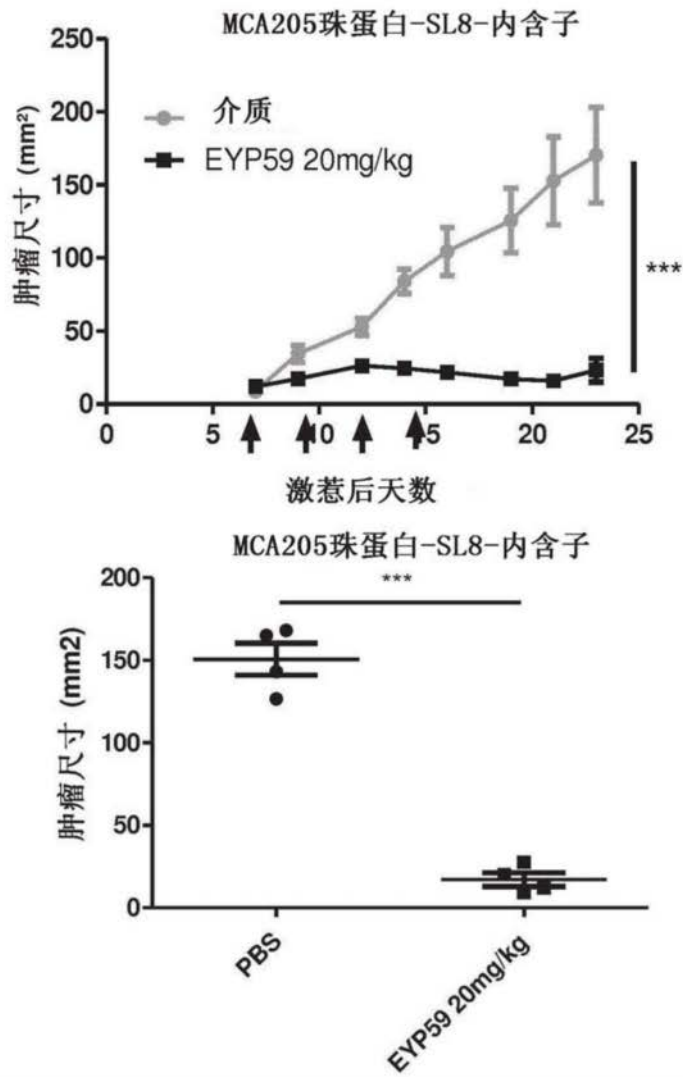


图7

C

