(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110167598 A
(43)申请公布日 2019.08.23

(21)申请号 201880006411.8

(22)申请日 2018.01.10

(30)优先权数据
62/444,735 2017.01.10 US
62/444,756 2017.01.10 US
62/467,945 2017.03.07 US
62/488,251 2017.04.21 US
62/488,407 2017.04.21 US
62/510,019 2017.05.23 US
62/510,024 2017.05.23 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2019.07.10

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2018/013199 2018.01.10

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2018/132496 EN 2018.07.19

(71)申请人 尼克塔治疗公司
地址 美国加利福尼亚

(72)发明人 Z·任 N·K·阿纳德 H·蔡 邓波良 B·V·乔什 J·萨勒斯基 T·米亚萨基 S·基维玛

(74)专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所 11038
代理人 袁志明

(51)Int.Cl.
A61K 47/60(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)

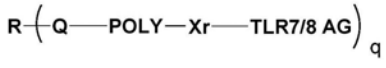
权利要求书9页 说明书88页 附图8页

(54)发明名称

TLR激动剂化合物的多臂聚合物缀合物以及相关的免疫治疗方法

(57)摘要

本发明提供了Toll样受体(“TLR”)激动剂例如TLR 7/8激动剂的多臂聚合物缀合物,以及相关的组合物,以及制备和使用此类缀合物的方法。示例性缀合物由式I涵盖:(I)或其药学上可接受的盐形式,其中R与每个Q一起是携带从3至约50个羟基、硫醇或氨基基团的多元醇、多硫醇、或多胺的残基;每个Q是选自氧、硫和-NH的连接基团;每个POLY独立地是水溶性非肽聚合物;每个X_r独立地是含键联间隔基部分;q是从3至约50的正整数;并且每个TLR 7/8AG是Toll样受体7/8激动剂。本发明还提供了向患有癌症的患者给予以下的方法:(a)IL-2Rβ活化量的长效IL-2Rβ选择性激动剂;和(b)Toll样受体激动剂,例如上述缀合物,以及相关的组合物、试剂盒和方法。



(I)

CN 110167598 A

1.一种缀合物，该缀合物包含通过含键联间隔基部分共价附接至多臂水溶性非肽聚合物的TLR 7/8激动剂。

2.根据权利要求1所述的缀合物，其中所述TLR 7/8激动剂是小分子。

3.根据权利要求1或权利要求2所述的缀合物，其中所述多臂水溶性聚合物包含从3至约50个聚合物臂。

4.根据权利要求1-3中任一项所述的缀合物，所述缀合物包含在所述多臂水溶性非肽聚合物的一个或多个臂的末端处共价附接的TLR 7/8激动剂。

5.根据权利要求4所述的缀合物，所述缀合物包含在所述多臂水溶性非肽聚合物的每个臂的末端处共价附接的TLR 7/8激动剂。

6.根据权利要求4所述的缀合物，所述缀合物与式I一致：

$$R\left(Q\text{——}POLY\text{—}Xr\text{——}TLR7/8\ AG\right)_q$$

式 I

其中：

R与每个Q一起是携带从3至约50个羟基、硫醇或氨基基团的多元醇、多硫醇、或多胺的残基；

每个Q是选自氧、硫和-NH的连接基团；

每个POLY独立地是水溶性非肽聚合物；

每个X_r独立地是含键联间隔基部分；

q是从3至约50的正整数；以及

每个TLR 7/8 AG是Toll样受体7/8激动剂；或

其药学上可接受的盐形式。

7.根据权利要求1-6中任一项所述的缀合物，其中所述TLR 7/8激动剂是(N-[4-(4-氨基-2-乙基-1H-咪唑并[4,5c]喹啉-1-基)丁基]甲烷磺酰胺或[8-(3-(吡咯烷-1-基甲基)苄基)-4-氨基-2-丁氧基-7,8-二氢蝶啶-6(5H)-酮]。

8.根据权利要求1-6中任一项所述的缀合物，其中所述TLR 7/8激动剂是咪唑喹啉化合物。

9.根据权利要求1-6中任一项所述的缀合物，其中所述TLR 7/8激动剂是瑞喹莫德或咪喹莫特。

10.根据权利要求1-9中任一项所述的缀合物，其中R与Q一起是多元醇的残基。

11.根据权利要求6-10中任一项所述的缀合物，其中每个X_r独立地是稳定的含键联间隔基部分。

12.根据权利要求6-10中任一项所述的缀合物，其中每个X_r独立地是可释放的含键联间隔基部分。

13.根据权利要求6-12中任一项所述的缀合物，其中q是从3至10的正整数。

14.根据权利要求6-12中任一项所述的缀合物，其中q是从3至6的正整数。

15.根据权利要求6-12中任一项所述的缀合物，其中q选自3、4和5。

16.根据权利要求6-12中任一项所述的缀合物，其中q是4。

17.根据前述权利要求中任一项所述的缀合物，其中所述含键联间隔基部分包含硫醚、氨基甲酸酯、酯、碳酸酯、或脲官能团。

18.根据权利要求1-16中任一项所述的缀合物，其中所述含键联间隔基部分包含酶可裂解的肽键联。

18.根据前述权利要求中任一项所述的缀合物，其中Xr与式II一致：

$\sim[X^1]_a-[Lr]_b-X^2\sim$

式II

其中：

a是0或1；

b是0或1；

当存在时，X^1是间隔基；

当存在时，Lr是键联；以及

X^2是直接共价附接于TLR 7/8激动剂的官能团。

19.根据权利要求18所述的缀合物，其中X^1存在。

20.根据权利要求19所述的缀合物，其中X^1是$-CH_2C(O)-$。

21.根据权利要求18所述的缀合物，其中X^1不存在。

22.根据权利要求18-21中任一项所述的缀合物，其中X^2选自下组，该组由以下组成-C(O)-NH-、-NH-C(O)-NH-、-NH-C(O)-、和-NH。

23.根据权利要求18-22中任一项所述的缀合物，其中Lr存在。

24.根据权利要求23所述的缀合物，其中Lr选自下组，该组由以下组成$-(CR_xR_y)_z-$和$-NH(CR_xR_y)_z-$，其中每个R_x和R_y独立地选自氢、低级烷基、卤素、和卤素取代的低级烷基，并且z是从1至6的整数。

25.根据权利要求24所述的缀合物，其中Lr选自$-CH_2-$、$-CH_2CH_2-$、$-CH_2CH_2CH_2-$、$-CH_2CH_2CH_2CH_2-$、$-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-$、$-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-$--$CH_2CHF-$、$-CHCH_3-$、$-CHCH(CH_3)_2-$、$-CHCH_2CH(CH_3)_2-$、$-C(CH_3)_2-$、$-NHCH_2-$、$-NHCH_2CH_2-$、$-NHCH_2CH_2CH_2-$、$-NHCH_2CH_2CH_2CH_2-$、$-NHCH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-$、$-NHCH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2-$--$NHCH_2CHF-$、$-NHCHCH_3-$、$-NHCHCH(CH_3)_2-$、$-NHCHCH_2CH(CH_3)_2-$、和$-NHC(CH_3)_2-$。

26.根据前述权利要求中任一项所述的缀合物，其中所述水溶性非肽聚合物是聚(环氧烷)。

27.根据权利要求26所述的缀合物，其中所述聚(环氧烷)是聚(环氧乙烷)。

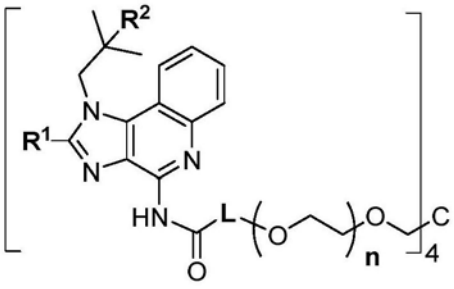
28.根据前述权利要求中任一项所述的缀合物，其中包含在“q”个聚合物臂的每个内的水溶性非肽聚合物含有从约1至约30个单体亚单元。

29.根据前述权利要求中任一项所述的缀合物，其中所述水溶性非肽聚合物具有的分子量为从约2,000道尔顿至约150,000道尔顿。

30.根据前述权利要求中任一项所述的缀合物，其中所述水溶性非肽聚合物具有的分子量为从约5,000道尔顿至约40,000道尔顿。

31.根据前述权利要求中任一项所述的缀合物，其中所述水溶性非肽聚合物具有的分子量为从约5,000道尔顿至约25,000道尔顿。

32.根据权利要求1所述的缀合物，所述缀合物具有与式III一致的式：



(式 III)

或其药学上可接受的盐或立体异构体,其中:

L是-$(CH_2)_m$-、-$(CH_2)_m$-NH-C(O)-$(CH_2)_m$-、-CHF-$(CH_2)_m$-NH-C(O)-$(CH_2)_m$-、-CH(CH_3)-NH-C(O)-$(CH_2)_m$-、-$(CH_2)_m$-CH$(CH(CH_3)_2)$-NH-C(O)-$(CH_2)_m$-、-$(CH_2)_m$-CH$(CH_2CH(CH_3)_2)$-NH-C(O)-$(CH_2)_m$-、-$C(CH_3)_2$-NH-C(O)-$(CH_2)_m$-、单键、或-NH-$(CH_2)_m$-,

每个m独立地是从1至5(包括端值)的整数;

每个n独立地是从40至350(包括端值)的整数;

R^1是氢或-CH_2-O-CH_2-CH_3;以及

R^2是氢或羟基。

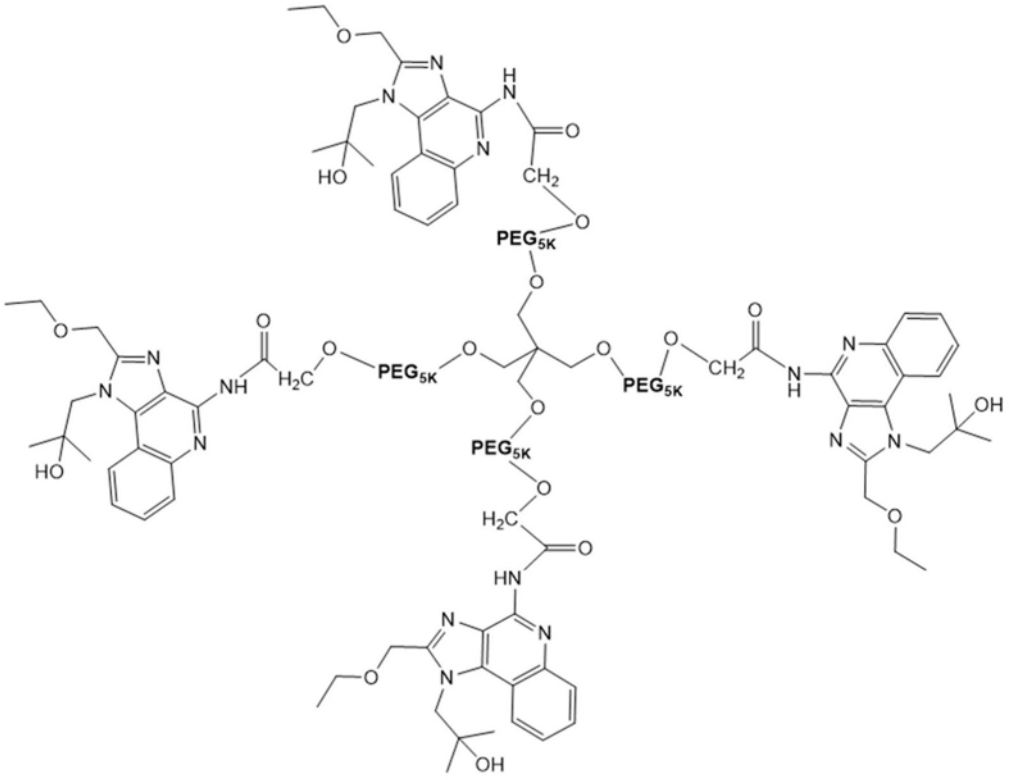
33.根据权利要求32所述的缀合物,其中L是-CH_2-、-CH_2-CH_2-NH-C(O)-CH_2-、-CH_2-CH_2-CH_2-、-CHF-CH_2-NH-C(O)-CH_2-、-CH_2-NH-C(O)-CH_2-、-CH(CH_3)-NH-C(O)-CH_2-、-CH_2-CH$(CH(CH_3)_2)$-NH-C(O)-CH_2-、-CH_2-CH$(CH_2CH(CH_3)_2)$-NH-C(O)-CH_2-、-$C(CH_3)_2$-NH-C(O)-CH_2-、单键、或-NH-CH_2-CH_2-。

34.根据权利要求31或权利要求32所述的缀合物,其中每个n独立地是从100至250(包括端值)的整数。

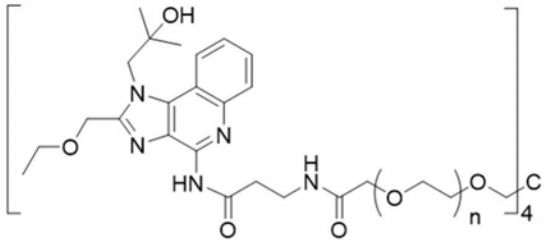
35.根据权利要求32至34中任一项所述的缀合物,其中R^1是氢,并且R^2是氢。

36.根据权利要求32-34中任一项所述的缀合物,其中R^1是-CH_2-O-CH_2-CH_3,并且R^2是羟基。

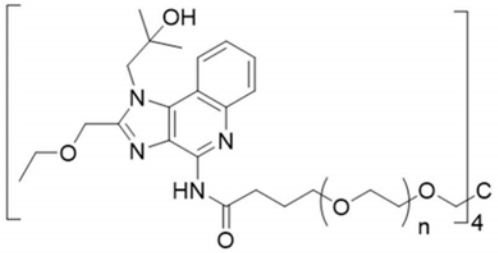
37.一种缀合物,所述缀合物选自化合物1-10和12-16组成的组:



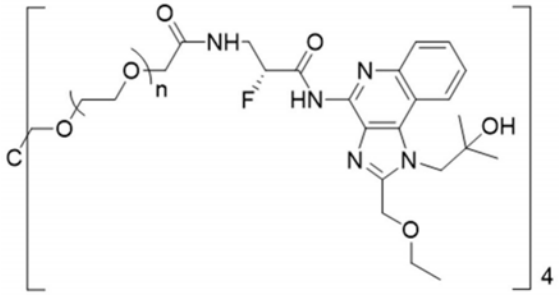
化合物1



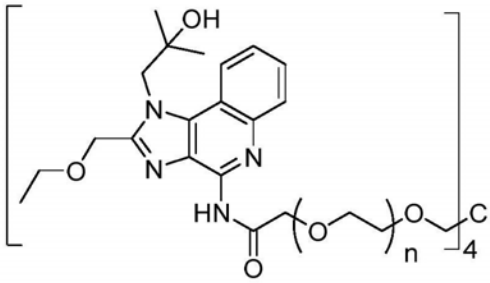
化合物2



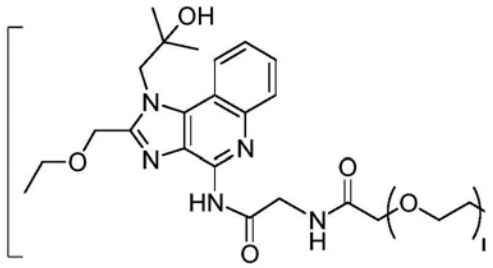
化合物3



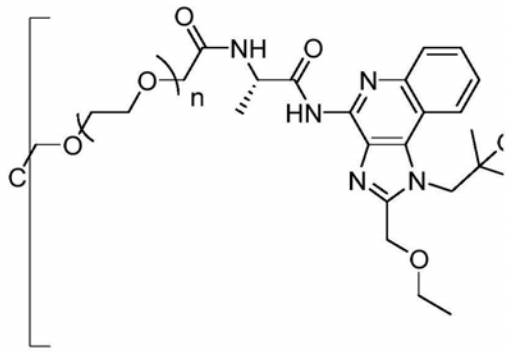
化合物4



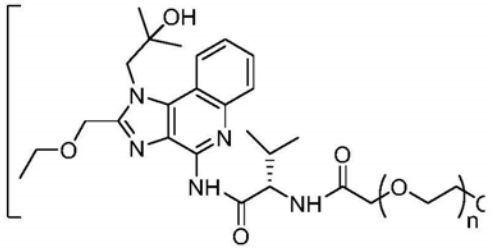
化合物 5



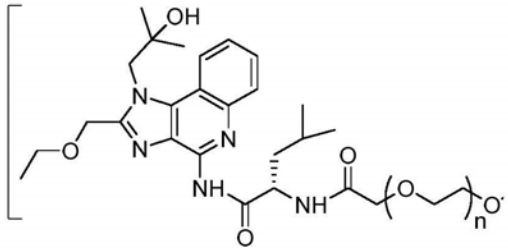
化合物 6



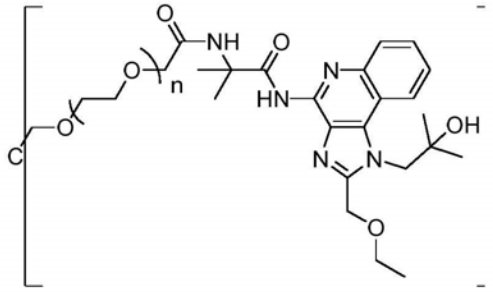
化合物 7



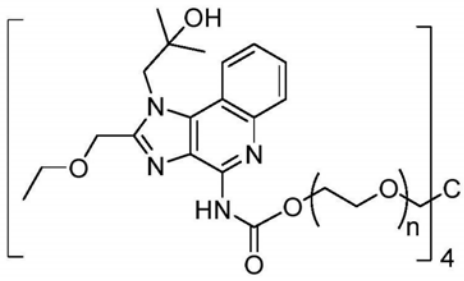
化合物 8



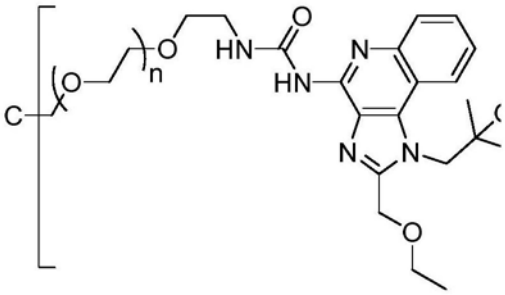
化合物 9



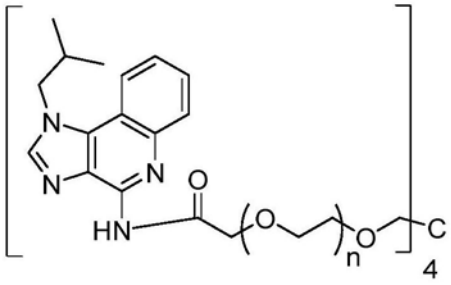
化合物 10



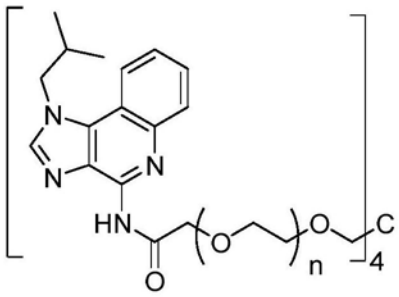
化合物 12



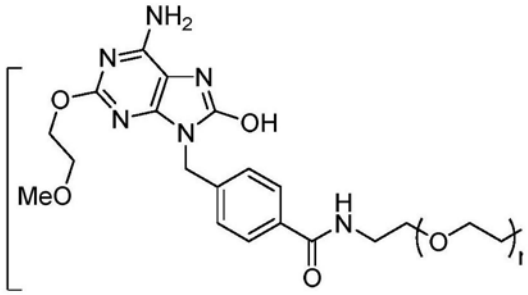
化合物 13



化合物 14



化合物 15



化合物 16

或其药学上可接受的盐或立体异构体，其中每个n独立地是从40至350的整数。

38.一种组合物，所述组合物包含如前述权利要求中任一项所述的缀合物和药学上可接受的赋形剂。

39.一种治疗方法，所述方法包括向有需要的受试者给予如前述权利要求中任一项所述的缀合物或组合物或组合物。

40.根据权利要求1-37中任一项所述的缀合物，所述缀合物用于在癌症治疗中使用。

41.根据权利要求1-37中任一项所述的缀合物，所述缀合物用于在制备可用于癌症治疗的药物中使用。

42.一种给药方法，所述方法包括向患有癌症的受试者给予(i)缀合物，所述缀合物包含通过含键联间隔基部分共价附接至根据权利要求1-37中任一项所述的多臂水溶性非肽聚合物的TLR 7/8受体活化量的TLR 7/8激动剂，和(ii)IL-2Rβ活化量的长效IL-2Rβ偏向性激动剂。

43.根据权利要求42所述的方法，其中所述缀合物和所述长效IL-2Rβ偏向性激动剂被同时或依次并按任何顺序以及通过相同和/或不同的给予途径、各自按免疫调节量给予。

44.根据权利要求43所述的方法，其中所述方法包括单个给药周期。

45.根据权利要求43所述的方法，其中所述方法包括两个或更多个给药周期。

46.根据权利要求42-45中任一项所述的方法，其中将所述缀合物局部给予，并且将所述长效IL-2Rβ偏向性激动剂肠胃外给予。

47.根据权利要求46所述的方法，其中将所述缀合物直接给予到癌性肿瘤部位(即，瘤内)。

48.根据权利要求42-47中任一项所述的方法，其中将所述缀合物与所述长效IL-2Rβ偏向性激动剂分开给予所述受试者。

49.根据权利要求42-49中任一项所述的方法，其中将所述缀合物在给予所述长效IL-2Rβ偏向性激动剂之前给予所述受试者。

50.根据权利要求42-49中任一项所述的方法，其中将所述缀合物和所述长效IL-2Rβ偏向性激动剂两者均在治疗的第1天给予。

51.根据权利要求42-49中任一项所述的方法，其中将所述缀合物在治疗的第1天给予，并且将所述长效IL-2Rβ偏向性激动剂在治疗的第1至4天中的任一天给予。

52.根据权利要求42-51中任一项所述的方法，其中所述受试者是人受试者。

53.根据权利要求42-52中任一项所述的方法，其中所述癌症是实体癌。

54.根据权利要求53所述的方法，其中所述实体癌可以选自下组，该组由以下组成：乳腺癌、卵巢癌、结肠癌、前列腺癌、骨癌、结肠直肠癌、胃癌、淋巴瘤、恶性黑素瘤、肝癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、胰腺癌、甲状腺癌、肾癌、胆管癌、脑癌、宫颈癌、上颌窦癌、膀胱癌、食管癌、霍奇金病以及肾上腺皮质癌。

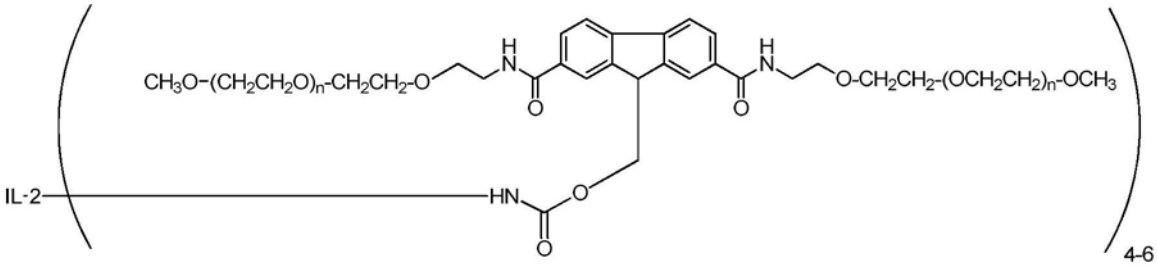
55.根据权利要求42-54中任一项所述的方法，其中所述长效IL-2Rβ偏向性激动剂包含可释放地共价附接至聚乙二醇的阿地白介素。

56.根据权利要求55所述的方法，其中所述长效IL-2Rβ偏向性激动剂包含可释放地共价附接至4、5和6个聚乙二醇聚合物的阿地白介素。

57.根据权利要求56所述的方法，其中所述长效IL-2Rβ偏向性激动剂包含可释放地共价附接至平均约6个聚乙二醇聚合物的阿地白介素。

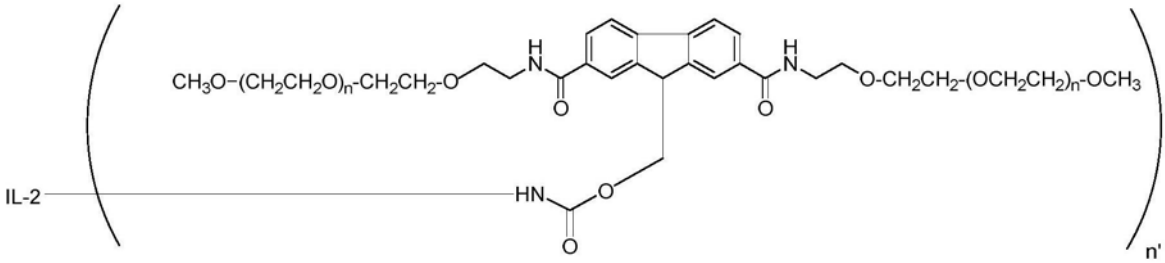
58.根据权利要求57所述的方法，其中可释放地共价附接至阿地白介素的聚乙二醇聚合物是分支的。

59.根据权利要求58所述的方法，其中所述长效IL-2Rβ偏向性激动剂包含由下式所涵盖的化合物：



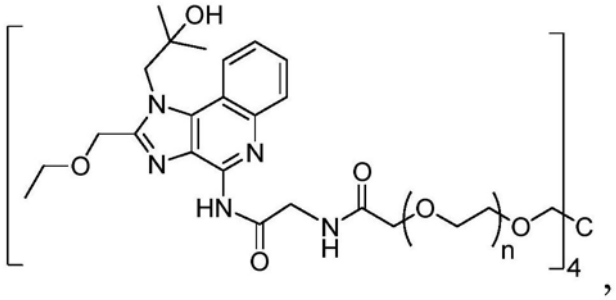
其中IL-2是白细胞介素-2，其中“n”是从约3至约4000的整数，或其药学上可接受的盐。

60.根据权利要求59所述的方法，其中所述长效IL-2Rβ偏向性激动剂包含在组合物中，所述组合物包含不超过10％(基于摩尔量)的由下式涵盖的化合物



其中IL-2是白细胞介素-2，n’是选自下组的整数，该组由以下组成：1、2、3、7和>7，以及其药学上可接受的盐。

61.根据权利要求42-60中任一项所述的方法，其中所述缀合物具有以下结构：



其中每个n独立地是从40至350的整数。

62.根据权利要求61所述的方法,其中在每个聚合物臂中n的值是基本上相同的。

63.根据权利要求61所述的方法,其中每个聚合物臂中n的值是约113。

64.根据权利要求42-63中任一项所述的方法,其中所述给予有效地在所述受试者中产生远位效应。

65.根据权利要求42-64中任一项所述的方法,其中当在合适的动物模型如小鼠CT-26结肠肿瘤模型中评估时,在治疗开始后的某天,即,在仅有运载体的组中的所有受试者已经达到0%存活率的当天后,所述给予有效提供百分比存活率,所述百分比存活率高于当以按组合给予时使用的剂量等效的治疗剂量给予时单独给予所述长效IL-2Rβ偏向性激动剂或所述缀合物所观察到的百分比存活率。

66.一种用于在治疗患有癌症的受试者中使用的组合,所述组合包含根据权利要求1-37中任一项所述的IL-2Rβ活化量的长效IL-2Rβ偏向性激动剂和先天性免疫力活化量的缀合物,随附用于在治疗患有癌症的受试者中使用的说明书。

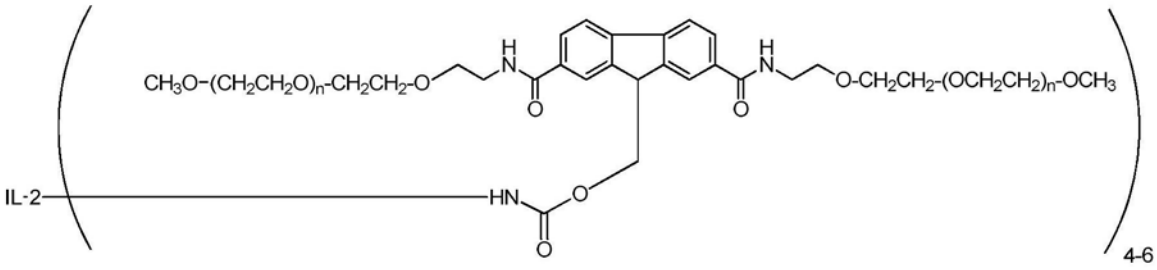
67.根据权利要求66所述的组合,其中所述长效IL-2Rβ偏向性激动剂包含可释放地共价附接至聚乙二醇的阿地白介素。

68.根据权利要求67所述的组合,其中所述长效IL-2Rβ偏向性激动剂包含可释放地共价附接至4、5和6个聚乙二醇聚合物的阿地白介素。

69.根据权利要求68所述的组合,其中所述长效IL-2Rβ偏向性激动剂包含可释放地共价附接至平均约6个聚乙二醇聚合物的阿地白介素。

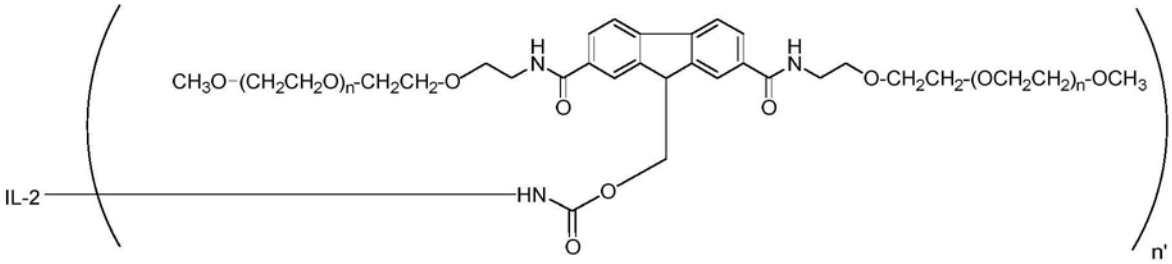
70.根据权利要求67-69中任一项所述的组合,其中可释放地共价附接至阿地白介素的聚乙二醇聚合物是分支的。

71.根据权利要求66所述的组合,其中所述长效IL-2Rβ偏向性激动剂包含由下式所涵盖的化合物:



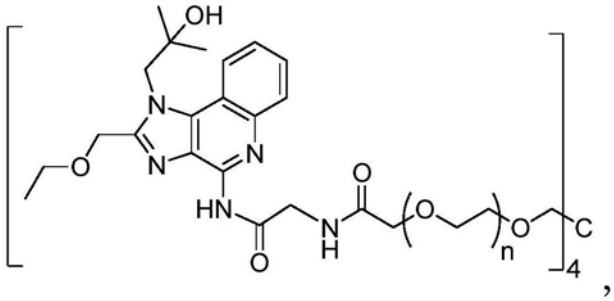
其中IL-2是白细胞介素-2,其中"n"是从约3至约4000的整数,或其药学上可接受的盐。

72.根据权利要求71所述的组合,其中所述长效IL-2Rβ偏向性激动剂包含在组合物中,所述组合物包含不超过10%(基于摩尔量)的由下式涵盖的化合物



其中IL-2是白细胞介素-2，n'是选自下组的整数，该组由以下组成：1、2、3、7和>7，或其药学上可接受的盐。

73.根据权利要求66-72中任一项所述的组合，其中所述缀合物具有以下结构：



，其中每个n独立地是从40至350的整数。

74.根据权利要求73所述的组合，其中在每个聚合物臂中n的值是基本上相同的。

75.根据权利要求73所述的组合，其中每个聚合物臂中n的值是约113。

TLR激动剂化合物的多臂聚合物缀合物以及相关的免疫治疗方法

相关申请的交叉引用

[0001] 本申请在35 U.S.C.§119(e)下要求以下各项的权益:2017年1月10日提交的美国临时专利申请号62/444,735;2017年1月10日提交的美国临时专利申请号62/444,756;2017年3月7日提交的美国临时专利申请号62/467,945;2017年4月21日提交的美国临时专利申请号62/488,251;2017年4月21日提交的美国临时专利申请号62/488,407;2017年5月23日提交的美国临时专利申请号62/510,019;和2017年5月23日提交的美国临时专利申请号62/510,024,每份专利的披露内容通过引用以其全文结合在此。

技术领域

[0002] 本申请(尤其)涉及Toll样受体(“TLR”)激动剂并且特别是TLR 7和/或TLR 8的Toll样受体激动剂的多臂聚合物缀合物,以及涉及包含多臂聚合物TLR激动剂缀合物的组合物,以及制备和使用这些缀合物的方法。本申请还涉及癌症免疫疗法领域,并且涉及例如通过向个体给予Toll样受体(TLR)激动剂(例如,Toll样受体激动剂的多臂聚合物缀合物)与长效IL-2Rβ偏向性激动剂的组合对患有癌症的个体进行的治疗,以及涉及在本文将更详细描述的相关的组合物和方法。

背景技术

[0003] Toll样受体(“TLR”)在属于先天性和适应性免疫系统的若干细胞类型上表达。迄今已在哺乳动物中鉴定出至少13种不同的TLR(Zhao,G.,等人.,Journal for ImmunoTherapy of Cancer[癌症免疫疗法杂志]2014,2:12)。TLR1、-2、-4、-5、-6和-10在细胞表面上表达,而TLR 3、-7、-8和-9位于细胞内的内体膜上(Kaczanowska,S.,等人.,J.Leukoc Biol.[白细胞生物学杂志]2013年6月;93(6):847-863)。TLR是检测病原体和恶性细胞衍生的分子(称为病原体相关分子模式(PAMP),在与TLR结合后,触发(NF)-κB和I型干扰素途径,导致树突细胞(DC)中促炎细胞因子和其他抗原呈递细胞(例如巨噬细胞)的产生)的传感器。TLR对于刺激DC成熟、抗原摄取和呈递,以及$CD4^+$细胞的分化和调节性T(Treg)细胞的控制是至关重要的。

[0004] 已经研究了TLR激动剂的抗肿瘤特性,然而,通常大多数TLR激动剂作为癌症治疗剂表现不佳。据推测,这种表现不佳可能是由免疫遏制因子的诱导抑制TLR激动剂诱导的炎症的机制所解释。(Lu,H.Frontiers in Immunology[免疫学前沿],2014年3月,5,83)。例如,TLR激动剂通过诱导树突细胞上的共刺激分子(例如CD80、CD86和CD40)以及使免疫应答极化的炎性细胞因子(例如TNF-α和IL-12)而具有免疫刺激作用。然而,TLR激动剂还具有免疫抑制作用,例如,通过诱导若干免疫抑制因子(包括IL-10、调节性T细胞(Treg)和PD-1),所有这些均可以阻遏抗肿瘤免疫力(Lu,H.,2014,同上)。

[0005] TLR-7、-8和-9在识别核酸基序和内体区室内的表达方面相似(Zhao,G.,2014,同上)。若干种配体(包括合成和天然核苷),已被表征为TLR7和/或TLR8配体。通过TLR7或TLR8

受体识别这些核苷配体激活细胞内途径，最终导致促炎细胞因子、趋化因子和I型干扰素(IFN)的诱导以及共刺激分子的上调。TLR是I型膜蛋白，其特征在于由富含亮氨酸的重复序列组成的胞外结构域，对识别病原体相关分子模式和细胞质结构域(称为Toll/白细胞介素-1受体(TIR)结构域，该结构域对于下游信号传导是必需的)负责。TLR7和TLR8密切相关，共享其细胞内内体位置，以及它们的配体。通过TLR7或TLR8识别配体后，募集含有TLR结构域的衔接分子髓样分化初级应答基因88(MyD88)。TLR7/8和MyD88的结合刺激白细胞介素-1受体相关激酶家族成员的募集，导致丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)和IκB激酶(IKK)复合物的下游活化。TLR 7和TLR 8的Toll样受体激动剂活化巨噬细胞，并且可以在一些情况下将肿瘤环境从肿瘤促进改变为肿瘤遏制性(炎性)环境。

[0006] 鉴于它们活化若干种细胞类型(如DC、单核细胞、巨噬细胞、成纤维细胞和人角质形成细胞)，诱导细胞凋亡，产生增强的免疫原性和对由细胞毒性T细胞淋巴细胞和化学治疗剂介导的杀伤敏感性的潜在能力，TLR配体被认为是是一类具有产生有效抗肿瘤免疫反应潜力的免疫应答调节剂。此外，已显示TLR8配体逆转$CD8^+$Treg细胞的遏制功能(Kiniwa Y.,等人.,Clin Cancer Res[临床癌症研究]2007;13:6947-58)。而且，TLR8配体的应用导致肿瘤浸润性$Foxp3^+$Treg细胞的减少，改变肿瘤环境从肿瘤促进性到肿瘤遏制性(Anz D.等人.,Cancer Res.[癌症研究]2015;75:4483-93)。另一方面，在某些情况下，已经显示TLR活化对肿瘤细胞的增殖、侵袭和/或存活是有利的(参见，例如，Bohnhorst J.,等人.,Leukemia[白血病]2006;20:1138-1144;和Jego G.,等人.,Leukemia[白血病]2006;20:1130-1137)。某些TLR 7/8激动剂也已经显示诱导免疫遏制和自身免疫疾病(Chi H.,等人.Frontiers in Pharmacology[药理学前沿].2017;8:304)。

[0007] 尽管在开发克服一种或多种上述缺点的新的和改进的TLR激动剂方面已经做出了大量努力，仍然存在对鉴定和提供新的且更有效的TLR激动剂以及相关的治疗方案的需求，该治疗方案克服现有技术的化合物和现有的治疗方法的缺点，同时还提供有利的免疫应答而不引发显著的不良副作用(例如炎症)。本披露力图解决这种和其他需求。可以将本文所述的TLR7/8激动剂用作独立的免疫治疗剂(即，作为单免疫治疗剂)，或在另一个方面，可以与长效IL-2Rβ偏向性激动剂组合使用。

发明内容

[0008] 在第一方面，本披露涉及Toll样受体(“TLR”)激动剂的多臂聚合物缀合物。更具体地，缀合物包含通过含键联间隔基部分共价附接至多臂水溶性非肽聚合物的TLR 7/8激动剂化合物。除其他之外，本文提供的缀合物允许局部给予缀合物，例如，给予肿瘤部位，其中该缀合物在肿瘤部位停留期间局部优先启动抗肿瘤免疫力。多臂缀合物的构架以及具体的TLR 7/8激动剂，附接化学和给予方式有效地产生缀合物，所述缀合物在肿瘤内延长时间保留，并且有效增加肿瘤抗原呈递和T细胞刺激(即，导致增强的CD8 T细胞引发)，即引发先天性免疫应答，同时伴随由局部活性引起的最小毒副作用。

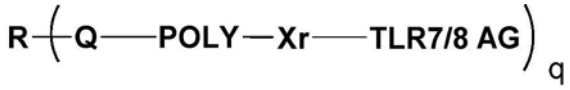
[0009] 在多臂缀合物的一些实施例中，TLR 7/8激动剂化合物是小分子。

[0010] 在多臂聚合物缀合物的又一个或多个另外的实施例中，多臂水溶性聚合物包含从3至约50个聚合物臂、或从3至约10个聚合物臂、或从3至6个聚合物臂。在一个或多个具体的实施例中，多臂聚合物缀合物包含3、4、或5个聚合物臂。在一个或多个另外的实施例中，多

臂聚合物缀合物包含4个聚合物臂。

[0011] 在一些实施例中，缀合物包含在多臂水溶性非肽聚合物的一个或多个壁的末端处共价附接的TLR 7/8激动剂。在一个或多个实施例中，TLR 7/8激动剂在多臂水溶性非肽聚合物的每个臂的末端处共价附接。在又一个或多个实施例中，多臂聚合物缀合物的聚合物臂中的每一个是相同的。

[0012] 在一些具体的实施例中，多臂聚合物缀合物具有与式I一致的结构：



式I

其中R与每个Q一起是携带从3至约50个羟基、硫醇或氨基基团的多元醇、多硫醇、或多胺的残基；每个Q是选自氧、硫和-NH(例如，分别对应于来自多元醇、多硫醇、或多胺的氧、硫或氮原子)的连接基团；每个POLY独立地是水溶性非肽聚合物；每个X_r独立地是含键联间隔基部分；q是从3至约50的正整数；并且每个TLR 7/8 AG是Toll样受体7/8激动剂；或其药学上可接受的盐形式。

[0013] 在又一个或多个另外的实施例中，TLR 7/8激动剂是(N-[4-(4-氨基-2-乙基-1H-咪唑并[4,5c]喹啉-1-基)丁基]甲烷磺酰胺或[8-(3-(吡咯烷-1-基甲基)苄基)-4-氨基-2-丁氧基-7,8-二氢蝶啶-6(5H)-酮]。

[0014] 在一些其他的实施例中，TLR 7/8激动剂是咪唑喹啉化合物。在一个或多个优选的实施例中，TLR 7/8激动剂是瑞喹莫德或咪喹莫特，或其类似物、衍生物或异构体。

[0015] 在参考式I的又一些另外的实施例中，R与Q一起是多元醇的残基。

[0016] 在关于式I的一些实施例中，每个X_r独立地是稳定的含键联间隔基部分。在又一些可替代的实施例中，每个X_r独立地是可释放的含键联间隔基部分。

[0017] 在与式I相关的一些另外的实施例中，q是选自3至10的正整数、或是选自3至6的正整数、或是选自3、4和5的正整数、或是4。

[0018] 在又一些另外的实施例中，含键联间隔基部分包含硫醚、氨基甲酸酯、酯、碳酸酯、或脲官能团。

[0019] 在又一些另外的实施例中，含键联间隔基部分包含酶可裂解的肽键联。

[0020] 在关于式I的一个或多个具体的实施例中，Xr与式II一致：

$\sim[X^1]_a-[Lr]_b-X^2\sim$

式II

其中a是0或1(表示当a是0时，X^1不存在；并且当a是1时，X^1存在)；b是0或1(表示当b是0时，Lr不存在；并且当b是1时，Lr存在)；当存在时，X^1是间隔基；当存在时，Lr是键联；并且X^2是直接共价附接于TLR 7/8激动剂的官能团。

[0021] 在涉及式II的一些实施例中，“a”是0。在又一些其他的实施例中，“b”是0。在一些另外的实施例中，“a”和“b”均是0。在又一些另外的实施例中，“a”是一。在又一些另外的实施例中，“b”是一。在又一些另外的实施例中，“a”和“b”均是一。

[0022] 在涉及式II的一些另外的实施例中，X^1是$-CH_2C(O)-$。

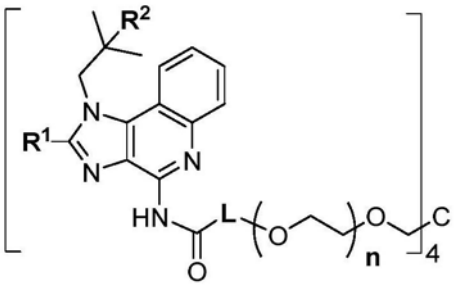
[0023] 在涉及式II的又一些另外的实施例中，X^2选自下组，该组由以下组成：-C(O)-NH-、-NH-C(O)-NH-、-NH-C(O)-、和-NH。

[0024] 在涉及式II的又一些另外的实施例中，Lr选自下组，该组由以下组成-$(CR_xR_y)_z$-和-$NH(CR_xR_y)_z$-，其中每个R_x和R_y独立地选自氢、低级烷基、卤素、和卤素取代的低级烷基，并且z是从1至6的整数。例如，在前述一些另外的具体施例中，Lr选自-CH_2-、-CH_2CH_2-、-$CH_2CH_2CH_2$-、-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-、-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-、-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-、-CH_2CHF-、-$CHCH_3$-、-$CHCH(CH_3)_2$-、-$CHCH_2CH(CH_3)_2$-、-$C(CH_3)_2$-、-$NHCH_2$-、-$NHCH_2CH_2$-、-$NHCH_2CH_2CH_2$-、-$NHCH_2CH_2CH_2CH_2$-、-$NHCH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-、-$NHCH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-、-$NHCH_2CHF$-、-$NHCHCH_3$-、-$NHCHCH(CH_3)_2$-、-$NHCHCH_2CH(CH_3)_2$-、和-$NHC(CH_3)_2$-。

[0025] 在缀合物的多臂聚合物部分的一个或多个实施例中，水溶性非肽聚合物是聚(环氧烷)。在一些具体的实施例中，聚(环氧烷)是聚(环氧乙烷)。

[0026] 在一些实施例中，包含在“q”个聚合物臂的每个内的水溶性非肽聚合物含有从约1至约30个单体亚单元。在又一些其他的实施例中，总的水溶性非肽聚合物(即，包括其每个聚合物臂)具有从约2,000道尔顿至约150,000道尔顿的分子量。在一些某种其他的实施例中，总的水溶性非肽聚合物具有从约5,000道尔顿至约40,000道尔顿的分子量。在又另外的实施例中，总的水溶性非肽聚合物具有从约5,000道尔顿至约25,000道尔顿的分子量。

