(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 119744351 A
(43)申请公布日 2025.04.01

(21)申请号 202380024182.3

(22)申请日 2023.03.01

(30)优先权数据
63/268,793 2022.03.02 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2024.08.28

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2023/063452 2023.03.01

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2023/168247 EN 2023.09.07

(71)申请人 欧拉泰克治疗公司
地址 美国纽约

(72)发明人 查尔斯·A·迪纳雷罗
伊萨克·滕格斯达尔

(74)专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司 31100
专利代理师 陈扬扬 杨昀

(51)Int.Cl.
G01N 33/574(2006.01)
C07K 16/28(2006.01)
C07K 16/30(2006.01)
C12Q 1/6886(2006.01)

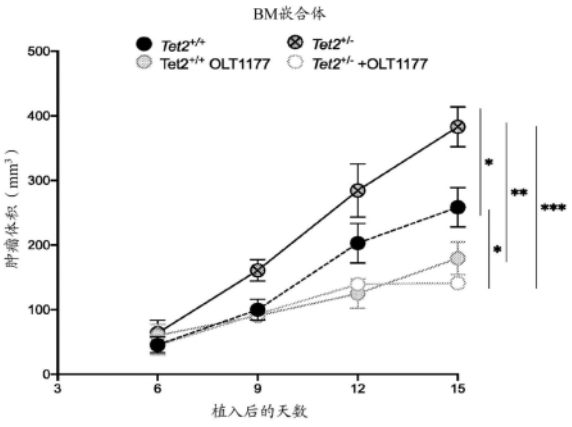
权利要求书1页 说明书10页 附图6页

(54)发明名称

用于治疗患有潜能未定的克隆性造血的实体癌患者的方法

(57)摘要

本发明涉及用于治疗患有潜能未定的克隆性造血(CHIP)的患者的实体癌的方法。该方法引入达泮舒腈的治疗性干预以改善CHIP患者的诸如乳腺癌之类的实体癌的该治疗。该方法包括首先通过检测来自患者的生物样本的Tet2或DNMT3A突变的存在或不存在来确定该患者是否患有CHIP病症,并然后接着使用达泮舒腈对患有CHIP病症的患者进行治疗性干预。本专利申请显示出CHIP在驱动乳腺癌中的作用。该数据提供了在乳腺癌患者中筛查Tet2或DNMT3A突变的基本原理,并且提供了作为治疗性治疗的达泮舒腈。



CN 119744351 A

1.一种治疗患者的实体癌的方法,所述方法包括以下步骤:

(a)确定患有乳腺癌或前列腺癌实体癌并且使用非达泮舒腈治疗进行治疗的患者的样本中的TET2或DNMT3A的克隆突变,以及(b1)如果确定所述患者具有大于0.02的TET2或DNMT3A的变异等位基因频率(VAF),则除了所述非达泮舒腈治疗之外,还使用有效量的达泮舒腈来治疗所述患者,或者(b2)如果确定所述患者具有≤0.02的TET2或DNMT3A的VAF,则继续用所述非达泮舒腈治疗来治疗所述患者。

2.根据权利要求1所述的方法,其中所述实体癌是乳腺癌,并且所述非达泮舒腈治疗是检查点抑制剂治疗。

3.根据权利要求2所述的方法,其中所述检查点抑制剂是程序性细胞死亡蛋白1(PD-1)、程序性死亡配体1(PD-L1)和细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4(CTLA-4)的抑制剂。

4.根据权利要求3所述的方法,其中所述检查点抑制剂是PD-1的抑制剂。

5.根据权利要求4所述的方法,其中所述检查点抑制剂是抗PD-1抗体。

6.根据权利要求2所述的方法,其中所述非达泮舒腈治疗是化学疗法。

7.根据权利要求2所述的方法,其中所述乳腺癌选自由以下项组成的组:原位导管癌(DCIS)、浸润性导管癌(IDC)、三阴性乳腺癌(TNBC)、炎性乳腺癌(IBC)、转移性乳腺癌和妊娠期间的乳腺癌。

8.根据权利要求1所述的方法,所述方法还包括在步骤(a)之前选择患有乳腺癌并且使用非达泮舒腈治疗进行治疗的患者的步骤。

9.根据权利要求1所述的方法,其中达泮舒腈通过口服施用来施用。

用于治疗患有潜能未定的克隆性造血的实体癌患者的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及用于治疗患有潜能未定的克隆性造血(CHIP)的患者的实体癌的方法。该方法包括首先通过检测Tet2或DNMT3A突变的存在或不存在来确定患者是否患有CHIP病症,并然后接着使用达泮舒腈对患有CHIP病症的患者进行治疗性干预。

背景技术

[0002] 随着人们年龄的增长,他们的组织积累越来越多的体细胞突变。当该过程发生在造血系统中时,相当大比例的循环血细胞可来源于单个突变的干细胞。这种增长称为“克隆性造血”,在老年人群体中是高度普遍的。克隆性造血(CH)是指通常在基因的一个等位基因中携带体细胞突变的造血干细胞(HSC)的逐渐、选择性扩增。CH的特征在于来源于单个克隆的血细胞的过度表达。诸如慢性髓系白血病或骨髓增生异常综合征之类的血癌是克隆性造血的原型示例。然而,这些癌症中存在的相同突变也在大部分健康老年人群体中发现。

[0003] 潜能未定的克隆性造血(CHIP)是指在不存在血液肿瘤和不存在血球减少的情况下,在血细胞或骨髓细胞中存在克隆性分子遗传学或细胞遗传学变化。CHIP是以血细胞的突变和克隆扩增为特征的非恶性病症。CHIP的发病率随年龄增加。当对一个人的血液或骨髓样本进行的检测表明血细胞携带与该病症相关联的遗传突变之一时,诊断为CHIP。

[0004] CHIP与出现血液恶性肿瘤和心血管疾病的较高风险以及减少的寿命相关联。

[0005] 肿瘤发生由基因组改变引发,该基因组改变包括点突变、基因缺失、导致细胞转化的染色体重排、自给自足的增殖、对抗增殖信号的不敏感性、逃避细胞凋亡和无限复制潜力,最终导致组织浸润和癌细胞转移。然而,肿瘤细胞的扩增与涉及癌细胞和非癌细胞两者的复杂事件网络相关。慢性炎症是此类促进病症的典型示例(1、2)。

[0006] 促炎细胞因子IL-1β是许多慢性炎性疾病的强效介质(3)。与癌症与慢性炎症的关联一致,已经表明IL-1β在若干肿瘤中过表达并且作为肿瘤促进机制(包括血管新生、免疫抑制、肿瘤相关巨噬细胞(TAM)的募集和癌细胞转移)的诱导物起作用(4至6)。

[0007] 乳腺癌的类型包括原位导管癌(DCIS)、浸润性导管癌(IDC)、三阴性乳腺癌(TNBC)、炎性乳腺癌(IBC)、转移性乳腺癌和妊娠期间的乳腺癌,以及其它类型。三阴性乳腺癌肿瘤的特征在于不存在雌激素受体(ER)、孕激素受体(PR)和升高的人表皮生长因子受体2(HER2)蛋白水平(7)。

[0008] NLRP3(NOD样受体家族含pyrin结构域蛋白3,也称为NLRP3或cryopyrin)是炎性小体的感受器之一,炎性小体是参与白介素-1β(IL-1β)和IL-18加工的大分子结构。NLRP3在胞内感染(细菌和病毒蛋白)或组织损伤(局部缺血)期间感测胞内危险。NLRP3活化会导致ASC(含有羧基末端半胱天冬酶募集结构域的凋亡相关斑点样蛋白)和半胱天冬酶-1的募集,从而导致炎性小体形成并且最终导致细胞死亡。

