



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109996544 A

(43)申请公布日 2019.07.09

(21)申请号 201780053782.7

(74)专利代理机构 永新专利商标代理有限公司
72002

(22)申请日 2017.06.27

代理人 左路 林晓红

(30)优先权数据

62/355,171 2016.06.27 US

(51)Int.Cl.

A61K 31/517(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

A61K 31/519(2006.01)

2019.02.25

A61K 39/395(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2017/039536 2017.06.27

A61K 31/41(2006.01)

A61K 31/4162(2006.01)

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/005519 EN 2018.01.04

(71)申请人 加利福尼亚大学董事会

地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 T·J·基普斯 L·陈 B·崔

权利要求书2页 说明书69页

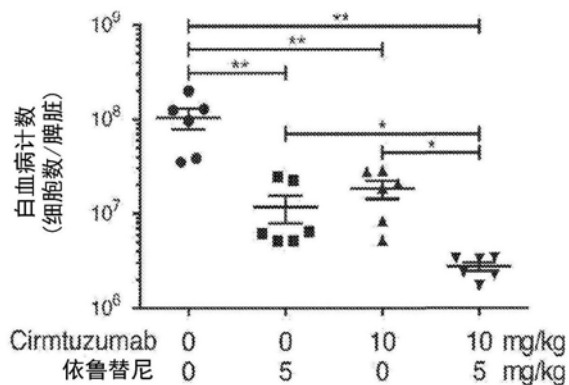
序列表7页 附图42页

(54)发明名称

癌症治疗组合

(57)摘要

尤其提供了用于治疗癌症的组合物和方法。所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的布鲁顿氏酪氨酸激酶(BTK)拮抗剂和ROR-1拮抗剂。进一步提供了药物组合物,其包括BTK拮抗剂、ROR-1拮抗剂和药学上可接受的赋形剂。在实施方案中,所述BTK拮抗剂是依鲁替尼且所述ROR-1拮抗剂是cirmtuzumab。



1. 治疗有需要的受试者中的癌症的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的布鲁顿氏酪氨酸激酶 (BTK) 拮抗剂和酪氨酸激酶样孤儿受体1 (ROR-1) 拮抗剂。

2. 权利要求1的方法,其中所述BTK拮抗剂是小分子。

3. 权利要求1的方法,其中所述BTK拮抗剂是依鲁替尼 (ibrutinib)、艾代拉里斯 (idelalisib)、福他替尼 (fostamatinib)、阿卡替尼 (acalabrutinib)、ONO/GS-4059、BGB-3111或CC-292 (AVL-292)。

4. 权利要求1的方法,其中所述BTK拮抗剂是依鲁替尼。

5. 权利要求1的方法,其中所述ROR-1拮抗剂是抗体或小分子。

6. 权利要求1的方法,其中所述ROR-1拮抗剂是抗ROR-1抗体。

7. 权利要求5的方法,其中所述抗体包含人源化重链可变区和人源化轻链可变区,其中所述人源化重链可变区包含SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3中所示的序列,且

其中所述人源化轻链可变区包含SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6中所示的序列。

8. 权利要求5的方法,其中所述抗体是cirmtuzumab。

9. 权利要求5的方法,其中所述抗体包含人源化重链可变区和人源化轻链可变区,其中所述人源化重链可变区包含SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:9中所示的序列,且

其中所述人源化轻链可变区包含SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12中所示的序列。

10. 权利要求1的方法,其中所述BTK拮抗剂和所述ROR-1拮抗剂以组合的协同量施用。

11. 权利要求1的方法,其中所述BTK拮抗剂和所述ROR-1拮抗剂同时或依次施用。

12. 权利要求1的方法,其中所述ROR-1拮抗剂在第一时间点施用且所述BTK拮抗剂在第二时间点施用,其中所述第一时间点在所述第二时间点之前。

13. 权利要求1的方法,其中所述BTK拮抗剂和所述ROR-1拮抗剂在施用前混合。

14. 权利要求1的方法,其中所述BTK拮抗剂以约1mg/kg、2mg/kg、5mg/kg、10mg/kg或15mg/kg的量施用。

15. 权利要求1的方法,其中所述BTK拮抗剂以约5mg/kg的量施用。

16. 权利要求1的方法,其中所述BTK拮抗剂以约420mg的量施用。

17. 权利要求1的方法,其中所述ROR-1拮抗剂以约1mg/kg、2mg/kg、3mg/kg、5mg/kg或10mg/kg的量施用。

18. 权利要求1的方法,其中所述ROR-1拮抗剂以约2mg/kg的量施用。

19. 权利要求1的方法,其中所述BTK拮抗剂以约5mg/kg的量施用且所述ROR-1拮抗剂以约2mg/kg的量施用。

20. 权利要求1的方法,其中所述BTK拮抗剂以约5mg/kg的量施用且所述ROR-1拮抗剂以约1mg/kg的量施用。

21. 权利要求1的方法,其中所述BTK拮抗剂在至少14天的疗程每天施用。

22. 权利要求1的方法,其中所述BTK拮抗剂在约28天的疗程每天施用。

23. 权利要求1的方法,其中所述ROR-1拮抗剂在约28天的疗程施用一次。

24. 权利要求1的方法,其中所述BTK拮抗剂静脉内施用。

25. 权利要求1的方法,其中所述ROR-1拮抗剂静脉内施用。

26. 权利要求1的方法,其中所述受试者是哺乳动物。

27. 权利要求1的方法,其中所述受试者是人。

28. 权利要求1的方法,其中所述癌症是淋巴瘤、白血病、骨髓瘤、AML、B-ALL、T-ALL、肾细胞癌、结肠癌、结肠直肠癌、乳腺癌、表皮鳞状细胞癌、黑色素瘤、胃癌、脑癌、肺癌、胰腺癌、子宫颈癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、前列腺癌、睾丸癌、甲状腺癌、头颈癌、子宫癌、腺癌或肾上腺癌。

29. 权利要求1的方法,其中所述癌症是慢性淋巴细胞性白血病 (CLL)、小淋巴细胞性淋巴瘤、边缘细胞B-细胞淋巴瘤、伯基特氏淋巴瘤或B细胞白血病。

30. 药物组合物,其包含BTK拮抗剂、ROR-1拮抗剂和药学上可接受的赋形剂。

31. 药物组合物,其包含BTK拮抗剂、抗ROR-1抗体和药学上可接受的赋形剂,其中所述BTK拮抗剂和所述抗ROR-1抗体以组合的协同量存在,其中所述组合的协同量有效地治疗有需要的受试者中的癌症。

32. 权利要求30的药物组合物,其中所述BTK拮抗剂是小分子。

33. 权利要求30的药物组合物,其中所述BTK拮抗剂是依鲁替尼 (ibrutinib)、艾代拉里斯 (idelalisib)、福他替尼 (fostamatinib)、阿卡替尼 (acalabrutinib)、ONO/GS-4059、BGB-3111或CC-292 (AVL-292)。

34. 权利要求30的药物组合物,其中所述BTK拮抗剂是依鲁替尼。

35. 权利要求30的药物组合物,其中所述ROR-1拮抗剂是抗体或小分子。

36. 权利要求30的药物组合物,其中所述ROR-1拮抗剂是抗ROR-1抗体。

37. 权利要求35的药物组合物,其中所述抗体包含人源化重链可变区和人源化轻链可变区,

其中所述人源化重链可变区包含SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3中所示的序列,且

其中所述人源化轻链可变区包含SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6中所示的序列。

38. 权利要求35的药物组合物,其中所述抗体是cirmtuzumab。

39. 权利要求35的药物组合物,其中所述抗体包含人源化重链可变区和人源化轻链可变区,

其中所述人源化重链可变区包含SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:9中所示的序列,且

其中所述人源化轻链可变区包含SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12中所示的序列。

癌症治疗组合

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2016年6月27日提交的美国临时申请号62/355,171的优先权,所述临时申请在此以其整体通过引用并入并用于所有目的。

[0003] 对作为ASCII文件递交的“序列表”、表或计算机程序列表附录的引用

[0004] 写在2017年6月19日创建的文件48537-582001W0 SL_ST25.TXT(10,919字节,机器格式IBM-PC,MS-Windows操作系统)中的序列表在此通过引入并入。

[0005] 关于对在联邦政府资助的研究和开发下进行的发明的权利的声明

[0006] 本发明是在美国国立卫生研究院授予的拨款号CA081534下的政府支持进行的。政府在本发明中具有某些权利。

背景技术

[0007] 经由BCR(B细胞受体)信号传导的信号传导被认为在疾病(例如,慢性淋巴细胞性白血病(CLL))的发病机理和/或进展中起作用。此外,靶向淋巴和白血病恶性肿瘤中的B-细胞受体(BCR)信号传导的药剂包括依鲁替尼和阿卡替尼(4-{8-氨基-3-[(2S)-1-(2-丁炔酰基)-2-吡咯烷基]咪唑并[1,5-a]吡嗪-1-基}-N-(2-吡啶基)苯甲酰胺(其抑制布鲁顿氏酪氨酸激酶(BTK))已显示显著的临床活性。通过破坏B-细胞信号传导途径,BTK治疗已与急剧的淋巴结反应相关,但是根除疾病和高风险疾病的复发仍然是挑战。

[0008] 这里提供了对本领域中的这些和其他问题的解决方案。

发明内容

[0009] 本文提供的组合物和方法尤其可用于治疗白血病。例如,本文提供了使用抗ROR-1抗体与BCR抑制剂的组合来治疗慢性淋巴细胞性白血病(CLL)的令人惊讶的有效方法。

[0010] 在一个方面提供了治疗有需要的受试者中的癌症的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的布鲁顿氏酪氨酸激酶(BTK)拮抗剂和酪氨酸激酶样孤儿受体1(ROR-1)拮抗剂。

[0011] 在一个方面提供了药物组合物,其包括BTK拮抗剂、ROR-1拮抗剂和药学上可接受的赋形剂。

[0012] 在一个方面提供了药物组合物,其包含BTK拮抗剂、抗ROR-1抗体和药学上可接受的赋形剂,其中所述BTK拮抗剂和所述抗ROR-1抗体以组合的协同量存在,其中所述组合的协同量有效地治疗有需要的受试者中的癌症。

[0013] 在一个方面,提供了治疗有需要的受试者中的癌症的方法。所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的布鲁顿氏酪氨酸激酶(BTK)拮抗剂和抗ROR-1抗体。

[0014] 在另一个方面,提供了药物组合物,其包括布鲁顿氏酪氨酸激酶(BTK)拮抗剂、抗ROR-1抗体和药学上可接受的赋形剂。

附图说明

[0015] 图1A-1D. UC-961抑制依鲁替尼处理的CLL细胞中的Wnt5a诱导的Rac1活化。(图1A)在与或不与Wnt5a孵育并用UC-961或依鲁替尼处理的CLL细胞中测量活化的Rac1,如每个泳道的顶部所示。(图1B)未经处理或用UC-961 (10 μ g/ml)和/或依鲁替尼 (0.5 μ M)处理的CLL细胞中的Wnt5a诱导的Rac1的活化。显示在五次独立实验中观察到的平均Rac1活化 (n=5)。(图1C)从依鲁替尼治疗的患者 (n=5)收集CLL细胞。在体外用或不用每个泳道上方所示的Wnt5a或UC-961处理的这些CLL细胞中测量活化的Rac1。(图1D)在用Wnt5a和/或UC-961处理的从用依鲁替尼治疗的患者收集的CLL细胞中测量Rac1活化。显示在五次独立实验中观察到的平均Rac1活化 (n=5)。每个泳道下面的数字是针对未处理的样品归一化的活化的GTP酶相比于总GTP酶的条带IOD的比率。数据显示为每组的平均值 \pm SEM。**P<0.01;***P<0.001;****P<0.0001,如使用单因素ANOVA与Tukey氏多重比较检验所计算。

[0016] 图2A-2B. UC-961抑制依鲁替尼处理的CLL细胞中的Wnt5a增强的增殖。(图2A)在有或没有Wnt5a的情况下并用UC-961或依鲁替尼处理的CFSE标记的CLL细胞 (n=6)的CD154诱导的增殖。用分裂中的细胞的百分比显示一个代表性CLL样品。(图2B)柱表明对于底部所示的每种培养条件来自6个不同患者各自的CFSE荧光减少的CLL细胞的平均比例。数据显示为平均值 \pm SEM,*P<0.05;**P<0.01,如通过单因素ANOVA与Tukey氏多重比较检验所测定。

[0017] 图3. 在CLL患者来源的异种移植小鼠中UC-961和依鲁替尼的累加抑制效应。如所示,在处理前1天将CLL细胞注射至Rag2^{-/-} γ c^{-/-}小鼠的腹膜腔中。腹膜灌洗液在细胞注射后7天收集,并在用对CD5、CD19和CD45特异性的mAb染色后通过细胞计数和流式细胞术分析进行残留CLL测定。图中的每个柱代表在处理后从小鼠收获的残留CLL细胞的百分比,其相对于从未处理的小鼠收获的细胞归一化。显示的数据是来自3个不同患者的平均值 \pm SEM,每组5只小鼠。P-值通过单因素ANOVA与Tukey氏多重比较检验测定。

[0018] 图4A-4D. UC-961抑制依鲁替尼处理的ROR-1 \times TCL1白血病细胞中的Wnt5a增强的增殖。(图4A)在与或不与Wnt5a孵育并用UC-961 (10 μ g/ml)和/或依鲁替尼 (0.5 μ M)处理的ROR-1 \times TCL1细胞中测量活化的Rac1,如每个泳道的顶部所示。每个泳道下面的数字是针对未处理的样品归一化的活化的GTP酶相比于总GTP酶的条带IOD的比率。(图4B)未经处理或用UC-961 (10 μ g/ml)和/或依鲁替尼 (0.5 μ M)处理的ROR-1 \times TCL1白血病细胞中的Wnt5a诱导的Rac1的活化。显示在五次独立实验中观察到的平均Rac1活化 (n=5)。(图4C)在有或没有Wnt5a的情况下并用UC-961或依鲁替尼处理的CFSE标记的ROR-1 \times TCL1白血病细胞 (n=6)的CD154诱导的增殖。用分裂中的细胞的百分比显示一个代表性ROR-1 \times TCL1白血病样品。(图4D)柱表明对于底部所示的每种培养条件来自5只不同小鼠各自的CFSE荧光减少的ROR-1 \times TCL1白血病细胞的平均比例。数据显示为平均值 \pm SEM;**P<0.01;***P<0.001;****P<0.0001,如使用单因素ANOVA与Tukey氏多重比较检验所计算。

[0019] 图5A-5C. 在ROR-1 \times TCL1白血病异种移植小鼠中UC-961和依鲁替尼的累加抑制效应。(图5A)显示Rag2^{-/-} γ c^{-/-}小鼠的代表性脾脏,其在接受 2×10^4 个ROR-1 \times TCL1白血病细胞的静脉内输注后25天收集。(图5B)UC-961和依鲁替尼的组合抑制Rag2^{-/-} γ c^{-/-}小鼠中ROR-1 \times TCL1白血病细胞的移植。Rag2^{-/-} γ c^{-/-}小鼠用 2×10^4 个ROR-1 \times TCL1白血病细胞移植,且然后在第1天给予1mg/kg UC-961的单次i.v注射或每日剂量的5-mg/kg依鲁替尼。描绘如通过光散射特征所确定的在用对B220(横坐标)和人ROR-1(纵坐标)特异性的荧光染料缀合的

mAb染色细胞后在过继性转移后第25天从代表性小鼠 ($n=5$) 收获的脾淋巴细胞荧光的等高线图,所述代表性小鼠接受顶部所示的治疗。每个等高线图的右上角的百分比表明具有白血细胞细胞的 $CD5^+B220^{low}ROR-1^+$ 表型的血液单核细胞的比例。(图5C)过继性转移 2×10^4 个 $ROR-1 \times TCL1$ 白血细胞后25天在接受 1-mg/kg UC-961 的单次注射或 5mg/kg 依鲁替尼的每日注射的受体 $Rag2^{-/-} \gamma c^{-/-}$ 小鼠的脾脏中 $ROR-1 \times TCL1$ 白血细胞的总数,如通过流式细胞术分析和细胞计数所测定。每个形状代表在个别小鼠中发现的白血细胞的数目。数据显示为每组动物 ($n=5$) 的平均值 \pm SEM;*** $P < 0.001$,如使用单因素ANOVA与Tukey氏多重比较检验所计算。

[0020] 图6A-6D. 依鲁替尼抑制BCR信号传导,但不抑制Wnt5a/ROR-1信号传导。(图6A)在与或不与Wnt5a或依鲁替尼以 $0, 0.25, 0.5$ 或 $1.0 \mu\text{M}$ 的浓度孵育的CLL细胞中测量活化的Rac1,如每个泳道的顶部所示。(图6B) CLL细胞用递增剂量的依鲁替尼处理1小时,且然后测定BTK活性位点的占据。(图6C)在用或不用不同剂量的依鲁替尼处理后,在CLL细胞中抗 μ -诱导的钙动员。将细胞内钙的相对平均荧光强度作为时间的函数作图。标记为“IgM”的箭头表明将抗 μ 添加至细胞的时间。(图6D)通过用DiOC6和PI染色测定细胞活力。呈现来自代表性患者的CLL细胞的点图,其分别定义水平轴和垂直轴上的白血细胞的相对绿色(DiOC6)和红色(PI)荧光强度。在用不同剂量的依鲁替尼处理后测定CLL细胞的活细胞群($DiOC6^+PI^-$)。每个点图中显示活细胞的百分比。

[0021] 图7A-7E. Wnt5a在用依鲁替尼处理的CLL细胞中诱导Rac1活化。(图7A)在没有CD154的情况下由Wnt5a诱导的CLL增殖的CFSE测定。在没有(左小图)或有(右小图)外源Wnt5a的情况下,在IL-4/10存在的情况下,与野生型HeLa细胞共培养5天的CFSE标记的CLL细胞 ($n=6$) 的荧光。显示对一个代表性CLL样品的测定结果,其中每个小图的左下方指示分裂中的细胞的百分比。(图7B)在没有CD154的情况下由Wnt5a诱导的 $ROR-1 \times TCL1$ 白血细胞增殖的CFSE测定。在没有(左小图)或有(右小图)外源Wnt5a的情况下,在IL-4/10存在的情况下,与HeLa细胞共培养5天的CFSE标记的CLL细胞 ($n=6$) 的荧光。显示对一个代表性CLL样品的测定结果,其中每个小图的左下方指示分裂中的细胞的百分比。(图7C)在用Wnt5a处理30分钟的血清饥饿的 $TCL1$ 白血细胞中测量Rac1活化。将全细胞裂解物在平行凝胶上运行以检查总Rac1。每个泳道下面的数字是相对于未处理的样品归一化的活化的GTP酶相比于总GTP酶的条带IOD的比率。(图7D)由Wnt5a和/或CD154诱导的 $TCL1$ 白血细胞增殖的CFSE测定。在没有或有外源Wnt5a的情况下,在IL-4/10存在的情况下,与野生型HeLa或HeLa $CD154$ 细胞共培养5天的CFSE标记的 $TCL1$ 白血细胞 ($n=3$) 的荧光。显示对一个代表性 $TCL1$ 白血细胞样品的测定结果,其中每个小图的左下方指示分裂中的细胞的百分比。(图7E)在底部指示的条件下来自 $TCL1$ 白血细胞 ($n=3$) 的分裂中CLL细胞的平均比例。数据显示为每组的平均值 \pm SEM;p-值使用单因素ANOVA与Tukey氏多重比较检验测定;ns:不显著。

[0022] 图8A-8B. 在 $ROR-1 \times TCL1$ 白血细胞异种移植小鼠中UC-961或依鲁替尼的剂量依赖性抑制效应。(图8A)在 $ROR-1 \times TCL1$ 白血细胞异种移植小鼠中依鲁替尼的剂量依赖性抑制效应。(图8B)在 $ROR-1 \times TCL1$ 白血细胞异种移植小鼠中UC-961的剂量依赖性抑制效应。每个形状代表在个别小鼠中发现的白血细胞的数目。数据显示为每组动物 ($n=6$) 的平均值 \pm SEM;* $P < 0.05$;*** $P < 0.001$,如使用单因素ANOVA与Tukey氏多重比较检验所计算。

[0023] 图9. $ROR-1$ 由BCR信号传导抑制剂诱导。

[0024] 图10.抗ROR-1抗体与依鲁替尼的组合对生态位依赖性动物模型中清除CLL细胞的累加效应。

[0025] 图11.抗ROR-1抗体与依鲁替尼的组合对ROR-1xTCL1小鼠白血病的累加效应。

[0026] 图12A-12F. Cirtuzumab抑制依鲁替尼处理的CLL细胞中的Wnt5a诱导的Rac1活化。(图12A) 在新鲜分离的依鲁替尼处理的CLL细胞或在没有或有外源Wnt5a (200ng/ml) 的无血清培养基中培养的分离的依鲁替尼处理的CLL细胞中测量活化的Rac1, 如每个泳道的顶部所示。(图12B) 在新鲜分离的依鲁替尼处理的CLL细胞或在有或没有Wnt5a (200ng/ml) 的无血清培养基中培养的分离的依鲁替尼处理的CLL细胞中测量活化的Rac1。显示在四次独立实验中观察到的平均Rac1活化 ($n=4$)。(图12C) 从依鲁替尼治疗的患者 ($n=4$) 收集CLL细胞。在用或不用Wnt5a (200ng/ml) 或cirtuzumab (10 μ g/ml) 处理的CLL细胞中测量活化的Rac1, 如免疫印迹的每个泳道上方所示(图12D) 在用Wnt5a (200ng/ml) 和/或cirtuzumab (10 μ g/ml) 处理的从经历用依鲁替尼的疗法的患者收集的CLL细胞中测量Rac1活化。显示在五次独立实验中观察到的平均Rac1活化 ($n=5$)。(图12E) 在与或不与Wnt5a孵育并用cirtuzumab (10 μ g/ml) 或依鲁替尼 (0.5 μ M) 处理的CLL细胞中测量活化的Rac1, 如每个泳道的顶部所示。(图12F) 未经处理或用cirtuzumab和/或依鲁替尼处理的CLL细胞中的Wnt5a诱导的Rac1的活化。显示在五次独立实验中观察到的平均Rac1活化 ($n=5$)。每个泳道下面的数字是针对未处理的样品归一化的活化的GTP酶相比于总GTP酶的条带IOD的比率。数据显示为每组的平均值 \pm SEM。* $P<0.01$; ** $P<0.001$; *** $P<0.0001$, 如使用单因素ANOVA与Tukey氏多重比较检验所计算。

[0027] 图13A-13D. Cirtuzumab抑制依鲁替尼处理的CLL细胞中的Wnt5a增强的增殖。(图13A) 在有或没有Wnt5a的情况下并用cirtuzumab (10 μ g/ml) 或依鲁替尼 (0.5 μ M) 处理的CFSE标记的CLL细胞 ($n=6$) 的CD154诱导的增殖。用分裂中的细胞的百分比显示一个代表性CLL样品。(图13B) 柱表明对于底部所示的每种培养条件来自6个不同患者各自的CFSE荧光减少的CLL细胞的平均比例。(图13C) 将CLL细胞在IL-4/10或Wnt5a存在的情况下在HeLa_{CD154}上共培养, 且然后用cirtuzumab (10 μ g/ml) 或依鲁替尼 (0.5 μ M) 处理4天, 在PI染色后进行细胞周期分析。显示一个代表性CLL样品。(图13D) 呈现测试的所有4个患者的S/G2/M期中的细胞的平均分数。数据显示为平均值 \pm SEM, * $P<0.05$; ** $P<0.01$, 如通过单因素ANOVA与Tukey氏多重比较检验所测定。

[0028] 图14A-14B. 用cirtuzumab和/或依鲁替尼治疗对CLL患者来源的异种移植物的影响。(图14A) 在处理前1天将CLL细胞注射至Rag2^{-/-} γ c^{-/-}小鼠的腹膜腔中。腹膜灌洗液在细胞注射后7天收集, 并在用对CD5、CD19和CD45特异性的mAb染色后通过细胞计数和流式细胞术分析进行残留CLL测定。每个等高线图的右上方显示的百分比表明治疗后从小鼠收获的细胞中CLL细胞的比例。(图14B) 图中的每个柱代表治疗后从小鼠收获的细胞中CLL细胞的百分比, 其相对于从未经处理的小鼠收获的细胞中CLL细胞的百分比 (其为100%) 归一化。显示的数据是来自3个不同患者的平均值 \pm SEM, 每组5只小鼠; *** $P<0.001$; **** $P<0.0001$, 如使用单因素ANOVA与Tukey氏多重比较检验所计算。

[0029] 图15A-15C. Cirtuzumab抑制依鲁替尼处理的ROR-1 \times TCL1白血病细胞中的Wnt5a增强的增殖。(图15A) 在与或不与Wnt5a (200ng/ml) 孵育并用cirtuzumab (10 μ g/ml) 和/或依鲁替尼 (0.5 μ M) 处理的ROR-1 \times TCL1细胞中测量活化的Rac1, 如每个泳道的顶部所示。每

个泳道下面的数字是针对未处理的样品归一化的活化的GTP酶相比于总GTP酶的条带密度的比率。(图15B)在有或没有cirtuzumab(10 μ g/ml)和/或依鲁替尼(0.5 μ M)的情况下用Wnt5a处理的ROR-1 \times TCL1白血病细胞中Rac1的活化。显示在五次独立实验中观察到的平均Rac1活化(n=5)。(图15C)在有或没有用Wnt5a(200ng/ml)和/或cirtuzumab(10 μ g/ml)或依鲁替尼(0.5 μ M)处理的CFSE标记的ROR-1 \times TCL1白血病细胞(n=5)的CD154诱导的增殖。柱表明对于底部所示的每种培养条件来自5只不同小鼠各自的具有减少的CFSE荧光的ROR-1 \times TCL1白血病细胞的平均比例。数据显示为平均值 \pm SEM;*P<0.05;**P<0.01;***P<0.0001,如使用单因素ANOVA与Tukey氏多重比较检验所计算。

[0030] 图16A-16C.用cirtuzumab和依鲁替尼治疗在移植组织相容性ROR-1⁺白血病的免疫缺陷小鼠中的累加抑制作用。(图16A)显示Rag2^{-/-} γ c^{-/-}小鼠的代表性脾脏,其在接受2 \times 10⁴个ROR-1 \times TCL1白血病细胞的静脉内输注后25天收集。(图16B) cirtuzumab和依鲁替尼的组合抑制Rag2^{-/-} γ c^{-/-}小鼠中ROR-1 \times TCL1白血病细胞的移植。Rag2^{-/-} γ c^{-/-}小鼠用2 \times 10⁴个ROR-1 \times TCL1白血病细胞移植,且然后在第1天给予1mg/kg cirtuzumab的单次静脉内注射或经由经口管饲法给予每日剂量的5mg/kg依鲁替尼。描绘在用对B220(横坐标)和人ROR-1(纵坐标)特异性的荧光染料缀合的mAb染色细胞后在过继性转移后第25天从代表性小鼠(n=5)收获的淋巴细胞荧光的等高线图,所述代表性小鼠接受顶部所示的治疗。每个等高线图的右上角的百分比表明具有白血病细胞的CD5⁺B220^{low}ROR-1⁺表型的血液单核细胞的比例。(图16C)过继性转移2 \times 10⁴个ROR-1 \times TCL1白血病细胞后25天在接受1mg/kg cirtuzumab的单次注射或5mg/kg依鲁替尼的每日注射的受体Rag2^{-/-} γ c^{-/-}小鼠的脾脏中ROR-1 \times TCL1白血病细胞的总数。每个符号代表在个别小鼠中发现的白血病细胞的数目。数据显示为每组动物(n=5)的平均值 \pm SEM;*P<0.05,**P<0.01,***P<0.001,如使用单因素ANOVA与Tukey氏多重比较检验所计算。

[0031] 图17A-17C.用cirtuzumab和依鲁替尼治疗在移植组织相容性ROR-1⁺白血病的免疫活性小鼠中的累加抑制作用。(图17A)显示ROR-1-Tg小鼠的代表性脾脏,其在接受2 \times 10⁴个ROR-1 \times TCL1白血病细胞的静脉内输注后25天收集。(图17B) cirtuzumab和依鲁替尼的组合抑制ROR-1-Tg小鼠中ROR-1 \times TCL1白血病细胞的移植。ROR-1-Tg小鼠用2 \times 10⁴个ROR-1 \times TCL1白血病细胞移植,且然后给予10mg/kg cirtuzumab的每周静脉内注射或经由经口管饲法给予每日剂量的5mg/kg依鲁替尼。描绘在用对B220(横坐标)和人ROR-1(纵坐标)特异性的荧光染料缀合的mAb染色细胞后在过继性转移后25天从代表性小鼠(n=6)收获的淋巴细胞荧光的等高线图,所述代表性小鼠接受顶部所示的治疗。每个等高线图的右上角的百分比表明具有白血病细胞的CD5⁺B220^{low}ROR-1⁺表型的血液单核细胞的比例。(图17C)过继性转移2 \times 10⁴个ROR-1 \times TCL1白血病细胞后28天在接受10mg/kg cirtuzumab的每周注射或每日剂量的依鲁替尼(以5mg/kg)的受体ROR-1-Tg小鼠的脾脏中ROR-1 \times TCL1白血病细胞的总数。每个符号代表在个别小鼠中发现的白血病细胞的数目。数据显示为每组动物(n=6)的平均值 \pm SEM;*P<0.05,**P<0.01,如使用单因素ANOVA与Tukey氏多重比较检验所计算。

[0032] 图18A-18B.在没有CD154的情况下由Wnt5a诱导的CLL增殖的CFSE测定。(图18A)分裂中CLL细胞的门控策略。首先将细胞对大小和奇异性进行门控,然后进行PI排除以鉴定活细胞用于进一步分析。用CFSE染色后检查活CD5和CD19CLL细胞的荧光。通过计算具有较低

CFSE荧光的细胞的比例来计算分裂中CLL细胞的百分比。(图18B)在没有(顶部小图)或有(下方小图)外源Wnt5a的情况下,在IL-4/10存在的情况下,与野生型HeLa细胞共培养5天的CFSE标记的CLL细胞(n=6)的荧光。显示对一个代表性CLL样品的测定结果,其中每个柱状图的左下角指示分裂中的细胞的百分比。

[0033] 图19A-19B.在有或没有外源Wnt5a的情况下,用Cirmtuzumab或依鲁替尼处理的CLL细胞的细胞周期分析。(图19A)将白血病细胞在IL-4/10或Wnt5a存在的情况下在HeLa_{CD154}上共培养,且然后用cirmtuzumab(10 μ g/ml)或依鲁替尼(0.5 μ M)处理4天,在PI染色后进行细胞周期分析。显示一个代表性白血病样品。(图19B)呈现测试的所有3个样品的S/G2/M期中的白血病细胞的平均比例。数据显示为平均值 \pm SEM,* P <0.05;** P <0.01,如通过单因素ANOVA与Tukey氏多重比较检验所测定。

[0034] 图20A-20B.Cirmtuzumab或依鲁替尼对ROR-1 \times TCL1白血病移植的小鼠的剂量依赖性抑制效应。(图20A)在ROR-1 \times TCL1白血病移植的小鼠中依鲁替尼的剂量依赖性抑制效应。(图20B)在ROR-1 \times TCL1白血病移植的小鼠中cirmtuzumab的剂量依赖性抑制效应。每个符号代表在个别小鼠中发现的白血病细胞的数目。数据显示为每组动物(n=6)的平均值 \pm SEM;* P <0.05;*** P <0.001,如使用单因素ANOVA与Tukey氏多重比较检验所计算。

[0035] 图21.由Wnt5a和/或CD154诱导的TCL1白血病细胞增殖的CFSE测定。在没有或有外源Wnt5a的情况下,在IL-4/10存在的情况下,与野生型HeLa或HeLa_{CD154}细胞共培养5天的CFSE标记的TCL1白血病细胞(n=3)的荧光。数据显示为每组的平均值 \pm SEM;p-值使用单因素ANOVA与Tukey氏多重比较检验测定。

[0036] 图22A-22C.MCL患者血浆中初始MCL和Wnt5a水平的抗原表达。(图22A)对表达CD5和CD19的MCL细胞的门控(左上方)。阴影柱状图显示用对其他表面抗原特异性的荧光染料缀合的mAb染色的门控MCL细胞的荧光。与CLL细胞相反,MCL细胞不能用对CD200(右上方)或CD23(左下方)特异性的mAb染色。与CLL相似,MCL表达高水平的ROR-1(右下方)。空心柱状图描绘用同种型对照抗体染色的细胞的荧光。(图22B)MCL vs CLL中的ROR-1的 Δ MFI.ns=不显著。(图22C)具有MCL的患者vs.年龄匹配的对照受试者中的血浆Wnt5a(每组n=4; P <0.05,Student氏t检验)。

[0037] 图23A-23D.MCL细胞中Rac1活化和细胞周期的分析。(图23A)在用或不用Wnt5a(200ng/ml)、用或不用依鲁替尼(0.5 μ M)或用或不用cirmtuzumab(10 μ g/ml)处理的MCL细胞中测量活化的Rac1,如免疫印迹的每个泳道上方所示。每个泳道下面的数字是针对未处理的样品归一化的活化的GTP酶相比于总GTP酶的条带IOD的比率。(图23B)未经处理或用cirmtuzumab和/或依鲁替尼处理的CLL细胞中的Wnt5a诱导的Rac1的活化。显示在五次独立实验中观察到的平均Rac1活化(n=3)。每个泳道下面的数字是针对未处理的样品归一化的活化的GTP酶相比于总GTP酶的条带IOD的比率。数据显示为每组的平均值 \pm SEM。*** P <0.0001,如使用单因素ANOVA与Tukey氏多重比较检验所计算。(图23C)将MCL细胞在IL-4/10或Wnt5a存在的情况下在HeLa_{CD154}上共培养,且然后用cirmtuzumab(10 μ g/ml)或依鲁替尼(0.5 μ M)处理4天,在PI染色后进行细胞周期分析。显示一个代表性CLL样品。(图23D)呈现测试的所有MCL患者的S/G2期中的细胞的平均分数(n=3)。数据显示为平均值 \pm S.E.M.;* P <0.05;** P <0.01,如通过单因素ANOVA与Tukey氏多重比较检验所测定.ns=不显著。

具体实施方式

[0038] 定义

[0039] 尽管本文显示和描述了本发明的各个实施方案和方面,对于本领域技术人员将显而易见的是,此类实施方案和方面仅仅通过实例的方式提供。对于本领域技术人员而言,在不偏离本发明的情况下,数值的变化、改变和替换现在将发生。应当理解,在实施本发明中可以采用本文所述的本发明的实施方案的各种替代方案。

[0040] 本文所用的部分标题仅用于组织的目的,而不应解释为限制所述的主体。本申请中引用的所有文件或文件的部分,包括但不限于专利、专利申请、文章、书籍、手册和论文,出于任何目的以其整体通过引用明确地并入本文。

[0041] 本文所用的缩写具有其在化学和生物学技术内的常规含义。本文所阐述的化学结构和化学式是根据化学领域中已知的化学价的标准规则来构建。

[0042] 在取代基由其从左向右书写的常规化学式指定时,其同样涵盖由从右向左书写该结构所产生的化学上相同的取代基,例如 $-\text{CH}_2\text{O}-$ 等于 $-\text{OCH}_2-$ 。

[0043] 除非另外阐述,否则术语“烷基”本身或作为另一个取代基的一部分时意指直链(即,不分支)或支链非环状碳链(或碳)或其组合,其可以是完全饱和、单不饱和或多不饱和的,并且可以包括具有指定碳原子数的二价和多价基团(即, C_1-C_{10} 意指一至十个碳)。饱和烷基的实例包括但不限于诸如以下的基团:甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、叔丁基、异丁基、仲丁基、(环己基)甲基;例如正戊基、正己基、正庚基、正辛基等等的同系物和异构体。不饱和烷基是具有一个或多个双键或三键的烷基。不饱和烷基的实例包括但不限于乙烯基、2-丙烯基、巴豆基、2-异戊烯基、2-(丁二烯基)、2,4-戊二烯基、3-(1,4-戊二烯基)、乙炔基、1-丙炔基和3-丙炔基、3-丁炔基以及高级同系物和异构体。烷氧基是经由氧连接子($-\text{O}-$)与分子的其余部分连接的烷基。烷基部分可以是烯基部分。烷基部分可以是炔基部分。烷基部分可以是完全饱和的。除了一个或多个双键外,烯基可以包括多于一个双键和/或一个或多个三键。除了一个或多个三键外,炔基可以包括多于一个三键和/或一个或多个双键。

[0044] 除非另外阐述,否则术语“亚烷基”本身或作为另一个取代基的一部分时意指衍生自烷基的二价基团,例如但不限于 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 。通常,烷基(或亚烷基)将具有1至24个碳原子,其中具有10个或更少碳原子的那些基团在本发明中是优选的。“低碳烷基”或“低碳亚烷基”是通常具有8个或更少碳原子的较短链烷基或亚烷基。除非另外阐述,否则术语“亚烯基”本身或作为另一个取代基的一部分意指衍生自烯烃的二价基团。

[0045] 除非另外阐述,否则术语“杂烷基”本身或与另一个术语组合时意指稳定直链或分支非环状链或其组合,其包括至少一个碳原子和至少一个杂原子(例如,O、N、P、Si和S),并且其中氮和硫原子可以任选地被氧化且氮杂原子可以任选地被季铵化。杂原子(例如,O、N、P、S和Si)可以位于杂烷基的任何内部位置或位于烷基与分子的其余部分连接的位置上。实例包括但不限于: $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}(\text{O})-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}(\text{O})_2-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}=\text{CH}-\text{O}-\text{CH}_3$ 、 $-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ 、 $-\text{CH}_2-\text{C}(\text{H})=\text{N}-\text{OCH}_3$ 、 $-\text{CH}=\text{CH}-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_3$ 、 $-\text{O}-\text{CH}_3$ 、 $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ 和 $-\text{CN}$ 。最多达两个或三个杂原子可以是连续的,诸如,例如, $-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{OCH}_3$ 和 $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ 。杂烷基部分可以包括一个杂原子(例如,O、N、S、Si或P)。杂烷基部分可以包括两个任选不同的杂原子(例如,O、N、S、Si或P)。杂烷基部

分可以包括三个任选不同的杂原子(例如, O、N、S、Si或P)。杂烷基部分可以包括四个任选不同的杂原子(例如, O、N、S、Si或P)。杂烷基部分可以包括五个任选不同的杂原子(例如, O、N、S、Si或P)。杂烷基部分可以包括最多达8个任选不同的杂原子(例如, O、N、S、Si或P)。除非另有说明, 术语“杂烯基”本身或与另一术语组合意指包括至少一个双键的杂烷基。除了一个或多个双键外, 杂烯基可以任选地包括多于一个双键和/或一个或多个三键。除非另有说明, 术语“杂炔基”本身或与另一术语组合意指包括至少一个三键的杂烷基。除了一个或多个三键外, 杂炔基可以任选地包括多于一个三键和/或一个或多个双键。

[0046] 类似地, 除非另外阐述, 否则术语“亚杂烷基”本身或作为另一个取代基的一部分时意指衍生自杂烷基的二价基团, 例如但不限于 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ 和 $-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_2-$ 。对于亚杂烷基, 杂原子还可以占据一个或两个链末端(例如, 亚烷基氧基、亚烷基二氧基、亚烷基氨基、亚烷基二氨基等等)。更进一步, 对于亚烷基和亚杂烷基连接基团, 书写连接基团的化学式的方向并不暗示连接基团的取向。例如, 式 $-\text{C}(\text{O})_2\text{R}'-$ 表示 $-\text{C}(\text{O})_2\text{R}'-$ 和 $-\text{R}'\text{C}(\text{O})_2-$ 。如以上所描述, 如本文所用的杂烷基包括经由杂原子与分子的其余部分连接的那些基团, 诸如 $-\text{C}(\text{O})\text{R}'$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NR}'$ 、 $-\text{NR}'\text{R}''$ 、 $-\text{OR}'$ 、 $-\text{SR}'$ 和/或 $-\text{SO}_2\text{R}'$ 。在叙述“杂烷基”, 随后叙述特定杂烷基, 诸如 $-\text{NR}'\text{R}''$ 等等的情况下, 应理解术语杂烷基和 $-\text{NR}'\text{R}''$ 并不冗余或互相排斥。相反, 叙述特定杂烷基是为了增加清楚程度。因此, 术语“杂烷基”在本文中不应当解释为排除特定的杂烷基, 诸如 $-\text{NR}'\text{R}''$ 等。

[0047] 除非另外阐述, 否则术语“环烷基”和“杂环烷基”本身或与其他术语组合时分别意指“烷基”和“杂烷基”的非芳香族环状形式, 其中构成一个或多个环的碳不一定需要与氢键合, 因为所有的碳价都参与与非氢原子的键合。另外, 对于杂环烷基, 杂原子可以占据杂环与分子的其余部分连接的位置。环烷基的实例包括但不限于环丙基、环丁基、环戊基、环己基、1-环己烯基、3-环己烯基、环庚基、3-羟基-环丁-3-烯基-1,2,二酮、1H-1,2,4-三唑基-5(4H)-酮、4H-1,2,4-三唑基等。杂环烷基的实例包括但不限于1-(1,2,5,6-四氢吡啶基)、1-哌啶基、2-哌啶基、3-哌啶基、4-吗啉基、3-吗啉基、四氢呋喃-2-基、四氢呋喃-3-基、四氢噻吩-2-基、四氢噻吩-3-基、1-哌嗪基、2-哌嗪基等。“亚环烷基”和“亚杂环烷基”单独或作为另一个取代基的一部分时分别意指衍生自环烷基和杂环烷基的二价基团。杂环烷基部分可以包括一个环杂原子(例如, O、N、S、Si或P)。杂环烷基部分可以包括两个任选不同的环杂原子(例如, O、N、S、Si或P)。杂环烷基部分可以包括三个任选不同的环杂原子(例如, O、N、S、Si或P)。杂环烷基部分可以包括四个任选不同的环杂原子(例如, O、N、S、Si或P)。杂环烷基部分可以包括五个任选不同的环杂原子(例如, O、N、S、Si或P)。杂环烷基部分可以包括最多达8个任选不同的环杂原子(例如, O、N、S、Si或P)。

[0048] 除非另外阐述, 否则术语“卤基”或“卤素”本身或作为另一个取代基的一部分时意指氟、氯、溴或碘原子。另外, 诸如“卤代烷基”的术语意在包括单卤代烷基和多卤代烷基。例如, 术语“卤基(C_1-C_4)烷基”包括但不限于氟甲基、二氟甲基、三氟甲基、2,2,2-三氟乙基、4-氯丁基、3-溴丙基等。

[0049] 除非另外阐述, 否则术语“酰基”意指 $-\text{C}(\text{O})\text{R}$, 其中R是取代或未取代的烷基、取代或未取代的环烷基、取代或未取代的杂烷基、取代或未取代的杂环烷基、取代或未取代的芳基或者取代或未取代的杂芳基。

[0050] 除非另外阐述, 否则术语“芳基”意指多不饱和芳族烃取代基, 其可以是稠合在一

起(即,稠环芳基)或共价连接的单环或多环(优选地1至3个环)。稠合环芳基是指稠合在一起的多个环,其中所述稠合环中至少一个是芳基环。术语“杂芳基”是指含有至少一个诸如N、O或S的杂原子的芳基(或环),其中氮和硫原子任选地被氧化且氮原子任选地被季铵化。因此,术语“杂芳基”包括稠合环杂芳基(即,稠合在一起的多个环,其中所述稠合环中至少一个是杂芳族环)。5,6-稠合环亚杂芳基是指稠合在一起的两个环,其中一个环具有5个成员而另一个环具有6个成员,并且其中至少一个环是杂芳基环。同样,6,6-稠合环亚杂芳基是指稠合在一起的两个环,其中一个环具有6个成员且另一个环具有6个成员,并且其中至少一个环是杂芳基环。而6,5-稠合环亚杂芳基是指稠合在一起的两个环,其中一个环具有6个成员而另一个环具有5个成员,并且其中至少一个环是杂芳基环。杂芳基可以经由碳或杂原子与分子的其余部分连接。芳基和杂芳基的非限制性实例包括苯基、1-萘基、2-萘基、4-联苯、1-吡咯基、2-吡咯基、3-吡咯基、3-吡唑基、2-咪唑基、4-咪唑基、吡嗪基、2-噁唑基、4-噁唑基、2-苯基-4-噁唑基、5-噁唑基、3-异噁唑基、4-异噁唑基、5-异噁唑基、2-噻唑基、4-噻唑基、5-噻唑基、2-呋喃基、3-呋喃基、2-噻吩基、3-噻吩基、2-吡啶基、3-吡啶基、4-吡啶基、2-嘧啶基、4-嘧啶基、5-苯并噻唑基、嘌呤基、2-苯并咪唑基、5-吡啶基、1-异喹啉基、5-异喹啉基、2-喹啉基、5-喹啉基、3-喹啉基和6-喹啉基。以上指出的芳基和杂芳基环系统各自的取代基是选自以下所描述的可接受的取代基的群组。“亚芳基”和“亚杂芳基”单独或作为另一个取代基的一部分时分别意指衍生自芳基和杂芳基的二价基团。芳基和杂芳基的非限制性实例包括吡啶基、嘧啶基、噻吩基、噻吩基、呋喃基、吡啶基、苯并噻二唑基、苯并二氧杂环戊烯基、苯并二氧杂环己烷基、硫代十氢化萘基、吡咯并吡啶基、吡啶基、喹啉基、喹啉基、吡啶并吡嗪基、喹啉酮基、苯并异噁唑基、咪唑并吡啶基、苯并呋喃基、苯并噻吩基、苯并噻吩基、苯基、萘基、联苯、吡咯基、吡唑基、咪唑基、吡嗪基、噁唑基、异噁唑基、噻唑基、呋喃基噻吩基、吡啶基、嘧啶基、苯并噻唑基、嘌呤基、苯并咪唑基、异喹啉基、噻二唑基、噻二唑基、吡咯基、二唑基、三唑基、四唑基、苯并噻二唑基、异噻唑基、吡啶并嘧啶基、吡咯并嘧啶基、苯并三唑基、苯并噁唑基或喹啉基。上述实例可以是取代的或未取代的,并且上述每个杂芳基实例的二价基团是亚杂芳基的非限制性实例。杂芳基部分可以包括一个环杂原子(例如,0、N或S)。杂芳基部分可以包括两个任选不同的环杂原子(例如,0、N或S)。杂芳基部分可以包括三个任选不同的环杂原子(例如,0、N或S)。杂芳基部分可以包括四个任选不同的环杂原子(例如,0、N或S)。杂芳基部分可以包括五个任选不同的环杂原子(例如,0、N或S)。芳基部分可以具有单个环。芳基部分可以具有两个任选不同的环。芳基部分可以具有三个任选不同的环。芳基部分可以具有四个任选不同的环。杂芳基部分可以具有一个环。杂芳基部分可以具有两个任选不同的环。杂芳基部分可以具有三个任选不同的环。杂芳基部分可以具有四个任选不同的环。杂芳基部分可以具有五个任选不同的环。

[0051] 稠合环杂环烷基-芳基是与杂环烷基稠合的芳基。稠合环杂环烷基-杂芳基是与杂环烷基稠合的杂芳基。稠合环杂环烷基-环烷基是与环烷基稠合的杂环烷基。稠合环杂环烷基-杂环烷基是与另一个杂环烷基稠合的杂环烷基。稠合环杂环烷基-芳基、稠合环杂环烷基-杂芳基、稠合环杂环烷基-环烷基或稠合环杂环烷基-杂环烷基可以各自独立地未被取代或者被本文中所描述的一个或多个取代基取代。

[0052] 如本文所用的术语“氧代”意指与碳原子成双键的氧。

[0053] 如本文所用的术语“烷基磺酰基”意指具有式-S(O₂)-R'的部分,其中R'是如上所

定义的取代或未取代的烷基基团。R'可以具有指定数目的碳(例如,“C₁-C₄烷基磺酰基”)。

[0054] 以上术语(例如,“烷基”、“杂烷基”、“环烷基”、“杂环烷基”“芳基”和“杂芳基”)各自包括所指示的基团的取代和未取代的形式。以下提供各类型基团的优选取代基。

[0055] 烷基和杂烷基(包括通常称为亚烷基、烯基、亚杂烷基、杂烯基、炔基、环烷基、杂环烷基、环烯基和杂环烯基的那些基团)的取代基可以是选自但不限于以下各项的多种基团中的一个或多个: -OR'、=O、=NR'、=N-OR'、-NR'R''、-SR'、-卤素、-SiR'R''R'''、-OC(O)R'、-C(O)R'、-CO₂R'、-CONR'R''、-OC(O)NR'R''、-NR''C(O)R'、-NR'-C(O)NR''R'''、-NR''C(O)₂R'、-NR-C(NR'R''R''')=NR''''、-NR-C(NR'R'')=NR''''、-S(O)R'、-S(O)₂R'、-S(O)₂NR'R''、-NRSO₂R'、NR'NR''R'''、ONR'R''、NR'C=(O)NR''NR''R''''、-CN、-NO₂,其数目范围为零至(2m'+1),其中m'是这种基团中的碳原子总数。R、R'、R''、R'''和R''''各自优选地独立地指氢、取代或未取代的杂烷基、取代或未取代的环烷基、取代或未取代的杂环烷基、取代或未取代的芳基(例如经1-3个卤素取代的芳基)、取代或未取代的杂芳基、取代或未取代的烷基、烷氧基或硫代烷氧基或芳基烷基。例如,当本发明的化合物包括多于一个R基团时,独立地选择各R基团,如同当各R'、R''、R'''和R''''基团在存在多于一个这些基团时。当R'和R''连接至同一氮原子时,其可与氮原子组合以形成4、5、6或7元环。例如,-NR'R''包括但不限于1-吡咯烷基和4-吗啉基。根据取代基的以上讨论,本领域技术人员应理解,术语“烷基”意在包括有包括与除了氢基团以外的基团结合的碳原子的基团,诸如卤代烷基(例如-CF₃和-CH₂CF₃)和酰基(例如-C(O)CH₃、-C(O)CF₃、-C(O)CH₂OCH₃等)。

[0056] 类似于针对烷基所描述的取代基,芳基和杂芳基的取代基是变化的并且是选自例如:-OR'、-NR'R''、-SR'、-卤素、-SiR'R''R'''、-OC(O)R'、-C(O)R'、-CO₂R'、-CONR'R''、-OC(O)NR'R''、-NR''C(O)R'、-NR'-C(O)NR''R'''、-NR''C(O)₂R'、-NR-C(NR'R''R''')=NR''''、-NR-C(NR'R'')=NR''''、-S(O)R'、-S(O)₂R'、-S(O)₂NR'R''、-NRSO₂R'、-NR'NR''R'''、-ONR'R''、-NR'C=(O)NR''NR''R''''、-CN、-NO₂、-R'、-N₃、-CH(Ph)₂、氟(C₁-C₄)烷氧基和氟(C₁-C₄)烷基,其数目范围为零至芳香族环系统上的开放原子价总数;且其中R'、R''、R'''和R''''优选地独立地选自氢、取代或未取代的烷基、取代或未取代的杂烷基、取代或未取代的环烷基、取代或未取代的杂环烷基、取代或未取代的芳基和取代或未取代的杂芳基。例如,当本发明的化合物包括多于一个R基团时,独立地选择各R基团,如同当各R'、R''、R'''和R''''基团在存在这些基团中的多于一个时。

[0057] 两个或更多个取代基可以任选地接合以形成芳基、杂芳基、环烷基或杂环烷基。发现此类所谓环形成取代基典型地但未必与环状基本结构连接。在一个实施方案中,环形成取代基与基本结构的相邻成员连接。例如,两个环形成取代基与环状基本结构的相邻成员连接产生了稠合环结构。在另一个实施方案中,环形成取代基与基本结构的单个成员连接。例如,两个环形成取代基与环状基本结构的单个成员连接产生了螺环结构。在另一个实施方案中,环形成取代基与基本结构的不相邻成员连接。

[0058] 芳基或杂芳基环的相邻原子上的取代基中的两个可以任选地形成式-T-C(O)-(CRR')_q-U-的环,其中T和U独立地为-NR-、-O-、-CRR'-或单键,且q是0至3的整数。或者,芳基或杂芳基环的相邻原子上的取代基中的两个可以任选地经式-A-(CH₂)_r-B-的取代基替换,其中A和B独立地为-CRR'-、-O-、-NR-、-S-、-S(O)-、-S(O)₂-、-S(O)₂NR'-或单键,且r是1至4的整数。如此形成的新环的单键之一可以任选地经双键替换。或者,芳基或杂芳基环的

