(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111212662 A
(43)申请公布日 2020.05.29

(21)申请号 201880050028.2

(22)申请日 2018.06.01

(66)本国优先权数据
PCT/CN2017/086911 2017.06.02 CN

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2020.02.02

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2018/035641 2018.06.01

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2018/223022 EN 2018.12.06

(71)申请人 科瑞华生物技术有限公司
地址 英属开曼群岛大开曼岛

(72)发明人 Y·张 W·魏 陈一友

(74)专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494
代理人 封新琴

(51)Int.Cl.
A61K 47/64(2006.01)
A61K 47/65(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)

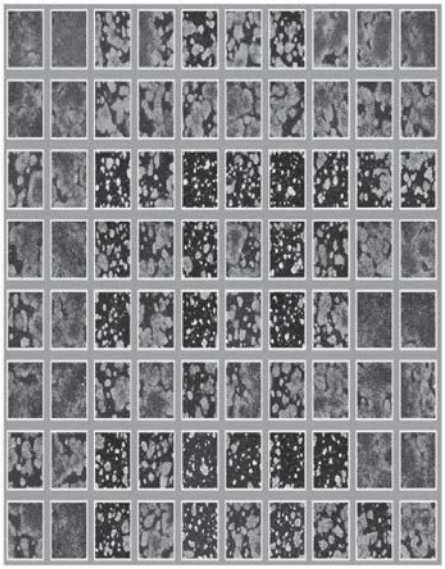
权利要求书3页 说明书30页 附图1页

(54)发明名称

治疗癌症的组合疗法

(57)摘要

提供了用于治疗包括上皮肿瘤在内的癌症的组合疗法以及相关组合物和方法,所述组合疗法以及相关组合物和方法包括至少两种药剂的组合,所述至少两种药剂例如为表皮生长因子受体(EGFR)抑制剂、丝裂原激活蛋白激酶(MEK)1/2抑制剂;以及细胞周期蛋白依赖性激酶(CDK)4/6抑制剂。



CN 111212662 A

1.一种在有需要的受试者中治疗癌症的方法,其包括向所述受试者给予两种或更多种药剂的组合,所述两种或更多种药剂选自:

(a)表皮生长因子受体(EGFR)抑制剂;

(b)丝裂原激活蛋白激酶(MEK)1/2抑制剂;和

(c)细胞周期蛋白依赖性激酶(CDK)4/6抑制剂。

2.根据权利要求1所述的方法,其中(a)是与EGFR或其配体特异性地结合的小分子或抗体(或其抗原结合片段),或任选地选自西妥昔单抗、帕尼单抗、扎鲁木单抗、尼妥珠单抗、马妥珠单抗、埃罗替尼、吉非替尼、阿法替尼、拉帕替尼、奥希替尼、布加替尼、和埃克替尼中的一种或多种。

3.根据权利要求1或2所述的方法,其中(b)是与MEK 1/2或其配体特异性地结合的小分子或抗体(或其抗原结合片段),或任选地选自曲美替尼、司美替尼和考比替尼中的一种或多种。

4.根据权利要求1-3中任一项所述的方法,其中(c)是与CDK 4/6或其配体特异性地结合的小分子或抗体(或其抗原结合片段),或任选地选自帕博西尼、瑞博西尼和阿贝西尼中的一种或多种。

5.根据权利要求1-4中任一项所述的方法,其包括将(a)和(b)的组合给予所述受试者,所述(a)和(b)任选地作为分开的组合物或一起作为同一组合物的一部分。

6.根据权利要求1-4中任一项所述的方法,其包括将(a)和(c)的组合给予所述受试者,所述(a)和(c)任选地作为分开的组合物或一起作为同一组合物的一部分。

7.根据权利要求1-4中任一项所述的方法,其包括将(a)、(b)、和(c)的组合给予所述受试者,所述(a)、(b)、和(c)任选地作为分开的组合物或一起作为同一组合物的一部分。

8.根据权利要求1-7中任一项所述的方法,其中所述癌症是恶性上皮肿瘤或癌。

9.根据权利要求8所述的方法,其中所述癌选自以下中的一种或多种:腺癌、鳞状细胞癌、腺鳞癌、间变性癌、大细胞癌和小细胞癌。

10.根据权利要求8或9所述的方法,其中所述癌选自以下中的一种或多种:上皮瘤,鳞状细胞瘤(鳞状细胞癌),基底细胞瘤(基底细胞癌),移行细胞癌,腺癌(任选地革囊胃、舒血管肠肽瘤、胆管癌、肝细胞癌、腺样囊性癌、肾细胞癌或格拉维茨瘤),附件或皮肤附属器瘤,粘液表皮样瘤,囊性、粘液性或浆液性瘤,导管、小叶或髓样瘤,腺泡细胞瘤,和复杂上皮瘤。

11.根据权利要求1-10中任一项所述的方法,其中所述癌症是选自以下中的一种或多种的癌:结肠癌、胃癌、肺癌(任选地小细胞肺癌或非小肺细胞癌)、乳腺癌、胰腺癌、口腔癌、前列腺癌、种系癌、直肠癌、肝癌(任选地肝细胞癌)、肾癌(任选地肾细胞癌)、和卵巢癌。

12.根据权利要求1-11中任一项所述的方法,其中相对于单独的(a)和/或(b)而言,(a)和(b)的组合将癌细胞生长降低了和/或将癌细胞杀伤提高了约或至少约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、200%、300%、400%、500%、600%、700%、800%、900%、1000%、2000%或更多。

13.根据权利要求12所述的方法,其中相对于单独的(a)和/或(b)而言,(a)和(b)的组合协同降低了癌细胞生长和/或协同提高了癌细胞杀伤。

14.根据权利要求1-11中任一项所述的方法,其中相对于单独的(a)和/或(c)而言,(a)和(c)的组合将癌细胞生长降低了和/或将癌细胞杀伤提高了约或至少约5%、10%、15%、

20％、25％、30％、35％、40％、45％、50％、60％、70％、80％、90％、100％、200％、300％、400％、500％、600％、700％、800％、900％、1000％、2000％或更多。

15.根据权利要求14所述的方法，其中相对于单独的(a)和/或(c)而言，(a)和(c)的组合协同降低了癌细胞生长和/或协同提高了癌细胞杀伤。

16.根据权利要求1-11中任一项所述的方法，其中相对于单独的(a)、(b)和/或(c)而言，(a)、(b)和(c)的组合将癌细胞生长降低了约或至少约5％、10％、15％、20％、25％、30％、35％、40％、45％、50％、60％、70％、80％、90％、100％、200％、300％、400％、500％、600％、700％、800％、900％、1000％、2000％或更多。

17.根据权利要求16所述的方法，其中相对于单独的(a)、(b)和/或(c)而言，(a)、(b)和(c)的组合协同降低了癌细胞生长和/或协同提高了癌细胞杀伤。

18.根据权利要求1-17中任一项所述的方法，其中(a)和(b)、(a)和(c)、或(a)、(b)和(c)的组合选自表E1-E6中的组合，并且任选地其中所述癌症对应于表E1-E6中的癌细胞。

19.一种治疗性组合物，其包含选自以下的两种或更多种药剂的组合：

(a)表皮生长因子受体(EGFR)抑制剂；

(b)丝裂原激活蛋白激酶(MEK)1/2抑制剂；和

(c)细胞周期蛋白依赖性激酶(CDK)4/6抑制剂。

20.根据权利要求19所述的治疗性组合物，其中(a)是与EGFR或其配体特异性地结合的小分子或抗体(或其抗原结合片段)，并且任选地选自西妥昔单抗、帕尼单抗、扎鲁木单抗、尼妥珠单抗、马妥珠单抗、埃罗替尼、吉非替尼、阿法替尼、拉帕替尼、奥希替尼、布加替尼、和埃克替尼中的一种或多种。

21.根据权利要求19或20所述的治疗性组合物，其中(b)是与MEK 1/2或其配体特异性地结合的小分子或抗体(或其抗原结合片段)，并且任选地选自曲美替尼、司美替尼和考比替尼中的一种或多种。

22.根据权利要求19-21中任一项所述的治疗性组合物，其中(c)是与CDK4/6或其配体特异性地结合的小分子或抗体(或其抗原结合片段)，并且任选地选自帕博西尼、瑞博西尼和阿贝西尼中的一种或多种。

23.根据权利要求19-22中任一项所述的治疗性组合物，其包含(a)和(b)的组合。

24.根据权利要求19-22中任一项所述的治疗性组合物，其包含(a)和(c)的组合。

25.根据权利要求19-22中任一项所述的治疗性组合物，其包含(a)、(b)和(c)的组合。

26.根据权利要求19-25中任一项所述的治疗性组合物，其中(a)和(b)、(a)和(c)、或(a)、(b)和(c)的组合选自表E1-E6中的组合，并且任选地其中所述癌症对应于表E1-E6中的癌细胞/组织类型。

27.根据权利要求19-26中任一项所述的治疗性组合物，其用于在有需要的受试者中治疗癌症。

28.根据权利要求27所述的用于所述用途的治疗性组合物，其中所述癌症是恶性上皮肿瘤或癌。

29.一种患者护理试剂盒，其包括选自以下的两种或更多种药剂的组合：

(a)表皮生长因子受体(EGFR)抑制剂；

(b)丝裂原激活蛋白激酶(MEK)1/2抑制剂；和

(c)细胞周期蛋白依赖性激酶(CDK)4/6抑制剂。

30.根据权利要求29所述的患者护理试剂盒,其包括(a)和(b)的组合,所述(a)和(b)任选地作为分开的组合物或作为同一组合物的一部分。

31.根据权利要求29所述的患者护理试剂盒,其包括(a)和(c)的组合,所述(a)和(c)任选地作为分开的组合物或作为同一组合物的一部分。

32.根据权利要求29所述的患者护理试剂盒,其包括(a)、(b)和(c)的组合,所述(a)、(b)和(c)任选地作为分开的组合物或作为同一组合物的一部分。

治疗癌症的组合疗法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2017年6月2日提交的PCT/CN2017/086911的优先权，将其通过引用以其整体并入。

背景技术

技术领域

[0003] 本公开文本的实施方案涉及用于治疗包括上皮肿瘤在内的癌症的组合疗法以及相关组合物和方法，所述组合疗法以及相关组合物和方法包括至少两种药剂的组合，所述至少两种药剂例如为表皮生长因子受体(EGFR)抑制剂、丝裂原激活蛋白激酶(MEK)1/2抑制剂以及细胞周期蛋白依赖性激酶(CDK)4/6抑制剂。

发明内容

[0004] 本公开文本的实施方案在相关的部分涉及在有需要的受试者中治疗癌症的方法，所述方法包括向所述受试者给予两种或更多种药剂的组合，所述两种或更多种药剂选自：

[0005] (a)表皮生长因子受体(EGFR)抑制剂；

[0006] (b)丝裂原激活蛋白激酶(MEK)1/2抑制剂；和

[0007] (c)细胞周期蛋白依赖性激酶(CDK)4/6抑制剂。

[0008] 在某些实施方案中，(a)是与EGFR或其配体特异性地结合的小分子或抗体(或其抗原结合片段)，或任选地选自西妥昔单抗、帕尼单抗、扎鲁木单抗、尼妥珠单抗、马妥珠单抗、埃罗替尼、吉非替尼、阿法替尼、拉帕替尼、奥希替尼、布加替尼、和埃克替尼中的一种或多种。

[0009] 在某些实施方案中，(b)是与MEK 1/2或其配体特异性地结合的小分子或抗体(或其抗原结合片段)，或任选地选自曲美替尼、司美替尼和考比替尼中的一种或多种。

[0010] 在某些实施方案中，(c)是与CDK 4/6或其配体特异性地结合的小分子或抗体(或其抗原结合片段)，或任选地选自帕博西尼、瑞博西尼和阿贝西尼中的一种或多种。

[0011] 一些实施方案包括将(a)和(b)的组合给予所述受试者，所述(a)和(b)任选地作为分开的组合物或一起作为同一组合物的一部分。一些实施方案包括将(a)和(c)的组合给予所述受试者，所述(a)和(c)任选地作为分开的组合物或一起作为同一组合物的一部分。一些实施方案包括将(a)、(b)、和(c)的组合给予所述受试者，所述(a)、(b)、和(c)任选地作为分开的组合物或一起作为同一组合物的一部分。

[0012] 在一些实施方案中，所述癌症是恶性上皮肿瘤或癌。在一些实施方案中，所述癌选自以下中的一种或多种：腺癌、鳞状细胞癌、腺鳞癌、间变性癌、大细胞癌和小细胞癌。在一些实施方案中，所述癌选自以下中的一种或多种：上皮瘤，鳞状细胞瘤(鳞状细胞癌)，基底细胞瘤(基底细胞癌)，移行细胞癌，腺癌(任选地革囊胃、舒血管肠肽瘤、胆管癌、肝细胞癌、腺样囊性癌、肾细胞癌或格拉维茨瘤)，附件或皮肤附属器瘤，粘液表皮样瘤，囊性、粘液性

或浆液性瘤，导管、小叶或髓样瘤，腺泡细胞瘤，和复杂上皮瘤。在一些实施方案中，所述癌症是选自以下中的一种或多种的癌：结肠癌、胃癌、肺癌(任选地小细胞肺癌或非小肺细胞癌)、乳腺癌、胰腺癌、口腔癌、前列腺癌、种系癌、直肠癌、肝癌(任选地肝细胞癌)、肾癌(任选地肾细胞癌)、和卵巢癌。

[0013] 在一些实施方案中，相对于单独的(a)和/或(b)而言，(a)和(b)的组合将癌细胞生长降低了和/或将癌细胞杀伤提高了约或至少约5％、10％、15％、20％、25％、30％、35％、40％、45％、50％、60％、70％、80％、90％、100％、200％、300％、400％、500％、600％、700％、800％、900％、1000％、2000％或更多。在一些实施方案中，相对于单独的(a)和/或(b)而言，(a)和(b)的组合协同降低了癌细胞生长和/或协同提高了癌细胞杀伤。在一些实施方案中，相对于单独的(a)和/或(c)而言，(a)和(c)的组合将癌细胞生长降低了和/或将癌细胞杀伤提高了约或至少约5％、10％、15％、20％、25％、30％、35％、40％、45％、50％、60％、70％、80％、90％、100％、200％、300％、400％、500％、600％、700％、800％、900％、1000％、2000％或更多。在一些实施方案中，相对于单独的(a)和/或(c)而言，(a)和(c)的组合协同降低了癌细胞生长和/或协同提高了癌细胞杀伤。在一些实施方案中，相对于单独的(a)、(b)和/或(c)而言，(a)、(b)和(c)的组合将癌细胞生长降低了约或至少约5％、10％、15％、20％、25％、30％、35％、40％、45％、50％、60％、70％、80％、90％、100％、200％、300％、400％、500％、600％、700％、800％、900％、1000％、2000％或更多。在一些实施方案中，相对于单独的(a)、(b)和/或(c)而言，(a)、(b)和(c)的组合协同降低了癌细胞生长和/或协同提高了癌细胞杀伤。

