



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 108778332 B

(45)授权公告日 2019.10.18

(21)申请号 201780016510.X

(22)申请日 2017.10.20

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 108778332 A

(43)申请公布日 2018.11.09

(66)本国优先权数据
201610921118.7 2016.10.21 CN

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2018.09.11

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/CN2017/107051 2017.10.20

(87)PCT国际申请的公布数据
W02018/072743 ZH 2018.04.26

(73)专利权人 苏州盛迪亚生物医药有限公司
地址 215126 江苏省苏州市苏州工业园区
凤里街350号

专利权人 江苏恒瑞医药股份有限公司
上海恒瑞医药有限公司

(72)发明人 马珂 曹国庆 杨昌永 张连山

(74)专利代理机构 北京戈程知识产权代理有限公司 11314

代理人 程伟

(51)Int.Cl.

A61K 39/395(2006.01)

C07D 487/04(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

审查员 王金凤

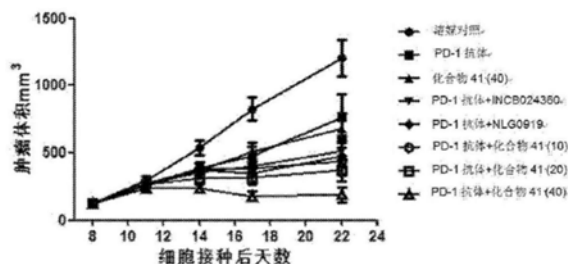
权利要求书1页 说明书15页
序列表4页 附图1页

(54)发明名称

PD-1抗体与IDO抑制剂联合在制备抗肿瘤的
药物中的用途

(57)摘要

本发明公开了PD-1抗体或其抗原结合片段
与IDO抑制剂联合在制备抗肿瘤的药物的用
途。

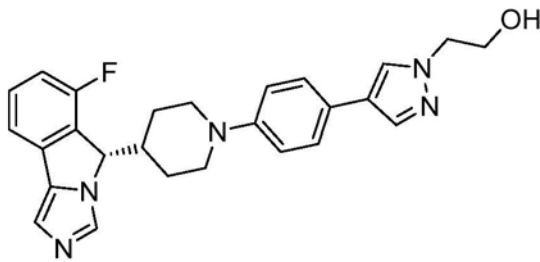


1. PD-1抗体或其抗原结合片段与IDO抑制剂联合在制备抗肿瘤药物中的用途,其特征在于,所述PD-1抗体或其抗原结合片段包含:

抗体轻链可变区,所述的抗体轻链可变区包含SEQ ID NO:4所示的LCDR1、如SEQ ID NO:5所示的LCDR2、如SEQ ID NO:6所示的LCDR3;和

抗体重链可变区,所述的抗体重链可变区包含如SEQ ID NO:1所示的HCDR1、如SEQ ID NO:2所示的HCDR2、如SEQ ID NO:3所示的HCDR3,

所述IDO抑制剂为式(I)所示的化合物或其可药用的盐、溶剂化合物,



2. 根据权利要求1所述的用途,其特征在于,所述的抗体或其抗原结合片段为人源化抗体或其片段。

3. 根据权利要求2所述的用途,其特征在于,所述的人源化抗体轻链序列为如SEQ ID NO:8所示的序列。

4. 根据权利要求2所述的用途,其特征在于,所述的人源化抗体重链序列为如SEQ ID NO:7所示的序列。

5. 根据权利要求2所述的用途,其特征在于,所述的人源化抗体轻链序列为如SEQ ID NO:8所示的序列,重链序列为如SEQ ID NO:7所示的序列。

6. 根据权利要求1-5任一项所述的用途,其特征在于,所述的肿瘤选自PD-1介导和/或IDO介导的肿瘤。

7. 根据权利要求1-5任一项所述的用途,其特征在于,所述的肿瘤选自肺癌、胃癌、肠癌、乳腺癌、宫颈癌、胰腺癌、脑癌、皮肤癌、前列腺癌、骨癌、肾癌、卵巢癌、膀胱癌、肝癌、输卵管肿瘤、腹膜肿瘤、黑色素瘤、神经胶质瘤、神经胶母细胞瘤、乳突肾性瘤、头颈部肿瘤、白血病、淋巴瘤、骨髓瘤。

8. 根据权利要求7所述的用途,其特征在于,所述的肿瘤选自乳腺癌、胃癌、结肠癌、直肠癌、肾癌、口腔癌、黑色素瘤、非小细胞肺癌或肝细胞癌。

9. 根据权利要求1-5任一项所述的用途,其特征在于,所述的肿瘤为表达PD-L1的肿瘤。

PD-1抗体与IDO抑制剂联合在制备抗肿瘤的藥物中的用途

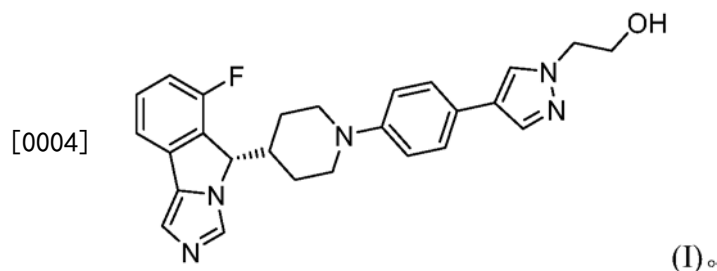
技术领域

[0001] 本发明涉及PD-1抗体或其抗原结合片段与IDO抑制剂化合物(S)-2-(4-(4-(4-(6-氟-5H-咪唑并[5,1-a]异吲哚-5-基)哌啶-1-基)苯基)-1H-吡唑-1-基)乙醇联合在制备抗肿瘤的藥物中的用途。

背景技术

[0002] 吲哚胺-吡咯-2,3-双加氧酶(Indoleamine-pyrrole-2,3-dioxygenase,IDO)是一种含铁血红素单体蛋白,由403个氨基酸残基组成,包括两个折叠的 α -螺旋结构域,大结构域包含催化口袋,底物可在催化口袋内与IDO发生疏水等作用。IDO与干扰素(interferon, IFN)、白细胞介素(interleukin, IL)、肿瘤坏死因子等多种细胞因子关系密切,它们在一定条件下可激活IDO。而T-细胞的细胞周期中存在一个对色氨酸水平非常敏感的调节点,一方面,IDO使局部色氨酸耗竭,致使T-细胞停滞于G1期中期,从而抑制了T细胞的增殖;另一方面,IDO催化色氨酸代谢产生的主要产物犬尿素由氧自由基介导引起细胞内氧化剂和抗氧化剂改变而诱导T-细胞凋亡,这是存在于机体的固有的免疫抑制机制。目前大量研究表明IDO在白血病细胞中较高表达,使局部T细胞增殖受抑,抑制T-细胞介导的免疫反应,使T-细胞活化信号转导受阻,从而介导肿瘤细胞逃逸免疫系统的攻击。已经发现大多数人类肿瘤组成性地表达IDO。因此,IDO是一个具潜力的癌症免疫治疗的靶标。

[0003] IDO抑制剂作为藥物在医药行业具有良好的应用前景,专利申请PCT/CN2016/079054(申请日2016.04.12,公开号W02016169421A1)中提供了一种结构新型的高效低毒的选择性IDO抑制剂化合物,具有优异的效果和作用,特别是优异的药代吸收活性,其化学名为(S)-2-(4-(4-(4-(6-氟-5H-咪唑并[5,1-a]异吲哚-5-基)哌啶-1-基)苯基)-1H-吡唑-1-基)乙醇,结构如下式(I)所示