相邻原子上的取代基中的两个可以任选地经式 $-(CRR')_s-X'-(C''R''R''')_d-$ 的取代基替换,其中s和d独立地为0至3的整数,且X'是 $-O-$ 、 $-NR'-$ 、 $-S-$ 、 $-S(O)-$ 、 $-S(O)_2-$ 或 $-S(O)_2NR'-$ 。取代基R、R'、R''和R'''优选地独立地选自氢、取代或未取代的烷基、取代或未取代的杂烷基、取代或未取代的环烷基、取代或未取代的杂环烷基、取代或未取代的芳基和取代或未取代的杂芳基。

[0059] 如本文所用,术语“杂原子”或“环杂原子”意在包括氧(O)、氮(N)、硫(S)、磷(P)和硅(Si)。

[0060] 如本文所用的“取代基基团”意指选自以下部分的基团:

[0061] (A) 氧代、卤素、 $-CF_3$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(=O)NHNH_2$ 、 $-NHC(=O)NH_2$ 、 $-NHSO_2H$ 、 $-NHC(=O)H$ 、 $-NHC(O)-OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCHF_2$ 、未取代的烷基、未取代的杂烷基、未取代的环烷基、未取代的杂环烷基、未取代的芳基、未取代的杂芳基和

[0062] (B) 用至少一个选自以下的取代基取代的烷基、杂烷基、环烷基、杂环烷基、芳基、杂芳基:

[0063] (i) 氧代、卤素、 $-CF_3$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(=O)NHNH_2$ 、 $-NHC(=O)NH_2$ 、 $-NHSO_2H$ 、 $-NHC(=O)H$ 、 $-NHC(O)-OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCHF_2$ 、未取代的烷基、未取代的杂烷基、未取代的环烷基、未取代的杂环烷基、未取代的芳基、未取代的杂芳基和

[0064] (ii) 用至少一个选自以下的取代基取代的烷基、杂烷基、环烷基、杂环烷基、芳基、杂芳基:

[0065] (a) 氧代、卤素、 $-CF_3$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(=O)NHNH_2$ 、 $-NHC(=O)NH_2$ 、 $-NHSO_2H$ 、 $-NHC(=O)H$ 、 $-NHC(O)-OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCHF_2$ 、未取代的烷基、未取代的杂烷基、未取代的环烷基、未取代的杂环烷基、未取代的芳基、未取代的杂芳基和

[0066] (b) 用至少一个选自以下的取代基取代的烷基、杂烷基、环烷基、杂环烷基、芳基、杂芳基:氧代、卤素、 $-CF_3$ 、 $-CN$ 、 $-OH$ 、 $-NH_2$ 、 $-COOH$ 、 $-CONH_2$ 、 $-NO_2$ 、 $-SH$ 、 $-SO_3H$ 、 $-SO_4H$ 、 $-SO_2NH_2$ 、 $-NHNH_2$ 、 $-ONH_2$ 、 $-NHC(=O)NHNH_2$ 、 $-NHC(=O)NH_2$ 、 $-NHSO_2H$ 、 $-NHC(=O)H$ 、 $-NHC(O)-OH$ 、 $-NHOH$ 、 $-OCF_3$ 、 $-OCHF_2$ 、未取代的烷基、未取代的杂烷基、未取代的环烷基、未取代的杂环烷基、未取代的芳基、未取代的杂芳基。

[0067] 如本文所用的“大小受限的取代基”或“大小受限的取代基基团”意指选自以上针对“取代基基团”所述的所有取代基的基团,其中各取代或未取代的烷基是取代或未取代的 C_1-C_{20} 烷基,各取代或未取代的杂烷基是取代或未取代的2至20元杂烷基,各取代或未取代的环烷基是取代或未取代的 C_3-C_8 环烷基,各取代或未取代的杂环烷基是取代或未取代的3至8元杂环烷基,各取代或未取代的芳基是取代或未取代的 C_6-C_{10} 芳基,且各取代或未取代的杂芳基是取代或未取代的5至10元杂芳基。

[0068] 如本文所用的“低碳取代基(lower substituent)”或“低碳取代基基团(lower substituent group)”意指选自以上针对“取代基基团”所述的所有取代基的基团,其中各取代或未取代的烷基是取代或未取代的 C_1-C_8 烷基,各取代或未取代的杂烷基是取代或未取代的2至8元杂烷基,各取代或未取代的环烷基是取代或未取代的 C_3-C_7 环烷基,各取代或未

取代的杂环烷基是取代或未取代的3至7元杂环烷基,各取代或未取代的芳基是取代或未取代的C₆-C₁₀芳基,且各取代或未取代的杂芳基是取代或未取代的5至9元杂芳基。

[0069] 在一些实施方案中,本文的化合物中所描述的各取代的基团被至少一个取代基团取代。更具体地,在一些实施方案中,本文的化合物中所描述的各取代的烷基、取代的杂烷基、取代的环烷基、取代的杂环烷基、取代的芳基、取代的杂芳基、取代的亚烷基、取代的亚杂烷基、取代的亚环烷基、取代的亚杂环烷基、取代的亚芳基和/或取代的亚杂芳基被至少一个取代基团取代。在其他实施方案中,这些基团中的至少一个或所有被至少一个大小受限的取代基团取代。在其他实施方案中,这些基团中的至少一个或所有被至少一个低碳取代基团取代。

[0070] 在其中的化合物的其他实施方案中,各取代或未取代的烷基可以是取代或未取代的C₁-C₂₀烷基,各取代或未取代的杂烷基是取代或未取代的2至20元杂烷基,各取代或未取代的环烷基是取代或未取代的C₃-C₈环烷基,各取代或未取代的杂环烷基是取代或未取代的3至8元杂环烷基,各取代或未取代的芳基是取代或未取代的C₆-C₁₀芳基,和/或各取代或未取代的杂芳基是取代或未取代的5至10元杂芳基。在其中的化合物的一些实施方案中,各取代或未取代的亚烷基是取代或未取代的C₁-C₂₀亚烷基,各取代或未取代的亚杂烷基是取代或未取代的2至20元亚杂烷基,各取代或未取代的亚环烷基是取代或未取代的C₃-C₈亚环烷基,各取代或未取代的亚杂环烷基是取代或未取代的3至8元亚杂环烷基,各取代或未取代的亚芳基是取代或未取代的C₆-C₁₀亚芳基,和/或各取代或未取代的亚杂芳基是取代或未取代的5至10元亚杂芳基。

[0071] 在一些实施方案中,各取代或未取代的烷基是取代或未取代的C₁-C₈烷基,各取代或未取代的杂烷基是取代或未取代的2至8元杂烷基,各取代或未取代的环烷基是取代或未取代的C₃-C₇环烷基,各取代或未取代的杂环烷基是取代或未取代的3至7元杂环烷基,各取代或未取代的芳基是取代或未取代的C₆-C₁₀芳基,和/或各取代或未取代的杂芳基是取代或未取代的5至9元杂芳基。在一些实施方案中,各取代或未取代的亚烷基是取代或未取代的C₁-C₈亚烷基,各取代或未取代的亚杂烷基是取代或未取代的2至8元亚杂烷基,各取代或未取代的亚环烷基是取代或未取代的C₃-C₇亚环烷基,各取代或未取代的亚杂环烷基是取代或未取代的3至7元亚杂环烷基,各取代或未取代的亚芳基是取代或未取代的C₆-C₁₀亚芳基,和/或各取代或未取代的亚杂芳基是取代或未取代的5至9元亚杂芳基。在一些实施方案中,所述化合物是以下实施例部分、附图或表中列出的化学物质。

[0072] 术语“药学上可接受的盐”意在包括用相对无毒的酸或碱制备的活性化合物的盐,其取决于本文中所描述的化合物上所发现的特定取代基。当本发明的化合物含有相对酸性的官能度时,可以通过使此类化合物的中性形式与足量的所需碱(单纯或处于合适的惰性溶剂中)接触来获得碱加成盐。药学上可接受的碱加成盐的实例包括钠、钾、钙、铵、有机氨基或镁盐或类似盐。当本发明的化合物含有相对碱性的官能度时,可以通过使此类化合物的中性形式与足量的所需酸(单纯或处于合适的惰性溶剂中)接触来获得酸加成盐。药学上可接受的酸加成盐的实例包括衍生自无机酸(如盐酸、氢溴酸、硝酸、碳酸、单氢碳酸、磷酸、单氢磷酸、二氢磷酸、硫酸、单氢硫酸、氢碘酸或亚磷酸等)的盐,以及衍生自相对无毒的有机酸(如乙酸、丙酸、异丁酸、马来酸、丙二酸、苯甲酸、琥珀酸、辛二酸、富马酸、乳酸、扁桃酸、酞酸、苯磺酸、对甲苯基磺酸、柠檬酸、酒石酸、甲磺酸等)的盐。还包括氨基酸诸如精氨

酸等的盐,以及有机酸如葡糖醛酸或半乳糖醛酸等的盐(参见,例如,Berge等人,Journal of Pharmaceutical Science 66:1-19(1977))。本发明的某些特定化合物含有允许所述化合物转化成碱或酸加成盐的碱性和酸性官能度。本领域技术人员已知的其他药学上可接受的载体适用于本发明。与相应的游离碱形式相比,盐倾向于更易溶于水性或其他质子溶剂中。在其他情况下,所述制剂可以是在4.5至5.5的pH范围的1mM-50mM组氨酸、0.1%-2%蔗糖、2%-7%甘露醇中的冻干粉末,其在使用前与缓冲液混合。

[0073] 因此,本发明的化合物可以作为盐,诸如与药学上可接受的酸的盐存在。本发明包括此类盐。此类盐的实例包括盐酸盐、氢溴酸盐、硫酸盐、甲磺酸盐、硝酸盐、马来酸盐、乙酸盐、柠檬酸盐、富马酸盐、酒石酸盐(例如(+)-酒石酸盐、(-)-酒石酸盐或其混合物,包括外消旋混合物)、琥珀酸盐、苯甲酸盐和与氨基酸诸如谷氨酸的盐。这些盐可以通过本领域技术人员已知的方法来制备。

[0074] 优选地通过使所述盐与碱或酸接触并且以常规方式分离母体化合物来再生化合物的中性形式。化合物的母体形式在某些物理性质(诸如在极性溶剂中的溶解度)方面不同于各种盐形式。

[0075] 本文提供了可以是前药形式的药剂(例如化合物、药物、治疗剂)。本文所述的化合物的前药是在选择的生理条件下容易经历化学变化以提供最终试剂(例如化合物、药物、治疗剂)的那些化合物。另外,前药可以在离体环境中通过化学或生物化学方法转化为药剂(例如化合物、药物、治疗剂)。本文所述的前药包括在选择的生理条件下容易经历化学变化以向生物系统(例如在受试者中)提供药剂(例如化合物、药物、治疗剂)的化合物。

[0076] 本发明的某些化合物可以以非溶剂化形式以及溶剂化形式(包括水合形式)存在。通常,溶剂化形式等效于非溶剂化形式并且涵盖在本发明的范围内。本发明的某些化合物可以呈多种结晶或非晶形式存在。通常,所有物理形式对于本发明所涵盖的用途都是等效的并且意图在本发明的范围内。

[0077] 如本文所用,术语“盐”是指本发明方法中所使用的化合物的酸或碱盐。可接受的盐的说明性实例是无机酸(盐酸、氢溴酸、磷酸等)盐、有机酸(乙酸、丙酸、谷氨酸、柠檬酸等)盐、季铵(碘甲烷、碘乙烷等)盐。

[0078] 本发明的某些化合物具有不对称碳原子(光学或手性中心)或双键;对映异构体、外消旋物、非对映异构体、互变异构体、几何异构体、立体异构体形式可以在绝对立体化学的方面针对氨基酸定义为(R)-或(S)-或定义为(D)-或(L)-,并且个别异构体涵盖在本发明的范围内。本发明的化合物不包括本领域中已知过于不稳定而无法合成和/或分离的那些。本发明意在包括呈外消旋和光学纯形式的化合物。光学活性(R)-和(S)-或(D)-和(L)-异构体可以使用手性合成子或手性试剂来制备,或使用常规技术进行拆分。当本文描述的化合物含有烯烃键或其他几何不对称中心时,并且除非另外说明,否则意图所述化合物包括E和Z几何异构体。

[0079] 如本文所用,术语“异构体”是指具有相同数目和种类的原子并且因此具有相同分子量但在原子的结构排列或构型方面不同的化合物。

[0080] 如本文所用的术语“互变异构体”是指平衡存在且容易从一种异构体形式转化成另一种的两种或更多种结构异构体之一。

[0081] 本领域技术人员应显而易见,本发明的某些化合物可以呈互变异构体形式存在,


所述化合物的所有此类互变异构体形式都在本发明的范围内。

[0082] 除非另外阐述,否则本文描绘的结构还意在包括该结构的所有立体化学形式;即,各不对称中心的(R)和(S)构型。因此,本发明化合物的单一立体化学异构体以及对映异构体与非对映异构体混合物在本发明的范围内。

[0083] 除非另外阐述,否则本文描绘的结构还意在包括仅在存在一个或多个同位素富集的原子方面不同的化合物。例如,具有本发明的结构但以氘或氚替换氢、或以经¹³C或¹⁴C富集的碳替换碳的化合物在本发明的范围内。

[0084] 本发明的化合物还可以在构成此类化合物的一个或多个原子处含有非天然比例的原子同位素。例如,所述化合物可以用放射性同位素诸如氚(³H)、氟(¹⁸F)、碘125(¹²⁵I)或碳14(¹⁴C)进行放射性标记。本发明化合物的所有同位素变化形式无论是否具有放射性都涵盖在本发明的范围内。

[0085] “类似物(Analog)”或“类似物(analogue)”可互换使用,并且根据化学和生物学内的其通常普通含义使用,并且是指在结构上类似于另一种化合物(即,所谓的“参考”化合物)、但在组成方面,例如一个原子被不同元素的原子替换或存在特定官能团或一个官能团被另一个官能团替换或在参考化合物(包括其异构体)的一个或多个手性中心的绝对立体化学方面不同的化学化合物。因此,类似物是在功能和外观而不是在结构或起源上与参考化合物类似或相当的化合物。

[0086] 符号“”表示化学部分与分子或化学式的其余部分的连接点。

[0087] 在实施方案中,如本文所述的化合物可以包括R²和/或其他变量的多个实例。在此类实施方案中,每个变量可以任选地是不同的,并且可以适当地标记以区分每个基团以便更清楚。例如,在每个R²不同的情况下,它们可以分别被称为例如R^{2.1}、R^{2.2}、R^{2.3}和/或R^{2.4},其中R²的定义由R^{2.1}、R^{2.2}、R^{2.3}和/或R^{2.4}假定。在R²的定义内使用的变量和/或出现在多个实例并且不同的其他变量可以类似地适当地标记以区分每个基团以更清楚。在一些实施方案中,所述化合物是本文所述的化合物(例如,在一个方面、实施方案、实施例、权利要求、表格、方案、附图或图中)。

[0088] 如本文所用的术语“一个/种(a)”或“一个/种(an)”意指一个/种或多个/种。另外,如本文所用的短语“用[n]取代”意指指定基团可以被任何或所有命名的取代基中的一个或多个取代。例如,在基团(诸如烷基或杂芳基)被“未取代的C₁-C₂₀烷基或未取代的2至20元杂烷基取代”的情况下,所述基团可以含有一个或多个未取代的C₁-C₂₀烷基,和/或一个或多个未取代的2至20元杂烷基。

[0089] 在部分被R取代基取代的情况下,所述基团可被称为“R-取代的”。在部分是R-取代的情况下,所述部分被至少一个R取代基取代,并且每个R取代基是任选地不同的。例如,在本文中的部分是R¹²-取代或未取代的烷基的情况下,多个R¹²取代基可以连接至烷基部分,其中每个R¹²取代基是任选地不同的。在R-取代的部分被多个R取代基取代的情况下,每个R-取代基在本文中可以使用引号(')诸如R'、R''等来区分。例如,在所述部分是R¹²-取代或未取代的烷基且所述部分被多个R¹²取代基取代的情况下,多个R¹²取代基可以区分为R^{12'}、R^{12''}、R^{12'''}等。在实施方案中,多个R取代基是3。在实施方案中,多个R取代基是2。

[0090] 在实施方案中,如本文所述的化合物可以包括R¹、R²、R³、R⁴、R⁵、R⁶、R⁷、R⁹、R¹⁰、R¹¹、R¹²、R¹³、R¹⁴和/或其他变量的多个实例。在此类实施方案中,每个变量可以任选地是不同的,

并且可以适当地标记以区分每个基团以便更清楚。例如,在每个 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^9 、 R^{10} 、 R^{11} 、 R^{12} 、 R^{13} 和/或 R^{14} 不同的情况下,它们可以分别被称为例如 $R^{1.1}$ 、 $R^{1.2}$ 、 $R^{1.3}$ 、 $R^{1.4}$ 、 $R^{2.1}$ 、 $R^{2.2}$ 、 $R^{2.3}$ 、 $R^{2.4}$ 、 $R^{3.1}$ 、 $R^{3.2}$ 、 $R^{3.3}$ 、 $R^{3.4}$ 、 $R^{4.1}$ 、 $R^{4.2}$ 、 $R^{4.3}$ 、 $R^{4.4}$ 、 $R^{5.1}$ 、 $R^{5.2}$ 、 $R^{5.3}$ 、 $R^{5.4}$ 、 $R^{6.1}$ 、 $R^{6.2}$ 、 $R^{6.3}$ 、 $R^{6.4}$ 、 $R^{7.1}$ 、 $R^{7.2}$ 、 $R^{7.3}$ 、 $R^{7.4}$ 、 $R^{9.1}$ 、 $R^{9.2}$ 、 $R^{9.3}$ 、 $R^{9.4}$ 、 $R^{10.1}$ 、 $R^{10.2}$ 、 $R^{10.3}$ 、 $R^{10.4}$ 、 $R^{11.1}$ 、 $R^{11.2}$ 、 $R^{11.3}$ 、 $R^{11.4}$ 、 $R^{12.1}$ 、 $R^{12.2}$ 、 $R^{12.3}$ 、 $R^{12.4}$ 、 $R^{13.1}$ 、 $R^{13.2}$ 、 $R^{13.3}$ 、 $R^{13.4}$ 、 $R^{14.1}$ 、 $R^{14.2}$ 、 $R^{14.3}$ 和/或 $R^{14.4}$,其中 R^1 的定义由 $R^{1.1}$ 、 $R^{1.2}$ 、 $R^{1.3}$ 和/或 $R^{1.4}$ 假定, R^2 的定义由 $R^{2.1}$ 、 $R^{2.2}$ 、 $R^{2.3}$ 和/或 $R^{2.4}$ 假定, R^3 的定义由 $R^{3.1}$ 、 $R^{3.2}$ 、 $R^{3.3}$ 和/或 $R^{3.4}$ 假定, R^4 的定义由 $R^{4.1}$ 、 $R^{4.2}$ 、 $R^{4.3}$ 和/或 $R^{4.4}$ 假定, R^5 的定义由 $R^{5.1}$ 、 $R^{5.2}$ 、 $R^{5.3}$ 和/或 $R^{5.4}$ 假定, R^6 的定义由 $R^{6.1}$ 、 $R^{6.2}$ 、 $R^{6.3}$ 和/或 $R^{6.4}$ 假定, R^7 的定义由 $R^{7.1}$ 、 $R^{7.2}$ 、 $R^{7.3}$ 和/或 $R^{7.4}$ 假定, R^9 的定义由 $R^{9.1}$ 、 $R^{9.2}$ 、 $R^{9.3}$ 和/或 $R^{9.4}$ 假定, R^{10} 的定义由 $R^{10.1}$ 、 $R^{10.2}$ 、 $R^{10.3}$ 和/或 $R^{10.4}$ 假定, R^{11} 的定义由 $R^{11.1}$ 、 $R^{11.2}$ 、 $R^{11.3}$ 和/或 $R^{11.4}$ 假定, R^{12} 的定义由 $R^{12.1}$ 、 $R^{12.2}$ 、 $R^{12.3}$ 和/或 $R^{12.4}$ 假定, R^{13} 的定义由 $R^{13.1}$ 、 $R^{13.2}$ 、 $R^{13.3}$ 和/或 $R^{13.4}$ 假定, R^{14} 的定义由 $R^{14.1}$ 、 $R^{14.2}$ 、 $R^{14.3}$ 和/或 $R^{14.4}$ 假定。在 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 、 R^5 、 R^6 、 R^7 、 R^9 、 R^{10} 、 R^{11} 、 R^{12} 、 R^{13} 和/或 R^{14} 的定义内使用的变量和/或出现在多个实例并且不同的其他变量可以类似地适当地标记以区分每个基团以更清楚。

[0091] 本发明化合物的描述受本领域技术人员已知的化学键合的原理限制。因此,在基团可能被许多取代基中的一个或多个取代的情况下,选择此类取代以便符合化学键合原理且得到并非固有地不稳定和/或本领域技术人员将知道可能在环境条件(诸如水性、中性和几种已知的生理条件)下不稳定的化合物。例如,杂环烷基或杂芳基符合本领域技术人员已知的化学键合原理经由环杂原子与分子的其余部分连接,由此避免固有地不稳定的化合物。

[0092] 抗体是大的、复杂的分子(~150,000或约1320个氨基酸的分子量),其具有复杂的内部结构。天然抗体分子含有两对相同的多肽链,每对具有一条轻链和一条重链。每条轻链和重链进而由两个区域组成:参与结合靶抗原的可变("V")区域和与免疫系统的其他组分相互作用的恒定("C")区域。轻链和重链可变区在三维空间中聚集在一起以形成结合抗原(例如,细胞表面上的受体)的可变区。在每个轻链或重链可变区内,存在称为互补决定区("CDR")的三个短区段(平均长度为10个氨基酸)。抗体可变结构域中的六个CDR(三个来自轻链,且三个来自重链)在三维空间中折叠在一起以形成对接至靶抗原上的实际抗体结合位点。CDR的位置和长度已经由Kabat,E.等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest,U.S.Department of Health and Human Services,1983,1987精确地定义。在CDR中不含的可变区的部分被称为框架("FR"),其形成CDR的环境。

[0093] 术语“抗体”根据其在领域中通常已知的含义使用。抗体例如作为完整的免疫球蛋白或通过用各种肽酶消化产生的许多充分表征的片段存在。因此,例如,胃蛋白酶消化铰链区中二硫键以下的抗体以产生 $F(ab)'_2$,Fab的二聚体,其本身是通过二硫键与 V_H-C_{H1} 连接的轻链。 $F(ab)'_2$ 可以在温和条件下还原以破坏铰链区中的二硫键,由此将 $F(ab)'_2$ 二聚体转化为Fab'单体。Fab'单体基本上是具有铰链区的部分的Fab(参见Fundamental Immunology (Paul编,第3版1993)。尽管在完整抗体的消化方面定义了各种抗体片段,技术人员将理解,此类片段可以化学地或通过使用重组DNA方法从头合成。因此,如本文所用,术语抗体还包括通过修饰完整抗体产生的抗体片段,或使用重组DNA方法从头合成的那些(例如,单链Fv)或使用噬菌体展示文库鉴定的那些(参见,例如,McCafferty等人,Nature 348:552-554 (1990))。

[0094] 为了制备单克隆或多克隆抗体,可以使用本领域已知的任何技术(参见,例如,Kohler&Milstein,Nature 256:495-497 (1975);Kozbor等人,Immunology Today 4:72 (1983);Cole等人,pp.77-96,Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy (1985))。“单克隆”抗体(mAb)是指衍生自单一克隆的抗体。用于产生单链抗体的技术(美国专利号4,946,778)可以适用于产生针对本发明多肽的抗体。而且,转基因小鼠或其他生物体诸如其他哺乳动物可用于表达人源化抗体。或者,噬菌体展示技术可用于鉴定特异性结合选择的抗原的抗体和异聚Fab片段(参见,例如,McCafferty等人,Nature 348:552-554 (1990);Marks等人,Biotechnology 10:779-783 (1992))。

[0095] mAb的表位是mAb结合的其抗原的区域。如果每种抗体竞争性抑制(阻断)另一种抗体与抗原的结合,则两种抗体结合相同或重叠的表位。也就是说,1x、5x、10x、20x或100x过量的一种抗体使另一种抗体的结合抑制至少30%,但优选50%、75%、90%或甚至99%,如在竞争性结合测定中所测量(参见,例如,Junghans等人,Cancer Res.50:1495,1990)。或者,如果抗原中减少或消除一种抗体的结合的基本上所有氨基酸突变减少或消除另一种抗体的结合,则两种抗体具有相同的表位。如果减少或消除一种抗体的结合的一些氨基酸突变减少或消除另一种抗体的结合,则两种抗体具有重叠的表位。

[0096] 抗体例如作为完整的免疫球蛋白或通过用各种肽酶消化产生的许多充分表征的片段存在。因此,例如,胃蛋白酶消化铰链区中二硫键以下的抗体以产生F(ab)'₂,Fab的二聚体,其本身是通过二硫键与V_H-C_{H1}连接的轻链。F(ab)'₂可以在温和条件下还原以破坏铰链区中的二硫键,由此将F(ab)'₂二聚体转化为Fab'单体。Fab'单体基本上是具有铰链区的部分的抗原结合部分(参见Fundamental Immunology (Paul编,第3版1993)。尽管在完整抗体的消化方面定义了各种抗体片段,技术人员将理解,此类片段可以化学地或通过使用重组DNA方法从头合成。因此,如本文所用,术语抗体还包括通过修饰完整抗体产生的抗体片段,或使用重组DNA方法从头合成的那些(例如,单链Fv)或使用噬菌体展示文库鉴定的那些(参见,例如,McCafferty等人,Nature 348:552-554 (1990))。

[0097] 单链可变片段(scFv)通常是用10至约25个氨基酸的短接头肽连接的免疫球蛋白的重链(VH)和轻链(VL)的可变区的融合蛋白。所述接头通常可以为了柔性而富含甘氨酸,以及为了溶解性而富含丝氨酸或苏氨酸。所述接头可以连接VH的N-末端与VL的C-末端,反之亦然。

[0098] 为了制备本发明和根据本发明使用的合适的抗体,例如重组、单克隆或多克隆抗体,可以使用本领域已知的许多技术(参见,例如,Kohler&Milstein,Nature 256:495-497 (1975);Kozbor等人,Immunology Today 4:72 (1983);Cole等人,pp.77-96,Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy,Alan R.Liss,Inc. (1985);Coligan,Current Protocols in Immunology (1991);Harlow&Lane,Antibodies,A Laboratory Manual (1988);和Goding,Monoclonal Antibodies:Principles and Practice(第2版1986))。可以从细胞克隆编码目标抗体的重链和轻链的基因,例如,可以从杂交瘤克隆编码单克隆抗体的基因并用于产生重组单克隆抗体。编码单克隆抗体的重链和轻链的基因文库也可以由杂交瘤或浆细胞制备。重链和轻链基因产物的随机组合产生具有不同抗原特异性的抗体的大合并物(参见,例如,Kuby,Immunology (第3版1997))。用于产生单链抗体或重组抗体的技术(美国专利4,946,778,美国专利号4,816,567)可以适用于产生针对本发明多肽的抗体。

而且,转基因小鼠或其他生物体诸如其他哺乳动物可用于表达人源化或人抗体(参见,例如,美国专利号5,545,807;5,545,806;5,569,825;5,625,126;5,633,425;5,661,016, Marks等人, *Bio/Technology* 10:779-783 (1992); Lonberg等人, *Nature* 368:856-859 (1994); Morrison, *Nature* 368:812-13 (1994); Fishwild等人, *Nature Biotechnology* 14:845-51 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnology* 14:826 (1996); 和 Lonberg&Huszar, *Intern.Rev.Immunol.* 13:65-93 (1995))。或者,噬菌体展示技术可用于鉴定特异性结合选择的抗原的抗体和异聚Fab片段(参见,例如,McCafferty等人, *Nature* 348:552-554 (1990); Marks等人, *Biotechnology* 10:779-783 (1992))。抗体也可以制成双特异性的,即能够识别两种不同的抗原(参见,例如,WO 93/08829, Traunecker等人, *EMBO J.* 10:3655-3659 (1991); 和 Suresh等人, *Methods in Enzymology* 121:210 (1986))。抗体也可以杂缀合物,例如,两个共价连接的抗体,或免疫毒素(参见,例如,美国专利号4,676,980, WO 91/00360; WO92/200373; 和 EP 03089)。

[0099] 用于人源化或灵长类化非人抗体的方法是本领域众所周知的(例如,美国专利号4,816,567;5,530,101;5,859,205;5,585,089;5,693,761;5,693,762;5,777,085;6,180,370;6,210,671;和6,329,511;WO 87/02671;欧洲专利申请0173494; Jones等人 (1986) *Nature* 321:522; 和 Verhoyen等人 (1988) *Science* 239:1534)。人源化抗体进一步描述于例如 Winter和 Milstein (1991) *Nature* 349:293中。通常,人源化抗体具有从非人来源引入其中的一个或多个氨基酸残基。这些非人氨基酸残基通常被称为输入残基,其通常取自输入可变区。人源化可以基本上遵循 Winter和同事的方法(参见,例如, Morrison等人, *PNAS USA*, 81:6851-6855 (1984), Jones等人, *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann等人, *Nature* 332:323-327 (1988); Morrison和 Oi, *Adv. Immunol.*, 44:65-92 (1988), Verhoeyen等人, *Science* 239:1534-1536 (1988) 和 Presta, *Curr.Op.Struct.Biol.* 2:593-596 (1992), Padlan, *Molec. Immun.*, 28:489-498 (1991); Padlan, *Molec. Immun.*, 31 (3):169-217 (1994)), 通过用啮齿动物 CDR 或 CDR 序列取代为人抗体的相应序列来进行。因此,此类人源化抗体是嵌合抗体(美国专利号4,816,567), 其中基本上少于完整的人可变结构域已被来自非人物种的相应序列取代。在实践中,人源化抗体通常是人抗体,其中一些 CDR 残基和可能一些 FR 残基被来自啮齿动物抗体中的类似位点的残基取代。例如,包含编码人源化免疫球蛋白框架区的第一序列和编码期望免疫球蛋白互补决定区的第二序列组的多核苷酸可以合成产生或通过组合适当的 cDNA 和基因组 DNA 区段产生。人恒定区 DNA 序列可以根据众所周知的方法从多种人细胞分离。

[0100] “嵌合抗体”是抗体分子,其中 (a) 恒定区或其部分被改变、替换或交换,使得抗原结合位点(可变区)连接至不同或改变的类别、效应子功能和/或物种的恒定区域,或为嵌合抗体赋予新特性的完全不同的分子,例如酶、毒素、激素、生长因子、药物等;或 (b) 可变区或其部分用具有不同或改变的抗原特异性的可变区改变、替换或交换。本发明和根据本发明使用的优选抗体包括人源化和/或嵌合单克隆抗体。

[0101] 用于将治疗剂缀合至抗体的技术是众所周知的(参见,例如, Arnon 等人, “Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy”, in *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld 等人(编), pp.243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom 等人, “Antibodies For Drug Delivery”, *Controlled Drug*

Delivery (第2版), Robinson等人(编), pp.623-53 (Marcel Dekker, Inc.1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review" in *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera等人(编), pp.475-506 (1985); 和Thorpe等人, "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", *Immunol. Rev.*, 62:119-58 (1982)。如本文所用, 术语“抗体-药物缀合物”或“ADC”是指与抗体缀合或以其他方式共价结合的治疗剂。如本文提及的“治疗剂”是用于治疗或预防疾病诸如癌症的组合物。

[0102] 短语“特异性(或选择性)结合”抗体或“与...特异性(或选择性)免疫反应”, 当指蛋白或肽时, 是指经常在蛋白和其他生物剂的异质群体中确定蛋白的存在的结合反应。因此, 在指定的免疫测定条件下, 指定的抗体以背景的至少两倍、更通常背景的多于10至100倍结合特定蛋白。在此类条件下与蛋白的特异性结合需要针对其对特定蛋白的特异性选择的抗体。例如, 可以选择多克隆抗体以仅获得与所选抗原特异性免疫反应而不与其他蛋白特异性免疫反应的抗体子集。该选择可以通过减去与其他分子交叉反应的抗体来实现。各种免疫测定形式可用于选择与特定蛋白特异性免疫反应的抗体。例如, 固相ELISA免疫测定通常用于选择与蛋白特异性免疫反应的抗体(对于可用于测定特异性免疫反应性的免疫测定形式和条件的描述, 参见, 例如, Harlow&Lane, *Using Antibodies, A Laboratory Manual* (1998))。

[0103] “配体”是指能够结合受体的试剂, 例如多肽或其他分子。

[0104] “接触”根据其普通含义使用并且是指允许至少两种不同的物质(例如化学化合物, 包括生物分子或细胞)变得足够接近以足以发生反应、相互作用或物理碰触的过程。然而, 应当理解, 所得反应产物可以由所加入的试剂之间的反应直接产生或由反应混合物中可能产生的来自一种或多种所加入的试剂的中间物产生。

[0105] 术语“接触”可以包括允许两种物质反应、相互作用或物理接触, 其中两种物质可以是例如如本文提供的药物组合物和细胞。在实施方案中, 接触包括例如允许如本文所述的药物组合物与细胞或患者相互作用。

[0106] 除非另外定义, 否则本文使用的技术和科学术语具有与本领域普通技术人员通常理解的相同的含义。参见, 例如, Singleton等人, *DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY*第2版, J.Wiley&Sons (New York, NY 1994); Sambrook等人, *MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL*, Cold Springs Harbor Press (Cold Springs Harbor, NY 1989)。与本文描述的那些类似或等效的任何方法、装置和材料均可用于本发明的实践中。提供以下定义以便于理解本文中频繁使用的某些术语, 并不意在限制本公开的范围。

[0107] “核酸”是指单链或双链形式的脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸及其聚合物, 及其互补物。术语“多核苷酸”是指核苷酸的线性序列。术语“核苷酸”通常是指多核苷酸的单个单元, 即单体。核苷酸可以是核糖核苷酸、脱氧核糖核苷酸或其修饰形式。本文考虑的多核苷酸的实例包括单链和双链DNA、单链和双链RNA(包括siRNA)以及具有单链和双链DNA和RNA的混合物的杂合分子。如本文所用的核酸还指具有与天然存在的核酸相同的基本化学结构的核酸。此类类似物具有修饰的糖和/或修饰的环取代基, 但保留与天然存在的核酸相同的基本化学结构。核酸模拟物是指具有与核酸的一般化学结构不同的结构、但以与天然存在的核酸类似的方式发挥功能的化学化合物。此类类似物的实例包括但不限于硫代磷酸酯、

氨基磷酸酯、甲基磷酸酯、手性-甲基磷酸酯、2-0-甲基核糖核苷酸和肽-核酸(PNA)。

[0108] 术语“多肽”、“肽”和“蛋白”在本文中可互换使用来指氨基酸残基的聚合物,其中在实施方案中,所述聚合物可以缀合至不由氨基酸组成的部分。该术语适用于其中一个或多个氨基酸残基是相应天然存在的氨基酸的人工化学模拟物的氨基酸聚合物,以及适用于天然存在的氨基酸聚合物和非天然存在的氨基酸聚合物。“融合蛋白”是指重组表达为单一部分的编码两种或更多种分开的蛋白序列的嵌合蛋白。

[0109] 术语“肽基”和“肽基部分”意指单价肽。

[0110] 术语“氨基酸”是指天然存在和合成的氨基酸,以及氨基酸类似物和以与天然存在的氨基酸类似的方式发挥功能的氨基酸模拟物。天然存在的氨基酸为由基因密码编码的那些,以及随后修饰的那些氨基酸,例如羟脯氨酸、 γ -羧基谷氨酸和0-磷酸丝氨酸。氨基酸类似物是指具有与天然存在的氨基酸相同的基本化学结构(即与氢、羧基、氨基和R基团结合的 α 碳,所述R基团例如高丝氨酸、正亮氨酸、甲硫氨酸亚砷、甲硫氨酸甲基硫)的化合物。此类类似物具有修饰的R基团(例如正亮氨酸)或修饰的肽骨架,但保留与天然存在的氨基酸相同的基础化合物结构。氨基酸模拟物是指具有与氨基酸的一般化学结构不同的结构、但以与天然氨基酸类似的方式发挥功能的化学化合物。术语“非天然存在的氨基酸”和“非天然氨基酸”是指在自然界中未发现的氨基酸类似物、合成氨基酸和氨基酸模拟物。

[0111] 本文中可以通过其众所周知的三字母符号或通过IUPAC-IUB生物化学命名委员会推荐的单字母符号提及氨基酸。同样地,可以通过其普遍接受的单字母代码提及核苷酸。

[0112] “保守修饰的变体”适用于氨基酸和核酸序列两者。关于特定核酸序列,“保守修饰的变体”是指编码相同或基本上相同的氨基酸序列的那些核酸。由于遗传密码的简并性,许多核酸序列将编码任何给定蛋白。例如,密码子GCA、GCC、GCG和GCU都编码氨基酸丙氨酸。因此,在其中密码子指定丙氨酸的每个位置,密码子可以改变为所述的任何相应密码子而不改变编码的多肽。此类核酸变异是“沉默变异”,其是保守修饰变异的一种。本文中编码多肽的每个核酸序列也描述核酸的每种可能的沉默变异。技术人员将认识到,核酸中的每个密码子(除了AUG,其通常是甲硫氨酸的唯一密码子,和TGG,其通常是色氨酸的唯一密码子)可以被修饰以产生功能相同的分子。因此,编码多肽的核酸的每个沉默变异隐含在每个所述序列中。

[0113] 关于氨基酸序列,技术人员将认识到,对核酸、肽、多肽或蛋白序列的单个取代、缺失或添加(其改变、添加或缺失编码的序列中的单个氨基酸或小百分比的氨基酸)是“保守修饰的变体”,其中改变导致用化学上相似的氨基酸取代氨基酸。提供功能相似的氨基酸的保守取代表是本领域众所周知的。此类保守修饰的变体是对本发明的多态变体、种间同源物和等位基因的补充,并且不排除本发明的多态变体、种间同源物和等位基因。

[0114] 以下八组各自含有相互保守取代的氨基酸:

[0115] 1) 丙氨酸(A),甘氨酸(G);

[0116] 2) 天冬氨酸(D),谷氨酸(E);

[0117] 3) 天冬酰胺(N),谷氨酰胺(Q);

[0118] 4) 精氨酸(R),赖氨酸(K);

[0119] 5) 异亮氨酸(I),亮氨酸(L),甲硫氨酸(M),缬氨酸(V);

[0120] 6) 苯丙氨酸(F),酪氨酸(Y),色氨酸(W);

[0121] 7) 丝氨酸(S), 苏氨酸(T); 和

[0122] 8) 半胱氨酸(C), 甲硫氨酸(M) (参见, 例如, Creighton, Proteins (1984))。

[0123] 术语“参考…编号”或“对应于”, 当在给定氨基酸或多核苷酸序列的编号的上下文中使用时, 是指当给定氨基酸或多核苷酸序列与参考序列进行比较时指定参考序列的残基的编号。当蛋白中的氨基酸残基在蛋白内占据与给定残基相同的基本结构位置时, 其“对应于”给定残基。本领域技术人员将立即认识到具有不同编号系统的其他蛋白中对应于蛋白(例如, ROR-1)中的特定位置的残基的身份和位置。例如, 通过与蛋白(例如ROR-1)进行简单的序列比对, 在与所述蛋白比对的其他蛋白序列中鉴定对应于所述蛋白的特定位置的残基的身份和位置。例如, 当选择的残基占据与位置138的谷氨酸相同的基本空间或其他结构关系时, 选择的蛋白中的选择的残基对应于位置138的谷氨酸。在一些实施方案中, 在选择的蛋白与蛋白针对最大同源性进行比对时, 比对的选择的蛋白与谷氨酸138比对的位置据说对应于谷氨酸138。代替一级序列比对, 也可以使用三维结构比对, 例如, 其中选择的蛋白的结构与位置138的谷氨酸和所比较的总体结构针对最大对应性进行比对。在该情况下, 在结构模型中占据与谷氨酸138相同的基本位置的氨基酸据说对应于谷氨酸138残基。

[0124] “序列同一性百分比”通过将两条最佳比对序列经比对窗口进行比较来确定, 其中比对窗口中的多核苷酸或多肽序列的部分与用于两个序列的最佳比对的参考序列(其不包含添加或缺失)相比可以包含添加或缺失(即, 空位)。通过确定存在于两个序列中的相同核酸残基或氨基酸残基的位置的数量以得到匹配位置的数量、将匹配位置的数量除以比较窗口中位置的总数并将结果乘以100以得到序列同一性的百分比而计算百分比。

[0125] 在两个或更多个核酸或多肽序列的上下文中, 术语“相同”或百分比“同一性”是指两个或更多个序列或子序列, 当如使用以下序列比较算法之一或通过手动比对和目视检查所测量在比较窗口或指定区域上针对最大对应性进行比较和比对时, 所述序列或子序列是相同的或具有指定百分比的相同的氨基酸残基或核苷酸(即, 在指定区域, 例如本发明的整个多肽序列或本发明的多肽的各个结构域的指定区域上, 60%同一性, 任选地65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%同一性)。此类序列然后据说是“实质上相同的”。该定义也指测试序列的互补物。任选地, 同一性存在于长度为至少约50个核苷酸的区域上, 或更优选地长度为100至500或1000或更多个核苷酸的区域上。

[0126] 对于序列比较, 通常, 一个序列充当测试序列与其比较的参考序列。当使用序列比较算法时, 将测试和对照序列输入计算机, 然后指定坐标(如果需要), 并且指定序列算法程序参数。可以使用默认程序参数, 或者可以指定替代参数。然后, 序列比较算法基于程序参数计算测试序列相对于对照序列的序列同一性百分数。

[0127] 如本文所用的“比较窗口”包括与连续位置数的任一个的区段的参考, 所述连续位置数选自例如全长序列或20至600, 约50至约200, 或约100至约150个氨基酸或核苷酸, 其中序列可以在将两个序列最佳比对之后与相同的连续位置数的对照序列比较。用于比较的序列比对方法在本领域中众所周知。可以例如通过Smith和Waterman (1970) Adv. Appl. Math. 2: 482c的局部同源算法、通过Needleman和Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48: 443的同源比对算法、通过Pearson和Lipman (1988) Proc. Nat' l. Acad. Sci. USA 85: 2444的对于相似性方法的研究、通过这些算法的电脑化实施(在Wisconsin Genetics软件包中的GAP、BESTFIT、FASTA和TFASTA, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI)

或者通过人工比对和目测(参见,例如Ausubel等人,Current Protocols in Molecular Biology (1995增刊))来进行用于比较的最佳序列比对。

[0128] 适于测定序列同一性百分数和序列相似性的算法的实例为BLAST和BLAST2.0算法,其分别描述于Altschul等人(1977)Nuc.Acids Res.25:3389-3402和Altschul等人(1990)J.Mol.Biol.215:403-410中。进行BLAST分析的软件通过国家生物技术信息中心(在ncbi.nlm.nih.gov/的网站)而公开可得的。该算法涉及通过鉴定查询序列中长度W的短字段来首先鉴定高得分序列对(HSP),所述查询序列当与数据库序列的相同长度的字段比对时匹配或满足一些正-阈值得分T。T被称为邻域字段得分阈(Altschul等人,同上)。这些初始的邻域字段命中充当用于开始搜索的种子以找到含有它们的更长的HSP。字段命中在沿每一序列的两个方向上延伸,直到可以增加累积比对得分。对于核苷酸序列,使用参数M(匹配残基的对的奖励得分;通常>0)和N(错配残基的惩罚得分;通常<0)来计算累积得分。对于氨基酸序列,将得分矩阵用于计算累积得分。字段命中在每一方向的延伸当在下列情况时停止:累积比对得分从其最大实现值跌落数量X;累积得分由于一个或多个负-得分残基比对而达到0或以下;或者达到任一序列末端。BLAST算法参数W、T和X确定比对的灵敏度和速度。BLASTN程序(对于核苷酸序列)使用字段长度(W)为11、期望值(E)为10、M=5、N=-4以及两个链的比较作为默认值。对于氨基酸序列,BLASTP程序使用字段长度为3和期望值(E)为10及BLOSUM62得分矩阵(参见Henikoff和Henikoff(1989)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89:10915)、比对(B)为50、期望值(E)为10、M=5、N=-4以及两个链的比较作为默认值。

[0129] BLAST算法还进行两个序列之间的相似性的统计学分析(参见,例如,Karlin和Altschul(1993)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:5873-5787)。由BLAST算法提供了一种相似性量度是最小总和概率(P(N)),其提供了两个核苷酸或氨基酸序列之间偶然发生匹配的概率的指示。例如,如果在测试核酸与参考核酸的比较中的最小总和概率小于约0.2,更优选地小于约0.01,且最优选地小于约0.001,则认为核酸与参考序列相似。

[0130] 两个核酸序列或多肽基本上相同的指示是由第一核酸编码的多肽与针对由第二核酸编码的多肽产生的抗体在免疫学上交叉反应,如下所述。因此,多肽通常与第二多肽实质上相同,例如,其中两个肽仅通过保守取代而不同。两个核酸序列实质上相同的另一个指示是两个分子或它们的互补物在严格条件下与彼此杂交,如下所述。两个核酸序列实质上相同的另一个指示是相同的引物可用于扩增序列。

[0131] 术语“分离的”,当应用于蛋白时,表示该蛋白基本上不含与其天然状态相关的其他细胞组分。其优选处于均相状态,尽管其可以呈干燥或水溶液。纯度和均匀性通常使用分析化学技术诸如聚丙烯酰胺凝胶电泳或高效液相色谱测定。作为制剂中存在的主要物质的蛋白是实质上纯化的。术语“纯化的”表示蛋白在电泳凝胶中基本上产生一个条带。具体地,其意味着蛋白为至少85%纯,更优选至少95%纯,且最优选至少99%纯。

[0132] 短语“特异性(或选择性)结合”抗体或“与...特异性(或选择性)免疫反应”,当指蛋白或肽时,是指在蛋白和其他生物剂的异质群体中确定蛋白的存在的结合反应。因此,在指定的免疫测定条件下,指定的抗体以背景的至少两倍结合特定蛋白,并且实质上不以显著量结合样品中存在的其他蛋白。通常,特定或选择性反应将是背景信号或噪声的至少两倍,并且更通常是背景的多于10至100倍。

[0133] 如本文所用的“细胞”是指进行足以保存或复制其基因组DNA的代谢或其他功能的

细胞。细胞可以通过本领域众所周知的方法鉴定,所述方法包括例如完整膜的存在,通过特定染料染色,产生子代的能力,或者在配子的情况下,与第二配子组合以产生可行的后代的能力。细胞可以包括原核和真核细胞。原核细胞包括但不限于细菌。真核细胞包括但不限于酵母细胞和源自植物和动物的细胞,例如哺乳动物、昆虫(例如,夜蛾属)和人细胞。

[0134] 如本文所定义,术语“抑制(inhibition)”、“抑制(inhibit)”、“抑制(inhibiting)”等在提及蛋白-抑制剂(例如,受体拮抗剂或信号传导途径抑制剂)相互作用时意指相对于抑制剂不存在的情况下的蛋白活性或功能,消极地影响(例如降低)蛋白的活性或功能(例如,减少受体或蛋白的活性)。在一些实施方案中,抑制是指疾病或疾病症状(例如,癌症)的减少。因此,抑制包括至少部分、部分或完全阻断刺激;降低、预防或延迟活化;或失活、脱敏或下调信号转导或酶活性或蛋白的量。类似地,“抑制剂”是抑制受体或另一种蛋白(例如通过结合、部分或完全阻断、减少、预防、延迟、失活、脱敏或下调活性(例如,受体活性或蛋白活性)的化合物或蛋白。

[0135] 如本文提供的术语“BTK拮抗剂”是指与对照相比能够抑制BTK活性的物质。BTK的抑制活性可以是相比于对照中的10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更低。在某些情况下,抑制是相比于对照的1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍或更多倍。相对于不存在BTK拮抗剂,BTK拮抗剂抑制BTK活性,例如,通过至少部分地,部分或完全阻断BTK的刺激,减少,预防或延迟BTK的活化,或失活、脱敏或下调BTK的信号转导、活性或量。

[0136] 如本文提供的术语“ROR-1拮抗剂”是指与对照相比能够抑制ROR-1活性的物质。ROR-1的抑制活性可以是相比于对照中的10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更低。在某些情况下,抑制是相比于对照的1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍或更多倍。相对于不存在ROR-1拮抗剂,ROR-1拮抗剂抑制ROR-1活性,例如,通过至少部分地,部分或完全阻断ROR-1的刺激,减少,预防或延迟ROR-1的活化,或失活、脱敏或下调ROR-1的信号转导、活性或量。在实施方案中,所述ROR-1拮抗剂是抗体或小分子。

[0137] 术语“拮抗剂”可以替代地在本文中用作抑制剂。

[0138] 如本文所用的“治疗有效剂量或量”是指其被施用而产生效果(例如,治疗或预防疾病)的剂量。准确的剂量和制剂将取决于治疗目的,并且将由本领域技术人员使用已知技术而确定(参见,例如Lieberman, *Pharmaceutical Dosage Forms* (vols. 1-3, 1992); Lloyd, *The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding* (1999); Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 第20版, Gennaro, 编辑(2003)以及Pickar, *Dosage Calculations* (1999))。例如,对于给定参数,治疗有效量将显示至少5%、10%、15%、20%、25%、40%、50%、60%、75%、80%、90%或至少100%的增加或减少。治疗效力也可以表示为“倍数”增加或减少。例如,治疗有效量可以具有标准对照的至少1.2倍、1.5倍、2倍、5倍或更多倍的效果。治疗有效剂量或量可以改善疾病的一种或多种症状。当施用它的效果是治疗有发展疾病风险的人时,治疗有效剂量或量可以预防或延迟疾病或疾病的一种或多种症状的发作。

[0139] “抗癌剂”根据其平常普通的含义使用,并且是指具有抗肿瘤性质或抑制细胞生长或增殖的能力的组合物(例如化合物、药物、拮抗剂、抑制剂、调节剂)。在一些实施方案中,抗癌剂是化学治疗剂。在一些实施方案中,抗癌剂是本文鉴定的在治疗癌症的方法中具有效用的药剂。在一些实施方案中,抗癌剂是由FDA或除了USA以外的国家的类似管理机构批