[0009] 达泮舒腈是一种合成的小分子β-磺酰腈,其已被证明会选择性地抑制NLRP3炎性小体并且当口服施用于健康受试者时是安全的(8)。

附图说明

[0010] 图1A示出了来自原位植入E0771细胞的种系Tet2+/+(野生型)或$Tet2^{+/-}$小鼠的肿瘤生长曲线。$Tet2^{+/-}$小鼠用达泮舒腈(OLT1177®)或不含达泮舒腈的对照食物口服治疗(N=8,两个独立实验)。

[0011] Tet2+/-驱动的乳腺癌进展是依赖于NLRP3活化的。图1B示出了从分离自荷瘤小鼠的骨髓贴壁细胞产生的IL-1β的平均值±SEM。

[0012] 图2.通过移植75% WT:25% Tet2+/+或Tet2+/-混合的BM生成骨髓(BM)嵌合体。给BM嵌合体小鼠原位植入E0771乳腺肿瘤,并且给予标准饮食或达泮舒腈饮食。图2示出了接受标准饮食或达泮舒腈饮食的植入E0771细胞的Tet2+/+(WT)或Tet2+/-嵌合体小鼠的肿瘤生长曲线(N=10,两个独立实验)。

[0013] 图3A至图3B示出了来自图2的BM嵌合体小鼠的外周血(3A)和肿瘤(3B)中的供体来源细胞的总百分比。

[0014] 图4A至图4B示出了来自图2的BM嵌合体小鼠的肿瘤浸润粒细胞的频率(4A)和MHC-II+表达的gMFI(4B)。

[0015] 图5A至图5B示出了来自图2的BM嵌合体小鼠的趋化因子C-C基序配体2(CCL2,5A)和角质细胞趋化因子(KC,5B)的血浆细胞因子产生。

[0016] 在所有附图中:***p<0.001,**p<0.01,*p<0.05。

具体实施方式

[0017] 克隆性造血(CH)与血液恶性肿瘤增加相关联。CH可定义为导致具有增加的炎性表型的髓样细胞的克隆扩增的造血干细胞中的体细胞突变。驱动参与DNA甲基化的基因10-11易位2(Tet2)和/或DNA甲基转移酶3a(DNMT3A)中的突变导致克隆扩增。Tet2是三种酶之一,这些酶负责催化5-甲基胞嘧啶氧化为5-羟甲基胞嘧啶和另外的中间体,可最终导致脱甲基化。DNMT3A基因提供制造DNA甲基转移酶3α的指令,该酶是负责DNA的胞嘧啶碱基中第五位的重新甲基化的两种酶之一,是影响基因表达的标记。

[0018] 本发明人已经发现CHIP在驱动诸如乳腺癌和前列腺癌之类的实体癌中的作用。在实体肿瘤浸润的髓样细胞中,免疫抑制性肿瘤微环境(TME)通过失调的细胞因子信号传导而被促进。CHIP和实体瘤之间的联系是浸润的髓样细胞出现在TME中以及具有高炎症反应,促进了肿瘤促进信号转导。对于患有CHIP的癌症患者,该疾病可能更严重或者患者处于更大的风险中。在乳腺癌中,CHIP在所有晚期乳腺癌中具有有害作用,这是因为当乳腺癌进展时,IL-1β随着疾病严重程度而增加。

[0019] 促炎性细胞因子IL-1β促进乳腺癌进展并且与疾病严重程度相关联。髓样细胞中NLRP3炎性小体的活化是IL-1β加工的主要来源。

[0020] NLRP3炎性小体的活化扩大对组织损伤的炎症反应以及介导另外的损伤。达泮舒腈是选择性NLRP3炎性小体抑制剂;达泮舒腈通过阻止NLRP3炎性小体的活化来减少炎症。

[0021] 根据达泮舒腈的作用机制,其阻止IL-1β和IL-18的产生和/或释放以及抑制动物和人类受试者中NLRP3炎性小体的形成,本发明人已经发现用于引入达泮舒腈的治疗性干预以改善CHIP患者的实体癌(诸如乳腺癌或前列腺癌)的治疗的方法。该方法包括首先通过检测Tet2或DNMT3A突变的存在或不存在来确定患者是否患有CHIP病症,并然后接着使用达

泮舒腈对患有CHIP病症的患者进行治疗性干预。

[0022] 治疗方法

[0023] 本发明涉及一种治疗诸如乳腺癌或前列腺癌之类的实体癌的患者的方法。该方法包括以下步骤:(a)确定患有实体癌并且使用非达泮舒腈治疗进行治疗的患者的样本中的TET2或DNMT3A的克隆突变,并且(b1)如果患者具有大于0.02的TET2或DNMT3A的变异等位基因频率(VAF),则除了非达泮舒腈治疗之外,还使用有效量的达泮舒腈来治疗患者,或者(b2)如果患者具有≤0.02的TET2或DNMT3A的VAF,则继续使用非达泮舒腈治疗来治疗患者,而不使用达泮舒腈治疗。

[0024] 在本方法中,识别患有实体癌并且使用非达泮舒腈治疗进行治疗的患者,并且从该患者获取生物样本。生物样本例如可以是来自患者的血液样本或骨髓细胞。优选血液样本。然后确定患者样本中TET2或DNMT3A的克隆突变。

[0025] TET2和DNMT3A是最常见的突变的CHIP驱动基因。具有TET2或DNMT3A突变的单核细胞和T细胞示出非常类似的促炎基因表达的增加。

[0026] 确定癌症患者样本中TET2或DNMT3A的克隆突变提供了患者的预后。本发明人已经发现,具有高Tet2或DNMT3A VAF的患者处于发展成晚期疾病的更大风险中并且受益于达泮舒腈治疗。达泮舒腈干预疗法逆转CHIP表型,并且可通过抑制衰减其它治疗的功效的NLRP3活化来提供与其它非达泮舒腈治疗的一些协同作用。

[0027] 为了确定克隆突变,将CHIP的阈值设定为2%的Tet2或DNMT3A的变体等位基因分数(VAF)(意味着2%的测序等位基因含有突变,或大约4%的细胞含有突变,假设突变是杂合的)。Tet2或DNMT3A的VAF可通过下一代测序或错误校正的测序从患者血液样本检测(9、10)。例如,VAF可通过如Dorsheimer中所述的样本制备、DNA分离、靶富集、高通量测序和变体调用来检测(10)。

[0028] 在确定TET2或DNMT3A的克隆突变后,如果患者具有大于0.02的TET2或DNMT3A的变体等位基因频率(VAF),则除了非达泮舒腈治疗外,还使用有效量的达泮舒腈来治疗患者。如果患者具有≤0.02的TET2或DNMT3A的VAF,则患者继续使用非达泮舒腈治疗,而不增加达泮舒腈治疗。

[0029] 如本文所用,“有效量的达泮舒腈”是通过改善病理状况和/或减轻、改善和/或消除疾病症状而有效治疗疾病的达泮舒腈的量。例如,有效量是减少癌症生长和/或减小肿瘤大小的量。

[0030] 适于通过本方法治疗的实体癌例如包括乳腺癌和前列腺癌。乳腺癌包括三阴性乳腺癌(TNBC)、原位导管癌(DCIS)、浸润性导管癌(IDC)、炎性乳腺癌(IBC)、转移性乳腺癌和妊娠期间的乳腺癌,以及其它类型。

