



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115697343 A

(43) 申请公布日 2023.02.03

(21) 申请号 202180030900.9

(22) 申请日 2021.03.05

(30) 优先权数据

62/986,482 2020.03.06 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2022.10.25

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2021/021053 2021.03.05

(87) PCT国际申请的公布数据

W02021/178779 EN 2021.09.10

(71) 申请人 因赛特公司

地址 美国特拉华州

(72) 发明人 J·里奥斯-多利亚 H·K·科贝斯

(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494
专利代理师 封新琴

(51) Int.Cl.

A61K 31/53 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

权利要求书2页 说明书47页

序列表11页 附图12页

(54) 发明名称

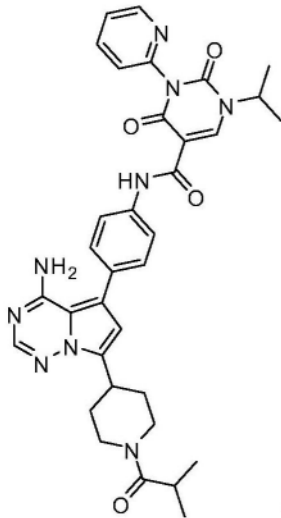
包含AXL/MER和PD-1/PD-L1抑制剂的组合法

(57) 摘要

本公开涉及通过施用作为AXL/MER激酶抑制剂的化合物与结合至PD-1的抗体或其抗体片段的组合来治疗癌症的方法。

1. 一种治疗患者的癌症的方法,所述方法包括向所述患者施用:

(i) 化合物1,其具有以下结构:



化合物 1;

或其药学上可接受的盐;和

(ii) 结合至人类PD-1的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体包含(ii-1)可变重链(VH)结构域,其包含VH互补决定区(CDR)1、VH CDR2和VH CDR3;和(ii-2)可变轻链(VL)结构域,其包含VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3;其中:

- (a) 所述VH CDR1包含氨基酸序列SYWMN(SEQ ID NO:6);
- (b) 所述VH CDR2包含氨基酸序列VIHPSDSETWLDQKFKD(SEQ ID NO:7);
- (c) 所述VH CDR3包含氨基酸序列EHYGTSPFAY(SEQ IDNO:8);
- (d) 所述VL CDR1包含氨基酸序列RASESVDNYGMSFMNW(SEQ ID NO:9);
- (e) 所述VL CDR2包含氨基酸序列AASNQGS(SEQ ID NO:10);并且
- (f) 所述VL CDR3包含氨基酸序列QQSKEVPYT(SEQ IDNO:11)。

2. 如权利要求1所述的方法,其中化合物1和所述抗体是同时施用。

3. 如权利要求1所述的方法,其中化合物1和所述抗体是依序施用。

4. 如权利要求1所述的方法,其中化合物1是口服施用。

5. 如权利要求1-4中任一项所述的方法,其中所述抗体或抗原结合片段是经由静脉内施用来施用。

6. 如权利要求1-5中任一项所述的方法,其中所述抗体或抗原结合片段是每3周一次以375mg的剂量来施用。

7. 如权利要求1-5中任一项所述的方法,其中所述抗体或抗原结合片段是每4周一次以500mg的剂量来施用。

8. 如权利要求1-5中任一项所述的方法,其中所述抗体或抗原结合片段是每4周一次以750mg的剂量来施用。

9. 如权利要求1-8中任一项所述的方法,其中所述VH结构域包含SEQ ID NO:4中所示的氨基酸序列。

10. 如权利要求1-9中任一项所述的方法,其中所述VL结构域包含SEQ ID NO:5中所示的氨基酸序列。

11. 如权利要求1-8中任一项所述的方法,其中所述VH结构域包含SEQ ID NO:4中所示的氨基酸序列并且所述VL结构域包含SEQ ID NO:5中所示的氨基酸序列。

12. 如权利要求1-11中任一项所述的方法,其中:

(a) 所述抗体包含Fc区和铰链结构域;

(b) 所述Fc区和所述铰链结构域属于IgG4类型;并且

(c) 所述铰链结构域包含稳定突变。

13. 如权利要求1-12中任一项所述的方法,其中所述抗体包含重链并且其中所述重链包含SEQ ID NO:2中所示的氨基酸序列。

14. 如权利要求1-13中任一项所述的方法,其中所述抗体包含轻链并且其中所述轻链包含SEQ ID NO:3中所示的氨基酸序列。

15. 如权利要求1-12中任一项所述的方法,其中所述抗体包含重链和轻链,并且其中所述重链包含SEQ ID NO:2中所示的氨基酸序列并且所述轻链包含SEQ ID NO:3中所示的氨基酸序列。

16. 如权利要求1-11中任一项所述的方法,其中所述抗体包含属于IgG1类型的Fc区。

17. 如权利要求1-12和16中任一项所述的方法,其中所述抗体包含重链并且其中所述重链包含SEQ ID NO:13中所示的氨基酸序列。

18. 如权利要求1-12和16中任一项所述的方法,其中所述抗体包含轻链和重链,其中所述重链包含SEQ ID NO:13中所示的氨基酸序列并且所述轻链包含SEQ ID NO:3中所示的氨基酸序列。

19. 如权利要求1-18中任一项所述的方法,其中所述抗体是人源化抗体。

20. 如权利要求1-19中任一项所述的方法,其中所述癌症是选自肝细胞癌、膀胱癌、乳腺癌、子宫颈癌、结肠直肠癌、子宫内膜癌、肛门癌、默克细胞癌(Merkel cell carcinoma)、胃癌、头颈癌、肾癌、肝癌、肺癌、卵巢癌、前列腺癌、食管癌、胆囊癌、胰腺癌、甲状腺癌、皮肤癌、白血病、多发性骨髓瘤、慢性淋巴球性淋巴瘤、成人T细胞白血病、B细胞淋巴瘤、急性骨髓性白血病、霍奇金氏或非霍奇金氏淋巴瘤、华氏巨球蛋白血症(Waldenstrom's Macroglobulinemia)、毛细细胞淋巴瘤、伯基特氏淋巴瘤(Burkett's lymphoma)、神经胶母细胞瘤、黑色素瘤和横纹肌肉瘤。

21. 如权利要求1-19中任一项所述的方法,其中所述癌症是选自肉瘤、头颈癌、黑色素瘤和非小细胞肺癌。

包含AXL/MER和PD-1/PD-L1抑制剂的组合疗法

技术领域

[0001] 本公开涉及通过施用作为AXL/MER激酶抑制剂的化合物与结合至PD-1的抗体或其抗体片段的组合来治疗癌症的方法。

背景技术

[0002] 受体酪氨酸激酶 (RTK) 是将信号从细胞外环境传输至细胞质和细胞核以调控细胞事件 (例如存活、生长、增殖、分化、粘附和迁移) 的细胞表面蛋白。

[0003] TAM子家族由包括Tyro3、AXL和Mer在内的三种RTK组成 (Graham等人, 2014, Nature Reviews Cancer 14, 769-785; Linger等人, 2008, Advances in Cancer Research 100, 35-83)。TAM激酶的特征在于由两个免疫球蛋白样结构域和两个纤连蛋白III型结构域组成的细胞外配体结合结构域。对于TAM激酶已鉴定出两种配体, 生长停滞特异性6 (GAS6) 和蛋白S (PROS1)。GAS6可结合至并且活化所有三种TAM激酶, 而PROS1是Mer和Tyro3的配体 (Graham等人, 2014, Nature Reviews Cancer 14, 769-785)。

[0004] AXL (还称为UFO、ARK、JTK11和TYRO7) 最初是鉴定为来自患有慢性骨髓性白血病的患者的DNA的转化基因 (O'Bryan等人, 1991, Mol Cell Biol 11, 5016-5031; Graham等人, 2014, Nature Reviews Cancer 14, 769-785; Linger等人, 2008, Advances in Cancer Research 100, 35-83)。GAS6结合至AXL并且诱导AXL酪氨酸激酶的后续自身磷酸化和活化。AXL活化数种下游信号传导途径, 包括PI3K-Akt、Raf-MAPK、PLC-PKC (Feneyrolles等人, 2014, Molecular Cancer Therapeutics 13, 2141-2148; Linger等人, 2008, Advances in Cancer Research 100, 35-83)。

[0005] MER (还称为MERTK、EYK、RYK、RP38、NYK和TYRO12) 最初鉴定为来自类淋巴母细胞表达文库的磷酸蛋白 (Graham等人, 1995, Oncogene 10, 2349-2359; Graham等人, 2014, Nature Reviews Cancer 14, 769-785; Linger等人, 2008, Advances in Cancer Research 100, 35-83)。GAS6和PROS1均可结合至Mer并且诱导Mer激酶的磷酸化和活化 (Lew等人, 2014)。与AXL一样, MER活化还传递下游信号传导途径, 包括PI3K-Akt和Raf-MAPK (Linger等人, 2008, Advances in Cancer Research 100, 35-83)。

[0006] TYRO3 (还称为DTK、SKY、RSE、BRT、TIF、ETK2) 最初通过基于PCR的克隆研究来鉴定 (Lai等人, Neuron 6, 691-70, 1991; Graham等人, 2014, Nature Reviews Cancer 14, 769-785; Linger等人, 2008, Advances in Cancer Research 100, 35-83)。两种配体GAS6和PROS1可结合至并且活化TYRO3。尽管TYRO3活化下游的信号传导途径在TAM RTK中研究最少, 但似乎PI3K-Akt和Raf-MAPK途径均有所涉及 (Linger等人, 2008, Advances in Cancer Research 100, 35-83)。发现AXL、MER和TYRO3在癌细胞中过度表达。

[0007] 仍需要使用AXL/MER激酶调节剂与结合至PD-1的抗体或其抗体片段的组合的新的癌症治疗方案。本公开针对这一需求和其他需求。

细胞中T细胞增殖的图。

[0027] 图5B是在体外从经化合物1预处理的人类PBMC分化的原代巨噬细胞中IFN- γ 产生的图。

[0028] 图6A是热图,示出在PBMC中化合物1和/或瑞弗利单抗对白细胞介素(IL)-2的体外诱导。

[0029] 图6B是热图,示出在PBMC中化合物1和/或瑞弗利单抗对干扰素(IFN)- γ 的体外诱导。

[0030] 图6C是热图,示出在PBMC中化合物1和/或瑞弗利单抗对肿瘤坏死因子(TNF)- α 的体外诱导。

[0031] 图6D是热图,示出在PBMC中化合物1和/或瑞弗利单抗对颗粒球-巨噬细胞群落刺激因子(GM-CSF)的体外诱导。

[0032] 图6E是热图,示出在PBMC中化合物1和/或瑞弗利单抗对IL-12p70的体外诱导。

[0033] 图7A是用化合物1处理后MBT-2肿瘤体积的图,其展示化合物1在C3H小鼠的MBT-2肿瘤模型中的肿瘤生长抑制功效。

[0034] 图7B是用化合物1处理后4T1肿瘤体积的图,其展示化合物1在BALB/c小鼠的4T1肿瘤模型中的肿瘤生长抑制功效。

[0035] 图7C是用化合物1处理后4T1肿瘤体积的图,其展示化合物1在无胸腺裸小鼠的4T1肿瘤模型中的肿瘤生长抑制功效。

[0036] 图7D是经化合物1处理的带有4T1肿瘤的小鼠的M1/M2样巨噬细胞比率的图。

[0037] 图8A是用化合物1、抗程序化死亡配体1(PD-L1)或组合口服给药的C57BL/6小鼠的MC38肿瘤体积的图。

[0038] 图8B是用化合物1、抗PD-L1或组合处理后带有MC38肿瘤的小鼠中CD4⁺Ki67⁺细胞的百分比的图。

[0039] 图8C是用化合物1、抗PD-L1或组合处理后带有MC38肿瘤的小鼠中CD8⁺Ki67⁺细胞的百分比的图。

[0040] 图8D是用化合物1、抗PD-L1或组合处理后带有MC38肿瘤的小鼠的肿瘤提取物中干扰素(IFN)- γ 的浓度的图。

[0041] 图9A是用化合物1处理后无胸腺裸小鼠中CTG-2041肿瘤的肿瘤体积的图。

[0042] 图9B是用化合物1处理后无胸腺裸小鼠中CTG-1302肿瘤的肿瘤体积的图。

[0043] 图9C是用化合物1处理后无胸腺裸小鼠中CTG-1339肿瘤的肿瘤体积的图。

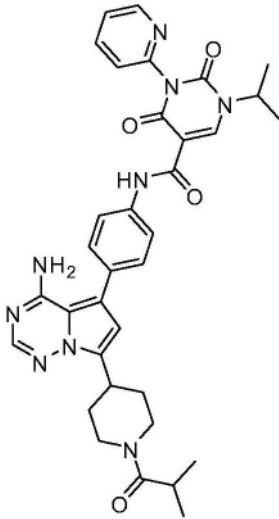
[0044] 图9D示出经化合物1或媒剂处理的小鼠的CTG-2041或CTG-1339肿瘤的pAXL、AXL、pMER、MER、GAS6、pAKT、AKT和 β -肌动蛋白的蛋白质印迹。

具体实施方式

[0045] 本申请尤其提供一种治疗患者的癌症的方法,所述方法包括向所述患者施用:

[0046] (i) 化合物1,其具有以下结构:

[0047]



化合物 1;

[0048] 或其药学上可接受的盐;和

[0049] (ii) 结合至人类PD-1的抗体或其抗原结合片段(例如瑞弗利单抗)。

[0050] 体外研究表明用单剂化合物1处理和单剂瑞弗利单抗处理诱导促发炎细胞因子,然而,化合物1与PD-1抗体瑞弗利单抗的组合产生大得多的细胞因子诱导(实施例G)。

[0051] 人类PD-1蛋白(Genbank登录号NP_005009)的氨基酸序列是:MQIPQAPWPVVWAVLQLGWRPGWFLDSPDRPWNPTFSPALLVTEGDNATFTCSFSNTSESVLNWYRMSPSNQTDKLAAPEDRSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVVRARRNDSGYLCAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPSPRPAGQFQTLVVGVVGGLLGLSLVLLVWVLAVICSRAARGTIGARRTGQPLKEDPSAVPVFSVDYGELDFQWREKTPEPPVPCVPEQTEYATIVFPSMGMTSSPARRGSADGPRSAQPLRPEDGHCSWPL (SEQ ID NO:1)。

[0052] 瑞弗利单抗是结合至人类PD-1的人源化IgG4单克隆抗体(参见US 2019/0127467,其以引用的方式全文并入本文中)。下文描述成熟瑞弗利单抗重链和轻链的氨基酸序列。

[0053] 可变重链(VH)结构域和可变轻链(VL)结构域的互补决定区(CDR)1、2和3是以成熟VL和VH序列的N至C末端的顺序显示并且加有下划线并加粗。由下文所列出的成熟重链(SEQ ID NO:2)和成熟轻链(SEQ ID NO:3)组成的抗体被称为瑞弗利单抗。

[0054] 成熟瑞弗利单抗重链(HC)

[0055]

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTS**SYWMN**WVRQ
 APGQGLEWIG**VIHPDSETWLDQKFKDR**VTITVDKSTSTAYMEL
 SSLRSEDTAVYYCARE**HYGTSPFAY**WGQGLTVTVSSASTKGPSV
 FPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP
 AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVE
 SKYGPCCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD
 VSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVL
 HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS

[0056] QEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL
DSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS
LSLG (SEQ ID NO:2)

[0057] 成熟瑞弗利单抗轻链(LC)

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRRASESVDNYGMSFMNWFQ
QKPGQPPKLLIHAAASNQGSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFA
VYFCQQSKEVPYTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT
[0058] ASVVCLLNFPYAPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY
SLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ
ID NO:3)

[0059] 瑞弗利单抗的可变重链(VH)结构域具有以下氨基酸序列:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYSFTSYWMNWVRQ
APGQGLEWIGVIHPSDSETWLDQKFKDRVITITVDKSTSTAYMEL
[0060] SSLRSEDTAVYYCAREEHYGTSPFAYWGQGLTVSS (SEQ ID
NO:4)

[0061] 瑞弗利单抗的可变轻链(VL)结构域具有以下氨基酸序列:

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRRASESVDNYGMSFMNWFQ
[0062] QKPGQPPKLLIHAAASNQGSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFA
VYFCQQSKEVPYTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:5)

[0063] 下文列出瑞弗利单抗的VH CDR的氨基酸序列:

[0064] VH CDR1:SYWMN (SEQ ID NO:6);

[0065] VH CDR2:VIHPSDSETWLDQKFKD (SEQ ID NO:7);

[0066] VH CDR3:EHYGTSPFAY (SEQ ID NO:8)

[0067] 下文列出瑞弗利单抗的VL CDR的氨基酸序列:

[0068] VL CDR1:RASESVDNYGMSFMN (SEQ ID NO:9);

[0069] VL CDR2:AASNQGS (SEQ ID NO:10); 和

[0070] VL CDR3:QQSKEVPYT (SEQ ID NO:11)。

[0071] 因此,本公开提供一种治疗患者的癌症的方法,所述方法包括向所述患者施用:

[0072] (i) 化合物1,其具有以下结构:

域包含稳定突变。

[0089] 在一些实施方案中,所述抗体包含重链,其中所述重链包含SEQ ID NO:2中所示的氨基酸序列。

[0090] 在一些实施方案中,VL结构域包含SEQ ID NO:5中所示的氨基酸序列。

[0091] 在一些实施方案中,所述抗体包含轻链,其中所述轻链包含SEQ ID NO:3中所示的氨基酸序列。

[0092] 在一些实施方案中,VH结构域包含SEQ ID NO:4中所示的氨基酸序列并且VL结构域包含SEQ ID NO:5中所示的氨基酸序列。

[0093] 在一些实施方案中,所述抗体包含重链和轻链,并且其中重链包含SEQ ID NO:2中所示的氨基酸序列并且轻链包含SEQ ID NO:3中所示的氨基酸序列。

[0094] 在一些实施方案中,所述抗体包含属于IgG1类型的Fc区。

[0095] 在一些实施方案中,所述抗体包含属于IgG1类型的Fc区,所述Fc区包含变体CH2-CH3结构域(包含L234A/L235A(AA)取代),但但缺乏C末端赖氨酸残基。在一些实施方案中,所述抗体包含属于IgG1类型的Fc区,其中成熟重链和轻链序列是SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:3。

[0096] 成熟重链(HC)

[0097] QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYSFT SYWMNWVRQA PGQGLEWIGV IHPSDSETWL DQKFKDRVTI TVDKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCAREH YGTSPFAYWG QGTLTVSSA STKGPSVFPPL APSSKSTSGG TAALGCLVKD YFPEPVTVSW NSGALTSGVH TFPAVLQSSG LYSLSVTV PSSSLGTQTY ICNVNHKPSN TKVDKRVKPK SCDKTHTCPP CPAPEAAGGP SVFLFPPKPK DTLMISRTPE VTCVVVDVSH EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQYNS TYRVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL PAPIEKTISK AKGQPREPQV YTLPPSREEM TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTPPV L DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ QGNVFCSSVM HEALHNHYTQ KSLSLSPG (SEQ ID NO:13)

[0098] 在一些实施方案中,所述抗体或抗原结合片段是人源化抗体。

[0099] 在一些实施方案中,化合物1或其药学上可接受的盐和瑞弗利单抗是同时或依序施用于患者。在一些实施方案中,化合物1或其药学上可接受的盐和瑞弗利单抗是同时施用于患者。在一些实施方案中,化合物1或其药学上可接受的盐和瑞弗利单抗是依序施用于患者。

[0100] 化合物1和其药学上可接受的盐可通过多种方法施用于受试者,例如有需要的受试者,例如人类受试者。对于许多应用,施用途径是口服。在一些实施方案中,化合物1或其药学上可接受的盐是作为药物组合物来施用。

[0101] 化合物1的制剂(例如固体口服剂型)描述于美国专利公布号2020/0000812 A1中,所述美国专利公布以引用的方式全文并入。在一些实施方案中,化合物1是配制成包含以下的固体口服剂型:

[0102] (a) 化合物1或其药学上可接受的盐(例如化合物1马来酸盐)、溶剂化物或水合物;

[0103] (b) 有机酸;和

[0104] (c) 表面活性剂。

[0105] 术语“有机酸”是指具有酸性性质的有机化合物。在一些实施方案中,有机酸是各自经一个或多个酸性基团(例如1个、2个或3个羧酸、醇或磺酸基团)取代的C₁₋₆烷基、C₂₋₆烯

基或5-6元杂环烷基,其中所述5-6元杂环烷基任选地经C₁₋₆烷基取代,所述C₁₋₆烷基任选地经一个或多个酸性基团(例如1个、2个、3个或4个羧酸、醇或磺酸基团)取代。所述有机酸可为经一个或多个酸性基团(例如1个、2个、3个或4个羧酸、醇或磺酸基团)取代的C₁₋₆烷基或C₂₋₆烯基。在一些实施方案中,所述有机酸是经1个、2个或3个羧酸基团取代并且经0个、1个或2个醇基团取代的C₁₋₆烷基或C₂₋₆烯基。在一些实施方案中,所述有机酸是经一个或多个酸性基团(例如1个、2个或3个羧酸、醇或磺酸基团)取代并且任选地经C₁₋₆烷基取代的5-6元杂环烷基,其中所述C₁₋₆烷基任选地经一个或多个酸性基团(例如1个、2个或3个羧酸、醇或磺酸基团)取代。示例性有机酸包括但不限于柠檬酸、抗坏血酸、富马酸、苹果酸、山梨酸、酒石酸和其水合物或溶剂化物。制剂中的有机酸可为约1wt%和至约50wt%。制剂中的有机酸可为约5wt%至约40wt%。制剂中的有机酸可为约5wt%至约30wt%。制剂中的有机酸可为约5wt%至约20wt%。制剂中的有机酸可为约10wt%至约20wt%。例如,制剂中的有机酸可为约1重量%、2重量%、3重量%、4重量%、5重量%、6重量%、7重量%、8重量%、9重量%、10重量%、15重量%、20重量%、25重量%、30重量%、35重量%、40重量%、45重量%或50重量%。在一些实施方案中,制剂中的有机酸为约10wt%。在一些实施方案中,制剂中的有机酸为约20wt%。

[0106] 在一些实施方案中,所述有机酸是柠檬酸。在一些实施方案中,柠檬酸是柠檬酸单水合物。制剂中的柠檬酸可为约1wt%和至约50wt%。制剂中的柠檬酸可为约5wt%至约40wt%。制剂中的柠檬酸可为约5wt%至约30wt%。制剂中的柠檬酸可为约5wt%至约20wt%。制剂中的柠檬酸可为约10wt%至约20wt%。例如,制剂中的柠檬酸可为约1重量%、2重量%、3重量%、4重量%、5重量%、6重量%、7重量%、8重量%、9重量%、10重量%、15重量%、20重量%、25重量%、30重量%、35重量%、40重量%、45重量%或50重量%。在一些实施方案中,制剂中的柠檬酸为约10wt%。在一些实施方案中,制剂中的柠檬酸为约20wt%。

[0107] 表面活性剂可有助于增加化合物1或其药学上可接受的盐(例如化合物1马来酸盐)、溶剂化物或水合物的生物可用性。术语“表面活性剂”是指降低两种液体之间或液体与固体之间的表面张力的化合物。在一些实施方案中,表面活性剂也可具有其他功能,例如崩解剂、润湿剂、乳化剂、发泡剂和分散剂。示例性表面活性剂包括但不限于泊洛沙姆(poloxamer)。泊洛沙姆的实例是泊洛沙姆407、泊洛沙姆338、泊洛沙姆237和泊洛沙姆188。在一个实施方案中,泊洛沙姆是泊洛沙姆188。在一个实施方案中,泊洛沙姆是泊洛沙姆407。泊洛沙姆是聚乙烯-丙二醇共聚物(已知商标名是Supronic、Pluronic或Tetronic),其具有可有助于药物释放的热可逆性质和溶胶-凝胶转变性质。例如,泊洛沙姆在小于室温下展现溶胶状态并且在体温(37.2°C)下转化成凝胶状态,这可改变药物释放特征(D. Ramya Devi等人, J. Pharm. Sci. & Res. 第5卷(8), 2013, 159-165; Y. Mao等人, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 35(2004) 1127-1142)。

[0108] 抗PD-1抗体或其抗原结合片段可通过多种方法施用于受试者,例如有需要的受试者,例如人类受试者。对于许多应用,施途径是以下一者:静脉内注射或输注(IV)、皮下注射(SC)、腹膜内(IP)或肌肉内注射。也可能使用关节内递送。也可使用其他肠胃外施用模式。此类模式的实例包括:动脉内、鞘内、囊内、眶内、心内、真皮内、经气管、表皮下、关节内、囊下、蛛网膜下、脊柱内以及硬膜外和胸骨内注射。在一些情形下,施用可为口服。

[0109] 抗PD-1抗体或其抗原结合片段可通过多种方法施用于受试者,例如有需要的受试

者,例如人类受试者。对于许多应用,施用途径是以下一者:静脉内注射或输注(IV)、皮下注射(SC)、腹膜内(IP)或肌肉内注射。也可能使用关节内递送。也可使用其他肠胃外施用模式。此类模式的实例包括:动脉内、鞘内、囊内、眶内、心内、真皮内、经气管、表皮下、关节内、囊下、蛛网膜下、脊柱内以及硬膜外和胸骨内注射。在一些情形下,施用可为口服。

[0110] 所述抗体或其抗原结合片段的施用途径和/或模式也可针对个别情形进行调整,例如通过监测受试者,例如使用断层摄影成像,例如以使肿瘤可视化。

[0111] 所述抗体或其抗原结合片段可以固定剂量或以mg/kg剂量来施用。也可选择剂量以减少或避免针对抗PD-1抗体的抗体的产生。剂量方案经调整以提供期望反应,例如治疗反应或组合治疗效应。通常,可使用多个剂量的抗PD-1抗体(和任选地第二剂)以便向受试者提供生物可用量的所述剂。例如,可施用在0.1-100mg/kg、0.5-100mg/kg、1mg/kg-100mg/kg、0.5-20mg/kg、0.1-10mg/kg或1-10mg/kg范围内的剂量。也可使用其他剂量。在特定实施方案中,向需要用抗PD-1抗体治疗的受试者施用1mg/kg、2mg/kg、3mg/kg、4mg/kg、5mg/kg、10mg/kg、15mg/kg、20mg/kg、30mg/kg、35mg/kg或40mg/kg的剂量的所述抗体。

[0112] 组合物可包含约1mg/mL至100mg/ml或约10mg/mL至100mg/ml或约50至250mg/mL或约100至150mg/ml或约100至250mg/ml的抗PD-1抗体或其抗原结合片段。

[0113] 如本文所用的剂量单位形式或“固定剂量”或“稳定剂量”是指适于作为单位剂量供待治疗受试者使用的物理离散单位;每一单位含有经计算以与所需药物载体一起并且任选地与所述另一剂一起产生期望治疗效应的预定量的活性化合物。可给予单一或多个剂量。或者或另外,抗体可经由连续输注来施用。示例性固定剂量包括375mg、500mg和750mg。

[0114] 抗PD-1抗体或其抗原结合片段剂量可例如在足以涵盖至少2个剂量、3个剂量、5个剂量、10个剂量或更多个剂量的一段时间(治疗期)内,以周期性间隔施用,例如每天一次或两次,或每周约1至4次,或优选地每周一次、每两周一次(biweekly/every two weeks)、每三周一次、每月一次,例如持续约1至12周,优选地2至8周,更优选地约3至7周,并且甚至更优选地约4周、5周或6周。可能影响有效治疗受试者所需的剂量和时间的因素包括例如疾病或病症的严重程度、制剂、递送途径、先前治疗、受试者的一般健康状况和/或年龄以及所存在的其他疾病。另外,用治疗有效量的化合物治疗受试者可包括单一治疗或优选地,可包括一系列治疗。