准用于治疗癌症的药剂。抗癌剂的实例包括但不限于：MEK (例如MEK1、MEK2或MEK1和MEK2) 抑制剂 (例如XL518、CI-1040、PD035901、selumetinib/AZD6244、GSK1120212/trametinib、GDC-0973、ARRY-162、ARRY-300、AZD8330、PD0325901、U0126、PD98059、TAK-733、PD318088、AS703026、BAY 869766)、烷基化剂 (例如环磷酰胺、异环磷酰胺、苯丁酸氮芥、白消安、美法仑、甲二氯二乙胺、尿嘧啶氮芥、噻替派、亚硝基脲、氮芥类 (例如甲二氯二乙胺、环磷酰胺、苯丁酸氮芥、美法仑)、乙烯亚胺和甲基三聚氰胺 (例如六甲基三聚氰胺、噻替派)、烷基磺酸酯 (例如白消安)、亚硝基脲 (例如卡莫司汀、洛莫司汀、司莫司汀、链脲霉素)、三氮烯 (达卡巴嗪)、抗代谢物 (例如5-咪唑硫嘌呤、甲酰四氢叶酸、卡培他滨、氟达拉滨、吉西他滨、培替曲塞、雷替曲塞、叶酸类似物 (例如胺甲蝶呤) 或嘧啶类似物 (例如氟尿嘧啶、氟尿苷、阿糖胞苷)、嘌呤类似物 (例如巯基嘌呤、硫鸟嘌呤、喷司他丁) 等)、植物碱 (例如长春新碱、长春花碱、长春瑞滨、长春地辛、鬼臼毒素、紫杉醇、多西他赛等)、拓扑异构酶抑制剂 (例如伊立替康、拓扑替康、安吡啶、依托泊苷 (VP16)、依托泊苷磷酸盐、替尼泊苷等)、抗肿瘤抗生素 (例如多柔比星、阿霉素、道诺霉素、表柔比星、放线菌素、博莱霉素、丝裂霉素、米托蒽醌、普卡霉素等)、铂基化合物或含铂化合物 (例如顺铂、奥沙利铂、卡铂)、蒽二酮 (例如米托蒽醌)、经取代的脲 (例如羟基脲)、甲基胍衍生物 (例如丙卡巴胍)、肾上腺皮质抑制剂 (例如米托坦、氨鲁米特)、表鬼臼毒素 (例如依托泊苷)、抗生素 (例如道诺霉素、多柔比星、博莱霉素)、酶 (例如L-天门冬酰胺酶)、有丝分裂原活化的蛋白激酶信号传导的抑制剂 (例如U0126、PD98059、PD184352、PD0325901、ARRY-142886、SB239063、SP600125、BAY43-9006、渥曼青霉素或LY294002)、Syk抑制剂、mTOR抑制剂、抗体 (例如利克散)、棉籽酚、根纳三思、多酚E、Chlorofusin、全反式视黄酸 (ATRA)、苔藓抑素、肿瘤坏死因子相关的凋亡诱导配位体 (TRAIL)、5-氮杂-2'-脱氧胞苷、全反式视黄酸、多柔比星、长春新碱、依托泊苷、吉西他滨、依马替尼 (Gleevec.RTM.)、格尔德霉素、17-N-烯丙基氨基-17-去甲氧基格尔德霉素 (17-AAG)、夫拉平度、LY294002、硼替佐米、曲妥单抗、BAY11-7082、PKC412、PD184352、20-表-1, 25-二羟基维生素D3; 5-乙炔基尿嘧啶; 阿比特龙; 阿柔比星; 酰基富烯; 腺环戊醇; 阿多来新; 阿地白介素; ALL-TK拮抗剂; 六甲蜜胺; 氨莫司汀; 阿米多克; 氨磷汀; 氨基乙酰丙酸; 氨柔比星; 氨吡啶; 阿那格雷; 阿那曲唑; 穿心莲内酯; 血管生成抑制剂; 拮抗剂D; 拮抗剂G; 安雷利克斯; 抗背侧形态发生蛋白1; 抗雄激素、前列腺癌; 抗雌激素; 抗赘生剂; 反义寡核苷酸; 蚜肠菌素甘氨酸; 凋亡基因调节剂; 凋亡调节剂; 无嘌呤核酸; ara-CDP-DL-PTBA; 精氨酸脱氨酶; 阿舒莱灵; 阿他美坦; 阿莫司汀; 阿新他汀1; 阿新他汀2; 阿新他汀3; 阿扎斯琼; 阿扎霉素; 氮杂酪氨酸; 浆果赤霉素III衍生物; 巴拉诺; 巴马司他; BCR/ABL拮抗剂; 苯并二氢卟吩; 苯甲酰十字孢碱; β 内酰胺衍生物; β -阿来辛; β 克拉霉素B; 桦木酸; bFGF抑制剂; 比卡米特; 比生群; 双氮杂环丙基精胺; 双奈法德; 双枸缘酸环己噻卓酯A; 比折来新; 布雷福特; 溴匹立明; 布度钛; 丁胱亚磺基肟; 卡泊三醇; 卡弗他丁C; 喜树碱衍生物; 金丝雀痘IL-2; 卡培他滨; 甲酰胺-氨基-三唑; 甲酰胺基三唑; CaRestM3; CARN700; 软骨来源抑制剂; 卡折来新; 酪蛋白激酶抑制剂 (ICOS); 粟精胺; 杀菌肽B; 西曲瑞克; 二氢卟吩; 氯喹磺酰胺; 西卡前列素; 顺卟啉; 克拉屈滨; 克罗米芬类似物; 克霉唑; 考利斯霉素A; 考利斯霉素B; 风车子素A4; 风车子素类似物; 康进宁; 卡那贝西汀816; 克立那醇; 念珠藻素8; 念珠藻素A衍生物; 麻疯树毒素A; 环戊蒽醌; 环普拉坦; 塞培霉素; 阿糖胞苷十八烷基磷酸钠; 细胞溶解因子; 磷酸己烷雌酚; 达昔单抗; 地西他滨; 脱氢代代宁B; 地洛瑞林; 地塞米松; 右异环磷酰胺; 右雷佐生; 右

维拉帕米;地吡酮;代代宁B;二羟基苯并氧肟酸;二乙基正精胺;二氢-5-氮杂胞苷;9-二氧霉素;二苯基螺莫斯汀;二十二醇;多拉司琼;去氧氟尿苷;屈洛昔芬;屈大麻酚;倍癌霉素SA;依布硒;依考莫司汀;依地福新;依决洛单抗;依氟鸟氨酸;榄香烯;乙噻替氟;表柔比星;依立雄胺;雌莫司汀类似物;雌激素激动剂;雌激素拮抗剂;依他硝唑;磷酸依托泊苷;依西美坦;法倔唑;法扎拉滨;芬维A胺;非格司亭;非那雄胺;夫拉平度;氟卓斯汀;夫卢丝龙;氟达拉滨;盐酸氟柔红霉素;福酚美克;福美坦;福司曲星;福莫司汀;德吡啉钷;硝酸镓;加洛他滨;加尼瑞克;明胶酶抑制剂;吉西他滨;谷胱甘肽抑制剂;赫舒凡;神经调节蛋白;环己基双乙酰胺;金丝桃素;伊班膦酸;伊达比星;艾多昔芬;伊决孟酮;伊莫福新;伊洛马司他;咪唑并吡啶酮;咪喹莫特;免疫刺激肽;胰岛素样生长因子-1受体抑制剂;干扰素激动剂;干扰素;白介素;碘苄胍;碘阿霉素;4-甘薯苦醇;伊罗普拉;伊索拉定;异苯格唑;异高软海绵素B;伊他司琼;结丝立得;卡哈拉得F;三乙酸片螺素-N;兰瑞肽;雷纳霉素;来格司亭;硫酸蘑菇多糖;莱托斯汀;来曲唑;白血病抑制因子;白细胞 α 干扰素;亮丙瑞林+雌激素+孕酮;亮丙瑞林;左旋咪唑;利阿唑;直链多胺类似物;亲脂性二糖肽;亲脂性铂化合物;利索纳得7;洛铂;胍乙基磷酸丝氨酸;洛美曲索;氯尼达明;洛索萘醌;洛伐他汀;洛索立宾;勒托替康;德吡啉钷;莱索菲林;细胞溶解肽;美坦新;慢诺他汀A;马立马司他;马索罗酚;马斯平;基质溶解因子抑制剂;基质金属蛋白酶抑制剂;美诺立尔;硫巴妥苯胺;美替瑞林;甲硫氨酸酶;甲氧氯普胺;MIF抑制剂;米非司酮;米替福新;米立司亭;错配双链RNA;米托胍脞;二溴卫矛醇;丝裂霉素类似物;米托萘胺;米托毒素成纤维细胞生长因子-皂草毒蛋白;米托萘醌;莫法罗汀;莫拉司亭;单克隆抗体,人绒毛膜促性腺激素;单磷酸脂质A+分支杆菌细胞壁骨架;莫派达醇;多药抗性基因抑制剂;基于多肿瘤抑制剂1的疗法;芥类抗癌剂;印度洋海绵胺B;分枝杆菌细胞壁萃取物;米亚普龙;N-乙酰基地那林;经N-取代的苯甲酰胺;那法瑞林;那瑞替喷;纳洛酮+镇痛新;纳帕英;萘萘二醇;那托司亭;奈达铂;奈莫柔比星;奈立膦酸;中性内肽酶;尼鲁米特;尼萨霉素;氮氧化物调节剂;硝基氧抗氧化剂;尼多林;06-苄基鸟嘌呤;奥曲肽;奥可斯酮;寡核苷酸;奥那司酮;昂丹司琼;奥莱辛;口服细胞因子诱导剂;奥马铂;奥沙特隆;奥沙利铂;氧杂奥诺霉素;帕劳胺;棕榈酰根霉素;帕米磷酸;人参炔三醇;帕诺米芬;副菌铁素;帕折普汀;培门冬酶;培得星;戊聚硫钠;喷司他丁;喷托唑;全氟溴烷;培磷酰胺;紫苏子醇;苯那霉素;乙酸苯酯;磷酸酶抑制剂;皮西巴尼;盐酸毛果芸香碱;吡柔比星;吡曲克辛;胎盘素A;胎盘素B;纤溶酶原激活因子抑制剂;铂络合物;铂化合物;铂-三胺络合物;卜吩姆钠;泊非霉素;强的松;丙基双吡啶酮;前列腺素J2;蛋白酶体抑制剂;基于蛋白A的免疫调节剂;蛋白激酶C抑制剂;微藻蛋白激酶C抑制剂;蛋白酪氨酸磷酸酶抑制剂;嘌呤核苷磷酸化酶抑制剂;紫红素;吡唑啉吡啶;吡哆醛化血红蛋白聚氧乙烯缀合物;raf拮抗剂;雷替曲塞;雷莫司琼;ras法尼基蛋白转移酶抑制剂;ras抑制剂;ras-GAP抑制剂;去甲瑞替普汀;依替膦酸铈Re186;根霉素;核糖酶;RII维甲酰胺;罗谷亚胺;罗希吐碱;罗莫肽;罗喹美克;卢比格酮B1;卢伯西;沙芬戈;伞托平;SarCNU;萨可菲醇A;沙格司亭;Sdi1模拟物;司莫司汀;衰老来源抑制剂1;有义寡核苷酸;信号转导抑制剂;信号转导调节剂;单链抗原结合蛋白;西佐喃;索布佐生;硼卡钠;苯基乙酸钠;索尔醇;生长调节素结合蛋白;索纳明;膦门冬酸;斯卡霉素D;螺莫司汀;脾五肽;海绵他汀1;角鲨胺;干细胞抑制剂;干细胞分裂抑制剂;斯提酰胺;基质分解素抑制剂;斯菲诺辛;超活性血管活性肠肽拮抗剂;苏拉迪塔;苏拉明;苦马豆碱;合成粘多糖;他莫司汀;他莫昔芬甲碘化物;牛磺莫司汀;他扎罗汀;替可加

兰钠;替加氟;碇吡喃洋;端粒酶抑制剂;替莫泊芬;替莫唑胺;替尼泊昔;十氧化四氯;四佐胺;泰立拉汀;噻可拉林;血小板生成素;血小板生成素模拟物;胸腺法新;胸腺生成素受体激动剂;胸腺曲南;促甲状腺激素;本紫红素乙酯锡;替拉扎明;二氯环戊二烯钛;拓扑森汀;托瑞米芬;全能干细胞因子;翻译抑制剂;维甲酸;三乙酰基尿苷;曲西立滨;三甲曲沙;曲普瑞林;托烷司琼;妥罗雄脲;酪氨酸激酶抑制剂;酪氨酸磷酸化抑素;UBC抑制剂;乌苯美司;泌尿生殖窦来源生长抑制因子;尿激酶受体拮抗剂;伐普肽;瓦立奥林B;载体系统,红细胞基因疗法;维拉雷琐;藜芦明;瓦尔丁;维替泊芬;长春瑞滨;维夏汀;维他辛;伏氯唑;扎诺特隆;折尼铂;亚苾维C;净司他丁斯酯、阿霉素、更生霉素、博莱霉素、长春花碱、顺铂、阿西维辛;阿柔比星;盐酸阿考达唑;阿克罗宁;阿多来新;阿地白介素;六甲蜜胺;安波霉素;醋酸阿美萸醌;氨鲁米特;氨吡啶;阿那曲唑;安曲霉素;天门冬酰胺酶;曲林菌素;阿扎胞苷;氮替派;固氮霉素;巴马司他;苾替派;比卡米特;盐酸比生群;二甲磺酸双奈法德;比折来新;硫酸博来霉素;布喹那钠;溴匹立明;白消安;放线菌素C;二甲睾酮;卡拉酰胺;卡贝替姆;卡铂;卡莫司汀;盐酸卡柔比星;卡折来新;西地芬戈;苯丁酸氮芥;西罗霉素;克拉屈滨;甲磺酸克立那托;环磷酰胺;阿糖胞苷;达卡巴嗪;盐酸道诺霉素;地西他滨;右奥马铂;地扎瓜宁;甲磺酸地扎瓜宁;地吡啶;多柔比星;盐酸多柔比星;屈洛昔芬;柠檬酸屈洛昔芬;丙酸屈他雄酮;达佐霉素;依达曲沙;盐酸依氟鸟氨酸;依沙芦星;恩洛铂;恩普氨酯;依匹哌啶;盐酸表柔比星;厄布洛唑;盐酸伊索比星;雌莫斯汀;雌莫司汀磷酸钠;依他硝唑;依托泊苷;磷酸依托泊苷;艾托卜宁;盐酸法倔唑;法扎拉滨;芬维A胺;氟尿苷;磷酸氟达拉滨;氟尿嘧啶;氟西他滨;磷喹酮;福司曲星钠;吉西他滨;盐酸吉西他滨;羟基脲;盐酸伊达比星;异环磷酰胺;伊莫福新;白介素II(包括重组白介素II或r1L.sub.2);干扰素 α -2a;干扰素 α -2b;干扰素 α -n1;干扰素 α -n3;干扰素 β -1a;干扰素 γ -1b;异丙铂;盐酸伊立替康;醋酸兰瑞肽;来曲唑;醋酸亮丙瑞林;盐酸立阿唑;洛美曲索钠;洛莫司汀;盐酸洛索萸醌;马索罗酚;美登素;盐酸甲二氯二乙胺;醋酸甲地孕酮;醋酸美仑孕酮;美法仑;美诺立尔;巯基嘌呤;氨甲喋呤;氨甲喋呤钠;氯苯氨啶;美妥替哌;米度胺;米托卡星;丝裂红体;米托洁林;米托马星;丝裂霉素;米托司培;米托坦;盐酸米托萸醌;霉酚酸;诺考达唑;诺加霉素;奥马铂;奥昔舒仑;培门冬酶;培利霉素;戊氮芥;硫酸培洛霉素;培磷酰胺;哌泊溴烷;哌泊舒凡;盐酸吡罗萸醌;普卡霉素;普洛美坦;卜吩姆钠;泊非霉素;泼尼氮芥;盐酸丙卡巴肼;嘌呤霉素;盐酸嘌呤霉素;吡唑呋林;利波腺苷;罗谷亚胺;沙芬戈;盐酸沙芬戈;司莫司汀;辛曲秦;磷乙酰天门冬氨酸钠;司帕霉素;盐酸螺旋锗;螺莫司汀;螺铂;链黑霉素;链脲霉素;磺氯苯脲;他利霉素;替可加兰钠;替加氟;盐酸替洛萸醌;替莫泊芬;替尼泊昔;替罗昔隆;睾内酯;硫咪嘌呤;硫鸟嘌呤;塞替派;噻唑呋林;替拉扎明;柠檬酸托瑞米芬;醋酸曲托龙;磷酸曲西立滨;三甲曲沙;葡糖醛酸三甲曲沙;曲普瑞林;盐酸妥布氯唑;尿嘧啶氮芥;乌瑞替派;伐普肽;维替泊芬;硫酸长春碱;硫酸长春新碱;长春地辛;硫酸长春地辛;硫酸长春匹定;硫酸长春苷酯;硫酸长春罗辛;酒石酸长春瑞滨;硫酸长春罗定;硫酸长春利定;伏氯唑;折尼铂;净司他丁;盐酸佐柔比星、使细胞停滞在G2-M期和/或调节微管形成或稳定性的药剂(例如Taxol.TM(即紫杉醇)、Taxotere.TM、包含紫杉烷骨架的化合物、厄布洛唑(即,R-55104)、多拉司他汀10(即,DLS-10和NSC-376128)、依西酸米伏布林(即,CI-980)、长春新碱、NSC-639829、圆皮海绵内酯(即,NVP-XX-A-296)、ABT-751(Abbott,即E-7010)、海洋素(例如海洋素A和海洋素C)、海绵抑素(例如海绵抑素1、海绵抑素2、海绵抑素3、海绵抑素4、海绵抑素5、海绵抑素6、

海绵抑素7、海绵抑素8和海绵抑素9)、盐酸西马多丁(即,LU-103793和NSC-D-669356)、埃博霉素(例如埃博霉素A、埃博霉素B、埃博霉素C(即,去氧埃博霉素A或dEpoA)、埃博霉素D(即,KOS-862、dEpoB和去氧埃博霉素B)、埃博霉素E、埃博霉素F、埃博霉素BN-氧化物、埃博霉素AN-氧化物、16-氮杂-埃博霉素B、21-氨基埃博霉素B(即,BMS-310705)、21-羟基埃博霉素D(即,去氧埃博霉素F和dEpoF)、26-氟埃博霉素、奥里斯他汀PE(即,NSC-654663)、索博列多汀(即,TZT-1027)、硫酸长春新碱、念珠藻素52(即,LY-355703)、维替乐福酰胺、微管溶素A、卡纳登素、矢车菊黄素(即,NSC-106969)、奥克西丁A1(即,BT0-956和DIME)、福佳立德B、劳马立德、那可丁(也称为NSC-5366)、那可平、哈密特林、乙酸丙酮二茂钒、蒙萨曲尔、因诺可(即,NSC-698666)、伊斯罗宾(诸如去甲伊斯罗宾、去乙酰伊斯罗宾、异伊斯罗宾A和Z-伊斯罗宾)、卡巴斯德、卡巴林、软海绵素B、二唑酰胺A、箭根薯酮内酯A、戴佐斯他汀、(-)-苯阿斯汀(即,NSCL-96F037)、肌基质蛋白B、瑞伐斯他汀磷酸钠、类固醇(例如地塞米松)、非那雄胺、芳香酶抑制剂、诸如戈舍瑞林或亮丙瑞林的促性腺激素释放激素促效剂(GnRH)、肾上腺类固醇(例如强的松)、孕酮(例如己酸羟孕酮、醋酸甲地孕酮、醋酸甲羟孕酮)、雌激素(例如己烯雌酚、乙炔雌二醇)、抗雌激素(例如他莫西芬)、雄激素(例如丙酸睾酮、氟羟甲睾酮)、抗雄激素(例如氟他胺)、免疫刺激剂(例如卡介苗(BCG)、左旋咪唑、白介素-2、 α -干扰素等)、单株抗体(例如抗CD20、抗HER2、抗CD52、抗HLA-DR和抗VEGF单克隆抗体)、免疫毒素(例如抗CD33单克隆抗体-卡奇霉素缀合物、抗CD22单克隆抗体-假单胞菌外毒素缀合物等)、放射免疫疗法(例如抗CD20单克隆抗体与 ^{111}In 、 ^{90}Y 或 ^{131}I 的缀合物等)、雷公藤内酯、高三尖杉酯碱、更生霉素、多柔比星、表柔比星、拓扑替康、依曲康唑、长春地辛、西立伐他汀、长春新碱、脱氧腺苷、舍曲林、匹伐他汀、伊立替康、氯苯吩嗪、5-壬基氧基色胺、维罗非尼、达拉菲尼、埃罗替尼、吉非替尼、EGFR抑制剂、表皮生长因子受体(EGFR)靶向疗法或治疗剂(例如吉非替尼(IressaTM)、埃罗替尼(TarcevaTM)、西妥昔单抗(ErbituxTM)、拉帕替尼(TykerbTM)、帕尼单抗(VectibixTM)、凡德他尼(CaprelsaTM)、阿法替尼/BIBW2992、CI-1033/卡奈替尼、来那替尼/HKI-272、CP-724714、TAK-285、AST-1306、ARRY334543、ARRY-380、AG-1478、达克替尼/PF299804、OSI-420/去甲埃罗替尼、AZD8931、AEE788、培利替尼/EKB-569、CUDC-101、WZ8040、WZ4002、WZ3146、AG-490、XL647、PD153035、BMS-599626)、索拉非尼、伊马替尼、舒尼替尼、达沙替尼、激素疗法等等。

[0140] 术语“依鲁替尼”,也称为Imbruvica[®]、PCI 32765等,在通常和常规意义上是指1-[(3R)-3-[4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基]哌啶-1-基]丙-2-烯-1-酮(CAS登记号936563-96-1)。在实施方案中,所述BTK拮抗剂是美国专利号7,514,444;8,008,309;8,497,277;8,476,284;8,697,711和8,703,780(其以其整体通过引用并入本文并用于所有目的)中公开的任一种化合物。

[0141] 术语“艾代拉里斯(idelalisib)”,也称为CAL101、GS-1101、Zydelig[®]等,在通常和常规意义上是指5-氟-3-苯基-2-[(1S)-1-(7H-嘌呤-6-基氨基)丙基]-4(3H)-喹啉啉酮(CAS登记号870281-82-6)。在实施方案中,所述BTK拮抗剂是美国专利号9,469,643;9,492,449;8,139,195;8,492,389;8,865,730;和9,149,477(其以其整体通过引用并入本文并用于所有目的)中公开的任一种化合物。

[0142] 术语“R406”等在通常和常规意义上是指6-((5-氟-2-((3,4,5-三甲氧基苯基)氨基)嘧啶-4-基)氨基)-2,2-二甲基-2H-吡啶并[3,2-b][1,4]噁嗪-3(4H)-酮苯磺酸盐。

[0143] 术语“福他替尼(fostamatinib)”等在通常和常规意义上是指6-((5-氟-2-((3,4,5-三甲氧基苯基)氨基)嘧啶-4-基)氨基)-2,2-二甲基-2H-吡啶并[3,2-b][1,4]噁嗪-3(4H)-酮苯磺酸盐(CAS登记号901119-35-5或1025687-58-4(二钠盐))。福他替尼是R406的前药。在实施方案中,所述BTK拮抗剂是美国专利号7,449,458(其以其整体通过引用并入本文并用于所有目的)中公开的任一种化合物。

[0144] 术语“阿卡替尼(acalabrutinib)”,也称为ACP-196等,在通常和常规意义上是指4-[8-氨基-3-[(2S)-1-丁-2-炔酰基吡咯烷-2-基]咪唑并[1,5-a]吡嗪-1-基]-N-吡啶-2-基苯甲酰胺(CAS登记号1420477-60-6)。在实施方案中,所述BTK拮抗剂是美国专利申请号20140155385、20160151364、20160159810(其以其整体通过引用并入本文并用于所有目的)中公开的任一种化合物。

[0145] 术语“ON0/GS-4059”等在通常和常规意义上是指6-氨基-7-(4-苯氧基苯基)-9-[(3S)-1-丙-2-烯酰基哌啶-3-基]嘌呤-8-酮(CAS登记号1351636-18-4)。在实施方案中,所述BTK拮抗剂是美国专利号8,940,725和8,557,803以及美国专利申请号20150094299(其以其整体通过引用并入本文并用于所有目的)中公开的任一种化合物。

[0146] 术语“BGB-3111”等在通常和常规意义上是指2-(4-苯氧基苯基)-7-(1-丙-2-烯酰基哌啶-4-基)-1,5,6,7-四氢吡唑并[1,5-a]嘧啶-3-甲酰胺(CAS登记号1633350-06-7)。在实施方案中,所述BTK拮抗剂是美国专利申请号20150259354和20160083392(其以其整体通过引用并入本文并用于所有目的)中公开的任一种化合物。

[0147] 术语“CC-292”,也称为AVL-292、spebrutinib等,在通常和常规意义上是指N-[3-[[5-氟-2-[4-(2-甲氧基乙氧基)]苯胺基]嘧啶-4-基]氨基]苯基]丙-2-烯酰胺(CAS登记号1202757-89-8)。在实施方案中,所述BTK拮抗剂是美国专利号8,338,439(其以其整体通过引用并入本文并用于所有目的)中公开的任一种化合物。

[0148] 术语“cirmtuzumab”、“UC-961”和“99961.1”是指能够结合人受体酪氨酸激酶样孤儿受体1(ROR-1)的细胞外结构域的人源化单克隆抗体。在实施方案中,cirmtuzumab是公开于美国专利申请号14/422,519(其以其整体通过引用并入本文并用于所有目的)的任一种抗体或其片段。

[0149] 如本文所用,术语“约”意指包括指定值的一系列值,本领域普通技术人员认为其与指定值合理相似。在实施方案中,约意指使用本领域通常可接受的测量的标准偏差内。在实施方案中,约意指延伸至指定值的 $\pm 10\%$ 的范围。在实施方案中,约意指指定值。

[0150] 术语“疾病”或“病况”是指能够用本文提供的化合物、药物组合物或方法治疗的患者或受试者的存在状态或健康状况。在实施方案中,所述疾病是癌症(例如肺癌、卵巢癌、骨肉瘤、膀胱癌、宫颈癌、肝癌、肾癌、皮肤癌(例如,Merkel细胞癌)、睾丸癌、白血病、淋巴瘤、头颈癌、结肠直肠癌、前列腺癌、胰腺癌、黑色素瘤、乳腺癌、神经母细胞瘤)。所述疾病可以是自身免疫性疾病、炎症性疾病、癌症、感染性疾病、代谢性疾病、发育疾病、心血管疾病、肝脏疾病、肠道疾病、内分泌疾病、神经疾病或其他疾病。

[0151] 如本文所用,术语“癌症”是指在哺乳动物中发现的所有类型的癌症、赘生物或恶性肿瘤,包括白血病、淋巴瘤、黑色素瘤、神经内分泌肿瘤、癌和肉瘤。可用本文提供的化合物、药物组合物或方法治疗的示例性癌症包括淋巴瘤、肉瘤、膀胱癌、骨癌、脑瘤、子宫颈癌、结肠癌、食道癌、胃癌、头颈癌、肾癌、骨髓瘤、甲状腺癌、白血病、前列腺癌、乳腺癌(例如,三

阴性、ER阳性、ER阴性、化疗抗性、赫塞汀 (herceptin) 抗性、HER2阳性、多柔比星 (doxorubicin) 抗性、他莫西芬 (tamoxifen) 抗性、导管癌、小叶癌、原发性、转移性)、卵巢癌、胰腺癌、肝癌 (例如, 肝细胞癌)、肺癌 (例如, 非小细胞肺癌、鳞状细胞肺癌、腺癌、大细胞肺癌、小细胞肺癌、类癌、肉瘤)、多形性胶质母细胞瘤、胶质瘤、黑色素瘤、前列腺癌、去势抵抗性的前列腺癌、乳腺癌、三阴性乳腺癌、胶质母细胞瘤、卵巢癌、肺癌、鳞状细胞癌 (例如, 头、颈或食道)、结肠直肠癌、白血病、急性骨髓性白血病、淋巴瘤、B细胞淋巴瘤或多发性骨髓瘤。额外实例包括: 甲状腺癌、内分泌系统癌、脑癌、乳腺癌、子宫颈癌、结肠癌、头颈癌、食道癌、肝癌、肾癌、肺癌、非小细胞肺癌、黑色素瘤、间皮瘤、卵巢癌、肉瘤、胃癌、子宫癌或成神经管细胞瘤、霍奇金氏症 (Hodgkin's disease)、非霍奇金氏淋巴瘤、多发性骨髓瘤、神经母细胞瘤、胶质瘤、多形性胶质母细胞瘤、卵巢癌、横纹肌肉瘤、原发性血小板增多症、原发性巨球蛋白血症、原发性脑瘤、癌症、恶性胰腺胰岛素瘤、恶性类癌、泌尿膀胱癌、恶性前期皮肤病变、睾丸癌、淋巴瘤、甲状腺癌、神经母细胞瘤、食道癌、生殖泌尿道癌、恶性高血钙症、子宫内膜癌、肾上腺皮质腺癌、内分泌或外分泌胰腺的新生瘤、髓质甲状腺癌、髓质甲状腺癌、黑色素瘤、结肠直肠癌、乳突状甲状腺癌、肝细胞癌、乳头佩吉特氏 (Paget's) 症、叶状肿瘤、小叶癌、导管癌、胰脏星形细胞的癌症、肝脏星形细胞的癌症或前列腺癌。

[0152] 术语“白血病”广义上是指血液形成器官的渐进性恶性肿瘤并且通常特征在于血液和骨髓中的白细胞和其前细胞的畸态增殖和发育。白血病在临床上通常基于以下各项进行分类: (1) 疾病的持续时间和特征: 急性或慢性; (2) 所涉及的细胞类型: 骨髓 (骨髓原性)、淋巴样 (淋巴原性) 或单核细胞性; 和 (3) 血液中的异常细胞数目增加或不增加-白血性或非白血性 (亚白血性)。可用本文提供的化合物、药物组合物或方法治疗的示例性白血病包括, 例如, 急性非淋巴细胞性白血病、慢性淋巴细胞性白血病、急性粒细胞性白血病、慢性粒细胞性白血病、急性早幼粒细胞性白血病、成人T细胞白血病、非白血性白血病、白细胞不增多性白血病、嗜碱性粒细胞性白血病、母细胞白血病、牛白血病、慢性粒细胞性白血病、皮肤白血病、胚细胞性白血病、嗜酸性粒细胞性白血病、格罗斯氏白血病、毛细胞白血病、成血细胞性白血病、血胚细胞性白血病、组织细胞性白血病、干细胞性白血病、急性单核细胞性白血病、白细胞减少性白血病、淋巴样白血病、成淋巴细胞白血病、淋巴细胞性白血病、淋巴细胞原白血病、淋巴系白血病、淋巴肉瘤白血病、肥大细胞白血病、巨核细胞白血病、小原粒型白血病、单核细胞白血病、髓细胞白血病、髓细胞性白血病、骨髓性粒细胞性白血病、粒单核细胞性白血病、内格利型白血病、浆细胞白血病、多发性骨髓瘤、浆细胞性白血病、早幼粒细胞性白血病、里德尔细胞白血病、希林氏白血病、干细胞白血病、亚白血性白血病或未分化细胞性白血病。

[0153] 术语“肉瘤”通常是指由胚性结缔组织样物质组成的肿瘤并且通常包括嵌入纤维状或均质物质中的紧密堆积的细胞。可用本文提供的化合物、药物组合物或方法治疗的肉瘤包括软骨肉瘤、纤维肉瘤、淋巴肉瘤、黑色素肉瘤、粘液肉瘤、骨肉瘤、Abemethy氏肉瘤、脂肉瘤、脂肪肉瘤、泡状软部肉瘤、成釉细胞肉瘤、葡萄样肉瘤、绿色肉瘤、绒膜癌、胚胎性肉瘤、韦尔姆斯氏肉瘤、子宫内膜肉瘤、基质肉瘤、尤因氏肉瘤、筋膜肉瘤、成纤维细胞肉瘤、巨细胞肉瘤、粒细胞肉瘤、霍奇金氏肉瘤、自发多发性有色出血性肉瘤、B细胞成免疫细胞肉瘤、淋巴瘤、T细胞成免疫细胞肉瘤、Jensen氏肉瘤、卡波西氏肉瘤、枯氏细胞肉瘤、血管肉瘤、白血病性肉瘤、恶性间叶瘤肉瘤、骨膜外肉瘤、网状细胞肉瘤、鲁斯氏肉瘤、浆液囊性肉

瘤、滑膜肉瘤或毛细管扩张肉瘤。

[0154] 术语“黑色素瘤”被视为意指由皮肤和其他器官的黑色素细胞系统产生的肿瘤。可用本文提供的化合物、药物组合物或方法治疗的黑色素瘤包括,例如,肢端雀斑样痣黑色素瘤、无黑色素性黑色素瘤、良性青少年性黑色素瘤、Cloudman氏黑色素瘤、S91黑色素瘤、哈-帕二氏黑色素瘤、青少年性黑色素瘤、恶性雀斑样痣黑色素瘤、恶性黑色素瘤、结节性黑色素瘤、甲下黑色素瘤或浅表扩散性黑色素瘤。

[0155] 术语“癌瘤(carcinoma)”是指倾向于浸润周围组织且引起转移的由上皮细胞组成的恶性新生物。可用本文提供的化合物、药物组合物或方法治疗的示例性癌瘤包括,例如,甲状腺髓样癌、家族性甲状腺髓样癌、腺泡癌、腺泡性癌、腺囊性癌、腺样囊性癌、腺癌、肾上腺皮质癌、肺泡癌、肺泡细胞癌、基底细胞癌、基底细胞性癌、类基底细胞癌、基底鳞状细胞癌、细支气管肺泡癌、细支气管癌、支气管癌、髓样癌、胆管细胞癌、绒膜癌、胶样癌、粉刺癌、子宫体癌、筛状癌、铠甲状癌、皮肤癌、柱状癌、柱状细胞癌、管癌、导管癌、硬癌、胚胎癌、类髓癌、表皮样癌、腺样上皮细胞癌、外植癌、溃疡性癌、硬纤维癌、胶样癌、凝胶状癌、巨细胞癌、巨细胞性癌、腺癌、粒层细胞癌、发母质癌、多血癌、肝细胞癌、许特莱氏细胞癌、粘液癌、类粘液癌、幼稚型胚胎性癌、原位癌、表皮内癌、上皮内癌、克罗姆佩柯赫尔氏癌、汇集物尔契茨基氏细胞癌、大细胞癌、豆样癌、豆状癌、脂肪瘤癌、小叶癌、淋巴上皮癌、髓质癌、髓样癌、黑色素癌、软癌、胶样癌、粘液癌、粘液细胞癌、粘液表皮样癌、粘液癌、粘液性癌、粘液瘤样癌、鼻咽癌、燕麦细胞癌、骨样癌、类骨质癌、乳头状癌、门脉周癌、侵袭前癌、蜂状上皮细胞癌、软癌、肾脏肾细胞癌、贮备细胞癌、梭形细胞癌、施奈德癌、硬癌、阴囊癌、印戒细胞癌、单纯癌、小细胞癌、马铃薯状癌、球状细胞癌、绳捆癌、海绵体癌、鳞状癌、鳞状细胞癌、线癌、血管扩张性癌、血管扩张癌、移行细胞癌、结节性皮癌、小管癌、结节状皮癌、疣状癌或绒毛状癌。

[0156] 如本文所用,术语“癌转移”、“癌转移性”和“转移性癌症”可互换使用,并且指增殖性疾病或病症(例如癌症)从一个器官或另一个非相邻器官或身体部分的扩散。癌症发生在起源部位,例如乳房,该部位被称为原发性肿瘤,例如原发性乳腺癌。原发肿瘤或起源部位的一些癌细胞获取穿透和渗透局部区域周围正常组织的能力和/或穿透淋巴系统或血管系统的壁、通过系统循环至身体中的其他部位和组织的能力。由原发性肿瘤的癌细胞形成的第二临床可检测肿瘤被称为转移性或继发性肿瘤。当癌细胞转移时,假定转移性肿瘤及其细胞与原始肿瘤的那些相似。因此,如果肺癌转移至乳房,则乳房部位的继发性肿瘤由异常的肺细胞而非异常的乳房细胞组成。乳房中的继发性肿瘤被称为转移性肺癌。因此,短语转移性癌症是指其中受试者具有或曾具有原发性肿瘤且具有一种或多种继发性肿瘤的疾病。短语非转移性癌症或具有非转移性癌症的受试者是指其中受试者具有原发性肿瘤但不具有一种或多种继发性肿瘤的疾病。例如,转移性肺癌是指具有原发性肺肿瘤或具有原发性肺肿瘤的病史且在第二位置或多个位置(例如,在乳房中)具有一种或多种继发性肿瘤的受试者中的疾病。

[0157] 与疾病(例如,糖尿病、癌症(例如前列腺癌、肾癌、转移性癌症、黑色素瘤、去势抵抗性前列腺癌、乳腺癌、三阴性乳腺癌、胶质母细胞瘤、卵巢癌、肺癌、鳞状细胞癌(例如,头、颈或食道)、结肠直肠癌、白血病、急性髓性白血病、淋巴瘤、B细胞淋巴瘤或多发性骨髓瘤))相关的物质或物质活动或功能的上下文中的术语“相关”或“与...相关”意味着疾病(例如肺

癌、卵巢癌、骨肉瘤、膀胱癌、宫颈癌、肝癌、肾癌、皮肤癌(例如,Merkel细胞癌)、睾丸癌、白血病、淋巴瘤、头颈癌、结肠直肠癌、前列腺癌、胰腺癌、黑色素瘤、乳腺癌、神经母细胞瘤)(全部或部分)由物质或物质活性或功能引起,或所述疾病的症状(全部或部分)由物质或物质活性或功能引起。

[0158] “患者”或“有需要的受试者”是指患有或易患疾病或病况的活生物体,所述疾病或病况可通过施用如本文提供的组合物或药物组合物来治疗。非限制性实例包括人、其他哺乳动物、牛、大鼠、小鼠、狗、猴、山羊、绵羊、牛、鹿和其他非哺乳动物。在一些实施方案中,患者是人。

[0159] 方法

[0160] 本文提供的方法尤其可用于治疗癌症。在实施方案中,如本文所述的方法和组合物提供了表达ROR-1的癌症的有效治疗。在一个方面提供了治疗有需要的受试者中的癌症的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的布鲁顿氏酪氨酸激酶(BTK)拮抗剂和酪氨酸激酶样孤儿受体1(ROR-1)拮抗剂。

[0161] 在另一个方面,提供了治疗有需要的受试者中的癌症的方法。所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的布鲁顿氏酪氨酸激酶(BTK)拮抗剂和抗ROR-1抗体。

[0162] 如本文所用的术语“布鲁顿氏酪氨酸激酶”,也称为酪氨酸-蛋白激酶BTK,是指任何重组体或天然存在形式的布鲁顿氏酪氨酸激酶(BTK)或其维持BTK活性(例如,相比于BTK的至少50%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%内的活性)的变体或同系物。在一些方面,所述变体或同系物相比于天然存在的BTK蛋白在完整序列或部分序列(例如,50、100、150或200个连续氨基酸部分)具有至少90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%氨基酸序列同一性。在实施方案中,BTK蛋白与UniProt参考编号Q01687标识的蛋白或与其具有实质同一性的变体或同系物是实质上相同的。

[0163] 在实施方案中,所述BTK拮抗剂是小分子。在实施方案中,所述BTK拮抗剂是依鲁替尼(ibrutinib)、艾代拉里斯(idelalisib)、福他替尼(fostamatinib)、阿卡替尼(acalabrutinib)、ONO/GS-4059、BGB-3111或CC-292(AVL-292)。在实施方案中,所述BTK拮抗剂是依鲁替尼(ibrutinib)。在实施方案中,所述BTK拮抗剂是艾代拉里斯(idelalisib)。在实施方案中,所述BTK拮抗剂是福他替尼(fostamatinib)。在实施方案中,所述BTK拮抗剂是阿卡替尼(acalabrutinib)。在实施方案中,所述BTK拮抗剂是ONO/GS-4059。在实施方案中,所述BTK拮抗剂是BGB-3111。在实施方案中,所述BTK拮抗剂是CC-292(AVL-292)。在实施方案中,所述BTK拮抗剂是R406。

[0164] 如本文所用的术语“ROR-1”是指任何重组体或天然存在形式的酪氨酸激酶样孤儿受体1(ROR-1)或其维持ROR-1活性(例如,相比于ROR-1的至少50%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%内的活性)的变体或同系物。在一些方面,所述变体或同系物相比于天然存在的ROR-1蛋白在完整序列或部分序列(例如,50、100、150或200个连续氨基酸部分)具有至少90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%氨基酸序列同一性。在实施方案中,所述ROR-1蛋白与登录号NP_005003.1标识的蛋白或与其具有实质同一性的变体或同系物是实质上相同的。在实施方案中,所述ROR-1蛋白包括SEQ ID NO:13的氨基酸序列。在实施方案中,所述ROR-1蛋白是SEQ ID NO:13的氨基酸序列。在实施方案中,所述ROR-1蛋白包括SEQ ID NO:14的氨基酸序列。在实施方案中,所述ROR-1蛋白包括SEQ ID NO:15的氨基酸序

列。

[0165] 在ROR-1拮抗剂是抗体的情况下,所述抗体特异性结合ROR-1多肽。因此,在实施方案中,所述ROR-1拮抗剂是抗ROR-1抗体。在实施方案中,所述抗ROR-1抗体是人源化抗体。

[0166] 所述抗ROR-1抗体可以包括容许其结合一部分ROR-1多肽或其片段的氨基酸序列(例如,CDR)。因此,在实施方案中,所述抗体包括人源化重链可变区和人源化轻链可变区,其中所述人源化重链可变区包括SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3中所示的序列,且其中所述人源化轻链可变区包括SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6中所示的序列。

[0167] 在实施方案中,所述抗体是cirmtuzumab。如本文所定义的cirmtuzumab在本文中也称为UC-961或99961.1.cirmtuzumab的开发和结构公开于美国专利申请号14/422,519,其以其整体通过引用并入本文并用于所有目的。

[0168] 在实施方案中,所述抗体包括人源化重链可变区和人源化轻链可变区,其中所述人源化重链可变区包括SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:9中所示的序列,且其中所述人源化轻链可变区包括SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12中所示的序列。包括由SEQ ID NO:7、8、9、10、11、12所示的氨基酸序列(即CDRs)的抗体可在本文中称为抗体D10。抗体D10的开发和使用公开于美国专利号9,217,040,其以其整体通过引用并入本文并用于所有目的。

[0169] 在实施方案中,所述抗体结合ROR-1的氨基酸130-160或其片段。在实施方案中,所述抗体结合包括在对应于ROR-1的位置138的位置处的谷氨酸的肽。在实施方案中,所述抗体特异性结合ROR-1蛋白的细胞外结构域的3'或中间Ig样区。在实施方案中,所述抗体结合ROR-1蛋白的细胞外结构域的位置1-147的Ig样区的3'端。

[0170] 在实施方案中,所述抗体抑制癌转移。在实施方案中,所述抗体是抗体片段。在实施方案中,所述抗体是人抗体。在实施方案中,所述抗体是人源化抗体。在实施方案中,所述抗体是嵌合抗体。在实施方案中,所述抗体是单链抗体。

[0171] 在实施方案中,所述抗体具有约500pM至约6nM的结合亲和力。在实施方案中,所述抗体具有约550pM至约6nM的结合亲和力。在实施方案中,所述抗体具有约600pM至约6nM的结合亲和力。在实施方案中,所述抗体具有约650pM至约6nM的结合亲和力。在实施方案中,所述抗体具有约700pM至约6nM的结合亲和力。在实施方案中,所述抗体具有约750pM至约6nM的结合亲和力。在实施方案中,所述抗体具有约800pM至约6nM的结合亲和力。在实施方案中,所述抗体具有约850pM至约6nM的结合亲和力。在实施方案中,所述抗体具有约900pM至约6nM的结合亲和力。在实施方案中,所述抗体具有约950pM至约6nM的结合亲和力。在实施方案中,所述抗体具有约1nM至约6nM的结合亲和力。在实施方案中,所述抗体具有约1nM至约6nM的结合亲和力。在实施方案中,所述抗体具有约1.5nM至约6nM的结合亲和力。在实施方案中,所述抗体具有约2nM至约6nM的结合亲和力。在实施方案中,所述抗体具有约2.5nM至约6nM的结合亲和力。在实施方案中,所述抗体具有约3nM至约6nM的结合亲和力。在实施方案中,所述抗体具有约3.5nM至约6nM的结合亲和力。在实施方案中,所述抗体具有约4nM至约6nM的结合亲和力。在实施方案中,所述抗体具有约4.5nM至约6nM的结合亲和力。在实施方案中,所述抗体具有约5nM至约6nM的结合亲和力。在实施方案中,所述抗体具有约5.5nM至约6nM的结合亲和力。

抗体具有500pM至800pM的结合亲和力。在实施方案中,所述抗体具有500pM至750pM的结合亲和力。在实施方案中,所述抗体具有500pM至700pM的结合亲和力。在实施方案中,所述抗体具有500pM至650pM的结合亲和力。在实施方案中,所述抗体具有500pM至600pM的结合亲和力。在实施方案中,所述抗体具有500pM至550pM的结合亲和力。

[0175] 在实施方案中,所述抗体具有约500pM的结合亲和力。在实施方案中,所述抗体具有500pM的结合亲和力。在实施方案中,所述抗体具有约550pM的结合亲和力。在实施方案中,所述抗体具有550pM的结合亲和力。在实施方案中,所述抗体具有约600pM的结合亲和力。在实施方案中,所述抗体具有600pM的结合亲和力。在实施方案中,所述抗体具有约650pM的结合亲和力。在实施方案中,所述抗体具有650pM的结合亲和力。在实施方案中,所述抗体具有约700pM的结合亲和力。在实施方案中,所述抗体具有700pM的结合亲和力。在实施方案中,所述抗体具有约750pM的结合亲和力。在实施方案中,所述抗体具有750pM的结合亲和力。在实施方案中,所述抗体具有约800pM的结合亲和力。在实施方案中,所述抗体具有800pM的结合亲和力。在实施方案中,所述抗体具有约850pM的结合亲和力。在实施方案中,所述抗体具有850pM的结合亲和力。在实施方案中,所述抗体具有约900pM的结合亲和力。在实施方案中,所述抗体具有900pM的结合亲和力。在实施方案中,所述抗体具有约950pM的结合亲和力。在实施方案中,所述抗体具有950pM的结合亲和力。在实施方案中,所述抗体具有约1nM的结合亲和力。在实施方案中,所述抗体具有1nM的结合亲和力。在实施方案中,所述抗体具有约1.5nM的结合亲和力。在实施方案中,所述抗体具有1.5nM的结合亲和力。在实施方案中,所述抗体具有约2nM的结合亲和力。在实施方案中,所述抗体具有2nM的结合亲和力。在实施方案中,所述抗体具有约2.5nM的结合亲和力。在实施方案中,所述抗体具有2.5nM的结合亲和力。在实施方案中,所述抗体具有约3nM的结合亲和力。在实施方案中,所述抗体具有3nM的结合亲和力。在实施方案中,所述抗体具有约3.5nM的结合亲和力。在实施方案中,所述抗体具有3.5nM的结合亲和力。在实施方案中,所述抗体具有约4nM的结合亲和力。在实施方案中,所述抗体具有4nM的结合亲和力。在实施方案中,所述抗体具有约4.5nM的结合亲和力。在实施方案中,所述抗体具有4.5nM的结合亲和力。在实施方案中,所述抗体具有约5nM的结合亲和力。在实施方案中,所述抗体具有5nM的结合亲和力。在实施方案中,所述抗体具有约5.5nM的结合亲和力。在实施方案中,所述抗体具有5.5nM的结合亲和力。在实施方案中,所述抗体具有约6nM的结合亲和力。在实施方案中,所述抗体具有6nM的结合亲和力。

[0176] 在实施方案中,所述抗体以小于约40nM(例如,35、30、25、20、15、10、9、8、7、6、5、4、3、2、1、0.5、0.25、0.1nM)的 K_D 结合ROR-1蛋白。在实施方案中,所述抗体以小于40nM(例如,35、30、25、20、15、10、9、8、7、6、5、4、3、2、1、0.5、0.25、0.1nM)的 K_D 结合ROR-1蛋白。在实施方案中,所述抗体以小于约35nM的 K_D 结合ROR-1蛋白。在实施方案中,所述抗体以小于35nM的 K_D 结合ROR-1蛋白。在实施方案中,所述抗体以小于约30nM的 K_D 结合ROR-1蛋白。在实施方案中,所述抗体以小于30nM的 K_D 结合ROR-1蛋白。在实施方案中,所述抗体以小于约25nM的 K_D 结合ROR-1蛋白。在实施方案中,所述抗体以小于25nM的 K_D 结合ROR-1蛋白。在实施方案中,所述抗体以小于约20nM的 K_D 结合ROR-1蛋白。在实施方案中,所述抗体以小于20nM的 K_D 结合ROR-1蛋白。在实施方案中,所述抗体以小于约15nM的 K_D 结合ROR-1蛋白。在实施方案中,所述抗体以小于15nM的 K_D 结合ROR-1蛋白。在实施方案中,所述抗体以小于约10nM的 K_D 结合

ROR-1蛋白。在实施方案中,所述抗体以小于10nM的 K_D 结合ROR-1蛋白。在实施方案中,所述抗体以小于约9nM的 K_D 结合ROR-1蛋白。在实施方案中,所述抗体以小于9nM的 K_D 结合ROR-1蛋白。在实施方案中,所述抗体以小于约8nM的 K_D 结合ROR-1蛋白。在实施方案中,所述抗体以小于8nM的 K_D 结合ROR-1蛋白。在实施方案中,所述抗体以小于约7nM的 K_D 结合ROR-1蛋白。在实施方案中,所述抗体以小于7nM的 K_D 结合ROR-1蛋白。在实施方案中,所述抗体以小于约6nM的 K_D 结合ROR-1蛋白。在实施方案中,所述抗体以小于6nM的 K_D 结合ROR-1蛋白。在实施方案中,所述抗体以小于约5nM的 K_D 结合ROR-1蛋白。在实施方案中,所述抗体以小于5nM的 K_D 结合ROR-1蛋白。在实施方案中,所述抗体以小于约4nM的 K_D 结合ROR-1蛋白。在实施方案中,所述抗体以小于4nM的 K_D 结合ROR-1蛋白。在实施方案中,所述抗体以小于约3nM的 K_D 结合ROR-1蛋白。在实施方案中,所述抗体以小于3nM的 K_D 结合ROR-1蛋白。在实施方案中,所述抗体以小于约2nM的 K_D 结合ROR-1蛋白。在实施方案中,所述抗体以小于2nM的 K_D 结合ROR-1蛋白。在实施方案中,所述抗体以小于约1nM的 K_D 结合ROR-1蛋白。在实施方案中,所述抗体以小于1nM的 K_D 结合ROR-1蛋白。在实施方案中,所述抗体以小于约0.5nM的 K_D 结合ROR-1蛋白。在实施方案中,所述抗体以小于0.5nM的 K_D 结合ROR-1蛋白。在实施方案中,所述抗体以小于约0.25nM的 K_D 结合ROR-1蛋白。在实施方案中,所述抗体以小于0.25nM的 K_D 结合ROR-1蛋白。在实施方案中,所述抗体以小于约0.1nM的 K_D 结合ROR-1蛋白。在实施方案中,所述抗体以小于0.1nM的 K_D 结合ROR-1蛋白。

[0177] 在实施方案中,所述抗体是cirmtuzumab,本文中也称为99961.1或UC-961。在实施方案中,所述抗体是D10。

[0178] 在实施方案中,BTK拮抗剂和ROR-1拮抗剂以组合的协同量施用。在实施方案中,BTK拮抗剂和抗ROR-1抗体以组合的协同量施用。如本文所用的“组合的协同量”是指产生协同效应(即大于加成效应的效应)的第一量(例如,BTK拮抗剂的量)和第二量(例如,ROR-1拮抗剂的量)的总和。因此,在本文中可交换使用的术语“协同”、“协同性”、“协同的”、“组合的协同量”和“协同治疗效应”是指组合施用的化合物的测量的效应,其中测量的效应大于作为单一药剂单独施用的化合物各自的个别效应的总和。

[0179] 在实施方案中,协同量可以是当与ROR-1拮抗剂分开使用时的BTK拮抗剂的量的约0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3.0、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4.0、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5.0、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8.0、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、8.6、8.7、8.8、8.9、9.0、9.1、9.2、9.3、9.4、9.5、9.6、9.7、9.8、9.9、10.0、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%。在实施方案中,协同量可以是当与BTK拮抗剂分开使用时的ROR-1拮抗剂的量的约0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3.0、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4.0、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5.0、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、

6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8.0、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、8.6、8.7、8.8、8.9、9.0、9.1、9.2、9.3、9.4、9.5、9.6、9.7、9.8、9.9、10.0、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%。

[0180] 所述协同效应可以是降低BTK活性的效应和/或降低ROR-1活性的效应。在实施方案中,BTK拮抗剂和ROR-1拮抗剂之间的协同性导致的降低(例如,BTK活性的降低或ROR-1活性的降低)比当单独和分开使用时BTK拮抗剂或ROR-1拮抗剂的降低的总和高大约0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3.0、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4.0、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5.0、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8.0、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、8.6、8.7、8.8、8.9、9.0、9.1、9.2、9.3、9.4、9.5、9.6、9.7、9.8、9.9、10.0、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99或100%。在实施方案中,BTK拮抗剂和ROR-1拮抗剂之间的协同性导致的BTK蛋白和/或ROR-1蛋白的抑制比当单独和分开使用时BTK拮抗剂或ROR-1拮抗剂的抑制的总和高大约0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3.0、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4.0、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5.0、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8.0、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、8.6、8.7、8.8、8.9、9.0、9.1、9.2、9.3、9.4、9.5、9.6、9.7、9.8、9.9、10.0、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99或100%。

[0181] 协同效应可以是治疗癌症的效应,诸如:淋巴瘤(即治疗淋巴瘤的协同效应)、白血病(即治疗白血病的协同效应)、骨髓瘤(即治疗骨髓瘤的协同效应)、AML(即治疗AML的协同效应)、B-ALL(即治疗B-ALL的协同效应)、T-ALL(即治疗T-ALL的协同效应)、肾细胞癌(即治疗肾细胞癌的协同效应)、结肠癌(即治疗结肠癌的协同效应)、结肠直肠癌(即治疗结肠直肠癌的协同效应)、乳腺癌(即治疗乳腺癌的协同效应)、表皮鳞状细胞癌(即治疗表皮鳞状细胞癌的协同效应)、黑色素瘤(即治疗黑色素瘤的协同效应)、胃癌(即治疗胃癌的协同效应)、脑癌(即治疗脑癌的协同效应)、肺癌(即治疗肺癌的协同效应)、胰腺癌(即治疗胰腺癌的协同效应)、子宫颈癌(即治疗子宫颈癌的协同效应)、卵巢癌(即治疗卵巢癌的协同效应)、肝癌(即治疗肝癌的协同效应)、膀胱癌(即治疗膀胱癌的协同效应)、前列腺癌(即治疗前列腺癌的协同效应)、睾丸癌(即治疗睾丸癌的协同效应)、甲状腺癌(即治疗甲状腺癌的

