



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112424222 A

(43) 申请公布日 2021.02.26

(21) 申请号 201980026429.9

(74) 专利代理机构 北京市君合律师事务所
11517

(22) 申请日 2019.02.17

代理人 顾云峰 张怡

(30) 优先权数据

62/631,771 2018.02.17 US

62/757,729 2018.11.08 US

(51) Int.Cl.

C07K 16/22 (2006.01)

C07D 487/04 (2006.01)

C07D 471/04 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2020.10.16

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2019/018377 2019.02.17

(87) PCT国际申请的公布数据

W02019/161320 EN 2019.08.22

(71) 申请人 冠科美博有限公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 S·雷德卡 M·雷迪

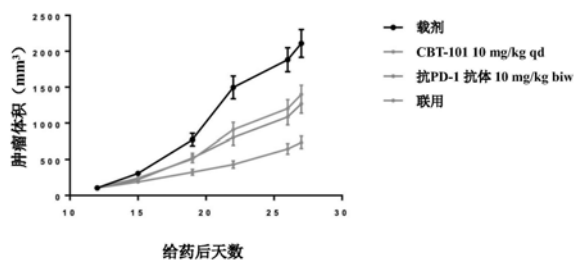
权利要求书3页 说明书20页 附图7页

(54) 发明名称

使用中性粒细胞调节剂与免疫检查点调节剂的组合的癌症治疗

(57) 摘要

本公开提供了在对象中治疗癌症的方法。该方法包括在所述对象中测量选自下组的生物标记物的基础水平的步骤：肝细胞生长因子、中性粒细胞绝对计数、c-Met+中性粒细胞和中性粒细胞与淋巴细胞的比率(NLR)。该方法还包括下述步骤：确定所述生物标记物的基础水平等于或高于阈值，或者确定施用免疫检查点调节剂后所述生物标记物的变化等于或高于阈值；和向所述对象施用c-Met抑制剂和免疫检查点调节剂的组合。



1. 一种治疗患有癌症的对象的方法,所述方法包括:
测量来自所述对象的样品中的选自下组的生物标记物的基础水平:肝细胞生长因子、中性粒细胞绝对计数、c-Met+中性粒细胞和中性粒细胞与淋巴细胞的比率(NLR);
确定所述生物标记物的所述基础水平等于或高于阈值;和
向所述对象施用中性粒细胞调节剂和免疫检查点调节剂的组合。
2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述生物标记物是NLR且所述阈值是3。
3. 根据权利要求1所述的方法,其中所述癌症选自下组:肺癌、黑色素瘤、肾癌、肝癌、骨髓瘤、前列腺癌、乳腺癌、结直肠癌、胰腺癌、甲状腺癌、血液系统癌症、白血病和非霍奇金氏淋巴瘤。
4. 根据权利要求1所述的方法,其中所述癌症是非小细胞肺癌(NSCLC)、肾细胞癌或肝细胞癌。
5. 根据权利要求1所述的方法,其中所述中性粒细胞调节剂是c-Met抑制剂。
6. 根据权利要求5所述的方法,其中所述c-Met抑制剂选自下组:克唑替尼、卡博替尼、APL-101、PLB1001、伯瑞替尼、SU11274、PHA665752、K252a、PF-2341066、AM7、JNJ-38877605、PF-04217903、MK2461、GSK1363089(XL880,福雷替尼)、AMG458、替凡替尼(ARQ197)、INCB28060(INC280,卡马替尼)、E7050、BMS-777607、沃利替尼(volitinib)、HQP-8361、merestinib、ARGX-111、onartuzumab、rilotumumab、emibetuzumab和XL184。
7. 根据权利要求5所述的方法,其中所述c-Met抑制剂是抗c-Met抗体。
8. 根据权利要求1所述的方法,其中所述免疫检查点选自下组:PD-1、PD-L1、PD-L2、LAG-3、TIM-1、CTLA-4、VISTA、B7-H2、B7-H3、B7-H4、B7-H6、284、ICOS、HVEM、CD160、gp49B、PIR-B、KIR家族受体、TIM-1、TIM-4、BTLA、SIRP α (CD47)、CD48、284(CD244)、B7.1、B7.2、ILT-2、ILT-4、TIGIT和A2aR。
9. 根据权利要求1所述的方法,其中所述免疫检查点的调节剂是抗体或化合物。
10. 根据权利要求1所述的方法,其中所述免疫检查点的调节剂是抗PD-1抗体或抗PD-L1抗体。
11. 根据权利要求10所述的方法,其中所述抗PD-1抗体是APL-501、GB226或genolimzumab。
12. 根据权利要求10所述的方法,其中所述抗PD-L1抗体是APL-502或TQB2450。
13. 一种治疗患有癌症的对象的方法,所述方法包括:
测量所述对象中的选自下组的生物标记物的第一水平:肝细胞生长因子、中性粒细胞绝对计数、c-Met+中性粒细胞和NLR;
在一段时间内向所述对象施用免疫检查点的调节剂;
测量所述对象中的所述生物标记物的第二水平;
确定所述生物标记物的所述第二水平与生物标记物的所述第一水平之间的差异等于或高于临界值;和
向所述对象施用中性粒细胞调节剂和免疫检查点调节剂的组合。
14. 根据权利要求13所述的方法,其中所述生物标记物是NLR且所述临界值是2。
15. 根据权利要求13所述的方法,其中所述生物标记物的所述第一水平小于阈值。
16. 根据权利要求15所述的方法,其中所述生物标记物是NLR且所述阈值是3。

17. 根据权利要求13所述的方法,其中所述癌症选自下组:肺癌、黑色素瘤、肾癌、肝癌、骨髓瘤、前列腺癌、乳腺癌、结直肠癌、胰腺癌、甲状腺癌、血液系统癌症、白血病和非霍奇金氏淋巴瘤。

18. 根据权利要求13所述的方法,其中所述癌症是非小细胞肺癌(NSCLC)或肝细胞癌。

19. 根据权利要求13所述的方法,其中所述中性粒细胞调节剂是c-Met抑制剂。

20. 根据权利要求19所述的方法,其中所述c-Met抑制剂选自下组:克唑替尼、卡博替尼、SU11274、PHA665752、K252a、PF-2341066、AM7、JNJ-38877605、PF-04217903、MK2461、GSK1363089(XL880,福雷替尼)、AMG458、替凡替尼(ARQ197)、INCB28060(INC280,卡马替尼)、E7050、BMS-777607、沃利替尼(volitinib)、HQP-8361、merestinib、ARGX-111、onartuzumab、rilotumumab、emibetuzumab和XL184。

21. 根据权利要求13所述的方法,其中所述c-Met抑制剂是抗c-Met抗体。

22. 根据权利要求13所述的方法,其中所述免疫检查点选自下组:PD-1、PD-L1、PD-L2、LAG-3、TIM-1、CTLA-4、VISTA、B7-H2、B7-H3、B7-H4、B7-H6、284、ICOS、HVEM、CD160、gp49B、PIR-B、KIR家族受体、TIM-1、TIM-4、BTLA、SIRP α (CD47)、CD48、284(CD244)、B7.1、B7.2、ILT-2、ILT-4、TIGIT和A2aR。

23. 根据权利要求13所述的方法,其中所述免疫检查点的调节剂是抗体或化合物。

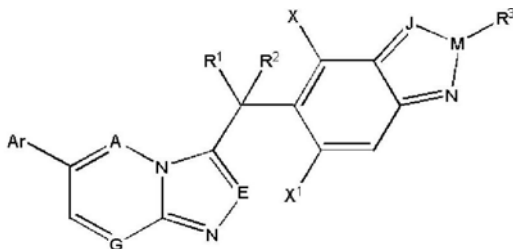
24. 根据权利要求13所述的方法,其中所述免疫检查点的调节剂是抗PD-1抗体或抗PD-L1抗体。

25. 根据权利要求24所述的方法,其中所述抗PD-1抗体是APL-501、GB226或genolimzumab。

26. 根据权利要求24所述的方法,其中所述抗PD-L1抗体是APL-502或TQB2450。

27. 一种治疗患有癌症的对象的方法,所述方法包括:

(A) 向所述对象施用c-Met抑制剂,所述c-Met抑制剂包含下式所示的化合物



其中:

R¹和R²独立地为氢或卤素;

X和X¹独立地为氢或卤素;

A和G独立地为CH或N,或CH=G被硫原子替代;

E是N;

J是CH、S或NH;

M是N或C;

Ar是芳基或杂芳基,其任选被1-3个独立地选自下述的取代基取代:C₁₋₆烷基、C₁₋₆烷氧基、卤代C₁₋₆烷基、卤代C₁₋₆烷氧基、C₃₋₇环烷基、卤素、氰基、氨基、-CONR⁴R⁵、-NHCOR⁶、-SO₂NR⁷R⁸、C₁₋₆烷氧基-、C₁₋₆烷基-、氨基-C₁₋₆烷基-、杂环基和杂环基-C₁₋₆烷基-,或两个连接的取代基与其所相连的原子一起形成与芳基或杂芳基稠合的4-6元内酰胺;

R³是氢、C₁₋₆烷基、C₁₋₆烷氧基、卤代C₁₋₆烷基、卤素、氨基或-CONH-C₁₋₆烷基-杂环基；

R⁴和R⁵独立地为氢、C₁₋₆烷基、C₃₋₇环烷基、杂环基-C₁₋₆烷基，或R⁴和R⁵与其所连接的N一起形成杂环基；

R⁶是C₁₋₆烷基或C₃₋₇环烷基；和

R⁷和R⁸独立地为氢或C₁₋₆烷基；

(B) 向所述对象施用

选自由W02016/014688中公开的那些组成的组的抗PD-1抗体；

或

选自由W02016/022630中公开的那些组成的组的抗PD-L1抗体。

使用中性粒细胞调节剂与免疫检查点调节剂的组合的癌症治疗

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2018年02月17日提交的美国临时专利申请号62/631,771和2018年11月08日提交的美国临时专利申请号62/757,729的优先权,其公开内容通过引用并入本申请。

发明领域

[0003] 本发明总体上涉及癌症治疗。特别地,本发明涉及使用中性粒细胞调节剂与免疫检查点调节剂的组合治疗癌症的方法。

背景技术

[0004] 调节患者自身免疫系统来对抗肿瘤的癌症免疫疗法突显了癌细胞进化以避免免疫监视机制(例如,通过增强对由癌症相关基因改变表达的肿瘤抗原的免疫耐受)的重要性。以针对PD-1、PD-L1或CTLA4的单克隆抗体为代表的几种免疫检查点抑制剂,已使越来越多种类的一些癌症患者产生了显著且持久的应答。然而,目前作为单一药物的免疫疗法(如PD-1或PD-L1阻断)在癌症患者中仅表现出有限的应答(参见,例如,Padmanee Sharma和James P.Allison,“Immune Checkpoint Targeting in Cancer Therapy:Toward Combination Strategies with Curative Potential”Cell (2015) 161:205-214)。

[0005] 为了扩展癌症免疫疗法的应用,已探索了调节免疫检查点途径活性的组合疗法。例如,已检测了c-Met抑制剂与PD-1抗体的组合(参见,例如,WO 2017/106810;Glodde等,Immunity (2017) 47:789-802)。然而,对c-Met抑制剂与抗PD-1抗体联合治疗的反应性取决于背景(Glodde等,Immunity (2017) 47:789-802)。因此,对开发新的方法来增加组合免疫疗法治疗癌症的反应性存在持续的需求。

发明内容

[0006] 在一个方面中,本公开提供了一种治疗患有癌症的对象的方法。在一个实施方式中,所述方法包括:测量来自所述对象的样品中的选自下组的生物标记物的基础水平:肝细胞生长因子、中性粒细胞绝对计数、c-Met+中性粒细胞和中性粒细胞与淋巴细胞的比率(NLR);确定所述生物标记物的所述基础水平等于或高于阈值;和向所述对象施用治疗有效量的中性粒细胞调节剂和免疫检查点调节剂的组合。

[0007] 在另一个实施方式中,所述方法包括:测量所述对象中的选自下组的生物标记物的第一水平:肝细胞生长因子、中性粒细胞绝对计数、c-Met+中性粒细胞和NLR;在一段时间内向所述对象施用免疫检查点的调节剂;测量所述对象中的所述生物标记物的第二水平;确定所述生物标记物的所述第二水平与生物标记物的所述第一水平之间的差异等于或高于临界值;和向所述对象施用治疗有效量的中性粒细胞调节剂和免疫检查点调节剂的组合。

