



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118477075 A

(43) 申请公布日 2024.08.13

(21) 申请号 202410562274.3

(51) Int.Cl.

(22) 申请日 2017.02.17

A61K 31/4439 (2006.01)

(30) 优先权数据

A61P 9/14 (2006.01)

16305193.1 2016.02.19 EP

A61P 19/00 (2006.01)

(62) 分案原申请数据

A61P 35/00 (2006.01)

201780011659.9 2017.02.17

A61P 43/00 (2006.01)

(71) 申请人 国家医疗保健研究所

地址 法国巴黎

申请人 国家科学研究中心 巴黎西岱大学  
巴黎公共救济院

(72) 发明人 G·卡诺德

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所

11256

专利代理人 孟凡宏

权利要求书1页 说明书11页 附图4页

(54) 发明名称

用于治疗PIK3CA相关过度生长综合征群的方法

(57) 摘要

本发明涉及一种治疗PIK3CA相关过度生长综合征群(PROS),更具体的,先天性脂质性过度生长、血管畸形、表皮痣和脊柱/骨骼异常和/或脊柱侧凸(CLOVES)综合征的方法。目前,对于患者没有特异性的治疗,且没有PROS的动物模型以更好地了解该疾病的病理生理学。本发明人开发了PROS的遗传小鼠模型,其再现了人疾病并证明了BYL719的功效。基于这些结果,他们用BYL719治疗了患有严重CLOVES综合征的两名患者,一名成人和一名儿童。该药物在两名患者中对疾病具有强大的功效,诱导所有受影响器官的快速恢复。因此,本发明涉及一种治疗有需要的受试者的PROS的方法,包括向所述受试者施用治疗有效量的BYL719。

1. 治疗有效量的BYL719在制备用于治疗有需要的受试者的PIK3CA相关过度生长综合征群(PROS)的药物中的用途。

2. 权利要求1所述的用途,其中所述PROS疾病是先天性脂质性过度生长、血管畸形、表皮痣和脊柱/骨骼异常和/或脊柱侧凸(CLOVES)综合征。

3. 权利要求1所述的用途,其中所述PROS疾病是Klippel-Trenaunay综合征。

## 用于治疗PIK3CA相关过度生长综合征群的方法

[0001] 本申请是申请日为2017年2月17日、申请号为201780011659.9、发明名称为“用于治疗PIK3CA相关过度生长综合征群的方法”的发明专利申请的分案申请。

### 技术领域

[0002] 本发明涉及治疗PIK3CA相关过度生长综合征群(PROS)的方法，例如先天性脂肪性过度生长、血管畸形和表皮痣(CLOVES)。

### 背景技术

[0003] PIK3CA相关过度生长综合征群的术语“PROS”被同意包括与体细胞PIK3CA突变相关的已知和新兴临床病变，包括巨指畸形、FAO、HHML、CLOVES和相关的巨脑症(Keppler-Noreuil等2014)。在美国国立卫生研究院(NIH)召开的一次研讨会讨论并制定了关于PIK3CA相关的体细胞过度生长疾病的诊断和治疗的共识文件。

[0004] CLOVES，代表先天性脂肪性过度生长、血管畸形、表皮痣和脊柱/骨骼异常和/或脊柱侧凸。该综合征被认为是一种罕见疾病，其特征在于进行性的、复杂的和混合的躯干血管畸形、失调的脂肪组织、不同程度的脊柱侧凸，以及没有进行性骨生长过度的扩大的骨结构(Sapp等人2007;Alomari等人2009)。这种综合征与癌症不同。事实上，在CLOVES综合征中，肿瘤是良性的，组织只是过度生长并且受试者是畸形的。CLOVES综合征在出生时很少见且明显。无论种族或民族如何，它都会同等影响男性和女性。许多患有这种综合症的患者被误诊。

[0005] CLOVES综合征是由PIK3CA基因中的体细胞镶嵌突变引起的。PIK3CA编码PI3K的110kD催化 $\alpha$ 亚基，其响应于酪氨酸激酶受体，配体结合被活化并将磷脂酰肌醇(3,4)-二磷酸(PIP2)转化为磷脂酰肌醇(3,4,5)-三磷酸(PIP3)。已经在几种类型的癌症中描述了PIK3CA的活化突变，但其从未在CLOVES综合征中描述过。2012年，Kurek等人通过测序DNA或RNA鉴定了PIK3CA中的活化突变。但是，今天，CLOVES综合症无法治愈。

[0006] Limaye等2015公开了PIK3CA中的体细胞突变涉及癌症、过度生长综合征和淋巴管畸形(LM)。更具体地，作者表明，称为人脐静脉内皮细胞(HUVEC)并随后用突变的PIK3CA逆转录病毒转染的来自健康供体(不受PROS影响)的培养细胞系具有AKT/mTORC通路的激活。如预期的那样，药物BYL719消除了PIK3CA-变体在该人工模型中诱导的AKT磷酸化，表明这些蛋白质参与相同的信号传导通路。但是，该体外模型没有再现与PROS患者相关的任何症状或疾病表型，更具体地，没有显示任何证据表明该药物可用于治疗患有PROS的患者。因此，需要了解BYL719在PROS患者中，尤其是CLOVES综合征或Klippel-Trenaunay综合征患者中的用途。

### 发明简述

[0008] 本发明涉及治疗有需要的受试者的PROS的方法，包括向受试者施用治疗有效量的BYL719的步骤。特别地，本发明由权利要求限定。

[0009] 发明详述

[0010] Novartis合成的BYL719正处于晚期实体瘤的II/III期临床试验。发明人开发了PROS的第一个遗传小鼠模型,该模型再现了人类疾病并证明了PIK3CA的药理学抑制剂BYL719在预防和改善PROS小鼠中所有器官功能障碍方面的功效。基于这些结果,他们使用BYL719治疗了患有严重CLOVES综合征的两名患者,一名成人和一名儿童。在两名患者中,该药物对疾病具有强大的功效,诱导所有受影响器官的快速恢复。以前难治性的血管肿瘤缩小,充血性心力衰竭完全恢复,半身肥大减少,脊柱侧凸减弱。该药物没有任何明显的副作用。总之,本研究提供了支持PIK3CA抑制作为PROS患者有希望的疗法的第一个直接证据。

[0011] 因此,本发明涉及治疗有需要的受试者的PROS的方法,包括向受试者施用治疗有效量的BYL719的步骤。更具体地,本发明涉及治疗有需要的受试者的CLOVES综合征的方法,包括向受试者施用治疗有效量的BYL719的步骤。