[0031] 适于达泮舒腈干预的乳腺癌的非达泮舒腈治疗包括但不限于检查点抑制剂疗法,该检查点抑制剂疗法是癌症免疫疗法的一种形式。检查点抑制剂疗法靶向免疫检查点,免疫检查点是免疫系统的关键调节因子,当它们被刺激时,可衰减对免疫刺激的免疫应答。一些癌症可通过刺激免疫检查点靶点来保护其自身免受攻击。目前用于治疗乳腺癌并且适于达泮舒腈干预的检查点抑制剂包括但不限于程序性细胞死亡蛋白1(PD-1)、程序性死亡配体1(PD-L1)和细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4(CTLA-4)的抑制剂。PD-1存在于T细胞的表面上并且是PD-L1的受体。PD-1通过抑制炎性T细胞活性在下调免疫应答中发挥作用。该机制

有助于身体预防自身免疫性疾病,然而,该机制也可预防癌细胞被杀死(11)。

[0032] 适于达泮舒腈干预的乳腺癌的非达泮舒腈治疗还可包括化学疗法,诸如5-氟尿嘧啶核苷和吉西他滨。

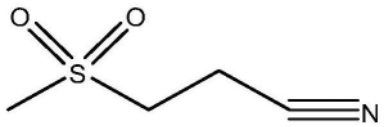
[0033] 适于达泮舒腈干预的前列腺癌的非达泮舒腈治疗包括但不限于放射疗法、化学疗法和/或长期雄激素剥夺疗法。目前批准用于前列腺癌的化学治疗剂是多西他赛或卡巴他赛(cabaxitaxel),这些连同雄激素剥夺一起已经证明在增加存活方面是有效的。靶向雄激素产生或信号传导的激素策略包括阿比特龙或恩扎鲁胺。

[0034] 达泮舒腈干预疗法逆转CHIP表型,并且可通过抑制衰减其它治疗的功效的NLRP3活化来提供与化学疗法的一些协同作用。例如,达泮舒腈干预疗法逆转CHIP表型,并且可提供与诸如抗PD-1和抗PD-L1之类的检查点抑制剂治疗的一些协同作用。

[0035] 如果确定患者具有大于0.02的TET2或DNMT3A的变体等位基因频率(VAF)并且适于达泮舒腈的联合治疗,则达泮舒腈治疗和非达泮舒腈治疗可同时或相继施用。

[0036] 化合物

[0037] 本发明使用纯化的达泮舒腈(3-甲磺酰基-丙腈)或其药学上可接受的溶剂化物,作为治疗性干预。

[0038] 

达泮舒腈

[0039] 如本文所用,“药学上可接受的溶剂合物”是保留母体化合物的期望生物活性并且不赋予不期望的毒理学作用的溶剂合物。如本文所用,“溶剂化物”是加成络合物,其中化合物与可接受的共溶剂以某一固定的比例组合。共溶剂包括但不限于水、乙酸、乙醇和其他适合的有机溶剂。

[0040] 药物组合物

[0041] 药物组合物中的活性化合物达泮舒腈或其药学上可接受的溶剂化物的量通常对于可注射制剂为约0.1%至5%,对于片剂制剂为约1%至90%,对于胶囊制剂为1%至100%,对于局部制剂为约0.01%至20%、0.05%至20%、0.1%至20%、0.2%至15%、0.5%至10%、或1%至5%(w/w),并且对于贴剂制剂为约0.1%至5%。

[0042] 如本申请中所用,“约”是指所叙述的值的±10%。

[0043] 药学上可接受的载体是非活性成分,可由本领域技术人员使用常规标准来选择。药学上可接受的载体包括但不限于非水基溶液、悬浮液、乳液、微乳液、胶束溶液、凝胶和软膏。药学上可接受的载体还可含有多种成分,这些成分包括但不限于盐水和水性电解质溶液;离子和非离子渗透剂,诸如氯化钠、氯化钾、甘油和右旋糖;pH调节剂和缓冲液,诸如氢氧化物的盐、磷酸盐、柠檬酸盐、乙酸盐、硼酸盐;和三乙醇胺;抗氧化剂,诸如亚硫酸氢盐、亚硫酸盐、偏亚硫酸氢盐、硫代亚硫酸盐、抗坏血酸、乙酰半胱氨酸、半胱氨酸、谷胱甘肽、丁基化羟基苯甲醚、丁基化羟基甲苯、生育酚和棕榈酸抗坏血酸酯的盐、酸和/或碱;表面活性剂,诸如卵磷脂、磷脂,包括但不限于磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺和磷脂酰肌醇;泊洛沙姆和泊洛沙胺、聚山梨醇酯(诸如聚山梨醇酯80、聚山梨醇酯60和聚山梨醇酯20)、聚醚(诸如聚乙二醇和聚丙二醇);聚乙烯,诸如聚乙烯醇和聚维酮;纤维素衍生物,诸如甲基纤维素、羟

丙基纤维素、羟乙基纤维素、羧甲基纤维素和羟丙基甲基纤维素及它们的盐;石油衍生物,诸如矿物油和白凡士林;脂肪,诸如羊毛脂、花生油、棕榈油、大豆油;甘油单酯、甘油二酯和甘油三酯;丙烯酸聚合物,诸如羧基聚亚甲基凝胶,和疏水改性的交联丙烯酸酯共聚物;多糖(诸如葡聚糖)和糖胺聚糖(诸如透明质酸钠)。此类药学上可接受的载体可使用众所周知的防腐剂进行防腐以防止细菌污染,这些防腐剂包括但不限于苯扎氯铵、乙二胺四乙酸及其盐、苄索氯铵、氯己定、氯丁醇、对羟基苯甲酸甲酯、硫柳汞和苯乙醇,或者可配制为供单次或多次使用的非防腐制剂。

[0044] 例如,达泮舒腈的片剂制剂或胶囊制剂可含有没有生物活性且不与活性化合物反应的其它赋形剂。片剂的赋形剂可包括填充剂、粘合剂、润滑剂和助流剂、崩解剂、润湿剂和释放速率调节剂。粘合剂促进制剂颗粒的粘附,并且对于片剂制剂是重要的。粘合剂的示例包括但不限于羧甲基纤维素、纤维素、乙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、甲基纤维素、刺梧桐树胶、淀粉、淀粉和黄蓍胶、聚(丙烯酸)和聚乙烯吡咯烷酮。

[0045] 例如,达泮舒腈的贴剂制剂可包含一些非活性成分,诸如1,3-丁二醇、二羟基氨基乙酸铝、乙二胺四乙酸二钠、D-山梨糖醇、明胶、陶土、对羟基苯甲酸甲酯、聚山梨醇酯80、聚维酮、丙二醇、对羟基苯甲酸丙酯、羧甲基纤维素钠、聚丙烯酸钠、酒石酸、二氧化钛和纯化水。贴剂制剂还可以含有皮肤渗透性增强剂,诸如乳酸酯(例如,乳酸月桂酯)或二乙二醇单乙醚。

[0046] 包括达泮舒腈的局部制剂可以是凝胶、乳膏、洗剂、液体、乳液、软膏、喷雾剂、溶液和悬浮液的形式。局部制剂中的非活性成分例如包括但不限于乳酸月桂酯(润肤剂/渗透增强剂)、二乙二醇单乙醚(润肤剂/渗透增强剂)、DMSO(溶解性增强剂)、硅酮弹性体(流变/质地改性剂)、辛酸/癸酸甘油三酯(润肤剂)、水杨酸辛酯(润肤剂/UV过滤剂)、硅酮流体(润肤剂/稀释剂)、角鲨烯(润肤剂)、葵花油(润肤剂)和二氧化硅(增稠剂)。在一个实施方案中,局部凝胶制剂中包含二乙二醇单乙醚。

[0047] 达泮舒腈的药物组合物可通过全身施用或部分施用来施加。全身施用包括但不限于口服、肠胃外(诸如静脉内、肌肉内、皮下或直肠)和吸入施用。在全身施用中,活性化合物首先到达血浆,然后分布到靶组织中。口服施用是本发明优选的施用途径。部分施用包括局部施用。

