



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 119365489 A

(43) 申请公布日 2025. 01. 24

(21) 申请号 202380042671.1

(22) 申请日 2023.04.07

(30) 优先权数据

63/328,951 2022.04.08 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.11.25

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2023/065489 2023.04.07

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/196943 EN 2023.10.12

(71) 申请人 印希比生物科学有限公司

地址 美国加利福利亚州

(72) 发明人 W·克拉戈 B·P·埃克尔曼

K·M·威利斯

(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

专利代理师 封新琴

(51) Int.Cl.

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

权利要求书4页 说明书42页

序列表(电子公布) 附图113页

(54) 发明名称

DR5激动剂与PLK1抑制剂或CDK抑制剂组合
疗法

(57) 摘要

本文提供了用DR5激动剂和PLK1抑制剂的组
合治疗癌症的方法。本文还提供了用DR5激动剂
和CDK抑制剂的组合治疗癌症的方法。

1. 一种治疗有需要的受试者的癌症的方法,所述方法包括向所述受试者施用(a)死亡受体5(DR5)激动剂和(b)Polo样激酶1(PLK1)抑制剂。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述DR5激动剂是INBRX-109、依托奈明 α (ABBV-621)、IGM-8444(IGM Biosciences)、BI 905711(Boehringer Ingelheim)、GEN1029(HexaBody®-DR5/DR5; Genmab)、TAS266(Novartis)、MM-201a(Merrimack Pharmaceuticals)或MM201-b(Merrimack Pharmaceuticals)。

3. 根据权利要求2所述的方法,其中所述DR5激动剂是INBRX-109。

4. 根据权利要求1所述的方法,其中所述DR5激动剂是DR5结合多肽。

5. 根据权利要求4所述的方法,其中所述DR5结合多肽是至少四价的。

6. 根据权利要求3-5中任一项所述的方法,其中所述DR5结合多肽包含至少一个VHH结构域,所述至少一个VHH结构域包含含有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的CDR1、含有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的CDR2和含有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的CDR3。

7. 根据权利要求6所述的方法,其中所述至少一个VHH结构域包含与SEQ ID NO:4的氨基酸序列至少90%、至少95%、至少99%或100%相同的氨基酸序列。

8. 根据权利要求3-7中任一项所述的方法,其中所述DR5结合多肽包含VHH结构域,所述VHH结构域包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列。

9. 根据权利要求3-8中任一项所述的方法,其中所述DR5结合多肽包含Fc区。

10. 根据权利要求9所述的方法,其中所述Fc区包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列。

11. 根据权利要求3-10中任一项所述的方法,其中所述DR5结合多肽具有结构VHH-接头-VHH-接头-Fc。

12. 根据权利要求3-11中任一项所述的方法,其中每个VHH结构域包含含有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的CDR1、含有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的CDR2和含有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的CDR3。

13. 根据权利要求3-12中任一项所述的方法,其中所述VHH-接头-VHH包含与SEQ ID NO:5的氨基酸序列至少90%、至少95%、至少99%或100%相同的氨基酸序列。

14. 根据权利要求13所述的方法,其中所述VHH-接头-VHH包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列。

15. 根据权利要求3-14中任一项所述的方法,其中所述DR5结合多肽包含与SEQ ID NO:7的氨基酸序列至少90%、至少95%、至少99%或100%相同的氨基酸序列。

16. 根据权利要求3-15中任一项所述的方法,其中所述DR5结合多肽包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列。

17. 根据权利要求3-15中任一项所述的方法,其中所述DR5结合多肽由SEQ ID NO:7的氨基酸序列组成。

18. 根据权利要求1-17中任一项所述的方法,其中所述PLK1抑制剂是小分子或干扰RNA(siRNA)。

19. 根据权利要求1-18中任一项所述的方法,其中所述PLK1抑制剂是安文塞替、伏拉塞替、瑞格塞替、BI2536(Boehringer Ingelheim)、N-[[4-[(6-氯-3-吡啶基)甲氧基]-3-甲氧基苯基]甲基]-3,4-二甲氧基苯乙胺盐酸盐(SBE 13HC1)、MLN0905(Takeda Oncology)、GSK461364(GlaxoSmithKline)、波洛辛、波洛辛-2HT、R03280(CAS号1062243-51-9)、HMN-

214 (CAS号173529-46-9)、HMN-176 (CAS号173529-10-7)、2-氰基-2-[3-乙基-4-氧代-5-[[3-(2-吡咯烷-1-基乙基)苯胺基]甲基]-1,3-噻唑烷-2-基]-N-(2,2,2-三氟乙基)乙酰胺(ZK-噻唑啉酮)或环波林9 (CAS号40533-25-3)、5-(5,6-二甲氧基-1H-苯并咪唑-1-基)-3-[[2-(三氟甲基)苯基]甲氧基]-2-噻吩甲酰胺(GW 843682X)。

20. 根据权利要求19所述的方法,其中所述PLK1抑制剂是安文塞替、伏拉塞替、瑞格塞替、BI2536 (Boehringer Ingelheim)、MLN0905 (Takeda Oncology)、GSK461364 (GlaxoSmithKline)、CYC140 (Cyclacel)、TKM-080301 (TKM-PLK1; Arbutus Biopharma) 或 TAK-960 (Takeda Pharmaceutical Company)。

21. 根据权利要求1-18中任一项所述的方法,其中所述PLK1抑制剂是安文塞替。

22. 根据权利要求1-21中任一项所述的方法,其中将所述DR5激动剂和所述PLK1抑制剂分开施用。

23. 根据权利要求22所述的方法,其中将所述DR5激动剂和所述PLK1抑制剂依序施用。

24. 根据权利要求22或23所述的方法,其中在所述PLK1抑制剂之前施用至少一个剂量或第一剂量的所述DR5激动剂。

25. 根据权利要求22或23所述的方法,其中在所述PLK1抑制剂之后施用至少一个剂量或第一剂量的所述DR5激动剂。

26. 根据权利要求1-21中任一项所述的方法,其中将所述DR5激动剂和所述PLK1抑制剂并行施用。

27. 根据权利要求1-26中任一项所述的方法,其中所述DR5激动剂和所述PLK1抑制剂协同作用。

28. 根据权利要求27所述的方法,其中在体外细胞存活测定中测定协同作用。

29. 根据权利要求1-28中任一项所述的方法,其中与单独施用的每种药剂相比,所述DR5激动剂和所述PLK1抑制剂的施用导致协同效应。

30. 一种治疗有需要的受试者的癌症的方法,所述方法包括向所述受试者施用(a) 死亡受体5 (DR5) 激动剂和(b) 细胞周期蛋白依赖性激酶 (CDK) 抑制剂。

31. 根据权利要求30所述的方法,其中所述DR5激动剂是INBRX-109、依托奈明 α (ABBV-621)、IGM-8444 (IGM Biosciences)、BI 905711 (Boehringer Ingelheim)、GEN1029 (HexaBody® - DR5/DR5; Genmab)、TAS266 (Novartis)、MM-201a (Merrimack Pharmaceuticals) 或MM201-b (Merrimack Pharmaceuticals)。

32. 根据权利要求31所述的方法,其中所述DR5激动剂是INBRX-109。

33. 根据权利要求30所述的方法,其中所述DR5激动剂是DR5结合多肽。

34. 根据权利要求33所述的方法,其中所述DR5结合多肽是至少四价的。

35. 根据权利要求32-34中任一项所述的方法,其中所述DR5结合多肽包含至少一个VHH结构域,所述至少一个VHH结构域包含含有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的CDR1、含有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的CDR2和含有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的CDR3。

36. 根据权利要求35所述的方法,其中所述至少一个VHH结构域包含与SEQ ID NO:4的氨基酸序列至少90%、至少95%、至少99%或100%相同的氨基酸序列。

37. 根据权利要求32-36中任一项所述的方法,其中所述DR5结合多肽包含VHH结构域,所述VHH结构域包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列。

38. 根据权利要求32-37中任一项所述的方法,其中所述DR5结合多肽包含Fc区。
39. 根据权利要求38所述的方法,其中所述Fc区包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列。
40. 根据权利要求32-39中任一项所述的方法,其中所述DR5结合多肽具有结构VHH-接头-VHH-接头-Fc。
41. 根据权利要求32-40中任一项所述的方法,其中每个VHH结构域包含含有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的CDR1、含有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的CDR2和含有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的CDR3。
42. 根据权利要求32-41中任一项所述的方法,其中所述VHH-接头-VHH包含与SEQ ID NO:5的氨基酸序列至少90%、至少95%、至少99%或100%相同的氨基酸序列。
43. 根据权利要求42所述的方法,其中所述VHH-接头-VHH包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列。
44. 根据权利要求32-43中任一项所述的方法,其中所述DR5结合多肽包含与SEQ ID NO:7的氨基酸序列至少90%、至少95%、至少99%或100%相同的氨基酸序列。
45. 根据权利要求32-44中任一项所述的方法,其中所述DR5结合多肽包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列。
46. 根据权利要求32-44中任一项所述的方法,其中所述DR5结合多肽由SEQ ID NO:7的氨基酸序列组成。
47. 根据权利要求30-46中任一项所述的方法,其中所述CDK抑制剂是CDK9抑制剂。
48. 根据权利要求30-47中任一项所述的方法,其中所述CDK抑制剂是小分子。
49. 根据权利要求30-48中任一项所述的方法,其中所述CDK抑制剂是夫拉平度、瑟利西利、迪尼西利、奥妥西利、艾尼西利、AZD4573、i-CDK9或NVP-2。
50. 根据权利要求49中任一项所述的方法,其中所述CDK抑制剂是迪尼西利、NVP-2、夫拉平度、艾尼西利或AZD4573。
51. 根据权利要求30-50中任一项所述的方法,其中将所述DR5激动剂和所述CDK抑制剂分开施用。
52. 根据权利要求51所述的方法,其中将所述DR5激动剂和所述CDK抑制剂依序施用。
53. 根据权利要求51或52所述的方法,其中在所述CDK抑制剂之前施用至少一个剂量或第一剂量的所述DR5激动剂。
54. 根据权利要求51或52所述的方法,其中在所述CDK抑制剂之后施用至少一个剂量或第一剂量的所述DR5激动剂。
55. 根据权利要求30-51中任一项所述的方法,其中将所述DR5激动剂和所述CDK抑制剂并行施用。
56. 根据权利要求30-55中任一项所述的方法,其中所述DR5激动剂和所述CDK抑制剂协同作用。
57. 根据权利要求56所述的方法,其中在体外细胞存活测定中测定协同作用。
58. 根据权利要求30-57中任一项所述的方法,其中与单独施用的每种药剂相比,所述DR5激动剂和所述CDK抑制剂的施用导致协同效应。
59. 根据权利要求1-58中任一项所述的方法,其中所述癌症是肾上腺癌;星形细胞瘤;基底细胞癌;胆道癌;膀胱癌;骨癌;脑和中枢神经系统癌症;乳腺癌;腹膜癌;宫颈癌;绒毛

膜癌;软骨肉瘤;尤因肉瘤;结肠直肠癌(结直肠癌);结缔组织癌;消化系统癌症;子宫内膜癌;食道癌;眼癌;头颈癌;胃癌;胃肠癌;胶质母细胞瘤;肝癌;肝细胞瘤;上皮内瘤;肾脏癌或肾癌;喉癌;白血病;肝脏癌症;肺癌;小细胞肺癌;非小细胞肺癌;肺腺癌;肺鳞癌;黑色素瘤;骨髓瘤;神经母细胞瘤;口腔癌(唇、舌、口和/或咽);卵巢癌;胰腺癌,如胰腺腺癌;脑垂体癌;前列腺癌;视网膜母细胞瘤;横纹肌肉瘤;直肠癌;呼吸系统癌症;间皮瘤;唾液腺癌;肉瘤;皮肤癌;鳞状细胞癌;胃癌;睾丸癌;甲状腺癌;子宫或子宫内膜癌;泌尿系统癌症;和外阴癌;淋巴瘤;霍奇金淋巴瘤;非霍奇金淋巴瘤;B细胞淋巴瘤;低分级/滤泡性非霍奇金淋巴瘤(NHL);小淋巴细胞(SL)NHL;中分级/滤泡性NHL;中分级弥漫性NHL;高分级免疫母细胞NHL;高分级淋巴母细胞NHL;高分级小无核裂细胞NHL;大肿块NHL;套细胞淋巴瘤;艾滋病相关淋巴瘤;华氏巨球蛋白血症;慢性淋巴细胞白血病(CLL);急性成淋巴细胞性白血病(ALL);毛细胞白血病;慢性骨髓细胞性白血病;以及其他癌和肉瘤;以及移植后淋巴增殖性疾病(PTLD),以及与斑痣性错构瘤病相关的异常血管增生,水肿(如与脑肿瘤相关的水肿),以及梅格斯综合征。

60.一种用于在治疗癌症的方法中使用的DR5激动剂,其中所述方法包括施用所述DR5激动剂与PLK1抑制剂的组合。

61.DR5激动剂在制造用于治疗癌症的药剂中的用途,其中所述药剂用于与PLK1抑制剂一起施用。

62.一种用于在治疗癌症的方法中使用的DR5激动剂,其中所述方法包括施用所述DR5激动剂与CDK抑制剂如CDK9抑制剂的组合。

63.DR5激动剂在制造用于治疗癌症的药剂中的用途,其中所述药剂用于与CDK抑制剂如CDK9抑制剂一起施用。

DR5激动剂与PLK1抑制剂或CDK抑制剂组合疗法

相关申请的交叉引用

[0001] 本申请要求2022年4月8日提交的美国临时申请号63/328,951的优先权权益,将所述临时申请出于任何目的通过引用以其整体并入本文。

技术领域

[0002] 本发明涉及用DR5激动剂和PLK1抑制剂的组合或DR5激动剂和CDK抑制剂(如CDK9抑制剂)的组合治疗癌症。

背景技术

[0003] 死亡受体5(DR5;也称为TNFRSF10B或TRAILR2)是TNF受体超家族(TNFRSF)的成员,并且是TNF受体超家族中结合TNF相关细胞凋亡诱导配体(TRAIL)的细胞表面受体。TRAIL通过选择性地从健康细胞群中根除不需要的、受感染的和恶性的细胞,在哺乳动物发育和宿主防御中发挥重要作用。在结合TNF受体家族成员DR4或DR5时,TRAIL通过半胱天冬酶依赖性凋亡诱导细胞凋亡。DR5显现是肿瘤细胞上的主要受体,促进观察到的TRAIL途径的肿瘤偏向活性。DR5被天然配体TRAIL激活,TRAIL使三个DR5受体紧密接近,从而激活细胞内半胱天冬酶-8并启动其他诱导死亡的半胱天冬酶(如半胱天冬酶-9和半胱天冬酶-3)的激活。因此,启动这种细胞死亡途径需要DR5受体的聚集来实现高效的细胞死亡。DR5激动剂是用于治疗癌症的有希望的治疗性候选物。

[0004] Polo样激酶属于有丝分裂丝氨酸/苏氨酸激酶家族,其参与细胞周期进程、中心体周期、有丝分裂和对DNA损伤的细胞应答。迄今为止,已经在哺乳动物细胞中鉴定了五种polo样激酶:PLK1、PLK2、PLK3、PLK4和PLK5。Polo样激酶在许多真核细胞中高度保守,并且特征在于N末端丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶结构域(PLK5除外)以及一个或两个称为polo盒(PB)的具有相似性的C末端区域的存在。在polo样激酶家族成员中,PLK1是表征最充分的。PLK1在细胞周期进程和有丝分裂的不同阶段(包括有丝分裂进入、G2/M检查点、纺锤体组装成熟、染色体分离和有丝分裂退出)发挥作用。PLK1在几种肿瘤类型中过表达,并且显现出导致增殖增强。其在大多数正常成人组织中几乎检测不到。PLK1抑制阻止细胞增殖并且引起有丝分裂灾难,使其成为治疗癌症的治疗性靶标。

[0005] 细胞周期蛋白依赖性激酶(CDK)是由调节性细胞周期蛋白激活的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶。人基因组编码二十个CDK,其响应于细胞内和细胞外信号在许多细胞过程(如细胞分裂和转录)中发挥特定作用。CDK9是转录的调节剂,并且被某些癌细胞利用来用于蛋白质的恒定产生以维持癌细胞存活。CDK9与其主要的细胞周期蛋白伴侣(细胞周期蛋白T1)结合形成正转录延伸因子b(P-TEFb),正转录延伸因子b在真核细胞中的主要功能是通过将RNA聚合酶II(RNAP II)的C末端结构域(CTD)处的YSPTSPS串联重复序列的S2残基磷酸化介导新生mRNA链的转录延伸。CDK9对于髓样细胞白血病1(MCL-1)的表达是必需的。CDK9途径的失调涉及大量癌症类型的预后和对抗癌治疗剂的耐药性,使其成为治疗癌症的治疗性靶标。

发明内容

[0006] 本文提供了用死亡受体5 (DR5) 激动剂和Polo样激酶1 (PLK1) 抑制剂治疗受试者的癌症的方法。在一些实施方案中,所述方法包括施用多价死亡受体5 (DR5) 结合多肽和Polo样激酶1 (PLK1) 抑制剂。本文还提供了用死亡受体5 (DR5) 激动剂和细胞周期蛋白依赖性激酶9 (CDK9) 抑制剂治疗受试者的癌症的方法。在一些实施方案中,所述方法包括施用多价死亡受体5 (DR5) 结合多肽和CDK9抑制剂。在一些实施方案中,所述多价DR5结合多肽是至少四价的。在各种实施方案中,所述DR5结合多肽是DR5激动剂。

实施方案1.一种治疗有需要的受试者的癌症的方法,所述方法包括向所述受试者施用(a)死亡受体5 (DR5) 激动剂和(b)Polo样激酶1 (PLK1) 抑制剂。

实施方案2.根据实施方案1所述的方法,其中所述DR5激动剂是INBRX-109、依托奈明 α (eftozanermin alfa) (ABBV-621)、IGM-8444 (IGM Biosciences)、BI 905711 (Boehringer Ingelheim)、GEN1029 (HexaBody®-DR5/DR5; Genmab)、TAS266 (Novartis)、MM-201a (Merrimack Pharmaceuticals) 或MM201-b (Merrimack Pharmaceuticals)。

实施方案3.根据实施方案2所述的方法,其中所述DR5激动剂是INBRX-109。

实施方案4.根据实施方案1所述的方法,其中所述DR5激动剂是DR5结合多肽。

实施方案5.根据实施方案4所述的方法,其中所述DR5结合多肽是至少四价的。

实施方案6.根据实施方案3-5中任一项所述的方法,其中所述DR5结合多肽包含至少一个VHH结构域,所述至少一个VHH结构域包含含有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的CDR1、含有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的CDR2和含有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的CDR3。

实施方案7.根据实施方案6所述的方法,其中所述至少一个VHH结构域包含与SEQ ID NO:4的氨基酸序列至少90%、至少95%、至少99%或100%相同的氨基酸序列。

实施方案8.根据实施方案3-7中任一项所述的方法,其中所述DR5结合多肽包含VHH结构域,所述VHH结构域包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列。

实施方案9.根据实施方案3-8中任一项所述的方法,其中所述DR5结合多肽包含Fc区。

实施方案10.根据实施方案9所述的方法,其中所述Fc区包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列。

实施方案11.根据实施方案3-10中任一项所述的方法,其中所述DR5结合多肽具有结构VHH-接头-VHH-接头-Fc。

实施方案12.根据实施方案3-11中任一项所述的方法,其中每个VHH结构域包含含有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的CDR1、含有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的CDR2和含有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的CDR3。

实施方案13.根据实施方案3-12中任一项所述的方法,其中所述VHH-接头-VHH包含与SEQ ID NO:5的氨基酸序列至少90%、至少95%、至少99%或100%相同的氨基酸序列。

实施方案14.根据实施方案13所述的方法,其中所述VHH-接头-VHH包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列。

实施方案15.根据实施方案3-14中任一项所述的方法,其中所述DR5结合多肽包含与SEQ ID NO:7的氨基酸序列至少90%、至少95%、至少99%或100%相同的氨基酸序列。

实施方案16.根据实施方案3-15中任一项所述的方法,其中所述DR5结合多肽包含

SEQ ID NO:7的氨基酸序列。

实施方案17.根据实施方案3-15中任一项所述的方法,其中所述DR5结合多肽由SEQ ID NO:7的氨基酸序列组成。

实施方案18.根据实施方案1-17中任一项所述的方法,其中所述PLK1抑制剂是小分子或干扰RNA(siRNA)。

实施方案19.根据实施方案1-18中任一项所述的方法,其中所述PLK1抑制剂是安文塞替(onvansertib)、伏拉塞替(volasertib)、瑞格塞替(rigosertib)、BI2536(Boehringer Ingelheim)、N-[[4-[(6-氯-3-吡啶基)甲氧基]-3-甲氧基苯基]甲基]-3,4-二甲氧基苯乙胺盐酸盐(SBE 13HCl)、MLN0905(Takeda Oncology)、GSK461364(GlaxoSmithKline)、波洛辛(poloxin)、波洛辛-2HT、R03280(CAS号1062243-51-9)、HMN-214(CAS号173529-46-9)、HMN-176(CAS号173529-10-7)、2-氰基-2-[3-乙基-4-氧代-5-[[3-(2-吡咯烷-1-基乙基)苯胺基]甲基]-1,3-噻唑烷-2-基]-N-(2,2,2-三氟乙基)乙酰胺(ZK-噻唑啉酮)或环波林(cyclapolin)9(CAS号40533-25-3)、5-(5,6-二甲氧基-1H-苯并咪唑-1-基)-3-[[2-(三氟甲基)苯基]甲氧基]-2-噻吩甲酰胺(GW 843682X)。

实施方案20.根据实施方案19所述的方法,其中所述PLK1抑制剂是安文塞替、伏拉塞替、瑞格塞替、BI2536(Boehringer Ingelheim)、MLN0905(Takeda Oncology)、GSK461364(GlaxoSmithKline)、CYC140(Cyclacel)、TKM-080301(TKM-PLK1;Arbutus Biopharma)或TAK-960(Takeda Pharmaceutical Company)。

实施方案21.根据实施方案1-18中任一项所述的方法,其中所述PLK1抑制剂是安文塞替。

实施方案22.根据实施方案1-21中任一项所述的方法,其中将所述DR5激动剂和所述PLK1抑制剂分开施用。

实施方案23.根据实施方案22所述的方法,其中将所述DR5激动剂和所述PLK1抑制剂依序施用。

实施方案24.根据实施方案22或23所述的方法,其中在所述PLK1抑制剂之前施用至少一个剂量或第一剂量的所述DR5激动剂。

实施方案25.根据实施方案22或23所述的方法,其中在所述PLK1抑制剂之后施用至少一个剂量或第一剂量的所述DR5激动剂。

实施方案26.根据实施方案1-21中任一项所述的方法,其中将所述DR5激动剂和所述PLK1抑制剂并行施用。

实施方案27.根据实施方案1-26中任一项所述的方法,其中所述DR5激动剂和所述PLK1抑制剂协同作用。

实施方案28.根据实施方案27所述的方法,其中在体外细胞存活测定中测定协同作用。

实施方案29.根据实施方案1-28中任一项所述的方法,其中与单独施用的每种药剂相比,所述DR5激动剂和所述PLK1抑制剂的施用导致协同效应。

实施方案30.一种治疗有需要的受试者的癌症的方法,所述方法包括向所述受试者施用(a)死亡受体5(DR5)激动剂和(b)细胞周期蛋白依赖性激酶(CDK)抑制剂。

实施方案31.根据实施方案30所述的方法,其中所述DR5激动剂是INBRX-109、依托

奈明α (ABBV-621)、IGM-8444 (IGM Biosciences)、BI 905711 (Boehringer Ingelheim)、GEN1029 (HexaBody®-DR5/DR5; Genmab)、TAS266 (Novartis)、MM-201a (Merrimack Pharmaceuticals) 或 MM201-b (Merrimack Pharmaceuticals)。实施方案32. 根据实施方案31所述的方法, 其中所述DR5激动剂是INBRX-109。实施方案33. 根据实施方案30所述的方法, 其中所述DR5激动剂是DR5结合多肽。

实施方案34. 根据实施方案33所述的方法, 其中所述DR5结合多肽是至少四价的。

实施方案35. 根据实施方案32-34中任一项所述的方法, 其中所述DR5结合多肽包含至少一个VHH结构域, 所述至少一个VHH结构域包含含有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的CDR1、含有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的CDR2和含有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的CDR3。

实施方案36. 根据实施方案35所述的方法, 其中所述至少一个VHH结构域包含与SEQ ID NO:4的氨基酸序列至少90%、至少95%、至少99%或100%相同的氨基酸序列。

实施方案37. 根据实施方案32-36中任一项所述的方法, 其中所述DR5结合多肽包含VHH结构域, 所述VHH结构域包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列。

实施方案38. 根据实施方案32-37中任一项所述的方法, 其中所述DR5结合多肽包含Fc区。

实施方案39. 根据实施方案38所述的方法, 其中所述Fc区包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列。

实施方案40. 根据实施方案32-39中任一项所述的方法, 其中所述DR5结合多肽具有结构VHH-接头-VHH-接头-Fc。

实施方案41. 根据实施方案32-40中任一项所述的方法, 其中每个VHH结构域包含含有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的CDR1、含有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的CDR2和含有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的CDR3。

实施方案42. 根据实施方案32-41中任一项所述的方法, 其中所述VHH-接头-VHH包含与SEQ ID NO:5的氨基酸序列至少90%、至少95%、至少99%或100%相同的氨基酸序列。

实施方案43. 根据实施方案42所述的方法, 其中所述VHH-接头-VHH包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列。

实施方案44. 根据实施方案32-43中任一项所述的方法, 其中所述DR5结合多肽包含与SEQ ID NO:7的氨基酸序列至少90%、至少95%、至少99%或100%相同的氨基酸序列。

实施方案45. 根据实施方案32-44中任一项所述的方法, 其中所述DR5结合多肽包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列。

实施方案46. 根据实施方案32-44中任一项所述的方法, 其中所述DR5结合多肽由SEQ ID NO:7的氨基酸序列组成。

实施方案47. 根据实施方案30-46中任一项所述的方法, 其中所述CDK抑制剂是CDK9抑制剂。

实施方案48. 根据实施方案30-47中任一项所述的方法, 其中所述CDK抑制剂是小分子。

实施方案49. 根据实施方案30-48中任一项所述的方法, 其中所述CDK抑制剂是夫拉平度 (flavopiridol)、瑟利西利 (seliciclib)、迪尼西利 (dinaciclib)、奥妥西利 (atuveciclib)、艾尼西利 (enitociclib)、AZD4573、i-CDK9或NVP-2。

实施方案50.根据实施方案49中任一项所述的方法,其中所述CDK抑制剂是迪尼西利、NVP-2、夫拉平度、艾尼西利或AZD4573。

实施方案51.根据实施方案30-50中任一项所述的方法,其中将所述DR5激动剂和所述CDK抑制剂分开施用。

实施方案52.根据实施方案51所述的方法,其中将所述DR5激动剂和所述CDK抑制剂依序施用。

实施方案53.根据实施方案51或52所述的方法,其中在所述CDK抑制剂之前施用至少一个剂量或第一剂量的所述DR5激动剂。

实施方案54.根据实施方案51或52所述的方法,其中在所述CDK抑制剂之后施用至少一个剂量或第一剂量的所述DR5激动剂。

实施方案55.根据实施方案30-51中任一项所述的方法,其中将所述DR5激动剂和所述CDK抑制剂并行施用。

实施方案56.根据实施方案30-55中任一项所述的方法,其中所述DR5激动剂和所述CDK抑制剂协同作用。

实施方案57.根据实施方案56所述的方法,其中在体外细胞存活测定中测定协同作用。

实施方案58.根据实施方案30-57中任一项所述的方法,其中与单独施用的每种药剂相比,所述DR5激动剂和所述CDK抑制剂的施用导致协同效应。

实施方案59.根据实施方案1-58中任一项所述的方法,其中所述癌症是肾上腺癌;星形细胞瘤;基底细胞癌;胆道癌;膀胱癌;骨癌;脑和中枢神经系统癌症;乳腺癌;腹膜癌;宫颈癌;绒毛膜癌;软骨肉瘤;尤因肉瘤;结肠直肠癌(结直肠癌);结缔组织癌;消化系统癌症;子宫内膜癌;食道癌;眼癌;头颈癌;胃癌;胃肠癌;胶质母细胞瘤;肝癌;肝细胞瘤;上皮内瘤;肾脏癌或肾癌;喉癌;白血病;肝脏癌症;肺癌;小细胞肺癌;非小细胞肺癌;肺腺癌;肺鳞癌;黑色素瘤;骨髓瘤;神经母细胞瘤;口腔癌(唇、舌、口和/或咽);卵巢癌;胰腺癌,如胰腺腺癌;脑垂体癌;前列腺癌;视网膜母细胞瘤;横纹肌肉瘤;直肠癌;呼吸系统癌症;间皮瘤;唾液腺癌;肉瘤;皮肤癌;鳞状细胞癌;胃癌;睾丸癌;甲状腺癌;子宫或子宫内膜癌;泌尿系统癌症;和外阴癌;淋巴瘤;霍奇金淋巴瘤;非霍奇金淋巴瘤;B细胞淋巴瘤;低分级/滤泡性非霍奇金淋巴瘤(NHL);小淋巴细胞(SL)NHL;中分级/滤泡性NHL;中分级弥漫性NHL;高分级免疫母细胞NHL;高分级淋巴母细胞NHL;高分级小无核裂细胞NHL;大肿块NHL;套细胞淋巴瘤;艾滋病相关淋巴瘤;华氏巨球蛋白血症;慢性淋巴细胞白血病(CLL);急性成淋巴细胞性白血病(ALL);毛细胞白血病;慢性骨髓细胞性白血病;以及其他癌和肉瘤;以及移植后淋巴增殖性疾病(PTLD),以及与斑痣性错构瘤病相关的异常血管增生,水肿(如与脑肿瘤相关的水肿),以及梅格斯综合征。

实施方案60.一种用于在治疗癌症的方法中使用的DR5激动剂,其中所述方法包括施用所述DR5激动剂与PLK1抑制剂的组合。

实施方案61.DR5激动剂在制造用于治疗癌症的药剂中的用途,其中所述药剂用于与PLK1抑制剂一起施用。

实施方案62.一种用于在治疗癌症的方法中使用的DR5激动剂,其中所述方法包括施用所述DR5激动剂与CDK抑制剂如CDK9抑制剂的组合。

实施方案63.DR5激动剂在制造用于治疗癌症的药剂中的用途,其中所述药剂用于与CDK抑制剂如CDK9抑制剂一起施用。

附图说明

[0007] 图1A-图1F示出了逐步调整实验的结果,其中使不同的癌细胞系与多种浓度的INBRX-109(0.00001、0.0001、0.001、0.01、0.1、1或10nM)和安文塞替(0.32、1.6、8、40、200或1000nM)接触。癌细胞的存活百分比显示在每个图的y轴上。示出了癌细胞系HT-29(图1A)、LS174T(图1B)、SW620(图1C)、SW837(图1D)、SW1463(图1E)和LS411N(图1F)的结果。

[0008] 图2A-图2F示出了INBRX-109逐步调整实验的结果,其中使不同的癌细胞系与单独的或与200nM安文塞替组合的多种浓度的INBRX-109(0.0001、0.001、0.01、0.1、1或10nM)接触。癌细胞的存活百分比显示在每个图的y轴上。示出了癌细胞系HT-29(图2A)、LS174T(图2B)、SW620(图2C)、SW837(图2D)、SW1463(图2E)和LS411N(图2F)的结果。标记为“单独的Cpd”的虚线示出了用单独的200nM安文塞替处理的癌细胞的存活百分比。

[0009] 图3A-图3F示出了安文塞替逐步调整实验的结果,其中使不同的癌细胞系与单独的或与1nM INBRX-109组合的多种浓度的安文塞替(0.32、1.6、8、40、200或1000nM)接触。癌细胞的存活百分比显示在每个图的y轴上。示出了癌细胞系HT-29(图3A)、LS174T(图3B)、SW620(图3C)、SW837(图3D)、SW1463(图3E)和LS411N(图3F)的结果。标记为“单独的Ab”的虚线示出了用单独的1nM INBRX-109处理的癌细胞的存活百分比。

[0010] 图4A-图4I、图5A-图5I和图6A-图6L示出了安文塞替逐步调整实验的结果,其中使不同的结直肠癌细胞系与单独的或与1nM INBRX-109组合的多种浓度的安文塞替(274pM、823pM、2.47nM、7.41nM、22.22nM、66.67nM、200nM、600nM和1.8 μ M)接触。示出了癌细胞系SK-CO-1(图4A)、SNU-C5(图4B)、LS1034(图4C)、LS123(图4D)、LS180(图4E)、T84(图4F)、SW-48(图4G)、SW01116(图4H)、SW-1463(图4I)、SW-837(图5A)、SW-948(图5B)、LS 513(图5C)、NCI-H716(图5D)、HCT 116(图5E)、DLD-1(图5F)、HCT-15(图5G)、LS174T(图5H)、Ht-55(图5I)、SNU-81(图6A)、HT-29(图6B)、SW-620(图6C)、Hu Tu 80(图6D)、SW-480(图6E)、SW-403(图6F)、LoVo(图6G)、SNU-C2A(图6H)、NCI-H747(图6I)、COLO320DM(图6J)、RKO(图6K)、HCT-8(图6L)的结果。癌细胞的存活百分比显示在每个图的y轴上。标记为“单独的Ab”的虚线示出了用单独的1nM INBRX-109处理的癌细胞的存活百分比。

[0011] 图7A-图7I和图8A-图8H示出了安文塞替逐步调整实验的结果,其中使不同的胰腺癌细胞系与单独的或与1nM INBRX-109组合的多种浓度的安文塞替(274pM、823pM、2.47nM、7.41nM、22.22nM、66.67nM、200nM、600nM和1.8 μ M)接触。示出了癌细胞系MA PaCa-2(图7A)、Panc 05.24(图7B)、SW-1990(图7C)、HuP-T4(图7D)、BxPC-3(图7E)、Capan-2(图7F)、KP4(图7G)、AsPC-1(图7H)、PSN-1(图7I)、HPAF-II(图8A)、PANC-1(图8B)、Capan-1(图8C)、CFPAC-1(图8D)、Panc 03.27(图8E)、SU.86.86(图8F)、PL45(图8G)、Panc 10.05(图8H)的结果。癌细胞的存活百分比显示在每个图的y轴上。标记为“单独的Ab”的虚线示出了用单独的1nM INBRX-109处理的癌细胞的存活百分比。

[0012] 图9A-图9E示出了逐步调整实验的结果,其中使不同的癌细胞系与多种浓度的INBRX-109(0.00001、0.0001、0.001、0.01、0.1、1或10nM)和迪尼西利(0.2、1、5、25、125或625nM)接触。癌细胞的存活百分比显示在每个图的y轴上。示出了癌细胞系CAL-78(图9A)、

OUMS-27 (图9B)、SW1353 (图9C)、H-EMC-SS (图9D) 和SW620 (图9E) 的结果。

[0013] 图10A-图10E示出了INBRX-109逐步调整实验的结果,其中使不同的癌细胞系与单独的或与25nM迪尼西利组合的多种浓度的INBRX-109 (0.0001、0.001、0.01、0.1、1或10nM) 接触。癌细胞的存活百分比显示在每个图的y轴上。示出了癌细胞系CAL-78 (图10A)、OUMS-27 (图10B)、SW1353 (图10C)、H-EMC-SS (图10D) 和SW620 (图10E) 的结果。标记为“单独的Cpd”的虚线示出了用单独的25nM迪尼西利处理的癌细胞的存活百分比。

[0014] 图11A-图11E示出了迪尼西利逐步调整实验的结果,其中使不同的癌细胞系与单独的或与1nM INBRX-109组合的多种浓度的迪尼西利 (0.2、1、5、25、125或625nM) 接触。癌细胞的存活百分比显示在每个图的y轴上。示出了癌细胞系CAL-78 (图11A)、OUMS-27 (图11B)、SW1353 (图11C)、H-EMC-SS (图11D) 和SW620 (图11E) 的结果。标记为“单独的Ab”的虚线示出了用单独的1nM INBRX-109处理的癌细胞的存活百分比。

[0015] 图12A-图12E示出了逐步调整实验的结果,其中使不同的癌细胞系与多种浓度的INBRX-109 (0.00001、0.0001、0.001、0.01、0.1、1或10nM) 和NVP-2 (0.2、1、5、25、125或625nM) 接触。癌细胞的存活百分比显示在每个图的y轴上。示出了癌细胞系CAL-78 (图12A)、OUMS-27 (图12B)、SW1353 (图12C)、H-EMC-SS (图12D) 和SW620 (图12E) 的结果。

[0016] 图13A-图13E示出了INBRX-109逐步调整实验的结果,其中使不同的癌细胞系与单独的或与125nM NVP-2组合的多种浓度的INBRX-109 (0.0001、0.001、0.01、0.1、1或10nM) 接触。癌细胞的存活百分比显示在每个图的y轴上。示出了癌细胞系CAL-78 (图13A)、OUMS-27 (图13B)、SW1353 (图13C)、H-EMC-SS (图13D) 和SW620 (图13E) 的结果。标记为“单独的Cpd”的虚线示出了用单独的125nM NVP-2处理的癌细胞的存活百分比。

[0017] 图14A-图14E示出了NVP-2逐步调整实验的结果,其中使不同的癌细胞系与单独的或与1nM INBRX-109组合的多种浓度的NVP-2 (0.2、1、5、25、125或625nM) 接触。癌细胞的存活百分比显示在每个图的y轴上。示出了癌细胞系CAL-78 (图14A)、OUMS-27 (图14B)、SW1353 (图14C)、H-EMC-SS (图14D) 和SW620 (图14E) 的结果。标记为“单独的Ab”的虚线示出了用单独的1nM INBRX-109处理的癌细胞的存活百分比。

[0018] 图15A-图15F示出了逐步调整实验的结果,其中使不同的癌细胞系与多种浓度的INBRX-109 (0.00001、0.0001、0.001、0.01、0.1、1或10nM) 和夫拉平度 (0.2、1、5、25、125或625nM) 接触。癌细胞的存活百分比显示在每个图的y轴上。示出了癌细胞系CAL-78 (图15A)、OUMS-27 (图15B)、HS-SY-II (图15C)、SW1353 (图15D)、H-EMC-SS (图15E) 和SW620 (图15F) 的结果。

[0019] 图16A-图16F示出了INBRX-109逐步调整实验的结果,其中使不同的癌细胞系与单独的或与125nM夫拉平度组合的多种浓度的INBRX-109 (0.0001、0.001、0.01、0.1、1或10nM) 接触。癌细胞的存活百分比显示在每个图的y轴上。示出了癌细胞系CAL-78 (图16A)、OUMS-27 (图16B)、HS-SY-II (图16C)、SW1353 (图16D)、H-EMC-SS (图16E) 和SW620 (图16F) 的结果。标记为“单独的Cpd”的虚线示出了用单独的125nM夫拉平度处理的癌细胞的存活百分比。

[0020] 图17A-图17F示出了夫拉平度逐步调整实验的结果,其中使不同的癌细胞系与单独的或与1nM INBRX-109组合的多种浓度的夫拉平度 (0.2、1、5、25、125或625nM) 接触。癌细胞的存活百分比显示在每个图的y轴上。示出了癌细胞系CAL-78 (图17A)、OUMS-27 (图17B)、HS-SY-II (图17C)、SW1353 (图17D)、H-EMC-SS (图17E) 和SW620 (图17F) 的结果。标记为“单独

的Ab”的虚线示出了用单独的1nM INBRX-109处理的癌细胞的存活百分比。

[0021] 图18A-图18F示出了逐步调整实验的结果,其中使不同的癌细胞系与多种浓度的INBRX-109(0.00001、0.0001、0.001、0.01、0.1、1或10nM)和艾尼西利(0.2、1、5、25、125或625nM)接触。癌细胞的存活百分比显示在每个图的y轴上。示出了癌细胞系CAL-78(图18A)、OUMS-27(图18B)、HS-SY-II(图18C)、SW1353(图18D)、H-EMC-SS(图18E)和SW620(图18F)的结果。

[0022] 图19A-图19F示出了INBRX-109逐步调整实验的结果,其中使不同的癌细胞系与单独的或与125nM艾尼西利组合的多种浓度的INBRX-109(0.0001、0.001、0.01、0.1、1或10nM)接触。癌细胞的存活百分比显示在每个图的y轴上。示出了癌细胞系CAL-78(图19A)、OUMS-27(图19B)、HS-SY-II(图19C)、SW1353(图19D)、H-EMC-SS(图19E)和SW620(图19F)的结果。标记为“单独的Cpd”的虚线示出了用单独的125nM艾尼西利处理的癌细胞的存活百分比。

[0023] 图20A-图20F示出了艾尼西利逐步调整实验的结果,其中使不同的癌细胞系与单独的或与1nM INBRX-109组合的多种浓度的艾尼西利(0.2、1、5、25、125或625nM)接触。癌细胞的存活百分比显示在每个图的y轴上。示出了癌细胞系CAL-78(图20A)、OUMS-27(图20B)、HS-SY-II(图20C)、SW1353(图20D)、H-EMC-SS(图20E)和SW620(图20F)的结果。标记为“单独的Ab”的虚线示出了用单独的1nM INBRX-109处理的癌细胞的存活百分比。

[0024] 图21A-图21F示出了逐步调整实验的结果,其中使不同的癌细胞系与多种浓度的INBRX-109(0.00001、0.0001、0.001、0.01、0.1、1或10nM)和AZD-5991(0.0032、0.016、0.08、0.4、2.0、10nM)接触。癌细胞的存活百分比显示在每个图的y轴上。示出了癌细胞系CAL-78(图21A)、OUMS-27(图21B)、HS-SY-II(图21C)、SW1353(图21D)、H-EMC-SS(图21E)和SW620(图21F)的结果。

[0025] 图22A-图22F示出了INBRX-109逐步调整实验的结果,其中使不同的癌细胞系与单独的或与2nM AZD-5991组合的多种浓度的INBRX-109(0.0001、0.001、0.01、0.1、1或10nM)接触。癌细胞的存活百分比显示在每个图的y轴上。示出了癌细胞系CAL-78(图22A)、OUMS-27(图22B)、HS-SY-II(图22C)、SW1353(图22D)、H-EMC-SS(图22E)和SW620(图22F)的结果。标记为“单独的Cpd”的虚线示出了用单独的2nM AZD-5991处理的癌细胞的存活百分比。

[0026] 图23A-图23F示出了AZD-5991逐步调整实验的结果,其中使不同的癌细胞系与单独的或与1nM INBRX-109组合的多种浓度的AZD-5991(0.0032、0.016、0.08、0.4、2.0、10nM)接触。癌细胞的存活百分比显示在每个图的y轴上。示出了癌细胞系CAL-78(图23A)、OUMS-27(图23B)、HS-SY-II(图23C)、SW1353(图23D)、H-EMC-SS(图23E)和SW620(图23F)的结果。标记为“单独的Ab”的虚线示出了用单独的1nM INBRX-109处理的癌细胞的存活百分比。

具体实施方式

[0027] 本文提供的实施方案涉及用死亡受体5(DR5)激动剂和Po1o样激酶1(PLK1)抑制剂的组合治疗癌症的方法和/或用死亡受体5(DR5)激动剂和细胞周期蛋白依赖性激酶(CDK)抑制剂(如CDK9抑制剂)的组合治疗癌症的方法。

定义和各种实施方案

[0028] 本文所用的章节标题仅用于组织目的,而不应解释为限制所描述的主题。

[0029] 本文引用的所有参考文献,包括专利申请、专利出版物和Genbank登录号均通过引

用并入本文,就好像每个单独的参考文献都被具体地和单独地指示为通过引用以其整体并入。

[0030] 本文所述或参考的技术和程序通常是本领域技术人员很好理解和使用常规方法通常使用的,例如像在以下文献中所述的广泛使用的方法:Sambrook等人,Molecular Cloning:A Laboratory Manual第3版(2001)Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor,N.Y.CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY(F.M.Ausubel等人编,(2003));METHODS IN ENZYMOLOGY系列(Academic Press,Inc.):PCR 2:A PRACTICAL APPROACH(M.J.MacPherson,B.D.Hames和G.R.Taylor编(1995));Harlow和Lane编(1988) ANTIBODIES,A LABORATORY MANUAL,and ANIMAL CELL CULTURE(R.I.Freshney编(1987)); Oligonucleotide Synthesis(M.J.Gait编,1984);Methods in Molecular Biology, Humana Press;Cell Biology:A Laboratory Notebook(J.E.Cellis编,1998)Academic Press;Animal Cell Culture(R.I.Freshney)编,1987;Introduction to Cell and Tissue Culture(J.P.Mather和P.E.Roberts,1998)Plenum Press;Cell and Tissue Culture Laboratory Procedures(A.Doyle,J.B.Griffiths和D.G.Newell编,1993-8) J.Wiley and Sons;Handbook of Experimental Immunology(D.M.Weir和C.C.Blackwell 编);Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells(J.M.Miller和M.P.Calos编,1987); PCR:The Polymerase Chain Reaction,(Mullis等人编,1994);Current Protocols in Immunology(J.E.Coligan等人编,1991);Short Protocols in Molecular Biology(Wiley and Sons,1999);Immunobiology(C.A.Janeway和P.Travers,1997);Antibodies(P.Finch, 1997);Antibodies:A Practical Approach(D.Catty.编,IRL Press,1988-1989); Monoclonal Antibodies:APractical Approach(P.Shepherd和C.Dean编,Oxford University Press,2000);Using Antibodies:A Laboratory Manual(E.Harlow和D.Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press,1999));The Antibodies(M.Zanetti和 J.D.Capra编,Harwood Academic Publishers,1995);以及Cancer:Principles and Practice of Oncology(V.T.DeVita等人编,J.B.Lippincott Company,1993);以及其更新版本。

[0031] 除非另外定义,否则结合本公开文本使用的科学和技术术语应具有由本领域普通技术人员通常所理解的含义。此外,除非另外通过上下文要求或明确指出,否则单数的术语应包括复数并且复数术语应包括单数。对于各种来源或参考文献之间的任何定义冲突,以本文提供的定义为准。

[0032] 通常,免疫球蛋白重链中残基的编号是如Kabat等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,Md.(1991)中的EU索引的编号。“如Kabat中的EU索引”是指人IgG1 EU抗体的残基编号。

[0033] 应理解,本文所述的本发明的实施方案包括“由实施方案组成”和/或“基本上由实施方案组成”。除非另有说明,否则如本文所用的单数形式“一个”、“一种”和“所述”包括复数个指示物。本文使用术语“或”并不意味着替代方案是相互排斥的。

[0034] 在本申请中,除非本领域技术人员明确说明或理解,否则使用“或”意为“和/或”。在多个从属权利要求的上下文中,“或”的使用回指多于一个前述独立或从属权利要求。

[0035] 短语“参考样品”、“参考细胞”或“参考组织”表示具有至少一种已知特征的样品,所述样品可用作与具有至少一种未知特征的样品的比较物。在一些实施方案中,参考样品可用作阳性或阴性指示物。与具有未知特征的样品中存在的蛋白质和/或mRNA的水平相比,参考样品可用于确定存在于例如健康组织中的蛋白质和/或mRNA的水平。在一些实施方案中,参考样品来自相同的受试者,但来自受试者的与被测试的部分不同的部分。在一些实施方案中,参考样品来自癌症周围或邻近处的组织区域。在一些实施方案中,参考样品不是来自被测试的受试者,而是来自已知患有或未患有所讨论的障碍(例如,特定癌症或DR5相关障碍)的受试者的样品。在一些实施方案中,参考样品来自同一受试者,但来自受试者发生癌症之前的时间点。在一些实施方案中,参考样品来自于来自相同或不同受试者的良性癌症样品。当阴性参考样品用于比较时,阴性参考样品中所讨论的分子的表达水平或量将指示本领域技术人员在给定本公开文本的情况下认为不存在和/或存在低水平所述分子时的水平。当阳性参考样品用于比较时,阳性参考样品中所讨论的分子的表达水平或量将指示本领域技术人员在给定本公开文本的情况下认为存在一定水平的所述分子时的水平。

