



## (12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108367006 B

(45) 授权公告日 2021.12.31

(21) 申请号 201680073276.X

A61K 31/635 (2006.01)

(22) 申请日 2016.12.02

A61P 35/02 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 108367006 A

(43) 申请公布日 2018.08.03

(30) 优先权数据

62/263,582 2015.12.04 US

62/342,727 2016.05.27 US

62/342,755 2016.05.27 US

62/371,145 2016.08.04 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2018.06.14

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2016/064824 2016.12.02

(87) PCT国际申请的公布数据

W02017/096303 EN 2017.06.08

(73) 专利权人 博尔托拉制药公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 格雷戈里·科菲 冯佳佳

安德鲁·斯蒂尔

(74) 专利代理机构 广州文冠倪律知识产权代理

事务所(普通合伙) 44348

代理人 倪小敏 何锦标

(51) Int.Cl.

A61K 31/506 (2006.01)

A61K 31/519 (2006.01)

(56) 对比文件

MA JIAO ET AL.:.Cerdulatinib,a novel dual SYK/JAK kinase inhibitor,has broad anti-tumor activity in both ABC and GCB types of diffuse large B cell lymphoma.《ONCOTARGET》.2014,摘要,讨论.

PATEL MANISH ET AL.A Phase I Open-Label,Multi-Dose Escalation Study of the Dual Syk/Jak Inhibitor PRT062070 (Cerdulatinib) in Patients with Relapsed/Refractory B Cell Malignancies.《BLOOD》.2014,摘要.

BLUNT MATTHEW D ET AL.The Syk\Jak Inhibitor Cerdulatinib(PRT062070) Shows Promising Preclinical Activity in Chronic Lymphocytic Leukemia By Antagonising B Cell Receptor and Microenvironmental Signalling.《BLOOD》.2015,摘要.

BLUNT MATTHEW D ET AL.The Syk\Jak Inhibitor Cerdulatinib(PRT062070) Shows Promising Preclinical Activity in Chronic Lymphocytic Leukemia By Antagonising B Cell Receptor and Microenvironmental Signalling.《BLOOD》.2015,摘要.

审查员 包宁疆

权利要求书2页 说明书29页 附图5页

(54) 发明名称

用于治疗血液癌症的赛度替尼

(57) 摘要

本文公开了赛度替尼用于治疗包括血液癌症在内的疾病或病状的方法和用途以及用于治疗此类疾病或病状的赛度替尼的组合。

1. 组合物在制备用于在有需要的患者中治疗非霍奇金氏淋巴瘤 (NHL) 的药物中的应用, 其中所述组合物包含赛度替尼或其药学上可接受的盐、维奈托克或其药学上可接受的盐、以及至少一种药学上可接受的载体或赋形剂, 其中所述应用包括向所述患者施用有效量的所述组合物, 其中赛度替尼和维奈托克在所述组合物中以摩尔比2:1至1:5存在。

2. 赛度替尼或其药学上可接受的盐以及维奈托克或其药学上可接受的盐在制备用于在有需要的患者中治疗非霍奇金氏淋巴瘤 (NHL) 的药物中的应用, 其中所述应用包括向患者施用有效量的赛度替尼或其药学上可接受的盐以及有效量的维奈托克或其药学上可接受的盐; 其中任选地, 赛度替尼和维奈托克同时或依次施用, 其中所述应用包括以2:1至1:5的摩尔比施用赛度替尼和维奈托克。

3. 如权利要求1所述的应用, 其中所述非 霍奇金氏淋巴瘤 (NHL) 选自滤泡性淋巴瘤 (FL)、转化的滤泡性淋巴瘤 (tFL)、弥漫性大B细胞淋巴瘤 (DLBCL)、套细胞淋巴瘤 (MCL)、边缘区淋巴瘤、粘膜相关淋巴组织 (MALT) 以及瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症 (WM)。

4. 如权利要求3所述的应用, 其中所述非 霍奇金氏淋巴瘤 (NHL) 是DLBCL。

5. 如权利要求1所述的应用, 其中所述患者是攻击性NHL。

6. 如权利要求5所述的应用, 其中所述攻击性NHL选自弥漫性大B细胞淋巴瘤 (DLBCL)、3B级滤泡性淋巴瘤 (FL3b)、套细胞淋巴瘤 (MCL) 以及转化的非霍奇金氏淋巴瘤 (NHL)。

7. 如权利要求1所述的应用, 其中所述患者患有药物抗性和/或复发形式的非霍奇金氏淋巴瘤 (NHL)。

8. 如权利要求7所述的应用, 其中所述患者具有与复发和/或对用于治疗血液癌症的另一种药物的抗性相关的突变。

9. 如权利要求7所述的应用, 其中所述患者对化学治疗剂具有抗性。

10. 如权利要求1所述的应用, 其中所述患者先前施用了选自以下的药物: 烷化剂、抗-CD20抗体、BCL-2抑制剂、BTK抑制剂、PI3K $\delta$ 抑制剂、铂基药物、抗代谢物、蒽环类抗生素、BCR途径抑制剂以及另一种用于治疗血液癌症的化学治疗剂。

11. 如权利要求10所述的应用, 其中所述患者先前施用了选自以下的药物: 维奈托克、利妥昔单抗、依鲁替尼、艾达拉里斯以及氟达拉滨。

12. 如权利要求1-11中任一项所述的应用, 其中所述患者表达Bcl-2蛋白。

13. 如权利要求1-11中任一项所述的应用, 其中所述患者表达Bim蛋白。

14. 如权利要求1-11中任一项所述的应用, 其中赛度替尼或其药学上可接受的盐的有效量为每日施用25 mg至120 mg。

15. 如权利要求14所述的应用, 其中,

(i) 赛度替尼或其药学上可接受的盐的所述有效量为每日两次施用25 mg至50 mg; 或

(ii) 赛度替尼或其药学上可接受的盐的所述有效量为每日施用30 mg至45 mg。

16. 如权利要求1-11中任一项所述的应用, 其中赛度替尼或其药学上可接受的盐的有效量为每日两次施用40 mg至50 mg。

17. 如权利要求16所述的应用, 其中赛度替尼或其药学上可接受的盐的所述有效量为每日两次施用45 mg。

18. 如权利要求1-11中任一项所述的应用, 其中赛度替尼或其药学上可接受的盐的有效量为每日两次施用30 mg至40 mg。

19. 如权利要求18所述的应用, 其中,

- (i) 赛度替尼或其药学上可接受的盐的所述有效量为每日两次施用30 mg; 或
- (ii) 赛度替尼或其药学上可接受的盐的所述有效量为每日两次施用35 mg。

## 用于治疗血液癌症的赛度替尼

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请根据美国法典第35篇第119条(e)款要求2015年12月4日提交的美国临时申请62/263,582、2016年5月27日提交的美国临时申请62/342,727、2016年5月27日提交的美国临时申请62/342,755以及2016年8月4日提交的美国临时申请62/371,145的权益,所述临时申请各自以引用的方式整体并入本文。

### 发明领域

[0003] 本公开大体上涉及用于治疗包括血液癌症在内的疾病或病状的赛度替尼(cerdulatinib)以及用于治疗此类疾病或病状的赛度替尼的组合。

### 技术背景

[0004] 造血组织和淋巴组织的肿瘤或者造血和淋巴恶性肿瘤是影响血液、骨髓、淋巴以及淋巴系统的肿瘤。由于那些元件全部通过循环系统和免疫系统密切连接,所以影响一个元件的疾病通常也影响其他元件,从而产生密切相关的骨髓增生和淋巴细胞增生(并因此产生白血病和淋巴瘤)并且通常产生重叠问题。

[0005] 血液学恶性肿瘤可源自以下两种主要血液细胞谱系中的任一种:骨髓细胞系和淋巴细胞系。骨髓细胞系通常产生粒细胞、红细胞、血小板、巨噬细胞以及肥大细胞;淋巴细胞系产生B细胞、T细胞、NK细胞以及浆细胞。淋巴瘤、淋巴细胞白血病和骨髓瘤是来自淋巴系,而急性和慢性骨髓性白血病、骨髓增生异常综合征和骨髓增生性疾病是骨髓来源的。

[0006] B细胞淋巴瘤是影响B细胞的类型的淋巴瘤。淋巴瘤是淋巴结中的血液癌症。B细胞淋巴瘤包括霍奇金淋巴瘤和大部分非霍奇金淋巴瘤。

[0007] 滤泡性淋巴瘤(FL)是一种类型的血液癌症。它是最常见的无痛(缓慢生长)的非霍奇金淋巴瘤,并且是第二最常见形式的总体非霍奇金淋巴瘤。它被定义为滤泡中心B细胞(中心细胞和成中心细胞)的淋巴瘤,其具有至少部分滤泡形式。

[0008] B细胞慢性淋巴细胞白血病(B-CLL)也称为慢性淋巴白血病(CLL),是成人中最常见类型的白血病(白血细胞类型的癌症)。CLL影响B细胞淋巴细胞,所述淋巴细胞起源于骨髓,在淋巴结中发展并且通常通过产生抗体来对抗炎症。CLL是小淋巴细胞淋巴瘤(SLL)(一种类型的B细胞淋巴瘤)的主要存在于淋巴结中的阶段。CLL和SLL被认为是相同的潜在疾病,仅具有不同的外观。

[0009] 弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL或DLBL)是一种B细胞癌症,所述B细胞是负责产生抗体的类型的白血细胞。弥漫性大B细胞淋巴瘤涵盖生物学和临床上不同的集合的疾病,许多这些疾病不能通过良好定义和广泛接受的标准彼此区分。

[0010] B细胞受体(BCR)介导的信号传导是慢性淋巴细胞白血病(CLL)发病所需要的并且靶向BCR信号传导复合物内的激酶的药物正在彻底改变此疾病的治疗。

[0011] CLL疗法中所采用的一些化学治疗剂包括靶向BTK的依鲁替尼(ibrutinib, Imbruvica®)和靶向PI3Kδ的艾代拉里斯(idelalisib, Zydelig®)。然而,这些化合物抑制

所述疾病并通常并非治愈性的。另外,CLL患者可通过BTK或下游信号传导蛋白中的突变或其他机制来发展对这些化学治疗剂的抗性。另一种对CLL的化学疗法的抗性机制可以通过IL-4介导的JAK/STAT信号传导,其可以抵抗细胞毒性剂。因此,需要用于血液学恶性肿瘤的新型疗法。

## 发明概要

[0012] 如今发现赛度替尼在治疗复发性和/或难治性血液癌症诸如CLL和无痛B细胞非霍奇金氏淋巴瘤(“NHL”)中是有效的。当赛度替尼在临床前与另一种化学治疗剂诸如BCL-2抑制剂或BTK抑制剂组合使用时,有效性甚至更大。如实验数据所证实的,这些组合表现出协同作用结果。

[0013] 根据本公开的一个实施方案,提供一种组合物,其包含赛度替尼和化学治疗剂诸如BCL-2抑制剂、BTK抑制剂、P13K $\delta$ 抑制剂、抗-CD20抗体、ABT-199 (维奈托克(venetoclax))、利妥昔单抗(Rituxan<sup>®</sup>、Mabthera<sup>®</sup>、Zytux<sup>®</sup>)、铂基药物、抗代谢物、依鲁替尼(Imbruvica<sup>®</sup>)、艾代拉里斯(Zydelig<sup>®</sup>)或其组合。

[0014] 在一些实施方案中,所述组合物用于治疗选自以下的血液癌症:慢性淋巴细胞白血病(CLL)、小淋巴细胞淋巴瘤(SLL)、滤泡性淋巴瘤(FL)、转化的滤泡性淋巴瘤(tFL)、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、套细胞淋巴瘤(MCL)、边缘区淋巴瘤、粘膜相关淋巴组织(MALT)以及瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症(WM)。

[0015] 在一些实施方案中,所述组合物除赛度替尼之外还包含作为化学治疗剂的依鲁替尼(Imbruvica<sup>®</sup>)。在一些实施方案中,所述组合物除赛度替尼之外还包含作为化学治疗剂的依鲁替尼ABT-199 (维奈托克)。

[0016] 一些实施方案提供一种组合物,其包含赛度替尼或其药学上可接受的盐、以及维奈托克或其药学上可接受的盐、以及至少一种药学上可接受的载体或赋形剂。一些实施方案提供一种组合物,其包含赛度替尼或其药学上可接受的盐、以及维奈托克或其药学上可接受的盐、以及至少一种药学上可接受的载体或赋形剂,其中赛度替尼和维奈托克以约2:1至约1:5的摩尔比存在。

[0017] 一些实施方案提供一种组合物,其包含赛度替尼或其药学上可接受的盐、以及依鲁替尼或其药学上可接受的盐、以及至少一种药学上可接受的载体或赋形剂。

[0018] 本文提供治疗有需要的患者中的血液癌症的方法,所述方法包括向所述患者施用有效量的赛度替尼或其药学上可接受的盐、以及有效量的维奈托克或其药学上可接受的盐。

[0019] 本文还提供治疗有需要的患者中的血液癌症的方法,所述方法包括向所述患者施用有效量的赛度替尼或其药学上可接受的盐、以及有效量的维奈托克或其药学上可接受的盐,其中赛度替尼和维奈托克以约2:1至约1:5的摩尔比施用。

[0020] 一些实施方案提供一种治疗有需要的患者中的血液癌症的方法,所述方法包括向所述患者施用有效量的赛度替尼或其药学上可接受的盐、以及有效量的依鲁替尼或其药学上可接受的盐。

[0021] 本文还提供治疗有需要的患者中的血液癌症的方法,所述方法包括向所述患者施用有效量的赛度替尼或其药学上可接受的盐,其中所述患者具有CD79B突变、具有PLC $\gamma$  2突

变或不具有IKB缺失,其中赛度替尼或其药学上可接受的盐的所述有效量是每日施用约25 mg至约120 mg。

[0022] 附图描述

[0023] 图1提供描绘通过FACS分析得到的在多种DLBCL细胞系中在2  $\mu$ M赛度替尼下在72小时的Edu掺入抑制的条形图。

[0024] 图2提供描绘通过FACS分析得到的在多种DLBCL细胞系中在2  $\mu$ M赛度替尼下在72小时的对半胱天冬酶3裂解的先前诱导的抑制的条形图。

[0025] 图3示出在WT BTK转染的TMD8细胞中依鲁替尼和赛度替尼的作用的结果。将250 nM依鲁替尼或赛度替尼添加到培养物中并且每日计数活细胞数目,持续7天。所示结果是4次重复实验的平均值 $\pm$ 标准误差(“SE”)。空心圆圈=二甲亚砜(“DMSO”);实心圆圈=依鲁替尼(“IBR”);三角形=赛度替尼(“Cerd”)。

[0026] 图4示出在BTK<sup>C481S</sup>-转染的TMD8细胞中依鲁替尼和赛度替尼的作用。将250 nM依鲁替尼或赛度替尼添加到培养物中并且每日计数活细胞数目,持续7天。所示结果是4次重复实验的平均值 $\pm$ SE。空心圆圈=二甲亚砜(“DMSO”);实心圆圈=依鲁替尼(“IBR”);三角形=赛度替尼(“Cerd”)。

[0027] 图5示出具有未突变(“UM”) IGHV的CLL细胞(N=33)与IGHV突变(“M”) CLL (N=27)相比对赛度替尼更敏感。使用Student T检验分析数据。对IC<sub>50</sub>的平均值+SE作图。 $P=0.0395$ 。

[0028] 图6示出具有不同细胞遗传学异常的CLL细胞的赛度替尼敏感性。指示每个子组的案例号。通过ANOVA检验分析数据,对IC<sub>50</sub>的平均值+SE作图。\*, $P<0.05$ 。

[0029] 图7示出将CLL细胞用IL-4 (10 ng/ml)和CD40L (300 ng/ml)孵育6小时然后用如所指示的赛度替尼和/或ABT-199处理另外24小时。通过流式细胞术使用(A)PI/膜联蛋白V染色评定生存力。示出或汇总代表性图(B) (n=9),其示出对照的(PI/膜联蛋白V阴性细胞)的%。(C)按指示评价赛度替尼与ABT-199之间的协同相互作用。对角线下方的点表示协同相互作用,所述线上方是累加的。

[0030] 详细描述

[0031] 恶性B细胞接收源自肿瘤本身以及驻留在微环境中的非肿瘤细胞的存活信号。B细胞抗原受体(BCR)和细胞因子受体有助于存活。

[0032] B细胞淋巴瘤的子集证实了存活对BCR和/或细胞因子JAK/STAT信号传导的依赖性。SYK定位在BCR信号传导途径上的BTK、PI3K $\delta$ 和PLC  $\gamma$  2的上游,使其成为潜在治疗靶标。另外的存活支持似乎通过细胞因子诱导的JAK/STAT途径介导,所述途径可以通过肿瘤自分泌信号传导环或通过源自存在于肿瘤微环境中的非肿瘤浸润白细胞的促炎性细胞因子来活化。

