

1. 一种治疗有需要的人类患者的血液癌症的方法,所述方法包括对所述患者施用日剂量约10mg至约75mg的赛度替尼或其药学上可接受的盐。

2. 一种用于治疗有需要的患者的复发性或难治性血液癌症的方法,所述方法包括对所述患者施用有效量的赛度替尼或其药学上可接受的盐。

3. 一种用于治疗有需要的患者的复发性或难治性血液癌症的方法,所述方法包括对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:

所述患者具有与复发和/或对用于治疗血液癌症的药物的抗性关联的突变;和

所述有效量的赛度替尼或其药学上可接受的盐是约30mg至约80mg日剂量的赛度替尼。

4. 根据权利要求1或2所述的方法,其中所述患者具有与复发和/或对用于治疗血液癌症的药物的抗性关联的突变。

5. 根据权利要求3或4所述的方法,其中所述患者具有del17p突变、P53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、或与Caderin途径相关的突变。

6. 根据权利要求3-5中任一项所述的方法,其中所述患者在P53、BTK和EP300的全部中没有突变。

7. 根据权利要求3或4所述的方法,其中所述患者具有BTK突变。

8. 根据权利要求3或4所述的方法,其中所述患者对依鲁替尼具有抗性。

9. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述血液癌症选自由以下组成的组:非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、小淋巴细胞性淋巴瘤(SLL)、滤泡性淋巴瘤(FL)、转化滤泡性淋巴瘤(tFL)、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、和套细胞淋巴瘤(MCL)。

10. 根据权利要求9所述的方法,其中所述血液癌症是CLL。

11. 根据权利要求9所述的方法,其中所述血液癌症是SLL。

12. 根据权利要求9所述的方法,其中所述血液癌症是FL。

13. 根据权利要求9所述的方法,其中所述血液癌症是tFL。

14. 根据权利要求9所述的方法,其中所述血液癌症是DLBCL。

15. 根据权利要求9所述的方法,其中所述血液癌症是MCL。

16. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中先前对所述患者施用选自由以下组成的组的药物和用于治疗血液癌症的另一种化学治疗剂:烷化剂、抗CD20抗体、BCL-2抑制剂、BTK抑制剂、PI3K δ 抑制剂、基于铂的药物、抗代谢物、蒽环类药物、BCR途径抑制剂。

17. 根据权利要求1-16所述的方法,其中先前对所述患者施用选自由以下组成的组的药物:维特克拉、利妥昔单抗、依鲁替尼、艾达拉利司和氟达拉滨。

18. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中在还包含药学上可接受的赋形剂或载体的药物组合物中施用所述赛度替尼。

19. 根据权利要求1所述的方法,其中所述赛度替尼的日剂量为约70mg。

20. 根据权利要求1所述的方法,其中每天两次以每剂约35mg施用所述日剂量的赛度替尼。

21. 根据权利要求2或3所述的方法,其中以约15mg至约40mg的剂量每天两次施用所述有效量的赛度替尼或其药学上可接受的盐。

22. 根据权利要求2或3所述的方法, 其中以约30mg至约40mg的剂量每天两次施用所述有效量的赛度替尼或其药学上可接受的盐。

23. 根据权利要求2或3的方法, 其中以约35mg的剂量每天两次施用所述有效量的赛度替尼或其药学上可接受的盐。

用于治疗B细胞恶性肿瘤的赛度替尼

[0001] 相关申请的交叉引用

本申请根据35 U.S.C. §119(e) 要求2015年5月29日提交的美国临时申请62/168,530和2015年12月4日提交的美国临时申请62/263,582的权益,两者的全部内容通过引用并入本文。

技术领域

[0002] 本公开一般涉及使用赛度替尼来治疗血液癌症,包括B细胞恶性肿瘤和复发性或难治性血液癌症的方法。

背景技术

[0003] 造血和淋巴样组织的肿瘤或造血和淋巴样恶性肿瘤是影响血液、骨髓、淋巴和淋巴系统的肿瘤。由于那些要素都是通过循环系统和免疫系统两者而密切相关的,影响一者的疾病经常也会影响到其它要素,使得骨髓增生和淋巴增殖(以及因此白血病和淋巴瘤)密切相关,并且经常是重叠的问题。

[0004] 血液恶性肿瘤可以源自两种主要的血细胞谱系之一:髓样细胞系和淋巴样细胞系。髓样细胞系通常产生粒细胞、红细胞、凝血细胞、巨噬细胞和肥大细胞;淋巴样细胞系产生B、T、NK和浆细胞。淋巴瘤、淋巴细胞性白血病和骨髓瘤来自淋巴样系,而急性和慢性髓性白血病、骨髓增生异常综合征和骨髓增殖性疾病是髓样起源的。

[0005] B细胞淋巴瘤是影响B细胞的淋巴瘤类型。淋巴瘤是淋巴结中的“血液癌症”。B细胞淋巴瘤包括霍奇金氏淋巴瘤和大多数非霍奇金淋巴瘤两者。

[0006] 滤泡性淋巴瘤(FL)是一类血液癌症。它是最常见的无痛性(缓慢生长)非霍奇金氏淋巴瘤,以及总体上是非霍奇金氏淋巴瘤的第二常见形式。它定义为具有至少部分滤泡模式的滤泡中心B细胞(中心细胞和中心母细胞)的淋巴瘤。

[0007] B细胞慢性淋巴细胞性白血病(B-CLL)(也称为慢性淋巴样白血病(CLL))是成人中最常见的白血病类型(一类白细胞癌症)。CLL影响B细胞淋巴细胞,所述B细胞淋巴细胞在骨髓中起源,在淋巴结中发展,并且通常通过产生抗体而抵抗感染。CLL是主要在淋巴结中呈现的小淋巴细胞性淋巴瘤(SLL)(一类B细胞淋巴瘤)的一个阶段。认为CLL和SLL是相同的潜在疾病,仅具有不同的表现。

[0008] 弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL或DLBL)是B细胞的癌症,所述B细胞是一类负责产生抗体的白细胞。弥漫性大B细胞淋巴瘤包括生物学和临床上多种多样的一组疾病,其中许多疾病不能通过明确限定且广泛接受的标准而彼此分开。

[0009] B细胞受体(BCR)介导的信号传导是慢性淋巴细胞性白血病(CLL)发病机制必需的,并且靶向BCR信号传导复合物内的激酶的药物正在革新此疾病的治疗。

[0010] CLL治疗中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的艾代拉利司(idelalisib)(ZYDELIG®)。然而,这些化合物抑制疾病并且通常不是治愈性的。此外,CLL患者可以通过BTK或下游信号传导蛋白中的突变

或其它机制而对这些化学治疗剂形成抗性。

[0011] 针对在CLL、SLL、DLBCL和FL的标准疗法上失败的患者的当前治疗选择是有限的。因此,需要针对血液恶性肿瘤的新疗法。

发明内容

[0012] 本文提供了治疗有此需要的人类患者中的血液癌症或B细胞恶性肿瘤的方法,所述方法包括对患者施用日剂量约10mg至约75mg的赛度替尼(cerdulatinib)或其药学上可接受的盐。

[0013] 本文中还提供了用于治疗有需要的患者的复发性或难治性血液癌症的方法,所述方法包括对患者施用有效量的赛度替尼或其药学上可接受的盐。

[0014] 一些实施方案提供了治疗有需要的患者的复发性或难治性血液癌症的方法,所述方法包括对患者施用有效量的赛度替尼或其药学上可接受的盐,其中:

患者具有与复发和/或对用于治疗血液癌症的药物的抗性关联的突变;和

有效量的赛度替尼或其药学上可接受的盐是约30mg至约80mg日剂量的赛度替尼。

[0015] 在一些实施方案中,血液癌症是慢性淋巴细胞性白血病 (CLL)、小淋巴细胞性淋巴瘤 (SLL)、滤泡性淋巴瘤 (FL)、转化滤泡性淋巴瘤 (tFL)、弥漫性大B细胞淋巴瘤 (DLBCL) 或套细胞淋巴瘤 (MCL)。

[0016] 在一些实施方案中,有需要的患者是由于许多原因而对血液癌症表现出药物抗性和/或复发的患者。例如,患者可以具有与复发和/或对用于治疗血液癌症的药物的抗性关联的突变。例如,患者可以具有del17p突变、P53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Caderin途径相关的突变或其组合。根据一些实施方案,患者在P53、BTK和EP300全部中没有突变。

附图说明

[0017] 图1提供了条形图,其描绘了在2 μ M赛度替尼下在72小时时在多种DLBCL细胞系中通过FACS分析得到的对Edu掺入的抑制。

[0018] 图2提供了条形图,其描绘了在2 μ M赛度替尼下在72小时时在多种DLBCL细胞系中通过FACS分析得到的对胱天蛋白酶3切割的在前诱导的抑制。

[0019] 图3提供了在用媒介物或各种剂量水平的赛度替尼处理时随着时间(x轴)绘制后爪炎症评分(平均值 $\pm$ 平均值标准误差(“SEM”);y轴;每组n = 8)。每个给药组的平均血浆浓度(C_{max})显示在图的右侧。星号表示相对于媒介物根据学生T检验的统计显著性(p < 0.05)。

[0020] 图4显示了在经WT BTK转染的TMD8细胞中依鲁替尼和赛度替尼的影响结果。向培养物中加入250nM依鲁替尼或赛度替尼,并且每天计数活细胞数目达7天。显示的结果是4次重复实验的平均值 $\pm$ 标准误差(“SE”)。空心环=二甲亚砜(“DMSO”);闭合环= 依鲁替尼(“IBR”);三角形= 赛度替尼(“Cerd”)。

[0021] 图5显示了在经BTK^{C481S}-转染的TMD8细胞中的依鲁替尼和赛度替尼的影响。向培养物中加入250nM依鲁替尼或赛度替尼,并且每天计数活细胞数目达7天。显示的结果是4次重复实验的平均值 $\pm$ SE。空心环=二甲亚砜(“DMSO”);闭合环=依鲁替尼(“IBR”);三角形= 赛

度替尼(“Cerd”)。

[0022] 图6显示具有未突变(“UM”)IGHV的CLL细胞(N = 33)比IGHV突变(“M”)CLL(N = 27)对赛度替尼更敏感。数据用学生T检验进行分析。绘制IC₅₀的平均值+SE。 $P = 0.0395$ 。

[0023] 图7显示具有不同细胞遗传学异常的CLL细胞的赛度替尼敏感性。指出每个亚组的病例编号。数据通过ANOVA检验进行分析,绘制IC₅₀的平均值+SE。*, $P < 0.05$ 。

具体实施方式

[0024] 1. 定义

除非另外定义,否则本文使用的所有技术和科学术语具有与本公开所属领域的普通技术人员通常理解的相同的含义。如本文所用,以下术语具有以下含义。

[0025] 必须注意的是,除非上下文另外明确指出,否则如本文和所附权利要求书中所用,单数形式“一个”、“一种”和“所述/该”包括复数指示物。因此,例如,提到“药剂”包括多种药剂。