[0048] 组合物的给药可基于受试者的乳腺癌程度和每个患者的个体反应而变化。对于全身施用,所递送的活性化合物的血浆浓度可以变化;但通常为$1x10^{-10}$摩尔/升至$1x10^{-4}$摩尔/升,并且优选$1x10^{-8}$摩尔/升至$1x10^{-5}$摩尔/升。

[0049] 在一个实施方案中,将达泮舒腈口服施用于受试者。口服施用的剂量通常为至少1mg/kg/天并且小于100mg/kg/天,优选5mg/kg/天至100mg/kg/天,这取决于受试者的年龄和状况。例如,对于人类受试者,口服施用的剂量是1mg/kg/天至10mg/kg/天或1mg/kg/天至50mg/kg/天或1mg/kg/天至100mg/kg/天或5mg/kg/天至50mg/kg/天或5mg/kg/天至100mg/kg/天或10mg/kg/天至50mg/kg/天或10mg/kg/天至100mg/kg/天。例如,对于人类受试者,口服施用的剂量是100mg/天至10,000mg/天,并且优选100mg/天至2500mg/天、500mg/天至2500mg/天、500mg/天至4000mg/天、1000mg/天至5000mg/天、2000mg/天至5000mg/天、2000mg/天至6000mg/天或2000mg/天至8000mg/天。该药物可以每天口服一次、两次、三次或四次。患者每天接受治疗,持续14天,最长至1个月、2个月或3个月或终身。

[0050] 在一个实施方案中,将达泮舒腈静脉内施用于受试者。静脉内推注或静脉内输注的剂量通常为0.03mg/kg/天至5mg/kg/天或者0.03mg/kg/天至1mg/kg/天。

[0051] 在一个实施方案中,将达泮舒腈皮下施用于受试者。皮下施用的剂量通常为0.3mg/kg/天至20mg/kg/天、0.3mg/kg/天至3mg/kg/天、或者0.1mg/kg/天至1mg/kg/天。

[0052] 在一个实施方案中,达泮舒腈局部施加。根据医学问题和疾病病理学而定,局部达泮舒腈组合物每天局部施加至少1次或2次,或每天3次至4次。通常,局部组合物包含约0.01%至20%、或0.05%至20%、或0.1%至20%、或0.2%至15%、0.5%至10%、或1%至5%(w/w)的活性化合物。通常,每个剂量将0.2mL至10mL的局部组合物施加于个体。

[0053] 本领域技术人员将认识到,达泮舒腈的多种递送机制可适用于本发明。

[0054] 当确定乳腺癌患者或前列腺癌患者另外使用达泮舒腈治疗时,患者的非达泮舒腈治疗将遵循已经为该患者建立的相同方案。另选地,可减少患者的非达泮舒腈治疗的剂量或治疗间隔。

[0055] 本发明可用于治疗哺乳动物受试者,诸如人类、马、狗和猫。本发明特别可用于治疗人类。

[0056] 本专利申请已经证明,与不使用达泮舒腈治疗的那些小鼠相比,达泮舒腈治疗降低了$Tet2^{+/-}$小鼠中的EO771 TNBC的肿瘤生长。

[0057] 此外,本发明人已经证明,与野生型小鼠相比,从荷瘤$Tet2^{+/-}$小鼠培养的骨髓细胞表现出增加的IL-1β产生。此外,与未经治疗的$Tet2^{+/-}$小鼠相比,使用达泮舒腈治疗的荷瘤$Tet2^{+/-}$小鼠的骨髓细胞分泌显著更少的IL-1β。

[0058] 在三阴性乳腺癌中,IL-1β促进免疫抑制性TME。本发明人已经证明,荷瘤$Tet2^{+/-}$小鼠在骨髓贴壁细胞中产生更多的IL-1β,这指示Tet2+/-突变的增加使得宿主更易受免疫抑制性TME的影响。具有Tet2 VAF增加的CHIP患者处于发展成晚期疾病的更大风险中,并且达泮舒腈干预疗法抑制IL-1β的产生以及改善患者病症。达泮舒腈通过抑制IL-1β的产生有效逆转CHIP表型以及抑制NLRP3炎性小体活性。

[0059] 本专利申请已经表明转移性乳腺癌中的功能丧失性TET2突变的肿瘤促进结果。Tet2-CH本身不代表特定疾病,而是作为使IL-1β介导的疾病恶化的预先存在的触发因素。本发明人已经证明Tet2+/-种系小鼠的肿瘤生长增加了2倍。为了确定该观察是否仅仅是整个生物体中Tet2杂合性的人为现象或真正的Tet2 CH现象,本发明人使用混合的BM与25% Tet2 CH生成了BM嵌合体小鼠,并且表明,与Tet2+/+对照相比,Tet2+/-骨髓嵌合体的肿瘤生长增加了2倍,这证明这实际上是CH结果。

[0060] 此外,本专利申请示出了通过Tet2+/-嵌合体中血浆CCL2和KC的诱导,髓样细胞向肿瘤微环境(TME)的NLRP3依赖募集,导致肿瘤浸润粒细胞增加。一致地,本发明人观察到TME中来源于供体的Tet2+/-突变体的显著增加,从而将这些高炎性细胞置于TME中。这些数据表明,将高炎性Tet2+/-髓样细胞募集到乳腺癌TME促进了乳腺癌进展。

[0061] 在Tet2+/-荷瘤小鼠的饮食中添加达泮舒腈使粒细胞水平正常化至在Tet2+/+小鼠中存在的那些水平,反映了对IL-1β的依赖性。这些数据暗示了在肿瘤进展中的粒细胞并且突出了IL-1β诱导的粒细胞生成驱动肿瘤生长的循环。因此,达泮舒腈呈现了中和由Tet2+/-CH或DNMT3A CH介导的炎性疾病的治疗方法。

[0062] 以下实施例进一步说明本发明。这些实施例仅旨在说明本发明,并且不应被解释

为限制性的。

[0063] 实施例

[0064] 在下文描述的实施例中使用以下材料和方案。

[0065] 小鼠

[0066] 为Jackson Laboratories购买Tet2等位基因杂合型或Tet2等位基因野生型的6周龄至8周龄B6(Cg)-Tet2tm1.2Rao/J(JAX)雌性小鼠。

[0067] 细胞系

[0068] 小鼠转移性乳腺癌细胞系E0771购自ATCC。在补充有10％ FBS、1％HEPES、100单位/ml青霉素和0.1mg/ml链霉素的RPMI(康宁)中培养E0771细胞。将细胞保持在37℃的潮湿的5％ CO_2环境中。

[0069] 肿瘤模型

[0070] 将$2x10^5$ E0771细胞与matrigel混合并且原位植入到乳腺脂肪垫中(第0天)。在E0771细胞植入后第3天开始,用含有7.5g达泮舒腈/kg食物的食物颗粒随意喂予用达泮舒腈治疗的小鼠,并且持续至被处死。对于种系小鼠模型,在第18天处死小鼠,并且对于嵌合体小鼠模型,在第15天处死小鼠。小鼠通常每天消耗约4g食物,导致对照组的近似日剂量为0mg/kg/天,并且治疗组的近似日剂量为1,000mg/kg/天。小鼠饲料中的该食物颗粒浓度(食物中7.5g/kg的达泮舒腈)导致血液水平几乎与用1000mg/天剂量的达泮舒腈口服治疗的人类的血液水平(40μg/mL血液水平)相同(14)。用无达泮舒腈的对照食物颗粒喂予野生型和Tet2+/-小鼠。在E0771细胞植入后15天至18天后处死小鼠。使用通过数字卡尺测量的1/2(LxWxH)评估肿瘤体积。

