



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112852959 A

(43) 申请公布日 2021.05.28

(21) 申请号 202011356279.9

C07F 9/6509 (2006.01)

(22) 申请日 2020.11.27

C07D 471/04 (2006.01)

(66) 本国优先权数据

C07D 487/10 (2006.01)

PCT/CN2019/121214 2019.11.27 CN

A61P 35/00 (2006.01)

(71) 申请人 苏州亚盛药业有限公司

地址 215000 江苏省苏州市苏州工业园区  
星湖街218号B7楼701单元

申请人 亚盛医药集团(香港)有限公司

(72) 发明人 翟一帆 杨大俊 方东 陶然

(74) 专利代理机构 北京市君合律师事务所  
11517

代理人 吴瑜 顾云峰

(51) Int.Cl.

C12Q 1/6886 (2018.01)

G01N 33/574 (2006.01)

权利要求书12页 说明书76页  
序列表15页 附图15页

(54) 发明名称

用于预测靶向细胞凋亡途径的化合物的抗癌功效的方法和组合物

(57) 摘要

提供了用于预测MDM2抑制剂或Bcl-2/Bcl-xL双重抑制剂或Bcl-2抑制剂或Bcl-xL抑制剂在治疗癌症患者中的功效的生物标志物。还提供了用于评估生物标志物的基因水平的组合物,例如试剂盒,以及使用此类基因水平预测癌症患者对MDM2抑制剂或Bcl-2/Bcl-xL双重抑制剂或Bcl-2抑制剂或Bcl-xL抑制剂的应答的方法。可以使用此类信息来确定癌症患者的预后和治疗选择。

1. 一种用于在有需要的受试者中治疗癌症的方法,该方法包括:

- a) 在来源于该受试者的测试样品中测量至少一种包含Noxa的生物标志物的水平;
- b) 将该至少一种生物标志物的水平与该至少一种生物标志物的对应的参考水平进行比较,以确定与参考水平的差异;以及
- c) 当该差异达到预定的阈值时,向该受试者施用有效量的MDM2抑制剂或Bcl-2/Bcl-xL双重抑制剂或Bcl-xL抑制剂或Bcl-2抑制剂。

2. 一种用于鉴定患有癌症的受试者可能对用MDM2抑制剂或Bcl-2/Bcl-xL双重抑制剂或Bcl-xL抑制剂或Bcl-2抑制剂的治疗产生应答的方法,该方法包括:

- a) 在来源于该受试者的测试样品中测量至少一种包含Noxa的生物标志物的水平;
- b) 将该至少一种生物标志物的水平与该至少一种生物标志物的对应的参考水平进行比较,以确定与参考水平的差异;以及
- c) 当该差异达到预定的阈值时,鉴定该受试者可能对用MDM2抑制剂或Bcl-2/Bcl-xL双重抑制剂或Bcl-xL抑制剂或Bcl-2抑制剂的治疗产生应答。

3. 如权利要求2所述的方法,其中该方法进一步包括:

- d) 向被鉴定为可能对用MDM2抑制剂或Bcl-2/Bcl-xL双重抑制剂或Bcl-xL抑制剂或Bcl-2抑制剂的治疗产生应答的受试者施用有效量的MDM2抑制剂或Bcl-2/Bcl-xL双重抑制剂或Bcl-xL抑制剂或Bcl-2抑制剂。

4. 一种用于在受试者中监测治疗功效的方法,该受试者患有癌症并在治疗期内已经用MDM2抑制剂或Bcl-2/Bcl-xL双重抑制剂或Bcl-xL抑制剂或Bcl-2抑制剂进行了治疗,该方法包括:

- a) 治疗期后从该受试者获得测试样品;
- b) 在该测试样品中测量至少一种包含Noxa的生物标志物的水平,以获得该至少一种生物标志物的治疗后水平;
- c) 将该治疗后水平与来源于该受试者的治疗期之前的测试样品中的该至少一种生物标志物的基线水平进行比较,以确定该至少一种生物标志物的水平的治疗后变化;以及
- d) 当该治疗后变化达到预定的阈值时,向该受试者继续施用MDM2抑制剂或Bcl-2/Bcl-xL双重抑制剂或Bcl-xL抑制剂或Bcl-2抑制剂,或

当该治疗后变化未达到预定的阈值时,增加对该受试者的MDM2抑制剂或Bcl-2/Bcl-xL双重抑制剂或Bcl-xL抑制剂或Bcl-2抑制剂的剂量,向该受试者施用有效量的与MDM2抑制剂或Bcl-2/Bcl-xL双重抑制剂或Bcl-xL抑制剂或Bcl-2抑制剂组合的第二抗癌治疗剂,或向该受试者停止施用MDM2抑制剂或Bcl-2/Bcl-xL双重抑制剂或Bcl-xL抑制剂或Bcl-2抑制剂。

5. 如权利要求1-4中任一项所述的方法,其中该癌症是实体瘤或血液学癌症。

6. 如权利要求5所述的方法,其中该实体瘤选自肾上腺皮质癌、肛门癌、星形细胞瘤、儿童小脑或大脑癌、基底细胞癌、胆道癌、膀胱癌(例如,泌尿膀胱癌)、骨肿瘤、脑癌、小脑星形细胞瘤、大脑星形细胞瘤/恶性胶质瘤、室管膜瘤、髓母细胞瘤、幕上原始神经外胚层瘤、视觉通路和下丘脑胶质瘤、乳腺癌、伯基特淋巴瘤、宫颈癌、结肠癌、肺气肿、子宫内膜癌、食管癌、尤因氏肉瘤、视网膜母细胞瘤、胃/胃部癌、胶质瘤、头颈癌、心脏癌症、霍奇金淋巴瘤、胰岛细胞癌(内分泌胰腺癌)、卡波西肉瘤、肾癌(肾细胞癌)、喉癌、肝癌(例如,肝细胞癌)、肺

癌(例如,小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺腺癌、肺鳞状细胞癌)、神经母细胞瘤、非霍奇金淋巴瘤、卵巢癌、胰腺癌、胃肠道癌、咽癌、前列腺癌、直肠癌、肾细胞癌(肾癌)、视网膜母细胞瘤、尤因肿瘤家族、皮肤癌、胃癌、睾丸癌、咽喉癌、甲状腺癌、胆管癌、阴道癌和小细胞癌(例如,小细胞肺癌、肺外小细胞癌(EPSCC)、前列腺小细胞癌、膀胱小细胞癌)、黑素瘤、皮肤鳞状细胞癌、胶质母细胞瘤、子宫肿瘤、骨肉瘤、子宫癌、子宫CS、结肠直肠癌、宫颈癌、肉瘤、嫌色细胞癌、肾细胞癌(RCC)、透明细胞RCC、乳突状RCC、葡萄膜黑素瘤、睾丸生殖细胞瘤、低分级胶质瘤(LGG)、间皮瘤、PCPG、或胸腺瘤。

7.如权利要求5所述的方法,其中该血液学癌症选自慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、急性髓性白血病(AML)、T细胞幼淋巴细胞白血病、多发性骨髓瘤(MM)、华氏巨球蛋白血症(WM)、急性淋巴母细胞性白血病(ALL)和淋巴瘤(例如,套细胞淋巴瘤、弥漫性大B细胞淋巴瘤)。

8.一种用于在有需要的受试者中治疗癌症的方法,该方法包括:

- a)在来源于该受试者的测试样品中测量至少一种包含ASCL1的生物标志物的水平;
- b)将该至少一种生物标志物的水平与该至少一种生物标志物的对应的参考水平进行比较,以确定与参考水平的差异;以及
- c)当该差异达到预定的阈值时,向该受试者施用有效量的MDM2抑制剂或Bcl-2/Bcl-xL双重抑制剂或Bcl-xL抑制剂或Bcl-2抑制剂。

9.一种用于鉴定患有癌症的受试者可能对用MDM2抑制剂或Bcl-2/Bcl-xL双重抑制剂或Bcl-xL抑制剂或Bcl-2抑制剂的治疗产生应答的方法,该方法包括:

- a)在来源于该受试者的测试样品中测量至少一种包含ASCL1的生物标志物的水平;
- b)将该至少一种生物标志物的水平与该至少一种生物标志物的对应的参考水平进行比较,以确定与参考水平的差异;以及
- c)当该差异达到预定的阈值时,鉴定该受试者可能对用MDM2抑制剂或Bcl-2/Bcl-xL双重抑制剂或Bcl-xL抑制剂或Bcl-2抑制剂的治疗产生应答。

10.如权利要求9所述的方法,其中该方法进一步包括:

- d)向被鉴定为可能对用MDM2抑制剂、Bcl-2/Bcl-xL双重抑制剂或Bcl-xL抑制剂或Bcl-2抑制剂的治疗产生应答的受试者施用有效量的MDM2抑制剂或Bcl-2/Bcl-xL双重抑制剂或Bcl-xL抑制剂或Bcl-2抑制剂。

11.如权利要求8-10中任一项所述的方法,其中该癌症是神经内分泌癌。

12.如权利要求11所述的方法,其中该癌症选自肺大细胞神经内分泌癌(LCNEC)、甲状腺瘤、中肠癌、胆囊癌、卵巢癌、宫颈癌、嗜铬细胞瘤、梅克尔细胞瘤、胃癌、食管癌、胰腺癌、胃肠道癌、乳腺癌、肝癌、头颈癌、胆管癌和小细胞癌(例如,小细胞肺癌、肺外小细胞癌(EPSCC)、前列腺小细胞癌、或膀胱小细胞癌)。

13.如权利要求1-4和7-9中任一项所述的方法,其中该至少一种生物标志物包含Noxa和ASCL1两者。

14.如权利要求13所述的方法,其中该癌症是神经内分泌癌。

15.如前述权利要求中任一项所述的方法,其中通过mRNA水平、蛋白质水平或DNA水平测量该至少一种生物标志物的水平。

16.如权利要求15所述的方法,其中通过扩增测定、杂交测定、测序测定或免疫测定来

测量该至少一种生物标志物的水平。

17. 如权利要求16所述的方法, 其中该扩增测定是基于聚合酶链式反应 (PCR) 的方法。

18. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中该预定的阈值通过统计学方法设置, 或使用分类算法确定。

19. 如权利要求18所述的方法, 其中当测试样品中Noxa水平比Noxa的相应的参考水平高至少15% (例如, 至少25%、至少35%、至少45%、至少50%) 时, 达到Noxa的预定的阈值。

20. 如权利要求19所述的方法, 其中该Noxa的参考水平代表患有癌症的受试者的一般群体中Noxa的平均水平。

21. 如权利要求19所述的方法, 其中在对照样品中测量Noxa的参考水平。

22. 如权利要求18所述的方法, 其中当测试样品中ASCL1水平比ASCL1的相应的参考水平高至少15% (例如, 至少25%、至少50%、至少100%、至少150%) 时, 达到ASCL1的预定的阈值。

23. 如权利要求22所述的方法, 其中该ASCL1的参考水平代表患有癌症的受试者的一般群体中ASCL1的平均水平。

24. 如权利要求22所述的方法, 其中在对照样品中测量ASCL1的参考水平。

25. 如权利要求21或24所述的方法, 其中该对照样品是具有如下ASCL1水平的样品, 该ASCL1水平代表一般癌症群体中ASCL1的平均水平; 或是具有如下Noxa水平的样品, 该Noxa水平代表一般癌症群体中Noxa的平均水平。

26. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中该样品是体液样品或组织样品。

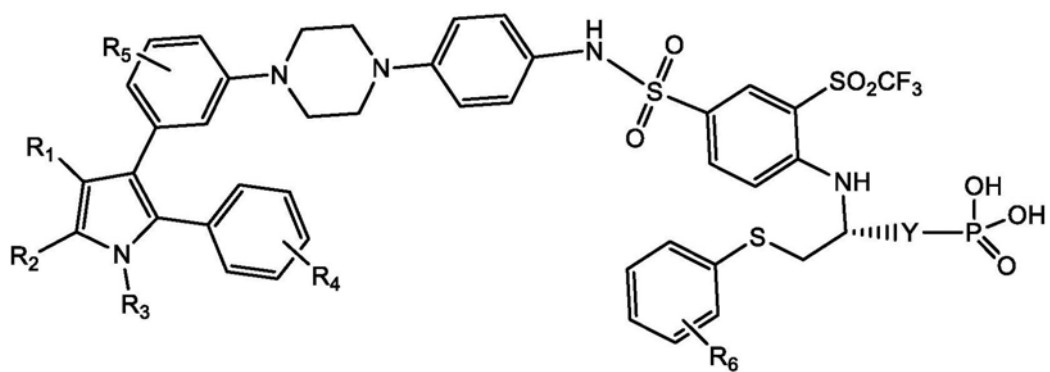
27. 如权利要求4所述的方法, 其中在治疗期后样品中Noxa水平的升高或维持表明对用MDM2抑制剂或Bcl-2/Bcl-xL双重抑制剂或Bcl-xL抑制剂或Bcl-2抑制剂治疗产生持续应答性的可能性。

28. 如权利要求4所述的方法, 其中样品中Noxa水平的降低表明对用MDM2抑制剂或Bcl-2/Bcl-xL双重抑制剂或Bcl-xL抑制剂或Bcl-2抑制剂的治疗产生降低的应答性的可能性。

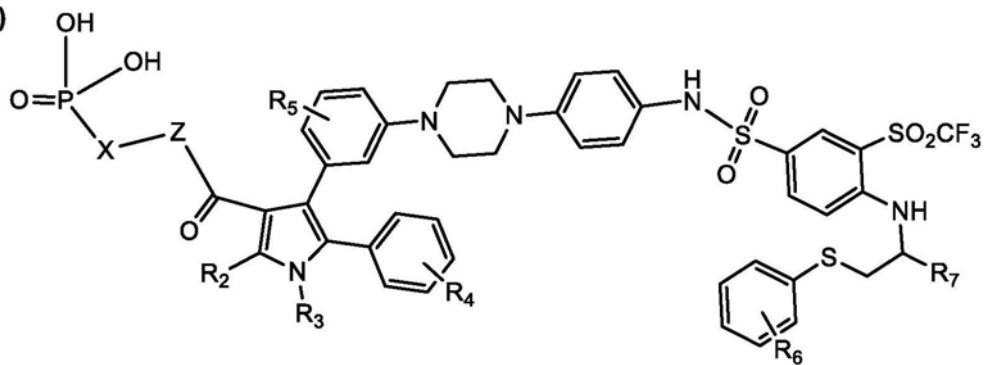
29. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中该至少一种生物标志物进一步包含选自下组的一种或多种另外的生物标志物, 该组由以下组成: Bcl-xL、Bcl-2、PUMA、Mcl-1、包含Bcl-xL的蛋白质复合物、包含Bcl-2的蛋白质复合物及其任何组合。

30. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中该Bcl-2/Bcl-xL双重抑制剂或Bcl-xL抑制剂或Bcl-2抑制剂是具有式 (I)、(II)、(III)、(IV) 或 (V) 的结构的化合物:

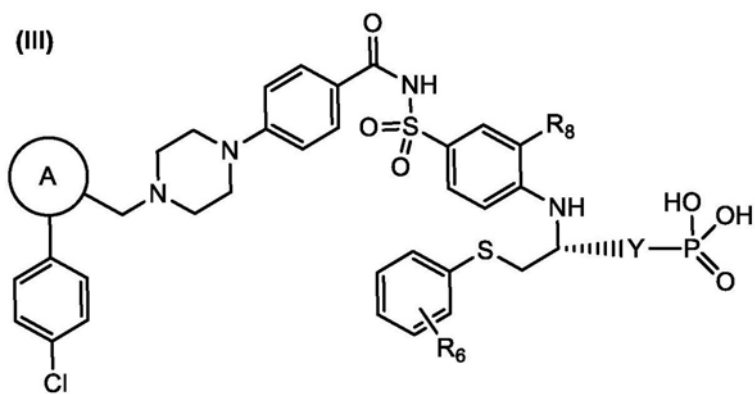
(I)



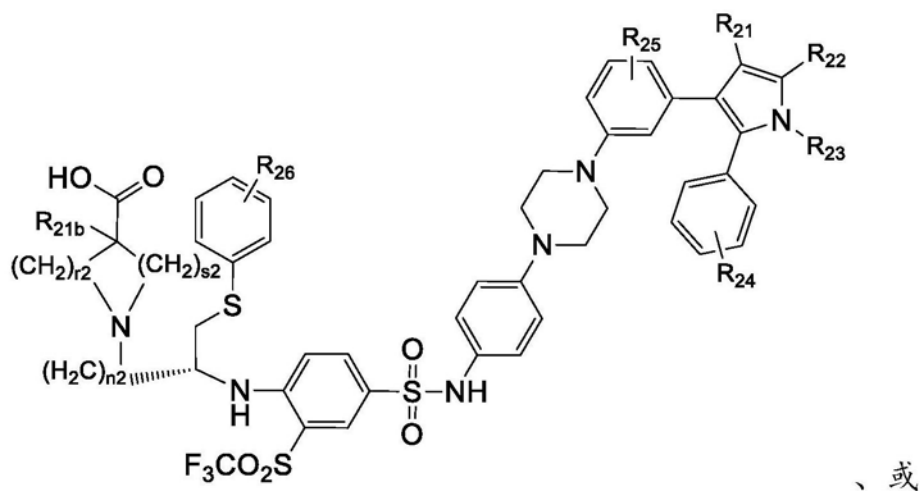
(II)



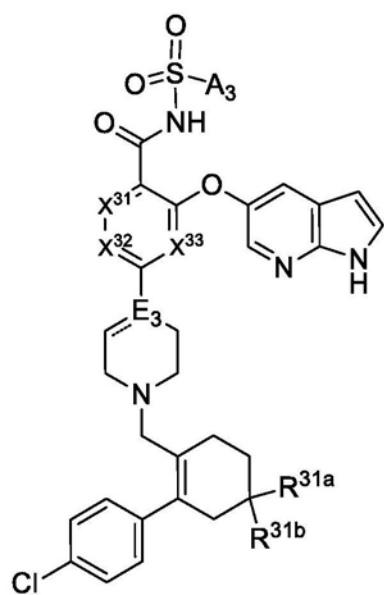
(III)



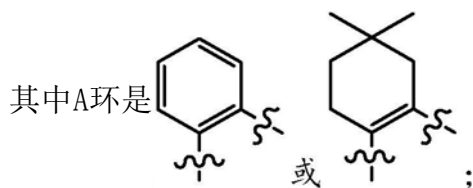
(IV)



(V)

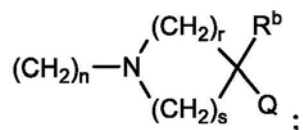


或 (I)、(II)、(III)、(IV) 或 (V) 的药学上可接受的盐,



取代的或未取代的X选自下组,该组由以下组成:亚烷基、亚烯基、环亚烷基、环亚烯基和杂环亚烷基;

Y选自下组,该组由以下组成:  $(CH_2)_n-N(R^a)_2$  和



Q选自下组,该组由以下组成:O、O  $(CH_2)_{1-3}$ 、 $NR^c$ 、 $NR^c$  ( $C_{1-3}$ 亚烷基)、OC(=O) ( $C_{1-3}$ 亚烷基)、

C(=O)O、C(=O)O(C<sub>1-3</sub>亚烷基)、NHC(=O)(C<sub>1-3</sub>亚烷基)、C(=O)NH和C(=O)NH(C<sub>1-3</sub>亚烷基)；  
Z是O或NR<sup>c</sup>；

R<sub>1</sub>和R<sub>2</sub>独立地选自下组，该组由以下组成：H、CN、NO<sub>2</sub>、卤代、烷基、环烷基、烯基、环烯基、炔基、芳基、杂芳基、杂环烷基、OR'、SR'、NR'R''、COR'、CO<sub>2</sub>R'、OCOR'、CONR'R''、CONR'SO<sub>2</sub>R''、NR'COR''、NR'CONR''R''、NR'C=SNR''R''、NR'SO<sub>2</sub>R''、SO<sub>2</sub>R'和SO<sub>2</sub>NR'R''；

R<sub>3</sub>选自下组，该组由以下组成：H、烷基、环烷基、烯基、环烯基、炔基、芳基、杂芳基、杂环烷基、OR'、NR'R''、OCOR'、CO<sub>2</sub>R'、COR'、CONR'R''、CONR'SO<sub>2</sub>R''、C<sub>1-3</sub>亚烷基CH(OH)CH<sub>2</sub>OH、SO<sub>2</sub>R'和SO<sub>2</sub>NR'R''；

R'、R''和R'''独立地是H、烷基、环烷基、烯基、环烯基、炔基、芳基、杂芳基、C<sub>1-3</sub>亚烷基杂环烷基、或杂环烷基；

R'和R''、或R''和R'''可以与它们所键合的原子一起形成3至7元环；

R<sub>4</sub>是氢、卤代、C<sub>1-3</sub>烷基、CF<sub>3</sub>或CN；

R<sub>5</sub>是氢、卤代、C<sub>1-3</sub>烷基、取代的C<sub>1-3</sub>烷基、羟基烷基、烷氧基或取代的烷氧基；

R<sub>6</sub>选自下组，该组由以下组成：H、CN、NO<sub>2</sub>、卤代、烷基、环烷基、烯基、环烯基、炔基、芳基、杂芳基、杂环烷基、OR'、SR'、NR'R''、CO<sub>2</sub>R'、OCOR'、CONR'R''、CONR'SO<sub>2</sub>R''、NR'COR''、NR'CONR''R''、NR'C=SNR''R''、NR'SO<sub>2</sub>R''、SO<sub>2</sub>R'和SO<sub>2</sub>NR'R''；

取代的或未取代的R<sub>7</sub>选自下组，该组由以下组成：氢、烷基、烯基、(CH<sub>2</sub>)<sub>0-3</sub>环烷基、(CH<sub>2</sub>)<sub>0-3</sub>环烯基、(CH<sub>2</sub>)<sub>0-3</sub>杂环烷基、(CH<sub>2</sub>)<sub>0-3</sub>芳基和(CH<sub>2</sub>)<sub>0-3</sub>杂芳基；

R<sub>8</sub>选自下组，该组由以下组成：氢、卤代、NO<sub>2</sub>、CN、CF<sub>3</sub>SO<sub>2</sub>和CF<sub>3</sub>；

R<sub>a</sub>选自下组，该组由以下组成：氢、烷基、杂烷基、烯基、羟基烷基、烷氧基、取代的烷氧基、环烷基、环烯基和杂环烷基；

R<sub>b</sub>是氢或烷基；

R<sub>c</sub>选自下组，该组由以下组成：氢、烷基、取代的烷基、羟基烷基、烷氧基和取代的烷氧基；

n、r和s独立地是1、2、3、4、5或6；

R<sub>21</sub>是SO<sub>2</sub>R<sub>2</sub>'；

R<sub>22</sub>是烷基，优选C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>烷基，更优选甲基、丙基或异丙基；

R<sub>23</sub>是烷基，优选C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>烷基，更优选甲基、丙基或异丙基；

R<sub>24</sub>是卤素，优选氟、氯；

R<sub>25</sub>是卤素，优选氟、氯；

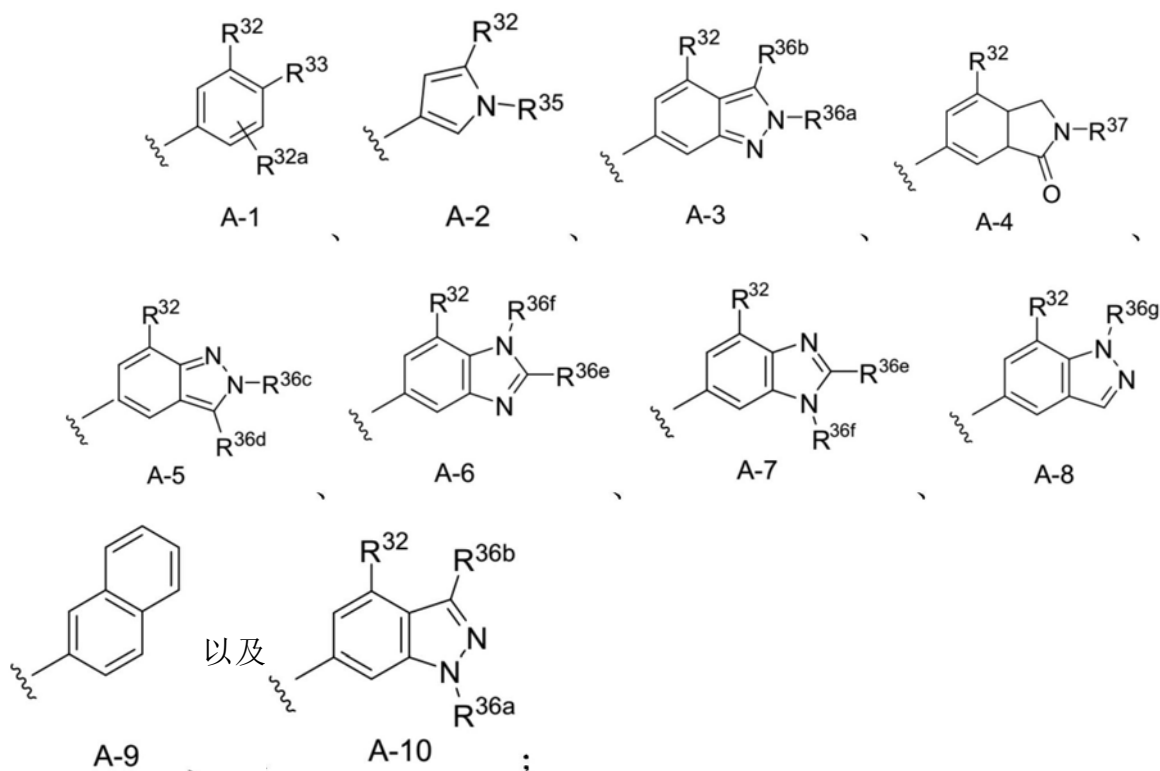
R<sub>26</sub>选自H、卤素、烷基，优选氟、氯、C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>烷基，更优选甲基、丙基、异丙基；

R<sub>21b</sub>是H或烷基，优选C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>烷基，更优选甲基、丙基或异丙基；

n<sub>2</sub>、r<sub>2</sub>和s<sub>2</sub>独立地是1、2、3、4、5或6，更优选地r<sub>2</sub>和s<sub>2</sub>都是2，并且n<sub>2</sub>是3、4或5，更优选地，n<sub>2</sub>、r<sub>2</sub>和s<sub>2</sub>都是2；

R<sub>2</sub>'是烷基，优选C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>烷基，更优选甲基、丙基或异丙基；

A<sub>3</sub>选自下组，该组由以下组成：



$E_3$ 是碳原子,并且 $\equiv$ 是双键;或

$E_3$ 是 $-C(H)-$ ,并且 $\equiv$ 是单键;或

$E_3$ 是氮原子,并且 $\equiv$ 是单键;

$X^{31}$ 、 $X^{32}$ 和 $X^{33}$ 各自独立地选自下组,该组由以下组成: $-CR^{38}=\equiv$ 和 $-N=\equiv$ ;

$R^{31a}$ 和 $R^{31b}$ 与它们所附接的碳原子一起形成3元、4元或5元任选取代的环烷基;或

$R^{31a}$ 和 $R^{31b}$ 与它们所附接的碳原子一起形成4元或5元任选取代的杂环;

$R^{32}$ 选自下组,该组由以下组成: $-NO_2$ 、 $-SO_2CH_3$ 和 $-SO_2CF_3$ ;

$R^{32a}$ 选自下组,该组由以下组成:氢和卤素;

$R^{33}$ 选自下组,该组由以下组成:氢、 $-CN$ 、 $-C\equiv CH$ 和 $-N(R^{34a})(R^{34b})$ ;

$R^{34a}$ 选自下组,该组由以下组成:任选取代的 $C_{1-6}$ 烷基、任选取代的 $C_{3-6}$ 环烷基、杂环、杂烷基、(环烷基)烷基和(杂环)烷基;

$R^{34b}$ 选自下组,该组由以下组成:氢和 $C_{1-4}$ 烷基;

$R^{35}$ 选自下组,该组由以下组成:任选取代的 $C_{1-6}$ 烷基、杂环、杂烷基、(环烷基)烷基和(杂环)烷基;

$R^{36a}$ 、 $R^{36c}$ 、 $R^{36e}$ 、 $R^{36f}$ 和 $R^{36g}$ 各自独立地选自下组,该组由以下组成:氢、任选取代的 $C_{1-6}$ 烷基、任选取代的 $C_{3-6}$ 环烷基、任选取代的芳基、任选取代的杂芳基、杂环、杂烷基、(环烷基)烷基和(杂环)烷基;

$R^{36b}$ 和 $R^{36d}$ 各自独立地选自下组,该组由以下组成:氢、 $C_{1-4}$ 烷基和卤素;

$R^{37}$ 选自下组,该组由以下组成:任选取代的 $C_{1-6}$ 烷基、杂环、杂烷基、(环烷基)烷基和(杂环)烷基;并且

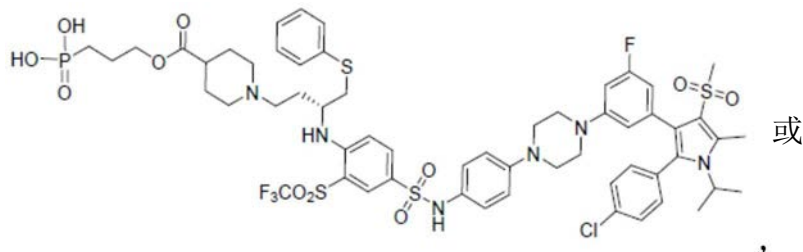
$R^{38}$ 选自下组,该组由以下组成:氢和卤素。

31. 如权利要求30所述的方法,其中该 $Bc1-2/Bc1-xL$ 双重抑制剂或 $Bc1-xL$ 抑制剂或

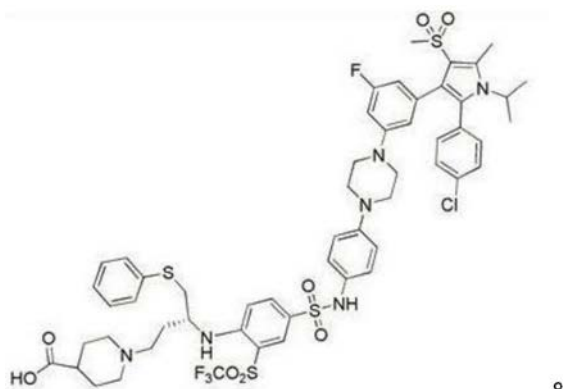


Bc1-2抑制剂是选自表1-A、表1-B和表1-C的化合物或其药学上可接受的盐。

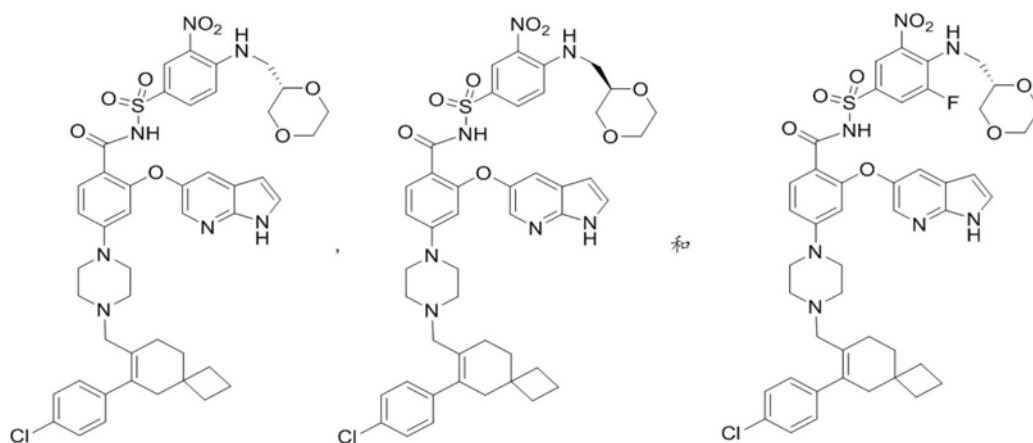
32. 如权利要求31所述的方法, 其中该Bc1-2/Bc1-xL双重抑制剂是具有以下结构的(R)-2-(1-(3-(4-(N-(4-(4-(3-(2-(4-氯苯基)-1-异丙基-5-甲基-4-(甲基磺酰基)-1H-吡咯-3-基)-5-氟苯基)哌嗪-1-基)苯基)氨磺酰基)-2-(三氟甲基磺酰基)苯基氨基)-4-(苯硫基)丁基)哌啶-4-羧基氧基)乙基膦酸, 或其药学上可接受的盐:



具有以下结构的(R)-1-(3-(4-(N-(4-(4-(3-(2-(4-氯苯基)-1-异丙基-5-甲基-4-(甲基磺酰基)-1H-吡咯-3-基)-5-氟苯基)哌嗪-1-基)苯基)氨磺酰基)-2-(三氟甲基磺酰基)苯基氨基)-4-(苯硫基)丁基)哌啶-4-甲酸, 或其药学上可接受的盐:

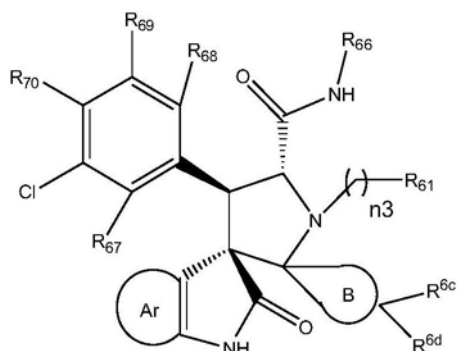


33. 如权利要求31所述的方法, 其中该Bc1-2/Bc1-xL双重抑制剂或Bc1-xL抑制剂或Bc1-2抑制剂选自具有以下结构的化合物




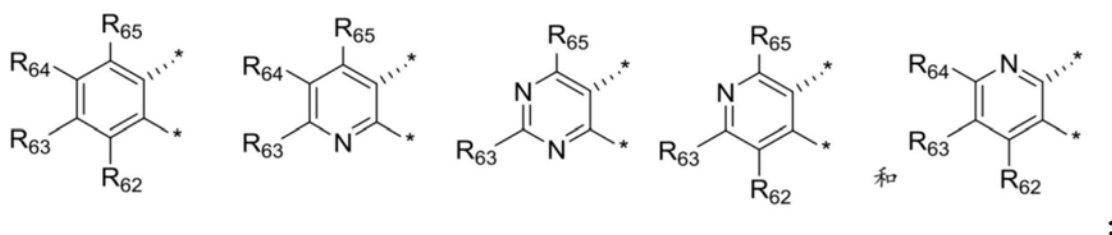
或其药学上可接受的盐。

34. 如权利要求1-29中任一项所述的方法, 其中该MDM2抑制剂包含具有以下式(VI)的化学结构:



或其药学上可接受的盐,其中

 选自下组,该组由以下组成

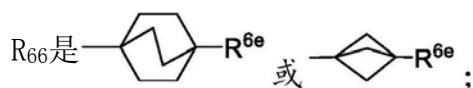


B是C<sub>4-7</sub>碳环;

R<sub>61</sub>是H、取代的或未取代的C<sub>1-4</sub>烷基、取代的或未取代的环烷基、取代的或未取代的杂环烷基、OR<sup>6a</sup>、或NR<sup>6a</sup>R<sup>6b</sup>;

n<sub>3</sub>是0、1或2;

R<sub>62</sub>、R<sub>63</sub>、R<sub>64</sub>、R<sub>65</sub>、R<sub>67</sub>、R<sub>68</sub>、R<sub>69</sub>和R<sub>70</sub>独立地选自下组,该组由以下组成:H、F、Cl、CH<sub>3</sub>和CF<sub>3</sub>;



R<sup>6a</sup>是氢或取代的或未取代的C<sub>1-4</sub>烷基;

R<sup>6b</sup>是氢或取代的或未取代的C<sub>1-4</sub>烷基;

R<sup>6c</sup>和R<sup>6d</sup>是环B的一个碳原子上的取代基,其中

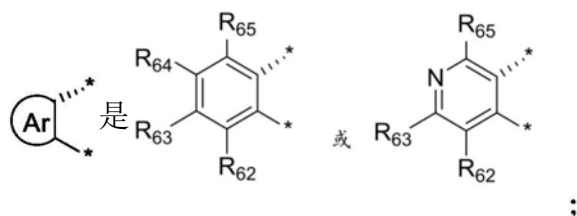
R<sup>6c</sup>是H、C<sub>1-3</sub>烷基、C<sub>1-3</sub>亚烷基-OR<sup>6a</sup>、OR<sup>6a</sup>或卤代;



R<sup>6d</sup>是H、C<sub>1-3</sub>烷基、C<sub>1-3</sub>亚烷基-OR<sup>6a</sup>、OR<sup>6a</sup>或卤代;或

R<sup>6c</sup>和R<sup>6d</sup>与它们所附接的碳一起形成4元至6元螺取代基,任选地包含氧原子;并且

R<sup>6e</sup>是-C(=O)OR<sup>6a</sup>、-C(=O)NR<sup>6a</sup>R<sup>6b</sup>或-C(=O)NHSO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>。

35. 如权利要求34所述的方法,其中



B是  或  ; 并且

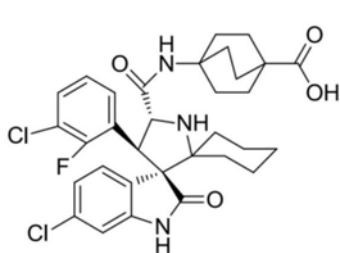
$R^{6c}$ 和 $R^{6d}$ 是F和F、H和H、OH和CH<sub>3</sub>、OH和H、CH<sub>3</sub>和CH<sub>3</sub>、CH<sub>3</sub>和OH、H和OH、CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>和CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>、或CH<sub>2</sub>OH和CH<sub>2</sub>OH。

36. 如权利要求34或35所述的方法, 其中 $R^{61}$ 是H、CH<sub>3</sub>或CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>。

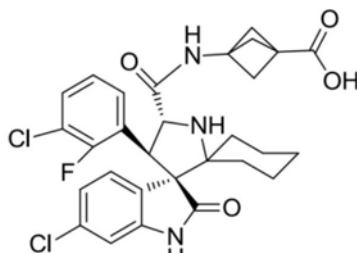
37. 如权利要求34-36中任一项所述的方法, 其中 $R_{62}$ 是H;  $R_{63}$ 是卤代;  $R_{64}$ 和 $R_{65}$ 是H。

38. 如权利要求34-37中任一项所述的方法, 其中 $R_{67}$ 是氟;  $R_{68}$ 、 $R_{69}$ 和 $R_{70}$ 中的每个是H; 并且 $R^{6e}$ 是-C(=O)OH、-C(=O)NH<sub>2</sub>或-C(=O)NHSO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>。

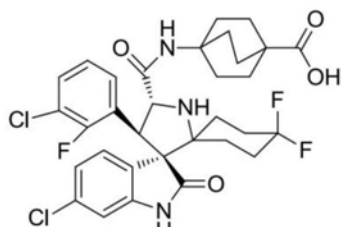
39. 如权利要求34所述的方法, 其中该MDM2抑制剂是选自以下的化合物:



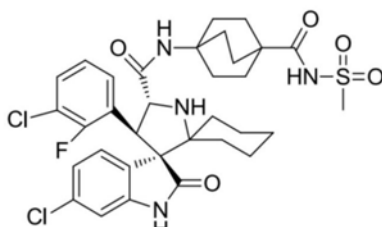
化合物 Q



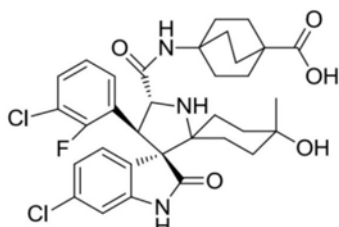
化合物 M



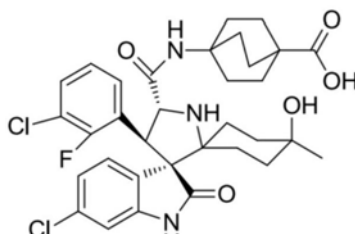
化合物 N



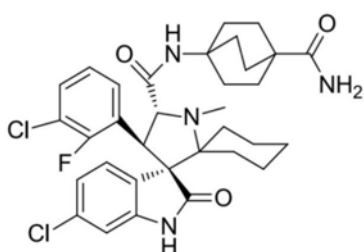
化合物 H



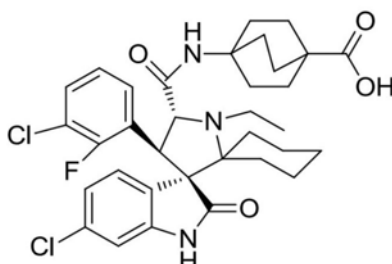
化合物 J



化合物 G

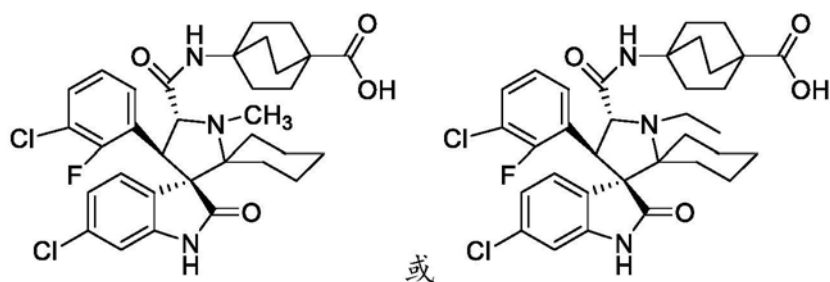


化合物 E



化合物 C





或其药学上可接受的盐。

41. 如权利要求1-29中任一项所述的方法, 其中该MDM2抑制剂是化合物C或其药学上可接受的盐。

42. 一种用于在如权利要求1-7和13-41中任一项所述的方法中使用的试剂盒, 该试剂盒包含一种或多种用于测量至少一种包含Noxa的生物标志物的水平的试剂。

43. 如权利要求42所述的试剂盒, 其中该一种或多种用于测量Noxa水平的试剂包含可以与Noxa的多核苷酸杂交的引物或探针, 或可以与Noxa的蛋白质特异性结合的抗体。

44. 一种用于在如权利要求8-26和29-41中任一项所述的方法中使用的试剂盒, 该试剂盒包含一种或多种用于测量至少一种包含ASCL1的生物标志物的水平的试剂。

45. 如权利要求44所述的试剂盒, 其中该一种或多种用于测量ASCL1水平的试剂包含可以与ASCL1的多核苷酸杂交的引物或探针, 或可以与ASCL1的蛋白质特异性结合的抗体。

46. 一种用于在如权利要求13-26和29-41中任一项所述的方法中使用的试剂盒, 该试剂盒包含一种或多种用于测量至少一种包含Noxa和ASCL1的生物标志物的水平的试剂。

47. 如权利要求46所述的试剂盒, 其中该一种或多种试剂包含可以与Noxa的多核苷酸杂交的第一引物或第一探针, 或可以与Noxa的蛋白质特异性结合的第一抗体, 以及可以与ASCL1的多核苷酸杂交的第二引物或第二探针, 或可以与ASCL1的蛋白质特异性结合的第二抗体。

48. 如权利要求42-47中任一项所述的试剂盒, 其中该一种或多种试剂被可检测地标记。

49. 用于测量至少一种包含Noxa的生物标志物的的水平的一种或多种试剂在生产用于进行如权利要求1-7和13-41中任一项所述的方法的试剂盒中的用途。

50. 用于测量至少一种包含ASCL1的生物标志物的的水平的一种或多种试剂在生产用于进行如权利要求8-26和29-41中任一项所述的方法的试剂盒中的用途。

51. 用于测量至少一种包含Noxa和ASCL1的生物标志物的的水平的一种或多种试剂在生产用于进行如权利要求13-26和29-41中任一项所述的方法的试剂盒中的用途。

## 用于预测靶向细胞凋亡途径的化合物的抗癌功效的方法和组合物

### 技术领域

[0001] 本发明总体上涉及癌症治疗。

### 背景技术

[0002] 逃避细胞凋亡是人类癌症的标志,并且是治疗抗性的常见原因 (Hanahan D等人, Cell[细胞] (2000) 100:57-70; Delbridge AR等人, Cold Spring Harb Perspect Biol[冷泉港生物学展望] (2012) 4)。因此,在人类癌症中靶向关键的细胞凋亡参与者是用于开发全新类型的抗癌疗法的有吸引力的新策略。

[0003] 对抗癌疗法有临床反应通常仅限于一部分患者。为了最大化抗癌疗法的效率,已经提出了基于分子生物标志物的个性化化学疗法。然而,对能够预测对抗癌疗法的应答的预测性生物标志物的鉴定仍然是一个挑战。因此,存在对开发生物标志物的持续需求,这些生物标志物用于预测靶向细胞凋亡途径的化合物的抗癌功效。

### 发明内容

[0004] 在一方面,本披露提供了用于在有需要的受试者中治疗癌症的方法。在一个实施例中,该方法包括:在来源于该受试者的测试样品中测量至少一种包含Noxa的生物标志物的水平;将该至少一种生物标志物的水平与该至少一种生物标志物的对应的参考水平进行比较,以确定与参考水平的差异;并且当该差异达到预定的阈值时,向该受试者施用有效量的MDM2抑制剂或Bcl-2/Bcl-xL双重抑制剂或Bcl-xL抑制剂或Bcl-2抑制剂。

[0005] 在另一方面,本披露提供了用于鉴定患有癌症的受试者可能对用MDM2抑制剂或Bcl-2/Bcl-xL双重抑制剂或Bcl-xL抑制剂或Bcl-2抑制剂的治疗产生应答的方法。在一个实施例中,该方法包括:在来源于该受试者的测试样品中测量至少一种包含Noxa的生物标志物的水平;并将该至少一种生物标志物的水平与该至少一种生物标志物的对应的参考水平进行比较,以确定与参考水平的差异;并且当该差异达到预定的阈值时,鉴定该受试者可能对用MDM2抑制剂或Bcl-2/Bcl-xL双重抑制剂或Bcl-xL抑制剂或Bcl-2抑制剂的治疗产生应答。

[0006] 在一个实施例中,用于鉴定患有癌症的受试者可能对用MDM2抑制剂或Bcl-2/Bcl-xL双重抑制剂或Bcl-xL抑制剂或Bcl-2抑制剂的治疗产生应答的方法进一步包括向被鉴定为可能对用MDM2抑制剂、Bcl-2/Bcl-xL双重抑制剂或Bcl-xL抑制剂或Bcl-2抑制剂的治疗产生应答的受试者施用有效量的MDM2抑制剂或Bcl-2/Bcl-xL双重抑制剂或Bcl-xL抑制剂或Bcl-2抑制剂。