[0012] 如本文所用,术语“治疗(treating)”或“治疗(treatment)”是指预防性或防治性治疗以及治愈性或疾病改善性治疗,包括治疗有感染疾病风险或怀疑已经感染疾病的患者,以及生病或被诊断为患有疾病或医学病症的受试者,包括抑制临床复发。可以向患有医学疾病或最终可能患有疾病的受试者施用治疗,以便预防、治愈、延迟疾病或复发疾病的一种或多种症状的发作,降低疾病或复发疾病的一种或多种症状的严重程度,或缓解疾病或复发疾病的一种或多种症状,或为了将受试者的存活率延长至超过在没有这种治疗的情况下预期。“治疗方案”是指疾病的治疗模式,例如治疗期间使用的剂量模式。治疗方案可包括诱导方案和维持方案。短语“诱导方案”或“诱导期”是指用于疾病初始治疗的治疗方案(或治疗方案的一部分)。诱导方案的总体目标是在治疗方案的初始阶段向受试者提供高水平的药物。诱导方案可以采用(部分或全部)“加载方案”,其可以包括施用比医生在维持方案期间使用的剂量更大的药物,比医生在维持方案期间施用的更频繁地施用药物,或两者兼有。短语“维持方案”或“维持期”是指用于在治疗疾病期间维持受试者,例如使受试者长期保持缓解(数月或数年)的治疗方案(或治疗方案的一部分)。维持方案可以采用连续治疗(例如,以规律的间隔,诸如每周、每月、每年等施用药物)或间歇治疗(例如,中断治疗、间歇治疗、复发时的治疗或实现特定预定标准的治疗[例如,疾病表现等])。

[0013] 如本文所用,术语“PROS”是指PIK3CA相关过度生长综合征群。它是一组疾病,如纤维脂肪过度生长(FAO)、巨脑-毛细血管畸形(MCAP)综合征、躯干先天性脂肪瘤不对称过度生长、淋巴、毛细血管、静脉和组合型的血管畸形、表皮痣、骨骼和脊柱异常(CLOVES)综合征和半增生多发性脂肪增多症(HHML)和Klippel-Trenaunay综合征。

[0014] 如本文所用,术语“纤维脂肪过度生长(FAO)”是指特征在于以下主要发现的综合征:具有骨骼过度生长的皮下、肌肉和内脏纤维脂质组织的节段性进行性过度生长(Lindhurst等,2012)。

[0015] 如本文所用,术语“巨脑-毛细血管畸形(MCAP)综合征”是指特征在于以下主要发现的综合征:(1)与张力减退、癫痫和轻微至严重的智力残疾的神经系统发现相关的巨脑症(MEG)或半侧巨脑症(HMEG);(2)伴有局灶性或全身性躯体过度生长的皮肤毛细血管畸形(Mirzaa等,2013)。

[0016] 在一个具体实施方案中,PROS疾病是CLOVES。如本文所用,术语“CLOVES”是指先天性、脂质性、过度生长、血管畸形、表皮痣和脊柱/骨骼异常和/或脊柱侧凸。该综合征的特征

在于脂质组织显示复杂的先天性过度生长(通常表现为躯干脂质性肿块)以及血管和淋巴管畸形的组合。

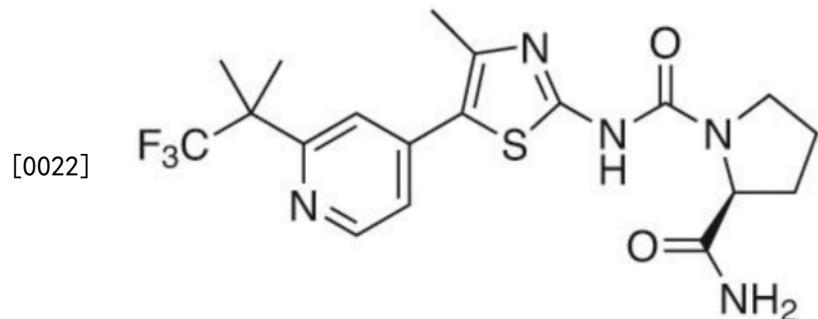
[0017] 如本文所用,术语“半增生多发性脂肪增多症(HHML)”是指以不对称的非进行性过度生长、多发性脂肪瘤和浅表血管畸形为特征的病症(BG等2013)。

[0018] 在一个具体实施方案中,PROS疾病是Klippel-Trenaunay综合征。如本文所用,术语“Klippel-Trenaunay综合征”是指其中血管和/或淋巴管不能正确形成的罕见先天性医学病症。

[0019] 因此,可以被诊断为呈现PROS中的疾病之一的受试者提供根据本发明的方法。

[0020] 如本文所用,术语“受试者”是指任何哺乳动物,例如啮齿动物、猫科动物、犬科动物和灵长类动物。特别地,在本发明中,受试者是患有或易患PROS疾病的人。在一个具体实施方案中,受试者是患有或易患CLOVES综合征的人。在一个具体实施方案中,受试者是患有或易患Klippel-Trenaunay综合征的人。

[0021] 如本文所用,术语“BYL719”是对由突变的PIK3CA基因活化的p110 $\alpha$ 同种型具有选择性的ATP竞争性口服PI3K抑制剂(Furet P.等2013;Fritsch C.等2014)。该分子也称为Alpelisib,在本领域中具有以下公式:



[0023] “治疗有效量”意欲是指用于赋予受试者治疗益处所需的最小量的活性剂。例如,受试者的“治疗有效量”是这样的量:其诱导、改善或引起与疾病相关的病理症状、疾病进展或生理状况的改善或对屈服于疾病的抵抗。应当理解,本发明化合物的每日总用量将由主治医师在合理的医学判断范围内决定。任何特定受试者的特定治疗有效剂量水平将取决于多种因素,包括所治疗的疾病和疾病的严重程度;所用特定化合物的活性;所用的具体组合物、受试者的年龄、体重、总体健康状况、性别和饮食;施用时间、施用途径和所用特定化合物的排泄率;治疗的持续时间;与所用特定化合物组合或同时使用的药物;以及医学领域众所周知的类似因素。例如,以低于实现所需治疗效果所需的水平开始化合物的剂量并逐渐增加剂量直至达到所需效果,这在本领域技术范围内。然而,产品的每日剂量可在每个成人每天0.01至1,000mg的宽范围内变化。通常,为对待治疗的受试者的剂量进行症状调整,组合物含有0.01、0.05、0.1、0.5、1.0、2.5、5.0、10.0、15.0、25.0、50.0、100、250和500mg活性成分。药物通常含有约0.01mg至约500mg活性成分,优选1mg至约100mg活性成分。通常以每天0.0002mg/kg至约20mg/kg体重,特别是每天约0.001mg/kg至7mg/kg体重的剂量水平提供有效量的药物。

[0024] 如上所述的PIK3CA抑制剂可以与药学上可接受的赋形剂和任选的缓释基质(例如可生物降解的聚合物)组合以形成药物组合物。“药学上”或“药学上可接受的”是指当适当地施用于哺乳动物,尤其是人时,不产生不利的、过敏的或其他不良反应的分子实体和组合

