



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101693031 A

(43) 申请公布日 2010.04.14

(21) 申请号 200910169040.8

(22) 申请日 2004.11.17

(30) 优先权数据

60/520,714 2003.11.18 US

(62) 分案原申请数据

200480033858.2 2004.11.17

(71) 申请人 诺瓦提斯公司

地址 瑞士巴塞尔

(72) 发明人 E·布赫东格尔 D·法布罗

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

代理人 黄革生 林柏楠

(51) Int. Cl.

A61K 31/553(2006.01)

A61K 31/502(2006.01)

A61P 43/00(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

A61P 35/02(2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图 1 页

(54) 发明名称

KIT 突变形式的抑制剂

(57) 摘要

本发明涉及治疗特征为 KIT 的突变形式的依赖 KIT 的疾病,其中鉴定了突变 KIT 并施用了突变 KIT 的适当抑制剂,所述抑制剂选自米哚妥林、伐



1. 米哌妥林或伐他拉尼用于生产治疗患者中依赖 KIT 的疾病的药物的用途,其包括:
 - (a) 鉴定与依赖 KIT 的疾病相关的 KIT 的突变形式;和
 - (b) 向所述患者施用有效抑制突变 KIT 量的抑制剂,所述抑制剂选自米哌妥林和伐他拉尼。
2. 权利要求 1 的用途,其中所述 KIT 的突变形式选自 D816F、D816H、D816N、D816Y、D816V、K642E、Y823D、De1550-558、De1 557-561、N822K、V654A、N822H、De1 550-558+V654A、De1 557-561+V654A、Ins503AY、V560G、558NP、De1557-558、De1 VV559-560、F522C、De1 579、R634W、K642E、T801I、C809G、D820Y、N822K、N822H、Y823D、Y823C 和 T670I。
3. 权利要求 2 的用途,其中所述 KIT 的突变形式选自 D816F、D816H、D816N、K642E、Y823D、De1 550-558、De1 557-561、N822K、V654A、N822H、De1 550-558+V654A、De1 557-561+V654A。
4. 权利要求 1 的用途,其中所述依赖 KIT 的疾病对伊马替尼治疗有抗药性。
5. 权利要求 2 的用途,其中所述 KIT 的突变形式选自 D816V、K642E、Y823D、De1 550-558、De1 557-561、N822K、V654A、N822H、De1 550-558+V654A、De1 557-561+V654A 并且所述抑制剂为米哌妥林。
6. 权利要求 2 的用途,其中所述 KIT 的突变形式选自 K642E、Y823D、De1 550-558、De1 557-561、N822K 和 N822H 并且所述抑制剂为伐他拉尼。
7. 权利要求 1-6 任一项的用途,其中所述依赖 KIT 的疾病选自肥大细胞疾病、急性骨髓性白血病、胃肠道间质瘤、精原细胞瘤和无性细胞瘤。
8. 权利要求 4 的用途,其中所述抑制剂为米哌妥林。
9. 权利要求 4 的用途,其中所述抑制剂为伐他拉尼。

KIT 突变形式的抑制剂

[0001] 本发明涉及特征为 KIT 突变形式的依赖 KIT 的疾病的的治疗,其中鉴定了所述突变 KIT 和施用了所述突变 KIT 的适当抑制剂。

[0002] c-kit 基因编码受体蛋白酪氨酸激酶,其在本文中称作 KIT,但也称为肥大 / 干细胞生长因子受体。KIT 的氨基酸序列和 c-kit 基因的核苷酸序列是已知的。参见 Swiss Prot. :P10721。与它的配体干细胞因子结合后, KIT 形成二聚体,所述二聚体自磷酸化并活化导致细胞生长的信号级联。导致 KIT 经活化形式,特别是独立于它的配体的活化的形式的突变是已知的并且认为在某些增生性疾病中起作用,所述疾病为诸如肥大细胞疾病,如肥大细胞增生症,特别是全身性肥大细胞增生症、急性骨髓性白血病、胃肠道间质瘤、sinonasal NK/T- 细胞淋巴瘤、精原细胞瘤和无性细胞瘤。