协同效应)、头颈癌(即治疗头颈癌的协同效应)、子宫癌(即治疗子宫癌的协同效应)、腺癌(即治疗腺癌的协同效应)、肾上腺癌(即治疗肾上腺癌的协同效应)、慢性淋巴细胞性白血病(即治疗慢性淋巴细胞性白血病的协同效应)、小淋巴细胞性淋巴瘤(即治疗小淋巴细胞性淋巴瘤的协同效应)、边缘细胞B-细胞淋巴瘤(即治疗边缘细胞B-细胞淋巴瘤的协同效应)、伯基特氏淋巴瘤(即治疗伯基特氏淋巴瘤的协同效应)和B细胞白血病(即治疗B细胞白血病的协同效应)的治疗效应。

[0182] BTK拮抗剂和ROR-1拮抗剂可以同时(例如,作为混合物)、分开但同时(例如,经由分开的静脉内途径)或依次(例如,首先施用一种药剂,随后施用第二种药剂)组合施用。因此,术语组合用于指BTK拮抗剂和ROR-1拮抗剂的并行、同时或依次施用。

[0183] 在一个实施方案中,BTK拮抗剂和ROR-1拮抗剂同时或依次施用。在一个实施方案中,BTK拮抗剂和ROR-1拮抗剂同时施用。在一个实施方案中,BTK拮抗剂和ROR-1拮抗剂依次施用。在治疗疗程期间,BTK拮抗剂和ROR-1拮抗剂可以在一些时间依次施用,而在其他时间同时施用。

[0184] 在实施方案中,在BTK拮抗剂和ROR-1拮抗剂依次施用的情况下,ROR-1拮抗剂在第一时间点施用,且BTK拮抗剂在第二时间点施用,其中第一时间点在第二时间点之前。或者,在实施方案中,在BTK拮抗剂和ROR-1拮抗剂依次施用的情况下,BTK拮抗剂在第一时间点施用,且ROR-1拮抗剂在第二时间点施用,其中第一时间点在第二时间点之前。

[0185] 在一个实施方案中,BTK拮抗剂和抗ROR-1抗体同时或依次施用。在一个实施方案中,BTK拮抗剂和抗ROR-1抗体同时施用。在一个实施方案中,BTK拮抗剂和抗ROR-1抗体依次施用。在治疗疗程期间,BTK拮抗剂和抗ROR-1抗体可以在一些时间依次施用,而在其他时间同时施用。

[0186] 在实施方案中,在BTK拮抗剂和抗ROR-1抗体依次施用的情况下,抗ROR-1抗体在第一时间点施用,且BTK拮抗剂在第二时间点施用,其中第一时间点在第二时间点之前。或者,在实施方案中,在BTK拮抗剂和抗ROR-1抗体依次施用的情况下,BTK拮抗剂在第一时间点施用,且抗ROR-1抗体在第二时间点施用,其中第一时间点在第二时间点之前。

[0187] 治疗疗程最好根据受试者的特征和所选择的治疗类型基于个人决定。治疗,诸如本文公开的那些,可以每天、每天两次、每两周、每月、或任何治疗有效的适用基础施用于受试者。所述治疗可以单独施用或与本文公开或本领域已知的任何其他治疗组合施用。额外治疗法可以与第一治疗同时施用、在不同时间施用、或根据完全不同的治疗时间表施用(例如,第一治疗可以是每天的,而额外治疗是每周的)。

[0188] 在BTK拮抗剂和ROR-1拮抗剂同时施用的情况下,BTK拮抗剂和ROR-1拮抗剂可以作为混合物施用。因此,在实施方案中,BTK拮抗剂和ROR-1拮抗剂在施用前混合。

[0189] 在实施方案中,所述BTK拮抗剂以约1mg/kg、2mg/kg、5mg/kg、10mg/kg或15mg/kg的量施用。在实施方案中,所述BTK拮抗剂以约1mg/kg的量施用。在实施方案中,所述BTK拮抗剂以1mg/kg的量施用。在实施方案中,所述BTK拮抗剂以约2mg/kg的量施用。在实施方案中,所述BTK拮抗剂以2mg/kg的量施用。在实施方案中,所述BTK拮抗剂以约5mg/kg的量施用。在实施方案中,所述BTK拮抗剂以5mg/kg的量施用。在实施方案中,所述BTK拮抗剂以约10mg/kg的量施用。在实施方案中,所述BTK拮抗剂以10mg/kg的量施用。在实施方案中,所述BTK拮抗剂以约15mg/kg的量施用。在实施方案中,所述BTK拮抗剂以15mg/kg的量施用。在实施方

案中,所述BTK拮抗剂以约420mg的量施用。在实施方案中,所述BTK拮抗剂以420mg的量施用。

[0190] 在实施方案中,所述ROR-1拮抗剂以约1mg/kg、2mg/kg、3mg/kg、5mg/kg或10mg/kg的量施用。在实施方案中,所述ROR-1拮抗剂以约1mg/kg的量施用。在实施方案中,所述ROR-1拮抗剂以1mg/kg的量施用。在实施方案中,所述ROR-1拮抗剂以约2mg/kg的量施用。在实施方案中,所述ROR-1拮抗剂以2mg/kg的量施用。在实施方案中,所述ROR-1拮抗剂以约3mg/kg的量施用。在实施方案中,所述ROR-1拮抗剂以3mg/kg的量施用。在实施方案中,所述ROR-1拮抗剂以约5mg/kg的量施用。在实施方案中,所述ROR-1拮抗剂以5mg/kg的量施用。在实施方案中,所述ROR-1拮抗剂以约10mg/kg的量施用。在实施方案中,所述ROR-1拮抗剂以10mg/kg的量施用。

[0191] 在实施方案中,所述BTK拮抗剂以约5mg/kg的量施用且所述ROR-1拮抗剂以约2mg/kg的量施用。在实施方案中,所述BTK拮抗剂以5mg/kg的量施用且所述ROR-1拮抗剂以2mg/kg的量施用。在实施方案中,所述BTK拮抗剂以约5mg/kg的量施用且所述ROR-1拮抗剂以约1mg/kg的量施用。在实施方案中,所述BTK拮抗剂以5mg/kg的量施用且所述ROR-1拮抗剂以1mg/kg的量施用。

[0192] 在实施方案中,所述BTK拮抗剂在至少14天(例如,15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、40、45或50天)的疗程每天施用。在实施方案中,所述BTK拮抗剂在至少15天的疗程每天施用。在实施方案中,所述BTK拮抗剂在至少16天的疗程每天施用。在实施方案中,所述BTK拮抗剂在至少17天的疗程每天施用。在实施方案中,所述BTK拮抗剂在至少18天的疗程每天施用。在实施方案中,所述BTK拮抗剂在至少19天的疗程每天施用。在实施方案中,所述BTK拮抗剂在至少20天的疗程每天施用。在实施方案中,所述BTK拮抗剂在至少21天的疗程每天施用。在实施方案中,所述BTK拮抗剂在至少22天的疗程每天施用。在实施方案中,所述BTK拮抗剂在至少23天的疗程每天施用。在实施方案中,所述BTK拮抗剂在至少24天的疗程每天施用。在实施方案中,所述BTK拮抗剂在至少25天的疗程每天施用。在实施方案中,所述BTK拮抗剂在至少26天的疗程每天施用。在实施方案中,所述BTK拮抗剂在至少27天的疗程每天施用。在实施方案中,所述BTK拮抗剂在至少28天的疗程每天施用。在实施方案中,所述BTK拮抗剂在至少29天的疗程每天施用。在实施方案中,所述BTK拮抗剂在至少30天的疗程每天施用。在实施方案中,所述BTK拮抗剂在至少31天的疗程每天施用。在实施方案中,所述BTK拮抗剂在至少32天的疗程每天施用。在实施方案中,所述BTK拮抗剂在至少33天的疗程每天施用。在实施方案中,所述BTK拮抗剂在至少34天的疗程每天施用。在实施方案中,所述BTK拮抗剂在至少35天的疗程每天施用。在实施方案中,所述BTK拮抗剂在至少40天的疗程每天施用。在实施方案中,所述BTK拮抗剂在至少45天的疗程每天施用。在实施方案中,所述BTK拮抗剂在至少50天的疗程每天施用。

[0193] 在实施方案中,所述BTK拮抗剂在约28天的疗程每天施用。在实施方案中,所述BTK拮抗剂在28天的疗程每天施用。

[0194] 在实施方案中,所述ROR-1拮抗剂在约28天的疗程施用一次。在实施方案中,所述ROR-1拮抗剂在28天的疗程施用一次。

[0195] 在实施方案中,所述BTK拮抗剂静脉内施用。在实施方案中,所述ROR-1拮抗剂静脉内施用。

[0196] 在实施方案中,所述受试者是哺乳动物。在实施方案中,所述受试者是人。

[0197] 如上所提及,本文提供的方法和组合物,包括其实施方案,可用于治疗癌症,且特别是表达ROR-1的癌症。在实施方案中,所述癌症是淋巴瘤、白血病、骨髓瘤、AML、B-ALL、T-ALL、肾细胞癌、结肠癌、结肠直肠癌、乳腺癌、表皮鳞状细胞癌、黑色素瘤、胃癌、脑癌、肺癌、胰腺癌、子宫颈癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、前列腺癌、睾丸癌、甲状腺癌、头颈癌、子宫癌、腺癌或肾上腺癌。在实施方案中,所述癌症是慢性淋巴细胞性白血病 (CLL)、小淋巴细胞性淋巴瘤、边缘细胞B-细胞淋巴瘤、伯基特氏淋巴瘤或B细胞白血病。

[0198] 可以改变如本文所提供的BTK拮抗剂和ROR-1拮抗剂的施用组合,包括其实施方案。例如,特定BTK拮抗剂(例如,依鲁替尼)可以与特定ROR-1拮抗剂(例如,cirmtuzumab)组合施用。因此,在实施方案中,BTK拮抗剂依鲁替尼与ROR-1拮抗剂cirmtuzumab组合施用。在实施方案中,BTK拮抗剂艾代拉里斯(idelalisib)与ROR-1拮抗剂cirmtuzumab组合施用。在实施方案中,BTK拮抗剂福他替尼(fostamatinib)与ROR-1拮抗剂cirmtuzumab组合施用。在实施方案中,BTK拮抗剂阿卡替尼(acalabrutinib)与ROR-1拮抗剂cirmtuzumab组合施用。在实施方案中,BTK拮抗剂ONO/GS-4059与ROR-1拮抗剂cirmtuzumab组合施用。在实施方案中,BTK拮抗剂BGB-3111与ROR-1拮抗剂cirmtuzumab组合施用。在实施方案中,BTK拮抗剂CC-292 (AVL-292) 与ROR-1拮抗剂cirmtuzumab组合施用。在实施方案中,BTK拮抗剂R406与ROR-1拮抗剂cirmtuzumab组合施用。

[0199] 在实施方案中,BTK拮抗剂依鲁替尼与ROR-1拮抗剂cirmtuzumab组合施用,且依鲁替尼以1mg/kg的量静脉内施用且cirmtuzumab以1mg/kg的量静脉内施用。在一个进一步实施方案中,依鲁替尼在28天的疗程每天施用且cirmtuzumab在28天的疗程施用一次。

[0200] 在实施方案中,BTK拮抗剂依鲁替尼与ROR-1拮抗剂cirmtuzumab组合施用,且依鲁替尼以1mg/kg的量静脉内施用且cirmtuzumab以2mg/kg的量静脉内施用。在一个进一步实施方案中,依鲁替尼在28天的疗程每天施用且cirmtuzumab在28天的疗程施用一次。

[0201] 在实施方案中,BTK拮抗剂依鲁替尼与ROR-1拮抗剂cirmtuzumab组合施用,且依鲁替尼以1mg/kg的量静脉内施用且cirmtuzumab以3mg/kg的量静脉内施用。在一个进一步实施方案中,依鲁替尼在28天的疗程每天施用且cirmtuzumab在28天的疗程施用一次。

[0202] 在实施方案中,BTK拮抗剂依鲁替尼与ROR-1拮抗剂cirmtuzumab组合施用,且依鲁替尼以1mg/kg的量静脉内施用且cirmtuzumab以5mg/kg的量静脉内施用。在一个进一步实施方案中,依鲁替尼在28天的疗程每天施用且cirmtuzumab在28天的疗程施用一次。

[0203] 在实施方案中,BTK拮抗剂依鲁替尼与ROR-1拮抗剂cirmtuzumab组合施用,且依鲁替尼以1mg/kg的量静脉内施用且cirmtuzumab以10mg/kg的量静脉内施用。在一个进一步实施方案中,依鲁替尼在28天的疗程每天施用且cirmtuzumab在28天的疗程施用一次。

[0204] 在实施方案中,BTK拮抗剂依鲁替尼与ROR-1拮抗剂cirmtuzumab组合施用,且依鲁替尼以2mg/kg的量静脉内施用且cirmtuzumab以1mg/kg的量静脉内施用。在一个进一步实施方案中,依鲁替尼在28天的疗程每天施用且cirmtuzumab在28天的疗程施用一次。

[0205] 在实施方案中,BTK拮抗剂依鲁替尼与ROR-1拮抗剂cirmtuzumab组合施用,且依鲁替尼以2mg/kg的量静脉内施用且cirmtuzumab以2mg/kg的量静脉内施用。在一个进一步实施方案中,依鲁替尼在28天的疗程每天施用且cirmtuzumab在28天的疗程施用一次。

[0206] 在实施方案中,BTK拮抗剂依鲁替尼与ROR-1拮抗剂cirmtuzumab组合施用,且依鲁

替尼以15mg/kg的量静脉内施用且cirtuzumab以1mg/kg的量静脉内施用。在一个进一步实施方案中,依鲁替尼在28天的疗程每天施用且cirtuzumab在28天的疗程施用一次。

[0220] 在实施方案中,BTK拮抗剂依鲁替尼与ROR-1拮抗剂cirtuzumab组合施用,且依鲁替尼以15mg/kg的量静脉内施用且cirtuzumab以2mg/kg的量静脉内施用。在一个进一步实施方案中,依鲁替尼在28天的疗程每天施用且cirtuzumab在28天的疗程施用一次。

[0221] 在实施方案中,BTK拮抗剂依鲁替尼与ROR-1拮抗剂cirtuzumab组合施用,且依鲁替尼以15mg/kg的量静脉内施用且cirtuzumab以3mg/kg的量静脉内施用。在一个进一步实施方案中,依鲁替尼在28天的疗程每天施用且cirtuzumab在28天的疗程施用一次。

[0222] 在实施方案中,BTK拮抗剂依鲁替尼与ROR-1拮抗剂cirtuzumab组合施用,且依鲁替尼以15mg/kg的量静脉内施用且cirtuzumab以5mg/kg的量静脉内施用。在一个进一步实施方案中,依鲁替尼在28天的疗程每天施用且cirtuzumab在28天的疗程施用一次。

[0223] 在实施方案中,BTK拮抗剂依鲁替尼与ROR-1拮抗剂cirtuzumab组合施用,且依鲁替尼以15mg/kg的量静脉内施用且cirtuzumab以10mg/kg的量静脉内施用。在一个进一步实施方案中,依鲁替尼在28天的疗程每天施用且cirtuzumab在28天的疗程施用一次。

[0224] 在实施方案中,BTK拮抗剂依鲁替尼与ROR-1拮抗剂cirtuzumab组合施用,且依鲁替尼以420mg的量静脉内施用且cirtuzumab以1mg/kg的量静脉内施用。在一个进一步实施方案中,依鲁替尼在28天的疗程每天施用且cirtuzumab在28天的疗程施用一次。

[0225] 在实施方案中,BTK拮抗剂依鲁替尼与ROR-1拮抗剂cirtuzumab组合施用,且依鲁替尼以420mg的量静脉内施用且cirtuzumab以2mg/kg的量静脉内施用。在一个进一步实施方案中,依鲁替尼在28天的疗程每天施用且cirtuzumab在28天的疗程施用一次。

[0226] 在实施方案中,BTK拮抗剂依鲁替尼与ROR-1拮抗剂cirtuzumab组合施用,且依鲁替尼以420mg的量静脉内施用且cirtuzumab以3mg/kg的量静脉内施用。在一个进一步实施方案中,依鲁替尼在28天的疗程每天施用且cirtuzumab在28天的疗程施用一次。

[0227] 在实施方案中,BTK拮抗剂依鲁替尼与ROR-1拮抗剂cirtuzumab组合施用,且依鲁替尼以420mg的量静脉内施用且cirtuzumab以5mg/kg的量静脉内施用。在一个进一步实施方案中,依鲁替尼在28天的疗程每天施用且cirtuzumab在28天的疗程施用一次。

[0228] 在实施方案中,BTK拮抗剂依鲁替尼与ROR-1拮抗剂cirtuzumab组合施用,且依鲁替尼以420mg的量静脉内施用且cirtuzumab以10mg/kg的量静脉内施用。在一个进一步实施方案中,依鲁替尼在28天的疗程每天施用且cirtuzumab在28天的疗程施用一次。

[0229] 药物组合物

[0230] 进一步考虑包括如本文提供的BTK拮抗剂和ROR-1拮抗剂(包括其实施方案)的组合物作为药物组合物。因此,在一个方面提供了药物组合物,其包括BTK拮抗剂、ROR-1拮抗剂和药学上可接受的赋形剂。

[0231] 在另一个方面,提供了药物组合物,其包括布鲁顿氏酪氨酸激酶(BTK)拮抗剂、抗ROR-1抗体和药学上可接受的赋形剂。在实施方案中,BTK拮抗剂和抗ROR-1抗体以组合的协同量存在,其中所述组合的协同量有效地治疗有需要的受试者中的癌症。

[0232] 本文提供的药物组合物中包括的BTK拮抗剂和ROR-1拮抗剂可以是本文描述的任一种BTK拮抗剂和/或ROR-1拮抗剂,包括其实施方案。例如,BTK拮抗剂可以是依鲁替尼,且ROR-1拮抗剂可以是cirtuzumab。同样地,可以配制本文提供的药物组合物,使得BTK拮抗

剂和ROR-1拮抗剂的施用量是如本文所述的量中的任一种。例如,依鲁替尼可以以这样的量存在,使得组合物的施用导致约5mg/kg或420mg的剂量,并且cirmtuzumab可以以导致约2mg/kg的剂量的量存在。

[0233] 提供的组合物尤其适用于体外或体内的制剂和施用。合适的载体和赋形剂及其制剂描述于Remington:The Science and Practice of Pharmacy,第21版,David B.Troy,编,Lippicott Williams&Wilkins (2005)。药学上可接受的载体意指不是生物学或其他方面不期望的材料,即所述材料可以施用于受试者,而不引起不期望的生物学效应或以有害方式与含有它的药物组合物的其他组分相互作用。如果施用于受试者,任选地选择载体以使活性成分的降解最小化并使受试者中的不良副作用最小化。

[0234] 本文提供的药物组合物包括这样的组合物,其中活性成分(例如本文所述的组合物,包括实施方案或实施例)以治疗有效量(即以有效实现其预期目的的量)包含。对特定应用有效的实际量尤其取决于所治疗的病况。当在方法中施用以治疗疾病时,本文所述的重组蛋白将含有有效实现期望所需结果(例如,调节靶分子的活性,和/或减少、消除或减缓疾病症状的进展)的量的活性成分。确定本发明的化合物的治疗有效量完全在本领域技术人员的能力范围内,特别是根据本文的详细公开内容。

[0235] 提供的组合物可以包括单一药剂或多于一种药剂。用于施用的组合物通常包括溶解在药物可接受的载体、优选水性载体的本文所述的药剂。可以使用各种水性载体,例如缓冲盐水等。这些溶液为无菌的,并且通常不含不期望的物质。这些组合物可以通过常规众所周知的灭菌技术而灭菌。所述组合物可以含有接近生理条件所需的药物可接受的辅助物质,例如pH调节和缓冲剂、毒性调节剂等,例如,乙酸钠、氯化钠、氯化钾、氯化钙、乳酸钠等。这些制剂中的活性剂的浓度可以广泛变化,并且主要根据所选施用模式和受试者需要,基于流体体积、粘度、体重等进行选择。

[0236] 作为游离碱或药理学上可接受的盐的活性化合物的溶液可以制备于与表面活性剂诸如羟丙基纤维素适当混合的水中。分散液也可以制备在甘油、液体聚乙二醇及其混合物中或油中。在一般的保存和使用条件下,这些制剂包含防腐剂以防止微生物的生长。

[0237] 药物组合物可以经由鼻内或可吸入溶液或喷雾剂、气溶胶或吸入剂递送。鼻用溶液可以是水溶液,其设计为以滴剂或喷雾剂施用于鼻道。可以制备鼻用溶液,使得它们在许多方面与鼻分泌物相似。因此,鼻用水溶液通常是等渗的并且稍微缓冲以维持5.5至6.5的pH。此外,如果需要,可以在制剂中包括抗微生物防腐剂,其类似于眼科制剂中使用的那些和适当的药物稳定剂。各种商业鼻用制剂是已知的,并且可以包括例如抗生素和抗组胺药。

[0238] 口服制剂可以包括赋形剂,例如药物级的甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、纤维素、碳酸镁等。这些组合物采用溶液、悬浮液、片剂、丸剂、胶囊、缓释制剂或粉末的形式。在一些实施方案中,口服药物组合物将包含惰性稀释剂或可同化的可食用载体,或者它们可以包封在硬壳或软壳明胶胶囊中,或者它们可以压制成片剂,或者它们可以直接并入饮食的食物中。对于口服治疗施用,活性化合物可以与赋形剂一起并入并以可摄入的片剂、口含片、锭剂、胶囊、酞剂、悬浮液、糖浆、晶片等的形式使用。此类组合物和制剂应当含有至少0.1%的活性化合物。当然,组合物和制剂的百分比可以变化,并且可以方便地为单位重量的约2-约75%,或优选25-60%。此类组合物中活性化合物的量使得可以获得合适的剂量。

[0239] 对于在水溶液中的肠胃外施用,例如,溶液应当适当地缓冲,并且首先用足够的盐水或葡萄糖使液体稀释液等渗。水溶液,特别是无菌水性介质,尤其适用于静脉内、肌肉内、皮下和腹膜内施用。例如,一个剂量可以溶解于1ml等渗NaCl溶液或添加至1000ml皮下灌注液或注射在提出的输注部位处。

[0240] 通过将所需量的活性化合物或构建体并入适当的溶剂中、随后无菌过滤而制备无菌的可注射溶液。通常,通过将各种无菌的活性成分并入含有基本分散介质的无菌媒介物中而制备分散剂。真空干燥和冷冻干燥技术(其产生活性成分加上任何额外期望成分的粉末)可用于制备无菌粉末用于重构无菌可注射溶液。还考虑制备更多或高度浓缩的用于直接注射的溶液。DMSO可用于作用于极快速渗透、将高浓度的活性剂递送至小面积的溶剂。

[0241] 化合物的制剂可以在单位剂量或多剂量密封容器(诸如安瓿和小瓶)中呈现。因此,所述组合物可以呈单位剂型。以这种形式,制剂被细分为含有适当量的活性成分的单位剂量。因此,取决于施用方法,所述组合物可以多种单位剂型施用。例如,适于口服施用的单位剂型包括,但不限于,粉剂、片剂、丸剂、胶囊剂和锭剂。

[0242] 施用于哺乳动物的剂量和频率(单剂量或多剂量)可以取决于各种因素而变化,例如,哺乳动物是否患有另一种疾病及其施用途径;接受者的体型、年龄、性别、健康、体重、身体质量指数和日常饮食;所治疗的疾病的症状的性质和程度(例如,癌症的症状和此类症状的严重程度),并行治疗的种类,来自所治疗疾病的并发症或其他健康相关问题。其他治疗方案或药剂可以与本发明的方法和化合物联合使用。建立的剂量(例如,频率和持续时间)的调整和操作完全在本领域技术人员的能力内。

[0243] 对于本文描述的任何组合物(例如,所提供的渗透细胞的缀合物),治疗有效量可以由细胞培养测定初步确定。目标浓度将是如例如使用本领域中已知的方法所测量,能够实现本文所述的方法的那些活性化合物浓度。如本领域众所周知,用于人类的有效量也可以由动物模型确定。例如,用于人类的剂量可以经配制以实现已发现在动物中有效的浓度。在人类中的剂量可以通过如以上所描述来监测癌症有效性并且向上或向下调节剂量来加以调节。基于以上所描述的方法和其他方法调节剂量以便在人类中实现最大功效完全在一般技术人员的能力范围内。

[0244] 剂量可以取决于受试者的需要和所采用的化合物而变化。在本发明的上下文中,施用给患者的剂量应当足以在一段时间内在患者中实现有益的治疗反应。还能通过任何副作用的存在、性质和程度来确定剂量的大小。用于特定情况的适当剂量的确定在从业者的技能范围内。通常,以小于化合物最佳剂量的较小剂量开始治疗。此后,通过小幅增加来提高剂量,直至达到在环境下的最佳效果。

[0245] 可以个别地调节剂量用量和间隔以提供对所治疗的具体临床适应症有效的施用化合物水平。这将提供与个体的疾病状态的严重程度相称的治疗方案。

[0246] 利用本文提供的教导,可以计划不会造成实质性毒性、但对治疗具体患者所显示的临床症状有效的有效预防性或治疗性治疗方案。这种计划应当涉及通过考虑诸如化合物效力、相对生物利用度、患者体重、不利副作用的存在和严重程度、优选...的因素而谨慎地选择活性化合物。

[0247] “药学上可接受的赋形剂”和“药学上可接受的载体”是指有助于向受试者施用活性剂和由受试者摄取并且可以包括在本发明的组合物中而不会对患者造成显著不利的毒

物学效果的物质。药学上可接受的赋形剂的非限制性实例包括水、NaCl、生理盐水溶液、乳酸林格氏液、正常蔗糖、正常葡萄糖、粘合剂、填充剂、崩解剂、润滑剂、包衣剂、甜味剂、调味剂、盐溶液(诸如林格氏溶液)、醇、油、明胶、碳水化合物(诸如乳糖、直链淀粉或淀粉)、脂肪酸酯、羟甲基纤维素、聚乙烯吡咯烷和颜料等。此类制剂可以经过灭菌并且在需要时与诸如润滑剂、防腐剂、稳定剂、润湿剂、乳化剂、用于影响渗透压的盐、缓冲剂、着色剂和/或芳族物质和不会与本发明化合物不利反应的类似物质混合。本领域技术人员应当承认,其他医药赋形剂可用于本发明。

[0248] 术语“药学上可接受的盐”是指衍生自本领域众所周知的各种有机和无机抗衡离子的盐,并且仅通过实例的方式,包括钠、钾、钙、镁、铵、四烷基铵等;且当分子含有碱性官能团时,有机酸或无机酸的盐,诸如盐酸盐、氢溴酸盐、酒石酸盐、甲磺酸盐、乙酸盐、马来酸盐、草酸盐等。

[0249] 术语“制备”意在包括配制活性化合物与作为载体的囊封材料从而提供胶囊剂,其中所述活性组分(有或无其他载体)被载体围绕,所述载体因此与其缔合。类似地,包括扁囊剂和锭剂。片剂、粉剂、胶囊剂、丸剂、扁囊剂和锭剂可以用作适合口服施用的固体剂型。

[0250] 在实施方案中,所述药物组合物由依鲁替尼、cirtuzumab和药学上可接受的赋形剂组成。在实施方案中,所述药物组合物由艾代拉里斯、cirtuzumab和药学上可接受的赋形剂组成。在实施方案中,所述药物组合物由福他替尼、cirtuzumab和药学上可接受的赋形剂组成。在实施方案中,所述药物组合物由阿卡替尼、cirtuzumab和药学上可接受的赋形剂组成。在实施方案中,所述药物组合物由ONO/GS-4059、cirtuzumab和药学上可接受的赋形剂组成。在实施方案中,所述药物组合物由BGB-3111、cirtuzumab和药学上可接受的赋形剂组成。在实施方案中,所述药物组合物由CC-292 (AVL-292)、cirtuzumab和药学上可接受的赋形剂组成。在实施方案中,所述药物组合物由R406、cirtuzumab和药学上可接受的赋形剂组成。

[0251] 在实施方案中,所述药物组合物包括等于1mg/kg的剂量的量的依鲁替尼和等于1mg/kg的剂量的量的cirtuzumab。在实施方案中,所述药物组合物包括等于1mg/kg的剂量的量的依鲁替尼和等于2mg/kg的剂量的量的cirtuzumab。在实施方案中,所述药物组合物包括等于1mg/kg的剂量的量的依鲁替尼和等于3mg/kg的剂量的量的cirtuzumab。在实施方案中,所述药物组合物包括等于1mg/kg的剂量的量的依鲁替尼和等于5mg/kg的剂量的量的cirtuzumab。在实施方案中,所述药物组合物包括等于1mg/kg的剂量的量的依鲁替尼和等于10mg/kg的剂量的量的cirtuzumab。

[0252] 在实施方案中,所述药物组合物包括等于2mg/kg的剂量的量的依鲁替尼和等于1mg/kg的剂量的量的cirtuzumab。在实施方案中,所述药物组合物包括等于2mg/kg的剂量的量的依鲁替尼和等于2mg/kg的剂量的量的cirtuzumab。在实施方案中,所述药物组合物包括等于2mg/kg的剂量的量的依鲁替尼和等于3mg/kg的剂量的量的cirtuzumab。在实施方案中,所述药物组合物包括等于2mg/kg的剂量的量的依鲁替尼和等于5mg/kg的剂量的量的cirtuzumab。在实施方案中,所述药物组合物包括等于2mg/kg的剂量的量的依鲁替尼和等于10mg/kg的剂量的量的cirtuzumab。

[0253] 在实施方案中,所述药物组合物包括等于5mg/kg的剂量的量的依鲁替尼和等于1mg/kg的剂量的量的cirtuzumab。在实施方案中,所述药物组合物包括等于5mg/kg的剂量的

的量的依鲁替尼和等于2mg/kg的剂量的量的cirtuzumab。在实施方案中,所述药物组合物包括等于5mg/kg的剂量的量的依鲁替尼和等于3mg/kg的剂量的量的cirtuzumab。在实施方案中,所述药物组合物包括等于5mg/kg的剂量的量的依鲁替尼和等于5mg/kg的剂量的量的cirtuzumab。在实施方案中,所述药物组合物包括等于5mg/kg的剂量的量的依鲁替尼和等于10mg/kg的剂量的量的cirtuzumab。

[0254] 在实施方案中,所述药物组合物包括等于10mg/kg的剂量的量的依鲁替尼和等于1mg/kg的剂量的量的cirtuzumab。在实施方案中,所述药物组合物包括等于10mg/kg的剂量的量的依鲁替尼和等于2mg/kg的剂量的量的cirtuzumab。在实施方案中,所述药物组合物包括等于10mg/kg的剂量的量的依鲁替尼和等于3mg/kg的剂量的量的cirtuzumab。在实施方案中,所述药物组合物包括等于10mg/kg的剂量的量的依鲁替尼和等于5mg/kg的剂量的量的cirtuzumab。在实施方案中,所述药物组合物包括等于10mg/kg的剂量的量的依鲁替尼和等于10mg/kg的剂量的量的cirtuzumab。

[0255] 在实施方案中,所述药物组合物包括等于15mg/kg的剂量的量的依鲁替尼和等于1mg/kg的剂量的量的cirtuzumab。在实施方案中,所述药物组合物包括等于15mg/kg的剂量的量的依鲁替尼和等于2mg/kg的剂量的量的cirtuzumab。在实施方案中,所述药物组合物包括等于15mg/kg的剂量的量的依鲁替尼和等于3mg/kg的剂量的量的cirtuzumab。在实施方案中,所述药物组合物包括等于15mg/kg的剂量的量的依鲁替尼和等于5mg/kg的剂量的量的cirtuzumab。在实施方案中,所述药物组合物包括等于15mg/kg的剂量的量的依鲁替尼和等于10mg/kg的剂量的量的cirtuzumab。

[0256] 在实施方案中,所述药物组合物包括等于420mg的剂量的量的依鲁替尼和等于1mg/kg的剂量的量的cirtuzumab。在实施方案中,所述药物组合物包括等于420mg的剂量的量的依鲁替尼和等于2mg/kg的剂量的量的cirtuzumab。在实施方案中,所述药物组合物包括等于420mg的剂量的量的依鲁替尼和等于3mg/kg的剂量的量的cirtuzumab。在实施方案中,所述药物组合物包括等于420mg的剂量的量的依鲁替尼和等于5mg/kg的剂量的量的cirtuzumab。在实施方案中,所述药物组合物包括等于420mg的剂量的量的依鲁替尼和等于10mg/kg的剂量的量的cirtuzumab。

[0257] 实施例

[0258] 经由BCR (B-细胞受体) 信号转导的信号转导被认为在疾病 (例如慢性淋巴细胞性白血病 (CLL)) 的发病机理和/或进展中扮演重要角色。此级联在CLL生物学中的重要性似乎已被用意欲阻断BCR-信号转导的小分子激酶抑制剂证明临床活性的临床试验重视。然而,几乎所有意欲阻断BCR-信号转导的抑制剂均无法具有完全效应 (CR), 表明抗衡BCR信号转导的其他机制可能参与以BCR信号转导治疗后的CLL的CR。本申请人已特别发现, ROR-1, 一种CLL的存活信号, 被抑制剂诱导且可以造成此效应。

[0259] 受体酪氨酸激酶样孤儿受体1 (ROR-1) 是一种胚胎内抗原, 其表达于来自具有慢性淋巴细胞性白血病 (CLL) 和套细胞淋巴瘤 (MCL) 的患者的淋巴瘤和白血病细胞的细胞表面上, 但表达于正常的B-细胞或其他产后组织上。配体Wnt5a与ROR-1的结合导致募集鸟嘌呤交换因子 (GEF), 其活化Rac1和RhoA并促进疾病相关的趋化性和增殖。靶向BCR和ROR-1信号传导途径、同时抑制BTK和ROR-1尚未报道。这里呈现的工作评估了依鲁替尼与新型和选择性抗ROR-1抗体cirtuzumab的组合在原发性CLL样品中的活性。当与用单独的单一药剂

的治疗相比,用BTK抑制剂和抗ROR-1抗体两者治疗进一步降低了CLL细胞存活,并且由于进一步破坏配体诱导的信号传导,组合诱导了协同生长抑制。因此,同时靶向这些激酶可以显著增加临床活性。

[0260] 此外,用抗ROR-1和依鲁替尼的组合治疗观察到的增强效力是意想不到的益处。具体地,将依鲁替尼与显示细胞介导的抗肿瘤反应性的抗CD20抗体的组合并未显示增强的效力。事实上,显示依鲁替尼干扰CD20抗体的活性。

[0261] 实施例1.用于治疗慢性淋巴细胞性白血病的Cirtuzumab (UC-961) 与依鲁替尼的组合。

[0262] 摘要. 依鲁替尼(一种不可逆转抑制布鲁顿氏酪氨酸激酶(BTK)的小分子)通过阻断B细胞受体(BCR)信号传导,在治疗具有慢性淋巴细胞性白血病(CLL)的患者中已显示效力,但不诱导完全反应(CR)或持久的缓解。RTK样孤儿受体-1(ROR-1)是Wnt5a的受体,并且在CLL进展中的非经典Wnt信号传导中起重要作用。在该研究中,申请人测试了依鲁替尼对CLL细胞中Wnt5a/ROR-1信号传导介导的活性的影响。申请人发现Wnt5a可以在用依鲁替尼处理的CLL细胞中诱导Rac1活化,并且尽管依鲁替尼治疗可以在不存在Wnt5a的情况下抑制CLL增殖;这被Wnt5a刺激逆转。此类作用被人源化抗ROR-1单克隆抗体(mAb) cirtuzumab (UC-961)阻断。此外,用UC-961和依鲁替尼的组合治疗显著抑制体外CLL增殖和体内ROR-1⁺白血病细胞的移植,这比单独的每种药剂更有效。该研究的结果为组合UC-961和依鲁替尼作为用于治疗具有CLL和其他表达ROR-1的B细胞肿瘤的患者提供了基本原理。

[0263] 引言. 经由B细胞受体(BCR)的信号传导在CLL的发病机制和进展中起重要作用。BCR的交联导致CD79a/b和Src家族激酶LYN的磷酸化,导致酪氨酸激酶Syk的募集和活化,所述酪氨酸激酶Syk诱导下游信号传导事件的级联,导致增强的B细胞存活。这种级联在CLL生物学中的重要性似乎通过激酶诸如Syk、Akt和BTK(其在BCR信号传导中是重要的)的小分子抑制剂的治疗作用。依鲁替尼是BTK的抑制剂,并且可以在大多数患者中诱导持久的临床反应,条件是它们无限期地继续疗法。然而,大多数患者通常仅实现部分反应(PR)。此外,患者几乎从未实现缺乏可检测的微小残留病(MRD)的完全反应(CR),甚至在延长的单药疗法之后。

[0264] 依鲁替尼实现深度CR的失败可能是由于存在未被BTK的抑制剂阻断的替代性存活信号传导途径。一种此类途径是通过经由ROR-1信号传导诱导的途径,所述ROR-1是在CLL细胞上表达、但不在正常的产后组织上表达的癌胎抗原。申请人发现ROR-1可以充当Wnt5a的受体,其可以诱导非经典WNT信号传导,导致Rho GTP酶(诸如Rac1)的活化和增强的白血病细胞增殖和存活。Wnt5a对Rac1的活化可以被抗ROR-1mAb,UC-961抑制,所述UC-961是一种一流的人源化单克隆抗体,其目前正在经历用于具有CLL的患者的临床试验中的评估。

[0265] 在该研究中,申请人在BCR信号传导抑制剂依鲁替尼存在的情况下研究Wnt5a/ROR-1信号传导,并检查依鲁替尼和人源化抗ROR-1单克隆抗体(mAb),cirtuzumab (UC-961)用于体外和体内CLL治疗的组合效应。

[0266] 结果.

[0267] 在依鲁替尼存在的情况下,UC-961抑制CLL细胞中的Wnt5a诱导的Rac1活化。Wnt5a可以诱导各种细胞类型(包括CLL细胞)中Rac1的活化。申请人评估Wnt5a是否可以在用依鲁替尼处理的CLL细胞中诱导Rac1活化。为此,申请人用浓度为0、0.25、0.5或1.0 μ M的依鲁替

尼处理CLL细胞2小时,且然后用外源Wnt5a处理细胞30分钟。免疫印迹分析显示用Wnt5a处理诱导Rac1活化,并且这种活化不能被依鲁替尼阻断,甚至在1 μ M的浓度(图6A),这是被认为是超生理的浓度,和引起100% BTK占据的浓度(图6B),这与先前的报告一致。此外,低至0.25 μ M的依鲁替尼浓度引起由抗 μ 的BCR连接诱导的钙通量的完全抑制(图S1C),而不会急剧影响CLL细胞活力(图6D)。

[0268] CLL患者血浆中依鲁替尼的最大浓度为近似0.5 μ M。因此,申请人在随后的研究中用0.5 μ M依鲁替尼处理CLL细胞。申请人在有或没有UC-961的情况下检查Wnt5a诱导的Rac1活化。申请人用依鲁替尼、UC-961或依鲁替尼和UC-961的组合预处理CLL细胞2小时,且然后在有或没有Wnt5a重组蛋白的情况下处理它们30分钟。依鲁替尼不抑制Wnt5a诱导的Rac1活化,然而,UC-961的处理将Wnt5a诱导的Rac1活化降低至与未用外源Wnt5a处理的CLL细胞中观察到的水平相当的水平(图1A-1B)。此外,UC-961与依鲁替尼的组合还抑制Wnt5a诱导的Rac1至基础水平(图1A-1B)。

[0269] 申请人检查经历依鲁替尼疗法的患者的CLL细胞是否可以用Wnt5a刺激。为此,从以420mg QD的标准治疗剂量经受用依鲁替尼治疗的患者收集血液单核细胞。将分离的CLL细胞在有或没有Wnt5a和/或UC-961的情况下孵育。Western印迹分析显示Wnt5a在来自这些患者的CLL细胞中诱导Rac1活化,而UC-961的孵育抑制Wnt5a诱导的Rac1活化;活性RAC1的水平与未处理的样品中的水平相似(图1C-1D)。这些结果证明依鲁替尼不抑制Wnt5a诱导的Rac1活化。

[0270] 在依鲁替尼存在的情况下,UC-961抑制Wnt5a增强的CLL细胞的增殖。Rac1-GTP酶的活化可以增强增殖。申请人通过在外源白介素(TL)-4和IL-10存在的情况下与表达CD154的细胞(HeLa_{CD154})共培养来诱导CLL细胞的增殖。向此类培养物中添加外源Wnt5a显著增强从用羧基荧光素琥珀酰亚胺酯(CFSE)标记的细胞的荧光强度推导的分裂中的细胞的比例;这种效应可以被UC-961抑制(图2A)。相反,与野生型HeLa细胞共培养的CLL细胞也未被诱导增殖,甚至在IL-4/10和/或Wnt5a存在的情况下(图7A-7B)。申请人的结果证明,由Wnt5a诱导的增殖可以被UC-961抑制至与没有Wnt5a的培养物中观察到的水平相当的水平。用依鲁替尼治疗可以抑制CD154诱导的CLL细胞增殖;然而,外源Wnt5a仍然可以在依鲁替尼存在的情况下增强分裂中的细胞的比例(图2A);这可以被UC-961抑制(图2A)。使用不同患者(N=6)的CLL细胞观察到相同的影响(图2B)。总的来说,这些数据证明UC-961可以阻断不受依鲁替尼治疗影响的Wnt5a信号传导。

[0271] 在CLL患者来源的异种移植物中UC-961和依鲁替尼的组合。申请人将CLL转移至免疫缺陷型Rag2^{-/-} γ c^{-/-}小鼠的腹膜腔中以生成异种移植物。申请人检查UC-961与依鲁替尼的组合在此类异种移植物中耗尽CLL细胞的能力。为此,申请人将AEVI-V培养基中的1 \times 10⁷个活的原代CLL细胞注射至每只小鼠的腹膜腔中。一天后,向小鼠不提供治疗或经由管饲法提供每日剂量的15mg/kg依鲁替尼,和/或以1mg/kg提供单一剂量的UC-961。7天后,CLL细胞经由腹膜灌洗(PL)收获,并通过流式细胞术检查。在用UC-961或依鲁替尼治疗的小鼠组中,每PL的计算的CLL细胞数显著少于从对照未治疗小鼠收集的数目。然而,用UC-961和依鲁替尼两者治疗的动物每PL的CLL细胞显著少于每个其他组,包括用单一药剂依鲁替尼或UC-961治疗的那些(图3)。这些数据证明UC-961对依鲁替尼在该异种移植模型中清除白血病细胞方面的累加效应。

[0272] 在依鲁替尼存在的情况下,UC-961抑制Wnt5a增强的Rac1活化和ROR-1×TCL1白血病细胞的增殖。从产生白血病的ROR-1×TCL1双转基因小鼠分离ROR-1×TCL1白血病细胞。申请人用依鲁替尼或UC-961预处理ROR-1×TCL1白血病细胞2小时,且然后在有或没有Wnt5a重组蛋白的情况下处理细胞30分钟。类似于申请人用人CLL细胞的发现,Wnt5a诱导的Rac1活化可以被UC-961抑制,但不被依鲁替尼抑制(图4A-4B)。UC-961与依鲁替尼的组合还抑制Wnt5a诱导的Rac1的活化至基础水平(图4A-4B)。然而,Wnt5a处理不能在源自缺乏ROR-1的表达的单转基因TCL1小鼠的白血病细胞中诱导Rac1活化(图8A)。

[0273] 再次,在外源IL-4和IL-10存在的情况下,与HeLa_{CD154}培养后,可诱导ROR-1×TCL1白血病细胞增殖。外源Wnt5a处理的添加显著增强分裂中的细胞的比例和可以从用CFSE标记的细胞的荧光推导的细胞分裂的数目(图4C-4D)。类似于人CLL细胞,与野生型HeLa细胞共培养的ROR-1×TCL1白血病细胞也未被诱导增殖,甚至在IL-4/10和/或Wnt5a存在的情况下(图8B)。用依鲁替尼治疗部分可以抑制CD154诱导的ROR-1×TCL1白血病细胞增殖。UC-961,但不是依鲁替尼,不能抑制Wnt5a响应于CD154和IL-4/10增强ROR-1×TCL1白血病细胞增殖的能力(图4C-4D)。另一方面,Wnt5a没有增强与HeLa_{CD154}细胞和IL-4/10共培养的ROR-1阴性TCL1-白血病细胞的增殖。

[0274] 在ROR-1×TCL1白血病移植小鼠中UC-961和依鲁替尼的组合。申请人检查UC-961与依鲁替尼的组合抑制在Rag2^{-/-}γc^{-/-}小鼠中ROR-1×TCL1白血病细胞(CD5⁺B220^{low}ROR-1⁺)的移植的能力。申请人每只Rag2^{-/-}γc^{-/-}小鼠移植2×10⁴个ROR-1×TCL1白血病细胞,且然后用15、5、1.67mg/kg依鲁替尼或用10、3、1mg/kg的单剂量的UC-961每天治疗动物。25天之后,处死动物并检查脾脏。依鲁替尼和UC-961以剂量依赖性方式抑制ROR-1×TCL1白血病细胞的扩增。申请人选择1-mg/kg单剂量的UC-961和5-mg/kg每日剂量的依鲁替尼用于组合研究。尽管单独用UC-961或依鲁替尼治疗的小鼠的脾脏显著小于没有治疗的同窝小鼠,但UC-961和依鲁替尼的组合治疗引起脾脏大小的最大减少(图5A)。申请人经由流式细胞术检查脾脏中ROR-1×TCL1白血病细胞的比例(图5B)。与未接受治疗的小鼠相比,用UC-961或依鲁替尼治疗的小鼠中每个脾脏的ROR-1×TCL1白血病细胞的百分比和总细胞数显著更低。然而,用UC-961和依鲁替尼两者治疗的动物每个脾脏的ROR-1×TCL1白血病细胞显著少于所有其他组,包括用单一药剂依鲁替尼或UC-961治疗的那些(图5C)。

[0275] 讨论。

[0276] CLL的特征在于单克隆的成熟CD5⁺B细胞的扩增,所述细胞在组织区室诸如淋巴结(LN)和骨髓(BM)中增殖。肿瘤增殖的差异可能是CLL的异质性临床过程的原因,并且反映恶性淋巴细胞间的遗传差异以及驱动肿瘤增殖的外部信号的活性。CLL细胞依赖于与肿瘤微环境中存在的细胞和可溶性因子的相互作用以增殖和存活。在可能支持体内CLL增殖和存活的途径中,BCR信号传导似乎是重要的途径之一。BTK参与BCR信号传导,并且对CLL发展的许多方面至关重要。在本研究中,申请人证明,依鲁替尼的治疗引起BTK的100%抑制,抑制IgM诱导的BCR信号传导,诸如钙内流,和降低CD154介导的CLL增殖。

[0277] 细胞途径比超高速公路更像网络。癌症使用多种病理信号传导和基因调控机制来促进其存活、增殖和恶性表型。申请人已报道了ROR-1在CLL中表达并有助于CLL进展。功能研究揭示,Wnt5a(ROR-1的配体)刺激ROR-1活化CLL细胞中的Rac1,并且Wnt5a/ROR-1信号传导对CLL进展是重要的。申请人检查依鲁替尼对Wnt5a/ROR-1信号传导(已显示其对Rac1活

化和CLL增殖是重要的)的功能的影响。申请人发现,即使依鲁替尼可以抑制CD154诱导的CLL增殖(这与先前报道的数据一致),但在外源IL-4/10存在的情况下与HeLa_{CD154}细胞共培养后,它不能抑制Wnt5a诱导的Rac1活化和Wnt5a增强的CLL增殖。此外,Wnt-5a在依鲁替尼治疗的患者中诱导显著的Rac1活化。由于CLL细胞的抗性克隆,CLL患者显示针对依鲁替尼的原发性抗性,这可能通过以下事实解释:依鲁替尼并不阻断对于CLL细胞生物学重要的Wnt5a诱导的信号传导,尤其在LN和BM微环境中。已经报道,依鲁替尼阻断Fc γ R介导的钙信号传导和细胞因子产生,但其对Rac活化没有影响,所述Rac活化是肌动蛋白聚合和吞噬作用的原因。

[0278] 通常需要组合疗法来有效地治疗许多肿瘤,因为存在多种冗余或替代途径,其可响应于途径的抑制而被活化并导致药物抗性和临床复发。研究人员已经从事于使用依鲁替尼与其他药物的组合疗法用于白血病治疗。还已观察到Bcl-2蛋白增加与Mcl-1和Bcl-XL下降,并且被表明为依鲁替尼处理的CLL细胞的存活机制。依鲁替尼与Bcl-2抑制剂(ABT-199)的组合通过BTK和Bcl-2途径的扰动显示对套细胞淋巴瘤细胞的增殖抑制和凋亡的协同作用。由于BTK和PI3K差异调节BCR信号传导,因此与依鲁替尼和PI3K抑制剂(艾代拉里斯(idelalisib))的组合疗法导致更明显的MCI和CLL细胞从其增殖和存活促进的生态位的动员。此外,依鲁替尼和抗CD20mAb组合研究显示,依鲁替尼显著降低CLL细胞上的CD20表达,并随后减少补体介导的细胞杀伤。依鲁替尼和抗CD20mAb之间的这种负相互作用可能降低组合疗法的效力。所有这些研究表明,当追求与依鲁替尼的组合疗法时,鉴定BCR信号传导与替代信号传导之间可能的相互作用或串扰是至关重要的。

[0279] 申请人在此证明UC-961在Wnt5a诱导的Rac1活化中显示显著的抑制活性,且由此抑制Wnt5a增强的CLL增殖。此外,施用UC-961和依鲁替尼的组合由于累加效应而消除受体Rag2^{-/-} γ c^{-/-}小鼠中的白血病细胞,其大于由单独每种药剂所引起。

[0280] UC-961和依鲁替尼实施彼此的影响。因此,预期组合疗法不仅导致其生长促进生态位中的增殖速率降低,而且还导致CLL细胞从那里更明显的动员。从药物清除和蛋白周转的角度来看,该效应也可以更强和更长,因为当使用该组合时BTK和ROR-1不必被完全占据。此外,可以给予较低剂量,这可能有益于效力/毒性比。然而,至关重要的是,靶向途径的多于一种关键组分可以克服先天疗法抗性并克服或预防获得性(单一)疗法抗性。例如,UC-961在依鲁替尼治疗的患者中仍然是有益的,所述患者具有BTK上的依鲁替尼结合位点处的突变,BTK轴上的额外分子诸如PLC γ 2中的突变,并且鉴定了SF3B1突变,其与预后不良有关。

[0281] 总之,申请人在使用CLL或ROR-1 \times TCL1白血病细胞的体外和体内系统中使用UC-961支持UC-961作为治疗药物的潜力,并且值得进一步研究其与依鲁替尼的组合疗法用于CLL和可能其他表达ROR-1的B细胞恶性肿瘤,其依赖于活跃的BCR信号传导和/或肿瘤微环境。

[0282] 方法.

