



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 119790069 A

(43) 申请公布日 2025. 04. 08

(21) 申请号 202380041917.3

(22) 申请日 2023.04.06

(30) 优先权数据

2205203.9 2022.04.08 GB

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.11.21

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2023/059270 2023.04.06

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/194583 EN 2023.10.12

(71) 申请人 UCB生物制药有限责任公司

地址 比利时

(72) 发明人 G·C·G·戴维斯 P·琼斯

B·J·樊德叁德 J·P·莫顿

(74) 专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所
有限公司 11038

专利代理师 王娜

(51) Int.Cl.

C07K 16/22 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61K 31/4184 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

权利要求书6页 说明书69页
序列表(电子公布) 附图15页

(54) 发明名称

Gremlin-1拮抗剂与Ras-Raf-MEK-ERK信号
传导抑制剂的组合

(57) 摘要

本发明涉及与Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑
制剂组合的用于用于治疗或预防癌症的方法中
的抗-GREM1拮抗剂。

1. 用于用在治疗或预防癌症的方法中的抗-GREM1拮抗剂,其中所述方法进一步包括施用Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂。

2. 根据权利要求1的用于所述用途的抗-GREM1拮抗剂,其中:

- (a) 所述癌症是实体癌症;
- (b) 所述癌症具有间质GREM1过表达;
- (c) 所述癌症是与Ras-Raf-MEK-ERK途径失调相关的癌症;
- (d) 所述癌症在暴露于抗-GREM1拮抗剂后显示出Ras-Raf-MEK-ERK途径失调;
- (e) 所述癌症含有在Ras基因,任选地KRAS、NRAS和/或HRAS中的突变;
- (f) 所述癌症含有在Raf基因,任选地ARAF、BRAF和/或CRAF中的突变;
- (g) 所述癌症是对使用Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂的治疗应答不佳、无应答或难治的癌症;和/或

(h) 所述癌症选自结肠直肠癌、多发性骨髓瘤、胰腺癌、膀胱癌、乳腺癌、肺癌、胃癌、十二指肠癌、食道癌、头颈癌、前列腺癌、神经胶质瘤、子宫内膜癌、肝癌、脾癌、骨驻留癌、黑素瘤和骨肉瘤。

3. 根据权利要求2(h)的用于所述用途的抗-GREM1拮抗剂,其中:

- (a) 所述癌症是胰腺癌;任选地其中:
 - (i) 所述胰腺癌是外分泌胰腺癌;和/或
 - (ii) 所述胰腺癌是胰腺导管腺癌(PDAC);
- (b) 所述癌症是多发性骨髓瘤或结肠直肠癌;任选地是KRAS/BRAF突变的结肠直肠癌;
- (c) 所述癌症是肺癌;任选地其中所述癌症是非小细胞肺癌(NSCLC);或
- (d) 所述癌症是黑素瘤;任选地是BRAF-突变的黑素瘤。

4. 根据前述权利要求中任一项的用于所述用途的抗-GREM1拮抗剂,其中:

- (a) 所述癌症具有上皮GREM1过表达;任选地其中所述癌症是GREM1引发的癌症;
- (b) 所述癌症是弥散性癌症;和/或
- (c) 所述癌症是确定的癌症。

5. 根据前述权利要求中任一项的用于所述用途的抗-GREM1拮抗剂,其中所述拮抗剂是肽、蛋白、抗体、多核苷酸、寡核苷酸、反义RNA、小干扰RNA(siRNA)、小分子抑制剂或小发夹RNA(shRNA)。

6. 根据权利要求5的用于所述用途的抗-GREM1拮抗剂,其中:

(a) 所述拮抗剂是与Gremlin-1上的表位结合的抗体,所述表位包含至少一个选自Ile131、Lys147、Lys148、Phe149、Thr150、Thr151、Arg169、Lys174和Gln175的残基,其中所述残基编号是根据SEQ ID NO:1;任选地其中:

(i) 所述抗体结合包含Ile131、Lys147、Lys148、Phe149、Thr150、Thr151、Arg169、Lys174和Gln175中的全部的表位;和/或

(ii) Lys147、Lys148、Phe149、Thr150、Thr151、Arg169、Lys174和Gln175位于相同的Gremlin-1单体上,并且Ile131位于第二个Gremlin-1单体上;

(b) 所述拮抗剂是抗-Gremlin-1抗体,该抗体包含在SEQ ID NO:10或12的重链可变区(HCVR)内所含的重链互补决定区(HCDR)序列和/或在SEQ ID NO:11或13的轻链可变区(LCVR)内所含的轻链互补决定区(LCDR)序列;或

(c) 所述拮抗剂是抗-Gremlin-1抗体,该抗体包含至少一个选自SEQ ID NO:3、4、5和6的HCDR序列和/或至少一个选自SEQ ID NO:7、8和9的LCDR序列;任选地其中:

(i) 所述抗-Gremlin-1抗体包含SEQ ID NO:6的HCDR3序列;

(ii) 所述抗-Gremlin-1抗体包含选自SEQ ID NO:4/5/6或选自SEQ ID NO:3/5/6的HCDR1/HCDR2/HCDR3序列组合和/或选自SEQ ID NO:7/8/9的LCDR1/LCDR2/LCDR3序列组合;

(iii) 所述抗-Gremlin-1抗体包含SEQ ID NO:4/5/6/7/8/9或SEQ ID NO:3/5/6/7/8/9的HCDR1/HCDR2/HCDR3/LCDR1/LCDR2/LCDR3序列组合;和/或

(iv) 所述抗-Gremlin-1抗体包含SEQ ID NO:10或12的重链可变区 (HCVR) 序列和/或SEQ ID NO:11或13的轻链可变区 (LCVR) 序列、或与其具有至少95%同一性的序列。

7. 根据权利要求6(c) (iv) 的用于所述用途的抗-GREM1拮抗剂,其中:

(a) 所述抗-Gremlin-1抗体包含SEQ ID NO:10/11或12/13的HCVR和LCVR序列对或与其具有至少95%同一性的序列;任选地其中所述抗-Gremlin-1抗体包含由SEQ ID NO:4/5/6/7/8/9或SEQ ID NO:3/5/6/7/8/9组成的HCDR1/HCDR2/HCDR3/LCDR1/LCDR2/LCDR3序列,并且HCVR和LCVR的剩余部分分别与SEQ ID NO:10、11、12和/或13具有至少95%同一性;和/或

(b) 所述抗-Gremlin-1抗体包含SEQ ID NO:14、16、18、22、28、30、32或34的重链和/或SEQ ID NO:15、17、19、23、29、31、33或35的轻链,或与其具有至少95%同一性的序列。

8. 根据权利要求7 (b) 的用于所述用途的抗-GREM1拮抗剂,其中所述抗-Gremlin-1抗体包含SEQ ID NO:14/15、16/17、18/19、22/23、28/29或30/31、32/33、34/35的重链和轻链对,或与其具有至少95%同一性的序列;任选地其中所述抗体的HCDR1/HCDR2/HCDR3/LCDR1/LCDR2/LCDR3序列由SEQ ID NO:4/5/6/7/8/9或SEQ ID NO:3/5/6/7/8/9组成,并且所述重链和轻链的剩余部分分别与SEQ ID NO:14、15、16和/或17具有至少95%同一性。

9. 根据权利要求5的用于所述用途的抗-GREM1拮抗剂,其中:

(a) 所述拮抗剂是与如在权利要求6 (a) (i) -7中的任一项中所定义的抗体竞争对Gremlin-1的结合的抗体;或

(b) 所述拮抗剂是与如在权利要求6 (a) (i) -7中的任一项中所定义的抗体结合在Gremlin-1上的相同表位的抗体。

10. 根据权利要求5-9中任一项的用于所述用途的抗-GREM1拮抗剂,其中:

(a) 所述拮抗剂抗体是嵌合抗体、人抗体或人源化抗体;和/或

(b) 所述拮抗剂抗体是Fab、修饰的Fab、Fab'、修饰的Fab'、F(ab')₂、Fv、单结构域抗体或scFv。

11. 根据权利要求5的用于所述用途的抗-GREM1拮抗剂,其中所述拮抗剂是编码如在权利要求6-10中的任一项中所定义的抗体的多核苷酸,或携带所述多核苷酸的表达载体。

12. 根据权利要求5-10中任一项的用于所述用途的抗-GREM1拮抗剂,其中所述拮抗剂抗体被包含在药物组合物中,所述药物组合物还包含药学上可接受的辅助剂和/或载体。

13. 根据前述权利要求中任一项的用于所述用途的抗-GREM1拮抗剂,其中:

(a) 所述Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂下调Mapk1、Nras、Kras和/或Myc信号传导;和/或

(b) 所述Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂是MEK抑制剂;任选地是变构MEK抑制剂。

14. 根据权利要求13 (b) 的用于所述用途的抗-GREM1拮抗剂,其中:

(a) 所述MEK抑制剂是MEK1和/或MEK2抑制剂;和/或

(b) 所述MEK抑制剂是司美替尼(AZD6244)、曲美替尼(GSK-1120212)、考比替尼(GDC-0973)、比美替尼(MEK162)、CI-1040(PD184352)、莫达美替尼(PD0325901)、TAK733、瑞法替尼(RDEA119/Bay 86-9766)、R0-5126766、R05068760、匹马塞替尼(AS703026)、AZD8330、GDC-0623、R0-4987655、WX-554(UCB-554)、HL-085、ARRY-300、ClnQ-03、G-573、PD184161、PD318088、PD98059、U0126或SL327;任选地其中:

(i) 所述MEK抑制剂是司美替尼(AZD6244);

(ii) 所述MEK抑制剂是曲美替尼(GSK-1120212);

(iii) 所述MEK抑制剂是WX-554(UCB-554);

(iv) 所述MEK抑制剂是司美替尼(AZD6244)并且所述癌症是胰腺癌;任选地是PDAC;或

(v) 所述MEK抑制剂是曲美替尼(GSK-1120212)并且所述癌症是胰腺癌;任选地是PDAC;

(vi) 所述MEK抑制剂是WX-554(UCB-554)并且所述癌症是胰腺癌;任选地是PDAC。

15. 根据权利要求13(b)的用于所述用途的抗-GREM1拮抗剂,其中所述MEK抑制剂选自:

(a) N-(2-氟-4-碘苯基)-3-(吗啉-4-基羰基)噻吩并[2,3-b]吡啶-2-胺;

(b) N-(2-氟-4-碘苯基)-3-[(4-甲基哌嗪-1-基)羰基]噻吩并[2,3-b]吡啶-2-胺;

(c) [2-[(2-氟-4-碘苯基)氨基]噻吩并[2,3-b]吡啶-3-基](吡咯烷-1-基)甲酮;

(d) (1-{2-[(2-氟-4-碘苯基)氨基]噻吩并[2,3-b]吡啶-3-羰基}哌啶-4-基)-氨基甲酸叔丁酯;

(e) 2-[(2-氟-4-碘苯基)氨基]噻吩并[2,3-b]吡啶-3-甲酸(4-氨基哌啶-1-基)酰胺二盐酸盐;

(f) (1-{2-[(2-氟-4-碘苯基)氨基]噻吩并[2,3-b]吡啶-3-羰基}氮杂环丁烷-3-基甲基)氨基甲酸叔丁酯;

(g) [3-((氨基甲基)氮杂环丁烷-1-基)-2-[(2-氟-4-碘苯基)氨基]噻吩并[2,3-b]吡啶-3-基]-甲酮;

(h) (1-{2-[(2-氟-4-碘苯基)氨基]噻吩并[2,3-b]吡啶-3-羰基}-(3R)-吡咯烷-3-基)氨基甲酸叔丁酯;

(i) (1-{2-[(2-氟-4-碘苯基)氨基]噻吩并[2,3-b]吡啶-3-羰基}-(3S)-吡咯烷-3-基)氨基甲酸叔丁酯;

(j) (1-{2-[(2-氟-4-碘苯基)氨基]噻吩并[2,3-b]吡啶-3-羰基}氮杂环丁烷-3-基)-氨基甲酸叔丁酯;

(k) [(3R)-3-氨基吡咯烷-1-基]-2-[(2-氟-4-碘苯基)氨基]噻吩并[2,3-b]吡啶-3-基]-甲酮;

(l) [(3S)-3-氨基吡咯烷-1-基]-2-[(2-氟-4-碘苯基)氨基]噻吩并[2,3-b]吡啶-3-基]-甲酮;

(m) (3-氨基氮杂环丁烷-1-基)-2-[(2-氟-4-碘苯基)氨基]噻吩并[2,3-b]吡啶-3-基]-甲酮;

(n) {2-[(2-氟-4-碘苯基)氨基]噻吩并[2,3-b]吡啶-3-基}-(3-羟基氮杂环丁烷-1-基)-甲酮;

(o) {2-[(2-氟-4-碘苯基)氨基]噻吩并[2,3-b]吡啶-3-基}-[(3R)-3-羟基吡咯烷-1-

基]-甲酮;

(p) {2-[(2-氟-4-碘苯基)氨基]噻吩并[2,3-b]吡啶-3-基}-[(3S)-3-羟基吡咯烷-1-基]-甲酮;

(q) {2-[(2-氟-4-碘苯基)氨基]噻吩并[2,3-b]吡啶-3-基}-[2-(羟甲基)-哌啶-1-基]-甲酮;

(r) {2-[(2-氟-4-碘苯基)氨基]噻吩并[2,3-b]吡啶-3-基}-[(3S)-3-(羟甲基)-吗啉-4-基]-甲酮;

(s) 4-{2-[(2-氟-4-碘苯基)氨基]噻吩并[2,3-b]吡啶-3-羰基}-(3R)-3-(羟甲基)哌嗪-1-甲酸叔丁酯;

(t) 2-[4-{2-[(2-氟-4-碘苯基)氨基]噻吩并[2,3-b]吡啶-3-基}羰基)哌嗪-1-基]乙醇;

(u) 3-[(1,4-二氮杂环庚烷-1-基羰基)-N-(2-氟-4-碘苯基)噻吩并[2,3-b]吡啶-2-胺];

(v) N-(2-氟-4-碘苯基)-3-(哌嗪-1-基羰基)噻吩并[2,3-b]吡啶-2-胺;

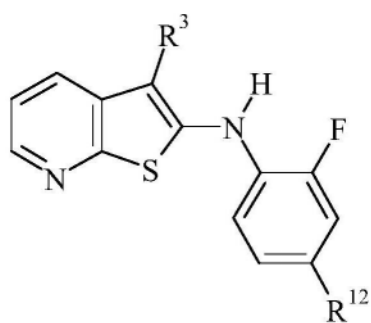
(w) [4-({2-[(2-氟-4-碘苯基)氨基]噻吩并[2,3-b]吡啶-3-基}羰基)-哌嗪-1-基]乙酸乙酯;

(x) [4-({2-[(2-氟-4-碘苯基)氨基]噻吩并[2,3-b]吡啶-3-基}羰基)哌嗪-1-基]乙酸;

(y) {2-[(2-氟-4-碘苯基)氨基]噻吩并[2,3-b]吡啶-3-基}-[(2R)-2-(甲氧基甲基)-吡咯烷-1-基]-甲酮(methone);和

(z) {2-[(2-氟-4-碘苯基)氨基]噻吩并[2,3-b]吡啶-3-基}-[(2R)-2-(羟甲基)-哌嗪-1-基]-甲酮。

16. 根据权利要求13(b)的用于所述用途的抗-GREM1拮抗剂,其中所述MEK抑制剂由式(II)、及其药学上可接受的盐、溶剂化物和N-氧化物表示:



(II)

其中

R¹²表示卤素;

R³表示CONR^bR^c;且

R^b和R^c与它们二者所连接的氮原子一起表示氮杂环丁烷-1-基、吡咯烷-1-基、哌啶-1-基、吗啉-4-基、硫代吗啉-4-基、哌嗪-1-基、高哌啶-1-基、高吗啉-4-基或高哌嗪-1-基,所述基团中的任一个可以任选地被一个或多个取代基取代,所述取代基选自C₁₋₆烷基、C₁₋₆烷

氧基、羟基、羧基(C₁₋₆)烷基(alkyl)、氨基-(C₁₋₆)烷基、(氨基)(羟基)(C₁₋₆)烷基、卤素、氧代、C₂₋₆烷基(alkyl)羰基、羧基、C₂₋₆烷氧基羰基、二(C₁₋₆)烷基(alhyl)胍基羰基、氨基、C₁₋₆烷基氨基、二(C₁₋₆)烷基-氨基、C₂₋₆烷基羰基氨基、氨基羰基氨基、氨基羰基、C₁₋₆烷基氨基羰基、二(C₁₋₆)烷基氨基羰基、氨基磺酰基、C₁₋₆烷基磺酰基、C₁₋₆烷基氨基羰基(C₁₋₆)烷基、C₁₋₆烷氧基(C₁₋₆)烷基、羧基(C₁₋₆)烷基、C₂₋₆烷氧基羰基(C₁₋₆)烷基、C₂₋₆烷氧基羰基氨基和C₂₋₆烷氧基羰基氨基-(C₁₋₆)烷基；

任选地其中R¹²表示溴或碘。

17. 根据权利要求1-13(a)中任一项的用于所述用途的抗-GREM1拮抗剂,其中所述Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂是ERK抑制剂;任选地其中:

(a) 所述ERK抑制剂是优立替尼、temuterkib、JSI-1187、ravoxertinib ASN007或MK-8353;和/或

(b) 所述ERK抑制剂是优立替尼;进一步任选地其中所述ERK抑制剂是优立替尼并且所述癌症是胰腺癌;任选地是PDAC。

18. 根据前述权利要求中任一项的用于所述用途的抗-GREM1拮抗剂,其中所述方法进一步包括施用另外的抗癌剂。

19. 用于用在治疗或预防癌症的方法中的Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂,其中所述方法包括进一步施用抗-GREM1拮抗剂。

20. 根据权利要求19的用于所述用途的Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂,其中所述癌症、所述拮抗剂和/或所述方法如在权利要求1-18中的任一项中所定义。

21. 根据权利要求19或权利要求20的用于所述用途的Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂,其中:

(a) 所述Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂是MEK抑制剂;任选地其中:

(i) 所述抑制剂是司美替尼(AZD6244);

(ii) 所述抑制剂是曲美替尼(GSK-1120212);或

(iii) 所述抑制剂是WX-554(UCB-554);或

(b) 所述Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂是ERK抑制剂;任选地其中所述ERK抑制剂是优立替尼。

22. 治疗癌症的方法,所述方法包括向有此需要的受试者施用与治疗有效量的Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂组合的治疗有效量的抗-GREM1拮抗剂。

23. 根据权利要求22所述的方法,其中所述癌症、所述拮抗剂和/或所述方法如在权利要求1-21中的任一项中所定义。

24. 包含抗-GREM1拮抗剂和Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂的组合物或试剂盒。

25. 根据权利要求24所述的组合物或试剂盒,其中:

(a) 所述抗-GREM1拮抗剂如在权利要求5至11中的任一项中所定义;和/或

(b) 所述Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂如在权利要求13(a)至17中的任一项中所定义。

26. 用于确定:

(a) 患有或疑似患有癌症或处于患上癌症的风险中的患者是否可能对使用GREM1拮抗剂和Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂的组合治疗做出应答的方法,所述方法包括测量所

述患者中的GREM1的间质表达、GREM1的上皮表达和/或Ras-Raf-MEK-ERK途径信号传导,并从而预测所述患者是否可能对使用所述组合的治疗做出应答;或

(b) 患有或疑似患有癌症或处于患上癌症的风险中的患者是否可能对使用GREM1拮抗剂和Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂的组合治疗做出应答的方法,所述方法包括测量所述患者中的GREM1的间质表达和/或GREM1的上皮表达,并确定所述患者是否具有RAS基因或RAF基因突变,并从而预测所述患者是否可能对使用所述组合的治疗做出应答;或

(c) 患有或疑似患有癌症或处于患上癌症的风险中的患者是否可能对使用GREM1拮抗剂和Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂的组合治疗做出应答的方法,所述方法包括测量所述患者中响应于抗-GREM1拮抗剂治疗的Ras-Raf-MEK-ERK信号传导途径信号传导,并从而预测所述患者是否可能对使用所述组合的治疗做出应答。

Gremlin-1拮抗剂与Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂的组合

发明领域

[0001] 本发明涉及用于治疗或预防癌症的组合疗法。具体而言,本发明涉及与Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂组合用在治疗或预防癌症的方法中的抗-GREM1拮抗剂,以及有关的组合物和试剂盒。本发明还涉及基于间质GREM1过表达和Ras-Raf-MEK-ERK信号传导途径信号传导或RAS基因或RAF基因中的突变来预测患者是否可能对组合疗法作出应答的方法。

[0002] 发明背景

[0003] 促分裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号转导途径(诸如Ras-Raf-MEK-ERK信号转导途径)在细胞存活、增殖和分化中起关键作用。由于失控的细胞增殖,这些途径中失调的信号传导与包括癌症在内的各种疾病有关。此外,已经报道,MAPK途径中上调的信号传导是响应于多种抗癌疗法(包括细胞毒性剂、免疫调节剂和EGFR抑制剂)的抗性机制(Martinelli, E. 等人, 2017; Kozar, I. 等人, 2019; Kobayashi, Y. 等人, 2020)。MAPK信号转导途径、特别是Ras-Raf-MEK-ERK信号转导途径的抑制剂,诸如MEK和ERK抑制剂,已经被描述用于治疗癌症。例如,MEK抑制剂已经被批准用于治疗BRAF突变的黑素瘤和KRAS/BRAF突变的结肠直肠癌。然而,在接受MAPK信号转导途径(诸如Ras-Raf-MEK-ERK信号转导途径)的抑制剂治疗的患者中,获得性抗性是常见的。因此,需要开发新疗法用于治疗 and 预防癌症。还需要能够提高现有MAPK途径抑制剂的效力的组合疗法。

[0004] 一种带来巨大挑战的癌症是胰腺癌。胰腺癌是一种近年来发病率增加的致死疾病。与胰腺癌相关的环境风险因素包括吸烟、胰腺炎、饮酒、肥胖、感染和饮食,这意味着胰腺癌在发达国家中越来越常见。与化学疗法组合的外科手术切除术(胰十二指肠切除术)是治疗胰腺癌的唯一长期潜在疗法。但是,有限的筛查加上症状的缺乏意味着患者通常被诊断为较晚阶段晚期疾病,从而限制了外科手术切除的机会。因此,胰腺癌是所有常见癌症中存活率最低的癌症之一,5年存活率不足7%,且10年或以上存活率仅为5%。在过去的40年里,存活率的提高有限,这更加凸显了对胰腺癌的新治疗性治疗的迫切需求。在不可切除的肿瘤中,胰腺癌的护理标准是化疗方案。但是,化学疗法与副作用相关,并且癌症复发是常见的。由于胰腺癌的较晚诊断、不良预后以及有限的治疗策略,因此需要改进的疗法。

[0005] 发明概述

[0006] 发明人已经证实,在暴露于抗-GREM1拮抗剂(诸如Ab7326)后,参与Ras-Raf-MEK-ERK信号传导的基因(诸如NRas、Myc和Mapk1)在LSL-Kras^{G12D/+}、LSL-Trp53^{R172H/+}、Pdx1-Cre(KPC)小鼠模型中上调。此外,发明人已经意外地表明,GREM1拮抗剂可以有利地与Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂(诸如MEK抑制剂)组合施用用于治疗或预防胰腺癌。基于这些结果,发明人设想,包含GREM1拮抗剂和Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂(诸如MEK抑制剂和ERK抑制剂)的组合疗法将在治疗和预防在用抗-GREM1拮抗剂治疗后Ras-Raf-MEK-ERK信号传导被诱导/上调的癌症方面具有普遍效用。此外,基于这些结果,发明人设想,包含GREM1拮抗剂和Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂(诸如MEK和ERK抑制剂)的组合疗法将在治疗和预防与Ras-Raf-MEK-ERK途径失调相关的癌症或含有Ras或Raf基因突变的癌症方面具有普遍效用。本文提供的体内结果表明,通过与MEK抑制剂组合施用GREM1拮抗剂,在LSL-

Kras^{G12D/+}、LSL-Trp53^{R172H/+}、Pdx1-Cre (KPC) 小鼠模型中的存活率显著提高,并且肿瘤生长减缓且肿瘤缩小。发明人的发现为预防和治疗癌症、特别是胰腺癌提供了改进的方案。

[0007] 因此,在本发明的第一个方面,提供了用于用在治疗或预防癌症的方法中的抗-GREM1拮抗剂,其中所述方法进一步包括施用Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂。

[0008] 在本发明的另一个方面,提供了用于用在治疗或预防癌症的方法中的Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂,其中所述方法进一步包括施用抗-GREM1拮抗剂。

[0009] 在本发明的另一个方面,提供了治疗癌症的方法,所述方法包括向有此需要的受试者施用与治疗有效量的Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂组合的治疗有效量的抗-GREM1拮抗剂。

[0010] 在本发明的又另一个方面,提供了包含抗-GREM1拮抗剂和Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂的组合物或试剂盒。

[0011] 在本发明的另一个方面,提供了用于确定患有或疑似患有癌症或处于患上癌症的风险中的患者是否可能对使用GREM1拮抗剂和Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂的组合治疗做出应答的方法,所述方法包括测量所述患者中响应于抗-GREM1拮抗剂治疗的Ras-Raf-MEK-ERK信号传导,并从而预测所述患者是否可能对使用所述组合的治疗做出应答。

[0012] 在本发明的另一个方面,提供了用于确定患有或疑似患有癌症或处于患上癌症的风险中的患者是否可能对使用GREM1拮抗剂和Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂的组合治疗做出应答的方法,所述方法包括测量所述患者中的GREM1的间质表达、GREM1的上皮表达和/或Ras-Raf-MEK-ERK信号传导,并从而预测所述患者是否可能对使用所述组合的治疗做出应答。

[0013] 在本发明的又另一个方面,提供了用于确定患有或疑似患有癌症或处于患上癌症的风险中的患者是否可能对使用GREM1拮抗剂和Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂的组合治疗做出应答的方法,所述方法包括测量所述患者中的GREM1的间质表达和/或GREM1的上皮表达,并确定所述患者是否具有RAS基因或RAF基因突变,并从而预测所述患者是否可能对使用所述组合的治疗做出应答。

[0014] 附图的简要描述

[0015] 图1-Kaplan-Meier分析,其显示了具有高于或低于所示中位数的gremlin-1表达的PDAC患者的存活率。与具有低表达的患者相比,具有表达高水平的gremlin-1的肿瘤的患者具有明显更差的预后。从KMplotter生成。

[0016] 图2-显示(a)繁殖策略和(b)实验设计的示意图。

[0017] 图3-通过NanoString技术分析的KPC小鼠模型中的46个基因的基因表达。A.在火山图中描绘的未调整的p-值。B.Nras表达的线性模型。C.Myc表达的线性模型。D.Mapk1表达的线性模型。

[0018] 图4-展示Ab7326 mIgG1暴露对KRAS途径的影响的途径富集。

[0019] 图5-该图显示了通过高分辨率超声测量的在药效动力学研究中接受治疗(如指示的)的个体小鼠中的肿瘤负荷。

[0020] 图6-该图显示了通过高分辨率超声测量的在存活研究队列中接受治疗(如指示的)的个体小鼠中的肿瘤负荷。

[0021] 图7-Kaplan-Meier分析,其显示从如指示的用Ab7326 mIgG1 (n=9)、司美替尼(n

=8) 或与司美替尼组合的Ab7326 mIgG1 (n=9) 治疗开始Pdx1-Cre、LSL-Kras^{G12D/+}、LSL-Trp53^{R172H/+} (KPC) 小鼠的存活率。

[0022] 图8-在如指示的治疗的小鼠中,使用针对癌症相关成纤维细胞的标志物(aSMA和Podoplanin)的抗体进行的IHC评分(通过HALO软件分析)的图,以及对胶原蛋白I和III的天狼猩红染色的图。

[0023] 图9a-Kaplan-Meier分析,其显示了从如指示的用媒介物对照(n=10)、Ab7326 mIgG1 (n=10)、UCB-554 (n=10) 或与UCB-554组合的Ab7326 mIgG1 (n=11) 治疗开始Pdx1-Cre、LSL-Kras^{G12D/+}、LSL-Trp53^{R172H/+} (KPC) 小鼠的存活率。

[0024] 图9b-箱线图,其显示了在用媒介物对照(n=10)、Ab7326 mIgG1 (n=8)、UCB-554 (n=10) 或与UCB-554组合的Ab7326 mIgG1 (n=11) 治疗的个体KPC小鼠中通过高分辨率超声测量的在治疗开始后第7天的肿瘤体积。每个箱描绘了四分位距,且线描绘了最小和最大观测值。实线水平条代表中位数,且虚线水平线代表平均体积。

[0025] 图9c-该图显示了在用媒介物对照(n=10) 或与UCB-554组合的Ab7326 mIgG1 (n=11) 治疗的个体KPC小鼠中通过高分辨率超声测量的随时间变化的肿瘤负荷。

[0026] 图10a-Kaplan-Meier分析,其显示了从如指示的用媒介物对照(n=10)、Ab7326 mIgG1 (n=19)、司美替尼(n=17) 或与司美替尼组合的Ab7326 mIgG1 (n=19) 治疗开始Pdx1-Cre、LSL-Kras^{G12D/+}、LSL-Trp53^{R172H/+} (KPC) 小鼠的存活率。数据是包括图7所示数据的组合数据集。

[0027] 图10b-箱线图,其显示了在用媒介物对照(n=10)、Ab7326 mIgG1 (n=8)、司美替尼(n=9) 或与司美替尼组合的Ab7326 mIgG1 (n=10) 治疗的个体KPC小鼠中通过高分辨率超声测量的在治疗开始后第7天的肿瘤体积。每个箱描绘了四分位距,且线描绘了最小和最大观测值。实线水平条代表中位数,且虚线水平线代表平均体积。

[0028] 图10c-该图显示了在用媒介物对照(n=10) 或与司美替尼组合的Ab7326 mIgG1 (n=10) 治疗的个体KPC小鼠中通过高分辨率超声测量的随时间变化的肿瘤负荷。

[0029] 表的简要描述

[0030] 表1-该表显示了与Kras^{G12D+} 小鼠胰腺导管细胞相比,在KPC肿瘤中和在合并的所有胰腺小鼠模型中上调的greml。

[0031] 表2-该表显示了给定治疗的剂量和计划、每次治疗的小鼠的数目以及每个治疗队列中的中位生存期。

[0032] 表3-该表显示了给定治疗的剂量和计划、每组小鼠的数目以及采样的时间点。

[0033] 表4-该表显示了给定治疗的剂量和计划、每次治疗的小鼠的数目、以及每个治疗队列中的中位生存期。*表示使用的历史数据。

[0034] 表5-该表对比了治疗队列之间的存活统计数据(对数秩分析)。与单独的司美替尼相比,使用Ab7326 mIgG1和司美替尼的组合治疗的小鼠表现出存活率的显著提高。

[0035] 表6-该表显示了接受治疗的个体小鼠的存活数据和审查。

[0036] 表7-该表显示了分析的个体小鼠样品。

[0037] 表8-该表显示了给定治疗的剂量和计划、每次治疗的小鼠的数目、以及每个治疗队列中的中位生存期。

[0038] 表9-用Ab7326和UCB-554组合治疗的KPC小鼠的存活统计数据的总结。

[0039] 表10-用Ab7326和司美替尼组合治疗的KPC小鼠的存活统计数据的总结。

[0040] 发明详述

[0041] 应当理解,所公开的产品和方法的不同应用可以根据本领域的特定需要进行定制。还应当理解,本文中使用的术语仅用于描述本发明的特定实施方案的目的,并不旨在限制。

[0042] 此外,如在本说明书和所附权利要求书中所用,单数形式“一个”、“一种”和“所述”包括复数指示物,除非上下文另外清楚地指示。因此,例如,对“一种抑制剂”的提及包括两种或更多种这样的抑制剂,或对“一种寡核苷酸”的提及包括两种或更多种这样的寡核苷酸等。

[0043] 在上文或下文中引用的所有出版物、专利和专利申请特此通过引用整体并入。

[0044] 使用抗-GREM1拮抗剂和Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂的组合疗法

[0045] 本发明提供了与Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂(诸如MEK或ERK抑制剂)组合的用于用在治疗或预防癌症的方法中的抗-GREM1拮抗剂。所述癌症通常是具有GREM1过表达的癌症和/或与Ras-Raf-MEK-ERK信号转导途径失调相关的癌症。另外地或供选择地,所述癌症可以是在暴露于抗-GREM1拮抗剂/用抗-GREM1拮抗剂治疗后表现出Ras-Raf-MEK-ERK途径失调的癌症。具体而言,所述癌症可以是在用本文描述的抗-GREM1拮抗剂治疗后Ras-Raf-MEK-ERK途径信号传导被诱导/上调的癌症。在没有抗-GREM1拮抗剂治疗存在下,这样的癌症可能不会显示Ras-Raf-MEK-ERK途径失调。换言之,在用本文描述的抗-GREM1拮抗剂治疗之前,所述癌症可能表现出相对于参考样品或参考值而言正常的Ras-Raf-MEK-ERK途径信号传导。另外地或供选择地,所述癌症可以被表征为包含RAS或RAF基因中的突变。

[0046] 本发明进一步提供了用于用在治疗或预防癌症的方法中的Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂,其中所述方法包括单独、依次或同时施用抗-GREM1拮抗剂。

[0047] Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂

[0048] Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂可以是任何靶向Ras-Raf-MEK-ERK促分裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号转导级联(其在本文也可以被称作经典的MAPK途径、Raf/MEK/ERK、Raf-MEK-ERK、Ras调节的Raf-MEK-ERK途径、MAPK/ERK(MEK)、Ras/Raf/MAPK(MEK)/ERK)、Ras-Raf-MAPK或Raf-MEK-ERK途径)的抑制剂,其参与细胞存活、增殖和分化。MAPK级联由多个细胞内信号传导途径组成。通常,生长因子与在细胞表面处的其同源受体(诸如EGF/EGFR)的结合会导致小GTP酶Ras的募集,这会活化丝氨酸苏氨酸激酶RAF,从而导致促分裂原活化蛋白激酶激酶(MEK)酶MEK1和MEK2的磷酸化和活化。MEK1和MEK2(也分别称为Map2k1和Map2k2)是双特异性激酶,其磷酸化Erk1和Erk2(MAPK),从而造成它们易位至细胞核并活化多种转录因子。因此,MEK抑制剂通常阻断MEK1/MEK2对Erk1/Erk2的磷酸化以及下游信号传导途径。ERK抑制剂还可以阻止Erk1/Erk2的磷酸化和/或抑制Erk1/Erk2的催化活性。

[0049] 本发明的发明人已经确定出,在暴露于抗-GREM1拮抗剂后,KPC小鼠模型中的KRAS信号传导被上调(图4)。此外,在KPC小鼠模型中,在暴露于抗-GREM1抗体Ab7326后,参与Ras-Raf-MEK-ERK途径的基因(诸如Mapk1、Nras和Myc)被上调(图3)。本发明的发明人已经进一步证实,抗-GREM1抗体和MEK抑制剂的组合在该模型中具有显著的抗肿瘤活性。因此,包含与Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂组合的抗-GREM1拮抗剂的组合疗法可以用于治疗

与GREM1过表达、Ras-Raf-MEK-ERK途径失调和/或Ras和Raf基因突变相关的癌症。

[0050] 此外,包含本文定义的抗-GREM1拮抗剂和Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂(诸如MEK抑制剂或ERK抑制剂)的组合疗法可以用于治疗或预防在早期暴露于抗-GREM1拮抗剂/用抗-GREM1拮抗剂治疗后Ras-Raf-MEK-ERK途径失调的癌症。具体而言,所述癌症可以是在用本文描述的抗-GREM1拮抗剂治疗后Ras-Raf-MEK-ERK途径信号传导被诱导/上调的癌症。在没有抗-GREM1拮抗剂治疗存在下,这样的癌症可能不会显示Ras-Raf-MEK-ERK途径失调。换言之,在用本文描述的抗-GREM1拮抗剂治疗之前,所述癌症可能表现出相对于参考样品或参考值而言正常的Ras-Raf-MEK-ERK途径信号传导。

[0051] 失调是指,与参考样品或参考水平相比,Ras-Raf-MEK-ERK途径被上调或下调。Ras-Raf-MEK-ERK途径可以在mRNA或蛋白水平上被上调或下调。例如,所述癌症可以是在暴露于本发明的抗-GREM1拮抗剂后,Ras-Raf-MEK-ERK途径中的基因/蛋白显示被上调的癌症。供选择地或额外地,所述癌症可以是响应于本发明的抗-GREM1拮抗剂治疗而显示出Map2k1、Map2k2、Erk1和/或Erk2磷酸化增加的癌症。所述癌症可以是先前描述用GREM1拮抗剂治疗的癌症或肿瘤。这样的癌症包括但不限于胰腺癌、多发性骨髓瘤、结肠直肠癌、乳腺癌和前列腺癌。在一个优选的实施方案中,所述癌症是胰腺癌。

[0052] 本文中使用的Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂包括其药学上可接受的盐和溶剂化物。

[0053] 在本发明中使用的抑制剂可以靶向Ras-Raf-MEK-ERK途径(经典的MAPK级联)内的任何蛋白。因此,所述抑制剂靶向Ras-Raf-MEK-ERK途径的至少一个组成部分来抑制Ras-Raf-MEK-ERK信号传导。Ras-Raf-MEK-ERK信号传导的抑制通常涉及该途径的至少一个组成部分的活性的降低。因此,所述抑制剂可以是Ras-Raf-MEK-ERK途径(经典的MAPK级联)中的任何节点(通常是任何蛋白)的直接或间接抑制剂。例如,Ras-Raf-MEK-ERK途径的抑制剂可以是直接或间接RAS抑制剂,诸如KRAS的抑制剂(例如ARS-1620或MRTX849)。供选择地,Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂可以是RAF抑制剂,诸如索拉非尼、威罗菲尼、达拉菲尼或康奈非尼。在另一个方面,Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂可以是MEK抑制剂。在下面详述了示例性的MEK抑制剂。在再另一个方面,Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂可以是ERK抑制剂,诸如优立替尼(4-[5-氯-2-[(1-甲基乙基)氨基]-4-吡啶基]-N-[(1S)-1-(3-氯苯基)-2-羟基乙基]-1H-吡咯-2-甲酰胺,单盐酸盐;(S)-4-(5-氯-2-(异丙基氨基)吡啶-4-基)-N-(1-(3-氯苯基)-2-羟基乙基)-1H-吡咯-2-甲酰胺;BVD-523;VRT-752271),temuterkib(LY3214996;4H-噻吩并[2,3-c]吡咯-4-酮,5,6-二氢-6,6-二甲基-2-[2-[(1-甲基-1H吡唑-5-基)氨基]-4-嘧啶基]-5-[2-(4-吗啉基)乙基];6,6-二甲基-2-[2-[(2-甲基吡唑-3-基)氨基]嘧啶-4-基]-5-(2-吗啉-4-基乙基)噻吩并[2,3-c]吡咯-4-酮),JSI-1187,ravoxertinib(1-[(1S)-1-(4-氯-3-氟苯基)-2-羟基乙基]-4-[2-[(2-甲基吡唑-3-基)氨基]嘧啶-4-基]吡啶-2-酮;(S)-1-(1-(4-氯-3-氟苯基)-2-羟基乙基)-4-(2-((1-甲基-1H-吡唑-5-基)氨基)嘧啶-4-基)吡啶-2(1H)-酮);MK-8353((3S)-3-甲基硫烷基-1-[2-[4-[4-(1-甲基-1,2,4-三唑-3-基)苯基]-3,6-二氢-2H-吡啶-1-基]-2-氧代乙基]-N-[3-(6-丙烷-2-基氧基吡啶-3-基)-1H-吡唑-5-基]吡咯烷-3-甲酰胺;(S)-N-(3-(6-异丙氧基吡啶-3-基)-1H-吡唑-5-基)-1-(2-(4-(4-(1-甲基-1H-1,2,4-三唑-3-基)苯基)-3,6-二氢吡啶-1(2H)-基)-2-氧代乙基)-3-(甲硫基)吡咯烷-3-甲酰胺),或ASN007((S)-N-(2-氨基-1-(3-

氯-5-氟苯基)乙基)-1-(5-甲基-2-((四氢-2H-吡喃-4-基)氨基)嘧啶-4-基)-1H-咪唑-4-甲酰胺)。在一个优选的实施方案中,所述ERK抑制剂是优立替尼。在本发明的一个特别优选的实施方案中,所述ERK抑制剂是优立替尼且要治疗的癌症是胰腺癌,优选胰腺导管腺癌(PDAC)。Ras-Raf-MEK-ERK信号传导途径的其它抑制剂是本领域众所周知的。