物。药学上可接受的载体或赋形剂是指无毒的固体、半固体或液体填充剂、稀释剂、包封材料或任何类型的制剂助剂。本发明药物组合物用于口服、舌下、皮下、肌肉内、静脉内、透皮、局部或直肠施用,可以向动物和人施用单位施用形式或作为与常规药物支持物的混合物的单独或与另一种活性成分组合的活性成分。合适的单位施用形式包括口服途径形式,例如片剂、凝胶胶囊、粉末、颗粒和口服悬浮液或溶液,舌下和口腔施用形式、喷雾剂、植入物、皮下、透皮、局部、腹膜内、肌肉内、静脉内、真皮下、透皮、鞘内和鼻内施用形式和直肠施用形式。通常,药物组合物包含对于能够注射的制剂而言药学上可接受的载体。这些可以特别是等渗的、无菌的盐水溶液(磷酸单钠或二钠、氯化钠、氯化钾、氯化钙或氯化镁等或这些盐的混合物),或干燥的,尤其是冷冻干燥的组合物,其在根据情况添加无菌水或生理盐水时,允许构成可注射溶液。适于注射使用的药物形式包括无菌水溶液或分散体;包括芝麻油、花生油或水性丙二醇的制剂;和用于临时制备无菌可注射溶液或分散体的无菌粉末。在所有情况下,该形式必须是无菌的并且必须是以便于容易注射的程度流动的。它必须在制造和储存条件下稳定,并且必须防止微生物如细菌和真菌的污染作用。包含本发明化合物作为游离碱或药学上可接受的盐的溶液可以在适当地与表面活性剂如羟丙基纤维素混合的水中制备。分散体也可以在甘油、液体聚乙二醇及其混合物和在油中制备。在通常的储存和使用条件下,这些制剂含有防腐剂以防止微生物的生长。可以将中性或盐形式的多肽(或其编码的核酸)配制成组合物。药学上可接受的盐包括酸加成盐(与蛋白质的游离氨基形成),其与无机酸例如盐酸或磷酸,或有机酸如乙酸、草酸、酒石酸、扁桃酸等形成。用游离羧基形成的盐也可以衍生自无机碱,例如氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化铵、氢氧化钙或氢氧化铁,和有机碱,如异丙胺、三甲胺、组氨酸、普鲁卡因等。载体也可以是溶剂或分散介质,其含有例如水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)、其合适的混合物和植物油。例如,通过使用涂层如卵磷脂,在分散体的情况下通过维持所需的粒度和通过使用表面活性剂,可以保持适当的流动性。可以通过各种抗细菌剂和抗真菌剂,例如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、山梨酸、硫柳汞等来防止微生物的作用。在许多情况下,优选包括等渗剂,例如糖或氯化钠。通过在组合物中使用延迟吸收的试剂(例如单硬脂酸铝和明胶)可以实现可注射组合物的延长吸收。通过以下制备无菌可注射溶液:将所需量的活性多肽掺入适当的溶剂中,根据需要加入上面列举的几种其它成分,然后过滤灭菌。通常,通过将各种灭菌的活性成分掺入无菌载体中来制备分散体,所述无菌载体含有基础分散介质和所需的来自上面列举的那些其他成分。在用于制备无菌可注射溶液的无菌粉末的情况下,优选的制备方法是真空干燥和冷冻干燥技术,其从先前无菌过滤的溶液中产生活性成分和任何其他所需成分的粉末。一旦配制,以与剂量制剂相容的方式并以治疗有效的量施用溶液。制剂易于以多种剂型施用,例如上述可注射溶液的类型,但也可使用药物释放胶囊等。例如,对于在水溶液中的肠胃外施用,如果需要,溶液应适当缓冲,并且首先用足够的盐水或葡萄糖使液体稀释剂等渗。这些特定的水溶液特别适用于静脉内、肌肉内、皮下和腹膜内施用。在这方面,根据本公开内容,可以使用的无菌水性介质对于本领域技术人员而言是已知的。例如,可以将一个剂量溶解在1ml等渗NaCl溶液中,并将其加入到1000ml的皮下注射液中或在所提议的输注部位注射。根据所治疗的受试者的病症,剂量必然发生一些变化。在任何情况下,负责施用的人员将确定个体受试者的适当剂量。

[0025] 通过以下附图和实施例进一步说明本发明。然而,这些实施例和附图不应以任何

方式解释为限制本发明的范围。

## 附图说明

[0026] 图1:PROS小鼠模型和BYL719的功效的表征。A) 施用它莫西芬后,PIK3CA<sup>WT</sup>和PIK3CA<sup>CAGG-CreER</sup>小鼠的Kaplan-Meier存活率曲线;B) 施用他莫西芬后,用或不用BYL719处理的PIK3CA<sup>CAGG-CreER</sup>小鼠的Kaplan-Meier存活率曲线。处理40天后,停止BYL719。C) 施用他莫西芬后,用或不用BYL719处理10天的PIK3CA<sup>CAGG-CreER</sup>小鼠的Kaplan-Meier存活率曲线。比例尺为10μm。

[0027] 图2:患有严重CLLOVES综合征的成年患者中BYL719的功效。A) 开始BYL719之前和之后患者1的临床参数(体重、胸围和腰围)。B) 开始BYL719之前和之后的脑利钠肽(BNP)和血清肌酐水平。

[0028] 图3:患有严重CLLOVES综合征的儿童患者中BYL719的功效。开始BYL719之前和之后患者2的临床参数(大腿围和腰围)。

## 具体实施方式

[0029] 材料和方法动物

[0030] 为了该研究,我们将获自Jackson实验室的C57BL/6背景上的纯合R26Stop<sup>FL</sup>P110\*(Stock#012343)和杂合CAGGCre-ERTM(Stock#004682)杂交。我们获得了R26Stop<sup>FL</sup>P110\*<sup>+/−</sup> x CAGGCre-ER<sup>TM+</sup>(本文称为PIK3CA<sup>CAGG-CreER</sup>)和R26Stop<sup>FL</sup>P110\*<sup>+/+</sup> x CAGGCre-ER<sup>TM-</sup>(本文称为PIK3CA<sup>WT</sup>)。随意喂养动物并将其在恒定的环境温度下在12小时光照周期中饲养。动物方案得到了“Services Vétérinaires de la Préfecture de Police de Paris”部门主任和巴黎笛卡尔大学伦理委员会的批准。在21天龄时,通过口腔灌胃施用单剂量的他莫昔芬(40mg × kg<sup>-1</sup>)。对于存活率研究,在他莫昔芬灌胃后每天跟踪小鼠((PIK3CA<sup>WT</sup> n=16和PIK3CA<sup>CAGG-CreER</sup> n=16)。对于治疗研究,用PI3KCA抑制剂BYL719(Chem Express; 50mg × kg<sup>-1</sup>,在0.5%羧甲基纤维素(Sigma)中,每日口服)或载体(0.5%羧甲基纤维素(Sigma),每日口服)处理小鼠。对于预防性研究,在他莫昔芬灌胃的同时开始处理(PIK3CA<sup>CAGG-CreER</sup> n=18),对于治疗性研究,在他莫昔芬灌胃后10天开始处理(PIK3CA<sup>CAGG-CreER</sup> n=6)。在PIK3CA<sup>CAGG-CreER</sup>的载体组中,他莫昔芬灌胃后第51天处死总计6只小鼠;在预防性BYL719组中,他莫昔芬灌胃后第51天处死6只小鼠;在PIK3CA<sup>CAGG-CreER</sup>的治疗性研究中,他莫昔芬灌胃后第70天处死6只小鼠,用于组织检查。

[0031] 细胞培养

[0032] 乳腺癌细胞系T-47D获自Sigma Aldrich。将细胞在含有DMEM+2mM谷氨酰胺+10%胎牛血清(FBS)的培养基中培养。对于BYL719实验(Chem Express),在进行蛋白质印迹之前,用增加浓度的BYL719(0、0.5、1和5μmol/L)处理细胞2、4和6小时。每个实验一式两份进行并重复至少三次。