[0014] 在一些实施方案中，(a)和(b)、(a)和(c)、或(a)、(b)和(c)的组合选自表E1-E6中的组合，并且任选地其中所述癌症对应于表E1-E6中的癌细胞。

[0015] 还包括治疗性组合物，其包含选自以下的两种或更多种药剂的组合：

[0016] (a)表皮生长因子受体(EGFR)抑制剂；

[0017] (b)丝裂原激活蛋白激酶(MEK)1/2抑制剂；和

[0018] (c)细胞周期蛋白依赖性激酶(CDK)4/6抑制剂。

[0019] 在一些实施方案中，(a)是与EGFR或其配体特异性地结合的小分子或抗体(或其抗原结合片段)，并且任选地选自西妥昔单抗、帕尼单抗、扎鲁木单抗、尼妥珠单抗、马妥珠单抗、埃罗替尼、吉非替尼、阿法替尼、拉帕替尼、奥希替尼、布加替尼、和埃克替尼中的一种或多种。在一些实施方案中，(b)是与MEK 1/2或其配体特异性地结合的小分子或抗体(或其抗原结合片段)，并且任选地选自曲美替尼、司美替尼和考比替尼中的一种或多种。在一些实施方案中，(c)是与CDK 4/6或其配体特异性地结合的小分子或抗体(或其抗原结合片段)，并且任选地选自帕博西尼、瑞博西尼和阿贝西尼中的一种或多种。

[0020] 某些组合物包含(a)和(b)的组合。某些组合物包含(a)和(c)的组合。某些组合物包含(a)、(b)和(c)的组合。

[0021] 在一些实施方案中，(a)和(b)、(a)和(c)、或(a)、(b)和(c)的组合选自表E1-E6中的组合，并且任选地其中所述癌症对应于表E1-E6中的癌细胞/组织类型。

[0022] 某些治疗性组合物用于在有此需要的受试者中治疗癌症。在一些实施方案中，所述癌症是恶性上皮肿瘤或癌。

[0023] 还包括患者护理试剂盒，其包括选自以下的两种或更多种药剂的组合：

[0024] (a)表皮生长因子受体(EGFR)抑制剂;

[0025] (b)丝裂原激活蛋白激酶(MEK)1/2抑制剂;和

[0026] (c)细胞周期蛋白依赖性激酶(CDK)4/6抑制剂。

[0027] 某些试剂盒包括(a)和(b)的组合,所述(a)和(b)任选地作为分开的组合物或作为同一组合物的一部分。一些试剂盒包括(a)和(c)的组合,所述(a)和(c)任选地作为分开的组合物或作为同一组合物的一部分。某些试剂盒包括(a)、(b)和(c)的组合,所述(a)、(b)和(c)任选地作为分开的组合物或作为同一组合物的一部分。

附图说明

[0028] 图1示出暴露于药剂或药剂组合后患者来源的上皮肿瘤细胞的图像。

具体实施方式

[0029] 除非另外定义,否则本文中使用的所有技术术语和科学术语具有与本公开文本所属领域的普通技术人员通常所理解的相同的含义。虽然可以在本公开的主题的实践或测试中使用与本文描述的那些方法、材料、组合物、试剂、细胞相似或等同相似或等同的任何方法、材料、组合物、试剂、细胞,但是描述了优选的方法和材料。本说明书中引用的所有出版物和参考文献,包括但不限于专利和专利申请,均通过引用以其整体并入本文,就好像每个单独的出版物或参考文献均被明确地和单独地指出为通过引用并入本文,就好像全部阐述一样。也将本申请要求优先权的任何专利申请以上文对于出版物和参考文献所述的方式通过引用以其整体并入本文。

[0030] 标准技术可用于重组DNA、寡核苷酸合成以及组织培养和转化(例如电穿孔、脂质转染)。酶促反应和纯化技术可以根据制造商的说明,如本领域中通常所实现或如本文所描述的来进行。这些和相关技术和程序可以总体上根据本领域中熟知的常规方法并且如本说明书全篇所引用和讨论的各种通用和更特定的参考文献中所描述的来进行。除非提供具体的定义,否则与本文所述的分子生物学、分析化学、合成有机化学以及医药化学结合使用的命名法及其实验室程序和技术是本领域中熟知并且常用的那些。标准技术可用于重组技术,分子生物学、微生物学、化学合成,化学分析,药物制备,配制,和递送以及患者治疗。

[0031] 出于本公开文本的目的,以下术语定义如下。

[0032] 本文使用的冠词“一个/种”(“a”和“an”)是指一个/种或多于一个/种(即,至少一个/种)该冠词的语法宾语。举例来说,“一个要素”意指一个要素或多于一个要素。

[0033] “约”是指与参考数量、水平、值、数目、频率、百分比、尺寸、大小、量、重量或长度相比,变化多达30%、25%、20%、15%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%或1%的数量、水平、值、数目、频率、百分比、尺寸、大小、量、重量或长度。

[0034] 术语“抗原”是指如下分子或分子的一部分,其能够被选择性结合剂(例如抗体)结合并且另外能够用于动物中以产生能够与此抗原的表位结合的抗体。抗原可以具有一个或多个表位。如本文所用,术语“抗原”包括如下物质,其能够在适当条件下诱导对所述物质的免疫应答以及能够与所述免疫应答的产物反应。例如,抗原可以被抗体(体液免疫应答)或致敏T淋巴细胞(T辅助细胞或细胞介导的免疫应答)或两者识别。抗原可以是可溶性物质,例如毒素和外来蛋白质,或是微粒,例如细菌和组织细胞;但是,只有蛋白质或多糖分子中

被称为抗原决定簇(表位)的部分与抗体或淋巴细胞上的特定受体组合。更广泛地,术语“抗原”包括如下任何物质,抗体与所述物质结合或需要针对所述物质的抗体;而与所述物质是否具有免疫原性无关。对于此类抗原,可以通过重组方法来鉴定抗体,而与任何免疫应答无关。

[0035] “拮抗剂”或“抑制剂”是指干扰或以其他方式降低另一种药剂或分子的生理作用的生物或化学药剂。在一些情况下,拮抗剂特异性地结合另一种药剂或分子。包括全部和部分拮抗剂和抑制剂。

[0036] “激动剂”是指增加或增强另一种药剂或分子的生理作用的生物结构或化学药剂。在一些情况下,激动剂特异性地结合另一种药剂或分子。包括完全和部分激动剂。

[0037] 如本文所用,术语“氨基酸”旨在意指天然存在和非天然存在的氨基酸以及氨基酸类似物和模拟物。天然存在的氨基酸包括在蛋白质生物合成过程中使用的20个(L)-氨基酸,以及其他氨基酸,例如4-羟脯氨酸、羟赖氨酸、锁链素、异锁链素、同型半胱氨酸、瓜氨酸和鸟氨酸。非天然存在的氨基酸包括例如(D)-氨基酸、正亮氨酸、正缬氨酸、对氟苯丙氨酸、乙硫氨酸等,这些是本领域技术人员已知的。氨基酸类似物包括天然和非天然存在的氨基酸的修饰形式。此类修饰可包括例如氨基酸上的化学基团和部分的取代或替代,或通过氨基酸的衍生化。氨基酸模拟物包括例如有机结构,其展现出与参考氨基酸功能上相似的特性,例如电荷和电荷间隔特征。例如,模拟精氨酸(Arg或R)的有机结构具有正电荷部分,所述正电荷部分位于与天然存在的Arg氨基酸的侧链的e-氨基相似的分子空间中并且具有与天然存在的Arg氨基酸的侧链的e-氨基相同程度的迁移率。模拟物还包括约束的结构,以便维持氨基酸或氨基酸官能团的最佳间隔和电荷相互作用。本领域技术人员知道或可以确定什么结构构成功能上等同的氨基酸类似物和氨基酸模拟物。

[0038] 如本文所用,在本文描述的治疗方法之前,处于发展疾病或不良反应的“风险中”的受试者可能具有或可能不具有可检测的疾病或疾病症状,并且可能具有或可能尚未显示出可检测的疾病或疾病症状。如本文所述和本领域已知,“处于风险中”表示受试者具有一种或多种风险因素,这些风险因素是与疾病发展相关的可测量参数。与不具有这些风险因素中的一种或多种的受试者相比,具有这些风险因素中的一种或多种的受试者具有更高的发展疾病或不良反应的可能性。

[0039] “生物相容”是指通常不会损害细胞或受试者的生物学功能并且不会导致任何程度的不可接受的毒性(包括变应原性和疾病状态)的材料或化合物。

[0040] 术语“结合”是指归因于例如共价、静电、疏水性和离子和/或氢键相互作用的在两个分子之间的直接缔合,并且包括相互作用如盐桥和水桥。

[0041] 在整个本公开文本中,除非上下文另有要求,否则词语“包含(comprise)”、“包含(comprises)”和“包含(comprising)”将被理解为暗示包括所述的步骤或要素或者步骤或要素的组,但不排除任何其他步骤或要素或者步骤或要素的组。

[0042] “由……组成”意为包括并限于在词组“由……组成”之后的任何内容。因此,词组“由……组成”指示,所列出的要素是必需的或强制性的,并且不可以存在任何其他要素。“本质上由……组成”意为包括所述词组后所列出的任何要素,并且限于不会干扰或促进本公开文本针对所列出的要素详细说明的活性或作用的其他要素。因此,词组“本质上由……组成”指示,所列出的要素是必需的或强制性的,但其他要素是任选的并且可以存在或可以

不存在,取决于它们是否显著影响所列出的要素的活性或作用。

[0043] 术语“无内毒素”或“基本上无内毒素”总体上涉及含有至多痕量(例如对受试者没有临床不良生理影响的量)的内毒素、并且优选不可检测量的内毒素的组合物、溶剂和/或容器。内毒素是与某些微生物(例如细菌,通常是革兰氏阴性细菌)相关联的毒素,但内毒素可发现于革兰氏阳性细菌(例如单核细胞增多性李斯特菌(Listeria monocytogenes))中。最普遍的内毒素是在各种革兰氏阴性细菌的外膜中发现的脂多糖(LPS)或脂寡糖(LOS),它们代表这些细菌引起疾病的能力的主要致病特征。人类中的少量内毒素可引起发烧,降低血压,以及炎症和凝血激活,以及其他不利的生理影响。

[0044] 因此,在药物生产中,通常期望从药物产品和/或药物容器中除去大部分或所有痕量的内毒素,因为即使少量也可能对人体造成不利影响。出于此目的,可以使用去热原烘箱,因为通常需要超过300℃的温度分解大多数内毒素。例如,基于诸如注射器或小瓶之类的主要包装材料,玻璃温度为250℃且保持时间为30分钟的组合通常足以使内毒素水平降低3log。考虑了去除内毒素的其他方法,包括例如如本文所述和本领域已知的色谱和过滤方法。

[0045] 可以使用本领域已知的常规技术检测内毒素。例如,利用来自鲎(horseshoe crab)的血液的鲎变形细胞裂解物测定是检测内毒素存在的非常灵敏的测定。在此测试中,非常低的LPS水平会导致鲎裂解物的可检测到的凝血,这是由于强大的酶促级联会放大此反应。也可以通过酶联免疫吸附测定(ELISA)对内毒素进行定量。关于基本上无内毒素,内毒素水平可以是小于约0.001、0.005、0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.08、0.09、0.1、0.5、1.0、1.5、2、2.5、3、4、5、6、7、8、9、或10EU/mg的活性化合物。通常,1ng脂多糖(LPS)对应于约1-10EU。

[0046] 术语“半最大有效浓度”或“EC50”是指如本文所述的药剂(例如小分子、抗体)的如下浓度,在所述浓度下它在某个指定的暴露时间后诱导在基线与最大值之间的一半反应;因此分级的剂量反应曲线的EC50代表化合物的观察到其最大作用的50%时的浓度。EC50还代表获得体内最大作用的50%所需的血浆浓度。类似地,“EC90”是指药剂或组合物的观察到其最大作用的90%时的浓度。“EC90”可以使用本领域的常规知识从“EC50”和斜坡斜率计算,或者可以直接从数据确定。在一些实施方案中,药剂(例如小分子、抗体)的EC50为小于约0.01、0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、40、50、60、70、80、90、100、200或500nM。在一些实施方案中,药剂的EC50值为约1nM或更小。

[0047] 药剂的“半衰期”可以指代,相对于在给予至生物体的血清或组织中时的药理学、生理学或其他活性或相对于任何其他定义的时间点,所述药剂失去此类活性的一半所花费的时间。“半衰期”还可以指代相对于在给予至生物体的血清或组织中时的起始量或浓度或者相对于任何其他定义的时间点,药剂的量或浓度降低到给予至生物体的血清或组织中的起始量的一半所花费的时间。可以测量在血清和/或任何一种或多种所选组织中的半衰期。

[0048] 术语“调节”和“改变”包括通常以相对于对照而言在统计学上显著或在生理学上显著的量或程度“增加”、“增强”或“刺激”以及“降低”或“减少”。“增加”、“刺激”或“增强”的量通常是“统计学上显著”的量,并且可包括在无组合物(例如不存在药剂)的情况下或由对照组合物产生的量的1.1、1.2、1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、30、40、50、60、70、80、90、

100或更多倍(例如500、1000倍)(包括其间的所有整数和范围,例如1.5、1.6、1.7、1.8等)的增加。“降低”或“减少”的量通常是“统计学上显著”的量,并且可包括在无组合物(例如不存在药剂)的情况下或由对照组合物产生的量的1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、或100%(包括其间的所有整数和范围)的降低。本文描述了比较的例子和“统计学上显著”量。