[0054] 在本发明的一个优选方面,Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂是MEK抑制剂。用于与抗-GREM1拮抗剂组合使用的MEK抑制剂可以是变构MEK抑制剂和/或MEK1和/或MEK2抑制剂。术语“变构MEK抑制剂”表示与MEK的ATP结合口袋之外的变构位点结合的抑制剂。变构MEK抑制剂(另外被称作III型MEK抑制剂)表现出高选择性,并且通常通过减少MEK1/2的激活环中的运动来发挥作用。其它MEK抑制剂包括I型和II型MEK抑制剂,它们竞争ATP结合并占据MEK的催化位点(I型)或与ATP结合口袋内的相邻位点结合(II型)。所有三种类型的MEK抑制剂都被考虑用在本发明的方法中。也就是说,I型、II型或III型MEK抑制剂可以用在本发明的方法中。

[0055] 示例性的变构MEK抑制剂包括司美替尼(AZD6244;ARRY-142886;6-(4-溴-2-氯苯胺基)-7-氟-N-(2-羟基乙氧基)-3-甲基苯并咪唑-5-甲酰胺)或曲美替尼(GSK-1120212;N-(3-{3-环丙基-5-[(2-氟-4-碘苯基)氨基]-6,8-二甲基-2,4,7-三氧代-3,4,6,7-四氢吡啶并[4,3-d]嘧啶-1(2H)-基}苯基)乙酰胺。用于用在本发明中的其它示例性的MEK抑制剂包括司美替尼(AZD6244)、曲美替尼(GSK-1120212)、考比替尼(GDC-0973;(S)-[3,4-二氟-2-(2-氟-4-碘苯基氨基)苯基][3-羟基-3-(哌啶-2-基)氮杂环丁烷-1-基]甲酮)、比美替尼(MEK162;5-((4-溴-2-氟苯基)氨基)-4-氟-N-(2-羟基乙氧基)-1-甲基-1H-苯并[d]咪唑-6-甲酰胺)、CI-1040(PD184352)、莫达美替尼(PD0325901;N-[(2R)-2,3-二羟基丙氧基]-3,4-二氟-2-[(2-氟-4-碘苯基)氨基]苯甲酰胺)、TAK733((R)-3-(2,3-二羟基丙基)-6-氟-5-(2-氟-4-碘苯基氨基)-8-甲基吡啶并[2,3-d]嘧啶-4,7(3H,8H)-二酮;3-[(2R)-2,3-二羟基丙基]-6-氟-5-(2-氟-4-碘苯胺基)-8-甲基吡啶并[2,3-d]嘧啶-4,7-二酮)、瑞法替尼(RDEA119/Bay86-9766;N-[3,4-二氟-2-(2-氟-4-碘苯胺基)-6-甲氧基苯基]-1-[(2S)-2,3-二羟基丙基]环丙烷-1-磺酰胺)、R0-5126766(3-[[2-[(甲基氨基磺酰基)氨基]-3-氟吡啶-4-基]甲基]-4-甲基-7-[(嘧啶-2-基)氧基]-2H-1-苯并吡喃-2-酮);N-[3-氟-4-[[4-甲基-2-氧代-7-(2-嘧啶基氧基)-2H-1-苯并吡喃-3-基]甲基]-2-吡啶基]-N'-甲基-磺酰胺)、R05068760、匹马塞替尼(AS703026;N-[(2S)-2,3-二羟基丙基]-3-(2-氟-4-碘苯胺基)吡啶-4-甲酰胺)、AZD8330(2-(2-氟-4-碘苯胺基)-N-(2-羟基乙氧基)-1,5-二甲基-6-氧代吡啶-3-甲酰胺;2-((2-氟-4-碘苯基)氨基)-N-(2-羟基乙氧基)-1,5-二甲基-6-氧代-1,6-二氢吡啶-3-甲酰胺)、GDC-0623(5-(2-氟-4-碘苯胺基)-N-(2-羟基乙氧基)咪唑并[1,5-a]吡啶-6-甲酰胺)、R0-4987655(3,4-二氟-2-(2-氟-4-碘苯胺基)-N-(2-羟基乙氧基)-5-[(3-氧代噁嗪烷-2-基)甲基]苯甲酰胺)、WX-554(UCB-554;[3-(氨基甲基)氮杂环丁烷-1-基]-{2-[(2-氟-4-碘苯基)氨基]噻吩并[2,3-b]吡啶-3-基}-甲酮)、HL-085、ARRY-300、ClnQ-03、G-573、PD184161(5-溴-2-[(2-氯-4-碘苯基)氨基]-N-(环丙基甲氧基)-3,4-二氟-苯甲酰胺)、PD318088(5-溴-N-(2,3-二羟基丙氧基)-3,4-二氟-2-[(2-氟-4-碘苯基)氨基]-苯甲酰胺)、PD98059(2-(2-氨基-3-甲氧基苯基)-4H-1-苯并吡喃-4-酮)、U0126(1,4-二氨基-2,3-二氧基-1,4-双(2-氨基苯基硫基)丁二烯;(2Z,3Z)-2,3-二[氨基[(2-氨基苯基)硫基]亚甲基]丁烷二腈)或SL327。

[0056] 在本发明的一个优选实施方案中,所述MEK抑制剂是司美替尼(AZD6244)或曲美替尼(GSK-1120212)。在本发明的一个特别优选的实施方案中,所述MEK抑制剂是司美替尼(AZD6244)或曲美替尼(GSK-1120212)且要治疗的癌症是胰腺癌,优选胰腺导管腺癌(PDAC)。

[0057] 在本发明的一个优选实施方案中,所述MEK抑制剂属于在2位被经取代的苯胺基部分取代的噻吩并[2,3-b]吡啶衍生物类别。属于该类别的示例性MEK抑制剂包括:

[0058] -N-(2-氟-4-碘苯基)-3-(吗啉-4-基羰基)噻吩并[2,3-b]吡啶-2-胺;

[0059] -N-(2-氟-4-碘苯基)-3-[(4-甲基哌嗪-1-基)羰基]噻吩并[2,3-b]吡啶-2-胺;

[0060] -2-[(2-氟-4-碘苯基)氨基]噻吩并[2,3-b]吡啶-3-基(吡咯烷-1-基)甲酮;

[0061] -(1-{2-[(2-氟-4-碘苯基)氨基]噻吩并[2,3-b]吡啶-3-羰基}哌啶-4-基)-氨基甲酸叔丁酯;

[0062] -2-[(2-氟-4-碘苯基)氨基]噻吩并[2,3-b]吡啶-3-甲酸(4-氨基哌啶-1-基)酰胺二盐酸盐;

[0063] -(1-{2-[(2-氟-4-碘苯基)氨基]噻吩并[2,3-b]吡啶-3-羰基}氮杂环丁烷-3-基)氨基甲酸叔丁酯;

[0064] -[3-(氨基甲基)氮杂环丁烷-1-基]-{2-[(2-氟-4-碘苯基)氨基]噻吩并[2,3-b]吡啶-3-基}-甲酮;

[0065] -(1-{2-[(2-氟-4-碘苯基)氨基]噻吩并[2,3-b]吡啶-3-羰基}-(3R)-吡咯烷-3-基)氨基甲酸叔丁酯;

[0066] -(1-{2-[(2-氟-4-碘苯基)氨基]噻吩并[2,3-b]吡啶-3-羰基}-(3S)-吡咯烷-3-基)氨基甲酸叔丁酯;

[0067] -(1-{2-[(2-氟-4-碘苯基)氨基]噻吩并[2,3-b]吡啶-3-羰基}氮杂环丁烷-3-基)-氨基甲酸叔丁酯;

[0068] -[(3R)-3-氨基吡咯烷-1-基]-{2-[(2-氟-4-碘苯基)氨基]噻吩并[2,3-b]吡啶-3-基}-甲酮;

[0069] -[(3S)-3-氨基吡咯烷-1-基]-{2-[(2-氟-4-碘苯基)氨基]噻吩并[2,3-b]吡啶-3-基}-甲酮;

[0070] -(3-氨基氮杂环丁烷-1-基)-{2-[(2-氟-4-碘苯基)氨基]噻吩并[2,3-b]吡啶-3-基}-甲酮;

[0071] -{2-[(2-氟-4-碘苯基)氨基]噻吩并[2,3-b]吡啶-3-基}-(3-羟基氮杂环丁烷-1-基)-甲酮;

[0072] -{2-[(2-氟-4-碘苯基)氨基]噻吩并[2,3-b]吡啶-3-基}-[(3R)-3-羟基吡咯烷-1-基]-甲酮;

[0073] -{2-[(2-氟-4-碘苯基)氨基]噻吩并[2,3-b]吡啶-3-基}-[(3S)-3-羟基吡咯烷-1-基]-甲酮;

[0074] -{2-[(2-氟-4-碘苯基)氨基]噻吩并[2,3-b]吡啶-3-基}-[2-(羟甲基)-哌啶-1-基]-甲酮;

[0075] -{2-[(2-氟-4-碘苯基)氨基]噻吩并[2,3-b]吡啶-3-基}-[(3S)-3-(羟甲基)-吗啉-4-基]-甲酮;

[0076] -4-{2-[(2-氟-4-碘苯基)氨基]噻吩并[2,3-b]吡啶-3-羰基}-(3R)-3-(羟甲基)哌嗪-1-甲酸叔丁酯;

[0077] -2-[4-{2-[(2-氟-4-碘苯基)氨基]噻吩并[2,3-b]吡啶-3-基}羰基)哌嗪-1-基]乙醇;

[0078] -3-((1,4-二氮杂环庚烷-1-基羰基)-N-(2-氟-4-碘苯基)噻吩并[2,3-b]吡啶-2-胺;

[0079] -N-(2-氟-4-碘苯基)-3-(哌嗪-1-基羰基)噻吩并[2,3-b]吡啶-2-胺;

[0080] -[4-({2-[(2-氟-4-碘苯基)氨基]噻吩并[2,3-b]吡啶-3-基}羰基)-哌嗪-1-基]乙酸乙酯;

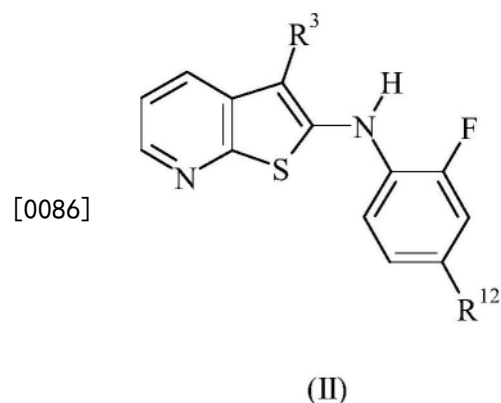
[0081] -[4-({2-[(2-氟-4-碘苯基)氨基]噻吩并[2,3-b]吡啶-3-基}羰基)哌嗪-1-基]乙酸;

[0082] -{2-[(2-氟-4-碘苯基)氨基]噻吩并[2,3-b]吡啶-3-基}-[(2R)-2-(甲氧基甲基)-吡咯烷-1-基]-甲酮(methone);和

[0083] -{2-[(2-氟-4-碘苯基)氨基]噻吩并[2,3-b]吡啶-3-基}-[(2R)-2-(羟甲基)-哌嗪-1-基]-甲酮。

[0084] 制备这些MEK抑制剂的方法公开于WO 2007/088345中,其通过引用整体并入本文。

[0085] 用于用在本发明中的属于在2位被经取代的苯胺基部分取代的噻吩并[2,3-b]吡啶衍生物类别的优选MEK抑制剂由式(II)的化合物及其药学上可接受的盐、溶剂化物和N-氧化物表示:



[0087] 其中

[0088] R^{12} 表示卤素;

[0089] R^3 表示 $CONR^bR^c$;且

[0090] R^b 和 R^c 与它们二者所连接的氮原子一起表示氮杂环丁烷-1-基、吡咯烷-1-基、哌啶-1-基、吗啉-4-基、硫代吗啉-4-基、哌嗪-1-基、高哌啶-1-基、高吗啉-4-基或高哌嗪-1-基,所述基团中的任一个可以任选地被一个或多个取代基取代,所述取代基选自 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烷氧基、羟基、羟基(C_{1-6})烷基(alkyl)、氨基- (C_{1-6}) 烷基、(氨基)(羟基) (C_{1-6}) 烷基、卤素、氧代、 C_{2-6} 烷基(alkyl)羰基、羧基、 C_{2-6} 烷氧基羰基、二(C_{1-6}) 烷基(alhyl)胍基羰基、氨基、 C_{1-6} 烷基氨基、二(C_{1-6}) 烷基-氨基、 C_{2-6} 烷基羰基氨基、氨基羰基氨基、氨基羰基、 C_{1-6} 烷基氨基羰基、二(C_{1-6}) 烷基氨基羰基、氨基磺酰基、 C_{1-6} 烷基磺酰基、 C_{1-6} 烷基氨基羰基(C_{1-6}) 烷基、 C_{1-6} 烷氧基(C_{1-6}) 烷基、羧基(C_{1-6}) 烷基、 C_{2-6} 烷氧基羰基(C_{1-6}) 烷基、 C_{2-6} 烷氧基羰基氨基和 C_{2-6} 烷

氧基羰基氨基- (C1-6) 烷基。

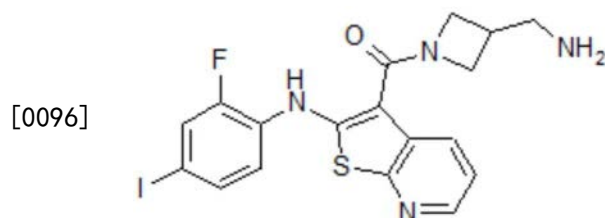
[0091] 在一个实施方案中, R^{12} 是溴。在另一个实施方案中, R^{12} 是碘。

[0092] 制备式 (II) 的化合物的方法公开于 WO 2007/088345 中, 其通过引用整体并入本文。

[0093] 在本发明的一个优选实施方案中, 所述 MEK 抑制剂是式 (II) 的化合物或其药学上可接受的盐、溶剂化物或 N-氧化物。在本发明的一个特别优选的实施方案中, 所述 MEK 抑制剂是式 (II) 的化合物或其药学上可接受的盐、溶剂化物或 N-氧化物且要治疗的癌症是胰腺癌, 优选胰腺导管腺癌 (PDAC)。

[0094] 在本发明的一个优选实施方案中, 所述 MEK 抑制剂是 WX-554 (UCB-554)。在本发明的一个特别优选的实施方案中, 所述 MEK 抑制剂是 WX-554 (UCB-554) 且要治疗的癌症是胰腺癌, 优选胰腺导管腺癌 (PDAC)。

[0095] 在此描绘了 WX-554 (UCB-554); [3-(氨基甲基) 氮杂环丁烷-1-基]-{2-[(2-氟-4-碘苯基) 氨基] 噻吩并 [2,3-b] 吡啶-3-基}-甲酮) 的结构:



[0097] 制备 WX-554 的方法公开于 WO 2007/088345 中, 其通过引用整体并入本文。

[0098] 属于在 2 位被经取代的苯胺基部分取代的噻吩并 [2,3-b] 吡啶衍生物类别的上述 MEK 抑制剂是强效的且选择性的 MEK 抑制剂, 其对人 MEK1 和/或 MEK2 酶具有 50 μ M 或更低、通常 20 μ M 或更低、经常 5 μ M 或更低、典型地 1 μ M 或更低、适当地 500 nM 或更低、理想地 100 nM 或更低且优选地 20 nM 或更低的结合亲和力 (IC_{50}) (技术人员将理解, 越小的 IC_{50} 数字表示活性越强的化合物)。相对于其它人激酶, 用于用在本发明中的这些 MEK 抑制剂对人 MEK1 和/或 MEK2 酶可以具有至少 10 倍选择性亲和力、通常至少 20 倍选择性亲和力、适当地至少 50 倍选择性亲和力和理想地至少 100 倍选择性亲和力。

[0099] 可以使用多种方法来确定 MEK 抑制剂的活性, 诸如体外 MEK 测定。一种示例性的体外 MEK 测定描述于 WO 2007/088345 中, 其通过引用整体并入本文。

[0100] 还设想, 包含本文定义的 GREM1 拮抗剂和 Ras-Raf-MEK-ERK 信号传导抑制剂 (诸如 MEK 抑制剂或 ERK 抑制剂) 的组合疗法可以用于治疗或预防通常用 Ras-Raf-MEK-ERK 信号传导抑制剂靶向的癌症。所述癌症可以是先前描述用 Ras-Raf-MEK-ERK 信号传导抑制剂治疗的癌症或肿瘤。这样的癌症包括但不限于胰腺癌、多发性骨髓瘤、结肠直肠癌、肺癌和黑素瘤。

[0101] 所述癌症可以是对使用 Ras-Raf-MEK-ERK 信号传导抑制剂的治疗有应答的癌症和/或考虑用 Ras-Raf-MEK-ERK 信号传导抑制剂治疗的癌症。供选择地, 所述癌症可以是对使用 Ras-Raf-MEK-ERK 信号传导抑制剂的治疗应答不佳、无应答或难治的癌症。所述癌症可以先前被描述为不适合用 Ras-Raf-MEK-ERK 信号传导抑制剂治疗。在某些情况下, 所述癌症可以最初对使用 Ras-Raf-MEK-ERK 信号传导抑制剂的治疗有应答, 但对 Ras-Raf-MEK-ERK 信号传导抑制剂产生抗性。可以通过任何方式来测量应答性。例如, 通过使用 X 射线、CT 或 MRI

扫描测量在治疗之前和之后的肿瘤大小或通过测量肿瘤标志物,可以评估对治疗的应答性。还可以使用血液试验来确定器官功能,以评估对治疗的应答性。用于监测胰腺癌中的应答性的一种示例性血液标志物是CA19-9。本领域技术人员知道如何测量癌症对治疗的应答性。

[0102] 癌症

[0103] 在包含抗-GREM1拮抗剂和Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂(诸如MEK或ERK抑制剂)的组合疗法的上下文中,所述癌症可以是任何癌症或肿瘤。具体而言,在包含抗-GREM1拮抗剂和Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂的组合疗法的上下文中,所述癌症可以是具有间质(通常是促结缔组织增生性间质)的任何癌症或肿瘤。所述癌症可以是GREM1引发的任何癌症或肿瘤。所述癌症可以是在其中观察到间质和/或上皮GREM1过表达的任何癌症。所述癌症或肿瘤可以具有间质GREM1过表达,但没有上皮GREM1过表达。所述癌症或肿瘤可以具有上皮GREM1过表达,但没有间质GREM1过表达。在优选的实施方案中,所述癌症或肿瘤在促结缔组织增生性间质中具有GREM1的过表达。所述癌症或肿瘤可以是适合用GREM1拮抗剂、MEK抑制剂和/或ERK抑制剂靶向的任何癌症或肿瘤,包括本领域已知适合用这样的药剂靶向的任何癌症或肿瘤,以及本领域已知适合用这样的药剂治疗的任何癌症或肿瘤。

[0104] 所述癌症或肿瘤可以是实体瘤。所述实体瘤可以具有促结缔组织增生性间质。

[0105] 之前已经在2019年6月18日提交的WO 2019/243801中证明抗-GREM1拮抗剂可有效治疗多种癌症,其公开内容通过引用整体并入本文。

[0106] 可以治疗的特别优选的癌症包括结肠直肠癌、多发性骨髓瘤、胰腺癌、膀胱癌、乳腺癌、肺癌、胃癌、十二指肠癌、食道癌、头颈癌、前列腺癌、神经胶质瘤、子宫内膜癌、卵巢癌、肝癌、脾癌、骨驻留癌、黑素瘤和骨肉瘤。可以治疗的癌症可以是肠癌、结肠癌或直肠癌。要治疗的癌症可以是弥散性癌症,例如转移性癌症。弥散性癌症应当被理解为已经从其在体内的最初起源部位扩散的癌症。例如,弥散性癌症可以是起源于患者的胰腺、骨髓、结肠、前列腺或乳腺组织但已经扩散至例如患者的肝或肺的癌症。

[0107] 包含GREM1拮抗剂和Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂的组合疗法也可以用于预防癌症的扩散。

[0108] 包含GREM1拮抗剂和Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂的组合疗法可以用于预防与癌症相关的息肉病。

[0109] 分级系统被用于癌症生物学和医学,以根据癌细胞的细胞分化的缺乏对其进行分类。这反映了癌细胞在形态学上与在癌细胞的起源组织中发现的健康细胞的差异程度。该分级系统可以用于指示特定癌症可能预计生长的速度。通常使用的癌症等级是(G)X级和1至4级。GX指示,无法评估癌症等级。G1(低等级)癌细胞具有与正常健康细胞相似的形态(即它们分化良好)并且预计会生长缓慢,并且不太可能扩散。G2(中间等级)癌细胞中等程度地分化,即它们看起来更不正常并且预计比G1细胞稍微更快地生长。G3(高等级)癌细胞具有与正常细胞相比非常不同的形态(即它们是分化不良的)并且预计比G1和G2细胞更快地生长。G4(高等级)癌细胞是未分化的(也被称作间变性的)并且预计具有最高的增殖能力。

[0110] 癌症分级不同于癌症分期,后者可以指示癌症可能如何扩散。常见的癌症分期系统具有五个阶段,即0期:癌细胞原位(即位于其正常组织中);I期:癌症局限于身体的一个部位;II期:癌症为局部晚期;III期:癌症也是局部晚期(癌症被指定为II期或III期可以取

决于癌症的具体类型);和IV期:癌症通常已经转移,或扩散至其它器官或全身。

[0111] 本领域技术人员知道如何确定癌症的等级和/或阶段。在一个实施方案中,本发明涉及与Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂组合的抗-GREM1拮抗剂用于治疗 and/或预防确定的癌症的用途。在一个实施方案中,所述癌症是确定的癌症。确定的癌症可以是高等级癌症,例如G3或G4癌症。确定的癌症可以是II期或以上的癌症。确定的癌症可以是III期或IV期癌症。在一个实施方案中,确定的癌症是已经转移的IV期癌症。在一个实施方案中,确定的癌症是确定的胰腺癌。

[0112] 除了特别例举的在治疗和预防胰腺癌中的应用外,发明人设想,在实施例中所示的与Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂组合的GREM1拮抗剂的治疗效果也将适用于治疗具有本文所述相应特征的其它癌症。

[0113] 具体而言,设想包含GREM1拮抗剂的组合将可用于预防或治疗其中Ras-Raf-MEK-ERK途径响应于本文描述的抗-GREM1拮抗剂治疗/暴露而失调的癌症。具体而言,所述癌症可以是其中在用本文描述的抗-GREM1拮抗剂治疗后Ras-Raf-MEK-ERK信号传导被诱导/上调的癌症。在没有抗-GREM1拮抗剂治疗存在下,这样的癌症可能不会显示Ras-Raf-MEK-ERK途径失调。换言之,在用本文描述的抗-GREM1拮抗剂治疗之前,所述癌症可以表现出相对于参考样品或参考值而言正常的Ras-Raf-MEK-ERK信号传导。

[0114] 还设想,包含GREM1拮抗剂的组合将可用于预防或治疗其中存在间质和/或上皮GREM1过表达的癌症,并且该过表达促进恶性细胞生长。这样的癌症包括胰腺癌、膀胱癌、肺癌、胃癌、十二指肠癌、食道癌、头颈癌、神经胶质瘤、子宫内膜癌、肝癌、脾癌、骨驻留癌和骨肉瘤。

[0115] 本发明的拮抗剂与Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂(诸如MEK抑制剂或ERK抑制剂)组合用于治疗或预防癌症。预防癌症可以包括预防受试者被诊断出患有癌症或延缓癌症的发作。预防癌症还可以包括预防先前已经诊断出癌症的受试者中的癌症复发或再发生。预防癌症另外可以包括增加尚未被诊断出癌症或先前已经诊断出癌症的受试者的存活。

[0116] 治疗癌症可以改善癌症的一种或多种症状,诱导或延长癌症的缓解,或者延迟癌症的复发或再发生。治疗可以治愈、减轻或部分地抑制癌症。它可能导致疾病症状的严重程度的降低,或无症状阶段的频率或持续时间的增加。治疗癌症还可以包括预防癌症(例如确定的癌症)从患者体内的其原发部位扩散到患者体内的一个或多个继发部位。因此,治疗癌症可能包括预防现有癌症的扩散或转移。在一个优选的实施方案中,本发明的拮抗剂与Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂(诸如MEK抑制剂或ERK抑制剂)组合用于治疗或预防胰腺癌。胰腺癌的治疗可能导致原发性肿瘤大小的减小,例如通过CT或内窥镜超声所测定的。这样的减小可以有利于用于从胰头切除肿瘤的Whipple手术(胰十二指肠切除术)。发明人已经证明,与MEK抑制剂组合的抗-GREM1拮抗剂治疗可以增加KPC小鼠模型的存活。因此,使用抗-GREM1拮抗剂和MEK抑制剂治疗胰腺癌也可能改善患者存活。预见到,使用ERK抑制剂治疗癌症、特别是胰腺癌,将会产生类似的有利结果。

[0117] 胰腺癌

[0118] 本发明优选地针对胰腺癌的治疗或预防。如在实施例更详细地描述的,本发明的发明人已经证实人胰腺导管腺癌样品中的GREM1过表达,并证实Grem1 mRNA的高表达与

不良预后显著相关(图1)。此外,本发明的发明人已经证实,在暴露于抗-GREM1拮抗剂后,在KPC小鼠模型中的KRAS信号传导被上调(图4),并且在暴露于抗-GREM1抗体Ab7326后,在KPC小鼠模型中参与Ras-Raf-MEK-ERK信号传导途径的基因(诸如Mapk1、Nras和Myc)被上调(图3)。本发明的发明人还已经证明,包含抗-GREM1拮抗剂和MEK抑制剂的组合疗法会在KPC小鼠模型中显著增加存活、减缓肿瘤生长并促进肿瘤缩小。KPC小鼠会长出在组织学和病理学上与人胰腺肿瘤相似的肿瘤,并模仿人胰腺癌。

[0119] 因此,在一个实施方案中,所述胰腺癌是特征为具有GREM1过表达的胰腺癌。在另一个实施方案中,所述胰腺癌可以被表征为具有外分泌肿瘤或神经内分泌肿瘤。胰腺神经内分泌癌(也被称作胰岛细胞肿瘤)发生在胰腺的内分泌腺中。一种特别优选的胰腺癌形式是外分泌胰腺癌,诸如胰腺导管腺癌(PDAC)。已经描述,PDAC占有所有胰腺癌的90%(Feldmann等人,J Hepatobiliary Pancreat Surg.2007;14(3):224-32)。胰腺癌可以是在胰腺导管的内壁中发生的任何癌症。

[0120] 已经报道,Ras-Raf-MEK-ERK信号传导途径在胰腺导管腺癌中发挥重要作用(Collisson EA.等人(2012)A central role for RAF→MEK→ERK signaling in the genesis of pancreatic ductal adenocarcinoma.Cancer Discov.2012 2(8):685-93)。例如,已知KRAS癌基因中的活化突变通过促进增强的细胞增殖、运动和存活来驱动PDAC形成,但靶向KRAS信号传导仍然具有挑战性,并且使用MEK抑制剂的临床试验在很大程度上未能在患者中取得具有统计学意义的结果(Brauswetter等人(2017)Molecular subtype specific efficacy of MEK inhibitors in pancreatic cancers.PLoS ONE 12(9):e0185687)。因此,在一个实施方案中,用于治疗胰腺癌是本文描述的具有Ras-Raf-MEK-ERK途径失调和/或Ras(诸如KRAS、NRAS和/或HRAS)或Raf基因(诸如ARAF、BRAF和/或CRAF)中的突变的胰腺癌。例如,所述胰腺癌可以是具有KRAS^{G12D}或KRAS^{G12R}突变/置换的胰腺癌肿瘤。供选择地,所述胰腺癌可以是具有BRAF^{V600E}突变/置换的胰腺癌肿瘤。

[0121] 在另一个实施方案中,所述胰腺癌是其中Ras-Raf-MEK-ERK途径响应于本文描述的抗-GREM1拮抗剂治疗/暴露而失调的胰腺癌。具体而言,所述胰腺癌可以是其中在用抗-GREM1拮抗剂治疗后Ras-Raf-MEK-ERK信号传导被诱导/上调的胰腺癌。在没有抗-GREM1拮抗剂治疗存在下,这样的胰腺癌可能不会显示Ras-Raf-MEK-ERK途径失调。换言之,在用本文描述的抗-GREM1拮抗剂治疗之前,所述胰腺癌可以表现出相对于参考样品或参考值而言正常的Ras-Raf-MEK-ERK途径信号传导。

[0122] 其它外分泌胰腺癌包括在胰腺导管中形成的鳞状细胞癌;腺鳞癌;印戒细胞癌;和胶样癌,其通常由导管内乳头状粘液赘生物发展而来。

[0123] 用于治疗的一种优选的胰腺癌类型可能对一种或多种已知的抗癌剂(诸如化学疗法)具有抗性。所述胰腺癌可以是弥散性胰腺癌。所述胰腺癌可以是转移性胰腺癌。转移性癌症应当被理解为从其在体内的最初起源部位扩散的癌症。因此,转移性胰腺癌表示从胰腺开始并扩散到其它器官(诸如肺、肝、骨和脑)的癌症。通常,转移性胰腺癌表示从胰腺开始并扩散到肺和/或肝的癌症。所述胰腺癌也可以是复发性胰腺癌。换言之,要通过本发明的方法治疗的胰腺癌包括在早期治疗(诸如化学疗法、放射疗法或治愈性外科手术)数月以后或甚至数年以后复发的胰腺癌。如下文进一步描述的,用于治疗的一种优选的胰腺癌类型可能对一种或多种已知的抗癌剂(诸如化学治疗剂)具有抗性。

[0124] 在某些方面,所述胰腺癌可以是对使用Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂的治疗有应答的胰腺癌,例如,对使用本文描述的MEK或ERK抑制剂的治疗有应答的胰腺癌。所述胰腺癌供选择地可以是对使用Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂的治疗应答不佳、无应答或难治的胰腺癌,例如,对使用本文描述的MEK或ERK抑制剂的治疗应答不佳、无应答或难治的胰腺癌。所述胰腺癌可能先前被认为不适合使用Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂治疗,例如先前被认为不适合使用本文描述的MEK或ERK抑制剂治疗的胰腺癌。在某些情况下,所述胰腺癌可能最初对使用Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂的治疗有应答,但对Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂产生抗性。例如,所述胰腺癌可能最初对使用MEK或ERK抑制剂的治疗有应答,但对本文描述的MEK或ERK抑制剂产生抗性。

[0125] 肺癌

[0126] 在另一个方面,本发明涉及肺癌的治疗或预防。所述肺癌最优选地是非小细胞肺癌(NSCLC)。所述NSCLC可以是晚期NSCLC,诸如III期或IV期NSCLC。所述NSCLC可以是鳞状细胞癌、腺癌或大细胞癌。所述癌症可以是小细胞肺癌。所述肺癌可以是不可切除的。所述肺癌可以是非血管生成的和/或可能表现出血管共选(co-option)。所述肺癌可以包括肺泡和/或间质肿瘤生长。所述肺癌可以是原发性肺癌或已经扩散到肺的任何继发性癌症,诸如乳腺癌或胰腺癌。所述肺癌可以是弥散性肺癌。所述肺癌可以是转移性肺癌。所述肺癌可以是特征为具有GREM1的过表达的肺癌。所述肺癌也可以是复发性肺癌。换言之,要通过本发明的方法治疗的肺癌包括在早期治疗(诸如化学疗法、放射疗法或治愈性外科手术)数月以后或甚至数年以后复发的肺癌。用于治疗的一种优选的肺癌类型可能对如下文进一步描述的一种或多种已知的抗癌剂(诸如化学治疗剂)具有抗性。

[0127] 在某些方面,所述肺癌可以是对使用Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂的治疗有应答的肺癌,例如,对使用本文描述的MEK或ERK抑制剂的治疗有应答的肺癌。所述肺癌供选择地可以是对使用Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂的治疗应答不佳、无应答或难治的肺癌,例如,对使用本文描述的MEK或ERK抑制剂的治疗应答不佳、无应答或难治的肺癌。所述肺癌可能先前被认为不适合使用Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂治疗,例如,先前被认为不适合使用本文描述的MEK或ERK抑制剂治疗的肺癌。在某些情况下,所述肺癌可能最初对使用Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂的治疗有应答,但对Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂产生抗性。例如,所述肺癌可能最初对使用MEK或ERK抑制剂的治疗有应答,但对本文描述的MEK或ERK抑制剂产生抗性。

[0128] 在另一个方面,用于治疗的肺癌是本文描述的具有Ras-Raf-MEK-ERK途径失调和/或Ras(诸如KRAS、NRAS和/或HRAS)或Raf基因(诸如ARAF、BRAF和/或CRAF)中的突变的肺癌。例如,用于治疗的肺癌可以是本文描述的具有MAPK/ERK途径失调和/或Ras(诸如KRAS、NRAS和/或HRAS)或Raf基因(诸如ARAF、BRAF和/或CRAF)中的突变的非小细胞肺癌。

[0129] 在另一个实施方案中,所述肺癌是其中Ras-Raf-MEK-ERK信号传导途径响应于本文描述的抗-GREM1拮抗剂治疗/暴露而失调的肺癌。具体而言,所述肺癌可以是其中在用抗-GREM1拮抗剂治疗后Ras-Raf-MEK-ERK信号传导被诱导/上调的肺癌。在没有抗-GREM1拮抗剂治疗存在下,这样的肺癌可能不会显示Ras-Raf-MEK-ERK途径失调。换言之,在用本文描述的抗-GREM1拮抗剂治疗之前,所述肺癌可能表现出相对于参考样品或参考值而言正常的Ras-Raf-MEK-ERK途径信号传导。

[0130] 黑素瘤

[0131] 在另一个方面,本发明涉及黑素瘤的治疗或预防。所述黑素瘤可以是表皮/皮肤黑素瘤,诸如浅表扩散性黑素瘤、结节性黑素瘤、恶性雀斑样黑素瘤或肢端雀斑样黑素瘤。所述皮肤黑素瘤可以是无黑色素性黑素瘤、痣样黑素瘤、spitz样黑素瘤或结缔组织增生性黑素瘤。在某些方面,所述黑素瘤可以是眼部/眼黑素瘤,诸如结膜黑素瘤、脉络膜黑素瘤或虹膜黑素瘤。在其它方面,所述黑素瘤可以是粘膜黑素瘤。

[0132] 所述黑素瘤可以是转移性黑素瘤。所述黑素瘤可以是特征为具有GREM1的过表达的黑素瘤。所述黑素瘤也可以是复发性黑素瘤。换言之,要通过本发明的方法治疗的黑素瘤包括在早期治疗(诸如化学疗法、放射疗法或治愈性外科手术)数月以后或甚至数年以后复发的黑素瘤。用于治疗的一种优选的黑素瘤类型可能对如下文进一步描述的一种或多种已知的抗癌剂(诸如化学治疗剂)具有抗性。

[0133] 在某些方面,所述黑素瘤可以是对使用Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂的治疗有应答的黑素瘤,例如,对使用本文描述的MEK或ERK抑制剂的治疗有应答的黑素瘤。所述黑素瘤供选择地可以是对使用Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂的治疗应答不佳、无应答或难治的黑素瘤,例如,对使用本文描述的Ras-Raf-MEK-ERK抑制剂的治疗应答不佳、无应答或难治的黑素瘤。所述黑素瘤可能先前被认为不适合使用Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂治疗,例如先前被认为不适合使用本文描述的MEK或ERK抑制剂治疗的黑素瘤。在某些情况下,所述黑素瘤可能最初对使用Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂的治疗有应答,但对Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂产生抗性。例如,所述黑素瘤可能最初对使用MEK或ERK抑制剂的治疗有应答,但对本文描述的MEK或ERK抑制剂产生抗性。

[0134] 在另一个方面,用于治疗的黑素瘤是本文描述的具有MAPK/ERK途径失调和/或Ras(诸如KRAS、NRAS和/或HRAS)或Raf基因(诸如ARAF、BRAF和/或CRAF)中的突变的黑素瘤。

[0135] 在另一个实施方案中,所述黑素瘤是其中MAPK/ERK途径响应于本文描述的抗-GREM1拮抗剂治疗/暴露而失调的黑素瘤。具体而言,所述黑素瘤可以是其中在用抗-GREM1拮抗剂治疗后MAPK/ERK信号传导被诱导/上调的黑素瘤。在没有抗-GREM1拮抗剂治疗存在下,这样的黑素瘤可能不会显示MAPK/ERK途径失调。换言之,在用本文描述的抗-GREM1拮抗剂治疗之前,所述黑素瘤可能表现出相对于参考样品或参考值而言正常的MAPK/ERK途径信号传导。

[0136] 结肠直肠癌

[0137] 本发明在一个方面涉及结肠直肠癌的预防或治疗。作为背景,肠粘膜是一个复杂的生态系统,并且上皮与其微环境、特别是下层间质具有相互依赖的关系。间质-上皮串扰与调节体内稳态密切相关,并在肠道再生和癌症中发生动态改变。细胞信号传导网络是区室间串扰的效应途径并控制上皮细胞命运决定,但可以被结肠直肠癌中的肿瘤微环境共选(co-opted)和破坏。

[0138] 结肠直肠癌的当前化疗管理在过去的20年里没有实质性变化,并且主要是基于使用组合细胞毒性剂(诸如FOLFOX和FOLFIRI方案,<http://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/cancer-in-general/treatment/cancer-drugs/drugs>)来对抗增殖的肿瘤上皮,并且可能产生对这些靶向上皮的药剂的抗性。现在,确定用于结肠直肠癌的新疗法比以往任何时候都更加重要。

[0139] 因此,用于治疗癌症或肿瘤是结肠直肠癌或结肠直肠肿瘤。用于治疗的一种特别优选的结肠直肠癌形式是特征为具有在间质细胞中的GREM1过表达(即间质GREM1过表达)的结肠直肠癌。所述间质细胞可以是癌症相关成纤维细胞。具有间质GREM1过表达的结肠直肠癌可能不显示上皮GREM1过表达。具有间质GREM1过表达的结肠直肠癌可能包括间质Foxl1过表达。用于治疗的一种特别适合的结肠直肠癌形式是作为间质亚型结肠直肠癌的结肠直肠癌,也描述为CMS4(Guinney等人,Nat Med 2015)。还可以治疗结肠直肠癌的任何其它亚型,包括如上文Guinney等人所述的CMS1、CMS2和CMS3中的任一种。本文描述的结肠直肠癌可以是近端结肠直肠癌(或近端结肠直肠肿瘤)。近端结肠是脾曲上游的大肠区域,即盲肠、升结肠和横结肠。在该区域中的癌症或肿瘤也被称作右侧癌症或肿瘤。本发明可以涉及治疗右侧结肠直肠癌或右侧结肠直肠肿瘤。

[0140] 所述结肠直肠癌可以是远端结肠直肠癌(或远端结肠直肠肿瘤)。所述远端结肠是脾曲下游的大肠区域,即降结肠、乙状结肠和直肠。在该区域中的癌症或肿瘤也被称作左侧癌症或肿瘤。本发明可以涉及治疗左侧结肠直肠癌或左侧结肠直肠肿瘤。具有GREM1的间质过表达的癌症可以优选地是散发性癌症。所述散发性癌症可以由体细胞突变引起。所述散发性癌症可以由致癌物质引起。散发性癌症不是由于遗传性基因突变引起的。所述散发性癌症可能造成GREM1的间质过表达。所述散发性癌症的增殖可能依赖于癌症中GREM1的间质过表达。

[0141] 至少三种接近GREM1的单核苷酸多态性(SNP)与北欧白人以及可能的其它人种的结肠直肠癌(CRC)风险独立相关(Tomlinson等人,PLoS Genet,2011)。与GREM1表达存在直接联系,并且其它SNP可能具有类似的影响。此外,在BMP2附近的两个常见SNP、在BMP4附近的两个SNP和在BMP7附近的一个SNP会影响BMP配体的表达并影响CRC风险。因此,所述癌症可以包含上述SNP中的一个或多个。

[0142] 根据本发明要治疗的癌症或肿瘤的另一类型是表现出GREM1在上皮细胞中的过表达的癌症或肿瘤。GREM1在上皮细胞中的过表达可能造成癌症。癌症的增殖可能依赖于GREM1的上皮过表达。因此,所述癌症可能具有上皮起源。所述癌症可以是结肠直肠癌或十二指肠癌。所述癌症可以是GREM1引发的。GREM1引发的是指,增强GREM1的活性或表达的致突变事件是癌症的原因。这样的癌症可以是由于遗传性基因突变。因此,所述癌症可以是家族性癌症(见下文)。

