



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 118574611 A

(43) 申请公布日 2024.08.30

(21) 申请号 202280089687.3

(22) 申请日 2022.11.23

(30) 优先权数据

63/282,547 2021.11.23 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.07.22

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2022/080408 2022.11.23

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/097259 EN 2023.06.01

(71) 申请人 IO治疗公司

地址 美国得克萨斯州

(72) 发明人 马丁·E·桑德斯

维迪亚萨加尔·武利贡达

(74) 专利代理机构 北京东方亿思知识产权代理  
有限责任公司 11258

专利代理师 谭玲玲

(51) Int.Cl.

A61K 31/343 (2006.01)

C07C 251/48 (2006.01)

C07D 307/81 (2006.01)

C07D 307/79 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

权利要求书7页 说明书27页 附图29页

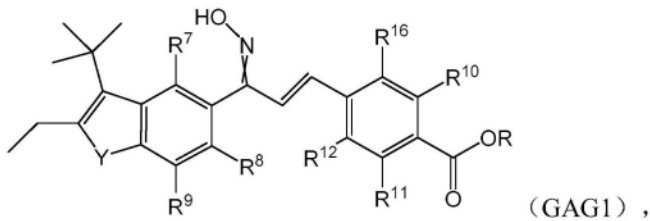
(54) 发明名称

使用RAR  $\gamma$  激动剂治疗癌症的方法

(57) 摘要

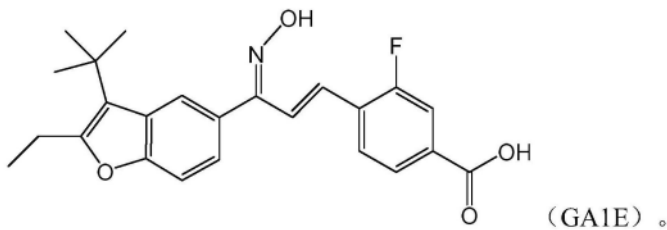
本发明公开了用于治疗癌症的新型RAR  $\gamma$  选择性激动剂。本发明还公开了向包括人在内的哺乳动物施用RAR  $\gamma$  选择性激动剂,以用于选择性地激活RAR  $\gamma$  受体并通过激活肿瘤浸润淋巴细胞来治疗癌症。

1. 一种治疗癌症的方法,其包括向有需要的患者施用有效量的具有以下结构的RAR $\gamma$ 选择性激动剂



或其药学上可接受的盐,其中R为H或C<sub>1-6</sub>烷基;连接至=N-OH基团的交叉双键表示立体化学未指定;R<sup>7</sup>至R<sup>12</sup>独立地为C<sub>1-6</sub>烷基、氢原子、烷氧基、卤素原子、硝基、羟基、OCF<sub>3</sub>或COR<sup>13</sup>,其中R<sup>13</sup>为C<sub>1-6</sub>烷基或CF<sub>3</sub>;Y为氧、硫或NR<sup>14</sup>,其中R<sup>14</sup>为C<sub>1-6</sub>烷基;并且R<sup>16</sup>为H或F。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述RAR $\gamma$ 选择性激动剂具有以下结构



3. 根据权利要求1或2所述的方法,其中所述癌症是实体肿瘤。

4. 根据权利要求3所述的方法,其中所述癌症是乳腺癌。

5. 根据权利要求4所述的方法,其中所述乳腺癌是三阴性乳腺癌。

6. 根据权利要求4所述的方法,其中所述乳腺癌是Her2<sup>+</sup>乳腺癌。

7. 根据权利要求3所述的方法,其中所述癌症是肺癌。

8. 根据权利要求1-7中任一项所述的方法,其中所述有效量为约1mg/天至约100mg/天。

9. 根据权利要求1-8中任一项所述的方法,其还包括施用CAR-T细胞。

10. 根据权利要求1-8中任一项所述的方法,其还包括施用免疫检查点抑制剂。

11. 一种产生或扩增肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)的方法,其通过使所述TIL与RAR $\gamma$ 选择性激动剂接触来实现。

12. 根据权利要求11所述的方法,其中接触包括向患有癌症的受试者施用所述RAR $\gamma$ 选择性激动剂。

13. 根据权利要求11所述的方法,其中接触包括在补充有所述RAR $\gamma$ 选择性激动剂的培养基中体外培养所述TIL。

14. 根据权利要求13所述的方法,其包括从肿瘤外植体中分离TIL。

15. 根据权利要求13所述的方法,其包括在经照射的肿瘤细胞的存在下,在补充有所述RAR $\gamma$ 选择性激动剂的培养基中体外培养外周血单核细胞(PBMC)。

16. 根据权利要求15所述的方法,其中所述PBMC和所述经照射的肿瘤细胞获自同一个体。

17. 根据权利要求13-16中任一项所述的方法,其中所述培养基进一步补充有IL-2。

18. 根据权利要求13-17中任一项所述的方法,其还包括用抗PD-1或抗PD-L1抗体补充所述培养基。

19. 一种治疗癌症的方法,其包括将根据权利要求11-18中任一项所产生或所扩增的所

述TIL输注给有需要的患者。

20. 一种治疗癌症的方法,其包括向有需要的患者提供RAR $\gamma$ 选择性激动剂扩增的TIL。

21. 根据权利要求20所述的方法,其中提供包括施用在补充有所述RAR $\gamma$ 选择性激动剂的培养基中体外培养的TIL。

22. 根据权利要求20或21所述的方法,其中提供包括向所述患者施用所述RAR $\gamma$ 选择性激动剂。

23. 根据权利要求20-22中任一项所述的方法,其中所述癌症是实体肿瘤。

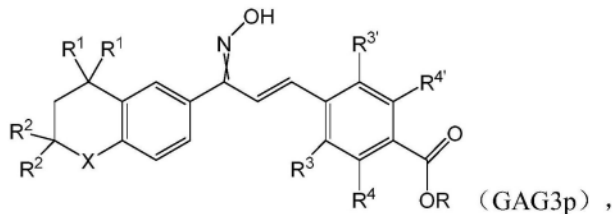
24. 根据权利要求23所述的方法,其中所述癌症是乳腺癌。

25. 根据权利要求24所述的方法,其中所述乳腺癌是三阴性乳腺癌。

26. 根据权利要求24所述的方法,其中所述乳腺癌是Her2<sup>+</sup>乳腺癌。

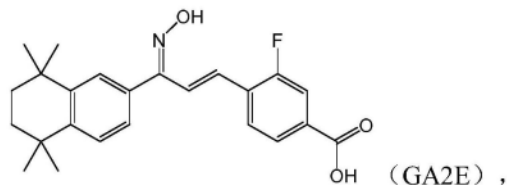
27. 根据权利要求24所述的方法,其中所述癌症是肺癌。

28. 根据权利要求11-27中任一项所述的方法,其中所述RAR $\gamma$ 选择性激动剂是以下结构的化合物



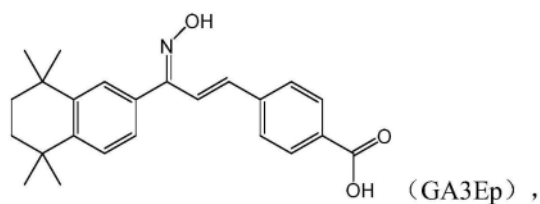
或其药学上可接受的盐,其中R为H或C<sub>1-6</sub>烷基;每个R<sup>1</sup>和R<sup>2</sup>独立地为H或C<sub>1-6</sub>烷基;R<sup>3</sup>、R<sup>3'</sup>、R<sup>4</sup>和R<sup>4'</sup>独立地为H或F;X为O、S、CH<sub>2</sub>、C(R<sup>5</sup>)<sub>2</sub>或NR<sup>6</sup>,其中每个R<sup>5</sup>和R<sup>6</sup>独立地为H或C<sub>1-6</sub>烷基;连接至=N-OH基团的交叉双键表示立体化学未指定。

29. 根据权利要求28所述的方法,其中所述RAR $\gamma$ 选择性激动剂是以下结构的化合物



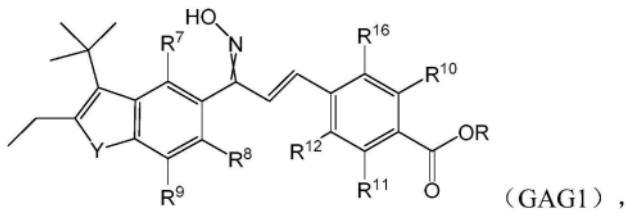
或其药学上可接受的盐。

30. 根据权利要求28所述的方法,其中所述RAR $\gamma$ 选择性激动剂是以下结构的化合物



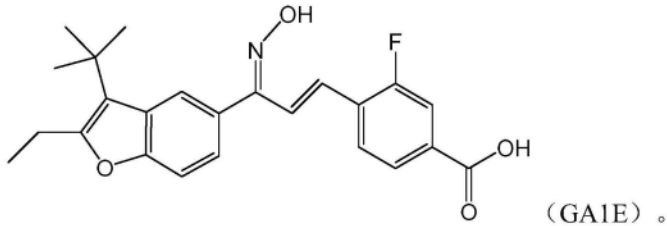
或其药学上可接受的盐。

31. 根据权利要求19-30中任一项所述的方法,其中所述RAR $\gamma$ 选择性激动剂是以下结构的化合物



或其药学上可接受的盐,其中R为H或C<sub>1-6</sub>烷基;连接至=N-OH基团的交叉双键表示立体化学未指定;R<sup>7</sup>至R<sup>12</sup>独立地为C<sub>1-6</sub>烷基、氢原子、烷氧基、卤素原子、硝基、羟基、OCF<sub>3</sub>或COR<sup>13</sup>,其中R<sup>13</sup>为C<sub>1-6</sub>烷基或CF<sub>3</sub>;Y为氧、硫或NR<sup>14</sup>,其中R<sup>14</sup>为C<sub>1-6</sub>烷基;并且R<sup>16</sup>为H或F。

32. 根据权利要求31所述的方法,其中所述RAR<sub>γ</sub>选择性激动剂具有以下结构



33. 根据权利要求1-10或19-32中任一项所述的方法,其包括向受试者施用所述RAR<sub>γ</sub>选择性激动剂,其中所述施用在整个治疗间隔期间周期性地发生。

34. 根据权利要求1-10或19-32中任一项所述的方法,其包括向受试者施用所述RAR<sub>γ</sub>选择性激动剂,其中所述施用在整个治疗间隔期间以重复周期发生。

35. 根据权利要求34所述的方法,其中一个治疗周期包括1)在第一时间跨度内周期性地施用所述RAR<sub>γ</sub>选择性激动剂和2)在第二时间跨度内暂停所述RAR<sub>γ</sub>选择性激动剂的施用,之后可开始新的周期。

36. 根据权利要求35所述的方法,其中所述第一时间跨度是10-15天或其中的任何整数天数。

37. 根据权利要求35或36所述的方法,其中所述第二时间跨度是两周至一个月或其中的任何整数天数。

38. 根据权利要求33-37中任一项所述的方法,其中周期性地是每天。

39. 根据权利要求33-37中任一项所述的方法,其中周期性地是每天两次。

40. 根据权利要求33-37中任一项所述的方法,其中周期性地是每隔一天。

41. 根据权利要求33-40中任一项所述的方法,其中所述治疗间隔从第一次施用延长直至实现完全反应。

42. 根据权利要求33-40中任一项所述的方法,其中所述治疗间隔从第一次施用延长直至所述癌症在疾病稳定或消退后再次进展。

43. 根据权利要求1-10或19-42中任一项所述的方法,其还包括施用Treg细胞的抑制剂。

44. 根据权利要求43所述的方法,其中所述Treg细胞的抑制剂包括RAR<sub>α</sub>拮抗剂。

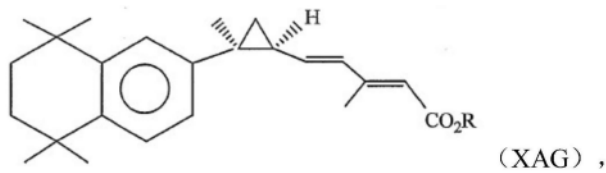
45. 根据权利要求43所述的方法,其中所述Treg细胞的抑制剂包括Treg消耗抗体。

46. 根据权利要求45所述的方法,其中所述Treg消耗抗体包括抗CD25抗体、抗GITR抗体、抗FoxP3抗体、抗CCR<sub>4</sub>抗体或抗叶酸受体4抗体。

47. 根据权利要求1-8或19-46中任一项所述的方法,其还包括施用抗PD-1或抗PD-L1抗

体。

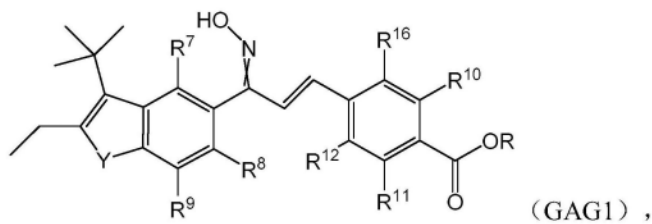
48. 根据权利要求1-10或19-46中任一项所述的方法, 其还包括施用具有以下结构的RXR激动剂或其药学上可接受的盐



其中R为H或C<sub>1-6</sub>烷基。

49. 根据权利要求48所述的方法, 其中所述RXR激动剂是3,7-二甲基-6(S),7(S)-甲桥,7-[1,1,4,4-四甲基-1,2,3,4-四氢-萘-7-基]2(E),4(E)庚二烯酸(IRX4204)。

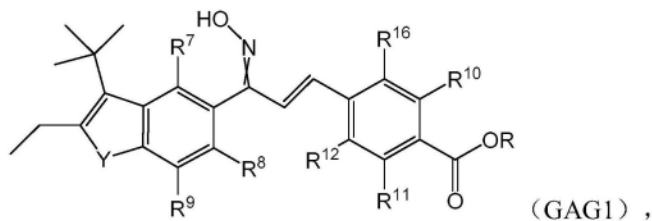
50. 一种增强嵌合抗原受体-T(CAR-T)癌症免疫疗法的方法, 其包括将有效量的具有以下结构的RAR $\gamma$ 选择性激动剂



或其药学上可接受的盐, 其中R为H或C<sub>1-6</sub>烷基; 连接至=N-OH基团的交叉双键表示立体化学未指定; R<sup>7</sup>至R<sup>12</sup>独立地为C<sub>1-6</sub>烷基、氢原子、烷氧基、卤素原子、硝基、羟基、OCF<sub>3</sub>或COR<sup>13</sup>, 其中R<sup>13</sup>为C<sub>1-6</sub>烷基或CF<sub>3</sub>; Y为氧、硫或NR<sup>14</sup>, 其中R<sup>14</sup>为C<sub>1-6</sub>烷基; 并且R<sup>16</sup>为H或F,

施用于正在接受、已经接受或计划接受CAR-T细胞的癌症患者。

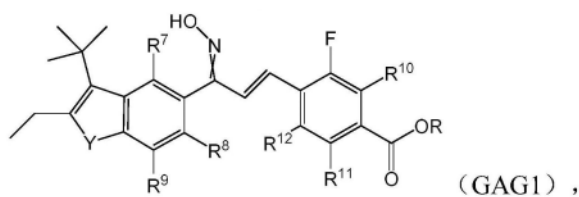
51. 一种增强免疫检查点抑制剂癌症免疫疗法的方法, 其包括将有效量的具有以下结构的RAR $\gamma$ 选择性激动剂



或其药学上可接受的盐, 其中R为H或C<sub>1-6</sub>烷基; 连接至=N-OH基团的交叉双键表示立体化学未指定; R<sup>7</sup>至R<sup>12</sup>独立地为C<sub>1-6</sub>烷基、氢原子、烷氧基、卤素原子、硝基、羟基、OCF<sub>3</sub>或COR<sup>13</sup>, 其中R<sup>13</sup>为C<sub>1-6</sub>烷基或CF<sub>3</sub>; Y为氧、硫或NR<sup>14</sup>, 其中R<sup>14</sup>为C<sub>1-6</sub>烷基; 并且R<sup>16</sup>为H或F,

施用于正在接受、已经接受或计划接受免疫检查点抑制剂的癌症患者。

52. 一种以下结构的RAR $\gamma$ 选择性激动剂:



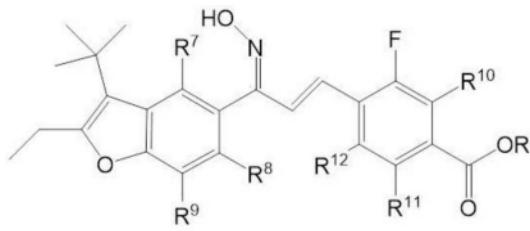
或其药学上可接受的盐, 其中R为H或C<sub>1-6</sub>烷基; R<sup>7</sup>至R<sup>12</sup>独立地为: C<sub>1-6</sub>烷基、氢原子、烷氧基、卤素原子、硝基、羟基、OCF<sub>3</sub>或COR<sup>13</sup>, 其中R<sup>13</sup>为C<sub>1-6</sub>烷基或CF<sub>3</sub>, Y为氧、硫或NR<sup>14</sup>, 其中R<sup>14</sup>为

C<sub>1-6</sub>烷基。

53. 根据权利要求52所述的RAR $\gamma$ 选择性激动剂,其中R为H、甲基或乙基。

54. 根据权利要求52所述的RAR $\gamma$ 选择性激动剂,其中Y为O。

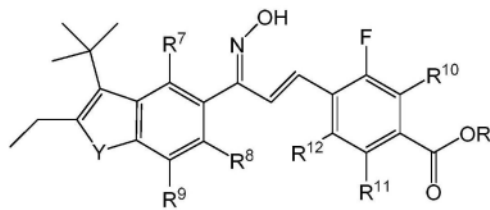
55. 根据权利要求54所述的RAR $\gamma$ 选择性激动剂,其具有以下结构:



(GAG1-1)。

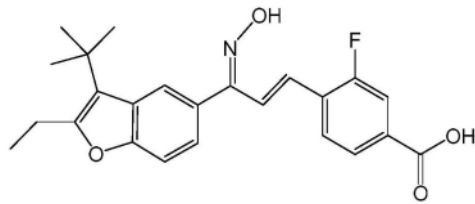
56. 根据权利要求52所述的RAR $\gamma$ 选择性激动剂,其中=N-OH基团呈E构型。

57. 根据权利要求56所述的RAR $\gamma$ 选择性激动剂,其具有以下结构:



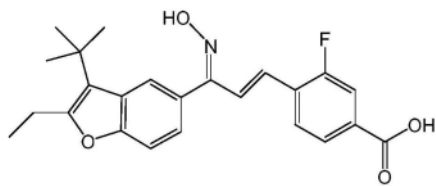
(GAG1-2)。

58. 根据权利要求52所述的RAR $\gamma$ 选择性激动剂,其中所述RAR $\gamma$ 选择性激动剂是4-((1E, 3E)-3-(3-(叔丁基)-2-乙基-苯并呋喃-5-基)-3-(羟基亚氨基)丙-1-烯-1-基)-3-氟苯甲酸(GA1E),其具有以下结构



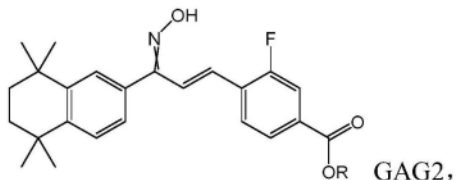
(GA1E)。

59. 根据权利要求52所述的RAR $\gamma$ 选择性激动剂,其中所述RAR $\gamma$ 选择性激动剂是4-((1E, 3Z)-3-(3-(叔丁基)-2-乙基-苯并呋喃-5-基)-3-(羟基亚氨基)丙-1-烯-1-基)-3-氟苯甲酸(GA1Z),其具有以下结构



(GA1Z)。

60. 一种具有以下结构的RAR $\gamma$ 选择性激动剂



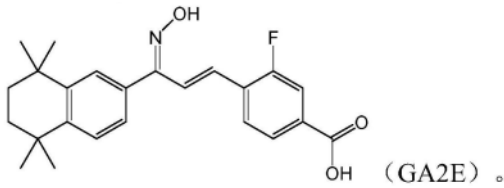
GAG2,

或其药学上可接受的盐,其中R为H或C<sub>1-6</sub>烷基,并且连接至=N-OH基团的交叉双键表示立体化学未指定。

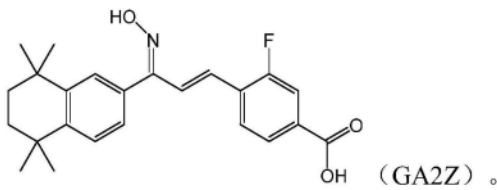
61. 根据权利要求60所述的RAR $\gamma$ 选择性激动剂,其中R为H、甲基或乙基。

62. 根据权利要求60所述的RAR $\gamma$ 选择性激动剂,其中=N-OH基团呈E构型。

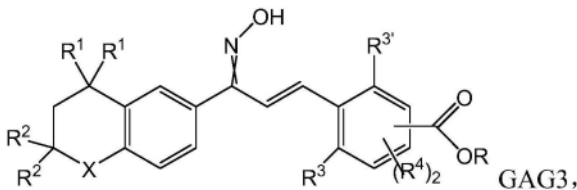
63. 根据权利要求60所述的RAR $\gamma$ 选择性激动剂,其中所述RAR $\gamma$ 选择性激动剂是3-氟-4-((1E,3E)-3-(羟基亚氨基)-3-(5,5,8,8-四甲基-5,6,7,8-四氢萘-2-基)丙-1-烯-1-基)苯甲酸(GA2E),其具有以下结构



64. 根据权利要求60所述的RAR $\gamma$ 选择性激动剂,其中所述RAR $\gamma$ 选择性激动剂是3-氟-4-((1E,3Z)-3-(羟基亚氨基)-3-(5,5,8,8-四甲基-5,6,7,8-四氢萘-2-基)丙-1-烯-1-基)苯甲酸(GA2Z),其具有以下结构

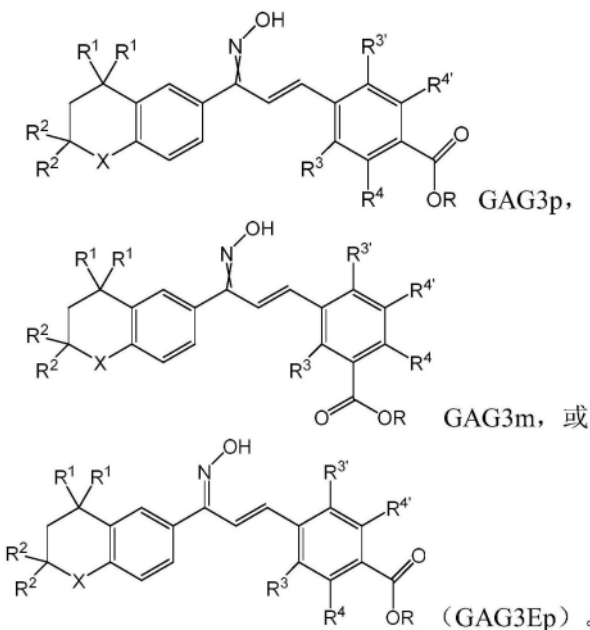


65. 一种具有以下结构的RAR $\gamma$ 选择性激动剂

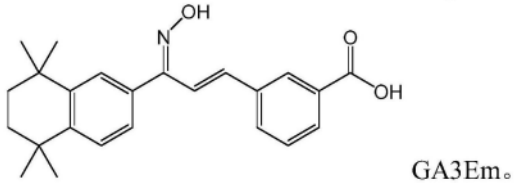
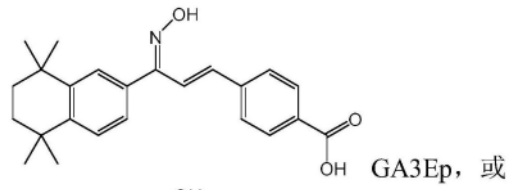


或其药学上可接受的盐,其中R为H或C<sub>1-6</sub>烷基;每个R<sup>1</sup>和R<sup>2</sup>独立地为H或C<sub>1-6</sub>烷基;R<sup>3</sup>和R<sup>3'</sup>独立地为H或卤素;(R<sup>4</sup>)<sub>2</sub>包含R<sup>4</sup>和R<sup>4'</sup>,其独立地为H、卤素、C<sub>1-6</sub>烷基或C<sub>1-6</sub>烷氧基;X为O、S、CH<sub>2</sub>、C(R<sup>5</sup>)<sub>2</sub>或NR<sup>6</sup>,其中每个R<sup>5</sup>和R<sup>6</sup>独立地为H或C<sub>1-6</sub>烷基;连接至=N-OH基团的交叉双键表示立体化学未指定;并且COOR基团处于间位或对位并且两个R<sup>4</sup>基团占据环上的其余位置。

66. 根据权利要求65所述的RAR $\gamma$ 选择性激动剂,其具有以下结构



67. 根据权利要求65所述的RAR $\gamma$ 选择性激动剂,其具有以下结构



## 使用RAR $\gamma$ 激动剂治疗癌症的方法

### 技术领域

[0001] 本公开涉及使用RAR $\gamma$ 激动剂治疗癌症的方法。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请要求2022年11月23日提交的美国临时专利申请63/282,547的权益,其全部内容通过引用并入本文。

### 背景技术

[0004] 类视黄醇是一类与核受体视黄酸受体 (RAR) 和类视黄醇X受体 (RXR) 相互作用的小分子。与RXR相互作用的类视黄醇被称为类维生素A,并且,在一些情况下,术语类视黄醇用于表示与RAR相互作用的化合物。RAR和RXR都有 $\alpha$ 、 $\beta$ 和 $\gamma$ 三种亚型。类视黄醇可以充当这些受体的激动剂或拮抗剂。一些类视黄醇与RAR和RXR两者以及每种亚型相互作用,而其他类视黄醇则将优先或特异性地与特定受体类型或亚型相互作用。类视黄醇调节多种细胞类型的发育和分化。类视黄醇具有多效性作用,这部分取决于特定的类视黄醇激活或抑制的特定受体类型和亚型。类视黄醇表现出一定程度的结构多样性。不可以可靠地预测特定的类视黄醇将与哪种受体类型和亚型相互作用,或者它将充当激动剂还是拮抗剂。

[0005] 由于科学文献中关于可能观察到的作用存在一定程度的不一致,因此可以从特定类视黄醇亚型预期的结果存在进一步的不确定性。Perri等人 (Exp Cell Res.327(2):183-191,2014) 在白血病细胞系的组织培养研究中发现,RAR $\alpha$ 激动剂和RAR $\gamma$ 拮抗剂各自抑制增殖,并且RAR $\gamma$ 拮抗剂与BCL- $x_L$ 和MCL-1的双重拮抗剂的组合具有极大的抑制作用。相比之下,Meister等人 (Anticancer Res.18(3A):1777-1786,1998) 发现,RAR $\gamma$ 激动剂对神经母细胞瘤细胞系具有最大抗增殖作用。在这两项研究中,细胞凋亡被视为抑制肿瘤细胞增殖的主要机制。Cheung等人 (Biochem Biophys Res Commun.229(1):349-54,1996) 通过用每种单独的RAR亚型转染神经母细胞瘤细胞系研究了RAR亚型特异性剂的作用并得出结论:RAR $\beta$ 表达对于生长抑制是必要的。Raffo等人 (Anticancer Res.20(3A):1535-43,2000) 观察到所有三种亚型的激动剂对乳腺癌细胞系都有一定的细胞凋亡活性,但RAR $\alpha$ 激动剂的作用最大。与这些体外实验相比,这些化合物中的任一种在体内可能具有什么作用、将在哪里发挥全部多效性作用甚至更不清楚。

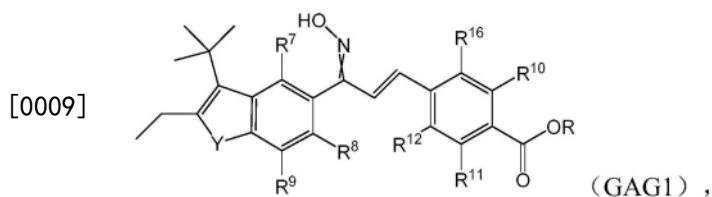
[0006] 癌症治疗方法不断发展,特异性和复杂性不断增加。早期的非手术癌症治疗方法通常针对对放射和化学攻击更敏感的快速分裂细胞。随着时间的推移,开发了更具特异性且一般毒性更小的治疗方法。一些治疗方法似乎具有广泛的适用性,例如免疫检查点抑制剂。其他治疗方法则针对表达特定抗原或参与调节增殖或分化的其他生物标志物的癌症;包括许多单克隆抗体和激酶抑制剂。然而,随着癌症治疗方法的种类不断增加,确定哪些候选治疗方法可以有效进行以及用于什么适应症变得越来越困难。

### 发明内容

[0007] 本文公开了体外扩增肿瘤浸润淋巴细胞 (TIL) 的方法以及通过向有需要的受试者

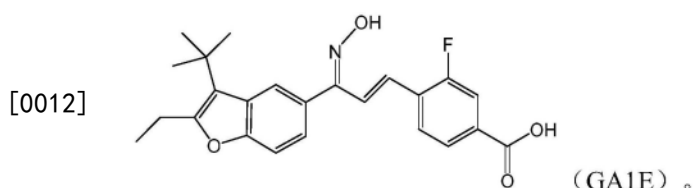
施用有效量的RAR $\gamma$ 选择性激动剂和/或扩增的TIL来治疗癌症的相关方法。