[0003] 已知作为甲磺酸盐以商品名 GLIVEC 或 GLEEVEC 上市的伊马替尼 (Imatinib) 抑制野生型 KIT 和某些 KIT 突变,例如通常在胃肠道间质瘤 (GIST) 中发现的外显子中的 KIT 突变。然而,它对某些其它的 KIT 突变形式,例如通常在全身性肥大细胞增生症中发现的 D816V 突变也是无活性的或显著较低的活性。本发明基于如下研究:该研究将特征为 KIT 突变形式的疾病的的治疗与适当的备选药物治疗基于该备选药物治疗能够抑制突变 KIT 而联系起来。

[0004] 因此,本发明涉及治疗患者中依赖 KIT 的疾病的方法,所述方法包括

[0005] (a) 鉴定与依赖 KIT 的疾病相关的 KIT 突变形式;和

[0006] (b) 向所述患者施用有效抑制突变 KIT 量的抑制剂,所述抑制剂选自米哌妥林 (midostaurin)、伐他拉尼 (vatalanib) 和化合物 A。

[0007] 依赖 KIT 的疾病一般为增生性疾病,其特征是由于 KIT 中的活化突变导致的过度 KIT 激酶活性。此种活化突变是本领域已知的并且通过本领域已知的技术鉴定。

[0008] 依赖 KIT 的疾病包括特征为以下已知的 KIT 突变的疾病: D816F、D816H、D816N、D816Y、D816V、K642E、Y823D、De1 550-558、De1 557-561、N822K、V654A、N822H、De1 550-558+V654A、De1 557-561+V654A、Ins503AY、V560G、558NP、De1 557-558、De1 VV559-560、F522C、De1 579、R634W、K642E、T801I、C809G、D820Y、N822K、N822H、Y823D、Y823C 和 T670I。

[0009] 在本发明的重要实施方案中,依赖 KIT 的疾病对伊马替尼的治疗有抗药性。对伊马替尼的治疗有抗药性的依赖 KIT 的疾病通常为如以上描述的依赖 KIT 的疾病,其中以 400-1000mg/ 天的剂量施用的伊马替尼不提供对突变 KIT 的足够抑制以实现显著的治疗益处。一般地,对伊马替尼有抗药性的突变 KIT 具有突变 KIT 的体外 IC_{50} 大于约 3 微摩尔 / 升。伊马替尼抗药性 KIT 突变包括 D816F、D816H、D816N、D816Y、D816V、T670I 和包括 V654A 的突变形式。

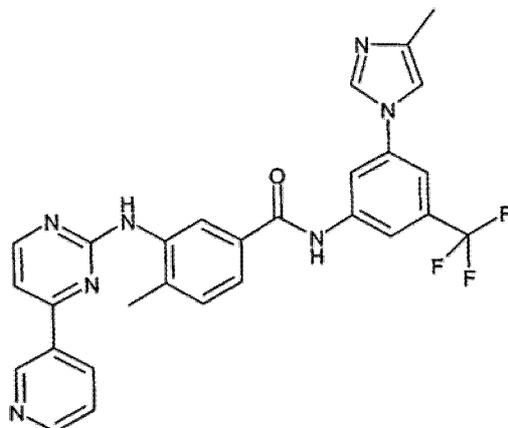
[0010] 抑制 KIT 突变形式的化合物的选择基于检测此种化合物或许多化合物抑制突变 KIT 的能力。此种检测通过本领域已知的或本领域技术人员技术范围内的标准抑制测定法实施。

[0011] 根据本发明的方法利用的 KIT 抑制剂包括米哌妥林、伐他拉尼和化合物 A。米哌妥

林 (US5 ;093, 330) 和伐他拉尼 (WO 98/35958) 是本领域已知的。化合物 A 是式

[0012] 化合物 A

[0013]



[0014] 的化合物并且可以根据 WO 04/005281 制备。

[0015] 通过常规方法确定米哚妥林、vatanalib 和化合物 A 的适当剂量。

[0016] 施用适当剂量的米哚妥林例如, 每天一次、两次或三次, 每天的总剂量为 25-300, 优选 50-300 更优选 50-100, 最优选 100-300mg, 例如每天施用两次或三次, 每天的总剂量为 150-250mg, 优选 225mg。

[0017] Vatanalib 的适当的日剂量为 300-4000mg, 例如 300-2000mg/ 天或 300-1500mg/ 天, 特别地, 300、500、750、1000、1250、1500 或 2000mg/ 天, 特别是 1250mg/ 天。