[0005] 程序性死亡分子1(programmed death-1,PD-1)是1992年发现的表达在T细胞表面的一个蛋白受体,参与到细胞的凋亡过程之中。PD-1属于CD28家族,与细胞毒性T淋巴细胞抗原4(cytotoxic T lymphocyte antigen 4,CTLA-4)具有23%的氨基酸同源性,但其表达却与CTLA不同,主要表达在活化的T细胞、B细胞和髓系细胞上。PD-1有两个配体,分别为PD-L1和PD-L2。PD-L1的主要表达于T细胞、B细胞、巨噬细胞和树突状细胞(dendritic cell, DC)上,在活化后细胞上的表达能够进行上调。而PD-L2的表达相对较局限,主要表达在抗原呈递细胞上,如活化的巨噬细胞和树突状细胞。新的研究发现乳腺癌、肺癌、胃癌、肠癌、肾癌、黑素瘤等人类肿瘤组织中检测到高PD-L1蛋白的表达,且PD-L1的表达水平和患者的临

床及预后紧密相关。由于PD-L1作为第二信号通路抑制T细胞增殖的作用，PD-1/PD-L1免疫疗法是当前备受瞩目的新一类抗癌免疫疗法，旨在利用人体自身的免疫系统抵御癌症，通过阻断PD-1/PD-L1信号通路使癌细胞死亡，具有治疗多种类型肿瘤的潜力，所以阻断PD-L1/PD-1之间结合成为了肿瘤免疫治疗领域一个非常有潜力的新兴靶点。专利申请W02015085847(公开日2015.06.18)中公开了一种高亲和力、高选择性、高生物活性的PD-1抗体。

[0006] 传统的抗癌治疗(手术、放疗和化疗)与之前相比已取得了一定的临床治疗效果，但由于治疗方法的局限性，一直不能实现患者肿瘤的治愈和生存期的延长。在治疗局部癌症方面，放疗是有效的，但治疗扩散性癌症时常常是治标不治本。在这些病例中，化疗依然是治疗的选择方案，但是化疗对机体正常组织的严重毒性作用也常常限制了它的临床应用。

[0007] 联合用药是影响药物作用的重要因素之一。两种或两种以上药物联合应用时，既可以产生协同作用，也可以产生拮抗作用。IDO在抗原提呈细胞和肿瘤细胞高表达，IDO通路通过抑制T细胞的增殖下调机体的免疫能力。和其它免疫检查点抑制剂(CTLA-4、PD-1和PD-L1)一样，IDO是肿瘤逃逸免疫系统的重要机制之一。目前进行临床试验的IDO抑制剂有4个。从临床效果来看，IDO单靶效果如果有限，通过上述的可能的联用机制，与免疫检查点抑制剂联合用药或许可增加疗效。2016年6月Incyte的IDO1抑制剂和默沙东的PD-1抗体Keytruda组合作为一线疗法治疗晚期黑色素瘤的三期临床试验正在开展，但存在着样本量过小以及非随机研究的问题，是否能够成功应用于临床仍值得深入研究。

发明内容

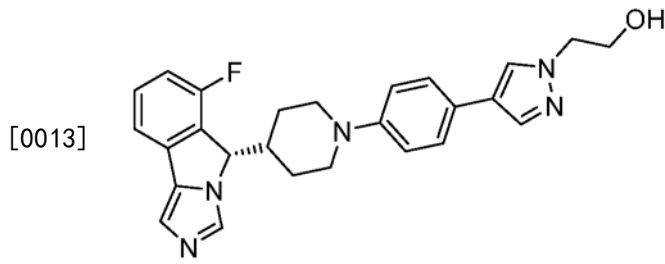
[0008] 本发明要解决的技术问题是提供PD-1抗体或其抗原结合片段与IDO抑制剂化合物联合的用途，具体为PD-1抗体或其抗原结合片段与(S)-2-(4-(4-(4-(6-氟-5H-咪唑并[5,1-a]异吡啶-5-基)哌啶-1-基)苯基)-1H-吡唑-1-基)乙醇联合在制备抗肿瘤的藥物中的用途。

[0009] 本发明提供一种PD-1抗体或其抗原结合片段与化合物(I)所示的IDO抑制剂联合在制备抗肿瘤藥物中的用途，其中，所述组分PD-1抗体或其抗原结合片段包含：

[0010] 抗体轻链可变区，所述的抗体轻链可变区包含至少1个选自如以下序列所示的LCDR:SEQ ID NO:4,SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:6;和

[0011] 抗体重链可变区，所述的抗体重链可变区包含至少1个选自如以下序列所述的HCDR:SEQ ID NO:1,SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3,

[0012] 所述IDO抑制剂为式(I)所示的化合物(S)-2-(4-(4-(4-(6-氟-5H-咪唑并[5,1-a]异吡啶-5-基)哌啶-1-基)苯基)-1H-吡唑-1-基)乙醇或其可药用的盐、溶剂化合物或其立体异构体，在本发明的具体实施方案中，式(I)所示化合物还使用代号41来表示，



[0014] 在本发明的一个优选实施例方案中,本发明的PD-1抗体或其抗原结合片段的抗体轻链可变区包含如SEQ ID NO:4所示的LCDR1。

[0015] 在本发明的一个优选实施例方案中,本发明的PD-1抗体或其抗原结合片段的抗体轻链可变区包含如SEQ ID NO:5所示的LCDR2。

[0016] 在本发明的一个优选实施例方案中,本发明的PD-1抗体或其抗原结合片段的抗体轻链可变区包含如SEQ ID NO:6所示的LCDR3。

[0017] 在本发明的一个优选实施例方案中,本发明的PD-1抗体或其抗原结合片段的抗体重链可变区包含如SEQ ID NO:1所示的HCDR1。

[0018] 在本发明的一个优选实施例方案中,本发明的PD-1抗体或其抗原结合片段的抗体重链可变区包含如SEQ ID NO:2所示的HCDR2。

[0019] 在本发明的一个优选实施例方案中,本发明的PD-1抗体或其抗原结合片段的抗体重链可变区包含如SEQ ID NO:3所示的HCDR3。

[0020] 其中,前面所述各CDR序列如下表所示:

[0021]

名称	序列	编号
HCDR1	SYMMS	SEQID NO:1
HCDR2	TISGGGANTYYPDSVKG	SEQID NO:2
HCDR3	QLYYFDY	SEQID NO:3
LCDR1	LASQTIGTWLT	SEQID NO:4
LCDR2	TATSLAD	SEQID NO:5
LCDR3	QQVYSIPWT	SEQID NO:6

[0022] 在本发明的一个优选实施例方案中,本发明的PD-1抗体或其抗原结合片段为人源化抗体或其片段。

[0023] 在本发明的一个优选实施例方案中,本发明的PD-1抗体或其抗原结合片段的人源化抗体轻链序列为如SEQ ID NO:8所示的序列或其变体;所述的变体优选在轻链可变区有0-10的氨基酸变化;更优选为A43S的氨基酸变化。

[0024] 在本发明的一个优选实施例方案中,本发明的PD-1抗体或其抗原结合片段的人源化抗体轻链序列为如SEQ ID NO:7所示的序列或其变体;所述变体优选在重链可变区有0-10的氨基酸变化;更优选为G44R的氨基酸变化。

[0025] 特别优选的所述的人源化抗体轻链序列为如SEQ ID NO:8所示的序列,重链序列为如SEQ ID NO:7所示的序列。

[0026] 前述的人源化抗体重、轻链的序列如下所示:

[0027] 重链

[0028]