[0008] 一个方面是一种治疗癌症的方法,其包括向有需要的患者施用有效量的具有以下结构的RAR $\gamma$ 选择性激动剂



[0010] 或其药学上可接受的盐,其中R为H或C<sub>1-6</sub>烷基,并且连接至=N-OH基团的交叉双键表示立体化学未指定。然而,在一些实施方式中,=N-OH基团的E构型是优选的。R<sup>7</sup>至R<sup>12</sup>独立地为:C<sub>1-6</sub>烷基、氢原子、烷氧基、卤素原子(例如F、Cl或Br)、硝基、羟基、OCF<sub>3</sub>或COR<sup>13</sup>,其中R<sup>13</sup>为C<sub>1-6</sub>烷基或CF<sub>3</sub>。Y为氧、硫或NR<sup>14</sup>,其中R<sup>14</sup>为C<sub>1-6</sub>烷基。R<sup>16</sup>为H或F。

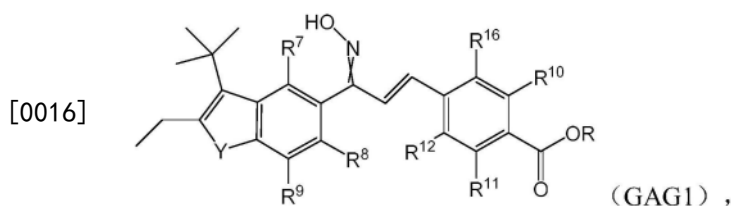
[0011] 在一些实施方式中,RAR $\gamma$ 选择性激动剂具有以下结构



[0013] 一个方面是一种产生、分化TIL或扩大其数量的方法,其通过使所述TIL与RAR $\gamma$ 选择性激动剂接触来实现。在一些实施方式中,接触包括在补充有RAR $\gamma$ 选择性激动剂的培养基中体外培养TIL。在一些实施方式中,接触包括向患有肿瘤的受试者施用RAR $\gamma$ 选择性激动剂。

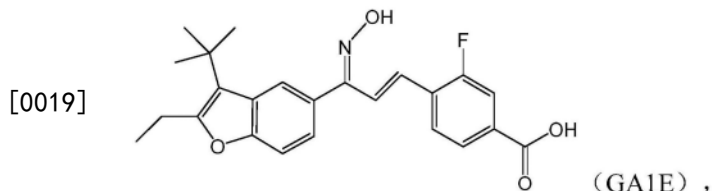
[0014] 对于上述方面,在一些实施方式中,RAR $\gamma$ 选择性激动剂是选择性的,因为它在临床相关浓度下对RAR $\alpha$ 没有激动活性或具有可忽略不计的激动活性。在一些实施方式中,RAR $\gamma$ 选择性激动剂是选择性的,因为它在临床相关浓度下对RAR $\alpha$ 和RAR $\beta$ 没有激动活性或具有可忽略不计的激动活性。

[0015] 在一些实施方式中,RAR $\gamma$ 选择性激动剂是以下结构的化合物

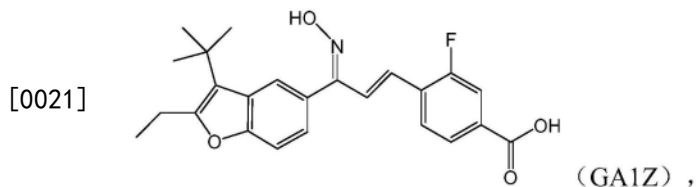


[0017] 或其药学上可接受的盐,其中R为H或C<sub>1-6</sub>烷基,并且连接至=N-OH基团的交叉双键表示立体化学未指定。然而,在一些实施方式中,=N-OH基团的E构型是优选的。R<sup>7</sup>至R<sup>12</sup>独立地为:C<sub>1-6</sub>烷基、氢原子、烷氧基、卤素原子(例如F、Cl或Br)、硝基、羟基、OCF<sub>3</sub>或COR<sup>13</sup>,其中R<sup>13</sup>为C<sub>1-6</sub>烷基或CF<sub>3</sub>。Y为氧、硫或NR<sup>14</sup>,其中R<sup>14</sup>为C<sub>1-6</sub>烷基。R<sup>16</sup>为H或F。

[0018] 在一些实施方式中,RAR $\gamma$ 选择性激动剂是具有以下结构的4-((1E,3E)-3-(3-(叔丁基)-2-乙基-苯并呋喃-5-基)-3-(羟基亚氨基)丙-1-烯-1-基)-3-氟苯甲酸(GA1E)

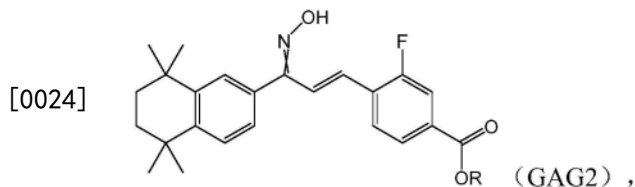


[0020] 或其药学上可接受的盐。在一些实施方式中, RAR $\gamma$ 选择性激动剂是具有以下结构的4-((1E,3Z)-3-(3-(叔丁基)-2-乙基-苯并呋喃-5-基)-3-(羟基亚氨基)丙-1-烯-1-基)-3-氟苯甲酸(GA1Z)

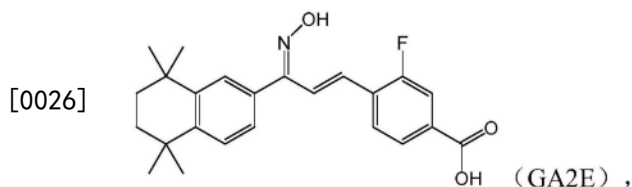


[0022] 或其药学上可接受的盐。

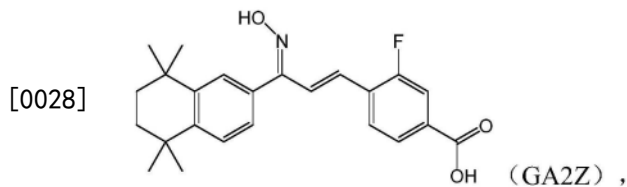
[0023] 在一些实施方式中, RAR $\gamma$ 选择性激动剂是以下结构的化合物



[0025] 或其药学上可接受的盐,其中R为H或C<sub>1-6</sub>烷基,并且连接至=N-OH基团的交叉双键表示立体化学未指定。然而,在一些实施方式中,=N-OH基团的E构型是优选的。在一些实施方式中, RAR $\gamma$ 激动剂是具有以下结构的3-氟-4-((1E,3E)-3-(羟基亚氨基)-3-(5,5,8,8-四甲基-5,6,7,8-四氢萘-2-基)丙-1-烯-1-基)苯甲酸(GA2E)

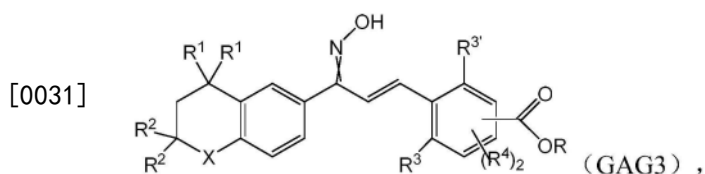


[0027] 或其药学上可接受的盐。在一些实施方式中, RAR $\gamma$ 选择性激动剂是具有以下结构的3-氟-4-((1E,3Z)-3-(羟基亚氨基)-3-(5,5,8,8-四甲基-5,6,7,8-四氢萘-2-基)丙-1-烯-1-基)苯甲酸(GA2Z)



[0029] 或其药学上可接受的盐。

[0030] 在一些实施方式中, RAR $\gamma$ 选择性激动剂是以下结构的化合物



[0032] 或其药学上可接受的盐,其中R为H或C<sub>1-6</sub>烷基;每个R<sup>1</sup>和R<sup>2</sup>独立地为H或C<sub>1-6</sub>烷基;R<sup>3</sup>和R<sup>3'</sup>独立地为H或卤素(例如,C1、F或Br);(R<sup>4</sup>)<sub>2</sub>包含R<sup>4</sup>和R<sup>4'</sup>,其独立地为H、卤素(例如,C1、F或Br)、C<sub>1-6</sub>烷基或C<sub>1-6</sub>烷氧基;X为O、S、CH<sub>2</sub>、C(R<sup>5</sup>)<sub>2</sub>或NR<sup>6</sup>,其中每个R<sup>5</sup>和R<sup>6</sup>独立地为H或C<sub>1-6</sub>烷基;连接至=N-OH基团的交叉双键表示立体化学未指定;并且COOR基团处于间位或对位并且两个R<sup>4</sup>基团占据环上的其余位置。在一些实施方式中,COOR基团的对位是优选的。在一些实施方式中,=N-OH基团的E构型是优选的。在一些实施方式中,两个R<sup>1</sup>均为CH<sub>3</sub>。在一些实施方式中,两个R<sup>2</sup>均为H。在一些实施方式中,X为C(R<sup>5</sup>)<sub>2</sub>。在一些实施方式中,两个R<sup>5</sup>均为CH<sub>3</sub>。在一些实施方式中,一个R<sup>3</sup>为H并且另一个R<sup>3</sup>为F。在一些实施方式中,两个R<sup>4</sup>均为H。在一些实施方式中,所有R<sup>3</sup>和R<sup>4</sup>均为H。在一些实施方式中,R为H。在一些实施方式中,R为甲基或乙基。在一些实施方式中,COOR基团处于对位。在一些实施方式中,COOR基团处于间位。在一些实施方式中,=N-OH基团呈E构型。在一些实施方式中,=N-OH基团呈Z构型。在特定实施方式中,R为H并且羧酸基团处于对位,两个R<sup>1</sup>均为CH<sub>3</sub>,两个R<sup>2</sup>均为H,X为C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>,所有R<sup>3</sup>和R<sup>4</sup>均为H,并且=N-OH基团呈E构型(GA3Ep)。一些实施方式具体地包括一个或多个可变位置上的一个或多个特定取代基。一些实施方式具体地排除一个或多个可变位置上的一个或多个特定取代基。

[0033] 在一些实施方式中,RAR $\gamma$ 选择性激动剂是CD437、CD2325、CD666、曲法罗汀(trifarotene)或BMS961。

[0034] 一个方面是一种使用RAR $\gamma$ 激动剂扩增的TIL治疗癌症的方法。在一些实施方式中,将RAR $\gamma$ 激动剂施用于患有待治疗的癌症的受试者。

[0035] 在替代性实施方式中,通过将培养物暴露于RAR $\gamma$ 激动剂来在体外培养物中扩增T淋巴细胞,并将RAR $\gamma$ 激动剂扩增的T淋巴细胞作为过继性T细胞疗法施用于患有待治疗的癌症的受试者。也就是说,培养基补充有RAR $\gamma$ 激动剂。培养基中的RAR $\gamma$ 激动剂浓度可以在1pM至1mM的范围内。在一些实施方式中,培养基中的RAR $\gamma$ 激动剂浓度为0.5nM。在一些实施方式中,T淋巴细胞是从来自受试者的肿瘤外植体中分离的TIL。在一些实施方式中,T淋巴细胞是外周血单核细胞(PBMC)。在一些实施方式中,T淋巴细胞培养物还包含经致死照射的肿瘤细胞。在一些实施方式中,待致死照射的肿瘤细胞获自待治疗的受试者。在一些实施方式中,培养基补充有白细胞介素2(IL-2)。在一些实施方式中,通过输注,例如通过静脉内或肿瘤内输注,将扩增的T淋巴细胞施用于受试者。

[0036] 在一些实施方式中,受试者是哺乳动物。在一些实施方式中,受试者是人。在一些实施方式中,RAR $\gamma$ 激动剂是GA1E。在一些实施方式中,RAR $\gamma$ 激动剂是GA2E。

[0037] 对于上述方面,在一些实施方式中,癌症是乳腺癌。在一些实施方式中,乳腺癌是三阴性乳腺癌。在一些实施方式中,癌症是Her2<sup>+</sup>乳腺癌。在一些实施方式中,癌症是肺癌,例如非小细胞肺癌。在一些实施方式中,癌症是实体肿瘤。在一些实施方式中,癌症是血液系统癌症。在一些实施方式中,癌症是癌(carcinoma)、肉瘤、黑素瘤、成胶质细胞瘤、白血病、淋巴瘤、骨髓瘤或浆细胞癌。

[0038] 在一些实施方式中,RAR $\gamma$ 激动剂的有效量为约0.01mg/m<sup>2</sup>/天至约300mg/m<sup>2</sup>/天;然而,低于或高于该示例性范围的剂量也在本公开的范围。日剂量可以为约0.5mg/m<sup>2</sup>/天至约100mg/m<sup>2</sup>/天、约1mg/m<sup>2</sup>/天至约90mg/m<sup>2</sup>/天、约5mg/m<sup>2</sup>/天至约80mg/m<sup>2</sup>/天;或至少约0.02mg/m<sup>2</sup>/天、0.03mg/m<sup>2</sup>/天、0.05mg/m<sup>2</sup>/天、0.07mg/m<sup>2</sup>/天、0.1mg/m<sup>2</sup>/天、0.2mg/m<sup>2</sup>/天、

0.3mg/m<sup>2</sup>/天、0.5mg/m<sup>2</sup>/天、0.7mg/m<sup>2</sup>/天、1mg/m<sup>2</sup>/天、2mg/m<sup>2</sup>/天、3mg/m<sup>2</sup>/天、5mg/m<sup>2</sup>/天、7mg/m<sup>2</sup>/天、10mg/m<sup>2</sup>/天、15mg/m<sup>2</sup>/天、20mg/m<sup>2</sup>/天、25mg/m<sup>2</sup>/天、30mg/m<sup>2</sup>/天、50mg/m<sup>2</sup>/天、70mg/m<sup>2</sup>/天或100mg/m<sup>2</sup>/天；或不超过约0.1mg/m<sup>2</sup>/天、0.2mg/m<sup>2</sup>/天、0.3mg/m<sup>2</sup>/天、0.5mg/m<sup>2</sup>/天、0.7mg/m<sup>2</sup>/天、1mg/m<sup>2</sup>/天、2mg/m<sup>2</sup>/天、3mg/m<sup>2</sup>/天、5mg/m<sup>2</sup>/天、7mg/m<sup>2</sup>/天、10mg/m<sup>2</sup>/天、15mg/m<sup>2</sup>/天、20mg/m<sup>2</sup>/天、25mg/m<sup>2</sup>/天、30mg/m<sup>2</sup>/天、50mg/m<sup>2</sup>/天、60mg/m<sup>2</sup>/天、70mg/m<sup>2</sup>/天、80mg/m<sup>2</sup>/天、90mg/m<sup>2</sup>/天、100mg/m<sup>2</sup>/天、125mg/m<sup>2</sup>/天、150mg/m<sup>2</sup>/天、175mg/m<sup>2</sup>/天、200mg/m<sup>2</sup>/天、225mg/m<sup>2</sup>/天、250mg/m<sup>2</sup>/天、275mg/m<sup>2</sup>/天或300mg/m<sup>2</sup>/天；或由前述值中的任两个限定的范围。在一些实施方式中，对于人的有效量为约0.006mg/天至约200mg/天或约1mg/天至约100mg/天。

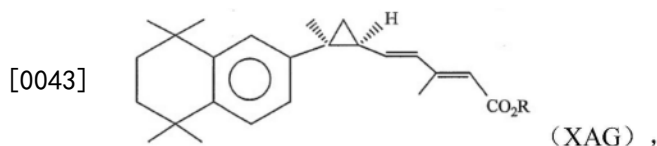
[0039] 在一些实施方式中，RAR $\gamma$ 激动剂的有效量为约0.27 $\mu$ g/kg/天至约8mg/kg/天；然而，低于或高于该示例性范围的剂量也在本公开的范围。日剂量可以为约0.013mg/kg/天至约2.7mg/kg/天、约0.025mg/kg/天至约2.5mg/kg/天、约0.130mg/kg/天至约22mg/kg/天；或至少约0.0005mg/kg/天、0.0008mg/kg/天、0.001mg/kg/天、0.0013mg/kg/天、0.0020mg/kg/天、0.0025mg/kg/天、0.005mg/kg/天、0.0008mg/kg/天、0.0010mg/kg/天、0.0013mg/kg/天、0.0020mg/kg/天、0.0027mg/kg/天、0.005mg/kg/天、0.008mg/kg/天、0.010mg/kg/天、0.013mg/kg/天、0.020mg/kg/天、0.027mg/kg/天、0.05mg/kg/天、0.08mg/kg/天、0.1mg/kg/天、0.13mg/kg/天、0.2mg/kg/天、0.5mg/kg/天、0.8mg/kg/天、1.0mg/kg/天、1.3mg/kg/天、1.8mg/kg/天、2.0mg/kg/天或2.7mg/kg/天；或不超过约0.0027mg/kg/天、0.005mg/kg/天、0.008mg/kg/天、0.010mg/kg/天、0.013mg/kg/天、0.020mg/kg/天、0.027mg/kg/天、0.05mg/kg/天、0.08mg/kg/天、0.1mg/kg/天、0.13mg/kg/天、0.2mg/kg/天、0.5mg/kg/天、0.8mg/kg/天、1.0mg/kg/天、1.3mg/kg/天、1.8mg/kg/天、2.0mg/kg/天、或2.7mg/kg/天、3.3mg/kg/天、4.0mg/kg/天、4.7mg/kg/天、5.4mg/kg/天、6.1mg/kg/天、6.8mg/kg/天、7.4mg/kg/天、或8.0mg/kg/天，或由前述值中的任两个限定的范围。

[0040] 对于包括向受试者施用RAR $\gamma$ 选择性激动剂的任何方面，在一些实施方式中，施用在整个治疗间隔期间周期性地发生。也就是说，在治疗间隔内定期出现的时间点施用RAR $\gamma$ 激动剂。在一些实施方式中，周期性地是每天两次、每天一次、每隔一天、每三天、或每周两次。在一些实施方式中，施用在整个治疗间隔期间以重复周期发生。在一些实施方式中，周期包括1) 在第一时间跨度内周期性地施用RAR $\gamma$ 选择性激动剂和2) 在第二时间跨度内暂停RAR $\gamma$ 选择性激动剂的施用，之后可开始新的周期。在一些实施方式中，第一时间跨度（在此期间施用RAR $\gamma$ 激动剂）为10-15天，或其中的任何整数天数。在一些实施方式中，第二时间跨度（在此期间暂停RAR $\gamma$ 激动剂的施用）为两周至一个月或其中的任何整数天数。在各种实施方式中，治疗间隔从第一次施用RAR $\gamma$ 激动剂延长直至实现完全反应、获得稳定的疾病、或在疾病稳定或消退之后再次发生疾病进展。

[0041] 对于包括向受试者施用RAR $\gamma$ 选择性激动剂的任何方面，一些实施方式还包括施用调节性T细胞(Treg)的抑制剂。在一些实施方式中，Treg的抑制剂是Treg消耗抗体。在各种实施方式中，Treg消耗抗体是抗CD25抗体、抗糖皮质激素诱导的肿瘤坏死因子相关蛋白(GITR)抗体、抗FoxP3抗体、抗CCR<sub>4</sub>抗体或抗叶酸受体4抗体。在一些实施方式中，Treg的抑制剂包括RAR $\alpha$ 拮抗剂。

[0042] 对于包括向受试者施用RAR $\gamma$ 选择性激动剂的任何方面，一些实施方式还包括施用

具有以下结构的RXR激动剂或其药学上可接受的盐：



[0044] 其中R为H或C<sub>1-6</sub>烷基。在一些实施方式中,RXR激动剂是3,7-二甲基-6(S),7(S)-甲桥,7-[1,1,4,4-四甲基-1,2,3,4-四氢-萘-7-基]2(E),4(E)庚二烯酸(IRX4204)。

[0045] 对于包括向受试者施用RAR $\gamma$ 选择性激动剂的任何方面,一些实施方式还包括施用CAR-T细胞。在一些实施方式中,RAR $\gamma$ 选择性激动剂是具有如上文所限定的GAG1的结构化合物。

[0046] 对于包括向受试者施用RAR $\gamma$ 选择性激动剂的任何方面,一些实施方式还包括施用抗PD-1或抗PD-L1抗体。

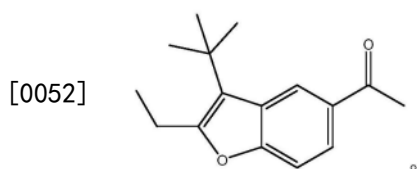
[0047] 对于包括通过使TIL与RAR $\gamma$ 选择性激动剂接触来产生或扩增所述TIL的任何方面,一些实施方式还包括在适当时施用抗PD-1或抗PD-L1抗体或用抗PD-1或抗PD-L1抗体补充培养基。

[0048] 一个方面是一种增强嵌合抗原受体-T (CAR-T) 癌症免疫疗法的方法,其包括向正在接受、已经接受或计划接受CAR-T细胞的癌症患者施用有效量的具有如上文所限定的GAG1的结构RAR $\gamma$ 选择性激动剂。

[0049] 一个方面是一种具有如上文所限定的GAG1的结构化合物。一个实施方式是4-((1E,3E)-3-(3-(叔丁基)-2-乙基-苯并呋喃-5-基)-3-(羟基亚氨基)丙-1-烯-1-基)-3-氟苯甲酸(GA1E)。一些实施方式是GA1E的药学上可接受的盐。一些实施方式是GA1E的C<sub>1-6</sub>酯。一些实施方式是包含GA1E或其盐或酯的药物组合物。

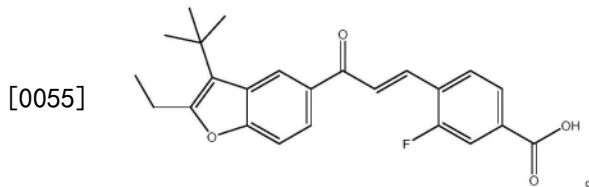
[0050] 一个方面是一种根据图1中的合成方案的GAG1的一般合成方法。完整的合成从化合物1开始,并且通过中间体(化合物2至5)进行,以产生GAG1物类(species),即异构体GA1E和GA1Z。一些实施方式是一种合成GAG1物类的方法,其包括通过使化合物3与n-BuLi和N-甲氧基-N-甲基乙酰胺反应来产生中间体化合物4。一些实施方式是一种合成GAG1物类的方法,其包括通过使化合物4与3-氟-4-甲酰基苯甲酸甲酯反应来产生中间体化合物5。一些实施方式是一种合成GAG1物类的方法,其通过使化合物5与盐酸羟胺在有机碱或无机碱的存在下反应来实现。在一些实施方式中,碱是吡啶。

[0051] 一个方面是中间体化合物4,其具有以下结构



[0053] 另一方面是一种合成化合物4的方法,其通过使化合物3与n-BuLi和N-甲氧基-N-甲基乙酰胺反应来实现。

[0054] 一个方面是中间体化合物5,其具有以下结构



[0056] 另一方面是一种合成化合物5的方法,其通过使化合物4与3-氟-4-甲酰基苯甲酸甲酯在碱诸如NaOH的存在下反应来实现。

### 附图说明

[0057] 图1示出用于合成GAG1物类GA1E和GA1Z的方案。

[0058] 图2示出用于合成GAG1物类GAG1-1和GAG1-2的方案。

[0059] 图3A-B描绘了GA1E(图3A)和GA2E(图3B)的RAR $\alpha$ 和RAR $\gamma$ 反式激活测定的结果。

[0060] 图4A-B描绘了相对于媒介物对照,用RAR $\gamma$ 选择性激动剂他扎罗汀酸(tazarotenic acid)和GA2E在同基因、免疫活性小鼠模型中治疗三阴性乳腺癌的结果。图4A示出该研究的三个小组中的每一个在实验过程中的肿瘤体积,以及因此肿瘤生长的抑制。图4B示出该研究的三个小组中的每一个在实验过程中的体重。

[0061] 图5A-B描绘了对于治疗剂GA2E、他扎罗汀酸和媒介物对照中的每一个,在实施例3中描述的研究结束时切除的肿瘤的流式细胞术分析的结果。结果示出为百分比(上图)和细胞的绝对数量/肿瘤(下图)。图5A示出肿瘤中的活细胞数量及其占总细胞的百分比(活)、基于CD45染色的白细胞数量及其占活细胞的百分比(CD45)、基于CD3染色的T细胞总数及其占白细胞的百分比(总T),以及基于CD4染色的CD4<sup>+</sup>T细胞及其占总T细胞的百分比(CD4T)。图5B示出基于CD4和细胞内IFN $\gamma$ 染色的记忆性T辅助细胞的数量及其占总CD4<sup>+</sup>细胞的百分比(TH IFN $\gamma$ )、基于CD4和细胞内IL-17染色的Th17细胞的数量及其占总CD4<sup>+</sup>细胞的百分比(TH IL17)、基于CD4、CD25和FOXP3染色的调节性T细胞的数量及其占总CD4<sup>+</sup>细胞的百分比(Treg)、基于CD8染色的CD8<sup>+</sup>T细胞及其占总T细胞的百分比(CD8T),以及基于CD8和细胞内IFN $\gamma$ 染色的记忆性溶细胞性T细胞及其占CD8<sup>+</sup>细胞的百分比(TC IFN $\gamma$ )。

[0062] 图6A-B描绘了对照小鼠(◆)和10mg/kg(■)、25mg/kg(▲)或50mg/kg(X)的GA2E治疗的小鼠中植入EMT6三阴性乳腺癌细胞的Ba1b/c小鼠从治疗第一天(第0天)直到研究结束的重量变化,报告为质量(图6A)或变化百分比(图6B)。

[0063] 图7描绘了对照小鼠(◆)和10mg/kg(■)、25mg/kg(▲)或50mg/kg(X)的GA2E治疗的小鼠中植入EMT6三阴性乳腺癌细胞的Ba1b/c小鼠从治疗第一天(第0天)直到研究结束的肿瘤生长,以mm<sup>3</sup>计。

[0064] 图8A-C描绘了用媒介物对照或RAR $\gamma$ 选择性激动剂处理的经回忆抗原刺激的PBMC的IFN $\gamma$ 产生(以pg/ml计);图8A GA2E;图8B GA3Ep;图8C他扎罗汀酸。

[0065] 图9A-C描绘了用媒介物对照或RAR $\gamma$ 选择性激动剂处理的经回忆抗原刺激的CD8<sup>+</sup>PBMC的PBMC增殖;图9A GA2E;图9B GA3Ep;图9C他扎罗汀酸。

[0066] 图10A-B描绘了对照(◆)和GA2E治疗的(■)小鼠中植入Her2<sup>+</sup>乳腺癌细胞系(JIMT-1)和人PBMC的NSG-B2M小鼠从治疗第一天(第0天)到研究结束的重量变化,报告为质量(图10A)或变化百分比(图10B)。

[0067] 图11描绘了对照(◆)和GA2E治疗的(■)小鼠中植入Her2<sup>+</sup>乳腺癌细胞系(JIMT-1)

和人PBMC的NSG-B2M小鼠从治疗第一天(第0天)到研究结束的肿瘤生长,以 $\text{mm}^3$ 计。

[0068] 图12A-E描绘了在研究的第26天(终止),对照(◆)和GA2E治疗的(■)小鼠中植入Her2<sup>+</sup>乳腺癌细胞系(JIMT-1)和人PBMC的NSG-B2M小鼠的CD8<sup>+</sup>TIL的流式细胞术T亚群分析。亚群是总CD8<sup>+</sup>T细胞(图12A,TC)、初始CD8<sup>+</sup>T细胞(图12B,CD8初始)、中央记忆CD8<sup>+</sup>T细胞(图12C,CD8 TCM)、效应记忆CD8<sup>+</sup>T细胞(图12D,CD8 TEM)和终末分化效应CD8<sup>+</sup>T细胞(图12E,CD8 TEFF)。治疗与对照之间的差异显著性:\*表示 $P<0.05$ ;\*\*\*表示 $P<0.001$ ;无星号表示 $P>0.05$ 。

[0069] 图13A-C描绘了在研究的第26天(终止),对照(◆)和GA2E治疗的(■)小鼠中植入Her2<sup>+</sup>乳腺癌细胞系(JIMT-1)和人PBMC的NSG-B2M小鼠的CD8<sup>+</sup>TIL的流式细胞术生物标志物分析。亚群是PD-1<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T细胞(图13A,TC PD1)、CD18β<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T细胞(图13B,TC CD18)和CD54<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T细胞(图13C,TC CD54)。治疗与对照之间的差异显著性:\*\*表示 $P<0.005$ ;\*\*\*表示 $P<0.001$ ;\*\*\*\*表示 $P<0.0001$ 。

[0070] 图14A-E描绘了在研究的第26天(终止),对照(◆)和GA2E治疗的(■)小鼠中植入Her2<sup>+</sup>乳腺癌细胞系(JIMT-1)和人PBMC的NSG-B2M小鼠的CD4<sup>+</sup>TIL的流式细胞术T亚群分析。亚群是总CD4<sup>+</sup>T细胞(图14A,TH)、初始CD4<sup>+</sup>T细胞(图14B,CD4初始)、中央记忆CD4<sup>+</sup>T细胞(图14C,CD4 TCM)、效应记忆CD4<sup>+</sup>T细胞(图14D,CD4 TEM)和终末分化效应CD4<sup>+</sup>T细胞(图14E,CD4 TEFF)。治疗与对照之间的差异显著性:\*表示 $P<0.05$ ;\*\*\*表示 $P<0.001$ ;无星号表示 $P>0.05$ 。