[0036] 如本文所用的在受益于或响应于施用治疗剂的上下文中使用的术语“益处”、“临床益处”、“反应性”和“治疗反应性”可以通过评估各种终点来测量,所述终点例如在一定程度上对疾病进展的抑制,包括减慢和完全停止;疾病发作和/或症状的次数的减少;病灶大小的减小;疾病细胞浸润到邻近的外周器官和/或组织的抑制(即减少、减缓或完全终止);疾病传播的抑制(即减少、减缓或完全终止);在一定程度上对与障碍相关的一种或多种症状的缓解;治疗后无病表现的时间例如无进展存活期的延长;增加的总存活期;更高的反应率;和/或降低的在治疗后给定时间点的死亡率。“无反应”或“反应失败”的受试者或癌症是未能满足上述“有反应”资格的受试者或癌症。

[0037] 术语“核酸分子”、“核酸”和“多核苷酸”可以互换使用,并且是指核苷酸的聚合物。此类核苷酸聚合物可包含天然和/或非天然核苷酸,并且包括但不限于DNA、RNA和PNA。“核酸序列”是指核酸分子或多核苷酸中包含的核苷酸的线性序列。

[0038] 术语“多肽”和“蛋白质”可互换地用于指代氨基酸残基的聚合物,并且不限于最小长度。氨基酸残基的此类聚合物可以含有天然或非天然氨基酸残基,并且包括但不限于氨基酸残基的肽、寡肽、二聚体、三聚体和多聚体。所述定义涵盖全长蛋白质及其片段两者。这些术语还包括多肽的表达后修饰,例如糖基化、唾液酸化、乙酰化、磷酸化等。此外,出于本公开文本的目的,“多肽”是指包括对天然序列的修饰(如缺失、添加和取代,在本质上通常是保守的)的蛋白质,只要所述蛋白质保持期望的活性即可。这些修饰可能是故意的(如通过定点诱变),或者可能是偶然的(如通过产生蛋白质的宿主的突变或由于PCR扩增引起的错误)。

[0039] 如本文所用的术语“DR5”、“死亡受体5”、“TNFRSF10B”和“TRAILR2”是指细胞中对DR5前体的加工而产生的任何天然的成熟DR5。除非另有说明,否则所述术语包括来自任何脊椎动物来源的DR5,所述脊椎动物来源包括哺乳动物,如灵长类动物(例如,人和食蟹猴或恒河猴)和啮齿动物(例如,小鼠和大鼠)。所述术语还包括天然存在的DR5变体,如剪接变体或等位基因变体。非限制性示例性前体人DR5氨基酸序列例如示于NCBI登录号NP_003833.4中。参见SEQ ID NO:8。非限制性示例性前体人DR5氨基酸序列例如示于SEQ ID NO:9中。

[0040] 如本文所用,术语“PLK1”和“polo样激酶1”是指任何天然的成熟PLK1。除非另有说

明,否则所述术语包括来自任何脊椎动物来源的PLK1,所述脊椎动物来源包括哺乳动物,如灵长类动物(例如,人和食蟹猴或恒河猴)和啮齿动物(例如,小鼠和大鼠)。所述术语还包括天然存在的PLK1变体,如剪接变体或等位基因变体。非限制性PLK1氨基酸序列示于例如UniProtKB/Swiss-Prot登录号P53350.1中。参见SEQ ID NO:10。

[0041] 如本文所用,术语“CDK9”和“细胞周期蛋白依赖性激酶9”是指任何天然的成熟CDK9。除非另有说明,否则所述术语包括来自任何脊椎动物来源的CDK9,所述脊椎动物来源包括哺乳动物,如灵长类动物(例如,人和食蟹猴或恒河猴)和啮齿动物(例如,小鼠和大鼠)。所述术语还包括天然存在的CDK9变体,如剪接变体或等位基因变体。非限制性氨基酸序列示于例如UniProtKB/Swiss-Prot登录号P50750-1中。参见SEQ ID NO:11。

[0042] 术语“特异性结合”抗原或表位是本领域熟知的术语,并且确定这种特异性结合的方法也是本领域熟知的。如果相比于分子与替代细胞或物质反应或相缔合的情况,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缔合,则所述分子被视为展现出“特异性结合”或“优先结合”。如果与单结构域抗体(sdAb)或含有VHH的多肽与其他物质结合的情况相比,所述抗体或多肽以更大的亲和力、亲合力、更容易地和/或以更长的持续时间与靶标结合,则所述抗体或多肽与所述靶标“特异性结合”或“优先结合”。例如,特异性或优先与DR5表位结合的sdAb或含有VHH的多肽是这样的sdAb或含有VHH的多肽,其与其他DR5表位或非DR5表位结合相比以更大的亲和力、亲合力、更容易地和/或以更长的持续时间结合此表位。通过阅读此定义还应理解例如,特异性或优先与第一靶标结合的sdAb或含有VHH的多肽可以或不特异性或优先与第二靶标结合。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。“特异性”是指结合蛋白选择性结合抗原的能力。

[0043] 术语“抑制”(“inhibition”或“inhibit”)是指任何表型特征的减少或停止,或该特征的发生率、程度或可能性的减少或停止。“降低”或“抑制”是指与参考相比,活性、功能和/或量的减少、降低或阻滞。在一些实施方案中,“降低”或“抑制”意指导致总体减少10%或更多的能力。在一些实施方案中,“降低”或“抑制”意指导致总体减少50%或更多的能力。在一些实施方案中,“降低”或“抑制”意指引起总体减少75%、85%、90%、95%或更多的能力。在一些实施方案中,在相同的时间段内,相对于对照,上述量在一段时间内被抑制或减少。

[0044] 如本文所用,术语“表位”是指与抗原结合分子(例如,sdAb或含有VHH的多肽)结合的在靶分子(例如,抗原,如蛋白质、核酸、碳水化合物或脂质)上的位点。表位通常包括如氨基酸、多肽或糖侧链等分子的化学活性表面分组,并且具有特定的三维结构特征以及特定的电荷特征。表位可以由所述靶分子的连续和/或并置的非连续残基(例如,氨基酸、核苷酸、糖、脂质部分)形成。由连续残基(例如,氨基酸、核苷酸、糖、脂质部分)形成的表位通常在暴露于变性溶剂时保留,而通过三级折叠形成的表位通常在用变性溶剂处理时丢失。表位可以包括但不限于至少3个、至少5个或8-10个残基(例如,氨基酸或核苷酸)。在一些实施方案中,表位长度为少于20个残基(例如,氨基酸或核苷酸)、少于15个残基或少于12个残基。如果两种抗体展现出对一种抗原的竞争性结合,则它们可以结合所述抗原内的相同表位。在一些实施方案中,表位可以通过与抗原结合分子上的CDR残基的一定最小距离来鉴定。在一些实施方案中,表位可以通过上述距离来鉴定,并且进一步限于参与抗原结合分子

的残基与抗原残基之间的键(例如,氢键)的那些残基。表位也可以通过各种扫描来鉴定,例如丙氨酸或精氨酸扫描可以指示抗原结合分子可以与之相互作用的一个或多个残基。除非明确指出,否则作为表位的一组残基不排除其他残基为特定抗原结合分子的表位的一部分。相反,这样一组的存在表示表位的最小系列(或物种组)。因此,在一些实施方案中,鉴定为表位的一组残基表示与抗原相关的最小表位,而不是抗原上表位的残基的排除列表。

[0045] 术语“抗体”在最广泛的意义上使用,并且涵盖包含抗体样抗原结合结构域的各种多肽,包括但不限于常规抗体(通常包含至少一条重链和至少一条轻链)、单结构域抗体(sdAb,包含至少一个VHH结构域和Fc区)、含有VHH的多肽(包含至少一个VHH结构域的多肽)、以及前述任一种的片段,只要它们展现出所需抗原结合活性即可。在一些实施方案中,抗体包含二聚化结构域。此类二聚化结构域包括但不限于重链恒定结构域(包含CH1、铰链、CH2和CH3,其中CH1通常与轻链恒定结构域CL配对,而铰链介导二聚化)和Fc区(包含铰链、CH2和CH3,其中铰链介导二聚化)。

[0046] 术语抗体还包括但不限于嵌合抗体、人源化抗体、和各种物种(如骆驼科(包括美洲驼)、鲨鱼、小鼠、人、食蟹猴等)的抗体。

[0047] 如本文所用的术语“抗原结合结构域”是指抗体的足以结合抗原的部分。在一些实施方案中,常规抗体的抗原结合结构域包含三个重链CDR和三个轻链CDR。因此,在一些实施方案中,抗原结合结构域包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区含有CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3和维持与抗原的结合所需的FR1和/或FR4的任何部分,所述轻链可变区含有CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3和维持与抗原的结合所需的FR1和/或FR4的任何部分。在一些实施方案中,sdAb或含有VHH的多肽的抗原结合结构域包含VHH结构域的三个CDR。因此,在一些实施方案中,sdAb或含有VHH的多肽的抗原结合结构域包含VHH结构域,所述VHH结构域含有CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3和维持与抗原的结合所需的FR1和/或FR4的任何部分。

[0048] 如本文所用的术语“VHH”或“VHH结构域”或“VHH抗原结合结构域”是指单结构域抗体(如骆驼科抗体或鲨鱼抗体)的抗原结合部分。在一些实施方案中,VHH包含三个CDR和四个框架区,指定为FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3和FR4。在一些实施方案中,VHH可以在N端或C端被截短以使其仅包含部分FR1和/或FR4,或缺少那些框架区中的一个或两个,只要VHH基本上保持抗原结合和特异性即可。

[0049] 术语“单结构域抗体”和“sdAb”在本文中可互换地用于指代包含至少一个单体结构域(如VHH结构域)而不包含轻链和Fc区的抗体。在一些实施方案中,sdAb是两种多肽的二聚体,其中每种多肽包含至少一个VHH结构域和Fc区。如本文所用,术语“单结构域抗体”和“sdAb”涵盖包含多个VHH结构域的多肽,如具有结构VHH₁-VHH₂-Fc或VHH₁-VHH₂-VHH₃-Fc的多肽,其中VHH₁、VHH₂和VHH₃可以相同或不同。

[0050] 术语“含有VHH的多肽”是指包含至少一个VHH结构域的多肽。在一些实施方案中,VHH多肽包含两个、三个或四个或更多个VHH结构域,其中每个VHH结构域可以是相同或不同的。在一些实施方案中,含有VHH的多肽包含Fc区。在一些此类实施方案中,含有VHH的多肽可以称为sdAb。此外,在一些此类实施方案中,VHH多肽可以形成二聚体。含有VHH的多肽(其也是sdAb)的非限制性结构包括VHH₁-Fc、VHH₁-VHH₂-Fc和VHH₁-VHH₂-VHH₃-Fc,其中VHH₁、VHH₂和VHH₃可以相同或不同。在此类结构的一些实施方案中,一个VHH可以通过接头连接至另一个VHH,或者一个VHH可以通过接头连接至Fc。在一些此类实施方案中,接头包含1-20个氨基

酸,优选1-20个主要由甘氨酸和任选的丝氨酸构成的氨基酸。在一些实施方案中,当含有VHH的多肽包含Fc时,它形成二聚体。因此,如果结构VHH₁-VHH₂-Fc形成二聚体,则认为它是四价的(即,二聚体具有四个VHH结构域)。类似地,如果结构VHH₁-VHH₂-VHH₃-Fc形成二聚体,则认为它是六价的(即,二聚体具有六个VHH结构域)。

[0051] 术语“单克隆抗体”是指基本上同质的抗体群体中的一种抗体(包括含有sdAb或VHH的多肽),即除了少量存在的可能天然存在的突变之外,构成所述群体的单个抗体是相同的。单克隆抗体针对单一抗原位点具有高度特异性。此外,与通常包括针对不同决定簇(表位)的不同抗体的多克隆抗体制剂相反,每种单克隆抗体针对抗原上的单一决定簇。因此,单克隆抗体样品可以与抗原上的相同表位结合。修饰语“单克隆的”指示抗体的特征是从基本上同质的抗体群体获得,并且不应解释为需要通过任何特定方法产生抗体。例如,单克隆抗体可以通过Kohler和Milstein,1975,Nature 256:495首次描述的杂交瘤方法制备,或者可以通过如美国专利号4,816,567等中所述的重组DNA方法制备。例如,还可以从使用McCafferty等人,1990,Nature 348:552-554中描述的技术产生的噬菌体文库中分离单克隆抗体。

[0052] 术语“CDR”表示通过本领域技术人员的至少一种鉴定方式定义的互补决定区。在一些实施方案中,CDR可以根据Chothia编号方案、Kabat编号方案、Kabat和Chothia的组合、AbM定义和/或接触定义中的任一个来定义。VHH包含三个CDR,指定为CDR1、CDR2和CDR3。

[0053] 如本文所用,术语“重链恒定区”是指包含至少三个重链恒定结构域C_H1、铰链、C_H2和C_H3的区域。当然,除非另有说明,否则结构域内的非功能改变性缺失和改变都涵盖在术语“重链恒定区”的范围内。非限制性示例性重链恒定区包括 γ 、 δ 和 α 。非限制性示例性重链恒定区还包括 ϵ 和 μ 。每个重链恒定区对应于一种抗体同种型。例如,含有 γ 恒定区的抗体为IgG抗体,含有 δ 恒定区的抗体为IgD抗体,以及含有 α 恒定区的抗体为IgA抗体。此外,包含 μ 恒定区的抗体为IgM抗体,以及包含 ϵ 恒定区的抗体为IgE抗体。某些同种型可以进一步细分为子类。例如,IgG抗体包括但不限于IgG1(包含 γ_1 恒定区)、IgG2(包含 γ_2 恒定区)、IgG3(包含 γ_3 恒定区)和IgG4(包含 γ_4 恒定区)抗体;IgA抗体包括但不限于IgA1(包含 α_1 恒定区)和IgA2(包含 α_2 恒定区)抗体;以及IgM抗体包括但不限于IgM1和IgM2。

[0054] 如本文所用,“Fc区”是指包含CH2和CH3的重链恒定区的一部分。在一些实施方案中,Fc区包含铰链、CH2和CH3。在各种实施方案中,当Fc区包含铰链时,铰链介导两个含Fc多肽之间的二聚化。Fc区可以是本文讨论的任何抗体重链恒定区同种型的。在一些实施方案中,Fc区是IgG1、IgG2、IgG3或IgG4的。

[0055] 如本文所用,“受体人框架”是包含源自人免疫球蛋白框架或人共有框架的重链可变结构域(V_H)框架的氨基酸序列的框架,如本文所讨论的。源自人免疫球蛋白框架或人共有框架的受体人框架可以包含其相同的氨基酸序列,或者它可以含有氨基酸序列变化。在一些实施方案中,跨单个抗原结合结构域(如VHH)中的所有受体人框架,氨基酸变化的数量为少于10、或少于9、或少于8、或少于7、或少于6、或少于5、或少于4、或少于3。

[0056] “亲和力”是指分子(例如,抗体,如sdAb或含有VHH的多肽)的单个结合位点与其结合配偶体(例如,抗原)之间的非共价相互作用总和的强度。分子X对其配偶体Y的亲和力或表观亲和力通常可以分别由解离常数(KD)或K_{D-表观}表示。可以通过本领域已知的常用方法(例如ELISA K_D、KinExA、流式细胞术和/或表面等离子体共振装置)(包括本文所述的那些)

测量亲和力。此类方法包括但不限于涉及BIAcore®、Octet®或流式细胞术的方法。

[0057] 如本文所用,术语“ K_D ”是指抗原结合分子/抗原相互作用的平衡解离常数。当本文使用术语“ K_D ”时,它包括 K_D 和 $K_{D-表观}$ 。

[0058] 在一些实施方案中,抗原结合分子的 K_D 是使用表达抗原的细胞系通过流式细胞术并将在每个抗体浓度下测量的平均荧光拟合到非线性单位点结合方程(Prism Software graphpad)来测量。在一些此类实施方案中, K_D 是 $K_{D-表观}$ 。

[0059] 术语“生物活性”是指分子的任何一种或多种生物学特性(无论是在体内发现的天然存在的,还是通过重组方式提供或实现的)。生物学特性包括但不限于结合配体,诱导或增加细胞增殖,以及诱导或增加细胞因子的表达。

[0060] “激动剂”或“激活性”抗体或多肽是增加和/或激活其靶抗原的生物活性的抗体或多肽。在一些实施方案中,激动剂抗体或多肽与抗原结合,并且将所述抗原的生物活性提高至少约20%、40%、60%、80%、85%或更多。

[0061] “拮抗剂”、“阻断性”或“中和”抗体是抑制、降低和/或失活靶抗原的生物活性的抗体。在一些实施方案中,中和抗体与抗原结合,并且将所述抗原的生物活性降低至少约20%、40%、60%、80%、85%、90%、95%、99%或更多。

[0062] “亲和力成熟的”sdAb或含有VHH的多肽是指与不具有此类改变的亲本sdAb或含有VHH的多肽相比,在一个或多个CDR中具有一个或多个改变的sdAb或含有VHH的多肽,此类改变导致sdAb或含有VHH的多肽对抗原的亲和力提高。

[0063] 如本文所用,“人源化VHH”是指其中一个或多个框架区已基本被人框架区替代的VHH。在一些情形下,人免疫球蛋白的某些框架区(FR)残基被相应的非人残基替代。此外,人源化VHH可以包含这样的残基,其在原始VHH和人框架序列中均未发现,但是被包括在内以进一步改善和优化sdAb、含有VHH的多肽性能。在一些实施方案中,人源化sdAb或含有VHH的多肽包含人Fc区。应当理解,人源化序列可以通过其一级序列来鉴定,并且不一定表示产生抗体的过程。

[0064] “效应子阳性Fc区”具有天然序列Fc区的“效应子功能”。示例性“效应子功能”包括Fc受体结合;C1q结合和补体依赖性细胞毒性(CDC);Fc受体结合;抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC);吞噬作用;下调细胞表面受体(例如B细胞受体);和B细胞激活等。此类效应子功能通常需要将Fc区与结合结构域(例如,抗体可变结构域)组合,并且可以使用各种测定进行评估。

[0065] “天然序列Fc区”包含与在自然界中发现的Fc区的氨基酸序列相同的氨基酸序列。天然序列人Fc区包括天然序列人IgG1 Fc区(非A同种异型和A同种异型);天然序列人IgG2 Fc区;天然序列人IgG3 Fc区;和天然序列人IgG4Fc区以及其天然存在的变体。

[0066] “变体Fc区”包含由于至少一个氨基酸修饰而不同于天然序列Fc区氨基酸序列的氨基酸序列。在一些实施方案中,“变体Fc区”包含的氨基酸序列由于至少一个氨基酸修饰而不同于天然序列Fc区氨基酸序列,但仍保留天然序列Fc区的至少一种效应子功能。在一些实施方案中,与天然序列Fc区或与亲本多肽的Fc区相比,变体Fc区具有在天然序列Fc区或在亲本多肽的Fc区中的至少一个氨基酸取代,例如约一至约十个氨基酸取代,并且优选约一至约五个氨基酸取代。在一些实施方案中,本文的变体Fc区将与天然序列Fc区和/或与亲本多肽的Fc区具有至少约80%的序列同一性,与其至少约90%的序列同一性,与其至少

约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%或至少约99%的序列同一性。

[0067] “Fc受体”或“FcR”描述了与抗体Fc区结合的受体。在一些实施方案中,Fc γ R是天然人FcR。在一些实施方案中,FcR是结合IgG抗体的受体(γ 受体),并包括Fc γ RI、Fc γ RII和Fc γ RIII亚类的受体,包括这些受体的等位基因变体和选择性剪接形式。Fc γ RII受体包括Fc γ RIIA(“激活性受体”)和Fc γ RIIB(“抑制性受体”),它们具有相似的氨基酸序列,主要区别在于其细胞质结构域。激活性受体Fc γ RIIA在其细胞质结构域中包含免疫受体酪氨酸激活基序(ITAM)。抑制性受体Fc γ RIIB在其细胞质结构域中包含免疫受体酪氨酸抑制基序(ITIM)。(参见例如,Daeron,Annu.Rev.Immunol.15:203-234(1997))。例如,在以下文献中对FcR进行了综述:Ravetch和Kinet,Annu.Rev.Immunol.9:457-92(1991);Capel等人,Immunomethods 4:25-34(1994);以及de Haas等人,J.Lab.Clin.Med.126:330-41(1995)。本文中的术语“FcR”涵盖其他FcR,包括将来要鉴定的那些。例如,术语“Fc受体”或“FcR”还包括新生儿受体FcRn,所述FcRn负责将母体IgG转移到胎儿(Guyer等人,J.Immunol.117:587(1976)和Kim等人,J.Immunol.24:249(1994))和调节免疫球蛋白的稳态。测量与FcRn结合的方法是已知的(参见例如,Ghetie和Ward,Immunol.Today 18(12):592-598(1997);Ghetie等人,Nature Biotechnology,15(7):637-640(1997);Hinton等人,J.Biol.Chem.279(8):6213-6216(2004);WO 2004/92219(Hinton等人))。

[0068] 如本文所用,术语“基本上相似”或“基本上相同”表示两个或更多个数值之间足够高的相似性,使得本领域技术人员认为这两个或更多个值之间的差异在由所述值测量的生物学特征的背景下具有很小或者没有生物学和/或统计学显著性。在一些实施方案中,两个或更多个基本上相似的值的差异不超过约5%、10%、15%、20%、25%或50%中的任一个。

[0069] 多肽“变体”意指在比对序列和引入空位(如果需要)以实现最大序列同一性百分比并且不将任何保守取代视为序列同一性的一部分之后,与天然序列多肽具有至少约80%的氨基酸序列同一性的生物活性多肽。此类变体包括例如其中在多肽的N端或C端添加、或缺失一个或多个氨基酸残基的多肽。在一些实施方案中,变体将具有至少约80%的氨基酸序列同一性。在一些实施方案中,变体将具有至少约90%的氨基酸序列同一性。在一些实施方案中,变体将与天然序列多肽具有至少约95%的氨基酸序列同一性。

[0070] 如本文所用,关于肽、多肽或抗体序列的“氨基酸序列同一性百分比(%)”和“同源性”定义为在比对序列和引入空位(如果需要)以实现最大序列同一性百分比并且不将任何保守取代视为序列同一性的一部分之后,候选序列中与特定肽或多肽序列中的氨基酸残基相同的氨基酸残基的百分比。用于确定氨基酸序列同一性百分比的比对可以以本领域熟知的多种方式来实现,例如,使用公众可获得的计算机软件,如BLAST、BLAST-2、ALIGN或MEGALIGN™(DNASTAR)软件。本领域技术人员可以确定用于测量比对的适当参数,包括在所比较序列的全长上实现最大比对所需的任何算法。

[0071] 氨基酸取代可以包括但不限于将多肽中的一种氨基酸用另一种氨基酸替代。示例性取代在表1中示出。可以将氨基酸取代引入目的抗体中,并且筛选产物的所需活性,例如保留/改善的抗原结合、降低的免疫原性或改善的ADCC或CDC。

表1

原始残基	示例性取代
Ala (A)	Val;Leu;Ile

Arg (R)	Lys;Gln;Asn
Asn (N)	Gln;His;Asp,Lys;Arg
Asp (D)	Glu;Asn
Cys (C)	Ser;Ala
Gln (Q)	Asn;Glu
Glu (E)	Asp;Gln
Gly (G)	Ala
His (H)	Asn;Gln;Lys;Arg
Ile (I)	Leu;Val;Met;Ala;Phe;正亮氨酸
Leu (L)	正亮氨酸;Ile;Val;Met;Ala;Phe
Lys (K)	Arg;Gln;Asn
Met (M)	Leu;Phe;Ile
Phe (F)	Trp;Leu;Val;Ile;Ala;Tyr
Pro (P)	Ala
Ser (S)	Thr
Thr (T)	Val;Ser
Trp (W)	Tyr;Phe
Tyr (Y)	Trp;Phe;Thr;Ser
Val (V)	Ile;Leu;Met;Phe;Ala;正亮氨酸

[0072] 可根据常见的侧链特性将氨基酸分组：

- (1) 疏水性：正亮氨酸、Met、Ala、Val、Leu、Ile；
- (2) 中性亲水性：Cys、Ser、Thr、Asn、Gln；
- (3) 酸性：Asp、Glu；
- (4) 碱性：His、Lys、Arg；
- (5) 影响链取向的残基：Gly、Pro；
- (6) 芳香族：Trp、Tyr、Phe。

[0073] 非保守取代将需要将这些类别之一的成员交换为另一类别。

[0074] 术语“载体”用于描述可以被工程化为含有一种或多种克隆的多核苷酸的可以在宿主细胞中繁殖的多核苷酸。载体可包括一种或多种以下元件：复制起点、调节目的多肽表达的一种或多种调节序列（如启动子和/或增强子）、和/或一种或多种选择性标记基因（如抗生素抗性基因和可用于比色测定的基因，例如 β -半乳糖苷酶）。术语“表达载体”是指用于在宿主细胞中表达目的多肽的载体。

[0075] “宿主细胞”是指可以是或已经是载体或分离的多核苷酸的受体的细胞。宿主细胞可以是原核细胞或真核细胞。示例性的真核细胞包括哺乳动物细胞，如灵长类动物或非灵长类动物细胞；真菌细胞，如酵母；植物细胞；和昆虫细胞。非限制性示例性哺乳动物细胞包括但不限于NS0细胞、PER.C6[®]细胞 (CruCell) 以及293和CHO细胞及其衍生物（如293-6E、CHO-DG44、CHO-K1、CHO-S和CHO-DS细胞）。宿主细胞包括单个宿主细胞的后代，并且由于天然的、偶然的或故意的突变，所述后代可能不一定与原始亲本细胞完全相同（在形态学或基因组DNA互补序列方面）。宿主细胞包括用本文提供的一种或多种多核苷酸在体内转染的细

胞。

[0076] 如本文所用,术语“分离的”是指已经与通常在自然界中发现或产生的至少一些组分分离的分子。例如,当多肽与产生它的细胞的至少一些组分分离时,称其为“分离的”。当多肽在表达后由细胞分泌时,将含有所述多肽的上清液与产生它的细胞物理分离,认为是“分离”所述多肽。类似地,当多核苷酸不是典型地在自然界中发现的较大的多核苷酸的一部分时(如例如,在DNA多核苷酸的情况下的基因组DNA或线粒体DNA),或例如在RNA多核苷酸的情况下与产生它的细胞的至少一些组分分离,多核苷酸被称为“分离的”。因此,在宿主细胞内的载体中包含的DNA多核苷酸可称为“分离的”。

[0077] 术语“个体”和“受试者”在本文中可互换使用以指代动物,例如哺乳动物。在一些实施方案中,提供了治疗哺乳动物的方法,所述哺乳动物包括但不限于人、啮齿动物、猿猴、猫类、犬类、马类、牛类、猪类、绵羊类、山羊类、哺乳动物实验室动物、哺乳动物家畜、哺乳动物运动动物和哺乳动物宠物。在一些例子中,“个体”或“受试者”是指需要治疗疾病或障碍的个体或受试者。在一些实施方案中,接受治疗的受试者可以是指明如下事实的患者:受试者已被鉴定为患有与治疗相关的障碍,或有患上所述障碍的足够风险。

[0078] 如本文所用,“疾病”或“障碍”是指需要和/或期望治疗的病症。

[0079] 除非另有说明,否则术语“肿瘤细胞”、“癌细胞”、“癌症”、“肿瘤”和/或“瘤”在本文中可互换使用,并且是指展现出会干扰身体器官和系统的正常功能发挥的不受控制的生长和/或异常增加的细胞存活和/或细胞凋亡的抑制的一种细胞(或多种细胞)。此定义包括良性和恶性癌症、息肉、增生以及休眠的肿瘤或微转移。

[0080] 术语“癌症”和“肿瘤”涵盖实体癌和血液/淋巴癌,并且还涵盖恶性、恶变前和良性生长,如发育异常。示例性癌症包括但不限于:肾上腺癌;星形细胞瘤;基底细胞癌;胆道癌;膀胱癌;骨癌;脑和中枢神经系统癌症;乳腺癌;腹膜癌;宫颈癌;绒毛膜癌;软骨肉瘤;尤因肉瘤;结肠直肠癌(结直肠癌);结缔组织癌;消化系统癌症;子宫内膜癌;食道癌;眼癌;头颈癌;胃癌(包括胃肠癌);胶质母细胞瘤;肝癌;肝细胞瘤;上皮内瘤;肾脏癌或肾癌;喉癌;白血病;肝脏癌症;肺癌(例如,小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺腺癌和肺鳞癌);黑色素瘤;骨髓瘤;神经母细胞瘤;口腔癌(唇、舌、口和咽);卵巢癌;胰腺癌,如胰腺腺癌;脑垂体癌;前列腺癌;视网膜母细胞瘤;横纹肌肉瘤;直肠癌;呼吸系统癌症;间皮瘤;唾液腺癌;肉瘤;皮肤癌;鳞状细胞癌;胃癌;睾丸癌;甲状腺癌;子宫或子宫内膜癌;泌尿系统癌症;外阴癌;淋巴瘤,包括霍奇金和非霍奇金淋巴瘤、以及B细胞淋巴瘤(包括低分级/滤泡性非霍奇金淋巴瘤(NHL);小淋巴细胞(SL)NHL;中分级/滤泡性NHL;中分级弥漫性NHL;高分级免疫母细胞NHL;高分级淋巴母细胞NHL;高分级小无核裂细胞NHL;大肿块NHL;套细胞淋巴瘤;艾滋病相关淋巴瘤);以及华氏巨球蛋白血症;慢性淋巴细胞白血病(CLL);急性成淋巴细胞性白血病(ALL);毛细胞白血病;慢性骨髓细胞性白血病;以及其他癌和肉瘤;以及移植后淋巴增殖性疾病(PTLD),以及与斑痣性错构瘤病相关的异常血管增生,水肿(如与脑肿瘤相关的水肿),以及梅格斯综合征。

[0081] 在一些实施方案中,“增加”或“减少”分别是指统计学上显著的增加或减少。技术人员将清楚,“调节”还可以涉及与相同条件但不存在测试药剂的情况相比,实现靶标或抗原对其配体、结合配偶体、用于缔合为同多聚体或异多聚体形式的配偶体、或底物中的一种或多种的亲合力、亲合力、特异性和/或选择性的改变(可以是增加或减少);实现靶标或抗

原对存在靶标或抗原的介质或环境中的一种或多种条件(如pH、离子强度、存在辅因子等)的敏感性的改变(可以是增加或减少);和/或细胞增殖或细胞因子产生。这可以以任何合适的方式和/或使用本身已知的或本文描述的任何合适的测定来确定,这取决于所涉及的靶标。

[0082] 如本文所用,“治疗”是用于获得有益的或期望的临床结果的途径。如本文所用,“治疗”涵盖针对包括人在内的哺乳动物中的疾病的治疗剂的任何施用或应用。出于本公开文本的目的,有益或期望的临床结果包括但不限于以下中的任何一个或多个:减轻一种或多种症状,降低疾病程度,预防或延迟疾病的传播(例如转移,例如转移到肺或淋巴结),预防或延迟疾病的复发,延迟或减缓疾病的进展,改善疾病状态,抑制疾病或疾病进展,抑制或减缓疾病或疾病进展,停滞疾病发展和缓解(无论是部分还是全部)。“治疗”还涵盖降低增殖性疾病的病理后果。本文提供的方法考虑了这些治疗方面中的任何一个或多个。与上述一致,术语治疗不需要百分之百地去除所述障碍的所有方面。

[0083] “改善”是指与不施用治疗剂相比,一种或多种症状的减轻或改进。“改善”还包括缩短或减少症状的持续时间。

[0084] 术语“抗癌剂”在本文中以其最广泛的意义使用,是指用于治疗一种或多种癌症的药剂。此类药剂的示例性类别包括但不限于化学治疗剂、抗癌生物制剂(如细胞因子、受体细胞外结构域-Fc融合物、和抗体)、放射疗法、CAR-T疗法、治疗性寡核苷酸(如反义寡核苷酸和siRNA)和溶瘤病毒。

[0085] 如本文所用,术语“协同的”、“协同地”和“协同作用”是指两种或更多种药剂的超过加性效应。DR5激动剂与PLK1抑制剂之间或DR5激动剂与CDK抑制剂(如CDK9抑制剂)之间的协同效应的确定可以使用本文所述的测定进行。

[0086] 术语“生物样品”意指来自活物或曾经的活物的物质的量。此类物质包括但不限于血液(例如全血)、血浆、血清、尿液、羊水、滑液、内皮细胞、白细胞、单核细胞、其他细胞、器官、组织、骨髓、淋巴结和脾脏。

[0087] 术语“对照”或“参考”是指已知不含有分析物(“阴性对照”)或含有分析物(“阳性对照”)的组合物。阳性对照可包含已知浓度的分析物。

[0088] 如本文所用,“延迟疾病的发展”意指推迟、阻碍、减缓、延缓、稳定、抑制和/或延期疾病(例如癌症)的发展。此延迟可以具有不同的时间长度,这取决于病史和/或所治疗的个体。对于本领域技术人员显而易见的是,足够或显著的延迟实际上可以涵盖预防,因为个体不会患上疾病。例如,可能延迟晚期癌症,如转移的发展。

[0089] 如本文所用,“预防”包括提供关于受试者的疾病的发生或复发的预防,所述受试者可能易患所述疾病但尚未被诊断患有所述疾病。除非另有说明,否则术语“降低”、“抑制”或“预防”并不表示或要求在所有时间内完全预防,而只是在所测量的时间段内如此。

[0090] 物质/分子、激动剂或拮抗剂的“治疗有效量”可根据如个体的疾病状态、年龄、性别和体重,以及物质/分子、激动剂或拮抗剂在个体中引发所需应答的能力等因素而变化。治疗有效量也是治疗有益效果超过物质/分子、激动剂或拮抗剂的任何毒性或有害作用的量。治疗有效量可以按一次或多次施用来递送。“治疗有效量”是指在必要的剂量和持续必要的时间段的情况下有效实现所需治疗和/或预防结果的量。

[0091] 术语“药物配制品”和“药物组合物”可互换使用,并且是指呈使得一种或多种活性

成分的生物活性有效的形式、并且不含对所述配制品所施用的受试者具有不可接受的毒性的其他组分的制剂。此类配制品可以是无菌的。

[0092] “药学上可接受的载体”是指用于与治疗剂一起使用的无毒固体、半固体或液体填充剂、稀释剂、包囊材料、配制助剂或本领域常规的载体,所述载体和治疗剂共同构成用于向受试者施用的“药物组合物”。药学上可接受的载体在使用的剂量和浓度下对接受者无毒,并且与配制品的其他成分相容。药学上可接受的载体适用于所用配制品。

[0093] 与一种或多种其他治疗剂“组合”施用包括同时(并行)和以任何顺序依序施用。

[0094] 术语“并行”在本文中用于指两种或更多种治疗剂的施用,其中至少部分施用在时间上重叠或者其中一种治疗剂的施用相对于另一种治疗剂的施用在很短的时间段内发生,或者其中两种药剂的治疗作用重叠持续至少一段时间。

[0095] 术语“依序”在本文中用于指两种或更多种治疗剂的施用在时间上不重叠,或者其中药剂的治疗作用不重叠。

[0096] 如本文所用,“与……结合”是指除了一种治疗模式之外还施用另一种治疗模式。因此,“与……结合”是指在向个体施用一种治疗模式之前、期间或之后施用另一种治疗模式。

[0097] 术语“药品说明书”用于指代通常包括在治疗产品的商业包装中的说明书,所述说明书含有关于使用此类治疗产品的适应证、用法、剂量、施用、组合疗法、禁忌症和/或警告的信息。

[0098] “制品”是包含至少一种试剂(例如,用于治疗疾病或障碍(例如癌症)的药剂)或用于特异性地检测本文所述的生物标记物的探针的任何制造物(例如包装或容器)或试剂盒。在一些实施方案中,所述制造物或试剂盒作为用于实施本文所述的方法的单元进行促销、分发或销售。

[0099] 术语“标记”和“可检测标记”意指例如与抗体或抗原附接的部分,以使特异性结合对的成员之间的反应(例如,结合)可检测。所述特异性结合对的经标记的成员称为“被可检测地标记”。因此,术语“经标记的结合蛋白”是指掺入了用于鉴定所述结合蛋白的标记的蛋白质。在一些实施方案中,所述标记是可产生能通过视觉或仪器手段检测的信号的可检测标记,例如,掺入经放射性标记的氨基酸或将生物素基部分附接到多肽,所述生物素基部分可以通过加标记的抗生物素蛋白检测(例如,链霉抗生物素蛋白含有荧光标记物或酶活性,可通过光学方法或比色法检测)。用于多肽的标记的例子包括但不限于以下:放射性同位素或放射性核素(例如, ^3H 、 ^{14}C 、 ^{35}S 、 ^{90}Y 、 ^{99}Tc 、 ^{111}In 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{177}Lu 、 ^{166}Ho 或 ^{153}Sm);色原、荧光标记(例如,FITC、罗丹明、镧系荧光粉)、酶标记(例如,辣根过氧化物酶、萤光素酶、碱性磷酸酶);化学发光标记;生物素基团;由第二报道分子识别的预定多肽表位(例如,亮氨酸拉链对序列、第二抗体的结合位点、金属结合结构域、表位标签);和如钆螯合物等的磁性剂。通常用于免疫测定的标记的代表性例子包括产生光的部分,例如吖啶鎓化合物;和产生荧光的部分,例如荧光素。在这方面,所述部分本身可能没有被可检测地标记,但在与又另一部分反应时可能变得可检测。

示例性DR5激动剂

[0100] 本文提供了治疗癌症的方法,所述方法包括施用DR5激动剂。非限制性示例性DR5激动剂包括INBRX-109、依托奈明 α (ABBV-621)、IGM-8444(IGM Biosciences)、BI 905711

(Boehringer Ingelheim)、GEN1029 (HexaBody®-DR5/DR5; Genmab)、TAS266 (Novartis)、MM-201a (Merrimack Pharmaceuticals) 和 MM201-b (Merrimack Pharmaceuticals)。在一些实施方案中, DR5激动剂是DR5结合多肽。在一些实施方案中, 本文提供的DR5结合多肽是多价的。在一些实施方案中, 本文提供的DR5结合多肽是至少四价的。

[0101] 在各种实施方案中, DR5结合多肽包含至少一个VHH结构域, 所述至少一个VHH结构域包含含有SEQ ID NO:1的序列的CDR1、含有SEQ ID NO:2的序列的CDR2和含有SEQ ID NO:3的序列的CDR3。在一些实施方案中, 至少一个VHH结构域是人源化的。在一些实施方案中, DR5结合多肽包含至少一个VHH结构域, 所述至少一个VHH结构域包含与SEQ ID NO:4的氨基酸序列至少90%、至少95%、至少99%或100%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中, DR5结合多肽包含至少一个VHH结构域, 所述至少一个VHH结构域包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列。

[0102] 在一些实施方案中, DR5结合多肽包含至少一个结合DR5的VHH结构域和一个Fc区。在一些实施方案中, 本文提供的DR5结合多肽包含两个结合DR5的VHH结构域和一个Fc区。在一些实施方案中, Fc区在生理条件下介导DR5结合多肽的二聚化, 使得形成使DR5结合位点数量加倍的二聚体。例如, 包含两个结合DR5的VHH结构域和一个Fc区的DR5结合多肽作为单体是二价的, 但在生理条件下, Fc区可介导二聚化, 使得DR5结合多肽在此类条件下是四价二聚体。

[0103] 在各种实施方案中, 提供了DR5结合多肽, 其中每个VHH结构域包含含有SEQ ID NO:1的序列的CDR1、含有SEQ ID NO:2的序列的CDR2和含有SEQ ID NO:3的序列的CDR3。在一些实施方案中, 每个VHH结构域是人源化的。

[0104] 在一些实施方案中, DR5结合多肽包含结构VHH-接头-VHH-接头-Fc。在一些实施方案中, DR5结合多肽的VHH-接头-VHH部分包含与SEQ ID NO:5的氨基酸序列至少90%、至少95%、至少99%或100%相同的氨基酸序列。在一些实施方案中, DR5结合多肽的VHH-接头-VHH部分包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列。在一些实施方案中, Fc包含铰链。在一些此类实施方案中, Fc包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列。在一些实施方案中, DR5结合多肽包含与SEQ ID NO:7的氨基酸序列至少90%、至少95%、至少99%或100%相同的氨基酸序列, 其包含两个VHH结构域和一个Fc区。在一些实施方案中, DR5结合多肽包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列, 其包含两个VHH结构域和一个Fc区。在一些实施方案中, DR5结合多肽由SEQ ID NO:7的氨基酸序列组成。由SEQ ID NO:7或缺少末端赖氨酸的SEQ ID NO:7的氨基酸序列组成的DR5结合多肽可以称为INBRX-109。

[0105] 在一些实施方案中, 结合DR5的VHH结构域可以是人源化的。人源化抗体(如sdAb或含有VHH的多肽)可用作治疗分子, 因为人源化抗体降低或消除人对非人抗体的免疫应答, 所述人对非人抗体的免疫应答可能导致对抗体治疗剂的免疫应答以及降低的治疗剂的有效性。通常, 人源化抗体包含一个或多个可变结构域, 其中CDR(或其部分)源自非人抗体, 并且FR(或其部分)源自人抗体序列。人源化抗体任选地还将包含人恒定区的至少一部分。在一些实施方案中, 人源化抗体中的一些FR残基被来自非人抗体(例如, CDR残基所来源的抗体)的相应残基取代, 例如以恢复或改善抗体特异性或亲和力。

[0106] 人源化抗体及其制备方法综述于例如Almagro和Fransson(2008) Front.Biosci.13:1619-1633中, 并且进一步描述于例如以下文献中: Riechmann等人,

(1988) *Nature* 332:323-329; Queen等人, (1989) *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 86:10029-10033; 美国专利号5,821,337、7,527,791、6,982,321和7,087,409; Kashmiri等人, (2005) *Methods* 36:25-34; Padlan, (1991) *Mol. Immunol.* 28:489-498 (描述了“表面重修”); Dall’Acqua等人, (2005) *Methods* 36:43-60 (描述了“FR改组”); 以及 Osbourn等人, (2005) *Methods* 36:61-68 和 Klimka等人, (2000) *Br. J. Cancer*, 83:252-260 (描述了用于FR改组的“导向选择”方法)。

[0107] 可以用于人源化的人框架区包括但不限于:使用“最佳拟合”法选择的框架区(参见例如, Sims等人(1993) *J. Immunol.* 151:2296); 衍生自具有特定亚组的重链可变区的人抗体的共有序列的框架区(参见例如, Carter等人(1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285; 和 Presta等人(1993) *J. Immunol.* 151:2623); 人成熟(体细胞突变)框架区或人种系框架区(参见例如, Almagro和 Fransson(2008) *Front. Biosci.* 13:1619-1633); 和衍生自筛选FR文库的框架区(参见例如, Baca等人, (1997) *J. Biol. Chem.* 272:10678-10684 和 Rosok等人, (1996) *J. Biol. Chem.* 271:22611-22618)。通常, 将VHH的FR区替代为人FR区以制备人源化VHH。在一些实施方案中, 替代人FR的某些FR残基以改善人源化VHH的一种或多种特性。具有此类替代残基的VHH结构域在本文中仍称为“人源化”的。

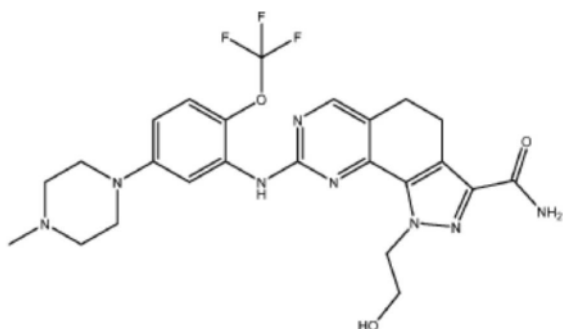
[0108] 在各种实施方案中, 在DR5结合多肽中所包括的Fc区是人Fc区, 或者源自人Fc区。

[0109] 在一些实施方案中, 在DR5结合多肽中所包括的Fc区源自人Fc区, 并且在下铰链中包含对应于IgG1 E233、L234和L235的三个氨基酸的缺失, 在本文中称为“Fc xELL”。Fc xELL多肽不与Fc γ R接合, 并因此称为“效应子沉默”或“效应子无效”, 然而在一些实施方案中, xELL Fc区结合FcRn并因此具有与FcRn介导的再循环相关的延长半衰期和胞吞转运。在一些实施方案中, Fc区是人IgG1 xELL Fc区。

示例性PLK1抑制剂

[0110] 本文提供了治疗癌症的方法, 所述方法包括施用PLK1抑制剂。在一些实施方案中, PLK1抑制剂是小分子。在一些实施方案中, PLK1抑制剂是RNAi。在一些实施方案中, PLK1抑制剂是安文塞替、伏拉塞替、瑞格塞替、BI2536 (Boehringer Ingelheim)、N-[4-[(6-氯-3-吡啶基) 甲氧基]-3-甲氧基苯基]甲基]-3,4-二甲氧基苯乙胺盐酸盐 (SBE 13HC1)、MLN0905 (Takeda Oncology)、GSK461364 (GlaxoSmithKline)、CYC140 (Cyclacel)、TKM-080301 (TKM-PLK1; Arbutus Biopharma)、TAK-960 (Takeda Pharmaceutical Company)、波洛辛、波洛辛-2HT、R03280 (CAS号1062243-51-9)、2-氰基-2-[3-乙基-4-氧代-5-[[3-(2-吡咯烷-1-基乙基) 苯胺基]甲基]-1,3-噻唑烷-2-基]-N-(2,2,2-三氟乙基) 乙酰胺 (ZK-噻唑啉酮)、环波林9 (CAS号40533-25-3)、5-(5,6-二甲氧基-1H-苯并咪唑-1-基)-3-[[2-(三氟甲基) 苯基]甲氧基]-2-噻吩甲酰胺 (GW 843682X)、HMN-214 (CAS号173529-46-9) 或HMN-176 (CAS号173529-10-7)。在一些实施方案中, PLK1抑制剂是安文塞替、伏拉塞替、瑞格塞替、BI2536 (Boehringer Ingelheim)、MLN0905 (Takeda Oncology)、GSK461364 (GlaxoSmithKline)、CYC140 (Cyclacel)、TKM-080301 (TKM-PLK1; Arbutus Biopharma) 或TAK-960 (Takeda Pharmaceutical Company)。

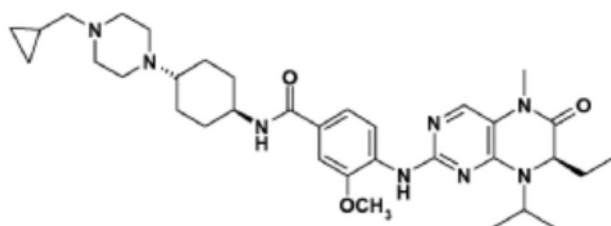
[0111] 在一些实施方案中, PLK1抑制剂是安文塞替。安文塞替(也称为PCM-075或NMS-1286937)是选择性ATP竞争性PLK1抑制剂, 其具有以下结构:



或其药学上可接受的盐或水合物。参见

例如,美国专利号8,927,530。安文塞替对PLK1具有特异性,并且在实体恶性肿瘤和血液恶性肿瘤的模型中在体外和体内都具有有效的抗肿瘤活性。

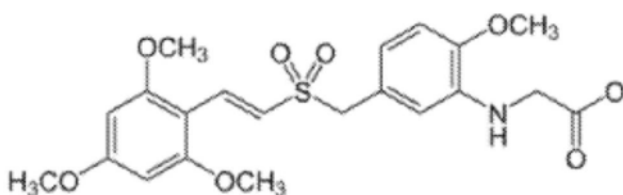
[0112] 在一些实施方案中,PLK1抑制剂是伏拉塞替。伏拉塞替是选择性PLK1抑制剂,具有以下结构:



或其药学上可接受的盐或水合物。参

见例如,WO 04/076454和WO 07/090844。

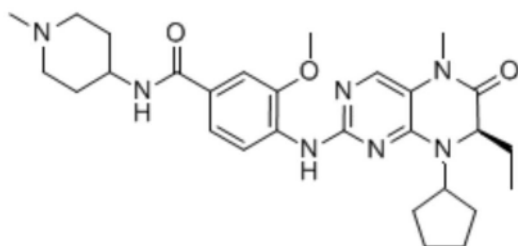
[0113] 在一些实施方案中,PLK1抑制剂是瑞格塞替。瑞格塞替是多种激酶(包括PI3-K和PLK1)的抑制剂,具有以下结构:



或其药学上可接受的盐或水合物。

参见例如,美国专利号7,598,232(化合物4)。

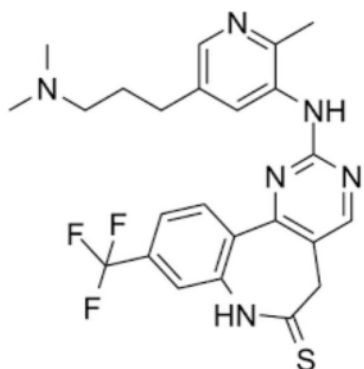
[0114] 在一些实施方案中,PLK1抑制剂是BI2536。BI2536是PLK1的选择性抑制剂,具有以下结构:



或其药学上可接受的盐或水合物。参见例

如,Steegmaier等人,Current Biology,17:316-322(2007)。

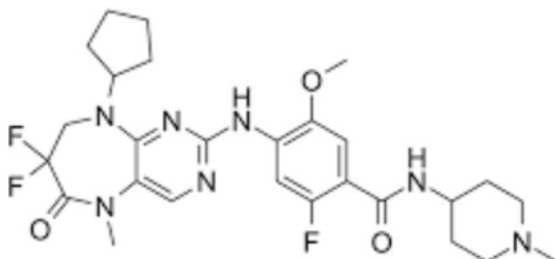
[0115] 在一些实施方案中,PLK1抑制剂是MLN0905。MLN0905是PLK1的选择性抑制剂,具有以下结构:



或其药学上可接受的盐或水合物。参见例如, Mol

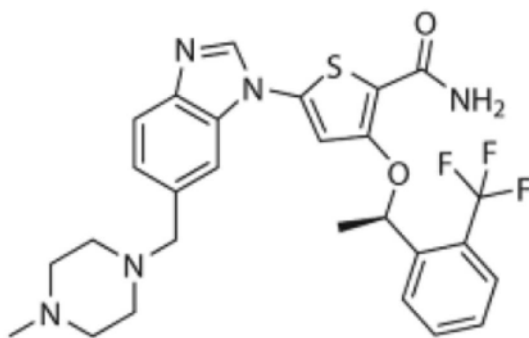
Cancer Ther, 11:2045-53 (2012)。

[0116] 在一些实施方案中, PLK1抑制剂是TAK-960。TAK-960是PLK1的选择性抑制剂, 具有以下结构:



或其药学上可接受的盐或水合物。参见例如, Mol Cancer Ther, 11:700-9 (2012)。

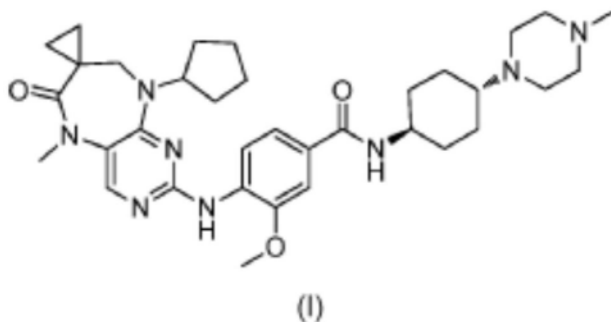
[0117] 在一些实施方案中, PLK1抑制剂是GSK461364。GSK461364是ATP竞争性PLK1抑制剂, 具有以下结构:



或其药学上可接受的盐或水合物。参见例

如, Clin Cancer Res. 17(10):3420-30 (2011)。

[0118] 在一些实施方案中, PLK1抑制剂是CYC140。在一些实施方案中, PLK1抑制剂具有以下结构:



或其药学上可接受的盐或水合物。参

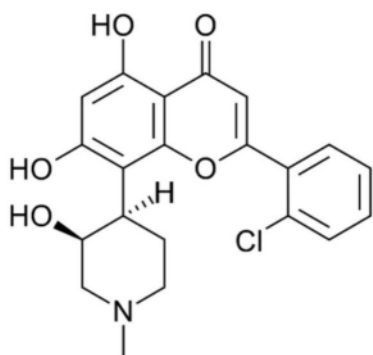
见例如, WO 2009/040556。

[0119] 在一些实施方案中,PLK1抑制剂是TKM-080301。TKM-080301是脂质纳米颗粒(LNP)配制品,其包含四种脂质和针对人PLK1 mRNA的合成双链siRNA。合成siRNA是互补RNA寡核苷酸的双链体,其被设计为在通过RNA干扰机制实现转录后基因抑制。参见例如, *Oncologist*,24(6):747-e218(2019);WO 2008/342535。

示例性CDK抑制剂

[0120] 本文提供了治疗癌症的方法,所述方法包括施用CDK抑制剂(如CDK9抑制剂)。在一些实施方案中,CDK抑制剂是小分子。在一些实施方案中,CDK抑制剂是夫拉平度(Tolero Pharmaceuticals)、瑟利西利(罗斯科维汀(roscovitine)/CYC202)、迪尼西利(Merck)、奥妥西利(Bayer)、艾尼西利(Vincerx Pharma)、AZD4573(AstraZeneca)、i-CDK9或NVP-2。

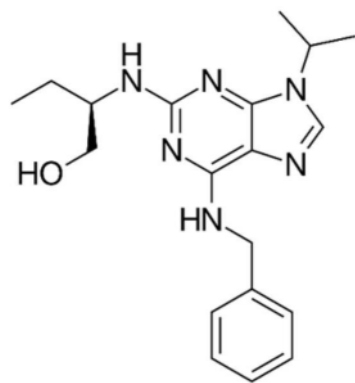
[0121] 在一些实施方案中,CDK抑制剂是夫拉平度。夫拉平度(也称为L86-8275、alvocidib、NSC 649890或HMR-1275;Tolero Pharmaceuticals)是选择性ATP竞争性CDK9抑制剂,具有以下结构:



或其药学上可接受的盐或水合物。夫拉平度是CDK9的

有效和选择性抑制剂并且对各种肿瘤细胞系(如人肺癌和乳腺癌)具有抗肿瘤活性,并且还抑制异种移植模型中的肿瘤生长。参见例如,Anshabo等人, *Frontiers in Oncology*,11(2021)。

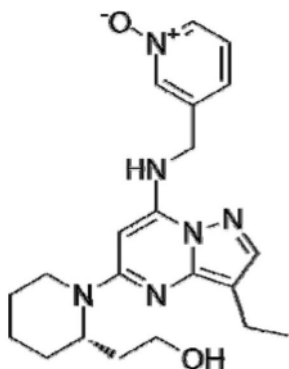
[0122] 在一些实施方案中,CDK抑制剂是瑟利西利(也称为罗斯科维汀或CYC202)。瑟利西利是选择性CDK抑制剂,具有以下结构:



或其药学上可接受的盐或水合物。参见例如,Anshabo等

人, *Frontiers in Oncology*,11(2021)。

[0123] 在一些实施方案中,CDK抑制剂是迪尼西利(也称为SCH 727965;Merck)。迪尼西利是有效的、选择性的CDK(包括CDK1、CDK2、CDK5和CDK9)的小分子抑制剂,具有以下结构:

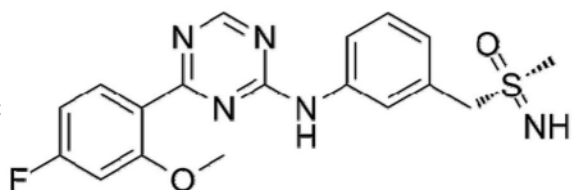


或其药学上可接受的盐或水合物。参见例如,Anshabo等人,

Frontiers in Oncology,11(2021)。

[0124] 在一些实施方案中,CDK抑制剂是奥妥西利(也称为BAY1143572;Bayer)。奥妥西利是有效且高度选择性的正转录延伸因子b(PTEF-b)(由CDK9和细胞周期蛋白-T(CycT)构成)

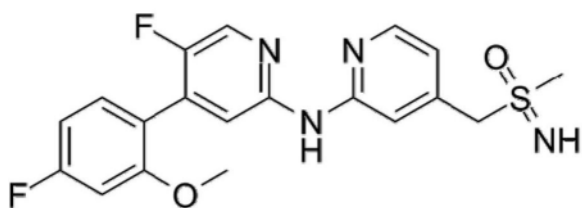
的抑制剂,具有以下结构:



或其药学上可接受的盐

或水合物。参见例如,Anshabo等人,Frontiers in Oncology,11(2021)。

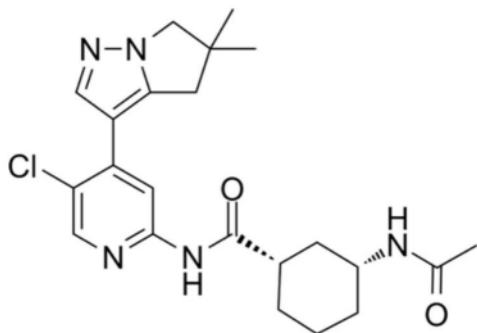
[0125] 在一些实施方案中,CDK抑制剂是艾尼西利(也称为BAY1251152或VIP152;Vincerox Pharma)。艾尼西利是有效且高选择性的PTEF-b/CDK9抑制剂,具有以下结构:



或其药学上可接受的盐或水合物。参见

例如,Anshabo等人,Frontiers in Oncology,11(2021)。

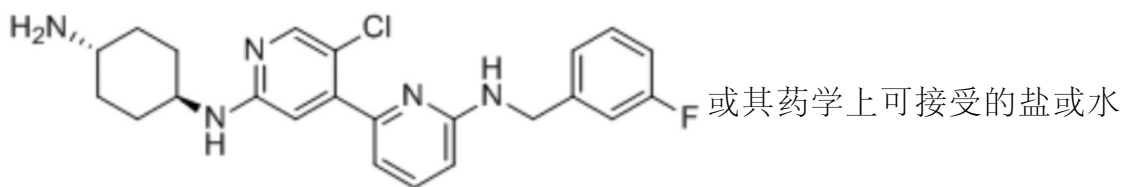
[0126] 在一些实施方案中,CDK抑制剂是AZD4573(AstraZeneca)。AZD4573是CDK9的选择性抑制剂,具有以下结构:



或其药学上可接受的盐或水合物。参见例如,

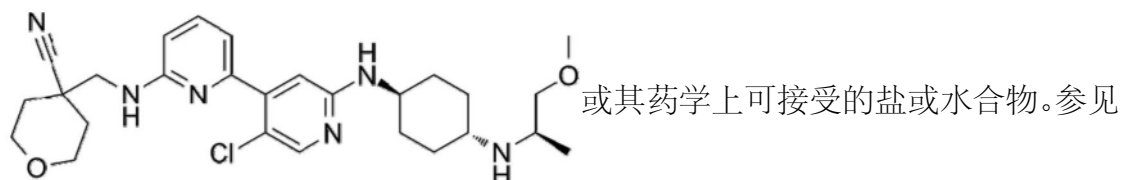
Anshabo等人,Frontiers in Oncology,11(2021)。

[0127] 在一些实施方案中,CDK抑制剂是i-CDK9。i-CDK9 CDK抑制剂对CDK9的选择性是对其他CDK的600倍,具有以下结构:



合物。i-CDK9抑制双特异性酪氨酸磷酸化调节激酶(DYRK) 1A和1B,尽管与CDK9相比效力更低。参见例如,Anshabo等人,Frontiers in Oncology,11(2021)。

[0128] 在一些实施方案中,CDK抑制剂是NVP-2。NVP-2是ATP竞争性、基于氨基嘧啶的抑制剂并且是i-CDK9的化学类似物,并且具有以下结构:



例如,Nat Chem Biol 14,163-170(2018)。

多肽表达和产生

[0129] 提供了包含编码DR5结合多肽的多核苷酸的核酸分子。在一些实施方案中,所述核酸分子还可以编码指导所述DR5结合多肽分泌的前导序列,所述前导序列通常被切割,使得其不存在于所分泌的多肽中。前导序列可以是天然重链(或VHH)前导序列,或者可以是另一种异源前导序列。

[0130] 可以使用本领域常规的重组DNA技术构建核酸分子。在一些实施方案中,核酸分子是适合在选择的宿主细胞中表达的表达载体。

[0131] 提供了包含编码本文所述的DR5结合多肽的核酸的载体。此类载体包括但不限于DNA载体、噬菌体载体、病毒载体、逆转录病毒载体等。在一些实施方案中,选择优化用于在所需细胞类型如CHO、或CHO衍生细胞、或NS0细胞中表达多肽的载体。示例性的此类载体描述于例如Running Deer等人,Biotechnol.Prog.20:880-889(2004)中。

[0132] 在一些实施方案中,DR5结合多肽可以在原核细胞(如细菌细胞)中表达;或者在真核细胞(如真菌细胞(如酵母)、植物细胞、昆虫细胞和哺乳动物细胞)中表达。这种表达可以例如根据本领域已知的程序进行。可用于表达多肽的示例性真核细胞包括但不限于COS细胞,包括COS 7细胞;293细胞,包括293-6E细胞;CHO细胞,包括CHO-S、DG44.Lec13 CHO细胞和FUT8 CHO细胞;PER.C6[®]细胞(Cruce11);以及NS0细胞。在一些实施方案中,DR5结合多肽可以在酵母中表达。参见例如,美国公开号US2006/0270045 A1。在一些实施方案中,基于其对所述多肽进行所需翻译后修饰的能力来选择特定的真核宿主细胞。例如,在一些实施方案中,CHO细胞产生的多肽的唾液酸化水平高于293细胞中产生的相同多肽的唾液酸化水平。

[0133] 可通过任何方法将一种或多种核酸(如载体)引入所需宿主细胞,所述方法包括但不限于磷酸钙转染、DEAE-葡聚糖介导的转染、阳离子脂质介导的转染、电穿孔、转导、感染等。非限制性示例性方法描述于例如Sambrook等人,Molecular Cloning,A Laboratory Manual,第3版Cold Spring Harbor Laboratory Press(2001)。根据任何合适的方法,可以在所需宿主细胞中瞬时地或稳定地转染核酸。

[0134] 还提供了包含本文所述的任何核酸或载体的宿主细胞。在一些实施方案中,提供了表达本文所述的DR5结合多肽的宿主细胞。在宿主细胞中表达的DR5结合多肽可以通过任何合适的方法进行纯化。此类方法包括但不限于使用亲和基质或疏水相互作用色谱法。合适的亲和配体包括ROR1 ECD和结合Fc区的药剂。例如,蛋白A、蛋白G、蛋白A/G或抗体亲和柱可以用于结合Fc区并且纯化包含Fc区的DR5结合多肽。疏水相互作用色谱法,例如丁基或苯基柱,也可适用于纯化一些多肽,如抗体。离子交换色谱法(例如阴离子交换色谱法和/或阳离子交换色谱法)也可适用于纯化一些多肽,如抗体。混合模式色谱法(例如反相/阴离子交换、反相/阳离子交换、亲水相互作用/阴离子交换、亲水相互作用/阳离子交换等)也可适用于纯化某些多肽,如抗体。许多纯化多肽的方法是本领域已知的。

[0135] 在一些实施方案中,在无细胞系统中产生DR5结合多肽。非限制性示例性无细胞系统描述于例如以下文献中:Sitaraman等人,Methods Mol.Biol.498:229-44(2009); Spirin,Trends Biotechnol.22:538-45(2004);Endo等人,Biotechnol.Adv.21:695-713(2003)。

[0136] 在一些实施方案中,提供了通过上述方法制备的DR5结合多肽。在一些实施方案中,在宿主细胞中制备DR5结合多肽。在一些实施方案中,在无细胞系统中制备DR5结合多肽。在一些实施方案中,DR5结合多肽是纯化的。在一些实施方案中,提供了包含DR5结合多肽的细胞培养基。

[0137] 在一些实施方案中,提供了包含通过上述方法制备的抗体的组合物。在一些实施方案中,组合物包含在宿主细胞中制备的DR5结合多肽。在一些实施方案中,组合物包含在无细胞系统中制备的DR5结合多肽。在一些实施方案中,组合物包含经纯化的DR5结合多肽。

药物组合物

[0138] 在一些实施方案中,包含DR5激动剂、PLK1抑制剂和/或CDK抑制剂的组合物以具有各种药学上可接受的载体的配制品提供(参见例如,Gennaro,Remington:The Science and Practice of Pharmacy with Facts and Comparisons:Drugfacts Plus,第20版(2003); Ansel等人,Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems,第7版,Lippencott Williams and Wilkins(2004);Kibbe等人,Handbook of Pharmaceutical Excipients,第3版,Pharmaceutical Press(2000))。可以使用各种药学上可接受的载体,包括媒介物、佐剂和稀释剂。此外,还可以使用各种药学上可接受的辅助物质,如pH调节剂和缓冲剂、张力调节剂、稳定剂、湿润剂等。

[0139] 在一些实施方案中,INBRX-109在包含50mg/mL INBRX-109、10mM组氨酸HCl、8%w/v蔗糖、0.2%w/v泊洛沙姆-88的配制品(pH 6.0)中提供。

使用DR5激动剂和PLK1抑制剂治疗癌症的示例性方法

[0140] 在一些实施方案中,提供了治疗个体的癌症的方法,所述方法包括施用DR5激动剂和PLK1抑制剂。

[0141] 在一些实施方案中,所述方法包括向个体施用有效量的DR5激动剂和PLK1抑制剂。此类治疗方法可用于人或动物。在一些实施方案中,提供了治疗人的方法。可以用本文提供的DR5激动剂和PLK1抑制剂的组合治疗的非限制性示例性癌症包括肾上腺癌;星形细胞瘤;基底细胞癌;胆道癌;膀胱癌;骨癌;脑和中枢神经系统癌症;乳腺癌;腹膜癌;宫颈癌;绒毛膜癌;软骨肉瘤;尤因肉瘤;结肠直肠癌(结直肠癌);结缔组织癌;消化系统癌症;子宫内膜

癌;食道癌;眼癌;头颈癌;胃癌;胃肠癌;胶质母细胞瘤;肝癌;肝细胞瘤;上皮内瘤;肾脏癌或肾癌;喉癌;白血病;肝脏癌症;肺癌;小细胞肺癌;非小细胞肺癌;肺腺癌;肺鳞癌;黑色素瘤;骨髓瘤;神经母细胞瘤;口腔癌(唇、舌、口和咽);卵巢癌;胰腺癌,如胰腺腺癌;脑垂体瘤;前列腺癌;视网膜母细胞瘤;横纹肌肉瘤;直肠癌;呼吸系统癌症;间皮瘤;唾液腺癌;肉瘤;皮肤癌;鳞状细胞癌;胃癌;睾丸癌;甲状腺癌;子宫或子宫内膜癌;泌尿系统癌症;和外阴癌;淋巴瘤;霍奇金淋巴瘤;非霍奇金淋巴瘤;B细胞淋巴瘤;低分级/滤泡性非霍奇金淋巴瘤(NHL);小淋巴细胞(SL) NHL;中分级/滤泡性NHL;中分级弥漫性NHL;高分级免疫母细胞NHL;高分级淋巴母细胞NHL;高分级小无核裂细胞NHL;大肿块NHL;套细胞淋巴瘤;艾滋病相关淋巴瘤;华氏巨球蛋白血症;慢性淋巴细胞白血病(CLL);急性成淋巴细胞性白血病(ALL);毛细胞白血病;慢性骨髓细胞性白血病;以及其他癌和肉瘤;以及移植后淋巴增殖性疾病(PTLD),以及与斑痣性错构瘤病相关的异常血管增生,水肿(如与脑肿瘤相关的水肿),以及梅格斯综合征。

[0142] 可以根据需要向受试者施用DR5激动剂和PLK1抑制剂。每种药剂的施用频率的确定可以由本领域技术人员(如主治医生)基于对以下因素的考量来进行:所治疗的病症、所治疗受试者的年龄、所治疗病症的严重程度、所治疗受试者的一般健康状况等。在一些实施方案中,一次或多次向受试者施用有效剂量的一种或多种治疗剂。在一些实施方案中,每天、每半周、每周、每两周、每月一次等向受试者施用有效剂量的DR5激动剂和/或PLK1抑制剂。向受试者施用有效剂量的DR5激动剂和/或PLK1抑制剂至少一次。在一些实施方案中,可以多次施用有效剂量的DR5激动剂和/或PLK1抑制剂,包括在至少一个月、至少六个月或至少一年的历程内多次施用。

[0143] 在一些实施方案中,将DR5激动剂以有效治疗(包括预防)癌症的量施用。治疗有效量通常取决于所治疗受试者的体重、其身体或健康状况、要治疗的病症的广泛性或所治疗受试者的年龄。通常,可以以以下的量施用DR5结合多肽:每剂量约0.05mg/kg体重至约100mg/kg体重范围内、或每剂量约10 μ g/kg体重至约100mg/kg体重范围内、或每剂量约50 μ g/kg体重至约5mg/kg体重范围内、或每剂量约100 μ g/kg体重至约10mg/kg体重范围内、或每剂量约100 μ g/kg体重至约20mg/kg体重范围内、或每剂量约0.5mg/kg体重至约20mg/kg体重范围内、或每剂量约1mg/kg体重至约10mg/kg体重范围内。

[0144] 在一些实施方案中,将PLK1抑制剂(或其药学上可接受的盐或水合物)以1mg/m²至1000mg/m²(包括例如,10mg/m²至500mg/m²、10mg/m²至300mg/m²或10mg/m²至200mg/m²)的剂量施用。在一些实施方案中,将PLK1抑制剂(或其药学上可接受的盐或水合物)以1mg至10,000mg(包括例如,10mg至5,000mg、或10mg至1,000mg、或10mg至500mg)的剂量施用。

[0145] 在一些实施方案中,将安文塞替以在2mg/m²与100mg/m²之间的剂量施用。在一些实施方案中,将伏拉塞替以在10与500mg之间的剂量施用。在一些实施方案中,将瑞格塞替以在10与1,000mg之间的剂量施用。

[0146] 在一些实施方案中,可以通过各种途径在体内施用治疗剂,所述途径包括但不限于口服、肌肉内、静脉内、动脉内、肠胃外、腹膜内或皮下。可以根据预期的应用选择适当的配制品和施途径。

[0147] 在一些实施方案中,将DR5激动剂和PLK1抑制剂分开施用。在一些实施方案中,将DR5激动剂和PLK1抑制剂依序施用。在一些实施方案中,在PLK1抑制剂之前施用至少一个剂

量的DR5激动剂。在一些实施方案中,在PLK1抑制剂之后施用至少一个剂量的DR5激动剂。

[0148] 在一些实施方案中,将DR5激动剂和PLK1抑制剂并行施用。

[0149] 在一些实施方案中,DR5激动剂和PLK1抑制剂协同作用。在一些实施方案中,在体外细胞存活测定中测定协同作用。在一些实施方案中,与单独施用的每种药剂相比,DR5激动剂和PLK1抑制剂的施用导致协同效应。

[0150] 在一些实施方案中,提供了一种用于在治疗癌症的方法中使用的DR5激动剂,其中所述方法包括施用DR5激动剂与PLK1抑制剂的组合。

[0151] 在一些实施方案中,提供了DR5激动剂在制造用于治疗癌症的药剂中的用途,其中药剂用于与PLK1抑制剂一起施用。

使用DR5激动剂和CDK抑制剂治疗癌症的示例性方法

[0152] 在一些实施方案中,提供了治疗个体的癌症的方法,所述方法包括施用DR5激动剂和CDK抑制剂(如CDK9抑制剂)。

[0153] 在一些实施方案中,所述方法包括向个体施用有效量的DR5激动剂和CDK抑制剂。此类治疗方法可用于人或动物。在一些实施方案中,提供了治疗人的方法。可以用本文提供的DR5激动剂和CDK抑制剂的组合治疗的非限制性示例性癌症包括肾上腺癌;星形细胞瘤;基底细胞癌;胆道癌;膀胱癌;骨癌;脑和中枢神经系统癌症;乳腺癌;腹膜癌;宫颈癌;绒毛膜癌;软骨肉瘤;尤因肉瘤;结肠直肠癌(结直肠癌);结缔组织癌;消化系统癌症;子宫内膜癌;食道癌;眼癌;头颈癌;胃癌;胃肠癌;胶质母细胞瘤;肝癌;肝细胞瘤;上皮内瘤;肾脏癌或肾癌;喉癌;白血病;肝脏癌症;肺癌;小细胞肺癌;非小细胞肺癌;肺腺癌;肺鳞癌;黑色素瘤;骨髓瘤;神经母细胞瘤;口腔癌(唇、舌、口和咽);卵巢癌;胰腺癌,如胰腺腺癌;脑垂体癌;前列腺癌;视网膜母细胞瘤;横纹肌肉瘤;直肠癌;呼吸系统癌症;间皮瘤;唾液腺癌;肉瘤;皮肤癌;鳞状细胞癌;胃癌;睾丸癌;甲状腺癌;子宫或子宫内膜癌;泌尿系统癌症;和外阴癌;淋巴瘤;霍奇金淋巴瘤;非霍奇金淋巴瘤;B细胞淋巴瘤;低分级/滤泡性非霍奇金淋巴瘤(NHL);小淋巴细胞(SL) NHL;中分级/滤泡性NHL;中分级弥漫性NHL;高分级免疫母细胞NHL;高分级淋巴瘤母细胞NHL;高分级小无核裂细胞NHL;大肿块NHL;套细胞淋巴瘤;艾滋病相关淋巴瘤;华氏巨球蛋白血症;慢性淋巴细胞白血病(CLL);急性成淋巴细胞性白血病(ALL);毛细胞白血病;慢性髓细胞性白血病;以及其他癌和肉瘤;以及移植后淋巴增殖性疾病(PTLD),以及与斑痣性错构瘤病相关的异常血管增生,水肿(如与脑肿瘤相关的水肿),以及梅格斯综合征。

[0154] 可以根据需要向受试者施用DR5激动剂和CDK抑制剂。每种药剂的施用频率的确定可以由本领域技术人员(如主治医生)基于对以下因素的考量来进行:所治疗的病症、所治疗受试者的年龄、所治疗病症的严重程度、所治疗受试者的一般健康状态等。在一些实施方案中,一次或多次向受试者施用有效剂量的一种或多种治疗剂。在一些实施方案中,每天、每半周、每周、每两周、每月一次等向受试者施用有效剂量的DR5激动剂和/或CDK抑制剂。向受试者施用有效剂量的DR5激动剂和/或CDK抑制剂至少一次。在一些实施方案中,可以多次施用有效剂量的DR5激动剂和/或CDK抑制剂,包括在至少一个月、至少六个月或至少一年的历程内多次施用。

[0155] 在一些实施方案中,将DR5激动剂以有效治疗(包括预防)癌症的量施用。治疗有效量通常取决于所治疗受试者的体重、其身体或健康状况、要治疗的病症的广泛性或所治疗

受试者的年龄。通常,可以以以下的量施用DR5结合多肽:每剂量约0.05mg/kg体重至约100mg/kg体重范围内、或每剂量约10 μ g/kg体重至约100mg/kg体重范围内、或每剂量约50 μ g/kg体重至约5mg/kg体重范围内、或每剂量约100 μ g/kg体重至约10mg/kg体重范围内、或每剂量约100 μ g/kg体重至约20mg/kg体重范围内、或每剂量约0.5mg/kg体重至约20mg/kg体重范围内、或每剂量约1mg/kg体重至约10mg/kg体重范围内。

[0156] 在一些实施方案中,将CDK抑制剂(或其药学上可接受的盐或水合物)以1mg/m²至1000mg/m²(包括例如,10mg/m²至500mg/m²、10mg/m²至300mg/m²或10mg/m²至200mg/m²)的剂量施用。在一些实施方案中,将CDK抑制剂(或其药学上可接受的盐或水合物)以1mg至10,000mg(包括例如,10mg至5,000mg、或10mg至1,000mg、或10mg至500mg)的剂量施用。

[0157] 在一些实施方案中,将夫拉平度以在2mg/m²与100mg/m²之间的剂量施用。在一些实施方案中,将瑟利西利以在10与500mg之间的剂量施用。在一些实施方案中,将迪尼西利以在10与2,000mg之间的剂量施用。在一些实施方案中,将奥妥西利以在10与1,000mg之间的剂量施用。在一些实施方案中,将艾尼西利以在10与500mg之间的剂量施用。在一些实施方案中,将AZD4573以在1与100mg之间的剂量施用。

[0158] 在一些实施方案中,可以通过各种途径在体内施用治疗剂,所述途径包括但不限于口服、肌肉内、静脉内、动脉内、肠胃外、腹膜内或皮下。可以根据预期的应用选择适当的配制品和施用途径。

[0159] 在一些实施方案中,将DR5激动剂和CDK抑制剂分开施用。在一些实施方案中,将DR5激动剂和CDK抑制剂依序施用。在一些实施方案中,在CDK抑制剂之前施用至少一个剂量的DR5激动剂。在一些实施方案中,在CDK抑制剂之后施用至少一个剂量的DR5激动剂。

[0160] 在一些实施方案中,将DR5激动剂和CDK抑制剂并行施用。

[0161] 在一些实施方案中,DR5激动剂和CDK抑制剂协同作用。在一些实施方案中,在体外细胞存活测定中测定协同作用。在一些实施方案中,与单独施用的每种药剂相比,DR5激动剂和CDK抑制剂的施用导致协同效应。

[0162] 在一些实施方案中,提供了一种用于在治疗癌症的方法中使用的DR5激动剂,其中所述方法包括施用DR5激动剂与CDK抑制剂的组合。

[0163] 在一些实施方案中,提供了DR5激动剂在制造用于治疗癌症的药剂中的用途,其中药剂用于与CDK抑制剂一起施用。

试剂盒

[0164] 还提供了包含本文提供的任何DR5激动剂和/或PLK1抑制剂和合适包装的制品以及试剂盒。在一些实施方案中,本发明包括试剂盒,所述试剂盒具有(i)包含DR5激动剂的配制品,(ii)包含PLK1抑制剂的配制品和(iii)使用试剂盒向个体施用配制品的说明书。在一些实施方案中,本发明包括试剂盒,所述试剂盒具有(i)包含DR5激动剂的配制品,和(ii)使用试剂盒向个体施用配制品与PLK1抑制剂的组合的说明书。在一些实施方案中,本发明包括试剂盒,所述试剂盒具有(i)包含PLK1抑制剂的配制品,和(ii)使用试剂盒向个体施用配制品与DR5激动剂的组合的说明书。

[0165] 还提供了包含本文提供的任何DR5激动剂和/或CDK抑制剂和合适包装的制品以及试剂盒。在一些实施方案中,本发明包括试剂盒,所述试剂盒具有(i)包含DR5激动剂的配制品,(ii)包含CDK抑制剂的配制品和(iii)使用试剂盒向个体施用配制品的说明书。在一些

实施方案中,本发明包括试剂盒,所述试剂盒具有(i)包含DR5激动剂的配制品,和(ii)使用试剂盒向个体施用配制品与CDK抑制剂的组合的说明书。在一些实施方案中,本发明包括试剂盒,所述试剂盒具有(i)包含CDK抑制剂的配制品,和(ii)使用试剂盒向个体施用配制品与DR5激动剂的组合的说明书。

[0166] 用于本文所述组合物的合适包装是本领域中已知的,并且包括例如小瓶(例如密封的小瓶)、器皿、安瓿、瓶子、罐子、软包装(例如密封的Mylar或塑料袋)等。可以进一步将这些制品灭菌和/或密封。还提供了包含本文所述的组合物的单位剂型。这些单位剂型可以以单个或多个单位剂量储存在合适的包装中,并且也可以进一步灭菌和密封。本发明的试剂盒中提供的说明书通常是标签或药品说明书(例如,试剂盒中包括的纸页)上的书面说明书,但机器可读的说明书(例如,磁性或光学存储盘上携带的说明书)也是可接受的。与DR5激动剂、PLK1抑制剂和/或CDK抑制剂的使用有关的说明书通常包括关于用于预期治疗或工业用途的剂量、给药时间表和施用途径的信息。试剂盒还可以包含选择合适的个体或治疗的描述。

[0167] 这些容器可以是单位剂量、散装包装(例如,多剂量包装)或亚单位剂量。例如,还可以提供包含足够剂量的本文公开的分子的试剂盒以在延长的时间段内为个体提供有效治疗,所述延长的时间段为如约一周、2周、3周、4周、6周、8周、3个月、4个月、5个月、6个月、7个月、8个月、9个月或更长时间中的任一者。试剂盒还可以包括多个单位剂量的分子和使用说明书,并且其包装量足以在药房(例如,医院药房和复合药房)中储存和使用。在一些实施方案中,试剂盒包含干燥(例如,冻干的)组合物,所述干燥(例如,冻干的)组合物可以重构、重悬或再水合以形成总体上稳定的DR5激动剂水溶液。

实施例

[0168] 以下所讨论的实施例仅旨在举例说明本发明,并且因此不应视为以任何方式限制本发明。实施例并不旨在表示以下实验是进行的全部或仅有的实验。已经努力确保关于所使用的数字(例如,量、温度等)的准确度,但是应考虑到一些实验误差和偏差。除非另有指示,否则份数是重量份,分子量是重均分子量,温度是按摄氏度计,并且压力是大气压或接近大气压。

实施例1: INBRX-109和安文塞替的组合活性

[0169] 在各种癌细胞系上测试INBRX-109和安文塞替的组合以测定对癌细胞的细胞毒性。

测定方案

[0170] 在第1天,如下接种细胞。收获每个细胞系的单层培养物以用于如下详述的化合物筛选。抽吸培养基,并且将细胞用PBS洗涤一次。添加Accutase并且将烧瓶在37°C下孵育直至细胞分离。添加等体积的完全培养基以淬灭Accutase,然后将细胞上下吸移数次以产生均匀的单细胞悬浮液。使用TC20自动化细胞计数器通过台盼蓝测定细胞的密度和活力。将实验细胞重悬于伊格尔极限必需培养基(EMEM)/10% FBS/Anti-Anti培养基(完全EMEM)中,达到 0.17×10^6 /mL的浓度,并且以15 μ L/孔(最终2,500/孔)接种于384孔发光板的内孔中。将每个细胞系一式两份地铺在单独的板上。用50 μ L PBS填充外部的孔,然后将板在湿润的温度受控的37°C组织培养箱中在5% CO₂下孵育过夜,持续16小时。

[0171] 在第2天,制备以下测试品和对照品:安文塞替、INBRX-109和星孢菌素。

[0172] 安文塞替:从Selleck Chemicals购买10mg的安文塞替储备液,并且重悬于DMSO中,达到10mM。然后将其分成等分试样并且在-80℃下储存。紧临在稀释和用于测定之前解冻等分试样。制备连续稀释的500x主板(在100%DMSO中从500μM开始6点5倍稀释,加上仅DMSO的对照),并且用移液器轻轻混合。为了产生安文塞替的5x工作稀释板,从500x板到完全培养基(EMEM)中进行1:100稀释。

[0173] INBRX-109:选择INBRX-109测定浓度范围以包括在先前用几种癌细胞系进行的细胞毒性测定中观察到的最小和最大活性,其中1nM被定义为最大有效浓度。制备INBRX-109连续稀释的50x主板(在完全EMEM中从500nM开始6点10倍稀释,加上仅完全EMEM的对照),并且用移液器轻轻混合。为了产生INBRX-109的5x工作稀释板,将来自50x主板的每个孔1:10稀释到完全EMEM中。

[0174] 星孢菌素:星孢菌素作为细胞毒性的阳性对照包括在测定中。将从制造商购买的10mM DMSO储备液解冻,分成等分试样,并且在-80℃下储存。紧临在稀释和用于测定之前解冻等分试样。通过将5μL的10mM星孢菌素储备溶液添加至495μL完全EMEM中,然后充分混合,制备5x星孢菌素工作稀释液(100μM)。

[0175] 同样在第2天,添加测试品和对照品。将安文塞替小分子工作稀释液(5μL的5x)、INBRX-109工作稀释液(5μL的5x)或星孢菌素阳性对照(5μL的5x)添加至相应的实验孔中。在板上进行安文塞替逐步调整,并且在板下进行INBRX-109逐步调整,得到两种测试品的所有可能组合的矩阵。将这些测试品一式两份地添加至每个细胞系中。然后将板以400x g离心1分钟,然后在37℃湿度受控的组织培养箱(5% CO₂)中孵育48小时。

[0176] 在第4天,进行活力测量。将板平衡至室温持续10分钟,然后将25μL的CellTiter-Glo2.0[®]添加至每个孔中。将板以400x g旋转1分钟,然后覆盖并且在室温下在黑暗中孵育10分钟。用100%乙醇蒸气去除任何可见气泡,然后使用384孔不透明板设置和SoftMaxPro v5.4软件,采用50毫秒的积分时间,在Spectra Max M5e读板仪上读取发光(RLU)。为了测定测试品对细胞活力的影响,将原始RLU值输出到Excel中,并且将存活百分比计算为媒介物对照(在EMEM中0.5% DMSO)的百分比,其中将媒介物对照设定为100%。在GraphPad Prism 9中将数据作图。

结果

[0177] 图1A-图1F示出了逐步调整实验的结果,其中使多种癌细胞系与不同浓度的INBRX-109(0.0001、0.001、0.01、0.1、1或10nM)和安文塞替(0、0.32、1.6、8、40、200或1000nM)接触。癌细胞的存活百分比显示在每个图的y轴上。示出了癌细胞系HT-29、LS174T、SW620、SW837、SW1463和LS411N的结果。

[0178] 图2A-图2F示出了INBRX-109逐步调整实验的结果,其中使多种癌细胞系与单独的或与200nM安文塞替组合的不同浓度的INBRX-109(0.0001、0.001、0.01、0.1、1或10nM)接触。癌细胞的存活百分比显示在每个图的y轴上。示出了癌细胞系HT-29、LS174T、SW620、SW837、SW1463和LS411N的结果。标记为“单独的Cpd”的虚线示出了用单独的200nM安文塞替处理的癌细胞的存活百分比。

[0179] 图3A-图3F示出了安文塞替逐步调整实验的结果,其中使多种癌细胞系与单独的或与1nM INBRX-109组合的不同浓度的安文塞替(0.32、1.6、8、40、200或1000nM)接触。癌细胞的存活百分比显示在每个图的y轴上。示出了癌细胞系HT-29、LS174T、SW620、SW837、

SW1463和LS411N的结果。标记为“单独的Ab”的虚线示出了用单独的INBRX-109处理的癌细胞的存活百分比。

[0180] 表1示出了采用和不采用200nM安文塞替的INBRX-109逐步调整曲线的 EC_{50} 值。最大细胞毒性计算为100减去存活%。

表1

细胞系	仅 INBRX-109		INBRX-109 + 200 nM 安文塞替	
	EC_{50} (pM)	最大细胞毒性 (%)	EC_{50} (pM)	最大细胞毒性 (%)
HT-29	11.58	71.42	0.0554	94.94
LS174T	10.65	59.68	90.66	79.32
SW620	4.775	20.25	0.965	88.56
SW837	1.234	6.43	0.371	80.64
SW1463	65.98	38.14	4.946	73.74
LS411N	不稳定	13.27	0.687	88.9

[0181] 表2示出了采用和不采用1nM INBRX-109的安文塞替逐步调整曲线的 EC_{50} 值。最大细胞毒性计算为100减去存活%。

表2

细胞系	仅安文塞替		安文塞替 + 1 nM INBRX-109	
	EC_{50} (nM)	在 200 nM 时的最大细胞毒性 (%)	EC_{50} (nM)	在 200 nM 时的最大细胞毒性 (%)
HT-29	约 2.296	5.54	21.41	94.63
LS174T	约 196.7	16.93	约 54.73	79.32
SW620	31.3	51.37	30.45	87.53
SW837	27247	27.17	约 43.16	80.64
SW1463	124.3	25.79	约 38.19	74.39
LS411N	约 4145862	12.35	约 10.27	84.45

[0182] INBRX-109和安文塞替的组合示出了对在该筛选中测试的每个癌细胞系的细胞杀伤增强。通常在安文塞替浓度高于40nM时观察到更大的益处。在这些浓度下,组合产生协同效应,如通过与单独的INBRX-109处理的 EC_{50} 相比,INBRX-109的 EC_{50} 的变化所显示的。参见例如,图2和表1。此外,与单独使用任一药物的处理相比,这种组合导致总体细胞存活的降低。

[0183] 在单独的1nM INBRX-109、单独的安文塞替或1nM INBRX-109和不同浓度的安文塞替(274pM、823pM、2.47nM、7.41nM、22.22nM、66.67nM、200nM、600nM和1.8 μ M)的组合存在的情况下,基本上如上文所述对另外的癌细胞系测定细胞杀伤。表3和表4以及图4-图8示出了

单独的1nM INBRX-109的最大细胞毒性,以及采用和不采用1nM INBRX-109的安文塞替逐步调整曲线的 EC_{50} 值。一组结直肠癌细胞系的结果示于表3和图4-图6中,并且一组胰腺细胞系的结果示于表4以及图7和图8中。

表3

细胞系	仅 1 nM INBRX-109		仅安文塞替		安文塞替 + 1 nM INBRX-109	
	EC_{50} (nM)	在 1 nM 时的 最大细胞 毒性 (%)	EC_{50} (nM)	在 600 nM 时的 最大细胞毒 性 (%)	EC_{50} (nM)	在 600 nM 时的 最大细胞 毒性 (%)
SK-CO-1	N/A	92.2	113.4	52.8	111.0	94.2
SNU-C5	N/A	48.6	95.6	42.9	57.7	87.7
LS 1034	N/A	56.9	236.6	38.8	199.4	85.8
LS 123	N/A	3.1	150.1	9.6	171.6	24.1
LS 180	N/A	27.2	505.0	42.9	196.6	86.2
T84	N/A	9.1	355.3	32.1	297.2	62.9
SW-48	N/A	93.9	37.3	76.6	28.3	99.4
SW-1116	N/A	15.3	441.4	10.4	411.1	39.4
SW-1463	N/A	28.5	201.1	21.0	98.0	64.2
SW-837	N/A	7.1	226.7	24.5	183.5	73.5
SW-948	N/A	98.5	97.0	43.2	23.3	99.0
LS 513	N/A	92.3	215.0	39.6	100.9	93.7
NCI-H716	N/A	9.2	81.3	34.8	83.6	51.2
HCT 116	N/A	54.4	112.0	76.0	66.8	96.6
DLD-1	N/A	41.9	280.0	45.8	183.6	90.4
HCT-15	N/A	49.6	268.0	61.4	175.3	94.9
LS174T	N/A	41.2	251.7	59.5	109.1	94.1
HT-55	N/A	48.4	51.4	41.8	44.1	87.9
SNU-81	N/A	82.1	187.3	24.3	71.9	92.3
HT-29	N/A	19.9	61.6	45.6	43.0	98.3
SW620	N/A	19.4	62.1	61.8	54.6	90.4
Hutu 80	N/A	4.0	137.8	85.4	133.4	86.5
SW-480	N/A	19.7	126.0	40.7	93.3	86.3
SW-403	N/A	15.7	62.5	46.4	64.9	89.0
LoVo	N/A	16.2	34.1	29.6	41.8	90.8
SNU-C2A	N/A	41.4	72.7	42.9	42.9	78.0
NCI-H747	N/A	13.4	71.6	17.4	78.7	44.5
COLO320DM	N/A	4.7	382.5	58.3	283.0	79.6
RKO	N/A	3.6	85.9	65.7	54.7	93.8
HCT-8	N/A	6.7	205.0	52.7	200.0	81.3

表4

细胞系	仅 1 nM INBRX-109		仅安文塞替		安文塞替 + 1 nM INBRX-109	
	EC ₅₀ (nM)	在 1 nM 时的最大细胞毒性 (%)	EC ₅₀ (nM)	在 600 nM 时的最大细胞毒性 (%)	EC ₅₀ (nM)	在 600 nM 时的最大细胞毒性 (%)
MIA PaCa-2	N/A	77.9	179.0	67.0	81.3	96.4
Panc 05.04	N/A	97.0	204.9	44.4	61.1	97.4
SW-1990	N/A	54.7	699.7	13.4	598.4	68.7
HuP-T4	N/A	80.7	138.1	33.7	35.1	85.3
BxPC-3	N/A	51.3	139.4	70.1	119.3	91.8
Capan-2	N/A	11.1	149.7	3.9	134.5	46.2
KP4	N/A	7.8	104.7	74.7	82.4	97.8
AsPC-1	N/A	14.5	444.3	19.9	230.3	60.0
PSN-1	N/A	91.9	85.3	83.2	63.0	98.0
HPAF-II	N/A	22.8	63.3	27.2	51.9	68.2
PANC-1	N/A	32.6	152.1	36.2	120.8	87.2
Capan-1	N/A	86.9	186.2	27.8	79.0	94.3
CFPAC-1	N/A	23.8	134.5	45.3	153.7	86.4
Panc 03.27	N/A	53.2	121.5	36.7	90.0	87.5
SU.86.86	N/A	92.5	629.1	30.5	91.4	98.9
PL45	N/A	14.1	83.6	56.5	68.1	82.2
Panc 10.05	N/A	23.8	81.9	47.2	81.7	83.3

[0184] 与单独的任一种药剂相比, INBRX-109和安文塞替的组合示出了对在该筛选中测试的癌细胞系的细胞杀伤增强, 并且在一些情况下, 与单独的安文塞替相比, 添加1nM INBRX-109显著降低了EC₅₀。

[0185] 该数据表明, 与单独的药物本身相比, DR5激动剂(如INBRX-109)和PLK1抑制剂(如安文塞替)的组合导致改善的或协同的癌细胞杀伤。

实施例2: INBRX-109和CDK9抑制剂的组合活性

[0186] 进行另外的测定以在各种细胞系上测试INBRX-109和细胞周期蛋白依赖性激酶9(CDK9)抑制剂(迪尼西利、NVP-2、夫拉平度和艾尼西利)或下游MCL-1抑制剂(AZD5991)的组合以测定对癌细胞的细胞毒性。

测定方案

[0187] 在第1天, 如下接种细胞。收获每个细胞系(软骨肉瘤: CAL-78、OUMS-27、SW1353和

H-EMC-SS;结直肠癌:SW620;和滑膜肉瘤:HS-SY-II)的单层培养物以用于化合物筛选。抽吸培养基,并且将细胞用PBS洗涤一次。添加Accutase并且将烧瓶在37℃下孵育直至细胞分离。添加等体积的完全培养基以淬灭Accutase,然后将细胞上下吸移数次以产生均匀的单细胞悬浮液。使用TC20自动化细胞计数器通过台盼蓝测定细胞的密度和活力。将实验细胞重悬于伊格尔极限必需培养基(EMEM)/10% FBS/Anti-Anti培养基(完全EMEM)中,达到 $0.17 \times 10^6/\text{mL}$ 的浓度,并且以15mL/孔(最终2,500/孔)接种于384孔发光板的内部孔中。将每个细胞系一式两份地铺在单独的板上。用50mL PBS填充外部孔,然后将板在湿润的温度受控的37℃组织培养箱中在5% CO₂下孵育过夜,持续16小时。

[0188] 在第2天,如下所述制备以下测试品和INBRX-109:

迪尼西利(购自MedChemExpress):在完全培养基(EMEM)中制备5X工作连续稀释板(6点5倍稀释,从312.5uM开始,最终浓度范围为625nM至0.2nM)。

NVP-2(购自MedChemExpress):在完全培养基(EMEM)中制备5X工作连续稀释板(6点5倍稀释,从312.5uM开始,最终浓度范围为625nM至0.2nM)。

夫拉平度(购自MedChemExpress):在完全培养基(EMEM)中制备5X工作连续稀释板(6点5倍稀释,从312.5uM开始,最终浓度范围为625nM至0.2nM)。

艾尼西利(购自MedChemExpress):在完全培养基(EMEM)中制备5X工作连续稀释板(6点5倍稀释,从312.5uM开始,最终浓度范围为625nM至0.2nM)。

AZD-5991(购自MedChemExpress):在完全培养基(EMEM)中制备5X工作连续稀释板(6点5倍稀释,从5mM开始,最终浓度范围为10uM至3.2nM)。