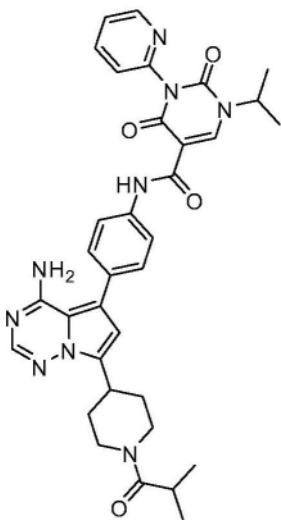
[0115] 示例性给药方案包括以375mg的固定剂量每3周一次施用抗PD-1抗体或其抗原结合片段。另一示例性给药方案包括以500mg的固定剂量每4周一次施用抗PD-1抗体或其抗原结合片段。另一示例性给药方案包括以750mg的固定剂量每4周一次施用抗PD-1抗体或其抗原结合片段。

[0116] 在一些实施方案中,术语“约”是指加或减值的10%。本领域技术人员应知晓,本文所呈现的值可因实验的条件(例如数据收集或仪器的变化)而变化。

[0117] 化合物1

[0118] 化合物1(N-(4-(4-氨基-7-(1-异丁酰基哌啶-4-基)吡咯并[1,2-f][1,2,4]三嗪-5-基)苯基)-1-异丙基-2,4-二氧化-3-(吡啶-2-基)-1,2,3,4-四氢嘧啶-5-甲酰胺)具有以下结构:

[0119]



[0120] 化合物1可如美国专利号9,981,975和美国公布号2019/112313中所述来合成,所述专利以引用的方式全文并入本文中。

[0121] 本公开还包括本文所述的化合物1的药学上可接受的盐。

[0122] 化合物1的结晶盐形式描述于美国公布号2019/112313中,所述美国公布以引用的方式全文并入本文中。

[0123] 在一些实施方案中,化合物1和其盐是大体上分离的。“大体上分离”意指所述化合物至少部分地或大体上与形成或检测到其的环境分离。部分分离可包括例如富集化合物1的组合物。大体分离可包括含有至少约50重量%、至少约60重量%、至少约70重量%、至少约80重量%、至少约90重量%、至少约95重量%、至少约97重量%或至少约99重量%的化合物1或其盐的组合物。分离化合物和其盐的方法是本领域中常规的。

[0124] 化合物1可以多种固体形式存在。如本文所用,“固体形式”意图指特征在于一种或多种性质的固体,例如熔点、溶解度、稳定性、结晶度、吸湿性、水含量、TGA特征、DSC特征、DVS特征、XRPD特征等。例如,固体形式可为非晶形、结晶或其混合物。

[0125] 不同结晶固体形式通常具有不同的晶格(例如晶胞),并且通常因此具有不同的物理性质。在一些情况下,不同的结晶固体形式具有不同的水或溶剂含量。不同晶格可通过固态表征方法、例如通过X射线粉末衍射(XRPD)来鉴定。其他表征方法(例如差示扫描量热法(DSC)、热重分析(TGA)、动态蒸汽吸附(DVS)等)进一步有助于鉴定所述固体形式以及有助于测定稳定性和溶剂/水含量。

[0126] 反射(峰)的XRPD图案通常被视为特定结晶形式的指纹。众所周知,XRPD峰的相对强度可广泛地变化,尤其视样品制备技术、晶体大小分布、所用各种滤波器、样品安装程序和所用特定仪器而定。在一些情况下,可观察到新的峰,或现有的峰可能会消失,视仪器的类型或设置而定。如本文所用,术语“峰”是指具有最大峰高度/强度的至少约4%的相对高度/强度的反射。另外,仪器变化和其他因素可能影响 2θ 值。因此,峰分配(例如本文所报告的那些)可加或减约 0.2° (2θ)变化,并且如本文XRPD的上下文中所用的术语“大体上”意图涵盖上文所提及的变化。

[0127] 与DSC、TGA或其他热实验结合的温度读数可以相同的方式变化约 $\pm 3^\circ\text{C}$,视仪器、特定设置、样品制备等而定。

[0128] 因此,在一些实施方案中,本申请提供N-(4-(4-氨基-7-(1-异丁酰基哌啶-4-基)

吡咯并[1,2-f][1,2,4]三嗪-5-基)苯基)-1-异丙基-2,4-二氧化-3-(吡啶-2-基)-1,2,3,4-四氢嘧啶-5-甲酰胺马来酸盐(本文中还称为化合物1的马来酸盐、化合物1马来酸盐或其任何变化形式)。

[0129] 在一些实施方案中,所述盐是1:1化学计量比的N-(4-(4-氨基-7-(1-异丁酰基哌啶-4-基)吡咯并[1,2-f][1,2,4]三嗪-5-基)苯基)-1-异丙基-2,4-二氧化-3-(吡啶-2-基)-1,2,3,4-四氢嘧啶-5-甲酰胺:马来酸。

[0130] 在一些实施方案中,本文所提供的化合物1的马来酸盐是结晶。如本文所用,“结晶”或“结晶形式”意图指结晶物质的某一晶格构形。同一物质的不同结晶形式通常具有不同晶格(例如晶胞),这些晶格是归因于各结晶形式所特有的不同物理性质。在一些情况下,不同晶格构形具有不同的水或溶剂含量。

[0131] 化合物1的化合物的马来酸盐可以各种结晶形式制备,包括例如形式I、形式II、形式III、形式IV或形式V,如美国公布号2019/112313中所述,所述美国公布以引用的方式全文并入本文中。

[0132] 化合物1马来酸盐,形式I:

[0133] 本文提供化合物1的结晶形式,称为形式I,其描述于下文实施例5中。

[0134] 在一些实施方案中,化合物1的马来酸盐具有至少一个XRPD峰(以 2θ 表示),其选自约 4.3° 、约 8.4° 、约 12.6° 、约 13.2° 和约 18.5° 。

[0135] 在一些实施方案中,化合物1的马来酸盐具有至少两个XRPD峰(以 2θ 表示),其选自约 4.3° 、约 8.4° 、约 12.6° 、约 13.2° 和约 18.5° 。

[0136] 在一些实施方案中,化合物1的马来酸盐具有至少三个XRPD峰(以 2θ 表示),其选自约 4.3° 、约 8.4° 、约 12.6° 、约 13.2° 和约 18.5° 。

[0137] 在一些实施方案中,化合物1的马来酸盐具有至少四个XRPD峰(以 2θ 表示),其选自约 4.3° 、约 8.4° 、约 12.6° 、约 13.2° 和约 18.5° 。

[0138] 在一些实施方案中,化合物1的马来酸盐包含以下XRPD峰(以 2θ 表示):约 4.3° 、约 8.4° 、约 12.6° 、约 13.2° 和约 18.5° 。

[0139] 在一些实施方案中,化合物1的马来酸盐包含以下XRPD峰(以 2θ 表示):约 4.3° 、约 8.4° 和约 13.2° 。

[0140] 在一些实施方案中,化合物1的马来酸盐具有DSC热谱图,其具有在约 211°C 处的吸热峰。

[0141] 化合物1马来酸盐,形式II:

[0142] 本文提供化合物1的结晶形式,称为形式II,其描述于下文实施例6和实施例7中。

[0143] 在一些实施方案中,化合物1的马来酸盐的形式II具有至少一个XRPD峰(以 2θ 表示),其选自约 3.8° 、约 7.8° 、约 23.5° 和约 26.0° 。

[0144] 在一些实施方案中,化合物1的马来酸盐的形式II具有至少两个XRPD峰(以 2θ 表示),其选自约 3.8° 、约 7.8° 、约 23.5° 和约 26.0° 。

[0145] 在一些实施方案中,化合物1的马来酸盐的形式II具有至少三个XRPD峰(以 2θ 表示),其选自约 3.8° 、约 7.8° 、约 23.5° 和约 26.0° 。

[0146] 在一些实施方案中,化合物1的马来酸盐的形式II包含以下XRPD峰(以 2θ 表示):约 3.8° 、约 7.8° 、约 23.5° 和约 26.0° 。

[0147] 在一些实施方案中,化合物1的马来酸盐的形式II包含以下XRPD峰(以 2θ 表示):约 3.8° 、约 7.8° 和约 23.5° 。

[0148] 化合物1马来酸盐,形式III:

[0149] 本文提供化合物1的结晶形式,称为形式III,其描述于下文实施例6和实施例8中。

[0150] 在一些实施方案中,化合物1的马来酸盐的形式III具有至少一个XRPD峰(以 2θ 表示),其选自约 3.8° 、约 7.7° 、约 12.1° 、约 18.9° 和约 20.6° 。

[0151] 在一些实施方案中,化合物1的马来酸盐的形式III具有至少两个XRPD峰(以 2θ 表示),其选自约 3.8° 、约 7.7° 、约 12.1° 、约 18.9° 和约 20.6° 。

[0152] 在一些实施方案中,化合物1的马来酸盐的形式III具有至少三个XRPD峰(以 2θ 表示),其选自约 3.8° 、约 7.7° 、约 12.1° 、约 18.9° 和约 20.6° 。

[0153] 在一些实施方案中,化合物1的马来酸盐的形式III具有至少四个XRPD峰(以 2θ 表示),其选自约 3.8° 、约 7.7° 、约 12.1° 、约 18.9° 和约 20.6° 。

[0154] 在一些实施方案中,化合物1的马来酸盐的形式III包含以下XRPD峰(以 2θ 表示): 3.8° 、约 7.7° 、约 12.1° 、约 18.9° 和约 20.6° 。

[0155] 在一些实施方案中,化合物1的马来酸盐的形式III包含以下XRPD峰(以 2θ 表示):约 3.8° 、约 7.7° 、约 12.1° 和约 18.9° 。

[0156] 在一些实施方案中,化合物1的马来酸盐的形式III具有DSC热谱图,其具有在约 165.4°C 和约 195.4°C 处的吸热峰。在一些实施方案中,化合物1的马来酸盐的形式III具有DSC热谱图,其具有在约 165.4°C 处的吸热峰。在一些实施方案中,化合物1的马来酸盐的形式III具有DSC热谱图,其具有在约 195.4°C 处的吸热峰。

[0157] 化合物1马来酸盐,形式IV:

[0158] 本文提供化合物1的结晶形式,称为形式IV,其描述于下文实施例6和实施例9中。

[0159] 在一些实施方案中,化合物1的马来酸盐的形式IV具有至少一个XRPD峰(以 2θ 表示),其选自约 3.9° 、约 4.6° 、约 7.8° 、约 9.1° 和约 22.8° 。

[0160] 在一些实施方案中,化合物1的马来酸盐的形式IV具有至少两个XRPD峰(以 2θ 表示),其选自约 3.9° 、约 4.6° 、约 7.8° 、约 9.1° 和约 22.8° 。

[0161] 在一些实施方案中,化合物1的马来酸盐的形式IV具有至少三个XRPD峰(以 2θ 表示),其选自约 3.9° 、约 4.6° 、约 7.8° 、约 9.1° 和约 22.8° 。

[0162] 在一些实施方案中,化合物1的马来酸盐的形式IV具有至少四个XRPD峰(以 2θ 表示),其选自约 3.9° 、约 4.6° 、约 7.8° 、约 9.1° 和约 22.8° 。

[0163] 在一些实施方案中,化合物1的马来酸盐的形式IV包含以下XRPD峰(以 2θ 表示):约 3.9° 、约 4.6° 、约 7.8° 、约 9.1° 和约 22.8° 。

[0164] 在一些实施方案中,化合物1的马来酸盐的形式IV包含以下XRPD峰(以 2θ 表示):约 3.9° 、约 4.6° 、约 7.8° 和约 9.1° 。

[0165] 在一些实施方案中,化合物1的马来酸盐的形式IV具有DSC热谱图,其具有在约 152.1°C 和约 202.6°C 处的吸热峰。在一些实施方案中,化合物1的马来酸盐的形式IV具有DSC热谱图,其具有在约 152.1°C 处的吸热峰。在一些实施方案中,化合物1的马来酸盐的形式IV具有DSC热谱图,其具有在约 202.6°C 处的吸热峰。

[0166] 化合物1马来酸盐,形式V:

[0167] 本文提供化合物1的结晶形式,称为形式V,其描述于下文实施例6和实例10中。

[0168] 在一些实施方案中,化合物1的马来酸盐的形式V具有至少一个XRPD峰(以 2θ 表示),其选自约 4.1° 、约 8.3° 、约 8.8° 、约 18.0° 和约 27.3° 。

[0169] 在一些实施方案中,化合物1的马来酸盐的形式V具有至少两个XRPD峰(以 2θ 表示),其选自约 4.1° 、约 8.3° 、约 8.8° 、约 18.0° 和约 27.3° 。

[0170] 在一些实施方案中,化合物1的马来酸盐的形式V具有至少三个XRPD峰(以 2θ 表示),其选自约 4.1° 、约 8.3° 、约 8.8° 、约 18.0° 和约 27.3° 。

[0171] 在一些实施方案中,化合物1的马来酸盐的形式V具有至少四个XRPD峰(以 2θ 表示),其选自约 4.1° 、约 8.3° 、约 8.8° 、约 18.0° 和约 27.3° 。

[0172] 在一些实施方案中,化合物1的马来酸盐的形式V包含以下XRPD峰(以 2θ 表示):约 4.1° 、约 8.3° 、约 8.8° 、约 18.0° 和约 27.3° 。

[0173] 在一些实施方案中,化合物1的马来酸盐的形式V包含以下XRPD峰(以 2θ 表示):约 4.1° 、约 8.3° 、约 8.8° 和约 27.3° 。

[0174] 在一些实施方案中,化合物1的马来酸盐的形式V具有DSC热谱图,其具有在约 200.1°C 处的吸热峰。

[0175] 抗体和抗体的药物组合物的制备

[0176] 在某些实施方案中,结合至人类PD-1的抗体包括人类重链和轻链恒定区。在某些实施方案中,重链恒定区包含CH1结构域和铰链区。在一些实施方案中,重链恒定区包含CH3结构域。如果重链恒定区包括取代,那么此类取代会改变抗体的性质(例如增加或减小以下一者或多者:Fc受体结合、抗体糖基化、半胱氨酸残基数、效应细胞功能或补体功能)。在某些实施方案中,抗体是IgG抗体。在特定实施方案中,抗体是选自由IgG1、IgG2、IgG3和IgG4组成的组。

[0177] 抗体(例如瑞弗利单抗)可例如通过制备和表达编码所列举的氨基酸序列的合成基因或通过使人类生殖系基因突变以提供编码所列举的氨基酸序列的基因来制得。另外,这种抗体和结合至人类PD-1的其他抗体可例如使用以下方法中的一者或多者来获得。

[0178] 人源化抗体可通过用来自人类Fv可变区的等效序列替代不直接参与抗原结合的Fv可变区序列来产生。用于产生人源化抗体的一般方法提供于Morrison,S.L.,*Science*, 229:1202-1207 (1985), Oi等人,*BioTechniques*, 4:214 (1986), 和US 5,585,089;US 5,693,761;US 5,693,762;US 5,859,205;以及US 6,407,213中。那些方法包括分离、操纵和表达编码重链或轻链中的至少一者的免疫球蛋白Fv可变区的全部或一部分的核酸序列。此类核酸的来源为本领域技术人员众所周知的并且例如可从产生如上文所述针对预定靶的抗体的杂交瘤、从生殖系免疫球蛋白基因或从合成构建物获得。然后可将编码人源化抗体的重组DNA克隆至适当表达载体中。

[0179] 例如,人类生殖系序列公开于Tomlinson,I.A.等人,*J.Mol.Biol.*, 227:776-798 (1992);Cook,G.P.等人,*Immunol.Today*, 16:237-242 (1995);Chothia,D.等人,*J.Mol.Bio.* 227:799-817 (1992);和Tomlinson等人,*EMBO J.*, 14:4628-4638 (1995)中。VBASE目录提供人类免疫球蛋白可变区序列的综合目录(由Tomlinson,I.A.等人,MRC Centre for Protein Engineering,Cambridge,UK编译)。这些序列可用作例如用于框架区和CDR的人类序列的来源。也可使用共有人类框架区,举例说来,如美国专利号6,300,064中

所述。

[0180] 也可使用用于使抗体人源化的其他方法。例如,其他方法可解释抗体的三维结构、三维靠近结合决定子的框架位置和免疫原性肽序列。参见例如WO 90/07861;美国专利号5,693,762;5,693,761;5,585,089;5,530,101;和6,407,213;Tempest等人(1991) *Biotechnology* 9:266-271。另一方法被称为“人工程化”并且描述于例如U.S.2005-008625中。

[0181] 抗体可包括人类Fc区,例如野生型Fc区或包括一个或多个变化的Fc区。在一个实施方案中,恒定区发生改变(例如发生突变)以改变抗体的性质(例如增加或减小以下一者或多者:Fc受体结合、抗体糖基化、半胱氨酸残基数、效应细胞功能或补体功能)。例如,人类IgG1恒定区可在一个或多个残基(例如残基234和237(基于Kabat编号)中的一者或多者)处发生突变。抗体可在重链的CH2区中具有降低或改变效应功能(例如Fc受体结合和补体活化)的突变。例如,抗体可具有突变,例如美国专利号5,624,821和5,648,260中所述的那些。抗体也可具有稳定免疫球蛋白的两条重链之间的二硫键的突变,例如本领域中所公开的IgG4铰链区的突变(例如Angal等人(1993) *Mol. Immunol.* 30:105-08)。还参见例如U.S.2005-0037000。

[0182] 结合至人类PD-1或人类PD-L1的抗体可呈结合至人类PD-1或人类PD-L1的抗体的全长抗体形式或低分子量形式(例如生物活性抗体片段或微小抗体),例如Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、Fd、dAb、scFv和sc(Fv)₂。本公开涵盖的其他抗体包括含有单一可变链(例如VH或VL)或其生物活性片段的单结构域抗体(sdAb)。参见例如Moller等人, *J. Biol. Chem.*, 285(49):38348-38361(2010);Harmsen等人, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 77(1):13-22(2007);U.S.2005/0079574和Davies等人(1996) *Protein Eng.*, 9(6):531-7。与完整抗体一样, sdAb能够选择性结合至特异性抗原。具有仅12-15kDa的分子量, sdAb远小于常见抗体并且甚至小于Fab片段和单链可变片段。

[0183] 本文提供组合物,其包含结合至人类PD-1或人类PD-L1的抗体或其抗原结合片段和其一种或多种酸性变体的混合物,例如,其中酸性变体的量小于约80%、70%、60%、60%、50%、40%、30%、30%、20%、10%、5%或1%。还提供组合物,其包含含有至少一个脱酰胺位点的结合至人类PD-1或人类PD-L1的抗体或其抗原结合片段,其中所述组合物的pH为约5.0至约6.5,使得例如至少约90%的抗体并非脱酰胺的(即小于约10%的抗体是脱酰胺的)。在某些实施方案中,小于约5%、3%、2%或1%的抗体是脱酰胺的。pH可为5.0至6.0,例如5.5或6.0。在某些实施方案中,所述组合物的pH是5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4或6.5。

[0184] “酸性变体”是相关多肽的变体,其比所述相关多肽酸性更强(例如通过阳离子交换色谱所测定)。酸性变体的实例是脱酰胺变体。

[0185] 多肽分子的“脱酰胺”变体是其中原始多肽的一个或多个天冬酰胺残基已转化成天冬氨酸、即中性酰胺侧链已转化成具有整体酸性特征的残基的多肽。

[0186] 如本文中参考包含结合至人类PD-1或人类PD-L1的抗体或其抗原结合片段的组合物所用,术语“混合物”意指存在结合至人类PD-1或人类PD-L1的期望抗体或其抗原结合片段和其一种或多种酸性变体。所述酸性变体可主要包含结合至人类PD-1或人类PD-L1的脱酰胺抗体,和少量其他酸性变体。

[0187] 在某些实施方案中,发生突变以消除脱酰胺的抗体的结合亲和力(K_D)、缔合速率(K_D 缔合)和/或解离速率(K_D 解离)类似于野生型抗体的结合亲和力、缔合速率和/或解离速率,例如具有小于约5倍、2倍、1倍(100%)、50%、30%、20%、10%、5%、3%、2%或1%的差异。

[0188] 抗体片段

[0189] 抗体片段(例如Fab、Fab'、F(ab')₂、Facb和Fv)可通过完整抗体的蛋白水解消化来制备。例如,抗体片段可通过用酶(例如木瓜蛋白酶、胃蛋白酶或血纤维蛋白溶酶)处理完整抗体来获得。完整抗体的木瓜蛋白酶消化产生F(ab)₂或Fab片段;完整抗体的胃蛋白酶消化产生F(ab')₂或Fab';并且完整抗体的血纤维蛋白溶酶消化产生Facb片段。

[0190] 或者,抗体片段可重组产生。例如,可构建编码相关抗体片段的核酸,将其引入表达载体中,并且在合适宿主细胞中表达。参见例如Co, M.S.等人, *J. Immunol.*, 152:2968-2976 (1994); Better, M. 和 Horwitz, A.H., *Methods in Enzymology*, 178:476-496 (1989); Plueckthun, A. 和 Skerra, A., *Methods in Enzymology*, 178:476-496 (1989); Lamoyi, E., *Methods in Enzymology*, 121:652-663 (1989); Rousseaux, J. 等人, *Methods in Enzymology*, (1989) 121:663-669 (1989); 和 Bird, R.E. 等人, *TIBTECH*, 9:132-137 (1991)。抗体片段可在大肠杆菌(*E. coli*)中表达并且从其中分泌,因此允许容易地产生大量这些片段。抗体片段可从抗体噬菌体文库分离。或者, Fab'-SH片段可直接从大肠杆菌回收并且化学偶合以形成F(ab)₂片段(Carter等人, *Bio/Technology*, 10:163-167 (1992))。根据另一方法, F(ab')₂片段可直接从重组宿主细胞培养物分离。包含补救受体结合表位残基的具有延长的体内半衰期的Fab和F(ab')₂片段描述于美国专利号5,869,046中。

[0191] 微小抗体

[0192] 结合至人类PD-1或人类PD-L1的抗体的微小抗体包括双功能抗体、单链(scFv)和单链(Fv)₂(sc(Fv)₂)。

[0193] “双功能抗体”是通过基因融合构建的二价微小抗体(参见例如Holliger, P. 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 90:6444-6448 (1993); EP 404,097; WO 93/11161)。双功能抗体是由两条多肽链构成的二聚体。双功能抗体的每一条多肽链的VL和VH结构域通过接头结合。构成接头的氨基酸残基的数目可介于2至12个残基之间(例如3-10个残基或5个或约5个残基)。双功能抗体中的多肽的接头通常因太短而使VL和VH无法彼此结合。因此,在同一多肽链中编码的VL和VH无法形成单链可变区片段,而是与不同单链可变区片段形成二聚体。因此,双功能抗体具有两个抗原结合位点。

[0194] scFv是通过用接头连接VH和VL而获得的单链多肽抗体(参见例如Huston等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 85:5879-5883 (1988); 和 Plickthun, “*The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*”, 第113卷, Resenbourg和Moore编辑, Springer Verlag, New York, 第269-315页, (1994))。待连接的VH和VL的顺序不受特定限制,并且其可以任一顺序排列。排列的实例包括:[VH]接头[VL];或[VL]接头[VH]。scFv中的H链V区和L链V区可衍生自本文所述的结合至人类PD-1或人类PD-L1的任何抗体或其抗原结合片段。

[0195] sc(Fv)₂是其中两个VH和两个VL通过接头连接以形成单链的微小抗体(Hudson等人, *J. Immunol. Methods*, (1999) 231:177-189 (1999))。sc(Fv)₂可例如通过用接头连结scFv来制备。本公开的sc(Fv)₂包括优选其中从单链多肽的N末端开始,两个VH和两个VL以下列

顺序排列的抗体:VH、VL、VH和VL ([VH]接头[VL]接头[VH]接头[VL]);然而,两个VH和两个VL的顺序并不限于上述排列,并且其可以任一顺序排列。

[0196] 双特异性抗体

[0197] 双特异性抗体是对至少两个不同的表位具有结合特异性的抗体。示例性双特异性抗体可结合至PD-1蛋白的两个不同的表位。其他此类抗体可组合PD-1结合位点与另一蛋白质的结合位点。双特异性抗体可制备为全长抗体或其低分子量形式(例如F(ab')₂双特异性抗体、sc(Fv)₂双特异性抗体、双功能抗体双特异性抗体)。

[0198] 全长双特异性抗体的传统产生是基于两条免疫球蛋白重链-轻链对的共表达,其中两条链具有不同的特异性(Millstein等人,Nature,305:537-539(1983))。在不同的方法中,具有期望结合特异性的抗体可变结构域融合至免疫球蛋白恒定结构域序列。将编码免疫球蛋白重链融合物和必要时免疫球蛋白轻链的DNA插入单独表达载体中,并且共转染至合适宿主细胞中。这提供调整三种多肽片段的比例的较大灵活性。然而,在至少两条多肽链的等比率表达产生高产量时,有可能将两条或所有三条多肽链的编码序列插入单一表达载体中。

[0199] 根据美国专利号5,731,168中所述的另一方法,可使抗体分子对之间的界面工程化以使从重组细胞培养物回收的异二聚体的百分比最大化。优选界面包含C_{H3}结构域的至少一部分。在这种方法中,来自第一抗体分子的界面的一条或多条小氨基酸侧链经较大侧链(例如酪氨酸或色氨酸)置换。通过用较小氨基酸侧链(例如丙氨酸或苏氨酸)置换大氨基酸侧链,在第二抗体分子的界面上产生大小与大侧链相同或相似的补偿性“空腔”。这提供增加异二聚体相对于其他不期望的末端产物(例如同二聚体)的产率的机制。

[0200] 双特异性抗体包括交联或“异源缀合物”抗体。例如,异源缀合物中的一种抗体可偶合至抗生物素蛋白,另一抗体可偶合至生物素。异源缀合物抗体可使用任何方便的交联方法来制得。

[0201] “双功能抗体”技术提供制造双特异性抗体片段的替代机制。所述片段包含通过接头连结至VL的VH,所述接头因太短而不允许在同一链上的两个结构域之间配对。因此,一个片段的VH和VL结构域被迫与另一片段的互补VL和VH结构域配对,由此形成两个抗原结合位点。

[0202] 多价抗体

[0203] 表达与抗体结合的抗原的细胞对多价抗体的内化(和/或分解代谢)可快于二价抗体。本文所述的抗体可为具有三个或更多个抗原结合位点的多价抗体(例如四价抗体),其可容易地通过编码抗体多肽链的核酸的重组表达来产生。多价抗体可包含二聚化结构域和三个或更多个抗原结合位点。示例性二聚化结构域包含Fc区或铰链区(或由其组成)。多价抗体可包含三个至约八个(例如四个)抗原结合位点(或由其组成)。多价抗体任选地包含至少一条多肽链(例如至少两条多肽链),其中所述多肽链包含两个或更多个可变结构域。例如,所述多肽链可包含VD1-(X1)_n-VD2-(X2)_n-Fc,其中VD1是第一可变结构域,VD2是第二可变结构域,Fc是Fc区的多肽链,X1和X2代表氨基酸或肽间隔体,并且n是0或1。

[0204] 缀合抗体

[0205] 本文所公开的抗体可为结合至多种分子的缀合抗体,所述分子包括大分子物质,例如聚合物(例如聚乙二醇(PEG)、经PEG修饰的聚乙烯亚胺(PEI)(PEI-PEG)、聚谷氨酸