[0033] 在CLL和非霍奇金氏淋巴瘤(“NHL”)中观察到若干种细胞因子的血清浓度增加,并且这预测一种更具攻击性的疾病进展。这些细胞因子的来源可以是以自分泌刺激方式源自肿瘤本身或者源自已在肿瘤微环境内增加无效免疫应答的非肿瘤白细胞。在实验上,IL4已显示促进CLL B-细胞在培养物中的存活并且通过用氟达拉滨和苯丁酸氮芥处理来防止它们死亡。在此存活支持下潜藏的机制似乎是BCL2家族成员的细胞因子诱导的下调。

[0034] 在慢性淋巴细胞白血病(CLL)中B细胞受体(BCR)介导的信号传导的重要性在最近几年甚至变得更清楚,并且靶向在BCR信号传导复合物内的激酶的药物正在彻底改变此疾

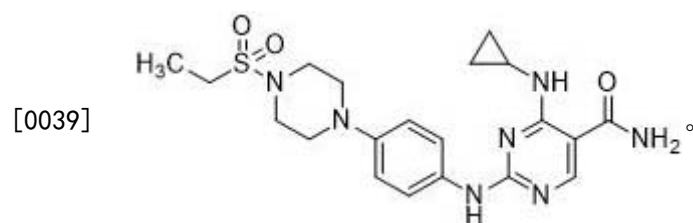
病的治疗。用于复发/难治性CLL的最新批准的药剂包括依鲁替尼 (BTK抑制剂) 和赛度替尼 (PI3K $\delta$ 抑制剂)。迄今为止,这些化合物未证明是治愈性的,这可部分通过来自肿瘤微环境的信号介导。重要的是,一定比例的患者对于依鲁替尼而言通过BTK或PLC  $\gamma$  中的突变或者由于还未知的机制正在发展对这些新药剂的抗性。脾酪氨酸激酶 (SYK) 属于非受体激酶的 SYK/ZAP70家族并且在B细胞内的BCR、趋化因子和整联蛋白受体下游的活化信号传输中起重要作用,并且仍为用于治疗某些B细胞恶性肿瘤和自身免疫疾病的感兴趣的靶标。

[0035] CLL细胞依赖于来自构成微环境的各种细胞的信号。使用基因集合富集分析,鉴别IL-4基因标记,其在淋巴结组织中与匹配的血液和骨髓相比有所富集。淋巴细胞中的IL-4信号主要通过1型IL-4受体 (IL-4R) 通过Janus蛋白酪氨酸激酶JAK1和JAK3来得到,从而导致STAT6磷酸化 (pSTAT6)。

[0036] 本文所述的组合物和方法解决了用于具有某些突变或对目前疗法有抗性的患者的目前治疗方案中的缺陷。本文所述的组合物和方法还提供用于治疗首次治疗患者的协同治疗,无论所述患者是否具有突变。

[0037] 组合物

[0038] 本文所述的组合物包含赛度替尼。赛度替尼是SYK和JAK二者家族成员的小分子ATP竞争性可逆抑制剂,其已在B细胞癌和自身免疫疾病的临床前模型中证实强效和广泛活性。美国专利8,138,339中描述的赛度替尼具有化学名4-(环丙基氨基)-2-(4-(4-(乙基磺酰基)哌嗪-1-基)苯基氨基)嘧啶-5-甲酰胺,并且具有下式:



[0040] 在本文所述的一些实施方案中,赛度替尼也可以是指其盐或前药。在本文所述的一些实施方案中,赛度替尼也可以是指其药学上可接受的盐或前药。

[0041] 如本文所用,术语“药学上可接受的盐”是指任何酸加成盐或碱加成盐,其抗衡离子在所述盐的药用剂量下对于患者是无毒的。药学上可接受的盐的主体是本领域中已熟知的。如果在这些组合物中使用本公开的化合物的药学上可接受的盐,则那些盐优选地衍生自无机酸或有机酸和碱。在此类酸式盐中包括以下各项:乙酸盐、己二酸盐、海藻酸盐、天冬氨酸盐、苯甲酸盐、苯磺酸盐、硫酸氢盐、丁酸盐、柠檬酸盐、樟脑酸盐、樟脑磺酸盐、环戊烷丙酸盐、二葡萄糖酸盐、十二烷基硫酸盐、乙磺酸盐、富马酸盐、lucoheptanoate、甘油磷酸盐、半硫酸盐、庚酸盐、己酸盐、盐酸盐、氢溴酸盐、氢碘酸盐、2-羟基乙磺酸盐、乳酸盐、马来酸盐、甲磺酸盐、2-萘磺酸盐、烟酸盐、草酸盐、扑酸盐、果胶酸盐、过硫酸盐、3-苯基-丙酸盐、苦味酸盐、特戊酸盐、丙酸盐、琥珀酸盐、酒石酸盐、硫氰酸盐、甲苯磺酸盐、十一酸盐、氢卤化物(例如,盐酸盐和氢溴酸盐)、硫酸盐、磷酸盐、硝酸盐、氨基磺酸盐、丙二酸盐类、水杨酸盐、亚甲基-双-b-羟萘甲酸盐、龙胆酸盐、羟乙基磺酸盐、二-对-甲苯酰基酒石酸盐、乙烷磺酸盐、环己基氨基磺酸盐、奎尼酸盐等。药学上可接受的碱加成盐包括但不限于衍生自碱金属或碱土金属碱或常规有机碱的那些,诸如三乙胺、吡啶、哌啶、吗啉、N-甲基吗啉、铵盐、碱金属盐(诸如钠盐和钾盐)、碱土金属盐(诸如钙盐和镁盐)、具有有机碱的盐(诸如二环己基

胺盐、N-甲基-D-葡萄糖胺)、以及具有氨基酸诸如精氨酸、赖氨酸的盐等。

[0042] 另外,含氮碱性基团可用如以下的试剂季铵化:低级烷基卤化物,如甲基、乙基、丙基和丁基氯化物、溴化物以及碘化物;二烷基硫酸酯,如二甲基、二乙基、二丁基和二戊基硫酸酯;长链卤化物,如癸基、月桂基、肉豆蔻基和硬脂酰基氯化物、溴化物和碘化物;芳烷基卤化物,如苄基和苯乙基溴化物;以及其他。因此获得水或油可溶性或可分散性产物。

[0043] 还涵盖赛度替尼的“前药”(或本文所述的其他化合物)并且所述前药为在生理条件下容易经历化学变化以提供本公开的化合物的那些化合物。另外,可通过化学或生物化学方法在离体环境中将前药转化为本公开的化合物。例如,当放置在具有合适的酶或化学试剂的经皮贴剂贮库中时,前药可缓慢地转化为本公开的化合物。前药在转化成活性药物之前频繁地但不一定是药学上无活性的。前药通常通过用前体基团(下文所定义)遮蔽在药物中据信部分为活性所需要的官能团以形成前体部分来获得,所述前体部分在指定使用条件下经历转化诸如切割,以释放所述官能团并因此释放活性药物。切割前体部分可以诸如通过水解反应自发进行,或者它可以通过另一种试剂诸如通过酶、通过光、通过酸或碱、或通过改变身体或环境参数或暴露于所述参数(诸如改变温度)来催化或诱导。所述药剂对于使用条件而言可以是内源性的,诸如存在于前药所施用的细胞中的酶或胃部酸性条件,或者它可以外源地提供。

[0044] “前体基团”是指一种类型的保护基团,当用于遮蔽活性药物内的官能团以形成前体部分时,所述保护基团将所述药物转化成前药。前体基团通常通过在指定使用条件下可裂解的键附接至药物的官能团。因此,前体基团是前体部分在指定使用条件下切割释放官能团的该部分。作为具体实例,式-NH-C(O)CH<sub>3</sub>的酰胺前体部分包含前体基团-C(O)CH<sub>3</sub>。

[0045] 适用于遮蔽本文所述的化合物中的官能团以产生前药的各种各样的前体基团以及所得前体部分是本领域中已熟知的。例如,氨基官能团可以作为酰胺、氨基甲酸酯、亚胺、脲、苯膦基、磷酰基或氧硫基前体部分遮蔽,所述前体部分可以在体内水解以提供氨基。本公开包括本领域中已知用于改变溶解度或水解特征以用作持续释放或前药制剂的那些酯和酰基。合适的前体基团及其对应前体部分的其他具体实例对于本领域技术人员而言将是显而易见的。

[0046] 考虑到赛度替尼可以适用于严重预治疗患者和/或复发/难治性血液癌症,所述血液癌症包括但不限于CLL、FL、NHL以及DLBCL。赛度替尼已显示在体外在原发性弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)细胞中诱导细胞凋亡。赛度替尼已显示在原发性CLL中诱导细胞凋亡,在不良预后诸如未突变的IGHV、高CD49d、ZAP-70或表面IgM表达的情况下具有优选的活性。

[0047] 一些化学治疗剂在罹患多种血液癌症的患者中例如由于BCR或细胞因子介导的信号传导、IL-4介导的信号传导和/或BCR活化途径(它们对血液癌症具有保护性)而引起药物抗性。根据本公开的实施方案,赛度替尼可以克服导致药物抗性的这些保护性机制。

[0048] 一些实施方案提供一种组合物,所述组合物包含赛度替尼、或其药学上可接受的盐或前药、以及化学治疗剂。

[0049] 根据一些实施方案,提供一种组合物,所述组合物包含赛度替尼或其盐和选自以下的化学治疗剂:BCL-2抑制剂、BTK抑制剂、P13Kδ抑制剂、铂基药物、抗代谢物以及其组合。

[0050] 在一些实施方案中,化学治疗剂是BCL-2抑制剂、BTK抑制剂、P13Kδ抑制剂、抗-CD20抗体、ABT-199(维奈托克)、利妥昔单抗(Rituxan®、Mabthera®、Zytux®)、铂基药



物、抗代谢物、依鲁替尼 (Imbruvica®)、艾代拉里斯 (Zydelig®) 或其组合。在一些实施方案中,化学治疗剂选自由以下组成的组:维奈托克、利妥昔单抗、依鲁替尼、艾代拉里斯、吉西他滨、奥沙利铂及其组合。

[0051] 在一些实施方案中,化学治疗剂是duvelisib (PI3K- $\delta$ 和PI3K- $\gamma$ 抑制剂)、乌利昔单抗 (ublituximab) (抗-CD20抗体)、奥滨尤妥珠单抗 (obinutuzumab) (抗-CD20抗体)、ACP-196 (BTK抑制剂)、TGR-1202 (PI3K- $\delta$ 抑制剂)、纳武单抗 (nivolumab) (抗-PD-1抗体)、派姆单抗 (pembrolizumab) (抗-PD-1抗体)、皮地利珠单抗 (pidilizumab) (抗-PD-1抗体)、CTL019 (CAR-T抑制剂)、KTE-C19 CAR (CAR-T抑制剂)、或EPZ-6438 (EZH2抑制剂)、阿立塞替 (alisertib) (极光激酶抑制剂)、或莫格穆里单抗 (mogamulizumab) (抗-CCR4抗体)。

[0052] 在一些实施方案中,赛度替尼和化学治疗剂可以在细胞凋亡中提供协同效应。在一些实施方案中,赛度替尼和化学治疗剂可以在表达Bcl-2蛋白质的细胞系中提供协同效应。在一些实施方案中,赛度替尼和化学治疗剂可以在表达Bim蛋白质的细胞系中提供协同效应。

[0053] 在一些实施方案中,赛度替尼以治疗剂量施用并且其他化学治疗剂的量可以是减少所述药剂的治疗剂量的约10%至约65%的量,所述剂量在本文中描述。

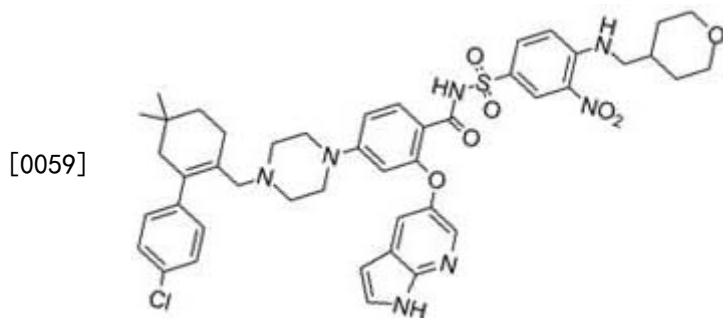
[0054] 在一些实施方案中,所述组合物包含赛度替尼和化学治疗剂,赛度替尼与化学治疗剂的摩尔比是约300:1至约3:1。

[0055] 在一些实施方案中,所述组合物用于治疗血液癌症,诸如慢性淋巴细胞白血病 (CLL)、小淋巴细胞淋巴瘤 (SLL)、滤泡性淋巴瘤 (FL)、转化的滤泡性淋巴瘤 (tFL)、弥漫性大B细胞淋巴瘤 (DLBCL) 和/或套细胞淋巴瘤 (MCL)。

[0056] 在一些实施方案中,所述组合物用于治疗血液癌症,其中所述血液癌症是慢性淋巴细胞白血病 (CLL)、小淋巴细胞淋巴瘤 (SLL)、滤泡性淋巴瘤 (FL)、转化的滤泡性淋巴瘤 (tFL)、弥漫性大B细胞淋巴瘤 (DLBCL)、套细胞淋巴瘤 (MCL)、边缘区淋巴瘤、粘膜相关淋巴组织 (MALT) 或瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症 (WM)。

[0057] 在一些实施方案中,提供一种组合物,其包含赛度替尼或其药学上可接受的盐、以及化学治疗剂维奈托克、以及至少一种药学上可接受的载体或赋形剂。在一些实施方案中,组合物包含赛度替尼或其药学上可接受的盐或前药、以及化学治疗剂维奈托克或其药学上可接受的盐或前药、以及至少一种药学上可接受的载体或赋形剂。

[0058] ABT-199 (维奈托克) 是BCL2抑制剂并且例如描述于美国专利8,722,657和美国专利8,580,794中。维奈托克具有化学名4-(4-([2-(4-氯苯基)-4,4-二甲基环己-1-烯-1-基]甲基}哌嗪-1-基)-N-((3-硝基-4-[(四氢-2H-吡喃-4-基甲基)氨基]苯基)-磺酰基)-2-(1H-吡咯并[2,3-b]吡啶-5-基氧基)苯甲酰胺并且具有下式:



[0060] 在本文所述的实施方案中,赛度替尼也可以是指其药学上可接受的盐(如以上所定义的)。

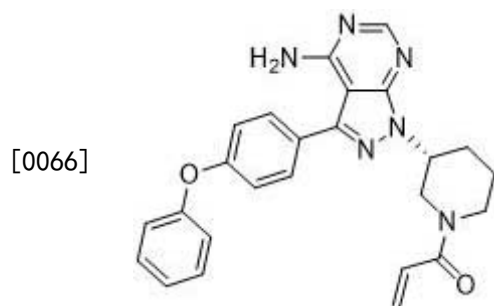
[0061] 在一些实施方案中,赛度替尼和维奈托克在细胞凋亡中提供协同效应。

[0062] 在一些实施方案中,提供一种组合物,其包含赛度替尼和维奈托克,赛度替尼与维奈托克的摩尔比是约300:1至约3:1。在一些实施方案中,组合物包含亚治疗量的赛度替尼和/或维奈托克。例如,考虑到赛度替尼以治疗剂量施用并且维奈托克的量可以是减少所述药剂的治疗剂量的约10%至约65%的量,所述剂量在本文中描述。在一些实施方案中,赛度替尼以如本文所定义的治疗有效量施用并且维奈托克的量可以是减少维奈托克的治疗剂量的约10%至约50%的量。

[0063] 在一些实施方案中,组合物包含赛度替尼和维奈托克,赛度替尼与维奈托克的摩尔比是约9:1至约1:9。在一些实施方案中,组合物包含赛度替尼和维奈托克,赛度替尼与维奈托克的摩尔比是约2:1至约1:2。在一些实施方案中,组合物包含赛度替尼和维奈托克,赛度替尼与维奈托克的摩尔比是约2:1至约1:5。在一些实施方案中,组合物包含赛度替尼和维奈托克,赛度替尼与维奈托克的摩尔比是约1:1。在一些实施方案中,组合物包含赛度替尼和维奈托克,赛度替尼与维奈托克的摩尔比是约1:1、约1:2、约1:9、约2:1或约9:1。

[0064] 在一些实施方案中,维奈托克无论是单独的还是与赛度替尼组合,均以每日约400 mg施用。在一些实施方案中,维奈托克无论是单独的还是与赛度替尼组合,均以每日20 mg施用,持续受试者服用维奈托克的前7天。

[0065] 依鲁替尼(Imbruvica®)是BTK抑制剂并且描述于例如美国7,514,444中。依鲁替尼具有化学名1-[(3R)-3-[4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基]哌啶-2-烯-1-酮]并且具有下式:



[0067] 在一些实施方案中,组合物包含赛度替尼和依鲁替尼。在一些实施方案中,赛度替尼和依鲁替尼以约300:1至约3:1的赛度替尼与依鲁替尼的摩尔比施用。

[0068] 在一些实施方案中,赛度替尼或其药学上可接受的盐或前药和依鲁替尼以约2:1至约1:5的赛度替尼与依鲁替尼的摩尔比施用。在一些实施方案中,赛度替尼和依鲁替尼以亚治疗剂量施用。