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYMMSWVRQAPGKGLEWVATISG
 GGANTYYYPDSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQLYYFDY
 WGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS
 GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKR
 VESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDPE
 VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
 SNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
 EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEAL
 HNHYTQKSLSLSLGK

SEQID NO: 7

[0029] 轻链

[0030]

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCLASQTIGTWLTWYQQKPGKAPKLLIYTATSLA
 DGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQVYSIPWTFGGGTKVEIKRTVA
 APSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPRQAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE
 QDSKSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQID NO: 8

[0031] 在优选的实施方案中,所述的肿瘤选自PD-1介导的相关疾病或病症以及IDO介导的色氨酸代谢途径的病理学特征的疾病。

[0032] 在优选的实施方案中,所述的肿瘤选自IDO过表达肿瘤。在优选的实施方案中,所述的肿瘤对免疫治疗耐受或不敏感,所述免疫治疗选自PD-1抗体。

[0033] 在优选的实施方案中,所述肿瘤可以选自肺癌、胃癌、肠癌、结肠癌、乳腺癌、宫颈癌、直肠癌、胰腺癌、脑癌、皮肤癌、口腔癌、前列腺癌、骨癌、肾癌、卵巢癌、膀胱癌、肝癌、输卵管肿瘤、卵巢瘤、腹膜肿瘤、黑色素瘤、神经胶质瘤、神经胶母细胞瘤、肝细胞癌、乳突肾性瘤、头颈部肿瘤、白血病、淋巴瘤、骨髓瘤或非小细胞肺癌。优选表达PD-L1的肿瘤,更优选为乳腺癌、肺癌、胃癌、肠癌、结肠癌、肾癌、黑色素瘤或非小细胞肺癌。

[0034] 本发明中的PD-1抗体或其抗原结合片段的用量没有特别限制,例如可以是0.1-1000mg,优选自50-600mg,优选自50mg、60mg、70mg、75mg、100mg、125mg、150mg、175mg、200mg、225mg、250mg、375mg、400mg、425mg、450mg、475mg、500mg、600mg,更优选自100mg、200mg、400mg;也可以是1-10mg/kg,优选自1mg/kg、2mg/kg、3mg/kg、4mg/kg、5mg/kg、6mg/kg、7mg/kg、8mg/kg、9mg/kg、10mg/kg,更优选3mg/kg、4mg/kg、5mg/kg。本发明中的IDO用量没有特别限制,例如可以是0.1-1000mg,优选10mg、20mg、25mg、50mg、75mg、100mg、150mg、200mg、300mg、400mg、500mg、600mg、700mg、750mg、800mg、900mg、1000mg,更优选50mg、100mg、200mg、400mg、800mg、1000mg。

[0035] 在联合给药时,PD-1抗体或其抗原结合片段与通式(I)所示的IDO抑制剂的重量比例也没有特别限制,例如可以是0.001~1000,优选10mg、20mg、25mg、50mg、75mg、100mg、150mg、200mg、300mg、400mg、500mg、600mg、700mg、750mg、800mg、900mg、1000mg,更优选50mg、100mg、200mg、400mg、800mg、1000mg。

[0036] 二者的给药频率可根据患者的情况决定,在优选的实施方案中,IDO抑制剂是BID(一天给药两次)或一天给药一次,PD-1抗体是QOD(间隔一天给药一次)或Q3W(每三周给予一次)或Q2W(每2周给予一次)。

[0037] 本发明的还涉及一种PD-1抗体或其抗原结合片段与通式(I)所示的IDO抑制剂联合在制备抗肿瘤药物中的用途,其中PD-1抗体或其抗原结合片段与通式(I)所示的IDO抑制剂分别被制备成药物组合物,例如分别被配制为片剂、胶囊剂、丸剂、颗粒剂、溶液剂、混悬剂、糖浆剂、注射剂(包括注射液、注射用无菌粉末与注射用浓溶液)、栓剂、吸入剂或喷雾剂。

[0038] 此外,本发明的所述药物制剂还可以以任何合适的给药方式,例如口服、肠胃外、直肠、经肺或局部给药等方式施用于需要这种治疗的患者或受试者。当用于口服给药时,所述药物组合物可制成口服制剂,例如口服固体制剂,如片剂、胶囊剂、丸剂、颗粒剂等;或,口服液体制剂,如口服溶液剂、口服混悬剂、糖浆剂等。当制成口服制剂时,所述药物制剂还可包含适宜的填充剂、粘合剂、崩解剂、润滑剂等。当用于肠胃外给药时,所述药物制剂可制成注射剂,包括注射液、注射用无菌粉末与注射用浓溶液。当制成注射剂时,所述药物组合物可采用现有制药领域中的常规方法来进行生产。当配制注射剂时,所述药物制剂中可以不加入附加剂,也可根据药物的性质加入适宜的附加剂。当用于直肠给药时,所述药物制剂可制成栓剂等。用于经肺给药时,所述药物制剂可制成吸入剂或喷雾剂等。特别优选的PD-1抗体的可注射形式是注射液或冻干粉针,其包含PD-1抗体、缓冲剂、稳定剂,任选地还含有表面活性剂。缓冲剂可选自醋酸盐、柠檬酸盐、琥珀酸盐、以及磷酸盐中的一种或几种。稳定剂可选自糖或氨基酸,优选二糖,例如蔗糖、乳糖、海藻糖、麦芽糖。表面活性剂选自聚氧乙烯氢化蓖麻油、甘油脂肪酸酯、聚氧乙烯山梨醇酐脂肪酸酯,优选所述聚氧乙烯山梨醇酐脂肪酸酯为聚山梨酯20、40、60或80,最优选聚山梨酯20。最为优选的PD-1抗体的可注射形式包含PD-1抗体、醋酸盐缓冲剂、海藻糖和聚山梨酯20。

[0039] 本发明中,所谓“联合”是一种给药方式,其包括两种药物先后,或同时给药的各种情况,此处所谓“同时”是指在同一给药周期给予PD-1抗体和IDO抑制剂,例如在2天内,或1天内给予两种药物。所谓“先后”给药,则包括在不同给药周期内分别给予PD-1抗体和IDO抑制剂的情况。这些给药方式,均属于本发明所述的联合给药。

[0040] 本发明还提供了一种治疗肿瘤的方法,包括向肿瘤患者联合给予前述的PD-1抗体和IDO抑制剂。

[0041] 本发明提供上述PD-1抗体联合上述IDO抑制剂作为治疗抗肿瘤的药物。本发明还提供了一种药物套组,或者一种药物包装盒,其中含有前述的IDO抑制剂和PD-1抗体。

[0042] 本发明还提供了一种药物组合物,包含前述的有效量的PD-1抗体和前述的IDO抑制剂,以及一种或多种可药用的赋型剂、稀释剂或载体。

[0043] 发明详述

[0044] 为了更容易理解本发明,以下具体定义了某些技术和科学术语。除显而易见在本文件中的它处另有明确定义,否则本文使用的所有其它技术和科学术语都具有本发明所属领域的一般技术人员通常理解的含义。

[0045] 本发明所用氨基酸三字母代码和单字母代码如J.biol.chem,243,p3558(1968)中所述。

[0046] 本发明所述的抗体指免疫球蛋白,是由两条相同的重链和两条相同的轻链通过链间二硫键连接而成的四肽链结构。免疫球蛋白重链恒定区的氨基酸组成和排列顺序不同,故其抗原性也不同。据此,可将免疫球蛋白分为五类,或称为免疫球蛋白的同种型,即IgM, IgD, IgG, IgA和IgE,其相应的重链分别为 μ 链, δ 链 γ , α 链, ϵ 链。同一类Ig根据其铰链区氨基酸组成和重链二硫键的数目和位置的差别,又可分为不同的亚类,如IgG可分为IgG1, IgG2, IgG3, IgG4。轻链通过恒定区的不同分为 κ 链或 λ 链。五类Ig中第每类Ig都可以有 κ 链或 λ 链。