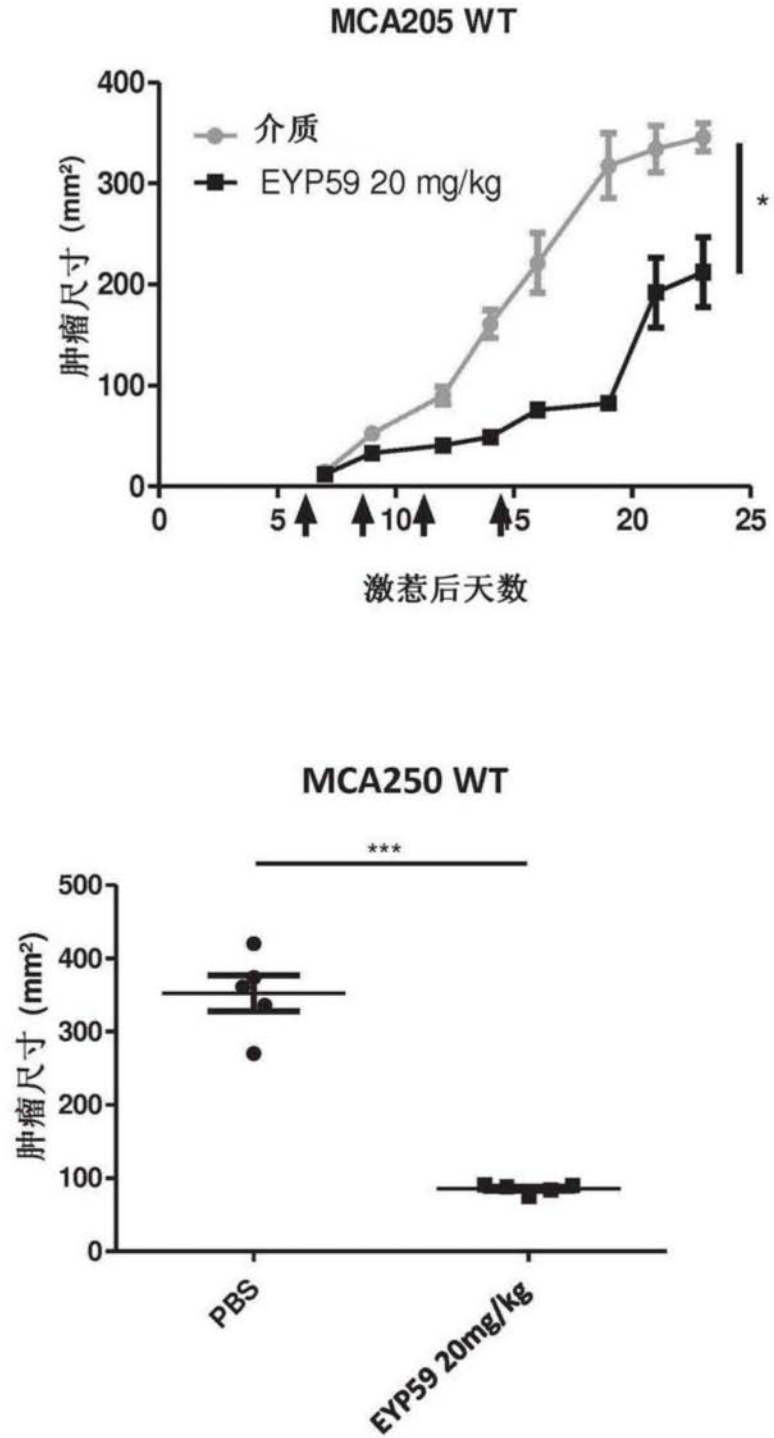


图7(续)