[0049] 术语“多肽”、“蛋白质”和“肽”可互换使用,并且意指不限于任何特定长度的氨基酸聚合物。术语“酶”包括多肽或蛋白质催化剂。术语包括修饰,例如肉豆蔻酰化、硫酸化、糖基化、磷酸化以及信号序列的添加或缺失。术语“多肽”或“蛋白质”是指一个或多个氨基酸链,其中每个链包含通过肽键共价连接的氨基酸,并且其中所述多肽或蛋白质可以包含通过肽键非共价和/或共价连接在一起的多个链(所述多个链具有天然蛋白质(即由天然存在的并且特别是非重组的细胞或者由基因工程化细胞或重组细胞产生的蛋白质)的序列),并且包括具有天然蛋白质的氨基酸序列的分子或者具有天然序列的一个或多个氨基酸的缺失、增加和/或取代的分子。在某些实施方案中,多肽是由重组细胞产生的“重组”多肽,所述重组细胞包含一种或多种重组DNA分子,所述一种或多种重组DNA分子通常由异源多核苷酸序列或原本不会在细胞中发现的多核苷酸序列的组合构成。

[0050] 本文所指的术语“分离的”多肽或蛋白质意为:主题蛋白质(1)不含通常会在自然界中和其一起发现的至少一些其他蛋白质,(2)本质上不含来自相同来源(例如来自相同物种)的其他蛋白质,(3)由来自不同物种的细胞表达,(4)已与至少约50%的多核苷酸、脂质、碳水化合物、或自然界中相关联的其他材料分离,(5)与在自然界中和“分离的蛋白质”相关联的蛋白质部分不相关联(通过共价或非共价相互作用),(6)与在自然界中相关联的多肽可操作地相关联(通过共价或非共价相互作用),或(7)在自然界中不存在。这样的分离的蛋白质可以由基因组DNA、cDNA、mRNA或其他RNA编码,或可以是合成起源的,或其任何组合。在某些实施方案中,分离的蛋白质基本上不含在其天然环境中发现的会干扰其用途(治疗、诊断、预防、研究或其他方式)的蛋白质或多肽或其他污染物。

[0051] 在某些实施方案中,可以定义组合物中任何给定药剂(例如抗体、小分子)的“纯度”。例如,某些组合物可以包含药剂例如多肽剂,所述多肽剂基于蛋白质或重量-重量是至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、或100%纯的,包括其间的所有小数和范围,如(例如且不意在限制)通过高效液相色谱(HPLC)(其为生物化学和分析化学中频繁用以分离、鉴定和定量化合物的熟知柱色谱形式)所测量。

[0052] 术语“溶解度”是指本文提供的药剂(例如抗体、小分子)溶解在液体溶剂中并形成均质溶液的特性。溶解度通常表示为浓度:表示为每单元体积溶剂中的溶质质量(g溶质/kg溶剂,g/dL(100mL),mg/ml等)、体积摩尔浓度、重量摩尔浓度、摩尔分数、或浓度的其他类似描述。每溶剂量可以溶解的最大溶质平衡量是在指定条件(包括温度、压力、pH和溶剂性质)下此溶质在此溶剂中的溶解度。在某些实施方案中,溶解度是在生理pH或其他pH(例如在pH 5.0、pH 6.0、pH 7.0、pH 7.4、pH 7.6、pH 7.8或pH 8.0(例如约pH 5-8))下测量的。在某些实施方案中,溶解度是在水或生理缓冲液(例如PBS或NaCl(有或没有NaP))中测量的。在特定的实施方案中,溶解度是在相对较低的pH(例如pH 6.0)和相对较高的盐(例如500mM NaCl和10mM NaP)下测量的。在某些实施方案中,溶解度是在诸如血液或血清的生物流体

(溶剂)中测量的。在某些实施方案中,温度可以是约室温(例如约20℃、21℃、22℃、23℃、24℃、25℃)或约体温(37℃)。在某些实施方案中,药剂在室温下或在37℃的溶解度为至少约0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、40、50、60、70、80、90或100mg/ml。

[0053] “受试者”或“有需要的受试者”或“患者”或“有需要的患者”包括哺乳动物受试者,例如人受试者。

[0054] “基本上”或“本质上”意指几乎全部或全部,例如,某个给定数量的95%、96%、97%、98%、99%或更高。

[0055] “统计学上显著的”意指结果不太可能是偶然发生的。统计学显著性可以通过本领域已知的任何方法来确定。常用的显著性量度包括p值,其表示如果零假设为真则观察到的事件所发生的频率或概率。如果获得的p值小于显著性水平,则拒绝零假设。在简单情况下,显著性水平定义为p值等于或小于0.05。

[0056] “治疗反应”是指基于一种或多种治疗剂的给予而对症状的改善(无论是否持续)。

[0057] 如本文所用,术语“治疗有效量”、“治疗剂量”、“预防有效量”或“诊断有效量”是在给予后引起期望的生物学反应所需的药剂(例如抗体、小分子)的量。

[0058] 如本文所用,对受试者(例如哺乳动物,诸如人)或细胞的“治疗”是在试图改变个体或细胞的自然进程中所使用的任何类型的干预。治疗包括但不限于药物组合物的给予,并且可以预防性地或者在病理事件开始或与病原体接触之后进行。还包括“预防性”治疗,其可以涉及降低所治疗疾病或病症的进展速度,延迟此疾病或病症的发作,或降低其发作的严重性。“治疗”或“预防”不一定指示完全根除、治愈或预防疾病或病症或其相关症状。

[0059] 术语“野生型”是指在群体中最常观察到的基因或基因产物(例如多肽),因此被任意设计为基因的“正常”或“野生型”形式。

[0060] 除非另外明确说明,否则本说明书中的每个实施方案均适用于每个其他实施方案。

[0061] 途径和药剂

[0062] 某些实施方案采用抑制或拮抗表皮生长因子受体(EGFR)活性、丝裂原激活蛋白激酶(MEK)1/2活性、和/或细胞周期蛋白依赖性激酶(CDK)4/6活性的任何两种或更多种药剂的组合。此类药剂的一般例子包括小分子和抗体(或其抗原结合片段),在本文中更详细地描述了它们。

[0063] EGFR。表皮生长因子受体(EGFR;ErbB-1;在人类中为HER1)是一种跨膜蛋白,其为细胞外蛋白质配体的表皮生长因子家族(EGF家族)成员的受体。EGF是一种生长因子,其通过与其受体EGFR结合来刺激细胞生长、增殖和分化。人EGF是具有53个氨基酸残基和三个分子内二硫键的6kDa蛋白。EGF通过与细胞表面上的EGFR以高亲和力结合而起作用。这刺激配体诱导的二聚化,从而激活内在蛋白质-受体的酪氨酸激酶活性。然后,酪氨酸激酶活性启动信号转导级联,导致细胞内的各种生化变化,包括细胞内钙水平的升高、糖酵解和蛋白质合成的增加以及某些基因(包括参与DNA合成和细胞增殖的那些)的表达增加。

[0064] 导致EGFR过表达或过度活性的突变与各种癌症相关联,这些癌症包括肺鳞状细胞癌、肛门癌、胶质母细胞瘤和头颈部上皮肿瘤等。因此,在某些实施方案中,所述药剂抑制EGFR活性或EGFR调节的途径。

[0065] 例如，在某些实施方案中，所述药剂是抗体(或其抗原结合片段)，所述抗体(或其抗原结合片段)特异性地结合EGFR，例如特异性地结合EGFR的细胞外配体结合结构域，并任选地抑制或减少刺激性配体或信号分子(例如EGF)的结合。说明性抗EGFR抗体描述于例如美国专利号5,844,093;7,132,511;7,247,301;7,595,378;7,723,484;7,939,072;和7,960,516中，将它们通过引用并入。EGFR抑制剂抗体的特定非限制性例子包括西妥昔单抗、帕尼单抗、扎鲁木单抗、尼妥珠单抗和马妥珠单抗、及其片段或变体。在特定的实施方案中，抗体是西妥昔单抗(Erbitux®)或其片段或变体。西妥昔单抗由对人EGFR的N末端部分有特异性的225鼠EGFR单克隆抗体的Fv(可变;抗原结合)区以及人IgG1重链和κ轻链恒定(框架)区构成。

[0066] 还包括EGFR的小分子抑制剂，例如EGFR激酶活性的酪氨酸激酶抑制剂。小分子EGFR抑制剂的非限制性例子包括埃罗替尼、吉非替尼、阿法替尼、拉帕替尼、奥希替尼、布加替尼和埃克替尼。因此，在某些实施方案中，EGFR抑制剂是任何一种或多种前述抗体或小分子。

[0067] MEK 1/2。丝裂原激活蛋白激酶(MAPK)级联是参与调节正常细胞增殖、存活和分化的关键信号传导途径。MAPK级联的异常调节促成癌症和其他人类疾病。具体而言，细胞外信号调节的激酶(ERK)MAPK途径已与许多癌症相关而作为治疗性靶标。ERK是进化保守的信号传导模块的下游组分，由Raf丝氨酸/苏氨酸激酶激活。Raf激活MAPK/ERK激酶(MEK)1/2双特异性蛋白激酶，然后激活ERK1/2。在人类癌症中Raf的突变激活支持了此途径在人类癌发生中的重要作用。此外，Raf-MEK-ERK途径是Ras小GTP酶(人类癌症中突变频率最高的致癌基因)的关键下游效应物。最后，Ras是表皮生长因子受体(EGFR)的关键下游效应物，在许多人类癌症中均被突变激活和/或过表达。ERK激活还促进EGFR配体的表达上调，从而促进对肿瘤生长至关重要的自分泌生长环。

[0068] 因此，某些实施方案涉及例如通过抑制MEK 1/2双特异性蛋白激酶来调节(例如抑制)EGFR-Ras-Raf-MEK-ERK信号传导途径。因此，一些实施方案包括抑制MEK1和/或MEK2的小分子。小分子MEK 1/2抑制剂的非限制性例子包括曲美替尼、司美替尼、考比替尼、和比美替尼。MEK1和MEK2抑制剂的其他例子描述于，例如，美国申请号2009/0124595;美国申请号2009/0246198;和美国申请号2010/0004234，将它们通过引用并入。

[0069] CDK 4/6。细胞周期蛋白依赖性激酶(CDK)是在调节细胞周期中发挥作用的蛋白激酶的家族。CDK4和CDK6调节细胞周期中的细胞G1期进展和G1/S过渡。已经显示CDK4和CDK6可磷酸化并因此调节肿瘤抑制物视网膜母细胞瘤蛋白的活性，并且在多种肿瘤中过表达或以其他方式不平衡。例如，CDK4和CDK6的过表达可以为癌细胞提供某些癌症标志，包括细胞周期和细胞代谢的失控。

[0070] 因此，某些实施方案涉及例如通过抑制CDK4和/或CDK6激酶来调节(例如抑制)CDK 4/6调节的途径。包括如下药剂，所述药剂抑制CDK 4/6磷酸化蛋白质上的丝氨酸或苏氨酸残基的能力或活性，或抑制CDK 4/6与参与信号途径的其他蛋白质/配体的相互作用。CDK4和CDK6与细胞周期蛋白D形成复合物，以调节细胞周期从G1到S期的进展。已显示CDK4与视网膜母细胞瘤(Rb)、CDC37、CDKN1B、CDKN2B、CDKN2C、CEBPA、CCND1、CCND3、DBNL、MyoD、P16、PCNA、和SERTAD1相互作用。已显示CDK6与视网膜母细胞瘤(RB)、CDKN2C、PPM1B、细胞周期蛋白D3、细胞周期蛋白D1和PPP2CA相互作用。因此，在某些实施方案中，CDK 4/6抑制剂降低了

CDK4和/或CDK6与任何一种或多种前述蛋白质或配体的相互作用。

[0071] 因此，一些实施方案包括抑制CDK4和/或CDK6的小分子。小分子CDK 4/6抑制剂的非限制性例子包括瑞博西尼、阿贝西尼和帕博西尼。CDK 4/6抑制剂的其他例子描述于例如WO 2007/140222;WO 2010/020675;以及美国申请号2013/0035336中，将它们通过引用并入。

[0072] 抗体。在一些实施方案中，如上所述，所述药剂是抗体或“其抗原结合片段”。抗体或抗原结合片段可以本质上是任何类型的。如本领域熟知的，抗体是能够通过位于免疫球蛋白分子可变区中的至少一个表位识别位点与靶标特异性结合的免疫球蛋白分子。在某些实施方案中，靶标是EGFR(例如EGFR的配体结合结构域)、EGR、MEK1、MEK2、CDK4、CDK6或其任何组合或其任何配体。因此，在某些实施方案中，抗体以约、至少约或小于约0.01、0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、40、或50nM的结合亲和力(Kd)特异性地结合本文所述的靶标。在某些实施方案中，抗体(或其抗原结合片段)特异性地结合和/或抑制EGFR、MEK1、MEK2、CDK4、CDK6或其任何组合，包括其任何配体(例如EGR)，如本文所述和本领域已知的。

[0073] 如本文所用，术语“抗体”不仅涵盖完整的多克隆或单克隆抗体，而且包括其片段(例如dAb、Fab、Fab’、F(ab’)2、Fv)、单链(ScFv)、其合成变体、天然存在的变体、融合蛋白(其包含具有有所需特异性的抗原结合片段的抗体部分)、人源化抗体、嵌合抗体、以及免疫球蛋白分子的包含具有所需特异性的抗原结合位点或片段(表位识别位置)的任何其他修饰构型。在本文中更详细地描述了抗体(及其抗原结合片段)的某些特征和特性。

[0074] 如本文所用，术语“抗原结合片段”是指包含与目标抗原结合的免疫球蛋白重链和/或轻链的至少一个CDR的多肽片段。在这方面，本文描述的抗体的抗原结合片段可以包含来自与靶分子结合的抗体的VH和VL序列的1、2、3、4、5或全部6个CDR。

[0075] 术语“抗原”是指如下分子或分子的一部分，其能够被选择性结合剂(例如抗体)结合并且另外能够用于动物中以产生能够与此抗原的表位结合的抗体。抗原可以具有一个或多个表位。

[0076] 术语“表位”包括能够与免疫球蛋白或T细胞受体特异性地结合的任何决定簇，优选多肽决定簇。表位是由抗体结合的抗原区域。在某些实施方案中，表位决定簇包括分子的化学活性表面基团，例如氨基酸、糖侧链、磷酰基或磺酰基，并且在某些实施方案中可以具有特定的三维结构特征和/或特定的电荷特征。关于抗原的一级结构，表位可以是连续的或不连续的。

[0077] 如果与分子(例如抗体)和替代细胞或物质反应或相关联的情况相比，所述分子与特定细胞或物质更频繁更快速地以更长的持续时间和/或以更大的亲和力反应或相关联，则所述分子被视为展现出“特异性结合”或“优先结合”。如果与抗体结合其他物质的情况相比，抗体以更大亲和力、亲合力更容易地和/或以更长的持续时间(例如以统计学上显著的量)结合靶标，则抗体“特异性结合”或“优先结合”靶标。例如，与抗体结合其他表位的情况下相比，特异性地或优先结合特定表位的抗体是以更大亲和力、亲合力更容易地和/或以更长的持续时间结合此特定表位的抗体。通过阅读此定义还应理解，例如，特异性地或优先结合第一靶标的抗体(或部分或表位)可以或可以不特异性地或优先结合第二靶标。这样，“特