[0069] 在一些实施方案中,赛度替尼和依鲁替尼以约9:1至约1:9的赛度替尼与依鲁替尼的摩尔比施用。在一些实施方案中,赛度替尼和依鲁替尼以约2:1至约1:2的赛度替尼与依鲁替尼的摩尔比施用。在一些实施方案中,赛度替尼和依鲁替尼以约1:1的赛度替尼与依鲁替尼的摩尔比施用。在一些实施方案中,赛度替尼和依鲁替尼以约1:1、约1:2、约1:9、约2:1或约9:1的赛度替尼与依鲁替尼的摩尔比施用。

[0070] 在一些实施方案中,依鲁替尼以每日约420 mg至约560 mg施用。在一些实施方案

中,依鲁替尼以约140 mg施用并且每日施用三次或四次。在一些实施方案中,依鲁替尼当与赛度替尼组合施用时的每日约210 mg至约280 mg施用。在一些实施方案中,依鲁替尼当与赛度替尼组合施用时的每日约140 mg施用并且每日施用一次、一次半或两次。在一些实施方案中,依鲁替尼以每日约560 mg施用。在一些实施方案中,依鲁替尼以每日约420 mg施用。在一些实施方案中,依鲁替尼以每日约280 mg施用。在一些实施方案中,依鲁替尼以每日约140 mg施用。

[0071] 在一些实施方案中,赛度替尼以如本文所定义的治疗有效量施用并且依鲁替尼的量可以是减少依鲁替尼的治疗剂量的约10%至约50%的量。

[0072] 待施用的本文所述的化合物的量可以通过标准程序考虑各种因素来确定,所述因素诸如化合物 $IC_{50}$ 、化合物的生物半衰期、受试者的年龄、尺寸和体重以及正在治疗的适应症。这些因素和其他因素的重要性是本领域普通技术人员所熟知的。通常,剂量将是在约0.01与50 mg/kg正在治疗的受试者之间、或0.1与20 mg/kg正在治疗的受试者之间。可以使用多个剂量。

[0073] 根据一些实施方案,赛度替尼的治疗有效量是在IL-4和/或CD40L存在下表现出在体外细胞凋亡小于15%减少的量,其中IL-4和/或CD40L以预期存在于神经节组织部位中的任何量存在。在一些实施方案中,化学治疗剂以一定量施用使得在IL-4和/或CD40L存在下在体外细胞凋亡减少至少15%,其中IL-4和/或CD40L以预期存在于神经节组织部位中的任何量存在。

[0074] 在某些实施方案中,单独或以预定组合之一用于所述方法中的赛度替尼的治疗有效量是每日至少约10 mg。在一个实施方案中,赛度替尼的治疗有效量是每个剂量至少约10、20、30、40或50 mg。在一个实施方案中,赛度替尼的治疗有效量是每日至少约10、20、30、40、50、60、70、80、90或100 mg。

[0075] 在一个实施方案中,赛度替尼的治疗有效量是每日至少30 mg、35 mg、40 mg、45 mg、50 mg、55 mg、60 mg或65 mg。在一个实施方案中,赛度替尼的治疗有效量是至少约15 mg、20 mg、25 mg、30 mg或35 mg并且每日施用两次。

[0076] 在某些实施方案中,赛度替尼的治疗有效量是不超过每日约500、400、300、200、150、120或100 mg。在一个实施方案中,赛度替尼的治疗有效量是不超过每个剂量约300、200、150、120、100、90、80、70、60、55或50 mg。

[0077] 在某些实施方案中,赛度替尼的治疗有效量是不超过每日约100 mg、95 mg、90 mg、85 mg、80 mg或75 mg。在某些实施方案中,赛度替尼的治疗有效量是不超过45 mg、40 mg、35 mg或30 mg并且每日施用两次。

[0078] 在一个实施方案中,赛度替尼无论是单独地还是与另一种药剂组合都以每日约10 mg至200 mg、约25 mg至150 mg、约50至120 mg或约80至100 mg施用。

[0079] 在一个实施方案中,赛度替尼的治疗有效量无论是单独的还是与另一种药剂组合都是每日25 mg至120 mg。在一些实施方案中,赛度替尼的有效量是25 mg至50 mg,每日两次。

[0080] 在一个实施方案中,赛度替尼无论是单独地还是与另一种药剂组合都以每个剂量约10 mg至150 mg、约25 mg至120 mg、约30至80 mg或约40至50 mg施用,每日一次或两次。在某些实施方案中,赛度替尼无论是单独的还是与另一种药剂组合都是每日一次、两次、三

次或四次施用。

[0081] 在一个实施方案中,赛度替尼无论是单独的还是与另一种药剂组合都是以约30 mg至约80 mg施用,每日一次。在一个实施方案中,赛度替尼无论是单独的还是与另一种药剂组合都是以约15 mg至约40 mg施用,每日两次。

[0082] 在一个实施方案中,45 mg的赛度替尼无论是单独的还是与另一种药剂组合都是每日施用两次。在一个实施方案中,35 mg的赛度替尼无论是单独的还是与另一种药剂组合都是每日施用两次。

[0083] 在一些实施方案中,赛度替尼或其药学上可接受的盐的有效量是约40 mg至约50 mg,每日施用两次。

[0084] 在一些实施方案中,赛度替尼或其药学上可接受的盐的有效量是约30 mg至约40 mg,每日施用两次。

[0085] 在一些实施方案中,赛度替尼或其药学上可接受的盐的有效量无论是单独的还是与另一种药剂组合都是以每日约30 mg至约45 mg施用。

[0086] 在一些实施方案中,30 mg的赛度替尼或其药学上可接受的盐无论是单独的还是与另一种药剂组合都是每日施用两次。

[0087] 在本发明上下文中,如本文所述的术语“治疗有效量”或“有效量”是指化合物或材料或者所述化合物或材料的量在施用时足以或有效地预防、缓解或减轻正在治疗的疾病、病症或医学病状的一种或多种症状和/或延长正在治疗的受试者的存活。治疗有效量将根据化合物、疾病、病症或病状及其严重程度以及待治疗的哺乳动物的年龄、重量等而变化。所述剂量可以常规地施用,例如以多至每日四次的分次剂量或以持续释放形式施用。

[0088] 术语“治疗剂量”是指化合物或材料对于产生所需效应可需要的剂量。

[0089] 如本文所用,“每日剂量”是指治疗物质在24小时内服用的总量。

[0090] 药物制剂

[0091] 全文所述的组合物可以多种药物制剂施用。合适剂型部分取决于用途或施用路径,例如口服、透皮、经粘膜、吸入或通过注射(肠胃外)。此类剂型应允许化合物达到靶细胞。其他因素是本领域中已熟知的,并且包括阻止化合物或组合物发挥其作用的考虑因素,诸如毒性和剂型。技术和制剂通常可见于The Science and Practice of Pharmacy, 第21版, Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia, PA, 2005 (以引用方式并入本文中)。

[0092] 载体或赋形剂可以用于产生组合物。可以选择载体或赋形剂以有利于化合物的施用。载体的实例包括碳酸钙、磷酸钙、各种糖(诸如乳糖、葡萄糖或蔗糖)、或各种类型的淀粉、纤维素衍生物、明胶、植物油、聚乙二醇以及生理上相容的溶剂。生理上相容的溶剂的实例包括注射用水(WFI)无菌溶液、盐水溶液和右旋糖。

[0093] 术语“药学上可接受的载体或赋形剂”是指总体上安全、无毒,并且在生物学上以及其它方面并非不合需要的适用于制备药物组合物的载体或赋形剂,并且包括可为兽医使用以及人药物使用接受的载体或赋形剂。如本文所用的“药学上可接受的载体或赋形剂”包括一种以及多于一种这种载体或赋形剂。

[0094] 术语“施用”是指向受试者口服施用、作为栓剂施用、局部接触、静脉内、腹膜内、肌肉内、病灶内、鼻内或皮下施用,或植入缓释装置,例如,小型渗透泵。通过任何途径进行施用,

包括肠胃外和经粘膜(例如,经颊、经舌下、经上腭、经牙龈、经鼻、经阴道、经直肠或经皮)。肠胃外施用包括例如,静脉内、肌内、动脉内、皮内、皮下、腹膜内、心室内和颅内。其它递送模式包括但不限于使用脂质体制剂、静脉内输注、经皮贴剂等。

[0095] 化合物可以通过不同路径施用,包括静脉内、腹膜内、皮下、肌内、口服、经粘膜、直肠、透皮或吸入。在一些实施方案中,化合物可通过口服施用来施用。对于口服施用,例如,化合物可以被配制成常规口服剂型诸如胶囊、片剂和液体制剂诸如糖浆、酏剂和浓缩的滴剂。

[0096] 对于吸入,本公开的化合物可以被配制为粉剂或合适的溶液、悬浮液或气溶胶。粉剂和溶液可以使用本领域已知的合适添加剂配制。例如,粉末可以包括合适的粉剂基料诸如乳糖或淀粉,并且溶液可以包含丙二醇、无菌水、乙醇、氯化钠,以及其他添加剂诸如酸、碱和缓冲盐。此类溶液或悬浮液可以通过经由喷雾器、泵、雾化器或喷雾器等吸入来施用。本公开的化合物还可以与其他吸入的疗法例如皮质类固醇诸如丙酸氟替卡松、二丙酸倍氯米松、曲安奈德、布地奈德以及糠酸莫米松; $\beta$ 激动剂诸如沙丁胺醇、沙美特罗和福莫特罗;抗胆碱能剂诸如溴化异丙托品或噻托溴铵;血管扩张剂诸如曲前列环素(treprostinil)和伊洛前列素;酶诸如DNA酶;治疗性蛋白质;免疫球蛋白抗体;寡核苷酸,诸如单链或双链DNA或RNA、siRNA;抗生素诸如妥布霉素;蕈毒碱受体拮抗剂;白三烯拮抗剂;细胞因子拮抗剂;蛋白酶抑制剂;色甘酸钠;奈多罗米钠;以及色甘酸钠。

[0097] 用于口服使用的药物制剂可例如通过以下方式来获得:将活性化合物与固体赋形剂组合,任选地研磨所得混合物,以及必要时在添加合适的助剂之后加工颗粒混合物,以获得片剂或糖衣片核心。合适的赋形剂特别是填充剂,如糖,包括乳糖、蔗糖、甘露糖醇或山梨糖醇;纤维素制剂,例如玉米淀粉、小麦淀粉、稻米淀粉、马铃薯淀粉、明胶、黄蓍树胶、甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、羧甲基纤维素钠(CMC)和/或聚乙烯吡咯烷酮(PVP:聚维酮)。必要时,可添加崩解剂,诸如交联聚乙烯吡咯烷酮、琼脂或海藻酸或其盐诸如海藻酸钠。

[0098] 糖锭剂核提供有合适的包衣。出于这个目的,可使用浓缩糖溶液,其可任选地含有例如阿拉伯胶、滑石、聚乙烯吡咯烷酮、卡伯波凝胶(carbopol gel)、聚乙二醇(PEG)、和/或二氧化钛、漆溶液以及合适的有机溶剂或溶剂混合物。染料或颜料可添加至片剂或糖衣片包衣中以鉴定或表征活性化合物剂量的不同组合。

[0099] 可口服使用的药物制剂包括由明胶制得的推入-配合型胶囊(“胶囊锭”)以及由明胶和塑化剂(如甘油或山梨糖醇)制得的软质密封胶囊。所述推入-配合型胶囊可以含有与填充剂如乳糖、粘合剂如淀粉和/或润滑剂如滑石或硬脂酸镁以及任选地稳定剂混合的活性成分。在软质胶囊中,活性化合物可溶解或混悬于合适的液体,如脂肪油、液体石蜡或液体聚乙二醇(PEG)中。此外,可以添加稳定剂。

[0100] 可替代地,可以使用注射(胃肠外施用),例如肌内、静脉内、腹膜内和/或皮下。对于注射,本公开的组合物可于无菌液体溶液中配制,例如于生理相容性缓冲液或溶液,诸如盐水溶液、汉克氏溶液(Hank's solution)或林格氏溶液中配制。此外,组合物可以固体形式配制并在使用之前即刻再溶解或混悬。也可产生冻干形式。

[0101] 施用也可以通过经粘膜、局部、透皮或吸入方式进行。对于经粘膜、局部或经皮施用,在制剂中使用适合于待渗透的屏障的渗透剂。此类渗透剂在本领域中通常是已知的,并且例如对于经粘膜施用,包括胆汁盐和梭链孢酸衍生物。另外,洗涤剂也可用于促进渗透。

经粘膜施用例如可以通过鼻喷剂或栓剂(直肠或阴道)进行。

[0102] 本公开的局部用组合物通过选择本领域已知的适当载体来配制为油状物、乳膏、洗剂、膏剂等。合适的载体包括植物油或矿物油、白凡士林(白软石蜡)、支链脂肪或油、动物脂肪以及高分子量醇(大于 $C_{12}$ )。在另一个实施方案中,载体是其中活性成分可溶的那些。按需要,也可以包含乳化剂、稳定剂、湿润剂和抗氧化剂以及赋予颜色或香味的试剂。用于局部应用的乳膏由矿物油、自身乳化蜂蜡和水的混合物配制,在该混合物中,以少量溶剂(例如油)溶解的活性成分为混合的。另外,通过经皮方式施用可包括经皮贴片或敷料诸如用活性成分和任选地一种或多种本领域已知的载体或稀释剂浸渍的绷带。为以经皮传递系统形式施用,在整个剂量方案期间,剂量施用将当然为连续的而非间歇的。

[0103] 本公开的化合物也可以与其他用于治疗相同疾病的疗法组合使用。此类组合使用包括在不同时间施用所述化合物和一种或多种其他治疗剂、或共同施用所述化合物和一种或多种其他疗法。在一些实施方案中,对于本公开的一种或多种化合物或组合中使用的其他疗法,可以通过本领域普通技术人员已熟知的方法改变剂量,例如减小相对于单独使用的化合物或疗法给药的量。

[0104] 应理解,组合使用包括与其他疗法、药物、医学程序等一起使用,其中其他疗法或程序可以在与本公开的化合物不同的时间(例如,在短时间内,诸如总数小时(例如1、2、3、4-24小时)内、或在更长的时间(例如1-2天、2-4天、4-7天、1-4周)内)或在与本公开的化合物相同的时间施用。组合使用还包括与施用一次或不频繁施用的疗法或医学程序诸如手术一起使用,连同在其他疗法或程序之前或之后短时间或较长时间内施用的本公开的化合物。在一些实施方案中,本公开提供通过不同施用路径或通过相同施用路径递送的本公开的化合物和一种或多种其他治疗剂的递送。对于任何施用路径的组合使用包括以任何制剂一起递送通过相同施用路径递送的本公开的化合物和一种或多种其他药物治疗剂,所述制剂包括其中两种化合物以在施用它们维持治疗活性的方式化学连接的制剂。在一个实施方案中,其他药物疗法可以与本公开的一种或多种化合物共同施用。通过共同施用组合使用包括施用化学连接的化合物的共制剂或制剂、或在彼此短时间内以单独制剂施用两种或更多种化合物(例如在一个小时、2个小时、3个小时、多至24小时),通过相同或不同路径彼此施用。单独制剂的共同施用包括通过经由装置例如相同吸入装置、相同注射器等递送、或在彼此短时间内从单独装置施用来进行共同施用。通过相同路径递送的本公开的化合物和一种或多种另外的药物疗法的共制剂包括将这些材料一起制备以使得它们可以通过一个装置施用,包括组合在一个制剂中的单独化合物或被修改以使得它们化学连接但仍维持其生物活性的化合物。此类化学连接的化合物可以具有基本上在体内维持的键,或者所述键可以在体内分解,从而分成两个活性组分。

[0105] 方法

[0106] 本文提供的一些实施方案涉及用于治疗有需要的患者中的血液癌症的方法,其包括向患者施用有效量的赛度替尼。在一些实施方案中,提供一种用于治疗有需要的患者中的血液癌症的方法,其包括向患者施用如本文所述的组合物。

[0107] 本文提供的一些实施方案涉及治疗罹患以下一种或多种的患者的方法:B细胞非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、滤泡性淋巴瘤(FL)、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)或其他转化的FL。

[0108] “患者”是指人和非人动物,尤其是哺乳动物。患者的实例包括但不限于人、牛、狗、猫、山羊、绵羊、猪和兔。

[0109] 如本文所用的术语“治疗(treat/treating/treatment)”以及其语法变化包括部分或完全延迟、减缓、减轻病症或病状的一种或多种伴随性症状或减小其强度和/或减缓、减轻或阻碍病症或病状的一种或多种原因。如本文所述的治疗可以预防地、防止地、姑息地或矫正地应用。