[0008] 在又一个实施方式中,本公开的方法向所述对象施用治疗有效量的c-Met抑制剂和抗PD-1抗体或抗PD-L1抗体的组合。

附图说明

[0009] 图1A-1C说明了在MC-38同源结肠癌模型中c-Met抑制剂和抗PD-1抗体的组合的协同作用。图1A说明了实验设计。图1B说明了c-Met抑制剂(APL-101)和抗PD-1抗体的组合协同抑制肿瘤生长。图1C说明了单独或组合使用c-Met抑制剂和抗PD-1抗体的治疗不会影响所治疗小鼠的体重。

[0010] 图2A-2C说明了在H-22同源肝细胞癌模型中c-Met抑制剂和抗PD-1抗体的组合的协同作用。图2A说明了实验设计。图2B说明了c-Met抑制剂(APL-101)和抗PD-1抗体的组合协同抑制肿瘤生长。图2C说明了单独或组合使用c-Met抑制剂和抗PD-1抗体的治疗不会影响所治疗小鼠的体重。

[0011] 图3A-3C说明了在RENCA同源肾细胞癌模型中c-Met抑制剂和抗PD-1抗体的组合的协同作用。图3A说明了实验设计。图3B说明了c-Met抑制剂(APL-101)和抗PD-1抗体的组合协同抑制肿瘤生长。图3C说明了单独或组合使用c-Met抑制剂和抗PD-1抗体的治疗不会影响所治疗小鼠的体重。

[0012] 图4A-4C说明了c-Met抑制剂和抗PD-1抗体的组合降低了肿瘤微环境中的中性粒细胞百分比。图4A说明了在IHC分析中抗PD-1抗体的治疗增加了c-Met阳性中性粒细胞。图4B说明了c-Met抑制剂和抗PD-1抗体的组合降低了肿瘤微环境中的中性粒细胞百分比。图4C说明了抗PD-1抗体的治疗增加了外周循环中的c-Met阳性中性粒细胞,以及c-Met抑制剂和抗PD-1抗体的组合降低了外周循环中的中性粒细胞百分比。

[0013] 图5是抗PD1与c-Met抑制剂联合免疫疗法的1期研究示意图。

[0014] 图6是抗PD1与c-Met抑制剂联合免疫疗法的2期研究示意图。

[0015] 发明详述

[0016] 在更详细地描述本公开之前,应理解,本公开不限于所描述的特定实施方式,并且因此当然可以变化。还应理解,本文中使用的术语仅出于描述特定实施方式的目的,而无意于限制本发明,因为本公开的范围将仅由所附权利要求限制。

[0017] 除非另有定义,否则本文中使用的所有技术和科学术语具有与本公开所属领域普通技术人员通常所理解的含义。尽管与本文描述的类似或等同的任何方法和材料也可以用于本公开的实践或测试中,但是现在描述优选的方法和材料。

[0018] 本说明书中引用的所有出版物和专利均通过引用并入本文,就好像每个单独的出版物或专利均被具体地和单独地指出通过引用并入本文一样,并且通过引用并入本文以公开和描述与引用出版物有关的方法和/或材料。任何出版物的引用均是针对其在申请日之前的公开内容,不应将其解释为承认本公开由于在先公开而无权早于该出版物。此外,提供的公开日期可能与实际公开日期不同,所述实际公开日期可能需要独立确认。

[0019] 对于本领域技术人员而言,在阅读本公开后将显而易见的是,本文描述和示出的每个单独的实施方式具有离散的组件和特征,其可以容易地与其他几个实施方式中的任何一个的特征分离或组合在一起,且不脱离本公开的范围或主旨。任何所述方法都可以以所述事件的顺序或逻辑上可能的任何其他顺序执行。

[0020] 定义

[0021] 提供下述定义以帮助读者。除非另有定义,否则本文使用的所有技术术语、符号和其他科学或医学术语或专门用语旨在具有化学和医学领域技术人员通常理解的含义。在某些情况下,为了清楚和/或易于参考,在此定义了具有通常理解含义的术语,并且在本文中包括这样的定义不应被解释为表示与本领域通常理解的术语的定义之间具有实质性差异。

[0022] 除非上下文另外明确指出,否则如在本文中所使用的单数形式的“一个(a)”、“一种(an)”和“所述(the)”包括复数引用。

[0023] 如在本文中所使用的,术语“施用”是指向对象提供药剂或组合物,包括但不限于由医学专业人员施用或自我施用。

[0024] 如在本文中所使用的,“抗体”涵盖天然存在的免疫球蛋白以及非天然存在的免疫球蛋白,包括例如单链抗体、嵌合抗体(例如,人源化鼠抗体)和异源缀合抗体(例如,双特异性抗体)。抗体片段包括结合抗原的那些(例如,Fab'、F(ab')₂、Fab、Fv和rIgG)。亦参见,例如,Pierce Catalog and Handbook,1994-1995(Pierce Chemical Co.,Rockford,Ill.); Kuby,J.,Immunology,3rd Ed.,W.H.Freeman&Co.,New York(1998)。术语抗体还包括二价或双特异性分子、双功能抗体、三功能抗体和四功能抗体。术语“抗体”还包括多克隆和单克隆抗体。

[0025] 如在本文中所使用的,“抗血管生成剂”指减少或抑制新生血管生长的物质,例如血管内皮生长因子(VEGF)的抑制剂和内皮细胞迁移的抑制剂。抗血管生成剂包括但不限于2-甲氧基雌二醇、血管生成抑制素、贝伐单抗、软骨衍生的血管生成抑制因子、内皮抑素、IFN- α 、IL-12、伊曲康唑、利诺米特、血小板因子-4、催乳素、SU5416、苏拉明、他喹莫德、替可加兰、四硫代钼酸盐、沙利度胺、血小板反应蛋白、血小板反应蛋白、TNP-470、阿柏西普、其药学上可接受的盐、前药及其组合。

[0026] 如在本文中所使用的,术语“癌症”是指涉及异常细胞生长的任何疾病,并且包括影响身体中任何组织、器官或细胞的疾病的所有阶段和所有形式。该术语包括所有已知的癌症和肿瘤性病征(无论其特征是恶性、良性、软组织或是实体),以及所有阶段和等级的癌症(包括转移前和转移后的癌症)。通常,可以根据癌症所在或起源的组织或器官以及癌组织和细胞的形态对癌症进行分类。如在本文中所使用的,癌症类型包括急性淋巴细胞白血病(ALL)、急性髓细胞性白血病、肾上腺皮质癌、肛门癌、星形细胞瘤、儿童小脑或脑癌、基底细胞癌、胆管癌、膀胱癌、骨肿瘤、脑癌、乳腺癌、伯基特氏淋巴瘤、小脑星形细胞瘤、脑星形细胞瘤/恶性神经胶质瘤、子宫颈癌、慢性淋巴细胞性白血病、慢性髓细胞性白血病、结肠癌、肺气肿、子宫内膜癌、室管膜瘤、食道癌,尤因家族肿瘤、尤因氏肉瘤、胃(胃)癌(gastric (stomach) cancer)、胶质瘤、头颈癌、心脏癌、霍奇金淋巴瘤、胰岛细胞癌(内分泌胰腺)、卡波西肉瘤、肾癌(肾细胞癌)、喉癌、白血病、肝癌、肺癌、髓母细胞瘤、黑色素瘤、神经母细胞瘤、非霍奇金淋巴瘤、卵巢癌、胰腺癌、咽癌、前列腺癌、直肠癌、肾细胞癌(肾癌)、视网膜母细胞瘤、皮肤癌、胃癌、幕上原始神经外胚层肿瘤、睾丸癌、喉癌、甲状腺癌、阴道癌、视觉通路和下丘脑神经胶质瘤。

[0027] 根据本发明的细胞毒剂包括DNA损伤剂、抗代谢药、抗微管剂、抗生素剂等。DNA损伤剂包括烷化剂、基于铂的药剂、嵌入剂和DNA复制抑制剂。DNA烷化剂的非限制性实例包括环磷酰胺、氮芥、尿嘧啶氮芥、美法仑、苯丁酸氮芥、异环磷酰胺、卡莫司汀、洛莫司汀、链佐

星、白消安、替莫唑胺、其药学上可接受的盐、前药及其组合。基于铂的药剂的非限制性实例包括顺铂、卡铂、奥沙利铂、奈达铂、赛特铂、四硝酸三铂、其药学上可接受的盐、前药及其组合。嵌入剂的非限制性实例包括阿霉素、柔红霉素、伊达比星、米托蒽醌、其药学上可接受的盐、前药及其组合。DNA复制抑制剂的非限制性实例包括伊立替康、托泊替康、安吡啶、依托泊苷、磷酸依托泊苷、替尼泊苷、其药学上可接受的盐、前药及其组合。抗代谢药包括叶酸拮抗剂(如甲氨蝶呤和培美曲塞),嘌呤拮抗剂(如6-巯基嘌呤、达卡巴嗪和氟达拉滨),和嘧啶拮抗剂(如5-氟尿嘧啶、阿糖胞嘧啶、卡培他滨、吉西他滨、地西他滨),其药学上可接受的盐、前药及其组合。抗微管剂包括但不限于长春花生物碱、紫杉醇(Taxol®)、多西他赛(Taxotere®)和伊沙匹隆(Ixempra®)。抗生素剂包括但不限于放线菌素、蒽环类、戊柔比星、表柔比星、博来霉素、普卡霉素、丝裂霉素、其药学上可接受的盐、前药及其组合。

[0028] 如在本文中所使用的,术语“有效量”或“治疗有效量”是指足以预防、治疗、减轻和/或改善任何病症或疾病的症状和/或其根本原因的药剂的量,或者足以在细胞上产生所需作用的药剂的量。在一个实施方式中,“治疗有效量”是足以减轻或消除疾病的症状的量。在另一个实施方式中,治疗有效量是足以克服疾病本身的量。

[0029] 在本发明中,术语“免疫调节剂”是指通过增强或降低免疫系统产生抗体或敏化细胞的能力以改变免疫应答的物质,所述细胞识别并与引发其产生的抗原反应。免疫调节剂可以是重组的、合成的或天然的制剂,并且包括细胞因子、皮质类固醇、细胞毒剂、胸腺素和免疫球蛋白。一些免疫调节剂天然存在于机体内,并且其中的某些可以在药物制剂中获得。在某些实施方式中,免疫调节剂是免疫检查点的调节剂。免疫调节剂的实例包括但不限于粒细胞集落刺激因子(G-CSF)、干扰素、咪喹莫特和来自细菌的细胞膜组分、IL-2、IL-7、IL-12、CCL3、CCL26、CXCL7、和合成的胞嘧啶磷酸鸟苷(CpG)。

[0030] 短语“药学上可接受的”是指在合理的医学判断范围内,适于与人和动物的组织接触而没有过度毒性、刺激性、过敏反应、或者其他问题或并发症,与合理的获益/风险比相称的那些化合物、材料、组合物和/或剂型。

[0031] 如在本文中所使用的,短语“药学上可接受的载体”指药学上可接受的材料、组合物或载剂,如液体或固体填充剂、稀释剂、赋形剂或溶剂包封材料,其参与将题述化合物从机体的一个器官或部分携带或转运至机体的另一个器官或部分。在与制剂的其他成分具有相容性且对患者无害的意义上,每种载体必须是“可接受的”。能够作为药学上可接受载体的材料的一些实例包括:糖,如乳糖、葡萄糖和蔗糖;淀粉,如玉米淀粉和马铃薯淀粉;纤维素及其衍生物,如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素和醋酸纤维素;粉状西黄蓍胶;麦芽;明胶;滑石粉;赋形剂,如可可脂和栓剂蜡;油,如花生油、棉籽油、红花油、芝麻油、橄榄油、玉米油和大豆油;二醇,如丙二醇;多元醇,如甘油、山梨醇、甘露醇和聚乙二醇;酯,如油酸乙酯和月桂酸乙酯;琼脂;缓冲剂,如氢氧化镁和氢氧化铝;海藻酸;无热原水;等渗盐水;林格氏溶液;乙醇;pH缓冲溶液;聚酯,聚碳酸酯和/或聚酸酐;以及药物制剂中使用的其他无毒相容性物质。

[0032] “药学上可接受的盐”是指化合物相对无毒的无机和有机酸加成盐。

[0033] 如在本文中所使用的,术语“光活性治疗剂”是指在暴露于光后变得具有活性的化合物和组合物。光活性治疗剂的某些实例公开在例如美国专利申请公开系列号2011/015223中。