[0027] 在一个或多个具体的实施例中，TLR 7/8激动剂的多臂聚合物缀合物具有与式III一致的式：

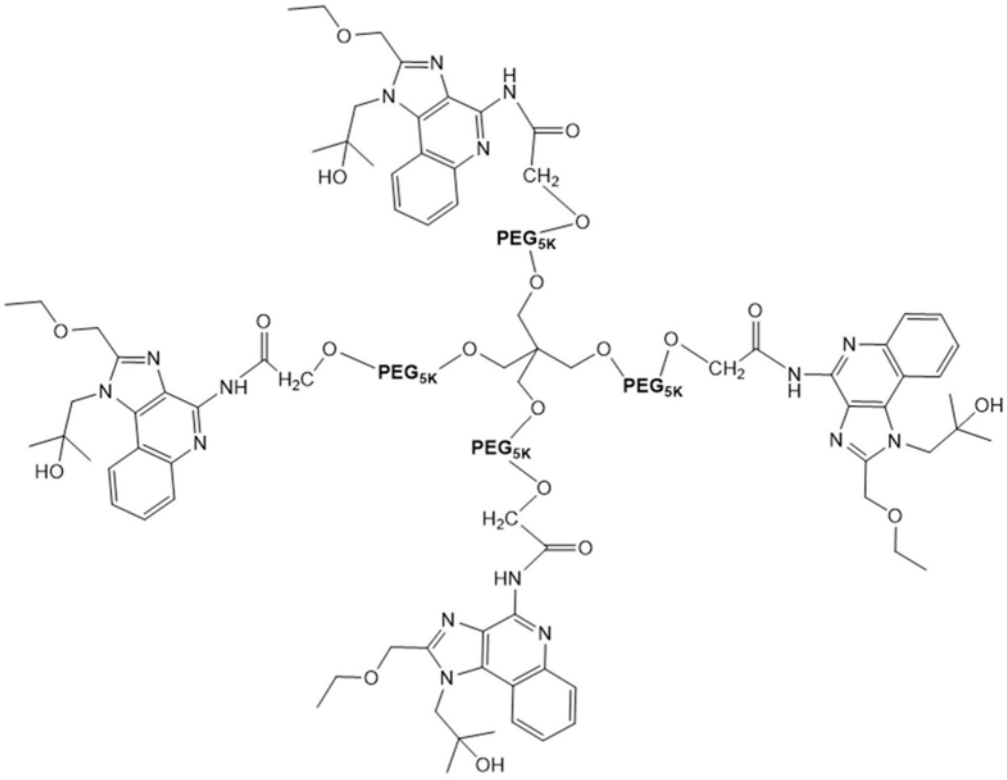


(式 III)

或药学上可接受的盐或其立体异构体，其中L是-$(CH_2)_m$-、-$(CH_2)_m$-NH-C(O)-$(CH_2)_m$-，-CHF-$(CH_2)_m$-NH-C(O)-$(CH_2)_m$-、-$CH(CH_3)$-NH-C(O)-$(CH_2)_m$-、-$(CH_2)_m$-$CH(CH(CH_3)_2)$-NH-C(O)-$(CH_2)_m$-、-$(CH_2)_m$-$CH(CH_2CH(CH_3)_2)$-NH-C(O)-$(CH_2)_m$-、-$C(CH_3)_2$-NH-C(O)-$(CH_2)_m$-、单键、或-NH-$(CH_2)_m$-，每个m独立地是从1至5(包括端值)的整数；每个n独立地是从40至350(包括端值)的整数；R^1是氢或-CH_2-O-CH_2-CH_3；并且R^2是氢或羟基。在又一些另外的涉及式III的实施例中，L选自-CH_2-、-CH_2-CH_2-NH-C(O)-CH_2-、-CH_2-CH_2-CH_2-、-CHF-CH_2-NH-C(O)-CH_2-、-CH_2-NH-C(O)-CH_2-、-$CH(CH_3)$-NH-C(O)-CH_2-、-CH_2-$CH(CH(CH_3)_2)$-NH-C(O)-CH_2-、-CH_2-$CH(CH_2CH(CH_3)_2)$-NH-C(O)-CH_2-、-$C(CH_3)_2$-NH-C(O)-CH_2-、单键、和-NH-CH_2-CH_2-。

[0028] 在又一些另外的式III的实施例中，每个n独立地是从100至250(包括端值)的整数。在又一些其他的实施例中，R^1是氢，并且R^2是氢。在又一些另外的实施例中，R^1是-CH_2-O-CH_2-CH_3，并且R^2是羟基。

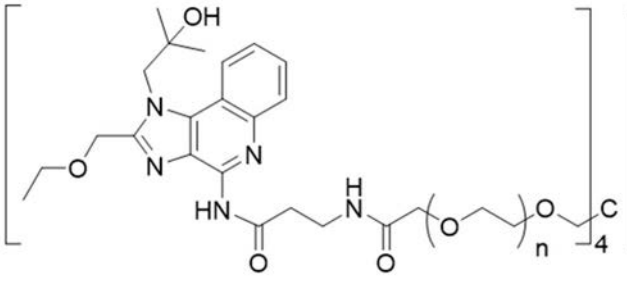
[0029] 在一个或多个具体的实施例中，多臂聚合物缀合物选自如下的化合物1-10和12-16：



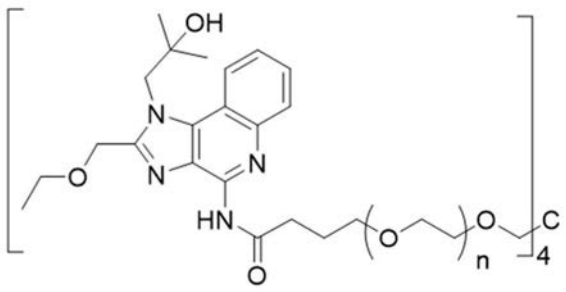
化合物1

其中每个，

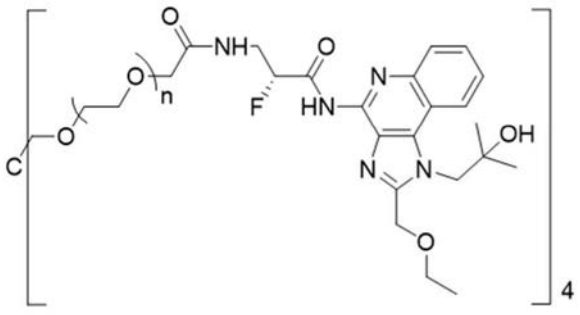
PEG5k是具有式～$(CH_2CH_2O)_yCH_2CH_2$～的线性聚乙二醇，其中y约为113；



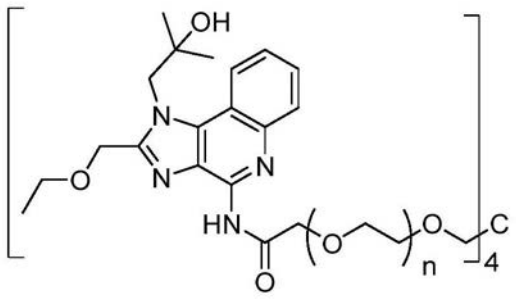
化合物2



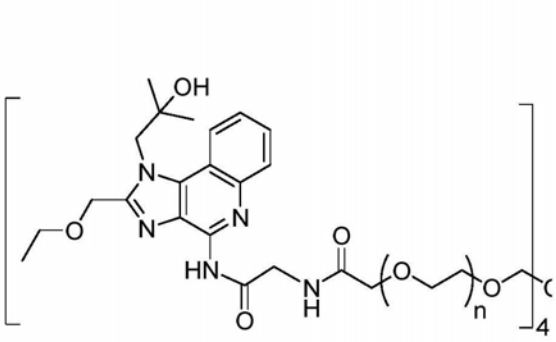
化合物3



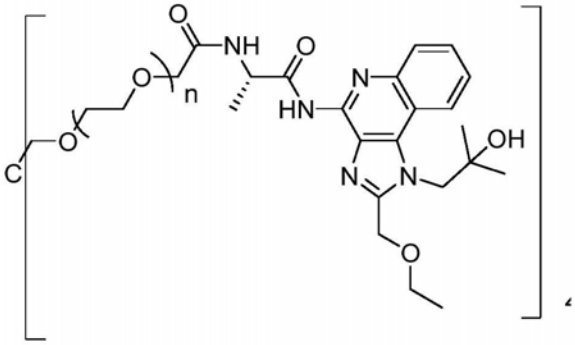
化合物4



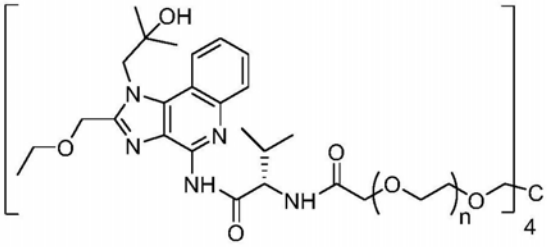
化合物 5



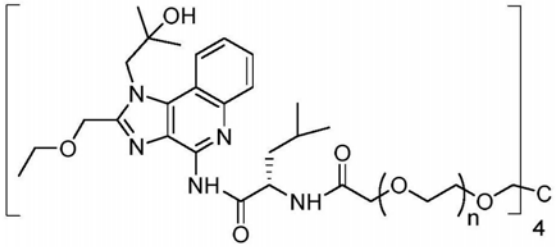
化合物 6



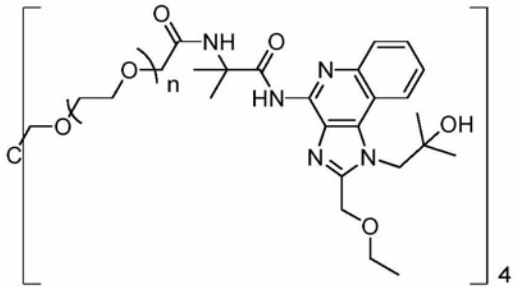
化合物 7



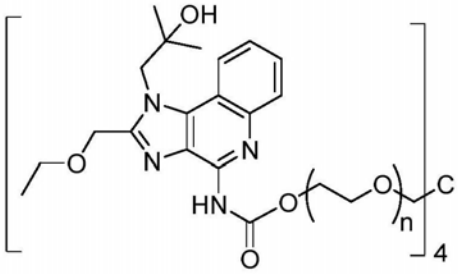
化合物 8



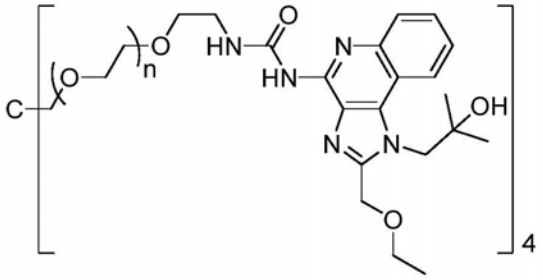
化合物 9



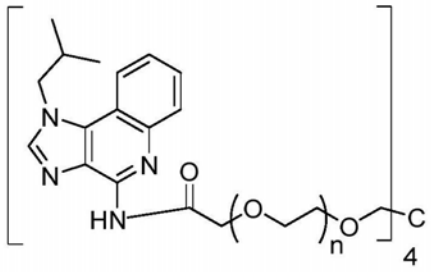
化合物 10



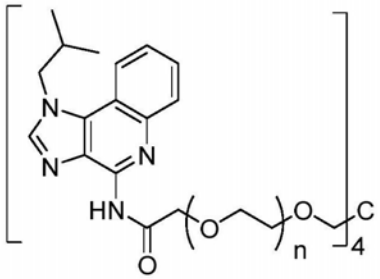
化合物 12



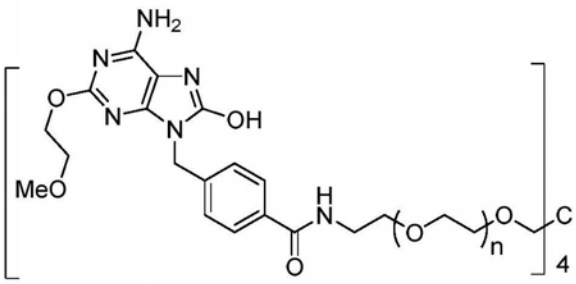
化合物 13



化合物 14



化合物 15



化合物 16

或其药学上可接受的盐或立体异构体,其中每个n独立地是从40至350的整数。

[0030] 在一个或多个具体的实施例中,多臂聚合物缀合物是化合物6。

[0031] 在又一个或多个另外的实施例中，提供了包含如本文所述的多臂聚合物缀合物和药学上可接受的赋形剂的组合物。

[0032] 在又另一个方面(例如，第二方面)，本披露提供了治疗方法，该方法包括向对其有需要的受试者给予如本文提供的多臂聚合物缀合物。

[0033] 在又另一个(即，第三)方面，披露了用于在癌症治疗中使用的如本文提供的TLR 7/8激动剂的多臂聚合物缀合物。

[0034] 在相关的(即，第四)方面，披露了用于在制备有用于癌症治疗的药物中使用的如本文提供的TLR 7/8激动剂的多臂聚合物缀合物。

[0035] 在又另一个(即，第五)方面，披露了制备TLR 7/8激动剂的多臂聚合物缀合物的方法，该方法通过在适合实现所述共价附接的条件下经由稳定的或可释放的含键联间隔基部分共价附接TLR 7/8激动剂与多臂水溶性聚合物。

[0036] 在又另外的(即，第六)方面，本文提供了以下方法，该方法包括向患有癌症的受试者给予TLR激动剂例如像如本文所披露的TLR 7/8激动剂的多臂聚合物缀合物和IL-2Rβ活化量的长效IL-2Rβ偏向性激动剂(二者在本文中将被更详细地描述)。在某些实施例中，该组合有效促进免疫系统(例如通过促进CD8 T细胞、CD11c+和CD8+树突细胞、和中性粒细胞)的活化，同时还克服免疫抑制(例如通过遏制调节性T细胞、巨噬细胞和单核细胞)。

[0037] 为清楚起见，关于给予顺序，TLR 7/8激动剂和长效IL-2Rβ偏向性激动剂可以同时或依次并按任何顺序给予，并且各自按免疫调节量经由相同和/或不同的给予途径给予。此外，治疗可以包括单个治疗周期，或者可以包括多个治疗周期(即，两个或更多个)。

[0038] 在一个或多个实施例中，将TLR激动剂局部给予，并且将长效IL-2Rβ偏向性激动剂肠胃外给予。在一个或多个相关的实施例中，将TLR激动剂(例如，TLR 7/8激动剂的多臂聚合物缀合物)直接给予至肿瘤部位。

[0039] 在与第六方面相关的一个或多个实施例中，将TLR激动剂(例如，TLR 7/8激动剂的多臂聚合物缀合物)与长效IL-2Rβ偏向性激动剂分开给予受试者。

[0040] 在又一个或多个另外的实施例中，在给予长效IL-2Rβ偏向性激动剂之前，将TLR激动剂(例如，TLR 7/8激动剂的多臂聚合物缀合物)给予受试者。例如，在一个或多个实施例中，在治疗的第1天同时给予TLR激动剂和长效IL-2Rβ偏向性激动剂。在一个或多个可替代的实施例中，在治疗的第1天给予TLR激动剂，并且在治疗的第1至4天中的任一天给予长效IL-2Rβ偏向性激动剂。例如，在治疗的第1、2、3、或4天中的任一天给予长效IL-2Rβ偏向性激动剂。

[0041] 在优选的实施例中，受试者是人受试者。

[0042] 在一个或多个另外的实施例中，癌症是实体癌。例如，该癌症选自下组，该组由以下组成：乳腺癌、卵巢癌、结肠癌、前列腺癌、骨癌、结肠直肠癌、胃癌、淋巴瘤、恶性黑素瘤、肝癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、胰腺癌、甲状腺癌、肾癌、胆管癌、脑癌、宫颈癌、上颌窦癌、膀胱癌、食管癌、霍奇金病以及肾上腺皮质癌。

[0043] 在一些实施例中，该长效IL-2Rβ偏向性激动剂包含可释放地共价附接至聚乙二醇的阿地白介素。在又一些另外的实施例中，该长效IL-2Rβ偏向性激动剂包含可释放地共价附接至4、5和6个聚乙二醇聚合物的阿地白介素。在又一些其他实施例中，该长效IL-2Rβ偏向性激动剂包含可释放地共价附接至平均约6个聚乙二醇聚合物的阿地白介素。在一个或

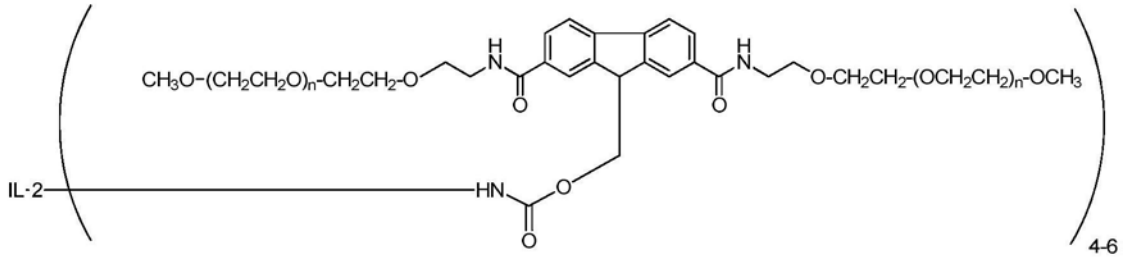
多个另外的实施例中，这些可释放地共价附接至阿地白介素的聚乙二醇聚合物是分支的。

[0044] 在与实施例的前述方面中任一个或多个相关的又一些另外的实施例中，TLR激动剂是TLR 7或TLR 8激动剂。在一个或多个实施例中，TLR激动剂是TLR 7激动剂。在又一个或多个可替代的实施例中，TLR激动剂是TLR 8激动剂。在一些实施例中，TLR激动剂是长效TLR激动剂，例如长效TLR 7或长效TLR 8激动剂(例如，多臂聚合物修饰的TLR 7或TLR 8激动剂)。

[0045] 在又一些另外的实施例中，长效TLR激动剂是TLR激动剂的多臂水溶性聚合物缀合物(例如TLR 7/8激动剂)。在又一个或多个另外的实施例中，多臂水溶性聚合物与TLR激动剂(例如，TLR 7/8激动剂)稳定地共价连接。在一个或多个可替代的实施例中，多臂水溶性聚合物与TLR激动剂(例如，TLR 7/8激动剂)可释放地共价连接。

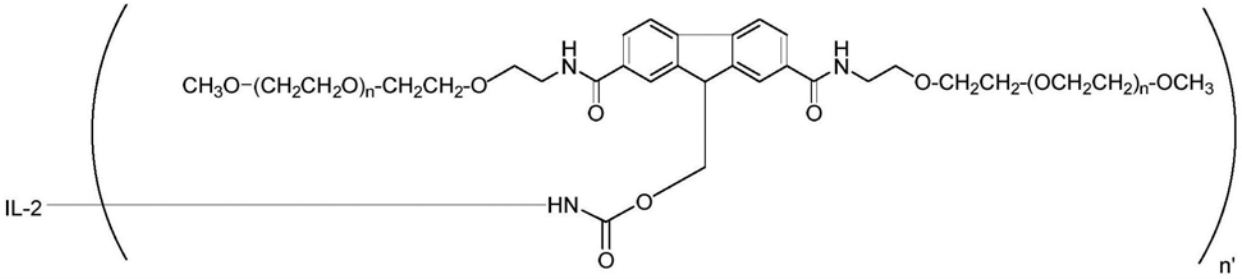
[0046] 在又一个或多个具体的实施例中，长效TLR激动剂是基于4-臂-戊赤藓糖醇基的聚乙二醇缀合物，该缀合物具有在其四个聚合物臂中的每个臂的末端处稳定地或可释放地共价连接的TLR激动剂分子。

[0047] 在一些优选的实施例中，长效IL-2Rβ偏向性激动剂包含由下式所涵盖的化合物：



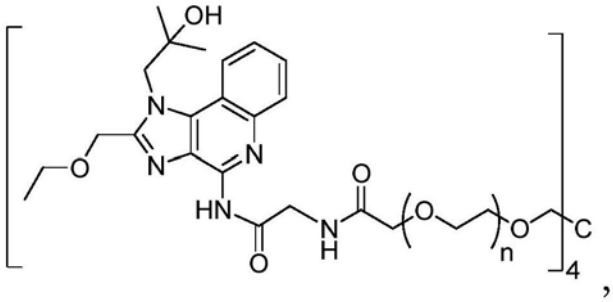
其中IL-2是白细胞介素-2，“n”是从约3至约4000的整数，或其药学上可接受的盐。

[0048] 在一些实施例中，具有如在前述段落中列出的式的长效IL-2Rβ偏向性激动剂被包含在组合物中，该组合物包含不超过10％(基于摩尔量)的由下式涵盖的化合物：



其中IL-2是白细胞介素-2，n’是选自下组的整数，该组由以下组成：1、2、3、7和>7，以及其药学上可接受的盐。

[0049] 在给予方法的一些另外的实施例中，TLR 7/8缀合物具有以下结构：



，其中每个n独立地是从40至350的整数。

在一个或多个相关的实施例中，在每个聚合物臂中n的值是基本上相同的。在一些具体的实施例中，在四个聚合物臂中的每个壁中n的值约为113。

[0050] 在第六方面的一些实施例中，给予有效地在受试者中产生远位效应。

[0051] 在与前述相关的一些另外的实施例中，当在合适的动物模型(例如小鼠CT-26结肠肿瘤模型)中评估时，在治疗开始后的某天(即，在仅有运载体的组中的所有受试者已经达到0％存活率的当天后)(例如，在第35天和50天之间)，所述给予有效提供百分比存活率，该百分比存活率高于在单独给予每种单一药剂(即，长效IL-2Rβ偏向性激动剂和TLR激动剂)时观察到的百分比存活率。

[0052] 在又另一个方面，提供了试剂盒，该试剂盒包含IL-2Rβ活化量的长效IL-2Rβ偏向性激动剂和先天性免疫力活化量的TLR激动剂(例如，TLR 7/8激动剂的多臂聚合物缀合物)，随附用于在治疗患有癌症的受试者中使用的说明书。

[0053] 在该试剂盒的一个或多个实施例中，长效IL-2Rβ偏向性激动剂和TLR激动剂包含在用于给予受试者的单一组合物中，其中该单一组合物任选地包含药学上可接受的赋形剂。

[0054] 在该试剂盒的一些可替代的实施例中，该长效IL-2Rβ偏向性激动剂和该TLR激动剂被提供在单独的容器中，并且该试剂盒包括用于将该TLR激动剂和该长效IL-2Rβ偏向性激动剂分开给予至受试者的说明书。

[0055] 在试剂盒的一些实施例中，长效IL-2Rβ偏向性激动剂和TLR激动剂处于固体形式。在一个或多个相关的实施例中，长效IL-2Rβ偏向性激动剂和长效TLR激动剂各自处于适于在水性稀释剂中重构的固体形式。

[0056] 在又一个或多个另外的实施例中，长效IL-2Rβ偏向性激动剂和TLR激动剂各自包含在各自含有药学上可接受的赋形剂的单独的组合物中。

[0057] 本发明的缀合物、组合物、方法等的另外的实施例从以下的说明、实例以及权利要求中将是很清楚的。正如从前述以及以下说明可以认识到在此描述的各自和每一特征、以及二种或多种此类特征的各自和每一组合被包括在本披露的范围之内，前提是包括在这样一种组合中的特征不是互不一致的。此外，任何特征或特征的组合可以被特定地排除在任何实施例之外。

附图说明

[0058] 图1是显示以下内容的图：如在实例21中详细描述的，在小鼠结肠癌模型(CT-26)中，原发性肿瘤(TLR激动剂注射部位)体积相对用各种干预(运载体；示例性长效IL-2Rβ偏向性激动剂，RSLAIL-2；示例性TLR激动剂，4-臂-PEG20k-CM-N-R848；以及RSLAIL-2和4-臂-PEG20k-CM-N-R848的组合)处理的小鼠最初给药后的天数。

[0059] 图2是显示以下内容的图：如在实例21中详细描述的，在小鼠结肠癌模型(CT-26)中，继发性肿瘤(远端，非TLR激动剂注射部位)体积相对用各种干预处理的小鼠最初给药后的天数。

[0060] 图3是显示以下内容的图：如在实例21中详细描述的，在小鼠结肠癌模型(CT-26)中，百分比存活率相对用各种干预(运载体；示例性长效IL-2Rβ偏向性激动剂，RSLAIL-2；示例性TLR激动剂，4-臂-PEG20k-CM-N-R848；以及RSLAIL-2和4-臂-PEG20k-CM-N-R848的组

合)处理的小鼠最初给药后的天数。

[0061] 图4A-4D是显示以下内容的图:如实例23中详细描述的,在治疗开始后第25天,用RSLAIL-2和R848的组合治疗导致在高剂量组中10只动物中有9只、中剂量组中10只动物中有7只、和在低剂量组中8只动物中仅1只的所处理的肿瘤的肿瘤体积减小或维持。

[0062] 图4E-4H是显示以下内容的图:如实例23中详细描述的,在治疗后第32天,用RSLAIL-2和化合物6的组合治疗导致在高剂量组中10只动物中有9只、中剂量组中10只动物中有9只、并且(令人惊喜地)在低剂量组中10只动物中有10只的所处理的肿瘤的肿瘤体积减小或维持。

[0063] 图5A-5D是显示以下内容的图:如实例23中详细描述的,在治疗开始后第25天,用RSLAIL-2和R848的组合治疗导致在高剂量组中10只动物中有9只、中剂量组中10只动物中有5只、和在低剂量组中8只动物中仅1只的未经处理的肿瘤的肿瘤体积减小或维持。

[0064] 图5E-5H是显示以下内容的图:如实例23中详细描述的,在治疗后第32天,用RSLAIL-2和化合物6的组合治疗导致在高剂量组中10只动物中有9只、中剂量组中10只动物中有8只、并且(令人惊喜地)在低剂量组中10只动物中有10只的未经处理的肿瘤的肿瘤体积减小或维持。

[0065] 图6A和6B是提供如实例18所述,在用化合物6处理后,分别在2小时和6小时处对肿瘤和血浆细胞因子浓度进行比较的图。针对每种所测量的细胞因子(IL-6、KC/GRO、TNF-α、IL-1β、IL-5、IFN-α、IFN-γ、IL-2和IL-12p70),全身细胞因子的浓度显著低于在肿瘤中的浓度。

具体实施方式

定义

[0066] 如在本说明书中所使用的,单数形式“一个/种(a/an)”和“该”包括复数个指示物,除非上下文中另外明确规定。

[0067] “水溶性非肽聚合物”是指聚合物,该聚合物在室温下在水中是至少35%(按重量计)可溶的,优选地大于70%(按重量计)、并且更优选地大于95%(按重量计)可溶的。典型地,“水溶性”聚合物的未过滤的水性制剂传输相同溶液在过滤后传输的光的量的至少75%(更优选至少95%)。然而,最优选的是该水溶性聚合物是至少95%(按重量计)可溶于水的或完全可溶于水的。关于为“非肽的”,聚合物当具有少于35%(按重量计)的氨基酸残基时是非肽的。

[0068] 术语“单体”、“单体亚单元”和“单体单元”在此可互换使用并且是指聚合物的基本结构单元之一。在均聚物的情况下,单一的重复结构单元形成该聚合物。在共聚物的情况下,两个或更多个结构单元重复出现--以一种模式或随机地--以形成该聚合物。优选的聚合物是均聚物。该水溶性的、非肽的聚合物包括一个或多个串联附接的单聚体以形成一个单聚体链。聚合物可以由单一的单体类型(即,均聚物类型)或两种或三种单体类型(即,是共聚物类型)形成。

[0069] 如本文使用的“聚合物”是具有从约2至约2000个或更多个(例如从约2至约4000个)单体的分子。具体的聚合物包括在以下更详细说明的具有多种几何形状(例如直链、支链或叉状的)的那些。

[0070] 如在此使用的“PEG“和“聚乙二醇”意指包括任何水溶性的聚(环氧乙烷)。除非另外指明,“PEG聚合物”或任何聚乙二醇是这样一种物质,其中基本上所有的(优选所有的)单体亚单元是环氧乙烷亚单元,但是,该聚合物可以含有不同的封端部分或官能团,例如用于缀合。PEG聚合物可以包括以下两种结构中的一种:“-$(CH_2CH_2O)_n$-”或“-$(CH_2CH_2O)_{n-1}CH_2CH_2$-”,这取决于末端的一个或多个氧是否被置换(例如在合成转化期间)。如上所述,对于这些PEG聚合物,变量(n)(即重复单元的数量)在从约2至2000,或从2至4000的范围内,并且整个PEG的末端基团和构架可以变化。当PEG进一步包括用于连接至例如小分子药物的官能团时,当与PEG聚合物共价附接时该官能团不会导致氧-氧键(-O-O-,一种过氧化物键联)的形成。

[0071] 术语“封端的”或“末端加帽的”在本文中可互换使用来指具有封端部分的聚合物的末端或端点。典型地,虽然不是必需的,封端部分包括羟基或C_{1-20}烷氧基或碱性芳氧基(alkaaryloxy)基团。因此,封端部分的实例包括烷氧基(例如甲氧基和乙氧基)、苄氧基以及芳基、杂芳基、环基、杂环基等。另外,设想前述每种基团的饱和、不饱和、取代以及未取代的形式。此外,封端基团还可以是硅烷。封端基团还可以有利地包含可检测标记。当聚合物具有包含可检测标记的封端基团时,通过使用适合的检测器可以确定该聚合物和/或该聚合物所偶联的感兴趣的部分(例如活化剂)的量或位置。这样的标记包括但不限于:荧光剂、化学发光剂、在酶标记中使用的部分、比色部分(例如染料)、金属离子、放射性部分等等。适合的检测器包括光度计、胶片、分光仪等。此外,封端基团可以包括一个靶向部分。

[0072] 术语“靶向部分”是指帮助缀合物定位于靶向区域的分子结构(例如帮助进入细胞或结合受体)。优选地,该靶向部分包括维生素、抗体、抗原、受体、DNA、RNA、唾液酸化路易斯X抗原、透明质酸、糖类、细胞特异性凝集素、类固醇或类固醇衍生物、RGD肽、细胞表面受体的配体、血清组分、或针对不同细胞内或细胞外受体的组合分子。该靶向部分还可以包括脂质或磷脂。示例性的磷脂包括但不限于磷脂酰胆碱类、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰肌醇、磷脂酰甘油以及磷脂酰乙醇胺。这些脂质可以处于微胶粒或脂质体以及类似物的形式。该靶向部分可以进一步包括可检测标记,或者替代地可检测标记可以作为靶向部分起作用。当聚合物缀合物具有包括可检测标记的靶向基团时,可以使用适合的检测器确定该聚合物和/或该聚合物缀合到其上的部分(例如活化剂)的量和/或分布/位置。这样的标记包括但不限于:荧光剂、化学发光剂、在酶标记中所使用的部分、比色物(例如染料)、金属离子、放射性部分、金颗粒、量子点等等。

[0073] 在水溶性聚合物(如PEG)的背景下,分子量可以表示为数均分子量或重均分子量。除非另外指明,否则所有对分子量的提及在此均指重均分子量。两种分子量测定(数均与重均分子量)均可以使用凝胶渗透色谱法或其他液相色谱技术来测量。也可以使用用于测量分子量值的其他方法,如使用端-基分析或测量依数性(colligative property)(例如凝固点降低、沸点升高或渗透压)来确定数均分子量或使用光散射技术、超速离心法或粘度测定法来确定重均分子量。PEG聚合物典型地是多分散的(即,这些聚合物的数均分子量与重均分子量不相等),具有优选小于约1.2、更优选小于约1.15、仍然更优选小于约1.10、又仍然更优选小于约1.05并且最优选小于约1.03的低多分散性值。

[0074] 关于聚合物的几何学或整体结构而言的“分支的”指的是具有从一个分支点伸出的两个或更多个聚合物“臂”的聚合物。

[0075] 关于聚合物的几何形状或总体结构,“叉状的”是指具有从分支点延伸的两个或更多个官能团(典型地通过一个或多个原子)的聚合物。

[0076] “分支点”是指包括一个或多个原子的歧点,在该点上聚合物从直链结构上分支或分叉成一个或多个另外的臂。

[0077] 术语“反应性的”或“活化的”是指官能团,该官能团在常规的有机合成条件下容易地或以实用的速率进行反应。这与不反应的或需要强催化剂或不实用的反应条件而进行反应的那些基团(即,“不反应的”或“惰性的”基团)相反。

[0078] 对于在反应混合物中存在的官能团,“不容易反应的”表示该基团在对于在该反应混合物中产生所希望的反应有效的条件下仍然是大部分完整的。

[0079] “保护基团”是防止或阻断分子中的特定化学反应性官能团在某些反应条件下的反应的部分。保护基团可以取决于受保护的化学反应基团的类型连同有待使用的反应条件以及在分子中另外的反应性或保护性基团的存在而改变。可以受保护的官能团包括,作为举例:羧酸基团、氨基、羟基、硫醇基、羰基以及类似物。对于羧酸的代表性的保护基团包括酯(例如对甲氧基苄基酯)、酰胺和酰肼;对于氨基基团,包括氨基甲酸酯(例如叔丁氧基羰基)和酰胺;对于羟基基团,包括醚和酯;对于硫醇基团,包括硫醚和硫酯;对于羰基基团,包括缩醛和缩酮;等。这些保护基团是本领域技术人员公知的,并且描述于例如T.W.Greene和G.M.Wuts,Protecting Groups in Organic Synthesis[有机合成中的保护基团],第三版,威利出版社,纽约,1999中,并且其中引用参考。

[0080] 处于“保护形式”的官能团是指携带保护基团的官能团。如在此使用的,术语“官能团”或它们的任何同义词包括它们的受保护的形式。

[0081] “可释放的键联”是在生理条件下裂解的相对不稳定的键,其中裂解可以通过许多不同机制中的任何一种发生。示例性可释放的键联的其中一种类型是可水解键,即,在与水反应(即,水解)时裂解的键,例如在生理条件下,例如像酰胺键(如芳族酰胺键)的水解。键在水中水解的倾向将不仅取决于连接两个原子的键的总体类型而且取决于与这些原子连接的取代基。适当的水解不稳定的或弱的键联可以包括但不限于羧酸酯、磷酸酯、酸酐、缩醛、缩酮、酰氧基烷基醚、亚胺、原酸酯、肽、寡核苷酸、硫酯以及碳酸酯。可释放的键联还包括酶促可释放的键联,其中“酶促可释放的键联”是指经受一种或多种酶裂解的键联。其他类型的释放机制包括但不限于1,6-苄基消除,β-消除等。虽然某些键可被认为是稳定的或可释放的,但应在分子或结构实体的整体结构内考虑这种表征。在某些情况下,包含可释放的键的聚合物缀合物被称为前药,其中在体内(即,在生理条件下)裂解可释放的键后,释放母体药物(或最终释放,取决于可释放地附接到活性剂的聚合物部分数量)。例如,在水溶性聚合物(例如聚乙二醇)的情况下与活性部分(例如白细胞介素-2)或TLR激动剂(例如瑞喹莫德(还被称为R848))共价附接的共价“可释放”键联是在生理条件下裂解的键联,从而从使水溶性聚合物从活性部分释放或分离,或使活性部分从水溶性聚合物分离。

[0082] “稳定的”键联或键是指在水中基本上稳定的化学键(例如,在生理学条件下),也就是说在生理条件下经一段延长的时间没有经受任何明显程度的水解。水解稳定的键联的实例通常可以包括但不限于以下:碳-碳键(例如在脂肪链中)、醚类、酰胺类、氨基甲酸酯类、胺等。大体上,稳定的键联是在生理条件下表现出小于约1%-2%的每日水解率的键联。代表性化学键的水解速率可以在大多数标准化学教科书中找到。

[0083] “TLR 7/8激动剂”(或“TLR激动剂”)是针对Toll样受体7和/或Toll样受体8的激动剂的任何化合物。

[0084] “实质上”或“基本上”表示几乎全部的或完全的,例如一些给定的数量的95%或更大、更优选97%或更大、仍更优选98%或更大、甚至更优选99%或更大、还又更优选99.9%或更大,最优选99.99%或更大。

[0085] “烷基”是指在长度上具有范围从大约1至20个原子的烃链。这些烃链优选但不必需是饱和的并且可以是支链或直链。示例性烷基基团包括甲基、乙基、丙基、丁基、戊基、2-甲基丁基、异丙基、3-甲基戊基等。如在此使用的,当提及三个或多个碳原子时,“烷基”包括环烷基。“烯基”基团是具有至少一个碳-碳双键的2至20个碳原子的烷基基团。

[0086] 术语“被取代的烷基”或“被取代的C_{q-r}烷基”(其中q和r是标识该烷基中所包含的碳原子范围的整数)表示由一个、两个、或三个卤素原子(例如F、Cl、Br、I)、三氟甲基、羟基、C_{1-7}烷基(例如,甲基、乙基、正丙基、异丙基、丁基、叔丁基等)、C_{1-7}烷氧基、C_{1-7}酰氧基、C_{3-7}杂环基、氨基、苯氧基、硝基、羧基、酰基、氰基等取代的以上这些烷基基团。这些被取代的烷基可以用相同或用不同的取代基被取代一次、两次、或三次。

[0087] “低级烷基”是指含有从1至7个碳原子的烷基,并且可以是直链或支链的,如以下例子:甲基、乙基、正丁基、异丁基、叔丁基。

[0088] ″低级烯基″是指具有至少一个碳-碳双键的具有2至6个碳原子的低级烷基基团。

[0089] “非干扰性取代基”是当在分子中存在时典型地不与包含在该分子中的其他官能团反应的那些基团。

[0090] “烷氧基”是指-O-R基团,其中R是烷基或被取代的烷基,优选C_1-C_{20}烷基(例如,甲氧基、乙氧基、丙基氧基等),优选地C_1-C_7。

[0091] “药学上可接受的赋形剂”或“药学上可接受的载体”是指可以包含在在此描述的组合物中并且对于患者不会引起显著不良毒理学效应的组分。

[0092] 术语“芳基”表示具有高达14个碳原子的芳香族基团。芳基包括苯基、萘基、联苯基、菲基、蒽基以及类似物。“被取代的苯基”和“被取代的芳基”分别表示被一个、两个、三个、四个或五个(例如,1-2、1-3或1-4个取代基)取代的苯基基团和芳基基团,这些取代基选自卤素(F、Cl、Br、I)、羟基、氰基、硝基、烷基(例如,C_{1-6}烷基)、烷氧基(例如,C_{1-6}烷氧基)、苄氧基、羧基、芳基等等。

[0093] 如果适用,如本文所述的示例性缀合物、活性部分、或其他适当应用的化学部分意在涵盖其类似物、异构体、多晶型物、溶剂化物和药学上可接受的盐形式。

[0094] “药理学有效量”、“生理学有效量”、和“治疗有效量”在此可互换地使用,表示活性剂(通常是聚合物缀合物)的量被需要以便在血流中或在靶组织中提供活性剂和/或缀合物的所希望的水平。精确的量可以取决于多个因素,例如特定的活性剂、组合物的组分以及物理特征、预期的病人群、病人的考虑因素,并且可以容易地由本领域的普通技术人员基于在此提供的以及在相关文献中可得的信息来确定。

[0095] 在此描述的碱性反应物或酸性反应物包括中性的、带电荷的、以及它们的任何相应的盐的形式。

[0096] 如在此使用的术语“患者”或“受试者”是指患有或易患可以通过给予如在此提供的化合物或组合物或组合来预防或治疗的病状(如癌症)的活生物体,并且包括人和动物两

者。受试者包括但不限于哺乳动物(例如,鼠科动物、猿猴、马科动物、牛科动物、猪科动物、犬科动物、猫科动物等),并且优选是人。

[0097] “任选的”或“任选地”表示随后描述的情形可以但是并非必然发生,这样该说明包括其中该情形发生的情况以及该情形不发生的情况。

[0098] 如本文所用的“小分子”是指通常具有分子量小于约1000的有机化合物。

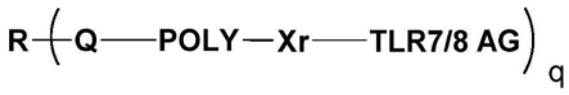
概述

[0099] 本文所述的多臂水溶性聚合物-TLR 7/8激动剂缀合物结合许多在药物设计和治疗原理(整合到新颖的潜在更安全和高效的抗癌疗法中)中的创新进展。它们能够进行先天性免疫系统活化,并且当由与TLR激动剂化合物的可释放的键联组成时,有效地在注射的组织(例如癌性肿瘤)中释放和保留活性TLR 7/8激动剂。当瘤内给予时,这些缀合物有效活化局部肿瘤抗原向细胞毒性T细胞的呈递并克服肿瘤环境中的免疫遏制性信号。多臂水溶性聚合物支架有助于注射的缀合物主要保留在注射的肿瘤部位,由此TLR 7/8激动剂依赖性免疫活化在全身活性降低的情况下在治疗部位中最高。与现有的全身小分子TLR激动剂相比,这种药物设计的关键优势在于在所治疗的肿瘤处局部药物活性和降低潜在毒性的减少的全身暴露。

[0100] 另外,如本文提供的组合治疗(其中将多臂水溶性聚合物-TLR 7/8激动剂缀合物与长效IL-2Rβ偏向性激动剂组合给予)源自局部TLR 7/8激动剂聚合物缀合物驱动的抗肿瘤先天性免疫活化和长效IL-2Rβ偏向性激动剂对细胞毒性T细胞的全身瘤内扩增的固有协同作用。如本文所述,在多个同系肿瘤模型中的研究表明,双重治疗组合的药代动力学和药效学特性的优化导致高效的组合疗法,该疗法成功地偶联类似于天然病原体驱动的免疫应答的抗肿瘤先天性和适应性免疫活化。两种治疗组分均活化免疫系统的互补臂以参与全身肿瘤清除所需的整个免疫活化级联。本文所述的组合疗法被设计为相比于单独施用的任一种药剂,协同地引发更安全和更有效的抗肿瘤免疫应答。这些和其他特征将变得显而易见,并在以下部分中详细描述。

TLR 7/8激动剂的多臂聚合物缀合物

[0101] 如上所述,本文提供了Toll样受体(“TLR”)激动剂化合物的多臂聚合物缀合物,即,TLR 7/8激动剂。在一些具体的实施例中,该多臂聚合物缀合物具有与式I一致的结构:



式I

其中R与每个Q一起是分别携带从3至约50个羟基、硫醇或氨基基团的多元醇、多硫醇、或多胺的残基;每个Q独立地是选自氧、硫和-NH(例如,分别对应于来自多元醇、多硫醇、或多胺的氧、硫或氮原子)的连接基团;每个POLY独立地是水溶性非肽聚合物;每个X_r独立地是含键联间隔基部分;q是从3至约50的正整数;并且每个TLR 7/8 AG是Toll样受体7/8激动剂,其中式I还涵盖其药学上可接受的盐。我们现在将考虑式I的多臂聚合物缀合物的不同组分中的每一种。

[0102] 考虑到式I,在一个或多个实施例中,多元醇、多硫醇或多胺的残基“R”(与多臂聚合物结合使用)是具有从约3至约150个碳原子(例如,从约3至约50个碳原子)的含有机基团

的部分。在一些优选的实施例中，当R与Q一起时(即，$(R-Q)_q$，即多元醇、多胺或多硫醇核心分子)包含从3至约25个碳原子，或从3至约10个碳原子(例如像3、4、5、6、7、8、9、或10个碳原子)。除了由Q定义的那些之外，残基可以包含一个或多个杂原子(例如，O、S或N)。关于多元醇(或多胺或多硫醇)的残基是指去除一个或多个末端氢原子后的母体分子，以提供适合于附接POLY的有机基团。

[0103] 如前所述，形成本文提供的多臂缀合物的支化基础的多元醇、多硫醇或多胺的残基("R-Q"$_q$)来源于相应的多元醇、多硫醇或多胺。在一个或多个实施例中，对应的多元醇、多硫醇、或多胺分别带有可用于聚合物附接的至少三个羟基、硫醇、或氨基基团。"多元醇"是包含三个或更多个羟基基团的分子。"多硫醇"是包含三个或更多个硫醇基团的分子。"多胺"是包含三个或更多个氨基基团的分子。

[0104] 在一个或多个实施例中，多元醇、多胺或多硫醇通常分别包含3至约25个羟基基团、或氨基基团、或硫醇基团，例如分别从3至约10(即，3、4、5、6、7、8、9、或10)个羟基、氨基基团、或硫醇基团，优选地分别从3至约8(即，3、4、5、6、7、或8)个羟基、氨基基团、或硫醇基团。在一个或多个实施例中，在每个羟基、硫醇、或氨基基团之间的原子数将变化，尽管在每个羟基、硫醇、或氨基基团之间的从约1至约20(例如，从1至约5)个插入的原子(例如碳原子)的长度是示例性的。在提及插入的核心原子和长度时，$-CH_2-$被认为具有一个插入原子的长度，$-CH_2CH_2-$被认为具有两个原子的长度，等等。

[0105] 示例性多元醇和多胺分别具有(基团)-$(OH)_q$和(基团)-$(NH_2)_q$结构，其中(基团)对应于含有机基团，并且q是从3至约50的正整数。注意如上所述，在式I中，变量"Q"在与R一起时典型地代表如本文所述的核心有机基团的残基。换言之，当描述多元醇、多硫醇和聚合物胺时，特别是通过名称，这些分子以其在掺入含多臂聚合物的结构之前的形式被引用(即，被称为它们的母体分子)。换言之，当描述优选的有机核心分子时，特别是通过名称，这些核心分子以其前体形式被描述，而不是以其在去除例如一个或多个质子后的基团形式描述。因此，例如，如果有机核心基团衍生自戊赤藓糖醇，前体多元醇具有结构$C(CH_2OH)_4$，并且该有机核心基团与Q一起对应于$C(CH_2O-)_4$，其中Q是O。因此，例如，对于式I的缀合物，其中R与Q一起是多元醇，戊赤藓糖醇$C(CH_2OH)_4$的残基，残基R与Q一起对应于"$C(CH_2O-)_4$"，使得多臂聚合物缀合物中"q"个聚合物臂的每个将从戊赤藓糖醇核心或残基的每个氧原子发出。