[0110] 如本文所用的术语“预防(prevent/preventing/prevention)”以及其语法变化是指部分或完全延迟或排除病症或病状和/或其一种或多种伴随性症状的发作或复发、或者阻止受试者获取或再次获取病症或病状、或者减少受试者获取或获得病症或病状或其一种或多种伴随性症状的风险。

[0111] 本文所述的方法和组合物通常将用于人受试者的疗法中。然而,它们也可以用于治疗其他动物受试者中的类似或相同适应症。在此上下文中,术语“受试者”、“动物受试者”等是指人和非人脊椎动物,例如哺乳动物,诸如非人灵长类、运动和商业动物,例如马、牛、猪、绵羊、啮齿动物,以及宠物例如犬科和猫科动物。

[0112] 对于本文所述的实施方案,疗法可以是使用赛度替尼的单一疗法或包含本文所述的组合物的组合疗法。

[0113] 在一些实施方案中,患者罹患B细胞恶性肿瘤、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、滤泡性淋巴瘤(FL)或转化的FL中的一种或多种。

[0114] 在一些实施方案中,患者罹患晚期恶性肿瘤。

[0115] 在一些实施方案中,患者已复发或不响应于现有化学疗法。在一些实施方案中,至少两种先前疗法对患者无效。在一些实施方案中,至少一种先前疗法对患者无效。

[0116] 在一些实施方案中,患者患有B细胞恶性肿瘤。在一些实施方案中,本文提供的方法用于治疗血液癌症,诸如慢性淋巴细胞白血病(CLL)、小淋巴细胞淋巴瘤(SLL)、滤泡性淋巴瘤(FL)、转化的滤泡性淋巴瘤(tFL)、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)和/或套细胞淋巴瘤(MCL)。

[0117] 在一些实施方案中,本文提供的方法用于治疗血液癌症,诸如非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、小淋巴细胞淋巴瘤(SLL)、滤泡性淋巴瘤(FL)、转化的滤泡性淋巴瘤(tFL)、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)和/或套细胞淋巴瘤(MCL)。

[0118] 在一些实施方案中,所述组合物用于治疗选自以下的血液癌症:慢性淋巴细胞白血病(CLL)、小淋巴细胞淋巴瘤(SLL)、滤泡性淋巴瘤(FL)、转化的滤泡性淋巴瘤(tFL)、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、套细胞淋巴瘤(MCL)、边缘区淋巴瘤、粘膜相关淋巴组织(MALT)以及瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症(WM)。

[0119] 在一些实施方案中,提供一种用于治疗有需要的患者中的血液癌症的方法,其包括向患者施用有效量的赛度替尼和有效量的选自以下的化学治疗剂:BCL-2抑制剂、BTK抑制剂、PI3K $\delta$ 抑制剂、利妥昔单抗、铂基药物、抗代谢物以及其组合。

[0120] 根据一些实施方案,治疗血液癌症的方法包括施用用于治疗血液癌症的化学治疗剂。在一些实施方案中,化学治疗剂通过不同于赛度替尼的作用机制来起作用(例如,除双重SYK/JAK抑制之外的机制)。在一些实施方案中,当同时或依次一起施用时,赛度替尼和化学治疗剂可以例如在引起细胞凋亡或另外减小肿瘤尺寸方面提供协同效应。例如,赛度替

尼和化学治疗剂可以各自以亚治疗量(即对于单独的各药剂而言将是亚治疗的量)施用至患者。而且,赛度替尼或化学治疗剂之一可以亚治疗量施用至患者。在一些实施方案中,赛度替尼和化学治疗剂以约300:1至约3:1或约2:1至约1:5的赛度替尼与化学治疗剂的摩尔比施用。

[0121] 在一些实施方案中,患者患有B细胞恶性肿瘤。在一些实施方案中,患者患有骨髓恶性肿瘤,诸如多发性骨髓瘤和急性骨髓性白血病。

[0122] 在一些实施方案中,血液癌症是慢性淋巴细胞白血病(CLL)。在一些实施方案中,血液癌症是小淋巴细胞淋巴瘤(SLL)。

[0123] 在一些实施方案中,血液癌症是非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)。在一些实施方案中,血液癌症是攻击性NHL(诸如DLBCL、FL3B、MCL或转化的NHL)。在一些实施方案中,血液癌症是转化的非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)。在一些实施方案中,血液癌症是无痛性NHL。

[0124] 在一些实施方案中,血液癌症是滤泡性淋巴瘤(FL)。在一些实施方案中,FL是1级、2级、3A级(FL3a)或3B级(FL3b)。在一些实施方案中,血液癌症是FL3b。在一些实施方案中,血液癌症是弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)。在一些实施方案中,血液癌症是套细胞淋巴瘤(MCL)。

[0125] 在一些实施方案中,患者出于许多原因表现出针对血液癌症的药物抗性和/或复发。例如,患者可具有与复发和/或对用于治疗血液癌症的药物的抗性相关的突变。例如,患者可包含del17p突变、TP 53突变、ATM突变、STAT突变、STAT 6突变、C481S STAT6突变、与NOTCH途径相关的突变、与钙粘蛋白途径相关的突变或其组合。

[0126] 因此,一些实施方案提供一种用于治疗有需要的患者中的血液癌症的方法,其包括向患者施用有效量的赛度替尼或其药学上可接受的盐、或如本文所述的组合物,其中患者具有与复发和/或对用于治疗血液癌症的另一种药物的抗性相关的突变。

[0127] 一些实施方案提供一种用于治疗有需要的患者中的血液癌症的方法,其包括向患者施用有效量的赛度替尼或其药学上可接受的盐、或如本文所述的组合物,其中患者具有与复发和/或对用于治疗血液癌症的另一种药物的抗性相关的突变,并且赛度替尼或其药学上可接受的盐的有效量是每日施用约25 mg至约120 mg。

[0128] 在一些实施方案中,患者可具有与复发和/或对用于治疗血液癌症的药物的抗性相关的突变。在一些实施方案中,患者可包含del17p突变、TP 53突变、ATM突变、STAT突变、STAT 6突变、C481S BTK突变、与NOTCH途径相关的突变、或与钙粘蛋白途径相关的突变或其组合。根据一些实施方案,患者不具有P53、BTK和EP300各自中的突变。在一些实施方案中,患者可具有STAT中的S86A突变。

[0129] 在一些实施方案中,患者可包含del17p突变、TP53突变、ATM突变、STAT突变、STAT 6突变、C481S BTK突变、与NOTCH途径相关的突变、与钙粘蛋白途径相关的突变或其组合。根据一些实施方案,患者不具有P53、BTK和EP300全部中的突变。

[0130] 在一些实施方案中,患者可包含del17p突变、del11q突变、P 53突变、ATM突变、STAT突变、STAT 6突变、C481S STAT6突变、与NOTCH途径相关的突变、与钙粘蛋白途径相关的突变或其组合。在一些实施方案中,患者可包含del17p突变、del11q突变、TP 53突变、ATM突变、STAT突变、STAT 6突变、C481S BTK突变、与NOTCH途径相关的突变、与钙粘蛋白途径相关的突变或其组合。



[0131] 在一些实施方案中,患者具有MYD88突变、CARD11突变或A20突变。在一些实施方案中,患者具有高风险遗传异常,包括del11q、三体性12和del17p。在一些实施方案中,患者具有del17p突变。在一些实施方案中,患者具有del11q突变。

[0132] 在一些实施方案中,患者具有CD79B突变、MYD88突变、CARD11突变或A20突变。在一些实施方案中,患者具有CD79B突变。在一些实施方案中,患者不具有IKB缺失。

[0133] 在一些实施方案中,患者具有PLC  $\gamma$  2突变。考虑到由于赛度替尼是SYK (位于磷脂酶C  $\gamma$  2 (“PLC  $\gamma$  2”)上游和JAK的双重抑制剂,适用于治疗具有PLC  $\gamma$  2突变的患者。

[0134] 在一些实施方案中,患者具有BTK突变。在一些实施方案中,患者具有PLC  $\gamma$  2突变。在一些实施方案中,患者不具有IKB缺失。在一些实施方案中,患者不具有I $\kappa$ B- $\alpha$ 、I $\kappa$ B- $\beta$ 、I $\kappa$ B- $\epsilon$ 或I $\kappa$ B- $\gamma$ 的缺失。

[0135] 在一些实施方案中,患者具有不良预后,诸如未突变的IGHV、高CD49d、ZAP-70或表面IgM表达。

[0136] 在一些实施方案中,患者对非赛度替尼药物具有抗性。这些药物的非限制性实例为抗-CD20抗体、BCL-2抑制剂、BTK抑制剂、P13K $\delta$ 抑制剂、利妥昔单抗、铂基药物、抗代谢物、依鲁替尼、艾代拉里斯、氟达拉滨(磷酸氟达拉滨,Fludara<sup>®</sup>)、蒽环类抗生素、BCR途径抑制剂、维奈托克、或用于治疗血液癌症的另一种化学治疗剂。化学治疗剂的其他非限制性实例包括烷化剂、细胞骨架破裂剂、埃博霉素(epothiolone)、组蛋白脱乙酰酶抑制剂、拓扑异构酶I抑制剂、拓扑异构酶II抑制剂、核苷酸类似物和前体类似物、抗生素、铂基药剂、类视色素、长春花生物碱或其组合。在一些实施方案中,患者对化学治疗剂具有抗性。

[0137] 在一些实施方案中,患者对以下各项具有抗性:抗-CD20抗体、BCL-2抑制剂、BTK抑制剂、P13K $\delta$ 抑制剂、铂基药物、抗代谢物、蒽环类抗生素(ananthracycline)、BCR途径抑制剂、或用于治疗血液癌症的另一种化学治疗剂。在一些实施方案中,患者具有对选自以下组成的组的药物的抗性:依鲁替尼、艾代拉里斯、氟达拉滨(磷酸氟达拉滨,FLUDARA<sup>®</sup>)、或ABT-199 (维奈托克)。在一些实施方案中,患者对依鲁替尼具有抗性。

[0138] 在一些实施方案中,患者先前施用了用于治疗血液癌症的药物。药物的非限制性实例包括烷化剂、抗-CD20抗体、BCL-2抑制剂、BTK抑制剂、P13K $\delta$ 抑制剂、利妥昔单抗、铂基药物、抗代谢物、依鲁替尼、艾代拉里斯、氟达拉滨(磷酸氟达拉滨,FLUDARA<sup>®</sup>)、蒽环类抗生素、BCR途径抑制剂、维奈托克以及其他用于治疗血液癌症的药剂。化学治疗剂的其他非限制性实例包括细胞骨架破裂剂、埃博霉素、组蛋白脱乙酰酶抑制剂、拓扑异构酶I抑制剂、拓扑异构酶II抑制剂、核苷酸类似物和前体类似物、抗生素、铂基药剂、类视色素、长春花生物碱或其组合。

[0139] 在一些实施方案中,患者对选自以下组成的组的药物具有抗性:烷化剂、抗-CD20抗体、BCL-2抑制剂、BTK抑制剂、P13K $\delta$ 抑制剂、铂基药物、抗代谢物、蒽环类抗生素、BCR途径抑制剂以及其他用于治疗血液癌症的药剂。在一些实施方案中,药物为利妥昔单抗、依鲁替尼、艾代拉里斯、氟达拉滨(磷酸氟达拉滨,Fludara<sup>®</sup>)或ABT-199 (维奈托克)。在一些实施方案中,药物为R-CHOP (利妥昔单抗;环磷酰胺;盐酸多柔比星;(长春新碱);泼尼松)。在一些实施方案中,药物为R-CVP (利妥昔单抗;环磷酰胺;长春新碱;泼尼松)。在一些实施方案中,药物为贝伐单抗。在一些实施方案中,药物为氟达拉滨和利妥昔单抗的组合、苯达莫司汀和利妥昔单抗的组合、或贝伐单抗和利妥昔单抗的组合。

[0140] 在一些实施方案中,患者先前施用了选自以下的药物:维奈托克、利妥昔单抗、依鲁替尼、艾代拉里斯以及氟达拉滨。

[0141] 在某些实施方案中,患者为60岁或更大年龄并且在第一线癌症疗法之后复发。在某些实施方案中,患者为18岁或更大年龄并且在第二线癌症疗法之后复发或难治。在某些实施方案中,患者为60岁或更大年龄并且主要为第一线癌症疗法难治的。在某些实施方案中,患者为70岁或更大年龄并且先前未治疗。在某些实施方案中,患者为70岁或更大年龄并且不适合和/或不可能受益于癌症疗法。

[0142] 在一些实施方案中,患者表达Bcl-2蛋白。在一些实施方案中,患者表达Bim蛋白。

[0143] 一些实施方案提供一种治疗有需要的患者中的血液癌症的方法,所述方法包括向所述患者施用有效量的赛度替尼或其药学上可接受的盐、以及有效量的依鲁替尼或其药学上可接受的盐,其中患者具有CD79B突变、具有PLC  $\gamma$  2突变或不具有IKB缺失。

[0144] 一些实施方案提供一种用于治疗B细胞淋巴瘤的方法,其包括向具有癌细胞的B细胞淋巴瘤患者施用有效量的赛度替尼或其药学上可接受的盐,所述癌细胞具有I $\kappa$ B $\alpha$ 基因的下调,其中所述细胞不具有I $\kappa$ B $\alpha$ 基因的两个等位基因上的灭活突变,不具有CD40受体信号途径的失调并且不具有tol1样受体信号传导途径的失调。

[0145] 在一些实施方案中,患者不具有CD40的活化。在一些实施方案中,患者不具有无活性I $\kappa$ B $\alpha$ 蛋白。在一些实施方案中,细胞具有B细胞受体信号途径或细胞因子受体信号途径的失调。在一些实施方案中,细胞具有增加的CARD11或MYD88的活性、或减小的A20的活性。

[0146] 一些实施方案提供一种用于确定B细胞淋巴瘤患者是否适合包含赛度替尼或其药学上可接受的盐的疗法的方法,其包括测量患者癌细胞中I $\kappa$ B $\alpha$ 蛋白的活性或表达或者CD40受体信号途径或tol1样受体途径的活性并且如果I $\kappa$ B $\alpha$ 蛋白为无活性的、如果CD40受体信号传导途径是失调的、或者如果tol1样受体信号传导途径是失调的,则确定该患者不适合所述疗法。

[0147] 在一些实施方案中,B细胞淋巴瘤是弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)。在一些实施方案中,癌细胞为B淋巴细胞。在一些实施方案中,CD40受体信号传导途径的失调包括CD40的活化。

[0148] 一些实施方案提供一种治疗具有癌细胞的患者的B细胞淋巴瘤的方法,所述癌细胞具有I $\kappa$ B $\alpha$ 基因的下调,所述方法包括向患者施用有效量的赛度替尼或其药学上可接受的盐和NF- $\kappa$ B抑制剂。在一些实施方案中,细胞具有失调的CD40受体信号传导或失调的tol1样受体信号传导。在一些实施方案中,CD40受体信号传导途径的失调包括CD40的活化。

[0149] 本公开的一些实施方案提供用于治疗有需要的患者中的血液癌症的方法,其包括向患者施用有效量的赛度替尼和有效量的维奈托克或者施用包含如本文所述的赛度替尼和维奈托克的组合物。

[0150] 根据本公开的另一个实施方案,一种用于治疗有需要的患者中的血液癌症的方法包括施用治疗有效量的赛度替尼和用于治疗相同血液癌症的化学治疗剂(诸如维奈托克)的组合,所述组合包含亚治疗有效量的赛度替尼和亚治疗有效量的化学治疗剂。

[0151] 本文提供向患者施用有效量的赛度替尼和有效量的维奈托克以治疗血液癌症的方法。在一些实施方案中,赛度替尼和维奈托克同时或依次施用。在一些实施方案中,血液癌症为难治性或复发性血液癌症。在一些实施方案中,难治性或复发性血液癌症为慢性淋

巴细胞白血病 (CLL)、小淋巴细胞淋巴瘤 (SLL)、滤泡性淋巴瘤 (FL)、转化的滤泡性淋巴瘤 (tFL)、弥漫性大B细胞淋巴瘤 (DLBCL) 或套细胞淋巴瘤 (MCL)。

[0152] 本文还提供使用包含赛度替尼或其药学上可接受的盐和化学治疗剂诸如维奈托克和致死一种药学上可接受的载体或赋形剂的组合物用于治疗血液癌症的方法。在一些实施方案中,血液癌症为难治性或复发性血液癌症。在一些实施方案中,难治性或复发性血液癌症为慢性淋巴细胞白血病 (CLL)、小淋巴细胞淋巴瘤 (SLL)、滤泡性淋巴瘤 (FL)、转化的滤泡性淋巴瘤 (tFL)、弥漫性大B细胞淋巴瘤 (DLBCL) 或套细胞淋巴瘤 (MCL)。