[0034] 如在本文中所使用的,术语“放射增敏剂”是指使肿瘤细胞对放射疗法更敏感的化合物。放射增敏剂的实例包括米索硝唑、甲硝唑、替拉扎明和反式番红花酸钠。

[0035] 如在患者对癌症疗法的应答的上下文中所使用的,术语“反应性”、“临床应答”、“阳性临床应答”等可以互换使用,并且是指患者对治疗的有利应答,而不是不利的应答(即,不良事件)。在患者中,有益应答可以以很多临床参数表示,包括可检测的肿瘤消失(完全应答,CR)、肿瘤尺寸和/或癌细胞数量减小(部分应答,PR)、肿瘤生长停滞(疾病稳定,SD)、抗肿瘤免疫应答增强、可能导致肿瘤消退或排斥;与肿瘤相关的一种或多种症状在某种程度上减轻;治疗后生存时间增加;和/或在治疗后给定时间点的死亡率降低。肿瘤尺寸和/或癌细胞数量和/或肿瘤转移的持续增加表明缺乏对治疗的有益应答。在人群中,可以基于一个或多个终点来评价药物的临床获益(即,其有效性)。例如,总体应答率(ORR)分析将那些在药物治疗后经历CR或PR的患者归类为应答者。疾病控制(DC)分析将药物治疗后经历CR、PR或SD的患者归类为应答者。可以使用任何提示患者获益的终点来评估阳性临床应答,包括但不限于(1)在一定程度上抑制肿瘤生长,包括减慢和完全停止生长;(2)减少肿瘤细胞的数量;(3)缩小肿瘤尺寸;(4)抑制(即,减少、减慢或完全终止)肿瘤细胞浸润至邻近周围器官和/或组织;(5)抑制转移;(6)增强可能导致肿瘤消退或排斥的抗肿瘤免疫应答;(7)在一定程度上减轻与肿瘤相关的一种或多种症状;(8)增加治疗后的生存时间;和/或(9)降低治疗后给定时间点的死亡率。还可以以各种临床结果指标表示阳性临床应答。相对于具有可比较的临床诊断的患者人群的结果,也可以在个人结果背景下考虑阳性临床结果,并且可以使用各种终点进行评估,如无复发间隔(RFI)持续时间增加,与人群中的总生存期(OS)相比生存时间增加,无病生存(DFS)时间增加,无远距离复发间隔(DRFI)持续时间增加等等。其他终点包括无任何事件(AE)生存的可能性、无转移复发(MR)生存(MRFS)的可能性、无疾病生存(DFS)的可能性、无复发生存(RFS)的可能性、首次进展(FP)的可能性和无远距离转移生存(DMFS)的可能性。阳性临床应答的可能性增加对应于癌症复发(recurrence)或复发(relapse)的可能性减小。

[0036] 如在本文中所使用的,术语“对象”指人或任何非人动物(例如,小鼠、大鼠、家兔、犬、猫、牛、猪、绵羊、马或灵长类动物)。人包括产前和产后形式。在很多实施方式中,对象是人。对象可以是患者,其是指呈现给医疗提供者以诊断或治疗疾病的人。本文中使用的术语“对象”可以与“个体”或“患者”互换使用。对象可以患有或易患疾病或病症,但是可能显示或可能不显示该疾病或病症的症状。

[0037] 如在本文中所使用的,“协同”不仅仅意味着累加。协同作用可以通过本领域公知的各种测定来测量。

[0038] 如在本文中所使用的,术语“毒素”是指植物或动物来源的抗原性毒物或毒液。一个实例是白喉毒素或其部分。

[0039] 术语“治疗(treatment)”、“治疗(treat)”或“治疗(treating)”指减少癌症(例如,乳腺癌、肺癌、卵巢癌等)或癌症症状的影响的方法。因此,在所公开的方法中,治疗可以指癌症或癌症症状的严重程度降低10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%。例如,如果与对照相比,对象的一种或多种疾病症状减少10%,则认为治疗疾病的方法是治疗。因此,减少可以是与原生或对照水平相比10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%或者10%至100%之间的任何百分比的减少。应当理解的是,治疗不

一定是指疾病、病症或者疾病或病症的症状的治愈或完全消除。

[0040] 中性粒细胞相关的生物标记物

[0041] 在一个方面中,本公开提供了一种使用联合免疫疗法治疗癌症患者的方法,所述方法以能够预测联合免疫疗法反应性的中性粒细胞相关生物标记物为基础。在一个实施方式中,所述方法包括:测量来自对象的样品中中性粒细胞相关生物标记物的基础水平;确定所述生物标记物的基础水平等于或高于阈值;和向所述对象施用联合免疫疗法。

[0042] 中性粒细胞(neutrophil),也称为中性白细胞(neutrocyte)或多形核髓源性抑制细胞(PMN-MDSC),是通常存在于血液中的一种吞噬细胞。在大多数哺乳动物中,中性粒细胞是粒细胞丰度最高的类型,也是白细胞丰度最高的类型。中性粒细胞形成先天免疫系统的重要组成部分,并在不同情况下发挥各种功能。在急性炎症期间,特别是作为细菌感染和某些癌症的结果,中性粒细胞是炎症细胞迁移到炎症部位的最早应答者之一。

[0043] 检测和测量中性粒细胞数量的方法是本领域公知的。例如,苏木素和伊红(H&E)染色长期以来用于将中性粒细胞与嗜碱性和嗜酸性白细胞相区分。还可以通过表达某些标记物(例如,CD11c、CD13、CD15、CD16、CD33和CD68)来鉴别中性粒细胞。

[0044] 髓源性抑制细胞(MDSC)是抑制免疫系统的一组异质性的未成熟骨髓细胞。总体而言,MDSC群由单核细胞样MDSC和多形核MDSC(PMN-MDSC或中性粒细胞)组成。MDSC的数量随着肿瘤的存在而增加。已发现,PMN-MDSC代表了癌症中的大多数MDSC,并且保护癌症免受免疫系统的破坏。

[0045] 如在本文中所使用的,术语“中性粒细胞相关生物标记物”指在对象的任何样品或组织中指示中性粒细胞的存在、丰度或激活的生物标记物。在某些实施方式中,中性粒细胞相关生物标记物选自下组:肝细胞生长因子、中性粒细胞绝对计数、c-Met+中性粒细胞和中性粒细胞与淋巴细胞的比率(NLR)。

[0046] 在某些实施方式中,中性粒细胞相关生物标记物是NLR,且阈值是约3、3.5、4、4.5或5。

[0047] 在另一个实施方式中,所述方法包括:测量所述对象中的生物标记物的第一水平;在一段时间内向所述对象施用免疫疗法;测量所述对象中的所述生物标记物的第二水平;确定所述生物标记物的所述第二水平与生物标记物的所述第一水平之间的差异等于或高于临界值;和向所述对象施用联合免疫疗法。

[0048] 在某些实施方式中,其中所述中性粒细胞相关生物标记物是NLR,且所述临界值是约2、2.5、3、3.5或4。

[0049] 在某些实施方式中,所治疗的对象是哺乳动物。在某些实施方式中,所述哺乳动物选自下组:人、灵长类动物、农场动物和家畜。在某些实施方式中,所述哺乳动物是人。

[0050] 在某个实施方式中,所治疗的癌症选自下组:肺癌、黑色素瘤、肾癌、肝癌、骨髓瘤、前列腺癌、乳腺癌、结直肠癌、胰腺癌、甲状腺癌、血液系统癌症、白血病和非霍奇金氏淋巴瘤。

[0051] c-Met抑制剂和免疫检查点调节剂的组合使用

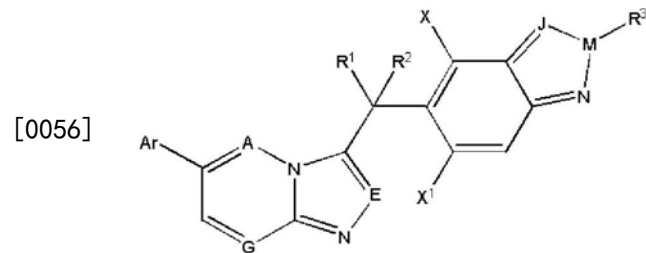
[0052] 在另一个方面中,本公开提供了一种使用联合免疫疗法治疗癌症的方法。在某些实施方式中,当例如通过监测如上所述的中性粒细胞相关生物标记物确定对象可能对联合免疫疗法有应答时,向对象施用所述联合免疫疗法。在某个实施方式中,联合免疫疗法是c-

Met抑制剂和免疫检查点调节剂的组合使用。在一些实施方式中,免疫检查点调节剂是抗PD-1抗体或抗PD-L1抗体。

[0053] c-MET是一种原癌基因,其编码一种称为肝细胞生长因子受体(HGFR)的蛋白。c-Met蛋白由裂解c-Met的前体(原c-Met)生成的 α 链和 β 链组成,并通过二硫键形成二聚体。c-Met是一种跨细胞膜的受体,且整个 α 链和部分 β 链存在于细胞外(参见,例如,Mark等,The Journal of Biological Chemistry,1992,Vol.267,No.36,pp.26166-26171;Journal of Clinical and Experimental Medicine (IGAKU NO AYUMI),2008,Vol.224,No.1,pp.51-55)。关于人c-Met及其 α 链和 β 链,还请参见GenBank登录号:NP-000236.2。已发现,癌症中异常的MET活化与不良预后相关,其中异常活化的c-Met会触发肿瘤生长,形成向肿瘤提供营养的新血管以及癌症向其他器官扩散。

[0054] 如在本文中所使用的,“c-Met抑制剂”指能够抑制c-Met蛋白的表达或活性的药剂。在某些实施方式中,c-Met抑制剂选自下组:克唑替尼、卡博替尼、APL-101、PLB1001、波齐替尼(bozitinib)、SU11274、PHA665752、K252a、PF-2341066、AM7、JNJ-38877605、PF-04217903、MK2461、GSK1363089(XL880,福雷替尼)、AMG458、替凡替尼(ARQ197)、INCB28060(INC280,卡马替尼)、E7050、BMS-777607、沃利替尼(volitinib)、HQP-8361、merestinib、ARGX-111、onartuzumab、rilotumumab、emibetuzumab和XL184。

[0055] 在一些实施方式中,所述c-Met抑制剂包含下式所示的化合物



[0057] 其中:

[0058] R^1 和 R^2 独立地为氢或卤素;

[0059] X和 X^1 独立地为氢或卤素;

[0060] A和G独立地为CH或N,或CH=G被硫原子替代;

[0061] E是N;

[0062] J是CH、S或NH;

[0063] M是N或C;

[0064] Ar是芳基或杂芳基,其任选被1-3个独立地选自下述的取代基取代: C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基、卤代 C_{1-6} 烷基、卤代 C_{1-6} 烷氧基、 C_{3-7} 环烷基、卤素、氰基、氨基、 $-CONR^4R^5$ 、 $-NHCOR^6$ 、 $-SO_2NR^7R^8$ 、 C_{1-6} 烷氧基-、 C_{1-6} 烷基-、氨基- C_{1-6} 烷基-、杂环基和杂环基- C_{1-6} 烷基-,或两个连接的取代基与其所相连的原子一起形成与芳基或杂芳基稠合的4-6元内酰胺;

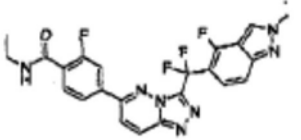
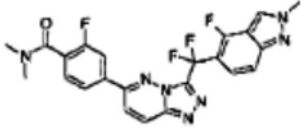
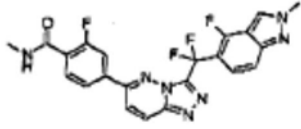
[0065] R^3 是氢、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基、卤代 C_{1-6} 烷基、卤素、氨基或 $-CONH-C_{1-6}$ 烷基-杂环基;

[0066] R^4 和 R^5 独立地为氢、 C_{1-6} 烷基、 C_{3-7} 环烷基、杂环基- C_{1-6} 烷基,或 R^4 和 R^5 与其所连接的N一起形成杂环基;

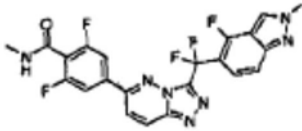
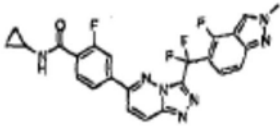
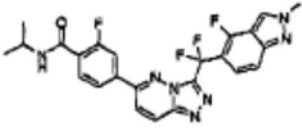
[0067] R^6 是 C_{1-6} 烷基或 C_{3-7} 环烷基;和

