



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 114901289 A

(43) 申请公布日 2022. 08. 12

(21) 申请号 202080089754.2

C · 德里森 L · 贝西 A · 贝西

(22) 申请日 2020.03.12

(74) 专利代理机构 北京信诺创成知识产权代理有限公司 11728

(30) 优先权数据

专利代理师 王笑康 王庆云

1915618.1 2019.10.28 GB

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

(51) Int.Cl.

2022.06.23

A61K 31/66 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

A61K 31/4545 (2006.01)

PCT/EP2020/056698 2020.03.12

A61K 31/496 (2006.01)

(87) PCT国际申请的公布数据

A61K 31/50 (2006.01)

W02021/083555 EN 2021.05.06

A61K 31/506 (2006.01)

(71) 申请人 奥斯陆大学

A61K 31/5377 (2006.01)

地址 挪威奥斯陆

A61P 35/00 (2006.01)

A61K 31/00 (2006.01)

(72) 发明人 H · 法尔罕 L · 蒙特 K · 塔斯肯

S · 斯坎兰德 M · 吉利伯托

F · 赫勒姆 · 施杰斯沃德

权利要求书2页 说明书26页 附图10页

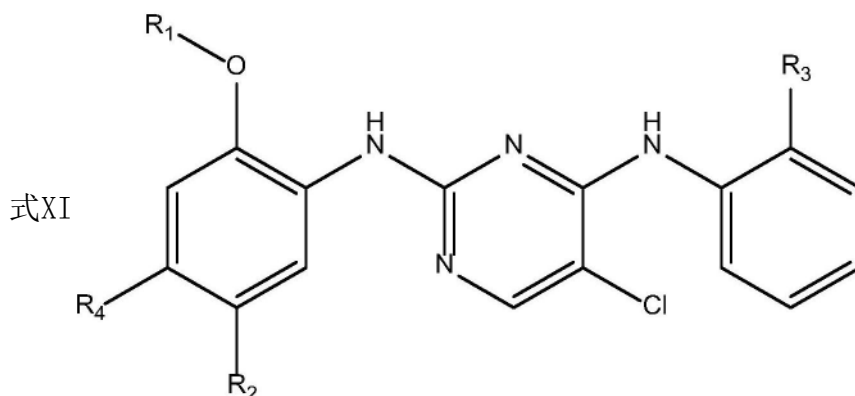
(54) 发明名称

用于治疗ALK阴性癌症和浆细胞介导的疾病
的ALK抑制剂

(57) 摘要

本发明提供了治疗对象的ALK阴性/LTK阳性
癌症的方法,包括向对象施用药学上有效剂量的
线性ALK抑制剂。本发明在治疗多发性骨髓瘤包
括蛋白酶体抑制剂耐药的多发性骨髓瘤方面具
有特殊用途。

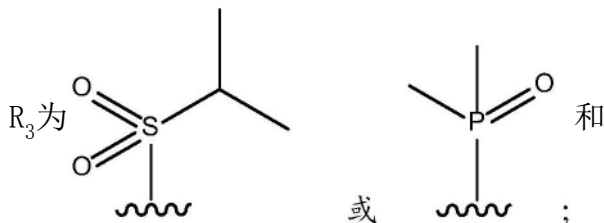
1. 用于治疗对象癌症或浆细胞介导的疾病的线性间变性淋巴瘤激酶 (ALK) 抑制剂, 其中所述癌症或浆细胞介导的疾病特征是ALK阴性和白细胞酪氨酸激酶 (LTK) 阳性的细胞。
2. 根据权利要求1所述的用途的ALK抑制剂, 其中所述用途是治疗癌症。
3. 根据权利要求2所述的用途的ALK抑制剂, 其中所述癌症是多发性骨髓瘤。
4. 根据权利要求2所述的用途的ALK抑制剂, 其中所述癌症是慢性淋巴细胞白血病或肝癌。
5. 根据权利要求2至4中任一项所述的用途的ALK抑制剂, 其中所述癌症对蛋白酶体抑制剂的治疗耐药。
6. 根据权利要求5所述的用途的ALK抑制剂, 其中所述蛋白酶体抑制剂为硼替佐米。
7. 根据权利要求1所述的用途的ALK抑制剂, 其中所述浆细胞介导的疾病是自身免疫疾病。
8. 根据权利要求7所述的用途的ALK抑制剂, 其中所述自身免疫疾病为狼疮或免疫性血小板减少症。
9. 根据权利要求7所述的用途的ALK抑制剂, 其中所述浆细胞介导的疾病是移植物抗宿主疾病。
10. 根据权利要求1至9中任一项所述的用途的ALK抑制剂, 其中所述抑制剂具有式XI所示的结构

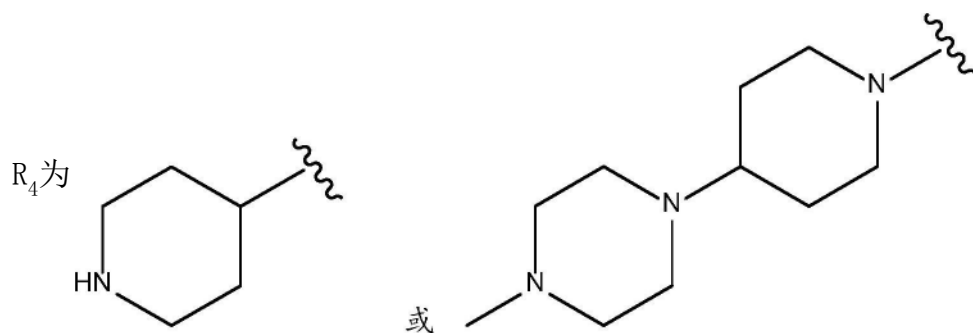


其中:

R_1 为 CH_3 或 iPr ;

R_2 为 H 或 CH_3 ;