[0153] 在一些实施方案中,赛度替尼和维奈托克以约300:1至约3:1的赛度替尼与维奈托克的摩尔比施用。在一些实施方案中,赛度替尼和维奈托克以约9:1至约1:9的赛度替尼与维奈托克的摩尔比施用。在一些实施方案中,赛度替尼和维奈托克以约2:1至约1:2的赛度替尼与维奈托克的摩尔比施用。在一些实施方案中,赛度替尼和维奈托克以约2:1至约1:5的赛度替尼与维奈托克的摩尔比施用。在一些实施方案中,赛度替尼和维奈托克以约1:1的赛度替尼与维奈托克的摩尔比施用。在一些实施方案中,赛度替尼和维奈托克以亚治疗剂量施用。在一些实施方案中,赛度替尼和维奈托克以约1:1、约1:2、约1:9、约2:1、或约9:1的赛度替尼与维奈托克的摩尔比施用。

[0154] 在一些实施方案中,维奈托克无论是单独还是与赛度替尼组合使用,均以约0.01至50 mg/kg、或0.1至20 mg/kg正在治疗的受试者施用。在一些实施方案中,维奈托克无论是单独还是与赛度替尼组合使用,均以每日一次约10 mg、20 mg、50 mg、100 mg、150 mg、200 mg、250 mg、300 mg、350 mg、400 mg、或约450 mg mg施用。在一些实施方案中,维奈托克无论是单独还是与赛度替尼组合使用,均以每日小于约600 mg、约550 mg、约500 mg、约450 mg、约400 mg、约350 mg、约300 mg、约250 mg、约200 mg、约150 mg、约100 mg、或约50 mg施用。

[0155] 在一些实施方案中,维奈托克无论是单独的还是与赛度替尼组合,均以每日约400 mg施用。在一些实施方案中,维奈托克无论是单独的还是与赛度替尼组合,均以每日20 mg施用,持续受试者服用维奈托克的前7天。

[0156] 本公开的一些实施方案提供用于治疗有需要的患者中的血液癌症的方法,其包括向患者施用有效量的赛度替尼和有效量的依鲁替尼或者施用包含如本文所述的赛度替尼和依鲁替尼的组合物。

[0157] 根据本公开的另一个实施方案,一种用于治疗有需要的患者中的血液癌症的方法包括施用治疗有效量的赛度替尼和用于治疗相同血液癌症的化学治疗剂(诸如依鲁替尼)的组合,所述组合包含亚治疗有效量的赛度替尼和亚治疗有效量的化学治疗剂。

[0158] 在一些实施方案中,赛度替尼和依鲁替尼 (Imbruvica®) 以约2:1至约1:5的赛度替尼与依鲁替尼的摩尔比施用。在一些实施方案中,赛度替尼和依鲁替尼以亚治疗剂量施用。在一些实施方案中,赛度替尼和依鲁替尼同时或依次施用。

[0159] 在一些实施方案中,赛度替尼和依鲁替尼以约9:1至约1:9的赛度替尼与依鲁替尼的摩尔比施用。在一些实施方案中,赛度替尼和依鲁替尼以约2:1至约1:2的赛度替尼与依鲁替尼的摩尔比施用。在一些实施方案中,赛度替尼和依鲁替尼以约1:1的赛度替尼与依鲁替尼的摩尔比施用。在一些实施方案中,赛度替尼和依鲁替尼以约1:1、约1:2、约1:9、约2:1、或约9:1的赛度替尼与依鲁替尼的摩尔比施用。

[0160] 在另一个实施方案中,本公开提供一种治疗有需要的受试者中的癌症的方法,其通过向受试者施用与有效地治疗癌症的一种或多种其他疗法或医学程序的组合的有效量的包含任何一种或多种化合物或如本文所述的组合化合物来进行。其他疗法或医学程序包括合适的抗癌疗法(例如药物疗法、疫苗疗法、基因疗法、光动力学疗法)或医学程序(例如手术、辐射治疗、过高热加热、骨髓或干细胞移植)。在一个实施方案中,一种或多种合适的抗癌疗法或医学程序选自使用化学治疗剂(例如化学治疗药物)的治疗、辐射治疗(例如x-射线、 $\gamma$ -射线、或电子、质子、中子、或 $\alpha$ 粒子束)、超高温加热(例如微波、超声波、射频消融术)、疫苗疗法(例如AFP基因肝细胞癌疫苗、AFP腺病毒载体疫苗、AG-858、同种异体GM-CSF-分泌乳腺癌疫苗、树突细胞肽疫苗)、基因疗法(例如Ad5CMV-p53载体、腺病毒编码MDA7、腺病毒5-肿瘤坏死因子 $\alpha$ )、光动力学疗法(例如氨基乙酰丙酸、莫特沙芬镭)、手术、或骨髓和干细胞移植。

#### [0161] 试剂盒

[0162] 在另一个实施方案中,本公开提供包含如在此所述的化合物或组合或任何这些化合物的药学上可接受的盐、溶剂合物、互变异构体、异构体或氘类似物、或其药物组合物中的任一种的试剂盒。在一些实施方案中,所述化合物或组合物包装在例如小瓶、瓶、烧瓶中,其可进一步包装在例如盒、封套或袋中;所述化合物或组合物由美国食品和药品管理局或类似管理机构批准用于施用至哺乳动物例如人;所述化合物或组合物被批准用于施用至哺乳动物例如人,用于蛋白激酶介导的疾病或病状;本文所述的试剂盒可以包括书面使用说明和/或所述化合物或组合物适用于或批准用于施用至哺乳动物例如人以用于蛋白激酶介导的疾病或病状的其他指示;并且所述化合物或组合物可以单位剂量或单剂量形式包装,例如单剂量丸剂、胶囊等。

### 实施例

[0163] 实施例1:赛度替尼在2  $\mu$ M下针对15 DLBCL细胞系具有广泛活性。

[0164] 材料和方法:DLBCL细胞系活力测定

[0165] 使用CellTiter Glo (Promega)测定在384孔板中使用十点浓度反应曲线筛选自ATCC的细胞系以生成IC<sub>50</sub>。每个IC<sub>50</sub>值是至少四个重复实验的平均值。进行使用基于FACS的半胱天冬酶3裂解检测试剂盒(BD Biosciences)的随后分析和Edu掺入。

[0166] 赛度替尼在DLBCL细胞系中证实相对于更靶向药剂的广泛抗肿瘤活性。以下表1汇总了与其他相关激酶抑制剂相比的赛度替尼IC<sub>50</sub>值:PRT06318 (Syk抑制剂,其描述于美国专利6,432,963中);InSolution™ JAK抑制剂I (CAS 457081-03-7;表3中的“Pan-Jak”);CP-690550 (Jak3抑制剂);艾代拉里斯(PI3K $\delta$ 抑制剂);IPI-145(PI3K $\delta$ 和 $\gamma$ 抑制剂);以及多柔比星(“Doxo”;蒽环类抗生素)。这些抑制剂可商购获得并且根据本领域技术人员已知的合成方法制备。

[0167] 表1

[0168]

细胞系	CellTiter Glo 测定中的激酶抑制剂的 IC <sub>50</sub>						
	赛度替尼	PRT06-318	Pan-Jak	CP690550	艾代拉里斯	IPI-145	Doxo
LY18	1.0	2.8	0.8	50	3.8	0.96	0.06
VAL	2.7	4.5	5.2	50	29	21	0.22
DHL6	1.2	0.9	2.63	50	0.03	0.002	0.14
LY10	0.29	0.31	5.1	50	12	5.7	0.04
DHL4	1.4	1.1	50	28	12	3.7	0.10
DHL5	0.31	0.44	39	41	1.3	0.33	0.03
U2932	2.6	8	3.9	50	40	27	0.35
LY1	4.4	10	0.7	50	4.9	1.3	0.19
DHL10	2.3	20	40	50	12	4.1	0.30
LY7	1.9	9	34	50	13	25	0.14
DHL8	3.1	19	28	38	49	45	0.15
DLCL2	5.4	9	42	50	15	5	0.18
DB	14	30	21.4	50	42	50	0.37
TOLEDO	6.9	15	5.9	41	50	18	0.44
RCK8	15.6	22	43	50	50	50	0.20

[0169] 在表示ABC和GCB亚型的15种细胞系的组中,9种经历细胞凋亡并且另外2经历细胞周期停滞。在4种细胞系中观察到SYK和JAK抑制的协同效应,而3种细胞系对SYK抑制敏感但对JAK抑制不敏感,并且1种细胞系对JAK抑制敏感但对SYK抑制不敏感。15种细胞系中的三种(DB、TOLEDO和RCK8)对赛度替尼有抗性。

[0170] 表1还显示含有CD79突变的LY10 (OCI-LY10)细胞系对赛度替尼敏感。表1进一步证实缺乏I $\kappa$ B- $\alpha$ 表达的细胞系RCK8可以导致对赛度替尼的抗性。基于这些观察,考虑到赛度替尼可以适用于治疗携带CD79突变的患者但不适用于携带I $\kappa$ B家族成员的缺失的患者。

[0171] 图1和图2分别描绘了显示通过FACS分析得到的Edu掺入的抑制百分比和半胱天冬酶3裂解的诱导百分比的条形图。

[0172] 以上数据表明赛度替尼在2  $\mu$ M下针对DLBCL细胞系有广泛活性并且主要通过诱导细胞凋亡来起作用。

[0173] 考虑到赛度替尼适用于治疗B细胞白血病和淋巴瘤,诸如DLBCL。

[0174] 实施例2:赛度替尼对原代人CLL细胞的作用

[0175] 24个原代CLL样品中的赛度替尼

[0176] CLL细胞分离和培养:使用人B细胞富集混合试剂盒(Stemcell Technologies, Vancouver, BC, Canada)纯化CLL细胞(来自患者全血)并且用抗-CD5/CD19染色以验证纯度,对于所有情况所述纯度大于95%。将分离的CLL细胞以 $1 \times 10^7$ 个细胞/mL的密度在具有15%胎牛血清(Gibco, Grand Island, NY, USA)、青霉素(100 IU)和链霉素(100  $\mu$ g/mL)的RPMI-1640中在2.5 mg/mL CpG、100 ng/mL CD40L、10 ng/mL IL-4存在或不存在下培养。使用板结合抗IgM (10  $\mu$ g/mL)进行抗-IgM刺激。用10 ng/mL IL-6 (R&D Systems, Minneapolis, MN)刺激CLL细胞,以检测JAK1/JAK2 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA)和STAT3 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA)的磷酸化。

[0177] 细胞活力测定和IC<sub>50</sub>测定:来自CLL患者的分离的CD5<sup>+</sup>/CD19<sup>+</sup>细胞使用或未使用增加浓度的赛度替尼( $10^1$ - $10^5$  nM)孵育72小时并且如先前所述通过用2  $\mu$ g/mL碘化丙啶(PI)(Molecular Probe)测量细胞活力。活细胞门内的一万个事件通过FACS LSR2 (BD

Biosciences) 计数并且将数据归一化至每个样本匹配的媒介物对照 (100%)。然后使用 GraphPad Prism 6 程序 (San Diego, CA, USA) 生成  $IC_{50}$ 。

[0178] 共同培养条件: 人骨髓基质细胞系 HS-5 从 ATCC 获得并且 NK-Tert (NK Tert) 由 Jan A. Burger 博士 (M.D. Anderson) 惠赠, 先前已描述 CLL 细胞和基质细胞共同培养测定 (例如 Cheng 等人, *Leukemia*. 2014; 28 (3): 649-657)。简言之, 将基质细胞以  $5 \times 10^4$  个/孔的浓度接种在 24 孔板中并孵育 24 小时以允许细胞附着。然后将 CLL 细胞以 100:1 ( $5 \times 10^6$  个细胞/mL) 的比率添加到培养物中, 在 RPMI 培养基中的基质细胞融合层上。通过轻轻吸移来收获 CLL 细胞, 使附着基质细胞层保持完整。

[0179] 具有系列稀释的赛度替尼的原代 CLL 样品在 72 小时之后通过 PI/7AAD 流式细胞术测量细胞活力。

[0180] 在 IL-4/CD40L 存在或不存在下使用双重 SYK/JAK 抑制剂赛度替尼处理二十四个原代 CLL 样品并且使用碘化丙啶/膜联蛋白 V 染色和 PARP 裂解评定细胞凋亡。通过免疫印迹法和流式细胞术评定赛度替尼对 B 细胞受体和细胞因子受体诱导的信号传导的作用。

[0181] 将来自 24 位患者的 CLL 细胞用赛度替尼处理 24、48 和 72 小时并且使用碘化丙啶/膜联蛋白 V 染色评定活力。赛度替尼以浓度和时间依赖性方式诱导细胞凋亡。

[0182] 未突变的 IGHV 和高表达的 CD49d 与进展性疾病和 CLL 的较差预后相关。对于治疗性用途重要的是, 赛度替尼在 U-CLL 中与 M-CLL 相比并且在具有高 CD49d 或 ZAP70 表达 (>30%) 的 CLL 细胞中与具有低 CD49d 或 ZAP70 表达 (<30%) 的 CLL 细胞相比诱导显著更大的细胞凋亡。

[0183] 发现用赛度替尼处理 CLL 细胞诱导促细胞凋亡半胱天冬酶 3 蛋白的裂解/活化并且还增加细胞凋亡标记 85 kDa PARP 亚片段的水平。赛度替尼诱导的细胞凋亡通过用半胱天冬酶抑制剂 ZVAD 共同处理来抑制, 这指示 CLL 细胞的赛度替尼诱导的细胞凋亡通过半胱天冬酶依赖性机制来发生。另外, 在 ZVAD 存在下在赛度替尼处理 24 小时之后促细胞凋亡蛋白 NOXA 的水平增加, 同时抗细胞凋亡蛋白 MCL1 降低。

[0184] 淋巴结中 BCR 的连接增强 CLL 存活和对化学疗法的抗性。赛度替尼预处理能够抑制可溶性抗-IgM 和固定化的抗-IgM 诱导的信号传导途径。IL-4 在 CLL 细胞中通过 JAK/STAT-6 途径发送信号并且已显示在介导免于化学疗法的影响方面是重要的。用赛度替尼处理 CLL 细胞取消了 IL-4 诱导的 STAT6 磷酸化。另外, 赛度替尼在 ZVAD 存在下 24 小时之后抑制 IL-4 增加的表面 IgM 表达。

[0185] 在患者中, 淋巴结组织部位提供保护 CLL 细胞免于细胞凋亡的各种信号。因此已使用 IL-4 和 CD40L 在体外模拟淋巴结环境。IL-4/CD40L 处理在 24 小时之后与未处理细胞相比增加 CLL 细胞的活力。

[0186] 此实施例显示用赛度替尼处理原代人 CLL 细胞诱导半胱天冬酶依赖性细胞凋亡, 在 CLL 样品不良预后标记中具有增加的功效; 赛度替尼以患者中可达到的浓度 ( $\sim 2.2 \mu\text{M}$ ) 超过 BCR 和 IL-4 介导的信号传导; 并且赛度替尼在 IL-4/CD40L 支持物存在或不存在下诱导细胞凋亡。

[0187] 个 CLL 样品中的赛度替尼

[0188] 在根据以上所述的方法分析的 60 个 CLL 样品中, 60 个 CLL 中的  $IC_{50}$  范围是 0.37 至  $10.02 \mu\text{M}$ 。所述组的赛度替尼的平均  $IC_{50}$  为  $2.57 \mu\text{M}$ , 这是临床上可达到的。

[0189] 无论由赛度替尼进行的细胞杀伤是否不同, 还研究由已知预后因素分层的 CLL 亚

组。已发现具有未突变的IGHV (N=33) 对比突变的IGHV (N=27) 的CLL细胞具有较低 $IC_{50}$ 并且因此对赛度替尼更敏感( $P=0.0395$ ) (使用Student检验分析的数据) (图5)。具有高风险遗传异常(包括del (11q)、三体性12和del (17p)) 的CLL细胞与具有del (13q) 或缺乏全部这些特异性遗传异常现象的那些细胞相比对赛度替尼更敏感(图6)。因此,CLL细胞对赛度替尼敏感,尤其是在通过IGHV和细胞遗传学得到不良预后的情况下。

[0190] 还考虑到,如通过例如Zap70所证明的,赛度替尼也将适用于不良预后的情况。

[0191] 实施例3:赛度替尼I期研究的临床和相关结果

[0192] 在患有复发性/难治性CLL/SLL或B细胞非霍奇金氏淋巴瘤(NHL) 的患者中进行赛度替尼的首次人研究。进行具有28天周期的3+3剂量递增研究;研究的剂量范围是每日一次15 mg至65 mg和每日两次高达45 mg。患者在第1天接受单剂量,持续72小时PK评价。在第4天开始连续给药。向患有CLL/SLL或B细胞NHL的43位患者给药。中值年龄为67岁(范围23-85)并且中值先前疗法(tx)为3 (范围1-8)。

[0193] 监测药代动力学(“PK”)、药效动力学(“PD”) 和安全性。通过标准准则评定响应。使用多种全血测定来确定SYK和JAK的抑制水平,从而测量通过B细胞抗原、IL2、IL4、IL6和GM-CSF的受体进行的信号传导。还测量肿瘤负荷的血清标记,包括CCL3、CCL4和其他炎症标记( $\beta 2M$ 和CRP)。