[0143] 用于治疗的一种优选的结肠直肠癌类型可能对如下文进一步描述的一种或多种已知的抗癌剂(诸如化学治疗剂)具有抗性。

[0144] 所述结肠直肠癌可以是弥散性结肠直肠癌。所述结肠直肠癌可以是转移性结肠直肠癌。所述结肠直肠癌可以是肺的转移性结肠直肠癌。所述结肠直肠癌可以是肝的转移性结肠直肠癌。所述结肠直肠癌可以是骨的转移性结肠直肠癌。

[0145] 所述结肠直肠癌可以特征在于Foxl1的间质过表达。所述结肠直肠癌可以特征在于一种或多种Wnt配体的间质过表达。例如,所述结肠直肠癌可以特征在于Wnt5A和/或Wnt2B的间质过表达。如果一种结肠直肠癌具有Foxl1和/或Wnt配体(例如Wnt5A或Wnt2B)的间质过表达,则所述结肠直肠癌可能特别适合使用GREM1拮抗剂进行预防或治疗。

[0146] 在某些方面,所述结肠直肠癌可以是对使用Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂的治疗有应答的结肠直肠癌,例如,对使用本文描述的MEK或ERK抑制剂的治疗有应答的结肠

直肠癌。所述结肠直肠癌供选择地可以是对使用Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂的治疗应答不佳、无应答或难治的结肠直肠癌,例如,对使用本文描述的MEK或ERK抑制剂的治疗应答不佳、无应答或难治的结肠直肠癌。所述结肠直肠癌可能先前被认为不适合使用Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂治疗,例如,先前被认为不适合使用本文描述的MEK或ERK抑制剂治疗的结肠直肠癌。在某些情况下,所述结肠直肠癌可能最初对使用Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂的治疗有应答,但对Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂产生抗性。例如,所述结肠直肠癌可能最初对使用本文描述的MEK或ERK抑制剂的治疗有应答,但对MEK或ERK抑制剂产生抗性。

[0147] 在另一个方面,用于治疗的结肠直肠癌是本文描述的具有Ras-Raf-MEK-ERK途径失调和/或Ras(诸如KRAS、NRAS和/或HRAS)或Raf基因(诸如ARAF、BRAF和/或CRAF)中的突变的结肠直肠癌。例如,所述结肠直肠癌可以是KRAS/BRAF突变的结肠直肠癌。所述KRAS突变的结肠直肠癌可以被表征为具有以下KRAS突变中的任一种:G12D、G12V、G12C、G12A、G13D、Q61H、Q61L、Q61R、A146T和/或A146V。所述BRAF突变的结肠直肠癌可以是BRAF^{V600E}突变。

[0148] 在另一个实施方案中,所述结肠直肠癌是其中Ras-Raf-MEK-ERK途径响应于本文描述的抗-GREM1拮抗剂治疗/暴露而失调的结肠直肠癌。具体而言,所述结肠直肠癌可以是其中在用抗-GREM1拮抗剂治疗后Ras-Raf-MEK-ERK信号传导被诱导/上调的结肠直肠癌。在没有抗-GREM1拮抗剂治疗存在下,这样的结肠直肠癌可能不会显示Ras-Raf-MEK-ERK途径失调。换言之,在用本文描述的抗-GREM1拮抗剂治疗之前,所述结肠直肠癌可能表现出相对于参考样品或参考值而言正常的Ras-Raf-MEK-ERK途径信号传导。

[0149] 家族性癌症

[0150] 家族性癌症包括由GREM1编码基因中的一个或多个突变或影响GREM1基因表达的任何其它突变导致的癌症。常染色体显性病症遗传性混合性息肉病综合征(HMPS)是由GREM1上游的40kb重复引起,所述重复导致病理区室表达从受限的间质梯度转变为整个上皮中的异位GREM1基因表达。

[0151] 要用抗-GREM1拮抗剂治疗的受试者可能在先前已经被确定为具有发生家族性癌症的风险。例如,基于受试者的家族史和/或因为受试者携带已知会导致家族性癌症或增加罹患家族性癌症的风险的基因突变,可以确定受试者处于风险中。

[0152] 所述家族性癌症可以是Lynch综合征,其也被称作遗传性非息肉性结肠直肠癌(HNPCC)。所述家族性癌症可以是家族性腺瘤性息肉病(FAP)。

[0153] 患有家族性腺瘤性息肉病(FAP)的患者或受试者可以特别适合使用包含抗-GREM1拮抗剂的组合疗法进行治疗。要用包含抗-GREM1拮抗剂(例如抗-GREM1抗体)和Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂的组合疗法治疗或预防的家族性癌症可以是FAP。可以向先前患有FAP的受试者预防性地施用与Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂组合的抗-GREM1拮抗剂,例如以防止复发。可以向先前未患过FAP但是先前已经确定处于罹患FAP的风险中的受试者预防性地施用与Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂组合的抗-GREM1拮抗剂。某个受试者可能已经被确定为处于发生FAP的风险中,因为已经发现该受试者在其Apc基因中携带有害突变。

[0154] 在某些方面,所述家族性癌症可以是对使用Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂的治疗有应答的家族性癌症,例如,对使用本文描述的MEK或ERK抑制剂的治疗有应答的家族

性癌症。所述家族性癌症供选择地可以是对使用Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂的治疗应答不佳、无应答或难治的家族性癌症,例如,对使用本文描述的MEK或ERK抑制剂的治疗应答不佳、无应答或难治的家族性癌症。所述家族性癌症可能先前被认为不适合使用Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂治疗,例如,所述家族性癌症可能先前已经被认为不适合使用本文描述的MEK或ERK抑制剂治疗。在某些情况下,所述家族性癌症可能最初对使用Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂的治疗有应答,但对Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂产生抗性。例如,所述家族性癌症可能最初对使用本文描述的MEK或ERK抑制剂的治疗有应答,但对MEK或ERK抑制剂产生抗性。

[0155] 在另一个方面,用于治疗的家族性癌症是本文描述的具有Ras-Raf-MEK-ERK途径失调和/或Ras(诸如KRAS、NRAS和/或HRAS)或Raf基因(诸如ARAF、BRAF和/或CRAF)中的突变的家族性癌症。

[0156] 在另一个实施方案中,所述家族性癌症是其中Ras-Raf-MEK-ERK途径响应于本文描述的抗-GREM1拮抗剂治疗/暴露而失调的家族性癌症。具体而言,所述家族性癌症可以是其中在用抗-GREM1拮抗剂治疗后Ras-Raf-MEK-ERK信号传导被诱导/上调的家族性癌症。在没有抗-GREM1拮抗剂治疗存在下,这样的家族性癌症可能不会显示Ras-Raf-MEK-ERK途径失调。换言之,在用本文描述的抗-GREM1拮抗剂治疗之前,所述家族性癌症可能表现出相对于参考样品或参考值而言正常的Ras-Raf-MEK-ERK途径信号传导。

[0157] 多发性骨髓瘤

[0158] 本发明在另一个方面涉及多发性骨髓瘤的治疗或预防。多发性骨髓瘤(MM)是一种特征在于骨髓(BM)内的浆细胞(PC)的克隆增殖的血液系统恶性肿瘤。众所周知,BM支持MM中的肿瘤生长,肿瘤细胞和BM之间的双向信号传导对于MM PC的持续生长、扩散和存活至关重要。细胞和非细胞BM组分对MM PC的生长和扩散产生不同的影响。虽然最近的研究已经确定了在疾病进展中发挥作用的BM组分,并且已经开发出靶向这些的疗法,但MM的标准护理治疗仍然主要依赖于靶向肿瘤细胞本身。虽然这样的疗法对于延长患者存活期有效,但由于BM在MM细胞的生长、扩散、存活和抗性中发挥重要作用,因此需要靶向疾病的这一重要方面的更有效疗法。实际上,MM是一种基本上无法治愈的疾病,疾病复发是有效治疗该疾病所面临的关键问题。

[0159] 因此,本发明还涉及多发性骨髓瘤的治疗或预防。多发性骨髓瘤通常包含超过一个浆细胞团在骨髓内的存在。因此,多发性骨髓瘤通常与骨髓中浆细胞的异常增殖有关。用于治疗的一种特别优选的多发性骨髓瘤形式特征为具有GREM1在骨髓中的过表达。因此,所述多发性骨髓瘤可以包含间质GREM1过表达。所述间质GREM1过表达可能存在于骨骼的密质骨隔室中。所述间质GREM1过表达可能反映间质细胞数目的增加,或在现有的表达GREM1的间质细胞内GREM1的表达水平的增加。骨髓可以包含骨软骨网状(OCR)干细胞。过表达GREM1的间质细胞可以包含OCR干细胞。用于治疗的一种优选的多发性骨髓瘤类型可能对如下文进一步描述的一种或多种已知的抗癌剂(诸如化学治疗剂)具有抗性。

[0160] 在某些方面,所述多发性骨髓瘤可以是对使用Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂的治疗有应答的多发性骨髓瘤,例如对使用本文描述的MEK或ERK抑制剂的治疗有应答的多发性骨髓瘤。所述多发性骨髓瘤供选择地可以是对使用Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂的治疗应答不佳、无应答或难治的多发性骨髓瘤,例如对使用本文描述的MEK或ERK抑制剂

的治疗应答不佳、无应答或难治的多发性骨髓瘤。所述多发性骨髓瘤可能先前被认为不适合使用Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂治疗,例如先前被认为不适合使用MEK或ERK抑制剂治疗的多发性骨髓瘤。在某些情况下,所述多发性骨髓瘤可能最初对使用Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂的治疗有应答,但对Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂产生抗性。例如,所述多发性骨髓瘤可能最初对使用本文描述的MEK或ERK抑制剂的治疗有应答,但对MEK或ERK抑制剂产生抗性。

[0161] 在另一个方面,用于治疗的多发性骨髓瘤是本文描述的具有Ras-Raf-MEK-ERK途径失调和/或Ras(诸如KRAS、NRAS和/或HRAS)或Raf基因(诸如ARAF、BRAF和/或CRAF)中的突变的多发性骨髓瘤。

[0162] 在另一个实施方案中,所述多发性骨髓瘤是其中Ras-Raf-MEK-ERK途径响应于本文描述的抗-GREM1拮抗剂治疗/暴露而失调的多发性骨髓瘤。具体而言,所述多发性骨髓瘤可以是其中在用抗-GREM1拮抗剂治疗后Ras-Raf-MEK-ERK信号传导被诱导/上调的多发性骨髓瘤。在没有抗-GREM1拮抗剂治疗存在下,这样的多发性骨髓瘤可能不会显示Ras-Raf-MEK-ERK途径失调。换言之,在用本文描述的抗-GREM1拮抗剂治疗之前,所述多发性骨髓瘤可能表现出相对于参考样品或参考值而言正常的Ras-Raf-MEK-ERK途径信号传导。

[0163] 乳腺癌

[0164] 本发明在另一个方面涉及乳腺癌的治疗或预防。所述乳腺癌可以是浸润性乳腺癌,诸如浸润性小叶乳腺癌。所述乳腺癌可以是三阴性乳腺癌。所述乳腺癌可以是炎症性乳腺癌。所述乳腺癌可以是乳腺的血管肉瘤。所述乳腺癌可以是原位导管癌或原位小叶癌。

[0165] 本发明提供了通过施用与Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂组合的抗-GREM1拮抗剂来治疗和预防乳腺癌。所述乳腺癌可以包含间质GREM1过表达。过表达GREM1的间质乳腺细胞可以包含间质成纤维细胞,在本文中也描述为癌症相关的成纤维细胞。所述乳腺癌也可以是复发性乳腺癌。换言之,要通过本发明的方法治疗的乳腺癌包括在早期治疗(诸如化学疗法、放射疗法或治愈性外科手术)数月以后或甚至数年以后复发的乳腺癌。用于治疗的一种优选的乳腺癌类型可能对如下文进一步描述的一种或多种已知的抗癌剂(诸如化学治疗剂)具有抗性。所述乳腺癌可以是弥散性乳腺癌。所述乳腺癌可以是转移性乳腺癌。所述乳腺癌可以是肺的转移性乳腺癌。所述乳腺癌可以是肝的转移性乳腺癌。所述乳腺癌可以是骨的转移性乳腺癌。

[0166] 在某些方面,所述乳腺癌可以是对使用Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂的治疗有应答的乳腺癌,例如对使用本文描述的MEK或ERK抑制剂的治疗有应答的乳腺癌。所述乳腺癌供选择地可以是对使用Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂的治疗应答不佳、无应答或难治的乳腺癌,例如对使用本文描述的MEK或ERK抑制剂的治疗应答不佳、无应答或难治的乳腺癌。所述乳腺癌可能先前被认为不适合使用Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂治疗,例如先前被认为不适合使用本文描述的MEK或ERK抑制剂治疗的乳腺癌。在某些情况下,所述乳腺癌可能最初对使用Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂的治疗有应答,但对Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂产生抗性。例如,所述乳腺癌可能最初对使用本文描述的MEK或ERK抑制剂的治疗有应答,但对MEK或ERK抑制剂产生抗性。

[0167] 在另一个实施方案中,所述乳腺癌是其中Ras-Raf-MEK-ERK途径响应于本文描述的抗-GREM1拮抗剂治疗/暴露而失调的乳腺癌。具体而言,所述乳腺癌可以是其中在用抗-

GREM1拮抗剂治疗后Ras-Raf-MEK-ERK信号传导被诱导/上调的乳腺癌。在没有抗-GREM1拮抗剂治疗存在下,这样的乳腺癌可能不会显示Ras-Raf-MEK-ERK途径失调。换言之,在用本文描述的抗-GREM1拮抗剂治疗之前,所述乳腺癌可能表现出相对于参考样品或参考值而言正常的Ras-Raf-MEK-ERK途径信号传导。

[0168] 前列腺癌

[0169] 在另一个方面,本发明涉及前列腺癌的治疗或预防。所述前列腺癌可以是前列腺腺癌。所述前列腺癌可以是已经扩散至前列腺的移行细胞癌或泌尿道上皮癌。

[0170] 所述前列腺癌可以是特征为具有GREM1的过表达的前列腺癌。所述前列腺癌也可以是复发性前列腺癌。换言之,要通过本发明的方法治疗的前列腺癌包括在早期治疗(诸如化学疗法、放射疗法或治愈性外科手术)数月以后或甚至数年以后复发的前列腺癌。用于治疗的一种优选的前列腺癌类型可能对如下文进一步描述的一种或多种已知的抗癌剂(诸如化学治疗剂)具有抗性。

[0171] 本发明进一步提供了通过施用与Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂组合的抗-GREM1拮抗剂来治疗和预防前列腺癌。所述前列腺癌可以是弥散性前列腺癌。所述前列腺癌可以是转移性前列腺癌。所述前列腺癌可以是肺的转移性前列腺癌。所述前列腺癌可以是肝的转移性前列腺癌。所述前列腺癌可以是骨的转移性前列腺癌。

[0172] 在某些方面,所述前列腺癌可以是对使用Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂的治疗有应答的前列腺癌,例如对使用本文描述的MEK或ERK抑制剂的治疗有应答的前列腺癌。所述前列腺癌供选择地可以是对使用Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂的治疗应答不佳、无应答或难治的前列腺癌,例如对使用本文描述的MEK或ERK抑制剂的治疗应答不佳、无应答或难治的前列腺癌。所述前列腺癌可能先前被认为不适合使用Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂治疗,例如先前被认为不适合使用本文描述的MEK或ERK抑制剂治疗的前列腺癌。在某些情况下,所述前列腺癌可能最初对使用Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂的治疗有应答,但对Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂产生抗性。例如,所述前列腺癌可能最初对使用本文描述的MEK或ERK抑制剂的治疗有应答,但对MEK或ERK抑制剂产生抗性。

[0173] 在另一个实施方案中,所述前列腺癌是其中Ras-Raf-MEK-ERK途径响应于本文描述的抗-GREM1拮抗剂治疗/暴露而失调的前列腺癌。具体而言,所述前列腺癌可以是其中在用抗-GREM1拮抗剂治疗后Ras-Raf-MEK-ERK信号传导被诱导/上调的前列腺癌。在没有抗-GREM1拮抗剂治疗存在下,这样的前列腺癌可能不会显示Ras-Raf-MEK-ERK途径失调。换言之,在用本文描述的抗-GREM1拮抗剂治疗之前,所述前列腺癌可能表现出相对于参考样品或参考值而言正常的Ras-Raf-MEK-ERK途径信号传导。

[0174] 膀胱癌

[0175] 在另一个方面,本发明涉及膀胱癌的治疗或预防。所述膀胱癌可以是移行细胞(泌尿道上皮)膀胱癌。所述膀胱癌可能起源于膀胱的上皮衬里。所述膀胱癌可以是非肌层浸润性膀胱癌。所述膀胱癌可以是鳞状细胞膀胱癌。所述膀胱癌可以是腺癌。所述膀胱癌可以是膀胱衬里生长到固有层中的高等级T1肿瘤。所述膀胱癌可以是浅表性癌症或浸润性膀胱癌。所述膀胱癌可以是复发性膀胱癌。本文中使用的术语复发性膀胱癌表示在治疗(诸如外科手术治疗)后复发的膀胱癌。

[0176] 本发明进一步提供了通过施用与Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂组合的抗-

GREM1拮抗剂来治疗和预防膀胱癌。所述膀胱癌可以是弥散性膀胱癌。所述膀胱癌可以是转移性膀胱癌。所述膀胱癌可以是肺的转移性膀胱癌。所述膀胱癌可以是肝的转移性膀胱癌。所述膀胱癌可以是骨的转移性膀胱癌。所述膀胱癌可以是特征为具有GREM1的过表达的膀胱癌。所述膀胱癌也可以是复发性膀胱癌。换言之,要通过本发明的方法治疗的膀胱癌包括在早期治疗(诸如化学疗法、放射疗法或治愈性外科手术)数月以后或甚至数年以后复发的膀胱癌。用于治疗的一种优选的膀胱癌类型可能对如下文进一步描述的一种或多种已知的抗癌剂(诸如化学治疗剂)具有抗性。

[0177] 在某些方面,所述膀胱癌可以是对使用Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂的治疗有应答的膀胱癌,例如对使用本文描述的MEK或ERK抑制剂的治疗有应答的膀胱癌。所述膀胱癌供选择地可以是对使用Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂的治疗应答不佳、无应答或难治的膀胱癌,例如,对使用MEK或ERK抑制剂的治疗应答不佳、无应答或难治的膀胱癌。所述膀胱癌可能先前被认为不适合使用Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂治疗,例如先前被认为不适合使用本文描述的MEK或ERK抑制剂治疗的膀胱癌。在某些情况下,所述膀胱癌可能最初对使用Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂的治疗有应答,但对Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂产生抗性。例如,所述膀胱癌可能最初对使用本文描述的MEK或ERK抑制剂的治疗有应答,但对MEK或ERK抑制剂产生抗性。

[0178] 在另一个实施方案中,所述膀胱癌是其中Ras-Raf-MEK-ERK途径响应于本文描述的抗-GREM1拮抗剂治疗/暴露而失调的膀胱癌。具体而言,所述膀胱癌可以是其中在用抗-GREM1拮抗剂治疗后Ras-Raf-MEK-ERK信号传导被诱导/上调的膀胱癌。在没有抗-GREM1拮抗剂治疗存在下,这样的膀胱癌可能不会显示Ras-Raf-MEK-ERK途径失调。换言之,在用本文描述的抗-GREM1拮抗剂治疗之前,所述膀胱癌可能表现出相对于参考样品或参考值而言正常的Ras-Raf-MEK-ERK途径信号传导。

[0179] 卵巢癌

[0180] 在另一个方面,本发明涉及卵巢癌的治疗或预防。所述卵巢癌可以是上皮卵巢癌、生殖细胞卵巢癌或性索间质卵巢癌。所述卵巢癌可以是原发性腹膜癌。所述卵巢癌可以是输卵管癌。所述卵巢癌可以特征在于边缘卵巢肿瘤。所述卵巢癌可以特征在于生殖细胞卵巢肿瘤。所述卵巢癌可以是透明细胞卵巢癌。所述癌症可以是浆液性卵巢癌。所述卵巢癌可以是粘液卵巢癌。所述卵巢癌可以是子宫内膜样癌。

[0181] 所述卵巢癌可以是特征为具有GREM1的过表达的卵巢癌。所述卵巢癌也可以是复发性卵巢癌。换言之,要通过本发明的方法治疗的卵巢癌包括在早期治疗(诸如化学疗法、放射疗法或治愈性外科手术)数月以后或甚至数年以后复发的卵巢癌。用于治疗的一种优选的卵巢癌类型可能对如下文进一步描述的一种或多种已知的抗癌剂(诸如化学治疗剂)具有抗性。

[0182] 本发明进一步提供了通过施用与Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂组合的抗-GREM1拮抗剂来治疗和预防卵巢癌。所述卵巢癌可以是弥散性卵巢癌。所述卵巢癌可以是转移性卵巢癌。所述卵巢癌可以是肺的转移性卵巢癌。所述卵巢癌可以是肝的转移性卵巢癌。所述卵巢癌可以是骨的转移性卵巢癌。

[0183] 在某些方面,所述卵巢癌可以是对使用Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂的治疗有应答的卵巢癌,例如对使用本文描述的MEK或ERK抑制剂的治疗有应答的卵巢癌。所述卵

巢癌可以供选择地是对使用Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂的治疗应答不佳、无应答或难治的卵巢癌,例如对使用本文描述的MEK或ERK抑制剂的治疗应答不佳、无应答或难治的卵巢癌。所述卵巢癌可能先前被认为不适合使用Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂治疗,例如先前被认为不适合使用本文描述的MEK或ERK抑制剂治疗的卵巢癌。在某些情况下,所述卵巢癌可能最初对使用Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂的治疗有应答,但对Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂产生抗性。例如,所述卵巢癌可能最初对使用本文描述的MEK或ERK抑制剂的治疗有应答,但对MEK或ERK抑制剂产生抗性。

[0184] 在另一个实施方案中,所述卵巢癌是其中Ras-Raf-MEK-ERK途径响应于本文描述的抗-GREM1拮抗剂治疗/暴露而失调的卵巢癌。具体而言,所述卵巢癌可以是其中在用抗-GREM1拮抗剂治疗后Ras-Raf-MEK-ERK信号传导被诱导/上调的卵巢癌。在没有抗-GREM1拮抗剂治疗存在下,这样的卵巢癌可能不会显示Ras-Raf-MEK-ERK途径失调。换言之,在用本文描述的抗-GREM1拮抗剂治疗之前,所述卵巢癌可能表现出相对于参考样品或参考值而言正常的Ras-Raf-MEK-ERK途径信号传导。

[0185] 间质和上皮

[0186] 本文描述的使用GREM1拮抗剂与MAPK/ERK信号传导抑制剂的组合预防或治疗的癌症可以包含间质和/或上皮GREM1过表达。

[0187] 本文中使用的术语“间质细胞”或“间质”表示组织或器官的结构和/或连接部分。

[0188] 间质组织主要由含有结缔组织细胞的细胞外基质构成。细胞外基质主要由基质(一种多孔的水合凝胶,主要由蛋白多糖聚集体制成)和结缔组织纤维组成。在间质中常见三种类型的纤维:胶原I型纤维、弹性纤维和网状(胶原III型)纤维。成纤维细胞和周细胞属于最常见的间质细胞类型。

[0189] 在癌症或肿瘤(例如在组织或器官的上皮中起始)的背景下,组织或器官的间质可以辅助癌症生长和进展。与癌症或肿瘤相关的间质可以由在癌症或肿瘤周围的纤维或结缔组织的生长引起的促结缔组织增生性间质。

[0190] 在间质的任何部分/任何间质细胞中都可以观察到GREM1的过表达。所述间质细胞可以是成纤维细胞或成纤维细胞样支持细胞。所述间质细胞可以是上述任何癌症或肿瘤的促结缔组织增生性间质(诸如从结肠直肠癌中的胰腺、结肠或直肠,或多发性骨髓瘤中的骨髓)中分离的成纤维细胞或成纤维细胞样支持细胞。所述间质细胞可以是癌症相关的成纤维细胞。

[0191] 本文中使用的术语“上皮”表示源自组织或器官的外层或内层衬里的细胞。就结肠而言,肠上皮是形成胃肠道的小肠和大肠的腔表面或衬里的细胞层。它由简单的柱状上皮组成。“上屏障”是由四种肠上皮细胞类型组成的肠上皮单层柱状细胞:吸收性肠细胞、杯状细胞、潘氏细胞和肠内分泌细胞。上屏障特征在小肠和大肠中是相似的。主要区别是在十二指肠、空肠和回肠中存在的隆起和突起(环状褶皱、绒毛和微绒毛),其允许增加吸收表面。这在结肠中没有观察到,相反结肠显示平坦的表面。在被称为绒毛的粘膜突起中,存在称为Lieberkühn隐窝的弯曲,它们是明显的腺状内陷。在其中观察到上皮GREM1过表达的细胞可以是任何上皮细胞,诸如任何肠上皮细胞。

[0192] 虽然不受理论约束,但本发明的发明人推测,GREM1在上皮和/或间质中的过表达可能促进干细胞/祖细胞表型(增加干细胞/祖细胞的数目)、促进上皮干细胞行为并推动癌

症进展和/或对化学治疗剂的抗性。因此,根据本发明使用的包含GREM1拮抗剂和Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂的组合疗法可以预防异常癌症干细胞/祖细胞表型的诱导、减少上皮干细胞行为和/或减少其中要预防或治疗癌症的受试者的组织或器官的上皮中的干细胞/祖细胞的数目。通过评估已知的上皮和癌症干细胞标志物,可以在临床上测定GREM1拮抗剂的影响干细胞行为的能力。

[0193] 可以通过任何方式确定间质和/或上皮中GREM1的过表达。通常通过与相同组织类型的正常细胞中的标志物水平(即基础表达水平)进行对比来确定GREM1的过表达。所述表达通常相对于其它基因的表达水平进行归一化,优选地包含一个或多个管家基因。GREM1也可以被归类为在癌症患者群体的阈值百分比中表现出过表达或表达不足。群体中每个患者的过表达可以比几何平均值高2。群体中至少10%、更优选地至少15%或更多的患者可能表现出这样的过表达。

[0194] GREM1间质过表达表示高于匹配的正常组织的水平的间质GREM1水平。例如,间质GREM1水平可以是匹配的正常组织的水平的至少两倍。

[0195] 在GREM1被过表达的情况下,其量可以相对于基础量增加任意量。例如,GREM1引发的癌症诸如HMPs可以包含上皮GREM1的数千倍上调,而在正常上皮中未观察到GREM1表达。包含间质GREM1过表达的散发性癌症可以包含超过器官正常间质中的生理性GREM1表达水平的任何水平的间质过表达。技术人员能够评价与相同类型的正常细胞中的GREM1的水平相比过表达在间质或上皮中的存在。

[0196] 所确定的量可以是mRNA的量。因此,所述癌症可以包含GREM1 mRNA的过表达。与相同组织类型的正常细胞相比,所述癌症可以包含增加的GREM1 mRNA的量。所述mRNA可以增加任意量。使用定量反转录聚合酶链式反应(qRT-PCR)诸如实时qRT-PCR、定量基因测定(Affymetrix/Thermo Fisher)、通过RNA印迹法或使用微阵列、RNA测序,可以测量mRNA的量。优选地通过将样品的基因表达与由该基因二倍体的肿瘤组成的参考样品中的特定基因的表达水平分布进行对比来确定mRNA表达。使用RNAseq通过期望最大化(RSEM)算法(cBioportal for Cancer Genomics, www.cbioportal.org; Gao等人, 2013和Serami等人 2012),可以得出z-评分。优选地将比参考集的平均值高或低2个标准差的z-评分分别视为过表达或表达不足。

[0197] 所测定的量可以是蛋白的量。所述癌症可以包含GREM1蛋白的过表达,诸如与相同组织类型的正常细胞相比。所述蛋白可以增加任意量。使用免疫组织化学、蛋白质印迹法、质谱法或荧光激活细胞分选术(FACS),包括通过使用本发明的抗-GREM1抗体,可以测量蛋白的量。用于确定表达的阈值可以因所用技术而异,并且可以根据免疫组织化学评分进行验证。

[0198] 因此,如本文描述的与Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂组合的GREM1拮抗剂用于治疗或预防患者的癌症的用途可以包括(a)测量癌症中的GREM1的量,和(b)如果所述癌症包含GREM1的过表达,则向所述患者施用与Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂组合的GREM1拮抗剂,并从而治疗或预防所述癌症。GREM1的量可以是mRNA或蛋白的量,并且所述过表达可以是上面讨论的任何过表达。

[0199] 可以在来自患者的任何合适样品中进行上述测量。可以在从患者获取的癌症或肿瘤活检样品中进行所述测量。可以从活检样品分离间质和/或上皮(间质细胞和/或上皮细

胞)。所述活检组织可以是福尔马林固定的石蜡包埋的 (FFPE) 组织或新鲜组织。所述组织可以是胰腺组织、膀胱组织、肺组织、子宫内膜组织、乳腺组织、胃组织、十二指肠组织、食道组织、骨髓或结肠直肠组织。可以在癌症活检样品上进行上面讨论的方法中的任一种。也可以对在患者血液中循环的癌细胞进行这样的方法。可以在尿液或血液外泌体上进行所述RNA方法。

[0200] 与Ras-Raf-MEK-ERK信号传导途径失调相关的癌症

[0201] 如上面所指出的, 发明人已经证实, 在暴露于根据本发明的抗-GREM1拮抗剂 (Ab7326) 后, 在KPC小鼠模型中的KRAS信号传导被上调。此外, 在KPC小鼠模型中, 在暴露于Ab7326后, 参与Ras-Raf-MEK-ERK途径的基因 (诸如Mapk1、Nras和Myc) 被上调。因此, 靶向Gremlin-1和Ras-Raf-MEK-ERK途径的组合疗法将是有利的。

[0202] 本发明涵盖与Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂组合的抗-GREM1拮抗剂用于治疗或预防与Ras-Raf-MEK-ERK途径失调相关的癌症和/或含有Ras或Raf基因突变的癌症的用途。所述Ras基因可以是例如KRAS、NRAS和/或HRAS。所述Raf基因可以是例如ARAF、BRAF和/或CRAF。与MAPK/ERK途径失调相关的癌症和/或含有Ras或Raf基因突变的癌症可以包括例如结肠直肠癌、多发性骨髓瘤、胰腺癌、膀胱癌、乳腺癌、肺癌、胃癌、卵巢癌、十二指肠癌、食道癌、头颈癌、前列腺癌、神经胶质瘤、子宫内膜癌、肝癌、脾癌、骨驻留癌和骨肉瘤。

[0203] 本发明还包括包含本文定义的抗-GREM1拮抗剂和Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂的组合疗法, 其用于治疗或预防其中在使用抗-GREM1拮抗剂的早期暴露/治疗后Ras-Raf-MEK-ERK途径发生失调的癌症。具体而言, 所述癌症可以是其中在用本文描述的抗-GREM1拮抗剂治疗后Ras-Raf-MEK-ERK途径信号传导被诱导/上调的癌症。在没有抗-GREM1拮抗剂治疗存在下, 这样的癌症可能不会显示Ras-Raf-MEK-ERK途径失调。换言之, 在用本文描述的抗-GREM1拮抗剂治疗之前, 所述癌症可能表现出相对于参考样品或参考值而言正常的Ras-Raf-MEK-ERK途径信号传导。

[0204] 在一个优选的实施方案中, 本发明涉及胰腺癌的治疗或预防。例如, 本发明涵盖包含本文定义的抗-GREM1拮抗剂和Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂的组合疗法, 其用于治疗或预防其中在使用抗-GREM1拮抗剂的早期暴露/治疗后Ras-Raf-MEK-ERK途径发生失调的胰腺癌。供选择地或额外地, 所述胰腺癌可以以经典MAPK途径的组成性活化为特征。在许多情况下, 胰腺癌涉及KRAS (其编码RAS) 中的功能获得性突变。典型的功能获得性突变包括G12D或G12R置换, 并且见于胰腺导管腺癌中。在其它情况下, 胰腺癌涉及BRAF (其编码B-RAF) 中的功能获得性突变。一种典型的功能获得性突变见于位置V600E, 从而导致RAF的组成性激酶活性。

[0205] 如上面所指出的, 本发明还可以涉及KRAS/BRAF突变的结肠直肠癌的治疗或预防。在另一个方面, 本发明涉及BRAF突变的黑素瘤, 诸如带有BRAF中的V600E突变的黑素瘤。

[0206] GREM1

[0207] 在本发明中在蛋白的上下文中使用的术语GREM1或Gremlin-1表示通常具有如UniProt条目060565 (SEQ ID NO:1) 中所示的氨基酸序列的蛋白, 即人GREM1。术语GREM1和Gremlin-1还可以表示Gremlin-1多肽, 其:

[0208] (a) 包含具有或没有N-端信号肽的SEQ ID NO:1的氨基酸序列或由其组成, 即可以包含如在SEQ ID NO:21中所示的成熟肽序列或由其组成; 或

[0209] (b) 是一种衍生物,其相对于具有或没有N-端信号肽的SEQ ID NO:1的氨基酸序列(如在SEQ ID NO:21中所示)具有一个或多个氨基酸置换、修饰、缺失或插入,其保留Gremlin-1的活性,诸如SEQ ID NO:20的氨基酸序列。

[0210] (c) 其变体,这样的变体通常与SEQ ID NO:1(或SEQ ID NO:20或21)具有至少约60%、70%、80%、90%、91%、92%、93%、94%或95%同一性(或甚至约96%、97%、98%或99%同一性)。换言之,这样的变体可以与SEQ ID NO:1具有约60%至约99%同一性,适当地与SEQ ID NO:1具有约80%至约99%同一性,更适当地与SEQ ID NO:1具有约90%至约99%同一性,且最适当地与SEQ ID NO:1具有约95%至约99%同一性。在下面进一步描述变体。

[0211] 如在下面进一步讨论的,通常基于SEQ ID NO:1的序列引用残基编号。但是,技术人员可以容易地将残基编号外推至如上面讨论的衍生物或变体序列。在引用残基编号的情况下,本发明还包括在变体或衍生物序列上的这些残基。

[0212] GREM1或Gremlin-1核酸序列可以包含SEQ ID NO:36或SEQ ID NO:37的序列或其变体或由它们组成。在下面进一步描述变体核酸序列。GREM1或Gremlin-1核酸序列可以包含任何GREM1转录物变体或由其组成。GREM1转录物变体的实例是转录物1(NCBI:NM_013372.6;ENSEMBL:ENST00000560677.5);转录物2:NCBI:NM_001191323.1;ENSEMBL:ENST00000560830.1);转录物3:NCBI:NM_001191322.1;ENSEMBL:ENST00000622074.1。截至2018年6月18日在上述登录号下可得到的序列通过引用并入本文。

[0213] 拮抗剂

[0214] 抗-GREM1拮抗剂是降低GREM1的功能或活性的任何分子。抗-GREM1拮抗剂可以任意程度地降低GREM1的功能或活性。抗-GREM1拮抗剂可以使GREM1功能或活性降低至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少95%,或可以阻止任何GREM1功能或活性。通过测量在存在和不存在抗-GREM1拮抗剂的情况下细胞中的GREM1功能或活性,可以确定抗-GREM1拮抗剂降低GREM1功能或活性的程度。所述细胞可以是正常细胞或癌细胞。所述细胞可以是如上所述的癌细胞。它们可以是胰腺癌细胞。所述胰腺癌细胞可以存在于如在实施例中所描述的KPC小鼠模型中。因此,可以在小鼠模型中进行胰腺癌的组合疗法中的GREM1拮抗剂活性的体内测定。更一般而言,显示通过任何方式降低GREM1的功能或活性的GREM1拮抗剂然后可以在体外或在体内测定其预防或减少癌细胞(诸如胰腺癌细胞)的增殖的能力,或预防、减少或消除癌症或肿瘤的能力。

[0215] 所述拮抗剂可以通过任何方式降低GREM1功能。它可能直接地或间接地增加或减少影响GREM1功能的任何分子的活性或量。它可能在mRNA或蛋白水平降低GREM1的量。它可能增加GREM1的降解。它可能通过抑制性修饰来降低GREM1的功能。它可能降低增强GREM1功能的分子的转录。它可能使用诸如锌指核酸酶等药剂破坏编码GREM1的DNA或增强GREM1功能的分子。

[0216] 所述拮抗剂可以是与Gremlin-1相互作用的药剂。与Gremlin-1相互作用的药剂通常是结合Gremlin-1的药剂。与Gremlin-1相互作用的药剂可以调节Gremlin-1。抑制性调节剂可以对Gremlin-1的任何功能产生影响,但通常降低Gremlin-1与BMP(BMP 2/4/7)的结合。所述拮抗剂可以是BMP-7模拟分子。Gremlin-1是BMP的负调节剂,因此减少的结合会增加通过BMP的信号传导。活化调节剂可以增加Gremlin-1与BMP的结合。

[0217] 通过本领域已知的任何方法可以检测BMP结合和信号传导。

[0218] 所述拮抗剂可以通过结合GREM1的活性位点而发挥作用,或者通过结合不同位点而发挥变构作用。所述拮抗剂可以通过结合GREM1的调节剂或配体而起作用,从而降低GREM1的活化。所述拮抗剂可以是可逆的或不可逆的。

[0219] GREM1拮抗剂可以是小分子抑制剂、肽、蛋白、抗体、多核苷酸、寡核苷酸、反义RNA、小干扰RNA(siRNA)或小发夹RNA(shRNA)。

[0220] GREM1的拮抗剂可以是与编码GREM1的mRNA或编码增强GREM1活性的分子的mRNA特异性地杂交的寡核苷酸。GREM1的拮抗剂可以是编码任何降低GREM1功能的分子的多核苷酸。例如,所述GREM1拮抗剂可以是编码本文描述的抗-GREM1抗体的多核苷酸。

[0221] GREM1的拮抗剂可以是特异性地结合任何靶分子(通常是蛋白)从而直接地或间接地降低GREM1功能的抗体。所述拮抗剂可以是特异性地结合GREM1的抗体。在这方面,所述抗体可以通过变构失活或通过阻断活性所需的其靶标与配体之间的相互作用来降低GREM1功能。

[0222] 通过本领域已知的任何适当方法,诸如通过x-射线晶体学确定的残基和拮抗剂之间的距离(通常小于**6Å**或小于**4Å**),可以确定拮抗剂与蛋白残基的相互作用。治疗剂可靶向的Gremlin-1区域可以包括氨基酸Asp92-Leu99、Arg116-His130、Ser137-Ser142、Cys176-Cys178。这些是在Gremlin-1的表面上发生突变的那些的**6Å**以内。

[0223] 抗体拮抗剂

[0224] 本文提及的术语“抗体”包括完整抗体及其任何抗原结合片段(即,“抗原结合部分”)或单链。抗体是指包含通过二硫键互连的至少两条重(H)链和两条轻(L)链的糖蛋白,或其抗原结合部分。每条重链由重链可变区(在本文中缩写为HCVR或V_H)和重链恒定区构成。每条轻链包含一条轻链可变区(在本文中缩写为LCVR或V_L)和一条轻链恒定区。重链和轻链的可变区含有与抗原相互作用的结合结构域。所述V_H和V_L区域可以进一步细分成被称作互补决定区(CDR)的高变异性区域,其散布有被称作框架区(FR)的更保守的区域。

[0225] 抗体的恒定区可以介导免疫球蛋白与宿主组织或因子的结合,所述宿主组织或因子包括免疫系统的各种细胞(例如,效应细胞)和经典补系统的第一种组分(C1q)。

[0226] 根据本发明使用的抗体可以是单克隆抗体或多克隆抗体,并且通常将是单克隆抗体。根据本发明使用的抗体可以是嵌合抗体、CDR-移植抗体、纳米抗体、人或人源化抗体或其中任一种的抗原结合部分。为了生产单克隆抗体和多克隆抗体,实验动物通常是非人哺乳动物诸如山羊、兔、大鼠或小鼠,但也可以在其它物种中产生所述抗体。

[0227] 通过常规方法,诸如用感兴趣的抗原免疫合适的动物,可以产生多克隆抗体。随后可以从动物取得血液并纯化IgG级分。

[0228] 当需要对动物进行免疫时,通过使用众所周知的和常规的方案(参见例如Handbook of Experimental Immunology,D.M.Weir(编),第4卷,Blackwell Scientific Publishers,Oxford,England,1986)将多肽施用给动物(例如非人动物),可以获得针对Gremlin-1的抗体。许多温血动物,诸如兔、小鼠、大鼠、绵羊、牛、骆驼或猪都可以进行免疫。但是,小鼠、兔、猪和大鼠通常是最合适的。

[0229] 通过本领域已知的任何方法诸如杂交瘤技术(Kohler和Milstein,1975,Nature,256:495-497)、三源杂交瘤(trioma)技术、人B-细胞杂交瘤技术(Kozbor等人,1983,

