



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112262157 A

(43) 申请公布日 2021.01.22

(21) 申请号 201980031078.0

(74) 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司
72002

(22) 申请日 2019.03.11

代理人 左路 林晓红

(30) 优先权数据

62/641,035 2018.03.09 US

(51) Int.Cl.

C07K 16/30 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

A61K 39/395 (2006.01)

2020.11.09

A61K 31/337 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

A61K 9/00 (2006.01)

PCT/US2019/021694 2019.03.11

A61P 35/04 (2006.01)

(87) PCT国际申请的公布数据

WO2019/173843 EN 2019.09.12

(71) 申请人 加利福尼亚大学董事会

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 T·基普斯 S·张 E·M·吉亚

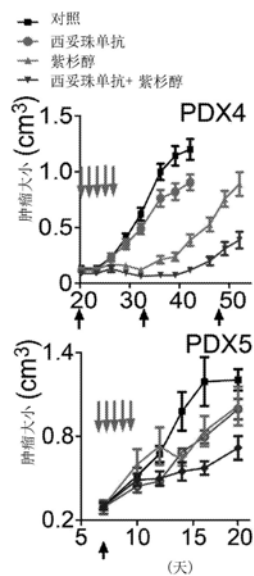
权利要求书2页 说明书66页
序列表4页 附图42页

(54) 发明名称

化药抗性癌症的组合治疗

(57) 摘要

尤其提供了用于治疗化药抗性癌症(乳腺癌)的组合物和方法。该方法包括向有此需要的受试者施用治疗有效量的化学治疗剂和ROR-1拮抗剂。进一步提供的是包括化学治疗剂、ROR-1拮抗剂和药学上可接受的赋形剂的药物组合物。在实施方案中,化学治疗剂是紫杉醇,并且ROR-1拮抗剂是西妥珠单抗。



1. 一种治疗有此需要的受试者中的化药抗性癌症的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的化学治疗剂、以及治疗有效量的酪氨酸激酶样孤儿受体1 (ROR-1) 拮抗剂,从而治疗所述受试者中的化药抗性癌症。

2. 权利要求1的方法,其包括在所述施用之前,检测所述受试者中的ROR-1水平。

3. 权利要求2的方法,其中所述受试者正在接受或已接受化学疗法。

4. 权利要求3的方法,其中所述化药抗性癌症是化药抗性乳腺癌。

5. 权利要求4的方法,其进一步包括在所述施用之前,选择相对于标准对照表达增加水平的ROR-1的受试者。

6. 权利要求5的方法,其中所述化学治疗剂是植物生物碱、抗肿瘤抗生素或拓扑异构酶抑制剂。

7. 权利要求6的方法,其中所述化学治疗剂是紫杉醇或多西他赛。

8. 权利要求6的方法,其中所述化学治疗剂是多柔比星或表柔比星。

9. 权利要求1的方法,其中所述ROR-1拮抗剂是抗体或小分子。

10. 权利要求9的方法,其中所述ROR-1拮抗剂是抗ROR-1抗体。

11. 权利要求10的方法,其中所述抗体包含人源化重链可变区和人源化轻链可变区,其中所述人源化重链可变区包含SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3中所示的序列;和

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

12. 权利要求10的方法,其中所述抗体是西妥珠单抗。

13. 权利要求10的方法,其中所述抗体包含人源化重链可变区和人源化轻链可变区,其中所述人源化重链可变区包含SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:9中所示的序列;和

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

14. 权利要求1的方法,其中所述化学治疗剂和所述ROR-1拮抗剂以组合的协同量施用。

15. 权利要求1的方法,其中所述化学治疗剂和所述ROR-1拮抗剂同时或序贯施用。

16. 权利要求1的方法,其中所述ROR-1拮抗剂在第一时间点施用,而所述化学治疗剂在第二时间点施用,其中所述第一时间点先于所述第二时间点。

17. 权利要求1的方法,其中所述化学治疗剂和所述ROR-1拮抗剂在施用之前进行混合。

18. 权利要求1的方法,其中所述化学治疗剂是紫杉醇。

19. 权利要求18的方法,其中所述化学治疗剂以约5mg/kg、10mg/kg、11mg/kg、12mg/kg、13mg/kg、14mg/kg或15mg/kg的量施用。

20. 权利要求19的方法,其中所述化学治疗剂以约13mg/kg的量施用。

21. 权利要求1的方法,其中所述化学治疗剂以13.4mg/kg的量施用。

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

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

24. 权利要求1的方法,其中所述化学治疗剂以13.4mg/kg的量施用,并且所述ROR-1拮

抗剂以约2mg/kg施用。

25. 权利要求1的方法,其中在至少14天的过程中每天施用所述化学治疗剂。

26. 权利要求1的方法,其中在约28天的过程中每天施用所述化学治疗剂。

27. 权利要求1的方法,其中在约28天的过程中施用一次所述ROR-1拮抗剂。

28. 权利要求1的方法,其中所述化学治疗剂是静脉内施用的。

29. 权利要求1的方法,其中所述ROR-1拮抗剂是静脉内施用的。

30. 权利要求1的方法,其中所述受试者是哺乳动物。

31. 权利要求1的方法,其中所述受试者是人。

32. 一种治疗有此需要的受试者中的乳腺癌的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的化学治疗剂、以及治疗有效量的酪氨酸激酶样孤儿受体1 (ROR-1) 拮抗剂,从而治疗所述受试者中的乳腺癌。

33. 一种药物组合物,其包含 (i) 选自植物生物碱、抗肿瘤抗生素和拓扑异构酶抑制剂的化学治疗剂, (ii) ROR-1拮抗剂和 (iii) 药学上可接受的赋形剂。

34. 一种药物组合物,其包含 (i) 选自植物生物碱、抗肿瘤抗生素和拓扑异构酶抑制剂的化学治疗剂, (ii) 抗ROR-1抗体和 (iii) 药学上可接受的赋形剂,其中所述化学治疗剂和抗ROR-1抗体以组合的协同量存在,其中所述组合的协同量有效治疗有此需要的受试者中的乳腺癌。

35. 权利要求34的药物组合物,其中所述化学治疗剂是植物生物碱。

36. 权利要求35的药物组合物,其中所述化学治疗剂是紫杉醇。

37. 权利要求36的药物组合物,其中所述ROR-1拮抗剂是抗体或小分子。

38. 权利要求37的药物组合物,其中所述ROR-1拮抗剂是抗ROR-1抗体。

39. 权利要求38的药物组合物,其中所述抗体包含人源化重链可变区和人源化轻链可变区,

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

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

40. 权利要求38的药物组合物,其中所述抗体是西妥珠单抗。

化药抗性癌症的组合治疗

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2018年3月9日提交的美国临时申请号62/641,035的优先权,所述美国临时申请在此整体且为了所有目的引入作为参考。

[0003] 作为ASCII文件提交的“序列列表”、表或计算机程序列表附录的引用

[0004] 于2019年3月8日创建,3,371字节,机器格式IBM-PC,MS-Windows操作系统,文件048537-605001WO_SEQUENCE_LISTING_ST25.TXT中写入的序列列表,在此引入作为参考。

[0005] 关于联邦资助的研究与开发的发明权利声明

[0006] 本发明在由美国国立卫生研究院(National Institutes of Health)授予的授权号 CA081534下,由政府支持完成。政府拥有本发明的某些权利。

背景技术

[0007] 化学疗法和内分泌疗法的进展已降低了乳腺癌死亡率,但仍有20%的患者复发,且最终死于这种疾病。(Early Breast Cancer Trialists' Collaborative等人,2012)一种解释这种假设的模型认为存在癌症干细胞(CSC),所述癌症干细胞对化学疗法是相对抗性的,具有自我更新能力,可以重构肿瘤,并且可以扩散到远处部位。(Brooks等人,2015; Wahl和Spike,2017)。如果是这样,则同样靶向CSC的疗法可能改善治疗结果和患者存活。

[0008] 研究已鉴定了将CSC与其它癌细胞区分开的特征。CSC具有形成非粘附细胞球状体和植入免疫缺陷小鼠的独特能力。(Al-Hajj等人,2003; Creighton等人,2009) 此类细胞具有反映了其相对高的自我更新能力和/或药物抗性的基因表达标记。(Creighton 等人,2009) 值得注意的是Hippo-YAP途径的活化,所述Hippo-YAP途径诱导促成自我更新、对化学疗法的抗性和/或转移潜力的遗传改变。(Chan等人,2008; Cordenonsi 等人,2011; Maugeri-Sacca和De Maria,2016; Moroishi等人,2015)

[0009] CSC的另一个显著特点在于B淋巴瘤-Mo-MLV插入区1同源物(BMI1)的增强表达;高水平的BMI1与具有基底样表型的乳腺癌有关,所述基底样表型与患者存活不良有关。(Wang等人,2012) BMI1可能促进CSC自我更新和启动肿瘤的能力(Kreso 等人,2014; Paranjape等人,2014; Wu等人,2011)。此外,BMI1可以增强编码ATP结合盒(ABC)转运蛋白的基因表达,所述转运蛋白增强对化学疗法的抗性。(Su等人,2015; Wu等人,2011)

[0010] 乳腺CSC还具有将其与其它赘生性细胞区分开的表型特点。CSC具有醛脱氢酶1(ALDH1)的独特表达,并且一般表达与低水平的CD24(CD24^{Low})或CD47结合的CD2、CD49f、CD133和/或CD44。(Al-Hajj等人,2003; Ginestier等人,2007; Kaur 等人,2016)。然而,此类CSC有关的表面蛋白并不限于赘生性细胞。一个例外是ROR1,一类I型孤儿受体酪氨酸激酶样,其由许多癌症表达,但不由正常的产后组织表达。(Zhang等人,2012b) 具有高水平的ROR1+细胞的乳腺癌趋于分化不良,并且表达与上皮间质转变(EMT)有关的标记物。(Cui等人,2013) ROR1的高水平表达与三阴性乳腺癌患者治疗后相对较短的无疾病存活或总体存活有关。(Zhang等人,2012a; Chien等人,2016) 相反,沉默ROR1减弱与EMT有关的基因表达,并且削弱癌细胞的体外迁移/侵袭和体内转移,揭示了ROR1以及与CSC有关的特点和/或预

后不良之间的关系 (Cui等人,2013)

[0011] 先前研究显示了ROR1是Wnt5a的受体, (Fukuda等人,2008) 其可以在慢性淋巴细胞性白血病 (CLL) 中诱导非经典的Wnt信号传导,导致Rho-GTP酶的活化以及增强的肿瘤细胞增殖和生存。(Yu等人,2015) 相对于非赘生性乳腺组织,Rho蛋白,包括RhoA、Rac1和cdc42,在乳腺癌中以高水平表达。(Fritz等人,1999) Rho GTP 酶的活化可以促成肿瘤发生,并且增强对化学疗法的抗性。(Hein等人,2016) 此外, Wnt诱导的Rho-GTP酶活化可以促进HEK293A细胞中的YAP/TAZ活化。(Park等人, 2015) 然而,尚不清楚ROR1的异常表达是否促成乳腺癌细胞中的Rho-GTP酶信号传导的活化、YAP/TAZ活化或BMI1,或者ROR1依赖性信号传导是否增强药物抗性和/ 或肿瘤细胞的自我更新。

[0012] 此处提供的是本领域中的这些问题及其它问题的解决方案。

发明内容

[0013] 在一个方面,提供的是治疗有此需要的受试者中的化药抗性癌症的方法。该方法包括向受试者施用治疗有效量的化学治疗剂、以及治疗有效量的酪氨酸激酶样孤儿受体1 (ROR-1) 拮抗剂,从而治疗受试者中的化药抗性癌症。

[0014] 在一个方面,提供的是治疗有此需要的受试者中的乳腺癌的方法。该方法包括向受试者施用治疗有效量的化学治疗剂、以及治疗有效量的酪氨酸激酶样孤儿受体1 (ROR-1) 拮抗剂,从而治疗受试者中的化药抗性乳腺癌。

[0015] 在一个方面,提供的是药物组合物,其包括 (i) 选自植物生物碱、抗肿瘤抗生素和拓扑异构酶抑制剂的化学治疗剂, (ii) ROR-1拮抗剂和 (iii) 药学上可接受的赋形剂。

[0016] 在一个方面,提供的是药物组合物,其包括 (i) 选自植物生物碱、抗肿瘤抗生素和拓扑异构酶抑制剂的化学治疗剂, (ii) 抗ROR-1抗体和 (iii) 药学上可接受的赋形剂,其中所述化学治疗剂和抗ROR-1抗体以组合的协同量存在,其中所述组合的协同量有效治疗有此需要的受试者中的乳腺癌。

附图说明

[0017] 图1A-1G. 该图显示了相对于来自GSE87455数据集中的在疗法之前的患者的ROR1Low肿瘤 (N=61), 在ROR1Hi肿瘤 (N=61) 上,在化学疗法之前和之后,ROR1 以及与CSC有关的基因的表达 (图1A), Rac1/RhoA/cdc42信号传导途径、Hippo-YAP 靶基因和BMI1靶基因的富集图。(图1B), 在化学疗法之前 (“前”) 或匹配的化学疗法之后 (“后”) 的乳腺癌患者样品 (后,前,N=57) 中的ROR1或ALDH1A1表达水平。线指示了在治疗前亚组相对于治疗后亚组中的中值基因表达水平。(图1C), 相对于GSE87455数据集中匹配的治疗前样品 (N=57), 在治疗后样品 (N=57) 上,由Rac1/RhoA/cdc42信号传导活化的基因的富集图。(图1D), 使用由未接受过治疗的患者的乳腺癌组织制备的裂解产物,关于如右侧上指示的蛋白质的免疫印迹分析。关于 β -肌动蛋白的探测充当蛋白质上样对照。在每个泳道下方的数字代表就关于患者1 注明的比率而言标准化的,关于每种蛋白质相对于 β -肌动蛋白的条带密度比。(图1E), 在治疗之前从患者获得的乳腺癌活组织检查中,关于ROR1相对于TAZ或ROR1相对于BMI1的皮尔森相关分析。(图1F), 用抗ROR1 mAb, 4A5染色的乳腺癌组织的代表性图像。比例尺:25 μ M。(图1G), 在用多西他赛/表柔比星±环磷酰胺治疗之前 (前) 或之后 (后), 从患者

获得的乳腺活组织检查样本中ROR1的免疫组织化学染色。P值使用费希尔精确检验进行确定。

[0018] 图2A-2E. 该图显示了在紫杉醇治疗后,ROR1+乳腺癌细胞富含具有乳腺CSC表型和功能特点的细胞。(图2A),该图描绘了在由箭头指示的天数时,关于未接受治疗(正方形数据点,N=7)或已接受紫杉醇(圆形数据点,N=5)的动物,在一段时间内的平均肿瘤生长(\pm SEM)。(图2B),就ROR1或13-肌动蛋白(所述13-肌动蛋白充当蛋白质上样对照)检查来自PDX4或PDX5的裂解产物,所述PDX4或PDX5从未治疗的小鼠(-)或用紫杉醇(+)治疗的小鼠中分离,如在顶部处指示的。在每个泳道下方的数字是针对从未治疗的小鼠中分离的PDX标准化的,ROR1与13-肌动蛋白的条带密度比。(图2C-2D),直方图描绘了来自PDX4或PDX5的球状体(图2C)或侵入细胞(图2D)的平均数目 \pm SEM,所述PDX4或PDX5从未治疗的小鼠(空心条,N=3)或紫杉醇治疗的小鼠(黑色条,N=3)中摘除。直方图左侧的代表性显微照片描绘了PDX的球状体或侵袭性细胞,所述PDX从未治疗的小鼠或接受紫杉醇的小鼠中摘除,如左边缘上指示的。比例尺:100 μ m。(图2E),从来自小鼠的PDX4或PDX5中分离肿瘤细胞,所述小鼠未接受治疗(未治疗的)或用紫杉醇进行治疗(紫杉醇),如左边缘上指示的。将来自每个PDX的分离的肿瘤细胞重新植入小鼠(N=5)内,并且记录肿瘤发生率。左图提供了关于肿瘤的代表性照片,所述肿瘤从未治疗的小鼠或接受紫杉醇的小鼠中分离。使用极端有限稀释分析(ELDA)软件,在右图中提供了致瘤细胞的频率和概率估计。

[0019] 图3A-3P. 该图显示了Wnt5a诱导Rho1依赖性的Rho-GTP酶、YAP/TAZ和BMI1 活化。(图3A),使用由Hs578T细胞(亲代)或敲除ROR1的Hs578T(ROR1^{-/-})制备的裂解产物,关于如右侧上指示的蛋白质的免疫印迹分析,所述细胞用Wnt5a刺激在顶部处指示的时间。在每个泳道下方的数字代表就未用Wnt5a处理的细胞而言标准化的,关于每种蛋白质相对于13-肌动蛋白的条带密度比。(图3B),使用Hs578T细胞的裂解产物,关于在右侧上指示的蛋白质的免疫印迹分析,所述细胞已用同种型对照IgG(hIgG)或西妥珠单抗进行处理,然后用Wnt5a刺激在顶部上指示的时间。在每个泳道下方的数字代表就不含Wnt5a的hIgG处理的细胞而言标准化的,关于每种蛋白质相对于13-肌动蛋白的条带密度比。(图3C),如在顶部上指示的,使用来自未用Wnt5a处理的(-)或用Wnt5a处理(+)的亲代或ROR1^{-/-}-Hs578T的裂解产物,关于在右边缘上指示的蛋白质的免疫印迹分析。在每个泳道下方的数字如3A中。(图3D),亲代(顶部行)或ROR1^{-/-}-Hs578T细胞(底部行)的显微照片,所述细胞如在底部处指示的未用Wnt5a进行处理或用Wnt5a进行处理,然后如在顶部处指示的就YAP/TAZ和DAPI进行染色,然后使用共聚焦显微镜检查进行检查。比例尺:20 μ m。显微照片右侧的直方图提供了在每个视野中位于细胞核内的YAP/TAZ的平均百分比(N=10, \pm SEM)。(图3E),使用由Hs578T细胞制备的裂解产物,关于在右侧上指示的蛋白质的免疫印迹分析,所述Hs578T细胞用西妥珠单抗或hIgG进行培养,然后未用Wnt5a进行处理或用Wnt5a进行处理,如在顶部处指示的。在每个泳道下方的数字如3B中。(图3F),Hs578T的显微照片,所述Hs578T用西妥珠单抗或hIgG培养过夜(如左侧上指示的),然后未用Wnt5a进行处理或用Wnt5a处理4小时(如在底部处指示的),然后就YAP/TAZ和DAPI进行染色(如在顶部处指示的),然后使用共聚焦显微镜检查进行检查。比例尺:20 μ m。显微照片右侧的直方图提供了在每个视野中位于细胞核内的YAP/TAZ的平均百分比(N=10, \pm SEM)。(图3G),使用亲代或ROR1^{-/-}-Hs578T的裂解产物(如在底部上指示的),关于在右侧上指示的蛋白质的免疫印迹分析,所述细胞用

Wnt5a处理在顶部处指示的时间。在每个泳道下方的数字是针对在时间0收集的样品标准化的, BMI1相对于13-肌动蛋白、pAKT相对于总AKT、或ROR1相对于13-肌动蛋白的条带密度比。(图3H), 如在顶部上指示的, 使用已用对照siRNA或AKT特异性siRNA (AKT-siRNA) 处理的Hs578T的裂解产物, 关于在右侧上指示的蛋白质的免疫印迹分析。在每个泳道下方的数字如3G中。(图3I), 使用Hs578T的裂解产物, 关于如右边缘上指示的蛋白质的免疫印迹分析, 所述Hs578T已用hIgG或西妥珠单抗处理过夜, 然后未用Wnt5a进行处理或用Wnt5a进行处理, 如在顶部处指示的。在每个泳道下方的数字如3G中。(图3J), 使用Hs578T的裂解产物, 关于如右边缘上指示的蛋白质的免疫印迹分析, 所述Hs578T已用hIgG或西妥珠单抗处理过夜, 然后用Wnt5a处理在顶部处指示的时间。在每个泳道下方的数字如3G中。(图3K-3L), 直方图描绘了来自一式三份的亲代或ROR1^{-/-}-Hs578T的球状体(图3K)或侵袭性细胞(图3L)的平均数目±SEM, 所述亲代或ROR1^{-/-}-Hs578T未用Wnt5a进行处理或用Wnt5a进行处理。(图3M), 亲代或ROR1^{-/-}-Hs578T的活细胞百分比, 所述亲代或ROR1^{-/-}-Hs578T在未补充有Wnt5a或补充有Wnt5a的培养基中进行培养(如图例中指示的), 然后用紫杉醇以下文指示的浓度进行处理。数据点代表一式三份孔中的活细胞的平均百分比±SEM。(图3N-3O), 条形图描绘了来自三个分开的培养孔中的Hs578T细胞的球状体(图3N)或侵袭性细胞(图3O)的平均数目±SEM, 所述Hs578T细胞与hIgG或西妥珠单抗一起温育过夜, 然后用或不用Wnt5a进行处理。空心条指示在三个分开的培养孔中, 在第一次传代过程中(第1次)检测到的球状体数目±SEM, 而实心条提供了第二次传代(第2次)的球状体数目±SEM。(图3P), Hs578T的活细胞百分比, 所述Hs578T在未补充有Wnt5a或补充有Wnt5a(如图例中指示的)、具有hIgG或西妥珠单抗的培养基中进行培养, 然后用紫杉醇以下文指示的浓度进行处理。数据点代表一式三份孔中的活细胞的平均百分比±SEM。

[0020] 图4A-4G. 该图显示了西妥珠单抗阻遏Hippo-YAP和BMI1的活化, 并且抑制乳腺癌PDX的植入、自我更新和转移。(图4A), 线形图描绘了在由黑色箭头指示的天数时, 关于未接受治疗(由正方形表示的数据点)或用西妥珠单抗治疗(由圆圈表示的数据点)的动物, 在一段时间内PDX4或PDX5的平均肿瘤生长(±SEM, N=6-8)。使用斯氏t检验, 一个星号指示P<0.05, 两个星号指示P<0.01。(图4B), 条形图提供了从图1A中描述的每组的小鼠中摘除的肿瘤的平均重量(±SEM, N=6-8)。(图4C), 如在左侧上指示的, 来自代表性荷瘤小鼠的肺组织的HE染色, 所述荷瘤小鼠用PDX5的细胞植入, 并且用对照hIgG或西妥珠单抗进行治疗。虚线圆圈突出显示了转移灶。比例尺: 100μm。散点图显示了按治疗组, 在每只动物的肺中发现的转移灶的平均数目(±SEM, N=6)。(图4D), 如经由RNAseq (GSE108632) 评价的, 在用对照hIgG相对于西妥珠单抗治疗的小鼠中, 与Rho-GTP酶、Hippo-YAP或BMI1的活化有关的基因, 或者衍生自PDX4的PDX中的CD44⁺/CD24^{Low}细胞 (CD44⁺/CD24^{Low} UP) 中上调的基因的富集图。(图4E), 使用由PDX4或PDX5制备的裂解产物(如在底部上指示的), 关于在右侧上指示的蛋白质的免疫印迹分析, 所述PDX4或PDX5从用对照hIgG或西妥珠单抗治疗的小鼠中摘除, 如在顶部处指示的。在每行下方的数字是针对第一对照样品标准化的, 活化的相对于总GTP酶, pAKT相对于总AKT、BMI1、ABCG2、TAZ/YAP, CTGF相对于13-肌动蛋白, 或ROR1相对于13-肌动蛋白的条带密度比。(图4F), 代表性的等高线图显示了从PDX4中分离的肿瘤细胞上的CD44和CD24的相对表达, 所述PDX4从用hIgG或西妥珠单抗治疗的小鼠中取出。散点图显示了在每组(N=6)的PDX4肿瘤中发现的CD44⁺/CD24^{Low}的平均比例。(图4G), 该表提供了发展

肿瘤的小鼠数目(分子)相对于植入有来自PDX4或PDX5的细胞的小鼠数目(分母)(如左列中指示的),所述PDX4或PDX5从用hIgG或西妥珠单抗治疗的小鼠中取出(如第二列中指示的)。对于这些实验,向小鼠给予不同数目的肿瘤细胞(如“细胞数目”下方的行中指示的)。右侧倒数第二列中提供了使用ELDA软件计算的致瘤细胞的频率。P值指示了从hIgG相对于西妥珠单抗治疗的小鼠中回收的肿瘤细胞的致瘤频率之间的差异的显著性。

[0021] 图5A-5C. 该图显示了西妥珠单抗和紫杉醇具有针对乳腺癌PDX的互补活性。(图5A), 线形图描绘了在小鼠中, 在一段时间内PDX4或PDX5的平均肿瘤生长(\pm SEM, N=8-10), 所述小鼠未进行治疗(对照, 由正方形表示的数据点)、或在由黑色箭头指示的天数时用西妥珠单抗(由圆圈表示的数据点)进行治疗、或在由红色箭头指示的天数时用紫杉醇(由向上的三角形表示的数据点)进行治疗、或用两者(由向下的三角形表示的数据点)进行治疗。(图5B), 使用由从小鼠中分离的PDX4制备的裂解产物, 关于在右侧上指示的蛋白质的免疫印迹分析, 所述小鼠未进行治疗(对照)或者用西妥珠单抗、紫杉醇或两者进行治疗, 如在顶部上指示的。在每行下面的数字是如4E中的条带密度比。(图5C), 该表提供了发展PDX的小鼠数目(分子)相对于植入有来自 PDX4或PDX5的细胞的小鼠数目(如顶部行中指示的)(分母), 所述PDX4或PDX5 从用hIgG、西妥珠单抗、紫杉醇、或西妥珠单抗和紫杉醇治疗的小鼠中取出(如最左列中指示的)。对于这些实验, 向小鼠给予不同数目的肿瘤细胞(如PDX名称下方的行中指示的)。底图提供了在来自PDX4的肿瘤细胞植入的小鼠中发展的代表性肿瘤的照片, 所述PDX4从未进行治疗或者用西妥昔单抗和/或紫杉醇进行治疗的小鼠中取出, 如在右侧上指示的。

[0022] 图6A-6B. 该图显示了ROR1^{Hi}乳腺癌具有比ROR1^{Low}乳腺癌更高水平的与 Rho-GTP酶、Hippo-YAP或BMI1的活化有关的基因。(图6A), 关于来自GSE21974 的ROR1^{Low}和ROR1^{Hi}样品组(N=25), 与Rac1/RhoA/cdc42、Hippo-YAP、BMI1的活化有关的基因的富集图。SIZE是分析中包括的基因数目。NES(标准化的富集得分) 说明了基因集大小中的差异, 并且可以用于比较跨越基因集的分析结果。FDR q-val(错误发现率q值)是具有给定NES的基因集代表假阳性的估计概率。当错误发现率(FDR) 小于0.25时, 每个基因集被视为有意义的。该图的中间部分显示了其中基因集的成员在排序基因的列表中出现的位置。(图6B), 在化学疗法之前(“前”)或化学疗法之后(“后”)的匹配的乳腺癌患者样品(后, 前, N=25)中的ROR1或ALDH1A1表达水平。线指示了在治疗前组相对于治疗后组中的中值基因表达水平。

[0023] 图7A-7N. 该图显示了与ROR^{Low}乳腺癌相比, ROR1^{Hi}乳腺癌表达更高水平的与 CSC相关的标记物, 并且具有更大的形成球状体、侵袭基质胶或形成异种移植物的能力。(图7A), 关于从每个PDX中分离的原发性肿瘤细胞的门控策略。由摘除的肿瘤结节制备单细胞悬浮液, 并且用碘化丙锭(PI)、钙黄绿素紫或二乙酸荧光素(FDA)、以及对于EpCAM特异性的荧光染料缀合的mAb或无关抗原(对照)进行染色。我们对具有适当的前向光散射(FSC)和侧向散射(SSC)特征的细胞进行门控(左)。我们排除了由PI标记的死细胞, 并且对由钙黄绿素染色的活细胞进行门控(中)。因为细胞也用荧光染料缀合的mAb进行染色, 所以我们对人乳腺癌细胞进行门控, 所述细胞用对于EpCAM特异性的mAb进行染色(右)。(图7B), 来自每个PDX的细胞对于ROR1用4A5或对照mAb进行染色, 并且对于ALDOFLUOR不用(-)或用(+) ALDH1抑制剂DEAB进行染色, 如在直方图的每个柱的顶部处指示的。顶部行中的每个等高线图上的空心框指示用于限定具有ALDH1活性的细胞的门, 指出了所述细胞的比例。等高线图左侧的空

心框描绘了用于鉴定确实缺乏ALDH1活性的细胞的门。在底部行中的是描绘了细胞的荧光的直方图,所述细胞对于ALDH1活性呈阴性(左)或阳性(右)。右图提供了在来自五个不同PDX肿瘤各自的ALDH1⁺相对于ALDH1^{Neg}细胞中,关于ROR1的染色强度。(图7C),来自每个PDX的细胞用CD44、CD24、4A5 或对照mAb进行染色。直方图描绘了门控的CD44⁺/CD24^{Low}或CD44⁺/CD24⁺细胞的荧光;阴影直方图描绘了用同种型对照mAb染色的细胞的荧光,而空心直方图描绘了用4A5染色的细胞的荧光。右图提供了来自五个不同PDX各自的CD44⁺CD24^{Low}相对于CD44⁺CD24⁺细胞的ROR1染色强度。每个图中的数字提供了关于ROR1的平均荧光强度比(MFIR),其衍生自由抗ROR1 mAb标记的细胞的平均荧光强度(MFI)除以由对照抗体标记的细胞的MFI。(图7D),PDX1-5的组织切片用4A5进行染色,用于通过IHC检测ROR1。比例尺:15 μ m。(图7E),经由免疫印迹分析检查PDX 肿瘤的ROR1或BMI1。(图7F),检查从PDX肿瘤中分离的单个肿瘤细胞上的ROR1 或YAP/TAZ的共聚焦显微镜检查。比例尺:20 μ m。右侧的条形图提供了从每个PDX 中分离的细胞中的核YAP/TAZ的平均百分比。(图7G),通过从每个PDX中分离的细胞生成的球状体的显微照片。比例尺:100 μ m。条形图描绘了通过来自一式三份孔中的每个PDX的细胞形成的球状体的平均数目 \pm SEM。(图7H),来自每个PDX的分离的肿瘤细胞的侵袭性细胞的代表性显微照片。显微照片的右侧是条形图,其描绘了在三个独立的实验中,从每个肿瘤细胞群体迁移到基质胶内的肿瘤细胞的平均相对比例(\pm SEM),各自针对迁移到基质胶内的来自PDX5的肿瘤细胞比例进行标准化。比例尺:10 μ m。使用Dunnett的多重比较检验,星号表示 $P < 0.05$,**指示 $P < 0.01$,且***表示 $P < 0.001$ 。(图7I-7J)从每个PDX生成单细胞悬浮液,所述PDX从未接受治疗(未治疗的)、或已用紫杉醇治疗的PDX植入小鼠中取出。我们经由流式细胞术检查了ROR1 (图7I)或ALDH1酶促活性(图7J)。DEAB,ALDH1酶促活性的抑制剂,用于鉴定具有ALDH1活性的细胞。(I),空心直方图描述了用抗ROR1染色的细胞的荧光强度。阴影直方图描述了用对照抗体染色的细胞的荧光强度。每个直方图中的数字描绘了ROR1⁺细胞的百分比。(图7J),等高线图右侧的空心框描绘了用于鉴定确定具有ALDH1活性的细胞的门。每个直方图中的数字描绘了ALDH1⁺细胞的百分比。(图7K),用于分选ROR1⁺相对于ROR1^{Neg}细胞的策略。空心框指示用于选择ROR1^{Neg}(左)或 ROR1⁺(右)细胞的门。(图7L),由从每个PDX中分离的ROR1⁺或ROR1^{Neg}细胞形成的球状体的显微照片,如在顶部上指示的。比例尺:100 μ m。右侧的条形图描绘了通过三种分开的培养物中的每种细胞制剂形成的球状体的平均数目 \pm SEM,如在直方图的底部处指示的。(图7M),来自从不同PDX中分离的ROR1⁺或ROR1^{Neg}细胞的基质胶侵袭性细胞的显微照片,如在顶部上指示的。比例尺:10 μ m。右侧的条形图描述了针对来自PDX5的细胞进行标准化,关于三个独立实验中的每种细胞制剂的细胞进入基质胶内的平均相对侵袭(\pm SEM)。(图7N),植入有ROR1⁺或ROR1^{Neg}细胞的动物中的肿瘤发生率,所述细胞从各种乳腺癌PDX各自中分离。使用ELDA软件计算致瘤细胞的频率和概率估计。N.D指示未完成。

[0024] 图8A-8B. 该图显示了通过Wnt5a诱导的增强的BMI1表达依赖于AKT的活化。(图8A),通过定量PCR(qPCR)检查在指定的时间点,用以100ng/ml的Wnt5a处理的Hs578T细胞中的BMI1 mRNA水平。显示的数据是一式三份相对于时间0样品的 BMI1的平均表达水平,并且就GAPDH而言进行标准化。误差条指示SEM。(图8B), Hs578T细胞在无血清培养基中进行培养,用或不用MK-2206预处理3小时,然后用或不用以100ng/ml Wnt5a刺激6小时。经由免疫印迹分析检查了在这些样品上的BMI1、pAKT和AKT。在AKT行下方的数字提供了pAKT与AKT

的条带密度比,其针对用 Wnt5a处理0分钟的样品进行标准化。 β -肌动蛋白充当蛋白质上样对照。在BMI1行下方的数字提供了就用Wnt5a处理0分钟的样品进行标准化的,BMI1与 β -肌动蛋白的条带密度比。

[0025] 图9A-9F. 该图显示了用西妥珠单抗治疗可以在体外抑制YAP/TAZ活性和BMI1 表达,并且在体内阻遏肿瘤生长。(图9A),就Wnt5a的表达检查了来自PDX1-PDX5 的裂解产物,如在右边缘上指示的。 β -肌动蛋白充当上样对照。(图9B),经由共聚焦显微镜检查,就YAP/TAZ检查了从PDX4或PDX5中分离的单细胞悬浮液,所述PDX4 或PDX5用以50 μ g/ml的西妥珠单抗抗体或对照抗体处理4小时。右侧的条形图提供了每个视野的细胞中的核YAP/TAZ的平均百分比。比例尺:20 μ m。(图9C),经由免疫印迹分析,就BMI1、ROR1或13-肌动蛋白检查了来自PDX4或PDX5的裂解产物,所述PDX4或PDX5用以50 μ g/ml的西妥珠单抗抗体或对照抗体处理指示的时间。(图9D),由不同PDX的分离的肿瘤细胞形成的球状体的代表性显微照片,所述不同PDX 用以50 μ g/ml的对照抗体或西妥珠单抗进行处理。右图上的条形图描绘了在每种处理的三个分开的培养孔中,由用西妥珠单抗或对照抗体处理的PDX4或PDX5的肿瘤细胞形成的球状体的平均数目 \pm SEM。(图9E),来自不同PDX的分离的肿瘤细胞的侵袭性细胞的代表性显微照片,所述不同PDX用以50 μ g/ml的对照抗体或西妥珠单抗进行处理。显微照片的右侧是条形图,其描绘了在三个独立实验中的每种细胞制剂的侵入细胞的平均数目 \pm SEM。比例尺:10 μ m。(图9F),将来自以50 μ l的每个PDX样品的1X10⁶细胞与等体积的基质胶混合,然后注入雌性Rag2^{-/-} γ c^{-/-}小鼠的乳房垫内。在一段时间内监测肿瘤生长共42或48天。在42 (PDX5) 或48 (PDX4) 天时取出的每个PDX的代表性照片。比例尺:1cm。

[0026] 图10. 该图显示了用西妥珠单抗处理增强了乳腺癌细胞对紫杉醇的敏感性。PDX4或PDX5样品的单细胞悬浮液用西妥珠单抗或对照抗体,连同或不连同渐增浓度的紫杉醇一起处理24小时。如通过流式细胞术分析确定的,数据显示为来自每种处理的一式三份样品的活细胞的平均百分比(\pm SEM)。如通过斯氏t检验确定的,星号指示P<0.05,且**指示P<0.01。

[0027] 图11. 该图显示了线形图,其描绘了在由箭头指示的天数时,关于未接受治疗(正方形数据点)或用西妥珠单抗治疗(圆形数据点)的动物,在一段时间内PDX3、PDX4 和PDX5各自的平均肿瘤生长(\pm SEM,n=6-8)。使用斯氏t检验,一个星号指示P<0.05,且两个星号指示P<0.01。

[0028] 图12. 该图显示了由从每个PDX中分离的ROR1^{HI}或ROR1^{Neg}细胞形成的球状体的显微照片,如在顶部上指示的。比例尺:100 μ m。右侧的条形图描绘了通过三种分开的培养物中的每种细胞制剂形成的球状体的平均数目 \pm SEM,如在直方图的底部处指示的。

[0029] 图13. 该图显示了来自从不同PDX中分离的ROR1^{HI}或ROR1^{Low}细胞的基质胶侵袭性细胞的显微照片,如在顶部上指示的。比例尺:10 μ m。右侧的条形图描绘了对于在三个独立的实验中的每种细胞制剂的10-20个视野,进入基质胶内的平均侵入细胞(\pm SEM)/视野。

[0030] 图14. 该图显示了植入有ROR1^{Hi}或ROR1^{Low}细胞的动物中的肿瘤发生率,所述细胞从各种乳腺癌PDX各自中分离。使用ELDA软件计算致瘤细胞的频率和概率估计。N.D指示未完成。

[0031] 图15. 该图显示了在化学疗法之前(“前”)或化学疗法之后(“后”)的匹配的乳腺癌患者样品(后,前,N=57,GSE87455)中的ROR1、ALDH1A1、Wnt5a表达水平。

[0032] 图16. 该图显示了在化学疗法之前(“前”)或化学疗法之后(“后”)的匹配的乳腺癌患者样品(后,前,N=25,GSE21974)中的ROR1、ALDH1A1或Wnt5a表达水平。线指示了在治疗前组相对于治疗后组中的中值基因表达水平。

[0033] 图17. 该图显示了相对于GSE21974数据库中匹配的治疗前样品(N=25),关于ROR1^{Low}和ROR1^{Hi}样品组(N=25),或者在来自接受新辅助化学疗法的患者(N=25)的乳腺癌活组织检查上,关于与CD44⁺/CD24^{Low} MS、ETM、Rac1/RhoA/cdc42的活化、Hippo-YAP、BMI1有关的基因的基因集富集(GSE)分析。SIZE是分析中包括的基因数目。NES(标准化的富集得分)说明了基因集大小中的差异,并且可以用于比较跨越基因集的分析结果。NOM p-val(标称p值)是未对于基因集大小或多重基因集测试进行调整的富集得分的统计显著性,FDR q-val(错误发现率q值)是具有给定NES的基因集代表假阳性的估计概率。当错误发现率(FDR)小于0.25时,每个基因集被视为有意义的。

[0034] 图18. 在2天(PDX5)或48(PDX4)天后,将来自以50 μ l的每个PDX样品的 1×10^6 细胞与等体积的基质胶混合,然后注入雌性Rag2^{-/-} γ c^{-/-}小鼠的乳房垫内。在一段时间内监测肿瘤生长共42或48天。比例尺:1cm。

[0035] 图19. 该图显示了条形图,其提供了从图18中描述的每组中的小鼠中摘除的肿瘤的平均重量。(±SEM,N=5-8)。

[0036] 图20. 该图显示了如经由RNAseq(GSE108632)评价的,在用对照hIgG相对于西妥珠单抗治疗的小鼠中,衍生自PDX4的PDX中的与EMT有关的基因的富集图。

具体实施方案

[0037] I. 定义

[0038] 虽然本文显示且描述了本发明的各个实施方案和方面,但对于本领域技术人员显而易见的是,此类实施方案和方面仅作为示例提供。本领域技术人员现在将想到众多变化、改变和取代,而不背离本发明。应该理解,关于本文所述的本发明实施方案的各种替代方案可以用于实践本发明中。

[0039] 本文使用的章节标题仅用于组构目的,并且不应解释为限制所述的主体。本申请中引用的所有文件或文件的部分,包括但不限于专利、专利申请、文章、书籍、手册和论文,明确地在此整体引入作为参考为了任何目的。

[0040] 本文使用的缩写具有其在化学和生物学领域中的常规含义。本文所述的化学结构和化学式根据化学领域中已知的化学价的标准规则构建。

[0041] 当取代基团由其从左到右书写的常规化学式指定时,它们同样涵盖起因于从右到左书写结构的化学上相同的取代基,例如-CH₂O-等价于-OCH₂-。

[0042] 除非另有说明,否则术语“烷基”本身或作为另一个取代基的部分,意指直链(即,非分支)或分支的非环状碳链(或碳)或其组合,其可以是完全饱和的、单不饱和的或多不饱和的,并且可以包括具有指定的碳原子数(即,C₁-C₁₀意指一至十个碳)的二价和多价原子团。饱和烃原子团的实例包括但不限于基团例如甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、叔丁基、异丁基、仲丁基、(环己基)甲基,例如正戊基、正己基、正庚基、正辛基等等的同系物和异构体。不饱和烷基基团是具有一个或多个双键或三键的那种。不饱和烷基基团的实例包括但不限于乙烯基、2-丙烯基、巴豆基、2-异戊烯基、2-(丁二烯基)、2,4-戊二烯基、3-(1,4-

戊二烯基)、乙炔基、1-和3-丙炔基、3-丁炔基、以及更高级的同系物和异构体。烷氧基是由氧接头(-O-)与分子的剩余部分附着的烷基。烷基部分可以是烯基部分。烷基部分可以是炔基部分。烷基部分可以是完全饱和的。除了一个或多个双键外,烯基还可以包括超过一个双键和/或一个或多个三键。除了一个或多个三键外,炔基还可以包括超过一个三键和/或一个或多个双键。

[0043] 除非另有说明,否则术语“亚烷基”本身或作为另一个取代基的部分,意指衍生自烷基的二价原子团,如例示的但不限于 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 。通常,烷基(或亚烷基)基团具有1至24个碳原子,其中具有10个或更少碳原子的那些基团是本发明中优选的。“低级烷基”或“低级亚烷基”是较短链的烷基或亚烷基基团,一般具有八个或更少的碳原子。除非另有说明,否则术语“亚烯基”本身或作为另一个取代基的部分意指衍生自烯烃的二价原子团。

[0044] 除非另有说明,否则术语“杂烷基”本身或与另一个术语组合,意指稳定的直链或分支的非环状链或其组合,包括至少一个碳原子和至少一个杂原子(例如,O、N、P、Si 和S),并且其中氮和硫原子可以任选被氧化,并且氮杂原子可以任选被季铵化。杂原子(例如,O、N、P、S和Si)可以置于杂烷基基团的任何内部位置处或烷基在其下与分子的剩余部分附着的位置处。实例包括但不限于: $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{S}(\text{O})-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}(\text{O})_2-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}=\text{CH}-\text{O}-\text{CH}_3$ 、 $-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{N}-\text{OCH}_3$ 、 $-\text{CH}=\text{CH}-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_3$ 、 $-\text{O}-\text{CH}_3$ 、 $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ 和 $-\text{CN}$ 。至多两个或三个杂原子可以是邻接的,例如 $-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{OCH}_3$ 和 $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ 。杂烷基部分可以包括一个杂原子(例如,O、N、S、Si或P)。杂烷基部分可以包括两个任选地不同的杂原子(例如,O、N、S、Si或P)。杂烷基部分可以包括三个任选地不同的杂原子(例如,O、N、S、Si或P)。杂烷基部分可以包括四个任选地不同的杂原子(例如,O、N、S、Si或P)。杂烷基部分可以包括五个任选地不同的杂原子(例如,O、N、S、Si或P)。杂烷基部分可以包括至多8个任选地不同的杂原子(例如,O、N、S、Si或P)。除非另有说明,否则术语“杂烯基”本身或与另一个术语组合,意欲包括至少一个双键的杂烷基。除了一个或多个双键外,杂烯基还可以任选地包括超过一个双键和/或一个或多个三键。除非另有说明,否则术语“杂炔基”本身或与另一个术语组合,意欲包括至少一个三键的杂烷基。除了一个或多个三键外,杂炔基还可以任选地包括超过一个三键和/或一个或多个双键。

[0045] 类似地,除非另有说明,否则术语“杂亚烷基”本身或作为另一个取代基的部分,意指衍生自杂烷基的二价原子团,如例示的但不限于 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ 和 $-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_2-$ 。对于杂亚烷基基团,杂原子也可以占据链末端中的任一个或两个(例如亚烷氧基、亚烷二氧基、亚烷基氨基、亚烷基二氨基等等)。再进一步地,对于亚烷基和杂亚烷基连接基团,连接基团的取向不通过其中书写连接基团的式的方向暗示。例如,式 $-\text{C}(\text{O})_2\text{R}'-$ 表示 $-\text{C}(\text{O})_2\text{R}'-$ 和 $-\text{R}'\text{C}(\text{O})_2-$ 两者。如上所述,如本文使用的,杂烷基基团包括通过杂原子与分子的剩余部分附着的那些基团,例如 $-\text{C}(\text{O})\text{R}'$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NR}'$ 、 $-\text{NR}'\text{R}''$ 、 $-\text{OR}'$ 、 $-\text{SR}'$ 和/或 $-\text{SO}_2\text{R}'$ 。当叙述“杂烷基”,随后为特定的杂烷基基团的叙述,例如 $-\text{NR}'\text{R}''$ 等等时,应理解术语杂烷基和 $-\text{NR}'\text{R}''$ 不是多余的或相互排斥的。相反,叙述特定的杂烷基基团以增加清晰度。因此,术语“杂烷基”在本文中不应解释为排除特定的杂烷基,例如 $-\text{NR}'\text{R}''$ 等等。

[0046] 除非另有说明,否则术语“环烷基”和“杂环烷基”本身或其它术语组合,分别意指“烷基”和“杂烷基”的非芳族环状形式,其中由于所有碳价都参与与非氢原子的键,构

成一个或多个环的碳不一定必须与氢键合。另外,对于杂环烷基,杂原子可以占据在其下杂环与分子的剩余部分附着的位置。环烷基的实例包括但不限于环丙基、环丁基、环戊基、环己基、1-环己烯基、3-环己烯基、环庚基、3-羟基-环丁-3-烯基-1,2二酮、1H-1,2,4-三唑基-5(4H)-酮、4H-1,2,4-三唑基等等。杂环烷基的实例包括但不限于1-(1,2,5,6-四氢吡啶基)、1-哌啶基、2-哌啶基、3-哌啶基、4-吗啉基、3-吗啉基、四氢呋喃-2-基、四氢呋喃-3-基、四氢噻吩-2-基、四氢噻吩-3-基、1-哌嗪基、2-哌嗪基等等。单独或作为另一个取代基的部分的“环亚烷基”和“杂环亚烷基”分别意指衍生自环烷基和杂环烷基的二价原子团。杂环烷基部分可以包括一个环杂原子(例如,O、N、S、Si或P)。杂环烷基部分可以包括两个任选地不同的环杂原子(例如,O、N、S、Si或P)。杂环烷基部分可以包括三个任选地不同的环杂原子(例如,O、N、S、Si或P)。杂环烷基部分可以包括四个任选地不同的环杂原子(例如,O、N、S、Si或P)。杂环烷基部分可以包括五个任选地不同的环杂原子(例如,O、N、S、Si或P)。杂环烷基部分可以包括至多8个任选地不同的环杂原子(例如,O、N、S、Si或P)。

[0047] 除非另有说明,否则术语“卤代”或“卤素”本身或作为另一个取代基的部分意指氟、氯、溴或碘原子。另外,术语如“卤代烷基”意欲包括单卤代烷基和多卤代烷基。例如,术语“卤代(C₁-C₄)烷基”包括但不限于氟甲基、二氟甲基、三氟甲基、2,2,2-三氟乙基、4-氯丁基、3-溴丙基等等。

[0048] 除非另有说明,否则术语“酰基”意指-C(O)R,其中R是取代或未取代的烷基、取代或未取代的环烷基、取代或未取代的杂烷基、取代或未取代的杂环烷基、取代或未取代的芳基、或者取代或未取代的杂芳基。