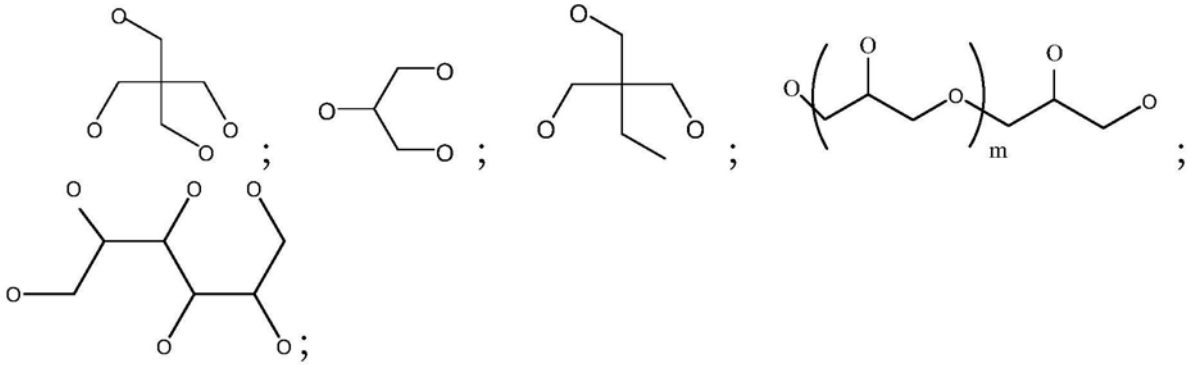
[0106] 说明性多元醇包括具有从1至10个碳原子和从3至10个羟基基团的脂肪族多元醇，包括例如三羟基烷类、四羟基烷类、多羟基烷基醚类、多羟基烷基聚醚类等。脂环族多元醇包括直链的或闭环的糖类以及糖醇类，例如甘露醇、山梨糖醇、肌醇、木糖醇、白雀木醇、苏糖醇、阿糖醇、赤藓糖醇、侧金盏花醇、卫矛醇、岩藻糖(facose)、核糖、阿拉伯糖、木糖、来苏糖、鼠李糖、半乳糖、葡萄糖、果糖、山梨糖、甘露糖、吡喃糖、阿卓糖、塔罗糖、塔格糖(tagitose)、吡喃糖苷、蔗糖、乳糖、麦芽糖以及类似物。脂肪族多元醇的另外的例子包括葡萄糖、核糖、甘露糖、半乳糖以及相关立体异构体的衍生物。也可以使用芳香族多元醇，例如1,1,1-三(4'-羟苯基)烷类，例如1,1,1-三(4-羟苯基)乙烷，2,6-双(羟烷基)甲酚以及类似物。可以使用的其他核心多元醇包括多羟基冠醚、环糊精、糊精以及其他碳水化合物(例如单糖、低聚糖以及多糖、淀粉以及淀粉酶)。

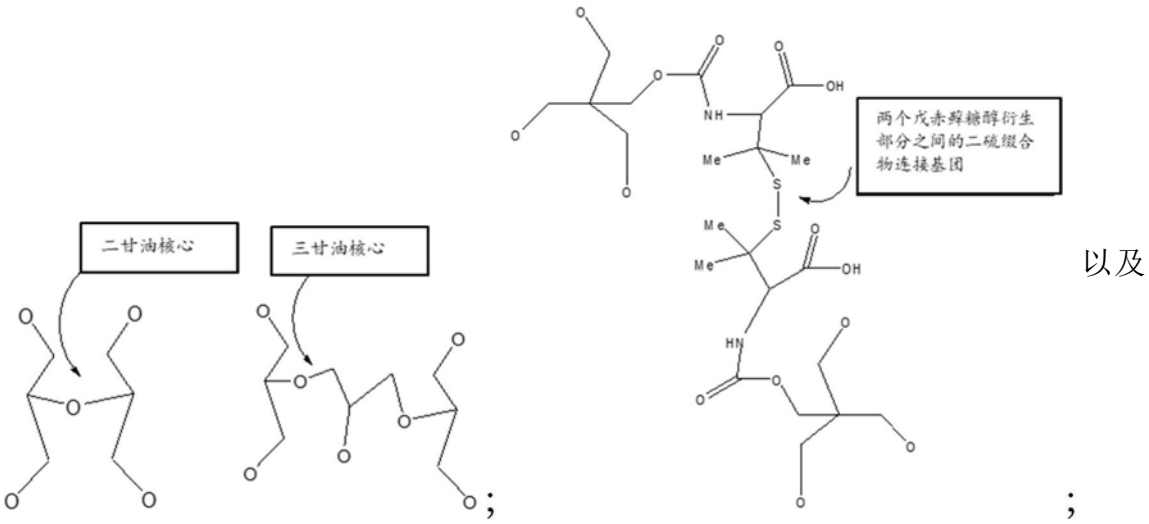
[0107] 示例性多元醇包括甘油、三羟甲基丙烷、季戊四醇、二季戊四醇、三季戊四醇，甘油、三羟甲基丙烷、季戊四醇、二季戊四醇、三季戊四醇的乙氧基化形式。而且还优选的是还

原糖类，例如山梨糖醇以及甘油低聚物，例如二甘油、三甘油、六甘油以及类似物。21臂的聚合物可以使用具有21个可用羟基基团的羟丙基-β-环糊精合成。此外，作为示例性多元醇还包括具有平均24个羟基基团的聚甘油。

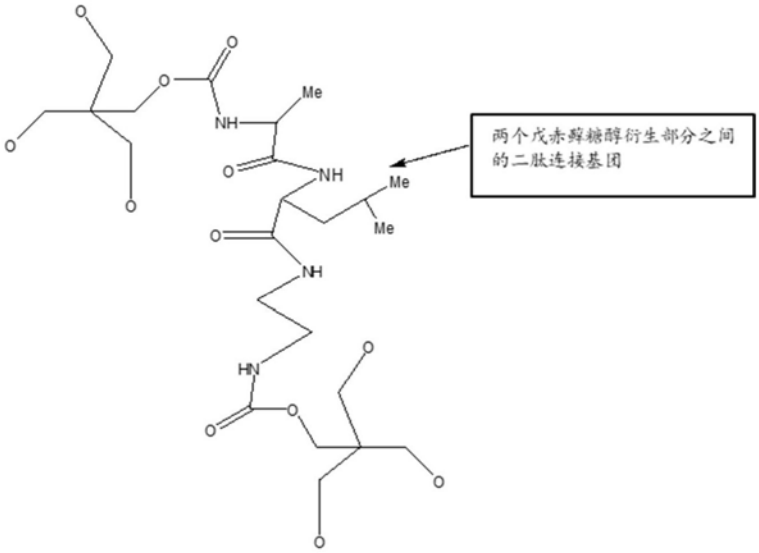
[0108] 示例性的聚胺包括脂肪族聚酰胺，例如二亚乙基三胺、N,N',N"-三甲基二亚乙基三胺、五甲基二亚乙基三胺、三亚乙基四胺、四亚乙基五胺、五亚乙基六胺、二亚丙基三胺、三亚丙基四胺、双-(3-氨基丙基)-胺、双-(3-氨基丙基)-甲胺、以及N,N-二甲基-二亚丙基三胺。可以使用的天然存在的多胺包括腐胺、亚精胺和精胺。用于使用的许多合适的五胺、四胺、寡胺以及戊烷脒类似物描述于Bacchi等人.(2002)Antimicrobial Agents and Chemotherapy[抗微生物剂和化学疗法],46(1):55-61中，将其通过引用并入本文中。

[0109] 以下提供了对应于多元醇残基的说明性结构(尽管每个结构用衍生自相应羟基基团的氧原子("O")描绘，每个"O"可以被硫("S")或NH取代以分别描绘多硫醇或多胺的相应的残基)。注意到以下示出的残基将根据具有式I的缀合物被理解为对应于R与Q一起，以提供如下所示具有对应于氧(或其他合适的杂原子)原子数目的多个臂的多臂聚合物缀合物。





以及



，

其中m是从0至40的正整数[例如，0-10，例如，0-5(即，0、1、2、3、4、5)]。水溶性非肽聚合物，“POLY”。

[0110] 这些多臂聚合物缀合物包含水溶性非肽聚合物。可以使用大量的聚合物，并且本文提供的结构关于水溶性聚合物的类型(例如，聚环氧乙烷或聚噁唑啉)或大小(例如，从2至4,000个单体大小)不受限制。

[0111] 关于类型，水溶性非肽聚合物被理解为一系列重复单体，其中一种或多种单体的类型决定了水溶性非肽聚合物的类型。示例性单体包括但不限于环氧烷，例如环氧乙烷或氧化丙烯；烯醇，例如乙烯醇、1-丙烯醇或2-丙烯醇；乙烯基吡咯烷酮；羟基烷基甲基丙烯酰胺和羟基烷基甲基丙烯酸酯，其中，在每种情况下，烷基优选地是甲基；α-羟酸，例如乳酸或乙醇酸；磷腈、噁唑啉、碳水化合物(如单糖)、糖醇(如甘露醇)；以及N-丙烯酰基吗啉。在一个或多个实施例中，水溶性非肽聚合物是选自该组的两种单体类型的共聚物，或更优选地是选自该组的一种单体类型的均聚物。关于包括嵌段共聚物的共聚物，共聚物中的两种单体类型可以是相同的单体类型，例如，两种环氧烷(如环氧乙烷和氧化丙烯)。

[0112] 关于大小，水溶性非肽聚合物可以相对小，或水溶性非肽聚合物可以相对大。

[0113] 关于POLY，换言之，关于在存在相对小的水溶性非肽聚合物的那些实施例中每个聚合物臂，分子量的示例性值包括：低于约2000；低于约1500；低于约1450；低于约1400；低于约1350；低于约1300；低于约1250；低于约1200；低于约1150；低于约1100；低于约1050；低于约1000；低于约950；低于约900；低于约850；低于约800；低于约750；低于约700；低于约650；低于约600；低于约550；低于约500；低于约450；低于约400；低于约350；低于约300；低于约250；低于约200；和低于约100道尔顿。相对小的水溶性非肽聚合物的示例性范围包括从约100至约1400道尔顿；从约100至约1200道尔顿；从约100至约800道尔顿；从约100至约500道尔顿；从约100至约400道尔顿；从约200至约500道尔顿；从约200至约400道尔顿；从约75至1000道尔顿；和从约75至约750道尔顿。

[0114] 对于相对小的水溶性非肽聚合物(“POLY”)，其中的单体数目将通常落在一个或多个以下的范围内：在1和约30(包括端值)之间；在约2和约25之间；在约2和约20之间；在约2和约15之间；在约2和约12之间；在约2和约10之间。在某些情况下，在聚合物(和相应的缀合

物)中串联的单体数目是1、2、3、4、5、6、7、或8个中的其中一个。在另外的实施例中,聚合物(和相应的缀合物)包含9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、或20个单体。在又另外的实施例中,每个聚合物"臂"中的聚合物部分(和相应的缀合物)具有串联的21、22、23、24、25、26、27、28、29或30个单体。因此,例如,当水溶性非肽聚合物臂包含-$(OCH_2CH_2)_n$-时,"n"是这样的整数,在一些实施例中,其选自1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29和30,并且可以落入以下范围中的一个或多个:在约1和约25之间;在约1和约20之间;在约1和约15之间;在约1和约12之间;在约1和约10之间。

[0115] 当缀合物中总的水溶性非肽聚合物的分子量是相对大的(例如,大于2,000道尔顿)时,总的分子量可以落入2,000道尔顿至约150,000道尔顿的范围内。然而,示例性范围包括以下分子量:在从约3,000道尔顿至约120,000道尔顿的范围;在从约5,000道尔顿至约110,000道尔顿的范围;在从大于5,000道尔顿至约100,000道尔顿的范围、在从约6,000道尔顿至约90,000道尔顿的范围、在从约10,000道尔顿至约85,000道尔顿的范围、在大于10,000道尔顿至约85,000道尔顿的范围、在从约20,000道尔顿至约85,000道尔顿的范围、在从约53,000道尔顿至约85,000道尔顿的范围、在从约25,000道尔顿至约120,000道尔顿的范围、在从约29,000道尔顿至约120,000道尔顿的范围、在从约35,000道尔顿至约120,000道尔顿的范围、以及在从约40,000道尔顿至约120,000道尔顿的范围。

[0116] 对于相对大的水溶性非肽聚合物的示例性分子量(关于式I中每个聚合物臂"POLY")包括约500道尔顿、约750道尔顿、约1,000道尔顿、约1500道尔顿、约2,000道尔顿、约2,200道尔顿、约2,500道尔顿、约3,000道尔顿、约4,000道尔顿、约4,400道尔顿、约4,500道尔顿、约5,000道尔顿、约5,500道尔顿、约6,000道尔顿、约7,000道尔顿、约7,500道尔顿、约8,000道尔顿、约9,000道尔顿、约10,000道尔顿、约11,000道尔顿、约12,000道尔顿、约13,000道尔顿、约14,000道尔顿、约15,000道尔顿、和约20,000道尔顿。

[0117] 对于相对大的水溶性非肽聚合物的示例性分子量(关于多臂缀合物的总聚合物部分)包括,例如,约20,000道尔顿、22,500道尔顿、约25,000道尔顿、约30,000道尔顿、约35,000道尔顿、约40,000道尔顿、约45,000道尔顿、约50,000道尔顿、约55,000道尔顿、约60,000道尔顿、约65,000道尔顿、约70,000道尔顿、和约75,000道尔顿。具有任何前述总分子量的水溶性非肽聚合物的支化形式也可用于每个聚合物臂中以提供多重支化的缀合物。

[0118] 因此,无论是使用相对小或相对大的水溶性非肽聚合物,当水溶性非肽聚合物是聚(环氧乙烷)时,聚合物将包含多个(OCH_2CH_2)单体[或(CH_2CH_2O)单体,取决于如何定义PEG]。如在整个说明书中所使用的,重复单元的数量由"$(OCH_2CH_2)_n$"中的下标"n"鉴别。因此,(n)的值典型地落在以下范围中的一个或多个内:从2至约3400、从约100至约2300、从约100至约2270、从约136至约2050、从约225至约1930、从约450至约1930、从约1200至约1930、从约568至约2727、从约660至约2730、从约795至约2730、从约795至约2730、从约909至约2730、和从约1,200至约1,900。对于已知分子量的任何给定聚合物,通过将聚合物的总重均分子量除以重复单体的分子量有可能确定重复单元的数目(即"n")。

[0119] 关于多臂水溶性非肽聚合物,这些聚合物通常包含三个或更多个可辨别的水溶性非肽聚合物臂或区段。除了其他优点之外,考虑到每个臂与TLR 7/8激动剂共价连接的能力,与例如具有与其附接的单一TLR 7/8激动剂的线性聚合物相比,多臂水溶性非肽类聚合物具有提供更大药物特性的潜力。含键联间隔基部分,"Xr"。

[0120] 根据式I,通常将POLY共价附接至TLR 7/8激动剂的含键联间隔基部分可以在生物学相关的pH下水解和/或酶促稳定或可释放。换言之,在一些实施例中,Xr是水解稳定的键联。在又一些其他的实施例中,Xr包含可释放的键联。

[0121] 如前所述,稳定的键联是在给予患者后在体内不明显裂解的键联。就此而言,稳定的键联对于本领域普通技术人员已知的。此外,可以通过实验(例如,通过向患者给予具有所提出的稳定键联的缀合物,并且例如通过色谱法或其他适合的技术对定期获得的用于指示裂解的血液样品进行测试)来测试给定的键联是否作为与本文提供的缀合物相关的稳定键联。

[0122] 在多臂缀合物的一些实施例中,含有间隔基部分的键联包含在TLR 7/8激动剂和水溶性非肽聚合物之间插入的可释放的键联。因此,可释放的键联是在给予患者后在体内裂解,从而从其聚合物臂释放TLR 7/8激动剂化合物(或其略微修饰的形式,例如,具有小分子标签)的键联。就此而言,可释放的键联对于本领域普通技术人员已知的。此外,可以通过实验(例如,通过向患者给予具有所提出的可释放键联的缀合物,并且例如通过色谱法或其他适合的技术对定期获得的用于指示裂解的血液样品进行测试)来测试与本文提供的多臂缀合物相关的给定的键联是否在自然界中是可释放的。在一些优选的实施例中,TLR 7/8激动剂的多臂聚合物缀合物包含可释放的键联,换言之,Xr包含可释放的键联。

[0123] 例如,在37℃下将缀合物样品与来自人的肝素化和汇集的血浆(pH 7.2-7.4)(并且在不同的时间点取样,其中样品被立即冷冻直至对样品进行分析和定量,例如,使用用于检测和定量的任何合适的技术(如LC-MS))孵育后在体外确定包含在TLR 7/8激动剂的多臂聚合物缀合物中的键联的可释放性质的评估。然后基于缀合物从其初始标称孵育浓度的转化仅归因于TLR 7/8激动剂释放的假设来计算表观转化半衰期($t_{1/2,app}$),其中$t_{1/2}$为约300小时或更少可以被认为表示可释放的键联或可释放的缀合物。

[0124] 与本文提供的缀合物相关的示例性可释放的键联可以包括而不限于酰胺、硫醚、氨基甲酸酯、酯、碳酸酯、脲和酶可裂解的肽键联,这取决于TLR 7/8激动剂化合物的结构和整体连接基团的结构。在一些情况下,当单独考虑时,键或键联通常不被认为是"可释放的"或可裂解的,然而,当与其共价附接的分子实体的结构(例如具有咪唑喹啉结构的TLR 7/8激动剂化合物)一起使用时,由于特定的释放机制(例如β-消除,酰胺水解等)这种键联可能是可释放的。例如,硫醚、酰胺、氨基甲酸酯、酯、碳酸酯、脲等可以通过β-消除反应或通过水解(具有或不具有酶促配位,例如酯可以作为可释放的键联而无论酯是否通过酯酶裂解)裂解。

[0125] 包含可释放的键联的TLR 7/8激动剂的多臂聚合物缀合物在释放导致未经修饰的母体分子的释放的情况下通常被归类为前药,因为在给予后(即,在生理条件下),它们释放共价附接的TLR 7/8激动剂化合物。通常,本文所述的具体的多臂聚合物瑞喹莫德缀合物包含与瑞喹莫德的可释放的键联。

[0126] 关于酶可裂解的肽键联,间隔基部分可以包括已知作为针对预期患者群体中存在的酶的底物的一系列氨基酸中的一种或多种。通过这种方式,在向患者给予后,包含在缀合物中的酶可裂解肽键联的酶促诱导的裂解将释放TLR 7/8激动剂(或具有由裂解产生的相对小的分子片段或"标签"的TLR 7/8激动剂)。在给定患者群体中经历酶促裂解的肽键联的实例描述于例如在美国专利申请公开号US 2005/0079155中,并且还可以通过实验确定。

[0127] 关于Xr，含键联间隔基部分可以包含许多示例性氨基酸中的任一种，例如β-丙氨酸、甘氨酸、L-丙氨酸、L-缬氨酸、亮氨酸、二甲基甘氨酸等。在一些实施例中，Xr包含羧甲基基团-$CH_2C(O)-$，其通过其氨基基团与任何一种或多种前述氨基酸共价附接，其中其末端羧基基团共价附接至TLR 7/8激动剂的氨基基团以提供酰胺键联，在一些实施例中，该激动剂是可释放的。

[0128] 在一些实施例中，含键联间隔基部分，“Xr”与式II一致：

$$\sim[X^1]_a-[Lr]_b-X^2\sim$$

(式II)

其中“a”是0或1(因此0表示“X^1”不存在，并且1表示“X^1”存在)；“b”是0或1(因此0表示“Lr”不存在，并且1表示“Lr”存在)；当存在时，X^1是间隔基；当存在时，Lr是键联；并且X^2是直接共价附接于TLR 7/8激动剂的官能团。

[0129] 在其中a和b均是0的式II的那些情况下，将理解含键联间隔基由X^2组成，该X^2是将TLR 7/8激动剂共价附接至多臂聚合物的剩余部分(例如，附接至聚合物臂，POLY)的官能团。在这种情况下，含键联间隔基仅含有官能团X^2，并且在TLR 7/8激动剂和水溶性非肽聚合物之间不存在其他原子。通常，X^2包含未经修饰的TLR 7/8激动剂的一个或多个原子，多臂聚合物的剩余部分与所述原子共价附接。例如，如果附接发生在TLR 7/8激动剂的氨基基团处，通常该氨基基团形成X^2的一部分。

[0130] 在式II的那些实例(其中a和b中的任一者或两者是1)中，将理解除了构成X^2的那些原子之外，含键联间隔基包含一个或多个另外的原子。非限制性示例性X^1和Lr，当从左到右或从右到左考虑时，包括-O-、-NH-、-S-、-C(O)-、-C(O)O-、-OC(O)-、-CH_2-C(O)O-、-CH_2-OC(O)-、-C(O)O-CH_2-、-OC(O)-CH_2-、C(O)-NH、NH-C(O)-NH、O-C(O)-NH、-C(S)-、-CH_2-、-CH_2-CH_2-、-CH_2-CH_2-CH_2-、-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-、-O-CH_2-、-CH_2-O-、-O-CH_2-CH_2-、-CH_2-O-CH_2-、-CH_2-CH_2-O-、-O-CH_2-CH_2-CH_2-、-CH_2-O-CH_2-CH_2-、-CH_2-CH_2-O-CH_2-、-CH_2-CH_2-CH_2-O-、-O-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-、-CH_2-O-CH_2-CH_2-CH_2-、-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-、-CH_2-CH_2-CH_2-O-CH_2-、-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-O-、-C(O)-NH-CH_2-、-C(O)-NH-CH_2-CH_2-、-CH_2-C(O)-NH-CH_2-、-CH_2-CH_2-C(O)-NH-、-C(O)-NH-CH_2-CH_2-CH_2-、-CH_2-C(O)-NH-CH_2-CH_2-、-CH_2-CH_2-C(O)-NH-CH_2-、-CH_2-CH_2-CH_2-C(O)-NH-、-C(O)-NH-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-、-CH_2-C(O)-NH-CH_2-CH_2-CH_2-、-CH_2-CH_2-C(O)-NH-CH_2-CH_2-、-CH_2-CH_2-CH_2-C(O)-NH-CH_2-、-CH_2-CH_2-CH_2-C(O)-NH-CH_2-CH_2-、-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-C(O)-NH-、-NH-C(O)-CH_2-、-CH_2-NH-C(O)-CH_2-、-CH_2-CH_2-NH-C(O)-CH_2-、-NH-C(O)-CH_2-CH_2-、-CH_2-NH-C(O)-CH_2-CH_2、-CH_2-CH_2-NH-C(O)-CH_2-CH_2、-C(O)-NH-CH_2-、-C(O)-NH-CH_2-CH_2-、-O-C(O)-NH-CH_2-、-O-C(O)-NH-CH_2-CH_2-、-NH-CH_2-、-NH-CH_2-CH_2-、-CH_2-NH-CH_2-、-CH_2-CH_2-NH-CH_2-、-C(O)-CH_2-、-C(O)-CH_2-CH_2-、-CH_2-C(O)-CH_2-、-CH_2-CH_2-C(O)-CH_2-、-CH_2-CH_2-C(O)-CH_2-CH_2-、-CH_2-CH_2-C(O)-、-CH_2-CH_2-CH_2-C(O)-NH-CH_2-CH_2-NH-、-CH_2-CH_2-CH_2-C(O)-NH-CH_2-CH_2-NH-C(O)-CH_2-、二价环烷基基团、-N(R^6)-，其中R^6是H或选自下组的有机基团，该组由以下组成：烷基、被取代的烷基、烯基、被取代的烯基、炔基、被取代的炔基、芳基和被取代的芳基，以及一个或多个前述的组合。另外的间隔基和键联包括酰基氨基、酰基、芳氧基、含有在1和5(包括端值)之间的碳原子的亚烷基桥、烷基氨基、具有约2至4(包括端值)个的碳原子的二烷基氨基、哌啶基、吡咯烷基、N-(低级烷基)-2-哌啶基、吗啉基、1-哌嗪基、4-(低级烷基)-1-哌嗪基、4-(羟基-低级

烷基)-1-哌嗪基、4-(甲氧基-低级烷基)-1-哌嗪基、芴基、和胍。出于本发明说明书的目的，然而，原子团当与聚合物区段紧邻时不被认为是间隔基，并且该原子团与聚合物的单体是相同的，使得该基团将仅仅代表该聚合物链的一个延伸。

[0131] 当存在时，间隔基和/或键联在性质上典型地是但并非必需是直链的。另外，间隔基和/或键联典型地是但并非必需是水解稳定的和/或是酶稳定的。在一个或多个实施例中，当存在时，间隔基或键联具有小于约12个原子(例如，小于约10个原子、小于约8个原子、和小于约5个原子)的链长度。关于确定特定的间隔基或键联的长度，本文的长度被定义为单链中的原子数，不包括取代基。例如，脲键联，例如这种R-POLY-NH-(C=O)-NH-TLR 7/8激动剂，被认为具有三个原子(-NH-C(O)-NH-)的链长度。

[0132] 关于式II，当存在时，X^1的具体的实例包括-CH_2C(O)-(在本文中被称为羧基甲基)。

[0133] X^2的实例包括-C(O)-NH-(其中NH是附接至TLR 7/8激动剂的连接点，并且在共价附接之前形成未经修饰的TLR激动剂的一部分)；-NH-C(O)-NH-(其中NH是附接至TLR 7/8激动剂的连接点并且在共价附接之前形成未经修饰的TLR激动剂的一部分)；-NH-C(O)(其中羰基碳代表附接至TLR 7/8激动剂的连接点并且在共价附接之前形成未经修饰的TLR激动剂的一部分)，和-NH(其中氮原子代表附接至TLR 7/8激动剂的连接点并且在共价附接之前形成未经修饰的TLR激动剂的一部分)。

[0134] Lr的实例包括-$(CR_xR_y)_z$-和-NH$(CR_xR_y)_z$-，其中每个R_x和R_y独立地选自氢、低级烷基、卤素(X)，和卤素取代的低级烷基，并且z是从1至6的整数(例如，选自1、2、3、4、5、和6)。低级烷基的实例包括甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、异丁基、仲丁基，戊基和己基；示例性卤素基团是氟、氯、溴、碘。说明性Lr基团包括，例如，-CH_2-、-CH_2CH_2-、-$CH_2CH_2CH_2$-、-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-、-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-、-$CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-、-CH_2CHF-、-$CHCH_3$-、-$CHCH(CH_3)_2$-、-$CHCH_2CH(CH_3)_2$-、-$C(CH_3)_2$-、-$NHCH_2$-、-$NHCH_2CH_2$-、-$NHCH_2CH_2CH_2$-、-$NHCH_2CH_2CH_2CH_2$-、-$NHCH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-、-$NHCH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2$-、-$NHCH_2CHF$-、-$NHCHCH_3$-、-$NHCHCH(CH_3)_2$-、-$NHCHCH_2CH(CH_3)_2$-和-$NHC(CH_3)_2$-。本文提供了另外的结构。

TLR 7/8激动剂

[0135] 现在转向包含在本文所述的多臂聚合物缀合物中的TLR 7/8激动剂，TLR 7/8激动剂是作为Toll样受体7和/或Toll样受体8的激动剂的任何化合物。优选地，TLR 7/8激动剂是小分子激动剂。说明性结构分类包括含鸟苷的化合物和咪唑喹啉。

[0136] 说明性TLR 7/8激动剂化合物包括例如，3M-052(MEDI-9797)、R848(S-28463)、R837(S-26308)、S-28690、3M-001(852A、PF-4878691、TMX-101)、GS-9620)、ANA-773、AZD8848、CL097、CL057(3M-002)、3M-003、TMX-202、TMX-302、TMX-306、IV136、IV209、3M-011、SM-276001、SM-324405、SM-324405、SM-360320、PF-4171455、CpG、CpR、ssRNA、BHMA、SM-324405、AZ12441970、和AZ12443988。

[0137] 例如，TLR 7/8激动剂可以选自以下：4-((6-氨基-8-羟基-2-(2-甲氧基乙氧基)-9H-嘌呤-9-基)-甲基)-N-(20-叠氮基-3,6,9,12,15,18-六氧杂二十烷基)苯甲酰胺；3-(1-(1-(4-((6-氨基-8-羟基-2-(2-甲氧基乙氧基)-9H-嘌呤-9-基)甲基)苯基)-1-氧代-5,8,11,14,17,20-六氧杂-2-氮杂二十二碳-22-基)-1H-1,2,3-三唑-4-基)丙酸；4-((6-氨基-8-羟基-2-(2-甲氧基乙氧基)-9H-嘌呤-9-基)-甲基)-N-(20-氨基-3,6,9,12,15,18-六氧杂二十烷基)苯甲酰胺；4-((6-氨基-8-羟基-2-(2-甲氧基乙氧基)-9H-嘌呤-9-基)甲基)-

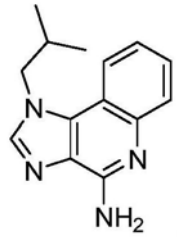
N-(32-叠氮基-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30-十氧杂-基)甲基)-N-(32-叠氮基-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30-十氧杂三十二基)苯甲酰胺;3-(1-(1-(4-((6-氨基-8-羟基-2-(2-甲氧基乙氧基)-9H-3-(1-(1-(4-((6-氨基-8-羟基-2-(2-甲氧基乙氧基)-9H嘌呤-9-基)甲基)苯基)-1-氧代-5,8,11,14,17,20,23,26,29,32-十氧杂-2-氮杂三十四烷醇-34-基)-1H-1,2,3-三唑-4-基)-丙酸;4-((6-氨基-8-羟基-2-(2-甲氧基乙氧基)-9H-嘌呤-9-基)甲基)-N-(32-氨基-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30-十氧杂三十二基)-苯甲酰胺;4-((6-氨基-8-羟基-2-(2-甲氧基乙氧基)-9H-嘌呤-9-基)甲基)-N-(59-氨基-3,6,9,12,15,18,21,24,27,30,33,36,39,42,45,48,51,54,57-十九氧杂五十九基)苯甲酰胺;{N-[4-(4-氨基-2-乙基-1H-咪唑并[4,5c]喹啉-1-基)丁基]甲烷磺酰胺};[8-(3-(吡咯烷-1-基甲基)苄基)-4-氨基-2-丁氧基-7,8-二氢蝶啶-6(5H)-酮];[2-(4-((6-氨基-2-(2-甲氧基乙氧基)-8-氧代-7H-嘌呤-9(8H)-基)甲基)苯甲酰胺基)乙基2,3-双(十二酰基氧基)丙基磷酸盐];[1-(4-((6-氨基-2-(2-甲氧基乙氧基)-8-氧代-7H-嘌呤-9(8H)-基)甲基)苯基)-1-氧代-5,8,11,14,17,20-六氧杂-2-氮杂二十三烷-23-酸];[9-苄基-8-羟基-2-(2-甲氧基乙氧基)腺嘌呤;甲基2-(3-{[6-氨基-2-丁氧基-8-氧代-7H-嘌呤-9(8H)-基]甲基}苯基)乙酸酯,SM-324406:2-(3-{[6-氨基-2-丁氧基-8-氧代-7H-嘌呤-9(8H)-基]甲基}苯基)乙酸;甲基2-(3-(((3-(6-氨基-2-丁氧基-8-氧代-7H-嘌呤-9(8H)-基)丙基)(3-(二甲基氨基)丙基)氨基)苯基)乙酸酯;和2-(3-(((3-(6-氨基-2-丁氧基-8-氧代-7H-嘌呤-9(8H)-基)丙基)(3-(二甲基氨基)丙基)氨基)苯基)。

[0138] 在TLR 7/8激动剂的多臂聚合物缀合物的一些具体的实施例中,该TLR 7/8激动剂是3M-052(MEDI-9797)、R848(S-28463)、R837(S-26308)、S-28690、3M-001(852A,PF-4878691)、TMX-101、GS-9620、ANA-773、AZD8848、CL097、SM-324405、AZ12441970、GSK2245053、SZ-101、4-[6-氨基-8-羟基-2-(2-甲氧基乙氧基)嘌呤-9-基甲基]苯甲醛(UC-1V150)、9-苄基-8-羟基-2-(2-甲氧基乙氧基)腺嘌呤(SM360320,1V136)、VTX-1463和VTX-2337。在又一些其他的实施例中,TLR 7/8激动剂是(N-[4-(4-氨基-2-乙基-1H-咪唑并[4,5c]喹啉-1-基)丁基]甲烷磺酰胺或[8-(3-(吡咯烷-1-基甲基)苄基)-4-氨基-2-丁氧基-7,8-二氢蝶啶-6(5H)-酮]。

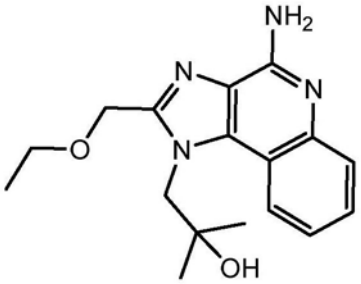
[0139] 在某些优选的实施例中,TLR 7/8激动剂是咪唑喹啉化合物。说明性咪唑喹啉包括例如,1-取代的、2-取代的1H-咪唑并[4,5-c]-喹啉-4-胺化合物,如在美国专利号5,389,640中所述。此类化合物包括4-氨基-7-氯-α,α-二甲基-2-乙氧基甲基-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-1-乙醇;4-氨基-α,α-二甲基-2-羟甲基-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-1-乙醇;4-氨基-α,α-二甲基-2-甲氧基甲基-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-1-乙醇;2-乙氧基甲基-1-(3-甲氧基丙基)-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-4-胺;和1-(2-甲氧基乙基)-2-甲氧基甲基-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-4-胺。

[0140] 在一个或多个优选的实施例中,TLR 7/8激动剂是瑞喹莫德(R-848)或咪喹莫特(1-异丁基-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-4-胺)或其衍生物。

[0141] 在一个或多个具体的实施例中,TLR 7/8激动剂是咪喹莫特,



[0142] 在又某些其他具体的实施例中,TLR 7/8激动剂是瑞喹莫德,



R-848

[0143] TLR 7/8激动剂与多臂聚合物的共价附接可以通过附接至TLR 7/8激动剂化合物上的任何合适的官能团或原子来发生。适合于附接至多臂聚合物的说明性官能团包括氨基、羟基、羧基、和硫醇等。在某些优选的实施例中,与咪喹莫特的共价附接在芳族-NH_2基团上发生。在其他优选的实施例中,与瑞喹莫德的共价附接在芳族-NH_2基团上发生。以下提供示例性结构。

用于合成缀合物的方法.

[0144] 本文所述的缀合物可以按多种方法制备,并且在以下实例中提供了示例性合成。

[0145] 在一个实例中,通过以下方法制备这些缀合物,该方法包括将多臂水溶性非肽反应性聚合物共价附接至TLR 7/8激动剂。许多TLR 7/8激动剂可以商购获得或通过本领域技术人员已知的方法合成。

[0146] 关于反应性多臂水溶性非肽聚合物,此类聚合物可以按携带一个或多个反应性基团的形式商购获得,从而提供适合共价附接TLR 7/8激动剂的试剂;或可以如PCT公开号WO 2011/063156中所述通过烷氧基化直接合成。以该形式,水溶性非肽聚合物通常被称为聚合物试剂或被活化的聚合物。

[0147] 作为实例,多种适合的多元醇核心材料中的任何一种可以购自化学品供应商(例如奥德里奇公司(Aldrich)(圣路易斯,密苏里州))。该多元醇的末端羟基首先使用例如强碱被转化成它们的阴离子形式以提供适合于引发聚合反应的位置,之后是单体亚单元(例如氧化乙烯)到该核心上的直接聚合。允许链构建持续,直到在每个臂中达到所需长度的聚合物链,随后终止反应(例如通过猝灭),和任选地引入合适的反应性基团。

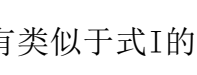
[0148] 在可替代的方法中,活化的多臂聚合物前体可以通过以下方式合成制备:首先提供所需的多元醇核心材料,并使该多元醇在合适的条件下与所需长度的杂双官能PEG甲磺酸酯反应,其中非甲磺酸酯PEG末端被任选地保护以防止与该多元醇核心反应。如果需要,在脱保护后,然后所得多臂聚合物前体适合于另外的转化或直接偶联至TLR 7/8激动剂。

[0149] 此类聚合物试剂的商品供应商包括西格玛奥德里奇公司(Sigma-Aldrich)(圣路

易斯,密苏里州)、创意PEG工厂(Creative PEGWorks)(温斯顿-塞勒姆,北卡罗莱纳州,美国)、尚柏生物PEG商店(SunBio PEG-Shop)(美国尚柏生物(SunBio USA),奥林达,加利福尼亚州)、美国JenKem技术公司(JenKem Technology USA)(艾伦(Allen)得克萨斯州)、和NOF美国公司(白原市,纽约州)(参见,例如,具有4或8个聚合物臂的多臂聚合物的SUNBRIGHT系列,或从多元醇核心延伸的3或4个聚合物臂的分支聚合物系列)。使用常规实验,本领域普通技术人员可以鉴定具有大小、构架和反应性基团等的多臂聚合物试剂,用于制备主题TLR7/8激动剂缀合物。

[0150] 例如,可以制备一系列缀合物,其中该系列中的每个成员在特征方面不同(例如,水溶性非肽聚合物的大小、反应性基团的类型、键联释放的能力等),并然后将系列中的一个成员给予患者,随后对血样和/或尿样定期检测和定量(例如,使用色谱技术)。按与初始患者类似的方式给予和量化该系列的每个成员。一旦测试了这些系列中的每个成员,就可以检查结果以确定哪个或哪些特征提供具有所需一种或多种效果的缀合物。

[0151] 在缀合条件下,将聚合物试剂共价附接至TLR 7/8激动剂,该条件包括在允许多臂聚合物试剂的反应性基团共价附接至TLR 7/8激动剂上的反应性基团的温度、pH、时间和溶剂的条件下将TLR 7/8激动剂与聚合物试剂(通常相对于TLR 7/8激动剂的摩尔过量的多臂聚合物试剂)组合。在一个或多个具体的实施例中,反应性基团是反应性氨基基团。

[0152] 示例性聚合物试剂将具有类似于式I的结构,例如,,其中Y代表式I中的Xr,除了Y以有效与TLR 7/8激动剂的反应性基团或原子反应的官能团终止,以提供与TLR 7/8激动剂化合物的最终的共价附接。例如,关于式II,Y类似于～$[X^1]_a$-$[Lr]_b$-X^2～,除了不包含X^2而是直接共价附接至TLR 7/8激动剂,Y具有根据式II'的结构,～$[X^1]_a$-$[Lr]_b$-X^{pre-2}～,其中每个变量是如以上针对式II所述,除了X^{pre-2}之外,其代表适合于与TLR 7/8激动剂的反应性基团或原子(即,X^2基团前体)反应的反应性基团,使得与TLR 7/8激动剂偶联导致共价的键联,X^2。

[0153] 在一些实施例中,选择多臂聚合物试剂,使得(i)聚合物试剂的一个或多个反应性基团在TLR 7/8激动剂的反应性基团处形成共价附接;和(ii)聚合物试剂包括可释放的键联(即,在共价附接至TLR 7/8激动剂之前)或导致可释放的键联(例如,在多臂聚合物试剂与TLR 7/8激动剂共价附接后)的形成。

[0154] 在又一些其他的实施例中,选择多臂聚合物试剂,使得(i)聚合物试剂的反应性基团在TLR 7/8激动剂的反应性基团处形成共价附接;和(ii)聚合物试剂包含稳定的键联(例如,在共价附接至TLR 7/8激动剂之前)或导致稳定的键联(例如,在共价附接至TLR 7/8激动剂后)的形成。

[0155] 用于形成与小分子(如TLR 7/8激动剂,例如,X^{pre-2})共价附接的说明性反应性基团包括N-琥珀酰亚胺基碳酸酯、胺、酰肼、琥珀酰亚胺基丙酸酯、琥珀酰亚胺基丁酸酯、琥珀酰亚胺基琥珀酸酯、琥珀酰亚胺基酯、苯并三唑碳酸酯、缩水甘油醚、氧基羰基咪唑、对硝基苯基碳酸酯、醛、马来酰亚胺、正吡啶基-二硫化物、丙烯酰基、乙烯基砜等。在一个或多个实施例中,X^{pre-2}是羧基或是经活化的酯。

[0156] 在一些示例性实施例中,在其每个聚合物臂的末端处具有经活化的羧基甲基基团(例如,羧甲基基团的NHS酯)的多臂聚合物试剂共价附接至氨基酸(例如,β-丙氨酸、甘氨

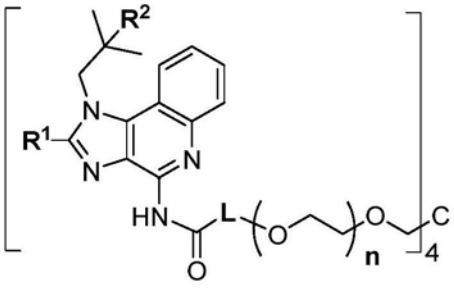
酸、L-丙氨酸、L-缬氨酸、亮氨酸、二甲基甘氨酸等)以提供适合于偶联如本文所述的TLR 7/8激动剂的经活化的多臂聚合物试剂。

[0157] 基于本文提供的披露内容和在相关文献的背景下,携带反应性基团的给定聚合物试剂和TLR 7/8激动剂上的反应性基团之间的示例性缀合条件对于本领域的普通技术人员将是已知的。参见,例如,Poly(ethylene glycol)Chemistry and Biological Applications[聚(乙二醇)化学和生物学应用],American Chemical Society[美国化学学会],华盛顿(Washington,DC)(1997)。在所附的支持实例中提供了用于制备主题多臂聚合物缀合物的代表性详细的实例。参见,例如,实例1-16。

[0158] TLR 7/8激动剂的多臂聚合物缀合物的某些特征是优选的,并且如下所述的这些特征中的每一个在组合中将被单独和明确地考虑。在一些优选的实施例中,从中心核心中发出的每个聚合物臂是相同的。换言之,例如,关于从R发出的式I,每个Q、POLY、Xr和TLR 7/8激动剂是相同的。在某些优选的实施例中,q是4。在其他优选的实施例中,多臂聚合物缀合物包含戊赤藓糖醇核心。在又一些另外的实施例中,TLR 7/8激动剂是瑞喹莫德。在又一些另外的实施例中,POLY是聚乙二醇,并且POLY-Xr包含$-CH_2-C(O)-$氨基酸-,其中氨基酸选自β-丙氨酸、甘氨酸、L-丙氨酸、L-缬氨酸、亮氨酸、$H_2NCH_2CHFCOOH$、和二甲基甘氨酸,并且氨基酸的氨基基团直接附接至羰基基团。在前述的又一些另外的实施例中,氨基酸是甘氨酸。在又一些另外的实施例中,多臂聚合物缀合物是化合物6。

示例性缀合物

[0159] 以下提供具有如上所述特征的代表性缀合物。例如,缀合物可以具有如由式III所定义的结构:



(式 III)

或药学上可接受的盐或其立体异构体,其中L是$-(CH_2)_m-$、$-(CH_2)_m-NH-C(O)-(CH_2)_m-$、$-CHF-(CH_2)_m-NH-C(O)-(CH_2)_m-$、$-CH(CH_3)-NH-C(O)-(CH_2)_m-$、$-(CH_2)_m-CH(CH(CH_3)_2)-NH-C(O)-(CH_2)_m-$、$-(CH_2)_m-CH(CH_2CH(CH_3)_2)-NH-C(O)-(CH_2)_m-$、$-C(CH_3)_2-NH-C(O)-(CH_2)_m-$、单键、或$-NH-(CH_2)_m-$;每个m独立地是从1至5(包括端值)的整数;每个n独立地是从40至350(包括端值)的整数;R^1是氢或$-CH_2-O-CH_2-CH_3$;并且R^2是氢或羟基。

[0160] 在式III的具体的缀合物中,L选自例如,$-CH_2-$、$-CH_2-CH_2-NH-C(O)-CH_2-$、$-CH_2-CH_2-CH_2-$、$-CHF-CH_2-NH-C(O)-CH_2-$、$-CH_2-NH-C(O)-CH_2$、$-CH(CH_3)-NH-C(O)-CH_2-$、$-CH_2-CH(CH(CH_3)_2)-NH-C(O)-CH_2-$、$-CH_2-CH(CH_2CH(CH_3)_2)-NH-C(O)-CH_2-$、$-C(CH_3)_2-NH-C(O)-CH_2-$、单键、和$-NH-CH_2-CH_2-$。

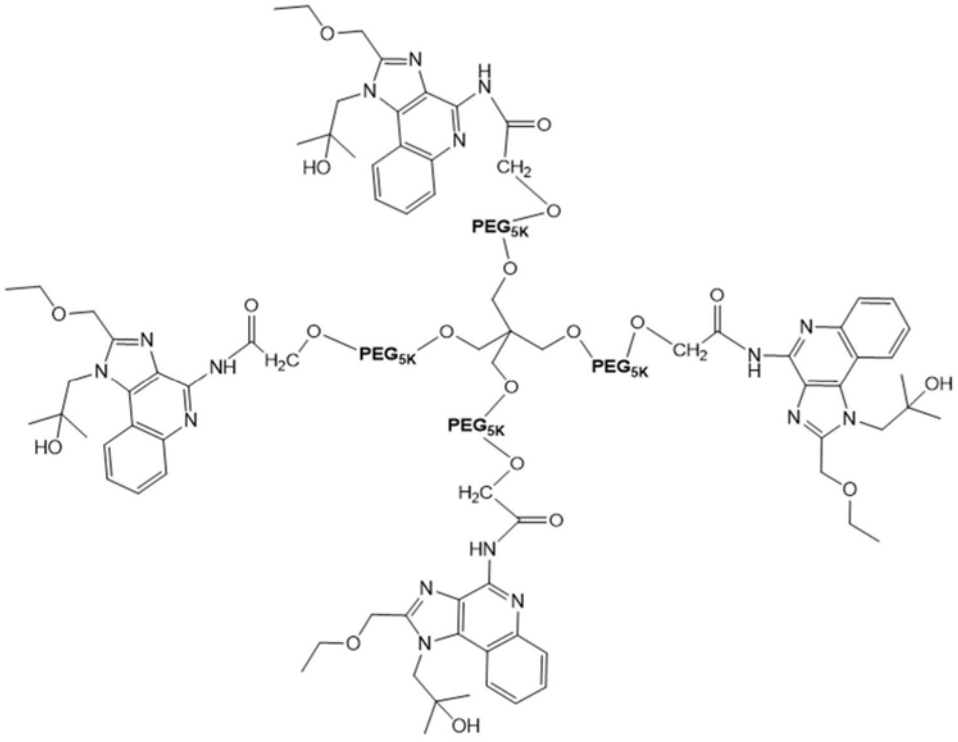
[0161] 式III的一些具体的实施例如下。

[0162] 例如,在一些实施例中,每个n独立地是从100至250(包括端值)的整数。

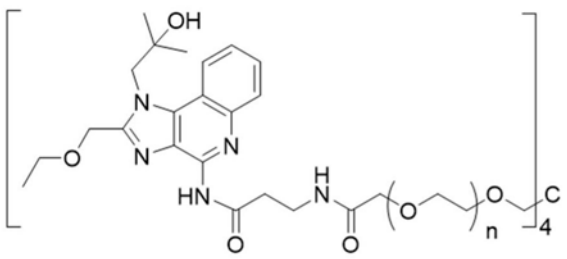
[0163] 在式III的一些缀合物中，R^1是氢，并且R^2是氢。

[0164] 在又另外的式III的缀合物中，R^1是$-CH_2-O-CH_2-CH_3$，并且R^2是羟基。

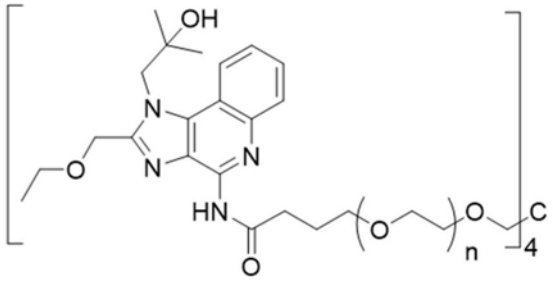
[0165] 具体的多臂缀合物具有如下结构。换言之，在一些实施例中，多臂聚合物缀合物具有化合物1-10或12-16中任一个的结构：