[0071] 具有嵌合骨髓(BM)的小鼠

[0072] 为了创建更高度类似于人类CHIP的小鼠模型,我们生成了具有75％野生型(WT)和25％ Tet2纯合(Tet2+/+)或杂合(Tet2+/-)的嵌合骨髓(BM)的小鼠。为了鉴定WT或Tet2+/-细胞对造血的贡献,我们使用泛造血标记物CD45。我们使用在CD45 C57BL/6和Boy/J(分别为CD45.2和CD45.1)中具有变体的两种同系小鼠品系,可使用流式细胞术分析用荧光标记的抗体来识别它们。为了生成嵌合BM,我们对Boy/J受体小鼠(CD45.1)进行致死照射,其中每隔三小时施用11gy分割剂量。然后用两百万个未分级的BM细胞移植经照射的受体小鼠,这些细胞是75％ CD45.1WT和25％ CD45.2的混合。

[0073] Tet2+/+或Tet2+/-。通过眶后(RO)窦注射给予细胞。为了监测供体来源细胞的移植,每四周通过下颌下静脉对小鼠进行放血。然后通过溶血处理血液以去除红细胞,并且随后用荧光抗体对白细胞进行染色以进行流式细胞术分析。

[0074] 移植6周后,通过乳腺癌细胞的原位移植对小鼠给予乳腺肿瘤。通过使用卡尺测量小鼠的肿瘤体积来评估肿瘤进展。15天后,处死小鼠,并且收获它们的骨髓、外周血和肿瘤用于流式细胞术分析,以确定免疫细胞群体的水平和来自WT或Tet2+/+或Tet2+/-骨髓细胞的相对贡献。

[0075] 骨髓细胞因子产生

[0076] 收集来自荷瘤小鼠的骨髓细胞并且通过40μM细胞滤网过滤。将$3x10^6$细胞放入24孔板中并且温育过夜。第二天,去除非贴壁部分,并且用10μM达泮舒腈处理贴壁部分,并且在补充有10％ FBS、100单位/ml青霉素和0.1mg/ml链霉素的RPMI中培养24小时。使用

DuoSet ELISA(R&DSystems)测量细胞培养上清液中的细胞因子。

[0077] 流式细胞术

[0078] 骨髓分离和细胞染色在染色介质(SM;Hanks平衡盐溶液[HBSS1x,康宁1-022-CM],补充有热灭活的胎牛血清[FBS,VWR 97068-05],以达到最终浓度2%)中在冰上进行。用3mL的SM冲洗股骨和胫骨,并且接着用ACK裂解缓冲液进行RBC裂解。通过心脏分离外周血并且置于RBC裂解缓冲液中。在RBC裂解后,在冰上将细胞与抗体鸡尾酒一起温育30分钟,然后洗涤并且再悬浮于含有碘化丙锭的SM中以对死细胞进行染色。在BD FACSCelesta上执行流式细胞术。

[0079] 贴壁骨髓分离、培养和刺激

[0080] 如上所述,从四个长骨收集骨髓细胞,并且在计数前通过40μM细胞滤网过滤。将$1x10^6$细胞放入平底组织培养板中并且温育过夜。第二天,去除非贴壁部分,并将贴壁部分用于下游实验。

[0081] 细胞因子分析

[0082] 对于蛋白质印迹和细胞因子分析,用±LPS(100ng/mL)刺激贴壁骨髓细胞并且再培养24小时。在补充有10% FBS、100单位/ml青霉素和0.1mg/ml链霉素的RPMI中培养细胞。对于条件培养基刺激,通过温育$1x10^6$细胞72小时来收集E0771条件培养基,收集上清液并且离心以去除细胞碎片。然后将条件培养基以1:2加入到正常培养基中24小时。使用DuoSet ELISA(R&D Systems)测量细胞培养上清液中的细胞因子。

[0083] 实施例1A:达泮舒腈减少了Tet2+/-小鼠(种系)的乳腺肿瘤体积

[0084] 髓样细胞是乳腺癌TME中的肿瘤促进IL-1β的主要来源,并且已经报道了在肿瘤浸润白细胞中的TET2突变。由于来自Tet2缺陷型小鼠的髓样细胞在炎症刺激后具有增加的IL-1β基因表达,我们评估了Tet2杂合的小鼠是否表现出更具侵袭性的乳腺癌表型。我们将小鼠转移性luminal B型乳腺癌细胞系E0771原位植入Tet2+/+(WT)或Tet2+/-种系小鼠中。植入后三天,将小鼠置于对照饲料饮食或富含OLT1177®(达泮舒腈)的营养相同的饮食15天。在E0771细胞植入后21天后处死小鼠。

[0085] 肿瘤体积的结果示于图1中。与Tet2+/+(WT)小鼠相比,$Tet2^{+/-}$小鼠表现出肿瘤生长增加2倍($p<0.05$)。此外,与标准饮食的$Tet2^{+/-}$小鼠相比,接受达泮舒腈饮食的Tet2+/-小鼠的肿瘤生长被显著抑制(降低68%,$p<0.01$)。与标准饮食相比,达泮舒腈的Tet2+/+(WT)小鼠的肿瘤生长也显著降低($p<0.05$)。在达泮舒腈饮食的Tet2+/+(WT)或Tet2+/-小鼠之间没有观察到肿瘤生长的变化(图1)。

[0086] 实施例1B:达泮舒腈减少了Tet2+/-小鼠的IL-1β产生

[0087] 接下来,我们评估了来自荷瘤小鼠的髓样细胞的炎症潜力。从实施例1的荷瘤小鼠培养骨髓贴壁细胞,并且用LPS刺激过夜。与WT相比,从荷瘤Tet2+/-小鼠培养的骨髓细胞表现出增加的IL-1β产生($p<0.01$,图1B)。此外,与未经治疗的Tet2+/-小鼠相比,使用达泮舒腈治疗的荷瘤Tet2+/-小鼠的骨髓细胞分泌显著更少的IL-1β($p<0.05$,图2)。

[0088] 实施例2:达泮舒腈减少了Tet2+/-骨髓嵌合模型的乳腺肿瘤体积

[0089] CH的特征在于造血隔室中的体细胞突变的克隆扩增。在该实施例中,我们确定了Tet2缺陷的肿瘤促进作用是否在骨髓嵌合模型(克隆性造血的实验模型)中得以维持。

[0090] 我们以1:3供体:对比组的比例将来自Tet2+/+和Tet2+/-供体小鼠的未分级的骨

髓(BM)细胞与CD45.1+Boy/J对比组BM混合,并且将细胞移植到经致死照射的Boy/J受体小鼠中。移植后六周,如上所述,原位植入E0771细胞。在植入后第3天,给予小鼠对照饲料或富含达泮舒腈的饮食。我们在Tet2+/-嵌合体小鼠中观察到基本上相同的加速肿瘤生长模式($p<0.05$),该肿瘤生长在接受达泮舒腈饮食的Tet2+/-嵌合体小鼠中再次被抑制($p<0.001$)。同样,达泮舒腈也抑制了Tet2+/+嵌合动物的肿瘤生长,达到等同于经达泮舒腈治疗的Tet2+/-嵌合体小鼠的基线水平(图2)。实施例1和实施例2的结果表明Tet2+/-促进乳腺癌进展,并且达泮舒腈能够有效地减少肿瘤生长。

[0091] 实施例3.加速的TET2+/-驱动的乳腺肿瘤生长被达泮舒腈减少

[0092] 统称为髓样细胞的粒细胞和单核细胞是来源于骨髓中造血干细胞的普通祖细胞的分化后代。

[0093] 在该实施例中,我们首先评估了Tet2缺陷型髓样细胞渗入外周血(图3A)和肿瘤(图3B)中的程度。图3A示出了与Tet2+/+小鼠相比,在Tet2+/-嵌合体小鼠的外周血中,供体来源细胞的频率显著增加。图3B示出了与Tet2+/+小鼠相比,在Tet2+/-嵌合体小鼠的肿瘤中,Tet2+/-供体来源细胞的频率显著增加。