[0007] 在另一方面,本披露提供了用于在受试者中监测治疗功效的方法,该受试者患有癌症,并在治疗期内已经用MDM2抑制剂或Bcl-2/Bcl-xL双重抑制剂或Bcl-xL抑制剂或Bcl-2抑制剂进行了治疗。在一个实施例中,该方法包括:治疗期后从该受试者获得测试样品;在该测试样品中测量至少一种包含Noxa的生物标志物的水平,以获得该至少一种生物标志物

的治疗后水平;将该治疗后水平与来源于该受试者的治疗期之前的样品中的该至少一种生物标志物的基线水平进行比较,以确定该至少一种生物标志物的水平的治疗后变化;并且当该治疗后变化达到预定的阈值,或当该治疗后变化未达到预定的阈值时,向该受试者继续施用MDM2抑制剂或Bcl-2/Bcl-xL双重抑制剂或Bcl-xL抑制剂或Bcl-2抑制剂,增加对该受试者的MDM2抑制剂或Bcl-2/Bcl-xL双重抑制剂或Bcl-xL抑制剂或Bcl-2抑制剂的剂量,或向该受试者施用有效量的与MDM2抑制剂、Bcl-2/Bcl-xL双重抑制剂或Bcl-xL抑制剂或Bcl-2抑制剂组合的第二抗癌治疗剂,或向该受试者停止施用MDM2抑制剂或Bcl-2/Bcl-xL双重抑制剂或Bcl-xL抑制剂或Bcl-2抑制剂。

[0008] 在某些实施例中,在治疗期后样品中Noxa水平的升高或维持表明了对用MDM2抑制剂或Bcl-2/Bcl-xL双重抑制剂或Bcl-xL抑制剂或Bcl-2抑制剂治疗产生持续应答性的可能性。在某些实施例中,样品中Noxa水平的降低表明了对用MDM2抑制剂、Bcl-2/Bcl-xL双重抑制剂或Bcl-xL抑制剂或Bcl-2抑制剂的治疗产生降低的应答性的可能性。

[0009] 在一些实施例中,第二抗治疗剂可以选自抗肿瘤剂、抗血管生成剂、化学治疗剂和肽类癌症治疗剂。在又一个实施例中,抗肿瘤剂选自抗生素型药剂、烷化剂、抗代谢剂、激素药剂、免疫学药剂、干扰素型药剂、激酶抑制剂、其他药剂及其组合。

[0010] 在一些实施例中,将免疫检查点分子作为第二抗癌治疗剂与MDM2抑制剂组合施用。在一些实施例中,将化学治疗剂作为第二抗癌治疗剂与Bcl-2/Bcl-xL抑制剂或Bcl-2抑制剂或Bcl-xL抑制剂组合施用。

[0011] 在一些实施例中,可以将第二抗癌治疗剂与MDM2抑制剂或Bcl-2/Bcl-xL抑制剂或Bcl-2抑制剂或Bcl-xL抑制剂同时地、单独地或顺序地施用。

[0012] 在某些实施例中,癌症是实体瘤或血液学癌症。在某些实施例中,癌症选自肾上腺皮质癌、肛门癌、星形细胞瘤、儿童小脑或大脑癌、基底细胞癌、胆道癌(bile duct cancer)、膀胱癌(例如,泌尿膀胱癌)、骨肿瘤、脑癌、小脑星形细胞瘤、大脑星形细胞瘤/恶性胶质瘤、室管膜瘤、髓母细胞瘤、幕上原始神经外胚层瘤、视觉通路和下丘脑胶质瘤、乳腺癌、伯基特淋巴瘤、宫颈癌、结肠癌、肺气肿、子宫内膜癌、食管癌、尤因氏肉瘤、视网膜母细胞瘤、胃/胃部癌(gastric/stomach cancer)、胶质瘤、头颈癌、心脏癌症、霍奇金淋巴瘤、胰岛细胞癌(内分泌胰腺癌)、卡波西肉瘤、肾癌(肾细胞癌)、喉癌(laryngeal cancer)、肝癌(例如,肝细胞癌)、肺癌(例如,小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺腺癌、肺鳞状细胞癌)、神经母细胞瘤、非霍奇金淋巴瘤、卵巢癌、胰腺癌、胃肠道癌、咽癌、前列腺癌、直肠癌、肾细胞癌(肾癌)、视网膜母细胞瘤、尤因肿瘤家族、皮肤癌、胃癌、睾丸癌、咽喉癌(throat cancer)、甲状腺癌、胆管癌(cholangiocarcinoma)、阴道癌和小细胞癌(例如,小细胞肺癌(SCLC)、肺外小细胞癌(EPSCC)、前列腺小细胞癌、或膀胱小细胞癌)、黑素瘤、皮肤鳞状细胞癌、胶质母细胞瘤、子宫肿瘤(hysterocarcinoma)、骨肉瘤、子宫癌、子宫CS、结肠直肠癌、宫颈癌、肉瘤、嫌色细胞癌、肾细胞癌(RCC)、透明细胞RCC、乳突状RCC、葡萄膜黑素瘤、睾丸生殖细胞瘤、低分级胶质瘤(LGG)、间皮瘤、PCPG、或胸腺瘤。在某些实施例中,癌症选自慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、急性髓性白血病(AML)、T细胞幼淋巴细胞白血病、多发性骨髓瘤(MM)、华氏(Waldenstrom)巨球蛋白血症(WM)、急性淋巴母细胞性白血病(ALL)和淋巴瘤(例如,套细胞淋巴瘤、弥漫性大B细胞淋巴瘤)。

[0013] 在一方面,本披露提供了用于在有需要的受试者中治疗癌症的方法。在一个实施

例中,该方法包括:在来源于该受试者的测试样品中测量至少一种包含ASCL1的生物标志物的水平;将该至少一种生物标志物的水平与该至少一种生物标志物的对应的参考水平进行比较,以确定与参考水平的差异;并且当该差异达到预定的阈值时,向该受试者施用有效量的MDM2抑制剂或Bcl-2/Bcl-xL双重抑制剂或Bcl-xL抑制剂或Bcl-2抑制剂。

[0014] 在另一方面,本披露提供了用于鉴定患有癌症的受试者可能对用MDM2抑制剂或Bcl-2/Bcl-xL双重抑制剂或Bcl-xL抑制剂或Bcl-2抑制剂的治疗产生应答的方法。在一个实施例中,该方法包括:在来源于该受试者的测试样品中测量至少一种包含ASCL1的生物标志物的水平;并将该至少一种生物标志物的水平与该至少一种生物标志物的对应的参考水平进行比较,以确定与参考水平的差异;并且当该差异达到预定的阈值时,鉴定该受试者可能对用MDM2抑制剂或Bcl-2/Bcl-xL双重抑制剂或Bcl-xL抑制剂或Bcl-2抑制剂的治疗产生应答。

[0015] 在一个实施例中,用于鉴定患有癌症的受试者可能对用MDM2抑制剂或Bcl-2/Bcl-xL双重抑制剂或Bcl-xL抑制剂或Bcl-2抑制剂的治疗产生应答的方法进一步包括向被鉴定为可能对用MDM2抑制剂或Bcl-2/Bcl-xL双重抑制剂或Bcl-xL抑制剂或Bcl-2抑制剂的治疗产生应答的受试者施用有效量的MDM2抑制剂或Bcl-2/Bcl-xL双重抑制剂或Bcl-xL抑制剂或Bcl-2抑制剂。

[0016] 在某些实施例中,癌症是神经内分泌癌。在某些实施例中,癌症选自肺大细胞神经内分泌癌(LCNEC)、甲状腺瘤、中肠癌、胆囊癌、卵巢癌、宫颈癌、嗜铬细胞瘤、梅克尔细胞瘤、胃癌、食管癌、胰腺癌、胃肠道癌、乳腺癌、肝癌、头颈癌、胆管癌、或小细胞癌(例如,小细胞肺癌、肺外小细胞癌(EPSCC)、前列腺小细胞癌、或膀胱小细胞癌)。

[0017] 在一方面,本披露提供了用于在有需要的受试者中治疗癌症的方法。在一个实施例中,该方法包括:在来源于该受试者的测试样品中测量至少一种包含Noxa和ASCL1两者的生物标志物的水平;将该至少一种生物标志物的水平与该至少一种生物标志物的对应的参考水平进行比较,以确定与参考水平的差异;并且当该差异达到预定的阈值时,向该受试者施用有效量的MDM2抑制剂或Bcl-2/Bcl-xL双重抑制剂或Bcl-xL抑制剂或Bcl-2抑制剂。

[0018] 在另一方面,本披露提供了用于鉴定患有癌症的受试者可能对用MDM2抑制剂或Bcl-2/Bcl-xL双重抑制剂或Bcl-xL抑制剂或Bcl-2抑制剂的治疗产生应答的方法。在一个实施例中,该方法包括:在来源于该受试者的测试样品中测量至少一种包含Noxa和ASCL1两者的生物标志物的水平;并将该至少一种生物标志物的水平与该至少一种生物标志物的对应的参考水平进行比较,以确定与参考水平的差异;并且当该差异达到预定的阈值时,鉴定该受试者可能对用MDM2抑制剂或Bcl-2/Bcl-xL双重抑制剂或Bcl-xL抑制剂或Bcl-2抑制剂的治疗产生应答。

[0019] 在一个实施例中,用于鉴定患有癌症的受试者可能对用MDM2抑制剂或Bcl-2/Bcl-xL双重抑制剂或Bcl-xL抑制剂或Bcl-2抑制剂的治疗产生应答的方法进一步包括向被鉴定为可能对用MDM2抑制剂或Bcl-2/Bcl-xL双重抑制剂或Bcl-xL抑制剂或Bcl-2抑制剂的治疗产生应答的受试者施用有效量的MDM2抑制剂或Bcl-2/Bcl-xL双重抑制剂或Bcl-xL抑制剂或Bcl-2抑制剂。

[0020] 在另一方面,本披露提供了用于在受试者中监测治疗功效的方法,该受试者患有癌症,并在治疗期内已经用MDM2抑制剂或Bcl-2/Bcl-xL双重抑制剂或Bcl-xL抑制剂或Bcl-



2抑制剂进行了治疗。在一个实施例中,该方法包括:治疗期后从该受试者获得测试样品;在该测试样品中测量至少一种包含Noxa和ASCL1两者的生物标志物的水平,以获得该至少一种生物标志物的治疗后水平;将该治疗后水平与来源于该受试者的治疗期之前的样品中的该至少一种生物标志物的基线水平进行比较,以确定该至少一种生物标志物的水平的治疗后变化;并且当该治疗后变化达到预定的阈值,或当该治疗后变化未达到预定的阈值时,向该受试者继续施用MDM2抑制剂或Bcl-2/Bcl-xL双重抑制剂或Bcl-xL抑制剂或Bcl-2抑制剂,增加对该受试者的MDM2抑制剂或Bcl-2/Bcl-xL双重抑制剂或Bcl-xL抑制剂或Bcl-2抑制剂的剂量,向该受试者施用有效量的与MDM2抑制剂或Bcl-2/Bcl-xL双重抑制剂或Bcl-xL抑制剂或Bcl-2抑制剂组合的第二抗癌治疗剂,或向该受试者停止施用MDM2抑制剂或Bcl-2/Bcl-xL双重抑制剂或Bcl-xL抑制剂或Bcl-2抑制剂。

[0021] 在某些实施例中,癌症是神经内分泌癌。

[0022] 在某些实施例中,该至少一种生物标志物包含Noxa和ASCL1,并且癌症是神经内分泌癌。在某些实施例中,神经内分泌癌是肺大细胞神经内分泌癌(LCNEC)、甲状腺瘤、中肠癌、胆囊癌、卵巢癌、宫颈癌、嗜铬细胞瘤、梅克尔细胞瘤、胃癌、食管癌、胰腺癌、胃肠道癌、乳腺癌、肝癌、头颈癌、胆管癌、或小细胞癌(例如,小细胞肺癌、肺外小细胞癌(EPSCC)、前列腺小细胞癌、或膀胱小细胞癌)。在某些实施例中,神经内分泌癌是小细胞癌。在某些实施例中,该至少一种生物标志物包含Noxa和ASCL1,并且癌症是小细胞肺癌。

[0023] 在本文所述的任何方面,通过mRNA水平、蛋白质水平或DNA水平来测量该至少一种生物标志物的水平。在某些实施例中,通过扩增测定、杂交测定、测序测定或免疫测定来测量该至少一种生物标志物的水平。

[0024] 在某些实施例中,扩增测定是基于聚合酶链式反应(PCR)的方法。

[0025] 在某些实施例中,通过统计学方法设置预定的阈值。

[0026] 在某些实施例中,当测试样品中Noxa水平比Noxa的相应的参考水平高至少15%(例如,至少25%、至少35%、至少45%、至少50%)时,达到Noxa的预定的阈值。

[0027] 在某些实施例中,Noxa的参考水平代表患有癌症的受试者的一般群体中Noxa的平均水平。在某些实施例中,在对照样品中测量Noxa的参考水平。在某些实施例中,对照样品是具有如下Noxa水平的样品,该Noxa的水平代表一般癌症群体中Noxa的平均水平。

[0028] 在某些实施例中,当测试样品中ASCL1水平比ASCL1的相应的参考水平高至少15%(例如,至少25%、至少50%、至少100%、至少150%)时,达到ASCL1的预定的阈值。

[0029] 在某些实施例中,ASCL1的参考水平代表患有癌症的受试者的一般群体中ASCL1的平均水平。

[0030] 在某些实施例中,在对照样品中测量ASCL1的参考水平。在某些实施例中,对照样品是具有如下ASCL1水平的样品,该ASCL1水平代表一般癌症群体中ASCL1的平均水平。

[0031] 在某些实施例中,样品是体液样品或组织样品。

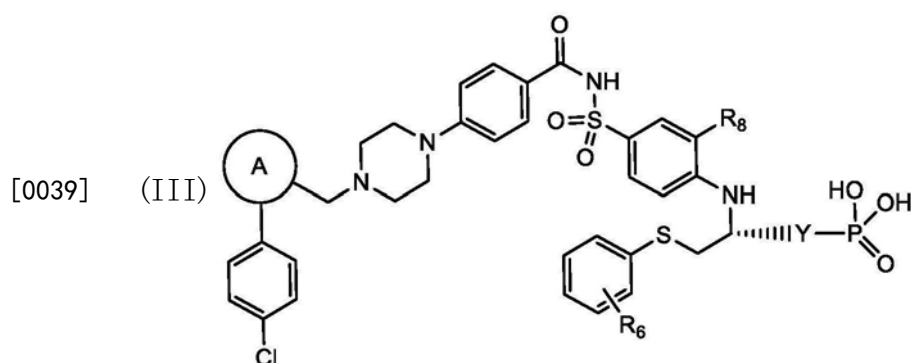
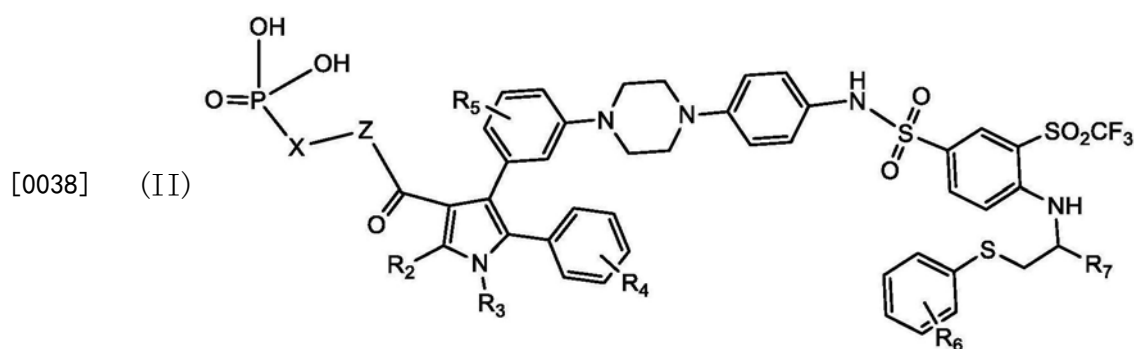
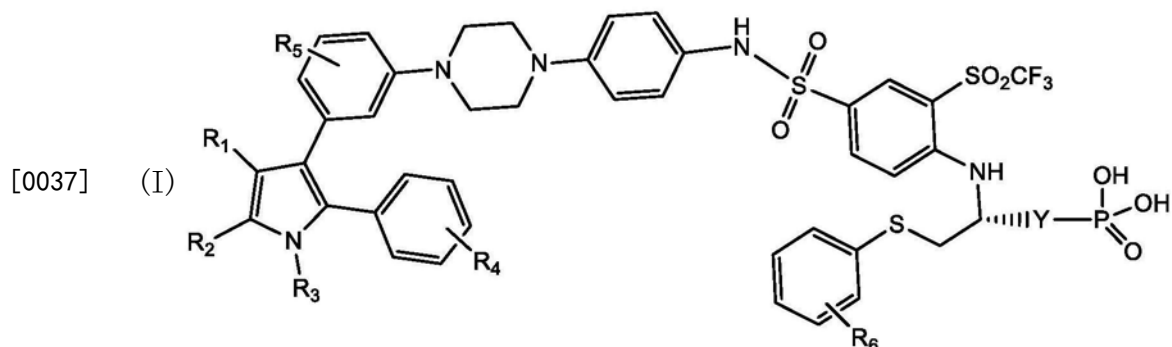
[0032] 在某些实施例中,该至少一种生物标志物进一步包含选自下组的一种或多种另外的生物标志物,该组由以下组成:Bcl-xL、Bcl-2、Mcl-1、包含Bcl-xL蛋白的蛋白质复合物、包含Bcl-2的蛋白质复合物,或其任何组合。

[0033] 在某些实施例中,比较的步骤是用算法进行的。

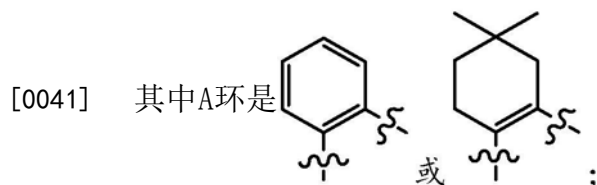
[0034] 在某些实施例中,该算法包括分类算法。

[0035] 在某些实施例中,差异包括测试样品中水平的测试得分和参考水平的参考得分之间的差异,并且其中测试得分和参考得分由算法计算。

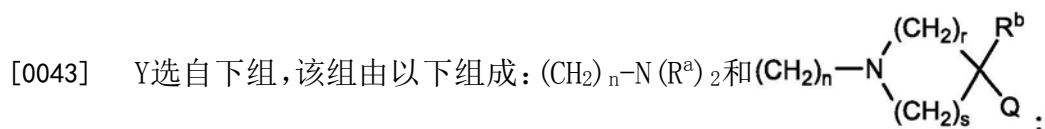
[0036] 在某些实施例中,本文所述的Bc1-2/Bc1-xL双重抑制剂是具有式(I)、(II)或(III)的结构的化合物:



[0040] 或其药学上可接受的盐;



[0042] 取代的或未取代的X选自下组,该组由以下组成:亚烷基、亚烯基、环亚烷基、环亚烯基和杂环亚烷基;



[0044] Q选自下组,该组由以下组成:O、O  $(CH_2)_{1-3}$ 、 $NR^c$ 、 $NR^c$  ( $C_{1-3}$ 亚烷基)、OC(=O) ( $C_{1-3}$ 亚烷

基)、C(=O)O、C(=O)O(C<sub>1-3</sub>亚烷基)、NHC(=O)(C<sub>1-3</sub>亚烷基)、C(=O)NH和C(=O)NH(C<sub>1-3</sub>亚烷基)；

[0045] Z是O或NR<sup>c</sup>；

[0046] R<sub>1</sub>和R<sub>2</sub>独立地选自下组，该组由以下组成：H、CN、NO<sub>2</sub>、卤代、烷基、环烷基、烯基、环烯基、炔基、芳基、杂芳基、杂环烷基、OR'、SR'、NR'R''、COR'、CO<sub>2</sub>R'、OCOR'、CONR'R''、CONR'SO<sub>2</sub>R''、NR'COR''、NR'CONR''R''、NR'C=SNR''R''、NR'SO<sub>2</sub>R''、SO<sub>2</sub>R'和SO<sub>2</sub>NR'R''；

[0047] R<sub>3</sub>选自下组，该组由以下组成：H、烷基、环烷基、烯基、环烯基、炔基、芳基、杂芳基、杂环烷基、OR'、NR'R''、OCOR'、CO<sub>2</sub>R'、COR'、CONR'R''、CONR'SO<sub>2</sub>R''、C<sub>1-3</sub>亚烷基CH(OH)CH<sub>2</sub>OH、SO<sub>2</sub>R'和SO<sub>2</sub>NR'R''；

[0048] R'、R''和R'''独立地是H、烷基、环烷基、烯基、环烯基、炔基、芳基、杂芳基、C<sub>1-3</sub>亚烷基杂环烷基、或杂环烷基；

[0049] R'和R''、或R''和R'''可以与它们所键合的原子一起形成3至7元环；

[0050] R<sub>4</sub>是氢、卤代、C<sub>1-3</sub>烷基、CF<sub>3</sub>或CN；

[0051] R<sub>5</sub>是氢、卤代、C<sub>1-3</sub>烷基、取代的C<sub>1-3</sub>烷基、羟基烷基、烷氧基或取代的烷氧基；

[0052] R<sub>6</sub>选自下组，该组由以下组成：H、CN、NO<sub>2</sub>、卤代、烷基、环烷基、烯基、环烯基、炔基、芳基、杂芳基、杂环烷基、OR'、SR'、NR'R''、CO<sub>2</sub>R'、OCOR'、CONR'R''、CONR'SO<sub>2</sub>R''、NR'COR''、NR'CONR''R''、NR'C=SNR''R''、NR'SO<sub>2</sub>R''、SO<sub>2</sub>R'和SO<sub>2</sub>NR'R''；

[0053] 取代的或未取代的R<sub>7</sub>选自下组，该组由以下组成：氢、烷基、烯基、(CH<sub>2</sub>)<sub>0-3</sub>环烷基、(CH<sub>2</sub>)<sub>0-3</sub>环烯基、(CH<sub>2</sub>)<sub>0-3</sub>杂环烷基、(CH<sub>2</sub>)<sub>0-3</sub>芳基和(CH<sub>2</sub>)<sub>0-3</sub>杂芳基；

[0054] R<sub>8</sub>选自下组，该组由以下组成：氢、卤代、NO<sub>2</sub>、CN、CF<sub>3</sub>SO<sub>2</sub>和CF<sub>3</sub>；

[0055] R<sub>a</sub>选自下组，该组由以下组成：氢、烷基、杂烷基、烯基、羟基烷基、烷氧基、取代的烷氧基、环烷基、环烯基和杂环烷基；

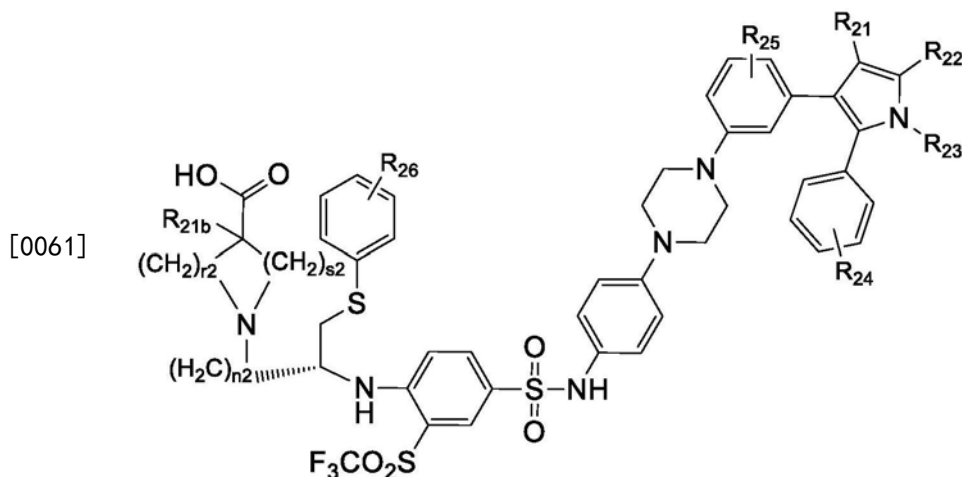
[0056] R<sub>b</sub>是氢或烷基；

[0057] R<sub>c</sub>选自下组，该组由以下组成：氢、烷基、取代的烷基、羟基烷基、烷氧基和取代的烷氧基；并且

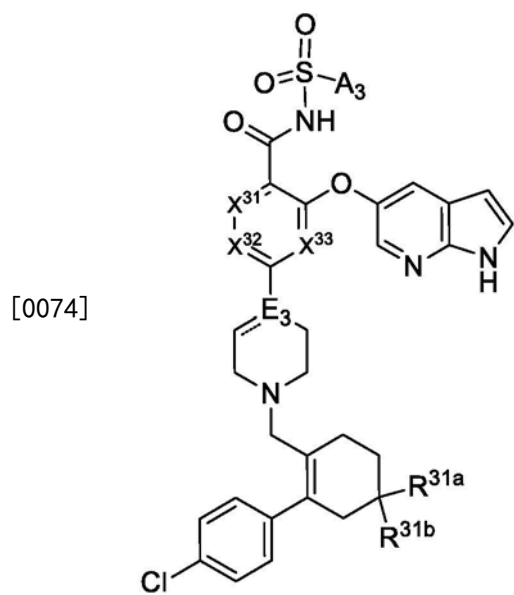
[0058] n、r和s独立地是1、2、3、4、5或6。

[0059] 在某些实施例中，本文所述的Bc1-2/Bc1-xL双重抑制剂是具有式(IV)的结构的化合物：

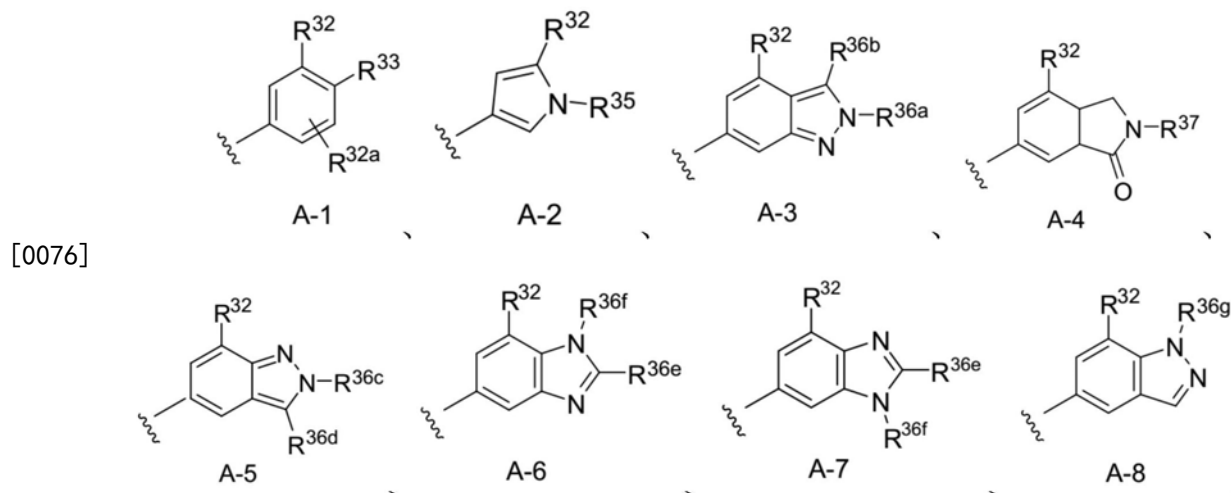
[0060] (IV)

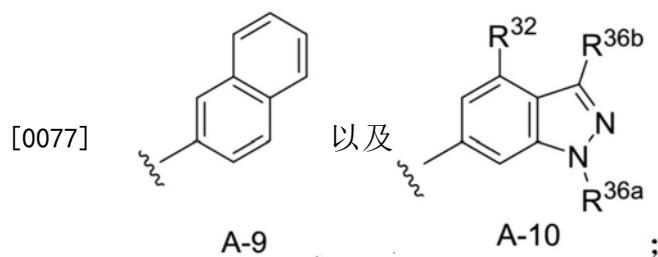


- [0062] 或其药学上可接受的盐；
- [0063]  $R_{21}$ 是 $SO_2R_2'$ ；
- [0064]  $R_{22}$ 是烷基，优选 $C_1$ - $C_4$ 烷基，更优选甲基、丙基或异丙基；
- [0065]  $R_{23}$ 是烷基，优选 $C_1$ - $C_4$ 烷基，更优选甲基、丙基或异丙基；
- [0066]  $R_{24}$ 是卤素，优选氟、氯；
- [0067]  $R_{25}$ 是卤素，优选氟、氯；
- [0068]  $R_{26}$ 选自H、卤素、烷基，优选氟、氯、 $C_1$ - $C_4$ 烷基，更优选甲基、丙基、异丙基；
- [0069]  $R_{21b}$ 是H或烷基，优选 $C_1$ - $C_4$ 烷基，更优选甲基、丙基或异丙基；
- [0070]  $n_2$ 、 $r_2$ 和 $s_2$ 独立地是1、2、3、4、5或6，更优选地 $r_2$ 和 $s_2$ 都是2，并且 $n_2$ 是3、4或5，更优选地， $n_2$ 、 $r_2$ 和 $s_2$ 都是2；并且
- [0071]  $R_2'$ 是烷基，优选 $C_1$ - $C_4$ 烷基，更优选甲基、丙基或异丙基。
- [0072] 在某些实施例中，本文所述的Bc1-2抑制剂是具有式(V)的结构的化合物：
- [0073] (V)



- [0075] 或其药学上可接受的盐； $A_3$ 选自下组，该组由以下组成：





[0078] E<sub>3</sub>是碳原子,并且==是双键;或

[0079] E<sub>3</sub>是-C(H)-,并且==是单键;或

[0080] E<sub>3</sub>是氮原子,并且==是单键;

[0081] X<sup>31</sup>、X<sup>32</sup>和X<sup>33</sup>各自独立地选自下组,该组由以下组成:-CR<sup>38</sup>=和-N=;

[0082] R<sup>31a</sup>和R<sup>31b</sup>与它们所附接的碳原子一起形成3元、4元或5元任选取代的环烷基;或

[0083] R<sup>31a</sup>和R<sup>31b</sup>与它们所附接的碳原子一起形成4元或5元任选取代的杂环;

[0084] R<sup>32</sup>选自下组,该组由以下组成:-NO<sub>2</sub>、-SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>和-SO<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>;

[0085] R<sup>32a</sup>选自下组,该组由以下组成:氢和卤素;

[0086] R<sup>33</sup>选自下组,该组由以下组成:氢、-CN、-C≡CH和-N(R<sup>34a</sup>)(R<sup>34b</sup>);

[0087] R<sup>34a</sup>选自下组,该组由以下组成:任选取代的C<sub>1-6</sub>烷基、任选取代的C<sub>3-6</sub>环烷基、杂环、杂烷基、(环烷基)烷基和(杂环)烷基;

[0088] R<sup>34b</sup>选自下组,该组由以下组成:氢和C<sub>1-4</sub>烷基;

[0089] R<sup>35</sup>选自下组,该组由以下组成:任选取代的C<sub>1-6</sub>烷基、杂环、杂烷基、(环烷基)烷基和(杂环)烷基;

[0090] R<sup>36a</sup>、R<sup>36c</sup>、R<sup>36e</sup>、R<sup>36f</sup>和R<sup>36g</sup>各自独立地选自下组,该组由以下组成:氢、任选取代的C<sub>1-6</sub>烷基、任选取代的C<sub>3-6</sub>环烷基、任选取代的芳基、任选取代的杂芳基、杂环、杂烷基、(环烷基)烷基和(杂环)烷基;

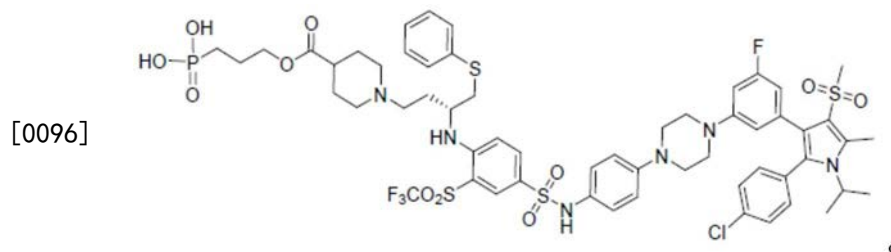
[0091] R<sup>36b</sup>和R<sup>36d</sup>各自独立地选自下组,该组由以下组成:氢、C<sub>1-4</sub>烷基和卤素;

[0092] R<sup>37</sup>选自下组,该组由以下组成:任选取代的C<sub>1-6</sub>烷基、杂环、杂烷基、(环烷基)烷基和(杂环)烷基;并且

[0093] R<sup>38</sup>选自下组,该组由以下组成:氢和卤素。

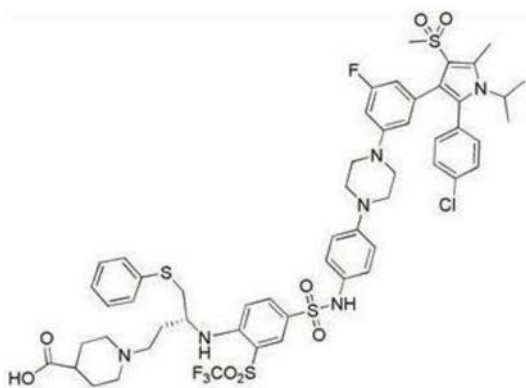
[0094] 在某些实施例中,Bcl-2/Bcl-xL双重抑制剂或Bcl-xL抑制剂或Bcl-2抑制剂是选自表1-A、表1-B和表1-C的化合物或其药学上可接受的盐。

[0095] 在某些实施例中,Bcl-2/Bcl-xL双重抑制剂是具有以下结构的(R)-2-(1-(3-(4-(N-(4-(4-(3-(2-(4-氯苯基)-1-异丙基-5-甲基-4-(甲基磺酰基)-1H-吡咯-3-基)-5-氟苯基)哌嗪-1-基)苯基)氨磺酰基)-2-(三氟甲基磺酰基)苯基氨基)-4-(苯硫基)丁基)哌啶-4-羧基氧基)乙基膦酸(在本文中还被称为“化合物A15”),或其药学上可接受的盐:



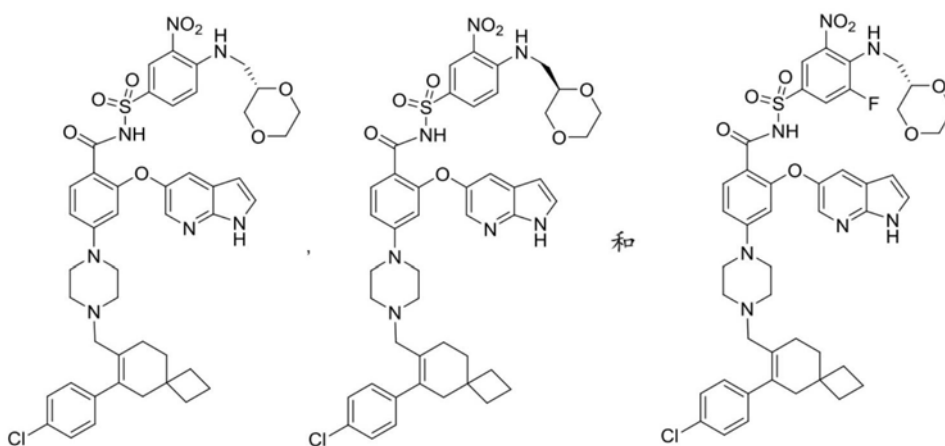
[0097] 在某些实施例中, Bc1-2/Bc1-xL双重抑制剂是具有以下结构的(R)-1-(3-(4-(N-(4-(4-(3-(2-(4-氯苯基)-1-异丙基-5-甲基-4-(甲基磺酰基)-1H-吡咯-3-基)-5-氟苯基)哌嗪-1-基)苯基)氨磺酰基)-2-(三氟甲基磺酰基)苯基氨基)-4-(苯硫基)丁基)哌啶-4-甲酸(在本文中还被称为“化合物B4”),或其药学上可接受的盐:

[0098]



[0099] 在某些实施例中, Bc1-2抑制剂选自具有以下结构的化合物

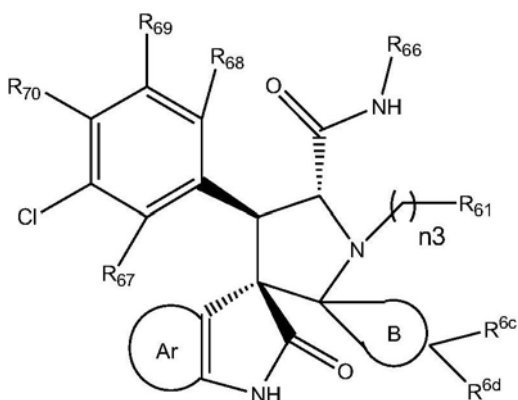
[0100]



[0101] 或其药学上可接受的盐。

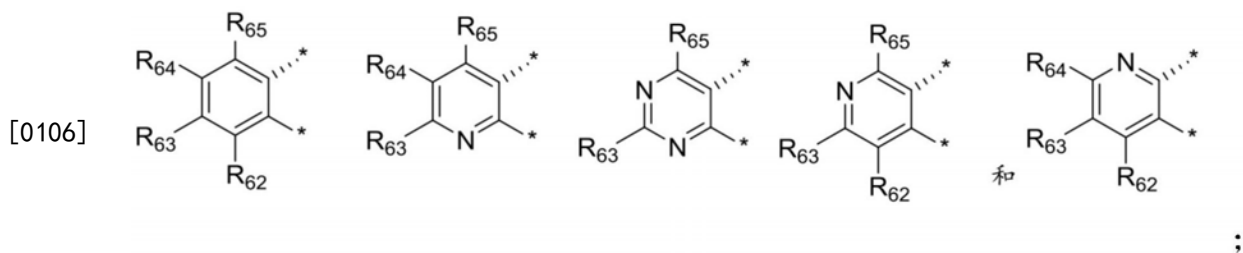
[0102] 在某些实施例中, MDM2抑制剂包含具有以下式(VI)的化学结构:

[0103]



[0104] 或其药学上可接受的盐,其中

[0105]  选自下组,该组由以下组成:

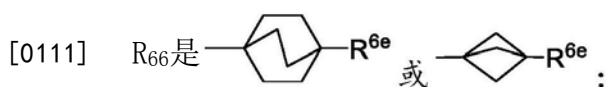


[0107] B是C<sub>4-7</sub>碳环；

[0108] R<sub>61</sub>是H、取代的或未取代的C<sub>1-4</sub>烷基、取代的或未取代的环烷基、取代的或未取代的杂环烷基、OR<sup>6a</sup>、或NR<sup>6a</sup>R<sup>6b</sup>；

[0109] n<sub>3</sub>是0、1或2；

[0110] R<sub>62</sub>、R<sub>63</sub>、R<sub>64</sub>、R<sub>65</sub>、R<sub>67</sub>、R<sub>68</sub>、R<sub>69</sub>和R<sub>70</sub>独立地选自下组，该组由以下组成：H、F、Cl、CH<sub>3</sub>和CF<sub>3</sub>；



[0112] R<sup>6a</sup>是氢或取代的或未取代的C<sub>1-4</sub>烷基；

[0113] R<sup>6b</sup>是氢或取代的或未取代的C<sub>1-4</sub>烷基；

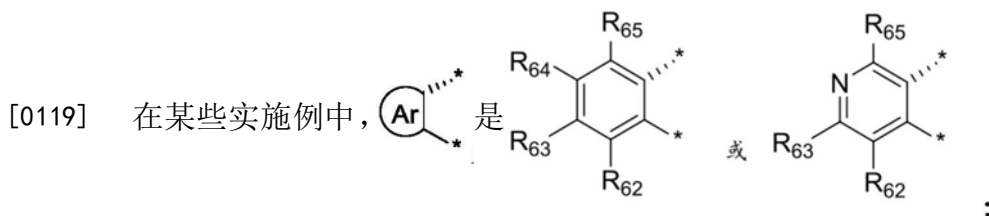
[0114] R<sup>6c</sup>和R<sup>6d</sup>是环B的一个碳原子上的取代基，其中

[0115] R<sup>6c</sup>是H、C<sub>1-3</sub>烷基、C<sub>1-3</sub>亚烷基-OR<sup>6a</sup>、OR<sup>6a</sup>或卤代；


[0116] R<sup>6d</sup>是H、C<sub>1-3</sub>烷基、C<sub>1-3</sub>亚烷基-OR<sup>6a</sup>、OR<sup>6a</sup>或卤代；或

[0117] R<sup>6c</sup>和R<sup>6d</sup>与它们所附接的碳一起形成4元至6元螺取代基，任选地包含氧原子；并且

[0118] R<sup>6e</sup>是-C(=O)OR<sup>6a</sup>、-C(=O)NR<sup>6a</sup>R<sup>6b</sup>或-C(=O)NHSO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>。



[0121] R<sup>6c</sup>和R<sup>6d</sup>是F和F、H和H、OH和CH<sub>3</sub>、OH和H、CH<sub>3</sub>和CH<sub>3</sub>、CH<sub>3</sub>和OH、H和OH、CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>和CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>、或CH<sub>2</sub>OH和CH<sub>2</sub>OH。

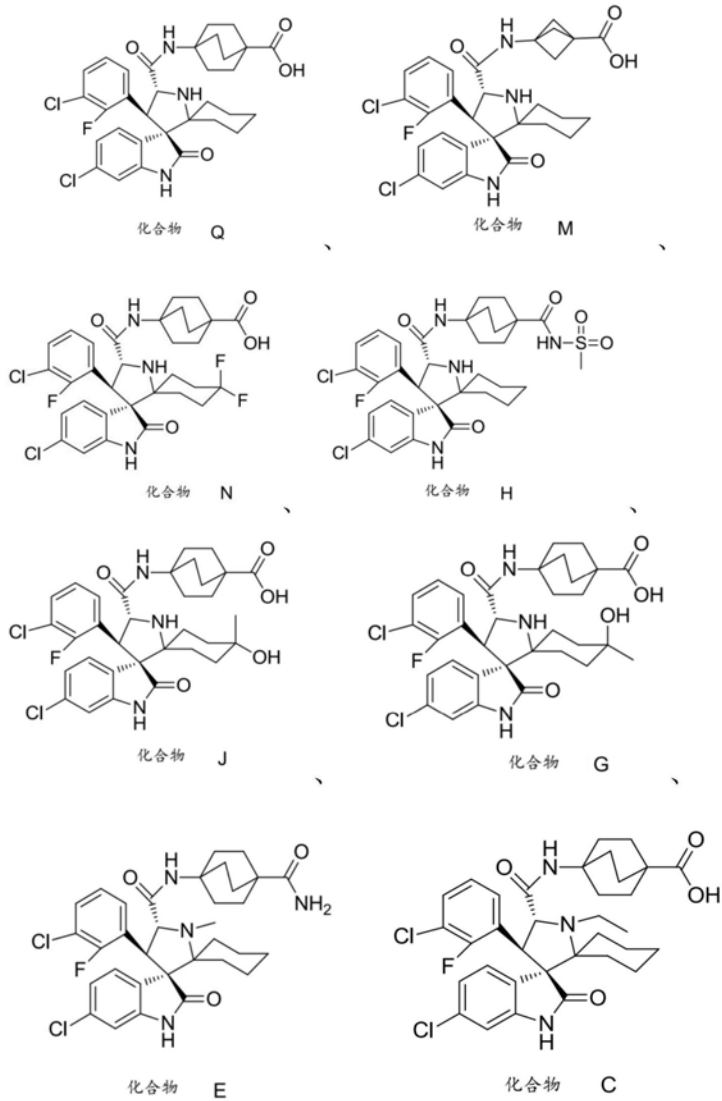
[0122] 在某些实施例中， R<sub>61</sub>是H、CH<sub>3</sub>或CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>。

[0123] 在某些实施例中，R<sub>62</sub>是H；R<sub>63</sub>是卤代；R<sub>64</sub>和R<sub>65</sub>是H。

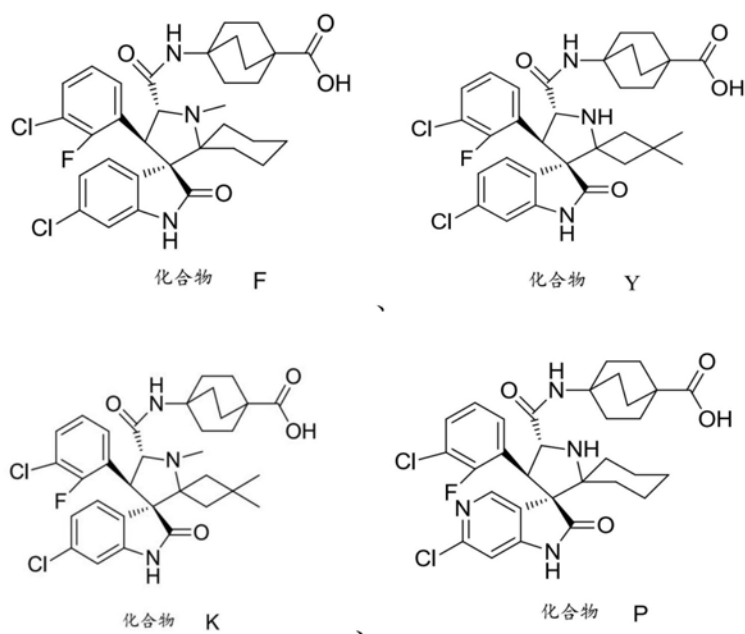
[0124] 在某些实施例中，R<sub>67</sub>是氟；R<sub>68</sub>、R<sub>69</sub>和R<sub>70</sub>中的每个是H；并且R<sup>6e</sup>是-C(=O)OH、-C(=O)NH<sub>2</sub>或-C(=O)NHSO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>。

[0125] 在某些实施例中，MDM2抑制剂是选自以下的化合物：

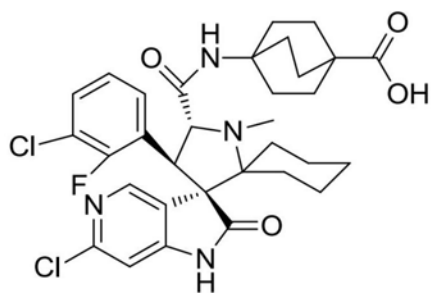
[0126]



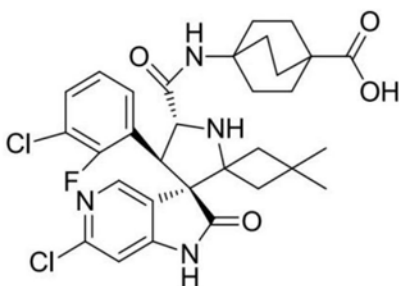
[0127]





