(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 115845070 A
(43)申请公布日 2023.03.28

(21)申请号 202211692364.1

(22)申请日 2017.05.16

(30)优先权数据
62/339363 2016.05.20 US

(62)分案原申请数据
201780044786.9 2017.05.16

(71)申请人 伊莱利利公司
地址 美国印第安纳州

(72)发明人 M.H.本德 高红 B.K.帕特尔

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001
专利代理师 李唐 张华

(51)Int.Cl.
A61K 45/06(2006.01)
A61K 39/395(2006.01)
A61K 31/55(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)
A61P 35/02(2006.01)

权利要求书1页 说明书14页

(54)发明名称

用NOTCH和PD-1或PD-L1抑制剂的组合治疗

(57)摘要

本发明涉及用NOTCH和PD-1或PD-L1抑制剂的组合治疗。本发明提供治疗患者的T细胞急性淋巴细胞白血病、急性淋巴细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病、急性髓性白血病、慢性髓性白血病、红白血病、三阴性乳腺癌、乳腺癌、卵巢癌、黑素瘤、肺癌、非小细胞肺癌、胰腺癌、胶质母细胞瘤、结直肠癌、头颈癌、宫颈癌、前列腺癌、肝癌、口腔鳞状细胞癌、皮肤癌、成神经管细胞瘤、肝细胞癌、肝内和肝外胆管癌、硬纤维瘤、软组织肉瘤或腺样囊性癌的药物及方法，其包括用4,4,4-三氟-N-[(1S)-2-[[(7S)-5-(2-羟乙基)-6-氧代-7H-吡啶并[2,3-d][3]苯并氮杂䓬-7-基]氨基]-1-甲基-2-氧代-乙基]丁酰胺或其药学上可接受的盐或水合物和选自帕姆单抗、纳武单抗、阿特朱单抗、度伐单抗和阿维鲁单抗的PD-1或PD-L1抑制剂的组合治疗。

CN 115845070 A

1.4,4,4-三氟-N-[(1S)-2-[[(7S)-5-(2-羟乙基)-6-氧代-7H-吡啶并[2,3-d][3]苯并氮杂䓬-7-基]氨基]-1-甲基-2-氧代-乙基]丁酰胺或其药学上可接受的盐或水合物用于制备第一药物的用途;和选自阿特朱单抗、度伐单抗和阿维鲁单抗的PD-L1抑制剂用于独立制备第二药物的用途;所述第一和第二药物组合用于治疗选自以下的癌症:T细胞急性淋巴细胞白血病、急性淋巴细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病、急性髓性白血病、慢性髓性白血病、红白血病、三阴性乳腺癌、乳腺癌、卵巢癌、黑素瘤、肺癌、非小细胞肺癌、胰腺癌、胶质母细胞瘤、结直肠癌、头颈癌、宫颈癌、前列腺癌、肝癌、口腔鳞状细胞癌、皮肤癌、成神经管细胞瘤、肝细胞癌、肝内和肝外胆管癌、硬纤维瘤软组织肉瘤和腺样囊性癌。

2.权利要求1的用途,其中所述癌症是结直肠癌。

3.权利要求1的用途,其中所述用途用于通过同时、分开或依次施用有效量的4,4,4-三氟-N-[(1S)-2-[[(7S)-5-(2-羟乙基)-6-氧代-7H-吡啶并[2,3-d][3]苯并氮杂䓬-7-基]氨基]-1-甲基-2-氧代-乙基]丁酰胺或其药学上可接受的盐或水合物和PD-1或PD-L1抑制剂治疗癌症。

4.权利要求1-3中任一项的用途,其中所述第一药物经制备用于2.5 mg/患者-75 mg/患者的4,4,4-三氟-N-[(1S)-2-[[(7S)-5-(2-羟乙基)-6-氧代-7H-吡啶并[2,3-d][3]苯并氮杂䓬-7-基]氨基]-1-甲基-2-氧代-乙基]丁酰胺或其药学上可接受的盐或水合物的剂量。

5.权利要求4的用途,其中所述第一药物经制备用于10 mg/患者-50 mg/患者的4,4,4-三氟-N-[(1S)-2-[[(7S)-5-(2-羟乙基)-6-氧代-7H-吡啶并[2,3-d][3]苯并氮杂䓬-7-基]氨基]-1-甲基-2-氧代-乙基]丁酰胺或其药学上可接受的盐或水合物的剂量。

6.权利要求4的用途,其中所述第一药物经制备以在5天的时间内每隔一天每天使用一次,接着两天不给药(T.I.W.)。

7.权利要求5的用途,其中所述第一药物经制备以在5天的时间内每隔一天每天使用一次,接着两天不给药(T.I.W.)。

8.权利要求1-3中任一项的用途,其中所述第一药物经制备用于口服施用。

9.权利要求1-3中任一项的用途,其中以1 mg/kg-3 mg/kg的施用量制备所述第二药物。

10.权利要求9的用途,其中所述第二药物经制备以每14-21天使用一次。

11.权利要求1-3中任一项的用途,其中所述第二药物经制备用于胃肠外施用。

12.权利要求11的用途,其中所述胃肠外施用为静脉内输注。

用NOTCH和PD-1或PD-L1抑制剂的组合治疗

[0001] 本申请是申请日为2017年5月16日的中国专利申请201780044786.9“用NOTCH和PD-1或PD-L1抑制剂的组合治疗”的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明涉及用4,4,4-三氟-N-[(1S)-2-[[(7S)-5-(2-羟乙基)-6-氧代-7H-吡啶并[2,3-d][3]苯并氮杂䓬-7-基]氨基]-1-甲基-2-氧代-乙基]丁酰胺或其药学上可接受的盐或水合物(化合物A)和程序性死亡受体1(PD-1)抑制剂或程序性死亡受体配体1(PD-L1)抑制剂的癌症治疗,以及使用组合治疗癌症的方法。

背景技术

[0003] 4,4,4-三氟-N-[(1S)-2-[[(7S)-5-(2-羟乙基)-6-氧代-7H-吡啶并[2,3-d][3]苯并氮杂䓬-7-基]氨基]-1-甲基-2-氧代-乙基]丁酰胺或其药学上可接受的盐或水合物是Notch途径信号传导抑制剂化合物。Notch信号传导在发育和组织稳态期间起重要作用。由于配体和/或受体的突变、扩增或过表达导致的Notch信号传导的失调涉及许多恶性肿瘤。抑制Notch信号传导是开发癌症疗法的潜在目标。化合物A及制备和使用该化合物的方法(包括用于治疗T细胞急性淋巴细胞白血病、急性淋巴细胞白血病、急性髓性白血病、慢性髓性白血病、红白血病、乳腺癌、卵巢癌、黑素瘤、肺癌、胰腺癌、胶质母细胞瘤、结直肠癌、头颈癌、宫颈癌、前列腺癌、肝癌、鳞状细胞癌(口腔)、皮肤癌和成神经管细胞瘤)在WO2013/016081中公开,且在PCT/US2016/026119中公开治疗平滑肌肉瘤。化合物A正在具有限定的分子途径改变或基于组织的恶性肿瘤的第1期临床试验和扩展组中,并与针对显示与Notch途径信号传导有关的突变、扩增或基因表达改变的特定肿瘤类型的其他特异性识别的抗癌剂组合,以及在患有T细胞急性淋巴细胞白血病或T细胞淋巴细胞淋巴瘤(T-ALL/T-LBL)的患者中的临床试验中被研究。