[0283] 细胞和样品制备

[0284] CLL样本.从加利福尼亚大学圣地亚哥分校Moore's癌症中心的CLL患者收集血液样品。通过密度离心用Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare Life Sciences)分离PBMC,并悬浮于90%胎牛血清(FBS) (Omega Scientific)和10%DMSO (Sigma-Aldrich)中,用于在液氮

中的存活储存。在整个研究中使用具有 $>95\%$ CD19⁺CD5⁺CLL细胞的样品而无需进一步纯化。

[0285] 依鲁替尼占据测定. 用递增浓度的依鲁替尼(0、0.25、0.5或1 μ M)处理CLL细胞1小时。然后将细胞在磷酸盐缓冲盐水中洗涤并储存在 -80°C ，直至如所述进行BTK占据测定。使用GraphPad Prism 6.0版(GraphPad, San Diego, CA)比较BTK占据。

[0286] 钙通量测定. 将CLL细胞与0、0.25、0.5或1.0 μ M依鲁替尼孵育30分钟，且然后在缺乏Ca²⁺和Mg²⁺的Hanks平衡盐溶液(HBSS)中与2mM Fluo-4AM(Molecular Probes)一起加载。将细胞保持在37 $^{\circ}\text{C}$ 用于用抗人IgM F(ab)₂刺激。如所述，通过流式细胞术分析监测钙释放。

[0287] 细胞增殖测定. 如所述进行原代CLL或ROR-1 \times TCL1白血病细胞增殖测定。将白血病细胞用羧基荧光素琥珀酰亚胺酯(CFSE, Life Technologies)标记，并在24孔盘中在照射的HeLaCD154细胞层(8000Rad; 80戈瑞)上在完全RPMI-1640培养基中以15:1的CLL/HeLaCD154细胞比以 1.5×10^6 /孔/ml铺板，所述完全RPMI-1640培养基补充有5ng/ml重组人白介素(IL)-4(R&D Systems)和15ng/ml重组人IL-10(R&D Systems)。Wnt5a(200ng/ml, R&D Systems)或UC-961(10 μ g/ml)如文本中所示。CFSE标记的CLL细胞通过流式细胞术分析；如前所述，使用Modfit LT软件(3.0版, Verity Software House)分析细胞增殖。

[0288] Rac1活化测定. Rac1活化测定试剂购自Cytoskeleton并按照制造商的说明使用。简而言之，GTP结合的活性Rac1用PAK-PBD珠粒拉下，且然后进行免疫印迹分析。全细胞裂解物的免疫印迹用于评价总Rac1。条带的积分光密度(IOD)通过光密度测定法评估，并使用Gel-Pro Analyzer 4.0软件(Media Cybernetics, MD)进行分析。

[0289] 免疫印迹分析. 如所述进行Western印迹分析。来自每个样品的等量总蛋白通过SDS-PAGE分级分离并印迹至聚偏二氟乙烯膜上。Western印迹分析使用对Rac1特异性的一级mAb进行，所述一级mAb使用与辣根过氧化物酶缀合的二抗(Cell Signaling Technology)检测。

[0290] 人CLL患者来源的异种移植研究. 将6至8周龄的Rag2^{-/-} γ c^{-/-}小鼠(最初获得自Catriona Jamieson, University of California San Diego)在无特定病原体的条件下圈养在层流柜中并自由采食。申请人将AIM-V培养基中的 2×10^7 个活的原代CLL细胞注射至每只小鼠的腹腔中。在第二天，通过i.p.注射一次1mg/kg UC-961并通过口服管饲法每天以15mg/kg施用依鲁替尼。7天后，通过向腔体注射12mL的总体积的Dulbecco氏PBS来提取腹膜灌洗液(PL)。通过使用Guava计数测定PL细胞的总回收率。随后，将细胞用小鼠和人Fc封闭剂两者在4 $^{\circ}\text{C}$ 下封闭30分钟，用各种人细胞表面标志物(例如，CD19、CD5、CD45)染色，且然后进行流式细胞术分析。申请人通过将PL中CLL细胞的百分比乘以总PL细胞计数来计算每个PL中CLL细胞的数目。将来自人IgG处理的小鼠的残留白血病细胞设定为100%的基线。每个处理组包括至少6只小鼠，并且数据呈现为平均值 \pm SEM。

[0291] ROR-1 \times TCL1白血病过继性转移研究. 申请人评估了UC-961与依鲁替尼的组合在免疫缺陷型Rag2^{-/-} γ c^{-/-}小鼠中的抗白血病活性。ROR-1 \times TCL1白血病B细胞(CD5⁺B220^{hi}ROR-1⁺)获得自脾脏，经由密度梯度离心富集，悬浮于无菌PBS中，每只动物以 2×10^4 个细胞i.v.注射至Rag2^{-/-} γ c^{-/-}受体小鼠中。用于移植的样品通过流式细胞术验证为 $>95\%$ 白血病B细胞。对于UC-961的剂量依赖性疗法，受体小鼠不接受治疗，或在第1天接受10mg/kg、3mg/kg和1mg/kg的UC-961的一个剂量i.v.注射。对于依鲁替尼的剂量依赖性疗法，受体小鼠不接受治疗，或在第1天开始接受15mg/kg、5mg/kg和1.67mg/kg的依鲁替尼的每日p.o.注射。对

于组合疗法,受体小鼠不接受治疗,或在第1天开始接受1mg/kg的UC-961的一个剂量i.v.注射和/或每日p.o.5mg/kg的依鲁替尼。所有小鼠在第25天处死,且脾脏的单细胞悬浮液通过在氯化铵-钾(ACK)裂解溶液中低渗裂解来清除红细胞,洗涤,悬浮于PBS(pH=7.4)中的2%(wt/vol)BSA(Sigma)中,并使用优化浓度的荧光染料-缀合的mAb对CD3(17A2)、CD5(53-7.3)、B220(RA3-6B2)和ROR-1(4A5)的表面表达进行染色。使用双激光FACSCalibur(BD)通过四色多参数流式细胞术检查细胞,并使用FlowJo软件(TreeStar)分析数据。通过经由流式细胞术测定总淋巴细胞的CD5⁺B220^低ROR-1⁺细胞的百分比并将该数目乘以总脾细胞计数来计算每个脾脏的白血病细胞的总数。

[0292] 统计学.如通过Kolmogorov-Smirnov检验所确定,对于满足正态分布条件的数据集,数据呈现为如所示的平均值±SEM。平均值之间的差异的统计学显著性通过单因素ANOVA与Tukey氏多重比较检验进行评价。P值小于0.05被认为是显著的。用GraphPad Prism 6.0(GraphPad Software Inc.)进行显著性分析。

[0293] 实施例2.组合研究。

[0294] 用不同的BCR抑制剂处理CLL细胞并检查ROR-1表达,在BCR抑制剂处理后显著诱导ROR-1表达。申请人培养CLL细胞(其在免疫缺陷型Rag2/共同 γ 链敲除小鼠(Rag2^{-/-} γ c^{-/-})的腹膜腔中通过BCR信号传导抑制剂诱导的ROR-1表达增加),随后用对照Ig、抗ROR-1抗体、依鲁替尼或抗ROR-1抗体和依鲁替尼的组合处理。CLL细胞对用抗ROR-1抗体和依鲁替尼的组合治疗比仅用抗ROR-1抗体或依鲁替尼治疗更敏感。在免疫缺陷的受体小鼠中测试抗ROR-1抗体和依鲁替尼的组合抑制表达人ROR-1的鼠白血病细胞的过继性转移的能力。向6只RAG2^{-/-} γ c^{-/-}小鼠静脉内注射1mg/kg的人源化抗人ROR-1mAb UC-961。两小时后,向所有小鼠给予1x10⁴个源自ROR-1xTCL1转基因小鼠的CD5⁺B220¹⁰人ROR-1⁺鼠白血病细胞的静脉内注射。依鲁替尼每日治疗在白血病异种移植后第二天开始。当与对照动物(通过单一药剂治疗的动物)相比时,抗ROR-1抗体和依鲁替尼的组合治疗导致脾脏(这些恶性细胞累积的主要器官)中白血病细胞减少超过90%。

[0295] 如图9中所描绘,用不同的BCR抑制剂处理CLL细胞并检查ROR-1表达,在BCR抑制剂处理后显著诱导ROR-1表达。

[0296] 如图10中所描绘,申请人培养CLL细胞(其在免疫缺陷型Rag2/共同 γ 链敲除小鼠(Rag2^{-/-} γ c^{-/-})的腹膜腔中通过BCR信号传导抑制剂诱导的ROR-1表达增加),随后用对照Ig、抗ROR-1抗体、依鲁替尼或抗ROR-1抗体和依鲁替尼的组合处理。CLL细胞对用抗ROR-1抗体和依鲁替尼的组合治疗比仅用抗ROR-1抗体或依鲁替尼治疗更敏感。

[0297] 如图11中所描绘,向Rag2^{-/-} γ c^{-/-}小鼠给予1x10⁴个源自ROR-1xTCL1转基因小鼠的CD5⁺B220¹⁰人ROR-1⁺鼠白血病细胞的静脉内注射,其随后用对照Ig、抗ROR-1抗体、依鲁替尼或抗ROR-1抗体和依鲁替尼的组合治疗。与仅用抗ROR-1抗体或依鲁替尼的治疗相比,抗ROR-1抗体和依鲁替尼的组合治疗导致脾脏(这些恶性细胞累积的主要器官)中白血病细胞的显著减少。

[0298] 实施例3.CIRTTUZUMAB抑制用依鲁替尼治疗的慢性淋巴细胞性白血病中的Wnt5a诱导的Rac1活化

[0299] 摘要.经由B细胞受体(BCR)的信号传导在慢性淋巴细胞性白血病(CLL)的发病机制和进展中起重要作用。这通过依鲁替尼(一种可以阻断BCR-信号传导的布鲁顿氏酪氨酸

激酶 (BTK) 的抑制剂) 的临床有效性得到强调。然而, 没有继续疗法的情况下, 依鲁替尼不能诱导完全反应 (CR) 或持久缓解, 这表明替代途径也有助于不依赖于BCR信号传导的CLL生长/存活。ROR-1是Wnt5a的受体, 其可以促进Rac1的活化以增强CLL-细胞增殖和存活。在该研究中, 申请人发现用依鲁替尼治疗的患者的CLL细胞具有活化的Rac1。此外, Wnt5a可以诱导Rac1活化并在有效地完全抑制BTK和BCR-信号传导的浓度增强用依鲁替尼处理的CLL细胞的增殖。Wnt5a诱导的Rac1活化可以被cirtuzumab (UC-961) (抗ROR-1mAb) 阻断。申请人发现, 在体内清除白血病细胞中, 用cirtuzumab和依鲁替尼治疗比单独用任一药剂治疗明显更有效。该研究表明, cirtuzumab可以增强依鲁替尼在治疗具有CLL或其他ROR-1⁺B-细胞恶性肿瘤患者中的活性。

[0300] 引言. CLL细胞依赖于与肿瘤微环境中存在的细胞和可溶性因子的相互作用以增殖和存活。在可能支持体内CLL增殖和存活的途径中, BCR-信号传导起重要作用。BCR的交联导致CD79 α / β 和Src家族激酶LYN的磷酸化, 导致酪氨酸激酶Syk的募集和活化, 所述酪氨酸激酶Syk诱导下游信号传导事件的级联, 导致增强的B细胞存活。该级联在CLL生物学中的重要性似乎通过细胞内激酶的小分子抑制剂的临床活性得到强调, 所述细胞内激酶在BCR-信号传导中起关键作用, 诸如SYK、磷酸肌醇3-激酶 (PI3K) 或布鲁顿氏酪氨酸激酶 (BTK)。依鲁替尼是一种BTK的小分子抑制剂, 已证明在具有CLL的患者的治疗中高度有效。然而, 尽管具有优异的临床活性, 但在不存在持续治疗的情况下, 依鲁替尼通常不能根除该疾病或诱导持久的反应。

[0301] 依鲁替尼诱导完全反应的失败可能是由于未被BTK的抑制剂阻断的替代性存活-信号传导途径。一种此类途径是通过经由ROR-1信号传导诱导的途径, 所述ROR-1是在CLL细胞上表达、但不在正常的产后组织上表达的癌胎抗原。申请人发现ROR-1可以充当Wnt5a的受体, 其可以诱导活化Rho GTP酶 (诸如Rac1) 的非经典WNT信号传导, 并增强白血病细胞增殖和存活。Wnt5a对Rac1的活化可以被抗ROR-1mAb, cirtuzumab (UC-961) 抑制, 所述cirtuzumab (UC-961) 是一种一流的人源化单克隆抗体, 其目前正在经历用于具有CLL的患者的临床试验中的评估。

[0302] 在该研究中, 申请人研究Wnt5a/ROR-1信号传导是否受用依鲁替尼治疗的影响, 并且在体外和体内检查依鲁替尼和cirtuzumab对CLL细胞的活性。

[0303] 材料和方法

[0304] 血液采样和动物. 按照赫尔辛基宣言和加利福尼亚大学圣地亚哥分校的机构审查委员会 (IRB) (IRB批准号080918), 在加利福尼亚大学圣地亚哥Moore癌症中心从CLL患者收集血液样品, 所述CLL患者满足普通B细胞CLL的诊断和免疫表型标准且提供书面知情同意书。如所述分离PBMC。所有小鼠实验都根据美国国立卫生研究院关于实验室动物的护理和使用的指南进行, 并且加州大学圣地亚哥分校批准研究方案。所有小鼠都是周龄和性别匹配的。

[0305] BTK-占据测定. 用递增浓度的依鲁替尼 (0、0.25、0.5或1 μ M) 处理CLL细胞1小时。然后将细胞在磷酸盐缓冲盐水中洗涤并储存在-80 $^{\circ}$ C, 直至如所述进行BTK占据测定。使用GraphPad Prism 6.0版 (GraphPad, San Diego, CA) 比较BTK占据。

[0306] 钙通量测定. 将CLL细胞与0、0.25、0.5或1.0 μ M依鲁替尼孵育30分钟, 且然后在缺乏Ca²⁺和Mg²⁺的Hanks平衡盐溶液 (HBSS) 中与2mM Fluo-4AM (Molecular Probes) 一起加载。

将细胞保持在37°C用于用抗人IgM F(ab)₂刺激。如所述,通过流式细胞术分析监测钙释放。

[0307] Rac1活化测定.如前所述,用于Rac1活化测定的试剂在申请人的实验室中进行。如所述进行Rac1拉下和免疫印迹分析。

[0308] 细胞增殖测定.申请人根据前述描述进行白血病细胞增殖测定。对于这些分析,申请人使用其特征性的光散射和排除PI的能力对活的CD5⁺CD19⁺细胞进行门控(图18A-18B)。

[0309] 细胞周期分析.将白血病细胞(1×10⁷)悬浮于100μl PBS中,并通过添加1ml冷乙醇在4°C下固定过夜。将细胞以700x g旋转2分钟,并用含有1%BSA的PBS洗涤两次。然后将沉淀的细胞悬浮于500μl含有1%BSA和1μl RNase (100mg/ml)的PBS中;添加RNase以消化RNA。将PI溶液(0.5mg/ml,在38mM柠檬酸钠,pH7.0中)、1μl煮沸的RNase A(100mg/ml)和PI-染色溶液(0.5mg/ml,在38mM柠檬酸钠,pH7.0中;60μl)添加至细胞中,并在室温下避光孵育1小时。其后立即,使用FACSArray (Becton Dickinson)经由流式细胞术分析细胞,并使用FlowJo软件(Tree Star Inc.)分析数据。

[0310] CLL患者来源的异种移植物.将6至8周龄的Rag2^{-/-}γc^{-/-}小鼠(最初获得自Catriona Jamieson,University of California San Diego)在无特定病原体的条件下圈养在层流柜中并自由采食。申请人将AIM-V培养基中的2×10⁷个活的原代CLL细胞注射至每只小鼠的腹腔中。在第二天,通过i.p.注射一次1mg/kg cirtuzumab并通过口服管饲法每天以15mg/kg施用依鲁替尼。7天后,通过向腔体注射12mL的总体积的Dulbecco氏PBS来提取腹膜灌洗液(PL)。通过使用Guava计数测定PL细胞的总回收率。随后,将细胞用小鼠和人Fc封闭剂两者在4°C下封闭30分钟,用各种人细胞表面标志物(例如,CD19、CD5、CD45)染色,且然后进行流式细胞术分析。申请人通过将PL中CLL细胞的百分比乘以总PL细胞计数来计算每个PL中CLL细胞的数目。将来自人IgG处理的小鼠的残留白血病细胞设定为100%的基线。每个处理组包括至少5只小鼠,并且数据呈现为平均值±SEM。

[0311] ROR-1×TCL1白血病过继性转移研究.如前所述,申请人评估cirtuzumab与依鲁替尼的组合在免疫缺陷的Rag2^{-/-}γc^{-/-}或免疫活性的Rag2^{-/-}γc^{-/-}转基因小鼠中的抗白血病活性。

[0312] 统计学分析.数据显示为平均值±SEM。通过Kolmogorov-Smirnov检验确定数据集的正态分布。平均值之间的差异的统计学显著性通过单因素ANOVA与Tukey氏多重比较检验进行评价。申请人使用GraphPad Prism 6.0(GraphPad Software Inc.)来使用文本中描述的统计学方法计算显著性水平。p≤0.05被认为是显著的。

[0313] 结果

[0314] 依鲁替尼未能抑制CLL中的Wnt5a诱导的Rac1活化。申请人检查每天以420mg的标准剂量服用依鲁替尼的患者的血液单核细胞。新鲜分离的CLL细胞具有活化的Rac1,其在无血清培养基中随着时间而减少,除非提供有外源Wnt5a(图12A-12B),如对于未服用依鲁替尼的患者的CLL细胞所示。此外,来自依鲁替尼治疗的患者的CLL细胞与或不与Wnt5a和/或cirtuzumab一起孵育。免疫印迹分析显示Wnt5a在来自所有检查的患者的CLL细胞中诱导Rac1活化,而用cirtuzumab治疗抑制Wnt5a诱导的Rac1活化(图12C-12D)。这些结果表明用依鲁替尼的疗法不抑制ROR-1依赖性、Wnt5a诱导的Rac1活化。

[0315] 申请人检查体外用依鲁替尼治疗CLL细胞是否可以抑制CLL中的Wnt5a诱导的Rac1活化。为此,申请人将从未治疗患者收集的CLL细胞与浓度为0、0.25、0.5或1.0μM的依鲁替

尼一起孵育2小时,且然后用外源Wnt5a处理细胞30分钟。免疫印迹分析证明,依鲁替尼也不能阻断Wnt5a诱导的Rac1活化,甚至在1 μ M的依鲁替尼浓度(图6A),其大大超过实现BTK的100%占据和BTK活性的抑制所需的浓度(图6B)。另一方面,申请人注意到浓度低至0.25 μ M的依鲁替尼抑制由抗IgM诱导的钙通量(图6C),而不会急剧影响CLL细胞活力(图6D)。

[0316] 用该药物治疗的患者中依鲁替尼的峰值血浆浓度为近似0.5 μ M,可以实现100%占据和BTK抑制的浓度。因此,依鲁替尼以0.5 μ M用于后续研究。申请人在有或没有依鲁替尼和/或cirtuzumab的情况下检查Wnt5a诱导的Rac1活化。将CLL细胞与依鲁替尼、cirtuzumab或依鲁替尼和cirtuzumab两者一起培养2小时,且然后用外源Wnt5a刺激30分钟。为了比较,来自相同CLL样品的细胞在没有Wnt5a的情况下平行培养。用Wnt5a处理CLL细胞诱导Rac1活化至显著高于未用Wnt5a处理的CLL细胞的水平的水平(图12E-12F)。用cirtuzumab、而非依鲁替尼处理可以抑制CLL细胞中Wnt5a诱导的Rac1活化(图12E-12F)。如所预期,依鲁替尼没有阻断cirtuzumab抑制Wnt5a诱导的Rac1活化的能力(图12E-12F)。

[0317] Cirtuzumab抑制用依鲁替尼处理的CLL细胞的Wnt5a增强的增殖。Rac1-GTP酶的活化可以增强增殖,而Rac1的丧失导致造血细胞生长受损。申请人通过将白血病细胞与表达CD154的HeLa细胞(HeLa_{CD154})和重组白介素(IL)-4和IL-10的共培养来诱导CLL细胞的增殖。将外源Wnt5a添加至CLL细胞与HeLa_{CD154}细胞和IL-4/10的共培养物中显著增强分裂中CLL细胞的比例。用cirtuzumab而非依鲁替尼处理CLL细胞可以阻断Wnt5a增强的CLL细胞的增殖(图13A)。对于不同患者(n=6)的CLL细胞观察到相同的影响(图13B)。单独的IL4/10和/或Wnt5a不能诱导CLL-细胞增殖(图18A-18B)。此外,用碘化丙锭(PI)对透化的白血病细胞的细胞周期分析证明Wnt5a增强S/G2/M中CD154刺激的白血病细胞的分数的分数(图13C-13D)。Wnt5a增强S/G2/M中细胞的比例的能力可以通过用cirtuzumab处理而非依鲁替尼处理来抑制(图13C-13D)。

[0318] cirtuzumab和/或依鲁替尼在CLL患者来源的异种移植物中的活性。申请人将CLL细胞转移至免疫缺陷的Rag2^{-/-} γ c^{-/-}小鼠的腹腔中,并检查用依鲁替尼和/或cirtuzumab处理是否可以在体内耗尽CLL细胞。为此,申请人将AIM-V培养基中的1 \times 10⁷个活的原代CLL细胞注射至每只小鼠的腹腔中。一天后,向小鼠不提供治疗或经由经口管饲法以15mg/kg提供每日剂量的依鲁替尼,和/或经由i.p.注射以1mg/kg提供单一剂量的cirtuzumab。7天后,CLL细胞经由腹膜灌洗(PL)收获,并通过检查收获的腹膜细胞中CLL细胞的比例(图14A)。用cirtuzumab或依鲁替尼治疗的小鼠中PL中的CLL细胞的百分比和总数显著低于未接受任何治疗的小鼠中。然而,在用cirtuzumab和依鲁替尼治疗的小鼠的PL中发现的CLL细胞显著少于单独用任一种药剂治疗的小鼠的PL中(图14B)。

[0319] Cirtuzumab,而非依鲁替尼,抑制Wnt5a增强的Rac1活化和ROR-1 \times TCL1白血病细胞的增殖。从产生ROR-1⁺白血病的ROR-1 \times TCL1双转基因小鼠分离ROR-1 \times TCL1白血病细胞。申请人用依鲁替尼或cirtuzumab预处理ROR-1 \times TCL1白血病细胞2小时,且然后在有或没有Wnt5a的情况下培养细胞30分钟。类似于用人CLL细胞的发现,Wnt5a诱导的Rac1活化可以被cirtuzumab抑制,但不被依鲁替尼抑制(图15A-15B)。cirtuzumab与依鲁替尼的组合还抑制Wnt5a诱导的Rac1的活化至未处理细胞中观察到的水平(图15A-15B)。然而,Wnt5a治疗不能诱导单转基因TCL1小鼠的白血病细胞中Rac1的活化,所述单转基因TCL1小鼠发展缺乏ROR-1的表达的白血病(图7C)。

[0320] 再次, 申请人通过将细胞在重组IL-4/10存在的情况下与HeLaCD154共培养来诱导ROR-1×TCL1白血病细胞的增殖。外源Wnt5a显著增加细胞分裂数的百分比(图15C)。与人CLL细胞一样, 单独的Wnt5a和/或IL-4/10不能诱导ROR-1×TCL1转基因小鼠的ROR-1⁺白血病细胞的增殖(图15C), 表明该效应对CD154的依赖性。与早期研究一致, Wnt5a没有增强与HeLaCD154细胞和IL-4/10共培养的ROR-1阴性TCL1-白血病细胞的增殖(图21A), 表明该效应对ROR-1的依赖性。用依鲁替尼治疗不能抑制Wnt5a增强CD154诱导的ROR-1×TCL1白血病细胞增殖的能力。另一方面, cirmtuzumab阻断Wnt5a响应于CD154和IL-4/10增强ROR-1×TCL1白血病细胞增殖的能力(图15C)。

[0321] 如对于人CLL细胞所示, 使用PI对透化的ROR-1×TCL1白血病细胞的细胞周期分析证明Wnt5a可以增加S/G2/M中CD154刺激的ROR-1⁺白血病细胞的比例(图19A-19B)。此外, Wnt5a增强S/G2/M中ROR-1⁺白血病细胞的分数的能力可以通过用cirmtuzumab处理而非依鲁替尼处理来抑制(图19A-19B)。

[0322] 用cirmtuzumab和/或依鲁替尼治疗移植ROR-1×TCL1白血病的免疫缺陷小鼠。申请人检查cirmtuzumab和/或依鲁替尼抑制在Rag2^{-/-}γc^{-/-}小鼠中ROR-1×TCL1白血病细胞移植的能力。申请人用2×10⁴个ROR-1×TCL1白血病细胞移植每只动物, 且然后通过管饲法以15、5、1.67mg/kg每日施用依鲁替尼, 或经由静脉内注射以1、3或10mg/kg提供单剂量的cirmtuzumab。25天之后, 处死动物并检查每只动物的脾脏。依鲁替尼(图20A)或cirmtuzumab(图20B)以剂量依赖性方式减少脾白血病细胞的数目。申请人选择1mg/kg的cirmtuzumab剂量和依鲁替尼5mg/kg的每日剂量用于组合研究。尽管单独用cirmtuzumab或依鲁替尼治疗的移植小鼠具有比未接受任何治疗的移植动物显著更小的脾, 但用cirmtuzumab和依鲁替尼的组合治疗的小鼠具有最大的脾脏大小的减少(图16A)。此外, 用cirmtuzumab或依鲁替尼治疗的小鼠中脾脏中白血病细胞的平均比例和数目显著低于未接受治疗的移植小鼠(图16B-16C)。然而, 用cirmtuzumab和依鲁替尼治疗的移植动物每个脾脏白血病细胞的比例和数目显著低于所有其他组(图16B-16C)。

[0323] 用cirmtuzumab和/或依鲁替尼治疗移植ROR-1×TCL1白血病的免疫活性小鼠。申请人检查cirmtuzumab和/或依鲁替尼抑制免疫活性人ROR-1转基因(ROR-1-Tg)小鼠中ROR-1×TCL1白血病细胞(CD5⁺B220^{low}ROR-1⁺)的移植的能力。申请人将2×10⁴个ROR-1×TCL1白血病细胞注射至ROR-1-Tg小鼠, 并且不施用治疗, 经由管饲法以5mg/kg施用依鲁替尼的每日剂量, 或经由静脉内注射以10mg/kg施用cirmtuzumab的每周剂量。28天之后, 处死动物并检查每只动物的脾脏。尽管单独用cirmtuzumab或依鲁替尼治疗的移植小鼠具有比未接受任何治疗的移植动物显著更小的脾, 但用cirmtuzumab和依鲁替尼的组合治疗的小鼠具有最大的脾脏大小的减少(图17A)。此外, 用cirmtuzumab或依鲁替尼治疗的小鼠中脾脏中平均比例和白血病细胞数显著低于未接受治疗的小鼠中(图17B-17C)。然而, 用cirmtuzumab和依鲁替尼治疗的移植动物每个脾脏白血病细胞的比例和数目显著低于所有其他组(图17B-17C)。

[0324] 讨论

[0325] 在该研究中, 申请人检查接受用依鲁替尼治疗的患者的CLL细胞, 其通过其抑制BTK的能力高度有效地抑制BCR-信号传导。首先, 申请人注意到用依鲁替尼治疗的患者的CLL细胞具有活化的Rac1, 其在无血清培养基中随着时间而减少, 除非申请人用外源Wnt5a

补充培养基。此外,申请人发现Wnt5a可以诱导CLL活化Rac1,如在各种细胞类型(包括CLL细胞)中所示。随后的研究显示,Wnt5a可以诱导Rac1活化,甚至在用超生理浓度的依鲁替尼处理的CLL细胞中,所述超生理浓度超过实现100%占据和抑制BTK和BCR-信号传导所需的水平。本研究中所示的Wnt5a信号传导依赖于ROR-1,如通过cirmtuzumab抑制Wnt5a诱导的Rac1的活化的能力所表明。申请人得出结论,依鲁替尼不能阻断ROR1依赖性、Wnt5a诱导的Rac1的活化,所述Rac1充当可影响多种信号传导途径的细胞内信号转导体。

[0326] 活化的Rac1可能减轻抗癌疗法的有效性。先前的研究发现,活化的Rac1可以增强CLL细胞对细胞毒性药物的抗性。一项研究发现,活化的T细胞和成纤维细胞可以诱导CLL细胞以活化Rac1,并获得对氟达拉滨一磷酸盐的细胞毒性作用的抗性;活化的Rac1的抑制可以恢复这些CLL细胞对该药物的敏感性。在另一项研究中,发现Rac1与Bcl-2相互作用并增强其功能,所述Bcl-2在CLL中过表达。另一项涉及急性白血病细胞的研究发现,用NSC-23766(活化的Rac1的抑制剂)处理可以增强Bcl-2拮抗剂对白血病细胞的细胞毒性。最后淋巴瘤细胞中p53的丢失已与Rac1的活化增加有关,所述Rac1可以被NSC-23766或Rac1的显性阴性形式(Rac1N17)抑制,导致自发或药物诱导的凋亡的速率的剂量依赖性增加。可想到,在用依鲁替尼治疗的患者的CLL细胞中观察到的活化的Rac1提供了辅助信号,其增强用依鲁替尼治疗的患者的白血病细胞的存活。

[0327] 此外,Wnt5a信号传导也可以促进用依鲁替尼治疗的患者的白血病细胞增殖。Wnt5信号传导的功能性结果部分由Wnt5a增强由CD154诱导的增殖的能力证明,所述CD154可以诱导在外源IL4/10或IL-21存在的情况下的体外CLL增殖。尽管依鲁替尼部分可以抑制CD154诱导的CLL细胞增殖,但可能由于其抑制BCR和BCR非依赖性途径的能力,申请人发现依鲁替尼不能抑制Wnt5a经由ROR-1依赖性信号传导增强CD154诱导的CLL增殖的能力,然而,其可以通过用cirmtuzumab治疗来阻断。

[0328] Wnt5a最可能由CLL微环境中的细胞产生,但具有CLL的患者的血浆也具有高水平的Wnt5a。Wnt5a也可能由CLL细胞自身产生,允许自分泌活化。实际上,一项研究发现可能表达高水平的Wnt5a的CLL细胞显然具有增加的运动性和趋化反应,这可能由于Wnt5a-自分泌信号传导。申请人在较早研究中还注意到,Wnt5a可以经由RhoA的活化增强CLL细胞向趋化因子的迁移。然而,因为BTK经由趋化因子受体诸如CXCR4在CLL信号传导中起重要作用,申请人将注意力集中于Wnt5a活化Rac1的能力,所述Rac1可以经由相对独立于BTK的信号传导途径增强由CD154诱导的增殖。

[0329] 因为Wnt5a-ROR-1信号传导途径在用依鲁替尼处理的CLL细胞中看起来是完整的,所以申请人检查用依鲁替尼和cirmtuzumab治疗的累加(如果不是协同的)效应。对于用组织相容性ROR-1⁺白血病或人CLL异种移植物移植的小鼠,申请人发现,在体内清除白血病细胞中,用cirmtuzumab和依鲁替尼两者治疗比单独用任一药剂治疗显著更有效。该研究表明,cirmtuzumab可以增强依鲁替尼在治疗具有CLL或其他ROR-1⁺B-细胞恶性肿瘤患者中的活性。

[0330] 组合疗法在治疗具有癌症的患者方面经常更有效。正在进行研究,以评估依鲁替尼与其他药物(诸如维奈托克(venetoclax)或抗CD20mAb)的组合的活性。因为cirmtuzumab和依鲁替尼靶向独立的信号传导途径,它们在从小鼠模型清除白血病细胞中具有明显的协同作用。通过靶向多于一种导致白血病细胞生长/存活的信号传导途径,与cirmtuzumab和

依鲁替尼的组合疗法也可以减轻获取对BTK的抑制剂的抗性的风险,其有时在接受依鲁替尼单一疗法的患者中发生。

[0331] 总之,从治疗效力和耐药性的角度来看,这些临床前观察结果提供了用cirtuzumab与依鲁替尼或BTK的其他抑制剂诸如阿卡替尼对于具有CLL或表达ROR-1的其他B细胞恶性肿瘤的患者的基本原理。

[0332] 实施例4.用于套细胞淋巴瘤的抗ROR-1抗体和依鲁替尼的组合

[0333] 申请人组最近的一项研究证明,用依鲁替尼治疗的患者的CLL细胞具有活化的Rac1。此外,Wnt5a可以诱导Rac1活化并在有效地完全抑制BTK和BCR-信号传导的浓度增强用依鲁替尼处理的CLL细胞的增殖。Wnt5a诱导的Rac1活化可以被cirtuzumab(UC-961)(抗ROR-1mAb)阻断。申请人发现,在体内清除白血病细胞中,用cirtuzumab和依鲁替尼治疗比单独用任一药剂治疗明显更有效。该研究表明,cirtuzumab可以增强依鲁替尼在治疗具有CLL或其他ROR-1⁺B-细胞恶性肿瘤患者中的活性。因此,申请人检查具有MCL的患者的原发性淋巴瘤细胞的Wnt5a诱导的Rac1的ROR-1依赖性活化。将MCL细胞与依鲁替尼、cirtuzumab或依鲁替尼和cirtuzumab两者一起培养2小时,且然后用外源Wnt5a刺激30分钟。为了比较,来自相同MCL样品的细胞在没有Wnt5a的情况下平行培养。如对于CLL细胞所示,Wnt5a以ROR-1依赖性方式诱导原代MCL细胞的活化。例如,Wnt5a在原代MCL细胞中诱导Rac1活化(图23A)。Cirtuzumab,而非依鲁替尼,可以抑制Wnt5a在原代MCL细胞中诱导Rac1活化的能力,类似于申请人在原代CLL细胞中观察到的。

[0334] Rac1-GTP酶的活化可以增强增殖,而Rac1的丧失导致造血细胞生长受损。碘化丙啶(PI)是最常用的用于DNA含量/细胞周期分析的染料。为了评估MCL细胞对CD40连接和IL-4暴露的反应性,申请人通过将淋巴瘤细胞与表达CD154的HeLa细胞(HeLaCD154)以及重组IL-4和IL-10细胞共培养来诱导原代MCL细胞的增殖。将外源Wnt5a添加至MCL细胞与HeLaCD154细胞和IL-4/10的共培养物中,显著增强S/G2期中的MCL细胞的比例,如使用基于PI的细胞周期研究所评价,如对于CLL细胞所示。申请人还使用PI对透化的MCL细胞进行细胞周期分析,并且发现Wnt5a刺激显著增加CD154刺激的S/G2中的MCL细胞的分数的分数(图23B)。Wnt5a增强S/G2中原代MCL细胞的比例的能力可以通过用cirtuzumab处理而非依鲁替尼处理来抑制,如先前对于CLL细胞所示。

[0335] 这些数据证明ROR-1信号传导在MCL中的功能重要性以及cirtuzumab抑制该淋巴瘤中ROR-1介导的致癌活性的能力。MCL中cirtuzumab的活性与申请人在CLL中观察到的活性相同,对于CLL,申请人在3种不同动物模型中发现cirtuzumab与依鲁替尼在清除白血病细胞中具有协同抗肿瘤活性。

[0336] 实施例5.用于治疗慢性淋巴细胞性白血病和B细胞非霍奇金淋巴瘤的候选药物

[0337] 新型BTK抑制剂依鲁替尼和磷脂酰-4-5-二磷酸3-激酶- δ 抑制剂艾代拉里斯(idelalisib)(CAL-101)单独或与抗CD20抗体组合是治疗慢性淋巴细胞性白血病和B细胞非霍奇金淋巴瘤的候选药物。用依鲁替尼预处理1小时不增加由抗CD20抗体介导的细胞系或慢性淋巴细胞性白血病样品的直接细胞死亡。用依鲁替尼预处理不抑制补体活化或补体介导的裂解。相反,依鲁替尼在纯化系统或全血测定中强烈抑制由抗CD20抗体利妥昔单抗、奥法木单抗或奥比珠单抗诱导的所有细胞介导的机制。自然杀伤细胞的活化和通过这些细胞的抗体依赖性细胞毒性以及通过巨噬细胞或嗜中性粒细胞的吞噬作用可以被依鲁替尼

抑制,其中半数最大有效浓度为0.3-3 μ M。从持续口服依鲁替尼治疗的患者分离的自然杀伤细胞的抗CD20介导的活化的分析表明,重复的药物给药在体内抑制这些细胞。已经显示,磷脂酰-4-5-二磷酸3-激酶- δ 抑制剂艾代拉里斯(idelalisib)类似地抑制由抗CD20抗体诱导的免疫细胞介导的机制,尽管该药物在10 μ M的影响弱于以相同浓度的依鲁替尼观察到的影响。不希望受任何理论束缚,据信抗CD20抗体与这些激酶抑制剂的组合治疗方案的设计应考虑这两类药物之间的多重负相互作用。

[0338] 参考文献

[0339] Stevenson FK, Krysov S, Davies AJ, Steele AJ, Packham G. B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2011 Oct 20; 118:4313-4320.

[0340] Burger JA, Tedeschi A, Barr PM, Robak T, Owen C, Ghia P, 等人 Ibrutinib as Initial Therapy for Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med* 2015 Dec 17; 373:2425-2437.

[0341] Byrd JC, Furman RR, Coutre SE, Flinn IW, Burger JA, Blum KA, 等人 Targeting BTK with ibrutinib in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2013 Jul 4; 369:32-42.

[0342] Byrd JC, O'Brien S, James DF. Ibrutinib in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2013 Sep 26; 369:1278-1279.

[0343] Komarova NL, Burger JA, Wodarz D. Evolution of ibrutinib resistance in chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014 Sep 23; 111:13906-13911.

[0344] Fukuda T, Chen L, Endo T, Tang L, Lu D, Castro JE, 等人 Antisera induced by infusions of autologous Ad-CD154-leukemia B cells identify ROR-1 as an oncofetal antigen and receptor for Wnt5a. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008 Feb 26; 105:3047-3052.

[0345] Widhopf GF, 2nd, Cui B, Ghia EM, Chen L, Messer K, Shen Z, 等人 ROR-1 can interact with TCL1 and enhance leukemogenesis in Emu-TCL1 transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014 Jan 14; 111:793-798.

[0346] Hofbauer SW, Krenn PW, Ganghammer S, Asslaber D, Pichler U, Oberascher K, 等人 Tiam1/Rac1 signals contribute to the proliferation and chemoresistance, but not motility, of chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood* 2014 Apr 3; 123:2181-2188.

[0347] Kaucka M, Plevova K, Pavlova S, Janovska P, Mishra A, Verner J, 等人 The planar cell polarity pathway drives pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia by the regulation of B-lymphocyte migration. *Cancer Res* 2013 Mar 1; 73:1491-1501.

[0348] Yu J, Chen L, Cui B, Widhopf GF, 2nd, Shen Z, Wu R, 等人 Wnt5a induces ROR-1/ROR2 heterooligomerization to enhance leukemia chemotaxis and proliferation. *J Clin Invest* 2015 Dec 21.

[0349] Choi MY, Widhopf GF, 2nd, Wu CC, Cui B, Lao F, Sadarangani A, 等人 Pre-

clinical Specificity and Safety of UC-961, a First-In-Class Monoclonal Antibody Targeting ROR-1. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 2015 Jun; 15 Suppl: S167-169.

[0350] Nishita M, Itsukushima S, Nomachi A, Endo M, Wang Z, Inaba D, 等人 Ror2/ Frizzled complex mediates Wnt5a-induced AP-1 activation by regulating Dishevelled polymerization. *Mol Cell Biol* 2010 Jul; 30: 3610-3619.

[0351] Naskar D, Maiti G, Chakraborty A, Roy A, Chattopadhyay D, Sen M. Wnt5a-Rac1-NF- κ B homeostatic circuitry sustains innate immune functions in macrophages. *J Immunol* 2014 May 1; 192: 4386-4397.

[0352] Zhu Y, Shen T, Liu J, Zheng J, Zhang Y, Xu R, 等人 Rab35 is required for Wnt5a/Dvl2-induced Rac1 activation and cell migration in MCF-7 breast cancer cells. *Cell Signal* 2013 May; 25: 1075-1085.

[0353] Ren L, Campbell A, Fang H, Gautam S, Elavazhagan S, Fatehchand K, 等人 Analysis of the Effects of the Bruton's tyrosine kinase (BTK) Inhibitor Ibrutinib on Monocyte Fc γ Receptor (Fc γ R) Function. *J Biol Chem* 2016 Feb 5; 291: 3043-3052.

[0354] Honigberg LA, Smith AM, Sirisawad M, Verner E, Loury D, Chang B, 等人 The Bruton tyrosine kinase inhibitor PCI-32765 blocks B-cell activation and is efficacious in models of autoimmune disease and B-cell malignancy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010 Jul 20; 107: 13075-13080.

[0355] Rushworth SA, Murray MY, Zaitseva L, Bowles KM, MacEwan DJ. Identification of Bruton's tyrosine kinase as a therapeutic target in acute myeloid leukemia. *Blood* 2014 Feb 20; 123: 1229-1238.

[0356] Di Paolo JA, Huang T, Balazs M, Barbosa J, Barck KH, Bravo BJ, 等人 Specific BTK inhibition suppresses B cell- and myeloid cell-mediated arthritis. *Nat Chem Biol* 2011 Jan; 7: 41-50.

[0357] de Jong J, Sukbuntherng J, Skee D, Murphy J, O'Brien S, Byrd JC, 等人 The effect of food on the pharmacokinetics of oral ibrutinib in healthy participants and patients with chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Chemother Pharmacol* 2015 May; 75: 907-916.

[0358] Advani RH, Buggy JJ, Sharman JP, Smith SM, Boyd TE, Grant B, 等人 Bruton tyrosine kinase inhibitor ibrutinib (PCI-32765) has significant activity in patients with relapsed/refractory B-cell malignancies. *J Clin Oncol* 2013 Jan 1; 31: 88-94.

[0359] Etienne-Manneville S, Hall A. Rho GTPases in cell biology. *Nature* 2002 Dec 12; 420: 629-635.

[0360] Gu Y, Filippi MD, Cancelas JA, Siefring JE, Williams EP, Jasti AC, 等人 Hematopoietic cell regulation by Rac1 and Rac2 guanosine triphosphatases. *Science* 2003 Oct 17; 302: 445-449.

[0361] Fecteau JF, Corral LG, Ghia EM, Gaidarova S, Futralan D, Bharati IS, 等人

Lenalidomide inhibits the proliferation of CLL cells via a cereblon/p21 (WAF1/Cip1)-dependent mechanism independent of functional p53. *Blood* 2014Sep 4;124:1637-1644.

[0362] Zhang S, Wu CC, Fecteau JF, Cui B, Chen L, Zhang L, 等人 Targeting chronic lymphocytic leukemia cells with a humanized monoclonal antibody specific for CD44. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013Apr 9;110:6127-6132.

[0363] Herishanu Y, Perez-Galan P, Liu D, Biancotto A, Pittaluga S, Vire B, 等人 The lymph node microenvironment promotes B-cell receptor signaling, NF-kappaB activation, and tumor proliferation in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2011Jan 13;117:563-574.

[0364] Burger JA. Nurture versus nature: the microenvironment in chronic lymphocytic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2011;2011:96-103.

[0365] Chiorazzi N, Rai KR, Ferrarini M. Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2005Feb 24;352:804-815.

[0366] Rossi D, Spina V, Bomben R, Rasi S, Dal-Bo M, Brusca A, 等人 Association between molecular lesions and specific B-cell receptor subsets in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2013Jun 13;121:4902-4905.

[0367] Ghia P, Chiorazzi N, Stamatopoulos K. Microenvironmental influences in chronic lymphocytic leukaemia: the role of antigen stimulation. *J Intern Med* 2008Dec;264:549-562.

[0368] Herishanu Y, Katz BZ, Lipsky A, Wiestner A. Biology of chronic lymphocytic leukemia in different microenvironments: clinical and therapeutic implications. *Hematol Oncol Clin North Am* 2013Apr;27:173-206.

[0369] Woyach JA, Bojnik E, Ruppert AS, Stefanovski MR, Goettl VM, Smucker KA, 等人 Bruton's tyrosine kinase (BTK) function is important to the development and expansion of chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Blood* 2014Feb 20;123:1207-1213.

[0370] Herman SE, Mustafa RZ, Gyamfi JA, Pittaluga S, Chang S, Chang B, 等人 Ibrutinib inhibits BCR and NF-kappaB signaling and reduces tumor proliferation in tissue-resident cells of patients with CLL. *Blood* 2014May 22;123:3286-3295.

[0371] Cheng S, Ma J, Guo A, Lu P, Leonard JP, Coleman M, 等人 BTK inhibition targets in vivo CLL proliferation through its effects on B-cell receptor signaling activity. *Leukemia* 2014Mar;28:649-657.

[0372] Mathews Griner LA, Guha R, Shinn P, Young RM, Keller JM, Liu D, 等人 High-throughput combinatorial screening identifies drugs that cooperate with ibrutinib to kill activated B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014Feb 11;111:2349-2354.

[0373] Guo A, Lu P, Galanina N, Nabhan C, Smith SM, Coleman M, 等人 Heightened BTK-

dependent cell proliferation in unmutated chronic lymphocytic leukemia confers increased sensitivity to ibrutinib. *Oncotarget* 2016Jan 26;7:4598-4610.

[0374] Woodcock J, Griffin JP, Behrman RE. Development of novel combination therapies. *N Engl J Med* 2011Mar 17;364:985-987.

[0375] Cervantes-Gomez F, Lamothe B, Woyach JA, Wierda WG, Keating MJ, Balakrishnan K, 等人 Pharmacological and Protein Profiling Suggests Venetoclax (ABT-199) as Optimal Partner with Ibrutinib in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Clin Cancer Res* 2015Aug 15;21:3705-3715.

[0376] Zhao X, Bodo J, Sun D, Durkin L, Lin J, Smith MR, 等人 Combination of ibrutinib with ABT-199: synergistic effects on proliferation inhibition and apoptosis in mantle cell lymphoma cells through perturbation of BTK, AKT and BCL2 pathways. *Br J Haematol* 2015Mar;168:765-768.

[0377] de Rooij MF, Kuil A, Kater AP, Kersten MJ, Pals ST, Spaargaren M. Ibrutinib and idelalisib synergistically target BCR-controlled adhesion in MCL and CLL: a rationale for combination therapy. *Blood* 2015Apr 2;125:2306-2309.

[0378] Da Roit F, Engelberts PJ, Taylor RP, Breij EC, Gritti G, Rambaldi A, 等人 Ibrutinib interferes with the cell-mediated anti-tumor activities of therapeutic CD20 antibodies: implications for combination therapy. *Haematologica* 2015Jan;100:77-86.

[0379] Skarzynski M, Niemann CU, Lee YS, Martyr S, Maric I, Salem D, 等人 Interactions between Ibrutinib and Anti-CD20 Antibodies: Competing Effects on the Outcome of Combination Therapy. *Clin Cancer Res* 2016Jan 1;22:86-95.

[0380] Woyach JA, Furman RR, Liu TM, Ozer HG, Zapatka M, Ruppert AS, 等人 Resistance mechanisms for the Bruton's tyrosine kinase inhibitor ibrutinib. *N Engl J Med* 2014Jun 12;370:2286-2294.

[0381] Yuan Y, Shen H, Franklin DS, Scadden DT, Cheng T. In vivo self-renewing divisions of haematopoietic stem cells are increased in the absence of the early G1-phase inhibitor, p18INK4C. *Nat Cell Biol* 2004May;6:436-442.

[0382] Shen H, Yu H, Liang PH, Cheng H, Xu Feng R, Yuan Y, 等人 An acute negative bystander effect of gamma-irradiated recipients on transplanted hematopoietic stem cells. *Blood* 2012Apr 12;119:3629-3637.

[0383] Ghia P, Chiorazzi N, Stamatopoulos K. Microenvironmental influences in chronic lymphocytic leukaemia: the role of antigen stimulation. *J Intern Med* 2008Dec;264:549-562.

[0384] Herishanu Y, Katz BZ, Lipsky A, Wiestner A. Biology of chronic lymphocytic leukemia in different microenvironments: clinical and therapeutic implications. *Hematol Oncol Clin North Am* 2013Apr;27:173-206.

[0385] Burger JA. Nurture versus nature: the microenvironment in chronic lymphocytic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2011;2011:96-103.

- [0386] Stevenson FK, Krysov S, Davies AJ, Steele AJ, Packham G. B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2011 Oct 20; 118:4313-4320.
- [0387] Burger JA, Tedeschi A, Barr PM, Robak T, Owen C, Ghia P, 等人 Ibrutinib as Initial Therapy for Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med* 2015 Dec 17; 373:2425-2437.
- [0388] Byrd JC, Furman RR, Coutre SE, Flinn IW, Burger JA, Blum KA, 等人 Targeting BTK with ibrutinib in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2013 Jul 4; 369:32-42.
- [0389] Byrd JC, O'Brien S, James DF. Ibrutinib in relapsed chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2013 Sep 26; 369:1278-1279.
- [0390] Komarova NL, Burger JA, Wodarz D. Evolution of ibrutinib resistance in chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014 Sep 23; 111:13906-13911.
- [0391] Fukuda T, Chen L, Endo T, Tang L, Lu D, Castro JE, 等人 Antisera induced by infusions of autologous Ad-CD154-leukemia B cells identify ROR-1 as an oncofetal antigen and receptor for Wnt5a. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008 Feb 26; 105:3047-3052.
- [0392] Widhopf GF, 2nd, Cui B, Ghia EM, Chen L, Messer K, Shen Z, 等人 ROR-1 can interact with TCL1 and enhance leukemogenesis in Emu-TCL1 transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014 Jan 14; 111:793-798.
- [0393] Hofbauer SW, Krenn PW, Ganghammer S, Asslaber D, Pichler U, Oberascher K, 等人 Tiam1/Rac1 signals contribute to the proliferation and chemoresistance, but not motility, of chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood* 2014 Apr 3; 123:2181-2188.
- [0394] Kaucka M, Plevova K, Pavlova S, Janovska P, Mishra A, Verner J, 等人 The planar cell polarity pathway drives pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia by the regulation of B-lymphocyte migration. *Cancer Res* 2013 Mar 1; 73:1491-1501.
- [0395] Yu J, Chen L, Cui B, Widhopf GF, 2nd, Shen Z, Wu R, 等人 Wnt5a induces ROR-1/ROR2 heterooligomerization to enhance leukemia chemotaxis and proliferation. *J Clin Invest* 2015 Dec 21.
- [0396] Choi MY, Widhopf GF, 2nd, Wu CC, Cui B, Lao F, Sadarangani A, 等人 Pre-clinical Specificity and Safety of UC-961, a First-In-Class Monoclonal Antibody Targeting ROR-1. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 2015 Jun; 15(Suppl):S167-169.
- [0397] Honigberg LA, Smith AM, Sirisawad M, Verner E, Loury D, Chang B, 等人 The Bruton tyrosine kinase inhibitor PCI-32765 blocks B-cell activation and is efficacious in models of autoimmune disease and B-cell malignancy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010 Jul 20; 107:13075-13080.
- [0398] Rushworth SA, Murray MY, Zaitseva L, Bowles KM, MacEwan DJ. Identification

of Bruton's tyrosine kinase as a therapeutic target in acute myeloid leukemia. *Blood* 2014Feb 20;123:1229-1238.

[0399] Ren L, Campbell A, Fang H, Gautam S, Elavazhagan S, Fatehchand K, 等人 Analysis of the Effects of the Bruton's tyrosine kinase (BTK) Inhibitor Ibrutinib on Monocyte Fcγ Receptor (FcγR) Function. *J Biol Chem* 2016Feb 5;291:3043-3052.

[0400] Di Paolo JA, Huang T, Balazs M, Barbosa J, Barck KH, Bravo BJ, 等人 Specific BTK inhibition suppresses B cell- and myeloid cell-mediated arthritis. *Nat Chem Biol* 2011Jan;7:41-50.

[0401] de Jong J, Sukbuntherng J, Skee D, Murphy J, O'Brien S, Byrd JC, 等人 The effect of food on the pharmacokinetics of oral ibrutinib in healthy participants and patients with chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Chemother Pharmacol* 2015May;75:907-916.

[0402] Advani RH, Buggy JJ, Sharman JP, Smith SM, Boyd TE, Grant B, 等人 Bruton tyrosine kinase inhibitor ibrutinib (PCI-32765) has significant activity in patients with relapsed/refractory B-cell malignancies. *J Clin Oncol* 2013Jan 1;31:88-94.

[0403] Etienne-Manneville S, Hall A. Rho GTPases in cell biology. *Nature* 2002Dec 12;420:629-635.

[0404] Gu Y, Filippi MD, Cancelas JA, Siefring JE, Williams EP, Jasti AC, 等人 Hematopoietic cell regulation by Rac1 and Rac2 guanosine triphosphatases. *Science* 2003Oct 17;302:445-449.

[0405] Fecteau JF, Corral LG, Ghia EM, Gaidarova S, Futalan D, Bharati IS, 等人 Lenalidomide inhibits the proliferation of CLL cells via a cereblon/p21 (WAF1/Cip1)-dependent mechanism independent of functional p53. *Blood* 2014Sep 4;124:1637-1644.

[0406] Zhang S, Wu CC, Fecteau JF, Cui B, Chen L, Zhang L, 等人 Targeting chronic lymphocytic leukemia cells with a humanized monoclonal antibody specific for CD44. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013Apr 9;110:6127-6132.

[0407] Herman SE, Mustafa RZ, Gyamfi JA, Pittaluga S, Chang S, Chang B, 等人 Ibrutinib inhibits BCR and NF-κB signaling and reduces tumor proliferation in tissue-resident cells of patients with CLL. *Blood* 2014May 22;123:3286-3295.

[0408] Cheng S, Ma J, Guo A, Lu P, Leonard JP, Coleman M, 等人 BTK inhibition targets in vivo CLL proliferation through its effects on B-cell receptor signaling activity. *Leukemia* 2014Mar;28:649-657.

[0409] Nishita M, Itsukushima S, Nomachi A, Endo M, Wang Z, Inaba D, 等人 Ror2/ Frizzled complex mediates Wnt5a-induced AP-1 activation by regulating Dishevelled polymerization. *Mol Cell Biol* 2010Jul;30:3610-3619.