[0094] 图4A示出了与接受标准饮食的Tet2+/+嵌合体相比,在接受标准饮食的Tet2+/-嵌合体中,总肿瘤浸润粒细胞显著增加($p<0.05$)。图4A还示出了与标准饮食的Tet2+/-嵌合体相比,在接受达泮舒腈饮食的Tet2+/-嵌合体中,肿瘤浸润性粒细胞显著降低($p<0.05$)。

[0095] 图4B示出了与接受标准饮食的Tet2+/+嵌合体相比,在接受标准饮食的Tet2+/-嵌合体中,肿瘤浸润粒细胞表达了显著更少的MHC-II蛋白(gMFI)($p<0.05$)。Tet2+/-嵌合体中存在的减少的MHC-II表达在使用达泮舒腈饮食后被缓解($p<0.001$)。

[0096] 图5示出了来自图2的BM嵌合体小鼠的血浆趋化因子和细胞因子。如图5所示,与标准饮食的Tet2+/+嵌合体相比,接受标准饮食的Tet2+/-嵌合体小鼠显示出增加的循环CCL2和KC($p<0.05$)。此外,与标准饮食的Tet2+/-嵌合体相比,在接受达泮舒腈饮食的Tet2+/-嵌合体中,循环CCL2和KC显著降低($p<0.05$)。

[0097] 合在一起,这些数据证明了乳腺癌促进的Tet2+/-克隆的扩增如何维持TME的炎性环境,继而促进乳腺癌进展,并且达泮舒腈能够减少Tet2+/-克隆的扩增。

[0098] 参考文献

[0099] 1.Y.Guo,et al.Cancer Res 77,6429-6441(2017).

[0100] 2.S.Shalapour,et al.J Clin Invest 125,3347-3355(2015).

[0101] 3.C.A.Dinarello.Blood 117,3720-3732(2011).

[0102] 4.R.N.Apte,et al.Cancer Metastasis Rev 25,387-408(2006).

[0103] 5.C.A.Dinarello.Cancer Metastasis Rev 29,317-329(2010).

[0104] 6.B.Guo,et al.Sci Rep 6,36107(2016).

[0105] 7.K.L.Lee,et al.Cancers 11(9),1334(2019).

[0106] 8.C.Marchetti,et al.Proc Natl Acad Sci U S A 115,E1530-E1539(2018).

[0107] 9.A.Young,et al.Nature Communications.DOI:10.1038(2016)

[0108] 10.L.Dorsheimer,et al.JAMACardiol.4:25-33(2019)

[0109] 11.N.L.Syn,et al.Lancet Oncology 18(12),PE731-E741(2017).