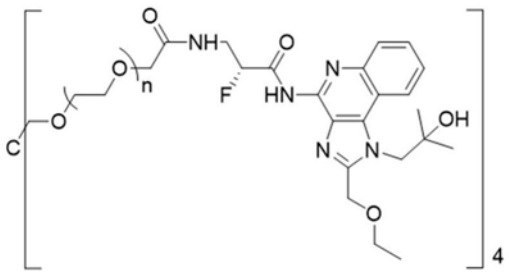
化合物1



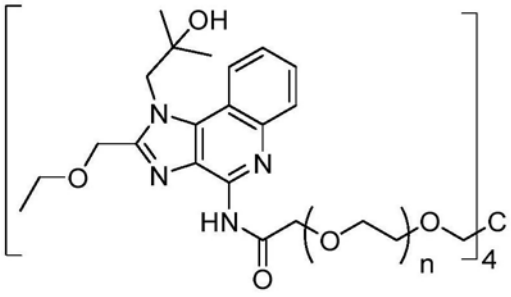
化合物2



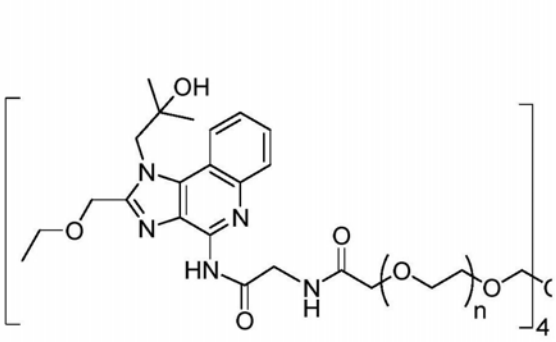
化合物3



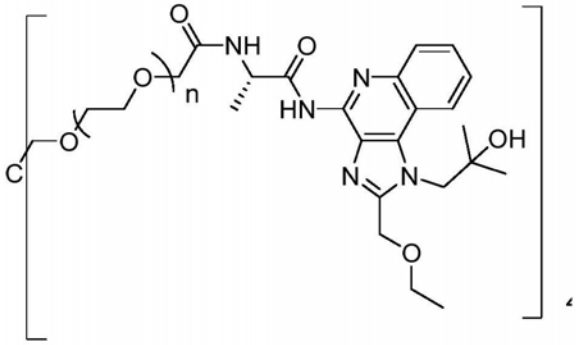
化合物4



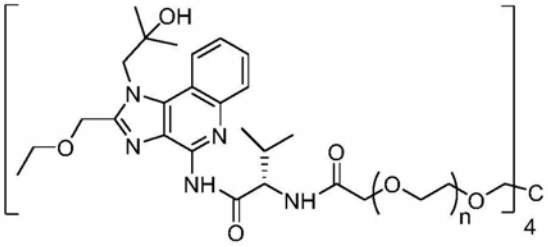
化合物 5



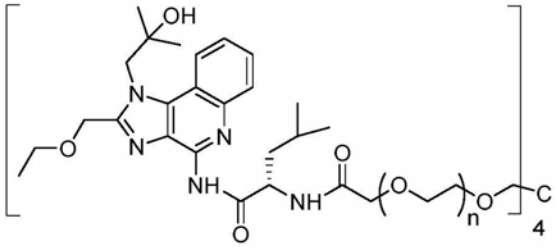
化合物 6



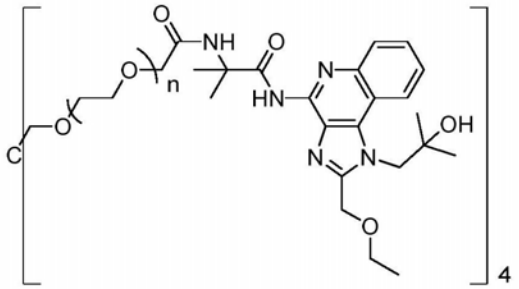
化合物 7



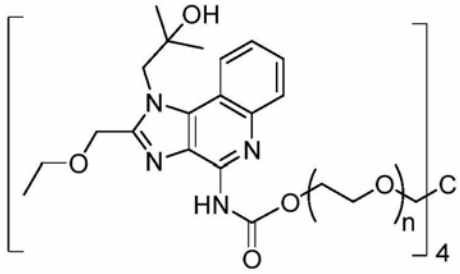
化合物 8



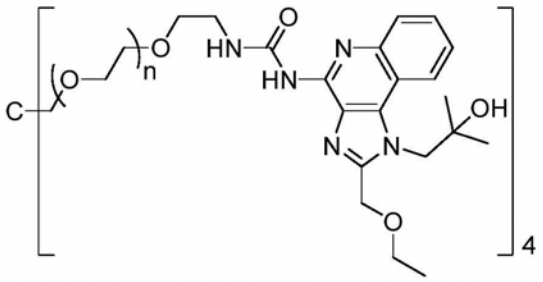
化合物 9



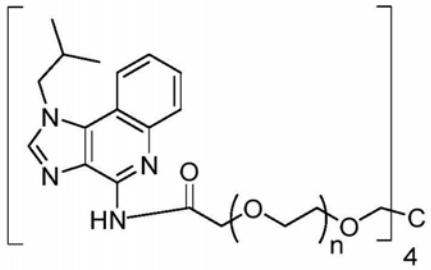
化合物 10



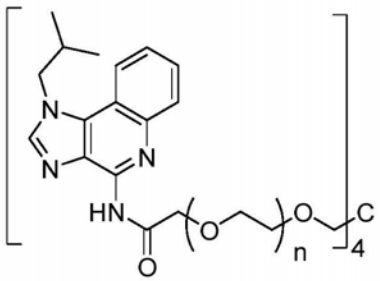
化合物 12



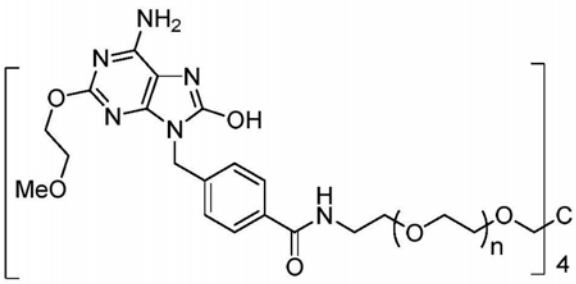
化合物 13



化合物 14



化合物 15



化合物 16

或其药学上可接受的盐或立体异构体。

[0166] 在一些实施例中,由于不完全化学转化(即,与TLR 7/8激动剂共价偶联),在化学

合成期间常规遇到产率小于100％和/或其他不可避免的并发情况，包含多臂聚合物缀合物的示例性组合物将包含少于理想数目的附接至“q”个聚合物臂中每一个的TLR 7/8激动剂化合物。这种数字通常被称为聚合物负载量的程度，其中100％负载量代表完全负载量，使得TLR 7/8激动剂化合物与“q”个聚合物臂的每个的末端共价附接。例如，可以将示例性“4-臂-PEG”缀合物表征为包含四-臂缀合物的混合物，其中组合物中四-臂缀合物的至少50面积％(a/a，如通过HPLC测量)具有四个臂中的每一个与TLR 7/8激动剂缀合。包含示例性“4-臂-PEG”缀合物的另外的示例性组合物可以被表征为包含四-臂缀合物的组合物，其中组合物中四-臂缀合物的至少65％-90％、70％-85％、或70％-75％面积％(a/a，如通过HPLC测量)具有四个臂中的每一个与TLR 7/8激动剂缀合。

组合物

[0167] 可以给予缀合物本身或按药学上可接受的盐形式给予，并且对本文中任何一种或多种多臂聚合物缀合物的任何引用旨在包括药学上可接受的盐。如果使用，如本文所述的缀合物的盐应该是药理学上和药学上均可接受的。可以通过使用文献中详细描述的标准方法，将缀合物与有机或无机酸反应来制备此类药理学上和药学上可接受的盐。有用的盐的实例包括但不限于由以下酸制备的那些盐：盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸、磷酸、马来酸、乙酸、水杨酸、对甲苯磺酸、酒石酸、柠檬酸、甲磺酸、甲酸、丙二酸、琥珀酸、萘-2-磺酸和苯磺酸、三氟乙酸等。同样，药学上可接受的盐可以作为碱金属或碱土金属盐来制备，如羧酸基团的钠、钾、或钙盐。

[0168] 缀合物，并且特别是缀合物的TLR 7/8激动剂部分，可含有一个或多个手性中心。对于其中包含的每个手性中心，本发明的化合物和结构旨在涵盖每种光学异构体以及光学活性形式的任何组合或比率，或例如单一光学活性对映异构体，或对映异构体的任何组合或比率(例如，非消旋(scalemic)和外消旋混合物)。另外，小分子药物可具有一种或多种几何异构形式，并且认为各自包括在本文中。关于几何异构体，缀合物可以包含单一几何异构体或两种或更多种几何异构体的混合物，但优选的是具体的多臂聚合物缀合物结构内的单一几何异构体。

[0169] 本文还提供了药物制剂，这些药物制剂包含与药物赋形剂组合的如本文提供的TLR 7/8激动剂的多臂聚合物缀合物。总的来说，该缀合物本身将处于固体形式(例如，沉淀物)，它能够与可以处于固体或液体形式的适合的药物赋形剂相结合。

[0170] 示例性赋形剂包括但不限于先祖下组的那些，该组由以下组成：碳水化合物、无机盐、抗微生物剂、抗氧化剂、表面活性剂、缓冲剂、酸、碱以及其组合。

[0171] 碳水化合物，诸如糖、衍生化糖(诸如糖醇、醛糖酸、酯化糖和/或糖聚合物)，可以作为赋形剂存在。具体的碳水化合物赋形剂包括，例如：单糖，诸如果糖、麦芽糖、半乳糖、葡萄糖、D-甘露糖、山梨糖等；二糖，诸如乳糖、蔗糖、海藻糖、纤维二糖等；多糖，诸如棉子糖、松三糖、麦芽糖糊精、葡聚糖、淀粉等；以及糖醇，诸如甘露糖醇、麦芽糖醇、乳糖醇、木糖醇、山梨糖醇、肌醇等。

[0172] 赋形剂还可以包括无机盐或缓冲剂，诸如柠檬酸、氯化钠、氯化钾、硫酸钠、硝酸钾、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠以及其组合。

[0173] 该制剂还可以包含抗微生物剂以用于防止或阻止微生物生长。适合的抗微生物剂的非限制性实例包括氯化苄烷铵、苄索氯铵、苯甲醇、西吡氯铵、三氯叔丁醇、苯酚、苯乙醇、

硝酸苯汞、硫柳汞(thimersol)、以及它们的组合。

[0174] 在该制剂中还可以存在抗氧化剂。抗氧化剂用于防止氧化，由此防止缀合物或制剂的其他组分的变质。适合的抗氧化剂包括例如抗坏血酸棕榈酸酯、丁羟茴醚、丁羟甲苯、次磷酸、单硫代甘油、没食子酸丙酯、亚硫酸氢钠、甲醛次硫酸钠、焦亚硫酸钠、以及它们的组合。

[0175] 表面活性剂可以作为赋形剂存在。示例性表面活性剂包括：聚山梨醇酯，诸如“吐温20”和“吐温80”以及普郎尼克(pluronic)，诸如F68和F88(两者均可从新泽西州芒特奥利夫的BASF公司(BASF,Mount Olive,NJ)获得)；脱水山梨糖醇酯；脂质，诸如磷脂，诸如卵磷脂和其他磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、脂肪酸和脂肪酯；类固醇，诸如胆固醇；以及螯合剂，如EDTA，锌和其他此类合适的阳离子。

[0176] 药学上可接受的酸或碱可以作为赋形剂在本发明的制剂中存在。可以使用的酸的非限制性实例包括选自下组的那些，该组由以下组成：盐酸、乙酸、磷酸、柠檬酸、苹果酸、乳酸、甲酸、三氯乙酸、硝酸、高氯酸、磷酸、硫酸、富马酸、以及它们的组合。适合的碱的实例包括但不限于选自下组的碱，该组由以下组成：氢氧化钠、乙酸钠、氢氧化铵、氢氧化钾、乙酸铵、乙酸钾、磷酸钠、磷酸钾、柠檬酸钠、甲酸钠、硫酸钠、硫酸钾、富马酸钾、以及它们的组合。

[0177] 根据本披露的内容和相关用于配制的方法，适用于在组合物中使用的其他药物赋形剂和/或添加剂可以在例如，“Remington:The Science&Practice of Pharmacy[雷明顿:药学科学与实践]”，第22版.,Remington:The Essentials of Pharmaceutics(2009)[雷明顿:药物概述]；以及在“Physician's Desk Reference[医师手册]”，2017和在“Handbook of Pharmaceutical Excipients[药物赋形剂手册]”，第7版中发现。

[0178] 在该组合物中的缀合物的量将取决于多个因素而改变，但是当该组合物在一个单位剂量的容器中储存时它最佳地将是一个治疗上有效剂量。治疗有效剂量可以通过重复给予渐增量的缀合物以便确定哪个量产生临床上所希望的终点来以实验方式确定。

[0179] 组合物中任何单独赋形剂的量将根据赋形剂的活性和组合物的特定需要而变化。任何单独赋形剂的最佳量通过常规实验确定，即通过制备含有不同量的赋形剂(范围从低到高)的组合物，检查稳定性和其他参数，并且然后确定在没有显著不利作用的情况下获得最佳性能的范围。

[0180] 然而，总的来说，赋形剂将在该组合物中以按重量计大约1％至大约99％、优选按重量计从大约5％至大约98％，更优选按重量计从大约15％至大约95％的赋形剂的量存在，其中浓度最优选是小于按重量计30％。

[0181] 这些药物组合物可以采取任何数目的形式并且就此而言组合物不受限制。示例性制剂可以处于适合于口服给予的形式，例如片剂、囊片、胶囊、软胶囊、糖锭、分散剂、悬浮剂、溶液、酏剂、糖浆、锭剂、经皮贴剂、喷雾剂、栓剂以及散剂。在优选的实施例中，组合物处于适合用于瘤内给予的形式。

[0182] 口服剂型包括片剂、囊片、胶囊、软胶囊、悬浮剂、溶液、酏剂、以及糖浆，并且还可以包括任选包封的多种颗粒、珠粒、粉末或丸剂。这样的剂型是使用药物配制领域中已知的常规方法来制备的并且描述于相关的文件中。

[0183] 片剂和囊片，例如，可以使用标准的片剂加工程序和设备来生产。当制备含有在此

描述的缀合物的片剂或囊片时，直接压片以及造粒技术是优选的。除了缀合物之外，这些片剂以及囊片通常包括无活性的药学上可接受的载体材料，如粘合剂、润滑剂、崩解剂、填充剂、稳定剂、表面稳定剂、着色剂、流平剂以及类似物。粘合剂被用来对片剂赋予粘合性质并且以此确保该片剂保持完整。合适的粘合剂材料包括但不限于淀粉(包括玉米淀粉以及预胶凝淀粉)、明胶、糖类(包括蔗糖、葡萄糖、右旋糖、以及乳糖)、聚乙二醇、蜡类、以及天然的以及合成的胶质，例如阿拉伯胶海藻酸钠、聚乙烯吡咯酮、纤维素聚合物(包括羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、甲基纤维素、微晶纤维素、乙基纤维素、羟乙基纤维素、以及类似物)以及硅酸镁铝。润滑剂被用来促进片剂的制造，从而促进粉末流动并且防止在释放压力时颗粒顶裂(即，颗粒破损)。有用的润滑剂是硬脂酸镁、硬脂酸钙以及硬脂酸。崩解剂被用来促进片剂的崩解，并且通常是淀粉、粘土、纤维素、藻胶、胶质或交联聚合物。填充剂包括(例如)材料类，如二氧化硅、二氧化钛、氧化铝、滑石、高岭土、粉状纤维素、以及微晶纤维素，连同水溶性材料类，例如甘露醇、尿素、蔗糖、乳糖、右旋糖、氯化钠以及山梨糖醇。正如在本领域中所熟知的，稳定剂被用来抑制或延缓药物的分解反应(包括例如氧化反应)。

[0184] 胶囊也是优选的口服剂型，在这种情况下该含缀合物的组合物可以被包封成液体或凝胶的形式(例如在软胶囊的情况下)或固体(包括颗粒，例如粒料、珠粒、粉末或球粒)的形式。适合的胶囊包括硬和软胶囊，并且通常由明胶、淀粉或纤维材料制成。两件式硬质明胶胶囊优选是例如使用明胶的带子或类似物而密封的。

[0185] 包括处于基本干燥的形式的肠胃外配制品(作为冻干物或沉淀物，它可以处于粉末或饼的形式)连同准备注射用的配制品，它们是液体并且需要将干燥形式的肠胃外配制品进行复水的步骤。适合用于在注射之前重构固体组合物的稀释剂的实例包括注射用抑菌水、水中的5％右旋糖、磷酸盐缓冲生理盐水、林格氏溶液(Ringer's solution)、生理盐水、无菌水、去离子水以及其组合。

[0186] 在一些情况下，旨在用于肠胃外给药的组合物可以采取非水溶液、悬浮液、或乳液的形式，通常是无菌的。无水溶剂或载体的例子是丙二醇、聚乙二醇、植物油，如橄榄油以及玉米油、明胶、以及可注射的有机酯类，例如油酸乙酯。

[0187] 在此描述的肠胃外配制品还可以包括辅助剂类，例如防腐剂、湿润剂、乳化剂以及分散剂。通过掺入杀菌剂、过滤通过细菌不通过的滤器、辐射或加热将这些配制品灭菌。

[0188] 该缀合物还可以使用常规的经皮贴剂或其他经皮递送系统通过皮肤来给药，其中该结合物包含在层叠结构中，该结构作为药物递送装置而贴附在皮肤上。在这样结构中，该缀合物包含在位于上背衬层之下的层或“贮藏库”中。该层叠结构可以包含单个的贮藏库，或者它可以包含多个贮藏库。

[0189] 该缀合物还可以被配制成栓剂用于直肠给药。就栓剂而言，该缀合物与栓剂基质材料相混合，该材料是(例如在室温下保持固态但是在体温下软化、熔融或溶解的赋形剂)例如可可黄油(可可豆油)、聚乙二醇、甘油明胶、脂肪酸、以及它们的组合。栓剂可以(例如)进行以下步骤(不必为所示出的顺序)来进行制备：将该栓剂基质材料熔融以形成熔体；掺入该结合物(在该栓剂基质材料熔融之前或之后)；将该熔体倒入模具中；冷却该熔体(例如将含熔体的模具放置在室温环境中)，由此形成栓剂；并且从该模具中移出这些栓剂。

[0190] 在一些优选的实施例中，缀合物或包含缀合物的组合物在瘤内给予，例如直接给予到瘤内(例如，通过注射)。这种给予提供了在肿瘤中实现高浓度的TLR 7/8激动剂，其中

TLR 7/8激动剂延迟释放到体循环中，并且在包含可释放的键联的缀合物情况下，延迟释放到肿瘤本身中。用于瘤内给予TLR 7/8激动剂的多臂聚合物缀合物的示例性配制品包含在pH 7.4下的Na/K磷酸盐缓冲液。

[0191] 在一些实施例中，可以将包含缀合物的组合物进一步掺入合适的递送运载体中。此类递送运载体可提供缀合物的受控和/或连续释放，并且还可用作靶向部分。递送运载体的非限制性实例包括佐剂、合成佐剂、微胶囊、微粒、脂质体和酵母细胞壁颗粒。酵母细胞壁可以被各种处理以选择性地去除蛋白质组分、葡聚糖或甘露聚糖层，并且被称为全葡聚糖颗粒(WGP)、酵母β-葡聚糖甘露聚糖颗粒(YGMP)，酵母葡聚糖颗粒(YGP)、红酵母属酵母细胞颗粒(YCP)。酵母细胞，例如酿酒酵母(S.cerevisiae)和红酵母属物种是优选的；然而，可以使用任何酵母细胞。这些酵母细胞在流体动力学体积方面表现出不同的特性，并且在它们可以释放其内容物的靶器官中也不同。将生产方法和这些颗粒的表征描述于美国专利号5,741,495、4,810,646、4,992,540、5,028,703、5,607,677和美国专利申请公开号2005/0281781和2008/0044438中。

[0192] 还提供了用于向患者给予如本文提供的TLR 7/8激动剂的多臂聚合物缀合物的方法，该患者患有对用缀合物治疗有应答的病症(例如像患有癌症的患者)。该方法包括给予治疗有效量的缀合物(优选地提供为药物制剂的一部分)，其中说明性给予方式除口服给予外还包括诸如肺、鼻、口腔、直肠、舌下、经皮、瘤内和肠胃外的途径。如在此所使用，术语“肠胃外”包括皮下、静脉内、动脉内、腹腔内、心脏内、鞘内、以及肌内注射，连同输注注射。

[0193] 在某些实施例中，癌症是实体癌。例如，该癌症可以选自下组，该组由以下组成：乳腺癌、卵巢癌、结肠癌、前列腺癌、骨癌、结肠直肠癌、胃癌、淋巴瘤、恶性黑素瘤、肝癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、胰腺癌、甲状腺癌、肾癌、胆管癌、脑癌、宫颈癌、上颌窦癌、膀胱癌、食管癌、霍奇金病以及肾上腺皮质癌。

[0194] 在其中使用肠胃外给予的情况下，可能有用的使用稍微更大的聚合物，例如，具有从约500至60,000道尔顿范围内的分子量(例如，具有分子量为约500、1000、2000、2500、3000、5000、7500、10000、15000、20000、25000、30,000、40,000、50,000或更大)。

[0195] 在实施例中，提供了方法，该方法涉及治疗癌症的方法，该方法包括向患者给予包含如本文所述的缀合物的药物组合物。

[0196] 在实施例中，本文提供了如本文所述的缀合物在制备药物中的用途，该药物可用于治疗癌症(例如实体癌)。

[0197] 待给予的实际剂量将根据受试者的年龄、体重和一般状况，以及所治疗的病状的严重程度，健康专家的判断、以及所给予的缀合物而变化。治疗有效量是本领域的普通技术人员已知的和/或在相关参考文本和文献中描述的。总体上，治疗有效量将在从约0.001mg至1000mg的范围内，优选地在从0.01mg/天至750mg/天的剂量并且更优选地在从0.10mg/天至500mg/天的剂量。

[0198] 根据临床医师的判断、患者的需要等等，可以按多种给药方案给予单位剂量的任何给定缀合物(再次，优选地以药物制剂的一部分的形式提供)。具体给药方案将是本领域的普通技术人员已知的或可以使用常规方法以实验方式确定。示例性的给药方案包括但不限于：给予每日五次、每日四次、每日三次、每日两次、每日一次、每周三次、每周两次、每周一次、每月两次、每月一次以及其任何组合。一旦已实现临床终点，就暂停组合物的给药。

通过给予Toll样受体(TLR)激动剂与长效IL-2R B 偏向性激动剂的组合来治疗患有癌症的受试者

[0199] 已经提出给予IL-2Rβ选择性激动剂通过靶向适应性免疫系统对患有某些癌症的患者有益。因此,预期这样的给予降低调控性T细胞的免疫遏制性作用,同时增加CD8+记忆T细胞,由此募集患者自身的免疫系统来消除癌细胞。参见,例如,Charych等人.,AACR 2013,摘要#482。

[0200] 在癌症治疗中经由给予IL-2Rβ选择性激动剂(其可直接免疫活化)来募集癌症患者的免疫系统可以在一些情况下例如通过给予其他药剂来进一步增强。然而,当试图通过给予一种以上免疫调节物质来活化针对肿瘤的细胞毒性免疫应答时,出现了许多挑战。例如,在一些情况下,给予第二免疫调节剂实际上可以减弱或遏制而不是增强第一免疫调节剂的细胞毒性作用,而当作为单一药剂(即,作为单一疗法)给予该第一免疫调节剂时,促进强烈的抗肿瘤应答。在癌症免疫疗法中,在免疫刺激和免疫抑制之间实现有利的平衡以提供有效的抗肿瘤应答(尤其是当给予多种活性剂时)代表了重大挑战。

[0201] 已经研究了TLR激动剂的抗肿瘤特性,然而,通常大多数TLR激动剂作为癌症治疗剂表现不佳。据推测,这种表现不佳可能是由免疫遏制因子的诱导抑制TLR激动剂诱导的炎症的机制所解释。(Lu,H.Frontiers in Immunology[免疫学前沿],2014年3月,5,83)。例如,TLR激动剂通过诱导树突细胞上的共刺激分子(例如CD80、CD86和CD40)以及使免疫应答极化的炎性细胞因子(例如TNF-α和IL-12)而具有免疫刺激作用。然而,TLR激动剂还具有免疫抑制作用,例如,通过诱导若干免疫抑制因子(包括IL-10、调节性T细胞(Treg)和PD-1),所有这些均可以阻遏抗肿瘤免疫力(Lu,H.,2014,同上)。因此,在试图获得免疫治疗剂组合(其中两种组分有利地相互作用以提供增强的治疗效果)方面存在显著的挑战。

[0202] 如上所述,尽管迄今为止已经在开发涵盖各种平台的有效癌症免疫疗法方面进行了大量的努力,但仍存在对鉴定和提供新的和更有效的免疫治疗方案(例如,用于治疗癌症)的需要。本披露的这些方面和其他方面力图解决这种和其他需求。

概述

[0203] 为了解决与涉及单一免疫治疗剂的当前抗肿瘤策略相关的至少一些缺点,例如像,高全身暴露和相关毒性和/或次佳溶瘤作用,本文提供了以下方法,该方法包括向患有癌症的受试者给予先天性免疫力活化量的TLR激动剂和IL-2Rβ活化量的长效IL-2Rβ偏向性激动剂。本披露至少部分基于发现令人惊讶的有利治疗组合,所述组合包含TLR激动剂,优选地是如本文提供的TLR 7/8激动剂的多臂聚合物缀合物和长效IL-2R激动剂,并且更具体地是IL-2Rβ偏向性激动剂。

[0204] IL-2通过含有α(IL2Rα,CD25)、β(IL2Rβ,CD122)和常见γ链受体(γc,CD132)的受体-信号传导复合物刺激免疫细胞增殖和活化。在高剂量下,IL2结合至异二聚体IL2Rβγ受体,从而导致肿瘤杀伤CD8+记忆效应T(CD8 T)细胞的所希望的扩增。然而,IL2还以更大的亲和力结合至其异三聚体受体IL2Rαβγ,其扩增免疫遏制性CD4+、CD25+调控性T细胞(Treg),这可能导致对癌症免疫疗法的不良作用。因此,本文提供了治疗方式,所述治疗方式组合给予IL-2Rαβ偏向性激动剂,并且特别是长效IL-2Rαβ偏向性激动剂和TLR激动剂。不受理论束缚,诸位申请人已经发现通过利用长效IL-2化合物(其中与负责活化免疫遏制性Treg的IL2Rα亚单元相互作用的区域被掩蔽(即,其活性被遏制或抑制)),即长效IL-2Rαβ偏

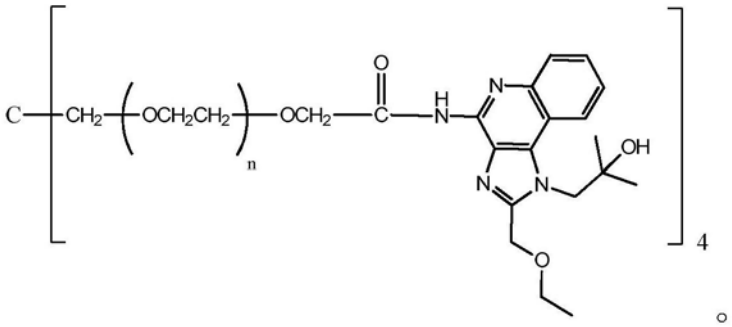
向性激动剂，当与具有抗原呈递细胞成熟和T细胞初免作用机制的TLR激动剂选择性地组合时，可以实现优异的治疗功效，如将从本披露和支持实例中变得显而易见。实际上，在代表性实例中，前述组合产生了惊人的远位效应，使得在所有肿瘤(其中直接给予TLR激动剂的肿瘤(原发性肿瘤)和其中不直接给予TLR激动剂的肿瘤(继发性肿瘤))中观察到功效。

[0205] 本文提供的治疗方法包括给予TLR激动剂，即用于刺激先天性免疫应答。给予TLR激动剂对于例如活化先天性免疫力、髓样细胞反应和增加肿瘤抗原呈递是有效的。通常，TLR激动剂可以通过模拟局部感染在肿瘤中产生肿瘤遏制性微环境。

[0206] 根据本文所述的方法给予各种TLR激动剂，并且本披露内容就此而言不受限制。申请人的观点是，经由IL-2途径(即，通过共同给予TLR激动剂和长效IL-2Rαβ偏向性激动剂)从而刺激由于TLR激动剂和长效IL-2Rαβ偏向性激动剂的互补性质和作用机制引起的所需T细胞应答可以实现成功的结果。说明性TLR激动剂包括，但不限于例如，TLR 7或TLR 8激动剂。特别优选的TLR激动剂是如先前所述的TLR 7/8激动剂的多臂聚合物缀合物。

[0207] 在一个或多个实施例中，TLR激动剂是20,000道尔顿的基于4-臂-戊赤藓糖醇基的聚乙二醇缀合物，该缀合物具有在其四个聚合物臂中的每个臂的末端处稳定地或可释放地共价连接的TLR激动剂分子(例如瑞喹莫德)。

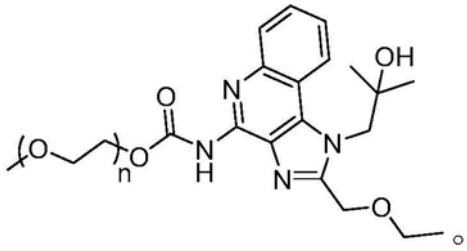
[0208] 在某些实施例中，长效TLR激动剂是基于4-臂-戊赤藓糖醇基的聚乙二醇缀合物，该缀合物具有在其四个聚合物臂中的每个臂的末端处可释放地共价连接的R848，并且具有以下结构。



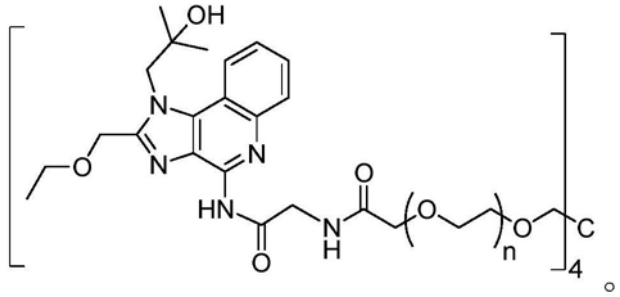
[0209] 前述TLR激动剂多臂聚合物缀合物在本文中被称为“4-臂-PEG-CM-N-R848”，其中N-表示与TLR激动剂分子R848的氨基基团的键联；其制备描述于实例3中。

[0210] 在某些实施例中，TLR激动剂是化合物1-10或12-16中的任一个或其药学上可接受的盐。

[0211] 在某些实施例中，TLR激动剂是具有以下示出的结构的化合物11，其中n是如本文所述的任何合适数量的重复单元：



[0212] 在又其他优选的实施例中，TLR激动剂化合物是化合物6，具有以下示出的结构，其中n是如本文所述的任何合适数量的重复单元：

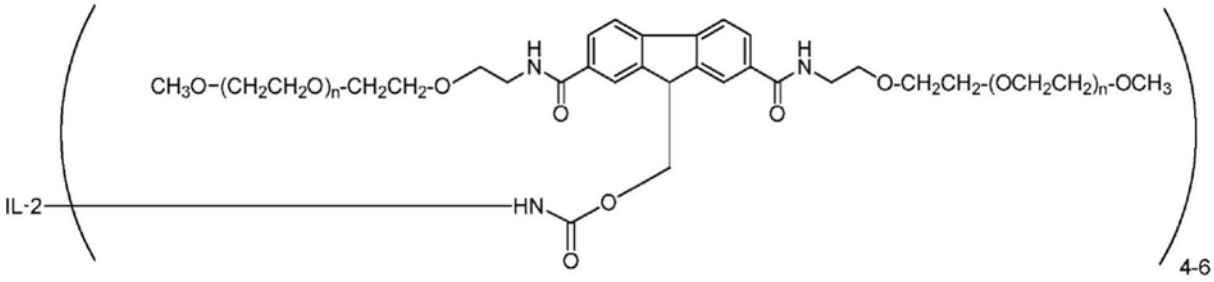


[0213] TLR激动剂可以通过任何合适的给药途径给予，例如皮内、静脉内、皮下、鼻内、淋巴管内、瘤内等。在该方法的一个或多个具体的实施例中，将TLR激动剂按活化受试者的先天性免疫力的有效量直接给予肿瘤(例如，通过注射)。

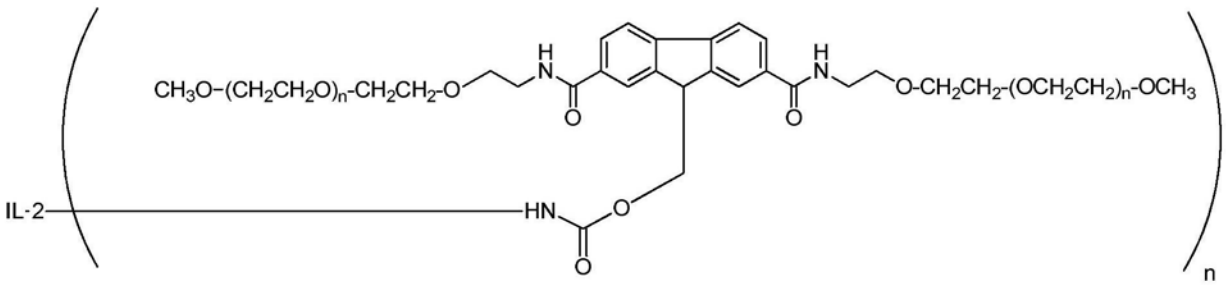
长效IL-2Rβ-偏向性激动剂

[0214] 在此描述的方法、配制品、试剂盒等涉及给予长效IL-2Rβ-偏向性激动剂。在此方面，本披露不限于任何特定的长效IL-2Rβ偏向性激动剂，只要该激动剂表现出的对IL-2Rβ的体外结合亲和力比在相同体外模型中对IL-2Rαβ的结合亲和力大至少5倍(更优选地大至少10倍)，并且具有比IL-2大至少10倍的有效体内半衰期(基于IL-2的体内消失的半衰期)。作为举例，有可能测量针对IL-2的结合亲和力作为标准。在此方面，在此的实例1中提及的RSLAIL-2表现出相对于IL-2，对IL-2Rαβ的亲和力的约60倍降低；但是相对于IL-2，对IL-2Rβ的亲和力的仅约5倍降低。

[0215] 长效IL-2Rβ偏向性激动剂的非限制性实例描述于国际专利公开号WO 2012/065086和WO 2015/125159中。示例性长效IL-2Rβ偏向性激动剂是本申请实例19中引提及的RSLAIL-2，其中可释放的PEG是基于如下所示的2,7,9-取代的芴，其中聚(乙二醇)链经由酰胺键联(芴-C(O)-NH～)从芴环上的2-和7-位置延伸，并且经由与经由亚甲基(-CH_2-)附接至芴环的9-位置的氨基甲酸酯氮原子附接而可释放的共价附接至IL-2。在此方面，RSLAIL-2是包含由下式所涵盖的化合物的组合物：



其中IL-2是IL-2的残基；以及其药学上可接受的盐，其中“n”是从约3至约4000的整数。在一个或多个实施例中，该组合物含有不超过10％(基于摩尔量)、并且优选地不超过5％(基于摩尔量)的由下式所涵盖的化合物



其中IL-2是IL-2的残基，(n)(是指与IL-2附接的聚乙二醇部分的数量)是选自下组的整数，该组由以下组成：1、2、3、7和>7；以及其药学上可接受的盐。在一些实施例中，RSLAIL-2具有平均约六个与IL-2附接的聚乙二醇部分。在一些其他实施例中，RSLAIL-2通常被认为是无活性的前药，即在给予时无活性，并且凭借在体内缓慢释放聚乙二醇部分，从而提供白细胞介素-2的活性缀合形式，而有效在肿瘤部位达到持续浓度。

[0216] RSLAIL-2的另外的示例性组合物包含根据以上式的化合物，其中该分子的总体聚合物部分具有从约250道尔顿至约90,000道尔顿范围内的重均分子量。另外适合的范围包括选自约1,000道尔顿至约60,000道尔顿的范围、从约5,000道尔顿至约60,000道尔顿的范围、约10,000道尔顿至约55,000道尔顿的范围、从约15,000道尔顿至约50,000道尔顿的范围、以及从约20,000道尔顿至约50,000道尔顿的范围内的重均分子量。

[0217] 聚乙二醇聚合物部分的另外的说明性重均分子量包括约200道尔顿、约300道尔顿、约400道尔顿、约500道尔顿、约600道尔顿、约700道尔顿、约750道尔顿、约800道尔顿、约900道尔顿、约1,000道尔顿、约1,500道尔顿、约2,000道尔顿、约2,200道尔顿、约2,500道尔顿、约3,000道尔顿、约4,000道尔顿、约4,400道尔顿、约4,500道尔顿、约5,000道尔顿、约5,500道尔顿、约6,000道尔顿、约7,000道尔顿、约7,500道尔顿、约8,000道尔顿、约9,000道尔顿、约10,000道尔顿、约11,000道尔顿、约12,000道尔顿、约13,000道尔顿、约14,000道尔顿、约15,000道尔顿、约20,000道尔顿、约22,500道尔顿、约25,000道尔顿、约30,000道尔顿、约35,000道尔顿、约40,000道尔顿、约45,000道尔顿、约50,000道尔顿、约55,000道尔顿、约60,000道尔顿、约65,000道尔顿、约70,000道尔顿、以及约75,000道尔顿。在一些实施例中，聚乙二醇聚合物的重均分子量是约20,000道尔顿。

[0218] 如上所述，长效IL-2Rβ偏向性激动剂可以呈药学上可接受的盐的形式(如是TLR激动剂的情况)。典型地，此类盐通过与药学上可接受的酸或酸等效物反应而形成。术语“药学上可接受的盐”在此方面通常将是指相对无毒的无机和有机酸加成盐。这些盐可以在给予媒介物或剂型制造过程中原位制备，或通过将如在此描述的长效白细胞介素-2与适合有机酸或无机酸单独反应并分离因此形成的盐来制备。代表性盐包括氢溴酸盐、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、甲苯磺酸盐、柠檬酸盐、马来酸盐、富马酸盐、琥珀酸盐、酒石酸盐、萘酸盐(napthylate)、草酸盐、甲磺酸盐、葡庚糖酸盐、乳糖醛酸盐、以及月桂基磺酸盐等等。(参见，例如，Berge等人.(1977)"Pharmaceutical Salts[药物盐]"，J.Pharm.Sci.[药物科学杂志]66:1-19)。因此，如所描述的盐可以衍生自无机酸，这些无机酸如盐酸、氢溴酸、硫酸、氨基磺酸、磷酸、硝酸等；或由有机酸制备，这些有机酸如乙酸、丙酸、琥珀酸、乙醇酸、硬脂酸、乳酸、苹果酸、酒石酸、柠檬酸、抗坏血酸、棕榈酸、马来酸、羟基马来酸、苯基乙酸、谷氨酸、苯甲酸、水杨酸、磺胺酸、2-乙酰氧基苯甲酸、富马酸、甲苯磺酸、甲烷磺酸、乙烷磺酸、草酸、衣康酸等。

[0219] 关于前述IL-2Rβ偏向性激动剂，如在此使用的术语“IL-2”是指具有人IL-2活性的部分。在IL-2残基的背景下，术语‘残基’意指IL-2分子在一个或多个共价附接位点处共价附接至聚合如聚乙二醇之后保留的部分，如以上式中所示。应了解的是，当未修饰IL-2附接至聚合物(如聚乙二醇)时，由于存在与这种或这些聚合物的键联相关的一个或多个共价键而使IL-2轻微改变。在一些情况下，将这种附接至另一个分子的IL-2的轻微改变形式称为

IL-2的“残基”。

[0220] 例如,具有对应于国际专利公开号WO 2012/065086中描述的SEQ ID NO:1至4中任一者的氨基酸序列的蛋白质是示例性IL-2蛋白质,如与其基本上同源的任何蛋白质或多肽一样。术语基本上同源意指特定主题序列(例如突变序列)因一个或多个取代、缺失或添加而不同于参考序列,其净效应不导致在该参考序列与主题序列之间不利的官能差异。为了在此的目的,具有大于95%的同源性、等效的生物活性(不过不必需是等效强度的生物活性)、以及等效的表达特征的序列被认为是基本上同源的。出于确定同源性的目的,应当忽略成熟序列的截短。如在此所使用,术语“IL-2”包括例如通过位点定向诱变而有意修饰或通过突变而偶然修饰的此类蛋白质。这些术语还包括具有从1至6个额外糖基化位点的类似物、在蛋白质的羧基末端处具有至少一个额外氨基酸(其中该一个或多个额外氨基酸包括至少一个糖基化位点)的类似物以及具有包含至少一个糖基化位点的氨基酸序列的类似物。该术语包括天然部分和重组产生的部分。另外,IL-2可以来源于人类来源、动物来源以及植物来源。一种示例性IL-2是被称为阿地白介素的重组IL-2。

[0221] 常规方法(如涉及放射性标记化合物、体内给予该化合物以及确定其清除率的那些方法)可以用于确定提出为长效IL-2Rβ偏向性激动剂的化合物是否是“长效的”。出于在此的目的,IL-2Rβ偏向性激动剂的长效性质典型地使用流式细胞术来测定以测量在给予有待在小鼠中评估的激动剂之后的不同时间点在淋巴细胞中的STAT5磷酸化。作为参考,信号在IL-2的情况下丢失约24小时,但是持续时间段大于长效IL-2Rβ偏向性激动剂的时间。作为说明,对于RSLAIL-2组合物,信号持续数天。

[0222] 现在考虑如在此描述的长效激动剂的IL-2Rβ偏向性,实例20提供与RSLAIL-2的示例性组合物的受体偏向性有关的体外数据和体内数据两者。如实例20中所描述,在鼠黑素瘤肿瘤模型中,当与IL-2比较时,RSLAIL-2的CD8/调控性T细胞的比率支持IL-2受体β相对于IL2受体α的优先活化。示例性长效IL-2Rβ偏向性激动剂如RSLAIL-2例如可有效相对于Treg优先活化和扩增效应CD8+T细胞和NK细胞。

[0223] 此外,代表性的长效IL-2Rβ偏向性激动剂如RSLAIL-2相对于IL-2提供增加的肿瘤暴露并且优选地显著增强的肿瘤暴露,例如当针对IL-2的等效物标准化时暴露增加至少50倍、或暴露增加至少100倍、或暴露增加至少200倍、或暴露增加至少300倍、或暴露增加至少400倍、或暴露增加至少500倍。

与前述相关的方法、组合物和试剂盒

[0224] 基于如本文所述的长效IL-2Rβ偏向性激动剂的至少一种或多种特征,本文提供了方法,这些方法通过给予例如,局部给予具有最小的全身暴露的TLR激动剂的多臂聚合物缀合物来有效选择性优化肿瘤中的TLR活性从而通过全身给予长效IL-2化合物来扩增癌症患者的T细胞应答,其中与负责活化免疫遏制性Treg的IL2Rα亚单元相互作用的区域被掩盖,从而实现组合的优异治疗功效。

[0225] 根据在此描述的方法、组合物和试剂盒,该长效IL-2Rβ偏向性激动剂以IL-2Rβ活化量提供。本领域的普通技术人员可以确定多少给定的长效IL-2Rβ偏向性激动剂足以提供在IL-2Rβ处的临床相关的激动活性。例如,本领域的普通技术人员可以参考文献和/或给予一系列增加量的长效IL-2Rβ偏向性激动剂并且确定哪个或哪些量提供IL-2Rβ的临床上有效的激动活性。可替代地,长效IL-2Rβ偏向性激动剂的活化量可以使用以上描述的体内

STAT5磷酸化测定来确定(在给予之后体内测定),其中足以在大于10％NK细胞的峰值下诱导STAT5磷酸化的量被视为活化量。

[0226] 然而,在一个或多个实例中,该IL-2Rβ活化量是以蛋白质的量表达的由以下范围中的一个或多个所涵盖的量:从约0.01至100mg/kg;从约0.01mg/kg至约75mg/kg;从约0.02mg/kg至约60mg/kg;从约0.03mg/kg至约50mg/kg;从约0.05mg/kg至约40mg/kg;从约0.05mg/kg至约30mg/kg;从约0.05mg/kg至约25mg/kg;从约0.05mg/kg至约15mg/kg;从约0.05mg/kg至约10mg/kg;从约0.05mg/kg至约5mg/kg;从约0.05mg/kg至约1mg/kg。在一些实施例中,长效IL-2Rβ偏向性激动剂以小于或等于0.7mg/kg的剂量给予。具体的说明性给药范围包括例如,从约0.1mg/kg至约10mg/kg、或从约0.2mg/kg至约7mg/kg或从约0.2mg/kg至小于约0.7mg/kg。