[0033] 形态分析

[0034] 将小鼠组织固定在4%多聚甲醛中,石蜡包埋。用高碘酸希夫(PAS)染色4-μm肝脏切片,用苏木精和伊红(H&E)染色4-μm脾脏切片,用Masson三色染色4-μm肾脏切片。

[0035] 免疫组织化学和免疫荧光

[0036] 将石蜡包埋的4- $\mu\text{m}$ 肾脏切片与抗-P-AKT(Ser<sup>473</sup>)抗体(Cell Signaling Technology, ref#4060)、抗P-S6RP抗体(Cell Signaling Technology, ref#5364)和抗-CD34抗体(eBioscience, ref#14-0341)一起孵育。使用共聚焦显微镜Zeiss LSM 700分析免疫荧光研究。

#### [0037] 蛋白质印迹

[0038] 如前所述进行蛋白质印迹<sup>21</sup>。简言之,通过SDS-PAGE分离来自肝脏、肌肉、心脏、肾脏和T-47D细胞的蛋白质提取物,然后转移到合适的膜上并与抗-P-AKT(Ser<sup>473</sup>)抗体(Cell Signaling Technology, ref#4060)、抗P-AKT(Thr<sup>308</sup>)抗体(Cell Signaling Technology, ref#13038)、抗P-S6RP抗体(Cell Signaling Technology, ref#5364)、抗GAPDH(Merck Millipore, ref#374)和抗 $\beta$ -肌动蛋白抗体(Sigma-Aldrich, ref#A2228)一起孵育,然后与合适的过氧化物酶偶联的第二抗体一起孵育。使用Fusion FX7相机(Vilbert Lourmat)获得化学发光,并使用Bio1D软件(Certain Tech)进行光密度测定。

#### [0039] 患者

[0040] 该研究于2015年9月开始在Necker医院的肾脏科进行。患有CLOVES综合征的患者在治疗建立前进行了临床检查、肿瘤测量和痣测量。以每天口服250mg的剂量开始BYL719治疗。该研究对在Necker医院随访的两名患者(一名成人和一名儿童)上进行。该方案经ANSM批准(授权号为553984-986和584018);获得每位患者或其法定代理人的书面知情同意书。Novartis友情提供了BYL719。第一名患者接受250mg/天,第二名患者接受50mg/天。每天早餐前,口服BYL719。两个月内,在任何一餐之后监测血糖,然后逐渐稀疏。

#### [0041] 数据分析和统计

[0042] 数据表示为平均值±SEM。用Mantel-Cox(对数秩)检验分析存活率曲线。使用ANOVA评估实验组之间的差异,当显著时( $P<0.05$ )随后进行Tukey-Kramer检验。当仅比较两组时,使用Mann-Whitney检验。使用Graph Prism软件进行统计分析。

#### [0043] 肾功能

[0044] 使用Synchron Cx4自动分析仪(Beckman Coulter, Villepinte, France),在第一年每周测量血清肌酸酐水平,之后每3个月测量。使用MDRD公式(eGFR)估算肾小球滤过率。

#### [0045] 活检样品和形态分析

[0046] 将肾活检标本固定在醇-福尔马林-乙酸溶液中并包埋在石蜡中。用高碘酸希夫(PAS)、Masson三色和苏木精和伊红(H&E)染色4微米切片。进行电子显微镜分析。

#### [0047] 免疫组织化学和免疫荧光

[0048] 将石蜡包埋的肾的四个切片与抗nephrin抗体(Progen)、抗WT1抗体(Dako)、抗podocin抗体(Sigma)和抗突触蛋白抗体(Novus Biologicals)一起孵育。在总肾小球面积。对于每个活检,定量所有的肾小球切片。用适当的Alexa 488或555-偶联的第二抗体(Molecular Probes)显示第一抗体。使用Zeiss LSM 700共聚焦显微镜观察免疫荧光染色。使用Nikon数码相机Dx/m/1200和Image J软件自动定量足细胞染色区域,并表示为足细胞染色区域的百分比。

#### [0049] 原位杂交

[0050] 使用先前描述的地高辛-抗地高辛技术测定醇-福尔马林-乙酸溶液固定的、石蜡包埋的组织的PI3K $\alpha$ 的RNA表达。使用硝基蓝四唑-5-溴-4-氯-3-吲哚基磷酸甲苯胺(NBT-

BCIP) 来观察组织中的感染细胞。通过将有义探针与平行切片杂交和将反义探针与未感染肾组织杂交来系统地检查杂交信号的特异性。观察ISH染色的组织，并用Olympus Proxis显微镜和Zeiss Axio Cam ICc1拍照。

[0051] 细胞培养

[0052] 在补充有15% FBS、青霉素(50IU/ml)/链霉素(50μg/ml)和非必需氨基酸(Invitrogen)的DMEM中生长人成纤维细胞。

[0053] 蛋白质印迹

[0054] 如前所述进行蛋白质印迹，使用1:1000的兔抗体：人磷酸化p70 S6激酶(Thr389)(Cell Signaling Technologies)，然后是1:10,000的辣根过氧化物酶偶联的抗兔第二抗体(Dako)。p70 S6激酶在Thr389位点的磷酸化状态是mTOR磷酸化特有的。使用小鼠单克隆抗b-肌动蛋白抗体(Sigma-Aldrich, Lyon, France)作为对照。将蛋白质磷酸化水平标准化为b-肌动蛋白的匹配光密度值。

[0055] DNA测序

[0056] 使用标准技术从来自患者的外周血单核细胞(PBMC)和肿瘤区的皮肤活检提取DNA。通过直接测序所有PI3KCa外显子和侧翼内含子区域进行突变筛选。

[0057] 体积测定

[0058] 使用磁共振成像(MRI)确定每个肿瘤的体积。在BYL719开始前的第0天进行MRI，然后每月进行一次。简言之，通过将面积测量值和切片厚度的乘积相加来计算体积。

[0059] 数据分析和统计

[0060] 数据表示为平均值±SD。使用ANOVA评估实验组之间的差异，当显著时，随后进行Tukey-Kramer检验。当仅比较两组时，使用Mann-Whitney检验。认为概率值<0.05具有统计学意义。用GraphPad Prism 5(GraphPad软件, La Jolla, CA)进行分析。

[0061] 结果

[0062] 发明人观察到施用BYL719的受试者中过度生长的组织的大小显著减少。治疗一个月后，患者体重从83.5kg减少到73.5kg。这种体重减轻与水肿的显著减少和总体心功能率的改善有关(2015年12月治疗前心输出量为221/min, 2月8日测量为81/min)。在第30天，血浆脑利钠肽水平从2500pg/ml降至240pg/ml，证实了心脏衰竭的改善。治疗30天后，经CT扫描和磁共振成像(MRI)分析，皮下肿瘤大小显示总体减少10%。患者的Karnofsky表现状态量表在30天内从40%提高到60%。血红蛋白水平从8g/dl增加至11.8g/dl。