INBRX-109:在完全培养基(EMEM)中的5x工作连续稀释板(6点10倍稀释,从50nM开始,最终浓度范围为10nM至0.0001nM)。

[0189] 如下将测试品添加至细胞中:将小分子化合物工作稀释液(5μL的5x)、INBRX-109工作稀释液(5μL的5x)或仅培养基添加至相应的实验孔中。在板上横向进行小分子化合物逐步调整,并且在板上纵向进行INBRX-109逐步调整,得到两种测试品的所有可能组合的矩阵。将这些测试品一式两份地添加至每个细胞系中。然后将板以400x g离心1分钟,然后在37℃湿度受控的组织培养箱(5%CO₂)中孵育48小时。

[0190] 在与测试品孵育后,简要地进行活力测量。将板平衡至室温持续10分钟,然后将25μL的CellTiter-Glo 2.0®添加至每个孔中。将板以400x g旋转1分钟,然后覆盖并且在室温下在黑暗中孵育10分钟。用100%乙醇蒸气去除任何可见气泡,然后使用384孔不透明板设置和SoftMax®Pro v5.4软件,采用50毫秒的积分时间,在Spectra Max M5e读板仪上读取发光(RLU)。为了测定测试品对细胞活力的影响,将原始RLU值输出到Excel中,并且将存活百分比计算为媒介物对照(在EMEM中0.5% DMSO)的百分比,其中将媒介物对照设定为100%。在GraphPad Prism 9中将数据作图。

结果

[0191] 这些逐步调整实验的结果示于以下图中:图9A-图9E(逐步调整的INBRX-109和迪

尼西利)、图10A-图10E(逐步调整的INBRX-109,单独的或与25nM迪尼西利一起)、图11A-图11E(逐步调整的迪尼西利,单独的或与1nM INBRX-109一起)、图12A-图12E(逐步调整的INBRX-109和NVP-2)、图13A-图13E(逐步调整的INBRX-109,单独的或与125nM NVP-2一起)、图14A-图14E(逐步调整的NVP-2,单独的或与1nM INBRX-109一起)、图15A-图15F(逐步调整的INBRX-109和夫拉平度)、图16A-图16F(逐步调整的INBRX-109,单独的或与125nM夫拉平度一起)、图17A-图17F(逐步调整的夫拉平度,单独的或与1nM INBRX-109一起)、图18A-图18F(逐步调整的INBRX-109和艾尼西利)、图19A-图19F(逐步调整的INBRX-109,单独的或与125nM艾尼西利一起)、图20A-图20F(逐步调整的艾尼西利,单独的或与1nM INBRX-109一起)、图21A-图21F(逐步调整的INBRX-109和AZD-5991)、图22A-图22F(逐步调整的INBRX-109,单独的或与2nM AZD-5991一起)以及图23A-图23F(逐步调整的AZD-5991,单独的或与1nM INBRX-109一起)。标记为“单独的Ab”的虚线示出了用单独的1nM INBRX-109处理的癌细胞的存活百分比,并且标记为“单独的Cpd”的虚线示出了用指定的小分子抑制剂处理的癌细胞的存活百分比。

[0192] 表5示出了采用和不采用25nM迪尼西利的INBRX-109逐步调整曲线的EC₅₀值。最大细胞毒性计算为100减去存活%。

表5

细胞系	仅 INBRX-109		INBRX-109 + 25 nM 迪尼西利	
	EC ₅₀ (pM)	在 1 nM 时的最大细胞毒性 (%)	EC ₅₀ (pM)	最大细胞毒性 (%)
CAL-78	> 3597	9.3	0.16	91.7
OUMS-27	982.2	6.4	0.68	86.1
SW1353	不稳定	6.9	0.81	84.6
H-EMC-SS	2.2	99.1	0.22	99.7
SW620	7.8	27.6	0.20	99.1

[0193] 表6示出了采用和不采用1nM INBRX-109的迪尼西利逐步调整曲线的EC₅₀值。最大细胞毒性计算为100减去存活%。

表6

细胞系	仅迪尼西利		迪尼西利 + 1 nM INBRX-109	
	EC ₅₀ (nM)	在 25 nM 时的最大细胞毒性 (%)	EC ₅₀ (nM)	最大细胞毒性 (%)
CAL-78	5.76	47.1	3.70	91.4
OUMS-27	不稳定	15.1	6.18	86.13
SW1353	8.23	58.0	7.38	85.11
H-EMC-SS	4.62	54.0	7.61	99.62
SW620	3.82	46.2	4.80	99.52

[0194] 表7示出了采用和不采用25nM NVP-2的INBRX-109逐步调整曲线的EC₅₀值。最大细胞毒性计算为100减去存活%。

表7

细胞系	仅 INBRX-109		INBRX-109 + 125 nM NVP-2	
	EC ₅₀ (pM)	在 1 nM 时的最大细胞毒性 (%)	EC ₅₀ (pM)	最大细胞毒性 (%)
CAL-78	不稳定	9.3	0.13	82.2
OUMS-27	> 4090	4.2	0.42	84.3
SW1353	不稳定	0.8	0.50	71
H-EMC-SS	1.96	96.5	0.17	98.8
SW620	98.06	20.8	0.11	98.1

[0195] 表8示出了采用和不采用1nM INBRX-109的NVP-2逐步调整曲线的EC₅₀值。最大细胞毒性计算为100减去存活%。

表8

细胞系	仅 NVP-2		NVP-2 + 1 nM INBRX-109	
	EC ₅₀ (nM)	在 125 nM 时的最大细胞毒性 (%)	EC ₅₀ (nM)	最大细胞毒性 (%)
CAL-78	23.25	42.2	26.44	92.4
OUMS-27	9.0	20.4	16.31	88.5
SW1353	30.63	52.8	22.28	79.5
H-EMC-SS	23.51	46.4	24.46	98.7
SW620	12.57	39.5	4.91	98.7

[0196] 表9示出了采用和不采用25nM夫拉平度的INBRX-109逐步调整曲线的EC₅₀值。最大细胞毒性计算为100减去存活%。

表9

细胞系	仅 INBRX-109		INBRX-109 + 125 nM 夫拉平度	
	EC ₅₀ (pM)	在 1 nM 时的最大细胞毒性 (%)	EC ₅₀ (pM)	最大细胞毒性 (%)
CAL-78	17.19	11	0.60	77.3
OUMS-27	0.95	6.2	0.89	61.3
HS-SY-II	不稳定	8.5	1.93	64.1
SW1353	不稳定	4.1	2.81	39.8
H-EMC-SS	9.25	96.2	1.46	98.5
SW620	1.37	8.2	0.90	90.8

[0197] 表10示出了采用和不采用1nM INBRX-109的夫拉平度逐步调整曲线的EC₅₀值。最大细胞毒性计算为100减去存活%。

表10

细胞系	仅夫拉平度		夫拉平度 + 1 nM INBRX-109	
	EC ₅₀ (nM)	在 125 nM 时的最大细胞毒性 (%)	EC ₅₀ (nM)	最大细胞毒性 (%)
CAL-78	145.5	10.9	114.6	94
OUMS-27	109.1	24.0	118.2	87.8
HS-SY-II	108.4	55.8	102.6	95.1
SW1353	201.8	21.7	133.4	88.3
H-EMC-SS	114.4	21.9	53.94	99
SW620	不稳定	21.7	50.20	98.7

[0198] 表11示出了采用和不采用125nM艾尼西利的INBRX-109逐步调整曲线的EC₅₀值。最大细胞毒性计算为100减去存活%。

表11

细胞系	仅 INBRX-109		INBRX-109 + 125 nM 艾尼西利	
	EC ₅₀ (pM)	在 1 nM 时的最大细胞毒性 (%)	EC ₅₀ (pM)	最大细胞毒性 (%)
CAL-78	28.95	11.2	0.68	72.6
OUMS-27	不稳定	约 0	0.93	56.5
HS-SY-II	11.02	7.4	646.0	71.0
SW1353	9.1	8.8	1.05	45.1
H-EMC-SS	9.26	95.8	2.33	98.2
SW620	1.98	10.6	0.67	93.0

[0199] 表12示出了采用和不采用1nM INBRX-109的艾尼西利逐步调整曲线的EC₅₀值。最大细胞毒性计算为100减去存活%。

表12

细胞系	仅艾尼西利		艾尼西利 + 1 nM INBRX-109	
	EC ₅₀ (nM)	在 125 nM 时的最大细胞毒性 (%)	EC ₅₀ (nM)	最大细胞毒性 (%)
CAL-78	144.2	10.9	108.5	90.8
OUMS-27	51.00	25.6	90.36	81
HS-SY-II	73.95	73.2	89.10	94
SW1353	102.2	28.0	102.7	64.6
H-EMC-SS	123.6	15.8	113.8	99.2
SW620	25.76	27.3	39.27	97.6

[0200] 表13示出了采用和不采用2μM AZD-5991的INBRX-109逐步调整曲线的EC₅₀值。最大细胞毒性计算为100减去存活%。

表13

细胞系	仅 INBRX-109		INBRX-109 + 2 μ M AZD-5991	
	EC ₅₀ (pM)	在 1 nM 时的最大细胞毒性 (%)	EC ₅₀ (pM)	最大细胞毒性 (%)
CAL-78	0.62	12.9	3.93	64.9
OUMS-27	8872.0	7.0	8.71	8.2
HS-SY-II	0.83	27.5	不稳定	92.1
SW1353	不稳定	6.6	5.33	27.7
H-EMC-SS	10.19	96.2	2.59	99.6
SW620	9.84	9.9	5.78	23.2

[0201] 表14示出了采用和不采用1nM INBRX-109的AZD-5991逐步调整曲线的EC₅₀值。最大细胞毒性计算为100减去存活%。

表14

细胞系	仅 AZD-5991		AZD-5991 + 1 nM INBRX-109	
	EC ₅₀ (μ M)	在 2 μ M 时的最大细胞毒性 (%)	EC ₅₀ (μ M)	最大细胞毒性 (%)
CAL-78	0.084	37.2	0.096	64.9
OUMS-27	> 5000	约 0	0.015	13.3
HS-SY-II	0.04	87.5	0.13	88.6
SW1353	10.12	约 0	0.58	30.8
H-EMC-SS	0.18	11.9	0.007	99.5
SW620	285.7	7.6	不稳定	64.1

[0202] INBRX-109与每种测试的CDK9抑制剂(迪尼西利、NVP-2、夫拉平度和艾尼西利)的组合显示出对在这些筛选中测试的几乎每种癌细胞系的细胞杀伤增强。INBRX-109与AZD-5991 (MCL-1 (CDK9下游靶标)的抑制剂)的组合也显示出对许多细胞系的细胞杀伤增强。通常在迪尼西利和NVP-2的浓度高于25nM时,在夫拉平度和艾尼西利的浓度为125nM或更高以及在AZD-5991的浓度高于0.4 μ M时观察到更大的益处。在这些浓度下,组合产生协同效应,如通过与单独的INBRX-109处理的杀伤曲线相比,INBRX-109与CDK9和下游MCL-1抑制剂组合的杀伤曲线的变化所显示的。参见例如,图9-图23和表5-表14。此外,与单独使用任一药物的处理相比,这种组合导致总体细胞存活的降低。

[0203] 在不脱离本公开文本的精神或本质特征的情况下,本发明可以以其他特定形式实施。因此,前述实施方案在所有方面都被认为是说明性的,而不是对本公开文本的限制。本公开文本的范围因此由所附权利要求而不是由前述描述指示,并且因此在权利要求的等效含义和范围内的所有变化都旨在包含在本文中。

某些序列的列表

SEQ ID NO	描述	序列
1	INBRX-109 CDR1	SGLTFPNYGM
2	INBRX-109 CDR2	AIYWSSGGTVY
3	INBRX-109 CDR3	AVTIRGAATQTWKYDYW
4	INBRX-109 VHH	EVQLLESGGGEVQPGGSLRLSCAASGLTFPNYGMGWFRQAPGKEREFVSAIYWS GGTVYYAESVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCAVTIRGAATQTW KYDYWGQGTTLVTVKPGG
5	INBRX-109 VHH-接头-VHH	EVQLLESGGGEVQPGGSLRLSCAASGLTFPNYGMGWFRQAPGKEREFVSAIYWS GGTVYYAESVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCAVTIRGAATQTW KYDYWGQGTTLVTVKPGGSGGSEVQLLESGGGEVQPGGSLRLSCAASGLTFPNYGM GWFRQAPGKEREFVSAIYWSGGTVYYAESVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLR AEDTAVYYCAVTIRGAATQTWKYDYWGQGTTLVTVKPGG
6	Fc (具有铰链)	DKTHTCPPCPAPGGSPVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSFSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK
7	INBRX-109	EVQLLESGGGEVQPGGSLRLSCAASGLTFPNYGMGWFRQAPGKEREFVSAIYWS GGTVYYAESVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCAVTIRGAATQTW KYDYWGQGTTLVTVKPGGSGGSEVQLLESGGGEVQPGGSLRLSCAASGLTFPNYGM GWFRQAPGKEREFVSAIYWSGGTVYYAESVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLR AEDTAVYYCAVTIRGAATQTWKYDYWGQGTTLVTVKPGGGGDKTHTCPPCPAPGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
8	人 DR5 (具有信号肽, 氨基酸 1-55)	MEQRGQNAPA ASGARKRHGP GPREARGARP GPRVPKTLVL VVAAVLLLVLS AESALITQQD LAPQQRAAPQ QKRSSPSEGL CPPGHHISED GRDCISCKYG QDYSTHWNDL LFCLRCTRCD SGEVELSPCT TTRNTVCQCE EGTFREEDSP EMCRKCRTGC PRGMVKVGDC TPWSDIECVH KESGTKHSGE VPAVEETVTS SPGTPASPCS LSGIIIGVTV AAVVLIVAVF VCKSLWKKV LPYLKGICSG GGGDPERVDR SSQRPGAEDN VLNEIVSILQ PTQVPEQEME VQEPAEPTGV NMLSPGESEH LLEPAEAERS QRRRLVPAN EGDPTETLRQ CFDDFADLVP FDSWEPLMRK LGLMDNEIKV AKAEAAGHRD TLYTMLIKWV NKTGRDASVH TLDDALETLG ERLAKQKIED HLLSSGKFMY LEGNADSAMS

9	成熟的人 DR5	ITQQD LAPQQRAAPQ QKRSSPSEGL CPPGHHISED GRDCISCKYG QDYSTHWNDL LFCLRCTRCD SGEVELSPCT TTRNTVCQCE EGTFREEDSP EMCRKCRGTC PRGMVKVDC TPWSDIECVH KESGTHKSGE VPAVEETVTS SPGTPASPCS LSGIIGVTV AAVVLIVAVF VCKSLWKKV LPYLKGICSG GGGDPERVDR SSQRPGAEDN VLNEIVSILQ PTQVPEQEME VQEPAEPTGV NMLSPGESEH LLEPAEAERS QRRRLVPAN EGDPTETLRQ CFDDFADLVP FDSWEPLMRK LGLMDNEIKV AKAEAAGHRD TLYTMLIKWV NKTGRDASVH TLDDALETG ERLAKQKIED HLLSSGKFMY LEGNADSAMS
10	人 PLK1	MSAAVTAGKL ARAPADPGKA GVPGVAAPGA PAAAPPAKEI PEVLVDPRSR RRYVRGRFLG KGGFAKCFEI SDADTKEVFA GKIVPKSLLL KPHQREKMSM EISIHRS LAH QHVVGFGHFF EDNDFVFFVL ELCRRRSLLE LHKRRKALTE PEARYYLRQI VLGCQYLHRN RVIHRDLKLG NLFLNEDLEV KIGDFGLATK VEYDGERKKT LCGTPNYIAP EVLSKKGHSF EVDVWSIGCI MYTLLVGKPP FETSCLKETY LRIKKNEYSI PKHINPVAAS LIQKMLQTFD TARPTINELL NDEFFTSYI PARLPITCLT IPPRFSIAPS SLDPSNRKPL TVLNKGLENP LPERPREKEE PVVRETGEVV DCHLSDMLQQ LHSVNASKPS ERGLVRQEEA EDPACIPIFW VSKWVDYSDK YGLGYQLCDN SVGVLFNDST RLILYNDGDS LQYIERDGTE SYLTVSSHPN SLMKKITLLK YFRNYMSEHL LKAGANITPR EGDELARLPY LRTWFRTRSA IILHLSNGSV QINFFQDHTK LILCPLMAAV TYIDEKRDFR TYRLSLLEEY GCCKELASRL RYARTMVDKL LSSRSASNRL KAS
11	人 CDK9	MAKQYDSVECPFCDEVSKYEKLAKIGQGTGFEVFKARHRKTGQKVALKKVLMEN EKEGFPITALREIKILQLLKHENVVNLIEICRTKASPYNRCKGSIYLVDFCEH DLAGLLSNVLVKFTLSEIKRVMQMLLNGLYYIHRNKILHRDMKAANVLITRDGV LKLADFG LARAFSLAKNSQPNRYTNRVVT LWYRPPPELLLGERDYGPPIDLWGAG CIMAEMWTRSPIMQGNTEQHQLALISQLCGSITPEVWPVNDNYELYEKLELVKG QKRKVKDR LKAYVRDPYALDLIDKLLVLDPAQRIDSDDALNHDFWSDPMPSDL KGMLSTHLTSMFEYLAPPRRKGQSITQQSTNQSRNPATTNQTEFERVF