[0026] 如本文所用,术语“包含”或“包括”意图表示组合物和方法包括所列举的要素,但不排除其它要素。当用于定义组合物和方法时,“基本上由...组成”应当意指出于叙述的目的排除对于组合而言有任何实质性意义的其它要素。因此,基本上由如本文定义的要素组成的组合物将不排除不实质上影响要求保护的基本且新颖特征的其它材料或步骤。“由...组成”是指排除超过痕量的其它成分要素和实质性方法步骤。由这些过渡术语中每个定义的实施方案都在本公开的范围內。

[0027] 术语“约”在数值名称,例如温度、时间、量和浓度,包括范围前使用时表示可以以(+)或(-)10%、5%或1%变化的近似值。

[0028] 如本文所用,术语“药学上可接受的盐”是指任何酸或碱加成盐,其抗衡离子在盐的药物剂量中对患者是无毒的。许多药学上可接受的盐在制药领域中是公知的。如果在这些组合物中利用了本公开的化合物的药学上可接受的盐,那么那些盐优选源自无机或有机酸和碱。此类酸盐中包括以下:乙酸盐、己二酸盐、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、葡萄糖庚酸盐(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、双羟萘酸盐、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、水杨酸盐、亚甲基双-b-羟基萘甲酸盐、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源自碱金属或碱土金属碱或常规有机碱如三乙胺、吡啶、哌啶、吗啉、N-甲基吗啉的盐、铵盐、碱金属盐如钠和钾盐、碱土金属盐如钙盐和镁盐、与有机碱形成的盐如二环己胺盐、N-甲基-D-葡萄糖胺以及氨基酸如精氨酸、赖氨酸形成的盐等等。

[0029] 此外,含碱性氮基团可以用试剂季铵化,所述试剂如低级烷基卤化物,诸如甲基、乙基、丙基和丁基氯化物、溴化物和碘化物;硫酸二烷基酯,如硫酸二甲酯、二乙酯、二丁酯和二戊酯,长链卤化物,如癸基、月桂基、肉豆蔻酰基和硬酯酰基氯化物、溴化物和碘化物;

芳烷基卤化物,如苄基和苯乙基溴化物等。从而,获得水或油可溶性或分散性产物。

[0030] 本文中所述的赛度替尼或其它化合物的“前药”也包括在内,并且是在生理条件下容易经历化学变化以提供本公开化合物的那些化合物。另外,前药可以通过离体环境中的化学或生物化学方法而转化为本公开的化合物。例如,前药当置于具有合适的酶或化学试剂的经皮贴剂储库中时可以缓慢转化为本公开的化合物。前药通常但不必是药理学上无活性的,直至转化为活性药物。通常通过用前基团 (progroup) (下文定义) 掩蔽药物中认为对于活性为部分需要的官能团以形成前部分 (promoiety) 来获得前药,所述前部分在规定使用条件下经历转化,如切割以释放所述官能团,以及因此释放活性药物。前部分的切割可以自发地进行,如通过水解反应,或者它可以由另一种试剂,如通过酶、通过光、通过酸或通过碱,或者通过改变物理或环境参数或暴露于物理或环境参数,例如改变温度来催化或诱导。该试剂对于使用条件可以是内源性的,如接受前药施用的细胞中存在的酶或胃的酸性条件,或者它可以外源供应。

[0031] “前基团”是指当用于掩蔽活性药物内的官能团以形成前部分时将药物转化成前药的一类保护基团。前药通常通过在规定使用条件下可切割的键与药物的官能团连接。因此,前基团是在规定使用条件下切割以释放官能团的前部分的该部分。作为具体实例,式—NH—C(O)CH₃的酰胺前部分包括前基团—C(O)CH₃。

[0032] 适用于掩蔽本文所述的化合物中的官能团以产生前药的极其多种前基团以及所得的前部分在本领域中是公知的。例如,可将氨基官能团掩蔽为可在体内水解以提供氨基的酰胺、氨基甲酸酯、亚胺、脒、苯膦基、磷酰基或亚磺酰基前部分。本公开包括本领域已知用于修改溶解度或水解特性以用作持续释放或前药制剂的那些酯和酰基。合适的前基团及其各自前部分的其它具体实例对于本领域技术人员将是显而易见的。

[0033] 如本文所用,“抑制剂”是指抑制或结合受体、部分或完全阻断受体的刺激或活性,降低、关闭、防止、延迟受体的激活或酶促活性,灭活、脱敏或下调受体活性的试剂或分子。

[0034] 术语“药学上可接受的载体或赋形剂”是指可用于制备药物组合物且通常安全、无毒并且在生物学上或其它方面并非不想要的载体或赋形剂,并且包括兽医学使用以及人药物使用可接受的载体或赋形剂。如本文所用,“药学上可接受的载体或赋形剂”包括一种和超过一种此类载体或赋形剂两者。

[0035] 术语“施用”是指口服施用、以栓剂施用、局部接触、静脉内、腹膜内、肌内、损伤内、鼻内或皮下施用、或对受试者植入缓慢释放装置(例如微型渗透泵)。通过任何途径施用,所述途径包括肠胃外和经粘膜(例如,含服、舌下、腭、龈、鼻、阴道、直肠或经皮)。肠胃外施用包括例如静脉内、肌内、小动脉内、皮内、皮下、腹膜内、心室内和颅内。其它递送模式包括但不限于使用脂质体制剂、静脉内输注、经皮贴剂等。

[0036] “患者”是指人和非人的动物,特别是哺乳动物。患者的实例包括但不限于人、牛、狗、猫、山羊、绵羊、猪和兔。

[0037] 如本文所用,术语“治疗”、“处理”和其语法变化包括部分或完全延迟、改善、减轻或降低病症或病况的一种或多种伴随症状的强度和/或改善、减轻或阻碍病症或病况的一种或多种原因。如本文所述的治疗可以预防性、防范性、姑息性或补救性应用。

[0038] 如本文所用,术语“预防”及其语法变化是指部分或完全延迟或排除疾病或病况和/或其一种或多种伴随症状的发作或复发或阻碍受试者获得或重新获得病症或病况或者

降低受试者获得或重新获得病症或病况或其一种或多种伴随症状的风险的方法。

[0039] 在本上下文中,术语“治疗有效”或“有效量”表示化合物或材料或化合物或材料的量在施用时足以或有效预防、缓解或改善治疗的疾病、病症或医学状况的一种或多种症状,和/或延长所治疗的受试者的存活。治疗有效量将随化合物、疾病、病症或状况及其严重程度和待治疗的哺乳动物的年龄、重量等而变化。该剂量可以方便地施用,例如,以一天至多四次的分开剂量或以持续释放形式。

[0040] 如本文所用,“日剂量”是指将在24小时内服用的治疗物质的总量。

[0041] 本文所述的方法和组合物通常将用于人受试者的治疗。但是,它们也可以用于治疗其它动物受试者中的相似或相同的适应症。在这种情况下,术语“受试者”、“动物受试者”等是指人和非人的脊椎动物,例如哺乳动物,如非人灵长类、运动和商业动物,例如马、牛、猪、绵羊、啮齿类和宠物,如狗和猫。

[0042] 2. 使用方法

恶性B细胞接受源于肿瘤自身以及来自存在于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。

[0043] B细胞淋巴瘤的亚组表明依赖于BCR和/或细胞因子JAK/STAT信号传导实现存活。SYK位于BCR信号传导途径上的BTK、PI3K δ 和PLC γ 2上游,使其成为潜在的治疗靶点。额外的存活支持似乎是由细胞因子诱导的JAK/STAT途径介导的,其可以通过肿瘤自分泌信号传导环路或通过源自存在于肿瘤微环境中的非肿瘤浸润性白细胞的促炎性细胞因子来激活。

[0044] 在CLL和非霍奇金氏淋巴瘤(“NHL”)中观察到几种细胞因子的血清浓度增加,并且预测更具侵入性的疾病进展。这些细胞因子的来源可以以自分泌刺激方式源自肿瘤自身,或者来自肿瘤微环境内已经引起了无效的免疫应答的非肿瘤白细胞。实验上已经显示了,IL4促进培养的CLL B细胞的存活,并通过用氟达拉滨和苯丁酸氮芥的治疗来保护它们免于死亡。这种存活支持根本的机制似乎是细胞因子诱导的BCL2家族成员上调。

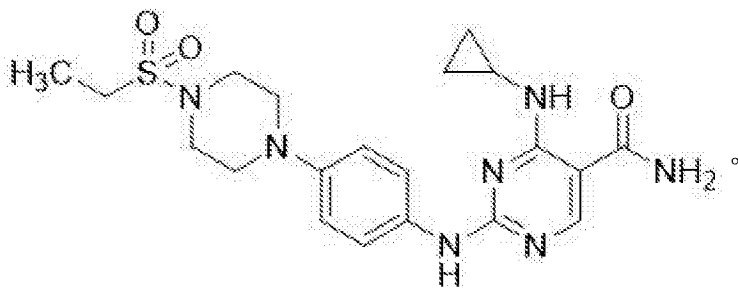
[0045] 近年来,B细胞受体(BCR)介导的信号传导在慢性淋巴细胞性白血病(CLL)发病机制中的重要性已经变得甚至更加明显,并且靶向BCR信号传导复合物内激酶的药物正在革新此种疾病的治疗。最近批准的用于复发性/难治性CLL的药剂包括依鲁替尼(BTK抑制剂)和艾代拉利司(PI3K δ 抑制剂)。迄今为止,这些化合物尚未证明是治愈的,其部分可以由来自肿瘤的信号介导。重要的是,一部分患者正在对这些新药剂形成抗性,或是对于依鲁替尼通过BTK或PLC γ 中的突变或者由于尚未知的机制。脾酪氨酸激酶(SYK)属于非受体激酶的SYK/ZAP70家族,并且在B细胞内的BCR、趋化因子和整联蛋白受体的下游激活信号的传递中起中心作用,并且仍然是治疗某些B细胞恶性肿瘤和自身免疫性疾病的有趣靶标。

[0046] CLL细胞依赖于来自构成微环境的各种细胞的信号。淋巴细胞中的IL-4信号主要经由Janus蛋白酪氨酸激酶JAK1和JAK3通过I型IL-4受体(IL-4R)来衍生,导致STAT6磷酸化(pSTAT6)。

[0047] 在用于慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、小淋巴细胞性淋巴瘤(SLL)和滤泡性淋巴瘤(FL)的标准疗法上失败的患者的目前治疗选择是有限的。

[0048] 本文提供了通过施用赛度替尼来治疗血液癌症的方法。赛度替尼是SYK和JAK家族成员的小分子ATP竞争性可逆抑制剂。先前已经描述(参见例如US 8,138,339)的赛度替尼具有化学名称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-羧酰

铵,并且具有通式:



[0049] 在本文所述的实施方案中,赛度替尼也可以指其药学上可接受的盐或前药。

[0050] 预期赛度替尼可用于重度预治疗的患者和/或复发性/难治性血液癌症,包括但不限于CLL、FL、NHL和DLBCL。赛度替尼也诱导原发性CLL凋亡,在预后不良,如未突变的IGHV、高CD49d、ZAP-70或表面IgM表达的情况下,具有优先活性。

[0051] 本文提供了治疗有此需要的人类患者中的血液癌症的方法,所述方法包括对患者施用日剂量约10mg至约75mg的赛度替尼或其药学上可接受的盐,或包含日剂量约10mg至约75mg的赛度替尼或其药学上可接受的盐和至少一种药学上可接受的赋形剂或载体的药物组合物。