[0004] 肿瘤细胞通过各种机制逃避免疫系统的检测和消除。从内源上看,免疫检查点途径用于维持自身耐受和控制T细胞活化。PD-1配体PD-L1和PD-L2与T细胞上发现的PD-1受体的结合抑制T细胞增殖和细胞因子产生。PD-1配体的上调发生在一些肿瘤中且通过该途径的信号传导有助于抑制肿瘤的活性T细胞免疫监视。已经显示抑制PD-1或PD-L1恢复肿瘤的免疫介导破坏。临床研究发现,用拮抗剂抗体靶向PD-1或PD-L1释放PD-1途径介导的免疫反应(包括抗肿瘤反应)抑制。

[0005] 据报道,Notch途径信号传导是活化的$CD8^+$ T细胞对PD-1表达的调节因子,Mathieu等,Immunology and Cell Biology,2013,91:82-88。尽管存在针对患有癌症的患者的治疗选择,但仍然需要提供增强功效和较低毒性中的一种或两种的新的和不同的疗法。目前的免疫疗法已经在一部分癌症类型中且仅在一部分患者中显示益处。需要新的疗法或组合策略来改善针对特定癌症的总反应或促进这些治疗延伸至目前可以对单独的任一种试剂反应较小的癌症。

发明内容

[0006] 据信，本发明提供与由单独的任一种试剂提供的治疗效果相比，来自化合物A和抗PD-1或PD-L1单克隆抗体抑制剂活性对T细胞急性淋巴细胞白血病、急性淋巴细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病、急性髓性白血病、慢性髓性白血病、红白血病、三阴性乳腺癌、乳腺癌、卵巢癌、黑素瘤、肺癌、非小细胞肺癌、胰腺癌、胶质母细胞瘤、结直肠癌、头颈癌、宫颈癌、前列腺癌、肝癌、口腔鳞状细胞癌、皮肤癌、成神经管细胞瘤、肝细胞癌、肝内和肝外胆管癌、硬纤维瘤、软组织肉瘤和腺样囊性癌的组合活性的有益治疗效果。

[0007] 本发明的一个方面提供治疗在患者中的T细胞急性淋巴细胞白血病、急性淋巴细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病、急性髓性白血病、慢性髓性白血病、红白血病、三阴性乳腺癌、乳腺癌、卵巢癌、黑素瘤、肺癌、非小细胞肺癌、胰腺癌、胶质母细胞瘤、结直肠癌、头颈癌、宫颈癌、前列腺癌、肝癌、口腔鳞状细胞癌、皮肤癌、成神经管细胞瘤、肝细胞癌、肝内和肝外胆管癌、硬纤维瘤、软组织肉瘤或腺样囊性癌的方法，其包括向需要治疗的患者施用有效量的4,4,4-三氟-N-[(1S)-2-[[(7S)-5-(2-羟乙基)-6-氧代-7H-吡啶并[2,3-d][3]苯并氮杂䓬-7-基]氨基]-1-甲基-2-氧代-乙基]丁酰胺或其药学上可接受的盐或水合物和有效量的选自帕姆单抗(pembrolizumab)、纳武单抗(nivolumab)、阿特朱单抗(atezolizumab)、度伐单抗(durvalumab)和阿维鲁单抗(avelumab)的PD-1或PD-L1抑制剂。

[0008] 本发明的另一方面提供治疗患者中的结直肠癌的方法，其包括向需要治疗的患者施用有效量的4,4,4-三氟-N-[(1S)-2-[[(7S)-5-(2-羟乙基)-6-氧代-7H-吡啶并[2,3-d][3]苯并氮杂䓬-7-基]氨基]-1-甲基-2-氧代-乙基]丁酰胺或其药学上可接受的盐或水合物，和有效量的选自帕姆单抗、纳武单抗、阿特朱单抗、度伐单抗和阿维鲁单抗的PD-1或PD-L1抑制剂。

[0009] 本发明的另一方面提供治疗患者中的T细胞急性淋巴细胞白血病、急性淋巴细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病、急性髓性白血病、慢性髓性白血病、红白血病、三阴性乳腺癌、乳腺癌、卵巢癌、黑素瘤、肺癌、非小细胞肺癌、胰腺癌、胶质母细胞瘤、结直肠癌、头颈癌、宫颈癌、前列腺癌、肝癌、口腔鳞状细胞癌、皮肤癌、成神经管细胞瘤、肝细胞癌、肝内和肝外胆管癌、硬纤维瘤、软组织肉瘤或腺样囊性癌的方法，其包括向需要治疗的患者同时、分开或依次施用有效量的4,4,4-三氟-N-[(1S)-2-[[(7S)-5-(2-羟乙基)-6-氧代-7H-吡啶并[2,3-d][3]苯并氮杂䓬-7-基]氨基]-1-甲基-2-氧代-乙基]丁酰胺或其药学上可接受的盐或水合物，和有效量的选自帕姆单抗、纳武单抗、阿特朱单抗、度伐单抗和阿维鲁单抗的PD-1或PD-L1抑制剂。

[0010] 本发明的另一方面提供治疗患者中的结直肠癌的方法，其包括向需要治疗的患者同时、分开或依次施用有效量的4,4,4-三氟-N-[(1S)-2-[[(7S)-5-(2-羟乙基)-6-氧代-7H-吡啶并[2,3-d][3]苯并氮杂䓬-7-基]氨基]-1-甲基-2-氧代-乙基]丁酰胺或其药学上可接受的盐或水合物，和有效量的选自帕姆单抗、纳武单抗、阿特朱单抗、度伐单抗和阿维鲁单抗的PD-1或PD-L1抑制剂。

[0011] 本发明的另一方面提供用于同时、分开或依次用于治疗以下疾病的化合物4,4,4-三氟-N-[(1S)-2-[[(7S)-5-(2-羟乙基)-6-氧代-7H-吡啶并[2,3-d][3]苯并氮杂䓬-7-基]氨基]-1-甲基-2-氧代-乙基]丁酰胺或其药学上可接受的盐或水合物；和选自帕姆单抗、纳

武单抗、阿特朱单抗、度伐单抗和阿维鲁单抗的PD-1或PD-L1抑制剂:T细胞急性淋巴细胞白血病、急性淋巴细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病、急性髓性白血病、慢性髓性白血病、红白血病、三阴性乳腺癌、乳腺癌、卵巢癌、黑素瘤、肺癌、非小细胞肺癌、胰腺癌、胶质母细胞瘤、结直肠癌、头颈癌、宫颈癌、前列腺癌、肝癌、口腔鳞状细胞癌、皮肤癌、成神经管细胞瘤、肝细胞癌、肝内和肝外胆管癌、硬纤维瘤、软组织肉瘤或腺样囊性癌。