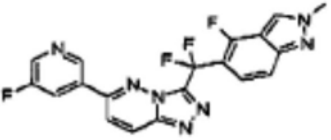
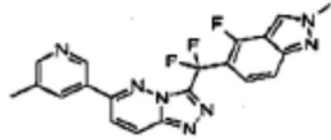
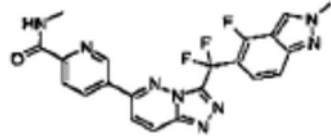
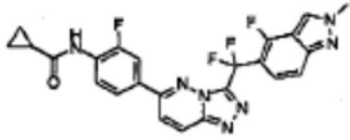
[0068] R^7 和 R^8 独立地为氢或 C_{1-6} 烷基;

[0069] 在一些实施方式中,所述c-Met抑制剂选自下组:

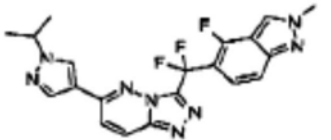
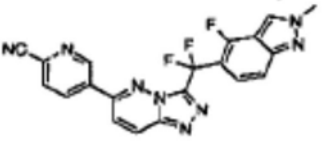
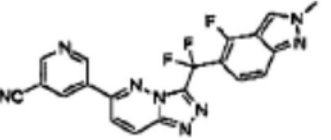
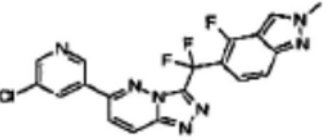


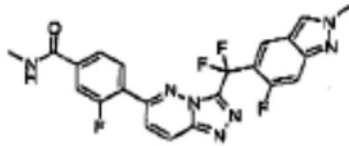
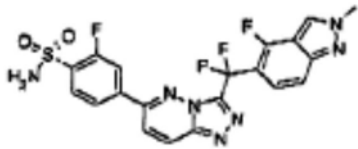
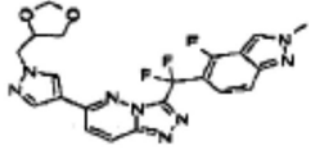
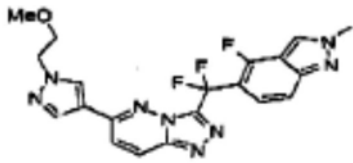
[0070]



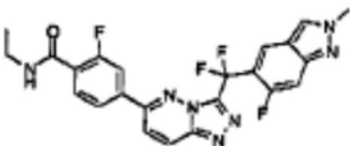
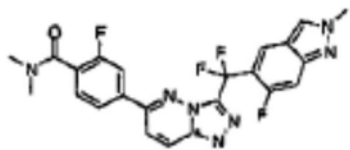
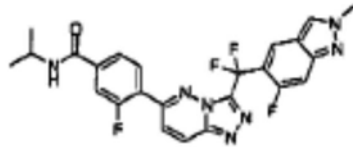
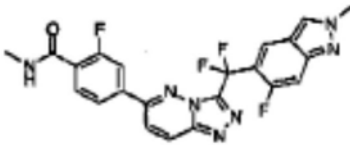


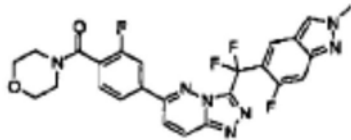
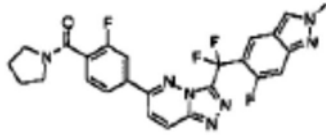
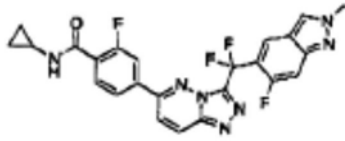
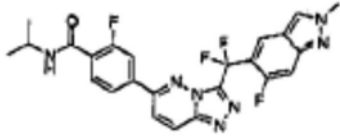
[0071]



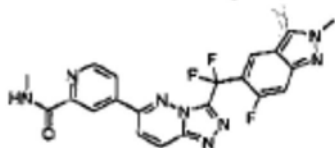
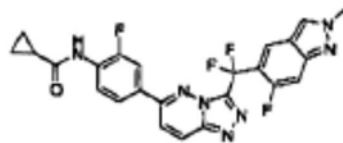
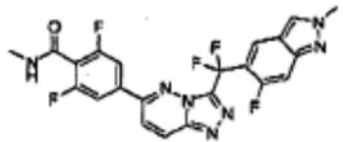
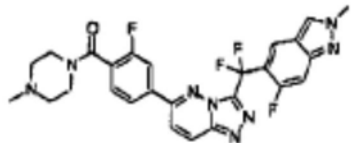


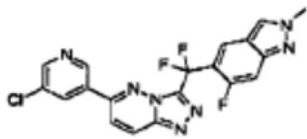
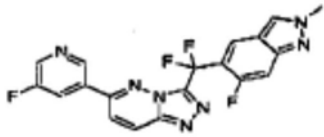
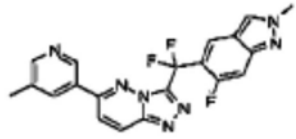
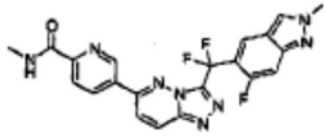
[0072]



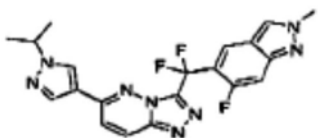
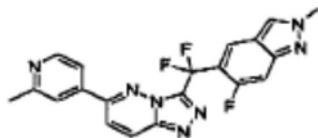
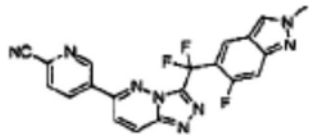


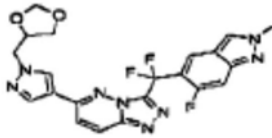
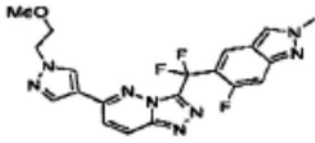
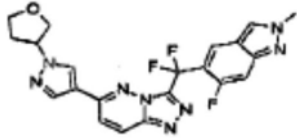
[0073]



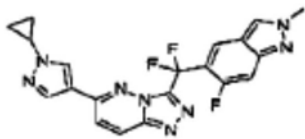
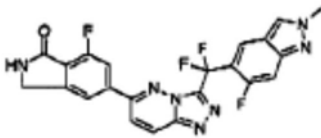
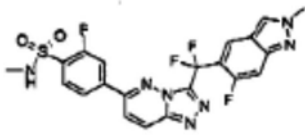


[0074]

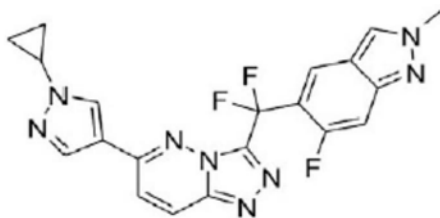




[0075]



[0076] 在某些实施方式中，c-Met抑制剂是APL-101（以前称为CBT-101，参见US20150218171，其全部内容通过引用并入本文），其具有下式所示的结构：



[0077]

[0078] 在某些实施方式中，c-Met抑制剂可以与药学上可接受的载体一起配制。当存在载体时，可以将其以任何适宜的量与c-Met抑制剂混合，如基于c-Met抑制剂和载体的总体积或重量，以载体重量的5%至95%的量。在一些实施方式中，载体的量可以在下限为5%、10%、12%、15%、20%、25%、28%、30%、40%、50%、60%、70%或75%中的任一个和上限（高于下限）为20%、22%、25%、28%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%和95%中的任一个的范围内。在一个特定实施方式中，载体的量可以基于特定剂型、c-Met抑制剂的相对量、包含载体的组合物的总重量、载体的物理和化学性质以及制剂领域普通技术人员公知的其他因素的考量来确定。

[0079] 如在本文中所使用的，术语“免疫检查点”或“癌症免疫检查点”是指免疫系统中的

一种分子,其上调免疫应答的信号(即,共刺激分子)或下调免疫应答的信号(即,抑制性分子)。在某些实施方式中,免疫检查点选自下组:PD-1、PD-L1、PD-L2、LAG-3、TIM-1、CTLA-4、VISTA、B7-H2、B7-H3、B7-H4、B7-H6、284、ICOS、HVEM、CD160、gp49B、PIR-B、KIR家族受体、TIM-1、TIM-4、BTLA、SIRP α (CD47)、CD48、284 (CD244)、B7.1、B7.2、ILT-2、ILT-4、TIGIT和A2aR。

[0080] 在某些实施方式中,免疫检查点的调节剂是针对免疫检查点的单克隆抗体。在某些实施方式中,免疫检查点是PD-1或PD-L1。在某些实施方式中,抗PD-1抗体选自PCT申请公开号W02016/014688中公开的那些,其全部内容通过引用并入本文。在某些实施方式中,抗PD-1抗体是APL-501(以前称为CBT-501,参见W02016/014688)、GB226或genolimzumab。在某些实施方式中,抗PD-L1抗体选自PCT申请公开号W02016/022630中公开的那些,其全部内容通过引用并入本文。在某些实施方式中,抗PD-L1抗体是APL-502(以前称为CBT-502,参见W02016/022630)或TQB2450。

[0081] 根据本公开,c-Met抑制剂和免疫检查点的调节剂(或另一种抗癌治疗剂)可以同时或在不同时间(被医师认为最合适的)向对象共同施用。如果c-Met抑制剂和免疫检查点调节剂在不同时间施用(例如,通过连续施用),则可以在施用c-Met抑制剂之前向对象施用免疫检查点调节剂。或者,c-Met抑制剂可以在施用免疫检查点调节剂之前向对象施用。

[0082] c-Met抑制剂或免疫检查点调节剂或其他抗癌治疗剂可以以任何所需的和有效的方式施用:口服摄入,或作为软膏剂或滴剂用于眼部局部施用,胃肠外施用或以任何适当的方式用于其他施用,如腹膜内、皮下、局部、皮内、吸入、肺内、直肠、阴道、舌下、肌内、静脉内、动脉内、鞘内或淋巴内施用。此外,c-Met抑制剂或免疫检查点调节剂或其他抗癌治疗剂可以与其他治疗联合施用。如果需要,可以将c-Met抑制剂或免疫检查点调节剂或其他抗癌治疗剂包封或以其他方式保护其免受胃或其他分泌物的损害。

[0083] 本文公开的c-Met抑制剂或免疫检查点调节剂或其他抗癌治疗剂的剂量的适宜的非限制性实例是从约1mg/kg/天至约2400mg/kg/天,如从约1mg/kg/天至约1200mg/kg/天、75mg/kg/天至约300mg/kg/天,包括从约1mg/kg/天至约100mg/kg/天。此类药剂的其他代表性剂量包括每天约1mg/kg、5mg/kg、10mg/kg、15mg/kg、20mg/kg、25mg/kg、30mg/kg、35mg/kg、40mg/kg、45mg/kg、50mg/kg、60mg/kg、70mg/kg、75mg/kg、80mg/kg、90mg/kg、100mg/kg、125mg/kg、150mg/kg、175mg/kg、200mg/kg、250mg/kg、300mg/kg、400mg/kg、500mg/kg、600mg/kg、700mg/kg、800mg/kg、900mg/kg、1000mg/kg、1100mg/kg、1200mg/kg、1300mg/kg、1400mg/kg、1500mg/kg、1600mg/kg、1700mg/kg、1800mg/kg、1900mg/kg、2000mg/kg、2100mg/kg、2200mg/kg和2300mg/kg。在一些实施方式中,在人体内c-Met抑制剂的剂量是400mg/天,每12小时服用一次。在一些实施方式中,在人体内c-Met抑制剂的剂量范围是300-500mg/天、100-600mg/天或25-1000mg/天。本文公开的c-Met抑制剂或免疫检查点调节剂或其他抗癌治疗剂的有效剂量可以分两个、三个、四个、五个、六个或更多个亚剂量进行施用,在全天以适当的间隔分别施用。

[0084] 其他联用疗法

[0085] 在一个实施方式中,所述方法还包括施用至少一种选自下组的另外的治疗剂:细胞毒剂、毒素、放射性核素、免疫调节剂、光活性治疗剂、放射增敏剂、激素、抗血管生成剂及其组合。在某些实施方式中,c-Met抑制剂、免疫检查点调节剂和其他治疗剂的施用提供了