[0052] 本文还提供了用于治疗有需要的患者的复发性或难治性血液癌症的方法,所述方法包括对患者施用有效量的赛度替尼或其药学上可接受的盐或包含日剂量约10mg至约75mg的赛度替尼或其药学上可接受的盐和至少一种药学上可接受的赋形剂或载体的药物组合物。

[0053] 一些实施方案提供了治疗有需要的患者的复发性或难治性血液癌症的方法,所述方法包括对患者施用有效量的赛度替尼或其药学上可接受的盐或包含有效量的赛度替尼或其药学上可接受的盐和至少一种药学上可接受的赋形剂或载体的药物组合物,其中:

赛度替尼或其药学上可接受的盐的有效量是约30mg至约80mg赛度替尼的日剂量。

[0054] 一些实施方案提供了治疗有需要的患者的复发性或难治性血液癌症的方法,所述方法包括对患者施用有效量的赛度替尼或其药学上可接受的盐或包含有效量的赛度替尼或其药学上可接受的盐和至少一种药学上可接受的赋形剂或载体的药物组合物,其中:

患者具有与复发和/或对治疗血液癌症的药物的抗性关联的突变;和

赛度替尼或其药学上可接受的盐的有效量是约30mg至约80mg赛度替尼的日剂量。

[0055] 本文提供的一些实施方案涉及治疗患有B细胞非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、滤泡性淋巴瘤(FL)、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)或其它转化FL的患者方法。

[0056] 在一些实施方案中,患者患有B细胞恶性肿瘤、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、滤泡性淋巴瘤(FL)或转化FL中的一种或多种。

[0057] 在一些实施方案中,患者患有晚期恶性肿瘤。

[0058] 在一些实施方案中,患者已经复发或对先前的化疗没有反应。在一些实施方案中,患者的至少两次先前的疗法失败。在一些实施方案中,患者的至少一次先前的疗法失败。

[0059] 在一些实施方案中,患者具有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,如慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、小淋巴细胞性淋巴瘤(SLL)、滤泡性淋巴瘤(FL)、转化滤泡性淋巴瘤(tFL)、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)和/或套细胞淋巴瘤

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

[0060] 根据一些实施方案,血液癌症是CLL。根据一些实施方案,血液癌症是DLBCL。根据一些实施方案,血液癌症是FL。根据一些实施方案,血液癌症是SLL。根据一些实施方案,血液癌症是NHL。根据一些实施方案,血液癌症是tFL。根据一些实施方案,血液癌症是MCL。

[0061] 一些化学治疗剂在患者中遭受药物抗性,例如由于BCR IL-4介导的信号传导和/或BCR激活途径,其对血液癌症是保护性的。根据本公开的实施方案,赛度替尼可以克服这些导致药物抗性的保护性机制。

[0062] 在一些实施方案中,由于多种原因,有需要的患者是表现出对血液癌症的药物抗性和/或血液癌症复发的患者。例如,患者可以具有与复发和/或对治疗血液癌症的药物的抗性关联的突变。例如,患者可以具有del17p突变、P53突变、ATM突变、STAT突变、STAT 6突变、C481S STAT6突变、与NOTCH途径相关的突变或与Caderin途径相关的突变。

[0063] 在一些实施方案中,患者可以在STAT中具有S86A突变。

[0064] 在一些实施方案中,患者可以具有del17p突变、del11q突变、P53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Caderin途径相关的突变或其组合。

[0065] 根据一些实施方案,患者在P53,BTK和EP300的每种中没有突变。

[0066] 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。

[0067] 在一些实施方案中,患者具有BTK突变。

[0068] 在一些实施方案中,患者可以具有不良预后,如未突变的IGHV、高CD49d、ZAP-70或表面IgM表达。

[0069] 在一些实施方案中,患者对非赛度替尼的药物具有抗性。这些药物的非限制性实例是抗CD20抗体、BCL-2抑制剂、BTK抑制剂、P13K δ 抑制剂、利妥昔单抗、基于铂的药物、抗代谢物、依鲁替尼、艾代拉利司、氟达拉滨(氟达拉滨磷酸盐,FLUDARA[®])、蒽环类药物、BCR途径抑制剂、ABT-199 (Venetoclax, 维特克拉) 或用于治疗血液癌症的另一种化学治疗剂。化学治疗剂的其它非限制性实例包括烷化剂、细胞骨架破坏剂、埃博霉素、组蛋白脱乙酰酶抑制剂、拓扑异构酶I的抑制剂、拓扑异构酶II的抑制剂、核苷酸类似物和前体类似物、抗生素、基于铂的药剂、类视黄醇、长春花生物碱或其组合。

[0070] 在一些实施方案中,患者对抗CD20抗体、BCL-2抑制剂、BTK抑制剂、P13K δ 抑制剂、基于铂的药物、抗代谢物、蒽环类药物、BCR途径抑制剂或用于治疗血液癌症的其它化学治疗剂具有抗性。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:ABT-199 (维特克拉)、利妥昔单抗、依鲁替尼、艾代拉利司和氟达拉滨(氟达拉滨磷酸盐,FLUDARA[®])。在一些实施方案中,患者对依鲁替尼具有抗性。

[0071] 在一些实施方案中,先前对患者施用用于治疗血液癌症的药物。非限制性实例药物包括烷化剂、抗CD20抗体、BCL-2抑制剂、BTK抑制剂、P13K δ 抑制剂、利妥昔单抗、基于铂的药物、抗代谢物、依鲁替尼、艾代拉利司、氟达拉滨(氟达拉滨磷酸盐,FLUDARA[®])、蒽环类药

物、BCR途径抑制剂、ABT-199 (维特克拉) 和用于治疗血液癌症的其它药剂。化学治疗剂的其它非限制性实例包括细胞骨架破坏剂、埃博霉素、组蛋白脱乙酰酶抑制剂、拓扑异构酶I的抑制剂、拓扑异构酶II的抑制剂、核苷酸类似物和前体类似物、抗生素、基于铂的药剂、类视黄醇、长春花生物碱或其组合。

[0072] 在一些实施方案中, 先前对患者施用选自以下组成的组的药物: 烷化剂、抗CD20抗体、BCL-2抑制剂、BTK抑制剂、PI3K δ 抑制剂、基于铂的药物、抗代谢物、蒽环类药物、BCR途径抑制剂、和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, 先前对患者施用选自以下组成的组的药物: 维特克拉、利妥昔单抗、依鲁替尼、艾代拉利司和氟达拉滨。在一些实施方案中, 药物是R-CHOP (利妥昔单抗; 环磷酰胺; 盐酸多柔比星; 安可平 (长春新碱); 泼尼松)。在一些实施方案中, 药物是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, 药物是贝伐单抗。在一些实施方案中, 药物是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。

[0073] 在某些实施方案中, 患者为60岁或以上, 并且在一线癌症疗法后复发。在某些实施方案中, 患者为18岁或以上, 并且在二线癌症疗法后是复发或难治的。在某些实施方案中, 患者为60岁或以上, 并且对于一线癌症疗法是主要难治的。在某些实施方案中, 患者为70岁或以上, 并且先前未治疗。在某些实施方案中, 患者为70岁或以上, 并且不合格和/或不大可能从癌症疗法中受益。

[0074] 考虑到诸如化合物IC₅₀、化合物的生物半衰期、受试者的年龄、体格和体重以及正在治疗的适应症等因素, 可以通过标准程序来确定待施用的各种化合物的量。这些和其它因素的重要性是本领域普通技术人员所熟知的。通常, 剂量将在约0.01和50mg/kg治疗的受试者之间, 或者在0.1和20mg/kg治疗的受试者之间。可以使用多剂量。

[0075] 在一些实施方案中, 治疗有此需要的人类患者中的复发性或难治性血液癌症的方法包括对患者施用日剂量约10mg至约75mg的赛度替尼或其药学上可接受的盐或包含日剂量约10mg至约75mg的赛度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的药物组合物。

[0076] 在一些实施方案中, 治疗有此需要的人类患者中的复发性或难治性血液癌症的方法包括对患者每天两次施用约45mg剂量的赛度替尼或其药学上可接受的盐。

[0077] 在一些实施方案中, 治疗有此需要的人类患者中的复发性或难治性血液癌症的方法包括对患者每天两次施用约35mg剂量的赛度替尼或其药学上可接受的盐。

[0078] 在本文提供的一些实施方案中, 赛度替尼的日剂量为约10mg至约75mg。在本文提供的一些实施方案中, 赛度替尼的日剂量为约25mg至约45mg。在一些实施方案中, 赛度替尼的日剂量为约15mg、30mg、45mg或50mg。

[0079] 在一些实施方案中, 赛度替尼的日剂量为约15mg、约20mg、约25mg、约30mg、约35mg、约40mg、约45mg、约50mg、约55mg、约60mg、约65mg、约70mg、约75mg、约80mg、约90mg、约95mg、约100mg、约105mg或约110mg。在一些实施方案中, 赛度替尼的日剂量是约90mg。在一些实施方案中, 赛度替尼的日剂量为约70mg。在一些实施方案中, 每天两次以每剂约35mg施用赛度替尼的日剂量。

[0080] 在一些实施方案中, 赛度替尼的施用是每天一次。在一些实施方案中, 每天两次施用。在一些实施方案中, 每天三次施用。

[0081] 在某些实施方案中,本文提供的方法中使用的赛度替尼的治疗有效量为至少约10mg/天。在一个实施方案中,赛度替尼的治疗有效量为每剂至少约10、20、30、40或50mg。在一个实施方案中,赛度替尼的治疗有效量为每天至少约10、20、30、40、50、60、70、80、90或100mg。

[0082] 在一个实施方案中,赛度替尼的治疗有效量为每天至少30mg、35mg、40mg、45mg、50mg、55mg、60mg或65mg。在一个实施方案中,赛度替尼的治疗有效量为至少约15mg、20mg、25mg、30mg或35mg,并且每天两次施用。

[0083] 在某些实施方案中,赛度替尼的治疗有效量不超过每天约500、400、300、200、150、120或100mg。在一个实施方案中,赛度替尼的治疗有效量不超过每剂约300、200、150、120、100、90、80、70、60、55或50mg。

[0084] 在某些实施方案中,赛度替尼的治疗有效量不超过每天约100mg、95mg、90mg、85mg、80mg或75mg。在某些实施方案中,赛度替尼的治疗有效量不超过45mg、40mg、35mg或30mg,并且每天两次施用。

[0085] 在一个实施方案中,无论是单独还是与另一种药剂组合,治疗有效量的赛度替尼以每天约10mg至200mg、约25mg至150mg、约50至120mg、约80至100mg施用。

[0086] 在一个实施方案中,无论是单独还是与另一种药剂组合,赛度替尼的治疗有效量为每天25mg至120mg。在一些实施方案中,赛度替尼的有效量为每天两次25mg至50mg。

[0087] 在一个实施方案中,无论是单独还是与另一种药剂组合,治疗有效量的赛度替尼以约10mg至150mg、约25mg至120mg、约30至80mg、约40至50 mg剂量,一天一次或两次施用。在某些实施方案中,无论是单独还是与另一种药剂组合,一天一次、两次、三次或四次施用赛度替尼。