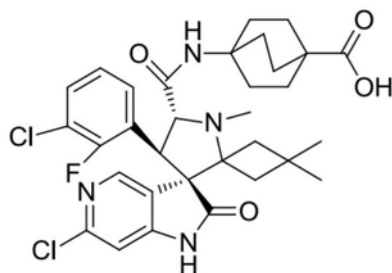


化合物 T



化合物 S

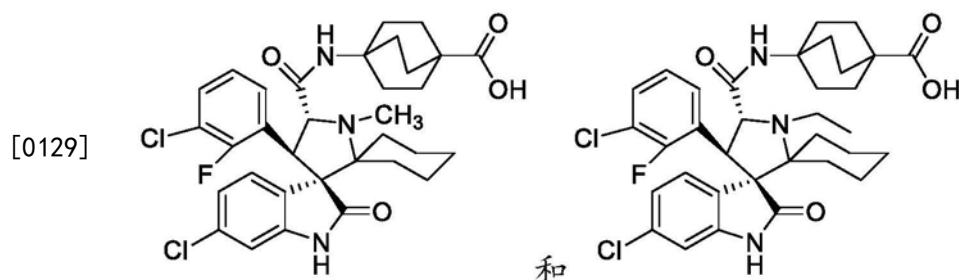
和



化合物 W

或药学上可接受的盐。

[0128] 在某些实施例中,MDM2抑制剂是



[0129]

和

[0130] 或其药学上可接受的盐。

[0131] 在某些实施例中,MDM2抑制剂是化合物C,或药学上可接受的盐。

[0132] 在又另一个方面,本披露提供了用于在本文所述的方法中使用的试剂盒。在一个实施例中,试剂盒包含一种或多种用于测量至少一种包含Noxa的生物标志物的水平的试剂。在一个实施例中,试剂盒包含一种或多种用于测量至少一种包含ASCL1的生物标志物的水平的试剂。在一个实施例中,试剂盒包含一种或多种用于测量至少一种包含Noxa和ASCL1两者的生物标志物的水平的试剂。

[0133] 在某些实施例中,用于测量Noxa水平的试剂包含可以与Noxa的多核苷酸杂交的引物或探针,或可以与Noxa的蛋白质特异性结合的抗体。在某些实施例中,用于测量ASCL1水平的试剂包含可以与ASCL1的多核苷酸杂交的引物或探针,或可以与ASCL1的蛋白质特异性结合的抗体。在某些实施例中,一种或多种试剂包含可以与Noxa的多核苷酸杂交的第一引物或第一探针、或可以与Noxa的蛋白质特异性结合的第一抗体,以及可以与ASCL1的多核苷酸杂交的第二引物或第二探针、或可以与ASCL1的蛋白质特异性结合的第二抗体。

[0134] 在某些实施例中,一种或多种试剂被可检测地标记。

[0135] 在另一方面,本披露提供了用于测量至少一种包含Noxa、ASCL1或两者的生物标志

物的水平的一种或多种试剂在生产用于进行本文所述方法的诊断试剂盒中的用途。在一个实施例中,该至少一种生物标志物包含Noxa。在一个实施例中,该至少一种生物标志物包含ASCL1。在一个实施例中,该至少一种生物标志物包含Noxa和ASCL1两者。

## 附图说明

[0136] 以下附图构成本说明书的一部分,并且被包括在内以进一步说明本披露的某些方面。通过参考这些附图中的一个或多个附图,结合本文中呈现的具体实施例的详细描述,可以更好地理解本披露。

[0137] 图1A和1B说明在用Bcl-2/Bcl-xL双重抑制剂化合物A15处理的胃癌PDX(患者来源的异种移植)模型中,Noxa表达水平与肿瘤消退相关联。

[0138] 图2A和2B说明在用Bcl-2/Bcl-xL双重抑制剂化合物A15处理的食管癌PDX(患者来源的异种移植)模型中,Noxa表达水平与肿瘤消退相关联。

[0139] 图3A至3E说明在胃癌PDX模型中另外的生物标志物(包括PUMA(图3A)、BIM(图3B)、Bcl-xL(图3C)和Mcl-1(图3D)、Bcl-2(图3E))与肿瘤消退的关联性。

[0140] 图4A和4B说明在Toledo细胞系(图4A)和在RS4;11细胞系(图4B)中,化合物B4和参考化合物ABT-737在降低Bcl-xL:BIM或Bcl2:BIM的蛋白质复合物的水平方面的比较。

[0141] 图5A、5B和5C说明在ASCL-1-高和Noxa-高小细胞肺癌(SCLC)PDX中化合物A15的抗肿瘤活性(图5A),在所有SCLC PDX模型中化合物A15的抗肿瘤活性与Noxa表达之间的关联性(图5B),以及在ASCL-1-高SCLC PDX中化合物A15的抗肿瘤活性与Noxa表达之间的关联性(和图5C)。

[0142] 图6显示如本文提供的生物标志物的示例性序列。

## 具体实施方式

[0143] 在更详细地描述本披露之前,应理解的是本披露不限于所描述的具体实施例,因此这些当然可以改变。还应当理解,本文使用的术语仅是为了描述具体实施例的目的,而并不意图是限制性的,因为本披露的范围将仅由所附权利要求书限定。

[0144] 除非另外定义,本文所用的全部技术术语和科学术语具有与本披露所属领域的普通技术人员通常所理解的相同意义。虽然与本文所述的那些方法和材料相似或等同的任意方法和材料也可以用于实施或测试本披露,但是现在描述优选的方法和材料。

[0145] 在本说明书中引用的所有公开物和专利通过引用结合于此,就像每个单独公开物或专利被确切地并且单独地指示为通过引用被结合并且通过引用结合于此,以结合所引用的这些公开物来披露和描述这些方法和/或材料。任何公开物的引用内容是针对在提交日之前的披露,并且不能理解为承认因为先前披露而本披露不能获得比这些公开物更早的申请日。此外,所提供的公开日期可能与实际的公开日期不同,实际的公开日期可能需要单独地确认。

[0146] 如将对于本领域技术人员清楚的是,在阅读本披露时,本文描述和展示单独实施例的每一个具有离散的组分和特征,这些组分和特征可以在不偏离本披露的范围或精神的情况下易于与任何其他若干个实施例的特征分离或组合。可以按照所叙述的事件的顺序或按照逻辑上可行的任何其他顺序来进行任何叙述的方法。

### [0147] 定义

[0148] 提供以下定义来帮助读者。除非另有定义,否则本文使用的所有技术术语、符号和其他科学或医学术语或用辞旨在具有由化学和医学领域技术人员通常理解的含义。在一些情况下,为了清楚和/或为了便于参考而在本文中定义了具有通常理解的含义的术语,并且在本文中包括这些定义不应必须被解释为表示与本领域中通常理解的术语的定义之间的实质性差异。

[0149] 如本文所使用的,单数形式“一个/种(a/an)”以及“该(the)”包括复数指示物,除非上下文清楚地另外指明。

[0150] 如本文所使用的,术语“生物标志物”是指作为一些生物学状态或状况的可测量的指示物的生物分子。本文使用的术语“生物标志物”旨在涵盖例如目的多核苷酸、由目的多核苷酸编码的多肽。本文提供的生物标志物的实例可以是基因(例如,基因组DNA、cDNA)、或基因产物(例如,从基因转录的mRNA、或由基因编码的蛋白质)。本文提供的特定的生物标志物的实例包括例如Noxa和ASCL1。

[0151] 关于生物标志物的术语“水平”是指样品中存在的目的生物标志物的量或数量。这样的量或数量可以用绝对术语(即,样品中生物标志物的总数量)、或相对术语(即,样品中生物标志物的浓度或百分比)表示。可以在DNA水平(例如,如由染色体区域中基因的量或数量或拷贝数表示)、RNA水平(例如,如mRNA量或数量表示)、或蛋白质水平(例如,如蛋白质质量或数量或蛋白质复合物量或数量表示)上测量生物标志物的水平。

[0152] 值得注意的是,在本披露中,例如“包括/包含/含有(comprises/comprised/comprising/contains/containing)”等术语旨在是包括性的或开放式的,并且不排除另外的、未列举的元素或方法步骤。

[0153] 术语“测定”、“测量”和“检测”可互换地使用,并且是指定量和半定量的测定。

[0154] 术语“杂交”是指核酸分子的至少部分互补的链的结合、双链化或配对。当存在避免与非靶核酸序列非特异性结合的足够程度的互补性时,核酸链可以与靶核酸链特异性杂交。对核酸杂交的大量指导可见于,例如,Tijssen Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Acid Probes[生物化学和分子生物学实验室技术:与核酸探针杂交]第I部分,第2章,“Overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays[杂交原理和核酸探针测定策略的综述],”(1993)爱思维尔公司(Elsevier),纽约州)。

[0155] 术语“核酸”和“多核苷酸”可互换地使用,并且是指任何长度的核苷酸的聚合形式(脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸,或其类似物)。多核苷酸可以具有任何三维结构并且可以执行任何已知或未知的功能。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、信使RNA(mRNA)、转移RNA、核糖体RNA、核酶、cDNA、shRNA、单链短或长RNA、重组多核苷酸、分支多核苷酸、质粒、载体、任何序列的分离的DNA、控制区、任何序列的分离的RNA、核酸探针和引物。核酸分子可以是线性或环状的。

[0156] 术语“互补性”是指通过传统的沃森-克里克类型或其他非传统类型在核酸序列和另一种核酸序列之间进行碱基配对的能力。互补性可以是部分的或全部的。当一个或多个核酸碱基根据碱基配对原则不匹配时,发生部分互补性。百分比互补性表示核酸分子中可与第二核酸序列形成碱基对的(例如,沃森-克里克碱基配对)的核酸碱基的百分比(例如,

10个碱基中的5、6、7、8、9、10个碱基配对是50%、60%、70%、80%、90%和100%互补)。

[0157] 通常,“蛋白质”是多肽(即,通过肽键彼此连接的至少两个氨基酸的串)。蛋白质可以包括氨基酸以外的部分(例如,可以是糖蛋白)和/或还可以另外进行加工或修饰。本领域普通技术人员将理解,“蛋白质”可以是由细胞产生的完整多肽链(具有或不具有信号序列),或者可以是其功能部分。本领域普通技术人员将进一步理解,蛋白质有时可包含多于一个的多肽链,例如通过一个或多个二硫键连接或通过其他方式缔合。

[0158] 如本文所使用的,关于受试者对治疗产生应答的“可能性”和“可能”是对该受试者中发生治疗应答的可能性的度量。它可以与“概率”互换地使用。可能性是指大于推测但小于确定性的概率。因此,如果理性人使用常识、训练或经验得出结论认为鉴于当前情形,治疗应答是可能的,则治疗应答是可能的。在一个实施例中,术语“可能性”和“可能”表示发生治疗应答的可能性的百分比的机会。在一些实施例中,患有癌症的受试者被鉴定为“可能应答”是指如下患有癌症的受试者,该受试者对用Bcl-2/Bcl-xL抑制剂和Bcl-2抑制剂或Bcl-xL抑制剂的治疗产生应答有着大于30%机会、大于40%机会、大于50%机会、大于60%机会、大于70%机会、大于80%机会、大于90%机会。

[0159] 如在受试者对癌症疗法的治疗应答的上下文中使用的术语“应答的”或“应答性”可互换地使用,并且是指受试者对治疗的有益应答,而不是不利应答(即不良事件)。在受试者中,有益应答可以根据许多临床参数来表达,这些临床参数包括可检测到的肿瘤消失(完全应答),肿瘤大小和/或癌细胞数减小(部分应答),肿瘤生长停滞(稳定的疾病),肿瘤生长速度降低(其延长整体存活期),可能导致肿瘤消退或排斥的抗肿瘤免疫反应增强;与肿瘤有关的一种或多种症状在某种程度上的减轻;治疗后的存活期长度增加;和/或治疗后给定点处的死亡率降低。肿瘤大小和/或癌细胞数的持续增加(没有任何有利于整体存活期的生长速率的降低)、和/或肿瘤转移表明缺乏对治疗的有益应答,并因此降低了应答性。

[0160] 如本文所述,术语“有效量”是指当通过本发明的方法施用,足以将用于治疗目的病症或疾病的一种或多种活性成分有效递送至有需要的个体的该一种或多种活性成分的量。在癌症或其他增殖性障碍的情况下,该药剂的有效量可以减少(即,在某种程度上延迟并且优选地停止)不想要的细胞增殖;减少癌细胞的数量;减小肿瘤大小;抑制(即,在一定程度上延迟并且优选地停止)癌细胞浸润到外周器官中;抑制(即,在一定程度上延迟并且优选地停止)肿瘤转移;在一定程度上抑制肿瘤生长;减少靶细胞中的Bcl-2/Bcl-xL信号传导;和/或在一定程度上缓解一种或多种症状。

[0161] 如本文所使用的,“癌症”是范围广泛的细胞恶性肿瘤的通用名称,其特征生长不受控、缺乏分化以及侵袭局部组织和转移的潜力或能力。这些赘生性恶性肿瘤以不同程度的患病率影响体内的每个组织和器官。癌症涉及具有致癌细胞典型特征(例如不受控的增殖、永生、转移潜力、快速生长和增殖速率以及某些特有形态特征)的细胞的存在。癌细胞通常呈肿瘤形式,但是此类细胞可以单独存在,或可以作为独立细胞(例如白血病细胞)在血流中循环。术语癌症和肿瘤在本文中可互换地使用。该术语包括所有已知的癌症和赘生性病症(无论被描述为恶性、良性、血液学的还是实体性的),以及所有阶段和等级的癌症(包括转移前和转移后的癌症)。

[0162] 如本文所使用的,术语“实体瘤”是指不包含囊肿或液体区域的任何癌症。实体瘤通常不包括白血病(即,血癌)。实体瘤可以是良性或恶性的。如本文所使用的,实体瘤的类

型包括但不限于,肾上腺皮质癌、肛门癌、星形细胞瘤、儿童小脑或大脑癌、基底细胞癌、胆道癌、膀胱癌(例如,泌尿膀胱癌)、骨肿瘤、脑癌、小脑星形细胞瘤、大脑星形细胞瘤/恶性胶质瘤、室管膜瘤、髓母细胞瘤、幕上原始神经外胚层瘤、视觉通路和下丘脑胶质瘤、乳腺癌、伯基特淋巴瘤、宫颈癌、结肠癌、肺气肿、子宫内膜癌、食管癌、尤因氏肉瘤、视网膜母细胞瘤、胃/胃部癌、胶质瘤、头颈癌、心脏癌症、霍奇金淋巴瘤、胰岛细胞癌(内分泌胰腺癌)、卡波西肉瘤、肾癌(肾细胞癌)、喉癌、肝癌(例如,肝细胞癌)、肺癌(例如,小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺腺癌、肺鳞状细胞癌)、神经母细胞瘤、非霍奇金淋巴瘤、卵巢癌、胰腺癌、胃肠道癌、咽癌、前列腺癌、直肠癌、肾细胞癌(肾癌)、视网膜母细胞瘤、尤因肿瘤家族、皮肤癌、胃癌、睾丸癌、咽喉癌、甲状腺癌、胆管癌、阴道癌和小细胞癌(例如,小细胞肺癌(SCLC)、肺外小细胞癌(EPSCC)、前列腺小细胞癌、或膀胱小细胞癌)、黑素瘤、皮肤鳞状细胞癌、胶质母细胞瘤、子宫肿瘤、骨肉瘤、子宫癌、子宫CS、结肠直肠癌、宫颈癌、肉瘤、嫌色细胞癌、肾细胞癌(RCC)、透明细胞RCC、乳突状RCC、葡萄膜黑素瘤、睾丸生殖细胞瘤、低分级胶质瘤(LGG)、间皮瘤、PCPG、或胸腺瘤。

[0163] 如本文所使用的,“神经内分泌癌”是起因于神经内分泌系统(神经系统和内分泌腺激素相互作用的弥散系统)的癌症;或起因于通过例如对生存必要的肽的选择性肿瘤基因表达(STEPS)等致癌过程而获得神经内分泌细胞的一些特性的非内分泌细胞的癌症(参见, North (2000) *Exper. Physiol.* [实验生理学] 85S:27S-40S)。大多数详细描述成人神经内分泌肿瘤都具有独特性,并源于已知的原发位点,包括类癌、嗜铬细胞瘤和梅克尔细胞瘤。类癌包括胃癌、胰腺癌、结肠癌、肝癌、肺癌、卵巢癌、乳腺癌、睾丸癌和宫颈癌。嗜铬细胞瘤是一种肾上腺髓质癌,通常会导致肾上腺产生过多的儿茶酚胺。梅克尔细胞瘤是在皮肤上或仅在皮肤下形成的癌症,但有时也被认为是由下面的软组织引起的。它们也被称为皮肤的神经内分泌癌。

[0164] 神经内分泌癌的实例包括但不限于,小细胞癌、乳腺癌、小细胞肺癌(SCLC)、肺大细胞神经内分泌癌(LCNEC)、甲状腺癌、胃癌、胰腺癌、中肠癌、肝癌、胆囊癌、卵巢癌、宫颈癌、食管癌、胃肠道癌、头颈癌、胆管癌、嗜铬细胞瘤和梅克尔细胞瘤。

[0165] 如本文所使用的,“小细胞癌”是指以短的倍增时间、高的生长比率和转移的早期发展为特征的高度恶性癌症类型。小细胞癌最常见于肺,并且偶发于其他身体部位,例如子宫颈、前列腺和胃肠道。示例性小细胞癌包括小细胞肺癌、肺外小细胞癌(EPSCC)、前列腺小细胞癌、膀胱小细胞癌。

[0166] 术语“血液学癌症”是指在血液形成组织(例如骨髓)中或在免疫系统的细胞中开始的任何癌症。在某些实施例中,血液学癌症是慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、急性髓性白血病(AML)、T细胞幼淋巴细胞白血病、多发性骨髓瘤(MM)、华氏巨球蛋白血症(WM)、急性淋巴瘤母细胞性白血病(ALL)或淋巴瘤(例如,套细胞淋巴瘤、弥漫性大B细胞淋巴瘤)。

[0167] 如本文所使用的,术语“样品”是指来源于受试者的生物样品,并且包含一种或多种目的生物标志物。样品的实例包括但不限于体液,例如血液、血浆、血清、尿液、阴道液、子宫或阴道冲洗液、胸膜液、腹水液、脑脊液、唾液、汗液、眼泪、痰、细支气管肺泡灌洗液等;以及组织,例如活检组织(例如,活检的骨组织、骨髓、乳腺组织、胃肠道组织、肺组织、肝组织、前列腺组织、脑组织、神经组织、脑膜组织、肾组织、子宫内膜组织、宫颈组织、淋巴结组织、肌肉组织或皮肤组织)、石蜡包埋的组织。在某些实施例中,样品可以是如下生物样品,该生

物样品包含癌细胞(包括循环癌细胞)或来自肿瘤周围或与肿瘤相邻的组织的细胞。在一些实施例中,生物样品是例如通过肿瘤活检或细针抽吸从肿瘤组织或从肿瘤周围或与肿瘤相邻的组织获得的新鲜或存档的样品。在一些实施例中,样品可以是任何含有癌细胞或怀疑含有癌细胞的生物流体(例如在外周血单核细胞(PBMC)中)。通常在医院或诊所之后,例如在活检期间,根据标准方案进行从受试者收集样品。

[0168] 如本文所使用的,术语“测试样品”是指来源于需要癌症治疗的受试者的样品,并且代表该受试者的癌症病情。例如,测试样品可以包含癌细胞。

[0169] 如本文所使用的,术语“对照样品”是指除了在参考水平上表达目的生物标志物,还在其他方面与测试样品相当的样品。对照样品的实例包括但不限于参考癌细胞或组织样品,或健康、非癌组织样品,或二倍体、非转化的、非癌性、基因组稳定的健康人类细胞系(只要它们在参考水平上表达目的生物标志物)。

[0170] 如本文所使用的,术语“受试者”是指人类或任何非人类动物(例如,小鼠、大鼠、兔、狗、猫、牛、猪、绵羊、马或灵长类动物)。在许多实施例中,受试者是人类。受试者可以是患者,是指呈现给医疗提供者以诊断或治疗疾病的人。术语“受试者”在本文中“个体”或“患者”互换地使用。受试者可以患有或易患疾病或障碍,但是可以显示或不显示该疾病或障碍的症状。

[0171] 除非另有说明,否则如本文所使用的术语癌症的“治疗(treating/treatment)”是指部分地或完全地逆转、减轻、抑制或阻止受试者中肿瘤生长、肿瘤转移或其他引起癌症的细胞或增生性细胞的进展。

[0172] 如本文所使用的,术语“预后(prognose/prognosing)”是指疾病或病症的未来病程或结果的预测或预报。

[0173] 如本文所使用的,“共同施用”或“组合疗法”应被理解为使用单独的配制品或单一药物配制品施用两种或更多种活性剂,或以任何顺序连续施用,使得存在两种(或所有)活性剂同时发挥其生物学活性的一段时间。本文预期一种活性剂(例如,Bcl-2/Bcl-xL双重抑制剂或Bcl-2抑制剂或Bcl-xL抑制剂)可以改善第二药剂的活性,例如,可以使靶细胞(例如癌细胞)对第二药剂的活性敏感。共同施用不需要同时、按相同的频率或通过相同的施用途径来施用这些药剂。

[0174] 如本文所使用的,术语“烷基”是指直链和支链的饱和 $C_{1-10}$ 烃基团,包括但不限于甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、仲丁基、叔丁基、正戊基、2-甲基丁基、3-甲基丁基、2,2-二甲基丙基、正己基、2-甲基戊基、3-甲基戊基、4-甲基戊基、2,2-二甲基丁基、2,3-二甲基丁基、3,3-二甲基丁基和2-乙基丁基。

[0175] 术语 $C_{m-n}$ 表示烷基基团具有“m”至“n”个碳原子。

[0176] 术语“亚烷基”是指具有取代基的烷基基团。例如,烷基(例如甲基)或亚烷基(例如 $-CH_2-$ )基团可以被独立地选择的卤代、三氟甲基、三氟甲氧基、羟基、烷氧基、硝基、氰基、烷基氨基或氨基基团中的一个或多个(并且典型地一个至三个)取代。

[0177] 除了含有碳-碳双键外,术语“烯基”被等同地定义为“烷基”,例如乙烯基、丙烯基和丁烯基。除了含有碳-碳双键外,术语“亚烯基”与“亚烷基”被等同地定义。除了该基团含有碳-碳三键外,术语“炔基”和“亚炔基”被等同地定义为“烷基”和“亚烷基”。

[0178] 如本文所使用的,术语“卤代”或“卤素”被定义为氟、氯、溴或碘。



的环丙基、环丁基、环戊基、环己基、环庚基和环辛基。

[0192] 如本文所使用的,术语“杂环烷基”表示含有总计4个至12个原子的单环或二环、饱和或部分不饱和的环系统,其中这些原子中的一个至五个独立地选自氮、氧和硫,并且剩余原子是碳。杂环烷基基团的非限制性实例是氮杂环丁烷基、吡咯烷基、哌啶基、哌嗪基、二氢吡咯基、吗啉基、硫代吗啉基、二氢吡啶基、氧杂环庚基、二氧杂环庚基、硫代环庚基、二氮杂环庚基,各自任选地被环原子上的独立选择的卤代、C<sub>1-6</sub>烷基、C<sub>1-6</sub>烷氧基、氰基、氨基、氨基甲酰基、硝基、羧基、C<sub>2-7</sub>烯基、C<sub>2-7</sub>炔基等中的一个或多个(并且典型地一个至三个)取代。

[0193] 用于预测MDM2抑制剂或Bcl-2/Bcl-xL双重抑制剂或Bcl-2抑制剂或Bcl-xL抑制剂的功  
效的生物标志物

[0194] 本文所述的方法和组合物部分地基于对生物标志物的发现,这些生物标志物的水平可预测患有癌症的受试者对靶向细胞凋亡途径的化合物(包括MDM2抑制剂或Bcl-2/Bcl-xL双重抑制剂或Bcl-2抑制剂或Bcl-xL抑制剂)的治疗产生应答的可能性。生物标志物还可用于在患有癌症的受试者中预测靶向细胞凋亡途径的化合物(包括MDM2抑制剂或Bcl-2/Bcl-xL双重抑制剂或Bcl-2抑制剂或Bcl-xL抑制剂)的治疗功效。

[0195] i. 细胞凋亡途径和靶向该途径的化合物

[0196] 细胞凋亡途径包括复杂网络中的多个参与者,这些参与者结合在一起调节细胞的命运。Bcl-2(B细胞淋巴瘤蛋白2)家族蛋白在线粒体介导的(也称为“内在”)途径中是细胞凋亡的关键调节因子。它们的活性与淋巴样癌症和若干种实体瘤癌症的发作有关,并且据信在许多癌症中是化学疗法抗性的关键介质。Bcl-2家族蛋白的特征在于结构性同源结构域BH1、BH2、BH3和BH4,并且可以根据每种蛋白质包含多少个同源结构域或根据其生物学活性(即,该蛋白质是否具有抗凋亡(促存活)或促凋亡(促死亡)功能)被进一步分类为三个亚族。

[0197] Bcl-2蛋白的第一亚组包含具有所有四个同源结构域(即,BH1、BH2、BH3和BH4)的蛋白质。它们的一般作用是抗-凋亡,即保护细胞免于启动细胞死亡过程。例如Bcl-2、Bcl-w、Bcl-xL、Mcl-1和Bfl-1/A1等蛋白质是该第一亚组的成员。

[0198] 属于Bcl-2蛋白的第二亚组的蛋白质包含三个同源结构域BH1、BH2和BH3,并具有促凋亡作用。该第二亚组的两种主要代表性蛋白质是Bax和Bak。

[0199] Bcl-2蛋白的第三亚组由仅包含BH3结构域的蛋白质组成,并且该亚组的成员通常被称为“仅BH3蛋白”。它们对细胞的生物学作用是促凋亡。Bim、Bid、Bad、Bik、Noxa、Hrk、Bmf和Puma是该第三亚族蛋白质的实例。

[0200] Bcl-2家族蛋白调节细胞死亡的确切机制尚不完全清楚。在Bcl-2家族蛋白调节细胞死亡的一种假设中,这些仅BH3蛋白被进一步根据其调节功能分为“激活剂”(例如Bim和Bid)、或“敏化剂”(例如Bad、Bik、Noxa、Hrk、Bmf和Puma)。

[0201] 激活剂仅BH3蛋白结合并直接激活促凋亡蛋白质。这些激活剂还可以结合并抑制抗凋亡Bcl-2家族蛋白。该结合隔离这些激活剂蛋白质并阻止它们发挥其细胞凋亡活性。

[0202] 由敏化剂肽置换这些激活剂导致Bax/Bak介导的细胞凋亡。敏化剂仅BH3蛋白仅与抗凋亡Bcl-2家族蛋白结合,并阻断其抗凋亡功能。每种敏化剂蛋白可以具有不同的特异性特征。例如,Noxa以高亲和力结合Mcl-1,BAD与Bcl-xL和Bcl-2结合但仅与Mcl-1弱结合,而PUMA与所有的这三个靶标都结合良好。这些相互作用可具有多种结果,包括体内平衡、细胞



死亡、对细胞凋亡的敏化和细胞凋亡的阻滞。

[0203] 抗凋亡(促存活)和促凋亡(促死亡)蛋白之间的平衡决定了细胞存活或死亡的命运。促存活蛋白质(例如Bcl-2和Bcl-xL)的过表达与肿瘤发生有关,并且是抗癌疗法抗性的常见原因(Vaux DL等人,Nature[自然](1988) 335:440-42;Delbridge AR等人,Cell Death Differ[细胞死亡与分化](2015) 22:1071-80)。因此,被设计成靶向抗凋亡Bcl-2家族蛋白的药剂(例如,小分子BH3模拟物)可以为癌症患者的治疗提供新的策略。然而,抗凋亡Bcl-2家族蛋白或BH3模拟物的临床可用抑制剂(包括进行临床评估的抑制剂)在血液学癌症以及实体瘤中显示出有限的功效,这可能是由于复杂的信号传导途径和肿瘤微环境所致。

[0204] 先前已经将Bcl-2/Bcl-xL双重抑制剂或Bcl-2抑制剂或Bcl-xL抑制剂描述为抗癌治疗剂(参见,例如PCT申请WO 2014113413 A1、PCT/CN 2019/098576、PCT/CN 2019/086673、PCT US 2014011571,将其各自的全部内容通过引用并入本文),并且在人类中作为单一疗法或与用于治疗疾病和病症的标准护理化学疗法药剂组合而被评估,其中对Bcl-2家族蛋白活性的抑制提供了益处。

[0205] 由于细胞凋亡途径中涉及过多的Bcl-2家族蛋白,并且这些蛋白质的天然水平可以按不同细胞类型而变化,所以很少存在通常可应用于预测特定的Bcl-2抑制剂、Bcl-xL抑制剂或Bcl-2/Bcl-xL双重抑制剂的抗癌功效的生物标志物。

[0206] 在由Bcl-2家族蛋白调节的细胞凋亡途径的上游,肿瘤抑制因子p53结合导致细胞凋亡的细胞信号。p53明显通过协同作用的转录依赖性和非依赖性机制促进细胞凋亡。例如,p53的激活诱导特异性细胞凋亡靶基因的表达,这使得Bcl-2家族的平衡向促凋亡成员转移。p53的激活还允许其快速易位至线粒体,从而促进促凋亡成员从其隔离状态释放(McBride A.等人,Frontiers in Oncology[肿瘤学前沿],(2019) 9:192,Haupt S.等人,Journal of Cell Science[细胞科学杂志],(2003) 116:4077)。除了调节细胞凋亡外,p53的激活还引发细胞周期停滞或细胞衰老(Green DR,Nature[自然],2009;458(7242):1127)。新兴证据进一步表明,p53功能障碍促进了炎症并支持肿瘤免疫逃避,因此p53功能障碍可作为肿瘤发生的免疫学驱动因素(Guo G,Cancer Research[癌症研究],2017;77(9):2292)。因此,操纵p53活性构成了癌症治疗的有吸引力的目标。

[0207] MDM2(鼠双微体2)被p53转录激活,并且MDM2反过来通过至少三种机制抑制p53活性(Wu等人,Genes Dev.[基因与发育]7:1126(1993))。首先,MDM2蛋白直接与p53反式激活结构域结合,从而抑制p53介导的反式激活。其次,MDM2蛋白包含核输出信号序列,并且在与p53结合后,该核输出信号序列诱导p53的核输出,从而阻止p53与所靶向的DNA结合。第三,MDM2蛋白是E3泛素连接酶,并且在与p53结合后,能够促进p53降解。MDM2和p53是自动调节反馈回路的一部分(Wu等人,Genes Dev.[基因与发育]7:1126(1993))。如本文所使用的,“MDM2”旨在涵盖MDM2基因、以及MDM2基因产物(例如,mRNA、蛋白质)。人类MDM2的示例性序列在NCBI登录号ABT17086、ABT17084.1、ABT17085.1或ABT17083.1下是可用的。

[0208] MDM2抑制剂干扰MDM2癌蛋白与肿瘤抑制因子p53蛋白的结合,并且充当药理学p53激活剂。先前已经将MDM2抑制剂描述为抗癌治疗剂(参见,例如美国专利号9,745,314,将其全部内容通过引用并入本文),并且在人类中作为单一疗法或与用于治疗疾病和病症的标准护理化学疗法药剂组合而被评估,其中对MDM2和MDM2相关蛋白活性的抑制提供了益处。

[0209] 本发明中披露的MDM2抑制剂抑制p53或p53相关蛋白与MDM2或MDM2相关蛋白之间

的相互作用。通过抑制MDM2或MDM2相关蛋白对p53或p53相关蛋白的负作用,本发明的MDM2抑制剂使细胞对细胞凋亡和/或细胞周期停滞的诱导剂敏感。在一个实施例中,本发明的MDM2抑制剂诱导细胞凋亡和/或细胞周期停滞。

[0210] ii.生物标志物

[0211] 本文已经鉴定出,生物标志物能够预测靶向细胞凋亡途径的化合物的应答或治疗功效的可能性。本文提供的生物标志物包括Noxa和ASCL1。

[0212] 如本文所使用的,术语“Noxa”是指Noxa基因和Noxa基因产物(例如,Noxa基因的mRNA和由Noxa基因编码的蛋白质)。Noxa基因(也被称为佛波醇-12-豆蔻酸酯-13-乙酸酯诱导的蛋白1(PMA诱导的蛋白1,或PMAIP1)基因、立即早期应答蛋白APR基因、成人T细胞白血病衍生的PMA应答性基因或APR基因)编码至少部分通过促进线粒体膜变化和促凋亡蛋白从线粒体外排来促进半胱天冬酶的激活和细胞凋亡的蛋白质。人类Noxa基因在NCBI数据库中具有基因ID为5366。人类Noxa基因的mRNA转录物具有NCBI参考序列为NM\_021127.2。由人类Noxa基因编码的蛋白质具有NCBI参考序列为NP\_066950.1。本文中将Noxa的示例性序列提供为SEQ ID NO:8(DNA序列)和SEQ ID NO:7(蛋白质序列)。

[0213] 如本文所使用的,术语“ASCL1”是指ASCL1基因和ASCL1基因产物(例如,ASCL1基因的mRNA和由ASCL1基因编码的蛋白质)。ASCL1基因(也被称为Achaete-Scute同系物1基因、Achaete-Scute家族BHLH转录因子1基因、A类碱性螺旋-环-螺旋蛋白46基因、HASH1基因、ASH1基因、MASH1基因)编码在神经元分化中起关键作用的转录因子。ASCL1的直接转录靶标包括Bcl2。人类ASCL1基因在NCBI数据库中具有基因ID为429。人类ASCL1基因的mRNA转录物具有NCBI参考序列为NM\_004316.4。由人类ASCL1基因编码的蛋白质具有NCBI参考序列为NP\_004307.2。在本文中将ASCL1的示例性序列提供为SEQ ID NO:22(DNA序列)和SEQ ID NO:21(蛋白质序列)。

[0214] ASCL1对神经元分化(例如神经内分泌细胞的正常发育)至关重要。另外,ASCL1表达与神经内分泌肺癌的生长和存活有关(Augustyn,A.等人PNAS[美国国家科学院院刊],111:14788-14793(2014))。关于小细胞肺癌(SCLC)的近期研究提出,通过四个关键转录调节因子(ASCL1、神经原性分化因子(NeuroD1)、yes相关蛋白1(YAP1)和POU 2类同源框(POU2F3))的不同表达将SCLC分为四种亚型,其中这四个转录调节因子的表达基本上是互斥的,而表达ASCL1的SCLC占SCLC的比例最大(即,约70%)(Rudin,CM等人,19:289-297,(2019))。

[0215] 本披露的发明人出人意料地发现,至少一种包含Noxa、或ASCL1或两者的生物标志物的水平与MDM2抑制剂或Bcl-2/Bcl-xL双重抑制剂或Bcl-2抑制剂或Bcl-xL抑制剂的治疗功效相关。

[0216] 在某些实施例中,该生物标志物包含含有SEQ ID NO:8的基因序列的Noxa基因、或由其编码的mRNA。在某些实施例中,该生物标志物包含含有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的Noxa蛋白。

[0217] 在某些实施例中,该生物标志物包含含有SEQ ID NO:22的基因序列的ASCL1基因、或由其编码的mRNA。在某些实施例中,该生物标志物包含含有SEQ ID NO:21的氨基酸序列的ASCL1蛋白。

[0218] 因此,基于至少一种包含Noxa、ASCL1或两者的生物标志物的测量水平,本披露提

供了用于测量至少一种包含Noxa、ASCL1或两者的生物标志物的水平的检测试剂;和用于鉴定患有癌症的受试者可能对用MDM2抑制剂或Bcl-2/Bcl-xL双重抑制剂或Bcl-2抑制剂或Bcl-xL抑制剂的治疗产生应答的方法;用于在有需要的受试者中治疗癌症的方法;以及用于在受试者中监测治疗功效的方法,该受试者患有癌症,并在治疗期内已经用MDM2抑制剂或Bcl-2/Bcl-xL双重抑制剂或Bcl-2抑制剂或Bcl-xL抑制剂进行了治疗。

[0219] 在一些实施例中,该至少一种生物标志物进一步包含选自下组的一种或多种另外的生物标志物,该组由以下组成:Bcl-xL、Bcl-2、PUMA、Mc1-1、包含Bcl-xL的蛋白质复合物、包含Bcl-2的蛋白质复合物及其任何组合。

[0220] 本文中Bcl-xL的示例性序列提供为SEQ ID NO:4 (DNA序列) 和SEQ ID NO:3 (蛋白质序列)。本文中Bcl-2的示例性序列提供为SEQ ID NO:2和14 (DNA序列) 以及SEQ ID NO:1和13 (蛋白质序列)。本文中PUMA的示例性序列提供为SEQ ID NO:10 (DNA序列) 和SEQ ID NO:9 (蛋白质序列)。本文中Mc1-1的示例性序列提供为SEQ ID NO:12、18和20 (DNA序列) 以及SEQ ID NO:11、17和19 (蛋白质序列)。

[0221] 在一些实施例中,该蛋白质复合物包含与仅BH3蛋白或与包含BH3结构域的蛋白质复合的Bcl-xL蛋白。在一些实施例中,该蛋白质复合物进一步包含与仅BH3蛋白或与包含BH3结构域的蛋白质复合的Bcl-2蛋白。

[0222] 在某些实施例中,该仅BH3蛋白选自下组,该组由以下组成:BIM、BID、BAD、BIK、HRK、BMF和PUMA。在某些实施例中,该仅BH3蛋白可以选自BIM和PUMA。

[0223] 本文中BIM的示例性序列提供为SEQ ID NO:6和16 (DNA序列) 以及SEQ ID NO:5和15 (蛋白质序列)。

[0224] 在一些实施例中,该蛋白质复合物包含选自下组的复合物,该组由以下组成:Bcl-xL:BIM、Bcl-xL:PUMA、Bcl-2:BIM、Bcl-2:PUMA及其任何组合。

#### [0225] iii. 生物标志物的检测试剂

[0226] 在一方面,本披露提供了用于检测或测量该至少一种包含Noxa、ASCL1或两者的生物标志物的水平的检测试剂。测量可以在RNA水平、DNA水平和/或蛋白质水平上。可以使用用于检测靶RNA、靶DNA或靶蛋白质的合适的试剂。

[0227] 在某些实施例中,检测试剂包含可以与Noxa的多核苷酸杂交的一种或多种引物或探针,和/或可以与ASCL1的多核苷酸杂交的一种或多种引物或探针。如本文所使用的,术语“引物”是指由于靶多核苷酸序列的序列内的至少一部分引物的序列互补性,可以与靶多核苷酸序列特异性杂交的寡核苷酸。引物的长度可以是至少8个核苷酸,典型地为8至70个核苷酸,通常为18至26个核苷酸。为了与靶序列正确杂交,引物可以与靶多核苷酸序列的杂交部分具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、或至少95%序列互补性。可用作引物的寡核苷酸可以根据最初由Beaucage和Caruthers, Tetrahedron Letts. [四面体通讯] (1981) 22:1859-1862所述的固相亚磷酰胺三酯方法,使用自动合成仪,如Needham-Van Devanter等人, Nucleic Acids Res. [核酸研究] (1984) 12:6159-6168中所述进行化学合成。

[0228] 引物可用于核酸扩增反应,其中引物被延伸以产生多核苷酸的新链。引物可以由技术人员使用本领域已知的常识容易地设计,使得它们可以与本文提供的至少一种生物标志物的靶核苷酸序列的核苷酸序列特异性退火。通常,将引物的3'核苷酸设计成与靶序列

在相应的核苷酸位置处互补,以通过聚合酶提供最佳的引物延伸。

[0229] 如本文所使用的,术语“探针”是指由于靶多核苷酸序列的序列内的至少一部分探针的序列互补性,可以与靶多核苷酸序列特异性杂交的寡核苷酸或其类似物。示例性探针可以是例如DNA探针、RNA探针或蛋白质核酸(PNA)探针。探针的长度可以是至少8个核苷酸,典型地为8至70个核苷酸,通常为18至26个核苷酸。为了与靶序列正确杂交,探针可以与靶多核苷酸序列的杂交部分具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%序列互补性。并且探针也可以根据如上所述的固相亚磷酸三酯方法化学合成。用于制备DNA和RNA探针的方法、以及用于将其与靶核苷酸序列杂交的条件描述于Molecular Cloning: A Laboratory Manual[分子克隆:实验室手册],J.Sambrook等人编辑,第2版Cold Spring Harbor Laboratory Press[冷泉港实验室出版社],1989,第10和11章中。

[0230] 在某些实施例中,本文提供的引物或探针包含可与SEQ ID NO:8或22的序列内的一部分杂交的多核苷酸序列。在某些实施例中,本文提供的引物或探针包含可与SEQ ID NO:2、4、6、10、12、14、16、18或20的序列内的一部分杂交的多核苷酸序列。在某些实施例中,本文提供的引物或探针包含与SEQ ID NO:8或22的序列内的一部分具有至少60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%互补性的多核苷酸序列。在某些实施例中,本文提供的引物或探针包含与SEQ ID NO:2、4、6、10、12、14、16、18或20的序列内的一部分具有至少60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%互补性的多核苷酸序列。

[0231] 在某些实施例中,检测试剂包含可以与Noxa的蛋白质特异性结合的一种或多种抗体,和/或可以与ASCL1的蛋白质特异性结合的一种或多种抗体。

[0232] 如本文所使用的,术语“抗体”是指可以与靶蛋白抗原特异性结合的免疫球蛋白或其抗原结合片段。可以通过从噬菌体或类似载体中的重组抗体文库中选择抗体来鉴定和制备抗体,以及通过对动物(例如兔或小鼠)进行免疫来制备多克隆和单克隆抗体(参见,例如,Huse等人,Science[科学](1989) 246:1275-1281;Ward等人,Nature[自然](1989) 341:544-546)。

[0233] 在某些实施例中,本文提供的抗体包含能够与具有SEQ ID NO:7或21的序列的蛋白质或多肽内的表位特异性结合的抗原结合区。在某些实施例中,本文提供的抗体包含能够与具有SEQ ID NO:1、3、5、9、11、13、15、17或19的序列的蛋白质或多肽内的表位特异性结合的抗原结合区。

[0234] 在某些实施例中,本文提供的引物、探针和抗体是被可检测地标记的。适合用于标记引物、探针和抗体的可检测标记的实例包括例如发色团、放射性同位素、荧光团、化学发光部分、颗粒(可见的或荧光的)、核酸、配体、或催化剂(例如酶)。

[0235] 放射性同位素的实例包括但不限于, $^{123}\text{I}$ 、 $^{124}\text{I}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^3\text{H}$ 、 $^{111}\text{In}$ 、 $^{112}\text{In}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{64}\text{Cu}$ 、 $^{67}\text{Cu}$ 、 $^{86}\text{Y}$ 、 $^{88}\text{Y}$ 、 $^{90}\text{Y}$ 、 $^{177}\text{Lu}$ 、 $^{211}\text{At}$ 、 $^{186}\text{Re}$ 、 $^{188}\text{Re}$ 、 $^{153}\text{Sm}$ 、 $^{212}\text{Bi}$ 和 $^{32}\text{P}$ 。

[0236] 荧光团的实例包括但不限于,吖啶、7-氨基-4-甲基香豆素-3-乙酸(AMCA)、BODIPY、瀑布蓝(Cascade Blue)、Cy2、Cy3、Cy5、Cy7、伊丹(Edans)、伊红(Eosin)、赤藓红、荧光素、6-FAM、TET、JOC、HEX、俄勒冈绿(Oregon Green)、罗丹明、罗丹绿(Rhodol Green)、Tamra、Rox和Texas Red<sup>TM</sup>(分子探针公司(Molecular Probes, Inc.),尤金(Eugene),俄勒冈州(Oreg.))。

[0237] 酶的实例包括但不限于,碱性磷酸酶、酸性磷酸酶、辣根过氧化物酶、 $\beta$ -半乳糖苷酶和核糖核酸酶。

[0238] 配体的实例包括但不限于,生物素、亲和素、抗体或抗原。

[0239] 应理解的是,可检测标记不必产生可检测信号,例如,在一些实施例中,它可以与可检测配偶体反应或与一种或多种另外的化合物反应以产生可检测信号。例如,可检测标记可以是能够用作标记的配体的特异性结合对成员的配体(例如,第二标记的抗体)。再例如,由于其催化导致可检测信号产生的发色、发荧光或发光底物的催化活性,酶可用作可检测标记。

[0240] 在某些实施例中,本文提供的可检测地标记的引物、探针或抗体可以进一步包含淬灭剂物质。淬灭剂物质是指如下物质,当与荧光物质足够接近地存在时,由于例如荧光共振能量转移(FRET),其可以淬灭由荧光物质发出的荧光。

[0241] 淬灭剂物质的实例包括但不限于,Tamra、Dabcyl或黑洞淬灭剂(Black Hole Quencher)(BHQ,生物研究技术公司(Biosearch Technologies))、DDQ(优罗泰公司(Eurogentec))、Iowa Black FQ(集成DNA技术公司(Integrated DNA Technologies))、QSY-7(分子探针公司(Molecular Probes)) and Eclipse淬灭剂(时代生物科学公司(Epoch Biosciences))。

[0242] 通过切口平移方法或通过随机引物方法,可以将引物和探针标记为具有高特异性活性。有用的探针标记技术描述在文献中(Fan,Y-S,Molecular cytogenetics:protocols and applications[分子细胞遗传学:方案与应用],Humana Press[胡玛纳出版社],托托华(Totowa),新泽西州(N.J.)xiv,411(2002))。

[0243] 在某些实施例中,该一种或多种试剂包含可以与Noxa的多核苷酸杂交的引物或探针,或可以与Noxa的蛋白质特异性结合的抗体。在某些实施例中,本文提供的抗体包含能够与具有SEQ ID NO:7的序列的蛋白质或多肽内的表位特异性结合的抗原结合区。

[0244] 在某些实施例中,该一种或多种试剂包含可以与ASCL1的多核苷酸杂交的引物或探针,或可以与ASCL1的蛋白质特异性结合的抗体。在某些实施例中,本文提供的抗体包含能够与具有SEQ ID NO:21的序列的蛋白质或多肽内的表位特异性结合的抗原结合区。

[0245] 在某些实施例中,该一种或多种试剂包含可以与Noxa的多核苷酸杂交的第一引物或第一探针,或可以与Noxa的蛋白质特异性结合的抗体,以及可以与Noxa的多核苷酸杂交的第二引物或第二探针,或可以与Noxa的蛋白质特异性结合的第二抗体。在某些实施例中,本文提供的第一抗体包含能够与具有SEQ ID NO:7的序列的蛋白质或多肽内的表位特异性结合的抗原结合区,并且本文提供的第二抗体包含能够与具有SEQ ID NO:21的序列的蛋白质或多肽内的表位特异性结合的抗原结合区。