[0049] 除非另有说明,否则术语“芳基”意指多不饱和的芳族烃取代基,其可以是稠合在一起(即稠环芳基)或共价连接的单个环或多重环(优选1至3个环)。稠环芳基指稠合在一起的多重环,其中稠环中的至少一个是芳基环。术语“杂芳基”指含有至少一个杂原子如N、O或S的芳基基团(或环),其中氮和硫原子任选被氧化,并且氮原子任选被季铵化。因此,术语“杂芳基”包括稠环杂芳基基团(即,稠合在一起的多重环,其中稠环中的至少一个是杂芳基环)。5,6-稠环杂亚芳基指稠合在一起的两个环,其中一个环具有5个成员且另一个环具有6个成员,并且其中至少一个环是杂芳基环。同样地,6,6-稠环杂亚芳基指稠合在一起的两个环,其中一个环具有6个成员且另一个环具有6个成员,并且其中至少一个环是杂芳基环。并且6,5-稠环杂亚芳基指稠合在一起的两个环,其中一个环具有6个成员且另一个环具有5个成员,并且其中至少一个环是杂芳基环。杂芳基基团可以通过碳或杂原子与分子的剩余部分附着。芳基和杂芳基的非限制性实例包括苯基、1-萘基、2-萘基、4-联苯基、1-吡咯基、2-吡咯基、3-吡咯基、3-吡唑基、2-咪唑基、4-咪唑基、吡嗪基、2-噁唑基、4-噁唑基、2-苯基-4-噁唑基、5-噁唑基、3-异噁唑基、4-异噁唑基、5-异噁唑基、2-噻唑基、4-噻唑基、5-噻唑基、2-呋喃基、3-呋喃基、2-噻吩基、3-噻吩基、2-吡啶基、3-吡啶基、4-吡啶基、2-嘧啶基、4-嘧啶基、5-苯并噻唑基、嘌呤基、2-苯并咪唑基、5-吲哚基、1-异喹啉基、5-异喹啉基、2-喹啉基、5-喹啉基、3-喹啉基和6-喹啉基。关于上述芳基和杂芳基环系统各自的取代基选自下述可接受的取代基。单独或作为另一个取代基的部分的“亚芳基”和“杂亚芳基”分别意指衍生自芳基和杂芳基的二价原子团。芳基和杂芳基的非限制性实例包括吡啶基、嘧啶基、苯硫基、噻吩基、呋喃基、吲哚基、苯并噁二唑基、苯并二噁唑基、苯并二氧杂环己烷基、thianaphthanyl、吡咯并吡啶基、吲唑基、喹啉基、喹啉基、吡啶并吡嗪基、噻唑啉酮基、苯

并异噁唑基、咪唑并吡啶基、苯并呋喃基、苯并噻吩基、苯并苯硫基、苯基、萘基、联苯基、吡咯基、吡唑基、咪唑基、吡嗪基、噁唑基、异噁唑基、噻唑基、呋喃基噻吩基、吡啶基、嘧啶基、苯并噻唑基、嘌呤基、苯并咪唑基、异喹啉基、噻二唑基、噁二唑基、吡咯基、二唑基、三唑基、四唑基、苯并噻二唑基、异噻唑基、吡唑并嘧啶基、吡咯并嘧啶基、苯并三唑基、苯并噁唑基或喹啉基。上述实例可以是取代或未取代的，并且上述每个杂芳基实例的二价原子团是杂亚芳基的非限制性实例。杂芳基部分可以包括一个环杂原子(例如O、N或S)。杂芳基部分可以包括两个任选不同的环杂原子(例如O、N或S)。杂芳基部分可以包括三个任选不同的环杂原子(例如O、N或S)。杂芳基部分可以包括四个任选不同的环杂原子(例如O、N或S)。杂芳基部分可以包括五个任选不同的环杂原子(例如O、N或S)。芳基部分可以具有单个环。芳基部分可以具有两个任选不同的环。芳基部分可以具有三个任选不同的环。芳基部分可以具有四个任选不同的环。杂芳基部分可以具有一个环。杂芳基部分可以具有两个任选不同的环。杂芳基部分可以具有三个任选不同的环。杂芳基部分可以具有四个任选不同的环。杂芳基部分可以具有五个任选不同的环。

[0050] 稠环杂环烷基-芳基是与杂环烷基稠合的芳基。稠环杂环烷基-杂芳基是与杂环烷基稠合的杂芳基。稠环杂环烷基-环烷基是与环烷基稠合的杂环烷基。稠环杂环烷基-杂环烷基是与另一个杂环烷基稠合的杂环烷基。稠环杂环烷基-芳基、稠环杂环烷基-杂芳基、稠环杂环烷基-环烷基或稠环杂环烷基-杂环烷基可以各自独立地未被取代或者被本文所述的一个或多个取代基取代。

[0051] 如本文使用的，术语“氧代”意指与碳原子双重键合的氧。

[0052] 如本文使用的，术语“烷基磺酰基”意指具有式-S(O₂)-R'的部分，其中R'是如上定义的取代或未取代的烷基。R'可以具有指定数目的碳(例如“C₁-C₄烷基磺酰基”)。

[0053] 上述术语(例如“烷基”、“杂烷基”、“环烷基”、“杂环烷基”、“芳基”和“杂芳基”)各自包括取代和未被取代形式的所指示原子团。下文提供了每种类型原子团的优选取代基。

[0054] 关于烷基和杂烷基原子团(包括通常称为亚烷基、烯基、杂亚烷基、杂烯基、炔基、环烷基、杂环烷基、环烯基和杂环烯基的那些基团)的取代基可以是选自下述(但不限于其)的各种基团中的一个或多个：-OR'、=O、=NR'、=N-OR'、-NR'R''、-SR'、-卤素、-SiR'R''R'''、-OC(O)R'、-C(O)R'、-CO₂R'、-CONR'R''、-OC(O)NR'R''、-NR''C(O)R'、-NR'-C(O)NR''R'''、-NR''C(O)₂R'、-NR-C(NR'R''R''')=NR''''、-NR-C(NR'R'')=NR''''、-S(O)R'、-S(O)₂R'、-S(O)₂NR'R''、-NRSO₂R'、-NR'NR''R''''、-ONR'R''、-NR'C=(O)NR''NR''''R''''''、-CN、-NO₂，数目范围为零至(2m'+1)，其中m'为此类原子团中的碳原子总数目。R、R'、R''、R'''和R''''各自优选独立地指氢，取代或未取代的杂烷基，取代或未取代的环烷基，取代或未取代的杂环烷基，取代或未取代的芳基(例如被1-3个卤素取代的芳基)，取代或未取代的杂芳基，取代或未取代的烷基、烷氧基或硫代烷氧基，或芳基烷基。当本发明的化合物包括多于一个R基团时，例如，R基团各自独立地选择为每个R'、R''、R'''和R''''基团，当存在多于一个这些基团时。当R'和R''附着至相同的氮原子时，它们可以与氮原子，以结合形成4-、5-、6-或7-元环。例如，-NR'R''包括但不限于1-吡咯烷基和4-吗啉基。根据取代基的上文讨论，本领域技术人员将理解，术语“烷基”意欲包括这样的基团，所述基团包括与除氢基团外的基团结合的碳原子，例如卤代烷基(例如-CF₃和-CH₂CF₃)和酰基(例如-C(O)CH₃、-C(O)CF₃、-C(O)CH₂OCH₃等等)。

[0055] 类似于对于烷基原子团所述的取代基，关于芳基和杂芳基的取代基是变化的，并

且选自例如： $-\text{OR}'$ 、 $-\text{NR}'\text{R}''$ 、 $-\text{SR}'$ 、 $-\text{卤素}$ 、 $-\text{SiR}'\text{R}''\text{R}'''$ 、 $-\text{OC}(\text{O})\text{R}'$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{R}'$ 、 $-\text{CO}_2\text{R}'$ 、 $-\text{CONR}'\text{R}''$ 、 $-\text{OC}(\text{O})\text{NR}'\text{R}''$ 、 $-\text{NR}''\text{C}(\text{O})\text{R}'$ 、 $-\text{NR}'\text{C}(\text{O})\text{NR}''\text{R}'''$ 、 $-\text{NR}''\text{C}(\text{O})_2\text{R}'$ 、 $-\text{NR}'\text{C}(\text{NR}'\text{R}''\text{R}''')$ 、 $-\text{NR}''\text{C}(\text{NR}'\text{R}''\text{R}''')$ 、 $-\text{NR}'\text{C}(\text{NR}'\text{R}''\text{R}''')$ 、 $-\text{S}(\text{O})\text{R}'$ 、 $-\text{S}(\text{O})_2\text{R}'$ 、 $-\text{S}(\text{O})_2\text{NR}'\text{R}''$ 、 $-\text{NRSO}_2\text{R}'$ 、 $-\text{NR}'\text{NR}''\text{R}'''$ 、 $-\text{ONR}'\text{R}''$ 、 $-\text{NR}'\text{C}=\text{O}\text{NR}''\text{NR}'''\text{R}''''$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{R}'$ 、 $-\text{N}_3$ 、 $-\text{CH}(\text{Ph})_2$ 、氟(C₁-C₄)烷氧基和氟(C₁-C₄)烷基,其数目范围为从零到芳环系统上的开放效价总数;并且其中R'、R''、R'''和R''''优选独立地选自氢、取代或未取代的烷基、取代或未取代的杂烷基、取代或未取代的环烷基、取代或未取代的杂环烷基、取代或未取代的芳基和取代或未取代的杂芳基。当本发明的化合物包括多于一个R基团时,例如,R基团各自独立地选择为每个R'、R''、R'''和R''''基团,当存在多于一个这些基团时。

[0056] 两个或更多个取代基可以任选地连接,以形成芳基、杂芳基、环烷基或杂环烷基。这种所谓的成环取代基通常(虽然不一定)被发现附着至环状基础结构。在一个实施方案中,成环取代基附着至基础结构的相邻成员。例如,附着至环状基础结构的相邻成员的两个成环取代基产生稠环结构。在另一个实施方案中,成环取代基附着至基础结构的单个成员。例如,附着至环状基础结构的单个成员的两个成环取代基产生螺环结构。在另外一个实施方案中,成环取代基附着至基础结构的不相邻成员。

[0057] 芳环或杂芳环的相邻原子上的两个取代基可以任选地形成式 $-\text{T}-\text{C}(\text{O})-(\text{CRR}')_q-\text{U}-$ 的环,其中T和U独立地是 $-\text{NR}-$ 、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{CRR}'-$ 或单键,并且q是0至3的整数。可替代地,芳环或杂芳环的相邻原子上的两个取代基可以任选地被式 $-\text{A}-(\text{CH}_2)_r-\text{B}-$ 的取代基取代,其中A和B独立地是 $-\text{CRR}'-$ 、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{NR}-$ 、 $-\text{S}-$ 、 $-\text{S}(\text{O})-$ 、 $-\text{S}(\text{O})_2-$ 、 $-\text{S}(\text{O})_2\text{NR}'-$ 或单键,并且r是1至4的整数。如此形成的新环的单键之一可以任选地替换为双键。可替代地,芳环或杂芳环的相邻原子上的两个取代基可以任选地替换为式 $-(\text{CRR}')_s-\text{X}'-(\text{C}''\text{R}''\text{R}''')$ 的取代基,其中s和d独立地是0至3的整数,并且X'为 $-\text{O}-$ 、 $-\text{NR}'-$ 、 $-\text{S}-$ 、 $-\text{S}(\text{O})-$ 、 $-\text{S}(\text{O})_2-$ 或 $-\text{S}(\text{O})_2\text{NR}'-$ 。取代基R、R'、R''和R'''优选独立地选自氢、取代或未取代的烷基、取代或未取代的杂烷基、取代或未取代的环烷基、取代或未取代的杂环烷基、取代或未取代的芳基和取代或未取代的杂芳基。

[0058] 如本文使用的,术语“杂原子”或“环杂原子”意欲包括氧(O)、氮(N)、硫(S)、磷(P)和硅(Si)。

[0059] 如本文使用的,“取代基团”意指选自下述部分的基团:

[0060] (A) 氧代、卤素、 $-\text{CF}_3$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{CONH}_2$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{SH}$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-\text{SO}_4\text{H}$ 、 $-\text{SO}_2\text{NH}_2$ 、 $-\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{ONH}_2$ 、 $-\text{NHC}=\text{O}\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{NHC}=\text{O}\text{NH}_2$ 、 $-\text{NHSO}_2\text{H}$ 、 $-\text{NHC}=\text{O}\text{H}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})-\text{OH}$ 、 $-\text{NHOH}$ 、 $-\text{OCF}_3$ 、 $-\text{OCHF}_2$ 、未取代的烷基、未取代的杂烷基、未取代的环烷基、未取代的杂环烷基、未取代的芳基、未取代的杂芳基,和

[0061] (B) 被选自下述的至少一个取代基取代的烷基、杂烷基、环烷基、杂环烷基、芳基、杂芳基:

[0062] (i) 氧代、卤素、 $-\text{CF}_3$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{OH}$ 、 $-\text{NH}_2$ 、 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{CONH}_2$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 $-\text{SH}$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-\text{SO}_4\text{H}$ 、 $-\text{SO}_2\text{NH}_2$ 、 $-\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{ONH}_2$ 、 $-\text{NHC}=\text{O}\text{NHNH}_2$ 、 $-\text{NHC}=\text{O}\text{NH}_2$ 、 $-\text{NHSO}_2\text{H}$ 、 $-\text{NHC}=\text{O}\text{H}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})-\text{OH}$ 、 $-\text{NHOH}$ 、 $-\text{OCF}_3$ 、 $-\text{OCHF}_2$ 、未取代的烷基、未取代的杂烷基、未取代的环烷基、未取代的杂环烷基、未取代的芳基、未取代的杂芳基,和

[0063] (ii) 被选自下述的至少一个取代基取代的烷基、杂烷基、环烷基、杂环烷基、芳基、杂芳基:

[0064] (a) 氧代、卤素、-CF₃、-CN、-OH、-NH₂、-COOH、-CONH₂、-NO₂、-SH、-SO₃H、-SO₄H、-SO₂NH₂、-NHNH₂、-ONH₂、-NHC(=O)NHNH₂、-NHC(=O)NH₂、-NHSO₂H、-NHC(=O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCF₃、-OCHF₂、未取代的烷基、未取代的杂烷基、未取代的环烷基、未取代的杂环烷基、未取代的芳基、未取代的杂芳基,和

[0065] (b) 被选自下述的至少一个取代基取代的烷基、杂烷基、环烷基、杂环烷基、芳基、杂芳基:氧代、卤素、-CF₃、-CN、-OH、-NH₂、-COOH、-CONH₂、-NO₂、-SH、-SO₃H、-SO₄H、-SO₂NH₂、-NHNH₂、-ONH₂、-NHC(=O)NHNH₂、-NHC(=O)NH₂、-NHSO₂H、-NHC(=O)H、-NHC(O)OH、-NHOH、-OCF₃、-OCHF₂、未取代的烷基、未取代的杂烷基、未取代的环烷基、未取代的杂环烷基、未取代的芳基、未取代的杂芳基。

[0066] 如本文使用的,“尺寸受限的取代基”或“尺寸受限的取代基团”意指选自上文对于“取代基团”描述的所有取代基的基团,其中每个取代或未取代的烷基是取代或未取代的C₁-C₂₀烷基,每个取代或未取代的杂烷基是取代或未取代的2至20元杂烷基,每个取代或未取代的环烷基是取代或未取代的C₃-C₈环烷基,每个取代或未取代的杂环烷基是取代或未取代的3至8元杂环烷基,每个取代或未取代的芳基是取代或未取代的C₆-C₁₀芳基,并且每个取代或未取代的杂芳基是取代或未取代的5至10元杂芳基。

[0067] 如本文使用的,“低级取代基”或“低级取代基团”意指选自上文对于“取代基团”描述的所有取代基的基团,其中每个取代或未取代的烷基是取代或未取代的C₁-C₈烷基,每个取代或未取代的杂烷基是取代或未取代的2至8元杂烷基,每个取代或未取代的环烷基是取代或未取代的C₃-C₇环烷基,每个取代或未取代的杂环烷基是取代或未取代的3至7元杂环烷基,每个取代或未取代的芳基是取代或未取代的C₆-C₁₀芳基,并且每个取代或未取代的杂芳基是取代或未取代的5至9元杂芳基。

[0068] 在一些实施方案中,本文化合物中描述的每个取代基团被至少一个取代基团取代。更具体地,在一些实施方案中,本文化合物中描述的每个取代的烷基、取代的杂烷基、取代的环烷基、取代的杂环烷基、取代的芳基、取代的杂芳基、取代的亚烷基、取代的杂亚烷基、取代的亚环烷基、取代的杂亚环烷基、取代的亚芳基和/或取代的杂亚芳基被至少一个取代基团取代。在其它实施方案中,这些基团中的至少一个或全部被至少一个尺寸受限的取代基团取代。在其它实施方案中,这些基团中的至少一个或全部被至少一个低级取代基团取代。

[0069] 在本文化合物的其它实施方案中,每个取代或未取代的烷基可以是取代或未取代的C₁-C₂₀烷基,每个取代或未取代的杂烷基是取代或未取代的2至20元杂烷基,每个取代或未取代的环烷基是取代或未取代的C₃-C₈环烷基,每个取代或未取代的杂环烷基是取代或未取代的3至8元杂环烷基,每个取代或未取代的芳基是取代或未取代的C₆-C₁₀芳基,并且每个取代或未取代的杂芳基是取代或未取代的5至10元杂芳基。在本文化合物的一些实施方案中,每个取代或未取代的亚烷基是取代或未取代的C₁-C₂₀亚烷基,每个取代或未取代的杂亚烷基是取代或未取代的2至20元杂亚烷基,每个取代或未取代的亚环烷基是取代或未取代的C₃-C₈亚环烷基,每个取代或未取代的杂亚环烷基是取代或未取代的3至8元杂亚环烷基,每个取代或未取代的亚芳基是取代或未取代的C₆-C₁₀亚芳基,和/或每个取代或未取代的杂亚芳基是取代或未取代的5至10元杂亚芳基。

[0070] 在一些实施方案中,每个取代或未取代的烷基是取代或未取代的C₁-C₈烷基,每个

取代或未取代的杂烷基是取代或未取代的2至8元杂烷基,每个取代或未取代的环烷基是取代或未取代的C₃-C₇环烷基,每个取代或未取代的杂环烷基是取代或未取代的3至7元杂环烷基,每个取代或未取代的芳基是取代或未取代的C₆-C₁₀芳基,并且每个取代或未取代的杂芳基是取代或未取代的5至9元杂芳基。在一些实施方案中,每个取代或未取代的亚烷基是取代或未取代的C₁-C₈亚烷基,每个取代或未取代的杂亚烷基是取代或未取代的2至8元杂亚烷基,每个取代或未取代的亚环烷基是取代或未取代的C₃-C₇亚环烷基,每个取代或未取代的杂亚环烷基是取代或未取代的3至7元杂亚环烷基,每个取代或未取代的亚芳基是取代或未取代的C₆-C₁₀亚芳基,和/或每个取代或未取代的杂亚芳基是取代或未取代的5至9元杂亚芳基。在一些实施方案中,化合物是在下文实施例部分、附图或表中阐述的化学种类。

[0071] 因此,本发明的化合物可以作为例如具有药学上可接受的酸的盐存在。本发明包括此类盐。此类盐的实例包括盐酸盐、氢溴酸盐、硫酸盐、甲磺酸盐、硝酸盐、马来酸盐、乙酸盐、柠檬酸盐、富马酸盐、酒石酸盐(例如(+)-酒石酸盐、(-)-酒石酸盐、或其混合物包括外消旋混合物)、琥珀酸盐、苯甲酸盐、以及具有氨基酸例如谷氨酸的盐。这些盐可以通过本领域技术人员已知的方法来制备。

[0072] 化合物的中性形式优选通过使盐与碱或酸接触,并且以常规方式分离母体化合物来再生。化合物的母体形式在某些物理特性(例如在极性溶剂中的溶解度)方面不同于各种盐形式。

[0073] 本文提供的是可以以前药形式的试剂(例如化合物、药物、治疗剂)。本文所述化合物的前药是这样的化合物,其在选定的生理条件下容易经历化学变化,以提供最终试剂(例如化合物、药物、治疗剂)。另外,可以在离体环境中,通过化学方法或生化方法,将前药转换为试剂(例如化合物、药物、治疗剂)。本文所述的前药包括这样的化合物,其在选定的生理条件下容易经历化学变化,以向生物系统(例如在受试者中)提供试剂(例如化合物、药物、治疗剂)。

[0074] 本发明的某些化合物可以以非溶剂化形式以及溶剂化形式,包括水合形式存在。一般而言,溶剂化形式等价于非溶剂化形式,并且涵盖在本发明的范围内。本发明的某些化合物可以以多重结晶形式或无定形形式存在。一般而言,所有物理形式对于由本发明考虑的用途是等价的,并且预期落入本发明的范围内。

[0075] 如本文使用的,术语“盐”指在本发明的方法中使用的化合物的酸式盐或碱式盐。可接受的盐的说明性实例是无机酸(盐酸、氢溴酸、磷酸等等)盐、有机酸(乙酸、丙酸、谷氨酸、柠檬酸等等)盐、季铵(碘甲烷、碘乙烷等等)盐。

[0076] 本发明的某些化合物具有不对称碳原子(光学或手性中心)或双键;对映异构体、外消旋体、非对映异构体、互变异构体、几何异构体、立体异构形式,可以根据绝对立体化学定义为(R)-或(S)-或者对于氨基酸(D)-或(L)-,并且各个异构体涵盖在本发明的范围内。本发明的化合物不包括本领域已知太不稳定而不能合成和/或分离的化合物。本发明意欲包括以外消旋和光学纯形式的化合物。光学活性的(R)-和(S)-、或(D)-和(L)-异构体可以使用手性合成子或手性试剂制备,或使用常规技术分辨。当本文所述的化合物含有烯键或其它几何不对称中心时,并且除非另有说明,否则所述化合物包括E和Z几何异构体两者。

[0077] 如本文使用的,术语“异构体”指具有相同数目和种类的原子,并且因此具有相同分子量,但在原子的结构排列或构型方面不同的化合物。

[0078] 如本文使用的,术语“互变异构体”指两种或更多种结构异构体之一,其以平衡存在并且容易地从一种异构形式转换为另一种异构形式。

[0079] 对于本领域技术人员显而易见的是,本发明的某些化合物可以以互变异构体形式存在,化合物的所有此类互变异构形式都在本发明的范围内。

[0080] 除非另有说明,否则本文描述的结构也意欲包括该结构的所有立体化学形式;即,关于每个不对称中心的R和S构型。因此,本文化合物的单一立体化学异构体以及对映异构体和非对映异构体混合物都在本发明的范围内。

[0081] 除非另有说明,否则本文描述的结构还意欲包括仅在一个或多个同位素富集原子的存在方面不同的化合物。例如,除了氢替换为氘或氚、或者碳替换为富含¹³C或¹⁴C的碳之外,具有本文结构的化合物都在本发明的范围内。

[0082] 本发明的化合物还可以在构成此类化合物的一个或多个原子处含有非天然比例的原子同位素。例如,化合物可以用放射性同位素,例如氚(³H)、碘-125(¹²⁵I)或碳-14(¹⁴C)进行放射性标记。本发明的化合物的所有同位素变化,无论是否是放射性的,都涵盖在本发明的范围内。

[0083] “类似物(Analog)”或“类似物(analogue)”可互换使用,并且根据其在化学和生物学内的平常的普通含义使用,并且指这样的化学化合物,其在结构上与另一种化合物(即,所谓的“参考”化合物)相似,但是在组成中不同,例如,在一个原子替换为不同元素的原子方面,或在特定官能团的存在下,或一个官能团替换为另一个官能团,或者参考化合物包括其异构体的一个或多个手性中心的绝对立体化学。相应地,类似物是在功能和外观方面与参考化合物相似或可比较,但在结构或起源方面则不是的化合物。

[0084] 如在本文中使用的,术语“一个”或“一种”意指一个或多个/一种或多种。另外,如本文使用的,短语“被[n]取代”意指特定的基团可以被任何或所有所述取代基中的一个或多个取代。例如,当基团例如烷基或杂芳基基团“被未取代的C₁-C₂₀烷基、或未取代的2至20元杂烷基取代”时,该基团可以含有一个或多个未取代的C₁-C₂₀烷基、和/或一个或多个未取代的2至20元杂烷基。

[0085] 本发明的化合物的描述受到本领域技术人员已知的化学键合原理的限制。相应地,当基团可以被许多取代基中的一个或多个取代时,选择此类取代以便遵循化学键合的原理,并且给出并非固有不安定的和/或对于本领域普通技术人员已知为在环境条件下可能是不稳定的化合物,所述环境条件例如水性、中性和几种已知的生理条件。例如,杂环烷基或杂芳基经由环杂原子与分子的剩余部分附着,顺应本领域技术人员已知的化学键合原理,从而避免固有不安定的化合物。

[0086] 术语“抗体”根据其在领域中众所周知的含义使用。抗体例如作为完整的免疫球蛋白或通过用各种肽酶消化产生的许多充分表征的片段存在。因此,例如,胃蛋白酶消化铰链区中的二硫化物连接以下的抗体,以产生F(ab)'₂, Fab的二聚体,其本身是通过二硫键与V_H-C_{H1}连接的轻链。F(ab)'₂可以在温和条件下还原,以破坏铰链区中的二硫化物连接,从而将F(ab)'₂二聚体转换为Fab'单体。Fab'单体基本上是具有铰链区的部分的Fab(参见Fundamental Immunology(Paul编辑,第3版1993)。虽然各种抗体片段根据完整抗体的消化进行定义,但技术人员之一将理解,此类片段可以通过化学方法或通过使用重组DNA方法从头合成。因此,如本文使用的,术语抗体还包括通过完整抗体的修饰产生的抗体片段,或使

用重组DNA方法从头合成的那些(例如,单链Fv),或使用噬菌体展示文库鉴定的那些(参见例如,McCafferty等人,Nature 348: 552-554(1990))。

[0087] 术语“抗体”指由免疫球蛋白基因或其功能片段编码的多肽,其特异性结合并识别抗原。公认的免疫球蛋白基因包括 κ 、 λ 、 α 、 γ 、 δ 、 ϵ 和 μ 恒定区基因,以及无数免疫球蛋白可变区基因。轻链分类为 κ 或 λ 。重链分类为 γ 、 μ 、 α 、 δ 或 ϵ ,其依次又分别定义免疫球蛋白类别,IgG、IgM、IgA、IgD和IgE。

[0088] 当提及蛋白质或肽时,短语“特异性地(或选择性地)结合抗体”或“与之特异性地(或选择性地)免疫反应”,指通常在蛋白质及其它生物制品的异质群体中,其为蛋白质存在的决定因素的结合反应。因此,在指定的免疫测定条件下,指定的抗体与特定蛋白质的结合是本底的至少两倍,且更通常是本底的10至100倍。在此类条件下与抗体的特异性结合需要就其对于特定蛋白质的特异性而选择的抗体。例如,可以选择多克隆抗体以仅获得与所选抗原而不与其它蛋白质特异性免疫反应的抗体子集。可以通过减去与其它分子交叉反应的抗体来实现该选择。各种免疫测定形式可以用于选择与特定蛋白质特异性免疫反应的抗体。例如,照常规使用固相ELISA免疫测定来选择与蛋白质特异性免疫反应的抗体(关于可以用于确定特异性免疫反应性的免疫测定形式和条件的描述,参见例如,Harlow&Lane, Using Antibodies, A Laboratory Manual(1998))。

[0089] 示例性免疫球蛋白(抗体)结构单元包含四聚体。每个四聚体由两对相同的多肽链组成,每对具有一条“轻”(约25kDa)和一条“重”链(约50-70kDa)。每条链的N末端限定了主要负责抗原识别、约100至110个或更多个氨基酸的可变区。术语“可变重链”、“V_H”或“VH”指免疫球蛋白重链的可变区,包括Fv、scFv、dsFv或Fab;而术语“可变轻链”、“V_L”或“VL”指免疫球蛋白轻链的可变区,包括Fv、scFv、dsFv或Fab的可变区。

[0090] 抗体功能片段的实例包括但不限于完整抗体分子、抗体片段例如Fv、单链Fv(scFv)、互补决定区(CDR)、VL(轻链可变区)、VH(重链可变区)、Fab、F(ab) 2'以及能够结合靶抗原的免疫球蛋白肽的那些或任何其它功能部分的任何组合(参见例如,FUNDAMENTAL IMMUNOLOGY(Paul编辑,第4版(2001))。如本领域技术人员应了解的,可以通过各种方法来获得各种抗体片段,所述方法例如用酶如胃蛋白酶消化完整抗体;或从头合成。抗体片段经常通过化学方法或通过使用重组DNA方法从头合成。因此,如本文使用的,术语抗体包括通过完整抗体的修饰产生的抗体片段,或使用重组DNA方法从头合成的那些(例如,单链Fv),或使用噬菌体展示文库鉴定的那些(参见例如,McCafferty等人,(1990) Nature 348:552)。术语“抗体”还包括二价或双特异性分子、双抗体、三抗体和四抗体。二价和双特异性分子在例如以下中描述:Kostelny 等人(1992) J. Immunol. 148:1547, Pack和Pluckthun(1992) Biochemistry 31:1579, Hollinger等人(1993), PNAS. USA 90:6444, Gruber等人(1994) J Immunol. 152: 5368, Zhu等人(1997) Protein Sci. 6:781, Hu等人(1996) Cancer Res. 56: 3055, Adams等人(1993) Cancer Res. 53:4026,以及McCartney等人(1995) Protein Eng. 8: 301。

[0091] “嵌合抗体”是这样的抗体分子,其中(a)恒定区或其一部分被改变、替换或交换,使得抗原结合位点(可变区)与不同类别或改变类别、效应子功能和/或种类的恒定区连接,或对嵌合抗体赋予新性质的完全不同的分子,例如酶、毒素、激素、生长因子、药物等;或(b)可变区或其一部分用具有不同或改变的抗原特异性的可变区改变、替换或交换。根据本发

明且用于根据本发明使用的优选抗体包括人源化和/或嵌合单克隆抗体。

[0092] “接触”根据其平常的普通含义使用,并且指允许至少两个不同的种类(例如包括生物分子或细胞的化学化合物)变得足够接近以反应、相互作用或物理接触的过程。然而,应当了解,所得到的反应产物可以直接由添加的试剂之间的反应产生,或者由可以在反应混合物中产生的一种或多种添加的试剂的中间产物产生。

[0093] 术语“接触”可以包括允许两个种类反应、相互作用或物理接触,其中所述两个种类可以是例如如本文所述的化合物和蛋白质或酶。在一些实施方案中,接触包括允许本文所述的化合物与信号传导途径中涉及的蛋白质或酶相互作用。

[0094] 除非另有定义,否则本文使用的技术和科学术语具有与本领域普通技术人员通常理解相同的含义。参见例如,Singleton等人,DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY 2nd ed.,J.Wiley&Sons (New York,NY 1994);Sambrook 等人,MOLECULAR CLONING,A LABORATORY MANUAL,Cold Springs Harbor Press (Cold Springs Harbor,NY 1989)。与本文描述的那些类似或等价的任何方法、装置和材料都可以用于本发明的实践中。提供下述定义以促进本文中频繁使用的某些术语的理解,并不意味着限制本公开内容的范围。

[0095] 如在本文中可以使用的,术语“核酸”、“核酸分子”、“核酸寡聚物”、“寡核苷酸”、“核酸序列”、“核酸片段”和“多核苷酸”可互换使用,并且预期包括但不限于共价连接在一起的核苷酸的聚合形式,其可以具有各种长度,或脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸,或者其类似物、衍生物或修饰。不同的多核苷酸可以具有不同的三维结构,并且可以执行各种已知或未知的功能。多核苷酸的非限制性实例包括基因、基因片段、外显子、内含子、基因间DNA(包括但不限于异染色质DNA)、信使RNA(mRNA)、转移RNA、核糖体RNA、核酶、cDNA、重组多核苷酸、分支多核苷酸、质粒、载体、分离的DNA 序列、分离的RNA序列、核酸探针和引物。可用于本公开内容的方法中的多核苷酸可以包含天然核酸序列及其变体、人工核酸序列或此类序列的组合。

[0096] 多核苷酸通常由四种核苷酸碱基的特异性序列组成:腺嘌呤(A);胞嘧啶(C);鸟嘌呤(G);以及胸腺嘧啶(T)(当多核苷酸为RNA时,尿嘧啶(U)取代胸腺嘧啶(T))。因此,术语“多核苷酸序列”是多核苷酸分子的字母表示;可替代地,该术语可以应用于多核苷酸分子本身。这种字母表示可以输入到具有中央处理器的计算机中的数据库内,并且用于生物信息学应用例如功能基因组学和同源性检索。多核苷酸可以任选地包括一种或多种非标准核苷酸、核苷酸类似物和/或修饰的核苷酸。

[0097] 当氨基酸残基在蛋白质内占据与给定残基相同的基本结构位置时,蛋白质中的氨基酸残基“对应于”给定的残基。

[0098] 术语“氨基酸”指天然存在的和合成的氨基酸,以及以与天然存在的氨基酸类似的方式起作用的氨基酸类似物和氨基酸模拟物。天然存在的氨基酸是由遗传密码编码的那些,以及后来进行修饰的那些氨基酸,例如羟脯氨酸、 γ -羧基谷氨酸和O-磷酸丝氨酸。氨基酸类似物指与天然存在的氨基酸具有相同的基本化学结构的化合物,即与氢、羧基基团、氨基基团和R基团结合的 α 碳,例如高丝氨酸、正亮氨酸、甲硫氨酸亚砷、甲硫氨酸甲基砷。此类类似物具有修饰的R基团(例如正亮氨酸)或修饰的肽主链,但保留与天然存在的氨基酸相同的基本化学结构。氨基酸模拟物指具有与氨基酸的一般化学结构不同的结构,但以与天

然存在的氨基酸类似的方式起作用的化学化合物。术语“非天然存在的氨基酸”和“非天然氨基酸”指在自然界中未发现的氨基酸类似物、合成氨基酸和氨基酸模拟物。

[0099] 氨基酸在本文中可以通过其通常已知的三字母符号或由IUPAC-IUB生物化学命名委员会(Biochemical Nomenclature Commission)推荐的单字母符号来提及。同样地,核苷酸可以通过其通常公认的单字母代码来提及。

[0100] 术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”在本文中可互换使用,以指氨基酸残基的聚合物,其中在实施方案中,所述聚合物可以与不由氨基酸组成的部分缀合。该术语应用于氨基酸聚合物,其中一个或多个氨基酸残基是相应天然存在的氨基酸的人工化学模拟物,以及天然存在的氨基酸聚合物和非天然存在的氨基酸聚合物。“融合蛋白”指编码两种或更多种分开的蛋白质序列的嵌合蛋白质,所述蛋白质序列作为单一部分重组表达。

[0101] 术语“肽基”和“肽基部分”意指单价肽。

[0102] “保守修饰的变体”应用于氨基酸和核酸序列两者。关于特定的核酸序列,“保守修饰的变体”指编码相同或基本上相同的氨基酸序列的那些核酸。由于遗传密码的简并性,许多核酸序列编码任何给定的蛋白质。例如,密码子GCA、GCC、GCG和GCU都编码氨基酸丙氨酸。因此,在其中丙氨酸由密码子指定的每一个位置处,密码子可以改变为所述的任何相应密码子而不改变编码的多肽。此类核酸变异是“沉默变异”,其是保守修饰变异的一种。本文中编码多肽的每一个核酸序列也描述了核酸的每一种可能的沉默变异。技术人员将认识到,核酸中的每个密码子(除了通常是甲硫氨酸的唯一密码子的AUG和通常是色氨酸的唯一密码子的TGG之外)可以进行修饰,以产生功能上相同的分子。相应地,编码多肽的核酸的每个沉默变异隐含在每个所述序列中。

[0103] 关于氨基酸序列,技术人员将认识到改变、添加或缺失编码序列中的单个氨基酸或小百分比的氨基酸,对核酸、肽、多肽或蛋白质序列的个别取代、缺失或添加是“保守修饰的变体”,其中所述改变导致用化学上相似的氨基酸的氨基酸取代。提供功能上相似的氨基酸的保守取代表是本领域众所周知的。此类保守修饰的变体是对本公开内容的多态变体、种间同源物和等位基因的补充,并且不排除其。

[0104] 下述八组各自含有其为关于彼此的保守取代的氨基酸:

[0105] 1) 丙氨酸(A)、甘氨酸(G);

[0106] 2) 天冬氨酸(D)、谷氨酸(E);

[0107] 3) 天冬酰胺(N)、谷氨酰胺(Q);

[0108] 4) 精氨酸(R)、赖氨酸(K);

[0109] 5) 异亮氨酸(I)、亮氨酸(L)、甲硫氨酸(M)、缬氨酸(V);

[0110] 6) 苯丙氨酸(F)、酪氨酸(Y)、色氨酸(W);

[0111] 7) 丝氨酸(S)、苏氨酸(T);和

[0112] 8) 半胱氨酸(C)、甲硫氨酸(M)

[0113] (参见例如,Creighton,Proteins(1984))。

[0114] 当在给定氨基酸或多核苷酸序列的编号的上下文中使用时,术语“提及的编号”或“对应于的编号”,指当给定氨基酸或多核苷酸序列与参考序列进行比较时,特定参考序列的残基编号。当氨基酸残基在蛋白质内占据与给定残基相同的基本结构位置时,蛋白质中的氨基酸残基“对应于”给定的残基。本领域技术人员将立即识别在具有不同编号系统的其

它蛋白质中,与蛋白质(例如,ROR-1)中的特异性位置相对应的残基的身份和位置。例如,通过与蛋白质(例如,ROR-1)进行简单的序列比对,在与所述蛋白质比对的其它蛋白质序列中,鉴定与所述蛋白质的特异性位置相对应的残基的身份和位置。

[0115] “序列同一性的百分比”通过是比较窗上比较两个最佳比对的序列来确定,其中所述比较窗中的多核苷酸或多肽序列的部分可以包含与参考序列(其不包含添加或缺失)相比的添加或缺失(即,缺口),用于两个序列的最佳比对。百分比通过以下进行计算:确定在其处在两个序列中出现相同核酸碱基或氨基酸残基的位置数目,以得到匹配位置的数目,将匹配位置的数目除以比较窗中的位置总数目,并且将结果乘以100,以得到序列同一性的百分比。

[0116] 在两个或更多个核酸或多肽序列的上下文中,术语“相同”或百分比“同一性”指如使用具有下述缺省参数的BLAST或BLAST 2.0序列比较算法,或者通过手动比对和目视检查测量的(参见例如,NCBI网站<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>等等),其为相同的或具有指定百分比的其为相同(即,当在比较窗或指定区域上就最大对应性比较且比对时,在指定区域上约60%的同一性,优选65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高的同一性)的氨基酸残基或核苷酸的两个或更多个序列或子序列。此类序列然后被说成“基本上相同的”。这个定义还指或可以应用于测试序列的互补体。该定义还包括具有缺失和/或添加的序列,以及具有取代的序列。如下所述,优选算法可以解决缺口等等。优选地,同一性存在于长度至少约25个氨基酸或核苷酸的区域上,或更优选地长度50-100个氨基酸或核苷酸的区域上。

[0117] 氨基酸或核苷酸碱基“位置”由基于其相对于N末端(或5'末端)的位置,序贯鉴定参考序列中的每个氨基酸(或核苷酸碱基)的数目表示。由于在确定最佳比对时必须加以考虑的缺失、插入、截短、融合等等,一般而言通过简单地从N末端计数确定的测试序列中的氨基酸残基数目不一定与其在参考序列中相应位置的数目相同。例如,在其中变体相对于比对的参考序列具有缺失的情况下,变体中将不存在对应于参考序列中在缺失位点处的位置的氨基酸。当在比对的参考序列中存在插入时,该插入将不对应于参考序列中的编号的氨基酸位置。在截短或融合的情况下,参考序列或比对序列中可以存在不对应于相应序列中的任何氨基酸的氨基酸段。

[0118] 如本文使用的,术语“异常”指与正常不同。当用于描述酶促活性或蛋白质功能时,异常指大于或小于正常对照或正常未患病对照样品的平均值的活性或功能。异常活性可以指导致疾病的活性量,其中使异常活性恢复到正常量或非疾病有关量(例如,通过施用如本文所述的化合物或使用如本文所述的方法),导致疾病或者一种或多种疾病症状的减少。

[0119] 对于序列比较,通常一个序列充当参考序列,测试序列与之进行比较。当使用序列比较算法时,将测试序列和参考序列输入计算机内,需要时,指定子序列坐标,并且指定序列算法程序参数。可以使用缺省程序参数,或者也可以指定替代参数。序列比较算法然后基于程序参数,计算测试序列相对于参考序列的百分比序列同一性。

[0120] 如本文使用的,“比较窗”包括提及选自例如全长序列或20至600、约50至约200、或约100至约150个氨基酸或核苷酸的邻接位置数目中的任何一个的区段,其中序列可以在两个序列进行最佳比对后与相同数目的邻接位置的参考序列进行比较。用于比较的序列比对方法是本领域众所周知的。用于比较的最佳序列比对可以例如通过以下进行: Smith和

Waterman (1970) *Adv. Appl. Math.* 2:482c 的局部同源性算法, Needleman 和 Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48:443 的同源性比对算法, Pearson 和 Lipman (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2444 的相似性搜索方法, 这些算法的计算机化实现 (Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI 中的 GAP、BESTFIT、FASTA 和 TFASTA), 或手动比对和目视检查 (参见例如, Ausubel 等人, *Current Protocols in Molecular Biology* (1995 补充))。

[0121] 适合于确定百分比序列同一性和序列相似性的算法的实例是 BLAST 和 BLAST 2.0 算法, 其分别描述于 Altschul 等人 (1977) *Nuc. Acids Res.* 25:3389-3402, 以及 Altschul 等人 (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-410 中。用于进行 BLAST 分析的软件可通过美国国家生物技术信息中心 (National Center for Biotechnology Information) (在 ncbi.nlm.nih.gov/ 处的网站) 公开获得。该算法涉及首先通过鉴定查询序列中长度 W 的短字来鉴定高分序列对 (HSP), 当与数据库序列中的相同长度的字比对时, 所述 HSP 或匹配或满足一些正值阈值得分 T 。 T 称为邻域字得分阈值 (Altschul 等人, 同上)。这些最初的邻域字命中充当种子, 用于起始搜索以找到包含其的更长 HSP。只要可以增加累积比对得分, 字命中就沿着每个序列在两个方向上延伸。对于核苷酸序列, 使用参数 M (关于一对匹配残基的奖励得分; 总是 >0) 和 N (关于错配残基的惩罚得分; 总是 <0) 计算累积得分。对于氨基酸序列, 使用评分矩阵来计算累积得分。在以下情况下, 停止每个方向上的字命中的扩展: 累积比对得分从其最大实现值减少数目 X ; 由于一个或多个负评分残基比对的积累, 累积评分变为零或低于零; 或达到任一序列的末端。BLAST 算法参数 W 、 T 和 X 确定比对的灵敏度和速度。BLASTN 程序 (对于核苷酸序列) 使用字长 (W) 11、期望值 (E) 或 10、 $M=5$ 、 $N=-4$ 以及两条链的比较作为缺省值。对于氨基酸序列, BLASTP 程序使用字长 3 和期望值 (E) 10、以及 BLOSUM62 评分矩阵 (参见 Henikoff 和 Henikoff (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915)、比对 (B) 50、期望值 (E) 10、 $M=5$ 、 $N=-4$ 以及两条链的比较作为缺省值。

[0122] BLAST 算法还进行两个序列之间的相似性的统计学分析 (参见例如, Karlin 和 Altschul (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873-5787)。由 BLAST 算法提供的一种相似性度量是最小总和概率 ($P(N)$), 其提供了通过其两个核苷酸或氨基酸序列之间的匹配偶然发生的概率的指示。例如, 如果在测试核酸与参考核酸的比较中的最小总和概率小于约 0.2, 更优选地小于约 0.01, 并且最优选地小于约 0.001, 则核酸视为与参考序列相似。

[0123] 两个核酸序列或多肽基本上相同的指示是由第一核酸编码的多肽与针对由第二核酸编码的多肽产生的抗体免疫交叉反应, 如下文所述。因此, 多肽通常与第二多肽基本上相同, 例如, 其中两种肽仅通过保守取代而不同。两个核酸序列基本上相同的另一个指示是两个分子或其互补体在严格条件下彼此杂交, 如下文所述。两个核酸序列基本上相同的另外一个指示是相同的引物可以用于扩增序列。

[0124] 当应用于核酸或蛋白质时, 术语“分离的”表示核酸或蛋白质基本上不含它与之在天然状态中结合的其它细胞组分。它可以例如处于同质状态, 并且可以是干燥的或在水溶液中。纯度和同质性通常使用分析化学技术如聚丙烯酰胺凝胶电泳或高效液相层析进行测定。其为制剂中存在的占优势种类的蛋白质是基本上纯化的。

[0125] 化合物的“选择性的”或“选择性”等等指化合物区分分子靶的能力 (例如, 具有针对 HMT SUV39H1 和/或 HMT G9a 的选择性的化合物)。

[0126] 化合物的“特异性的”、“特异性地”、“特异性”等等指化合物对特定分子靶引起特定作用(例如抑制)的能力,伴随对细胞中的其它蛋白质最低限度的作用或无作用(例如具有针对ROR-1的特异性的化合物)展示ROR1活性的抑制,而相同的化合物展示对其它ROR蛋白如ROR2的很少至无抑制)。

[0127] 当提及蛋白质或肽时,短语“特异性地(或选择性地)结合抗体”或“与之特异性地(或选择性地)免疫反应”,指在蛋白质及其它生物制品的异质群体中,其为蛋白质存在的决定因素的结合反应。因此,在指定的免疫测定条件下,指定的抗体与特定蛋白质的结合是本底的至少两倍,并且基本上不以显著量与样品中存在的其它蛋白质结合。通常,特异性或选择性反应是本底信号或噪声的至少两倍,且更通常是本底的10至100倍。

[0128] 如本文使用的,“细胞”指进行足以保存或复制其基因组DNA的代谢或其它功能的细胞。细胞可以通过本领域众所周知的方法鉴定,包括例如完整膜的存在、通过特定染料的染色、产生子代的能力、或者在配子的情况下、与第二配子结合以产生存活后代的能力。细胞可以包括原核细胞和真核细胞。原核细胞包括但不限于细菌。真核细胞包括但不限于酵母细胞以及衍生自植物和动物的细胞,例如哺乳动物、昆虫(例如斜纹夜蛾)和人细胞。当细胞是天然不贴壁或已通过胰蛋白酶消化进行处理以不粘附至表面时,它们可能是有用的。

[0129] “干细胞”是特征在于通过有丝分裂细胞分裂而自我更新的能力,以及分化成组织或器官的潜力的细胞。在哺乳动物干细胞中,可以区分出胚胎干细胞(ES细胞)和成体干细胞(例如HSC)。胚胎干细胞驻留在胚泡中并产生胚胎组织,而成体干细胞则驻留在成年组织中,用于组织再生和修复的目的。如本文提供的“神经干细胞”指这样的干细胞,其能够通过有丝分裂细胞分裂而自我更新,并且分化成神经细胞(例如,神经胶质细胞、神经元、星形胶质细胞、少突胶质细胞)。

[0130] “B细胞”或“B淋巴细胞”指其在本领域中的标准用途。B细胞是淋巴细胞,一类白血细胞(白细胞),其发展为产生抗体的浆细胞(“成熟B细胞”)。“未成熟B细胞”是可以发展为成熟B细胞的细胞。一般地,前B细胞经历免疫球蛋白重链重排而变成祖B前B细胞,并且进一步经历免疫球蛋白轻链重排而变成未成熟B细胞。未成熟B细胞包括T1和T2 B细胞。

[0131] 如本文使用的,“T细胞”或“T淋巴细胞”是一类淋巴细胞(白血细胞的亚型),其在细胞介导的免疫中起关键作用。通过在细胞表面上T细胞受体的存在,可以将它们与其它淋巴细胞(例如B细胞和天然杀伤细胞)区分开。T细胞包括例如天然杀伤T(NKT)细胞、细胞毒性T淋巴细胞(CTL)、调节性T(Treg)细胞和T辅助细胞。可以通过使用T细胞检测剂来区分不同类型的T细胞。

[0132] “记忆性T细胞”是在先前的感染、遭遇癌症或先前疫苗接种的过程中,已先前遇到并响应其同源抗原的T细胞。在与其同源抗原的第二次相遇时,记忆性T细胞可以繁殖(分裂),以产生比免疫系统第一次响应病原体更快且更强的免疫应答。

[0133] “调节性T细胞”或“抑制性T细胞”是调节免疫系统,维持对自身抗原的耐受,并且预防自身免疫性疾病的淋巴细胞。

[0134] 如本文定义的,在提及蛋白质-抑制剂相互作用中的术语“抑制(inhibition)”、“抑制(inhibit)”、“抑制(inhibiting)”等等,意指相对于在不存在抑制剂的情况下的蛋白质活性或功能,负面影响(例如降低)蛋白质的活性或功能。在实施方案中,抑制意指相对于

不存在抑制剂的情况下的蛋白质浓度或水平,负面影响(例如降低)蛋白质的浓度或水平。在实施方案中,抑制指疾病或疾病症状的减少。在实施方案中,抑制指特定蛋白质靶的活性中的减少。因此,抑制包括至少部分、部分地或完全阻断蛋白质的刺激,降低、预防或延迟蛋白质的活化,或者使蛋白质失活,脱敏或下调蛋白质的信号转导或酶促活性或量。在实施方案中,抑制指起因于直接相互作用(例如,抑制剂与靶蛋白结合)的靶蛋白活性的减少。在实施方案中,抑制指来自间接相互作用(例如,抑制剂与活化靶蛋白的蛋白质结合,从而预防靶蛋白活化)的靶蛋白活性的减少。“ROR1抑制剂”是这样的化合物,相对于在不存在抑制剂的情况下的ROR1活性或功能,所述化合物负面影响(例如降低)ROR1的活性或功能。术语“ROR-1抑制剂”和“ROR-1拮抗剂”自始至终可互换使用,并且具有与本文定义相同的含义。