[0012] 本发明的另一方面提供用于同时、分开或依次用于治疗结直肠癌的化合物4,4,4-三氟-N-[(1S)-2-[[(7S)-5-(2-羟乙基)-6-氧代-7H-吡啶并[2,3-d][3]苯并氮杂䓬-7-基]氨基]-1-甲基-2-氧代-乙基]丁酰胺或其药学上可接受的盐或水合物;和选自帕姆单抗、纳武单抗、阿特朱单抗、度伐单抗和阿维鲁单抗的PD-1或PD-L1抑制剂。

[0013] 本发明的另一方面提供:4,4,4-三氟-N-[(1S)-2-[[(7S)-5-(2-羟乙基)-6-氧代-7H-吡啶并[2,3-d][3]苯并氮杂䓬-7-基]氨基]-1-甲基-2-氧代-乙基]丁酰胺或其药学上可接受的盐或水合物用于制造药物的用途;和选自帕姆单抗、纳武单抗、阿特朱单抗、度伐单抗和阿维鲁单抗的PD-1或PD-L1抑制剂在制造药物中的用途;所述药物用于同时、分开或依次治疗T细胞急性淋巴细胞白血病、急性淋巴细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病、急性髓性白血病、慢性髓性白血病、红白血病、三阴性乳腺癌、乳腺癌、卵巢癌、黑素瘤、肺癌、非小细胞肺癌、胰腺癌、胶质母细胞瘤、结直肠癌、头颈癌、宫颈癌、前列腺癌、肝癌、口腔鳞状细胞癌、皮肤癌、成神经管细胞瘤、肝细胞癌、肝内和肝外胆管癌、硬纤维瘤、软组织肉瘤或腺样囊性癌。

[0014] 本发明的另一方面提供:4,4,4-三氟-N-[(1S)-2-[[(7S)-5-(2-羟乙基)-6-氧代-7H-吡啶并[2,3-d][3]苯并氮杂䓬-7-基]氨基]-1-甲基-2-氧代-乙基]丁酰胺或其药学上可接受的盐或水合物用于制造药物的用途;和选自帕姆单抗、纳武单抗、阿特朱单抗、度伐单抗和阿维鲁单抗的PD-1或PD-L1抑制剂在制造药物中的用途;所述药物用于同时、分开或依次治疗结直肠癌。

[0015] 本发明的另一方面是商业包装,其包含每种治疗剂的单独组合物以及同时、分开或依次施用的说明书,用于治疗T细胞急性淋巴细胞白血病、急性淋巴细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病、急性髓性白血病、慢性髓性白血病、红白血病、三阴性乳腺癌、乳腺癌、卵巢癌、黑素瘤、肺癌、非小细胞肺癌、胰腺癌、胶质母细胞瘤、结直肠癌、头颈癌、宫颈癌、前列腺癌、肝癌、口腔鳞状细胞癌、皮肤癌、成神经管细胞瘤、肝细胞癌、肝内和肝外胆管癌、硬纤维瘤、软组织肉瘤或腺样囊性癌。

[0016] 本发明的又一个方面是商业包装,其包含每种治疗剂的单独组合物以及同时、分开或依次施用的说明书,用于治疗结直肠癌。

[0017] 化合物4,4,4-三氟-N-[(1S)-2-[[(7S)-5-(2-羟乙基)-6-氧代-7H-吡啶并[2,3-d][3]苯并氮杂䓬-7-基]氨基]-1-甲基-2-氧代-乙基]丁酰胺或其药学上可接受的盐或其水合物(化合物A)具有CAS登记号142138-81-4。或者,该化合物可以命名为:N-[(1S)-2-[[(7S)-6,7-二氢-5-(2-羟乙基)-6-氧代-5H-吡啶并[3,2-a][3]苯并氮杂䓬-7-基]氨基]-1-甲基-2-氧代乙基]-4,4,4-三氟丁酰胺。其他名称可用于明确识别化合物A。

[0018] 如本文所用,术语“PD-1抑制剂”和“PD-L1抑制剂”是指完全人或人源化IgG单克隆抗体,任选优化的单克隆抗体。

[0019] PD-1抑制剂包括纳武单抗和帕姆单抗。纳武单抗(Opdivo®)也称为iMDX- 1106、MDX-1106-04、ONO-4538或BMS-936558并具有CAS登记号:946414-94-4。纳武单抗是完全人IgG4单克隆抗体,其特异性阻断PD-1。纳武单抗(克隆5C4)和特异性结合到PD-1的其他人单克隆抗体公开于US8,008,449和WO2006/121168中。帕姆单抗(Keytruda®)(以前称为lambrolizumab),也称为Merck 3745、MK-3475或SCH-900475,是结合到PD-1的人源化IgG4单克隆抗体。帕姆单抗公开于Hamid, O.等, *New England Journal of Medicine*, 2013, 369(2): 134-44;WO2009/114335;和US 8,354,509。其他抗PD-1抗体公开于US 8,609,089;US 2010028330;和/或US 20120114649。

[0020] PD-L1抑制剂包括YW243.55.S70、MPDL3280A、MEDI-4736、MSB-0010718C和MDX-1105。YW243.55.S70是描述于WO2010/077634和US20100203056中的抗PD-L1抗体。MDPL3280A(也称为RG7446,RO5541267,阿特朱单抗,Tecentriq™)是结合到PD-L1的完全人源化的Fc优化的IgG1单克隆抗体。MPDL3280A和针对PD-L1的其他人单克隆抗体公开于US 7,943,743和US 20120039906中。MEDI-4736(也称为度伐单抗)是针对PD-L1的Fc优化的IgG1单克隆抗体并描述于WO2011/066389中。MSB-0010718C(也称为阿维鲁单抗)是针对PD-L1的完全人IgG1单克隆抗体并描述于WO2013/079174中。MDX-1105,也称为BMS-936559,是WO2007/005874中描述的完全人IgG4单克隆抗PD-L1抗体。

[0021] 如本文所用,术语“患者”是指哺乳动物,优选人。

[0022] “治疗有效量”或“有效量”是指化合物A或其药学上可接受的盐或水合物或含有化合物A或其药学上可接受的盐或水合物的药物组合物的剂量,以及PD-1或PD-L1抑制剂或含有PD-1或PD-L1抑制剂的药物组合物的剂量,所述剂量是抑制肿瘤细胞生长和消除或减缓或阻止患者中癌症进展所必需的。化合物A或其药学上可接受的盐或水合物的剂量范围为在5天的时间内每隔一天每天一次2.5mg/患者至75mg/患者,接着两天不给药(T.I.W.)。除非标签上另有说明,否则PD-1或PD-L1抑制剂的剂量范围为每14-21天一次在30至60分钟内静脉内输注1-3mg/kg。化合物A或其药学上可接受的盐或水合物的优选剂量为10mg至50mg T.I.W范围。治疗患者所需的确切剂量和治疗时间长度将由医师根据疾病的阶段和严重性以及个体患者的具体需要和反应来确定。可以调整给药施用以向患者提供更优化的治疗益处并控制或改善任何药物相关的毒性。备选给药方案例如每天一次(QD)、每天两次(B.I.D.)、每天三次(T.I.D.);每隔一天(Q2D)或每三天(Q3D)每天给药一次可能适合于化合物A。可以调整PD-1或PD-L1抑制剂的给药施用,包括拒绝给予剂量或永久停用进一步给药以控制或改善药物相关的毒性。