[0246] 可以理解,在某些实施例中,将抗体进行修饰或标记以适当地在多种检测测定中使用。在某些实施例中,抗体是被可检测地标记的。在某些实施例中,抗体可以包含捕获部分,或者可以被固定。

[0247] 捕获部分的实例可以包括例如结合配偶体或固体基质,例如多孔和无孔材料、胶乳颗粒、磁性颗粒、微粒、条带、珠、膜、微量滴定孔和塑料管。固相材料的选择和可检测地标记抗原或抗体试剂的方法是根据所需的测定形式性能特征确定的。在某些实施例中,抗体可以被固定在固体基质上。固定化可以通过共价连接或非共价附接(例如涂覆)进行。

[0248] 用于患者鉴定、治疗指导和预后的方法

[0249] 在另一方面,本披露提供了用于鉴定患有癌症的受试者可能对用MDM2抑制剂或Bcl-2/Bcl-xL双重抑制剂或Bcl-2抑制剂或Bcl-xL抑制剂的治疗产生应答的方法。在某些实施例中,该方法包括:在来源于该受试者的测试样品中测量至少一种包含Noxa或ASCL1或两者的生物标志物的水平;将该至少一种生物标志物的水平与该至少一种生物标志物的对应的参考水平进行比较,以确定与参考水平的差异;并且当该差异达到预定的阈值时,确定该受试者可能对用MDM2抑制剂或Bcl-2/Bcl-xL双重抑制剂或Bcl-2抑制剂或Bcl-xL抑制剂的治疗产生应答。

[0250] 在另一方面,本披露提供了用于在有需要的受试者中治疗癌症的方法。在某些实施例中,该方法包括:在来源于该受试者的样品中测量至少一种包含Noxa或ASCL1或两者的生物标志物的水平;将该至少一种生物标志物的水平与该至少一种生物标志物的对应的参考水平进行比较,以确定与参考水平的差异;并且当该差异达到预定的阈值时,向该受试者施用有效量的MDM2抑制剂或Bcl-2/Bcl-xL双重抑制剂或Bcl-2抑制剂或Bcl-xL抑制剂。

[0251] 在另一方面,本披露提供了用于在受试者中监测治疗功效或预后的方法,该受试者患有癌症,并在治疗期内已经用MDM2抑制剂或Bcl-2/Bcl-xL双重抑制剂或Bcl-2抑制剂或Bcl-xL抑制剂进行了治疗。在某些实施例中,该方法包括:治疗期后从该受试者获得测试样品;在该测试样品中测量至少一种包含Noxa的生物标志物的水平,以获得该至少一种生物标志物的治疗后水平;将该治疗后水平与来源于该受试者的治疗期之前的测试样品中的该至少一种生物标志物的基线水平进行比较,以确定该至少一种生物标志物的水平的治疗后变化。在某些实施例中,当该治疗后变化达到预定的阈值时,该方法进一步包括向该受试者继续施用MDM2抑制剂或Bcl-2/Bcl-xL双重抑制剂或Bcl-2抑制剂或Bcl-xL抑制剂。在某些实施例中,当该治疗后变化未达到预定的阈值时,增加对该受试者的MDM2抑制剂或Bcl-2/Bcl-xL双重抑制剂或Bcl-2抑制剂或Bcl-xL抑制剂的剂量,向该受试者施用有效量的与MDM2抑制剂或Bcl-2/Bcl-xL双重抑制剂或Bcl-2抑制剂或Bcl-xL抑制剂组合的第二抗癌治疗剂,或向该受试者停止施用MDM2抑制剂或Bcl-2/Bcl-xL双重抑制剂或Bcl-2抑制剂或Bcl-xL抑制剂。

[0252] i. 样品制备

[0253] 适用于实施本文提供的方法的任何生物样品可以来源于受试者。在某些实施例中,可以通过可取的方法对样品进一步处理,用于进行该至少一种生物标志物的水平的测量。

[0254] 在某些实施例中,该方法进一步包括从来源于受试者的生物流体样品(例如,外周血样品)或组织样品中分离或提取癌细胞(例如,循环肿瘤细胞)。癌细胞可以通过免疫磁分离技术来分离,例如可从易莫尼康公司(Immicon)(亨廷顿谷(Huntingdon Valley),宾夕法尼亚州(Pa.))获得的技术。

[0255] 在某些实施例中,可以对组织样品进行处理以进行原位杂交。例如,可以在将组织样品固定在玻璃显微镜载玻片上之前进行石蜡包埋,然后用溶剂(典型地为二甲苯)脱蜡。

[0256] 在某些实施例中,该方法进一步包括如果生物标志物的RNA或DNA水平是待测量的,则从样品中分离核酸。多种提取方法适用于从细胞或组织中分离DNA或RNA,例如苯酚和氯仿提取,并且多种其他方法描述于例如,Ausubel等人,Current Protocols of

Molecular Biology[当代分子生物学实验指南](1997) John Wiley&Sons[约翰·威利父子出版社],以及Sambrook和Russell,Molecular Cloning:A Laboratory Manual[分子克隆:实验室手册]第3版(2001)。

[0257] 还可以使用可商购的试剂盒来分离RNA,包括例如,NucliSens提取试剂盒(生物梅里埃公司(Biomerieux),玛西埃图瓦勒(Marcy l'Etoile),法国)、QIAamp<sup>TM</sup>微型血液试剂盒、Agencourt Genfind<sup>TM</sup>、Rneasy<sup>®</sup>微型柱(凯杰公司(Qiagen))、PureLink<sup>®</sup> RNA微型试剂盒(赛默飞世尔科技公司(Thermo Fisher Scientific))和Eppendorf Phase Lock Gels<sup>TM</sup>。技术人员可以按照制造商的方案容易地提取或分离RNA或DNA。

[0258] ii. 测量生物标志物的水平的方法

[0259] 本披露的方法包括在来源于患有癌症或怀疑患有癌症的受试者的样品中测量本文所述的至少一种生物标志物的水平。

[0260] 本文提供的生物标志物Noxa和/或ACSL1(和任选地另外的生物标志物,包括Bcl-xL、Bcl-2、PUMA、Mcl-1、包含Bcl-xL的蛋白质复合物、包含Bcl-2的蛋白质复合物)旨在涵盖包括mRNA、蛋白质以及DNA(例如,基因组DNA)的不同形式。因此,可以通过RNA水平(例如,mRNA水平)、蛋白质水平或DNA水平来测量该至少一种生物标志物的水平。mRNA水平和/或蛋白质水平还可以被称为该至少一种生物标志物的表达水平。在某些实施例中,该蛋白质复合物在蛋白质水平上测量。

[0261] 该至少一种包含Noxa、或ASCL1或两者的生物标志物的RNA(例如,mRNA)水平或DNA水平可以通过本领域已知的任何合适的核酸测定(例如,核酸扩增测定、核酸杂交测定、核酸测序测定)以及其他方法(例如,高效液相色谱法(HPLC)片段分析、毛细管电泳等)来测量。可以通过本领域已知的任何方法,例如但不限于免疫测定法来测量生物标志物的蛋白质水平。这些方法在本领域中是熟知的,并且在下文作为示例性说明进行详细描述。

[0262] a) 扩增测定

[0263] 核酸扩增测定涉及复制靶核酸(例如,DNA或RNA),从而增加经扩增的核酸序列的拷贝数。扩增可以是指数的或线性的。示例性核酸扩增方法包括但不限于使用以下方法进行的扩增:聚合酶链式反应(“PCR”,参见美国专利4,683,195和4,683,202;PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications[PCR方案:方法和应用指南](Innis等人编辑,1990))、逆转录酶聚合酶链式反应(RT-PCR)、实时定量PCR(qRT-PCR)、定量PCR(例如,TaqMan<sup>®</sup>)、巢式PCR、连接酶链式反应(参见Abravaya,K.等人,Nucleic Acids Research[核酸研究],23:675-682,(1995))、分支DNA信号扩增(参见,Urdea,M.S.等人,AIDS,7(增刊2):S11-S14,(1993))、可扩增的RNA报告分子、Q-β复制(参见,Lizardi等人,Biotechnology[生物技术](1988)6:1197)、基于转录的扩增(参见,Kwoh等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA[美国国家科学院院刊](1989)86:1173-1177)、回旋DNA扩增、链置换激活、循环探针技术、自动维持序列扩增(Guatelli等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA[美国国家科学院院刊](1990)87:1874-1878)、滚环复制(美国专利号5,854,033)、基于核酸序列的等温扩增(NASBA)、以及基因表达的连续分析(SAGE)。

[0264] 在一些实施例中,为测量生物标志物的mRNA水平,在扩增之前将生物标志物的靶RNA逆转录为cDNA。可以使用多种逆转录酶,包括但不限于MMLV RT、MMLV RT的RNase H突变

体例如Superscript和Superscript II(生命技术公司(Life Technologies),GIBCO BRL,盖瑟斯堡(Gaithersburg),马里兰州(Md.))、AMV RT和来自嗜热栖热菌(*Thermus thermophilus*)的热稳定逆转录酶。例如,可以用于将RNA转化为cDNA的一种方法是改编自Superscript II预扩增系统(生命技术公司,GIBCO BRL,盖瑟斯堡,马里兰州;目录号18089-011)的方案,如由Rashtchian,A.,PCR Methods Applic.[PCR方法应用],4:S83-S91,(1994)中所述。

[0265] 在某些实施例中,在核酸扩增测定后,对本文提供的至少一种生物标志物的水平进行定量。例如,可以在琼脂糖凝胶上分离扩增的产物,并用溴化乙锭染色,然后使用标准凝胶电泳方法进行检测和定量。可替代地,可以用合适的可检测标记(例如,放射性核苷酸或荧光核苷酸)整体标记扩增的产物,然后使用X射线胶片或在合适的激发光谱下可视化。

[0266] 在某些实施例中,在核酸扩增测定期间,对生物标志物的RNA(例如,mRNA)的表达水平或DNA的拷贝数变化进行定量,这也被称为实时扩增或定量扩增。定量扩增的方法披露在以下文献中:例如美国专利号6,180,349、6,033,854、和5,972,602,以及例如Gibson等人,Genome Research[基因组研究](1996)6:995-1001;DeGraves等人,Biotechniques[生物技术](2003)34(1):106-10,112-5;Deiman B等人,Mol Biotechnol.[分子生物技术](2002)20(2):163-79。定量通常基于对可检测信号的监测,该可检测信号代表扩增(例如,PCR)反应循环中模板的拷贝。可通过嵌入剂(例如SYBR GREEN™和SYBR GOLD™)或扩增过程中使用的标记引物或标记探针来产生可检测信号。

[0267] 在某些实施例中,标记的引物或标记的探针包含含有荧光团的可检测标记。在某些实施例中,标记的引物或标记的探针可以进一步包含淬灭剂物质。在一种引物或探针中荧光团和淬灭剂物质(“双重标记的”)的存在可以有助于提供自淬灭探针例如TaqMan(美国专利号5,210,015和5,538,848)或分子信标探针(美国专利号5,118,801和5,312,728)、或其他无分支或线性信标探针(Livak等人,1995,PCR Method Appl.[PCR方法应用],4:357-362;Tyagi等人,1996,Nature Biotechnology[自然生物技术],14:303-308;Nazarenko等人,1997,Nucl.Acids Res.[核酸研究],25:2516-2521;美国专利号5,866,336和6,117,635)。在完整的引物或探针中,淬灭剂物质和荧光团非常接近,使得当荧光团被辐射激发时,荧光团会通过荧光共振能量转移(FRET)将能量转移至同一探针中的淬灭剂物质,从而不发出信号。

[0268] 在定量扩增测定(例如,实时PCR)中,可以使用本领域已知的方法对经检测的生物标志物的水平进行定量。例如,在扩增期间,可以在每个PCR循环期间监测和计算荧光信号。可以进一步计算阈值循环或Ct值。Ct值是在荧光与预定的值相交处的循环。可以使用标准曲线将Ct与核酸的初始量或起始细胞数相关。构建标准曲线以关联Ct值与所测量的生物标志物的对数水平之间的差异。

[0269] 作为质量控制量度,可以测量内部对照生物标志物的水平。技术人员将理解,内部对照生物标志物可以固有地存在于样品中,并且可以将其水平用于归一化至少一种包含Noxa、ASCL1或两者的生物标志物的测量水平,以抵消样品绝对数中的任何差异。

[0270] b) 杂交测定

[0271] 核酸杂交测定使用探针与靶核酸杂交,从而允许检测靶核酸。杂交测定的非限制性实例包括RNA印迹法、DNA印迹法、原位杂交、微阵列分析和基于多重杂交的测定。



[0272] 在某些实施例中,用于杂交测定的探针是被可检测地标记的。在某些实施例中,用于杂交测定的基于核酸的探针是未标记的。可以将此类未标记的探针固定在固体支持物(如微阵列)上,并且可以与可检测地标记的靶核酸分子杂交。

[0273] 在某些实施例中,可以通过分离核酸(例如, RNA或DNA),使核酸分开(例如,通过凝胶电泳),然后将分开的核酸转移到合适的膜滤器(例如,硝化纤维素滤器)上来进行杂交测定,其中将探针与靶核酸杂交并允许检测。参见,例如, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* [分子克隆: 实验室手册], J. Sambrook等人编辑,第2版, Cold Spring Harbor Laboratory Press [冷泉港实验室出版社], 1989, 第7章。探针和靶核酸的杂交可以通过本领域已知的方法检测或测量。例如,可以通过将杂交的滤器暴露于照相胶片来进行杂交的放射自显影检测。由杂交滤器曝光的照相胶片的光密度扫描提供了靶核酸水平的准确测量。计算机成像系统也可以用于量化生物标志物的水平。

[0274] 在一些实施例中,杂交测定可以在微阵列上进行。微阵列提供了用于同时测量大量靶核酸分子的水平的方法。靶核酸可以是RNA、DNA、从mRNA逆转录的cDNA或染色体DNA。可以允许靶核酸与包含基质的微阵列杂交,该微阵列具有以高达几百万个探针/平方厘米基质表面的密度排列的多个固定的核酸探针。样品中的RNA或DNA与阵列上的互补探针杂交,然后通过激光扫描进行检测。确定阵列上每个探针的杂交强度,并将其转换为代表RNA或DNA相对水平的定量值。参见,美国专利号6,040,138、5,800,992和6,020,135、6,033,860以及6,344,316。

[0275] 使用机械合成方法合成这些阵列的技术例如描述于美国专利号5,384,261中。尽管经常采用平面阵列表面,但是该阵列可以在实际上任何形状的表面或甚至多重表面上制造。阵列可以是在珠、凝胶、聚合物表面、纤维(例如光纤)、玻璃或任何其他合适的基质上的肽或核酸,参见美国专利号5,770,358、5,789,162、5,708,153、6,040,193和5,800,992。可以按允许对全包装置进行诊断或其他操作的这样的方式包装阵列。有用的微阵列也是可商购的,例如,购自昂飞公司(Affymetrix)、纳米线技术公司(Nano String Technologies)的微阵列,购自派诺克公司(Panomics)的QuantiGene 2.0多元测定。

[0276] 在某些实施例中,杂交测定可以是原位杂交测定。原位杂交测定可用于检测目的生物标志物(例如, Noxa或ASCL1或两者)的基因座上拷贝数变化(例如增加或扩增)的存在。可用于原位杂交测定的探针可以是基因座特异性探针,这些探针与染色体上的特异性基因座杂交以检测特定目的基因座(例如, Noxa或ASCL1或两者)的存在或缺失。其他类型的探针也可能是有用的,例如,染色体计数探针(例如,可与目的染色体中的重复序列区杂交,以指示整个染色体的存在或缺失)和染色体臂探针(例如,可与染色体区域杂交,并指示特定染色体的臂的存在或缺失)。使用用于原位杂交的独特序列探针的方法在美国专利号5,447,841中进行了描述,将其通过引用并入本文。可以使用荧光显微镜和针对每个荧光团的合适的滤器,或通过使用双重或三重带通滤器组观察多个荧光团来查看探针。参见,例如 Bittner等人的美国专利号5,776,688,将其通过引用并入本文。任何合适的显微成像方法(包括自动数字成像系统)都可用于使杂交的探针可视化。可替代地,可以使用例如流式细胞术等技术来检查探针的杂交模式。

[0277] c) 测序方法

[0278] 在测量目的生物标志物的水平中有用的测序方法涉及对靶核酸的测序和对经测

序的靶核酸的计数。测序方法的实例包括但不限于, RNA测序、焦磷酸测序和高通量测序。

[0279] 高通量测序涉及合成法测序 (sequencing-by-synthesis)、连接法测序 (sequencing-by-ligation) 和超深度测序 (ultra-deep sequencing) (例如, 描述于 Marguiles 等人, Nature [自然] 437 (7057): 376-80 (2005) 中)。合成法测序涉及通过在聚合酶扩增中掺入标记的核苷酸或核苷酸类似物来合成靶核酸的互补链。在成功掺入标记核苷酸之后或即刻开始, 测量该标记的信号并记录核苷酸的身份。在掺入之前去除经掺入的核苷酸上的可检测标记, 重复检测和鉴定步骤。合成法测序方法的实例是本领域已知的, 并且描述于例如美国专利号 7,056,676、美国专利号 8,802,368 和美国专利号 7,169,560 中, 将其内容通过引用并入本文。以使用折返 PCR 和锚定引物在固体表面 (或微阵列或芯片) 上进行合成法测序。靶核酸片段可以通过与锚定引物杂交而附接至固体表面, 并进行桥接扩增。该技术在例如 Illumina<sup>®</sup> 测序平台上使用。

[0280] 焦磷酸测序涉及将靶核酸区域与引物杂交, 并在聚合酶的存在下, 通过顺序地掺入对应于碱基 A、C、G 和 T (U) 的脱氧核苷酸三磷酸来延伸新链。每次碱基的掺入都伴随着焦磷酸盐的释放, 焦磷酸盐被硫酸化酶转化为 ATP, 从而驱动了氧化荧光素的合成和可见光的释放。由于焦磷酸盐的释放与掺入的碱基数等摩尔, 因此发出的光与在任一步骤中添加的核苷酸数成正比。重复该过程, 直到确定整个序列。

[0281] 在某些实施例中, 本文所述的生物标志物的水平通过全转录组测序或 RNA 测序 (例如, RNA-Seq) 来测量。已经描述了 RNA 测序的方法 (参见 Wang Z, Gerstein M 和 Snyder M, Nature Review Genetics [遗传学自然评论] (2009) 10:57-63; Maher CA 等人, Nature [自然] (2009) 458:97-101; Kukurba K 和 Montgomery SB, Cold Spring Harbor Protocols [冷泉港实验方案] (2015) 2015 (11): 951-969)。简而言之, 将从样品中提取的 mRNA 反转录为 cDNA, 然后剪切为片段。选择在适当长度范围内的片段, 并与测序衔接子连接, 然后进行扩增、测序并将读数映射到参考基因组。

[0282] 该至少一种包含 Noxa 或 ASCL1 或两者的生物标志物的蛋白质水平可以通过本领域已知的任何合适的蛋白质测定来测量, 例如免疫测定、质谱法、2-D 凝胶电泳、蛋白质阵列等。包含 Bcl-xL 的蛋白质复合物和/或包含 Bcl-2 的蛋白质复合物的水平可以通过本领域已知的用于测量蛋白质间相互作用的任何合适的测定来测量, 一般参见, Protein-Protein Interactions: A Molecular Cloning Manual [蛋白质间相互作用: 分子克隆手册], 第 2 版, Golemis 和 Adams 编辑, Cold Spring Harbor Laboratory Press [冷泉港实验室出版社] (2005)。在某些实施例中, 蛋白质间相互作用的测定基于免疫测定或邻近测定。合适的方法通常例如 Meso Scale Discovery (MSD) 高级酶联免疫吸附测定 (MSD-ELISA)、标准复合物 ELSIA、邻近连接测定 (PLA)、共免疫沉淀、免疫印迹测定或交联测定等。

#### [0283] d) 免疫测定

[0284] 免疫测定典型地涉及使用与靶多肽或蛋白质 (例如, Noxa 或 ASCL1) 特异性结合的抗体来检测或测量靶多肽或蛋白质的存在或水平。此类抗体可以使用本领域已知的方法获得 (参见, 例如, Huse 等人, Science [科学] (1989) 246:1275-1281; Ward 等人, Nature [自然] (1989) 341:544-546), 或可以从商业来源获得。免疫测定的实例包括但不限于, 蛋白质印迹法、酶联免疫吸附测定 (ELISA)、酶免疫测定 (EIA)、放射免疫测定 (RIA)、夹心测定、竞争性测定、免疫荧光染色和成像、免疫组织化学 (IHC) 和荧光激活细胞分选术 (FACS)。关于免疫

学和免疫测定程序的综述,参见Basic and Clinical Immunology[基础和临床免疫学](Stites和Terr编辑,第7版1991)。此外,可以按多种构型中的任一种进行免疫测定,这些构型在酶免疫测定(Maggio编辑,1980)以及Harlow和Lane(同上)中被广泛综述。关于一般免疫测定的综述,还参见Methods in Cell Biology:Antibodies in Cell Biology[细胞生物学方法:细胞生物学中的抗体],第37卷(Asai编辑1993);Basic and Clinical Immunology[基础和临床免疫学](Stites和Terr编辑,第7版1991)。

[0285] 免疫组织化学(IHC)通过检测特异性抗体/适配子-抗原相互作用来证明原位细胞或组织组成,其中抗体/适配子已被可检测标记加了标签。可检测标记可以是荧光染料、胶体金属、半抗原、放射性标志物,或更常见地是酶。实验样品包括福尔马林固定的、石蜡包埋的(FFPE)样品。理想地,需要最大的信号强度以及最小的背景或非特异性染色,以给出最佳的抗原展示。IHC方案在本领域中是熟知的;参见,例如,Immunocytochemical Methods and Protocols[免疫细胞化学方法和方案](第二版),由Lorette C.Javois编辑,来自Methods in Molecular Medicine[分子医学方法],第115卷,Humana Press[胡玛纳出版社],1999(ISBN 0-89603-570-0)。

[0286] 在某些实施例中,抗体是被可检测地标记的,或是未标记的但可以与被可检测地标记的第二分子(例如,可检测地标记的第二抗体)反应。其他检测系统也是可用的,例如时间分辨荧光、内部反射荧光、扩增(例如,聚合酶链式反应)和拉曼光谱学。

[0287] 在某些实施例中,抗体可以被固定在固体基质上。固定化可以通过共价连接或非共价附接(例如涂覆)进行。固体基质的实例包括多孔和无孔材料、胶乳颗粒、磁性颗粒、微粒、条带、珠、膜、微量滴定孔和塑料管。固相材料的选择和可检测地标记抗原或抗体试剂的方法是根据所需的测定形式性能特征确定的。

[0288] 靶多肽或蛋白质的水平可以例如通过归一化为内部对照值或标准曲线来确定。

[0289] 可以将本文所述的每种生物标志物的水平归一化为标准标志物的标准水平。标准标志物的标准水平可以是预先确定的,同时确定的,或样品获自受试者之后确定的。标准标志物可以在同一测定中运行,或可以是来自先前测定的已知的标准标志物。在通过测序测定(例如,RNA测序)确定生物标志物的水平的情况下,可以将生物标志物的水平归一化为测序的总读数。

[0290] 本文提供的用于测量生物标志物的水平的任何测定和方法可以被改适或优化,以用于在自动化和半自动化系统或定点照护测定系统中使用。自动化和半自动化系统的实例描述于例如Hu等人,Lab On a Chip[芯片实验室]2017,17(13):2225;Song等人,Anal Chem[分析化学],2019,91(1):388;以及Rusling等人,Analyst[分析员]2010,135(10):2496中。

[0291] iii. 与相应的参考水平进行比较

[0292] 然后将生物标志物的水平(例如,任选地归一化)与相应生物标志物的相应的参考水平进行比较,以确定与参考水平的差异。如本文所使用的,该至少一种生物标志物(例如,Noxa、或ASCL1、或两者)的术语“参考水平”是指如下生物标志物的水平,该生物标志物的水平代表正常受试者的对照水平,或代表患有癌症的受试者的一般群体中该生物标志物的平均水平。在某些实施例中,该至少一种生物标志物(例如,Noxa、或ASCL1、或两者)的参考水平代表患有癌症的受试者的一般群体中该生物标志物的平均水平。

[0293] 在某些实施例中,参考水平可以是通常在一种或多种健康细胞或组织样品中或在

一种或多种对照(例如,癌症)细胞或组织样品中观察到的相应生物标志物水平的典型水平、测量水平、或范围。在某些实施例中,参考水平可以是在健康的受试者群体中或在患有癌症的受试者的一般群体中(例如,在一般的癌症患者群体中)相应生物标志物的平均水平。如本文所使用的,“患有癌症的受试者的一般群体”或“一般癌症患者群体”是指癌症受试者或患有不同种类癌症的患者的群体。例如,一般癌症患者群体可以是一组至少三种(四种、五种、六种、七种、八种、九种、十种或更多种)类型的癌症患者,其中一些患者患有第一类型癌症、一些患有第二类型癌症、一些患有第三类型癌症,依此类推。例如,一般癌症患者群体可以是患有各种癌症或多种癌症类型的群体。在某些实施例中,参考水平也可以是被认为代表患有癌症的受试者的一般群体的经验水平。在某些实施例中,本文所述的生物标志物的参考水平是使用与在测量本文提供的生物标志物的水平中使用的相同或相当的测量方法或测定而获得的。

[0294] 在某些实施例中,参考水平可以是预先确定的。例如,可以基于在正常组织或样品的集合中的生物标志物水平的测量值来计算或概括参考水平。又例如,参考水平可以基于对来自正常群体的相当的样品中通常观察到的生物标志物水平的统计。

[0295] 在某些实施例中,参考水平可以与测试样品中的生物标志物的水平进行平行测试。在某些实施例中,在对照样品中测量参考水平。在某些实施例中,对照样品是来源于同一受试者或来源于健康受试者的正常的组织样品。在某些实施例中,对照样品来源于对照癌症患者。在某些实施例中,对照样品是来自一个或多个健康受试者或来自一个或多个癌症患者的相当的样品。

[0296] 测试样品中该至少一种生物标志物的水平可以在升高或降低方面表现出与参考水平的差异。取决于特定的生物标志物,为了根据本文提供的方法预测对MDM2抑制剂或Bcl-2/Bcl-xL抑制剂双重抑制剂或Bcl-2抑制剂或Bcl-xL抑制剂产生应答性的可能性,可以在一种生物标志物中寻求增加,但在另一种生物标志物中寻求降低。如本文所使用的,术语“升高”是指如在测试样品中测量的生物标志物的水平高于该生物标志物的相应的参考水平。类似地,如本文所使用的“降低”是指如在样品中测量的生物标志物的水平低于该生物标志物的相应的参考水平。如本文所使用的,术语“维持”是指没有显著变化。

[0297] 在某些实施例中,Noxa水平的升高与对本文提供的MDM2抑制剂或Bcl-2/Bcl-xL双重抑制剂或Bcl-2抑制剂或Bcl-xL抑制剂产生应答性的可能性有关。在某些实施例中,ASCL1水平的升高与对本文提供的MDM2抑制剂或Bcl-2/Bcl-xL双重抑制剂或Bcl-2抑制剂或Bcl-xL抑制剂产生应答性的可能性有关。在某些实施例中,Noxa水平的升高和ASCL1水平的升高与对本文提供的MDM2抑制剂或Bcl-2/Bcl-xL双重抑制剂或Bcl-2抑制剂或Bcl-xL抑制剂产生应答性的可能性有关。

[0298] 在某些实施例中,该至少一种生物标志物(例如,Bcl-xL、Bcl-2、Mcl-1、和/或包含Bcl-xL蛋白质的蛋白质复合物和/或包含Bcl-2的蛋白质复合物)的水平可以被进一步考虑,例如以增加诊断的敏感性和特异性。例如,Bcl-xL水平的升高、Bcl-2水平的升高、维持至Mcl-1水平的降低、和/或包含Bcl-xL蛋白质或Bcl-2蛋白质的蛋白质复合物水平的升高还与对本文提供的Bcl-2/Bcl-xL双重抑制剂产生应答性的可能性有关。在某些实施例中,Noxa水平的升高,和/或ASCL1水平的升高,伴随着Bcl-xL水平的升高、Bcl-2水平的升高、维持至Mcl-1水平的降低、或包含Bcl-xL蛋白质或Bcl-2蛋白质的蛋白质复合物水平的升高,

与对本文提供的MDM2抑制剂或Bcl-2/Bcl-xL双重抑制剂或Bcl-2抑制剂或Bcl-xL抑制剂产生应答性的可能性有关。

[0299] 在某些实施例中,将与参考水平的差异与预定的阈值做进一步比较。在某些实施例中,可以通过统计方法设置预定的阈值,使得如果与参考水平的差异达到预定的阈值,则可以认为这种差异在统计学上是显著的。有用的统计分析方法描述于L.D.Fisher和G.vanBelle,Biostatistics:A Methodology for the Health Sciences[生物统计学:健康科学方法论](Wiley-Interscience[威利国际科学出版社],纽约州,1993)中。可以基于置信度(“p”)值确定统计学显著性,p值可以使用未配对的2尾t检验来计算。通常可以使用例如小于或等于0.1、0.05、0.025或0.01的p值来指示统计学显著性。置信区间和p值可以通过本领域熟知的方法来确定。参见,例如,Dowdy和Wearden,Statistics for Research[研究统计],John Wiley&Sons[约翰·威利父子出版社],纽约,1983。

[0300] 在某些实施例中,Noxa水平的预定的阈值是至少15%、至少25%、至少35%、至少45%、或至少50%的升高。如本文所使用的,“升高百分比”或“更高百分比”是指增量的百分比。例如,100%升高表示从参考水平的100%增加,相当于参考水平的总共200%。换言之,当在测试样品中测量的Noxa水平比Noxa的相应的参考水平高至少15%、至少25%、至少35%、至少45%、或至少50%时,测试样品中Noxa的这种测量水平被认为与参考水平显著不同。

[0301] 在某些实施例中,ASCL1水平的预定的阈值是至少15%、至少25%、至少35%、至少45%、或至少50%、或至少100%的升高。换言之,当在测试样品中测量的ASCL1水平比ASCL1的相应的参考水平高至少50%、至少75%、至少100%、至少125%、或至少150%时,测试样品中ASCL1的这种测量水平被认为与参考水平显著不同。

[0302] 用于患者鉴定和治疗指导的方法

[0303] 在另一方面,本披露提供了用于鉴定患有癌症的受试者可能对用MDM2抑制剂或Bcl-2/Bcl-xL双重抑制剂或Bcl-xL抑制剂或Bcl-2抑制剂的治疗产生应答的方法。在一个实施例中,该方法包括:在来源于该受试者的测试样品中测量至少一种包含Noxa、ASCL1或Noxa和ASCL1的生物标志物的水平;并将该至少一种生物标志物的水平与该至少一种生物标志物的对应的参考水平进行比较,以确定与参考水平的差异;并且当该差异达到预定的阈值时,鉴定该受试者可能对用MDM2抑制剂或Bcl-2/Bcl-xL双重抑制剂或Bcl-xL抑制剂或Bcl-2抑制剂的治疗产生应答。

[0304] 在某些实施例中,如果该差异未达到预定的阈值,那么该受试者被鉴定为不太可能对用MDM2抑制剂或Bcl-2/Bcl-xL双重抑制剂或Bcl-2抑制剂或Bcl-xL抑制剂的治疗产生应答。可以建议这些经鉴定的受试者进行另外的测试以确认结论,或可替代地可以建议不用本文提供的MDM2抑制剂或Bcl-2/Bcl-xL双重抑制剂或Bcl-2抑制剂或Bcl-xL抑制剂进行治疗。

[0305] 在某些实施例中,本文提供的方法进一步包括向被鉴定为可能对用MDM2抑制剂或Bcl-2/Bcl-xL双重抑制剂或Bcl-2抑制剂或Bcl-xL抑制剂的治疗产生应答的受试者施用有效量的MDM2抑制剂或Bcl-2/Bcl-xL双重抑制剂或Bcl-2抑制剂或Bcl-xL抑制剂。

[0306] 在某些实施例中,本文提供的方法进一步包括向被鉴定为可能对用MDM2抑制剂或Bcl-2/Bcl-xL双重抑制剂或Bcl-2抑制剂或Bcl-xL抑制剂的治疗产生应答的受试者施用有

效量的与MDM2抑制剂或Bcl-2/Bcl-xL双重抑制剂或Bcl-2抑制剂或Bcl-xL抑制剂组合的第二抗癌治疗剂。

[0307] 在另一方面,本披露提供了用于在有需要的受试者中治疗癌症的方法。在某些实施例中,该方法包括:在来源于该受试者的测试样品中测量至少一种包含Noxa或ASCL1或两者的生物标志物的水平;将该至少一种生物标志物的水平与该至少一种生物标志物的对应的参考水平进行比较,以确定与参考水平的差异;并且当差异达到预定的阈值时,向该受试者施用有效量的MDM2抑制剂或Bcl-2/Bcl-xL双重抑制剂或Bcl-2抑制剂或Bcl-xL抑制剂。

[0308] 在另一方面,本披露提供了用于在受试者中监测治疗功效的方法,该受试者患有癌症,并在治疗期内已经用MDM2抑制剂或Bcl-2/Bcl-xL双重抑制剂或Bcl-2抑制剂或Bcl-xL抑制剂进行了治疗。在某些实施例中,该方法包括:治疗期后从该受试者获得测试样品;在测试样品中测量至少一种包含Noxa或ASCL1或两者的生物标志物的水平,以获得该至少一种生物标志物的治疗后水平;将该治疗后水平与来源于该受试者的治疗期之前的测试样品中的该至少一种生物标志物的基线水平进行比较,以确定该至少一种生物标志物的水平的治疗后变化。如果该治疗后差异仍达到预定的阈值,那么该受试者被鉴定为仍对用MDM2抑制剂或Bcl-2/Bcl-xL双重抑制剂或Bcl-2抑制剂或Bcl-xL抑制剂的治疗产生应答。可替代地,如果该治疗后差异未达到预定的阈值,那么该受试者被鉴定为对本文提供的MDM2抑制剂或Bcl-2/Bcl-xL双重抑制剂或Bcl-2抑制剂或Bcl-xL抑制剂具有降低的应答性或不再产生应答。

[0309] 在某些实施例中,该方法进一步包括当该差异达到预定的阈值时,向该受试者继续施用MDM2抑制剂或Bcl-2/Bcl-xL双重抑制剂或Bcl-2抑制剂或Bcl-xL抑制剂。在某些实施例中,当差异未达到预定的阈值时,该方法进一步包括:向该受试者施用有效量的与MDM2抑制剂或Bcl-2/Bcl-xL双重抑制剂或Bcl-2抑制剂或Bcl-xL抑制剂组合的第二抗癌治疗剂,或向该受试者停止施用MDM2抑制剂或Bcl-2/Bcl-xL双重抑制剂或Bcl-2抑制剂或Bcl-xL抑制剂。

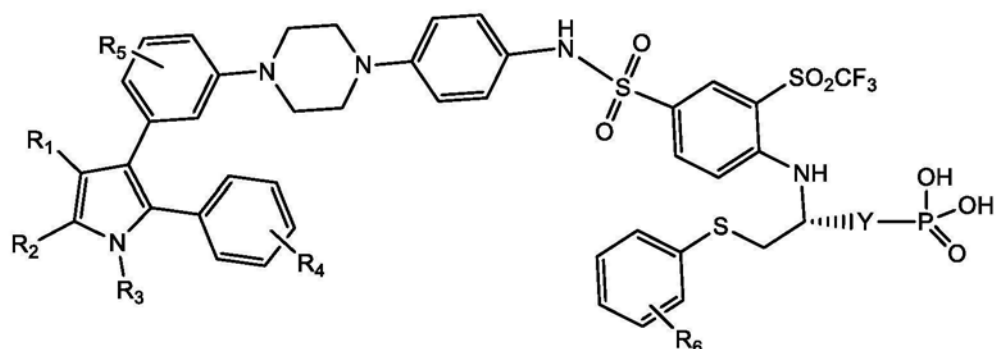
[0310] 在某些实施例中,该至少一种生物标志物进一步包含Bcl-xL、Bcl-2、PUMA、Mcl-1、包含Bcl-xL的蛋白质复合物,或其任何组合。样品中Noxa (以及任选地Bcl-2、Bcl-xL) 的治疗后水平的降低表明对用MDM2抑制剂或Bcl-2/Bcl-xL双重抑制剂或Bcl-2抑制剂或Bcl-xL抑制剂的治疗产生降低的应答性的可能性。在某些实施例中,样品中Mcl1的治疗后水平的升高表明对用MDM2抑制剂或Bcl-2/Bcl-xL双重抑制剂或Bcl-2抑制剂或Bcl-xL抑制剂的治疗产生降低的应答性的可能性。

[0311] Bcl-2/Bcl-xL双重抑制剂或Bcl-2抑制剂或Bcl-xL抑制剂

[0312] 在某些实施例中,本文所述的Bcl-2/Bcl-xL双重抑制剂是具有结构式(I)、(II)或(III)的化合物:

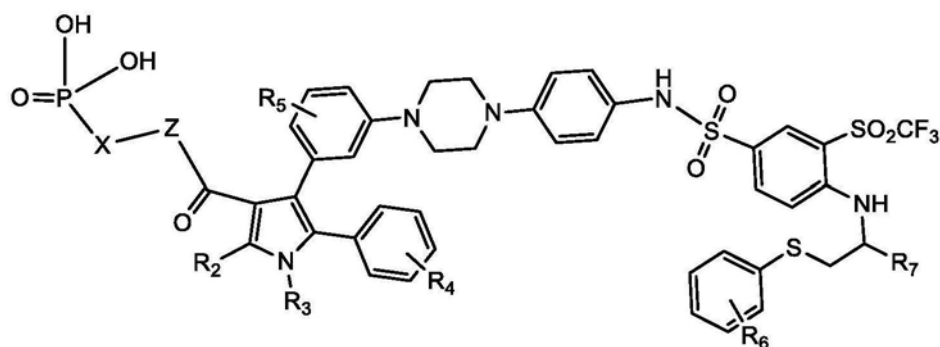
[0313]

(I)



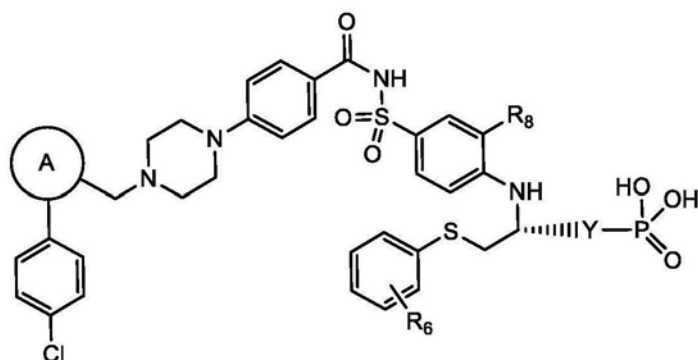
[0314]

(II)



[0315]

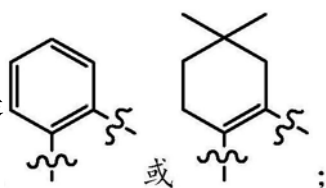
(III)



[0316] 或式 (I)、(II) 或 (III) 的药学上可接受的盐；

[0317]

其中A环是



[0318] 取代的或未取代的X选自下组,该组由以下组成:亚烷基、亚烯基、环亚烷基、环亚烯基和杂环亚烷基;

[0319]

Y选自下组,该组由以下组成:  $(CH_2)_n-N(R^a)_2$  和  $(CH_2)_n-N(CH_2)_r(CH_2)_s$  其中  $R^b$  和  $Q$  是取代基;[0320] Q选自下组,该组由以下组成:O、 $O(CH_2)_{1-3}$ 、 $NR^c$ 、 $NR^c(C_{1-3}$ 亚烷基)、 $OC(=O)$  ( $C_{1-3}$ 亚烷基)、 $C(=O)O$ 、 $C(=O)O(C_{1-3}$ 亚烷基)、 $NHC(=O)$  ( $C_{1-3}$ 亚烷基)、 $C(=O)NH$ 和 $C(=O)NH(C_{1-3}$ 亚烷基);[0321] Z是O或 $NR^c$ ;[0322]  $R_1$ 和 $R_2$ 独立地选自下组,该组由以下组成:H、CN、 $NO_2$ 、卤代、烷基、环烷基、烯基、环

烯基、炔基、芳基、杂芳基、杂环烷基、OR'、SR'、NR'R''、COR'、CO<sub>2</sub>R'、OCOR'、CONR'R''、CONR'SO<sub>2</sub>R''、NR'COR''、NR'CONR''R''、NR'C=SNR''R''、NR'SO<sub>2</sub>R''、SO<sub>2</sub>R'和SO<sub>2</sub>NR'R''；

[0323] R<sub>3</sub>选自下组,该组由以下组成:H、烷基、环烷基、烯基、环烯基、炔基、芳基、杂芳基、杂环烷基、OR'、NR'R''、OCOR'、CO<sub>2</sub>R'、COR'、CONR'R''、CONR'SO<sub>2</sub>R''、C<sub>1-3</sub>亚烷基CH(OH)CH<sub>2</sub>OH、SO<sub>2</sub>R'和SO<sub>2</sub>NR'R''；

[0324] R'、R''和R'''独立地是H、烷基、环烷基、烯基、环烯基、炔基、芳基、杂芳基、C<sub>1-3</sub>亚烷基杂环烷基、或杂环烷基；

[0325] R'和R''、或R''和R'''可以与它们所键合的原子一起形成3至7元环；

[0326] R<sub>4</sub>是氢、卤代、C<sub>1-3</sub>烷基、CF<sub>3</sub>或CN；

[0327] R<sub>5</sub>是氢、卤代、C<sub>1-3</sub>烷基、取代的C<sub>1-3</sub>烷基、羟基烷基、烷氧基或取代的烷氧基；

[0328] R<sub>6</sub>选自下组,该组由以下组成:H、CN、NO<sub>2</sub>、卤代、烷基、环烷基、烯基、环烯基、炔基、芳基、杂芳基、杂环烷基、OR'、SR'、NR'R''、CO<sub>2</sub>R'、OCOR'、CONR'R''、CONR'SO<sub>2</sub>R''、NR'COR''、NR'CONR''R''、NR'C=SNR''R''、NR'SO<sub>2</sub>R''、SO<sub>2</sub>R'和SO<sub>2</sub>NR'R''；

[0329] 取代的或未取代的R<sub>7</sub>选自下组,该组由以下组成:氢、烷基、烯基、(CH<sub>2</sub>)<sub>0-3</sub>环烷基、(CH<sub>2</sub>)<sub>0-3</sub>环烯基、(CH<sub>2</sub>)<sub>0-3</sub>杂环烷基、(CH<sub>2</sub>)<sub>0-3</sub>芳基和(CH<sub>2</sub>)<sub>0-3</sub>杂芳基；

[0330] R<sub>8</sub>选自下组,该组由以下组成:氢、卤代、NO<sub>2</sub>、CN、CF<sub>3</sub>SO<sub>2</sub>和CF<sub>3</sub>；

[0331] R<sub>a</sub>选自下组,该组由以下组成:氢、烷基、杂烷基、烯基、羟基烷基、烷氧基、取代的烷氧基、环烷基、环烯基和杂环烷基；

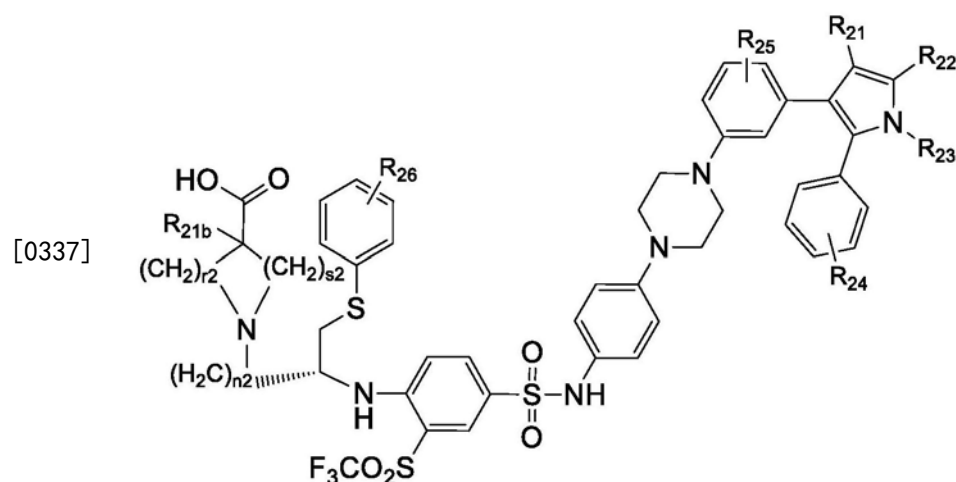
[0332] R<sub>b</sub>是氢或烷基；

[0333] R<sub>c</sub>选自下组,该组由以下组成:氢、烷基、取代的烷基、羟基烷基、烷氧基和取代的烷氧基；并且

[0334] n、r和s独立地是1、2、3、4、5或6。

[0335] 在某些实施例中,本文所述的Bc1-2/Bc1-xL双重抑制剂是具有式(IV)的结构的化合物:

[0336] (IV)



[0338] 或(IV)的药学上可接受的盐；

[0339] R<sub>21</sub>是SO<sub>2</sub>R<sub>2</sub>'；

[0340] R<sub>22</sub>是烷基,优选C<sub>1-4</sub>烷基,更优选甲基、丙基或异丙基；

[0341] R<sub>23</sub>是烷基,优选C<sub>1-4</sub>烷基,更优选甲基、丙基或异丙基；



[0342]  $R_{24}$ 是卤素,优选氟、氯;

[0343]  $R_{25}$ 是卤素,优选氟、氯;

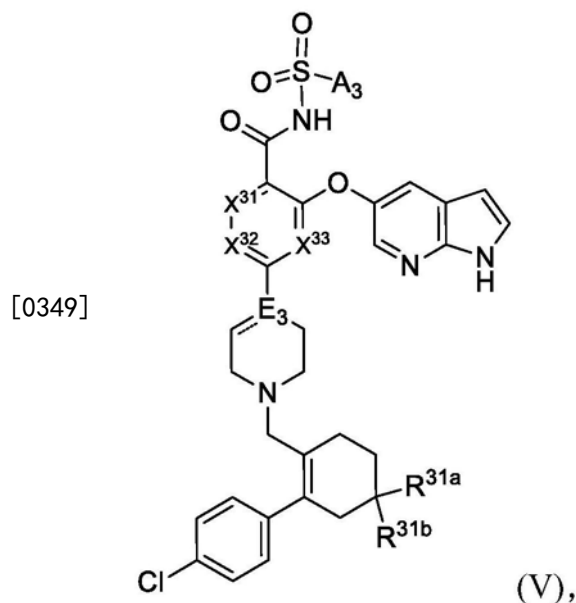
[0344]  $R_{26}$ 选自H、卤素、烷基,优选氟、氯、 $C_1$ - $C_4$ 烷基,更优选甲基、丙基、异丙基;