[0071] 图15A-D描绘了在研究的第26天(终止),对照(◆)和GA2E治疗的(■)小鼠中植入Her2<sup>+</sup>乳腺癌细胞系(JIMT-1)和人PBMC的NSG-B2M小鼠的CD4<sup>+</sup>TIL的流式细胞术生物标志物分析。亚群是PD-1<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T细胞(图15A,TH PD1)、CD18β<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T细胞(图15B,TH CD18)、CD54<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T细胞(图15C,TH CD54)和Fox3P<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T细胞(图15D,Treg)。治疗与对照之间的差异显著性:\*表示 $P<0.05$ ;无星号表示 $P>0.05$ 。

[0072] 图16描绘了在三种RARγ激动剂GA1E(■)、GA2E(●)和GA3Ep(▲)的存在下生长的EMT6细胞的细胞活力的剂量-反应曲线。

[0073] 图17描绘了在三种RARγ激动剂GA1E(■)、GA2E(●)和GA3Ep(▲)的存在下生长的Lewis肺癌(LLC)细胞的细胞活力的剂量-反应曲线。

[0074] 图18A-B描绘了对照小鼠(◆)和10mg/kg(■)或25mg/kg(▲)的GA2E治疗的小鼠中植入LLC细胞的B57BL/6小鼠从治疗第一天(第0天)到研究结束的重量变化,报告为质量(图18A)或变化百分比(图18B)。

[0075] 图19描绘了对照小鼠(◆)和10mg/kg(■)或25mg/kg(▲)的GA2E治疗的小鼠中植入LLC细胞的B57BL/6小鼠从治疗第一天(第0天)到研究结束的肿瘤生长,以 $\text{mm}^3$ 计。

[0076] 图20描绘了对于每种治疗剂,即在每个图中分别处于第1、2和3列中的媒介物对照和剂量为10mg/kg和25mg/kg的GA2E,在实施例10所述的研究结束时切除的LLC肿瘤的流式细胞术分析的结果。结果示出为占总T细胞的百分比(上图)和每mg肿瘤的细胞的绝对数量(下图)。描绘了肿瘤中的活细胞数量及其占总细胞的百分比(活)、基于CD45染色的白细胞数量及其占活细胞的百分比(CD45),以及基于CD3染色的T细胞总数及其占白细胞的百分比(总T)。

[0077] 图21描绘了对于每种治疗剂,即在每个图中分别处于第1、2和3列中的媒介物对照和剂量为10mg/kg和25mg/kg的GA2E,在实施例10所述的研究结束时切除的LLC肿瘤的流式细胞术分析的结果。结果示出为占总T细胞的百分比(上图)和每mg肿瘤的细胞的绝对数量

(下图)。描绘了基于CD4染色的CD4<sup>+</sup>T细胞的数量及其占总T细胞的百分比(CD4<sup>+</sup>)、基于CD4和细胞内IFN- $\gamma$ 的阳性染色的T辅助细胞(T辅助1),以及基于CD4、CD25和FOXP3的阳性染色的调节性T细胞。

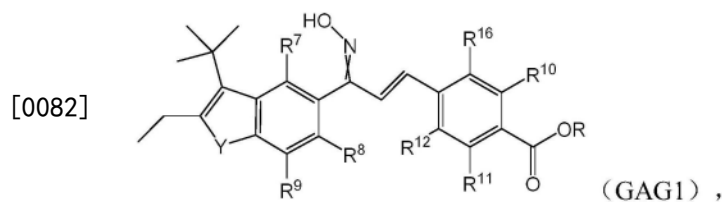
[0078] 图22描绘了对于每种治疗剂,即在每个图中分别处于第1、2和3列中的媒介物对照和剂量为10mg/kg和25mg/kg的GA2E,在实施例10所述的研究结束时切除的LLC肿瘤的流式细胞术分析的结果。结果示出为占总T细胞的百分比(上图)和每mg肿瘤的细胞的绝对数量(下图)。描绘了基于CD8染色的CD8<sup>+</sup>T细胞的数量及其占总T细胞的百分比(CD8<sup>+</sup>)、基于CD8和细胞内IFN- $\gamma$ 的阳性染色的细胞毒性T细胞(细胞毒性CD8)、基于CD8和CD62L的阳性染色以及CD44的阴性染色的初始CD8<sup>+</sup>T细胞(CD8初始),基于CD8、CD62L和CD44的阳性染色的CD8<sup>+</sup>中央记忆T细胞(CD8 T<sub>cm</sub>),以及基于CD8和CD44的阳性染色以及CD62L的阴性染色的CD8<sup>+</sup>效应记忆T细胞(CD8 T<sub>em</sub>)。

### 具体实施方式

[0079] 本文公开了扩增肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)的方法以及通过向有需要的受试者施用有效量的RAR $\gamma$ 选择性激动剂来治疗癌症的相关方法。

[0080] 如本文所用,“RAR $\gamma$ 选择性激动剂”是指在一些临床相关浓度下对RAR $\alpha$ 没有激动活性或具有可忽略不计的激动活性的RAR $\gamma$ 激动剂。在一些实施方式中,RAR $\gamma$ 选择性激动剂是选择性的,因为它在一些临床相关浓度下对RAR $\alpha$ 和RAR $\beta$ 没有激动活性或具有可忽略不计的激动活性。“临床相关浓度”是指接受有效剂量的RAR $\gamma$ 选择性激动剂的受试者的血液中的浓度(通常通过测定血浆或血清来确定),或在体外培养中用于产生、分化或扩增TIL的浓度,与其中正在使用RAR $\gamma$ 选择性激动剂的方法相关。在一些实施方式中,激活RAR $\gamma$ 的EC<sub>50</sub>比激活RAR $\alpha$ 或RAR $\alpha$ 和RAR $\beta$ 的EC<sub>50</sub>小至少100倍,或小至少50倍。

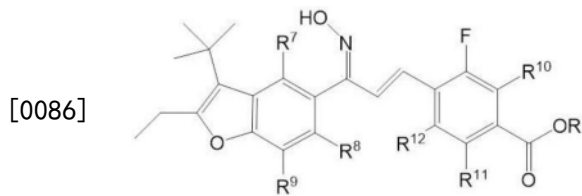
[0081] 一个方面是一种治疗癌症的方法,其包括向有需要的患者施用有效量的具有以下结构的RAR $\gamma$ 选择性激动剂



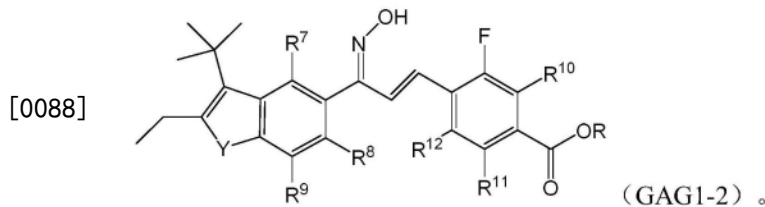
[0083] 或其药学上可接受的盐,其中R为H或C<sub>1-6</sub>烷基,并且连接至=N-OH基团的交叉双键表示立体化学未指定。然而,在一些实施方式中,=N-OH基团的E构型是优选的。R<sup>7</sup>至R<sup>12</sup>独立地为:C<sub>1-6</sub>烷基、氢原子、烷氧基、卤素原子(例如F、Cl或Br)、硝基、羟基、OCF<sub>3</sub>或COR<sup>13</sup>,其中R<sup>13</sup>为C<sub>1-6</sub>烷基或CF<sub>3</sub>。Y为氧、硫或NR<sup>14</sup>,其中R<sup>14</sup>为C<sub>1-6</sub>烷基。R<sup>16</sup>为H或F。在一些实施方式中,R为甲基或乙基。在一些实施方式中,R为H。在一些实施方式中,R<sup>16</sup>为F。

[0084] GAG1物类的合成方案在图1和2中给出。

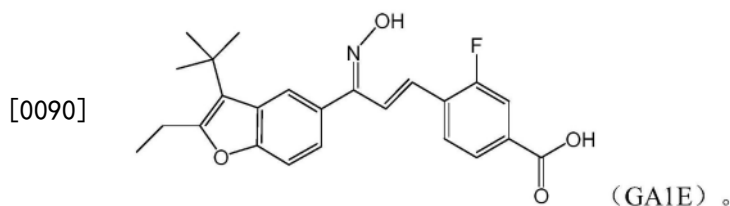
[0085] 在一些实施方式中,在具有GAG1的结构RAR $\gamma$ 选择性激动剂中,Y为O:



[0087] 在一些实施方式中,在具有GAG1的结构RAR $\gamma$ 选择性激动剂中,=N-OH基团呈E构型:



[0089] 在一些实施方式中,具有GAG1的结构RAR $\gamma$ 选择性激动剂具有以下结构



[0091] 如本文所用,烷基是指由碳和氢构成的不含双键或三键的片段。烷基可以是直链烷基、支链烷基、环烷基或它们的组合。 $C_{1-6}$ 烷基是指具有1至6个碳原子的烷基并且包括但不限于甲基、乙基、丙基、异丙基、正丁基、仲丁基、异丁基、叔丁基、戊基异构体、己基异构体、环丙基、环丁基、环戊基、环己基,以及任何地方具有1-6个碳原子的它们的组合。这些考虑因素同样适用于烷基部分或烷氧基。

[0092] 对于本文公开的包含被R基团取代的芳环的结构,当R基团为烷氧基时,氧原子的一个价连接至芳环并且另一个价连接至烷氧基的烷基部分。

[0093] 本文公开的一个方面是一种产生、分化或扩增TIL的方法,其通过使所述TIL与RAR $\gamma$ 选择性激动剂接触来实现。RAR $\gamma$ 激动剂刺激T细胞效应功能,但不刺激Treg细胞,因此可以促进抗癌免疫反应。具体地,本文所述的RAR $\gamma$ 选择性激动剂可以促进CD8<sup>+</sup>TIL的扩增。IL-2先前已用于扩增TIL。体外培养可以导致T细胞受体库发生变化,并且体外扩增的TIL通常与作为生长因子的另外的IL-2一起输注。然而,IL-2也与多种毒性相关,其中的一些与毛细血管渗漏综合征(表现为水肿、低血压和输注数小时内尿量减少)相关,并且还与发烧、寒战、肌痛和恶心相关。对用于扩增TIL而不产生如此大的毒性的替代剂的需要长期存在但尚未得到满足。

[0094] 如本文所用,术语“TIL”主要是指可以在肿瘤内发现的淋巴细胞。这种TIL可以从外植的肿瘤组织中分离并在体外扩增。然而TIL从肿瘤外部浸润肿瘤,因此也可以在肿瘤外部发现。因此,也可以在肿瘤抗原(例如,经致死照射的肿瘤细胞)的存在下体外培养PBMC,以产生或扩增能够浸润到肿瘤中的T细胞。产生、分化或扩增TIL的方法涵盖PBMC的这种用途。

[0095] 在一些实施方式中,使TIL与RAR $\gamma$ 选择性激动剂接触包括在补充有RAR $\gamma$ 选择性激动剂的培养基中体外培养TIL。用于培养TIL的程序是本领域技术人员已知的。为了总结基

本程序,将切除的肿瘤组织切碎成大约1-3mm<sup>3</sup>的片段并置于培养基中(例如分别置于具有2mL或1mL培养基的24或48孔板中),并允许TIL从组织中外渗。可替代地,可对肿瘤组织进行酶促消化和/或机械解聚以获得单细胞悬浮液。为了进行扩增,可以将TIL在适当的培养基中体外培养3-6周,每2-3天更换一半培养基并在80%汇合时分瓶。肿瘤细胞在前1-3周从培养物中消失。为了更快地扩增TIL,可以将抗CD3抗体和100至200倍过量的经照射的饲养细胞(自体或同种异体)添加到培养物中。可以将TIL转移至生物反应器以支持高细胞密度并实现10<sup>9</sup>至2x10<sup>11</sup>个细胞的群。RAR $\gamma$ 选择性激动剂在培养物中持续使用。

[0096] 在其中从PBMC产生或扩增TIL的一些实施方式中,PBMC获自待治疗的受试者(自体)。在其他实施方式中,PBMC获自HLA匹配的供体。在一些实施方式中,肿瘤细胞获自待治疗的受试者,而在其他实施方式中,它们获自不同的个体。在一些实施方式中,PBMC和肿瘤细胞获自同一个体。在一些实施方式中,该个体是待治疗的受试者。在一些实施方式中,PBMC和肿瘤细胞获自不同个体,例如,PBMC可以是自体的,但与来自HLA匹配的供体或同种异体供体的肿瘤细胞一起培养。在一些实施方式中,PBMC(或TIL)与经致死照射的肿瘤细胞一起培养,但在替代实施方式中,培养物含有肿瘤细胞裂解物,或者纯化或合成的肿瘤抗原。

[0097] 在一些实施方式中,接触包括向患有肿瘤的受试者施用RAR $\gamma$ 选择性激动剂。

[0098] 本文公开的一个方面是一种治疗癌症的方法,其包括向有需要的患者提供RAR $\gamma$ 选择性激动剂扩增的TIL。在一个实施方式中,将RAR $\gamma$ 选择性激动剂施用于患有待治疗的癌症的受试者。在一个替代实施方式中,通过将培养物暴露于RAR $\gamma$ 选择性激动剂来在培养物中扩增TIL,并且将RAR $\gamma$ 选择性激动剂扩增的TIL作为过继性T细胞疗法施用于患有待治疗的癌症的受试者。在一些实施方式中,受试者是哺乳动物。在一些实施方式中,受试者是人。在一些实施方式中,RAR $\gamma$ 选择性激动剂是GAG1。在一些实施方式中,RAR $\gamma$ 选择性激动剂是GAG2。在一些实施方式中,RAR $\gamma$ 选择性激动剂是GAG3p。在一些情况下,GAG1、GAG2或GAG3p的=N-OH基团呈E构型。在另外的实施方式中,RAR $\gamma$ 选择性激动剂是结构GAG1、GAG2或GAG3所涵盖的任何单独物类或物类组。一些实施方式具体地排除结构GAG1、GAG2或GAG3所涵盖的任何单独物类或物类组。

[0099] 对于任何相关方面,在一些实施方式中,癌症是实体肿瘤、癌、肉瘤或血液系统癌症。对于任何相关方面,在一些实施方式中,癌症是黑素瘤、成胶质细胞瘤、肾细胞癌、肺癌、膀胱癌、乳腺癌、宫颈癌、结肠癌、胆囊癌、喉癌、肝癌、甲状腺癌、胃癌、唾液腺癌、前列腺癌、胰腺癌、卵巢癌、白血病、淋巴瘤、骨髓瘤或浆细胞癌。对于任何相关方面,在一些实施方式中,癌症是乳腺癌。在一些实施方式中,乳腺癌是三阴性乳腺癌。在一些实施方式中,癌症是Her2<sup>+</sup>乳腺癌。在一些实施方式中,癌症是肺癌,例如非小细胞肺癌。在一些实施方式中,有需要的受试者是人。

[0100] 许多乳腺癌的生长受到雌激素、孕激素和表皮生长因子(特别是当癌症表达过量的人表皮生长因子受体2(Her2)时)的刺激。拮抗这些作用的剂已被证明是乳腺癌的有效治疗剂。然而,约10-20%的乳腺癌不表达雌激素受体、孕激素受体或过量的Her2。因此,这些癌症被称为“三阴性乳腺癌”。三阴性乳腺癌通常比其他类型的乳腺癌更具侵袭性,预后更差,部分原因是治疗选择较少。三阴性乳腺癌转移的可能性也更大并且治疗后复发的可能性更大。乳腺癌根据其正常的健康乳腺细胞的相似性以3分制进行分级,等级越高表明与

正常细胞的相似性越低。三阴性乳腺癌通常为3级。三阴性乳腺癌通常是“基底样”的,这意味着它们类似于乳腺导管内壁的基底细胞。基底样癌症往往更具侵袭性且级别更高。与更常见于60岁以上人群的其他类型的乳腺癌相比,三阴性乳腺癌的发病年龄往往较小,例如50岁以下。约70%具有BRCA突变的癌症是三阴性的。总而言之,这些因素使得三阴性乳腺癌成为一种特别难以治疗的疾病。

[0101] 目前三阴性乳腺癌的治疗方法包括新辅助化疗(在手术去除肿瘤之前化疗);聚ADP-核糖聚合酶(PARP)的抑制剂,诸如奥拉帕尼(olaparib);以及免疫疗法,例如通过PD-1阻断,诸如通过与白蛋白结合的紫杉醇组合的阿替利珠单抗(attezolizumab)。

[0102] 在向受试者施用RAR $\gamma$ 选择性激动剂的一些实施方式中,有效量为约0.01mg/m<sup>2</sup>/天至约300mg/m<sup>2</sup>/天;然而,低于或高于该示例性范围的剂量也在本公开的范围。日剂量可以为约0.5mg/m<sup>2</sup>/天至约100mg/m<sup>2</sup>/天、约1mg/m<sup>2</sup>/天至约90mg/m<sup>2</sup>/天、约5mg/m<sup>2</sup>/天至约80mg/m<sup>2</sup>/天;或至少约0.02mg/m<sup>2</sup>/天、0.03mg/m<sup>2</sup>/天、0.05mg/m<sup>2</sup>/天、0.07mg/m<sup>2</sup>/天、0.1mg/m<sup>2</sup>/天、0.2mg/m<sup>2</sup>/天、0.3mg/m<sup>2</sup>/天、0.5mg/m<sup>2</sup>/天、0.7mg/m<sup>2</sup>/天、1mg/m<sup>2</sup>/天、2mg/m<sup>2</sup>/天、3mg/m<sup>2</sup>/天、5mg/m<sup>2</sup>/天、7mg/m<sup>2</sup>/天、10mg/m<sup>2</sup>/天、15mg/m<sup>2</sup>/天、20mg/m<sup>2</sup>/天、25mg/m<sup>2</sup>/天、30mg/m<sup>2</sup>/天、50mg/m<sup>2</sup>/天、70mg/m<sup>2</sup>/天或100mg/m<sup>2</sup>/天;或不超过约0.1mg/m<sup>2</sup>/天、0.2mg/m<sup>2</sup>/天、0.3mg/m<sup>2</sup>/天、0.5mg/m<sup>2</sup>/天、0.7mg/m<sup>2</sup>/天、1mg/m<sup>2</sup>/天、2mg/m<sup>2</sup>/天、3mg/m<sup>2</sup>/天、5mg/m<sup>2</sup>/天、7mg/m<sup>2</sup>/天、10mg/m<sup>2</sup>/天、15mg/m<sup>2</sup>/天、20mg/m<sup>2</sup>/天、25mg/m<sup>2</sup>/天、30mg/m<sup>2</sup>/天、50mg/m<sup>2</sup>/天、60mg/m<sup>2</sup>/天、70mg/m<sup>2</sup>/天、80mg/m<sup>2</sup>/天、90mg/m<sup>2</sup>/天、100mg/m<sup>2</sup>/天、125mg/m<sup>2</sup>/天、150mg/m<sup>2</sup>/天、175mg/m<sup>2</sup>/天、200mg/m<sup>2</sup>/天、225mg/m<sup>2</sup>/天、250mg/m<sup>2</sup>/天、275mg/m<sup>2</sup>/天或300mg/m<sup>2</sup>/天;或由前述值中的任两个限定的范围。这些剂量可除以37换算成大致等效的人体剂量,以mg/kg/天计。

[0103] 在一些实施方式中,RAR $\gamma$ 激动剂的有效量为约0.27 $\mu$ g/kg/天至约8mg/kg/天;然而,低于或高于该示例性范围的剂量也在本公开的范围。日剂量可以为约0.013mg/kg/天至约2.7mg/kg/天、约0.025mg/kg/天至约2.5mg/kg/天、约0.130mg/kg/天至约22mg/kg/天;或至少约0.0005mg/kg/天、0.0008mg/kg/天、0.001mg/kg/天、0.0013mg/kg/天、0.0020mg/kg/天、0.0025mg/kg/天、0.005mg/kg/天、0.0008mg/kg/天、0.0010mg/kg/天、0.0013mg/kg/天、0.0020mg/kg/天、0.0027mg/kg/天、0.005mg/kg/天、0.008mg/kg/天、0.010mg/kg/天、0.013mg/kg/天、0.020mg/kg/天、0.027mg/kg/天、0.05mg/kg/天、0.08mg/kg/天、0.1mg/kg/天、0.13mg/kg/天、0.2mg/kg/天、0.5mg/kg/天、0.8mg/kg/天、1.0mg/kg/天、1.3mg/kg/天、1.8mg/kg/天、2.0mg/kg/天或2.7mg/kg/天;或不超过约0.0027mg/kg/天、0.005mg/kg/天、0.008mg/kg/天、0.010mg/kg/天、0.013mg/kg/天、0.020mg/kg/天、0.027mg/kg/天、0.05mg/kg/天、0.08mg/kg/天、0.1mg/kg/天、0.13mg/kg/天、0.2mg/kg/天、0.5mg/kg/天、0.8mg/kg/天、1.0mg/kg/天、1.3mg/kg/天、1.8mg/kg/天、2.0mg/kg/天、或2.7mg/kg/天、3.3mg/kg/天、4.0mg/kg/天、4.7mg/kg/天、5.4mg/kg/天、6.1mg/kg/天、6.8mg/kg/天、7.4mg/kg/天、或8.0mg/kg/天,或由前述值中的任两个限定的范围。这些剂量可乘以37换算成大致等效的人体剂量,以mg/m<sup>2</sup>/天计。

[0104] 在一些实施方式中,对于人的有效量为约0.006mg/天至约200mg/天或约1mg/天至约100mg/天。在一些实施方式中,日剂量在单次施用中给予。在其他实施方式中,将日剂量分成多次施用,例如间隔9-15、10-14、11-13或12小时的两次施用。

[0105] RAR $\gamma$ 选择性激动剂不必在整个治疗过程中都以治疗水平存在于受试者体内。这是

因为RAR $\gamma$ 选择性激动剂的主要治疗作用是间接的,促进免疫反应、TIL的扩增,在不存在RAR $\gamma$ 选择性激动剂的情况下,所述TIL仍持续存在。由于免疫反应的产生需要时间,因此在停止RAR $\gamma$ 选择性激动剂的施用之前可能无法观察到有益效果。事实上,在一些实施方式中,来个药物假期可能是有益的,在此期间暂停RAR $\gamma$ 选择性激动剂的施用。就RAR $\gamma$ 选择性激动剂的施用与毒性或其他不良副作用相关而言,暂停施用使得受试者有时间从不良作用中恢复,而不是让它们继续恶化。如本文所用,“暂停”是指中断药物施用,意图并预期其将在以后的时间恢复并且与没有计划恢复药物施用的中止不同。恢复施用可以是有益的,因为免疫反应往往随着时间的推移而减弱。因此,对于包括向受试者施用RAR $\gamma$ 选择性激动剂的任何方面,在一些实施方式中,施用在整个治疗间隔期间周期性地发生。也就是说,在治疗间隔内定期出现的时间点施用RAR $\gamma$ 激动剂。在一些实施方式中,周期性地是每天两次、每天一次、每隔一天、每三天、或每周两次。在一些实施方式中,施用在整个治疗间隔期间以重复周期发生。在一些实施方式中,周期包括1)在第一时间跨度内周期性地施用RAR $\gamma$ 选择性激动剂和2)在第二时间跨度内暂停RAR $\gamma$ 选择性激动剂的施用,之后可开始新的周期。在一些实施方式中,第一时间跨度(在此期间施用RAR $\gamma$ 激动剂)为10-15天,或其中的任何整数天数。在一些实施方式中,第二时间跨度(在此期间暂停RAR $\gamma$ 激动剂的施用)为两周至一个月或其中的任何整数天数。在各种实施方式中,治疗间隔从第一次施用RAR $\gamma$ 激动剂延长直至实现完全反应、获得稳定的疾病、或发生疾病进展。

[0106] RAR $\gamma$ 选择性激动剂可通过任何合适的施用途径施用于受试者。在一些实施方式中,RAR $\gamma$ 选择性激动剂口服施用。在一些实施方式中,RAR $\gamma$ 选择性激动剂通过注射或输注施用,例如静脉内、皮下或肿瘤内。在一些实施方式中,RAR $\gamma$ 选择性激动剂鼻内施用。在一些实施方式中,RAR $\gamma$ 选择性激动剂通过鼻或口腔(肺部)吸入施用。

[0107] 离体扩增的TIL通常通过输注施用,例如静脉内或肿瘤内输注。然而,在一些实施方式中,离体扩增的TIL以单次推注或分成多次推注、静脉内或肿瘤内施用。在一些实施方式中,RAR $\gamma$ 选择性激动剂与TIL一起包含在推注或输注中。在各种实施方式中,输注可持续半小时、一小时、几小时、一天或几天。

[0108] 在一些实施方式中,施用约 $10^9$ 至 $>10^{11}$ 个TIL,例如约 $1 \times 10^{10}$ 至 $2 \times 10^{11}$ 。RAR $\gamma$ 选择性激动剂在培养物中持续使用,并且可与输注的扩增TIL一起被包括在内。RAR $\gamma$ 激动剂也可在TIL输注后向患者施用设定的时间段或施用直到肿瘤消除或观察不到TIL带来进一步的好处。

[0109] 在一些实施方式中,RAR $\gamma$ 选择性激动剂用作单一疗法。在其他实施方式中,它与当前疗法之一组合在其他治疗方法之前、期间或之后使用。

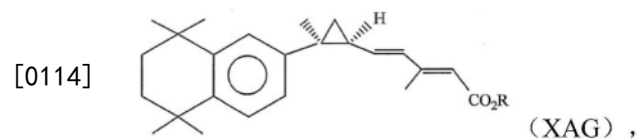
[0110] RAR $\gamma$ 选择性激动剂促进为CD8<sup>+</sup>效应细胞的TIL的扩增。与人们对CD8<sup>+</sup>效应细胞的普遍了解一致,这些细胞表达PD-1,所述PD-1可以充当CD8<sup>+</sup>效应细胞活性的负调节因子。因此,在一些实施方式中,将使用RAR $\gamma$ 选择性激动剂的治疗与PD-1阻断相组合。使用RAR $\gamma$ 选择性激动剂的治疗还可以增加CD8<sup>+</sup>TIL中PD-1<sup>+</sup>T细胞的存在。同样出于这个原因,在一些实施方式中,将使用RAR $\gamma$ 选择性激动剂的治疗与PD-1阻断相组合。几种用于PD-1阻断(也称为免疫检查点抑制)的产品正在接受临床评估。这些包括抗PD-1抗体帕博利珠单抗(pembrolizumab)、纳武单抗(nivolumab)、西米普利单抗(cemiplimab)、多塔利单抗(dostarlimab)、替雷利珠单抗(tislelizumab)、斯巴达珠单抗(spartalizumab)、卡瑞利珠

单抗(camrelizumab)、信迪利单抗(sintilimab)、特瑞普利单抗(toripalimab)、JTX-4014、INCMGA00012、AMP-514和布格利单抗(budigalimab),以及抗PD-L1抗体阿替利珠单抗(atezolizumab)、阿维鲁单抗(avelumab)、度伐利尤单抗(durvalumab)、恩沃利单抗(envalfolimab)、CK-301、CS-1001、KN035SHR-1316、CBT-502、BGB-A333和BMS-936559。PD-L1的几种非抗体抑制剂也在开发中,包括AUNP12(一种29mer肽)、CA-170(一种有机小分子)和BMS-986189(一种大环肽)。AMP-224是PD-L2(也称为B7-DC)与抗体Fc区的融合蛋白,其正被开发为抗PD-1检查点抑制剂。此类抗体构成用于PD-1阻断的手段。

[0111] 一种不断增长的癌症治疗模式是嵌合抗原受体T细胞(CAR-T)疗法。CAR-T细胞实际上是人工TIL。因此,在一些实施方式中,将如本文所述的使用RAR $\gamma$ 选择性激动剂的治疗与CAR-T疗法相组合。RAR $\gamma$ 选择性激动剂可以增强嵌合抗原受体修饰的免疫细胞(CAR-MIC)疗法,如US2019001563A1和US20180338940A1(其中的每一个所教导的关于用RAR $\gamma$ 激动剂增强CAR-MIC的所有内容均通过引用并入)中所述。因此,一些实施方式是增强CAR-MIC癌症免疫疗法的方法,其包括向正在接受、已经接受或计划接受CAR-MIC的癌症患者施用具有GAG1的结构RAR $\gamma$ 选择性激动剂。在一些情况下,CAR-MIC是CAR-T细胞。

[0112] 对于包括向受试者施用RAR $\gamma$ 选择性激动剂的任何方面,一些实施方式还包括施用调节性T细胞(Treg)的抑制剂。在一些实施方式中,Treg的抑制剂是Treg消耗抗体。在各种实施方式中,Treg消耗抗体是抗CD25抗体、抗GITR抗体、抗FoxP3抗体、抗CCR4抗体或抗叶酸受体4抗体。在一些实施方式中,Treg的抑制剂包括RAR $\alpha$ 拮抗剂。