[0023] 本发明的组合治疗通过向需要治疗的T细胞急性淋巴细胞白血病、急性淋巴细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病、急性髓性白血病、慢性髓性白血病、红白血病、三阴性乳腺癌、乳腺癌、卵巢癌、黑素瘤、肺癌、非小细胞肺癌、胰腺癌、胶质母细胞瘤、结直肠癌、头颈癌、宫颈癌、前列腺癌、肝癌、口腔鳞状细胞癌、皮肤癌、成神经管细胞瘤、肝细胞癌、肝内和肝外胆管癌、硬纤维瘤、软组织肉瘤和腺样囊性癌优选软组织肉瘤患者,在28天的周期内每周(7天)在5天内每隔一天每天一次且两天不给药的方式施用有效量的化合物A或其药学上可接受的盐或水合物,和每14-21天一次在30-60分钟内以1-3 mg/kg施用PD-1或PD-L1抑制剂而进行。

[0024] 术语“治疗(treatment)”、“疗法(treat)”和“治疗(treating)”意在包括对患者所

患癌症的全方位干预，例如施用化合物A和PD-1或PD-L1抑制剂以缓解、减缓、停止或逆转一种或多种症状，并延迟、停止或逆转癌症的进展，即使癌症实际上没有被消除。

[0025] 化合物A或其药学上可接受的盐或水合物优选使用药学上可接受的载体配制成药物组合物，并通过各种途径施用。优选地，这种组合物用于口服施用。PD-1或PD-L1抑制剂优选使用药学上可接受的载体配制成药物组合物，并通过胃肠外途径施用，优选静脉内输注。优选地，这种组合物可以是冻干粉末或液体组合物。根据标签或通过本领域的常规技术，重组或稀释至准备施用剂量。这样的药物组合物和制备它们的方法是本领域熟知的。参见，例如，HANDBOOK OF PHARMACEUTICAL EXCIPIENTS, 第5版, Rowe等编辑, Pharmaceutical Press (2006)；和REMINGTON: THE SCIENCE AND PRACTICE OF PHARMACY (Troy等编辑, 第21版, Lippincott Williams & Wilkins (2006)。

[0026] 化合物A能够与许多无机和有机抗衡离子反应以形成药学上可接受的盐。这些药学上可接受的盐和制备它们的常用方法是本领域熟知的。参见，例如，P. Stahl等, HANDBOOK OF PHARMACEUTICAL SALTS: PROPERTIES, SELECTION AND USE, (VCHA/Wiley-VCH, 2002); S.M. Berge等, “Pharmaceutical Salts, “ Journal of Pharmaceutical Sciences, 第66卷第1期, 1977年1月。

[0027] 本发明的组合治疗的功效可以通过评估癌症治疗中常用的各种终点来测量，包括但不限于肿瘤消退，肿瘤重量或尺寸缩小，至进展的时间，总体存活，无进展存活，总反应速率，反应持续时间，抑制转移性扩散而没有肿瘤消退，以及PET/CT成像。

[0028] 术语“组合”、“治疗组合”和“药物组合”是指非固定剂量组合，任选地与组合施用的说明书一起包装，其中各种治疗剂、化合物A或其药学上可接受的盐或水合物和PD-1或PD-L1抑制剂可以同时独立施用或在允许治疗剂发挥协同作用的时间间隔内分开施用。

[0029] 术语“同时”施用意指以单一操作向患者施用化合物A和PD-1或PD-L1抑制剂中的每一种，例如其中化合物A和PD-1或PD-L1抑制剂中的每一种在基本相同的时间独立施用或在允许化合物A和PD-1或PD-L1抑制剂显示协同治疗效果的时间间隔内分开施用。

[0030] 术语“分开”施用意指从非固定剂量剂型向患者同时、基本上并行或以任何顺序依次施用化合物A和PD-1或PD-L1抑制剂中的每一种。对于施用每种化合物A和PD-1或PD-L1抑制剂可以有或可以没有规定的时间间隔。

[0031] 术语“依次”施用是指在分开的操作中从非固定(分开)剂型向患者施用化合物A和PD-1或PD-L1抑制剂中的每一种。两个施用操作可以或可以不通过规定的时间间隔连接。例如，施用化合物A T.I.W.并在规定的时间内例如每14至21天一次施用PD-1或PD-L1抑制剂。

[0032] 短语“与.....组合”包括向需要治疗的癌症患者，特别是结直肠癌患者同时、分开和依次施用化合物A和PD-1或PD-L1抑制剂中的每一种。

[0033] 术语“共同施用”或“组合施用”包括向单个患者施用治疗剂，且包括治疗方案，其中可以通过不同施用途径或在不同时间施用试剂。

[0034] 可以例如使用本领域已知的合适方法例如Sigmoid-Emax方程(Holford和Scheiner, *Clin. Pharmacokinet.*, 1981, 6: 429-453)、Loewe加性方程(the equation of Loewe additivity)(Loewe和Muischenk, *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.*, 1926, 114: 313-326)、中值效应方程(median-effect equation)(Chou和Talalay, *Adv. Enzyme Regul.*, 1984, 22: 27-55)和Bliss独立性(Independence)方法或已知的等同物计算在单

个患者中产生效果的两种治疗剂的有益作用，所述效果大于单独施用的每种试剂的简单累加效果。每个方程可以应用于实验数据以产生相应的图来帮助将药物组合的效果评估为加性、在加性的生物学相关范围内、小于加性或大于加性。