11. 根据权利要求10所述的用途的ALK抑制剂,其中所述抑制剂为色瑞替尼。
12. 根据权利要求11所述的用途的ALK抑制剂,其中所述治疗包括每日施用包括450mg的色瑞替尼的剂量,且所述剂量为口服施用。
13. 根据权利要求11所述的用途的ALK抑制剂,其中所述治疗包括每日施用包括200mg至400mg的色瑞替尼的剂量,且所述剂量为口服施用。
14. 根据权利要求11所述的用途的ALK抑制剂,其中所述治疗用于多发性骨髓瘤,并且其中所述治疗包括每日施用包括400mg至500mg的色瑞替尼的剂量,且所述剂量为口服施用。
15. 根据权利要求10所述的用途的ALK抑制剂,其中所述抑制剂为布加替尼。
16. 根据权利要求1至9中任一项所述的用途的ALK抑制剂,其中所述抑制剂选自克唑替尼、恩沙替尼、艾乐替尼和恩曲替尼。
17. 根据权利要求1至16中任一项所述的用途的ALK抑制剂,其中所述对象是人类。
18. 治疗对象癌症或浆细胞介导的疾病的方法,其中所述癌症或浆细胞介导的疾病的特征是ALK阴性和LTK阳性的细胞,所述方法包括向所述对象施用药学上有效剂量的线性ALK抑制剂。
19. 诊断和治疗对象的ALK阴性癌症的方法,包括:
 - (i) 诊断所述对象的癌症;
 - (ii) 检测所述癌症的ALK和LTK表达;和
 - (iii) 当发现所述癌症为ALK阴性和LTK阳性时,向所述对象施用药学上有效剂量的线性ALK抑制剂。
20. 诊断和治疗对象的ALK阴性癌症的方法,包括:
 - (i) 诊断所述对象的癌症;
 - (ii) 确定所述癌症为ALK阴性和LTK阳性;和
 向所述对象施用有效治疗所述癌症的量的线性ALK抑制剂。
21. 根据权利要求17至19中任一项所述的方法,其中所述癌症、浆细胞介导的疾病、ALK抑制剂、对象和/或剂量根据权利要求2至17中任一项所定义。
22. 线性ALK抑制剂在制备用于治疗对象癌症或浆细胞介导的疾病的药物中的用途,其中所述癌症或浆细胞介导的疾病的特征是ALK阴性和LTK阳性的细胞。
23. 根据权利要求22所述的用途,其中所述癌症、浆细胞介导的疾病、ALK抑制剂、治疗或对象根据权利要求2至17中任一项所定义。

用于治疗ALK阴性癌症和浆细胞介导的疾病的ALK抑制剂

[0001] 本发明提供线性间变性淋巴瘤激酶 (ALK) 抑制剂,用于治疗人类ALK阴性和白细胞酪氨酸激酶 (LTK) 阳性癌症 (ALK^{Neg}LTK^{Pos}靶细胞)。本发明还提供线性ALK抑制剂,用于治疗人类浆细胞介导的疾病,其特征为ALK阴性和LTK阳性浆细胞。根据本发明治疗的浆细胞介导的疾病尤其可以是以产生自身抗体为特征的自身免疫疾病。

[0002] 间变性淋巴瘤激酶 (ALK) 是一种受体酪氨酸激酶 (RTK),属于胰岛素受体超家族。在健康成年人中,ALK蛋白仅在中枢神经系统低水平表达 (Pulford等人,Blood 89:1394-1404,1997)。然而,正如Hallberg&Palmer,2016 (Annals of Oncology 27 (Supplement 3): iii4-iii15) 所综述,许多癌症中都有异常ALK表达的报道。据报道,ALK融合蛋白在几种癌症中表达。已发现ALK与多种蛋白质形成融合,尤其包括NPM (在例如间变性大细胞淋巴瘤中) 和EML4 (在例如非小细胞肺癌 (NSCLC) 中)。致癌ALK融合包括ALK蛋白的激酶结构域,并且与配体无关 (即ALK结构域具有组成性活性)。ALK介导的瘤形成的其他机制也已被确定:全长ALK基因的点突变已被报道,特别是在神经母细胞瘤中;据报道,在几种肿瘤类型中也有全长ALK的过表达。

[0003] ALK抑制剂广泛用于治疗ALK^{Pos}癌症,即以任何形式表达ALK的癌症。例如,W02009/126154和W0 2010/002655公开了用于治疗由ALK介导的病况 (尤其是由ALK介导的癌症) 的三嗪和嘧啶衍生物。获准用于癌症治疗的首个ALK抑制剂是克唑替尼,其于2011年获准用于治疗ALK^{Pos} NSCLC。此后,许多其他ALK抑制剂也被批准用于相同的适应症,包括色瑞替尼、艾乐替尼和布加替尼。色瑞替尼在W0 2008/073687中首次披露。

[0004] 本发明提供了已知ALK抑制剂的新用途。本发明包括提供用于治疗人类ALK^{Neg}LTK^{Pos}癌症的ALK抑制剂。还包括提供治疗浆细胞介导的疾病的ALK抑制剂,该疾病的特征是浆细胞为ALK^{Neg}LTK^{Pos}。白细胞酪氨酸激酶 (LTK) 是一种内质网 (ER) 驻留受体酪氨酸激酶,调节ER的输出 (Centonze等人,Journal of Cell Biology 218 (8):2470-2480, 2019)。本发明人已证明LTK在蛋白质稳态 (proteostasis) 中起着重要作用。

[0005] 蛋白质稳态一方面包括新生蛋白质的合成和运输,另一方面包括错误折叠蛋白质的降解。蛋白质稳态的生物合成和降解部分高度互连,形成所谓的蛋白质稳态网络。ER是蛋白质稳态的主要场所,配备有各种控制系统,可以感知和响应蛋白质组的不平衡。当错误折叠的蛋白质积累时,三种ER驻留跨膜蛋白 (IRE1、ATF6和PERK) 被激活,导致未折叠蛋白反应 (UPR) 的诱导。UPR一方面增加ER折叠和处理蛋白质的能力,但也刺激末端错误折叠的蛋白质的蛋白酶体降解。因此,UPR可被称为蛋白质稳态网络的自动调节过程。当错误折叠的蛋白质离开ER进入降解区时,正确折叠的分泌蛋白质将ER留在COPII载体中,该载体形成于称为ER出口位点 (ERES) 的特殊区域。虽然对错误折叠蛋白质的适应性反应已经相当清楚,但对感知折叠蛋白质负荷并通过调节ERES作出反应的等效机制知之甚少。

[0006] 本文证实LTK可对分泌性载量作出响应,并调节ER的分泌能力,从而使其成为蛋白质稳态网络中的调节节点。因此,LTK代表蛋白质稳态网络生物合成部分的靶点,有可能成为治疗以过度蛋白质分泌为特征的疾病的靶点。许多癌症的特征在于高水平的蛋白质分泌 (分泌过多),并表现出对蛋白质稳态机制的高度依赖性。某些浆细胞介导的疾病,包括自身

免疫疾病,也以浆细胞、浆母细胞或其前体的蛋白(抗体)分泌过多为特征。

[0007] 以蛋白质分泌过多为特征的病况的一个特殊实例是多发性骨髓瘤。多发性骨髓瘤是一种克隆性浆细胞癌。受累细胞是抗体产生细胞,多发性骨髓瘤以抗体分泌过多为特征。通过蛋白酶体抑制剂的临床成功,多发性骨髓瘤中蛋白质稳态的重要性显而易见,蛋白酶体抑制剂可抑制蛋白质稳态网络的降解部分 (Moreau等人, Blood 120 (5) :947-959, 2012)。虽然多发性骨髓瘤治疗的最新进展提高了生存时间,但截至2011年,多发性骨髓瘤的5年总生存率仅为49% (Kazandjian, Seminars in Oncology 43 (6) :676-681 2016), 虽然治疗可能会带来疾病缓解,但它被认为是无法治愈的。因此,需要新的治疗方法。