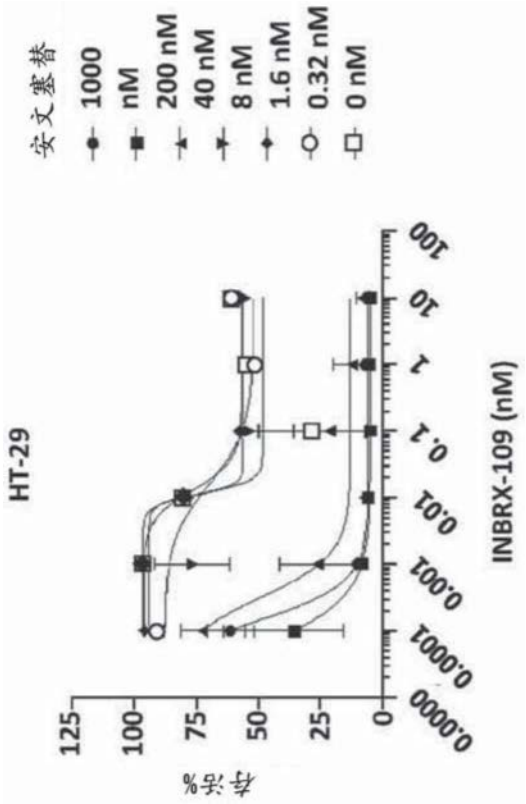


图1A

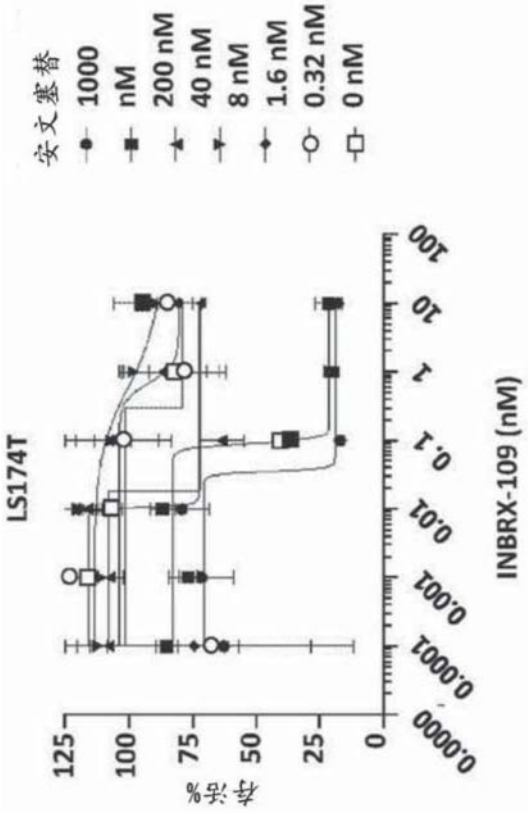


图1B

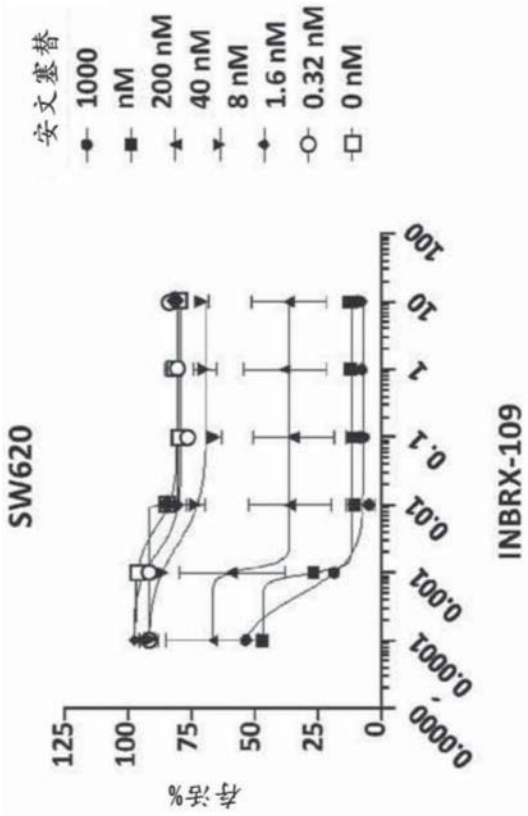


图1C

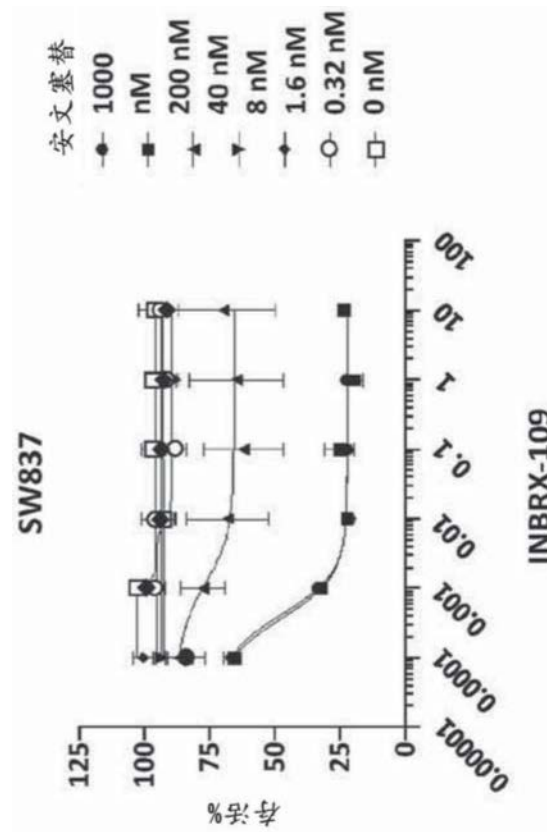


图1D

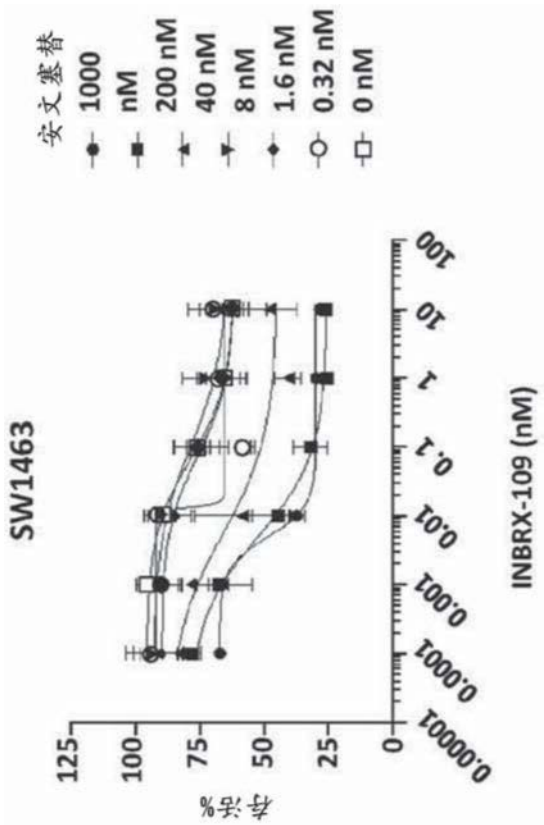


图1E

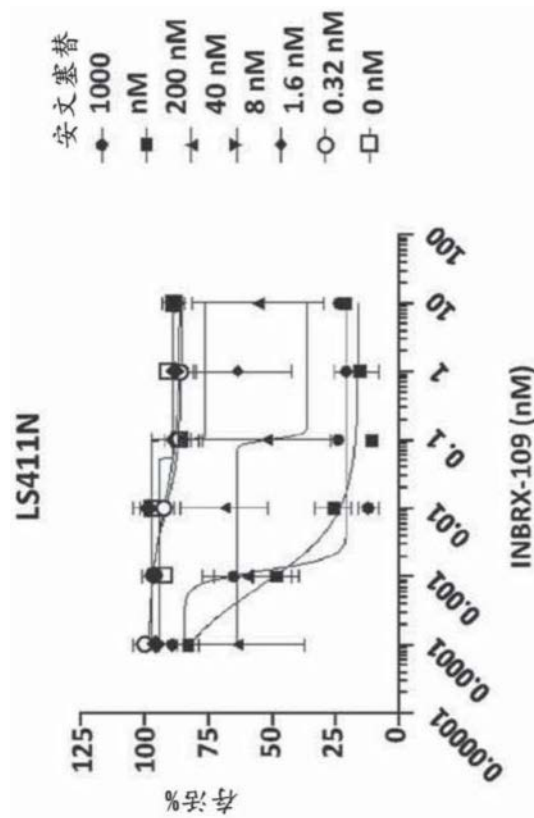


图1F

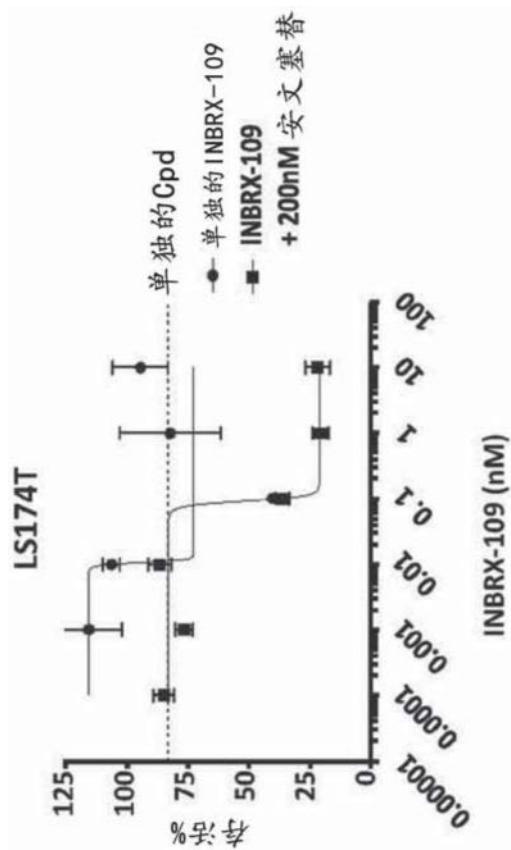


图2B

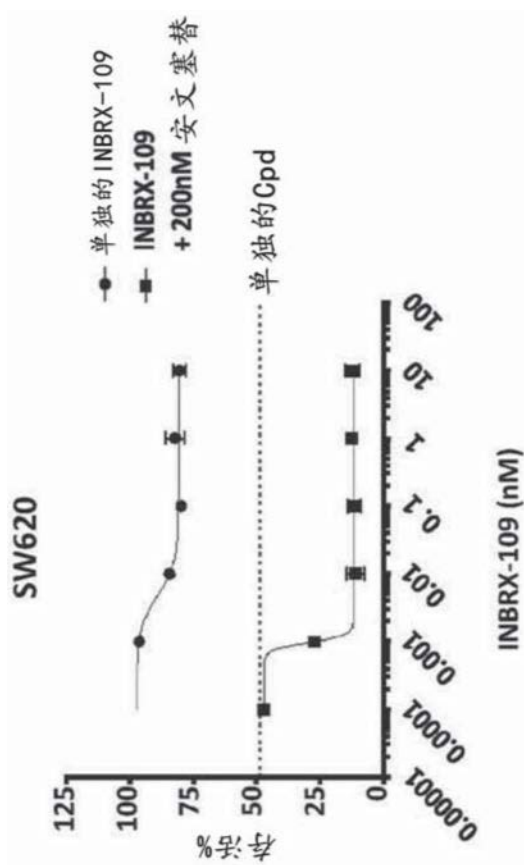


图2C

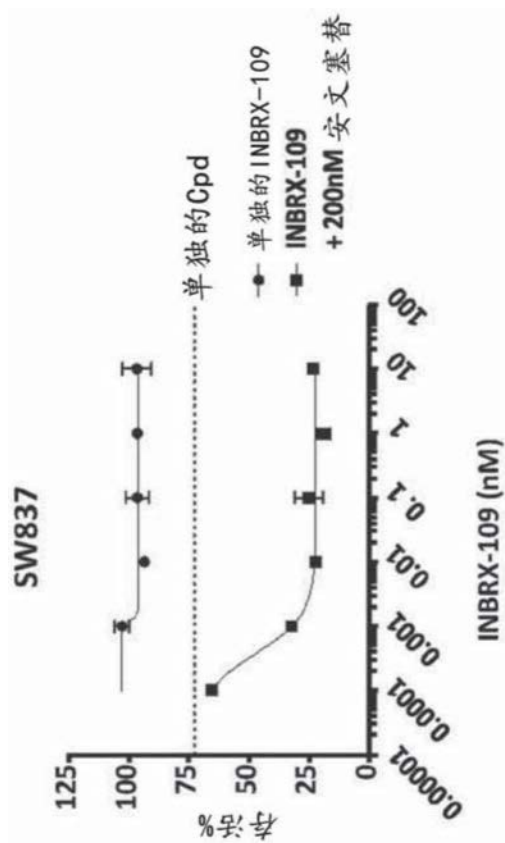


图2D

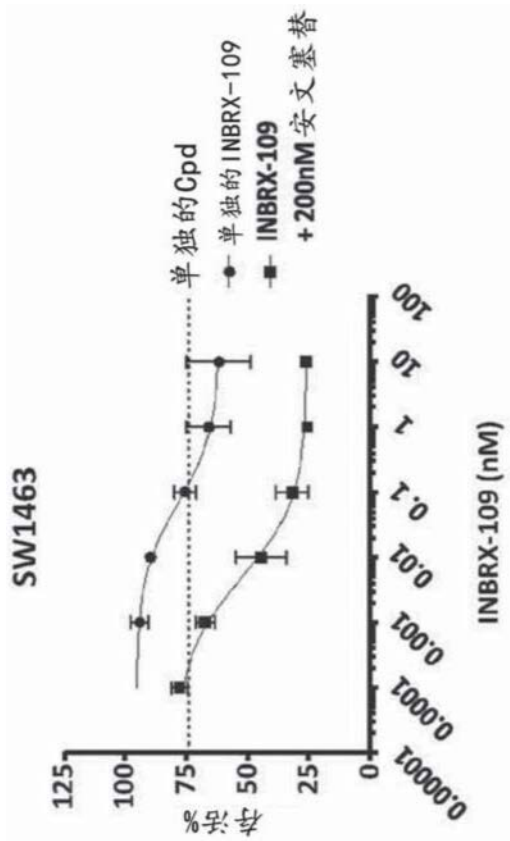


图2E

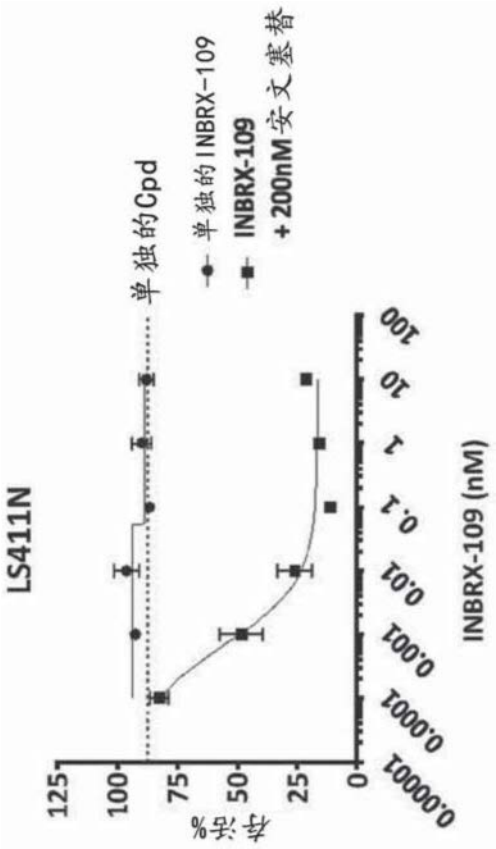


图2F

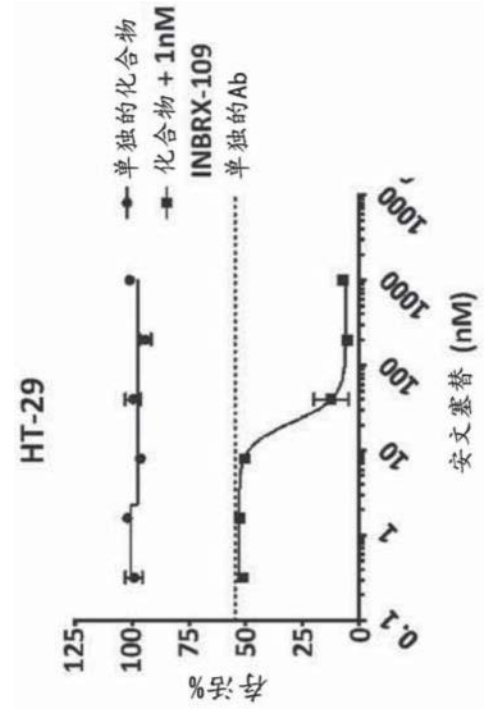


图3A

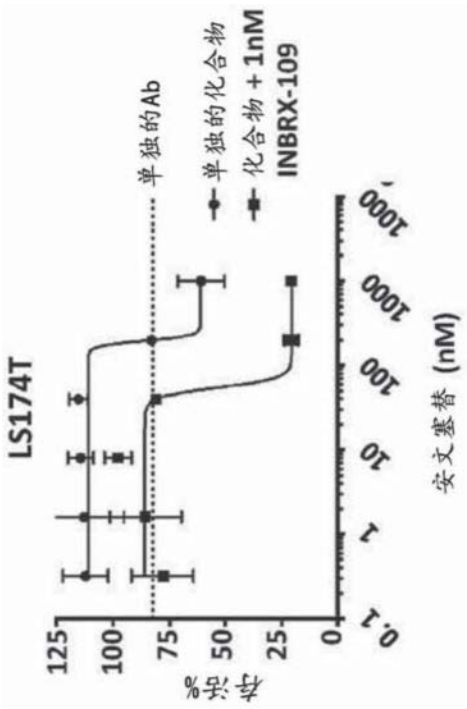


图3B

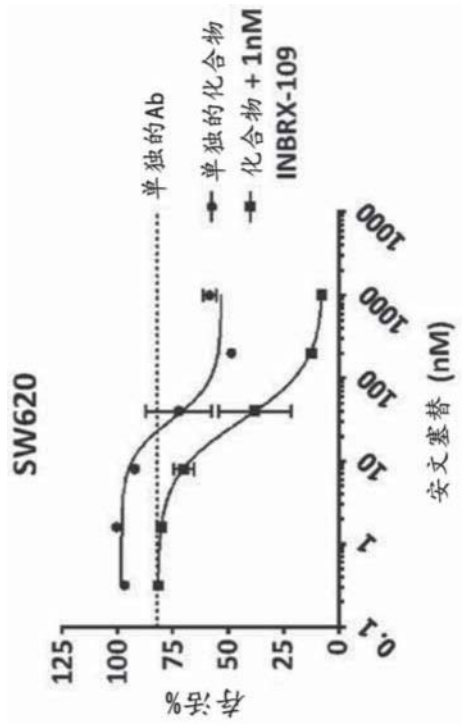


图3C

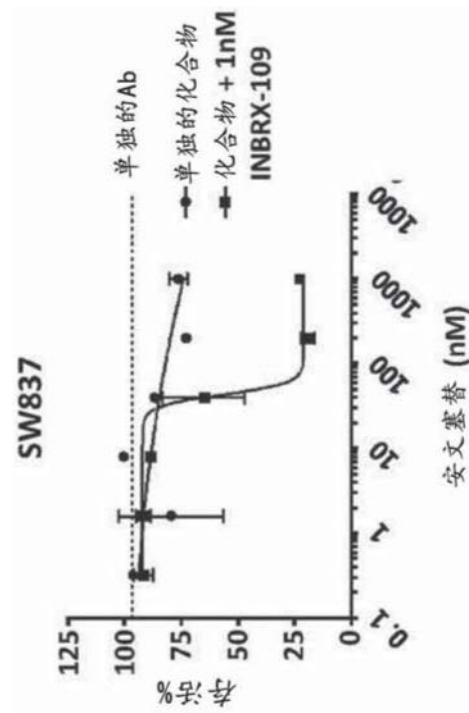


图3D

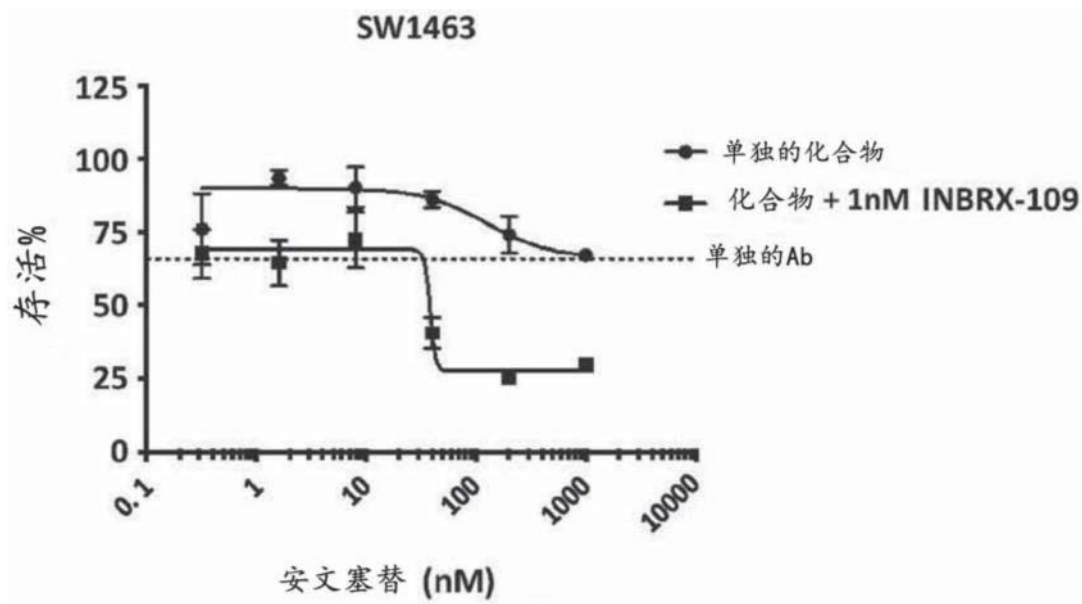


图3E

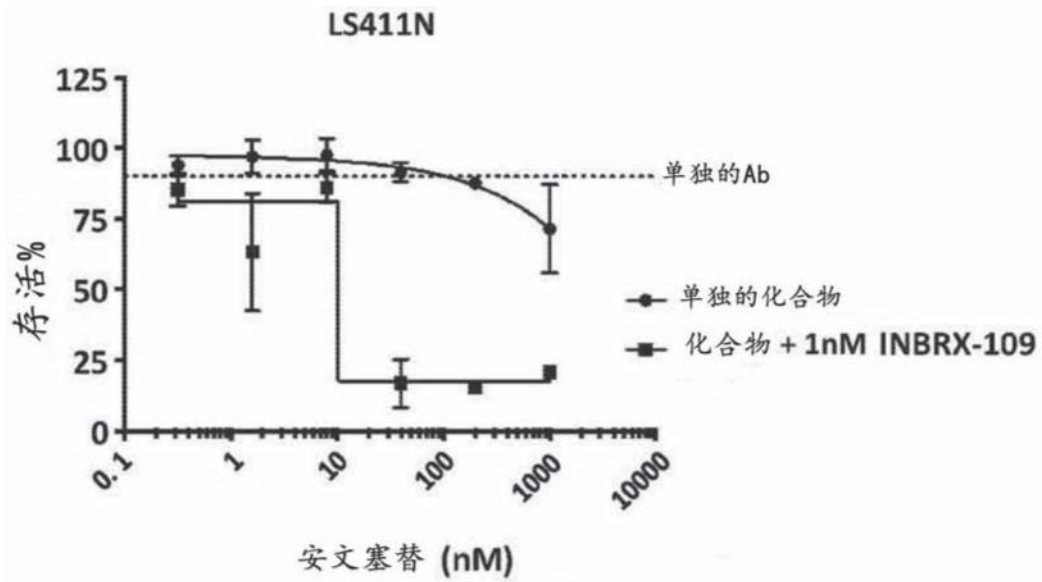


图3F

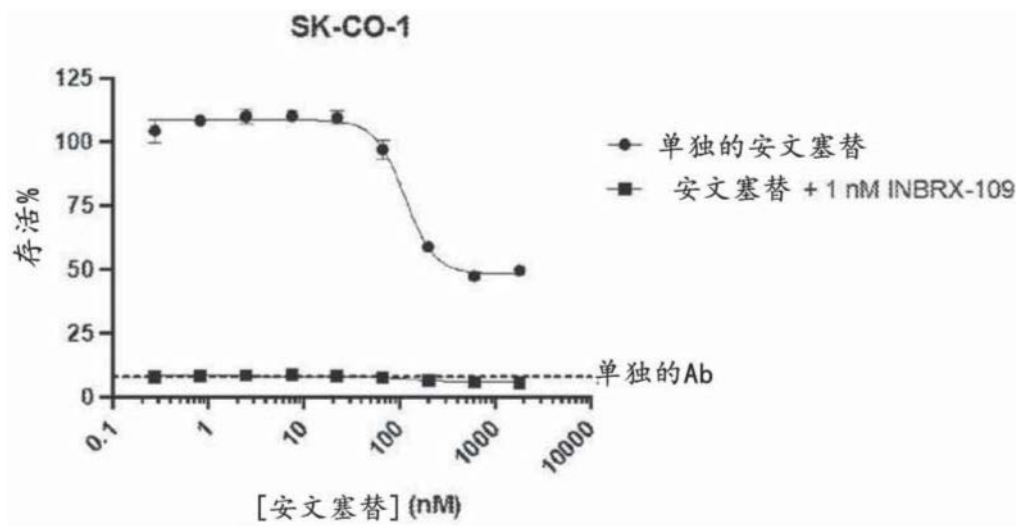


图4A

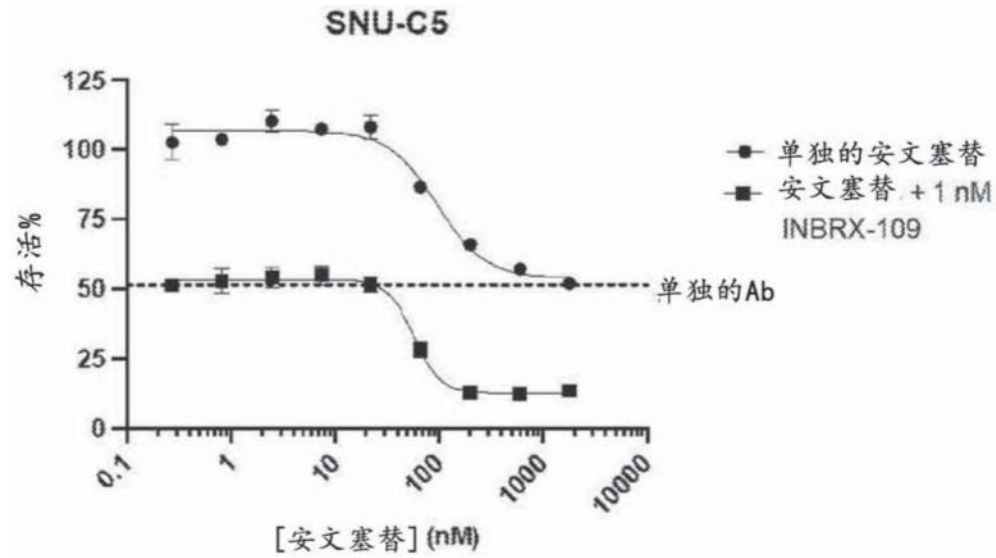


图4B

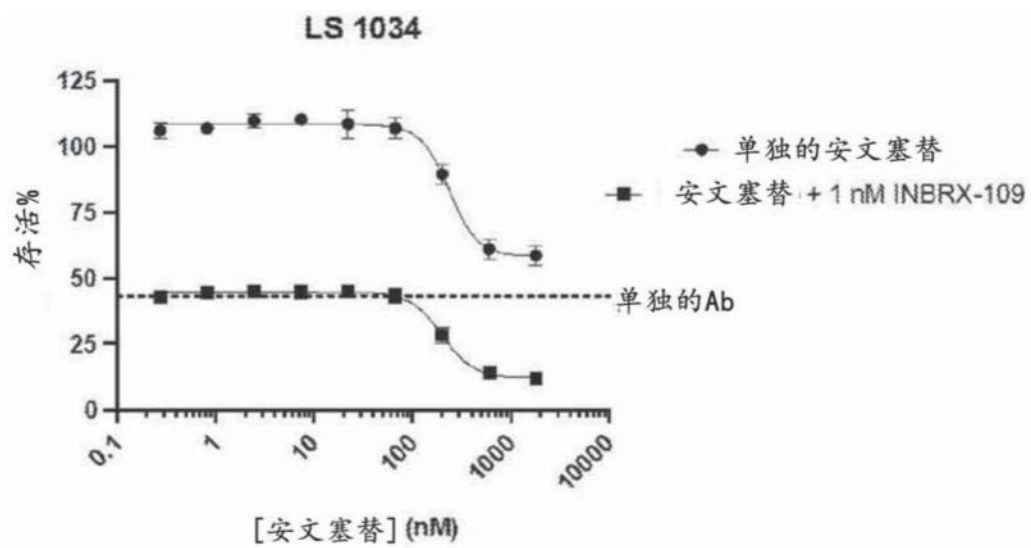


图4C

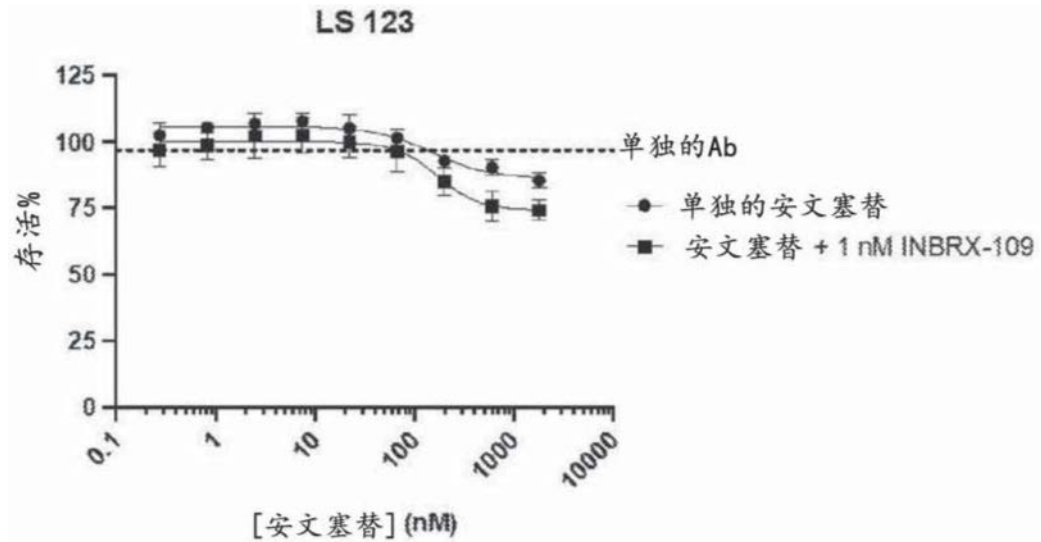


图4D

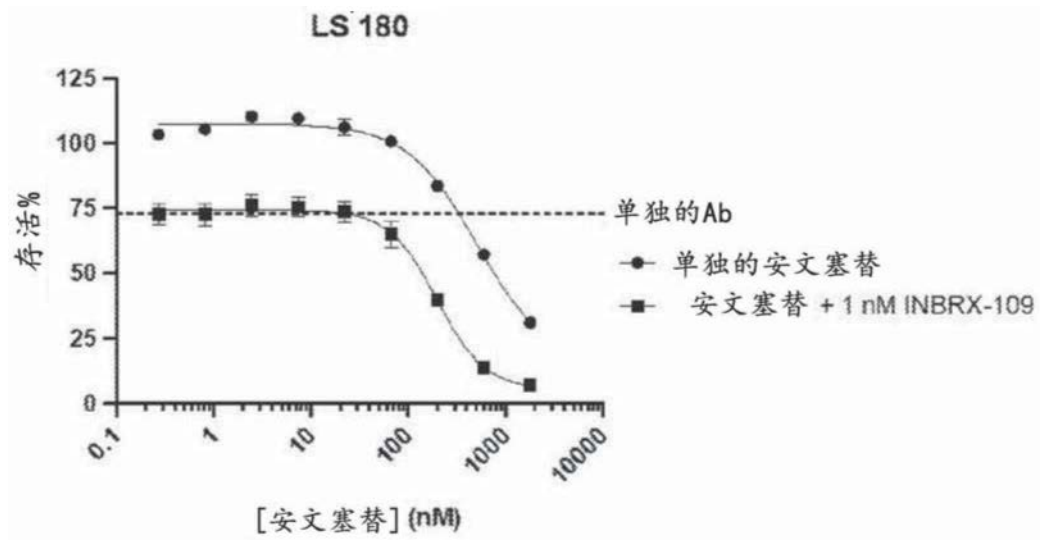


图4E

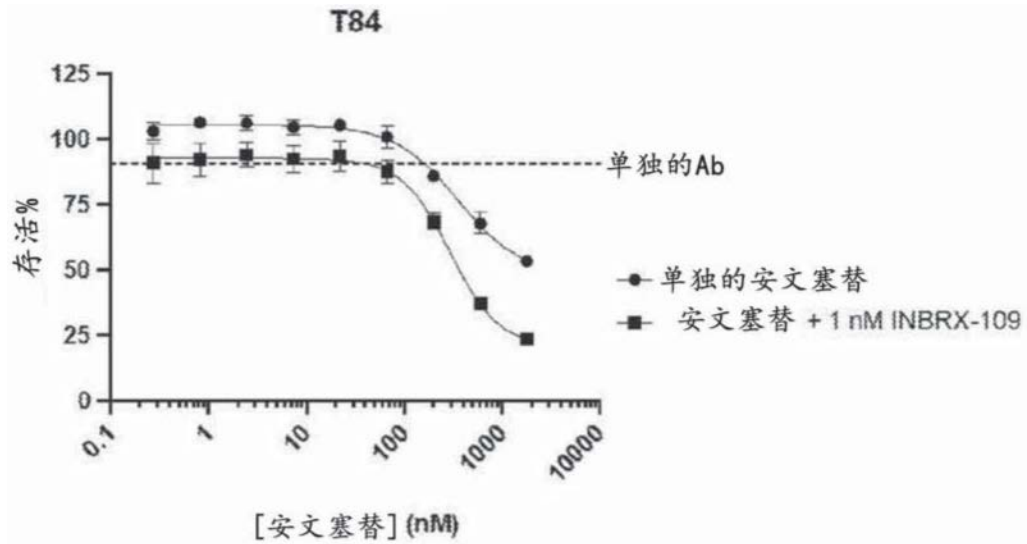


图4F

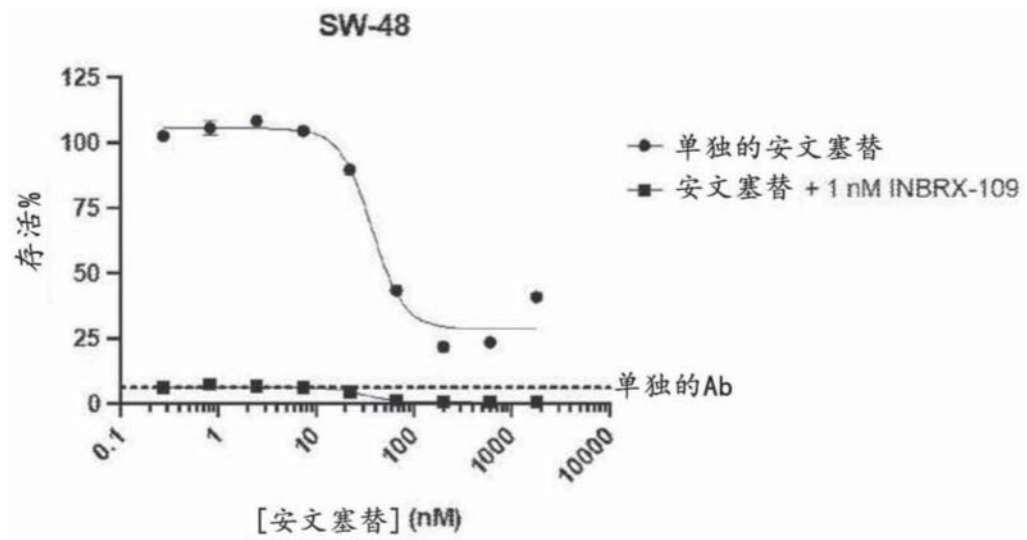


图4G

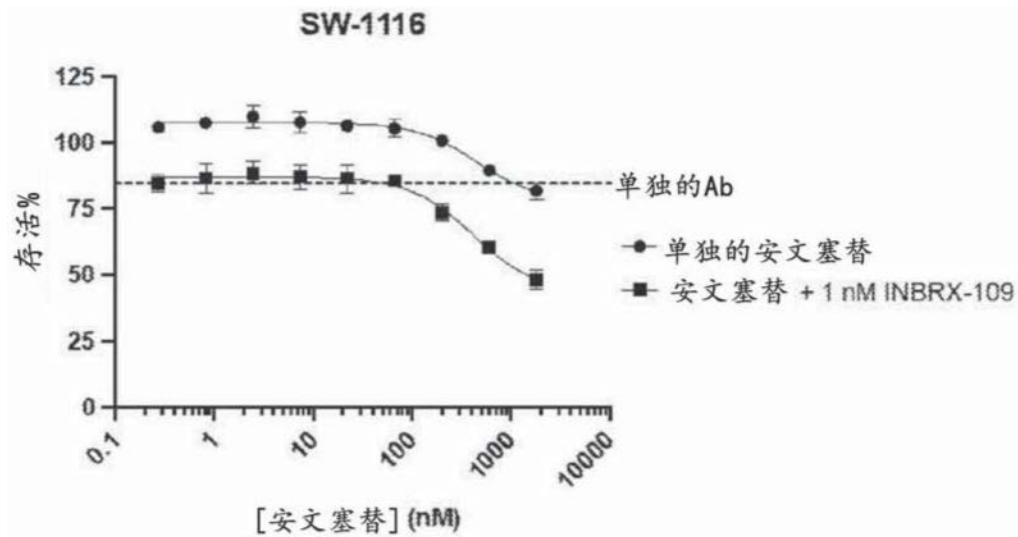


图4H

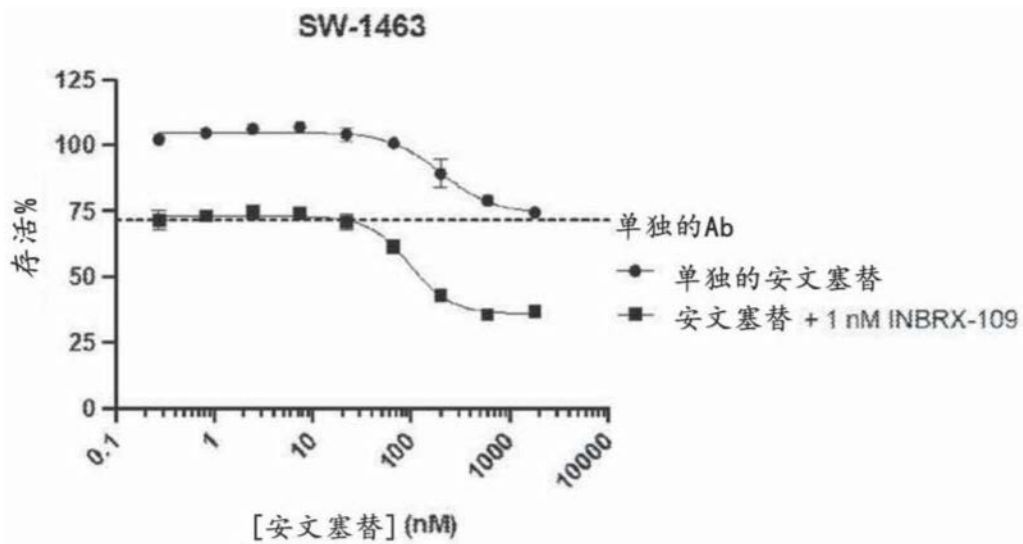


图4I

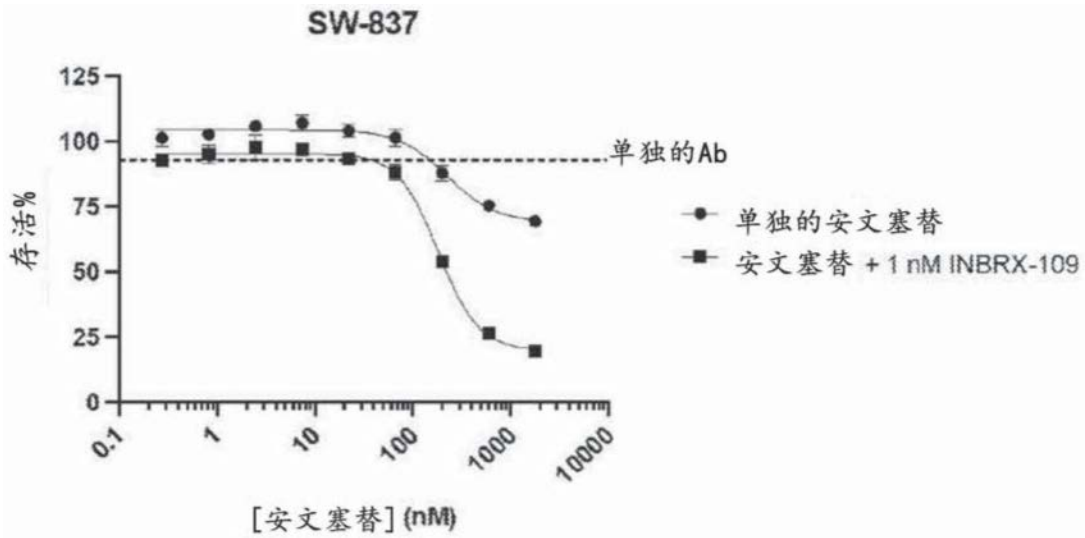


图5A

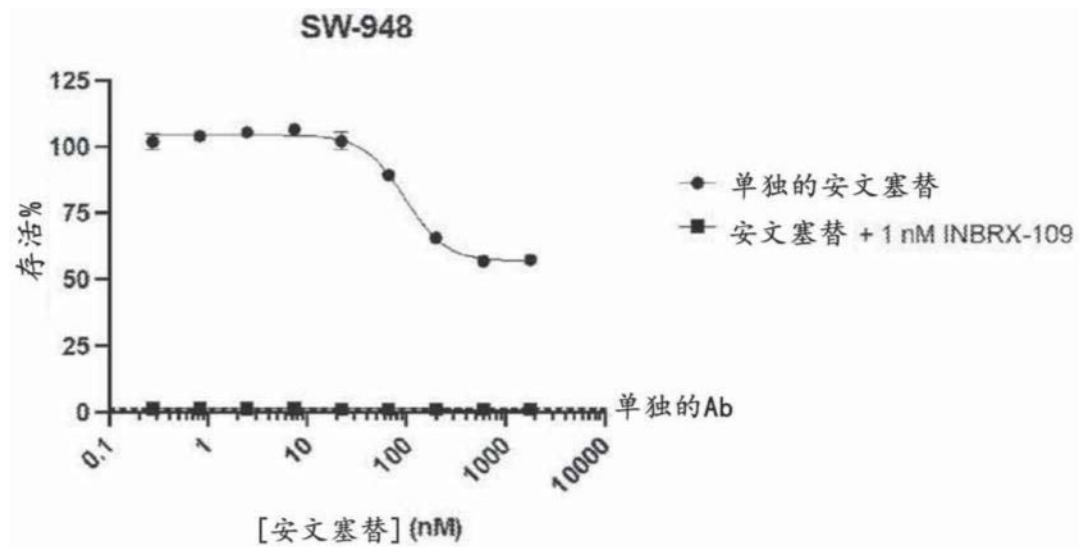


图5B

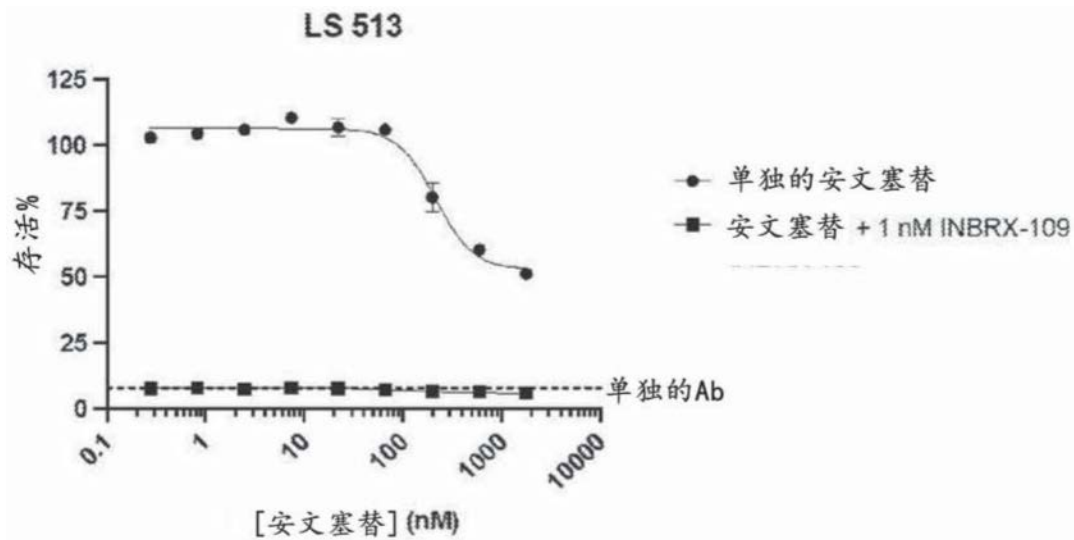


图5C

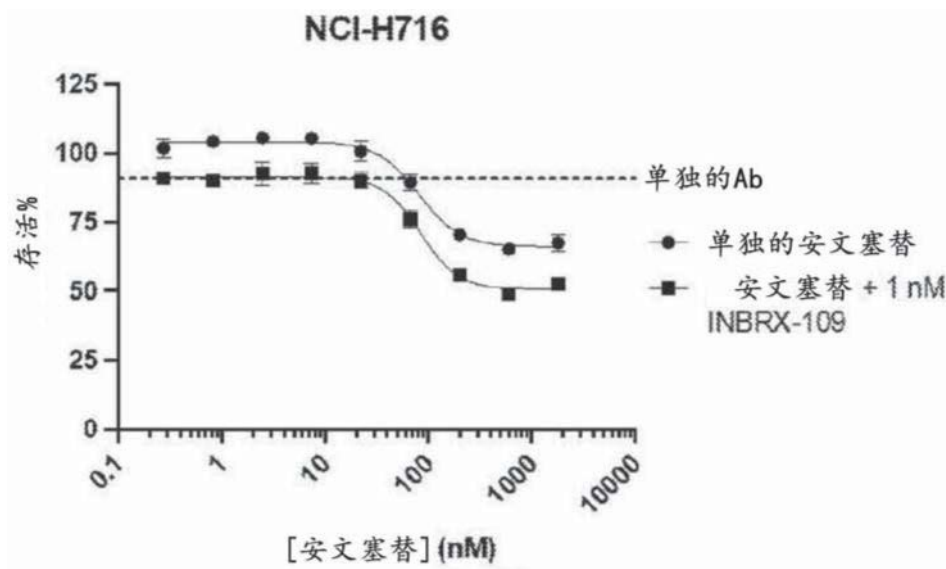


图5D

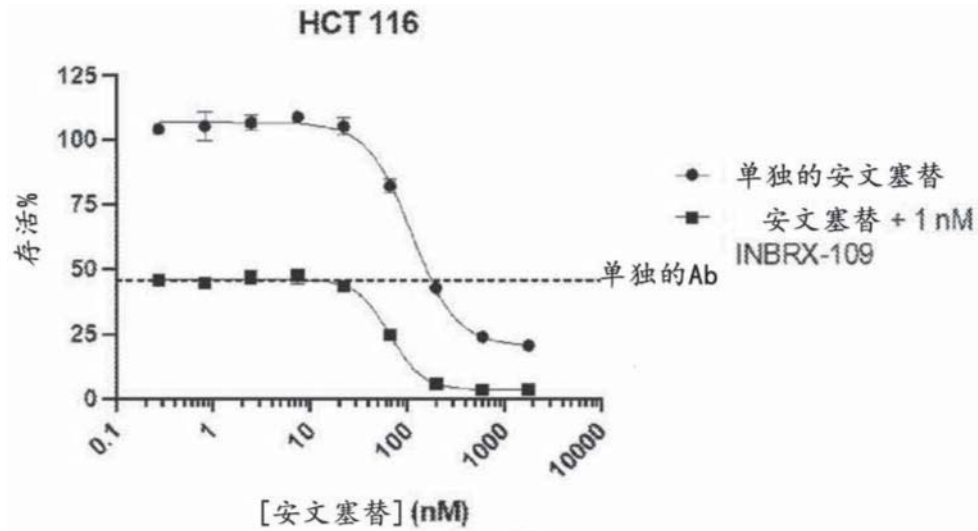


图5E

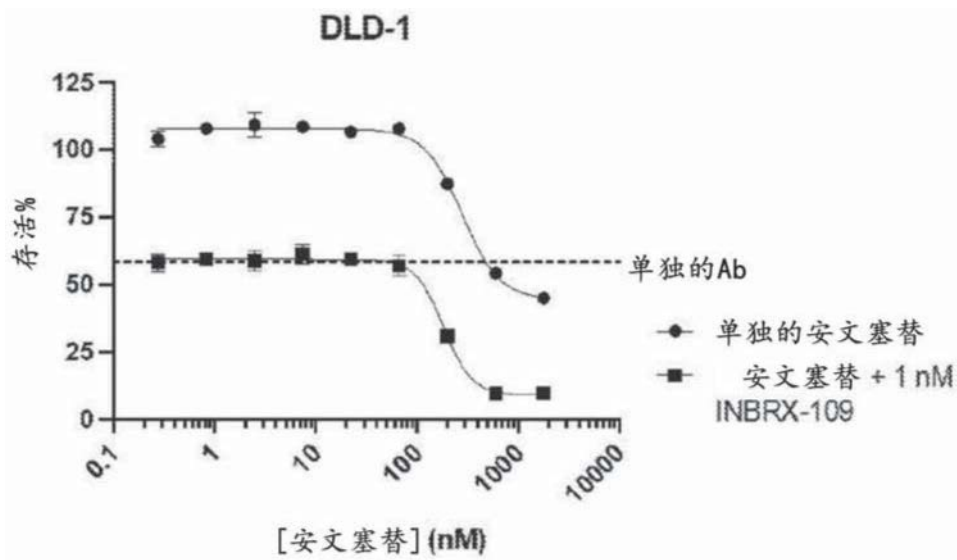


图5F

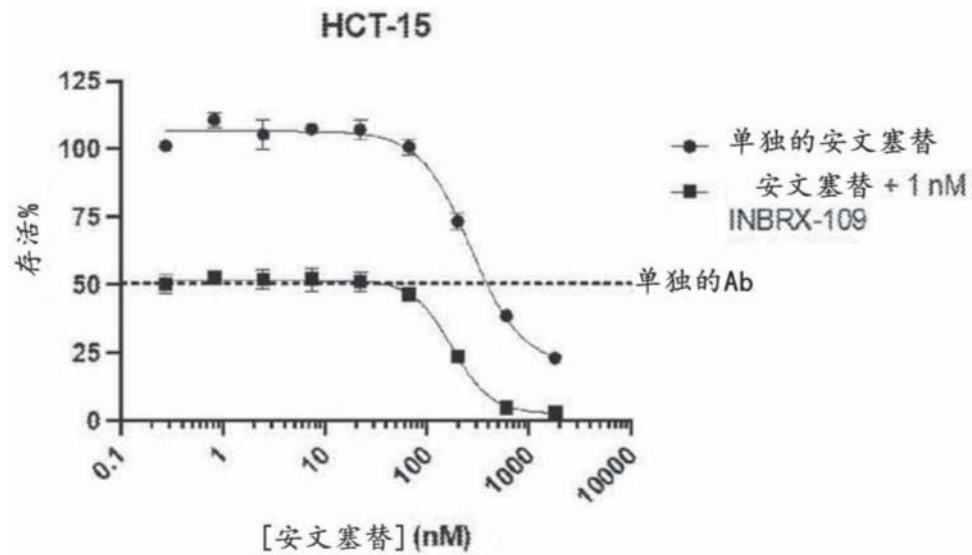


图5G

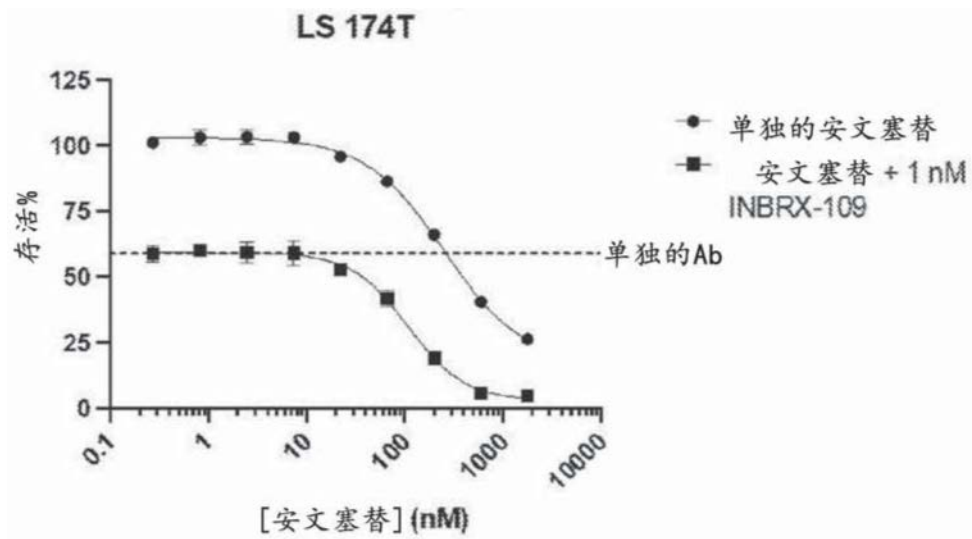


图5H

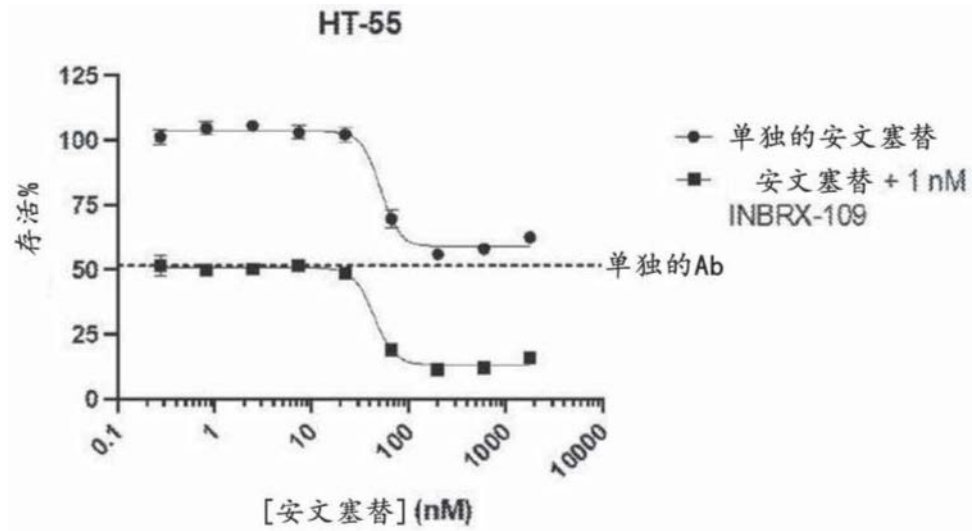


图5I

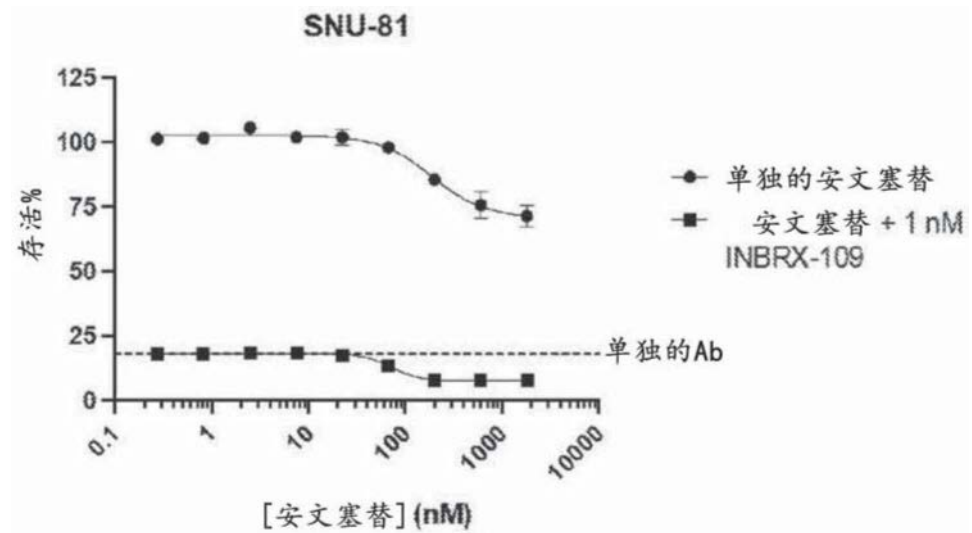


图6A

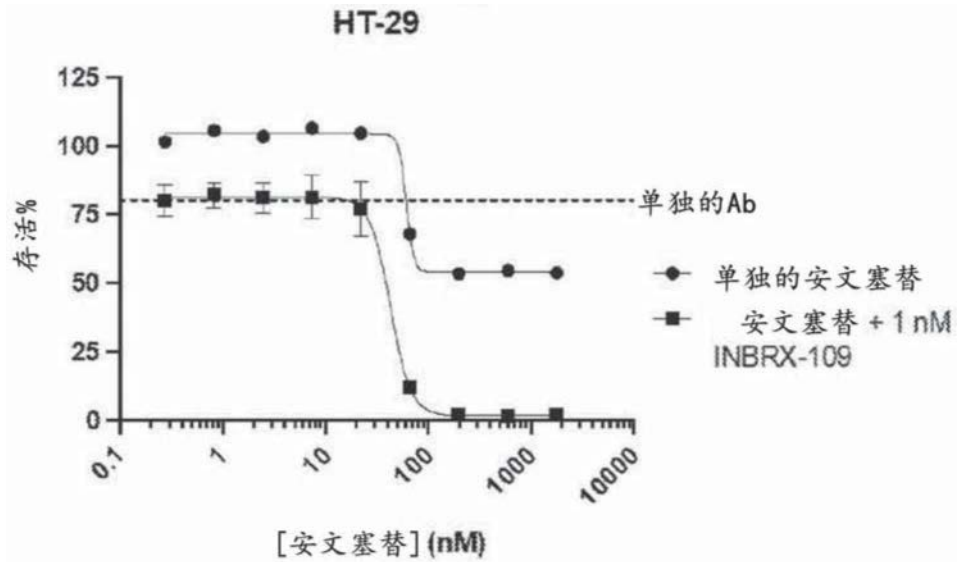


图6B