[0135] 术语“抑制剂”、“阻遏物”或“拮抗剂”或“下调物”可互换地指这样的物质,其能够可检测地降低给定基因或蛋白质的表达或活性。与在不存在拮抗剂的情况下的对照相比,拮抗剂可以使表达或活性降低10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更多。在某些情况下,与在不存在拮抗剂的情况下的表达或活性相比,表达或活性低1.5、2、3、4、5、10倍或更低。

[0136] 术语“疾病”或“状况”指能够用本文提供的化合物或方法治疗的患者或受试者的存在状态或健康状况。该疾病可能是癌症。该疾病可能是自身免疫性疾病。该疾病可能是炎性疾病。该疾病可能是传染病。在一些进一步情况下,“癌症”指人癌症和癌、肉瘤、腺癌、淋巴瘤、白血病等,包括实体癌和淋巴样癌、肾癌、乳腺癌、肺癌、膀胱癌、结肠癌、卵巢癌、前列腺癌、胰腺癌、胃癌、脑癌、头颈癌、皮肤癌、子宫癌、睾丸癌、神经胶质瘤、食道癌和肝癌(liver cancer)包括肝癌(hepatocarcinoma)、淋巴瘤包括B急性淋巴母细胞淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤(例如,伯基特氏、小细胞和大细胞淋巴瘤)、霍奇金淋巴瘤、白血病(包括AML、ALL和CML)或多发性骨髓瘤。

[0137] 如本文使用的,术语“炎性疾病”指特征在于异常炎症(例如,与对照如未患有疾病的健康人相比,增加水平的炎症)的疾病或状况。炎性疾病的实例包括自身免疫性疾病、关节炎、类风湿性关节炎、银屑病关节炎、幼年特发性关节炎、多发性硬化、系统性红斑狼疮(SLE)、重症肌无力、幼年发作性糖尿病、1型糖尿病、格-巴二氏综合征、桥本氏脑炎、桥本氏甲状腺炎、强直性脊柱炎、银屑病、干燥综合征、血管炎、肾小球肾炎、自身免疫性甲状腺炎、白塞氏病、克罗恩氏病、溃疡性结肠炎、大疱性类天疱疮、结节病、鱼鳞病、格拉夫斯眼病(Graves ophthalmopathy)、炎性肠病、爱迪生氏病、白癜风、哮喘、过敏性哮喘、寻常痤疮、乳糜泻、慢性前列腺炎、炎性肠病、盆腔炎性疾病、再灌注损伤、缺血再灌注损伤、中风、结节病、移植排斥、间质性膀胱炎、动脉粥样硬化、硬皮病和特应性皮炎。

[0138] 如本文使用的,术语“癌症”指在哺乳动物(例如人)中发现的所有类型的癌症、赘生物或恶性肿瘤,包括白血病、淋巴瘤、癌和肉瘤。可以用本文提供的化合物或方法治疗的示例性癌症包括脑癌、神经胶质瘤、胶质母细胞瘤、神经母细胞瘤、前列腺癌、结肠直肠癌、胰腺癌、髓母细胞瘤、黑素瘤、宫颈癌、胃癌、卵巢癌、肺癌、头癌、霍奇金病和非霍奇金淋巴瘤。可以用本文提供的化合物或方法治疗的示例性癌症包括甲状腺癌、内分泌系统癌、脑癌、乳腺癌、宫颈癌、结肠癌、头颈癌、肝癌、肾癌、肺癌、卵巢癌、胰腺癌、直肠癌、胃癌和子宫癌。另外的实例包括甲状腺癌、胆管癌、胰腺腺癌、皮肤的皮肤黑素瘤、结肠腺癌、直肠腺癌、胃腺癌、食道癌、头颈部鳞状细胞癌、乳腺浸润性癌、肺腺癌、肺鳞状细胞癌、非小细胞肺癌、

间皮瘤、多发性骨髓瘤、神经母细胞瘤、神经胶质瘤、多形胶质母细胞瘤、卵巢癌、横纹肌肉瘤、原发性血小板增多症、原发性巨球蛋白血症、原发性脑瘤、恶性胰腺胰岛素瘤、恶性类癌、膀胱癌、恶变前的皮肤病变、睾丸癌、甲状腺癌、神经母细胞瘤、食道癌、泌尿生殖道癌、恶性高钙血症、子宫内膜癌、肾上腺皮质癌、内分泌或外分泌性胰腺赘生物、甲状腺髓样癌、甲状腺髓样癌、黑素瘤、结肠直肠癌、乳头状甲状腺癌、肝细胞癌或前列腺癌。

[0139] 如本文使用的,术语“转移”、“转移性”和“转移性癌症”可以互换使用,并且指来自一个器官或另一不相邻器官或身体部分的增殖性疾病或病症,例如癌症的扩散。“转移性癌症”也称为“IV期癌症”。癌症在起源部位例如乳腺处发生,所述部位被称为原发性肿瘤,例如原发性乳腺癌。原发性肿瘤或起源部位中的一些癌细胞获得穿透且浸润局部区域中的周围正常组织的能力,和/或穿透循环通过该系统的淋巴系统或血管系统的壁至身体中的其它部位和组织的能力。由原发性肿瘤的癌细胞形成的第二临床上可检测的肿瘤称为转移性或继发性肿瘤。当癌细胞转移时,推测转移性肿瘤及其细胞与原始肿瘤的那些相似。因此,如果肺癌转移至乳腺,则在乳腺部位处的继发性肿瘤由异常的肺细胞而不是异常的乳腺细胞组成。乳腺中的继发性肿瘤被称为转移性肺癌。因此,短语转移性癌症指其中受试者患有或曾经患有原发性肿瘤,并且患有或多种继发性肿瘤的疾病。短语非转移性癌症或患有非转移性癌症的受试者指其中受试者患有原发性肿瘤,但没有一种或多种继发性肿瘤的疾病。例如,转移性肺癌指患有原发性肺肿瘤或具有原发性肺肿瘤史,以及患有在第二位置或多重位置(例如在乳腺中)的一种或多种继发性肿瘤的受试者中的疾病。

[0140] 如本文使用的,“化学治疗剂”指用于通过破坏或抑制癌细胞或组织来治疗癌症的分子(例如化合物、肽、蛋白质、核酸、0103)。化学治疗剂可以对于某些癌症或某些组织是选择性的。在实施方案中,本文的化学治疗剂可以包括表观遗传抑制剂和多激酶抑制剂。

[0141] “化学治疗剂”或“化学治疗剂”根据其平常的普通含义使用,并且指具有抗肿瘤特性、或者抑制细胞生长或增殖的能力的化学组合物(例如,化合物、药物、拮抗剂、抑制剂、调节剂)或化合物。在一些实施方案中,化学治疗剂是本文鉴定的在治疗癌症的方法中具有有效用的试剂。在一些实施方案中,化学治疗剂是由FDA或除美国外的国家的类似管理机构批准用于治疗癌症的试剂。化学治疗剂的实例包括但不限于MEK(例如MEK1、MEK2、或MEK1和MEK2)抑制剂(例如XL518、CI-1040、PD035901、司美替尼/AZD6244、GSK1120212/曲美替尼、GDC-0973、ARRY-162、ARRY-300、AZD8330、PD0325901、U0126、PD98059、TAK-733、PD318088、AS703026、BAY 869766)、烷化剂(例如环磷酰胺、异环磷酰胺、苯丁酸氮芥、白消安、美法仑、二氯甲基二乙胺、乌拉莫司汀、噻替哌、亚硝基脲、氮芥(例如甲氯乙胺、环磷酰胺、苯丁酸氮芥、美法仑)、乙烯亚胺和甲基三聚氰胺(例如六甲基三聚氰胺、噻替哌)、烷基磺酸盐(例如白消安)、亚硝基脲(例如卡莫司汀、洛莫司汀、司莫司汀、链脲佐菌素)、三氮烯(氮烯咪胺)、抗代谢物(例如5-硫唑嘌呤、甲酰四氢叶酸、卡培他滨、氟达拉滨、吉西他滨、培美曲塞、雷替曲塞、叶酸类似物(例如氨甲蝶呤)、或嘧啶类似物(例如氟尿嘧啶、氟尿苷、阿糖胞苷)、嘌呤类似物(例如巯嘌呤、硫鸟嘌呤、喷司他丁)等)、植物生物碱(例如长春新碱、长春碱、长春瑞滨、长春地辛、鬼臼毒素、紫杉醇、多西他赛等)、拓扑异构酶抑制剂(例如伊立替康、拓扑替康、安吡啶、依托泊苷(VP16)、磷酸依托泊苷、替尼泊苷等)、抗肿瘤抗生素(例如多柔比星、阿霉素、柔红霉素、表柔比星、放线菌素、博来霉素、丝裂霉素、米托蒽醌、普卡霉素等)、基于铂的化合物(例如顺铂、草酰铂、卡铂)、蒽二酮(例如米托蒽醌)、取代脲(例如羟基

脲)、甲基胍衍生物(例如丙卡巴嗪)、肾上腺皮质压制剂(例如米托坦、氨鲁米特)、表鬼臼毒素(例如依托泊苷)、抗生素(例如柔红霉素、多柔比星、博来霉素)、酶(例如 L-天冬酰胺酶)、丝裂原活化蛋白激酶信号传导的抑制剂(例如U0126、PD98059、PD184352、PD0325901、ARRY-142886、SB239063、SP600125、BAY 43-9006、渥曼青霉素或LY294002、Syk抑制剂、mTOR抑制剂、抗体(例如rituxan)、棉酚、genasense、多酚E、绿褐素(Chlorofusin)、全反式维甲酸(ATRA)、苔藓抑素、肿瘤坏死因子相关的凋亡诱导配体(TRAIL)、5-氮杂2'-脱氧胞苷、全反式维甲酸、多柔比星、长春新碱、依托泊苷、吉西他滨、伊马替尼(Gleevec.RTM.)、格尔德霉素、17-N-烯丙基氨基-17-去甲氧基格尔德霉素(17-AAG)、黄酮哌啶醇、LY294002、硼替佐米、曲妥珠单抗、BAY 11-7082、PKC412、PD184352、20-epi-1,25二羟基维生素D3;5-乙炔尿嘧啶;阿比特龙;阿柔比星;酰基富烯;腺环戊醇;阿多来新;阿地白介素;ALL-TK 拮抗剂;六甲蜜胺;氨莫司汀;2,4-二氯苯氧乙酸;氨磷汀;氨基酮戊酸;氨柔比星;氨茶碱;阿那格雷;阿那曲唑;穿心莲内酯;血管生成抑制剂;拮抗剂D;拮抗剂G;安雷利克斯(antarelix);抗背部化形态发生蛋白1;抗雄激素、前列腺癌;抗雌激素;抗癌酮;反义寡核苷酸;甘氨酸阿非迪霉素;凋亡基因调节剂;凋亡调节物;无嘌呤核酸;ara-CDP-DL-PTBA;精氨酸脱氨酶;asulacrine;阿他美坦;阿莫司汀;阿奇他汀1;阿奇他汀2;阿奇他汀3;阿扎司琼;阿扎霉素;重氮酪氨酸;浆果赤霉素III衍生物;balanol;巴马司他;BCR/ABL拮抗剂;苯甲毒素;苯甲酰基星形孢菌素; β -alethine; betaclamycin B;桦木酸;bFGF抑制剂;比卡鲁胺;比生群;双氮丙啶基精胺;双奈法德;bistratene A;比折来新;breflate;溴匹立明;布度钛;丁硫氨酸-亚砷亚胺;卡泊三醇;钙磷酸结合蛋白C(calphostin C);喜树碱衍生物;金丝雀痘IL-2;卡培他滨;甲酰胺-氨基-三唑;羧基氨基三唑;CaRest M3;CARN 700;软骨衍生抑制剂;卡折来新;酪蛋白激酶抑制剂(ICOS);栗精胺;杀菌肽B;西曲瑞克;二氢卟吩;氯喹啉磺胺;西卡前列素;顺式卟啉;克拉屈滨;氯米芬类似物;克霉唑;collismycin A; collismycin B;考布他汀A4;考布他汀类似物;conagenin;crambescidin 816;克立那托;念珠藻环肽(cryptophycin)8;念珠藻环肽A衍生物;curacin A;环戊葱醌;cycloplatam; cypemycin;阿糖胞苷ocfosfate;溶细胞因子;磷酸己烷雌酚;达昔单抗;地西他滨;脱氢膜海鞘素(dehydrodidemnin)B;地洛瑞林;地塞米松;右异环磷酰胺;右雷佐生;右维拉帕米;地吡醌;膜海鞘素B;didox;二乙基去甲精胺;二氢-5-氮胞苷;9-dioxamycin;联苯螺莫司汀;二十二醇;多拉司琼;去氧氟尿苷;屈洛昔芬;屈大麻酚;多卡米星 SA;依布硒;依考莫司汀;依地福新;依决洛单抗;依氟鸟氨酸;榄香烯;乙噻替氟;表柔比星;爱普列特;雌氮芥类似物;雌激素激动剂;雌激素拮抗剂;依他硝唑;磷酸依托泊苷;依西美坦;法倔唑;法扎拉滨;芬维A胺;非格司亭;非那雄胺;黄酮吡醇;氟卓斯汀;fluasterone;氟达拉滨;盐酸氟代柔红霉素;福酚美克;福美坦;福司曲星;福莫司汀;钆替沙林(gadolinium texaphynin);硝酸镓;加洛他滨;加尼瑞克;明胶酶抑制剂;吉西他滨;谷胱甘肽抑制剂;hepsulfam;heregulin;六亚甲基二乙酰胺;金丝桃素;伊班膦酸;依达比星;艾多昔芬;伊决孟酮;伊莫福新;伊洛马司他;咪唑吡啶酮;咪喹莫特;免疫刺激肽;胰岛素样生长因子-1受体抑制剂;干扰素激动剂;干扰素;白介素;碘苄胍;碘阿霉素;甘薯醇,4-;伊罗普拉;伊索拉定;伊苯加唑(isobengazole);异高软海绵素(isohomohalicondrin)B;伊他司琼;jasplakinolide;kahalalide F;片螺素-N三乙酸盐;兰瑞肽;雷拉霉素;来格司亭;硫酸香菇多糖;leptolstatin;来曲唑;白血病抑制因子;白细胞 α 干扰素;亮丙瑞林+雌激素+孕酮;亮丙瑞

林;左旋咪唑;利阿唑;线性多胺类似物;亲脂性二糖肽;亲脂性铂化合物;lissoclinamide 7;洛铂;蚯蚓磷脂;洛美曲索;氟尼达明;洛索葱醌;洛伐他汀;洛索立宾;勒托替康;镨 texaphyrin;利索茶碱(lysofylline);裂解肽;美坦辛;mannostatin A;马立马司他;马索罗酚;maspin;基质溶解因子抑制剂;基质金属蛋白酶抑制剂;美诺立尔;merbarone;美替瑞林;甲硫氨酸酶;甲氧氯普胺;MIF抑制剂;米非司酮;米替福新;米立司亭;错配的双链RNA;米托胍脲;二溴卫矛醇;丝裂霉素类似物;米托蒽胺;mitotoxin成纤维细胞生长因子-皂草素;米托葱醌;莫法罗汀;莫拉司亭;单克隆抗体,人绒毛膜促性腺激素;单磷酸脂质A+分枝杆菌细胞壁sk;莫哌达醇;多药抗性基因抑制剂;基于多肿瘤抑制基因1的疗法;芥子抗癌剂;mycaperoxide B;分枝杆菌细胞壁提取物;myriaporone;N-乙酰地那林;N-取代苯酰胺;那法瑞林;那瑞替喷(nagrestip);纳洛酮+戊唑星;napavin;naphterpin;那托司亭;奈达铂;奈莫柔比星;奈立膦酸;中性肽链内切酶;尼鲁米特;nisamycin;一氧化氮调节剂;硝基氧抗氧化剂;nitrullyn;06-苄基鸟嘌呤;奥曲肽;okicenone;寡核苷酸;奥那司酮;昂丹司琼;昂丹司琼;oracin;口服细胞因子诱导剂;奥马铂;奥沙特隆;奥沙利铂;oxaunomycin;palauamine;桐酰根霉素;帕米膦酸;人参炔三醇;帕诺米芬;副细菌素;帕折普汀;培门冬酶;培得星;木聚硫钠;喷司他丁;pentrozole;全氟溴烷;培磷酰胺;紫苏醇;phenazinomycin;乙酸苯酯;磷酸酶抑制剂;溶链菌素(picibanil);盐酸匹鲁卡品;吡柔比星;吡曲克辛;placetin A;placetin B;纤溶酶原激活物抑制剂;铂络合物;铂化合物;铂-三胺络合物;吡吩姆钠;泊非霉素;泼尼松;丙基二-吡啶酮;前列腺素J2;蛋白酶体抑制剂;基于蛋白A的免疫调节剂;蛋白激酶C抑制剂;蛋白激酶C抑制剂,微藻;蛋白酪氨酸磷酸酶抑制剂;嘌呤核苷磷酸化酶抑制剂;红紫素;吡唑啉吡啶;吡醇羟乙酯化血红蛋白聚氧乙烯缀合物;raf拮抗剂;雷替曲塞;雷莫司琼;ras法呢基蛋白质转移酶抑制剂;ras抑制剂;ras-GAP抑制剂;去甲基化瑞替普汀;依替膦酸铈Re 186;根霉素;核酶;RII维甲酰胺;罗谷亚胺;罗希吐碱;罗莫肽;罗喹美克;rubiginone B 1;ruboxyl;沙芬戈;沙托品(saintopin);SarCNU;肌肉叶绿醇A;沙格司亭;Sdi 1模拟物;司莫司汀;衰老衍生抑制剂1;有义寡核苷酸;信号转导抑制剂;信号转导调节剂;单链抗原结合蛋白;西佐喃;索布佐生;硼卡钠;苯乙酸钠;索尔醇(solverol);生长调节素结合蛋白;索纳明;膦门冬酸;spicamycin D;螺莫司汀;脾脏五肽(splenopentin);海绵抑素(spongistatin)1;角鲨胺;干细胞抑制剂;干细胞分裂抑制剂;stipiamide;基质溶素抑制剂;sulfinosine;强效血管活性肠肽拮抗剂;suradista;舒拉明;苦马豆素;合成葡糖氨基聚糖;他莫司汀;它莫西芬甲硫碘化物;牛磺莫司汀;他扎罗汀;替可加兰钠;替加氟;tellurapyrylium;端粒酶抑制剂;替莫泊芬;替莫唑胺;替尼泊昔;四氯十氧化物;四唑胺(tetrazomine);thaliblastine;噻可拉林;促血小板生成素;促血小板生成素模拟物;胸腺法新;胸腺生成素受体激动剂;胸腺曲南;促甲状腺激素;乙基锡初紫红素;替拉扎明;二氯二茂钛;topsentin;托瑞米芬;全能干细胞因子;翻译抑制剂;维甲酸;三乙酰尿昔;曲西立宾;三甲曲沙;曲普瑞林;托烷司琼;妥罗雄脲;酪氨酸激酶抑制剂;tyrphostins;UBC抑制剂;乌苯美司;泌尿生殖窦衍生生长抑制因子;尿激酶受体拮抗剂;伐普肽;variolin B;载体系统,红细胞基因疗法;维拉雷琐;藜芦胺;verdins;维替泊芬;长春瑞滨;vinxaltine;vitaxin;伏氯唑;扎诺特隆;折尼铂;亚苄维C;净司他丁斯酯、阿霉素、更生霉素、博来霉素、长春碱、顺铂、阿西维辛;阿柔比星;盐酸阿考达唑;阿克罗宁;阿多来新;阿地白介素;六甲蜜胺;安波霉素;乙酸阿美葱醌;氨鲁米特;氨茶碱;阿那曲

唑;安曲霉素;天冬酰胺酶;曲林菌素;阿扎胞苷;阿扎替派;阿佐霉素;巴马司他;苯佐替派;比卡鲁胺;盐酸比生群;甲磺酸双奈法德;比折来新;硫酸博来霉素;布喹那钠;溴匹立明;白消安;放线菌素C;卡芦唑酮;卡醋酸;卡贝替姆;卡铂;卡莫司汀;盐酸卡柔比星;卡折来新;西地芬戈;苯丁酸氮芥;西罗霉素;克拉屈滨;甲磺酸克立那托;环磷酰胺;阿糖胞苷;达卡巴嗪;盐酸柔红霉素;地西他滨;右奥马铂;地扎瓜宁;甲磺酸地扎瓜宁;地吡醌;多柔比星;盐酸多柔比星;屈洛昔芬;柠檬酸屈洛昔芬;丙酸屈他雄酮;达佐霉素;依达曲沙;盐酸依氟鸟氨酸;依沙芦星;恩洛铂;恩普氨酯;依匹哌啉;盐酸表柔比星;厄布洛唑;盐酸依索比星;雌莫司汀;雌莫司汀磷酸钠;依替硝唑;依托泊苷;磷酸依托泊苷;氯苯乙嘧啶;盐酸法倔唑;法扎拉滨;芬维A胺;氟尿苷;磷酸氟达拉滨;氟尿嘧啶;氟西他滨;磷嗪酮;福司曲星钠;吉西他滨;盐酸吉西他滨;羟基脲;盐酸依达比星;异环磷酰胺;iimofosine;白介素II(包括重组白介素II或 r1L.sub.2)、干扰素 α -2a;干扰素 α -2b;干扰素 α -n1;干扰素 α -n3;干扰素 β -1a;干扰素 γ -1b;异丙基铂;盐酸伊立替康;乙酸兰瑞肽;来曲唑;乙酸亮丙瑞林;盐酸利拉唑;洛美曲索钠;洛莫司汀;盐酸洛索萘醌;马索罗酚;美登素;盐酸二氯甲基二乙胺;乙酸甲地孕酮;乙酸美伦孕酮;美法仑;美诺立尔;巯嘌呤;氨甲蝶呤;氨甲蝶呤钠;氯苯氨啉;美妥替派;米丁度胺;米托卡星;丝裂红素;米托洁林;米托马星;丝裂霉素;米托司培;米托坦;盐酸米托蒽醌;麦考酚酸;诺考达唑;诺拉霉素;奥马铂;奥昔舒仑;培门冬酶;培利霉素;奈莫司汀;硫酸培洛霉素;培磷酰胺;哌泊溴烷;哌泊舒凡;盐酸吡罗萘醌;普卡霉素;普洛美坦;吡吩姆钠;泊非霉素;泼尼氮芥;盐酸丙卡巴肼;嘌呤霉素;盐酸嘌呤霉素;吡唑霉素;利波腺苷;罗谷亚胺;沙芬戈;盐酸沙芬戈;司莫司汀;辛曲秦;磷乙酰天冬氨酸钠;司帕霉素;盐酸螺旋锳;螺莫司汀;螺铂;链黑霉素;链脲佐菌素;磺氯苯脲;他利霉素;替可加兰钠;替加氟;盐酸替洛萘醌;替莫泊芬;替尼泊苷;替罗昔隆;鞣内酯;硫咪嘌呤;硫鸟嘌呤;噻替派;噻唑呋林(tiazofurin);替拉扎明;柠檬酸托瑞米芬;乙酸曲托龙;磷酸曲西立滨;三甲曲沙;葡萄糖醛酸三甲曲沙;曲普瑞林;盐酸妥布氯唑;尿嘧啶氮芥;乌瑞替派;伐普肽;维替泊芬;硫酸长春碱;硫酸长春新碱;长春地辛;硫酸长春地辛;硫酸长春匹定;硫酸长春甘酯;硫酸环氧长春碱;酒石酸长春瑞滨;硫酸异长春碱;硫酸长春利定;伏氯唑;折尼铂;净司他丁;盐酸佐柔比星,在G2-M期阻滞细胞和/或调节微管形成或稳定性的试剂(例如Taxol.TM(即紫杉醇)、Taxotere.TM、包含紫杉烷骨架的化合物、厄布洛唑(即R-55104)、多拉司他汀10(即DLS-10和NSC-376128)、羟乙基磺酸米伏布林(即,作为CI-980)、长春新碱、NSC-639829、Discodermolide(即,作为 NVP-XX-A-296)、ABT-751(Abbott,即E-7010)、Altorhyrtin(例如Altorhyrtin A和 Altorhyrtin C)、海绵抑素(例如海绵抑素1、海绵抑素2、海绵抑素3、海绵抑素4、海绵抑素5、海绵抑素6、海绵抑素7、海绵抑素8和海绵抑素9)、盐酸西马多丁(即LU-103793和NSC-D-669356)、埃博霉素(例如埃博霉素A、埃博霉素B、埃博霉素 C(即脱氧埃博霉素A或dEpoA)、埃博霉素D(即KOS-862、dEpoB和脱氧埃博霉素 B)、埃博霉素E、埃博霉素F、埃博霉素B N-氧化物、埃博霉素A N-氧化物、16-氮杂-埃博霉素B、21-氨基埃博霉素B(即BMS-310705)、21-羟基埃博霉素D(即脱氧埃博霉素F和dEpoF)、26-氟埃博霉素、澳瑞他汀PE(即NSC-654663)、索布利多丁(即TZT-1027)、LS-4559-P(Pharmacia,即LS-4577)、LS-4578(Pharmacia,即 LS-477-P)、LS-4477(Pharmacia)、LS-4559(Pharmacia)、RPR-112378(Aventis)、硫酸长春新碱、DZ-3358(Daiichi)、FR-182877(Fujisawa,即WS-9885B)、GS-164(Takeda)、GS-198(Takeda)、KAR-2(Hungarian Academy of Sciences)、BSF-223651

(BASF, 即ILX-651和LU-223651)、SAH-49960 (Lilly/Novartis)、SDZ-268970 (Lilly/Novartis)、AM-97 (Armad/Kyowa Hakko)、AM-132 (Armad)、AM-138 (Armad/Kyowa Hakko)、IDN-5005 (Indena)、念珠藻素52 (即LY-355703)、AC-7739 (Ajinomoto, 即AVE-8063A和CS-39.HCl)、AC-7700 (Ajinomoto, 即AVE-8062、AVE-8062A、CS-39-L-Ser.HCl和RPR-258062A)、维替维胺、Tubulysin A、Canadensol、矢车菊黄素 (即NSC-106969)、T-138067 (Tularik, 即T-67、TL-138067和TI-138067)、COBRA-1 (Parker Hughes Institute, 即DDE-261和WHI-261)、H10 (Kansas State University)、H16 (Kansas State University)、Oncocidin A1 (即BTO-956和DIME)、DDE-313 (Parker Hughes Institute)、Fijianolide B、Laulimalide、SPA-2 (Parker Hughes Institute)、SPA-1 (Parker Hughes Institute, 即SPIKET-P)、3-IAABU (Cytoskeleton/Mt. Sinai School of Medicine, 即MF-569)、那可丁 (也称为NSC-5366)、Nascapine、D-24851 (Asta Medica)、A-105972 (Abbott)、Hemiasterlin、3-BAABU (Cytoskeleton/Mt. Sinai School of Medicine, 即MF-191)、TMPN (Arizona State University)、乙酰丙酮二茂钒、T-138026 (Tularik)、Monsatrol、Inanocine (即NSC-698666)、3-IAABE (Cytoskeleton/Mt. Sinai School of Medicine)、A-204197 (Abbott)、T-607 (Tularik, 即T-900607)、RPR-115781 (Aventis)、艾榴塞洛素 (Eleutherobin) (例如去甲基艾榴塞洛素、去乙酰基艾榴塞洛素、异艾榴塞洛素A和Z-艾榴塞洛素)、Caribaeoside、卡利贝林、软海绵素B、D-64131 (Asta Medica)、D-68144 (Asta Medica)、Diazonamide A、A-293620 (Abbott)、NPI-2350 (Nereus)、根薯酮内酯A、TUB-245 (Aventis)、A-259754 (Abbott)、Diozostatin、(-)-苯基阿夕斯丁 (即, NSCL-96F037)、D-68838 (Asta Medica)、D-68836 (Asta Medica)、肌基质蛋白B、D-43411 (Zentaris, 即D-81862)、A-289099 (Abbott)、A-318315 (Abbott)、HTI-286 (即SPA-110、三氟乙酸盐)、(Wyeth)、D-82317 (Zentaris)、D-82318 (Zentaris)、SC-12983 (NCI)、瑞舒伐他汀磷酸钠、BPR-0Y-007 (National Health Research Institutes) 和SSR-250411 (Sanofi)、甾类 (例如地塞米松)、非那雄胺、芳香酶抑制剂、促性腺激素释放激素激动剂 (GnRH) 如戈舍瑞林或亮丙瑞林、肾上腺皮质类固醇 (例如泼尼松)、孕激素 (例如己酸羟孕酮、乙酸甲地孕酮、乙酸甲羟孕酮)、雌激素 (例如己烯雌酚、炔雌醇)、抗雌激素 (例如它莫昔芬)、雄激素 (例如丙酸睾酮、氟甲睾酮)、抗雄激素 (例如氟他胺)、免疫刺激剂 (例如卡介苗 (BCG)、左旋咪唑、白介素2、 α -干扰素等)、单克隆抗体 (例如抗CD20、抗HER2、抗CD52、抗 HLA-DR和抗VEGF单克隆抗体)、免疫毒素 (例如抗-CD33单克隆抗体-卡利奇霉素缀合物、抗-CD22单克隆抗体-假单胞菌外毒素缀合物等)、放射免疫疗法 (例如, 与 ^{111}In 、 ^{90}Y 或 ^{131}I 等缀合的抗CD20单克隆抗体)、雷公藤内酯醇、高三尖杉酯碱、更生霉素、多柔比星、表柔比星、托泊替康、伊曲康唑、长春地辛、西立伐他汀、长春新碱、脱氧腺苷、舍曲林、匹伐他汀、伊立替康、氯法齐明、5-壬基氨基色胺、维莫非尼、达拉非尼、厄洛替尼、吉非替尼、EGFR抑制剂、表皮生长因子受体 (EGFR) 靶向疗法或治疗剂 (例如吉非替尼 (IressaTM)、厄洛替尼 (TarcevaTM)、西妥昔单抗 (ErbixTM)、拉帕替尼 (TykerbTM)、帕尼单抗 (VectibixTM)、凡德他尼 (CaprelsaTM)、阿法替尼 /BIBW2992、CI-1033/卡奈替尼、奈拉替尼/HKI-272、CP-724714、TAK-285、AST-1306、ARRY334543、ARRY-380、AG-1478、达克替尼/PF299804、OSI-420/去甲基厄洛替尼、AZD8931、AEE788、培利替尼/EKB-569、CUDC-101、WZ8040、WZ4002、WZ3146、AG-490、XL647、PD153035、BMS-599626)、索拉非尼、伊马替尼、舒尼替尼、达沙替尼等等。

[0142] “ROR1拮抗剂”指这样的化合物(例如本文所述的化合物),当与对照(例如该化合物的不存在或已知无活性的化合物)相比,所述化合物降低ROR1的活性。

[0143] 术语“西妥珠单抗”、“UC-961”和“99961.1”在本文中可互换使用,并且指能够结合人受体酪氨酸激酶样孤儿受体1(ROR-1)的细胞外结构域的人源化的单克隆抗体。在实施方案中,西妥珠单抗是美国专利申请号14/422,519中公开的任何一种抗体或其片段,所述美国专利申请整体且为了所有目的引入本文作为参考。

[0144] 术语“紫杉醇”也称为泰素等等,在通常和习惯意义上,指由CAS登记号33069-62-4标识的化合物。

[0145] 术语“多西他赛”也称为“DTX”、“DXL”、“泰素帝”和“Docetaxel”等等,在通常和习惯意义上,指由CAS登记号114977-28-5标识的化合物。

[0146] 术语“表柔比星”也称为“Erlence”等等,在通常和习惯意义上,指由CAS登记号56420-45-2标识的化合物。

[0147] 术语“多柔比星”也称为“阿霉素”等等,在通常和习惯意义上,指由CAS登记号23214-92-8标识的化合物。

[0148] 术语“治疗(treating)”或“治疗(treatment)”指在损伤、疾病、病理状况或状况的治疗或改善方面的任何成功标记,包括任何客观或主观参数,例如减轻;缓解;症状的缩小或使得损伤、病理状况或状况对患者更可耐受;变性或衰退的速率中的减慢;使得变性的最终点较不虚弱;或改善患者的身体或精神健康。症状的治疗或改善可以基于客观或主观参数;包括身体检查、神经精神检查和/或精神病学评估的结果。术语“治疗”及其动词的变化可以包括损伤、疾病、病理状况或状况的预防。在实施方案中,“治疗”是预防。在实施方案中,治疗不包括预防。

[0149] 如本文使用的(以及如本领域充分理解的),“治疗(treating)”或“治疗(treatment)”还广泛地包括用于在受试者的状况中获得有益结果或期望结果,包括临床结果的任何方法。有益或期望的临床结果可以包括但不限于一种或多种症状或状况的减轻或改善,疾病程度的缩小,稳定(即,不恶化)疾病状态,疾病传播或扩散的预防,疾病进展的延迟或减慢,疾病状态的改善或缓和,疾病复发的减少以及缓解,无论是部分的还是全部的,并且无论是可检测的还是不可检测的。换言之,如本文使用的,“治疗”包括疾病的任何治愈、改善或预防。治疗可以预防疾病发生;抑制疾病的扩散;缓解疾病的症状(例如眼痛、看到光晕、红眼、非常高的眼内压),完全或部分消除疾病的根本原因,缩短疾病的持续时间或实现这些的组合。

[0150] 如本文使用的,“治疗”和“治疗”包括预防性治疗。治疗方法包括向受试者施用治疗有效量的活性剂。施用步骤可以由单次施用组成,或者可以包括一系列施用。治疗期的长度取决于各种因素,例如状况的严重性、患者的年龄、活性剂的浓度、治疗中使用的组合物的活性或其组合。还应了解,用于治疗或预防的试剂的有效剂量可以在特定治疗或预防方案的过程中增加或降低。剂量中的变化可以通过本领域已知的标准诊断测定导致并且变得明显。在一些情况下,可能需要长期施用。例如,将组合物以足以治疗患者的量和持续时间施用于受试者。在实施方案中,治疗(treating)或治疗(treatment)不是预防性治疗。

[0151] 术语“预防”指患者中的疾病症状发生中的降低。如上文指示的,预防可以是完全的(没有可检测到的症状)或部分的,使得观察到比不存在治疗可能发生的更少的症状。

[0152] “患者”或“有此需要的受试者”指患有或易患疾病或状况的活生物,所述疾病或状况可以通过施用如本文提供的药物组合物来治疗。非限制性实例包括人、其它哺乳动物、牛、大鼠、小鼠、犬、猴、山羊、绵羊、牛、鹿及其它非哺乳动物。在一些实施方案中,患者是人。

[0153] “有效量”是相对于化合物的不存在,足以使化合物实现所述目的的量(例如,实现对于其施用的效应、治疗疾病、减少酶活性、增加酶活性、减少信号传导途径、或者减少疾病或状况的一种或多种症状)。“治疗有效量”的实例是足以促成疾病的一种或多种症状的治疗、预防或减少的量,其也可以称为“治疗有效量”。一种或多种症状的“减少”(以及该短语的语法等价物)意指症状的严重程度或频率的降低、或症状的消除。药物的“预防有效量”是这样的药物量,当施用于受试者时,所述量具有预期的预防效应,例如,预防或延迟损伤、疾病、病理状况或状况的发作(或复发),或者减少损伤、疾病、病理状况或状况、或其症状发作(或复发)的可能性。完全预防效应不一定通过施用一个剂量而发生,而是可能仅在施用一系列剂量后才发生。因此,预防有效量可以以一次或多次施用进行施用。如本文使用的,“活性降低量”指相对于拮抗剂的不存在,降低酶活性所需的拮抗剂的量。如本文使用的,“功能破坏量”指相对于拮抗剂的不存在,破坏酶或蛋白质的功能所需的拮抗剂的量。确切的量将取决于治疗的目的,并且可由本领域技术人员使用已知技术确定(参见例如,Lieberman, *Pharmaceutical Dosage Forms* (第 1-3卷,1992);Lloyd, *The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding* (1999);Pickar, *Dosage Calculations* (1999);以及Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 第20版,2003, Gennaro 编辑, Lippincott, Williams&Wilkins)。

[0154] 对于本文所述的任何化合物,治疗有效量可以最初由细胞培养测定进行确定。靶浓度是能够实现本文所述方法的活性化合物的浓度,如使用本文所述的或本领域已知的方法测量的。

[0155] 如本领域众所周知的,还可以由动物模型确定用于人的治疗有效量。例如,用于人的剂量可以配制为达到在动物中已发现有效的浓度。如上文所述,可以通过监测化合物有效性,并且向上或向下调整剂量来调整人中的剂量。基于上述方法和其它方法来调整剂量以达到在人中的最大功效,完全在普通技术人员的能力范围内。

[0156] 如本文使用的,术语“治疗有效量”指足以改善病症的治疗剂的量,如上文所述。例如,对于给定的参数,治疗有效量将显示至少5%、10%、15%、20%、25%、40%、50%、60%、75%、80%、90%或至少100%的增加或降低。治疗功效也可以表示为增加或降低“倍数”。例如,治疗有效量可以具有超过对照至少1.2倍、1.5倍、2倍、5倍或更多的效应。

[0157] 剂量可以根据患者的需求和待采用的化合物而变。在本公开内容的上下文中,施用于患者的剂量应该足以在一段时间内,在患者中实现有益的治疗应答。剂量的大小也由任何不良副作用的存在、性质和程度决定。用于特定情况的适当剂量的确定在从业者的技术内。一般地,以小于化合物的最佳剂量的较小剂量起始治疗。其后,通过小增量来增加剂量,直到达到在特定情况下的最佳效应。可以个别地调整剂量和间隔,以提供对于待治疗的特定临床适应症有效的所施用化合物的水平。这将提供与个体的疾病状态的严重性相称的治疗方案。

[0158] 如本文使用的,术语“施用”意指经口施用,作为栓剂施用,局部接触,静脉内、肠胃外、腹膜内、肌内、病灶内、鞘内、鼻内或皮下施用,或缓慢释放装置例如微型渗透泵对受试

者的植入。施用通过任何途径,包括肠胃外和经粘膜(例如经颊、舌下、腭、牙龈、鼻、阴道、直肠或经皮)。肠胃外施用包括例如静脉内、肌内、小动脉内、皮内、皮下、腹膜内、心室内和颅内。其它递送模式包括但不限于脂质体制剂、静脉输注、经皮贴剂等的使用。在实施方案中,施用不包括除所述活性剂外的任何活性剂的施用。

[0159] “共施用”意指本文所述的组合物在一种或多种另外疗法施用的同时、正好之前或正好之后施用。本文提供的化合物可以单独施用或可以共施用于患者。共施用意欲包括同时或序贯施用个别或组合(多于一种化合物)的化合物。因此,当需要时,还可以将制剂与其它活性物质组合(例如以减少代谢降解)。本公开内容的组合物可以经皮、通过局部途径施用,配制为敷药棒、溶液、悬浮液、乳液、凝胶、乳膏、软膏、糊剂、凝胶剂、涂剂、粉末和气溶胶。

[0160] “对照”样品或值指充当参考,通常是已知参考的样品,用于与测试样品的比较。例如,可以从测试条件(例如在测试化合物的存在下)获得测试样品,并且与来自已知条件的样品进行比较,例如在不存在测试化合物的情况下(阴性对照),或在已知化合物的存在下(阳性对照)。对照也可以表示从多个测试或结果收集的平均值。本领域技术人员将认识到,可以设计对照用于评价任何数目的参数。例如,可以设计对照以基于药理学数据(例如半衰期)或治疗措施(例如副作用的比较)来比较治疗益处。本领域技术人员将理解在给定情况下哪些对照是有价值的,并且能够基于与对照值的比较来分析数据。对照对于确定数据的重要性也是有价值的。例如,如果关于给定参数的值在对照中是广泛变体,则测试样品中的变化将不被认为显著的。

[0161] 如本文使用的,癌症模型生物是在生物内显示出的表型指示癌症或造成癌症的元素的活性的生物。术语癌症在上文定义。广泛多样的生物可以充当癌症模型生物,并且包括例如癌细胞和哺乳动物生物,例如啮齿类动物(例如小鼠或大鼠)和灵长类动物(例如人)。癌细胞系由本领域技术人员广泛地理解为显示出类似于体内癌症的表型或基因型的细胞。如本文使用的,癌细胞系包括来自动物(例如小鼠)和人的细胞系。

[0162] 如本文定义的,在提及蛋白质-抑制剂相互作用中的术语“活化(activation)”、“活化(activate)”、“活化(activating)”、“活化剂”等等,意指相对于在不存在活化剂的情况下的蛋白质活性或功能,正面影响(例如增加)蛋白质的活性或功能。在实施方案中,活化意指相对于在不存在活化剂的情况下的蛋白质浓度或水平,正面影响(例如增加)蛋白质的浓度或水平。该术语可以指活化,或者活化、增敏或上调在疾病中降低的蛋白质的信号转导或酶促活性或量。因此,活化可以包括至少部分、部分地或完全增加蛋白质的刺激,增加或允许蛋白质的活化,或者活化、增敏或上调与疾病相关的蛋白质的信号转导或酶促活性或量(例如,相对于未患病对照,在疾病中降低的蛋白质)。活化可以包括至少部分、部分地或完全增加蛋白质的刺激,增加或允许蛋白质的活化,或者活化、增敏或上调蛋白质的信号转导或酶促活性或量。

[0163] 术语“激动剂”、“活化剂”、“上调物”等指能够可检测地增加给定基因或蛋白质的表达或活性的物质。与不存在激动剂的对照相比,激动剂可以使表达或活性增加10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更多。在某些情况下,与不存在激动剂的情况下的表达或活性相比,表达或活性是1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍或更高。

[0164] 术语“表达”包括涉及多肽生产的任何步骤,包括但不限于转录、转录后修饰、翻

译、翻译后修饰和分泌。可以使用用于检测蛋白质的常规技术(例如,ELISA、蛋白质印迹、流式细胞术、免疫荧光、免疫组织化学等)来检测表达。

[0165] 术语“调节剂”指相对于调节剂的不存在,增加或降低靶分子的水平或靶分子的功能或分子靶的物理状态的组合物。在一些实施方案中,ROR1有关疾病的调节剂是减少与ROR1有关的疾病(例如,癌症、炎性疾病、自身免疫性疾病或传染病)的一种或多种症状的严重性的化合物。ROR1调节剂是增加或降低ROR1的活性或功能或者活性水平或功能水平的化合物。

[0166] 术语“调节”根据其平常的普通含义使用,并且指转变或改变一种或多种特性的动作。“调节”指转变或改变一种或多种特性的过程。例如,当应用于调节剂对靶蛋白的作用时,调节意指通过增加或降低靶分子的性质或功能或者靶分子的量来改变。

[0167] 在与疾病(例如蛋白质有关的疾病,与ROR1活性有关的癌症,ROR1有关的癌症,ROR1有关的疾病(例如癌症、炎性疾病、自身免疫性疾病或传染病))有关的物质或物质活性或功能的上下文中的“有关”或“与……有关”,意指该疾病(例如癌症、炎性疾病、自身免疫性疾病或传染病)(全部或部分)由物质或者物质活性或功能引起,或者该疾病的症状(全部或部分)由物质或者物质活性或功能引起。例如,与ROR1活性或功能有关的癌症可以是(整个或部分)起因于异常ROR1功能(例如酶促活性、蛋白质-蛋白质相互作用、信号传导途径)的癌症,或者其中疾病的特定症状(整个或部分)由异常的ROR1活性或功能引起的癌症。如本文使用的,如果是致病因子,则描述为与疾病有关的可以用于疾病治疗的靶。例如,在其中增加的ROR1活性或功能(例如信号传导途径活性)引起疾病(例如癌症、炎性疾病、自身免疫性疾病或传染病)的情况下,可以用ROR1调节剂或ROR1抑制剂治疗与ROR1活性或功能有关的癌症、或者ROR1有关的疾病(例如癌症、炎性疾病、自身免疫病或传染病)。例如,在其中增加的ROR1活性或功能(例如信号传导途径活性)引起疾病的情况下,可以用ROR1调节剂或ROR1抑制剂治疗与ROR1活性或功能有关的炎性疾病、或者ROR1有关的炎性疾病。

[0168] 如本文使用的,术语“信号传导途径”指细胞组分和任选地细胞外组分(例如蛋白质、核酸、小分子、离子、脂质)之间的一系列相互作用,其将一种组分中的改变传达给一种或多种其它组分,其依次又可能将改变传达给另外组分,所述另外组分任选地传播给其它信号传导途径组分。例如,ROR1与如本文所述的化合物的结合可以减少ROR1催化反应的产物水平或该产物的下游衍生物水平,或者结合可以减少ROR1酶或ROR1反应产物与下游效应物或信号传导途径组分之间的相互作用,导致细胞生长、增殖或存活中的改变。

[0169] 如本文使用的,术语“约”意欲包括指定值的一系列值,本领域普通技术人员将合理地认为其与指定值相似。在实施方案中,“约”意指在使用本领域一般可接受的测量的标准差内。在实施方案中,约意指延伸至指定值的 $\pm 10\%$ 的范围。在实施方案中,约包括指定值。

[0170] 如本文使用的,“协同量”指第一量(例如,本文提供的化合物的量)和第二量(例如,治疗剂)的总和,其导致协同效应(即,大于叠加效应的效应)。因此,在本文中可互换使用的术语“协同”、“协同作用”、“协同的”、“组合的协同量”和“协同治疗效应”指组合施用的化合物的测量效应,其中所述测量效应大于本文提供的化合物各自作为单一试剂施用的个别效应的总和。

[0171] 在实施方案中,协同量可以是当与治疗剂分开使用时,本文提供的化合物的量的

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

[0172] 如本文使用的,术语“EC50”或“半数最大有效浓度”指能够诱导应答的分子(例如抗体、嵌合抗原受体或双特异性抗体)浓度,所述应答在基线应答和在指定的暴露时间后的最大应答的中间。在实施方案中,EC50是产生该分子的最大可能效应的50%的分子(例如抗体、嵌合抗原受体或双特异性抗体)浓度。

[0173] II. 方法

[0174] 本文提供的方法尤其可用于癌症的治疗。在实施方案中,如本文所述的方法和组合物提供了用于表达ROR-1的化药抗性癌症的有效治疗。申请人已惊讶地发现,ROR-1的表达在用化学疗法治疗后的癌细胞中增加。进一步地,申请人显示了ROR-1表达增强了癌细胞转移并存活过化学疗法治疗的能力,导致了化药抗性。申请人在本文中描述了ROR-1拮抗剂(例如,ROR-1抗体)和化学治疗剂(例如,紫杉醇)的共施用如何比用单独任一者的治疗更有效,并且因此有效地治疗癌症(例如,乳腺癌)。

[0175] 在一个方面,提供的是治疗有此需要的受试者中的化药抗性癌症的方法。该方法包括向受试者施用治疗有效量的化学治疗剂、以及治疗有效量的酪氨酸激酶样孤儿受体1(ROR-1)拮抗剂,从而治疗受试者中的化药抗性癌症。

[0176] 在另一个方面,提供的是治疗有此需要的受试者中的乳腺癌的方法。该方法包括向所述受试者施用治疗有效量的化学治疗剂、以及治疗有效量的酪氨酸激酶样孤儿受体1(ROR-1)拮抗剂,从而治疗受试者中的乳腺癌。在实施方案中,乳腺癌是化药抗性乳腺癌。

[0177] 如本文使用的,术语“ROR-1”指酪氨酸激酶样孤儿受体1(ROR-1)、或者其维持ROR-1活性(例如与ROR-1相比,在至少50%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%活性内)的变体或同系物的重组或天然存在形式中的任一种。在一些方面,与天然存

在的ROR-1蛋白相比,变体或同系物跨越整个序列或序列的一部分(例如50、100、150或200个连续氨基酸部分)具有至少90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的氨基酸序列同一性。在实施方案中,ROR-1蛋白基本上等同于由登录号 NP_005003.1鉴定的蛋白质、或者与其具有基本同一性的变体或同源物。

[0178] 在其中ROR-1拮抗剂是抗体的情况下,该抗体与ROR-1多肽特异性结合。因此,在实施方案中,ROR-1拮抗剂是抗ROR-1抗体。在实施方案中,抗ROR-1抗体是人源化抗体。

[0179] 抗ROR-1抗体可以包括允许其结合ROR-1多肽或其片段的一部分的氨基酸序列(例如,CDR)。因此,在实施方案中,该抗体包括人源化重链可变区和人源化轻链可变区,其中所述人源化重链可变区包括SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3中所示的序列;并且其中所述人源化轻链可变区包括SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6中所示的序列。