[0008] 以显示蛋白质分泌过多的细胞为特征的病况的另一实例是慢性淋巴细胞白血病 (CLL), 一种以淋巴结、脾脏或骨髓中B淋巴细胞的克隆性增殖为特征的癌症。癌组织 (所谓的假滤泡) 中增殖的CLL母细胞 (blasts) 在进行细胞分裂之前分泌单克隆抗体 (Darwiche等人, Frontiers in Immunology 9:683, 2018)。

[0009] 以蛋白分泌过多为特征的病况的其他实例是与失调浆细胞产生自身抗体相关的自身免疫疾病。这种病况的一个实例是狼疮 (又称系统性红斑狼疮, 或SLE), 其中失调的B细胞分化允许浆细胞发育, 产生针对细胞核成分的自身抗体 (如抗核抗体, ANA)。狼疮中自身抗体的特别常见靶点包括双链DNA和核糖核蛋白。这种自身免疫疾病的另一个实例是免疫性血小板减少症 (ITP), 其中失调的浆细胞产生针对血小板表面结构的抗体, 导致血小板耗尽, 导致凝血不足。需要对这些自身免疫疾病的有效治疗。

[0010] 本发明人先前已证明某些已知的ALK抑制剂在抑制LTK方面有效 (Centonze等人, 上文)。发明人现已证明, 用临床批准的ALK抑制剂靶向LTK可使分泌过多的细胞 (如多发性骨髓瘤细胞和增殖的CLL母细胞) 对ER应激敏感, 并诱导凋亡。以相同的方式, 在各种自身免疫疾病中分泌高水平的自身抗体的失调浆细胞中也会发生促凋亡作用。因此, 虽然先前认为ALK抑制剂在治疗ALK^{Pos}癌症方面的作用很大程度上受到限制, 但本发明提供了几种此类药物的新用途, 用于治疗ALK^{Neg}LTK^{Pos}癌症 (尤其是治疗ALK^{Neg}LTK^{Pos}多发性骨髓瘤和ALK^{Neg}LTK^{Pos}CLL) 和以ALK⁻/LTK⁺细胞为特征的浆细胞介导的疾病。发明人已经证明, ALK抑制剂的作用与ALK表达无关, 因为LTK⁺ALK⁻敲低或ALK敲除细胞系对ALK抑制仍然敏感。

[0011] 因此, 在第一方面, 本发明提供了用于治疗对象癌症或浆细胞介导的疾病的线性ALK抑制剂, 其中所述癌症或浆细胞介导的疾病的特征是ALK阴性和LTK阳性的细胞。

[0012] 在类似方面, 本发明提供了治疗对象癌症或浆细胞介导的疾病的方法, 其中所述癌症或浆细胞介导的疾病的特征是ALK阴性和LTK阳性的细胞, 所述方法包括向所述对象施用有效治疗所述癌症的量的线性ALK抑制剂。

[0013] 还提供了诊断和治疗对象的ALK阴性癌症的方法, 包括:

[0014] (i) 诊断所述对象的癌症;

[0015] (ii) 检测所述癌症的ALK和LTK表达; 和

[0016] (iii) 当发现所述癌症为ALK阴性和LTK阳性时, 向所述对象施用有效治疗所述癌症的量的线性ALK抑制剂。

[0017] 类似地, 本文提供了诊断和治疗对象的ALK阴性癌症的方法, 包括:

[0018] (i) 诊断所述对象的癌症;

[0019] (ii) 确定所述癌症为ALK阴性和LTK阳性; 和

[0020] 向所述对象施用有效治疗所述癌症的量的线性ALK抑制剂。

[0021] 在另一方面,本发明提供了线性ALK抑制剂在制备用于治疗对象癌症或浆细胞介导的疾病的药物中的用途,其中所述癌症或浆细胞介导的疾病的特征是ALK阴性和LTK阳性的细胞。

[0022] 在另一方面,本发明提供用于治疗蛋白酶体抑制剂耐药癌症的线性ALK抑制剂。蛋白酶体抑制剂耐药癌症优选为蛋白酶体抑制剂耐药多发性骨髓瘤。蛋白酶体抑制剂耐药癌症可能是LTK阳性癌症,尤其是LTK阳性多发性骨髓瘤。

[0023] 下文将更详细地讨论,对象可以是任何哺乳动物对象,但在上述方面的某些优选实施方案中,其为人类对象。

[0024] 如上所述,本发明人已发现几种已知的ALK抑制剂(在本文中也称为ALK抑制剂)在抑制LTK方面也有效。特别地,如实例所示,已发现线性ALK抑制剂在抑制LTK方面有效。然而,发现环状ALK抑制剂是无效的。虽然ALK和LTK是相关蛋白(它们的细胞质激酶结构域在人类中有79%相同;Centonze等人,上文),但无法预测某些ALK抑制剂会对LTK表现出交叉特异性,而其他抑制剂则不会。

[0025] 如本文所述,ALK抑制剂是能够与ALK(特别是人类ALK)相互作用并降低或消除其活性的化合物。人类ALK具有UniProt登录号Q9UM73。ALK抑制剂能够抑制全长野生型ALK和ALK融合蛋白的活性。如Chand等人(Disease Models&Mechanisms 6:373-382,2013,通过引用并入本文)所述,已知许多检测化合物在ALK抑制中的活性的方法。例如,ALK激活需要Tyr1278上的自磷酸化。因此,抑制ALK活性就抑制了Tyr1278自磷酸化,这可通过使用抗磷酸ALK(Y1278)抗体的免疫印迹检测。此类抗体可商购(例如抗体#3710,Cell Signaling Technology,USA)。因此,为了确定化合物是否在ALK抑制中具有活性(即,是ALK抑制剂),可将所述感兴趣化合物应用于表达人类ALK的细胞,细胞裂解并分析Tyr1278上的ALK自磷酸化。

[0026] 还已知其他检测ALK抑制的方法,例如,分析Tyr1604上的ALK自磷酸化和/或ALK底物(如ERK和STAT3)的磷酸化,如Chand等人所述(同上)。

[0027] 本领域已知几种ALK抑制剂,迄今为止已有六种被批准用于医疗用途:克唑替尼、色瑞替尼、艾乐替尼、布加替尼、恩曲替尼和劳拉替尼。其他已知的ALK抑制剂包括贝扎替尼(belizatinib)。

[0028] 本文中使用的ALK抑制剂也有效抑制LTK,特别是人类LTK。人类LTK具有UniProt登录号P29376。“有效抑制LTK”是指抑制剂能够与LTK(特别是人类LTK)相互作用并降低或消除其活性。已知检测化合物在LTK抑制中的活性的方法,并在下面的实施例中展示。特别地,LTK激活需要Tyr672上的自磷酸化,这相当于Tyr1278上ALK的自磷酸化。许多识别磷酸ALK(Y1278)的抗体也识别磷酸LTK(Y672)。用于检测磷酸LTK(Y672)的合适抗体可商购(例如抗体D59G10,细胞信号传导技术)。因此,为了确定化合物是否具有LTK抑制活性(即,是LTK抑制剂),可将感兴趣的化合物应用于表达人类LTK的细胞,细胞溶解并分析Tyr672上的LTK自磷酸化。