[0345]  $R_{21b}$ 是H或烷基,优选 $C_1$ - $C_4$ 烷基,更优选甲基、丙基或异丙基;

[0346]  $n_2$ 、 $r_2$ 和 $s_2$ 独立地是1、2、3、4、5或6,更优选地 $r_2$ 和 $s_2$ 都是2,并且 $n_2$ 是3、4或5,更优选地, $n_2$ 、 $r_2$ 和 $s_2$ 都是2;并且

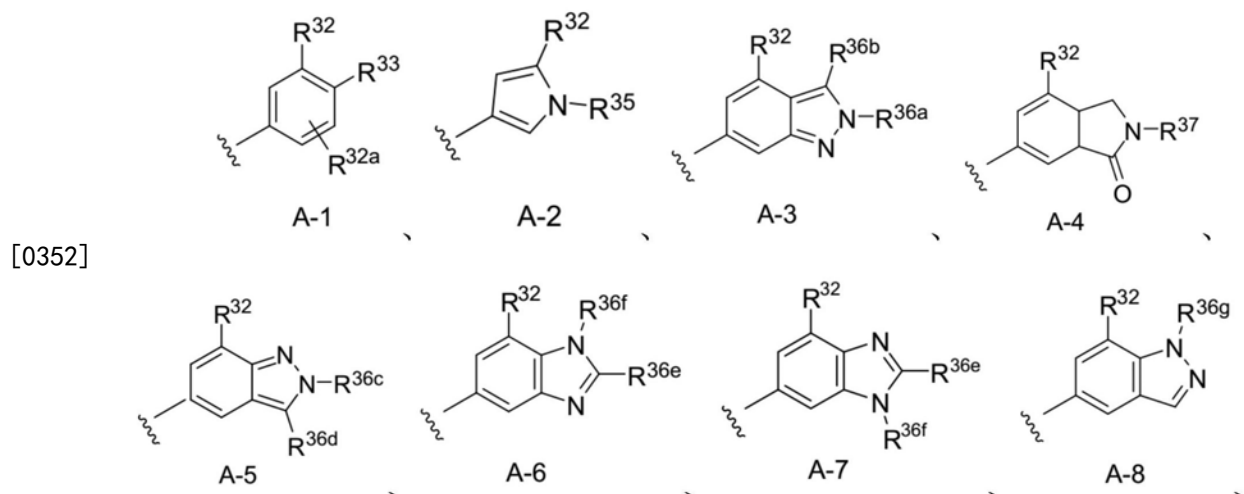
[0347]  $R_2'$ 是烷基,优选 $C_1$ - $C_4$ 烷基,更优选甲基、丙基或异丙基。

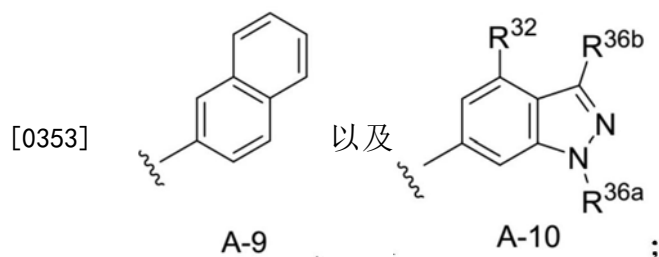
[0348] 在某些实施例中,本文所述的Bc1-2抑制剂是具有式(V)的结构的化合物:



[0350] 或(V)的药学上可接受的盐;

[0351]  $A_3$ 选自下组,该组由以下组成:





[0354] E<sub>3</sub>是碳原子,并且==是双键;或

[0355] E<sub>3</sub>是-C(H)-,并且==是单键;或

[0356] E<sub>3</sub>是氮原子,并且==是单键;

[0357] X<sup>31</sup>、X<sup>32</sup>和X<sup>33</sup>各自独立地选自下组,该组由以下组成:-CR<sup>38</sup>=和-N=;

[0358] R<sup>31a</sup>和R<sup>31b</sup>与它们所附接的碳原子一起形成3元、4元或5元任选取代的环烷基;或

[0359] R<sup>31a</sup>和R<sup>31b</sup>与它们所附接的碳原子一起形成4元或5元任选取代的杂环;

[0360] R<sup>32</sup>选自下组,该组由以下组成:-NO<sub>2</sub>、-SO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>和-SO<sub>2</sub>CF<sub>3</sub>;

[0361] R<sup>32a</sup>选自下组,该组由以下组成:氢和卤素;

[0362] R<sup>33</sup>选自下组,该组由以下组成:氢、-CN、-C≡CH和-N(R<sup>34a</sup>)(R<sup>34b</sup>);

[0363] R<sup>34a</sup>选自下组,该组由以下组成:任选取代的C<sub>1-6</sub>烷基、任选取代的C<sub>3-6</sub>环烷基、杂环、杂烷基、(环烷基)烷基和(杂环)烷基;

[0364] R<sup>34b</sup>选自下组,该组由以下组成:氢和C<sub>1-4</sub>烷基;

[0365] R<sup>35</sup>选自下组,该组由以下组成:任选取代的C<sub>1-6</sub>烷基、杂环、杂烷基、(环烷基)烷基和(杂环)烷基;

[0366] R<sup>36a</sup>、R<sup>36c</sup>、R<sup>36e</sup>、R<sup>36f</sup>和R<sup>36g</sup>各自独立地选自下组,该组由以下组成:氢、任选取代的C<sub>1-6</sub>烷基、任选取代的C<sub>3-6</sub>环烷基、任选取代的芳基、任选取代的杂芳基、杂环、杂烷基、(环烷基)烷基和(杂环)烷基;

[0367] R<sup>36b</sup>和R<sup>36d</sup>各自独立地选自下组,该组由以下组成:氢、C<sub>1-4</sub>烷基和卤素;

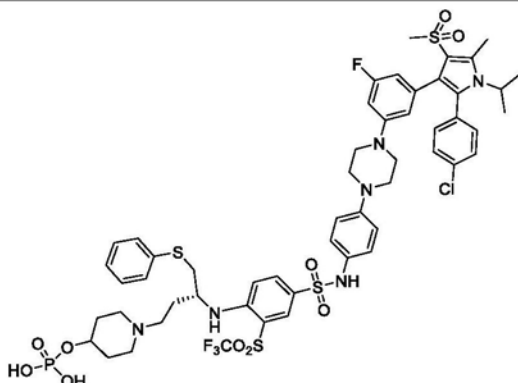
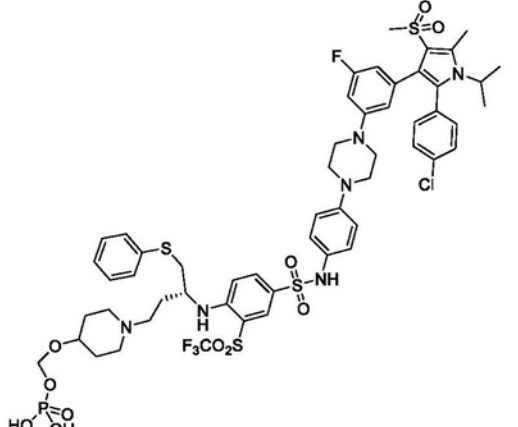
[0368] R<sup>37</sup>选自下组,该组由以下组成:任选取代的C<sub>1-6</sub>烷基、杂环、杂烷基、(环烷基)烷基和(杂环)烷基;并且

[0369] R<sup>38</sup>选自下组,该组由以下组成:氢和卤素。

[0370] 在某些实施例中,本文所述的具有结构式(I-III)的Bcl-2/Bcl-xL双重抑制剂是选自表1-A的化合物或该化合物的药学上可接受的盐。

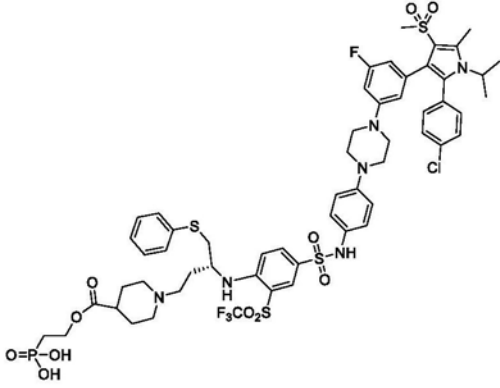
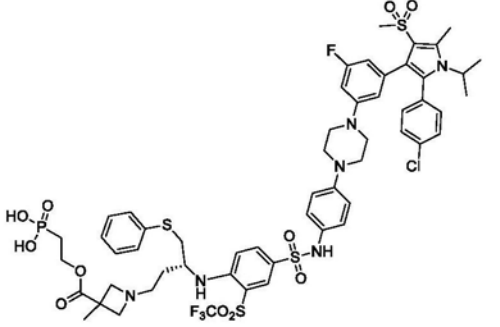
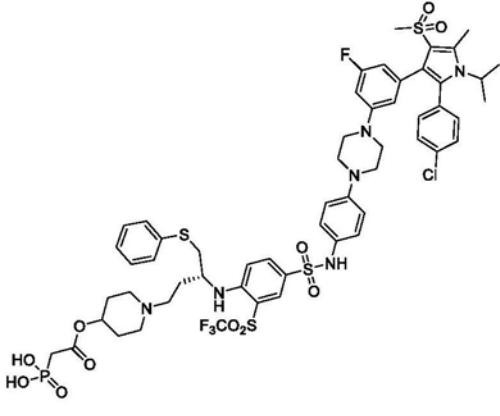
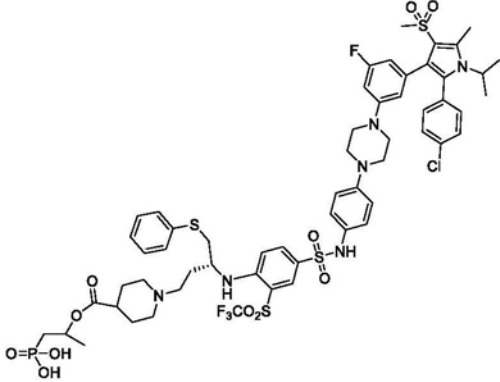
[0371] 表1-A

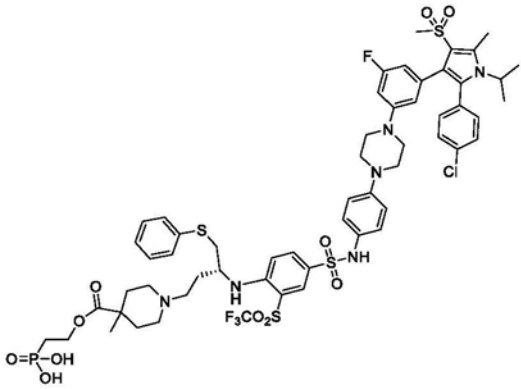
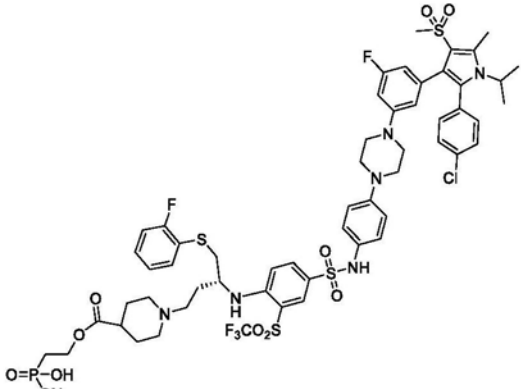
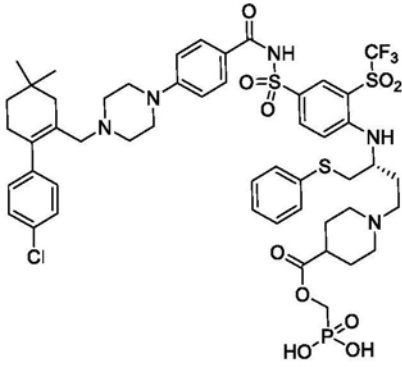
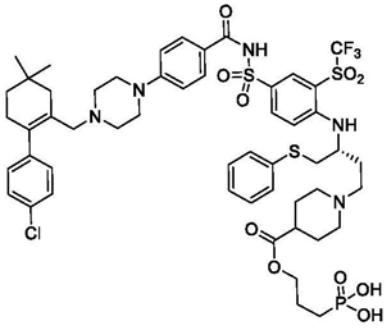
[0372]

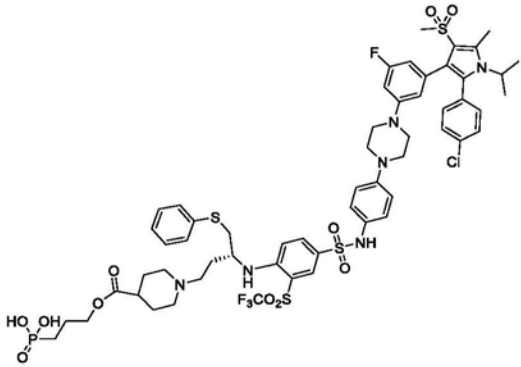
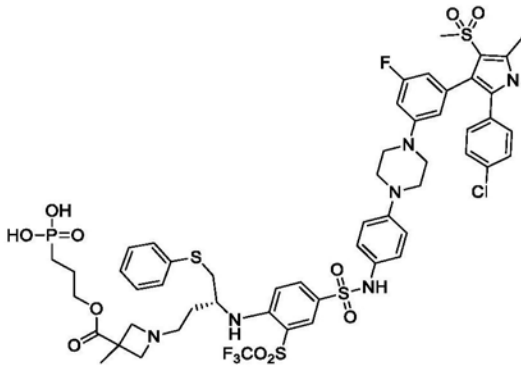
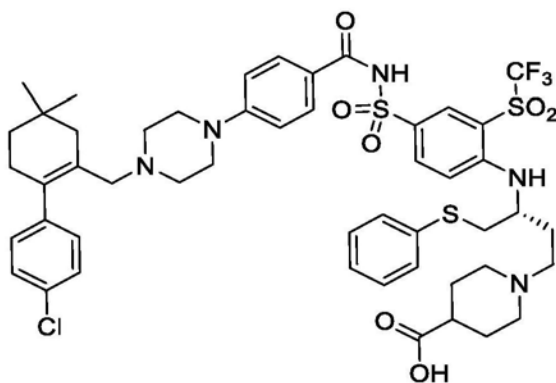
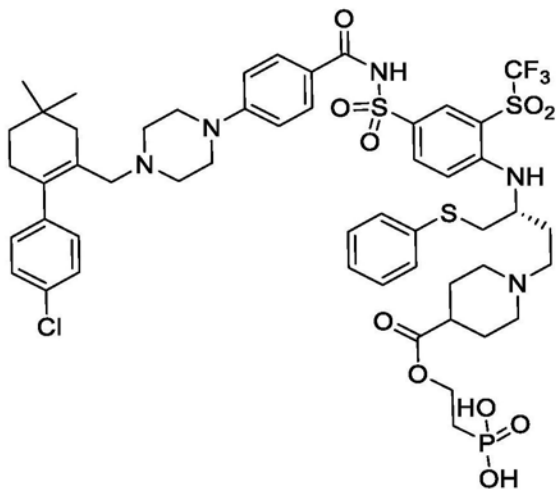
化合物	结构
A1	 <p>Chemical structure of compound A1. It features a central benzene ring substituted with a trifluoromethyl group (F<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>S), a sulfonamide group (SO<sub>2</sub>NH), and a thioether group (SCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N-cyclohexyl). The thioether chain is further substituted with a phenyl group and a phosphonic acid group (HO-P(=O)(OH)-O-cyclohexyl). The sulfonamide group is linked to a piperazine ring, which is connected to a 4-fluorophenyl group and a 4-chlorophenyl group. The 4-chlorophenyl group is further substituted with a sulfonamide group (SO<sub>2</sub>NH) and a 4-fluorophenyl group.</p>
A2	 <p>Chemical structure of compound A2. It is similar to A1, but the thioether chain is substituted with a phenyl group and a phosphonic acid group (HO-P(=O)(OH)-O-cyclohexyl) instead of a sulfonamide group.</p>

[0373]

A3	
A4	
A5	
A6	

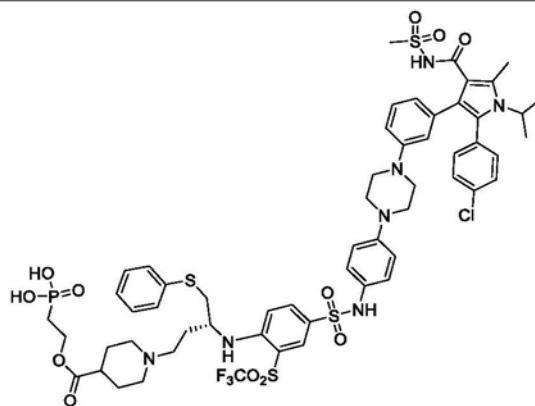
A7	
A8	
[0374] A9	
A10	

A11	
A12	
A13	
A14	

A15	
A16	
[0376] A17	
A18	

[0377]

A19



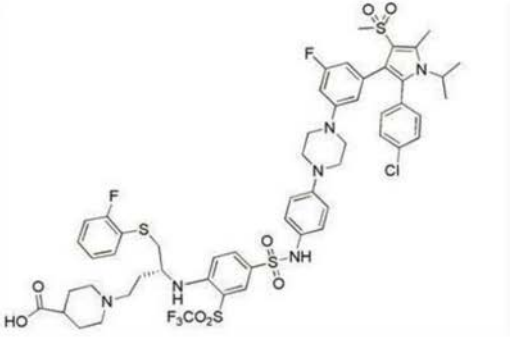
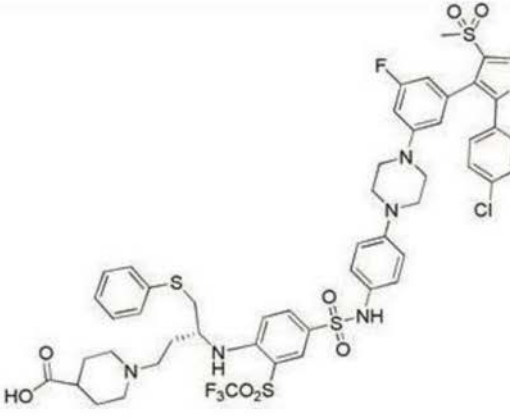
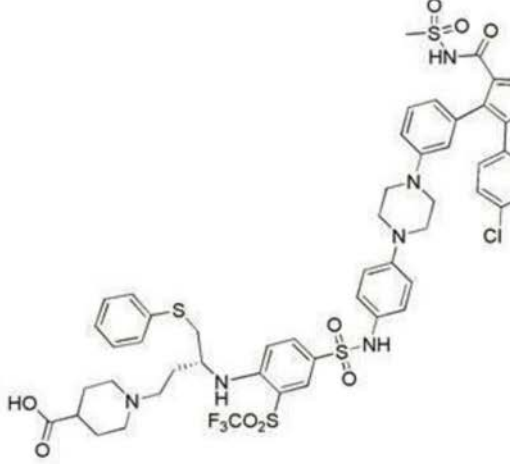
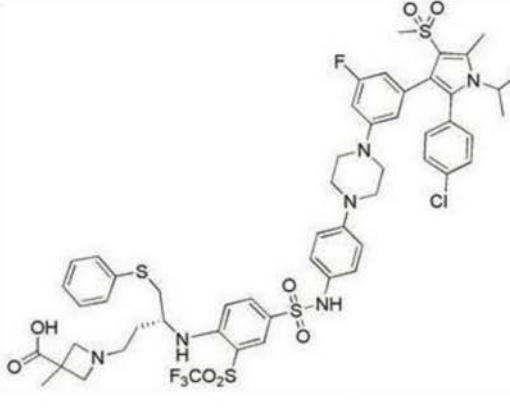
[0378] 在某些实施例中,本文所述的具有结构式(IV)的Bc1-2/Bc1-xL双重抑制剂是选自表1-B的化合物。

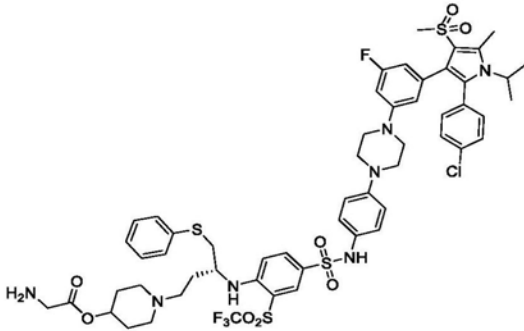
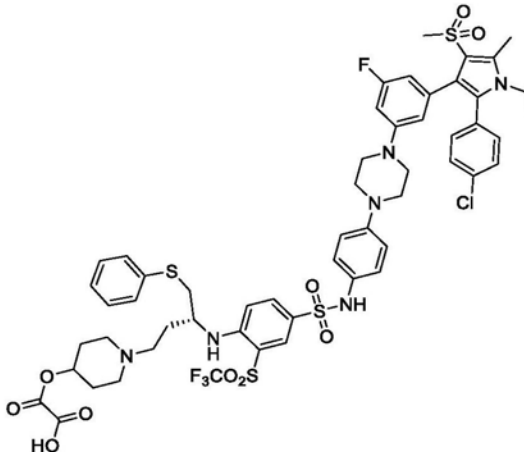
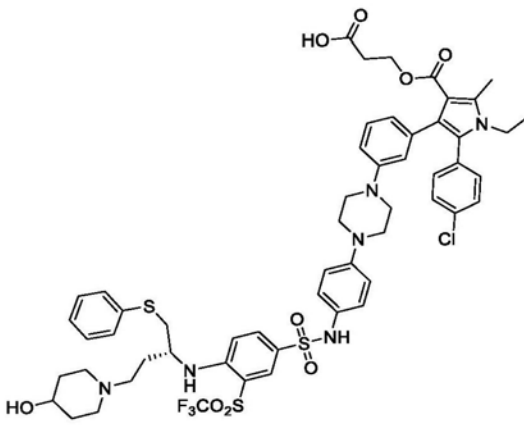
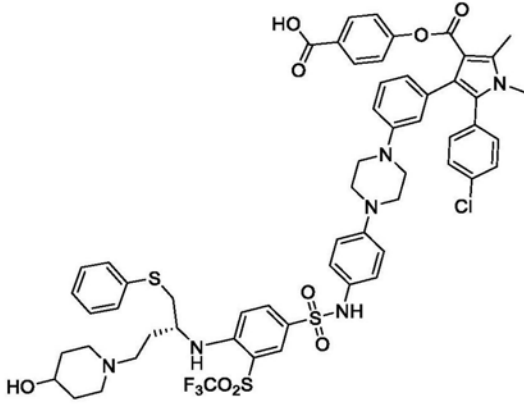
[0379] 表1-B

[0380]

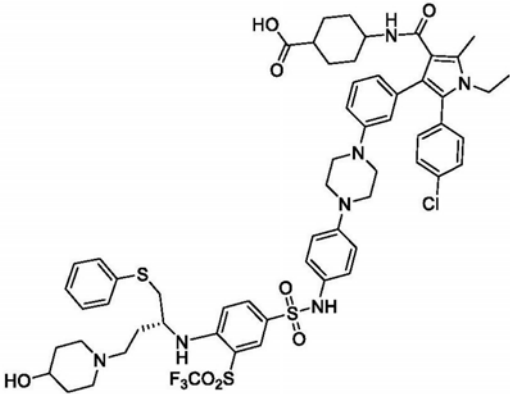
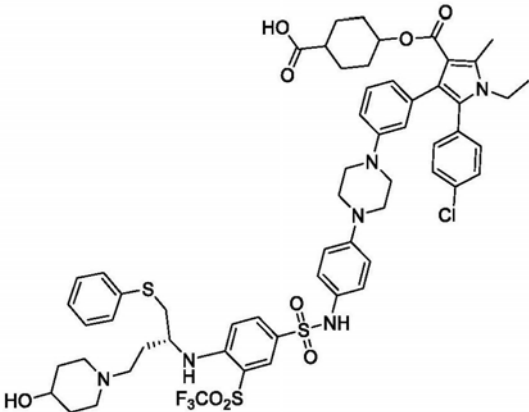
化合物	结构
B1	
B2	



B3	
B4	
[0381] B5	
B6	

B7	
B8	
B9	
B10	

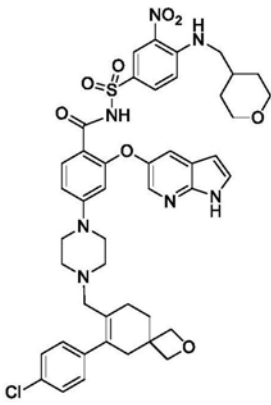
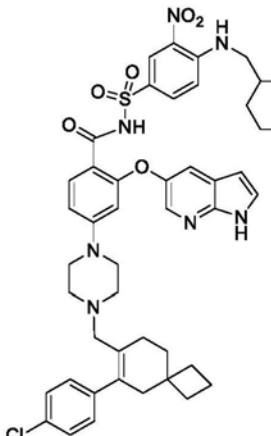
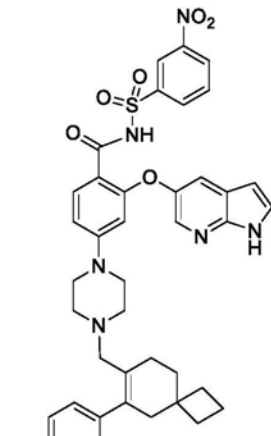
[0382]

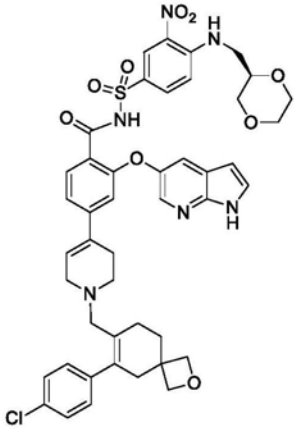
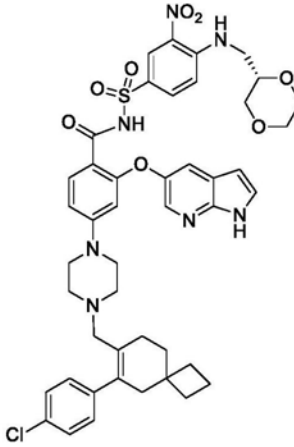
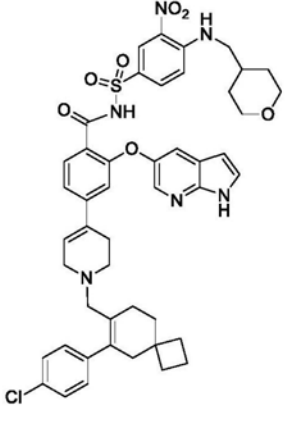
<p>B11</p>	 <p>Chemical structure of B11: A complex molecule featuring a central benzene ring substituted with a trifluoromethyl group (F<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>S), a sulfonamide group (SO<sub>2</sub>NH), and a chiral amine. The amine is linked to a 4-hydroxy-4-(phenylthio)pyrrolidine. The sulfonamide group is connected to a 4-(4-chlorophenyl)piperazine, which is further linked to a 4-(4-chlorophenyl)-1-ethyl-5-methyl-1H-imidazole-2-carboxamide. The imidazole ring is also substituted with a 4-(4-chlorophenyl)-1-ethyl-5-methyl-1H-imidazole-2-carboxamide group.</p>
<p>[0383]</p>	 <p>Chemical structure of B12: A complex molecule featuring a central benzene ring substituted with a trifluoromethyl group (F<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>S), a sulfonamide group (SO<sub>2</sub>NH), and a chiral amine. The amine is linked to a 4-hydroxy-4-(phenylthio)pyrrolidine. The sulfonamide group is connected to a 4-(4-chlorophenyl)piperazine, which is further linked to a 4-(4-chlorophenyl)-1-ethyl-5-methyl-1H-imidazole-2-carboxamide. The imidazole ring is also substituted with a 4-(4-chlorophenyl)-1-ethyl-5-methyl-1H-imidazole-2-carboxamide group.</p>

[0384] 在某些实施例中,本文所述的具有结构式(V)的Bcl-2抑制剂是选自表1-C的化合物或该化合物的药学上可接受的盐。

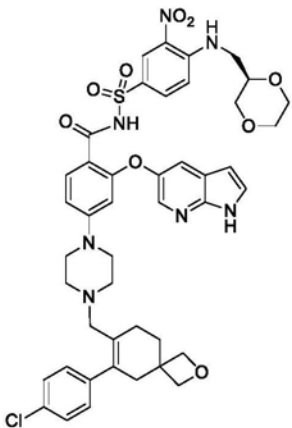
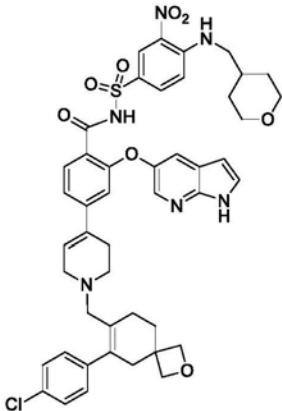
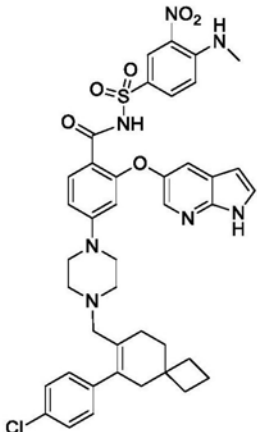
[0385] 表1C

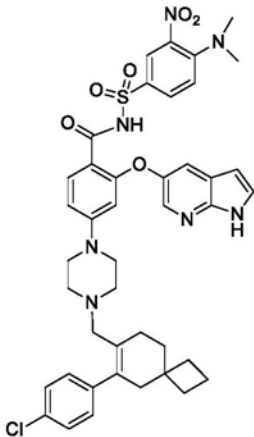
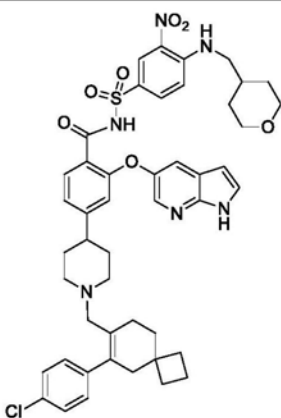
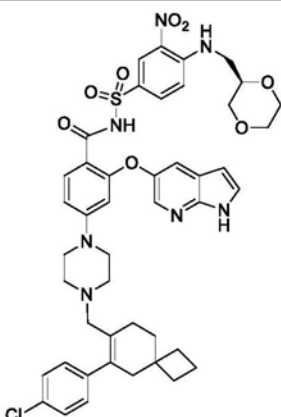
[illegible]

C2	
C3 [0387]	
C4	

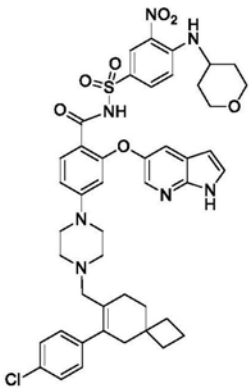
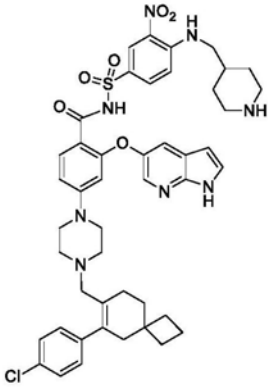
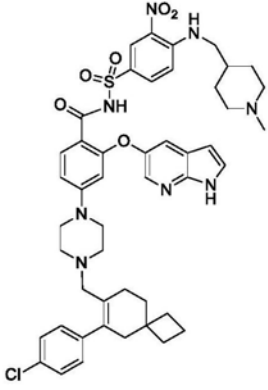
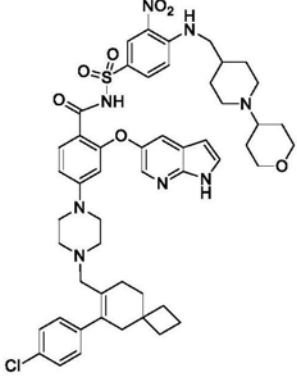
C5	
[0388] C6	
C7	

[0389]

C8	
C9	
C10	

C11	
C12	
C13	

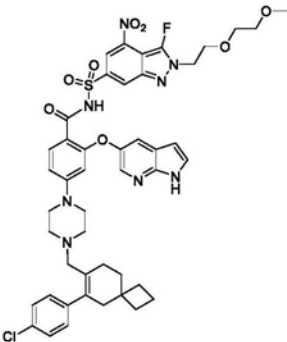
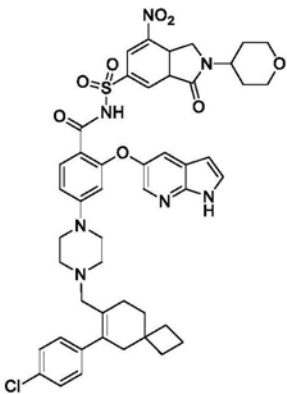
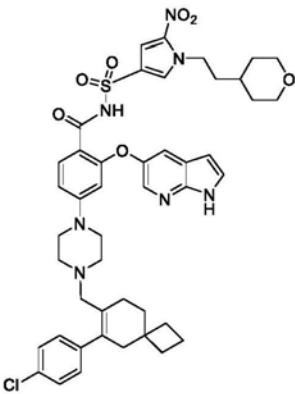
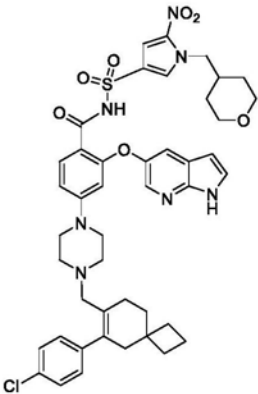
[0391]

C14	
C15	
C16	
C17	

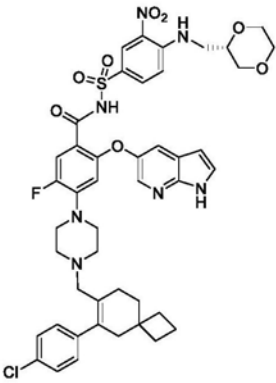
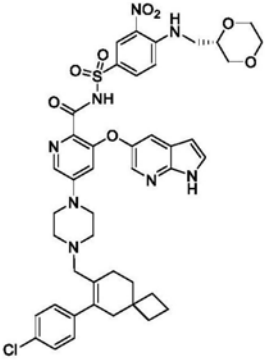
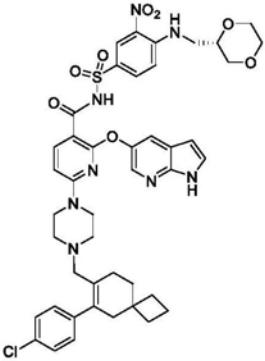
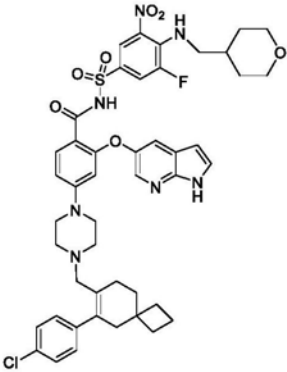


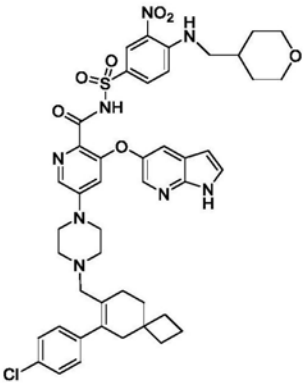
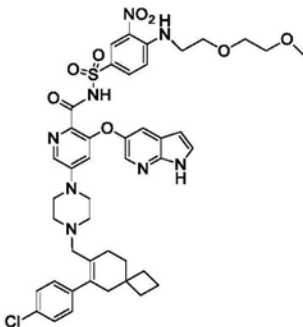
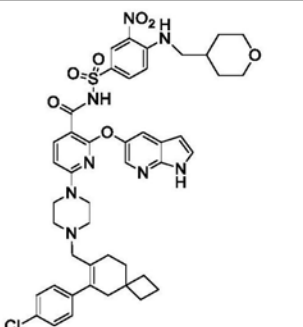
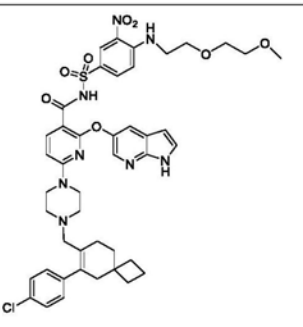
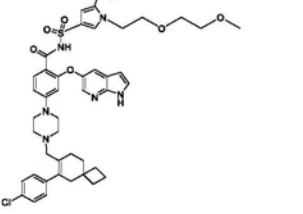
C18	
C19	
C20	
C21	

[0393]

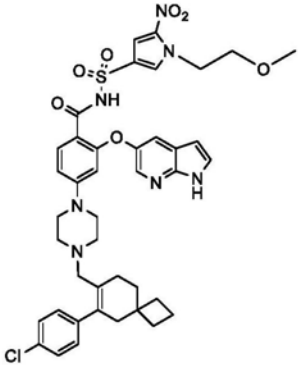
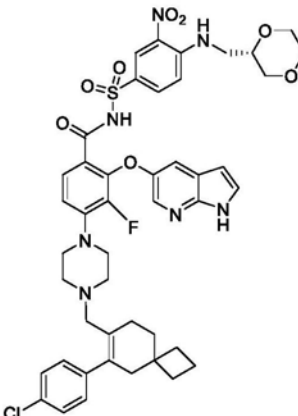
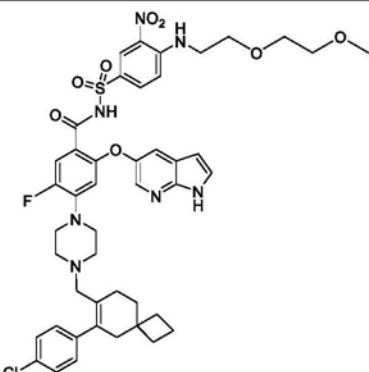
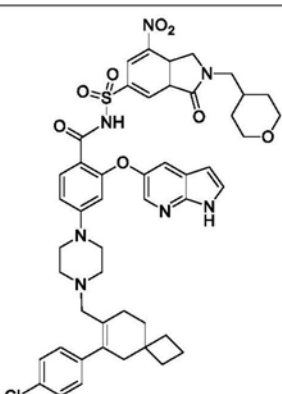
C22	
C23	
C24	
C25	

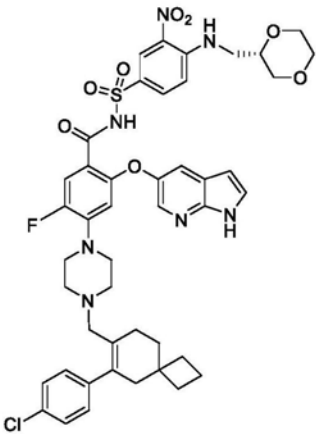
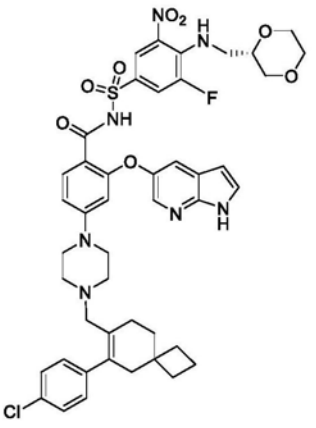
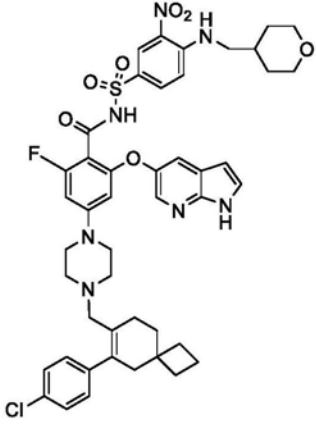
[0394]

C26	
C27	
C28	
C29	

C30	
C31	
C32	
C33	
C34	

[0396]

C35	
C36	
C37	
C38	

C39	
[0397] C40	
C41	

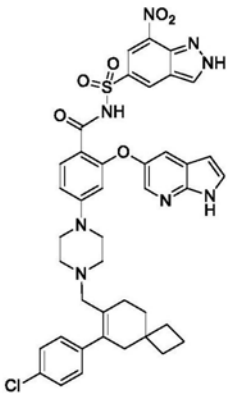
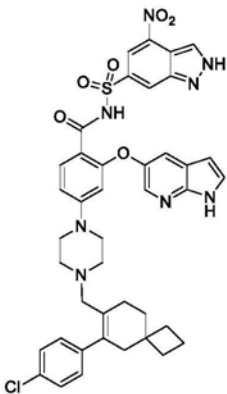
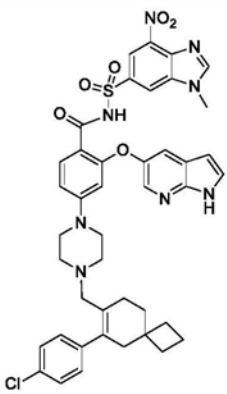
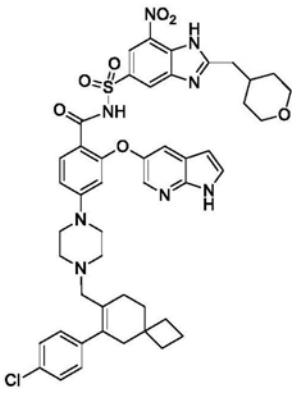
C42	
C43	
C44	
C45	

[0398]



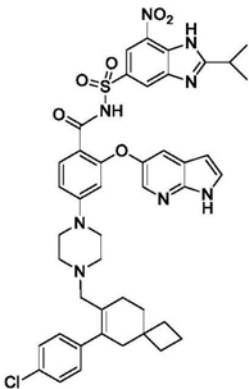
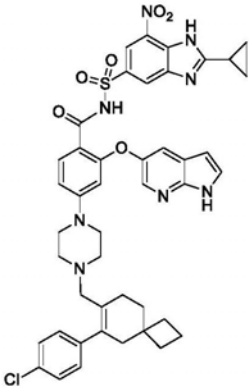
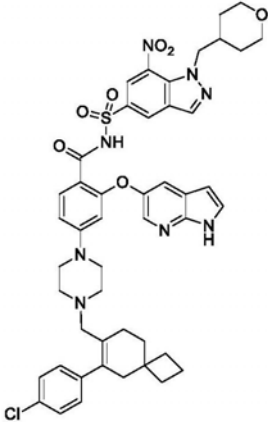
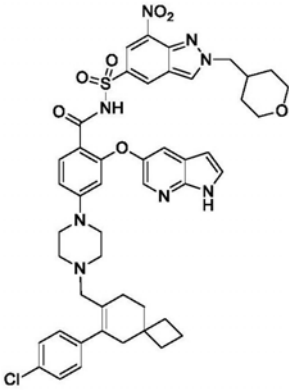


[0400]

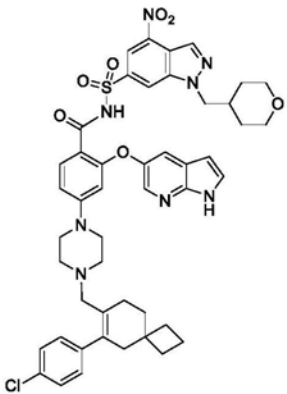
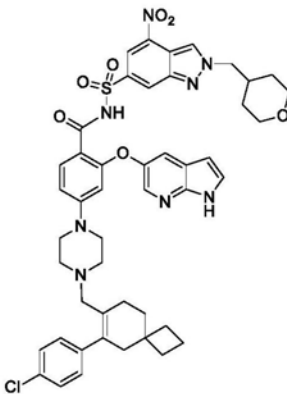
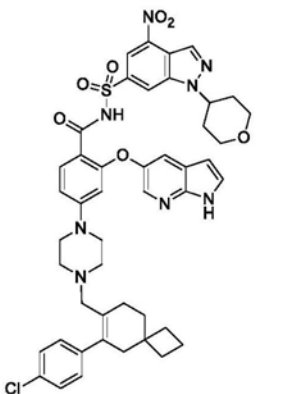
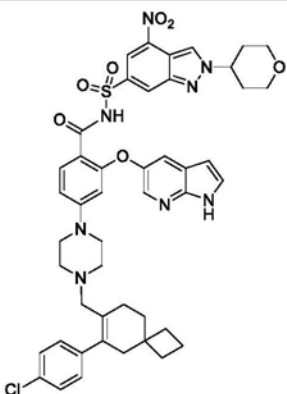
C50	 <p>Chemical structure of compound C50: A 7-nitro-1H-benzotriazole-2-sulfonyl group is connected via a carbonyl group to a 4-(4-(4-chlorophenyl)-4,5,6,7-tetrahydro-2H-cyclohepta[b]pyridin-2-yl)phenyl group. The 4-position of the phenyl ring is also substituted with a 1H-indolizin-5-yl group.</p>
C51	 <p>Chemical structure of compound C51: A 7-nitro-1H-benzotriazole-2-sulfonyl group is connected via a carbonyl group to a 4-(4-(4-chlorophenyl)-4,5,6,7-tetrahydro-2H-cyclohepta[b]pyridin-2-yl)phenyl group. The 4-position of the phenyl ring is also substituted with a 1H-indolizin-5-yl group.</p>
C52	 <p>Chemical structure of compound C52: A 7-nitro-1-methyl-1H-benzotriazole-2-sulfonyl group is connected via a carbonyl group to a 4-(4-(4-chlorophenyl)-4,5,6,7-tetrahydro-2H-cyclohepta[b]pyridin-2-yl)phenyl group. The 4-position of the phenyl ring is also substituted with a 1H-indolizin-5-yl group.</p>
C53	 <p>Chemical structure of compound C53: A 7-nitro-1-(2-oxa-6-azabicyclo[3.2.1]hept-6-yl)-1H-benzotriazole-2-sulfonyl group is connected via a carbonyl group to a 4-(4-(4-chlorophenyl)-4,5,6,7-tetrahydro-2H-cyclohepta[b]pyridin-2-yl)phenyl group. The 4-position of the phenyl ring is also substituted with a 1H-indolizin-5-yl group.</p>

[0401]