[0180] 在实施方案中,该抗体是西妥珠单抗。如本文定义的西妥珠单抗在本文中也称为UC-961或99961.1,并且这些术语自始至终可互换使用。西妥珠单抗的开发和结构公开于美国专利申请号14/422,519中,所述美国专利申请整体且为了所有目的引入本文作为参考。在实施方案中,西妥珠单抗(即99961.1、UC-961)包括人源化重链可变区和人源化轻链可变区,其中所述人源化重链可变区包括SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3中所示的序列;并且其中所述人源化轻链可变区包括SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6中所示的序列。

[0181] 在实施方案中,该抗体包括人源化重链可变区和人源化轻链可变区,其中所述人源化重链可变区包括SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:9中所示的序列;并且其中所述人源化轻链可变区包括SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12中所示的序列。包括由SEQ ID NO:7、8、9、10、11、12所示的氨基酸序列(即,CDR)的抗体,在本文中可以被称为抗体D10。抗体D10的开发和使用公开于美国专利号9,217,040中,所述美国专利整体且为了所有目的引入本文作为参考。

[0182] 在实施方案中,该抗体结合ROR-1的氨基酸130-160或其片段。在实施方案中,该抗体结合在对应于ROR-1的位置138的位置处包括谷氨酸的肽。在实施方案中,该抗体特异性结合ROR-1蛋白的细胞外结构域的3'区域或中间Ig样区域。在实施方案中,该抗体从位置1-147结合ROR-1蛋白的细胞外结构域的Ig样区域的3'末端。

[0183] 在实施方案中,该抗体抑制转移。在实施方案中,该抗体是抗体片段。在实施方案中,该抗体是人的。在实施方案中,该抗体是人源化的。在实施方案中,该抗体是嵌合抗体。在实施方案中,该抗体是单链抗体。

[0184] 在实施方案中,该抗体具有约500pM至约6nM的结合亲和力。在实施方案中,该抗体具有约550pM至约6nM的结合亲和力。在实施方案中,该抗体具有约600pM至约6nM的结合亲和力。在实施方案中,该抗体具有约650pM至约6nM的结合亲和力。在实施方案中,该抗体具有约700pM至约6nM的结合亲和力。在实施方案中,该抗体具有约750pM至约6nM的结合亲和力。在实施方案中,该抗体具有约800pM至约6nM的结合亲和力。在实施方案中,该抗体具有约850pM至约6nM的结合亲和力。在实施方案中,该抗体具有约900pM至约6nM的结合亲和力。在实施方案中,该抗体具有约950pM至约6nM的结合亲和力。在实施方案中,该抗体具有约1nM至约6nM的结合亲和力。在实施方案中,该抗体具有约1nM至约6nM的结合亲和力。在实施

亲和力。在实施方案中,该抗体具有500pM至2.5nM的结合亲和力。在实施方案中,该抗体具有500pM至2nM的结合亲和力。在实施方案中,该抗体具有500pM至1.5nM的结合亲和力。在实施方案中,该抗体具有500pM至1nM的结合亲和力。在实施方案中,该抗体具有500pM至950pM的结合亲和力。在实施方案中,该抗体具有500pM至900pM的结合亲和力。在实施方案中,该抗体具有500pM至850pM的结合亲和力。在实施方案中,该抗体具有500pM至800pM的结合亲和力。在实施方案中,该抗体具有500pM至750pM的结合亲和力。在实施方案中,该抗体具有500pM至700pM的结合亲和力。在实施方案中,该抗体具有500pM至650pM的结合亲和力。在实施方案中,该抗体具有500pM至600pM的结合亲和力。在实施方案中,该抗体具有500pM至550pM的结合亲和力。

[0188] 在实施方案中,该抗体具有约500pM的结合亲和力。在实施方案中,该抗体具有500pM的结合亲和力。在实施方案中,该抗体具有约550pM的结合亲和力。在实施方案中,该抗体具有550pM的结合亲和力。在实施方案中,该抗体具有约600pM的结合亲和力。在实施方案中,该抗体具有600pM的结合亲和力。在实施方案中,该抗体具有约650pM的结合亲和力。在实施方案中,该抗体具有650pM的结合亲和力。在实施方案中,该抗体具有约700pM的结合亲和力。在实施方案中,该抗体具有700pM的结合亲和力。在实施方案中,该抗体具有约750pM的结合亲和力。在实施方案中,该抗体具有750pM的结合亲和力。在实施方案中,该抗体具有约800pM的结合亲和力。在实施方案中,该抗体具有800pM的结合亲和力。在实施方案中,该抗体具有约850pM的结合亲和力。在实施方案中,该抗体具有850pM的结合亲和力。在实施方案中,该抗体具有约900pM的结合亲和力。在实施方案中,该抗体具有900pM的结合亲和力。在实施方案中,该抗体具有约950pM的结合亲和力。在实施方案中,该抗体具有950pM的结合亲和力。在实施方案中,该抗体具有约1nM的结合亲和力。在实施方案中,该抗体具有约1nM的结合亲和力。在实施方案中,该抗体具有1nM的结合亲和力。在实施方案中,该抗体具有约1.5nM的结合亲和力。在实施方案中,该抗体具有1.5nM的结合亲和力。在实施方案中,该抗体具有约2nM的结合亲和力。在实施方案中,该抗体具有2nM的结合亲和力。在实施方案中,该抗体具有约2.5nM的结合亲和力。在实施方案中,该抗体具有2.5nM的结合亲和力。在实施方案中,该抗体具有约3nM的结合亲和力。在实施方案中,该抗体具有3nM的结合亲和力。在实施方案中,该抗体具有约3.5nM的结合亲和力。在实施方案中,该抗体具有3.5nM的结合亲和力。在实施方案中,该抗体具有约4nM的结合亲和力。在实施方案中,该抗体具有4nM的结合亲和力。在实施方案中,该抗体具有约4.5nM的结合亲和力。在实施方案中,该抗体具有4.5nM的结合亲和力。在实施方案中,该抗体具有约5nM的结合亲和力。在实施方案中,该抗体具有5nM的结合亲和力。在实施方案中,该抗体具有约5.5nM的结合亲和力。在实施方案中,该抗体具有5.5nM的结合亲和力。在实施方案中,该抗体具有约6nM的结合亲和力。在实施方案中,该抗体具有6nM的结合亲和力。

[0189] 在实施方案中,该抗体以小于约40nM(例如35、30、25、20、15、10、9、8、7、6、5、4、3、2、1、0.5、0.25、0.1nM)的 K_D 与ROR-1蛋白结合。在实施方案中,该抗体以小于40nM(例如35、30、25、20、15、10、9、8、7、6、5、4、3、2、1、0.5、0.25、0.1nM)的 K_D 与ROR-1蛋白结合。在实施方案中,该抗体以小于约35nM的 K_D 与ROR-1蛋白结合。在实施方案中,该抗体以小于35nM的 K_D 与ROR-1蛋白结合。在实施方案中,该抗体以小于约30nM的 K_D 与ROR-1蛋白结合。在实施方案中,该抗体以小于30nM的 K_D 与ROR-1蛋白结合。在实施方案中,该抗体以小于约25nM的 K_D 与

ROR-1蛋白结合。在实施方案中,该抗体以小于25nM的 K_D 与ROR-1蛋白结合。在实施方案中,该抗体以小于约20nM的 K_D 与ROR-1蛋白结合。在实施方案中,该抗体以小于20nM的 K_D 与ROR-1蛋白结合。在实施方案中,该抗体以小于约15nM的 K_D 与ROR-1蛋白结合。在实施方案中,该抗体以小于15nM的 K_D 与ROR-1蛋白结合。在实施方案中,该抗体以小于约10nM的 K_D 与ROR-1蛋白结合。在实施方案中,该抗体以小于10nM的 K_D 与ROR-1蛋白结合。在实施方案中,该抗体以小于约9nM的 K_D 与ROR-1蛋白结合。在实施方案中,该抗体以小于9nM的 K_D 与ROR-1蛋白结合。在实施方案中,该抗体以小于约8nM的 K_D 与ROR-1蛋白结合。在实施方案中,该抗体以小于8nM的 K_D 与ROR-1蛋白结合。在实施方案中,该抗体以小于约7nM的 K_D 与ROR-1蛋白结合。在实施方案中,该抗体以小于7nM的 K_D 与ROR-1蛋白结合。在实施方案中,该抗体以小于约6nM的 K_D 与ROR-1蛋白结合。在实施方案中,该抗体以小于6nM的 K_D 与ROR-1蛋白结合。在实施方案中,该抗体以小于约5nM的 K_D 与ROR-1蛋白结合。在实施方案中,该抗体以小于5nM的 K_D 与ROR-1蛋白结合。在实施方案中,该抗体以小于约4nM的 K_D 与ROR-1蛋白结合。在实施方案中,该抗体以小于4nM的 K_D 与ROR-1蛋白结合。在实施方案中,该抗体以小于约3nM的 K_D 与ROR-1蛋白结合。在实施方案中,该抗体以小于3nM的 K_D 与ROR-1蛋白结合。在实施方案中,该抗体以小于约2nM的 K_D 与ROR-1蛋白结合。在实施方案中,该抗体以小于2nM的 K_D 与ROR-1蛋白结合。在实施方案中,该抗体以小于约1nM的 K_D 与ROR-1蛋白结合。在实施方案中,该抗体以小于1nM的 K_D 与ROR-1蛋白结合。在实施方案中,该抗体以小于约0.5nM的 K_D 与ROR-1蛋白结合。在实施方案中,该抗体以小于0.5nM的 K_D 与ROR-1蛋白结合。在实施方案中,该抗体以小于约0.25nM的 K_D 与ROR-1蛋白结合。在实施方案中,该抗体以小于0.25nM的 K_D 与ROR-1蛋白结合。在实施方案中,该抗体以小于约0.1nM的 K_D 与ROR-1蛋白结合。在实施方案中,该抗体以小于0.1nM的 K_D 与ROR-1蛋白结合。

[0190] 在实施方案中,该抗体是西妥珠单抗,在本文中也称为99961.1或UC-961。在实施方案中,该抗体是D10。

[0191] 在实施方案中,化学治疗剂和ROR-1拮抗剂以组合的协同量施用。在实施方案中,化学治疗剂和抗ROR-1抗体以组合的协同量施用。如本文使用的,“组合的协同量”指第一量(例如,治疗剂的量)和第二量(例如,ROR-1拮抗剂的量)的总和,其导致协同效应(即,大于叠加效应的效应)。因此,在本文中可互换使用的术语“协同”、“协同作用”、“协同的”、“组合的协同量”和“协同治疗效应”指组合施用的化合物的测量效应,其中所述测量效应大于化合物各自作为单一试剂施用的个别效应的总和。

[0192] 在实施方案中,协同量可以是当与ROR-1拮抗剂分开使用时,治疗剂的量的约0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3.0、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4.0、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5.0、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8.0、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、8.6、8.7、8.8、8.9、9.0、9.1、9.2、9.3、9.4、9.5、9.6、9.7、9.8、9.9、10.0、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%。在实施方案中,

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

[0193] 协同效应可以是细胞(例如,癌细胞)分裂降低效应和/或ROR-1活性降低效应。在实施方案中,化学治疗剂和ROR-1拮抗剂之间的协同可以导致与当个别地且分开地使用,化学治疗剂或ROR-1拮抗剂的降低总和相比,大约0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3.0、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4.0、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5.0、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8.0、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、8.6、8.7、8.8、8.9、9.0、9.1、9.2、9.3、9.4、9.5、9.6、9.7、9.8、9.9、10.0、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99%或100%的降低(例如,细胞(例如癌细胞)分裂的降低或ROR-1活性的降低)。在实施方案中,化学治疗剂和ROR-1拮抗剂之间的协同可以导致与当个别地且分开地使用,化学治疗剂或ROR-1拮抗剂的抑制总和相比,大0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3.0、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4.0、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5.0、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8.0、8.1、8.2、8.3、8.4、8.5、8.6、8.7、8.8、8.9、9.0、9.1、9.2、9.3、9.4、9.5、9.6、9.7、9.8、9.9、10.0、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99%或100%的细胞(例如癌细胞)分裂和/或ROR-1蛋白质的抑制。

[0194] 协同效应可以是癌症治疗效应,例如乳腺癌(即,治疗乳腺癌的协同效应)、淋巴瘤(即,治疗淋巴瘤的协同效应)、白血病(即,治疗白血病的协同效应)、骨髓瘤(即,治疗骨髓瘤的协同效应)、AML(即,治疗AML的协同效应)、B-ALL(即,治疗B-ALL的协同效应)、T-ALL(即,治疗T-ALL的协同效应)、肾细胞癌(即,治疗肾细胞癌的协同效应)、结肠癌(即,治疗结肠癌的协同效应)、结肠直肠癌(即,治疗结肠直肠癌的协同效应)、上皮鳞状细胞癌(即,治

疗上皮鳞状细胞癌的协同效应)、黑素瘤(即,治疗黑素瘤的协同效应)、胃癌(即,治疗胃癌的协同效应)、脑癌(即,治疗脑癌的协同效应)、肺癌(即,治疗肺癌的协同效应)、胰腺癌(即,治疗胰腺癌的协同效应)、宫颈癌(即,治疗宫颈癌的协同效应)、卵巢癌(即,治疗卵巢癌的协同效应)、肝癌(即,治疗肝癌的协同效应)、膀胱癌(即,治疗膀胱癌的协同效应)、前列腺癌(即,治疗前列腺癌的协同效应)、睾丸癌(即,治疗睾丸癌的协同效应)、甲状腺癌(即,治疗甲状腺癌的协同效应)、头颈癌(即,治疗头颈癌的协同效应)、子宫癌(即,治疗子宫癌的协同效应)、腺癌(即,治疗腺癌的协同效应)、肾上腺癌(即,治疗肾上腺癌的协同效应)、慢性淋巴细胞性白血病(即,治疗慢性淋巴细胞性白血病的协同效应)、小淋巴细胞淋巴瘤(即,治疗小淋巴细胞淋巴瘤的协同效应)、边缘细胞B细胞淋巴瘤(即,治疗边缘细胞B细胞淋巴瘤的协同效应)、伯基特氏淋巴瘤(即,治疗伯基特氏淋巴瘤的协同效应)和B细胞白血病(即,治疗B细胞白血病的协同效应)治疗效应。

[0195] 化学治疗剂和ROR-1拮抗剂可以同时(例如,作为混合物),分开但同时(例如,经由分开的静脉内管线),或序贯地(例如,首先施用一种试剂,随后施用第二试剂)组合施用。因此,术语组合用于指化学治疗剂和ROR-1拮抗剂的伴随、同时或序贯施用。

[0196] 在实施方案中,化学治疗剂和ROR-1拮抗剂同时或序贯施用。在实施方案中,化学治疗剂和ROR-1拮抗剂同时施用。在实施方案中,化学治疗剂和ROR-1拮抗剂序贯施用。在治疗过程期间,化学治疗剂和ROR-1拮抗剂有时可以序贯施用,而在其它时间可以同时施用。

[0197] 在实施方案中,当化学治疗剂和ROR-1拮抗剂序贯施用时,ROR-1拮抗剂在第一时间点施用,而化学治疗剂在第二时间点施用,其中第一时间点先于第二时间点。可替代地,在实施方案中,当化学治疗剂和ROR-1拮抗剂序贯施用时,化学治疗剂在第一时间点施用,而ROR-1拮抗剂在第二时间点施用,其中第一时间点先于第二时间点。

[0198] 在实施方案中,化学治疗剂和抗ROR-1抗体同时或序贯施用。在实施方案中,化学治疗剂和抗ROR-1抗体同时施用。在实施方案中,化学治疗剂和抗ROR-1抗体序贯施用。在治疗过程期间,化学治疗剂和抗ROR-1抗体有时可以序贯施用,而在其它时间可以同时施用。

[0199] 在实施方案中,当化学治疗剂和抗ROR-1抗体序贯施用时,抗ROR-1抗体在第一时间点施用,而化学治疗剂在第二时间点施用,其中第一时间点先于第二时间点。可替代地,在实施方案中,当化学治疗剂和抗ROR-1抗体序贯施用时,化学治疗剂在第一时间点施用,而抗ROR-1抗体在第二时间点施用,其中第一时间点先于第二时间点。

[0200] 治疗过程最好根据个体的特定特征和选择的治疗类型,在个体基础上进行确定。治疗例如本文公开的那些,可以在每天一次、每天两次、每两周一次、每月一次或治疗有效的任何适用基础上,施用于受试者。治疗可以单独施用,或者与本文公开或本领域已知的任何其它治疗组合施用。另外的治疗可以与第一疗法同时,在不同时间,或在完全不同的治疗方案上(例如,第一疗法可以是每天一次,而另外的治疗是每周一次)施用。

[0201] 在其中化学治疗剂和ROR-1拮抗剂同时施用的情况下,化学治疗剂和ROR-1拮抗剂可以作为混合物施用。因此,在实施方案中,化学治疗剂和ROR-1拮抗剂在施用之前进行混合。

[0202] 在实施方案中,化学治疗剂以约5mg/kg、10mg/kg、11mg/kg、12mg/kg、13 mg/kg、14mg/kg或15mg/kg的量施用。在实施方案中,化学治疗剂以约5mg/kg的量施用。在实施方案中,化学治疗剂以约6mg/kg的量施用。在实施方案中,化学治疗剂以约7mg/kg的量施用。在

实施方案中,化学治疗剂以约8mg/kg的量施用。在实施方案中,化学治疗剂以约9mg/kg的量施用。在实施方案中,化学治疗剂以10mg/kg的量施用。在实施方案中,化学治疗剂以约11mg/kg的量施用。在实施方案中,化学治疗剂以约12mg/kg的量施用。在实施方案中,化学治疗剂以约13mg/kg的量施用。在实施方案中,化学治疗剂以约14mg/kg的量施用。在实施方案中,化学治疗剂以约13.4 mg/kg的量施用。在一个进一步的实施方案中,化学治疗剂是紫杉醇。

[0203] 在实施方案中,ROR-1拮抗剂以约1mg/kg、2mg/kg、3mg/kg、5mg/kg或10mg/kg 的量施用。在实施方案中,ROR-1拮抗剂以约1mg/kg的量施用。在实施方案中,ROR-1拮抗剂以1mg/kg的量施用。在实施方案中,ROR-1拮抗剂以约2mg/kg的量施用。在实施方案中,ROR-1拮抗剂以2mg/kg的量施用。在实施方案中,ROR-1拮抗剂以约3 mg/kg的量施用。在实施方案中,ROR-1拮抗剂以3mg/kg的量施用。在实施方案中,ROR-1拮抗剂以约5mg/kg的量施用。在实施方案中,ROR-1拮抗剂以5mg/kg的量施用。在实施方案中,ROR-1拮抗剂以约10mg/kg的量施用。在实施方案中,ROR-1拮抗剂以10mg/kg的量施用。

[0204] 在实施方案中,化学治疗剂以约13mg/kg的量施用,并且ROR-1拮抗剂以约2mg/kg的量施用。在实施方案中,化学治疗剂以14mg/kg的量施用,并且ROR-1拮抗剂以2 mg/kg的量施用。在实施方案中,化学治疗剂以13.4mg/kg的量施用,并且ROR-1拮抗剂以2mg/kg的量施用。在实施方案中,化学治疗剂以约13mg/kg的量施用,并且 ROR-1拮抗剂以约1mg/kg的量施用。在实施方案中,化学治疗剂以14mg/kg的量施用,并且ROR-1拮抗剂以1mg/kg的量施用。在实施方案中,化学治疗剂以13.4mg/kg 的量施用,并且ROR-1拮抗剂以1mg/kg的量施用。

[0205] 在实施方案中,在至少14天(例如15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、40、45或50天)的过程中每天施用化学治疗剂。在实施方案中,在至少15天的过程中每天施用化学治疗剂。在实施方案中,在至少16天的过程中每天施用化学治疗剂。在实施方案中,在至少17天的过程中每天施用化学治疗剂。在实施方案中,在至少18天的过程中每天施用化学治疗剂。在实施方案中,在至少19天的过程中每天施用化学治疗剂。在实施方案中,在至少20天的过程中每天施用化学治疗剂。在实施方案中,在至少21天的过程中每天施用化学治疗剂。在实施方案中,在至少22天的过程中每天施用化学治疗剂。在实施方案中,在至少23天的过程中每天施用化学治疗剂。在实施方案中,在至少24天的过程中每天施用化学治疗剂。在实施方案中,在至少25天的过程中每天施用化学治疗剂。在实施方案中,在至少26天的过程中每天施用化学治疗剂。在实施方案中,在至少27天的过程中每天施用化学治疗剂。在实施方案中,在至少28天的过程中每天施用化学治疗剂。在实施方案中,在至少29天的过程中每天施用化学治疗剂。在实施方案中,在至少30 天的过程中每天施用化学治疗剂。在实施方案中,在至少31天的过程中每天施用化学治疗剂。在实施方案中,在至少32天的过程中每天施用化学治疗剂。在实施方案中,在至少33天的过程中每天施用化学治疗剂。在实施方案中,在至少34天的过程中每天施用化学治疗剂。在实施方案中,在至少35天的过程中每天施用化学治疗剂。在实施方案中,在至少40天的过程中每天施用化学治疗剂。在实施方案中,在至少45天的过程中每天施用化学治疗剂。在实施方案中,在至少50天的过程中每天施用化学治疗剂。

[0206] 在实施方案中,在约28天的过程中每天施用化学治疗剂。在实施方案中,在28天的

过程中每天施用化学治疗剂。

[0207] 在实施方案中,在约28天的过程中施用一次ROR-1拮抗剂。在实施方案中,在 28天的过程中施用一次ROR-1拮抗剂。

[0208] 在实施方案中,化学治疗剂是静脉内施用的。在实施方案中,ROR-1拮抗剂是静脉内施用的。

[0209] 在实施方案中,受试者是哺乳动物。在实施方案中,受试者是人。

[0210] 在实施方案中,该方法包括在施用之前检测受试者中的ROR-1水平。对于受试者中的ROR-1水平检测,考虑了本领域中通常用于检测生物样品中的蛋白质的任何方法。对于ROR-1水平的检测,可以使用衍生自受试者的任何合适的生物样品。生物样品包括但不限于组织衍生的样品,血液衍生的样品,唾液衍生的样品,尿衍生的样品,血清衍生的样品或血浆衍生的样品。

[0211] 用于检测和鉴定ROR-1 (例如ROR-1蛋白或ROR-1RNA) 水平的方法涉及在本领域技术内的常规分子生物学、微生物学和重组DNA技术。此类技术在文献中充分说明 (参见例如,Sambrook,Fritsch&Maniatis,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第二版,1989,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.;Animal Cell Culture,R.I.Freshney,编辑,1986)。

[0212] 如本文提供的,术语“检测”包括“检测ROR-1的水平”、“检测ROR-1蛋白的表达水平”、或“检测ROR-1RNA的表达水平”,并且包括本领域众所周知的方法和技术。例如,用于表达谱分析的捕获阵列可以用于确定蛋白质或RNA的表达水平。捕获阵列采用高亲和力捕获试剂,例如常规抗体、单结构域、改造的支架、肽、核酸适体或互补核酸(例如RNA或DNA),以高流量方式结合并检测特异性靶配体。抗体阵列具有所需的特异性特性和可接受的本底,并且一些是商购可得的(BD Biosciences, San Jose, CA; Clontech, Mountain View, CA; BioRad; Sigma, St. Louis, MO)。用于捕获阵列的抗体可以通过常规免疫(多克隆血清和杂交瘤)进行制备,或者在从噬菌体或核糖体展示文库中选择之后(Cambridge Antibody Technology, Cambridge, UK; Biolnvent, Lund, 瑞典; Affitech, Walnut Creek, CA; Biosite, San Diego, CA),作为通常在大肠杆菌(E. coli)中表达的重组片段进行制备。除常规抗体、Fab和scFv片段之外,来自骆驼科动物或改造的人等价物(Domantis, Waltham, MA)的单个V结构域任选地可用于阵列中。

[0213] 与抗体阵列结合的蛋白质分析物直接地或间接地,例如经由第二抗体进行检测。直接标记用于比较具有不同颜色的不同样品。当针对相同蛋白质配体的成对抗体可获得时,夹心免疫测定提供了高特异性和灵敏度,并且因此是用于低丰度蛋白质(例如细胞因子)的首选方法;它们还给出了检测蛋白质修饰的可能性。无标记的检测方法,包括质谱法、表面等离子共振和原子力显微镜检查,避免了配体的改变。任何一种方法所需要的是最佳的灵敏度和特异性,伴随低本底以给出高信噪比。由于分析物浓度覆盖范围广,因此必须适当地调整灵敏度。样品的连续稀释或不同亲和力抗体的使用是这个问题的解决方案。目的蛋白质经常是在体液和提取物中以低浓度的蛋白质,需要在pg或更低范围内的检测,例如细胞因子或细胞中的低表达产物。

[0214] 捕获分子阵列的替代方案是通过分子印迹技术制备的那种,其中肽(例如,来自蛋白质的C末端区域)用作模板,以在可聚合的基质中生成结构上互补的、序列特异性的空腔;

然后,这些空腔可以特异性捕获具有适当的一级氨基酸序列的(变性)蛋白质(ProteinPrint™,Aspira Biosystems,Burlingame,CA)。

[0215] 在诊断上和表达谱分析中有用的另一种方法是ProteinChip®阵列(Ciphergen,Fremont,CA),其中固相层析表面结合来自混合物(例如血浆或肿瘤提取物)的具有相似电荷或疏水性特征的蛋白质,并且SELDI-TOF质谱法用于检测保留的蛋白质。

[0216] 大规模功能芯片已通过固定大量的纯化蛋白质进行构建,并且用于测定广泛范围的生化功能,例如蛋白质与其它蛋白质的相互作用、药物-靶相互作用、酶-底物等。一般地,它们需要克隆到大肠杆菌、酵母或类似物内的表达文库,然后例如经由His标签从所述表达文库中纯化表达的蛋白质,并且进行固定。无细胞的蛋白质转录/翻译是用于合成蛋白质的可行替代方案,所述蛋白质无法在细菌或其它体内系统中良好地表达。

[0217] 在实施方案中,检测包括使来自受试者的生物样品与抗ROR-1抗体接触,并且检测抗ROR-1抗体与生物样品中的ROR-1的结合。在实施方案中,检测包括使受试者与抗ROR-1抗体接触,并且检测抗ROR-1抗体与受试者中的ROR-1的结合。在实施方案中,该抗体是美国专利序列号9,217,040中公开的任何一种抗ROR-1抗体,所述美国专利在此整体且为了所有目的引入作为参考。

[0218] 如本文提及的,“标准对照”指充当参考,通常是已知参考的样品,用于与测试样品的比较。例如,可以从怀疑患有癌症的患者中获取测试样品,并且与来自已知癌症患者、或已知正常(非疾病)个体的样品进行比较。对照还可以代表从相似个体的群体(例如,具有相似医学背景、相同年龄、重量等的癌症患者或健康个体)中收集的平均值。对照值也可以得自相同个体,例如,在疾病之前或治疗之前的较早获得的样品。技术人员将认识到对照可以设计用于评价任何数目的参数。

[0219] 本领域技术人员将理解在给定情况下哪些对照是有价值的,并且能够基于与对照值的比较来分析数据。对照对于确定数据的重要性也是有价值的。例如,如果关于给定参数的值在对照中是广泛变体,则测试样品中的变化将不被认为显著的。在所公开方法的一些实例中,当评价ROR-1的表达水平时,将该水平与ROR-1的对照表达水平进行比较。对照表达水平意指来自缺乏癌症的样品或受试者、处于癌症或癌症状态的选定阶段的样品或受试者、或者在不存在特定变量例如治疗剂(例如化学治疗剂)的情况下的ROR-1表达水平。可替代地,对照水平包含已知量的ROR-1。此类已知量与缺乏癌症、处于癌症或癌症状态的选定阶段、或者在不存在特定变量例如治疗剂的情况下的受试者的平均水平相关联。对照水平还包括来自如本文所述的一个或多个选定样品或受试者的ROR-1表达水平。例如,对照水平包括在来自受试者的样品中的ROR-1表达水平的评价,所述受试者未患有癌症、处于癌症或癌症状态的选定阶段、或未接受用于癌症的治疗。另一个示例性的对照水平包括在取自多重受试者的样品中的ROR-1表达水平的评价,所述受试者未患有癌症、处于癌症的选定阶段、或未接受用于癌症的治疗。

[0220] 当对照水平包括在不存在化学治疗剂的情况下的样品或受试者中的ROR-1表达水平时,对照样品或受试者任选地是在用化学治疗剂治疗之前或之后待测试的相同样品或受试者、或者是在不存在治疗剂的情况下的选定样品或受试者。可替代地,对照水平是由未患有特定疾病的多个受试者计算的平均表达水平。对照水平还包括已知对照水平或本领域已知的值。

[0221] 在实施方案中,该方法进一步包括在施用治疗有效量的化学治疗剂和治疗有效量的 ROR-1拮抗剂之前,选择相对于标准对照表达增加水平的ROR-1的受试者。在实施方案中,该方法进一步包括在施用之前,选择相对于标准对照表达增加水平的ROR-1的受试者。选定的受试者可以就癌症(例如乳腺癌)进行治疗。在一些实施方案中,受试者未就癌症(例如乳腺癌)进行治疗。受试者可以是参加临床试验的多个受试者的部分。当受试者是临床试验的部分时,选择至少部分基于如本文提供的ROR-1表达水平的确定。在实施方案中,受试者正在接受或已接受化学疗法。在实施方案中,化药抗性癌症是化药抗性乳腺癌。在实施方案中,受试者正在接受化学疗法。在实施方案中,受试者已接受化学疗法。在进一步的实施方案中,标准对照是在患者接受化学疗法之前检测到的ROR-1水平。

[0222] 在实施方案中,化学治疗剂是植物生物碱、抗肿瘤抗生素、拓扑异构酶抑制剂。在实施方案中,化学治疗剂是植物生物碱。在实施方案中,化学治疗剂是抗肿瘤抗生素。在实施方案中,化学治疗剂是拓扑异构酶抑制剂。在实施方案中,化学治疗剂是紫杉醇或多西他赛。在实施方案中,化学治疗剂是紫杉醇。在实施方案中,化学治疗剂是多西他赛。在实施方案中,化学治疗剂是多柔比星或表柔比星。在实施方案中,化学治疗剂是多柔比星。在实施方案中,化学治疗剂是表柔比星。

[0223] 在实施方案中,化学治疗剂不是BTK拮抗剂。在实施方案中,化学治疗剂不是CAL101、R406或依鲁替尼。在实施方案中,化学治疗剂不是依鲁替尼。

[0224] 在实施方案中,ROR-1拮抗剂是抗体或小分子。在实施方案中,ROR-1拮抗剂是抗体。在实施方案中,ROR-1拮抗剂是小分子。在实施方案中,ROR-1拮抗剂是抗ROR-1抗体。

[0225] 在一个实施方案中,化药抗性癌症是乳腺癌,化学治疗剂是紫杉醇,ROR-1拮抗剂是西妥珠单抗,并且选定的受试者已接受化学疗法。

[0226] III. 药物组合物

[0227] 如本文提供的包括化学治疗剂和ROR-1拮抗剂的组合物,包括其实施方案,进一步考虑作为药物组合物。因此,在一个方面,提供的是药物组合物,其包含(i)选自植物生物碱、抗肿瘤抗生素和拓扑异构酶抑制剂的化学治疗剂,(ii) ROR-1拮抗剂和(iii)药学上可接受的赋形剂。

[0228] 在另一个方面,提供的是药物组合物,其包含(i)选自植物生物碱、抗肿瘤抗生素和拓扑异构酶抑制剂的化学治疗剂,(ii)抗ROR-1抗体和(iii)药学上可接受的赋形剂,其中所述化学治疗剂和抗ROR-1抗体以组合的协同量存在,其中所述组合的协同量有效治疗有此需要的受试者中的乳腺癌。

[0229] 本文提供的药物组合物中包括的化学治疗剂和ROR-1拮抗剂可以是在本文包括其实施方案中描述的化学治疗剂和/或ROR-1拮抗剂中的任何一种。例如,化学治疗剂可以是紫杉醇,并且ROR-1拮抗剂可以是西妥珠单抗。同样地,可以这样配制本文提供的药物组合物,使得化学治疗剂和ROR-1拮抗剂的施用量是如本文描述的量中的任何一种。例如,紫杉醇可以以这样的量存在,使得组合物的施用导致13.4mg/kg的剂量,并且西妥珠单抗可以以导致约2mg/kg的剂量的量存在。

[0230] 因此,在实施方案中,化学治疗剂是植物生物碱。在实施方案中,化学治疗剂是紫杉醇。在实施方案中,ROR-1拮抗剂是抗体或小分子。在实施方案中,ROR-1拮抗剂是抗体。在实施方案中,ROR-1拮抗剂是小分子。在实施方案中,ROR-1拮抗剂是抗ROR-1抗体。在实施

方案中,该抗体包括人源化重链可变区和人源化轻链可变区,其中所述人源化重链可变区包括SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3中所示的序列;并且其中所述人源化轻链可变区包括SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6中所示的序列。在实施方案中,该抗体是西妥珠单抗。

[0231] 提供的组合物尤其适合于体外或体内配制和施用。合适的载体和赋形剂及其制剂在Remington:The Science and Practice of Pharmacy,第21版,David B.Troy,编辑,Lippicott Williams&Wilkins (2005) 中描述。药学上可接受的载体意指并非生物学上或其它方面不期望的材料,即,将该材料施用于受试者而不引起不期望的生物学效应、或以有害的方式与它包含在其中的药物组合物的其它组分相互作用。如果施用于受试者,则载体任性地选择为最小化活性成分的降解和最小化受试者中的不良副作用。

[0232] 本文提供的药物组合物包括这样的组合物,其中活性成分(例如本文所述的化合物,包括实施方案或实施例)以治疗有效量,即以有效实现其预期目的的量包含。对于特定应用有效的实际量尤其取决于待治疗的状况。当在治疗疾病的方法中施用,本文所述的重组蛋白将含有有效实现所需结果的活性成分的量,所述结果例如调节靶分子的活性,和/或减少、消除或减慢疾病症状的进展。本发明的化合物的治疗有效量的确定完全在本领域技术人员的能力内,尤其是根据本文的详细公开内容。

[0233] 提供的组合物可以包含单一试剂或多于一种试剂。用于施用的组合物通常包括溶解在药学上可接受的载体,优选水性载体中的如本文所述的试剂。可以使用各种水性载体,例如缓冲盐水等等。这些溶液是无菌的,并且一般不含不期望的物质。这些组合物可以通过常规的、众所周知的灭菌技术进行灭菌。组合物可以含有接近生理条件所需的药学上可接受的辅助物质,例如pH调节剂和缓冲剂、毒性调节剂等等,例如乙酸钠、氯化钠、氯化钾、氯化钙、乳酸钠等等。这些制剂中的活性剂浓度可以广泛地变化,并且主要基于根据所选定的特定施用模式和受试者的需要,基于流体体积、粘度、体重等等加以选择。

[0234] 可以在与表面活性剂例如羟丙基纤维素适当地混合的水中,制备作为游离碱或药学上可接受的盐的活性化合物的溶液。分散体也可以在甘油、液态聚乙二醇及其混合物和油中进行制备。在普通的贮存和使用条件下,这些制剂可以含有防腐剂以防止微生物的生长。

[0235] 药物组合物可以经由鼻内或可吸入溶液或喷雾剂、气溶胶或吸入剂递送。鼻溶液可以是设计为以滴剂或喷雾剂施用于鼻道的水溶液。可以这样制备鼻溶液,使得它们在许多方面与鼻分泌物相似。因此,鼻腔水溶液通常是等渗的,并且轻微地缓冲以维持5.5至6.5的pH。另外,需要时,与眼制剂中使用的那些相似的抗微生物防腐剂和适当的药物稳定剂可以包括在制剂中。各种商业鼻制剂是已知的,并且可以包括例如抗生素和抗组胺药。

[0236] 经口制剂可以包括赋形剂,例如,药用级别的甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、纤维素、碳酸镁等等。这些组合物采取溶液、悬浮液、片剂、丸剂、胶囊、持续释放制剂或粉末的形式。在一些实施方案中,经口药物组合物将包含惰性稀释剂或可同化的可食用载体,或者它们可以被封装在硬壳或软壳明胶胶囊中,或者它们可以被压制成片剂,或者它们可以直接与饮食的食物一起掺入。对于经口治疗性施用,活性化合物可以与赋形剂一起掺入,并且以可摄取片剂、颊片剂、锭剂、胶囊、酞剂、悬浮液、糖浆剂、糯米纸囊剂(wafer)等的形式使用。此类组合物和制剂应该含有至少0.1%的活性化合物。组合物和制剂的百分比

当然可以变化,并且可以方便地为单位重量的约2%至约75%,或优选25-60%。此类组合物中的活性化合物的量是这样的,使得可以获得合适的剂量。

[0237] 对于在水溶液中的肠胃外施用,例如,溶液应该适当地进行缓冲,并且首先致使液体稀释剂与足够的盐水或葡萄糖等渗。水溶液,特别是无菌水性介质,尤其适合于静脉内、肌内、皮下和腹膜内施用。例如,一个剂量可以溶解在1ml等渗NaCl溶液中,并且或者加入1000ml皮下注射液中,或者在提议的输注部位处注射。

[0238] 可以通过将所需量的活性化合物或构建体掺入适当的溶剂中,随后为过滤灭菌来制备无菌注射溶液。一般地,通过将各种灭菌的活性成分掺入无菌媒介物内来制备分散体,所述无菌媒介物含有基本分散介质。产生活性成分加上任何另外的所需成分的粉末的真空干燥和冷冻干燥技术,可以用于制备无菌粉末用于重构无菌注射溶液。也可以考虑用于直接注射的更浓缩或高度浓缩的溶液的制备。DMSO可以用作溶剂用于极其快速的渗透,将高浓度的活性剂递送到小区域。

[0239] 化合物的制剂可以存在于单位剂量或多剂量的密封容器,例如安瓿和小瓶中。因此,该组合物可以是单位剂型。以此类形式,将制剂细分成含有适当数量的活性成分的单位剂量。因此,取决于施用方法,组合物可以以各种单位剂型进行施用。例如,适合于经口施用的单位剂型包括但不限于粉末、片剂、丸剂、胶囊和锭剂。

[0240] 施用于哺乳动物的剂量和频率(单一剂量或多重剂量)可以根据各种因素而变,所述因素例如哺乳动物是否患有另一种疾病及其施用途径;接受者的大小、年龄、性别、健康、体重、体重指数和饮食;待治疗疾病的症状(例如癌症症状和此类症状的严重性)的性质和程度,并发治疗的种类,待治疗疾病的并发症或其它健康有关的问题。其它治疗方案或试剂可以与本发明的方法和化合物结合使用。所确认的剂量(例如频率和持续时间)的调节和操作完全在本领域技术人员的能力内。

[0241] 对于本文所述的任何组合物(例如,提供的细胞穿透缀合物),治疗有效量可以最初由细胞培养测定确定。靶浓度将是能够实现本文描述的方法的活性化合物的浓度,如使用本文描述或本领域已知的方法测量的。如本领域众所周知的,也可以从动物模型确定用于人中的有效量。例如,可以配制用于人的剂量以达到已发现在动物中有效的浓度。如上所述,可以通过监测有效性并且向上或向下调节剂量来调整人中的剂量。基于上述方法和其它方法调节剂量以达到在人中的最大功效完全在普通技术人员的能力内。

[0242] 剂量可以根据患者的需求和待采用的化合物而变。在本发明的上下文中,施用于患者的剂量应该足以在一段时间内,在患者中实现有益的治疗应答。剂量的大小也由任何不良副作用的存在、性质和程度决定。用于特定情况的适当剂量的确定在从业者的技术内。一般地,以小于化合物的最佳剂量的较小剂量起始治疗。其后,通过小增量来增加剂量,直到达到在特定情况下的最佳效应。

[0243] 可以个别地调整剂量和间隔,以提供对于待治疗的特定临床适应症有效的所施用化合物的水平。这将提供与个体的疾病状态的严重性相称的治疗方案。

[0244] 利用本文提供的教导,可以计划有效的预防或治疗方案,其不引起基本毒性,并且仍然有效地治疗由特定患者证实的临床症状。这种计划应该涉及通过考虑因素小心地选择活性化合物,所述因素例如化合物效价、相对生物利用度、患者体重、不良副作用的存在和严重性。

[0245] “药学上可接受的赋形剂”和“药学上可接受的载体”指这样的物质，其帮助活性剂对受试者的施用和由受试者的吸收，并且可以包括在本发明的组合中而不对患者引起显著的不良毒理学作用。药学上可接受的赋形剂的非限制性实例包括水、NaCl、生理盐水溶液、乳酸林格氏液、正常蔗糖、正常葡萄糖、粘合剂、填料、崩解剂、润滑剂、包衣、甜味剂、香料、盐溶液(如林格氏溶液)、醇类、油、明胶、碳水化合物(如乳糖、直链淀粉或淀粉)、脂肪酸酯、羟甲基纤维素、聚乙烯吡咯烷和颜料等等。此类制剂可以被灭菌，并且需要时，可以与辅助试剂混合，所述辅助试剂例如润滑剂、防腐剂、稳定剂、润湿剂、乳化剂、用于影响渗透压的盐、缓冲剂、着色剂和/或芳香物质等等，其不与本发明的化合物有害地反应。本领域技术人员将认识到其它药物赋形剂可用于本发明中。

[0246] 术语“药学上可接受的盐”指衍生自本领域众所周知的各种有机和无机抗衡离子的盐，并且仅作为示例包括钠、钾、钙、镁、铵、四烷基铵等等；并且当分子含有碱性官能团时，有机酸或无机酸的盐，例如盐酸盐、氢溴酸盐、酒石酸盐、甲磺酸盐、乙酸盐、马来酸盐、草酸盐等等。

[0247] 术语“制剂”预期包括具有包封材料作为载体的活性化合物的制剂，提供其中活性组分连同或不连同其它载体一起被载体包围的胶囊，其因此与之结合。类似地，包括扁囊剂和锭剂。片剂、粉末、胶囊、丸剂、扁囊剂和锭剂可以用作适合于经口施用的固体剂型。

[0248] 在实施方案中，药物组合物由紫杉醇、西妥珠单抗和药学上可接受的赋形剂组成。在实施方案中，药物组合物由多西他赛、西妥珠单抗和药学上可接受的赋形剂组成。在实施方案中，药物组合物由多柔比星、西妥珠单抗和药学上可接受的赋形剂组成。在实施方案中，药物组合物由表柔比星、西妥珠单抗和药学上可接受的赋形剂组成。

[0249] 在实施方案中，药物组合物包括等价于13.4mg/kg剂量的紫杉醇量和等价于1 mg/kg剂量的西妥珠单抗量。在实施方案中，药物组合物包括等价于13.4mg/kg剂量的紫杉醇量和等价于2mg/kg剂量的西妥珠单抗量。在实施方案中，药物组合物包括等价于13.4mg/kg剂量的紫杉醇量和等价于3mg/kg剂量的西妥珠单抗量。在实施方案中，药物组合物包括等价于13.4mg/kg剂量的紫杉醇量和等价于5mg/kg剂量的西妥珠单抗量。在实施方案中，药物组合物包括等价于13.4mg/kg剂量的紫杉醇量和等价于10 mg/kg剂量的西妥珠单抗量。

[0250] 在实施方案中，治疗有此需要的受试者中的癌症的方法包括向受试者施用治疗有效量的有丝分裂抑制剂和ROR-1拮抗剂。在实施方案中，治疗患有化学疗法抗性肿瘤的患者中的癌症的方法包括向所述受试者施用治疗有效量的有丝分裂抑制剂和ROR-1拮抗剂。在实施方案中，治疗有此需要的受试者中的癌症的方法包括向所述受试者施用治疗有效量的ROR-1抗体，其中所述受试者相对于标准对照表达升高水平的ROR-1。在实施方案中，有丝分裂抑制剂是紫杉醇。在实施方案中，ROR-1拮抗剂是西妥珠单抗。在实施方案中，癌症是乳腺癌。在实施方案中，药物组合物包含有丝分裂抑制剂和ROR-1 抗体，其中所述有丝分裂抑制剂和ROR-1抗体以组合的协同量存在，其中所述组合的协同量有效治疗有此需要的受试者中的癌症。

[0251] 应理解，本文描述的实施例和实施方案仅用于说明性目的，并且鉴于其的各种修改或改变将由本领域技术人员想到，并且待包括在本申请的精神和范围以及所附权利要求的范围内。本文引用的所有出版物、专利和专利申请出于所有目的在此整体引入参考。

[0252] 实施例

[0253] 实施例1:西妥珠单抗靶向对癌症化学疗法选择性抗性的ROR1+乳腺癌干细胞

[0254] 我们查询了在化学疗法之前和之后,从患者中收集的原发性乳腺癌样本的转录组数据。我们还检查了化学疗法对免疫缺陷小鼠中乳腺癌患者衍生的异种移植物(PDX)的作用,并且评价了ROR1+乳腺癌细胞是否具有活化的Rho-GTP酶、Hippo-YAP或BMI1,和/或乳腺癌CSC的特点。最后,我们测试了人源化的抗ROR1抗体,西妥珠单抗,单独或与紫杉醇组合是否具有针对乳腺癌PDX的活性。

[0255] 乳腺癌转录组数据的查询揭示了,具有高水平ROR1的肿瘤具有与Rho-GTP酶、Hippo-YAP或BMI1的活化有关的基因的高水平表达。此类基因和ROR1的肿瘤细胞表达在化学疗法后增加。Wnt5a诱导Hs578T或乳腺癌患者衍生的异种移植物(PDX)中的ROR1依赖性Rho-GTP酶、YAP/TAZ、AKT和BMI1活化,并且增加了肿瘤细胞侵袭基质胶,形成球状体或存活过用紫杉醇的治疗的能力;这些效应可以被抗ROR1 mAb 西妥珠单抗抑制,所述抗体也阻遏CD44⁺/CD24^{Low}乳腺癌干细胞(CSC)中上调的基因的表达,以及与Rho-GTP酶、Hippo-YAP或BMI1的活化有关的基因的表达。西妥珠单抗还损害了乳腺癌细胞植入Rag2^{-/-}γc^{-/-}小鼠或发展转移灶的能力。最后,西妥珠单抗和紫杉醇的组合比单独的任一种试剂更有效地根除乳腺癌PDX,指示了西妥珠单抗可以改善晚期乳腺癌患者的治疗结果。

[0256] 在化学疗法之前和之后的ROR1及其它基因的表达

[0257] 我们查询了关于在治疗之前的HER2阴性乳腺肿瘤活组织检查的PubMed Gene Expression Omnibus(GEO)数据库(GSE87455)。(Kimbung等人,2018)基于其 ROR1的相对表达,我们将关于每个样本(N=122)的数据分成2个亚组。具有比中值水平更多的ROR1转录物的样品被指定为ROR1^{Hi}(N=61),而具有更少ROR1的肿瘤样品被指定为ROR1^{Low}。基因集富集(GSE)分析揭示了,相对于ROR1^{Low}肿瘤,ROR1^{Hi}肿瘤共同表达更高水平的与Rho-GTP酶(Liberzon等人,2011;Schaefer等人,2009)、Hippo-YAP(Li等人,2017)、或BMI1(Wiederschain等人,2007)的活化有关的基因(图1A)。与ROR1^{Low}肿瘤相比,ROR1^{Hi}乳腺癌还具有更高水平的胚胎干细胞有关基因,其启动子在胚胎干细胞中由Oct4或胚胎干细胞身份的NOS靶调节物结合且活化,包括编码转录调节因子(NOS TF)的NOS活化靶子集(表1)。(Ben-Porath等人,2008)最后,ROR1^{Hi}乳腺癌具有更高水平的基因,相对于非CD44⁺/CD24^{Low}或所有肿瘤细胞,所述基因在CD44⁺/CD24^{Low}或乳腺微球(mammosphere)(MS)形成细胞中区别性地上调。(Creighton等人,2009)类似地将另一个GEO数据库(GSE21974)(Stickeler等人,2011)中描述的样品分成ROR1^{Hi}和ROR1^{Low}亚组,揭示了相似的关联(图6A)。

[0258] GSE87455数据集具有关于在化学疗法之前(前)和之后(后)获得的肿瘤组织(N=57)的数据,所述化学疗法由表柔比星加上多西他赛和贝伐珠单抗的4个周期组成。匹配的治疗前和治疗后样本之间的基因表达中的差异类似ROR1^{Hi}相对于ROR1^{Low}乳腺癌的那些。在分析的34,694个基因中,我们鉴定了相对于其匹配的治疗前活组织检查,在治疗后活组织检查中,或者与ROR1^{Low}肿瘤相比在ROR1^{Hi}肿瘤中的1,000个最过表达的基因和1,000个最表达不足的基因。在化学疗法后最过表达的1000个转录物中的365个在相对于ROR1^{Low}癌症由ROR1^{Hi}癌症最过表达的1000个转录物中(例如ALDH1A1),而仅3个在相对于ROR1^{Hi}肿瘤由ROR1^{Low}肿瘤最过表达的1000个转录物中(p<0.0001,费希尔精确检验)。类似地,在化学疗法后最表达不足的1,000个转录物中的190个也在相对于ROR1^{Hi}肿瘤由ROR1^{Low}肿瘤最表达不足的1,000个转录物中,而这些转录物无一相对于ROR1^{Hi}癌症由ROR1^{Low}肿瘤表达不足(p<