[0029] 如上所述,本发明人发现线性ALK抑制剂也具有LTK抑制活性,而环状ALK抑制剂对LTK无效。“线性”ALK抑制剂是指缺乏充当分子核的中心环(即从其延伸所有官能团的中心环)的ALK抑制剂。这种环在本文中称为环状分子核。因此,线性ALK抑制剂仍然可以包括环

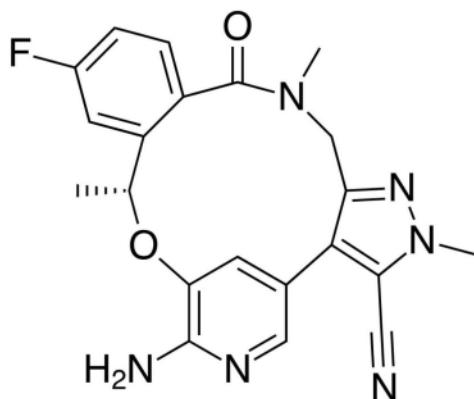
状官能团,例如苯基等。然而,在这种情况下,并非所有官能团和侧链都从相同的环状结构延伸(或形成其一部分)。换言之,术语“线性ALK抑制剂”不包括环化的分子,从具有“环形”结构(即环形骨架)的分子的意义上来说,其不包括不同的和定义的末端。包含环状分子核的ALK抑制剂是环状ALK抑制剂,或者,可备选地表示为环化或环状ALK抑制剂。

[0030] 环状ALK抑制剂的一个实例是劳拉替尼,其具有式I所示的结构。如其所示,劳拉替尼包含形成分子核的12元环。有了这个核心环,劳拉替尼为环状ALK抑制剂。已发现劳拉替尼在抑制LTK方面没有活性。

式 I:

劳拉替尼

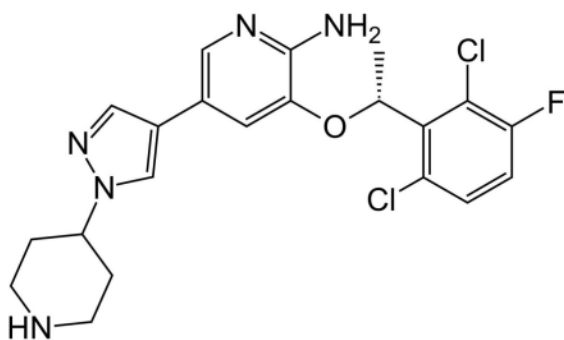
[0031]



[0032] 线性ALK抑制剂具有缺少环状分子核的结构。相反,线性ALK抑制剂包含许多互相串连接在一起的官能团。线性ALK抑制剂的实例包括克唑替尼、色瑞替尼、布加替尼、恩沙替尼、艾乐替尼和恩曲替尼。克唑替尼(3-[(1R) -1-(2,6-二氯-3-氟苯基) 乙氧基]-5-(1-哌啶-4-基吡唑-4-基) 吡啶-2-胺)的结构如式II所示;色瑞替尼(5-氯-2-N-(5-甲基-4-哌啶-4-基-2-丙-2-基氧基苯基)-4-N-(2-丙-2-基磺酰基苯基) 嘧啶-2,4-二胺)的结构如式III所示;布加替尼(5-氯-4-N-(2-二甲基磷酰基苯基)-2-N-[2-甲氧基-4-[4-(4-甲基哌嗪-1-基) 哌啶-1-基] 苯基] 嘧啶-2,4-二胺)的结构如式IV所示;恩沙替尼(6-氨基-5-[(1R) -1-(2,6-二氯-3-氟苯基) 乙氧基]-N-[4-[(3R,5S) -3,5-二甲基哌嗪-1-羰基] 苯基] 哒嗪-3-甲酰胺)的结构如式V所示;艾乐替尼(9-乙基-6,6-二甲基-8-(4-吗啉-4-基哌啶-1-基)-11-氧代-5H-苯并[b]呋唑-3-甲腈)的结构如式VI所示;和恩曲替尼(N-[5-[(3,5-二氟苯基) 甲基]-1H-吡唑-3-基]-4-(4-甲基哌嗪-1-基)-2-(恶烷-4-基氨基) 苯甲酰胺)的结构如式VII所示。

式 II:

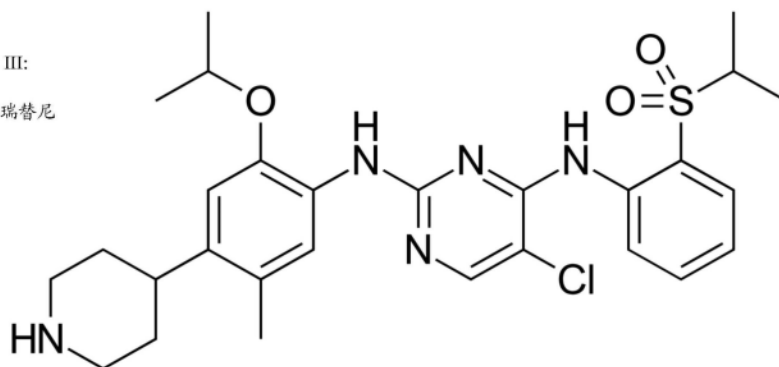
克唑替尼



[0033]

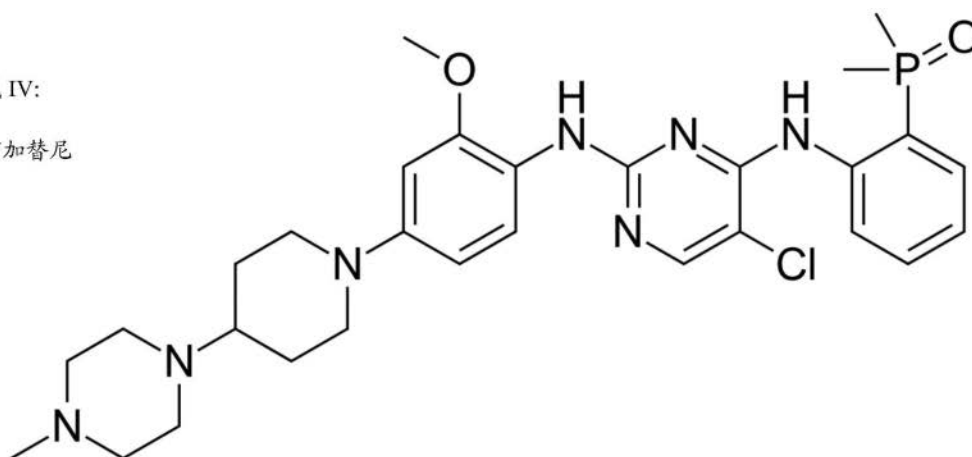
式 III:

色瑞替尼



式 IV:

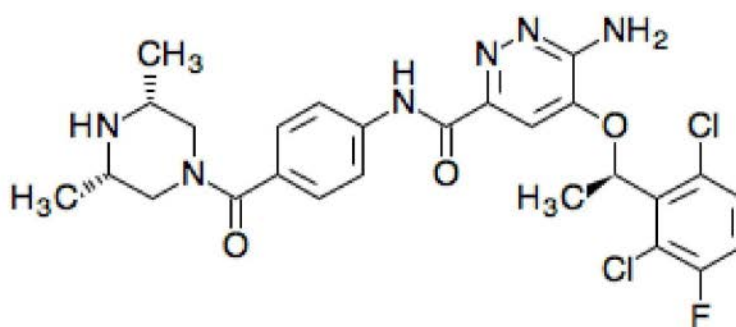
布加替尼



式 V:

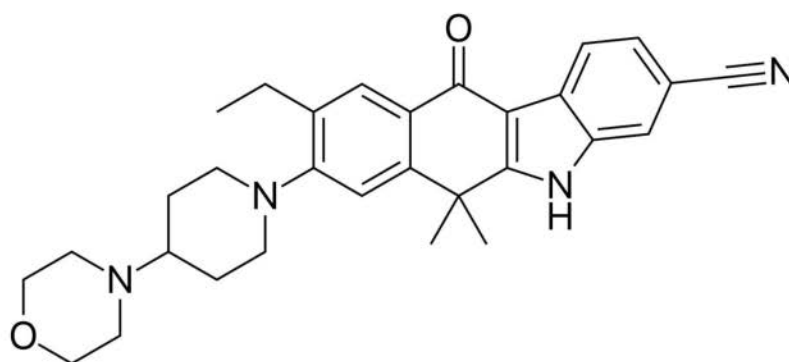
[0034]

恩沙替尼



式 VI:

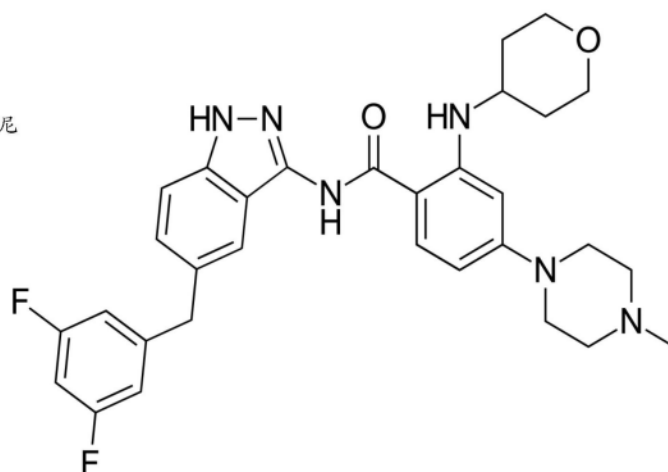
艾乐替尼



式 VII:

恩曲替尼

[0035]



[0036] 如式II-VII可以看出,线性ALK抑制剂缺少环状分子核。尽管举例说明的线性ALK抑制剂均含有环状基团(例如苯基),但这些基团均未形成中心环,所有官能团均从该中心环延伸。

[0037] 在非线性、“环状”ALK抑制剂中,环状分子核可能是ALK抑制剂中最大的环状基团。具体地,环状分子核可包含至少两个成员,多于分子内的任何其他环状基团。可备选地定义的,环状分子核可以是至少8元环,例如9元环、10元环、11元环或12元环。劳拉替尼的环状分子核是12元环。如上所述,线性ALK抑制剂是不具有环状分子核的ALK抑制剂。

[0038] 根据本发明的ALK抑制剂用于治疗癌症或浆细胞介导的疾病,其特征是细胞为ALK^{Neg}和LTK^{Pos}。以细胞为ALK^{Neg}和LTK^{Pos}为特征的癌症是作为组分的恶性细胞表达LTK但不表达ALK的癌症。也就是说,根据本发明要治疗的癌症是ALK^{Neg}(ALK阴性)和LTK^{Pos}(LTK阳性)。

[0039] 本文所用的ALK^{Pos}(或ALK阳性)癌症是指以任何形式表达ALK蛋白的癌症:以野生型蛋白形式、ALK融合蛋白形式或突变全长蛋白形式(例如,包含功能获得性突变)。确定癌症是否表达ALK的方法在本领域中是标准的,目前常用于确定ALK抑制剂治疗已获批准的癌症尤其是NSCLC的ALK表达状态。

[0040] 这种方法通常在癌症活检样本上进行。检测ALK表达的合适方法的实例是免疫组织化学(IHC)。用于检测ALK表达的IHC试剂盒已获得监管批准,并已上市。此类试剂盒的一个实例是Ventana ALK (D5F3) CDx分析(Roche,Switzerland),其可用于检测ALK表达。也可使用其他此类试剂盒。

[0041] 在特定实施方案中,在已获得监管批准的ALK表达检测中给出阳性结果的癌症被视为ALK阳性,并且在此类ALK表达检测中给出阴性结果的任何癌症被视为ALK阴性。熟练的病理学家能够常规确定组织样本是ALK^{Pos}还是ALK^{Neg}。

[0042] 因此,当分析癌组织的ALK表达时,ALK^{Neg}癌症可能是被确定为ALK阴性的癌症。特别地,ALK^{Neg}癌症可以是其中IHC未检测到ALK表达的癌症。例如,ALK阴性癌症可能是根据已获得ALK表达检测监管批准的分析提供阴性结果的癌症。在特定实施方案中,ALK^{Neg}癌症是根据Ventana ALK (D5F3) CDx分析提供阴性结果的癌症。

[0043] 还可以使用例如荧光原位杂交(FISH)在基因组水平上直接检测ALK基因重排。裂解FISH尤其可用于检测ALK基因重排,且合适的裂解FISH试剂盒可商购(例如Vysis ALK裂解FISH探针试剂盒,Abbott Molecular,USA;产品编号06N38-023),且可由技术人员设计。在DNA水平上显示ALK基因重排的癌症在本文定义为ALK^{Pos}癌症。如上所述,本发明涉及ALK癌症的治疗。

[0044] 类似地,LTK^{Pos}癌症是具有可检测的LTK表达水平的癌症。本领域的标准方法可用于检测LTK表达,如用于ALK检测。此类方法通常可在活检样本上进行。例如,免疫组织化学(如免疫荧光染色)可用于直接检测LTK蛋白表达。逆转录酶PCR(RT-PCR)可靠地用于检测mRNA水平的LTK表达。技术人员可以设计用于LTK RT-PCR的合适引物。优选地,qPCR用于检测LTK表达。技术人员可以设计用于LTK qPCR的合适引物,也可商购(例如,LTK QuantiTect引物分析,Qiagen;目录号QT00219877)。