异性结合”或“优先结合”并不一定需要(尽管可以包括)专一结合。通常,但并非必须,对结合的提及意指优先结合。

[0078] 免疫学结合总体上是指在免疫球蛋白分子与免疫球蛋白特异性针对的抗原之间发生的非共价相互作用类型,例如通过举例说明而非限制,非共价相互作用类型是由于静电、离子、亲水性和/或疏水性吸引或排斥、空间力、氢键合、范德华力和其他相互作用。免疫结合相互作用的强度或亲和力可以表示为相互作用的解离常数(Kd),其中较小的Kd表示较大的亲和力。可以使用本领域熟知的方法定量所选多肽的免疫结合特性。一种这样的方法需要测量抗原结合位点/抗原复合物形成和解离的速率,其中那些速率取决于复合物配偶体的浓度、相互作用的亲和力以及同样影响两个方向上的速率的几何参数。因此,“缔合速率常数”(Kon)和“解离速率常数”(Koff)二者均可以通过计算浓度和实际的缔合和解离速率来确定。Koff/Kon的比率使得可以取消所有与亲和力无关的参数,因此等于解离常数Kd。

[0079] 抗体可以通过本领域普通技术人员已知的多种技术中的任何一种来制备。参见例如Harlow和Lane,Antibodies:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory,1988。对目标多肽具有特异性的单克隆抗体可以例如使用Kohler和Milstein,Eur.J.Immunol.6:511-519,1976的技术及其改进来制备。还包括利用转基因动物例如小鼠表达人抗体的方法。参见例如Neuberger等人,Nature Biotechnology 14:826,1996;Lonberg等人,Handbook of Experimental Pharmacology 113:49-101,1994;和Lonberg等人,Internal Review of Immunology 13:65-93,1995。特定例子包括REGENEREX®的VELOCIMMUNE®平台(参见例如美国专利号6,596,541)。

[0080] 还可通过使用噬菌体展示或酵母展示文库产生或鉴定抗体(参见例如美国专利号7,244,592;Chao等人,Nature Protocols.1:755-768,2006)。可用文库的非限制性例子包括克隆文库或合成文库,例如人组合抗体文库(HuCAL),其中人抗体库的结构多样性由七个重链和七个轻链可变区基因代表。这些基因的组合在主文库中产生了49个框架。通过在这些框架上叠加高度可变的基因盒(CDR=互补决定区),可以重现出庞大的人类抗体库。还包括设计成具有以下的人类文库:编码轻链可变区、重链CDR-3的人类供体来源片段,编码重链CDR-1中的多样性的合成DNA,和编码重链CDR-2中的多样性的合成DNA。适合使用的其他文库对于本领域技术人员将是清楚的。

[0081] 在某些实施方案中,本文所述的抗体及其抗原结合片段包括分别插入在重链与轻链框架区(FR)组之间的重链和轻链CDR组,所述框架区为CDR提供支持并限定CDR相对于彼此的空间关系。如本文所用,术语“CDR组”是指重链或轻链V区的三个高变区。从重链或轻链的N末端开始行进,这些区域分别表示为“CDR1”、“CDR2”和“CDR3”。因此,抗原结合位点包括六个CDR,其包含来自重链和轻链V区中的每一个的CDR组。包含单个CDR(例如CDR1、CDR2或CDR3)的多肽在本文中称为“分子识别单元”。对许多抗原-抗体复合物的晶体学分析证实,CDR的氨基酸残基与结合的抗原形成广泛的接触,其中最广泛的抗原接触是与重链CDR3。因此,分子识别单元主要负责抗原结合位点的特异性。

[0082] 如本文所用,术语“FR组”是指作为重链或轻链V区的CDR组的CDR的框架的四个侧翼氨基酸序列。一些FR残基可接触结合的抗原;然而,FR主要负责将V区折叠成抗原结合位点,特别是FR残基直接与CDR相邻。在FR内,某些氨基残基和某些结构特征是非常高度保守的。在这方面,所有的V区序列都包含约90个氨基酸残基的内部二硫化物环。当V区折叠成结

合位点时,CDR显示为形成抗原结合表面的突出环基序。通常公认的是,存在FR的保守结构区,其影响CDR环折叠形状成某些“典范”结构,而不管精确的CDR氨基酸序列如何。此外,已知某些FR残基参与稳定抗体重链和轻链相互作用的非共价域间接触。

[0083] 免疫球蛋白可变结构域的结构和位置可以通过参考Kabat,E.A.等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest.第4版.US Department of Health and Human Services.1987及其更新版来确定。

[0084] 还包括“单克隆”抗体,其是指同质抗体群体,其中单克隆抗体由参与表位的选择性结合的氨基酸(天然存在和非天然存在的)构成。单克隆抗体是高度特异性的,其针对单个表位。术语“单克隆抗体”不仅涵盖完整的单克隆抗体和全长单克隆抗体,还涵盖其片段(例如Fab、Fab’、F(ab’)2、Fv),单链(ScFv),其变体,包含抗原结合部分的融合蛋白,人源化单克隆抗体,嵌合单克隆抗体,以及免疫球蛋白分子的包括具有所需特异性和与表位结合能力的抗原结合片段(表位识别位点)的任何其他修饰构型。关于抗体的来源或制备方式(例如,通过杂交瘤、噬菌体选择、重组表达、转基因动物),无意受到限制。所述术语包括完整的免疫球蛋白以及上述在“抗体”的定义下描述的片段等。

[0085] 蛋白水解酶木瓜蛋白酶优先切割IgG分子以产生几个片段,其中两个片段(F(ab)片段)各自包括含有完整抗原结合位点的共价异二聚体。胃蛋白酶能够切割IgG分子以提供几个片段,包括含有两个抗原结合位点的F(ab’)2片段。根据本发明的某些实施方案使用的Fv片段可以通过优先对IgM进行蛋白水解切割,并且在极少情况下通过对IgG或IgA免疫球蛋白分子进行蛋白水解切割而产生。然而,Fv片段更通常是使用本领域已知的重组技术来衍生。Fv片段包括非共价的VH::VL异二聚体,其包含保留了天然抗体分子的大部分抗原识别和结合能力的抗原结合位点。参见Inbar等人,PNAS USA.69:2659-2662,1972;Hochman等人,Biochem.15:2706-2710,1976;以及Ehrlich等人,Biochem.19:4091-4096,1980。

[0086] 在某些实施方案中,考虑了单链Fv或scFV抗体。根据本申请的有关选择具有所需特异性的抗体的传授内容,可以使用标准分子生物学技术制备例如κ抗体(Ill等人,Prot.Eng.10:949-57,1997);微小抗体(Martin等人,EMBO J 13:5305-9,1994);双抗体(Holliger等人,PNAS 90:6444-8,1993);或Janusins(Traunecker等人,EMBO J 10:3655-59,1991;和Traunecker等人,Int.J.Cancer Suppl.7:51-52,1992)。

[0087] 单链Fv(sFv)多肽是共价连接的VH::VL异二聚体,其由包含通过编码肽的接头连接的VH和VL编码基因的基因融合物表达。Huston等人(PNAS USA.85(16):5879-5883,1988)。已经描述了许多方法来识别用于将天然聚集的但化学分离的来自抗体V区的轻和重多肽链转化为sFv分子的化学结构,所述sFv分子会折叠成基本上类似于抗原结合位点结构的三维结构。参见,例如,Huston等人的美国专利号5,091,513和5,132,405;和Ladner等人的美国专利号4,946,778。

[0088] 在某些实施方案中,本文所述的抗体为“双抗体”的形式。双抗体是多肽的多聚体,每个多肽包含第一结构域和第二结构域,所述第一结构域含有免疫球蛋白轻链的结合区,所述第二结构域含有免疫球蛋白重链的结合区,这两个结构域连接(例如通过肽接头)但不能缔合彼此形成抗原结合位点:抗原结合位点是通过多聚体中一个多肽的第一结构域与多聚体中另一个多肽的第二结构域的缔合而形成的(WO 94/13804)。抗体的dAb片段由VH结构域组成(Ward等人,Nature 341:544-546,1989)。双抗体和其他多价或多特异性片段可以例

如通过基因融合来构建(参见WO 94/13804;和Holliger等人,PNAS USA.90:6444-6448,1993)。

[0089] 还包括包含连接到CH3结构域的scFv的微型抗体(参见Hu等人,Cancer Res.56:3055-3061,1996)。还参见Ward等人,Nature.341:544-546,1989;Bird等人,Science.242:423-426,1988;Huston等人,PNAS USA.85:5879-5883,1988);PCT/US 92/09965;WO 94/13804;以及Reiter等人,Nature Biotech.14:1239-1245,1996。

[0090] 当使用双特异性抗体时,它们可以是常规的双特异性抗体,其可以按多种方式制造(Holliger和Winter,Current Opinion Biotechnol.4:446-449,1993),例如以化学方式制备或由杂交体杂交瘤制备;或者可以是上述任何双特异性抗体片段。双抗体和scFv可以仅使用可变结构域而在没有Fc区的情况下来构建,从而潜在地降低抗独特型反应的作用。

[0091] 与双特异性全抗体相反,双特异性双抗体也可能特别有用,因为它们可以容易地在大肠杆菌中构建和表达。可以使用噬菌体展示(WO 94/13804)从文库中容易地选择具有适当结合特异性的双抗体(和许多其他多肽,例如抗体片段)。如果双抗体的一个臂保持恒定,例如具有针对抗原X的特异性,那么可以制备其中另一个臂变化的文库,并选择具有适当特异性的抗体。双特异性全抗体可以通过杵臼工程化(Ridgeway等人,Protein Eng.,9:616-621,1996)来制备。

[0092] 在某些实施方案中,本文描述的抗体可以按UniBody®的形式提供。UniBody®是去除了铰链区的IgG4抗体(参见GenMab Utrecht,The Netherlands;还参见例如US 20090226421)。与目前的小抗体形式相比,这种抗体技术产生稳定的、较小的、具有所期望的更长治疗窗口的抗体形式。IgG4抗体被认为是惰性的,因此不与免疫系统相互作用。可以通过消除抗体的铰链区来修饰完整的人IgG4抗体,以获得相对于相应的完整IgG4(GenMab,Utrecht)具有不同稳定性特性的半分子片段。将IgG4分子减半仅剩下UniBody®上的一个区域,所述区域可与同源抗原(例如疾病靶标)结合,并且因此UniBody®与靶细胞上的仅一个位点单价地结合。对于某些癌细胞表面抗原,这种单价结合可能不会刺激癌细胞的生长,如使用具有相同抗原特异性的二价抗体可看到的;因此UniBody®技术可以为一些类型的常规抗体难治性癌症提供治疗选择。当治疗一些形式的癌症时,UniBody®的小尺寸可能是大的益处,可以使分子更好地分布在较大的实体瘤上,并潜在地提高功效。

[0093] 在某些实施方案中,本文提供的抗体可以采取纳米抗体的形式。微型抗体由单个基因编码,并在几乎所有原核和真核宿主例如大肠杆菌(参见美国专利号6,765,087)、霉菌(例如曲霉属或木霉属)和酵母(例如酵母属、克鲁维酵母属、汉逊酵母属或毕赤酵母属)(参见美国专利号6,838,254)中高效产生。生产过程是可扩展的,并且已经生产了几千克数量的纳米抗体。可以将纳米抗体配制成具有长保存期限的即用型溶液。纳米克隆(Nanoclone)方法(参见WO 06/079372)是基于对B细胞的自动高通量选择来产生针对所需靶标的纳米抗体的专有方法。

[0094] 在某些实施方案中,抗体或其抗原结合片段是人源化的。这些实施方案是指通常使用重组技术制备的嵌合分子,其具有源自来自非人物种的免疫球蛋白的抗原结合位点和

分子的基于人免疫球蛋白结构和/或序列的剩余免疫球蛋白结构。抗原结合位点可以包括与恒定域融合的完整可变结构域,或者仅移植到可变结构域中适当框架区上的CDR。表位结合位点可以是野生型或被一个或多个氨基酸取代修饰。这消除了作为人个体中的免疫原的恒定区,但是仍然存在对外来可变区的免疫应答的可能性(LoBuglio等人,PNAS USA 86:4220-4224,1989;Queen等人,PNAS USA.86:10029-10033,1988;Riechmann等人,Nature.332:323-327,1988)。对抗体人源化的说明性方法包括美国专利号7,462,697中描述的方法。

[0095] 另一种方法不仅着眼于提供人类来源的恒定区,而且还修饰可变区,以将其改造为尽可能接近人类形式。已知的是,重链和轻链的可变区均包含三个互补决定区(CDR),这些互补决定区响应于所讨论的表位而变化并决定了结合能力,其侧翼是在给定物种中相对保守并推定为CDR提供支架的四个框架区(FR)。当针对特定表位制备非人抗体时,可通过将源自非人抗体的CDR移植到待修饰人抗体中存在的FR上来“改造”或“人源化”可变区。这种方法应用于各种抗体已经报道于以下文献:Sato等人,Cancer Res.53:851-856,1993;Riechmann等人,Nature 332:323-327,1988;Verhoeyen等人.,Science 239:1534-1536,1988;Kettleborough等人,Protein Engineering.4:773-3783,1991;Maeda等人,Human Antibodies Hybridoma 2:124-134,1991;Gorman等人,PNAS USA.88:4181-4185,1991;Tempest等人,Bio/Technology9:266-271,1991;Co等人,PNAS USA.88:2869-2873,1991;Carter等人,PNAS USA.89:4285-4289,1992;和Co等人,J Immunol.148:1149-1154,1992。在一些实施方案中,人源化抗体保留所有CDR序列(例如,人源化小鼠抗体包含来自小鼠抗体的所有六个CDR)。在其他实施方案中,人源化抗体具有相对于原始抗体而改变的一个或多个CDR(一个、两个、三个、四个、五个、六个),它们也称为一个或多个“源自”来自原始抗体的一个或多个CDR的CDR。