(PGA) (N-(2-羟基丙基)甲基丙烯酰胺 (HPMA) 共聚物)、透明质酸、放射性材料 (例如⁹⁰Y、¹³¹I) 荧光物质、发光物质、半抗原、酶、金属螯合物、药物和毒素 (例如卡奇霉素 (calceamicin)、假单胞菌外毒素 (Pseudomonas exotoxin) A、蓖麻毒素 (例如脱糖基化蓖麻毒素A链))。

[0206] 在一个实施方案中,为了改进结合至人类PD-1或人类PD-L1的抗体的细胞毒性作用和因此改进其治疗有效性,使所述抗体与高毒性物质,包括放射性同位素和细胞毒性剂缀合。这些缀合物可将毒性负载选择性地递送至靶位点(即表达抗体所识别抗原的细胞),同时避开抗体不识别的细胞。为了使毒性最小化,通常基于具有短血清半衰期的分子来对缀合物进行工程化(因此,使用鼠类序列以及IgG3或IgG4同型)。

[0207] 在某些实施方案中,结合至人类PD-1或人类PD-L1的抗体或其抗原结合片段经部分修饰,所述部分改进其在循环中(例如在血液、血清或其他组织中)的稳定化和/或滞留例如达至少1.5倍、2倍、5倍、10倍或50倍。例如,结合至人类PD-1或人类PD-L1的抗体或其抗原结合片段可与聚合物(例如大体上非抗原性聚合物,例如聚环氧烷或聚环氧乙烷)缔合(例如缀合)。合适聚合物将大体上根据重量而变化。可使用数目平均分子量介于约200至约35,000道尔顿(或约1,000至约15,000,和2,000至约12,500)范围内的聚合物。例如,结合至人类PD-1或人类PD-L1的抗体或其抗原结合片段可缀合至水溶性聚合物,例如亲水性聚乙烯基聚合物,例如聚乙烯醇或聚乙烯吡咯烷酮。此类聚合物的实例包括聚环氧烷均聚物,例如聚乙二醇(PEG)或聚丙二醇、聚氧乙烯化多元醇、其共聚物和其嵌段共聚物,条件是维持所述嵌段共聚物的水溶解度。其他有用聚合物包括聚氧化烯,例如聚氧乙烯、聚氧丙烯以及聚氧乙烯和聚氧丙烯的嵌段共聚物;聚甲基丙烯酸酯;卡波姆(carbomer);和分支或未分支的多糖。

[0208] 上述缀合抗体可通过对本文所述的抗体或其较低分子量形式执行化学修饰来制备。用于修饰抗体的方法为本领域中众所周知的(例如US 5057313和US 5156840)。

[0209] 产生抗体的方法

[0210] 抗体可在细菌或真核细胞中产生。一些抗体(例如Fab)可在细菌细胞(例如大肠杆菌细胞)中产生。抗体也可在真核细胞(例如转化细胞系(例如CHO、293E、COS))中产生。另外,抗体(例如scFv)可在酵母细胞,例如毕赤酵母(Pichia)(参见例如Powers等人,J Immunol Methods.251:123-35(2001))、汉逊酵母(Hansenula)或酵母菌属(Saccharomyces)中表达。为了产生相关抗体,构建编码抗体的多核苷酸,将其引入表达载体中,并且然后在合适宿主细胞中表达。使用标准分子生物学技术来制备重组表达载体,转染宿主细胞,选择转化体,培养宿主细胞并回收抗体。

[0211] 如果打算在细菌细胞(例如大肠杆菌)中表达抗体,那么表达载体应具有允许载体在细菌细胞中扩增的特征。另外,当使用大肠杆菌(例如JM109、DH5 α 、HB101或XL1-Blue)作为宿主时,载体必须具有启动子,例如lacZ启动子(Ward等人,341:544-546(1989))、araB启动子(Better等人,Science,240:1041-1043(1988))或可允许在大肠杆菌中有效表达的T7启动子。此类载体的实例包括例如M13系列载体、pUC系列载体、pBR322、pBluescript、pCR-Script、pGEX-5X-1(Pharmacia)、“QIA表达系统”(QIAGEN)、pEGFP和pET(当使用这种表达载体时,宿主优选是表达T7 RNA聚合酶的BL21)。表达载体可含有用于抗体分泌的信号序列。为在大肠杆菌的周质中产生,可使用pelB信号序列(Lei等人,J.Bacteriol.,169:4379(1987))作为用于抗体分泌的信号序列。对于细菌表达,可使用氯化钙方法或电穿孔方法将

表达载体引入细菌细胞中。

[0212] 如果打算在动物细胞(例如CHO、COS和NIH3T3细胞)中表达抗体,那么表达载体包括在这些细胞中表达所需的启动子,例如SV40启动子(Mulligan等人,Nature,277:108(1979))、MMLV-LTR启动子、EF1 α 启动子(Mizushima等人,Nucleic Acids Res.,18:5322(1990))或CMV启动子。除编码免疫球蛋白或其结构域的核酸序列外,重组表达载体也可携带其他序列,例如调控载体在宿主细胞中的复制的序列(例如复制起点)和可选择标记基因。可选择标记基因促进其中已引入载体的宿主细胞的选择(参见例如美国专利号4,399,216、4,634,665和5,179,017)。例如,可选择标记基因通常赋予其中已引入载体的宿主细胞对药物(例如G418、潮霉素(hygromycin)或甲氨蝶呤(methotrexate))的抗性。具有可选择标记物的载体的实例包括pMAM、pDR2、pBK-RSV、pBK-CMV、pOPRSV和pOP13。

[0213] 在一个实施方案中,抗体是在哺乳动物细胞中产生的。用于表达抗体的示例性哺乳动物宿主细胞包括中国仓鼠卵巢(CHO细胞)(包括dhfr⁻CHO细胞,描述于Urlaub和Chasin(1980)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 77:4216-4220中,与例如Kaufman和Sharp(1982)Mol.Biol.159:601-621中所述的DHFR可选择标记物一起使用)、人类胚肾293细胞(例如293、293E、293T)、COS细胞、NIH3T3细胞、淋巴球性细胞系(例如NS0骨髓瘤细胞和SP2细胞)以及来自转基因动物(例如转基因哺乳动物)的细胞。例如,所述细胞是乳腺上皮细胞。

[0214] 在用于抗体表达的示例性系统中,通过磷酸钙介导的转染将编码结合至人类PD-1或人类PD-L1的抗体的抗体重链和抗体轻链的重组表达载体引入dhfr⁻CHO细胞中。在重组表达载体内,抗体重链和轻链基因各自可操作地连接至增强子/启动子调控元件(例如衍生自SV40、CMV、腺病毒等,例如CMV增强子/AdMLP启动子调控元件或SV40增强子/AdMLP启动子调控元件)以驱动基因的高转录水平。重组表达载体还携带DHFR基因,所述基因允许选择已使用甲氨蝶呤选择/扩增经载体转染的CHO细胞。培养所选转化体宿主细胞以允许表达抗体重链和轻链并且从培养基回收抗体。

[0215] 抗体也可通过转基因动物来产生。例如,美国专利号5,849,992描述在转基因哺乳动物的乳腺中表达抗体的方法。构建包括乳汁特异性启动子和编码相关抗体的核酸和分泌信号序列的转基因。由此类转基因哺乳动物的雌性产生的乳汁包括其中分泌的相关抗体。抗体可从乳汁纯化,或对于一些应用,可直接使用。还提供包含一种或多种本文所述的核酸的动物。

[0216] 本公开的抗体可从宿主细胞的内部或外部(例如培养基)分离并且纯化为大体上纯并且均质的抗体。常用于抗体纯化的分离和纯化方法可用于分离和纯化抗体,并且不限于任何特定方法。可通过适当地选择并且组合例如柱色谱、过滤、超滤、盐析、溶剂沉淀、溶剂萃取、蒸馏、免疫沉淀、SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳、等电聚焦、透析和重结晶来分离和纯化抗体。色谱包括例如亲和色谱、离子交换色谱、疏水色谱、凝胶过滤、反相色谱和吸附色谱(Strategies for Protein Purification and Characterization:A Laboratory Course Manual.Daniel R.Marshak等人编辑,Cold Spring Harbor Laboratory Press,1996)。色谱可使用液相色谱(例如HPLC和FPLC)来进行。用于亲和色谱的柱包括蛋白质A柱和蛋白质G柱。使用蛋白质A柱的柱的实例包括Hyper D、POROS和Sepharose FF(GE Healthcare Biosciences)。本公开还包括使用这些纯化方法高度纯化的抗体。

[0217] 具有改变的糖基化的抗体

[0218] 不同糖型可显著影响治疗剂的性质,包括药物动力学、药效学、受体相互作用和组织特异性靶向(Graddis等人,2002,Curr Pharm Biotechnol.3:285-297)。具体说来,对于抗体,除了抗体的效应功能(例如与诱导CDC的补体复合物C1的结合和与负责调节ADCC途径的Fc γ R受体的结合)外,寡糖结构还可影响与蛋白酶抗性相关的性质、由FcRn受体介导的抗体血清半衰期、吞噬作用和抗体反馈(Nose和Wigzell,1983;Leatherbarrow和Dwek,1983;Leatherbarrow等人,1985;Walker等人,1989;Carter等人,1992,PNAS,89:4285-4289)。

[0219] 因此,调节抗体效应功能的另一方法包括改变抗体恒定区的糖基化。改变的糖基化包括例如减少或增加糖基化残基数、改变糖基化残基的模式或位置以及改变糖结构。在人类IgG上发现的寡糖影响其效应功能的程度(Raju,T.S.BioProcess International 2003年4月.44-53);人类IgG寡糖的微观不均一性可影响生物功能,例如CDC和ADCC、与各种Fc受体的结合和与C1q蛋白的结合(Wright A.和Morrison SL.TIBTECH 1997,15 26-32;Shields等人,J Biol Chem.2001276(9):6591-604;Shields等人,J Biol Chem.2002;277(30):26733-40;Shinkawa等人,J Biol Chem.2003 278(5):3466-73;Umana等人,Nat Biotechnol.1999年2月;17(2):176-80)。例如,IgG结合C1q并且活化补体级联的能力可取决于位于两个CH2结构域之间的碳水化合物部分(其通常锚定于Asn297处)的存在、不存在或修饰(Ward和Ghetie,Therapeutic Immunology 2:77-94(1995))。

[0220] 含Fc的多肽(例如抗体,例如IgG抗体)中的糖基化位点可通过标准技术来鉴定。糖基化位点的鉴定可为实验性的或基于序列分析或建模数据。已描述共有基序,即由各种糖基转移酶识别的氨基酸序列。例如,N连接的糖基化基序的共有基序通常为NXT或NXS,其中X可为除脯氨酸外的任何氨基酸。还已描述用于定位潜在糖基化基序的数种算法。因此,为了鉴定抗体或含Fc片段内的潜在糖基化位点,例如通过使用公共数据库(例如由生物序列分析中心(Center for Biological Sequence Analysis)提供的网站)来检查抗体的序列(参见用于预测N连接的糖基化位点的NetNGlyc服务器和用于预测O连接的糖基化位点的NetOGlyc服务器)。

[0221] 体内研究已确认无糖基抗体的效应功能降低。例如,无糖基抗CD8抗体无法清除小鼠中带有CD8的细胞(Isaacs,1992J.Immunol.148:3062)并且无糖基抗CD3抗体不会诱导小鼠或人类中的细胞因子释放综合征(Boyd,1995见上文;Friend,1999Transplantation 68:1632)。PD-1抗体的无糖基化形式还具有降低的效应功能。

[0222] 重要的是,尽管去除CH2结构域中的聚糖似乎对效应功能具有显著效应,但抗体的其他功能和物理性质保持不变。具体说来,已显示去除聚糖对血清半衰期和抗原结合几乎不具有影响(Nose,1983见上文;Tao,1989见上文;Dorai,1991见上文;Hand,1992见上文;Hobbs,1992Mol.Immunol.29:949)。

[0223] 本公开的结合至人类PD-1或人类PD-L1的抗体可经修饰或发生改变以引发增加或减小的效应功能(与第二PD-1特异性抗体相比)。用于改变抗体的糖基化位点的方法描述于例如US 6,350,861和US 5,714,350、WO 05/18572和WO 05/03175中;这些方法可用于产生具有改变的、减少的或无糖基化的本公开抗体。

[0224] 使用方法

[0225] 本文所述的方法涉及癌症的治疗。实例癌症包括膀胱癌、乳腺癌、子宫颈癌、结肠直

肠癌、小肠癌、结肠癌、直肠癌、肛门癌、子宫内膜癌、胃癌、头颈癌(例如喉癌、下咽癌、鼻咽癌、口咽癌、唇癌和口癌)、肾癌、肝癌(例如肝细胞癌、胆道细胞癌)、肺癌(例如腺癌、小细胞肺癌和非小细胞肺癌、小细胞和非小细胞癌、支气管癌、支气管腺瘤、胸膜肺母细胞瘤)、卵巢癌、前列腺癌、睾丸癌、子宫癌、食管癌、胆囊癌、胰腺癌(例如外分泌胰腺癌)、胃癌、甲状腺癌、副甲状腺癌、皮肤癌(例如鳞状细胞癌、卡波西氏肉瘤(Kaposi sarcoma)、默克细胞皮肤癌)和脑癌(例如星形细胞瘤、髓母细胞瘤、室管膜瘤、神经外胚层肿瘤、松果体瘤)。

[0226] 可用本公开的治疗方法治疗的其他癌症包括骨癌、眼内癌、妇科癌症、内分泌系统癌症、肾上腺癌、软组织肉瘤、尿道癌、阴茎癌、垂体癌、三阴性乳癌(TNBC)和环境诱发的癌症,包括由石棉诱发的那些。

[0227] 其他实例癌症包括血液恶性病,例如白血病或淋巴瘤、多发性骨髓瘤、慢性淋巴球性淋巴瘤、成人T细胞白血病、B细胞淋巴瘤、皮肤T细胞淋巴瘤、急性骨髓性白血病、霍奇金氏或非霍奇金氏淋巴瘤、骨髓增生性赘瘤(例如真性红细胞增多症、原发性血小板过多症和原发性骨髓纤维化)、华氏巨球蛋白血症(Waldenström's Macroglobulinemia)、毛细胞淋巴瘤、慢性骨髓性淋巴瘤、急性淋巴母细胞性淋巴瘤、AIDS相关的淋巴瘤和伯基特氏淋巴瘤(Burkitt's lymphoma)。

[0228] 可用本公开的治疗方法治疗的其他癌症包括眼肿瘤、神经胶母细胞瘤、黑色素瘤、横纹肌肉瘤、淋巴肉瘤和骨肉瘤。

[0229] 本公开的方法也可用于治疗转移性癌症,尤其表达PD-L1的转移性癌症。

[0230] 在一些实施方案中,可使用本公开的方法治疗的疾病和适应症包括但不限于血液癌、头颈癌、肉瘤、肺癌、胃肠癌、泌尿生殖道癌、肝癌、骨癌、神经系统癌、妇科癌症和皮肤癌。

[0231] 示例性血液癌包括淋巴瘤和白血病,例如急性淋巴母细胞性白血病(ALL)、急性骨髓性白血病(AML)、急性前骨髓细胞性白血病(APL)、慢性淋巴球性白血病(CLL)、小淋巴球性淋巴瘤(SLL)、慢性骨髓性白血病(CML)、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、套细胞淋巴瘤(MCL)、边缘带淋巴瘤(MZL)、非霍奇金氏淋巴瘤(包括复发性或难治性NHL)、滤泡性淋巴瘤(FL)、霍奇金氏淋巴瘤、淋巴母细胞性淋巴瘤、骨髓增生性疾病(例如原发性骨髓纤维化(PMF)、真性红细胞增多症(PV)、原发性血小板增多症(ET))、骨髓发育不良综合征(MDS)、T细胞急性淋巴母细胞性淋巴瘤(T-ALL)、多发性骨髓瘤、皮肤T细胞淋巴瘤、外周T细胞淋巴瘤、华氏巨球蛋白血症、毛细胞淋巴瘤、慢性骨髓性淋巴瘤和伯基特氏淋巴瘤。

[0232] 示例性肉瘤包括软骨肉瘤、尤恩氏肉瘤(Ewing's sarcoma)、骨肉瘤、横纹肌肉瘤、血管肉瘤、纤维肉瘤、脂肪肉瘤、粘液瘤、横纹肌瘤、横纹肌肉瘤、纤维瘤、脂肪瘤、错构瘤和畸胎瘤。

[0233] 示例性肺癌包括非小细胞肺癌(NSCLC)、小细胞肺癌、支气管癌(鳞状细胞腺癌、未分化小细胞腺癌、未分化大细胞腺癌)、肺泡(细支气管)癌、支气管腺瘤、软骨瘤型错构瘤和间皮瘤。

[0234] 示例性胃肠癌包括食管癌(鳞状细胞癌、腺癌、平滑肌肉瘤、淋巴瘤)、胃癌(癌瘤、淋巴瘤、平滑肌肉瘤)、胰腺癌(导管腺癌、胰岛素瘤、胰升糖素瘤、胃泌素瘤、类癌瘤、胰腺瘤)、小肠癌(腺癌、淋巴瘤、类癌瘤、卡波西氏肉瘤、平滑肌瘤、血管瘤、脂肪瘤、神经纤维瘤、纤维瘤)、大肠癌(腺癌、管状腺瘤、绒毛状腺瘤、错构瘤、平滑肌瘤)、结肠直肠癌和胆管癌。

[0235] 示例性泌尿生殖道癌包括肾癌(腺癌、威尔姆氏肿瘤(Wilm's tumor)[肾母细胞瘤]、肾细胞癌)、膀胱和尿道癌(鳞状细胞癌、移行细胞癌、腺癌、尿路上皮癌)、前列腺癌(腺癌、肉瘤)和睾丸癌(精细胞瘤、畸胎瘤、胚癌、畸形癌、绒毛膜癌、肉瘤、间质细胞癌、纤维瘤、纤维腺瘤、腺瘤样肿瘤、脂肪瘤)。

[0236] 示例性肝癌包括肝肿瘤(肝细胞癌)、胆道癌、肝母细胞瘤、血管肉瘤、肝细胞腺瘤和血管瘤。

[0237] 示例性骨癌包括例如成骨肉瘤(骨肉瘤)、纤维肉瘤、恶性纤维性组织细胞瘤、软骨肉瘤、尤恩氏肉瘤、恶性淋巴瘤(网状细胞肉瘤)、多发性骨髓瘤、恶性巨细胞瘤脊索瘤、骨软骨瘤(骨软骨性外生骨疣)、良性软骨瘤、软骨母细胞瘤、软骨粘液样纤维瘤、骨样骨瘤和巨细胞瘤。

[0238] 示例性神经系统癌包括头骨癌(骨瘤、血管瘤、肉芽肿、黄色瘤、畸形性骨炎)、脑膜癌(脑膜瘤、脑膜肉瘤、神经胶瘤病)、脑癌(星形细胞瘤、髓母细胞瘤、神经胶质瘤、室管膜瘤、胚细胞瘤(松果体瘤)、神经胶母细胞瘤、多形性神经胶母细胞瘤、寡树突神经胶质瘤、神经鞘瘤、视网膜母细胞瘤、先天瘤)和脊髓癌(神经纤维瘤、脑膜瘤、神经胶质瘤、肉瘤)以及神经母细胞瘤、莱-杜二氏病(Lhermitte-Duclos disease)、中枢神经系统(CNS)赘瘤、原发性CNS淋巴瘤和脊轴肿瘤。

[0239] 示例性妇科癌症包括子宫癌(子宫内膜癌)、子宫颈癌(宫颈癌、肿瘤前宫颈发育不良)、卵巢癌(卵巢癌瘤(浆液囊腺癌、粘液囊腺癌、未分类癌瘤)、粒膜细胞瘤、支持-间质细胞瘤(Sertoli-Leydig cell tumor)、无性胚胎瘤、恶性畸胎瘤)、阴户癌(鳞状细胞癌、上皮内癌、腺癌、纤维肉瘤、黑色素瘤)、阴道癌(透明细胞癌、鳞状细胞癌、葡萄形肉瘤(胚胎横纹肌肉瘤)和输卵管癌(癌瘤)。

[0240] 示例性皮肤癌包括黑色素瘤、基底细胞癌、鳞状细胞癌、卡波西氏肉瘤、默克细胞皮肤癌、胎块发育不良性痣、脂肪瘤、血管瘤、皮肤纤维瘤和瘢痕瘤。

[0241] 示例性头颈癌包括神经胶母细胞瘤、黑色素瘤、横纹肌肉瘤、淋巴肉瘤、骨肉瘤、鳞状细胞癌、腺癌、口腔癌、喉癌、鼻咽癌、鼻癌和鼻旁癌、甲状腺癌和副甲状腺癌。

[0242] 在一些实施方案中,本公开提供一种用于治疗有需要的患者的肝细胞癌的方法。在一些实施方案中,本公开提供一种用于治疗有需要的患者的横纹肌肉瘤、食管癌、乳癌或头颈癌的方法。

[0243] 在一些实施方案中,本公开提供一种治疗癌症的方法,其中所述癌症是选自肝细胞癌、膀胱癌、乳癌、子宫颈癌、结肠直肠癌、子宫内膜癌、肛门癌、默克细胞癌、胃癌、头颈癌、肾癌、肝癌、肺癌、卵巢癌、前列腺癌、食管癌、胆囊癌、胰腺癌、甲状腺癌、皮肤癌、白血病、多发性骨髓瘤、慢性淋巴球性淋巴瘤、成人T细胞白血病、B细胞淋巴瘤、急性骨髓性白血病、霍奇金氏或非霍奇金氏淋巴瘤、华氏巨球蛋白血症、毛细胞淋巴瘤、伯基特氏淋巴瘤、神经胶母细胞瘤、黑色素瘤和横纹肌肉瘤。

[0244] 在一些实施方案中,本公开提供一种治疗癌症的方法,其中所述癌症是选自肝细胞癌、乳癌、膀胱癌、结肠直肠癌、黑色素瘤、间皮瘤、肺癌、前列腺癌、胰腺癌、睾丸癌、甲状腺癌、鳞状细胞癌、神经胶母细胞瘤、神经母细胞瘤、子宫癌和横纹肌肉瘤。

[0245] 在一些实施方案中,本公开提供一种治疗癌症的方法,其中所述癌症是选自肉瘤、头颈癌、黑色素瘤和非小细胞肺癌。在一些实施方案中,所述癌症是肉瘤。在一些实施方案

中,所述癌症是头颈癌。在一些实施方案中,所述癌症是黑色素瘤。在一些实施方案中,所述癌症是非小细胞肺癌。

[0246] 本文所述的方法涉及癌症(例如实体肿瘤)的治疗。

[0247] 在一些实施方案中,所述实体肿瘤是选自皮肤癌、肺癌、淋巴瘤、肉瘤、膀胱癌、输尿管、尿道和脐尿管癌、胃癌、子宫颈癌、肝癌、乳癌、肾癌、鳞状细胞癌、结肠直肠癌、子宫内膜癌、肛门癌和高度微卫星不稳定性(MSI-H)肿瘤、错配修复缺陷(dMMR)和/或DNA聚合酶 ϵ 核酸外切酶结构域突变阳性疾病。

[0248] 在一些实施方案中,所述实体肿瘤是选自胆道癌、黑色素瘤、非小细胞肺癌、小细胞肺癌、霍奇金氏淋巴瘤、尿路上皮癌胃癌、肝细胞癌、默克细胞癌、三阴性乳癌、肾细胞癌、头颈鳞状细胞癌和结肠直肠癌。

[0249] 在一些实施方案中,所述实体肿瘤是选自肉瘤、头颈癌、黑色素瘤和非小细胞肺癌。在一些实施方案中,所述实体肿瘤是肉瘤。在一些实施方案中,所述实体肿瘤是头颈癌。在一些实施方案中,所述实体肿瘤是黑色素瘤。在一些实施方案中,所述实体肿瘤是非小细胞肺癌。

[0250] 如本文所用,术语“细胞”意图指体外、离体或体内细胞。在一些实施方案中,离体细胞可为从生物体(例如哺乳动物)切除的组织样品的一部分。在一些实施方案中,体外细胞可为细胞培养物中的细胞。在一些实施方案中,体内细胞是生活在生物体(例如哺乳动物)中的细胞。

[0251] 如本文所用,术语“接触”是指将体外系统或体内系统中的所指示部分放在一起。例如,使TAM激酶与化合物1“接触”包括向个体或患者(例如人类)施用化合物1以及例如将化合物1引入含有含TAM激酶的细胞或经纯化制剂的样品中。

[0252] 如本文所用,术语“受试者(subject)”、“个体(individual)”或“患者”可互换使用,是指任何动物,包括哺乳动物,优选小鼠、大鼠、其他啮齿动物、兔、狗、猫、猪、牛、绵羊、马或灵长类动物,并且最优选人类。

[0253] 如本文所用,术语“治疗(treating/treatment)”是指1)抑制疾病;例如,抑制正在经历或展示疾病、疾患或病症的病状或症状的个体的疾病、疾患或病症(即,阻止病状和/或症状的进一步发展),或2)改善疾病;例如,改善正在经历或展示疾病、疾患或病症的病状或症状的个体的疾病、疾患或病症(即,逆转病状和/或症状)。

[0254] 如本文所用,术语“预防(preventing/prevention)”是指预防可能易患疾病、疾患或病症但尚未经历或展示疾病的病状或症状的个体的疾病、疾患或病症。

[0255] 组合疗法

[0256] I. 癌症疗法

[0257] 癌细胞的生长和存活可受多个信号传导途径的功能障碍影响。因此,组合不同酶/蛋白/受体抑制剂以治疗此类疾患是有用的,所述酶/蛋白/受体抑制剂在其调节活性的靶中展现不同偏好。靶向一个以上的信号传导途径(或参与给定信号传导途径的一种以上的生物分子)可降低在细胞群体中产生药物抗性的可能性,和/或降低治疗的毒性。

[0258] 一种或多种其他药剂(例如化学治疗剂、消炎剂、类固醇、免疫抑制剂、肿瘤免疫剂、代谢酶抑制剂、趋化因子受体抑制剂和磷酸酶抑制剂)以及靶向疗法(例如Bcr-Abl、Flt-3、EGFR、HER2、JAK、c-MET、VEGFR、PDGFR、c-Kit、IGF-1R、RAF、FAK、CDK2和CDK4/6激酶抑

制剂,例如WO 2006/056399中所述的那些)可与本公开的治疗方法和方案组合使用来治疗癌症和实体肿瘤。其他剂(例如治疗性抗体)可与本公开的治疗方法和方案组合使用来治疗癌症和实体肿瘤。一种或多种其他药剂可同时或依序施用于患者。