[0227] 为了确认,关于长效IL-2Rβ偏向性激动剂,活化的量和程度可以广泛变化,并且当与给予TLR激动剂结合时仍然有效。换言之,长效IL-2Rβ偏向性激动剂的仅表现出在IL-2Rβ处的最小激动活性持续足够延长的时间段的量仍然可以是长效IL-2Rβ偏向性激动剂,只要当与TLR激动剂一起给予时,在此描述的方法、组合物和试剂盒产生临床上有意义的应答。在一些情况下,由于(例如)协同相互作用和应答,当伴随给予TLR激动剂(例如,长效TLR激动剂)时,可能仅需要IL-2Rβ的最小激动活性。

[0228] 在此描述的治疗方法可以持续长达监督患者的护理的临床医生认为该治疗方法有效的时间。指示该治疗方法有效的非限制性参数包括以下中的任何一个或多个:肿瘤缩小(就重量和/或体积而言);个体肿瘤集落的数量减少;肿瘤消除;以及无进展存活。肿瘤大小的变化可以通过任何适合的方法如成像来确定。可以采用各种诊断成像模态,如计算机断层摄影术(CT扫描)、双能CDT、正电子发射断层摄影术和MRI。

[0229] TLR激动剂和长效IL-2Rβ偏向性激动剂的实际剂量以及与在此描述的方法、组合物和试剂盒相关的给药方案将根据受试者的年龄、体重和一般状况以及所治疗的癌症的类型和进展、医疗保健专业人员的判断、以及有待给予的特定TLR激动剂和长效IL-2Rβ偏向性激动剂而变化。

[0230] 关于给予该TLR激动剂和长效IL-2Rβ偏向性激动剂的频率和时间表,本领域普通技术人员将能够确定适当的频率。例如,在治疗周期中,临床医生可以决定以单剂量或一系列剂量(例如,在数天或数周的过程内)给予TLR激动剂。在一些治疗方案中,TLR激动剂在治疗开始时以单剂量给予。将长效IL-2Rβ偏向性激动剂与TLR激动剂同时给予、或在给予TLR激动剂之前、或在给予TLR激动剂之后给予。在优选的治疗方式中,在长效IL-2Rβ偏向性激动剂之前给予TLR激动剂。例如,当TLR激动剂是TLR 7/8激动剂的多臂聚合物缀合物时,将TLR激动剂在瘤内给予,而将IL-2Rβ偏向性激动剂例如通过注射全身给予。例如,在一些治疗方式中,将长效IL-2Rβ偏向性激动剂在给予TLR激动剂的14天内给予(例如,在第1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14天中的任何一天),其中第0天表示治疗的开始。在一些治疗方案中,将长效IL-2Rβ偏向性激动剂在给予TLR激动剂的7天内给予,例如,在第1、2、3、4、5、6或7天中的任何一天;或在给予TLR激动剂的4天内给予,或在给予TLR激动剂的2天内给予。

[0231] 基于IL-2Rβ偏向性激动剂的长效性质,这种化合物典型地相对不频繁地给予(例如,每三周一次、每两周一次、每8-10天一次、每周一次等)。

[0232] 与治疗过程相关的示例性时间长度包括约一周;约两周;约三周;约四周;约五周;

约六周;约七周;约八周;约九周;约十周;约十一周;约十二周;约十三周;约十四周;约十五周;约十六周;约十七周;约十八周;约十九周;约二十周;约二十一周;约二十二周;约二十三周;约二十四周;约七个月;约八个月;约九个月;约十个月;约十一个月;约十二个月;约十三个月;约十四个月;约十五个月;约十六个月;约十七个月;约十八个月;约十九个月;约二十个月;约二十一个月;约二十二个月;约二十三个月;约二十四个月;约三十个月;约三年;约四年、以及约五年。

[0233] 在此描述的治疗方法典型地持续长达监督患者的护理的临床医生认为该治疗方法有效(即该患者响应于治疗)的时间。指示该治疗方法有效的非限制性参数可以包括以下中的一个或多个:肿瘤缩小(就重量和/或体积和/或视觉外观而言);个体肿瘤集落的数量减少;肿瘤消除;无进展存活;通过适合的肿瘤标志物(如果适用)的适当应答、NK(自然杀伤)细胞的数量增加、T细胞的数量增加、记忆T细胞的数量增加、中心记忆T细胞的数量增加、调控性T细胞如CD4+ Treg、CD25+ Treg和FoxP3+ Treg的数量减少等。

[0234] 在此提供的方法可用于(除其他事项外)治疗患有癌症的患者。例如,患者可能对以下治疗应答:单独用TLR激动剂的治疗、单独用长效IL-2Rβ偏向性激动剂的治疗、以及TLR激动剂和长效IL-2Rβ偏向性激动剂的组合的治疗,但对组合更应答。作为进一步的实例,患者可以对TLR激动剂或长效IL-2Rβ偏向性激动剂任一者无应答,但对组合应答。仍作为进一步的实例,当单独给予时,患者可以对TLR激动剂和长效IL-2Rβ偏向性激动剂二者都无应答,但对组合应答。

[0235] 例如,TLR激动剂和/或长效IL-2Rβ偏向性激动剂的给予典型地经由注射。还考虑了其他给药方式,如经肺、经鼻、经颊、经直肠、经舌下、以及经皮给药。如在此所使用,术语“肠胃外”包括皮下、静脉内、动脉内、瘤内、淋巴管内、腹膜内、心脏内、鞘内和肌肉内注射,以及输注注射。如先前所述,TLR激动剂和长效IL-2Rβ偏向性激动剂可以分开给予。可替代地,如果希望TLR激动剂和长效IL-2Rβ偏向性激动剂的给予是同时的,作为初始剂量或在整个治疗过程中或在给药方案的各个阶段--并且所述TLR激动剂和长效IL-2Rβ偏向性激动剂是一起且在给定配制品中相容--,则同时给予可以经由给予单一剂型/配制品(例如,静脉内给予含有两种免疫组分的静脉内配制品)来实现。本领域的普通技术人员可以通过常规测试确定两种此类组分是否一起且在给定配制品中相容。

[0236] 在此描述的治疗组合,即长效IL-2Rβ偏向性激动剂和TLR激动剂可以按试剂盒的形式提供。如上所述,这些组分可以包含在单一组合物中,任选地伴有一种或多种药学上可接受的赋形剂,或者可以提供在单独的容器中,其中试剂盒典型地包括使用说明书。这些试剂盒组分(例如包含TLR激动剂和长效IL-2Rβ偏向性激动剂的组合物)可以呈液体或固体形式。在某些实施例中,TLR激动剂和长效IL-2Rβ偏向性激动剂两者均呈固体形式。代表性的固体形式是为固体干燥形式的那些,例如含有按重量计少于约5%的水,或优选地按重量计少于2%的水。这些固体形式通常适于在水性稀释剂中重构。

[0237] 当前描述的方法、试剂盒和相关组合物可以用于治疗患有可以通过在此提供的方法补救或预防的任何病状(如癌症)的患者。示例性的病状是癌症,如例如纤维肉瘤、粘液肉瘤、脂肪肉瘤、软骨肉瘤、成骨肉瘤、脊索瘤、血管肉瘤、内皮肉瘤、淋巴管肉瘤、淋巴管内皮肉瘤、滑膜瘤、间皮瘤、尤因氏瘤、平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、结肠癌、胰腺癌、脑癌、乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、鳞状细胞癌、基底细胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳头状癌、乳头状腺

癌、囊腺癌、髓样癌、支气管癌、肾细胞癌、肝癌、胆管癌、绒毛膜癌、精原细胞瘤、胚胎性癌、维尔姆斯氏肿瘤、宫颈癌、霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、睾丸癌、肺癌、小细胞肺癌、脑癌、膀胱癌、上皮癌、胶质瘤、星形细胞瘤、成神经管细胞瘤、颅咽管瘤、室管膜瘤、松果体瘤、成血管细胞瘤、听神经瘤、少突神经胶质瘤、脑膜瘤、黑素瘤、多发性骨髓瘤、成神经细胞瘤、成视网膜细胞瘤、以及白血病。在一些特定实施例中，有待治疗的癌症是实体癌，如例如乳腺癌、卵巢癌、结肠癌、前列腺癌、骨癌、结肠直肠癌、胃癌、淋巴瘤、恶性黑素瘤、肝癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、胰腺癌、甲状腺癌、肾癌、胆管癌、脑癌、宫颈癌、上颌窦癌、膀胱癌、食管癌、霍奇金病以及肾上腺皮质癌。

[0238] 本发明的方法、试剂盒和组合物可用于增强给予作为单一药剂的TLR激动剂或长效IL-2Rβ偏向性激动剂的治疗效果。可以在治疗期间、单轮治疗后、2-3个治疗周期之后等的任何适合的时间点以及通过多种适合的方法中的任一种来评估增强的应答，包括肿瘤缩小(部分应答)，即肿瘤大小或体积的评估、肿瘤的消失、疾病进展的减少(癌症未进展)以及在适当的情况下一种或多种肿瘤测试标志物的分析。特别有效的治疗将使存活延长(当以50％最大肿瘤生长评估时)至少5天、或至少10天、或至少12天、或至少15天、或至少20天、或至少30天或更长时间。

[0239] 在此提供的方法、试剂盒、组合物等也可用于减少经历治疗的受试者的肿瘤生长或大小(或体积)。例如，在一些实施例中，当与治疗前肿瘤的大小相比时，一个或多个治疗周期可有效使肿瘤大小减小约25％、或约30％、或约40％、或约50％、或甚至约60％、或约70％或更多，例如约90％或更多。

[0240] 在转向支持实例时，如实例23-30中的详细描述，使用TLR 7/8激动剂的示例性多臂聚合物缀合物，瑞喹莫德，4-臂-PEG20k-CM-Gly-N-R848(化合物6)和说明性长效IL-2Rβ偏向性激动剂，RSLAIL-2评估各种鼠肿瘤模型的组合治疗功效。这些肿瘤模型分别包括CT26结肠癌肿瘤模型、WEHI-164纤维肉瘤肿瘤模型、JC乳腺癌肿瘤模型、4T1乳腺癌肿瘤模型、MC38结肠癌肿瘤模型、EMT6乳腺癌肿瘤模型、RM-1前列腺癌肿瘤模型、和H22肝细胞癌肿瘤模型。组合治疗在所有测试的肿瘤模型中显示功效，其中在多个模型中功效范围从显著的肿瘤生长抑制到高达100％的完全应答。

[0241] 来自CT26结肠癌肿瘤模型的结果表明，非常低量的瘤内递送的TLR激动剂与RSLAIL-2治疗的组合显著地抑制在治疗部位处以及在未治疗的远位肿瘤部位处(即，其中未直接给予TLR激动剂化合物的部位)的肿瘤生长。

[0242] 在WEHI-164纤维肉瘤肿瘤模型中，给药开始后的第52天在研究结束时，用RSLAIL-2+4-臂-PEG20k-CM-Gly-N-R848的双药治疗导致90％的动物存活。引人注意地，在RSLAIL-2+4-臂-PEG20k-CM-Gly-N-R848治疗组中所有动物中的80％具有完全应答，这意味着在研究结束时没有观察到可测量的肿瘤，相反，运载体组中没有存活的动物。由于在治疗开始后第17天和第31天之间达到限制肿瘤体积，将所有动物均从研究中移除。

[0243] 类似地，在JC乳腺癌肿瘤模型中，用RSLAIL-2和4-臂-PEG20k-CM-Gly-N-R848(化合物6)的双药剂治疗(即，组合疗法)导致在第43天90％的动物存活，而在第43天无存活的动物剩余在运载体组中。给药开始后的第113天在研究结束时，RSLAIL-2+4-臂-PEG20k-CM-Gly-N-R848组合治疗导致20％的动物存活。引人注意地，在RSLAIL-2+4-臂-PEG20k-CM-Gly-N-R848治疗组中10％的动物具有完全应答，这意味着在研究结束时没有观察到可测量

的肿瘤。相反，运载体组中没有存活的动物。实际上，由于在治疗开始后第26天和第36天之间达到限制肿瘤体积，将所有动物均从研究中移除。

[0244] 以类似的方式，在4T1乳腺癌肿瘤模型中，给药开始后的第25天在研究结束时，用RSLAIL-2+4-臂-PEG20k-CM-Gly-N-R848的双免疫治疗剂治疗导致30％的动物存活。通过减缓所治疗的动物中的肿瘤生长，用RSLAIL-2+4-臂-PEG20k-CM-Gly-N-R848的组合治疗显示出优于运载体治疗的显著改善。相反，在第25天研究结束时，运载体组中无存活的动物。由于在治疗开始后第16天和第18天之间达到限制肿瘤体积，将所有动物均从研究中移除。

[0245] 如实例27中所提供的，在MC38结肠癌肿瘤模型中，给药开始后的第70天在研究结束时，用RSLAIL-2+4-臂-PEG20k-CM-Gly-N-R848的双免疫治疗剂治疗导致50％的动物存活。显著地，RSLAIL-2+4-臂-PEG20k-CM-Gly-N-R848治疗组中所有存活的动物具有完全应答，这意味着在研究结束时没有观察到可测量的肿瘤。在鲜明的对比中，运载体组中无存活的动物。

[0246] 在如实例28所述的皮下EMT6乳腺癌肿瘤模型中，给药开始后的第55天在研究结束时，用RSLAIL-2或4-臂-PEG20k-CM-Gly-N-R848的单一药剂治疗导致肿瘤生长的部分控制，但无存活的动物。在鲜明的对比中，给药开始后的第55天在研究结束时，用RSLAIL-2+4-臂-PEG20k-CM-Gly-N-R848的双药剂治疗导致100％的动物存活。在治疗方案中，将肿瘤形成细胞皮下植入每个侧腹的肿瘤中，并且将4-臂-PEG20k-CM-Gly-N-R848给药于两个肿瘤之一(原发性肿瘤)的肿瘤内或肿瘤周围(即，直接)，其中第二对侧肿瘤未被直接用TLR激动剂4-臂-PEG20k-CM-Gly-N-R848治疗。将RSLAIL-2通过静脉内注射全身给药。存活组中的所有动物均具有完全应答，其中两个肿瘤(原发性和继发性)均被消除。换言之，出乎意料地，用RSLAIL-2+4-臂-PEG20k-CM-Gly-N-R848的组合治疗不仅提供了优于等同剂量RSLAIL-2或4-臂-PEG20k-CM-Gly-N-R848单一免疫治疗剂治疗方式的显著改善，而且还导致完全根除原发性肿瘤(注射TLR激动剂)和继发性肿瘤(未直接注射TLR激动剂，远离原发肿瘤部位)。运载体组中无存活的动物。

[0247] 如实例29中所提供的，进行研究以评估和比较当与运载体治疗相比时在RM-1前列腺癌肿瘤模型中说明性长效IL-2Rβ偏向性激动剂RSLAIL-2和示例性长效TLR激动剂4-臂-PEG20k-CM-Gly-N-R848的组合的抗肿瘤应答。与运载体治疗相比，用RSLAIL-2+4-臂-PEG20k-CM-Gly-N-R848的组合治疗剂导致显著减缓的肿瘤生长，导致在RSLAIL-2+4-臂-PEG20k-CM-Gly-N-R848治疗组中，治疗开始后20天时80％的动物存活和在第36天治疗结束时10％的动物存活。相反，在治疗开始后的第20天运载体组中无存活的动物。

[0248] 在如实例30所述的又另外的说明性体内研究中，进行研究以评估和比较当与运载体治疗相比时在H22肝细胞癌肿瘤模型中说明性长效IL-2Rβ偏向性激动剂，RSLAIL-2和示例性长效TLR激动剂，4-臂-PEG20k-CM-Gly-N-N-R848的组合的抗肿瘤应答。在鲜明的对比中，给药开始后的第105天在研究结束时，用RSLAIL-2+4-臂-PEG20k-CM-Gly-N-R848的双药剂治疗导致50％的动物存活。显著地，在RSLAIL-2+4-臂-PEG20k-CM-Gly-N-R848治疗组中40％的动物具有完全应答，表示在研究结束时未观察到可测量的肿瘤。相反，运载体组中无存活的动物，如在这些说明性实例中的每一个表明由披露的组合疗法提供的优越结果。

实例

[0249] 除非另有说明，否则实例中提及的所有非PEG化学试剂均可商购。除非另有说明，

否则水溶性聚合物试剂的制剂可以使用文献中描述的本领域已知的技术来自制备,或者可以从可商购的来源获得。

材料

[0250] 根据PCT公开号WO 2010/019233 A1的实例3,可以合成4-臂-PEG20kD-SCM(NHS-酯)和4-臂-PEG40kD-SCM(NHS-酯)。

[0251] 根据PCT公开号WO 2010/019233 A1的实例1可以合成4-臂-PEG20kD-BA(丁酸)。

[0252] mPEG5kD-SC可从NOF美国公司,尔湾市,加利福尼亚,美国获得。

[0253] 4-臂-PEG20kD-SC可从Biochempeg科学公司(Biochempeg Scientific Inc.),沃特敦,马萨诸塞州,美国获得。

[0254] 4-臂-PEG20kD-NCO可从JenKem技术公司(JenKem Technology),普莱诺,德克萨斯州,美国获得。

[0255] 4-臂-PEG20kD-胺可从莱桑生物公司(Laysan Bio),阿拉巴,阿拉巴马州,美国获得。

[0256] 以下提供根据前述每一种的化学结构。

[0257] 克隆并表达具有与阿地白介素的氨基酸序列相同的氨基酸序列的重组人IL-2,并且用于制备在此称为RSLAIL-2的示例性长效IL-2Rαβ偏向性激动剂。

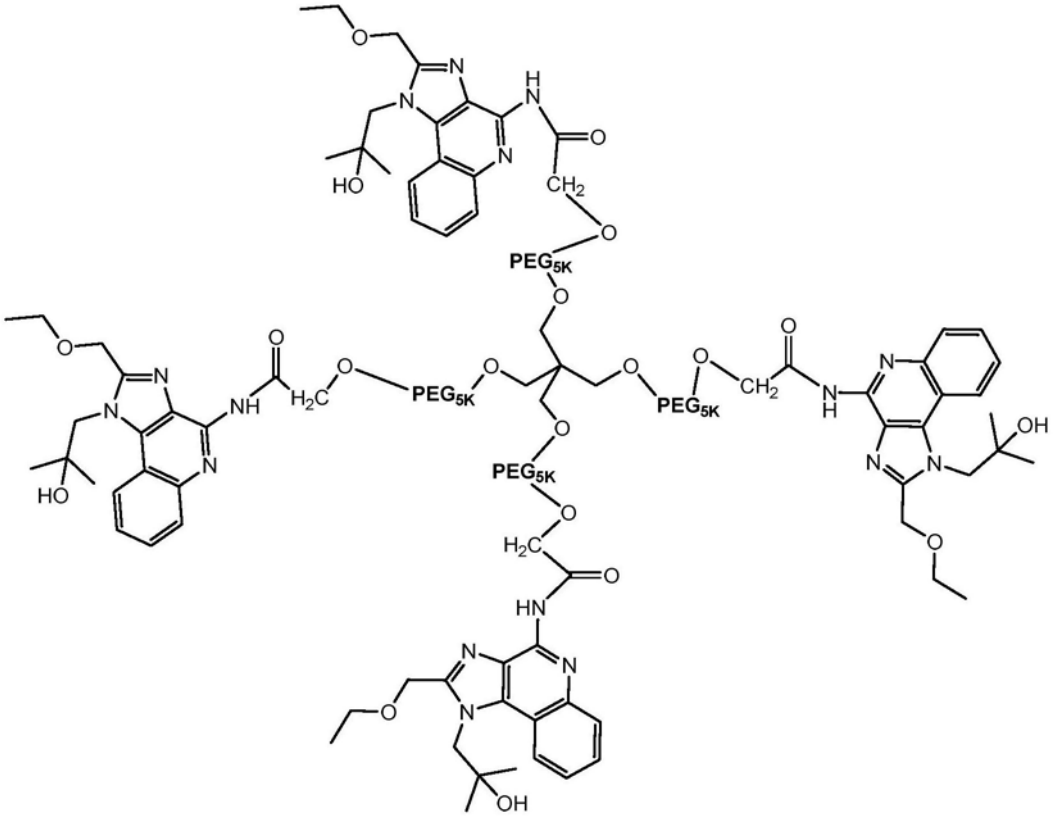
[0258] RSLAIL-2是指按照PCT国际专利申请公开号WO 2015/125159中的实例1的程序可获得的组合物,并且一般是指包含IL-2的多PEG化形式的组合物,其中在给予受试者后,与包含在多PEG化的缀合物中的PEG部分的附接是可释放的。

仪器

[0259] 在500mHz Bruker NMR光谱仪上产生^{1}H NMR(核磁共振)数据。

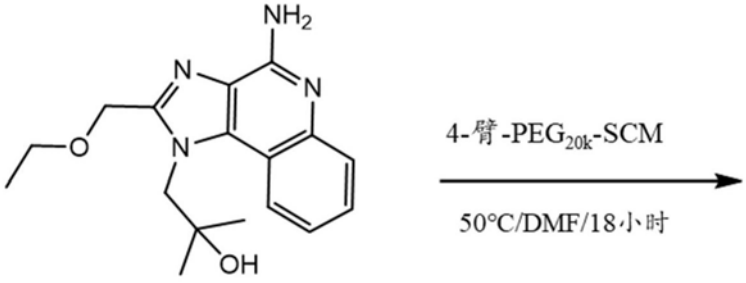
实例1

4-臂-PEG20k-CM-N-R848(化合物1)的合成

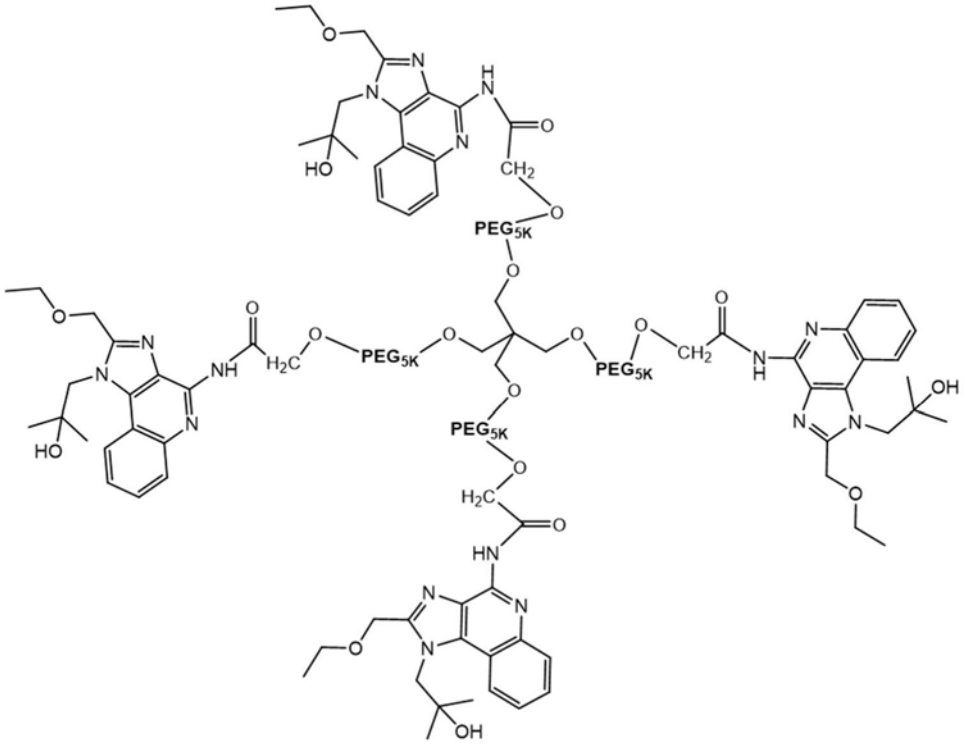


化合物 1

[0260] 根据以下反应方案合成标题化合物。

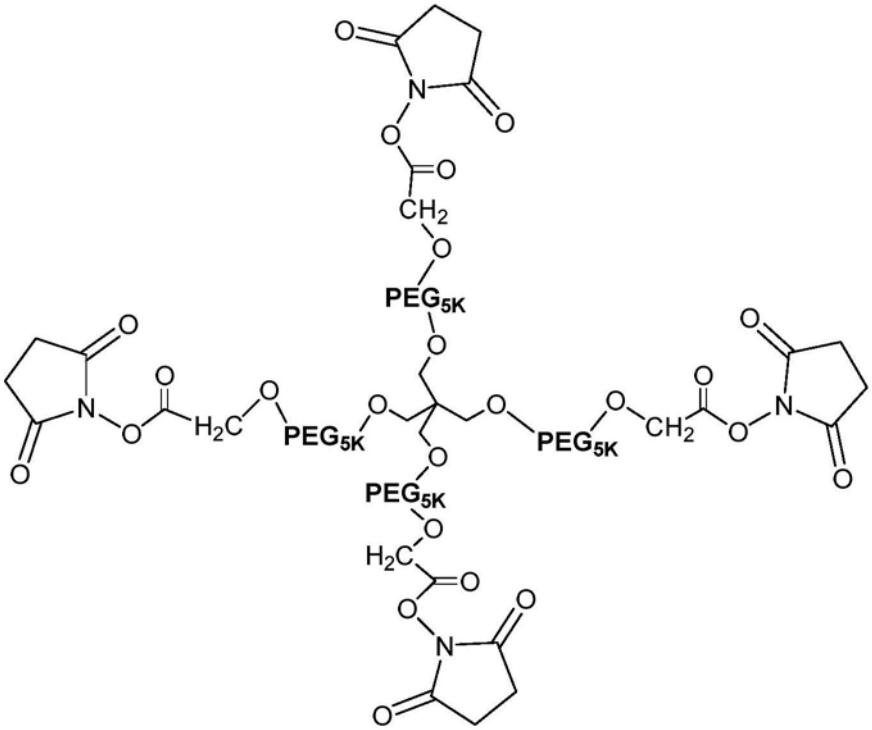


R-848



化合物1

其中4-臂-20k-PEG-SCM具有以下结构：



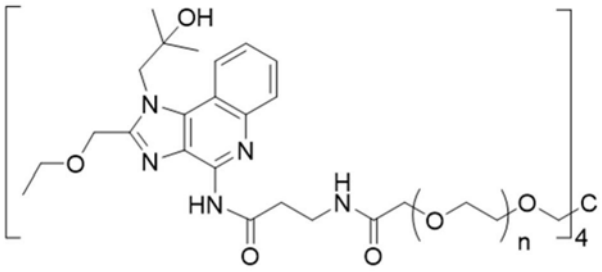
[0261] 在20℃下，将4-臂-20k-PEG-SCM(5.0g，1.0mmol SCM)和R-848(BePharm有限公司，377mg，1.2mmol)溶解于无水N,N-二甲基甲酰胺(25ml)。将该反应溶液在50℃下搅拌18小时。将该反应溶液倒入1升的乙醚中，同时搅拌。通过过滤收集形成的沉淀，并用乙醚(50ml)洗涤。将所获得的固体添加到异丙醇(300ml)中，并将悬浮液加热至60℃以形成澄清的溶液。将该溶液冷却至室温同时搅拌。通过过滤收集形成的沉淀，并用乙醚(50ml)洗涤。再次

重复在异丙醇中通过沉淀进行纯化，并随后在高真空下干燥过夜以给出呈白色固体的纯的缀合物(4.24g，具有5.1wt.％R-848负载量)。

[0262] ^{1}H NMR(500MHz，$CDCl_3$)δ9.4(broad，3.6H)，8.22-8.14(t，7.1H)，7.61(ddd，J＝8.3，7.0，1.3Hz，3.6H)，7.49(ddd，J＝8.2，7.0，1.4Hz，3.6H)，4.94(s，7.1H)，4.80(s，7.1H)，3.7-3.9(m，1818H)，1.32(s，20.1H)，1.25(t，J＝7.0Hz，10.7H)。

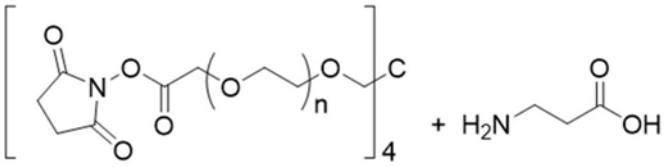
实例2

4-臂-PEG20k-CM-β-丙氨酸-N-R848(化合物2)的合成

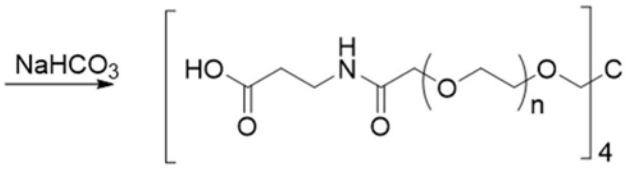


化合物2

[0263] 根据以下反应方案合成标题化合物。



4-臂-PEG20k-SCM　　β-丙氨酸

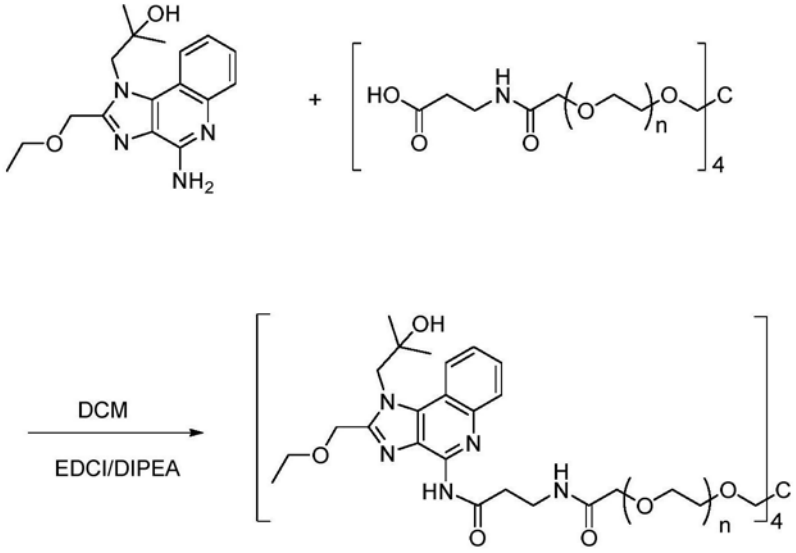


4-臂-PEG20k-CM-β-丙氨酸

4-臂-PEG20k-CM-β-丙氨酸：

[0264] 将β-丙氨酸(7.100g，10当量)和碳酸氢钠(6.720g，10当量)添加到去离子水(800ml)中，并将该混合物搅拌以形成澄清的溶液。将4-臂-PEG20k-SCM(40.020g，1当量)添加到溶液中。将该反应溶液在室温下搅拌3小时。将5N HCl添加到溶液中以将pH调节到4.0。将溶液用二氯甲烷(150ml)提取两次，并将有机相合并，并用无水硫酸钠干燥。通过玻璃料去除固体。将滤液凝缩至50ml，并然后添加到500ml乙醚中以得到沉淀。通过过滤获得呈白色粉末的产物(35.050g，产率87％)，并在高真空下干燥过夜。

[0265] ^{1}H NMR(500MHz，$CDCl_3$)δ3.98(s，7.11H)，3.64(t，7.11H)，3.58-3.33(m，1818H)，3.27(s，7.90H)，2.40(t，7.11H)。



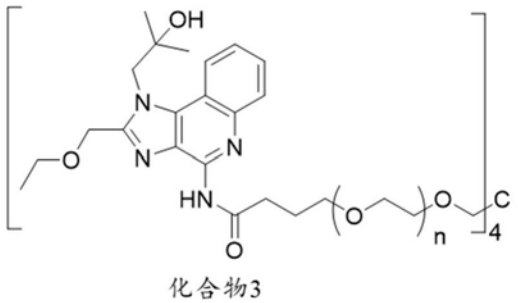
4-臂-PEG20k-CM-β-丙氨酸-N-R848：

[0266] 在20℃下，将4-臂-PEG20k-CM-β-丙氨酸(4.012g，0.8mmol的-COOH)、羟基苯并三唑(216mg，1.6mmol)、N-(3-二甲基氨基丙基)-N'-乙基碳二亚胺盐酸盐(307mg，1.6mmol)和N,N-二异丙基乙胺(207mg，1.6mmol)溶解于二氯甲烷(25ml)中。将该混合物在室温下搅拌30分钟。添加R848(302mg，0.96mmol)，并将该反应溶液在20℃下搅拌24小时。将该反应溶液添加到1升的乙醚中，同时搅拌。通过过滤收集形成的沉淀，并用乙醚(50ml)洗涤。将所获得的固体添加到异丙醇(300ml)中，并将悬浮液加热至60℃以形成澄清的溶液。将该溶液冷却至室温同时搅拌。通过过滤收集形成的沉淀，并用乙醚(50ml)洗涤。再次重复在异丙醇中通过沉淀进行纯化，并随后在高真空下干燥过夜以给出呈白色固体的纯的缀合物(3.860g，具有5.6％w/w R848负载量)。

[0267] ^{1}H NMR(500MHz，$CDCl_3$)δ8.82(s,3.56H)，8.17(d,J＝8.0Hz,4.49H)，8.07(d,J＝8.0Hz,4.02H)，7.49(t,J＝7.8Hz,4.17H)，7.49(t,J＝7.8Hz,7.55H)，4.93(s,8.39H)，4.79(s,9.0H)，3.99(s,7.60H)，3.80-3.44(m,1818H)，1.33(s)和1.26(t,J＝7.1Hz)(总共34.18H)。

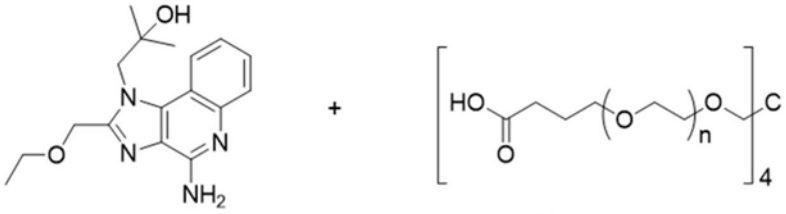
实例3

4-臂-PEG20k-BA-N-R848(化合物3)的合成

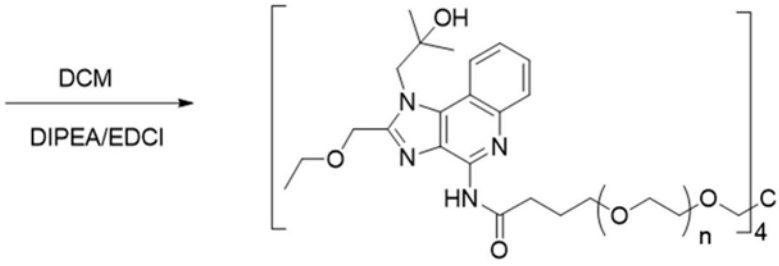


化合物3

[0268] 根据以下反应方案合成标题化合物。



4-臂-PEG20k-BA



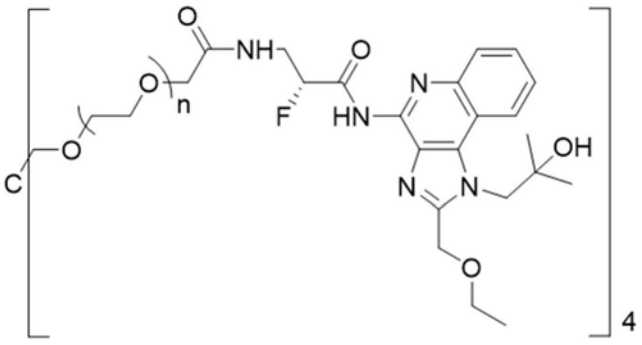
4-臂-PEG20k-BA-N-R848：

[0269] 在20℃下，将4-臂-PEG20k-BA(4.020g，0.8mmol的COOH)、羟基苯并三唑(216mg，1.6mmol)、N-(3-二甲基氨基丙基)-N'-乙基碳二亚胺盐酸盐(307mg，1.6mmol)、和N,N-二异丙基乙胺(207mg，1.6mmol)溶解于二氯甲烷(15ml)中。将该混合物在室温下搅拌30分钟。添加R848(302mg，0.96mmol)，并将该反应溶液在20℃下搅拌24小时。将该反应溶液添加到1升的乙醚中，同时搅拌。通过过滤收集形成的沉淀，并用乙醚(50ml)洗涤。将所获得的固体添加到异丙醇(300ml)中，并将悬浮液加热至60℃以形成澄清的溶液。将该溶液冷却至室温同时搅拌。通过过滤收集形成的沉淀，并用乙醚(50ml)洗涤。再次重复在异丙醇中通过沉淀进行纯化，并随后在高真空下干燥过夜以给出呈白色固体的纯的缀合物(3.805g，具有5.2％w/w R848负载量)。

[0270] ^{1}H NMR(500MHz，$CDCl_3$)δ8.16(d，J＝8.5Hz，3.45H)，8.07(d，J＝8.5Hz，3.43H)，7.59(t，J＝7.8Hz，3.63H)，7.47(t，J＝7.8Hz，3.71H)，4.91和4.78(s，15.86H)，3.77-3.40(m，1818H)，2.10(t，7.30H)，1.33(s)以及1.26(t，J＝7.1Hz)(总共31.34H)。

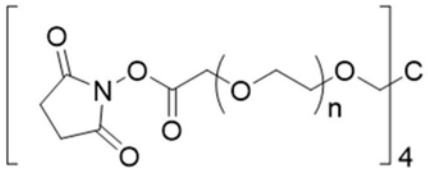
实例4

4-臂-PEG20k-CM-α-(R)-氟-丙酰胺-N-R848(化合物4)的合成

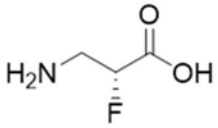


化合物4

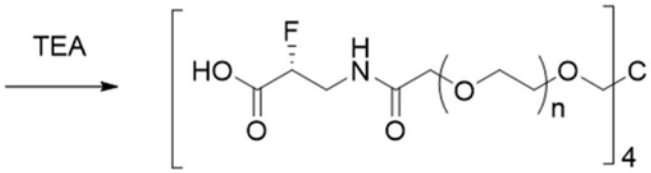
[0271] 根据以下反应方案合成标题化合物。



4臂-PEG20k-SCM



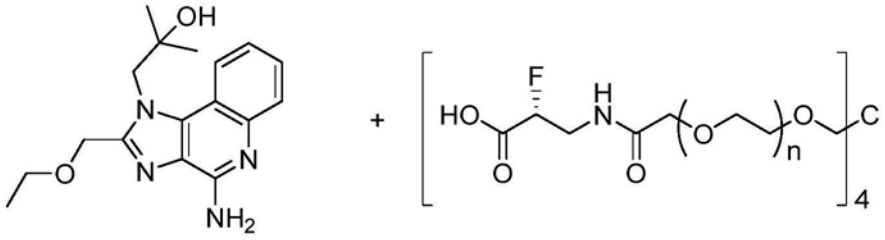
(*R*)-3-氨基-2-氟丙酸

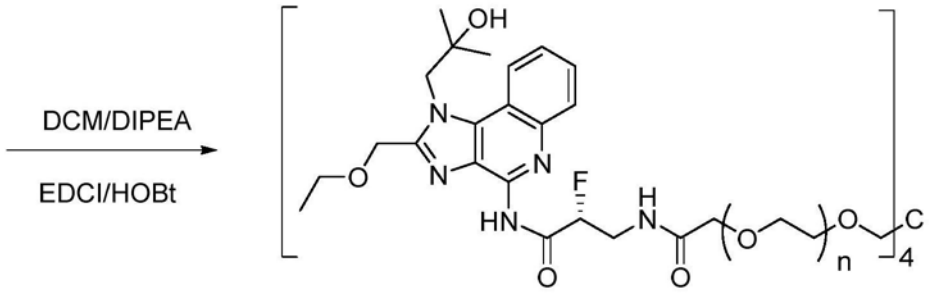


4-臂-PEG20k-CM-α-(R)-氟-丙酸：

[0272] 将4-臂-PEG20k-SCM(5.140g,1.03mmol)溶解于二氯甲烷(50ml)中。将(R)-3-氨基-2-氟-丙酸(440mg,4.11mmol)和三乙胺(416mg,4.11mmol)添加到N,N-二甲基甲酰胺(5ml)中以形成悬浮液。将该悬浮液添加到在DCM溶液中的4-臂-PEG20k-SCM里。将该反应在20℃下搅拌10天,并然后用水(200ml)稀释。将水溶液用二氯甲烷(3x 100ml)萃取。将有机相合并,用无水硫酸镁干燥并过滤。将滤液浓缩至50ml,将其添加至乙醚(1升)中以形成沉淀。通过过滤收集沉淀,将该沉淀在高真空下干燥以给出4.638g呈白色固体的4-臂-PEG20k-CM-α-(R)-氟-丙酸(具有70％取代)。

[0273] ^{1}H NMR(500MHz,$CDCl_3$)δ7.49(s,2.77H),5.02(d,J＝48.5Hz,2.77H),4.15(s,3.95H),3.65(br,1818H),3.11(q,J＝7.3Hz,2.92H),1.35(t,J＝7.3Hz,3.95H)。





4-臂-PEG20k-CM-α-(R)-氟-丙酰胺-N-R848：

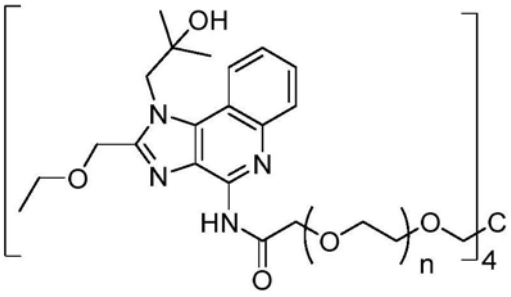
[0274] 将4-臂-PEG20k-CM-α-(R)-F-丙酸(2.004g,0.4mmol的COOH)、N,N-二异丙基乙胺(207mg,1.6mmol)、N-(3-二甲基氨基丙基)-N'-乙基碳二亚胺盐酸盐(153mg,0.8mmol)、和

羟基苯并三唑(108mg,0.9mmol)溶解于无水二氯甲烷(15ml)中。在30分钟内添加R848(113mg,0.36mmol)。将该反应溶液在20℃下搅拌18小时。将该反应溶液添加至1升的乙醚中同时搅拌。通过过滤收集形成的沉淀,并用乙醚(50ml)洗涤。将所获得的固体添加到异丙醇(300ml)中,并且将悬浮液加热至60℃以形成澄清的溶液。将该溶液冷却至室温同时搅拌。通过过滤收集形成的沉淀,并用乙醚(50ml)洗涤。再次重复在异丙醇中通过沉淀进行纯化,并随后在高真空下干燥过夜以给出呈白色固体的纯的缀合物(1.602g,具有4.1(w/w)%R848负载量)。

[0275] ^{1}H NMR(500MHz,$CDCl_3$)δ8.17(s,5.53H),7.54(d,J=57.7Hz,6.72H),4.92(s,4.74H),4.79(s,4.74H),3.62(br,1818H),1.5-1.0(br.,30.0H)。

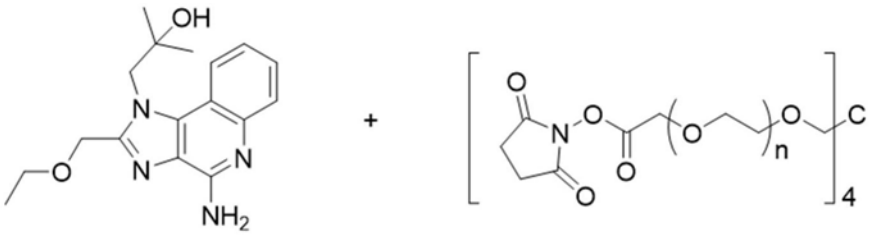
实例5

4-臂-PEG40k-CM-N-R848(化合物5)的合成

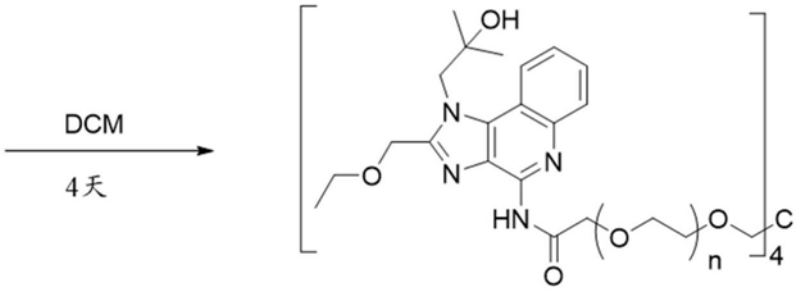


化合物5

[0276] 根据以下反应方案合成标题化合物。



4臂-PEG40K-SCM



4-臂-PEG40k-CM-N-R848:

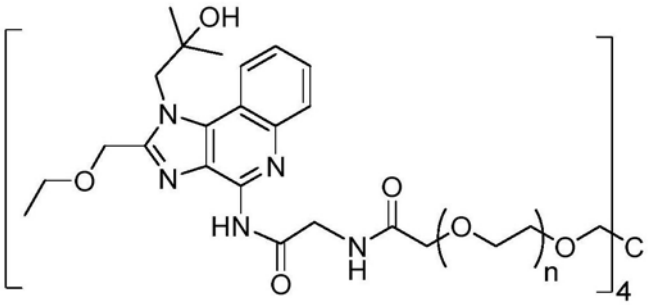
[0277] 将4-臂-PEG40k-SCM(4.410g,0.44mmol的SCM)溶解于无水二氯甲烷(33ml)中。在室温下添加R848(116mg,0.53mmol)。将所得混合物溶液在室温下搅拌4天。将该反应混合物

浓缩以去除溶剂。将残余物用如上所提及的异丙醇(300ml)再结晶两次以提供4.262g呈白色固体的产物。基于NMR分析,该产物包含2.0%(w/w)R848。

[0278] ^{1}H NMR(500MHz,$CDCl_3$)δ8.16(m,5.4H),7.58(t,2.8H),7.47(t,2.8H),4.92-4.70(m,10.6H),4.07(s,1.5H),3.88-3.45(m,3636H),1.23(s)和1.21(t)(总共23.6H)。