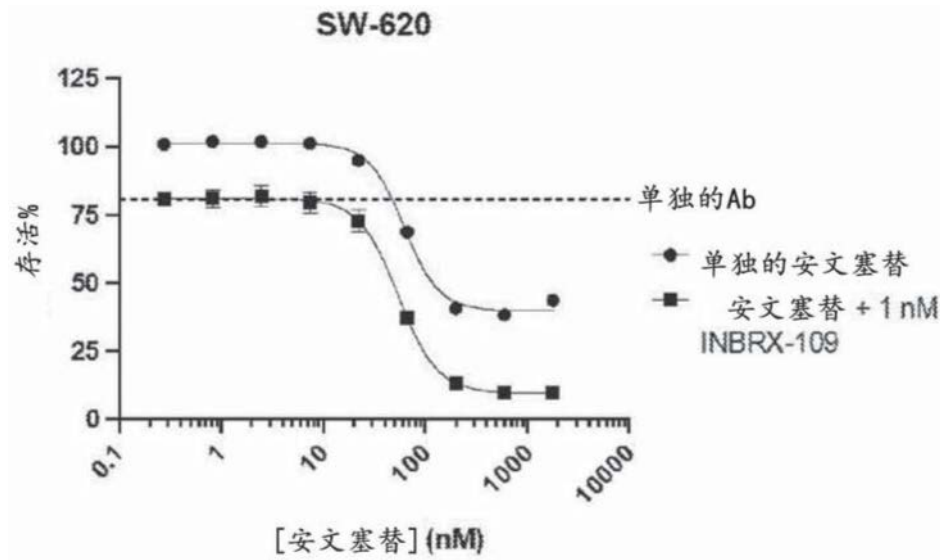


图6C

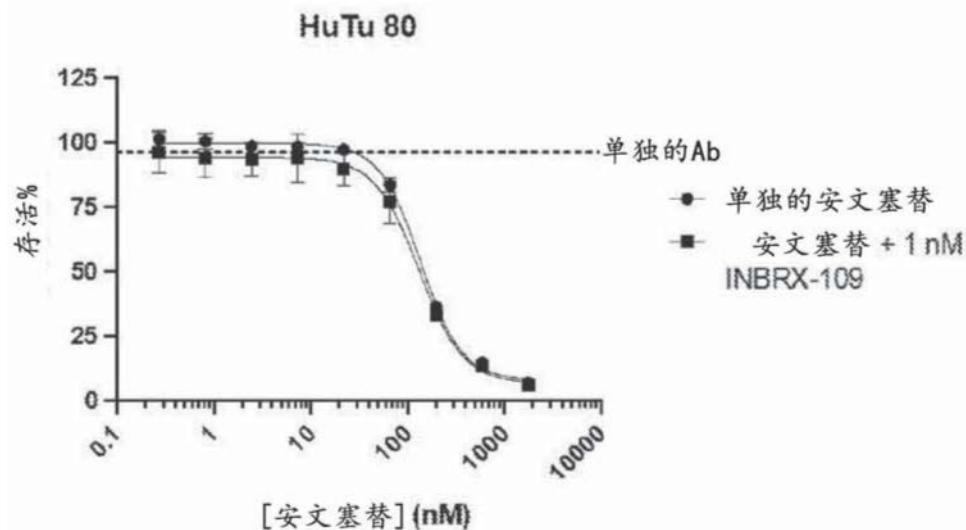


图6D

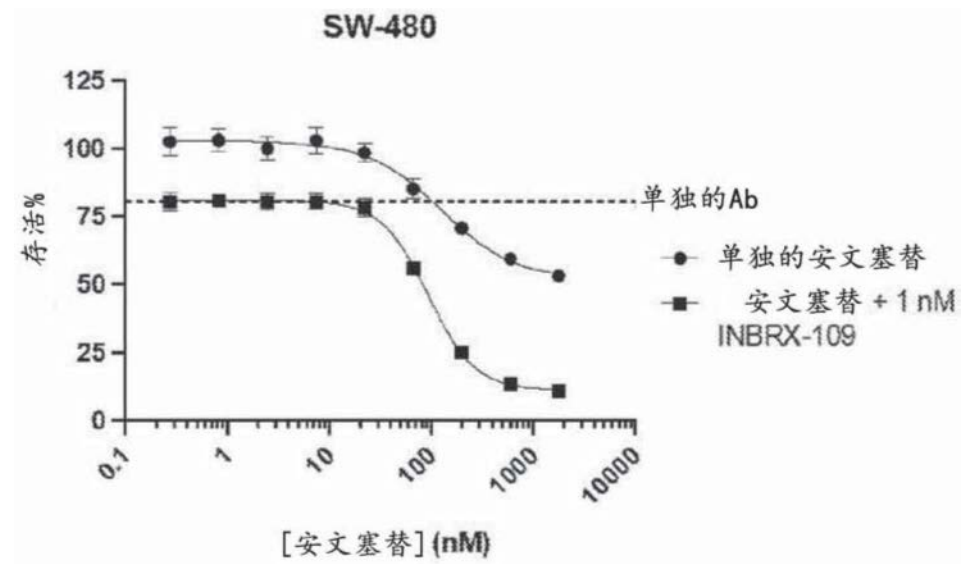


图6E

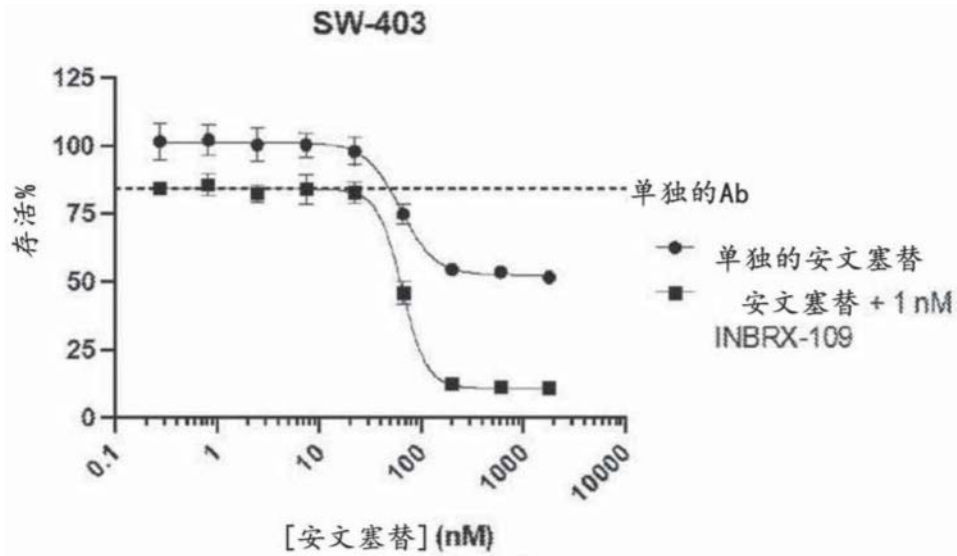


图6F

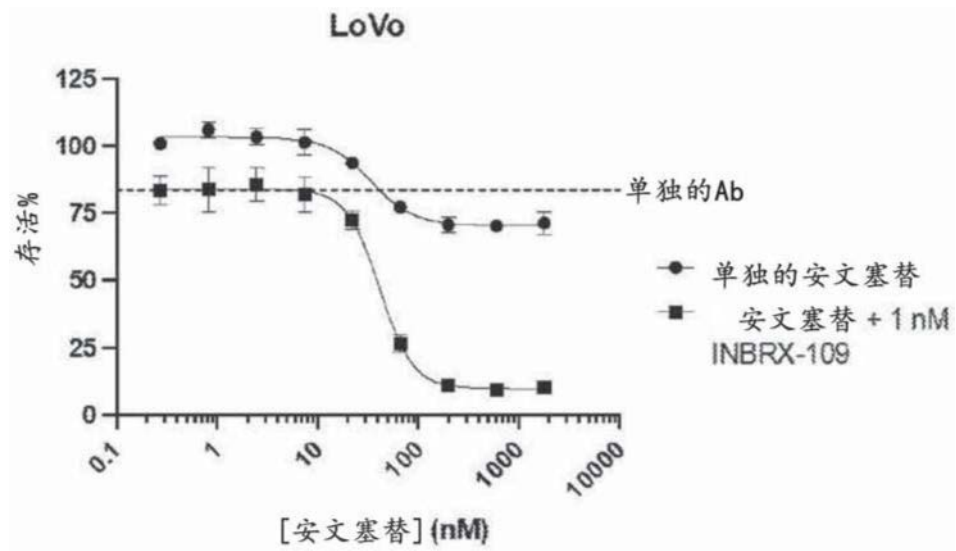


图6G

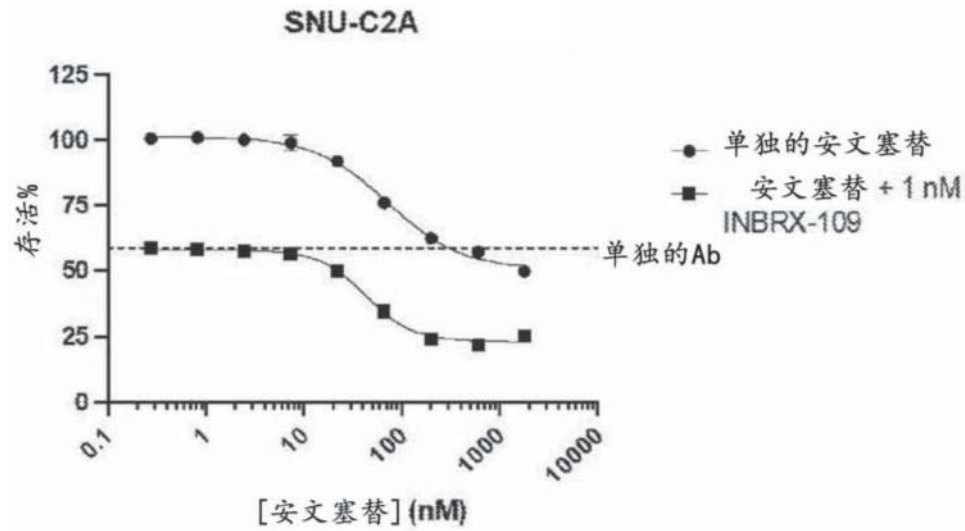


图6H

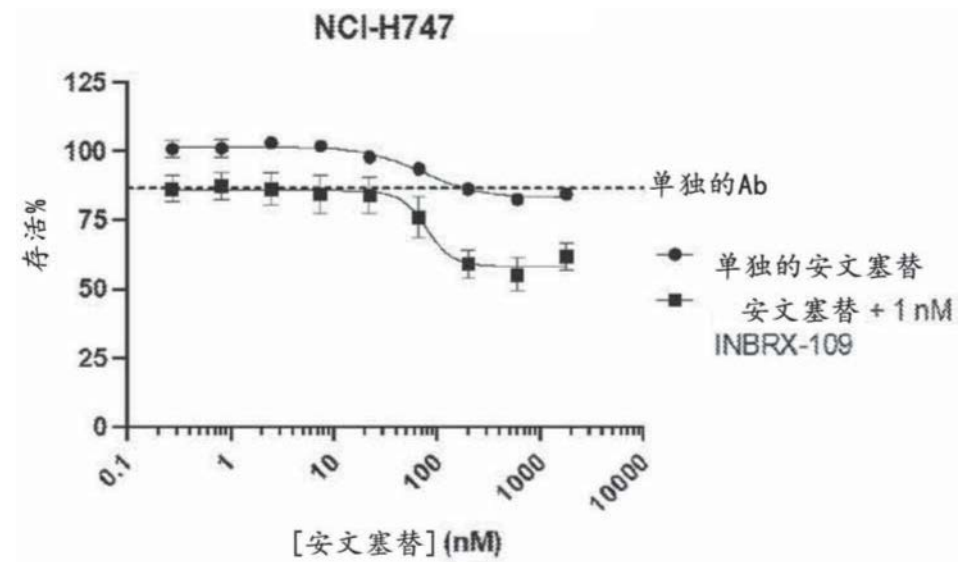


图6I

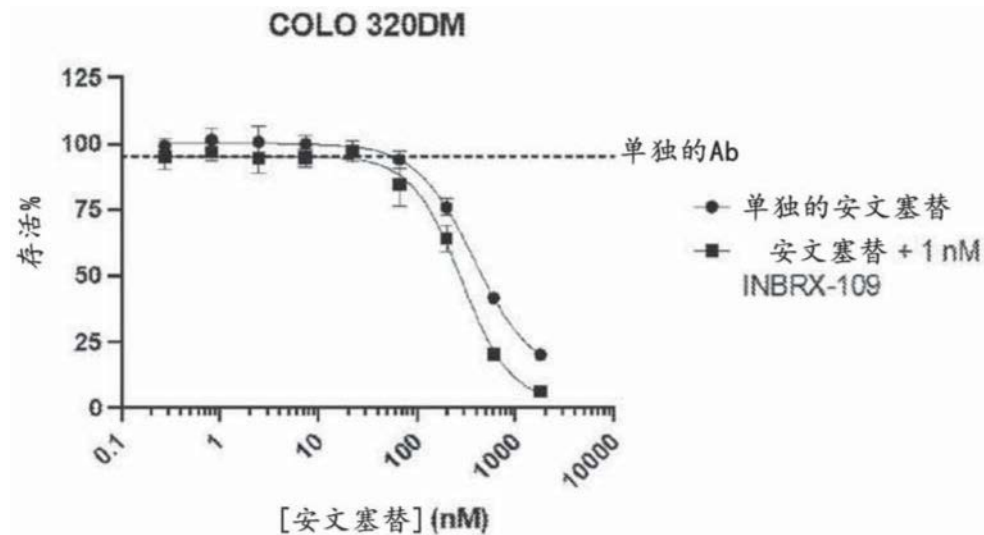


图6J

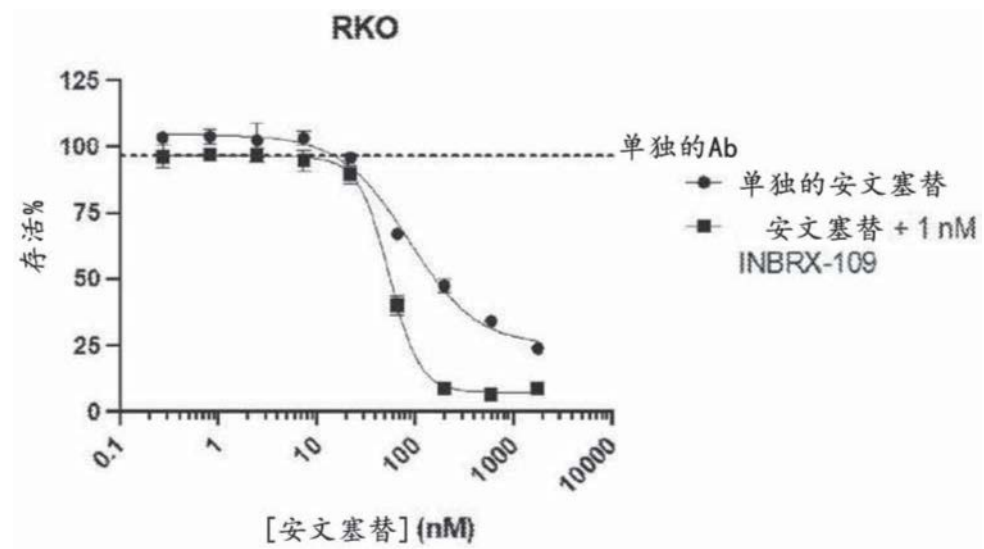


图6K

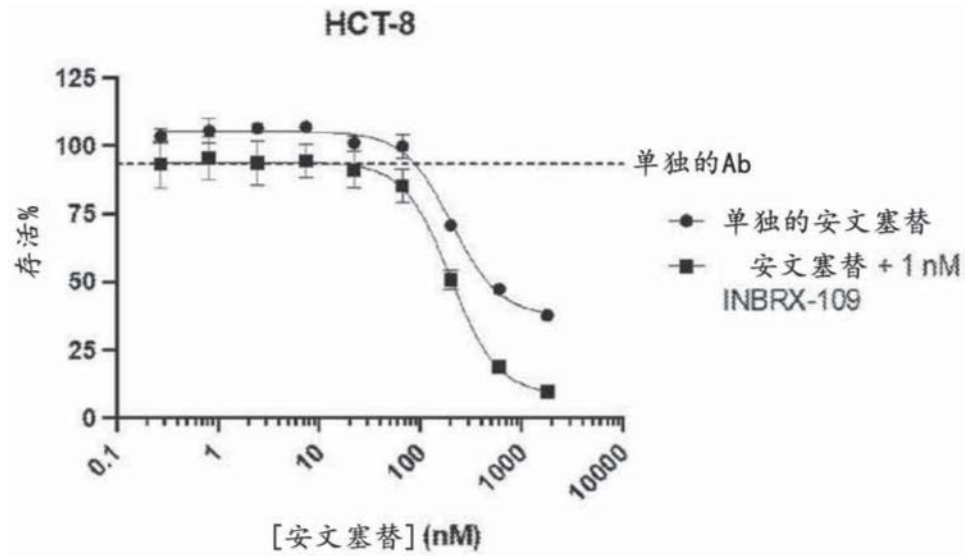


图6L

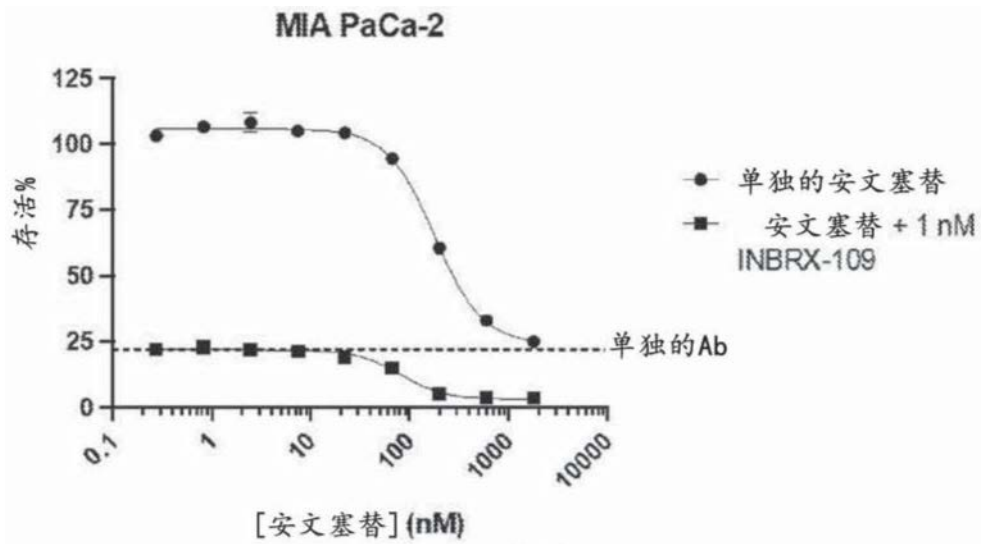


图7A

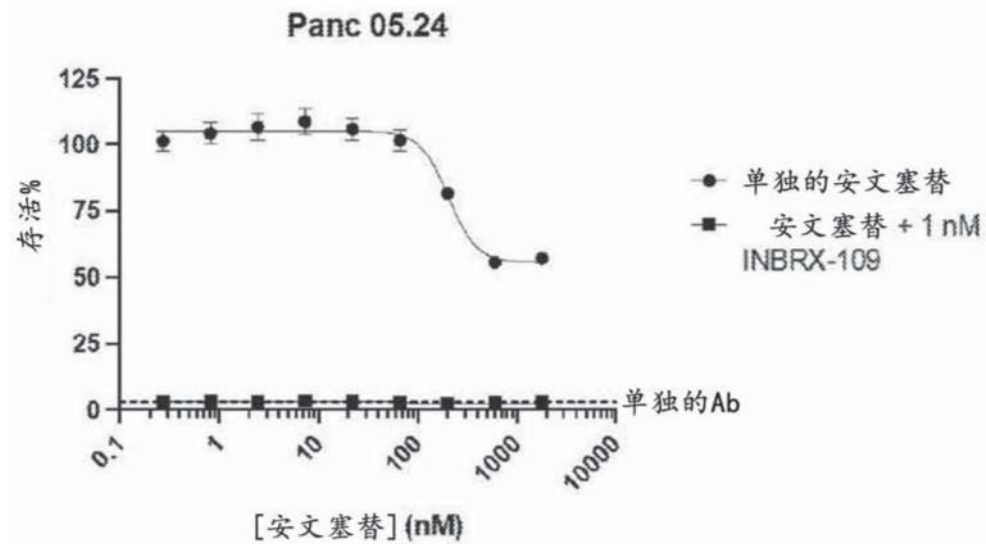


图7B

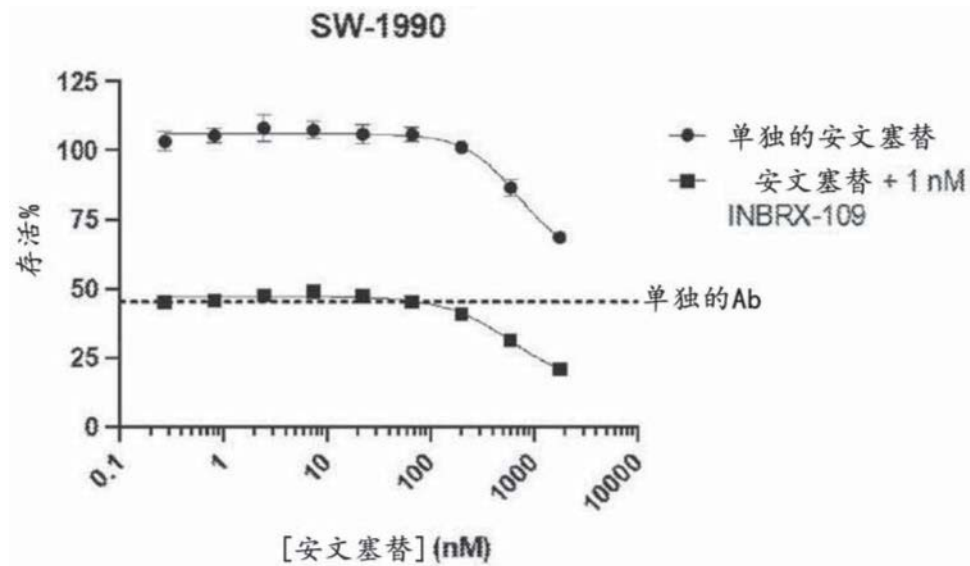


图7C

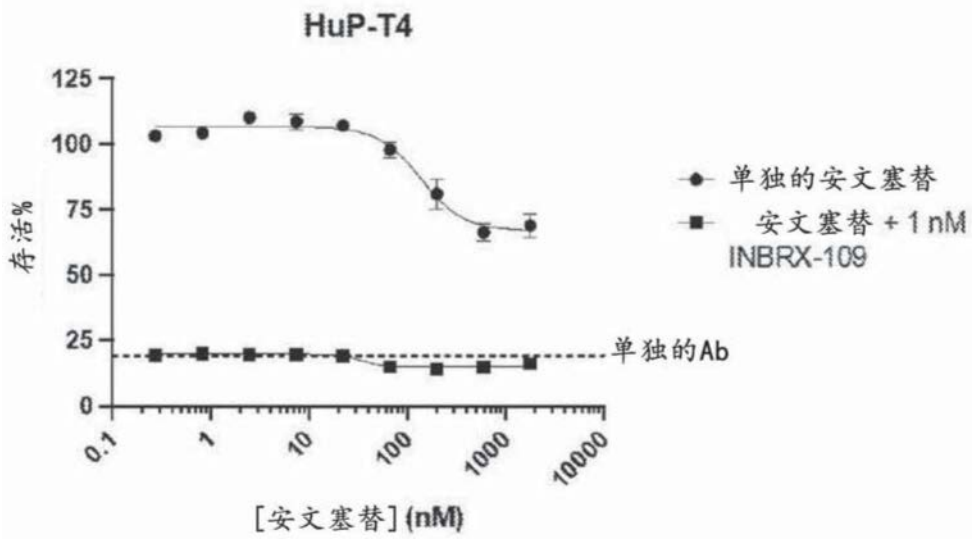


图7D

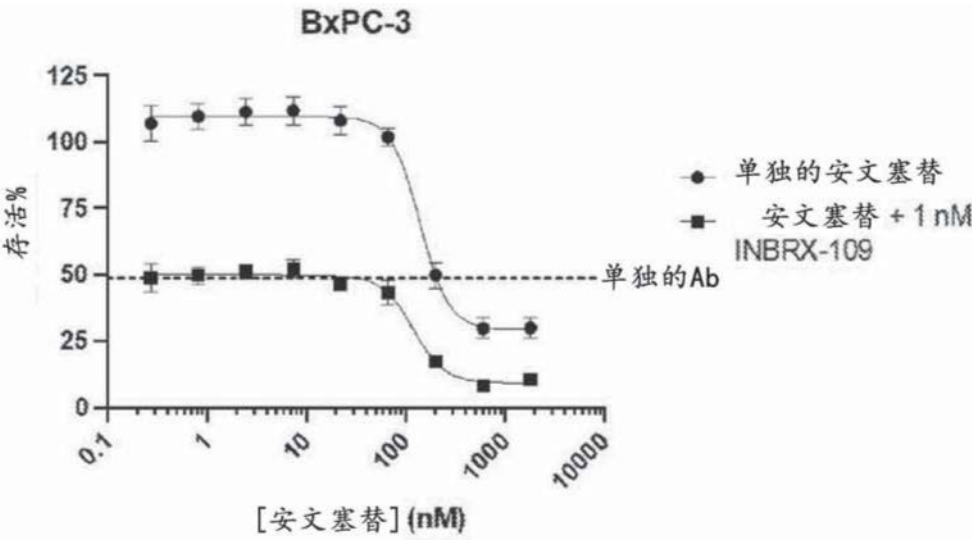


图7E

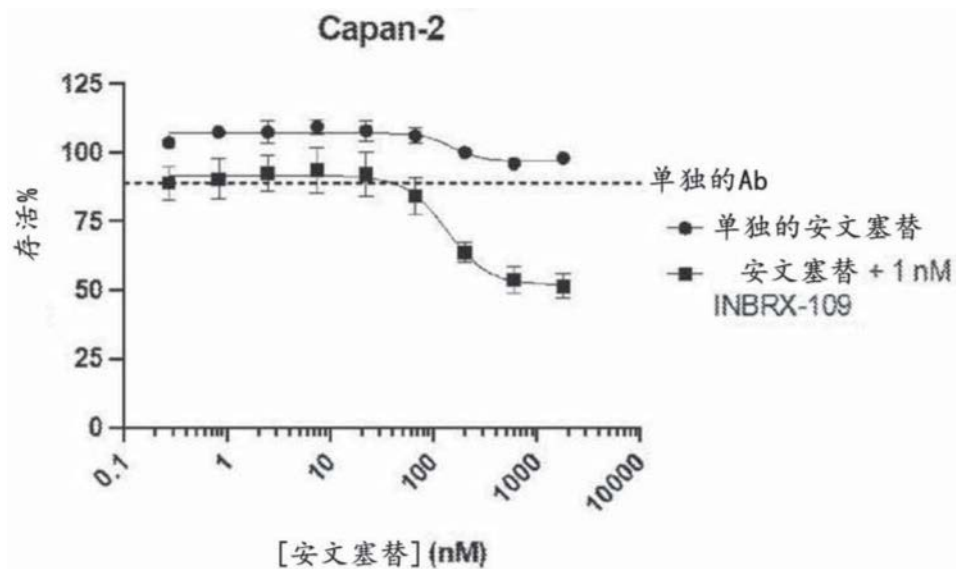


图7F

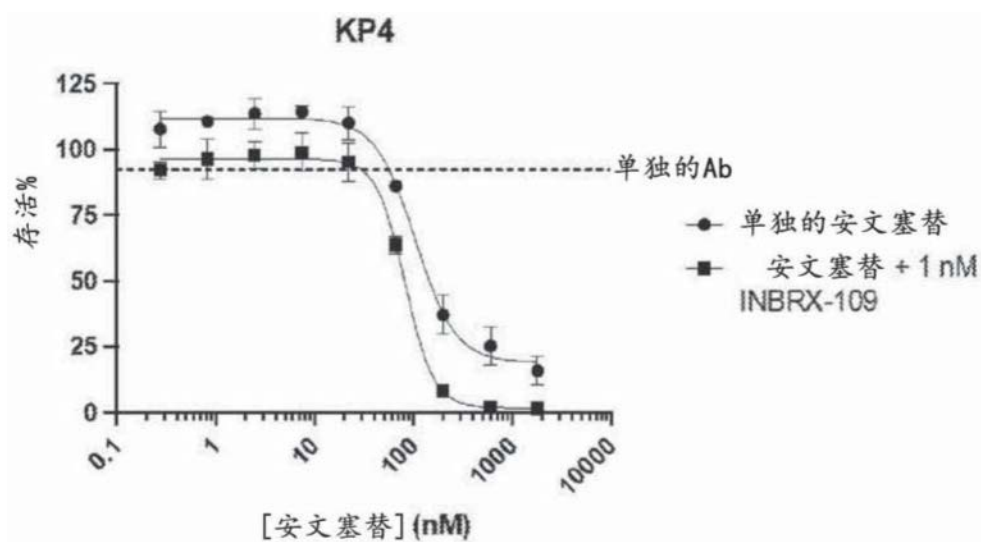


图7G

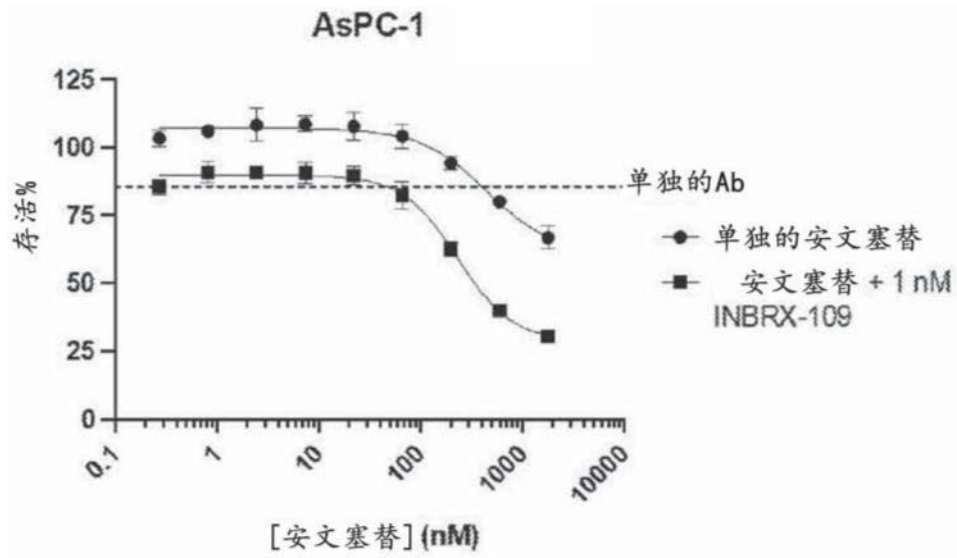


图7H

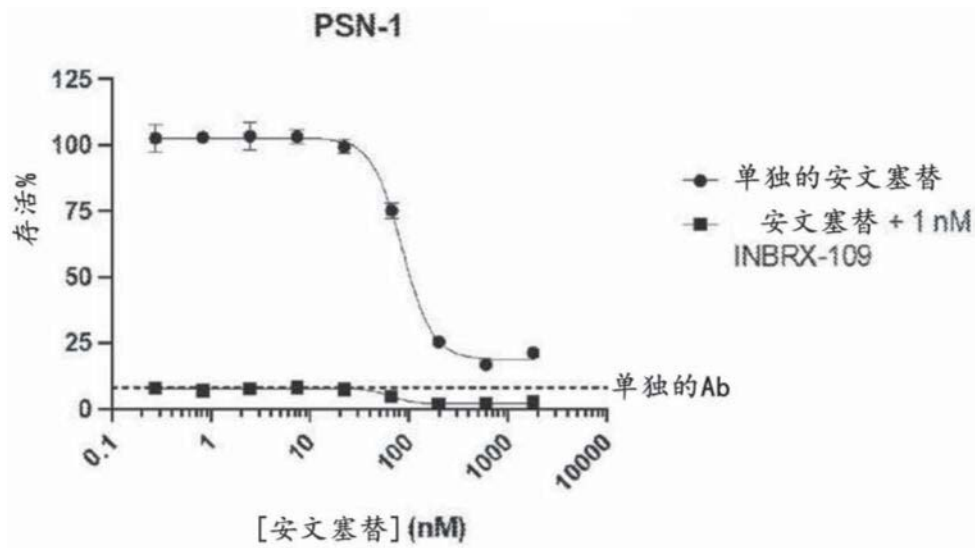


图7I

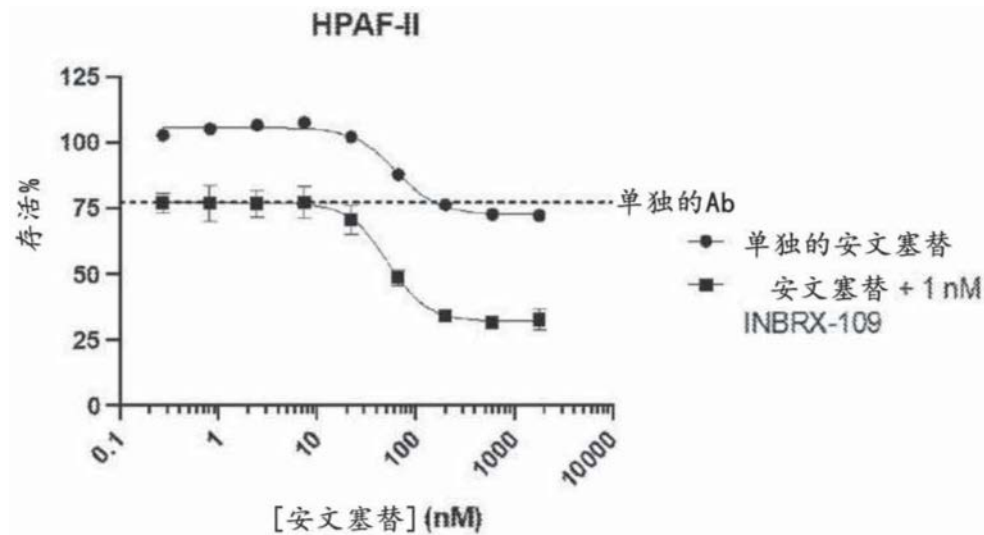


图8A

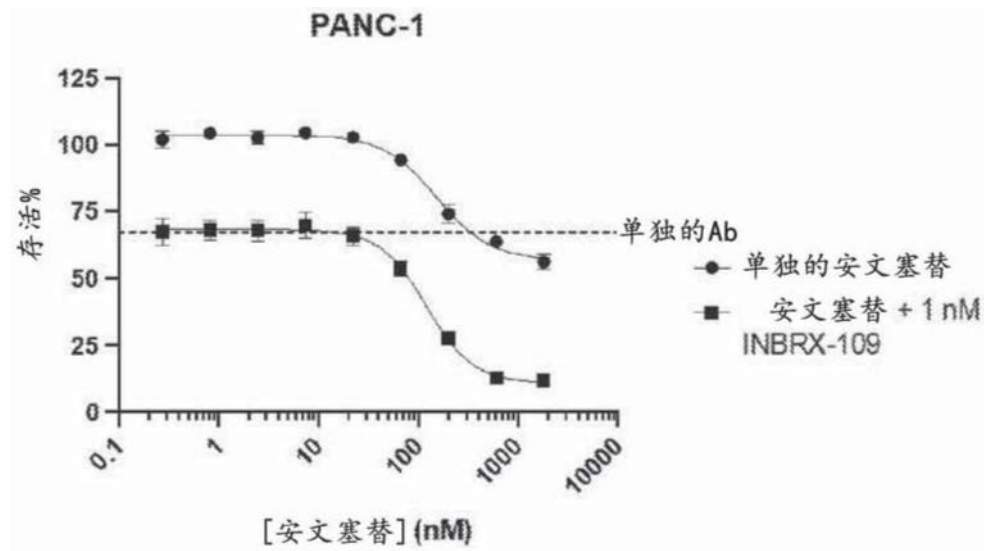


图8B

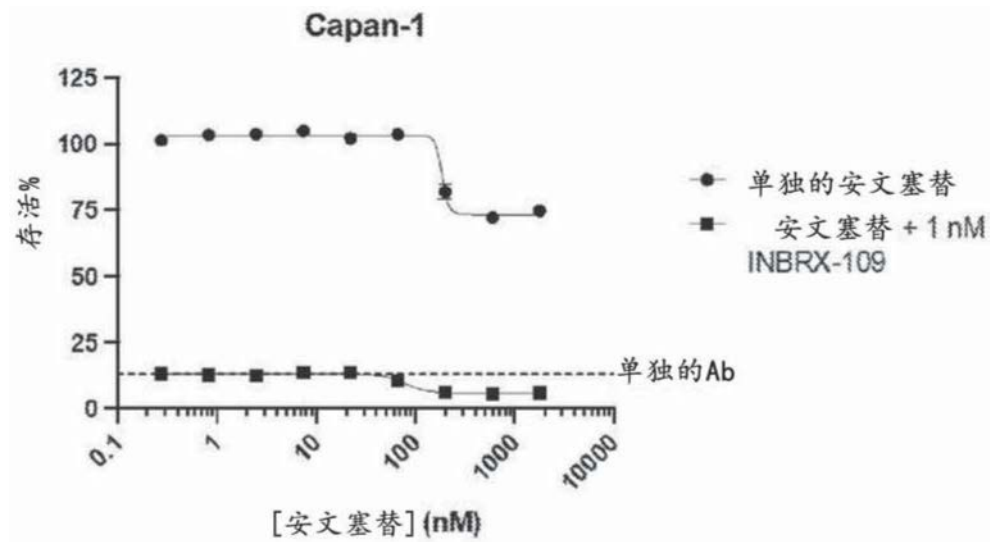


图8C

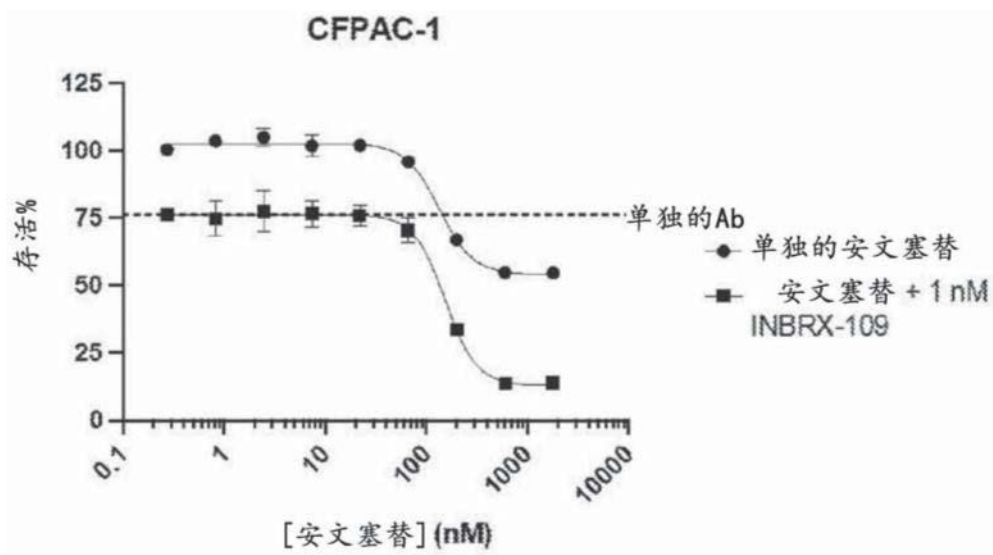


图8D

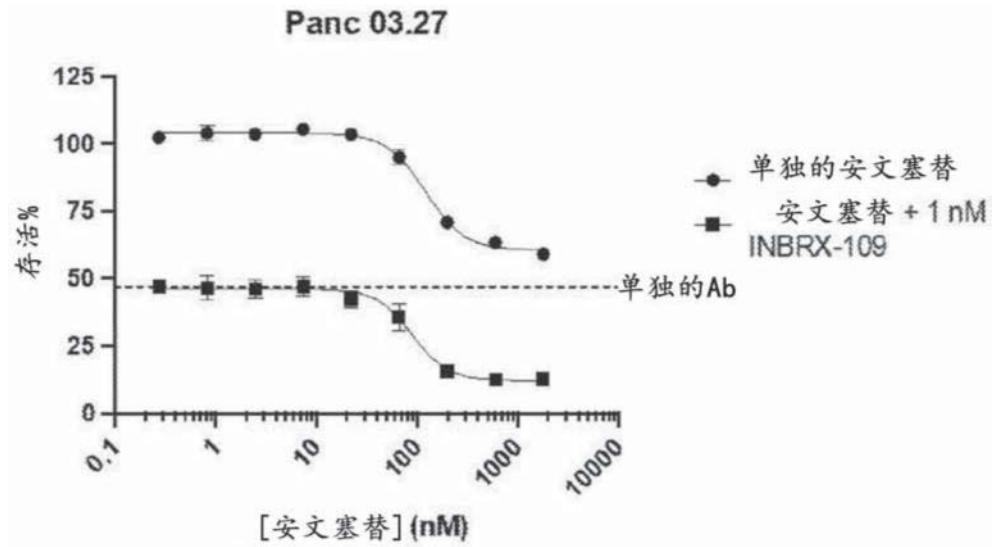


图8E

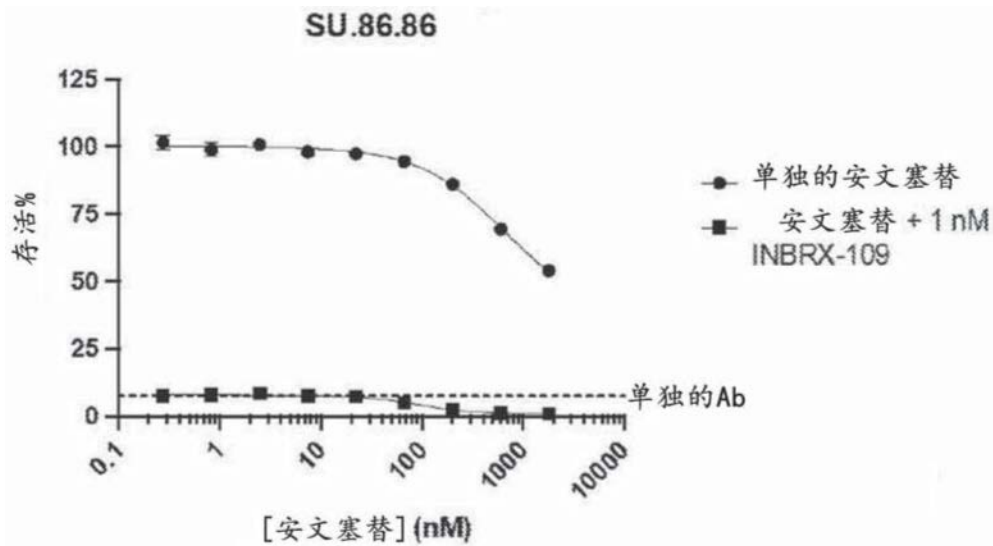


图8F

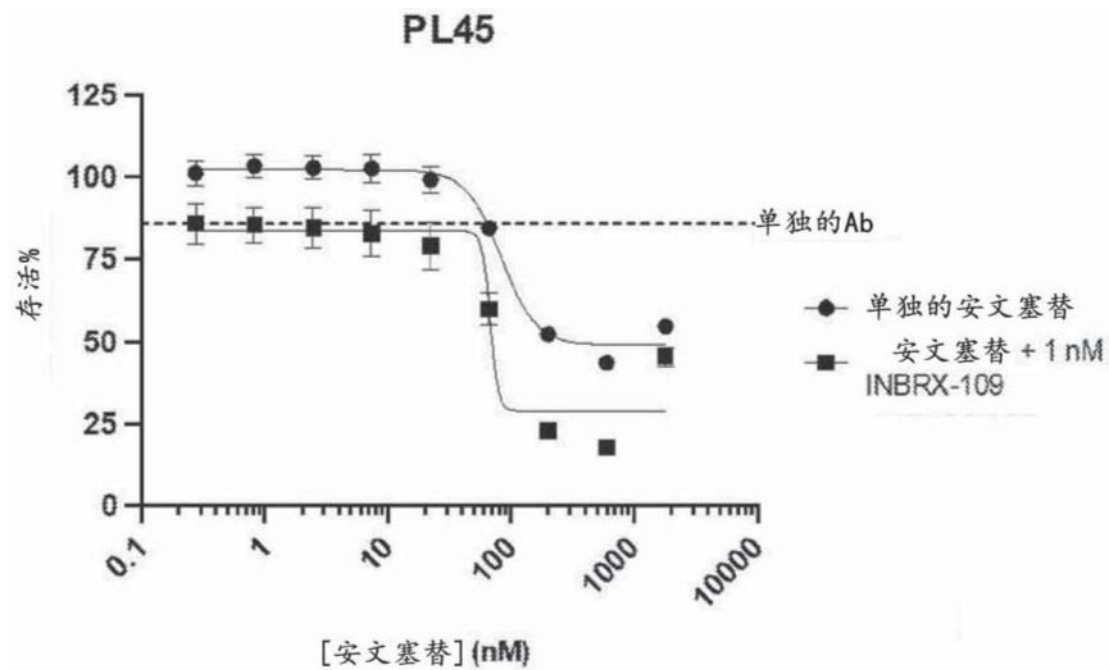


图8G

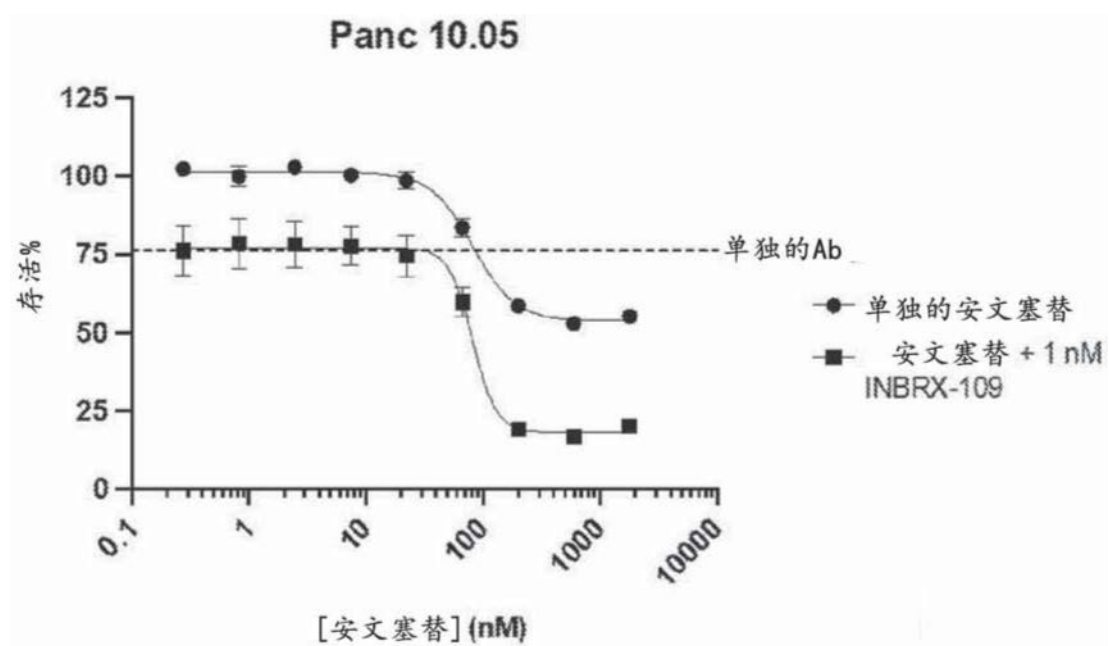


图8H

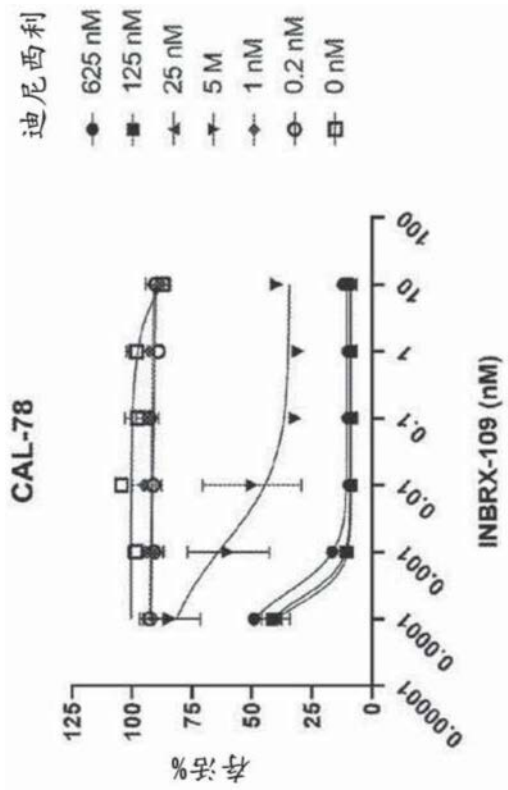


图9A

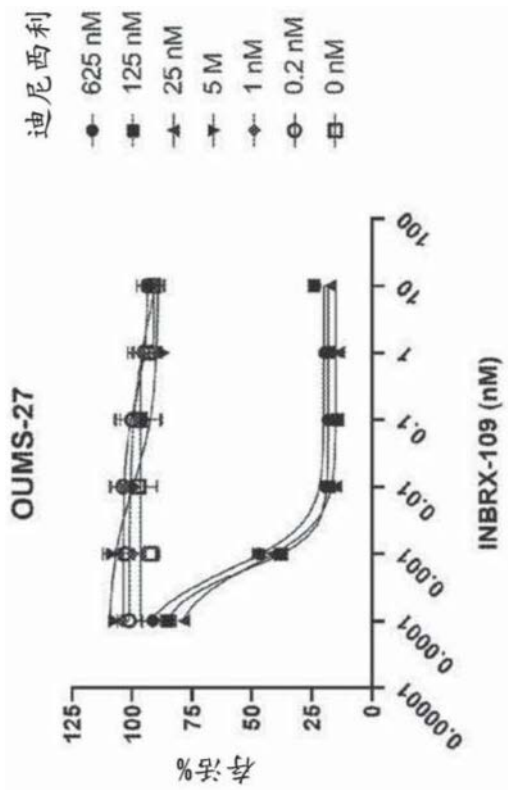


图9B

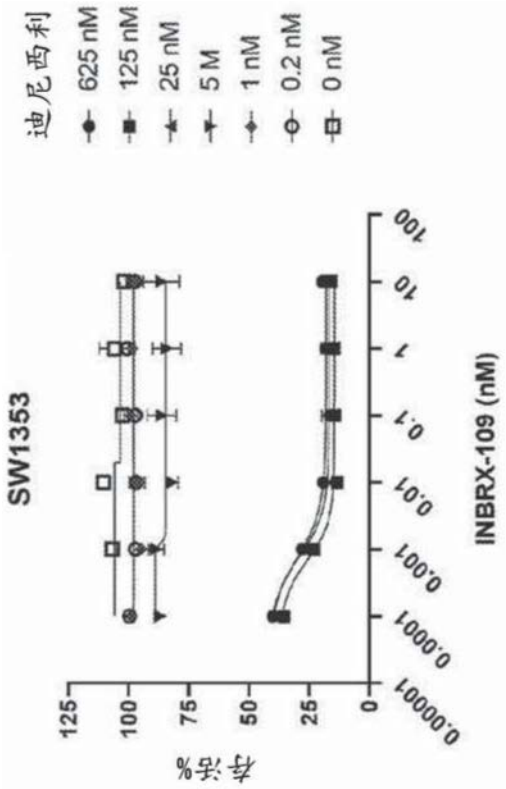


图9C

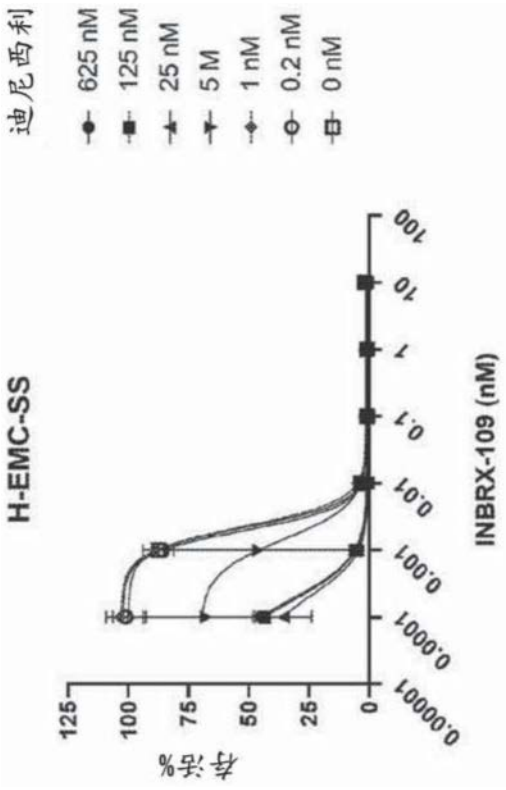


图9D

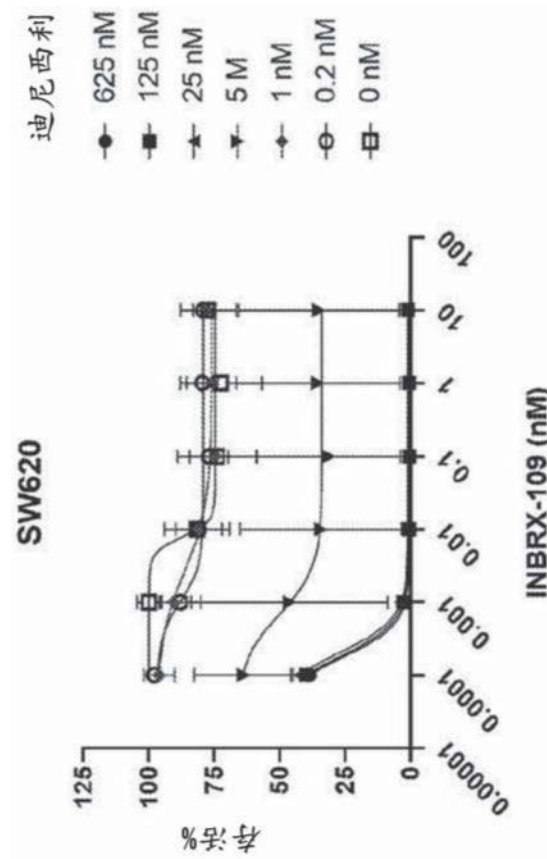


图9E

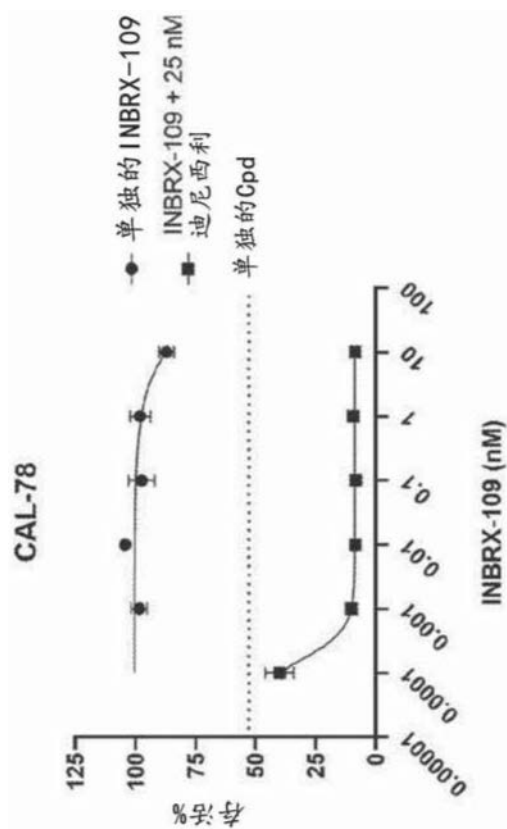


图10A

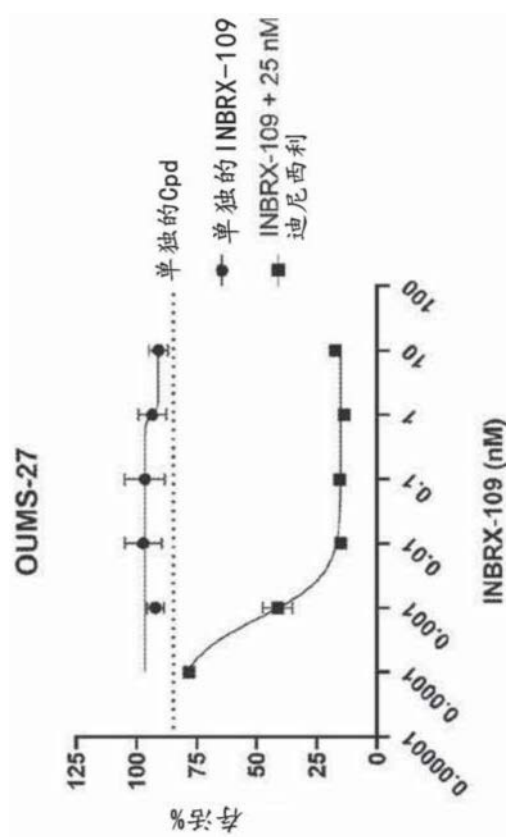


图10B

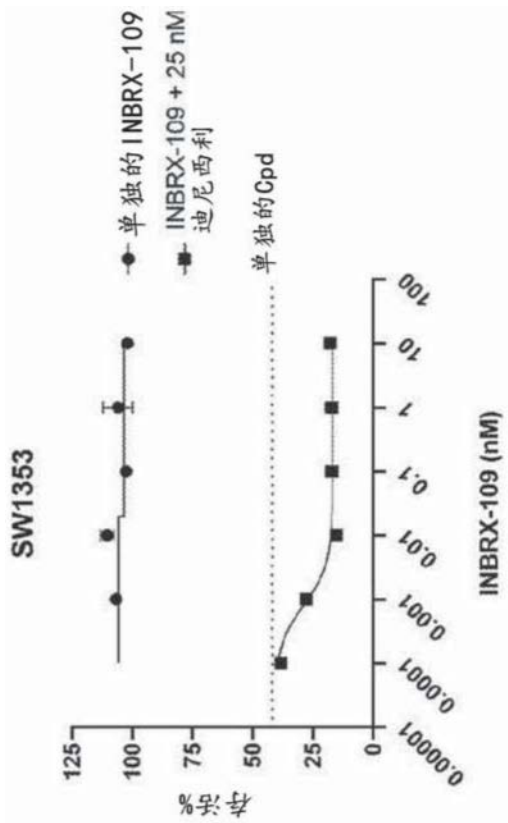


图10C

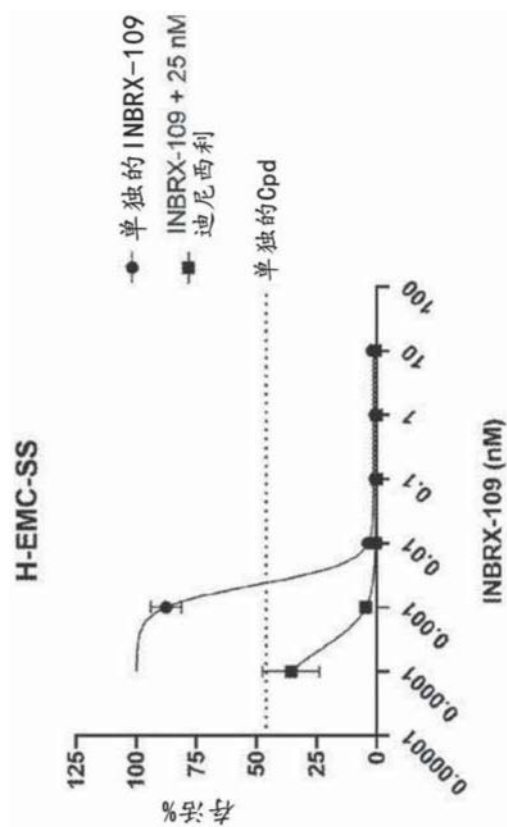


图10D

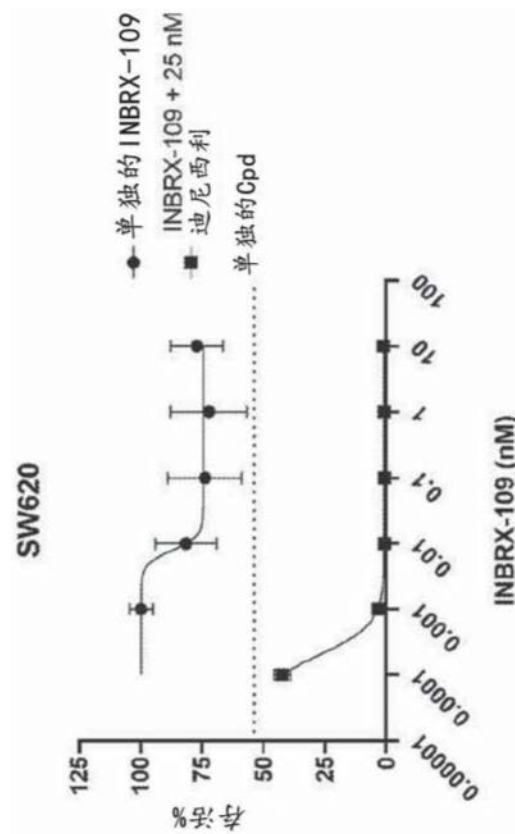


图10E