[0096] 在某些实施方案中,抗体可以是嵌合抗体。在这方面,嵌合抗体由抗体的与不同抗体的异源Fc部分可操作地连接或以其他方式融合的抗原结合片段构成。在某些实施方案中,异源Fc结构域是人来源的。在其他实施方案中,异源Fc结构域可来自与亲本抗体不同的Ig类别,包括IgA(包括IgA1和IgA2亚类)、IgD、IgE、IgG(包括IgG1、IgG2、IgG3和IgG4亚类)和IgM。在另外的实施方案中,异源Fc结构域可以由来自一种或多种不同Ig类别的CH2和CH3结构域构成。如上文关于人源化抗体所述,嵌合抗体的抗原结合片段可以仅包括本文描述的抗体的一个或多个CDR(例如,本文描述的抗体的1、2、3、4、5或6个CDR),或者可以包括完整的可变结构域(VL、VH或两者)。

[0097] 小分子。在特定的实施方案中,抑制剂或拮抗剂是“小分子”。小分子是指具有合成或生物来源(生物分子)的有机化合物,但通常不是聚合物。有机化合物是指分子中含碳的化合物的大类别,通常不包括仅含碳酸盐、简单碳氧化物、或氰化物的那些。“生物分子”总体上是指由生物体产生的有机分子,包括:大聚合物分子(生物聚合物),例如肽、多糖以及还有核酸;以及小分子,例如初级次级代谢产物、脂质、磷脂、糖脂、固醇、甘油脂、维生素和激素。“聚合物”总体上是指由通常通过共价化学键连接的重复结构单元构成的大分子或高分子。

[0098] 在某些实施方案中,小分子的分子量为小于约1000-2000道尔顿,通常在约300与700道尔顿之间,并且包括约50、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、500、650、

600、750、700、850、800、950、1000或2000道尔顿。

[0099] 某些小分子可以具有针对抗体所述的“特异性结合”特征。例如，在一些实施方案中，小分子以约、至少约或小于约0.01、0.05、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、40、或50nM的结合亲和力(Kd)特异性地结合本文所述的靶标。在某些实施方案中，小分子特异性地结合和/或抑制EGFR、MEK1、MEK2、CDK4、CDK6或其任何组合，包括其任何配体(例如EGR)，如本文所述和本领域已知的。

[0100] 使用方法和治疗性组合物

[0101] 如上所述，本公开文本的实施方案涉及以下发现：相对于单独的个别药剂，至少两种药剂的某些组合在原代细胞癌的离体模型中提供了显著且通常协同增加的癌细胞生长抑制活性。因此，一些实施方案涉及在有需要的受试者中治疗癌症、改善癌症的症状、或抑制癌症进展的方法，所述方法包括向受试者给予选自以下的两种或更多种药剂的组合：表皮生长因子受体(EGFR)抑制剂、丝裂原激活蛋白激酶(MEK)1/2抑制剂、和细胞周期蛋白依赖性激酶(CDK)4/6抑制剂。本文描述了前述药剂的具体例子。

[0102] 某些方法包括给予EGFR抑制剂和MEK 1/2抑制剂的组合。一些方法包括给予EGFR抑制剂和CDK 4/6抑制剂的组合。具体方法包括给予MEK 1/2抑制剂和CDK 4/6抑制剂的组合。某些方法包括给予EGFR抑制剂、MEK 1/2抑制剂和CDK 4/6抑制剂的组合。在一些情况下，将药剂例如在分开的治疗性组合物中并且在相同或不同的时间分开给予。在一些实施方案中，将药剂作为同一治疗性组合物的一部分同时给予。

[0103] 在一些实施方案中，相对于单独的每种个别药剂而言，药剂的组合将癌细胞生长降低了和/或将癌细胞杀伤提高了约或至少约5％、10％、15％、20％、25％、30％、35％、40％、45％、50％、60％、70％、80％、90％、100％、200％、300％、400％、500％、600％、700％、800％、900％、1000％、2000％或更多。在一些实施方案中，相对于单独的每种个别药剂而言，药剂的组合协同降低了癌细胞生长和/或协同提高了癌细胞杀伤。

[0104] 在一些实施方案中，本文所述的方法和治疗性组合物将受试者的中值存活时间增加了至少4周、5周、6周、7周、8周、9周、10周、15周、20周、25周、30周、40周、50周、60周、70周、80周、90周、100周、或更长。在某些实施方案中，本文所述的方法和治疗性组合物使受试者的中值存活时间增加了至少1年、2年、3年、4年、5年或更长。在一些实施方案中，本文所述的方法和治疗性组合物将无进展存活期增加了2周、3周、4周、5周、6周、7周、8周、9周、10周、15周、20周、25周、30周、40周、50周、60周、70周、80周、90周、100周或更长。在某些实施方案中，本文描述的方法或治疗性组合物将无进展存活期增加了1年、2年、3年、4年、5年或更长。

[0105] 在某些实施方案中，本文描述的方法和治疗性组合物足以导致肿瘤消退，如由在存活肿瘤的量方面统计学上显著降低所指示的，例如在肿瘤质量方面至少10％、20％、30％、40％、50％、60％、70％、80％、90％、100％或更大的降低，或由改变(例如统计学上显著降低的)的扫描尺寸所指示的。在某些实施方案中，本文描述的方法和治疗性组合物足以导致稳定疾病。在某些实施方案中，本文描述的方法和治疗性组合物足以导致临床医师已知的特定疾病适应症的症状上临床相关的减轻。

[0106] 在一些实施方案中，药剂的组合选自表E1-E6中提供的组合。

[0107] 本文所述的方法和治疗性组合物可用于治疗任何种类的癌症。在一些实施方案

中，所述癌症是恶性上皮肿瘤或癌。在一些实施方案中，所述癌选自以下中的一种或多种：上皮瘤，鳞状细胞瘤(鳞状细胞癌)，基底细胞瘤(基底细胞癌)，移行细胞癌，腺癌(任选地革囊胃、舒血管肠肽瘤、胆管癌、肝细胞癌、腺样囊性癌、肾细胞癌或格拉维茨瘤)，附件或皮肤附属器瘤，粘液表皮样瘤，囊性、粘液性或浆液性瘤，导管、小叶或髓样瘤，腺泡细胞瘤，和复杂上皮瘤。

[0108] 在一些实施方案中，所述癌症或癌选自以下中的一种或多种：结肠癌或结直肠癌，胃癌，肺癌(任选地小细胞肺癌或非小肺细胞癌)，乳腺癌(例如雌激素受体阳性(ER+)、雌激素受体阴性(ER-)、Her2阳性(Her2+)、Her2阴性(Her2-)，或其组合，例如ER+/Her2+、ER+/Her2-、ER-/Her2+或ER-/Her2-；或“三阴性”乳腺癌(呈雌激素受体阴性、孕酮受体阴性和HER2阴性)，胰腺癌，口腔癌，前列腺癌，种系癌，直肠癌，肝癌(任选地肝细胞癌)，肾癌(任选地肾细胞癌)，和卵巢癌。在一些实施方案中，所述癌症或癌是上述任何一种的转移性癌症。

[0109] 在一些实施方案中，所述癌症或癌选自以下中的一种或多种：黑素瘤(例如转移性黑素瘤)，骨癌，间皮瘤，白血病(例如淋巴细胞白血病、慢性骨髓性白血病、急性髓性白血病、复发急性髓性白血病)，淋巴瘤，肉瘤，B细胞恶性肿瘤，神经胶质瘤(例如星形细胞瘤、少突神经胶质瘤、室管膜瘤、或脉络丛乳头状瘤)，多形性胶质母细胞瘤(例如巨细胞胶质母细胞瘤或胶质肉瘤)，脑膜瘤，垂体腺瘤，前庭神经鞘瘤，原发性CNS淋巴瘤，原始神经外胚层肿瘤(髓母细胞瘤)，膀胱癌，子宫癌，食道癌，喉癌，脑癌，头颈癌，宫颈癌症，睾丸癌，胃癌，病毒诱导的肿瘤(例如乳头瘤病毒诱导的癌(例如宫颈癌、宫颈癌症))，腺癌，疱疹病毒诱导的肿瘤(例如伯基特淋巴瘤、EBV诱导的B细胞淋巴瘤)，乙肝诱导的肿瘤(肝细胞癌)，HTLV-1诱导的和HTLV-2诱导的淋巴瘤，听神经瘤，肺癌症(例如肺癌、支气管癌)，咽喉癌，肛门癌，胶质母细胞瘤，直肠癌，星形细胞瘤，脑肿瘤，视网膜母细胞瘤，基底细胞瘤，脑转移瘤，髓母细胞瘤，阴道癌，霍奇金综合征，脑膜瘤，施尼博格(Schneeberger)病，垂体肿瘤，蕈样真菌病，类癌，神经鞘瘤(neurinoma)，spinalioma，伯基特淋巴瘤，肾癌，胸腺瘤，子宫体癌，骨癌，非霍奇金淋巴瘤，尿道癌，CUP综合征，头颈肿瘤，少突神经胶质瘤，外阴癌，肠癌，食管癌，疣累及(wart involvement)，小肠肿瘤，颅咽管瘤，生殖器肿瘤，子宫内膜癌，肝转移瘤，阴茎癌，舌癌，胆囊癌，浆细胞瘤，和眼睑肿瘤。在一些实施方案中，所述癌症或癌是上述任何一种的转移性癌症。

[0110] 在一些实施方案中，所述癌症或癌具有EGFR相关联的突变或改变，并且药剂中的至少一种是EGFR抑制剂。例子包括表达或过表达EGFR的癌症或癌。在一些实施方案中，所述癌症具有EGFR突变，例如EGFR外显子19缺失和/或外显子21L858R取代突变。

[0111] 在一些实施方案中，所述癌症或癌类型选自表E1-E6，并且任选地通过表E1-E6中提供的相应药剂组合进行治疗。

[0112] 可以将治疗癌症的方法与其他治疗模式相组合。例如，可以将本文所述的组合疗法在其他治疗干预之前、期间或之后给予受试者，所述其他治疗干预包括对症护理、放射疗法、手术、移植、激素疗法、光动力疗法、抗生素疗法、或其任何组合。对症护理包括皮质类固醇的给予(以降低脑水肿、头痛、认知功能障碍和呕吐)，以及抗惊厥药的给予(以降低癫痫)。放射疗法包括全脑辐照、分段放射疗法和放射外科手术，例如立体定向放射外科手术，这些可以进一步与传统手术相组合。

[0113] 用于鉴定受试者患有本文所述的一种或多种疾病或病症的方法是本领域已知的。

[0114] 对于体内使用,如上所述,为了治疗人类疾病或测试,通常在给予之前将本文所述的药剂掺入一种或多种治疗性组合物或药物组合物中。

[0115] 因此,某些实施方案涉及治疗性组合物,其包括选自如本文所述的EGFR抑制剂、MEK 1/2抑制剂和CDK 4/6抑制剂的两种或更多种(例如3、4、5、6种)药剂的组合。一些治疗性组合物包括EGFR抑制剂和MEK 1/2抑制剂的组合。某些治疗性组合物包括EGFR抑制剂和CDK 4/6抑制剂的组合。特定的治疗性组合物包括MEK 1/2抑制剂和CDK 4/6抑制剂的组合。一些治疗性组合物包括EGFR抑制剂、MEK 1/2抑制剂和CDK 4/6抑制剂的组合。在特定的实施方案中,治疗性组合物包含选自表E1-E6中提供的组合的药剂组合。

[0116] 在一些情况下,治疗性组合物或药物组合物包含与药学上或生理学上可接受的载体或赋形剂相组合的本文所述的一种或多种药剂。如本文所述,某些治疗性组合物进一步包括至少一种癌症免疫治疗剂。

[0117] 在特定的实施方案中,包含诸如抗体之类的药剂的治疗性组合物基于蛋白质或重量-重量是基本上纯的,例如组合物的纯度为基于蛋白质或重量-重量至少约80%、85%、90%、95%、98%、或99%。

[0118] 在一些实施方案中,如本文所述和本领域已知,本文提供的抗体不形成聚集体,具有期望的溶解度和/或具有适用于人的免疫原性特征。因此,在一些实施方案中,包含抗体剂的治疗性组合物基本上不含聚集体。例如,某些组合物包含小于约10%(基于蛋白质)的高分子量聚集蛋白质,或小于约5%的高分子量聚集蛋白质,或小于约4%的高分子量聚集蛋白质,或小于约3%的高分子量聚集蛋白质,或小于约2%的高分子量聚集蛋白质,或小于约1%的高分子量聚集蛋白质。一些组合物包含抗体剂,所述抗体剂关于其表观分子质量为至少约50%、约60%、约70%、约80%、约90%或约95%单分散的。

[0119] 在一些实施方案中,抗体药剂被浓缩至约或至少约0.1mg/ml、0.2mg/ml、0.3mg/ml、0.4mg/ml、0.5mg/ml、0.6、0.7、0.8、0.9、1mg/ml、2mg/ml、3mg/ml、4mg/ml、5mg/ml、6mg/ml、7mg/ml、8mg/ml、9mg/ml、10mg/ml、11mg/ml、12mg/ml、13mg/ml、14mg/ml或15mg/ml,并被配制用于生物治疗用途。

[0120] 为了制备治疗性组合物或药物组合物,将有效量或所需量的一种或多种药剂与本领域技术人员已知适合于特定药剂和/或给予模式的任何一种或多种药物载体或赋形剂混合。药物载体可以是液体、半液体或固体。用于肠胃外、真皮内、皮下或局部应用的溶液或悬浮液可以包括例如无菌稀释剂(例如水)、盐水溶液(例如磷酸盐缓冲盐水;PBS)、固定油、聚乙二醇、甘油、丙二醇或其他合成溶剂;抗微生物剂(例如苯甲醇和对羟基苯甲酸甲酯);抗氧化剂(例如抗坏血酸和亚硫酸氢钠)和螯合剂(例如乙二胺四乙酸(EDTA));缓冲液(例如乙酸盐、柠檬酸盐和磷酸盐)。如果静脉内给予(例如,通过IV输注),则合适的载体包括生理盐水或磷酸盐缓冲盐水(PBS)、以及含有增稠剂和增溶剂(例如葡萄糖、聚乙二醇、聚丙二醇及其混合物)的溶液。

[0121] 纯形式或在适当的治疗性组合物或药物组合物中的本文所述药物的给予可以通过用于提供相似效用的药剂的任何接受的给予方式来进行。治疗性组合物或药物组合物可以通过将含药剂的组合物与适当的生理学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂组合来制备,并可以配制成固体、半固体、液体或气体形式的制剂,例如-片剂、胶囊、粉末、颗粒剂、软膏、溶液、栓剂、注射剂、吸入剂、凝胶、微球和气溶胶。另外,组合物内可以但不必须存在其他药