[0113] 对于包括向受试者施用RAR $\gamma$ 选择性激动剂的任何方面,一些实施方式还包括施用具有以下结构的RXR激动剂或其药学上可接受的盐:



[0115] 其中R为H或C<sub>1-6</sub>烷基。在一些实施方式中,R为甲基或乙基。在一些实施方式中,R为H;也就是说,RXR激动剂是3,7-二甲基-6(S),7(S)-甲桥,7-[1,1,4,4-四甲基-1,2,3,4-四氢-萘-7-基]2(E),4(E)庚二烯酸,也称为IRX4204。具有XAG的结构化合物具有抗癌活性,如US 2008/0300312A1和US2020/0390736A1(其所教导的关于用这些RXR激动剂治疗癌症的所有内容均通过引用并入)中所述。使用RAR $\gamma$ 选择性激动剂的治疗可能具有不良副作用,诸如可能变得过度的体重减轻,尤其是在较高剂量下,如下文的一些实施例中所观察到的。具有XAG的结构化合物还具有抗恶病质作用,如US20070185055A1(其所教导的关于用RXR激动剂治疗恶病质的所有内容通过引用并入)中所述,其可以抵消或减轻RAR $\gamma$ 激动剂促成潜在的过度体重减轻的副作用。因此,出于这些原因中的任一个或两者,在一些实施方式中,将如本文所述的使用RAR $\gamma$ 选择性激动剂的治疗与使用适当的RXR激动剂(诸如IRX4204)的治疗相组合。

[0116] 人体的平均表面积公认为成年男性1.9m<sup>2</sup>、成年女性1.6m<sup>2</sup>,并且12-13岁儿童1.33m<sup>2</sup>。这些值可以用于计算RAR $\gamma$ 选择性激动剂剂量的剂量范围。RAR $\gamma$ 选择性激动剂活性剂的总日剂量可以作为单剂量施用或作为两次剂量在24小时的时段内间隔8至16或10至14小时施用。对于历经几天或更长时间的重复施用,可以重复治疗直到出现期望的疾病或疾病症状抑制。然而,其他剂量方案可以是有用的并且在本公开的范围内。期望剂量可以通

过组合物的单次推注施用、通过组合物的多次推注施用或通过组合物的连续输注施用来递送。

[0117] RAR $\gamma$ 选择性激动剂可以使用标准施用技术施用于哺乳动物,包括肠胃外、口服、静脉内、腹膜内、皮下、肺部、透皮、肌内、鼻内、经颊、舌下或栓剂施用。如本文所用,术语“肠胃外”包括静脉内、肌内、皮下、直肠、阴道和腹膜内施用。RAR $\gamma$ 选择性激动剂优选适合口服施用,例如作为丸剂、片剂或胶囊。

[0118] 施用可以是连续的或间歇的。剂量也可通过施用的定时和频率来确定。因此,本文公开的RAR $\gamma$ 选择性激动剂可以每天、每周、每两周或每月给予一段时间,随后是任选的药物假期(无药期)并且该药物施用/药物假期循环可以根据需要重复。例如,RAR $\gamma$ 选择性激动剂可以每天施用,持续一周,然后在一个月的剩余时间内不施用,然后再施用一周,等等。在某些实施方式中,RAR $\gamma$ 激动剂的总日剂量可以作为单剂量施用或作为两次剂量在24小时的时间段内间隔开8至16或10至14小时施用。

[0119] 癌症疗法的有效性通常用“反应”来衡量。监测反应的技术可以类似于用于诊断癌症的测试,诸如但不限于:

[0120] • 通过体检可以从外部摸到并测量包括一些淋巴结的肿块或肿瘤。

[0121] • 一些内部癌症肿瘤将在x射线或CT扫描中显示出来,并且可以用尺测量。

[0122] • 可以进行验血,包括测量器官功能的那些。

[0123] • 可以针对某些癌症进行肿瘤标志物测试。

[0124] 无论使用哪种测试,无论是验血、细胞计数还是肿瘤标志物测试,都以特定的间隔重复进行,以便可以将结果与早期的同类型测试进行比较。

[0125] 对癌症治疗的反应以几种方式定义:

[0126] • 完全反应-所有癌症或肿瘤均消失;没有疾病证据。肿瘤标志物的表达水平(如果适用)可落在正常范围内。

[0127] • 部分反应-癌症缩小了一定百分比,但疾病仍然存在。肿瘤标志物的水平(如果适用)可能已经下降(或增加,基于肿瘤标志物,作为肿瘤负荷减小的指示),但疾病的证据仍然存在。

[0128] • 疾病稳定-癌症既没有增长也没有缩小;疾病的量没有变化。肿瘤标志物(如果适用)没有显著变化。

[0129] • 疾病进展-癌症已经增长;现在的疾病比治疗前更严重。肿瘤标志物测试(如果适用)显示肿瘤标志物已升高。

[0130] 癌症治疗功效的其他量度包括总生存期(即,从诊断或开始所评估的治疗开始测量到由于任何原因而死亡的时间)、无癌生存期(即,完全反应后癌症保持无法检测到的时间长度),以及无进展生存期(即,疾病稳定或无法检测到恢复的肿瘤生长的部分反应后的时间长度)。

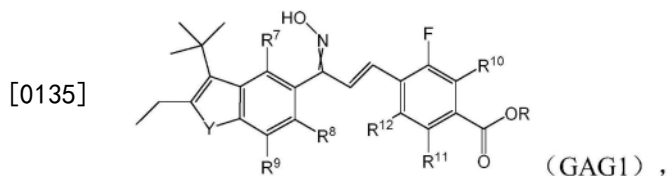
[0131] 参照肿瘤大小(肿瘤负荷)评估实体癌症治疗反应有两种标准方法:WHO和RECIST标准。这些方法测量实体肿瘤,以将当前肿瘤与过去的测量结果相比较,或者将变化与未来的测量结果相比较,并做出治疗方案的改变。在WHO方法中,测量实体肿瘤的长轴和短轴,然后计算这两个测量结果的乘积;如果存在多个实体肿瘤,则计算所有乘积的总和。在RECIST方法中,仅测量长轴。如果存在多个实体肿瘤,则计算所有长轴测量结果的总和。然而,对于

淋巴结,测量的是短轴而不是长轴。

[0132] 术语“治疗(treating)”或“治疗(treatment)”广泛地包括任何种类的治疗活动,包括减轻或预防人类或其他动物的疾病或其方面,或以其他方式影响人类或其他动物的身体的结构或任何功能的任何活动。治疗活动包括向患者施用本文所述的药物、剂型和药物组合物,尤其是根据本文公开的各种治疗方法和产生、分化或扩增TIL的方法,无论是由健康护理专业人员、患者本人或任何其他他人。治疗活动包括健康护理专业人员(诸如医生、医生助理、执业护士等)的命令、指示和建议,然后由任何其他他人(包括其他健康护理专业人员或患者本人)执行所述命令、指示和建议。这包括,例如,指导患者进行诊断程序,或指导临床实验室执行诊断程序,诸如用于癌症诊断和分期,以使患者最终可接受有益的适当治疗。在一些实施方式中,治疗活动的命令、指示和建议方面还可以包括通过批准药物的保险范围、拒绝承保替代药物、包括药物处方集中的药物、或从药物处方集中排除替代药物、或提供使用药物的经济激励(如保险公司或药品福利管理公司等可能做的那样)来鼓励、诱导或强制选择特定药物或它们的组合来治疗病状——并且实际使用该药物。在一些实施方式中,治疗活动还可以包括通过医院、诊所、健康维护组织、医疗实践或医生团队等可建立的政策或实践标准鼓励、诱导或强制选择特定药物来治疗病状——并且实际使用该药物。所有此类命令、指示和建议均应被视为在遵守指示的情况下获得治疗有益效果的条件。在一些情况下,患者还因遵守此类命令、指示或建议而获得经济利益。在一些情况下,健康护理专业人员还因遵守此类命令、指示或建议而获得经济利益。

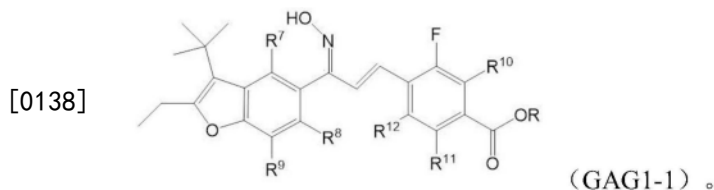
[0133] RAR $\gamma$ 选择性激动剂

[0134] 一个方面包括RAR $\gamma$ 选择性激动剂,其中RAR $\gamma$ 选择性激动剂是具有以下结构的化合物

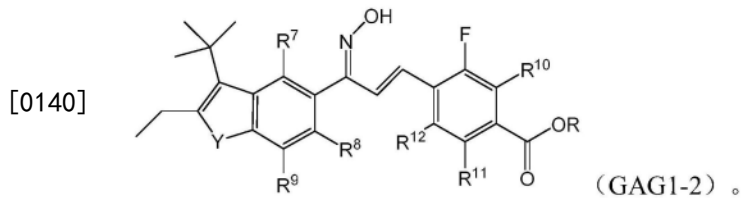


[0136] 或其药学上可接受的盐,其中R为H或C<sub>1-6</sub>烷基。然而,在一些实施方式中,=N-OH基团的E构型是优选的。R<sup>7</sup>至R<sup>12</sup>独立地为:C<sub>1-6</sub>烷基、氢原子、烷氧基、卤素原子(例如F、Cl或Br)、硝基、羟基、OCF<sub>3</sub>或COR<sup>13</sup>,其中R<sup>13</sup>为C<sub>1-6</sub>烷基或CF<sub>3</sub>。Y为氧、硫或NR<sup>14</sup>,其中R<sup>14</sup>为C<sub>1-6</sub>烷基。在一些实施方式中,R为甲基或乙基。在一些实施方式中,R为H。一些实施方式是一种包含具有GAG1的结构化合物或其药学上可接受的盐的药物组合物或制剂。对于任何方法方面,在一些实施方式中,RAR $\gamma$ 选择性激动剂是具有GAG1的结构化合物或其药学上可接受的盐。

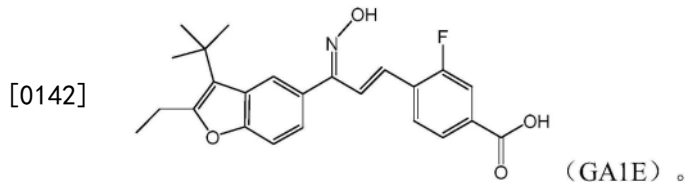
[0137] 在一些实施方式中,在具有GAG1的结构RAR $\gamma$ 选择性激动剂中,Y为O:



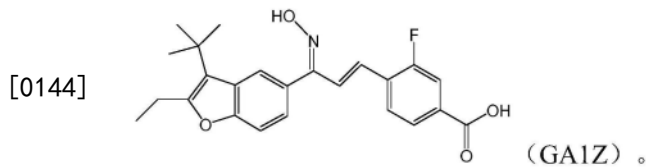
[0139] 在一些实施方式中,在具有GAG1的结构RAR $\gamma$ 选择性激动剂中,=N-OH基团呈E构型:



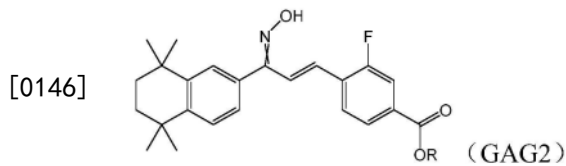
[0141] 对于任何方面,在一些实施方式中,RAR $\gamma$ 选择性激动剂是4-((1E,3E)-3-(3-(叔丁基)-2-乙基-苯并呋喃-5-基)-3-(羟基亚氨基)丙-1-烯-1-基)-3-氟苯甲酸(GA1E),其具有以下结构



[0143] 在一些实施方式中,RAR $\gamma$ 选择性激动剂是4-((1E,3Z)-3-(3-(叔丁基)-2-乙基-苯并呋喃-5-基)-3-(羟基亚氨基)丙-1-烯-1-基)-3-氟苯甲酸(GA1Z),其具有以下结构

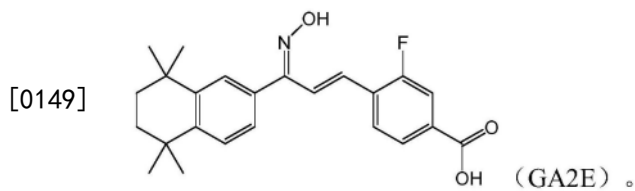


[0145] 对于任何使用方法方面,或任何产生、分化或扩增TIL的方法,在一些实施方式中,RAR $\gamma$ 选择性激动剂是以下结构的化合物

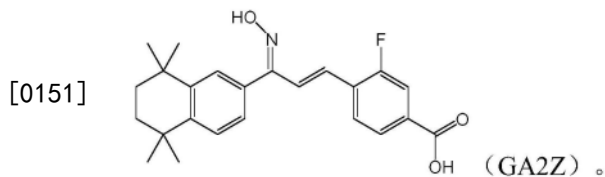


[0147] 或其药学上可接受的盐,其中R为H或C<sub>1-6</sub>烷基,并且连接至=N-OH基团的交叉双键表示立体化学未指定。然而,在一些实施方式中,=N-OH基团的E构型是优选的。在一些实施方式中,R为甲基或乙基。在一些实施方式中,R为H。在一些实施方式中,R为甲基或乙基。

[0148] 在一些实施方式中,RAR $\gamma$ 选择性激动剂是3-氟-4-((1E,3E)-3-(羟基亚氨基)-3-(5,5,8,8-四甲基-5,6,7,8-四氢萘-2-基)丙-1-烯-1-基)苯甲酸(GA2E),其具有以下结构

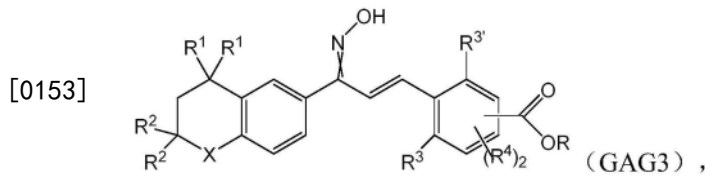


[0150] 在一些实施方式中,RAR $\gamma$ 选择性激动剂是具有以下结构的3-氟-4-((1E,3Z)-3-(羟基亚氨基)-3-(5,5,8,8-四甲基-5,6,7,8-四氢萘-2-基)丙-1-烯-1-基)苯甲酸(GA2Z)



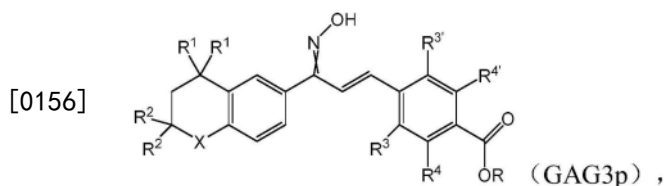
[0152] 对于任何使用方法方面,或任何产生、分化或扩增TIL的方法,在一些实施方式中,

RAR $\gamma$ 选择性激动剂是以下结构的化合物

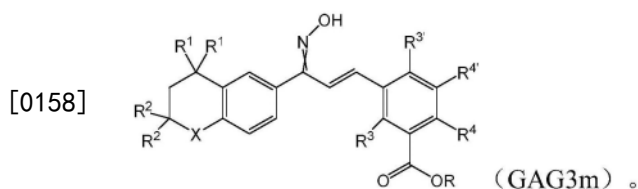


[0154] 或其药学上可接受的盐,其中R为H或C<sub>1-6</sub>烷基;每个R<sup>1</sup>和R<sup>2</sup>独立地为H或C<sub>1-6</sub>烷基;R<sup>3</sup>和R<sup>3'</sup>独立地为H或卤素(例如,C1、F或Br);(R<sup>4</sup>)<sub>2</sub>包含R<sup>4</sup>和R<sup>4'</sup>,其独立地为H、卤素(例如,C1、F或Br)、C<sub>1-6</sub>烷基或C<sub>1-6</sub>烷氧基;X为O、S、CH<sub>2</sub>、C(R<sup>5</sup>)<sub>2</sub>或NR<sup>6</sup>,其中每个R<sup>5</sup>和R<sup>6</sup>独立地为H或C<sub>1-6</sub>烷基;连接至=N-OH基团的交叉双键表示立体化学未指定;并且COOR基团处于间位或对位并且两个R<sup>4</sup>基团占据环上的其余位置。在一些实施方式中,COOR基团的对位是优选的。在一些实施方式中,=N-OH基团的E构型是优选的。在一些实施方式中,两个R<sup>1</sup>均为CH<sub>3</sub>。在一些实施方式中,两个R<sup>2</sup>均为H。在一些实施方式中,X为C(R<sup>5</sup>)<sub>2</sub>。在一些实施方式中,两个R<sup>5</sup>均为CH<sub>3</sub>。在一些实施方式中,一个R<sup>3</sup>为H并且另一个R<sup>3</sup>为F。在一些实施方式中,两个R<sup>4</sup>均为H。在一些实施方式中,所有R<sup>3</sup>和R<sup>4</sup>均为H。在一些实施方式中,R为H。在一些实施方式中,R为甲基或乙基。在一些实施方式中,COOR基团的对位是优选的。在一些实施方式中,=N-OH基团的E构型是优选的。在一些实施方式中,两个R<sup>1</sup>均为CH<sub>3</sub>。在一些实施方式中,两个R<sup>1</sup>均为H。在一些实施方式中,两个R<sup>2</sup>均为H。在一些实施方式中,X为C(R<sup>5</sup>)<sub>2</sub>。在一些实施方式中,X为CH<sub>2</sub>。在一些实施方式中,两个R<sup>5</sup>均为CH<sub>3</sub>。在一些实施方式中,两个R<sup>3</sup>均为H,而在其他实施方式中,一个R<sup>3</sup>为H并且一个R<sup>3</sup>为F。在一些实施方式中,两个R<sup>4</sup>均为H。在一些实施方式中,所有R<sup>3</sup>和R<sup>4</sup>均为H。在一些实施方式中,COOR基团处于对位。在一些实施方式中,COOR基团处于间位。在一些实施方式中,=N-OH基团呈E构型。在一些实施方式中,=N-OH基团呈Z构型。在特定实施方式中,R为H并且羧酸基团处于对位,两个R<sup>1</sup>均为CH<sub>3</sub>,两个R<sup>2</sup>均为H,X为C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>,所有R<sup>3</sup>和R<sup>4</sup>均为H,并且=N-OH基团呈E构型(GA3Ep)。一些实施方式具体地包括一个或多个可变位置上的一个或多个特定取代基。一些实施方式具体地包括一个或多个替代方案,而其他实施方式具体地排除这些替代方案中的一个或多个。

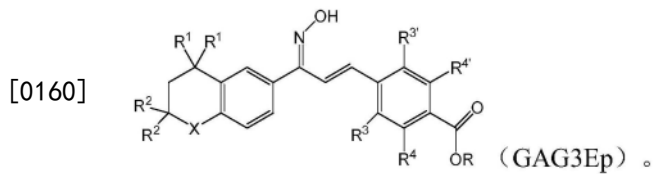
[0155] 对于GAG3,在一些实施方式中,RAR $\gamma$ 选择性激动剂具有以下结构



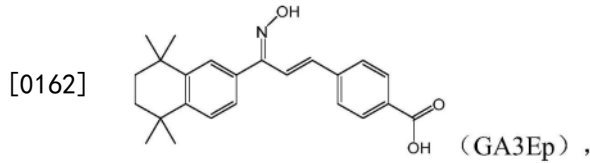
[0157] 并且其他实施方式具有以下结构



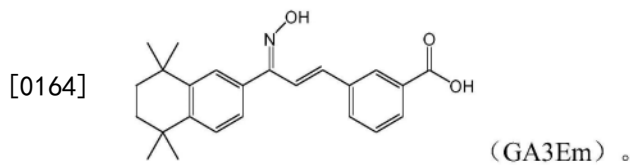
[0159] 对于GAG3,在一些实施方式中,RAR $\gamma$ 选择性激动剂具有以下结构



[0161] 在一些实施方式中, RAR $\gamma$ 选择性激动剂是具有以下结构的化合物



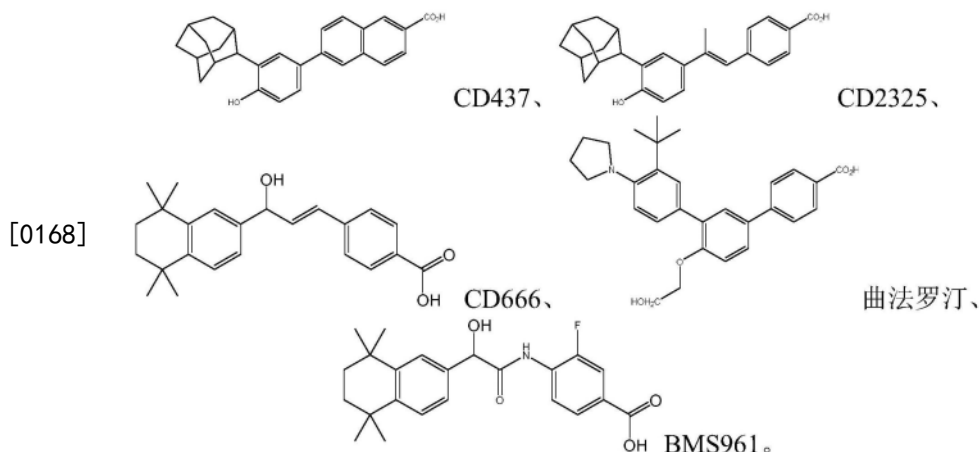
[0163] 并且在其他实施方式中, RAR $\gamma$ 选择性激动剂是具有以下结构的化合物



[0165] 对于本部分的包含COOR基团的前述RAR $\gamma$ 选择性激动剂中的任一种, 在一些实施方式中, R为H。在其中R为C<sub>1-6</sub>烷基的实施方式中, 酯的烷基部分在任何地方具有1至6个碳原子并且包括但不限于甲基、乙基、丙基、异丙基、正丁基、仲丁基、异丁基、叔丁基、戊基异构体、己基异构体、环丙基、环丁基、环戊基、环己基以及任何地方具有1-6个碳原子的它们的组合等。这些酯的各种子集(包括各个物类)和组合被设想为另外的不同实施方式, 包括在C<sub>1-6</sub>烷基属内的任何长度或长度集合的直链、支链和/或环状片段。

[0166] 对于本部分的包含=N-OH基团的前述RAR $\gamma$ 选择性激动剂中的任一种, 一些实施方式包含该基团的任一构型, 而其他实施方式仅包含E构型, 并且其他实施方式仅包含Z构型。

[0167] 对于任何使用方法方面, 在一些实施方式中, RAR $\gamma$ 选择性激动剂是他扎罗汀酸(对RAR $\gamma$ 的选择性高于RAR $\alpha$ , 但不高于RAR $\beta$ )、CD437、CD2325、CD666、曲法罗汀(trifarotene)或BMS961。



[0169] 在一些实施方式中, RAR $\gamma$ 激动剂是RAR $\gamma$ 选择性激动剂, 因为它在临床相关浓度下对RAR $\alpha$ 和RAR $\beta$ 没有激动活性或仅具有可忽略不计的激动活性。在一些实施方式中, RAR $\gamma$ 激动剂是RAR $\gamma$ 选择性激动剂, 因为它在临床相关浓度下对RAR $\alpha$ 没有激动活性或仅具有可忽略不计的激动活性。在各种实施方式中, 当激动剂对RAR $\gamma$ 的KD比其他RAR的KD低10倍、20倍、50倍或100倍以上时, RAR $\gamma$ 选择性激动剂在一些临床相关浓度下对RAR $\alpha$ 或RAR $\beta$ 没有激动活

性或仅具有可忽略不计的激动活性。KD通常在结合测定中确定。在各种实施方式中,当激动剂对RAR $\gamma$ 的EC<sub>50</sub>比其他RAR的EC<sub>50</sub>低10倍、20倍、50倍或100倍以上时,RAR $\gamma$ 选择性激动剂在一些临床相关浓度下对RAR $\alpha$ 或RAR $\beta$ 没有激动活性或仅具有可忽略不计的激动活性。EC<sub>50</sub>通常在激活测定(例如反式激活测定)中确定。在没有说明选择性的具体标准的一些实施方式中,RAR $\gamma$ 选择性激动剂满足这些标准中的至少一个,例如最不严格的标准。

[0170] 这些RAR $\gamma$ 激动剂构成用于激活RAR $\gamma$ 的手段,或用于产生、分化或扩增TIL的手段。一些实施方式具体地包括所公开的这些RAR $\gamma$ 激动剂的属、亚属或物类中的一种或多种。一些实施方式具体地排除所公开的这些RAR $\gamma$ 激动剂的属、亚属或物类中的一种或多种。

[0171] 实施例

[0172] 以下非限制性实施例仅出于说明目的提供,以便于更完整地理解现在设想的代表性实施方式。这些实施例不应被解释为限制本说明书中描述的任何实施方式。

[0173] 实施例1

[0174] GAG1的合成

[0175] 用于合成GAG1物类GA1E和GA1Z的合成方案在图1中给出。

[0176] 2-氧代-乙基-5-溴-水杨酸-2-基-丁酸乙酯

[0177] 向5-溴-水杨酸乙酯(化合物1,24.5g,100mmol)在丙酮(400mL)中的溶液中添加2-溴丁酸乙酯(23.4g,120mmol)和碳酸钾(20.7g,150mmol)并且将混合物在环境温度下搅拌24h。通过过滤除去固体物质并通过蒸馏除去溶剂,得到为黄色油状物的标题化合物(图1中未示出)。收率=23.2g。

[0178] 5-溴-2-乙基-苯并呋喃(2H)-3-酮(化合物2)

[0179] 分小份(5min)向乙基-2-氧代-乙基-5-溴水杨酸-2-基)-丁酸酯(23.2g,70.3mmol)在无水甲苯(300mL)中的冷(0℃)溶液中添加20%在乙醇中的乙醇钠(27g,80mmol)。移除冷却浴并将反应物在环境温度下搅拌12h。用水(25mL)和盐水(50mL)洗涤反应混合物。将有机层干燥并通过真空蒸馏除去溶剂。通过硅胶柱色谱法(10%乙酸乙酯的己烷溶液)纯化粗产物,得到为白色固体的标题化合物(化合物2)。收率=16.5g

[0180] <sup>1</sup>HNMR(CDCl<sub>3</sub>):1.09(三重峰,3H),1.80-1.95(m,1H),2.05-2.20(m,1H),4.61(t,2),7.12(d,1H),7.70(dd,1H),7.83(d,1H)。

[0181] 5-溴-3-叔丁基-2-乙基-苯并呋喃(化合物3)

[0182] 向氯化铯(25.41g,103mmol)在THF(250mL)中的冷(-78℃)悬浮液中添加t-BuMgCl的醚溶液(2M,41.2mL,82.4mmol),并将所得混合物搅拌30min。然后添加在THF(100mL)中的5-溴-2-乙基-苯并呋喃(2H)-3-酮(化合物2)(16.5g,68.66mmol)并将混合物在环境温度下搅拌30min。通过添加MeOH(-78℃)淬灭反应,用乙酸乙酯(100mL)稀释,用NH<sub>4</sub>Cl水溶液、水和盐水(各20mL)洗涤。将有机层干燥并通过蒸馏除去溶剂。所得残余物是叔醇和未反应的化合物2的混合物,该混合物无需进一步纯化即用于下一步骤。

[0183] 将粗叔醇(上面获得)、二氯甲烷(300mL)和p-TSA(200mg)的混合物在环境温度下搅拌12h。将混合物用NaHCO<sub>3</sub>水溶液、水和盐水(各100mL)洗涤。将有机层干燥并通过蒸馏除去溶剂。通过硅胶色谱法(3%乙酸乙酯/己烷)纯化残余的粗产物,得到为无色油状物的标题化合物(化合物3)。收率=2.8g

[0184] <sup>1</sup>HNMR(CDCl<sub>3</sub>):1.35(三重峰,3H),1.54(s,9H),2.97(q,2H),7.28(d,1H),7.33(dd,

1H), 7.88 (d, 1H)。

[0185] 1-(3-叔丁基-2-乙基-苯并呋喃-5-基)-乙酮(化合物4)

[0186] 向5-溴-3-叔丁基-2-乙基苯并呋喃(化合物3)(2.8g, 10mmol)在THF(60mL)中的冷(-78°C)溶液中添加n-BuLi的己烷溶液(2.5M溶液, 4.8mL, 12mmol)。将混合物经50min逐渐温热至大约10°C, 然后再次冷却至-78°C并通过注射器(干净)添加N-甲氧基-N-甲基乙酰胺(1.23g, 12mmol)。移除冷却并将反应物在环境温度下搅拌12hr。通过添加NH<sub>4</sub>Cl水溶液淬灭反应, 并将混合物搅拌15min。将混合物用乙酸乙酯(60mL)稀释, 用水和盐水(各10mL)洗涤。将有机层干燥并通过蒸馏除去溶剂。通过硅胶色谱法(7%乙酸乙酯的己烷溶液)纯化产物(化合物4), 收率=2.1g。