MCA250 WT

D

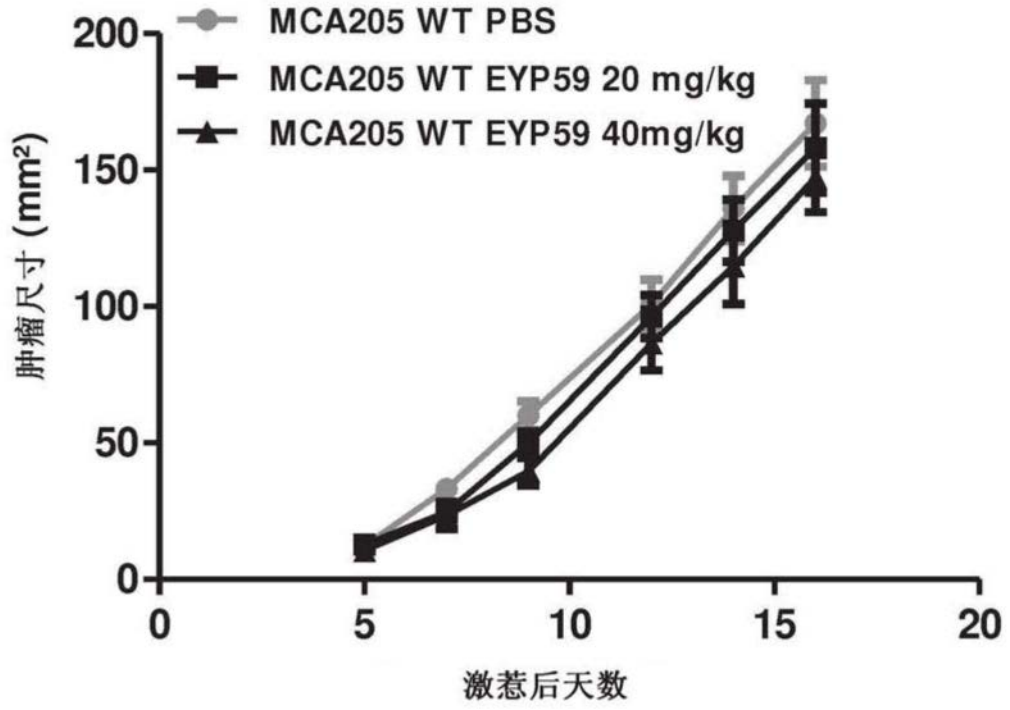


图7(续)

A