[0063] 在治疗前一些皮肤区域(左耳)显示加速老化表型，其在施用BYL719一个月后得到改善。此外，在治疗开始后几个大的痣显示脱色。

[0064] PROS小鼠模型

[0065] 我们通过开发PROS的小鼠模型开始了这项研究。为此，我们利用转基因小鼠品系R26StopFLP110\*的优势。这些小鼠允许以组织特异性方式诱导表达活化的PI3KCA异二聚体。将R26StopFLP110\*小鼠与CAGG-CreER小鼠杂交以产生PIK3CA<sup>CAGG-CreER</sup>动物，其在他莫昔芬施用后普遍过表达PIK3CA。用单剂量的40mg·kg<sup>-1</sup>他莫昔芬处理3周龄小鼠以诱导Cre重组<sup>16</sup>。我们观察到，与对照PIK3CA<sup>WT</sup>小鼠相比，PIK3CA<sup>CAGG-CreER</sup>小鼠在Cre诱导后第3天开始死亡，平均是Cre重组后6天(图1A)。在大多数情况下突然发生死亡，尸检显示腹腔和肝脏出血(数据未显示)。通过磁共振成像(MRI)评估，一些小鼠显示伴有腰大肌肥大的行走困难(数

据未显示)。此外,全身MRI显示脊柱侧凸、血管异常、肾囊肿和肌肉肥大快速发生(图1C)。组织学检查显示多个器官异常,包括伴有血管紊乱的严重肝脏脂肪变性(数据未显示)、脾微结构完整性丧失(数据未显示)、自发性出血和伴有异常血管的肾脏纤维化。为进一步表征血管异常,我们进行了CD34免疫染色,证实存在严重的血管扩张。正如所料,蛋白质印迹和免疫荧光研究显示所有检查器官中AKT/mTORC通路的活化。因此,我们得出结论,PIK3CA<sup>CAGG-CreER</sup>小鼠再现了人的PROS表型。

[0066] 在小鼠中BYL719预防PROS且是PROS的有效疗法

[0067] 我们决定测试BYL719对PIK3CA<sup>CAGG-CreER</sup>小鼠的影响。为此目的,我们首先进行了预防性研究,其中在Cre诱导后即开始口服施用BYL719(数据未显示)。我们观察到,每日施用的BYL719显著改善了动物存活率(图1C)。事实上,虽然安慰剂组中的所有PIK3CA<sup>CAGG-CreER</sup>小鼠在21天内死亡,但用BYL719处理的PIK3CA<sup>CAGG-CreER</sup>小鼠在40天后仍然存活,具有明显正常的外观。重要的是,Cre重组后40天的处理中断导致所有PIK3CA<sup>CAGG-CreER</sup>动物死亡。我们在Cre诱导后第40天处死了几只接受BYL719的PIK3CA<sup>CAGG-CreER</sup>小鼠。组织学检查显示,用BYL719处理的小鼠具有保存的组织(数据未显示)和正常血管(数据未显示)。蛋白质印迹和免疫荧光证实了BYL719抑制PI3KCA活化的功效(数据未显示)。

[0068] 接下来,我们通过在Cre诱导后10天(此时小鼠开始死亡)将安慰剂或BYL719给予PIK3CA<sup>CAGG-CreER</sup>小鼠进行治疗性研究(图1C)。在Cre诱导后第10天,MRI证实存在如前所述的组织异常(数据未显示)。虽然安慰剂组小鼠在接下来的几天内死亡,但BYL719显著改善了PIK3CA<sup>CAGG-CreER</sup>小鼠的存活率(图1C)。在治疗开始12天(Cre诱导后22天)后进行的MRI显示脊柱侧凸、肌肉肥大和血管异常的非常快速的改善(数据未显示)。组织学分析显示,BYL719处理的小鼠未显示或仅显示轻微的组织变化(数据未显示)。如在预防性研究中一样,蛋白质印迹和免疫荧光证实了PIK3CA抑制(数据未显示)。

[0069] 我们得出结论,BYL719能够显著改善PROS小鼠,这表明它可能是目前尚无药物治疗的PROS患者的有效治疗选择。

[0070] BYL719在具有PIK3CA突变的人细胞中的效果

[0071] 接下来,我们检查了BYL719在人细胞中抑制PIK3CA通路的功效。为此,我们使用了源自乳腺癌的T-47D人细胞。这些细胞携带PIK3CA c.3140A>G(H1047R)的杂合突变。这种功能突变的获得也是在PROS患者中观察到的最常见的突变<sup>6</sup>。

[0072] 我们首先证实了在这些细胞中的AKT/mTORC通路的自发激活,如通过残基Thr<sup>308</sup>和Ser<sup>473</sup>上的AKT的磷酸化状态以及S6RP蛋白的磷酸化所评估(数据未显示)。然后,将细胞暴露于增加浓度的BYL719。我们观察到,在暴露于浓度为1μmol/L的BYL 2小时后,AKT/mTORC通路被完全抑制(数据未显示)。当细胞暴露于BYL7194和6小时时,效果相似。

[0073] 这些数据表明,BYL719能够抑制具有PIK3CA c.3140A>G(H1047R)突变的人细胞中的PI3KCA活化。

[0074] BYL719在PROS患者中的极大影响

[0075] 基于这些结果,我们决定为两名患者(一名成人和一名儿童)施用BYL719作为同情使用,他们患有CLOVES综合征的极其严重的临床表现并且正在经历治疗失败和危及生命的并发症。患者1是29岁男性,具有嵌合性和活检证实的功能突变PIK3CA c.3140A>G(H1047R)。他患有过度生长综合征,其特征是左腿肥大、脊柱侧凸、多发痣和极其严重的血

管异常(数据未显示)。他经历了多次积极的减压手术,以去除腹部和背部的血管肿瘤,以及限制肿瘤生长的多次栓塞血管造影。由于脊髓压迫,他在20岁时变得截瘫,需要膀胱支架来排尿。他患有逐渐恶化的严重的收缩性心力衰竭,心输出量为181/min,脑钠尿肽(BNP)水平持续超过2500pg/mL(N<100pg/mL),对所有常用药物均有耐性。尚不清楚心力衰竭是否由血管分流、心肌细胞中的PIK3CA突变或两者造成。在5年期间,患者接受雷帕霉素以限制肿瘤生长进展但没有任何功效。最后,患者出现伴有严重蛋白尿的肾功能障碍。肾活检显示肾小球病变且伴有广泛的纤维化。肾脏病变可能是心脏功能障碍、雷帕霉素的使用<sup>11</sup>和/或肾上皮细胞中的PIK3CA突变的结果。CT扫描(数据未显示)和MRI(数据未显示)显示严重的血管异常,而PET扫描显示阴性。由于预后不良的病例严重程度,医生、外科医生和放射科医生决定停止任何介入治疗,并仅为他提供支持和姑息治疗。他的重要预后与估计为几个月的生存率有关。