[0088] 在一个实施方案中,无论是单独还是与另一种药剂组合,以约30mg至约80mg每天一次施用赛度替尼。在一个实施方案中,无论是单独还是与另一种药剂组合,以约15mg至约40mg每天两次施用赛度替尼。

[0089] 在一个实施方案中,无论是单独还是与另一种药剂组合,每天两次施用45mg的赛度替尼。在一个实施方案中,无论是单独还是与另一种药剂组合,每天两次施用35mg赛度替尼。

[0090] 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为每天两次施用药约40mg至约50mg。

[0091] 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为每天两次施用药约30mg至约40mg。

[0092] 在另一个实施方案中,本公开提供了治疗有此需要的受试者中的癌症的方法,其通过与有效治疗癌症的一种或多种其它疗法或医疗程序组合对受试者施用有效量的包含赛度替尼的组合物来进行。其它疗法或医疗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)或医疗程序(例如手术、放射疗法、过热加热、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疗程序选自用化学治疗剂(例如化学治疗药物)治疗、放射治疗(例如x射线、 γ 射线或电子、质子、中子或粒子束)、过热加热(例如微波、超声、射频消融)、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、异基因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、编码MDA7的腺载体、腺病毒5-肿瘤坏死因子 α ）、光动力疗法（例如氨基乙酰丙酸、莫特沙芬镧（motexatin lutetium））、手术或骨髓和干细胞移植。

[0093] 3. 药物组合物和试剂盒

本文提供的一些实施方案涉及药物组合物，其包含有效量的赛度替尼和至少一种药学上可接受的载体或赋形剂。

[0094] 载体或赋形剂可用于生产组合物。可以选择载体或赋形剂以促进化合物如赛度替尼的施用。载体的实例包括碳酸钙、磷酸钙、各种糖如乳糖、葡萄糖或蔗糖、或淀粉的类型、纤维素衍生物、明胶、植物油、聚乙二醇和生理学相容的溶剂。生理学相容性溶剂的实例包括注射用水（WFI）、盐水溶液和葡萄糖的无菌溶液。

[0095] 合适的剂型部分取决于使用或施用途径，例如口服、经皮、经粘膜、吸入剂或通过注射（胃肠外）。此类剂型应该允许化合物到达靶细胞。其它因素在本领域中是公知的，并且包括诸如毒性和延迟化合物或组合物发挥其作用的剂型等因素。技术和配方通常可以参见 *The Science and Practice of Pharmacy*，第21版，Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia, PA, 2005（其通过引用并入本文）。

[0096] 可以通过包括静脉内、腹膜内、皮下、肌肉内、口服、经粘膜、直肠、经皮或吸入的不同途径施用赛度替尼。在一些实施方案中，可以通过口服施用来施用赛度替尼。对于口服施用，例如，可将赛度替尼配制成常规口服剂型，如胶囊、片剂和液体制剂，如糖浆剂、酏剂和浓缩液滴。

[0097] 对于吸入剂，可以将赛度替尼配制成干粉或合适的溶液、悬浮液或气雾剂。粉末和溶液可以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末基质如乳糖或淀粉，并且溶液可以包含丙二醇、无菌水、乙醇、氯化钠和其它添加剂，如酸、碱和缓冲盐。此类溶液或悬浮液可以通过经由喷雾吸入、泵、雾化器或喷雾器等来施用。赛度替尼也可以与其它吸入疗法组合使用，例如皮质类固醇如丙酸氟替卡松、二丙酸倍氯米松、曲安奈德、布地奈德和糠酸莫米松； β 激动剂如沙丁胺醇、沙美特罗和福莫特罗；抗胆碱能药如异丙托溴铵或噻托溴铵；血管扩张药，如曲前列环素（treprostinil）和伊洛前列素（iloprost）；酶如DNA酶；治疗蛋白质；免疫球蛋白抗体；寡核苷酸，如单链或双链DNA或RNA、siRNA；抗生素如妥布霉素；毒蕈碱受体拮抗剂；白三烯拮抗剂；细胞因子拮抗剂；蛋白酶抑制剂；色甘酸钠；奈多克利钠（nedocril sodium）；和色甘酸钠。

[0098] 例如通过将赛度替尼与固体赋形剂组合，任选地研磨所得的混合物，并且若想要的话在添加合适的辅助剂后加工颗粒的混合物以获得片剂或锭剂芯，可以获得口服使用的药物制剂。适当的赋形剂特别是填充剂，如糖，包括乳糖、蔗糖、甘露醇、或山梨糖醇；纤维素制剂，例如玉米淀粉、小麦淀粉、大米淀粉、马铃薯淀粉、明胶、黄蓍树胶、甲基纤维素、羟甲基纤维素、羧甲基纤维素钠（CMC）、和/或聚乙烯吡咯烷酮（PVP：聚维酮）。若想要的话，可以添加崩解剂，如交联的聚乙烯吡咯烷酮、琼脂或海藻酸、或其盐，如海藻酸钠。

[0099] 给锭剂芯提供合适的包衣。为此，可以使用浓缩糖溶液，其可以任选地含有例如阿拉伯树胶、滑石、聚乙烯吡咯烷酮、卡波普凝胶，聚乙二醇（PEG）和/或二氧化钛、漆溶液和合适的有机溶剂或溶剂混合物。可以将染料或颜料加入到片剂或锭剂包衣中以鉴定或表征活性化合物剂量的不同组合。

[0100] 可以口服使用的药物制剂包括由明胶制成的推入-配合胶囊（“凝胶胶囊

(gelcap)”),以及由明胶和增塑剂(如甘油或山梨糖醇)制成的软密封胶囊。推入-配合胶囊可以含有与填充剂如乳糖、粘合剂如淀粉和/或润滑剂如滑石粉或硬脂酸镁以及任选地稳定剂混合的活性成分。在软胶囊中,可将赛度替尼溶解或悬浮于合适的液体中,如脂肪油、液体石蜡或液体聚乙二醇(PEG)。另外,可以加入稳定剂。

[0101] 或者,可以使用注射(胃肠外施用),例如肌肉内、静脉内、腹膜内和/或皮下。对于注射,将赛度替尼在无菌液体溶液中,如在生理上相容的缓冲液或溶液,如盐水溶液、汉克氏溶液或林格氏溶液中配制。另外,可以将赛度替尼配制成固体形式并在使用前立即重新溶解或悬浮。也可以产生冻干形式。

[0102] 也可以通过经粘膜、局部、经皮或吸入手段施用。对于经粘膜、局部或经皮施用,在配制剂中使用适合于要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,并且包括例如对于经粘膜施用,胆汁盐和夫西地酸衍生物。另外,可以使用去污剂来促进渗透。例如,经粘膜施用可以经由鼻喷雾或栓剂(直肠或阴道)。

[0103] 通过选择本领域中已知的适当载体来将本公开的局部组合物配制为油、乳膏、洗剂、软膏剂等。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、动物脂肪和高分子量醇(大于C₁₂)。在另一个实施方案中,载体是活性成分可溶于其中的那些载体。若想要的话,还可以包括乳化剂、稳定剂、湿润剂和抗氧化剂以及赋予颜色或香味的试剂。用于局部施用的乳膏从矿物油、自乳化蜂蜡和水的混合物配制,在所述混合物中混合了少量溶剂(例如油)中溶解的活性成分。此外,通过经皮手段的施用可以包括经皮贴剂或敷料,如用活性成分以及任选地本领域中已知的一种或多种载体或稀释剂浸渍的绷带。为了以经皮递送系统的形式施用,剂量施用贯穿整个剂量方案当然将是连续的而非间歇的。

[0104] 在另一个实施方案中,本公开提供了试剂盒,所述试剂盒包含赛度替尼或其药学上可接受的盐或其药物组合物。在一些实施方案中,例如在小瓶、瓶、烧瓶中包装化合物或组合物,所述小瓶、瓶、烧瓶可进一步包装在例如盒、封套或袋内;化合物或组合物由美国食品和药物管理局或类似管理机构批准用于施用于哺乳动物,例如人;对于蛋白激酶介导的疾病或病况,化合物或组合物批准用于施用于哺乳动物(例如人);本文所述的试剂盒可以包括关于使用的书面说明书和/或其它指示,即对于如本文中所述的疾病或病况如血液癌症,化合物或组合物适用于或批准用于对哺乳动物,例如人施用;以及可以以单位剂量或单一剂量形式,例如单一剂量丸剂、胶囊等包装化合物或组合物。

实施例

[0105] 实施例1:临床前模型、临床PK/PD和肿瘤反应

材料和方法

纯化的激酶测定法:在Millipore以固定浓度300nM ATP进行。使用10点浓度曲线来确定IC₅₀(抑制浓度)。

[0106] 人全血测定法:通过用各种针对BCR和细胞因子受体的激动剂刺激人全血来确定对SYK和JAK依赖性和非依赖性信号传导的抑制。使用8点浓度曲线来确定IC₅₀,如先前所述(Coffey等人,J. of Pharm. and Experimental Therapeutics, 351:538-548, 2014),刺激肝素化健康人全血的100μL等分试样。通过荧光激活细胞分选(“FACS”)确定信号传导和激活反应。对于临床试验,在给药之前和之后收集全血样品。通过相对于给药前刺激反应标

准化来计算抑制百分比。

[0107] DLBCL细胞系存活力测定法：使用十点浓度反应曲线产生IC₅₀，在384孔板中使用CellTiter Glo (Promega) 测定法筛选购自ATCC的细胞系。每个IC₅₀值是至少四次重复实验的平均值。进行使用基于FACS的胱天蛋白酶3切割检测试剂盒 (BD Biosciences) 的后续分析和Edu掺入。

[0108] 大鼠胶原诱导的关节炎：使用大鼠胶原蛋白诱导的关节炎模型测定赛度替尼的体内抗炎活性，并且完全如别处 (Coffey 等人, J. of Pharm. and Experimental Therapeutics, 340: 350-359, 2012) 所述进行。通过ELISA (R&D Systems) 确定胶原抗体滴度。使用液相色谱-串联质谱法测定稳态血清C_{max}。

[0109] 细胞因子分析：通过使用人炎症图的Myriad RBM (Austin, TX) 分析血清蛋白质。

[0110] 临床研究设计。这是复发性/难治性CLL/SLL或B细胞NHL患者中赛度替尼的1期开放标签、多剂量、剂量递增研究。以15mg QD (每天一次) 开始研究，并在具有28天安全窗的3 + 3设计中递增剂量。患者在第1天接受单剂量以进行72小时PK评估。然后在第4天开始连续给药。

[0111] 结果

在健康全血离体掺加实验中，赛度替尼以范围为0.2-0.9μM的IC₅₀ (在15 mg至40 mg的临床剂量下实现) 选择性抑制BCR/SYK和细胞因子 (IL2、IL4、IL6) JAK/STAT信号传导，在0.3 μM平均血浆浓度 (在≥30mg剂量下实现) 下在大鼠胶原诱导的关节炎模型中抑制炎症和关节破坏，并且在大多数细胞系中在2μM (在剂量≥40mg下实现) 下诱导凋亡。在每日一次口服给药后在癌症患者中安全实现了高于2 μM的血浆浓度，期间维持~1μM的稳态C_{min}。