[0194] 观察到,PK适用于每日给药一次,其半衰期为12-16小时并且峰谷比为2:1。在第1周期的第28天,在循环淋巴细胞中SYK和JAK的饱和抑制(80%-90%抑制) 和血清炎症标记(例如 $\beta 2M$ 、CRP、CCL4;50%-90%抑制) 发生在约0.6至1  $\mu M$ 的血浆浓度下,在40 mg剂量的 $C_{min}$ 下实现。在65 mg剂量下,这些参数在第1周期第1天得到80%-90%抑制,这指示与较低剂量相比更直接的作用。在65 mg剂量下,稳态 $C_{min}$ 和 $C_{max}$ 浓度分别为大约1和2  $\mu M$ ,足以在大部分测试的B细胞淋巴瘤细胞系中诱导细胞凋亡。

[0195] 通常,赛度替尼已良好耐受。总计十位患者已持续服用赛度替尼超过200天,包括服用一年或更长时间的2位。

[0196] 表2汇总在口服给药之后稳态药代动力学的数据,其中n = 28。

[0197] 表2. 在口服给药之后的稳态PK



[0198]

剂量组	SS Cmin $\mu\text{M}$	SS Cmax $\mu\text{M}$	SS Cave $\mu\text{M}$	AUC_tau $\mu\text{M}\cdot\text{h}$	T <sub>1/2</sub> h
15 mg/天	0.12 $\pm$ 0.04	0.38 $\pm$ 0.04	0.19 $\pm$ 0.03	4.5 $\pm$ 0.8	11.5 $\pm$ 3.9
30 mg/天	0.21 $\pm$ 0.12	0.63 $\pm$ 0.18	0.31 $\pm$ 0.12	7.5 $\pm$ 3.0	12.3 $\pm$ 6.8
40 mg/天	0.87 $\pm$ 0.07	1.48 $\pm$ 0.15	1.14 $\pm$ 0.03	27.3 $\pm$ 0.8	32.8 $\pm$ 17.0
45 mg/天*	0.82 $\pm$ 0.6	1.69 $\pm$ 0.6	1.11 $\pm$ 0.6	26.6 $\pm$ 13.9	22.3 $\pm$ 15.5
50 mg/天	0.90 $\pm$ 0.14	2.07 $\pm$ 0.54	1.31 $\pm$ 0.41	31.36 $\pm$ 9.95	NA
每日两次 ("BID")方 案					
15 mg/每日 两次	0.29 $\pm$ 0.11	0.53 $\pm$ 0.13	0.39 $\pm$ 0.11	4.7 $\pm$ 1.3	11.2 $\pm$ 4.3
20 mg/每日 两次	0.38 $\pm$ 0.02	0.89 $\pm$ 0.16	0.52 $\pm$ 0.09	6.2 $\pm$ 1	8.4 $\pm$ 1.8

[0199] \*PK异常值(稳态C<sub>max</sub>为0.15  $\mu\text{M}$ )从所述组去除。

[0200] 其中n = 20,在45 mg BID的剂量组中,观察到以下值:C<sub>min</sub> = 1.27  $\pm$  0.6  $\mu\text{M}$ ; C<sub>max</sub> = 2.16  $\pm$  0.5  $\mu\text{M}$ ; C<sub>ave</sub> = 1.4  $\pm$  0.7  $\mu\text{M}$ ; AUC\_tau = 33.3  $\pm$  15.9  $\mu\text{M}\cdot\text{h}$ ; T<sub>1/2</sub> = 27.5  $\pm$  22.5 h。

[0201] 观察到的是,在单一65 mg剂量的赛度替尼之后在来自FL患者的全血中观察到BCR信号传导的完全抑制。

[0202] 表3汇总了PK/PD数据,其中n = 43。

[0203] 表3. 剂量组的PK/PD



[0204]

剂量组	SS C <sub>min</sub> μM	SS C <sub>max</sub> μM	SS C <sub>ave</sub> μM	AUC <sub>tau</sub> μM*h	T <sub>1/2</sub> h	% Inh.BCR (C <sub>min</sub> -C <sub>max</sub> )	% Inh.IL4 (C <sub>min</sub> -C <sub>max</sub> )
						从所有数据拟合的 PK/PD 推导	
15 mg/天	0.12 ± 0.04	0.38 ± 0.04	0.19 ± 0.03	4.5 ± 0.8	11.5 ± 3.9	22 – 55%	16 – 42%
30 mg/天	0.21 ± 0.12	0.63 ± 0.18	0.31 ± 0.12	7.5 ± 3.0	12.3 ± 6.8	31 – 83%	26 – 57%
40 mg/天	0.87 ± 0.07	1.48 ± 0.15	1.14 ± 0.03	27.3 ± 0.8	32.8 ± 17.0	92 – 100%	63 – 78%
45 mg/天	0.82 ± 0.6	1.69 ± 0.6	1.11 ± 0.6	26.6 ± 13.9	22.3 ± 15.5		
50 mg/天	0.79 ± 0.37	1.57 ± 0.94	0.99 ± 0.62	23.8 ± 14.9	39.0 ± 12.4		
65 mg/天	0.76 ± 0.04	1.67 ± 0.09	1.01 ± 0.03	24.2 ± 0.7	25.1 ± 6.5		
100 mg/天 (一位患者)	0.37	1.11	0.68	16.3	14.4	53 – 98%	41 – 72%
15 mg/每日两次	0.29 ± 0.11	0.53 ± 0.13	0.39 ± 0.11	4.7 ± 1.3	11.2 ± 4.3	42 – 74%	34 – 51%
20 mg/每日两次	0.38 ± 0.02	0.89 ± 0.16	0.52 ± 0.09	6.2 ± 1	8.4 ± 1.8	55 – 95%	42 – 66%
45 mg/每日两次	1.48 ± 0.33	1.8 ± 0.7	1.5 ± 0.45			100 – 100%	95 – 95%

[0205] 回顾40-100 mg QD剂量,平均稳态(SS) C<sub>min</sub>和C<sub>max</sub>浓度分别在0.77 ± 0.41和1.63 ± 0.56 μM下达到平衡,并且发现平均稳态(SS) C<sub>ave</sub>浓度为1.07 ± 0.44 μM,BCR (C<sub>min</sub> - C<sub>max</sub>)的抑制%为92% - 100%,并且IL4 (C<sub>min</sub> - C<sub>max</sub>)的抑制%为63% - 78%。40-100

mg的QD给药导致周围血液中50%至100% (稳态 $C_{min}$ 至 $C_{max}$ ) SYK和JAK信号传导抑制以及炎症血清标记的显著抑制。

[0206] 基于这些结果,考虑到10 mg至约75 mg的日剂量的赛度替尼适用于治疗有需要的患者中的血液癌症。

[0207] SYK和JAK信号传导抑制以及炎症血清标记抑制的程度与肿瘤响应显著相关。虽然PK适用于具有12-16小时的 $t_{1/2}$ 和2:1峰谷比的QD给药,但是考虑到pH依赖性低溶解度限制溶解并且生理建模表明BID给药将增加总体暴露。

[0208] 这可以使用45 mg BID剂量来实现,其中观察到在外周血液测定中在SS  $C_{min}$  下的SYK和JAK完全抑制,与暴露中的近似倍增一致。在45 mg BID剂量下,将SS  $C_{min}$  增加至浓度约1.5  $\mu$ M,这足以在临床前肿瘤模型中使用原代细胞和细胞系诱导细胞凋亡。在患者中45 mg BID剂量的后续评价表明以此剂量水平治疗的所有患者的 $C_{min}$ 、 $C_{max}$  和AUC值较高并且PD标记指示两种路径的完全抑制。

[0209] 治疗突现的 $\geq 3$ 级不良事件(“AE”)似乎与研究相关并且在2位或更多位患者中发生以下事件:疲劳(n=5)、贫血和中性粒细胞减少症(各自n=3)、以及腹痛、中性粒细胞计数减少、以及肺炎(各自n=2)。在45 mg BID剂量下实现最高总体暴露,其中发生2次剂量限制性毒性(“DLT”):3级胰腺炎和3级疲劳。

[0210] 基于PK/AE曲线,似乎在1.25-1.5  $\mu$ M或更大的SS  $C_{min}$  下存在更高级的不良事件。PK建模指示35 mg BID的剂量将得到1.02  $\mu$ M的SS  $C_{min}$ 、1.3  $\mu$ M的SS  $C_{max}$ 、1.2  $\mu$ M的SS  $C_{ave}$ 、100 - 100% BCR抑制( $C_{min} - C_{max}$ )、以及90 - 95% IL4抑制( $C_{min} - C_{max}$ ),这预测是耐受的、有效的并且提供一致的抗肿瘤活性。

[0211] 在0.7  $\mu$ M的SS  $C_{min}$ 情况下在复发性/难治性CLL和FL患者中观察到一致的肿瘤响应。

[0212] 在患有CLL、FL和转化的FL (在3B的级别)的5位严重预处理患者中在范围为30-65 mg QD的剂量下观察到部分响应。在45 mg BID剂量组中观察到两个部分响应,一个在患有FL的患者中并且另一个在患有CLL的患者中。通常在2个治疗周期之后出现响应。多位患者已证明结节减小并在一年内维持临床益处。

[0213] 结论

[0214] 赛度替尼在患有淋巴恶性肿瘤的受试者中良好耐受。赛度替尼证实在高水平的SYK和JAK抑制下的有利PK曲线和良好耐受性。PK数据支持每日一次给药,在 $C_{min}$  下维持大量抑制。具有最大抑制的SYK/JAK信号传导的剂量依赖性和选择性抑制大于80%;未检测到JAK2或PKC的抑制。BCR信号传导途径在稳态 $C_{min}/C_{max}$  下得到90%-100%抑制,JAK/STAT信号传导在 $C_{min}/C_{max}$  下得到60%-80%抑制。PK数据指示来自每日口服一次40 mg至100 mg的暴露坪值,从而导致在稳态 $C_{min}$  下的次微摩尔暴露(约0.7  $\mu$ M)。考虑到溶解度可能是原因。BID给药克服暴露中的此坪值并且具有增强的PD效应。

[0215] 赛度替尼显著减少血液中的多种血清蛋白,所述蛋白是炎症标记,诸如 $\beta$ 2M、CRP、TNFR以及CCL3/4。在肿瘤响应与炎症血清标记(例如 $\beta$ 2M和CCL4)抑制之间观察到显著相关性。

[0216] 赛度替尼在严重预处理患者中具有有前景的活性。这些数据证实患有复发性/难治性B细胞恶性肿瘤的患者在此研究中的临床活性的证据。迄今为止,已观察到部分响应,

包括在患有CLL、FL和DLBCL的患者中。在多位患者中发现肿瘤减小,包括其疾病在用其他BCR途径抑制剂后进展(或不耐受其他BCR途径抑制剂)的那些患者。观察到淋巴球增多的证据,如使用其他BCR途径抑制剂看到的。结果还显示赛度替尼在这些严重预治疗的患者中良好耐受。

[0217] 这些结果(包括部分响应)提供赛度替尼在患有复发性或难治性血液癌症的患者中有活性并良好耐受的另外的证据。

[0218] 实施例4:发现赛度替尼阻断依鲁替尼敏感和依鲁替尼抗性的原代CLL细胞和BTK<sup>C481S</sup>转染的细胞系的增殖。

[0219] 依鲁替尼购自Selleckchem (Houston, TX, USA)。

[0220] 细胞分离和培养:使用人B细胞富集混合试剂盒(Stemcell Technologies, Vancouver, BC, Canada)纯化CLL细胞并且用抗-CD5/CD19(分别为克隆HIB19和UCHT2, eBioscience, San Diego, CA)染色以验证纯度,对于所有情况所述纯度大于95%。将分离的CLL细胞以 $1 \times 10^7$ 个细胞/mL的密度在具有15%胎牛血清(Gibco, Grand Island, NY)、青霉素(100 IU)和链霉素(100  $\mu$ g/mL)的RPMI-1640中在2.5 mg/mL CpG (ODN2006, 刺激性CpG-ODN B型, 人特异性的, 购自Invivogen (San Diego, CA))、100 ng/mL CD40L (Enzo Life Sciences, Plymouth Meeting, PA)、10 ng/mL IL-4 CD40L (Enzo Life Sciences, Plymouth Meeting, PA)存在或不存在下培养。使用板结合抗IgM (10  $\mu$ g/mL)进行抗-IgM刺激。

[0221] 细胞增殖测定:将溴脱氧尿苷(BrdU)添加到具有组合刺激的8天培养物中(2.5 $\mu$ g/mL CpG、100 ng/mL CD40L、10 ng/mL IL-4以及10  $\mu$ g/mL板结合抗-IgM)。通过流式细胞术使用BrdU Flow试剂盒(BD Biosciences)根据制造商说明书来分析BrdU<sup>+</sup>细胞百分比。

[0222] BTK C481S和T316A突变体构建体的生成:pCMV6表达载体中的BTK野生型(WT) cDNA克隆购自ORIGENE (Rockville, MD USA)。BTK<sup>C481S</sup>和BTK<sup>T316A</sup>突变体载体使用QuikChange II定点诱变试剂盒(Agilent Technologies, Cedar Creek, TX, USA)遵循制造商说明书来生成。通过Sanger测序确认突变体构建体的身份。

[0223] 细胞转染、细胞计数和活力测定:使用试剂盒V、Amaya Nucleofector上的程序U-13根据制造商方案(Amaxa, Cologne, Germany)用WT BTK或BTK<sup>C481S</sup>突变体的构建体转染TMD8细胞。在转染之后,在24孔板中将细胞与NKTert细胞共同培养24 h以用于回收。然后将依鲁替尼、赛度替尼和媒介物(DMSO)添加到转染的TMD8细胞中并且使用Muse<sup>™</sup> Count & Viability试剂盒使用Muse Cell Analyzer (Millipore, Hayward, CA, USA)测定细胞活力。

[0224] 流式细胞术:如先前所述使用优化量的荧光染料缀合的mAb进行用于FACS分析的细胞染色(例如Cheng等人, *Leukemia*. 2014; 28 (3) :649-657)。简言之,在用洗涤缓冲液(1 $\times$  PBS, 0.5% BSA, 0.1% Na<sub>3</sub>)洗涤两次之后,将 $1 \times 10^6$ 个细胞悬浮于100  $\mu$ L洗涤缓冲液中并且用荧光染料缀合的mAb染色并在室温下孵育20 min。将细胞以Perm/Wash缓冲液洗涤两次,之后通过流式细胞术扫描。对于细胞内磷物质流分析,将新鲜分离的CLL细胞立即用2%-4%多聚甲醛固定并保存在-80 $^{\circ}$ C下。将低温保存的细胞在室温下解冻并且在冰上用50%甲醇渗透4 h。将 $1 \times 10^6$ 个细胞悬浮于100  $\mu$ L洗涤缓冲液中并且用荧光染料缀合的mAb染色并在室温下孵育20 min。然后使用LSR2流式细胞仪(BD Biosciences)进行流式细胞术,并且使

用FlowJo软件(FLOWJO LLC, Ashland, OR, USA)分析数据。

[0225] 在组合刺激的条件下用250 nM依鲁替尼或赛度替尼处理在依鲁替尼治疗之前从响应于依鲁替尼的患者中分离的原代细胞。在第8天测量BrdU掺入。这些细胞同样良好响应于此浓度下的任一药物。

[0226] 还对从三位依鲁替尼复发性患者分离的细胞进行类似实验。这些样品携带赋予依鲁替尼抗性的BTK突变。两位患者具有已知的突变BTK<sup>C481S</sup>, 并且另一个患者具有BTK<sup>T316A</sup>。每日计数活细胞数目, 持续7天。

[0227] 当针对依鲁替尼和赛度替尼测试这些突变的细胞时, 在依鲁替尼处理之后留下大量的BrdU<sup>+</sup> CLL细胞, 而赛度替尼在所有三种情况下几乎完全阻断BrdU<sup>+</sup>细胞群体的出现。这些实验证明赛度替尼不仅阻断依鲁替尼敏感性CLL细胞中的细胞增殖, 而且也阻断依鲁替尼抗性CLL细胞中的细胞增殖。

[0228] 为了测试赛度替尼是否直接抑制依鲁替尼抗性细胞的生长, 构建BTK<sup>C481S</sup>和野生型BTK (WT) 表达载体, 克隆并且然后转染到依鲁替尼敏感性淋巴瘤细胞系TMD8中。评定在暴露于依鲁替尼或赛度替尼之后的细胞生长。

[0229] 观察到WT BTK转染的TMD8细胞的生长被250 nM的依鲁替尼和赛度替尼类似地抑制(图3)。然而, 正如预期的, BTK<sup>C481S</sup>-转染的细胞对依鲁替尼的敏感性较小(图4)。同时, 这些细胞的生长通过赛度替尼有效地阻断, 类似于WT BTK细胞中观察到的阻断。