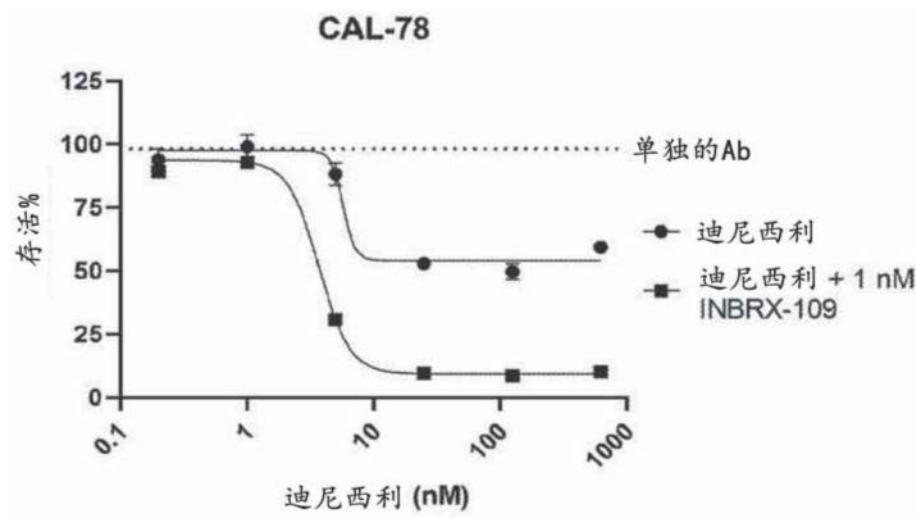


图11A

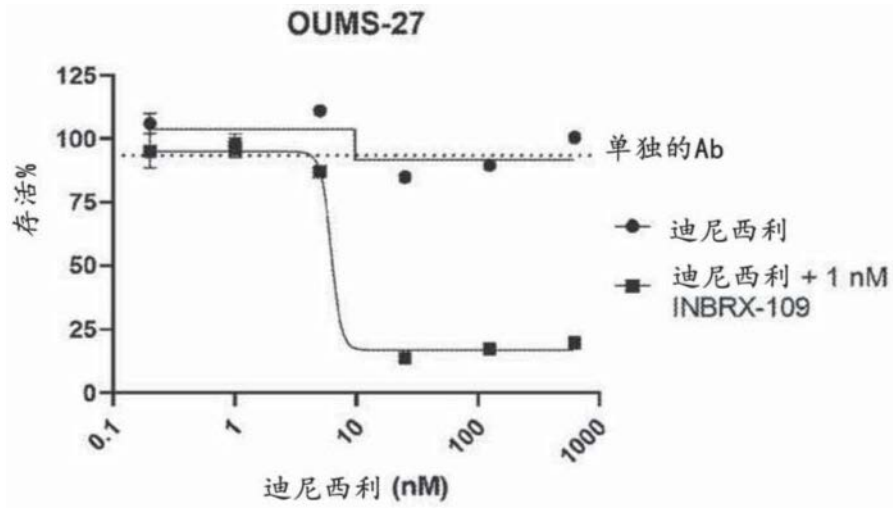


图11B

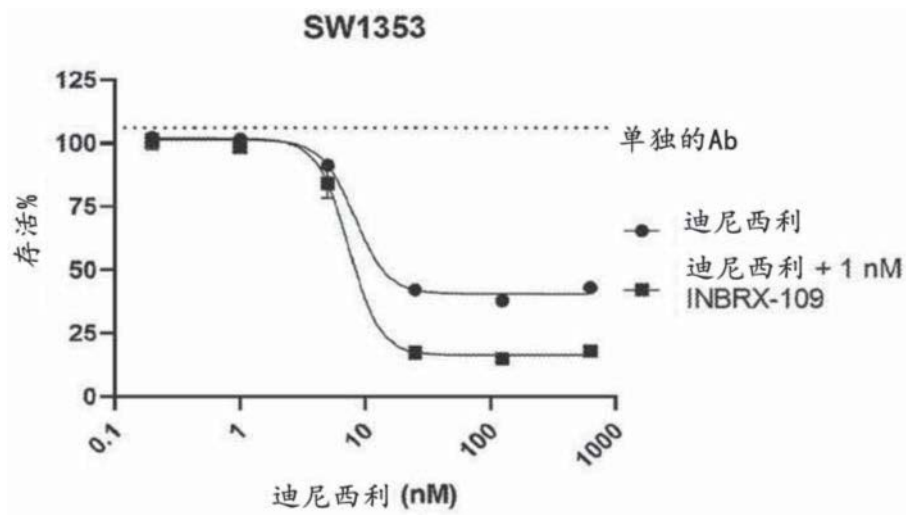


图11C

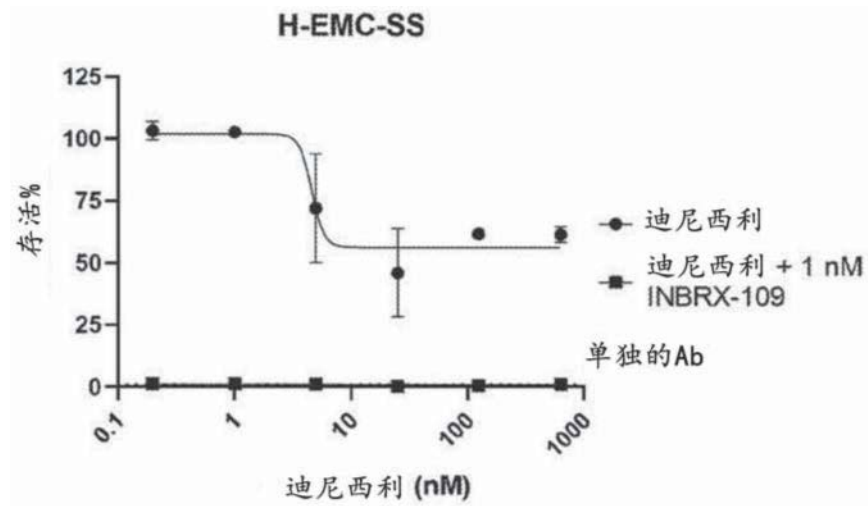


图11D

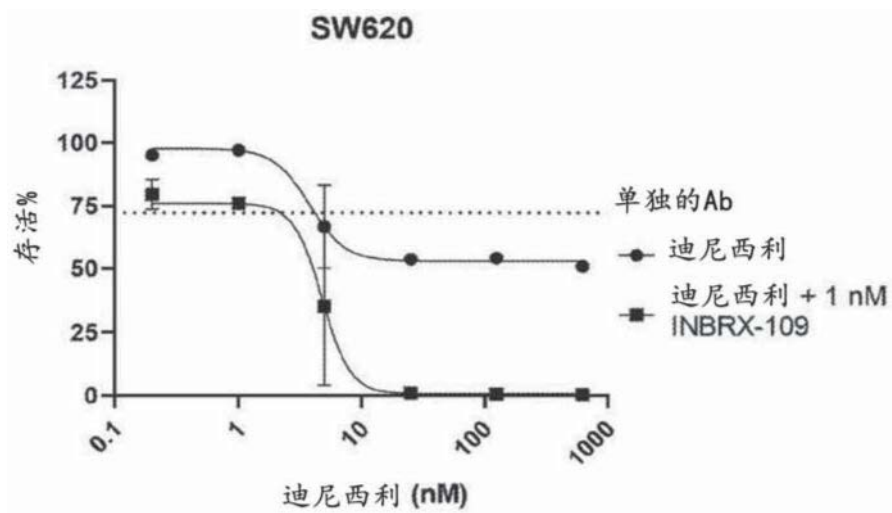


图11E

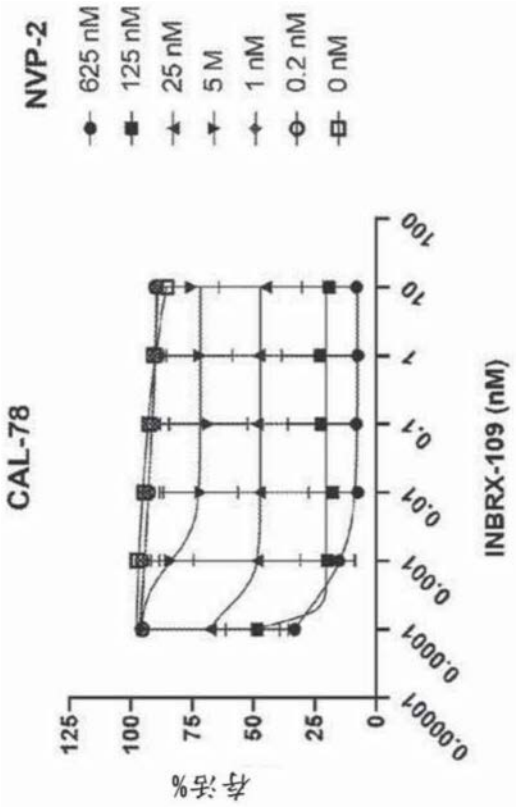


图12A

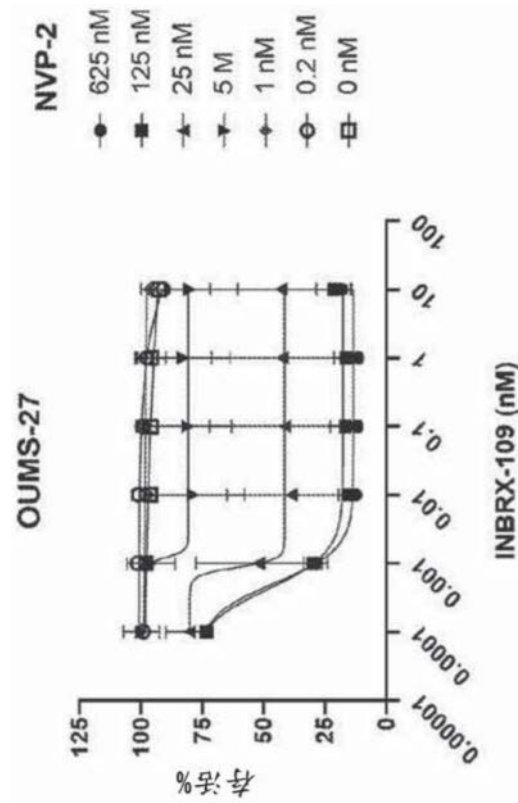


图12B

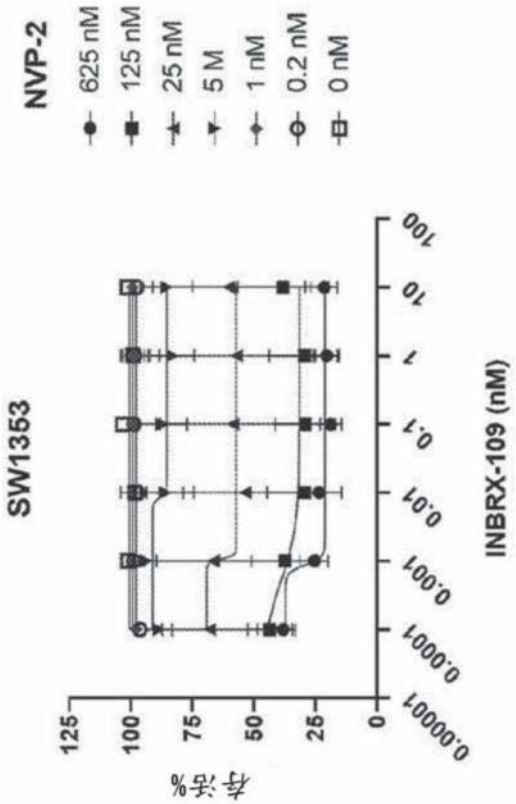


图12C

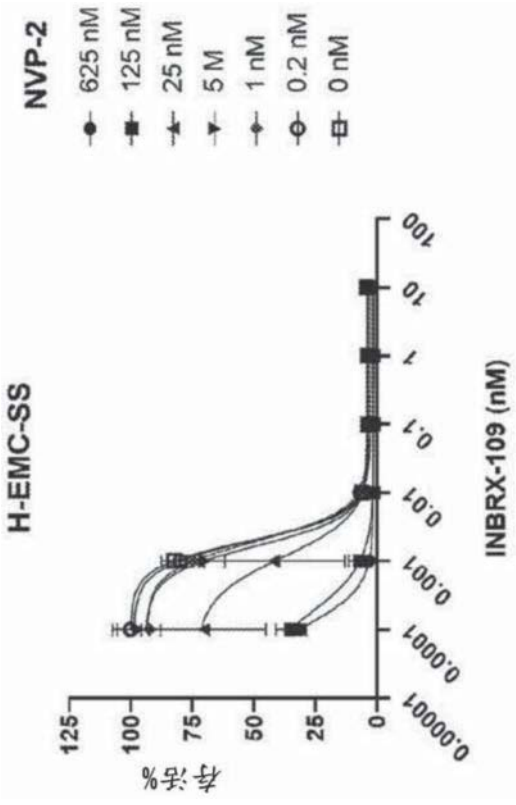


图12D

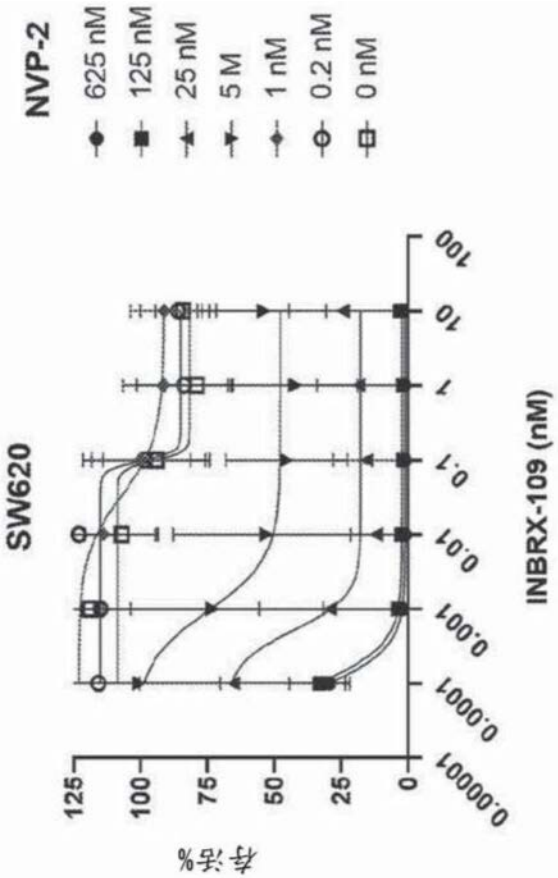


图12E

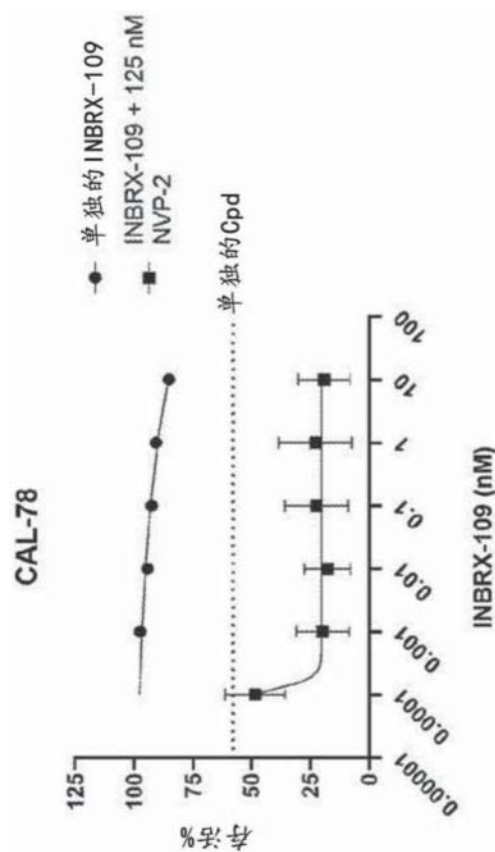


图13A

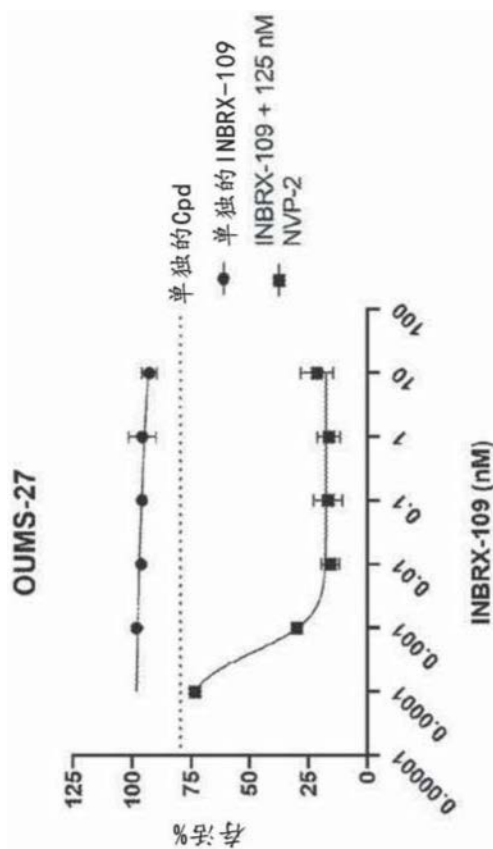


图13B

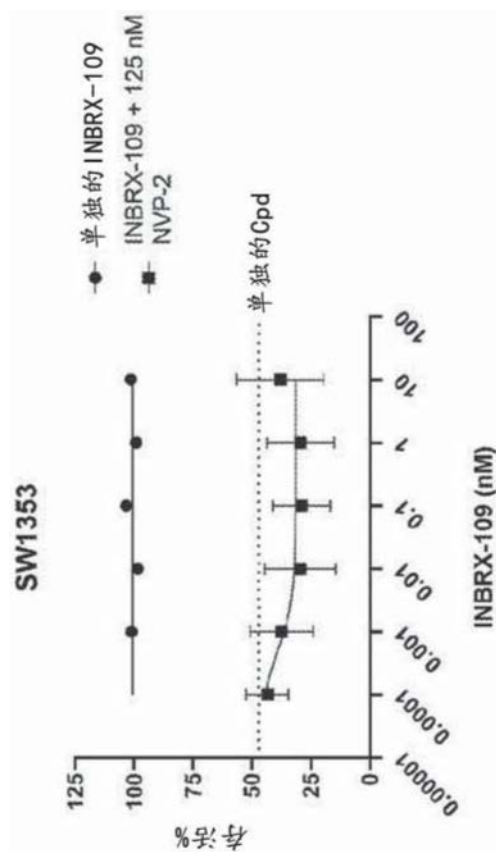


图13C

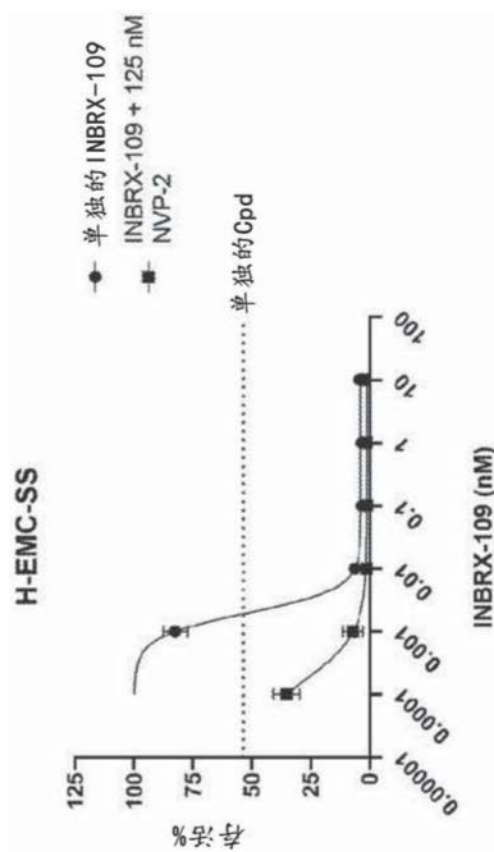


图13D

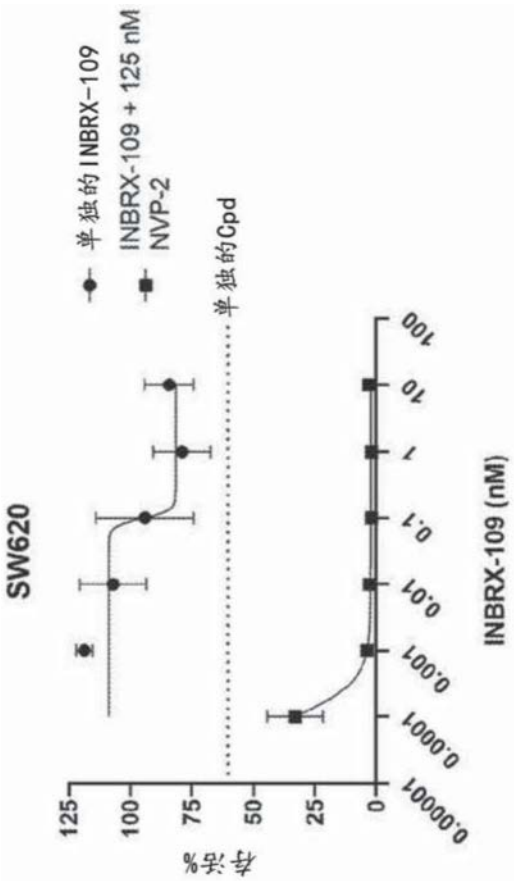


图13E

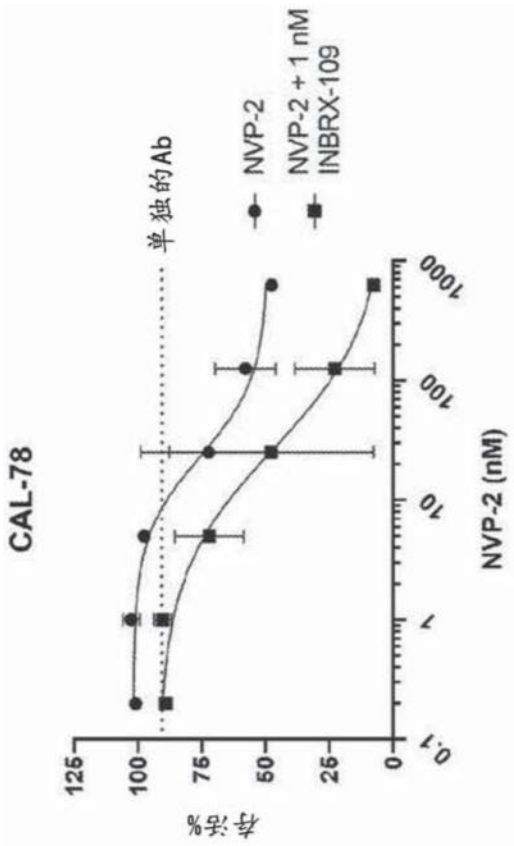


图14A

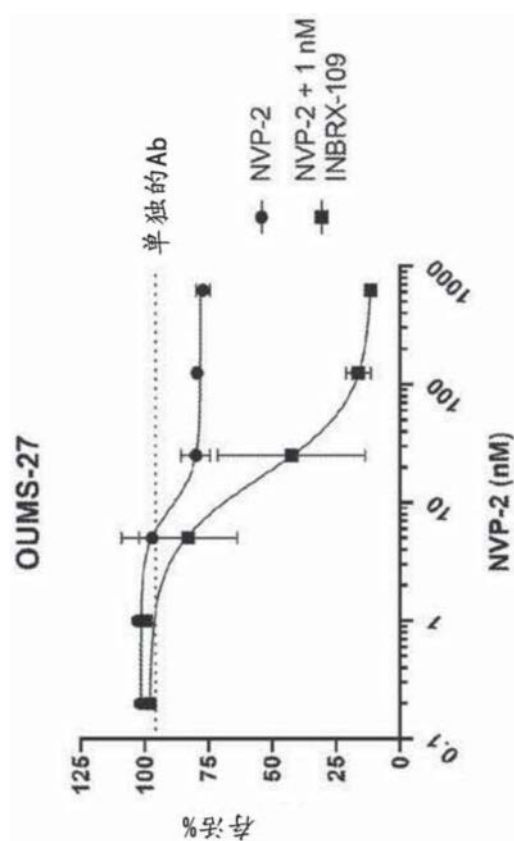


图14B

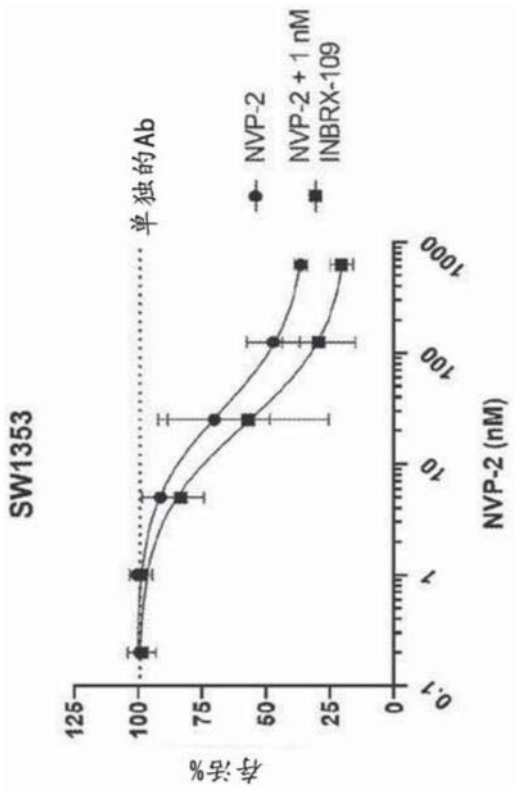


图14C

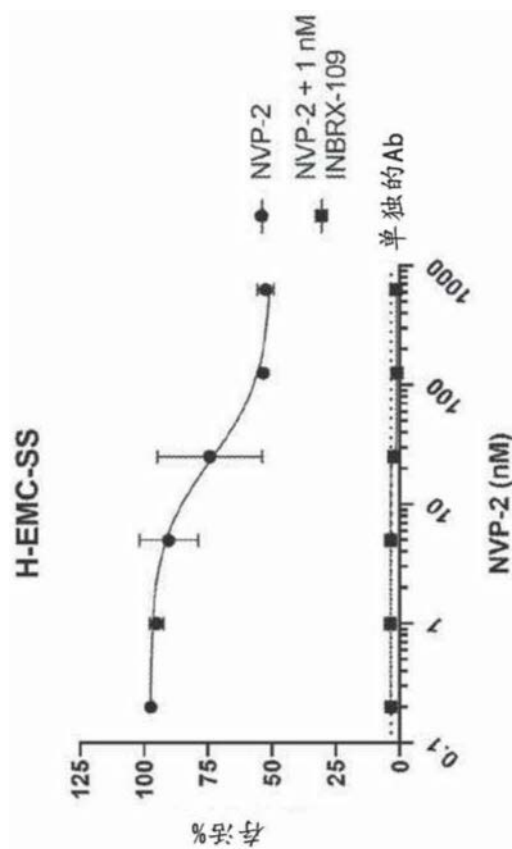


图14D

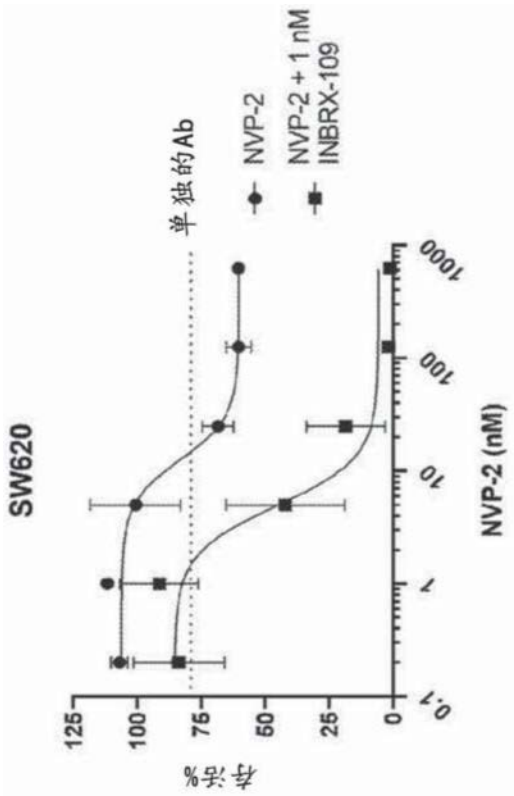


图14E

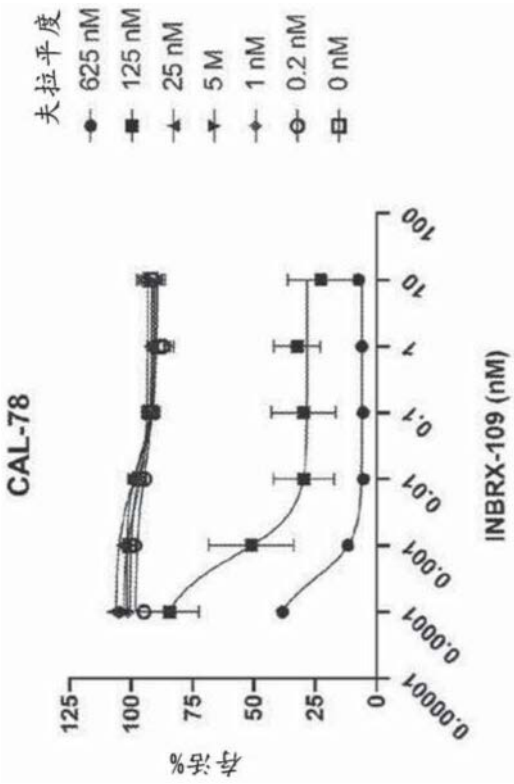


图15A

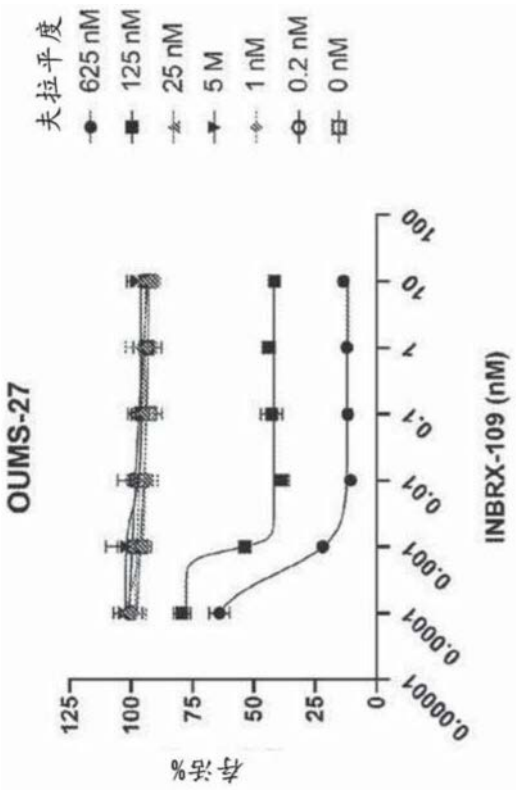


图15B

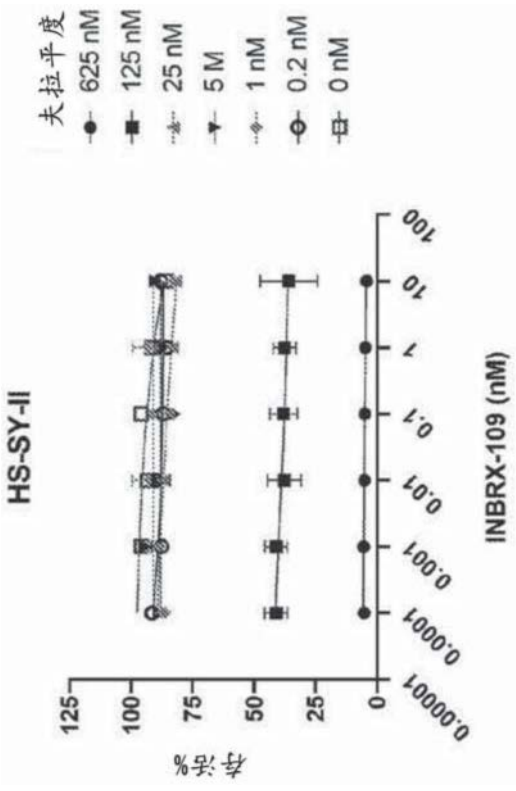


图15C

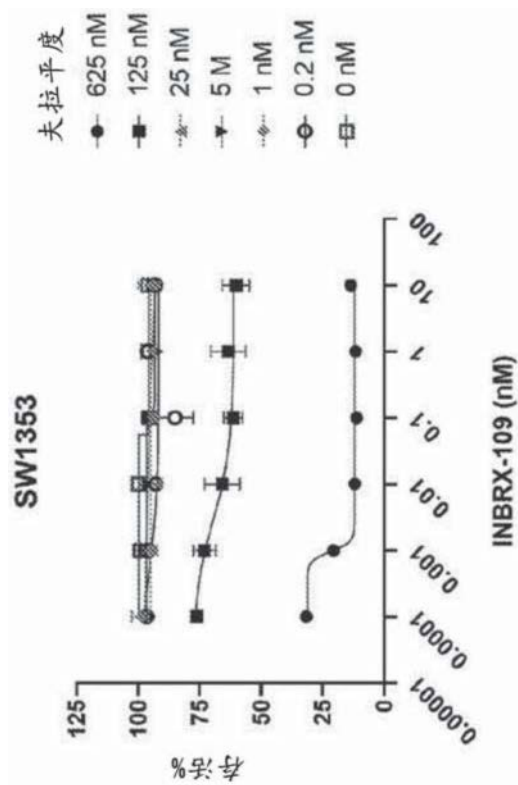


图15D

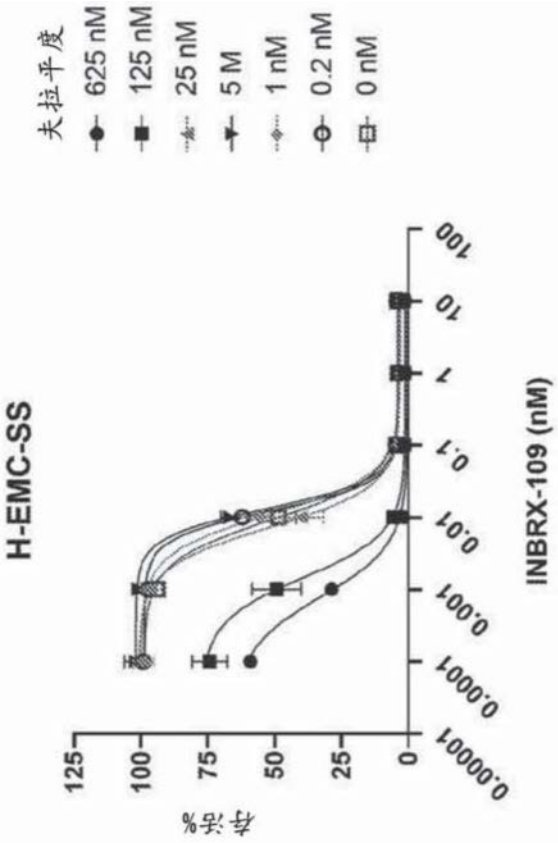


图15E

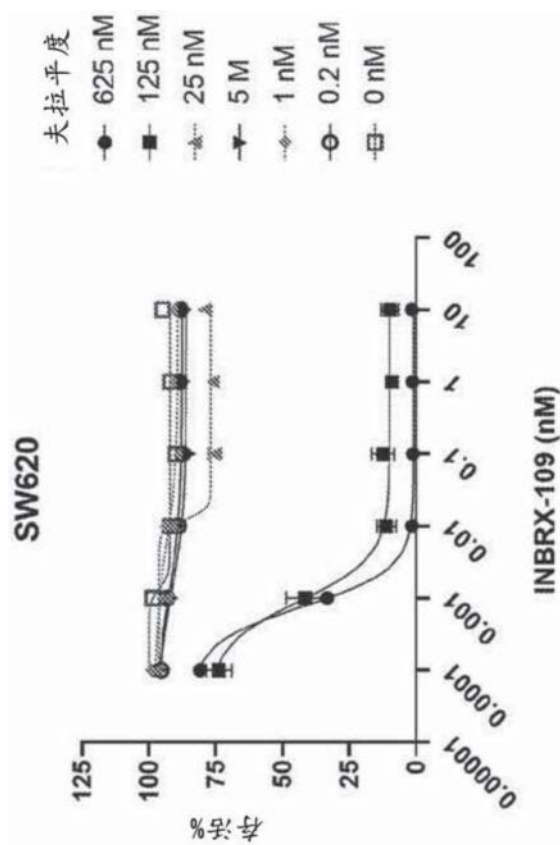


图15F

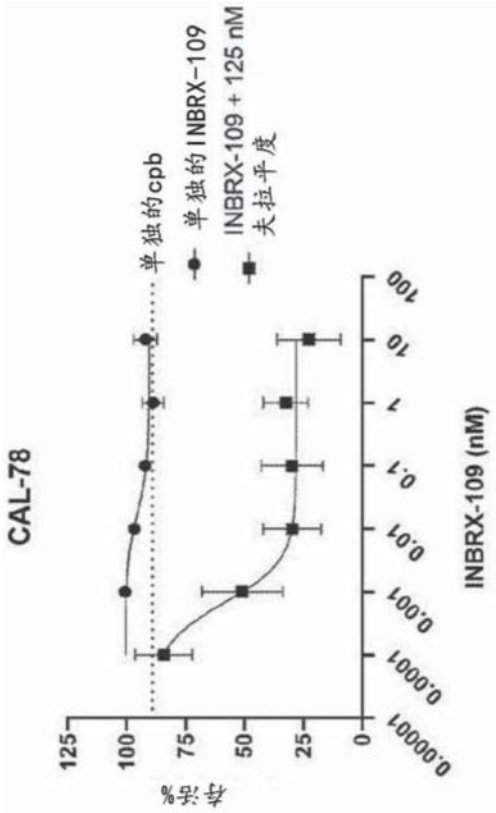


图16A

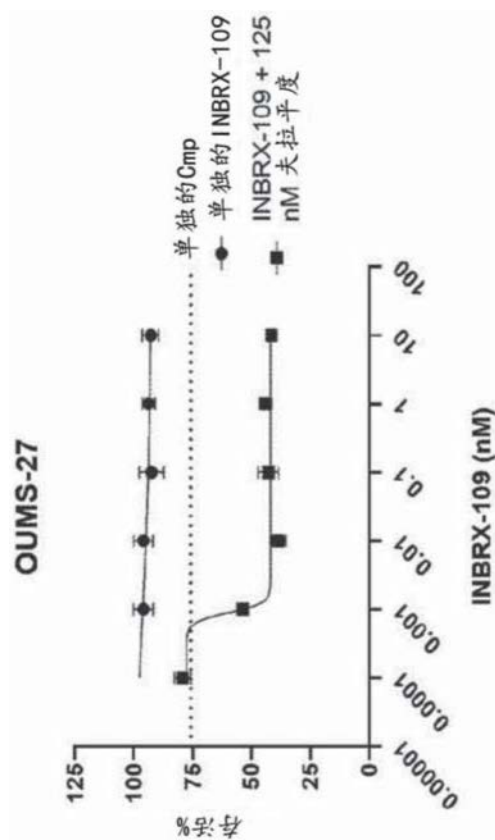


图16B

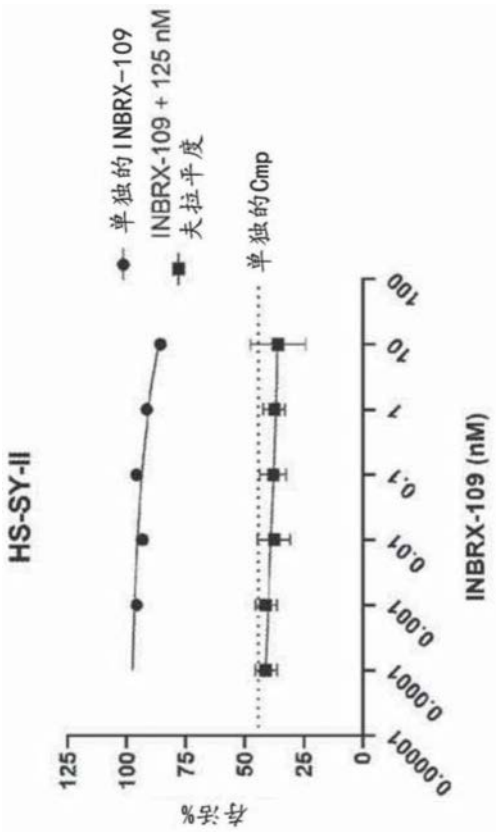


图16C

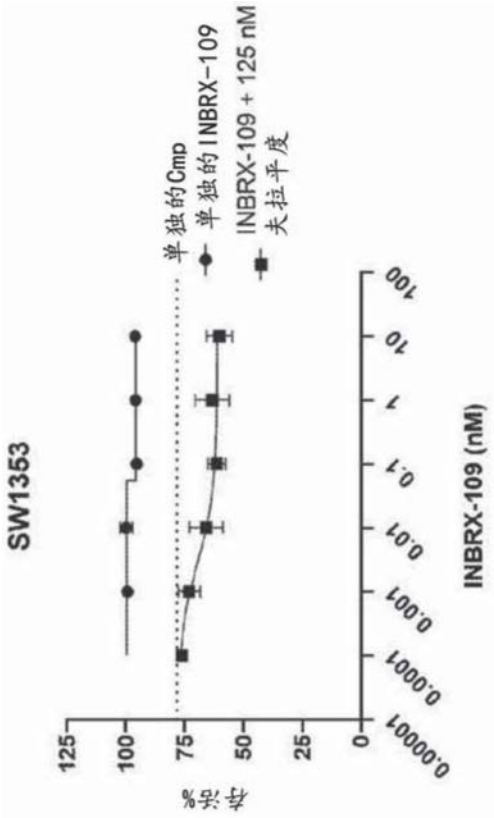


图16D

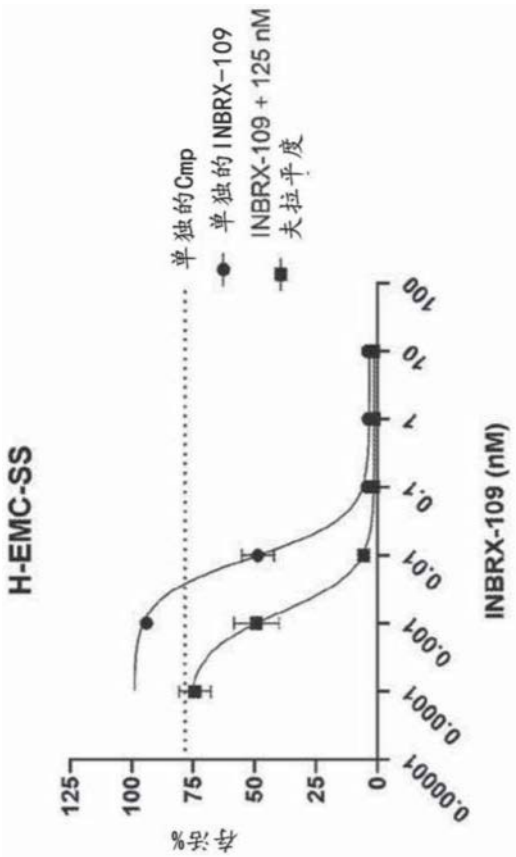


图16E

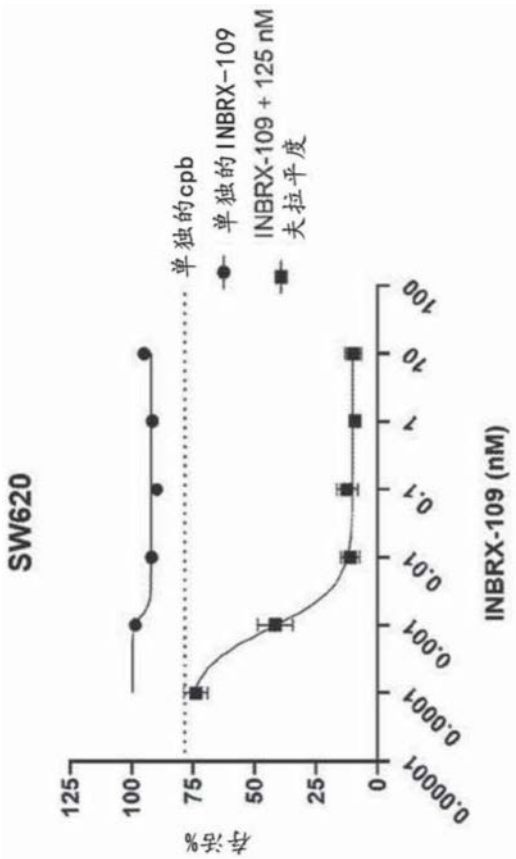


图16F

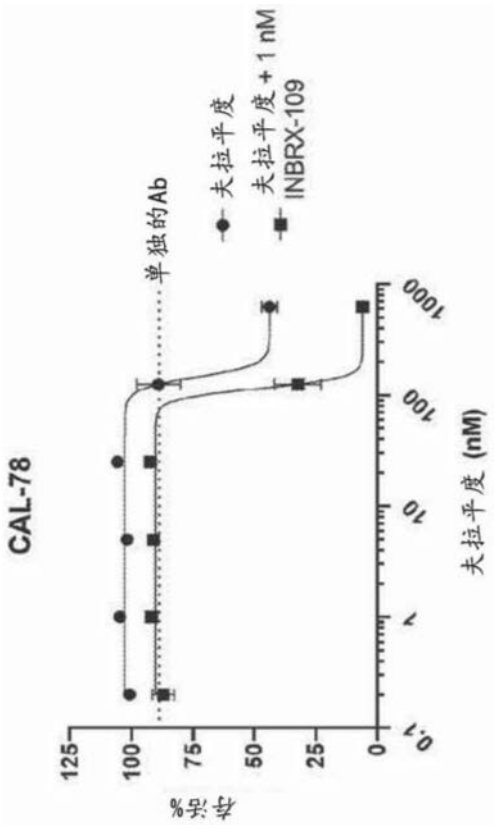


图17A

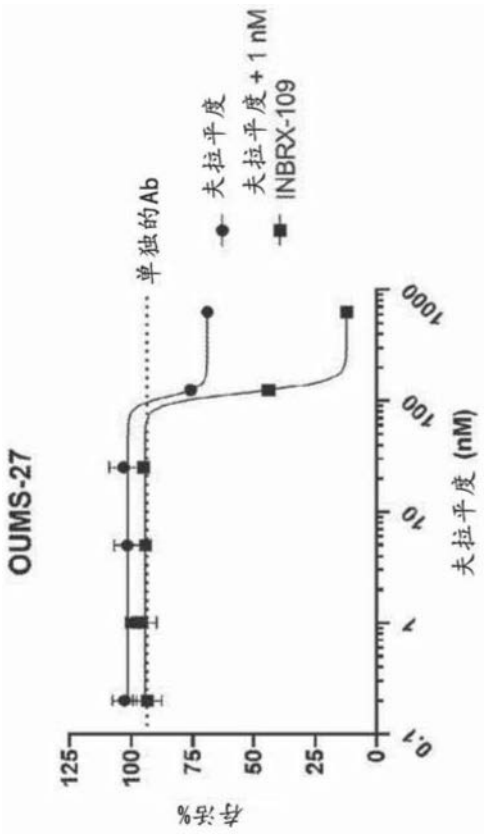


图17B

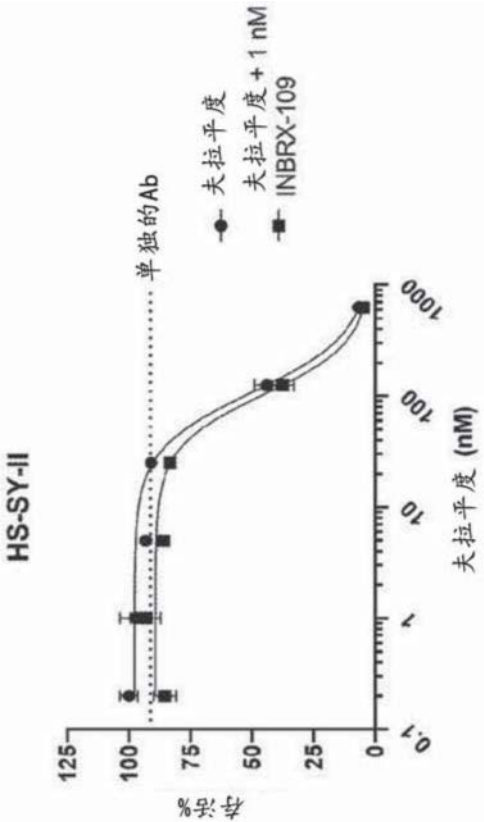


图17C

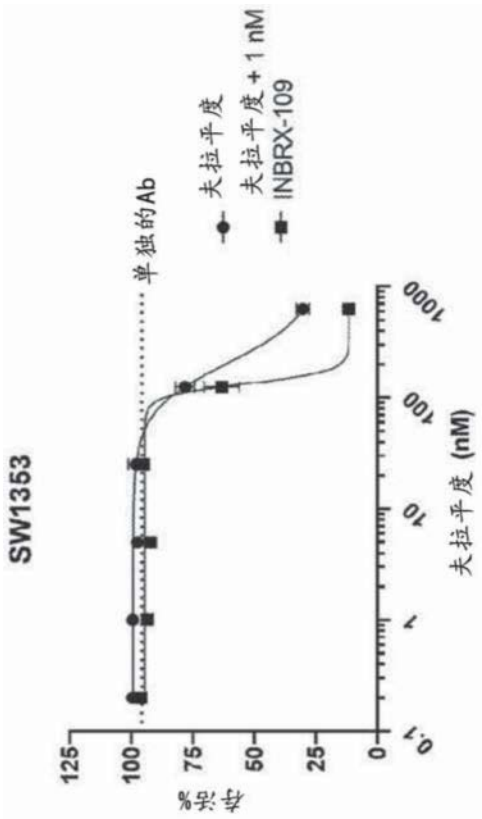


图17D

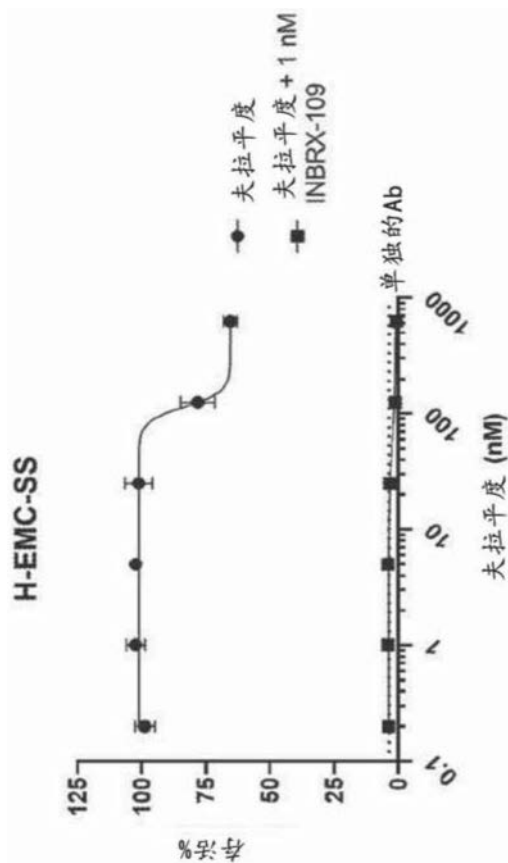