协同作用。

[0086] 提供下述实施例以更好地说明所要求保护的发明,并且不应将其解释为限制本发明的范围。下文描述的所有特定组合物、材料和方法全部或部分地落入本发明的范围内。这些特定组合物、材料和方法并非旨在限制本发明,而仅仅是为了说明落入本发明范围内的特定实施方式。本领域技术人员可以开发等同的组合物、材料和方法,而无需行使发明的能力并且不脱离本发明的范围。应当理解,可以对本文描述的程序作出很多变化,同时仍保持在本发明的范围内。发明人的意图是,这样的变化包括在本发明的范围内。

[0087] 实施例1

[0088] 本实施例说明了在MC-38同源结肠癌模型中使用c-Met抑制剂(APL-101)和抗PD-1抗体组合治疗的协同作用。

[0089] 实验设计

[0090] 发明人进行了APL-101与抗PD-1抗体的联用研究以评价联用的安全性和有效性。在同源小鼠的MC-38结肠癌模型中,分为四组,每组五只动物接受载剂(水,20mg/kg,口服,每天一次)、APL-101(10mg/kg,口服,每天一次)、抗PD-1(10mg/kg,腹腔注射,每周两次)或APL-101加抗PD-1。在载剂组以及APL-101组,在第1-15天每天向动物给药,而在单一药剂抗PD-1组中,在第1、4、8、11和15天给药。在APL-101与抗PD-1联用组中,在第5-15天(推迟4天)施用APL-101,而在第1、4、8、11和15天给予抗PD-1。

[0091] 材料和方法

[0092] 动物:雌性C57BL/6小鼠,6-8周龄,体重18-20g,由Shanghai Lingchang Bio-Technology Co.Ltd提供。

[0093] APL-101由CBT pharmaceuticals(现为Apollomics,Inc.)提供。抗PD-1抗体由BioXcell提供。

[0094] 细胞培养:将MC38肿瘤细胞解冻,并在37°C下在含5%CO₂的空气氛围中,在DMEM培养基中以单层培养物形式进行体外培养,该培养基中添加了10%热灭活的胎牛血清。通过胰蛋白酶-EDTA处理,每周常规将肿瘤细胞传代培养两次。收集在指数生长期生长的细胞,并计数以用于肿瘤接种。

[0095] 肿瘤接种:每只小鼠在右下肋腹部皮下接种0.1ml PBS中的MC38肿瘤细胞(1×10^6)。当平均肿瘤尺寸达到约80-120mm³时开始治疗。将肿瘤细胞接种日期表示为第0天。

[0096] 分组:在分组和治疗之前,将所有动物称重并使用游标卡尺测量肿瘤体积。由于肿瘤体积会影响任何给定治疗的有效性,因而将肿瘤体积用作数值参数,以将选定的动物随机分入指定的组。使用StudyDirector™软件(Studylog Systems,Inc.CA,USA)进行分组。

[0097] 观察和数据采集:接种肿瘤细胞后,每天检查动物的发病率和死亡率。在常规监测期间,检查动物是否有肿瘤生长和治疗对正常行为的任何影响,如活动性、目测估计的食物和水消耗量、体重增加/减少(随机分组后每周测量两次体重)、眼睛/毛发无光泽和任何其他异常影响。数据表的注释中详细记录了每只动物的死亡和观察到的临床体征。随机分组后,使用卡尺以二维方式每周两次测量肿瘤体积,并使用下述公式以mm³表示体积: $V = 0.5a \times b^2$,其中a和b分别是肿瘤的长度和宽度。(在研究结束时测量肿瘤重量)。整个给药过程以及肿瘤和体重测量均在层流柜中进行。

[0098] 统计:在每个时间点为每组的肿瘤体积提供平均值和平均值的标准误差(SEM)。使

用单因素ANOVA检测,根据在最佳治疗时间点(通常在最终给药后)获得的数据对两个比较组之间的肿瘤体积差异进行统计分析。所有数据均在SPSS(统计产品与服务解决方案)版本18.0(IBM,Armonk,NY,U.S.)中进行了分析。除原始P值小于0.001时,P值均四舍五入到小数点后三位,然后表示为 $P < 0.001$ 。所有检测均是双侧的。认为 $P < 0.05$ 具有统计学意义。

[0099] 结果

[0100] 如图1A-1C和表1中所示,抗PD-1 10mg/kg IP BIW x 2周与APL-101 10mg/kg QD x 2周组合的平均肿瘤生长抑制百分比显示出65.1%的肿瘤生长抑制,而抗PD-1 IP 10mg/kg BIW x 3周和APL-101 PO 10mg/kg QD x 3周分别为39.9%和33.6%。动物对联用方案具有很好的耐受性。评价收集的肿瘤组织的c-Met阳性和PD-L1中性粒细胞以及中性粒细胞与淋巴细胞的比率。

[0101] 表1:在MC38同源模型中的平均肿瘤生长百分比

[0102]	载剂	
	APL-101 10mg/kg qd	35.61
	抗PD-1抗体 10mg/kg biw	42.06
	组合	23.97

[0103] 实施例2

[0104] 本实施例说明了在H22同源肝癌模型中使用c-Met抑制剂(APL-101)和抗PD-1抗体组合治疗的协同作用。

[0105] 实验设计

[0106] 发明人进行了APL-101与抗PD-1抗体的联用研究以评价联用的安全性和有效性。在同源小鼠的H22肝癌模型中,分为四组,每组十只动物接受载剂(PVP K30,20mg/kg,口服,每天一次,持续三周)、APL-101(10mg/kg,口服,每天一次,持续三周)、抗PD-1(10mg/kg,腹腔注射,每周两次,持续三周)或APL-101加抗PD-1。

[0107] 材料和方法

[0108] 动物:雌性C57BL/6小鼠,6-8周龄,体重18-20g,由Shanghai Lingchang Bio-Technology Co.Ltd提供。

[0109] APL-101由CBT pharmaceuticals(现为Apollomics,Inc.)提供。抗PD-1抗体由BioXcell提供。PVP K30由Fluka Analytical提供。

[0110] 细胞培养:在37°C下在含5%CO₂的空气氛围中,将H22肿瘤细胞系在体外保持在添加了10%胎牛血清的RPMI-1640培养基中。通过胰蛋白酶-EDTA处理,每周常规将肿瘤细胞传代培养两次。收集在指数生长期生长的细胞,并计数以用于肿瘤接种。

[0111] 肿瘤接种:每只小鼠在右前侧皮下接种0.1ml PBS中的H22肿瘤细胞(2×10^6)用于形成肿瘤。当平均肿瘤尺寸达到约80-120mm³时开始治疗。将肿瘤细胞接种日期表示为第0天。

[0112] 随机分组:当平均肿瘤尺寸达到约80-120mm³时开始随机分组。该研究入组40只小鼠。将所有动物随机分配至4个研究组。基于随机区组设计进行随机分组。

[0113] 观察和数据采集:接种肿瘤细胞后,每天检查动物的发病率和死亡率。在常规监测期间,检查动物是否有肿瘤生长和治疗对行为的任何影响,如活动性、食物和水消耗量、体重增加/减少(随机分组后每周测量两次体重)、眼睛/毛发无光泽和任何其他异常。详细记

录每只动物的死亡率和观察到的临床体征。使用卡尺每周两次在二维上测量肿瘤体积,并使用下述公式以 mm^3 表示体积: $V = (L \times W \times W) / 2$,其中V是肿瘤体积,L是肿瘤长度(最长肿瘤尺寸)和W是肿瘤宽度(垂直于L的最长肿瘤尺寸)。(在研究结束时测量肿瘤重量)。给药以及肿瘤和体重测量均在层流柜中进行。

[0114] 统计分析:为了在三组或更多组之间进行比较,进行单因素ANOVA,然后进行多重比较程序。为了进行存活分析,生成Kaplan-Meier存活曲线,并进行对数秩检验。使用SPSS18.0分析所有数据。认为 $P < 0.05$ 具有统计学意义。

[0115] 结果

[0116] 如图2A-2C和表2所示,抗PD-1 10mg/kg IP BIW×3周与APL-101 10mg/kg QD×3周组合的平均肿瘤生长百分比显示出40.38%的肿瘤生长,而APL-101 10mg/kg QD×3周和抗PD-1 IP 10mg/kg BIW×3周分别为108.73%和65.85%。动物对联用方案具有很好的耐受性。

[0117] 表2:在H22同源肝癌模型中的平均肿瘤生长百分比

[0118] 载剂	
APL-101 10mg/kg qd	108.73
抗PD-1抗体 10mg/kg biw	65.85
组合	40.38

[0119] 实施例3

[0120] 本实施例说明了在同源Renca肾癌模型中使用c-Met抑制剂(APL-101)和抗PD-1抗体组合治疗的协同作用。

[0121] 实验设计

[0122] 发明人进行了APL-101与抗PD-1抗体的联用研究以评价联用的安全性和有效性。在同源小鼠的Renca肾癌模型中,分为四组,每组十只动物接受载剂(PVP K30,20mg/kg,口服,每天一次,持续三周)、APL-101(20mg/kg,口服,每天一次,持续三周)、抗PD-1(10mg/kg,腹腔注射,每周两次,持续三周)或APL-101(20mg/kg,口服,每天一次,持续三周)加抗PD-1(10mg/kg,腹腔注射,每周两次,持续三周)。

[0123] 材料和方法

[0124] 动物:雌性C57BL/6小鼠,6-8周龄,体重18-20g,由Shanghai Lingchang Bio-Technology Co.Ltd提供。

[0125] APL-101由CBT pharmaceuticals (Apollomics, Inc.) 提供。抗PD-1抗体由BioXcell提供。PVP K30由Fluka Analytical提供。

[0126] 细胞培养:在37°C下在含5%CO₂的空气氛围中,将Renca肿瘤细胞系在体外保持在添加了10%胎牛血清的DMEM培养基中。每周常规将肿瘤细胞传代培养两次。收集在指数生长期生长的细胞,并计数以用于肿瘤接种。

[0127] 肿瘤接种:每只小鼠在右前侧皮下接种0.1ml PBS中的RENCA肿瘤细胞(1×10^6)用于形成肿瘤。当平均肿瘤尺寸达到约80-120mm³时开始治疗。将肿瘤细胞接种日期表示为第0天。

[0128] 随机分组:当平均肿瘤尺寸达到约80-120mm³时开始随机分组。该研究入组40只小鼠。将所有动物随机分配至4个研究组。基于随机区组设计进行随机分组。

[0129] 观察和数据采集:接种肿瘤细胞后,每天检查动物的发病率和死亡率。在常规监测期间,检查动物是否有肿瘤生长和治疗对行为的任何影响,如活动性、食物和水消耗量、体重增加/减少(随机分组后每周测量两次体重)、眼睛/毛发无光泽和任何其他异常。详细记录每只动物的死亡率和观察到的临床体征。使用卡尺每周两次在二维上测量肿瘤体积,并使用下述公式以 mm^3 表示体积: $V = (L \times W \times W) / 2$,其中V是肿瘤体积,L是肿瘤长度(最长肿瘤尺寸)和W是肿瘤宽度(垂直于L的最长肿瘤尺寸)。(在研究结束时测量肿瘤重量)。给药以及肿瘤和体重测量均在层流柜中进行。

[0130] 统计分析:为了在三组或更多组之间进行比较,进行单因素ANOVA,然后进行多重比较程序。为了进行存活分析,生成Kaplan-Meier存活曲线,并进行对数秩检验。使用SPSS18.0分析所有数据。认为 $P < 0.05$ 具有统计学意义。

[0131] 结果

[0132] 如图3A-3C和表3所示,抗PD-1 10mg/kg IP BIW×3周与APL-101 10mg/kg QD×3周组合的平均肿瘤生长百分比显示出47%的肿瘤生长,而APL-101 10mg/kg QD×3周和抗PD-1 IP 10mg/kg BIW x 3周分别为77%和71%。动物对联用方案具有很好的耐受性。

[0133] 表2:在同源Renca肾癌模型中的平均肿瘤生长百分比

[0134] 载剂	
APL-101 10mg/kg qd	77
抗PD-1抗体 10mg/kg biw	71
组合	47

[0135] 实施例4

[0136] 本实施例说明了c-Met抑制剂(APL-101)和抗PD-1抗体的组合降低肿瘤微环境中的中性粒细胞百分比。

[0137] 实验设计

[0138] 在研究结束时从MC38结肠腺癌同源模型(实施例1中所述)中收集肿瘤组织,并在福尔马林中固定。将c-Met和中性粒细胞的双重IHC分析用于定量Met+中性粒细胞的表达。