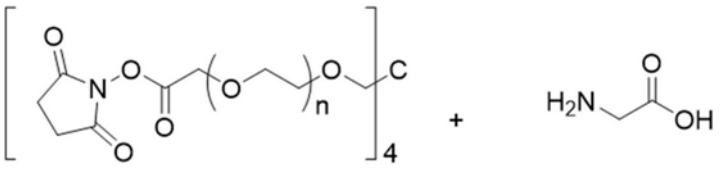
实例6

4-臂-PEG20k-CM-甘氨酸-N-R848(化合物6)的合成

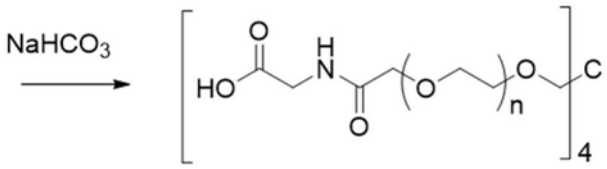


化合物6

[0279] 根据以下反应方案合成标题化合物。



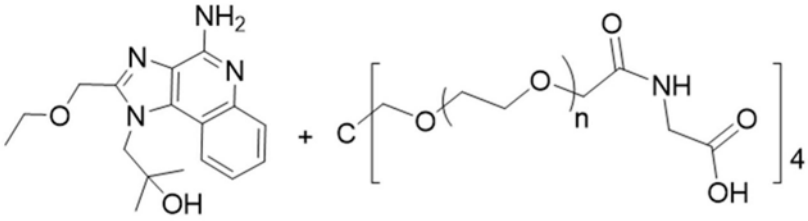
4臂-PEG20K-SCM 甘氨酸



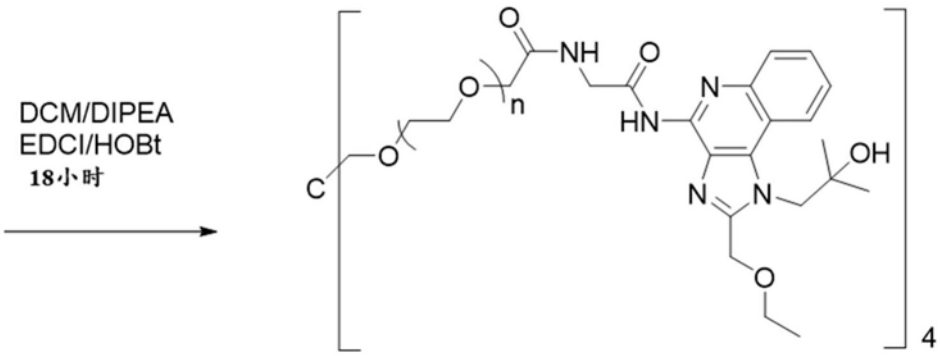
4-臂-PEG20k-CM-甘氨酸:

[0280] 将甘氨酸(6.003g,10当量)和碳酸氢钠(6.720g,10当量)添加到去离子水(800ml)中,并将溶液进行搅拌直到变得澄清。将4-臂-PEG20k-SCM(40.020g,1当量)添加到溶液中。将该反应溶液在室温下搅拌3小时。将5N HCl溶液添加到溶液中以将pH调节至4.0。将溶液用二氯甲烷(2x 150ml)萃取。将有机相合并,并用无水硫酸钠干燥。通过玻璃料去除固体。将滤液凝缩至50ml,并然后添加到500ml乙醚中以获得沉淀。通过过滤获得呈白色固体粉末的产物(35.050g),并在高真空下干燥过夜。

[0281] ^{1}H NMR(500MHz,$CDCl_3$)δ4.01(d,7.1H),3.99(s,7.1H),3.74-3.48(m,1818H),3.35(s,7.1H)。



4臂-PEG20k-CM-甘氨酸



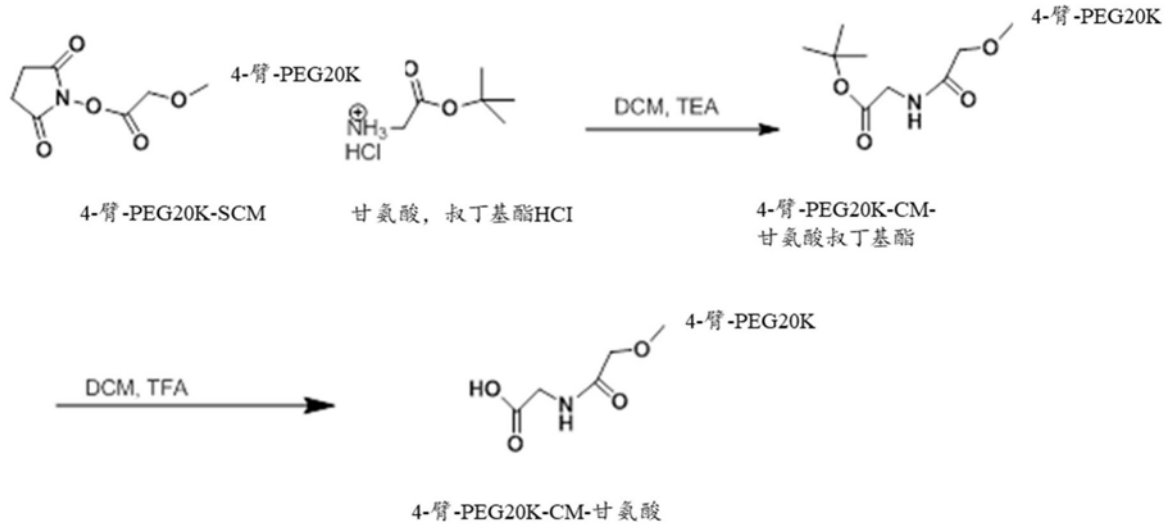
4-臂-PEG20k-CM-甘氨酸-N-R848：

[0282] 在20℃下，将4-臂-PEG20k-CM-甘氨酸(2.520g，0.5mmol COOH)、羟基苯并三唑(135mg，1mmol)、N-(3-二甲基氨基丙基)-N'-乙基碳二亚胺盐酸盐(192mg，1mmol)、和N,N-二异丙基乙胺(258mg，2mmol)溶解于二氯甲烷(15ml)中。将该混合物在20℃下搅拌30分钟。添加R848(189mg，0.6mmol)。将该反应溶液在20℃下搅拌18小时。将该反应溶液倒入1升乙醚中，同时搅拌。通过过滤收集形成的沉淀，并用乙醚(50ml)洗涤。将所获得的固体添加到异丙醇(300ml)中，并将悬浮液加热至60℃以形成澄清的溶液。将该溶液冷却至室温同时搅拌。通过过滤收集形成的沉淀，并用乙醚(50ml)洗涤。再次重复在异丙醇中通过沉淀进行纯化，并随后在高真空下干燥过夜以给出呈白色固体的纯的缀合物(1.823g，具有5.1％w/w R848负载量)。

[0283] ^{1}H NMR(500MHz，$CDCl_3$)δ8.97(s，3.56H)，8.18(d，J＝8.5Hz，3.52H)，8.16-8.11(m，2.77H)，7.81(s，2.92H)，7.63(t，J＝7.8Hz，3.06H)，7.51(t，J＝7.8Hz，3.48H)，4.98(d，J＝39.6Hz，13.32H)，4.81(s，6.64H)，4.13(s，6.20H)，3.65(s，1818H)，1.34(s，23.63H)，1.27(t，J＝7.1Hz，10.59H)。

4-臂-PEG20k-CM-甘氨酸的可替代的合成：叔丁酯保护的

[0284] 根据以下反应方案合成4-臂-PEG20k-CM-甘氨酸。



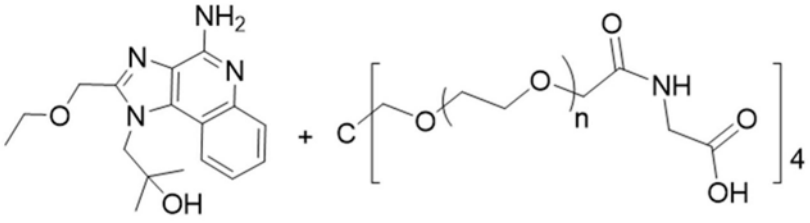
4-臂-PEG20k-CM-甘氨酸叔丁酯：

[0285] 将甘氨酸叔丁酯HCl(2.1g,12.6mmol,1.05当量)添加到二氯甲烷(300ml)中,随后添加三乙胺(2.54g,25mmol,2.1当量)和4-臂-PEG20k-SCM(60g,3mmol,MW为约20,000)。将该反应溶液在室温下搅拌12小时,并添加到搅拌的TBME(2.0L)中以沉淀产物。通过过滤分离产物,并用30％MeOH/70％TBME(1L)洗涤以去除NHS。将产物在真空下干燥12hr以提供4-臂-PEG20K-CM-甘氨酸叔丁酯(60.0g)。

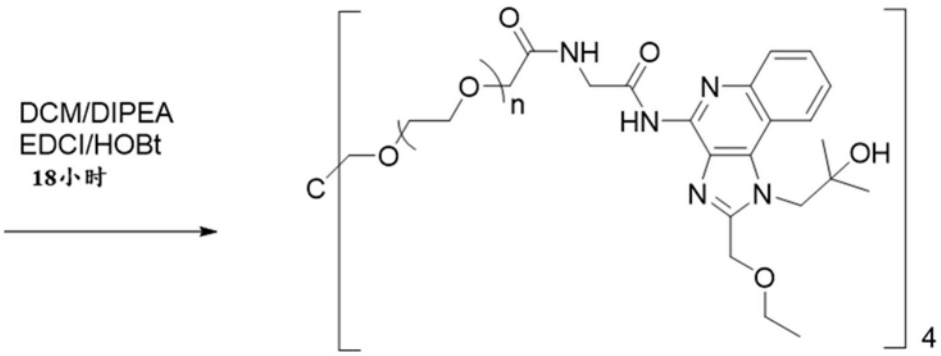
4-臂-PEG20k-CM-甘氨酸

[0286] 将TFA(225ml)添加到4-臂-PEG20K-CM-甘氨酸叔丁酯(55g)和DCM(75ml)的混合物中。允许该所得反应溶液在室温下搅拌14小时。将该反应混合物缓慢添加到搅拌的TBME(2.4L)中以沉淀产物。通过过滤将该产物分离并用30％MeOH/70％TBME(1L)洗涤。将产物在真空下干燥以提供4-臂-PEG20K-CM-甘氨酸(54.0g)。

[0287] ^{1}H NMR(500MHz,$CDCl_3$)δ4.01(d,7.1H),3.99(s,7.1H),3.74-3.48(m,1818H),3.35(s,7.1H)。



4臂-PEG20k-CM-甘氨酸

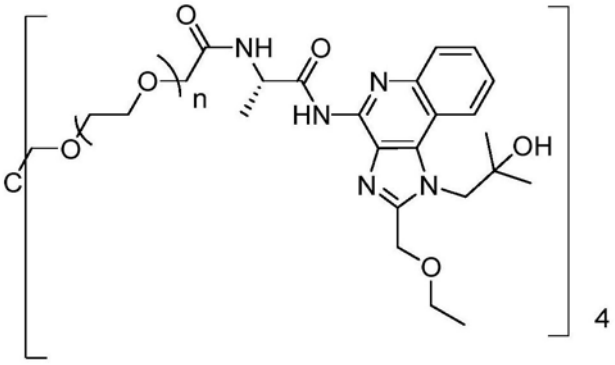


4-臂-PEG20k-CM-甘氨酸-N-R848：

[0288] 如上述反应方案中使用所得的4-臂-PEG20k-CM-甘氨酸以产生4-臂-PEG20k-CM-甘氨酸-N-R848。

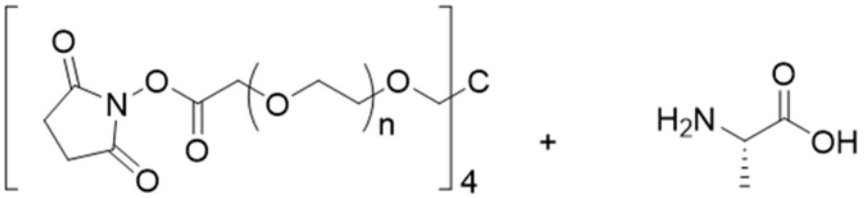
实例7

4-臂-PEG20k-CM-(L)-丙氨酸-N-R848(化合物7)的合成

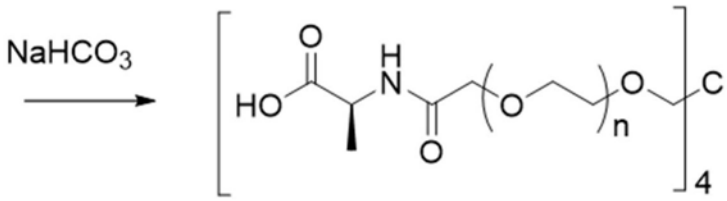


化合物 7

[0289] 根据以下反应方案合成标题化合物。



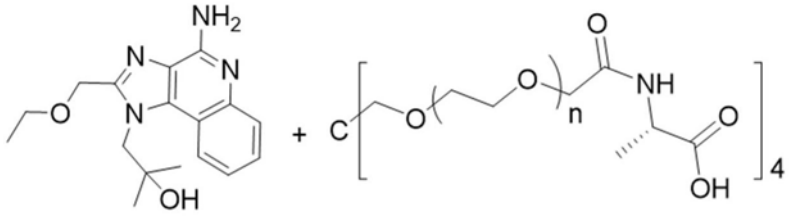
4臂-PEG20K-SCM 左旋丙氨酸

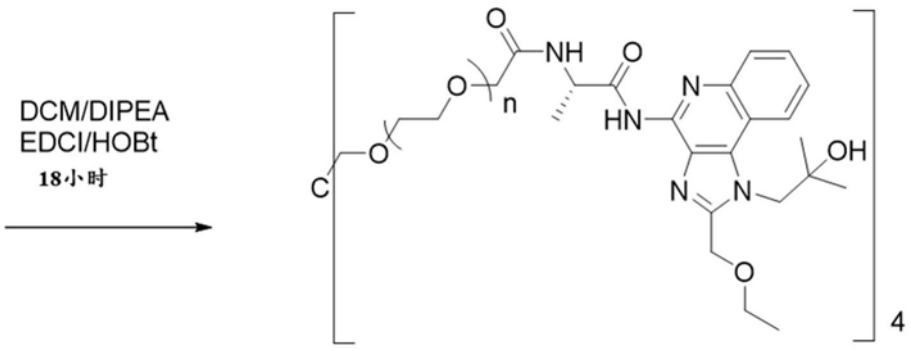


4-臂-PEG20k-CM-L-丙氨酸：

[0290] 将L-丙氨酸(7.100g,10当量)和碳酸氢钠(6.720g,10当量)添加到去离子水(800ml)中,并将该溶液搅拌直到变得澄清。然后将4-臂-PEG20k-SCM(40.030g,1当量)添加到溶液中。将该反应溶液在20℃下搅拌3小时。将5N HCl溶液添加到溶液中以将pH调节至4.0。将溶液用二氯甲烷(2x 150ml)萃取。将有机相合并,并用无水硫酸钠干燥。通过玻璃料去除固体。将滤液凝缩至50ml,并然后添加到500ml乙醚中以获得沉淀。通过过滤获得呈白色固体粉末的产物(35.012g,产率87%),并在真空中干燥过夜。

[0291] ^{1}H NMR(500MHz,$CDCl_3$)δ4.42(m,3.56H),3.85(s,7.11H),3.58-3.33(m,1818H),3.27(s,7.90H),1.30(d,10.28H)。





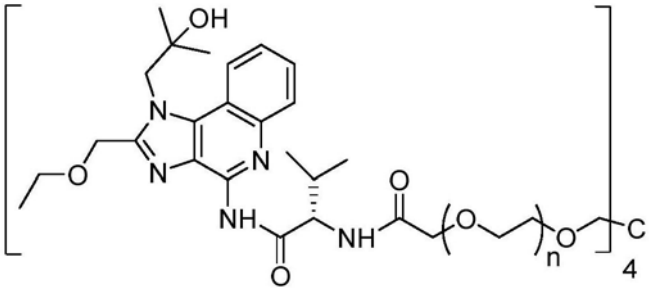
4-臂-PEG20k-CM-L-丙氨酸-N-R848：

[0292] 在20℃下,将4-臂-PEG20k-CM-L-丙氨酸(2.500g,0.5mmol的COOH)、N,N-二异丙基乙胺(258mg,2.0mmol)、N-(3-二甲基氨基丙基)-N'-乙基碳二亚胺盐酸盐(192mg,1.0mmol)和羟基苯并三唑(135mg,1mmol)溶解于无水二氯甲烷(15ml)中。在30分钟内添加R848(189mg,0.6mmol)。将该反应溶液在20℃下搅拌18小时。将该反应溶液倒入1升的乙醚中,同时搅拌。通过过滤收集形成的沉淀,并用乙醚(50ml)洗涤。将所获得的固体添加到异丙醇(300ml)中,并将悬浮液加热至60℃以形成澄清的溶液。将该溶液冷却至室温同时搅拌。通过过滤收集形成的沉淀,并用乙醚(50ml)洗涤。再次重复在异丙醇中通过沉淀进行纯化,并随后在高真空下干燥过夜以给出呈白色固体的纯的缀合物(1.702g,具有4.2%(w/w)R848负载量)。

[0293] ^{1}H NMR(500MHz,$CDCl_3$)δ8.14(d,J=8.4Hz,5.14H),7.69-7.54(m,3.95H),7.48(d,J=8.0Hz,2.37H),4.90(s,4.74H),4.78(s,4.74H),3.62(br,1818H),1.60(d,J=6.9Hz,5.93H),1.39(d,J=7.3Hz,5.93H),1.36-1.27(m,21.73H),1.24(d,J=6.7Hz,15.80H)。

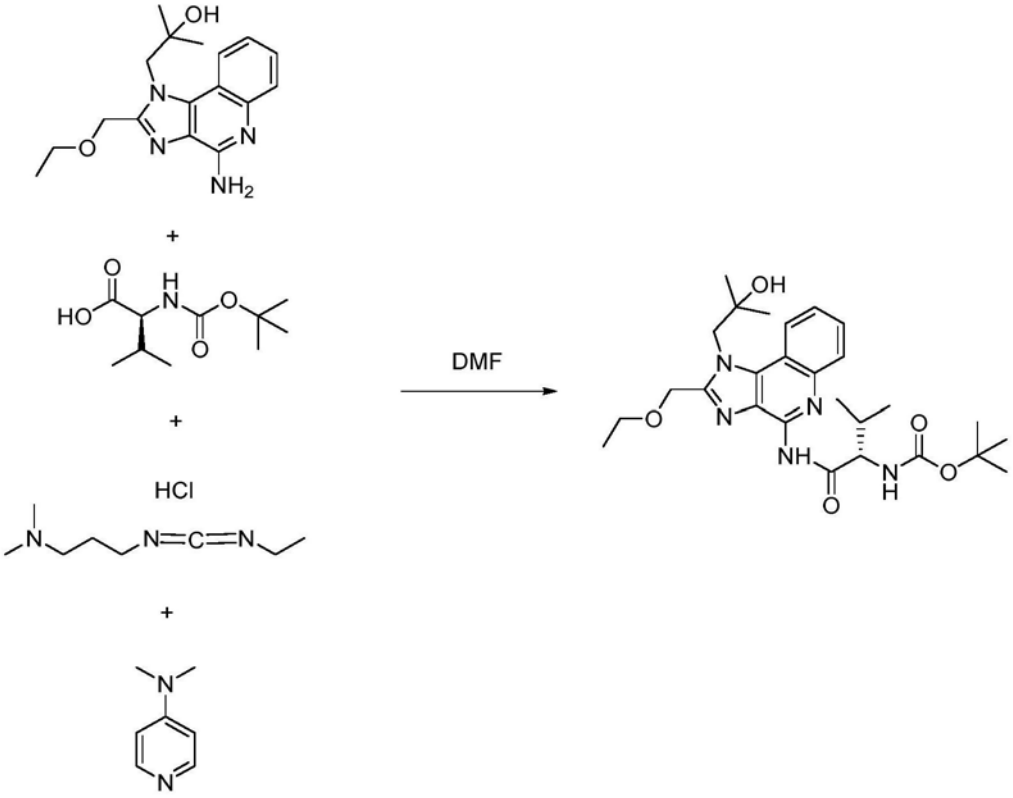
实例8

4-臂-PEG20k-CM-(L)-缬氨酸-N-R848(化合物8)的合成



化合物 8

[0294] 根据以下反应方案合成标题化合物。

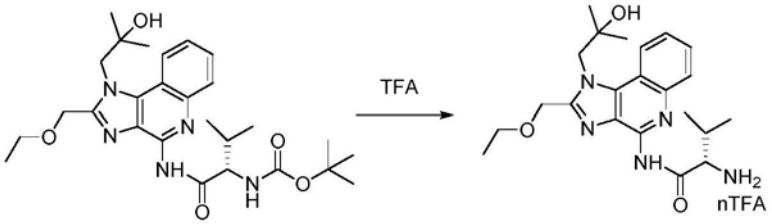


Boc-缬氨酸-R848：

[0295] 将1-(4-氨基-2-(乙氧基甲基)-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-1-基)-2-甲基丙-2-醇(R848)(237.5mg,0.755mmol)溶解于无水N,N-二甲基甲酰胺(5ml)中。添加Boc-L-缬氨酸(263.4mg,1.2mmol)和4-(二甲基氨基)吡啶(187.4mg,1.534mmol)。添加N-(3-二甲基氨基丙基)-N'-乙基碳二亚胺盐酸盐(236.1mg,1.232mmol)。将所得混合物在室温下搅拌3h。添加水以猝灭该反应。添加盐水。将该混合物用乙酸乙酯(2x 50ml)萃取。将合并的有机溶液经无水硫酸钠干燥,浓缩至干燥。使用1%-10%甲醇/二氯甲烷,将残余物经硅胶快速柱色谱纯化以提供呈白色固体的产物(394.7mg)。

[0296] ^{1}H-NMR(500MHz,$CDCl_3$)δ8.99(br.,1H),8.15-8.11(m,2H),7.58(t,J=7.5Hz,1H),7.47(t,J=7.5Hz,1H),5.42(m,1H),4.89(br,2H),4.77(s,2H),3.63(q,J=7.0Hz,2H),3.27(m,1H),2.45(br,1H),1.44(s,9H),1.31(br,6H),1.22(t,J=7.0Hz,3H),1.14(br,3H),0.93(d,J=6.0Hz,3H)。LC-MS:514(MH^+/z)。

缬氨酸-R848.nTFA盐：

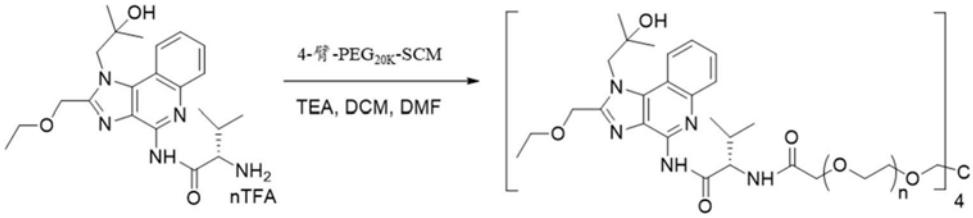


[0297] 将(S)-叔丁基(1-((2-(乙氧基甲基)-1-(2-羟基-2-甲基丙基)-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-4-基)氨基)-3-甲基-1-氧代丁-2-基)氨基甲酸酯(Boc-缬氨酸-R848)(377.0mg,0.73mmol)溶解于二氯甲烷(30ml)中,并添加三氟乙酸(3ml,38.8mmol)。将所得混合物在室温下搅拌3.5h。将该混合物浓缩以去除溶剂。将残余物在高真空下干燥以提供呈TFA盐的产

物(678.5mg)。

[0298] LC-MS:414(MH^+/z)。

4-臂-PEG_{20k}-缬氨酸-N-R848

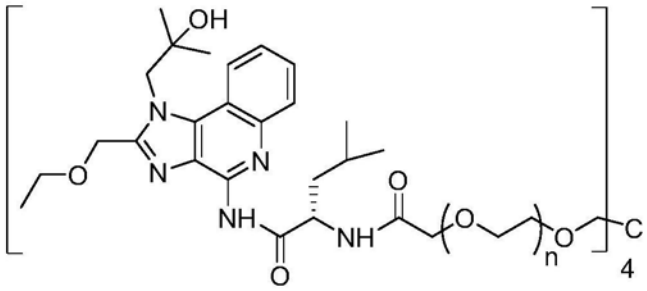


[0299] 在室温下,将4-臂-PEG20k-SCM(4.170g,0.74mmol的SCM)在无水二氯甲烷(20ml)中的溶液添加到缬氨酸-R848.nTFA(约0.734mmol)和三乙胺(0.3mL,2.15mmol)在N,N-二甲基甲酰胺(1.0ml)中的混合物里。将二氯甲烷(约10mL)用于在小瓶中溶解4-臂-PEG20k-SCM残余物,并添加到反应混合物中。添加三乙胺(0.15mL,1.076mmol)。将所得混合物在室温下搅拌23h。将该反应混合物浓缩以去除溶剂。将残余物用异丙醇(275ml)再结晶。将固体用乙醚洗涤,并在高真空下干燥过夜以提供4.053g呈白色固体的产物。药物负载量为4.3%(w/w)。

[0300] ^{1}H-NMR(500MHz,$CDCl_3$)δ8.99(br),8.10-8.09(m,6H),7.54(t,J=7.5Hz,3H),7.47(d,3H).7.42(t,J=7.5Hz,3H),4.840(br,6H),4.712(s,6H),4.07-3.95(m,6H),3.72-3.42(m,1818H),3.39(m,3H),2.41(br,6H),1.36(br,18H),1.16(t,J=6.5Hz,9H),1.12(m,9H),0.92(d,J=6.0Hz,9H)。

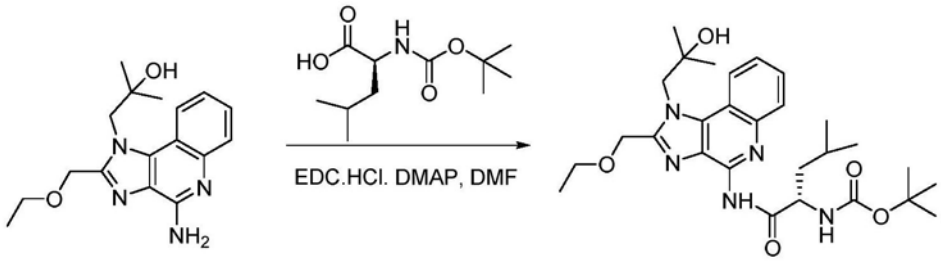
实例9

4-臂-PEG20k-CM-(L)-亮氨酸-N-R848(化合物9)的合成



化合物9

[0301] 根据以下反应方案合成标题化合物。

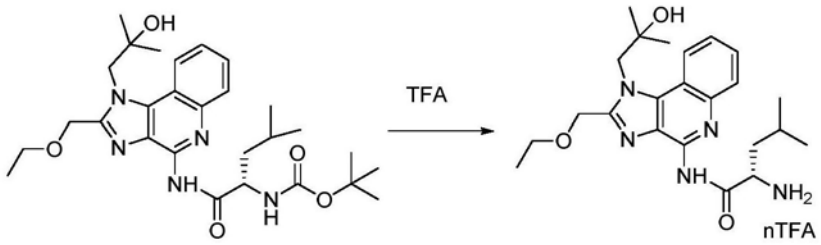


Boc-Leu-R848:

[0302] 将1-(4-氨基-2-(乙氧基甲基)-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-1-基)-2-甲基丙-2-醇(R848)(421.8mg,1.34mmol)溶解于N,N-二甲基甲酰胺(10ml)中。添加Boc-Leu-OH(501.4mg,2.207mmol)和4-(二甲基氨基)吡啶(344.6mg,2.82mmol)。添加N-(3-二甲基氨基

丙基)-N'-乙基碳二亚胺盐酸盐(438.2mg,2.286mmol)。将所得混合物在室温下搅拌18h。添加水以猝灭该反应。添加盐水。将该混合物用乙酸乙酯(2x 50ml)萃取。将合并的有机溶液经无水硫酸钠干燥,并浓缩至干燥。使用1%-10%甲醇/二氯甲烷,将残余物经硅胶快速柱色谱纯化,以提供呈白色固体的产物(494mg,70%产率)。

[0303] ^{1}H-NMR(500MHz,$CDCl_3$)δ9.03(br,1H),8.16(d,J=8.0Hz,1H),8.17(d,J=8.0Hz,1H),7.57(t,J=7.5Hz,1H),7.46(t,J=7.5Hz,1H),5.26(m,1H),4.85(br,2H),4.77(s,2H),3.63(q,J=7.0Hz,2H),3.26(m,1H),1.89(m,2H),1.69(s,3H),1.56(m,1H),1.43(s,9H),1.31(br,3H),1.22(t,J=7.0Hz,3H),1.08(br,3H),0.94(d,J=6.0Hz,3H)。LC-MS:528(MH^+/z)。



Leu-R848.nTFA盐:

[0304] 将(S)-叔丁基(1-((2-(乙氧基甲基)-1-(2-羟基-2-甲基丙基)-1H-咪唑并[4,5-c]喹啉-4-基)氨基)-4-甲基-1-氧代戊烷-2-基)氨基甲酸酯(Boc-Leu-R848)(494mg,0.936mmol)溶解于二氯甲烷(20ml)中,并且添加三氟乙酸(3ml,38.8mmol)。将所得混合物在室温下搅拌4h。将该混合物浓缩以去除溶剂。将残余物在高真空下干燥以提供呈TFA盐的产物(895.7mg)。

[0305] LC-MS:428(MH^+/z)。



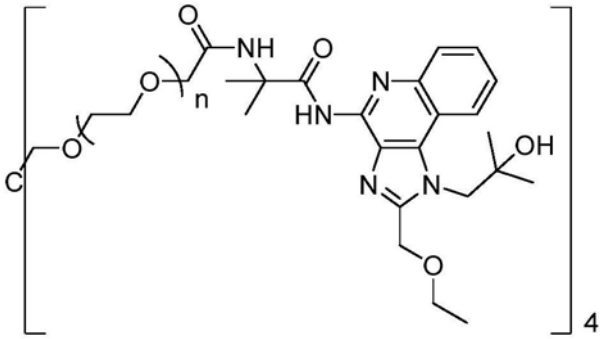
4-臂-PEG20k-CM-L-亮氨酸-R848:

[0306] 在室温下,将4-臂-PEG20k-SCM(5.200g,0.96mmol的SCM)在无水二氯甲烷(30ml)中的溶液添加至R848-Leu-NH_2.nTFA(约0.936mmol)在N,N-二甲基甲酰胺(1.0ml)中的溶液里。将二氯甲烷(约10mL)用于在小瓶中溶解4-臂-PEG20k-SCM的残余物,其被添加到反应混合物中。添加三乙胺(0.35ml,2.51mmol)。将所得混合物在室温下搅拌35min。添加三乙胺(0.25ml,1.79mmol)。将该混合物在室温下搅拌19h。将反应混合物浓缩以去除溶剂。将残余物用异丙醇(275ml)再结晶。将固体用乙醚洗涤并在高真空下干燥过夜以提供5.12g呈白色固体的产物。药物负载量为4%(w/w)。

[0307] ^{1}H-NMR(500MHz,$CDCl_3$)δ8.09-8.08(m,5.5H),7.51(t,J=7.5Hz,2.75H),7.40(m,5.5H).4.85(br,5.5H),4.70(s,5.5H),4.02-3.91(m,5.5H),3.70-3.32(m,1818H),1.81(m,2.75H),1.72(br,2.75H),1.63(m,2.75H),1.22(m,16.5H),1.12(t,J=6.0Hz,8.25H),0.95(br,8.25H),0.86(d,J=6.0Hz,8.25H)。

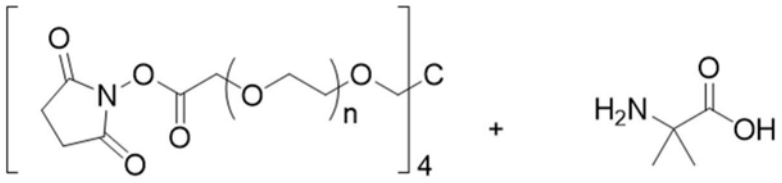
实例10

4-臂-PEG20k-CM-α,α-二甲基-甘氨酸-N-R848(化合物10)的合成

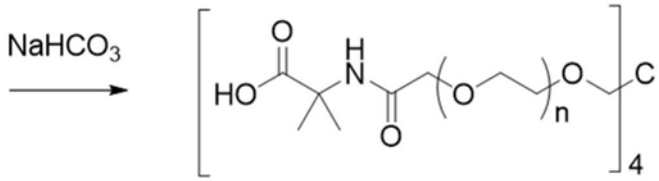


化合物 10

[0308] 根据以下反应方案合成标题化合物。



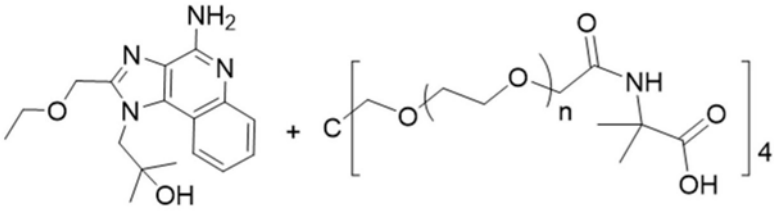
4臂-PEG20K-SCM



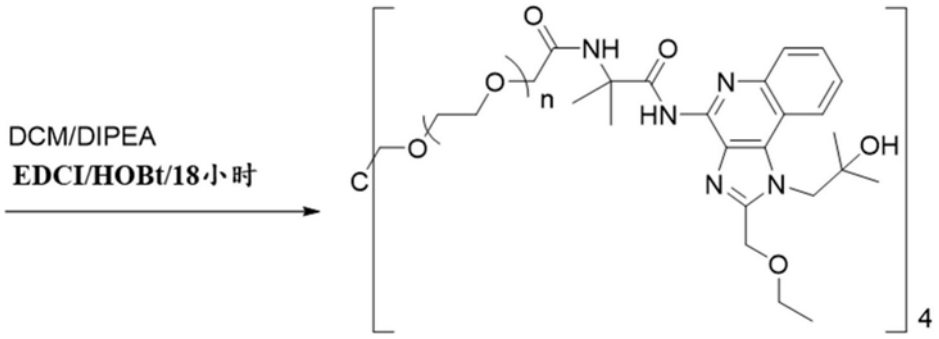
4-臂-PEG20k-CM-α,α-二甲基-甘氨酸:

[0309] 将2-氨基-2-甲基丙酸(2.890g,28mmol)和碳酸氢钠(2.352g,28mmol)溶解于水(40ml)中。将4-臂-PEG20k-SCM(7.0g,1.4mmol的SCM)分批添加。将反应混合物在20℃下搅拌18小时。将该反应用1M HCl(42ml)中和至pH 4.7。将该反应混合物用氯化钠饱和并用二氯甲烷(3x 100ml)萃取。将有机相经无水硫酸镁干燥并浓缩。将残余物用异丙醇(500ml)再结晶以给出4.710g呈白色固体的4-臂-PEG20k-CM-α,α-二甲基-甘氨酸(具有80%取代)。

[0310] ^{1}H NMR(500MHz,$CDCl_3$)δ7.45(s,3.56H),4.15(s,2.77H),3.97(s,2.77H),3.64(br,1818H),3.41(s,7.90H),1.62(s,19.36H)。



4臂-PEG20K-CM-
α,α-二甲基-甘氨酸



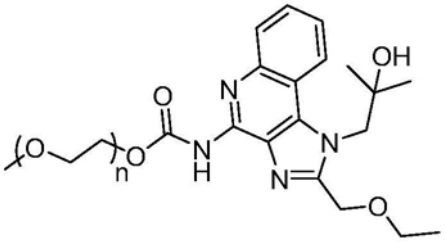
4-臂-PEG20k-CM-α,α-二甲基-甘氨酸-N-R848：

[0311] 在20℃下,将4-臂-PEG20k-CM-α,α-二甲基-甘氨酸(2.000g,0.43mmol的COOH)、N,N-二异丙基乙胺(258mg,2.0mmol)、N-(3-二甲基氨基丙基)-N'-乙基碳二亚胺盐酸盐(153mg,0.9mmol)、和羟基苯并三唑(108mg,0.9mmol)溶解于无水二氯甲烷(15ml)中。在30分钟内添加R848(138mg,0.44mmol)。将该反应溶液在20℃下搅拌18小时。将该反应溶液倒入1升的乙醚中,同时搅拌。通过过滤收集形成的沉淀,并用乙醚(50ml)洗涤。将所获得的固体添加到异丙醇(300ml)中,并将悬浮液加热至60℃以形成澄清的溶液。将该溶液冷却至室温同时搅拌。通过过滤收集形成的沉淀,并用乙醚(50ml)洗涤。再次重复在异丙醇中通过沉淀进行纯化,并随后在高真空下干燥过夜以给出呈白色固体的纯的缀合物(1.819g,具有4.7%(w/w)R848负载量)。

[0312] ^{1}H NMR(500MHz,$CDCl_3$)δ9.71(s,3.95H),8.29-8.03(m,3.95H),7.57(s,3.95H),7.45(s,3.95H),4.83(d,J=66.8Hz,11.85H),3.61(br,1818H),2.50(s,7.90H),1.76(s,11.85H),1.42(s,3.95H),1.26(d,J=34.3Hz,27.65H)。

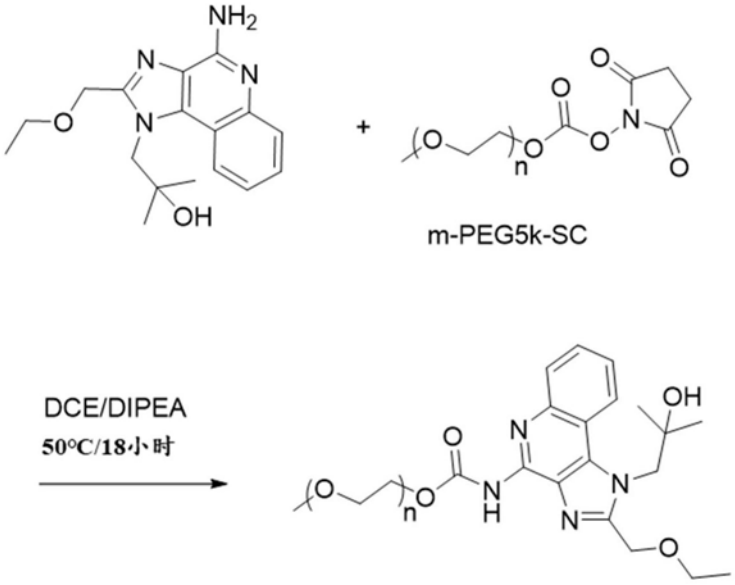
实例11

mPEG5k-氨基甲酸酯-N-R848(化合物11)的合成



化合物 11（比较性）

[0313] 根据以下反应方案合成标题化合物。



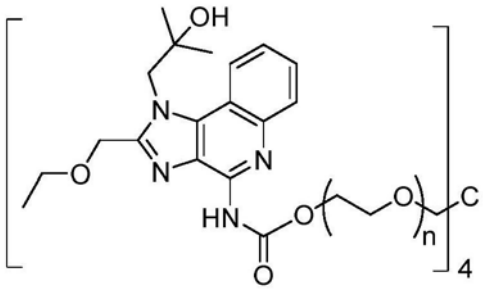
mPEG5k-氨基甲酸酯-N-R848：

[0314] 在50℃下，将mPEG5k-SC(2.500g，0.5mmol)、R848(236mg，0.75mmol)和N,N-二异丙基乙胺(129mg，1.0mmol)溶解于无水N,N-二甲基甲酰胺(20ml)中。将该反应溶液在50℃下搅拌18小时。将该反应溶液添加至1升的乙醚中同时搅拌。通过过滤收集形成的沉淀，并用乙醚(50ml)洗涤。将所获得的固体添加到异丙醇(300ml)中，并将悬浮液加热至60℃以形成澄清的溶液。将该溶液冷却至室温同时搅拌。通过过滤收集形成的沉淀，并用乙醚(50ml)洗涤。再次重复在异丙醇中通过沉淀进行纯化，并随后在高真空下干燥过夜以给出呈白色固体的纯的缀合物(2.338g，具有4.5％(w/w)R848负载量)。

[0315] ^{1}H NMR(500MHz，$CDCl_3$)δ8.18(s，0.77H)，8.13(dd，J＝8.4，1.3Hz，0.78H)，7.59(ddd，J＝8.4，7.0，1.3Hz，0.82H)，7.49-7.44(m，0.82H)，4.91(s，1.7H)，4.78(s，1.7H)，4.43(d，J＝4.8Hz，1H)，3.63(br，574H)，3.37(s，3H)，1.32(s，5H)，1.25(t，J＝7.0Hz，2H)。

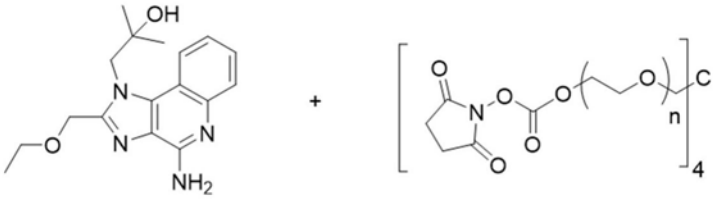
实例12

4-臂-PEG20k-氨基甲酸酯-N-R848(化合物12)的合成

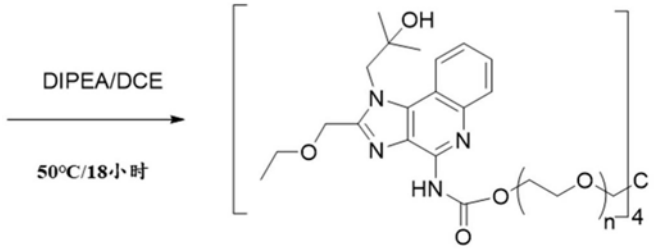


化合物 12

[0316] 根据以下反应方案合成标题化合物。



4臂-PEG20K-SC



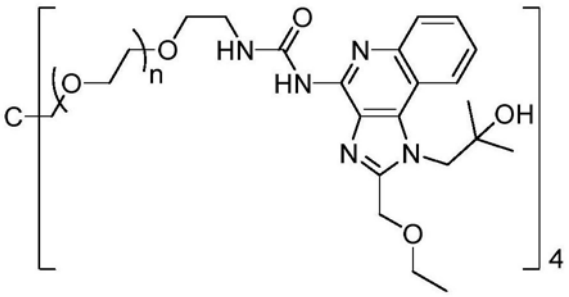
4-臂-PEG20k-氨基甲酸酯-N-R848：

[0317] 在50℃下，将4-臂-PEG20k-SC(5.0g，1.0mmol的SCM)和R848(377mg，1.2mmol)溶解于无水1,2-二氯乙烷(25ml)中。将N,N-二异丙基乙胺(129mg，2mmol)添加到溶液中。将该反应溶液在50℃下搅拌18小时。将该反应溶液添加至1升的乙醚中同时搅拌。通过过滤收集形成的沉淀，并用乙醚(50ml)洗涤。将所获得的固体添加到异丙醇(300ml)中，并将悬浮液加热至60℃以形成澄清的溶液。将该溶液冷却至室温同时搅拌。形成沉淀，并通过过滤收集，并用乙醚(50ml)洗涤。再次重复在异丙醇中通过沉淀进行纯化，并随后在高真空下干燥过夜以给出呈白色固体的纯的缀合物(4.240g，具有4.5％(w/w)R848负载量)。

[0318] ^{1}H NMR(500MHz，$CDCl_3$)δ8.16(t，J＝8.7Hz，5.93H)，7.61(t，J＝7.7Hz，3.16H)，7.48(t，J＝7.7Hz，3.16H)，4.93(s，2.96H)，4.80(s，5.93H)，4.45(t，J＝4.8Hz，2.96H)，3.82(t，J＝4.8Hz，2.96H)，3.79(t，J＝5.0Hz，5.93H)，3.65(br，1818H)，3.42(s，3.16H)，1.33(s，19.75H)，1.26(t，J＝7.0Hz，7.90H)。

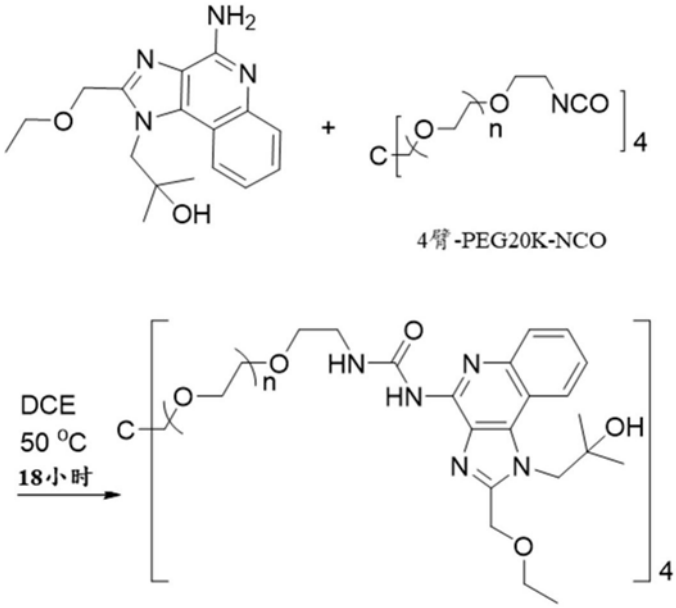
实例13

4-臂-PEG20k-脲-N-R848(化合物13)的合成



化合物 13

[0319] 根据以下反应方案合成标题化合物。



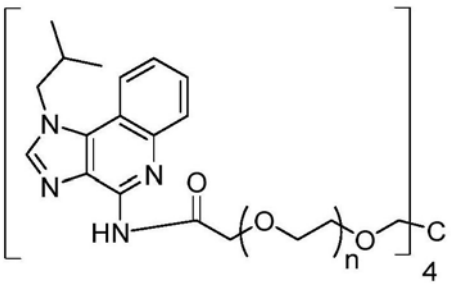
4-臂-PEG20k-脲-N-R848：

[0320] 在50℃下，将4-臂-PEG20k-异氰酸酯(1.0g，0.2mmolNCO)和R848(69.2mg，0.22mmol)溶解于无水1,2-二氯乙烷(10ml)中。将该反应溶液在50℃下搅拌18小时。将该反应溶液倒入0.5升的乙醚中，同时搅拌。通过过滤收集形成的沉淀，并用乙醚(50ml)洗涤。将所获得的固体添加到异丙醇(250ml)中，并将悬浮液加热至60℃以形成澄清的溶液。将该溶液冷却至室温同时搅拌。通过过滤收集形成的沉淀，并用乙醚(50ml)洗涤。再次重复在异丙醇中通过沉淀进行纯化，并随后在高真空下干燥过夜以给出呈白色固体的纯的缀合物(938g，具有4.7％(w/w)R848负载量)。