[0076] 根据我们的实验结果和伦理考虑后,我们决定将BYL719用于我们的患者。我们从Novatis和法国监管机构(Agence nationale de sécurité du médicament et des produits de santé, ANSM)获得了提供BYL719作为同情用途的认可。我们停用雷帕霉素,一个月后我们开始使用BYL719。每天口服递送该药。我们选择每天250mg作为起始剂量,该计量是在临床试验中使用并基于我们的体外数据的最低剂量。在最初的几天内,我们观察到患者总体状态的极大改善。患者开始感觉更好,更舒服。一周又一周,我们可以客观地看到药物对肿瘤大小、静脉扩张和皮肤方面的极大影响(数据未显示)。由于水肿清除,但也因为所有血管肿瘤异常的巨大减少(数据未显示),他在12个月内减掉了23kg。胸部和腹部周长在12个月内分别急剧下降Δ-20%和Δ-35%(图2A)。CT扫描和MRI证实总体血管肿瘤缩小,其中12个月时体积减少63%,以及皮下浸润消失(数据未显示)。药物对心脏功能的影响是显著的,其中在4周的过程中完全校正了BNP水平(图2B)。通过CT扫描确定,心输出量降至31/min,心脏大小减少25%(数据未显示)。指向体表面积的左心室质量从250g/m<sup>2</sup>降至148g/m<sup>2</sup>。肾功能也迅速改善,其中估计的肾小球滤过率从33增加到52ml/min/1.75m<sup>2</sup>(图3)。肥大左腿的体积也减小(数据未显示)。我们观察到皮肤肥大的显著改善,其中伴随着痣颜色的变化和耳朵尺寸的减小(数据未显示)。最后,在BYL719开始后6个月,患者开始具有部分获得的膀胱功能,并且改善了鞍式麻醉。MRI显示,压迫脊髓的静脉畸形的大小减少了60%。12个月后,除了通过方案控制良好的高血糖外,患者没有副作用。患者仍在接受BYL719。

[0077] 患者2是一名9岁女孩,在本研究前两年诊断为CLLOVES综合征,活检证实PIK3CA c.3140A>G(H1047R)获得性功能嵌合突变。她患有脊柱侧凸、左腿肥大、血管异常和背部肥大肌肉(数据未显示)。重要的是,她患有涉及左肾和胃肠道的大量囊性淋巴管瘤。PET扫描显示胸腺、背部肌肉和左腿代谢固定(数据未显示)。腹腔内肿瘤生长迅速,认为手术或介入放射学不可能。经过伦理考虑后,我们从Novatis和法国监管机构(ANSM)获得了提供BYL719的认可。由于该药物从未在儿童中进行过测试,我们决定从50mg/天的最低可用剂量开始。与第一位患者一样,我们在开始治疗后迅速观察到极大的临床改善(数据未显示)。患者报告舒适度提高,我们在120天内观察到左腿体积、左脚减少15%(减小1个鞋码)和腹围减少8%(数据未显示)。背部的肥大肌肉迅速缩小,出乎意料的是,在没有任何其他干预的情况下,她的脊柱侧凸在120天内逆转(图3)。更重要的是,MRI显示仅在4个月内腹腔肿瘤体积减

少了60%。治疗开始后4个月进行的PET扫描证实了几乎所有组织中的疾病减少。在随访期间,我们发现该患者的正常生长不受BYL719的影响,并且她报告没有副作用。患者仍在接受治疗。

[0078] 讨论

[0079] 本文中,我们报告再现了人类表型的第一个PROS小鼠模型,通过用PI3CA抑制剂BYL719治疗在小鼠模型中拯救PROS,并且使用翻译方法,已经证明了BYL719在PROS患者中的功效。该研究为支持PIK3CA抑制作为先前无法治疗的PROS中强有力且有效的治疗策略提供了第一个直接证据。

[0080] BYL719治疗促进了两名患者(成人和儿童)的恢复,其中在开始治疗后可迅速观察到积极的临床效果。与小鼠模型一样,该药物改善了与PROS相关的所有器官功能障碍。重要的是,该药物在整个治疗期间保持改善畸形的功效。与mTOR抑制剂不同,该药物耐受性良好,没有任何明显的副作用。正如预期的那样,鉴于PI3KCA在胰岛素受体的下游,第一位患者出现高血糖,表明对长期副作用的可能性应格外小心,特别是在可能影响生长、生育和青春期的儿童中。然而,在治疗期间,儿童的生长没有受到影响,在这种破坏性和之前难治性疾病中,必须权衡任何有害影响与益处。还有几个问题,包括何时是开始治疗的最佳时期以及何时或是否可以停止治疗。鉴于小鼠数据,似乎很可能停止药物与疾病的重新开始有关,正如在结节性硬化症患者中所见<sup>17</sup>。

[0081] PIK3CA是人类癌症中最常见的突变癌基因之一,且在PROS患者中发现了类似的突变<sup>6</sup>。与癌症一样,虽然可以在整个基因编码序列中检测到PIK3CA突变,但大多数突变发现在螺旋(E542K、E545K)和激酶结构域(H1047R)的3个主要热点簇中。这些突变中的每一个都导致PIK3CA通路的功能获得性活化。重要的是,在癌症模型中,无论突变类型如何,BYL719都能够完全阻断通路的活性<sup>14</sup>。此外,BYL719拯救了基于PIK3CA基因拷贝数增加的我们的PROS小鼠模型。综合这些数据表明,该药物在所有形式的PROS中肯定是有效的,而不仅仅是作用于H1047R突变。

[0082] 这一发现可能具有广泛的临床效果。重要的是,如果PROS很罕见,它们也不例外。由于表型异质性导致误诊,认为PROS患者的数据被大大低估。嵌合性通常需要使用高度敏感的技术来检测PIK3CA体细胞改变<sup>6</sup>。最近提出的将Klippel-Trenaunay综合征患者纳入PROS的建议突显了可能受益于BYL719的大量患者<sup>9</sup>,其发病率为1/100,000。重要的是,PROS是一个不断发展的实体,因为越来越多的疾病,如单独的静脉畸形也可能与PIK3CA突变相关联<sup>8,18,19</sup>。

[0083] 我们的小鼠模型提供了一个更好地了解PROS的病理生理学的独特机会。该模型再现了具有血管异常、肌肉肥大、肾功能障碍、肝脏脂肪变性、脾脏紊乱和脊柱侧凸的PROS。严重程度与他莫昔芬处理诱导的Cre重组事件的高百分比有关。小鼠因严重出血而死亡,特别是来自肠系膜和肝脏的血管。出血和渗漏是在CLOVES综合征患者中观察到的严重并发症<sup>6</sup>。我们还发现,肝脏中PIK3CA基因的过表达导致脂肪变性,如AKT/mTORC2的遗传过度活化一样。值得注意的是,小鼠在Cre重组后迅速发生脊柱侧凸。这种病变肯定是由于肥大的椎旁-躯干软组织肿块的发展,因为BYL719能够快速逆转异常。在肌肉量减少和具有代谢亢进信号的两名患者中也可见脊柱侧凸的改善。BYL719能够预防任何组织异常的发展,或在疾病出现时拯救所有缺陷。

[0084] 总之,这项工作的结果表明,PIK3CA抑制可能是改善PROS患者健康和生活质量的安全有效的手段。显然,这些结果必须在更大的患者队列中得到证实,但它们代表了PROS患者最有希望的治疗方法。