[0112] 赛度替尼针对SYK和JAK信号传导的效力和特异性

表1代表赛度替尼针对纯化的激酶的IC₅₀，所述激酶在270激酶组筛选 (Millipore) 中以>80%受抑制。尽管在酶反应中有抑制，对于AMPK、JAK2、TBK-1、RSK2、和RSK4在细胞水平上和/或在患者中没有抑制的证据。

[0113] 表1：纯化的激酶测定法

激酶	IC ₅₀ (nM)
TYK2	0.5
MST1	4
ARK5	4
MLK1	5
FMS	5
AMPK	6
JAK2	6
JAK3	8
TBK1	10
MARK1	10
JAK1	12
PAR1B-a	13
TSSK	14

MST2	15
GCK	18
JNK3	18
RSK2	20
RSK4	28
SYK	32
CHK1	42
FLT4	51
FLT3	90
RET	105
ITK	194

表2是各种健康正常人全血测定法中的赛度替尼IC的总结。这些数据证明了SYK、JAK1/3和JAK1/TYK2依赖性途径的选择性。针对SYK和JAK1/3/TYK2途径的效力是相当的。

[0114] 表2: 健康正常人全血测定法

细胞类型	刺激	激酶	读出	IC ₅₀ (μM)
B 细胞	BCR	SYK	CD69	0.1
	BCR	SYK	pERK Y204	0.5
	IL4	JAK1/3	pSTAT6 Y641	0.92
	PMA	PKC	pERK Y204	>4
嗜碱性粒细胞	FcεR1	SYK	CD63	0.12
T 细胞	IL2	JAK1/3	pSTAT5 Y694	0.2
	IL4	JAK1/3	pSTAT6 Y641	0.58
	TCR	Zap70	pERK Y204	>4
	PMA	PKC	pERK Y204	>4
单核细胞	IL6	JAK1/TYK2	pSTAT3 Y705	0.35
	GM-CSF	JAK2	pSTAT5 Y694	>4

赛度替尼在2μM下针对15种DLBCL细胞系是广泛活性的。

[0115] 相对于更为靶向性的药剂,赛度替尼在DLBCL细胞系中表明宽的抗肿瘤活性。下表3总结了与下述其它相关激酶抑制剂相比赛度替尼的IC₅₀值:PRT06318 (Syk抑制剂,其记载于美国专利6,432,963);InSolution™ JAK抑制剂I (CAS 457081-03-7;表3中的“Pan-Jak”);CP-690550 (Jak3抑制剂);艾代拉利司 (PI3Kδ抑制剂);IPI-145 (PI3Kδ和γ抑制剂);和多柔比星 (“Doxo”;蒽环类药物)。这些抑制剂是商品化的或者根据本领域技术人员已知的合成方法制备。

[0116] 表3

CellTiter Glo 测定法中的激酶抑制剂的 IC ₅₀							
细胞系	赛度替尼	PRT06-318	Pan-Jak	CP690550	艾代拉利司	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

在代表ABC和GCB亚型两者的15种细胞系的组中,9种经历凋亡,并且另外2种经历细胞周期阻滞。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而非JAK抑制敏感,并且1种细胞系对JAK而非SYK抑制敏感。15种细胞系中的三种(DB、TOLEDO和RCK8)对赛度替尼有抗性。

[0117] 图1和图2描绘了柱形图,其分别显示了Edu掺入的百分比抑制和通过FACS分析得到的胱天蛋白酶3切割的百分比诱导。

[0118] 上述数据表明赛度替尼在2 μM 下针对DLBCL细胞系是广泛活性的,并且主要通过诱导凋亡起作用。

[0119] 赛度替尼在大鼠中以0.52 μM C_{max}抑制自身免疫机制。

[0120] 图3显示了来自大鼠胶原诱发的关节炎模型的数据。在用媒介物或各种剂量水平的赛度替尼处理的情况下随时间(x轴)绘制了后爪炎性得分(平均值 $\pm$ SEM; y轴; 每组n=8)。每个给药组的平均血浆浓度(C_{max})显示在图的右侧。星号表示相对于媒介物根据学生T检验的统计显著性(p < 0.05)。

[0121] 在赛度替尼血浆浓度0.5-0.6 μM C_{max} (对应于~0.3-0.4 μM C_{平均})下完全抑制大鼠中的炎性和自身抗体产生。这些暴露在人体中在30 mg每日一次剂量下安全实现,并且对应于外周全血测定法中对SYK和JAK的约50%抑制。在临床测试的所有剂量水平下观察到血清B2M(及其它炎症标志物)降低的清楚证据。

[0122] 患者中的口服给药后SYK和JAK抑制的效力。

[0123] 在患者中的口服给药后,SYK和JAK途径与健康志愿者离体参加实验中观察到的效力以相似的效力受到抑制,并且对于多个周期的治疗,已经安全实现了对SYK和JAK的>90%

抑制。

[0124] 如通过CT扫描测量的肿瘤反应与患者来源的全血中的SYK和JAK信号传导的百分比抑制和炎症的血清标志物(例如 β 2M、CRP、IL10、VCAM1、sTNFR、CCL3)的百分比抑制显著相关。

[0125] 结论

诱导凋亡和/或细胞周期阻滞需要的赛度替尼浓度是变化的,但是一般在2 μ M下观察到。在40 mg QD下安全实现了1-2 μ M C_{min} 至 C_{max} 的稳态浓度。如通过CT扫描评估的患者肿瘤缩小与SYK和JAK的%抑制、几种炎症的血清标志物的%抑制显著相关,而且还与赛度替尼血浆浓度相关。剂量递增在良好可耐受性的情况下继续,直至100 mg QD。

[0126] 基于这些结果,认为赛度替尼可用于治疗B细胞淋巴瘤,如DLBCL。

[0127] 实施例2:赛度替尼对原代人CLL细胞的影响

24份原代CLL样品中的赛度替尼

CLL细胞分离和培养:使用人B细胞富集混合物试剂盒(Stemcell Technologies, Vancouver, BC, Canada)纯化CLL细胞(可购自ATCC),并且用抗CD5/CD19染色用于验证纯度,其在所有情况下大于95%。在2.5 mg/mL CpG、100 ng/mL CD40L、10 ng/mL IL-4的存在或不存在下以 1×10^7 个细胞/mL的密度在RPMI-1640中培养分离的CLL细胞,所述RPMI-1640具有15%胎牛血清(Gibco, Grand Island, NY, USA)、青霉素(100 IU)、和链霉素(100 μ g/mL)。用板结合的抗IgM (10 μ 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。

[0128] 细胞存活力测定法和 IC_{50} 确定:将从CLL患者分离的CD5⁺/CD19⁺细胞与或不与增加浓度的赛度替尼(10^1 - 10^5 nM)温育72小时,并且通过用2 μ g/mL碘化丙啶(PI) (Molecular Probe)染色测量细胞存活力,如先前描述。通过FACS LSR2 (BD Biosciences)计数活细胞门中的一万个事件,并且相对于每个样本的匹配媒介物对照(100%)标准化数据。然后,使用GraphPad Prism 6程序(San Diego, CA, USA)产生 IC_{50} 。

[0129] 共培养条件:人骨髓基质细胞系HS-5获自ATCC,并且NK-Tert (NKTert)由Jan A. Burger博士(M.D. Anderson)友情提供,先前描述了CLL细胞和基质细胞共培养测定法(例如Cheng等人, *Leukemia*. 2014; 28 (3):649-657)。简而言之,将基质细胞以 5×10^4 个细胞/每孔的浓度在24孔板中接种,并且温育24小时以让细胞粘附。然后,将CLL细胞以比率100:1 (5×10^6 个细胞/mL)加入到培养物中,在RPMI培养基中的基质细胞的汇合层上。通过温和移液,使粘附的基质细胞层保持完整来收获CLL细胞。

[0130] 具有连续稀释赛度替尼的原代CLL样品和用PI/7AAD流式细胞术在72小时后测量的细胞存活力。

[0131] 用赛度替尼,双重SYK/JAK抑制剂在IL-4/CD40L的存在或不存在下处理二十四份原代CLL样品,并且使用碘化丙啶/膜联蛋白V染色和PARP切割评估凋亡。通过免疫印迹法和流式细胞术评估赛度替尼对B细胞受体和细胞因子受体诱导的信号传导的影响。

[0132] 用赛度替尼将来自24名患者的CLL细胞处理24、48和72小时,并且使用碘化丙啶和膜联蛋白V染色评估存活力。赛度替尼以浓度和时间依赖性方式诱导凋亡。

[0133] 未突变的IGHV和高表达的CD49d与进行性疾病和CLL的恶化预后相关。对于治疗性

应用重要的是,赛度替尼在U-CLL中与M-CLL相比和在具有高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凋亡。

[0134] 发现用赛度替尼处理CLL细胞诱导促凋亡胱天蛋白酶3蛋白的切割/激活以及还提高85 kDa PARP亚片段(凋亡标志物)的水平。赛度替尼诱导的凋亡受到用胱天蛋白酶抑制剂ZVAD的共处理抑制,指示经由胱天蛋白酶依赖性机制发生赛度替尼诱导的CLL细胞凋亡。另外,在ZVAD存在下24小时的赛度替尼处理后,促凋亡蛋白NOXA的水平升高,而抗凋亡蛋白MCL1降低。

[0135] 淋巴结中的BCR结扎增强CLL存活和对化疗的抗性。赛度替尼预处理能够抑制可溶性抗IgM和固定的抗IgM诱导的信号传导途径两者。IL-4在CLL细胞中经JAK/STAT-6途径发出信号,并且已经显示在介导免于化疗的保护中是重要的。用赛度替尼处理CLL细胞消除了IL-4诱导的STAT6磷酸化。另外,赛度替尼在ZVAD的存在下在24小时后抑制IL-4,增加表面IgM表达。

[0136] 在患者中,淋巴结组织部位提供了保护CLL细胞免于凋亡的各种信号。因此,我们使用了IL-4和CD40L来体外模拟淋巴结环境。24小时后的IL-4/CD40L处理与未处理的细胞相比增加了CLL细胞的存活力。

[0137] 本实施例显示了用赛度替尼处理原代人CLL细胞诱导胱天蛋白酶依赖性凋亡,在不佳预后标志物的CLL样品中效力增加;赛度替尼在患者中可实现的浓度(~2.2 μ M)下克服了BCR和IL-4介导的信号传导;并且赛度替尼在IL-4/CD40L支持的存在或不存在下诱导凋亡。

[0138] 60份CLL样品中的赛度替尼

在根据上文描述的方法分析的60份CLL样品中,60份CLL中的IC₅₀范围为0.37至10.02 μ M。对于分组的赛度替尼的平均IC₅₀是2.57 μ M,这是临床可实现的。

[0139] 无论通过赛度替尼的细胞杀伤在CLL间是否不同,还研究了通过已知预后因素分层的亚组。发现了具有未突变IGHV (N=33)对突变IGHV (N=27)的CLL细胞具有更低的IC₅₀,并且因此对赛度替尼更敏感(P=0.0395)(用学生检验分析数据)(图6)。具有高风险遗传异常(包括del (11q)、三体性12、和del (17p))的CLL细胞比具有del (13q)或缺乏一起的这些特定遗传异常的细胞对赛度替尼更敏感(图7)。因此,CLL细胞对赛度替尼敏感,尤其是根据IGHV和细胞遗传学为不良预后的情况下。