[0321] ^{1}H NMR(500MHz，$CDCl_3$)δ10.30(d，J＝5.5Hz，3.56H)，8.17-8.09(m，7.11H)，7.94(d，J＝8.3Hz，3.56H)，7.57(t，J＝7.8Hz，3.56H)，7.43(t，J＝7.8Hz，3.56H)，4.92(s，7.51H)，4.77(s，7.51H)，3.63(br，1818H)，1.32(s，23.70H)，1.24(t，J＝7.1Hz，10.67H)。

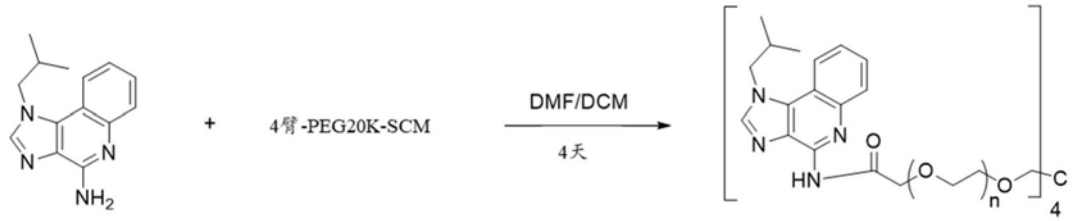
实例14

4-臂-PEG20k-CM-咪喹莫特(化合物14)的合成



化合物 14

[0322] 根据以下反应方案合成标题化合物。



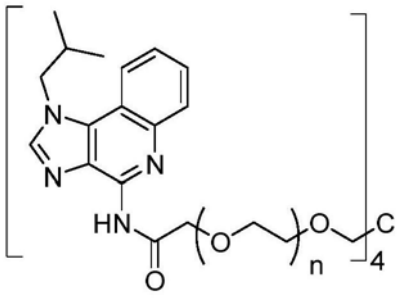
4-臂-PEG20k-CM-咪喹莫特:

[0323] 在室温下,将4-臂-PEG20k-SCM(6.789g,1.2mmol的SCM)溶解于无水二氯甲烷(33ml)中,并然后添加到咪喹莫特(359.7mg,1.452mmol)在N,N-二甲基甲酰胺(5.0ml)中的悬浮液里。将二氯甲烷(约10mL)用于溶解4-臂-PEG20k-SCM残余物,并添加到反应混合物中。将所得混合物在室温下搅拌3天。添加二氯甲烷(10ml)。将该混合物在室温下再搅拌一天。将反应混合物浓缩以去除溶剂。将残余物用异丙醇再结晶两次以提供4.8612g呈白色固体的产物。药物负载量为3.9%(w/w)。

[0324] ^{1}H NMR(500MHz,$CDCl_3$)δ9.55(br,2.5H),8.026(m,3.2H),7.853(d,J=8.0Hz,3.3H),7.720(s,3.3H),7.450(t,J=8.0Hz,3.3H),7.371(t,J=8.0Hz,3.3H),4.30-4.18(m,13.26H),3.471(m,1818H),2.190(m,3.1H),0.877和0.986(2s,20.4H)。

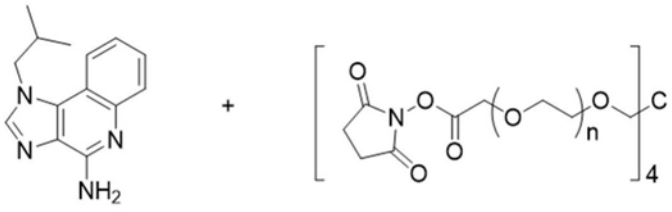
实例15

4-臂-PEG40k-CM-N-咪喹莫特(化合物15)的合成

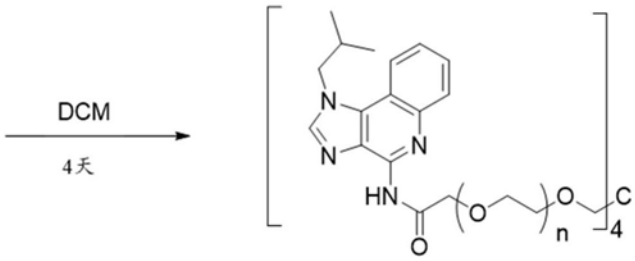


化合物 15

[0325] 根据以下反应方案合成标题化合物。



4臂-PEG40K-SCM



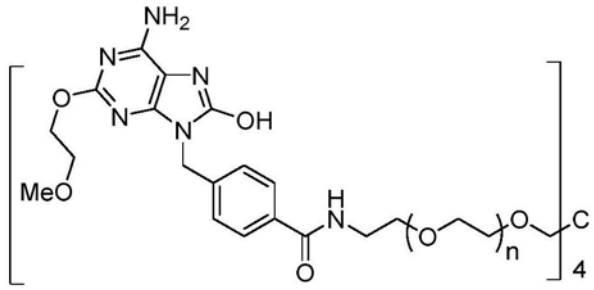
4-臂-PEG40k-CM-N-咪喹莫特：

[0326] 将4-臂-PEG40k-SCM(5.110g,0.51mmol的SCM)溶解于无水二氯甲烷(33ml)中,并且在室温下添加咪喹莫特(148mg,0.61mmol)。将所得悬浮液在室温下搅拌4天以形成澄清的溶液。将反应混合物浓缩以去除溶剂。将残余物用如上所提及的异丙醇(250ml)再结晶两次以提供4.609g呈白色固体的产物。基于NMR分析,该产物包含1.8％(w/w)咪喹莫特。

[0327] ^{1}H NMR(500MHz,$CDCl_3$)δ8.21(d,3.06H),8.02(d,3.06H),7.85(s,3.15H),7.63(t,3.34H),7.53(t,3.17H),4.34(d,6.21H),3.89-3.43(m,3636H),1.03(s,18.09H)。

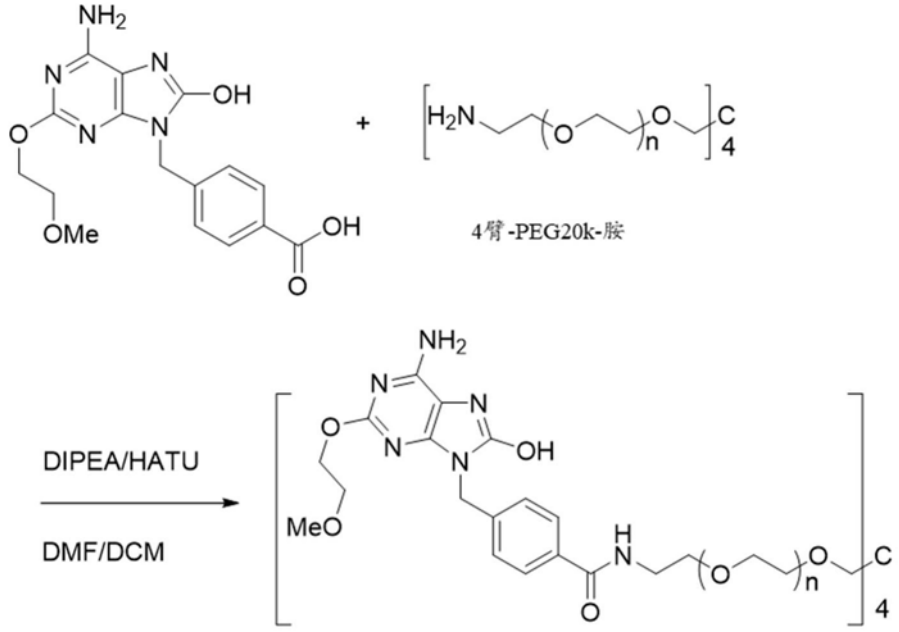
实例16

4-臂-PEG20k 4-((6-氨基-8-羟基-2-(2-甲氧基乙氧基)-9H-嘌呤-9-基)甲基)-苯甲酰胺(化合物16)的合成



化合物 16

[0328] 根据以下反应方案合成标题化合物。



[0329] 在20℃下,将4-臂-PEG20k-胺(1.500g,0.3mmol的胺)溶解于二氯甲烷(3ml)中。将该溶液添加到含有N,N-二异丙基乙胺(116mg,0.9mmol)、1-[双(二甲基氨基)亚甲基]-1H-1,2,3-三唑并[4,5-b]吡啶-3-氧化物六氟磷酸盐(137mg,0.36mmol)、和4-((6-氨基-8-羟基-2-(2-甲氧基乙氧基)-9H-嘌呤-9-基)甲基)苯甲酸(108mg,0.3mmol)的N,N-二甲基甲酰胺(10ml)溶液中。将该反应混合物在20℃下搅拌18小时。将该反应溶液添加至0.3升的乙醚中同时搅拌。通过过滤收集形成的沉淀,并用乙醚(50ml)洗涤。将所获得的固体通过快速色谱法(使用二氯甲烷中的10%-30%甲醇)进行纯化。将产物溶解于20ml二氯甲烷中并过滤。将滤液浓缩并再次在乙醚中沉淀,以给出呈白色固体的纯的缀合物(300mg,具有6.0%(w/w)药物负载量)。

[0330] ^{1}H NMR(500MHz,$CDCl_3$)δ9.26(s,3.95H),7.78(d,J=7.9Hz,7.90H),7.52(d,J=7.9Hz,7.90H),5.67(s,7.90H),5.04(s,7.90H),4.42(t,J=5.0Hz,7.90H),3.66(br,1818H)。

实例17

体内研究:对TLR7/8依赖性细胞因子产生的证明

[0331] 通过测量化合物6或R848对TLR7/8激动剂后细胞因子的诱导,进行研究以评估血浆中TLR7/8依赖性细胞因子的产生。

方法

[0332] 将化合物6、R848或运载体(HBSS;汉克氏平衡盐溶液(Hank's Balanced Salt Solution))瘤内给予携带CT26肿瘤的Balb/c小鼠。剂量为10μg化合物6(R848当量)或10μg R848。(基于TLR 7/8激动剂(例如,瑞喹莫德或其他TLR 7/8激动剂)含量表示缀合物剂量和浓度,其中TLR 7/8激动剂的质量独立于PEG质量表示)。在预-定量的时间点处采集血浆用于分析IFN-γ、IL-2、IL-4、IL5、IL-6、IL-1β、IL-10、IL-12p70、KC/GRO、TNF-α、和IFN-α的水平。

[0333] 为评估IFN-γ、IL-2、IL-4、IL5、IL-6、IL-1β、IL-10、IL-12p70、KC/GRO、和TNFα,使用来自细观发现公司(Meso Scale Discovery)(MSD;盖瑟斯堡(Gaithersburg),马里兰州,

美国)的捕获抗体预涂的96孔多点平板在一式两份样品上进行电化学发光测定。通过向每个孔中添加用MSD SULFO-TAG试剂标记的检测抗体并在室温下孵育2小时来定量特异性细胞因子水平。使用SECTOR Imager 2400立即读取平板,并使用Discovery Workbench软件4.0版(MSD,盖瑟斯堡,马里兰州,美国)对数据进行定量。

[0334] 根据制造商的说明书,用Verikine小鼠干扰素-αELISA试剂盒(PBL,皮斯卡塔韦,新泽西州,美国)测量小鼠IFNα。添加终止溶液后,使用BioTekμQuant酶标仪(伯腾公司(Biotek);威努斯基(Winooski),佛蒙特州,美国)测定450nm处的吸光度。使用Biotek Gen5软件(伯腾公司;威努斯基,佛蒙特州,美国)定量ELISA数据。数据被表示为重复的倍数变化的平均值。

结果

[0335] 表1和表2中提供的结果为三只动物的平均值。

表1:瘤内单次给予10μg测试化合物后2小时细胞因子的产生。

测试化合物	倍数变化(治疗/运载体)				
	IL6	IFNa	IL12	KC/GRO	TNFa
R848	++++	++	++	+	++
化合物6	++	+	+	+	+

将倍数变化提供如下:

NA是不适用

--是未测试的

+<50≤++<200≤+++<800≤++++

表2:瘤内单次给予10μg测试化合物后6小时细胞因子的产生

测试化合物	倍数变化(治疗/运载体)	
	IFNg	IL10
R848	++++	++
化合物6	+++	+

将倍数变化提供如下:

NA是不适用

--是未测试的

+<5≤++<10≤+++<20≤++++

[0336] 瘤内给予化合物6导致血浆中细胞因子的诱导,但用R848母体分子观察到的诱导水平降低。这些结果表明R848的PEG化降低了血浆细胞因子的全身产生,降低了毒性的可能性。

实例18

体内研究:血浆和肿瘤药代动力学和细胞因子产生

[0337] 进行研究以评估R848和化合物6在血浆和肿瘤组织中的单剂量药代动力学。

[0338] 将R848或化合物6瘤内给予携带CT26或EMT6肿瘤的Balb/c小鼠。R848和化合物6的剂量是10μg(R848当量)。使用合格的LC-MS/MS方法在预-定量的时间点采集血浆和肿瘤组织用于分析R848和化合物6。

[0339] 结果提供在表3A和3B中。提供的结果是3只动物的平均值,并以R848当量提供。

表3A:向携带CT26肿瘤的小鼠单次瘤内给予测试化合物后的血浆和肿瘤浓度

测试化合物	给药后的时间 (hr)	R848 血浆浓度 (ng/mL)	R848 肿瘤浓度 (ng/g)	化合物 6 血浆浓度 (ng/mL*)	化合物 6 肿瘤浓度 (ng/g*)
R848	0.25	++	++	NA	NA
	2.00	+	+	NA	NA
	6.00	+	+	NA	NA
	24.00	+	+	NA	NA
	48.00	BLQ	+	NA	NA
	72.00	BLQ	+	NA	NA
	96.00	BLQ	+	NA	NA
	120.00	BLQ	+	NA	NA
	144.00	BLQ	+	NA	NA
化合物6	0.25	+	+	+++	+++
	2.00	+	+	+++	+++
	6.00	+	+	+++	++
	24.00	+	+	+++	++
	48.00	+	+	++	+
	72.00	+	+	BLQ	+
	96.00	BLQ	+	BLQ	+
	120.00	+	+	BLQ	+
	144.00	+	+	BLQ	+

*R848当量

表3B:向携带EMT6肿瘤的小鼠单次瘤内给予测试化合物后的血浆和肿瘤浓度血浆

测试化合物	给药后的时间(hr)	R848血浆浓度(ng/mL)	R848肿瘤浓度(ng/g)	化合物6血浆浓度(ng/mL*)	化合物6肿瘤浓度(ng/g*)
R848	0.25	+++	++	NA	NA
	2.00	+	+	NA	NA
	6.00	+	+	NA	NA
	24.00	BLQ	+	NA	NA
	48.00	BLQ	+	NA	NA
	72.00	BLQ	+	NA	NA
	96.00	BLQ	+	NA	NA
	120.00	BLQ	+	NA	NA
	144.00	BLQ	+	NA	NA
化合物6	0.25	+	+	++	+++
	2.00	+	+	+++	+++
	6.00	+	+	+++	++
	24.00	+	+	++	+
	48.00	+	+	++	+
	72.00	BLQ	+	BLQ	+
	96.00	BLQ	+	BLQ	+
	120.00	BLQ	+	BLQ	+
	144.00	BLQ	+	BLQ	BLQ

*R848当量

将血浆浓度提供如下：

NA是不适用

BLQ是定量限以下

--是未测试的

+<10≤++<100≤+++<1,000≤++++

将肿瘤浓度提供如下：

NA是不适用

BLQ是定量限以下--是未测试的

+<1,000≤++<10,000≤+++<100,000≤++++

[0340] 当与瘤内给予R848时相比，瘤内给予化合物6是用于在所治疗的肿瘤中保留化合物6(并局部释放R848)的有效方法，同时显著降低释放的R848的峰值全身浓度，这与观察到的全身细胞因子的低峰值诱导一致。

[0341] 细胞因子分析(在携带CT26肿瘤的小鼠中)：在应用细胞因子分析后的多个时间点获得肿瘤和血浆样品。从所治疗的肿瘤中分离RNA以评估I型干扰素和NFκB依赖性基因表达的诱导。通过多重蛋白质测量测定从肿瘤组织和血浆中测量一组促炎细胞因子。

[0342] 化合物6对全身细胞因子的较低峰值诱导显示于图6A和6B中。图6A和6B是提供在

用化合物6处理后，分别在2小时和6小时处对肿瘤和血浆细胞因子浓度进行比较的图。针对每种所测量的细胞因子(IL-6、KC/GRO、TNF-α、IL-1β、IL-5、IFN-α、IFN-γ、IL-2和IL-12p70)，全身细胞因子的浓度显著低于在肿瘤中的浓度。

[0343] 这些CT26模型条件下的化合物6剂量显示出最佳的细胞因子诱导特征，使瘤内细胞因子诱导最大化和血液中的诱导最小化(图6A和6B)。该观察结果支持通过瘤内/瘤周围递送的化合物6(TLR 7/8激动剂的说明性多臂聚合物缀合物)，免疫细胞的肿瘤环境偏向性参与的目的，这降低过度全身免疫活化的风险。

[0344] 化合物6是TLR 7/8激动剂的多臂聚合物缀合物，依赖性地诱导小鼠肿瘤中TLR7受体活性下游的血浆细胞因子。与外周血相比，瘤内/瘤周围递送缀合物导致在所治疗的肿瘤中更高水平的TLR7途径活化，支持了局部瘤内偏向性免疫活化概念。

实例19

rIL-2与mPEG2-C2-Fmoc-20kD-NHS的反应

[0345] 将1.44mg/ml的纯化的rIL-2(106.4mL)装入第一容器中，接着添加53.6mL的配制缓冲液(10mM乙酸钠(pH 4.5)，5％海藻糖)。测量pH为4.62，测量温度为21.2℃。将PEG试剂C2-PEG2-FMOC-NHS-20K(如在WO 2006/138572中所描述可供使用的)(13.1g)装入第二容器中，接着添加73.3mL的2mM HCl。将所得溶液手动涡旋25分钟。将硼酸钠(0.5M，pH 9.8)添加至该第一容器以使pH升高至约9.1，并且接着将含有该PEG试剂的第二容器的内容物经从1至2分钟的时间段添加至该第一容器。接着通过将8.1mL的2mM HCl装入该第二容器并且将内容物添加至该第一容器来执行冲洗步骤。对于缀合反应，最终rIL-2浓度是0.6mg/mL，硼酸钠浓度是120mM，pH是9.1+/-0.2，温度是20℃-22℃，并且PEG试剂与rIL-2的摩尔比在针对该试剂的活性调整之后(取代水平)是35:1。使该缀合反应进行30分钟，并且通过添加75mL的2N乙酸酸化(以使pH降至大约4)猝灭。如先前所描述通过离子交换色谱法纯化产物，以提供主要为4聚体、5聚体和6聚体(是指可释放地共价附接至r-IL-2的PEG试剂的数量)的组合物(其中8聚体和更高的聚乙二醇化程度在与色谱法相关的洗涤步骤期间除去)。该组合物在本文中被称为“RSLAIL-2”。

实例20

RSLAIL-2的受体偏向性和相关的免疫治疗剂特性

[0346] 与IL-2受体的结合亲和力和与免疫刺激概况相关的受体偏向性：RSLAIL-2与IL-2Rα和IL-2Rβ的结合亲和力通过表面等离子体共振(Biacore T-100)直接测量并且将其与临床上可用的IL-2(阿地白介素)的结合亲和力相比较。抗人抗体(英杰公司(Invitrogen))使用EDC/NHS化学偶合至CM-5传感器芯片的表面。然后，将人IL-2Rα-Fc或IL-2Rβ-Fc融合蛋白用作此表面上捕获的配体。RSLAIL-2及其活性IL-2缀合物代谢物(1-PEG-和2-PEG-IL-2)的连续稀释液在pH 4.5的乙酸盐缓冲液中制备，起始于5mM。允许这些稀释液结合至配体5分钟，并且针对浓度对结合的反应单位(RU)作图以确定EC50值。将每种同种型对每种IL-2受体亚型的亲和力计算为相对于IL-2的亲和力的变化倍数。

[0347] RSLAIL-2的体外结合和活化概况表明聚乙二醇化干扰IL2与IL2Rα之间相对于阿地白介素的相互作用；进行了调查以确定这些效应是否使体内免疫细胞亚型的概况偏向。在给予RSLAIL-2或IL2后肿瘤中CD8 T细胞和Treg细胞的数量是IL2的多效性效应是否由于IL2与聚(乙二醇)在IL2/IL2Rα界面处的缀合(如在RSLAIL-2中)而变化的重要量度。为了解

决该问题，用单剂量的RSLAIL-2或5剂量的阿地白介素处理携带皮下B16F10小鼠黑素瘤肿瘤的小鼠，并通过流式细胞术定量肿瘤微环境中的免疫细胞。

[0348] 在阿地白介素处理的小鼠的肿瘤中，总CD8细胞和记忆CD8细胞作为肿瘤浸润性淋巴细胞的百分比增加；然而，这些效应是短暂的，在第5天达到相对于媒介物的显著性。相比之下，在单次RSLAIL-2给予后实现显著($P<0.05$)和持续的总CD8 T细胞和记忆CD8 T细胞刺激，相对于阿地白介素具有优异的记忆CD8(第7天)和总CD8(第7天和第10天)百分比。RSLAIL-2和阿地白介素处理两者均在处理开始后5天和7天产生增加的活化的自然杀伤(NK)细胞，尽管这种效应在第10天减少。在第5天相对于媒介物进行RSLAIL-2处理后，肿瘤浸润性淋巴细胞的CD4细胞百分比减少。在第10天，与媒介物和阿地白介素相比，RSLAIL-2产生更少的CD4细胞百分比。进一步分析CD4细胞群体的$FoxP3^+$子集，其定义Treg群体。RSLAIL-2给予在每个时间点降低Treg的百分比，这与由PEG链引起的对IL2Rα亚单元的接近减少一致。相比之下，使用阿地白介素的Treg减少是适度的，在第5天达到显著性。到第7天，CD8 T细胞的增加和Treg的减少导致肿瘤中CD8/Treg比率的显著升高。RSLAIL-2、阿地白介素和媒介物的CD8/Treg的比率分别为449、18和4，从而支持对于RSLAIL-2，相对于IL2受体α，IL2受体β的优先活化。

[0349] 进行免疫组织化学染色，并且证实CD8 T细胞不仅数量增加，而且散布有肿瘤细胞。这些结果表明，在没有肿瘤中Treg的相称刺激的情况下，与未修饰的IL-2(阿地白介素)情况下观察到的相比，RSLAIL-2可有效诱导更稳健的体内记忆效应CD8 T细胞应答，这与体外IL2Rβ偏向性结合概况一致。也就是说，RSLAIL-2可有效相对于Treg优先活化和扩增效应CD8+T细胞和NK细胞。

实例21

体内研究：在鼠CT-26结肠肿瘤模型中给予RSLAIL-2和4-臂-PEG20k-CM-N-R848

[0350] 在鼠CT-26结肠肿瘤模型中，进行研究以评估和比较当与用每种单一药剂RSLAIL-2和4-臂-PEG20k-CM-N-R848的免疫疗法相比时说明性长效IL-2Rβ偏向性激动剂、RSLAIL-2和示例性长效TLR激动剂、4-臂-PEG20k-CM-N-R848的组合的抗肿瘤应答。

[0351] 体内模型：使用的小鼠是约10周龄雌性Balb/c品种，其中在每个侧腹上植入2百万个CT26肿瘤细胞。允许细胞成熟成为肿瘤持续9天，达到100-150mm^3的体积。

[0352] 给药：将4-臂-PEG20k-CM-N-R848以40μl体积瘤内或瘤周围(即，直接地)对两个肿瘤(原发性肿瘤)之一给药。其次，对侧肿瘤不直接用TLR激动剂4-臂-PEG20k-CM-N-R848处理。将RSLAIL-2通过静脉内注射按0.8mg/kg全身给药。

[0353] 组被标记为：“RSLAIL-2+4-臂-PEG20k-CM-N-R848”：在肿瘤大小100-150mm^3的第一个给药日(给药的第0天)用800μg的4臂-20kPEG-CM-N-R848对小鼠进行瘤内/瘤周围给药。在第0、9和18天(即，它们每9天给药一次，总共3个剂量，从给药的第0天开始)，按0.8mg/kg的剂量还对相同的小鼠静脉内给予RSLAIL-2。

[0354] 组被标记为“4-臂-PEG20k-CM-N-R848”：在肿瘤大小为100-150mm^3范围内的第一个给药日(给药的第0天)用800μg的4臂-20kPEG-CM-N-R848对小鼠进行瘤内/瘤周围给药一次。

[0355] 组被标记为“RSLAIL-2”：在第0、9和18天(每9天，总共三个剂量，从给药的第0天开始)，还对小鼠静脉内给予0.8mg/kg RSLAIL-2。

[0356] 组被标记为“运载体”:在肿瘤大小为从100-150mm^{3}范围内的第一个给药日(给药的第0天)用40μl汉克氏缓冲盐水(4-臂-PEG20k-CM-N-R848的运载体)对小鼠进行瘤内/瘤周围给药。在第0、9和18天(每9天,总共3个剂量,从给药的第0天开始),还对相同的小鼠静脉内给予RSLAIL-2运载体。

[0357] 测量:每周3次通过卡尺测量所收集的肿瘤体积并使用以下公式计算:L x W^2/2,其中L是肿瘤长度,并且W是肿瘤宽度。

[0358] 结果提供在表4中。

表4.存活比例,以百分比表示

治疗开始后的天数	运载体 i.t.	1 x 800 μg 4-臂-PEG20k-CM-N-R848 i.t. + RSLAIL-2 i.v.“Combo”	单一药剂 1 x 800 μg 4-臂-PEG20k-CM-N-R848 i.t.	单一药剂 RSLAIL-2
0	100	100	100	100
9	90			90
12	50		80	
14	20			
16	0		70	
19			40	
21			30	
26				70
40				60
43				40
47		100	30	30

[0359] 给药开始后的第47天在实验结束时,用4-臂-PEG20k-CM-N-R848的单一药剂治疗导致仅30%的动物存活。仅20%的动物具有完全应答,治疗侧的肿瘤和未经治疗侧的肿瘤均消除;10%的动物具有部分应答,其中两个肿瘤中的一个被根除。

[0360] 在给药开始后的第47天在研究结束时,用RSLAIL-2的单一药剂治疗导致30%的动物存活。存活组中的所有动物均具有完全应答,其中两个肿瘤均被消除。

[0361] 最值得注意的是,用RSLAIL-2+4-臂-PEG20k-CM-N-R848的组合治疗导致在所有治疗的动物中肿瘤的完全消除和100%存活。引人注目地,在治疗的过程中,原发性和继发性肿瘤均被消除。参见图1-3。换言之,出乎意料地,组合治疗不仅导致优于单一药剂免疫治疗剂治疗方式的显著的改善,例如,4-臂-PEG20k-CM-N-R848(在第47天30%的存活);RSLAIL-2(在第47天30%存活)相比于组合免疫疗法(在至少47天100%存活),还导致原发性肿瘤(用TLR激动剂注射)和继发性肿瘤(无直接注射TLR激动剂,远离原发性肿瘤的部位)二者的完全根除。

[0362] 运载体组中无存活的动物。由于在治疗开始后第10天和第20天之间达到限制肿瘤体积,将所有动物均从研究中移除。

[0363] 当与单独给予每种免疫调节剂的单一疗法相比,组合的结果是惊人的,即RSLAIL-

2+4-臂-PEG20k-CM-N-R848的组合给予不仅有效根除原发性CT-26结肠肿瘤(通过注射向其中直接给予4-臂-PEG20k-CM-N-R848),而且也有效根除继发性CT-26结肠肿瘤。在研究的过程中(47天)未观察到肿瘤再生长。此外,对于组合疗法组存活率保持在100%,而到第47天,两个单一疗法组的存活率降至30%。

[0364] 将结果示出在图1-3中。

实例22

体内治疗对免疫细胞类型的影响

[0365] 该实例表明长效IL-2Rβ偏向性激动剂和TLR7/8激动剂的组合可以促进免疫系统的活化,同时还克服免疫抑制。具体地,通过促进CD8 T细胞、CD11c+和CD8+树突细胞以及中性粒细胞显示免疫活化,同时通过遏制调节性T细胞、巨噬细胞、和单核细胞显示克服免疫抑制。

[0366] 使用的雌性Balb/c小鼠是约10周龄,其中在每个侧腹植入200万个CT26肿瘤细胞。允许细胞生长9天,达到体积为从100-150mm^3的肿瘤大小。

[0367] 将R848以40μl体积在瘤内或瘤周围给予肿瘤(原发性肿瘤)之一。另一个(对侧)肿瘤未被给予R848。

[0368] 将RSLAIL-2通过静脉内注射按0.8mg/kg系统性给药。

[0369] 通过流式细胞术测量免疫细胞亚型。将肿瘤解离成单细胞悬浮液,并用鉴定细胞类型的荧光标记抗体组合对细胞染色,以评估对作为单一药剂和处于组合的RSLAIL-2和R848治疗应答时肿瘤内免疫细胞类型比例变化,包括单核细胞、巨噬细胞、调节性T细胞、CD8+ T细胞、中性粒细胞、和树突细胞亚型。

[0370] 将结果提供在表5中作为相对于运载体对照组的细胞群百分比。

[0371] 表5.单一药剂和组合对免疫细胞类型的体内作用(运载体的百分比)

	RSLAIL-2	R848	RSLAIL-2&R848
CD8 T细胞	200%	95%	265%
CD11c+ CD8+树突细胞	165%	135%	330%
中性粒细胞	225%	500%	525%
调节性T细胞	125%	20%	30%
巨噬细胞	85%	80%	50%
单核细胞	20%	160%	50%

[0372] 从表5中的数据可以看出,用R848的单一药剂治疗或用R848和RSLAIL-2的组合治疗导致:(i)降低肿瘤中调节性T细胞的丰度;和(ii)相对于运载体治疗的肿瘤,中性粒细胞丰度的增加。

[0373] 相对于运载体治疗的肿瘤,用RSLAIL-2的单一药剂治疗导致瘤内单核细胞的减少以及CD8 T细胞增加。

[0374] 在考虑组合时,用RSLAIL-2和R848(示例性TLR激动剂)的治疗导致将上述单一药剂作用组合对瘤内免疫细胞丰度的增强的作用。另外,当与运载体治疗相比,在所治疗的肿瘤中所述组合特异性地增加CD8+ CD11c+树突细胞并减少巨噬细胞。

[0375] 在用RSLAIL-2的组合治疗中所有的细胞变化不仅在R848治疗的肿瘤中被观察到,而且在未用R848直接治疗但与R848治疗的肿瘤存在于同一动物中的远位肿瘤中被观察到

(即,证明了远位效应)。

实例23

体内研究:在CT26肿瘤模型中给予RSLAIL-2和TLR激动剂

[0376] 在CT26肿瘤模型中,在一系列TLR激动剂剂量下,进行研究以评估和比较说明性长效IL-2Rβ偏向性激动剂、RSLAIL-2和短效TLR激动剂(R848)或示例性长效TLR激动剂(化合物6)的组合的抗肿瘤应答。

[0377] 使用的小鼠是约10周龄雌性Balb/c品种,其中在每个侧腹上植入2百万个CT26肿瘤细胞。允许细胞成熟成为肿瘤持续7天用于RSLAIL-2和化合物6的组合治疗,并且持续9天用于RSLAIL-2和R848的组合治疗,每个治疗组达到100-150mm^3的体积。每个治疗组含有10只小鼠。

[0378] 将TLR激动剂(R848or化合物6)以40μl体积在瘤内或瘤周围(即,直接)按10微克("高")、1微克("中")或0.1微克("低")(R848当量)固定剂量给予两个肿瘤(原发性肿瘤)之一。对侧肿瘤未直接用TLR激动剂治疗。将RSLAIL-2通过静脉内注射按0.8mg/kg全身给药。

[0379] 在肿瘤大小100-150mm^3的第一个给药日(给药的第0天)用10微克、1微克、或0.1微克(R848当量)固定剂量的TLR激动剂对小鼠进行瘤内/瘤周围给药。在第4、13和22天(即,它们每9天给药一次,总共3个剂量,从给药的第0天开始),按0.8mg/kg的剂量还对相同的小鼠静脉内给予RSLAIL-2。

[0380] 组被标记为"运载体":在肿瘤大小为从100-150mm^3范围内的第一个给药日(给药的第0天)用40μl汉克氏缓冲盐水(TLR激动剂的运载体)对小鼠进行瘤内/瘤周围给药。在第0、9和18天(每9天,总共3个剂量,从给药的第0天开始),还对相同的小鼠静脉内给予RSLAIL-2运载体。

[0381] 每周2-3次通过卡尺测量所收集的肿瘤体积并使用以下公式计算:$L \times W^2/2$,其中L是肿瘤长度,并且W是肿瘤宽度。

[0382] 对于用RSLAIL-2和R848的组合治疗的结果提供在图4A-4D中,并且对于用RSLAIL-2和化合物6的组合治疗提供在图4E-H中。对于用RSLAIL-2和R848的组合治疗的结果还显示在图5A-5D中,并且对于用RSLAIL-2和化合物6的组合治疗的结果还显示在图5E-5H中。如图4A-4D中所提供的,在治疗开始后第25天,用RSLAIL-2和R848的组合治疗导致在高剂量组中10只动物中有9只、中剂量组中10只动物中有7只、和在低剂量组中8只动物中仅1只的所处理的肿瘤的肿瘤体积减少或维持。

[0383] 如图4E-4H所提供的,在治疗开始后第32天,用RSLAIL-2和化合物6的组合治疗导致在高剂量组中10只动物中有9只、中剂量组中10只动物中有9只、和令人惊奇地在低剂量组中10只动物中有10只的所处理的肿瘤的肿瘤体积减少或维持。

[0384] 如图5A-5D中所提供的,在治疗开始后第25天,用RSLAIL-2和R848的组合治疗导致在高剂量组中10只动物中有9只、中剂量组中10只动物中有5只、和在低剂量组中8只动物中仅1只的未经处理的肿瘤的肿瘤体积减少或维持。

[0385] 如图5E-5H中所提供的,在治疗开始后第32天,用RSLAIL-2和化合物6的组合治疗导致在高剂量组中10只动物中有9只、中剂量组中10只动物中有8只、和令人惊奇地在低剂量组中10只动物中有10只的未经处理的肿瘤的肿瘤体积减少或维持。

[0386] 如图4A-4H和图5A-5H中所提供的,在治疗开始后第25天运载体组中无存活的动

物。由于在治疗开始后第8天和第18天之间达到限制肿瘤体积，将所有动物均从研究中移除。

[0387] 此数据表明非常低的亚微克量的瘤内递送的TLR激动剂化合物6与RSLAIL-2治疗的组合显著地抑制在治疗部位处以及在未治疗的远位肿瘤部位处(即，其中未直接给予TLR激动剂化合物的部位)的肿瘤生长。

实例24

体内研究：在WEHI-164肿瘤模型中给予RSLAIL-2和示例性TLR激动剂

[0388] 在WEHI-164纤维肉瘤肿瘤模型中，进行研究以评估和比较当与运载体治疗相比时说明性长效IL-2Rβ偏向性激动剂、RSLAIL-2和示例性TLR激动剂、4-臂-PEG20k-CM-Gly-N-R848(化合物6)的组合的抗肿瘤应答。

[0389] 体内模型：使用的小鼠是约10周龄雌性Balb/c品种，其中在右侧侧腹上皮下植入1百万个WEHI-164肿瘤细胞。在治疗开始前，允许细胞生长至体积达50-150mm^3体积的肿瘤。

[0390] 给药：将4-臂-PEG20k-CM-Gly-N-R848以40μl体积瘤内或瘤周围(即，直接地)地对肿瘤给药。将RSLAIL-2通过静脉内注射按0.8mg/kg全身给药。

[0391] 组被标记为："RSLAIL-2+4-臂-PEG20k-CM-Gly-N-R848"：在肿瘤大小50-150mm^3的第一个给药日(给药的第0天)用20μg的4臂-20kPEG-CM-Gly-N-R848对小鼠进行瘤内/瘤周围给药。在第0、9和18天(即，总共给予3个剂量，相隔9天)按0.8mg/kg的剂量还对相同的小鼠静脉内给予RSLAIL-2。

[0392] 组被标记为"运载体"：在肿瘤大小为从50-150mm^3范围内的第一个给药日(给药的第0天)用40μl汉克氏缓冲盐水(4-臂-PEG20k-CM-Gly-N-R848的运载体)对小鼠进行瘤内/瘤周围给药。在第0、9和18天(总共3个剂量，相隔9天，在给药的第0天开始)，还对相同的小鼠静脉内给予RSLAIL-2运载体缓冲液。

[0393] 测量：每周2-3次持续52天通过卡尺测量所收集的肿瘤体积并使用以下公式计算：$L \times W^2/2$，其中L是肿瘤长度，并且W是肿瘤宽度。

[0394] 数据提供在表6中。

表6.存活比例

治疗开始后的天数	运载体	4-臂-PEG20k-CM-Gly-N-R848 + RSLAIL-2
0	++++	++++
3	++++	++++
7	++++	++++
10	++++	++++
15	++++	++++
22	+++	++++
27	+++	++++
29	++	++++
31	+	++++
34	无	++++
41		++++
48		++++
52		++++

百分比存活率提供如下：

0%≤+<25%

25%≤++<50%

50%≤+++<75%

75%≤++++<100%

[0395] 给药开始后的第52天在研究结束时，用RSLAIL-2+4-臂-PEG20k-CM-Gly-N-R848的双药剂治疗导致90%的动物存活。引人注意地，在RSLAIL-2+4-臂-PEG20k-CM-Gly-N-R848治疗组中所有动物中的80%具有完全应答，表示在研究结束时没有观察到可测量的肿瘤。

[0396] 运载体组中无存活的动物。由于在治疗开始后第17天和第31天之间达到限制肿瘤体积，将所有动物均从研究中移除。

实例25

体内研究：在JC肿瘤模型中给予RSLAIL-2和TLR激动剂

[0397] 在JC乳腺癌肿瘤模型中，进行研究以评估和比较当与运载体治疗相比时说明性长效IL-2Rβ偏向性激动剂、RSLAIL-2和示例性TLR激动剂、4-臂-PEG20k-CM-Gly-N-R848的组合的抗肿瘤应答。

[0398] 体内模型：使用的小鼠是约10周龄雌性Balb/c品种，其中在右侧侧腹上皮下植入4百万个JC肿瘤细胞。在治疗开始前，允许细胞生长至体积达50-150mm^3体积的肿瘤。

[0399] 给药:将4-臂-PEG20k-CM-Gly-N-R848以40μl体积瘤内或瘤周围(即,直接地)地对肿瘤给药。将RSLAIL-2通过静脉内注射按0.8mg/kg全身给药。

[0400] 组被标记为:“RSLAIL-2+4-臂-PEG20k-CM-Gly-N-R848”:在肿瘤大小50-150mm^3的第一个给药日(给药的第0天)用20μg的4臂-20kPEG-CM-Gly-N-R848对小鼠进行瘤内/瘤周围给药。在第0、9和18天(即,总共给予3个剂量,相隔9天)按0.8mg/kg的剂量还对相同的小鼠静脉内给予RSLAIL-2。

[0401] 组被标记为“运载体”:在肿瘤大小为从50-150mm^3范围内的第一个给药日(给药的第0天)用40μl汉克氏缓冲盐水(4-臂-PEG20k-CM-Gly-N-R848的运载体)对小鼠进行瘤内/瘤周围给药。在第0、9和18天(总共3个剂量,相隔9天,在给药的第0天开始),还对相同的小鼠静脉内给予RSLAIL-2运载体缓冲液。

[0402] 测量:每周2-3次持续113天通过卡尺测量所收集的肿瘤体积并使用以下公式计算:$L \times W^2/2$,其中L是肿瘤长度,并且W是肿瘤宽度。

[0403] 数据提供在表7中。

表7.存活比例

治疗开始后的天数	运载体	4-臂-PEG20k-CM-Gly-N-R848 + RSLAIL-2
0	++++	++++
8	++++	++++
15	++++	++++
22	++++	++++
29	+++	++++
36	+	++++
43	无	++++
46		+++
50		+++
57		++
60		++
64		+
71		+
78		+
85		+
95		+
102		+
113		+

百分比存活率提供如下:

0%≤+<25%

25%≤++<50%

50%≤+++<75%

75%≤++++<100%

[0404] 用RSLAIL-2和4-臂-PEG20k-CM-Gly-N-R848(化合物6)的双药剂治疗(即,组合疗法)导致在第43天90%的动物存活,而在第43天无存活的动物剩余在运载体组中。给药开始后的第113天在研究结束时,RSLAIL-2+4-臂-PEG20k-CM-Gly-N-R848组合治疗导致20%的动物存活。引人注意地,在RSLAIL-2+4-臂-PEG20k-CM-Gly-N-R848治疗组中10%的动物具有完全应答,这意味着在研究结束时没有观察到可测量的肿瘤。

[0405] 运载体组中无存活的动物。由于在治疗开始后第26天和第36天之间达到限制肿瘤体积,将所有动物均从研究中移除。

实例26

体内研究:在4T1肿瘤模型中给予RSLAIL-2和TLR激动剂

[0406] 在皮下4T1乳腺癌肿瘤模型中,进行研究以评估和比较当与用单一药剂RSLAIL-2和单一药剂TLR激动剂(比较性单一疗法)的免疫疗法相比时说明性长效IL-2Rβ偏向性激动剂、RSLAIL-2、和示例性TLR激动剂、4-臂-PEG20k-CM-Gly-N-R848的组合的抗肿瘤应答。

[0407] 体内模型:使用的小鼠是约10周龄雌性Balb/c品种,其中在每个侧腹上植入2百万个4T1肿瘤细胞。允许细胞成熟成为肿瘤持续7天,达到75-150mm^3的体积。

[0408] 给药:将4-臂-PEG20k-CM-Gly-N-R848以40μl体积瘤内或瘤周围(即,直接地)对两个肿瘤(原发性肿瘤)之一给药。其次,对侧肿瘤不直接用TLR激动剂4-臂-PEG20k-CM-Gly-N-R848处理。将RSLAIL-2通过静脉内注射按0.8mg/kg全身给药。

[0409] 组被标记为:"RSLAIL-2+4-臂-PEG20k-CM-Gly-N-R848":在肿瘤大小75-150mm^3的第一个给药日(给药的第0天)用20μg的4臂-20kPEG-CM-Gly-N-R848对小鼠进行瘤内/瘤周围给药。在第0、9和18天(即,总共给予3个剂量,相隔9天,从给药的第0天开始)按0.8mg/kg的剂量还对相同的小鼠静脉内给予RSLAIL-2。

[0410] 组被标记为"运载体":在肿瘤大小为从75-150mm^3范围内的第一个给药日(给药的第0天)用40μl汉克氏缓冲盐水(4-臂-PEG20k-CM-Gly-N-R848的运载体)对小鼠进行瘤内/瘤周围给药。

[0411] 测量:每周2-3次通过卡尺测量所收集的肿瘤体积并使用以下公式计算:$L \times W^2/2$,其中L是肿瘤长度,并且W是肿瘤宽度。

[0412] 结果:数据提供在表8中。当与运载体治疗相比时,双联体组合的结果是显著的-即,RSLAIL-2和4-臂-PEG20k-CM-Gly-N-R848的双组合给予不仅在原发性肿瘤(通过注射直接给予4-臂-PEG20k-CM-Gly-N-R848)中有效减缓肿瘤生长,而且也有效减缓继发性肿瘤生长。在第25天研究结束时,RSLAIL-2和4-臂-PEG20k-CM-Gly-N-R848的双联体组合治疗组的存活率保持在30%,而在研究的第18天后无存活的动物剩余在运载体治疗组中。

[0413] 表8.存活比例

治疗开始后的天数	运载体	4-臂-PEG20k-CM-Gly-N-R848 + RSLAIL-2
0	++++	++++
3	++++	++++
7	++++	++++
9	++++	++++
11	++++	++++
14	++++	++++
16	+++	++++
18	+++	++++
21	无	+++
23		+++
25		++

百分比存活率提供如下：

0%≤+<25%

25%≤++<50%

50%≤+++<75%

75%≤++++<100%

[0414] 给药开始后的第25天在研究结束时，用RSLAIL-2+4-臂-PEG20k-CM-Gly-N-R848双免疫治疗剂治疗导致30%的动物存活。通过减缓所治疗的动物中的肿瘤生长，用RSLAIL-2+4-臂-PEG20k-CM-Gly-N-R848的组合治疗显示出优于运载体治疗的显著改善。

[0415] 在第25天研究结束时，运载体组中无存活的动物。由于在治疗开始后第16天和第18天之间达到限制肿瘤体积，将所有动物均从研究中移除。

实例27

体内研究：在MC38肿瘤模型中给予RSLAIL-2和TLR激动剂

[0416] 在MC38结肠癌肿瘤模型中，进行研究以评估和比较当与运载体治疗相比时说明性长效IL-2Rβ偏向性激动剂、RSLAIL-2、和TLR 7/8激动剂的示例性多臂聚合物缀合物、4-臂-PEG20k-CM-Gly-N-R848的组合的抗肿瘤应答。

[0417] 体内模型：使用的小鼠是约10周龄雌性Balb/c品种，其中在右侧侧腹上皮下植入25万个MC38肿瘤细胞。在治疗开始前，允许细胞生长至体积达50-150mm^{3}体积的肿瘤。