[0110] 从上述内容可以理解,本发明的特定实施方案已在本文被描述用于说明的目的,

但在不偏离本发明的范围的情况下可进行各种修改。因此,本发明不受所附权利要求的限制。

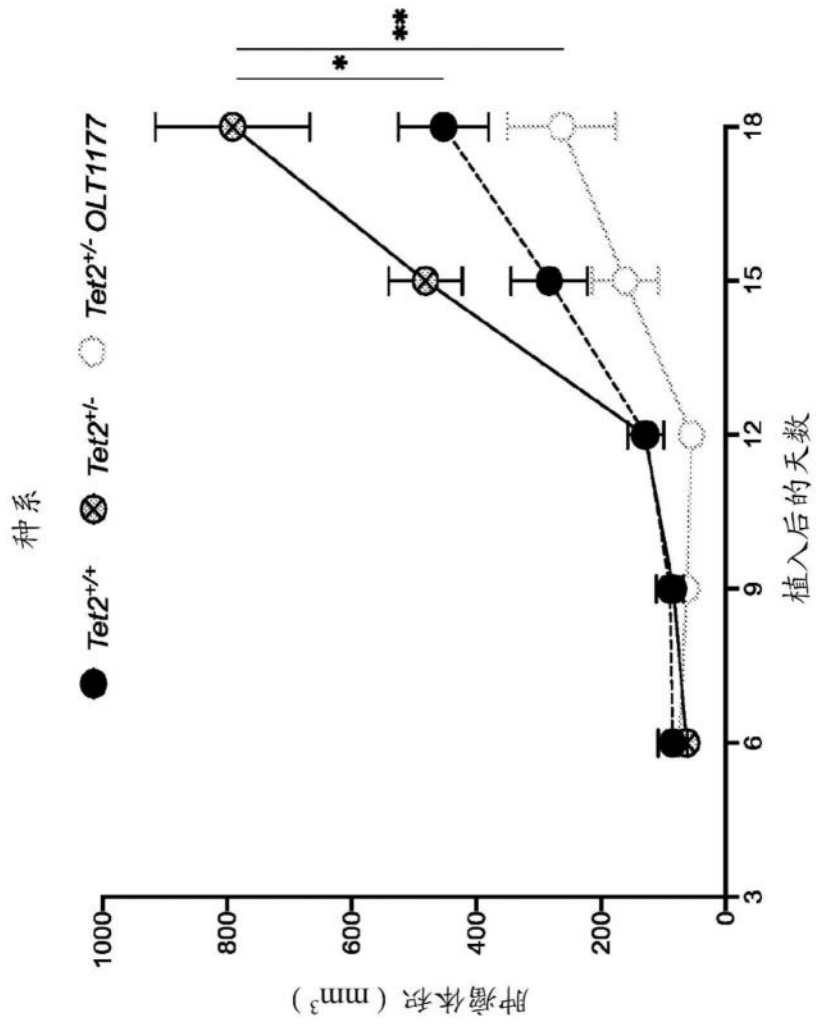

***
*
种系
Tet2+/+
Tet2+/-
Tet2+/- OLT1177
肿瘤体积（mm3）
1000
800
600
400
200
0
3
6
9
12
15
18
植入后的天数

图1A

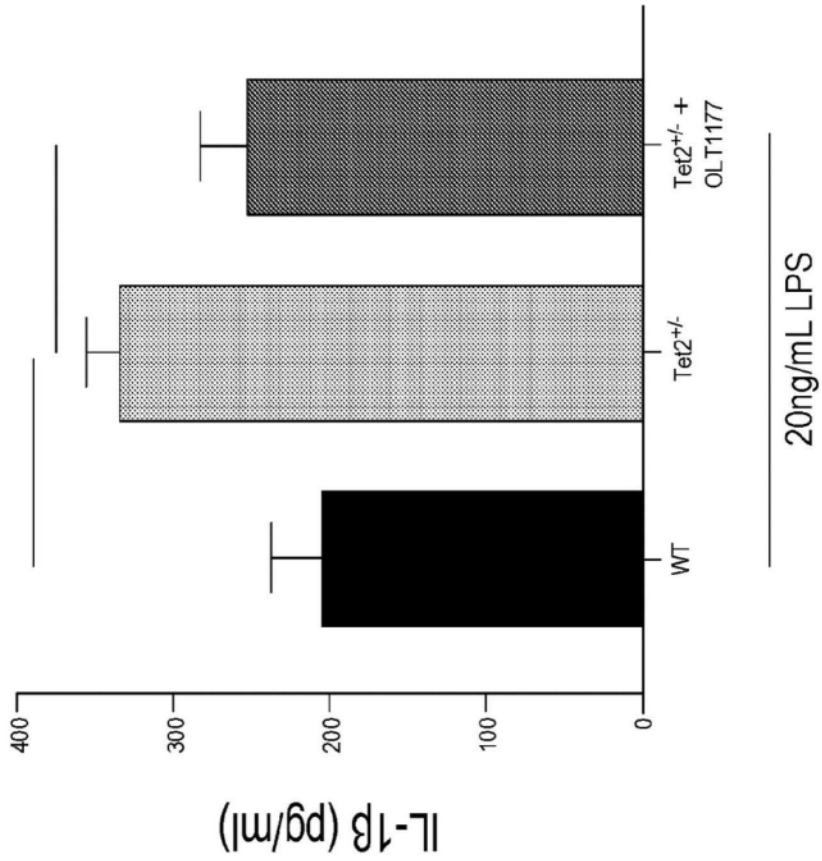


图1B

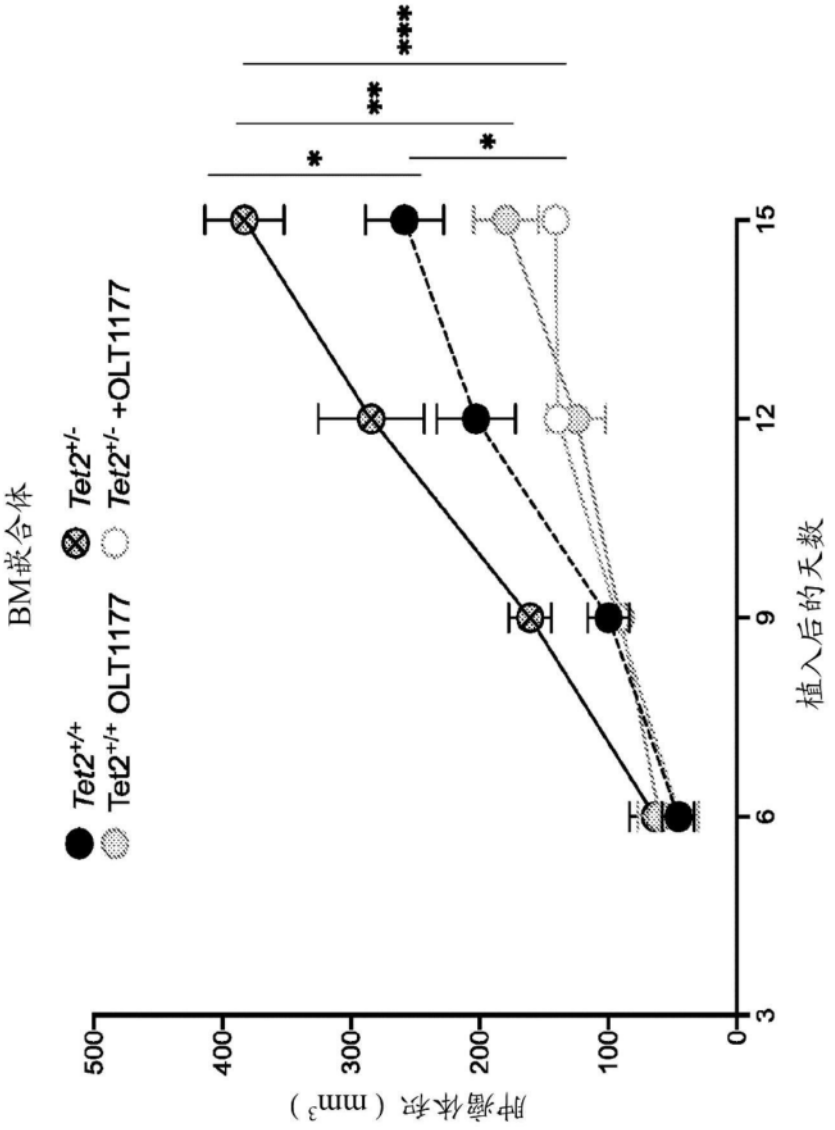

BM嵌合体
Tet2+/+
Tet2+/+ OLT1177
Tet2+/-
Tet2+/- +OLT1177
肿瘤体积（mm3）
植入后的天数
0
100
200
300
400
500
3
6
9
12
15
*
*
**
****

图2

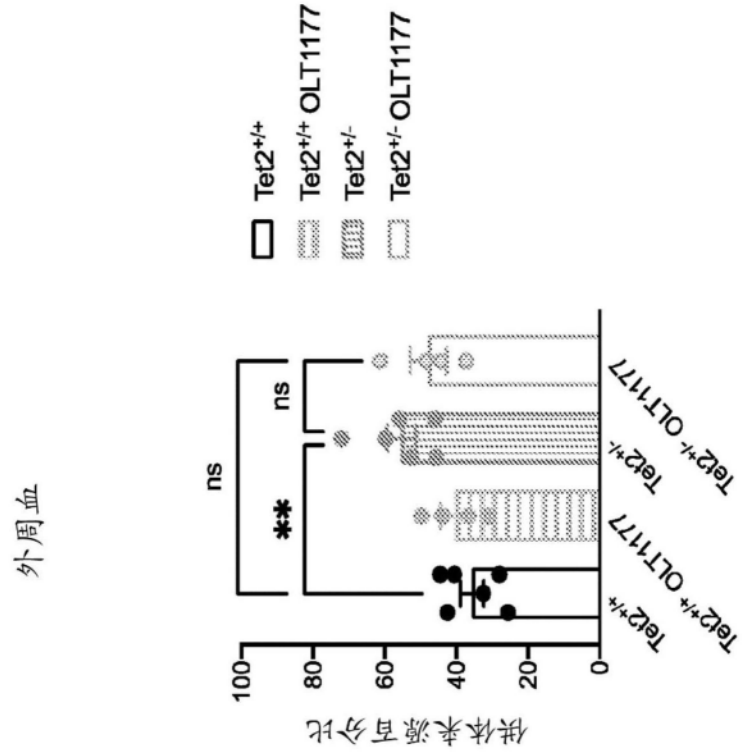

外周血
供体来源百分比
100
80
60
40
20
0
ns
**
ns
Tet2+/+
Tet2+/+ OLT1177
Tet2+/-
Tet2+/- OLT1177
Tet2+/+
Tet2+/+ OLT1177
Tet2+/-
Tet2+/- OLT1177

图3A

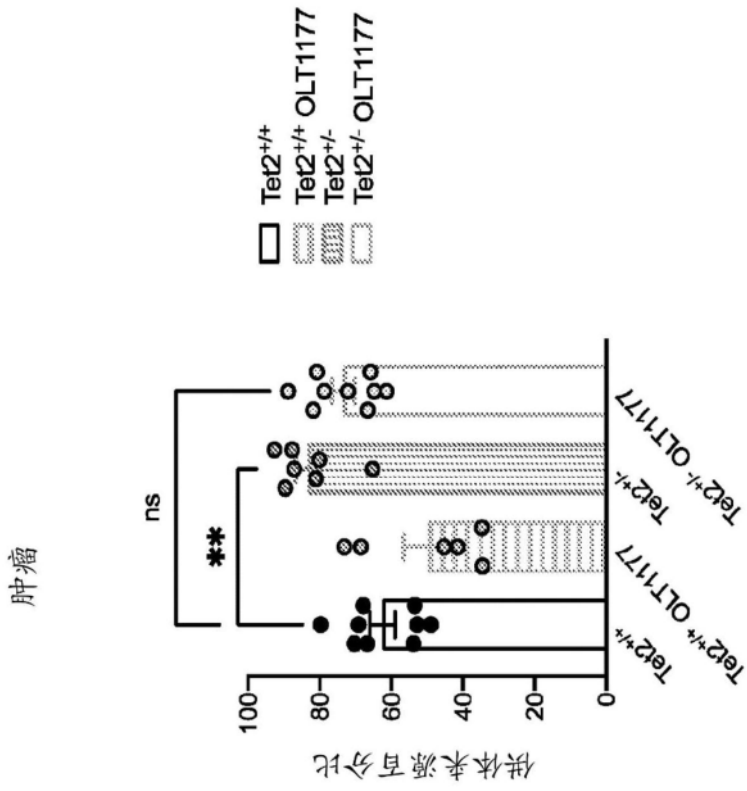

肿瘤
供体来源百分比
100
80
60
40
20
0
ns
**
Tet2+/+
Tet2+/+ OLT1177
Tet2+/-
Tet2+/- OLT1177
Tet2+/+
Tet2+/+ OLT1177
Tet2+/-
Tet2+/- OLT1177