[0259] 如本文所公开的治疗方法可与一种或多种其他酶/蛋白/受体抑制剂疗法组合使用来治疗疾病,例如癌症和本文所述的其他疾病或病症。例如,本公开的治疗方法和方案可与一种或多种以下激酶抑制剂组合来治疗癌症: Akt1、Akt2、Akt3、BCL2、CDK2、CDK4/6、TGF- β R、PKA、PKG、PKC、CaM-激酶、磷酸化酶激酶、MEKK、ERK、MAPK、mTOR、EGFR、HER2、HER3、HER4、INS-R、IDH2、IGF-1R、IR-R、PDGF α R、PDGF β R、PI3K(α 、 β 、 γ 、 δ 和多种或选择性)、CSF1R、KIT、FLK-II、KDR/FLK-1、FLK-4、f1t-1、FGFR1、FGFR2、FGFR3、FGFR4、c-Met、PARP、Ron、Sea、TRKA、TRKB、TRKC、TAM激酶(Axl、Mer、Tyro3)、FLT3、VEGFR/F1t2、F1t4、EphA1、EphA2、EphA3、EphB2、EphB4、Tie2、Src、Fyn、Lck、Fgr、Btk、Fak、SYK、FRK、JAK、ABL、ALK和B-Raf。可与本公开的治疗方法和方案组合治疗癌症的抑制剂的非限制性实例包括FGFR抑制剂(FGFR1、FGFR2、FGFR3或FGFR4,例如培米替尼(pemigatinib, INCY54828)、INCB62079)、EGFR抑制剂(还称为ErB-1或HER-1;例如厄洛替尼(erlotinib)、吉非替尼(gefitinib)、凡德他尼(vandetanib)、奥西替尼(orsimertinib)、西妥昔单抗(cetuximab)、奈昔木单抗(necitumumab)或帕尼单抗(panitumumab))、VEGFR抑制剂或途径阻断剂(例如贝伐珠单抗(bevacizumab)、帕唑帕尼(pazopanib)、舒尼替尼(sunitinib)、索拉菲尼(sorafenib)、阿西替尼(axitinib)、瑞戈非尼(regorafenib)、普纳替尼(ponatinib)、卡博替尼(cabozantinib)、凡德他尼、雷莫芦单抗(ramucirumab)、来瓦替尼(lenvatinib)、ziv-阿柏西普(aflibercept))、PARP抑制剂(例如奥拉帕尼(olaparib)、瑞卡帕尼(rucaparib)、维利帕尼(veliparib)或尼拉帕尼(niraparib))、JAK抑制剂(JAK1和/或JAK2,例如鲁索替尼(ruxolitinib)、巴瑞克替尼(baricitinib)、衣康替尼(itacitinib, INCB39110)、LSD1抑制剂(例如INCB59872和INCB60003)、TDO抑制剂、PI3K- δ 抑制剂(例如INCB50465和INCB50797)、PI3K- γ 抑制剂(例如PI3K- γ 选择性抑制剂)、Pim抑制剂(例如INCB53914)、CSF1R抑制剂、TAM受体酪氨酸激酶(Tyro-3、Axl和Mer)、腺苷受体拮抗剂(例如A2a/A2b受体拮抗剂)、HPK1抑制剂、趋化因子受体抑制剂(例如CCR2或CCR5抑制剂)、SHP1/2磷酸酶抑制剂、组蛋白脱乙酰酶抑制剂(HDAC)(例如HDAC8抑制剂)、血管生成抑制剂、白细胞介素受体抑制剂、溴和额外末端家族成员抑制剂(例如溴结构域抑制剂或BET抑制剂,例如INCB54329和INCB57643)、c-MET抑制剂(例如卡马替尼(capmatinib))、抗CD19抗体(例如他法替他单抗(tafasitamab))、ALK2抑制剂(例如INCB00928);或其组合。

[0260] 在一些实施方案中,本文所述的治疗方法是与施用PI3K δ 抑制剂组合。在一些实施方案中,本文所述的治疗方法是与施用JAK抑制剂组合。在一些实施方案中,本文所述的治疗方法是与施用JAK1或JAK2抑制剂(例如巴瑞克替尼或鲁索替尼)组合。在一些实施方案中,本文所述的治疗方法是与施用JAK1抑制剂组合。在一些实施方案中,本文所述的治疗方法是与施用JAK1抑制剂组合,所述JAK1抑制剂对JAK2具有选择性。

[0261] 可在组合疗法中施用的实例抗体包括但不限于曲妥珠单抗(trastuzumab)(例如抗HER2)、兰尼单抗(ranibizumab)(例如抗VEGF-A)、贝伐珠单抗(AVASTINTM,例如抗VEGF)、帕尼单抗(例如抗EGFR)、西妥昔单抗(例如抗EGFR)、瑞图宣(rituxan)(例如抗CD20)和针对c-MET的抗体。

[0262] 以下剂中的一者或多者可与本公开的治疗方法组合施用于患者并且作为非限制性清单呈现:细胞生长抑制剂、顺铂、多柔比星(doxorubicin)、泰索帝(taxotere)、汰癌胜(taxol)、依托泊苷(etoposide)、伊立替康(irinotecan)、肯托斯塔(camptostar)、托泊替康(topotecan)、太平洋紫杉醇(paclitaxel)、多西他赛(docetaxel)、埃博霉素(epothilone)、他莫昔芬(tamoxifen)、5-氟尿嘧啶、甲氨蝶呤、替莫唑胺(temozolomide)、环磷酰胺、SCH 66336、R115777、L778,123、BMS214662、IRESSA™(吉非替尼)、TARCEVA™(厄洛替尼)、针对EGFR的抗体、内含子、ara-C、阿霉素(adriamycin)、癌得星(cytoxan)、吉西他滨(gemcitabine)、尿嘧啶氮芥、甲川氯(chlormethine)、异环磷酰胺、美法仑(melphalan)、氮芥苯丁酸(chlorambucil)、哌血生(pipobroman)、三乙烯三聚氰胺、三乙烯硫代磷酰胺、白消安(busulfan)、卡莫司汀(carmustine)、洛莫司汀(lomustine)、链脲霉素(streptozocin)、达喀尔巴嗪(dacarbazine)、氟尿苷(floxuridine)、阿糖胞苷(cytarabine)、6-巯基嘌呤、6-巯鸟嘌呤、磷酸氟达拉滨(fludarabine phosphate)、奥沙利铂(oxaliplatin)、甲酰四氢叶酸(leucovorin)、ELOXATIN™(奥沙利铂)、喷司他丁(pentostatine)、长春碱(vinblastine)、长春新碱(vincristine)、长春地辛(vindesine)、博来霉素(bleomycin)、放线菌素D(dactinomycin)、道诺霉素(daunorubicin)、多柔比星、泛艾霉素(epirubicin)、伊达比星(idarubicin)、光辉霉素(mithramycin)、脱氧助间型霉素(deoxycoformycin)、丝裂霉素(mitomycin)-C、L-天冬酰胺酶、替尼泊苷(teniposide) 17.α.-炔雌醇、乙烯雌酚、睾固酮(testosterone)、普赖松(Prednisone)、氟甲睾固酮、丙酸屈他雄酮(Dromostanolone propionate)、睾(testolactone)、乙酸甲地孕酮(megestrolacetate)、甲基普赖苏浓(methylprednisolone)、甲基睾固酮、普赖苏浓、安西诺隆(triamcinolone)、氯烯雌醚(chlorotrianisene)、羟基助孕酮、胺鲁米特(aminoglutethimide)、雌氮芥(estramustine)、乙酸甲羟孕酮、柳培林(leuprolide)、氟他胺(flutamide)、托瑞米芬(toremifene)、戈舍瑞林(goserelin)、卡铂、羟基脲、安丫啶(amsacrine)、丙卡巴肼(procarbazine)、米托坦(mitotane)、米托蒽醌(mitoxantrone)、左旋咪唑(levamisole)、诺维本(navelbene)、阿那曲唑(anastrozole)、来曲唑(letrozole)、卡培他滨(capecitabine)、雷洛昔芬(reloxafine)、屈洛昔芬(droloxafine)、六甲蜜胺、癌思停、HERCEPTIN™(曲妥珠单抗)、BEXXAR™(托西莫单抗(tositumomab))、VELCADE™(硼替佐米(bortezomib))、ZEVALIN™(替伊莫单抗(ibritumomab tiuxetan))、TRISENOX™(三氧化砷)、XELODA™(卡培他滨)、长春瑞滨(vinorelbine)、吡吩姆(porfimer)、ERBITUX™(西妥昔单抗)、塞替派(thiotepa)、六甲蜜胺(altretamine)、美法仑、曲妥珠单抗、来曲唑、氟维司群(fulvestrant)、依西美坦(exemestane)、异环磷酰胺、利妥昔单抗(rituximab)、C225(西妥昔单抗)、坎帕斯(Campath)(阿伦珠单抗(alemtuzumab))、氯法拉滨(clofarabine)、克拉屈滨(cladribine)、艾弗迪隆(aphidicolon)、瑞图宣、舒尼替尼、达沙替尼(dasatinib)、替扎他滨(tezacitabine)、Sml1、氟达拉滨(fludarabine)、喷司他丁、曲安呼(triapine)、地多西(didox)、曲美多(trimidox)、艾米多西(amidox)、3-AP和MDL-101,731。

[0263] 本公开的治疗方法和方案可进一步与其他治疗癌症的方法(例如通过化学疗法、照射疗法、肿瘤靶向疗法、辅助疗法、免疫疗法或手术)组合使用。免疫疗法的实例包括细胞因子治疗(例如干扰素、GM-CSF、G-CSF、IL-2)、CRS-207免疫疗法、癌症疫苗、单克隆抗体、双特异性或多特异性抗体、抗体药物缀合物、过继性T细胞转移、Toll受体促效剂、RIG-I促效

剂、溶瘤病毒疗法和免疫调节小分子,包括雷利窦迈 (thalidomide) 或JAK1/2抑制剂、PI3K δ 抑制剂等。所述化合物可与一种或多种抗癌药物(例如化学治疗剂)组合施用。化学治疗剂的实例包括以下任一者:阿巴瑞克 (abarelix)、阿地白介素 (aldesleukin)、阿伦珠单抗、阿曲诺英 (alitretinoin)、别嘌呤醇、六甲蜜胺、阿那曲唑 (anastrozole)、三氧化砷、天冬酰胺酶、阿扎胞苷 (azacitidine)、贝伐珠单抗、贝沙罗汀 (bexarotene)、巴瑞克替尼、博来霉素、硼替佐米、白消安静脉内、口服白消安、卡普睾酮 (calusterone)、卡培他滨、卡铂、卡莫司汀、西妥昔单抗、氮芥苯丁酸、顺铂、克拉屈滨、氟达拉滨、环磷酰胺、阿糖胞苷、达喀尔巴嗪、放线菌素D、达肝素钠 (dalteparin sodium)、达沙替尼、道诺霉素、地西他滨 (decitabine)、地尼白细胞介素 (denileukin)、地尼白细胞介素2 (denileukin diftitox)、右雷佐生 (dexrazoxane)、多西他赛、多柔比星、丙酸屈他雄酮、依库株单抗 (eculizumab)、爱帕司他 (epacadostat)、泛艾霉素、厄洛替尼、雌氮芥、磷酸依托泊苷、依托泊苷、依西美坦、乙酸芬太尼 (fentanyl citrate)、非格司亭 (filgrastim)、氟尿苷、氟达拉滨、氟尿嘧啶、氟维司群、吉非替尼、吉西他滨、吉妥珠单抗奥佐米星 (gemtuzumab ozogamicin)、乙酸戈舍瑞林、乙酸组胺瑞林 (histrelin acetate)、替伊莫单抗、伊达比星、异环磷酰胺、甲磺酸伊马替尼 (imatinib mesylate)、干扰素 α 2a、伊立替康、二甲苯磺酸拉帕替尼 (lapatinib ditosylate)、雷利窦迈、来曲唑、甲酰四氢叶酸、乙酸柳培林、左旋咪唑、洛莫司汀、二氯甲基二乙胺、乙酸甲地孕酮、美法仑、巯基嘌呤、甲氨蝶呤、甲氧沙林 (methoxsalen)、丝裂霉素C、米托坦、米托蒽醌、苯丙酸诺龙 (nandrolone phenpropionate)、奈拉滨 (nelarabine)、诺莫单抗 (nofetumomab)、奥沙利铂、太平洋紫杉醇、帕米磷酸盐 (pamidronate)、帕尼单抗、培门冬酶 (pegaspargase)、培非格司亭 (pegfilgrastim)、培美曲塞二钠 (pemetrexed disodium)、喷司他丁、哌血生、普卡霉素 (plicamycin)、丙卡巴肼、奎那克林 (quinacrine)、拉布立酶 (rasburicase)、利妥昔单抗、鲁索替尼、索拉菲尼、链脲霉素、舒尼替尼、舒尼替尼马来酸盐、他莫昔芬、替莫唑胺、替尼泊苷、睾、雷利窦迈、硫鸟嘌呤、塞替派、托泊替康、托瑞米芬、托西莫单抗、曲妥珠单抗、维A酸 (tretinoin)、尿嘧啶氮芥、戊柔比星 (valrubicin)、长春碱、长春新碱、长春瑞滨、伏立诺他 (vorinostat) 和唑来膦酸盐 (zoledronate)。

[0264] 化学治疗剂的其他实例包括蛋白酶体抑制剂(例如硼替佐米)、雷利窦迈、雷利米得 (revlimid) 和DNA损伤剂,例如美法仑、多柔比星、环磷酰胺、长春新碱、依托泊苷、卡莫司汀等。

[0265] 实例类固醇包括皮质类固醇,例如地塞米松 (dexamethasone) 或普赖松。

[0266] 实例Bcr-Abl抑制剂包括甲磺酸伊马替尼 (GLEEVACTM)、尼罗替尼 (nilotinib)、达沙替尼、伯舒替尼 (bosutinib) 和普纳替尼以及药学上可接受的盐。合适Bcr-Abl抑制剂的其他实例包括美国专利号5,521,184、WO 04/005281和美国专利号60/578,491中所公开的属和种的化合物和其药学上可接受的盐。

[0267] 合适Flt-3抑制剂的实例包括米哌妥林 (midostaurin)、来他替尼 (lestaurtinib)、利尼伐尼 (linifanib)、舒尼替尼、马来酸舒尼替尼、索拉菲尼、奎扎替尼 (quizartinib)、克莱拉尼 (crenolanib)、帕利替尼 (pacritinib)、坦度替尼 (tandutinib)、PLX3397和ASP2215以及其药学上可接受的盐。合适Flt-3抑制剂的其他实例包括如WO 03/037347、WO 03/099771和WO 04/046120中所公开的化合物和其药学上可接受的盐。

[0268] 合适RAF抑制剂的实例包括达拉菲尼 (dabrafenib)、索拉菲尼和威罗菲尼

(vemurafenib) 以及其药学上可接受的盐。合适RAF抑制剂的其他实例包括如WO 00/09495和WO 05/028444中所公开的化合物和其药学上可接受的盐。

[0269] 合适FAK抑制剂的实例包括VS-4718、VS-5095、VS-6062、VS-6063、BI853520和GSK2256098以及其药学上可接受的盐。合适FAK抑制剂的其他实例包括如WO 04/080980、WO 04/056786、WO 03/024967、WO 01/064655、WO 00/053595和WO 01/014402中所公开的化合物和其药学上可接受的盐。

[0270] 合适CDK4/6抑制剂的实例包括帕博西尼 (palbociclib)、瑞博西利 (ribociclib)、曲拉西利 (trilaciclib)、来罗西利 (lerociclib) 和阿贝西利 (abemaciclib) 以及其药学上可接受的盐。合适CDK4/6抑制剂的其他实例包括如WO 09/085185、WO 12/129344、WO 11/101409、WO 03/062236、WO 10/075074和WO 12/061156中所公开的化合物和其药学上可接受的盐。

[0271] 在一些实施方案中,本公开的化合物可与一种或多种其他激酶抑制剂(包括伊马替尼)组合使用,尤其用来治疗对伊马替尼或其他激酶抑制剂有抗性的患者。

[0272] 在一些实施方案中,本公开的治疗方法可与化学治疗剂组合使用来治疗癌症,并且与单独化学治疗剂的反应相比可改进治疗反应,而不加重其毒性效应。在一些实施方案中,本公开的治疗方法可与本文所提供的化学治疗剂组合使用。例如,用于治疗多发性骨髓瘤的额外药剂可包括但不限于美法仑、美法仑加普赖松[MP]、多柔比星、地塞米松和万珂 (Velcade) (硼替佐米)。用于治疗多发性骨髓瘤的其他额外剂包括Bcr-Abl、Flt-3、RAF和FAK激酶抑制剂。在一些实施方案中,所述剂是烷基化剂、蛋白酶体抑制剂、皮质类固醇或免疫调节剂。烷基化剂的实例包括环磷酰胺 (CY)、美法仑 (MEL) 和苯达莫司汀 (bendamustine)。在一些实施方案中,蛋白酶体抑制剂是卡非佐米 (carfilzomib)。在一些实施方案中,皮质类固醇是地塞米松 (DEX)。在一些实施方案中,免疫调节剂是雷利塞迈 (LEN) 或泊马度胺 (pomalidomide, POM)。相加或协同效应是组合本公开的治疗方法与另一剂的期望结果。

[0273] 所述剂可以单一或连续剂型与本治疗方法的化合物1和/或结合至人类PD-1或人类PD-L1的抗体或其抗原结合片段组合,或所述剂可作为单独剂型同时或依序施用。

[0274] 在一些实施方案中,皮质类固醇(例如地塞米松)是与本公开的治疗方法组合施用于患者,其中地塞米松是以与连续方式相反的间歇性方式施用。

[0275] 本文所述的治疗方法可与另一免疫原性剂(例如癌性细胞、经纯化的肿瘤抗原(包括重组蛋白、肽和碳水化合物分子)、细胞和经编码免疫刺激细胞因子的基因转染的细胞)组合。可用肿瘤疫苗的非限制性实例包括黑色素瘤抗原的肽,例如gp100、MAGE抗原、Trp-2、MARTI和/或酪氨酸酶的肽或经转染以表达细胞因子GM-CSF的肿瘤细胞。

[0276] 本文所述的治疗方法可与疫苗接种方案组合使用来治疗癌症。在一些实施方案中,肿瘤细胞经转导以表达GM-CSF。在一些实施方案中,肿瘤疫苗包括来自参与人类癌症的病毒(例如人类乳头瘤病毒 (HPV)、肝炎病毒 (HBV和HCV) 和卡波西氏疱疹肉瘤病毒 (KHSV)) 的蛋白质。在一些实施方案中,本公开的治疗方法和方案可与肿瘤特异性抗原(例如从肿瘤组织自身分离的热休克蛋白)组合使用。在一些实施方案中,本文所述的治疗方法可与树突状细胞免疫组合来活化强效抗肿瘤反应。

[0277] 本公开的治疗方法和方案可与使表达 $Fe\alpha$ 或 $Fe\gamma$ 受体的效应细胞靶向肿瘤细胞的

双特异性大环肽组合使用。本公开的治疗方法和方案也可与活化宿主免疫反应性的大环肽组合。

[0278] 在一些其他实施方案中,本公开的治疗方法是与在骨髓移植或干细胞移植之前、期间和/或之后向患者施用其他治疗剂组合。本公开的治疗方法和方案可与骨髓移植组合使用来治疗多种造血来源的肿瘤。

[0279] 如上文实施方案中的任一者所论述,当向患者施用一种以上的药剂时,其可同时、单独、依序或组合施用(例如对于两种以上的剂)。

[0280] 安全并且有效地施用大多数的这些化学治疗剂的方法为本领域技术人员已知。另外,其施用描述于标准文献中。例如,许多化学治疗剂的施用描述于“Physicians’ Desk Reference”(PDR,例如1996版,Medical Economics Company, Montvale, NJ)中,所述文献的公开内容以引用的方式并入本文中,就如同全文阐释一般。

[0281] II. 免疫检查点疗法

[0282] 本公开的化合物(化合物1或其药学上可接受的盐)可与一种或多种免疫检查点抑制剂组合使用来治疗疾病,例如癌症或感染。示例性免疫检查点抑制剂包括针对免疫检查点分子(例如CBL-B、CD20、CD28、CD40、CD70、CD122、CD96、CD73、CD47、CDK2、GITR、CSF1R、JAK、PI3K δ 、PI3K γ 、TAM、精氨酸酶、HPK1、CD137(还称为4-1BB)、ICOS、A2AR、B7-H3、B7-H4、BTLA、CTLA-4、LAG3、TIM3、TLR(TLR7/8)、TIGIT、CD112R、VISTA、PD-1、PD-L1和PD-L2)的抑制剂。在一些实施方案中,免疫检查点分子是选自CD27、CD28、CD40、ICOS、OX40、GITR和CD137的刺激性检查点分子。在一些实施方案中,免疫检查点分子是选自A2AR、B7-H3、B7-H4、BTLA、CTLA-4、IDO、KIR、LAG3、PD-1、TIM3、TIGIT和VISTA的抑制性检查点分子。在一些实施方案中,本文提供的化合物可与一种或多种选自以下的剂组合使用:KIR抑制剂、TIGIT抑制剂、LAIR1抑制剂、CD160抑制剂、2B4抑制剂和TGFR β 抑制剂。

[0283] 在一些实施方案中,本文提供的化合物可与免疫检查点分子(例如,OX40、CD27、GITR和CD137(还称为4-1BB))的一种或多种促效剂组合使用。

[0284] 在一些实施方案中,免疫检查点分子的抑制剂是抗PD1抗体、抗PD-L1抗体或抗CTLA-4抗体。

[0285] 在一些实施方案中,免疫检查点分子的抑制剂是PD-1或PD-L1的抑制剂,例如抗PD-1或抗PD-L1单克隆抗体。在一些实施方案中,抗PD-1或抗PD-L1抗体是尼沃鲁单抗(nivolumab)、派姆单抗(pembrolizumab)、阿替珠单抗(atenzolizumab)、德瓦鲁单抗(durvalumab)、阿维鲁单抗(avelumab)、西米普利单抗(cemiplimab)、阿替珠单抗、阿维鲁单抗、替雷利珠单抗(tislelizumab)、司帕珠单抗(spartalizumab, PDR001)、西妥利单抗(cetrelimab, JNJ-63723283)、特瑞普利单抗(toripalimab, JS001)、卡瑞利珠单抗(camrelizumab, SHR-1210)、信迪利单抗(sintilimab, IBI308)、AB122(GLS-010)、AMP-224、AMP-514/MEDI-0680、BMS936559、JTX-4014、BGB-108、SHR-1210、MEDI4736、FAZ053、BCD-100、KN035、CS1001、BAT1306、LZM009、AK105、HLX10、SHR-1316、CBT-502(TQB2450)、A167(KL-A167)、STI-A101(ZKAB001)、CK-301、BGB-A333、MSB-2311、HLX20、TSR-042或LY3300054。在一些实施方案中,PD-1或PD-L1的抑制剂是以下专利中所公开的一者:美国专利号7,488,802、7,943,743、8,008,449、8,168,757、8,217,149或10,308,644;美国公布号2017/0145025、2017/0174671、2017/0174679、2017/0320875、2017/0342060、2017/

0362253、2018/0016260、2018/0057486、2018/0177784、2018/0177870、2018/0179179、2018/0179201、2018/0179202、2018/0273519、2019/0040082、2019/0062345、2019/0071439、2019/0127467、2019/0144439、2019/0202824、2019/0225601、2019/0300524或2019/0345170；或PCT公布号WO 03042402、WO 2008156712、WO 2010089411、WO 2010036959、WO 2011066342、WO 2011159877、WO 2011082400或WO 2011161699，所述专利的全文各自以引用的方式并入本文中。在一些实施方案中，PD-L1的抑制剂是INCB086550。

[0286] 在一些实施方案中，所述抗体是抗PD-1抗体，例如抗PD-1单克隆抗体。在一些实施方案中，抗PD-1抗体是尼沃鲁单抗、派姆单抗、西米普利单抗、斯巴达珠单抗、卡瑞利珠单抗、西妥利单抗、特瑞普利单抗、信迪利单抗、AB122、AMP-224、JTX-4014、BGB-108、BCD-100、BAT1306、LZM009、AK105、HLX10或TSR-042。在一些实施方案中，抗PD-1抗体是尼沃鲁单抗、派姆单抗、西米普利单抗、斯巴达珠单抗、卡瑞利珠单抗、西妥利单抗、特瑞普利单抗或信迪利单抗。在一些实施方案中，抗PD-1抗体是派姆单抗。在一些实施方案中，抗PD-1抗体是尼沃鲁单抗。在一些实施方案中，抗PD-1抗体是西米普利单抗。在一些实施方案中，抗PD-1抗体是斯巴达珠单抗。在一些实施方案中，抗PD-1抗体是卡瑞利珠单抗。在一些实施方案中，抗PD-1抗体是西妥利单抗。在一些实施方案中，抗PD-1抗体是特瑞普利单抗。在一些实施方案中，抗PD-1抗体是信迪利单抗。在一些实施方案中，抗PD-1抗体是AB122。在一些实施方案中，抗PD-1抗体是AMP-224。在一些实施方案中，抗PD-1抗体是JTX-4014。在一些实施方案中，抗PD-1抗体是BGB-108。在一些实施方案中，抗PD-1抗体是BCD-100。在一些实施方案中，抗PD-1抗体是BAT1306。在一些实施方案中，抗PD-1抗体是LZM009。在一些实施方案中，抗PD-1抗体是AK105。在一些实施方案中，抗PD-1抗体是HLX10。在一些实施方案中，抗PD-1抗体是TSR-042。在一些实施方案中，抗PD-1单克隆抗体是尼沃鲁单抗或派姆单抗。在一些实施方案中，抗PD1抗体是SHR-1210。其他抗癌剂包括抗体治疗剂，例如4-1BB（例如乌瑞鲁单抗（urelumab）、乌托米单抗（utomilumab））。在一些实施方案中，免疫检查点分子的抑制剂是PD-L1的抑制剂，例如抗PD-L1单克隆抗体。在一些实施方案中，抗PD-L1单克隆抗体是阿替珠单抗、阿维鲁单抗、德瓦鲁单抗、替雷利珠单抗、BMS-935559、MEDI4736、阿替珠单抗（MPDL3280A；还称为RG7446）、阿维鲁单抗（MSB0010718C）、FAZ053、KN035、CS1001、SHR-1316、CBT-502、A167、STI-A101、CK-301、BGB-A333、MSB-2311、HLX20或LY3300054。在一些实施方案中，抗PD-L1抗体是阿替珠单抗、阿维鲁单抗、德瓦鲁单抗或替雷利珠单抗。在一些实施方案中，抗PD-L1抗体是阿替珠单抗。在一些实施方案中，抗PD-L1抗体是阿维鲁单抗。在一些实施方案中，抗PD-L1抗体是德瓦鲁单抗。在一些实施方案中，抗PD-L1抗体是替雷利珠单抗。在一些实施方案中，抗PD-L1抗体是BMS-935559。在一些实施方案中，抗PD-L1抗体是MEDI4736。在一些实施方案中，抗PD-L1抗体是FAZ053。在一些实施方案中，抗PD-L1抗体是KN035。在一些实施方案中，抗PD-L1抗体是CS1001。在一些实施方案中，抗PD-L1抗体是SHR-1316。在一些实施方案中，抗PD-L1抗体是CBT-502。在一些实施方案中，抗PD-L1抗体是A167。在一些实施方案中，抗PD-L1抗体是STI-A101。在一些实施方案中，抗PD-L1抗体是CK-301。在一些实施方案中，抗PD-L1抗体是BGB-A333。在一些实施方案中，抗PD-L1抗体是MSB-2311。在一些实施方案中，抗PD-L1抗体是HLX20。在一些实施方案中，抗PD-L1抗体是LY3300054。

[0287] 在一些实施方案中，免疫检查点分子的抑制剂是结合至PD-L1的小分子，或其药学

上可接受的盐。在一些实施方案中,免疫检查点分子的抑制剂是结合至PD-L1并且内化PD-L1的小分子,或其药学上可接受的盐。在一些实施方案中,免疫检查点分子的抑制剂是选自US 2018/0179201、US 2018/0179197、US 2018/0179179、US 2018/0179202、US 2018/0177784、US 2018/0177870、美国专利号16/369,654(2019年3月29日提交)和美国专利号62/688,164中的那些化合物的化合物,或其药学上可接受的盐,所述专利各自以引用的方式全文并入本文中。

[0288] 在一些实施方案中,免疫检查点分子的抑制剂是KIR、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4和TGFR β 的抑制剂。