[0035] Notch的致癌作用首先报道在人T细胞白血病中，T细胞白血病涉及Notch1细胞内结构域向T细胞受体-β启动子区域的易位，导致Notch1细胞内结构域的过表达(Grabher等. Nature Review Cancer, 2006(6):347-359;Weng等. Science, 2004(306):269-271)。小鼠造血祖细胞中的Notch1细胞内结构域的过表达导致小鼠表现出与人类类似的T细胞急性淋巴细胞白血病。除了T细胞急性淋巴细胞白血病外，越来越多的证据表明Notch信号通过包括受体扩增和配体和/或受体的过表达的多种机制在其他癌症中致癌，包括急性淋巴细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病(Rosati等, Blood, 2009(113): 856-865)、急性髓性白血病(Sliwa等. Int J Clin Exp Pathol, 2014(7(3)): 882-889)、慢性髓性白血病(Nakahara等. Blood, 2010(115(14)): 2872-2881)和红白血病(Robert-Moreno等, Leukemia, 2007(21): 1496-1503)。由于配体和/或受体的突变或过表达导致的异常组成型Notch信号传导也涉及许多实体瘤恶性肿瘤，包括三阴性乳腺癌(Stoeck等, Cancer Discovery, 2014(4): 1154-1167)、乳腺癌、卵巢癌(Park等. Cancer Research, 2006(66):6312-6318)、黑素瘤(Gast等. Genes, Chromosomes & Cancer, 2010(49):733-745)、肺癌、非小细胞肺癌(Westhoff等. PNAS, 2009(106):22293-22298)、胰腺癌、胶质母细胞瘤、结直肠癌、头颈癌、宫颈癌、前列腺癌、肝癌、鳞状细胞癌(口腔)、皮肤癌和成神经管细胞瘤(Rangathan等, Nature Review Cancer, 2011(11):338-351和补充信息S1(表))。由于配体和/或受体的突变或过表达引起的异常组成型Notch信号传导也涉及血管肉瘤(Ravi等, J Clin Oncol, 2007, (25(18S, 六月20日增刊)): 摘要10030)、横纹肌肉瘤(Belyea等, Clin Cancer Res, 2011(17(23)): 7324-7336; Roma等, Clin Cancer Res, 2011(17(3)): 505-513)、脂肪肉瘤(J Clin Oncol, 2009, (27(15S, 增刊)): 摘要10526)、恶性纤维组织细胞瘤(Wang等, Cancer Res, 2012, (72): 1013-1022)、肝细胞癌(Villanueva等, Gastroenterology, 2012, (143): 1660-1669)、肝内和肝外胆管癌(Wu等, Int J Exp Pathol, 2014, (7(6)): 3272-3279; Sekiya等, J Clin Invest, 2012, (122(11)): 3914-3918; Yoon等, World J Gastroenterol, 2011, (17(35)): 4023-4030)和腺样囊性癌(Bell等, Annals of Diagnostic Pathology, 2014, (18): 10-13; Stoeck等, Cancer Discov, 2014, (4): 1154-1167)。

[0036] 癌症的性质是多因素的。在适当的情况下，可以组合具有不同作用机制的治疗剂。然而，仅考虑具有不同作用模式的治疗剂的组合不一定导致具有有利效果的组合。提供与仅一种治疗剂的单一疗法相比表现出的有益效果(治疗效果，例如增强的功效和/或较低的毒性)的特定治疗剂是优选的。

[0037] 认为本发明的组合适用于治疗T细胞急性淋巴细胞白血病、急性淋巴细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病、急性髓性白血病、慢性髓性白血病、红白血病、三阴性乳腺癌、乳腺癌、卵巢癌、黑素瘤、肺癌、非小细胞肺癌、胰腺癌、胶质母细胞瘤、结直肠癌、头颈癌、宫颈癌、前列腺癌、肝癌、口腔鳞状细胞癌、皮肤癌、成神经管细胞瘤、肝细胞癌、肝内和肝外胆管癌、硬纤维瘤、软组织肉瘤和腺样囊性癌，且特别适用于治疗标准治疗失败的软组织肉瘤患者。这包括患有表现对单一疗法的抗性或表现对不同于本发明的那些的组合的抗性的癌症

的患者。

[0038] 术语“完全反应”(CR)、“部分反应”(PR)、“进展性疾病”(PD)、“稳定疾病”(SD)、“客观反应”(OR)与根据RECIST v1.1, Eisenhauer等, *European Journal of Cancer*, 2009, 45, 228-247的定义一致使用。

[0039] 术语“至疾病进展的时间”(TTP)是指从初始治疗时间到癌症进展的通常以周或月测量的时间(参见RECIST v1.1关于进展性疾病的定义),癌症进展为目标病变直径总和至少增加20%,其以研究中的最小总和为参考(如果基线总和在研究中最小,则这包括基线总和)。除了相对增加20%外,总和还必须表明绝对增加至少5mm。一个或多个新病变的出现也被认为是进展。这种进展由熟练的临床医生评估。

[0040] 术语“延长TTP”是指相对于i)未治疗的患者,或ii)用少于化合物A和PD-1或PD-L1抑制剂两者治疗的患者,增加治疗患者的至疾病进展的时间。

[0041] 术语“存活”是指患者保持存活,且包括总体存活以及无进展存活。

[0042] 术语“总体存活”是指患者从诊断或治疗时起保持存活一段限定的时间段,例如1年、5年等。

[0043] 术语“无进展存活”是指患者在没有癌症进展的情况下保持存活。

[0044] 如本文所用,术语“延长存活”是指相对于i)未治疗的患者、ii)用少于化合物A和PD-1或PD-L1抑制剂两者治疗的患者或iii)对照治疗方案,增加治疗患者的总体或无进展存活。在开始治疗之后或在癌症的初始诊断之后,监测存活一段限定的时间段,例如一个月、六个月、1年、5年或10年等。

[0045] 术语“原发性肿瘤”或“原发性病变”是指原始癌症,而不是位于患者体内另一组织、器官或位置的转移性肿瘤或病变。

[0046] 在一个实施方案中,升高化合物A的剂量直至达到最大耐受剂量,且以固定剂量施用本发明的PD-1或PD-L1抑制剂。或者,化合物A可以固定剂量施用,且PD-1或PD-L1抑制剂的剂量可以升高。每个患者可以每天或间歇地接受化合物A和/或PD-1或PD-L1抑制剂的剂量。在这些研究中通过每6周评估症状评分,例如在12、18或24周后,可以确定治疗功效。

[0047] 化合物A可以通过WO2013/016081中描述的程序制备。

[0048] PD-1或PD-L1抑制剂可以通过以下中描述的程序制备:US 8,008,449和WO2006/121168;Hamid, O.等, *New England Journal of Medicine*, 2013, 369 (2): 134-44; WO2009/114335,和US 8,354,509;US 8,609,089、US 2010028330和/或US 20120114649; WO2010/077634;US2010203056;US 7,943,743;US 20120039906;WO2011/066389;WO2013/079174;和WO2007/005874;或通过本领域技术人员熟知和常规使用的程序制备。

具体实施方式

[0049] 本发明还涉及以下实施方案:

1. 一种治疗患者中的癌症的方法,所述癌症是T细胞急性淋巴细胞白血病、急性淋巴细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病、急性髓性白血病、慢性髓性白血病、红白血病、三阴性乳腺癌、乳腺癌、卵巢癌、黑素瘤、肺癌、非小细胞肺癌、胰腺癌、胶质母细胞瘤、结直肠癌、头颈癌、宫颈癌、前列腺癌、肝癌、口腔鳞状细胞癌、皮肤癌、成神经管细胞瘤、肝细胞癌、肝内和肝外胆管癌、硬纤维瘤、软组织肉瘤或腺样囊性癌,所述方法包括向需要治疗的患者施

用有效量的4,4,4-三氟-N-[(1S)-2-[[(7S)-5-(2-羟乙基)-6-氧代-7H-吡啶并[2,3-d][3]苯并氮杂 萘-7-基]氨基]-1-甲基-2-氧代-乙基]丁酰胺或其药学上可接受的盐或水合物，和有效量的选自帕姆单抗、纳武单抗、阿特朱单抗、度伐单抗和阿维鲁单抗的PD-1或PD-L1抑制剂。