[0018] 对于 70kg/ 人, 化合物 A 的日剂量为大约 0.05-5g, 优选大约 0.25-1.5g。

[0019] 图 1 是含有突变体的质粒图。

实施例

[0020] 将编码 aa 544-976 的人 KIT 基因克隆到杆状病毒供体质粒 pFB-GST-01。用限制性内切酶 Bam H1 和 EcoR1 切割该编码序列并连接到具有相容末端的 Bac-to-Bac 供体载体 pFB-GEX-P1。随后通过本领域技术人员已知的方法将所希望的突变导入到 KIT 基因中。由于在用于产生突变编码序列的最初质粒中的移码, 因此对于如图 1 显示的每种突变体用限制酶 BamH1-EcoR1 将突变的质粒插入片段切除并插入到 Bac-to-Bac 供体载体 pFB-GST-01 中。自动测序证明每种突变质粒都存在正确的序列。

[0021] 从用如在材料和方法中描述的 pFB-G01-KIT- 突变质粒克隆转化每个 DH10Bac 细胞的 10 个菌落产生杆粒 DNA, 将此种杆粒 DNA 转染到 Sf9 细胞中。将转染的细胞沉淀, 将培养基上清液中存在的所得重组杆状病毒扩大。使用用于免疫检测的抗 KIT 和抗 GST 抗体对经裂解的细胞沉淀物应用蛋白质印迹以证实病毒克隆表达 GST-c-KIT 融合蛋白。

[0022]

Kit 突变	Vatalanib IC ₅₀ (μM) (avg)	化合物 A IC ₅₀ (μM) (avg)
D816F	>10	>10
D816H	>10	>10
D816N	>10	<10
D816Y	>10	>10
D816V	>10	>10
K642E	<1	<10
Y823D	<1	<1
Del 550-558	<1	<2
Del 557-561	<1	<2
N822K	<2	<10
V654A	>10	>10
N822H	<2	<10
Del 550-558 + V654A	<10	<10
Del 557-561 + V654A	>10	>10

米喹妥林

HIS 制备物	平均 IC50 μ M	SEM	N°值
HT-KIT-TA23 wt	1.7	0.15	2
HT-KIT TA23 -D820G	0.084	0.05	2
HT-KIT TA23 -T670I	0.89	0.21	2
GST 制备物	平均 IC50 μ M	SEM	N°值
GST-KIT wt	1.8	0.26	10
GST-KIT Del 557-561	0.32	0.042	3
GST-KIT Del 550-558	0.53	0.057	3
GST-KIT Del 550-558+ V654A	0.27	0.079	5
GST-KIT Del 557-561 + V654A	0.34	0.11	5
GST-KIT V654A	0.46	0.16	5
GST-KIT K642E	0.64	0.036	4
GST-KIT R634W	0.33	0.13	2
GST-KIT T670I + Del 550-558	0.11	0.05	2
GST-KIT D816F	0.41	0.055	5
GST-KIT D816H	0.35	0.078	5
GST-KIT D816N	0.74	0.25	5
GST-KIT D816Y	0.29	0.11	9
GST-KIT D816V	0.25	0.039	3
GST-KIT D816H + R634W	0.08	0.04	2
GST-KIT N822H	0.37	0.12	5
GST-KIT N822K	0.15	0.058	5
GST-KIT Y823D	0.13	0.0075	3

[0023]

[0024] 测定条件: 1μ M ATP, 5μ g/ml Poly-EY, 室温孵育 10 分钟。

[0025] 从经转染细胞培养物中收集包含病毒的培养基用于感染以增加它的滴度。两轮感染后获得的包含病毒的培养基用于大规模的蛋白质表达。对于大规模的蛋白质表达, 用 5×10^7 个细胞 / 板接种 100cm^2 圆形组织培养板, 并用 1mL 包含病毒的培养基 (大约 5MOI) 感染。3 天后, 将细胞从培养板刮下, 以 500 转 / 分钟离心 5 分钟。来自 10-20 个 100cm^2 培养板的细胞沉淀物在 50mL 用冰预冷的裂解缓冲液 (25mM Tris-HCl, pH 7.5, 2mMEDTA, 1% NP-40, 1mM DTT, 1mM PMSF) 中重新悬浮。将细胞在冰上搅拌 15 分钟, 然后以 5000 转 / 分钟