[0187] <sup>1</sup>HNMR(CDCl<sub>3</sub>): 1.33(三重峰, 3H), 1.55(s, 9H), 2.68(s, 3H), 2.97(q, 2H), 7.87(d, 1H), 8.41(d, 2H)。

[0188] 4-[(E)-3-(3-叔丁基-2-乙基-苯并呋喃-5-基)-3-氧代-丙-1-烯基]-3-氟-苯甲酸(化合物5)

[0189] 将3-氟-4-甲酰基苯甲酸甲酯(1.56g, 8.6mmol)添加到1-(3-叔丁基-2-乙基-苯并呋喃-5-基)-乙酮(化合物4)(2.1g 8.6mmol)在10mL的1N氢氧化钠和20mL甲醇中的溶液中。在室温下搅拌18h后, 将反应混合物用1N HCl酸化并用乙酸乙酯(3x10 mL)萃取。将合并的有机层用盐水(1x10 mL)洗涤, 干燥(MgSO<sub>4</sub>)并减压浓缩。通过硅胶色谱法(50%乙酸乙酯的己烷溶液)纯化产物(化合物5), 收率=1.6克。

[0190] <sup>1</sup>HNMR(CDCl<sub>3</sub>): 1.39(三重峰, 3H), 1.60(s, 9H), 3.02(q, 2H), 7.32(s, 1H), 7.51(d, 1H), 7.83(t, 1H), 7.85(d, 1H), 7.92(d, 1H), 7.99(d, 1H), 8.03(d, 1H), 8.52(d, 1H)。

[0191] 4-[(E, 3E)-3-(3-叔丁基-2-乙基-苯并呋喃-5-基)-3-羟基氨基-丙-1-烯基]-3-氟-苯甲酸(GA1E)

[0192] 向4-[(E)-3-(3-叔丁基-2-乙基-苯并呋喃-5-基)-3-氧代-丙-1-烯基]-3-氟-苯甲酸(化合物5)(1.60g, 4.06mmol)在10mL乙醇中的溶液中添加盐酸羟胺(653mg, 9.40mmol)和吡啶(1.86g, 23.5mmol)。然后将反应混合物在回流下加热6h。冷却至室温后, 真空除去溶剂并将残余物溶于水中。用1N HCl将水层调节至pH 4-5并且通过过滤分离产物。通过硅胶色谱法(10%甲醇/1%三乙胺/二氯甲烷)进行进一步纯化, 收率=660mg纯E-异构体(GA1E)和98mg因分离不完全而得到的不纯的Z-异构体(GA1Z)。

[0193] GA1E: <sup>1</sup>HNMR(DMSO-D<sub>6</sub>): 1.31(三重峰, 3H), 1.50(s, 9H), 2.97(q, 2H), 6.95(d, 1H), 7.38(d, 1H), 7.57(d, 1H), 7.71(d, 1H), 7.82(d, 1H), 7.86(s, 1H), 7.90(d, 1H), 7.97(t, 1H)。

[0194] 实施例2

[0195] GA1E和GA2E的结合特异性和活性

[0196] 进行反式激活测定以测试GA1E和GA2E对RAR $\alpha$ 和RAR $\gamma$ 的结合活性的特异性。视黄酸受体反式激活活性和结合效率基本上如美国专利号5, 298, 429和5, 071, 773中所述的那样确定, 所述专利所教导的关于反式激活测定的所有内容通过引用并入本文。反式激活测定采用编码全长受体RAR $\alpha$ 和RAR $\gamma$ 的表达质粒。含有疱疹病毒胸苷激酶启动子和适当的视黄酸受体反应元件(RARE)的报告质粒位于编码萤火虫荧光素酶的开放编码区的上游。

[0197] 测试了GA1E和GA2E在0.5nM至625nM(GA2E)或.05nM至3320nM(GA1E)的浓度范围内在反式激活测定中激活RAR $\alpha$ 和RAR $\gamma$ 的能力。GA1E在整个浓度范围内诱导的RAR $\alpha$ 的反式激活

低于10%，但在 $\geq 25\text{nM}$ 的浓度下，RAR $\gamma$ 的反式激活超过50%，并且在 $\geq 125\text{nM}$ 的浓度下超过70% (图3A)。GA2E在所有测试浓度下诱导超过85%的反式激活并且在 $\leq 25\text{nM}$ 的浓度下诱导的RAR $\alpha$ 的反式激活低于10% (图3B)。

[0198] 实施例3

[0199] 用RAR $\gamma$ 激动剂治疗小鼠的三阴性乳腺癌

[0200] 在EMT6同基因小鼠乳腺癌模型中评估RAR $\gamma$ 激动剂他扎罗汀酸和GA2E。将 $5 \times 10^5$ 个EMT6细胞注射到免疫活性雌性Ba1b/c小鼠的乳腺脂肪垫中。当肿瘤达到 $50\text{-}150\text{mm}^3$ 的平均体积时，将小鼠根据肿瘤大小匹配到对照组或治疗组 (n=10-11)。

[0201] 从第0天开始，使用21次每日口服剂量 $10\text{mg/kg}$ 的 $1\text{mg/ml}$ 他扎罗汀酸或GA2E或媒介物对照对小鼠进行治疗。在第0、1、3、6、8、10、13、15、17、20和21天测量肿瘤体积并对小鼠称重。

[0202] 他扎罗汀酸和GA2E均抑制肿瘤生长，其中GA2E的功效更大 (图4A)。直到给药开始后超过10天，肿瘤生长的抑制才变得明显。在研究结束时，他扎罗汀酸对肿瘤生长的抑制为44%并且GA2E为63%。虽然媒介物对照组的体重略有增加，但两个治疗组的体重减轻相似但适度，介于15%与20%之间 (图4B)，表明该药物作为癌症治疗剂具有可接受的良好耐受性。

[0203] 实施例4

[0204] 使用RAR $\gamma$ 选择性激动剂增加小鼠三阴性乳腺癌肿瘤中的TIL

[0205] 在实施例3的研究结束时，切除肿瘤，在不使用蛋白酶的情况下将细胞解聚并分散，用各种试剂染色，并进行流式细胞术。图5A-B以细胞百分比和每个肿瘤的细胞数量的形式给出流式细胞术的结果。一般来说，肿瘤中只有少数细胞是活的，如通过用渗透坏死细胞并对其染色的染料FVS700进行染色所揭示的那样 (图5A，“活”图)。在这些活细胞中，很大一部分是白细胞 (图5A，“CD45”图)。使用抗CD3进行的染色 (图5A，“总T”图)显示，对于媒介物和他扎罗汀酸治疗的小鼠，平均只有分别约5%和10%的白细胞是T细胞，但在来自用GA2E治疗的小鼠的肿瘤中，平均约30%的白细胞是T细胞；差异具有统计显著性。大多数T细胞是CD4<sup>+</sup> (图5A，“CD4”图)，预计主要是辅助细胞。在CD4<sup>+</sup>细胞中，只有一小部分是基于IFN $\gamma$ 的细胞内染色的T记忆细胞 (预计主要是TH1记忆细胞) (图5B，“TH IFG $\gamma$ ”图)、基于IL-17的细胞内染色的TH17细胞 (图5B，“TH IFG $\gamma$ ”图)，或基于CD25和FoxP3的染色的Treg细胞 (图5B，“Treg”图)。约25-30%的T细胞是CD8<sup>+</sup> (图5B，“CD8 T”图)，预计主要是细胞毒性细胞。在来自用他扎罗汀酸和GA2E治疗的小鼠的肿瘤中，基于IFN $\gamma$ 的细胞内染色 (图5B，“TC IFN $\gamma$ ”图)为记忆细胞的CD8<sup>+</sup>T细胞的比例在数值上有所增加，尽管与媒介物对照动物的差异没有达到统计显著性。因此，GA2E治疗增加TIL的数量。

[0206] 实施例5

[0207] 用各种剂量的RAR $\gamma$ 激动剂治疗小鼠的三阴性乳腺癌

[0208] 使用基本上如上文所述的EMT6三阴性乳腺癌模型评估增加GA2E剂量的效果。每天向小鼠口服施用 $10\text{mg/kg}$  (n=10)、 $25\text{mg/kg}$  (n=10)或 $50\text{mg/kg}$  (n=11)的GA2E或媒介物对照 (n=10)，持续17天。然而， $50\text{mg/kg}$ 组中的所有小鼠均在不迟于第12天时因体重减轻过度而终止， $25\text{mg/ml}$ 组中的一只小鼠也是如此。媒介物对照组中的两只小鼠在第12天因肿瘤 $> 1500\text{mm}^3$ 而终止。

[0209] 总体而言,10mg/kg和25mg/kg作为癌症治疗剂具有可接受的良好耐受性,其中25mg/kg剂量的体重减轻仅短暂超过10% (图6A-B)。25mg/kg剂量在抑制肿瘤生长方面在一定程度上比10mg/kg剂量更有效。在那些动物参与研究的有限时间内,50mg/kg剂量的肿瘤抑制与其他剂量的肿瘤抑制没有明显差异(图7)。根据体表面积按比例扩大至人,小鼠中的10mg/kg和25mg/kg分别对应于人大约0.8mg/kg和2.0mg/kg。

#### [0210] 实施例6

##### [0211] RAR $\gamma$ 选择性激动剂促进CD8<sup>+</sup>记忆T细胞的活性和增殖

[0212] 将来自巨细胞病毒(CMV)阳性供体的外周血单核细胞(PBMC)用羧基荧光素琥珀酰亚胺酯(CFSE)标记,并用1mg/ml的CMV回忆抗原刺激。然后用三种不同的RAR $\gamma$ 选择性激动剂中的一种或媒介物(DMSO)对照处理PBMC,并在37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub>下孵育四天。收获培养物上清液并测定IFN $\gamma$ 的产生,并通过CFSE稀释液的流式细胞术评估PBMC的增殖。

[0213] CFSE是一种荧光反应性细胞膜渗透染料。CFSE被吸收后共价修饰蛋白质并在细胞中保留很长一段时间。经CFSE修饰的蛋白质通常在每次分裂时在子细胞之间均匀分配,使得细胞的荧光强度在每次分裂时下降。因此,染料荧光信号的减弱可以用作增殖的量度。

[0214] 对于GA2E、GA3Ep和他扎罗汀酸中的每一种,与媒介物对照相比,用RAR $\gamma$ 选择性激动剂进行处理在0.1nM至1000nM的浓度下显著增加IFN $\gamma$ 的产生(图8A-C)。CD8<sup>+</sup>细胞的增殖也增加(图9A-C)。尽管相对于增殖的背景水平增加很小,但这仍然相当有意义,因为将预计只有一小部分CD8<sup>+</sup>细胞对CMV具有特异性。

#### [0215] 实施例7

##### [0216] RAR $\gamma$ 选择性激动剂促进人CD8<sup>+</sup>效应TIL的产生和肿瘤缩小(NSG-B2m模型)

[0217] NSG-B2M小鼠模型是一种严重免疫功能不全的动物,结合了非肥胖糖尿病(NOD)、严重联合免疫缺陷(SCID)、IL-2受体 $\gamma$ 无效和 $\beta$ 2-微球蛋白无效的病变。人肿瘤细胞很容易移植到该模型中,并且也可以移植来自人免疫系统的细胞,以研究癌症免疫疗法的各种模式。因此,可以在该系统中对针对人肿瘤的人免疫反应建模。将悬浮在0.1mL磷酸盐缓冲盐水(PBS)与等体积的Matrigel<sup>®</sup>中的5x10<sup>6</sup>个JIMT-1细胞(人乳腺癌细胞系)注射到雌性NSG-B2M小鼠的乳腺脂肪垫中。一旦肿瘤达到100-200mm<sup>3</sup>的体积,就通过皮下注射到右肋腹中将1x10<sup>7</sup>个人PBMC植入小鼠中(随机化前)。PBMC获自两名供体并在各组之间均匀分配。当肿瘤达到200-250mm<sup>3</sup>的平均肿瘤体积(PBMC注射后约3天)时,将动物根据肿瘤体积匹配到治疗组和对照组,并开始给药。给药的第一天定义为第0天。向小鼠施用10mL/kg每日口服剂量的10%二甲基亚砜(DMSO)的PBS溶液(作为媒介物对照)或10mg/kg的溶解在10% DMSO的PBS溶液中的GA2E(作为治疗剂)。

[0218] 每周两次测量肿瘤体积,并在达到研究终点的当天测量。同样每周两次对小鼠称重,并在达到研究终点的当天称重。从第0天开始的体重减轻>10%的动物随意提供食物补充剂。在任何7天时段内体重减轻>20%或从第0天开始的体重减轻>30%的动物被视为垂死的并对其实施安乐死。

[0219] 研究终点定义为对照组的平均肿瘤体积(未截尾(uncensored))达到1500mm<sup>3</sup>时。如果这种情况发生在第28天之前,则允许对治疗组和单个小鼠给药并测量直至第28天。如果对照组的平均肿瘤体积(未截尾)在第28天未达到1500mm<sup>3</sup>,则所有动物的终点是对照组的平均肿瘤体积(未截尾)达到1500mm<sup>3</sup>的那一天,最多到最大值第60天。

[0220] GA2E治疗的小鼠的体重明显减轻,到研究的第12天 $>10\%$  (图10A-B),并且从第13天开始一直到研究结束,动物都处于药物假期。当小鼠接受GA2E时,没有观察到对肿瘤生长的影响,然而,在研究的第19天之后,存在肿瘤的缩小(图11);并且若干小鼠在第17天后出现缩小(数据未示出)。这些数据表明,RAR $\gamma$ 激动剂的抗肿瘤作用并非直接作用于肿瘤细胞本身,而是与RAR $\gamma$ 激动剂促进抗肿瘤免疫一致。

[0221] 在研究的第26天将小鼠处死,收集肿瘤并通过流式细胞术进行分析。统计分析通过普通的单因素方差分析与Tukey检验进行组间显著性比较。设置门以通过前向光散射识别单细胞,基于侧向散射和活体染色剂Fixable Viability Dye eFluor<sup>TM</sup>780染色识别作为单细胞的活细胞,基于侧向散射和抗CD45染色识别活细胞中的白细胞、基于侧向和前向光散射识别白细胞中的淋巴细胞,并且基于侧向散射和抗CD3染色识别淋巴细胞中的总T淋巴细胞(总T)。基于抗CD4和CD8抗体染色将总T淋巴细胞分为CD4<sup>+</sup>(TH)和CD8<sup>+</sup>(TC)淋巴细胞并评估亚群。以下观察是在每mg肿瘤组织的基础上进行的。

[0222] 与对照相比,GA2治疗的肿瘤中总CD8<sup>+</sup>淋巴细胞的浓度增加(图12A, $P<0.001$ )。肿瘤中CD8<sup>+</sup>细胞的初始(定义为CCR7<sup>+</sup>CD45AR<sup>+</sup>)、T中央记忆(CCR7<sup>+</sup>CD45AR<sup>-</sup>)或T效应记忆(CCR7<sup>-</sup>CD45AR<sup>-</sup>)亚群的浓度没有显著变化(分别为图12B、图12C和图12D)。然而,终末分化的CD8<sup>+</sup>T效应细胞(定义为CCR7<sup>-</sup>CD45AR<sup>+</sup>)的浓度显著增加(图12E, $P<0.0001$ )。CCR7促进归巢至淋巴结,因此在外周发现的效应细胞是CCR7<sup>-</sup>。在缩小的肿瘤中,该终末分化的CD8<sup>+</sup>T效应细胞(预计具有溶细胞作用)在TIL中增加,这与RAR $\gamma$ 激动剂(诸如GA2E)的抗癌活性是通过免疫机制而不是直接作用产生的解释是一致的。与对照相比,GA2E治疗的肿瘤中表达T细胞标志物PD-1、CD18 $\beta$ 和CD54的CD8<sup>+</sup>TIL的浓度也有所增加(分别为图13A, $P<0.0001$ ;图13B, $P<0.001$ ;和图13C, $P<0.01$ )。CD18和CD54均参与细胞间粘附和免疫监视。它们在TIL中的存在增加表明CD8<sup>+</sup>T效应细胞形成免疫突触和进行抗原识别的效率提高。PD-1参与免疫稳态,促进免疫反应的下调,例如通过表达PD-1的效应细胞的细胞凋亡。PD-1<sup>+</sup>细胞的增加反映了反应的上调。因此,PD-1/PD-L轴的拮抗剂,诸如抗PD-1和抗PD-L1抗体(免疫检查点抑制剂)可进一步加强由RAR $\gamma$ 激动剂(诸如GA2E)促进的免疫反应。

[0223] 总CD4<sup>+</sup>淋巴细胞的浓度降低(图14A; $P<0.05$ ),所有测试亚群也是如此:初始(定义为CCR7<sup>+</sup>CD45AR<sup>+</sup>)、T中央记忆(CCR7<sup>+</sup>CD45AR<sup>-</sup>)、T效应记忆(CCR7<sup>-</sup>CD45AR<sup>-</sup>)终末分化的CD4<sup>+</sup>T效应细胞(CCR7<sup>-</sup>CD45AR<sup>+</sup>) (分别为图14B、图14C和图14D,各自 $P<0.05$ ,以及图14D, $P>0.05$ )。与对照相比,GA2治疗的肿瘤中表达T细胞标志物PD-1、CD18 $\beta$ 、CD54和FoxP3的CD4<sup>+</sup>TIL的浓度也有所增加(分别为图15A, $P<0.05$ ;图15B, $P<0.05$ ;图15C, $P<0.05$ ;和图15D, $P>0.05$ )。

[0224] 在人抗肿瘤免疫反应的该模型中,RAR $\gamma$ 激动剂GA2E的治疗效果是显著增加肿瘤中的CD8<sup>+</sup>TIL浓度,尤其是终末分化的效应细胞的浓度。相比之下,肿瘤中的CD4<sup>+</sup>TIL浓度降低。类似地,虽然PD-1<sup>+</sup>、CD8 $\beta$ <sup>+</sup>和CD54<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>TIL的浓度增加,但CD4<sup>+</sup>TIL的浓度却降低。所有这些数据都与伴随着CD4<sup>+</sup>反应减弱的基于CD8<sup>+</sup>效应细胞的TIL抗肿瘤反应的促进相一致。申请人不知道特异性地增加TIL群体中的CD8<sup>+</sup>效应细胞的另一类小分子剂。对于癌症治疗而言,这种效果的期许性是显而易见的。

[0225] 还通过流式细胞术评估了肿瘤细胞的PD-L1、CD18 $\beta$ 、CD58(LFA-3)和Her2表达。GA2E治疗没有显著改变表达这些标志物的细胞的比例,这与RAR $\gamma$ 激动剂对肿瘤细胞没有直接作用是一致的。

[0226] 实施例8

[0227] RAR $\gamma$ 激动剂对三阴性乳腺癌细胞系的体外培养的影响

[0228] 将EMT6细胞在多种浓度的RAR $\gamma$ 激动剂GA1E、GA2E和GA3Ep的存在下体外培养5天,并通过Cell Titer Gloassay® (Promega) 评估活力。化合物在低于1 $\mu$ M的浓度下没有作用,但当浓度超过10 $\mu$ M时迅速变得有毒(图16)。GA1E、GA2E和GA3Ep的IC<sub>50</sub>分别为52 $\mu$ M、19 $\mu$ M和101 $\mu$ M。这些数据证实,在体内观察到的RAR $\gamma$ 激动剂的抗癌作用并非来自对肿瘤细胞的直接作用,而是最有可能来自对基于TIL的抗肿瘤免疫反应的促进。也就是说,在所使用的浓度下,RAR $\gamma$ 激动剂并不直接抑制肿瘤生长,因此它们的肿瘤抑制作用来自于它们对TIL的促进。

[0229] 实施例9

[0230] RAR $\gamma$ 激动剂对Lewis肺癌细胞系的体外培养的影响

[0231] 将Lewis肺癌(LLC)细胞在多种浓度的RAR $\gamma$ 激动剂GA1E、GA2E和GA3Ep的存在下体外培养,并通过Cell Titer Gloassay®评估活力。化合物在低于1 $\mu$ M的浓度下没有作用,但当浓度超过10 $\mu$ M时迅速变得有毒(图17)。GA1E、GA2E和GA3Ep的IC<sub>50</sub>分别为96 $\mu$ M、46 $\mu$ M和45 $\mu$ M。这些数据证实,在体内观察到的RAR $\gamma$ 激动剂的抗癌作用并非来自对肿瘤细胞的直接作用,而是最有可能来自对基于TIL的抗肿瘤免疫反应的促进。也就是说,在所使用的浓度下,RAR $\gamma$ 激动剂并不直接抑制肿瘤生长,因此它们的肿瘤抑制作用来自于它们对TIL的促进。

[0232] 实施例10

[0233] RAR $\gamma$ 选择性激动剂促进人CD8<sup>+</sup>效应TIL的产生和肿瘤缩小(LLC模型)

[0234] LLC模型是基于大约70年前在C57BL/6小鼠中自发出现的肺表皮样癌,同基因模型已用于预测临床益处。在6-8周龄的C57BL/6小鼠的左肋腹皮下注射0.1mL,含有3x10<sup>5</sup>个LLC细胞。当肿瘤达到50-150mm<sup>3</sup>的平均肿瘤体积时,将小鼠根据肿瘤大小进行匹配并分选到对照组和治疗组中,并且开始给药(第0天)。建立三个组,每组10只小鼠:媒介物对照、10mg/kg GA2E和25mg/kg GA2E。小鼠每天接受一次口服剂量,持续13天。在第0、2、4、6、9、11和13天测量肿瘤体积和重量。该研究在第13天结束,因为平均肿瘤体积>1500mm<sup>3</sup>,并通过流式细胞术分析肿瘤。10mg/kg组中的两只动物和25mg/kg组中的一只动物由于肿瘤溃疡而提前终止。

[0235] 10mg/kg剂量的GA2E具有良好的耐受性,在研究过程中体重减轻最小。25mg/kg剂量的GA2E的耐受性较差,与研究过程中的体重稳定减轻相关,到约第10天超过10%(图18A-B)。两种剂量的药物均抑制肿瘤生长,尽管两种剂量的肿瘤抑制作用没有显著差异(图19)。

[0236] 在研究的第13天将小鼠处死,收集肿瘤并通过流式细胞术进行分析。统计分析通过普通的单因素方差分析与Tukey检验进行组间显著性比较。设置门以通过前向光散射识别单细胞,基于侧向散射和活体染色剂Fixable Viability Dye eFluor™780染色识别作为单细胞的活细胞,基于侧向散射和抗CD45染色识别活细胞中的白细胞、基于侧向和前向光散射识别白细胞中的淋巴细胞,并且基于侧向散射和抗CD3染色识别淋巴细胞中的总T淋巴细胞(总T)。基于抗CD4和CD8抗体染色将总T淋巴细胞分为CD4<sup>+</sup>(TH)和CD8<sup>+</sup>(TC)淋巴细胞并评估亚群(图20)。以下观察是在每mg肿瘤组织的基础上进行的。

[0237] 与对照相比,GA2E治疗的肿瘤中总CD8<sup>+</sup>淋巴细胞的浓度增加(图22,图CD8<sup>+</sup>;对于25mg/kg剂量,P<0.05)。细胞毒性细胞的浓度也有所增加(图22,图细胞毒性CD8;对于25mg/kg剂量,P<0.05),肿瘤中效应记忆CD8<sup>+</sup>T细胞的浓度也有所增加(图22,图CD8<sup>+</sup> Tem;对于25mg/kg剂量,P<0.01)。肿瘤中初始和中央记忆CD8<sup>+</sup>T细胞的浓度随着治疗没有显著变化

(图22,分别为图CD8初始和图CD8 Tcm)。肿瘤中总CD4<sup>+</sup>T细胞、T辅助细胞和调节性T细胞的浓度随着治疗没有显著变化(图21)。然而,作为占总T细胞的百分比,Treg细胞的比例显著降低(图21,图Treg;P<0.001)。因此,在用GA2E治疗后,肿瘤中存在的TIL的数量(其表型应更有效地杀伤肿瘤细胞)扩大。

[0238] 实施例证明,RAR $\gamma$ 激动剂在多种癌症模型中抑制肿瘤生长,包括乳腺癌(Her2<sup>+</sup>和三阴性)和肺癌细胞系,并促进小鼠和人淋巴细胞中的TIL。由于RAR $\gamma$ 激动剂在体外似乎没有肿瘤生长抑制作用,因此在体内观察到的肿瘤生长抑制作用显然是由TIL的产生增加和抗肿瘤活性的促进所致。

[0239] 实施例11

[0240] 使用RAR $\gamma$ 激动剂药理学激活RAR $\gamma$ 信号传导与免疫检查点抑制剂抗体在B16黑素瘤细胞的排斥中具有协同作用

[0241] 在移植有B16F10肿瘤细胞的C57BL/6小鼠中检查免疫检查点抑制剂抗体治疗(诸如抗CTLA-4抗体)与10nM本文所公开的RAR $\gamma$ 激动剂的组合的抗肿瘤作用。仅用媒介物治疗的小鼠与未治疗的对照小鼠相比未表现出生存优势。使用免疫检查点抑制剂抗体和RAR $\gamma$ 激动剂两者治疗的小鼠在50天时的存活率有所提高,表明这两种剂协同消除B16黑素瘤细胞。接受联合治疗的存活小鼠能够抵抗活肿瘤细胞的再次攻击,这表明B16特异性记忆细胞的有效形成。重要的是,使用这种药物组合获得了抗黑素瘤效果,并且没有急性或迟发毒性的迹象。

[0242] 最后,应当理解,虽然通过参考具体实施方式强调了本说明书的方面,但是本领域技术人员将容易地认识到,这些所公开的实施方式仅说明本文所公开的主题的原理。因此,应当理解,所公开的主题决不限于本文所述的特定方法、方案和/或试剂等。因此,在不脱离本说明书的精神的情况下,可以根据本文的教导对所公开的主题做出各种修改或改变或做出其替代配置。最后,本文所用的术语仅出于描述具体实施方式的目的,并且不旨在限制将仅由权利要求限定的本发明的范围。因此,本发明并非被限制为如精确地所示出和所描述的。

[0243] 本文描述了本发明的某些实施方式,包括诸位发明人已知的用于实施本发明的最佳模式。当然,本领域普通技术人员阅读上述描述后将明白这些所述实施方式的变型。诸位发明人希望技术人员适当地应用这类变型,并且诸位发明人期望以不同于本文所具体描述的方式来实践本发明。因此,本发明包括被适用法律所允许的在此所附权利要求中所引用的主题的所有修改和等同物。此外,本发明涵盖了其所有可能的变型中的上述实施方式的任何组合,除非在本文另外指明或另外与上下文明显矛盾。

[0244] 本发明的替代实施方式、元素或步骤的分组不应解释为限制。各组成员可被单独提到并要求保护,或以与本文公开的其他组成员的任何组合被提到并要求保护。应当理解,由于便利和/或专利性的原因,一组的一个或多个成员可以被包括进一组中或从该组删除。当任何这类包括或删除发生时,本说明书被认为含有经改写的组,以满足对所附权利要求中所用的所有马库什(Markush)组的书面描述。

[0245] 除非另有说明,否则本说明书和权利要求中使用的表示特征、项目、数量、参数、特性、条款等的所有数字应被理解为在所有情况下都被术语“约”修饰。如本文所用,术语“约”是指如此限制的特征、项目、数量、参数、特性或条款涵盖所述特征、项目、数量、参数、特性

或条款的值上下正负百分之十的范围。因此,除非有相反的说明,否则在说明书和所附权利要求中列出的数值参数是可变化的近似值。在最低程度上,并且不试图将等同物的原则的应用限制到权利要求的范围的条件下,至少应该根据所记录的数值的有效数位和通过惯常的四舍五入法来解释每一个数字表示。尽管阐述本发明的宽泛范围的数值范围和值是近似值,在具体示例中列出的数值范围和值尽可能精确地报告。然而,任何数值范围或值固有地含有某些误差,这些误差是由它们各自测试测量中的标准偏差所不可避免地产生的。本文的值的数值范围的表述仅旨在用作个别地参考落在该范围内的每个独立数值的速记方法。除非本文另外指明,否则数值范围的每个单独值并入本说明书中,就像在本文单独列举一样。

[0246] 除非本文另有说明或与上下文明显相矛盾,否则在描述本存在发明的上下文中(尤其在所附权利要求的上下文中)使用的术语“一个”、“一种”和“该”以及类似指称应理解为包括单数和复数。本文所述的所有方法可以任何合适的顺序执行,除非本文另外指明或以其他方式与上下文明显矛盾。本文提供的任何和所有示例、或示例性语言(例如,“诸如”)的使用仅旨在更好地说明本发明并且不对另外所要求保护的本发明的范围产生限制。本说明书中的语言不应解释为指示对于本发明的实践必要的任何非所要求保护的元素。

[0247] 本文公开的具体实施方式可使用“由...组成”或“基本上由...组成”语言在权利要求中进一步限制。当用于权利要求时,无论作为所提交的还是所添加的每次修正,过渡术语“由...组成”排除权利要求中未指定的任何元素、步骤或成分。过渡术语“基本上由...组成”将权利要求的范围限制于指定的材料或步骤以及不实质影响一个或多个基础和新型特征的那些材料或步骤。这样要求保护的本发明的实施方式在本文固有地或明确地被描述和被实施。