[0139] 样品制备:收集新鲜标本,并将其置于10%NBF(中性缓冲福尔马林;固定体积/组织,10-20倍)中,在室温下固定24小时。将固定的组织修剪为3-5mm的厚度。将经修剪的组织移入包埋盒中。将盒子放入去离子水中30分钟,每30分钟换水两次。如果无法及时进行脱水程序,则将组织转移至70%乙醇中,并置于4°C的冰箱中。可以将组织在70%乙醇中在冰箱中保存约3-5天。脱水后,将固定组织的FFPE制备物和FFPE玻片制备物转移到LEICA ASP300S真空组织处理器中进行脱水。

[0140] FFPE玻片的制备:在Paraffin Embedding Station中将脱水组织包埋在石蜡中。用手动旋转切片将FFPE块切片,厚度为4 μm /切片。

[0141] 将FFPE切片与下述抗体一起用于IHC:抗中性粒细胞(LY6G/C)(abcam目录号#ab2557);抗c-Met(abcam目录号#ab51067);山羊抗Rb IgG(Leica目录号#DS9800);抗大鼠IgG(vector目录号#MP-7444-15)。

[0142] 图像扫描:将所有染色的切片均用NanoZoomer-HT 2.0图像系统(Hamamatsu photonics)扫描,放大40x,使用3个荧光通道:红、绿、蓝。生成整个切片的高分辨率图片,并进行进一步的定量分析。

[0143] IHC染色评分：第一步为全面观察染色模式，排除坏死和较大的基质区域。从每个样品中选择五个代表性视野进行定量分析。每种染色选择五个视野，并以20×放大倍率成像。使用Image J软件分析所有图像。计数c-Met和Ly6G/C共定位细胞和总细胞。将双重IF评分表示为五个视野中的c-Met和Ly6G/C共定位细胞计数的平均值与总细胞数的平均值之比。

[0144] 结果

[0145] 如图4A-4B中所示，抗PD1抗体增加c-Met阳性中性粒细胞，以及抗PD1加c-Met抑制剂减少肿瘤微环境中的中性粒细胞百分比。如图4C中所示，抗PD-1抗体治疗增加外周循环中c-Met阳性中性粒细胞，c-Met抑制剂和抗PD-1抗体联用减少外周循环中中性粒细胞的百分比。

[0146] 实施例5

[0147] 本实施例说明了在NSCLC、RCC、HCC和胃癌患者中c-Met抑制剂和抗PD-1抗体的体内有效性评价。

[0148] 设计一项联用试验，以发现由于肿瘤中c-Met+中性粒细胞浸润而无法从PD-1单一药剂疗法中获益的患者子集（例如，HCC和RCC），以及将c-Met抑制剂与PD-1共同施用有望在该人群中恢复PD-1的全部作用。C-Met抑制剂与PD-1抑制剂的联合治疗可在T细胞与肿瘤细胞之间形成桥梁，使T细胞直接靶向肿瘤细胞。通过这些不同的作用机制，APL-101（c-Met抑制剂）和APL-501（抗PD-1抗体）的联合治疗在增强宿主抗肿瘤应答中起协同作用。

[0149] 在第1个疗程的第1天，从晚上开始，在整个28天的疗程中，将APL-101连续（第1天-第28天）与PD-1抑制剂伴随施用。这可以检测血液生物标记物是否能够预测所研究的种群——中性粒细胞或HGF——在PD-1单一药剂治疗后处在基线或发生变化。已假定中性粒细胞与淋巴细胞的比率、血小板与淋巴细胞的比率、HGF和其他标记物可作为HCC、mRCC和其他肿瘤（例如，NSCLC）中PD-1无应答的预测性生物标记物。

[0150] 如图5中所示，在1期部分中，符合条件的HCC和RCC对象在28天疗程的第1天和第15天静脉内（IV）接受APL-501或纳武单抗，以及在每个28天疗程的连续28天每12小时口服APL-101。在28天疗程的第1天和第15天静脉内施用3mg/kg APL-501的剂量是基于在澳大利亚正在进行的针对复发性和难治性选定实体瘤对象的1期临床试验。每2周一次（第1天和第15天）施用纳武单抗240mg或3mg/kg是分别基于在美国或澳大利亚/新西兰已获批的说明书。PD-1抑制剂的剂量是固定的。APL-101的剂量是根据其毒性而逐渐增加或逐渐减小的。APL-101的初始剂量（每12小时150mg；每日总剂量300mg）是根据在中国使用APL-101正在进行的临床试验（NCT02896231和NCT02978261）的临床数据。在每种情况下，安全性审查委员会均认为3mg/kg和300mg剂量分别对于APL-501和APL-101是安全的。设计该试验旨在发现APL-501+APL-101（主要）以及纳武单抗+APL-101（次要）联用（R2PD）的安全剂量。

[0151] 如果队列中的6名对象中出现了两种或更多种DLT，则停止该队列的入组，并将此前的剂量水平认为是暂定的MTD。在暂定MTD组中所有6名另外的对象必须完成一个疗程的PD-1与ALP-101的联合施用。替换在完成第1个疗程的治疗前因毒性以外的原因退出的对象。仅在对所有第1个疗程安全性数据的SRC进行审核并批准后，才允许将剂量递增至剂量水平2。在推荐RP2D进行进一步评价之前，SRC会评价联合疗法的总体耐受性（例如，持续的2级不良事件、剂量降低、和剂量中断以及出现任何延迟毒性）。一旦确定了RP2D，就可以针对

接受较低剂量并从PD-1加APL-101中持续获得临床益处的对象允许患者内剂量递增,并且可以递增至RP2D。对所评价的所有队列水平在1期进行PK采样和评价。

[0152] 2期在患有局部晚期和转移性HCC和RCC的对象中确证如1期所确定的RP2D的安全性、耐受性和有效性。如图6中所示,基于Simon Minimax设计,分别在23名和22名HCC和RCC对象中进一步评价了所推荐的APL-101 2期剂量。如果ORR在HCC组第1阶段入组的23名对象中显示出 ≥ 4 例应答,则另外19名对象在第2阶段入组。类似地,如果ORR在RCC组第1阶段入组的23名对象中显示出 ≥ 5 例应答,则另外19名对象在第2阶段入组。在2期研究中不进行PK采样和评价。

[0153] 对于每名潜在的对象,入组前均有为期28天的筛选和资格评估阶段;在第1个疗程的第1天(C1D1)施用研究治疗的第1剂量(安全性和意向治疗人群)。对象在整个研究期间持续接受其所分配的治疗,直至出现由irRECIST,其次针对HCC对象由mRECIST确证的疾病进展[进展性疾病(PD)]、死亡、无法接受的治疗相关毒性或直至申办者关闭研究。治疗期间,在第1个疗程的第1天、第2天、第8天、第15天和第16天,以及随后每个疗程的第1天和第15天进行研究访视。对于在 ≥ 2 个周期出现应答[完全应答(CR)、部分应答(PR)]的对象,出现应答后至少再继续施用2个疗程的PD-1与APL-101的组合。对象接受最小2个疗程的PD-1和APL-101,以便对应答进行充分评价(可评价人群)。当出现由irRECIST,其次是由mRECIST(仅HCC对象)所确定的进展性疾病(PD)、无法耐受的毒性或当主要研究者提出风险/获益比不再对对象有益,或者对象撤回之知情同意后,停用PD-1与APL-101。在永久停用研究治疗后,进行治疗终止访视和30天安全性随访。替换在完成第1个疗程的联合治疗前因毒性以外的原因退出的对象。

[0154] 在整个研究期间,通过收集临床和实验室数据来评价研究治疗的耐受性和安全性,包括不良事件(AE)、严重不良事件(SAE)、DLT、伴随用药、生命体征、心电图(ECG)和美国东部肿瘤协作组(ECOG)体能状态方面的信息。使用计算机断层扫描(CT)或磁共振成像(MRI)扫描,根据标准RECIST v1.1以及其次根据irRECIST评估抗肿瘤应答。在特定时间点收集用于PK和PD分析的血清或血浆样品。

[0155] 1期和2期研究评估了基线时的中性粒细胞绝对计数(ANC)和中性粒细胞与淋巴细胞比率(NLR)以及ANC和NLR比率的变化与联合治疗的相关性,以及肝细胞生长因子(HGF)和髓源性抑制细胞(MDSC)的上述相关性,及其与药代动力学的关系。