0.0001, 费希尔精确检验)。

[0259] 我们注意到, 与其匹配的治疗前活组织检查相比, GSE87455中描述的57个治疗后癌症活组织检查中的43个(76%)表达了更高水平的ROR1, 并且48个(84%)表达了更高水平的ALDH1A1(图1B)。对于GSE21457中描述的样品观察到相似的发现(图6B)。此外, 与治疗前样本相比, 治疗后的癌细胞具有更高水平的与Rho-GTP酶、Hippo-YAP或BMI1的活化有关的基因(图1C)。另外, 如对于ROR1^{Hi}肿瘤注意到的, 治疗后的乳腺癌细胞表达更高水平的与胚胎干细胞或CD44⁺/CD24^{Low} CSC有关的基因(表1)。相反, 相对于非CSC或整个肿瘤群体, 在CD44⁺/CD24^{Low} CSC或MS形成细胞中以较低水平表达的基因在治疗后样本中表达不足(表1)(Creighton等人, 2009), 并且相对于ROR1^{Hi}肿瘤在ROR1^{Low}样品中过表达(表1)。总体而言, 这些数据暗示 ROR1是乳腺癌CSC的标记物, 和/或ROR1^{Hi}肿瘤细胞对于化学疗法具有选择优势。

[0260] 在化学疗法之前和之后的ROR1、TAZ和BMI1表达

[0261] 随着TAZ在Hippo-YAP的活化后积累(Park等人, 2015), 我们经由免疫印迹检查了来自未接受过治疗的患者(N=23)的原发癌的ROR1、TAZ和BMI1。如注意到的(Zhang等人, 2012a), >60%的原发性乳腺癌具有可检测的ROR1(图1D和表2)。此外, ROR1的表达与TAZ的表达相关联(图1E和表2, 皮尔森R=0.56, P<0.01, N=23)或BMI1(图1D和1E以及表2, 皮尔森R=0.99, P<0.0001, N=23)。

[0262] 我们从患有浸润性导管癌的患者(N=22)中获得了福尔马林固定、石蜡包埋的治疗前和治疗后活组织检查材料, 所述患者用多西他赛、表柔比星和/或环磷酰胺进行治疗, 并且经由免疫组织化学检查了ROR1。在22个匹配的样本中, 14个(64%)具有在治疗后增加的ROR1, 而7个(32%)具有并未改变的ROR1水平(图1F-1G, 表3)。仅一个治疗后样本具有比治疗前样品更低水平的ROR1(表3)。这些发现确证了查询转录物组数据作出的发现, 并且指出了癌症一般在化学疗法后变得富含ROR1⁺细胞。

[0263] ROR1⁺乳腺癌细胞具有乳腺癌CSC的特征

[0264] 我们在Rag2^{-/-}γc^{-/-}小鼠中建立了乳腺癌PDX(表4)。PDX保留了原发性肿瘤中通常发现的异质性, 所述原发性肿瘤通常含有具有CSC特点的小部分细胞。例如, 在PDX1或PDX4中, 分别只有0.6%或6.5%的肿瘤细胞具有可检测的ALDH1酶促活性(表4)。然而, 此类肿瘤细胞以及共表达CD44和低水平CD24的肿瘤细胞, 表达的ROR1水平高于其为ALDEFLUOR阴性、或者对于CD44和CD24呈阴性的相同肿瘤的癌细胞(图7A-7C)。具有最高水平的ROR1的PDX(PDX4和PDX5)也具有最高水平的CSC标记物和BMI1(图7D-7E)。此外, 如通过共聚焦显微镜检查评价的, 具有高水平的ROR1的PDX具有的核YAP/TAZ水平显著高于具有低至不可检测ROR1的相同PDX的癌细胞(图7F, P<0.05)。

[0265] 我们发现具有高比例的ROR1⁺细胞的PDX形成的球状体数目明显大于具有相对较少的ROR1⁺细胞的PDX(图7G)。此外, 具有高比例的ROR1⁺细胞的PDX的肿瘤细胞在基质胶中比具有很少ROR1⁺细胞的PDX的肿瘤细胞更具侵袭性(图7H)。

[0266] 我们将相等数目的来自每个PDX的肿瘤细胞植入Rag2^{-/-}γc^{-/-}小鼠内, 并且监测植入。使用来自具有高比例的ROR1⁺细胞的PDX(例如PDX4或PDX5)的细胞形成的肿瘤生长快于由具有少数ROR1⁺细胞的PDX(例如PDX1或PDX2, 图2A)发展的肿瘤。当继发性PDX达到大小300mm³时, 我们用13.4mg/kg紫杉醇治疗小鼠共连续5天, 并且观察到肿瘤消退(图2A)。我

们注意到与衍生自具有少数ROR1+细胞的PDX (例如PDX1或PDX2,图2A)的肿瘤形成对比,衍生自具有高比例的ROR1+细胞的 PDX (例如PDX4或PDX5)的肿瘤在治疗后不久继续生长。

[0267] 我们切除了衍生自PDX4或PDX5的肿瘤,并且发现用紫杉醇治疗的小鼠的残留肿瘤具有比未接受紫杉醇的小鼠的匹配肿瘤、或原始PDX更高比例的ROR1+细胞(图2B 和图7I, PDX4:61.7%±7.0%相对于4.5%±1.1%,PDX5:56.4%±6.4%相对于8.5%±5.8%)。如先前研究中注意到的(Samanta等人,2014),用紫杉醇治疗的小鼠的肿瘤也具有比未治疗小鼠的匹配肿瘤、或原始PDX更高比例的ALDH1表达细胞(图7J)。最后,与未治疗小鼠的匹配肿瘤或原始PDX相比,用紫杉醇治疗的小鼠的肿瘤富含可以形成球状体、侵袭基质胶或重新植入Rag2^{-/-}γc^{-/-}小鼠的细胞(图2C-2E)。

[0268] 我们使用4A5(图7K),结合与由西妥珠单抗识别的那种不同的ROR1表位的mAb,经由流式细胞术从PDX4或PDX5分离了ROR1+和ROR1^{Neg}乳腺癌细胞。ROR1+细胞形成的球状体数目明显大于ROR1^{Neg}细胞,后者形成很少的球状体或根本没有形成球状体(图7L)。此外,与相同肿瘤的ROR1^{Neg}癌细胞相比,ROR1+细胞在基质胶中明显更具侵袭性(图7M)。

[0269] 我们用有限数目的来自PDX4或PDX5的肿瘤细胞进行致瘤性测定。来自每个PDX 的500个ROR1+细胞可以在大多数小鼠中建立继发性PDX(图7N)。相比之下,相同数目的ROR1^{Neg}细胞并未形成肿瘤,除了在少数动物中之外(图7N)。类似地,从这些PDX分离的ALDH1+或CD44+/CD24^{Low}细胞也具有比相同PDX的ALDH1^{Neg}或CD44+/CD24+细胞明显更大的形成继发性PDX的能力(表5),如先前研究中注意到的。(Al-Hajj等人,2003;Ginestier等人,2007)

[0270] 西妥珠单抗抑制Wnt5a诱导的Rho1依赖性的Rho-GTP酶、Hippo-YAP和BMI1活化

[0271] 我们经由CRISPR/Cas9消除了为基础型乳腺癌细胞系Hs578T中的ROR1表达(图3A)。外源性Wnt5a可以在野生型Hs578T细胞(wt-Hs578T)中,在10分钟内诱导 Rac1、RhoA和cdc42的活化,但在缺乏ROR1的ROR1^{-/-}Hs578T细胞(ROR1^{-/-}Hs578T)中则不能(图3A)。此外,用西妥昔单抗而不是具有无关特异性的人IgG(hIgG)的处理,抑制了外源性Wnt5a诱导wt-Hs578T细胞中的Rac1、RhoA或cdc42活化的能力(图3B)。用Wnt5a的处理还增强了wt-Hs578T细胞而不是ROR1^{-/-}Hs578T中的 YAP/TAZ表达和核定位(图3C和3D)。

[0272] 用西妥珠单抗的处理还抑制了外源性Wnt5a诱导wt-Hs578T中的YAP/TAZ表达或核定位的能力(图3E和3F)。

[0273] 用外源性Wnt5a处理两小时可以增强wt-Hs578T细胞而不是ROR1^{-/-}Hs578T细胞中的BMI1蛋白表达,但不增强BMI1 mRNA的表达(图3G和图8A),提示了Wnt5a以转录后方式上调BMI1。与Wnt5a依赖于ROR1的这种效应一致,我们注意到西妥珠单抗可以抑制Wnt5a增强wt-Hs578T中的BMI1表达的能力(图3G)。

[0274] 我们检查了用Wnt5a处理Hs578T是否可以诱导AKT的磷酸化,所述先前研究发现可以抑制BMI1的蛋白酶体降解,以促进其积累。(Kim等人,2011)Wnt5a诱导 wt-Hs578T细胞而不是ROR1^{-/-}Hs578T细胞中的AKT磷酸化(图3G)。另一方面,用对于AKT特异性的小干扰RNA或AKT的小分子抑制剂(MK-2206)处理wt-Hs578T,损害Wnt5a诱导AKT活化的能力,并且也抑制Wnt5a增强BMI1表达的能力(图3H 和图8B)。用西妥珠单抗的处理还抑制了Wnt5a诱导AKT活化或BMI1表达的能力(图 3I-3J),提示这些Wnt5a效应依赖于ROR1信号转导。

[0275] 在功能上,ROR1^{-/-}Hs578T细胞形成的球状体明显少于wt-Hs578T细胞(图3K)。另外,用外源性Wnt5a的处理可以增强wt-Hs578T细胞而不是ROR1^{-/-}Hs578T的侵袭(图3L)。最

后,ROR1^{-/-}Hs578T细胞对用紫杉醇的治疗比wt-Hs578T细胞更敏感。此外,外源性Wnt5a可以增强wt-Hs578T而不是ROR1^{-/-}Hs578T对紫杉醇的抗性(图3M)。

[0276] 西妥珠单抗抑制外源性Wnt5a增强wt-Hs578T形成球状体(图3N)或侵袭基质胶(图3O)的能力。此外,用西妥珠单抗而不是非特异性hIgG的处理增强了wt-Hs578T对紫杉醇的敏感性,并且抑制了Wnt5a增强wt-Hs578T对紫杉醇的抗性的能力(图3P)。

[0277] 西妥珠单抗抑制乳腺癌PDX的再植入

[0278] 我们检查了西妥珠单抗对表达可变水平的Wnt5a的原发性乳腺癌细胞的活性(图9A)。在共聚焦显微镜检查之前,用以50μg/ml的西妥珠单抗处理来自每个PDX的分离的肿瘤细胞共4小时。这揭示了用西妥珠单抗处理的原发性乳腺癌细胞具有的核YAP/TAZ明显少于来自用对照hIgG处理的相同PDX的肿瘤细胞(图9B)。

[0279] 时程研究揭示了西妥珠单抗而不是非特异性hIgG可以在6小时内减少BMI1的表达(图9C)。西妥珠单抗还抑制了乳腺癌PDX形成球状体或侵袭基质胶的能力(图9D-9E)。西妥珠单抗(以10mg/kg)的每两周一次静脉内输注显著压制了PDX肿瘤的发展和生长(图4A-4B和图9F)。另外,注意到的西妥珠单抗治疗(N=0/小鼠)相对于对照治疗(N=2/小鼠)的动物之间的肺转移灶数目中的差异是统计学显著的(P<0.05,斯氏t检验)。

[0280] 我们检查了从西妥珠单抗治疗的小鼠(N=4)中切除的肿瘤相对于从对照Ig治疗的小鼠(N=4)中切除的肿瘤的转录组,并且对RNA-seq数据(GSE108632)进行GSE分析。与来自对照治疗的小鼠的PDX的肿瘤细胞相比,从西妥珠单抗治疗的小鼠的PDX中分离的肿瘤细胞具有明显更低的与Rho-GTP酶、Hippo-YAP或BMI1的活化或CD44⁺/CD24^{Low}肿瘤细胞有关的基因表达(图4D)。与对照治疗的小鼠的PDX相比,西妥珠单抗治疗的小鼠的PDX也具有通过免疫印迹分析更低水平的ROR1、减少水平的与Rho-GTP酶活化有关的基因、以及更低水平的由Hippo-YAP(例如CTGF)或BMI1(例如ABCG2)靶向的基因(图4E)。与对照hIgG治疗的小鼠的肿瘤相比,西妥珠单抗治疗的小鼠的肿瘤也具有明显更低比例的荷有CSC标记物的细胞(例如CD44⁺/CD24^{Low}群体)、以及通常由CD44⁺/CD24^{Low}肿瘤细胞以高水平表达的基因的更低表达(图4F)。

[0281] 我们从用西妥珠单抗或对照-hIgG治疗的小鼠中分离了PDX的肿瘤细胞,并且检查了其在Rag2^{-/-}γc^{-/-}小鼠中形成继发性PDX的相对能力。来自西妥珠单抗治疗的小鼠的PDX的肿瘤细胞在移植小鼠中的效力显著低于来自对照治疗的动物的相同PDX的肿瘤细胞(图4G)。总体而言,这些数据指出了用西妥珠单抗的治疗可以抑制乳腺CSC的生长和自我更新。

[0282] 紫杉醇和西妥珠单抗实现了比单独的任一种更大的肿瘤清除率

[0283] 我们用以50μg/ml的西妥珠单抗或对照hIgG,将来自PDX4或PDX5的等价数目的肿瘤细胞处理过夜,然后在具有渐增浓度的紫杉醇的一式三份的分开孔中培养细胞。用西妥珠单抗的治疗明显增强了乳腺癌细胞对紫杉醇的细胞毒性效应的敏感性(例如,PDX4的IC50:用西妥珠单抗的14±1μm相对于用非特异性hIgG的23±1μm,P<0.001,斯氏t检验,图10)。

[0284] 我们用西妥珠单抗(10mg/kg)、紫杉醇(13.4mg/kg)(Desai等人,2006)、或西妥珠单抗和紫杉醇的组合治疗荷有PDX4-或PDX5的小鼠。与用单独的西妥珠单抗或紫杉醇(其各自相对于对照治疗的动物抑制肿瘤生长)的治疗相比,用西妥珠单抗和紫杉醇的治疗在减少肿瘤体积方面明显更有效(图5A)。与用单独的紫杉醇处理的肿瘤细胞相比,从用西妥珠

单抗和紫杉醇治疗的小鼠的PDX中分离的肿瘤细胞具有减少水平的ROR1、减少的Rho-GTP酶和AKT活化、减少水平的YAP/TAZ、以及更低水平的Hippo-YAP靶基因(例如CTGF)表达、更低水平的BMI1、以及BMI1靶基因(例如ABCG2)的更低表达水平(图5B)。这些数据证实了西妥昔单抗和紫杉醇的组合具有互补的抗肿瘤活性。

[0285] 我们分离了在治疗后复发的PDX的肿瘤细胞,并且检查了其重新植入免疫缺陷小鼠的能力。我们发现来自用单一试剂紫杉醇治疗的小鼠的PDX的肿瘤细胞很容易发展继发性PDX。然而,从用西妥昔单抗治疗的小鼠中回收的肿瘤细胞在发展继发性PDX 方面甚至不如从对照IgG处理的动物中回收的肿瘤细胞有效。另一方面,用从用西妥昔单抗和紫杉醇治疗的小鼠分离的肿瘤细胞植入的小鼠无一发展可检测的肿瘤(图5C)。

[0286] 在用化学疗法治疗后的肿瘤复发可能由CSC亚群驱动,所述CSC亚群对标准化学疗法是相对抗性的,并且具有自我更新和/或肿瘤起始能力。(Brooks等人,2015;Wahl 和 Spike,2017) 与这个观点一致,我们观察到与在化学疗法前获得的匹配的肿瘤样本相比,在常规化学疗法后的残留乳腺癌细胞具有更高的CSC标记物表达、以及与CSC 有关的基因(例如Hippo-YAP或BMI1靶基因)。先前研究注意到,从紫杉醇治疗的动物中分离的PDX富含具有乳腺CSC特点的细胞。(Bhola等人,2013;Samanta等人,2014) 我们发现乳腺癌在化学疗法后也富含ROR1+细胞,暗示ROR1是CSC的标记物,所述CSC似乎由化学疗法选择和/或诱导。(Wahl和Spike,2017)

[0287] 在治疗前乳腺癌活组织检查患者的基因表达数据的分析中也指出了ROR1可以充当乳腺癌CSC细胞的标记物。我们发现与ROR1^{Low}乳腺癌相比,ROR1^{Hi}乳腺癌表达更高水平的ALDH1A1以及与CSC有关的其它基因。此外,与相同肿瘤的ROR1^{Neg}细胞相比,相同肿瘤的分选的ROR1+癌细胞表达更高水平的CSC有关基因。此外,与来自相同肿瘤的ROR1^{Neg}肿瘤细胞相比,ROR1+肿瘤细胞具有更大的形成球状体、侵袭基质和植入免疫缺陷小鼠的能力。总体而言,这些研究指出了ROR1是乳腺癌CSC的标记物。

[0288] ROR1不仅是CSC的标记物,而且显然在CSC的维持中起功能性作用。我们发现与Rho-GTP酶活化有关的基因的表达在表达ROR1的乳腺癌细胞中是增加的,并且 Wnt5a可以以ROR1依赖性方式增强Rho-GTP酶活化。先前研究发现Rho GTP酶信号传导在人乳腺肿瘤中是改变的,并且Rho-GTP酶的表达和活化升高与肿瘤进展、转移和预后不良相关联(Fritz等人,1999;McHenry和Vargo-Gogola,2010) 此外,Rac1 的活化可能促进乳腺癌细胞响应超分割放射治疗的存活。(Hein等人,2016)

[0289] ROR1还促成Hippo-YAP途径的活化。YAP/TAZ是Hippo-YAP途径的重要介质,所述Hippo-YAP途径可以促进胚胎干细胞或诱导多能干细胞的干性,以及通过增加癌细胞迁移和侵袭性、对化学疗法的抗性、以及形成远处转移灶的能力来促进肿瘤发生。(Bartucci等人,2015;Chan等人,2008;Hiemer等人,2014;Mo等人,2014;Moroishi 等人,2015;Tamm等人,2011) 先前研究发现Rho-GTP酶信号传导可能指导Hippo-YAP 途径,以维持人胚胎干细胞的存活和自我更新。(Ohgushi等人,2015) 此外,ROR1 与FZD2或FZD5的共表达诱导了显著的YAP去磷酸化和TAZ积累,导致HEK293A 细胞中的Hippo-YAP信号传导的活化。(Park等人,2015) 类似地,我们发现ROR1 与原发性乳腺癌细胞中的TAZ表达和核定位有关,并且Wnt5a可以以ROR1依赖性方式增强YAP/TAZ的核积累。

[0290] 原发性乳腺癌样本中的BMI1水平也与ROR1水平相关联。Wnt5a可以在2小时内诱导

ROR1依赖性的BMI1乳腺癌细胞表达增加。BMI1的快速诱导提示了Wnt5a/ROR1 信号传导增强BMI1的转录后稳定性,这似乎依赖于AKT的活化。活化的AKT可以使 BMI1在3个高度保守的丝氨酸残基处磷酸化,导致减少的BMI1蛋白周转率。(Murga 等人,2002;Nacerddine等人,2012;Voncken等人,2005) 与这个观点一致,我们发现沉默AKT抑制Wnt5a在ROR1+乳腺癌细胞中诱导BMI1的能力。

[0291] 由于ROR1的产后表达似乎实际上局限于癌细胞 (Zhang等人,2012a),ROR1 是用于抗癌治疗的有吸引力的靶。西妥珠单抗是针对ROR1特异性的人源化单克隆抗体,其正在经历CLL患者中的临床评估。(Choi等人,2015) 先前研究发现西妥珠单抗可以抑制ROR1+CLL细胞响应Wnt5a的增殖和迁移。(Yu等人,2016) 在此处,我们证实了西妥珠单抗还可以抑制Rho-GTP酶的活化、阻遏由Hippo-YAP或BMI1靶向的基因的表达、或者在CD44+/CD24^{Low}乳腺癌CSC中上调的基因的表达,揭示了西妥珠单抗可能抑制了CSC的维持和迁移所需的信号传导。与这个观点一致,我们发现西妥珠单抗可以压制ROR1+乳腺肿瘤细胞植入免疫缺陷小鼠或形成远处转移灶的能力。此外,我们发现西妥珠单抗可以增强ROR1+肿瘤细胞在体外对用紫杉醇处理的敏感性,这可能是由于其抑制YAP/TAZ或BMI1靶基因的活化的能力,先前研究证实其可以促成药物抗性。(Kreso等人,2014;Wu等人,2011)

[0292] CSC和非CSC细胞之间的功能差异可能影响对治疗的应答以及治疗后复发的倾向。(Wahl和Spike,2017;Wang等人,2015) 这可能解释了为何在体内用西妥珠单抗和紫杉醇的组合治疗具有比单独的任一疗法更大的针对建立的PDX的活性。相应地,具有针对CSC的一种(例如西妥珠单抗)和针对非CSC的一种(例如紫杉醇)的组合疗法可以具有协同的治疗活性,潜在地提供了改善的治疗结果和乳腺癌患者的存活。

[0293] 实验模型和受试者细节

[0294] 乳腺癌样本。在医院主管部门的批准和提供签名的知情同意书的患者同意后,从中国的Peking University Shenzhen Hospital获得检查ROR1、TAZ或BMI1表达的新鲜的冷冻乳腺组织。所有方案都由Shenzhen Medical Ethics Committee的Peking University Shenzhen Hospital批准。44个匹配的福尔马林固定的石蜡包埋 (FFPE) 肿瘤组织衍生自22个患者,所述患者从2005年9月到2015年1月,在中国Sun Yat-set University Cancer Center处新近诊断出浸润性导管癌。所有患者都具有在新辅助化学疗法前的中心穿刺活组织检查或切除活组织检查。在化学疗法后,所有患者都经历手术治疗。我们检查了在新辅助化学疗法之前和之后,来自每个患者的匹配的福尔马林固定的石蜡包埋的组织。术前化学疗法由多西他赛、和/或多柔比星、和/或环磷酰胺组成。所有方案都由Sun Yat-set University Cancer Center的Medical Ethics Committee (医学伦理委员会) 批准。从患者中收集用于生成患者衍生的异种移植物的原发性乳腺样本,根据赫尔辛基宣言 (Declaration of Helsinki),按照由UC San Diego的机构审查委员会 (Institutional Review Board) 批准的方案 (HRPP#090401),所述患者提供了书面知情同意书。

[0295] 患者衍生的异种移植。遵循美国国立卫生研究院 (National Institutes of Health) (NIH) 的实验动物指南的护理和使用,在本研究中使用四至八周龄的雌性Rag2-/- γ c-/- 小鼠。UC San Diego Medical Experimental Animal Care Committee批准了研究方案。将小鼠饲养在层流柜中的无特定病原体的条件下,并且随意喂养。使用机械切碎的新鲜乳腺癌样本建立PDX。根据生产商的说明书,使用GentleMACS Dissociator (Miltenyi

Biotec),对来自这些PDX模型的原发性肿瘤组织的早期传代(P1-P5)进行机械切碎、酶促和机械解离。在Percoll™ Plus (GE Healthcare Life Sciences,CC-17-5442-01)中,经由密度梯度离心去除红细胞。

[0296] 致瘤性测定。将细胞悬浮于乳腺上皮生长培养基 (Mammary-Epithelial Growth Medium) (MEGM) 中,所述MEGM与基质胶 (BD Biosciences, San Diego, CA) 以 1:1 比率混合,然后移植到Rag2^{-/-} γ c^{-/-}小鼠的乳腺垫内。我们每周监测小鼠的肿瘤发展。在经由静脉内注射用13.4mg/kg紫杉醇治疗连续5天后,我们摘除了肿瘤,以检查肿瘤细胞的ROR1表达。为了检查转移灶,我们在移植后的42或48天时收获了来自每个治疗组的6只小鼠的肺,并且在石蜡中包埋前,用10%福尔马林固定组织。将每个石蜡块切成200-μm的切片。由委员会认证的病理学家以盲法对肿瘤病灶进行评分。为了测试单独或与紫杉醇组合的西妥昔单抗是否损害原发性乳腺肿瘤细胞的植入,将1x10⁵ 个从PDX4或PDX5中分离的单细胞注射到4至6周龄的Rag2^{-/-} γ c^{-/-}小鼠的乳腺垫内。当肿瘤大小达到300mm³时,13.4mg/kg紫杉醇静脉内注射连续5天,或/和在第0天、第7天和随后每两周一次,静脉内注射10mg/kg的西妥珠单抗。对照组用hIgG代替西妥珠单抗进行注射。使用公式 $v = (\text{长度}) \times (\text{宽度})^2 \times 0.4$ 来确定肿瘤体积 (v)。

[0297] RNA-Seq。样品制备和测序。使用Trizol RNA提取方案,由从小鼠中摘除的肿瘤组织制备总RNA,所述小鼠已用对照hIgG或西妥珠单抗进行治疗,随后为使用RNeasy 柱 (Qiagen试剂盒)的纯化。使用Agilent TapeStation评价了总RNA的质量。样品具有范围为9.2至9.9的RNA完整数 (RIN)。遵循制造商的说明书,使用Illumina的TruSeq Stranded mRNA Sample Prep Kit,由1μg RNA生成RNA文库,将剪切时间修改为5分钟。将RNA文库进行多重化,并且在Illumina HiSeq4000上,用50个碱基对 (bp) 的单端读数 (SR50) 测序至大约4000万个读数/样品的深度。我们将标准的RNA-seq分析管线应用于八个样品。简言之,在使用Cutadapt的后期测序循环中,去除衔接子,并且将读数修剪掉具有低质量得分的碱基,所述Cutadapt从高流通量测序读数中去除衔接子序列 (Marcel, 2011)。然后,我们使用STAR aligner (v2.5.2b),将读数映射到人基因组构建38。(Dobin等人,2013) RSEM (v1.3.0) (Li和Dewey,2011) 用于从读数比对和Ensembl基因模型 (v83) 中获得原始基因计数。(Yates等人,2016) 我们使用软件包DESeq2 (Love等人,2014) 将读数计数数据标准化,并且使用软件包limma (Ritchie等人,2015) 来评价差异表达。将数据保藏在GEO数据库 (GSE108632) 中。

[0298] 基因集富集分析。我们使用GSEA软件 (Subramanian等人,2005),对GEO数据库中登录号GSE87455 (Kimbung等人,2018) 和GSE21974 (Stickeler等人,2011) 下可获得的主要微阵列数据进行基因集富集分析 (GSEA)。我们还对由PDX样品生成的RNA-Seq数据进行GSEA,所述PDX样品从西妥珠单抗治疗的小鼠或对照小鼠中分离。通过其ROR1的相对表达,对基因表达数据进行排序,所述基因表达数据得自在化学疗法治疗 (Tx) GSE21974之前 (n=25) 或之后 (n=25) 获得的50个乳腺癌样品、或者得自来自GSE87455数据集的122个乳腺癌样品。在这些情况下,对于所有样品ROR1表达值高于培养基的肿瘤被指定为ROR1Hi,而ROR1表达值低于培养基值的肿瘤被指定为ROR1Low。我们使用GSEA信噪比排序度量,通过其与乳腺癌组 (ROR1Hi 相对于ROR1Low) 的关联来排序基因。我们将GSEA集中于3条途径:BIOCARTA数据库中的Rac1、途径相互作用数据库 (Pathway Interaction Database) 中的cdc42 (Liberzon等人,2011;Schaefer等人,2009)、以及Ingenuity Pathway数据库 (IPA®, QIAGEN Redwood

City,在网站qiagen.com/ingenuity处)中的RhoA。当错误发现率(FDR)小于25%时,每个基因集都被视为显著的。(Subramanian等人,2005)对于每个测试的基因集,我们确定了基因集大小(SIZE)、富集得分(ES)、标准化ES(NES)、标称p值(NOM p-val)和FDR q值(FDR q-val)。FDR q值对于基因集大小和多重假设检验进行调整。

[0299] 球状体形成测定。将300-10000个活的单细胞铺平板到Ultra Low Attachment 6孔或96孔板(Corning Incorporated Life Sciences,Corning,NY)上,并且在具有或不具有以100ng/ml的重组Wnt5a(R&D system)的MEGMTM乳腺上皮细胞生长培养基(Lonza,MD)中培养1-3周。使用倒置显微镜(Nikon,Melville,NY),对尺寸大于100 μ m的球状体进行计数。

[0300] 流式细胞术分析。用Fc阻断剂(Miltenyi Biotec)处理单细胞悬浮液,然后用荧光素缀合的抗CD44、藻红蛋白(PE)缀合的抗CD24(Pharmingen)、Alexa-647缀合的4A5(Fukuda等人,2008)、PE缀合的抗EpCAM(BD Biosciences)进行染色。根据先前描述的方法检测ALDH1活性。(Zhang等人,2014)使用FACS-Calibur或FACS-Aria(Becton Dickinson)采集数据,并且使用FlowJo软件(Tree Star)进行分析。前向光散射(FSC)和侧向光散射(SSC)门控用于排除细胞碎片。此外,我们排除了用碘化丙锭(PI,Sigma)染色的细胞,并且对由钙黄绿素紫(Life Technology)染色的细胞进行门控,用于活细胞分析。最后,对结合对于人EpCAM特异性的mAb的细胞的门控允许我们检查乳腺癌上皮细胞。

[0301] 细胞侵袭测定。将来自原发性肿瘤的 5×10^4 个活的单细胞悬浮于MEBM生长培养基(Lonza,MD)中,在侵袭室(8- μ m孔径,BD Biosciences)中铺平板,并且伴随或不伴随西妥珠单抗(50 μ g/ml)培养过夜。下部室充满了从NIH3T3细胞收集的无血清条件培养基。如所述的进行细胞系的侵袭测定。(Cui等人,2013)刮去在每个插入物的顶侧上的细胞。侵袭性细胞用4%多聚甲醛进行固定,并且通过Diff-Quick染色试剂盒(IMEB Inc,San Marcos,CA)进行染色,并且用倒置显微镜(Nikon)进行显现。

[0302] 免疫组织化学染色。对于免疫组织化学染色,从小鼠异种移植物中切除的原发性肿瘤或肺器官在福尔马林中进行固定。如所述的,制备肺组织切片,并且用苏木精和曙红(H&E)、苏木精和/或抗ROR1抗体(4A5)进行染色。(Zhang等人,2012a)使用Delta Vision显微镜收集图像。ROR1的水平在下述量表上进行评分:得分0指示样品中的癌细胞无一由抗ROR1 mAb染色;得分1指示mAb与肿瘤细胞的低水平结合、或 mAb与少于50%的肿瘤细胞的低至中等水平结合;得分2指示多于50%的肿瘤细胞上的中等水平染色、或少于50%的肿瘤细胞上的肿瘤细胞的高水平染色;得分3指示多于50%的肿瘤细胞上的肿瘤细胞的高水平染色。所有染色都由委员会认证的病理学家进行评估。

[0303] 免疫荧光染色。将细胞在盖玻片上培养至适当的密度,或在各种处理之后,通过使用细胞离心机旋转到载玻片上。细胞用4%多聚甲醛进行固定,并且用0.1%Triton X-100的PBS溶液进行渗透化处理。在细胞用PBS洗涤两次后,将它们用1%BSA的PBS溶液封闭30分钟。将对照抗体或兔抗-YAP/TAZ和小鼠4A5加入封闭缓冲液中,并且温育一个半小时。在用PBS洗涤细胞后,使它们与Alexa Fluor 594缀合的抗兔二抗、或Alexa Fluor 488缀合的抗小鼠二抗一起温育1.5小时。然后再次洗涤细胞,然后使用具有DAPI的ProLong Gold Antifade Reagent(Life Technologies)固定到载玻片上。获得图像并且通过使用Olympus FV1000共聚焦显微镜检查进行分析。通过Image J软件的强度测量分析了核定位的YAP/TAZ

的百分比。通过从总细胞的YAP/TAZ信号强度中扣除细胞溶质中的YAP/TAZ信号强度,来计算核定位的YAP/TAZ。通过将核定位的YAP/TAZ信号除以整个细胞的YAP/TAZ信号,来计算核YAP/TAZ的百分比。

[0304] BrdU掺入ELISA。将300-10,000个细胞在具有或不具有不同处理的96孔板中铺平板,并且培养三天。根据制造商的说明书,进行BrdU细胞增殖ELISA(酶联免疫吸附测定,Roche)。简言之,将BrdU加入培养基中,并且将细胞培养过夜。然后将细胞固定,在96孔板的孔中渗透化处理,并且与对于BrdU特异性的过氧化物酶缀合的抗体一起温育2小时。四甲基联苯胺(TMB)底物用于过氧化物酶检测。使用标准曲线计算活细胞的数目,所述标准曲线衍生自不同数目的通过BrdU细胞增殖ELISA测量的相同细胞。通过将具有不同处理组的活细胞数目针对不具有处理的活细胞数目标准化,来计算活细胞的百分比。

[0305] 免疫印迹分析。用于经由免疫印迹分析检查蛋白质的细胞用对照抗体或西妥珠单抗(50 μ g/ml)处理过夜,然后在补充有或未补充有重组Wnt5a(100ng/ml)的培养基中进行培养。处理的细胞或组织在补充有蛋白酶抑制剂(Pierce),含有1%NP40、0.1% SDS、0.5%脱氧钠的缓冲液中进行裂解。将大小分离的蛋白质转移到膜上,所述膜然后与对于ROR1、YAP/TAZ、BMI-1、ABCG2、pAKT AKT、 β -Actin(Cell Signaling Technology)、Rac1、RhoA、cdc42(Cytoskeleton)、CTGF(Abcam)或Wnt5a(R&D system)特异性的一抗一起温育。在洗掉未结合的抗体后,使膜与缀合至辣根过氧化物酶的二抗一起温育。然后制备印迹用于增强化学发光和放射自显影术。使用二辛可宁酸蛋白测定(Pierce)来确定蛋白质浓度。

[0306] 用于活化RhoA、Rac1和Cdc42的测定。RhoA和Rac1活化测定试剂购自Cytoskeleton,并且根据制造商的说明书使用。简言之,分别用Rhotekin-RBD或PAK-PBD珠,将GTP结合的活性RhoA、Rac1或cdc42下拉,然后经受免疫印迹分析。全细胞裂解产物的免疫印迹用于评价总RhoA、Rac1或cdc42。通过光密度测定评估条带的集成光密度(IOD),并且使用Gel-Pro Analyzer 4.0软件(Media Cybernetics)进行分析。

[0307] 定量PCR。使用Trizol(Life Technologies)提取总RNA。使10- μ g体积的总RNA与10U不含RNA酶的DNA酶I(Life Technologies)一起在37 $^{\circ}$ C下温育30分钟。RNA用RNeasy Mini Kit(QIAGEN)进一步纯化。使用200U Superscript III Reverse Transcriptase(Life Technologies),将纯化的总RNA(2 μ g)转换为cDNA。根据制造商的方案,将Taq 2 \times Master Mix(NEB)用于PCR。

[0308] CRISPR敲除ROR1。根据先前描述的方案,使用SpCas9和嵌合指导RNA表达质粒PX330(Addgene)来生成稳定的ROR1敲除细胞系。(Zhang等人,2012a) ROR1的CRISPR靶向序列(CCAGTGC GTGGCAACAAACGGCA)(SEQ ID NO:5)用CRISPR设计工具(在网站crispr.mit.edu处)进行设计。用ROR1 CRISPR质粒转染的细胞使用4A5-Alex647就ROR1进行染色,并且将ROR1阴性细胞分离并置于培养内。这个过程重复连续3次,以分离ROR1敲除细胞群体。

[0309] 人AKT的沉默。AKT siRNA购自cell signaling。根据制造商的说明书,使用lipofectaimine RNAiMAX(Invitrogen),在DMEM无血清培养基中进行所有siRNA转染,然后经受不同的测定。

[0310] 统计分析。除非另有说明,否则数据呈现为平均值 \pm 平均值的标准误(SEM)。两组之间的差异通过不配对的2尾斯氏t检验进行确定。多重组之间的差异通过Dunnett的多重

比较检验进行确定。所有小于0.05的P值都被视为显著的。用GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software Inc.)进行显著性分析。

[0311] 表1。

[0312] 下表1显示了关于来自在化学疗法之前的乳腺癌患者的ROR1^{Hi} (N=61) 相对于ROR1^{Low} (N=61)、以及ROR1^{Low} (N=61) 相对于ROR1^{Hi} (N=61) 样品,或者关于来自GSE87455数据库中接受新辅助化学疗法的患者的乳腺癌活组织检查 (N=57) 相对于匹配的治疗前样品 (N=57) 的10个干细胞基因表达标记的基因集富集 (GSE) 分析。星号指示该基因集包括ROR1。

[0313]

基因集 ^a	大小 ^a	ES ^a			NES ^a			NOM p-val ^a			FDR q-val ^a			参考文献 ^a
		ROR1 ^{Hi} 相对于 ROR1 ^{Low} _a	ROR1 ^{Low} 相对于 ROR1 ^{Hi} _a	之后 相对于 于之 前 ^a	ROR1 ^{Hi} 相对于 ROR1 ^{Low} _a	ROR1 ^{Low} 相对于 ROR1 ^{Hi} _a	之后 相对于 于之 前 ^a	ROR1 ^{Hi} 相对于 ROR1 ^{Low} _a	ROR1 ^{Low} 相对于 ROR1 ^{Hi} _a	之后 相对于 于之 前 ^a	ROR1 ^{Hi} 相对于 ROR1 ^{Low} _a	ROR1 ^{Low} 相对于 ROR1 ^{Hi} _a	之后 相对于 于之 前 ^a	
CD44 ⁺ /CD24 ^{low} MS UP ^a	106	0.63 [*]	-0.63 [*]	0.29 [*]	1.67 [*]	-1.69 [*]	1.61 [*]	0.00 [*]	0.00 [*]	0.04 [*]	0.01 [*]	0.01 [*]	0.07 [*]	(Creighton 等人, 2009) ^a
CD44 ⁺ /CD24 ^{low} MS Down ^a	233	-0.59 [*]	0.59 [*]	-0.36 [*]	-1.56 [*]	1.54 [*]	-1.73 [*]	0.00 [*]	0.00 [*]	0.02 [*]	0.02 [*]	0.02 [*]	0.02 [*]	
Es exp1 ^a	359	0.31 [*]	-0.31 [*]	-0.30 [*]	0.82 [*]	-0.83 [*]	-1.57 [*]	0.72 [*]	0.73 [*]	0.06 [*]	0.85 [*]	0.85 [*]	0.03 [*]	(Ben-Porath 等人, 2008) ^a
Es exp2 ^a	35	-0.27 [*]	0.27 [*]	-0.34 [*]	-0.71 [*]	0.71 [*]	-1.76 [*]	0.87 [*]	0.88 [*]	0.04 [*]	0.97 [*]	0.97 [*]	0.03 [*]	
Nanog 靶 ^a	913	0.31 [*]	-0.31 [*]	-0.21 [*]	1.01 [*]	-1.01 [*]	-1.57 [*]	0.41 [*]	0.39 [*]	0.00 [*]	0.43 [*]	0.43 [*]	0.04 [*]	
Oct4 靶 ^a	274	0.37 [*]	-0.37 [*]	0.16 [*]	1.19 [*]	-1.19 [*]	1.23 [*]	0.05 [*]	0.06 [*]	0.09 [*]	0.22 [*]	0.21 [*]	0.20 [*]	
Sox2 靶 ^a	678	-0.33 [*]	0.33 [*]	-0.23 [*]	-1.05 [*]	1.05 [*]	-1.62 [*]	0.25 [*]	0.26 [*]	0.00 [*]	0.41 [*]	0.38 [*]	0.03 [*]	
NOS 靶 ^a	168	0.43 [*]	-0.43 [*]	0.18 [*]	1.34 [*]	-1.33 [*]	1.27 [*]	0.01 [*]	0.02 [*]	0.09 [*]	0.13 [*]	0.09 [*]	0.24 [*]	
NOS TF ^a	37	0.55 [*]	-0.55 [*]	0.19 [*]	1.40 [*]	-1.42 [*]	1.01 [*]	0.06 [*]	0.04 [*]	0.45 [*]	0.10 [*]	0.06 [*]	0.39 [*]	
Myc 靶 1 ^a	227	0.34 [*]	-0.34 [*]	-0.22 [*]	1.03 [*]	-1.03 [*]	-1.46 [*]	0.38 [*]	0.40 [*]	0.04 [*]	0.43 [*]	0.47 [*]	0.05 [*]	
Myc 靶 2 ^a	755	-0.42 [*]	0.42 [*]	-0.29 [*]	-1.28 [*]	1.28 [*]	-1.91 [*]	0.04 [*]	0.02 [*]	0.00 [*]	0.14 [*]	0.11 [*]	0.02 [*]	

[0314] 表2。

[0315] 下表2显示了来自乳腺癌患者的肿瘤的雌激素受体和ROR1表达状态。ND指示不确定。

患者 ID	ER 和 HER2/NEU 状态	ROR1 状态
1	N.D	-
2	HER2 ⁺	+
3	ER ⁺	+
4	ER ⁺	+
5	ER ⁺	+
6	ER ⁺	-
7	ER ⁺ /PR ⁺ /HER2 ⁻	+
8	N.D	-
9	ER ⁺	+
10	ER ⁺	-
11	ER ⁺	-
12	ER ⁺	+
13	HER2 ⁺	+
14	ER ⁺	+
15	HER2 ⁺	+
16	ER ⁺	+
17	ER ⁺	+
18	ER ⁺	-
19	ER ⁺	-
20	ER ⁺	-
21	ER ⁺ /PR ⁺ /HER2 ⁻	+
22	ER ⁺	+
23	ND	+

[0316] 表3.

[0317] 下表3显示了来自接受新辅助疗法的患者的肿瘤的临床和病理学特征。CR指示完全缓解,PR指示部分缓解,而ND指示不确定。

患者编号	ER/PR/HER2 状态	治疗	应答	POR1 前	染色后
1	ER-/PR-/HER2+	多西他赛/表柔比星	PR	1	2
2	ER-/PR-/HER2-	多西他赛/表柔比星	PR	2	3
3	ER-/PR-/HER2+	多西他赛/表柔比星/环磷酰胺	PR	3	3
4	ER-/PR-/HER2+	多西他赛/表柔比星	PR	1	3
5	N.D	多西他赛/表柔比星/环磷酰胺	CR	2	2
6	N.D	多西他赛/表柔比星/环磷酰胺	PR	2	2
7	ER+/PR-/HER2-	多西他赛/表柔比星/环磷酰胺	PR	2	2
8	ER-/PR-/HER2-	多西他赛/表柔比星/环磷酰胺	CR	2	3
9	ER+/PR+/HER2-	多西他赛/表柔比星	PR	1	3
10	ER-/PR-/HER2-	多西他赛/表柔比星/环磷酰胺	PR	2	3
11	ER+/PR-/HER2-	多西他赛/表柔比星	PR	1	2
12	ER+/PR+/HER2-	多西他赛/环磷酰胺	PR	2	2
13	ER+/PR+/HER2-	多西他赛/表柔比星	PR	2	3

[0320]	14	ER+/PR-/HER2+	多西他赛/表柔比星/环磷酰胺	CR	3	3
	15	ER+/PR+/HER2-	多西他赛/表柔比星	PR	2	3
	16	ER+/PR+/HER2-	多西他赛/表柔比星/环磷酰胺	PR	1	3
	17	N.D	多西他赛/多柔比星/环磷酰胺	PR	1	0
	18	ER-/PR+/HER2-	多西他赛/表柔比星	PR	2	3
	19	N.D	多西他赛/表柔比星/环磷酰胺	PR	2	3
	20	ER+/PR+/HER2-	多西他赛/表柔比星/环磷酰胺	PR	2	2
	21	ER-/PR-/HER2+	多西他赛/表柔比星	PR	1	2
	22	ER+/PR+/HER2-	多西他赛/表柔比星/环磷酰胺	PR	2	3

[0321] 表4.

[0322] 下表4显示了用于生成每个PDX的肿瘤的临床、病理特征和CSC标记物表达的比例。

PDX ID	ER/PR/HER2 状态	组织学	P53 突变状态	治疗之前	CSC 标记物的表达		
					ALDH1 ⁺	CD44 ⁺	CD44 ⁺ /CD24 ^{Low}
PDX1	ER-/PR-/HER2+	导管癌原发性肿瘤	N/A	紫杉烷/铂/曲妥珠单抗	0.6%	1.8%	0.1%
PDX2	ER-/PR-/HER2-	导管癌原发性肿瘤	无突变	无	2.9%	63.1%	48.8%
PDX3	ER-/PR-/HER2-	混合性导管和小叶癌原发性肿瘤	P53 突变	蒽环类/紫杉烷	3.5%	76.1%	5.6%
PDX4	ER-/PR-/HER2-	导管癌原发性肿瘤	P53 突变	紫杉烷	6.5%	23.9%	2.3%
PDX5	ER+/PR-/HER2-	导管癌腋窝淋巴结	P53 突变	N/A	8.4%	85.0%	6.2%

[0324] 表5. 下表5显示了植入有从乳腺癌PDX中分离的不同细胞亚群的动物中的肿瘤发生率。

亚群	细胞数目		致瘤细胞的频率	P 值
	500	100		
CD44 ⁺ /CD24 ^{Low}	3/4	2/4	1/265	0.002
CD44 ⁺ /CD24 ⁺	0/4	0/4	1/Inf	
ALDH1 ⁺	2/5	1/5	1/800	0.04
ALDH1 ^{Neg}	0/4	0/4		

[0326] 表6.

[0327] 表7.

[0328] 表8.

[0329] 表9.

[0330] 表10.

[0331] 下表10显示了植入有ROR1Hi或ROR1Low细胞的动物中的肿瘤发生率,所述细胞从各种乳腺癌PDX各自中分离。使用ELDA软件计算致瘤细胞的频率和概率估计。N.D指示未完成。

组织 ID		细胞数目			致瘤细胞的频率	P 值
		5000	500	100		
[0332] PDX3	ROR1 ^{Low}	0/4	0/9	0/10	1/2913	<0.01
	ROR1 ^{Hi}	2/5	5/10	1/10	Inf	
PDX4	ROR1 ^{Low}	3/6	2/6	N.D	1/455	<0.001
	ROR1 ^{Hi}	6/6	4/6	N.D	1/4740	
PDX5	ROR1 ^低	N.D	1/9	0/10	1/329	<0.001

[0333] 表11.

[0334] 下表11显示了相对于GSE21974数据库中匹配的治疗前样品 (N=25), 关于 ROR1^{Low}和ROR1^{Hi}样品组 (N=25), 或者在来自接受新辅助化学疗法的患者 (N=25) 的乳腺癌活组织检查上, 关于与CD44⁺/CD24^{Low} MS、ETM、Rac1/RhoA/cdc42的活化、Hippo-YAP、BMI1有关的基因的基因集富集 (GSE) 分析。SIZE是分析中包括的基因数目。NES (标准化的富集得分) 说明了基因集大小中的差异, 并且可以用于比较跨越基因集的分析结果。NOM p-val (标称p值) 是未对于基因集大小或多重基因集测试进行调整的富集得分的统计显著性, FDR q-val (错误发现率q值) 是具有给定NES 的基因集代表假阳性的估计概率。当错误发现率 (FDR) 小于0.25时, 每个基因集被视为有意义的。

基因集	大小	ES		NES		NOM p-val		FDR q-val	
		ROR1 ^{Hi} 相 对于 ROR1 ^{Low}	之后 相对于 之前	ROR1 ^{Hi} 相 对于 ROR1 ^{Low}	之后 相对于 之前	ROR1 ^{Hi} 相 对于 ROR1 ^{Low}	之后 相对于 之前	ROR1 ^{Hi} 相 对于 ROR1 ^{Low}	之后 相对于 之前
[0335] CD44 ⁺ /CD24 ^{Low} MS	99	0.46	0.52	1.61	2.16	0.03	0.00	0.07	0.00
EMT	220	0.52	0.31	1.78	1.47	0.00	0.00	0.00	0.03
Rac1 途径	22	0.48	0.52	1.44	1.61	0.05	0.01	0.08	0.01
RhoA 途径	45	0.44	0.41	1.34	1.52	0.12	0.03	0.12	0.02
[0336] CDC42	30	0.46	0.35	1.47	1.19	0.05	0.22	0.12	0.16
Hippo-Yap	57	0.53	0.36	1.60	1.33	0.04	0.07	0.03	0.07
BMI1	143	0.32	0.42	1.17	1.90	0.20	0.00	0.20	0.00

[0337] 参考文献

[0338] Al-Hajj, M., Wicha, M.S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S.J. 和 Clarke, M.F. (2003). Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. Proc Natl Acad Sci U S A 100, 3983-3988.