C54	
C55	
C56	
C57	

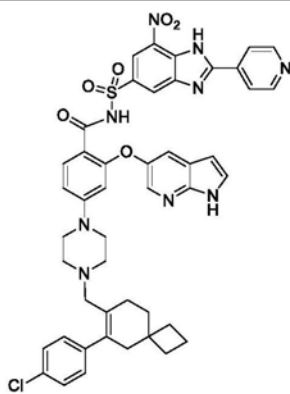
C58	 <p>Chemical structure of compound C58: A 4-chlorophenyl ring is connected via a methylene bridge to a piperidine ring. The piperidine ring is further connected via a methylene bridge to a 4-(4-(4-((4-chlorophenyl)methyl)piperidin-1-yl)phenoxy)benzamide group. The benzamide group is substituted with a 5-nitro-1H-indazol-2-yl group.</p>
C59	 <p>Chemical structure of compound C59: A 4-chlorophenyl ring is connected via a methylene bridge to a piperidine ring. The piperidine ring is further connected via a methylene bridge to a 4-(4-(4-((4-chlorophenyl)methyl)piperidin-1-yl)phenoxy)benzamide group. The benzamide group is substituted with a 5-nitro-1H-indazol-2-yl group.</p>
C60	 <p>Chemical structure of compound C60: A 4-chlorophenyl ring is connected via a methylene bridge to a piperidine ring. The piperidine ring is further connected via a methylene bridge to a 4-(4-(4-((4-chlorophenyl)methyl)piperidin-1-yl)phenoxy)benzamide group. The benzamide group is substituted with a 5-nitro-1H-indazol-2-yl group.</p>
C61	 <p>Chemical structure of compound C61: A 4-chlorophenyl ring is connected via a methylene bridge to a piperidine ring. The piperidine ring is further connected via a methylene bridge to a 4-(4-(4-((4-chlorophenyl)methyl)piperidin-1-yl)phenoxy)benzamide group. The benzamide group is substituted with a 5-nitro-1H-indazol-2-yl group.</p>

[0403]

C62	
C63	
C64	
C65	

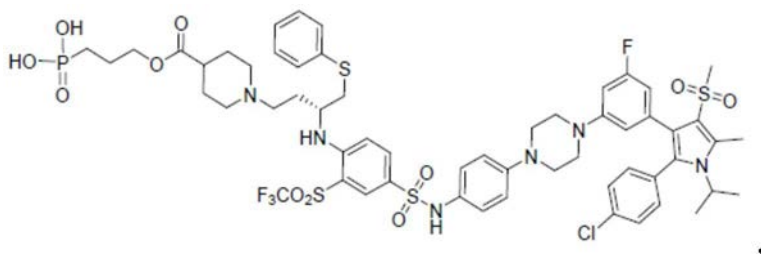
[0404]

C66



[0405] 在某些实施例中,Bcl-2/Bcl-xL双重抑制剂是具有以下结构的(R)-2-(1-(3-(4-(N-(4-(4-(3-(2-(4-氯苯基)-1-异丙基-5-甲基-4-(甲基磺酰基)-1H-吡咯-3-基)-5-氟苯基)哌嗪-1-基)苯基)氨磺酰基)-2-(三氟甲基磺酰基)苯基氨基)-4-(苯硫基)丁基)哌啶-4-羧基氧基)乙基膦酸(“化合物A15”)

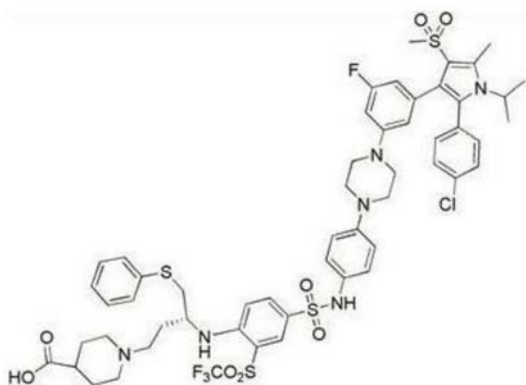
[0406]



或其药学上可接受的盐。

[0407] 在某些实施例中,Bcl-2/Bcl-xL双重抑制剂是具有以下结构的(R)-1-(3-(4-(N-(4-(4-(3-(2-(4-氯苯基)-1-异丙基-5-甲基-4-(甲基磺酰基)-1H-吡咯-3-基)-5-氟苯基)哌嗪-1-基)苯基)氨磺酰基)-2-(三氟甲基磺酰基)苯基氨基)-4-(苯硫基)丁基)哌啶-4-甲酸(“化合物B4”)

[0408]

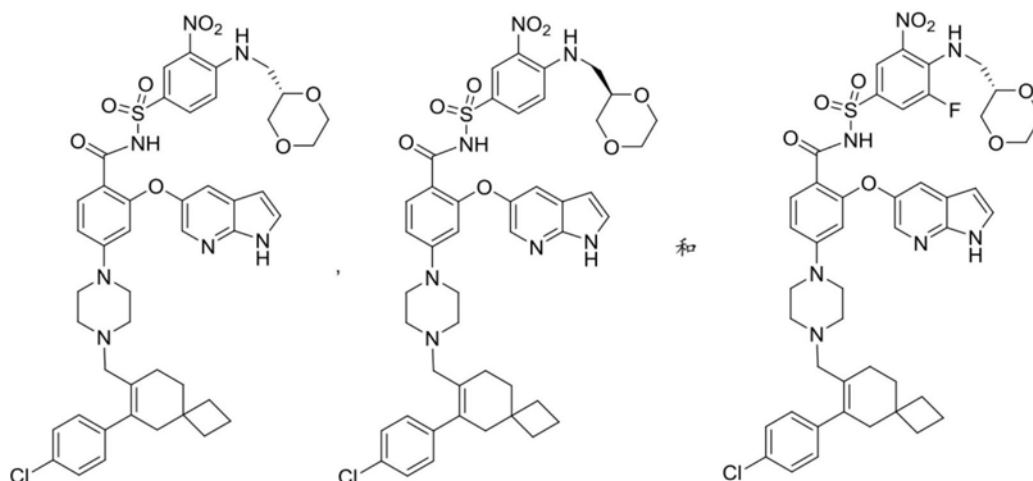


或其药学上可接受的盐。

[0409] 化合物A15是以非常高亲和力、以分别为1.6nM、4.4nM和9.3nM的IC<sub>50</sub>值与Bcl-2、Bcl-xL和Bcl-w蛋白质结合的小分子化合物。化合物A15对Mc1-1蛋白质具有弱亲和力。化合物A15在癌细胞系的一个亚组中显示出具有纳摩尔效价的有效体外细胞生长抑制活性。从机理上讲,化合物A15有效诱导半胱天冬酶-3和PARP的切割,半胱天冬酶-3和PARP是癌细胞和异种移植肿瘤组织中人类癌症的细胞凋亡的生化标志物。化合物B4是化合物A15的活性代谢物。

[0410] 在一些实施例中,Bcl-2抑制剂选自具有以下结构的化合物

[0411]



[0412] 或其药学上可接受的盐。

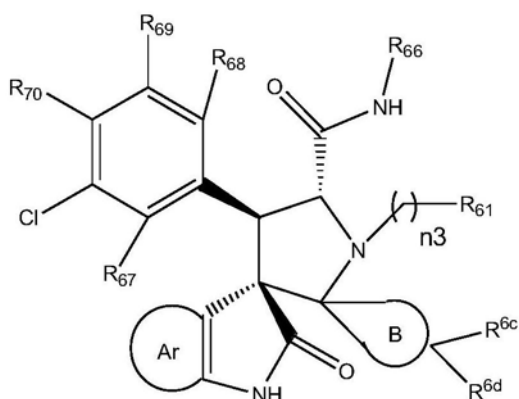
[0413] 许多Bcl-xL抑制剂在本领域中是已知的,例如在以下文献中描述的那些: Urbaniak A等人,Oncol Lett.[肿瘤学快报]2019年11月;18(5):5097-5106;Zhan Y等人,Cell Biosci.[细胞生物科学]2019年7月23日;9:60.;Hikita H等人,Hepatology.[肝脏学]2010;52:1310-21;Lee B等人,Biochem Biophys Res Commun.[生物化学和生物物理学研究通讯]2019年6月25日;514(2):518-523;Henz K等人,Biol Chem.[生物化学]2019年1月28日;400(2):181-185;Wang Q等人,Leuk Lymphoma.[白血病和淋巴瘤]2019年9月;60(9):2170-2180.;Rello-Varona S等人,Sci Rep.[科学报告]2019年3月7日;9(1):3816;Levesley J等人,Neuro Oncol.[神经肿瘤学]2018年1月22日;20(2):203-214以及 Lucantoni F等人,Oncotarget.[肿瘤靶标]2018年5月25日;9(40):26046-26063。

[0414] 在某些实施例中,本文所述的Bcl-xL抑制剂选自ABT-263、ABT-737、A-1331852、A-1155463和WEHI-539。


[0415] MDM2抑制剂

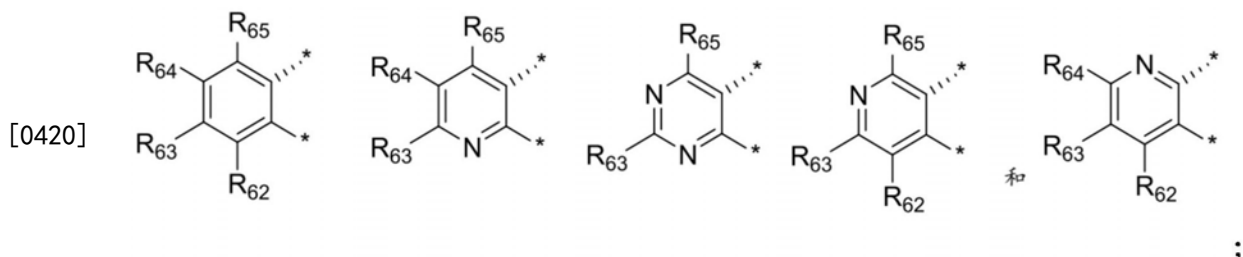
[0416] 在某些实施例中,MDM2抑制剂包含具有以下式(VI)的化学结构:

[0417]



[0418] 或其药学上可接受的盐,其中

[0419]  选自下组,该组由以下组成:

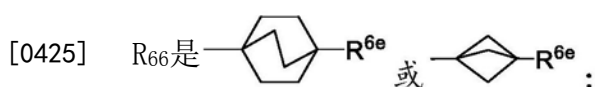


[0421] B是C<sub>4-7</sub>碳环；

[0422] R<sub>61</sub>是H、取代的或未取代的C<sub>1-4</sub>烷基、取代的或未取代的环烷基、取代的或未取代的杂环烷基、OR<sup>6a</sup>、或NR<sup>6a</sup>R<sup>6b</sup>；

[0423] n<sub>3</sub>是0、1或2；

[0424] R<sub>62</sub>、R<sub>63</sub>、R<sub>64</sub>、R<sub>65</sub>、R<sub>67</sub>、R<sub>68</sub>、R<sub>69</sub>和R<sub>70</sub>独立地选自下组，该组由以下组成：H、F、Cl、CH<sub>3</sub>和CF<sub>3</sub>；



[0426] R<sup>6a</sup>是氢或取代的或未取代的C<sub>1-4</sub>烷基；

[0427] R<sup>6b</sup>是氢或取代的或未取代的C<sub>1-4</sub>烷基；

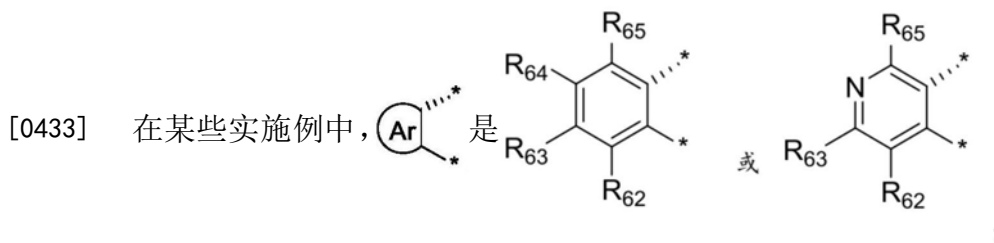
[0428] R<sup>6c</sup>和R<sup>6d</sup>是环B的一个碳原子上的取代基，其中

[0429] R<sup>6c</sup>是H、C<sub>1-3</sub>烷基、C<sub>1-3</sub>亚烷基-OR<sup>6a</sup>、OR<sup>6a</sup>或卤代；

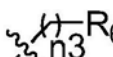
[0430] R<sup>6d</sup>是H、C<sub>1-3</sub>烷基、C<sub>1-3</sub>亚烷基-OR<sup>6a</sup>、OR<sup>6a</sup>或卤代；或

[0431] R<sup>6c</sup>和R<sup>6d</sup>与它们所附接的碳一起形成4元至6元螺取代基，任选地包含氧原子；并且

[0432] R<sup>6e</sup>是-C(=O)OR<sup>6a</sup>、-C(=O)NR<sup>6a</sup>R<sup>6b</sup>或-C(=O)NHSO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>。



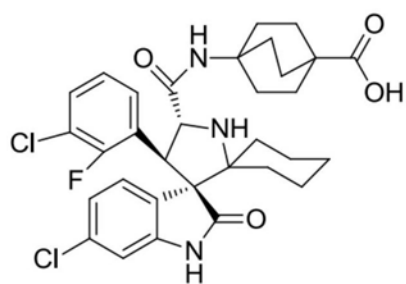
[0435] R<sup>6c</sup>和R<sup>6d</sup>是F和F、H和H、OH和CH<sub>3</sub>、OH和H、CH<sub>3</sub>和CH<sub>3</sub>、CH<sub>3</sub>和OH、H和OH、CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>和CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>、或CH<sub>2</sub>OH和CH<sub>2</sub>OH。

[0436] 在某些实施例中， R<sub>61</sub>是H、CH<sub>3</sub>或CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>。

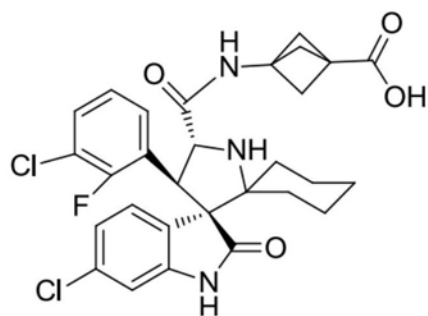
[0437] 在某些实施例中，R<sub>62</sub>是H；R<sub>63</sub>是卤代；R<sub>64</sub>和R<sub>65</sub>是H。

[0438] 在某些实施例中，R<sub>67</sub>是氟；R<sub>68</sub>、R<sub>69</sub>和R<sub>70</sub>中的每个是H；并且R<sup>6e</sup>是-C(=O)OH、-C(=O)NH<sub>2</sub>或-C(=O)NHSO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>。

[0439] 在某些实施例中，MDM2抑制剂是选自以下的化合物：

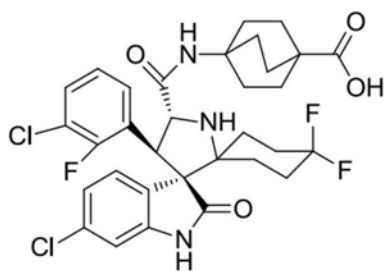


化合物 Q

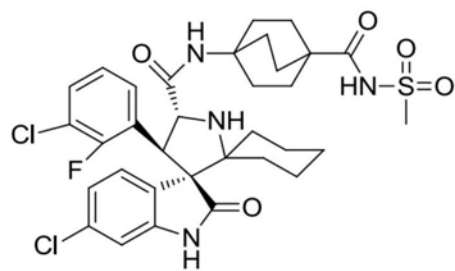


化合物 M

[0440]

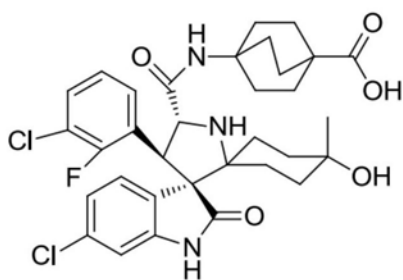


化合物 N

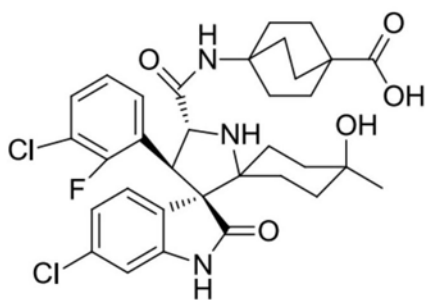


化合物 H

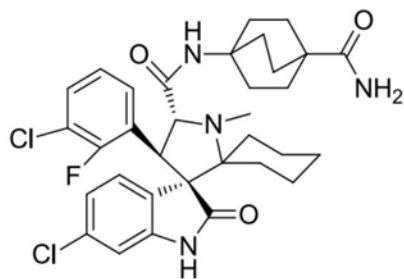




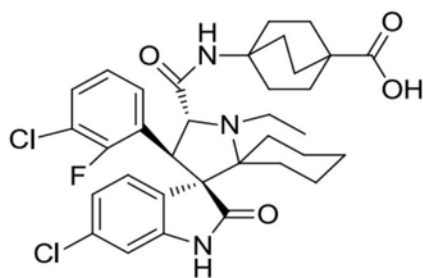
化合物 J



化合物 G

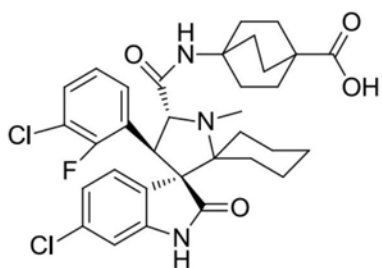


化合物 E

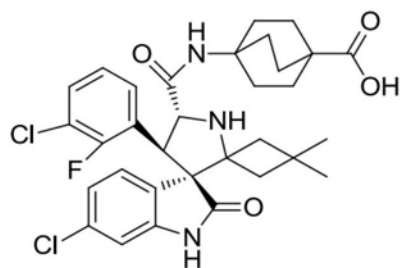


化合物 C

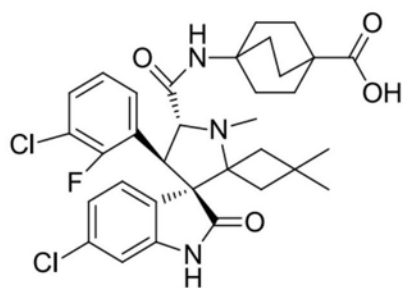
[0441]



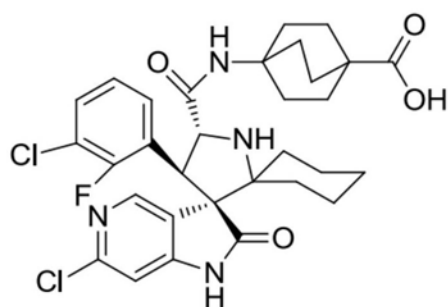
化合物 F



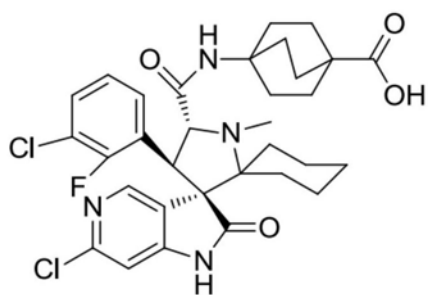
化合物 Y



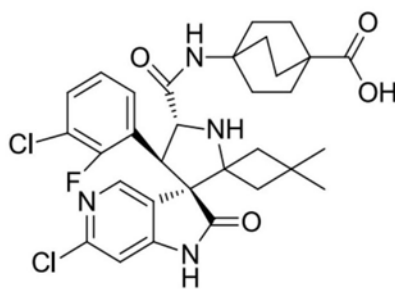
化合物 K



化合物 P

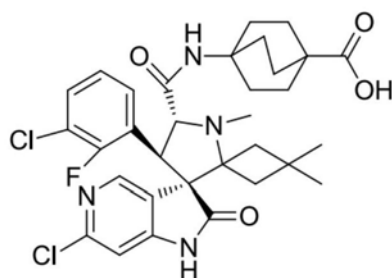


化合物 T



化合物 S

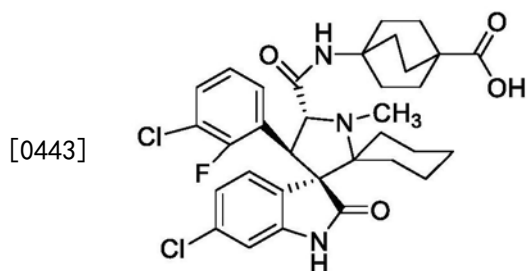
和



化合物 W

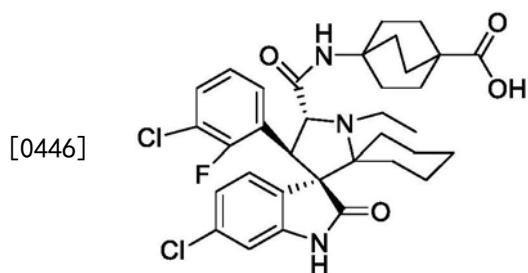
或药学上可接受的盐。

[0442] 在一个实施例中,MDM2抑制剂是



[0444] 或其药学上可接受的盐。

[0445] 在一个实施例中,MDM2抑制剂是



[0447] 或其药学上可接受的盐。

[0448] 将可在本申请中使用的更多的MDM2抑制剂和MDM2抑制剂的合成进一步披露于美国专利号9,745,314中,将其通过引用并入本文。

[0449] 第二抗癌治疗剂

[0450] 在一些实施例中,向受试者施用有效量的与MDM2抑制剂或Bcl-2/Bcl-xL抑制剂或Bcl-2抑制剂或Bcl-xL抑制剂组合的第二抗癌治疗剂,该受试者通过如本文所提供的方法被鉴定为可能对用MDM2抑制剂、Bcl-2/Bcl-xL双重抑制剂或Bcl-xL抑制剂或Bcl-2抑制剂

的治疗产生应答。

[0451] 在一些实施例中,向受试者施用有效量的与MDM2抑制剂或Bcl-2/Bcl-xL抑制剂或Bcl-2抑制剂或Bcl-xL抑制剂组合的第二抗癌治疗剂,该受试者通过如本文所提供的方法被鉴定为对用MDM2抑制剂或Bcl-2/Bcl-xL双重抑制剂或Bcl-xL抑制剂或Bcl-2抑制剂的治疗具有降低的应答可能性。

[0452] 在一些实施例中,向受试者施用与有效量的MDM2抑制剂或Bcl-2/Bcl-xL双重抑制剂或Bcl-2抑制剂或Bcl-xL抑制剂组合的有效量的第二抗癌治疗剂,该受试者已经被确定为具有至少一种包含Noxa、ASCL1或两者的生物标志物的治疗后变化,该变化未达到如本文所述的预定阈值。

[0453] 在一些实施例中,按与治疗具体癌症的护理标准下的标准剂量不同(例如,低于)的剂量施用MDM2抑制剂或Bcl-2/Bcl-xL双重抑制剂或Bcl-2抑制剂或Bcl-xL抑制剂。在某些实施例中,MDM2抑制剂、Bcl-2/Bcl-xL双重抑制剂或Bcl-2抑制剂或Bcl-xL抑制剂的施用剂量比治疗具体癌症的护理标准下的标准剂量低5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%。在某些实施例中,MDM2抑制剂、Bcl-2/Bcl-xL双重抑制剂或Bcl-2抑制剂或Bcl-xL抑制剂的施用剂量是治疗具体癌症的护理标准下的标准剂量的95%、90%、85%、80%、75%、70%、65%、60%、55%、50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%或5%。

[0454] 在一个具体的实施例中,第二抗癌治疗剂是可以用于治疗癌症的药剂。例如,第二抗癌治疗剂可以选自抗肿瘤剂、抗血管生成剂、化学治疗剂和肽类癌症治疗剂。在又一个实施例中,抗肿瘤剂选自抗生素型药剂、烷化剂、抗代谢剂、激素药剂、免疫学药剂、干扰素型药剂、激酶抑制剂、其他药剂及其组合。值得注意的是,第二抗癌治疗剂可以是传统的小的有机化学分子,或可以是高分子(例如蛋白质、抗体、肽体、DNA、RNA)或此类大分子的片段。

[0455] 在一些实施例中,另外的药物活性剂是免疫检查点分子的调节剂。

[0456] 如本文所使用的,“免疫检查点”或“免疫检查点分子”是免疫系统中的调节信号的分子。免疫检查点分子可以是共刺激检查点分子(即,调高信号),或抑制性检查点分子(即,调低信号)。如本文所使用的,“共刺激检查点分子”是免疫系统中调高信号或具有共刺激性的分子。如本文所使用的,“抑制性检查点分子”是免疫系统中调低信号或具有共抑制性的分子。

[0457] 如本文所使用的,“免疫检查点分子的调节剂”是能够改变受试者中免疫检查点活性的药剂。在某些实施例中,免疫检查点分子的调节剂改变一种或多种免疫检查点分子的功能,该一种或多种免疫检查点分子包括PD-1、PD-L1、PD-L2、CTLA-4、TIM-3、LAG3、CD160、2B4、TGF $\beta$ 、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、OX40、CD2、CD27、ICAM-1、NKG2C、SLAMF7、Nkp80、CD160、B7-H3、LFA-1、1COS、4-1BB、GITR、CD30、CD40、BAFFR、HVEM、CD7、LIGHT和CD83。免疫检查点的调节剂可以是免疫检查点的激活剂(例如,激动剂)或抑制剂(例如,拮抗剂)。在一些实施例中,免疫检查点分子的调节剂是免疫检查点结合蛋白(例如,抗体、抗体Fab片段、二价抗体、抗体药物缀合物、scFv、融合蛋白、二价抗体或四价抗体)。在一些实施例中,免疫检查点分子的调节剂是单克隆抗体或其抗原结合片段。在其他实施例中,免疫检查点分子的调节剂是小分子。在一个具体的实施例中,免疫检查点分子的调节剂是抗PD1抗体。在一个

具体的实施例中,免疫检查点分子的调节剂是抗PD-L1抗体。在一个具体的实施例中,免疫检查点分子的调节剂是抗CTLA-4抗体。

[0458] 在一些实施例中,免疫检查点分子的调节剂恢复抗肿瘤T细胞活性或阻断T细胞抑制性细胞活性。在一些实施例中,免疫检查点分子的调节剂是共刺激检查点分子的激活剂,并且共刺激检查点分子的激活剂改变完全T细胞激活所需的共刺激信号。

[0459] 在一些实施例中,免疫检查点分子的调节剂是派姆单抗、伊匹单抗、纳武单抗、阿特殊单抗、阿维鲁单抗(avelumab)、度伐鲁单抗(durvalumab)、AGEN-1884、BMS-986016、CS-1002、LAG525、MBG453、MEDI-570、OREG-103/BY40、利瑞鲁单抗(lirilumab)、曲美木单抗、纳武单抗、AMP-224、AMP-514、BGB-A317、赛米单抗(cemiplimab)、JS001、PDR-001、CS-1001、PF-06801591、IBI-308、匹地利珠单抗(pidilizumab)、SHR-1210、或TSR-042、JS003、LY3300054、MDX-1105、SHR-1316、KN035、或CK-301。

[0460] 在一些实施例中,第二抗癌治疗剂是化疗药物,是可以用于治疗癌症的生物(大分子)或化学(小分子)化合物。化疗药物的类型包括但不限于,组蛋白脱乙酰化酶抑制剂(HDACI)、烷化剂、抗代谢物、生物碱、细胞毒性/抗癌抗生素、拓扑异构酶抑制剂、微管蛋白抑制剂、蛋白质、抗体、激酶抑制剂等。化疗药物包括用于靶向疗法的化合物和传统化学疗法的非靶向性化合物。

[0461] 化疗药物的非限制性实例包括:埃罗替尼、阿法替尼、多西他赛、阿霉素、5-FU(5-氟尿嘧啶)、帕比司他、吉西他滨、顺铂、卡铂、紫杉醇、贝伐单抗、曲妥珠单抗、帕妥珠单抗、二甲双胍、替莫唑胺、他莫昔芬、多柔比星、雷帕霉素、拉帕替尼、羟基喜树碱、曲美替尼(trimetinib)。化疗药物的另外的实例包括:奥沙利铂、硼替佐米、舒尼替尼、来曲唑、伊马替尼、PI3K抑制剂、氟维司群、亚叶酸、洛那法尼、索拉非尼、吉非替尼、克唑替尼、伊立替康、拓扑替康、伐柔比星、维莫非尼、泰比维尼(telbivinin)、卡培他滨、凡德他尼、苯丁酸氮芥、帕尼单抗、西妥昔单抗、利妥昔单抗、托西莫单抗、坦罗莫司、依维莫司、帕唑帕尼、坎磷酰胺、噻替派、环磷酰胺;烷基磺酸酯,例如白消安、英丙舒凡(improsulfan)和哌泊舒凡(piposulfan);乙烯亚胺、苯佐替哌(benzodopa)、卡波醌、美妥替哌(meturedopa)、乌瑞替哌(uredopa)、甲基蜜胺(包括六甲蜜胺、三乙烯蜜胺、三乙基磷酰胺、三乙基硫代磷酰胺和三亚甲基蜜胺);布拉他辛(bullatacin)、布拉他辛酮(bullatacinone);苔藓虫素;海绵聚酮(callystatin)、CC-1065(包括它的阿多来新、卡折来新、比折来新合成类似物)、念珠藻素(特别地,念珠藻素1和念珠藻素8);多拉司他汀、多卡米新(包括合成类似物KW-2189和CB1-TM1);艾榴塞洛素(eleutherobin);水鬼蕉碱、葡枝珊瑚醇、海绵素;氮芥,例如,苯丁酸氮芥、萘氮芥、环磷酰胺、雌氮芥、异环磷酰胺、双-氯乙基-甲胺、氧氮芥马法兰、新恩比兴(novembichin)、苯芥胆甾醇、泼尼莫司汀、曲洛磷胺、乌拉莫司汀、亚硝基脲,例如卡莫司汀、氯脲菌素、福莫司汀、洛莫司汀、尼莫司汀、雷莫司汀;抗生素(例如,烯二炔类抗生素(例如,加利车霉素、加利车霉素 $\gamma$  1I、加利车霉素 $\omega$  1I、达内霉素、达内霉素A);二磷酸盐,例如,氯膦酸盐、埃斯培拉霉素、和新制癌菌素发色团和相关的色蛋白烯二炔类抗生素发色团)、阿克拉霉素、放线菌素、全反式维甲酸、氨基霉素、重氮丝氨酸、博来霉素、放线菌素C、卡柔比星(carabycin)、洋红霉素、噬癌菌素、色霉素、放线菌素D、柔红霉素、脱氧-氟尿苷、地托比星、6-重氮-5-氧代-L-正亮氨酸、吗啉代-多柔比星、氰基-吗啉代-多柔比星、2-吡咯啉-多柔比星、环氧多柔比星、表阿霉素、依索比星、伊达比星、麻西罗霉素、丝裂霉素、霉酚

酸、诺加霉素、橄榄霉素、培洛霉素、泊非霉素、嘌呤霉素、三铁阿霉素、罗多比星、链黑菌素、链脉霉素、杀结核菌素、乌苯美司、净司他丁、佐柔比星；抗代谢药，例如甲氨蝶呤；叶酸类似物，例如二甲基叶酸、甲氨蝶呤、蝶罗呤、三甲曲沙；嘌呤类似物，例如氟达拉滨、6-巯基嘌呤、甲氨蝶呤、硫咪嘌呤、硫鸟嘌呤；嘧啶类似物，例如安西他滨、阿扎胞苷、硫唑嘌呤、博来霉素、6-硝基尿苷、卡莫氟、阿糖胞苷、双脱氧尿苷、去氧氟尿苷、依诺他滨、氟尿苷；雄激素，卡鲁睾酮、屈他雄酮丙酸酯、环硫雄醇、美雄烷、睾内酯；抗肾上腺素药剂，例如氨鲁米特、米托坦、曲洛司坦；叶酸补充剂，例如亚叶酸；醋葡醛内酯；醛磷酰胺糖苷；氨基乙酰丙酸；恩尿嘧啶、安吡啶、阿莫司汀 (bestrabucil)、比生群、伊达曲沙、地磷酰胺 (defofamine)、秋水仙胺、地吡醌、依氟鸟氨酸、依利醋铵、埃博霉素、依托格鲁；硝酸镓；羟基脲；香菇多糖、氯尼达明 (lonidainine)、美登木素生物碱、美登素、安丝菌素、米托胍脲、米托蒽醌、莫派达醇、尼曲瑞林 (nitraerine)、喷司他丁、蛋氨酸芥、吡柔比星、洛索蒽醌、鬼臼酸；2-乙基胍；丙卡巴肼、**PSK®**多糖复合物 (JHS自然产品公司 (JHS Natural Products)，尤金，俄勒冈州)、雷佐生、根霉素、西佐喃、锗螺胺、细交链孢菌酮酸、三亚胺醌；2,2',2''-三氯-三乙胺；单端孢霉烯 (特别是T-2毒素、疣孢菌素 (verracurin) A、漆斑菌素A和蛇形菌素)；乌拉坦、长春地辛、达卡巴嗪、甘露莫司汀；二溴甘露醇；二溴卫矛醇；哌泊溴烷、盖克托辛 (gacytosine)、阿拉伯糖苷 ("Ara-C")；环磷酰胺；噻替派；硫鸟嘌呤；6-巯基嘌呤；甲氨蝶呤；长春碱；依托泊苷、异环磷酰胺、米托蒽醌、长春新碱、长春瑞滨、米托蒽醌 (novantrone)；培美曲塞；替尼泊苷、依达曲沙、道诺霉素；氨基蝶呤；伊班膦酸盐；CPT-11；拓扑异构酶抑制剂RFS 2000；DMF0，类视黄醇，例如视黄酸；及其药学上可接受的盐或衍生物。

[0462] 本文使用的化疗药物优选地选自下组，该组由以下组成：帕比司他、放线菌素、全反式维甲酸、阿扎胞苷、硫唑嘌呤、博来霉素、硼替佐米、卡铂、卡培他滨、顺铂、苯丁酸氮芥、环磷酰胺、胞嘧啶阿拉伯糖苷、柔红霉素、多西他赛、5-氟尿嘧啶、脱氧氟尿苷、多柔比星、表阿霉素、阿霉素、埃博霉素、依托泊苷、氟尿嘧啶、吉西他滨、羟基脲、伊达比星、伊马替尼、伊立替康、氮芥、巯基嘌呤、甲氨蝶呤、米托蒽醌、奥沙利铂、紫杉醇、培美曲塞、替尼泊苷、硫鸟嘌呤、拓扑替康、伐柔比星、维莫非尼、长春碱、长春新碱、长春地辛、长春瑞滨和羟基喜树碱。

[0463] 在一些实施例中，将免疫检查点分子作为第二抗癌治疗剂与MDM2抑制剂组合施用。在一些实施例中，将化学治疗剂作为第二抗癌治疗剂与Bcl-2/Bcl-xL抑制剂或Bcl-2抑制剂或Bcl-xL抑制剂组合施用。可以将第二抗癌治疗剂与MDM2抑制剂或Bcl-2/Bcl-xL抑制剂或Bcl-2抑制剂或Bcl-xL抑制剂同时地、单独地或顺序地施用。

#### [0464] 试剂盒

[0465] 在另一方面，本披露进一步提供了在如本文所述的任何测定中可用的一种或多种试剂，用于测量本文提供的该至少一种生物标志物的水平。这些试剂可以是引物、探针和抗体。

[0466] 在一些实施例中，本披露提供了附接到固体支持物 (例如阵列载玻片或芯片) 上的寡核苷酸探针，例如，如描述于Bowtell和Sambrook编辑的DNA Microarrays: A Molecular Cloning Manual [DNA微阵列：分子克隆手册] (2003) Cold Spring Harbor Laboratory Press [冷泉港实验室出版社] 中。此类装置的构建在本领域中是熟知的，例如如在以下美国专利和专利公开中所述：美国专利号5,837,832；PCT申请W0 95/11995；美国专利号5,807,

522;美国专利号7,157,229、7,083,975、6,444,175、6,375,903、6,315,958、6,295,153和5,143,854、2007/0037274、2007/0140906、2004/0126757、2004/0110212、2004/0110211、2003/0143550、2003/0003032和2002/0041420。还在以下参考文献中综述了核酸阵列:Biotechnol Annu Rev[生物技术年鉴](2002) 8:85-101;Sosnowski等人Psychiatr Genet[精神病遗传学](2002) 12(4):181-92;Heller,Annu Rev Biomed Eng[生物医学工程年鉴](2002) 4:129-53;Kolchinsky等人,Hum.Mutat[人类突变](2002) 19(4):343-60;和McGail等人,Adv Biochem Eng Biotechnol[生物化学工程/生物技术进展](2002) 77:21-42。

[0467] 在另一方面,本披露通过了用于在以上所述的方法中使用的试剂盒。典型地,试剂盒在载体或分隔容器中包含可用于本文提供的任何方法中的试剂。载体可以是呈例如袋、盒、管、架子形式的容器或支持物,并且任选地是分隔的。

[0468] 试剂盒包含本文提供的引物、探针和/或抗体或微阵列中的一种或多种。引物、探针和/或抗体可以被或不可以被可检测地标记。在某些实施例中,试剂盒可以进一步包含进行本文所述的方法的其他试剂。在此类应用中,试剂盒可以包含以下的任一者或全部:合适的缓冲液、用于分离核酸的试剂、用于扩增核酸的试剂(例如,聚合酶、dNTP混合物)、用于杂交核酸的试剂、用于对核酸进行测序的试剂、用于定量核酸的试剂(例如,嵌入剂、检测探针)、用于分离蛋白质的试剂、以及用于检测蛋白质的试剂(例如,抗体)。

[0469] 在某些实施例中,试剂盒可以进一步包含标准阴性对照和/或标准阳性对照。

[0470] 另外,试剂盒可包括指导材料,这些指导材料包含用于实施本文提供的方法的指导(即方案)。虽然指导材料典型地包含书面材料或印刷材料,但它们不限于此。

[0471] 在某些实施例中,试剂盒可进一步包含存储在计算机可读介质上的计算机程序产品。当计算机程序产品由计算机执行时,它进行以下步骤:将该至少一种生物标志物的水平与该至少一种生物标志物的对应的参考水平进行比较,以确定与参考水平的差异。任何能够存储此类计算机可执行指令并将其传送给最终使用者的介质都被本说明所考虑。这样的介质包括但不限于电子存储介质(例如,磁盘、磁带、磁带盒(cartridge)、芯片)、光学介质(例如,CD ROM)等。此类介质可以包括提供此类指导材料的因特网网站的网址。

[0472] 也可以使用载波信号对计算机程序进行编码和传输,这些载波信号被改适用于经由符合包括因特网的各种协议的有线网络、光学网络和/或无线网络进行传输。因此,可以使用此类程序编码的数据信号来创建根据本发明的实施例的计算机可读介质。可以将程序代码编码的计算机可读介质与兼容设备打包在一起,或者与其他设备分开提供(例如,通过因特网下载)。任何这样的计算机可读介质可以驻留在单个计算机产品(例如,硬盘驱动器、CD或整个计算机系统)上或内部,并且可以存在于系统或网络内的不同计算机产品上或内部。

[0473] 提供以下实例以更好地说明所要求保护的发明,并且不应将其解释为限制本发明的范围。下文描述的所有特定的组合物、材料和方法(全部或部分)均落入本发明的范围内。这些特定的组合物、材料和方法不旨在限制本发明,而仅仅是为了说明落入本发明的范围内的特定实施例。本领域技术人员可以开发等同的组合物、材料和方法,而无需使用创新能力,并且不脱离本发明的范围。应理解的是,可以在本文描述的程序中做出许多变化,同时仍然保持在本发明的范围内。发明人的意图是,此类变化包括在本发明的范围内。

[0474] 实例

#### [0475] 实例1

[0476] 该实例示出在胃癌PDX模型和食管癌PDX模型中, Noxa表达与化合物A15的化合物功效之间的相关性。

#### [0477] 材料与方法

[0478] 选择12个胃癌PDX模型和4个食管癌PDX模型进行功效研究。将携带患者来源的异种移植瘤(PDX)的小鼠根据其肿瘤体积随机分配到2个不同的研究组。随机化下的平均肿瘤体积是100–200mm<sup>3</sup>。在第1天, 基于“匹配分布(Matched distribution)”随机化方法(StudyDirector™软件)进行随机化。向小鼠施用媒介物或化合物A15, 持续21天(静脉内, 每周两次)。

[0479] 使用卡尺每周两次在二维上测量肿瘤体积, 并且使用以下公式以mm<sup>3</sup>表示体积: 肿瘤体积(mm<sup>3</sup>) = 0.5a × b<sup>2</sup> (其中a和b分别是肿瘤的长径和短径)。使用以下公式计算相对肿瘤体积(RTV):  $RTV = V_t / V_1$ , 其中V<sub>1</sub>和V<sub>t</sub>是在治疗的第一天(第1天)的平均肿瘤体积和在某个时间点上的平均肿瘤体积。肿瘤生长抑制百分比(%T/C)被计算为经治疗的肿瘤(T)的平均RTV除以对照肿瘤(C)的平均RTV × 100%。T/C值百分比是抗肿瘤效果的指示物: T/C值 < 42% 被NCI认为是具有显著抗肿瘤活性。T/C值 < 10% 被认为指示高度显著的抗肿瘤活性, 并且如果满足毒性和某些其他要求, 该值是被NCI用于证明临床试验合理性的水平(称为DN-2水平活性)。大于20%的体重减轻(组均值)或大于20%的药物致死被认为是指示剧毒剂量。所有数据在SPSS(统计产品和服务解决方案)18.0版(IBM公司, 阿蒙克, 纽约州, 美国)中进行分析。将Prism 6版(GraphPad软件公司, 圣地亚哥, 加利福尼亚州)用于图像显示。R<sup>2</sup>(决定相关性)显示y的百分比变化, 这由范围从0到1的所有x变量解释。1表示最强的可能一致性, 即完全相关。

#### [0480] 结果

[0481] 在胃癌PDX模型的功效试验中, 采用12个PDX模型(Bcl-xL<sup>hi</sup>、Bcl2<sup>hi</sup>、Mc11<sup>低-正常</sup>), 并用100mg/kg化合物A15(静脉内, 每周两次)治疗21天(总共7个剂量)。这些模型的T/C值在17–117之间变化(图1A和1B)(T/C值, 处理组相比媒介物对照组中的平均肿瘤体积)。已经针对这些模型进行了RNA测序, 并且将RNA测序数据表示为Log<sub>2</sub>(FPKM), 其中FPKM是指转录物的每千碱基的片段/百万个映射读数。基于RNA测序数据, 在这些模型中, Noxa的表达水平在1.0354至7.5223(由Log<sub>2</sub>(FPKM)表示)的范围内。通过线性回归分析T/C值和相应的RNA表达, 并且将R平方计算为0.8661, 这表明T/C的86.61%的变化可以用Noxa的RNA表达来解释(p < 0.0001)。

[0482] 从一组独立的实验中, 虽然采用了食管癌PDX模型(n = 4), 但观察到T/C与Noxa的表达之间的相似相关性(图2A和2B)。R<sup>2</sup>值被记录为0.7732(其中P < 0.05)。

[0483] 还分别测试了T/C与Bcl-2、Bcl-xL、Mc1-1、BIM和PUMA的RNA表达的相关性, 并且R平方分别显示在图3中: 0.2574(Bcl-2, 图3E); 0.0207(Bcl-xL, 图3C); 0.1737(Mc1-1, 图3D); 0.3382(BIM, 图3B)和0.0517(PUMA, 图3A)。

[0484] 总之, Noxa的RNA表达水平与Bcl-2/Bcl-xL双重抑制剂化合物A15治疗的胃癌和食管癌PDX模型中肿瘤消退的程度高度相关。这种相关性远高于任何其他所测试的生物标志物: BIM、Mc1-2、Bcl-2、PUMA和Bcl-xL。

#### [0485] 实例2

[0486] 该研究示出化合物B4在作为Bcl-2/Bcl-xL双重抑制剂发挥作用方面,对Bcl-xL的依赖性比对Bcl-2的依赖性更大。

[0487] ABT-737 (IUPAC名称:4-{4-[ (4'-氯-2-联苯基) 甲基]-1-哌嗪基}-N-[(4-{[(2R)-4-(二甲基氨基)-1-(苯基硫烷基)-2-丁基]氨基}-3-硝基苯基) 磺酰基] 苯甲酰胺) 是由雅培公司 (Abbott Laboratories) (现为艾伯维公司 (Abbvie)) 开发的最早的BH3模拟物之一。它充当双重Bcl-2/Bcl-xL抑制剂,并促进肿瘤细胞凋亡。该研究比较了Bcl-2和Bcl-xL在化合物B4或ABT-737之间的结合。

[0488] 选择弥漫性大B细胞淋巴瘤系Toledo和急性淋巴细胞性白血病系RS4;11进行该研究。将细胞用指定浓度 (分别为0.025uM、0.04uM和0.06uM) 的化合物B4或ABT-737治疗24小时,并收获以进行复杂分析。使用MSD高级ELISA方法分析Bcl-2:BIM和Bcl-xL:BIM复合物两者。

[0489] 结果显示,在Toledo (图4A) 和RS4;11 (图4B) 细胞系中,相比Bcl-2:BIM复合物,化合物B4更有效地破坏Bcl-xL:BIM。特别地,相比ABT-737,化合物B4更强烈地破坏Bcl-xL:BIM复合物。

[0490] 这些细胞系结果与使用化合物A15的相关胃癌/食管癌PDX试验一致 (数据未显示),这证实化合物A15 (在PDX中) 和化合物B4 (在细胞系中) 两者相比Bcl-2复合物更能靶向Bcl-xL,并且是与参考化合物ABT-737不同的。

[0491] 实例3.