[0045] 因此,根据本发明,可以使用本领域标准的方法在对象中诊断癌症。然后可以检测癌症中ALK和LTK的表达。可获取活检样本进行ALK和LTK表达检测。当活检样本用于诊断癌

症时,相同的活检样本或不同的活检样本可用于ALK和LTK表达检测。活检样本可通过任何适合于癌症类型的方法获得。例如,活检样本可以通过外科活检获得,例如,它可以是切除活检样本。可备选地,可通过针刺活检获得样本。在血液学癌症的情况下,包括多发性骨髓瘤和CLL,可通过骨髓活检(骨髓瘤和CLL)或血液样本(CLL)获得活检样本。熟练的医生有能力获得适当的活检样本。

[0046] 活检样本可以是液体活检样本,例如从血液中获得。具体地,如上所述,可分离和分析循环肿瘤细胞的ALK和LTK表达。Kamande等人(Integrative Biology 10(2):82-91, 2018)公开了用于多发性骨髓瘤诊断和表征的液体活检方法,其可用于检测ALK和LTK表达,如上所述。如果发现受试癌症为ALK^{Neg}LTK^{Pos},则可使用根据本发明的ALK抑制剂对其进行治疗。

[0047] 因此,可以使用上述技术通过实验确定癌症是否为ALK^{Neg}和LTK^{Pos}。可备选地,在一些情况下,基于相关癌症的已知特征,可以假设癌症是ALK^{Neg}和LTK^{Pos}。因此,在情况允许的情况下,可在无需实验室确认的情况下进行确定。

[0048] 如本文所用,术语“癌症”根据其在领域中的正常含义使用,即恶性肿瘤状态。根据本发明治疗的癌症可以是任何种类的癌症,包括实体癌和血液学癌。任何ALK^{Neg}和LTK^{Pos}的癌症都可以根据本发明进行治疗。

[0049] 在一个实施方案中,根据本发明待治疗的癌症为ROS1阴性(ROS1^{Neg})。ROS1是与ALK相关的酪氨酸激酶。它在正常发育中的作用尚不确定,但已发现它在几种癌症中异常表达。许多ALK抑制剂在抑制ROS1方面表现出活性,并且已发现此类ALK抑制剂(例如克唑替尼)在治疗ROS1^{Pos}癌症方面有用。人类ROS1具有UniProt登录号P08922。在癌症中,发现ROS1在融合蛋白中表达,融合蛋白是由基因重排产生的。已知几种致癌ROS1融合蛋白,其中ROS1具有组成性活性,包括与FIG、CD74、TPM3、SDC4和SLC34A2等的融合。

[0050] ROS1阴性癌症可能不展示ROS1的可检测的表达。然而,在一些健康成人组织中发现ROS1表达。因此,ROS1^{Neg}癌症可更优选地定义为不是由ROS1表达引起的癌症。特别地,ROS1^{Neg}癌症可定义为不表达由基因重排事件产生的突变ROS1的癌症。特别地,ROS1^{Neg}癌症不表达ROS1融合蛋白。这与本领域中使用的术语一致,其中术语“ROS1阳性”(ROS1^{Pos})通常用于指代表达ROS1融合蛋白的癌症。

[0051] ROS1与癌症的关系,特别是ROS1融合蛋白的作用,以及如何检测此类蛋白在Davies&Doebbele,Clinical Cancer Research 19(15):4040-4045,2013中描述。可使用本领域已知的任何方法检测ROS1融合蛋白的表达,例如qPCR或免疫组织化学。可备选地,可以在DNA水平上直接检测ROS1基因重排,例如通过FISH(Davies等人,Clinical Cancer Research 18(17):4570-4579,2012,通过引用并入本文)中描述了检测ROS1基因重排的“裂解”FISH分析)或下一代基因组测序。因此,根据本发明待治疗的癌症可以是ALK^{Neg}和ROS1^{Neg}以及LTK^{Pos}。

[0052] 在另一实施方案中,根据本发明待治疗的癌症为NTRK融合阴性(在本文中称为NTRK-f阴性,NTRK-f^{Neg})。人类中存在三种NTRK基因:NTRK1、NTRK2和NTRK3(其分别编码TrkA、TrkB和TrkC)。TrkA具有UniProt登录号P04629;TrkB具有UniProt登录号Q16620;TrkC具有UniProt登录号Q16288。Trk蛋白是与ALK相关的受体酪氨酸激酶。与ALK和ROS1类似,已经发现Trk基因重排与癌症相关,特别是产生组成性活性Trk融合蛋白的重排。已知几种此

类致癌Trk融合蛋白,包括Trk蛋白与TPM3、CD74、TRIM24和ETV6等的融合。

[0053] NTRK-f^{Neg}癌症是不表达由基因重排事件产生的突变Trk蛋白,特别是Trk融合蛋白的癌症。本领域已知检测NTRK基因融合的方法,并在Hsiao等人,Journal of Molecular Diagnostics 21(4):553-571中进行综述。合适的方法包括免疫组织化学(利用能够结合TrkA、TrkB和TrkC融合蛋白的泛-Trk抗体;FISH(特别是裂解FISH);qPCR;和下一代DNA测序。因此,根据本发明待治疗的癌症可以是ALK^{Neg}和NTRK-f^{Neg}以及LTK^{Pos}。在特定实施方案中,根据本发明的癌症为ALK^{Neg}和Ros1^{Neg}以及NTRK-f^{Neg}和LTK^{Pos}(ALK^{Neg}Ros1^{Neg}NTRK-f^{Neg}LTK^{Pos})。

[0054] 根据本发明的待治疗的癌症可以是与蛋白质分泌过多相关的癌症。与蛋白质分泌过多相关的癌症是具有高代谢活性并比其他细胞分泌显著更多蛋白质的癌症。与蛋白质分泌过多相关的癌症的一个实例是多发性骨髓瘤,它与称为M蛋白的单克隆免疫球蛋白的分泌过多相关。多发性骨髓瘤细胞是表现出蛋白质分泌过多的癌性浆细胞。如下文所述,CLL细胞也表达LTK,是ALK阴性的,并且在增殖状态下被ALK抑制剂靶向。在此,CLL细胞是表现出蛋白质分泌过多的癌性母细胞。如下文所述,非癌性浆细胞也表达LTK,是ALK阴性的,并被ALK抑制剂靶向。