图3B

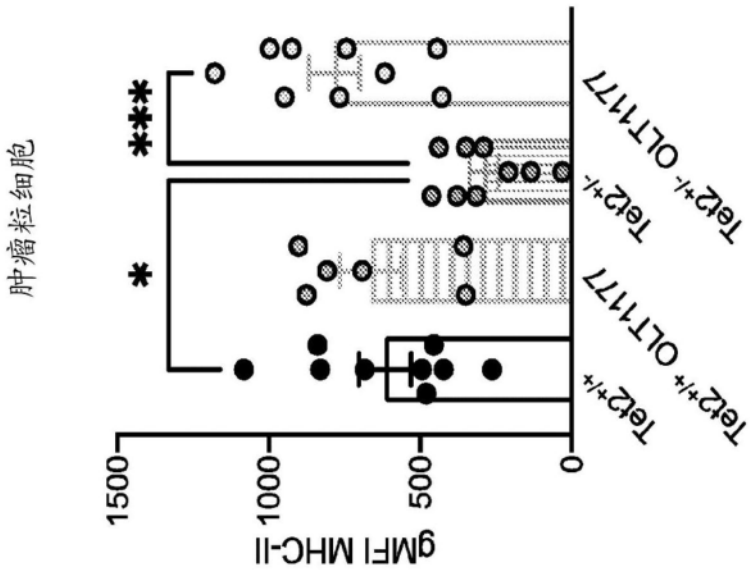

肿瘤粒细胞
gMFI MHC-II
1500
1000
500
0
*
***
Tet2+/+
Tet2+/+ OLT1177
Tet2+/-
Tet2+/- OLT1177

图4B

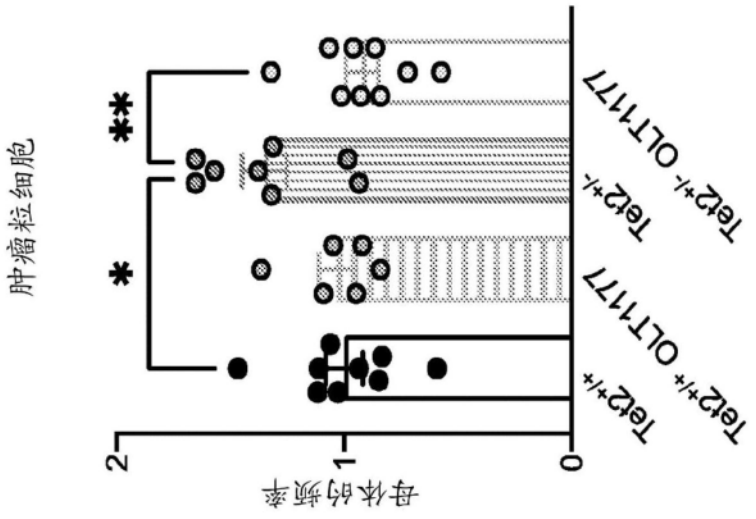

肿瘤粒细胞
母体的频率
2
1
0
*
**
Tet2+/+
Tet2+/+ OLT1177
Tet2+/-
Tet2+/- OLT1177

图4A

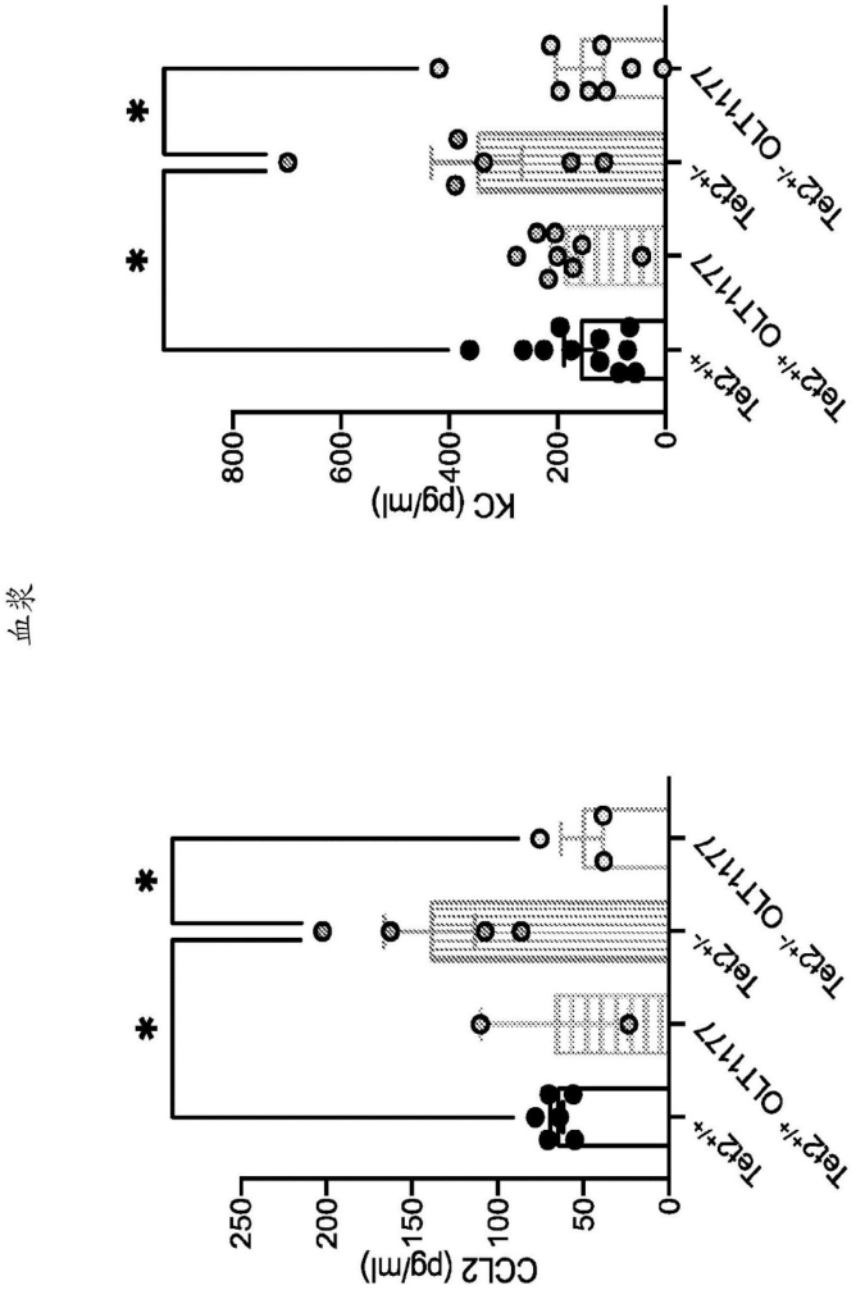

血浆
KC (pg/ml)
800
600
400
200
0
Tet2+/+
Tet2+/+ OLT1177
Tet2+/-
Tet2+/- OLT1177
*
*

图5B

CCL2 (pg/ml)
250
200
150
100
50
0
Tet2+/+
Tet2+/+ OLT1177
Tet2+/-
Tet2+/- OLT1177
*
*

图5A