[0230] 实施例5: 患有滤泡性淋巴瘤的患者的病例研究

[0231] 病例研究1 (患者1): 患者是71岁患有转化的滤泡性3B淋巴瘤的高加索人女性(通过IHC得到MYC/BCL2/BCL6阳性)。肿瘤为CD20+、CD10-、BCL2 (强)、cMYC (50%) 以及Ki67 (80%)。

[0232] 患者的先前疗法包括: R-CHOP (利妥昔单抗; 环磷酰胺; 盐酸多柔比星; 长春新碱; 泼尼松) (2013年11月-2014年2月)。患者在2015年2月复发。患者在2015年3月开始每日一次口服(“PO QD”)赛度替尼65 mg。

[0233] 观察到以下各项: 稳态C<sub>min</sub>-C<sub>max</sub>为0.73-1.74 μM; BCR信号传导抑制%为100%; IL2、IL4、IL6信号传导抑制%为60%-100%; 并且GM-CSF抑制%为~20%。患者在2个周期之后显示对赛度替尼的部分响应(69%)。

[0234] 患者1在2015年8月进展。患者1在5个治疗周期之后复发。

[0235] 病例研究2 (患者2): 患者为患有滤泡性淋巴瘤的71岁高加索人女性。

[0236] 患者先前疗法包括: 苯丁酸氮芥(1998; CR)、氟达拉滨/美罗华(1999-2000; CR) 以及阿瓦斯汀/美罗华(2011年3月-2012年1月)。患者2在2014年9月复发。患者2在2014年10月开始PO QD赛度替尼45 mg, 并且剂量由于疲劳而减少至30 mg。

[0237] 观察到以下各项: 稳态C<sub>min</sub>-C<sub>max</sub>为0.25-0.63 μM。BCR信号传导抑制%; 对于pSYK Y525/525为90%, 对于pERK Y204为0%; IL2、IL4、IL6信号传导抑制%为60%-100%; GM-CSF抑制%为0%; 在2个周期之后对赛度替尼的部分响应(56%) 并且在一年治疗之后76%结节减少。

[0238] 患者2保持服用药物。

[0239] 病例研究3 (患者3): 患者为患有滤泡性淋巴瘤的79岁高加索人男性。患者肿瘤携带STAT中的S86A突变。

[0240] 患者先前疗法: R-CVP (利妥昔单抗; 环磷酰胺; 长春新碱; 泼尼松龙) (2006-

2007)、R-维持(2006-2008)、BR(苯达莫司汀;利妥昔单抗)(5/2013-9/2013)、依鲁替尼(10/2013-4/2014)、R-CHOP(12/2013-4/2014)。患者3在2014年5月复发。患者3在2014年6月通过口服每日给予两次(“PO BID”)赛度替尼15 mg。在持续6个月服用赛度替尼的患者3中观察到稳定的疾病(20%结节减小)。

[0241] 这些病例研究显示,赛度替尼迄今为止在患有滤泡淋巴瘤的严重预处理患者中耐受良好并且具有有前景的活性。在其他非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)中已看到响应。

[0242] 实施例6:使用赛度替尼和ABT-199(维奈托克)组合观察到的协同作用

[0243] 使用Cell Titer Glo测定来确定DLBCL细胞系中的协同抗肿瘤活性。简言之,将5,000个细胞接种在96孔板的全组织培养基中。将赛度替尼和维奈托克以单独药剂形式以6个不同浓度范围(10、3、1、0.3、0.1、0.03  $\mu\text{M}$ )或者在赛度替尼与维奈托克以1:1、1:2、1:9、2:1和9:1比率组合之后应用于细胞。将细胞使用或不使用药物在37°C组织培养孵育器中孵育72小时,之后通过CellTiter Glo按照制造商方案(Promega)评价。如任何其他地方所述(Jacquement等人, Molecular Cancer 2012),在使用Prism软件进行 $\text{IC}_{50}$ 测定之后通过计算组合指数评分来评价协同作用。化合物可商购获得并且根据本领域技术人员已知的合成方法制备。

[0244] DLBCL细胞系

[0245] 如以下表4所示的(以 $\mu\text{M}$ 示出的 $\text{IC}_{50}$ ),ABT-199和赛度替尼在DLBCL细胞系中证实了协同效应。DLBCL细胞系购自ATCC。强协同作用被认为是在0.1-0.3范围内(在括号中);中等协同作用被认为是在0.3-0.6范围内;轻度协同作用被认为是在0.6-0.8范围内;累加效应被认为是在0.8-1.2范围内;并且轻度拮抗作用被认为是在>1.2范围内。

[0246] 表4

细 胞 系	赛 度 替 尼	ABT-19 9	1:1(Cl)	1:2(Cl)	1:9(Cl)	2:1(Cl)	9:1(Cl)
DHL4	1.4 9	1.63	0.57(0.42)	0.61(0.39)	1.07(0.66)	0.66(0.43)	0.75(0.50)
DHL1 0	0.3	3.7	0.65(1.17)	0.9(1.16)	2.07(1.19)	0.71(1.64)	0.46(1.39)
Ly1	4.3	0.75	0.74(0.58)	0.64(0.62)	0.63(0.77)	1.1(0.66)	2(0.69)
VAL	1.3	4.3	1.8(0.90)	2.1(0.86)	1.2(0.34)	0.88(0.52)	0.87(0.62)
DHL6	0.6 2	0.023	0.028(0.6 3)	0.019(0.5 6)	0.005(0.2 0)	0.035(0.5 4)	0.096(0.5 6)
Toled o	5.1	0.23	0.19(0.43)	0.15(0.44)	0.14(0.55)	0.24(0.38)	0.7(0.43)
U2932	3.7 3	0.49	0.18(0.21)	0.19(0.26)	0.26(0.48)	0.19(0.16)	0.32(0.14)

[0248] 在SU-DHL4细胞系中,赛度替尼展现出1.49  $\mu\text{M}$ 的 $\text{IC}_{50}$ 值,而ABT-199展现出1.63  $\mu\text{M}$ 的 $\text{IC}_{50}$ 值。相比之下,1:1比率的赛度替尼与ABT-199展现出0.57  $\mu\text{M}$ 的 $\text{IC}_{50}$ 值。类似地,在U2932细胞系中,赛度替尼展现出3.73  $\mu\text{M}$ 的 $\text{IC}_{50}$ 值,而ABT-199展现出0.49  $\mu\text{M}$ 的 $\text{IC}_{50}$ 值。相比之下,1:1比率的赛度替尼与ABT-199展现出0.18  $\mu\text{M}$ 的 $\text{IC}_{50}$ 值。



[0249] CLL原代细胞

[0250] 将CLL细胞用IL-4/CD40L处理6小时并且然后用单独或组合的ABT-199或赛度替尼孵育另外24小时。ABT-199在IL-4/CD40L不存在下与赛度替尼或媒介物对照相比显著减少CLL细胞活力。用IL-4/CD40L处理保护CLL细胞免于ABT-199诱导的细胞凋亡；然而，用赛度替尼处理将细胞活力减小至类似水平，无论使用或不使用IL-4/CD40L进行处理，以代表性样品示出(图7A)并且汇总(n=9)(图7B)。此外，用两种药物的组合处理CLL细胞与任一单独药物相比在更大程度上减小CLL细胞活力。

[0251] 使用先前对于CLL所述的分级2-药物分析方法，评价赛度替尼与ABT-199之间的协同相互作用。超过对角线的值表示累加相互作用并且低于所述线的那些值为协同作用的。在IL4/CD40L存在下，在大部分样品(n=8/9)中观察到协同关系(图7C)。

[0252] 在来自CD40L和IL-4的微环境支持存在下，赛度替尼与ABT-199组合协同产生更大水平的CLL细胞死亡。

[0253] 本文所提供的数据进一步证实由ABT-199和赛度替尼引起的协同效应。数据还指示赛度替尼与Bcl-2/Bcl-XL抑制剂的组合也可以是有用的。

[0254] 实施例7：使用赛度替尼和依鲁替尼组合观察到的协同作用

[0255] 使用Cell Titer Glo测定来确定DLBCL细胞系中的协同抗肿瘤活性。简言之，将5,000个细胞接种在96孔板的全组织培养基中。将赛度替尼和依鲁替尼以单独药剂形式以6个不同浓度范围(10、3、1、0.3、0.1、0.03  $\mu\text{M}$ )或者在赛度替尼与依鲁替尼以1:1、1:2、1:9、2:1和9:1比率组合之后应用于细胞。将细胞使用或不使用药物在37°C组织培养孵育器中孵育72小时，之后通过CellTiter Glo按照制造商方案(Promega)评价。如任何其他地方所述(Jacquement等人, Molecular Cancer 2012)，在使用Prism软件进行 $\text{IC}_{50}$ 测定之后通过计算组合指数评分来评价协同作用。化合物可商购获得并且根据本领域技术人员已知的合成方法制备。

[0256] 如以下表5所示，依鲁替尼和赛度替尼确实显示了协同效应的结果。强协同作用被认为是在0.1-0.3范围内(在括号中)；中等协同作用被认为是在0.3-0.6范围内；轻度协同作用被认为是在0.6-0.8范围内；累加效应被认为是在0.8-1.2范围内；并且轻度拮抗作用被认为是在>1.2范围内。

[0257] 表5

细胞系	赛度替尼	依鲁替尼	1:1(CI)	1:2(CI)	1:9(CI)	2:1(CI)	9:1(CI)
[0258] DHL4	1.7	3.1	1.6(0.73)	2.1(0.85)	2.4(0.84)	1.5(0.74)	1.2(0.67)
DHL10	0.22	1.89	0.49(1.24)	0.53(0.99)	1.14(1.18)	0.41(1.31)	0.25(1.04)
OCI-Ly1	4.3	0.75	0.74(0.58)	0.64(0.61)	0.63(0.77)	1.1(0.66)	2(2.45)
OCI-Ly18	1.33	1.24	0.5(0.39)	1.36(1.07)	0.76(0.61)	0.37(0.28)	0.4(0.30)
VAL	1.33	4.56	1.46(0.71)	1.57(0.62)	2.64(0.72)	0.98(0.56)	0.83(0.58)
DHL6	0.56	0.31	0.42(1.05)	0.27(0.74)	0.42(1.29)	0.43(0.97)	0.56(1.08)

[0259] 在OCI-Ly18细胞系中，赛度替尼展现出1.33  $\mu\text{M}$ 的 $\text{IC}_{50}$ 值，而依鲁替尼展现出1.24  $\mu\text{M}$ 的 $\text{IC}_{50}$ 值。相比之下，1:1比率的赛度替尼与依鲁替尼展现出0.5  $\mu\text{M}$ 的 $\text{IC}_{50}$ 值。类似地，在

U2932细胞系中,赛度替尼展现出3.73  $\mu\text{M}$ 的 $\text{IC}_{50}$ 值,而ABT-199展现出0.49  $\mu\text{M}$ 的 $\text{IC}_{50}$ 值。相比之下,1:1比率的赛度替尼与ABT-199展现出0.18  $\mu\text{M}$ 的 $\text{IC}_{50}$ 值。

[0260] 类似地,在VAL细胞系中,赛度替尼展现出1.33  $\mu\text{M}$ 的 $\text{IC}_{50}$ 值,而依鲁替尼展现出4.56  $\mu\text{M}$ 的 $\text{IC}_{50}$ 值。相比之下,2:1比率的赛度替尼与依鲁替尼展现出0.98  $\mu\text{M}$ 的 $\text{IC}_{50}$ 值。

[0261] 实施例8:  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ 的遗传或CD40L介导的损失与DLBCL细胞系中对双重SYK/JAK抑制剂赛度替尼的抗性相关

[0262] 在各种B细胞恶性肿瘤中观察到 $\text{NF}\kappa\text{B}$ 的调节异常,从而导致促使肿瘤进展的增殖和存活信号。在正常测试条件下, $\text{NF}\kappa\text{B}$ 在理论上通过其与 $\text{I}\kappa\text{B}$  ( $\text{NF}\kappa\text{B}$ 抑制剂) 家族成员物理缔合来负调节,从而抑制核转运或对DNA的接近。在B细胞中, $\text{NF}\kappa\text{B}$ 通过各种外部刺激(例如B细胞抗原受体、 $\text{tol1}$ 样受体、细胞因子受体、CD40) 来活化,从而导致 $\text{I}\kappa\text{B}$ 成员的IKK复合物依赖性磷酸化、靶向负调节蛋白以泛素化和降解。这些外部信号通过肿瘤本身以自分泌方式提供,或者通过肿瘤微环境提供。然而,在一些情况下,如在活化对CD79A/B、MYD88和CARD11的突变以及灭活负调节物诸如A20和 $\text{I}\kappa\text{B}$ 家族成员的上下文中已描述的,对外部刺激的需要通过 $\text{NF}\kappa\text{B}$ 的重要调节物的突变来影响或完全避开。

[0263] 赛度替尼在携带CARD11、MYD88和A20的突变的DLBCL细胞系中维持抗肿瘤活性。然而,DLBCL细胞系的子集展现出对用于存活的SYK和JAK信号传导的不同依赖程度,而在15种DLBCL细胞系中有3种完全赛度替尼抗性的。下一代测序揭示了在赛度替尼抗性细胞系之一RCK8中 $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ 基因的二等位基因灭活。一个等位基因携带外显子1中的移码突变,从而导致生成终止密码子,并且第二等位基因是外显子3中的Gln154处的无义突变,也导致终止密码子。细胞系缺乏蛋白质水平的 $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ 表达。因此继续探索 $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ 的损失对赛度替尼的抗性负责的可能性。

[0264] 与RCK8中 $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ 的损失一致,细胞系表现为具有增强的基质 $\text{NF}\kappa\text{B}$ 活性。野生型 $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ 的再表达导致 $\text{NF}\kappa\text{B}$ 快速抑制,并且最终导致细胞周期停滞和细胞死亡,这指示细胞系依赖于用于存活的此基因的损失。降低的细胞pAKT S473和pERK Y202与 $\text{NF}\kappa\text{B}$ 抑制相关,但pSTAT3 Y705与此无关。然后尝试在赛度替尼敏感性细胞系中使用siRNA敲低 $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ 以确定是否可以生成对SYK/JAK抑制的抗性。没有测试的DLBCL细胞系( $n=4$ ) 可以耐受 $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ 基因敲除,然而,这表明RCK8中的另外突变使得能够在 $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ 的纯合损失的条件存活。CD40的连接导致蛋白质水平下的 $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ 瞬时下调。因此在多种DLBCL细胞系中表征此情况并且发现 $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ 在CD40刺激后30-60分钟内最大抑制,在2-4小时恢复至预处理水平。然而对 $\text{NF}\kappa\text{B}$ 活化的影响时间更长,在7种测试的赛度替尼敏感性细胞系中,通过与CD40L共同培养来使5种细胞系有抗性。不仅 $\text{NF}\kappa\text{B}$ 的诱导与此抗性相关,而且pERK Y204、pAKT S473和pSTAT3 Y705也与其相关。有趣的是,CD40L诱导的 $\text{NF}\kappa\text{B}$ 活化未通过赛度替尼抑制,而其他信号传导事件被抑制,尽管生成抗性。

[0265] 总之,已证实 $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ 的损失与赛度替尼抗性DLBCL细胞系RCK8中增强的基质 $\text{NF}\kappa\text{B}$ 活性和存活相关。基质p $\text{NF}\kappa\text{B}$  (p65) 亚基的Hi水平是明显的,并且 $\text{IKB}-\alpha$ 表达的再引入导致p $\text{NF}\kappa\text{B}$ 降低和细胞死亡。 $\text{IKB}-\alpha$ 的CD40L-诱导的下调与若干DLBCL细胞系中的增加的p $\text{NF}\kappa\text{B}$  (p65) 和对赛度替尼抗性相关。

[0266] \*\*\*

[0267] 除非另外定义,否则本文中所用的所有技术和科学术语所具有的含义都与本公开

所属领域的普通技术人员通常所理解的相同。

[0268] 必须指出,除非上下文另外明确地规定,否则本文和附加的权利要求书中使用的单数形式“一个”、“一种”和“所述”包括多个指示物。因此,例如,对“一种药剂”的提及包括多种药剂。

[0269] 如本文所用,术语“包含 (comprising/comprises)”意图意指组合物和方法包括所述要素,但不排除其它要素。“基本上由……组成”在用于定义组合物和方法时将意味着排除对于针对所述目的的组合具有任何重要意义的其他要素。因此,主要由如本文定义的要素组成的组合物将不排除不会实质上影响所要求保护的基本和新型特征的其他材料或步骤。“由……组成”将意味着排除超过痕量的其它成分和实质性方法步骤。由这些过渡术语各自定义的实施方案在本公开的范围。

[0270] 术语“约”当在数字指示例如温度、时间、量和浓度 (包括范围) 之前使用时指示近似值,其可以改变 (+) 或 (-) 10%、5%或1%。

[0271] 所有出版物、专利申请、专利和其它本文提到的参考文献明确地以引用的方式整体并入本文,引用程度就如同每个参考文献分别以引用的方式并入本文一样。如有矛盾,以包括定义在内的本说明书为准。