[0339] Bartucci, M., Dattilo, R., Moriconi, C., Pagliuca, A., Mottotese, M., Federici, G., Benedetto, A.D., Todaro, M., Stassi, G., Sperati, F. 等人 (2015). TAZ is required for metastatic activity and chemoresistance of breast cancer stem cells. Oncogene 34, 681-690.

- [0340] Ben-Porath, I., Thomson, M.W., Carey, V.J., Ge, R., Bell, G.W., Regev, A. 和 Weinberg, R.A. (2008). An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors. *Nature genetics* 40, 499-507.
- [0341] Bhola, N.E., Balko, J.M., Dugger, T.C., Kuba, M.G., Sanchez, V., Sanders, M., Stanford, J., Cook, R.S. 和 Arteaga, C.L. (2013). TGF-beta inhibition enhances chemotherapy action against triple-negative breast cancer. *J Clin Invest* 123, 1348-1358.
- [0342] Brooks, M.D., Burness, M.L. 和 Wicha, M.S. (2015). Therapeutic Implications of Cellular Heterogeneity and Plasticity in Breast Cancer. *Cell Stem Cell* 17, 260-271.
- [0343] Chan, S.W., Lim, C.J., Guo, K., Ng, C.P., Lee, I., Hunziker, W., Zeng, Q. 和 Hong, W. (2008). A role for TAZ in migration, invasion, and tumorigenesis of breast cancer cells. *Cancer research* 68, 2592-2598.
- [0344] Chien, H.P., Ueng, S.H., Chen, S.C., Chang, Y.S., Lin, Y.C., Lo, Y.F., Chang, H.K., Chuang, W.Y., Huang, Y.T., Cheung, Y.C. 等人 (2016). Expression of ROR1 has prognostic significance in triple negative breast cancer. *Virchows Archiv: an international journal of pathology* 468, 589-595.
- [0345] Choi, M.Y., Widhopf, G.F., 2nd, Wu, C.C., Cui, B., Lao, F., Sadarangani, A., Cavagnaro, J., Prussak, C., Carson, D.A., Jamieson, C. 等人 (2015). Pre-clinical Specificity and Safety of UC-961, a First-In-Class Monoclonal Antibody Targeting ROR1. *Clinical lymphoma, myeloma & leukemia* 15 Suppl, S167-169.
- [0346] Cordenonsi, M., Zanconato, F., Azzolin, L., Forcato, M., Rosato, A., Frasson, C., Inui, M., Montagner, M., Parenti, A.R., Poletti, A. 等人 (2011). The Hippo transducer TAZ confers cancer stem cell-related traits on breast cancer cells. *Cell* 147, 759-772.
- [0347] Creighton, C.J., Li, X., Landis, M., Dixon, J.M., Neumeister, V.M., Solund, A., Rimm, D.L., Wong, H., Rodriguez, A., Herschkowitz, J.I. 等人 (2009). Residual breast cancers after conventional therapy display mesenchymal as well as tumor-initiating features. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 13820-13825.
- [0348] Cui, B., Zhang, S., Chen, L., Yu, J., Widhopf, G.F., 2nd, Fecteau, J.F., Ramenti, L.Z. 和 Kipps, T.J. (2013). Targeting ROR1 inhibits epithelial-mesenchymal transition and metastasis. *Cancer Res* 73, 3649-3660.
- [0349] Desai, N., Trieu, V., Yao, Z., Louie, L., Ci, S., Yang, A., Tao, C., De, T., Beals, B., Dykes, D. 等人 (2006). Increased antitumor activity, intratumor paclitaxel concentrations, and endothelial cell transport of cremophor-free, albumin-bound paclitaxel, ABI-007, compared with cremophor-based paclitaxel. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research* 12, 1317-1324.
- [0350] Dobin, A., Davis, C.A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S.,

Batut,P., Chaisson,M.和Gingeras,T.R. (2013) .STAR:ultrafast universal RNA-seq aligner.Bioinformatics 29,15-21.

[0351] Early Breast Cancer Trialists' Collaborative,G.,Peto,R.,Davies,C., Godwin,J.,Gray, R.,Pan,H.C.,Clarke,M.,Cutter,D.,Darby,S.,McGale,P.等人(2012) .Comparisons between different polychemotherapy regimens for early breast cancer:meta-analyses of long-term outcome among 100,000women in 123randomised trials.Lancet 379,432-444.

[0352] Fritz,G.,Just,I.和Kaina,B. (1999) .Rho GTPases are over-expressed in human tumors. International journal of cancer 81,682-687.

[0353] Fukuda,T.,Chen,L.,Endo,T.,Tang,L.,Lu,D.,Castro,J.E.,Widhopf,G.F.,2nd, Rassenti,L.Z.,Cantwell,M.J.,Prussak,C.E.等人(2008) .Antisera induced by infusions of autologous Ad-CD154-leukemia B cells identify ROR1 as an oncofetal antigen and receptor for Wnt5a. Proc Natl Acad Sci U S A 105,3047-3052.

[0354] Ginestier,C.,Hur,M.H.,Charafe-Jauffret,E.,Monville,F.,Dutcher,J., Brown,M., Jacquemier,J.,Viens,P.,Kleer,C.G.,Liu,S.等人(2007) .ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome.Cell Stem Cell 1, 555-567.

[0355] Hein,A.L.,Post,C.M.,Sheinin,Y.M.,Lakshmanan,I.,Natarajan,A.,Enke, C.A., Batra,S.K.,Ouellette,M.M.和Yan,Y. (2016) .RAC1 GTPase promotes the survival of breast cancer cells in response to hyper-fractionated radiation treatment.Oncogene 35,6319-6329.

[0356] Hiemer,S.E.,Szymaniak,A.D.和Varelas,X. (2014) .The transcriptional regulators TAZ and YAP direct transforming growth factor beta-induced tumorigenic phenotypes in breast cancer cells.J Biol Chem 289,13461-13474.

[0357] Kaur,S.,Elkahloun,A.G.,Singh,S.P.,Chen,Q.R.,Meerzaman,D.M.,Song,T., Manu,N.,Wu,W.,Mannan,P.,Garfield,S.H.等人(2016) .A function-blocking CD47 antibody suppresses stem cell and EGF signaling in triple-negative breast cancer.Oncotarget.

[0358] Kim,J.,Hwangbo,J.和Wong,P.K. (2011) .p38 MAPK-Mediated Bmi-1down-regulation and defective proliferation in ATM-deficient neural stem cells can be restored by Akt activation.PLoS One 6,e16615.

[0359] Kimbung,S.,Markholm,I.,Bjohle,J.,Lekberg,T.,von Wachenfeldt,A., Azavedo, E.,Saracco,A.,Hellstrom,M.,Veerla,S.,Paquet,E.等人(2018) .Assessment of early response biomarkers in relation to long-term survival in patients with HER2-negative breast cancer receiving neoadjuvant chemotherapy plus bevacizumab:Results from the Phase II PROMIX trial.Int J Cancer 142,618-628.

[0360] Kreso,A.,van Galen,P.,Pedley,N.M.,Lima-Fernandes,E.,Frelin,C.,Davis, T., Cao,L.,Baiazitov,R.,Du,W.,Sydorenko,N.等人(2014) .Self-renewal as a

therapeutic target in human colorectal cancer. *Nature medicine* 20,29-36.

[0361] Li, B. 和 Dewey, C.N. (2011). RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC bioinformatics* 12,323.

[0362] Li, C., Wang, S., Xing, Z., Lin, A., Liang, K., Song, J., Hu, Q., Yao, J., Chen, Z., Park, P.K. 等人 (2017). A ROR1-HER3-lncRNA signalling axis modulates the Hippo-YAP pathway to regulate bone metastasis. *Nature cell biology* 19,106-119.

[0363] Liberzon, A., Subramanian, A., Pinchback, R., Thorvaldsdottir, H., Tamayo, P. 和 Mesirov, J.P. (2011). Molecular signatures database (MSigDB) 3.0. *Bioinformatics* 27,1739-1740.

[0364] Love, M.I., Huber, W. 和 Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome biology* 15,550.

[0365] Marcel, M. (2011). Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet J* 17,10-12.

[0366] Maugeri-Sacca, M. 和 De Maria, R. (2016). Hippo pathway and breast cancer stem cells. *Critical reviews in oncology/hematology* 99,115-122.

[0367] McHenry, P.R. 和 Vargo-Gogola, T. (2010). Pleiotropic functions of Rho GTPase signaling: a Trojan horse or Achilles' heel for breast cancer treatment? *Current drug targets* 11,1043-1058.

[0368] Mo, J.S., Park, H.W. 和 Guan, K.L. (2014). The Hippo signaling pathway in stem cell biology and cancer. *EMBO reports* 15,642-656.

[0369] Moroishi, T., Hansen, C.G. 和 Guan, K.L. (2015). The emerging roles of YAP and TAZ in cancer. *Nature reviews Cancer* 15,73-79.

[0370] Murga, C., Zohar, M., Teramoto, H. 和 Gutkind, J.S. (2002). Rac1 and RhoG promote cell survival by the activation of PI3K and Akt, independently of their ability to stimulate JNK and NF-kappaB. *Oncogene* 21,207-216.

[0371] Nacerddine, K., Beaudry, J.B., Gijjala, V., Westerman, B., Mattioli, F., Song, J.Y., van der Poel, H., Ponz, O.B., Pritchard, C., Cornelissen-Steijger, P. 等人 (2012). Akt-mediated phosphorylation of Bmi1 modulates its oncogenic potential, E3 ligase activity, and DNA damage repair activity in mouse prostate cancer. *J Clin Invest* 122,1920-1932.

[0372] Ohgushi, M., Minaguchi, M. 和 Sasai, Y. (2015). Rho-Signaling-Directed YAP/TAZ Activity Underlies the Long-Term Survival and Expansion of Human Embryonic Stem Cells. *Cell Stem Cell* 17, 448-461.

[0373] Paranjape, A.N., Balaji, S.A., Mandal, T., Krushik, E.V., Nagaraj, P., Mukherjee, G. 和 Rangarajan, A. (2014). Bmi1 regulates self-renewal and epithelial to mesenchymal transition in breast cancer cells through Nanog. *BMC Cancer* 14, 785.

[0374] Park, H.W., Kim, Y.C., Yu, B., Moroishi, T., Mo, J.S., Plouffe, S.W., Meng, Z., Lin, K.C., Yu, F.X., Alexander, C.M. 等人 (2015). Alternative Wnt Signaling Activates

YAP/TAZ. Cell 162,780-794.

[0375] Ritchie, M.E., Phipson, B., Wu, D., Hu, Y., Law, C.W., Shi, W. 和 Smyth, G.K. (2015). limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. Nucleic acids research 43, e47.

[0376] Samanta, D., Gilkes, D.M., Chaturvedi, P., Xiang, L. 和 Semenza, G.L. (2014). Hypoxia-inducible factors are required for chemotherapy resistance of breast cancer stem cells. Proc Natl Acad Sci U S A 111, E5429-5438.

[0377] Schaefer, C.F., Anthony, K., Krupa, S., Buchhoff, J., Day, M., Hannay, T. 和 Buetow, K.H. (2009). PID: the Pathway Interaction Database. Nucleic Acids Res 37, D674-679.

[0378] Stickeler, E., Pils, D., Klar, M., Orłowski-Volk, M., Zur Hausen, A., Jäger, M., Watermann, D., Gitsch, G., Zeillinger, R. 和 Tempfer, C.B. (2011). Basal-like molecular subtype and HER4 up-regulation and response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. Oncol Rep 26, 1037-1045.

[0379] Su, J., Wu, S., Tang, W., Qian, H., Zhou, H. 和 Guo, T. (2015). Reduced SLC27A2 induces cisplatin resistance in lung cancer stem cells by negatively regulating Bmi1-ABCG2 signaling. Molecular carcinogenesis.

[0380] Tamayo, P., Mootha, V.K., Mukherjee, S., Ebert, B.L., Gillette, M.A., Paulovich, A., Pomeroy, S.L., Golub, T.R., Lander, E.S. 等人 (2005). Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. Proc Natl Acad Sci U S A 102, 15545-15550.

[0381] Tamm, C., Bower, N. 和 Anneren, C. (2011). Regulation of mouse embryonic stem cell self-renewal by a Yes-YAP-TEAD2 signaling pathway downstream of LIF. Journal of cell science 124, 1136-1144.

[0382] Voncken, J.W., Niessen, H., Neufeld, B., Rennefahrt, U., Dahlmans, V., Kubben, N., Holzer, B., Ludwig, S. 和 Rapp, U.R. (2005). MAPKAP kinase 3pK phosphorylates and regulates chromatin association of the polycomb group protein Bmi1. The Journal of biological chemistry 280, 5178-5187.

[0383] Wahl, G.M. 和 Spike, B.T. (2017). Cell state plasticity, stem cells, EMT, and the generation of intra-tumoral heterogeneity. NPJ Breast Cancer 3, 14.

[0384] Wang, A., Chen, L., Li, C. 和 Zhu, Y. (2015). Heterogeneity in cancer stem cells. Cancer letters 357, 63-68.

[0385] Wang, Y., Zhe, H., Ding, Z., Gao, P., Zhang, N. 和 Li, G. (2012). Cancer stem cell marker Bmi-1 expression is associated with basal-like phenotype and poor survival in breast cancer. World J Surg 36, 1189-1194.

[0386] Wiederschain, D., Chen, L., Johnson, B., Bettano, K., Jackson, D., Taraszka, J., Wang, Y.K., Jones, M.D., Morrissey, M., Deeds, J. 等人 (2007). Contribution of polycomb homologues Bmi-1 and Me1-18 to medulloblastoma pathogenesis. Molecular and cellular biology 27, 4968-4979.

[0387] Wu,X.,Liu,X.,Sengupta,J.,Bu,Y.,Yi,F.,Wang,C.,Shi,Y.,Zhu,Y.,Jiao,Q. 和 Song,F.(2011).Silencing of Bmi-1gene by RNA interference enhances sensitivity to doxorubicin in breast cancer cells.Indian journal of experimental biology 49,105-112.

[0388] Yates,A.,Akanni,W.,Amode,M.R.,Barrell,D.,Billis,K.,Carvalho-Silva,D.,Cummins,C.,Clapham,P.,Fitzgerald,S.,Gil,L.等人(2016).Ensembl 2016.Nucleic acids research 44,D710-716.

[0389] Yu,J.,Chen,L.,Cui,B.,Widhopf,G.F.,2nd,Shen,Z.,Wu,R.,Zhang,L., Zhang,S.,Briggs,S.P.和Kipps,T.J.(2015).Wnt5a induces ROR1/ROR2 heterooligomerization to enhance leukemia chemotaxis and proliferation.J Clin Invest.

[0390] Yu,J.,Chen,L.,Cui,B.,Widhopf,G.F.,2nd,Shen,Z.,Wu,R.,Zhang,L., Zhang,S.,Briggs,S.P.和Kipps,T.J.(2016).Wnt5a induces ROR1/ROR2 heterooligomerization to enhance leukemia chemotaxis and proliferation.J Clin Invest 126,585-598.

[0391] Zhang,S.,Chen,L.,Cui,B.,Chuang,H.Y.,Yu,J.,Wang-Rodriguez,J.,Tang,L.,Chen,G.,Basak,G.W.和Kipps,T.J.(2012a).ROR1 is expressed in human breast cancer and associated with enhanced tumor-cell growth.PLoS One 7,e31127.

[0392] Zhang,S.,Chen,L.,Wang-Rodriguez,J.,Zhang,L.,Cui,B.,Frankel,W.,Wu,R.和Kipps,T.J.(2012b).The onco-embryonic antigen ROR1 is expressed by a variety of human cancers.The American journal of pathology 181,1903-1910.

[0393] Zhang,S.,Cui,B.,Lai,H.,Liu,G.,Ghia,E.M.,Widhopf,G.F.,2nd,Zhang,Z.,Wu,C.C.,Chen,L.,Wu,R.等人(2014).Ovarian cancer stem cells express ROR1,which can be targeted for anti-cancer-stem-cell therapy.Proc Natl Acad Sci U S A 111,17266-17271.

[0394] 序列表

[0395] 99961.1CDR H1 (SEQ ID NO:1):GYAFTAYN

[0396] 99961.1CDR H2 (SEQ ID NO:2):FDPYDGGG

[0397] 99961.1CDR H3 (SEQ ID NO:3):GWYYFDY

[0398] 99961.1CDR L1 (SEQ ID NO:4):KSISKY

[0399] 99961.1CDR L2 (SEQ ID NO:5):SGS

[0400] 99961.1CDR L3 (SEQ ID NO:6):QQHDESPY

[0401] D10 CDR H1 (SEQ ID NO:7):GFSLTSYG

[0402] D10 CDR H2 (SEQ ID NO:8):IWAGGFT

[0403] D10 CDR H3 (SEQ ID NO:9):RGSSYSMDY

[0404] D10 CDR L1 (SEQ ID NO:10):SNVSY

[0405] D10 CDR L2 (SEQ ID NO:11):EIS

[0406] D10 CDR L3 (SEQ ID NO:12):QQWNYPLIT

[0407] GAPDH正向引物 (SEQ ID NO:13):5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3'

- [0408] GAPDH反向引物(SEQ ID NO:14):5'-GAAGATGGTGATGGGATTTTC-3'
- [0409] BMI1正向引物(SEQ ID NO:15):5'-CGTGTATTGTTTCGTTACCTGGA-3'
- [0410] BMI1反向引物(SEQ ID NO:16):5'-TTCAGTAGTGGTCTGGTCTTGT-3'
- [0411] ROR1的CRISPR靶向序列(SEQ ID NO:17):CCAGTGCGTGGCAACAAACGGCA
- [0412] P实施方案
- [0413] P实施方案1.一种治疗有此需要的受试者中的癌症的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的有丝分裂抑制剂和ROR-1拮抗剂。
- [0414] P实施方案2.一种治疗患有化学疗法抗性肿瘤的患者中的癌症的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的有丝分裂抑制剂和ROR-1拮抗剂。
- [0415] P实施方案3.一种治疗有此需要的受试者中的癌症的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的ROR-1抗体,其中所述受试者相对于标准对照表达升高水平的ROR-1,并且其中所述受试者已接受或正在接受化学疗法。
- [0416] P实施方案4.根据P实施方案1-3的方法,其中所述有丝分裂抑制剂是紫杉醇。
- [0417] P实施方案5.根据P实施方案1-3的方法,其中所述ROR-1拮抗剂是西妥珠单抗。
- [0418] P实施方案6.根据P实施方案1-3的方法,其中所述癌症是乳腺癌。
- [0419] P实施方案7.一种药物组合物,其包含药学有效量的有丝分裂抑制剂和ROR-1抗体。
- [0420] P实施方案8.P实施方案7的药物组合物,其中所述有丝分裂抑制剂和所述ROR-1抗体以组合的协同量存在,并且其中所述组合的协同量有效治疗有此需要的受试者中的癌症。
- [0421] 实施方案
- [0422] 实施方案1.一种治疗有此需要的受试者中的化药抗性癌症的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的化学治疗剂、以及治疗有效量的酪氨酸激酶样孤儿受体 1 (ROR-1) 拮抗剂,从而治疗所述受试者中的化药抗性癌症。
- [0423] 实施方案2.实施方案1的方法,其包括在所述施用之前,检测所述受试者中的ROR-1水平。
- [0424] 实施方案3.实施方案1或2的方法,其中所述受试者正在接受或已接受化学疗法。
- [0425] 实施方案4.实施方案1-3中任何一个的方法,其中所述化药抗性癌症是化药抗性乳腺癌。
- [0426] 实施方案5.实施方案1-4中任何一个的方法,其进一步包括在所述施用之前,选择相对于标准对照表达增加水平的ROR-1的受试者。
- [0427] 实施方案6.实施方案1-5中任何一个的方法,其中所述化学治疗剂是植物生物碱、抗肿瘤抗生素或拓扑异构酶抑制剂。
- [0428] 实施方案7.实施方案1-6中任何一个的方法,其中所述化学治疗剂是紫杉醇或多西他赛。
- [0429] 实施方案8.实施方案1-6中任何一个的方法,其中所述化学治疗剂是多柔比星或表柔比星。
- [0430] 实施方案9.实施方案1-8中任何一个的方法,其中所述ROR-1拮抗剂是抗体或小分子。

- [0431] 实施方案10.实施方案1-9中任何一个的方法,其中所述ROR-1拮抗剂是抗ROR-1抗体。
- [0432] 实施方案11.实施方案10的方法,其中所述抗体包含人源化重链可变区和人源化轻链可变区,其中所述人源化重链可变区包含SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3中所示的序列;并且其中所述人源化轻链可变区包含SEQ ID NO:4、SEQ ID NO: 5和SEQ ID NO:6中所示的序列。
- [0433] 实施方案12.实施方案10或11的方法,其中所述抗体是西妥珠单抗。
- [0434] 实施方案13.实施方案10的方法,其中所述抗体包含人源化重链可变区和人源化轻链可变区,其中所述人源化重链可变区包含SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:9中所示的序列;并且其中所述人源化轻链可变区包含SEQ ID NO:10、SEQ ID NO: 11和SEQ ID NO:12中所示的序列。
- [0435] 实施方案14.实施方案1-13中任何一个的方法,其中所述化学治疗剂和所述ROR-1拮抗剂以组合的协同量施用。
- [0436] 实施方案15.实施方案1-14中任何一个的方法,其中所述化学治疗剂和所述。
- [0437] 实施方案16.实施方案1-15中任何一个的方法,其中所述ROR-1拮抗剂在第一时间点施用,而所述化学治疗剂在第二时间点施用,其中所述第一时间点先于所述第二时间点。
- [0438] 实施方案17.实施方案1-16中任何一个的方法,其中所述化学治疗剂和所述ROR-1拮抗剂在施用之前进行混合。
- [0439] 实施方案18.实施方案1-17中任何一个的方法,其中所述化学治疗剂是紫杉醇。
- [0440] 实施方案19.实施方案1-18中任何一个的方法,其中所述化学治疗剂以约5 mg/kg、10mg/kg、11mg/kg、12mg/kg、13mg/kg、14mg/kg或15mg/kg的量施用。
- [0441] 实施方案20.实施方案1-19中任何一个的方法,其中所述化学治疗剂以约13mg/kg的量施用。
- [0442] 实施方案21.实施方案1-20中任何一个的方法,其中所述化学治疗剂以13.4mg/kg的量施用。
- [0443] 实施方案22.实施方案1-21中任何一个的方法,其中所述ROR-1拮抗剂以约1 mg/kg、2mg/kg、3mg/kg、5mg/kg或10mg/kg的量施用。
- [0444] 实施方案23.实施方案1-22中任何一个的方法,其中所述ROR-1拮抗剂以约2 mg/kg的量施用。
- [0445] 实施方案24.实施方案1-23中任何一个的方法,其中所述化学治疗剂以13.4mg/kg的量施用,并且所述ROR-1拮抗剂以约2mg/kg施用。
- [0446] 实施方案25.实施方案1-24中任何一个的方法,其中在至少14天的过程中每天施用所述化学治疗剂。
- [0447] 实施方案26.实施方案1-25中任何一个的方法,其中在约28天的过程中每天施用所述化学治疗剂。
- [0448] 实施方案27.实施方案1-26中任何一个的方法,其中在约28天的过程中施用一次所述ROR-1拮抗剂。
- [0449] 实施方案28.实施方案1-27中任何一个的方法,其中所述化学治疗剂是静脉内施用的。

- [0450] 实施方案29. 实施方案1-28中任何一个的方法, 其中所述ROR-1拮抗剂是静脉内施用的。
- [0451] 实施方案30. 实施方案1-29中任何一个的方法, 其中所述受试者是哺乳动物。
- [0452] 实施例31. 实施方案1-30中任何一个的方法, 其中所述受试者是人。
- [0453] 实施方案32. 一种治疗有此需要的受试者中的乳腺癌的方法, 所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的化学治疗剂、以及治疗有效量的酪氨酸激酶样孤儿受体1 (ROR-1) 拮抗剂, 从而治疗所述受试者中的化药抗性乳腺癌。
- [0454] 实施方案33. 一种药物组合物, 其包含 (i) 选自植物生物碱、抗肿瘤抗生素和拓扑异构酶抑制剂的化学治疗剂, (ii) ROR-1拮抗剂和 (iii) 药学上可接受的赋形剂。
- [0455] 实施方案34. 一种药物组合物, 其包含 (i) 选自植物生物碱、抗肿瘤抗生素和拓扑异构酶抑制剂的化学治疗剂, (ii) 抗ROR-1抗体和 (iii) 药学上可接受的赋形剂, 其中所述化学治疗剂和抗ROR-1抗体以组合的协同量存在, 其中所述组合的协同量有效治疗有此需要的受试者中的乳腺癌。
- [0456] 实施方案35. 实施方案33或34的药物组合物, 其中所述化学治疗剂是植物生物碱。
- [0457] 实施方案36. 实施方案33-35中任何一个的药物组合物, 其中所述化学治疗剂紫杉醇。
- [0458] 实施方案37. 实施方案33-36中任何一个的药物组合物, 其中所述ROR-1拮抗剂是抗体或小分子。
- [0459] 实施方案38. 实施方案33-37中任何一个的药物组合物, 其中所述ROR-1拮抗剂是抗ROR-1抗体。
- [0460] 实施方案39. 实施方案38的药物组合物, 其中所述抗体包含人源化重链可变区和人源化轻链可变区, 其中所述人源化重链可变区包含SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2 和SEQ ID NO:3中所示的序列; 并且其中所述人源化轻链可变区包含SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6中所示的序列。
- [0461] 实施方案40. 实施方案38的药物组合物, 其中所述抗体是西妥珠单抗。

序列表

<110> 加利福尼亚大学董事会
<120> 化药抗性癌症的组合治疗
<130> 048537-605001W0
<150> US 62/641,035
<151> 2018-03-09
<160> 17
<170> PatentIn version 3.5
<210> 1
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成多肽
<400> 1

Gly Tyr Ala Phe Thr Ala Tyr Asn
1 5

<210> 2
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成多肽
<400> 2

Phe Asp Pro Tyr Asp Gly Gly Ser
1 5

<210> 3
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成多肽
<400> 3

Gly Trp Tyr Tyr Phe Asp Tyr
1 5

<210> 4
<211> 6
<212> PRT

<213> 人工序列
<220>
<223> 合成多肽
<400> 4
Lys Ser Ile Ser Lys Tyr
1 5
<210> 5
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成多肽
<400> 5
Ser Gly Ser
1
<210> 6
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成多肽
<400> 6
Gln Gln His Asp Glu Ser Pro Tyr
1 5
<210> 7
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成多肽
<400> 7
Gly Phe Ser Leu Thr Ser Tyr Gly
1 5
<210> 8
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成多肽

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

<210> 9
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成多肽

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

<210> 10
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成多肽

<400> 10
Ser Asn Val Ser Tyr
1 5

<210> 11
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成多肽

<400> 11
Glu Ile Ser
1

<210> 12
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成多肽

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

<210> 13
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> GAPDH正向引物
<400> 13
gaaggtgaag gtcggagtc 19
<210> 14
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> GAPDH反向引物
<400> 14
gaagatggtg atgggatttc 20
<210> 15
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> BMI1正向引物
<400> 15
cgtgtattgt tcgttacctg ga 22
<210> 16
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> BMI1反向引物
<400> 16
ttcagtagtg gtctggtcctt gt 22
<210> 17
<211> 23
<212> DNA
<213> 智人
<400> 17
ccagtgcgtg gcaacaaacg gca 23

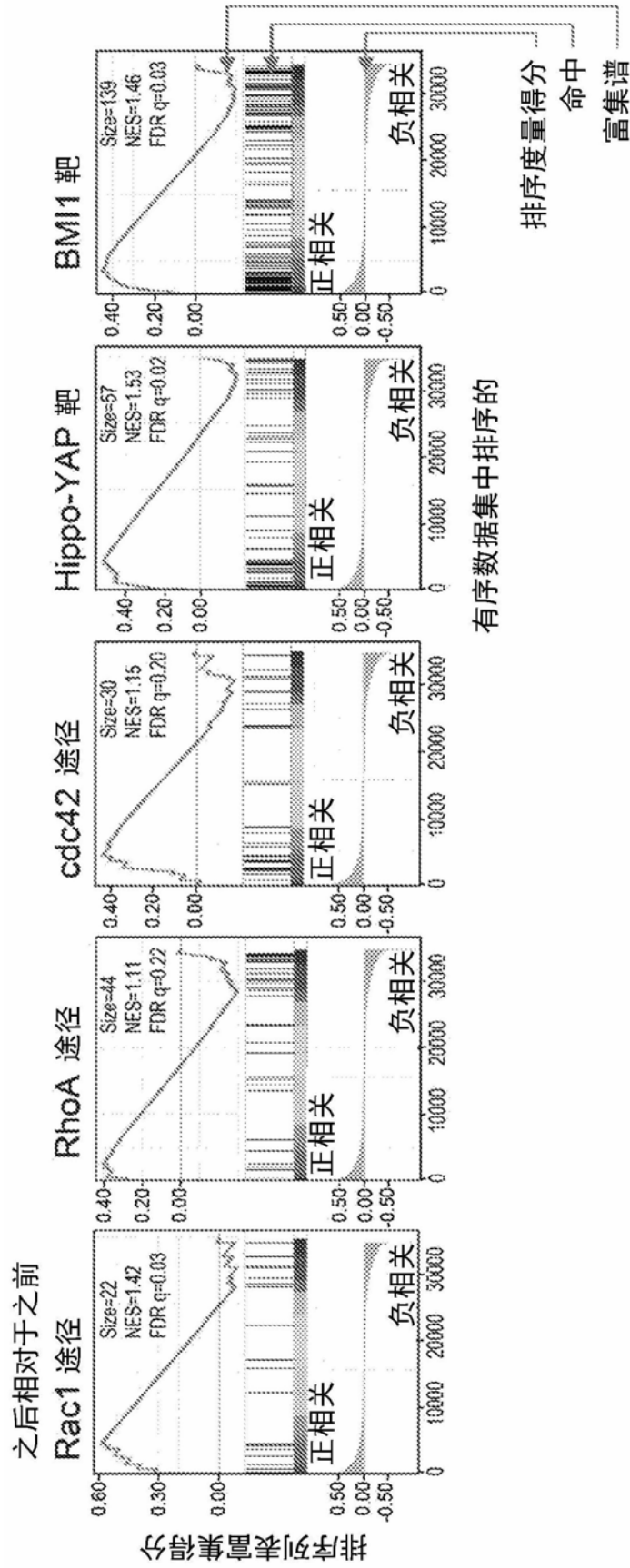


图1A

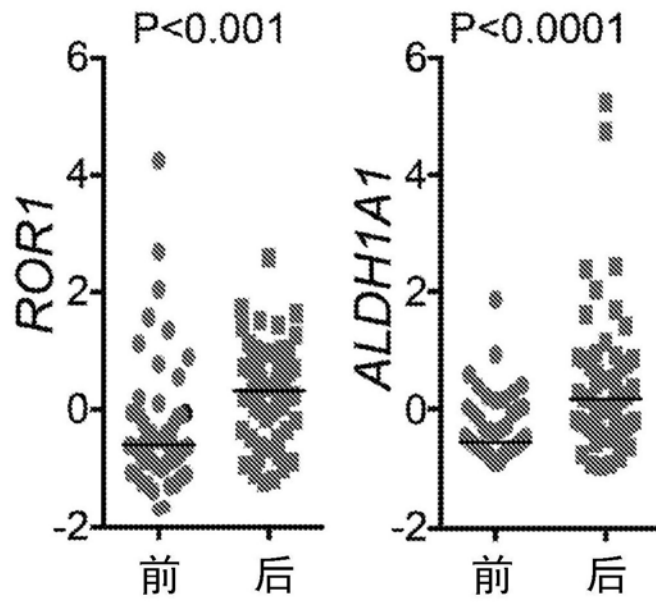


图1B

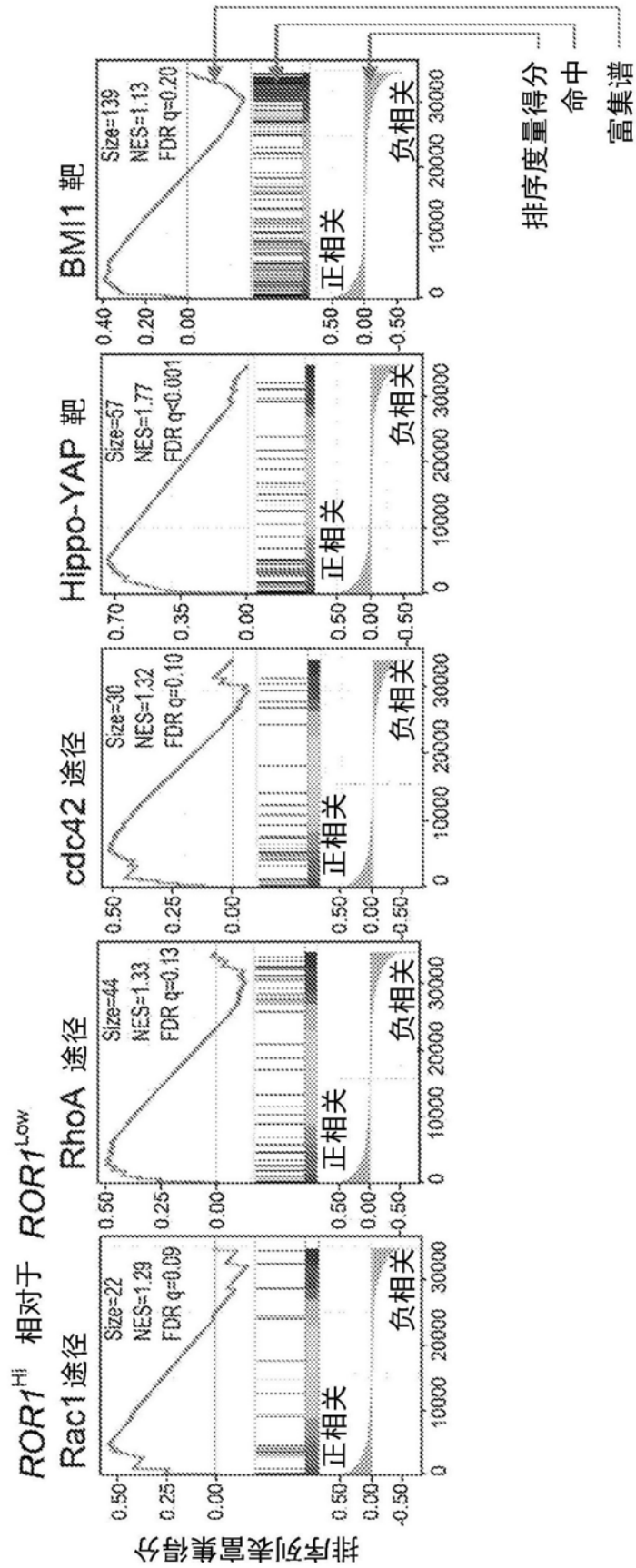


图1C

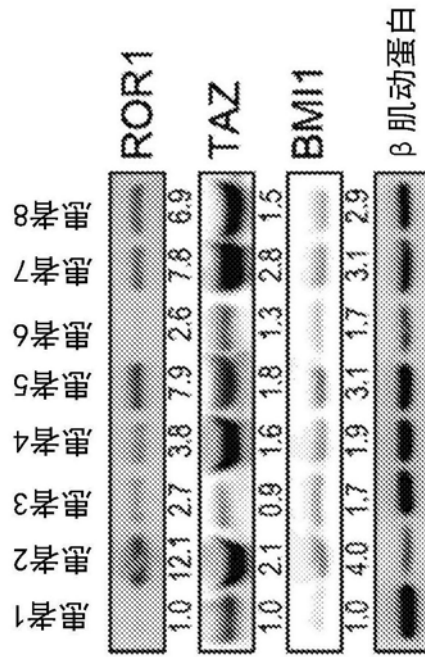


图1D

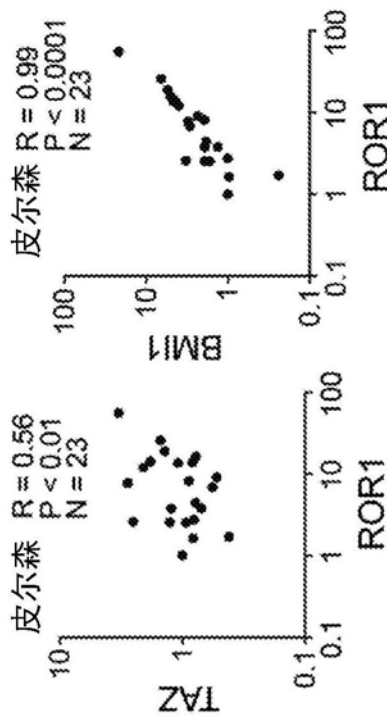


图1E

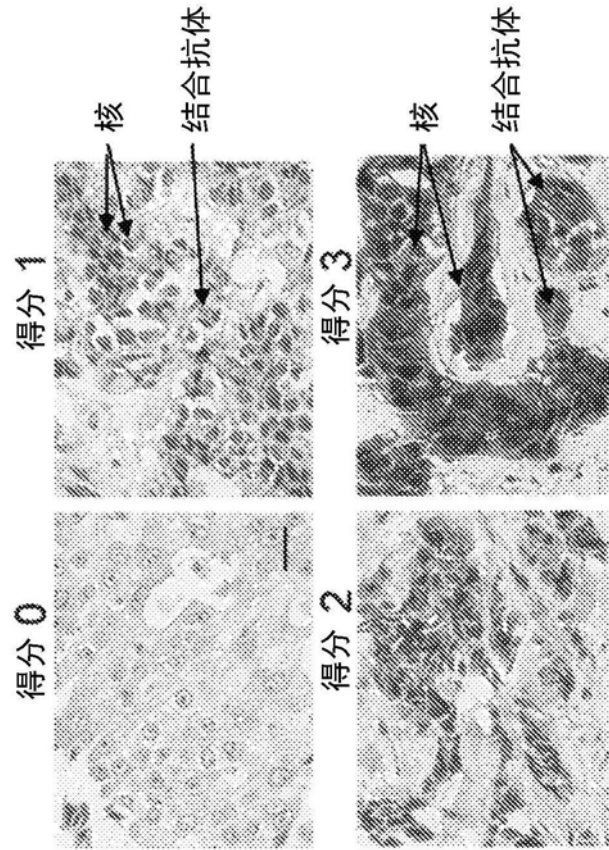


图1F

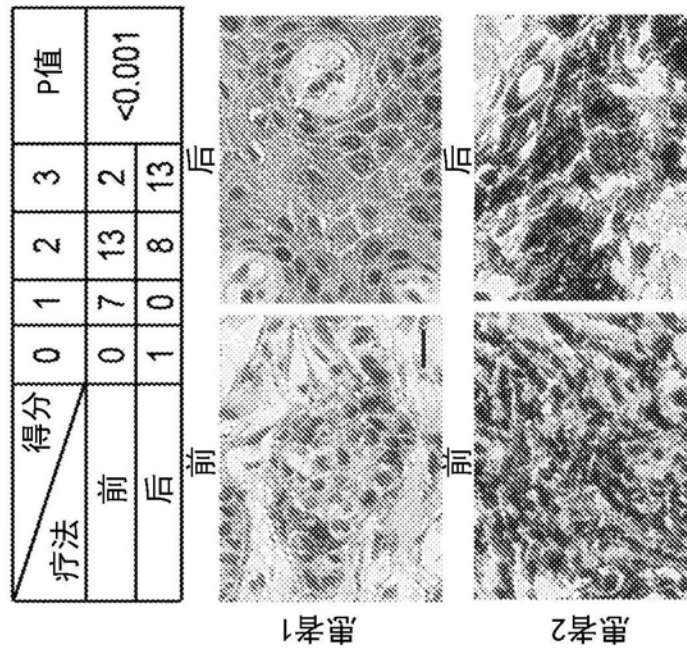


图1G

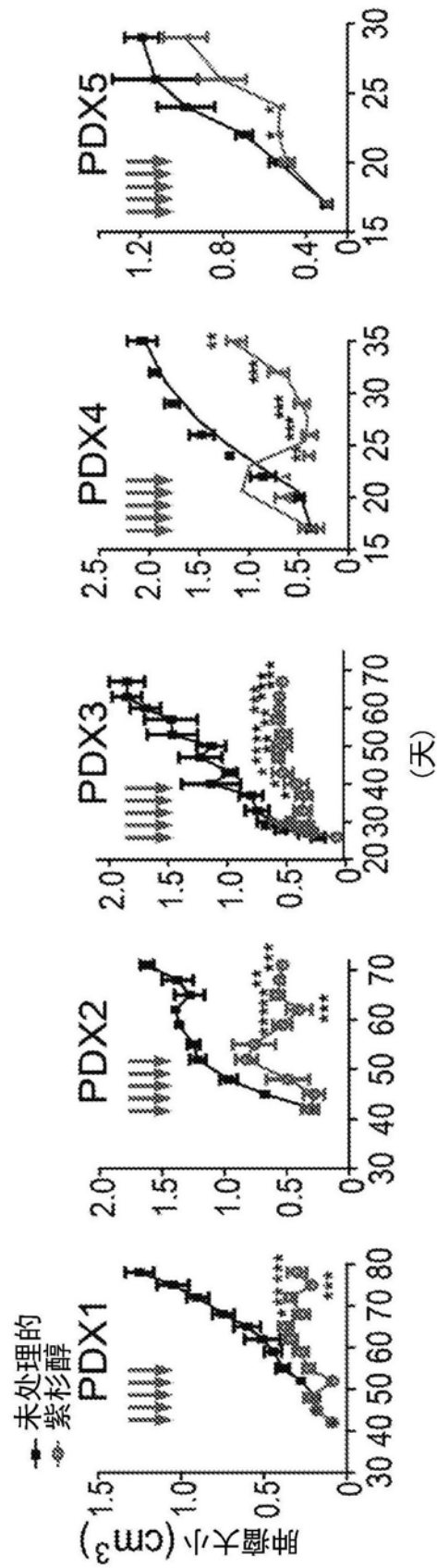


图2A

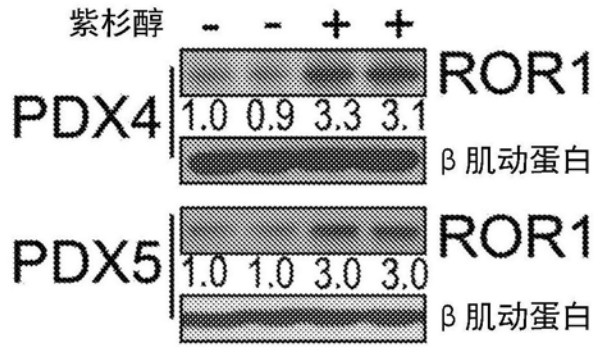


图2B

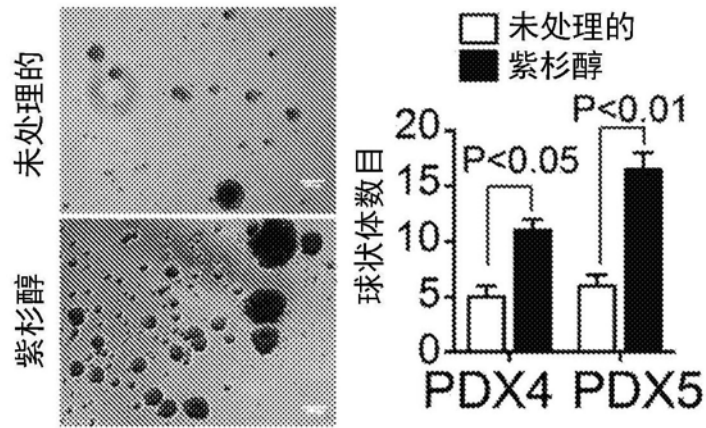


图2C

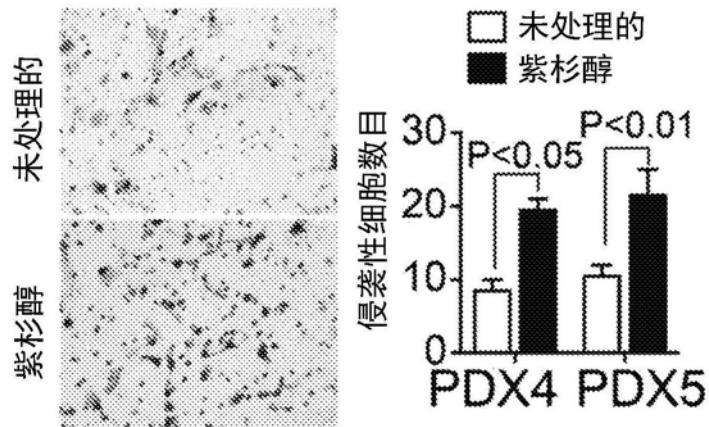
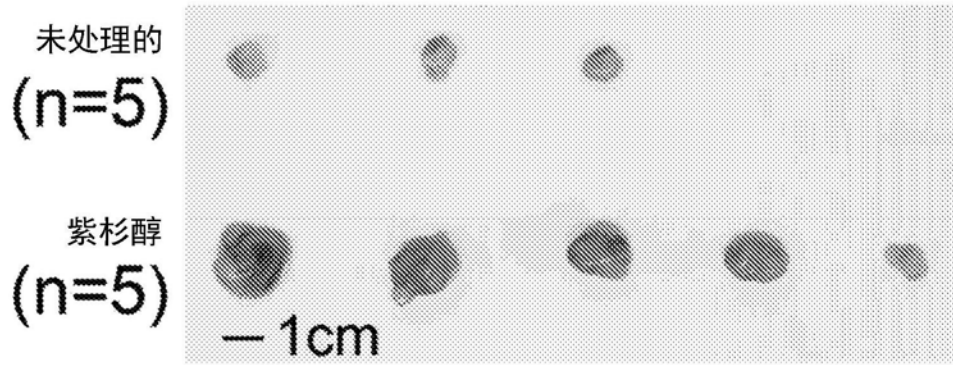


图2D



组织ID	处理	细胞数目		致瘤细胞的频率	P值
		10 ⁴	10 ³		
PDX4	未处理的	3/5	0/5	1/12683	0.0002
	紫杉醇	5/5	4/5	1/622	
PDX5	未处理的	4/5	0/5	1/7697	0.002
	紫杉醇	5/5	4/5	1/622	