[0047] 在本发明中,本发明所述的抗体轻链可变区可进一步包含轻链恒定区,所述的轻链恒定区包含人源或鼠源的 κ 、 λ 链或其变体。

[0048] 在本发明中,本发明所述的抗体重链可变区可进一步包含重链恒定区,所述的重链恒定区包含人源或鼠源的IgG1,2,3,4或其变体。

[0049] 抗体重链和轻链靠近N端的约110个氨基酸的序列变化很大,为可变区(V区);靠近C端的其余氨基酸序列相对稳定,为恒定区(C区)。可变区包括3个高变区(HVR)和4个序列相对保守的骨架区(FR)。3个高变区决定抗体的特异性,又称为互补性决定区(CDR)。每条轻链可变区(LCVR)和重链可变区(HCVR)由3个CDR区4个FR区组成,从氨基端到羧基端依次排列的顺序为:FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4。轻链的3个CDR区指LCDR1, LCDR2, 和LCDR3;重链的3个CDR区指HCDR1, HCDR2和HCDR3。发明所述的抗体或抗原结合片段的LCVR区和HCVR区的CDR氨基酸残基在数量和位置符合已知的Kabat编号规则(LCDR1-3, HCDE2-3),或者符合kabat和chothia的编号规则(HCDR1)。

[0050] 术语“人源化抗体(humanized antibody)”,也称为CDR移植抗体(CDR-grafted antibody),是指将小鼠的CDR序列移植到人的抗体可变区框架,即不同类型的人种系抗体构架序列中产生的抗体。可以克服嵌合抗体由于携带大量小鼠蛋白成分,从而诱导的强烈的抗体可变抗体反应。此类构架序列可以从包括种系抗体基因序列的公共DNA数据库或公开的参考文献获得。如人重链和轻链可变区基因的种系DNA序列可以在“VBase”人种系序列数据库(在因特网www.mrccpe.com.ac.uk/vbase可获得),以及在Kabat, E. A. 等人, 1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版中找到。在本发明一个优选的实施方案中,所述的PD-1人源化抗体小鼠的CDR序列选自SEQ ID NO:1,2,3,4,5,6。

[0051] 本发明中所述的“抗原结合片段”,指具有抗原结合活性的Fab片段, Fab ‘片段, F(ab’) 2片段,以及与人PD-1结合的Fv片段sFv片段;包含本发明所述抗体的选自SEQ ID NO:1至SEQ ID NO:6中的一个或多个CDR区。Fv片段含有抗体重链可变区和轻链可变区,但没有恒定区,并具有全部抗原结合位点的最小抗体片段。一般地, Fv抗体还包含在VH和VL结构域之间的多肽接头,且能够形成抗原结合所需的结构。也可以用不同的连接物将两个抗体可变区连接成一条多肽链,称为单链抗体(single chain antibody)或单链Fv(sFv)。本发明的术语“与PD-1结合”,指能与人PD-1相互作用。本发明的术语“抗原结合位点”指抗原上不连续的,由本发明抗体或抗原结合片段识别的三维空间位点。

[0052] “给予”和“处理”当应用于动物、人、实验受试者、细胞、组织、器官或生物流体时,是指外源性药物、治疗剂、诊断剂或组合物与动物、人、受试者、细胞、组织、器官或生物流体的接触。“给予”和“处理”可以指例如治疗、药物代谢动力学、诊断、研究和实验方法。细胞的处理包括试剂与细胞的接触,以及试剂与流体的接触,其中所述流体与细胞接触。“给予”和“处理”还意指通过试剂、诊断、结合组合物或通过另一种细胞体外和离体处理例如细胞。

“处理”当应用于人、兽医学或研究受试者时,是指治疗处理、预防或预防性措施,研究和诊断应用。

[0053] “治疗”意指给予患者内用或外用治疗剂,诸如包含本发明的任一种结合化合物的组合物,所述患者具有一种或多种疾病症状,而已知所述治疗剂对这些症状具有治疗作用。通常,在受治疗患者或群体中以有效缓解一种或多种疾病症状的量给予治疗剂,无论是通过诱导这类症状退化还是抑制这类症状发展到任何临床可测量的程度。有效缓解任何具体疾病症状的治疗剂的量(也称作“治疗有效量”)可根据多种因素变化,例如患者的疾病状态、年龄和体重,以及药物在患者产生需要疗效的能力。通过医生或其它专业卫生保健人士通常用于评价该症状的严重性或进展状况的任何临床检测方法,可评价疾病症状是否已被减轻。尽管本发明的实施方案(例如治疗方法或制品)在缓解每个患者都有的目标疾病症状方面可能无效,但是根据本领域已知的任何统计学检验方法如Student t检验、卡方检验、依据Mann和Whitney的U检验、Kruskal-Wallis检验(H检验)、Jonckheere-Terpstra检验和Wilcoxon检验确定,其在统计学显著数目的患者中应当减轻目标疾病症状。

[0054] “有效量”包含足以改善或预防医学病症的症状或病症的量。有效量还意指足以允许或促进诊断的量。用于特定患者或兽医学受试者的有效量可依据以下因素而变化:如治疗的病症、患者的总体健康情况、给药的方法途径和剂量以及副作用严重性。有效量可以是避免显著副作用或毒性作用的最大剂量或给药方案。

[0055] 本文使用的表述“细胞”、“细胞系”和“细胞培养物”可互换使用,并且所有这类名称都包括后代。因此,单词“转化体”和“转化细胞”包括原代受试细胞和由其衍生的培养物,而不考虑转移数目。还应当理解的是,由于故意或非有意的突变,所有后代在DNA含量方面不可能精确相同。包括具有与最初转化细胞中筛选的相同的功能或生物学活性的突变后代。在意指不同名称的情况下,其由上下文清楚可见。

[0056] “任选”或“任选地”意味着随后所描述地事件或环境可以但不必发生,该说明包括该事件或环境发生或不发生地场合。例如,“任选包含1-3个抗体重链可变区”意味着特定序列的抗体重链可变区可以但不必须存在。

[0057] 本发明PD-1抗体或其抗原结合片段与化合物(I)所示IDO抑制剂组合物可以有效解决肿瘤异质性,发挥显著的抑制肿瘤细胞作用,有效抑制肿瘤细胞的增殖、迁移或侵袭。

附图说明

[0058] 图1为本发明的PD-1抗体与式(I)所示IDO抑制剂(实施例中也称为化合物41)联合用药对MC38肿瘤生长的抑制作用曲线。

具体实施方式

[0059] 以下结合实施例进一步描述本发明,但这些实施例并非限制着本发明的范围。本发明实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件,如冷泉港的抗体技术实验手册,分子克隆手册;或按照原料或商品制造厂商所建议的条件。未注明具体来源的试剂,为市场购买的常规试剂。

[0060] 本发明的PD-1的HC序列为(SEQID NO:7),LC序列为(SEQID NO:8),如下所示:

[0061] HC

[0062]

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYMMSWVRQAPGKGLEWVATISG
 GGANTYYYPDSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARQLYYFDY
 WGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS
 GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKR
 VESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDPE
 VQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
 SNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
 EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEAL
 HNHYTQKSLSLSLGK