[0156] 结果表明,HGF的表达、中性粒细胞数量和NLR与联合治疗的有效性相关。

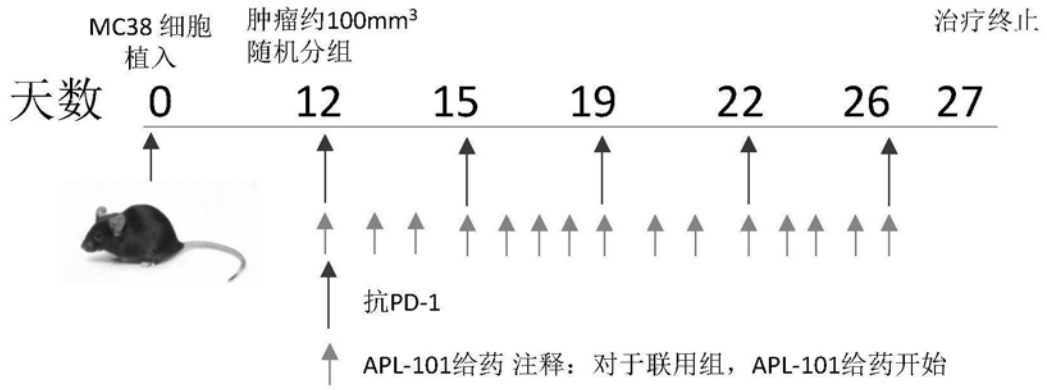


图1A

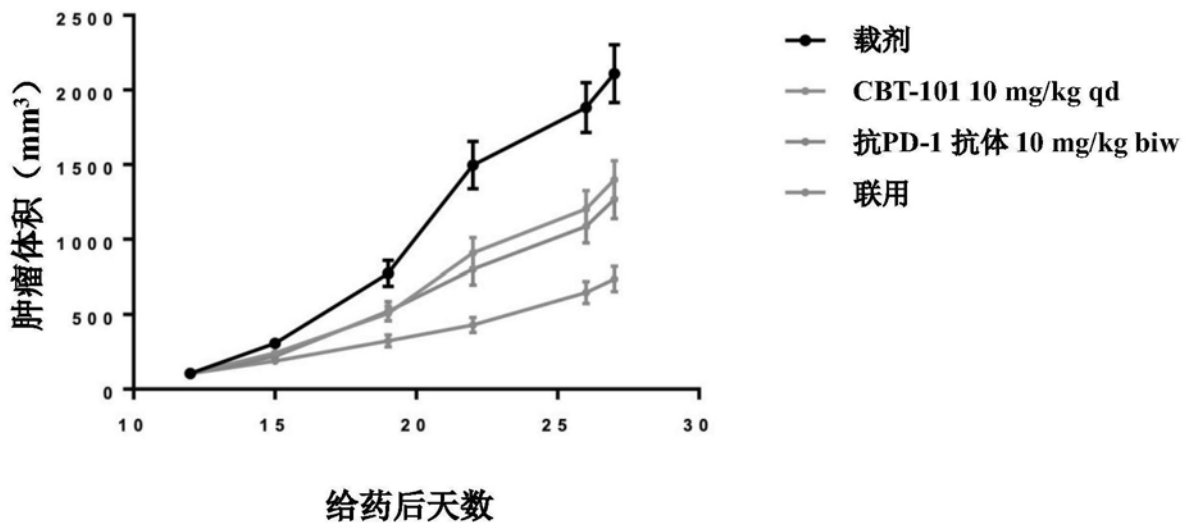


图1B

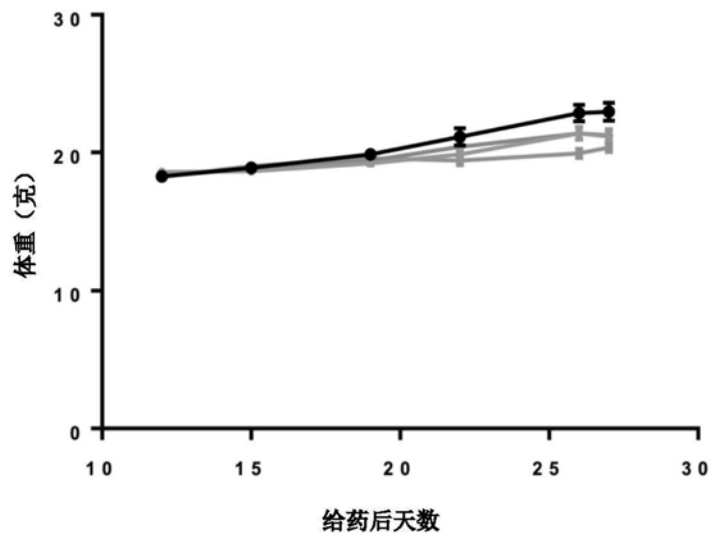


图1C

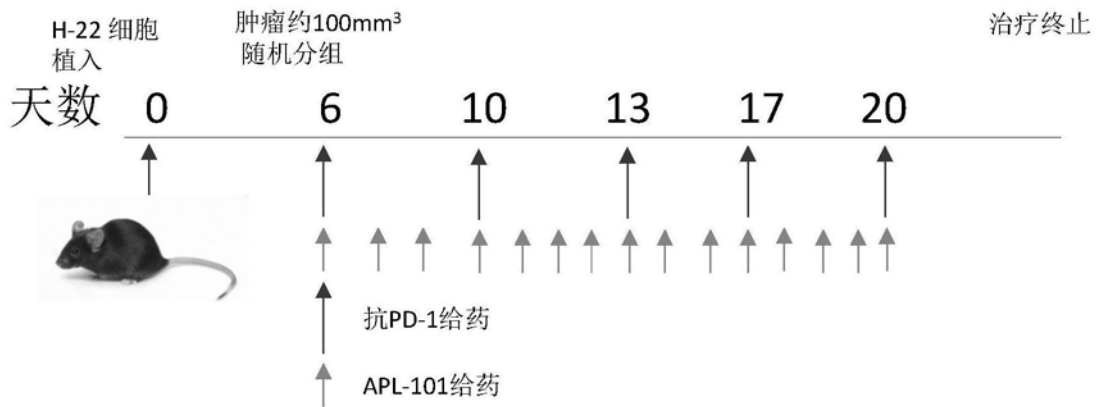


图2A

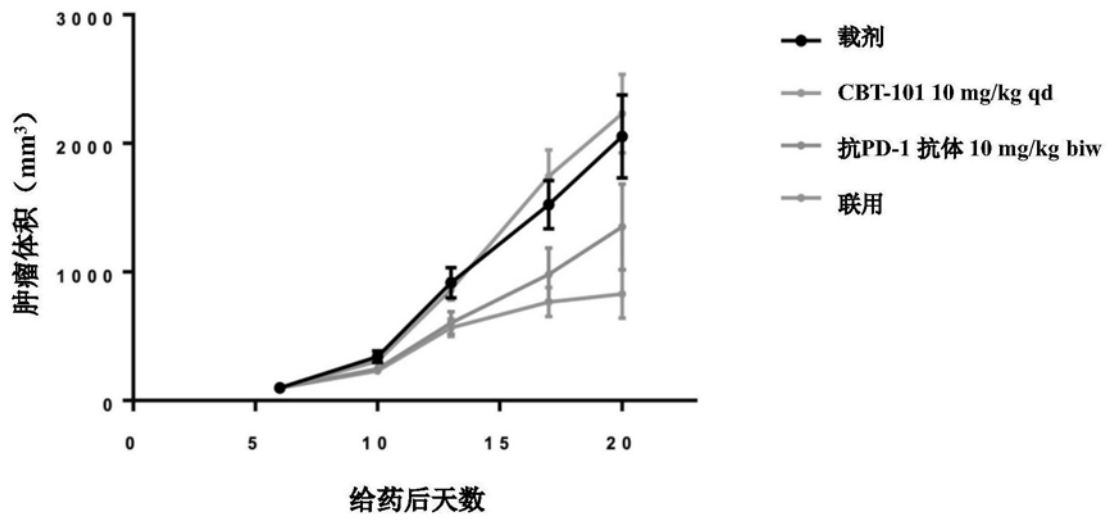


图2B

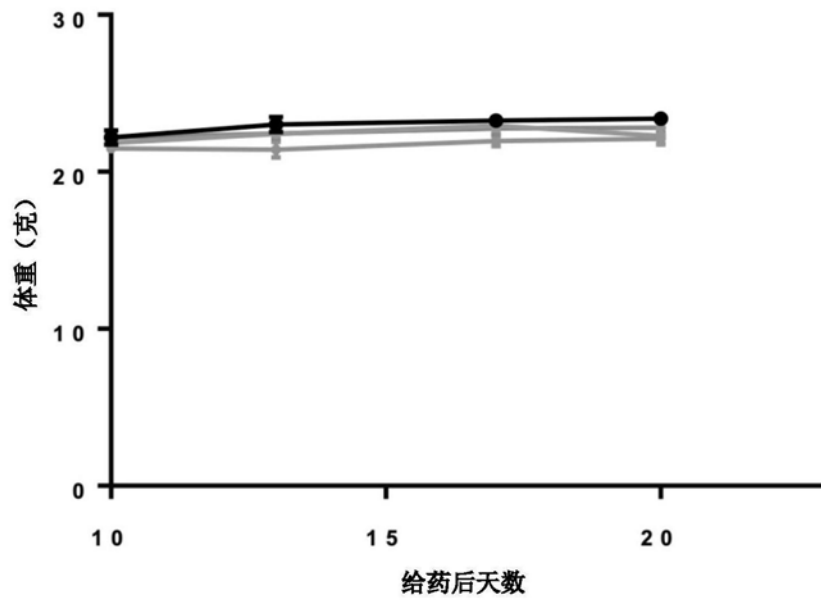


图2C

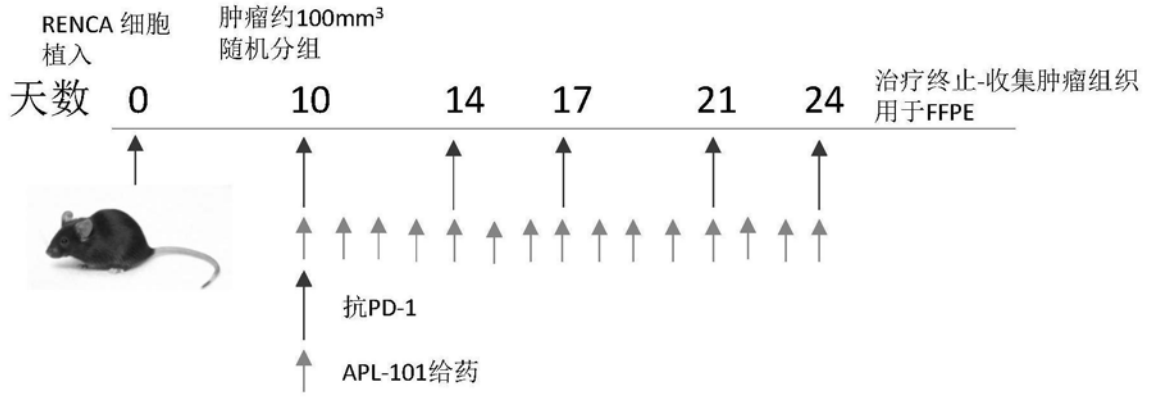