离心 20 分钟。

[0026] 将经离心的细胞裂解物加到 2mL 谷胱甘肽 - 琼脂糖 (sepharose) 柱 (Pharmacia) 上,用 10mL 的 25mM Tris-HCl,pH 7.5,2mM EDTA,1mM DTT,200mM NaCl 清洗 3 次。然后通过 10 次应用 (每次 1mL)25mM Tris-HCl,pH 7.5,10mM 还原型谷胱甘肽,100mM NaCl,1mMDTT,10% 甘油洗脱 GST- 标记的蛋白质,-70℃ 保存。

[0027] 在存在或不存在抑制剂的 20mM Tris-HCl, pH 7.6,3mM $MnCl_2$,3mM $MgCl_2$,1mM DTT,10 μ M Na_3VO_4 ,3 μ g/mL poly(Glu, Tyr)4 : 1,1 % DMSO,1.5 μ M ATP(γ - ^{33}P)-ATP 0.1 μ Ci) 中测定 200-500ng 多种 Kit 突变体的蛋白激酶活性。该测定 (30 μ L) 在 96 孔板中室温进行 30 分钟,加入 20 μ L 的 125mM EDTA 终止反应。随后,将 30 μ L 的反应混合物转移到事先用甲醇浸泡 5 分钟的 Immobilon-PVDF 膜 (Millipore, Bedford, MA, 美国) 上,用水清洗,然后用 0.5% H_3PO_4 浸泡 5 分钟,按照到与真空源分离的多头真空装置上。点上所有样品后,连接真空,每个孔用 200 μ L 0.5% H_3PO_4 清洗。将膜除去并在振荡器上用 1.0% H_3PO_4 清洗 4 次,用甲醇清洗一次。在室温干燥,固定到 Packard TopCount 96 孔框架并加入 10 μ L/ 孔的 Microscint (Packard) 后,对膜进行计数。通过对 4 种浓度 (通常 0.01、0.1、1 和 10 μ M) 一式两份的每种化合物抑制百分率的线性回归分析计算 IC_{50} 值。蛋白激酶活性的一个单位定义为在室温每 mg 蛋白质每分钟将 1 纳摩尔 ^{33}P 从 [γ ^{33}P]ATP 转移到底物蛋白质。

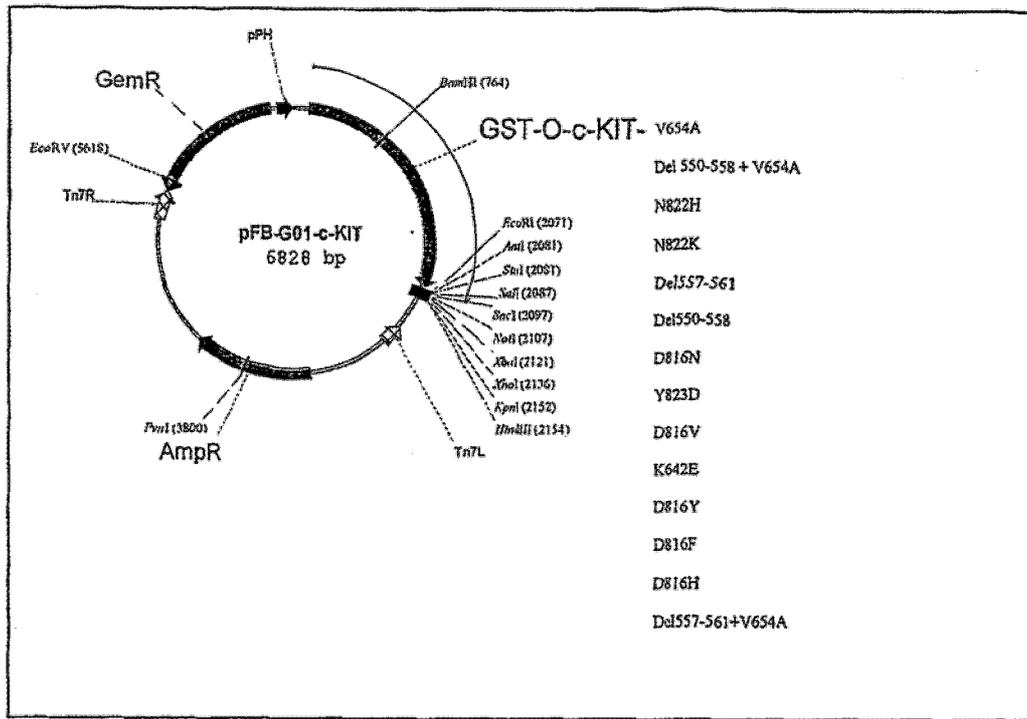


图 1