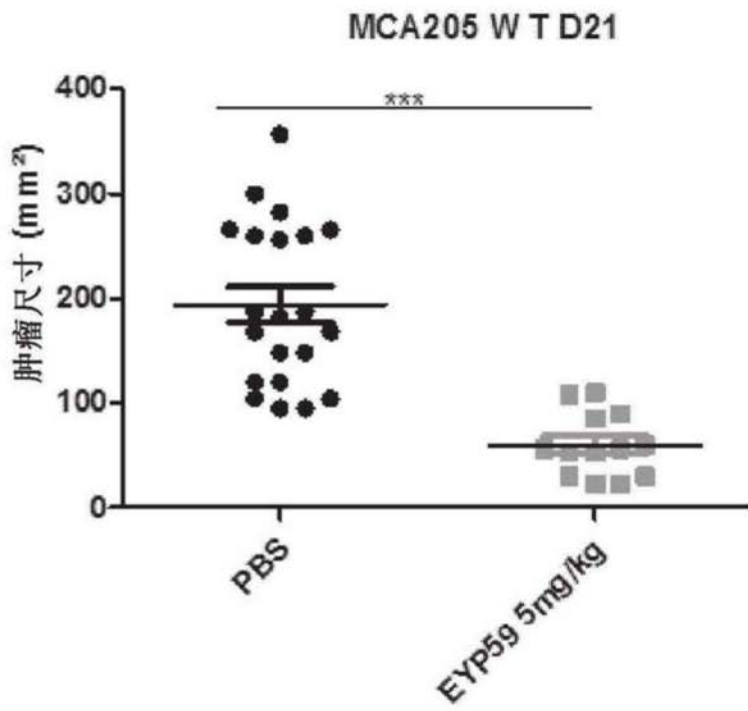
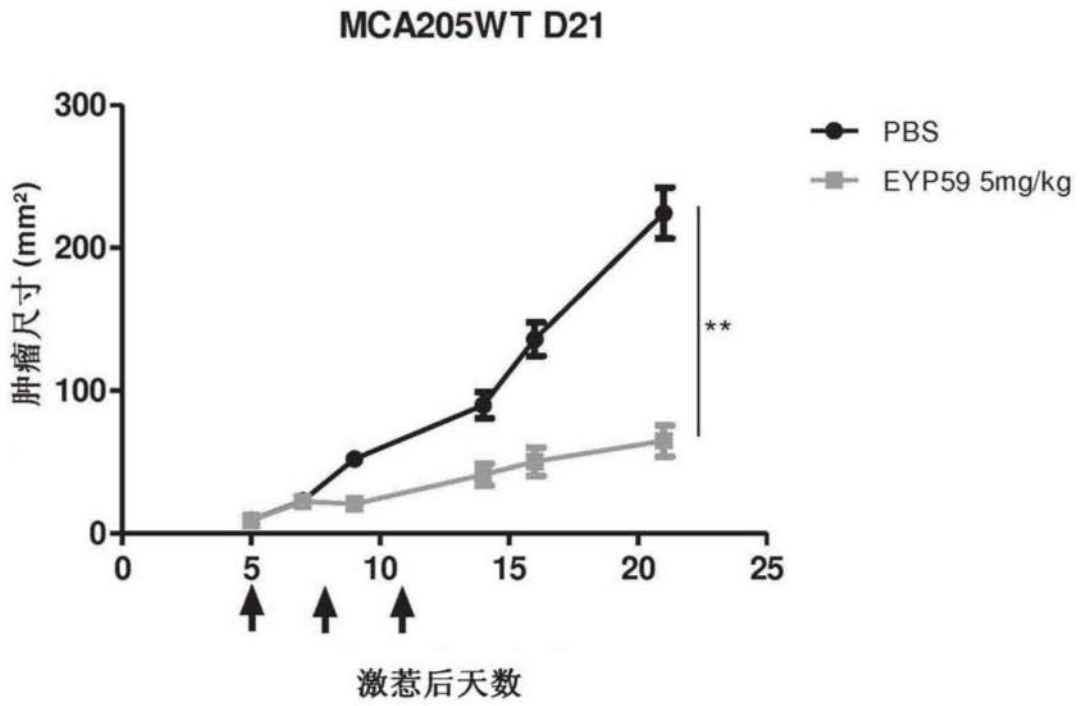