[0289] 在一些实施方案中,所述抑制剂是MCLA-145。

[0290] 在一些实施方案中,免疫检查点分子的抑制剂是CTLA-4的抑制剂,例如抗CTLA-4抗体。在一些实施方案中,抗CTLA-4抗体是伊匹单抗(ipilimumab)、曲美目单抗(tremelimumab)、AGEN1884或CP-675,206。

[0291] 在一些实施方案中,免疫检查点分子的抑制剂是LAG3的抑制剂,例如抗LAG3抗体。在一些实施方案中,抗LAG3抗体是BMS-986016、LAG525、INCAGN2385或依氟拉莫德(eftilagimod) α (IMP321)。

[0292] 在一些实施方案中,免疫检查点分子的抑制剂是CD73的抑制剂。在一些实施方案中,CD73的抑制剂是奥来单抗(oleclumab)。

[0293] 在一些实施方案中,免疫检查点分子的抑制剂是TIGIT的抑制剂。在一些实施方案中,TIGIT的抑制剂是OMP-31M32。

[0294] 在一些实施方案中,免疫检查点分子的抑制剂是VISTA的抑制剂。在一些实施方案中,VISTA的抑制剂是JNJ-61610588或CA-170。

[0295] 在一些实施方案中,免疫检查点分子的抑制剂是B7-H3的抑制剂。在一些实施方案中,B7-H3的抑制剂是恩妥珠单抗(enoblituzumab)、MGD009或8H9。

[0296] 在一些实施方案中,免疫检查点分子的抑制剂是KIR的抑制剂。在一些实施方案中,KIR的抑制剂是利利单抗(lirilumab)或IPH4102。

[0297] 在一些实施方案中,免疫检查点分子的抑制剂是A2aR的抑制剂。在一些实施方案中,A2aR的抑制剂是CPI-444。

[0298] 在一些实施方案中,免疫检查点分子的抑制剂是TGF- β 的抑制剂。在一些实施方案中,TGF- β 的抑制剂是曲贝德生(trabedersen)、加鲁替尼(galusertinib)或M7824。

[0299] 在一些实施方案中,免疫检查点分子的抑制剂是PI3K- γ 的抑制剂。在一些实施方案中,PI3K- γ 的抑制剂是IPI-549。

[0300] 在一些实施方案中,免疫检查点分子的抑制剂是CD47的抑制剂。在一些实施方案中,CD47的抑制剂是Hu5F9-G4或TTI-621。

[0301] 在一些实施方案中,免疫检查点分子的抑制剂是CD73的抑制剂。在一些实施方案中,CD73的抑制剂是MEDI9447。

[0302] 在一些实施方案中,免疫检查点分子的抑制剂是CD70的抑制剂。在一些实施方案中,CD70的抑制剂是库萨土珠单抗(cusatuzumab)或BMS-936561。

[0303] 在一些实施方案中,免疫检查点分子的抑制剂是TIM3的抑制剂,例如抗TIM3抗体。在一些实施方案中,抗TIM3抗体是INCAGN2390、MBG453或TSR-022。

[0304] 在一些实施方案中,免疫检查点分子的抑制剂是CD20的抑制剂,例如抗CD20抗体。在一些实施方案中,抗CD20抗体是奥妥珠单抗(obinutuzumab)或利妥昔单抗。

[0305] 在一些实施方案中,免疫检查点分子的促效剂是OX40、CD27、CD28、GITR、ICOS、CD40、TLR7/8和CD137(还称为4-1BB)的促效剂。

[0306] 在一些实施方案中,CD137的促效剂是乌瑞鲁单抗。在一些实施方案中,CD137的促效剂是乌托米单抗。

[0307] 在一些实施方案中,免疫检查点分子的促效剂是GITR的抑制剂。在一些实施方案中,GITR的促效剂是TRX518、MK-4166、INCAGN1876、MK-1248、AMG228、BMS-986156、GWN323、MEDI1873或MEDI6469。在一些实施方案中,免疫检查点分子的促效剂是OX40的促效剂,例如OX40促效剂抗体或OX40L融合蛋白。在一些实施方案中,抗OX40抗体是INCAGN01949、MEDI0562(他瓦利单抗(tavolimab))、MOXR-0916、PF-04518600、GSK3174998、BMS-986178或9B12。在一些实施方案中,OX40L融合蛋白是MEDI6383。

[0308] 在一些实施方案中,免疫检查点分子的促效剂是CD40的促效剂。在一些实施方案中,CD40的促效剂是CP-870893、ADC-1013、CDX-1140、SEA-CD40、R07009789、JNJ-64457107、APX-005M或Chi Lob 7/4。

[0309] 在一些实施方案中,免疫检查点分子的促效剂是ICOS的促效剂。在一些实施方案中,ICOS的促效剂是GSK-3359609、JTX-2011或MEDI-570。

[0310] 在一些实施方案中,免疫检查点分子的促效剂是CD28的促效剂。在一些实施方案中,CD28的促效剂是特雷珠单抗(theralizumab)。

[0311] 在一些实施方案中,免疫检查点分子的促效剂是CD27的促效剂。在一些实施方案中,CD27的促效剂是瓦利鲁单抗(varlilumab)。

[0312] 在一些实施方案中,免疫检查点分子的促效剂是TLR7/8的促效剂。在一些实施方案中,TLR7/8的促效剂是MEDI9197。

[0313] 本公开的化合物可与双特异性抗体组合使用。在一些实施方案中,双特异性抗体的结构域的一靶向PD-1、PD-L1、CTLA-4、GITR、OX40、TIM3、LAG3、CD137、ICOS、CD3或TGFβ受体。在一些实施方案中,双特异性抗体结合至PD-1和PD-L1。在一些实施方案中,结合至PD-1和PD-L1的双特异性抗体是MCLA-136。在一些实施方案中,双特异性抗体结合至PD-L1和CTLA-4。在一些实施方案中,结合至PD-L1和CTLA-4的双特异性抗体是AK104。

[0314] 在一些实施方案中,本公开的化合物可与一种或多种代谢酶抑制剂组合使用。在一些实施方案中,所述代谢酶抑制剂是ID01、TD0或精氨酸酶的抑制剂。ID01抑制剂的实例包括爱帕司他、NLG919、BMS-986205、PF-06840003、IOM2983、RG-70099和LY338196。精氨酸酶抑制剂的抑制剂包括INCB1158。

[0315] 如通篇所提供,额外化合物、抑制剂、剂等可以单一或连续剂型与本发明化合物组合,或它们可作为单独剂型同时或依序施用。

[0316] 药物组合物

[0317] 在一些实施方案中,化合物1或其药学上可接受的盐可配制为药物组合物的一部分。在一些实施方案中,结合至人类PD-1或人类PD-L1的抗体可配制为药物组合物的一部分。包含本文所述的化合物和结合至人类PD-1或人类PD-L1的抗体或其抗原结合片段的药物组合物可配制为药物组合物以施用于受试者,例如来治疗本文所述的病症。通常,药物组

合物包括药学上可接受的载体。如本文所用,“药学上可接受的载体”包括生理学上可相容的任何和所有溶剂、分散介质、包衣、抗细菌和抗真菌剂、等渗和延迟吸收剂等。设施组合物可包括药学上可接受的盐,例如酸加成盐或碱加成盐(参见例如Berge,S.M.等人.(1977) J.Pharm.Sci.66:1-19)。

[0318] 药物配制是充分建立的技术,并且进一步描述于例如Gennaro(编辑),Remington: The Science and Practice of Pharmacy,第20版,Lippincott,Williams&Wilkins(2000)(ISBN:0683306472);Ansel等人,Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems,第7版,Lippincott Williams&Wilkins Publishers(1999)(ISBN:0683305727);和Kibbe(编辑),Handbook of Pharmaceutical Excipients American Pharmaceutical Association,第3版(2000)(ISBN:091733096X)中。

[0319] 药物组合物可呈多种形式。这些形式包括例如液体、半固体和固体剂型,例如液体溶液(例如可注射和可输注溶液)、分散液或悬浮液、片剂、丸剂、散剂、脂质体和栓剂。优选形式可视预期施用模式和治疗应用而定。通常,本文所述的剂的组合物是呈可注射或可输注溶液的形式。

[0320] 所述组合物可配制为溶液、微乳液、分散液、脂质体或适于以高浓度稳定存储的其他有序结构。无菌可注射溶液可通过根据需要将所需量的本文所述的剂与上文所列举的一种成分或成分的组合一起并入适当溶剂中、然后无菌过滤来制备。通常,分散液是通过将本文所述的剂并入含有碱性分散介质和来自上文所列举成分的所需其他成分的无菌媒剂中来制备。在用于制备无菌可注射溶液的无菌粉末的情形下,优选制备方法是真空干燥和冷冻干燥,产生本文所述的剂加上来自其先前的无菌过滤溶液的任何额外期望成分的粉末。可例如通过使用包衣(例如卵磷脂)、在分散液的情形下通过维持所需粒径和通过使用表面活性剂来维持溶液的适当流动性。可注射组合物的延长吸收可通过将延迟吸收的剂(例如单硬脂酸盐和明胶)并入组合物中来达成。

[0321] 在某些实施方案中,结合至人类PD-1或人类PD-L1的抗体或其抗原结合片段可使用将保护化合物免于快速释放的载体来制备,例如受控释放制剂,包括植入物和微囊化递送系统。可使用生物可降解、生物相容性聚合物,例如乙烯乙酸乙烯酯、聚酸酐、聚乙醇酸、胶原蛋白、聚原酸酯和聚乳酸。许多制备此类制剂的方法已取得专利权或通常为已知的。参见例如Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems,J.R.Robinson编辑,Marcel Dekker,Inc.,New York(1978)。

[0322] 在一些实施方案中,所述化合物是配制为还包含至少一种赋形剂的药物组合物的一部分。

[0323] 在一些实施方案中,在制造本文所提供的组合物中,将所述化合物与赋形剂混合,用赋形剂稀释或以例如胶囊、药囊、纸或其他容器的形式封闭于此类载体内。当赋形剂用作稀释剂时,其可为固体、半固体或液体材料,用作活性成分的媒剂、载体或介质。因此,所述组合物可呈以下形式:片剂、丸剂、散剂、口含锭、药囊、扁囊剂、酞剂、悬浮液、乳液、溶液、糖浆、气溶胶(呈固体形式或在液体介质中)、含有例如至多10重量%活性化合物的软膏、软和硬明胶胶囊、栓剂、无菌可注射溶液和无菌包装的散剂。

[0324] 在一些实施方案中,本文所述的药物组合物是呈片剂形式。

[0325] 在制备制剂时,可研磨所述化合物以在与其它成分合并之前提供适当粒径。在一

些实施方案中,可将所述化合物研磨成小于200目的粒径。在一些实施方案中,可通过研磨来调整粒径以提供制剂中大体上均匀的分布,例如约40目。

[0326] 合适赋形剂的一些实例包括乳糖、右旋糖、蔗糖、山梨醇、甘露醇、淀粉、阿拉伯树胶、磷酸钙、褐藻酸盐、黄蓍胶、明胶、硅酸钙、微晶纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、纤维素、水、糖浆和甲基纤维素。所述制剂可另外包括:润滑剂,例如滑石、硬脂酸镁和矿物油;润湿剂;乳化和悬浮剂;防腐剂,例如羟基苯甲酸甲酯和羟基苯甲酸丙酯;甜味剂;和矫味剂。本文所提供的组合物可经配制以在通过采用本领域中已知的程序施用于患者后提供活性成分的快速、持续或延迟释放。

[0327] 所述组合物可以单位剂型配制。术语“单位剂型”是指合适作为人类受试者和其他哺乳动物的单位剂量的物理离散单位,各单位含有经计算以产生期望治疗效应(例如期望PK概况)的预定量的化合物以及合适药物赋形剂。

[0328] 在某些实施方案中,为制备固体组合物(例如片剂),将所述化合物与药物赋形剂混合以形成含有所述化合物的均质混合物的固体预配制组合物。当提及这些预配制组合物为均质时,所述化合物通常均匀分散于整个组合物中,以使得所述组合物可容易地细分成同样有效的单位剂型,例如片剂、丸剂和胶囊。这一固体预配制物然后细分成单位剂型。

[0329] 本公开的片剂或丸剂可包覆包衣或以其他方式进行混配以提供给予延长作用的优势的剂型。例如,所述片剂或丸剂可包含内部剂量组分和外部剂量组分,后者呈前者上的包膜形式。所述两种组分可由肠溶层分开,所述肠溶层用于抵抗胃中的崩解并且允许内部组分完整地进入十二指肠中或延迟释放。多种材料可用于此类肠溶层或包衣,此类材料包括多种聚合酸和聚合酸与诸如虫胶、鲸蜡醇和乙酸钠纤维素的材料的混合物。

[0330] 其中可并入本文所述的组合物以进行口服施用的液体形式包括水溶液,合适地矫味糖浆、水性或油性悬浮液和矫味乳液以及可食用油(例如棉籽油、芝麻油、椰子油或花生油)以及酞剂和类似药物媒剂。

[0331] 在一些实施方案中,本文所述的组合物是通过常规灭菌技术来灭菌,或可无菌过滤。水溶液可经包装以原样使用,或冻干,冻干制剂在施用之前与无菌水性载体组合。所述化合物制剂的pH通常将介于3与11之间,更优选介于5至9之间并且最优选介于7至8之间。应理解,使用前述赋形剂、载体或稳定剂中的某一者将形成药物盐。

[0332] 在一些实施方案中,化合物1是口服施用。在一些实施方案中,化合物1是以口服胶囊来施用。

[0333] 在一些实施方案中,化合物1是每天一次施用。

[0334] 在一些实施方案中,化合物1是以约5mg至约150mg的日剂量施用。在一些实施方案中,化合物1是以约5mg至约120mg的日剂量施用。在一些实施方案中,化合物1是以约5mg至约100mg的日剂量施用。在一些实施方案中,化合物1是以约5mg至约80mg的日剂量施用。在一些实施方案中,化合物1是以约5mg至约60mg的日剂量施用。在一些实施方案中,化合物1是以约5mg至约40mg的日剂量施用。在一些实施方案中,化合物1是以约5mg至约20mg的日剂量施用。在一些实施方案中,化合物1是以约5mg至约10mg的日剂量施用。在一些实施方案中,化合物1是以约10mg至约150mg的日剂量施用。在一些实施方案中,化合物1是以约10mg至约120mg的日剂量施用。在一些实施方案中,化合物1是以约10mg至约100mg的日剂量施用。在一些实施方案中,化合物1是以约10mg至约80mg的日剂量施用。在一些实施方案中,化

合物1是以约10mg至约60mg的日剂量施用。在一些实施方案中,化合物1是以约10mg至约40mg的日剂量施用。在一些实施方案中,化合物1是以约10mg至约20mg的日剂量施用。在一些实施方案中,化合物1是以约5mg、约10mg、约15mg、约20mg、约30mg、约45mg、约60mg、约90mg或约120mg的日剂量施用。

[0335] 在一些实施方案中,化合物1是以连续给药方案每天一次施用。在一些实施方案中,化合物1是以28天给药方案施用。

[0336] 在一些实施方案中,瑞弗利单抗是静脉内施用。

[0337] 在一些实施方案中,瑞弗利单抗是每月一次施用。在一些实施方案中,瑞弗利单抗是每四周一次施用。

[0338] 在一些实施方案中,瑞弗利单抗是以约250mg至约1000mg的剂量施用。在一些实施方案中,瑞弗利单抗是以约400mg至约600mg的剂量施用。在一些实施方案中,瑞弗利单抗是以约500mg的剂量施用。

[0339] 经标记的化合物

[0340] 本公开的另一方面涉及经标记的化合物1(放射性标记、荧光标记、同位素标记等),其不仅将可用于成像技术,并且也可用于体外和体内分析。

[0341] 本公开还包括同位素标记的化合物1。“同位素”或“放射性标记”的化合物是化合物1,其中一个或多个原子经原子质量或质量数不同于通常在自然界中发现(即天然)的原子质量或质量数的原子置换或取代。可并入本公开化合物中的合适放射性核种包括但不限于 ^2H (还写为针对氘的D)、 ^3H (还写为针对氚的T)、 ^{11}C 、 ^{13}C 、 ^{14}C 、 ^{13}N 、 ^{15}N 、 ^{15}O 、 ^{17}O 、 ^{18}O 、 ^{18}F 、 ^{35}S 、 ^{36}Cl 、 ^{82}Br 、 ^{75}Br 、 ^{76}Br 、 ^{77}Br 、 ^{123}I 、 ^{124}I 、 ^{125}I 和 ^{131}I 。例如,本公开化合物中的一个或多个氢原子可经氘原子置换,可任选地经氘原子取代。

[0342] 化合物1的一个或多个构成原子可经天然或非天然丰度的原子的同位素置换或取代。在一些实施方案中,化合物1包括至少一个氘原子。例如,本文所呈现的化合物中的一个或多个氢原子可经氘置换或取代。在一些实施方案中,所述化合物包括两个或更多个氘原子。在一些实施方案中,所述化合物包括1-2个、1-3个、1-4个、1-5个或1-6个氘原子。在一些实施方案中,所述化合物中的所有氢原子均可经氘原子置换或取代。

[0343] 将同位素纳入有机化合物中的合成方法为本领域中已知的(Deuterium Labeling in Organic Chemistry, Alan F. Thomas (New York, N.Y., Appleton-Century-Crofts, 1971; The Renaissance of H/D Exchange, Jens Atzrodt, Volker Derdau, Thorsten Fey and Jochen Zimmermann, Angew. Chem. Int. 2007版, 7744-7765; The Organic Chemistry of Isotopic Labelling, James R. Hanson, Royal Society of Chemistry, 2011)。同位素标记的化合物可用于各种研究,例如NMR光谱、代谢实验和/或分析。

[0344] 用较重同位素(例如氘)取代可提供由更大代谢稳定性产生的某些治疗优势,例如延长的体内半衰期或降低的剂量要求,并且因此在一些情况下可能为优选的(参见例如 A. Kerekes 等人, J. Med. Chem. 2011, 54, 201-210; R. Xu 等人, J. Label Compd. Radiopharm. 2015, 58, 308-312)。具体说来,在一个或多个代谢位点处取代可提供一种或多种治疗优势。

[0345] 应理解,“放射性标记”或“经标记的化合物”是已并入至少一个放射性核种的化合物。在一些实施方案中,所述放射性核种是选自由 ^3H 和 ^{14}C 组成的组。在一些实施方案中,所

述放射性核种是选自由¹¹C、¹⁸F、⁷⁵Br、⁷⁶Br和⁷⁷Br组成的组。

[0346] 试剂盒

[0347] 本公开还包括可用于例如治疗本文所提及的癌症的药物试剂盒,其包括一个或多个含有本文所述的药物组合物的容器。此类试剂盒必要时可还包括各种常规药物试剂盒组分中的一者或多者,例如含有一种或多种药学上可接受的载体的容器、其他容器等,如本领域技术人员将显而易见。指示待施用组分的量、施用指南和/或混合组分的指南的呈插页或呈标签形式的说明书也可包括在试剂盒中。

[0348] 实施例

[0349] 本发明将经由特定实施例更详细地加以描述。以下实施例为了说明性目的而提供,并且不意图以任何方式限制本发明。本领域技术人员将容易地认识到可发生改变或进行修改以产生基本上相同的结果的多种非关键参数。

[0350] 一般方法

[0351] 将H1299细胞 (RRID:CVCL_0060) 维持于含有10%胎牛血清 (FBS;GE Healthcare;#SH30071.03) 的RPMI-1640 (RPMI,ThermoFisher Scientific,Carlsbad,CA;#11875-093) 培养基中并且从美国典型培养物保藏中心 (American Type Culture Collection) (ATCC;#CRL-5803) 获得。从德国微生物和细胞培养物保藏中心 (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures) (DSMZ;Braunschweig,Germany;#ACC 300) 获得BAF3细胞并且使其在补充有10% FBS加4ng/mL白细胞介素 (IL) -3的RPMI中生长。从ATCC (#CRL-1424) 获得G361细胞 (RRID:CVCL_1220) 并且将其维持于含有10% FBS的RPMI培养基中。在过去3年内,已使用短串联重复剖析认证所有人类细胞系。用无霉浆菌的细胞执行所有实验。瑞弗利单抗是由Incyte提供并且是抗人类程序化细胞死亡 (PD) -1抗体。从两个健康供体的正常白血球分离 (Biological Specialties,Colmar,PA) 获得人类外周血单核细胞 (PBMC)。

[0352] 实施例A.生物化学分析

[0353] 通过TR-FRET分析使用AXL、MER和TYRO3的激酶结构域的重组磷酸化形式来研究化合物1抑制TAM家族成员的酶活性的生物化学效能。

[0354] 通过时间解析荧光能量转移 (TR-FRET) 分析测量磷酸-AXL (pAXL)、cMER和Tyro3激酶活性。在所述激酶分析之前,通过使重组AXL蛋白 (ThermoFisher Scientific;#PV4275) 在含有50mM Tris (pH 7.5)、0.2mg/mL AXL、5mM ATP、20mM MgCl₂和2mM二硫苏糖醇 (DTT) 的缓冲液中在室温下孵育1小时来进行AXL的自身磷酸化。激酶分析缓冲液含有50mM HEPES (pH 7.5)、10mM MgCl₂、1mM EGTA、0.01% NP-40和2mM DTT。在分析缓冲液中制备0.69nM磷酸-AXL或0.088nM cMER (Carna Biosciences,Kobe,Japan;#08-108) 或0.137nM TYRO3 (Life Technologies,PR7480A) 的酶溶液。将肽底物生物素-EQEDEPEGDYFEWLE-酰胺 (Quality Controlled Biochemicals,Hopkinton,MA) 溶解于二甲基亚砜 (DMSO) 中的1-mM储备溶液在含有2000μM ATP的分析缓冲液中稀释至1μM。将化合物1 (15nL) 溶解于DMSO中并且从化合物板转移至低体积白色384孔分析板 (Perkin Elmer ProxiPlate,Waltham,MA)。将酶溶液 (6μL;或用于酶空白的分析缓冲液) 添加至每板中的适当孔中并且孵育30分钟。然后,添加6μL/孔底物溶液以起始反应。保护板免于光照并且在室温下 (21°C) 孵育60分钟 (cMER和TYRO3) 或90分钟 (AXL)。通过添加含有50mM Tris-HCl (pH 7.8)、150mM NaCl、

0.05%牛血清白蛋白(BSA)、45mM EDTA、180nM SA-APC(Perkin Elmer;CR130-100)和3nM Eu-W1024抗磷酸酪氨酸PY20(Perkin Elmer;AD0067)的6- μ L检测溶液来终止反应。将板在室温下孵育30分钟,并且在PheraStar FS读板仪(BMG Labtech,Ortenberg,Germany)上测量均质时间解析荧光(HTRF)信号。计算每一浓度的抑制%,并且由使用GraphPad Prism软件(San Diego,CA)拟合的曲线产生半最大抑制浓度(IC_{50})值。

[0355] 通过测量在快速并且大量稀释cMER-抑制剂复合物后cMER酶活性的恢复来确定化合物可逆性。在含有50mM HEPES(pH 7.5)、10mM MgCl₂、1mM EGTA、0.01% NP-40和2mM DTT的激酶分析缓冲液中稀释cMER、ATP和生物素标记的肽底物。在含有50mM Tris-HCl(pH 7.8)、150mM NaCl、0.05% BSA和45mM EDTA的检测缓冲液中制备检测试剂(240nM SA-APC[Perkin Elmer;CR130-100]和4nM Eu-W1024抗磷酸酪氨酸PY20[Perkin Elmer;AD0067])。为了鉴定化合物的抑制模式,在不同ATP浓度(25 μ M、100 μ M、300 μ M和1000 μ M的最终反应浓度)下测量 IC_{50} 值。将化合物1与ATP和酶(66pM cMER)一起在8- μ L分析缓冲液中孵育延长的时间(2小时)。在这些条件下,达到化合物、ATP和酶之间的平衡,然后通过添加4 μ L1.5- μ M生物素标记的肽起始反应。孵育1小时后,通过含有60mM EDTA、240nM SA-APC(Perkin Elmer;CR130-100)和4nM Eu-W1024抗磷酸酪氨酸PY20(Perkin Elmer;#AD0067)的4- μ L检测试剂终止反应。在孵育30分钟后通过PheraStar读板仪以HTRF模式读取分析板。使剂量-反应曲线拟合并且将 IC_{50} 值绘制为ATP浓度的函数。化合物1的抑制常数(K_i)是通过将数据拟合至竞争性抑制的等式($IC_{50} = K_i(1 + [ATP]/K_m)$)来计算。

[0356] 多个批次的化合物1针对AXL、MER和TYRO3的平均 IC_{50} 值分别是 0.61 ± 0.31 nM($n=18$)、 3.17 ± 1.97 nM($n=25$)和 101 ± 27 nM($n=25$),这展示对TYRO3的约30倍选择性。还在包括179种激酶的综合激酶研究中在200nM下评估化合物1。与c-Met相比,化合物1对AXL和MER的选择性为约60倍并且不会抑制任何其他激酶。这些结果展示,化合物1是AXL和MER激酶的强效和高选择性抑制剂。使用MER激酶分析评估针对ATP浓度的抑制模式。如图1中所示,化合物1对MER激酶的 IC_{50} 值随着ATP浓度线性增加,表明ATP竞争性抑制模式。

[0357] 实施例B. 细胞增殖分析

[0358] 为了评估TAM受体家族内的细胞效能和选择性,产生具有稳定AXL、MER或TYRO3表达的小鼠BAF3细胞系。

[0359] 将与二聚化序列和HA标签融合的AXL、MER或TYRO3的细胞质结构域克隆至具有嘌呤霉素抗性标记物的pMSCV(鼠类干细胞病毒)载体中以通过电穿孔至BAF3细胞中个别地产生三种构建物。选择并表征具有IL-3非依赖性和嘌呤霉素抗性的单克隆。为了评估对BAF3细胞增殖的影响,在384孔板中在化合物1存在或不存在下在稀释于含有2% FBS的RPMI-1640中的不同浓度(从10 μ M最高浓度使用三倍稀释系数的10个浓度点)下,将1000个细胞/孔的BAF3、BAF3-AXL、BAF3 MER或BAF3-TYRO3细胞处理48小时。通过ATP分析(CellTiter-Glo Assay,Promega,Madison,WI)根据制造商的程序测量细胞活力。将数据转化成相对于DMSO对照的抑制%,并且使用GraphPad Prism软件拟合 IC_{50} 曲线。

[0360] 用化合物1处理稳定BAF3转染子会强效地抑制表达AXL或MER激酶的BAF3细胞的增殖,并且50%生长抑制(GI_{50})值所需的浓度分别为 16 ± 11 nM和 14 ± 4.9 nM,但较弱地抑制表达TYRO3的BAF3细胞的生长($IC_{50} = 498 \pm 161$ nM),并且对亲代BAF3细胞无活性($IC_{50} > 4000$ nM)。这些细胞数据与生物化学数据一致并且确认化合物1是AXL和MER的强效抑制剂并