- [0410] Naskar D, Maiti G, Chakraborty A, Roy A, Chattopadhyay D, Sen M. Wnt5a-Rac1-NF-kappaB homeostatic circuitry sustains innate immune functions in macrophages. *J Immunol* 2014 May 1; 192:4386-4397.
- [0411] Zhu Y, Shen T, Liu J, Zheng J, Zhang Y, Xu R, 等人 Rab35 is required for Wnt5a/Dvl2-induced Rac1 activation and cell migration in MCF-7 breast cancer cells. *Cell Signal* 2013 May; 25:1075-1085.
- [0412] Velaithan R, Kang J, Hirpara JL, Loh T, Goh BC, Le Bras M, 等人 The small GTPase Rac1 is a novel binding partner of Bcl-2 and stabilizes its antiapoptotic activity. *Blood* 2011 Jun 9; 117:6214-6226.
- [0413] Roberts AW, Seymour JF, Brown JR, Wierda WG, Kipps TJ, Khaw SL, 等人 Substantial susceptibility of chronic lymphocytic leukemia to BCL2 inhibition: results of a phase I study of navitoclax in patients with relapsed or refractory disease. *J Clin Oncol* 2012 Feb 10; 30:488-496.
- [0414] Mizukawa B, Wei J, Shrestha M, Wunderlich M, Chou FS, Griesinger A, 等人 Inhibition of Rac GTPase signaling and downstream pro-survival Bcl-2 proteins as combination targeted therapy in MLL-AF9 leukemia. *Blood* 2011 Nov 10; 118:5235-5245.
- [0415] Bosco EE, Ni W, Wang L, Guo F, Johnson JF, Zheng Y. Rac1 targeting suppresses p53 deficiency-mediated lymphomagenesis. *Blood* 2010 Apr 22; 115:3320-3328.
- [0416] Pascutti MF, Jak M, Tromp JM, Derks IA, Remmerswaal EB, Thijssen R, 等人 IL-21 and CD40L signals from autologous T cells can induce antigen-independent proliferation of CLL cells. *Blood* 2013 Oct 24; 122:3010-3019.
- [0417] Guo A, Lu P, Galanina N, Nabhan C, Smith SM, Coleman M, 等人 Heightened BTK-dependent cell proliferation in unmutated chronic lymphocytic leukemia confers increased sensitivity to ibrutinib. *Oncotarget* 2016 Jan 26; 7:4598-4610.
- [0418] Janovska P, Poppova L, Plevova K, Plesingerova H, Behal M, Kaucka M, 等人 Autocrine Signaling by Wnt-5a Deregulates Chemotaxis of Leukemic Cells and Predicts Clinical Outcome in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Clin Cancer Res* 2016 Jan 15; 22:459-469.
- [0419] O'Hayre M, Salanga CL, Kipps TJ, Messmer D, Dorrestein PC, Handel TM. Elucidating the CXCL12/CXCR4 signaling network in chronic lymphocytic leukemia through phosphoproteomics analysis. *PLoS One* 2010; 5:e11716.
- [0420] Woodcock J, Griffin JP, Behrman RE. Development of novel combination therapies. *N Engl J Med* 2011 Mar 17; 364:985-987.
- [0421] Da Roit F, Engelberts PJ, Taylor RP, Breij EC, Gritti G, Rambaldi A, 等人 Ibrutinib interferes with the cell-mediated anti-tumor activities of therapeutic CD20 antibodies: implications for combination therapy. *Haematologica* 2015 Jan; 100:77-86.

- [0422] Skarzynski M, Niemann CU, Lee YS, Martyr S, Maric I, Salem D, 等人 Interactions between Ibrutinib and Anti-CD20 Antibodies: Competing Effects on the Outcome of Combination Therapy. *Clin Cancer Res* 2016 Jan 1; 22:86-95.
- [0423] Woyach JA, Furman RR, Liu TM, Ozer HG, Zapatka M, Ruppert AS, 等人 Resistance mechanisms for the Bruton's tyrosine kinase inhibitor ibrutinib. *N Engl J Med* 2014 Jun 12; 370:2286-2294.
- [0424] Wu J, Zhang M, Liu D. Acalabrutinib (ACP-196): a selective second-generation BTK inhibitor. *J Hematol Oncol* 2016; 9:21.
- [0425] Byrd JC, Harrington B, O'Brien S, Jones JA, Schuh A, Devereux S, 等人 Acalabrutinib (ACP-196) in Relapsed Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med* 2016 Jan 28; 374:323-332.
- [0426] Zhang B, Chernoff J, Zheng Y. Interaction of Rac1 with GTPase-activating proteins and putative effectors. A comparison with Cdc42 and RhoA. *J Biol Chem* 1998 Apr 10; 273:8776-8782.
- [0427] Yuan Y, Shen H, Franklin DS, Scadden DT, Cheng T. In vivo self-renewing divisions of haematopoietic stem cells are increased in the absence of the early G1-phase inhibitor, p18INK4C. *Nat Cell Biol* 2004 May; 6:436-442.
- [0428] Shen H, Yu H, Liang PH, Cheng H, Xu Feng R, Yuan Y, 等人 An acute negative bystander effect of gamma-irradiated recipients on transplanted hematopoietic stem cells. *Blood* 2012 Apr 12; 119:3629-3637.
- [0429] Honigberg LA, Smith AM, Sirisawad M, Verner E, Loury D, Chang B, 等人 The Bruton tyrosine kinase inhibitor PCI-32765 blocks B-cell activation and is efficacious in models of autoimmune disease and B-cell malignancy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010 Jul 20; 107:13075-13080.
- [0430] Di Paolo JA, Huang T, Balazs M, Barbosa J, Barck KH, Bravo BJ, 等人 Specific BTK inhibition suppresses B cell- and myeloid cell-mediated arthritis. *Nat Chem Biol* 2011 Jan; 7:41-50.
- [0431] Zhang B, Chernoff J, Zheng Y. Interaction of Rac1 with GTPase-activating proteins and putative effectors. A comparison with Cdc42 and RhoA. *J Biol Chem* 1998 Apr 10; 273:8776-8782.
- [0432] Yu J, Chen L, Cui B, Widhopf GF, 2nd, Shen Z, Wu R, 等人 Wnt5a induces ROR-1/ROR2 heterooligomerization to enhance leukemia chemotaxis and proliferation. *J Clin Invest* 2015 Dec 21.
- [0433] Fecteau JF, Corral LG, Ghia EM, Gaidarova S, Futalan D, Bharati IS, 等人 Lenalidomide inhibits the proliferation of CLL cells via a cereblon/p21 (WAF1/Cip1)-dependent mechanism independent of functional p53. *Blood* 2014 Sep 4; 124:1637-1644.
- [0434] Yuan Y, Shen H, Franklin DS, Scadden DT, Cheng T. In vivo self-renewing divisions of haematopoietic stem cells are increased in the absence of the

early G1-phase inhibitor,p18INK4C.Nat Cell Biol 2004May;6:436-442.

[0435] Shen H,Yu H,Liang PH,Cheng H,XuFeng R,Yuan Y,等人An acute negative bystander effect of gamma-irradiated recipients on transplanted hematopoietic stem cells.Blood 2012Apr 12;119:3629-3637.

[0436] Castillo R,Mascarenhas J,Telford W,Chadburn A,Friedman SM,Schattner EJ.Proliferative response of mantle cell lymphoma cells stimulated by CD40ligation and IL-4.Leukemia 2000Feb;14(2):292-298.

[0437] Visser HP,Tewis M,Willemze R,Kluin-Nelemans JC.Mantle cell lymphoma proliferates upon IL-10in the CD40system.Leukemia 2000Aug;14(8):1483-1489.

[0438] Byrd JC,Furman RR,Coutre SE,Flinn IW,Burger JA,Blum KA,等人Targeting BTK with ibrutinib in relapsed chronic lymphocytic leukemia.N Engl J Med 2013Jul 04;369(1):32-42.

[0439] de Rooij MF,Kuil A,Geest CR,Eldering E,Chang BY,Buggy JJ,等人The clinically active BTK inhibitor PCI-32765targets B-cell receptor-and chemokine-controlled adhesion and migration in chronic lymphocytic leukemia.Blood 2012Mar 15;119(11):2590-2594.

[0440] Chang BY,Francesco M,De Rooij MF,Magadala P,Steggerda SM,Huang MM,等人Egress of CD19(+)CD5(+)cells into peripheral blood following treatment with the Bruton tyrosine kinase inhibitor ibrutinib in mantle cell lymphoma patients.Blood 2013Oct 03;122(14):2412-2424.

[0441] Spaargaren M,de Rooij MF,Kater AP,Eldering E.BTK inhibitors in chronic lymphocytic leukemia:a glimpse to the future.Oncogene 2015May 07;34(19):2426-2436.

[0442] Wang ML,Rule S,Martin P,Goy A,Auer R,Kahl BS,等人Targeting BTK with ibrutinib in relapsed or refractory mantle-cell lymphoma.N Engl J Med 2013Aug 08;369(6):507-516.

[0443] Woyach JA,Furman RR,Liu TM,Ozer HG,Zapatka M,Ruppert AS,等人Resistance mechanisms for the Bruton's tyrosine kinase inhibitor ibrutinib.N Engl J Med 2014Jun 12;370(24):2286-2294.

[0444] Byrd JC,Brown JR,O'Brien S,Barrientos JC,Kay NE,Reddy NM,等人Ibrutinib versus ofatumumab in previously treated chronic lymphoid leukemia.N Engl J Med 2014Jul 17;371(3):213-223.

[0445] Fukuda T,Chen L,Endo T,Tang L,Lu D,Castro JE,等人Antisera induced by infusions of autologous Ad-CD154-leukemia B cells identify ROR-1as an oncofetal antigen and receptor for Wnt5a.Proc Natl Acad Sci U S A2008Feb 26;105(8):3047-3052.

[0446] Hofbauer SW,Krenn PW,Ganghammer S,Asslaber D,Pichler U,Oberascher K,等人Tiam1/Rac1signals contribute to the proliferation and chemoresistance,but not motility,of chronic lymphocytic leukemia cells.Blood 2014Apr 3;123(14):

2181-2188.

[0447] Kaucka M, Plevova K, Pavlova S, Janovska P, Mishra A, Verner J, 等人 The planar cell polarity pathway drives pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia by the regulation of B-lymphocyte migration. *Cancer Res* 2013 Mar 1; 73 (5): 1491-1501.

[0448] Yu J, Chen L, Cui B, Widhopf GF, 2nd, Shen Z, Wu R, 等人 Wnt5a induces ROR-1/ROR2 heterooligomerization to enhance leukemia chemotaxis and proliferation. *J Clin Invest* 2015 Dec 21.

[0449] Yu J, Chen L, Cui B, Wu C, Choi MY, Chen Y, 等人 Cirmtuzumab inhibits Wnt5a-induced ROR1 activation in chronic lymphocytic leukemia treated with ibrutinib. *Leukemia* 2017 Jan 03.

[0450] Krishan A. Rapid flow cytofluorometric analysis of mammalian cell cycle by propidium iodide staining. *J Cell Biol* 1975 Jul; 66 (1): 188-193.

[0451] 非正式序列表

[0452] 99961.1 CDR H1 (SEQ ID NO:1): GYAFTAYD

[0453] 99961.1 CDR H2 (SEQ ID NO:2): FDPYDGGG

[0454] 99961.1 CDR H3 (SEQ ID NO:3): GWYYFDY

[0455] 99961.1 CDR L1 (SEQ ID NO:4): KSISKY

[0456] 99961.1 CDR L2 (SEQ ID NO:5): SGS

[0457] 99961.1 CDR L3 (SEQ ID NO:6): QQHDESPY

[0458] D10 CDR H1 (SEQ ID NO:7): GFSLTSYG

[0459] D10 CDR H2 (SEQ ID NO:8): IWAGGFT

[0460] D10 CDR H3 (SEQ ID NO:9): RGSSYSMDY

[0461] D10 CDR L1 (SEQ ID NO:10): SNVSY

[0462] D10 CDR L2 (SEQ ID NO:11): EIS

[0463] D10 CDR L3 (SEQ ID NO:12): QQWNYPLIT

[0464] 全长人ROR-1蛋白 (SEQ ID NO:13):

[0465] MHRPRRRGTRPPLLALLAALLAARGAAAQETELSVSAELVPTSSWNISSELNKDSYLTLDPEMNNITT
SLGQTAELHCKVSGNPPPTIRWFKNDAPVVQEPRLSFRSTIYGSRLRIRNLDTTDTGYFQCVATNGKEVVSSTGVL
FVKFGPPPTASPGYSDEYEEDGFCQPYRGIACARFIGNRTVYMESLHMQGEIENQITAFTMIGTSSHLSDKCSQFA
IPSLCHYAFPYCDETSSVPKPRDLCRDECEILENVLCQTEYIFARSNPMLMRLKLPNCEDLPQPESPEAANCIRIG
IPMADPINKNHKCYNSTGVVDYRGTVSVTKSGRQCQPWNSQYPHTHTFTALRFPELNGGHSYCRNPGNQKEAPWCFTL
DENFKSDLCDIPACDSKDSKEKNKMEILYILVPSVAIPLAIALFFFCVCRNNQKSSSAPVQRQPKHVRGQNVEMS
MLNAYKPKSKAKELPLSAVRFMEELGECAFGKIYKGHLYLPGMDHAQLVAIKTLKDYNNPQQWMEFQQEASLMAELH
HPNIVCLLGAVTQEQPVCMLFEYINQDGLHEFLIMRSPHSDVGCSSDEDGTVKSSLDHGDFLHIAIQIAAGMEYLSS
HFFVHKDLAARNILIGEQLHVKISDLGLSREIYSADYYRVQSKSLPIRWWPPEAIMYKGFSSSDSIWSFGVVLWEI
FSFGLQPYYGFSNQEVIEVMRKRQLLPCSEDCPPRMYSLMTECWNEIPSRPRFKDIHVRLRSWEGLSSHTSSTTPS
GGNATTQTTLSASPVSNLNPNRYPNYMFPSQGITPQQQIAGFIGPPIPNQRFIPINGYIPPGYAAFPAAHYQPT
GPPRVIQHCPPPKSRSPPSSASGSTSTGHVTSPLSSGSNQEANIPLLPHMSIPNHPGGMGITVFGNKSQKPYKIDSKQ

ASLLGDANIHGHTESMISAEL

[0466] 人ROR-1的21个氨基酸延伸,包括位置138的谷氨酸(SEQ ID NO:14):
VATNGKEVVSSTGVLFVKFGP

[0467] 人ROR-1的15个氨基酸延伸,包括位置138的谷氨酸(SEQ ID NO.15):
EVVSSTGVLFVKFGP

[0468] P实施方案

[0469] 实施方案P1.治疗有需要的受试者中的癌症的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的布鲁顿氏酪氨酸激酶(BTK)拮抗剂和抗ROR-1抗体。

[0470] 实施方案P2.根据实施方案P1所述的方法,其中所述BTK拮抗剂是CAL101、R406或依鲁替尼。

[0471] 实施方案P3.根据实施方案P1-P2之一所述的方法,其中所述BTK拮抗剂是依鲁替尼。

[0472] 实施方案P4.根据实施方案P1-P3之一所述的方法,其中所述抗ROR-1抗体是cirmtuzumab。

[0473] 实施方案P5.根据实施方案P1-P4之一所述的方法,其中所述BTK拮抗剂和抗ROR-1抗体以组合的协同量施用。

[0474] 实施方案P6.根据实施方案P1-P5之一所述的方法,其中所述BTK拮抗剂和抗ROR-1抗体同时或依次施用。

[0475] 实施方案P7.根据实施方案P1-P6之一所述的方法,其中所述癌症是淋巴瘤或腺癌。

[0476] 实施方案P8.根据实施方案P1-P7之一所述的方法,其中所述淋巴瘤是慢性淋巴细胞性白血病、小淋巴细胞性淋巴瘤、边缘细胞B-细胞淋巴瘤、或伯基特氏淋巴瘤。

[0477] 实施方案P9.根据实施方案P1-P8之一所述的方法,其中所述腺癌是结肠腺癌或乳腺癌。

[0478] 实施方案P10.药物组合物,其包含布鲁顿氏酪氨酸激酶(BTK)拮抗剂、抗ROR-1抗体和药学上可接受的赋形剂,其中所述BTK拮抗剂和所述抗ROR-1抗体以组合的协同量存在,其中所述组合的协同量有效地治疗有需要的受试者中的癌症。

[0479] 实施方案

[0480] 实施方案1.治疗有需要的受试者中的癌症的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的布鲁顿氏酪氨酸激酶(BTK)拮抗剂和酪氨酸激酶样孤儿受体1(ROR-1)拮抗剂。

[0481] 实施方案2.实施方案1的方法,其中所述BTK拮抗剂是小分子。

[0482] 实施方案3.实施方案1或2的方法,其中所述BTK拮抗剂是依鲁替尼(ibrutinib)、艾代拉里斯(idelalisib)、福他替尼(fostamatinib)、阿卡替尼(acalabrutinib)、ON0/GS-4059、BGB-3111或CC-292(AVL-292)。

[0483] 实施方案4.实施方案1-3之一的方法,其中所述BTK拮抗剂是依鲁替尼。

[0484] 实施方案5.实施方案1-4之一的方法,其中所述ROR-1拮抗剂是抗体或小分子。

[0485] 实施方案6.实施方案1-5之一的方法,其中所述ROR-1拮抗剂是抗ROR-1抗体。

[0486] 实施方案7.实施方案5-6之一的方法,其中所述抗体包含人源化重链可变区和人

源化轻链可变区,其中所述人源化重链可变区包含SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3中所示的序列,且其中所述人源化轻链可变区包含SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6中所示的序列。

[0487] 实施方案8.实施方案3-7之一的方法,其中所述抗体是cirmtuzumab。

[0488] 实施方案9.实施方案5-6之一的方法,其中所述抗体包含人源化重链可变区和人源化轻链可变区,其中所述人源化重链可变区包含SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:9中所示的序列,且其中所述人源化轻链可变区包含SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12中所示的序列。

[0489] 实施方案10.实施方案1-9之一的方法,其中所述BTK拮抗剂和所述ROR-1拮抗剂以组合的协同量施用。

[0490] 实施方案11.实施方案1-10之一的方法,其中所述BTK拮抗剂和所述ROR-1拮抗剂同时或依次施用。

[0491] 实施方案12.实施方案1-11之一的方法,其中所述ROR-1拮抗剂在第一时间点施用且所述BTK拮抗剂在第二时间点施用,其中所述第一时间点在所述第二时间点之前。

[0492] 实施方案13.实施方案1-12之一的方法,其中所述BTK拮抗剂和所述ROR-1拮抗剂在施用前混合。

[0493] 实施方案14.实施方案1-13之一的方法,其中所述BTK拮抗剂以约1mg/kg、2mg/kg、5mg/kg、15mg/kg或10mg/kg的量施用。

[0494] 实施方案15.实施方案1-14之一的方法,其中所述BTK拮抗剂以约5mg/kg的量施用。

[0495] 实施方案16.实施方案1-14之一的方法,其中所述BTK拮抗剂以约420mg的量施用。

[0496] 实施方案17.实施方案1-16之一的方法,其中所述ROR-1拮抗剂以约1mg/kg、2mg/kg、3mg/kg、5mg/kg或10mg/kg的量施用。

[0497] 实施方案18.实施方案1-17之一的方法,其中所述ROR-1拮抗剂以约2mg/kg的量施用。

[0498] 实施方案19.实施方案1-15或17-18之一的方法,其中所述BTK拮抗剂以约5mg/kg的量施用且所述ROR-1拮抗剂以约2mg/kg的量施用。

[0499] 实施方案20.实施方案1-15或17之一的方法,其中所述BTK拮抗剂以约5mg/kg的量施用且所述ROR-1拮抗剂以约1mg/kg的量施用。

[0500] 实施方案21.实施方案1-20之一的方法,其中所述BTK拮抗剂在至少14天的疗程每天施用。

[0501] 实施方案22.实施方案1-21之一的方法,其中所述BTK拮抗剂在约28天的疗程每天施用。

[0502] 实施方案23.实施方案1-22之一的方法,其中所述ROR-1拮抗剂在约28天的疗程施用一次。

[0503] 实施方案24.实施方案1-23之一的方法,其中所述BTK拮抗剂静脉内施用。

[0504] 实施方案25.实施方案1-24之一的方法,其中所述ROR-1拮抗剂静脉内施用。

[0505] 实施方案26.实施方案1-25之一的方法,其中所述受试者是哺乳动物。

[0506] 实施方案27.实施方案1-26之一的方法,其中所述受试者是人。

[0507] 实施方案28.实施方案1-27之一的方法,其中所述癌症是淋巴瘤、白血病、骨髓瘤、AML、B-ALL、T-ALL、肾细胞癌、结肠癌、结肠直肠癌、乳腺癌、表皮鳞状细胞癌、黑色素瘤、胃癌、脑癌、肺癌、胰腺癌、子宫颈癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、前列腺癌、睾丸癌、甲状腺癌、头颈癌、子宫癌、腺癌或肾上腺癌。

[0508] 实施方案29.实施方案1-28之一的方法,其中所述癌症是慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、小淋巴细胞性淋巴瘤、边缘细胞B-细胞淋巴瘤、伯基特氏淋巴瘤或B细胞白血病。

[0509] 实施方案30.药物组合物,其包含BTK拮抗剂、ROR-1拮抗剂和药学上可接受的赋形剂。

[0510] 实施方案31.药物组合物,其包含BTK拮抗剂、抗ROR-1抗体和药学上可接受的赋形剂,其中所述BTK拮抗剂和所述抗ROR-1抗体以组合的协同量存在,其中所述组合的协同量有效地治疗有需要的受试者中的癌症。

[0511] 实施方案32.实施方案30或31的药物组合物,其中所述BTK拮抗剂是小分子。

[0512] 实施方案33.实施方案30-32之一的药物组合物,其中所述BTK拮抗剂是依鲁替尼(ibrutinib)、艾代拉里斯(idelalisib)、福他替尼(fostamatinib)、阿卡替尼(acalabrutinib)、ONO/GS-4059、BGB-3111或CC-292(AVL-292)。

[0513] 实施方案34.实施方案30-33之一的药物组合物,其中所述BTK拮抗剂是依鲁替尼。

[0514] 实施方案35.实施方案30-34之一的药物组合物,其中所述ROR-1拮抗剂是抗体或小分子。

[0515] 实施方案36.实施方案30-35之一的药物组合物,其中所述ROR-1拮抗剂是抗ROR-1抗体。

[0516] 实施方案37.实施方案35或36的药物组合物,其中所述抗体包含人源化重链可变区和人源化轻链可变区,其中所述人源化重链可变区包含SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3中所示的序列,且其中所述人源化轻链可变区包含SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6中所示的序列。

[0517] 实施方案38.实施方案35-37之一的药物组合物,其中所述抗体是cirmtuzumab。

[0518] 实施方案39.实施方案35或36的药物组合物,其中所述抗体包含人源化重链可变区和人源化轻链可变区,其中所述人源化重链可变区包含SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:9中所示的序列,且其中所述人源化轻链可变区包含SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12中所示的序列。

<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic polypeptide
<400> 4
Lys Ser Ile Ser Lys Tyr
1 5
<210> 5
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic polypeptide
<400> 5
Ser Gly Ser
1
<210> 6
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic polypeptide
<400> 6
Gln Gln His Asp Glu Ser Pro Tyr
1 5
<210> 7
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic polypeptide
<400> 7
Gly Phe Ser Leu Thr Ser Tyr Gly
1 5
<210> 8
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic polypeptide

<400> 8
Ile Trp Ala Gly Gly Phe Thr
1 5

<210> 9
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic polypeptide

<400> 9
Arg Gly Ser Ser Tyr Ser Met Asp Tyr
1 5

<210> 10
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic polypeptide

<400> 10
Ser Asn Val Ser Tyr
1 5

<210> 11
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic polypeptide

<400> 11
Glu Ile Ser
1

<210> 12
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic polypeptide

<400> 12
Gln Gln Trp Asn Tyr Pro Leu Ile Thr
1 5

<210> 13
 <211> 937
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 13
 Met His Arg Pro Arg Arg Arg Gly Thr Arg Pro Pro Leu Leu Ala Leu
 1 5 10 15
 Leu Ala Ala Leu Leu Leu Ala Ala Arg Gly Ala Ala Ala Gln Glu Thr
 20 25 30
 Glu Leu Ser Val Ser Ala Glu Leu Val Pro Thr Ser Ser Trp Asn Ile
 35 40 45
 Ser Ser Glu Leu Asn Lys Asp Ser Tyr Leu Thr Leu Asp Glu Pro Met
 50 55 60
 Asn Asn Ile Thr Thr Ser Leu Gly Gln Thr Ala Glu Leu His Cys Lys
 65 70 75 80
 Val Ser Gly Asn Pro Pro Pro Thr Ile Arg Trp Phe Lys Asn Asp Ala
 85 90 95
 Pro Val Val Gln Glu Pro Arg Arg Leu Ser Phe Arg Ser Thr Ile Tyr
 100 105 110
 Gly Ser Arg Leu Arg Ile Arg Asn Leu Asp Thr Thr Asp Thr Gly Tyr
 115 120 125
 Phe Gln Cys Val Ala Thr Asn Gly Lys Glu Val Val Ser Ser Thr Gly
 130 135 140
 Val Leu Phe Val Lys Phe Gly Pro Pro Pro Thr Ala Ser Pro Gly Tyr
 145 150 155 160
 Ser Asp Glu Tyr Glu Glu Asp Gly Phe Cys Gln Pro Tyr Arg Gly Ile
 165 170 175
 Ala Cys Ala Arg Phe Ile Gly Asn Arg Thr Val Tyr Met Glu Ser Leu
 180 185 190
 His Met Gln Gly Glu Ile Glu Asn Gln Ile Thr Ala Ala Phe Thr Met
 195 200 205
 Ile Gly Thr Ser Ser His Leu Ser Asp Lys Cys Ser Gln Phe Ala Ile
 210 215 220
 Pro Ser Leu Cys His Tyr Ala Phe Pro Tyr Cys Asp Glu Thr Ser Ser
 225 230 235 240
 Val Pro Lys Pro Arg Asp Leu Cys Arg Asp Glu Cys Glu Ile Leu Glu
 245 250 255
 Asn Val Leu Cys Gln Thr Glu Tyr Ile Phe Ala Arg Ser Asn Pro Met
 260 265 270

Ile Leu Met Arg Leu Lys Leu Pro Asn Cys Glu Asp Leu Pro Gln Pro
 275 280 285
 Glu Ser Pro Glu Ala Ala Asn Cys Ile Arg Ile Gly Ile Pro Met Ala
 290 295 300
 Asp Pro Ile Asn Lys Asn His Lys Cys Tyr Asn Ser Thr Gly Val Asp
 305 310 315 320
 Tyr Arg Gly Thr Val Ser Val Thr Lys Ser Gly Arg Gln Cys Gln Pro
 325 330 335
 Trp Asn Ser Gln Tyr Pro His Thr His Thr Phe Thr Ala Leu Arg Phe
 340 345 350
 Pro Glu Leu Asn Gly Gly His Ser Tyr Cys Arg Asn Pro Gly Asn Gln
 355 360 365
 Lys Glu Ala Pro Trp Cys Phe Thr Leu Asp Glu Asn Phe Lys Ser Asp
 370 375 380
 Leu Cys Asp Ile Pro Ala Cys Asp Ser Lys Asp Ser Lys Glu Lys Asn
 385 390 395 400
 Lys Met Glu Ile Leu Tyr Ile Leu Val Pro Ser Val Ala Ile Pro Leu
 405 410 415
 Ala Ile Ala Leu Leu Phe Phe Phe Ile Cys Val Cys Arg Asn Asn Gln
 420 425 430
 Lys Ser Ser Ser Ala Pro Val Gln Arg Gln Pro Lys His Val Arg Gly
 435 440 445
 Gln Asn Val Glu Met Ser Met Leu Asn Ala Tyr Lys Pro Lys Ser Lys
 450 455 460
 Ala Lys Glu Leu Pro Leu Ser Ala Val Arg Phe Met Glu Glu Leu Gly
 465 470 475 480
 Glu Cys Ala Phe Gly Lys Ile Tyr Lys Gly His Leu Tyr Leu Pro Gly
 485 490 495
 Met Asp His Ala Gln Leu Val Ala Ile Lys Thr Leu Lys Asp Tyr Asn
 500 505 510
 Asn Pro Gln Gln Trp Met Glu Phe Gln Gln Glu Ala Ser Leu Met Ala
 515 520 525
 Glu Leu His His Pro Asn Ile Val Cys Leu Leu Gly Ala Val Thr Gln
 530 535 540
 Glu Gln Pro Val Cys Met Leu Phe Glu Tyr Ile Asn Gln Gly Asp Leu
 545 550 555 560
 His Glu Phe Leu Ile Met Arg Ser Pro His Ser Asp Val Gly Cys Ser
 565 570 575
 Ser Asp Glu Asp Gly Thr Val Lys Ser Ser Leu Asp His Gly Asp Phe

Met Gly Ile Thr Val Phe Gly Asn Lys Ser Gln Lys Pro Tyr Lys Ile
 900 905 910

Asp Ser Lys Gln Ala Ser Leu Leu Gly Asp Ala Asn Ile His Gly His
 915 920 925

Thr Glu Ser Met Ile Ser Ala Glu Leu
 930 935

<210> 14

<211> 21

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Val Ala Thr Asn Gly Lys Glu Val Val Ser Ser Thr Gly Val Leu Phe
 1 5 10 15