图8

B

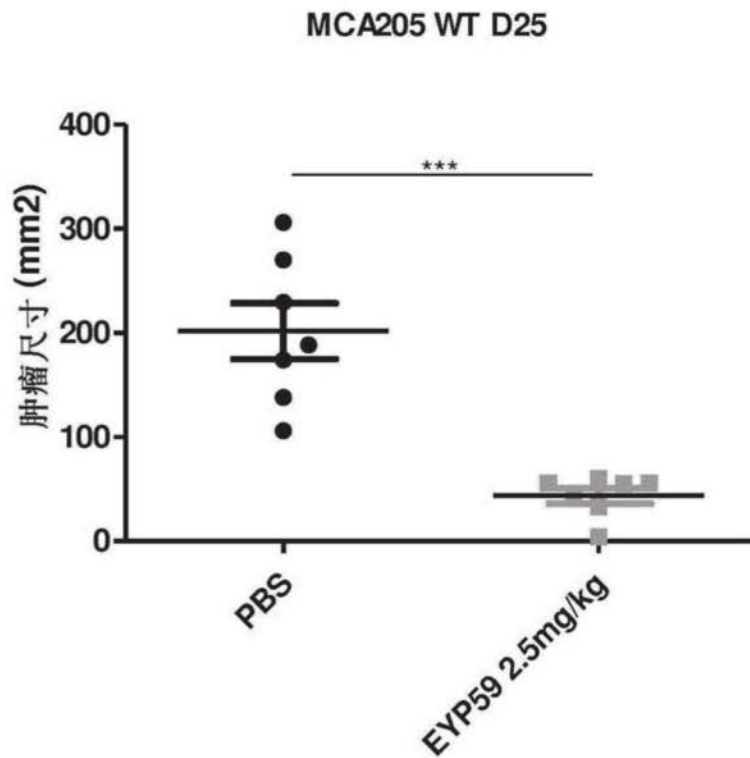
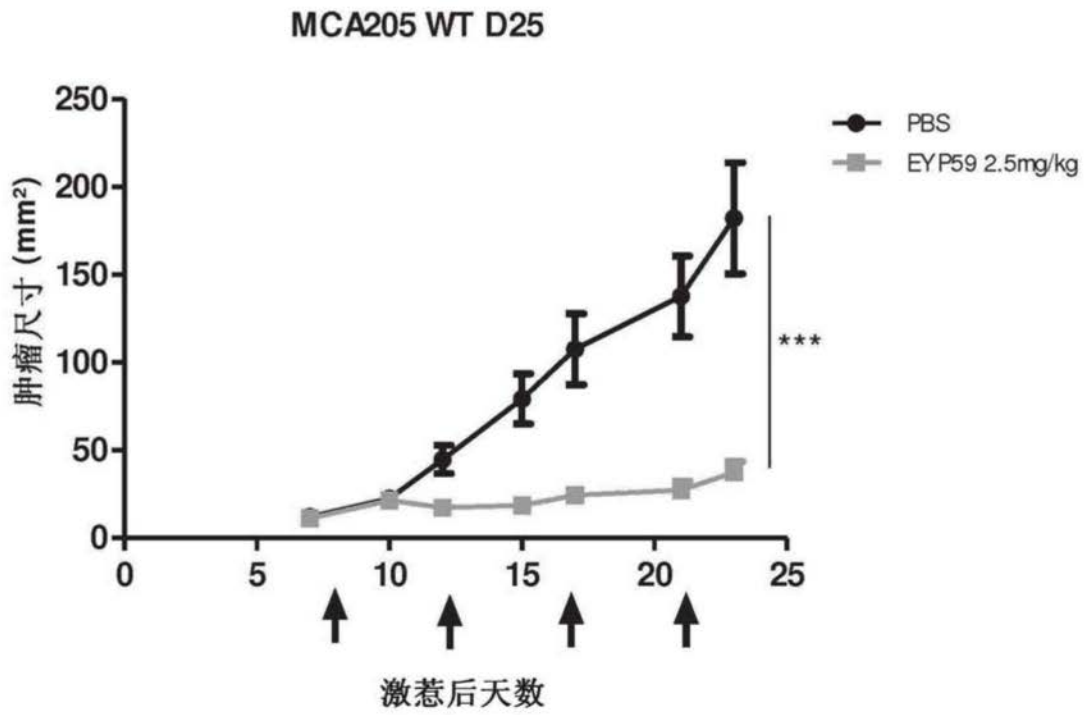