[0063] LC

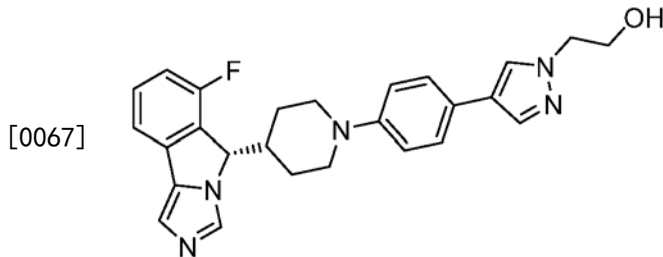
[0064]

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCLASQTIGTWLTWYQKPGKAPKLLIYTATSLA
 DGVPSRFSGSGSGTDFLTITSSLQPEDFATYYCQQVYSIPWTFGGGTKVEIKRTVA
 APSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE
 QDSKSTYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

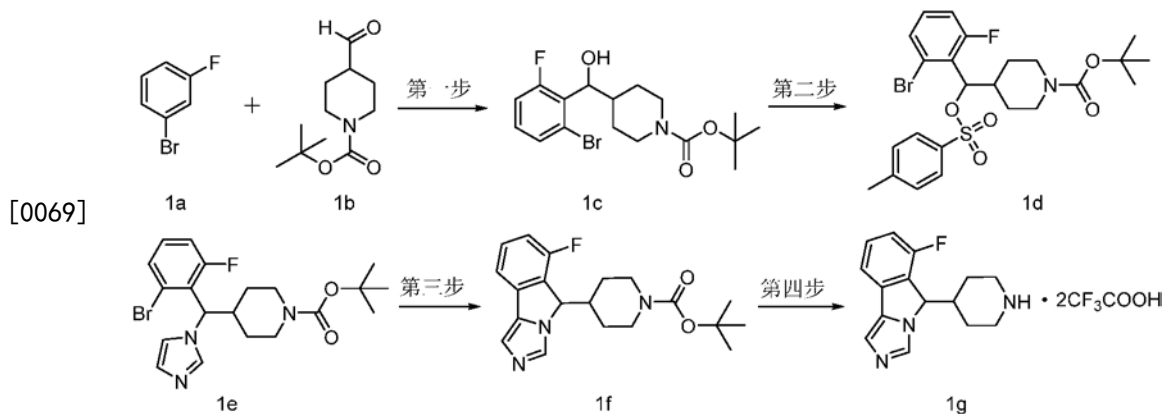
SEQID NO: 8

[0065] 本发明的通式(I)所示的IDO抑制剂化合物(S)-2-(4-(4-(4-(6-氟-5H-咪唑并[5,1-a]异吲哚-5-基)哌啶-1-基)苯基)-1H-吡唑-1-基)乙醇参考专利申请PCT/CN2016/079054(申请日2016.04.12,公开号W02016169421A1)中的实施例40、41中的方法制备,具体方法如下:

[0066] (S)-2-(4-(4-(4-(6-氟-5H-咪唑并[5,1-a]异吲哚-5-基)哌啶-1-基)苯基)-1H-吡唑-1-基)乙醇的制备



[0068] (1) 6-氟-5-(哌啶-4-基)-5H-咪唑并[5,1-a]异吲哚二三氟乙酸盐(化合物1g)(参见专利申请PCT/CN2016/079054(申请日2016.04.12,公开号W02016169421A1)中的实施例1中的制备方法)



[0070] 第一步

[0071] 4-((2-溴-6-氟苯)(羟基)甲基)哌啶-1-甲酸叔丁酯1c

[0072] 将二异丙基氨基锂(32.5mL, 65.0mmol)加入四氢呋喃(50mL)中,于-78℃滴加预制的1-溴-3-氟苯1a(8.75g, 50.0mmol, 25mL)的四氢呋喃溶液,于-78℃搅拌1小时。再于-78℃滴加预制的4-甲酰基哌啶-1-甲酸叔丁酯1b(8.75g, 50.0mmol, 25mL)的四氢呋喃溶液,于-78℃搅拌1小时。反应结束后,于-78℃滴加甲醇(25mL)淬灭反应,将反应液减压浓缩,用硅胶柱色谱法以洗脱剂体系(正己烷和乙酸乙酯)纯化所得残留物,得到化合物1c(16.3g, 黄色糖浆固体,产率84.0%)。

[0073] MS m/z (LC-MS): 332.0 [M-56]

[0074] 第二步

[0075] 4-((2-溴-6-氟苯基)(对甲苯磺酰基氧基)甲基)哌啶-1-甲酸叔丁酯1d

[0076] 将化合物1c(15g, 38.63mmol)溶于四氢呋喃(350mL)中,分批加入氢化钠(3.09g, 77.26mmol),搅拌至无气体放出。滴加预制的对甲苯磺酰氯(8.10g, 42.49mmol, 250mL)的四氢呋喃溶液,于室温下搅拌30分钟,回流搅拌4小时,于70℃搅拌48小时。反应结束后,冷却至0℃,滴加水(50mL)淬灭反应,加入饱和氯化钠溶液(50mL),分液,有机相用无水硫酸钠干燥,过滤,滤液减压浓缩,用硅胶柱色谱法以洗脱剂体系(正己烷和乙酸乙酯)纯化所得残留物,得到化合物1d(6.6g, 淡黄色粘稠固体,产率:31.80%)。

[0077] MS m/z (LC-MS): 314.0/316.0 [M-56-TsO]

[0078] 第三步

[0079] 4-((2-溴-6-氟苯)(1H-咪唑-1-基)甲基)哌啶-1-甲酸叔丁酯1e

[0080] 将咪唑(12.5g, 184.3mmol)溶于N,N-二甲基甲酰胺(50mL)中,分批加入氢化钠(7.40g, 184.3mmol),于室温搅拌1小时,滴加预制的化合物1d(10.0g, 18.43mmol, 20mL)的N,N-二甲基甲酰胺溶液,于100℃搅拌12小时。反应结束后,加入乙酸乙酯(300mL),用饱和氯化钠溶液洗涤(150mL×3),有机相用无水硫酸钠干燥,过滤,滤液减压浓缩,用硅胶柱色谱法以洗脱剂体系(二氯甲烷和甲醇)纯化所得残留物,得到化合物1e(1.90g, 棕色粘稠固体,产率:23.5%)。

[0081] MS m/z (LC-MS): 438.1/440.1 [M+1]

[0082] 第四步

[0083] 4-(6-氟-5H-咪唑并[5,1-a]异吲哚-5-基)哌啶-1-甲酸叔丁酯1f

[0084] 将化合物1e(1.90g, 4.33mmol), N,N-二环己基甲基胺(1.35g, 6.93mmol), 三苯基

磷(908mg, 3.46mmol)加入N,N-二甲基甲酰胺溶液(10mL)中, 氩气氛下, 加入醋酸钼(390mg, 1.74mmol), 于100℃搅拌4.5小时。反应结束后, 将反应液减压浓缩, 用硅胶柱色谱法以洗脱剂体系(正己烷和乙酸乙酯)纯化所得残留物, 得到化合物1f(1.30g, 黄色粘稠固体, 产率: 83.8%)。

[0085] MS m/z (LC-MS): 358.1 [M+1]