且对TYR03具有>30倍选择性。

[0361] 实例C.H1299细胞中的pAXL抑制分析

[0362] 在表达高水平内源AXL的肿瘤细胞系中评估化合物1调节AXL活性的能力。已显示非小细胞肺癌细胞系H1299展现显著增加的AXL蛋白表达。

[0363] 将H1299细胞接种(30,000个细胞/孔)于96孔组织培养板(Costar, Corning Incorporated, Corning, NY)中并且在37°C和5% CO₂下孵育过夜。添加适当浓度的化合物1并且将其在37°C和5% CO₂下孵育1小时。将1μg/mL的rhGAS6(R&D Systems, Minneapolis, MN; #885-GSB)添加至每孔中,并且将板在37°C和5% CO₂下孵育15分钟。收获细胞并且在冰上在含有蛋白酶和磷酸酶抑制剂(ThermoFisher Scientific; #78446)的110μL冰冷溶解缓冲液(Cell Signaling Technology, Danvers, MA; #9803)中溶解1小时并存储在-80°C下以用于ELISA。通过将Greiner lumitrac高结合板与8μg/mL的抗AXL抗体(R&D Systems; MAB154)在室温下一起孵育过夜来制备ELISA板。用含有0.1% BSA的磷酸盐缓冲生理盐水(PBS)洗涤所述板并且封闭。将细胞溶解产物装载至ELISA板上并且在室温下孵育2小时。洗涤所述板,并且与LANCE Eu-W1024抗磷酸酪氨酸抗体(Perkin Elmer; #AD0067)一起在室温下在DELFI A分析缓冲液(Perkin Elmer; #4002-0010)中孵育2小时,洗涤,并添加DELFI A增强溶液(Perkin Elmer; #4001-0010)。将所述板在室温下轻轻振荡15分钟并且在PheraStar(BMG Labtech)上读数。将数据转化成相对于DMSO对照的抑制%,并且通过使用GraphPad Prism拟合抑制%对抑制剂浓度对数的曲线来执行化合物1IC₅₀测定。

[0364] 用化合物1处理H1299细胞会强效地抑制pAXL,其中IC₅₀值为1.8±0.63nM(N=19),如图2中所示。

[0365] 实施例D.G361细胞中的磷酸-MER抑制分析

[0366] 在表达高水平MER激酶黑色素瘤细胞系G361细胞中评估化合物1阻断MER自身磷酸化的效能。

[0367] 在使用前使新解冻的G361细胞恢复三代,并且仅将解冻后20代以内的细胞用于分析中。将细胞保持在非汇合条件下并且用于对数期生长。将2mL 1×10⁶个细胞/mL(2×10⁶个细胞/孔)的G361细胞添加至6孔组织培养板(Corning Incorporated; #3961)中持续2天。在分析时,将1mL培养基添加至每孔中。为了测定化合物1的活性,使用5mM化合物1于DMSO中的储备溶液来制造DMSO工作储备溶液的三倍连续稀释液,在培养基中进一步稀释,并且将100μL经稀释的化合物添加至每孔中,最终浓度介于0.2nM至1μM范围内。对于不存在化合物1的对照孔,添加100μL的0.22% DMSO以维持每种样品中最终0.02%的DMSO浓度。将细胞和化合物的混合物在37°C下在补充有5% CO₂的加湿孵育器中孵育1小时,然后将10μL于PBS中的55.5μg/mL MER活化抗体(R&D Systems; #MAB8912;最终浓度等于500ng/mL)添加至每孔中,未经刺激的样品除外,并且在37°C下在补充有5% CO₂的加湿孵育器中孵育30分钟。孵育后,用2mL冷PBS将每孔洗涤两次。将含有1mM PMSF、1mM磷酸酶抑制剂(1:100稀释; ThermoFisher Scientific; #78426)和蛋白酶抑制剂(1:50稀释; Cal Biochem® #535140; MilliporeSigma, Burlington, MA)的溶解缓冲液(120μL; Cell Signaling Technology; #9803)添加至每种样品中并且在冰上孵育30分钟。将细胞提取物转移至96孔V底板,在4°C下在3000rpm下离心10分钟并且将提取物存储在80°C下直至通过ELISA分析磷酸-MER(pMer; R&D Systems; #DYC2579)。使用Molecular Devices SpectraMax Plus微板读取器

(Molecular Devices, San Jose, CA) 在450nm下测量板的光学密度,在540nm下进行波长校正。使用四参数算法曲线拟合软件(SOFTmax PRO application, Molecular Devices) 针对浓度对标准品的吸光度绘图以产生标准曲线。通过从标准曲线外推来测定未知样品的pMER浓度。通过GraphPad Prism 7.0使用具有可变斜率的非线性回归S形剂量-反应曲线来计算IC₅₀值。

[0368] 如图3中所示,在G361黑色素瘤细胞中,化合物1有效地阻断由MAB8912诱导的MER磷酸化,其中IC₅₀值为 8.3 ± 3.1 nM (N=2)。

[0369] 实施例E. 原代巨噬细胞中MER激酶活性的抑制

[0370] 评估在巨噬细胞中化合物1调节MER激酶活性的能力。

[0371] 使用Ficoll-Paque密度梯度离心来分离人类外周血单核细胞(PBMC)并且在室温下使用1×RBC溶解缓冲液(Cell Signaling Technology)将任何剩余红血球(RBC)溶解5分钟。用PBS洗涤PBMC,然后使用CD14微珠阳性选择分离,遵循制造商的方案按照说明(AutoMacs Pro, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany)富集单核球。最初将CD14⁺细胞以 1.5×10^6 /孔接种于6孔板中的补充有100ng/mL巨噬细胞群落刺激因子(M-CSF; R&D Systems; #216-MC)的RPMI-1640+10%热灭活FBS和10% AB人类血清(Sigma-Aldrich Corp., St Louis, MO)、100U/mL青霉素(penicillin)+100μg/mL链霉素(streptomycin)(Corning)中,并在37℃、5% CO₂下培养10天。每3天将新鲜M-CSF添加至培养基中直至巨噬细胞已附着。在用于所述分析的准备中,取出培养基并且用不含人类血清的新鲜培养基再喂食细胞。在100% DMSO中以1000×制备化合物1储备液并且首先67倍稀释于培养基中,并且然后在添加至巨噬细胞中时再稀释15倍。在37℃、5% CO₂下用化合物1处理巨噬细胞持续2小时。将5μg/mL抗MER抗体MAB8912(R&D Systems)添加至巨噬细胞中再持续30分钟,此时用冷PBS洗涤细胞。从孔中小心地抽出所有PBS并且使干板在-20℃下冷冻。

[0372] 使巨噬细胞在冰上解冻,然后在4℃下用250μL/孔的1×溶解缓冲液(Cell Signaling Technology; #9803)和Halt蛋白酶和磷酸酶抑制剂(ThermoFisher Scientific)溶解1小时。在冰上刮取溶解的细胞并且转移至Eppendorf瓶。使溶解产物在4℃下在12,700rpm下离心15分钟。称取PDX肿瘤并且用补充有蛋白酶和磷酸酶抑制剂混合液(Roche, Basel, Switzerland; #11836170001)的溶解缓冲液均质化。使肿瘤在冰上溶解30分钟,然后在13,000rpm下离心10分钟。使用BCA蛋白质分析试剂盒(Pierce, ThermoFisher Scientific; #23225)对蛋白质溶解产物进行定量。将溶解产物与6×Laemmli SDS样品缓冲液(Alfa Aesar, Haverhill, MA)一起转移至新管并且在95℃下加热样品持续6分钟。使用Novex™ 8%-16% Tris-甘氨酸微小凝胶或4%-12% Tris-甘氨酸Novex WedgeGels (Invitrogen, Carlsbad, CA)将约50μg蛋白质样品装载至每孔。使用iBlot(ThermoFisher Scientific)干燥印迹系统将蛋白质转移至硝基纤维素膜。使用0.5%脱脂乳粉在洗涤缓冲液(100mM NaCl、10mM Tris-HCl (pH 8.0)、0.1% Tween 20)中在室温下将膜封闭1小时。用于pMER的一级抗体是来自PhosphoSolutions(Aurora, CO; #p186-749)。从Cell Signaling Technology获得剩余抗体:MER(#4319)、pAXL(#5724)、AXL(#4566)、GAS6(#67202)、pAKT(#4060)、AKT(#9272)和β-肌动蛋白(#4970)。在0.5%乳/洗涤缓冲液中分别以1:500和1:1000添加一级抗体并且在4℃下摇动过夜。在洗涤缓冲液中洗涤膜三次,然后与二级抗体(抗兔IgG1-HRP; Cell Signaling Technology)一起以1:2500在室温下在0.5%乳/洗涤缓冲液中

孵育2小时。再洗涤所述膜,然后用SuperSignal West Dura延长持续时间的化学发光底物(ThermoFisher Scientific)检测条带并使用Fluorochem M数字成像仪(Protein Simple, San Jose,CA)使其可视化。

[0373] 化合物1能够以浓度依赖性方式抑制原代巨噬细胞中的pMER,其中 IC_{50} 为 1.6 ± 0.4 nM (N=2),如图4中所示。这些数据表明,化合物1可抑制肿瘤和原代人类免疫细胞中的MER激酶活性。

[0374] 实施例F.T细胞增殖分析的巨噬细胞抑制

[0375] 为了检查化合物1的功能活性,评估对巨噬细胞介导的T细胞增殖抑制的影响。

[0376] 通过Ficoll-Hypaque (GE Healthcare, Chicago, IL; #17-1440-02) 上的密度梯度离心、然后用抗CD14微珠 (Miltenyi Biotec; #130-050-201) 纯化,从健康供体的外周血分离人类PBMC。在37°C下使分离的CD14⁺单核球/巨噬细胞与100ng/mL M-CSF (R&D Systems; #216-MC) 和50ng/mL TGFβ1 (R&D Systems; #240-B) 一起孵育6天;将100μL/孔的CD14⁺巨噬细胞以 0.5×10^6 个细胞/mL接种于96孔圆底培养板 (Costar; #3799) 中并且用化合物1在37°C下处理过夜。使用Dynabeads调控CD4⁺CD25⁺T细胞试剂盒 (Life Technologies; #11363D) 来分离CD4⁺CD25⁻效应T (T_{eff}) 细胞,并且使用CellTrace CFSE细胞增殖试剂盒 (ThermoFisher Scientific; #C34554) 用羧基荧光琥珀酰亚胺基酯 (CFSE) 标记 T_{eff} 细胞。使新鲜的CFSE标记的 T_{eff} 细胞与Dynabeads人类T活化剂CD3/CD28 (ThermoFisher Scientific; #11132D) 以5:1的比率混合,然后将100μL/孔的T细胞/珠粒混合物以 1×10^6 个细胞/mL添加至化合物1处理的CD14⁺巨噬细胞中并且继续在37°C下培养5天。通过流式细胞仪 (BD LSRFortessa X-20, BD Biosciences, San Jose, CA) 分析 T_{eff} 细胞,并且在Luminex分析 (Millipore; #HCYTOMAG-60K_38plex) 中测试无细胞上清液以测量不同细胞因子和趋化因子的浓度。

[0377] 图5A展示化合物1部分地逆转巨噬细胞介导的T细胞增殖抑制。这与IFN-γ产生的增加相关,如图5B中所示。

[0378] 实施例G.PBMC细胞共培养分析

[0379] 评估化合物1与检查点阻断协作以进一步加强抗肿瘤反应的能力。将H1299肺癌细胞与经化合物1、抗人类程序化细胞死亡 (PD) -1抗体瑞弗利单抗或组合处理的经刺激的人类PBMC共培养,并且在两个不同实验中评价促发炎细胞因子的产生 (图6)。进行第三个实验,其确认这些结果 (未显示)。

[0380] 将H1299细胞与人类PBMC各自以4或 16×10^4 个细胞/mL在含有10% FBS、100U/mL青霉素-链霉素 (ThermoFisher Scientific; #15140-122) 和 $1 \times \beta$ -巯基乙醇 (ThermoFisher Scientific; #21985-023) 的RPMI中共培养。将化合物1或瑞弗利单抗以单剂或组合添加至细胞中。分别以1μg/mL、0.5μg/mL或100ng/mL的最终浓度添加抗CD3 (BD Biosciences #555336)、抗CD28 (BD Biosciences #555725) 或SEA (Toxin Technology, Sarasota, FL; #AT101red),以刺激细胞生长。在37°C下在5% CO₂孵育器中孵育培养物持续4天。收集上清液,使用多重分析系统 (定制的人类ProcartaPlex Luminex试剂盒, ThermoFisher Scientific; #PPX-15-MXRWE6P) 进行细胞因子分析。

[0381] 单独化合物1诱导IFN-γ、肿瘤坏死因子-α、颗粒球-巨噬细胞群落刺激因子并且适度诱导IL-12p70 (图6B-6D)。虽然瑞弗利单抗也在供体亚组中诱导这些细胞因子,但化合物1和瑞弗利单抗的组合展示与个别剂相比细胞因子产生的显著增加 (图6),包括IL-2 (图

6A)。这些数据展示,化合物1与检查点阻断的组合可诱导体外促发炎症细胞因子产生。

[0382] 实施例H. 体内功效研究

[0383] 为了测试化合物1的体内潜在免疫调节活性,在同基因肿瘤模型中执行抗肿瘤功效研究。

[0384] 患者源性异种移植物(PDX)模型是常用于评估抗癌药物的抗肿瘤功效的动物肿瘤模型(Jin K、Teng L、Shen Y、He K、Xu Z、Li G. Patient-derived human tumour tissue xenografts in immunodeficient mice: a systematic review, Clin Transl Oncol (2010) 12:473-80. doi:10.1007/s12094-010-0540-6)。PDX模型是通过将来自患者的新鲜癌组织直接植入免疫受损小鼠中来产生。这些模型与基于细胞的异种移植物模型不同,其不同之处在于,PDX模型从未在体外传代,而基于细胞的异种移植物是由生长于组织培养物中的植入细胞来产生。已显示,PDX模型保留了原发性患者肿瘤的遗传组成和组织形态,使其成为临床前药物发现的颇具价值的工具(Izumchenko E、Paz K、Ciznadija D、Sloma I、Katz A、Vasquez-Dunddel D等人, Patient-derived xenografts effectively capture responses to oncology therapy in a heterogeneous cohort of patients with solid tumors. Ann Oncol (2017) 28:2595-605. doi:10.1093/annonc/mdx416)。PDX模型已用于评估抗癌药物在癌症适应症的肿瘤模型中的反应(Gao H、Korn JM、Ferretti S、Monahan JE、Wang Y、Singh M等人, High-throughput screening using patient-derived tumor xenografts to predict clinical trial drug response. Nat Med (2015) 21:1318-25. doi:10.1038/nm.3954)。这些研究已证实可用于鉴定对治疗有反应的模型以及没有反应的那些模型,所述模型可出现在同一癌症适应症的肿瘤中。

[0385] 从日本研究生物资源细胞库保藏中心(Japanese Collection of Research Bioresources Cell Bank)获得MBT-2细胞并且将其维持于补充有10% FBS的DMEM中。从NCI获得MC38细胞。从ATCC获得4T1细胞并且将其维持于补充有10% FBS的RPMI培养基中。对于MBT-2实验,将 5×10^5 个MBT-2细胞皮下接种至6至8周龄C3H小鼠或无胸腺裸小鼠(Charles River Laboratories, Wilmington, MA)的右后侧腹中。对于MC38研究,将MC38肿瘤的浆(体内第6代)接种至12周龄雌性C57BL/6小鼠的右后侧腹中。对于4T1研究,将 7.5×10^5 个4T1细胞皮下接种至6至8周龄雌性BALB/c小鼠或无胸腺裸小鼠(Charles River Laboratories)的右后侧腹中。根据肿瘤体积使小鼠随机化,并且 $n=10-12$ 只/组。从研究开始至结束,每天两次(BID)连续口服给予化合物1。在MC38研究中,以15mg/kg每周两次腹膜内给予抗程序化死亡配体1(PD-L1)(BE0101, Bio X Cell, West Lebanon, NH)。还在治疗开始时起始,每周两次向媒介组和化合物1组施用大鼠IgG2b对照抗体(BE0090, Bio X Cell)。在4T1研究中,在研究开始时以15mg/kg腹膜内给予单剂量的抗PD-L1。在组合研究中,BID向媒介对照组和接受抗PD-L1的小鼠连续给予媒介直至研究结束。BID口服给予媒介和化合物1。在实验进程期间监测小鼠的肿瘤生长和明显耐受性。在Champions Oncology (Hackensack, NJ)进行PDX肿瘤模型。将PDX肿瘤植入6至8周龄的雌性无胸腺裸小鼠中。当肿瘤体积约为 $150-250\text{mm}^3$ 时,根据肿瘤体积使小鼠随机化并且以10mg/kg、30mg/kg或100mg/kg BID通过口服管饲向其施用化合物1。使用式 $(L \times W^2) / 2$ 计算肿瘤体积,其中L和W分别是指长度和宽度尺寸。使用式 $(1 - (V_T / V_C)) \times 100$ 计算肿瘤生长抑制(TGI),其中 V_T 是最后一天治疗时治疗组的肿瘤体积,并且 V_C 是最后一天治疗时对照组的肿瘤体积。使用二因子方差

分析 (ANOVA) 和Dunnett多重比较测试来确定治疗组之间的统计差异 (GraphPad Prism)。将动物圈养于由国际实验动物护理评价和认证协会 (Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care, International) 完全认证的屏障设施中。根据关于实验室动物的人类护理和使用 (Human Care and Use of Laboratory Animals) 的美国公共服务政策 (US Public Service Policy) 以及因塞特动物护理和使用委员会指南 (Incyte Animal Care and Use Committee Guidelines) 进行所有程序。

[0386] 在研究结束时,在最后一个剂量的化合物1之后4小时收集肿瘤并且放置于冰上。将肿瘤样品切割成2-mm片并且转移至Miltenyi C管 (Miltenyi Biotec;#130-096-334)。根据制造商的方案 (Miltenyi Biotec;#130-096-730) 进行肿瘤解离。用冷PBS冲洗滤液并且样品集结成粒。将红血球溶解于Pharm Lyse (BD Biosciences;#555899) 中。用PBS洗涤细胞并且在室温下在含有活/死染色剂 (LifeTech Scientific, Shenzhen, China;#L34966) 的PBS中再悬浮持续15分钟。然后在PBS中洗涤细胞并且使其再悬浮于染色缓冲液 (BD;#554657) 中,并在4°C下将以下抗体添加至样品中持续30分钟:CD3 (BD;#553062)、CD45 (BD;#564279)、CD8 (BD;#560182)、CD4 (BD;#552775)、CD11b (BD;#557657)、F4/80 (eBiosciences, San Diego, CA;#12-4801-82)、MHC II类 (BD;#562564) 和CD206 (BioLegend;#141708)。用固定/渗透缓冲液 (eBioscience 00-5523-00) 洗涤细胞,使其固定并且渗透。使细胞再悬浮于渗透缓冲液 (eBioscience;00-8333) 中。在室温下将Ki-67抗体 (BioLegend, San Diego, CA;#652413) 添加至样品中持续1小时。然后洗涤细胞并且使其再悬浮于染色缓冲液 (BD;#554657) 中以用于获取。M1巨噬细胞在CD45⁺、CD11b⁺F4/80⁺群体内经鉴定为II类MHC^{Hi}/CD206^{Lo}并且M2巨噬细胞经鉴定为II类MHC^{Lo}/CD206^{Hi}。在BD Fortessa上获取数据并且用FlowJo软件进行分析。使用多重蛋白质检测试剂盒根据制造商的方案 (MesoScale Diagnostics, Rockville, MD) 对肿瘤内干扰素 (IFN) - γ 的水平进行定量。通过单因子ANOVA和Dunnett多重比较测试 (GraphPad Prism) 来确定统计显著性。

[0387] 化合物1在MBT-2和4T1肿瘤模型中诱导剂量依赖性功效 (图7A和图7B)。在带有相同肿瘤的免疫缺陷小鼠中无活性,证实至少在这些模型中,抗肿瘤活性依赖于功能性免疫系统 (图7C)。在4T1模型中,化合物1治疗以剂量依赖性方式增加M1样巨噬细胞对M2样巨噬细胞的比率 (图7D)。基于使用原代人类PBMC观察到的增强的体外活性,在体内测试化合物1与检查点阻断的组合。在MC38模型中,化合物1和抗PD-L1均具有单剂抗肿瘤活性,但组合的活性显著较高 (图8A)。两种单剂治疗诱导CD4⁺和CD8⁺肿瘤浸润淋巴球的增殖,并且组合的程度较高 (图8B和图8C)。与单剂治疗相比,组合治疗还会增加肿瘤中的IFN- γ 水平 (图8D)。这些数据证实,化合物1诱导巨噬细胞极化,增加功能性CD4⁺和CD8⁺T细胞活性并且与检查点阻断组合来增强体内抗肿瘤活性。

[0388] 实施例I. 肉瘤PDX模型

[0389] 如实施例H中针对PDX模型所述,评估肉瘤PDX模型中化合物1的活性。每天两次向带有 (a) CTG-2041、(b) CTG-1302或 (c) CTG-1339肿瘤的无胸腺裸小鼠口服给予10mg/kg、30mg/kg和100mg/kg的化合物1。使经化合物1或媒介剂处理的小鼠的CTG-2041或CTG-1339肿瘤溶解并且针对pAXL、AXL、pMER、MER、GAS6、pAKT、AKT和 β -肌动蛋白通过蛋白质印迹进行加工。分析3只小鼠/组。从不同凝胶获得蛋白质印迹数据。使用CTG-2041肿瘤的实验代表血管肉瘤模型。使用CTG-1302肿瘤的实验代表平滑肌肉瘤模型。使用CTG-1339肿瘤的实验代表

骨肉瘤模型。

[0390] 在CTG-2041中观察到强抗肿瘤反应,并且在10mg/kg、30mg/kg和100mg/kg BID化合物1给药下具有等效活性并展示95% TGI(图9A)。还在CTG-1302中观察到稳健的抗肿瘤反应(图9B)。相反,CTG-1339对化合物1治疗有抗性(图9C)。为了理解负责与非反应者模型相比在反应者中观察到的差异的潜在机制,评估在CTG-2401和CTG-1339肿瘤中化合物1对AXL和MER活化以及下游信号传导的影响(图9D)。尽管化合物1在两种模型中抑制pAXL和pMER,但CTG-2041表达显著较高水平的总AXL和MER,尤其pAXL和pMER(图9D)。pAKT仅在CTG-2041中受抑制,这与化合物1的抗肿瘤功效相关联。化合物1治疗还增加两种肿瘤模型中的总MER水平,以及CTG-2041中的GAS6水平。

[0391] 在带有(a)CTG-2426肿瘤(粘液纤维肉瘤)和(b)CTG-1861肿瘤(胃肠基质瘤)的无胸腺裸小鼠中进一步进行实验。这些实验的结果显示于下表中。

模型	亚型	TGI (%)
CTG-2426	粘液纤维肉瘤	42
CTG-1861	胃肠基质瘤	74

[0393] 实施例J.人源化小鼠模型

[0394] 将动物圈养于由国际实验动物护理评价和认证协会完全认证的屏障设施中。根据关于实验室动物的人类护理和使用的美国公共服务政策以及因塞特动物护理和使用委员会指南进行所有程序。将5百万个H1299细胞(ATCC)皮下植入20至24周龄雌性人类CD34⁺复原的NSG小鼠(The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME)的右后侧腹中。细胞接种包括磷酸盐缓冲盐水(PBS)中的1:1体积比的基质胶(#354248; Corning, NY)。当肿瘤体积平均为约150mm³时,根据肿瘤体积和供体(2-5个供体/组)将小鼠随机化成10组并且用媒剂加上人类IgG1同型对照抗体、化合物1、瑞弗利单抗或组合进行治疗。将化合物1溶解于0.5%甲基纤维素中的50mM柠檬酸盐缓冲液中并且以30mg/kg BID口服给予。将瑞弗利单抗稀释于PBS中并且每5天以5mg/kg腹膜内给予。使用式 $(1 - (V_T/V_C)) * 100$ 计算肿瘤生长抑制(TGI),其中V_T是最后一天治疗时治疗组的肿瘤体积,并且V_C是最后一天治疗时对照组的肿瘤体积。使用二因子方差分析执行统计分析。

[0395] 实施例K.1期研究

[0396] 这一实施例描述1期、开放标签研究,所述研究意图评估单剂化合物1(部分1)和化合物1与瑞弗利单抗的组合(部分2)的安全性和耐受性、药物动力学、药效学和初步功效。

[0397] 部分1和部分2均包括剂量发现和剂量扩展。部分1A和部分1B招募患有所选实体肿瘤的参与者;部分1C招募患有AML的参与者。部分2A和部分2B仅招募患有所选实体肿瘤的参与者。研究治疗持续直至符合疾病进展、不可接受的毒性、死亡、同意退出或任何其他治疗退出准则为止。

[0398] 部分1:单剂化合物1

[0399] 所述研究起始于部分1A。最初,开始剂量水平群组中的3名参与者接受单剂量的化合物1,然后进行定时PK评价以确认起始连续施用前约1周的暴露。基于这一PK评价时的暴露,根据下文所列出的基于暴露的给药指南确定每个参与者的连续施用的剂量水平:

[0400] ●如果单剂量PK分析的AUC_{0-24h}介于>1000nM·h但<2000nM·h之间并且C_{24h}是≥15nM,那么以每天一次(QD)10mg的单剂化合物1剂量起始连续给药。

[0401] ●如果单剂量PK分析的 AUC_{0-24h} 是 $>2000nM \cdot h$ 并且 C_{24h} 是 $>15nM$,那么以5mg QD起始连续给药。

[0402] ●如果单剂量PK分析的 AUC_{0-24h} 是 $<1000nM \cdot h$ 或 $C_{24h} < 15nM$,那么以15mg QD起始连续给药。

[0403] ●如果单剂量PK分析的 AUC_{0-24h} 是 $>15,000nM \cdot h$ 或 $C_{24h} > 50nM$,那么由医学监测员评估参与者的暴露水平以确定是否可安全地治疗参与者或参与者是否将中断研究治疗。

[0404] 剂量递增始于最初3名参与者中施用的最低剂量。例如,如果最初3名参与者中的1名接受5mg QD,那么指定的开始剂量水平群组将为5mg QD并且使用3+3+3研究设计评价其安全性和耐受性。基于这一情形,将参与者招募于5mg群组中直至足够参与者和数据表明5mg剂量是可耐受的。同样,如果最初3名参与者中的最低剂量是10mg QD或15mg QD,那么10mg QD或15mg QD分别将为指定的开始剂量水平,并且参与者将被招募于最低剂量水平群组中,直至所述剂量水平群组宣称可耐受。在单剂量PK分析中以高于化合物1的指定开始剂量的剂量起始的最初3名参与者中的任一者保持他或她的基于暴露的剂量并且包括在相应的剂量水平群组分析中。

[0405] 在第1周期第1天时最初3名参与者的水平低于目标暴露 ($AUC_{0-24h} < 1000nM \cdot h$ 或 C_{24h} 是 $\leq 15nM$)的情形下,下一剂量水平增加可大于50%但不超过100%。单剂量PK分析是在剂量增加大于50%的任一剂量水平群组中在最初3名参与者中执行的,并且可在其他参与者中或在任何其他剂量水平群组中根据发起人的判断来执行。下文列出化合物1的剂量发现方案。

	剂量水平	化合物 1 的剂量	施用频率
[0406]	剂量水平 1	5 mg	QD, 28 天周期
	开始剂量/剂量水平 1	10 mg	QD, 28 天周期
	剂量水平 2	15 mg	QD, 28 天周期
	剂量水平 3	20 mg	QD, 28 天周期
	剂量水平 4	30 mg	QD, 28 天周期
[0407]	剂量水平 5	45 mg	QD, 28 天周期
	剂量水平 6	60 mg	QD, 28 天周期
	剂量水平 7	90 mg	QD, 28 天周期
	剂量水平 8	120 mg	QD, 28 天周期