[0492] 该研究显示化合物A15在ASCL-1-高和Noxa-高SCLC PDX模型中的抗肿瘤活性。

[0493] SCLC是具有极高突变率,但缺乏用于分子靶向疗法的经鉴定的驱动癌基因的异质性疾病。当前在诊所中将其作为单个疾病实体来治疗。最近的研究提高了我们对SCLC的理解,并且基于ASCL1、NEUROD1、POU2F3或YAP1的互斥表达表征了不同的亚型 (Rudin等人, 2019)。表达ASCL1的SCLC是最常见的亚型,占病例的70%。

[0494] 从58个可商购的SCLC的PDX模型 (可从中美冠科生物公司 (Crownbio) 获得PDX模型) 中获得Noxa表达水平。这58个PDX模型的Noxa表达水平已经通过RNA测序进行了确定,并且将其绘制在图5A中,其中每个点代表一个PDX模型。基于RNA测序数据,在这些模型中, Noxa的表达水平在低于2至高于6 (由Log2 (FPKM) 表示) 的范围内。在图5A中, PMAIP1 (编码的蛋白Noxa) 的平均水平在图上显示为带有误差条的直线。

[0495] 针对化合物A15的抗肿瘤活性,测试了这58个PDX模型中的13个模型。将化合物A15单一疗法按50mg/kg每周两次静脉内给予,并且肿瘤抑制率60%被设置为肿瘤消退的截止值。

[0496] 结果表明,化合物A15在总共测试的13个模型中的3个模型中实现了肿瘤消退 (图5A,表示为空心圆),但在其他10个测试模型中没有实现。出乎意料地,这三个应答性模型全部具有高于平均值的Noxa表达 (例如,图5A中,log2 FPKM高于6),并且还具ASCL1表达。相比之下,尽管分别表达NEUROD1、POU2F3或YAP1,其他10个非应答性模型 (图5A,表示为半实心圆) 不显示ASCL1表达,或显示ASCL1表达但具有低于平均值的Noxa表达。本研究中未测试化合物A15的抗肿瘤活性的45个模型被表示为灰点。

[0497] 结果表明,具有高Noxa表达的ASCL1亚型的SCLC对化合物A15单一疗法具有高度敏感性。



[0498] 使用线性回归进行的进一步统计表明,在所有测试模型(n=13)中,化合物A15的抗肿瘤活性与Noxa表达之间的决定系数(R<sup>2</sup>)为0.138(图5B)。当考虑ASCL-1表达(测试模型5/13)时,化合物A15的抗肿瘤活性与Noxa表达之间的决定系数(R<sup>2</sup>)可以增加至0.5067(图5C)。我们的结果表明,使用ASCL1和Noxa作为共同生物标志物将选出最有可能对化合物A15的治疗产生应答的SCLC患者。

[0499] 实例4

[0500] 该研究的目的是评估在胃癌PDX模型中MDM2抑制剂化合物C的抗肿瘤活性和Noxa水平。

[0501] 实验方法和程序与实例1中描述的类似。向小鼠施用媒介物或化合物C。

[0502] 在该功效试验中,采用胃癌PDX模型,并将其用100mg/kg化合物C口服治疗14天(总共7个剂量)或用10-50mg/kg化合物C口服治疗QOD。通过RNA测序来确定Noxa的表达水平。预期在化合物C治疗的胃PDX模型中,相对于参考水平的Noxa的高表达水平与肿瘤消退程度相关。

[0503] 尽管已经参考特定的实施例(其中的一些是优选的实施例)具体示出并描述了本披露,但是本领域技术人员应当理解,在不脱离如本文披露的本披露的精神和范围的情况下,可以在形式和细节上进行各种改变。

## 序列表

<110> 苏州亚盛药业有限公司  
 亚盛医药集团(香港)有限公司  
 <120> 用于预测靶向细胞凋亡途径的化合物的抗癌功效的方法和组合物  
 <130> 1252-004-02 PCT  
 <160> 22  
 <170> SIPOSequenceListing 1.0  
 <210> 1  
 <211> 239  
 <212> PRT  
 <213> 智人()  
 <400> 1  
 Met Ala His Ala Gly Arg Thr Gly Tyr Asp Asn Arg Glu Ile Val Met  
 1 5 10 15  
 Lys Tyr Ile His Tyr Lys Leu Ser Gln Arg Gly Tyr Glu Trp Asp Ala  
 20 25 30  
 Gly Asp Val Gly Ala Ala Pro Pro Gly Ala Ala Pro Ala Pro Gly Ile  
 35 40 45  
 Phe Ser Ser Gln Pro Gly His Thr Pro His Pro Ala Ala Ser Arg Asp  
 50 55 60  
 Pro Val Ala Arg Thr Ser Pro Leu Gln Thr Pro Ala Ala Pro Gly Ala  
 65 70 75 80  
 Ala Ala Gly Pro Ala Leu Ser Pro Val Pro Pro Val Val His Leu Thr  
 85 90 95  
 Leu Arg Gln Ala Gly Asp Asp Phe Ser Arg Arg Tyr Arg Arg Asp Phe  
 100 105 110  
 Ala Glu Met Ser Ser Gln Leu His Leu Thr Pro Phe Thr Ala Arg Gly  
 115 120 125  
 Arg Phe Ala Thr Val Val Glu Glu Leu Phe Arg Asp Gly Val Asn Trp  
 130 135 140  
 Gly Arg Ile Val Ala Phe Phe Glu Phe Gly Gly Val Met Cys Val Glu  
 145 150 155 160  
 Ser Val Asn Arg Glu Met Ser Pro Leu Val Asp Asn Ile Ala Leu Trp  
 165 170 175  
 Met Thr Glu Tyr Leu Asn Arg His Leu His Thr Trp Ile Gln Asp Asn  
 180 185 190  
 Gly Gly Trp Asp Ala Phe Val Glu Leu Tyr Gly Pro Ser Met Arg Pro  
 195 200 205

Leu Phe Asp Phe Ser Trp Leu Ser Leu Lys Thr Leu Leu Ser Leu Ala  
 210 215 220  
 Leu Val Gly Ala Cys Ile Thr Leu Gly Ala Tyr Leu Gly His Lys  
 225 230 235  
 <210> 2  
 <211> 720  
 <212> DNA  
 <213> 智人()  
 <400> 2  
 atggcgcacg ctgggagaac agggtagcat aaccgggaga tagtgatgaa gtacatccat 60  
 tataagctgt cgcagagggg ctacgagtgg gatgcgggag atgtgggagc cgcgcccccg 120  
 ggggcccggc ccgcaccggg catctttctc tcccagcccg ggcacacgcc ccatccagcc 180  
 gcatccccggg acccgggtcgc caggacctcg ccgctgcaga ccccggtgc ccccggcgcc 240  
 gccgcggggc ctgcgctcag cccgggtgcca cctgtggtcc acctgacct cgcgcaggcc 300  
 ggcgacgact tctcccgcgc ctaccgccc gacttcgcc agatgtccag ccagctgcac 360  
 ctgacgccct tcaccgcgcg gggacgcttt gccacggtgg tggaggagct cttcaggagc 420  
 ggggtgaact gggggaggat tgtggccttc tttgagttcg gtggggtcat gtgtgtggag 480  
 agcgtcaacc gggagatgtc gcccctggtg gacaacatcg ccctgtggat gactgagtac 540  
 ctgaaccggc acctgcacac ctggatccag gataacggag gctgggatgc ctttgtggaa 600  
 ctgtacggcc ccagcatgcg gcctctgttt gatttctcct ggctgtctct gaagactctg 660  
 ctcagtttgg ccctggtggg agcttgcata accctgggtg cctatctggg ccacaagtga 720  
 <210> 3  
 <211> 233  
 <212> PRT  
 <213> 智人()  
 <400> 3  
 Met Ser Gln Ser Asn Arg Glu Leu Val Val Asp Phe Leu Ser Tyr Lys  
 1 5 10 15  
 Leu Ser Gln Lys Gly Tyr Ser Trp Ser Gln Phe Ser Asp Val Glu Glu  
 20 25 30  
 Asn Arg Thr Glu Ala Pro Glu Gly Thr Glu Ser Glu Met Glu Thr Pro  
 35 40 45  
 Ser Ala Ile Asn Gly Asn Pro Ser Trp His Leu Ala Asp Ser Pro Ala  
 50 55 60  
 Val Asn Gly Ala Thr Gly His Ser Ser Ser Leu Asp Ala Arg Glu Val  
 65 70 75 80  
 Ile Pro Met Ala Ala Val Lys Gln Ala Leu Arg Glu Ala Gly Asp Glu  
 85 90 95  
 Phe Glu Leu Arg Tyr Arg Arg Ala Phe Ser Asp Leu Thr Ser Gln Leu

100	105	110
His Ile Thr Pro Gly Thr Ala Tyr Gln Ser Phe Glu Gln Val Val Asn		
115	120	125
Glu Leu Phe Arg Asp Gly Val Asn Trp Gly Arg Ile Val Ala Phe Phe		
130	135	140
Ser Phe Gly Gly Ala Leu Cys Val Glu Ser Val Asp Lys Glu Met Gln		
145	150	155
Val Leu Val Ser Arg Ile Ala Ala Trp Met Ala Thr Tyr Leu Asn Asp		
165	170	175
His Leu Glu Pro Trp Ile Gln Glu Asn Gly Gly Trp Asp Thr Phe Val		
180	185	190
Glu Leu Tyr Gly Asn Asn Ala Ala Ala Glu Ser Arg Lys Gly Gln Glu		
195	200	205
Arg Phe Asn Arg Trp Phe Leu Thr Gly Met Thr Val Ala Gly Val Val		
210	215	220
Leu Leu Gly Ser Leu Phe Ser Arg Lys		
225	230	
<210> 4		
<211> 702		
<212> DNA		
<213> 智人()		
<400> 4		
atgtctcaga gcaaccggga gctggtgggt gactttctct cctacaagct ttcccagaaa	60	
ggatacagct ggagtcagtt tagtgatgtg gaagagaaca ggactgaggc cccagaaggg	120	
actgaatcgg agatggagac cccagtgcc atcaatggca acccatcctg gcacctggca	180	
gacagccccg cgggtgaatgg agccactggc cacagcagca gtttgatgc ccgggaggtg	240	
atccccatgg cagcagtaaa gcaagcgtg agggaggcag gcgacgagtt tgaactgcgg	300	
taccggcggg cattcagtga cctgacatcc cagctccaca tcaccccagg gacagcatat	360	
cagagctttg aacaggtagt gaatgaactc ttccgggatg gggtaaactg gggtcgcatt	420	
gtggcctttt tctccttcgg cggggcactg tgcgtggaaa gcgtagacaa ggagatgcag	480	
gtattggtga gtcggatcgc agcttgatg gccacttacc tgaatgacca cctagagcct	540	
tggatccagg agaacggcgg ctgggatact tttgtggaac tctatgggaa caatgcagca	600	
gccgagagcc gaaagggcca ggaacgttc aaccgtggt tctgacggg catgactgtg	660	
gccggcgtgg ttctgctggg ctcaactctt agtcggaaat ga	702	
<210> 5		
<211> 198		
<212> PRT		
<213> 智人()		
<400> 5		

Met Ala Lys Gln Pro Ser Asp Val Ser Ser Glu Cys Asp Arg Glu Gly  
 1                      5                      10                      15  
 Arg Gln Leu Gln Pro Ala Glu Arg Pro Pro Gln Leu Arg Pro Gly Ala  
                     20                      25                      30  
 Pro Thr Ser Leu Gln Thr Glu Pro Gln Gly Asn Pro Glu Gly Asn His  
                     35                      40                      45  
 Gly Gly Glu Gly Asp Ser Cys Pro His Gly Ser Pro Gln Gly Pro Leu  
                     50                      55                      60  
 Ala Pro Pro Ala Ser Pro Gly Pro Phe Ala Thr Arg Ser Pro Leu Phe  
 65                      70                      75                      80  
 Ile Phe Met Arg Arg Ser Ser Leu Leu Ser Arg Ser Ser Ser Gly Tyr  
                     85                      90                      95  
 Phe Ser Phe Asp Thr Asp Arg Ser Pro Ala Pro Met Ser Cys Asp Lys  
                     100                      105                      110  
 Ser Thr Gln Thr Pro Ser Pro Pro Cys Gln Ala Phe Asn His Tyr Leu  
                     115                      120                      125  
 Ser Ala Met Ala Ser Met Arg Gln Ala Glu Pro Ala Asp Met Arg Pro  
                     130                      135                      140  
 Glu Ile Trp Ile Ala Gln Glu Leu Arg Arg Ile Gly Asp Glu Phe Asn  
 145                      150                      155                      160  
 Ala Tyr Tyr Ala Arg Arg Val Phe Leu Asn Asn Tyr Gln Ala Ala Glu  
                     165                      170                      175  
 Asp His Pro Arg Met Val Ile Leu Arg Leu Leu Arg Tyr Ile Val Arg  
                     180                      185                      190  
 Leu Val Trp Arg Met His  
                     195

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 597

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 智人()

&lt;400&gt; 6

atggcaaagc aaccttctga tgtaagttct gagtgtgacc gagaaggtag acaattgcag 60  
 cctgcggaga ggcctcccca gctcagacct ggggccccta cctccctaca gacagagcca 120  
 caaggtaatc ctgaaggcaa tcacggaggt gaaggggaca gctgccccca cggcagccct 180  
 cagggcccg c tgccccacc tgccagccct ggcccttttg ctaccagatc cccgcttttc 240  
 atcttttatga gaagatcctc cctgctgtct cgatcctcca gtgggtatatt ctcttttgac 300  
 acagacagga gcccagcacc catgagttgt gacaaatcaa cacaaacccc aagtcctcct 360  
 tgccaggcct tcaaccacta tctcagtgc atggcttcca tgaggcaggc tgaacctgca 420  
 gatatgcgcc cagagatatg gatcgcccaa gatttgccgc gtattggaga cgagtttaac 480

gcttactatg caaggagggt atttttgaat aattaccaag cagccgaaga ccacccacga 540  
 atggttatct tacgactgtt acgttacatt gtccgcctgg tgtggagaat gcattga 597  
 <210> 7  
 <211> 54  
 <212> PRT  
 <213> 智人()  
 <400> 7  
 Met Pro Gly Lys Lys Ala Arg Lys Asn Ala Gln Pro Ser Pro Ala Arg  
 1 5 10 15  
 Ala Pro Ala Glu Leu Glu Val Glu Cys Ala Thr Gln Leu Arg Arg Phe  
 20 25 30  
 Gly Asp Lys Leu Asn Phe Arg Gln Lys Leu Leu Asn Leu Ile Ser Lys  
 35 40 45  
 Leu Phe Cys Ser Gly Thr  
 50  
 <210> 8  
 <211> 165  
 <212> DNA  
 <213> 智人()  
 <400> 8  
 atgcctggga agaaggcgcg caagaacgct caaccgagcc ccgcgcgggc tccagcagag 60  
 ctggaagtcg agtgtgctac tcaactcagg agatttggag acaaactgaa cttccggcag 120  
 aaacttctga atctgatatc caaactcttc tgctcaggaa cctga 165  
 <210> 9  
 <211> 261  
 <212> PRT  
 <213> 智人()  
 <400> 9  
 Met Lys Phe Gly Met Gly Ser Ala Gln Ala Cys Pro Cys Gln Val Pro  
 1 5 10 15  
 Arg Ala Ala Ser Thr Thr Trp Val Pro Cys Gln Ile Cys Gly Pro Arg  
 20 25 30  
 Glu Arg His Gly Pro Arg Thr Pro Gly Gly Gln Leu Pro Gly Ala Arg  
 35 40 45  
 Arg Gly Pro Gly Pro Arg Arg Pro Ala Pro Leu Pro Ala Arg Pro Pro  
 50 55 60  
 Gly Ala Leu Gly Ser Val Leu Arg Pro Leu Arg Ala Arg Pro Gly Cys  
 65 70 75 80  
 Arg Pro Arg Arg Pro His Pro Ala Ala Arg Cys Leu Pro Leu Arg Pro

	85		90		95
His Arg Pro Thr Arg Arg His Arg Arg Pro Gly Gly Phe Pro Leu Ala					
100		105		110	
Trp Gly Ser Pro Gln Pro Ala Pro Arg Pro Ala Pro Gly Arg Ser Ser					
115		120		125	
Ala Leu Ala Leu Ala Gly Gly Ala Ala Pro Gly Val Ala Arg Ala Gln					
130		135		140	
Arg Pro Gly Gly Ser Gly Gly Arg Ser His Pro Gly Gly Pro Gly Ser					
145		150		155	160
Pro Arg Gly Gly Gly Thr Val Gly Pro Gly Asp Arg Gly Pro Ala Ala					
165		170		175	
Ala Asp Gly Gly Arg Pro Gln Arg Thr Val Arg Ala Ala Glu Thr Arg					
180		185		190	
Gly Ala Ala Ala Ala Pro Pro Leu Thr Leu Glu Gly Pro Val Gln Ser					
195		200		205	
His His Gly Thr Pro Ala Leu Thr Gln Gly Pro Gln Ser Pro Arg Asp					
210		215		220	
Gly Ala Gln Leu Gly Ala Cys Thr Arg Pro Val Asp Val Arg Asp Ser					
225		230		235	240
Gly Gly Arg Pro Leu Pro Pro Pro Asp Thr Leu Ala Ser Ala Gly Asp					
245		250		255	
Phe Leu Cys Thr Met					
260					

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 786

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 智人()

&lt;400&gt; 10

atgaaatttg gcatggggtc tgcccaggca tgtccatgcc aggtgcccag ggctgcttcc	60
acgacgtggg tcccctgcc aatttgtggc cccagggagc gccatggccc gcgcacgcc	120
ggagggcagc tccccggagc ccgtagaggg cctggcccgc gacggcccgc gccccttccc	180
gctcgccgc ctggtgccct cggcagtgtc ctgcggcctc tgcgagcccg gcctggctgc	240
cgccccgcc gccccaccc tgetgcccgc tgccctaccc tgcgccccca ccgccccacc	300
cgccgtcacc gccgccctgg ggggttcccg ctggcctggg ggtccccgca gccggccccg	360
aggcccgcc cccgacggc ctcagccctc gctctcgctg gcggagcagc acctggagtc	420
gcccggtccc agcgccccgg gggctctggc gggcggtccc acccaggcgg ccccgggagt	480
ccgcggggag gaggaacagt gggccccgga gatcggggcc cagctgcggc ggatggcgga	540
cgacctcaac gcacagtac agcggcggag acaagaggag cagcagcggc accgcccctc	600
accctggagg gtccctgtaca atctcatcat gggactcctg cccttaccga ggggccacag	660

agcccccgag atggagccca attaggtgcc tgcacccgcc cgggtggacgt cagggactcg	720
gggggcaggc ccctcccacc tcctgacacc ctggccagcg cgggggactt tctctgcacc	780
atgtag	786
<210> 11	
<211> 197	
<212> PRT	
<213> 智人()	
<400> 11	
Met Phe Gly Leu Lys Arg Asn Ala Val Ile Gly Leu Asn Leu Tyr Cys	
1 5 10 15	
Gly Gly Ala Gly Leu Gly Ala Gly Ser Gly Gly Ala Thr Arg Pro Gly	
20 25 30	
Gly Arg Leu Leu Ala Thr Gly Ala Lys Asp Thr Lys Pro Met Gly Arg	
35 40 45	
Ser Gly Ala Thr Ser Arg Lys Ala Leu Glu Thr Leu Arg Arg Val Gly	
50 55 60	
Asp Gly Val Gln Arg Asn His Glu Thr Ala Phe Gln Gly Met Leu Arg	
65 70 75 80	
Lys Leu Asp Ile Lys Asn Glu Asp Asp Val Lys Ser Leu Ser Arg Val	
85 90 95	
Met Ile His Val Phe Ser Asp Gly Val Thr Asn Trp Gly Arg Ile Val	
100 105 110	
Thr Leu Ile Ser Phe Gly Ala Phe Val Ala Lys His Leu Lys Thr Ile	
115 120 125	
Asn Gln Glu Ser Cys Ile Glu Pro Leu Ala Glu Ser Ile Thr Asp Val	
130 135 140	
Leu Val Arg Thr Lys Arg Asp Trp Leu Val Lys Gln Arg Gly Trp Asp	
145 150 155 160	
Gly Phe Val Glu Phe Phe His Val Glu Asp Leu Glu Gly Gly Ile Arg	
165 170 175	
Asn Val Leu Leu Ala Phe Ala Gly Val Ala Gly Val Gly Ala Gly Leu	
180 185 190	
Ala Tyr Leu Ile Arg	
195	
<210> 12	
<211> 594	
<212> DNA	
<213> 智人()	
<400> 12	



```

atgtttggcc tcaaaagaaa cgcgtaatc ggactcaacc tctactgtgg gggggccggc      60
ttgggggccc gcagcggcgg cgccaccgc cggggagggc gacttttggc caccggcgcc      120
aaggacacaa agccaatggg caggtctggg gccaccagca ggaaggcgct ggagacctta      180
cgacgggttg gggatggcgt gcagcgcaac cacgagacgg cttccaagg catgcttcgg      240
aaactggaca tcaaaaacga agacgatgtg aaatcgttgt ctcgagtgat gatccatgtt      300
ttcagcgacg gcgtaacaaa ctggggcagg attgtgactc tcatttcttt tggcgccttt      360
gtggctaaac acttgaagac cataaaccaa gaaagctgca tcgaaccatt agcagaaagt      420
atcacagacg ttctcgtaag gacaaaacgg gactggctag ttaaacaag aggctgggat      480
gggtttgtgg agttcttcca thtagaggac ctagaaggtg gcatcaggaa tgtgctgctg      540
gcttttgcag gtgttgctgg agtaggagct ggtttggcat atctaataag atag          594

```

<210> 13

<211> 205

<212> PRT

<213> 智人()

<400> 13

Met Ala His Ala Gly Arg Thr Gly Tyr Asp Asn Arg Glu Ile Val Met

1 5 10 15

Lys Tyr Ile His Tyr Lys Leu Ser Gln Arg Gly Tyr Glu Trp Asp Ala

20 25 30

Gly Asp Val Gly Ala Ala Pro Pro Gly Ala Ala Pro Ala Pro Gly Ile

35 40 45

Phe Ser Ser Gln Pro Gly His Thr Pro His Pro Ala Ala Ser Arg Asp

50 55 60

Pro Val Ala Arg Thr Ser Pro Leu Gln Thr Pro Ala Ala Pro Gly Ala

65 70 75 80

Ala Ala Gly Pro Ala Leu Ser Pro Val Pro Pro Val Val His Leu Thr

85 90 95

Leu Arg Gln Ala Gly Asp Asp Phe Ser Arg Arg Tyr Arg Arg Asp Phe

100 105 110

Ala Glu Met Ser Ser Gln Leu His Leu Thr Pro Phe Thr Ala Arg Gly

115 120 125

Arg Phe Ala Thr Val Val Glu Glu Leu Phe Arg Asp Gly Val Asn Trp

130 135 140

Gly Arg Ile Val Ala Phe Phe Glu Phe Gly Gly Val Met Cys Val Glu

145 150 155 160

Ser Val Asn Arg Glu Met Ser Pro Leu Val Asp Asn Ile Ala Leu Trp

165 170 175

Met Thr Glu Tyr Leu Asn Arg His Leu His Thr Trp Ile Gln Asp Asn

180 185 190

Gly Gly Trp Val Gly Ala Leu Gly Asp Val Ser Leu Gly	
195	200
205	
<210> 14	
<211> 618	
<212> DNA	
<213> 智人()	
<400> 14	
atggcgcacg ctgggagaac agggtagcat aaccgggaga tagtgatgaa gtacatccat	60
tataagctgt cgcagagggg ctacgagtgg gatgcgggag atgtgggagc cgcgcccccg	120
ggggccgccc ccgcaccggg catctttctc tcccagcccg ggacacagcc ccatccagcc	180
gcattcccggg acccggtcgc caggacctcg ccgctgcaga ccccggtcgc ccccggtcgc	240
gccgcggggc ctgcgtcag cccggtgcca cctgtggtcc acctgacct ccgccaggcc	300
ggcgacgact tctcccgcgc ctaccgcgcg gacttcgcgc agatgtccag ccagctgcac	360
ctgacgccct tcaccgcgcg gggacgttt gccacggtgg tggaggagct cttcaggagc	420
ggggtgaact gggggaggat tgtggccttc tttgagttcg gtggggtcat gtgtgtggag	480
agcgtcaacc gggagatgtc gcccctggtg gacaacatcg ccctgtggat gactgagtac	540
ctgaaccggc acctgcacac ctggatccag gataacggag gctgggtagg tgcacttggt	600
gatgtgagtc tgggctga	618
<210> 15	
<211> 138	
<212> PRT	
<213> 智人()	
<400> 15	
Met Ala Lys Gln Pro Ser Asp Val Ser Ser Glu Cys Asp Arg Glu Gly	
1 5 10 15	
Arg Gln Leu Gln Pro Ala Glu Arg Pro Pro Gln Leu Arg Pro Gly Ala	
20 25 30	
Pro Thr Ser Leu Gln Thr Glu Pro Gln Asp Arg Ser Pro Ala Pro Met	
35 40 45	
Ser Cys Asp Lys Ser Thr Gln Thr Pro Ser Pro Pro Cys Gln Ala Phe	
50 55 60	
Asn His Tyr Leu Ser Ala Met Ala Ser Met Arg Gln Ala Glu Pro Ala	
65 70 75 80	
Asp Met Arg Pro Glu Ile Trp Ile Ala Gln Glu Leu Arg Arg Ile Gly	
85 90 95	
Asp Glu Phe Asn Ala Tyr Tyr Ala Arg Arg Val Phe Leu Asn Asn Tyr	
100 105 110	
Gln Ala Ala Glu Asp His Pro Arg Met Val Ile Leu Arg Leu Leu Arg	
115 120 125	

Tyr Ile Val Arg Leu Val Trp Arg Met His

130

135

<210> 16

<211> 417

<212> DNA

<213> 智人()

<400> 16

atggcaaagc aaccttctga tgtaagttct gagtgtgacc gagaaggtag acaattgcag 60  
cctgcggaga ggccctcccca gctcagacct ggggccccta cctccctaca gacagagcca 120  
caagacagga gcccagcacc catgagttgt gacaaatcaa cacaaacccc aagtcctcct 180  
tgccaggcct tcaaccacta tctcagtgcg atggcttcca tgaggcaggc tgaacctgca 240  
gatatgcgcc cagagatatg gatcgcccaa gagttgcggc gtattggaga cgagtttaac 300  
gcttactatg caaggagggt atttttgaat aattaccaag cagccgaaga ccaccacga 360  
atggttatct tacgactgtt acgttacatt gtccgcctgg tgtggagaat gcattga 417

<210> 17

<211> 350

<212> PRT

<213> 智人()

<400> 17

Met Phe Gly Leu Lys Arg Asn Ala Val Ile Gly Leu Asn Leu Tyr Cys

1

5

10

15

Gly Gly Ala Gly Leu Gly Ala Gly Ser Gly Gly Ala Thr Arg Pro Gly

20

25

30

Gly Arg Leu Leu Ala Thr Glu Lys Glu Ala Ser Ala Arg Arg Glu Ile

35

40

45

Gly Gly Gly Glu Ala Gly Ala Val Ile Gly Gly Ser Ala Gly Ala Ser

50

55

60

Pro Pro Ser Thr Leu Thr Pro Asp Ser Arg Arg Val Ala Arg Pro Pro

65

70

75

80

Pro Ile Gly Ala Glu Val Pro Asp Val Thr Ala Thr Pro Ala Arg Leu

85

90

95

Leu Phe Phe Ala Pro Thr Arg Arg Ala Ala Pro Leu Glu Glu Met Glu

100

105

110

Ala Pro Ala Ala Asp Ala Ile Met Ser Pro Glu Glu Glu Leu Asp Gly

115

120

125

Tyr Glu Pro Glu Pro Leu Gly Lys Arg Pro Ala Val Leu Pro Leu Leu

130

135

140

Glu Leu Val Gly Glu Ser Gly Asn Asn Thr Ser Thr Asp Gly Ser Leu

145

150

155

160

Pro Ser Thr Pro Pro Pro Ala Glu Glu Glu Glu Asp Glu Leu Tyr Arg	
165	170 175
Gln Ser Leu Glu Ile Ile Ser Arg Tyr Leu Arg Glu Gln Ala Thr Gly	
180	185 190
Ala Lys Asp Thr Lys Pro Met Gly Arg Ser Gly Ala Thr Ser Arg Lys	
195	200 205
Ala Leu Glu Thr Leu Arg Arg Val Gly Asp Gly Val Gln Arg Asn His	
210	215 220
Glu Thr Ala Phe Gln Gly Met Leu Arg Lys Leu Asp Ile Lys Asn Glu	
225	230 235 240
Asp Asp Val Lys Ser Leu Ser Arg Val Met Ile His Val Phe Ser Asp	
245	250 255
Gly Val Thr Asn Trp Gly Arg Ile Val Thr Leu Ile Ser Phe Gly Ala	
260	265 270
Phe Val Ala Lys His Leu Lys Thr Ile Asn Gln Glu Ser Cys Ile Glu	
275	280 285
Pro Leu Ala Glu Ser Ile Thr Asp Val Leu Val Arg Thr Lys Arg Asp	
290	295 300
Trp Leu Val Lys Gln Arg Gly Trp Asp Gly Phe Val Glu Phe Phe His	
305	310 315 320
Val Glu Asp Leu Glu Gly Gly Ile Arg Asn Val Leu Leu Ala Phe Ala	
325	330 335
Gly Val Ala Gly Val Gly Ala Gly Leu Ala Tyr Leu Ile Arg	
340	345 350

&lt;210&gt; 18

&lt;211&gt; 1053

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 智人()

&lt;400&gt; 18

atgtttggcc tcaaaagaaa cgcggtaatc ggactcaacc tctactgtgg gggggccggc	60
ttgggggccc gcagcggcgg cgccaccgc ccgggagggc gacttttggc tacggagaag	120
gaggcctcgg cccggcgaga gataggggga ggggaggccg gcgcggtgat tggcggaagc	180
gccggcgcaa gcccccgtc caccctcacg ccagactccc ggagggtcgc gcggccgccc	240
cccattggcg ccgaggtccc cgacgtcacc gcgacccccg cgaggctgct tttcttcgcg	300
cccacccgcc gcgcggcgcc gcttgaggag atggaagccc cgcccgctga cgccatcatg	360
tcgcccgaag aggagctgga cgggtacgag ccggagcctc tcgggaagcg gccggtgtc	420
ctgccgctgc tggagtgtgt cggggaatct ggtaataaca ccagtacgga cgggtcacta	480
ccctcgacgc cgccgccagc agaggaggag gaggacgagt tgtaccggca gtcgctggag	540
attatctctc ggtaccttcg ggagcaggcc accggcgcca aggacacaaa gccaatgggc	600

```

aggtctgggg ccaccagcag gaaggcgctg gagaccttac gacgggttgg ggatggcgtg      660
cagcgcaacc acgagacggc cttccaaggc atgcttcgga aactggacat caaaaacgaa      720
gacgatgtga aatcgttgtc tcgagtgatg atccatgttt tcagcgacgg cgtaacaaac      780
tggggcagga ttgtgactct cttttctttt ggtgcctttg tggctaaaca cttgaagacc      840
ataaaccaag aaagctgcat cgaaccatta gcagaaagta tcacagacgt tctcgtaagg      900
acaaaacggg actggctagt taaacaaaga ggctgggatg ggtttgtgga gttcttccat      960
gtagaggacc tagaagggtg catcaggaat gtgctgctgg cttttgcagg tgttgctgga     1020
gtaggagctg gtttggcata tctaataaga tag                                     1053

```

<210> 19

<211> 271

<212> PRT

<213> 智人()

<400> 19

```

Met Phe Gly Leu Lys Arg Asn Ala Val Ile Gly Leu Asn Leu Tyr Cys
1           5           10           15
Gly Gly Ala Gly Leu Gly Ala Gly Ser Gly Gly Ala Thr Arg Pro Gly
          20           25           30
Gly Arg Leu Leu Ala Thr Glu Lys Glu Ala Ser Ala Arg Arg Glu Ile
          35           40           45
Gly Gly Gly Glu Ala Gly Ala Val Ile Gly Gly Ser Ala Gly Ala Ser
          50           55           60
Pro Pro Ser Thr Leu Thr Pro Asp Ser Arg Arg Val Ala Arg Pro Pro
65           70           75           80
Pro Ile Gly Ala Glu Val Pro Asp Val Thr Ala Thr Pro Ala Arg Leu
          85           90           95
Leu Phe Phe Ala Pro Thr Arg Arg Ala Ala Pro Leu Glu Glu Met Glu
          100          105          110
Ala Pro Ala Ala Asp Ala Ile Met Ser Pro Glu Glu Glu Leu Asp Gly
          115          120          125
Tyr Glu Pro Glu Pro Leu Gly Lys Arg Pro Ala Val Leu Pro Leu Leu
          130          135          140
Glu Leu Val Gly Glu Ser Gly Asn Asn Thr Ser Thr Asp Gly Ser Leu
          145          150          155          160
Pro Ser Thr Pro Pro Pro Ala Glu Glu Glu Glu Asp Glu Leu Tyr Arg
          165          170          175
Gln Ser Leu Glu Ile Ile Ser Arg Tyr Leu Arg Glu Gln Ala Thr Gly
          180          185          190
Ala Lys Asp Thr Lys Pro Met Gly Arg Ser Gly Ala Thr Ser Arg Lys
          195          200          205

```

Ala Leu Glu Thr Leu Arg Arg Val Gly Asp Gly Val Gln Arg Asn His  
 210 215 220  
 Glu Thr Ala Phe Gln Gly Trp Val Cys Gly Val Leu Pro Cys Arg Gly  
 225 230 235 240  
 Pro Arg Arg Trp His Gln Glu Cys Ala Ala Gly Phe Cys Arg Cys Cys  
 245 250 255  
 Trp Ser Arg Ser Trp Phe Gly Ile Ser Asn Lys Ile Ala Leu Leu  
 260 265 270

<210> 20

<211> 816

<212> DNA

<213> 智人()

<400> 20

atgtttggcc tcaaaagaaa cgcggtaatc ggactcaacc tctactgtgg gggggccggc 60  
 ttggggggccg gcagcggcgg cgccacccgc ccgggagggc gacttttggc tacggagaag 120  
 gaggcctcgg cccggcgaga gataggggga ggggaggccg gcgcggtgat tggcggaagc 180  
 gccggcgcaa gccccccgtc caccctcacg ccagactccc ggagggtcgc gcggccgccg 240  
 cccattggcg ccgaggtccc cgacgtcacc gcgacccccg cgaggctgct tttcttcgcg 300  
 cccacccgcc gcgcggcgcc gcttgaggag atggaagccc cggccgctga cgccatcatg 360  
 tcgcccgaag aggagctgga cgggtacgag ccggagcctc tcgggaagcg gccggctgtc 420  
 ctgccgctgc tggagttggt cggggaatct ggtaataaca ccagtacgga cgggtcacta 480  
 ccctcgacgc cgccgccagc agaggaggag gaggacgagt tgtaccggca gtcgctggag 540  
 attatctctc ggtaccttcg ggagcaggcc accggcgcca aggacacaaa gccaatgggc 600  
 aggtctgggg ccaccagcag gaaggcgctg gagaccttac gacgggttgg ggatggcgtg 660  
 cagcgcaacc acgagacggc cttccaagga tgggtttgtg gagttcttcc atgtagagga 720  
 cctagaaggt ggcatcagga atgtgctgct ggcttttgca ggtgttgctg gagtaggagc 780  
 tggtttggca tatctaataa gatagcctta ctgtaa 816

<210> 21

<211> 236

<212> PRT

<213> 智人()

<400> 21

Met Glu Ser Ser Ala Lys Met Glu Ser Gly Gly Ala Gly Gln Gln Pro  
 1 5 10 15  
 Gln Pro Gln Pro Gln Gln Pro Phe Leu Pro Pro Ala Ala Cys Phe Phe  
 20 25 30  
 Ala Thr Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gln  
 35 40 45  
 Ser Ala Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Ala Pro

50						55						60						
Gln	Leu	Arg	Pro	Ala	Ala	Asp	Gly	Gln	Pro	Ser	Gly	Gly	Gly	His	Lys			
65						70						75						80
Ser	Ala	Pro	Lys	Gln	Val	Lys	Arg	Gln	Arg	Ser	Ser	Ser	Pro	Glu	Leu			
					85						90						95	
Met	Arg	Cys	Lys	Arg	Arg	Leu	Asn	Phe	Ser	Gly	Phe	Gly	Tyr	Ser	Leu			
					100						105						110	
Pro	Gln	Gln	Gln	Pro	Ala	Ala	Val	Ala	Arg	Arg	Asn	Glu	Arg	Glu	Arg			
					115						120						125	
Asn	Arg	Val	Lys	Leu	Val	Asn	Leu	Gly	Phe	Ala	Thr	Leu	Arg	Glu	His			
					130						135						140	
Val	Pro	Asn	Gly	Ala	Ala	Asn	Lys	Lys	Met	Ser	Lys	Val	Glu	Thr	Leu			
145						150						155						160
Arg	Ser	Ala	Val	Glu	Tyr	Ile	Arg	Ala	Leu	Gln	Gln	Leu	Leu	Asp	Glu			
					165						170						175	
His	Asp	Ala	Val	Ser	Ala	Ala	Phe	Gln	Ala	Gly	Val	Leu	Ser	Pro	Thr			
					180						185						190	
Ile	Ser	Pro	Asn	Tyr	Ser	Asn	Asp	Leu	Asn	Ser	Met	Ala	Gly	Ser	Pro			
					195						200						205	
Val	Ser	Ser	Tyr	Ser	Ser	Asp	Glu	Gly	Ser	Tyr	Asp	Pro	Leu	Ser	Pro			
					210						215						220	
Glu	Glu	Gln	Glu	Leu	Leu	Asp	Phe	Thr	Asn	Trp	Phe							
225						230						235						
<210>	22																	
<211>	711																	
<212>	DNA																	
<213>	智人()																	
<400>	22																	
atggaaagct	ctgccaagat	ggagagcggc	ggcgccggcc	agcagcccca	gccgcagccc											60		
cagcagccct	tcctgccgcc	cgcagcctgt	ttctttgcca	cggccgcgagc	cgcggcggcc											120		
gcagccgccg	cagcggcagc	gcagagcgcg	cagcagcagc	agcagcagca	gcagcagcag											180		
cagcaggcgc	cgcagctgag	accggcggcc	gacggccagc	cctcaggggg	cggtcacaag											240		
tcagcgccca	agcaagtcaa	gcgacagcgc	tcgtcttcgc	ccgaactgat	gcgctgcaaa											300		
cgccgggtca	acttcagcgg	ctttggetac	agcctgccgc	agcagcagcc	ggccgccgtg											360		
gcgcgccgca	acgagcgcga	gcgcaaccgc	gtcaagttgg	tcaacctggg	ctttgccacc											420		
cttcggggagc	acgtcccca	cggcgcggcc	aacaagaaga	tgagtaaggt	ggagacactg											480		
cgctcggcgg	tcgagtacat	ccgcgcgctg	cagcagctgc	tggacgagca	tgacgcggtg											540		
agcgccgcct	tccaggcagg	cgctctgtcg	cccaccatct	cccccaacta	ctccaacgac											600		
ttgaactcca	tggccggctc	gccggtctca	tcctactcgt	cggacgaggg	ctcttacgac											660		