[0085] 在整个申请中,各种参考文献描述了本发明所属领域的现有技术。这些参考文献的公开内容通过引用并入本公开。

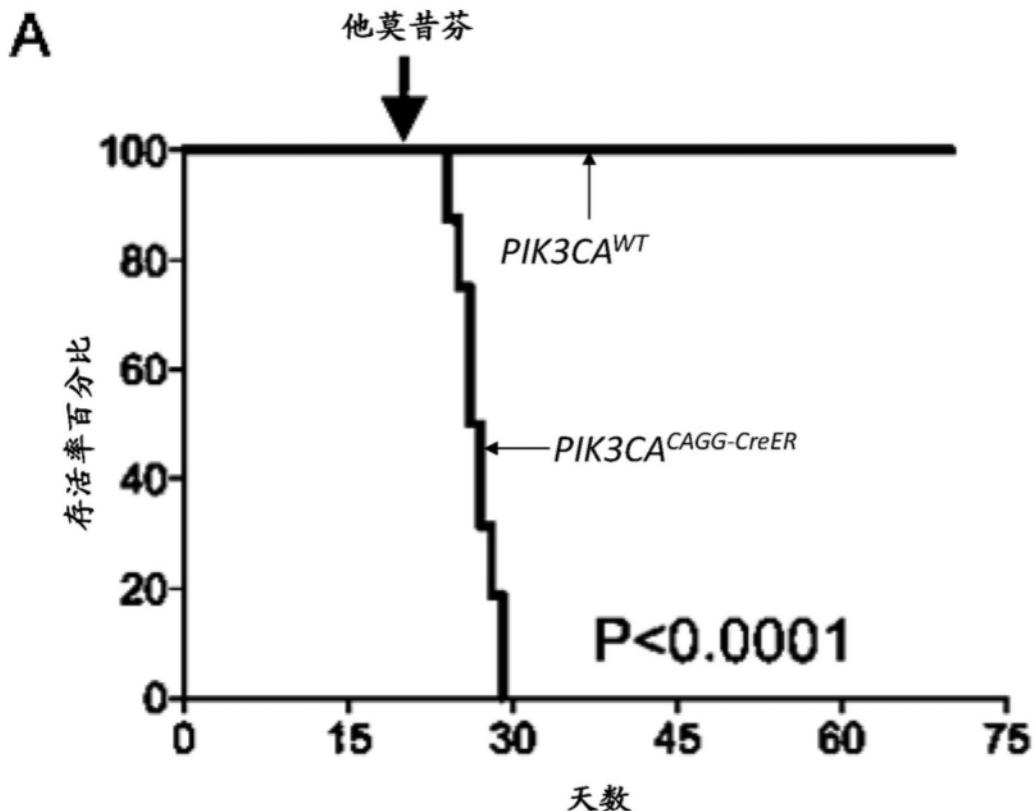


图1A

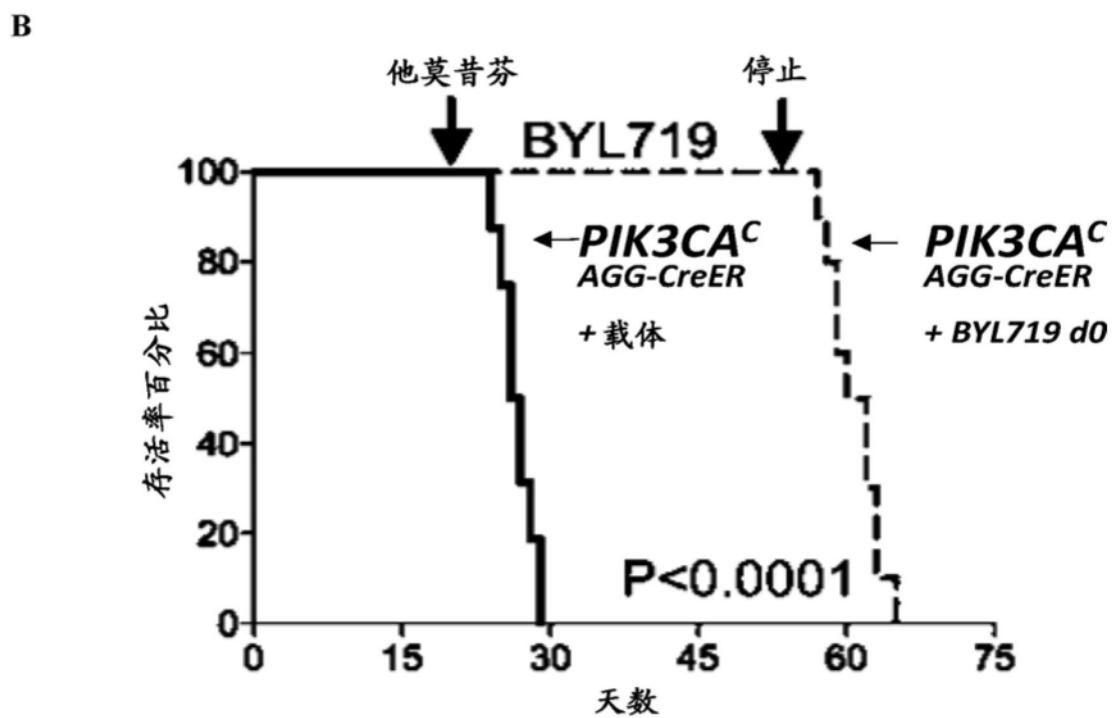


图1B

C

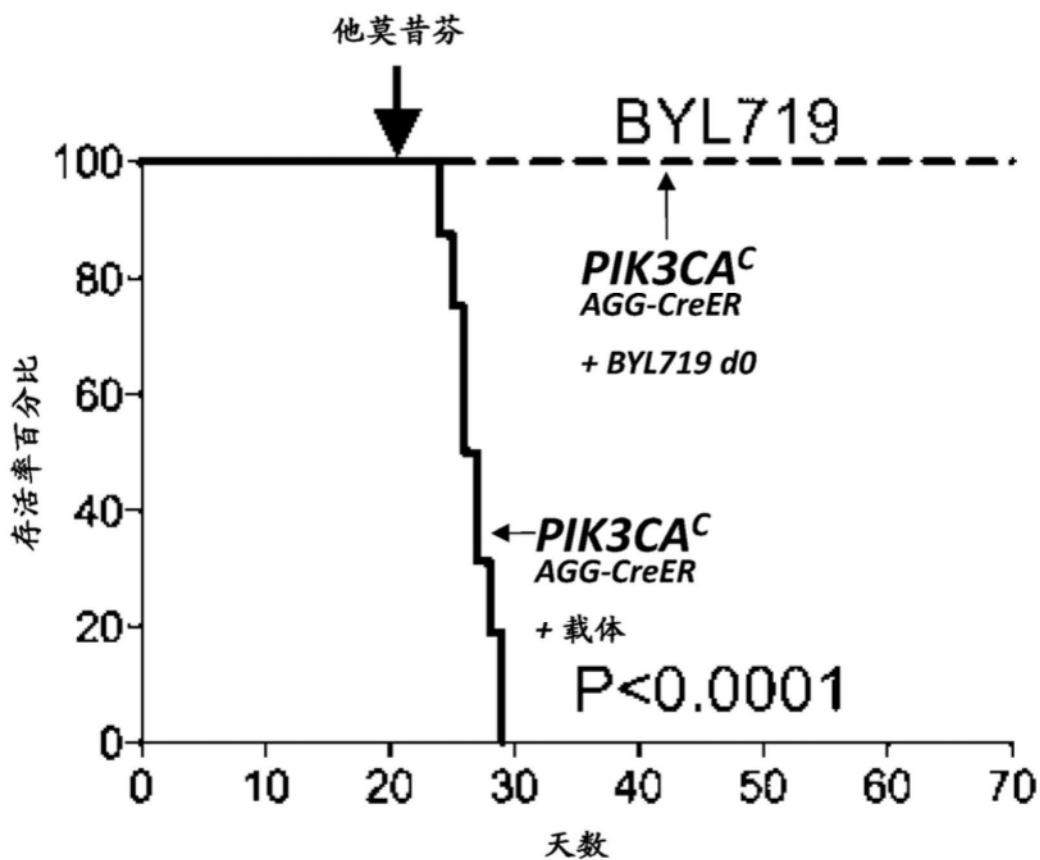