Immunology Today, 4:72) 和 EBV-杂交瘤技术 (Cole 等人, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, 第 77-96 页, Alan R Liss, Inc., 1985), 可以制备单克隆抗体。

[0230] 使用单淋巴细胞抗体方法, 通过克隆和表达由选择用于产生特异性抗体的单个淋巴细胞产生的免疫球蛋白可变区 cDNA, 例如通过 Babcock, J. 等人, 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93 (15): 7843-7848, WO 92/02551、WO 2004/051268 和 WO 2004/106377 描述的方法, 也可以产生根据本发明使用的抗体。

[0231] 使用本领域已知的各种噬菌体展示方法, 并且包括在以下文献中公开的那些, 也可以产生所述抗体: Brinkman 等人 (J. Immunol. Methods, 1995, 182: 41-50), Ames 等人 (J. Immunol. Methods, 1995, 184: 177-186), Kettleborough 等人 (Eur. J. Immunol. 1994, 24: 952-958), Persic 等人 (Gene, 1997 187 9-18), Burton 等人 (Advances in Immunology, 1994, 57: 191-280) 和 WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO 93/11236; WO 95/15982; WO 95/20401; 和 US 5,698,426; 5,223,409; 5,403,484; 5,580,717; 5,427,908; 5,750,753; 5,821,047; 5,571,698; 5,427,908; 5,516,637; 5,780,225; 5,658,727; 5,733,743 和 5,969,108。

[0232] 全人抗体是这样的抗体: 其中重链和轻链的可变区和恒定区 (如果存在的话) 全部来自人源, 或与人源序列基本上相同, 但不一定来自相同抗体。全人抗体的实例可以包括例如通过上述噬菌体展示方法产生的抗体和由小鼠产生的抗体, 其中鼠免疫球蛋白可变区和任选的恒定区基因已经被它们的人对应物替代, 例如, 如在 EP 0546073、US 5,545,806、US 5,569,825、US 5,625,126、US 5,633,425、US 5,661,016、US 5,770,429、EP 0438474 和 EP 0463151 中概括描述的。

[0233] 供选择地, 根据本发明使用的抗体可以通过包括以下步骤的方法产生: 用 Gremlin-1 免疫原免疫非人哺乳动物; 从所述哺乳动物获得抗体制品; 从其衍生出识别 Gremlin-1 的单克隆抗体。

[0234] 根据本发明使用的抗体分子可以包含具有全长重链和轻链的完整抗体分子或其片段或抗原结合部分。术语抗体的“抗原结合部分”表示抗体的保留选择性地结合抗原的能力的一个或多个片段。已经证实, 抗体的抗原结合功能可以由全长抗体的片段执行。抗体及其片段和抗原结合部分可以是但不限于 Fab、修饰的 Fab、Fab'、修饰的 Fab'、F(ab')₂、Fv、单结构域抗体 (例如 VH 或 VL 或 VHH)、scFv、二价、三价或四价抗体、Bis-scFv、双体 (diabody)、三体 (triabody)、四体 (tetrabody) 以及上述任一种的表位结合片段 (参见例如 Holliger 和 Hudson, 2005, Nature Biotech. 23 (9): 1126-1136; Adair 和 Lawson, 2005, Drug Design Reviews-在线 2 (3), 209-217)。用于创建和制造这些抗体片段的方法是本领域众所周知的 (参见例如 Verma 等人, 1998, Journal of Immunological Methods, 216, 165-181)。用于用在本发明中的其它抗体片段包括在国际专利申请 WO 2005/003169、WO 2005/003170 和 WO 2005/003171 中描述的 Fab 和 Fab' 片段以及在国际专利申请 WO 2009/040562 中描述的 Fab-dAb 片段。多价抗体可以包含多种特异性, 或者可以是单特异性的 (参见例如 WO 92/22853 和 WO 05/113605)。这些抗体片段可以使用本领域技术人员已知的常规技术获得, 并且可以筛选所述片段以与完整抗体相同的方式使用。

[0235] 如果存在的话, 则可以考虑到抗体分子的预期功能和特别是可能需要的效应功能来选择抗体分子的恒定区结构域。例如, 所述恒定区结构域可以是人 IgA、IgD、IgE、IgG 或

IgM结构域。具体而言,当抗体分子意图用于治疗用途并且需要抗体效应功能时,可以使用人IgG恒定区结构域,尤其是IgG1和IgG3同种型的恒定区结构域。供选择地,当抗体分子意图用于治疗目的并且不需要抗体效应功能时,可以使用IgG2和IgG4同种型。

[0236] 根据本发明使用的抗体可以通过重组方式制备、表达、建立或分离,例如(a)从感兴趣的免疫球蛋白基因的转基因或转染色体的动物(例如小鼠)或由其制备的杂交瘤中分离的抗体,(b)从被转化以表达感兴趣的抗体的宿主细胞(例如,从转染瘤)中分离的抗体,(c)从重组组合抗体文库中分离的抗体,和(d)通过任何其它涉及将免疫球蛋白基因序列剪接至其它DNA序列的方式制备、表达、建立或分离的抗体。

[0237] 根据本发明使用的抗体可以是人抗体或人源化抗体。本文中使用的术语“人抗体”意图包括具有可变区的抗体,其中框架区和CDR区都源自人种系免疫球蛋白序列。此外,如果抗体含有恒定区,那么所述恒定区也源自人种系免疫球蛋白序列。本文描述的人抗体可以包括不由人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基(例如,通过随机的或位点特异性的体外诱变或通过体内体细胞突变而引入的突变)。但是,本文中使用的术语“人抗体”无意包括这样的抗体:其中来源于另一哺乳动物物种(诸如小鼠)的种系的CDR序列已经移植至人框架序列上。

[0238] 这样的人抗体可以是人单克隆抗体。这样的人单克隆抗体可以由杂交瘤产生,所述杂交瘤包括从转基因非人动物(例如,转基因小鼠)获得的B细胞,所述转基因非人动物具有与永生化细胞融合的包含人重链转基因和轻链转基因的基因组。

[0239] 通过体外免疫人淋巴细胞,然后用爱泼斯坦-巴尔(EB)病毒转化淋巴细胞,可以制备人抗体。

[0240] 术语“人抗体衍生物”表示人抗体的任何修饰形式,例如,抗体与另一种药剂或抗体的缀合物。

[0241] 术语“人源化抗体”意图表示CDR-移植抗体分子,其中来源于另一哺乳动物物种(诸如小鼠)的种系的CDR序列已经移植至人框架序列上。可以在人框架序列内进行额外的框架区修饰。

[0242] 本文中使用的术语“CDR-移植抗体分子”表示这样的抗体分子:其中所述重链和/或轻链含有一个或多个来自供体抗体(例如鼠或大鼠单克隆抗体)的CDR(如果需要的话,包括一个或多个修饰的CDR),所述CDR被移植到受体抗体(例如人抗体)的重链和/或轻链可变区框架中。关于综述,参见Vaughan等人,Nature Biotechnology,16,535-539,1998。在一个实施方案中,不是整个CDR被转移,而是只有来自上述任何一个CDR的一个或多个特异性决定残基被转移至人抗体框架(参见例如,Kashmiri等人,2005,Methods,36,25-34)。在一个实施方案中,仅将来自上文描述的一个或多个CDR的特异性决定残基转移至人抗体框架。在另一个实施方案中,只有来自上述每个CDR的特异性决定残基被转移至人抗体框架。

[0243] 当移植CDR或特异性决定残基时,考虑到CDR所来源的供体抗体的类别/类型,包括小鼠、灵长类动物和人框架区,可以使用任何适当的受体可变区框架序列。适当地,根据本发明的CDR-移植抗体具有可变结构域,其包含人受体框架区以及一个或多个上述CDR或特异性决定残基。因此,在一个实施方案中提供了一种中和CDR-移植抗体,其中所述可变结构域包含人受体框架区和非人供体CDR。

[0244] 可以用在本发明中的人框架的实例是KOL、NEWM、REI、EU、TUR、TEI、LAY和POM

(Kabat等人,出处同上)。例如,KOL和NEWM可以用于重链,REI可以用于轻链,而EU、LAY和POM可以用于重链和轻链。供选择地,可以使用人种系序列;这些序列可在例如<http://www.vbase2.org/>(参见Retter等人,Nucl.Acids Res. (2005) 33(增刊1),D671-D674)得到。

[0245] 在本文描述的CDR-移植抗体中,受体重链和轻链不一定需要源自相同抗体,并且如果需要的话,可以包含具有源自不同链的框架区的复合链。

[0246] 此外,在本文描述的CDR-移植抗体中,框架区不需要具有与受体抗体完全相同的序列。例如,对于该受体链类别或类型,不常见残基可以被改变为更常出现的残基。供选择地,可以改变受体框架区中的选定残基,使得它们对应于在供体抗体中的相同位置处发现的残基(参见Reichmann等人,1998,Nature,332,323-324)。这样的变化应当保持在最低限度以恢复供体抗体的亲和力。在WO 91/09967中提出了一种用于选择在受体框架区中可能需要改变的残基的方案。

[0247] 本领域技术人员还应当理解,抗体可以经历多种翻译后修饰。这些修饰的类型和程度通常取决于用于表达抗体的宿主细胞系以及培养条件。这样的修饰可以包括糖基化、甲硫氨酸氧化、二酮哌嗪形成、天冬氨酸异构化和天冬酰胺脱酰胺化中的变化。一种常见的修饰是由于羧肽酶的作用而导致的羧基端碱性残基(诸如赖氨酸或精氨酸)的丢失(如在Harris,RJ.Journal of Chromatography 705:129-134,1995中所述)。

[0248] 在一个实施方案中,所述抗体重链包含CH1结构域,并且所述抗体轻链包含CL结构域(κ 或 λ)。

[0249] 生物分子(诸如抗体或片段)含有酸性和/或碱性官能团,从而赋予分子净正电荷或负电荷。总体上“观察到的”电荷的量将取决于实体的绝对氨基酸序列、在三维结构中带电基团的局部环境以及分子的环境条件。等电点(pI)是特定分子或表面不带净电荷的pH。在一个实施方案中,根据本公开内容的抗体或片段具有至少7的等电点(pI)。在一个实施方案中,所述抗体或片段具有至少8的等电点,诸如8.5、8.6、8.7、8.8或9。在一个实施方案中,所述抗体的pI是8。可以使用程序诸如**ExpASY http://www.expasy.ch/tools/pi_tool.html(参见Walker,The Proteomics Protocols Handbook,Humana Press (2005),571-607)来预测抗体或片段的等电点。

[0250] 为了表征优选的Gremlin-1表位,发明人已经结晶单独的人Gremlin-1以及其与被称为Ab 7326的抗体(Fab片段)的复合物。Gremlin-1的结晶使得BMP结合位点中的推定残基能够被确定。此外,通过与变构抑制性抗体Ab 7326一起结晶,可以确定抗体表位中的残基。与该表位结合的抗体具有作为治疗剂治疗与Gremlin-1相关的疾病的特殊潜力。

[0251] 已经确定本文描述的优选Ab 7326抗体会结合Gremlin-1的以下残基:Ile110(131)、Lys126(147)、Lys127(148)、Phe128(149)、Thr129(150)、Thr130(151)、Arg148(169)、Lys153(174)和Gln154(175),其中Lys126(147)、Lys127(148)、Phe128(149)、Thr129(150)、Thr130(151)、Arg148(169)、Lys153(174)和Gln154(175)存在于一个Gremlin-1单体上,并且Ile110(131)存在于第二个Gremlin-1单体上。在括号外的编号是基于结构文件(并且其基于结构比对与小鼠Gremlin-2的编号匹配)。在括号中的数字代表基于SEQ ID NO:1的UniProt条目060565的残基。使用NCONT分析在距离Gremlin-1-Ab7326Fab复合物4Å处确定出这些表位残基。

[0252] 因此,本文描述的抗体可以结合包含至少一个选自Ile131、Lys147、Lys148、

Phe149、Thr150、Thr151、Arg169、Lys174和Gln175(残基编号是基于SEQ ID NO:1)的残基的表位。本文描述的抗体可以结合包含这些残基中的2、3、4、5、6、7、8个或所有9个(优选至少5个残基)的表位。

[0253] 本文描述的抗体还可以识别其中Ile131存在于与其它残基不同的Gremlin-1单体上的表位。

[0254] 虽然这些残基针对人Gremlin-1的特定序列而提供,但技术人员使用常规技术可以容易地将这些残基的位置外推到其它相应Gremlin序列(例如小鼠)。因此,本发明还提供了与包含这些其它Gremlin序列内的相应残基的表位结合的抗体。

[0255] 为了筛选与特定表位结合的抗体,可以进行常规的交叉阻断测定,诸如在Harlow和Lane的Antibodies(Cold Spring Harbor Press,Cold Spring Harb.,NY)中描述的测定。其它方法包括丙氨酸扫描突变体、肽印迹(Reineke(2004)Methods Mol Biol 248:443-63)或肽裂解分析。此外,可以使用诸如表位切除、表位提取和抗原的化学修饰的方法(Tomer(2000)Protein Science 9:487-496)。这样的方法是本领域众所周知的。

[0256] 也可以通过x-射线晶体学分析来确定抗体表位。因此,通过与Gremlin-1结合的抗体的x-射线晶体学分析,可以评估本公开内容的抗体。具体而言,通过确定在Gremlin-1上在抗体互补位残基的**4Å**内的残基,可以以这种方式确定表位。

[0257] 因此,本文描述的抗体可以结合于Gremlin-1上的表位,所述表位包含至少一个选自Trp93、Phe117、Tyr119、Phe125、Tyr126和Phe138的残基,其中所述残基编号是根据SEQ ID NO:1。本文进一步描述了一种抗体,其结合包含全部Trp93、Phe117、Tyr119、Phe125、Tyr126和Phe138的表位。另外描述了一种结合包含下列残基的表位的抗体:Ile131、Lys147、Lys148、Phe149、Thr150、Thr151、Arg169、Lys174和Gln175。优选地,Lys147、Lys148、Phe149、Thr150、Thr151、Arg169、Lys174和Gln175位于Gremlin-1的一个单体上,并且Ile131位于Gremlin-1的另一个单体上(Gremlin-1二聚体结合BMP二聚体)。

[0258] 如果通过x-射线晶体学确定抗体互补位位于Gremlin-1残基的**4Å**内,则抗体可以结合上述Gremlin-1残基。

[0259] 与本文公开的表位结合的抗体可以包含SEQ ID NO:4至6的至少一个、至少两个或所有三个重链CDR序列(分别为HCDR1/HCDR2/HCDR3)。这些是使用Kabat方法确定的实施例的Ab 7326抗体的HCDR1/HCDR2/HCDR3序列。

[0260] 用于确定CDR序列的Kabat和Chothia方法(以及其它技术)是本领域众所周知的。可以使用任何适当的方法来确定CDR序列,并且在本发明中,虽然通常采用Kabat,但也可以使用其它技术。在本例中,SEQ ID NO:3代表使用组合的Chothia和Kabat定义确定的Ab7326HCDR1序列。

[0261] 根据本发明使用的抗体可以包含SEQ ID NO:7至9的至少一个、至少两个或所有三个轻链CDR序列(分别为LCDR1/LCDR2/LCDR3)。这些是使用Kabat方法得到的Ab 7326的LCDR1/LCDR2/LCDR3序列。

[0262] 所述抗体优选地至少包含SEQ ID NO:6的HCDR3序列。

[0263] 通常,所述抗体包含至少一个选自SEQ ID NO:4至6的重链CDR序列和至少一个选自SEQ ID NO:7至9的轻链CDR序列。所述抗体可以包含至少两个选自SEQ ID NO:4至6的重链CDR序列和至少两个选自SEQ ID NO:7至9的轻链CDR序列。所述抗体通常包含SEQ ID NO:

4至6的所有三个重链CDR序列(分别为HCDR1/HCDR2/HCDR3)和SEQ ID NO:7至9的所有三个轻链CDR序列(分别为LCDR1/LCDR2/LCDR3)。所述抗体可以是嵌合抗体、人抗体或人源化抗体。

[0264] 所述抗体可以包含SEQ ID NO:10或12的重链可变区(HCVR)序列(Ab 7326变体1和2的HCVR)。所述抗体可以包含SEQ ID NO:11或13的轻链可变区(LCVR)序列(Ab 7326变体1和2的LCVR)。所述抗体优选地包含SEQ ID NO:10或12的重链可变区序列和SEQ ID NO:11或13的轻链可变区序列(尤其是SEQ ID NO:10/11或12/13的HCVR/LCVR对)。

[0265] 所述抗体可以包含以下的重链(H-链)序列:

[0266] SEQ ID NO:14小鼠全长IgG1重链变体1,或

[0267] SEQ ID NO:28小鼠全长IgG1重链变体2,或

[0268] SEQ ID NO:30人全长IgG1重链变体1,或

[0269] SEQ ID NO:16人全长IgG1重链变体2,或

[0270] SEQ ID NO:22人全长IgG4P重链变体1,或

[0271] SEQ ID NO:34人全长IgG4P重链变体2,或

[0272] SEQ ID NO:18Fab重链变体1,或

[0273] SEQ ID NO:32Fab重链变体2。

[0274] 所述抗体可以包含以下的轻链(L-链)序列:

[0275] SEQ ID NO:15小鼠全长IgG1轻链变体1,或

[0276] SEQ ID NO:29小鼠全长IgG1轻链变体2,或

[0277] SEQ ID NO:31人全长IgG1轻链变体1,或

[0278] SEQ ID NO:17人全长IgG1轻链变体2,或

[0279] SEQ ID NO:23人全长IgG4P轻链变体1,或

[0280] SEQ ID NO:35人全长IgG4P轻链变体2,或

[0281] SEQ ID NO:19Fab轻链变体1,或

[0282] SEQ ID NO:33Fab轻链变体2。

[0283] 在一个实施例中,所述抗体包含以下的重链/轻链序列对:

[0284] SEQ ID NO:14/15小鼠全长IgG1变体1,或

[0285] SEQ ID NO:28/29小鼠全长IgG1变体2,或

[0286] SEQ ID NO:30/31人全长IgG1变体1,或

[0287] SEQ ID NO:16/17人全长IgG1变体2,或

[0288] SEQ ID NO:22/23人全长IgG4P变体1,或

[0289] SEQ ID NO:34/35人全长IgG4P变体2,或

[0290] SEQ ID NO:18/19Fab轻链变体1,或

[0291] SEQ ID NO:32/33Fab轻链变体2。

[0292] 相应序列的变体形式可以互换。例如,所述抗体可以包含以下的重链/轻链序列对:

[0293] SEQ ID NO:14/29小鼠全长IgG1重链变体1/轻链变体2,或

[0294] SEQ ID NO:28/15小鼠全长IgG1重链变体2/轻链变体1,或

[0295] SEQ ID NO:30/17人全长IgG1重链变体1/轻链变体2,或

[0296] SEQ ID NO:16/31人全长IgG1重链变体2/轻链变体1,或

[0297] SEQ ID NO:22/35人全长IgG4P重链变体1/轻链变体2,或

[0298] SEQ ID NO:34/23人全长IgG4P重链变体2/轻链变体1,或

[0299] SEQ ID NO:18/33Fab重链变体1/轻链变体2,或

[0300] SEQ ID NO:32/19Fab重链变体2/轻链变体1。

[0301] 所述抗体可以是嵌合抗体、人抗体或人源化抗体。

[0302] 所述抗体可以供选择地是或可以包含上述特定序列之一的变体。抗体变体的以下描述也适用于如上所述的GREM1多肽变体的选择。

[0303] 例如,变体可以是上述氨基酸序列中的任一个的置换、缺失或添加变体。

[0304] 变体抗体可以包含从上面讨论的特定序列的1、2、3、4、5个、至多10个、至多20个或更多个(通常至多最多50个)氨基酸置换和/或缺失。“缺失”变体可以包含单个氨基酸的缺失、小组氨基酸(诸如2、3、4或5个氨基酸)的缺失或较大氨基酸区域的缺失(诸如特定氨基酸结构域或其它特征的缺失)。“置换”变体通常涉及用相同数目的氨基酸替换一个或多个氨基酸并进行保守的氨基酸置换。例如,一种氨基酸可以被具有相似性质的替代氨基酸置换,例如另一种碱性氨基酸、另一种酸性氨基酸、另一种中性氨基酸、另一种带电氨基酸、另一种亲水氨基酸、另一种疏水氨基酸、另一种极性氨基酸、另一种芳族氨基酸或另一种脂族氨基酸。可以用于选择合适取代基的20种主要氨基酸的某些性能如下:

[0305]

Ala	脂族的、疏水的、中性的	Met	疏水的、中性的
Cys	极性的、疏水的、中性的	Asn	极性的、亲水的、中性的
Asp	极性的、亲水的、带电的(-)	Pro	疏水的、中性的
Glu	极性的、亲水的、带电的(-)	Gln	极性的、亲水的、中性的
Phe	芳族的、疏水的、中性的	Arg	极性的、亲水的、带电的(+)
Gly	脂族的、中性的	Ser	极性的、亲水的、中性的
His	芳族的、极性的、亲水的、带电的(+)	Thr	极性的、亲水的、中性的
Ile	脂族的、疏水的、中性的	Val	脂族的、疏水的、中性的
Lys	极性的、亲水的、带电的(+)	Trp	芳族的、疏水的、中性的
Leu	脂族的、疏水的、中性的	Tyr	芳族的、极性的、疏水的

[0306] “衍生物”或“变体”通常包括其中在序列中出现的氨基酸不是天然存在的氨基酸而是其结构类似物的那些。在序列中使用的氨基酸也可以被衍生化或修饰,例如被标记,只要抗体的功能不会受到显著不利影响。

[0307] 如上所述的衍生物和变体可以在抗体合成期间或通过生产后修饰来制备,或者当所述抗体为重组形式时,使用定点诱变、随机诱变或酶切割和/或核酸连接的已知技术来制备。

[0308] 变体抗体可以包含与本文所公开的氨基酸序列(特别是HCVR/LCVR序列和H-和L-

链序列)具有超过约60%或超过约70%(例如75或80%,通常超过约85%,例如超过约90或95%)氨基酸同一性的氨基酸序列。此外,所述抗体可以是这样的变体:其与本文公开的HCVR/LCVR序列和H-和L-链序列具有超过约60%或超过约70%(例如75或80%、通常超过约85%,例如超过约90或95%)氨基酸同一性,同时保留为这些序列公开的精确CDR。变体可以保留与本文公开的HCVR/LCVR序列和H-和L-链序列的至少约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性(在某些情况下,同时保留精确的CDR)。

[0309] 变体通常保留约60%至约99%同一性、约80%至约99%同一性、约90%至约99%同一性或约95%至约99%同一性。这种氨基酸同一性水平可以在相关SEQ ID NO序列的全长或序列的一部分中看到,诸如在约20、30、50、75、100、150、200个或更多个氨基酸中,取决于全长多肽的大小。

[0310] 关于氨基酸序列,“序列同一性”表示当使用ClustalW(Thompson等人,1994,出处同上)用以下参数进行评估时具有规定值的序列:

[0311] 逐对比对参数-方法:准确,矩阵:PAM,缺口开放罚分:10.00,缺口延伸罚分:0.10;

[0312] 多重比对参数-矩阵:PAM,缺口开放罚分:10.00,延迟的同一性百分比:30,惩罚末端缺口:开启,缺口分离距离:0,负矩阵:否,缺口延伸罚分:0.20,残基特异性的缺口罚分:开启,亲水缺口罚分:开启,亲水残基:GPSNDQEKR。在特定残基处的序列同一性意图包括已经简单衍生化的相同残基。

[0313] 因此提供了具有特定序列的抗体和维持这些链的功能或活性的变体。

[0314] 抗体可以与上文就H-链/L-链、HCVR/LCVR或CDR序列定义的那些竞争对Gremlin-1的结合,或结合与它们相同的表位。具体而言,抗体可以与包含SEQ ID NO:4/5/6/7/8/9的HCVR1/HCVR2/HCVR3/LCVR1/LCVR2/LCVR3序列组合的抗体竞争对Gremlin-1的结合,或结合与它们相同的表位。抗体可以与包含SEQ ID NO:10/11或12/13的HCVR和LCVR序列对或SEQ ID NO:14/15或16/17的全长链的抗体竞争对Gremlin-1的结合,或结合与它们相同的表位。

[0315] 术语“表位”是抗体所结合的抗原区域。表位可以定义为结构性的或功能性的。功能表位通常是结构表位的子集并且具有直接有助于相互作用亲和力的那些残基。表位也可以是构象性的,即由非线性氨基酸组成。在某些实施方案中,表位可以包括决定簇,所述决定簇是分子(诸如氨基酸、糖侧链、磷酸基基团或磺酰基基团)的化学活性表面分组,且在某些实施方案中,可以具有特定三维结构特征和/或比电荷特征。

[0316] 通过使用本领域已知的常规方法,可以容易地确定抗体是否与参考抗体结合相同的表位,或与参考抗体竞争结合。例如,为了确定试验抗体是否与本发明的参考抗体结合相同的表位,允许参考抗体在饱和条件下结合蛋白或肽。接下来,评估试验抗体与蛋白或肽结合的能力。如果试验抗体在与参考抗体饱和结合后能够结合蛋白或肽,则可以得出结论,试验抗体与参考抗体结合不同的表位。另一方面,如果试验抗体在与参考抗体饱和结合后不能结合蛋白或肽,则试验抗体可以结合与本发明的参考抗体所结合的表位相同的表位。

[0317] 为了确定抗体是否与参考抗体竞争结合,以两个方向进行上述结合方法。在第一个方向上,允许参考抗体在饱和条件下与蛋白/肽结合,然后评估试验抗体与蛋白/肽分子的结合。在第二个方向上,允许试验抗体在饱和条件下与蛋白/肽结合,然后评估参考抗体与蛋白/肽的结合。如果在两个方向上,只有第一种(饱和)抗体能够结合蛋白/肽,则得出结论,试验抗体和参考抗体竞争与蛋白/肽的结合。技术人员将理解,与参考抗体竞争结合的

抗体不一定与参考抗体结合相同的表位,但可能通过结合重叠或相邻的表位在空间上阻断参考抗体的结合。

[0318] 如果两种抗体各自竞争性地抑制(阻断)另一种抗体与抗原的结合,则所述两种抗体结合相同的或重叠的表位。也就是说,如在竞争性结合测定中所测量的,1、5、10、20或100倍过量的一种抗体会将另一种抗体的结合抑制至少50%、75%、90%或甚至99%(参见,例如,Junghans等人,Cancer Res,1990:50:1495-1502)。供选择地,如果抗原中基本上所有的减少或消除一种抗体的结合的氨基酸突变都会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某些氨基酸突变减少或消除另一种抗体的结合,则所述两种抗体具有重叠的表位。

[0319] 然后可以进行另外的例行实验(例如,肽突变和结合分析)以确认观察到的试验抗体的结合的缺乏是否实际上是由于与参考抗体结合相同的表位或者是否是空间阻断(或另一个现象)导致观察到的结合的缺乏。使用ELISA、RIA、表面等离子体共振、流式细胞计量术或本领域中可用的任何其它定量或定性抗体结合测定,可以进行这类的实验。

[0320] 通过例如标准ELISA或蛋白质印迹法,可以试验抗体与Gremlin-1的结合。ELISA测定也可以用于筛选显示与靶蛋白的阳性反应性的杂交瘤。通过监测抗体与表达靶蛋白的细胞的结合,例如通过流式细胞计量术,也可以确定抗体的结合选择性。因此,筛选方法可以包括通过进行ELISA或蛋白质印迹或通过流式细胞计量术来确定能够结合Gremlin-1的抗体的步骤。

[0321] 抗体可以选择性地(或特异性地)识别Gremlin-1。当抗体或其它化合物以优先或高亲和力结合其具有选择性的蛋白、但基本上不结合或以低亲和力结合其它蛋白时,所述抗体或其它化合物“选择性地结合”或“选择性地识别”该蛋白。通过确定抗体是否结合如上面讨论的其它相关蛋白或它是否区分它们,可以进一步研究抗体的选择性。根据本发明使用的抗体通常识别人Gremlin-1。

[0322] 抗体也可以与相关蛋白或人Gremlin-1以及来自其它物种的Gremlin-1具有交叉反应性。

[0323] 通过特异性的(或选择性的),应当理解,抗体与感兴趣的蛋白结合,而与任何其它分子没有显著的交叉反应性。可以通过本文描述的任何合适方法来评估交叉反应性。如果抗体结合另一种分子的强度是它结合感兴趣的蛋白的强度的至少约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或100%,则可以认为所述抗体的交叉反应性是显著的。特异性的(或选择性的)抗体结合另一种分子的强度可以是它结合感兴趣的蛋白的强度的约90%、85%、80%、75%、70%、65%、60%、55%、50%、45%、40%、35%、30%、25%或20%。抗体结合另一种分子的强度可以是它结合感兴趣的蛋白的强度的小于约20%、小于约15%、小于约10%或小于约5%、小于约2%或小于约1%。

[0324] 以前已经描述了抗-gremlin抗体,例如W02014/159010A1(Regeneron)描述了抑制Gremlin-1活性的抗-gremlin抗体,在25℃具有在625pM至270nM范围内的结合亲和力 K_D 值。Ciuculan等人(2013)描述了具有 5.6×10^{-10} M的结合亲和力 K_D 的抗-Gremlin-1单克隆抗体。

[0325] 本文(以及2017年12月19日提交的W0/2018/115017和2019年6月18日提交的W0 2019/243801,它们二者通过引用整体并入本文)描述的抗-Gremlin-1抗体是Gremlin-1活

性的变构抑制剂,并与远离BMP结合位点的如上所述的新表位结合。所述抗体以<100pM的Kd值以极高结合亲和力结合Gremlin-1。因此,所述抗体比目前可得到的抗体有显著改进,并且预计特别适用于治疗Gremlin-1介导的疾病。

[0326] 因此,适合与本发明一起使用的抗体可以对(人)Gremlin-1具有高亲和力结合。所述抗体可以具有小于<1nM且优选<500pM的解离常数(K_d)。在一个实施例中,所述抗体具有小于200pM的解离常数(K_d)。在一个实施例中,所述抗体具有小于100pM的解离常数(K_d)。可以使用多种方法来确定抗体对其靶抗原的结合亲和力,诸如表面等离子体共振测定、饱和测定或免疫测定诸如ELISA或RIA,这些对于本领域技术人员而言是众所周知的。一种用于确定结合亲和力的示例性方法是通过使用CM5传感器芯片在BIAcore™2000仪器(Biacore AB, Freiburg, 德国)上的表面等离子体共振分析,如Krinner等人(2007) Mol. Immunol. February; 44(5):916-25. (2006年5月11日电子公开)所述。

[0327] 根据本发明使用的抗体通常是抑制性抗体。Gremlin-1负向调节BMP-2、4和7,因此Gremlin-1的抑制会导致通过BMP实现的信号传导增加。

[0328] 可以用于筛选抗体是否能够抑制Gremlin-1的特定功能测定包括SMAD磷酸化测定和Hek Id1报告基因测定。通常,抑制性抗体会恢复SMAD磷酸化和/或在Hek Id1报告基因测定中恢复BMP的信号传导。与BMP对照相比,SMAD磷酸化可以恢复到至少80%、90%或100%。在Hek Id1报告基因测定中,抑制性抗体可以具有小于10nM、优选地小于5nM的 IC_{50} 。

[0329] 一旦确定并选择了合适的抗体,就可以通过本领域已知的方法确定所述抗体的氨基酸序列。可以使用简并引物克隆编码所述抗体的基因。可以通过常规方法重组生产所述抗体。

[0330] 本公开内容还提供了分离的DNA序列,其编码本文中新描述的抗体分子的重链和/或轻链可变区(或全长H-链和L-链)。

[0331] 一种变体多核苷酸可以包含在序列表中给出的任何核酸序列(包括GREM1和抗-GREM1抗体核酸序列)的1、2、3、4、5个、至多10个、至多20个、至多30个、至多40个、至多50个、至多75个或更多个核酸置换和/或缺失。通常,变体具有1-20、1-50、1-75或1-100个置换和/或缺失。

[0332] 合适的变体可以与本文公开的任一个核酸序列的多核苷酸具有至少约70%同源性,通常与其具有至少约80%或90%同源性和更适当地至少约95%、97%或99%同源性。变体可以保留至少约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性。变体通常保留约60%至约99%同一性、约80%至约99%同一性、约90%至约99%同一性或约95%至约99%同一性。在这些水平的同源性和同一性通常至少相对于多核苷酸的编码区存在。测量同源性的方法是本领域众所周知的,并且本领域技术人员将理解,在本发明的上下文中,基于核酸同一性来计算同源性。这样的同源性可以存在于至少约15个、至少约30个、例如至少约40个、60个、100个、200个或更多个连续核苷酸(取决于长度)的区域内。这样的同源性可以存在于未修饰的多核苷酸序列的整个长度上。

[0333] 测量多核苷酸同源性或同一性的方法是本领域已知的。例如,UWGCG包提供了BESTFIT程序,其可以用于计算同源性(例如,在其默认设置上使用)(Devereux等人(1984) Nucleic Acids Research 12,第387-395页)。

[0334] 还可以使用PILEUP和BLAST算法来计算同源性或排列序列(通常采用其默认设

置),例如如在Altschul S.F.(1993)J Mol Evol36:290-300;Altschul,S,F等人(1990)J Mol Biol 215:403-10中所述。

[0335] 用于执行BLAST分析的软件可通过国家生物技术信息中心(National Centre for Biotechnology Information) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 公开获取。该算法包括首先通过确定查询序列中长度为W的短字来确定高分序列对(HSP),所述短字当与数据库序列中相同长度的字比对时匹配或满足某些正值阈值评分T。T指邻近字评分阈值(Altschul等人,出处同上)。这些初始的邻近字采样充当启动搜索的种子,以查找包含它们的HSP。所述字采样沿着每个序列在两个方向延伸,直至累计比对评分可以增加。当出现以下情况时,在每个方向上的字采样的延伸被停止:由于一个或多个负评分残基比对的积累,累计比对评分达到零或以下;或者到达任一序列的末端。BLAST算法参数W、T和X决定了比对的灵敏度和速度。BLAST程序默认使用11的字长(W),50的BLOSUM62评分矩阵(参见Henikoff和Henikoff(1992)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89:10915-10919)比对(B),10的预期(E),M=5,N=4,以及两条链的对比。

[0336] BLAST算法执行两个序列之间的相似性的统计分析;参见例如,Karlin和Altschul(1993)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:5873-5787。由BLAST算法提供的一种相似性量度是最小总和概率(P(N)),它提供两个核苷酸或氨基酸序列之间偶然产生匹配的概率的指示。例如,如果一个序列与另一个序列相比的最小总和概率小于约1,通常小于约0.1,适当地小于约0.01,且最适当地小于约0.001,则认为第一序列与第二序列相似。例如,所述最小总和概率可以在约1至约0.001、通常约0.01至约0.001的范围内。

[0337] 所述同源物与相关多核苷酸的序列可以相差少于约3、5、10、15、20个或更多个突变(其中每个可以是置换、缺失或插入)。例如,所述同源物可以相差3至50个突变,通常3至20个突变。可以在同源物的至少30个、例如至少约40、60或100个或更多个连续核苷酸的区域上测量这些突变。

[0338] 在一个实施方案中,变体序列可以由于遗传密码的冗余而与在序列表中给出的特定序列不同。所述DNA代码具有4种主要核酸残基(A、T、C和G),并使用这些“拼写出”三字母密码子,其代表在生物体的基因中编码的蛋白的氨基酸。沿着DNA分子的密码子的线性序列被翻译成那些基因编码的蛋白中的氨基酸的线性序列。所述代码高度简并,其中61个密码子编码20种天然氨基酸,并且3个密码子代表“停止”信号。因此,大多数氨基酸由超过一个密码子编码-事实上,几种氨基酸由四种或更多种不同的密码子编码。因此,本发明的变体多核苷酸可以编码与本发明的另一种多核苷酸相同的多肽序列,但是可以具有不同的核酸序列,这是由于使用不同的密码子来编码相同的氨基酸。

[0339] 所述DNA序列可以包含合成的DNA,例如通过化学处理产生的DNA、cDNA、基因组DNA或它们的任何组合。

[0340] 可以通过本领域技术人员众所周知的方法获得编码本文所述抗体分子的DNA序列。例如,可以根据需要从确定的DNA序列或基于相应的氨基酸序列合成编码部分或全部抗体重链和轻链的DNA序列。

[0341] 构建载体的一般方法、转染方法和培养方法是本领域技术人员众所周知的。在这方面,参考“Current Protocols in Molecular Biology”,1999,F.M.Ausubel(编),Wiley Interscience,New York和Cold Spring Harbor Publishing出版的Maniatis Manual。

[0342] 核酸拮抗剂

[0343] 多核苷酸(诸如核酸)是包含两个或更多个核苷酸的聚合物。所述核苷酸可以是天然存在的或人工的。核苷酸通常含有核碱基、糖和至少一个连接基团,诸如磷酸酯、2'-O-甲基、2'-甲氧基-乙基、氨基磷酸酯、甲基膦酸酯或硫代磷酸酯基团。所述核碱基通常是杂环的。核碱基包括但不限于嘌呤和嘧啶,并且更具体地包括腺嘌呤(A)、鸟嘌呤(G)、胸腺嘧啶(T)、尿嘧啶(U)和胞嘧啶(C)。所述糖通常是戊糖。核苷酸糖包括但不限于核糖和脱氧核糖。所述核苷酸通常是核糖核苷酸或脱氧核糖核苷酸。所述核苷酸通常含有单磷酸酯、二磷酸酯或三磷酸酯。磷酸酯可以附着在核苷酸的5'或3'侧上。

[0344] 核苷酸包括但不限于腺苷单磷酸(AMP)、腺苷二磷酸(ADP)、腺苷三磷酸(ATP)、鸟苷单磷酸(GMP)、鸟苷二磷酸(GDP)、鸟苷三磷酸(GTP)、胸苷单磷酸(TMP)、胸苷二磷酸(TDP)、胸苷三磷酸(TTP)、尿苷单磷酸(UMP)、尿苷二磷酸(UDP)、尿苷三磷酸(UTP)、胞苷单磷酸(CMP)、胞苷二磷酸(CDP)、胞苷三磷酸(CTP)、5-甲基胞苷单磷酸、5-甲基胞苷二磷酸、5-甲基胞苷三磷酸、5-羟甲基胞苷单磷酸、5-羟甲基胞苷二磷酸、5-羟甲基胞苷三磷酸、环磷酸腺苷(cAMP)、环磷酸鸟苷(cGMP)、脱氧腺苷单磷酸(dAMP)、脱氧腺苷二磷酸(dADP)、脱氧腺苷三磷酸(dATP)、脱氧鸟苷单磷酸(dGMP)、脱氧鸟苷二磷酸(dGDP)、脱氧鸟苷三磷酸(dGTP)、脱氧胸苷单磷酸(dTMP)、脱氧胸苷二磷酸(dTDP)、脱氧胸苷三磷酸(dTTP)、脱氧尿苷单磷酸(dUMP)、脱氧尿苷二磷酸(dUDP)、脱氧尿苷三磷酸(dUTP)、脱氧胞苷单磷酸(dCMP)、脱氧胞苷二磷酸(dCDP)和脱氧胞苷三磷酸(dCTP)、5-甲基-2'-脱氧胞苷单磷酸、5-甲基-2'-脱氧胞苷二磷酸、5-甲基-2'-脱氧胞苷三磷酸、5-羟甲基-2'-脱氧胞苷单磷酸、5-羟甲基-2'-脱氧胞苷二磷酸和5-羟甲基-2'-脱氧胞苷三磷酸。所述核苷酸优选地选自AMP、TMP、GMP、UMP、dAMP、dTMP、dGMP或dCMP。

[0345] 所述核苷酸可以含有另外的修饰。具体而言,合适的修饰的核苷酸包括但不限于2'-氨基嘧啶(诸如2'-氨基胞苷和2'-氨基尿苷)、2'-羟基嘌呤(诸如2'-氟嘧啶(诸如2'-氟胞苷和2'-氟尿苷)、羟基嘧啶(诸如5'- α -P-硼代尿苷)、2'-O-甲基核苷酸(诸如2'-O-甲基腺苷、2'-O-甲基鸟苷、2'-O-甲基胞苷和2'-O-甲基尿苷)、4'-硫代嘧啶(诸如4'-硫代尿苷和4'-硫代胞苷),并且核苷酸具有核碱基的修饰(诸如5-戊炔基-2'-脱氧尿苷、5-(3-氨基丙基)-尿苷和1,6-二氨基己基-N-5-氨甲酰基甲基尿苷)。