图8(续)

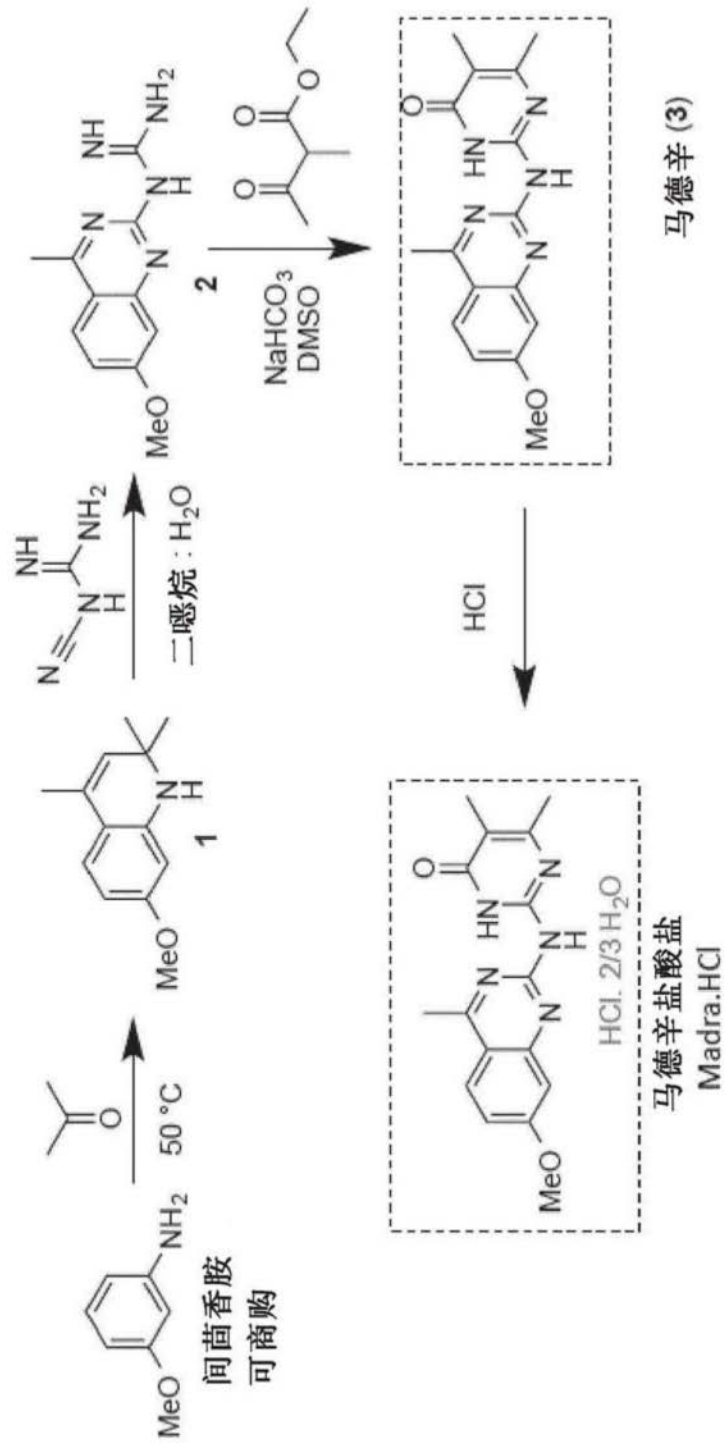


图9

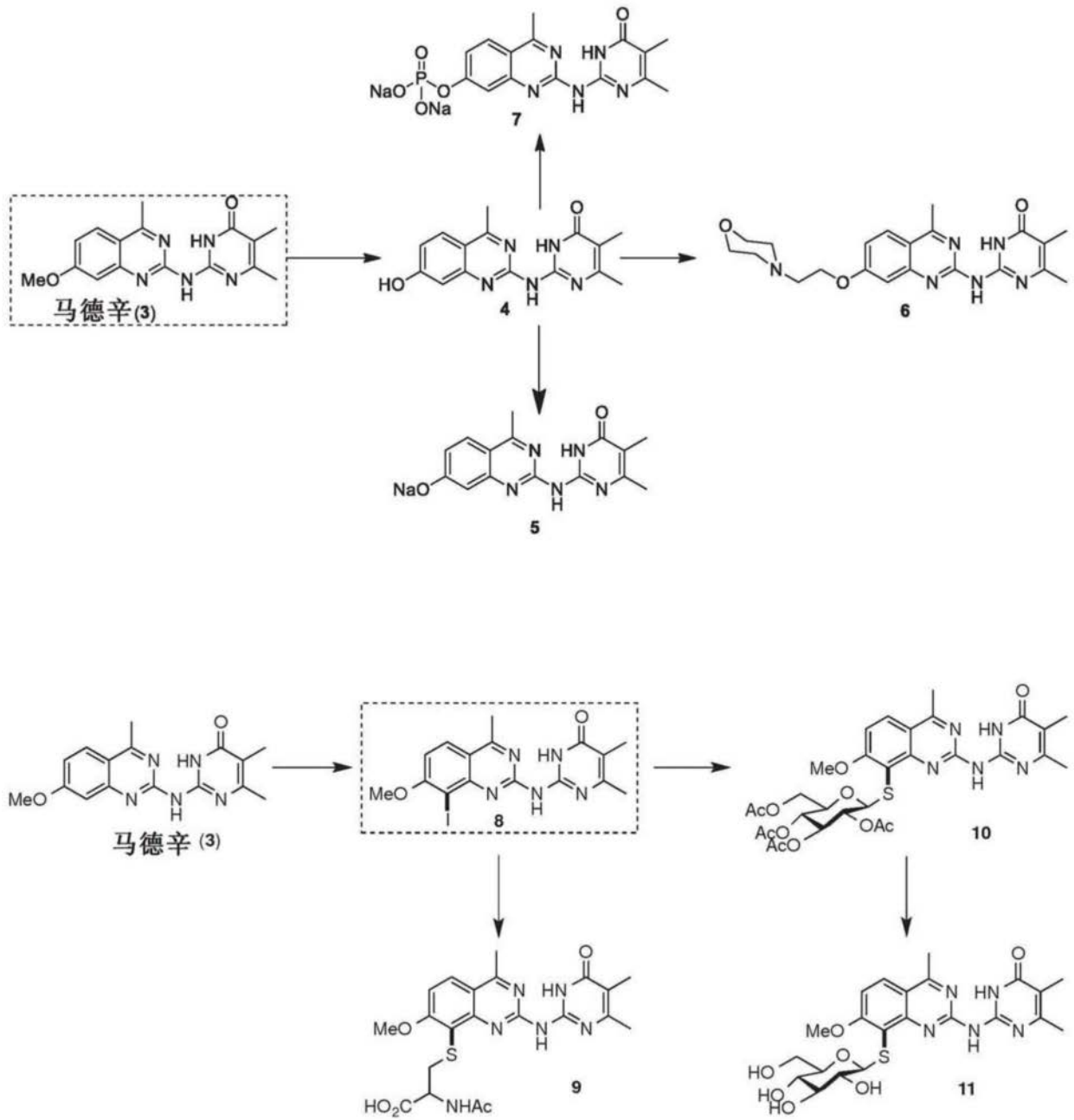