图3A

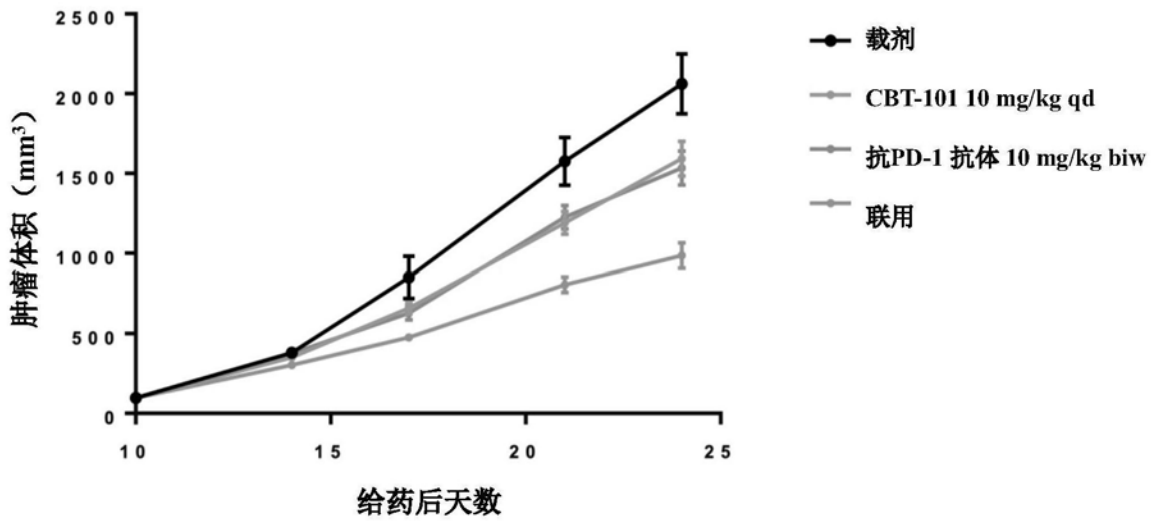


图3B

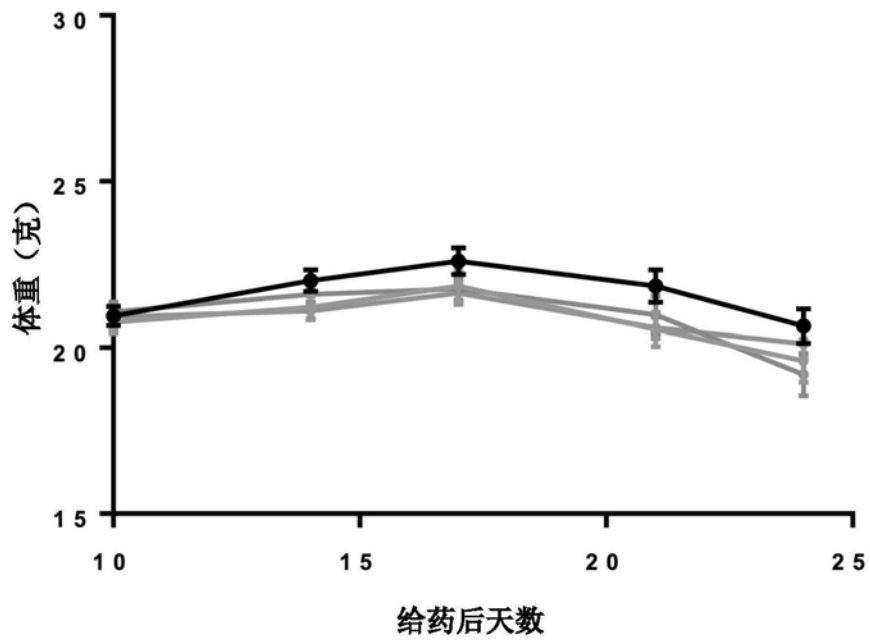


图3C

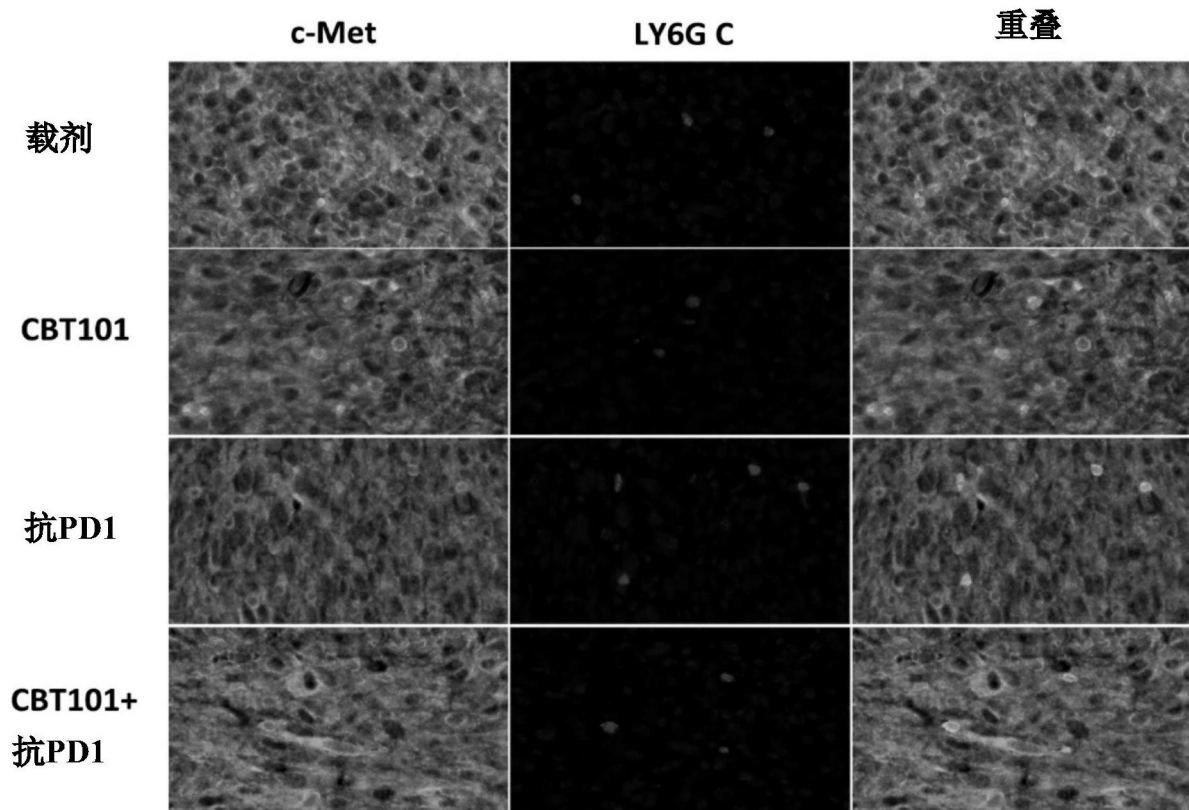


图4A

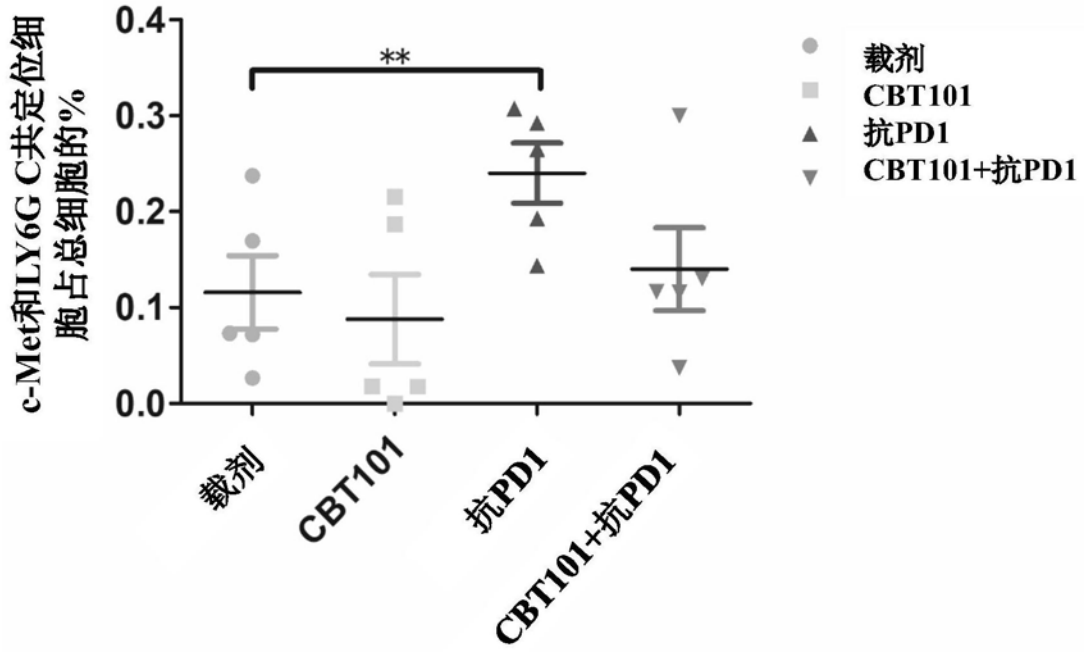


图4B

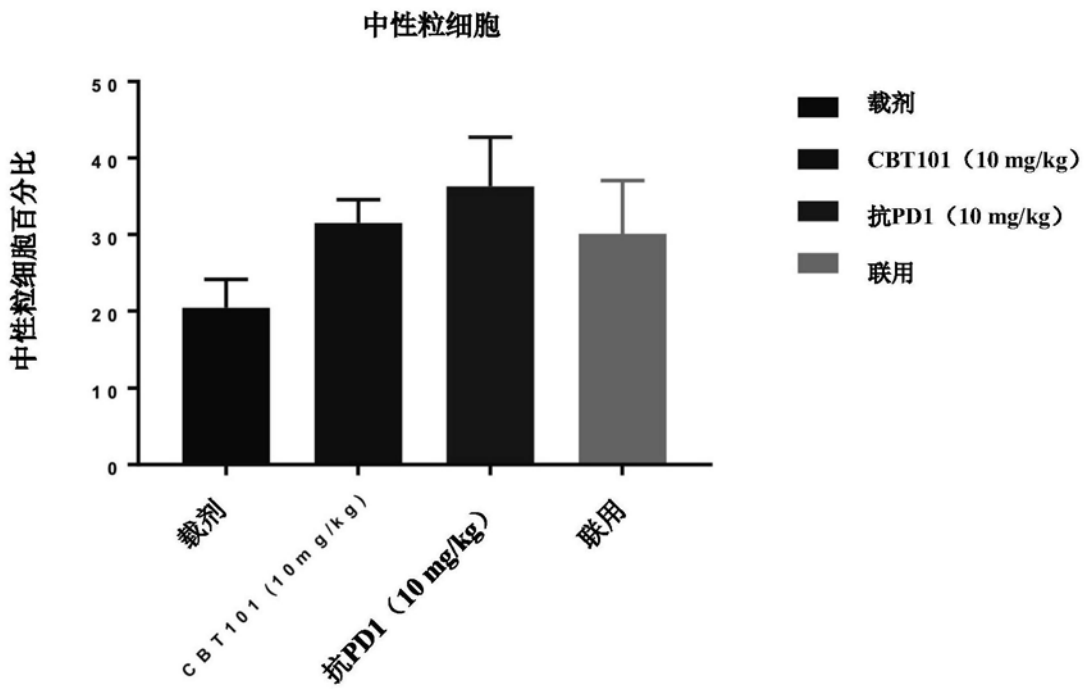


图4C

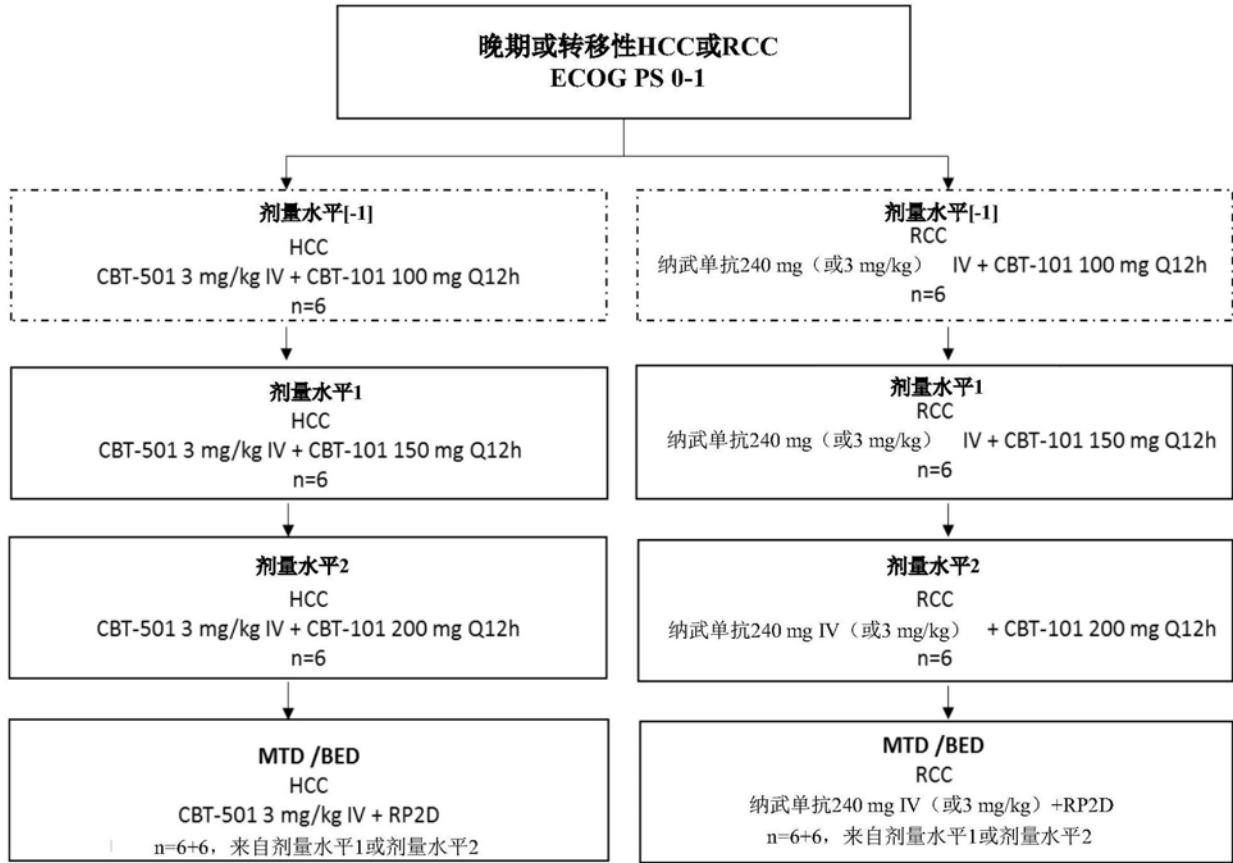


图5

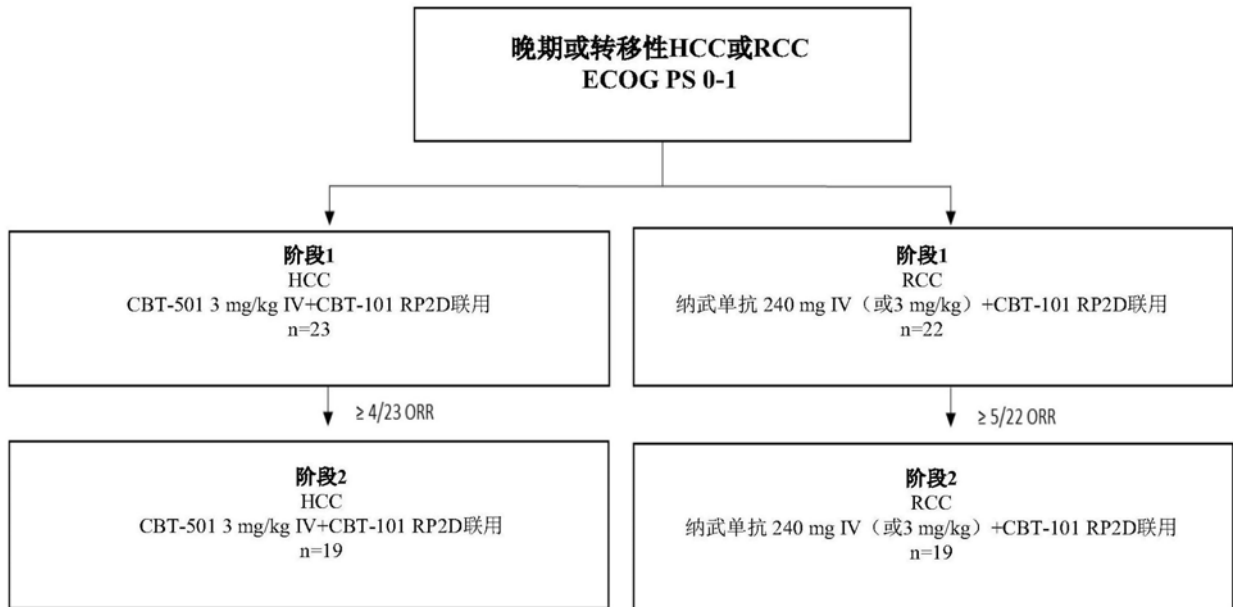


图6