Val Lys Phe Gly Pro
 20

<210> 15

<211> 15

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

Glu Val Val Ser Ser Thr Gly Val Leu Phe Val Lys Phe Gly Pro
 1 5 10 15

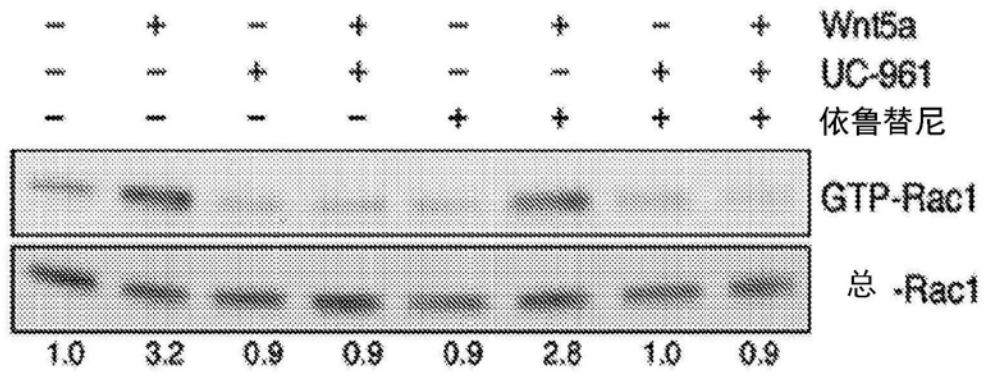


图1A

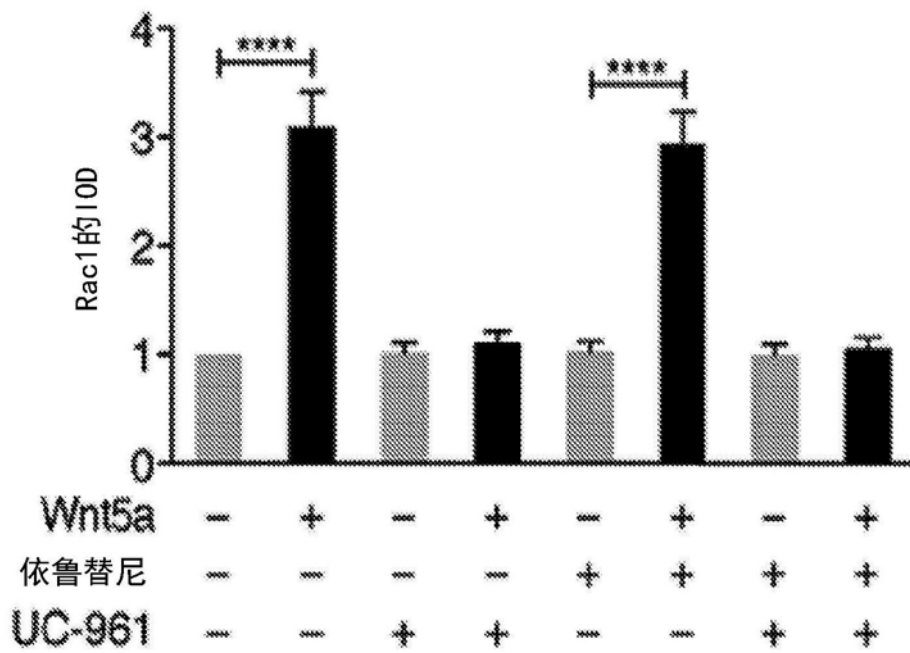


图1B

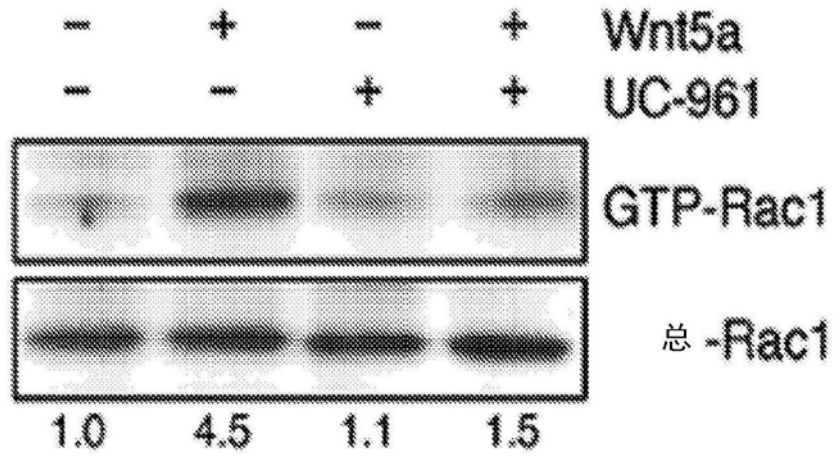


图1C

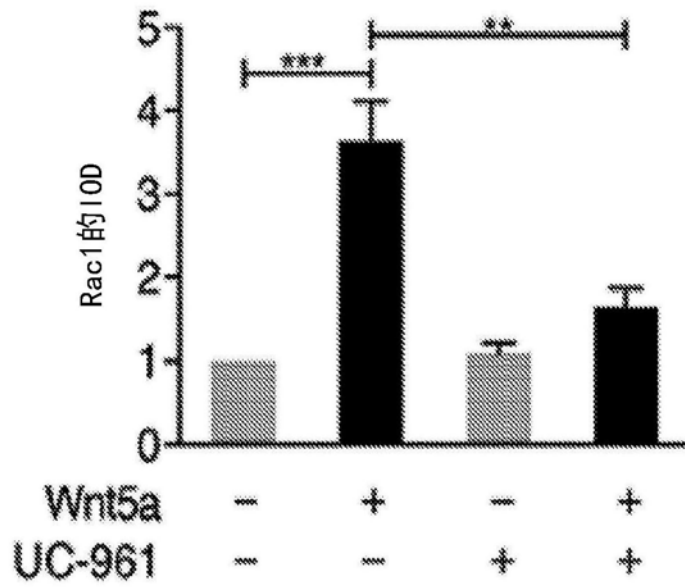


图1D

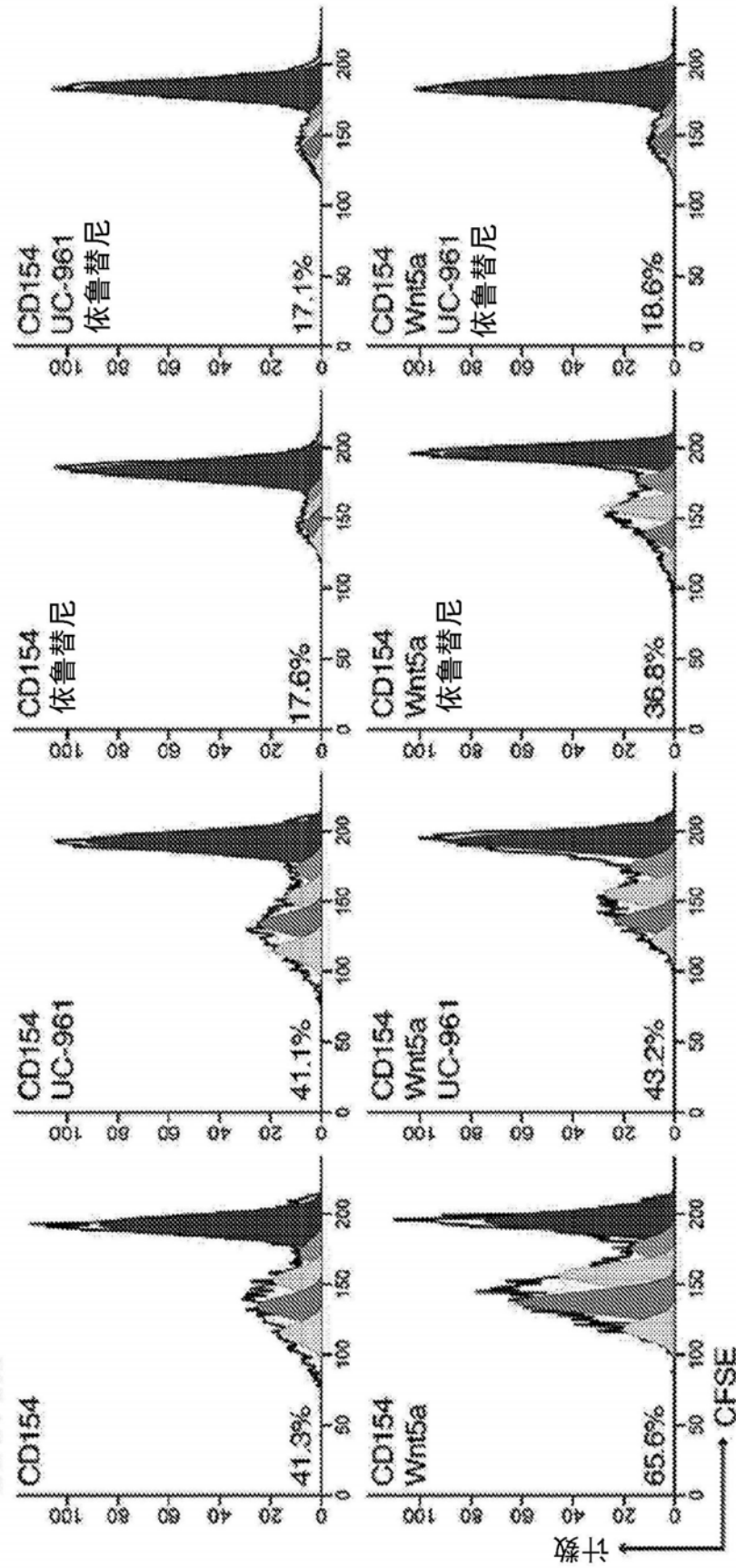


图2A

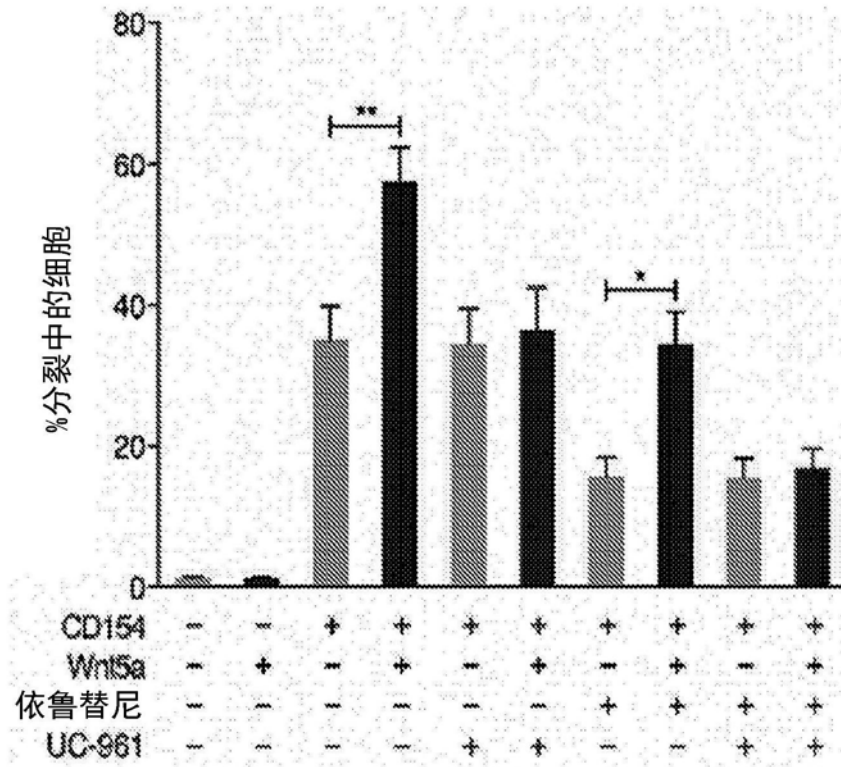


图2B

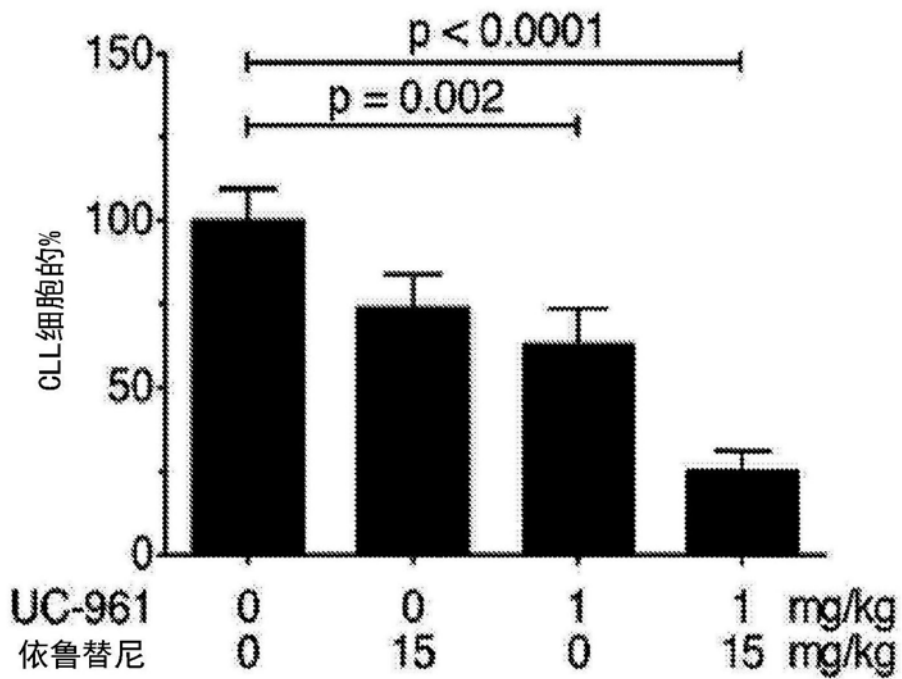


图3

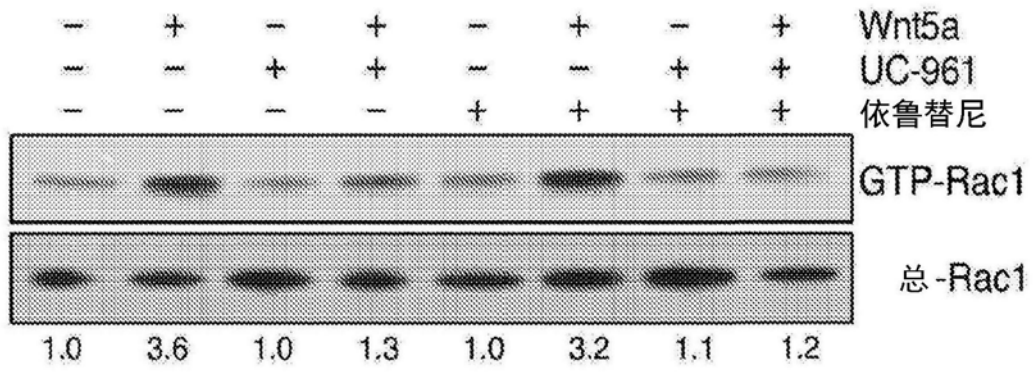


图4A

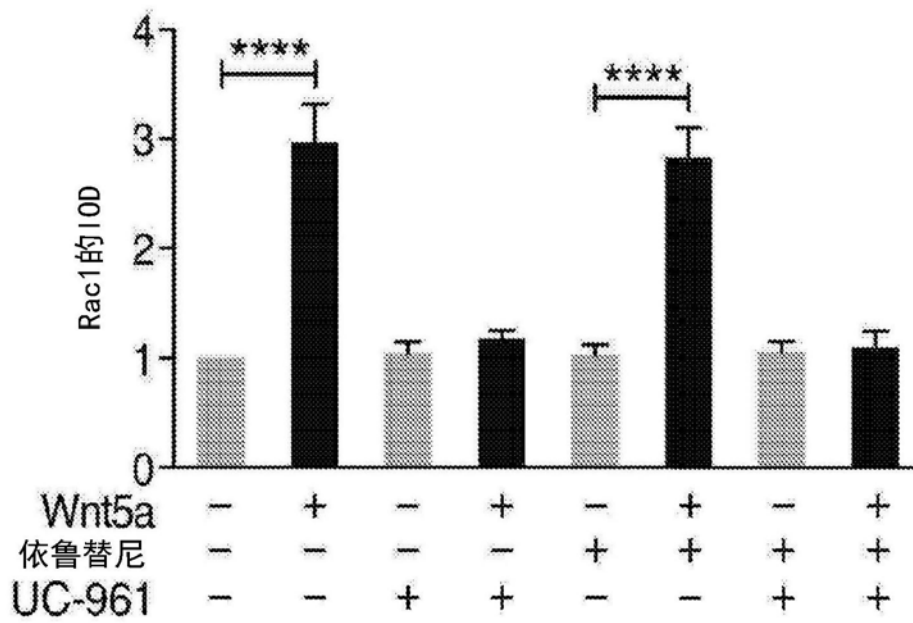


图4B

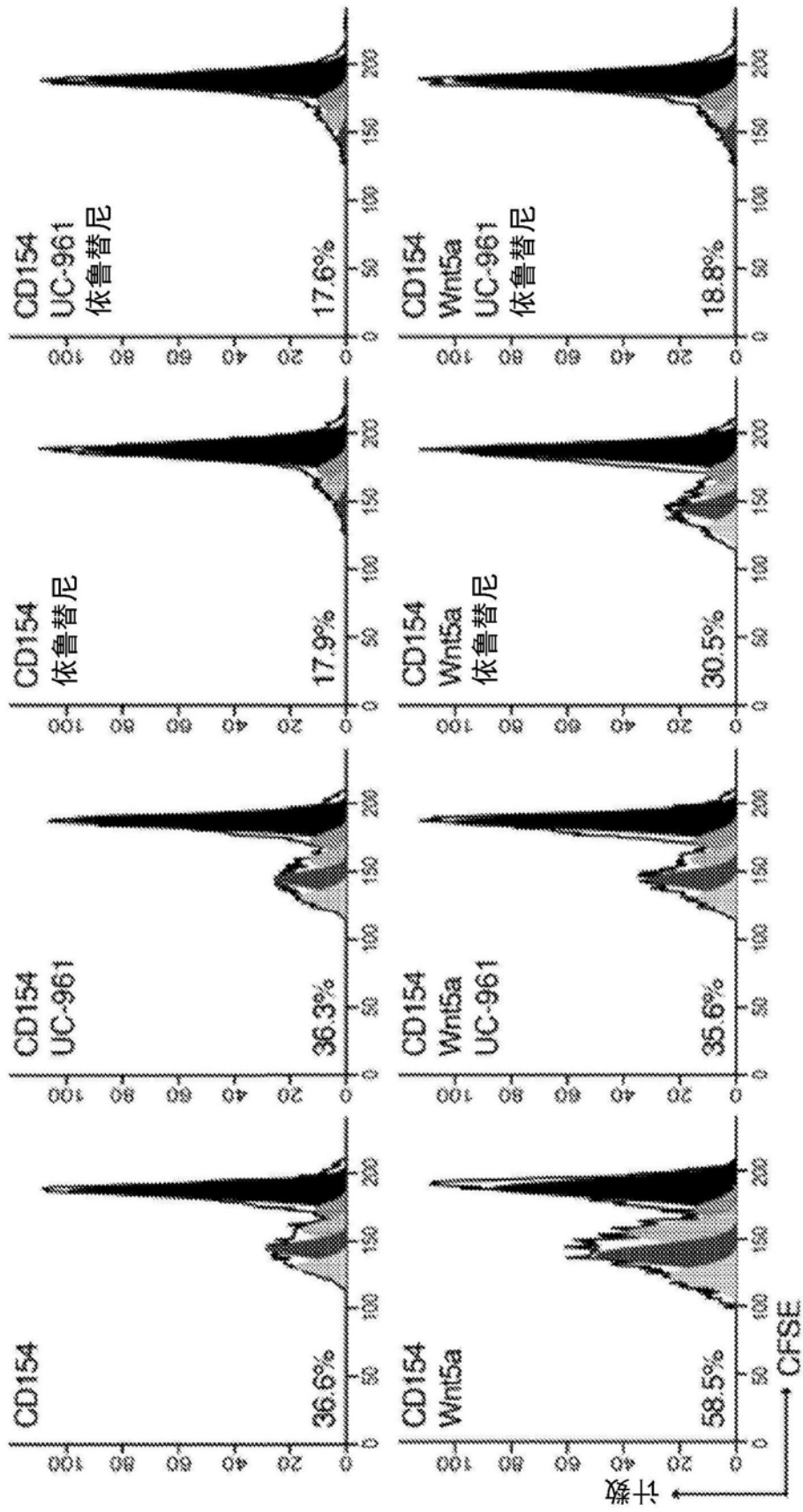


图4C

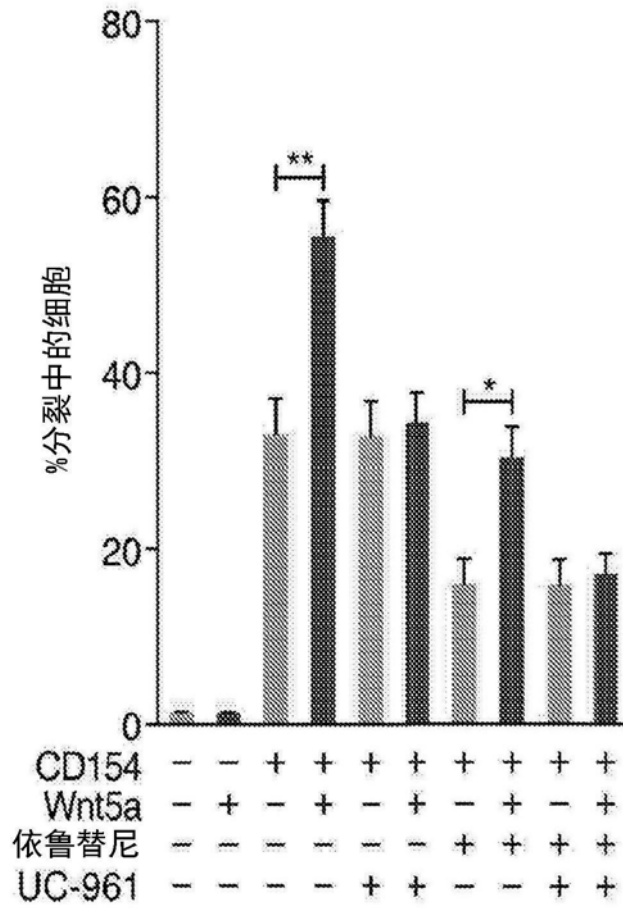


图4D

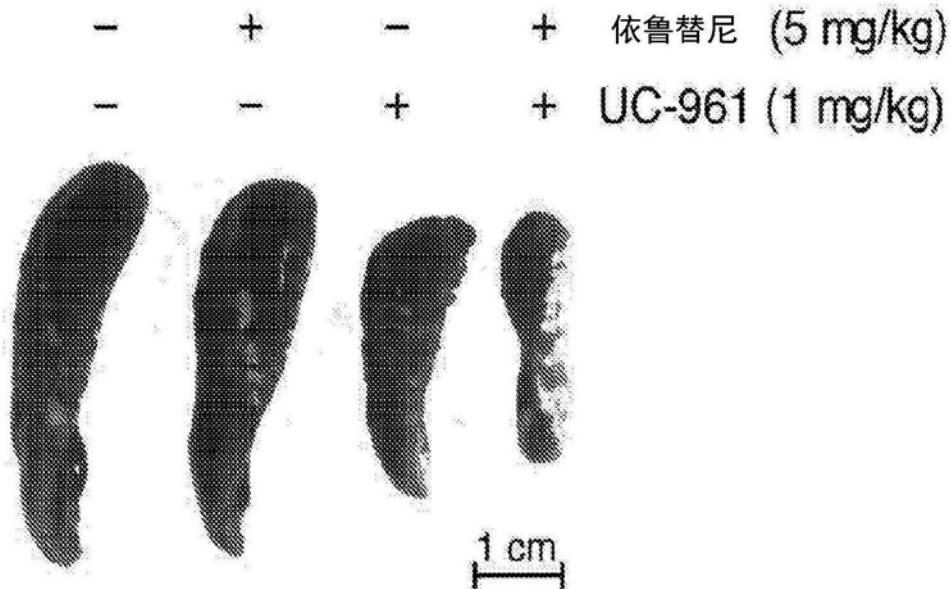


图5A

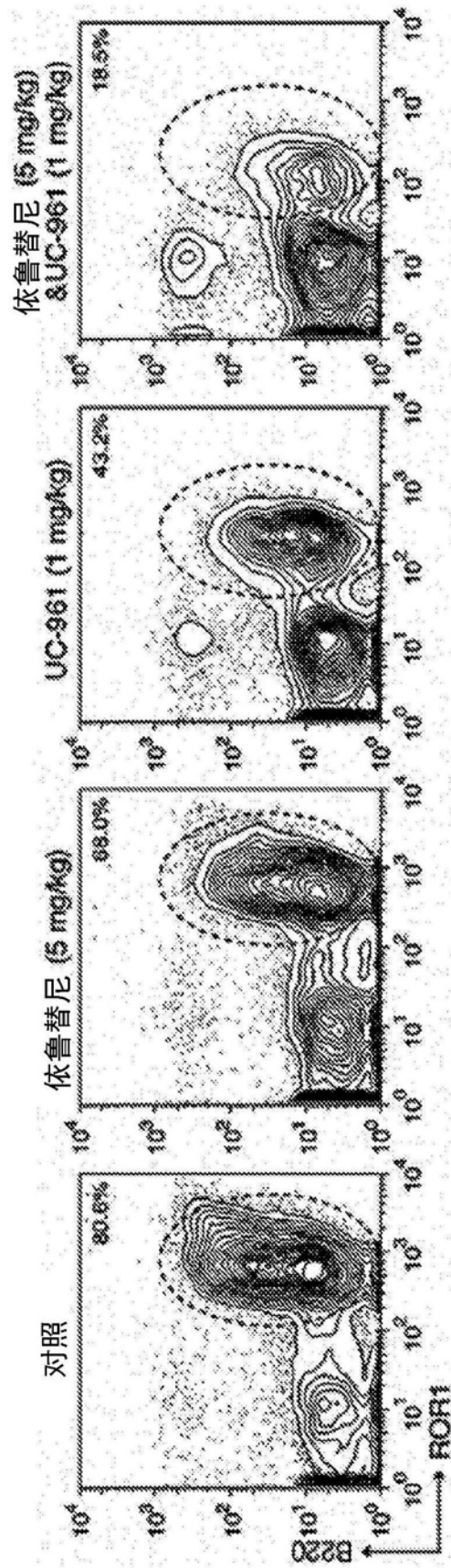


图5B

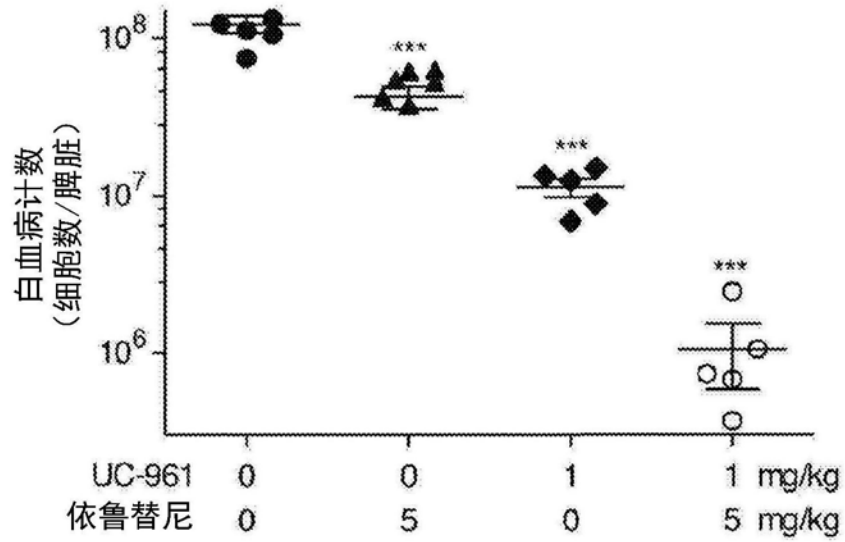


图5C

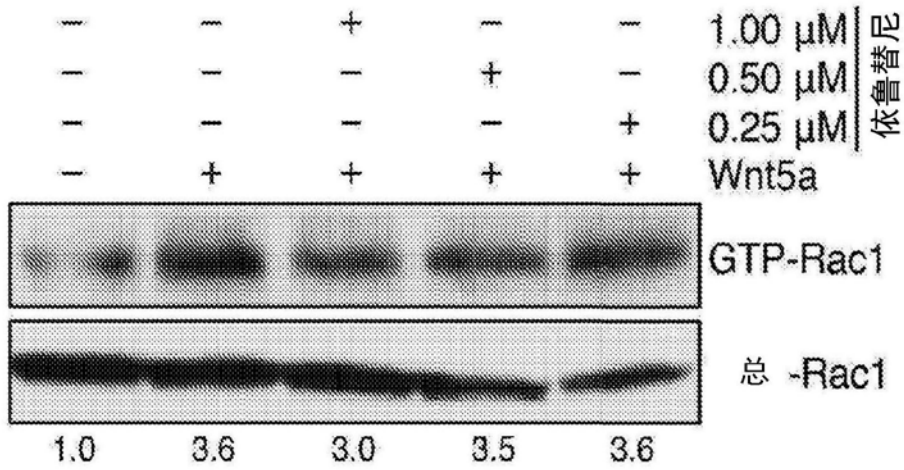


图6A

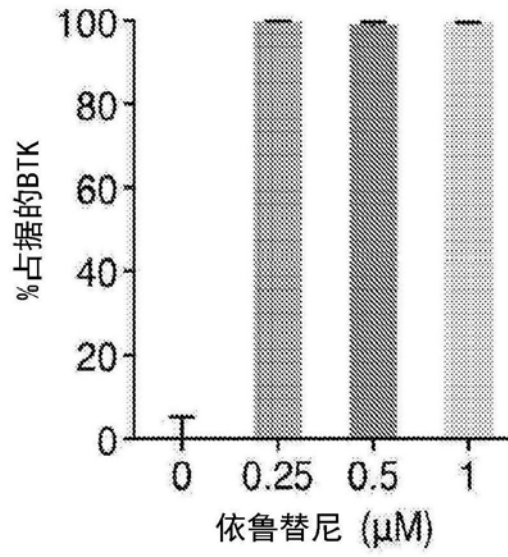


图6B

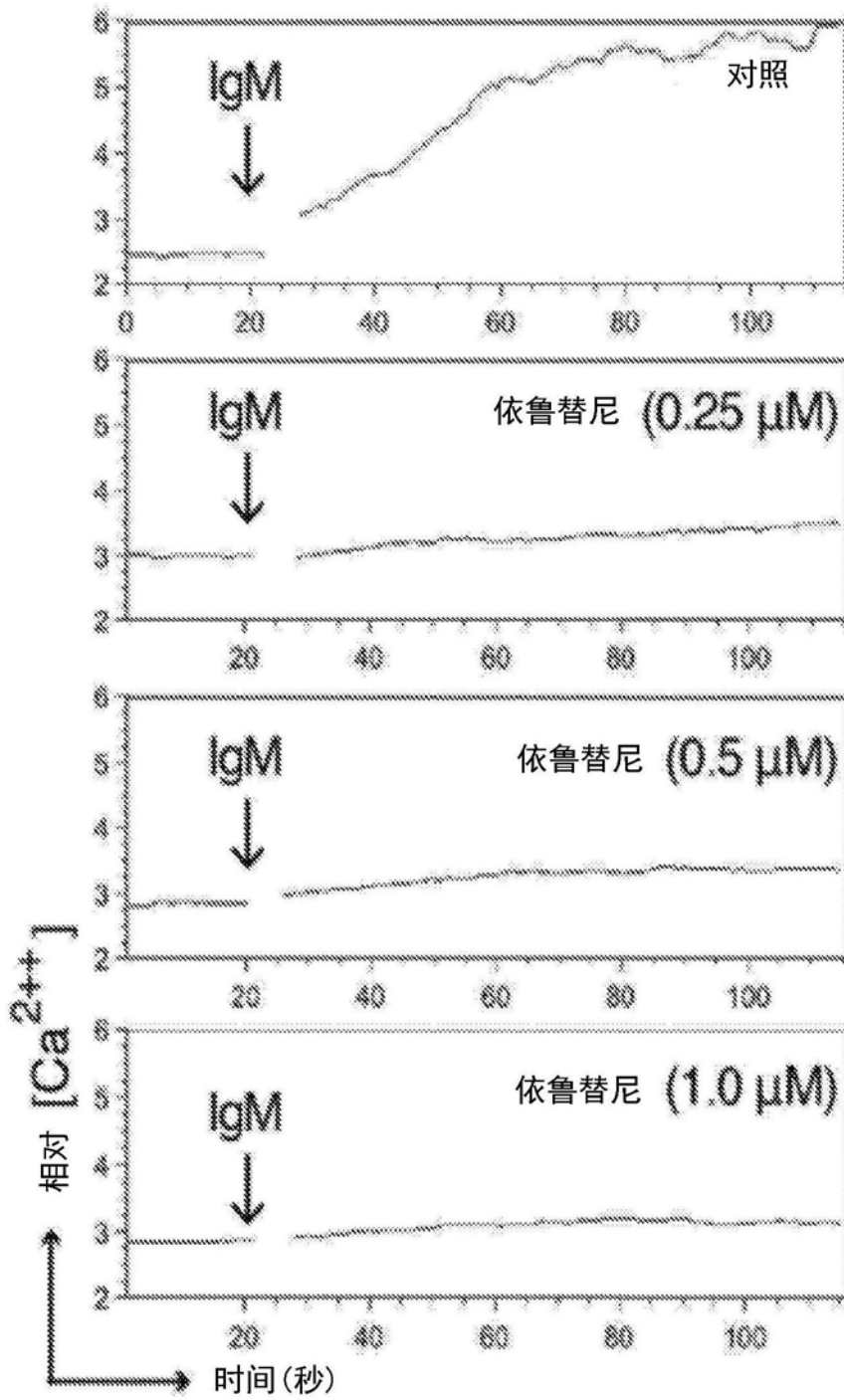


图6C

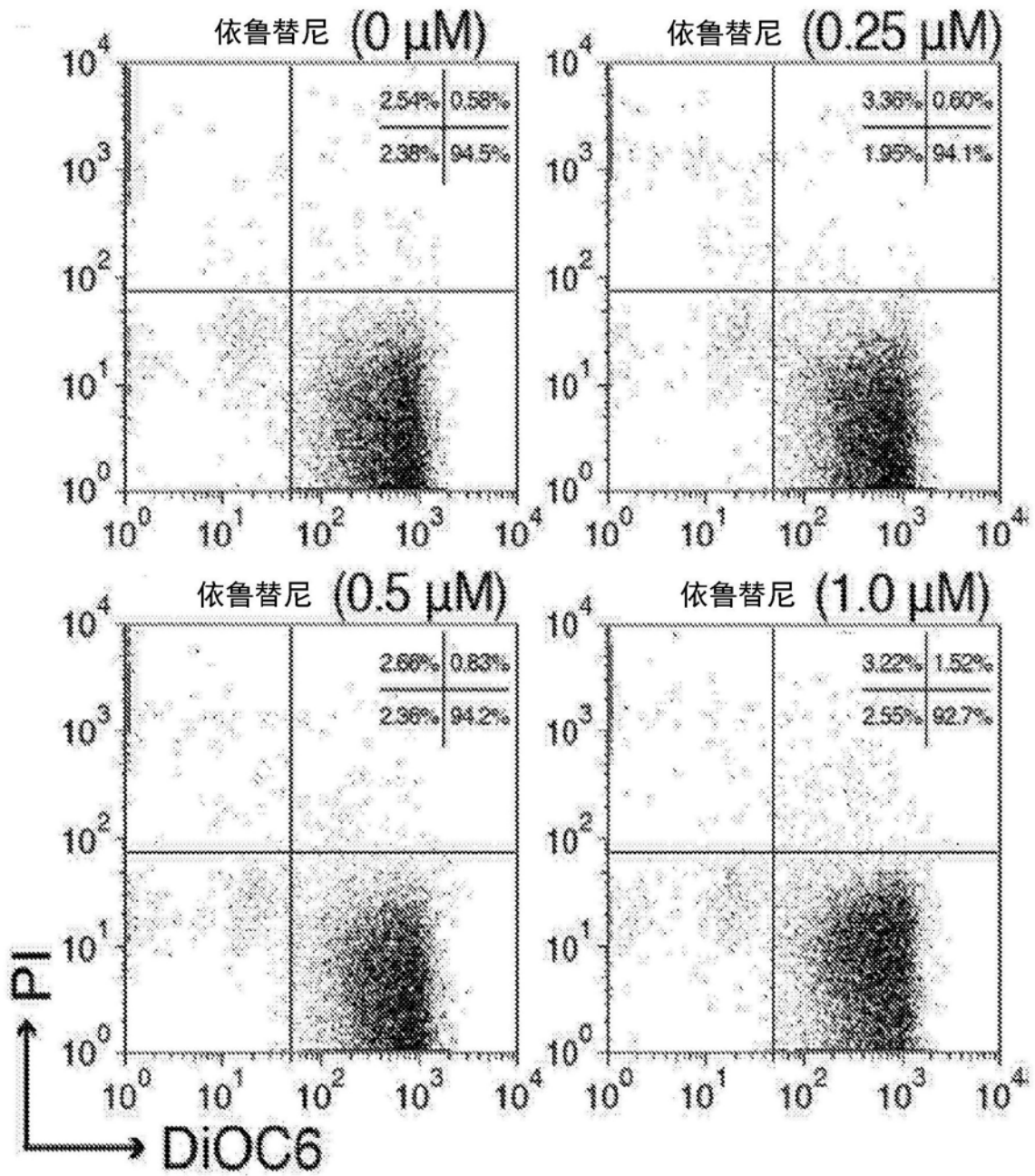


图6D

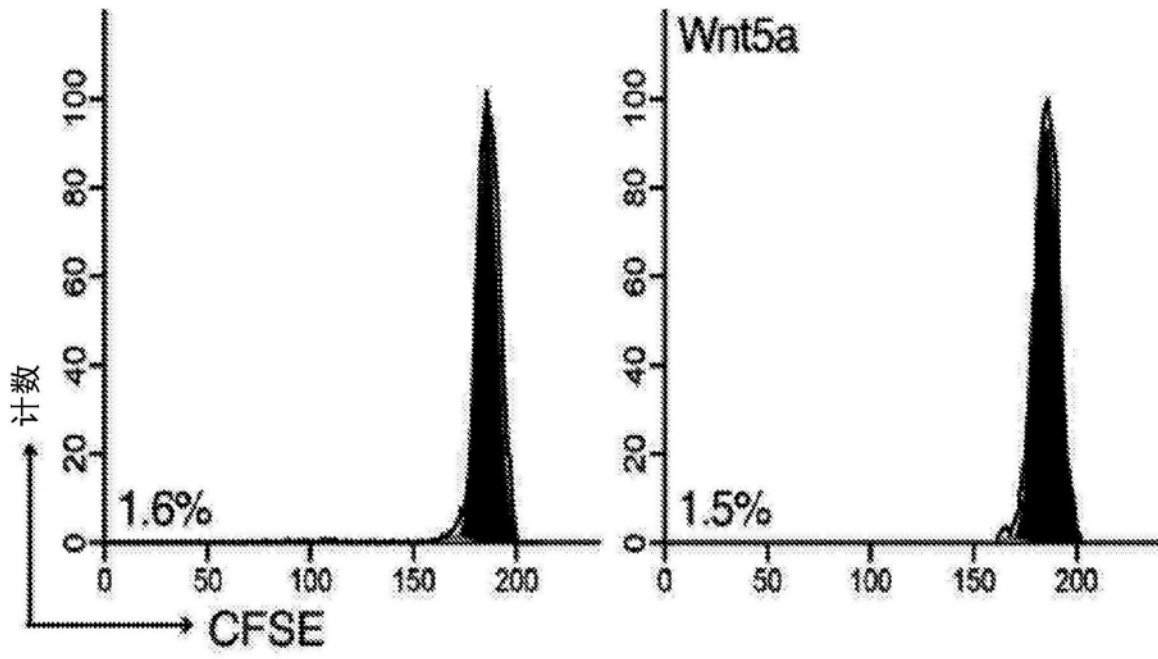


图7A

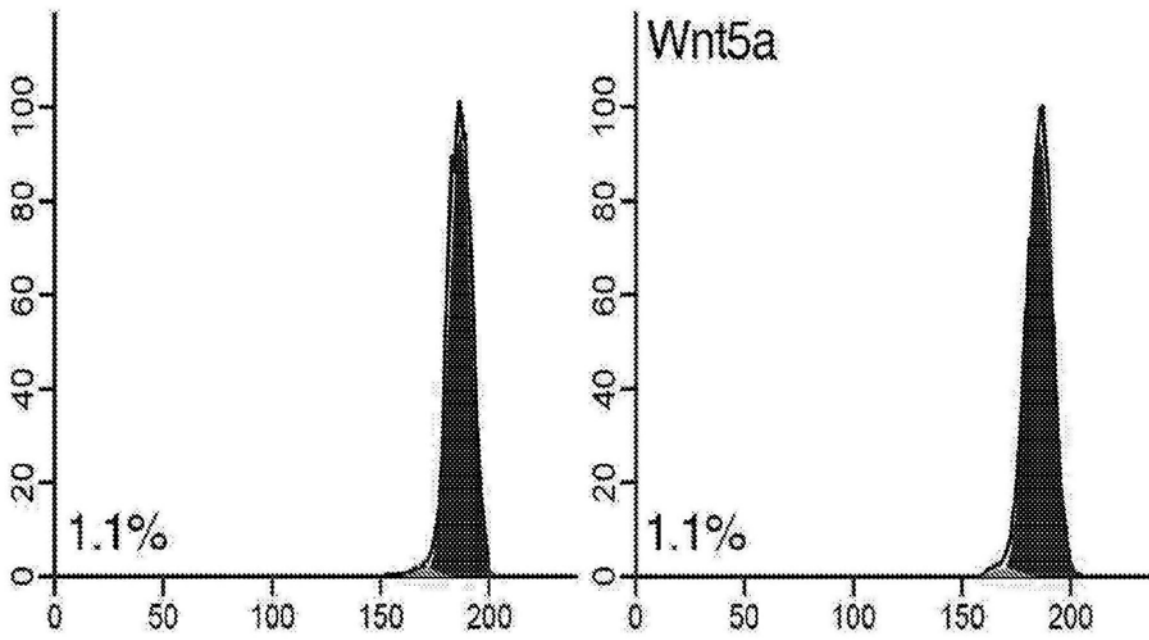


图7B

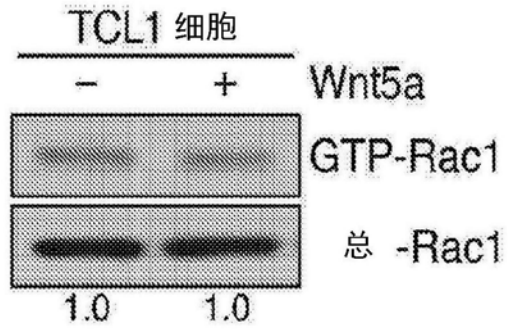


图7C

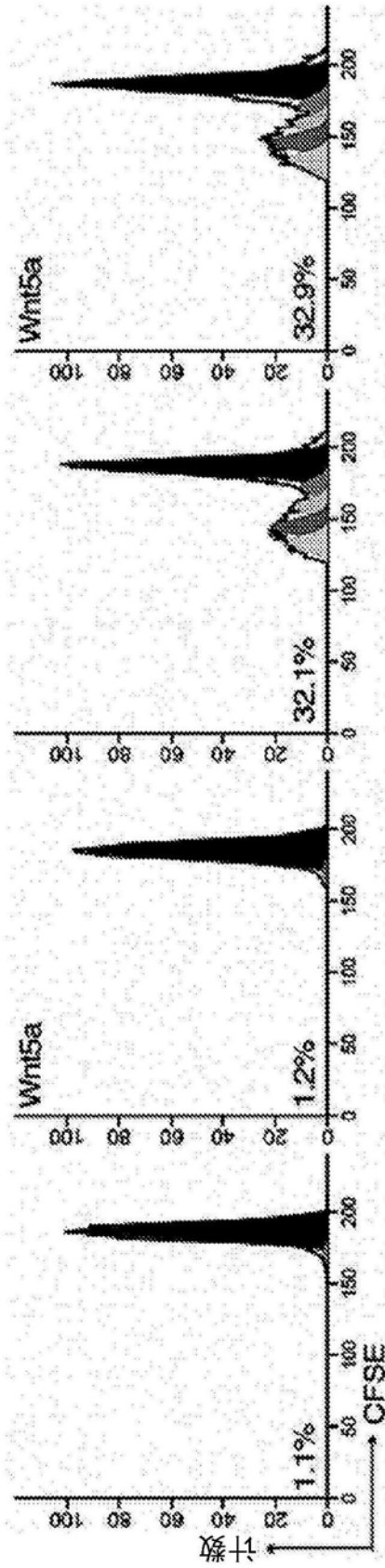


图7D

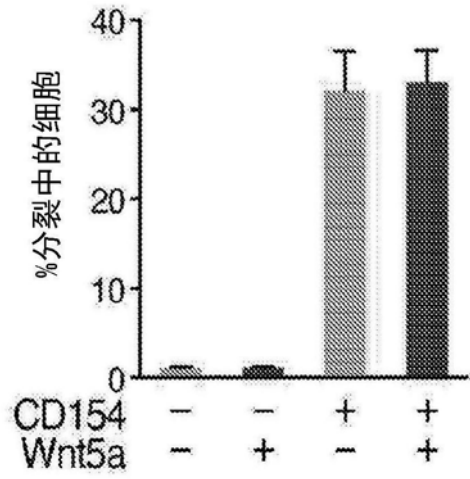


图7E

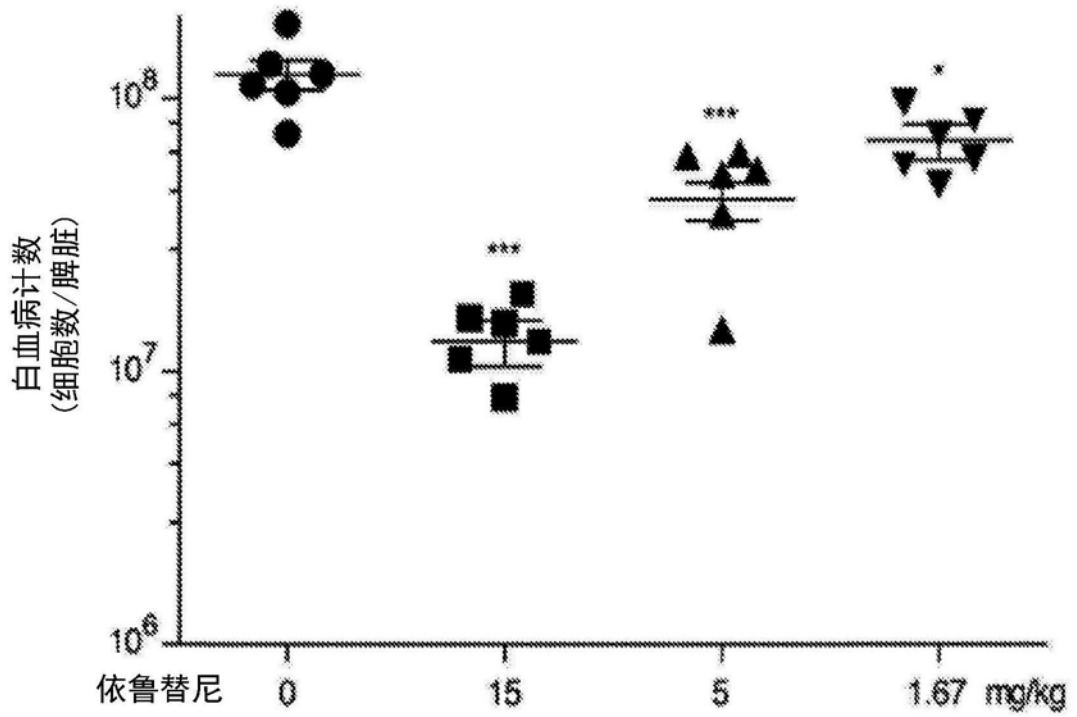


图8A

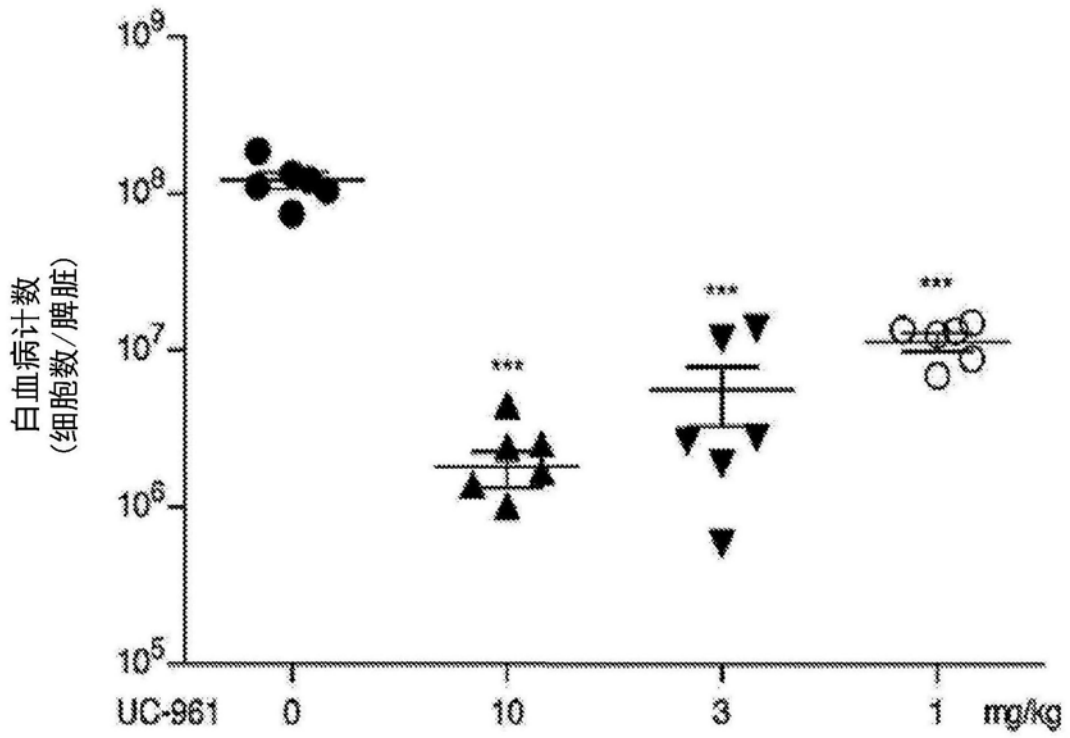


图8B

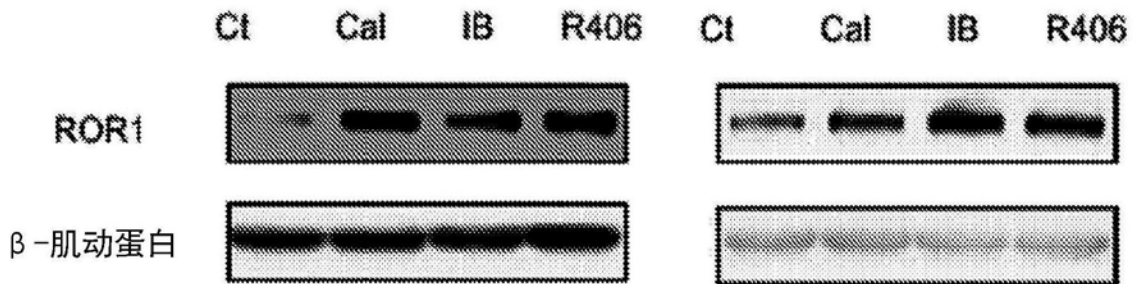


图9

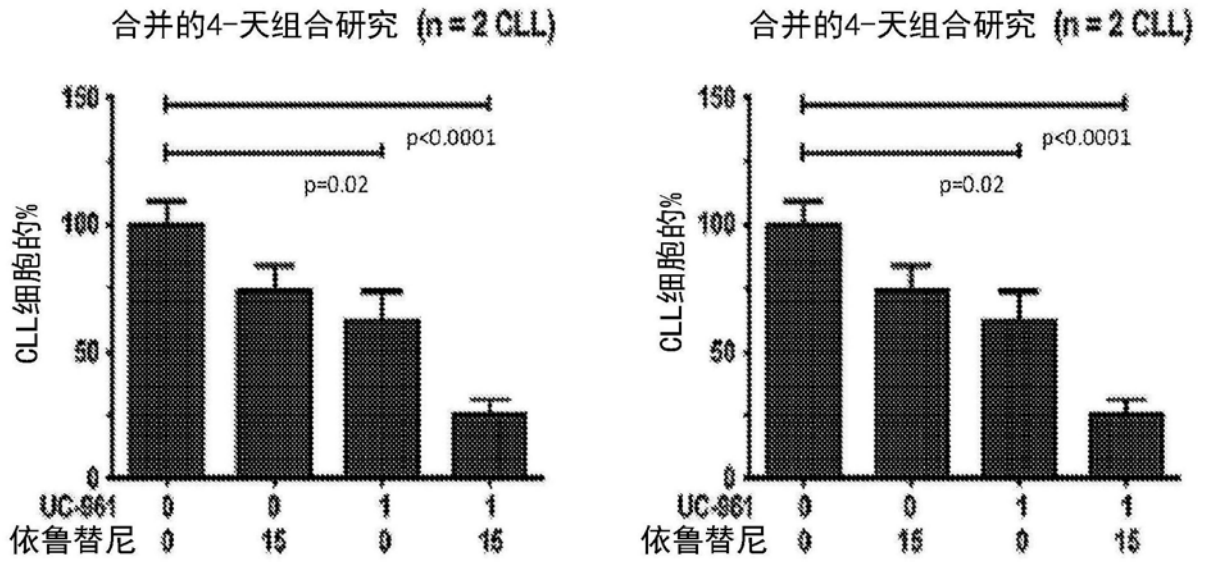


图10

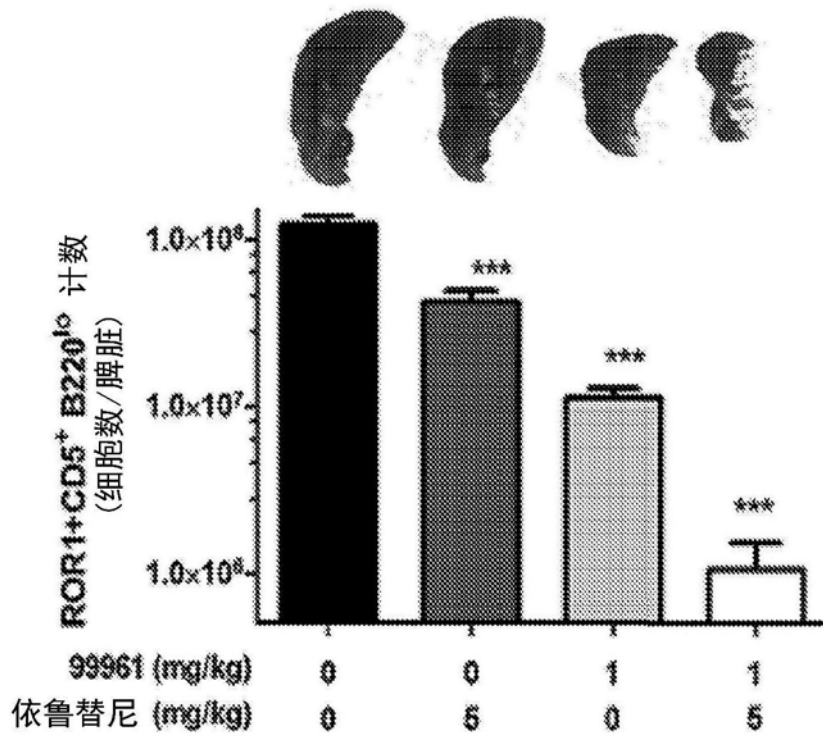


图11

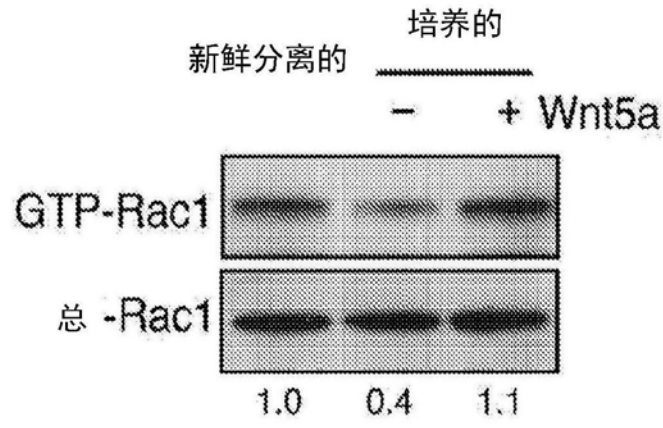


图12A

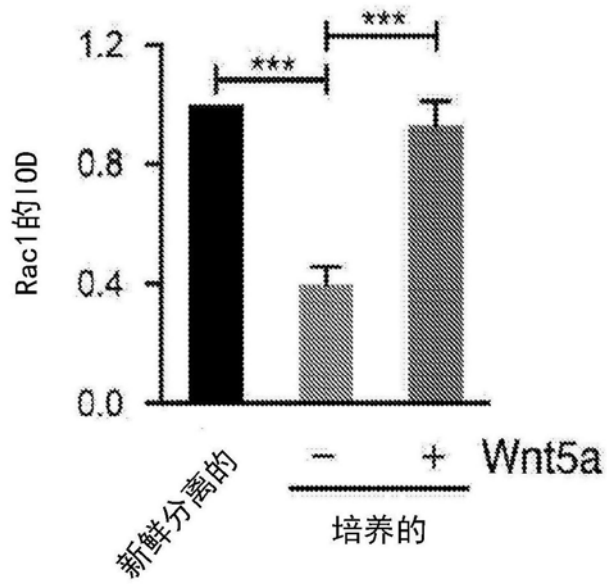


图12B

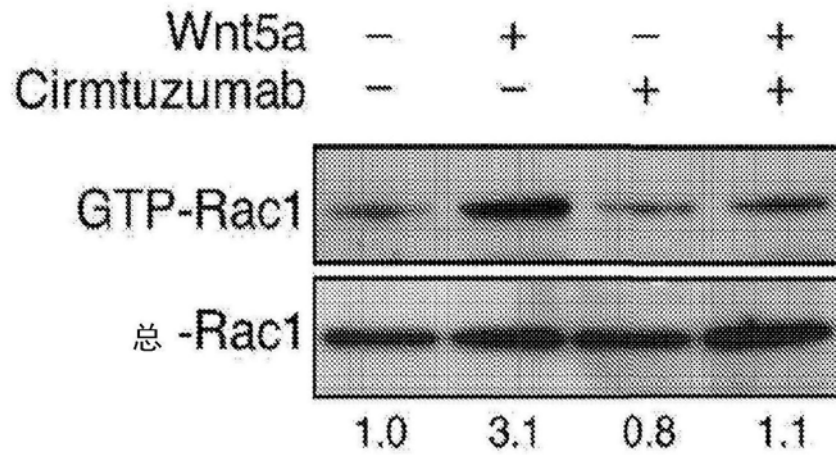


图12C