图10

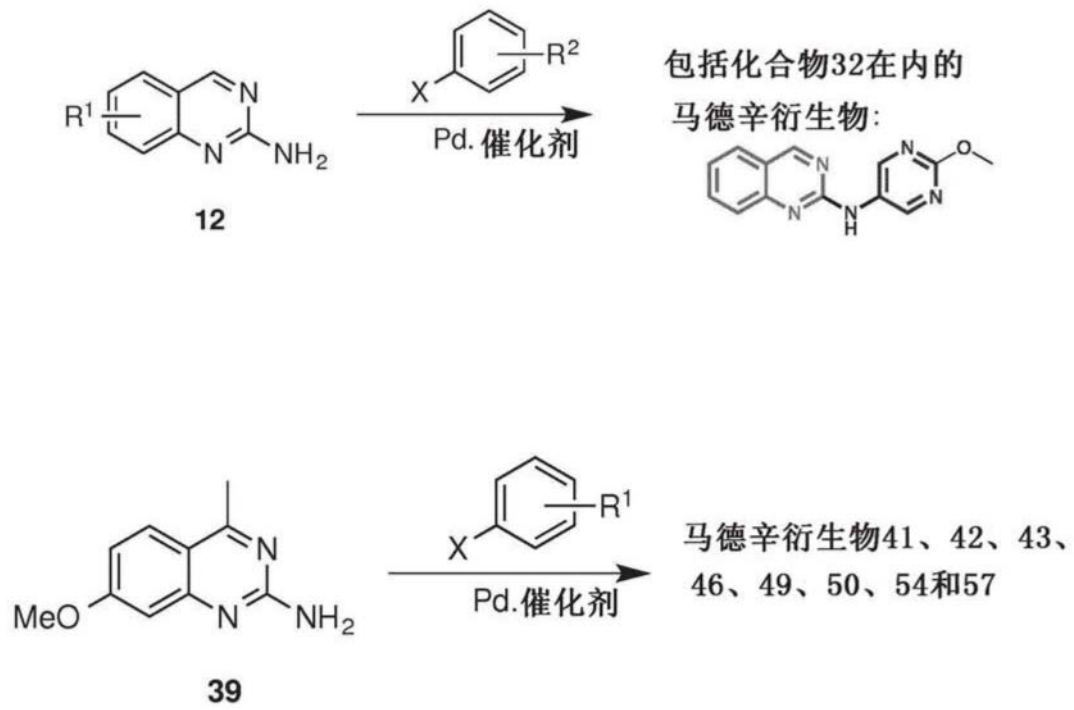


图10(续)