---

ccgctcagcc ccgaggagca ggagcttctc gacttcacca actggttctg a

711



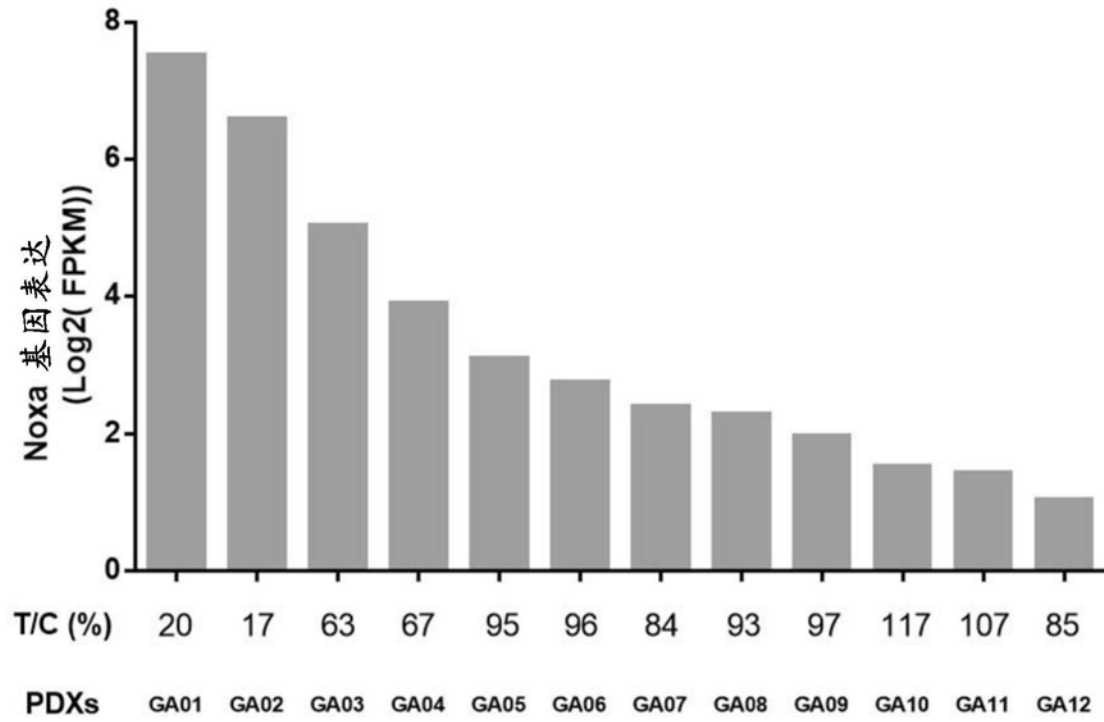


图1A

## 胃癌 PDX 模型

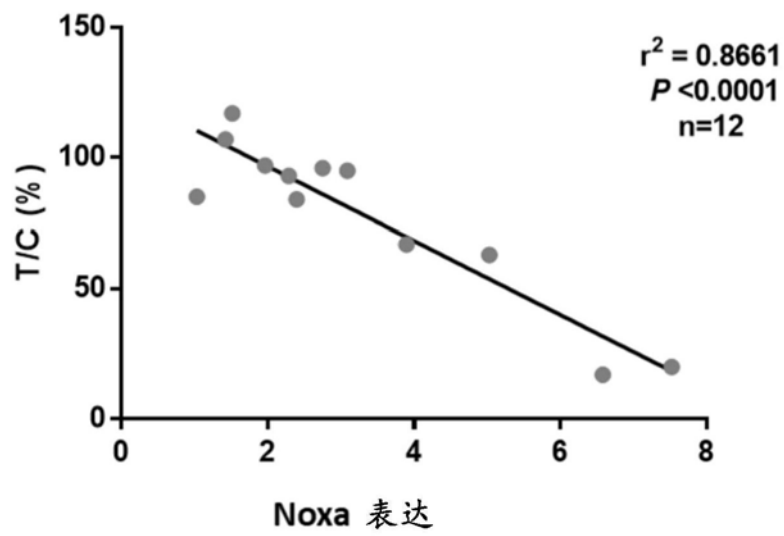


图1B

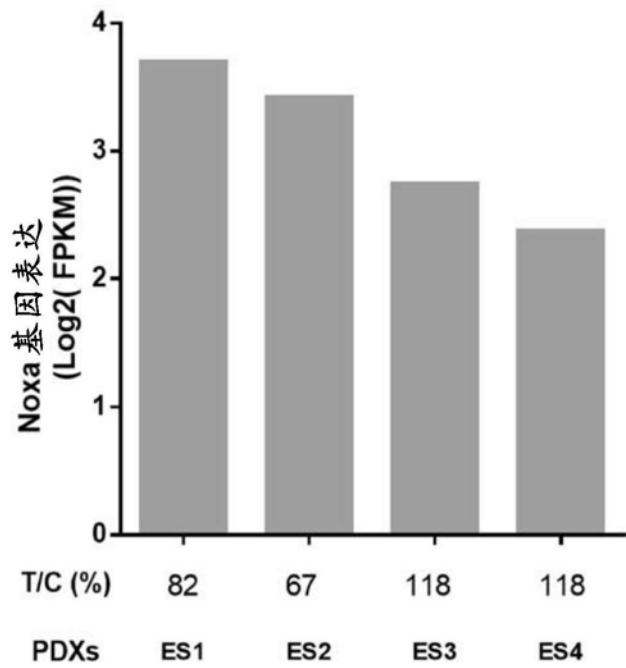


图2A

食管癌 PDX 模型

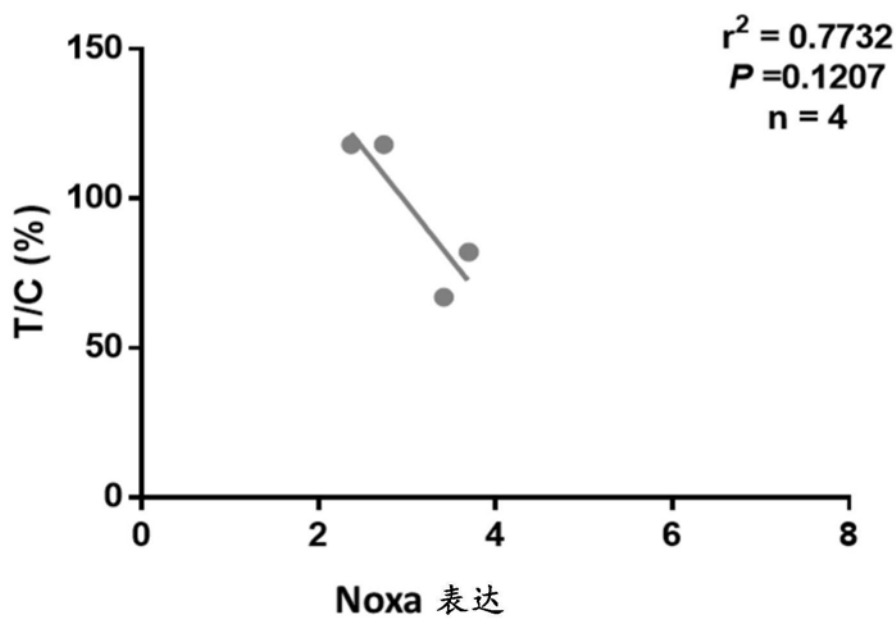


图2B

## 胃癌 PDX 模型

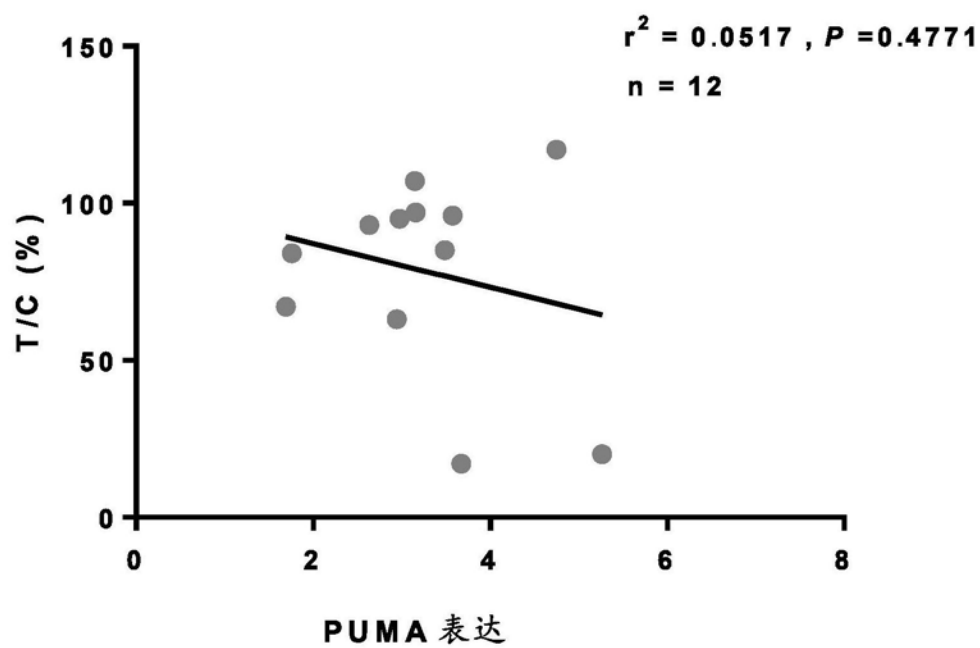


图3A

## 胃癌 PDX 模型

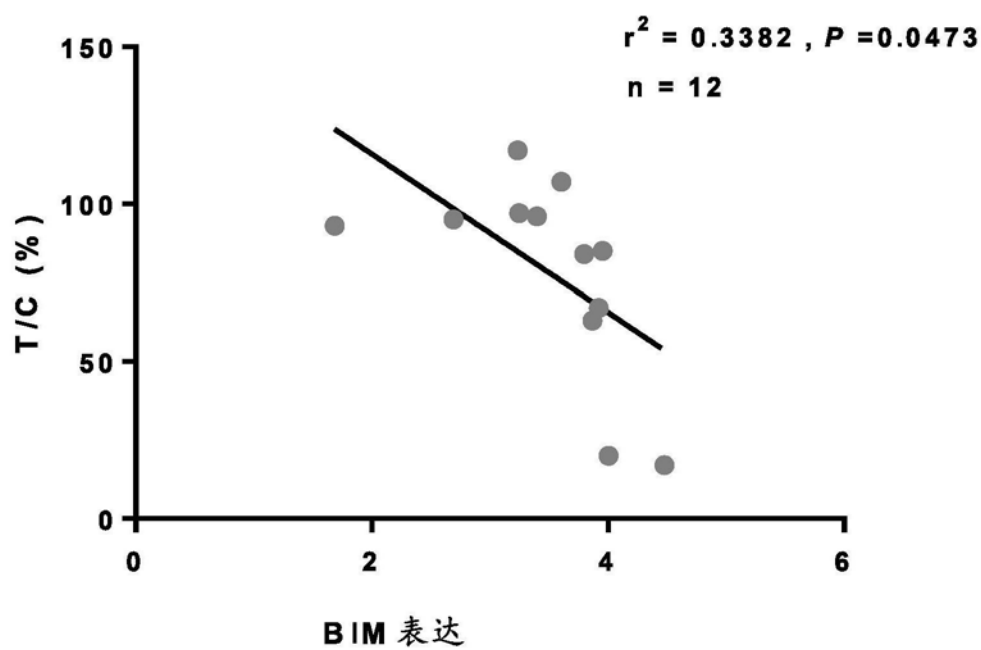


图3B

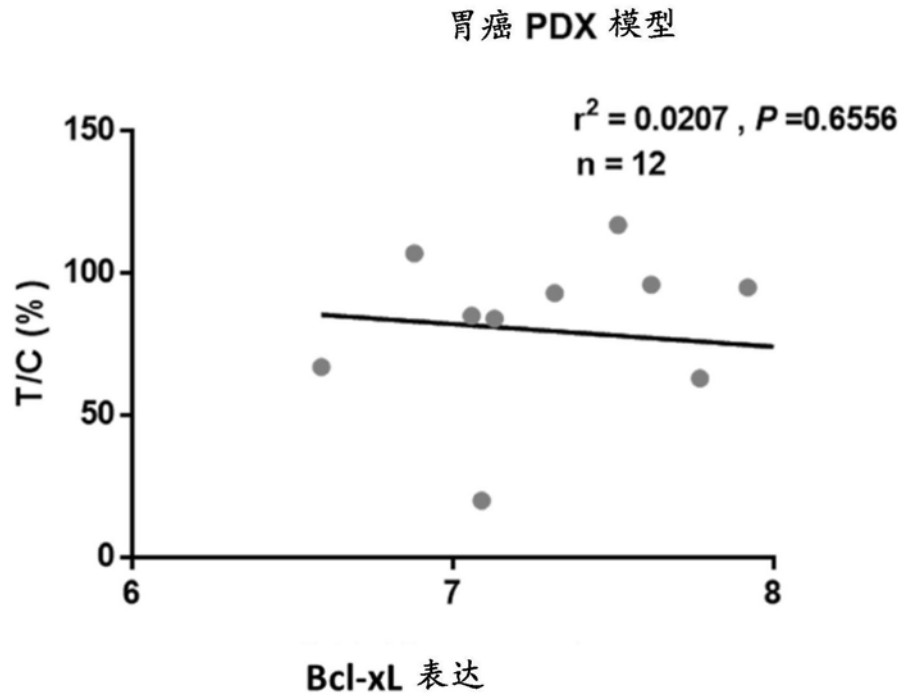


图3C

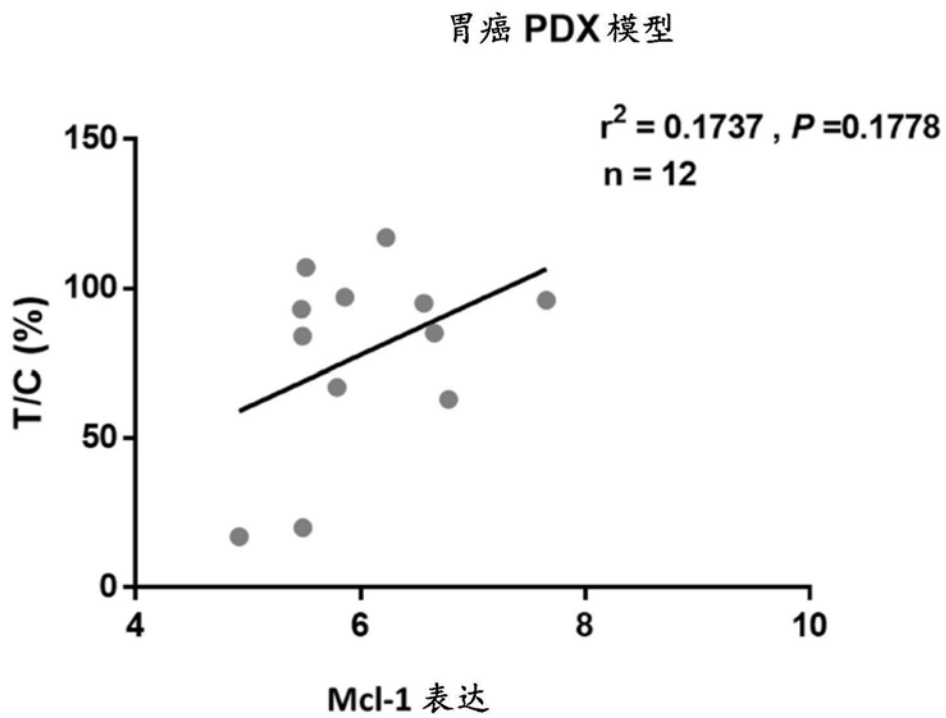


图3D

## 胃癌 PDX 模型

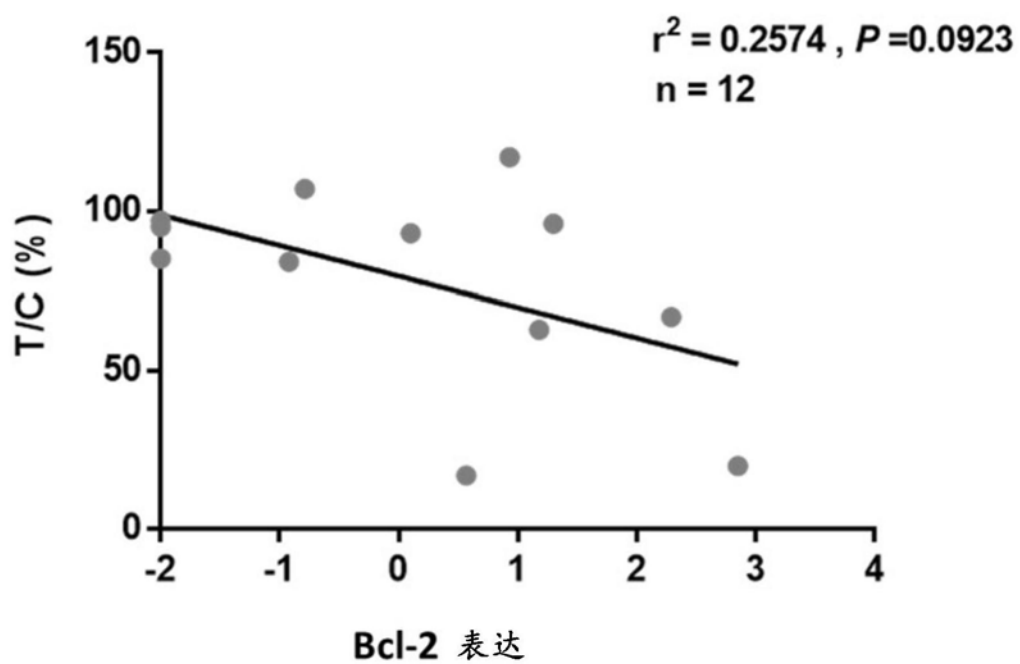


图3E

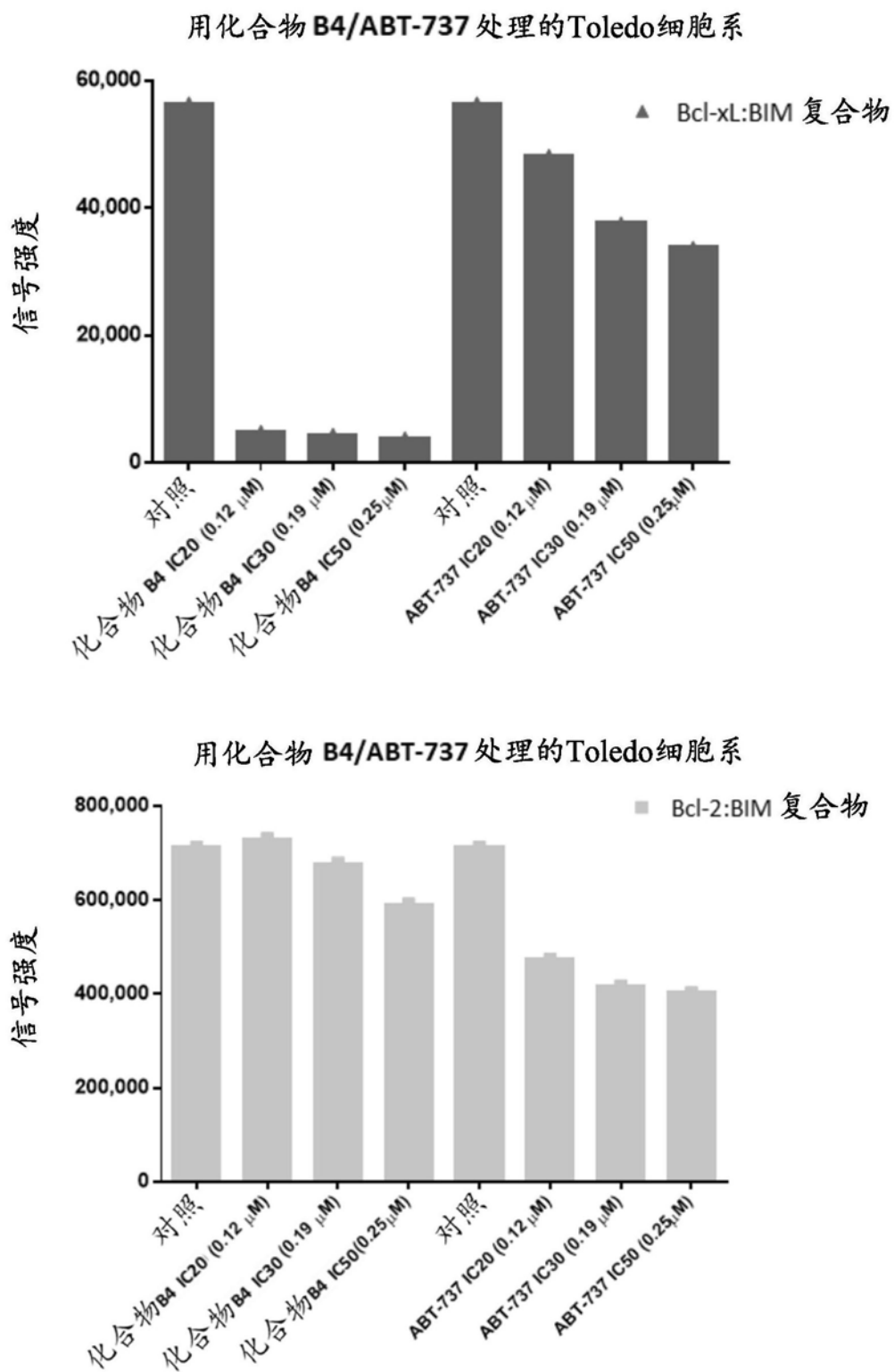


图4A

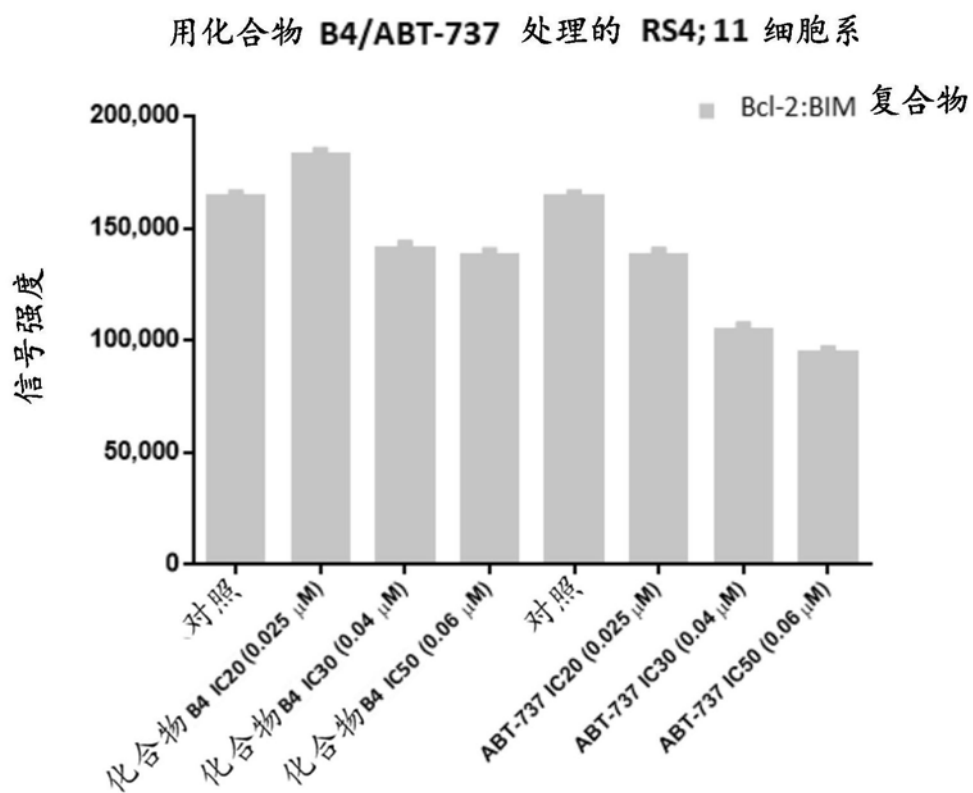
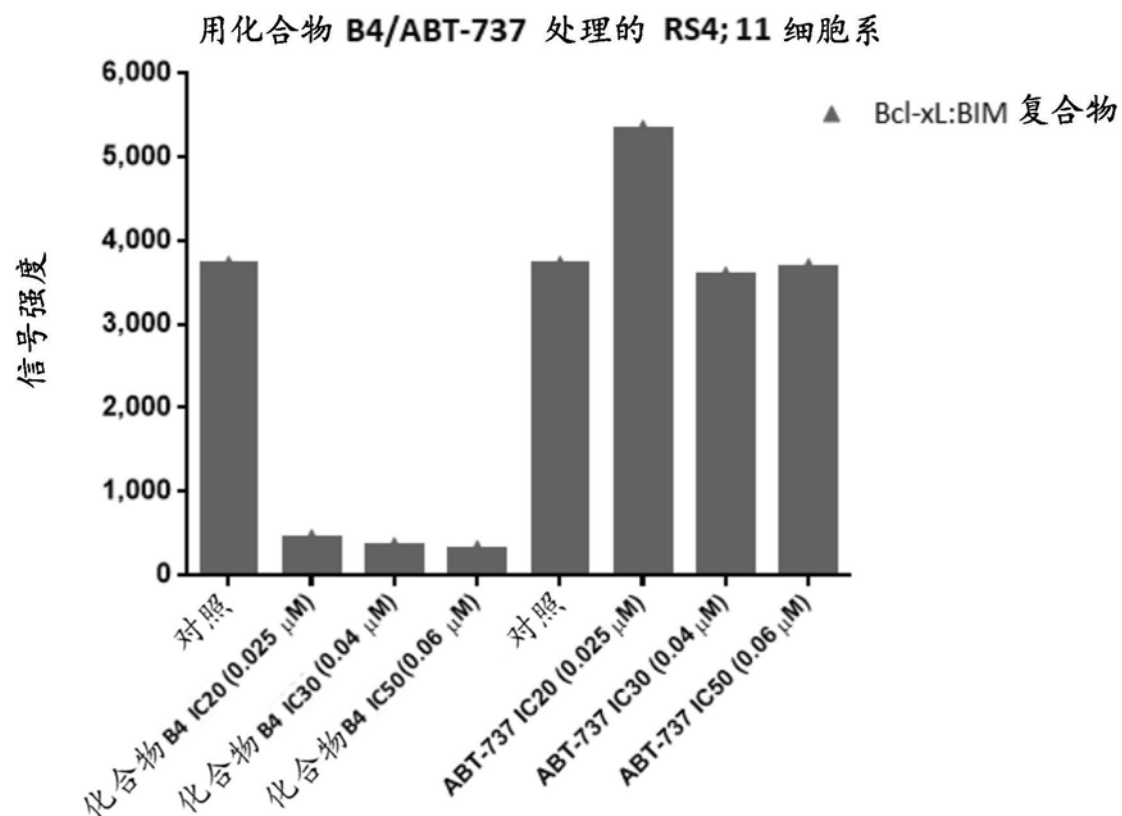


图4B

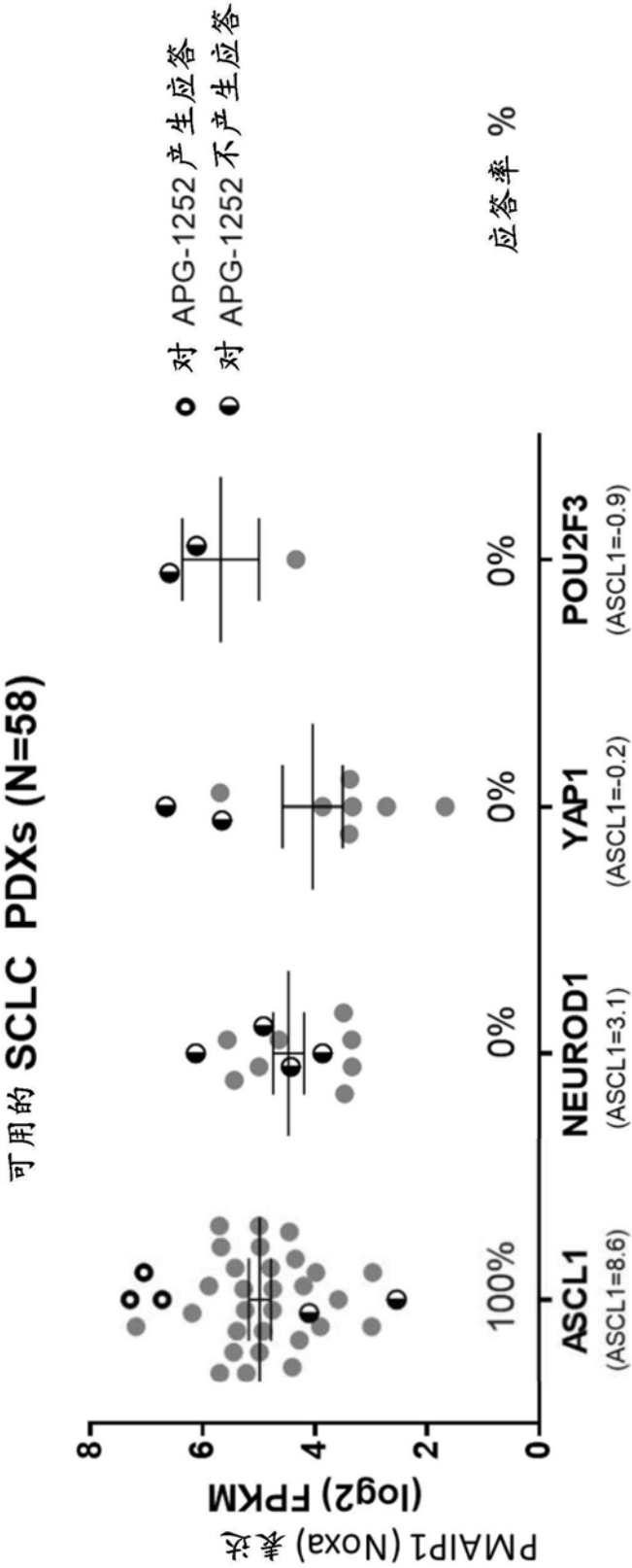


图5A



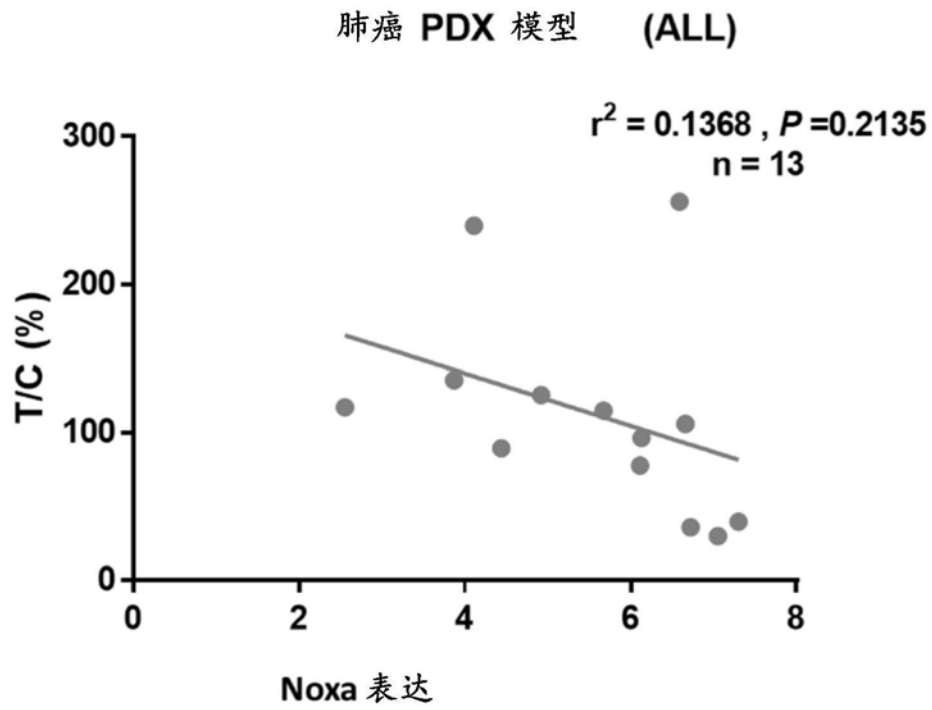


图5B

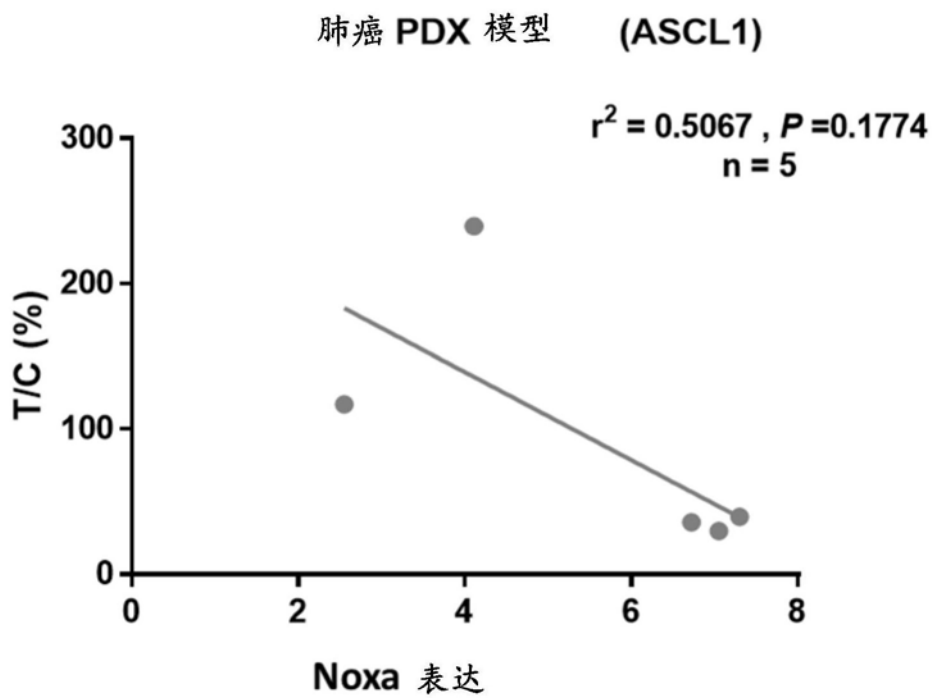


图5C

具有在本披露中提及的SEQ ID 编号的生物标志物的  
DNA编码序列和蛋白质（氨基酸）序列。

## 1. Bcl-2 $\alpha$

### 核苷酸序列 (720 nt): (SEQ ID No.2)

ATGGCGCAGCTGGGAGAACAGGGTACGATAACCGGGAGATAGTGATGAAGTACATCCATTATAAGCTGT  
CGCAGAGGGGGCTACGAGTGGGATGCGGGAGATGTGGGCGCCGCGCCCCGGGGGCGCCCCCGCACCGGGCATCT  
TCTCCTCCCAGCCCCGGGCACACGCCCCATCCAGCCGCATCCCGGGACCCGGTCGCCAGGACCTCGCCGCTGCAGACC  
CCGGCTGCCCCGGCGCCGCGGGGCCTGCGCTCAGCCCGGTGCCACCTGTGGTCCACCTGACCCTCCGCCAGGC  
CGGCGACGACTTCTCCCGCCGCTACCGCCGCGACTTCGCCGAGATGTCCAG  
CCAGCTGCACCTGACGCCCTTACCGCGCGGGGACGCTTTGCCACGGTGGTGGAGGAGCTCTTCAGGGAC  
GGGGTGAACTGGGGGAGGATTGTGGCCTTCTTTGAGTTCGGTGGGGTCATGTGTGTGGAGAGCGTCAACC  
GGGAGATGTGCCCCCTGGTGGACAACATCGCCCTGTGGATGACTGAGTACCTGAACCGGCACCTGCACAC  
CTGGATCCAGGATAACGGAGGCTGGGATGCCTTTGTGGAAGTGTACGGCCCCAGCATGCGGCCTCTGTTT  
GATTTCTCTGGCTGTCTCTGAAGACTCTGCTCAGTTTGGCCCTGGTGGGAGCTTGCATACCCTGGGTG  
CCTATCTGGGCCACAAGTGA

### 蛋白质序列 (239 aa): (SEQ ID No. 1)

MAHAGRTGYDNREIVMKYIHYKLSQRGYEWDAAGDVGAAPPGAAPAPGIFSSQPGHTPHPAASRDVPVARTS  
PLQTPAAPGAAAGPALSPVPPVVHLLTRQAGDDFSRRYRRDFAEMSSQLHLTPFTARGRFATVVEELFRD  
GVNWGRIVAFFEFGGVMCVESVNREMSPLVDNIALWMTEYLNRLHTWIQDNGGWDAFVELYGPSMRPLF  
DPSWLSLKTLLSLALVGACITLGAYLGHK

## 2. Bcl-2 $\beta$ :

### 核苷酸序列 (618 nt): (SEQ ID No.14)

ATGGCGCAGCTGGGAGAACAGGGTACGATAACCGGGAGATAGTGATGAAGTACATCCATTATAAGCTGT  
CGCAGAGGGGGCTACGAGTGGGATGCGGGAGATGTGGGCGCCGCGCCCCGGGGGCGCCCCCGCACCGGGCATCT  
TCTCCTCCCAGCCCCGGGCACACGCCCCATCCAGCCGCATCCCGGGACCCGGTCGCCAGGACCTCGCCGCTGCAGACC  
CCGGCTGCCCCGGCGCCGCGGGGCCTGCGCTCAGCCCGGTGCCACCTGTGGTCCACCTGACCCTCCGCCAGGC  
CGGCGACGACTTCTCCCGCCGCTACCGCCGCGACTTCGCCGAGATGTCCAG  
CCAGCTGCACCTGACGCCCTTACCGCGCGGGGACGCTTTGCCACGGTGGTGGAGGAGCTCTTCAGGGAC  
GGGGTGAACTGGGGGAGGATTGTGGCCTTCTTTGAGTTCGGTGGGGTCATGTGTGTGGAGAGCGTCAACC  
GGGAGATGTGCCCCCTGGTGGACAACATCGCCCTGTGGATGACTGAGTACCTGAACCGGCACCTGCACAC  
CTGGATCCAGGATAACGGAGGCTGGGTAGGTGCACTTGGTGATGTGAGTCTGGGCTGA

### 蛋白质序列 (205 aa): (SEQ ID No. 13)

MAHAGRTGYDNREIVMKYIHYKLSQRGYEWDAAGDVGAAPPGAAPAPGIFSSQPGHTPHPAASRDVPVARTS  
PLQTPAAPGAAAGPALSPVPPVVHLLTRQAGDDFSRRYRRDFAEMSSQLHLTPFTARGRFATVVEELFRD  
GVNWGRIVAFFEFGGVMCVESVNREMSPLVDNIALWMTEYLNRLHTWIQDNGGWVVGALGDVSLG

### 3. Bcl-xL ( Bcl-xL 8个同种型之一 ):

#### 核苷酸序列 (702 nt): (SEQ ID No. 4)

ATGTCTCAGAGCAACCGGGAGCTGGTGGTTGACTTTCTCTCTACAAGCTTTCCAGAAAGGATACAGCT  
GGAGTCAGTTTAGTGATGTGGAAGAGAACAGGACTGAGGCCCCAGAAGGGACTGAATCGGAGATGGAGACCCCCA  
GTGCCATCAATGGCAACCCATCCTGGCACCTGGCAGACAGCCCCGCGTGAATGGAGCCACTGGC  
CACAGCAGCAGTTTGGATGCCCGGGAGGTGATCCCATGGCAGCAGTAAAGCAAGCGCTGAGGGAGGCAGGCGAC  
GAGTTTGAAGTACCGGTACCGGCGGGCATTGAGTGACCTGACATCCAGCTCCACATCACCCAGG  
GACAGCATATCAGAGCTTTGAACAGGTAGTGAATGAACTCTTCGGGATGGGGTAACTGGGGTCGCATT  
GTGGCCTTTTTCTCTTCGGCGGGGCACTGTGCGTGGAAGCGTAGACAAGGAGATGCAGGTATTGGTGA  
GTCGGATCGCAGCTTGATGGCCACTTACCTGAATGACCACCTAGAGCCTTGATCCAGGAGAACGGCGG  
CTGGGATACTTTGTGGAAGTCTATGGGAACAATGCAGCAGCCGAGAGCCGAAAGGGCCAGGAACGCTTC  
AACCCTGCTTCTGACGGGCATGACTGTGGCCGGCGTGGTTCTGCTGGGCTCACTCTTCAGTCGGAAAT  
GA

#### 蛋白质序列 (233 aa): (SEQ ID No. 3)

MSQSNRELVDLSYKLSQKGYWSQFSDVEENRTEAPEGTESEMETPSAINGNPSWHLADSPAVNGATG  
HSSSLDAREVIPMAAVKQALREAGDEFELRYRRAFSDLTSQLHITPGTAYQSFEQVVNELFRDGVNWGRI  
VAFFSFGGALCVESVDKEMQVLVSRIAAMWATYLNHLEPWIQENGGWDTFVELYGNNAEAESRKGQERF  
NRWFLTGMTVAGVLLGSLFSRK

### 4. BimEL ( BIM 16个同种型之一 )

#### 核苷酸序列 (597 nt): (SEQ ID NO: 6)

ATGGCAAAGCAACCTTCTGATGTAAGTTCTGAGTGTGACCGAGAAGGTAGACAATTGCAGCCTGCGGAGA  
GGCCTCCCCAGCTCAGACCTGGGGCCCCCTACCTCCCTACAGACAGAGCCACAAGGTAATCCTGAAGGCAA  
TCACGGAGGTGAAGGGGACAGCTGCCCCACGGCAGCCCTCAGGGCCCGCTGGCCCCACCTGCCAGCCCT  
GGCCCTTTTGCTACCAGATCCCCGCTTTTCATCTTTATGAGAAGATCCTCCCTGCTGTCTCGATCCTCCA  
GTGGGTATTTCTCTTTGACACAGACAGGAGCCAGCACCCATGAGTTGTGACAAATCAACACAAACCCC  
AAGTCCTCCTGCCAGGCCTTCAACCACTATCTCAGTGCAATGGCTTCATGAGGCAGGCTGAACCTGCA  
GATATGCGCCAGAGATATGGATCGCCCAAGAGTTGCGGCGTATTGGAGACGAGTTTAACGCTTACTATG  
CAAGGAGGGTATTTTGAATAATTACCAAGCAGCCGAAGACCACCCACGAATGGTTATCTTACGACTGTT  
ACGTTACATTGTCCGCTGGTGTGGAGAATGCATTGA

#### 蛋白质序列 (198 aa): (SEQ ID No. 5)

MAKQPSDVSSECDREGRQLQPAERPPQLRPGAPTSLQTEPQGNPEGNHGGEGDSCPHGSPQGPLAPPASP  
GPFATRSPLFIFMRRSSLLSRSSGYFSFDTDRSPAPMSCDKSTQTPSPPCQAFNHYSAMASMRQAEP  
DMRPEIWIQAELRRIGDEFNAYYARRVFLNNYQAAEDHPRMVILRLRYIVRLVWRMH

## 5. BimL ( BIM 16个同种型之一 )

### 核苷酸序列 (417 nt): (SEQ ID NO: 16)

ATGGCAAAGCAACCTTCTGATGTAAGTTCTGAGTGTGACCGAGAAGGTAGACAATTGCAGCCTGCGGAGA  
GGCCTCCCCAGCTCAGACCTGGGGCCCCCTACCTCCCTACAGACAGAGCCACAAGACAGGAGCCCAGCACC  
CATGAGTTGTGACAAATCAACACAAACCCCAAGTCCTCCTTGCCAGGCCTTCAACCACTATCTCAGTGCA  
ATGGCTTCCATGAGGCAGGCTGAACCTGCAGATATGCGCCAGAGATATGGATCGCCCAAGAGTTGCGGC  
GTATTGGAGACGAGTTTAACGCTTACTATGCAAGGAGGGTATTTTGAATAATTACCAAGCAGCCGAAGA  
CCACCCACGAATGGTTATCTTACGACTGTTACGTTACATTGTCCGCTGGTGTGGAGAATGCATTGA

### 蛋白质序列 (138 aa): (SEQ ID No. 15)

MAKQPSDVSSECDREGRLQPAERPPQLRPGAPTSLQTEPQDRSPAPMSCDKSTQTPSPPCQAFNHLYLSA  
MASMRQAEPADMRPEIWIAQELRRIGDEFNAYYARRVFLNNYQAAEDHPRMVILRLRYIVRLVWRMH

## 6. PUMA (PUMA- $\gamma$ )

### 核苷酸序列 (786 nt): (SEQ ID NO: 10)

ATGAAATTTGGCATGGGGTCTGCCCAGGCATGTCCATGCCAGGTGCCAGGGCTGCTTCCACGACGTGGG  
TCCCCTGCCAGATTGTGCCCCAGGGAGCGCCATGGCCCGCGCACGCCAGGAGGGCAGCTCCCCGGAGC  
CCGTAGAGGGCCTGGCCCCGCGACGGCCCCGCGCCCCCTTCCCGCTCGGCCCGCTGGTGCCCTCGGCAGTGTC  
CTGCGGCCTCTGCGAGCCCGGCTGGCTGCCGCCCCCGCCGCCCCACCCCTGCTGCCCGCTGCCCTACCTC  
TGCGCCCCACCGCCCCACCCGCGCTACCGCCGCCCTGGGGGGTTCCCGCTGGCCTGGGGGTCCCCGCA  
GCCGGCCCCGAGGCCCGCGCCCCGGACGGTCCTCAGCCCTCGCTCTCGCTGGCGGAGCAGCACCTGGAGTC  
GCCCCGTGCCAGCGCCCCGGGGGCTCTGGCGGGCGGTCCACCCAGGCGGCCCGGGAGTCCGCGGGGAGGAGG  
AACAGTGGGCCCCGGGAGATCGGGGCCAGCTCGGGCGGATGGCGGACGACCTCAACGCACAGTACGAGCGGCGGA  
GACAAGAGGAGCAGCAGCGGCACCGCCCCCTACCCTGGAGGGTCTGTACAATCTCATCATGGGACTCCTGCCCTTA  
CCCAGGGGCCACAGAGCCCCGAGATGGAGCCCAATTAGGTGCCTGCACCCGCCCGGTGGACGTCAGGGACTCGGG  
GGGCAGGCCCTCCACCTCTGACACCCTGGCCAGCGCGGGGACTTTCTCTGCACCATGTAG

### 蛋白质序列 (261 aa): (SEQ ID No. 9)

MKFGMGSQAQPCQVPRAASTTWVPCQICGPRERHGPRTPGGQLPGARRGPGPRRPAPLPARPPGALGSV  
LRPLRARPGCRPRRPHPAARCLPLRPHRPTRRHRRPGGFPLAWGSPQAPRPAPGRSSALALAGGAAPGV  
ARAQRPGSGGRSHPGGPGSPRGGTVGPGDRGPAAADGGRPQRTVRAAETRGAAPPLTLEGPVQSHH  
GTPALTQGPQSPRDGAQLGACTRPVDVRDSGGRPLPPDTLASAGDFLCTM

## 7. Mcl-1 (Mcl-1ES)

### 核苷酸序列 (594 nt): (SEQ ID No.12)

ATGTTTGGCCTCAAAAGAAACGCGGTAATCGGACTCAACCTCTACTGTGGGGGGGCGGCTTGGGGGCCG  
GCAGCGGCGGCGCCACCCGCCGGAGGGCGACTTTTGGCCACCGCGCCAAGGACACAAAGCCAATGGGCAGGT  
CTGGGGCCACCAGCAGGAAGGCGCTGGAGACCTTACGACGGGTTGGGGATGGCGTGCAGCGCAACCACGAGACGG  
CCTTCCAAGGCATGCTTCGGAAACTGGACATCAAAAACGAAGACGATGTGAAATCGTTGTCTCGAGTGATGATCCATG  
TTTCAGCGACGGCGTAACAAACTGGGGCAGGATTGTGACTCTCATTTCTTT  
TGGTGCCTTTGTGGCTAAACACTTGAAGACCATAAACCAAGAAAGCTGCATCGAACCATTAGCAGAAAAGT  
ATCACAGACGTTCTCGTAAGGACAAAACGGGACTGGCTAGTTAAACAAAGAGGCTGGGATGGGTTTGTGG  
AGTTCTTCATGTAGAGGACCTAGAAGGTGGCATCAGGAATGTGCTGCTGGCTTTTGCAGGTGTTGCTGG  
AGTAGGAGCTGGTTTGGCATATCTAATAAGATAG

### 蛋白质序列 (197 aa): (SEQ ID No. 11)

MFGLKRNAVIGLNLVCGGAGLGAGSGGATRPGGRLATGAKDTKPMGRSGATSRKALETLLRRVGDGVQRN  
HETAFQGMRLKLDIKNEDDVKSLSRVMIHVFSDGVTNWGRIVTLISFGAFVAKHLKTINQESCIEPLAES  
ITDVLVRTKRDWLVKQRGWDGFVEFFHVEDLEGGIRNVLLAFAGVAGVGAGLAYLIR

## 8. Mcl-1L ( 长 )

### 核苷酸序列 (1053 nt): (SEQ ID No.18)

ATGTTTGGCCTCAAAAGAAACGCGGTAATCGGACTCAACCTCTACTGTGGGGGGGCGGCTTGGGGGCCG  
GCAGCGGCGGCGCCACCCGCCGGAGGGCGACTTTTGGCTACGGAGAAGGAGGCCTCGGCCGCGAGAGATAG  
GGGGAGGGGAGGCCGCGCGGTGATTGGCGGAAGCGCCGGCGCAAGCCCCCGTCCACCCTCACGCCAGACTCCC  
GGAGGGTTCGCGCGGCCCGCCCATTTGGCGCCGAGGTCCCCGACGTACCGCGACCCCGCGAGGCTGCTTTCTT  
CGCGCCACCCGCCGCGCGCGCCGCTTGAGGAGATGGAAGCCCCGGCCGCTGACGCCATCATGTGCGCCGAAGAG  
GAGCTGGACGGGTACGAGCCGGAGCCTCTCGGGAAGCGGCCGGCTGTCTGCCGCTGCTGGAGTTGGTCGGGGAA  
TCTGGTAATAACACAGTACGGACGGGTCACTACCCTCGACGCCGCCAGCAGAGGAGGAGGAGGACGAGTTGT  
ACCGGCAGTCGCTGGAGATTATCTCTCGGTACCTTCGGGAGCAGGCCACCGGCGCCAAGGACACAAAGCCAATGGG  
CAGGTCTGGGGCCACCAGCAGGAAGGCGCTGGAGACCTTACGACGGGTTGGGGATGGCGTGACGCGCAACCACGA  
GACGGCCTTCCAAGGCATGCTTCGGAACCTGGACATCAAAAACGAAGACGATGTGAAATCGTTGTCTCGAGTGATGA  
TCCATGTTTTTCAGCGACGGCGTAACAACTGGGGCAGGATTGTGACTCTCATTCTTTTGGTGCCTTTGTGGCTAAACA  
CTTGAAGACCATAAACCAAGAAAGCTGCATCGAACCATTAGCAGAAAGTATCACAGACGTTCTCGTAAGGACAAAAC  
GGGACTGGCTAGTTAAACAAAGAGGCTGGGATGGGTTTGTGGAGTTCTTCATGTAGAGGACCTAGAAGGTGG  
CATCAGGAATGTGCTGCTGGCTTTTGAGGTGTTGCTGGAGTAGGAGCTGGTTGGCATATCTAATAAGATAG

### 蛋白质序列 (350 aa): (SEQ ID No. 17)

MFGLKRNAVIGLNLYCGGAGLGAGSGGATRPGGRLATEKEASARREIGGGEAGAVIGGSAGASPPSTLT  
PDSRRVARPPPIGAIEVPDVTATPARLLFFAPTRRAAPLEEMEAPADAISPEEELDGYEPEPLGKRPAV  
LPILLELVGESGNNTSTDGSLPSTPPPAEEEEEDELYRQSLEIISRYLREQATGAKDTKPMGRSGATSRKAL  
ETLRRVGDGVQRNHETAFQGMRLKLDIKNEDDVKSLSRVMIHVFSDDVTNWGRIVTLISFGAFVAKHLKT  
INQESCIEPLAESITDVLVTRKRDWLVKQRGWDGFVEFFHVEDLEGGIRNVLLAFAGVAGVAGLAYLIR

## 9. Mcl-1S ( 短 )

### 核苷酸序列 (816 nt): (SEQ ID No.20)

ATGTTTGGCCTCAAAAGAAACGCGGTAATCGGACTCAACCTCTACTGTGGGGGGGCGGCTTGGGGGCCG  
GCAGCGGCGGCGCCACCCGCCGGAGGGCGACTTTTGGCTACGGAGAAGGAGGCCTCGGCCGCGAGAGATAG  
GGGGAGGGGAGGCCGCGCGGTGATTGGCGGAAGCGCCGGCGCAAGCCCCCGTCCACCCTCACGCCAGACTCCC  
GGAGGGTTCGCGCGGCCCGCCCATTTGGCGCCGAGGTCCCCGACGTACCGCGACCCCGCGAGGCTGCTTTCTT  
CGCGCCACCCGCCGCGCGCGCCGCTTGAGGAGATGGAAGCCCCGGCCGCTGACGCCATCATGTGCGCCGAAGAG  
GAGCTGGACGGGTACGAGCCGGAGCCTCTCGGGAAGCGGCCGGCTGTCTGCCGCTGCTGGAGTTGGTCGGGGAA  
TCTGGTAATAACACAGTACGGACGGGTCACTACCCTCGACGCCGCCAGCAGAGGAGGAGGAGGACGAGTTGT  
ACCGGCAGTCGCTGGAGATTATCTCTCGGTACCTTCGGGAGCAGGCCACCGGCGCCAAGGACACAAAGCCAATGGG  
CAGGTCTGGGGCCACCAGCAGGAAGGCGCTGGAGACCTTACGACGGGTTGGGGATGGCGTGACGCGCAACCACGA  
GACGGCCTTCCAAGGATGGGTTTGTGGAGTTCTTCATGTAGAGGACCTAGAAGGTGGCATCAGGAATGTGCTGCTG  
GCTTTTGACAGGTGTTGCTGGAGTAGGAGCTGGTTTGGCATATCTAATAAGATAGCCTTACTGTAA

### 蛋白质序列 (271 aa): (SEQ ID No. 19)

MFGLKRNAVIGLNLYCGGAGLGAGSGGATRPGGRLATEKEASARREIGGGEAGAVIGGSAGASPPSTLT  
PDSRRVARPPPIGAIEVPDVTATPARLLFFAPTRRAAPLEEMEAPADAISPEEELDGYEPEPLGKRPAV  
LPILLELVGESGNNTSTDGSLPSTPPPAEEEEEDELYRQSLEIISRYLREQATGAKDTKPMGRSGATSRKAL  
ETLRRVGDGVQRNHETAFQGWVCGVLPGRPRRWHQECAAGFCRCCWSRSWFGISNKIAL