[0248] 本说明书中引用和标识的所有专利、专利出版物和其他出版物均单独且明确地通过引用整体并入本文,以用于描述和公开例如在此类出版物中描述的可与本发明结合使用的组合物和方法的目的。这些出版物仅提供它们在本申请的提交日期之前的公开内容。就这一点而言,不得将本文的任何内容视为承认发明人因现有发明或任何其它原因而无权将此公开提前。所有关于日期的声明或关于这些文件的内容的表述都是基于申请人可获得的信息,并不构成对这些文件的日期或内容的正确性的任何承认。

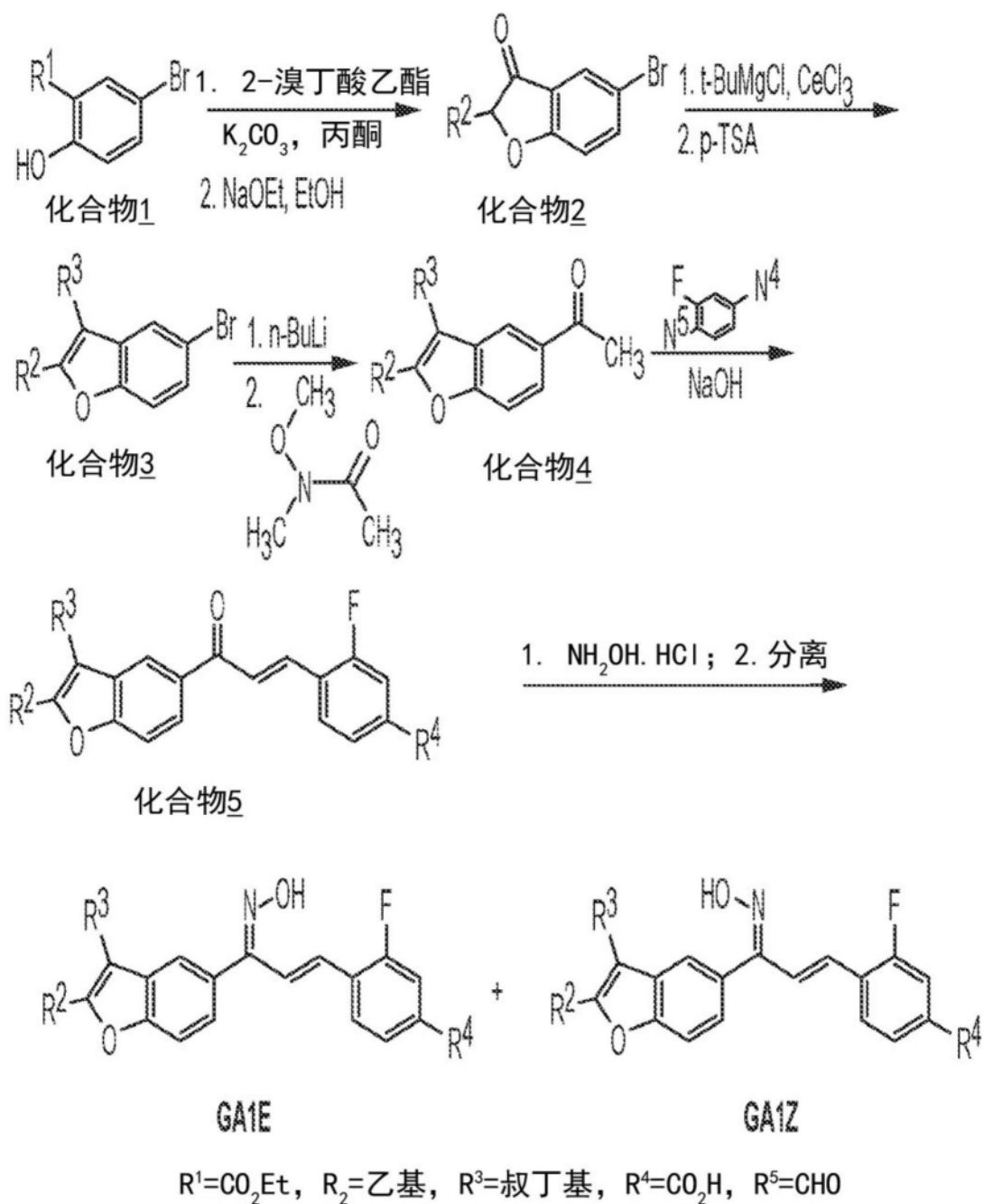


图1

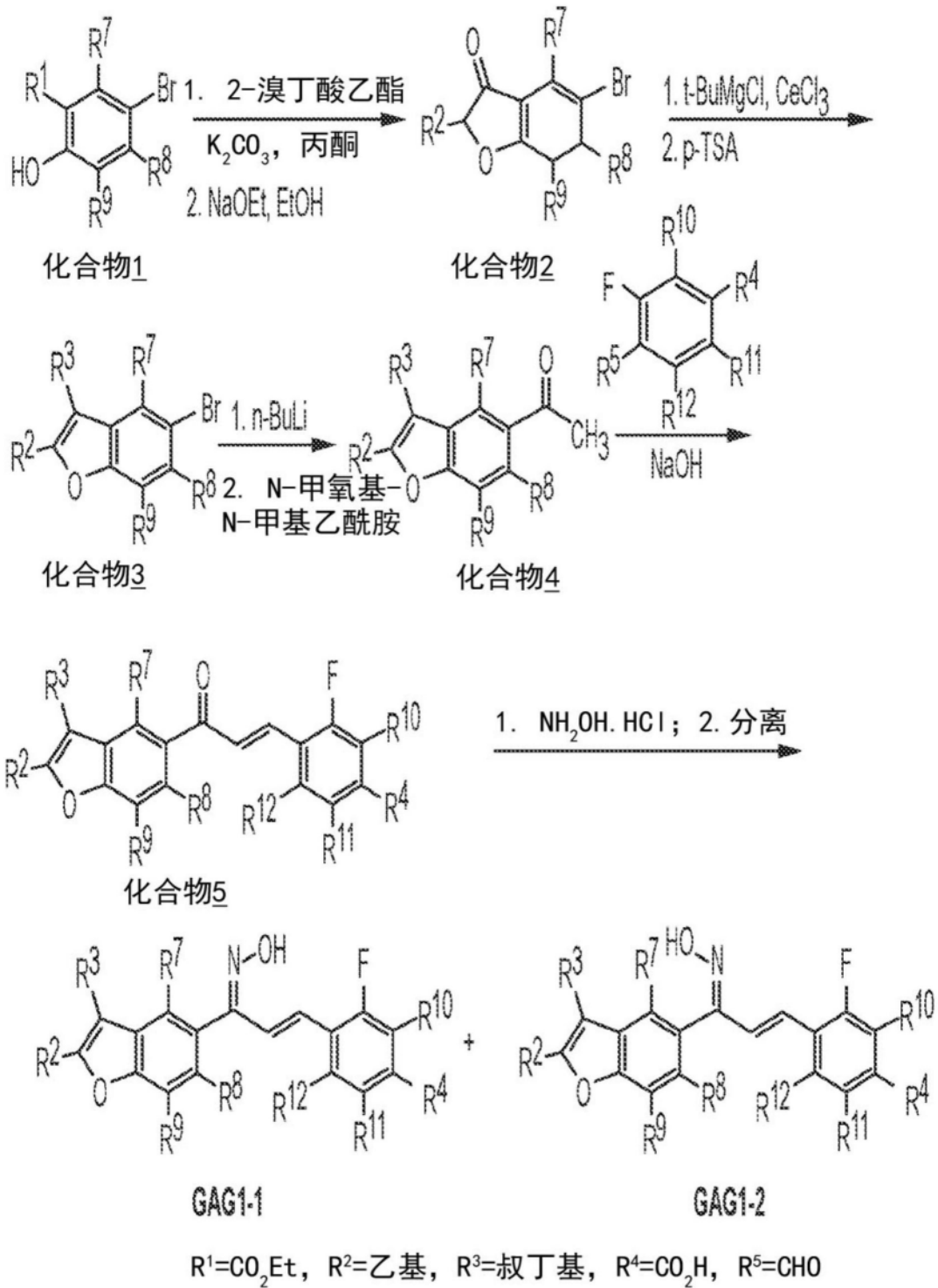


图2

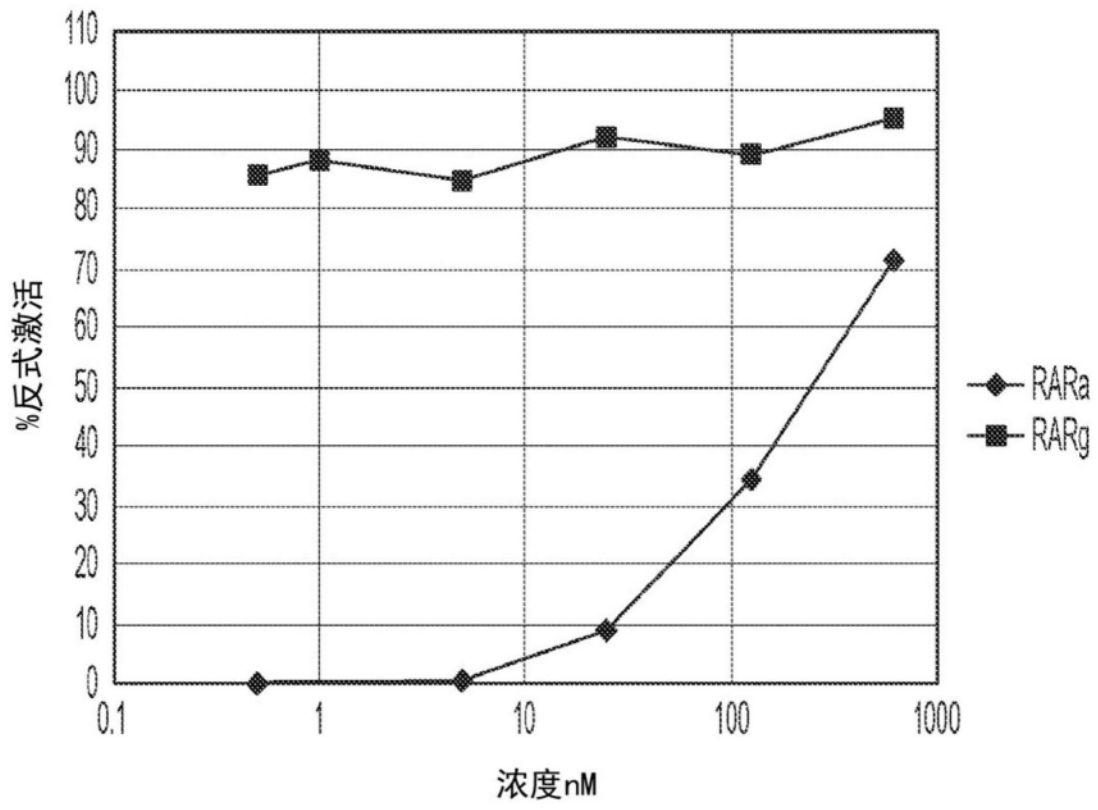


图3A

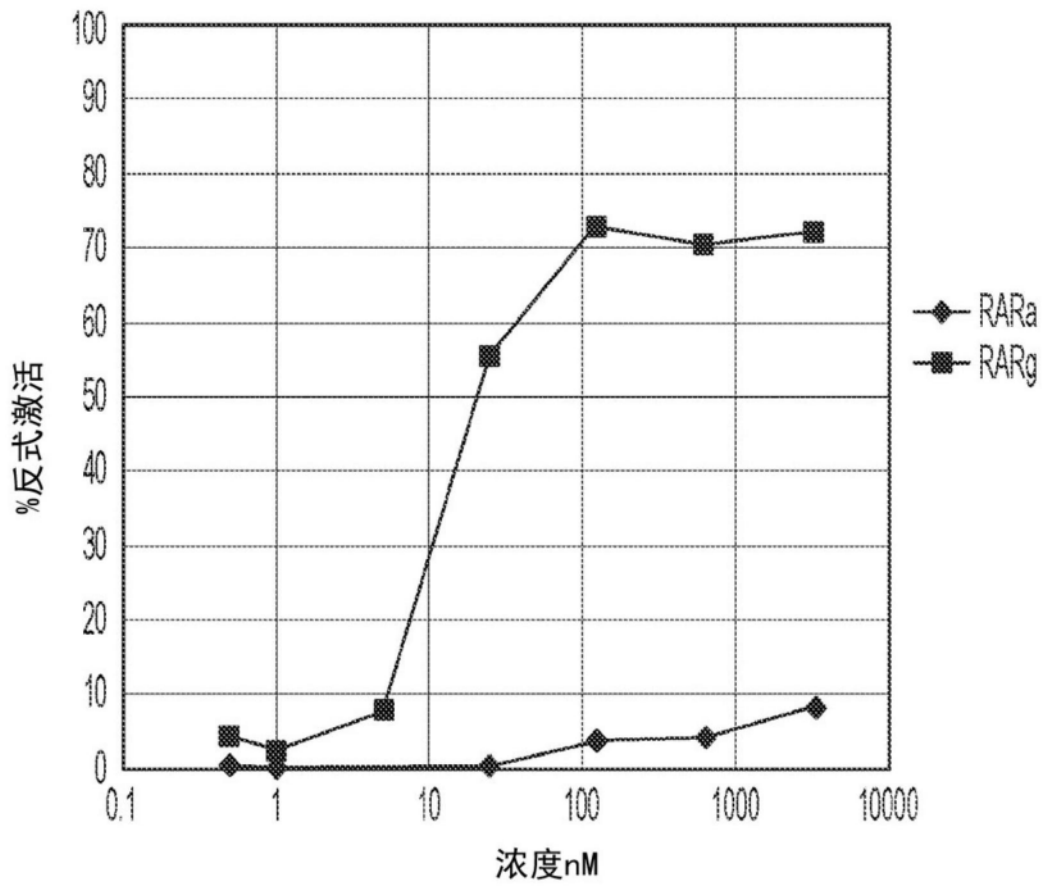


图3B

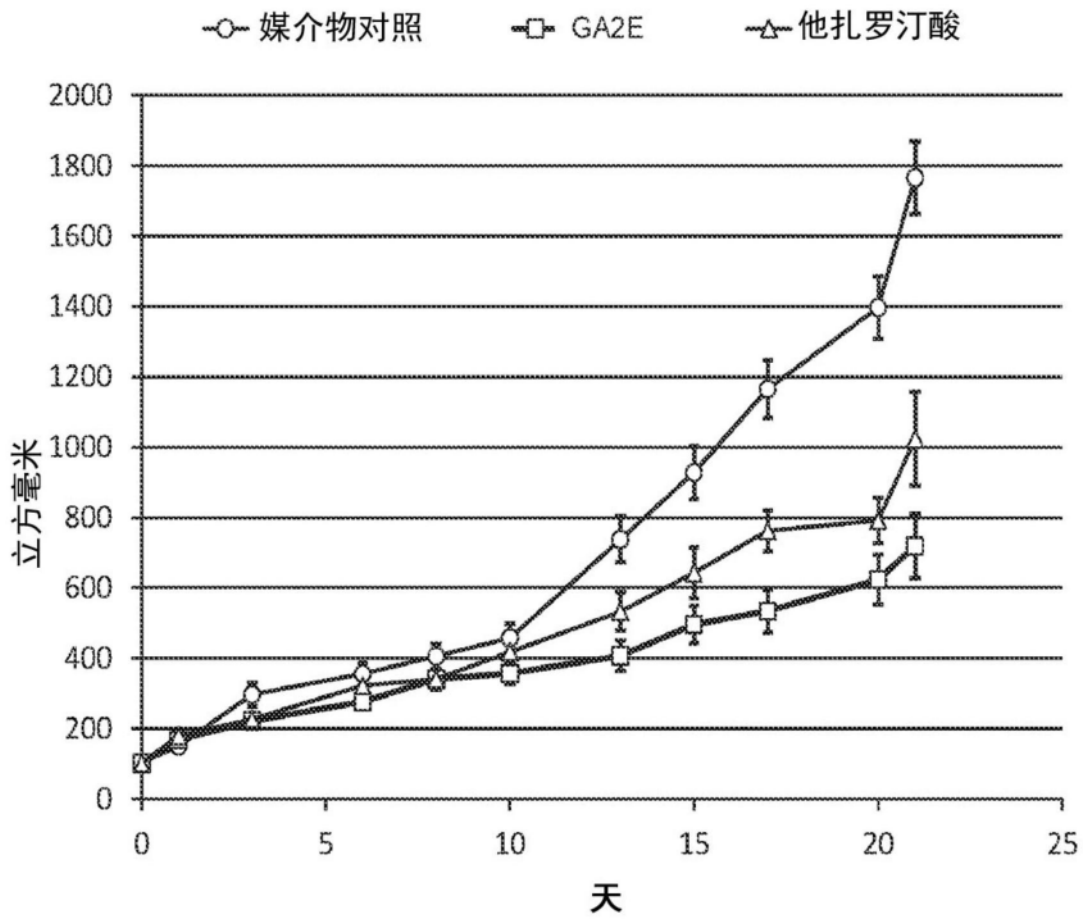


图4A

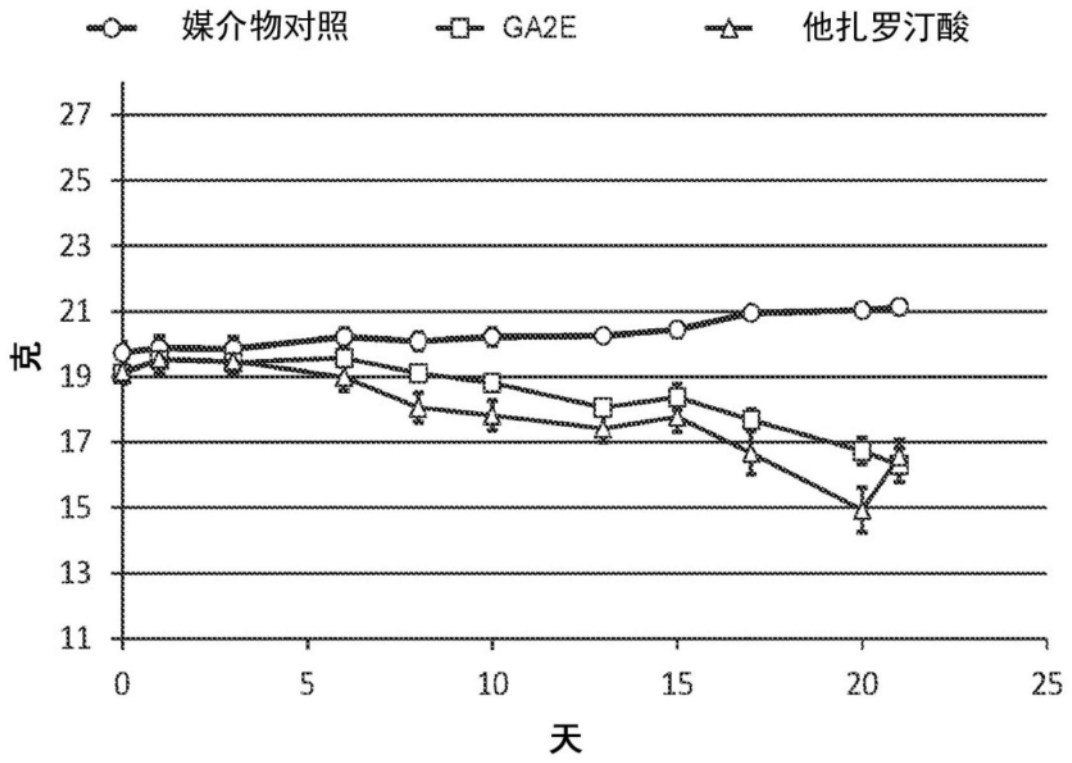


图4B

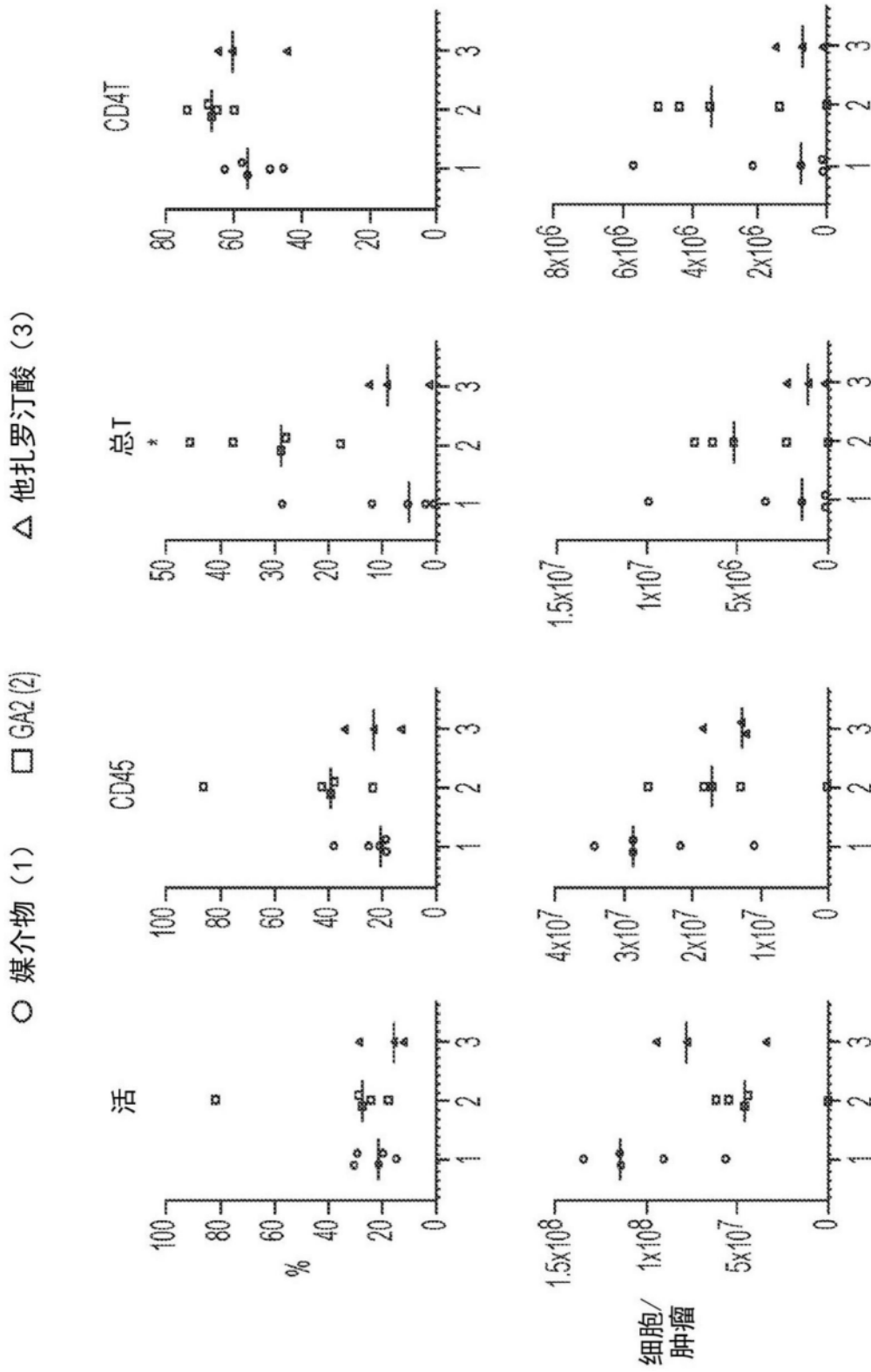


图5A

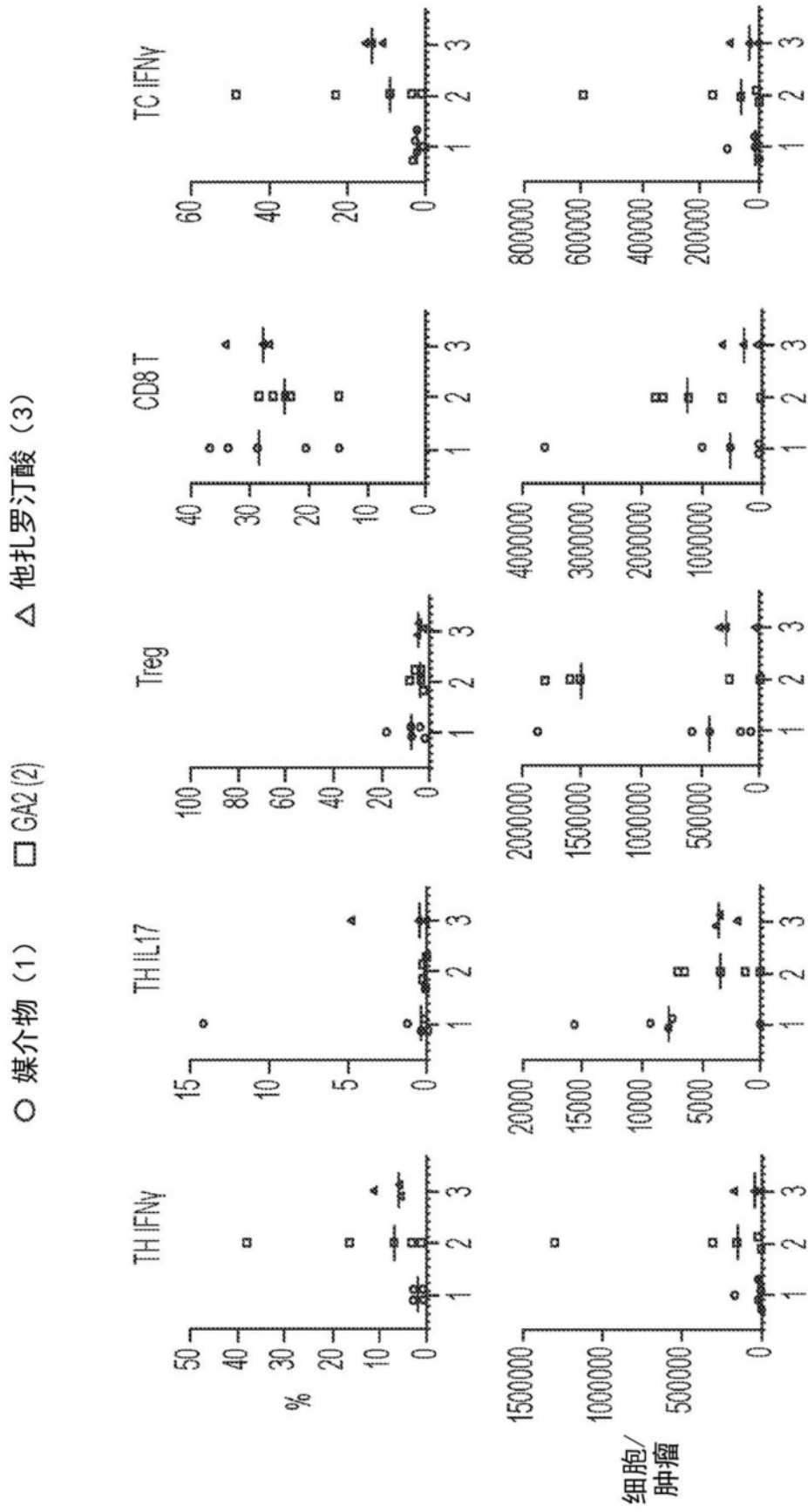


图5B

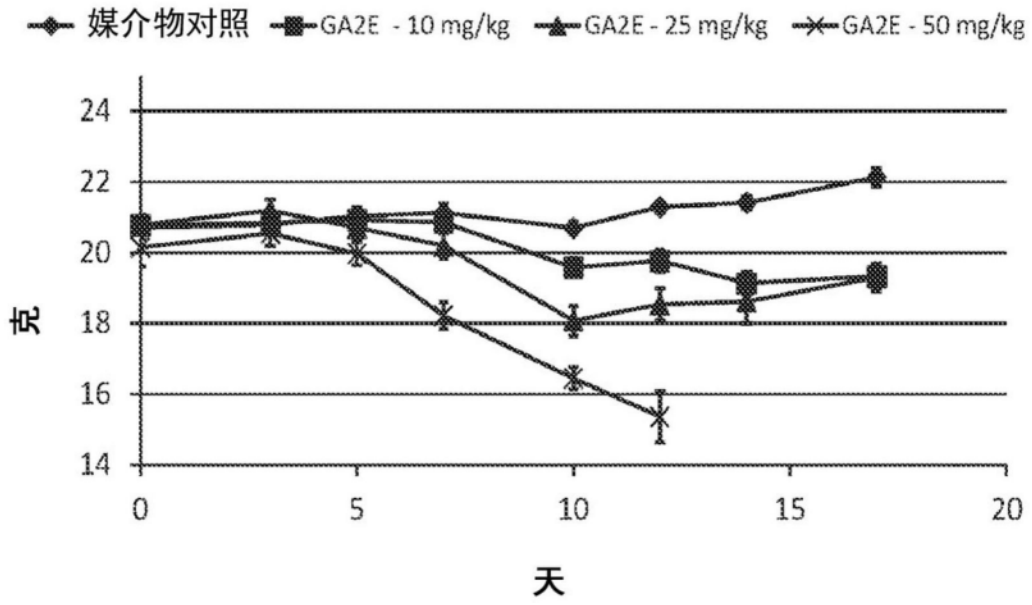


图6A

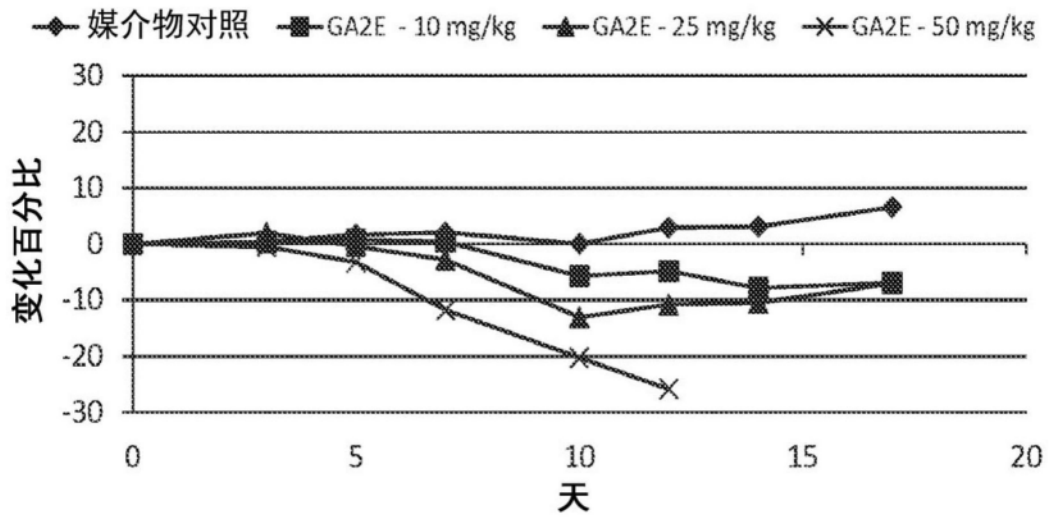


图6B

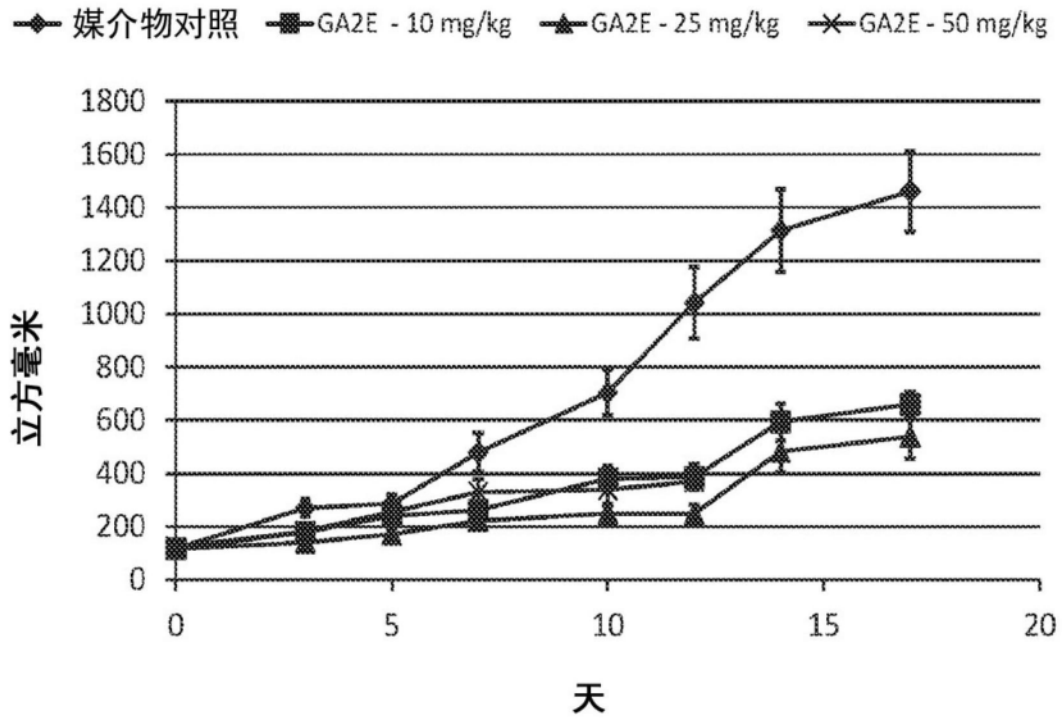


图7

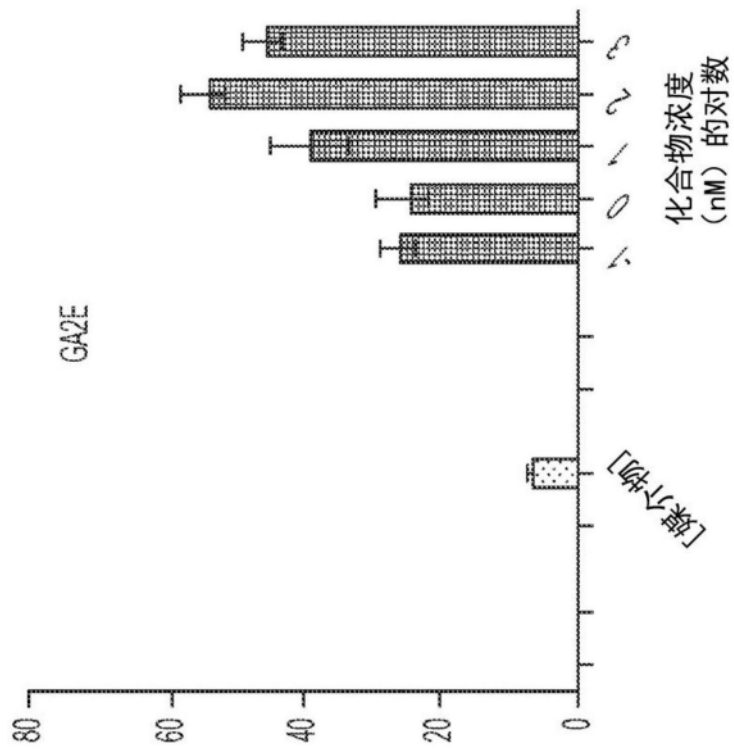


图8A