图2E

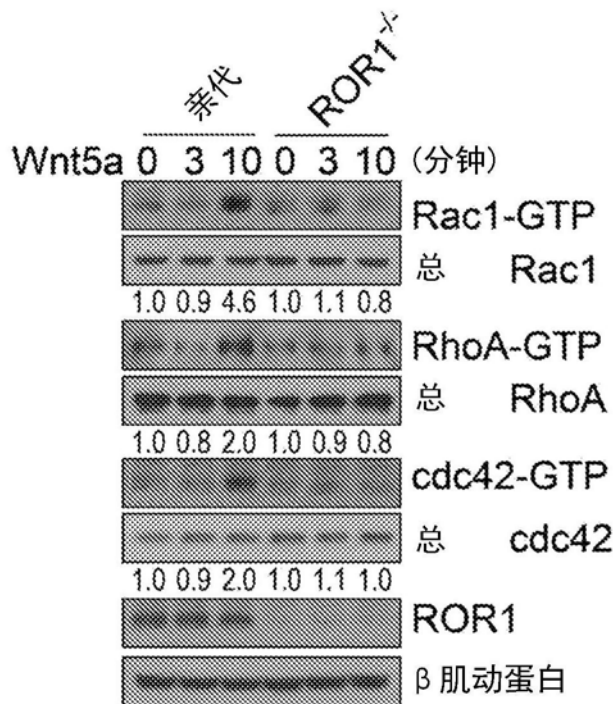


图3A

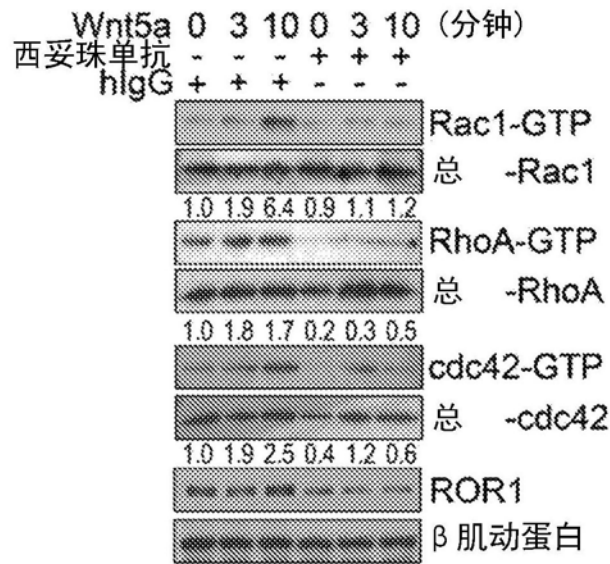


图3B

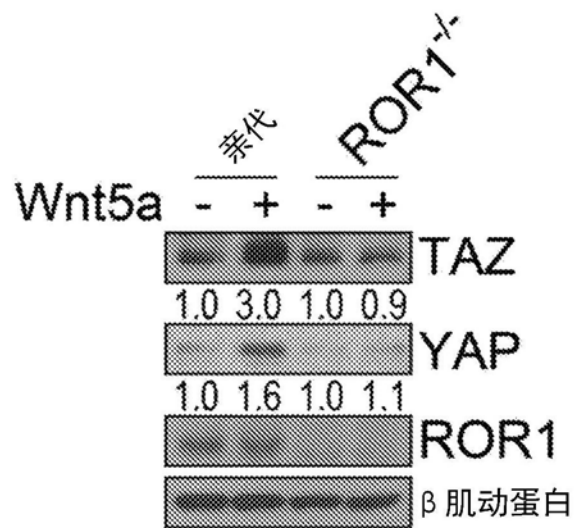


图3C

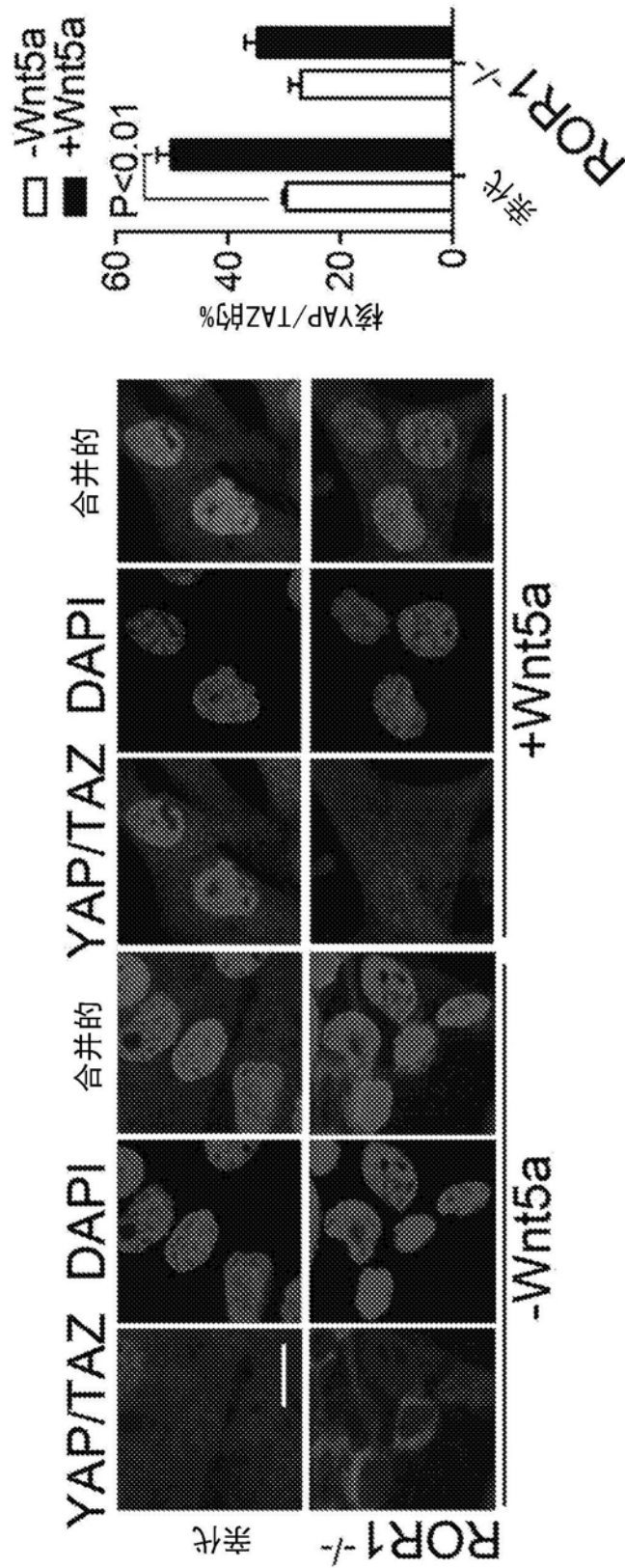


图3D

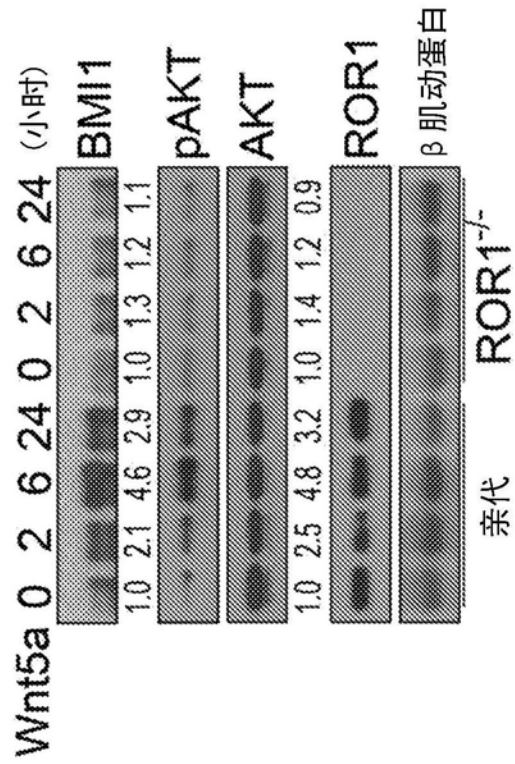


图3E

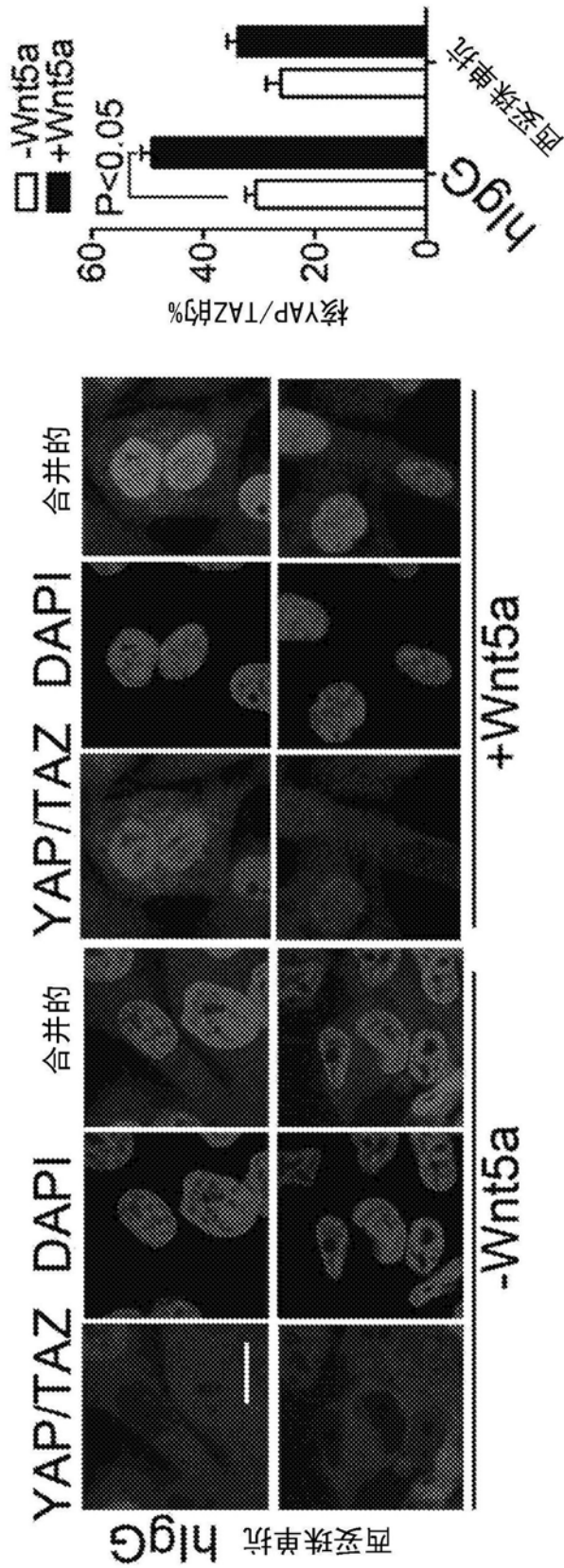


图3F

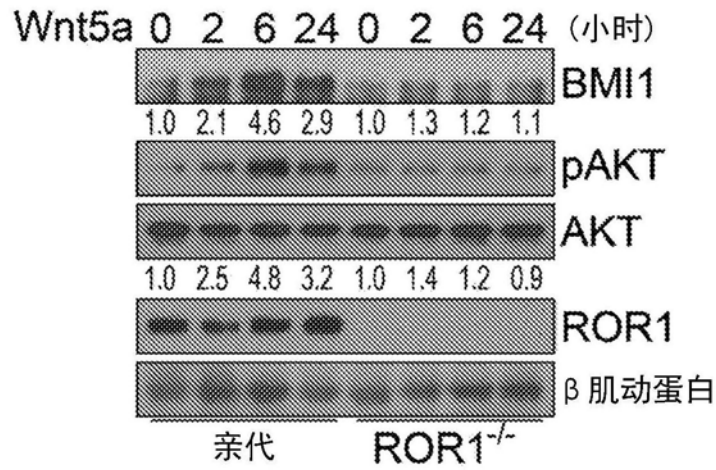


图3G

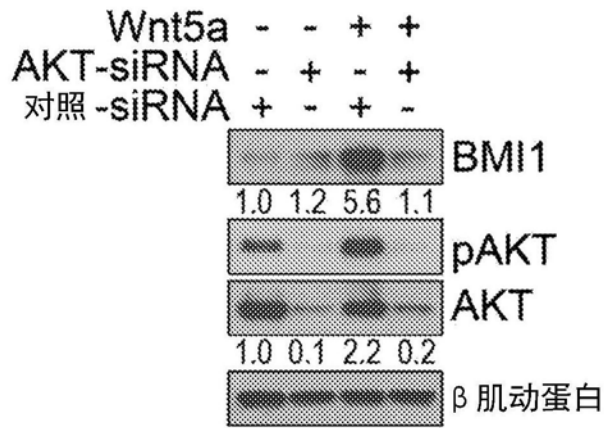


图3H

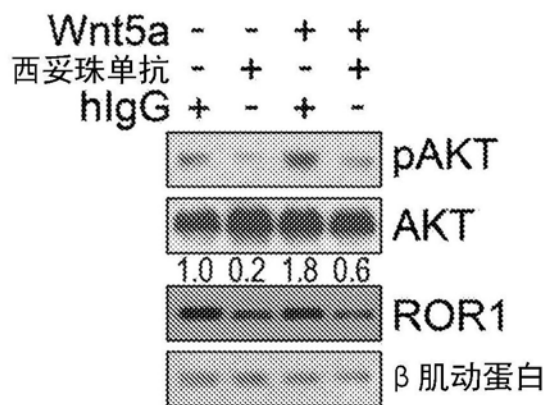


图3I

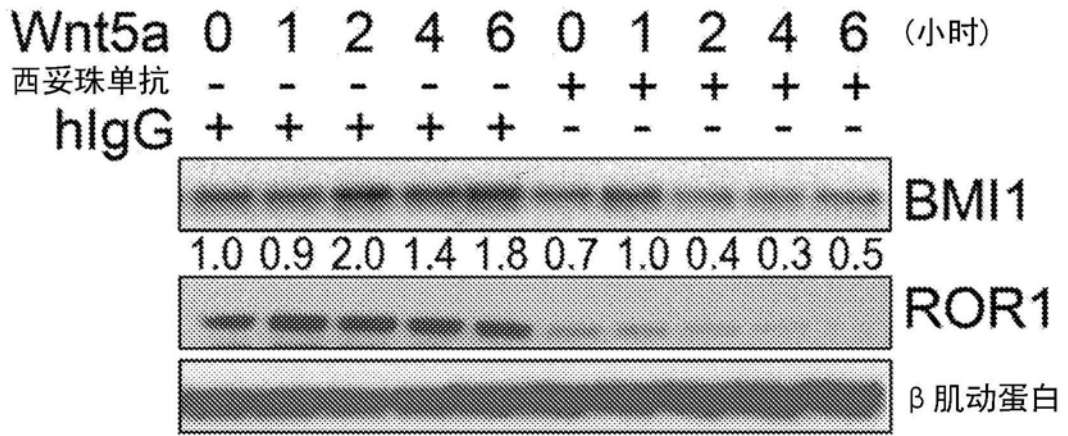


图3J

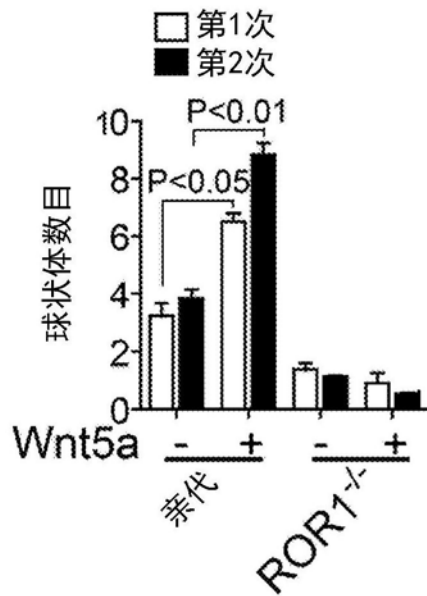


图3K

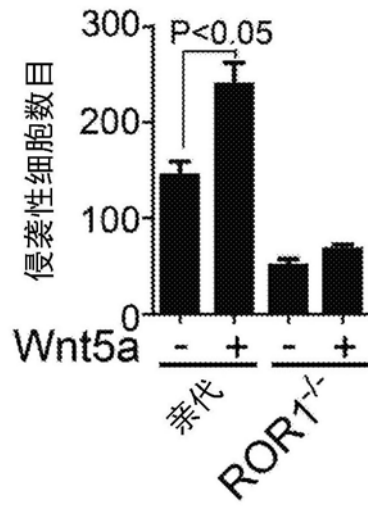


图3L

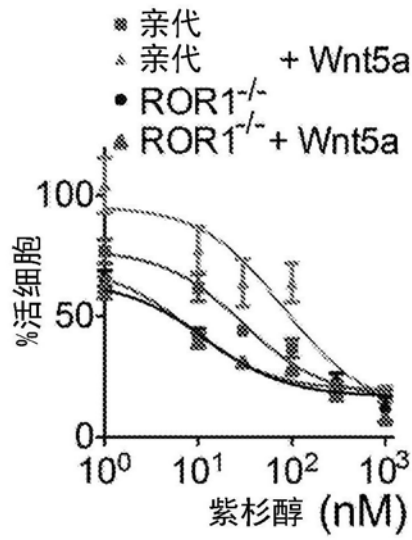


图3M

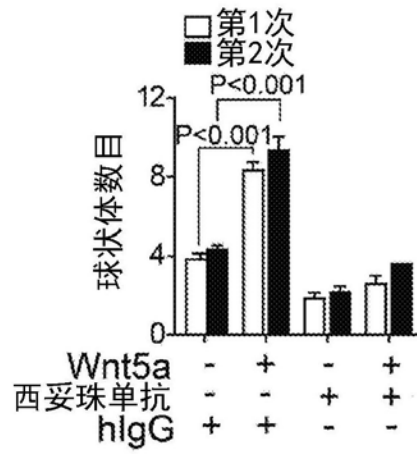


图3N

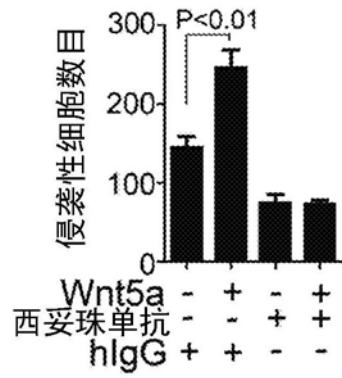


图3O

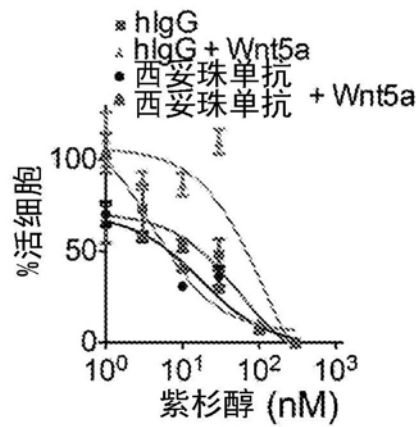


图3P

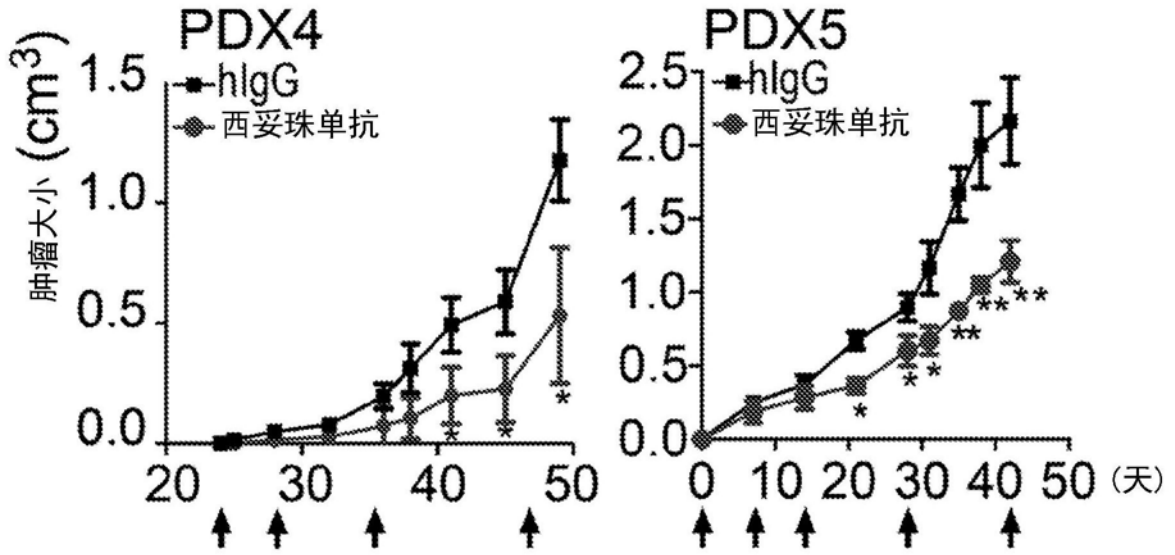


图4A

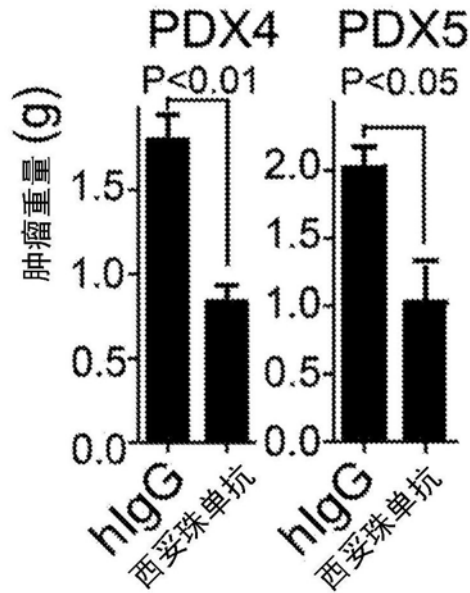


图4B

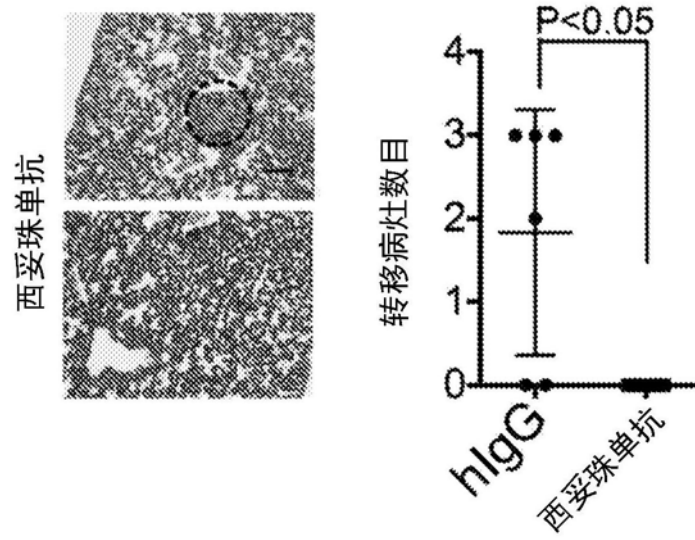


图4C

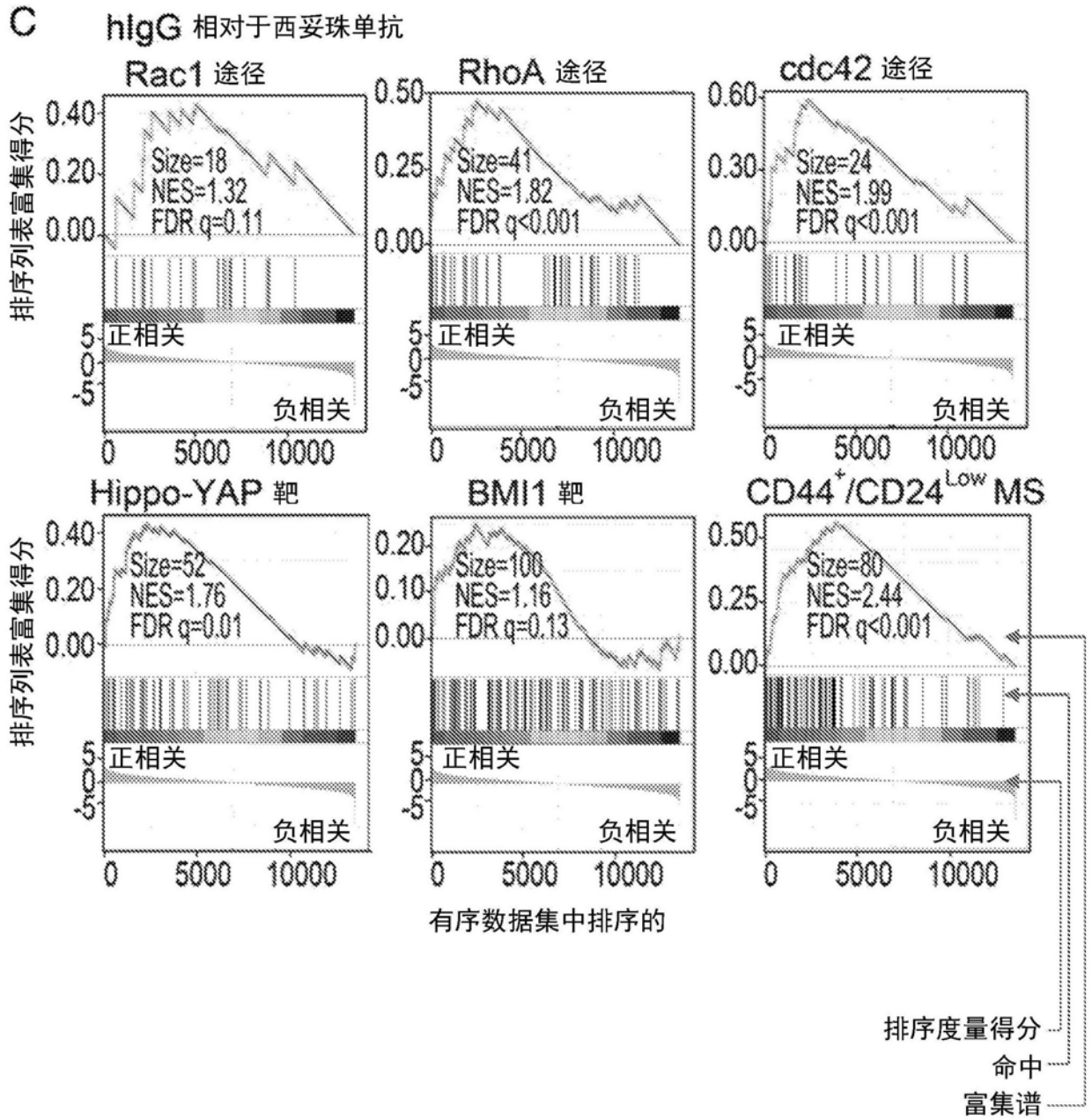


图4D

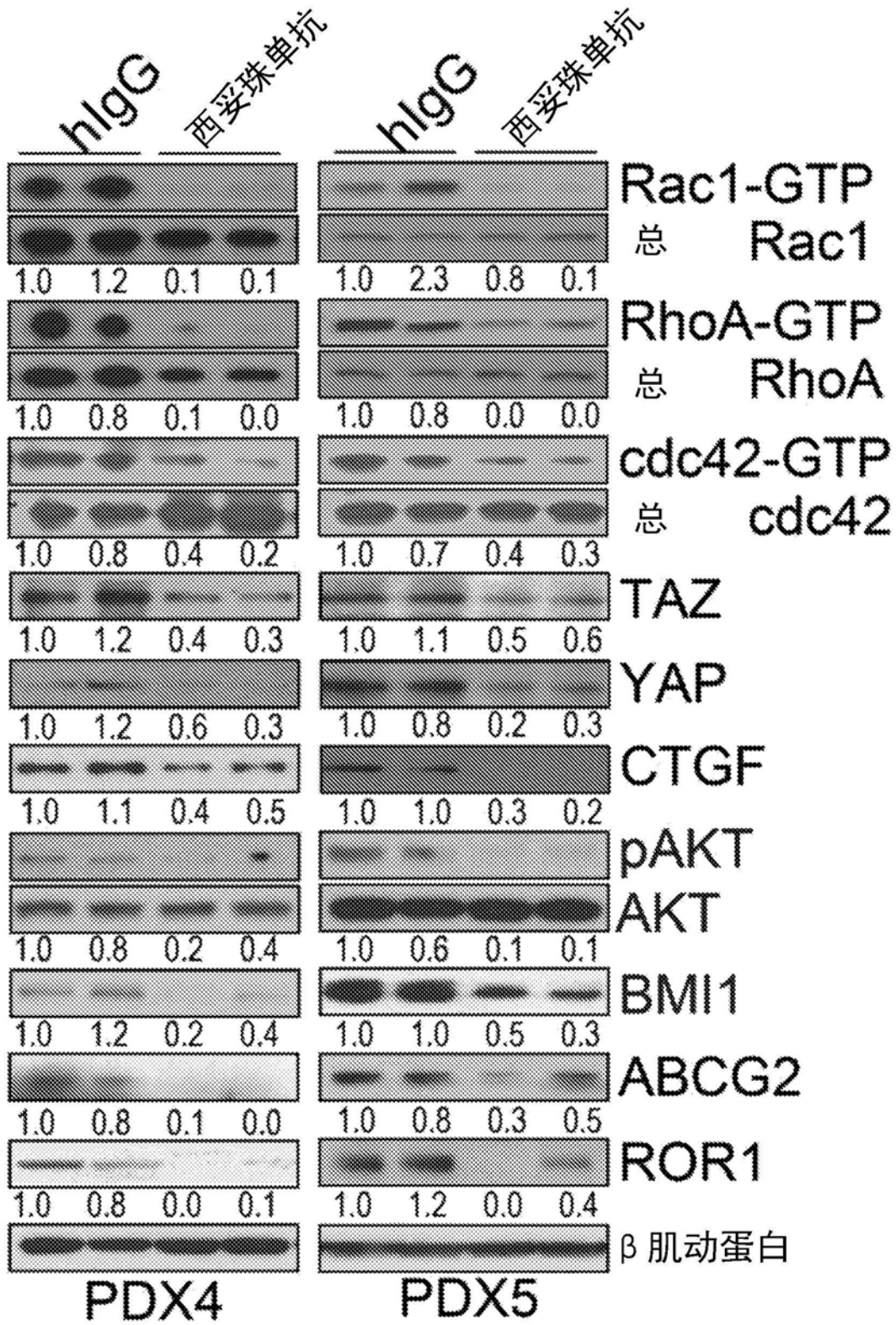


图4E

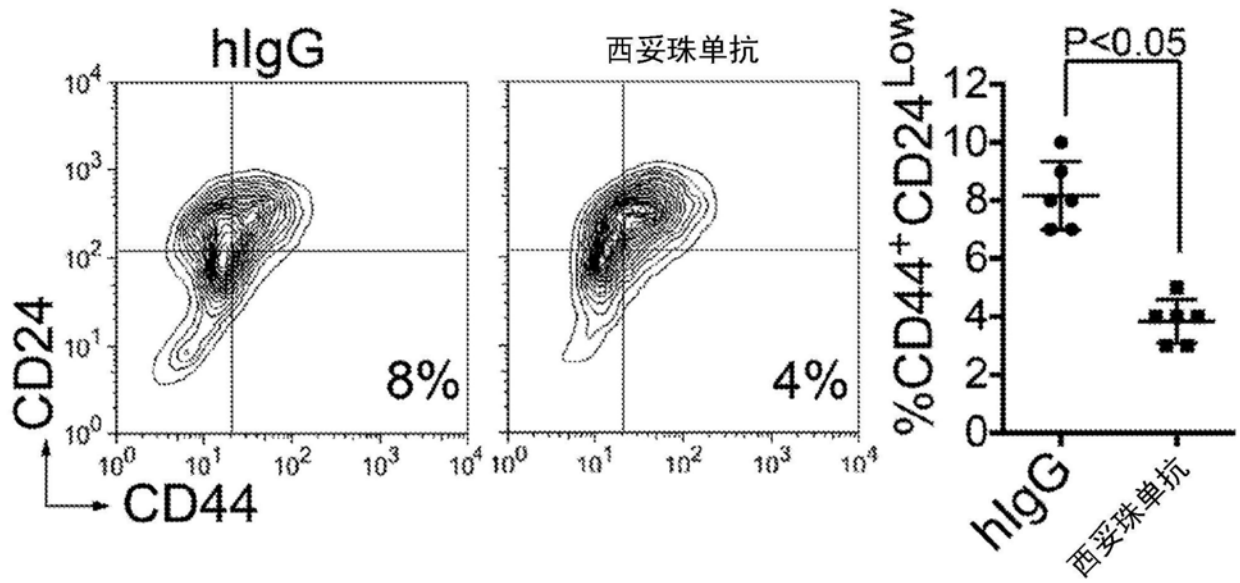


图4F

	处理	细胞数目			致瘤细胞的频率	P值
		1X10 ⁵	1X10 ⁴	1X10 ³		
PDX4	hlgG	10/10	10/10	0/5	1/3285	8.61e-13
	西妥珠单抗	2/10	1/10	0/5	1/247052	
PDX5	hlgG	N.D	5/5	2/4	1/1420	0.001
	西妥珠单抗	N.D	1/5	1/3	1/23572	

图4G

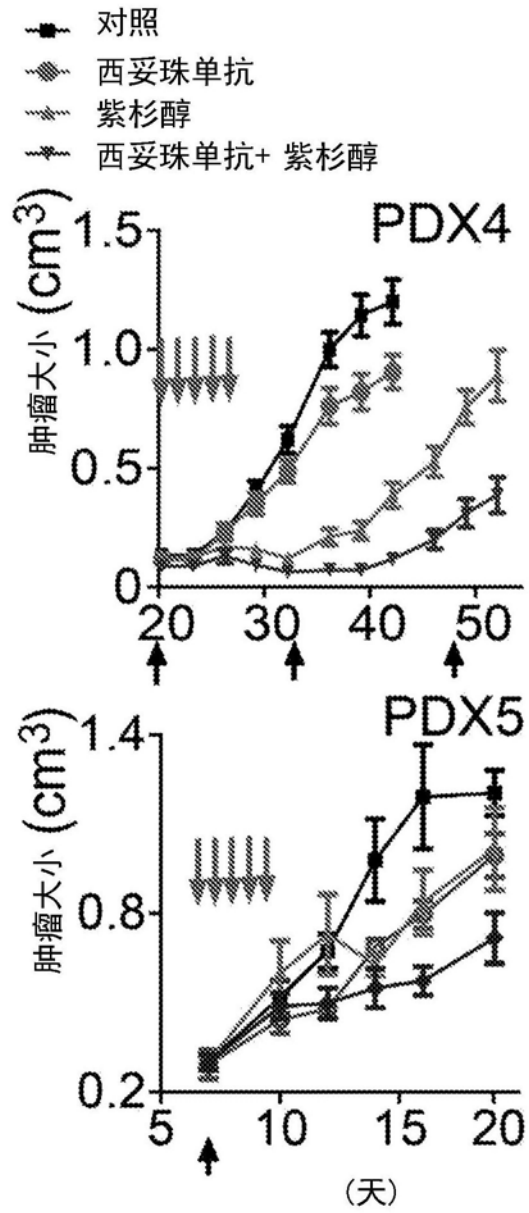


图5A

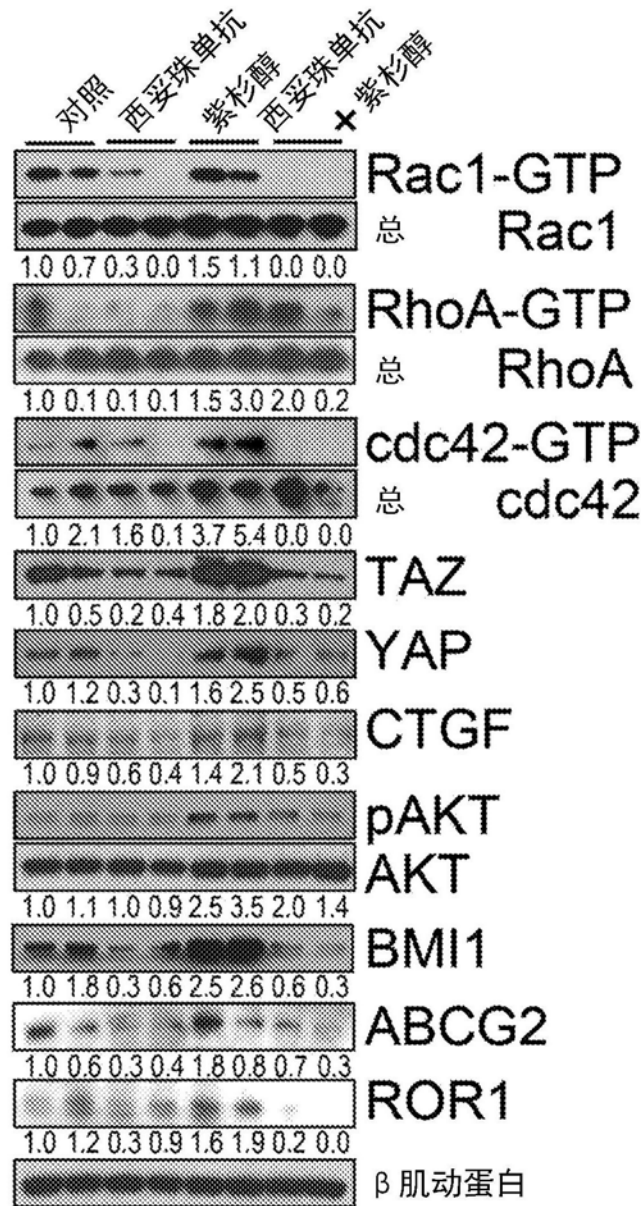


图5B

处理	细胞数目			
	PDX4		PDX5	
	1X10 ⁵	1X10 ⁴	1X10 ⁵	1X10 ⁴
对照	5/5	5/5	5/5	5/5
西妥珠单抗	2/5	1/5	3/5	2/5
紫杉醇	5/5	5/5	4/5	3/3
西妥珠单抗 +紫杉醇	0/5	0/4	0/5	0/3