[0272] 应了解尽管本公开已连同以上实施方案一起被描述,但上文描述和实施例意图说明而非限制本公开的范围。在本公开的范围内的其他方面、优势和修改将为本公开所属领域技术人员显而易见。



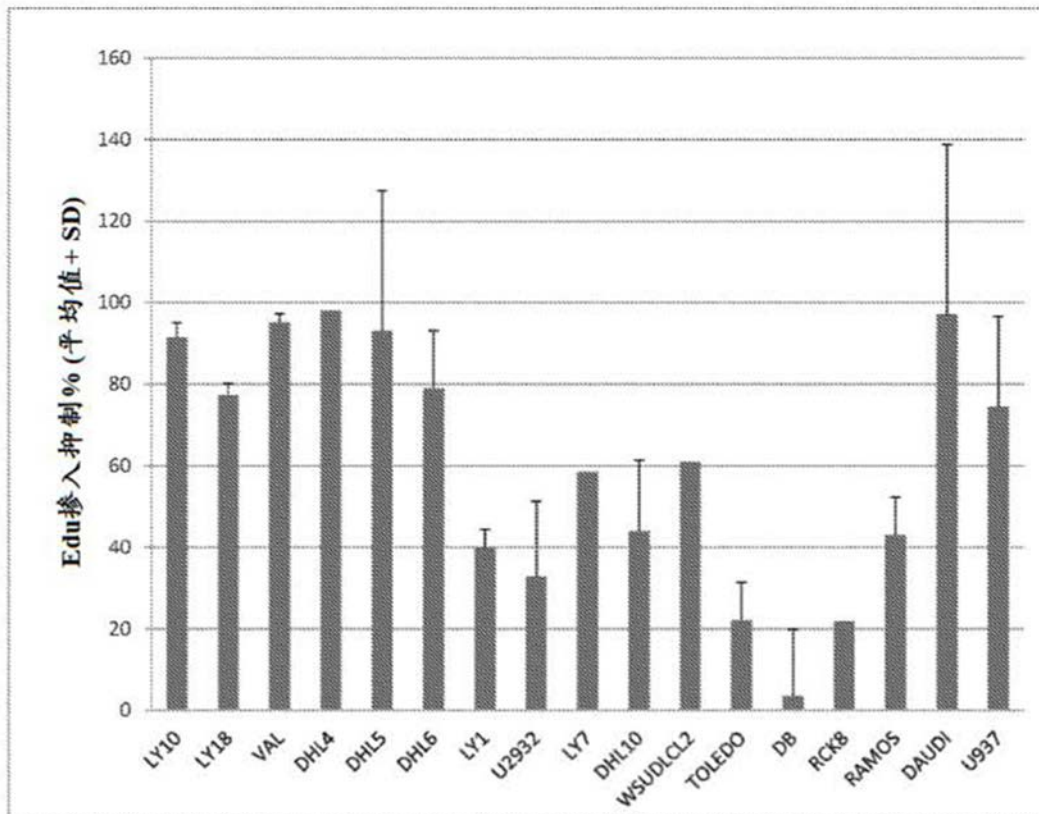


图1

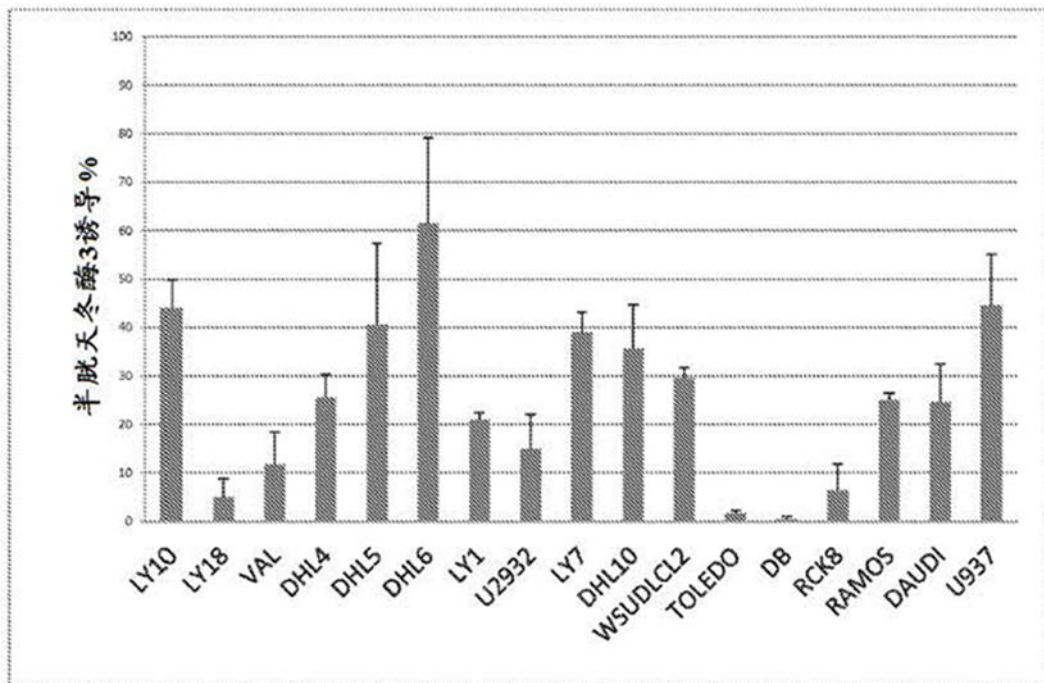


图2

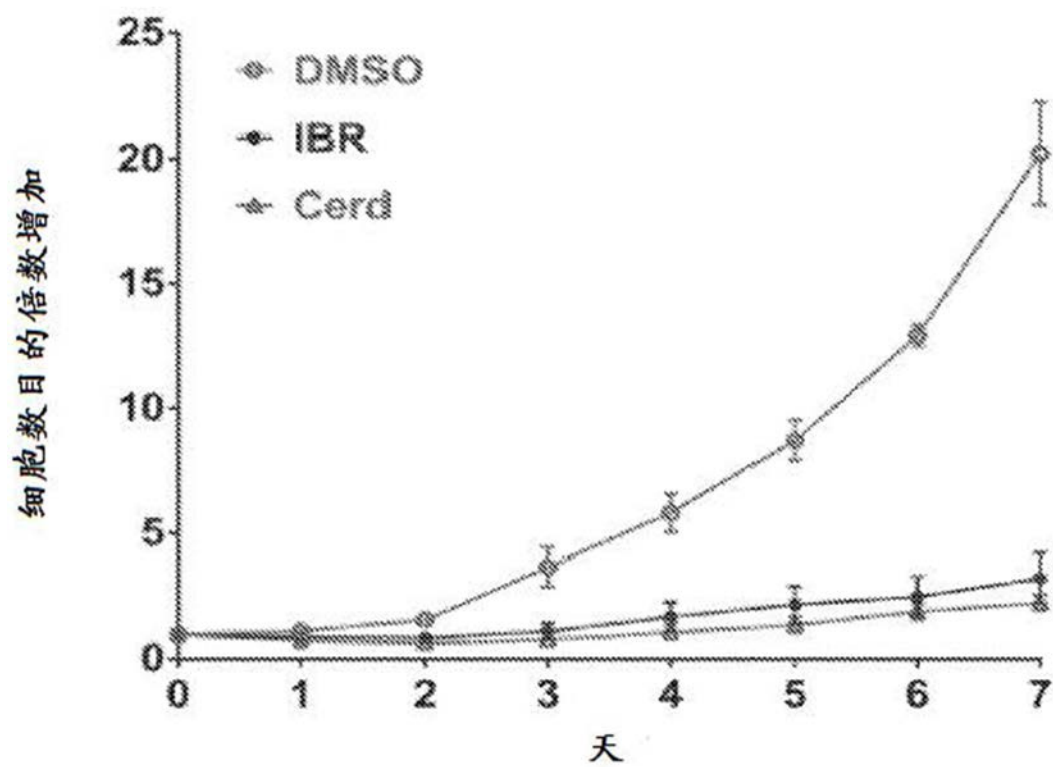
BTK野生型

图3

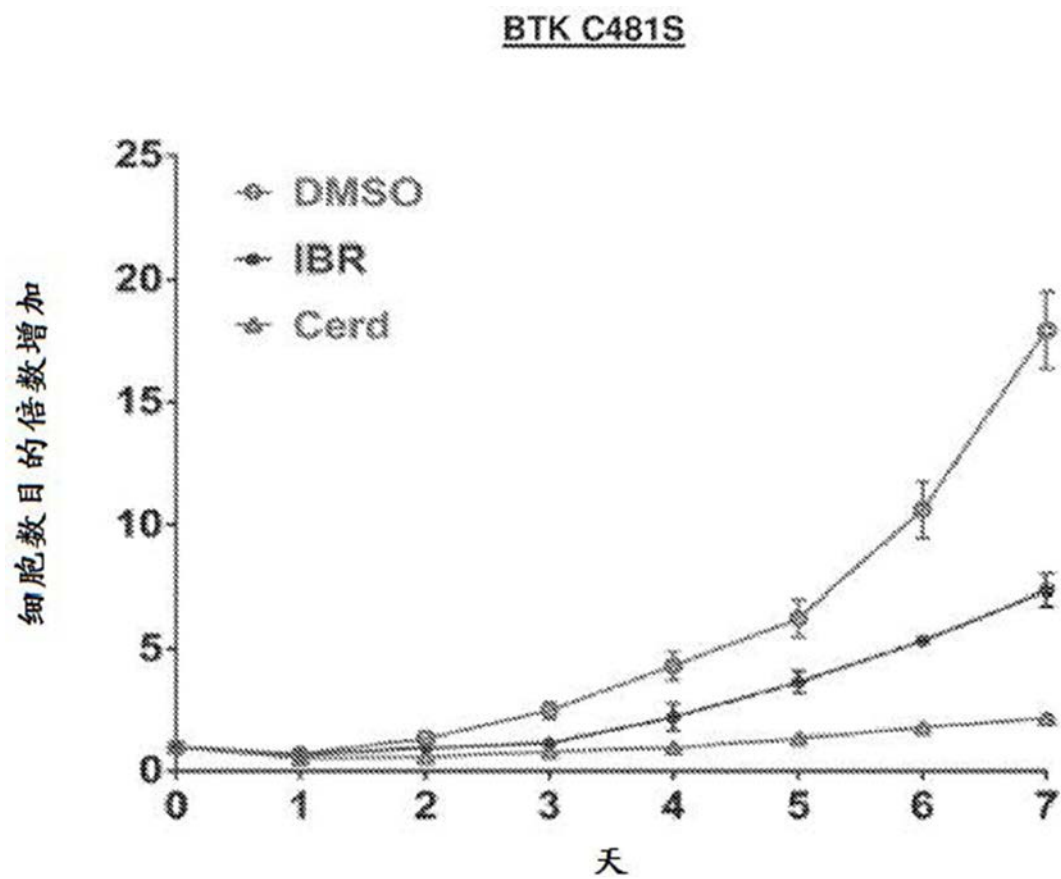


图4

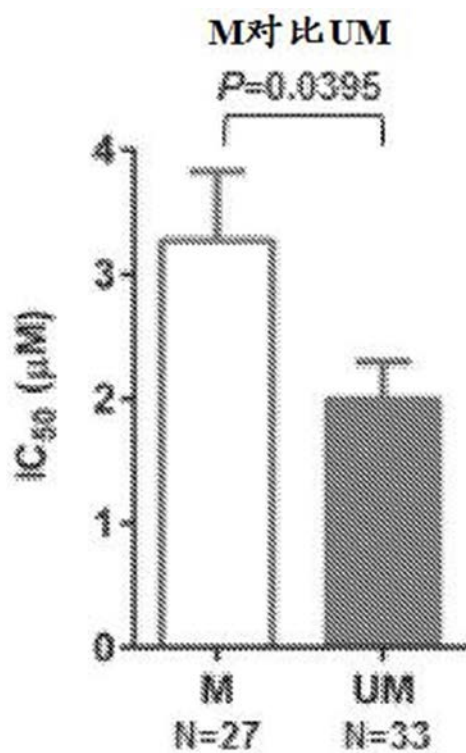


图5

## 细胞遗传学

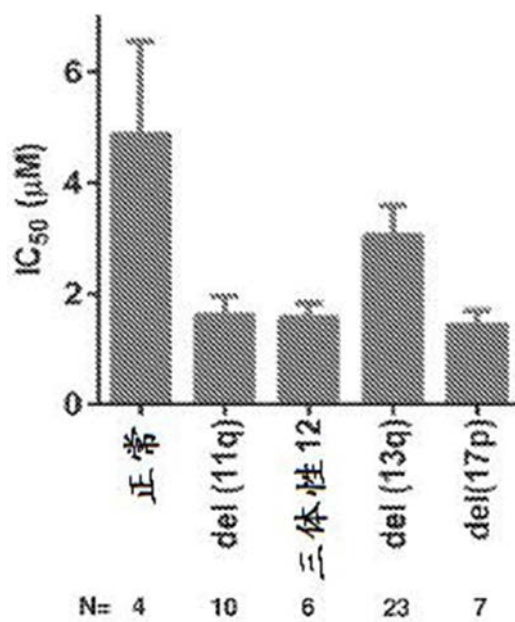


图6

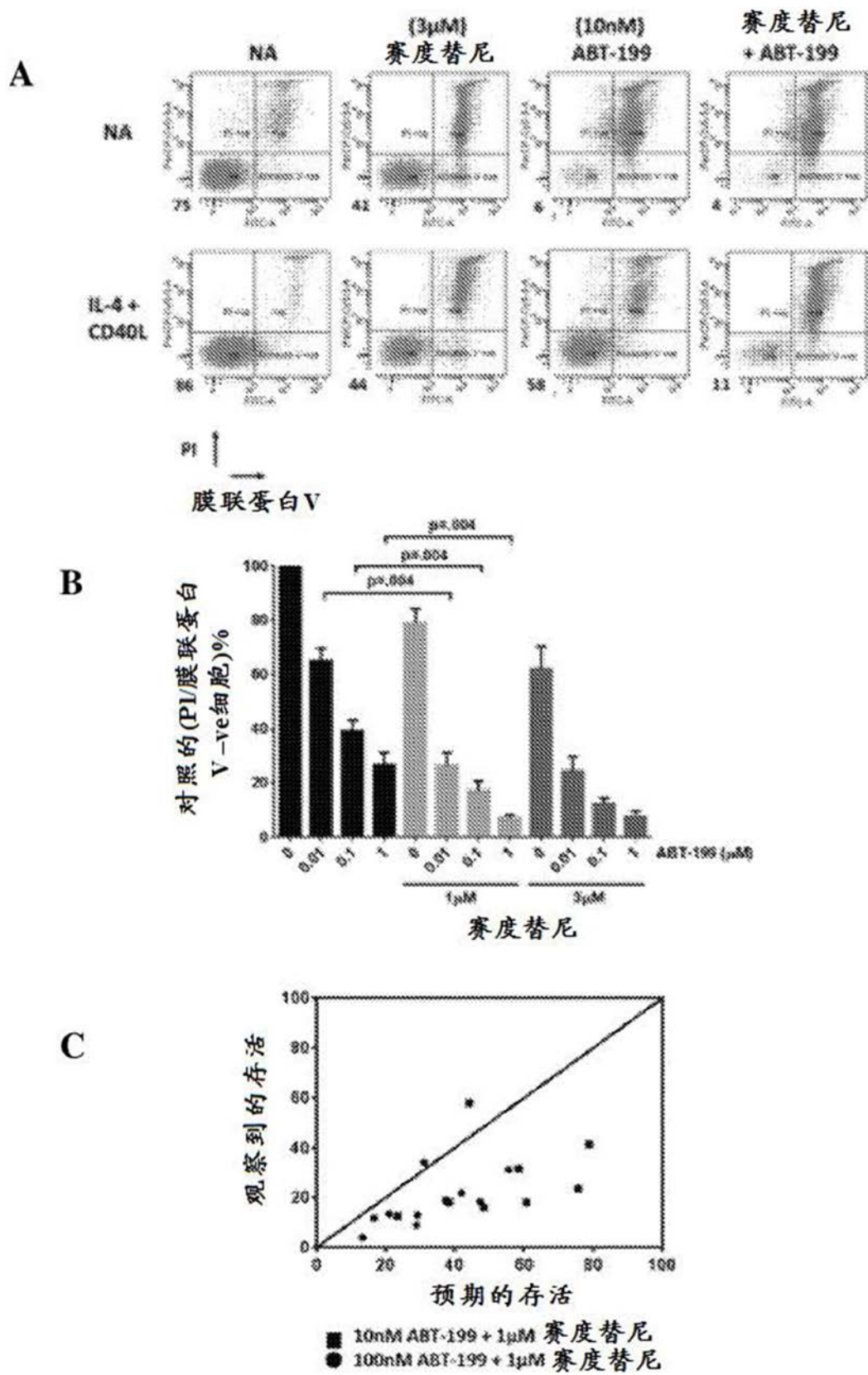


图7