[0408] 在部分1A中选择建议扩展剂量(“RDE”)后,起始部分1B。

[0409] 部分1B包括各自约12名参与者的4个独立的肿瘤特异性(黑色素瘤、NSCLC、SCCHN和软组织肉瘤)剂量扩展群组以进一步表征化合物1的RDE的安全性、耐受性、功效和药效学效应。部分1B中的所有参与者均需要成对肿瘤活检(预处理和然后在第2周期第1天与第3周期第1天之间)。一旦可从化合物1和瑞弗利单抗的部分2A组合递增获得安全性数据并且已确定组合的剂量是安全并且耐受的,部分1B剂量扩展群组中正在进行的参与者在完成最初治疗时活检和肿瘤成像并得到发起人批准后也可接受瑞弗利单抗。要求起始组合疗法的部分1B参与者重复第1周期和第2周期安全性和PK评价并且必须同意在起始组合治疗后4至8

周进行重复活检。化合物1的剂量不超过所测试的剂量并且经确定与瑞弗利单抗的组合在部分2A中是安全并且耐受的。

[0410] 所述研究的部分1C也可开始于在部分1A中鉴定RDE后,并且与部分1B平行进行。招募至这一扩展群组中的起始是由发起人决定。所述研究的这一部分将患有复发性和/或难治性AML的参与者招募至1个独立扩展群组中并且评估化合物1的RDE在这一群体中的安全性、耐受性和初步功效。部分1C使用具有停止规则的Simon 2阶段设计以在未观察到反应时在阶段1结束时提前终止。在阶段1中,招募10名参与者;如果未观察到客观反应,那么将不进一步招募以使在无临床活性证据的情况下治疗的参与者的数目最小化。如果观察到至少1次客观反应,那么可将至多19名额外参与者招募至所述群组中,在部分1C中招募最多29名。

[0411] 部分2:化合物1与瑞弗利单抗的组合

[0412] 部分2包含部分2A和部分2B。部分2A是剂量发现阶段,它是使用3+3+3设计来执行以评价化合物1与瑞弗利单抗的组合在患有所选晚期实体肿瘤的参与者中的安全性和耐受性。

[0413] 一旦剂量水平在部分1A中经确定为安全并且可耐受的,即开始部分2A,并可与部分1A平行招募,但在比当前确立的耐受剂量低1个剂量水平下。

[0414] 下文列出化合物1与瑞弗利单抗的组的剂量发现方案:

剂量水平	化合物 1 的剂量	化合物 1 施用	瑞弗利单抗的剂量	瑞弗利单抗施用
[0415] 剂量水平 1/ 起始剂量	在起始组合时,比部分1A中确立的最高安全/可耐受剂量低1个剂量水平。	QD, 28 天 周期	500 mg	IV 每四周 一次
剂量水平≥ 2	选择为可耐受的下一剂量水平不超过部分1A MTD 和/或 RDE。	QD, 28 天 周期	500 mg	IV 每四周 一次

[0416] 部分2B是剂量扩展以进一步评估在部分2A中确定的化合物1与瑞弗利单抗的组的RDE下的安全性、耐受性、功效和药效学效应。将招募各自约12名参与者的四个独立的肿瘤特异性(黑色素瘤、NSCLC、SCCHN和软组织肉瘤)扩展群组。要求部分2B中的所有参与者均进行成对肿瘤活检(预处理和然后在第2周期第1天与第3周期第1天之间)。

[0417] 研究治疗

[0418] 在每一28天周期中以口服胶囊QD施用化合物1。在每一28天周期的第1天经由IV施用瑞弗利单抗。研究药物使用单剂或组合方案继续,直至疾病进展、需要药物中断的不良事件或参与者或医师决定。参与者如果获得益处长达1年则继续治疗;届时,研究者和发起人将讨论继续治疗在临床上是否是适当的。

[0419] 参与者应在每天早晨大致相同的时间服用化合物1。可基于出现的PK观察结果调整施用时间表。

[0420] 纳入准则

[0421] 参与者仅在符合所有以下准则时才有资格纳入研究中:

- [0422] 首先,所有参与者必须为至少18岁。
- [0423] 部分1A、部分1B、部分2A和部分2B:无标准疗法可用或尽管有标准疗法但已具有进展或不耐受标准疗法的实体肿瘤的的组织学或细胞学证据,所述标准疗法可包括化学疗法、靶向疗法、生物疗法和免疫疗法,包括下文所概述的群组特异性要求:
- [0424] ●认为不适于手术或其他治愈性治疗或程序的根据RECIST v1.1可测量的病灶,其中至少1个靶病灶可用于评估。如果病灶中已展示进展,那么位于先前照射的区域中或经受其他局部区域疗法的区域中的肿瘤病灶被视为可测量的。
- [0425] 仅部分1A和部分2A:晚期或转移性胃腺癌或GEJ腺癌、HCC、黑色素瘤、NSCLC、RCC、软组织肉瘤、SCCHN(复发性或转移性)、TNBC或尿路上皮癌。获得医学监测员批准可允许额外肿瘤组织学,包括MSI-H肿瘤。
- [0426] 仅部分1B和部分2B:
- [0427] 群组1:晚期或转移性黑色素瘤
- [0428] -必须已接受可用标准护理,包括但不限于1种含有PD-1/L1的先前方案(呈单剂或组合形式),接受至少2个剂量的抗PD-1/L1剂,并且在治疗期间或之后经历PD。
- [0429] -已知BRAF状况(V600e和V600k)。
- [0430] -排除眼部黑色素瘤。
- [0431] 群组2:晚期或转移性NSCLC
- [0432] -必须已接受可用标准护理治疗,包括但不限于1种含有PD-1/L1的先前方案(呈单剂或组合形式),接受至少2个剂量的抗PD-1/L1剂,并且在治疗期间或之后经历PD。
- [0433] -允许招募先前已经适当靶向剂治疗的患有具有已知驱动突变(EGFR、ALK、ROS1、BRAF)的肿瘤的参与者。
- [0434] -已知PD-L1表达状况和/或TPS
- [0435] 群组3:复发性或转移性SCCHN
- [0436] -必须已接受可用标准护理,包括但不限于1种含有PD-1/L1的先前方案(呈单剂或组合形式),接受至少2个剂量的抗PD-1/L1剂,并且在治疗期间或之后经历PD。
- [0437] -已知PD-L1表达状况和/或TPS
- [0438] -排除鼻咽癌、甲状腺癌、唾液腺癌或非鳞状组织学癌。
- [0439] 群组4:晚期或转移性软组织肉瘤
- [0440] -必须已接受可用标准护理
- [0441] -合格的亚型包括平滑肌肉瘤、不良分化/去分化的脂肪肉瘤、高级多形性未分化肉瘤/MFH、粘液纤维肉瘤、恶性外周神经鞘瘤、上皮样肉瘤、透明细胞肉瘤、滑液肉瘤、横纹肌肉瘤、纤维肉瘤和血管肉瘤;经医学监测员批准可招募额外组织学。
- [0442] -必须尚未接受先前抗PD-1/L1靶向治疗。
- [0443] 部分1C:排除如通过WHO准则所定义的复发性或原发性难治性AML;急性前骨髓细胞性白血病(M3)、疗法相关的AML和转化MDS。
- [0444] 排除准则
- [0445] 如果符合以下准则中的任一者,那么参与者从研究中排除在外:
- [0446] 1. 参与者接受CYP3A4的强效抑制剂或诱导剂。
- [0447] a. 对于先前用强效CYP3A4抑制剂的治疗,需要在第一剂量的化合物1之前经历 ≥ 5

个半衰期的清除期才能招募至研究中。

[0448] b. 对于用CYP3A4诱导剂治疗任一参与者,需要在第一剂量的化合物1之前经历 ≥ 14 天的清除期才能招募至研究中。

[0449] 2. 患有黄斑变性、增生性糖尿病视网膜病变或伴有黄斑水肿的糖尿病视网膜病变、视网膜静脉阻塞、葡萄膜炎、中心性浆液性视网膜病变、白血病性视网膜病变、遗传性视网膜变性、遗传性视网膜变性的已知家族史的参与者,以及具有瞳孔扩张导致闭角型青光眼风险的参与者无资格。具有在眼科筛查检查期间鉴定的可能干扰眼部监测的其他临床上显著的异常的参与者无资格。如果在眼科筛查检查期间鉴定出异常,那么研究者应联系医学监测员来讨论是否有资格。

[0450] 3. 临床上显著的心脏病,包括LVEF $<40\%$,不稳定型心绞痛,第1周期第1天起6个月内的急性心肌梗塞,纽约心脏病协会III级或IV级充血性心力衰竭,以及需要治疗的心律失常。

[0451] 4. 研究者认为在临床上有意义的ECG史或存在。不包括 >480 毫秒的筛选QTcF间隔。在单个QTc >480 毫秒的情况下,如果3次ECG的平均QTc <480 毫秒,那么参与者可入选。对于心室内传导延迟(QRS间隔 >120 毫秒)的参与者,经发起人批准,可使用JTc间隔替代QTc。如果使用JTc替代QTc,那么JTc必须 ≤ 340 毫秒。排除左束支传导阻滞的参与者。

[0452] 5. 未治疗的脑或CNS转移或已具有进展的脑或CNS转移(例如新的或扩大的脑转移或可归因于脑或CNS转移的新的神经系统症状的证据)。先前接受过治疗并且具有临床上稳定的脑或CNS转移并停用所有皮质类固醇 ≥ 2 周的参与者有资格。

[0453] 6. 患有与先前疗法无关或由先前免疫检查点抑制剂疗法引起的活动性或非活动性自身免疫疾病或综合征(例如类风湿性关节炎、中度或重度银屑病、多发性硬化、炎性肠病)并且在过去2年中需要全身性治疗的参与者,或正在接受自身免疫疾病或炎性疾病的全身性疗法(即,使用疾病改进剂、皮质类固醇或免疫抑制药物)的参与者。

[0454] 7. 对先前免疫疗法具有3级或3级以上的免疫相关AE或任何眼部毒性的参与者。允许以下3级或3级以上的AE:

[0455] a. 使用局部疗法消退的3级皮疹。

[0456] b. 不需要中断治疗的无症状脂肪酶升高。

[0457] c. 根据上述第6条排除准则,允许出现自身免疫疾患。

[0458] 8. 不在方案定义的范围内的实验室值。如果在治疗开始前 >7 天进行以下筛选化学和血液学测试,那么必须在第1周期第1天研究药物施用前重复测试并确认有资格。具有如下筛选实验室值的参与者无资格:

实验室参数	部分 1A/1B 和部分 2 (实体肿瘤)	部分 1C (AML)
[0459] a. 血小板	$< 100 \times 10^9/L$	$< 50 \times 10^9/L$
b. 血红素	$< 9 \text{ g/dL}$ 或 $< 5.6 \text{ mmol/L}$	N/A
c. 绝对嗜中性球计数("ANC")	$< 1.5 \times 10^9/L$	$< 0.5 \times 10^9/L$

[0460] 实验室参数	所有参与者
--------------	-------

[0461]	d.天冬氨酸氨基转移酶(“AST”)和丙氨酸氨基转移酶(“ALT”)	≥ 2.5 × 正常上限(“ULN”) (在患有肝转移的参与者中, AST 和/或 ALT ≥ 5 × ULN)
	e.碱性磷酸酶	对于在筛选放射影像学检查时患有 1)骨转移和 2)无肝实质转移的参与者, ≥ 2.5 × ULN 或碱性磷酸酶 ≥ 5 × ULN
	f.总胆红素	≥ 1.2 × ULN, 除非结合的胆红素 ≤ ULN (如果总胆红素超过 ULN, 那么仅需要测试结合的胆红素)。如果无制度性 ULN, 那么直接胆红素必须 < 40%的总胆红素
	g.血清肌酸酐	对于肌酸酐水平 > 1.5 × 制度 ULN 的参与者, > 1.5 × 制度 ULN 或肌酸酐清除率 < 50 mL/min
	h. INR 或 PT	> 1.5 × ULN
	i. aPTT	> 1.5 × ULN

[0462] 9. 排除接受任何维生素K拮抗剂的参与者, 所述维生素K拮抗剂包括但不限于醋硝香豆素 (acenocoumarol)、氟茛二酮 (fluindione)、苯丙香豆素 (phenprocoumon) 和华法林 (warfarin)。

[0463] 10. 在首次施用研究药物之前的以下间隔内用抗癌药物或研究药物治疗:

[0464] a. 对于化学疗法、靶向小分子疗法或放射疗法, 至少14天。参与者不得因治疗而患有放射性肺炎。经发起人批准, 对非CNS疾病的姑息性放射允许1周清除期。

[0465] b. 对于用于抗癌疗法的先前单克隆抗体, 至少28天。对于具有长半衰期 (例如 > 5 天) 的其他剂, 第5个半衰期之前的招募需要医学监测员批准。

[0466] 11. 在开始研究治疗前, 尚未从先前疗法 (包括先前免疫疗法) 的毒性效应和/或先前手术干预的并发症恢复至 ≤ 1级或基线; 允许出现预期不会消退的稳定慢性毒性, 例如外周神经毒性、脱发和疲劳。

[0467] 12. 在第一剂量的研究治疗之前的7天内未使用全身性皮质类固醇。

[0468] 13. 在第一剂量的研究治疗的3个月内接受活疫苗

[0469] 14. 需要全身性疗法的活动性感染。需要对全身性抗生素进行28天清除。禁止在研究时和筛选期间使用益生菌。

[0470] 15. HBV或HCV感染或再活化风险的证据。必须无法检测到B型肝炎病毒DNA和HCV RNA。参与者对HBV DNA、HCV RNA、B型肝炎表面抗原或抗B型肝炎核心抗体不可呈阳性。

[0471] 16. 已知HIV (HIV 1/2抗体) 史。

[0472] 17. 已知对研究药物或制剂组分的任何组分有超敏反应或严重反应。

[0473] 18. 从筛选访视开始至研究治疗的最后一次剂量后的180天, 在研究的计划持续时间内怀孕或哺乳或预期受孕或生育子女。

- [0474] 19. 研究者认为会干扰充分参与研究的任何疾患,包括研究治疗的施用和参加必需的研究访视;对参与者构成重大风险;或干扰研究数据的解释。
- [0475] 20. 参与者(或父母、监护人或法定授权代表)无法理解ICF或不愿签署ICF。
- [0476] 21. 患有已知吞咽困难、短肠综合征、胃轻瘫或限制口服施用的药物的摄入或胃肠道吸收的其他疾患的参与者。
- [0477] 22. 仅部分1C:在第一剂量的化合物1的60天内经受HSCT的参与者,或筛选时接受HSCT后免疫抑制疗法的参与者,或患有临床上显著的GVHD的参与者。(允许对正在进行的皮肤GVHD使用局部类固醇。)
- [0478] 23. 仅部分1C:具有表明活动性CNS白血病或已知CNS白血病的临床症状的参与者。仅当筛选期间临床怀疑CNS与白血病有关时,才需要评估脑脊液。
- [0479] 24. 间质性肺病、间质性肺病病史或活动性非感染性肺炎的证据。
- [0480] 25. 器官移植史,包括同种异体干细胞移植(群组1C除外)。
- [0481] 26. 建议永久中断疗法的先前检查点抑制剂疗法期间的免疫相关毒性(根据产品标签或共识指南),或需要强化或延长免疫抑制以进行管控的任何免疫相关毒性(使用替代激素进行良好控制的内分泌病变除外)。
- [0482] 27. 眼皮肤白化病的诊断。
- [0483] 除了本文所述的那些修改外,本领域技术人员根据前面的描述将知晓本发明的各种修改。此类修改还意图落在所附权利要求书的范围内。本申请中所引用的每一参考文献(包括所有专利、专利申请和出版物)均以引用的方式全文并入本文中。

序列表

- <110> 因赛特公司
 <120> 包含AXL/MER和PD-1/PD-L1抑制剂的组合疗法
 <130> 20443-0665W01
 <150> US 62/986,482
 <151> 2020-03-06
 <160> 13
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 288
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 人源化、IgG4单克隆抗体
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1) .. (288)
 <223> 人类PD-1多肽(NCI序列NP_005009.2)
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1) .. (20)
 <223> 人类PD-1信号序列
 <400> 1

```

Met Gln Ile Pro Gln Ala Pro Trp Pro Val Val Trp Ala Val Leu Gln
1           5           10           15
Leu Gly Trp Arg Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp
           20           25           30
Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu Gly Asp
           35           40           45
Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val
           50           55           60
Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala
65           70           75           80
Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Cys Arg Phe Arg
           85           90           95
Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg
           100          105          110
Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu

```


Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 340 345 350
 Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
 355 360 365
 Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
 370 375 380
 Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
 385 390 395 400
 Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
 405 410 415
 Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
 420 425 430
 Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
 435 440 445
 <210> 3
 <211> 218
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 人源化、IgG4单克隆抗体
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1) .. (218)
 <223> 人类PD-1多肽(NCI序列NP 005009.2)
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1) .. (20)
 <223> 人类PD-1信号序列
 <400> 3
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr
 20 25 30
 Gly Met Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45
 Lys Leu Leu Ile His Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ser
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys
85 90 95
Glu Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105 110
Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
115 120 125
Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
130 135 140
Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
145 150 155 160
Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
165 170 175
Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
180 185 190
His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
195 200 205
Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 4

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人源化、IgG4单克隆抗体

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1) .. (119)

<223> 人类PD-1多肽(NCI序列NP 005009.2)

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1) .. (20)

<223> 人类PD-1信号序列

<400> 4

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
20 25 30
Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Val Ile His Pro Ser Asp Ser Glu Thr Trp Leu Asp Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Asp Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Glu His Tyr Gly Thr Ser Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 5

<211> 111

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人源化、IgG4单克隆抗体

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1) .. (111)

<223> 人类PD-1多肽(NCI序列NP 005009.2)

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1) .. (20)

<223> 人类PD-1信号序列

<400> 5

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr
 20 25 30
 Gly Met Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45
 Lys Leu Leu Ile His Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ser
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80
 Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys
 85 90 95
 Glu Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

<400> 12

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10

<210> 13

<211> 448

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 人源化、IgG4单克隆抗体

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1) .. (448)

<223> 人类PD-1多肽(NCI序列NP_005009.2)

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1) .. (20)

<223> 人类PD-1信号序列

<400> 13

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr
 20 25 30
Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
Gly Val Ile His Pro Ser Asp Ser Glu Thr Trp Leu Asp Gln Lys Phe
 50 55 60
Lys Asp Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
Ala Arg Glu His Tyr Gly Thr Ser Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125
Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140
Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145 150 155 160
Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu

	165		170		175
Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser					
	180		185		190
Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro					
	195		200		205
Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys					
	210		215		220
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro					
225		230		235	240
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser					
	245		250		255
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp					
	260		265		270
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn					
	275		280		285
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val					
	290		295		300
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu					
305		310		315	320
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys					
	325		330		335
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr					
	340		345		350
Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr					
	355		360		365
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu					
	370		375		380
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu					
385		390		395	400
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys					
	405		410		415
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu					
	420		425		430
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly					
	435		440		445