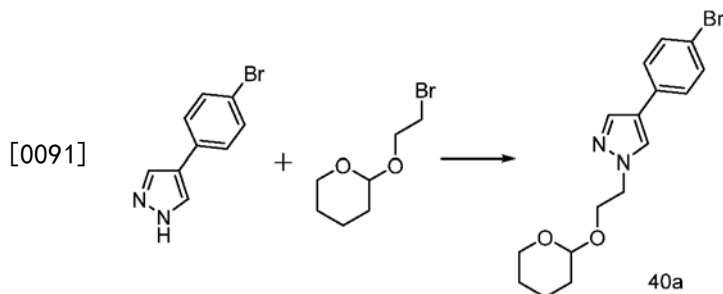
[0086] 第五步

[0087] 6-氟-5-(哌啶-4-基)-5H-咪唑并[5,1-a]异吲哚二三氟乙酸盐1g

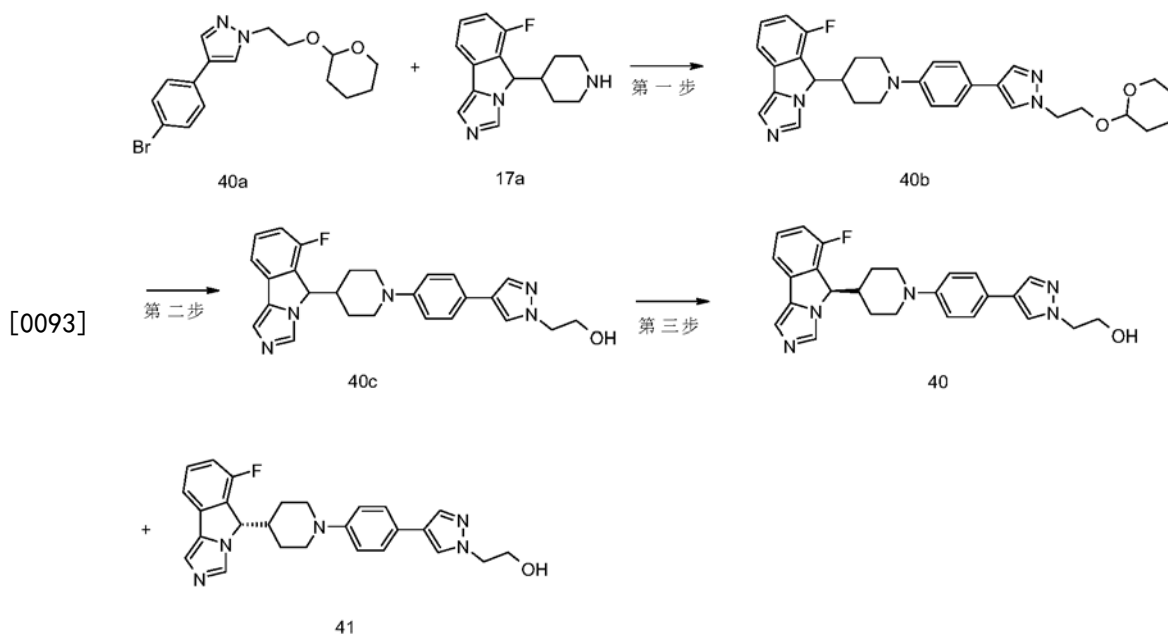
[0088] 将化合物1f(1.30g, 3.64mmol)溶于二氯甲烷(5mL)中, 滴加三氟乙酸(5mL), 于室温下搅拌1小时。反应结束后, 将反应液减压浓缩, 得到粗品化合物1g(1.77g, 棕色粘稠固体), 产品不经纯化直接进行下一步反应。

[0089] MS m/z (LC-MS): 258.3 [M+1]

[0090] (2) 4-(4-溴苯基)-1-(2-((四氢-2H-吡喃-2-基)氧基)乙基)-1H-吡唑(化合物40a)(参见CN104755477A(公开日2015.07.01)说明书第44页中公开的制备方法)



[0092] (3) (S)-2-(4-(4-(4-(6-氟-5H-咪唑并[5,1-a]异吲哚-5-基)哌啶-1-基)苯基)-1H-吡唑-1-基)乙醇(化合物41)



[0094] 第一步

[0095] 将4-(4-溴苯基)-1-(2-((四氢-2H-吡喃-2-基)氧基)乙基)-1H-吡唑40a(14.8g, 42mmol), 6-氟-5-(哌啶-4-基)-5H-咪唑并[5,1-a]异吲哚17a(13.9g, 42mmol)加入N,N-二甲基甲酰胺(300mL)中, 加入四氟硼酸三叔丁基磷(1.863g, 64.5mmol)和磷酸钾(35g,

168mmol), 氩气置换三次。加入三(二亚苄基丙酮)二钯(2.92g, 3.19mmol), 氩气置换一次, 反应液升温至110℃, 搅拌反应2小时。反应结束后, 将反应液过滤, 滤液减压浓缩除去N,N-二甲基甲酰胺, 用硅胶柱色谱法以洗脱剂体系(二氯甲烷和甲醇)纯化所得残留物, 得到化合物40b(6.38g, 灰色油状物, 产率:29%)。

[0096] 第二步

[0097] 将化合物40b(9g, 17.1mmol)溶于甲醇(100mL)中, 加入浓盐酸(12M, 5.7mL), 反应液升至45℃, 搅拌反应1小时。反应结束后, 将反应液冷却至室温, 加入饱和碳酸钠调反应液pH为8, 过滤, 滤液减压浓缩, 用硅胶柱色谱法以洗脱剂体系(二氯甲烷和甲醇)纯化所得残留物, 得到化合物40c(5.2g, 黄色固体, 产率:65%)。

[0098] 第三步

[0099] 将化合物40c(1.4g, 3.16mmol)进行手性制备(分离条件:手性制备柱Superchiral S-AS(Chiralway), 2cm I.D. × 25cm Length, 5μm; 流动相:CO₂/MeOH/DEA=60/40/0.05(v/v/v), 流速:50mL/min), 收集其相应组分, 减压浓缩, 得到化合物40(630mg, 黄色固体)和化合物41(652mg, 黄色固体)。

[0100] 实验例1、本发明组合对小鼠结肠癌(MC38)hPD-1转基因小鼠皮下移植瘤疗效

[0101] 供试品:PD-1抗体冻干粉(按照专利申请PCT/CN2016/098982, 申请日2016.09.14, 公开号W02017054646A1中的方法制备)、IDO抑制剂化合物41, 其制备方法见制备实施例。

[0102] 对照药:IDO抑制剂化合物INCB024360(结构为 ) 参考专利

W02010005958A1(公开日2010.01.14)第51页的实施例3中公开的方法制备;NLG0919(结构

为 ) 参考专利W02012142237A1(公开日2010.10.18)说明书第121页的实施例25中

公开的方法制备。

[0103] 实验动物:人源PD-1转基因小鼠,7-16周,80只,雌雄各半。该转基因小鼠购自Cephrim公司。所有的这些人源PD-1小鼠都是在由INNOVIVE提供的无特殊致病原(special pathogen free, SPF)实验动物屏障环境中繁育的。实验动物的饲养,操作步骤都是按照实验动物护理和使用委员会(IACUC)批准的实验室标准来进行的。

[0104] 试剂等材料来源:

[0105] β-环糊精(HPB,口服)购自Roquette公司;

[0106] 羧甲基纤维素钠(CMC-Na);

[0107] N,N-二甲基乙酰胺(DMA);

[0108] IgG来源于人来血清购自Sigma-Aldrich;

[0109] 所有细胞培养液和其他辅助成分是从购自Invitrogen。

[0110] 肿瘤模型的建立:

[0111] 复苏一管事先冷冻保存的鼠源直肠癌细胞系MC38于T-25长颈培养瓶中,加入含10%牛血清,1%青链霉素,2mM谷氨酰胺、1%丙酮酸盐钠,1%非必需氨基酸,和1%维生素的DMEM(高糖)细胞培养液,放置在含5%二氧化碳,37℃的培养箱中培养。培养液每周换液两次。细胞传代直到有足够的细胞数目可以种植在小鼠身上。对种植细胞的要求是:1)在快速生长期(通常是70%到90%瓶底面积的饱和度);2)低传代次数(通常在2到4代);3)接种前一天必需换新的培养液;4)存活率达到95%以上。

[0112] 在移植MC38细胞到小鼠身上时(第0天),MC38细胞按照细胞培养的标准步骤先消化收集,用PBS洗两次,然后进行细胞计数,最后再用PBS配成浓度为 5×10^6 MC38单细胞混悬液。接种前,细胞混悬液放入冰浴中。每只hPD-1转基因小鼠接种0.1mL含50万(5×10^5) MC38细胞于右侧皮下。

[0113] 供试品溶液配制:

[0114] 0.5% CMC-Na、10%环糊精和5%葡萄糖水溶液提前配好并储存在4℃冰箱中。

[0115] PD-1抗体:PD-1抗体冻干粉(200mg)首先加入的注射用水(5mL),得到40mg/mL的PD-1抗体浓缩液。给药的PD-1抗体溶液需每次给药时新鲜配制。取PD-1抗体浓缩液(100 μ L),再加入13.2mL的5%葡萄糖溶液(1:133.3倍稀释),混合均匀后得到0.3mg/mL的溶液。每只小鼠腹腔注射(ip)10mL/Kg的体积,最终剂量3mg/kg/每次。

[0116] 人体血浆IgG:IgG冻干粉(21mg)加入生理盐水(7mL)溶解,得到3mg/mL的IgG浓缩液。此浓缩液分装在7个1mL的试管里,放置于-20℃保存。每次给药时,取1管浓缩液在室温溶化。用生理盐水做1:10倍(0.5mL+4.5mL生理盐水)稀释。混合均匀后得到0.3mg/mL的溶液。每只小鼠腹腔注射(ip)10mL/Kg的体积,最终剂量3mg/kg/每次。

[0117] 所有其他样品每隔一天配制一次。

[0118] INCB024360 DMA溶液:先称INCB024360化合物(300mg),然后加入DMA(0.9mL),充分混匀,完全溶解,得到333mg/mL INCB024360浓缩液,放置在室温。每隔一天,取INCB024360浓缩液(240mL),在低速转动中,缓缓加入10%环糊精水溶液(3.76mL)。如不溶解,可短期超声波水浴,即可溶解。得到20mg/mL的给药溶液。每只小鼠口服5mL/Kg的体积,最终剂量100mg/Kg/每次。

[0119] NLG0919混悬液:称量NLG0919化合物(120mg),加入的0.5% CMC-Na(6mL)。然后超声水浴,得到20mg/mL细微颗粒的NLG0919混悬液。放置在室温。每只小鼠口服5mL/Kg的体积,最终剂量100mg/Kg/每次。

[0120] 化合物41混悬液:称取化合物41化合物(120mg),加入0.5% CMC-Na(15mL)。然后超声水浴,得到8mg/mL细微颗粒的NLG0919悬浊液。用0.5% CMC-Na按1:2倍(3mL加3mL)和1:4倍(1.5mL加4.5mL)稀释上述的悬浊液,相应的得到4mg/mL和2mg/mL细微颗粒的化合物41悬浊液。放置在室温。每只小鼠口服5mL/Kg的体积,最终剂量是40、20和10mg/Kg/每次。

[0121] PD-1抗体或者hIgG是每隔一天给一次药,时间为早晨。而其他三种化合物INCB024360、NLG0919和化合物41是早晚两次给药,早晚两次的间隔时间为8小时。

[0122] 待肿瘤体积达到约100mm³后开始分组给药,MC38细胞移植后要每天观察肿瘤的生长情况。当肿瘤出现后,测量肿瘤的大小直到长到大约100mm³时(计算肿瘤体积公式:肿瘤体积=1 \times w \times h \times 0.5236,其中1=长,w=宽,h=高,单位mm),从80只移植MC38细胞的小鼠中选出64只,随机分成8组(每性别4只,#1到#4是雌性;#5到#8是雄性)。这天定为第8天。测

试品按照预先设定的单用或合用,剂量和途径给药的具体实验方案设计如下表所示:

[0123]

组别	测试品	剂量(mg/kg) 和给药途径	给药时间	每组小鼠数 (只)
1	空白 (hIgG+0.5%CMC-Na)	ip + po	隔一天×7/一天两次×14	8
2	PD-1 抗体	3, ip	隔一天×7	8
3	化合物 41	40, po	一天两次×14	8
4	PD-1 抗体 +INCB024360	3, ip + 100, po	隔一天×7/一天两次×14	8
5	PD-1 抗体+NLG0919	3, ip + 100, po	隔一天×7/一天两次×14	8
6	PD-1 抗体+化合物 41	3, ip + 10, po	隔一天×7/一天两次×14	8
7	PD-1 抗体+化合物 41	3, ip + 20, po	隔一天×7/一天两次×14	8
8	PD-1 抗体+化合物 41	3, ip + 40, po	隔一天×7/一天两次×14	8

[0124] ip为腹腔注射;po为口服。

[0125] 组织样本的收集:

[0126] 在本实验给药结束后的第2天(实验的第22天),所有的实验小鼠继续做PK/PD研究。简单说,就是六组小鼠(组3到组8)按照此组的口服剂量再只给一次药(INCB024360、NLG0919和化合物41)。每组8只小鼠中,第一,二号小鼠不给任何药,只作为零点对照。第三到第五只小鼠提前2小时口服给药,第六到第八只小鼠提前8小时口服给药。这样小鼠在大概相同的时间用二氧化碳终止生命。小鼠全血样立即通过心脏穿刺取出,放入抗凝试管中,然后放置在冰浴里直到离心。血样在离心机中用15,000转的速度离心5分钟,试管中的上清液(血清)取出后放入一套新的试管中。最后所有的血清样本保存在-80℃的超低温冻箱里直到寄出给上海恒瑞医药有限公司。同时,所有小鼠身上的肿瘤被剥离,在天平上称重,记录。待所有的肿瘤都被取出来后,个体肿瘤拍照记录,随后肿瘤被分开包装,并存放在-80℃的超低温冻箱里。

[0127] 实验终点:

[0128] 肿瘤体积和小鼠的体重一周测量两次。

[0129] 如任何一只小鼠有下述情况之一出现,那么此小鼠将被中止实验并移出数据收集:

[0130] 1) 如小鼠肿瘤体积超过它10%的体重或超出1500mm³;

[0131] 2) 如小鼠显现毒性反应,并不能基本日常行动;

[0132] 3) 如小鼠的体重下降超过实验开始前体重的10%。

[0133] 数据分析:本实验的数据采用双因素方差分析(two-Way ANOVA)方法对空白组和治疗组,以及治疗组组之间进行统计处理,再用Bonferroni多组间的比较统计处理,所有的统计分析是在GraphPad Prism统计软件上运行的(Prism 6 for Windows,Version 6.0, GraphPad Software Inc.,San Diego,CA)。

[0134] 实验结果:

[0135]