物活性成分(包括本文其他地方所述的其他小分子)和/或合适的赋形剂,例如盐、缓冲液和稳定剂。

[0122] 给予可以通过多种不同途径来实现,这些途径包括口服、肠胃外、经鼻、静脉内、真皮内、肌内、皮下或局部。给予的优选方式取决于要治疗或预防的病症的性质。特定的实施方案包括静脉输注给予。

[0123] 载体可以包括例如药学上或生理学上可接受的载体、赋形剂或稳定剂,它们在所采用的剂量和浓度对暴露于其的细胞或哺乳动物是无毒的。通常,生理学上可接受的载体是pH缓冲水溶液。生理学上可接受的载体的例子包括缓冲液,诸如磷酸盐、柠檬酸盐和其他有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸;低分子量(少于约10个残基)多肽;蛋白质,诸如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物,诸如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,诸如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖和其他碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂,诸如EDTA;糖醇,诸如甘露醇或山梨醇;成盐抗衡离子,诸如钠;和/或非离子表面活性剂,诸如聚山梨醇酯20(TWEEN™)聚乙二醇(PEG)和泊洛沙姆(PLURONICS™)等。

[0124] 在一些实施方案中,一种或多种药剂可以包埋在例如通过凝聚技术或通过界面聚合制备的微胶囊(例如分别为羟甲基纤维素或明胶微胶囊和聚(甲基丙烯酸甲酯)微胶囊)中,包埋在胶体药物递送系统中(例如脂质体、白蛋白微球、微乳液、纳米颗粒和纳米胶囊),或包埋在粗乳液中。在Remington's Pharmaceutical Sciences,第16版,Oslo,A.编辑(1980)中公开了此类技术。一种或多种颗粒或脂质体可以进一步包括其他治疗剂或诊断剂。

[0125] 精确的剂量和治疗持续时间根据所治疗疾病而变化,并且可以使用已知的测试方案或通过在本领域已知的模型系统中测试组合物并据此外推而凭经验确定。还可进行对照临床试验。剂量还可以随着要减轻的病症的严重性而变化。通常配制并给予药物组合物以发挥治疗上有用的作用,同时使不良副作用最小化。可以一次给予组合物,或者可以分为多个较小的剂量以便按时间间隔给予。对于任何特定受试者,可以根据个人需要随时间调整具体剂量方案。

[0126] 因此,给予这些及相关治疗性组合物或药物组合物的典型途径包括但不限于口服、局部、透皮、吸入、肠胃外、舌下、颊、直肠、阴道和鼻内。如本文所用的术语肠胃外包括皮下注射、静脉内、肌内、胸骨内注射或输注技术。配制根据本公开文本的某些实施方案的治疗性组合物或药物组合物,以使得在向受试者或患者给予组合物时其中所含的活性成分具有生物利用度。将给予至受试者或患者的组合物可以采取一个或多个剂量单位的形式,其中例如片剂可以是单剂量单位,并且本文描述的气溶胶形式的药剂的容器可以容纳多个剂量单位。制备此类剂型的实际方法对于本领域技术人员是已知的或将是清楚的;例如参见Remington:The Science and Practice of Pharmacy,第20版(Philadelphia College of Pharmacy and Science,2000)。待给予的组合物通常将包含治疗有效量的用于治疗目的疾病或病症的本文所述的药剂。

[0127] 治疗性组合物或药物组合物可以为固体或液体形式。在一个实施方案中,一种或多种载体是微粒状的,使得所述组合物为例如片剂或粉末形式。一种或多种载体可以是液体,而组合物是例如口服油、可注射液体或气溶胶(其可用于例如吸入式给予)。当旨在用于口服给予时,药物组合物优选为固体或液体形式,其中半固体-、半液-体、悬浮液和凝胶形

式被包括在本文中所考虑的固体或液体的形式内。某些实施方案包括无菌可注射溶液。

[0128] 作为用于口服给予的固体组合物，可以将药物组合物配制成粉末、颗粒剂、压制片剂、丸剂、胶囊、口香糖、糯米纸囊剂等。这种固体组合物通常将包含一种或多种惰性稀释剂或可食用载体。此外，可以存在以下中的一种或多种：粘合剂，例如羧甲基纤维素、乙基纤维素、微晶纤维素、黄芪胶或明胶；赋形剂，例如淀粉、乳糖或糊精，崩解剂例如藻酸、藻酸钠、Primogel、玉米淀粉等；润滑剂，例如硬脂酸镁或Sterotex；助流剂，例如胶体二氧化硅；甜味剂，例如蔗糖或糖精；调味剂，例如薄荷、水杨酸甲酯或橙味剂；和着色剂。当药物组合物为胶囊形式，例如明胶胶囊时，除上述类型的材料外，药物组合物还可包含液体载体，例如聚乙二醇或油。

[0129] 治疗性组合物或药物组合物可以为液体形式，例如酏剂、糖浆、溶液、乳液或悬浮液。作为两个示例，液体可以用于口服给予或通过注射递送。当旨在用于口服给予时，优选的组合物除了本发明化合物外还包含一种或多种甜味剂、防腐剂、染料/着色剂、和增味剂。在旨在通过注射给予的组合物中，可以包括表面活性剂、防腐剂、润湿剂、分散剂、助悬剂、缓冲液、稳定剂和等渗剂中的一种或多种。

[0130] 液体治疗性组合物或药物组合物，无论它们是溶液、悬浮液还是其他类似形式，均可包括以下佐剂中的一种或多种：无菌稀释剂(例如注射用水、盐水溶液，优选生理盐水、林格氏溶液、等渗氯化钠)，固定油(例如可用作溶剂或悬浮介质的合成甘油单酯或甘油二酯)，聚乙二醇，甘油，丙二醇或其他溶剂；抗细菌剂，例如苯甲醇或对羟基苯甲酸甲酯；抗氧化剂，例如抗坏血酸或亚硫酸氢钠；螯合剂，例如乙二胺四乙酸；缓冲液，例如乙酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐，以及用于调节张力的药剂，例如氯化钠或右旋糖。可以将肠胃外制剂封装在由玻璃或塑料制成的安瓿、一次性注射器或多剂量小瓶中。生理盐水是优选的佐剂。可注射的药物组合物优选是无菌的。

[0131] 旨在用于肠胃外或口服给予的液体治疗性组合物或药物组合物应包含一定量的药剂，以使得获得合适的剂量。通常，此量为组合物中至少0.01％的目的药剂。当旨在用于口服给予时，此量可以在组合物重量的0.1％与约70％之间变化。某些口服治疗性组合物或药物组合物包含约4％与约75％之间的目的药剂。在某些实施方案中，制备根据本发明的治疗性组合物或药物组合物和制剂，使得在稀释之前，肠胃外剂量单元包含按重量计0.01％至10％的目的药剂。

[0132] 所述治疗性组合物或药物组合物可以旨在用于局部给予，在这种情况下，载体可以适当地包括溶液、乳液、软膏或凝胶基质。基质例如可以包括以下中的一种或多种：矿脂、羊毛脂、聚乙二醇、蜂蜡、矿物油、稀释剂(例如水和醇)、以及乳化剂和稳定剂。增稠剂可以存在于用于局部给予的治疗性组合物或药物组合物中。如果旨在用于透皮给予，则组合物可以包括透皮贴剂或离子电渗疗法设备。

[0133] 治疗性组合物或药物组合物可旨在用于例如以栓剂形式的直肠给予，所述栓剂将在直肠中融化并释放药物。用于直肠给予的组合物可以包含油性基质作为合适的非刺激性赋形剂。此类碱包括但不限于羊毛脂、可可脂和聚乙二醇。

[0134] 治疗性组合物或药物组合物可包括各种改变固体或液体剂量单位物理形式的材料。例如，组合物可包括在活性成分周围形成包衣壳的材料。形成包衣壳的材料通常是惰性的，并且可以选自例如糖、虫胶和其他肠溶包衣剂。可替代地，可以将活性成分装在明胶胶

囊中。固体或液体形式的治疗性组合物或药物组合物可包含与药剂结合的组分，从而有助于化合物的递送。可以按这种能力起作用的合适组分包括单克隆或多克隆抗体、一种或多种蛋白质或脂质体。

[0135] 治疗性组合物或药物组合物可以本质上由可作为气溶胶给予的剂量单位组成。术语气溶胶用于表示各种系统，其范围从胶体性质的系统到由加压包装组成的系统。递送可以是通过液化或压缩气体，或是通过分配活性成分的合适泵系统。气溶胶可以在单相、双相-或三相系统-中递送，以递送一种或多种活性成分。气溶胶的递送包括必要的容器、激活物、阀、子容器等，它们一起可以构成试剂盒。在没有过度实验的情况下，本领域普通技术人员可以确定优选的气溶胶。

[0136] 本文所述的组合物可以用保护药剂免于迅速从体内清除的载体(例如定时释放配制品或包衣)来制备。此类载体包括控释配制品，例如但不限于植入物和微胶囊化递送系统;以及可生物降解的生物相容性聚合物，例如乙烯乙酸乙烯酯、聚酸酐、聚乙醇酸、聚原酸酯、聚乳酸和本领域普通技术人员已知的其他。

[0137] 治疗性组合物或药物组合物可以通过制药领域中熟知的方法来制备。例如，旨在通过注射给予的治疗性组合物或药物组合物可以包含盐、缓冲液和/或稳定剂中的一种或多种，以及无菌蒸馏水以形成溶液。可以添加表面活性剂以促进均质溶液或悬浮液的形成。表面活性剂是与药剂非共价相互作用以促进药剂在水性递送系统中的溶解或均质悬浮。

[0138] 本文所述的组合疗法可包括给予包含两种或三种或更多种药剂(任选地连同一种或多种其他活性剂)的组合的单一药物剂量配制品，以及给予包含每种单独药剂(以其自身单独药物剂量配制品的形式)的组合物。例如，可将EGFR抑制剂和MEK 1/2抑制剂以单一口服剂量组合物(例如片剂或胶囊)一起给予受试者，或将每种药剂以分开的口服剂量配制品给予。类似地，可以将EGFR抑制剂和MEK 1/2抑制剂以例如在盐水溶液或其他生理学上可接受的溶液中的单一肠胃外剂量组合物一起给予受试者，或将每种药剂以分开的肠胃外剂量配制品给予。同样，可将EGFR抑制剂和CDK 4/6抑制剂以单一口服剂量组合物(例如片剂或胶囊)一起给予受试者，或将每种药剂以分开的口服剂量配制品给予。另外，可以将EGFR抑制剂和CDK 4/6抑制剂以例如在盐水溶液或其他生理学上可接受的溶液中的单一肠胃外剂量组合物一起给予受试者，或将每种药剂以分开的肠胃外剂量配制品给予。作为另一个例子，可将MEK 1/2抑制剂和CDK 4/6抑制剂以单一口服剂量组合物(例如片剂或胶囊)一起给予受试者，或将每种药剂以分开的口服剂量配制品给予。同样，可以将MEK 1/2抑制剂和CDK 4/6抑制剂以例如在盐水溶液或其他生理学上可接受的溶液中的单一肠胃外剂量组合物一起给予受试者，或将每种药剂以分开的肠胃外剂量配制品给予。作为另外的例子，可将EGFR抑制剂、MEK 1/2和CDK 4/6抑制剂以单一口服剂量组合物(例如片剂或胶囊)一起给予受试者，或将每种药剂以分开的口服剂量配制品给予。类似地，可以将EGFR抑制剂、MEK 1/2抑制剂、和CDK 4/6抑制剂以例如在盐水溶液或其他生理学上可接受的溶液中的单一肠胃外剂量组合物一起给予受试者，或将每种药剂以分开的肠胃外剂量配制品给予。当使用分开的剂量配制品时，可以在本质上相同的时间即同步，或在分开交错的时间即依次和以任何顺序给予组合物;组合疗法应理解为包括所有这些方案。

[0139] 还包括患者护理试剂盒，其包括选自EGFR抑制剂、MEK 1/2抑制剂和CDK 4/6抑制剂的两种或更多种(例如3、4、5、6种)药剂的组合。一些患者护理试剂盒包括EGFR抑制剂和

MEK 1/2抑制剂的组合，所述EGFR抑制剂和MEK 1/2抑制剂任选地作为分开的组合物或作为同一组合物的一部分。某些患者护理试剂盒包括EGFR抑制剂和CDK 4/6抑制剂的组合，所述EGFR抑制剂和CDK 4/6抑制剂任选地作为分开的组合物或作为同一组合物的一部分。某些患者护理试剂盒包括MEK 1/2抑制剂和CDK 4/6抑制剂的组合，所述MEK 1/2抑制剂和CDK 4/6抑制剂任选地作为分开的组合物或作为同一组合物的一部分。特定的患者护理试剂盒包括EGFR抑制剂、MEK 1/2抑制剂和CDK 4/6抑制剂的组合，所述EGFR抑制剂、MEK 1/2抑制剂和CDK 4/6抑制剂任选地作为分开的组合物或作为同一组合物的一部分。在特定的实施方案中，患者护理试剂盒包括选自表E1-E6中提供的组合的药剂组合，所述药剂任选地作为分开的组合物或作为同一组合物的一部分。

[0140] 本文的试剂盒还可包括一种或多种另外的治疗剂或其他适合或希望用于所治疗的适应症或所希望的诊断应用的组分。本文的试剂盒还可包括一个或多个注射器或其他协助预期递送方式所需或所希望的部件(例如支架、可植入贮存库等)。

[0141] 在一些实施方案中，患者护理试剂盒包含用于一种或多种组合物和一种或多种信息材料的分开的容器、分隔器或隔室。例如，可以将一种或多种组合物容纳于瓶子、小瓶或注射器中，并且可以将一种或多种信息材料与容器相关联而容纳。在一些实施方案中，试剂盒的单独元件容纳于单个未隔开的容器中。例如，组合物容纳于以标记形式附着有信息材料的瓶子、小瓶或注射器中。在一些实施方案中，试剂盒包括多个(例如，一包)单独的容器，每个容器包含本文所述的一种或多种药剂的一种或多种单位剂型(例如本文所述的剂型)。例如，试剂盒包括多个注射器、安瓿、铝箔包装或泡罩包装，每个均包含每种药剂的单个单位剂量。试剂盒的容器可以是气密的、防水的(例如不透水分或蒸发的变化)和/或不透光的。

[0142] 患者护理试剂盒任选地包括适合于给予组合物的装置，例如注射器、吸入器、滴管(例如滴眼管)、拭子(例如棉拭子或木质拭子)或任何这样的递送装置。在一些实施方案中，所述装置是可植入设备，其分配计量的剂量的一种或多种药剂。还包括例如通过组合本文所述的组分提供试剂盒的方法。