[0346] 所述多核苷酸中的核苷酸可以以任何方式彼此连接。所述核苷酸可以通过磷酸酯、2'-O-甲基、2'-甲氧基-乙基、氨基磷酸酯、甲基膦酸酯或硫代磷酸酯键连接。所述核苷酸通常通过其糖和磷酸酯基团连接,如在核酸中。所述核苷酸可以通过其核碱基连接,如在嘧啶二聚体中。

[0347] 所述GREM1拮抗剂可以是编码本文描述的抗-GREM1抗体的多核苷酸。

[0348] 所述多核苷酸可以是核酸,诸如脱氧核糖核酸(DNA)或核糖核酸(RNA)。所述多核苷酸可以是本领域已知的任何合成核酸,诸如肽核酸(PNA)、甘油核酸(GNA)、苏糖核酸(TNA)、锁核酸(LNA)、吗啉代核酸或其它具有核苷酸侧链的合成聚合物。所述多核苷酸可以是单链的或双链的。

[0349] 可以将所述多核苷酸序列克隆进任何合适的表达载体中。在表达载体中,编码构建体的多核苷酸序列通常可操作地连接至控制序列,所述控制序列能够提供宿主细胞对所述编码序列的表达。这样的表达载体可以用于表达构建体。

[0350] 在一个实施方案中,所述抗-GREM1拮抗剂是编码本文描述的抗-GREM1抗体的多核苷酸。所述多核苷酸可以提供用于基因治疗中。可以在能够提供抗-GREM1抗体在体内表达的任何合适载体中提供所述多核苷酸。

[0351] 编码抗-GREM1抗体的多核苷酸可以是DNA序列。可以在任何合适的载体(例如表达载体)中提供DNA序列,以施用给有此需要的受试者。例如,可以将DNA序列在能够提供抗-GREM1抗体的体内表达的表达载体中施用给受试者。所述表达载体可以是病毒表达载体,诸如腺相关病毒(AAV)载体。在一个实施方案中,所述抗-GREM1拮抗剂是编码本文描述的抗-GREM1抗体的DNA序列。在一个实施方案中,所述抗-GREM1拮抗剂是用于用在基因治疗中的DNA序列,其中所述DNA序列编码本文描述的抗-GREM1抗体。在一个实施方案中,所述抗-GREM1拮抗剂是包含编码本文描述的抗-GREM1抗体的DNA序列的AAV。在一个实施方案中,所述抗-GREM1拮抗剂是用于用在基因治疗中的AAV,其中所述AAV包含编码本文描述的抗-GREM1抗体的DNA序列。

[0352] 编码抗-GREM1抗体的多核苷酸可以是RNA序列。可以将所述RNA序列在任何合适的载体中施用给有此需要的受试者。所述RNA序列可以是信使RNA(mRNA)序列。可以将所述mRNA序列以稳定化的形式施用给有此需要的受试者。例如,可以在脂质纳米颗粒(LNP)组合物中提供所述mRNA序列。所述LNP组合物可以包含能够封装所述mRNA序列以提供所述mRNA序列的增加的稳定性的任何合适LNP。因此,在一个实施方案中,所述抗-GREM1拮抗剂是编码本文描述的抗-GREM1抗体的稳定化的mRNA序列。在一个实施方案中,所述抗-GREM1拮抗剂是用于用在基因治疗中的稳定化的mRNA序列,其中所述mRNA序列编码本文描述的抗-GREM1抗体。在一个实施方案中,所述抗-GREM1拮抗剂是LNP组合物,其包含编码本文描述的抗-GREM1抗体的mRNA。在一个实施方案中,所述抗-GREM1拮抗剂是用于用在基因治疗中的LNP组合物,其中所述LNP组合物包含编码本文描述的抗-GREM1抗体的mRNA。

[0353] 术语“可操作地连接”表示一种并列连接,其中所描述的组分处于允许它们以其预期方式发挥作用的关系。“可操作地连接”至编码序列的控制序列以这样的方式连接:在与控制序列相容的条件下实现编码序列的表达。可以将相同的或不同的多核苷酸的多个拷贝引入载体中。

[0354] 然后可以将所述表达载体引入合适的宿主细胞中。因此,可以如下生成构建体:将编码构建体的多核苷酸序列插入表达载体中,将所述载体引入相容的细菌宿主细胞中,并使所述宿主细胞在导致所述多核苷酸序列表达的条件下生长。

[0355] 基于核酸的GREM1拮抗剂可以降低GREM1的表达。用于敲低蛋白表达的反义和RNA干扰(RNAi)技术是本领域众所周知的,并且可以采用标准方法来敲低目标分子的表达。反义和siRNA技术均会干扰mRNA。反义寡核苷酸通过与mRNA的一部分结合(杂交)来干扰mRNA。因此,反义寡核苷酸被设计为与mRNA互补(尽管所述寡核苷酸不必如下面所讨论的100%互补)。换言之,反义寡核苷酸可以是cDNA的一部分。此外,寡核苷酸序列可以不与cDNA序列100%相同。下面也讨论了这一点。RNAi包含使用可以结合于mRNA并抑制蛋白表达的双链RNA,诸如小干扰RNA(siRNA)或小发夹RNA(shRNA)。

[0356] 因此,所述拮抗剂可以是与编码GREM1的mRNA特异性地杂交的寡核苷酸,诸如SEQ ID NO:36或SEQ ID NO:37的编码序列或其变体。当寡核苷酸以优先或高亲和力与靶序列杂交,但与其它序列基本上不杂交、不杂交或仅以低亲和力杂交时,所述寡核苷酸与靶序列

“特异性地杂交”。更优选地,寡核苷酸与靶序列杂交的 T_m 比它对其它核酸的 T_m 高至少5℃、至少10℃、至少20℃、至少30℃或至少40℃。允许杂交的条件是本领域众所周知的(例如,Sambrook等人,2001,Molecular Cloning:a laboratory manual,第3版,Cold Spring Harbour Laboratory Press;和Current Protocols in Molecular Biology,第2章,Ausubel等人,编,Green Publishing and Wiley-Interscience,New York(1995))。所述杂交条件可以是本领域中描述的严谨条件。

[0357] 寡核苷酸是短核苷酸聚合物,其通常具有50个或更少的核苷酸,诸如40个或更少、30个或更少、22个或更少、21个或更少、20个或更少、10个或更少或者5个或更少的核苷酸。所用的寡核苷酸长度可以是20至25个核苷酸,更优选长度是21或22个核苷酸。所述核苷酸可以是天然存在的或人工的。所述核苷酸可以是上述那些中的任一种。

[0358] GREM1拮抗剂可以是结合GREM1的抗体,通常特异性地结合GREM1。当抗体以优先或高亲和力结合某种蛋白、但基本上不结合、不结合或仅以低亲和力结合其它蛋白时,所述抗体“特异性地结合”所述蛋白。例如,当抗体其以优先或高亲和力结合靶分子,但基本上不结合、不结合或仅以低亲和力结合其它人蛋白时,所述抗体“特异性地结合”靶分子。

[0359] 如果抗体以 $1 \times 10^{-7} \text{M}$ 或更低、更优选 $5 \times 10^{-8} \text{M}$ 或更低、更优选 $1 \times 10^{-8} \text{M}$ 或更低或更优选 $5 \times 10^{-9} \text{M}$ 或更低的 K_d 结合,则所述抗体以优先或高亲和力结合。如果抗体以 $1 \times 10^{-6} \text{M}$ 或更高、更优选 $1 \times 10^{-5} \text{M}$ 或更高、更优选 $1 \times 10^{-4} \text{M}$ 或更高、更优选 $1 \times 10^{-3} \text{M}$ 或更高、甚至更优选 $1 \times 10^{-2} \text{M}$ 或更高的 K_d 结合,则所述抗体以低亲和力结合。

[0360] 所述抗体可以是例如单克隆抗体、多克隆抗体、单链抗体、嵌合抗体、双特异性抗体、CDR-移植抗体或人源化抗体。所述抗体可以是完整的免疫球蛋白分子或其片段诸如Fab、 $F(ab')_2$ 或Fv片段。

[0361] 患者

[0362] 根据本发明可以治疗任何患者。所述患者通常是人。但是,所述患者可以是另一种哺乳动物,诸如商业饲养的动物,诸如马、牛、羊、鱼、鸡或猪,实验动物,诸如小鼠或大鼠,或宠物,诸如豚鼠、仓鼠、兔、猫或狗。

[0363] 药物组合物、剂量和剂量方案

[0364] 用于用在本发明的方法中的GREM1拮抗剂可以在药物组合物中提供。用于用在本发明的方法中的Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂(诸如本文描述的MEK抑制剂或ERK抑制剂)还可以作为同一药物组合物的一部分或在单独的药物组合物中提供。例如,用于用在本发明的方法中的GREM1拮抗剂可以与本文描述的MEK抑制剂或ERK抑制剂或Ras-Raf-MEK-ERK信号传导的其它抑制剂一起在药物组合物中提供。所述药物组合物通常是无菌的,并且通常包括药学上可接受的载体和/或辅助剂。除了治疗活性成分之外,这些组合物还可以包含药学上可接受的赋形剂、载体、稀释剂、缓冲剂、稳定剂或本领域技术人员众所周知的其它材料。这样的材料应该是无毒的,并且不应干扰活性成分的功效。所述药物载体或稀释剂可以是例如等渗溶液。

[0365] 本文中使用的“药学上可接受的载体”包括生理学上相容的任何的和所有的溶剂、分散介质、包衣剂、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等。所述载体或其它材料的精确性质可以取决于施用途,例如口服、静脉内、皮肤或皮下、鼻、肌肉内和腹膜内途径。

[0366] 所述载体可以适用于胃肠外施用,例如静脉内、肌肉内、真皮内、眼内、腹膜内、皮

下、脊柱或其它胃肠外施用途径,例如通过注射或输注。供选择地,所述载体可以适合于非胃肠外施用,诸如局部、表皮或粘膜施用途径。所述载体可以适合于口服施用。根据施用途径,所述调节剂可以被包裹在材料中以保护所述化合物免于可能灭活所述化合物的酸和其它天然条件的作用。例如,固体口服形式可以含有与活性物质在一起的:稀释剂,例如乳糖、右旋糖、蔗糖、纤维素、玉米淀粉或马铃薯淀粉;润滑剂,例如二氧化硅、滑石粉、硬脂酸、硬脂酸镁或硬脂酸钙和/或聚乙二醇;粘合剂,例如淀粉、阿拉伯树胶、明胶、甲基纤维素、羧甲基纤维素或聚乙烯吡咯烷酮;解聚剂,例如淀粉、海藻酸、海藻酸盐或淀粉羟乙酸钠;泡腾混合物;染料;甜味剂;润湿剂,诸如卵磷脂、聚山梨酯、月桂基硫酸盐;以及一般而言,在药物制剂中使用的无毒的和药理学上无活性的物质。这样的药物制剂可以以已知方式制造,例如借助于混合、制粒、压片、包糖衣或薄膜包衣工艺。

[0367] 其它口服制剂包括诸如通常采用的赋形剂,例如药用级甘露醇、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、混悬剂、片剂、丸剂、胶囊剂、持续释放制剂或粉剂的形式,并含有10%至95%的活性成分,优选25%至70%。在将所述药物组合物冻干的情况下,可以在施用之前将冻干的材料重构,例如悬浮液。重构优选在缓冲液中进行。

[0368] 用于口服施用给个体的胶囊剂、片剂和丸剂可以具有肠溶包衣,所述肠溶包衣包括例如Eudragit“S”、Eudragit“L”、醋酸纤维素、醋酸邻苯二甲酸纤维素或羟丙基甲基纤维素。

[0369] 用于口服施用的液体分散体可以是糖浆剂、乳剂或混悬剂。所述糖浆剂可以含有例如蔗糖或蔗糖与甘油和/或甘露醇和/或山梨醇作为载体。

[0370] 混悬剂和乳剂可以含有例如天然树胶、琼脂、海藻酸钠、果胶、甲基纤维素、羧甲基纤维素或聚乙烯醇作为载体。用于肌肉内注射的混悬剂或溶液可以含有与活性物质在一起的药学上可接受的载体,例如无菌水、橄榄油、油酸乙酯、二醇类例如丙二醇,和如果需要的话,合适量的盐酸利多卡因。

[0371] 用于静脉内施用或输注的溶液可以含有例如无菌水作为载体,或优选地它们可以是无菌的、水性的、等渗盐水溶液的形式。

[0372] 对于栓剂而言,传统的粘合剂和载体可以包括例如聚亚烷基二醇或甘油三酯;这样的栓剂可以由含有在0.5%至10%、优选1%至2%的范围内的活性成分的混合物形成。

[0373] 多核苷酸或寡核苷酸抑制剂可以是裸核苷酸序列,或者与阳离子脂质、聚合物或靶向系统组合。它们可以通过任何可利用的技术来递送。例如,可以通过针注射引入所述多核苷酸或寡核苷酸,优选真皮内、皮下或肌肉内注射。供选择地,可以使用递送装置诸如颗粒介导的基因递送直接经皮肤递送所述多核苷酸或寡核苷酸。所述多核苷酸或寡核苷酸可以局部施用至皮肤或粘膜表面,例如通过鼻内、口服或直肠内施用。

[0374] 通过几种已知的转染技术,例如包括使用转染剂的那些,可以增强多核苷酸或寡核苷酸构建体的摄取。这些试剂的实例包括阳离子试剂,例如磷酸钙和IDEAE-葡聚糖,以及脂转染剂(lipofectants),例如lipofectam和transfectam。可以改变要施用的多核苷酸或寡核苷酸的剂量。

[0375] 本发明的药物组合物可以包含一种或多种药学上可接受的盐。“药学上可接受的盐”表示保留母体化合物的期望生物活性并且不会产生任何不希望的毒理学效应的盐。这

样的盐的实例包括酸加成盐和碱加成盐。

[0376] 药学上可接受的载体包括水性载体或稀释剂。可以用在本发明的药物组合物中的合适水性载体的实例包括水、缓冲的水和盐水。其它载体的实例包括乙醇、多元醇(诸如甘油、丙二醇、聚乙二醇等)和它们的合适混合物,植物油,诸如橄榄油,和可注射的有机酯,诸如油酸乙酯。在许多情况下,希望在所述组合物中包含等渗剂,例如,糖、多元醇(诸如甘露醇、山梨醇)或氯化钠。

[0377] 治疗组合物通常必须在制备和贮存条件下是无菌的和稳定的。可以将所述组合物配制为溶液、微乳剂、脂质体或其它适用于高药物浓度的有序结构。

[0378] 本发明的药物组合物可以包含另外的活性成分。

[0379] 包含本文所述的组合疗法和使用说明书的试剂盒也是在本公开内容的范围内。所述试剂盒可以进一步含有一种或多种另外的试剂,诸如本文中讨论的另外的治疗剂或预防剂。

[0380] 可以施用本文描述的拮抗剂或其制剂或组合物以进行预防性和/或治疗性治疗。

[0381] 在治疗应用中,向已经患有如上所述的障碍或病症的受试者施用足以治愈、减轻或部分地抑制所述病症或其一种或多种症状的量的化合物。这样的治疗性治疗可以导致疾病症状的严重程度的减轻,或无症状阶段的频率或持续时间的增加。足以实现此目的的量被定义为“治疗有效量”。

[0382] 在预防应用中,向处于如上所述的障碍或病症的风险中的受试者施用足以预防或减轻所述病症或其一种或多种症状的后续影响的量的制剂。足以实现此目的的量被定义为“预防有效量”。每种目的的有效量将取决于疾病或损伤的严重程度以及受试者的体重和总体状态。

[0383] 施用对象可以是人或非人动物。术语“非人动物”包括所有脊椎动物,例如,哺乳动物和非哺乳动物,诸如非人灵长类动物、绵羊、狗、猫、马、牛、鸡、两栖动物、爬行动物等。通常施用给人类。

[0384] 使用本领域已知的多种方法中的一种或多种,可以通过一种或多种施用途施用本发明的拮抗剂、Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂(例如MEK或ERK抑制剂)或药物组合物。技术人员将理解,施用的途径和/或方式将随所期望的结果而变化。本发明的化合物或药物组合物的施用途的实例包括静脉内、肌肉内、真皮内、眼内、腹膜内、皮下、脊柱或其它胃肠外施用途,例如通过注射或输注。本文中使用的短语“胃肠外施用”是指,除肠内和局部施用之外的施用方式,通常通过注射。供选择地,本发明的抗体/调节剂或药物组合物可以通过非胃肠外途径施用,诸如局部、表皮或粘膜施用途。本发明的抗体/调节剂或药物组合物可以用于口服施用。

[0385] 本发明的抗体/调节剂或药物组合物的合适剂量可以由熟练的医学从业人员确定。可以改变在本发明的药物组合物中的活性成分的实际剂量水平,从而得到对于特定患者、组合物和施用方式而言在对患者无毒的情况下有效地实现期望的治疗应答的活性成分的量。选择的剂量水平将取决于多种药代动力学因素,包括采用的本发明的特定组合物的活性,施用途,施用时间,正在采用的特定化合物的排泄速率,治疗的持续时间,与所用特定组合物组合使用的其它药物、化合物和/或材料,所治疗的患者的年龄、性别、重量、状况、总体健康和先前医疗史,和医学领域中众所周知的类似因素。

[0386] 根据上述情况,对于要治疗的患者,合适的剂量可以是例如在约0.01 μ g/kg至约1000mg/kg体重的范围内,通常为约0.1 μ g/kg至约100mg/kg体重。例如,合适的剂量可以是每天约1 μ g/kg至约10mg/kg体重,或每天约10 μ g/kg至约5mg/kg体重。

[0387] 可以调整剂量方案来提供最佳的期望应答(例如,治疗应答)。例如,可以施用单次剂量,可以随时间施用几个分份剂量,或可以根据治疗形势的急迫性所指示而按比例降低或提高所述剂量。所述剂量可以作为多次剂量提供,例如以固定间隔施用,例如每小时施用2、3或4个剂量。可以通过相同的或不同的途径、向相同的或不同的位置施用多次剂量。供选择地,剂量也可以是通过持续释放制剂,在这种情况下,需要更低频率的施用。剂量和频率可以取决于拮抗剂在患者中的半衰期和期望的治疗持续时间。

[0388] 通常,在1pg至1mg、优选1pg至10 μ g核酸(对于颗粒介导的递送)和10 μ g至1mg(对于其它途径)的范围内施用多核苷酸或寡核苷酸抑制剂。

[0389] 本文中使用的剂量单位形式表示适合作为待治疗对象的单位剂量的物理上离散的单位;每个单位含有经计算会产生期望的治疗效果的预定量的活性化合物以及所需的药物载体。

[0390] 如上所述,本发明的调节剂/抗体或药物组合物可以与一种或多种其它治疗剂共同施用。

[0391] 上面提到的技术和方案的实例可以参见:Remington's Pharmaceutical Sciences,第20版,2000,Lippincott,Williams和Wilkins出版。

[0392] 两种或更多种药剂的组合施用可以通过多种不同的方式实现。两者可以在单一组合物中一起施用,或者它们可以在单独的组合物中作为组合疗法的一部分施用。例如,一种可以在另一种之前或单独施用、在另一种之后或依次施用、或者并行地或同时地施用。例如,所述抗-GREM1拮抗剂可以在Ras-Raf-MERK-ERK信号传导抑制剂之前或单独施用、在其之后或依次施用、或者并行地或同时地施用。例如,所述抗-GREM1拮抗剂可以在本文描述的MEK抑制剂之前或单独施用、在其之后或依次施用、或者并行地或同时地施用。在本发明的另一个方面,所述抗-GREM1拮抗剂可以在本文描述的ERK抑制剂之前或单独施用、在其之后或依次施用、或者并行地或同时地施用。

[0393] 组合物和试剂盒

[0394] 另外提供了包含抗-GREM1拮抗剂和Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂的组合物或试剂盒。抗-GREM1拮抗剂可以是本文描述的任何抗-GREM1拮抗剂。Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂可以是本文描述的任何Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂。例如,本发明提供了包含抗-GREM1拮抗剂和MEK抑制剂的组合物或试剂盒。在另一个方面,本发明提供了包含抗-GREM1拮抗剂和ERK抑制剂的组合物或试剂盒。所述组合物或试剂盒可以适合用于治疗胰腺癌。在一个优选的实施方案中,所述MEK抑制剂是司美替尼(AZD6244)、曲美替尼(GSK-1120212)或WX-554(UCB-554),特别是作为用于治疗的胰腺癌的组合物或试剂盒的一部分。一种优选的组合包含抗-GREM1拮抗剂和司美替尼(AZD6244)、曲美替尼(GSK-1120212)或WX-554(UCB-554)。在另一个优选的实施方案中,所述ERK抑制剂是优立替尼。

[0395] 可以在本文描述的组合物或试剂盒中提供组合了抗-GREM1特异性和其它上述特异性之一的双特异性抗体。在上述组合物和试剂盒中的任一种中的抗-GREM1拮抗剂可以优选地是抗-GREM1抗体。

[0396] 另外的治疗组合

[0397] 如上所述的本发明的组合疗法可以与另一种治疗组合物组合使用/施用以进行治疗,例如作为辅助疗法。所述其它治疗组合物或治疗可以是例如本文讨论的那些中的一种或多种,并且可以与本发明的组合物同时或依次施用。

[0398] GREM1拮抗剂在组合治疗中具有特殊用途,因为它们可以用于使癌症或肿瘤对其它抗癌剂(诸如放射疗法或外科手术)敏感。在没有GREM1拮抗剂存在下,所述癌症可以对其它抗癌剂或癌症疗法具有抗性。

[0399] 因此,与Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂组合的抗-GREM1拮抗剂可以进一步与任何其它癌症疗法或任何其它癌症治疗剂组合使用。所述其它癌症疗法可以选自任何已知的针对相关癌症的疗法,诸如任何已知的针对胰腺癌的疗法。所述其它癌症疗法可以是放射疗法。例如, Van Cutsem(及其它人)在Annals of Oncology, 2014. 第25卷, 第3期中描述了合适的放射疗法治疗。所述放射疗法可以在癌症外科手术之前或在癌症外科手术之后进行。所述放射疗法可以是辅助放射疗法。所述放射疗法可以与本文描述的Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂组合进行。例如,可以将包含GREM1拮抗剂和司美替尼(AZD6244)的组合疗法与放射疗法组合使用。此外,可以将包含GREM1拮抗剂和曲美替尼(GSK-1120212)的组合疗法与放射疗法组合使用。供选择地,可以将包含GREM1拮抗剂和WX-554(UCB-554)的组合疗法与放射疗法组合使用。包含GREM1拮抗剂和本文描述的任何MEK抑制剂的组合疗法可以与放射疗法组合使用。供选择地,包含GREM1拮抗剂和本文描述的任何ERK抑制剂的组合疗法可以与放射疗法组合使用。例如,可以将包含GREM1拮抗剂和优立替尼的组合疗法与放射疗法组合使用。

[0400] 当不与本文描述的包含GREM1拮抗剂的组合疗法一起施用时,所述癌症可以对放射疗法具有抗性。

[0401] 作为上述方面的一部分,本发明提供了根据本发明与Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂组合的抗-GREM1拮抗剂,其用于用在治疗和/或预防癌症(诸如胰腺癌)的方法中,其中所述方法进一步包括单独、依次或同时施用另外的抗癌剂。在一个优选的实施方案中,本发明提供了根据本发明与一种或多种MEK抑制剂(诸如司美替尼(AZD6244)、曲美替尼(GSK-1120212)和/或WX-554(UCB-554))组合的抗-GREM1拮抗剂,其用于用在治疗和/或预防癌症(诸如胰腺癌)的方法中,其中所述方法进一步包括单独、依次或同时施用另外的抗癌剂。

[0402] 作为上述方面的一部分,本发明提供了与一种或多种Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂组合的抗-GREM1拮抗剂,其用于用在治疗和/或预防癌症(诸如胰腺癌)的方法中。例如,本发明可以提供根据本发明与MEK抑制剂司美替尼(AZD6244)组合的抗-GREM1拮抗剂,其用于用在治疗和/或预防癌症(诸如胰腺癌)的方法中,其中所述方法进一步包括单独、依次或同时施用另外的MEK抑制剂,诸如曲美替尼(GSK-1120212)、考比替尼(GDC-0973)、比美替尼(MEK162)、CI-1040(PD184352)、莫达美替尼(PD0325901)、TAK733、瑞法替尼(RDEA119/Bay 86-9766)、R0-5126766、R05068760、匹马塞替尼(AS703026)、AZD8330、GDC-0623、R0-4987655、WX-554(UCB-554)、HL-085、ARRY-300、ClnQ-03、G-573、PD184161、PD318088、PD98059、U0126或SL327。

[0403] 在一个供选择的实施方案中,本发明可以提供根据本发明与MEK抑制剂曲美替尼(GSK-1120212)组合的抗-GREM1拮抗剂,其用于用在治疗和/或预防癌症(诸如胰腺癌)的方

法中,其中所述方法进一步包括单独、依次或同时施用另外的MEK抑制剂,诸如司美替尼(AZD6244)、考比替尼(GDC-0973)、比美替尼(MEK162)、CI-1040(PD184352)、莫达美替尼(PD0325901)、TAK733、瑞法替尼(RDEA119/Bay 86-9766)、R0-5126766、R05068760、匹马塞替尼(AS703026)、AZD8330、GDC-0623、R0-4987655、WX-554(UCB-554)、HL-085、ARRY-300、ClnQ-03、G-573、PD184161、PD318088、PD98059、U0126或SL327。

[0404] 在又一个替代实施方案中,本发明可以提供根据本发明与MEK抑制剂WX-554(UCB-554)组合的抗-GREM1拮抗剂,其用于用在治疗和/或预防癌症(诸如胰腺癌)的方法中,其中所述方法进一步包括单独、依次或同时施用另外的MEK抑制剂,诸如曲美替尼(GSK-1120212)、司美替尼(AZD6244)、考比替尼(GDC-0973)、比美替尼(MEK162)、CI-1040(PD184352)、莫达美替尼(PD0325901)、TAK733、瑞法替尼(RDEA119/Bay 86-9766)、R0-5126766、R05068760、匹马塞替尼(AS703026)、AZD8330、GDC-0623、R0-4987655、HL-085、ARRY-300、ClnQ-03、G-573、PD184161、PD318088、PD98059、U0126或SL327。

[0405] 在又一个替代实施方案中,本发明可以提供根据本发明与ERK抑制剂优立替尼组合的抗-GREM1拮抗剂,其用于用在治疗和/或预防癌症(诸如胰腺癌)的方法中,其中所述方法进一步包括单独、依次或同时施用另外的ERK抑制剂,诸如优立替尼、temuterkib、JSI-1187、ravoxertinib、ASN007或MK-8353。

[0406] 本发明可以另外提供与MEK抑制剂组合并进一步与本文描述的ERK抑制剂组合的抗-GREM1拮抗剂。

[0407] 检测和诊断

[0408] 基于间质GREM1与癌症之间的相关性,结合在使用GREM1拮抗剂治疗后Ras-Raf-MEK-ERK途径相关基因被上调的发现结果,本发明还提供了用于预测癌症对治疗的应答性的另外方式。这样的方式可以包括测量从患者获得的样品中的Ras-Raf-MEK-ERK途径信号传导、GREM1的间质表达和/或上皮表达。

[0409] 本发明提供了用于确定患有或疑似患有癌症或处于患上癌症的风险中的患者是否可能对使用GREM1拮抗剂和Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂的组合治疗做出应答的方法,所述方法包括测量患者中的GREM1的间质和/或上皮表达和Ras-Raf-MEK-ERK信号传导,并从而预测所述患者是否可能对使用所述组合的治疗做出应答。

[0410] 本发明另外提供了用于确定患有或疑似患有癌症或处于患上癌症的风险中的患者是否可能对使用抗-GREM1拮抗剂和Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂的组合治疗做出应答的方法,所述方法包括测量在用抗-GREM1拮抗剂治疗/暴露后患者中的Ras-Raf-MEK-ERK途径信号传导,并从而预测所述患者是否可能对使用所述组合的治疗做出应答。例如,响应于抗-GREM1拮抗剂治疗而上调/诱导的Ras-Raf-MEK-ERK信号传导可以指示所述患者是根据本发明的组合疗法的良好候选人。本发明另外提供了用于确定患有或疑似患有胰腺癌或处于发生胰腺癌的风险中的患者是否可能对使用抗-GREM1拮抗剂和Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂的组合治疗做出应答的方法,所述方法包括测量在用抗-GREM1拮抗剂治疗/暴露后患者中的Ras-Raf-MEK-ERK途径信号传导,并从而预测所述患者是否可能对使用所述组合的治疗做出应答。例如,响应于抗-GREM1拮抗剂治疗而上调的Ras-Raf-MEK-ERK信号传导可以指示所述患者是根据本发明的组合疗法的良好候选人。本发明另外提供了用于确定患有或疑似患有胰腺癌或处于发生胰腺癌的风险中的患者是否可能对使用GREM1拮抗剂和

Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂的组合治疗做出应答的方法,所述方法包括测量患者中GREM1的间质和/或上皮表达,并确定所述患者是否具有RAS基因或RAF基因突变,并从而预测所述患者是否可能对使用所述组合的治疗做出应答。

[0411] 预测的个体对给定疗法的应答性意味着预期该个体会从接受该疗法中获得益处或足够程度的益处。预测的个体对疗法的无应答性意味着预期该个体不会从接受该疗法中获得益处或足够程度的益处。用于预测应答的方法可以在施用GREM1拮抗剂和Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂的组合治疗之前进行。然后可以在为所述个体选择或推荐合适的治疗时考虑所述预测。供选择地,所述方法可以在用所述疗法治疗之后进行,并用于监测和预测所述个体对治疗的应答。通常,所述方法用于预测所述个体是否将对使用所述疗法的治疗具有原初应答,即所述个体是否将在第一次接受所述疗法时有应答。在某些情况下,所述方法用于预测继发性无应答性,即最初对治疗有应答的个体是否将在以后停止对治疗作出应答或将对治疗较差地做出应答。

[0412] 在某些情况下,与参考样品或参考水平相比,GREM1的过表达指示所述个体将对使用本文描述的组合治疗的疗法做出应答。与参考样品或参考水平相比,Ras-Raf-MEK-ERK信号传导的失调,例如Nras、Mapk1和/或Myc的上调也可以指示所述个体将对本文描述的组合治疗做出应答。通过检查磷酸化水平,例如,使用磷酸化位点特异性抗体,诸如针对MEK和ERK的磷酸化特异性抗体,可以测量Ras-Raf-MEK-ERK信号传导。例如,与参考样品或参考水平相比,响应于本发明的抗-GREM1拮抗剂治疗而增加的Map2k1/Map2k2/Erk1/Erk2的磷酸化指示所述个体将对使用本文描述的组合治疗的疗法做出应答。然后可以选择或推荐包含与Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂(诸如MEK抑制剂或ERK抑制剂)组合的GREM1拮抗剂的组合疗法,并且然后可以进一步施用给所述个体。

[0413] 在其它情况下,与参考样品或参考水平相比,降低的或正常的GREM1水平指示所述个体不会对使用GREM1拮抗剂的疗法做出应答。与参考样品或参考水平相比,正常的或降低的Ras-Raf-MEK-ERK信号传导可以指示个体不会对使用Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂的疗法做出应答。然后将包含GREM1拮抗剂和Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂的组合疗法施用给所述个体。此外,可以选择或推荐除本文描述的组合法之外的治疗性治疗来治疗所述个体,并且然后可以进一步施用给所述个体。

[0414] 在其它情况下,在RAS基因(诸如KRAS、NRAS和/或HRAS)或RAF基因(诸如ARAF、BRAF和/或CRAF)中的突变指示所述个体将对使用本文描述的组合法的疗法做出应答。然后可以选择或推荐包含与Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂组合的GREM1拮抗剂的组合法,并且然后可以进一步施用给所述个体。

[0415] 在本发明的所有方面,可以选择患有癌症(例如胰腺癌)的个体或疑似患有该疾病或病症的个体和/或处于患上该疾病或病症的风险中的个体进行治疗或确定。例如,所述个体可以尚未被正式诊断,但可以由于一种或多种症状的存在而被怀疑患有该疾病或病症。如果个体具有一个或多个与癌症相关的风险因素和/或一个或多个增加其对癌症的易感性的倾向,则可以认为所述个体处于患上癌症的风险中。与胰腺癌相关的风险因素可以包括由PRSS1基因中的突变造成的家族性胰腺炎以及遗传性基因突变,诸如在GREM1编码基因中的一个或多个突变或影响GREM1基因表达的任何其它突变。

[0416] 下列实施例举例说明本发明。

实施例

[0417] 材料和方法

[0418] 抗-gremlin-1抗体-Ab7326 mIgG1-APP.4405.IgG.mFc

[0419] 媒介物-磷酸盐缓冲盐水pH 7.4(由Beatson Institute提供)

[0420] 司美替尼(AZD6244)-由Beatson Institute提供(购自SYNthesis Pharm),在0.5% HPMC+0.1%吐温-80中。

[0421] UCB-554MEK抑制剂(UCB1366554-000,批次ID B10476792,由UCB提供)在10% DMSO+90%的1% (w/v) 甲基纤维素中。在125 μ l中以10mg/kg施用,每2天1次口服

[0422] 在实施例5中的媒介物是125 μ l的10% DMSO+90%的1% (w/v) 甲基纤维素,每2天1次口服(p.o., q2d)

[0423] 遗传修饰的小鼠

[0424] 之前已经描述了LSL-Kras^{G12D/+};Trp53^{R172H/+};Pdx1-Cre (KPC) 小鼠(Hingorani等人,2005)。通过杂交带有Pdx1-Cre和条件性LSL-KrasG12D或LSL-Trp53R172H等位基因的小鼠(品系01XJ6和01XL9,人癌症联盟的小鼠模型[Mouse Models of Human Cancer Consortium,MMHCC],NCI-Frederick,Frederick,MD,美国)来产生小鼠。将具有混合背景的小鼠在CRUK Beatson Institute内部繁殖,并维持在具有环境富集的常规笼养中,可随意获取标准食物和水。由Transnetyx(Cordoba,TN,美国)进行基因分型。招募两种性别的小鼠进行研究。所有动物实验均在英国内政部(UK Home Office)许可下进行,并经格拉斯哥大学(University of Glasgow)动物福利和伦理审查委员会批准。

[0425] 实施例3和4的治疗

[0426] 每周监测小鼠3次,直到通过腹部触诊诊断出胰腺癌并通过超声成像确认。将小鼠随机分配到治疗组并如下施用:30mg/kg Ab7326mIgG1每周两次皮下;或30mg/kg Ab7326 mIgG1每周两次皮下和25mg/kg司美替尼每天2次口服(p.o., b.i.d)。提供用25mg/kg司美替尼每天2次口服治疗的小鼠的历史数据。每组有 $\geq$ 12只小鼠。每天监测小鼠,并在治疗开始后7天(每组4只小鼠)或达到伦理终点时(每组 $\geq$ 8只小鼠,症状包括腹胀、恶病质、间歇性弓背或活动减少、竖毛、轻度腹泻、贫血)处死。通过Kaplan-Meier和对数秩分析对这些小鼠从治疗开始的存活进行统计评估。

[0427] 超声成像

[0428] 将VisualSonics Vevo 3100临床前成像平台(FUJIFILM VisualSonics,Toronto,加拿大)用于高分辨率超声成像以确认肿瘤诊断并每周监测肿瘤进展。用异氟烷和医用空气的混合物诱导并维持麻醉。每周计算每只小鼠的肿瘤体积并纵向绘制。

[0429] 采样

[0430] 按照机构指南,按照计划1方法宰杀小鼠。通过大体病理学和组织学评估死后肿瘤负荷。取出器官并在10%缓冲福尔马林中固定。在处死时,在可能的情况下,通过心脏穿刺采集终末血液样品并处理获得血清。将大部分肿瘤在10%缓冲福尔马林中固定以进行FFPE处理,并将任何剩余部分收获到**RNAlater®** (Sigma-Aldrich)中进行RNA制备和/或快速冷冻。将固定的组织包埋在石蜡中,并将5 μ m切片放在聚-L-赖氨酸载玻片上进行IHC分析。

[0431] 组织学和免疫组织化学

[0432] 如前所述,对福尔马林固定的、石蜡包埋的组织进行苏木精和曙红以及天狼猩红

染色。使用标准方案进行免疫组织化学。简而言之,将福尔马林固定的石蜡包埋的切片通过经过二甲苯和分级酒精系列进行脱石蜡和再水合。通过用过氧化氢处理使内源性过氧化物酶活性失活,此后进行柠檬酸盐缓冲液抗原修复。将切片在血清中封闭,并随后与一级抗体一起温育。将切片在二级抗体中温育30分钟,并用3,3'-二氨基联苯胺四盐酸盐进行染色显影。使用的一级抗体是抗- α -SMA (1A4, Sigma-Aldrich) 1:20,000) 和抗-podoplanin (RTD4E10, AbCam 1:250)。

[0433] 实施例5的治疗

[0434] 每周监测小鼠3次,直到通过腹部触诊诊断出胰腺癌并通过超声成像确认。将小鼠随机分配到治疗组(每组n=9-11)并施用:125 μ l 媒介物,每2天1次口服;30mg/kg Ab7326 mIgG1每周两次皮下;25mg/kg 司美替尼每天2次口服;30mg/kg Ab7326 mIgG1每周两次皮下和25mg/kg 司美替尼每天2次口服;在125 μ l中的UCB-554 10mg/kg,每2天1次口服;或30mg/kg Ab7326 mIgG1每周两次皮下和在125 μ l中的UCB-554 10mg/kg,每2天1次口服。

[0435] 每天监测小鼠,并在达到伦理终点时处死。

[0436] 实施例5的统计学

[0437] 使用Cox的比例风险模型计算风险比,对这些小鼠从治疗开始的存活进行统计评估。使用适合随机设计的线性模型分析在第7天的肿瘤体积数据,拟合第0天的治疗肿瘤体积用作协变量以提高估计的准确性。

[0438] 实施例1:胰腺癌中Grem1 mRNA表达的确证

[0439] 为了研究gremlin-1是否可能在胰腺癌中发挥作用,通过RNAseq分析确定,在一组人胰腺导管腺癌(PDAC)患者中确定了Grem1 mRNA表达。这证实了Grem1 mRNA在人PDAC中表达,并且高表达与不良预后显著相关(图1)。结果与一项公开的研究一致,该研究报告了Grem1表达与胰腺癌中的不良结果之间的联系(Yu等人,2018)。

[0440] 为了确定greml mRNA是否在KPC遗传工程改造的胰腺癌小鼠模型中表达,在KPC肿瘤(和其它原生胰腺癌模型)中检查了基因表达,并将其与对照即表达KrasG12D的正常胰腺导管上皮进行了对比。结果表明,与对照相比,在KPC肿瘤(和其它鼠胰腺肿瘤)中的gremlmRNA表达升高(表1)。

[0441] 表1

[0442]	基因符号	基因标题	KPC 肿瘤相对于胰腺导管细胞(倍数变化)	p-值	所有小鼠 PDAC 相对于胰腺导管细胞(倍数变化)	p-值
	<i>greml</i>	gremlin 1	5.5	4.0×10^{-3}	6.4	4.1×10^{-3}

[0443] 实施例2:用Ab7326 mIgG1治疗后在KPC小鼠模型中的基因表达变化。

[0444] 按照在材料和方法中所述,建立具有经确认的胰腺肿瘤的KPC小鼠。将小鼠纳入组中,用于用抗-gremlin抗体Ab7326 mIgG1或媒介物对照治疗,如表2所示。

[0445] 在伦理终点时处死小鼠,并将原发性肿瘤组织收获进**RNAlater®** (Sigma-Aldrich) 中进行RNA提取。使用Nanostring nCounter基因表达技术,使用一组大约750个探针针对RNA样品进行查询。

[0446] 表2

	治疗	剂量	计划	n=	中位生存期 (天)
[0447]	Ab7326 mIgG1	30mg/kg 皮下	每周两次	3	26
	媒介物(PBS)	na	每周两次	3	20

[0448] 在暴露于Ab7326 mIgG1后对KPC小鼠模型中基因表达变化的分析显示了MAPK/ERK (MEK) 途径及其典型成员的上调。

[0449] MAPK/ERK (MEK) 途径的典型成员Mapk1、Nras和Myc被上调(图3)。由于功效不足(每组3个样品,即Ab7326 mIgG1暴露和对照),这些基因在多重假设校正后失去了其统计学显著性(FDR<5%)。但是,当将Ab7326 mIgG1与对照组进行对比时,描绘这三个基因的基因表达分布差异的箱线图清楚地显示出上调的表达(图3)。

[0450] 途径富集分析证实了这一发现(图4)。KRAS信号传导的下调在下调的基因组中富集(p=0.03),而KRAS信号传导的上调与上调的差异表达的基因组相关(p=0.01)。尽管这些富集的途径在多重假设校正后不再具有统计学显著性,但上调效应和下调效应之间的一致模式却是惊人的。