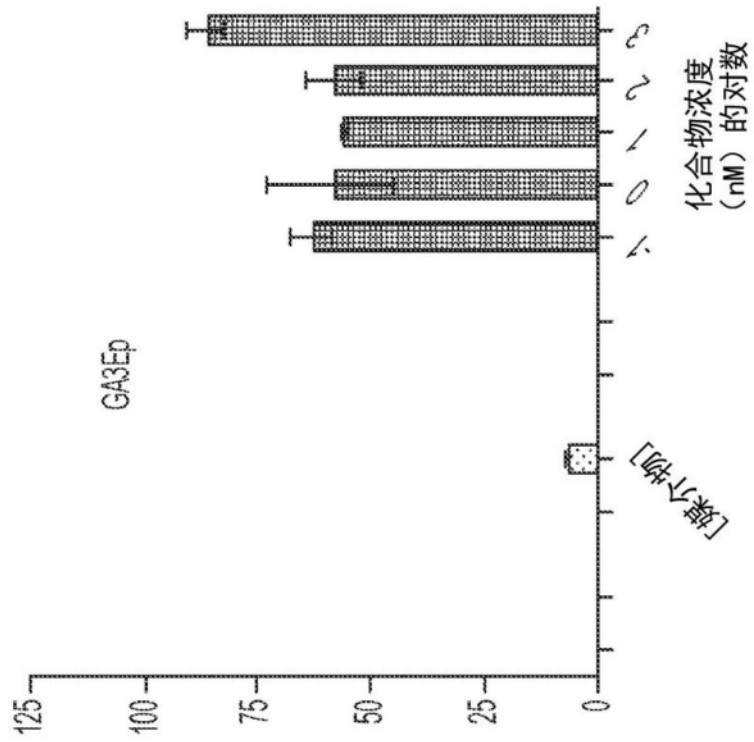


图8B

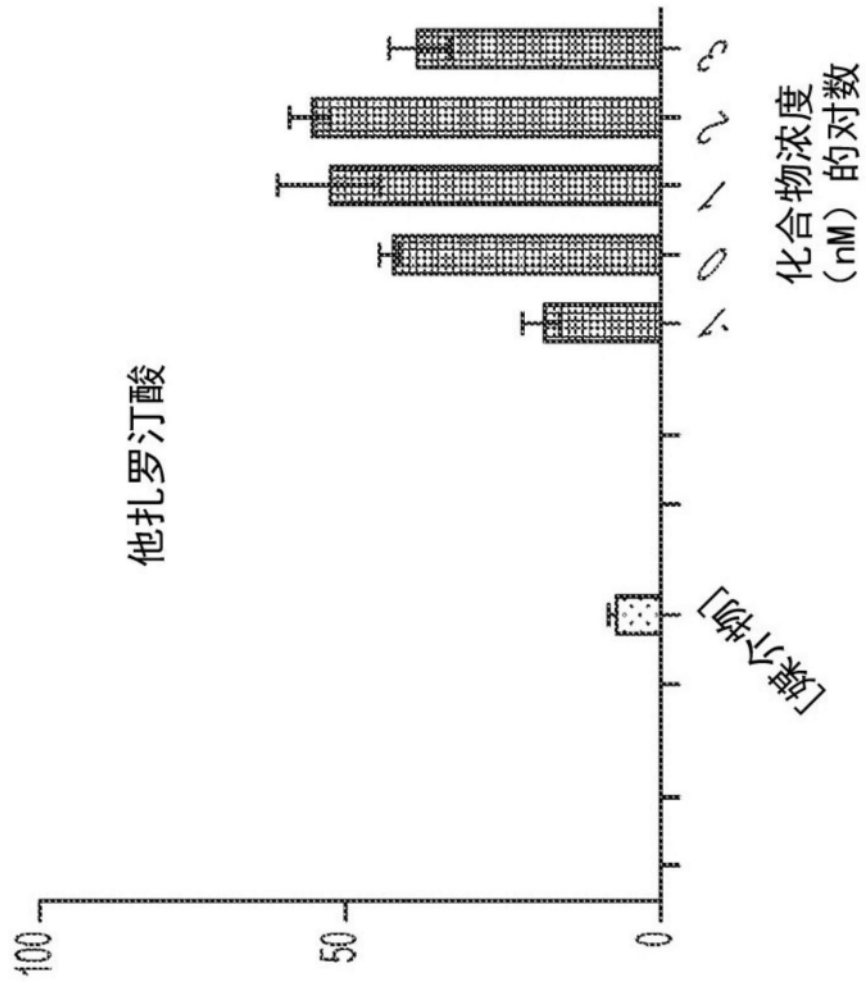


图8C

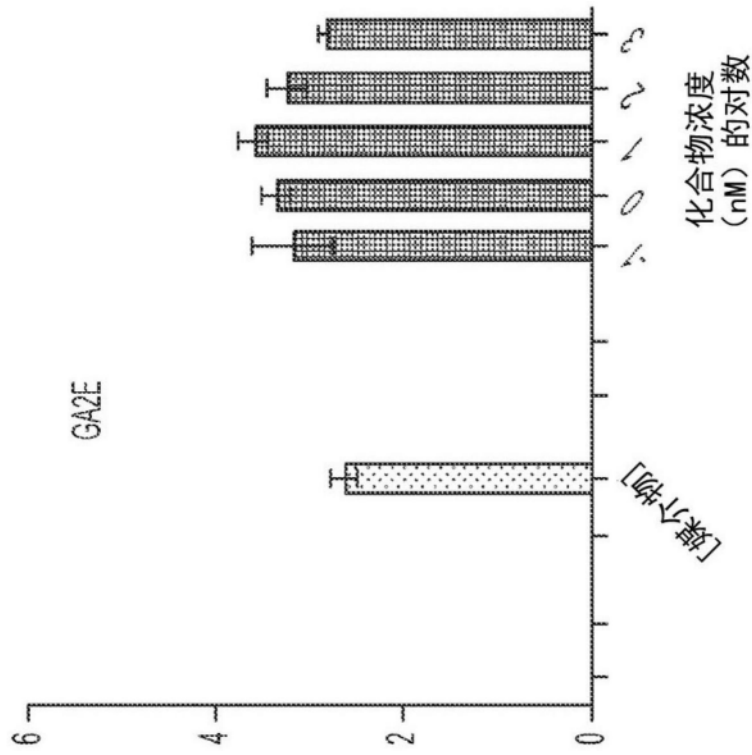


图9A

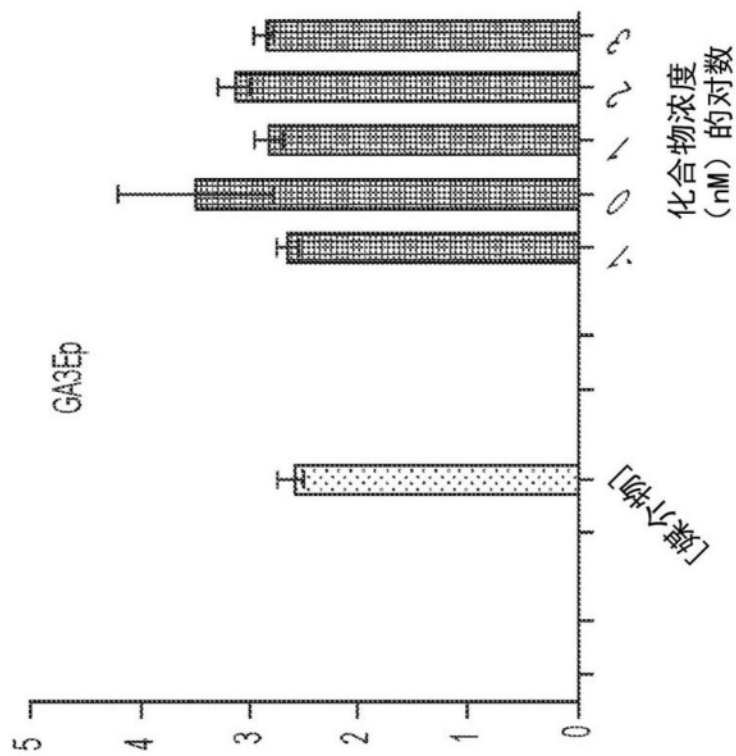


图9B

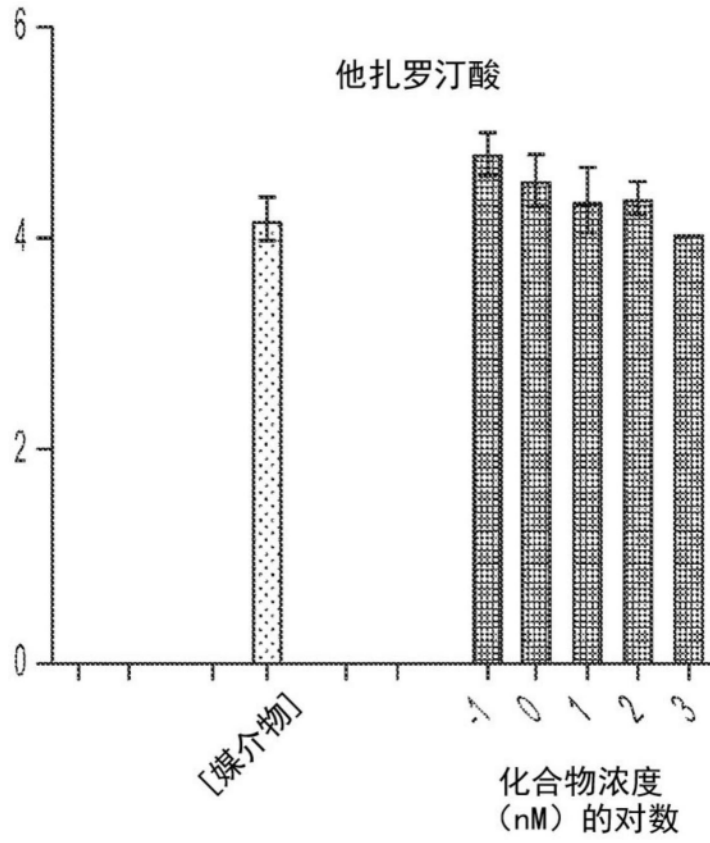


图9C

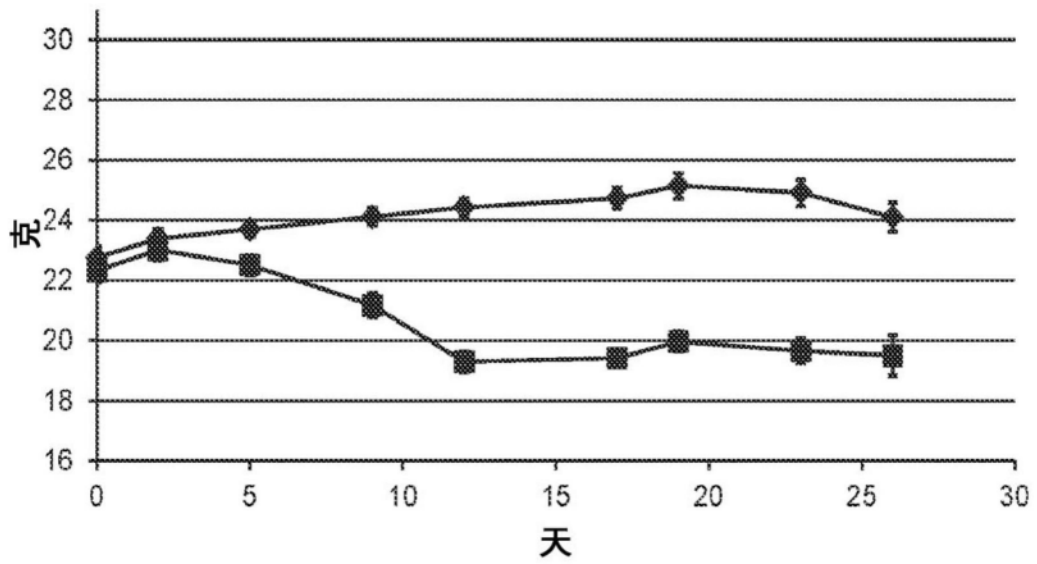


图10A

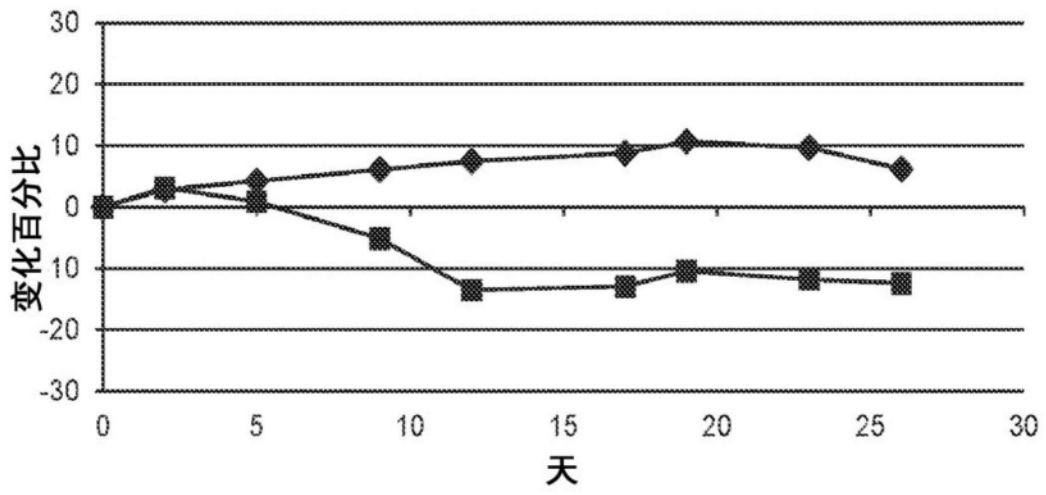


图10B

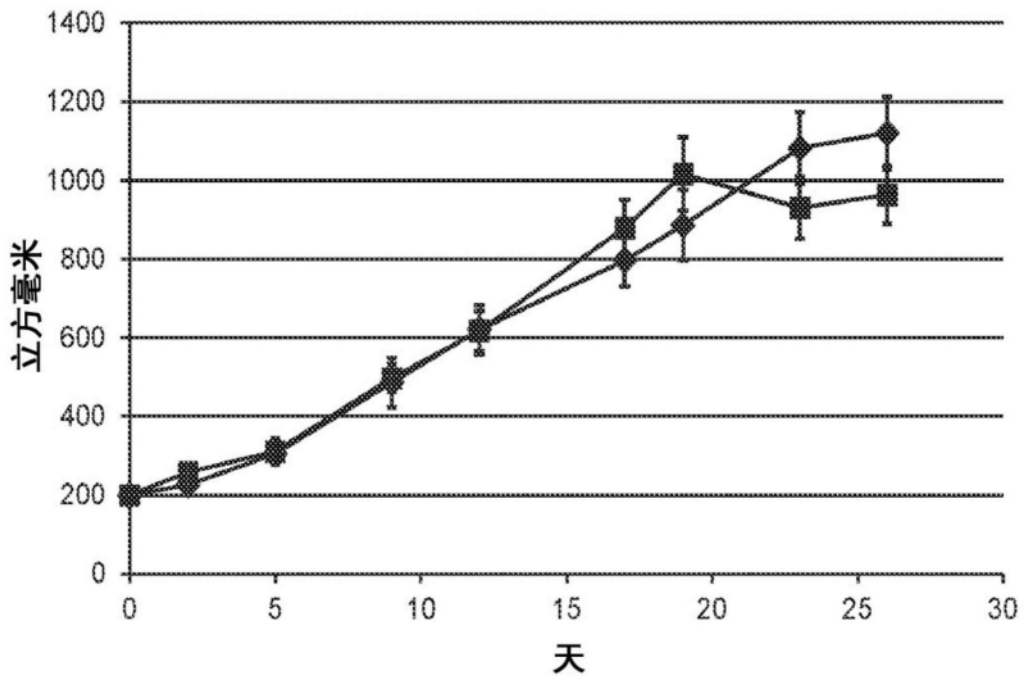


图11

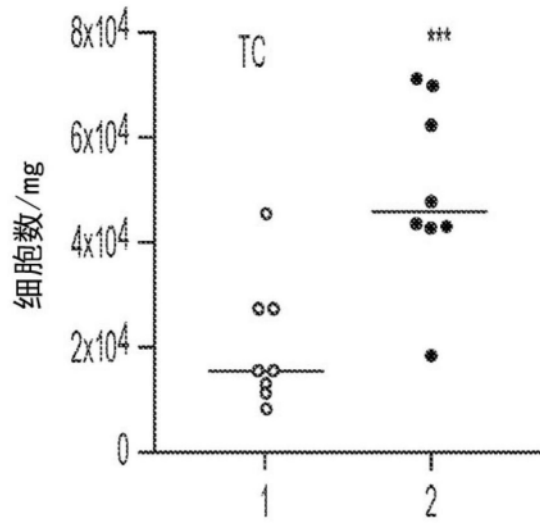


图12A

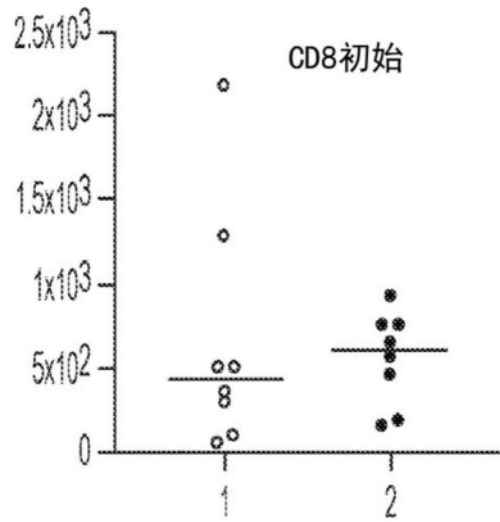


图12B

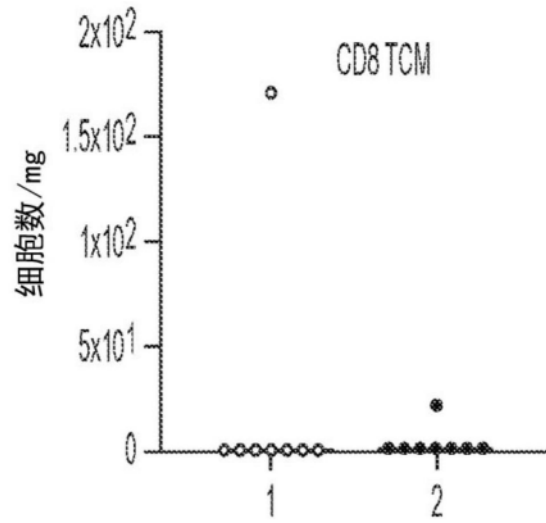


图12C

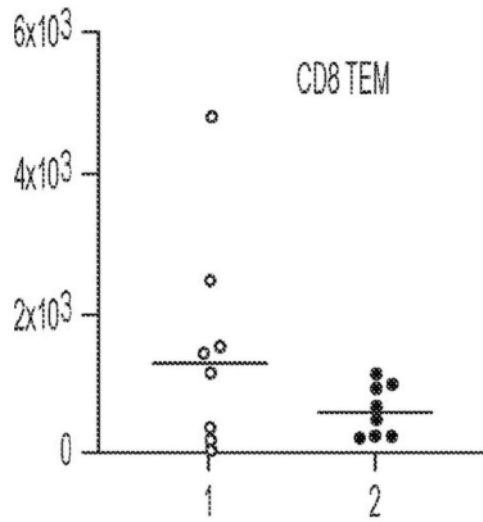


图12D

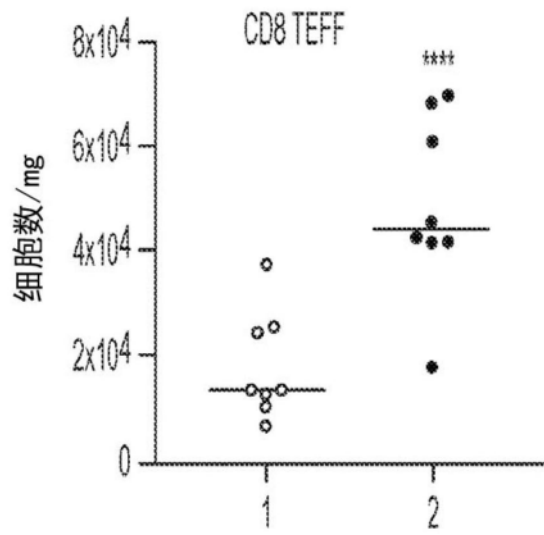


图12E

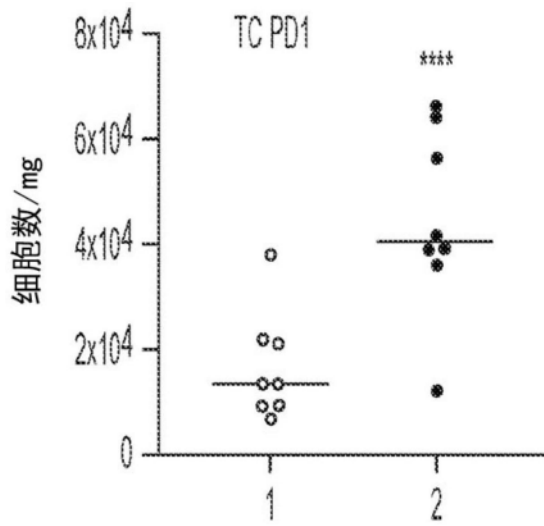


图13A

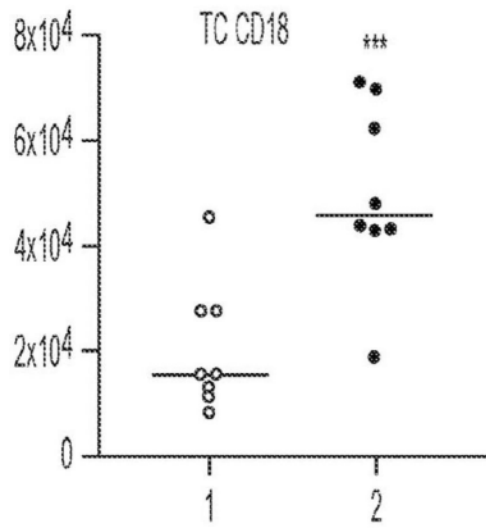


图13B

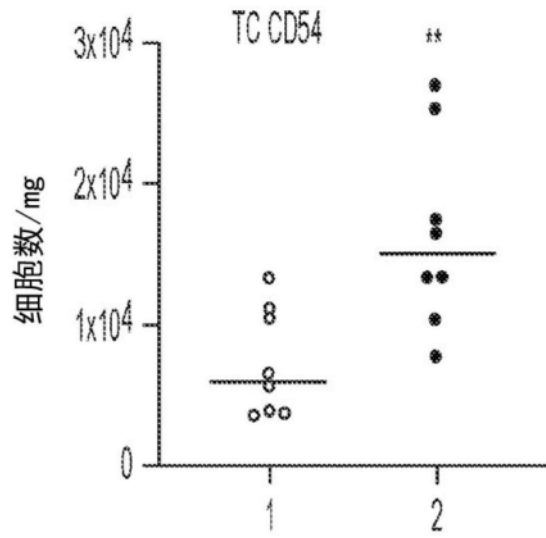


图13C

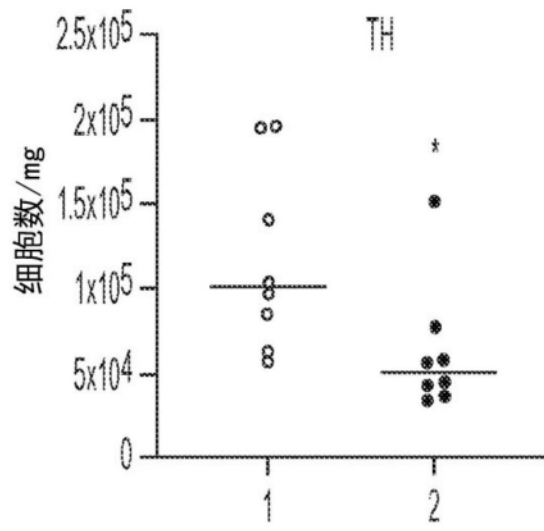