[0050] 2．实施方案1的方法，其中所述癌症是结直肠癌。

[0051] 3．一种治疗需要这种治疗的患者中的癌症的方法，所述癌症是T细胞急性淋巴细胞白血病、急性淋巴细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病、急性髓性白血病、慢性髓性白血病、红白血病、三阴性乳腺癌、乳腺癌、卵巢癌、黑素瘤、肺癌、非小细胞肺癌、胰腺癌、胶质母细胞瘤、结直肠癌、头颈癌、宫颈癌、前列腺癌、肝癌、口腔鳞状细胞癌、皮肤癌、成神经管细胞瘤、肝细胞癌、肝内和肝外胆管癌、硬纤维瘤、软组织肉瘤或腺样囊性癌，所述方法包括同时、分开或依次施用有效量的4,4,4-三氟-N-[(1S)-2-[[(7S)-5-(2-羟乙基)-6-氧代-7H-吡啶并[2,3-d][3]苯并氮杂萘-7-基]氨基]-1-甲基-2-氧代-乙基]丁酰胺或其药学上可接受的盐或水合物，和有效量的选自帕姆单抗、纳武单抗、阿特朱单抗、度伐单抗和阿维鲁单抗的PD-1或PD-L1抑制剂。

[0052] 4．实施方案3的方法，其中所述癌症是结直肠癌。

[0053] 5．化合物4,4,4-三氟-N-[(1S)-2-[[(7S)-5-(2-羟乙基)-6-氧代-7H-吡啶并[2,3-d][3]苯并氮杂萘-7-基]氨基]-1-甲基-2-氧代-乙基]丁酰胺或其药学上可接受的盐或水合物；和选自帕姆单抗、纳武单抗、阿特朱单抗、度伐单抗和阿维鲁单抗的PD-1或PD-L1抑制剂，其用于同时、分开或依次用于治疗T细胞急性淋巴细胞白血病、急性淋巴细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病、急性髓性白血病、慢性髓性白血病、红白血病、三阴性乳腺癌、乳腺癌、卵巢癌、黑素瘤、肺癌、非小细胞肺癌、胰腺癌、胶质母细胞瘤、结直肠癌、头颈癌、宫颈癌、前列腺癌、肝癌、口腔鳞状细胞癌、皮肤癌、成神经管细胞瘤、肝细胞癌、肝内和肝外胆管癌、硬纤维瘤、软组织肉瘤或腺样囊性癌。

[0054] 6．实施方案5的用途，其中所述癌症是结直肠癌。

[0055] 7．4,4,4-三氟-N-[(1S)-2-[[(7S)-5-(2-羟乙基)-6-氧代-7H-吡啶并[2,3-d][3]苯并氮杂萘-7-基]氨基]-1-甲基-2-氧代-乙基]丁酰胺或其药学上可接受的盐或水合物用于制造药物的用途；和选自帕姆单抗、纳武单抗、阿特朱单抗、度伐单抗和阿维鲁单抗的PD-1或PD-L1抑制剂用于独立制造药物的用途；所述药物用于同时、分开或依次治疗T细胞急性淋巴细胞白血病、急性淋巴细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病、急性髓性白血病、慢性髓性白血病、红白血病、三阴性乳腺癌、乳腺癌、卵巢癌、黑素瘤、肺癌、非小细胞肺癌、胰腺癌、胶质母细胞瘤、结直肠癌、头颈癌、宫颈癌、前列腺癌、肝癌、口腔鳞状细胞癌、皮肤癌、成神经管细胞瘤、肝细胞癌、肝内和肝外胆管癌、硬纤维瘤软组织肉瘤或腺样囊性癌。

[0056] 8．实施方案7的用途，其中所述癌症是结直肠癌。

[0057] 以下实施例说明单独的化合物A、单独的PD-1抑制剂或单独的PD-L1抑制剂中的每一种以及化合物A和PD-1或PD-L1抑制剂的组合的活性。

[0058] 生物学实施例1

体内研究：

对于体内研究，在6-8周龄BALB/C雌性小鼠(Harlan Laboratories)的后腿中通过皮下注射植入在0.2mL Hank平衡盐溶液(HBSS)中的1×10^6个CT26细胞(ATCC®CRL2639™)结

直肠癌细胞系。随意喂食小鼠正常食物。在肿瘤植入的第6天用口服施用(管饲)在0.25% Tween® 80中的含化合物A的1%羧甲基纤维素钠(Na-CMC),或腹膜内注射磷酸盐缓冲盐水(PBS)中的小鼠抗PD-L1抗体(10F.9G2,BioXcell目录号:BE0101)或腹膜内注射0.2mL体积的PBS或其各自的载体中的小鼠抗PD-1(CD279)抗体(克隆:RMP1-14,BioXCell#:BP0146-R)开始治疗。化合物A在周一、周三和周五的时间表以8mg/kg施用,持续2周,而10F.9G2和RMP1-14在周一和周四的时间表以250μg/剂量/动物施用,持续2周。

[0059] 随时间监测肿瘤生长和体重以评估功效和毒性迹象。肿瘤的二维测量每周进行两次,且肿瘤体积基于下式计算:(肿瘤体积)= [(L) x (W2) x (Π/6)],其中L是中轴长度且W是中轴宽度。将肿瘤体积数据转换为对数标度以均衡跨时间和治疗组的方差。使用SAS™软件(版本8.2)中的MIXED™程序用按照时间和治疗的双向重复测量的方差分析来分析对数体积数据。重复测量的相关模型是空间功率(spatial power)。对肿瘤体积标度进行逆对数的来自重复测量分析的最小二乘法平均值在表1中显示。在研究第20天比较每对组的P值显示在表2中。测试组是:

1:1% CMC/0.25% Tween® 80/0.05%消泡剂,周一-周三-周五x2,PO/PBS周一-周四x2,IP

2:化合物A,8 mg/kg,周一-周三-周五x2,PO

3:化合物B(PD-L1),250μg/剂量,周一-周四x2,IP

4:化合物C(PD-1),250μg/剂量,周一-周四x2,IP

5:化合物A,8mg/kg,周一-周三-周五x2,PO/化合物B(PD-L1),250μg/剂量,周一-周四x2,IP

6:化合物A,8mg/kg,周一-周三-周五x2,PO/化合物C(PD-1),250μg/剂量,周一-周四x2,IP

随时间监测肿瘤生长和体重以评估功效和毒性迹象。肿瘤的二维测量每周进行两次,且肿瘤体积基于下式计算:(肿瘤体积)= [(L) x (W2) x (Π/6)],其中L是中轴长度,且W是中轴宽度。将肿瘤体积数据转换为对数标度以均衡跨时间和治疗组的方差。使用SAS™软件(版本8.2)中的MIXED™程序用按照时间和治疗的双向重复测量的方差分析来分析对数体积数据。重复测量的相关模型是空间幂。在每个时间点将治疗组与对照组进行比较。也将MIXED™程序单独用于每个治疗组以计算每个时间点的调整平均值和标准误差。两种分析都考虑每只动物内的自相关性以及早期从研究中移除具有大肿瘤的动物时发生的数据丢失。针对每个治疗组绘制调整的平均值和标准误差相对于时间的曲线。抗肿瘤活性表示为治疗相对于对照的肿瘤体积百分比(%T/C),并通过比较治疗组中的肿瘤体积与载体治疗组来计算。治疗组的T/C百分比和统计学显著性值(p值)基本上如上所述测量并总结在表2中。