[0140] 还认为赛度替尼在如通过例如Zap70证明为不良预后的情况下也将是有用的。

[0141] 实施例3:赛度替尼的I期研究的临床和关联结果

在复发性/难治性CLL/SLL或B细胞非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)患者中进行赛度替尼的人类首次研究(first-in-human study)。进行具有28天周期的3+3剂量递增研究;研究的剂量范围为15 mg至65 mg每天一次和直至45 mg每天两次。患者在第1天接受单一剂量以进行72小时PK评估。在第4天启动连续给药。对43名CLL/SLL或B细胞NHL患者给药。中值年龄是67岁(范围23-85),并且中值在前疗法(tx)是3(范围1-8)。

[0142] 监测药代动力学("PK")、药效学("PD")、和安全性。通过标准规范评估反应。使用多种全血测定法确定SYK和JAK的抑制水平,所述全血测定法测量经由B细胞抗原、IL2、IL4、IL6、和GM-CSF的受体的信号传导。还测量肿瘤负荷的血清标志物,包括CCL3、CCL4、和其它炎症标志物(β 2M和CRP)。

[0143] 观察到PK适合于具有半衰期12-16小时和2:1峰谷比的每日一次给药。在周期1的第28天时,循环淋巴细胞中SYK和JAK (80-90%抑制) 和炎症的血清标志物的饱和抑制(例如 β 2M、CRP、CCL4;50-90%抑制)在血浆浓度约0.6-1 μ M(在40 mg剂量的 C_{min} 下实现)下发生。在65 mg剂量下,这些参数在周期1的第1天时受到80-90%抑制,指示与较低剂量相比更立即的效应。在65 mg剂量下,稳态 C_{min} 和 C_{max} 浓度分别是约1和2 μ M,足以诱导测试的大多数B细胞淋巴瘤细胞系中的凋亡。

[0144] 一般地,赛度替尼已经是良好耐受的。总共十名患者仍然服用赛度替尼达超过200天,包括2名已经服用一年以上的患者。

[0145] 表4总结了口服给药后稳态药代动力学的数据,其中n = 28。

[0146] 表4:口服给药后的稳态PK

剂量组	SS C_{min} μ M	SS C_{max} μ M	SS C_{ave} μ M	AUC_tau μ M*h	$T_{1/2}$ 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
每天两次 ("BID")方案					
15 mg/每天两次	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/每天两次	0.38 $\pm$ 0.02	0.89 $\pm$ 0.16	0.52 $\pm$ 0.09	6.2 $\pm$ 1	8.4 $\pm$ 1.8

*从组中除去PK异常值(稳态 C_{max} 为0.15 μ M)。

[0147] 当n = 20时,在剂量组45 mg BID,观察到以下各项: C_{min} = 1.27 $\pm$ 0.6 μ M; C_{max} = 2.16 $\pm$ 0.5 μ M; C_{ave} = 1.4 $\pm$ 0.7 μ M; AUC_{tau} = 33.3 $\pm$ 15.9 μ M*h; $T_{1/2}$ = 27.5 $\pm$ 22.5 h。

[0148] 观察到在单一65 mg剂量的赛度替尼后在来自FL患者的全血中观察到对BCR信号传导的完全抑制。

[0149] 表5总结了PK/PD数据,其中n = 43。

[0150] 表5:剂量组的PK/PD

剂量组	SS C _{min} μM	SS C _{max} μM	SS C _{ave} μM	AUC τ ₀₋₂₄ μM·h	T _{1/2} h	%抑制 BCR (C _{min} -C _{max})	%抑制 IL4 (C _{min} -C _{max})
						从所有数据的PK/PD拟合外推	
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(一名患者)	0.37	1.11	0.68	16.3	14.4	53 - 98%	41 - 72%
15 mg/每天两次	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/每天两次	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/每天两次	1.48 ± 0.33	1.8 ± 0.7	1.5 ± 0.45			100 - 100%	95 - 95%

在审视40-100 mg QD剂量时,平均稳态(SS) C_{min}和C_{max}浓度分别在0.77 ± 0.41和1.63 ± 0.56 μM达到稳定,并且发现平均稳态(SS) C_{ave}浓度是1.07 ± 0.44 μM,BCR (C_{min} - C_{max})的%抑制是92 - 100%,并且IL4 (C_{min} - C_{max})的%抑制是63 - 78%。40-100 mg的QD给药导致外周血中SYK和JAK信号传导的50至100%(稳态C_{min}至C_{max})抑制和炎症的血清标志物的显著抑制。

[0151] 基于这些结果,认为日剂量10 mg至约75 mg赛度替尼可用于治疗有需要的患者的血液癌症。

[0152] 对SYK和JAK信号传导的抑制以及对炎症的血清标志物的抑制的程度与肿瘤反应显著相关。虽然PK适合于具有12-16小时的t_{1/2}和2:1峰谷比的QD给药,但是认为pH依赖性低溶解度限制溶解,并且生理学建模表明BID给药将增加总体暴露。

[0153] 这用45 mg BID剂量实现,其中观察到外周血测定法中在SS C_{min}下对SYK和JAK的完全抑制,这与暴露的大致倍增一致。在45 mg BID剂量下,将SS C_{min}增加到约1.5 μM,足以在使用原代细胞和细胞系两者的临床前肿瘤模型中诱导凋亡的浓度。患者中45 mg BID剂量的后续评估表明在此剂量水平下治疗的所有患者的更高的C_{min}、C_{max}、和AUC值,并且PD标

志物指示对这两种途径的完全抑制。

[0154] 认为与研究相关并且在2名或以上患者中发生的 ≥ 3 级治疗紧急不利事件(“AE”)是:疲劳($n=5$)、贫血和嗜中性白血球减少(各为 $n=3$)、和腹部疼痛、嗜中性粒细胞计数减少、和肺炎(各为 $n=2$)。在45 mg BID剂量下实现最高的总体暴露,其中发生2例剂量限制毒性(“DLT”):3级胰腺炎和3级疲劳。

[0155] 基于PK/AE概貌,在1.25-1.5 μM 或更大的SS $C_{\min}$ 下似乎有更高等级的不利事件。PK建模指出剂量35 mg BID将产生1.02 μM 的SS $C_{\min}$ 、1.3 μM 的SS $C_{\max}$ 、1.2 μM 的SS C_{ave} 、对BCR ($C_{\min} - C_{\max}$)的%抑制为100 - 100%、和对IL4 ($C_{\min} - C_{\max}$)的%抑制为90 - 95%,预测这是可耐受的、有效的,并且提供一致的抗肿瘤活性。

[0156] 在具有0.7 μM 的SS $C_{\min}$ 的复发性/难治性CLL和FL患者中观察到一致的肿瘤反应。

[0157] 在范围为30-65 mg QD的剂量下在5名重度预治疗的CLL、FL、和转化DLBCL患者中观察到部分反应。在45 mg BID剂量组中观察到两个部分反应,一个在FL患者中并且另一个在CLL患者中。通常在2个周期的治疗后发生反应。多名患者已经表明结节减少,并且将临床益处维持超过一年。

[0158] 结论

赛度替尼在具有淋巴样恶性肿瘤的受试者中是耐受良好的。赛度替尼表明高水平SYK和JAK抑制下有利的PK概貌和良好的可耐受性。PK数据支持每天一次给药,将实质性抑制维持于 $C_{\min}$ 。以最大抑制对SYK/JAK信号传导的剂量依赖性且选择性的抑制大于80%;检测不到对JAK2或PKC的抑制。BCR信号传导途径在稳态 $C_{\min}/C_{\max}$ 下受到90-100%抑制,JAK/STAT信号传导在 $C_{\min}/C_{\max}$ 下受到60-80%抑制。PK数据指出口服每日一次40 mg至100 mg的暴露的平台期,导致稳态 $C_{\min}$ 下的亚微摩尔暴露(约0.7 μM)。认为溶解度可能是原因。BID给药克服了暴露的此平台期,并且具有增强的PD效果。

[0159] 赛度替尼显著降低了血液中作为炎症标志物的多种血清蛋白质,如 $\beta 2\text{M}$ 、CRP、TNFR、和CCL3/4。在肿瘤反应和抑制炎症的血清标志物(例如 $\beta 2\text{M}$ 和CCL4)之间观察到显著的关联。

[0160] 赛度替尼在重度预治疗的患者中具有有希望的活性。这些数据证明了复发性/难治性B细胞恶性肿瘤患者在此研究中的临床活性的证据。迄今为止,已经观察到部分反应,包括在CLL、FL、和DLBCL患者中。在多名患者中看到肿瘤缩小,所述患者包括服用其它BCR抑制剂后疾病进展(或不能耐受其它BCR抑制剂)的患者。观察到淋巴细胞增多的证据,如用其它BCR途径抑制剂看到。结果还显示了赛度替尼在这些重度预治疗患者中是耐受良好的。

[0161] 这些结果(包括部分反应)提供了额外的证据,即赛度替尼在具有复发性或难治性血液癌症患者中是活性的且耐受良好的。

[0162] 实施例4:发现赛度替尼阻断依鲁替尼敏感性和依鲁替尼抗性原代CLL细胞和经BTK^{C481S}转染的细胞系的增殖。

[0163] 依鲁替尼购自Selleckchem (Houston, TX, USA)。

[0164] 细胞分离和培养:使用人B细胞富集混合物试剂盒(Stemcell Technologies, Vancouver, BC, Canada)纯化CLL细胞,并且分别用抗CD5/CD19(分别为克隆HIB19和UCHT2, eBioscience, San Diego, CA)染色以验证纯度,其在所有情况下大于95%。在2.5

mg/mL CpG (ODN2006, 刺激性CpG-ODN B型, 人特异性, 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) 存在或不存在下以 1×10^7 个细胞/mL的密度在RPMI-1640中培养分离的CLL细胞, 所述RPMI-1640具有15%胎牛血清 (Gibco, Grand Island, NY)、青霉素 (100 IU)、和链霉素 (100 μ g/mL)。用板结合的抗IgM (10 μ g/mL) 进行抗IgM刺激。

[0165] 细胞增殖测定法: 在8天培养时在组合刺激 (2.5 μ g/mL CpG、100 ng/mL CD40L、10 ng/mL IL-4和10 μ g/mL板结合抗IgM) 的情况下添加溴脱氧尿苷 (BrdU)。使用BrdU Flow试剂盒 (BD Biosciences) 根据制造商的用法说明通过流式细胞术分析BrdU⁺细胞的百分比。

[0166] 产生BTK C481S和T316A突变体构建体: pCMV6表达载体中的BTK野生型 (WT) cDNA克隆购自ORIGENE (Rockville, MD USA)。使用QuikChange II定点诱变试剂盒 (Agilent Technologies, Cedar Creek, TX, USA) 遵循制造商的用法说明产生BTK^{C481S}和BTK^{T316A}突变体载体。通过Sanger测序确认突变体构建体的身份。