第2次移植

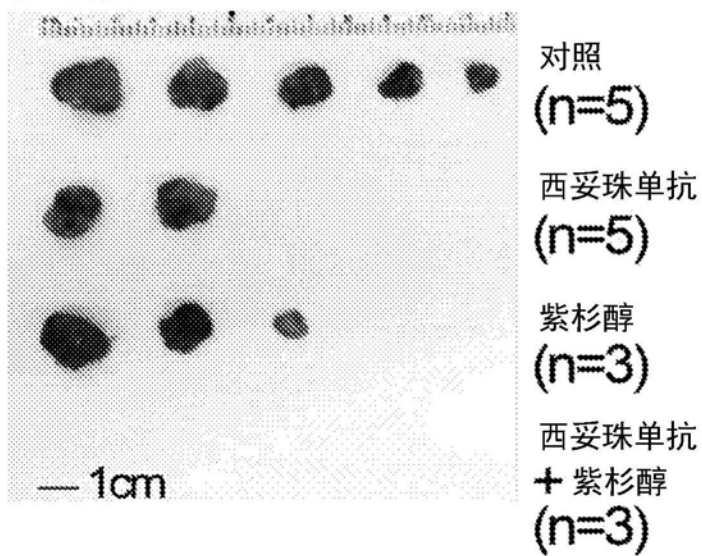


图5C

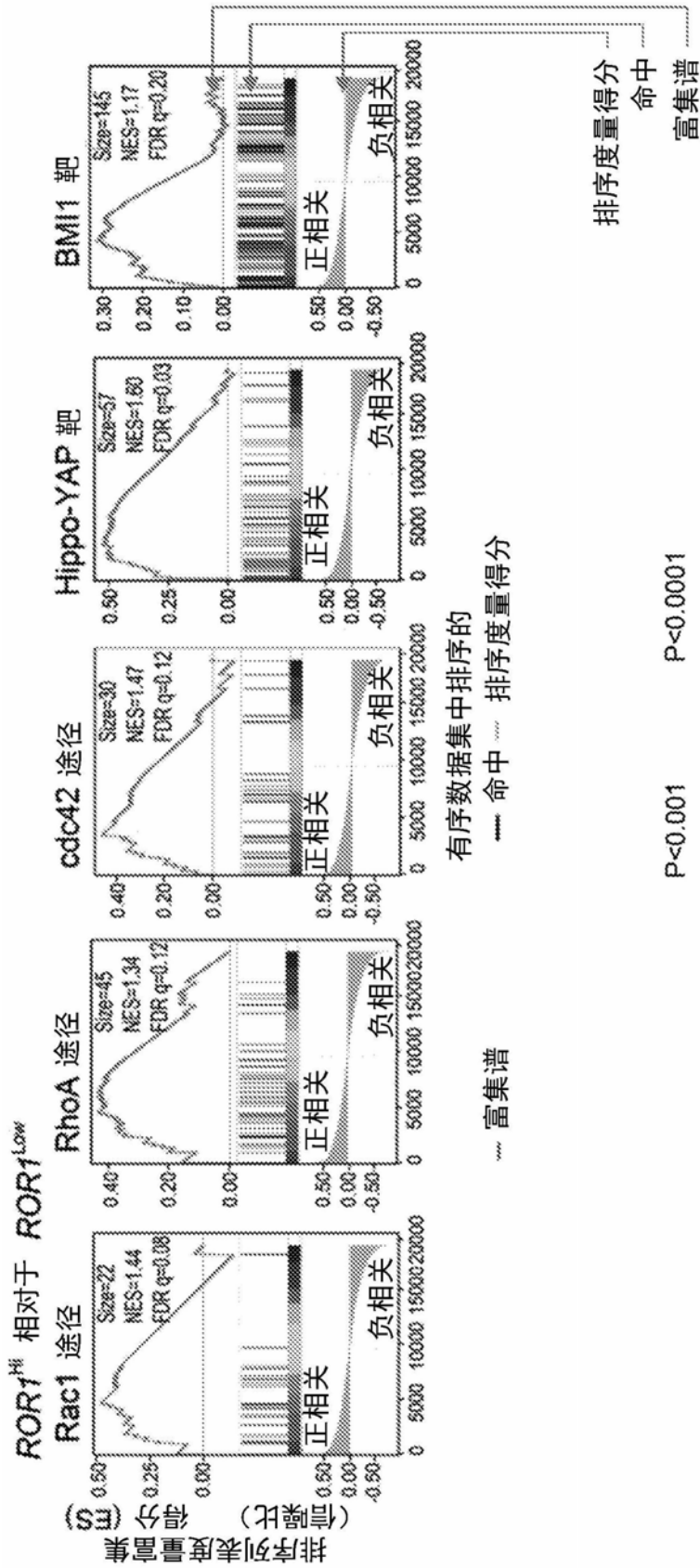


图6A

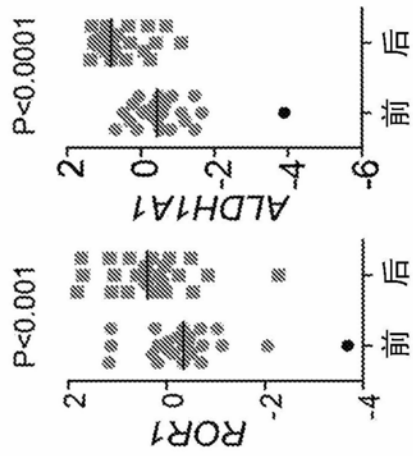


图6B

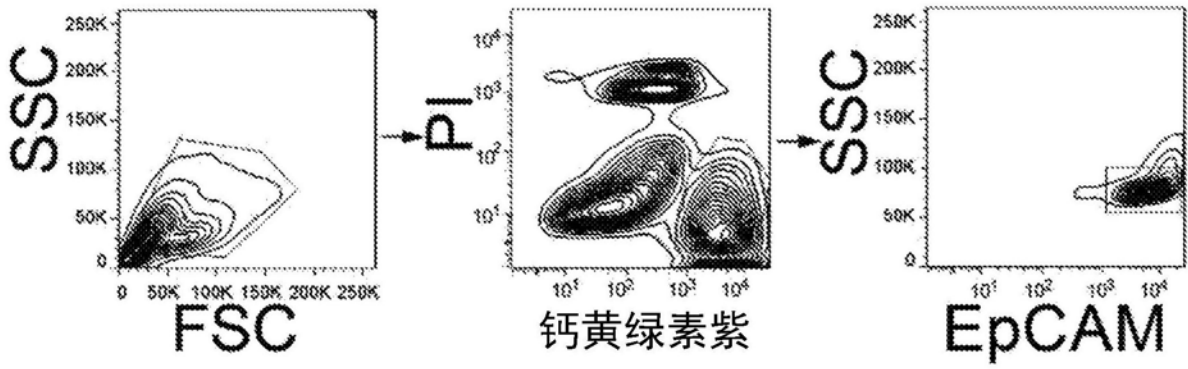


图7A

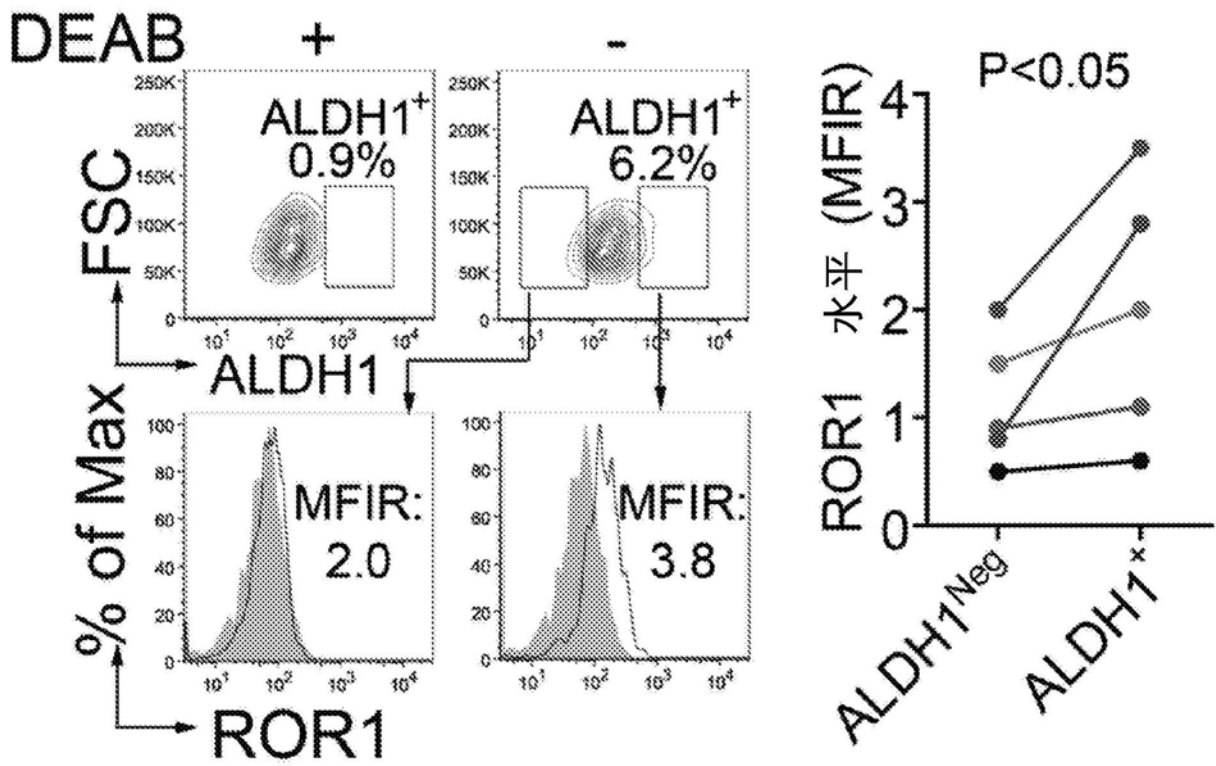


图7B

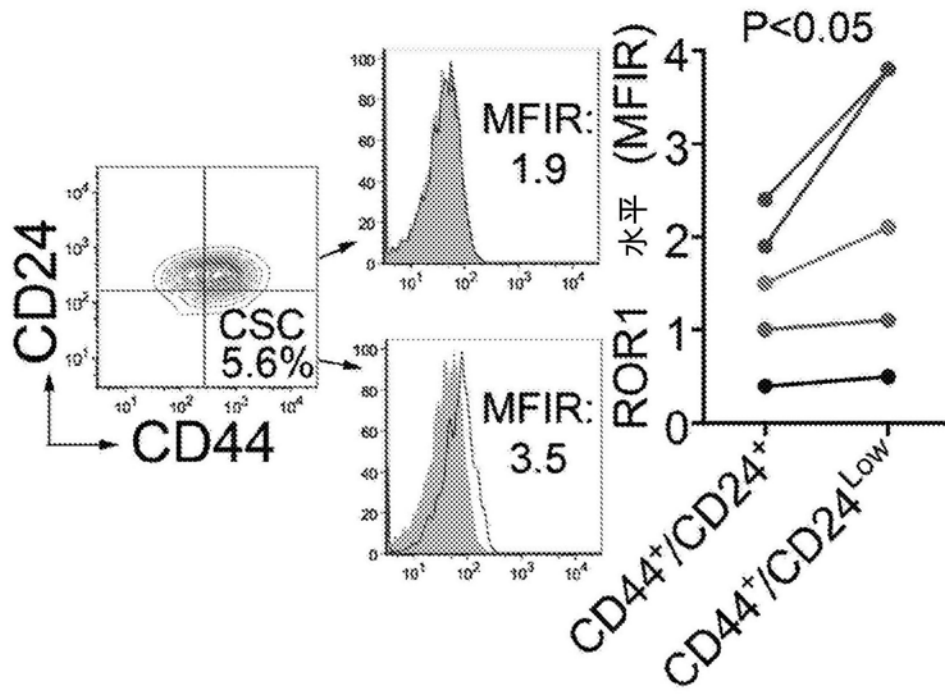


图7C

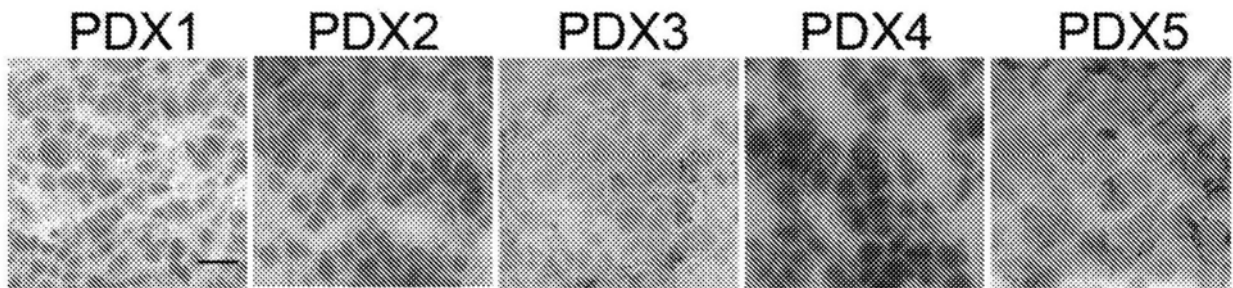


图7D

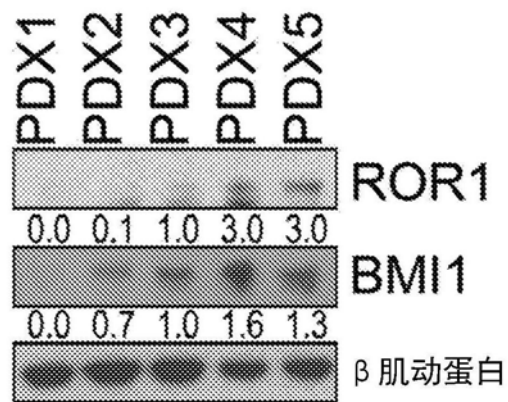


图7E

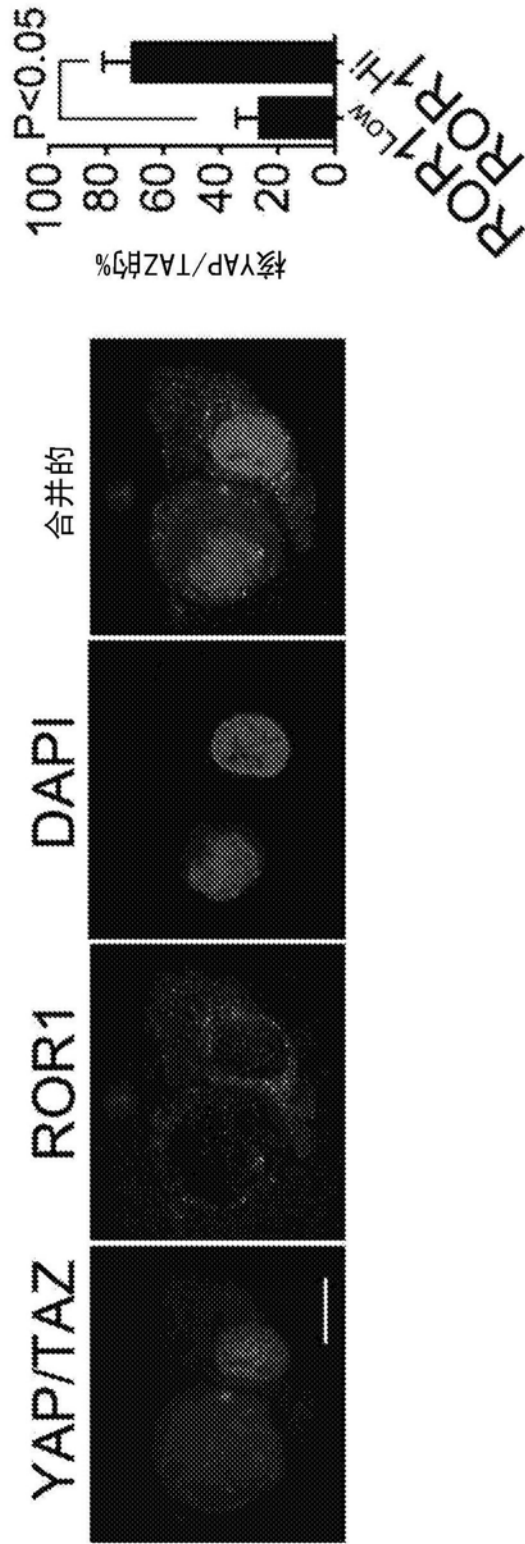


图7F

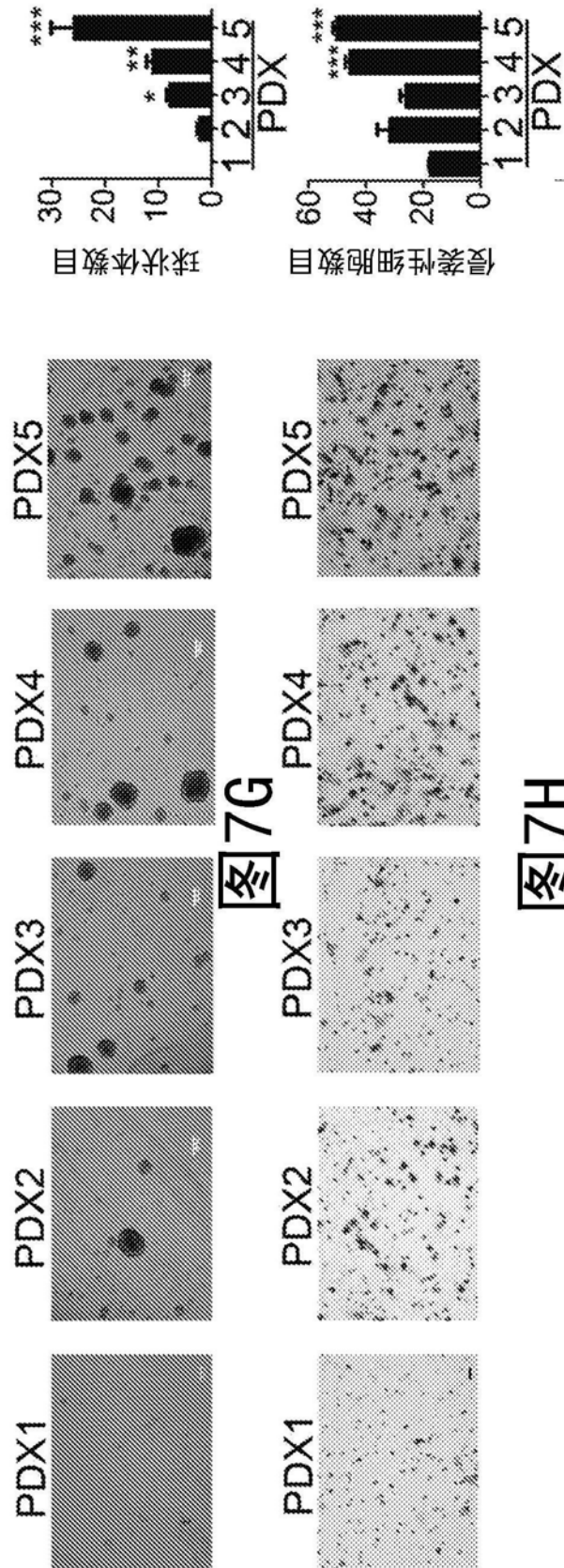


图7G

图7H

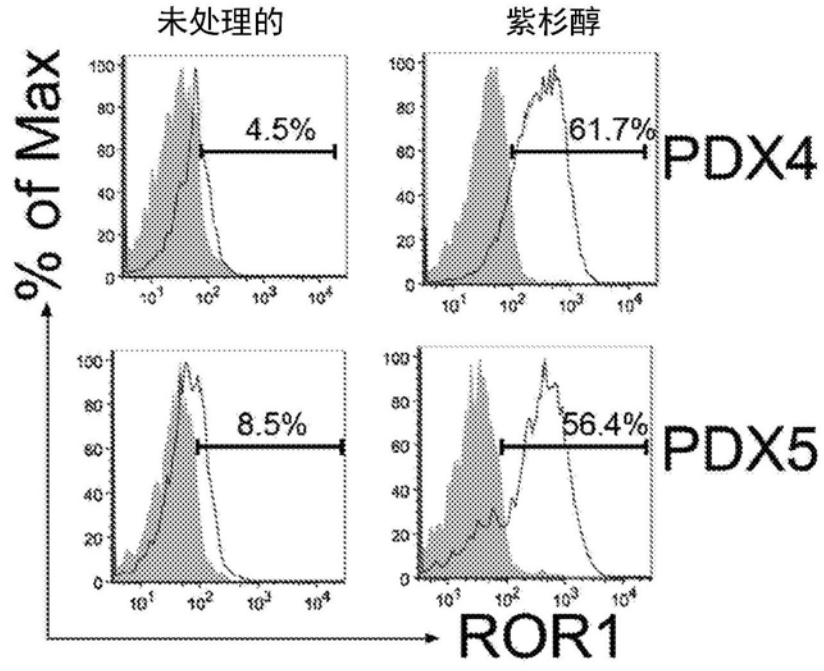


图7I

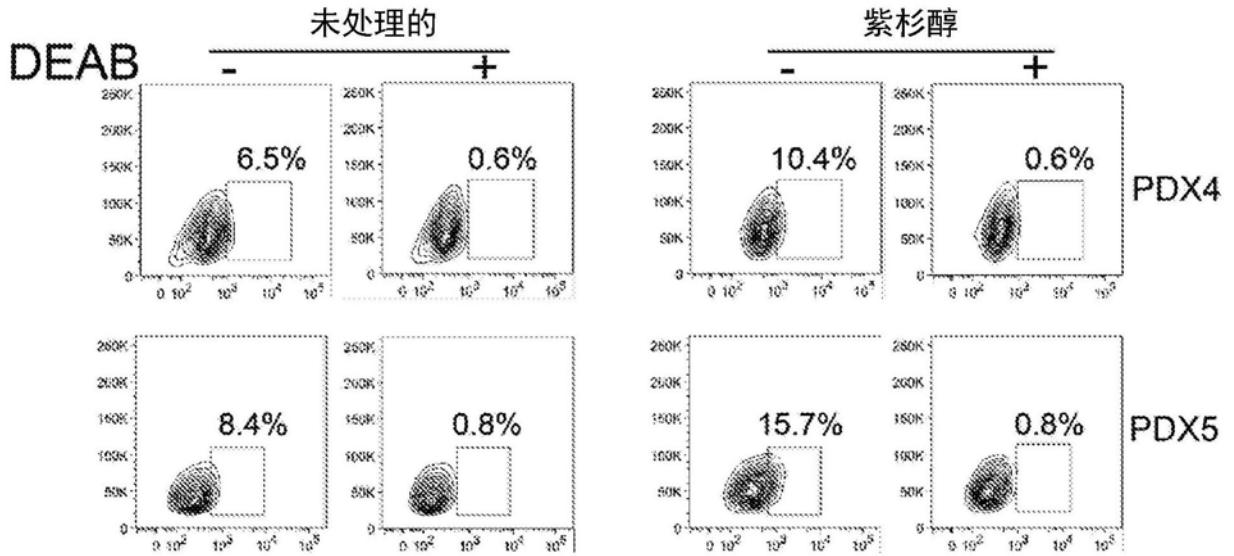


图7J

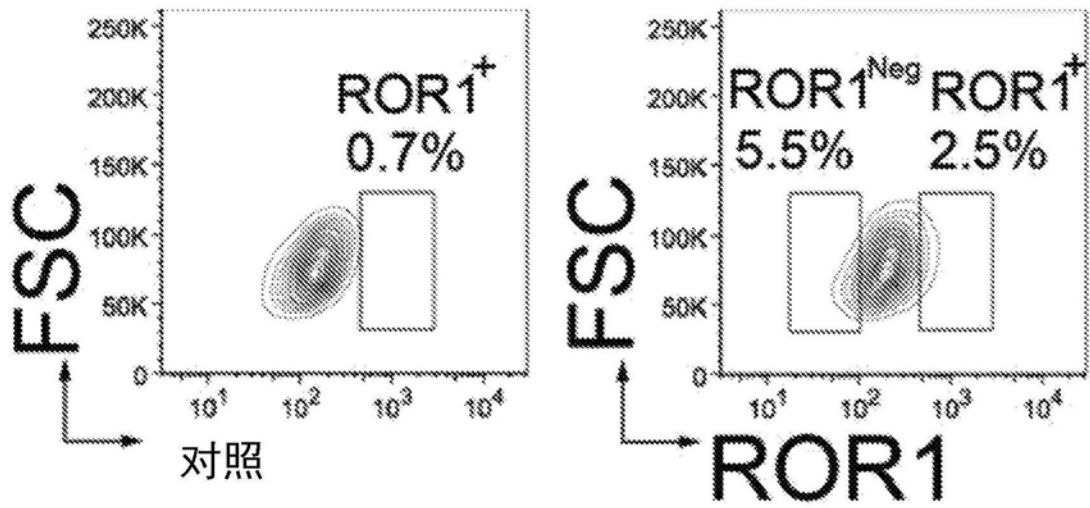


图7K

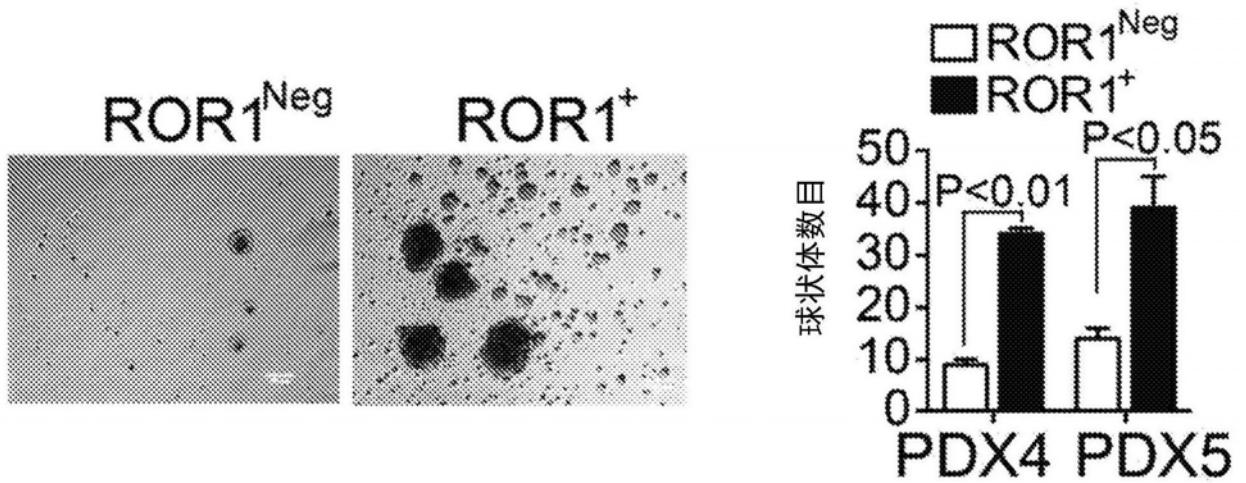


图7L

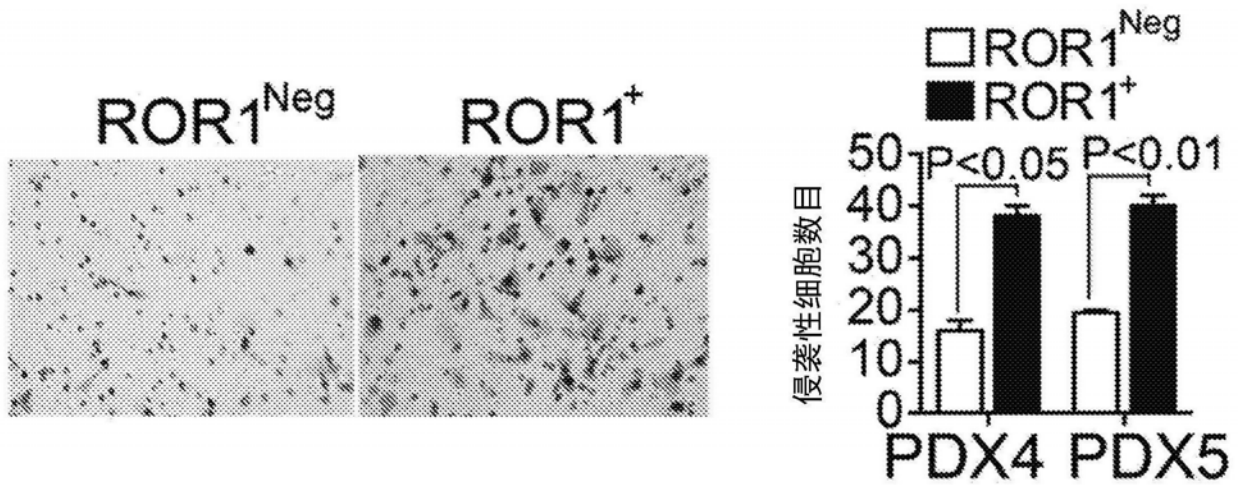


图7M

组织ID		细胞数目			致瘤细胞的频率	P值
		5000	500	100		
PDX4	ROR1 ⁺	6/6	4/6	N.D	1/455	<0.001
	ROR1 ^{Neg}	3/6	2/6	N.D	1/4740	
PDX5	ROR1 ⁺	N.D	8/9	1/10	1/329	<0.001
	ROR1 ^{Neg}	N.D	1/9	0/10	1/5247	

图7N

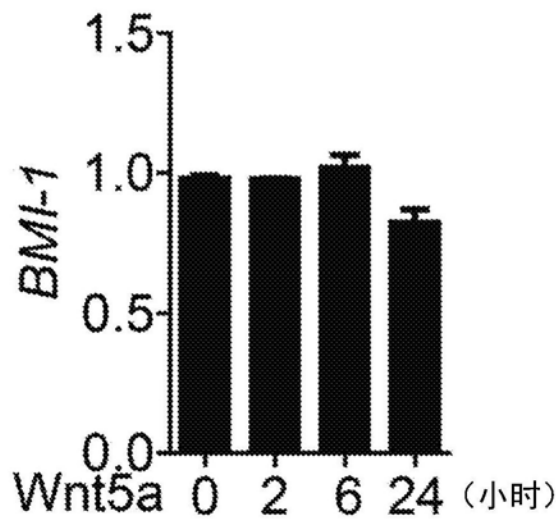


图8A

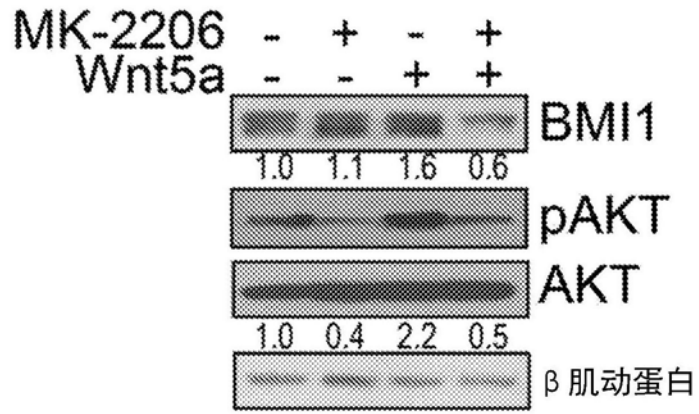


图8B

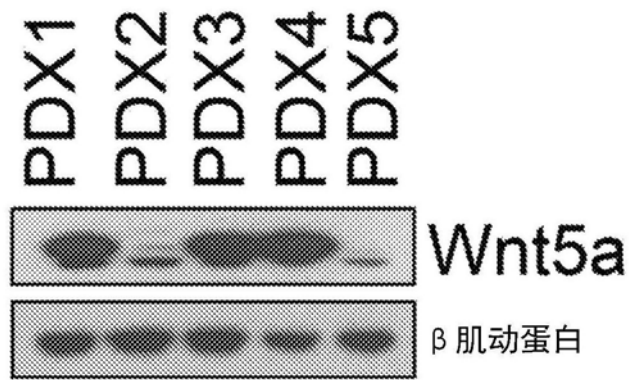


图9A

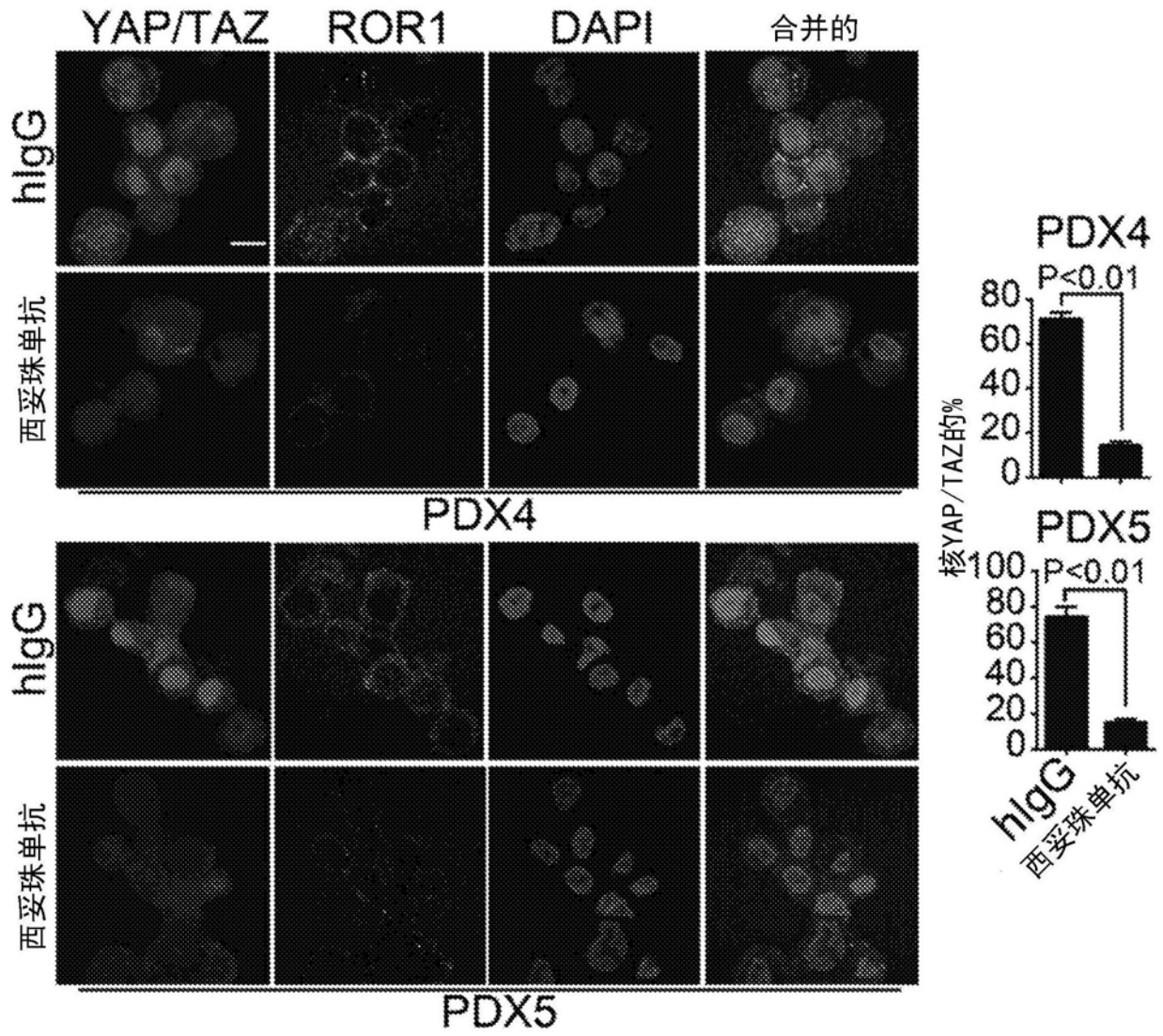


图9B

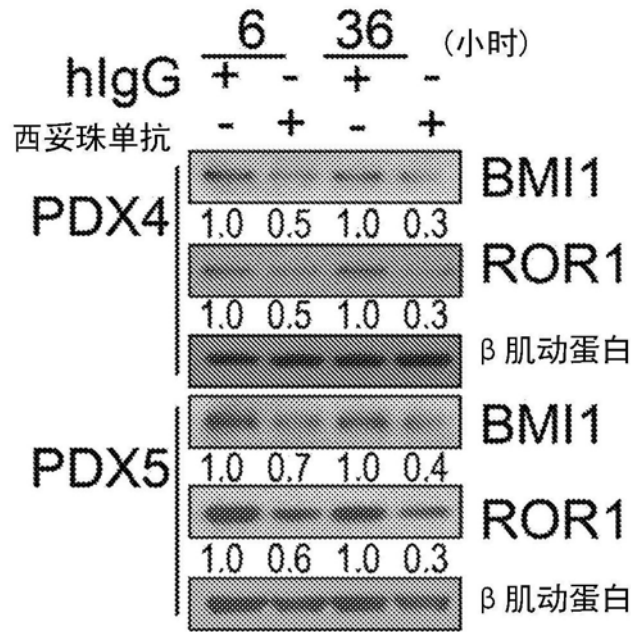


图9C

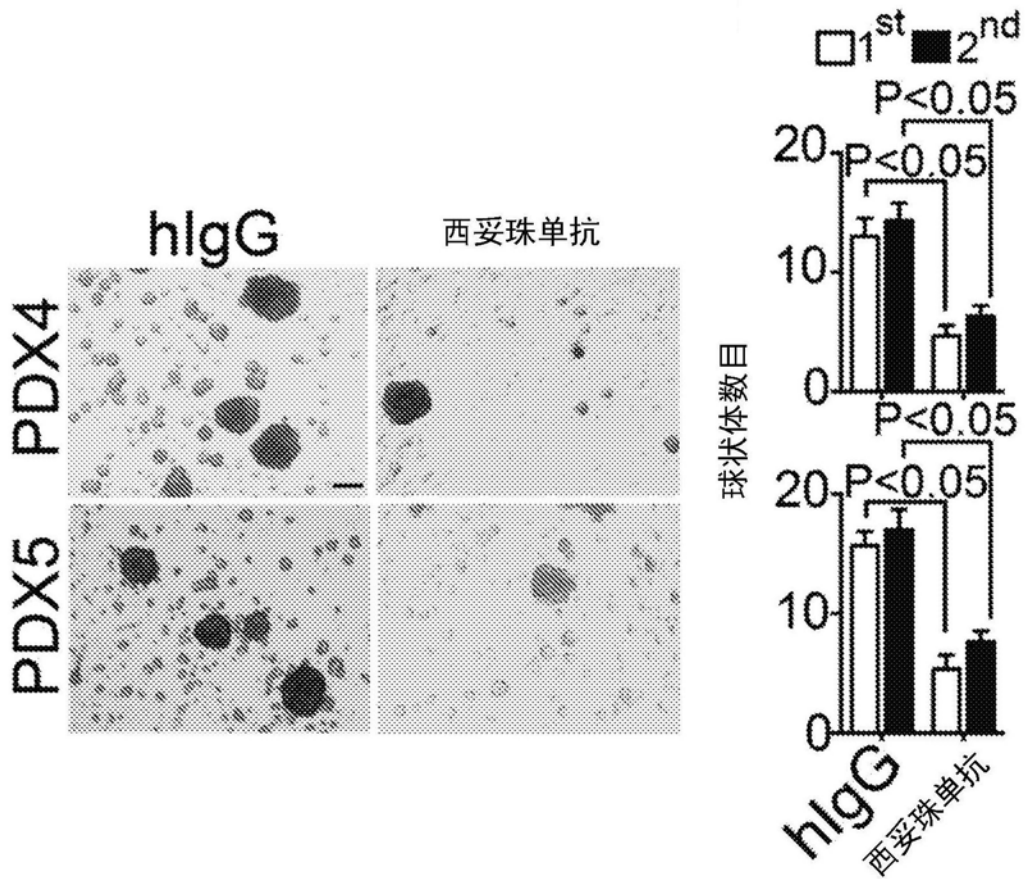


图9D

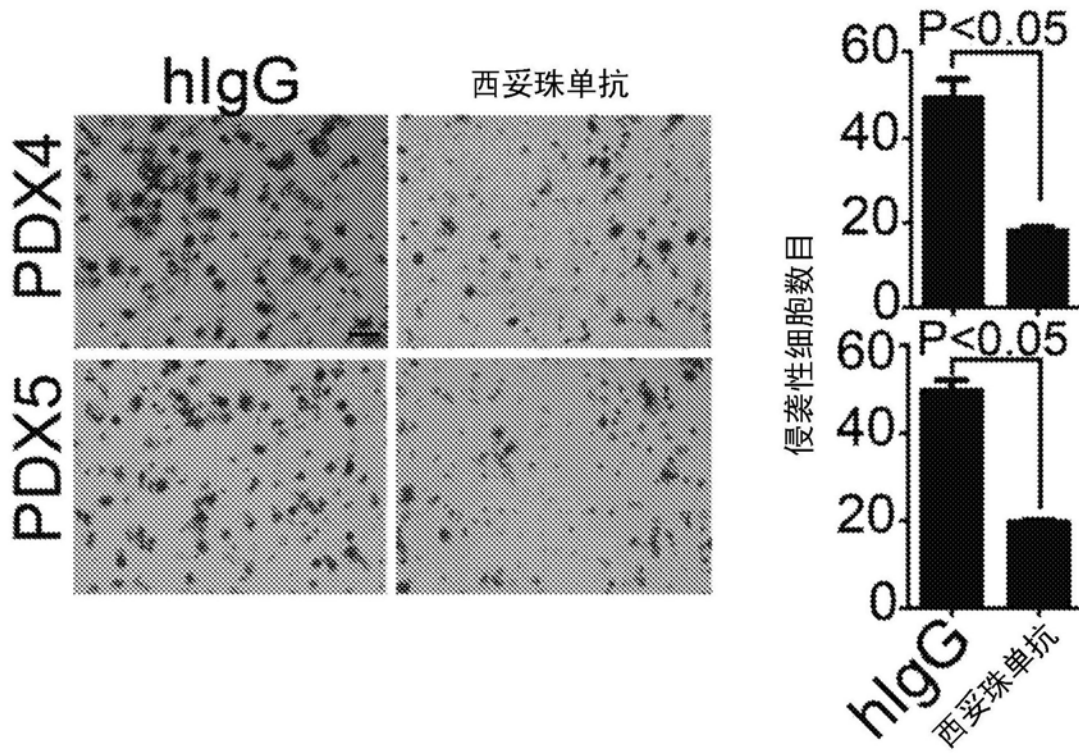


图9E

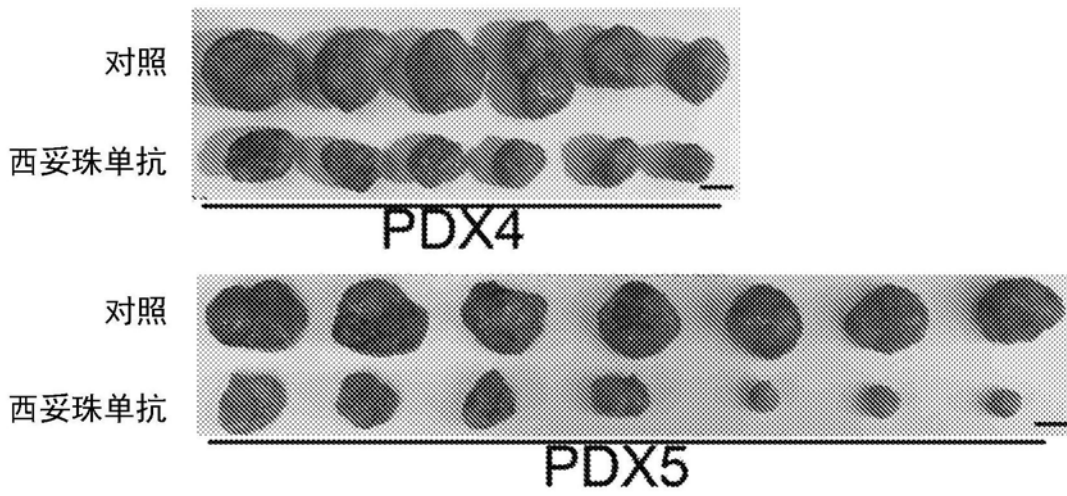


图9F

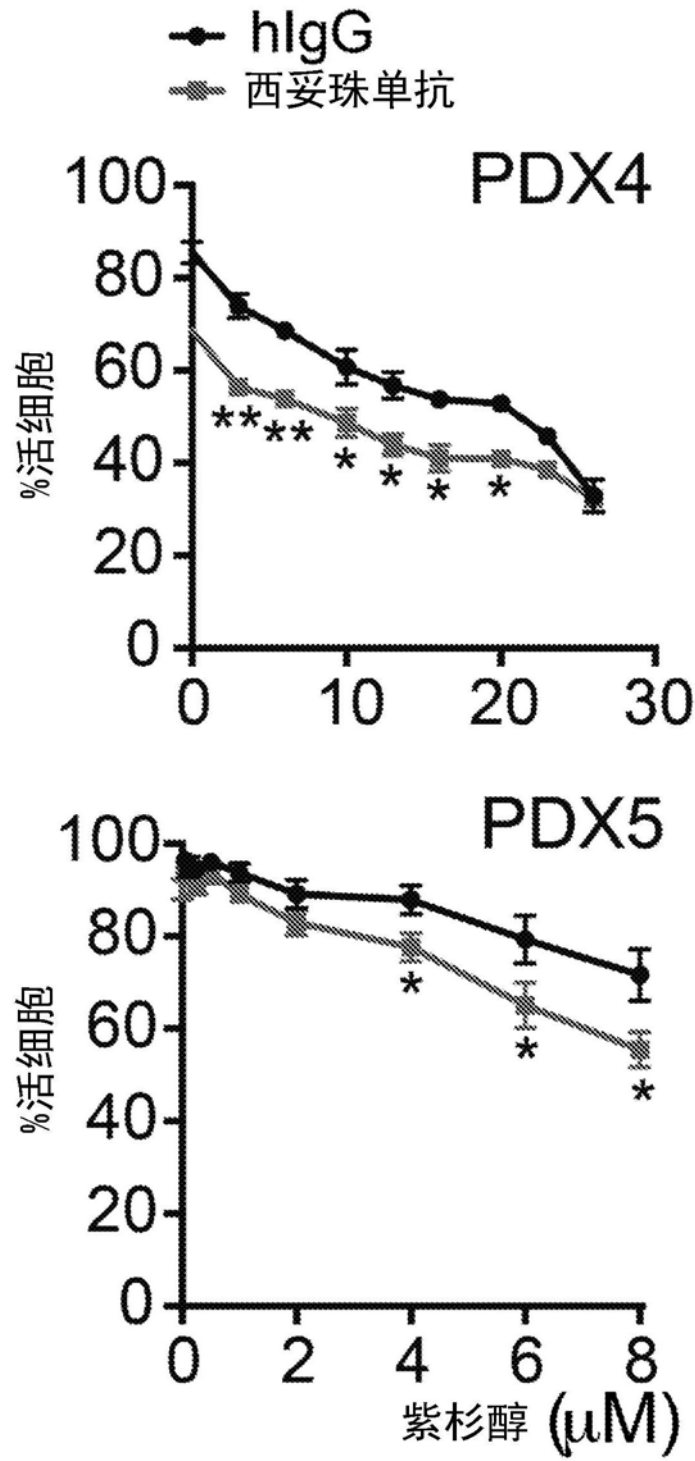


图10

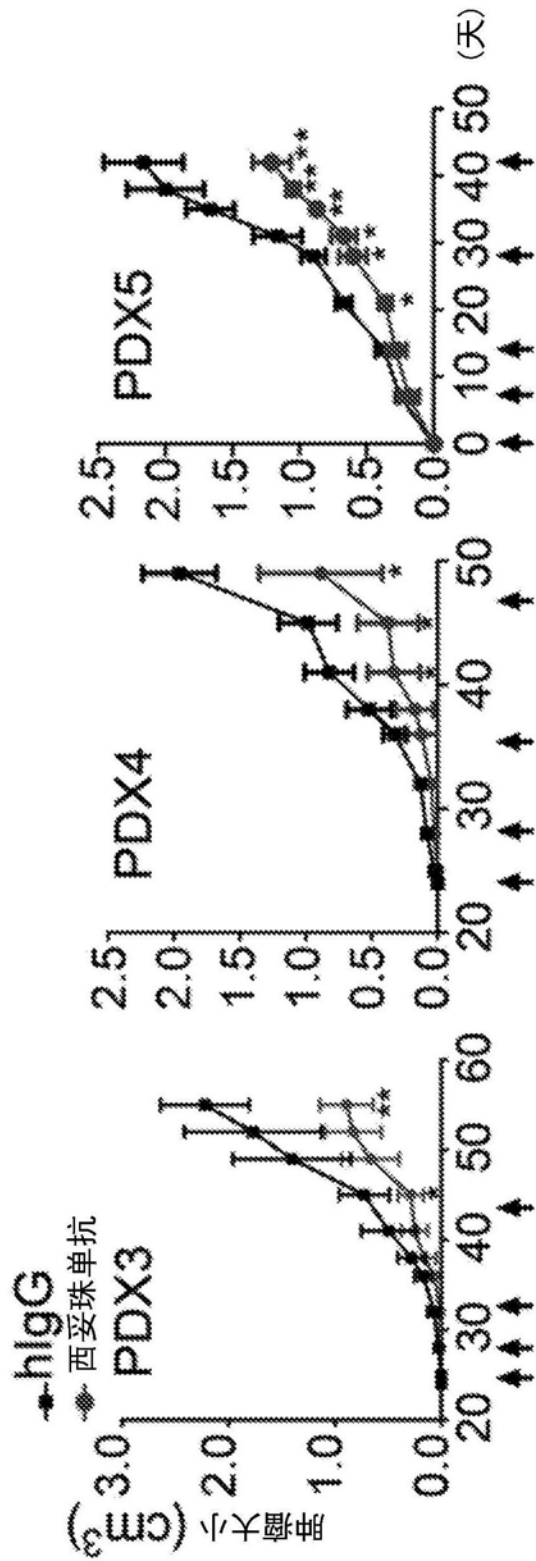


图11

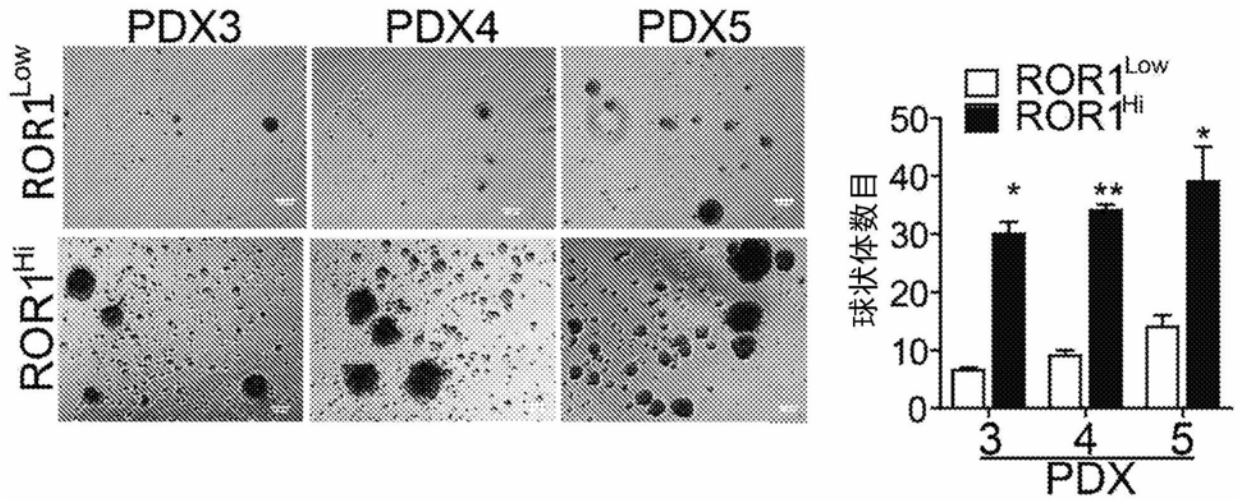


图12

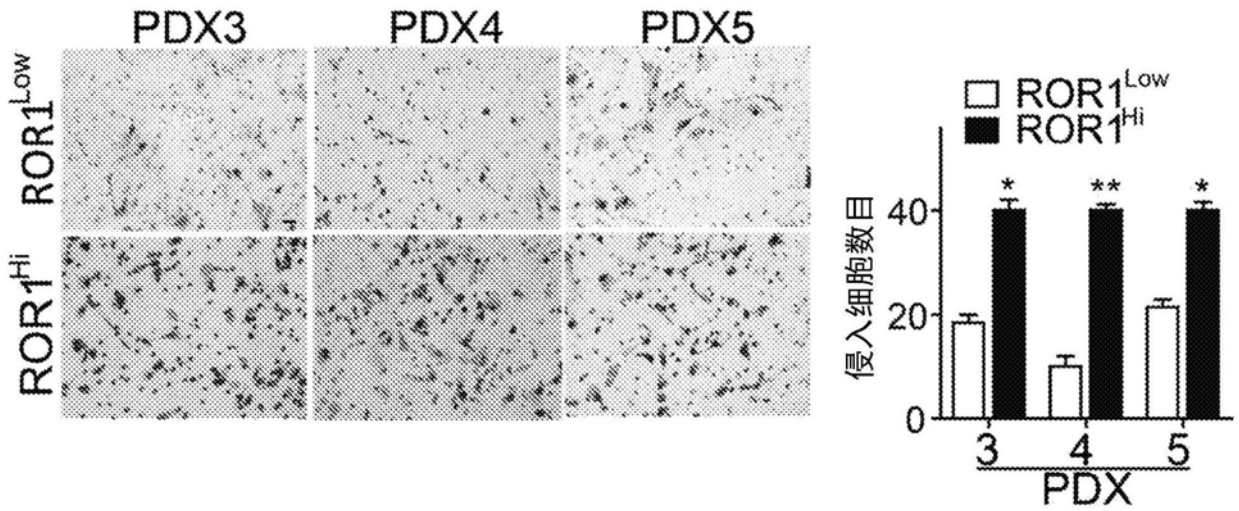


图13

组织ID		细胞数目			致瘤细胞的频率	P值
		5000	500	100		
PDX3	ROR1 ^{Low}	0/4	0/9	0/10	1/2913	<0.01
	ROR1 ^{Hi}	2/5	5/10	1/10	Inf	
PDX4	ROR1 ^{Low}	3/6	2/6	N.D	1/455	<0.001
	ROR1 ^{Hi}	6/6	4/6	N.D	1/4740	
PDX5	ROR1 ^{Low}	N.D	1/9	0/10	1/329	<0.001
	ROR1 ^{Hi}	N.D	8/9	1/10	1/5247	

图14

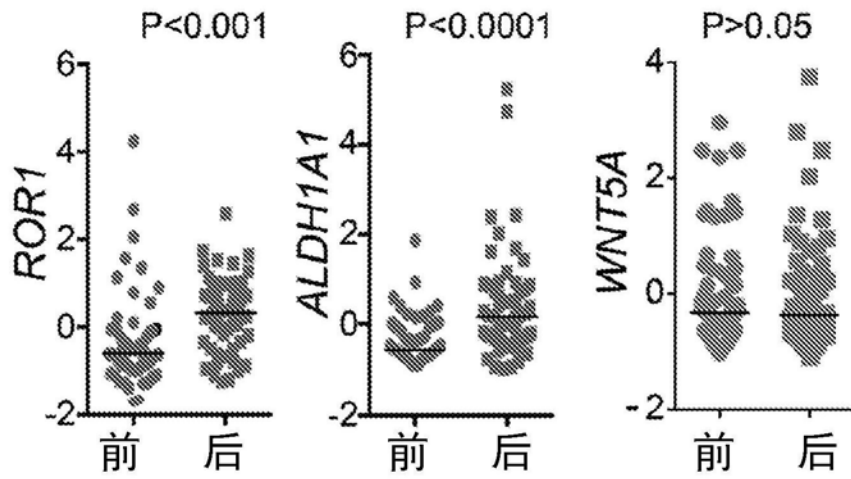


图15

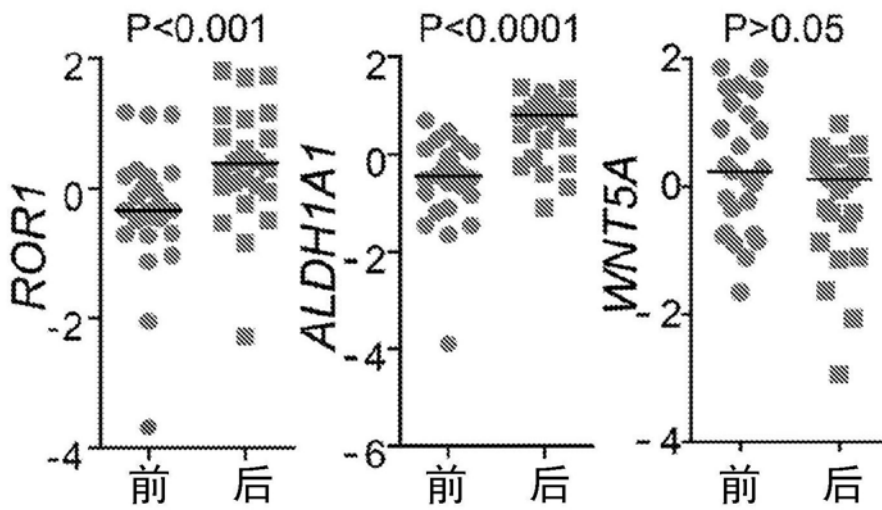


图16

基因集	大小	ES		NES		NOM p-val		FDR q-val	
		ROR1 ^{HI} 相对于ROR1 ^{Low}	之后相对于之前	ROR1 ^{HI} 相对于ROR1 ^{Low}	之后相对于之前	ROR1 ^{HI} 相对于ROR1 ^{Low}	之后相对于之前	ROR1 ^{HI} 相对于ROR1 ^{Low}	之后相对于之前
CD44 ⁺ /CD24 ^{low} MS	99	0.46	0.52	1.61	2.16	0.03	0.00	0.07	0.00
EMT	220	0.52	0.31	1.78	1.47	0.00	0.00	0.00	0.03
Rac1途径	22	0.48	0.52	1.44	1.61	0.05	0.01	0.08	0.01
RhoA途径	45	0.44	0.41	1.34	1.52	0.12	0.03	0.12	0.02
cdc42	30	0.46	0.35	1.47	1.19	0.05	0.22	0.12	0.16
Hippo-Yap	57	0.53	0.36	1.60	1.33	0.04	0.07	0.03	0.07
BMI1	143	0.32	0.42	1.17	1.90	0.20	0.00	0.20	0.00

图17

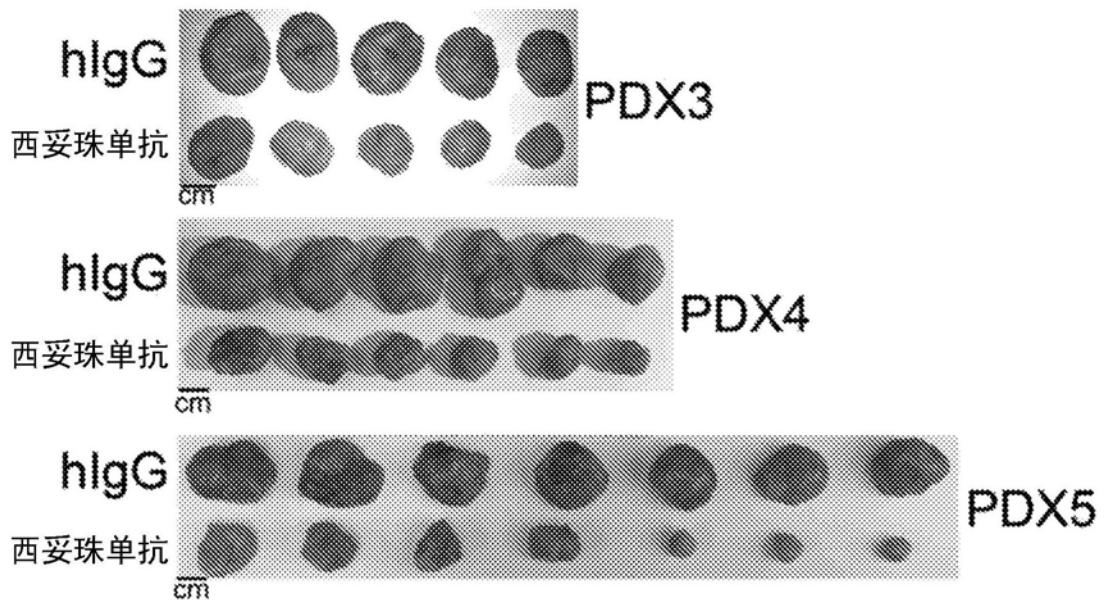


图18

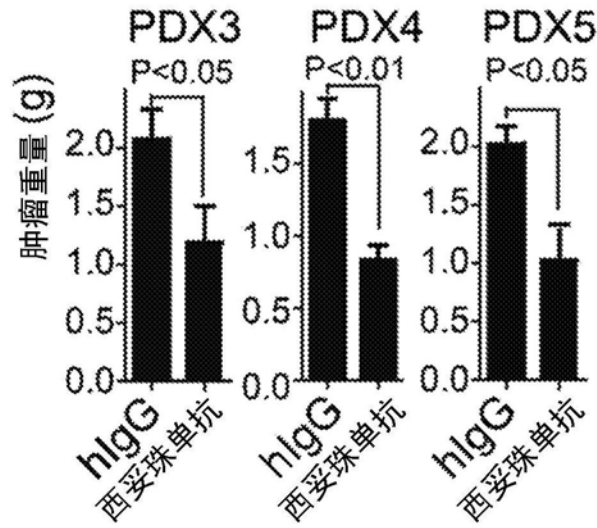


图19

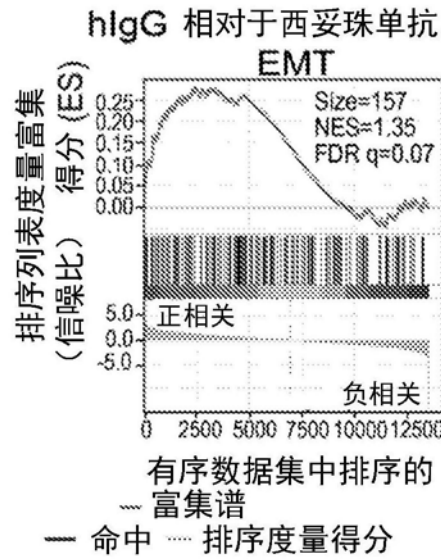


图20