[0060] 表1. 肿瘤体积(mm^3):几何平均值

	研究天数				
组	8	10	14	17	20
1 载体	52.92	99.25	486.99	1045.42	1643.20
2 化合物 A	47.96	88.80	376.50	751.13	1227.40
3 化合物 B	49.82	96.48	378.49	790.67	1313.36
4 化合物 C	45.30	87.73	241.50	491.72	622.56
5 化合物 A+B	42.79	88.58	221.73	321.19	472.83
6 化合物 A+C	47.88	102.62	245.30	501.45	569.20

表2.

肿瘤体积所有成对比较p值

组	2 化合物 A	3 化合物 B	4 化合物 C	5 化合物 A+B	6 化合物 A+C
1 载体	0.26	0.362	<0.001	<0.001	<0.001
2 化合物 A		0.828	0.009	<0.001	0.001
3 化合物 B			0.005	<0.001	<0.001
4 化合物 C				0.036	0.455
5 化合物 A+B					0.17

表2显示在该测试中，化合物A和PD-L1(组5)的组合表现出相对于单独的化合物A(组2)和PD-L1(组3)中的每一种的统计学显著的肿瘤生长抑制结果。化合物A和PD-1(组6)

的组合表现出相对于单独的化合物A(组2)统计学显著的生长抑制结果,而相对于单独的PD-1(组4)则未表现出。

[0061] 组合分析

使用先前描述的重复测量分析,对比陈述(contrast statement)用于使用组合的两种特定治疗(化合物A和PD-L1)测试研究第20天的相互作用效应。该测试是统计学显著的($p = 0.008$),表现出优于加性或协同活性,因为组合组中评估的平均肿瘤体积($298mm^3$)小于根据Bliss Independence方法的预期加性肿瘤体积($1134 \times 1069 / 1448 = 837\ mm^3$)。

[0062] 使用先前描述的重复测量分析,对比陈述用于使用组合的两种特定治疗(化合物A和PD-1)测试研究第20天的相互作用效应。该测试没有统计学显著性($p = 0.769$),表现出加性效应,因为组合组中评估的平均肿瘤体积($431mm^3$)接近于根据Bliss Independence方法的预期加性肿瘤体积($526 \times 1069 / 1448 = 389\ mm^3$)。

[0063] 机制分析

对于机制分析,在第20天在最后一剂的化合物A后1h切除CT-26肿瘤。切下约30mg的小块并储存在RNALater中用于基因表达分析。处理肿瘤的其余部分用于流式细胞术分析。

[0064] 流式细胞术

将肿瘤称重,然后在5ml 4℃完全培养基(CM;RPMI-1640/10%胎牛血清(FBS))中通过100μm过滤器均质化以产生单细胞悬浮液。将细胞在466 x g, 4℃下离心5分钟;将沉淀重新悬浮于新鲜CM(0.5-3ml,取决于沉淀体积)中,并使用Vi-Cell XR(Beckman Coulter)计数细胞。将每个肿瘤的相同数目的全部细胞(10×10^6)转移到96孔V底微型板(Fisher Scientific)。将细胞离心(700 x g, 3 min., 4℃)并在冰上重新悬浮于CM中的100μl 1μg/ml Fc封闭物(抗CD16/32(克隆2.4G2);Tonbo Biosciences)达30分钟。将细胞离心(700 x g, 3分钟, 4℃)并重新悬浮于含有可固定的活力染料(eBioscience)的100μl几种荧光染料缀合的表面标记抗体混合物中的一种[抗-CD3 (克隆145-2C11),-Ly-6G (克隆1A8),-CD11c (克隆HL3),-CD45 (克隆30-F11) (BD Biosciences),抗-CD8 (克隆53-6.7) (Biolegend),-CD11b (克隆M1/70),-CD3 (克隆145-2C11),-F4/80 (克隆BM8),-CD4 (克隆RM4-5)(eBioscience)]并在冰上避光培养30分钟。将细胞用200μl CM洗涤两次并离心(700 x g, 3 min., 4℃)。在第二次洗涤后,遵循具有所述修改的制造商的说明书,将细胞固定,渗透,并对Ki67(克隆SolA15) (eBioscience)使用Foxp3/转录因子染色缓冲液组(eBioscience)进行细胞内染色。简言之,将细胞以100μl/孔固定30min,然后在具有或不具有细胞内染料(取决于所用的染色组)的100μl/孔渗透缓冲液中固定30分钟。将细胞用200μl 1X渗透缓冲液洗涤两次并离心(700 x g, 3 min., 4℃),然后重新悬浮于具有2% FBS的PBS中。使用10通道LSR II细胞计数器(BD Biosciences)针对每个样品捕获1×10^6个事件(不包括碎片),并使用FlowJo V.10.0.8软件进行分析。数据表示为肿瘤细胞的百分比,其中注明的例外情况表示为亲本群体的百分比。ANOVA后的事后t检验用于载体和治疗组之间的统计学分析。结果总结在表3中。

表 3

群体	载体		化合物 A		化合物 B PD-L1 (10F.9G2)		化合物 C PD-1 (RMPI-14)		化合物 A + PD-L1 (10F.9G2)		化合物 A+ PD-1 (RMPI-14)	
	平均%±SEM	p 值	平均%±SEM	p 值	平均%±SEM	p 值	平均%±SEM	p 值	平均%±SEM	p 值	平均%±SEM	p 值
CD4+/Ki67+ (CD4+的%)	5.7±0.9	n.s.	7.6±0.5	n.s.	8.8±1.2	0.022	13.7±2.0	<0.001	14.1±1.2	<0.001	16.3±1.4	<0.001
CD8+/Ki67+ (CD8+的%)	21.8±3.6	n.s.	23.1±2.0	n.s.	24.1±1.9	n.s.	32.1±4.0	0.017	31.5±1.2	0.005	34.4±2.5	0.002
CD11b+ (肿瘤的%)	1.8±0.2	n.s.	2.9±0.2	0.002	2.1±0.2	n.s.	3.9±0.3	<0.001	4.4±0.5	<0.001	4.2±0.6	<0.001
CD11b+F4/80+ (肿瘤的%)	0.62±0.11	n.s.	0.89±0.15	-	0.67±0.07	n.s.	1.87±0.18	<0.001	1.75±0.28	<0.001	1.77±0.33	<0.001
CD11c+ (肿瘤的%)	0.24±0.04	n.s.	0.42±0.06	0.035	0.27±0.03	n.s.	0.31±0.05	n.s.	0.46±0.08	0.039	0.32±0.07	n.s.
CD11b+Ly-6G+F4/80- (肿瘤的%)	0.61±0.08	n.s.	1.12±0.08	<0.001	0.76±0.07	n.s.	0.99±0.10	0.003	1.29±0.16	<0.001	1.29±0.19	<0.001