[0451] 此外,当将KPC小鼠暴露于Ab7326 mIgG1时,增殖信号上升(G2M、E2F和MYC靶标)。这与MAPK/ERK (MEK) 途径活化的下游效应一致。在图4中,显示了log10(p) 评分,并且仅保留具有p<0.05的途径。没有进行多重假设校正。但是,MYC_靶标、E2F_靶标和G2M_检验点途径在该校正后仍然是显著的(FDR<5%)。

[0452] 所述发现支持Ab7326 mIgG1与MEK抑制剂用于治疗胰腺癌的潜在组合。此外,Ab7326 mIgG1暴露可以使胰腺癌对这种靶向治疗更敏感。

[0453] 实施例3:与使用Ab7326 mIgG1作为单一药剂的治疗相比,使用Ab7326 mIgG1和司美替尼的组合的治疗导致更慢的肿瘤生长

[0454] 之前已经描述了LSL-Kras^{G12D/+};LSL-Trp53^{R172H/+};Pdx1-Cre (KPC) 小鼠(Hingorani 等人,2005)。这些小鼠发生在组织学和病理学上与人胰腺肿瘤相似并且极具侵袭性、通常具有转移性且具有高度化学抗性的肿瘤,从而再次模仿人胰腺癌。建立了一组KPC小鼠,并监测小鼠直到它们发生可通过触诊检测到的胰腺癌。生成这些小鼠所需的繁殖策略以及实验设计如图2所示。

[0455] 至少每周通过触诊监测小鼠,直到可检测到胰腺肿瘤。在此时,使用高分辨率超声成像来确认胰腺癌的存在,并将小鼠纳入组中,用于用抗-Gremlin1抗体Ab7326 mIgG1或Ab7326 mIgG1+司美替尼组合治疗(详见表3和4)。

[0456] 表3

药效动力学评估研究				
治疗	剂量	计划	n=	时间点
[0457] Ab7326 mIgG1	30mg/kg 皮下	每周两次	4	7 天
Ab7326 mIgG1 + 司美替尼	30mg/kg 皮下 25mg/kg 口服	每周两次、每天 2 次	4	7 天

[0458] 表4

存活研究				
治疗	剂量	计划	n=	中位生存期
[0459] Ab7326 mIgG1	30mg/kg 皮下	每周两次	9	19
司美替尼*	25mg/kg 口服	每天 2 次	8	17
Ab7326 mIgG1 + 司美替尼	30mg/kg 皮下 25mg/kg 口服	每周两次、每天 2 次	9	33

[0460] 每组中的四只小鼠在1周后接受随访超声扫描,并且然后被处死以生成样品用于药效动力学评估(表3)。大体病理学分析并未揭示在不同实验条件下肿瘤负荷或表型的任何差异。通过超声对3D肿瘤成像的分析揭示,在用Ab7326 mIgG1+司美替尼组合治疗的小鼠中肿瘤生长减慢(图5)。

[0461] 实施例4:使用Ab7326 mIgG1和司美替尼的组的治疗导致与使用单独Ab7326 mIgG1的治疗相比更慢的肿瘤生长和肿瘤缩小以及延长的应答,并且导致与使用司美替尼和Ab7326 mIgG1作为单一药剂的治疗相比中位生存期的显著增加。

[0462] 对于存活组(表4),在治疗期间每周进行高分辨率超声成像,以便监测接受治疗的每只单独小鼠的肿瘤负荷。小鼠继续接受研究并受到密切监测直至达到伦理终点,在此时根据机构指南将其处死。表现出的临床特征包括腹胀、身体状况不佳(提示恶病质)、活动能力下降和偶尔出现黄疸。

[0463] 通过超声对3D肿瘤成像的分析揭示,在几只Ab7326 mIgG1和司美替尼的组合治疗的小鼠中,存在更慢的肿瘤生长、肿瘤缩小以及延长的应答(图6)。此外,我们观察到,用Ab7326 mIgG1和司美替尼的组合治疗的小鼠(33天)显示出与用单独的司美替尼治疗的小鼠(17天,对数秩, $p=0.050$)相比中位生存期的显著增加,以及与用单独Ab7326治疗的小鼠(19天,关于个体小鼠数据,参见图7、表5和表6)相比中位生存期的增加。来自药效动力学评估和存活研究的血清样品均被送至UCB进行分析(表7)。

[0464] 表5

	对数秩
[0465] Ab7326 + 司美替尼相对于 Ab7326	P=0.100
Ab7326 + 司美替尼相对于司美替尼	P=0.050
Ab7326 + 司美替尼相对于 Ab7326 (合并的第 1 个和第 2 个 Ab7326 单一药剂组)	P=0.061

[0466] 表6

[0467]

审查(=0)				
小鼠 ID	反应天数	Ab7326	司美替尼	Ab7326 +司美替尼
NKD207.1d	11	1		
NKD203.2e	18	1		
NKD193.7a	18	1		
NKD203.6a	18	1		
NKD192.9d	19	1		
NKD211.1f	21	1		
NKD211.3e	25	1		
NKD210.1d	33	1		
NKD206.2c	40	1		
160324	9		1	
NKD232.1b	13		1	
160323	15		1	
NKD214.9e	17		1	
130780	17		1	
173159	20		1	
148346	32		1	
NKD232.3d	33		1	
NKD219.1c	11			1
NKD217.1f	12			1
NKD221.1e	17			1
NKD208.1d	21			1
NKD214.1e	33			1
NKD186.10d	59			1
NKD206.1g	86			1
NKD190.8e	91			1
NKD191.6e	130			1

[0469] 表7

[0470]

小鼠 ID	治疗	时间点	样品
NKD191.1g	Ab7326	7 天	血清
NKD202.3g	Ab7326	7 天	血清
NKD201.6f	Ab7326	7 天	血清
NKD219.1d	Ab7326	7 天	血清
NKD203.2e	Ab7326	终点	血清
NKD193.7a	Ab7326	终点	血清
NKD192.9d	Ab7326	终点	血清

[0471]

NKD210.1d	Ab7326	终点	血清
NKD211.1f	Ab7326	终点	血清
NKD206.2c	Ab7326	终点	血清
NKD202.1j	Ab7326 + 司美替尼	7 天	血清
NKD203.3e	Ab7326 + 司美替尼	7 天	血清
NKD203.5i	Ab7326 + 司美替尼	7 天	血清
NKD209.2e	Ab7326 + 司美替尼	7 天	血清
NKD186.10d	Ab7326 + 司美替尼	终点	血清
NKD208.1d	Ab7326 + 司美替尼	终点	血清
NKD214.1e	Ab7326 + 司美替尼	终点	血清
NKD221.1e	Ab7326 + 司美替尼	终点	血清
NKD219.1c	Ab7326 + 司美替尼	终点	血清
NKD217.1f	Ab7326 + 司美替尼	终点	血清

[0472] 在处死实验小鼠后,大体病理学检查未揭示在不同实验条件下肿瘤负荷或表型的任何差异。对福尔马林固定的石蜡包埋的肿瘤组织进行免疫组织化学(IHC)分析以检查肿瘤微环境,以评估 α -SMA-阳性的和podoplanin-阳性的肿瘤相关的成纤维细胞的数量或胶原蛋白I和III的质量或数量的任何变化(通过天狼猩红染色测量)。使用HALO数字软件对染色进行评分,但是,任何试验方案对这些参数中的任一个都没有显著影响(图8)。

[0473] 结果

[0474] 总之,本文提出的结果证实,在KPC小鼠模型中,MAPK/ERK途径基因在暴露于Ab7326后上调。此外,Ab7326 mIgG1可以与司美替尼组合安全地施用给KPC小鼠。与使用单独的司美替尼的治疗相比,当使用Ab7326 mIgG1和司美替尼的组合治疗小鼠时,观察到存活的显著改善(参见图7、表5以及在表6中的个体小鼠数据)。此外,在几只只用Ab7326 mIgG1和司美替尼的组合治疗的小鼠中观察到肿瘤缩小,并且在这些小鼠中的应答延长。这表明,Ab7326 mIgG1和司美替尼的组合代表了一种非常有前途的胰腺癌治疗。

[0475] 实施例5:使用Ab7326 mIgG1与司美替尼或UCB-554MEK抑制剂的组合对KPC小鼠的治疗导致与使用单一药剂的治疗相比更慢的肿瘤生长和延长的存活。

[0476] 为了确定在实施例3中用Ab7326和司美替尼的组合观察到的延长存活是否适用于其它MEK抑制剂,并且为了通过增加每组中KPC小鼠的数目来进一步提高研究的稳健性,进行了一项对比与MEK抑制剂司美替尼或MEK抑制剂UCB-554组合的Ab7326的研究。按照在材料和方法中所述,建立具有确认的胰腺肿瘤的KPC小鼠,将其纳入组中用于如在表8中所示

的治疗,并通过超声和伦理生存终点监测肿瘤生长。

[0477] 表8

存活研究				
治疗	剂量	计划	n=	中位生存期
媒介物	125 μ l 口服	每 2 天	10	12 天
Ab7326 mIgG1	30mg/kg 皮下	每周两次	10	9.5 天
司美替尼	25mg/kg 口服	每天 2 次	9	22 天
Ab7326 mIgG1 + 司美 替尼	30mg/kg 皮下 25mg/kg 口服	每周两次、每 天 2 次	10	29.5 天
UCB-554	10mg/kg 口服	每 2 天	10	21 天
Ab7326 mIgG1 + UCB-554	30mg/kg 皮下 10mg/kg 口服	每周两次、每 2 天	11	32 天

[0479] 与仅有媒介物的对照或Ab7326治疗相比,使用MEK抑制剂UCB-554的治疗导致KPC小鼠的存活的适度提高(图9a和表8中位生存期)。但是,与单独的UCB-554相比,使用Ab7326和UCB-554的组合治疗导致KPC小鼠的存活的进一步提高(图9a和表8中位生存期)。将Cox的比例风险模型拟合到存活数据,并估算风险比(HR)用于对比不同的治疗组(表9)。Ab7326+UCB-554相对于媒介物对照($HR=3.57, p=0.005$)或单独的Ab7326($HR=4.38, p=0.001$)的风险比表明,所述组合在统计上显著提高存活。Ab7326+UCB-554相对于单独的UCB-554的风险比也大于1($HR=1.75$),表明所述组合比单独的MEK抑制改善存活率,但未达到统计显著性($p=0.211$)。

[0480] 表9-用Ab7326和UCB-554组合治疗的KPC小鼠的存活统计数据总结

存活研究		
对比	风险比	P 值
媒介物/Ab7326	0.82	0.656
媒介物/UCB-554	2.04	0.120
媒介物/Ab7326 + UCB-554	3.57	0.005
Ab7326/UCB-554	2.50	0.043
Ab7326/Ab7326 + UCB-554	4.38	0.001
UCB-554/Ab7326 + UCB-554	1.75	0.211

[0482] 通过超声使用3D肿瘤成像随时间测量了对照组或接受治疗的KPC小鼠中胰腺肿瘤的体积。在治疗开始后第7天的肿瘤体积的对比表明,与存活数据一致,与媒介物或单独Ab7326治疗相比,在UCB-554治疗组中的肿瘤体积减小(图9b)。此外,与单独的UCB-554相比,Ab7326+UCB-554的组合在第7天具有统计学上显著的肿瘤体积减小($p=0.040$)。

[0483] 测量随时间变化的该组小鼠的肿瘤体积直至达到伦理终点,表明与媒介物对照相比,Ab7326和UCB-554的组合治疗导致一个子组小鼠的肿瘤缩小或肿瘤生长减小(图9c)。

[0484] 将在实施例3中所示的司美替尼MEK抑制剂研究中收集的KPC小鼠存活数据(表4)

与来自实施例5队列的数据(表8)组合,通过包括更大数目的动物来提高分析的稳健性。如在图10a和表10中所示,Ab7326和司美替尼的组合比单独的媒介物(HR=5.16, $p<0.001$)或Ab7326治疗(HR=3.82, $p<0.001$)显著提高了KPC小鼠的存活。此外,Ab7326和司美替尼的组合比单独的司美替尼治疗显著提高存活,具有2.92的风险比($p=0.006$),表明在该胰腺癌模型中,将gremlin-1抑制与MEK途径抑制组合存在显著的有益效果。

[0485] 表10-用Ab7326和司美替尼组合治疗的KPC小鼠的存活统计数据总结

[0486]	存活研究		
	对比	风险比	P 值
	媒介物/Ab7326	1.35	0.450
	媒介物/司美替尼	1.77	0.166
	媒介物/Ab7326 + 司美替尼	5.16	0.000
	Ab7326/司美替尼	1.31	0.427
	Ab7326/Ab7326 + 司美替尼	3.82	0.000
	司美替尼/Ab7326 + 司美替尼	2.92	0.006

[0487] 在治疗开始后第7天的肿瘤体积的对比表明,与存活数据一致,与媒介物或单独Ab7326治疗相比,在司美替尼和司美替尼+Ab7326治疗组中的平均肿瘤体积减小(图10b)。

[0488] 测量随时间变化的该队列中小鼠的肿瘤体积直至达到伦理终点,表明与媒介物对照相比,Ab7326和司美替尼的组合治疗导致一个子组小鼠的肿瘤缩小或肿瘤生长减小(图10c)。

[0489] 综上所述,这些数据证实,在胰腺癌的KPC鼠模型中,与MEK抑制剂诸如司美替尼或UCB-554组合施用的抗-gremlin-1抗体Ab7326导致与使用单一药剂的治疗相比减少的肿瘤生长和增加的存活。这表明,同时靶向gremlin-1和MEK药理学途径可以在胰腺癌的治疗中产生累加或协同效应。

[0490] 方面

[0491] 1. 用于用在治疗或预防癌症的方法中的抗-GREM1拮抗剂,其中所述方法进一步包括施用Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂。

[0492] 2. 根据方面1的用于所述用途的抗-GREM1拮抗剂,其中所述癌症是实体癌症。

[0493] 3. 根据方面1或方面2的用于所述用途的抗-GREM1拮抗剂,其中所述癌症具有间质GREM1过表达。

[0494] 4. 根据前述方面中的任一个的用于所述用途的抗-GREM1拮抗剂,其中所述癌症是与Ras-Raf-MEK-ERK途径失调相关的癌症。

[0495] 5. 根据前述方面中的任一个的用于所述用途的抗-GREM1拮抗剂,其中所述癌症在暴露于抗-GREM1拮抗剂后显示出Ras-Raf-MEK-ERK途径失调。

[0496] 6. 根据前述方面中的任一个的用于所述用途的抗-GREM1拮抗剂,其中所述癌症含有在Ras基因,任选地KRAS、NRAS和/或HRAS中的突变。

[0497] 7. 根据前述方面中的任一个的用于所述用途的抗-GREM1拮抗剂,其中所述癌症含有在Raf基因,任选地ARAF、BRAF和/或CRAF中的突变。

[0498] 8. 根据前述方面中的任一个的用于所述用途的抗-GREM1拮抗剂,其中所述癌症是对使用Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂的治疗应答不佳、无应答或难治的癌症。

[0499] 9. 根据前述方面中的任一个的用于所述用途的抗-GREM1拮抗剂,其中所述癌症选自结肠直肠癌、多发性骨髓瘤、胰腺癌、膀胱癌、乳腺癌、肺癌、胃癌、十二指肠癌、食道癌、头颈癌、前列腺癌、神经胶质瘤、子宫内膜癌、肝癌、脾癌、骨驻留癌、黑素瘤和骨肉瘤。

[0500] 10. 根据方面9的用于所述用途的抗-GREM1拮抗剂,其中所述癌症是胰腺癌。

[0501] 11. 根据方面10的用于所述用途的抗-GREM1拮抗剂,其中所述胰腺癌是外分泌胰腺癌。

[0502] 12. 根据方面10或方面11的用于所述用途的抗-GREM1拮抗剂,其中所述胰腺癌是胰腺导管腺癌(PDAC)。

[0503] 13. 根据方面9的用于所述用途的抗-GREM1拮抗剂,其中所述癌症是多发性骨髓瘤或结肠直肠癌;任选地是KRAS/BRAF突变的结肠直肠癌。

[0504] 14. 根据方面9的用于所述用途的抗-GREM1拮抗剂,其中所述癌症是肺癌;任选地其中所述癌症是非小细胞肺癌(NSCLC)。

[0505] 15. 根据方面9的用于所述用途的抗-GREM1拮抗剂,其中所述癌症是黑素瘤;任选地是BRAF-突变的黑素瘤。

[0506] 16. 根据前述方面中任一个的用于所述用途的抗-GREM1拮抗剂,其中所述癌症具有上皮GREM1过表达。

[0507] 17. 根据方面16的用于所述用途的抗-GREM1拮抗剂,其中所述癌症是GREM1引发的癌症。

[0508] 18. 根据前述方面中的任一个的用于所述用途的抗-GREM1拮抗剂,其中所述癌症是弥散性癌症。

[0509] 19. 根据前述方面中的任一个的用于所述用途的抗-GREM1拮抗剂,其中所述癌症是确定的癌症。

[0510] 20. 根据前述方面中的任一个的用于所述用途的抗-GREM1拮抗剂,其中所述拮抗剂是肽、蛋白、抗体、多核苷酸、寡核苷酸、反义RNA、小干扰RNA(siRNA)、小分子抑制剂或小发夹RNA(shRNA)。

[0511] 21. 根据方面20的用于所述用途的抗-GREM1拮抗剂,其中所述拮抗剂是与Gremlin-1上的表位结合的抗体,所述表位包含至少一个选自Ile131、Lys147、Lys148、Phe149、Thr150、Thr151、Arg169、Lys174和Gln175的残基,其中所述残基编号根据SEQ ID NO:1。

[0512] 22. 根据方面21的用于所述用途的抗-GREM1拮抗剂,其中所述抗体结合包含所有Ile131、Lys147、Lys148、Phe149、Thr150、Thr151、Arg169、Lys174和Gln175的表位。

[0513] 23. 根据方面21或22的用于所述用途的抗-GREM1拮抗剂,其中Lys147、Lys148、Phe149、Thr150、Thr151、Arg169、Lys174和Gln175位于相同的Gremlin-1单体上,并且Ile131位于第二个Gremlin-1单体上。

[0514] 24. 根据方面20的用于所述用途的抗-GREM1拮抗剂,其中所述拮抗剂是抗-Gremlin-1抗体,该抗体包含在SEQ ID NO:10或12的重链可变区(HCVR)内所含的重链互补决定区(HCDR)序列和/或在SEQ ID NO:11或13的轻链可变区(LCVR)内所含的轻链互补决定区(LCDR)序列。

[0515] 25. 根据方面20的用于所述用途的抗-GREM1拮抗剂,其中所述拮抗剂是抗-

Gremlin-1抗体,该抗体包含至少一个选自SEQ ID NO:3、4、5和6的HCDR序列和/或至少一个选自SEQ ID NO:7、8和9的LCDR序列。

[0516] 26.根据方面25的用于所述用途的抗-GREM1拮抗剂,其中所述抗-Gremlin-1抗体包含SEQ ID NO:6的HCDR3序列。

[0517] 27.根据方面25或26的用于所述用途的抗-GREM1拮抗剂,其中所述抗-Gremlin-1抗体包含选自SEQ ID NO:4/5/6或选自SEQ ID NO:3/5/6的HCDR1/HCDR2/HCDR3序列组合和/或选自SEQ ID NO:7/8/9的LCDR1/LCDR2/LCDR3序列组合。

[0518] 28.根据方面25至27中任一个的用于所述用途的抗-GREM1拮抗剂,其中所述抗-Gremlin-1抗体包含SEQ ID NO:4/5/6/7/8/9或SEQ ID NO:3/5/6/7/8/9的HCDR1/HCDR2/HCDR3/LCDR1/LCDR2/LCDR3序列组合。

[0519] 29.根据方面25至28中任一个的用于所述用途的抗-GREM1拮抗剂,其中所述抗-Gremlin-1抗体包含SEQ ID NO:10或12的重链可变区(HCVR)序列和/或SEQ ID NO:11或13的轻链可变区(LCVR)序列,或与其具有至少95%同一性的序列。

[0520] 30.根据方面29的用于所述用途的抗-GREM1拮抗剂,其中所述抗-Gremlin-1抗体包含SEQ ID NO:10/11或12/13的HCVR和LCVR序列对或与其具有至少95%同一性的序列。

[0521] 31.根据方面30的用于所述用途的抗-GREM1拮抗剂,其中所述抗-Gremlin-1抗体包含由SEQ ID NO:4/5/6/7/8/9或SEQ ID NO:3/5/6/7/8/9组成的HCDR1/HCDR2/HCDR3/LCDR1/LCDR2/LCDR3序列,并且HCVR和LCVR的剩余部分分别与SEQ ID NO:10、11、12和/或13具有至少95%同一性。

[0522] 32.根据方面29-31的用于所述用途的抗-GREM1拮抗剂,其中所述抗-Gremlin-1抗体包含SEQ ID NO:14、16、18、22、28、30、32或34的重链和/或SEQ ID NO:15、17、19、23、29、31、33或35的轻链,或与其具有至少95%同一性的序列。

[0523] 33.根据方面32的用于所述用途的抗-GREM1拮抗剂,其中所述抗-Gremlin-1抗体包含SEQ ID NO:14/15、16/17、18/19、22/23、28/29或30/31、32/33、34/35的重链和轻链对,或与其具有至少95%同一性的序列。

[0524] 34.根据方面33的用于所述用途的抗-GREM1拮抗剂,其中所述抗体的HCDR1/HCDR2/HCDR3/LCDR1/LCDR2/LCDR3序列由SEQ ID NO:4/5/6/7/8/9或SEQ ID NO:3/5/6/7/8/9组成,并且所述重链和轻链的剩余部分分别与SEQ ID NO:14、15、16和/或17具有至少95%同一性。

[0525] 35.根据方面20的用于所述用途的抗-GREM1拮抗剂,其中所述拮抗剂是与如在方面22-32中任一个中所定义的抗体竞争对Gremlin-1的结合的抗体。

[0526] 36.根据方面20的用于所述用途的抗-GREM1拮抗剂,其中所述拮抗剂是与如在方面22-32中任一个中所定义的抗体结合在Gremlin-1上的相同表位的抗体。

[0527] 37.根据方面20-36中任一个的用于所述用途的抗-GREM1拮抗剂,其中所述拮抗剂抗体是嵌合抗体、人抗体或人源化抗体。

[0528] 38.根据方面20-37中任一个的用于所述用途的抗-GREM1拮抗剂,其中所述拮抗剂抗体是Fab、修饰的Fab、Fab'、修饰的Fab'、F(ab')₂、Fv、单结构域抗体或scFv。

[0529] 39.根据方面20的用于所述用途的抗-GREM1拮抗剂,其中所述拮抗剂是编码如在方面21-38中任一个中所定义的抗体的多核苷酸,或携带所述多核苷酸的表达载体。

[0530] 40. 根据方面20-38中任一个的用于所述用途的抗-GREM1拮抗剂,其中所述拮抗剂抗体被包含在进一步包含药学上可接受的辅助剂和/或载体的药物组合物中。

[0531] 41. 根据前述方面中任一个的用于所述用途的抗-GREM1拮抗剂,其中所述Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂下调Mapk1、Nras、Kras和/或Myc信号传导。

[0532] 42. 根据前述方面中任一个的用于所述用途的抗-GREM1拮抗剂,其中所述Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂是MEK抑制剂;任选地是变构MEK抑制剂。

[0533] 43. 根据方面42的用于所述用途的抗-GREM1拮抗剂,其中所述MEK抑制剂是MEK1和/或MEK2抑制剂。

[0534] 44. 根据方面42或方面43的用于所述用途的抗-GREM1拮抗剂,其中所述MEK抑制剂是司美替尼(AZD6244)、曲美替尼(GSK-1120212)、考比替尼(GDC-0973)、比美替尼(MEK162)、CI-1040(PD184352)、莫达美替尼(PD0325901)、TAK733、瑞法替尼(RDEA119/Bay 86-9766)、R0-5126766、R05068760、匹马塞替尼(AS703026)、AZD8330、GDC-0623、R0-4987655、WX-554(UCB-554)、HL-085、ARRY-300、ClnQ-03、G-573、PD184161、PD318088、PD98059、U0126或SL327。

[0535] 45. 根据方面42的用于所述用途的抗-GREM1拮抗剂,其中所述MEK抑制剂选自:

[0536] (a) N-(2-氟-4-碘苯基)-3-(吗啉-4-基羰基)噻吩并[2,3-b]吡啶-2-胺;

[0537] (b) N-(2-氟-4-碘苯基)-3-[(4-甲基哌嗪-1-基)羰基]噻吩并[2,3-b]吡啶-2-胺;

[0538] (c) 2-[(2-氟-4-碘苯基)氨基]噻吩并[2,3-b]吡啶-3-基(吡咯烷-1-基)甲酮;

[0539] (d) (1-{2-[(2-氟-4-碘苯基)氨基]噻吩并[2,3-b]吡啶-3-羰基}哌啶-4-基)-氨基甲酸叔丁酯;

[0540] (e) 2-[(2-氟-4-碘苯基)氨基]噻吩并[2,3-b]吡啶-3-甲酸(4-氨基哌啶-1-基)酰胺二盐酸盐;

[0541] (f) (1-{2-[(2-氟-4-碘苯基)氨基]噻吩并[2,3-b]吡啶-3-羰基}氮杂环丁烷-3-基甲基)氨基甲酸叔丁酯;

[0542] (g) [3-((氨基甲基)氮杂环丁烷-1-基)-{2-[(2-氟-4-碘苯基)氨基]噻吩并[2,3-b]吡啶-3-基}-甲酮];

[0543] (h) (1-{2-[(2-氟-4-碘苯基)氨基]噻吩并[2,3-b]吡啶-3-羰基}-(3R)-吡咯烷-3-基)氨基甲酸叔丁酯;

[0544] (i) (1-{2-[(2-氟-4-碘苯基)氨基]噻吩并[2,3-b]吡啶-3-羰基}-(3S)-吡咯烷-3-基)氨基甲酸叔丁酯;

[0545] (j) (1-{2-[(2-氟-4-碘苯基)氨基]噻吩并[2,3-b]吡啶-3-羰基}氮杂环丁烷-3-基)-氨基甲酸叔丁酯;

[0546] (k) [(3R)-3-氨基吡咯烷-1-基]-{2-[(2-氟-4-碘苯基)氨基]噻吩并[2,3-b]吡啶-3-基}-甲酮;

[0547] (l) [(3S)-3-氨基吡咯烷-1-基]-{2-[(2-氟-4-碘苯基)氨基]噻吩并[2,3-b]吡啶-3-基}-甲酮;

[0548] (m) (3-氨基氮杂环丁烷-1-基)-{2-[(2-氟-4-碘苯基)氨基]噻吩并[2,3-b]吡啶-3-基}-甲酮;

[0549] (n) {2-[(2-氟-4-碘苯基)氨基]噻吩并[2,3-b]吡啶-3-基}-(3-羟基氮杂环丁

烷-1-基)-甲酮;

[0550] (o) {2-[(2-氟-4-碘苯基)氨基]噻吩并[2,3-b]吡啶-3-基}-[(3R)-3-羟基吡咯烷-1-基]-甲酮;

[0551] (p) {2-[(2-氟-4-碘苯基)氨基]噻吩并[2,3-b]吡啶-3-基}-[(3S)-3-羟基吡咯烷-1-基]-甲酮;

[0552] (q) {2-[(2-氟-4-碘苯基)氨基]噻吩并[2,3-b]吡啶-3-基}-[2-(羟甲基)-哌啶-1-基]-甲酮;

[0553] (r) {2-[(2-氟-4-碘苯基)氨基]噻吩并[2,3-b]吡啶-3-基}-[(3S)-3-(羟甲基)-吗啉-4-基]-甲酮;

[0554] (s) 4-{2-[(2-氟-4-碘苯基)氨基]噻吩并[2,3-b]吡啶-3-羰基}-(3R)-3-(羟甲基)哌嗪-1-甲酸叔丁酯;

[0555] (t) 2-[4-{2-[(2-氟-4-碘苯基)氨基]噻吩并[2,3-b]吡啶-3-基}羰基)哌嗪-1-基]乙醇;

[0556] (u) 3-((1,4-二氮杂环庚烷-1-基羰基)-N-(2-氟-4-碘苯基)噻吩并[2,3-b]吡啶-2-胺;

[0557] (v) N-(2-氟-4-碘苯基)-3-(哌嗪-1-基羰基)噻吩并[2,3-b]吡啶-2-胺;

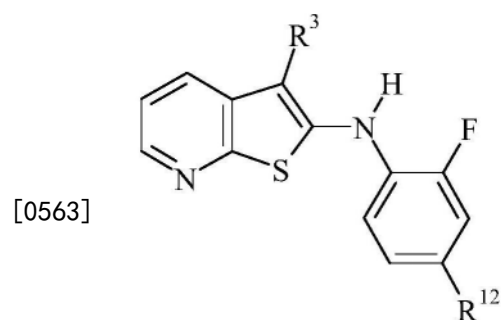
[0558] (w) [4-({2-[(2-氟-4-碘苯基)氨基]噻吩并[2,3-b]吡啶-3-基}羰基)-哌嗪-1-基]乙酸乙酯;

[0559] (x) [4-({2-[(2-氟-4-碘苯基)氨基]噻吩并[2,3-b]吡啶-3-基}羰基)哌嗪-1-基]乙酸;

[0560] (y) {2-[(2-氟-4-碘苯基)氨基]噻吩并[2,3-b]吡啶-3-基}-[(2R)-2-(甲氧基甲基)-吡咯烷-1-基]-甲酮(methone);和

[0561] (z) {2-[(2-氟-4-碘苯基)氨基]噻吩并[2,3-b]吡啶-3-基}-[(2R)-2-(羟甲基)-哌嗪-1-基]-甲酮。

[0562] 46. 根据方面42的用于所述用途的抗-GREM1拮抗剂,其中所述MEK抑制剂由式(II)、及其药学上可接受的盐、溶剂化物和N-氧化物代表:



(II)

[0564] 其中

[0565] R¹²表示卤素;

[0566] R³表示CONR^bR^c;且

[0567] R^b和R^c与它们二者所连接的氮原子一起表示氮杂环丁烷-1-基、吡咯烷-1-基、哌

啉-1-基、吗啉-4-基、硫代吗啉-4-基、哌嗪-1-基、高哌啉-1-基、高吗啉-4-基或高哌嗪-1-基,所述基团中的任一个可以任选地被一个或多个取代基取代,所述取代基选自C₁₋₆烷基、C₁₋₆烷氧基、羟基、羟基(C₁₋₆)烷基(alkyl)、氨基-(C₁₋₆)烷基、(氨基)(羟基)(C₁₋₆)烷基、卤素、氧代、C₂₋₆烷基(alkyl)羰基、羧基、C₂₋₆烷氧基羰基、二(C₁₋₆)烷基(alhyl)胍基羰基、氨基、C₁₋₆烷基氨基、二(C₁₋₆)烷基-氨基、C₂₋₆烷基羰基氨基、氨基羰基氨基、氨基羰基、C₁₋₆烷基氨基羰基、二(C₁₋₆)烷基氨基羰基、氨基磺酰基、C₁₋₆烷基磺酰基、C₁₋₆烷基氨基羰基(C₁₋₆)烷基、C₁₋₆烷氧基(C₁₋₆)烷基、羧基(C₁₋₆)烷基、C₂₋₆烷氧基羰基(C₁₋₆)烷基、C₂₋₆烷氧基羰基氨基和C₂₋₆烷氧基羰基氨基-(C1-6)烷基。

[0568] 47. 根据权利要求46所述的用于所述用途的抗-GREM1拮抗剂,其中R¹²表示溴或碘。

[0569] 48. 根据方面44的用于所述用途的抗-GREM1拮抗剂,其中所述MEK抑制剂是司美替尼(AZD6244)。

[0570] 49. 根据方面44的用于所述用途的抗-GREM1拮抗剂,其中所述MEK抑制剂是曲美替尼(GSK-1120212)。

[0571] 50. 根据方面44的用于所述用途的抗-GREM1拮抗剂,其中所述MEK抑制剂是WX-554(UCB-554)。

[0572] 51. 根据方面44的用途的抗-GREM1拮抗剂,其中所述MEK抑制剂是司美替尼(AZD6244)并且所述癌症是胰腺癌;任选地是PDAC。

[0573] 52. 根据方面44的用于所述用途的抗-GREM1拮抗剂,其中所述MEK抑制剂是曲美替尼(GSK-1120212)并且所述癌症是胰腺癌;任选地是PDAC。

[0574] 53. 根据方面44的用于所述用途的抗-GREM1拮抗剂,其中所述MEK抑制剂是WX-554(UCB-554)并且所述癌症是胰腺癌;任选地是PDAC。

[0575] 54. 根据方面1至41中任一个的用于所述用途的抗-GREM1拮抗剂,其中所述Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂是ERK抑制剂。

[0576] 55. 根据方面54的用于所述用途的抗-GREM1拮抗剂,其中所述ERK抑制剂是优立替尼、temuterkib、JSI-1187、ravoxertinib、ASN007或MK-8353。

[0577] 56. 根据方面54或55的用于所述用途的抗-GREM1拮抗剂,其中所述ERK抑制剂是优立替尼。

[0578] 57. 根据方面56的用于所述用途的抗-GREM1拮抗剂,其中所述ERK抑制剂是优立替尼并且所述癌症是胰腺癌;任选地是PDAC。

[0579] 58. 根据前述方面中任一个的用于所述用途的抗-GREM1拮抗剂,其中所述方法进一步包括施用另外的抗癌剂。

[0580] 59. 用于用在治疗或预防癌症的方法中的Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂,其中所述方法进一步包括施用抗-GREM1拮抗剂。

[0581] 60. 根据方面59的用于所述用途的Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂,其中所述癌症、所述拮抗剂和/或所述方法如在方面1-58中的任一个中所定义。

[0582] 61. 根据方面59或60的用于所述用途的Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂,其中所述Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂是MEK抑制剂。

[0583] 62. 根据方面61的用于所述用途的Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂,其中所述MEK抑制剂是司美替尼(AZD6244)。

[0584] 63. 根据方面61的用于所述用途的Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂,其中所述MEK抑制剂是曲美替尼(GSK-1120212)。

[0585] 64. 根据方面61的用于所述用途的Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂,其中所述MEK抑制剂是WX-554(UCB-554)。

[0586] 65. 根据方面59或60的用于所述用途的Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂,其中所述Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂是ERK抑制剂。

[0587] 66. 根据方面65的用于所述用途的Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂,其中所述ERK抑制剂是优立替尼。

[0588] 67. 治疗癌症的方法,所述方法包括向有此需要的受试者施用与治疗有效量的Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂组合的治疗有效量的抗-GREM1拮抗剂。

[0589] 68. 根据方面67的方法,其中所述癌症、所述拮抗剂和/或所述方法如在方面1-66中的任一个中所定义。

[0590] 69. 包含抗-GREM1拮抗剂和Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂的组合物或试剂盒。

[0591] 70. 根据方面69的组合物或试剂盒,其中所述抗-GREM1拮抗剂如在方面20至39中的任一个中所定义。

[0592] 71. 根据方面69或70的组合物或试剂盒,其中所述Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂如在方面41至57中的任一个中所定义。

[0593] 72. 用于确定患有或疑似患有癌症或处于患上癌症的风险中的患者是否可能对使用GREM1拮抗剂和Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂的组合治疗做出应答的方法,所述方法包括测量所述患者中的GREM1的间质表达、GREM1的上皮表达和/或Ras-Raf-MEK-ERK途径信号传导,并从而预测所述患者是否可能对使用所述组合的治疗做出应答。

[0594] 73. 用于确定患有或疑似患有癌症或处于患上癌症的风险中的患者是否可能对使用GREM1拮抗剂和Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂的组合治疗做出应答的方法,所述方法包括测量所述患者中的GREM1的间质表达和/或GREM1的上皮表达,并确定所述患者是否具有RAS基因或RAF基因突变,并从而预测所述患者是否可能对使用所述组合的治疗做出应答。

[0595] 74. 用于确定患有或疑似患有癌症或处于患上癌症的风险中的患者是否可能对使用GREM1拮抗剂和Ras-Raf-MEK-ERK信号传导抑制剂的组合治疗做出应答的方法,所述方法包括测量所述患者中响应于抗-GREM1拮抗剂治疗的Ras-Raf-MEK-ERK途径信号传导,并从而预测所述患者是否可能对使用所述组合的治疗做出应答。

[0596] 序列表

[0597] SEQ ID NO:1(人Gremlin-1;Uniprot ID:060565)

[0598] MSRTAYTVGALLLLLTLLPAAEGKKKGSQGAIPPPDKAQHNDSEQTQSPQQPGSRNRGRGQGRGTAMP
GEEVLESSQEALHVTERKYLKRDWCKTQPLKQTIHEEGCNSRTIINRFCYGCNSFYIPRHIRKEEGSFQSCSFCKP
KKFTTMMVTLNCPQLPPTKKKRVTRVKQCRCISIDL

[0599] SEQ ID NO:2(在晶体学中使用的人截短的Gremlin-1,具有N-端标签)

[0600] MGSSHHHHHSSGENLYFQGSAMPGEEVLESSQEALHVTERKYLKRDWCKTQPLKQTIHEEGCNSRTI
INRFCYGCNSFYIPRHIRKEEGSFQSCSFCKPKKFTTMMVTLNCPQLPPTKKKRVTRVKQCRCISIDL

[0601] SEQ ID NO:3(Ab7326 HCDR1组合的Kabat和Chothia)

- [0602] GYTFTDYMH
- [0603] SEQ ID NO:4 (Ab7326 HCDR1 Kabat)
- [0604] DYYMH
- [0605] SEQ ID NO:5 (Ab7326 HCDR2 Kabat)
- [0606] LVDPEDGETIYAEKFQG
- [0607] SEQ ID NO:6 (Ab7326 HCDR3 Kabat)
- [0608] DARGSGSYYPNHFDY
- [0609] SEQ ID NO:7 (Ab7326 LCDR1 Kabat)
- [0610] KSSQSVLYSSNNKNYLA
- [0611] SEQ ID NO:8 (Ab7326 LCDR2 Kabat)
- [0612] WASTRES
- [0613] SEQ ID NO:9 (Ab7326 LCDR3 Kabat)
- [0614] QQYYDTPT
- [0615] SEQ ID NO:10 (Ab7326重链可变区变体1)
- [0616] QVQLVESGAEVKKPGATVKISCKVSGYTFTDYMHVWQQAPGKGLEWMGLVDPEDGETIYAEKFQGRVT
ITADTSTD TAYMELSSLRSED TAVYYCATDARGSGSYYPNHFDYWGQGLTVTVSS
- [0617] SEQ ID NO:11 (Ab7326轻链可变区变体1)
- [0618] DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLA WYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFS
GSGSGTDFLTINSLQAEDVAVYFCQQYYDTPTFGQGRLEIK
- [0619] SEQ ID NO:12 (Ab7326重链可变区变体2)
- [0620] QVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYTFTDYMHVWQQAPGKGLEWMGLVDPEDGETIYAEKFQGRVT
ITADTSTD TAYMELSSLRSED TAVYYCATDARGSGSYYPNHFDYWGQGLTVTVSS
- [0621] SEQ ID NO:13 (Ab7326轻链可变区变体2)
- [0622] DIVMTQTPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLA WYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFS
GSGSGTDFLTINSLQAEDVAVYFCQQYYDTPTFGQGRLEIK
- [0623] SEQ ID NO:14 (小鼠全长IgG1重链变体1)
- [0624] QVQLVESGAEVKKPGATVKISCKVSGYTFTDYMHVWQQAPGKGLEWMGLVDPEDGETIYAEKFQGRVT
ITADTSTD TAYMELSSLRSED TAVYYCATDARGSGSYYPNHFDYWGQGLTVTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSM
VTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSSETVTCNVAHPASSTKVDKKIVP
RDCGCKPCICTVPEVSSVFI FPPKPKDVL TITLTPKVTCVVVDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTQPREEQFNST
FRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTI PPPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPED
ITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMDTDGSYFVYSKLNQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTTEKSLSHSPGK
- [0625] SEQ ID NO:15 (小鼠全长IgG1轻链变体1)
- [0626] DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLA WYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFS
GSGSGTDFLTINSLQAEDVAVYFCQQYYDTPTFGQGRLEIKRTDAAPT VSI FPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFY P
KDINVKKWIDGSE RQNGVLNSWTDQDSKSTYSMSSTLT LTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC
- [0627] SEQ ID NO:16 (人全长IgG1重链变体2)
- [0628] QVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYTFTDYMHVWQQAPGKGLEWMGLVDPEDGETIYAEKFQGRVT
ITADTSTD TAYMELSSLRSED TAVYYCATDARGSGSYYPNHFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT

AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE
PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0629] SEQ ID NO:17 (人全长IgG1轻链变体2)

[0630] DIVMTQTPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFS
GSGSGTDFLTINSLQAEDVAVYFCQQYYDTPTFGQGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYP
REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0631] SEQ ID NO:18 (Fab重链变体1)

[0632] QVQLVESGAIEVKKPGATVKISCKVSGYTFTDYYMHVWQQAPGKGLEWMGLVDPEDGETIYAEKFQGRVT
ITADTSTDYAMELSSLRSEDYAVYYCATDARGSGSYYPNHFYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT
AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE
PKSC

[0633] SEQ ID NO:19 (Fab轻链变体1)

[0634] DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFS
GSGSGTDFLTINSLQAEDVAVYFCQQYYDTPTFGQGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYP
REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0635] SEQ ID NO:20 (在晶体学中使用的人截短的Gremlin-1,没有N-端标签)

[0636] AMPGEEVLESSQEALHVTERTKYLKRDWCKTQPLKQTIHEEGCNSRTIINRFCYGGCNSFYIPRHIRKEE
GSFQSCSFCKPKKFTTMMVTLNCPQLPPTKKKRVTRVKQCRCISIDL

[0637] SEQ ID NO:21 (SEQ ID NO:1的成熟Gremlin-1序列,缺乏氨基酸1-21的信号肽)

[0638] KKKGSQGAIPPPDKAQHNDSEQTQSPQQPSRNRGRGQGRGTAMPGEEVLESSQEALHVTERTKYLKRDW
CKTQPLKQTIHEEGCNSRTIINRFCYGGCNSFYIPRHIRKEEGSFQSCSFCKPKKFTTMMVTLNCPQLPPTKKKRV
TRVKQCRCISIDL

[0639] SEQ ID NO:22 (人IgG4P重链变体1)

[0640] QVQLVESGAIEVKKPGATVKISCKVSGYTFTDYYMHVWQQAPGKGLEWMGLVDPEDGETIYAEKFQGRVT
ITADTSTDYAMELSSLRSEDYAVYYCATDARGSGSYYPNHFYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSEST
AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRV
SKYGPCCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQF
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFY
PSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

[0641] SEQ ID NO:23 (人IgG4P轻链变体1)

[0642] DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFS
GSGSGTDFLTINSLQAEDVAVYFCQQYYDTPTFGQGTRLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYP
REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0643] SEQ ID NO:24 (人IgG1重链DNA变体1)

[0644] caagtgaactggtggaatccggggccgaagtgaagagcccgagccactgtgaagatctcttgcaa
agtgtccggctacaccttcaccgactattacatgcactgggtccagcagggcacctgggaagggccttgagtggatg
ggtctggtcgatcccgaggacggcgaaactatctacgccgagaagttccagggtcgcgctaccatcaccgcccgcaca

cttccaccgacaccgcgtacatggagctgtccagcttgaggtccgaggacacagccgtgtactactgcgccacgga
tgctcggggaagcggcagctactacccgaaccacttcgactactggggacagggcactctcgtgactgtctcgagc
gcttctacaaagggccccctccgtgttcccgctcgctccatcatcgaagtctaccagcggaggcactgcggctctcg
gttgccctcgtgaaggactacttcccggagccggtgaccgtgtcgtggaacagcggagccctgaccagcggggtgca
cacctttccggccgtcttgagtcagcaagcggcctttactccctgtcatcagtggtgactgtcccgtccagctcattg
ggaacccaaacctacatctgcaatgtgaatcacaacacctagcaacaccaaggttgacaagaaagtcgagcccaaat
cgtgtgacaagactcacacttgtccgccgtgcccgccacccgaactgctgggaggtcccagcgtctttctgttccc
tccaaagccgaaagacacgctgatgatctcccgcaccccgaggtcacttgctgtggtcgtggacgtgtcacatgag
gaccagaggtgaagttcaattggtacgtggatggcgctcgaagtccacaatgccaaaactaagcccagagaagaac
agtacaattcgacctaccgcgtcgtgtccgtgctcacgggtgttgcatcaggattggctgaacgggaaggaatacaa
gtgcaaagtggtccaacaaggcgtgccggcaccgatcgagaaaactatctccaaagcgaagggaacagcctaggga
cctcaagttctacacgctgccaccatcacgggatgaactgactaagaatcaagttcactgacttgtctggtgaagg
ggttttaccctagcgacattgccgtggagtgggaatccaacggccagccagagaacaactacaagactaccctcc
agtgtcgcactcggatggatcgttcttcttcttactcgaagctcaccgtggataagtcccgggtggcagcagggaac
gtgttctcctgctcggatgatgcataagccctccataaccactatacccaaaagtcgctgtccctgtcgcgggaa
ag

[0645] SEQ ID NO:25 (人IgG1轻链DNA变体1)

[0646] gacattgtgatgaccagtcccccgattcgcttgcggtgtccctgggagaacgggcccaccattaactg
caagagctcacagtcctgtattcatcgaacaacaagaattacctcgcatggtatcagcagaagcctggacag
cctcccaagctgctcatctactgggctagcaccgcgaatccggggtgccgtagattctccggatcgggttcgg
gcaactgacttctgactatcaactcactgcaagccgaggatgtcgcgggtgtacttctgtcagcagttactacga
caccccgacctttggacaaggcaccagactggagattaagcgtacgggtggccgctccctccgtgttcatcttcca
ccctccgacgagcagctgaagtcgggcaccgcctccgtcgtgtgcctgctgaacaacttctacccccgcgaggcca
aggtgcagtggaaggtggacaacgcctgcagtcgggaactcccaggaatccgtcaccgagcaggactccaagga
cagcacctactccctgtcctccaccctgaccctgtccaaggccgactacgagaagcacaaggtgtacgcctgcgaa
gtgaccaccagggcctgtccagccccgtgaccaagtccttcaaccggggcgagtgc

[0647] SEQ ID NO:26 (人IgG4P重链DNA变体1)

[0648] caagtgaactggtggaatccggggccgaagtgaaaaagcccgagccactgtgaagatctcttgcaa
agtgtccggctacaccttcaccgactattacatgcactgggtccagcaggcacctgggaaggcccttgagtggatg
ggctctggtcgatcccaggacggcgaaactatctacgccgagaagttccagggtcgcgtcaccatcaccccgaca
cttccaccgacaccgcgtacatggagctgtccagcttgaggtccgaggacacagccgtgtactactgcgccacgga
tgctcggggaagcggcagctactacccgaaccacttcgactactggggacagggcactctcgtgactgtctcgagc
gcttctacaaagggccccctccgtgttccctctggcccccttgctcccgggtccacctccgagttaccgccgtcttg
gctgcctgggtcaaggactacttccccgagccccgtgacagtgctcctggaactctggcgccctgacctccggcgtgca
caccttccctgccgtgctgcagtcctccggcctgtactccctgtcctccgtcgtgaccgtgccctcctccagcctg
ggcaccaagacctacacctgtaacgtggaccacaagccctccaacaccaaggtggacaagcgggtggaatctaagt
acggccctccctgccccccctgccctgccctgaatttctgggcggaccttccgtgttctgttcccccaagcc
caaggacacctgatgatctcccggacccccgaagtgcactgcgtgggtggacgtgtcccaggaagatcccag
gtccagttcaattggtacgtggacggcgtggaagtgcacaatgccaaagaccaagcccagagaggaacagttcaact

ccacctaccgggtggtgtccgtgctgaccgtgctgcaccaggactggctgaacggcaaagagtacaagtgaaggt
gtccaacaagggcctgccctccagcatcgaaaagaccatctccaaggccaagggccagccccgcgagccccaggtg
tacacctgccccctagccaggaagagatgaccaagaaccaggtgtccctgacctgtctggtcaagggttctacc
cctccgacattgccgtggaatgggagtccaacggccagcccagagaacaactacaagaccacccccctgtgctgga
cagcgacggctccttcttctgtactctcggtgaccgtggacaagtcccgggtggcaggaaggcaacgtcttctcc
tgctccgtgatgcacgaggccctgcacaaccactacaccagaagtccctgtccctgagcctgggcaag

[0649] SEQ ID NO:27 (人IgG4P轻链DNA变体1)

[0650] gacattgtgatgaccagtgccccgattcgcttgcggtgtccctgggagaacggggccaccattaactg
caagagctcacagtccgtcctgtattcatcgaaacaagaattacctcgcatggtatcagcagaagcctggacag
cctcccaagctgctcatctactgggctagcaccgcgaatccggggtgccgtagattctccggatcggggttcgg
gcaactgacttactctgactatcaactcactgcaagccgaggatgtcgcggtgtacttctgtcagcagtactacga
caccgccacctttggacaaggcaccagactggagattaagcgtaacgggtggccgtccctccgtgttcatcttccca
ccctccgacgagcagctgaagtcgggcaccgcctccgtcggtgtgctgctgaacaacttctacccccgcgaggcca
aggtgcagtggaaaggtggacaacgccttgcagtcgggaactcccaggaatccgtcaccgagcaggactccaagga
cagcacctactccctgtcctccaccctgacctgtccaaggccgactacgagaagcacaaggtgtacgcctgcgaa
gtgaccaccaggggcctgtccagccccgtgaccaagtccttcaaccggggcgagtgc

[0651] SEQ ID NO:28 (小鼠全长IgG1重链变体2)

[0652] QVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYTFTDYYMHVQQAPGKGLEWMGLVDPEDGETIYAEKFQGRVT
ITADTSTDYAMELSSLRSEDYAVYYCATDARGSGSYYPNHFYWGQGLTVTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSM
VTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSSETVTCNVAHPASSTKVDKKIVP
RDCGCKPCICTVPEVSSVFIKPPKPKDVLITLTPKVTCTVVDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTQPREEQFNST
FRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAPPAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIKPPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPED
ITVEWQWNGQPAENYKNTQPIIMDTDGSYFVYSKLNQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTKSLSHSPGK

[0653] SEQ ID NO:29 (小鼠全长IgG1轻链变体2)

[0654] DIVMTQTPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFS
GSGSGTDFTLTINSLQAEDVAVYFCQQYYDTPTFGQGTREIKRTDAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYP
KDINVKKWIDGSEKQNGVLNSWTDQDSKSTYSMSSTLTLTKEDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNREK

[0655] SEQ ID NO:30 (人全长IgG1重链变体1)

[0656] QVQLVESGAIEVKKPGATVKISCKVSGYTFTDYYMHVQQAPGKGLEWMGLVDPEDGETIYAEKFQGRVT
ITADTSTDYAMELSSLRSEDYAVYYCATDARGSGSYYPNHFYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT
AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVE
PKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0657] SEQ ID NO:31 (人全长IgG1轻链变体1)

[0658] DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFS
GSGSGTDFTLTINSLQAEDVAVYFCQQYYDTPTFGQGTREIKRTVAAPSVFIKPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYP
REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0659] SEQ ID NO:32 (Fab重链变体2)

[0660] QVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYTFTDYYMHVWQQAPGKGLEWMGLVDPEDGETIYAEKFQGRVT
ITADTSTD TAYMELSSLRSED TAVYYCATDARGSGSYYPNHF DYWGQGT LTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT
AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKE
PKSC

[0661] SEQ ID NO:33 (Fab轻链变体2)

[0662] DIVMTQTPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFS
GSGSGTDFLTINSLQAEDVAVYFCQQYYDTPTFGQGT RLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYP
REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0663] SEQ ID NO:34 (人IgG4P重链变体2)

[0664] QVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYTFTDYYMHVWQQAPGKGLEWMGLVDPEDGETIYAEKFQGRVT
ITADTSTD TAYMELSSLRSED TAVYYCATDARGSGSYYPNHF DYWGQGT LTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSEST
AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNV DHKPSNTKVDK RVE
SKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQF
NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFY
PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSLGK

[0665] SEQ ID NO:35 (人IgG4P轻链变体2)

[0666] DIVMTQTPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFS
GSGSGTDFLTINSLQAEDVAVYFCQQYYDTPTFGQGT RLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYP
REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0667] SEQ ID NO:36 (人Gremlin-1;完整序列)

[0668] actcggtgcgccttcgcggaccggcgacccagtgacggccgcccgcgtcactctcggtcccgtga
ccccgcgccgagccccggcggtcttgccgcggccgcactcagcgccacgcgtcgaaagcgaggccccgaggacc
cgccgcactgacaggtgagcgcgacgcacccggcaggatgtgagtgggcgagggaagagggccgcaaaccaac
ccaggaccgcgtcagttccacgcgcggcagccctccgtgcgcgcaggctcgggtgcgttgctcggggggtgaatt
gtgaagaaccatcgcggggtccttccgtgctgaggccgcggacaccgtgacctcgctgctctgggtctgcaggga
cgtaggaaaaaagtgtgtaggagcgggcaggatgacccccacatcccgtttccacctccggaggccccgaaca
cgctcctggtgctggtggcagcagcctggcagacgcgcccgcttagcgaggcgcgaaagtcaggccgcagag
cgtaggagcatccggacctgctagtcggccgctgactgcgcggcgagttgccttgagagggtcccatgtgcttg
gcgccgcgtgggtctggggggtcttggggcgcccattggagtcgcgggttgagcatccggagaatccatgat
gtgtgcatttgccgatccccgaggtgagatggagactggcaagggcagagccgctgtgttcagccacagcgaaaa
ccgaacggtgggtaatccgacagctgcgggtgcggggcgcgccctggccgcgggtccagcgaaccgcagtgctc
acaaggcagacaccacacgcgtcgcggaccggccacgcactcgcgggcgctcgcttctctactccagcctcttc
ccgccccgcgcacgcccagctgaatggtagacgttctggcgccgggcagcgccaccgggtggttcccacttccg
cgcgacccccttaaactgtgttctagaggccccagcctcgcttgacgcctcactagctcctgaggactagga
ctggcggtgtaggcgggttgccggctgcaacagctgggcgtcttctgcttctctcgtgcctgggtggtccgc
tgccccctccacagcttgccggagcaaggccatagcaggggagtgaggagtatatggggctgtcacctccttgctg
gccggagttattttagactacagactccggaagaacagacgcgccaccgctctcgttggcattgccttcggatc
gcagctcctccttgggggtgccccagcttgccgtttatttgcctgcgccaggctctggcgacggtcacggggccag
gcggggaggggacggacggcaggtgaccagcctctgctgtgaagaaattcctgcgcgcccgagctgtccctaattgc

71

attcctactcaaaactccctttcactgattatgagcaggttgcttagctaaaatgagaaatacagcaagaagaggg
atggaaagagctggcttaaactttcccaaagacatcatgaacactgggaacaggtcatacatataccattttttatt
tctcagtcctcagtattagaatattgtgttccttagaggctttgtgaaaattggaatacattgccatgacctgcaca
ggatagaggtgggttaatatggcttaccttgctttagatgtttactcttgatccctaagggaactggaaggaaag
catgctgttagagaggacctgctttgagagtatgtgtcctctgggacaagtggaaatgaaagagaggatagaggcaaa
gagaaaaaaaggtggagatggggtgagacttgctggtggacagttgcaaagaaaactcatgatgagaataacatca
catttcttgaagaagctgaactgcattgatgggaagttgaggcagagtttgaaaagaagatatactgtctgcaaaa
aagaatcaacggagatgtcaggtatcttgatgcaccctgagtcctatgagatgcagcttaatttaatttaatat
gagtaggccattttcataagtggtggaaattaccataaagtggttgacagctaatacagggcgcatgaatgatgtcata
ggaacctaaagtctggatgagctatggattgaatttttactatgggacacccttctacatgtttgctgtggaaaagaa
ttgtcctcaagaaatgtacatcttctgcatttctctacatctctgatattttacaaagtgcacattatttggtgat
actacaactgggattttcaagtgcacatcactactatttcttccactgaagaatcaagagcagtcctgggggtgggga
gagcttgagtgattgacaaggatgtggcagagccctgggtccactatgaattatagttcttaccctgcttactgtc
actcatgtagagcagctagtgtgcctcagagcactgctgttctctgagaagctgaggtctcgattgacattcttga
agttggtgtttacttctctgaataaacaaggttggcaactcagacatcttacaataagtactaaagatttttg
aagaataggtttttaaaaaatgaaaaacatttccatttccatagctaataaatcttattttgaggaaaatgtact
tttcttttaaaaaaaaaaaaaagcctgtctgtcactctagaccctttggcttagaaggtaggcacactcacatagaaa
cagaaagtctgtccaaattaaaactgaaaaccacagttgactaattttgaatttatagctctgctgtttggcttctg
cgatagtatttaatttcaatggcttcaattagaaaatgaaacccatagcattccatagagaacaggtaaaaagtca
gggacatttggagttttccaagaaaaagaaagacaagtccttaggaagctctctaggtatggaaggaatttggcacac
tgagagtttagacatccaaaggatagcaattggctcttctgctcatgggcactgggtgaaggcattttaaatgcgaa
gaatggtacctctgtaaatcaatgaggttcataataatcatgcatttaccaaattttataagcacctgccttgtg
ccaggcactgagggttaaggtgatgaataagccctcatcaactgtcagactagatatttactcaataacagatgtga
aaatgccagaaggaaaagttgagtataaagaaagccttaagttggttcagagaaataaaattgcatttttcggat
agatgtttatggaatcggccttatgaggtaaacttgctcctatgcagtgaacatacattcccagttagtctcagatt
ggcctctgtgatgacaaactcagagggtcctgggtctaggagggtgaatttgtctggaggccattttcaggaggta
tgagggaagactggggcataggcctggggccatcccatgtactcctcctctgaaatggggagcaactgaattgtgt
tttatttttagatcttctgccaacttgaataaccagaaattcgtgaaaccttctcaaattcacactatattttgagac
caggagaaggtccttgagaaattgccacactgtcttatacctagtctctgaaaaattcagtcctgtattataact
gggcgttttctcataagtgctttttttttttttttttttttataatactttaagttctgggatacatgtgcagaa
tgtgcaggtttgttacataggtatacacgtgccatggtggtttgctgcacccatcaacccatcatctacattaggt
atttctcctaatagttacccttccctagccccccaccctcgacagggccagtggttgatgttccccctccctgtg
tccatgtgttctcattgttcaactcccacttatgagtgagagcatgcggtgtttggttttctgttctgtgttagt
ttgctgagaatgatgggtttttgggttccatccacgtccctgcaaaggacatgaactcatcctttttatggctgcata
gtattccatggtgtatatgtgccacatttgctttatccagtcctatcattgatgagcacttgggttggctccaagtc
tttgcctattatgactagtactgcgataaacatgtgtatatgtgtctttatattagaatgatttataatccttttagg
tctatacccagtaataggattcctgggtcaaattggtatttctggttctagatccttgaggaaattgccacactgtct
tccacaacggttgaactaatttactcccaccaacagtgtaaaagcattcctatttctccacatcctctccaaca
tctgtttgtttcctgactctttaatgacggccatttctaactggcgtgaaatggtatctcattgtggttttgatttgc

atttctctaataaccacgatgatgagctttttctcatatgtttgctggccccataaatgtcttcttttgagaat
gtctgttcatatcctttgccactttttgatggggttgtttgctttttcttgtaaatttgtttgagttccttgga
gattctggatattagcccttgtcagatggatagactgcaaaaattttctccattctgtaggttgccctgttact
ctgatggttagtttcttttgccatgcagaagctgtttagtttaattagatccaatttgtcagtttggcttttgttgc
ccattgcttttgggtgttttagtcatgaagtctttgccatgcctatgtcctgaattgtattgcctgggttttcttc
taggatttttatgggttttaggtcttacatttaagtctttaatccatcttgaattaattttgtataaggtgtaagg
aaagggtccagtttcagtttctgcgtatggctagccagttttcccaacgttatttattaaataggaatcctttc
cccattgcttgttttgtcaggtttgtcaaagatcagacgggtttagatgtgtggtgttatttctgaggcctctgt
tctgttccattgggtctgtatatctgtttgataccagtaccgtgctgttttggttactgtagcctttagtacagt
ttgaagtcaggtagcgtgatgctttgttcttttgccttaggattgtcttggctatatgggctcttttttgggttcta
tatgaaatttaagtagtttttcatagacatctatagaactctccaccccaaatcaacagaatatacattcttct
cagtatcgcatacacttattctaaaatgaccacataattagaagtaaaacactcctcagcaaatgcaaaaaacag
aaatectaacagctctgtcagacccagtgcaatcaaattagaactcaggattaagaaacttactgaaaaccacaca
actgcatggaaactgaacaacctgctcctgaatgactactgggtaataacaaaattaaggcagaaataaataggt
tctttgaaagaaatgagaacaaagacacaatataccagaatctctgggacacagctaaagcagtgtttagaggga
attgatagcactaaatgccacaggagaaagcgggacagatctaaaatcgacaccctaatacacaattaaaagaa
ctagagaaacaagagcaaaacaattcaaaagctagcagaagacaagaaataactaagatcagagcagaactgaagg
agatagagacacaaaaaaccttcaaaaaatcaatgaatccaggagctgttttttttttttgaaaagattaatga
aatagactgctagccaaactaataaaggagaaaagagagaagaatcaaatagacaatagacacaataaaaagtgat
aaaggggatatcaccactgatccacagaaatacaaaactaccatcagagaatactataaacacctctacgcaaata
aactagaaaatttggaagaaatggatacattcctgaacgcatacacccctcccaagactaaaccaggaagaagtga
atccctgaatagaccaatagcaagttctgaaattgaggcagtaattagtagcctaccaacaaaaaaagcccagga
ccagacagattcacagccgaagtctaccagaggtacaagaggagctagtaccattccttctgaaactattccaaa
caatagaaaaagaaggactcctccctaactcattttatgaggccagcatcatcctgataccaaaacctggcagaga
cacaacataaaggaaattcaggccaatatccctgatgaacattgatgtgaaaatcctcaataaaatactggcagca
catcaaaaagcttacctgccatgatcaagttggcttcatccctgggatgcaaggctggttcaacatacgcaaatca
ataaacgtaataatcacatacacagaaccaatgacaaaaaccacatgattatctcaatagatgcagaaaaggcct
tcgataaaattcaacaccccttcaatgctaagaactctcaataaactaggtattgatgaaacatatctcaaaaata
taagagttatttatgacaaaccacagccagtatcatactgaatgggcaaaaagctggaagcattccctttgaaaac
cgccacaaggatgacttctctcaccactcctattcaacatactattggaagttctggccagggaagcaggcaaga
caaataaataaagggtattcaaataggaagagaggaagtcaaattgtctctgtttgcagatgacatgattgtatat
ttagaaaaccccatcatctcagccaaaatctccttaagctgataagcaacttcagcaaagtctcaggatacaaaa
tcaatgtgcaaaaatcacaagcattcctatacaccaataatagacaaaacagccaaatcatgagtgaactccattc
acaagtgtacaaagaataaaataccttaggaatccaacttacaagggatgtgaaggacctcttcaaggagaactac
agaccactgctcaaggtaataagagaggacacaaacaatggaaaaacattccatgctcatggataggaagaatca
atattatgaaaatggccatactgccccaaacaatttatagattcaatgccatccccatcaagctaccactgacttc
cttcacagaattagaaaaaaactacttttaatttcatatggaactgaaaaaagagccggtatagccaagacgatcc
taagcaaaaaagaaaaagctggaagcatcatgctacctgacttcaaactatactacaaggctacagtaacaaaaac
agcatggtatagtataagtgttttttttaaaagacaaagtaagtaatttttttgttgggtgtaaaacaaaag

ctctgcataaagagcagggatgttgtaacatacactgaccaaaggtgggaaacctacagttggagcagaagctgaa
tgtcacattatcagctccgaacttataatgggtctaaaagtactaggttaatgttggaagatgggtgccatttaaag
atatcttaaattcaatatattaatttttaatttgacattatcctagagttgaatgggtgtttacttaccatgtgct
gttcattagaaaatctagatcctacactgcctttgcgcaaggtagttgctcctaataaccaacctgtccagtttt
gggtgggagaaataatgttactgttaagttgcacttagtggttattatgtgtaatactggatttccaaagagagaag
gaaaatgtttgctacacagctgtgttcttaggttcagaaaaccacaggagtgggacaggagaaccttcaggattca
gggtccgattgtttgtgatggccgcaggaggagactgtgaatttgaaactgcatccattgaaaagaaaatccctcca
cactttaataattctctccgtgccccatggcagcaagtgccttataggccttgctactcaaagcttaataaaaaggc
agacctgctgaatcataatctgcatcttaacaatatcccagatatgtgtgcaactttctttttttttttctttct
ttctttcttttttttttttgagacagagtctcgctcagtcacccaggctggagtgcagtggcgcgatctcggtcac
tgcaagctctgactcccgggttcacgccattctcctgccttagactcccgagtagctggcactacaggcgccccgc
actacgccccgctaattttttgtatttttagtagagatggggtttcaccgtgttagccaggatgggtctcgatctc
ctgacctcgtgatccgccgcccatctgggcttccaaagtgcctgggattacaggcgtgagccactgcgccccgcca
attgtctgcaactttcaagtctaagaagcactgtcccaggaggaaaatcttttagtctgaggcttctctcttgca
tctcttttttaaaaatatgtctgctcttctccacctttccctcttcttccgcttttctgtctgcctttactacct
ccccgaacattcaactttagaagagttcccccttctctgaattgcattcttcattcattcattcttttctctc
tctgtctatggtttctatttttgtcggttttccctcacctcacctcctgttatttttgccattgttcacata
tcaactgccctttcagaccataatctagcttctgaccatccactaatccattgccactaatttattcagcatgccc
atgccatttattaatgtaaataatttgacatacttgttctatcatgccatttttctaccttttaattgtatata
cacagacacatgtgaatgacataattcactattttaaaggtagaaaaatgtatatcgtggtacaaagtatacatt
gagtatctgtgcccagtttcaagatgagaataagttagagaggtgaagcctcatgagtcacgtcacctacacgctact
gtctttcattccatctgcagtactgccacacatttggttagttctccaattgctgtcacattgacatcgagttgga
tctgaacagcgtacctggggagacgaagtattggtatctttgcttaaatggagtgatttactgagagacaaagtga
catctttaagatcagatagcaagttactgcaccaggagcgcgacctttcctgtttgtgttttccctctgtcaaa
tgcccttctgggtctccatgaatctctccttccacatatgataaaaatgcaaagcttcataagcattcacagctcagg
aagcctcaggctagttggggagaaaagactgggaggtttccggaggaatgaagtcctctgagcagagaggttaatt
catcttgctgtaaaacaaaatagaaaataagttccccctcaataagtgaacgtaatacaaaagacaaatgtggttggt
gccagaggccaggaagaagtcttctgtgagaataggtgcagagaagagctaggccctggctgagtttaaaccttgac
ttagtcactgtgggactctgggtgagttactccatggattgatggctgggtcatggagataatgtacctaattca
tacaggtactgtgagaagtaaatggaatatttcacgttaagtgtttaacgggtgcgtttaaatgctaggtgctatta
ttattaatttttaaattaactttgccatgtttgtgtcttccctctctgtgcttctttcttttagtatgagccgc
acagcctacacggtgggagccctgttctcctcttggggaccctgtgcccgtgtgaagggaaaaagaaaggt
cccaaggtgccatccccccgagacaaggccagcacaatgactcagagcagactcagtcgccccagcagcctgg
ctccaggaaccggggcggggccaaggcggggactgccatgcccggggaggaggtgctggagtccagccaagag
gccttgcattgtgacggagcgcaaatacctgaagcgagactggtgcaaaaccagccgttaagcagaccatccag
aggaaggtgcaacagtcgcaccatcatcaaccgttctgttacggccagtgcactctttctacatccccagga
catccggaaggaggaaggttcctttcagtcctgtccttctgcaagcccaagaaattcactacatgatggtcaca
ctcaactgccctgaactacagccacctaccaagaagaagagagtcacacgtgtgaagcagtgctcgttgcataatcca
tcgatttggttaagccaaatccaggtgcaccagcatgtccttaggaatgcagccccaggaagtcccagacctaaa

acaaccagattcttacttggcttaaacctagaggccagaagaacccccagctgcctcctggcaggagcctgcttgt
gcgtagttcgtgtgcatgagtgtggatgggtgcctgtgggtgttttttagacaccagagaaaacacagtctctgcta
gagagcactccctattttgtaaacatatctgctttaatggggatgtaccagaaacccacctcacccggctcacat
ctaaagggcggggcccgtgggtctgggtctgactttgtgtttttgtgccctcctggggaccagaatctcctttcgg
atgaatgttcatggaagaggctcctctgagggaagagacctgttttagtgctgcattcgacatggaaaagtcctt
ttaacctgtgcttgcacccctcctcctcctcctcacaatccatctcttcttaagttgatagtgcactatgtca
gtctaactctcttgtttgccaaagttcctaaattaattcacttaaccatgatgcaaatgttttcttttgtgaaga
ccctccagactctgggagaggctgggtgtgggcaaggacaagcaggatagtgagtgagaaagggagggtggagggt
gaggccaaatcagggtccagcaaaagtcagtagggacattgcagaagcttgaaaggccaataccagaacacaggctg
atgcttctgagaaagtccttcttagtatttaacagaacccaagtgaacagaggagaaatgagattgccagaaagt
gattaactttggccgttgcaatctgctcaaacctaacacaaaactgaaaacataaatactgaccactcctatgttc
ggaccaagcaagttagctaaaccaaccaactcctctgctttgtccctcagggtgaaaagagaggtagtttagaa
ctctctgcataggggtgggaattaatcaaaaaccgcagaggctgaaattcctaatacctttcctttatctgtggtta
tagtcagctcatttccattccactatttcccataatgcttctgagagccactaacttgattgataaagatcctgcc
tctgctgagtgtacctgacagtagtctaagatgagagagtttagggactactctgttttagcaagagatattttgg
gggtctttttgttttaactattgtcaggagattgggctaaagagaagacgacgagagtaaggaaataaagggaatt
gcctctggctagagagtagttaggtgttaatacctggtagagatgtaagggatatgacctccctttctttatgtgc
tactgaggatctgaggggaccctgttaggagagcatagcatcatgatgtattagctgttcactctgctactggttg
gatggacataactattgtaactattcagttttactggttaggcactgtcctctgattaaacttggcctactggcaa
tggctacttaggattgatctaaggccaaagtgcagggtgggtgaactttattgtactttggatttggttaacctg
ttttcttcaagcctgaggttttatatacaaactccctgaatactctttttgccttgatatcttctcagcctcctagc
caagtcctatgtaatatggaaaacaaactgcagacttgagattcagttgccgatcaaggctctggcattcagag
aaccttgcactcgagaagctgtttttatttcgtttttgttttgatccagtgtctcccatctaacaactaaaca
ggagccatttcaaggcgggagatattttaaacacccaaaatgttgggtctgattttcaaacttttaactcactac
tgatgattctcacgctaggcgaatttgtccaaacacatagtgtgtgtgttttgatatactgtatgacccccccc
aaatctttgtattgtccacattctccaacaataaagcacagagtggatttaattaagcacacaaatgctaaggcag
aattttgagggtgggagagaagaaaagggaagaagctgaaaatgtaaaaccacaccaggaggagaaaatgacatt
cagaaccagcaaacactgaatttctcttgtttttaactctgccacaagaatgcaatttcgttaacggagatgac
ttaagttggcagcagtaatcttcttttaggagcttgtaccacagcttgcacataagtgcagatttggctcaagta
aagagaatttctcaacactaacttactgggataatcagcagcgttaactaccctaaaagcatatcactagccaaa
gagggaatatctgttcttcttactgtgcctatatattaagactagtacaaatgtgggtgtgtcttccaactttcattg
aaaatgccatatctataccatattttattcagctcactgatgatgtaatgatataatttttcattattatagtaga
atatttttatggcaagatatttgggtcttgatcatacctattaaaataatgccaaacaccaaataatgaattttat
gatgtacactttgtgcttggcattaaaagaaaaaacacacatcctggaagtctgtaagttgtttttgttactgt
aggcttcaaagtttaagagtgaagtgaaaaatctggaggagaggataatttccactgtgtggaatgtgaatagtt
aatgaaaagttatgggtatttaattgaattattacttcaaatacctttgggtcactgtgatttcaagcatgtttct
ttttctcctttatatgactttctctgagttgggcaaagaagaagctgacacaccgtatgttgttagagctttttat
ctgggtcaggggaaacaaaatcttgaccagctgaacatgtcttctctgagtcagtgctgaatctttattttttaaa
ttgaatgttccctaaagggttaacatttctaaagcaatattaagaaagactttaaatgttattttggaagacttacg

atgcatgtatacaaacgaatagcagataatgatgactagttcacacataaagtccttttaaggagaaaatctaaaa
tgaaaagtggataaacagaacatttataagtgatcagttaatgcctaagagtgaagtagttctattgacattcct
caagatatattaatcaactgcattatgtattatgtctgcttaaatcatttaaaaacggcaaagaattatatagac
tatgaggtaccttgctgtgtaggaggatgaaaggggagttgatagtcctcataaaactaatttggttcaagtttca
tgaatctgtaactagaatttaattttcaccccaataatgttctatatagcctttgctaaagagcaactaataaatt
aacctatttctttctgtg

[0669] SEQ ID NO:37(人Gremlin-1;编码序列)

[0670] Atgagccgcacagcctacacgggtgggagccctgcttctcctcttggggaccctgctgccggctgctga
agggaaaaagaaagggtcccaagggtgccatccccccgcagacaaggcccagcacatgactcagagcagactcag
tcgccccagcagcctggctccaggaaccggggggcggggccaaggggcggggcaactgccatgccccgggaggaggtgc
tgaggtccagccaagaggccctgcatgtgacggagcgcaaataacctgaagcgagactggtgcaaaaccagccgct
taagcagaccatccacgaggaaggctgcaacagtcgcaccatcatcaaccgcttctgttacggccagtgcactct
ttctacatccccaggcacatccggaaggaggaaggttcttctcagtcctgctccttctgcaagcccaagaaattca
ctaccatgatggtcacactcaactgcctgaactacagccacctaccaagaagaagagagtcacacgtgtgaagca
gtgtcgttgcatatccatcgatttggattaa

[0671] 参考文献

[0672] Hingorani, S.R., L.Wang, A.S.Multani, C.Combs, T.B.Deramaudt, R.H.Hruban, 等人. Trp53R172H and KrasG12D cooperate to promote chromosomal instability and widely metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma in mice. *Cancer Cell* 2005; 7: 469-83.

[0673] Kobayashi, Y., S.O.Lim 和 H.Yamaguchi. Oncogenic signaling pathways associated with immune evasion and resistance to immune checkpoint inhibitors in cancer. *Semin Cancer Biol*; 2020; 65: 51-64.

[0674] Kozar, I., C.Margue, S.Rothengatter, 等人. Many ways to resistance: How melanoma cells evade targeted therapies. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*; 2019; 1871(2): 313-322.

[0675] Martinelli, E., F.Morgillo, T.Troiani, 等人. Cancer resistance to therapies against the EGFR-RAS-RAF pathway: The role of MEK. *Cancer Treat Rev*; 2017; 53: 61-69.

[0676] Yu, Y., L.Cheng, B.Yan, 等人. Overexpression of Gremlin 1 by sonic hedgehog signaling promotes pancreatic cancer progression. *Int J Oncol*; 2018; 53(6): 2445-2457).