[0143] 本说明书中引用的所有出版物、专利申请和发布的专利均通过引用并入本文，就好像每个单独的出版物、专利申请或发布的专利均被明确地并单独地指出通过引用并入。

[0144] 尽管出于清楚理解的目的已经通过说明和实施例详细地描述了前述发明，但是根据本发明的传授内容，本领域普通技术人员将容易清楚的是，可以在不脱离所附权利要求的精神或范围的情况下对其进行某些改变和修改。仅通过说明的方式而不是通过限制的方式，提供以下实施例。本领域技术人员将容易认识到多种非关键参数，可以改变或修改这些参数以产生本质上相似的结果。

[0145] 实施例

[0146] 实施例1

[0147] 使用条件性重编程细胞池的离体药物测试

[0148] 来自结直肠癌患者、肝癌患者、肺癌患者、胰腺癌、胃癌患者和乳腺癌患者的手术样本均在获得患者共识后从北京肿瘤医院和中国医学科学院肿瘤医院获得。患者来源的异种移植肿瘤样本获得自Nod/SCID小鼠，所述小鼠接种了来自患者的手术肿瘤样本。

[0149] 对于离体药物敏感性测定，从患者组织样品或PDX异种移植肿瘤组织中分离肿瘤

细胞。简而言之，使用剪刀将肿瘤组织切成直径小于1mm的小块。将肿瘤片段转移到装有磁力搅拌棒的无菌100-ml三角玻璃烧瓶中。将含有0.25U/ml Liberase DH的10-15ml消化介质添加到切碎的肿瘤组织中以开始酶消化。将酶混合物在37℃在温和搅拌下孵育1-2小时。将消化的肿瘤组织通过100-μm细胞保持器过滤。将滤液通过40-μm细胞限制器重新过滤。收集保留在40-μm细胞限制器上的肿瘤细胞团，用HBSS洗涤两次，然后重悬浮于补充有几种干细胞生长因子的限定的生长培养基中。

[0150] 收集保留在40-μm细胞限制器上的肿瘤细胞团，用HBSS洗涤两次，然后重悬浮于补充有细胞生长因子和小分子抑制剂的限定的生长培养基中。在限定的生长培养基中过夜回收肿瘤细胞团。限定的生长培养基是StemPro® hESC SFM(限定的无血清和无饲养层的培养基(SFM))，补充有烟酰胺、Wnt3A、头蛋白(Noggin)(骨形态发生蛋白(BMP)抑制剂)、R-脊椎蛋白-1(Wnt/β-连环蛋白信号传导激动剂)和Y27632(Rho相关的含有卷曲螺旋的蛋白激酶(ROCK-1)抑制剂)。

[0151] 对于条件性重编程，将回收的CTOS解离成单个细胞，并在细胞培养板中以每孔约3000个细胞接种在饲养细胞/Rock抑制剂(Y27632)共培养系统中，并在37℃下生长3天。

[0152] 对于离体药物测试，将接种的肿瘤细胞暴露于单独的七种EGFR抑制剂、三种MEK 1/2抑制剂和三种CDK 4/6抑制剂，或EGFR抑制剂和MEK 1/2抑制剂的组合，EGFR抑制剂和CDK 4/6抑制剂的组合，MEK 1/2抑制剂和CDK 4/6抑制剂的组合，以及EGFR抑制剂、MEK 1/2抑制剂和CDK 4/6抑制剂的三重组合，持续72小时。更换新鲜培养基，将经处理的肿瘤细胞再次暴露于相同的药物或药物组合中，持续另外的72小时。所有药物均在DMSO中制备，并且DMSO在培养基中的最终浓度为0.1％。药物和药物组合的测试浓度为相关的AUC浓度(参见表E1)。

[0153]

表E1									
对照	对照	埃罗替尼	埃罗替尼	阿法替尼	阿法替尼	奥希替尼	奥希替尼	考比替尼	考比替尼
DMSO 0.2%	DMSO 0.5%	5	1	0.2	0.04	2	0.4	0.2	0.04
达拉非尼	达拉非尼	埃罗替尼＋达拉非尼	埃罗替尼＋达拉非尼	阿法替尼＋达拉非尼	阿法替尼＋达拉非尼	奥希替尼＋达拉非尼	奥希替尼＋达拉非尼	司美替尼	司美替尼
2	0.4	5＋2	1＋0.4	0.2＋2	0.04＋0.4	2＋2	0.4＋0.4	2	0.4
曲美替尼	曲美替尼	埃罗替尼＋曲美替尼	埃罗替尼＋曲美替尼	阿法替尼＋曲美替尼	阿法替尼＋曲美替尼	奥希替尼＋曲美替尼	奥希替尼＋曲美替尼	拉帕替尼	拉帕替尼
0.02	0.004	5＋0.02	1＋0.004	0.2＋0.02	0.04＋0.004	2＋0.02	0.4＋0.004	10	2
帕博西尼	帕博西尼	埃罗替尼＋帕博西尼	埃罗替尼＋帕博西尼	阿法替尼＋帕博西尼	阿法替尼＋帕博西尼	奥希替尼＋帕博西尼	奥希替尼＋帕博西尼	伏立诺他	伏立诺他
0.5	0.1	5＋0.5	1＋0.1	0.2＋0.5	0.04＋0.1	2＋0.5	0.4＋0.1	1	0.2
达拉非尼＋曲美替尼	达拉非尼＋曲美替尼	埃罗替尼＋达拉非尼＋曲美	埃罗替尼＋达拉非尼＋曲美	阿法替尼＋达拉非尼＋曲美	阿法替尼＋达拉非尼＋曲美	奥希替尼＋达拉非尼＋曲美	奥希替尼＋达拉非尼＋曲美	奥拉帕尼	奥拉帕尼

[0154]

		替尼	替尼	替尼	替尼	替尼	替尼		
2+0.02	0.4+0.004	5+2+0.02	1+0.4+0.004	0.2+2+0.02	0.04+0.4+0.004	2+2+0.02	0.4+0.4+0.004	10	2
达拉非尼+帕博西尼	达拉非尼+帕博西尼	埃罗替尼+达拉非尼+帕博西尼	埃罗替尼+达拉非尼+帕博西尼	阿法替尼+达拉非尼+帕博西尼	阿法替尼+达拉非尼+帕博西尼	奥希替尼+达拉非尼+帕博西尼	奥希替尼+达拉非尼+帕博西尼	依维莫司	依维莫司
2+0.5	0.4+0.1	5+2+0.5	1+0.4+0.1	0.2+2+0.5	0.04+0.4+0.1	2+2+0.5	0.4+0.4+0.1	0.03	0.006
曲美替尼+帕博西尼	曲美替尼+帕博西尼	埃罗替尼+曲美替尼+帕博西尼	埃罗替尼+曲美替尼+帕博西尼	阿法替尼+曲美替尼+帕博西尼	阿法替尼+曲美替尼+帕博西尼	奥希替尼+曲美替尼+帕博西尼	奥希替尼+曲美替尼+帕博西尼	克唑替尼	克唑替尼
0.02+0.5	0.004+0.1	5+0.02+0.5	1+0.004+0.1	0.2+0.02+0.5	0.04+0.004+0.1	2+0.02+0.5	0.4+0.004+0.1	0.3	0.06
达拉非尼+曲美替尼+帕博西尼	达拉非尼+曲美替尼+帕博西尼	埃罗替尼+达拉非尼+曲美替尼+帕博西尼	埃罗替尼+达拉非尼+曲美替尼+帕博西尼	阿法替尼+达拉非尼+曲美替尼+帕博西尼	阿法替尼+达拉非尼+曲美替尼+帕博西尼	奥希替尼+达拉非尼+曲美替尼+帕博西尼	奥希替尼+达拉非尼+曲美替尼+帕博西尼	奥希替尼+克唑替尼	奥希替尼+克唑替尼
2+0.02+0.5	0.4+0.004+0.1	5+2+0.02+0.5	1+0.4+0.004+0.1	0.2+2+0.02+0.5	0.04+0.4+0.004+0.1	2+2+0.02+0.5	0.4+0.4+0.004+0.1	2+0.3	0.4+0.06

[0155] 暴露于药物后,用5-乙炔基-2'-脱氧尿苷(Edu)标记上皮肿瘤细胞,以评估肿瘤细胞的增殖速率。在存在药物暴露的情况下,标记持续24小时。在对照组中,上皮肿瘤细胞未进行药物暴露,进行了培养基更换,但类似地用Edu标记。将经标记的肿瘤细胞固定,并在含有0.5%Triton X-100和3%BSA的封闭缓冲液中于4℃用Hoechst 33342染色过夜。将肿瘤细胞与EpCAM抗体(1:4000)在室温下孵育2小时,并用PBST冲洗。随后,将肿瘤细胞与Alexa Fluor®647缀合的山羊抗小鼠二抗在室温下孵育30分钟,并用PBST冲洗。

[0156] 通过Click-iT反应检测掺入的Edu,其中在黑暗中将固定细胞与含有1X Click-iT Edu反应缓冲液、CuSO4和叠氮化物缀合的Alexa Fluor染料的反应混合物一起孵育。将染色的细胞用PBS洗涤两次,然后进行图像采集和分析。

[0157] 为了进行图像采集和分析,将染色的肿瘤细胞通过高内涵筛选(HCS)平台(Thermo Scientific CellomicsArrayScanXTi HCS读取仪)进行成像。10倍物镜用于收集图像。对于每个孔,成像二十五个视野以进行分析。从图像中,从HCS读取仪获得了三个荧光信号。蓝色荧光信号记录被Hoechst 33342染色的细胞核信号,绿色荧光信号检测新合成的DNA中掺入的Edu,并且红色荧光信号检测EpCAM阳性上皮细胞群(参见图1)。

[0158] 使用EpCAM和Edu阳性读数计算MI(最大抑制指数)(参见下表E2和表E3)。

表E2

患者ID	癌症类型	对照EdU+	E	E+D	E+T	E+P	E+D+T	E+D+P	E+T+P	E+D+T+P	E+C
NYL-102	结肠	5876	11.79	3.34	123.96	30.18	58.82	19.99	309.74	172.72	20.59
NYL-081	结肠	16127	0.76	1.68	15.55	6.83	2.75	2.44	238.92	39.24	0.72
NYL-088	肝	15032	61.79	11.63	5693.89	983.12	222.30	223.29	13918.39	9954.87	126.96
CKY-016	结肠	3095	2.32	3.24	271.22	10.27	20.73	8.99	87.49	49.63	1.74
NYL-HZ-002	结肠	3047	49.07	24.67	192.60	447.43	111.37	219.84	447.00	447.00	50.03
ZKB-171	结肠	8605	13.50	5.22	39.21	123.10	87.79	10.41	907.67	220.07	39.08
NYL-109	结肠	3810	67.63	21.85	451.43	1085.49	254.00	449.30	1085.00	1085.00	101.57
NYL-178	结肠	19624	1.82	2.15	2.69	10.25	4.46	7.07	214.47	279.07	
NYL-JN-025	结肠	5065	7.79	4.57	115.97	8.60	21.49	15.83	107.09	80.15	13.40
NYL-149	结肠	1498	2.18	2.95	140.79	6.18	10.77	5.20	561.03	50.59	3.82
NYL-161	结肠	27848	5.35	3.44	7.86	49.45	6.80	28.37	174.98	229.54	6.47
NYL-132	结肠	25722	1.19	9.37	110.04	2.69	956.90	42.00	440.44	813.97	
NYL-113	结肠	15034	3.58	2.77	65.15	32.23	21.23	9.95	239.78	124.20	
NYL-170	结肠	4512	0.81	1.20	3.83	2.14	1.46	1.70	38.92	13.11	0.77
ZKB-070	结肠	4765	18.49	7.78	55.34	1430.91	34.59	172.96	5015.73	5015.73	25.58
NYP-006	胃	1236	2.07	0.98	1.22	1.85	1.06	1.55	9.49	9.60	1.30

[0159]

[0160]

NYL-040	结肠	6000	10.06	8.74	64.88	194.75	39.67	144.94	2069.08	586.54	11.95
ZKB-007	结肠	6871	18.18	9.20	55.93	1861.97	38.94	302.41	6871.00	6871.00	33.29
ZKB-165	胃	3984	0.65	0.85	6.48	32.57	3.40	24.17	257.38	320.02	0.65
ZKB-011	胰腺	12746	2.54	1.99	7.39	13.43	3.62	7.36	171.41	78.59	2.62
NYL-053	结肠	13107	11.48	7.45	84.80	143.21	16.96	36.64	1040.23	255.79	42.40
NYL-171	肺	3471	7.97	3.33	155.25	158.08	13.65	26.95	3337.84	396.73	11.77
E，EGFR抑制剂；D，BRAF抑制剂；T，MEK1/2抑制剂；P CDK4/6抑制剂；C, c-MET抑制剂											

[0161]

表E3

患者ID	癌症类型	对照EdU+	D	T	P	D+T	D+P	T+P	D+T+P
NYL-102	结肠	5876				1.81	2.58	4.44	2.83
NYL-081	结肠	16127				0.93	2.18	5.68	2.63
NYL-088	肝	15032				1.39	2.69	2.81	1.39
CKY-016	结肠	3095				4.43	3.20	98.06	17.12
NYL-HZ-002	结肠	3047	0.83	2.06	2.10	2.02	2.08	4.11	3.40
CKY-041	结肠	12553		1.05	1.10	0.90	1.64	1.01	1.14
ZKB-171	结肠	8605	1.18	1.85	1.43	1.46	1.81	3.92	2.77
NYL-109	结肠	3810	1.52	7.57	1.68	5.45	1.41	6.46	3.42
NYL-178	结肠	19624							
NYL-JN-025	结肠	5065				3.56	3.13	4.37	4.13
NYL-149	结肠	1498	4.01	4.13	2.35	0.59	5.23	4.28	1.59
NYL-161	结肠	27848	0.94	1.01	1.35	0.96	1.39	1.43	1.62
NYL-132	结肠	25722	1.42	1.42	1.94	2.45	2.88	2.40	3.97
NYL-113	结肠	15034	0.96	1.86	1.79	1.12	1.21	3.98	1.88
NYL-170	结肠	4512	2.11	0.61	3.09	0.51	5.68	0.89	0.93

[0162]