[0065] 表3中的数据显示如通过肿瘤内CD4+Ki67+ (活化的CD4+ T细胞),CD8+Ki67+ (活化的CD8+ T细胞),CD11b+(骨髓细胞),CD11b+F4/80+(巨噬细胞),CD11c +(树突细胞)和CD11b+Ly-6G+F4/80- (嗜中性粒细胞)所表现出的炎症反应升高。

[0066] 基因表达分析

对于从肿瘤分离RNA,切下约30mg组织。使用RNeasy 96孔柱板(Qiagen, Valencia, CA; Cat# 74182)和QiaVac 96真空歧管在15psi真空下通过RNeasy方案(2002年1月版)提取RNA。简言之,将组织在FP120(ThermoFisher Scientific, Waltham, MA; Cat# 6001-120)或FastPrep-24 (MP Biomedicals; Cat#116003500)中在2mL Lysing Matrix-D®管(MP Biomedicals, Solon, OH;Cat# 6913-500, 批号6913-500-120156)中在含有1% β-巯基乙醇的800μL Buffer- RLT中以速度6.0进行两次混合,每次30秒而均质化。管在14,000转/分钟(RPM)下离心30分钟。除去400-600μL上清液并与等体积的70%乙醇(Decon Labs, King of Prussia, PA; Cat#2401)混合,并转移到96孔RNeasy板上。根据供应商的方案,通过柱上的额外DNA酶-I消化(Qiagen,Cat#79254)除去任何潜在的污染DNA。在两个40μL等分试样的无DNA酶/RNA酶的水中提取总RNA。使用Nanodrop ND-1000分光光度计(Thermo Scietific)通过260nM的吸光度评估总RNA浓度。总RNA在-80℃下储存直至需要用于cDNA合成。

[0067] 将高容量cDNA逆转录试剂盒(Applied Biosystems, Framingham, MA; Cat# 4368813)用于使用具有以下参数的GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems)在96孔PCR板(Molecular Bioproducts, San Diego, CA; Cat# 3419)中以100μL的终体积逆转录3μg总RNA:25℃进行10分钟,37℃进行2小时,和4℃进行无限长。对于长期储存,cDNA储存在-30℃下,且总RNA储存在-80℃下。

[0068] 对于Taqman程序,在96孔透明光学反应板(Applied Biosystems, Cat# 4306737)

中用200μL无RNA酶/DNA酶的水稀释100μL cDNA并转移到2mL无RNA酶/DNA酶的管(Ambion, Cat# AM12475)。使用2x通用缓冲液(Applied Biosystems, Cat# 4318157)在384孔透明光学反应板(Applied Biosystems, Cat# 4309849)中以20μL的终体积进行Taqman反应。样品用Tecan Automated Pipetting Workstation (Tecan US Inc., Durham, NC;型号:Freedom Evo-100或Evo-150)分配,并在具有以下方案设置的ABI Prism 9700HT SDS板读数器中读取板:50℃进行2分钟,95℃进行10分钟,和在95℃下进行15秒和60℃进行1分钟的40个循环。基于基于标准曲线的方法对绝对C_T值进行归一化。所有计算均在Microsoft Excel电子表格模板中完成,且%抑制由对照值计算。在版本11 JMP Software(SAS,Gary,NC)上分析统计学显著性。结果在表4中描述为与载体对照相比的倍数变化。显示≥1.5倍(1.5X)的统计学显著值。在化合物A和PD-L1单独治疗组中没有检测到基因表达上的显著变化。数据表明当化合物A与PD-L1或PD1抗体组合时,与肿瘤内炎症和T细胞活化相关的基因表达增加。下面列出的所有Taqman引物和探针均购自Applied Biosystems Inc.(ABI)且其目录号作为ABI＃与结果摘要一起在表中列出。

[0069] 表4

基因	PD-L1+化合物A	PD1	PD1+化合物 A	ABI #
Ccl2		1.5x		Mm00441242_m1
Ccl3		2.4x		Mm00441259_g1
Ccl4		2.4x		Mm00443111_m1
Ccl5	6.5x	4.1x	4.6x	Mm01302427_m1
Infγ	4.6x	4.8x	4.4x	Mm01168134_m1
Il2	6.6x	3.5x	4.1x	Mm00434256_m1
Il4	5.9x	2.6x	4.1x	Mm00445259_m1
Il5	2.4x			Mm00439646_m1
Il10		2.0x		Mm01288386_m1
Il12b	2.9x	2.1x		Mm01288989_m1
Il13	11.2x	5.0x	8.0x	Mm00434204_m1
Tnfα	2.6x	2.2x		Mm00443260_g1
Gzmb	2.0x	2.3x	2.3x	Mm00442834_m1
Tgfbr1			1.2x	Mm00436964_m1
Tgfbr2	2.4x			Mm03024091_m1
Pd-l1	3.2x	2.7x	3.2x	Mm00452054_m1
Pd-l2	11.0x	7.1x	6.8x	Mm00451734_m1
Pd-1	2.9x	3.5x		Mm01285676_m1
Arg	2.1x			Mm00477592_m1
iNos	5.8x	4.7x	5.9x	Mm00440502_m1
Ido	4.6x	3.5x	4.9x	Mm00492590_m1
Icam	2.5x	2.0x	1.9x	Mm00516023_m1
Cd3e		3.2x		Mm01179194_m1
Cd4	3.1x	2.6x		Mm00442754_m1
Cd8b1	3.2x	3.3x		Mm00438116_m1
Cd20	8.9x			Mm00545909_m1
Cd45		1.7x		Mm01293577_m1
Cd68	1.6x		1.6x	Mm03047343_m1
Cd69	1.8x	1.7x		Mm01183378_m1
Cd86	2.0x	1.6x		Mm00444543_m1
Foxp3	2.8x	2.1x	2.4x	Mm00475162_m1
Icos	4.0x	2.7x	2.8x	Mm00497600_m1
Lag3	2.9x	2.7x		Mm00493071_m1
Tim3	2.3x	2.2x	2.1x	Mm00454540_m1
Tim4		2.8x	2.3x	Mm00724709_m1
Cd40l	4.3x	2.7x	2.8x	Mm00441911_m1
Cd200r1	2.1x	1.8x	1.7x	Mm00491164_m1
Tnfsf4(Ox40l)	1.8x		2.0x	Mm00437214_m1
Tnfsf18(Gitrl)	2.2x		1.9x	Mm00839222_m1
Tnfrsf4(Ox40)	2.2x	1.7x	1.6x	Mm00442039_m1
Tnfrsf18(Gitr)	2.5x	2.2x	2.0x	Mm00437136_m1