图17E

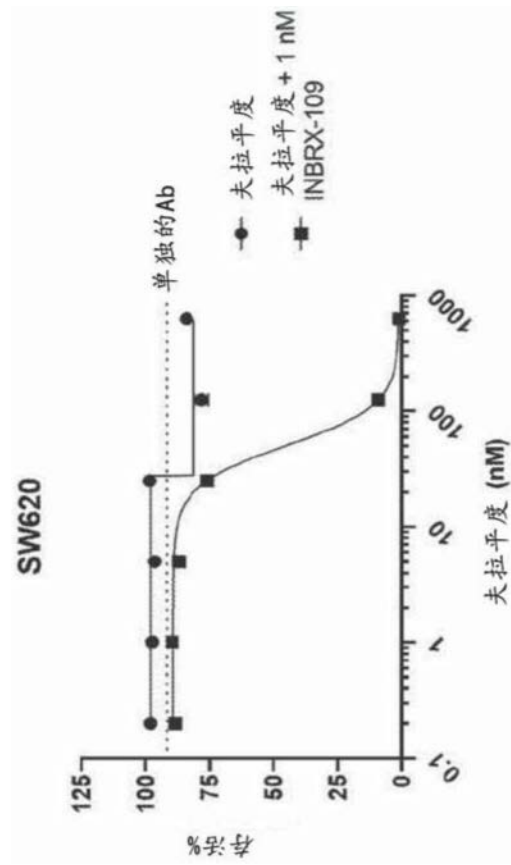


图17F

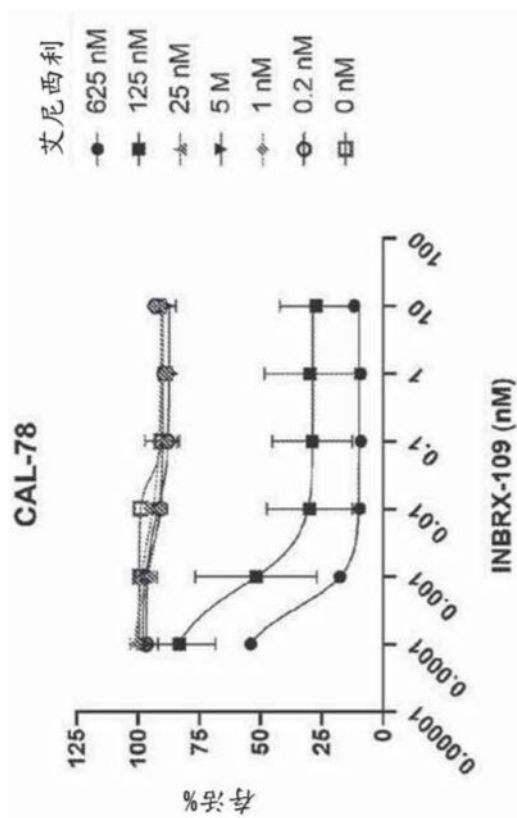


图18A

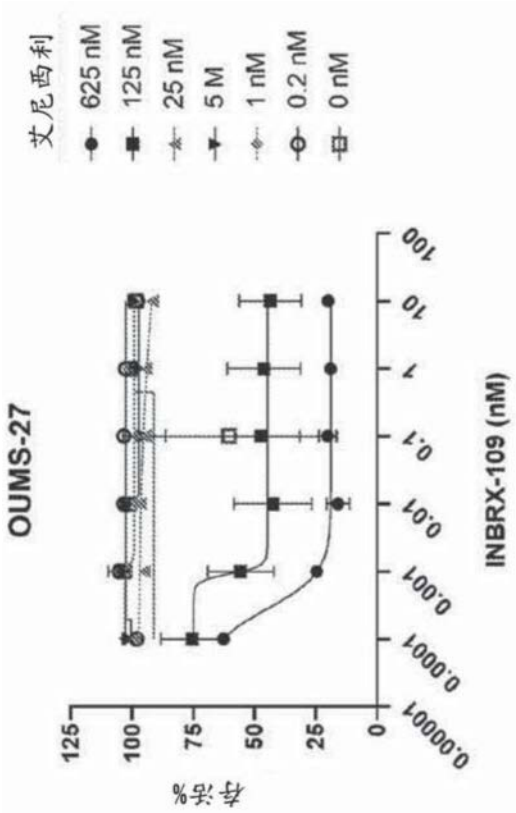


图18B

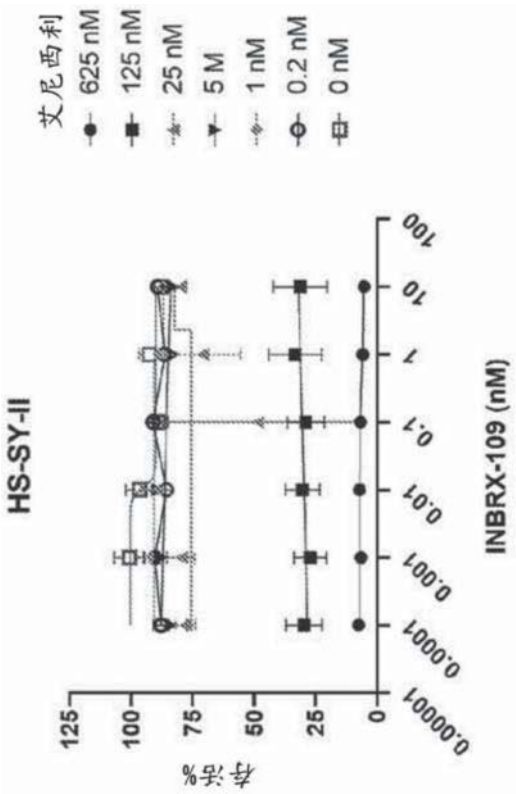


图18C

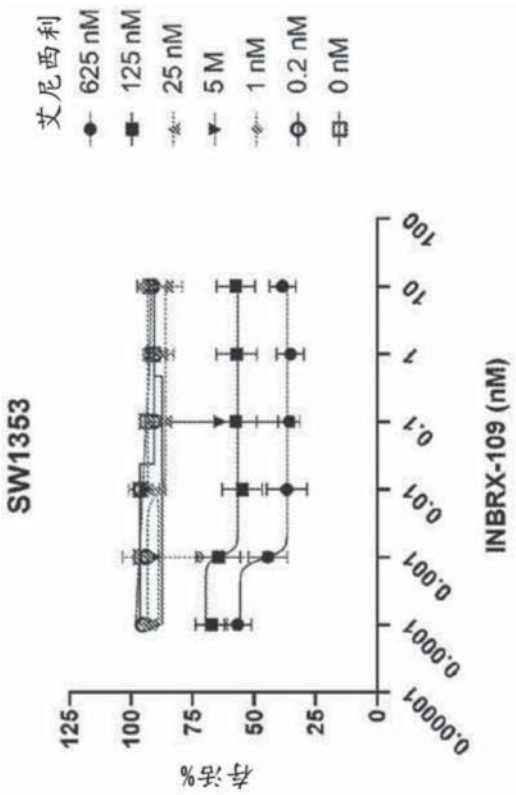


图18D

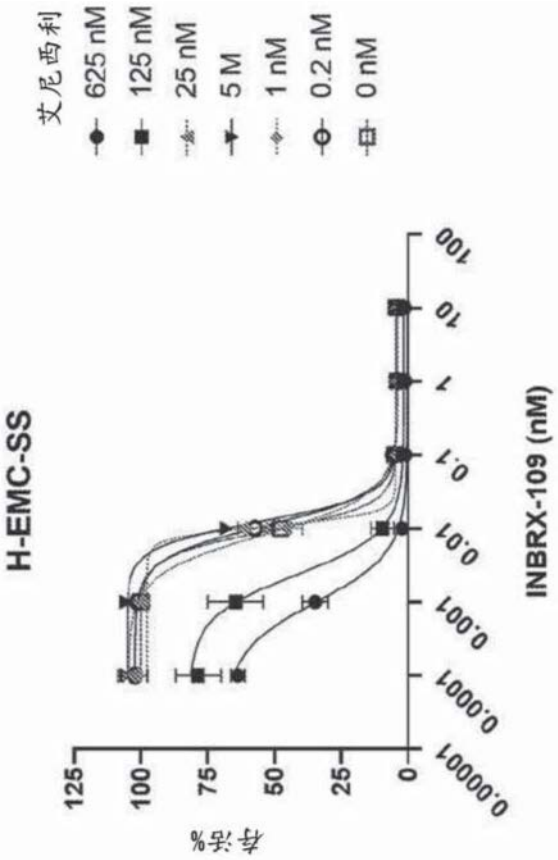


图18E

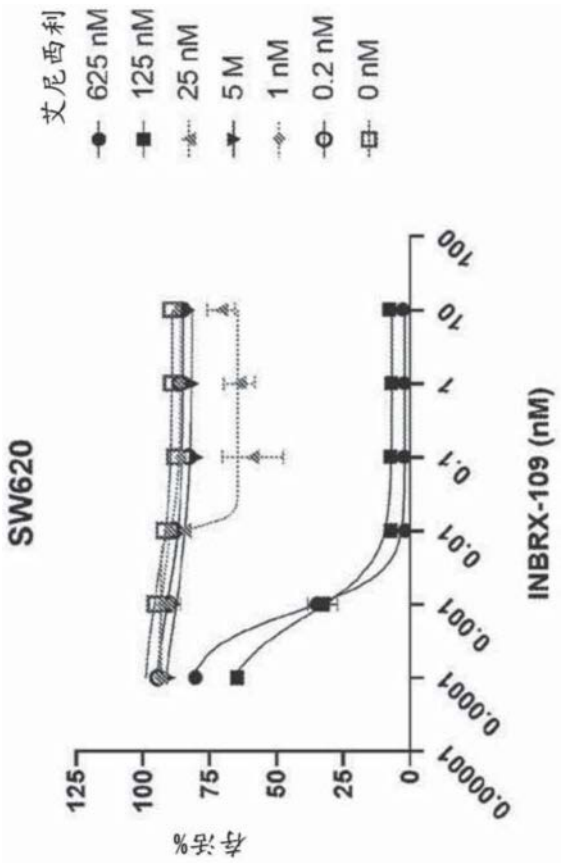


图18F

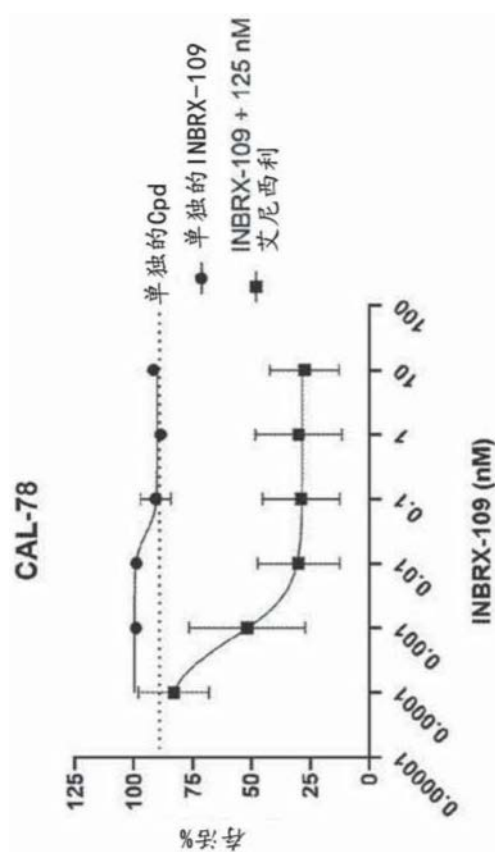


图19A

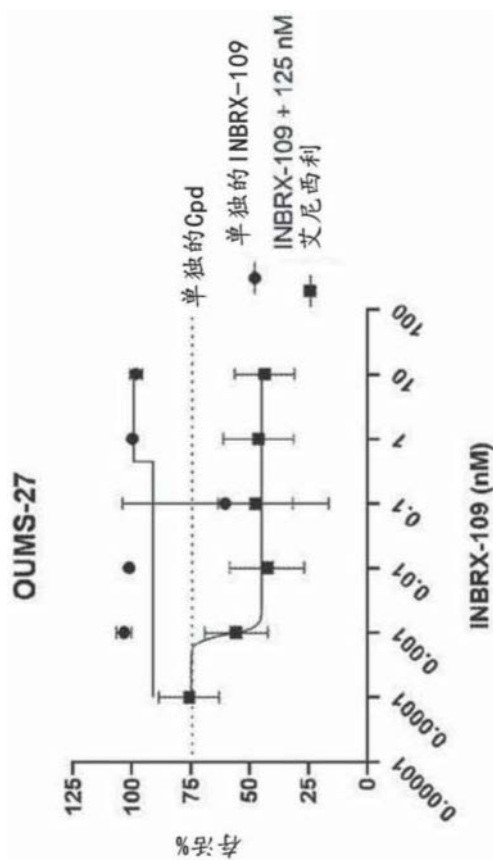


图19B

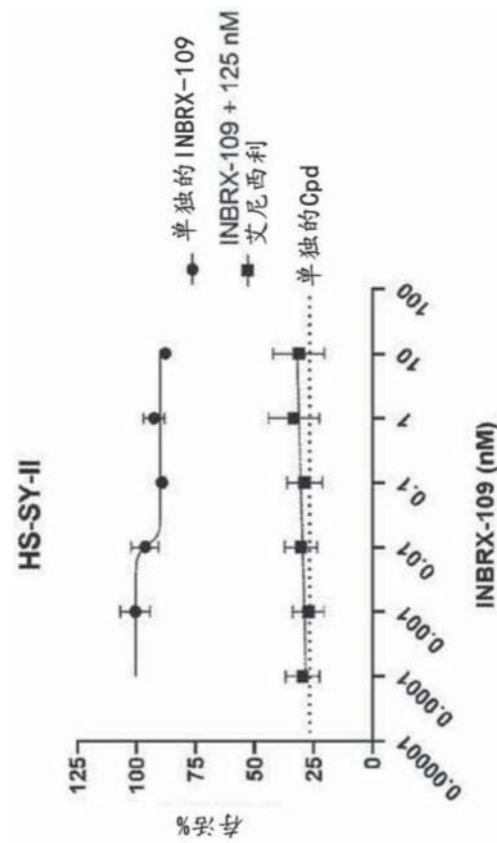


图19C

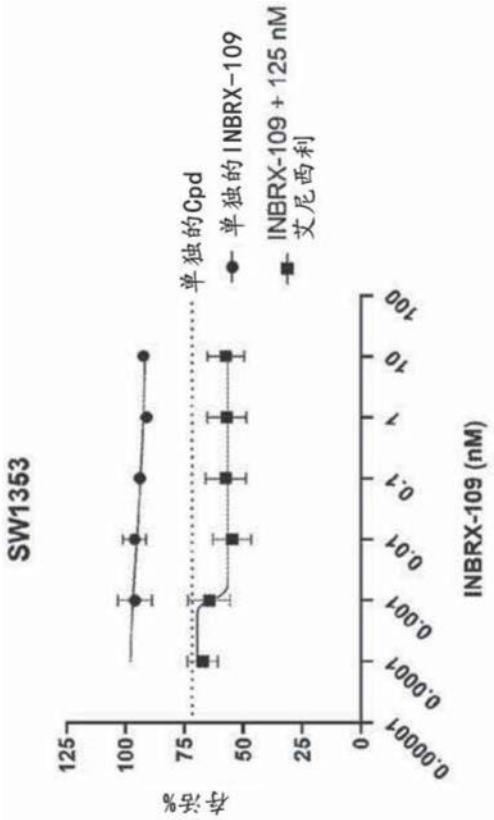


图19D

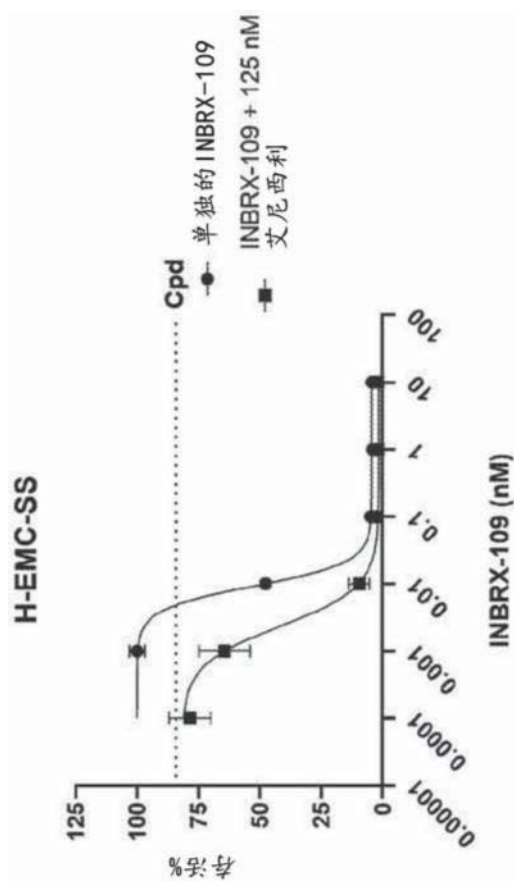


图19E

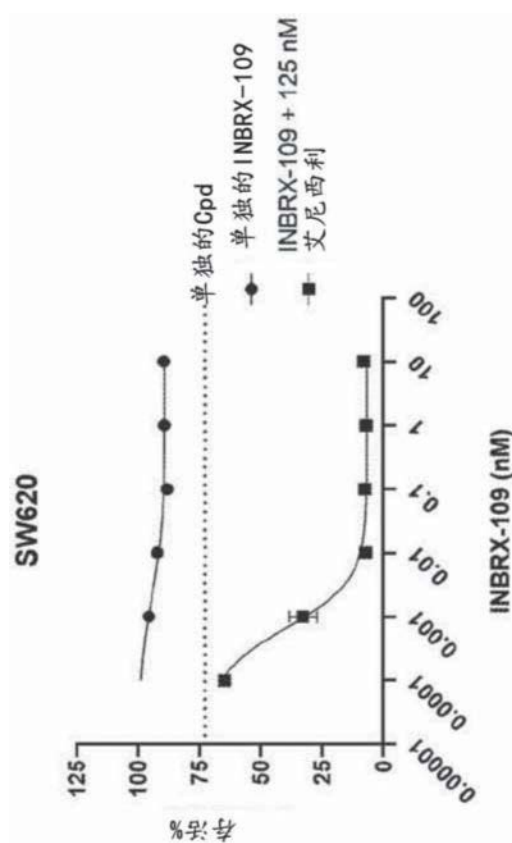


图19F

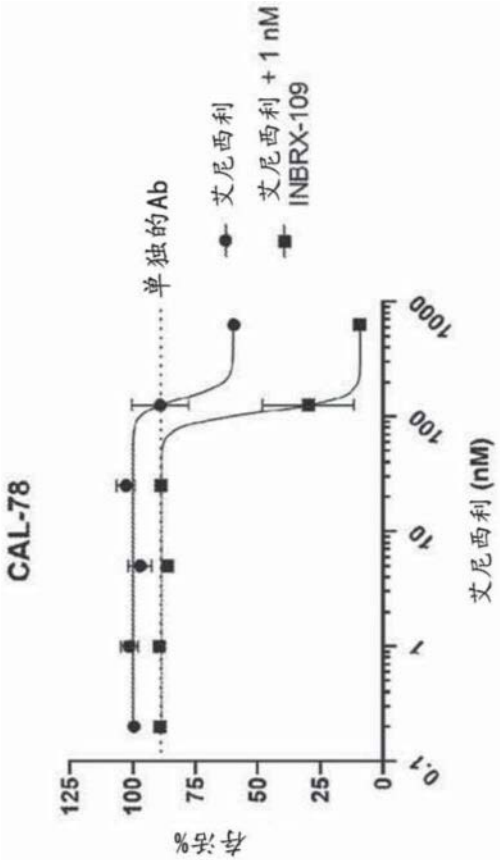


图20A

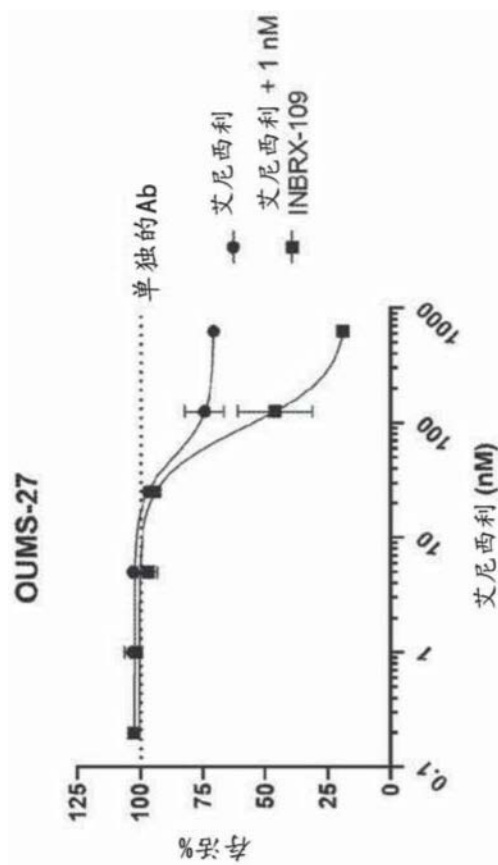


图20B

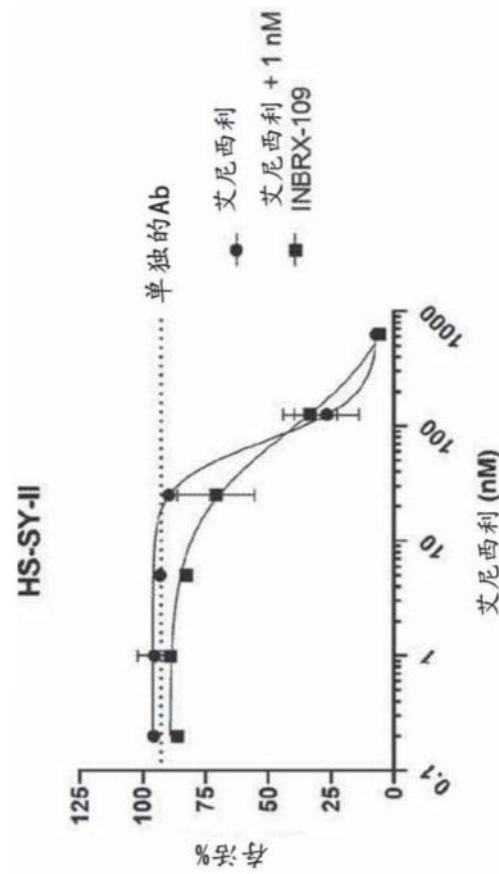


图20C

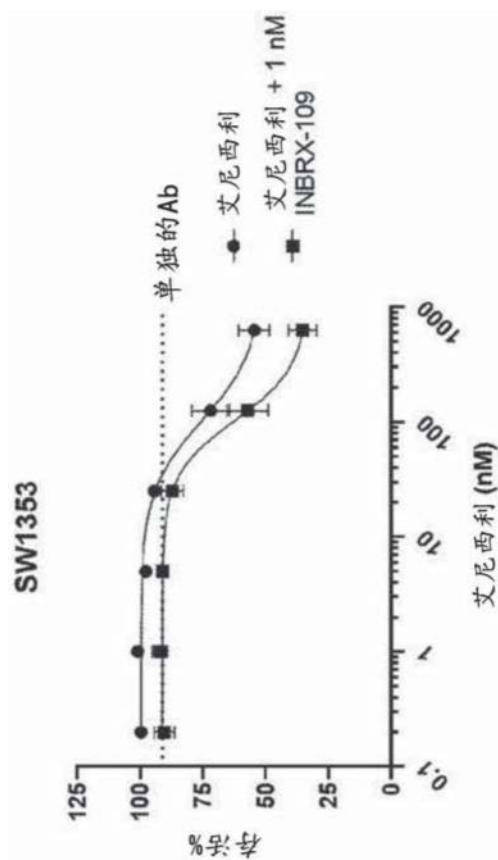


图20D

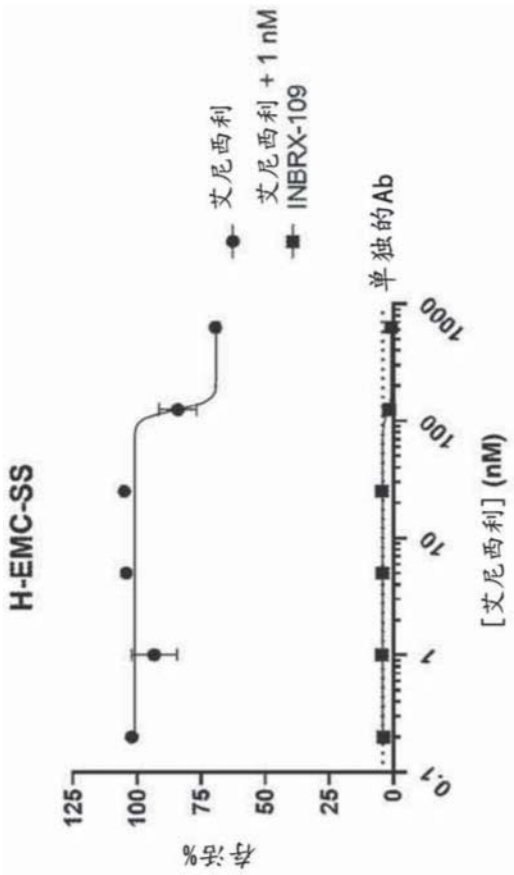


图20E

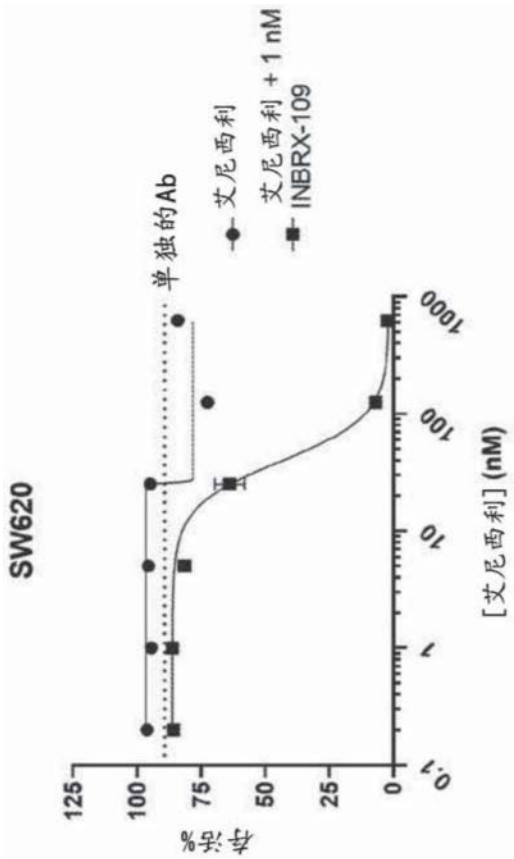


图20F

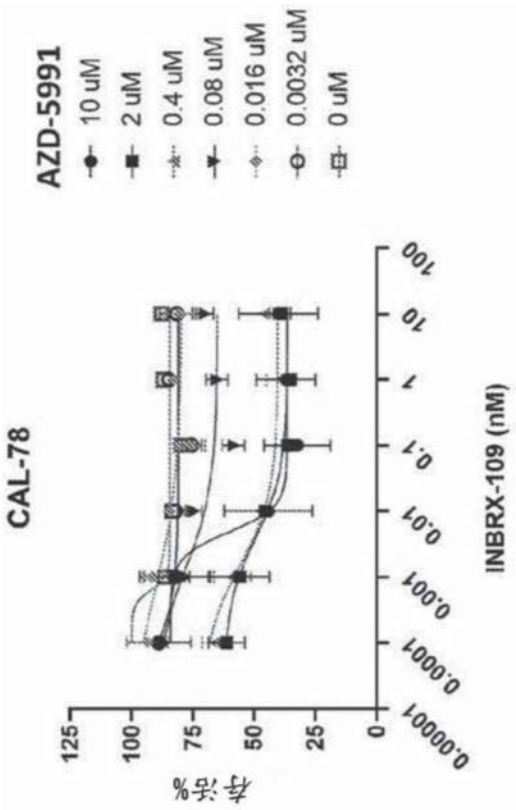


图21A

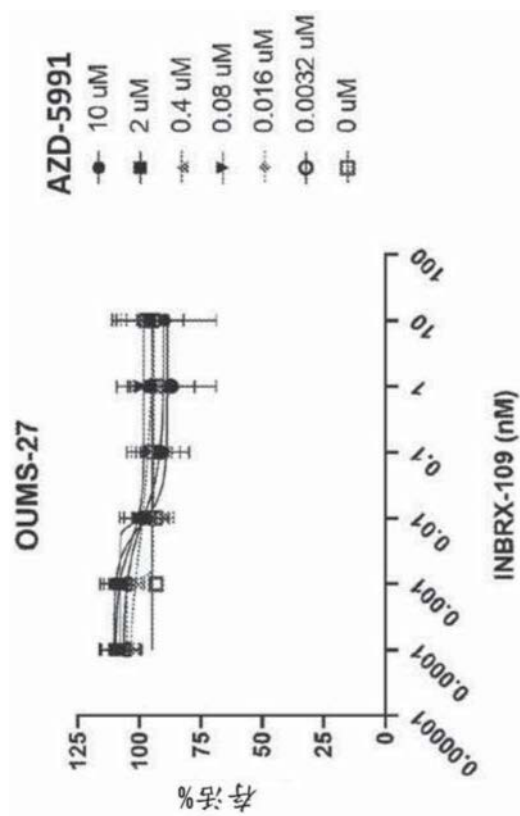


图21B

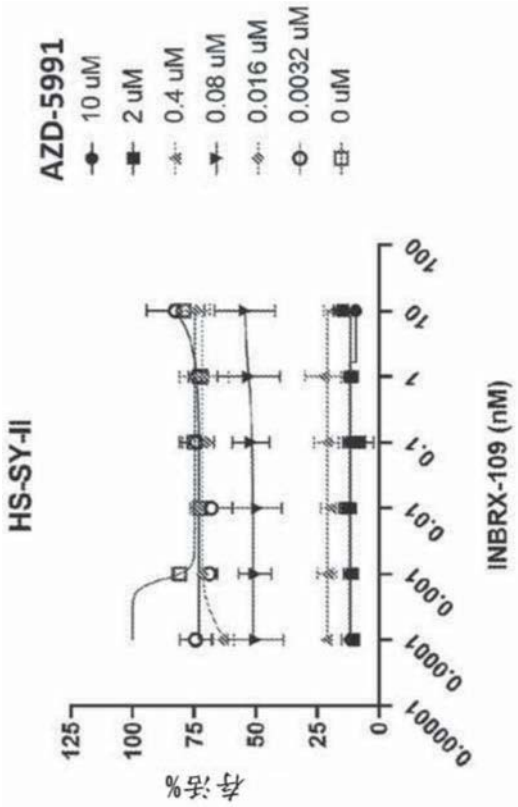


图21C

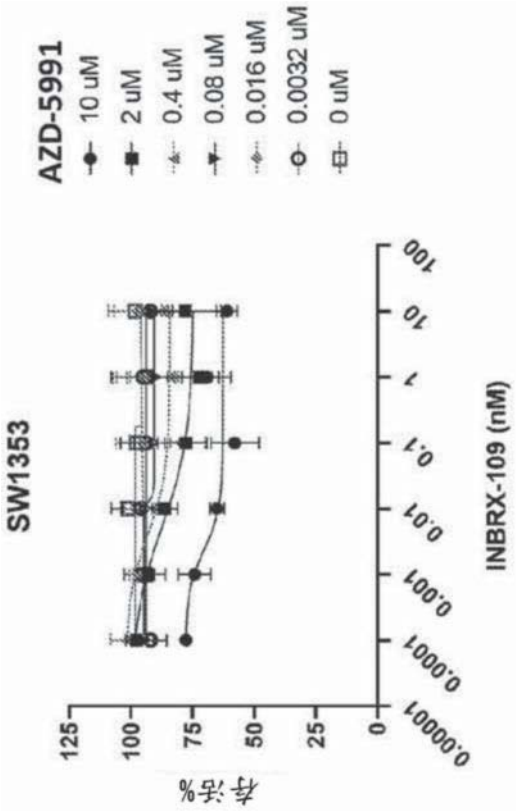


图21D

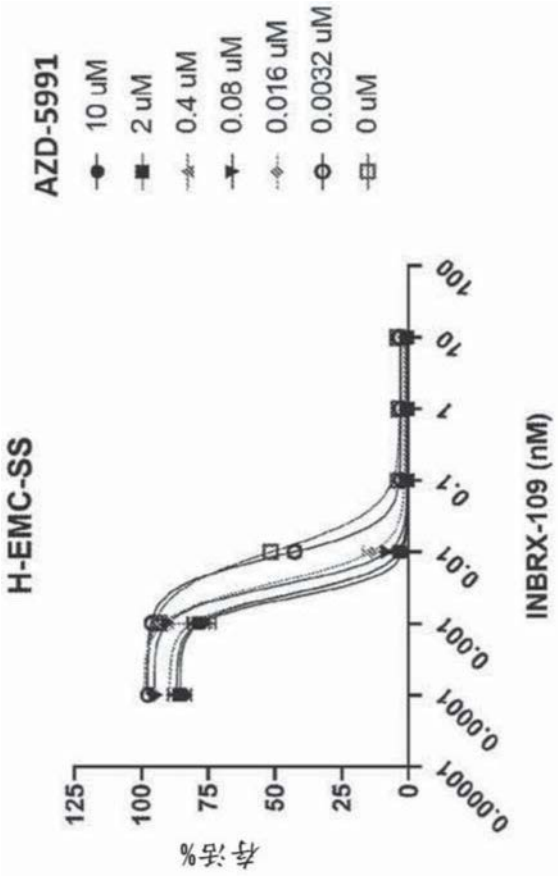


图21E

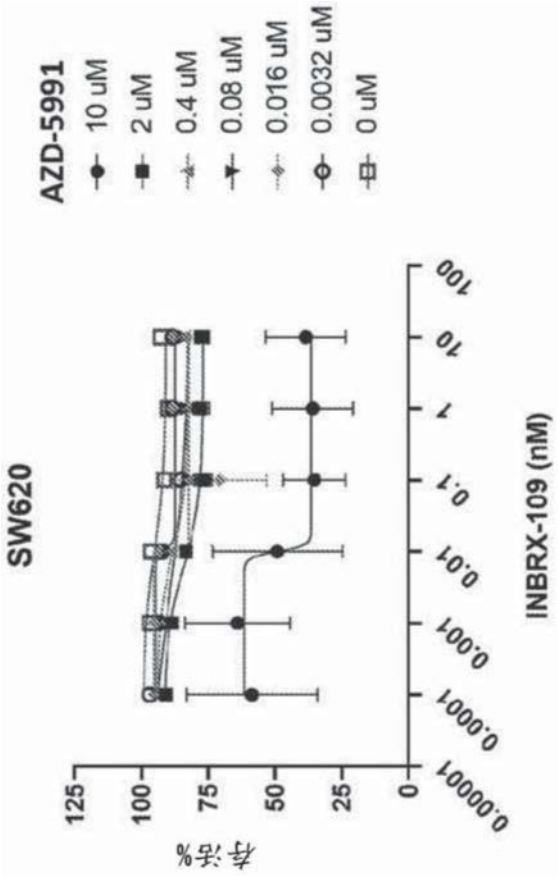


图21F

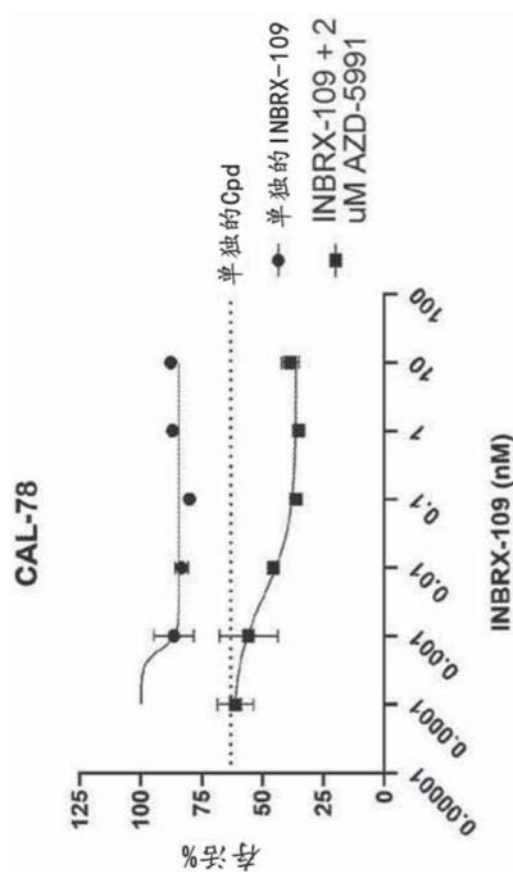


图22A

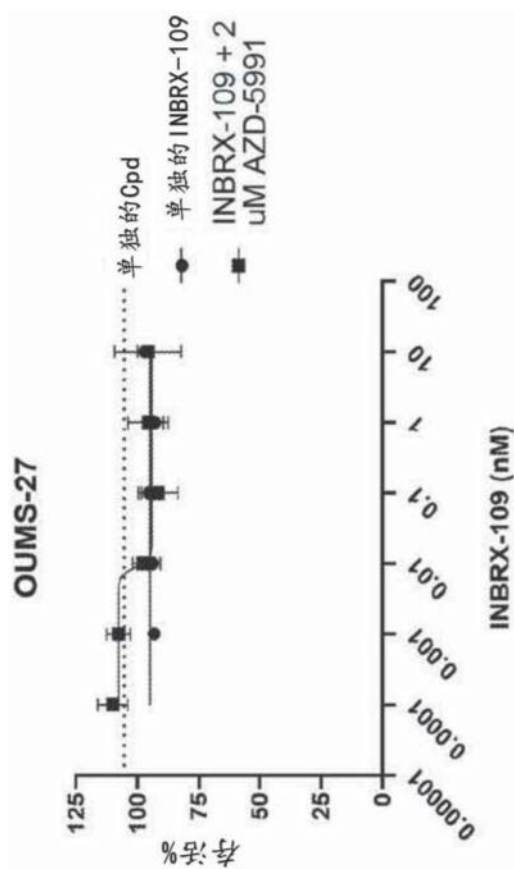


图22B

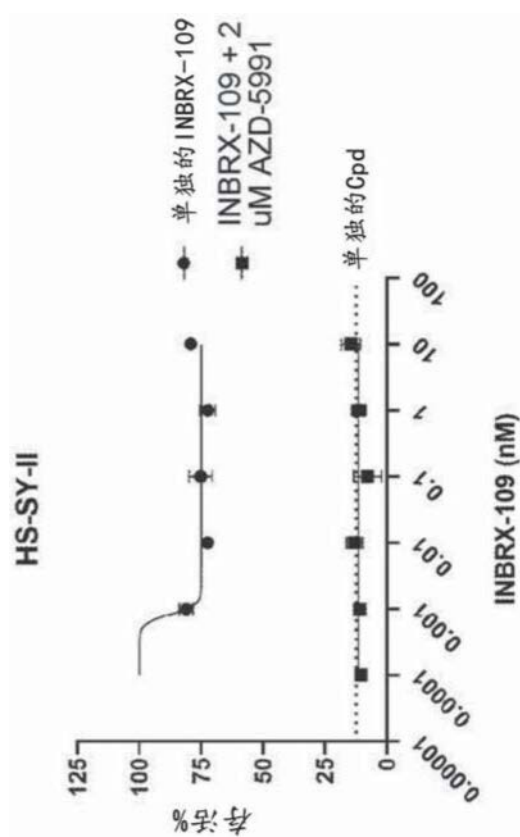


图22C

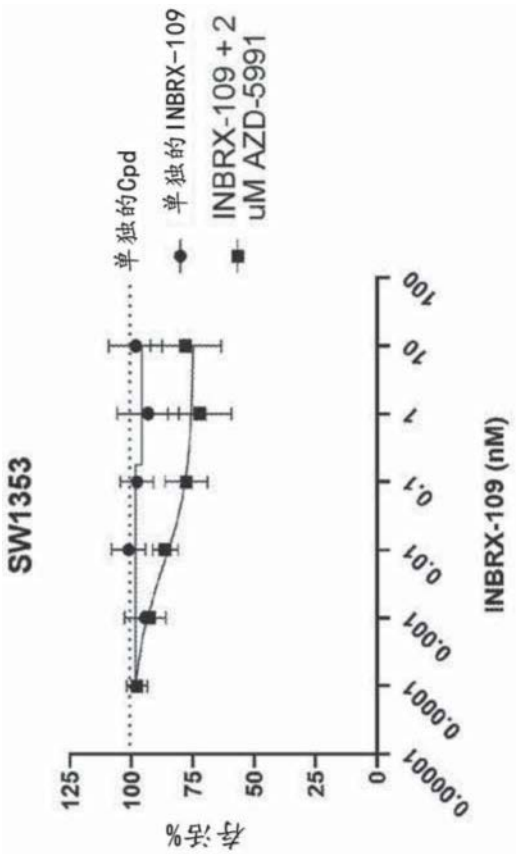


图22D

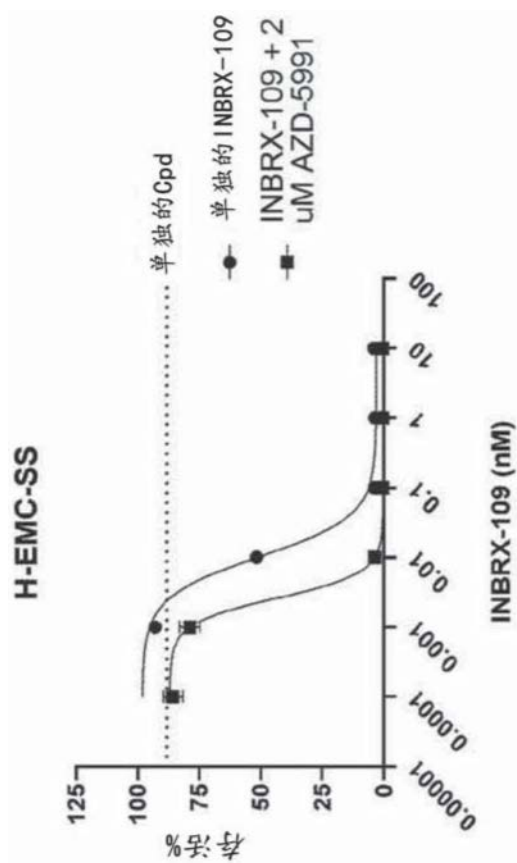


图22E

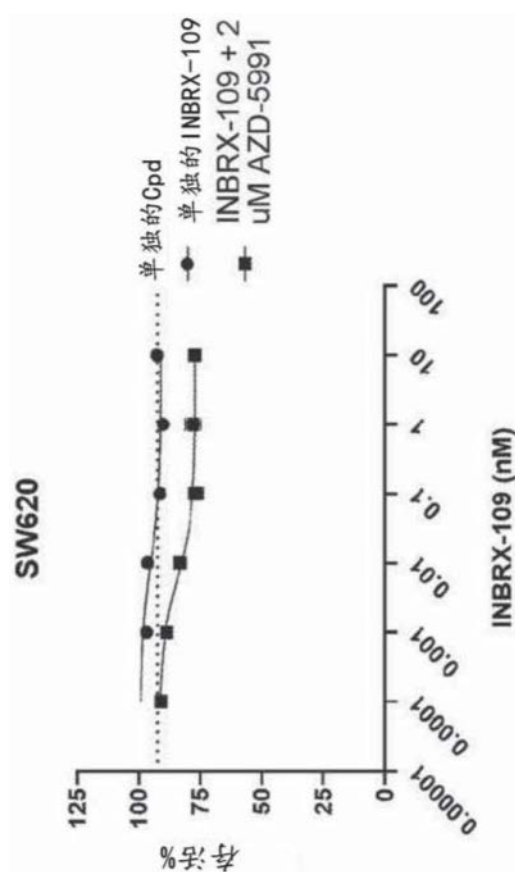


图22F

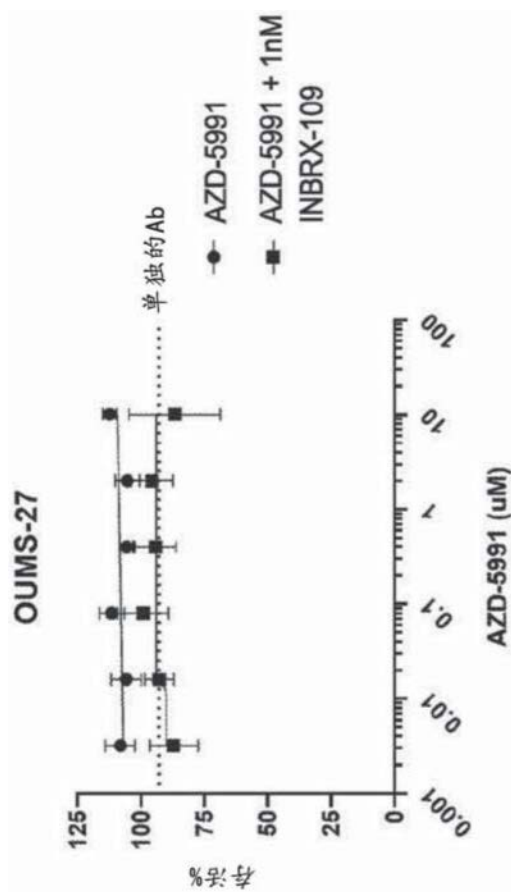


图23B

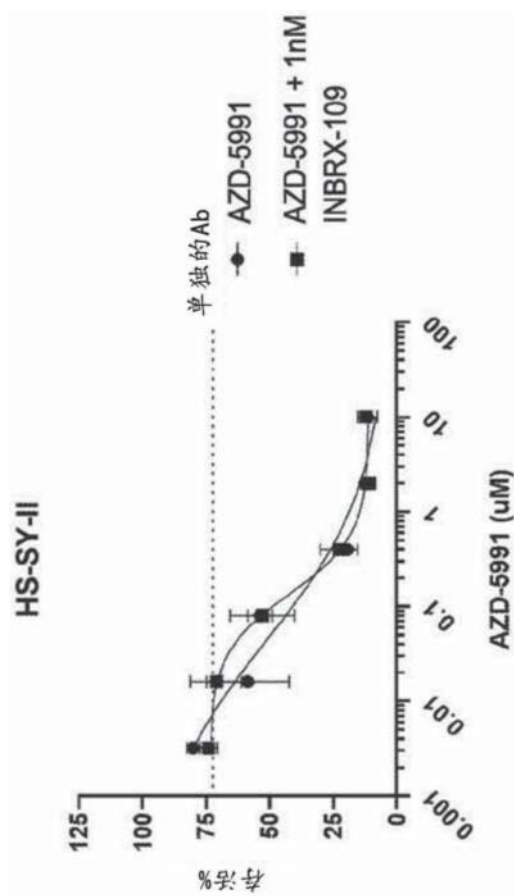


图23C

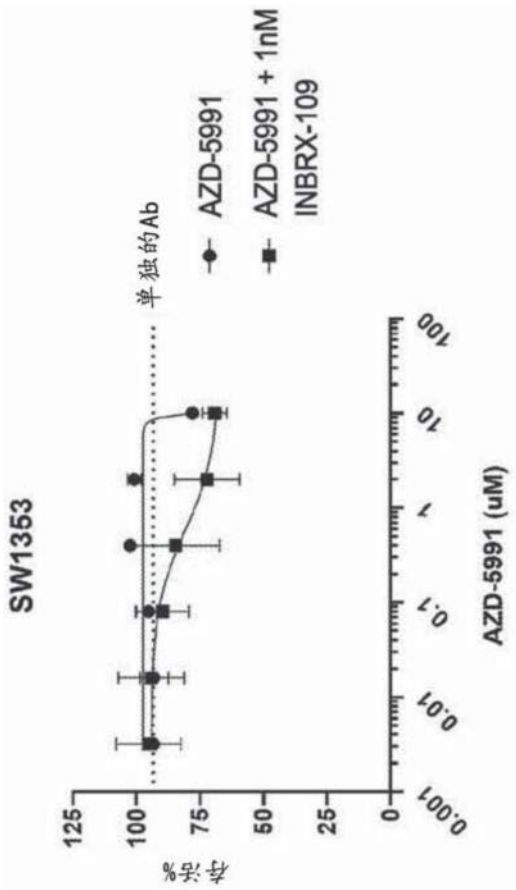


图23D

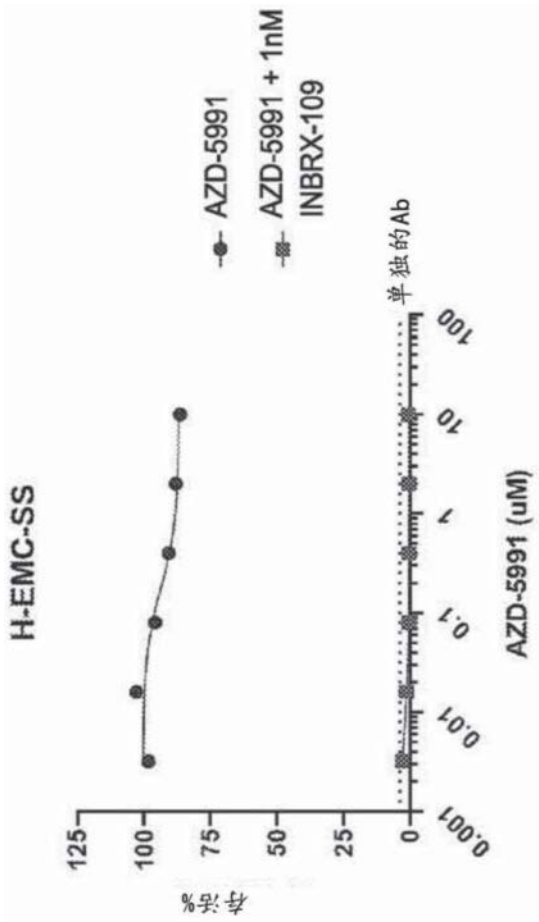


图23E

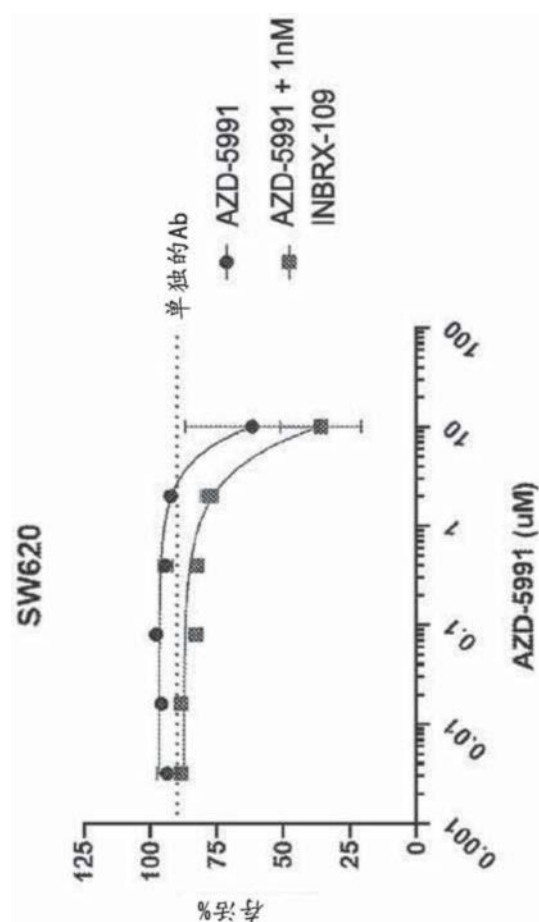


图23F