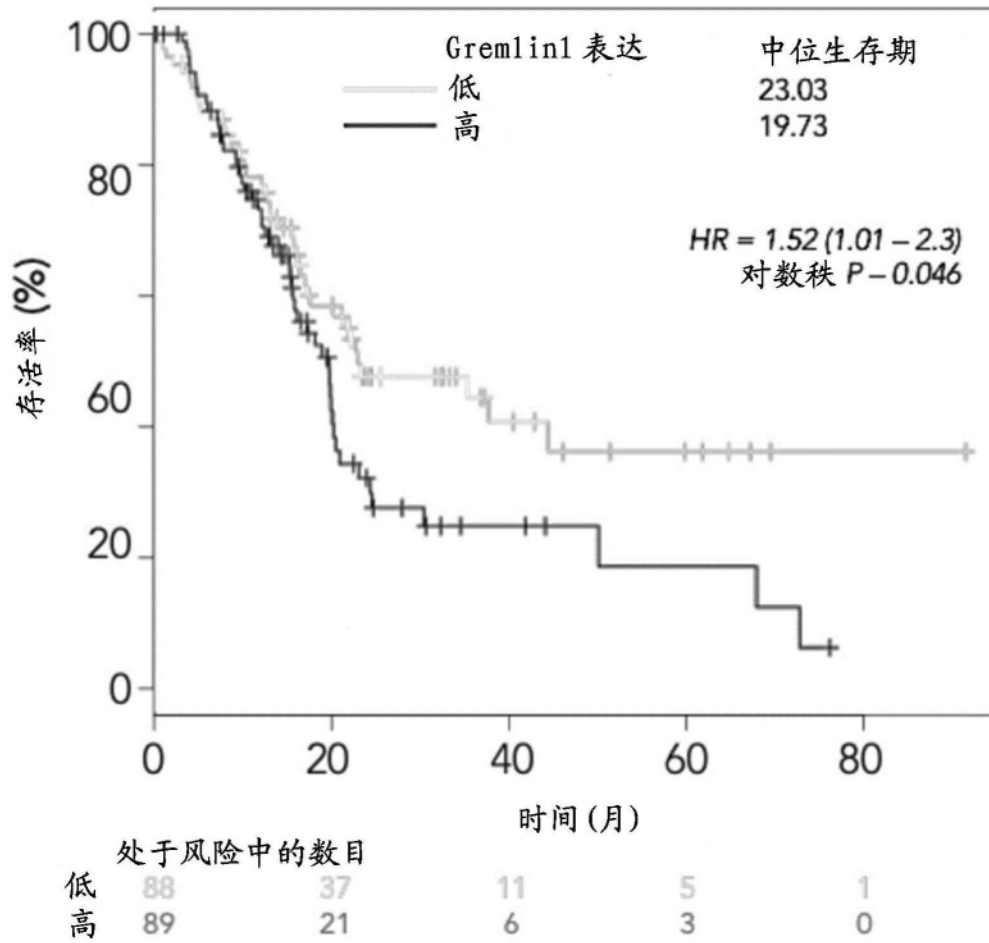


图1

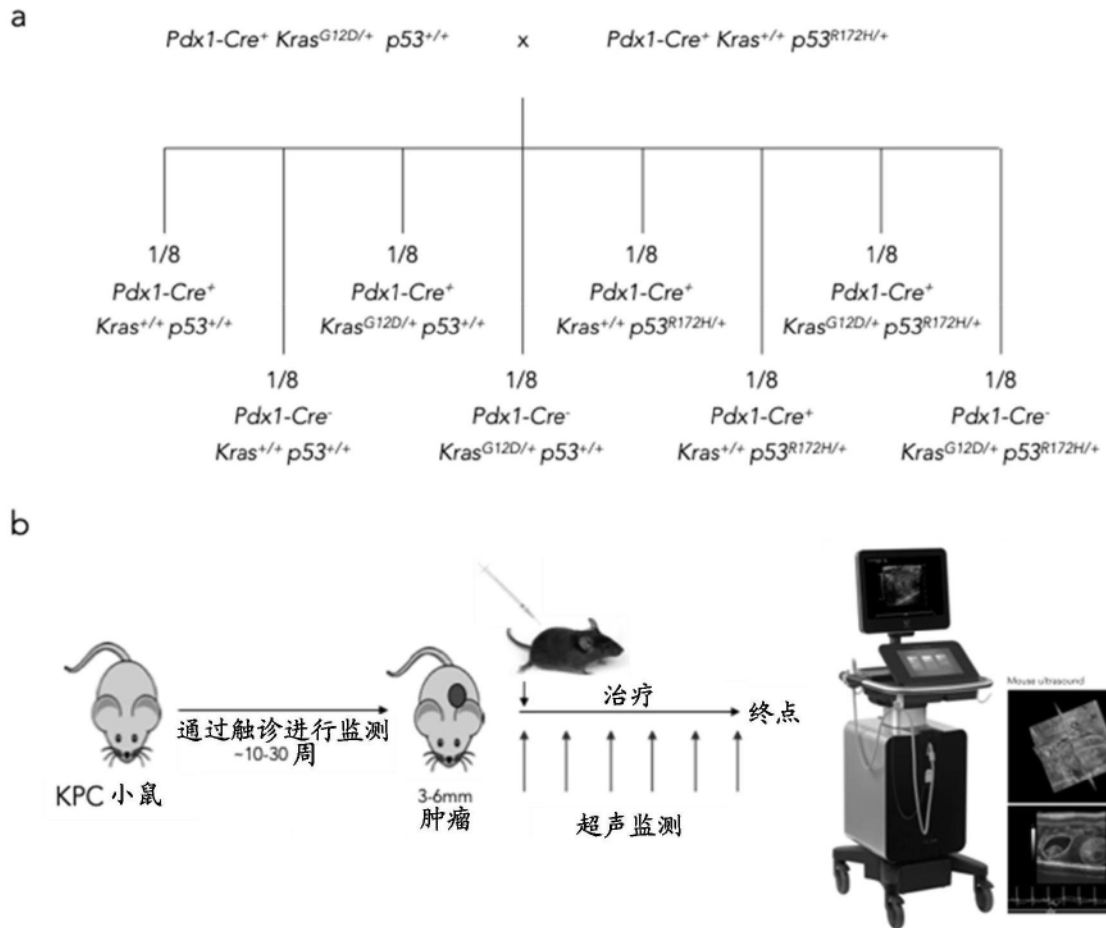


图2

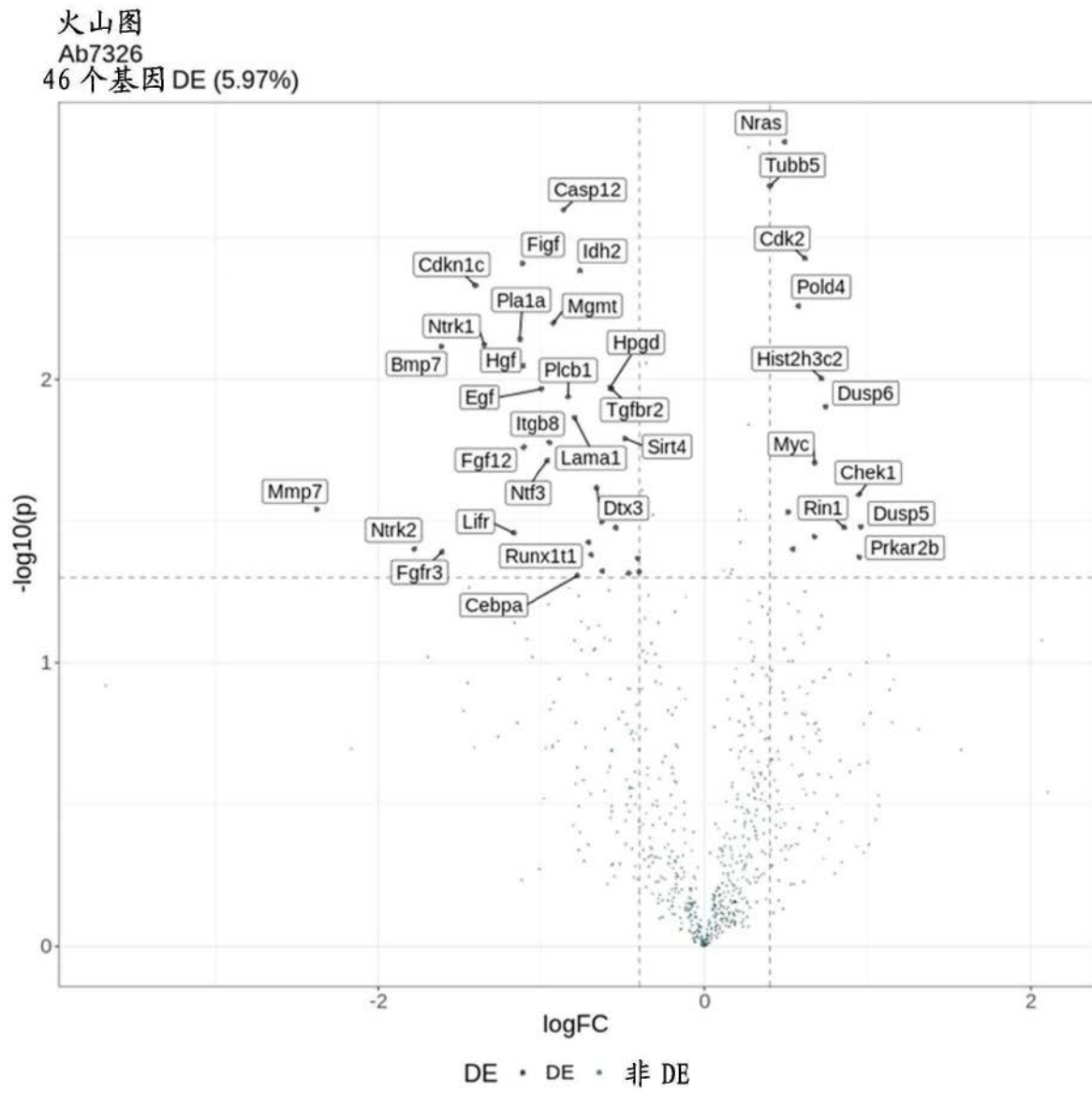


图 3A

图3

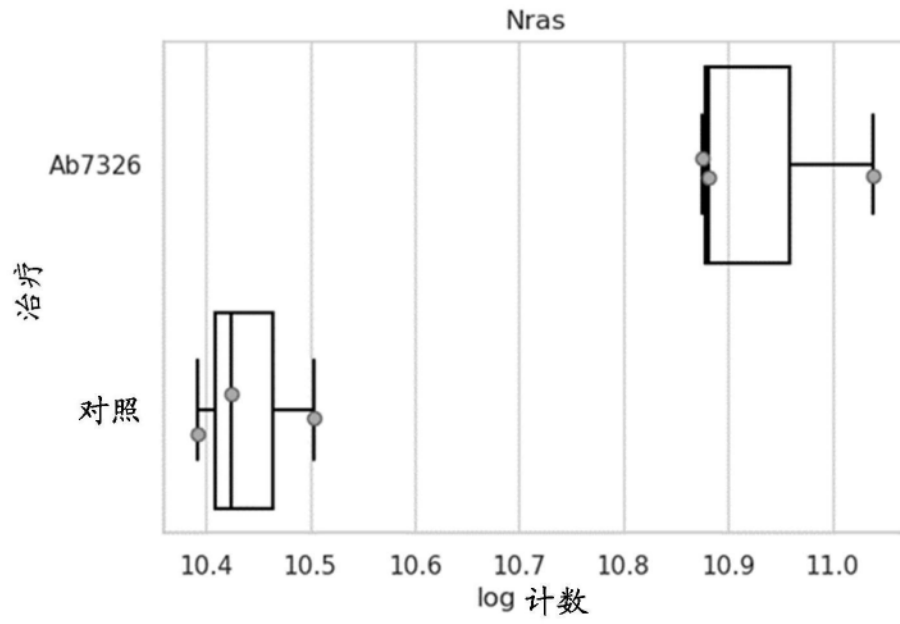


图 3B

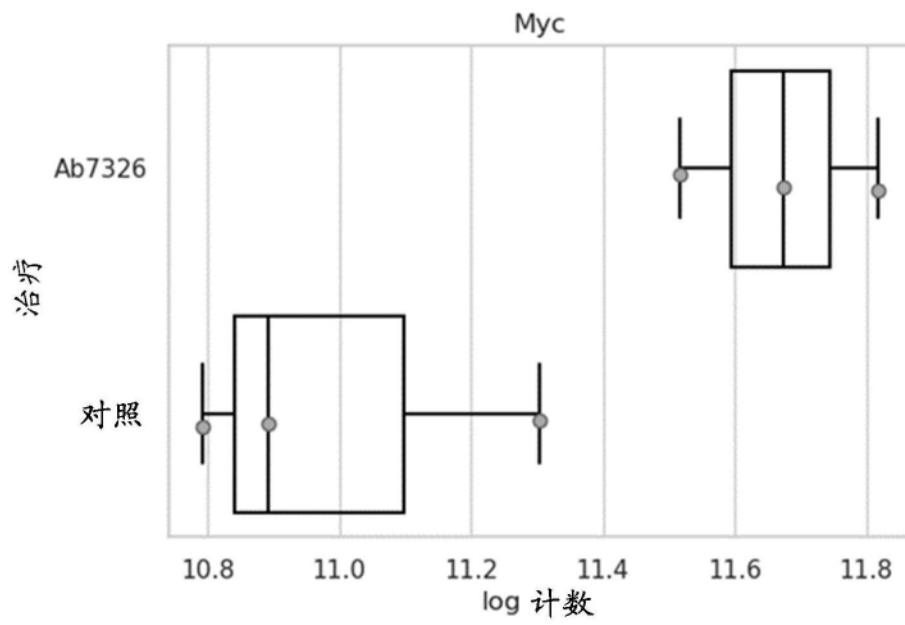


图 3C

图3续

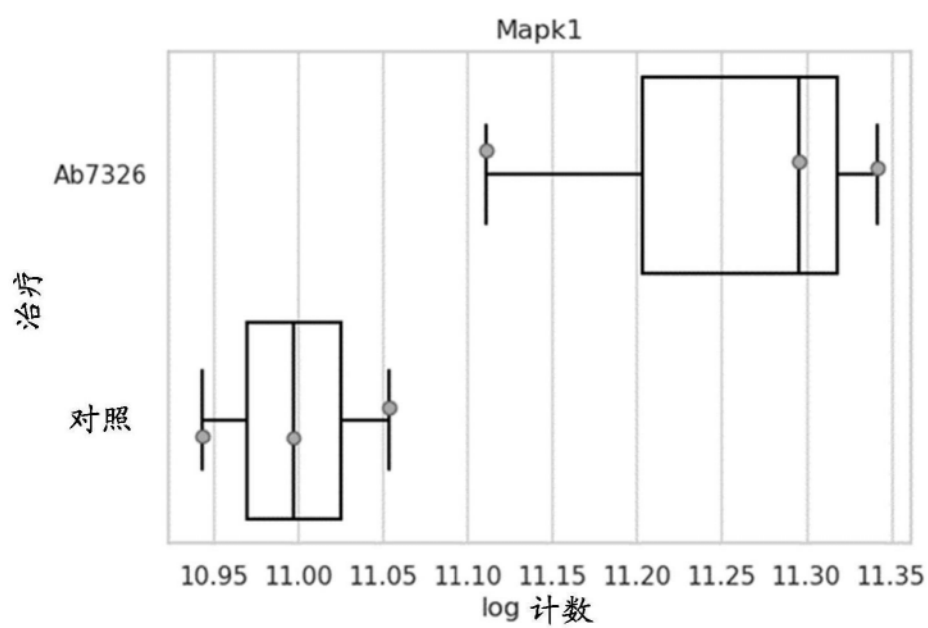


图 3D

图3续

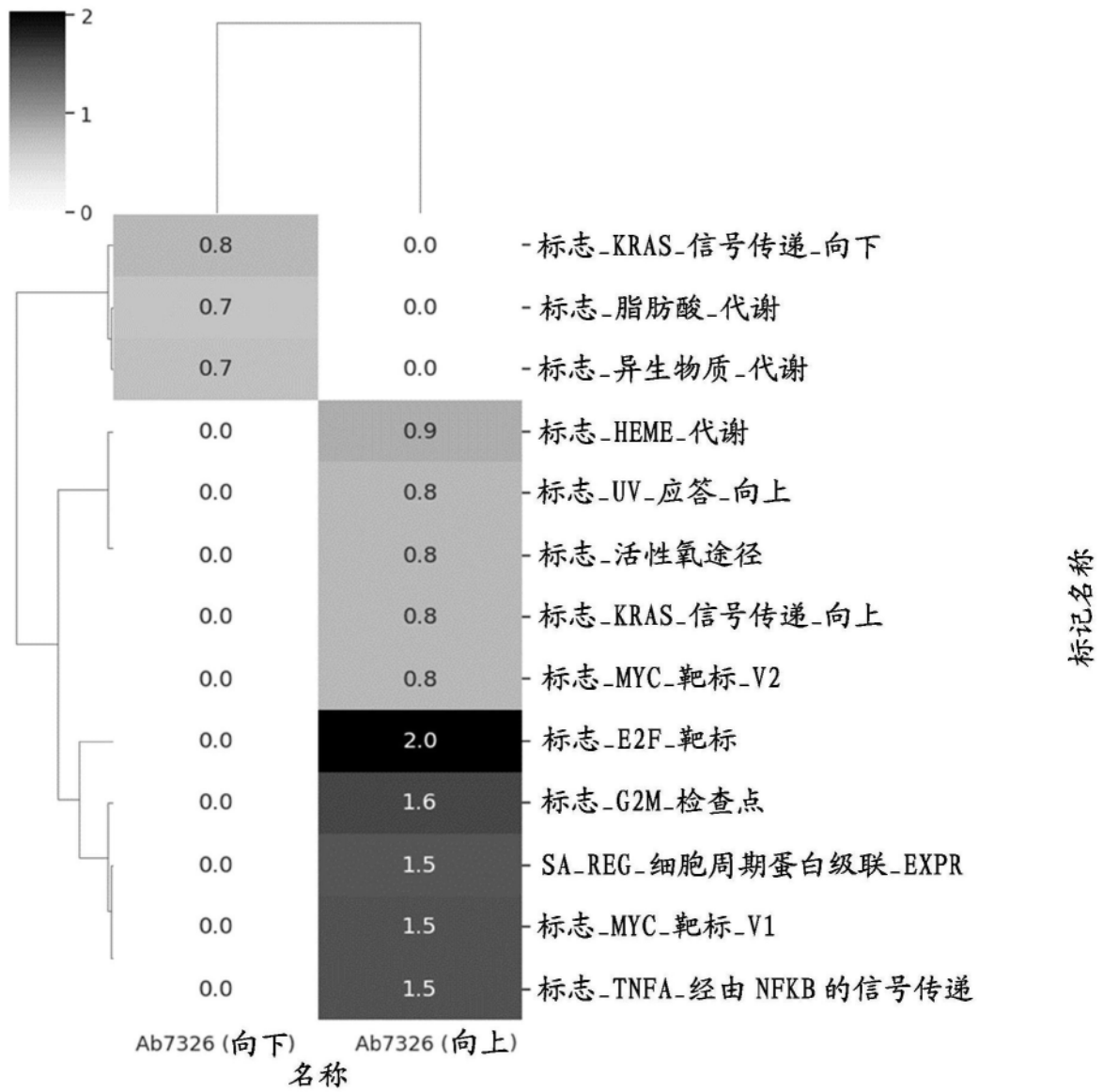


图4

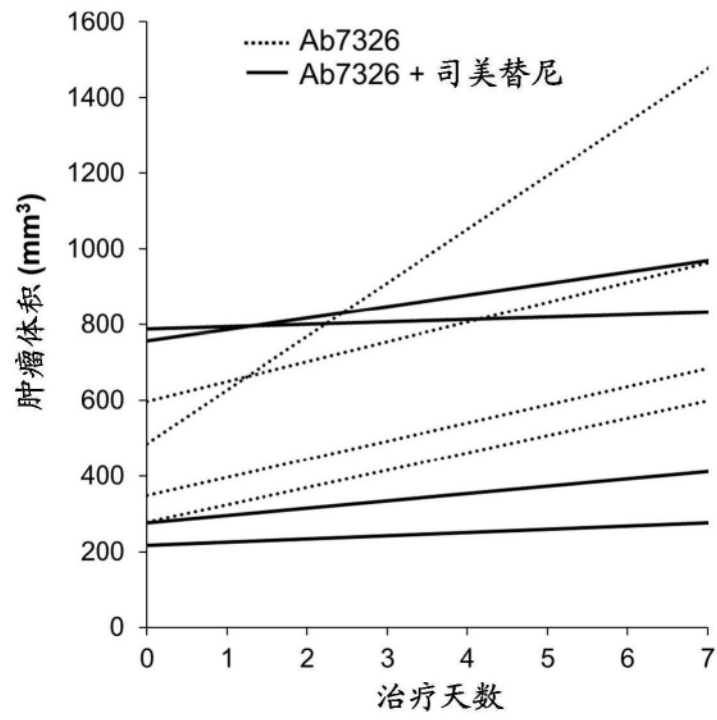


图5

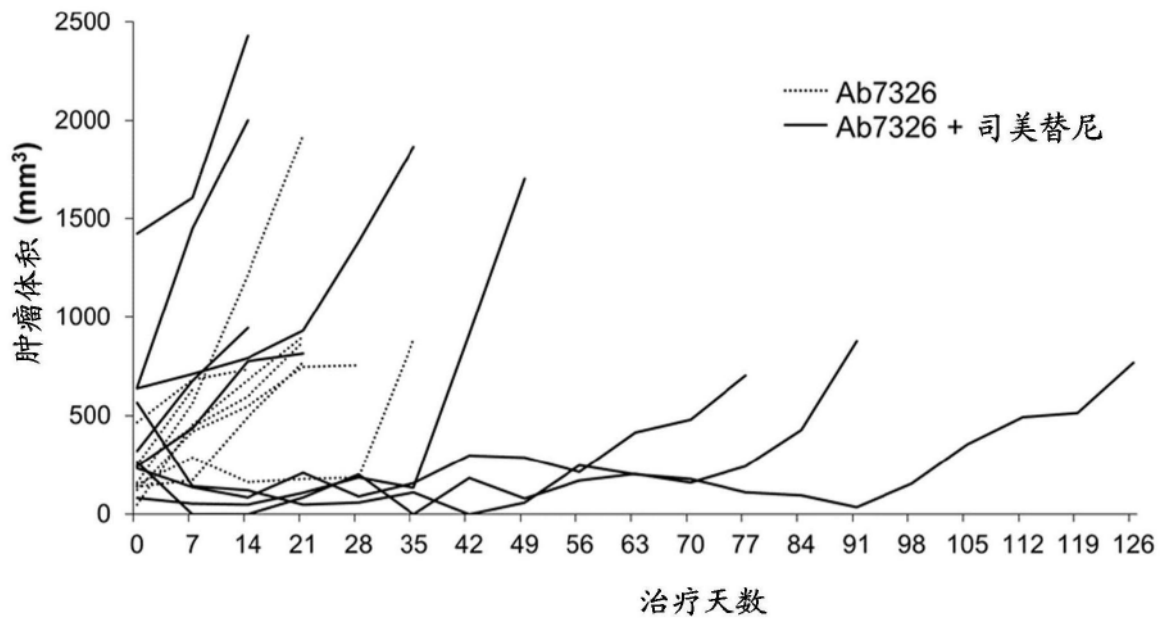


图6

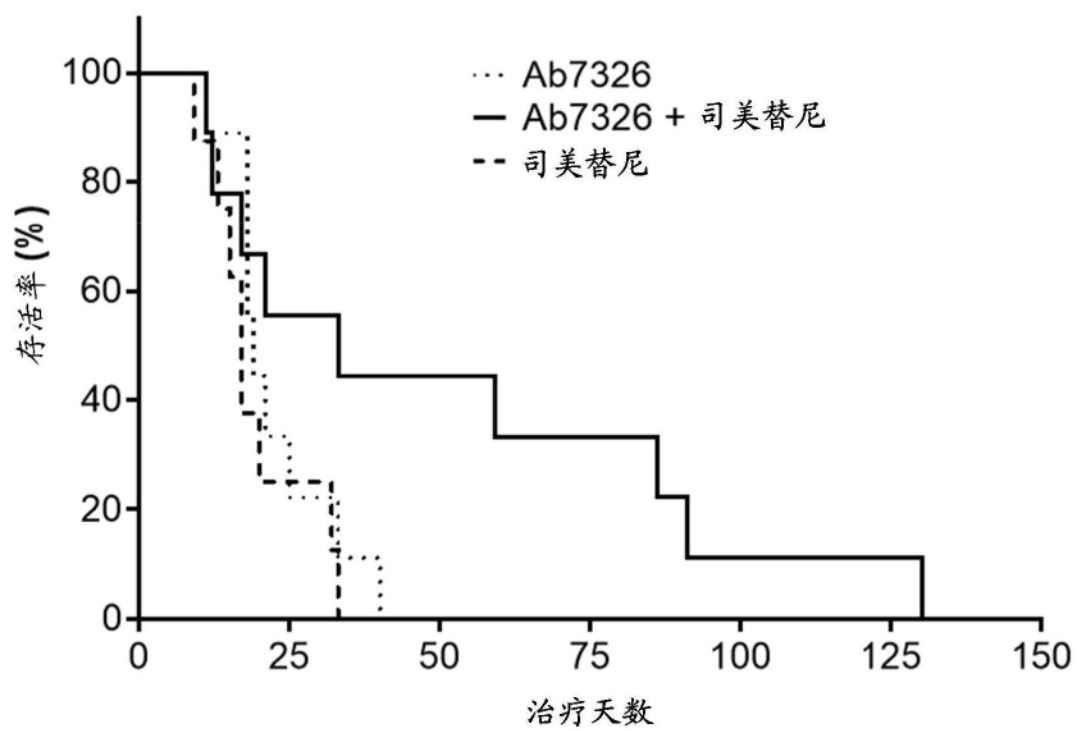


图7

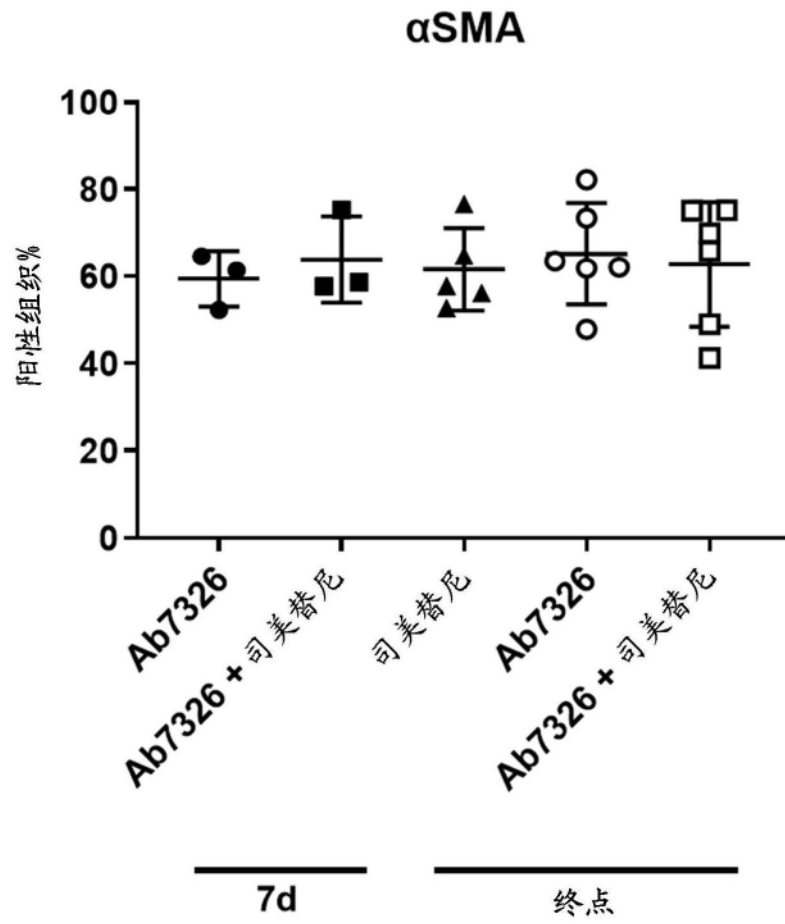


图8

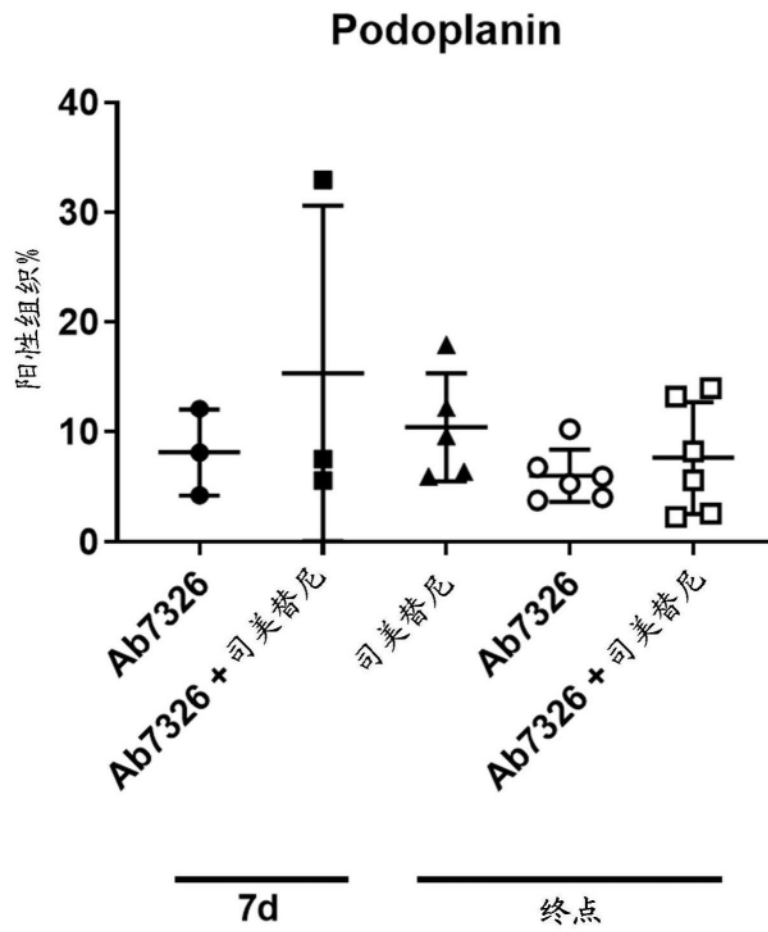


图8续

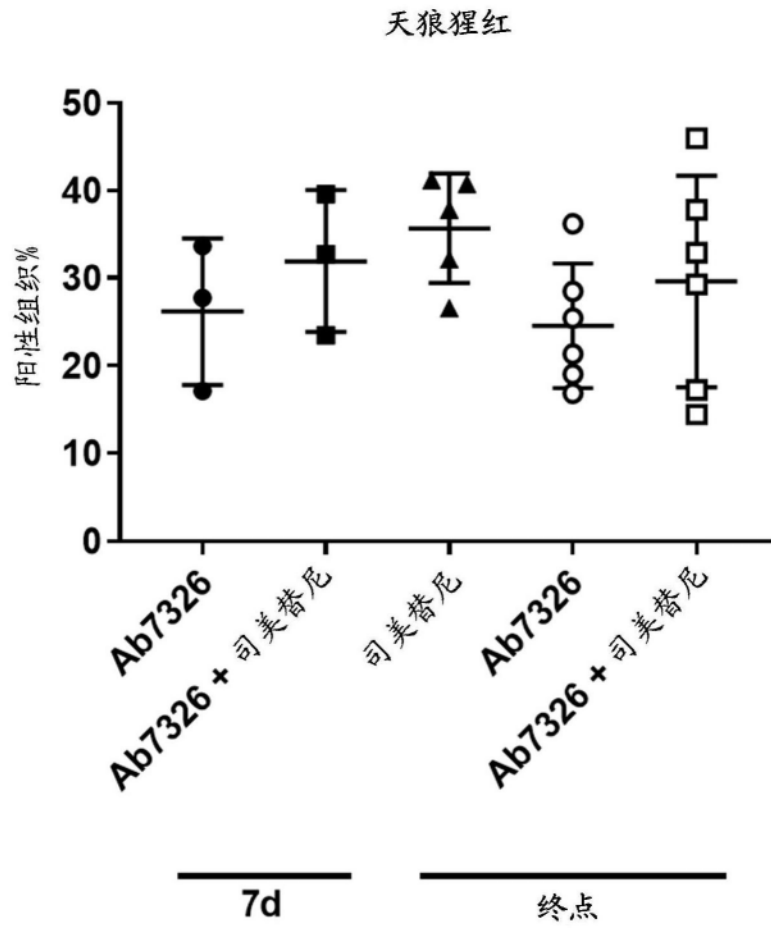


图8续

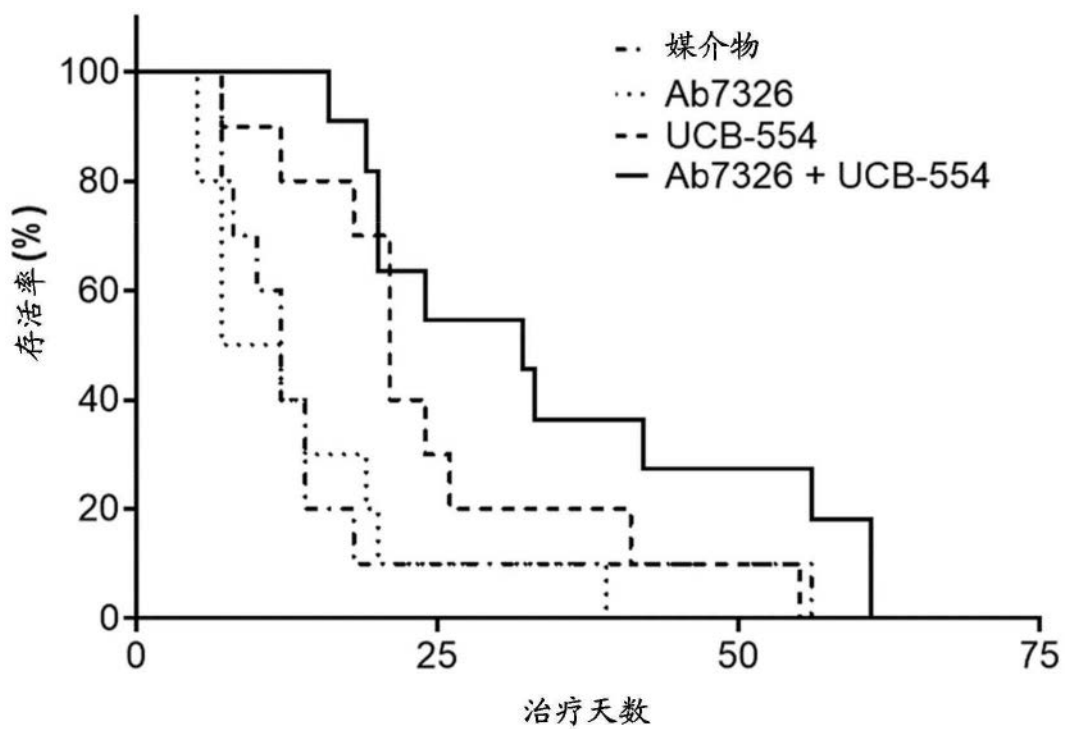


图 9a

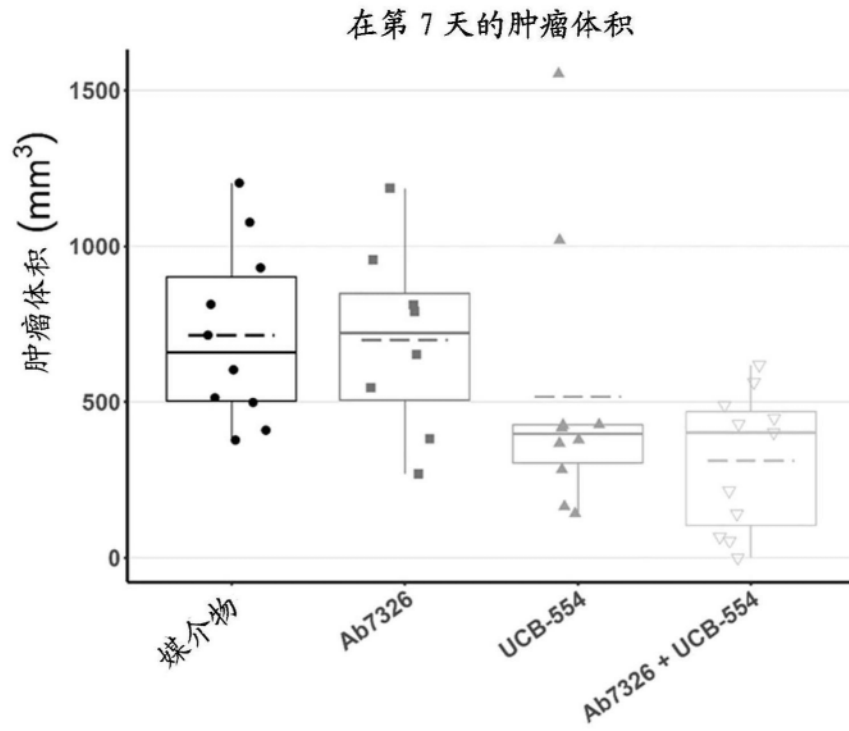


图 9b

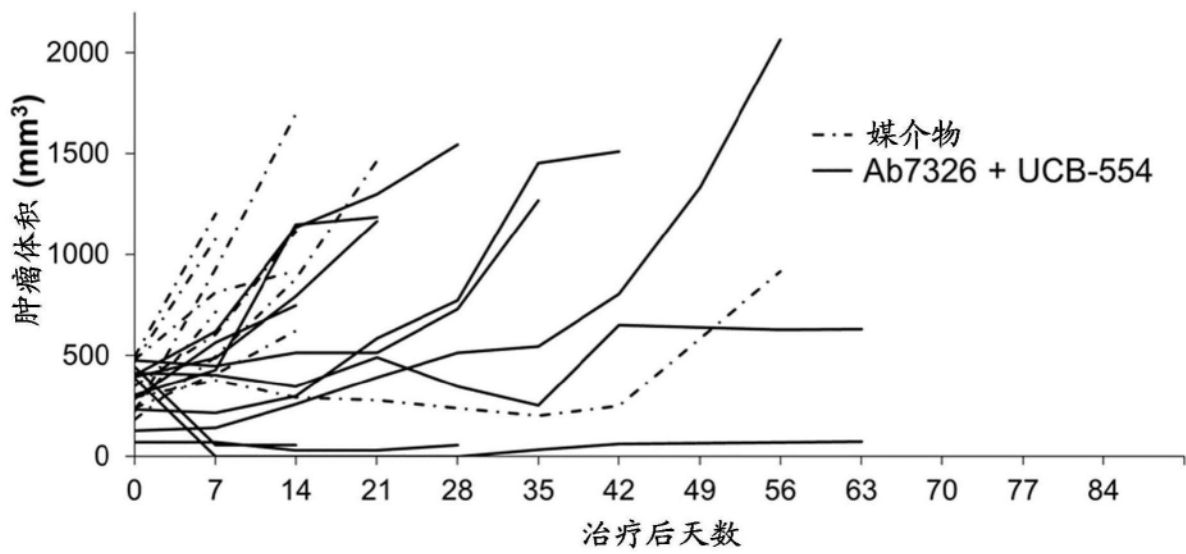


图 9c

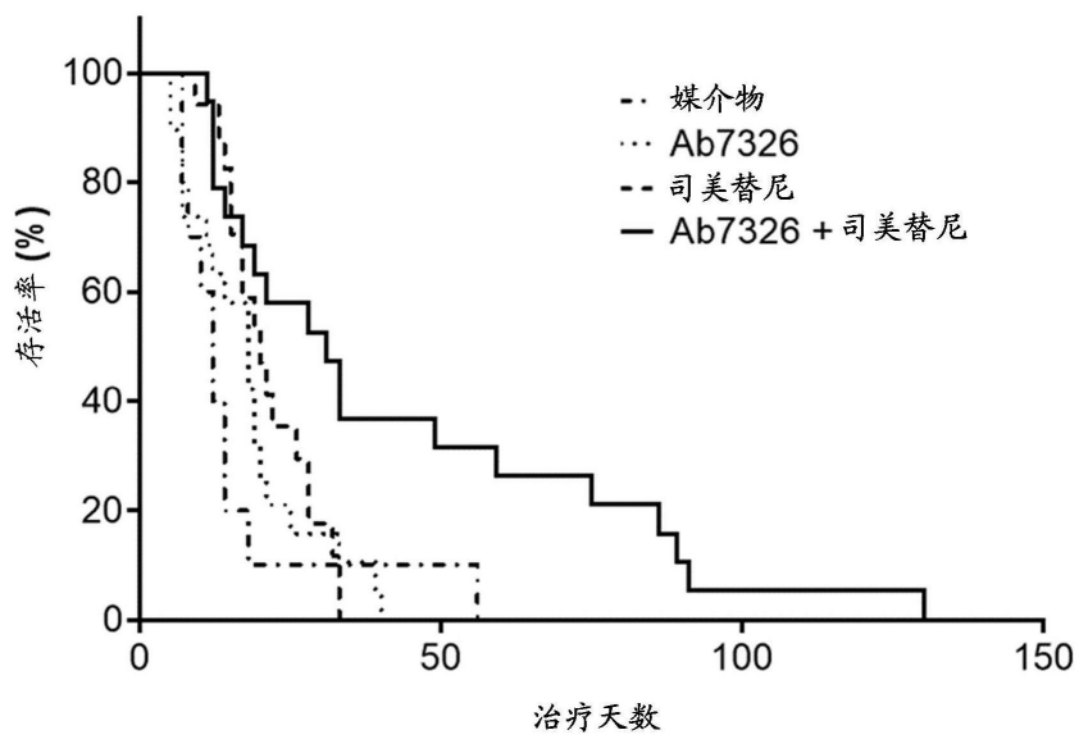


图 10a

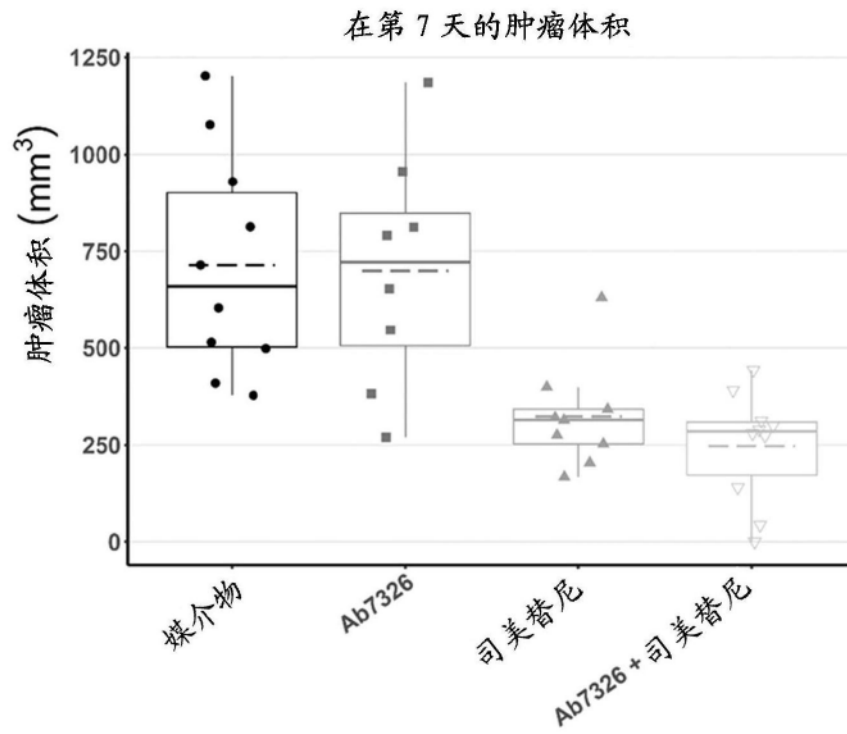


图 10b

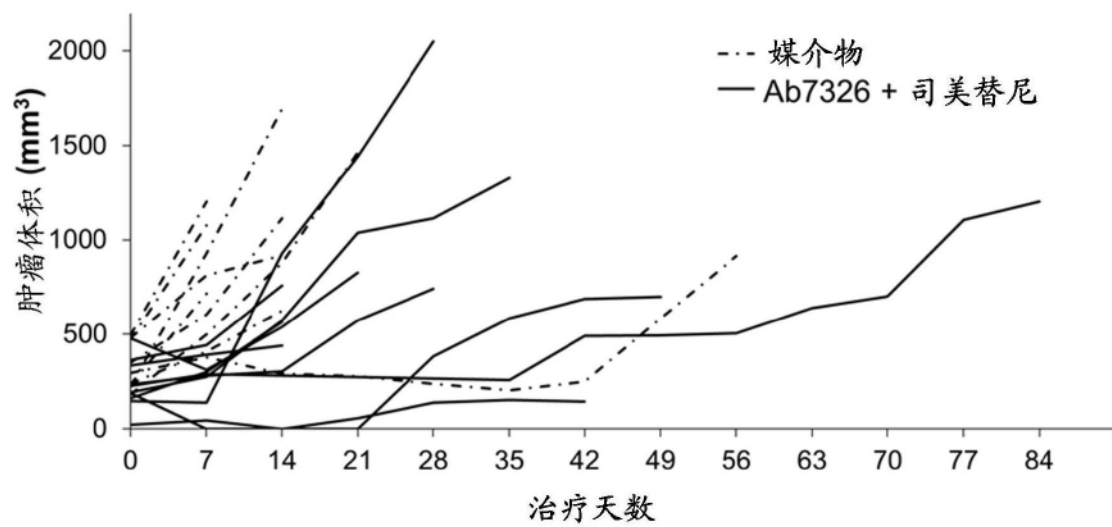


图 10c