ZKB-070	结肠	4765	1.18	0.74	4.35	0.73	3.29	1.72	1.23
NYP-006	胃	1236	0.47	0.55	2.89	0.35	1.16	0.86	0.79
NYL-040	结肠	6000	1.08	0.85	6.68	0.57	4.82	3.02	2.99
ZKB-007	结肠	6871	0.91	0.76	3.00	0.69	2.93	2.37	1.60
ZKB-165	胃	3984	1.83	0.60	7.38	0.63	9.15	8.00	13.40
ZKB-011	胰腺	12746	1.00	1.08	6.85	0.73	5.44	20.42	17.06
NYL-053	结肠	13107	1.10	1.96	2.71	1.36	1.90	5.00	2.48
E，EGFR抑制剂；D，BRAF抑制剂；T，MEK1/2抑制剂；P CDK4/6抑制剂；C, c-MET抑制剂									

[0163] MI(最大抑制指数)＝对照中的Edu阳性细胞/处理中的Edu阳性细胞。

[0164] 使用EpCAM和Edu阳性读数如下计算抑制百分比(参见下表E4和表E5)。

[0165]

表E4

患者ID	癌症类型	对照EdU+	E	E+D	E+T	E+P	E+D+T	E+D+P	E+T+P	E+D+T+P	E+C
NYL-102	结肠	5876									
NYL-081	结肠	16127	91.52%	70.03%	99.19%	96.69%	98.30%	95.00%	99.68%	99.42%	95.14%
NYL-088	肝	15032	0.00%	40.42%	93.57%	85.37%	63.59%	58.97%	99.58%	97.45%	0.00%
CKY-016	结肠	3095	98.38%	91.40%	99.98%	99.90%	99.55%	99.55%	99.99%	99.99%	99.21%
NYL-HZ-002	结肠	3047	56.85%	69.12%	99.63%	90.27%	95.18%	88.87%	98.86%	97.99%	42.66%
CKY-041	结肠	12553	97.96%	95.95%	99.48%	99.78%	99.10%	99.55%	99.78%	99.78%	98.00%
ZKB-171	结肠	8605	0.00%	100.00%	77.58%	70.98%	59.45%	39.82%	96.07%	79.35%	0.00%
NYL-109	结肠	3810	92.59%	80.85%	97.45%	99.19%	98.86%	90.40%	99.89%	99.55%	97.44%
NYL-178	结肠	19624	98.52%	95.42%	99.78%	99.91%	99.61%	99.78%	99.91%	99.91%	99.02%
NYL-JN-025	结肠	5065	45.19%	53.44%	62.79%	90.24%	77.60%	85.86%	99.53%	99.64%	
NYL-149	结肠	1498	87.17%	78.10%	99.14%	88.38%	95.35%	93.68%	99.07%	98.75%	92.54%
NYL-161	结肠	27848	54.23%	66.12%	99.29%	83.82%	90.72%	80.78%	99.82%	98.02%	73.82%

[0166]

NYL-132	结肠	25722	81.30%	70.90%	87.27%	97.98%	85.30%	96.47%	99.43%	99.56%	84.55%
NYL-113	结肠	15034	15.74%	89.33%	99.09%	62.77%	99.90%	97.62%	99.77%	99.88%	
NYL-170	结肠	4512	72.06%	63.84%	98.47%	96.90%	95.29%	89.95%	99.58%	99.19%	
ZKB-070	结肠	4765	0.00%	16.37%	73.87%	53.16%	31.43%	41.25%	97.43%	92.37%	0.00%
NYP-006	胃	1236	94.59%	87.15%	98.19%	99.93%	97.11%	99.42%	99.98%	99.98%	96.09%
NYL-040	结肠	6000	51.75%	-2.54%	18.31%	46.01%	5.55%	35.42%	89.46%	89.58%	23.26%
ZKB-007	结肠	6871	90.06%	88.56%	98.46%	99.49%	97.48%	99.31%	99.95%	99.83%	91.63%
ZKB-165	胃	3984	94.50%	89.13%	98.21%	99.95%	97.43%	99.67%	99.99%	99.99%	97.00%
ZKB-011	胰腺	12746	0.00%	0.00%	84.57%	96.93%	70.61%	95.86%	99.61%	99.69%	0.00%
NYL-053	结肠	13107	60.61%	49.87%	86.46%	92.55%	72.39%	86.41%	99.42%	98.73%	61.79%
E，EGFR抑制剂；D，BRAF抑制剂；T，MEK1/2抑制剂；P CDK4/6抑制剂；C, c-MET抑制剂											

[0167]

表E5

患者ID	癌症类型	对照EdU+	D	T	P	D+T	D+P	T+P	D+T+P
NYL-102	结肠	5876				44.87%	61.27%	77.49%	64.68%
NYL-081	结肠	16127				0.00%	54.05%	82.38%	61.97%
NYL-088	肝	15032				27.88%	62.76%	64.39%	27.80%
CKY-016	结肠	3095				77.43%	68.76%	98.98%	94.16%
NYL-HZ-002	结肠	3047	0.00%	51.53%	52.48%	50.56%	51.99%	75.66%	70.61%
CKY-041	结肠	12553		5.05%	9.05%	0.00%	39.07%	0.56%	12.42%
ZKB-171	结肠	8605	15.07%	46.02%	30.13%	31.67%	44.81%	74.51%	63.87%
NYL-109	结肠	3810	34.25%	86.79%	40.42%	81.65%	28.85%	84.52%	70.73%
NYL-178	结肠	19624							

[0168]

NYL-JN-025	结肠	5065				71.95%	68.06%	77.12%	75.78%
NYL-149	结肠	1498	75.06%	75.78%	57.40%	0.00%	80.86%	76.61%	37.06%
NYL-161	结肠	27848	-6.33%	0.59%	26.16%	0.00%	27.82%	30.25%	38.17%
NYL-132	结肠	25722	29.59%	29.60%	48.53%	59.20%	65.24%	58.39%	74.82%
NYL-113	结肠	15034	-3.84%	46.31%	44.25%	10.74%	17.53%	74.90%	46.70%
NYL-170	结肠	4512	52.58%	0.00%	67.64%	0.00%	82.40%	0.00%	0.00%
ZKB-070	结肠	4765	15.53%	-34.50%	77.00%	0.00%	69.60%	41.91%	18.51%
NYP-006	胃	1236	0.00%	0.00%	65.36%	0.00%	13.84%	0.00%	0.00%
NYL-040	结肠	6000	7.18%	0.00%	85.02%	0.00%	79.24%	66.85%	66.51%
ZKB-007	结肠	6871	0.00%	0.00%	66.72%	0.00%	65.86%	57.89%	37.46%
ZKB-165	胃	3984	45.31%	0.00%	86.45%	0.00%	89.07%	87.51%	92.54%
ZKB-011	胰腺	12746	0.00%	7.36%	85.40%	0.00%	81.61%	95.10%	94.14%
NYL-053	结肠	13107	9.11%	49.02%	63.04%	26.59%	47.25%	79.99%	59.60%
E，EGFR抑制剂；D，BRAF抑制剂；T，MEK1/2抑制剂；P CDK4/6抑制剂；C, c-MET抑制剂									

[0169] 药物A的抑制百分比(AI)＝1-A处理中的Edu阳性细胞/对照中的Edu阳性细胞。

[0170] 药物AB的抑制百分比(ABI)＝1-AB处理中的Edu阳性细胞/对照中的Edu阳性细胞。

[0171] 药物ABC的抑制百分比(ABCI)＝1-ABC处理中的Edu阳性细胞/对照中的Edu阳性细胞。

[0172] 在基于作用的策略下使用Bliss独立模型计算药物组合在AUC浓度下的组合指数(参见下表E6)。

[0173]

表E6

患者ID	癌症类型	E+D	E+T	E+P	E+D+T	E+D+P	E+T+P	E+D+T+P	E+C	D+T	D+P	T+P	D+T+P
NY	结肠	1.9	0.5	0.2	0.9	0.4	0.4	0.4	0.9	1.0	1.0	1.0	1.28

[0174]

L-HZ-002		9	3	3	1	7	8	8	8	2	1	6	
CKY-041	结肠		0.24	0.32			0.05		1.00			1.15	
ZKB-171	结肠	3.04	0.64	0.16	0.34	2.18	0.04	0.19	0.40	1.49	0.93	0.68	1.13
NYL-109	结肠	4.71	1.13	0.10	3.06	0.38	0.79	1.20	0.97	2.11	1.82	1.97	5.65
NYL-149	结肠	2.97	0.06	0.83	3.36	3.95	0.04	1.68	0.57	16.56	1.80	2.27	24.46
NYL-161	结肠	1.56	0.68	0.15	0.79	0.26	0.04	0.03	0.83	1.01	0.98	0.95	0.84
NYL-132	结肠	0.18	0.02	0.86	0.00	0.08	0.01	0.01		0.82	0.96	1.15	0.99
NYL-113	结肠	1.29	0.10	0.20	0.31	0.65	0.05	0.10		1.66	1.48	0.84	1.78
NYL-170	结肠	1.76	0.26	1.45	1.45	3.83	0.08	0.50	1.00	2.11	1.15	3.09	6.52
ZKB-070	结肠	2.81	0.33	0.06	0.63	0.55	0.02	0.02	0.72	1.18	1.56	2.53	4.19
NYP-006	胃	2.07	1.69	3.23	1.96	3.86	0.63	0.62	1.59	1.00	2.49	2.89	2.89
NYL-040	结肠	1.24	0.16	0.34	0.27	0.50	0.03	0.12	0.84	1.08	1.49	2.21	2.41
ZKB-007	结肠	1.98	0.33	0.03	0.47	0.18	0.01	0.01	0.60	1.00	1.03	1.27	1.88
ZKB-165	胃	1.83	0.15	0.23	0.54	0.56	0.03	0.04	1.31	1.83	1.47	0.92	1.01
ZKB-011	胰腺	1.27	0.37	1.29	0.76	2.36	0.11	0.24	1.03	1.08	1.26	0.36	0.43
NYL-053	结肠	1.70	0.27	0.22	1.46	0.93	0.06	0.26	0.39	1.58	1.57	1.06	2.36
NYL-171	肺	3.71	0.05	0.15	0.95	1.33	0.01	0.10	0.74	1.63	1.55	1.02	2.13

[0175]

E，EGFR抑制剂；D，BRAF抑制剂；T，MEK1/2抑制剂；P CDK4/6抑制剂；C,c-MET抑制剂

[0176] CI(AB)＝(AI+BI-AI*BI)/(ABI)。

[0177] 在基于作用的策略下,使用Bliss独立模型计算药物三重组合在AUC浓度下的组合指数。

[0178] CI(ABC)＝(AI+BI+CI-AI*BI-AI*CI-BI*CI+AI*BI*CI)/(ABCI)

[0179] 如果CI<1,则A和B的组合是协同的。

[0180] 如果CI＝1,则A和B的组合是累加的。

[0181] 如果CI>1,则A和B的组合是拮抗的。

[0182] 这些结果指示,EGFR、MEK 1/2和/或CDK 4/6抑制剂的各种组合在各种组织(包括结肠、胃、胰腺和肺组织等)的原发性肿瘤细胞的离体模型中提供了显著增加的(例如协同增加的)肿瘤细胞杀伤活性。

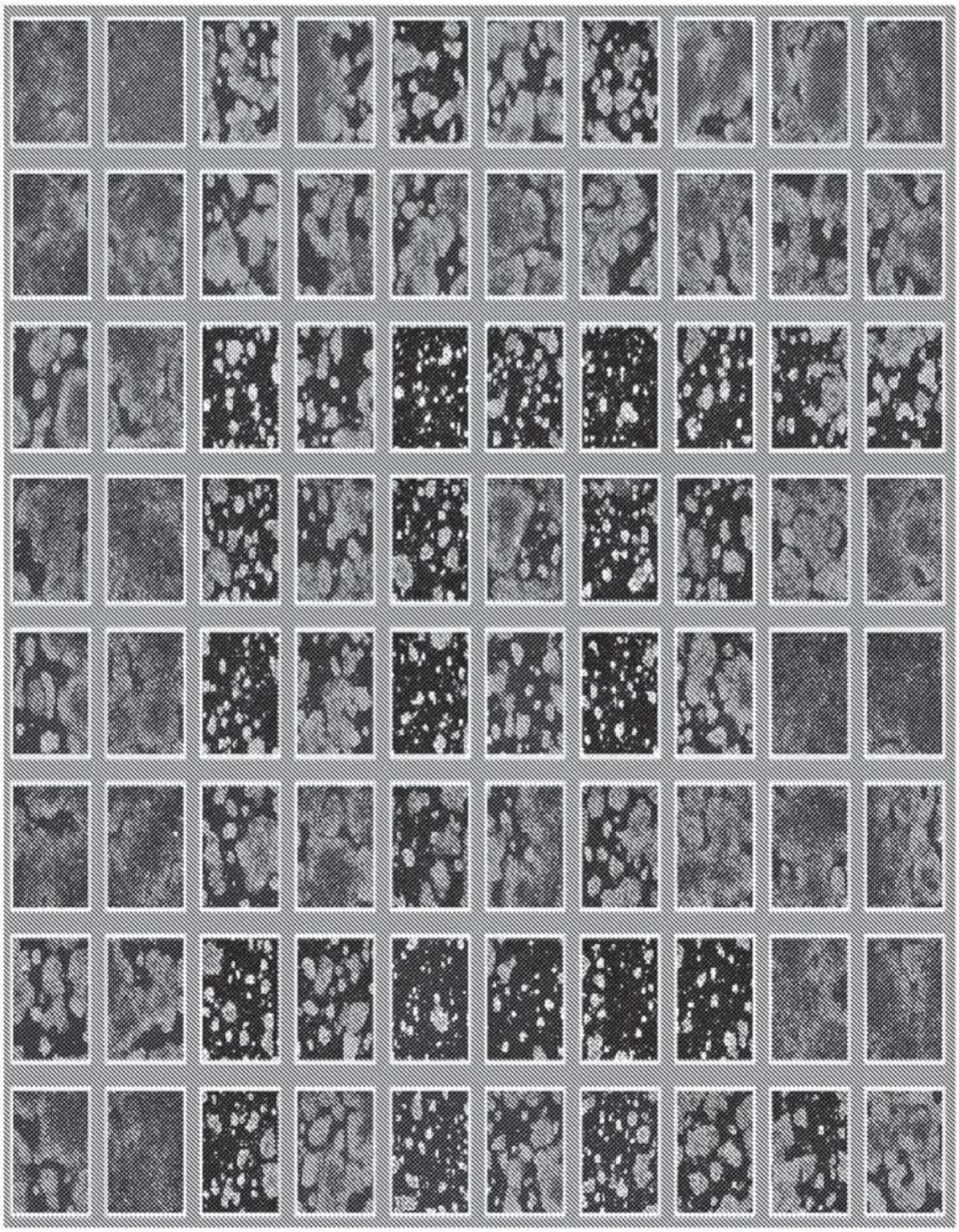


图1