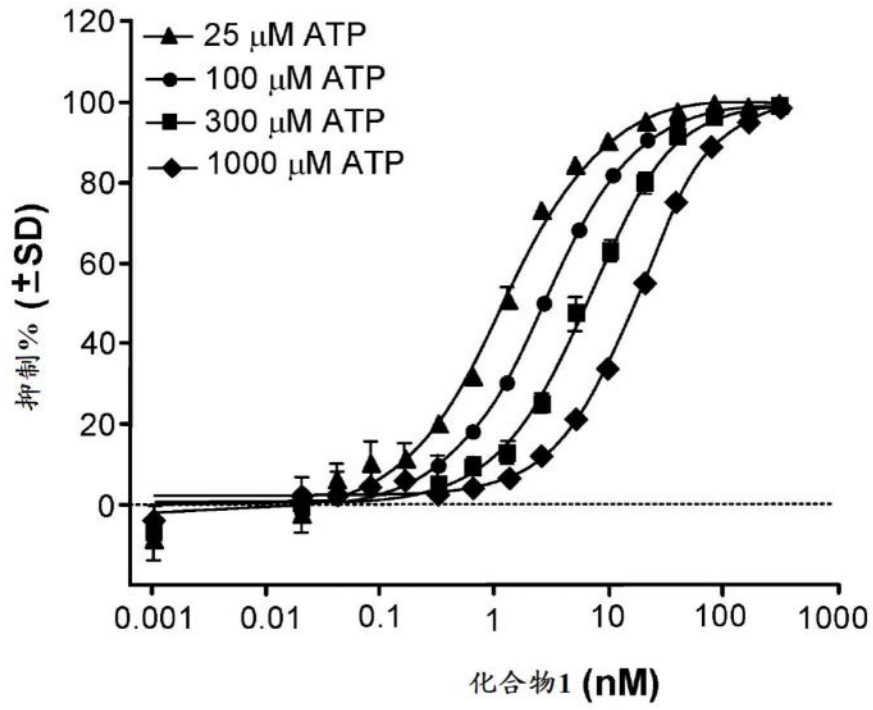


图1

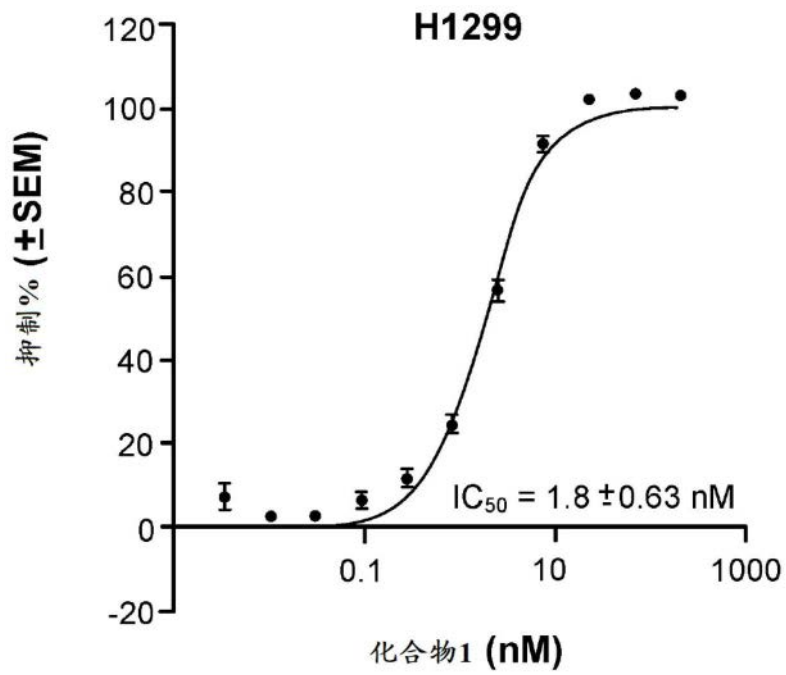


图2

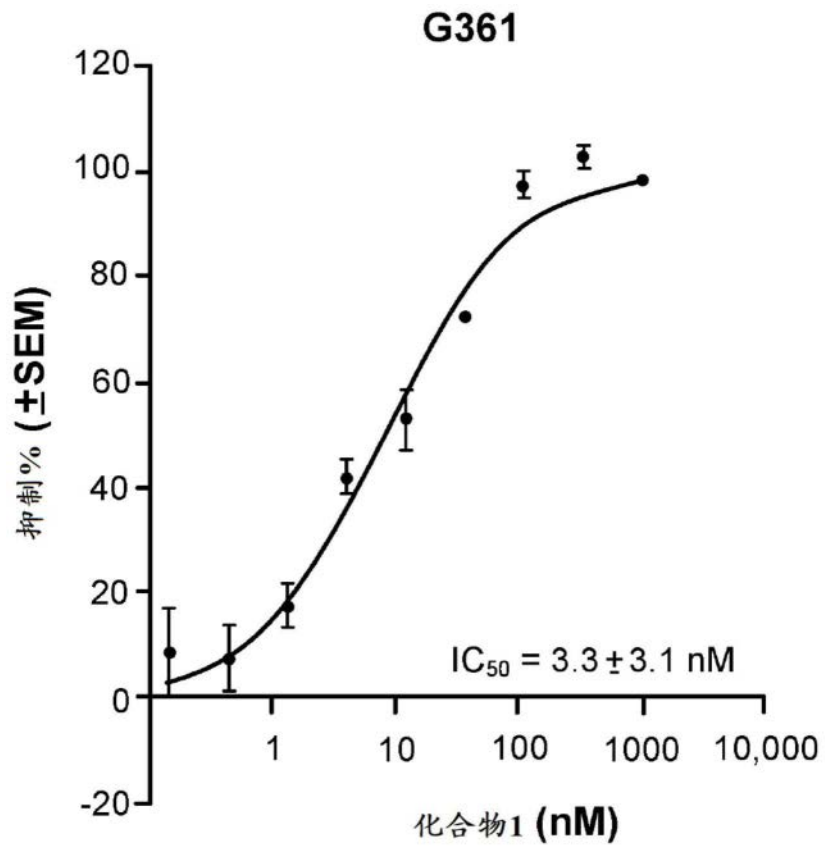


图3

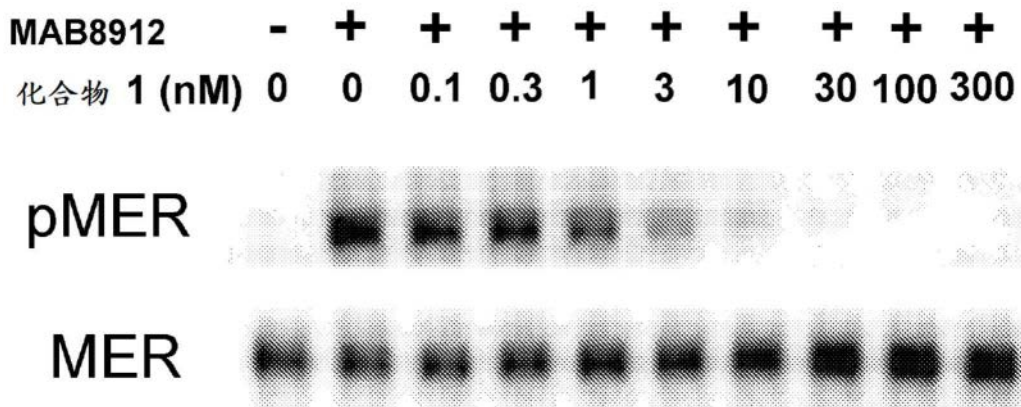


图4

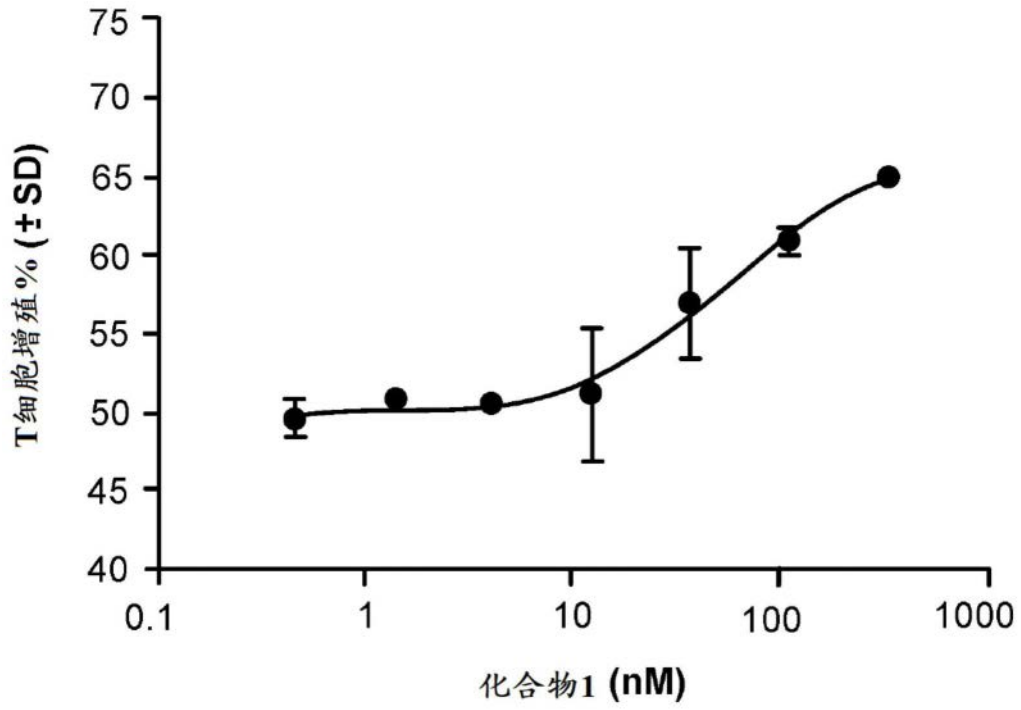


图5A

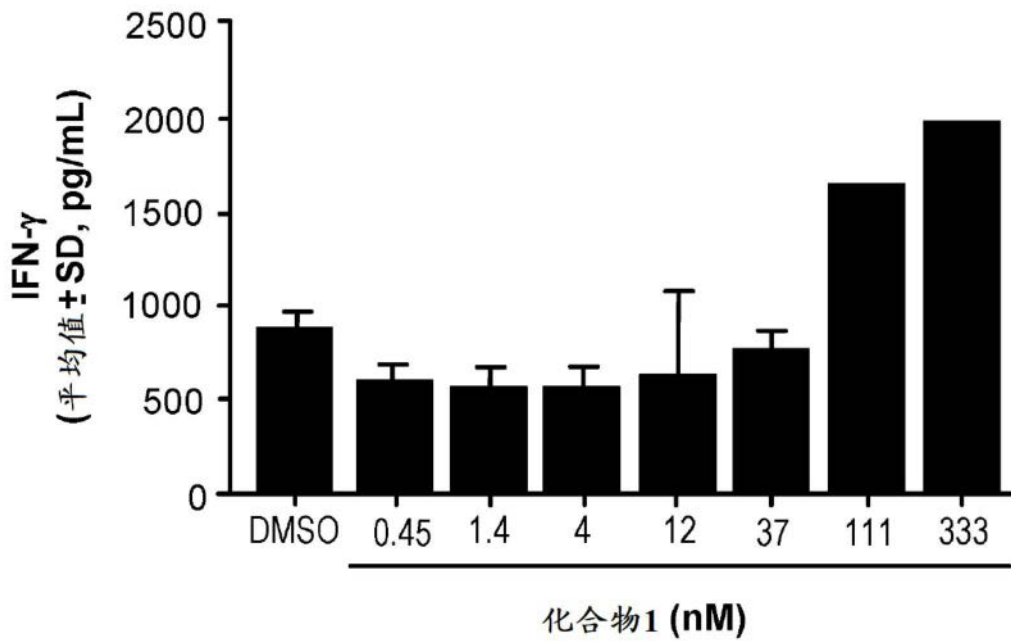


图5B

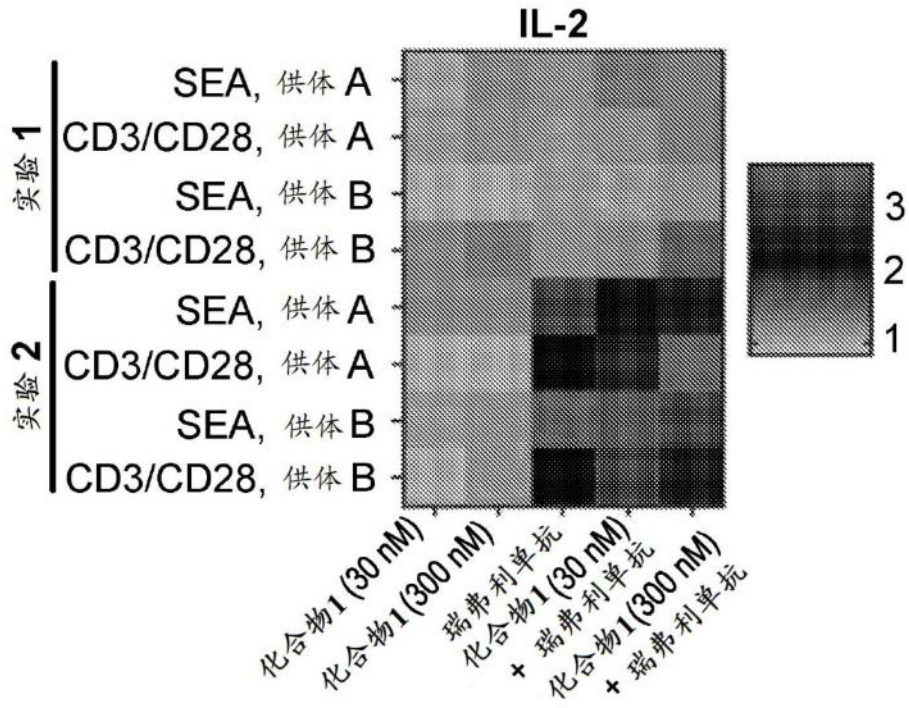


图6A

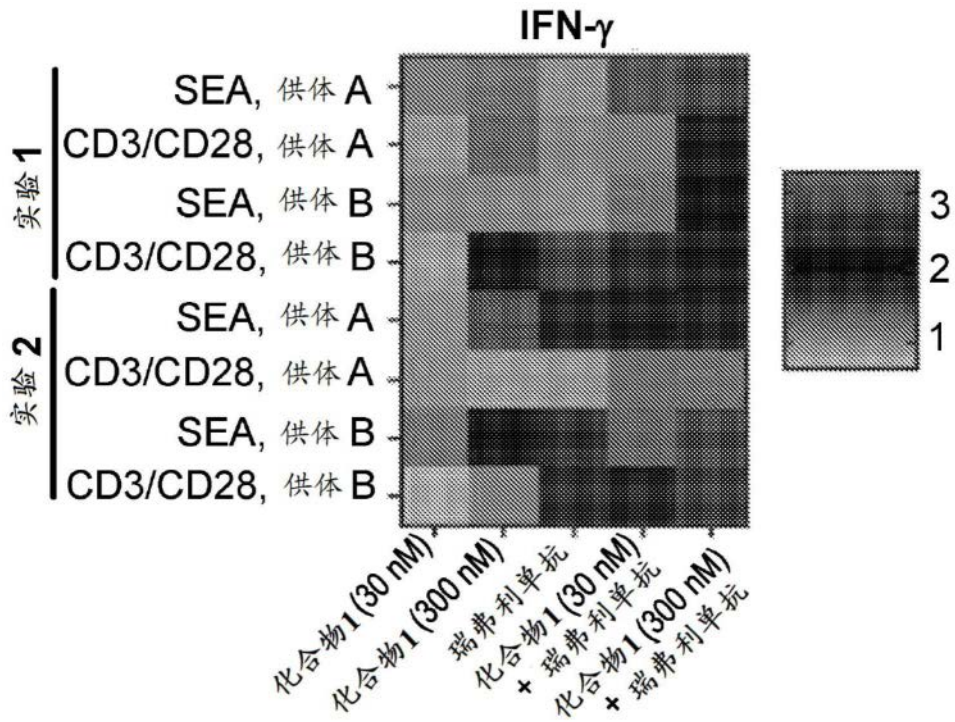


图6B

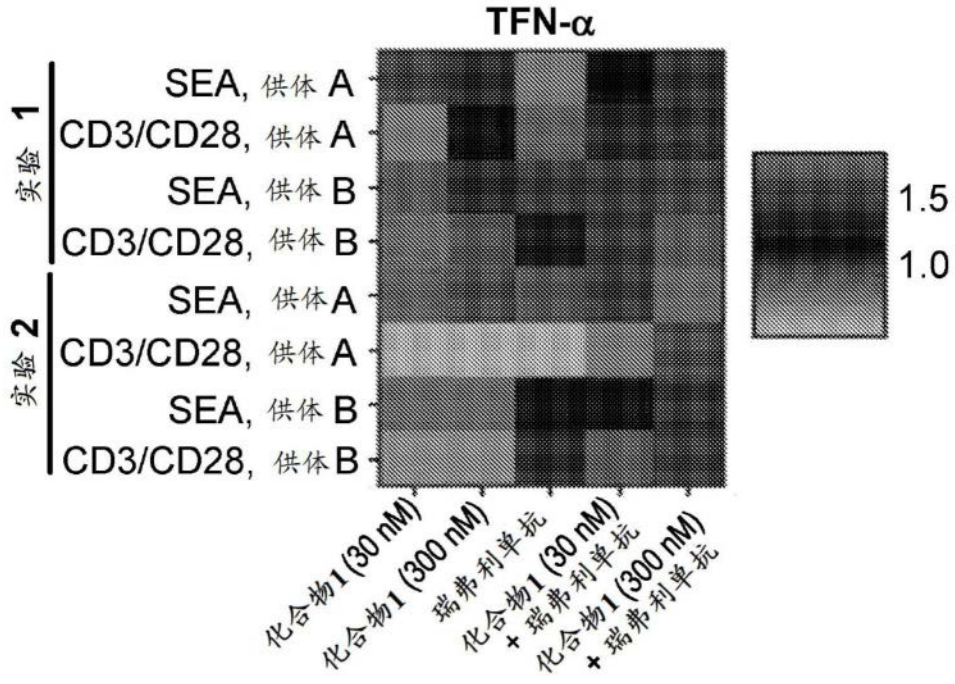


图6C

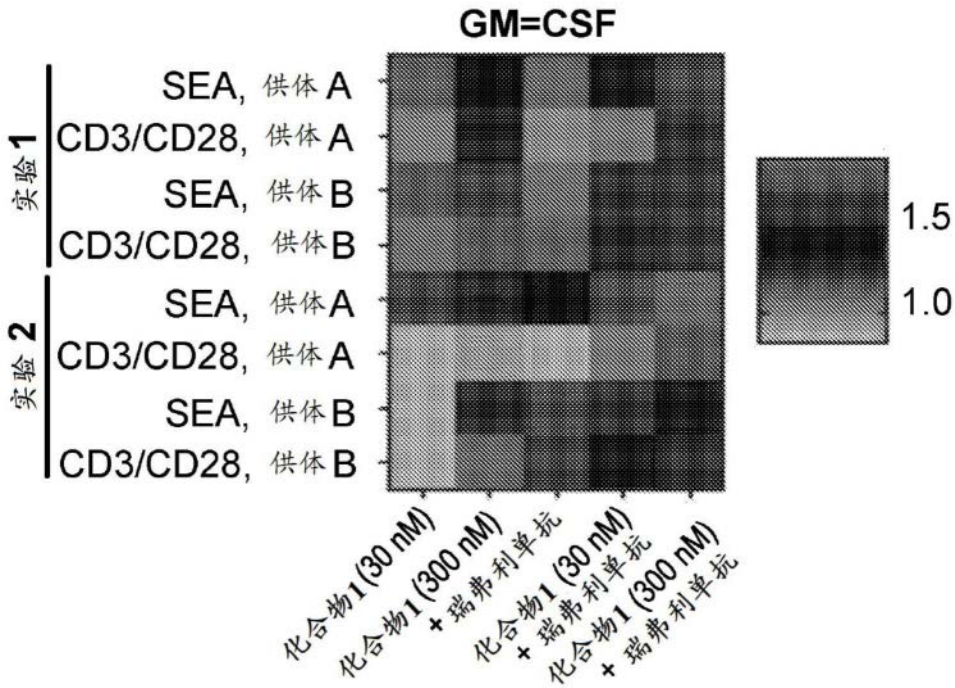


图6D

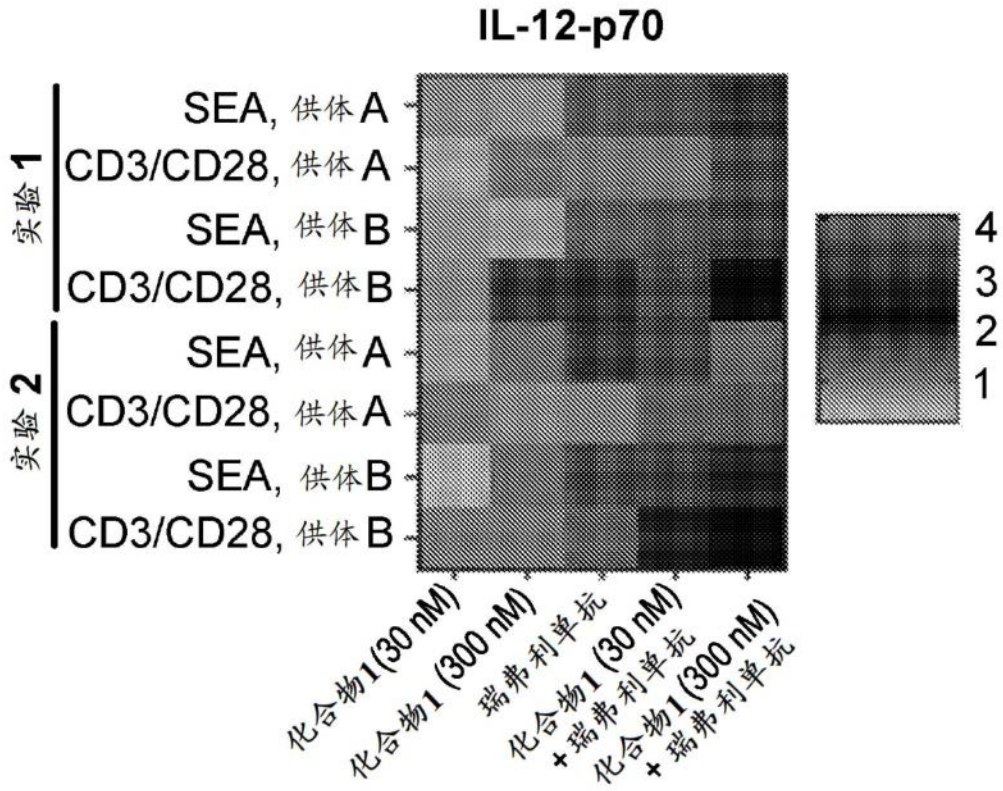


图6E

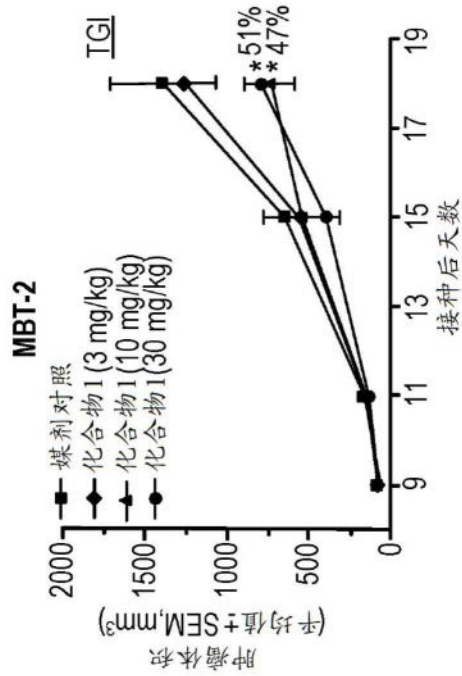


图7A

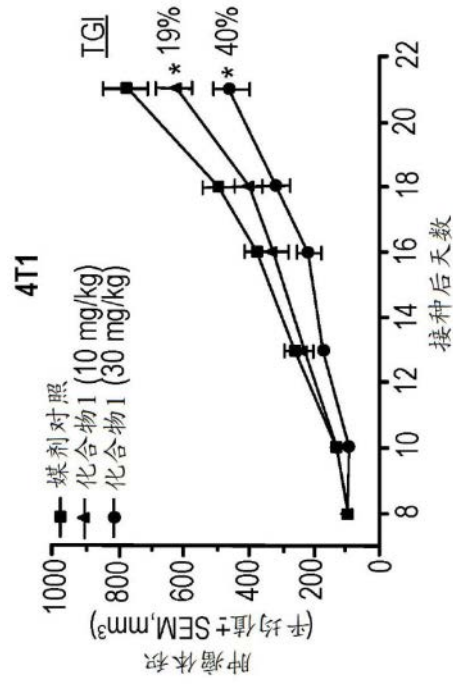


图7B

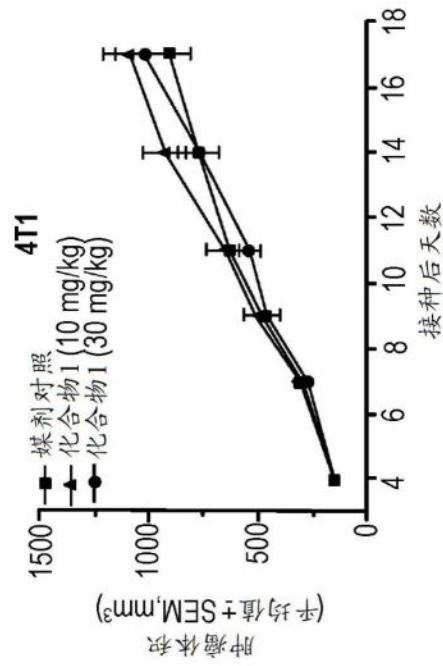


图7C

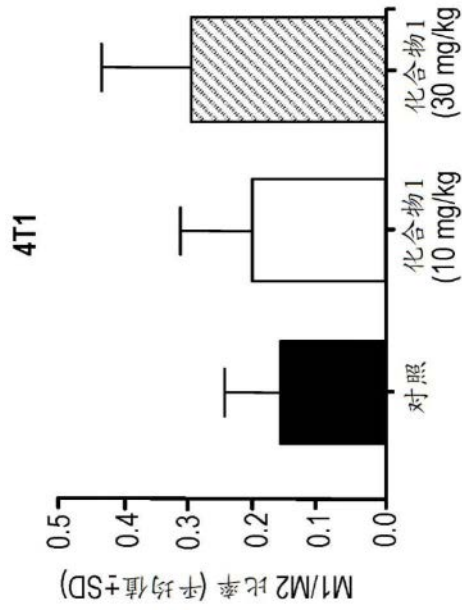


图7D

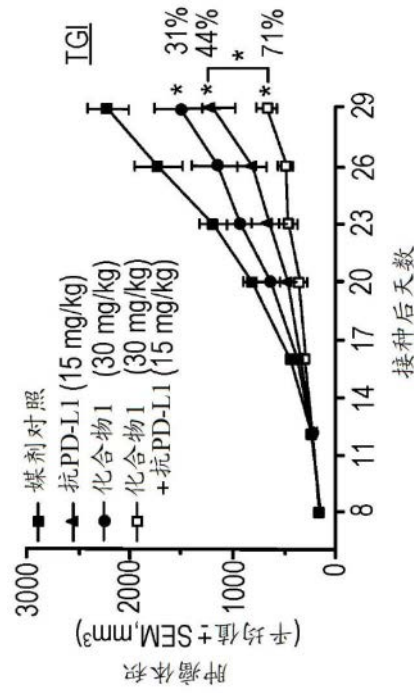


图8A

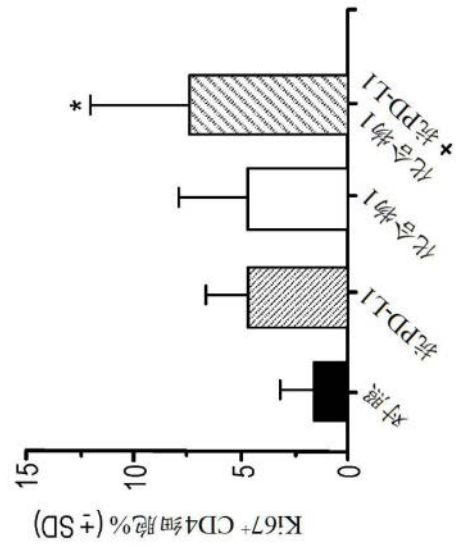


图8B

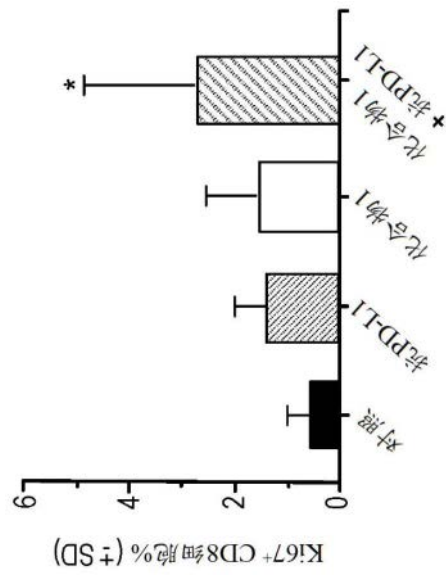


图8C

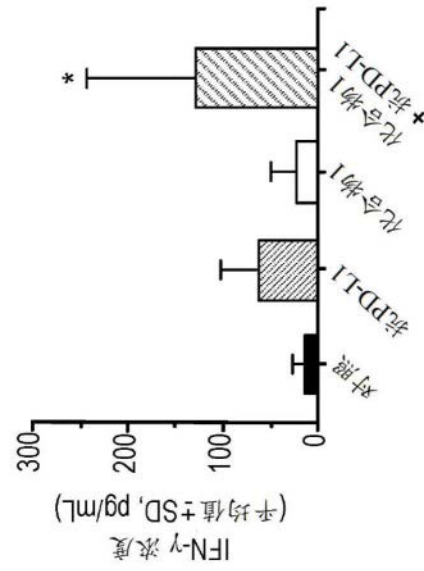


图8D

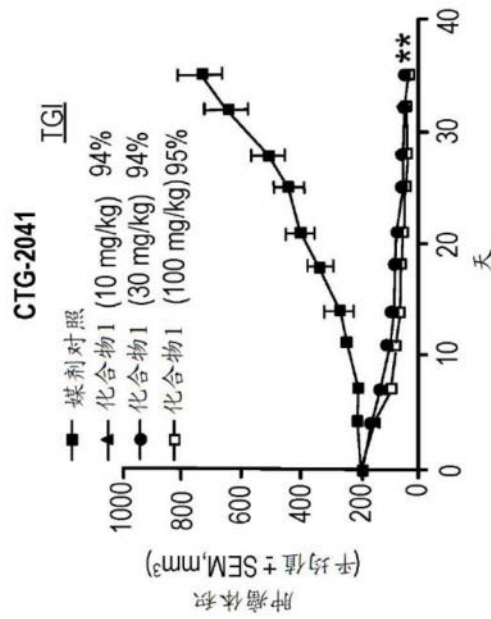


图9A

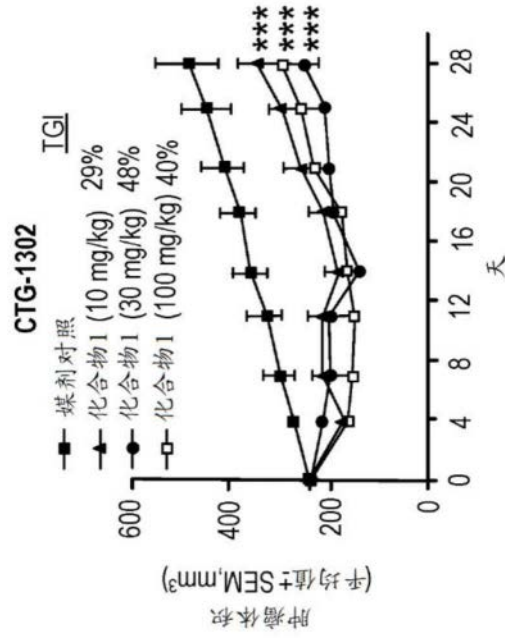


图9B

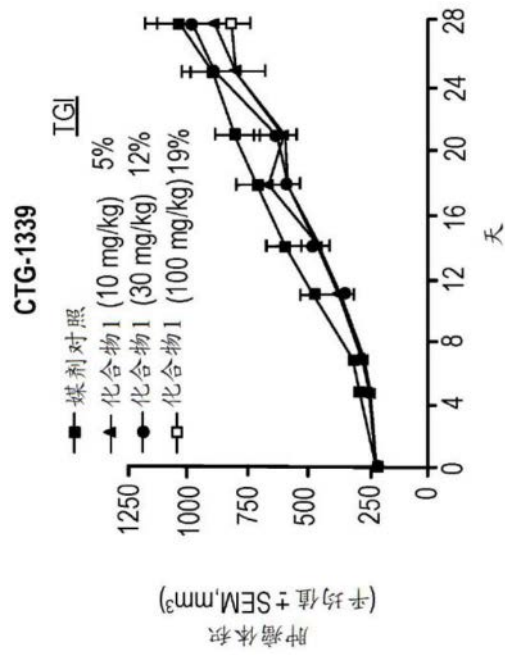


图9C

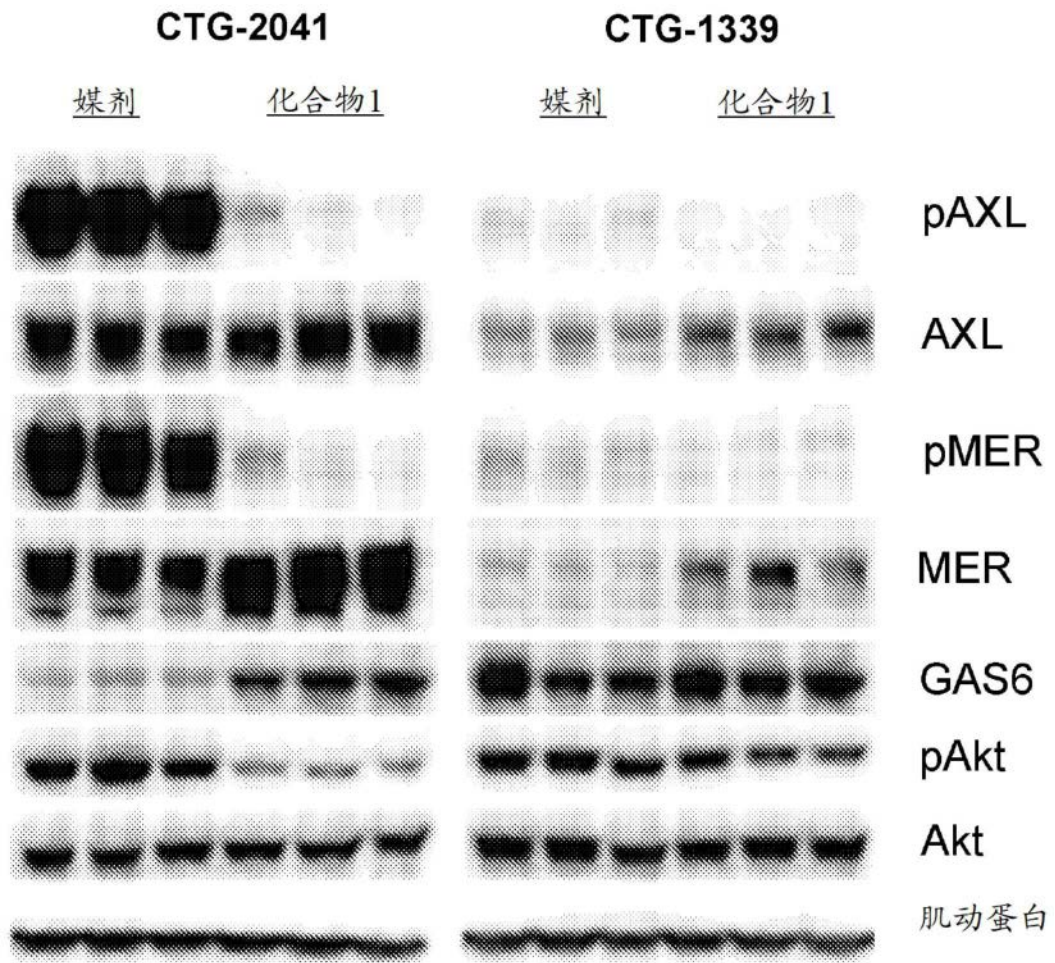


图9D