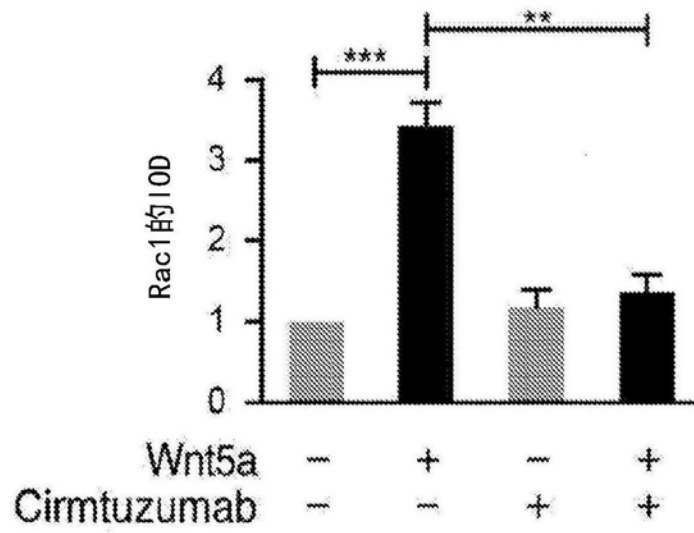


图12D

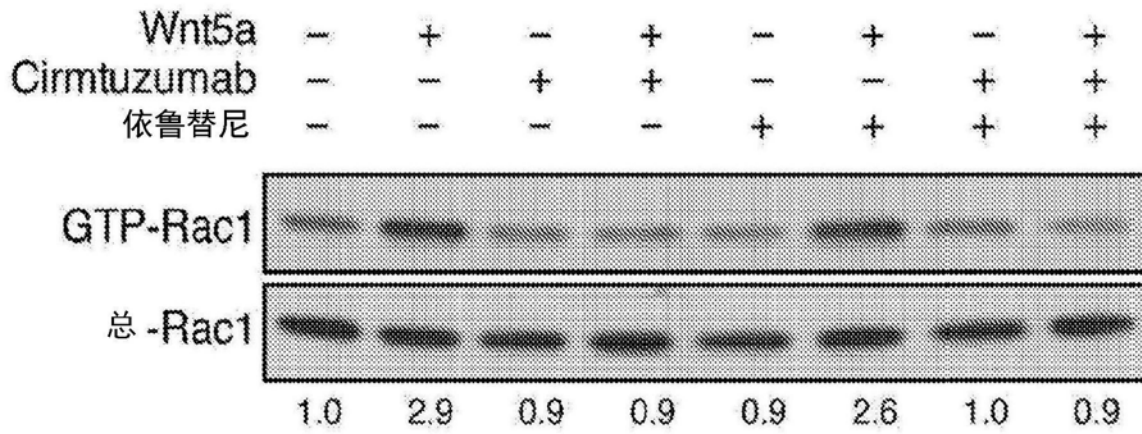


图12E

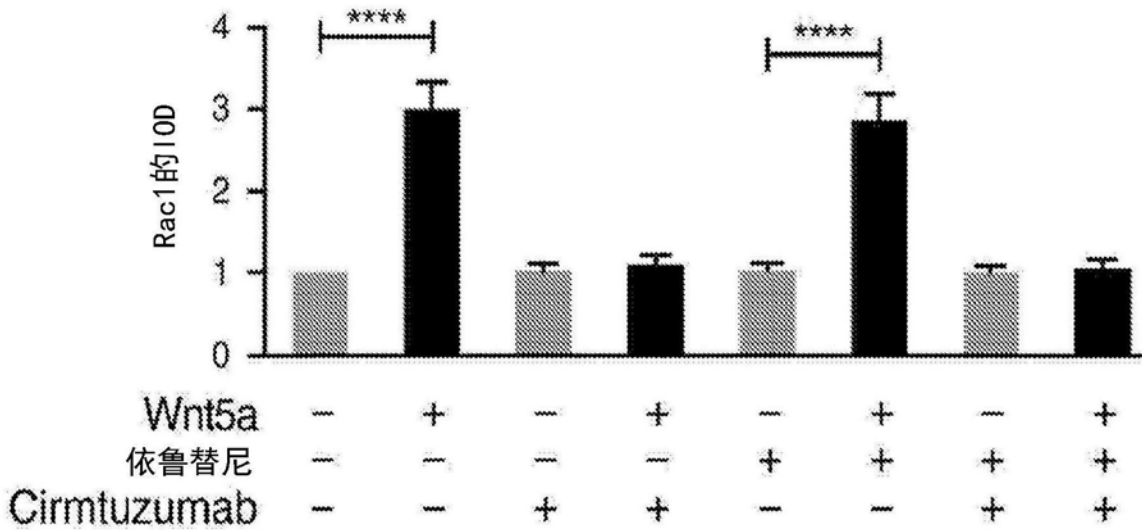


图12F

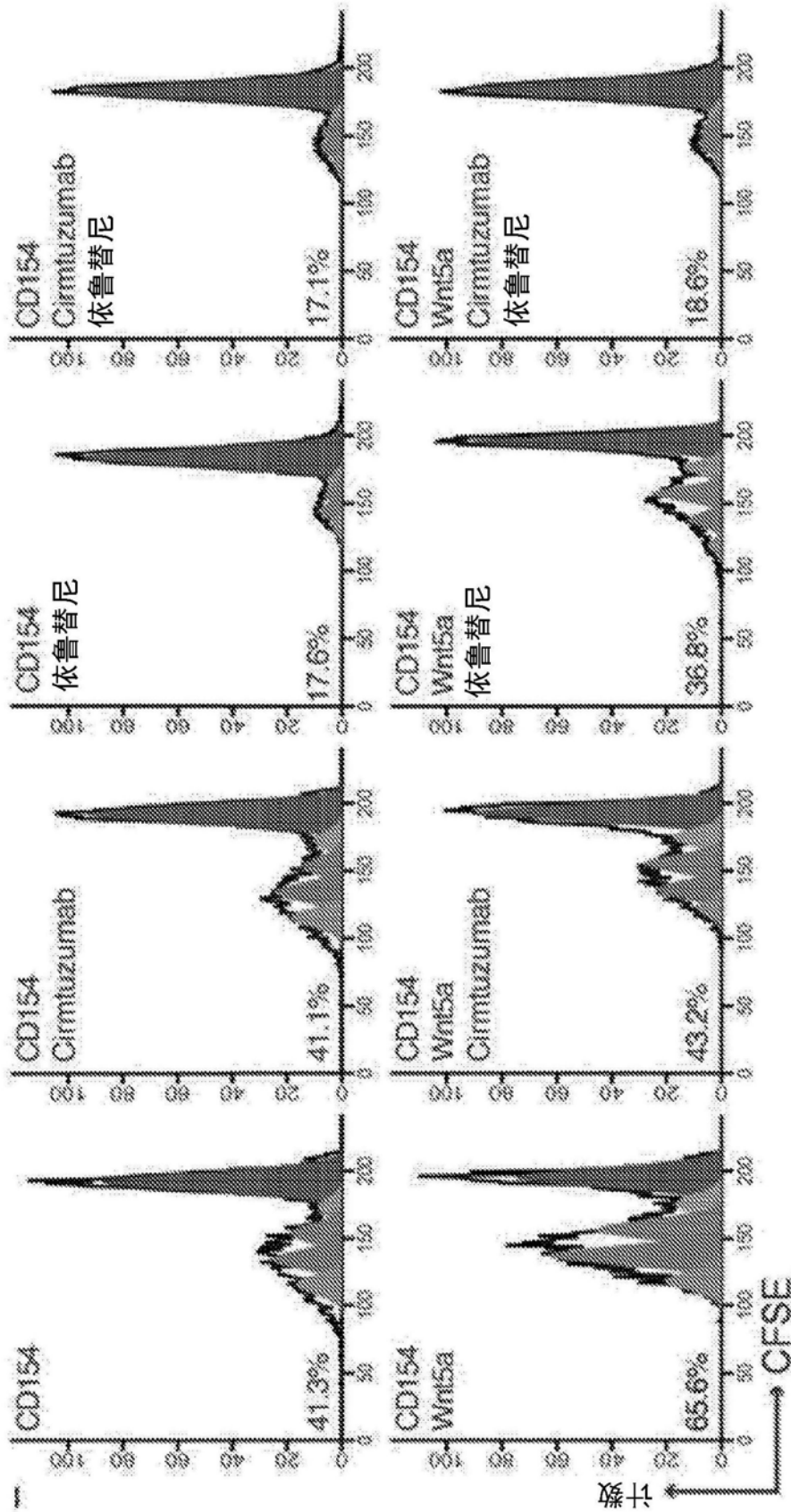


图13A

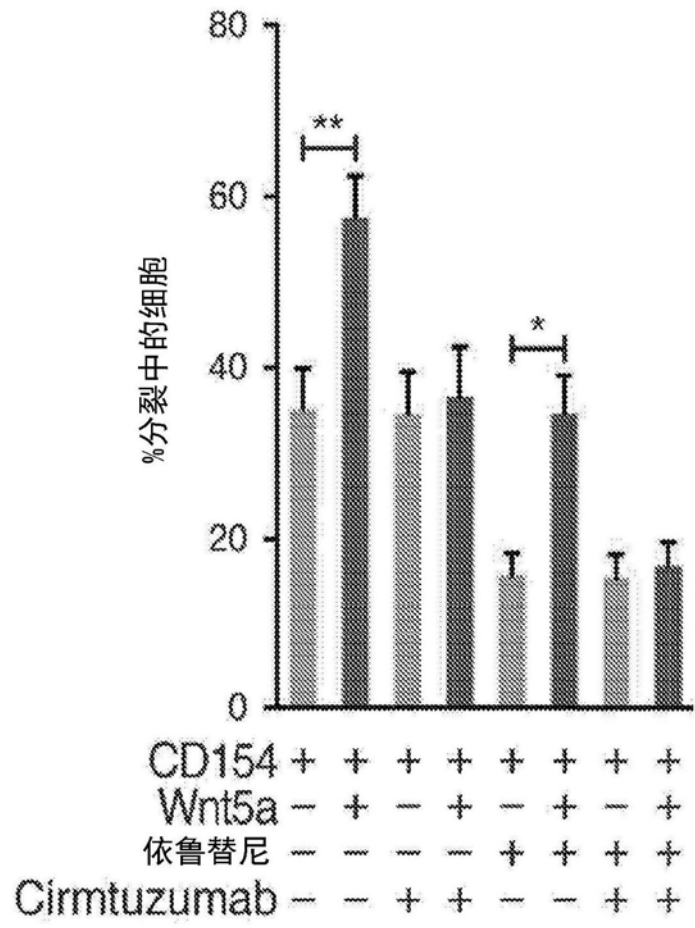


图13B

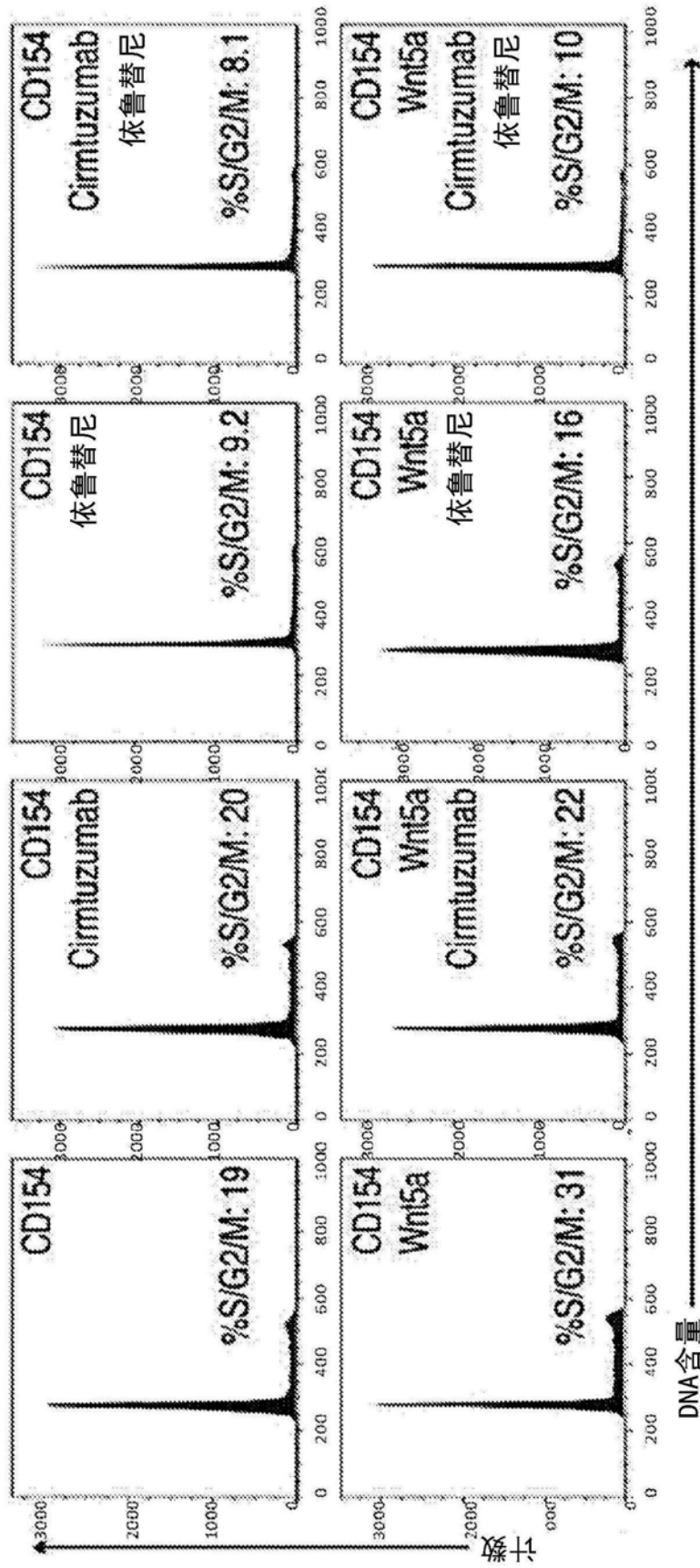


图13C

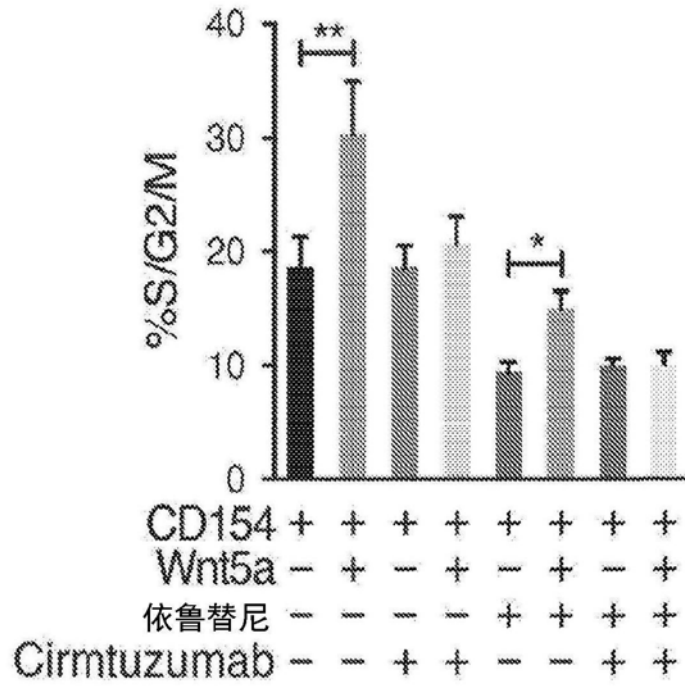


图13D

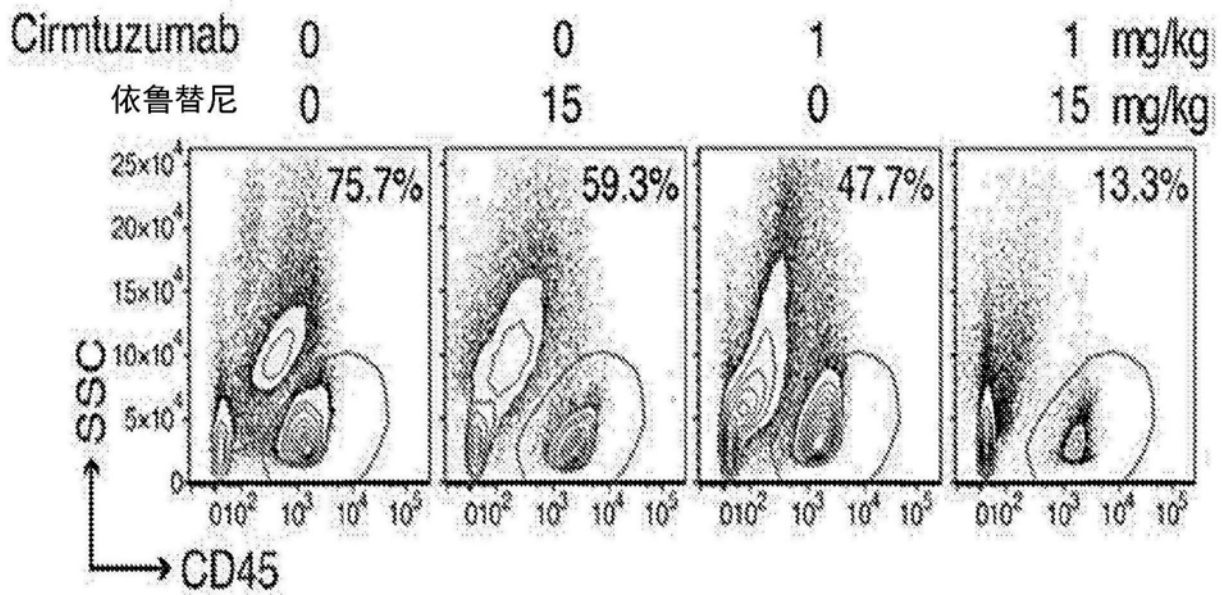


图14A

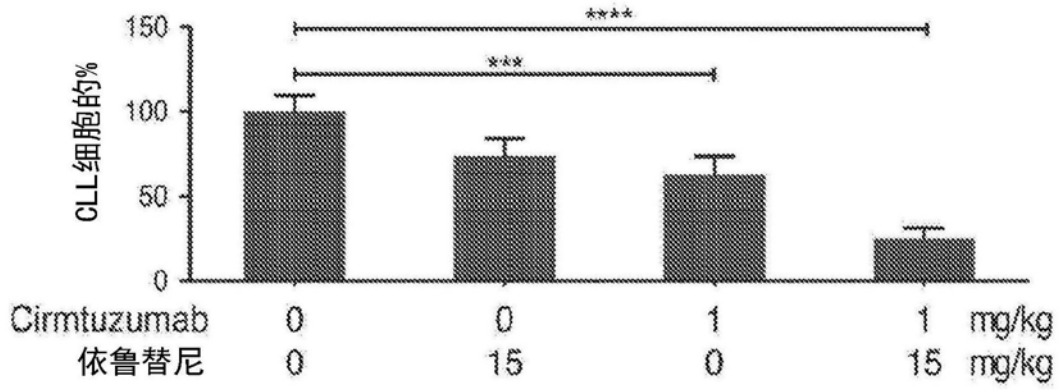


图14B

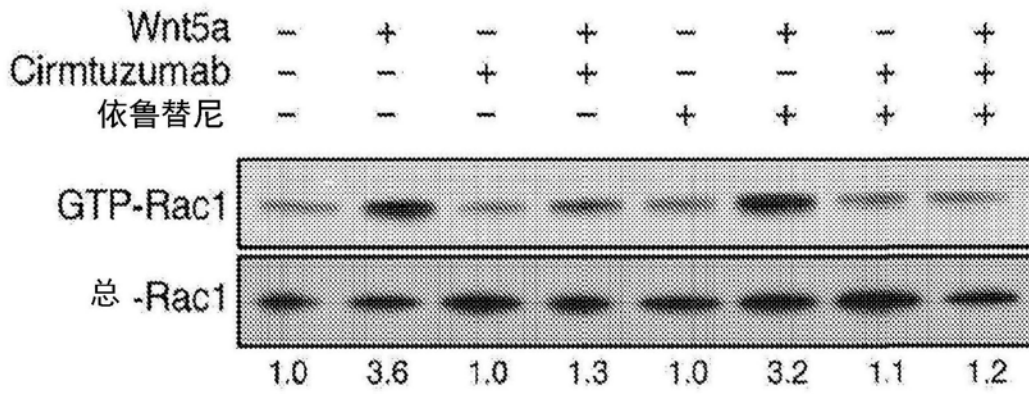


图15A

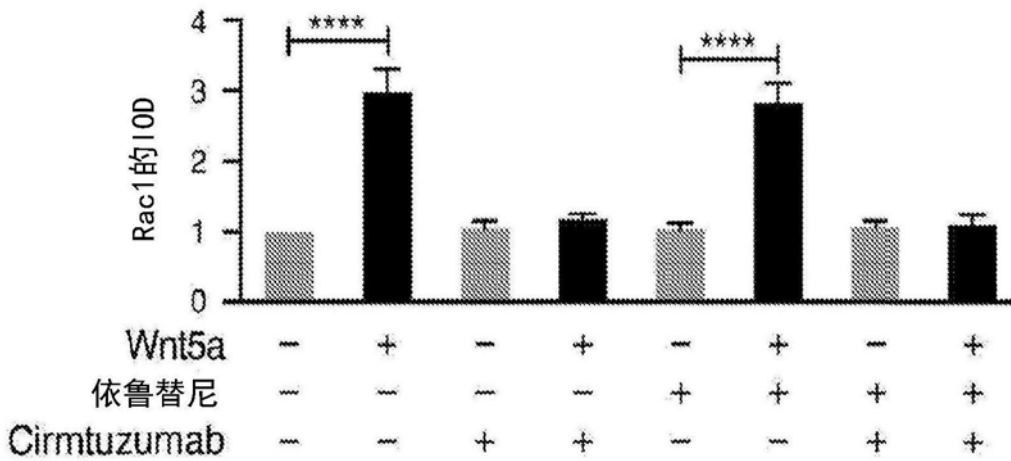


图15B

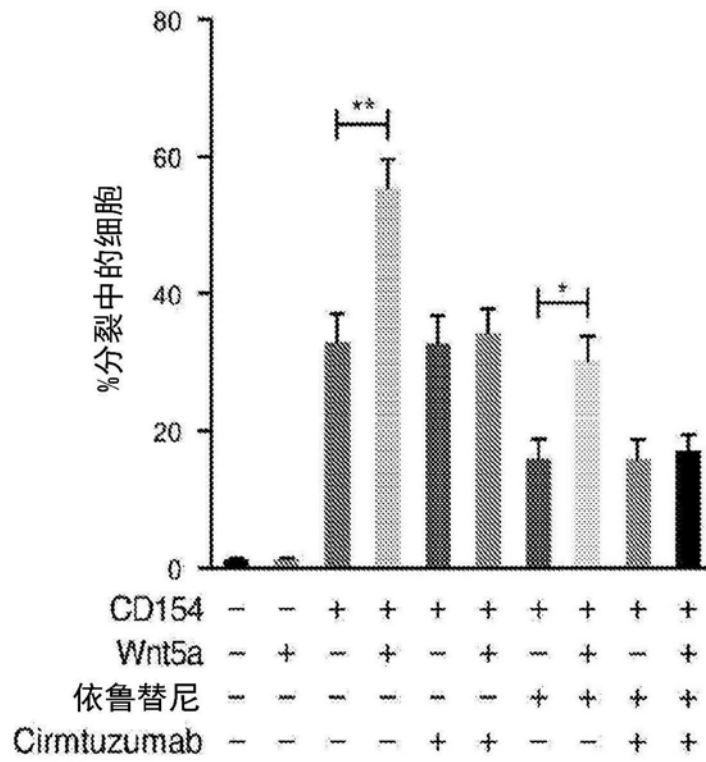


图15C

依鲁替尼	0	5	0	5 mg/kg
Cirtuzumab	0	0	1	1 mg/kg

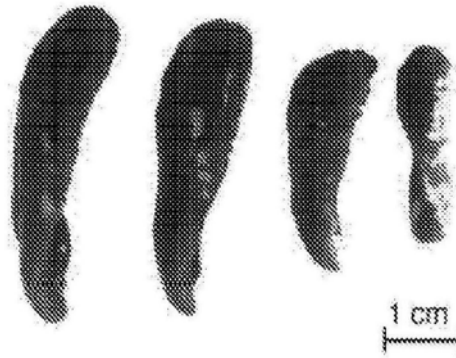


图16A

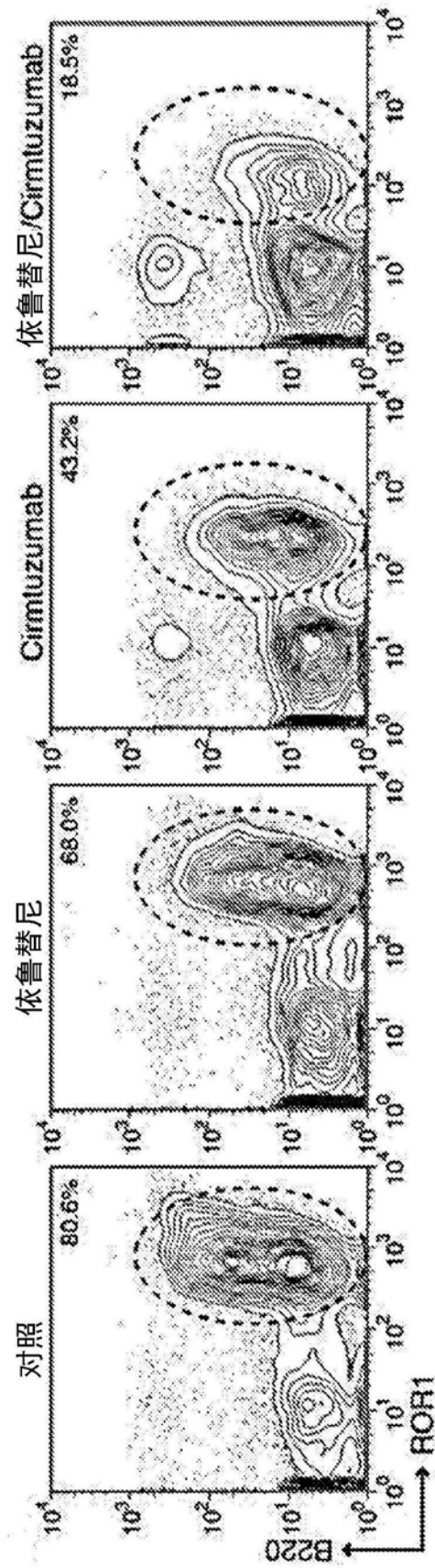


图16B

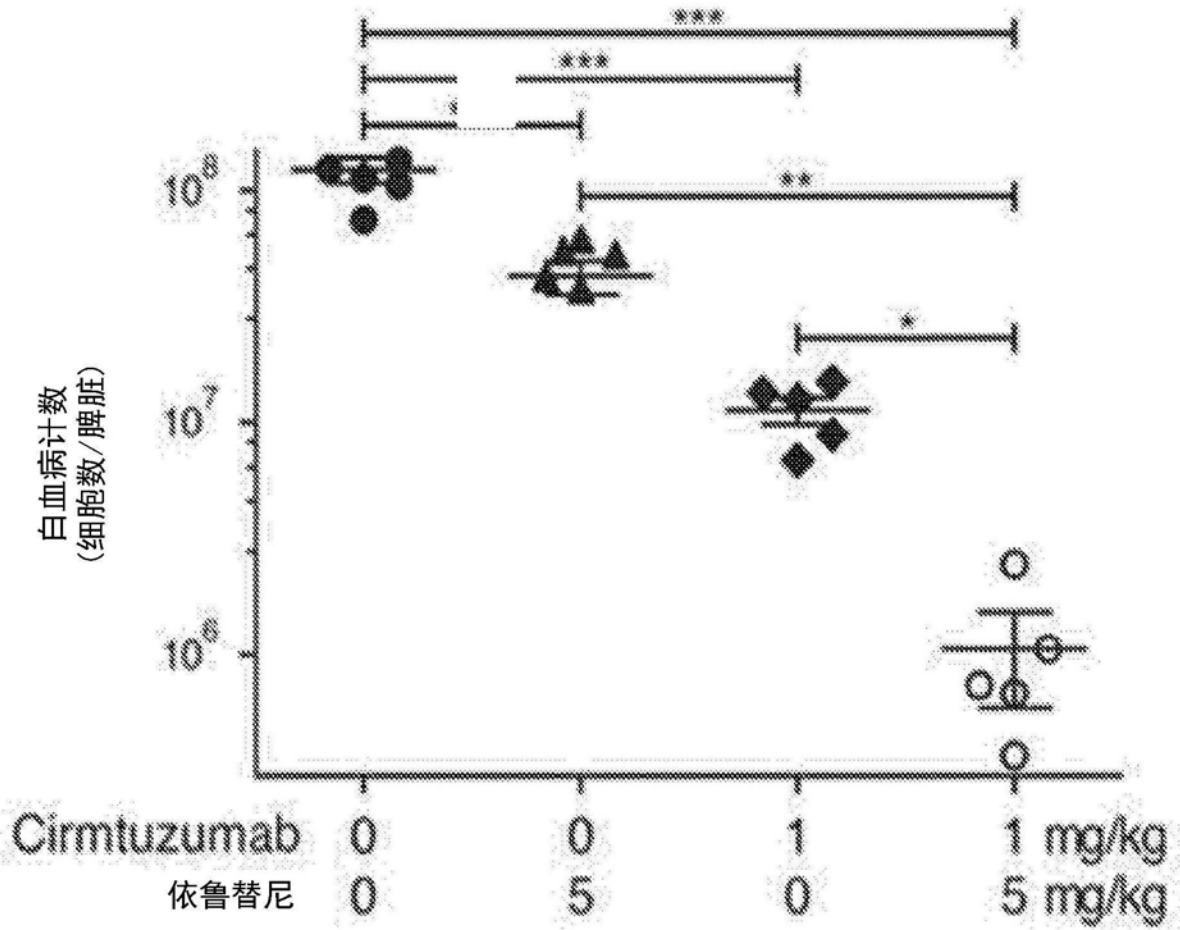


图16C

依鲁替尼	0	5	0	5 mg/kg
Cirmtuzumab	0	0	10	10 mg/kg

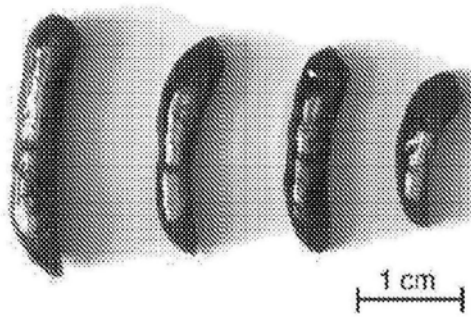


图17A

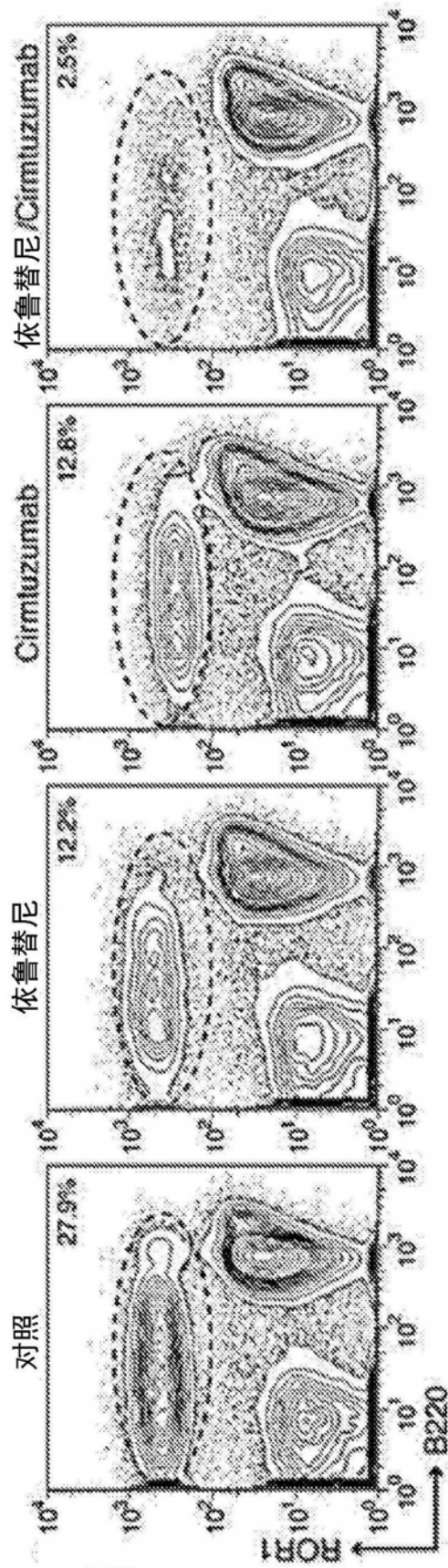


图17B

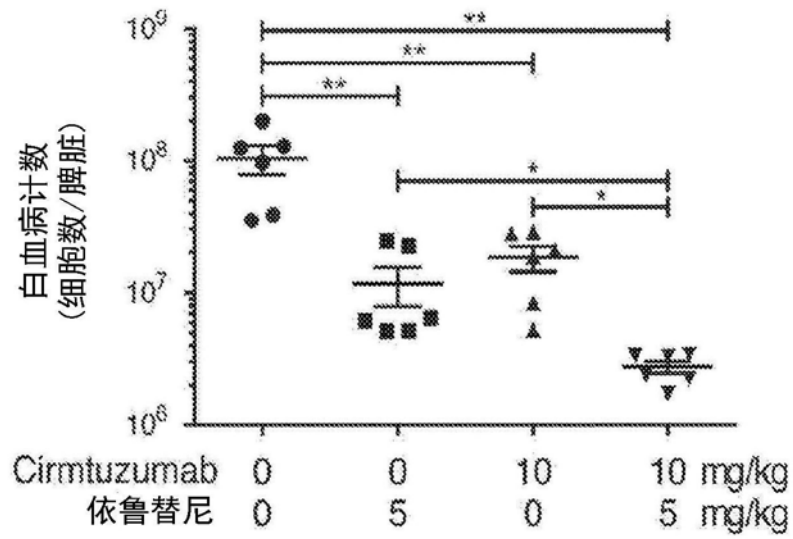


图17C

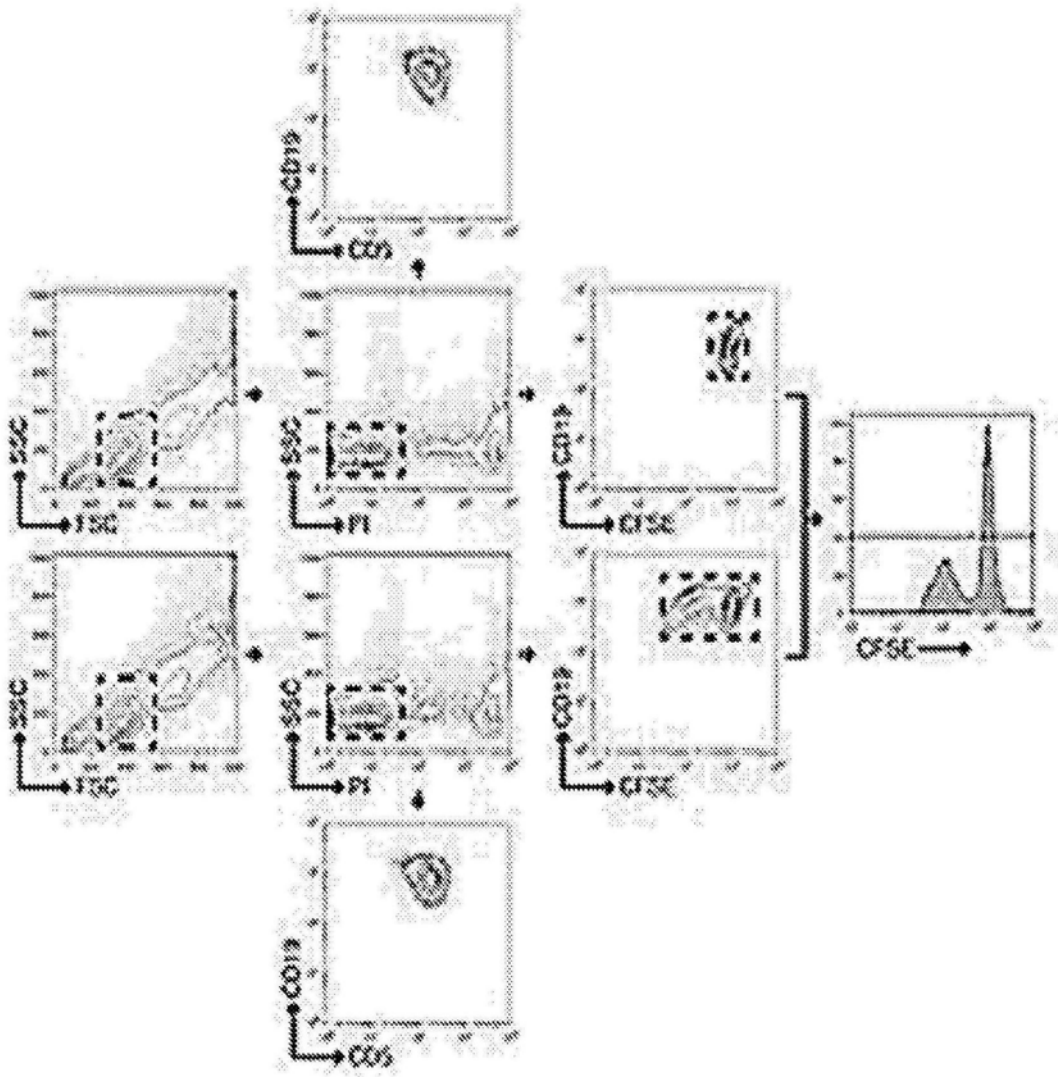


图18A

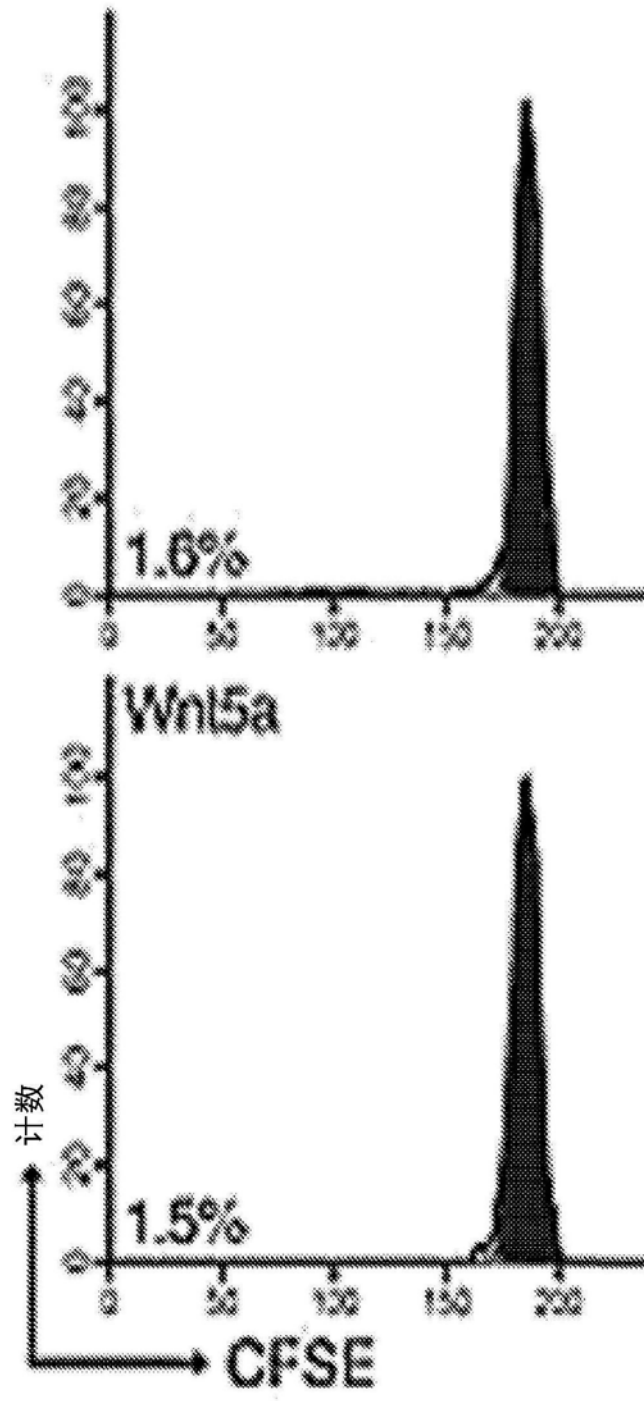


图18B

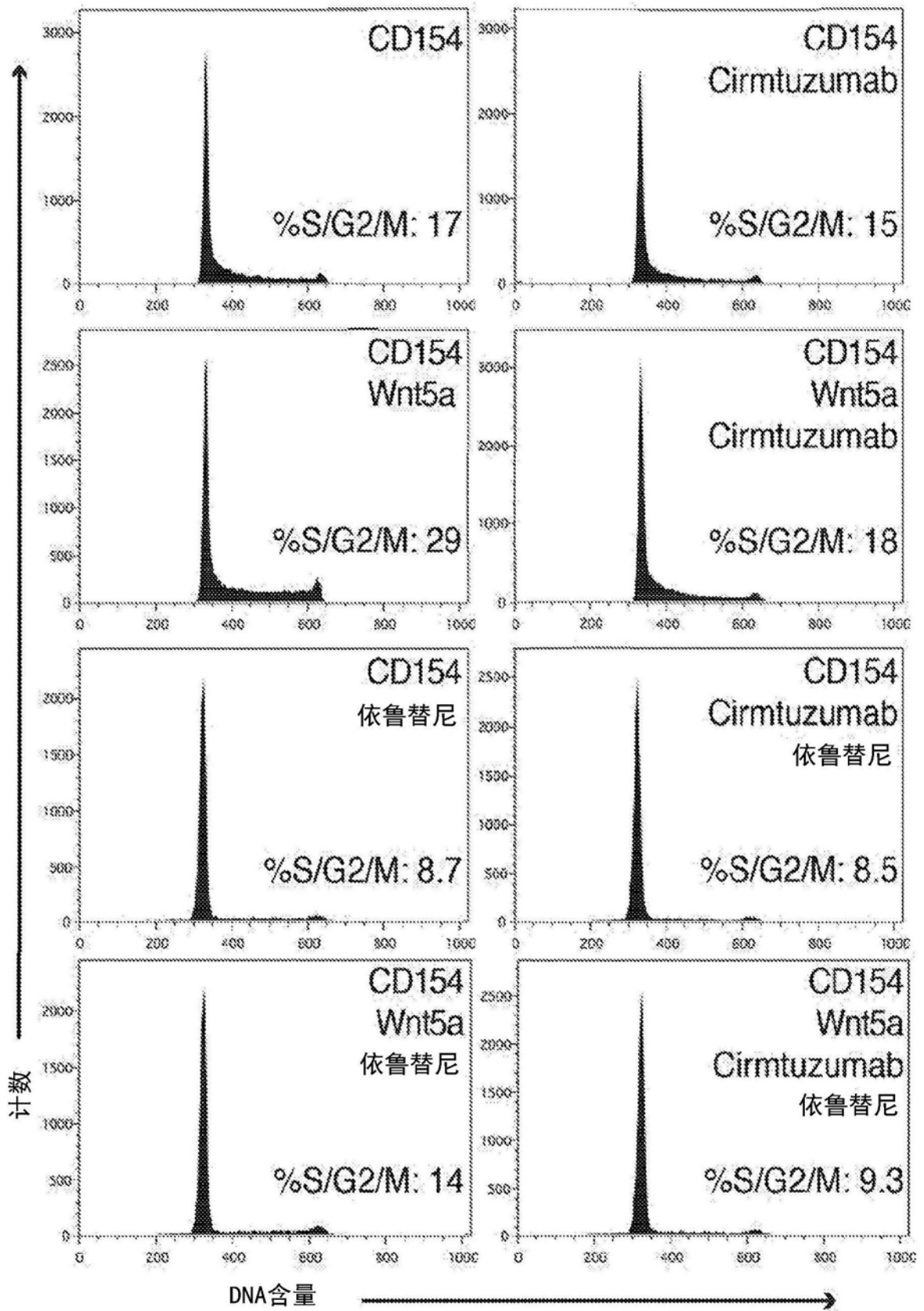


图19A

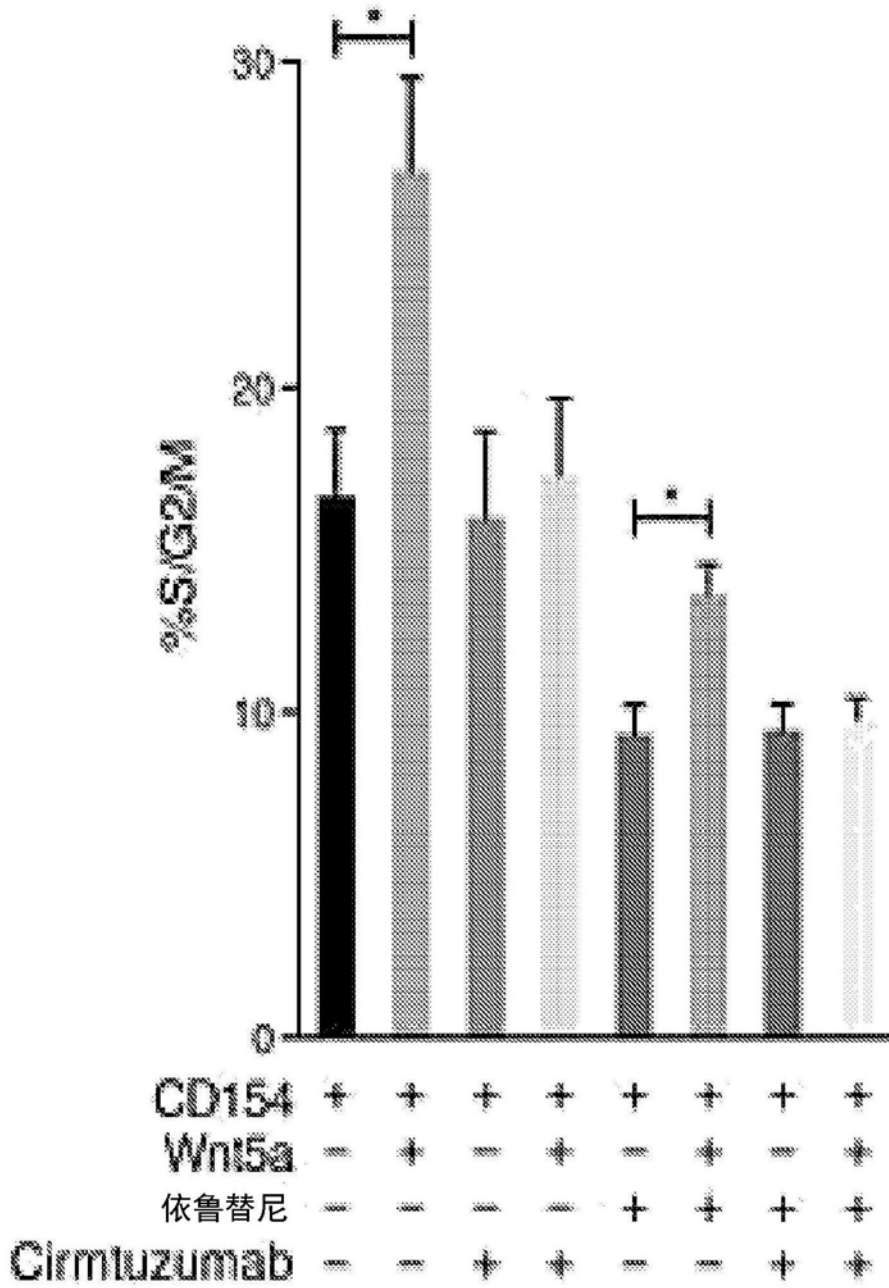


图19B

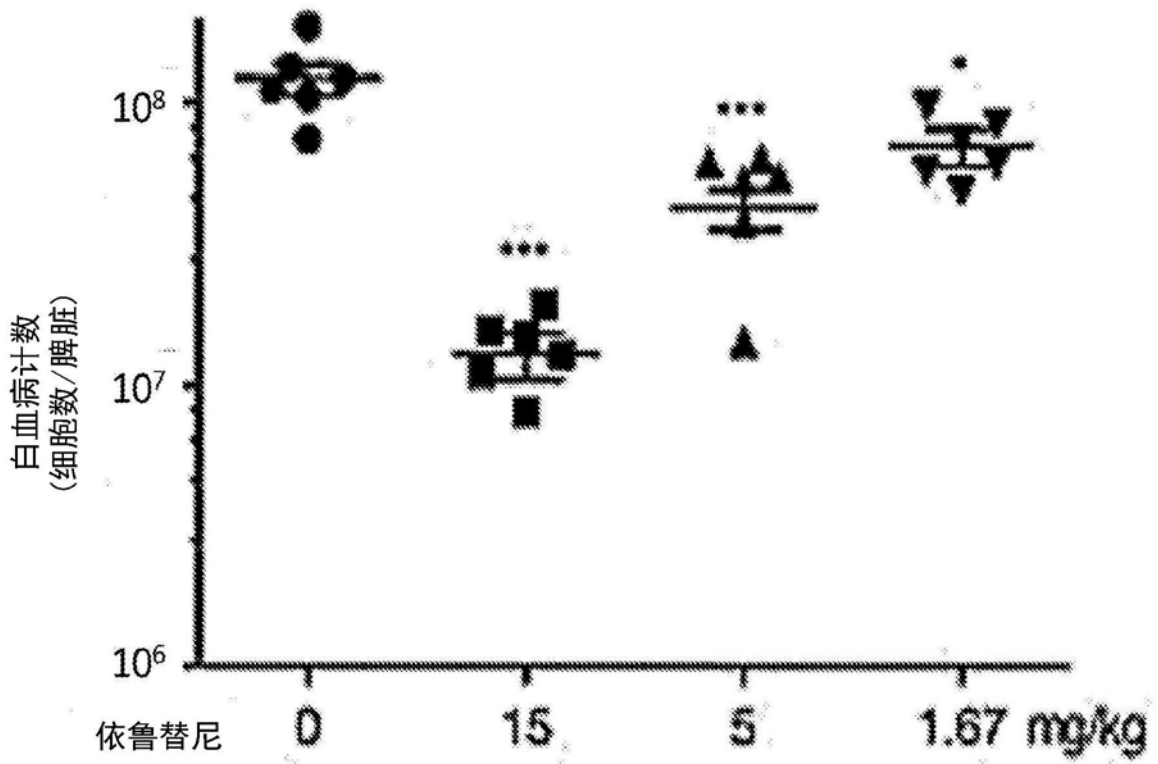


图20A

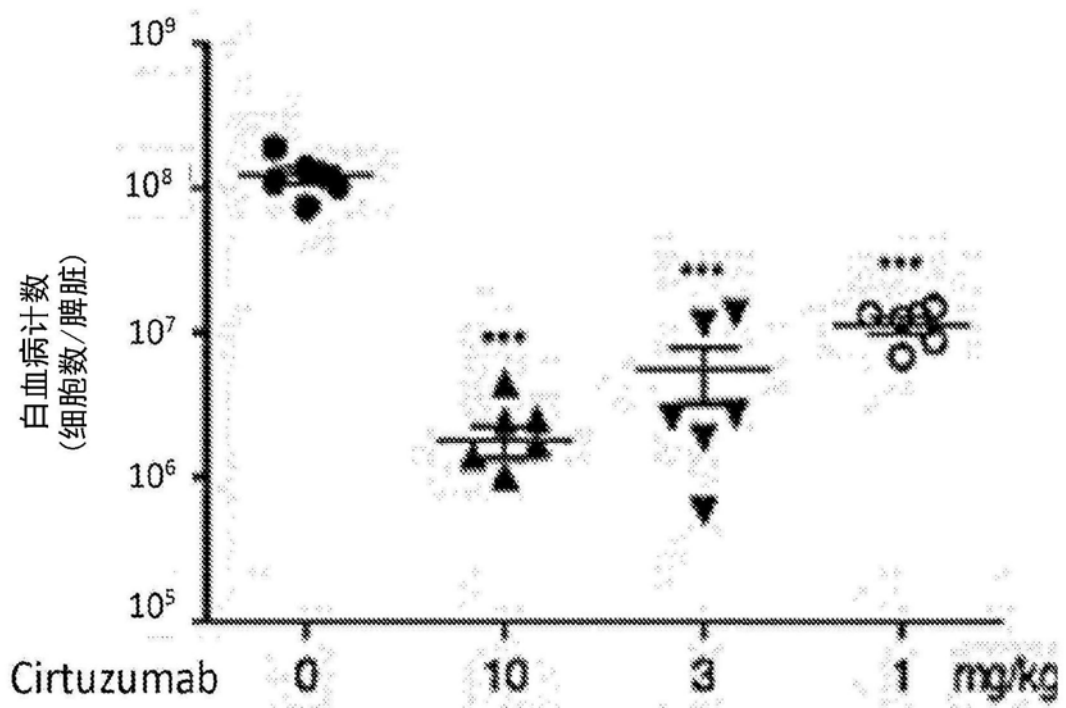


图20B

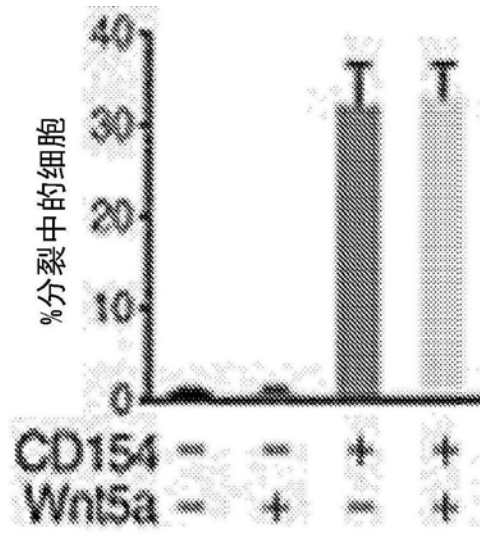


图21

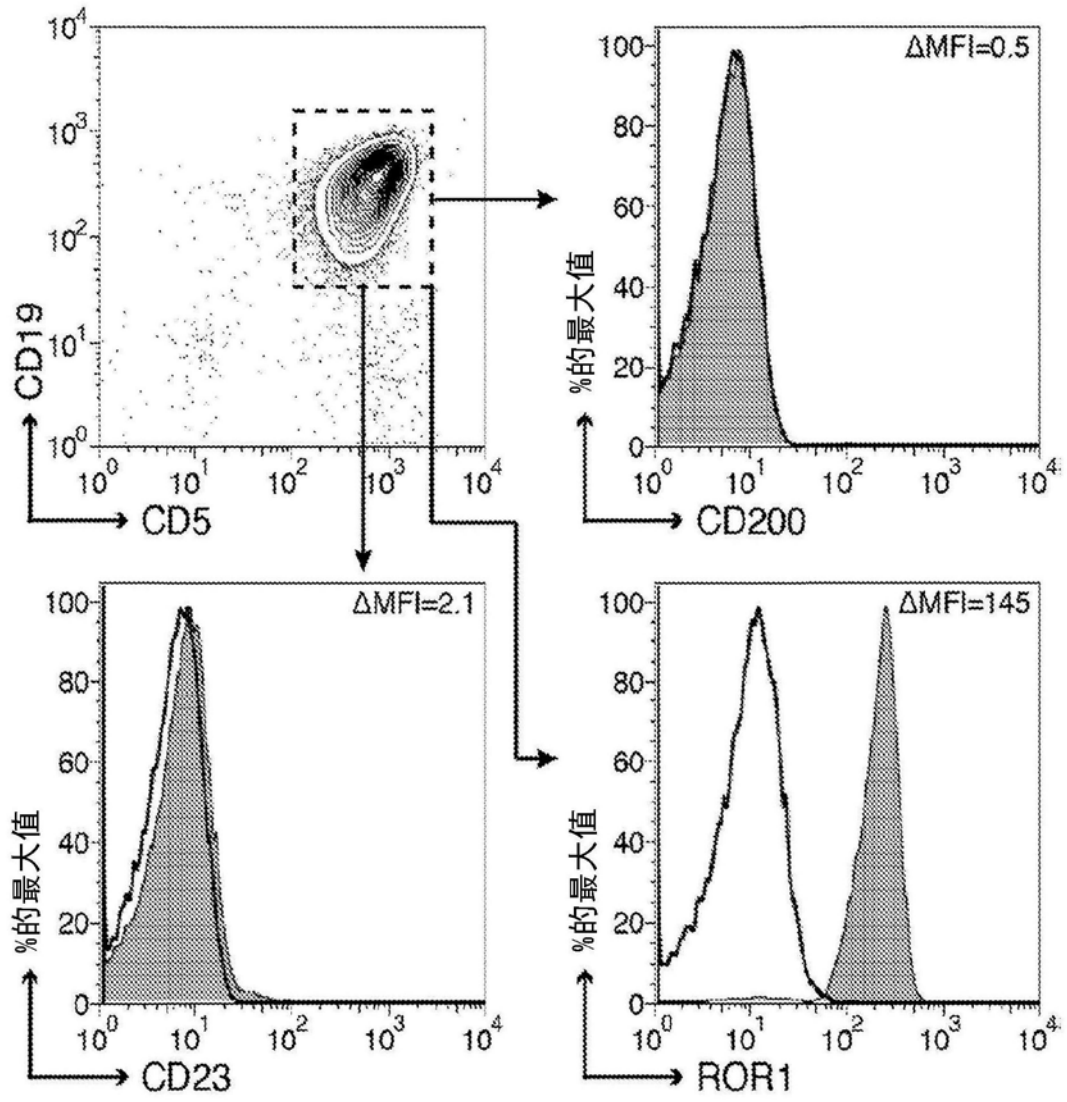


图22A

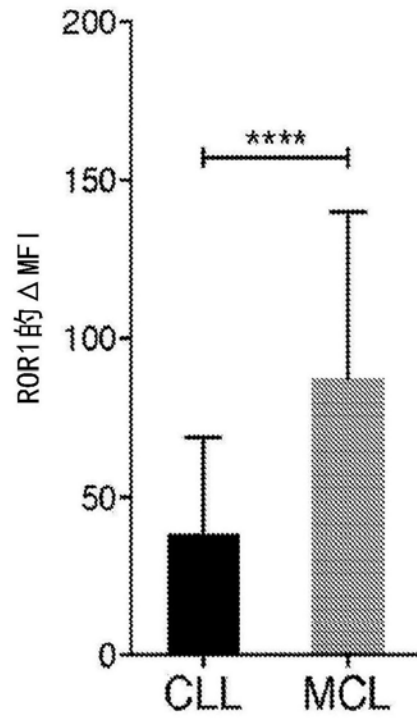


图22B

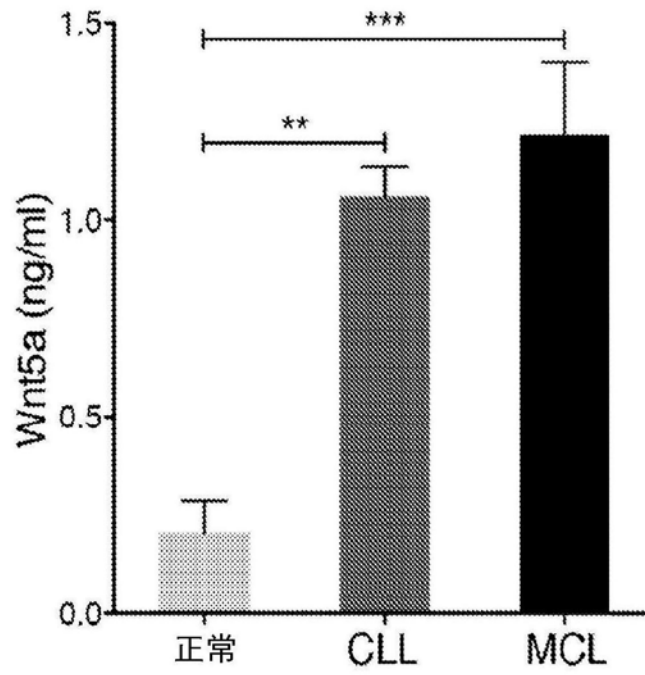


图22C

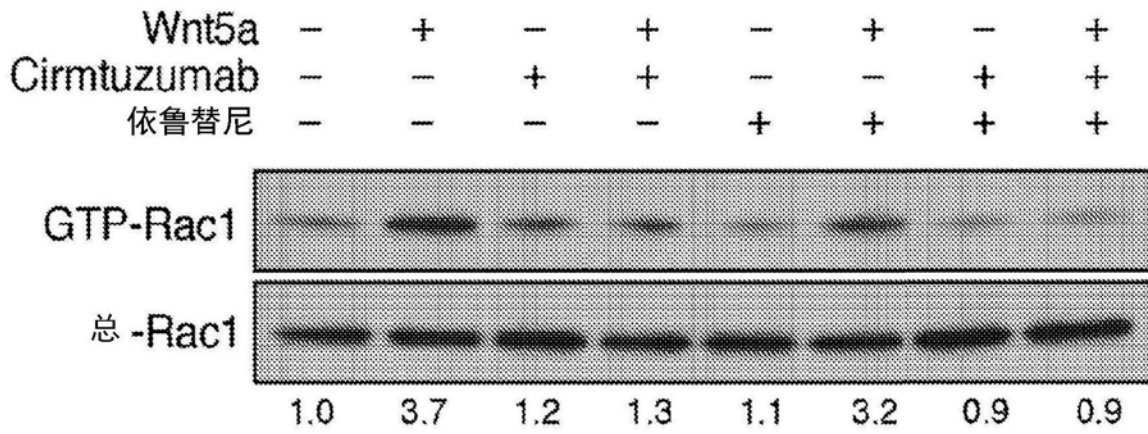


图23A

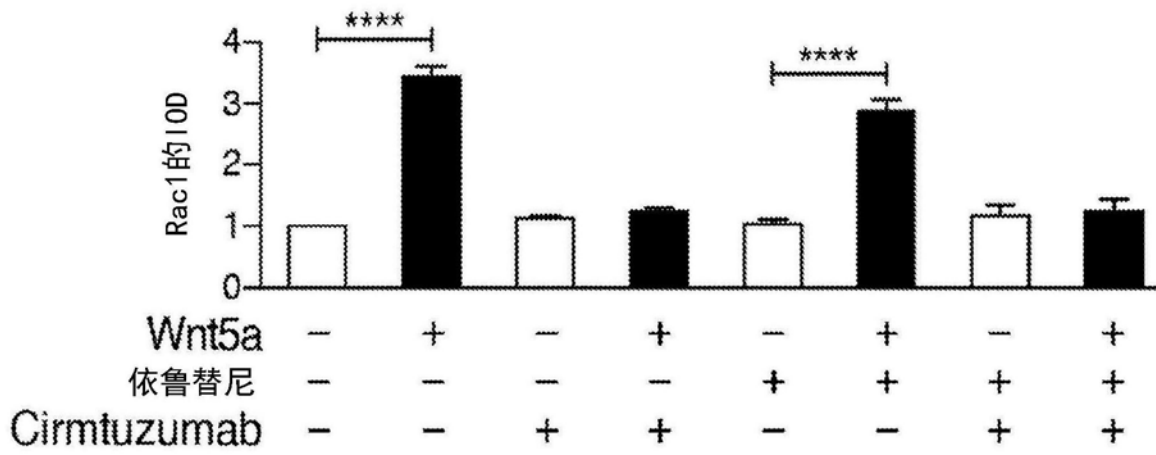


图23B

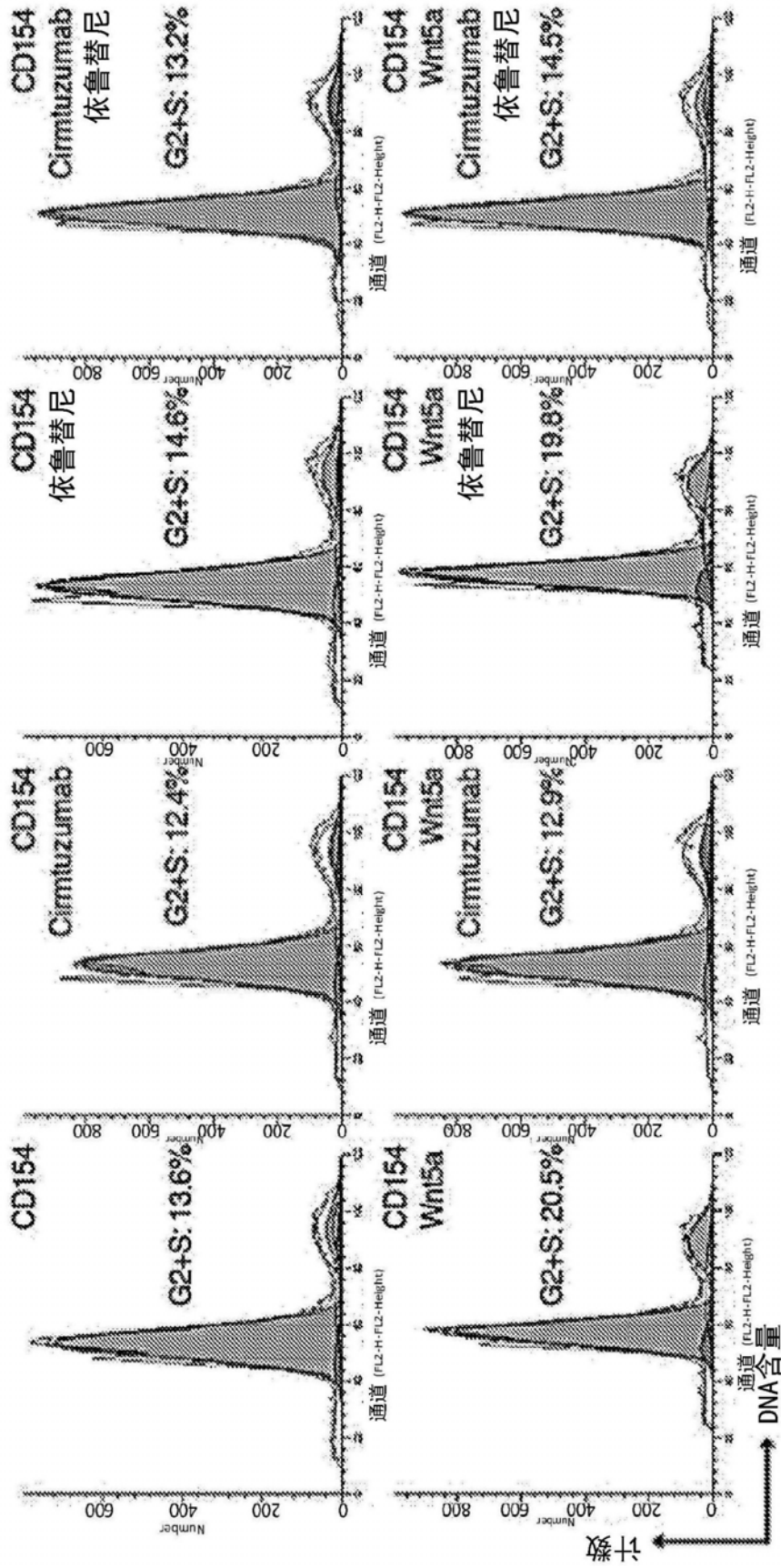


图23C

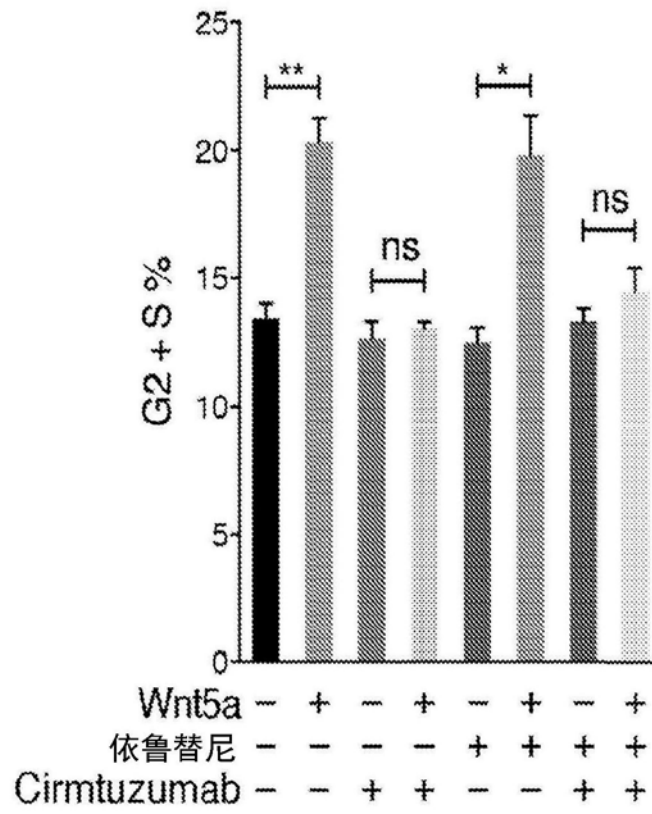


图23D