[0418] 给药：将4-臂-PEG20k-CM-Gly-N-R848以40μl体积瘤内或瘤周围(即，直接地)地对肿瘤给药。将RSLAIL-2通过静脉内注射按0.8mg/kg全身给药。

[0419] 组被标记为：“RSLAIL-2+4-臂-PEG20k-CM-Gly-N-R848”：在肿瘤大小50-150mm^{3}的第一个给药日(给药的第0天)用20μg的4臂-20kPEG-CM-Gly-N-R848对小鼠进行瘤内/瘤周围给药。在第0、9和18天(即，总共给予3个剂量，相隔9天)按0.8mg/kg的剂量还对相同的小

鼠静脉内给予RSLAIL-2。

[0420] 组被标记为“运载体”:在肿瘤大小为从50-150mm^{3}范围内的第一个给药日(给药的第0天)用40μl汉克氏缓冲盐水(4-臂-PEG20k-CM-Gly-N-R848的运载体)对小鼠进行瘤内/瘤周围给药。在第0、9和18天(总共3个剂量,相隔9天,在给药的第0天开始),还对相同的小鼠静脉内给予RSLAIL-2运载体缓冲液。

[0421] 测量:每周2-3次持续70天通过卡尺测量所收集的肿瘤体积并使用以下公式计算:$L \times W^2/2$,其中L是肿瘤长度,并且W是肿瘤宽度。

[0422] 结果:数据提供在表9中。

表9.存活比例

治疗开始后的天数	运载体	4-臂-PEG20k-CM-Gly-N-R848 + RSLAIL-2
0	++++	++++
3	++++	++++
7	++++	++++
14	+++	++++
17	+++	++++
21	++	+++
28	++	+++
35	+	+++
39	+	+++
42	无	+++
49		+++
56		+++
63		+++
70		+++

百分比存活率提供如下:

0%≤+<25%

25%≤++<50%

50%≤+++<75%

75%≤++++<100%

[0423] 给药开始后的第70天在研究结束时,用RSLAIL-2+4-臂-PEG20k-CM-Gly-N-R848的双药剂治疗导致50%的动物存活。显著地,RSLAIL-2+4-臂-PEG20k-CM-Gly-N-R848治疗组中所有存活的动物具有完全应答,这意味着在研究结束时没有观察到可测量的肿瘤。

[0424] 运载体组中无存活的动物。由于在治疗开始后第7天和第39天之间达到限制肿瘤体积，将所有动物均从研究中移除。

实例28

体内研究：在EMT6肿瘤模型中给予RSLAIL-2和TLR激动剂

[0425] 在皮下EMT6乳腺癌肿瘤模型中，进行研究以评估和比较当与用单一药剂RSLAIL-2和单一药剂TLR激动剂的免疫疗法相比时说明性长效IL-2Rβ偏向性激动剂、RSLAIL-2、和示例性长效TLR激动剂、4-臂-PEG20k-CM-Gly-N-R848的组合的抗肿瘤应答。

[0426] 体内模型：使用的小鼠是约10周龄雌性Balb/c品种，其中在每个侧腹植入2百万个EMT6肿瘤细胞。允许细胞成熟成为肿瘤持续7天，达到75-150mm^{3}的体积。

[0427] 给药：将4-臂-PEG20k-CM-Gly-N-R848以40μl体积瘤内或瘤周围(即，直接地)对两个肿瘤(原发性肿瘤)之一给药。其次，对侧肿瘤不直接用TLR激动剂4-臂-PEG20k-CM-Gly-N-R848处理。将RSLAIL-2通过静脉内注射按0.8mg/kg全身给药。

[0428] 组被标记为：“RSLAIL-2+4-臂-PEG20k-CM-Gly-N-R848”：在肿瘤大小75-150mm^{3}的第一个给药日(给药的第0天)用20μg的4臂-20kPEG-CM-Gly-N-R848对小鼠进行瘤内/瘤周围给药。在第0、9和18天(即，总共给予3个剂量，相隔9天，从给药的第0天开始)按0.8mg/kg的剂量还对相同的小鼠静脉内给予RSLAIL-2。

[0429] 组被标记为“RSLAIL-2”：在第0、9和18天(即，总共给予3个剂量，相隔9天，从给药的第0天开始)按0.8mg/kg的剂量还对小鼠静脉内给予RSLAIL-2。

[0430] 组被标记为“4-臂-PEG20k-CM-Gly-N-R848”：在肿瘤大小75-150mm^{3}的第一个给药日(给药的第0天)用20μg的4臂-20kPEG-CM-Gly-N-R848对小鼠进行瘤内/瘤周围给药。

[0431] 组被标记为“运载体”：在肿瘤大小为从75-150mm^{3}范围内的第一个给药日(给药的第0天)用40μl汉克氏缓冲盐水(4-臂-PEG20k-CM-Gly-N-R848的运载体)对小鼠进行瘤内/瘤周围给药。

[0432] 测量：每周2-3次通过卡尺测量所收集的肿瘤体积并使用以下公式计算：$L \times W^2/2$，其中L是肿瘤长度，并且W是肿瘤宽度。

[0433] 结果：数据提供在表10中。当与功效较差的RSLAIL-2和4-臂-PEG20k-CM-Gly-N-R848单一药剂治疗相比，双联体组合的结果很显著，即，RSLAIL-2和4-臂-PEG20k-CM-Gly-N-R848的双联体组合给予不仅有效根除原发性肿瘤(通过注射直接给予4-臂-PEG20k-CM-Gly-N-R848)，而且也有效根除继发性肿瘤。在完全的肿瘤消退后在21天的过程中，未观察到肿瘤再生长。此外，双联体组合治疗组的存活率保持在100％，而在第55天研究结束时无存活的动物剩余在单一药剂治疗组中。

[0434] 表10.存活比例

治疗开始后的天数	运载体	4-臂-PEG20k-CM-Gly-N-R848 + RSLAIL-2	4-臂-PEG20k-CM-Gly-N-R848	RSLAIL-2
0	++++	++++	++++	++++
3	++++	++++	++++	++++
8	++++	++++	++++	++++
13	++++	++++	++++	++++
15	+	++++	++++	++++
20	无	++++	+++	+++
27		++++	++	++
34		++++	+	+
42		++++	+	+
48		++++	+	无
55		++++	无	

百分比存活率提供如下：

0%≤+<25%

25%≤++<50%

50%≤+++<75%

75%≤++++<100%

[0435] 给药开始后的第55天在研究结束时，用RSLAIL-2或4-臂-PEG20k-CM-Gly-N-R848的单一药剂治疗导致肿瘤生长的部分控制，但无存活的动物。

[0436] 相反，给药开始后的第55天在研究结束时，用RSLAIL-2+4-臂-PEG20k-CM-Gly-N-R848的双药剂治疗导致100％的动物存活。存活组中的所有动物均具有完全应答，其中两个肿瘤均被消除。换言之，出乎意料地，用RSLAIL-2+4-臂-PEG20k-CM-Gly-N-R848的组合治疗不仅是优于等同剂量RSLAIL-2或4-臂-PEG20k-CM-Gly-N-R848免疫治疗剂治疗方式的显著改善，而且还导致完全根除原发性肿瘤(注射TLR激动剂)和继发性肿瘤(未直接注射TLR激动剂，远离原发肿瘤部位)。

[0437] 运载体组中无存活的动物。由于在治疗开始后第13天和第15天之间达到限制肿瘤体积，将所有动物均从研究中移除。

实例29

体内研究：在RM-1肿瘤模型中给予RSLAIL-2和TLR激动剂

[0438] 在RM-1前列腺癌肿瘤模型中，进行研究以评估和比较当与运载体治疗相比时说明性长效IL-2Rβ偏向性激动剂、RSLAIL-2、和示例性长效TLR激动剂、4-臂-PEG20k-CM-Gly-N-R848的组合的抗肿瘤应答。

[0439] 体内模型：使用的小鼠是约10周龄雌性Balb/c品种，其中在右侧侧腹上皮下植入2

百万个RM-1肿瘤细胞。在治疗开始前，允许细胞生长至体积达50-150mm^{3}体积的肿瘤。

[0440] 给药：将4-臂-PEG20k-CM-Gly-N-R848以40μl体积瘤内或瘤周围(即，直接地)地对肿瘤给药。将RSLAIL-2通过静脉内注射按0.8mg/kg全身给药。

[0441] 组被标记为："RSLAIL-2+4-臂-PEG20k-CM-Gly-N-R848"：在肿瘤大小50-150mm^{3}的第一个给药日(给药的第0天)用20μg的4臂-20kPEG-CM-Gly-N-R848对小鼠进行瘤内/瘤周围给药。在第0、9和18天(即，总共给予3个剂量，相隔9天)按0.8mg/kg的剂量还对相同的小鼠静脉内给予RSLAIL-2。

[0442] 组被标记为"运载体"：在肿瘤大小为从50-150mm^{3}范围内的第一个给药日(给药的第0天)用40μl汉克氏缓冲盐水(4-臂-PEG20k-CM-Gly-N-R848的运载体)对小鼠进行瘤内/瘤周围给药。在第0、9和18天(总共3个剂量，相隔9天，在给药的第0天开始)，还对相同的小鼠静脉内给予RSLAIL-2运载体缓冲液。

[0443] 测量：每周2-3次持续36天通过卡尺测量所收集的肿瘤体积并使用以下公式计算：$L \times W^2/2$，其中L是肿瘤长度，并且W是肿瘤宽度。

[0444] 结果：数据提供在表11中。

表11.存活比例

治疗开始后的天数	运载体	4-臂-PEG20k-CM-Gly-N-R848 + RSLAIL-2
0	++++	++++
6	++++	++++
13	++++	++++
18	+	+++
20	无	+++
25		+++
29		++
36		+

百分比存活率提供如下：

0%≤+<25%

25%≤++<50%

50%≤+++<75%

75%≤++++<100%

[0445] 与运载体治疗相比，用RSLAIL-2+4-臂-PEG20k-CM-Gly-N-R848的双药剂治疗导致显著减缓的肿瘤生长，导致在RSLAIL-2+4-臂-PEG20k-CM-Gly-N-R848治疗组中，治疗开始后20天80%的动物存活和在第36天治疗结束时10%的动物存活。

[0446] 在治疗开始后的第20天，运载体组中无存活的动物。由于在治疗开始后第13天和第18天之间达到限制肿瘤体积，将所有动物均从研究中移除。

实例30

体内研究：在H22肿瘤模型中给予RSLAIL-2和TLR激动剂

[0447] 在H22肝细胞癌肿瘤模型中，进行研究以评估和比较当与运载体治疗相比时说明性长效IL-2Rβ偏向性激动剂、RSLAIL-2、和示例性长效TLR激动剂、4-臂-PEG20k-CM-Gly-N-N-R848的组合的抗肿瘤应答。

[0448] 体内模型：使用的小鼠是约10周龄雌性Balb/c品种，其中在右侧侧腹上皮下植入3百万个H22肿瘤细胞。在治疗开始前，允许细胞生长至体积达50-150mm^{3}体积的肿瘤。

[0449] 给药：将4-臂-PEG20k-CM-Gly-N-R848以40μl体积瘤内或瘤周围(即，直接地)地对肿瘤给药。将RSLAIL-2通过静脉内注射按0.8mg/kg全身给药。

[0450] 组被标记为：“RSLAIL-2+4-臂-PEG20k-CM-Gly-N-R848”：在肿瘤大小50-150mm^{3}的第一个给药日(给药的第0天)用20μg的4臂-20kPEG-CM-Gly-N-R848对小鼠进行瘤内/瘤周围给药。在第0、9和18天(即，总共给予3个剂量，相隔9天)按0.8mg/kg的剂量还对相同的小鼠静脉内给予RSLAIL-2。

[0451] 组被标记为“运载体”：在肿瘤大小为从50-150mm^{3}范围内的第一个给药日(给药的第0天)用40μl汉克氏缓冲盐水(4-臂-PEG20k-CM-Gly-N-R848的运载体)对小鼠进行瘤内/瘤周围给药。在第0、9和18天(总共3个剂量，相隔9天，在给药的第0天开始)，还对相同的小鼠静脉内给予RSLAIL-2运载体缓冲液。

[0452] 测量：每周2-3次持续105天通过卡尺测量所收集的肿瘤体积并使用以下公式计算：$L \times W^2/2$，其中L是肿瘤长度，并且W是肿瘤宽度。

[0453] 结果：数据提供在表12中。

表12.存活比例

治疗开始后的天数	运载体	4-臂-PEG20k-CM-Gly-N-R848 + RSLAIL-2
0	++++	++++
7	++++	++++
14	++++	++++
21	++++	++++
28	++++	++++
35	++++	++++
38	+++	++++
42	+++	++++
45	++	++++
49	++	++++
52	++	++++
56	+	++++
59	无	+++
63		+++
70		+++
73		+++
77		+++
80		+++
84		+++
91		+++
94		+++
98		+++
105		+++

百分比存活率提供如下：

0%≤+<25%

25%≤++<50%

50％≤+++<75％

75％≤++++<100％

[0454] 给药开始后的第105天在研究结束时，用RSLAIL-2+4-臂-PEG20k-CM-Gly-N-R848的双药剂治疗导致50％的动物存活。显著地，在RSLAIL-2+4-臂-PEG20k-CM-Gly-N-R848治疗组中40％的动物具有完全应答，表示在研究结束时未观察到可测量的肿瘤。

[0455] 运载体组中无存活的动物。由于在第28天和第56天之间达到限制肿瘤体积，将所有动物均从研究中移除。

实例31

体外试验：通过4-臂-PEG20k-CM-Gly-N-N-R848和相关化合物活化TLR

[0456] 针对在剂量应答实验中开始人(h)TLR7、hTLR8和hTLR4下游的转录应答，将瑞喹莫德和示例性长效TLR激动剂、4-臂-PEG20k-CM-Gly-N-N-R848(化合物6)进行比较测试。

[0457] 使用的测试系统是HEK293细胞中的报告基因细胞系，其被人TLR受体以及与五个NFkB和AP-1结合位点(hTLR7和hTLR8细胞系)融合的最小IFNβ启动子或与五个NFkB和AP-1结合位点(hTLR4细胞系)融合的IL-12p40最小启动子的下游的分泌型碱性磷酸酶(SEAP)报告基因构建体稳定转染。将亲代细胞系(Null1和Null1K，用SEAP报告基因稳定转染，而没有hTLR受体表达)用作阴性对照。

[0458] 如表13所示，瑞喹莫德和化合物6活化hTLR7和hTLR8表达细胞系(而不在hTLR4细胞系)中的报告基因表达。LPS，已知的hTLR4配体，特异性地活化hTLR4细胞系的报告基因表达。这些数据表明瑞喹莫德特异性地活化hTLR7和hTLR8信号传导。化合物6还特异性地活化hTLR7和hTLR8下游的报告基因表达，但与瑞喹莫德相比具有>20倍更高的浓度并对hTLR4无影响。

[0459] 由于瑞喹莫德是已知的TLR 7/8激动剂，因此预期hTLR7和hTLR8而非hTLR4表达细胞系的应答。这些实验表明化合物6活性较差，并说明瑞喹莫德的释放对于有效的受体激动是所必需的。

[0460] 这些数据表明化合物6是瑞喹莫德的前药，并且通过可释放的连接基团与PEG缀合极大地削弱了瑞喹莫德的活性。由在PBMC培养物中的原代血液单核细胞中化合物6和瑞喹莫德活性的比较进一步支持该结论。

表13.通过化合物6、瑞喹莫德和LPS活化hTLR的总结.

	测试化合物	R848	化合物 6	LPS
TLR 报告基因细胞系	实验编号	EC_{50} (μM)	EC_{50} (μM)	EC_{50} (ng/mL)
hTLR7	实验 1	0.077	4.6	NT*
	实验 2	0.040	3.5	NT
	实验 3	0.092	4.8	NT
	平均值	0.070	4.3	NT
	SD	0.026	0.77	NT
hTLR8	实验 1	0.50	> 30	NT
	实验 2	0.45	> 30	NT
	实验 3	0.48	> 30	NT
	平均值	0.48	> 30	NT
	SD	0.027	-	NT
hTLR4	实验 1	NA	NA	0.095
Null1	实验 1	NA	NA	NT
Null1K	实验 1	NA	NA	NT

*NT＝未测试,**NA＝未检测到TLR途径的活化

实例32

在BALB/c小鼠的小鼠结肠癌模型CT26中,将化合物6或瑞喹莫德治疗与交错的RSLAIL-2的给予组合后对血浆细胞因子诱导的分析

[0461] 携带两个CT26皮下肿瘤(100-200mm3)(每个侧腹一个)的Balb/c小鼠(n＝6/组)被给予单次瘤内/瘤周围固定剂量的瑞喹莫德(10μg)或示例性长效TLR激动剂4-臂-PEG20k-CM-Gly-N-N-R848(化合物6)(1μg或10μg)至解剖学右侧肿瘤中。在化合物6或瑞喹莫德给予后96小时,使这些小鼠中的一半(n＝3/组)接受单次静脉内剂量(0.8mg/kg)的说明性长效IL-2Rβ偏向性激动剂RSLAIL-2,使得瑞喹莫德和化合物6之间作为单一药剂或与RSLAIL-2组合进行比较。在给药后的指定时间点处,通过多重蛋白质测量试验测定血浆中促炎细胞因子IFNα、IFNγ、TNFα、IL-6和IL-12的浓度。

[0462] 较低的化合物6剂量水平(1μg)显示血浆中所有细胞因子的非常适度的诱导。然而,瑞喹莫德和化合物6的10μg瘤内/瘤周围剂量均显示出在血液中稳健的促炎细胞因子诱导。两种化合物对于用快速诱导检测的所有细胞因子显示出类似的瞬时诱导模式,导致IFNα、TNFα、IL-6和IL-12在2小时达到峰值水平,并且在给予后6小时达到IFN-γ的延迟峰。到24小时细胞因子水平下降至接近背景水平。

[0463] 然而，除了TNFα，在所测量的所有细胞因子的诱导量中观察到瑞喹莫德和化合物6之间的关键差异。与化合物6相比，由瑞喹莫德诱导的峰值细胞因子水平的差异在从高8到10倍(IL-6，IFNα)至高3到4倍(IFNγ，IL-12)变化。在化合物6或瑞喹莫德诱导血浆中IFNα、TNF-和IL-12的适度升高后4天给予RSAIL-2。然而，在治疗开始时，RSLAIL-2比单一药剂瑞喹莫德或化合物6诱导IFNγ至更高水平。血浆IFNγ水平保持高(>100pg/ml)持续3天，这代表最后的采样时间。

[0464] 总之，在等效的瑞喹莫德剂量水平的并排比较中，在瘤内/瘤周围递送后，与未缀合的瑞喹莫德相比，化合物6显示出降低的血浆细胞因子诱导。向用化合物6的治疗中加入RSLAIL-2仅显著诱导一种所测量的细胞因子IFNγ，表明两种治疗剂的基本上非重叠的细胞因子诱导谱。

实例33

在CT26肿瘤模型中，由瘤内/瘤周围给予的TLR激动剂和静脉内RSLAIL-2诱导的免疫细胞药效学的流式细胞术评估

[0465] 携带双侧CT26皮下肿瘤(每个侧腹一个)的Balb/c小鼠(n＝3/组)被给予单次瘤内/瘤周围剂量的示例性长效TLR激动剂4-臂-PEG20k-CM-Gly-N-N-R848(化合物6)(10μg或0.1μg)至解剖学右侧肿瘤中或运载体。在化合物6给予后4天，静脉内递送说明性长效IL-2Rβ偏向性激动剂RSLAIL-2(0.8mg/kg)。

[0466] 通过流式细胞术分析评估治疗诱导的化合物6处理的肿瘤中局部的免疫细胞和对侧未处理的肿瘤远位的免疫细胞和在血液中的免疫细胞的变化。收集肿瘤和血液并在给予化合物6后进行抗体染色一天和七天。该治疗和分析方案使得能够表征快速化合物6剂量依赖性单组分活性，主要在先天性免疫细胞类型(包括对于肿瘤抗原呈递给T细胞所必需的中性粒细胞和树突细胞)中。在化合物6后7天的第二个取样时间点(RSLAIL-2治疗后3天)显示化合物6治疗如何依赖性地调节血液和肿瘤中后来出现的RSLAIL-2驱动的T细胞应答。

[0467] 在治疗后一天观察到的早期免疫事件包括化合物6治疗的肿瘤中按较高10μg剂量的瘤内中性粒细胞增加，这与细胞死亡增加一致。还与中性粒细胞肿瘤浸润同时发生的是树突细胞的瞬时活化，其显示在治疗的肿瘤和远位肿瘤中成熟和淋巴结归巢的标志物的上调。组合治疗开始后7天(RSLAIL-2给予后3天)，在所治疗的肿瘤中中性粒细胞以化合物6-剂量依赖性方式增加。在化合物6治疗和未经治疗的肿瘤中均观察到对RSLAIL-2诱导的肿瘤细胞死亡的化合物6依赖性影响，这可能是由两个肿瘤中细胞毒性CD8+ T细胞的RSLAIL-2依赖性增加的增强所驱动的。

[0468] 肿瘤相关的单核细胞在治疗后在肿瘤中减少，最显著地在给予RSLAIL-2后3天在第7天时间点。作为活细胞的一部分的巨噬细胞的总数增加，表明在肿瘤细胞中而非在白细胞中选择性地诱导增加的细胞死亡。然而，在组合治疗后，作为肿瘤中总白细胞的一部分的巨噬细胞的相对数量减少。

[0469] 白细胞中相对巨噬细胞减少的主要驱动因素是所显示的肿瘤浸润性T细胞的显著增加。在用RSLAIL-2的组合治疗后，CD8+ T细胞显示出肿瘤中选择性化合物6剂量依赖性增加。调节性T细胞的相对分数急剧下降，导致CD8:Treg比率高。肿瘤浸润性CD8+细胞毒性T细胞的增加的分数显示出高的CD44表面表达和PD-1+CTLA-4+双重阳性的增加，表明肿瘤环境中的高抗原特异性活性。

[0470] 与所治疗的肿瘤不同，血液中细胞活力和中性粒细胞数量不受影响。在化合物6治疗后，单核细胞最初以剂量依赖性方式在血液中瞬时增加，但在RSLAIL-2治疗后与运载体相比在血液中减少。血液NK细胞应答于高化合物6剂量显示出轻微增加。然而，在RSLAIL-2治疗后，NK细胞明显显著增加。与肿瘤环境相比，血液中的T细胞对治疗显示出显著不同的应答，其中最引人注目的差异是RSLAIL-2治疗后调节性T细胞的显著增加。在给予RSLAIL-2后，在较高的化合物6剂量组中仅观察到血液CD8+ T细胞群的适度增加。在给予化合物6后，CD4+ T细胞显示出边际剂量依赖性瞬时增加，但在给予RSLAIL-2后未观察到显著应答。重要的是，两个治疗组均显示血液中CD8:Treg比率的总体降低，这与在肿瘤中观察到的显著剂量依赖性CD8:Treg增加不同。

[0471] 虽然仅显示丰度的适度增加，但在血液中所检查的T细胞亚群中观察到活化标志物和抑制性反馈检查点受体的明显上调。响应于RSLAIL-2治疗，在血液中的调节性T细胞上CD25表达上调，这与IL-2受体的参与和观察到的丰度增加一致。在给予RSLAIL-2后，CD4+ T细胞在高剂量的化合物6和在两个药物治疗组中诱导CD69活化标志物的表达。CD8+ T细胞显示出响应于RSLAIL-2给予的稳健CD25表达增加和响应于高化合物6剂量的瞬时CD69上调。CD8+ T细胞的CD44表达分数显示出在给予RSLAIL-2后化合物6剂量依赖性增加。抑制性检查点受体PD-1和CTLA-4遵循与CD8+ T细胞上活化标志物CD25、CD69和CD44相同的诱导模式，表明肿瘤抗原依赖性活化。

[0472] 这些数据支持这样的模型，其中用长效TLR激动剂和长效IL-2Rβ偏向性激动剂(例如化合物6和RSLAIL-2)的说明性组合疗法分别导致优化肿瘤抗原特异性瘤内积累和细胞毒性T细胞活性的先天性和适应性免疫细胞类型的顺序活化。

[0473] 先天性免疫力通过以下活化：局部递送的化合物6驱动中性粒细胞释放肿瘤抗原，并通过树突细胞呈递给初级CD8+ T淋巴细胞，该淋巴细胞然后通过治疗的RSLAIL-2组分显著扩增，导致肿瘤抗原特异性活性CD8+ T细胞群的大量全身瘤内增加。

引用参考

[0474] 在此引用的所有文章、书籍、专利、专利公开及其他的公开物通过引用以其全部内容结合。在本说明书的传授内容与通过引用而结合的技术不一致的情况下，本说明书中的传授内容应优先。

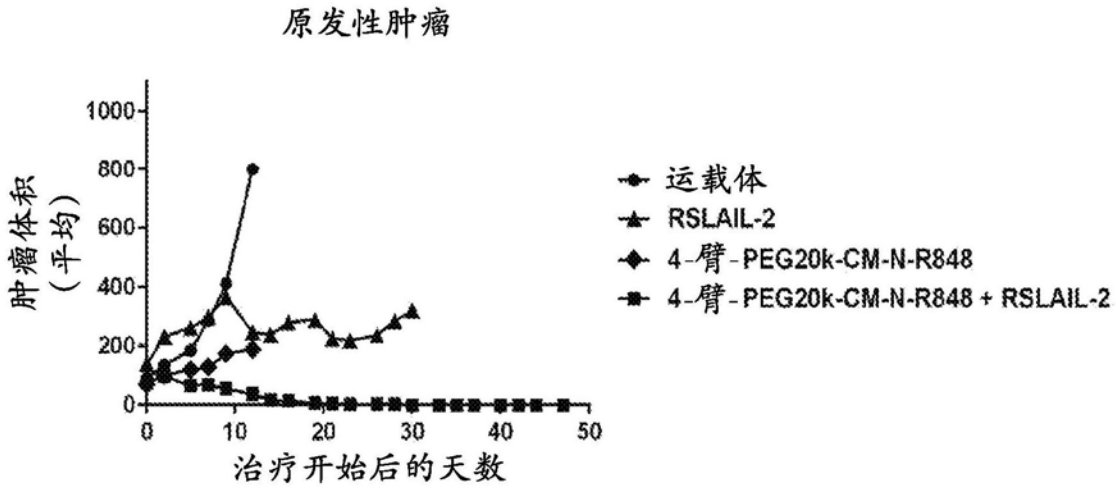

原发性肿瘤
肿瘤体积（平均）
1000
800
600
400
200
0
0
10
20
30
40
50
治疗开始后的天数
运载体
RSLAIL-2
4-臂-PEG20k-CM-N-R848
4-臂-PEG20k-CM-N-R848 + RSLAIL-2

图1

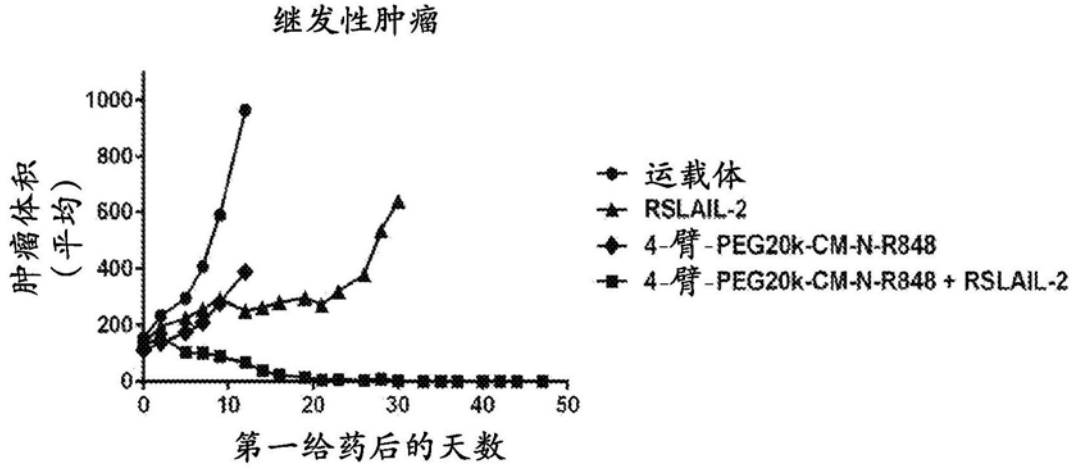

继发性肿瘤
肿瘤体积（平均）
1000
800
600
400
200
0
0
10
20
30
40
50
第一给药后的天数
运载体
RSLAIL-2
4-臂-PEG20k-CM-N-R848
4-臂-PEG20k-CM-N-R848 + RSLAIL-2

图2

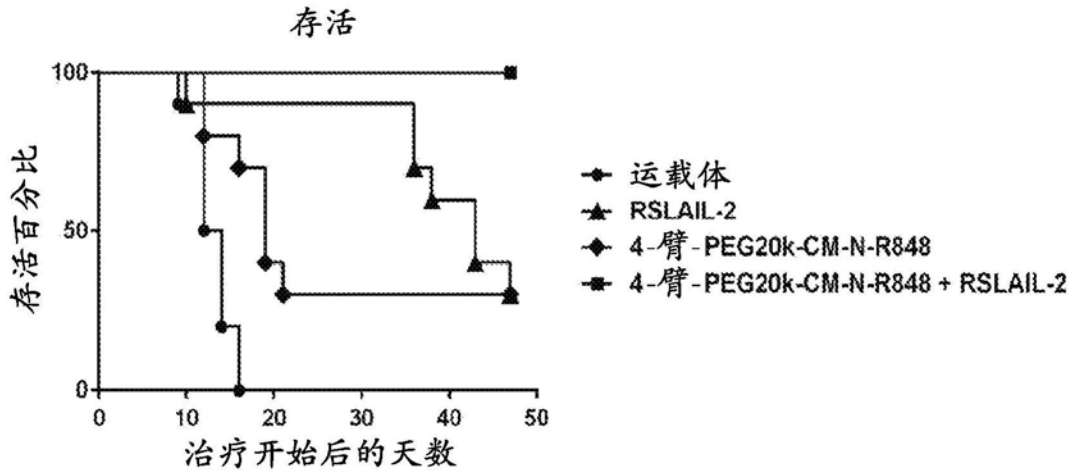

存活
100
50
0
存活百分比
0
10
20
30
40
50
治疗开始后的天数
运载体
RSLAIL-2
4-臂-PEG20k-CM-N-R848
4-臂-PEG20k-CM-N-R848 + RSLAIL-2

图3

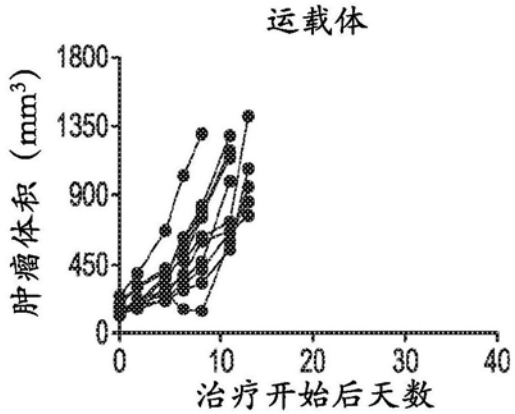

运载体
1800
1350
900
450
0
肿瘤体积（mm3）
0
10
20
30
40
治疗开始后天数

图4A

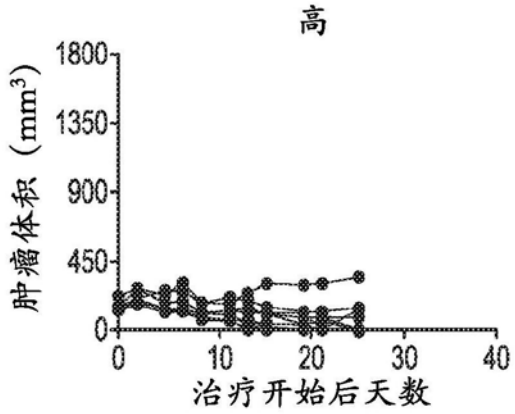

高
1800
1350
900
450
0
肿瘤体积（mm3）
0
10
20
30
40
治疗开始后天数

图4B

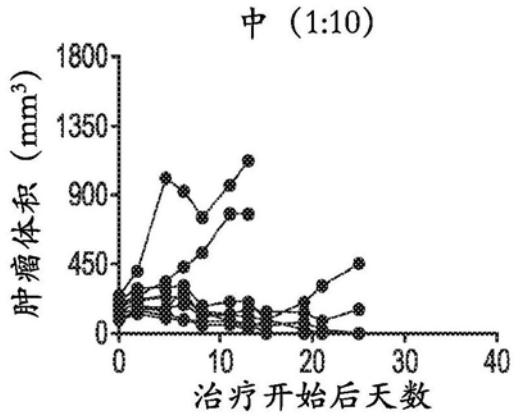

中（1:10）
肿瘤体积（mm³）
1800
1350
900
450
0
0
10
20
30
40
治疗开始后天数

图4C

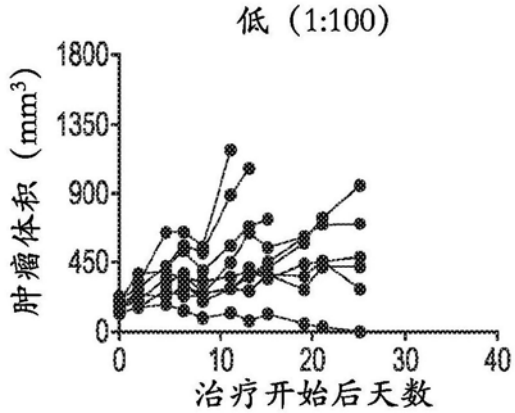

低（1:100）
肿瘤体积（mm³）
1800
1350
900
450
0
0
10
20
30
40
治疗开始后天数

图4D

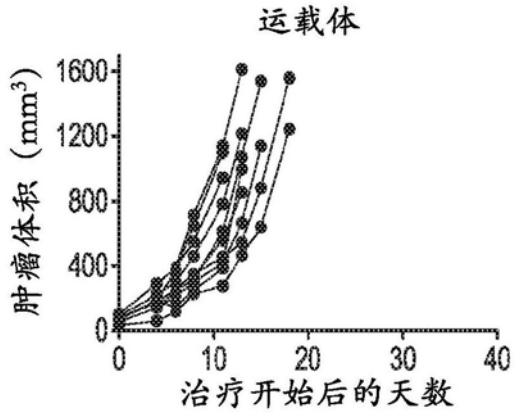

运载体
肿瘤体积（mm³）
1600
1200
800
400
0
0
10
20
30
40
治疗开始后的天数

图4E

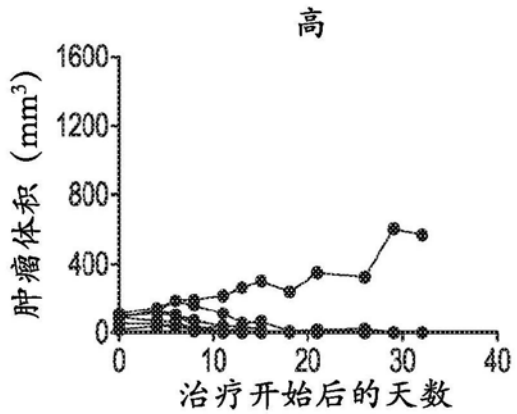

高
肿瘤体积（mm³）
1600
1200
800
400
0
0
10
20
30
40
治疗开始后的天数

图4F

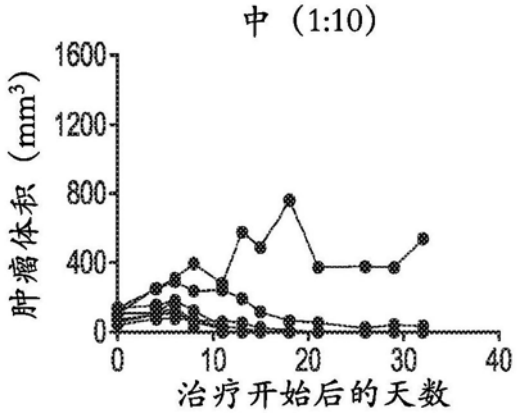

中（1:10）
肿瘤体积（mm³）
1600
1200
800
400
0
0
10
20
30
40
治疗开始后的天数

图4G

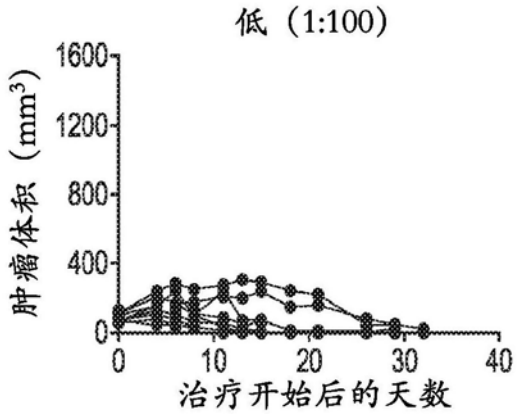

低（1:100）
肿瘤体积（mm³）
1600
1200
800
400
0
0
10
20
30
40
治疗开始后的天数

图4H

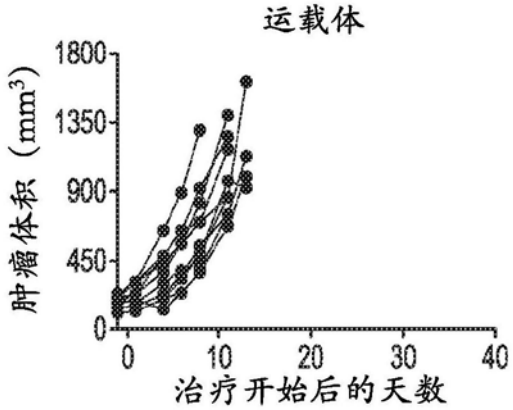

运载体
肿瘤体积（mm3）
1800
1350
900
450
0
0
10
20
30
40
治疗开始后的天数

图5A

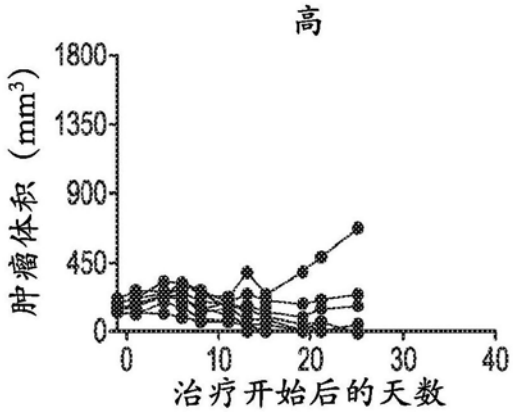

高
肿瘤体积（mm3）
1800
1350
900
450
0
0
10
20
30
40
治疗开始后的天数

图5B

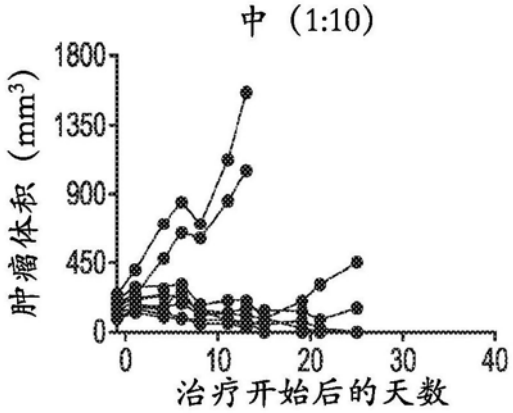

中（1:10）
肿瘤体积（mm3）
1800
1350
900
450
0
0
10
20
30
40
治疗开始后的天数

图5C

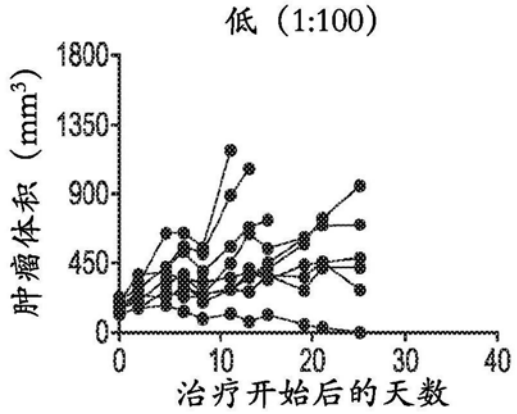

低（1:100）
肿瘤体积（mm3）
1800
1350
900
450
0
0
10
20
30
40
治疗开始后的天数

图5D

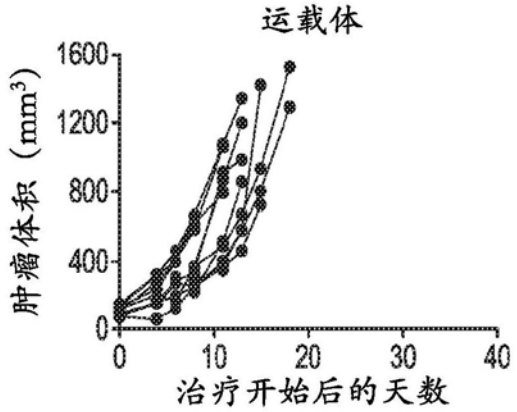

运载体
肿瘤体积（mm3）
1600
1200
800
400
0
0
10
20
30
40
治疗开始后的天数

图5E

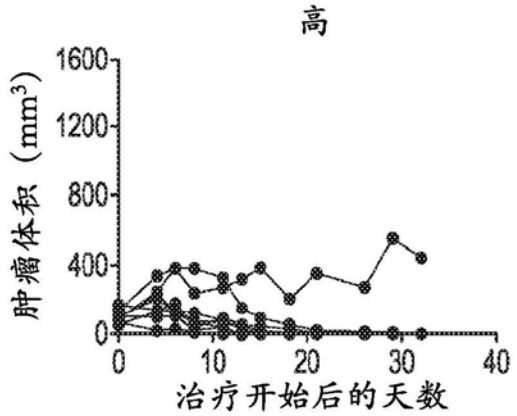

高
肿瘤体积（mm3）
1600
1200
800
400
0
0
10
20
30
40
治疗开始后的天数

图5F

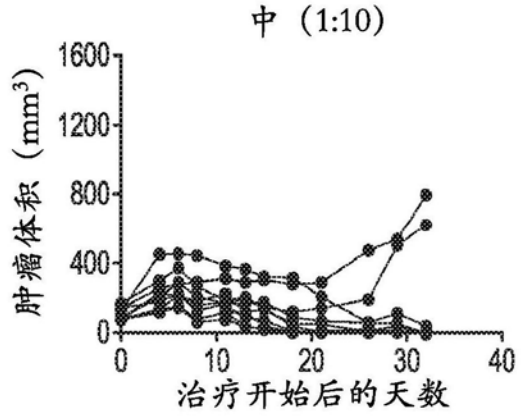

中（1:10）
肿瘤体积（mm3）
1600
1200
800
400
0
0
10
20
30
40
治疗开始后的天数

图5G

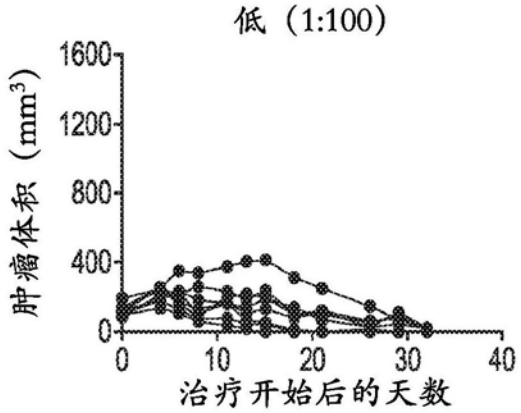

低（1:100）
肿瘤体积（mm3）
1600
1200
800
400
0
0
10
20
30
40
治疗开始后的天数

图5H

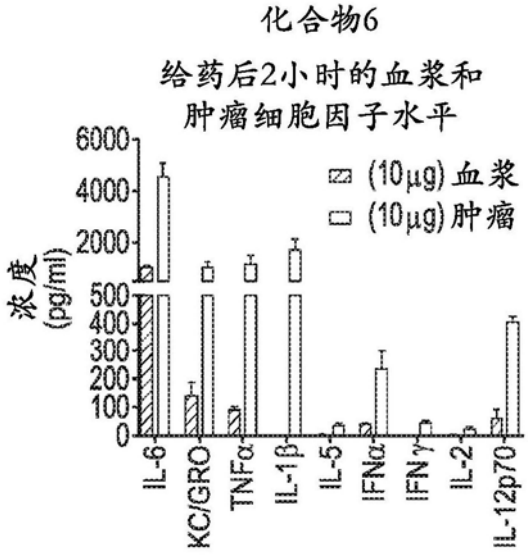

化合物6
给药后2小时的血浆和
肿瘤细胞因子水平
(10μg)血浆
(10μg)肿瘤
浓度
(pg/ml)
6000
4000
2000
500
400
300
200
100
0
IL-6
KC/GRO
TNFα
IL-1β
IL-5
IFNα
IFNγ
IL-2
IL-12p70

图6A

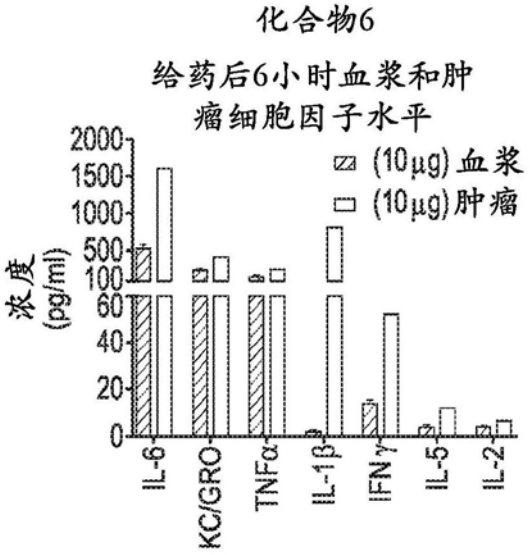

化合物6
给药后6小时血浆和肿瘤细胞因子水平
浓度 (pg/ml)
2000
1500
1000
500
100
60
40
20
0
(10μg)血浆
(10μg)肿瘤
IL-6
KC/GRO
TNFα
IL-1β
IFNγ
IL-5
IL-2

图6B