表 1、本发明组合物对结肠癌(MC38)hPD-1 转基因小鼠皮下移植瘤的抑制效果

组别	测试品	剂量(mg/kg)和给药途径	最大体重减少率(天)	%最大抑瘤率(天)	肿瘤体积(mm ³) (Mean±SEM)					
					Day8	Day11	Day14	Day17	Day22	
1	空白	ip + po	-1.2% (11)	—	124.7±14.8	294.4±31.1	535.5±51.4	825.3±87.7	1206.3±133.2	
2	PD-1 抗体	3, ip	-0.2% (11)	41.9% (19)	122.7±9.8	270.2±18.1	389.7±39.3	479.4±62.0***	760.7±172.7***	
3	化合物 41	40, po	-0.4% (11)	43.3% (22)	125.5±14.7	257.9±30.3	373.7±59.4	507.1±69.2**	683.7±105.1***	
4	PD-1 抗体 + INCB024360	3, ip + 100, po	-0.5% (11)	57.4% (22)	124.5±13.4	265.6±30.2	353.8±38.1	402.3±52.8***	514.5±116.5*** ⁰	
5	PD-1 抗体+NLG0919	3, ip + 100, po	-0.8% (11)	60.4% (22)	123.7±10.0	258.3±23.4	371.9±51.4	352.6±78.2***	477.2±134.3*** ⁰⁰	
6	PD-1 抗体+化合物 41	3, ip + 10, po	-1.6% (11)	63.7% (22)	122.3±9.6	271.8±32.0	379.3±42.9	386.2±52.2***	438.0±100.5*** ⁰⁰	
7	PD-1 抗体+化合物 41	3, ip + 20, po	-1.8% (11)	69.0% (22)	122.8±10.0	265.4±18.4	311.7±31.9	322.8±55.9***	374.0±83.1*** ⁰⁰⁰⁰	
8	PD-1 抗体+化合物 41	3, ip + 40, po	-1.7% (11)	84.3% (22)	122.7±10.3	238.3±22.7	239.3±31.7**	180.0±32.5*** ⁰⁰⁰⁰	189.2±56.9*** ⁰⁰⁰⁰⁰⁰	

备注: **P<0.01, *** p<0.001 vs 同一天组 1; ⁰P<0.05, ⁰⁰P<0.01, ⁰⁰⁰P<0.001 vs 同一天组 2; "P<0.01, ""P<0.001 vs 同一天组 3。

[0136] 实验结论:

[0137] 分组和治疗是从接种后的第8天 (D8) 开始的,由上表1实验数据显示,PD-1抗体或

者化合物41单用的最大抑瘤率分别为41.9%和43.3%，PD-1抗体与IDO抑制剂化合物41联合用药的最大抑瘤率是在第22天，参比IDO抑制剂化合物INCB024360 (100mg/kg)、NLG0919 (100mg/kg)与PD-1抗体联用的抑瘤率分别为43.3%和57.4%，化合物41与PD-1抗体联用剂量依赖性(10、20、40mg/kg)地抑制肿瘤生长，最大抑瘤率分别为63.7%，69.0%和84.3%。以上联用组在第22天与对照组或者与PD-1抗体单用组相比均具有统计学意义，10mg/kg IDO抑制剂化合物41与100mg/kg IDO/TDO抑制剂NLG0919的疗效相当，优于100mg/kg IDO抑制剂INCB024360。

[0138] 综上所述，本发明的PD-1抗体与IDO抑制剂化合物41联用对结肠癌(MC38)细胞的抑制效果明显优于单一组分PD-1抗体或者化合物41、并且优于对照组PD-1抗体与INCB024360或NLG0919100联用的效果，因此，本发明PD-1抗体与IDO抑制剂联合用药的抑瘤效果显著。

序列表

- <110> 苏州盛迪亚生物医药有限公司
 江苏恒瑞医药股份有限公司
 上海恒瑞医药有限公司
- <120> PD-1抗体与IDO抑制剂联合在制备抗肿瘤的藥物中的用途
- <130> 770075CPCN
- <150> CN201610921118.7
 <151> 2016-10-21
- <160> 8
- <170> SIPOSequenceListing 1.0
- <210> 1
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 鼠源(Mus musculus)
- <400> 1
 Ser Tyr Met Met Ser
 1 5
- [0001] <210> 2
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 鼠源(Mus musculus)
- <400> 2
 Thr Ile Ser Gly Gly Gly Ala Asn Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly
- <210> 3
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 鼠源(Mus musculus)
- <400> 3
 Gln Leu Tyr Tyr Phe Asp Tyr
 1 5
- <210> 4
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 鼠源(Mus musculus)
- <400> 4
 Leu Ala Ser Gln Thr Ile Gly Thr Trp Leu Thr
 1 5 10
- <210> 5
 <211> 7

<212> PRT
<213> 鼠源(Mus musculus)

<400> 5
Thr Ala Thr Ser Leu Ala Asp
1 5

<210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> 鼠源(Mus musculus)

<400> 6
Gln Gln Val Tyr Ser Ile Pro Trp Thr
1 5

<210> 7
<211> 443
<212> PRT
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
<221> PEPTIDE
<222> (1)..(443)
<223> 重链序列

[0002] <400> 7
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Met Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Thr Ile Ser Gly Gly Gly Ala Asn Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Gln Leu Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
100 105 110
Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
115 120 125
Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
130 135 140
Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
145 150 155 160
Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
165 170 175
Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
180 185 190
Gly Thr Lys Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr
195 200 205
Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro
210 215 220
Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro

```

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

```

[0003] <210> 8
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>
 <221> PEPTIDE
 <222> (1)..(214)
 <223> 轻链序列

<400> 8
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Leu Ala Ser Gln Thr Ile Gly Thr Trp
 20 25 30
 Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Thr Ala Thr Ser Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Val Tyr Ser Ile Pro Trp
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala

	130					135					140					
	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln
	145					150					155					160
	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser
					165					170						175
[0004]	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	Tyr
				180					185					190		
	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	Lys	Ser
			195					200					205			
	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys										
	210															

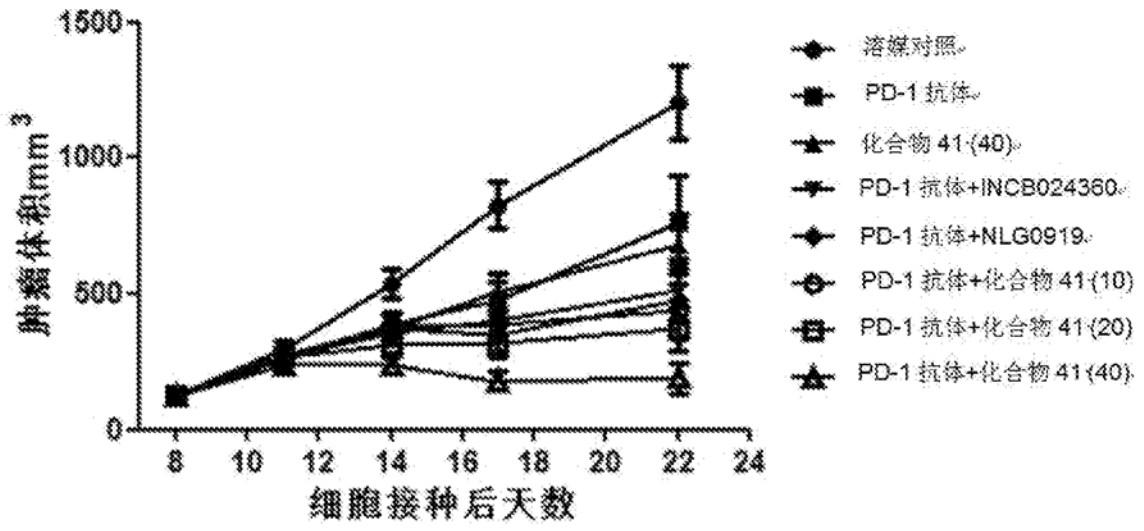


图1