图14A

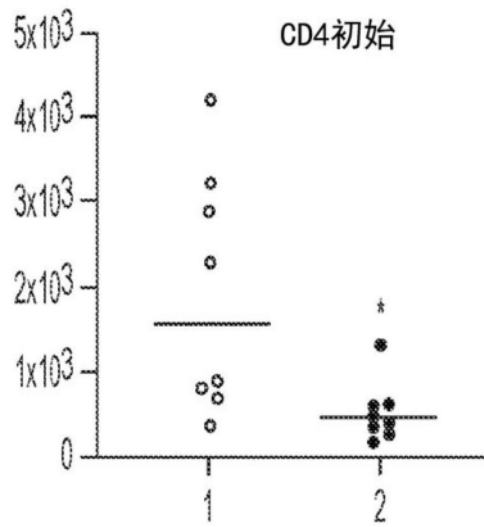


图14B

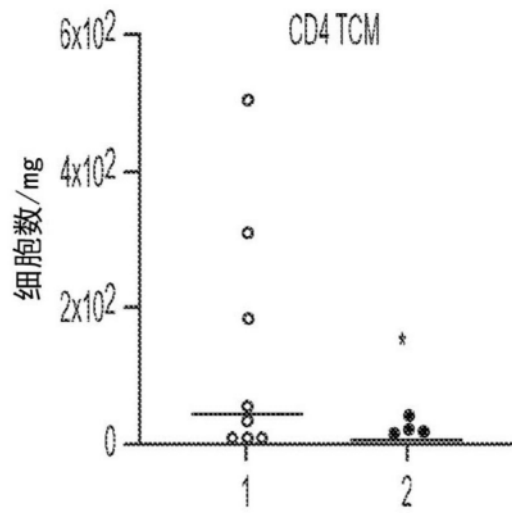


图14C

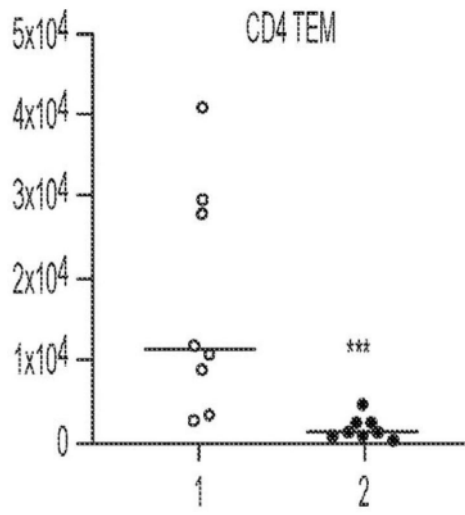


图14D

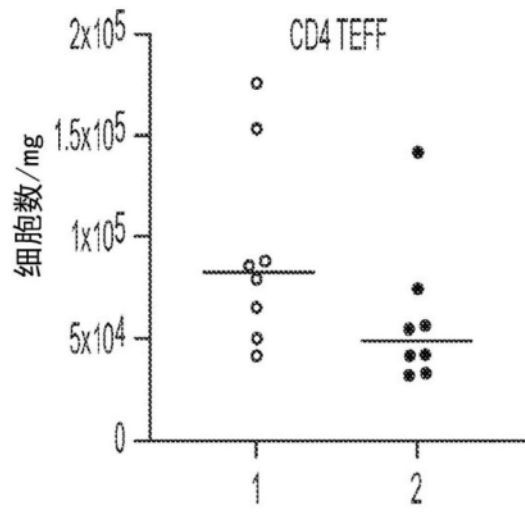


图14E

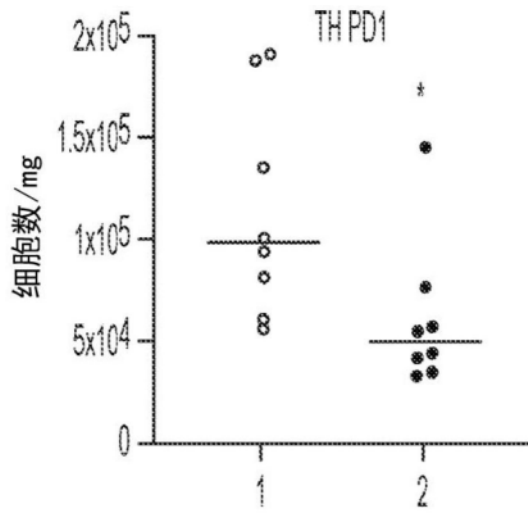


图15A

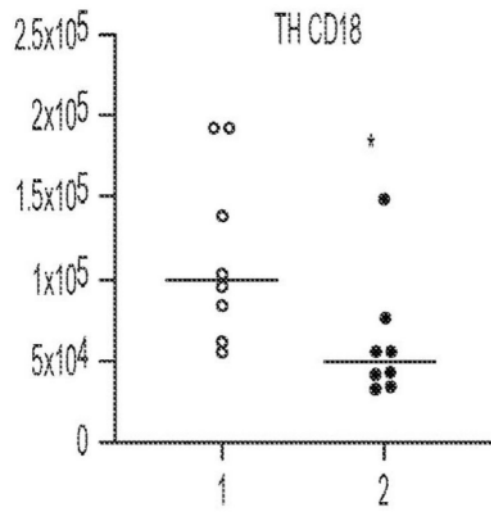


图15B

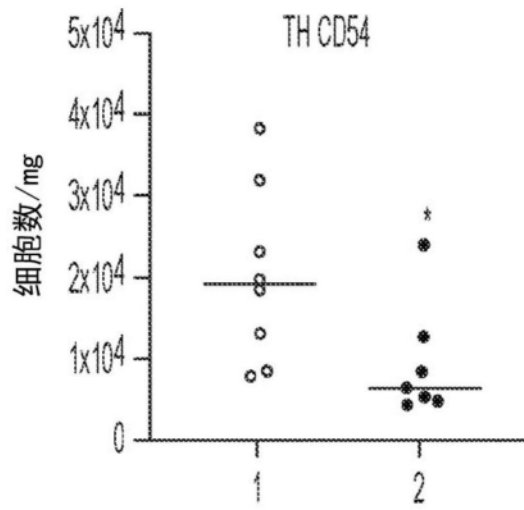


图15C

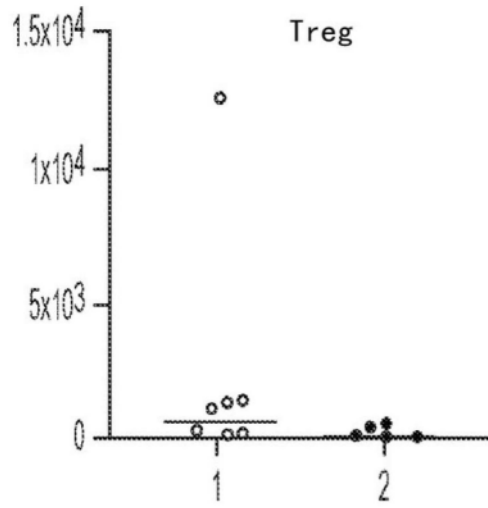


图15D

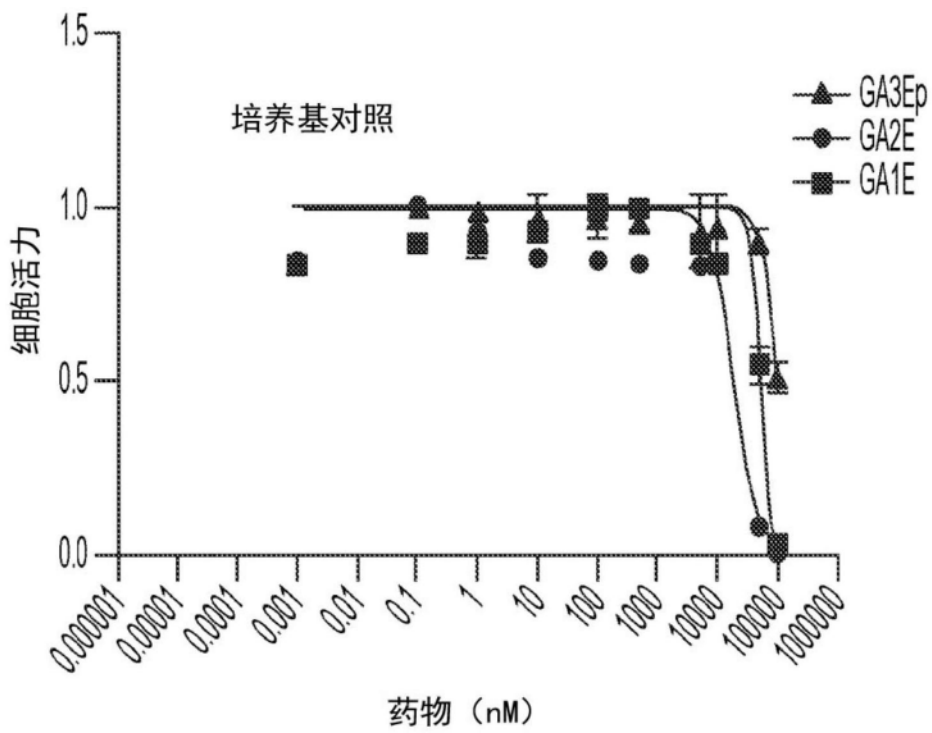


图16

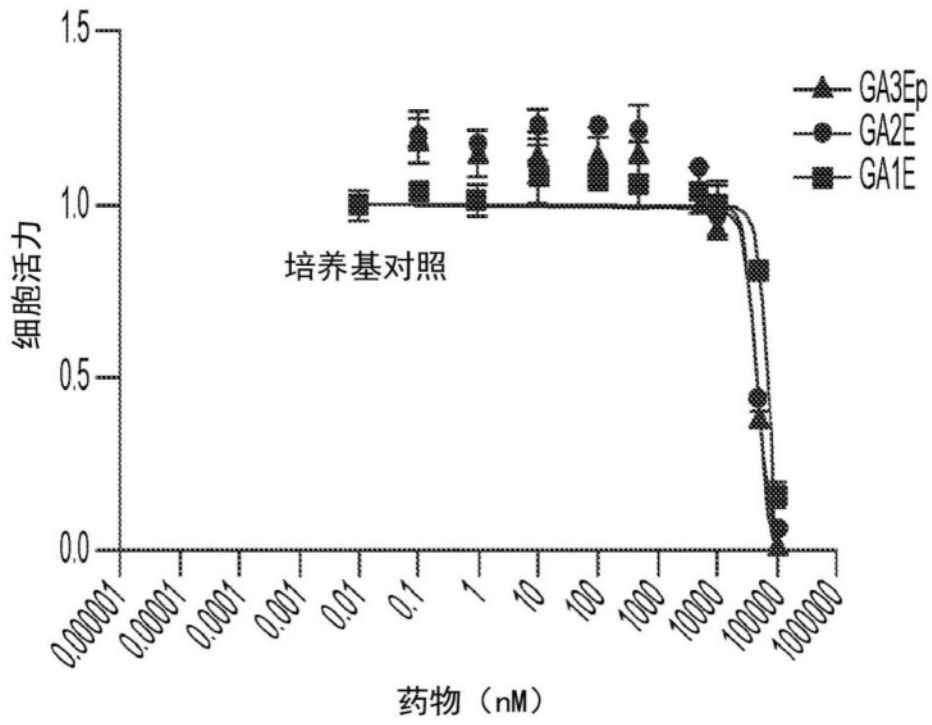


图17

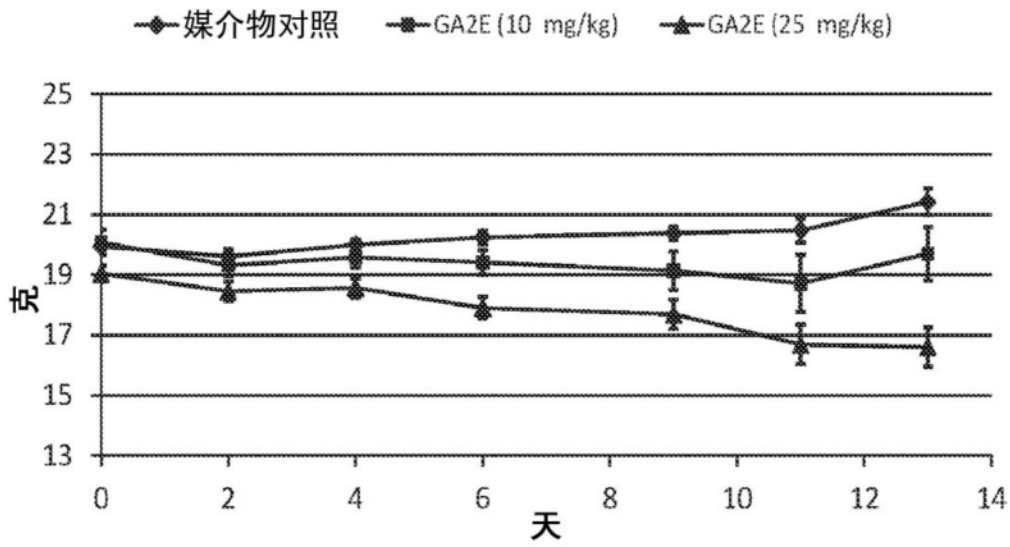


图18A

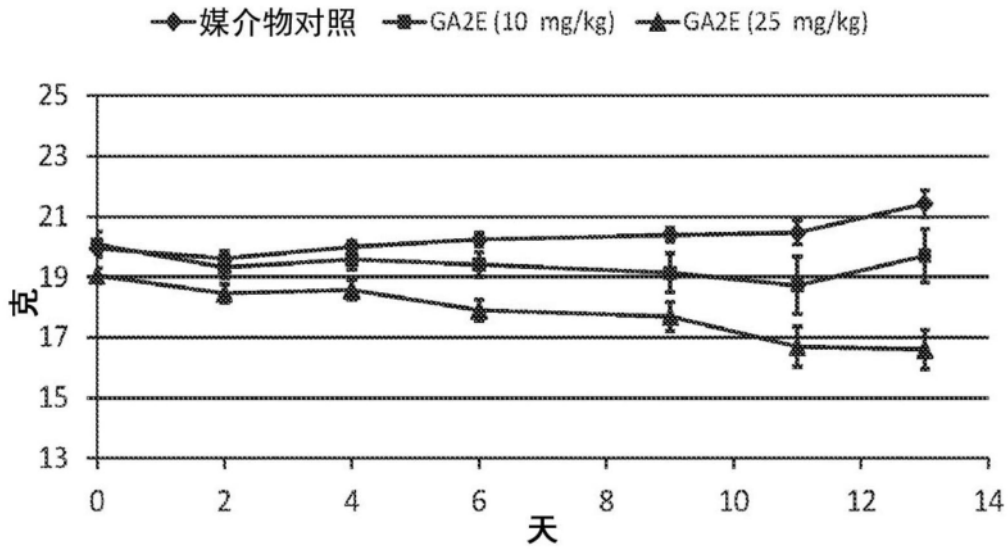


图18B

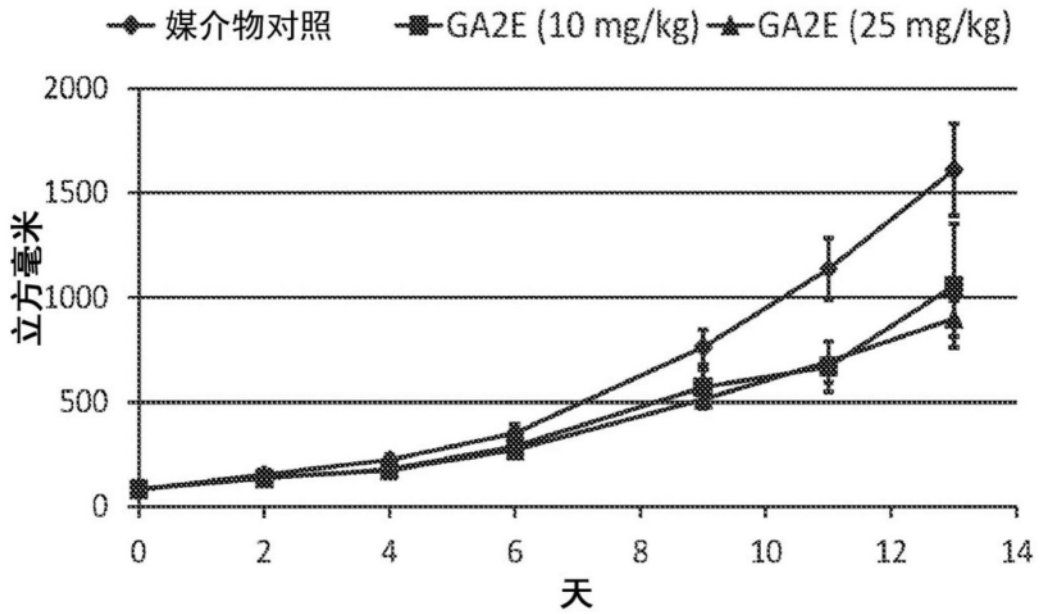


图19

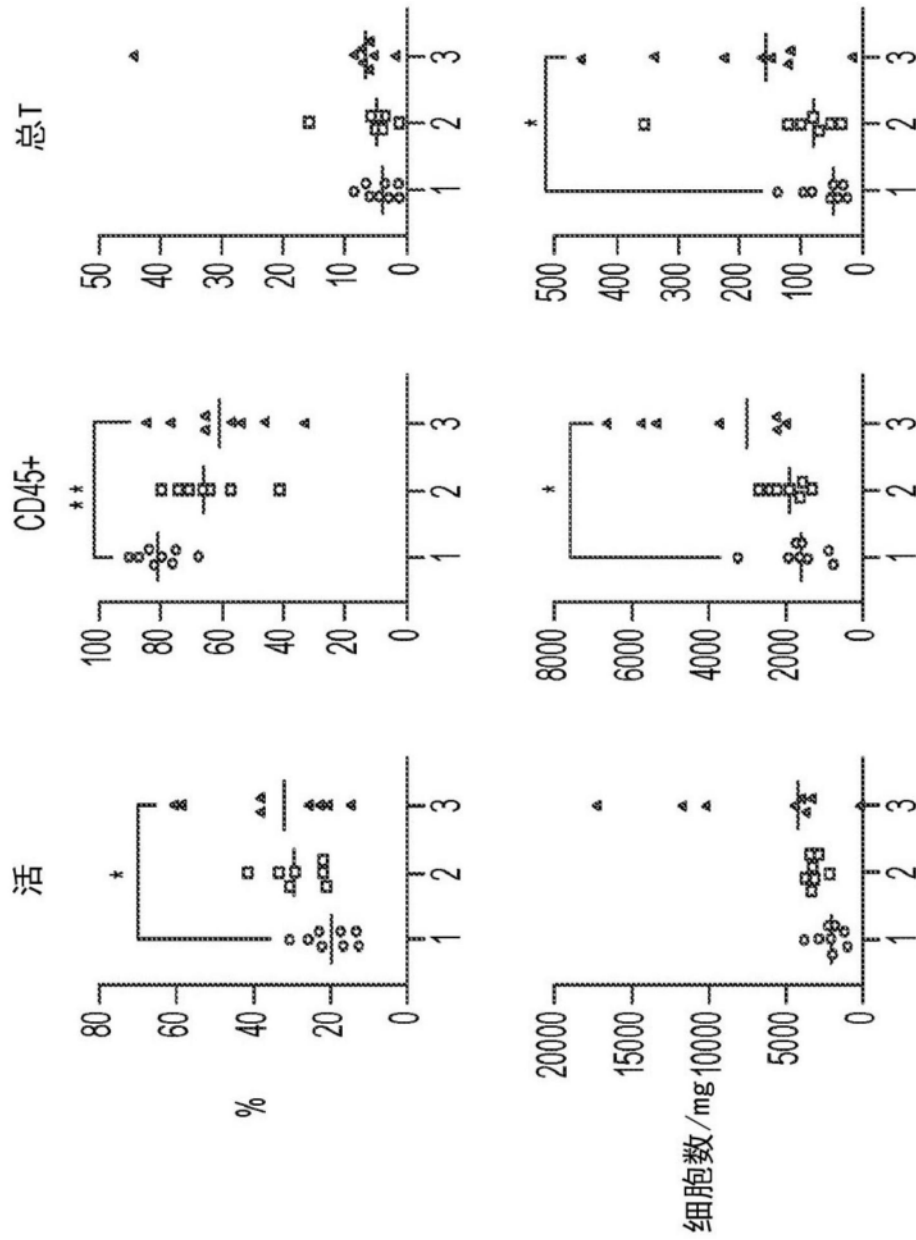


图20

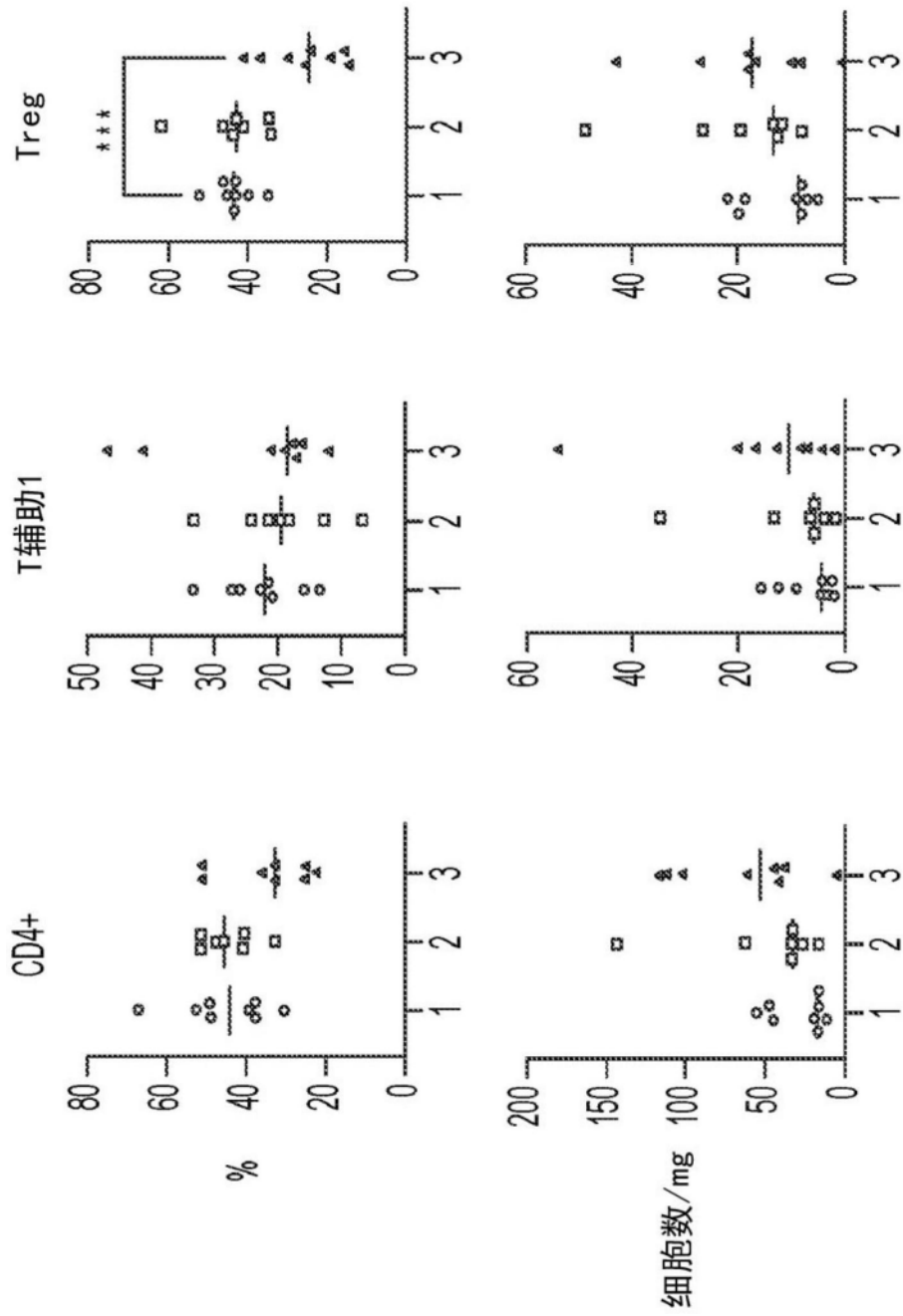


图21

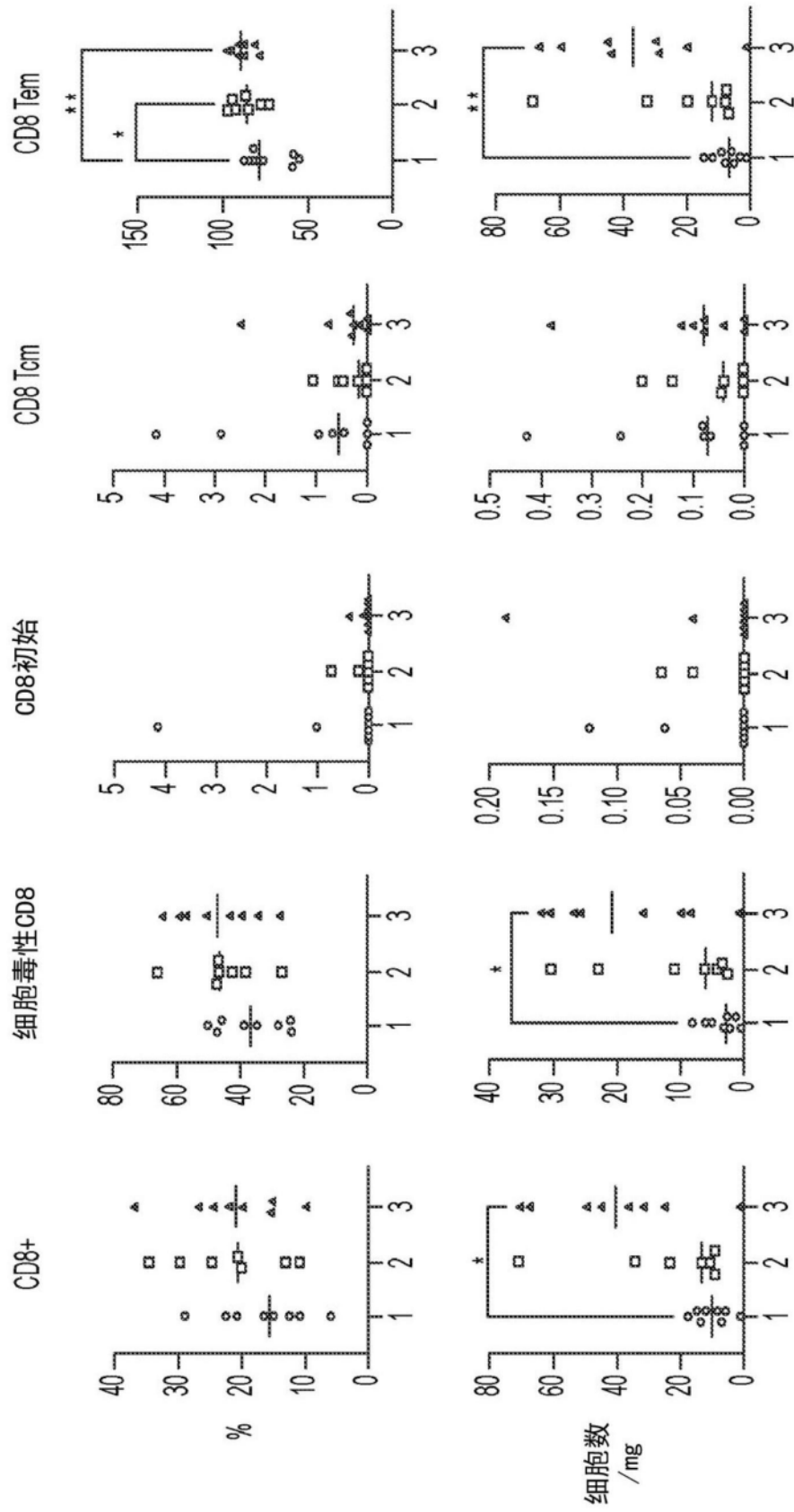


图22