图1C

A

BYL719

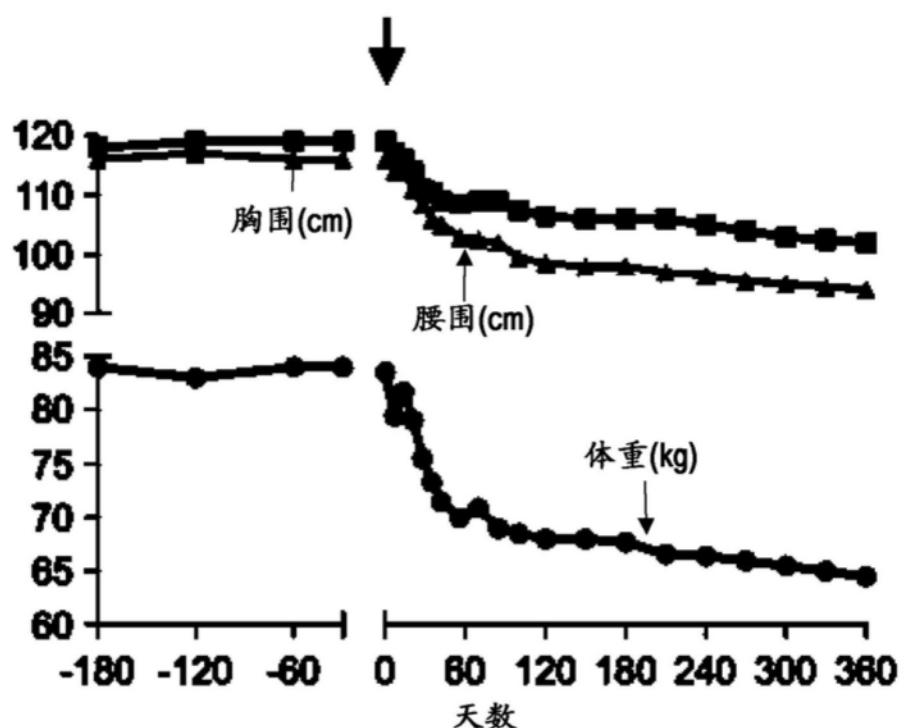


图2A

BYL719

B

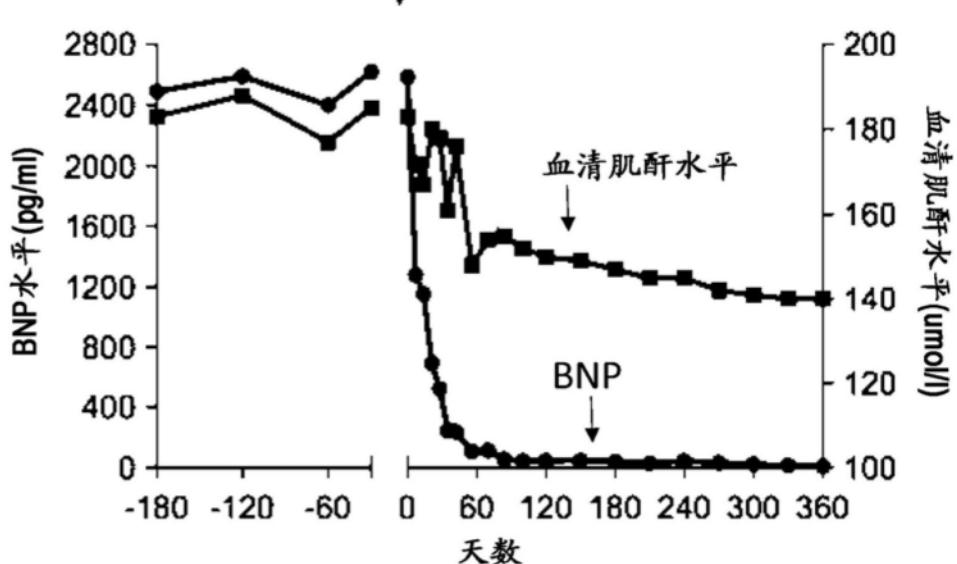


图2B

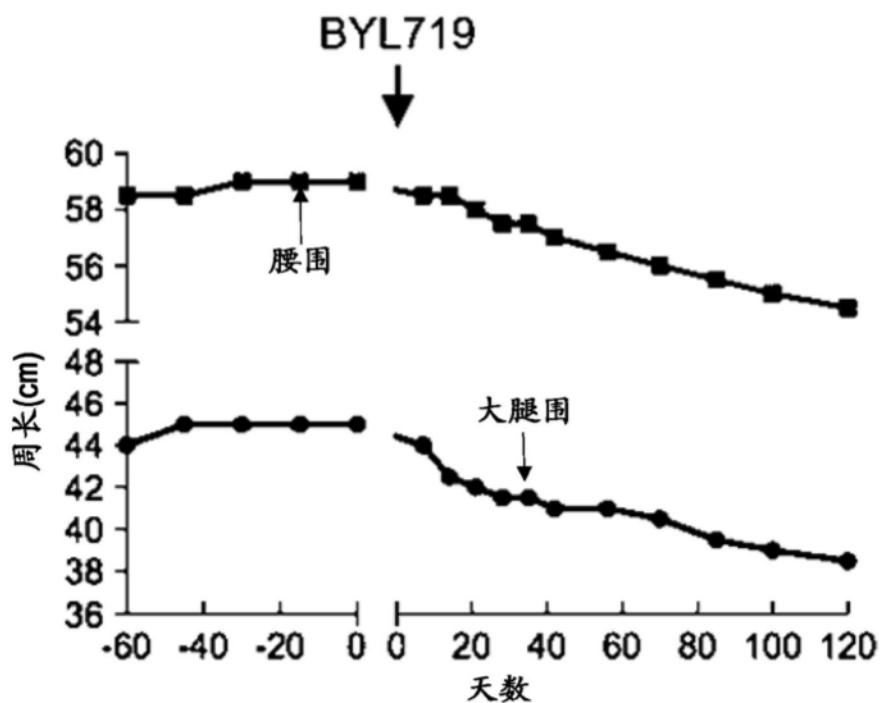


图3