[0167] 细胞转染、细胞计数和存活力测定法: 使用Amaxa Nucleofector上的kit V, 程序U-13, 根据制造商的方案 (Amaxa, Cologne, Germany) 用WT BTK或BTK^{C481S}突变体的构建体转染TMD8细胞。在转染后, 在24孔板中将细胞与NKTert细胞共培养24小时以进行回收。然后, 将依鲁替尼、赛度替尼和媒介物 (DMSO) 添加到经转染的TMD8细胞中, 并且用Muse™ 计数和存活力试剂盒使用Muse细胞分析仪 (Millipore, Hayward, CA, USA) 测定细胞和细胞存活力。

[0168] 流式细胞术: 用优化量的荧光染料缀合的单抗完成细胞染色以进行FACS分析, 如先前描述 (例如Cheng等人, *Leukemia*. 2014; 28 (3) : 649-657)。简言之, 在用清洗缓冲液 (1 $\times$ PBS、0.5% BSA、0.1% NaN₃) 清洗两次后, 将 1×10^6 个细胞悬浮于100 μ L清洗缓冲液中, 并且用荧光染料缀合的单抗染色, 并且在室温温育20分钟。在透化/清洗缓冲液中将细胞清洗两次, 之后通过流式细胞仪扫描。对于胞内磷流 (phosphoflow) 分析, 将新鲜分离的CLL细胞立即用2-4% 多聚甲醛固定, 并且贮存于-80°C。将冷冻保存的细胞在室温融化, 并且在冰上用50%甲醇渗透4小时。将 1×10^6 个细胞悬浮于100 μ L清洗缓冲液, 并且用荧光染料缀合的单抗染色, 并且在室温温育20分钟。然后, 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。

[0169] 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疗法前从对依鲁替尼反应的患者分离的原代细胞。在第8天时测量BrdU掺入。这些细胞同样好地对此浓度下的任一药物反应。

[0170] 还对来自三名依鲁替尼复发性患者分离的细胞进行了相似的实验。这些样品携带赋予依鲁替尼抗性的BTK突变。两名患者具有已知突变BTK^{C481S}, 并且另一名患者具有BTK^{T316A}。每天对活细胞数目计数达7天。

[0171] 当针对依鲁替尼和赛度替尼测试这些突变细胞时, 在依鲁替尼处理后仍然有相当大数目的BrdU⁺ CLL细胞, 而赛度替尼几乎完全阻断所有三个情况中的BrdU⁺细胞群体的出现。这些实验证明了赛度替尼不仅在依鲁替尼敏感性CLL细胞中而且还在依鲁替尼抗性CLL细胞中阻断细胞增殖。

[0172] 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^{C481S}和野生型

BTK (WT) 表达载体两者, 克隆, 然后转染到依鲁替尼敏感性淋巴瘤细胞系TMD8中。评估了暴露于依鲁替尼或赛度替尼后的细胞生长。

[0173] 观察到经WT BTK转染的TMD8细胞的生长受到250 nM的依鲁替尼和赛度替尼两者相似地抑制(图4)。然而, 经BTK^{C481S}转染的细胞对依鲁替尼不太敏感, 如预期(图5)。同时, 这些细胞的生长被赛度替尼有效阻断, 这类似于WT BTK细胞中观察到的阻断。

[0174] 实施例5: 滤泡性淋巴瘤患者的病例研究

病例研究1(患者1): 患者是71岁龄具有转化滤泡性3B淋巴瘤(根据IHC为MYC/BCL2/BCL6阳性)的高加索裔女性。肿瘤为CD20+、CD10-、BCL2(强)、cMYC (50%)、和Ki67 (80%)。

[0175] 患者的在前疗法包括: R-CHOP(利妥昔单抗; 环磷酰胺; 盐酸多柔比星; 安可平; 泼尼松)(2013年11月- 2014年2月)。患者在2015年2月复发。在2015年3月, 患者通过每日一次口服(“PO QD”)开始用赛度替尼65 mg。

[0176] 观察到下列各项: 稳态C_{min}-C_{max}是0.73-1.74 μM; %抑制BCR信号传导是100%; %抑制IL2、IL4、IL6信号传导是60-100%; 并且%抑制GM-CSF是~20%。患者在2个周期后显示对赛度替尼的部分反应(69%)。

[0177] 患者1在2015年8月进展。患者1在5个周期的治疗后复发。

[0178] 病例研究2(患者2): 患者是71岁龄的具有滤泡性淋巴瘤的高加索裔女性。

[0179] 患者的在前疗法包括: 苯丁酸氮芥(1998; CR)、氟达拉滨/美罗华(Rituxan)(1999-2000; CR)、和阿伐他汀(Avastin)/美罗华(2011年3月-2012年1月)。患者2在2014年9月复发。在2014年10月, 患者2开始用赛度替尼45 mg PO QD, 并且由于疲劳, 剂量降低到30 mg。

[0180] 观察到下列各项: 稳态C_{min}-C_{max}是0.25-0.63 μM。%抑制BCR信号传导; 对于pSYK Y525/525为90%, 对于pERK Y204为0%; %抑制IL2、IL4、IL6信号传导是60-100%; %抑制GM-CSF是0%; 2个周期后对赛度替尼的部分反应(56%) 和治疗一年后76%结节减少。

[0181] 患者2仍然服用药物。

[0182] 病例研究3(患者3): 患者是79岁龄的具有滤泡性淋巴瘤的高加索裔男性。患者的肿瘤携带STAT中的S86A突变。

[0183] 患者的在前疗法: 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。在2014年6月, 通过每日两次口服(“PO BID”)对患者3给予赛度替尼15 mg。在服用赛度替尼的患者3中观察到稳定的疾病达6个月(20%结节减少)。

[0184] 这些病例研究显示了迄今为止, 赛度替尼是耐受良好的, 并且在具有滤泡性淋巴瘤的重度预治疗患者中具有有希望的活性。已经在其它非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)中看到了反应。

[0185] * * *

除非另外定义, 本文中使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常理解的相同的含义。

[0186] 本文中示例性描述的发明可以在缺乏本文中未明确公开的任何一个或多个要素、一个或多个限制的情况下适当实施。因此, 例如, 术语“包含”、“包括”、“含有”等应当广义而

非限制性理解。另外，本文中使用的术语和表述用作描述性而非限制性的术语，并且在使用此类术语和表述中并不意图排除显示并且描述的特征及其部分的任何等同物，而是认识到各种修改在要求保护的发明的范围内是可能的。

[0187] 因此，应该理解的是，虽然本发明已经通过优选实施方案和可选特征进行了具体公开，但是本领域技术人员可以采取对其中体现的本发明的修改、改进和变化，并且认为此类修改、改进和变化在本发明的范围内。本文提供的材料、方法和实例代表了优选实施方案，是示例性的，并不意图限制本发明的范围。

[0188] 本文中已经广泛且一般性地描述了本发明。落入一般性公开内的每个较窄的种类和亚属分组也构成本发明的一部分。这包括对本发明的一般性描述，条件或负面限制是从属中除去任何主题，无论在本文中是否明确叙述提取的材料。

[0189] 另外，在根据马库什组描述本发明的特征或方面的情况下，本领域技术人员将认识到，因此，也根据马库什组的任何单独成员或成员亚组描述本发明。

[0190] 本文提及的所有出版物、专利申请、专利和其它参考文献通过引用明确并入本文，其程度就像每篇单独通过引用并入一样。在矛盾的情况下，以本说明书(包括定义)为准。

[0191] 应该理解的是，虽然已经结合上述实施方案描述了本公开，但是前面的描述和实例意图阐述而不是限制本公开的范围。在本公开的范围内的其它方面、优点和修改对于本公开所属领域的技术人员将是显而易见的。

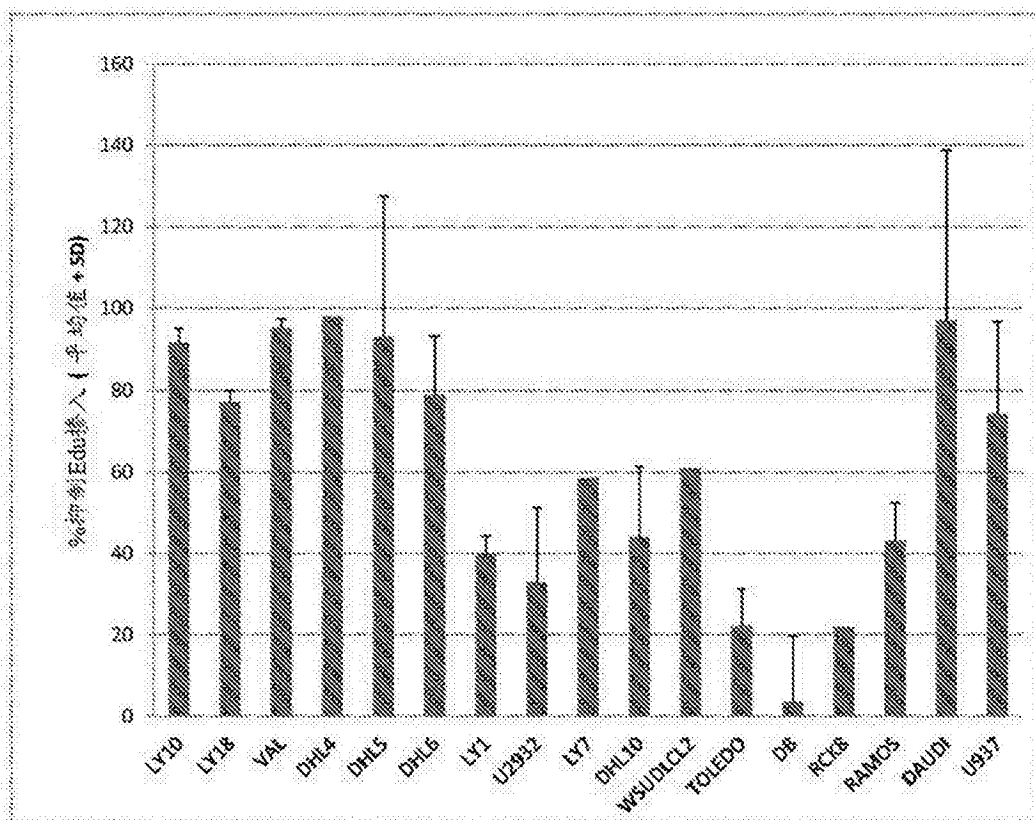


图1

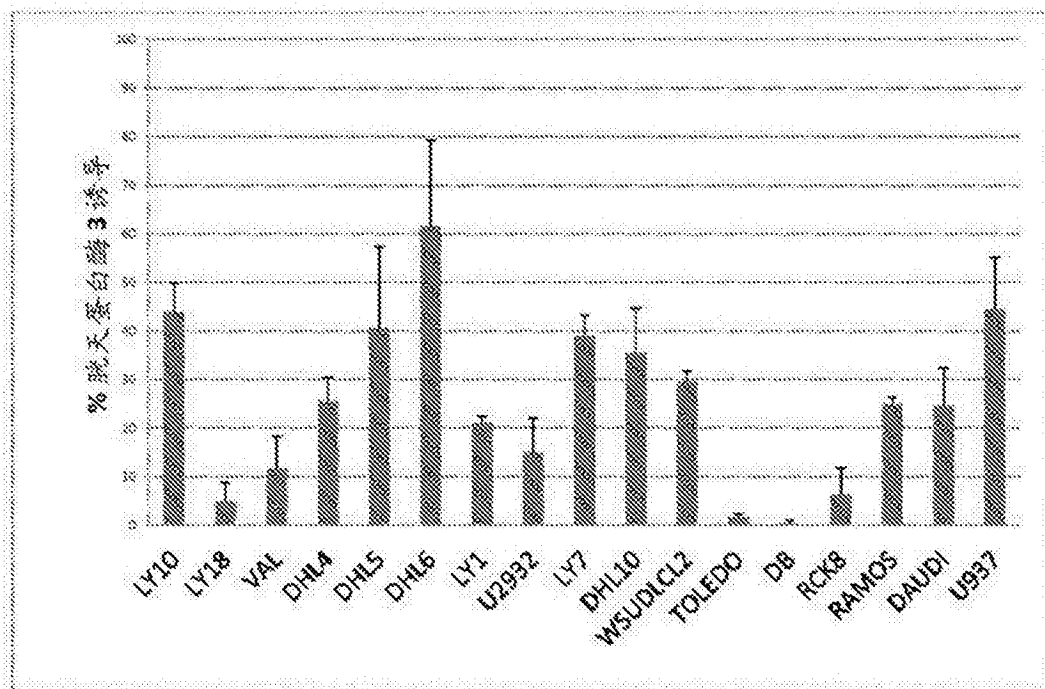


图2

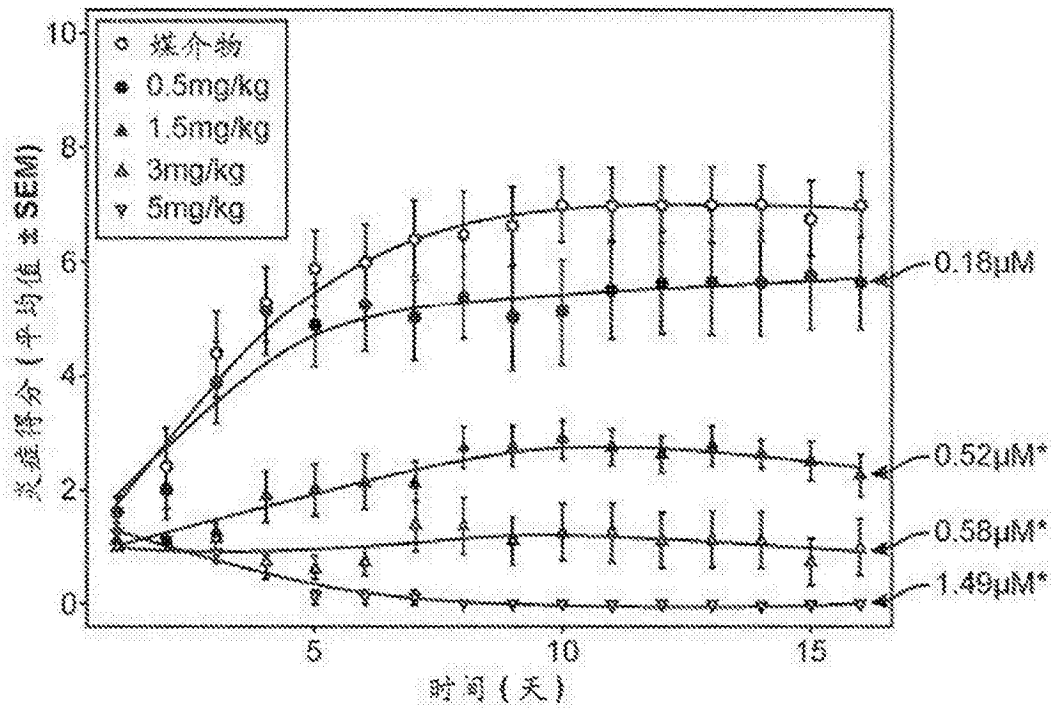


图3

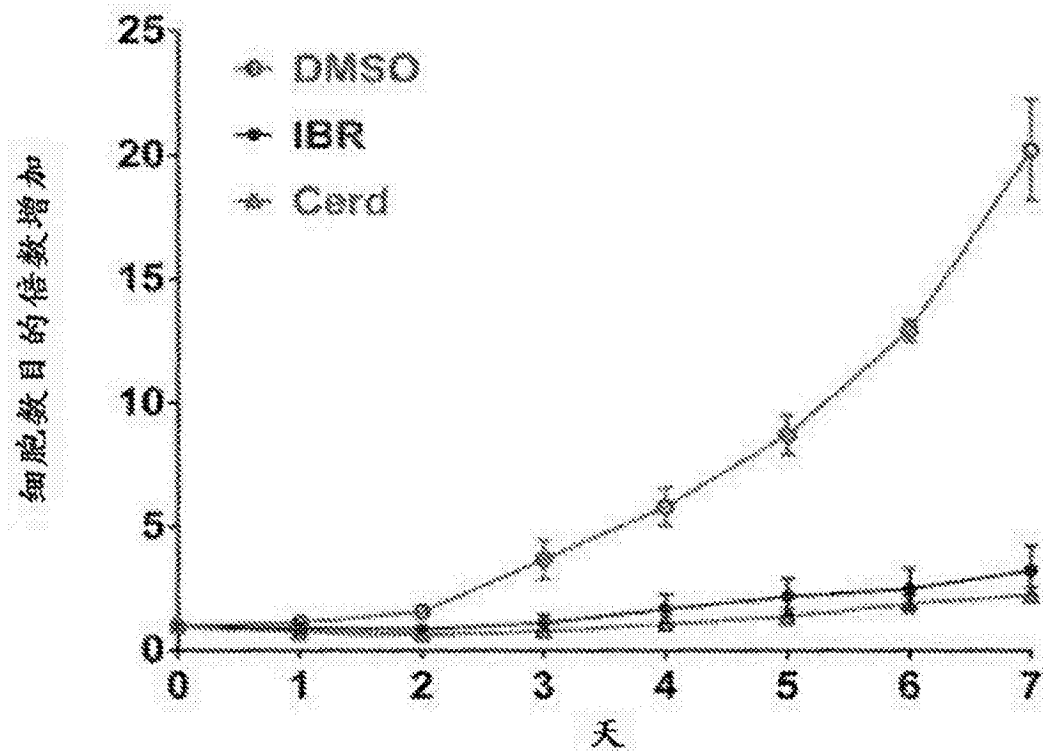
BTK 野生型

图4

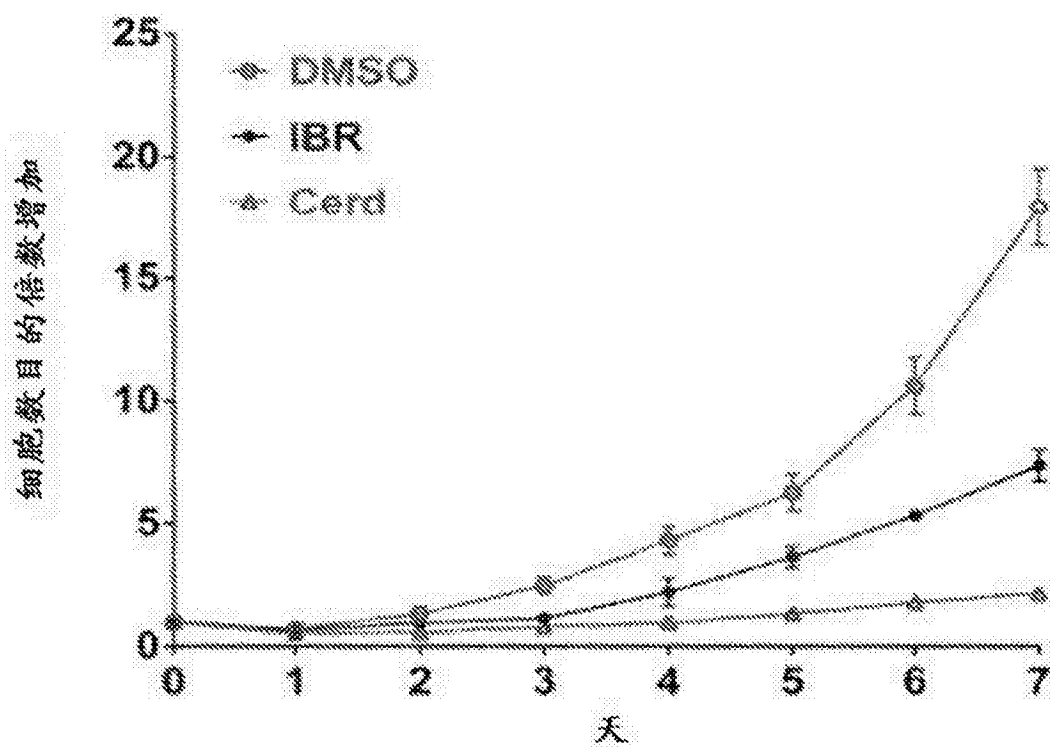
BTK C481S

图5

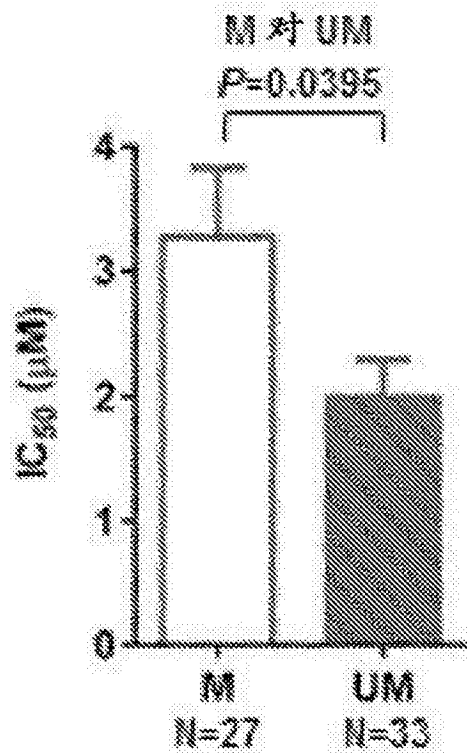


图6

细胞遗传学

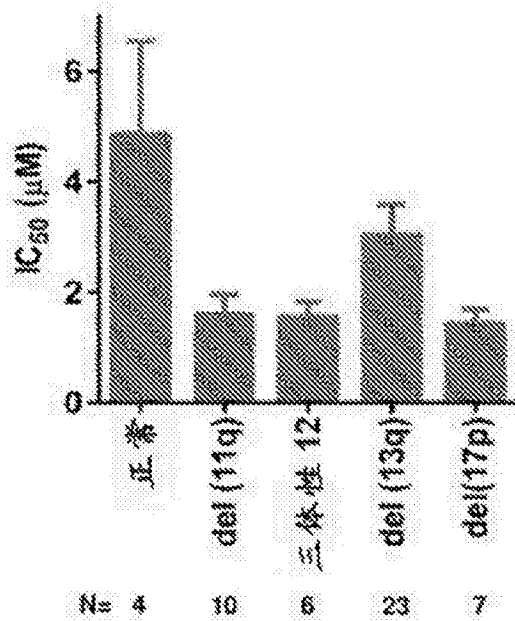


图7