[0055] 在特定实施方案中,根据本发明治疗的癌症为多发性骨髓瘤。如上文所述,多发性骨髓瘤(也可简称为“骨髓瘤”)是克隆性浆细胞癌。多发性骨髓瘤可根据血液和/或尿液中是否存在M蛋白进行诊断。更常见的是,多发性骨髓瘤是通过骨髓活检来诊断的,骨髓活检用于确定浆细胞所占骨髓的百分比。可进行医学成像(如X射线、MRI扫描和PET/CT扫描)以确定骨骼中的溶解性病变,这是多发性骨髓瘤的特征。因此,可以使用本领域的标准方法识别多发性骨髓瘤。ALK^{Neg}LTK^{Pos}多发性骨髓瘤可使用根据本发明的ALK抑制剂治疗。

[0056] 以下实例表明,ALK抑制剂可有效降低ALK^{Neg}LTK^{Pos}多发性骨髓瘤的生存力。如以下实例所示,很大一部分多发性骨髓瘤是ALK^{Neg}(767名患者中,大于99.8%的多发性骨髓瘤)。因此,本发明有利地为重要的LTK^{Pos}亚组多发性骨髓瘤患者(根据对下文所述的767名患者的分析,估计超过80%的多发性骨髓瘤患者)提供了一种新的治疗选择。

[0057] 在另一实施方案中,根据本发明治疗的癌症是B细胞恶性慢性淋巴细胞性白血病(CLL)。在发明人分析的107名CLL患者中,94/107(88%)具有表达LTK的CLL细胞,且没有患者具有表达ALK的CLL细胞。因此,大多数受试的CLL患者具有ALK^{Neg}LTK^{Pos}癌症。CLL细胞在淋巴组织中或在假滤泡中的骨髓中分裂,在所述假滤泡中癌支持细胞激活CLL细胞分裂。恶性CLL细胞在增殖状态下变成激活的大癌细胞,称为母细胞。在这种状态下,CLL细胞也变得分泌过多并分泌单克隆Ig(M蛋白)。CLL患者可能患有两种形式的癌症之一:IgVH突变和IgVH未突变CLL。IgVH未突变和IgVH突变型的CLL都容易被ALK抑制剂杀死,因此IgVH突变和IgVH未突变的CLL都可以根据本发明进行治疗。先前治疗和未治疗患者的CLL癌细胞都容易被ALK抑制剂杀死。因此,根据本发明,可将ALK抑制剂用作CLL的一线治疗(例如,用于新诊断的CLL或新症状的CLL),或用于治疗复发的CLL。

[0058] 在另一实施方案中,根据本发明治疗的癌症是ALK^{Neg}LTK^{Pos}肝癌。肝癌是指原发性肝癌,而不是从身体其他部位扩散到肝脏的继发性肝癌。可根据本发明治疗所有类型的肝癌,包括肝细胞癌、胆管癌和其他罕见类型的肝癌。

[0059] LTK和ALK在所有哺乳动物中都有表达。因此,本发明扩展到任何哺乳动物对象的

治疗。因此,除人类对象外,对象可以是任何牲畜、家畜或运动动物。本发明包括在人类或非人类哺乳动物中治疗 $ALK^{Neg}LTK^{Pos}$ 癌症。可根据本发明治疗的非人类哺乳动物的实例包括犬科(犬科动物)、猫科(猫科动物)和马科(马科动物)。

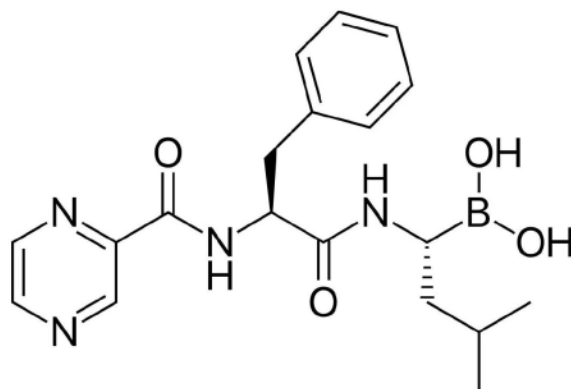
[0060] 根据本发明治疗的癌症可处于任何阶段,例如I期、II期、III期或IV期癌症。因此,根据本发明治疗的癌症可能是局部的,或者可能已经转移。在多发性骨髓瘤的情况下,根据国际分期系统的分类,骨髓瘤可能处于1期、2期或3期。根据本发明治疗的癌症可能是癌症的复发,例如,本发明可用于治疗复发的或复发性多发性骨髓瘤或CLL。根据本发明的多发性骨髓瘤的治疗包括隐匿性骨髓瘤的治疗。隐匿性骨髓瘤是活动性多发性骨髓瘤的前兆。治疗隐匿性骨髓瘤可防止或延缓其向活动性多发性骨髓瘤的进展。

[0061] 根据本发明治疗的癌症在人类对象(或患者)中。根据本发明治疗的患者是被诊断患有 $ALK^{Neg}LTK^{Pos}$ 癌症的患者。可以如上所述进行此类诊断。在特定实施方案中,根据本发明治疗的患者是被诊断患有 $ALK^{Neg}LTK^{Pos}$ 多发性骨髓瘤的患者。可备选地,患者可能已被诊断患有 $ALK^{Neg}LTK^{Pos}$ CLL。可备选地,患者可能已被诊断患有 $ALK^{Neg}LTK^{Pos}$ 原发性肝癌。患者可以是任何年龄,并且可以是男性或女性。

[0062] 如上所述,与蛋白质分泌过多相关的癌症(特别是多发性骨髓瘤)通常用蛋白酶体抑制剂治疗。迄今为止,三种蛋白酶体抑制剂已被批准用于治疗多发性骨髓瘤:硼替佐米(制剂VIII);卡非佐米(制剂IX)和伊沙佐米(制剂X)。

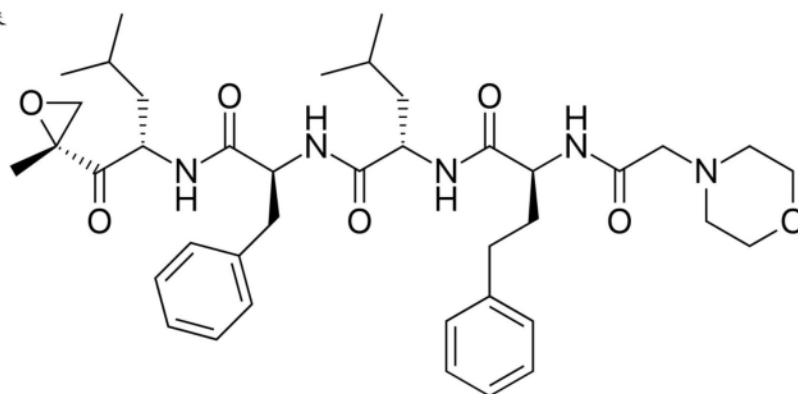
式 VIII:

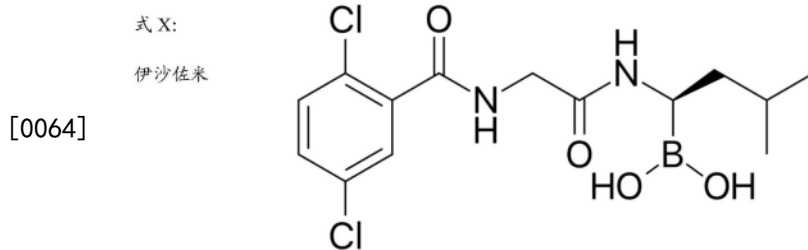
硼替佐米



[0063] 式 IX:

卡非佐米





[0065] 本领域还已知许多其他蛋白酶体抑制剂,其中一些正在进行癌症治疗的临床试验,包括:马里佐米、奥泼佐米(oprozomib)和MG132。

[0066] 在一个实施方案中,根据本发明治疗的癌症对蛋白酶体抑制剂的治疗具有耐药性。对蛋白酶体抑制剂的治疗具有耐药性的癌症是其生长不受蛋白酶体抑制剂抑制的癌症。也就是说,对蛋白酶体抑制剂治疗具有耐药性的癌症是对蛋白酶体抑制剂治疗无反应的癌症,即尽管使用蛋白酶体抑制剂治疗,但仍继续生长或进展的癌症。

[0067] 对蛋白酶体抑制剂治疗具有耐药性的癌症可能固有地对蛋白酶体抑制剂治疗具有耐药性。如上所述,以蛋白质分泌过多为特征的癌症特别容易受到蛋白酶体抑制剂治疗的影响。这是因为以蛋白质分泌过多为特征的癌症中蛋白质合成水平的增加导致内质网(ER)中错误折叠蛋白质水平的增加,从而导致ER应激。这可以通过蛋白酶体降解错误折叠的蛋白质来缓解。蛋白酶体抑制阻止错误折叠蛋白质的降解,从而阻止ER应激的缓解,导致细胞死亡。另一方面,与蛋白质分泌过多无关的癌症可能不会受到蛋白酶体抑制的影响,因此可能对蛋白酶体抑制剂的治疗具有耐药性。

[0068] 由于蛋白酶体在抑制剂结合位点的突变,其他癌症可能固有地对蛋白酶体抑制剂治疗具有耐药性。例如,已发现人类蛋白酶体B5亚单位的A49T突变与硼替佐米耐药性有关。癌症抵抗蛋白酶体抑制剂治疗的机制在Wallington-Beddoe等人,British Journal of Haematology 182(1):11-28,2018中综述。

[0069] 固有地对蛋白酶体抑制剂治疗具有耐药性的癌症是对蛋白酶体抑制剂治疗没有反应的癌症,即第一次向患者施用蛋白酶体抑制剂时,癌症对治疗没有反应,而是继续生长和/或进展。

[0070] 可备选地,对蛋白酶体抑制剂治疗具有耐药性的癌症可能已经获得蛋白酶体抑制剂耐药性。获得蛋白酶体抑制剂耐药性的癌症是最初对蛋白酶体抑制剂治疗有反应,但随后对这种治疗失去其反应性的癌症。这种对蛋白酶体抑制剂治疗的反应性丧失可能导致正在治疗的患者的癌症重新恶化或复发。癌症可能通过上述任何一种或多种机制获得对蛋白酶体抑制剂的耐药性,Wallington-Beddoe等人(上文)对此进行了综述,特别地包括蛋白酶体中突变的发展,阻止抑制剂结合。

[0071] 对蛋白酶体抑制剂治疗具有耐药性的癌症可能对一种或多种蛋白酶体抑制剂治疗耐药。众所周知,不同的蛋白酶体抑制剂对蛋白酶体具有不同的结合性能,因此癌症可能对一种蛋白酶体抑制剂具有耐药性,但易受另一种蛋白酶体抑制剂治疗的影响。在特定实施方案中,癌症对硼替佐米治疗具有耐药性。在另一实施方案中,癌症对卡非佐米治疗具有耐药性。在另一实施方案中,癌症对使用伊沙佐米治疗具有耐药性。癌症可能对所有蛋白酶体抑制剂的治疗具有耐药性,特别是所有获准用于癌症治疗的蛋白酶体抑制剂。对蛋白酶体抑制剂治疗具有耐药性的癌症可能是多发性骨髓瘤,特别是对硼替佐米治疗具有耐药性

的多发性骨髓瘤。

[0072] “浆细胞介导的疾病”是指其中失调的浆细胞或浆细胞产生的抗体损害健康的疾病或病况。也就是说,由浆细胞活性引起或促成的任何疾病或病况,都是浆细胞介导的疾病。在浆细胞介导的疾病中,浆细胞产生的抗体导致患者的组织损伤。这类疾病通常与失调的浆细胞的抗体分泌过多有关。本发明提供了用于治疗浆细胞介导的疾病的线性ALK抑制剂,其特征是细胞为ALK阴性和LTK阳性。在上下文中,ALK^{Neg}和LTK^{Pos}细胞是介导疾病的浆细胞。

[0073] 浆细胞介导的疾病的实例包括许多自身免疫疾病,包括系统性红斑狼疮和ITP,以及移植物抗宿主病(GVHD)。虽然GVHD有时主要被认为是T细胞介导的疾病,但它在慢性排斥反应中也具有重要的B细胞组分。在这里,失调的浆细胞产生自身抗体,这对延迟移植排斥反应和疾病影响起到了重要作用。因此,本文认为GVHD是浆细胞介导的疾病。

[0074] 如本文所定义,“浆细胞”是指浆细胞谱系的所有类型的细胞,即成熟浆细胞及其前体。浆细胞在本文中定义为晚期至终末分化的B细胞,其包括抗体分泌的浆母细胞和其他抗体分泌的B细胞母细胞。因此,“浆细胞”包括成熟浆细胞和短寿命浆母细胞。如本领域技术人员所知,激活的记忆B细胞母细胞可表达CD20,CD20可在CD38^{Hi}CD138^{Neg}的浆母细胞中丢失。浆细胞可能是CD38^{Hi}CD138^{Pos}CD19⁺或CD38^{Hi}CD138^{Pos}CD19^{Neg}终末分化的浆细胞。

[0075] 因此,根据本发明,线性ALK抑制剂可用于治疗自身免疫疾病,特别是以产生自身抗体为特征的自身免疫疾病。根据本发明可治疗的自身免疫疾病的实例包括狼疮和ITP。本发明还提供了使用线性ALK抑制剂治疗GVHD。如上所述,非癌性浆细胞(例如,浆母细胞和成熟浆细胞)的特征是具有ALK^{Neg}LTK^{Pos}表型,因此根据本发明治疗的任何浆细胞介导的疾病(例如自身免疫疾病或GVHD)都是由ALK^{Neg}LTK^{Pos}浆细胞介导的,尽管如上所述,浆细胞的ALK和LTK表型可以通过实验确定。

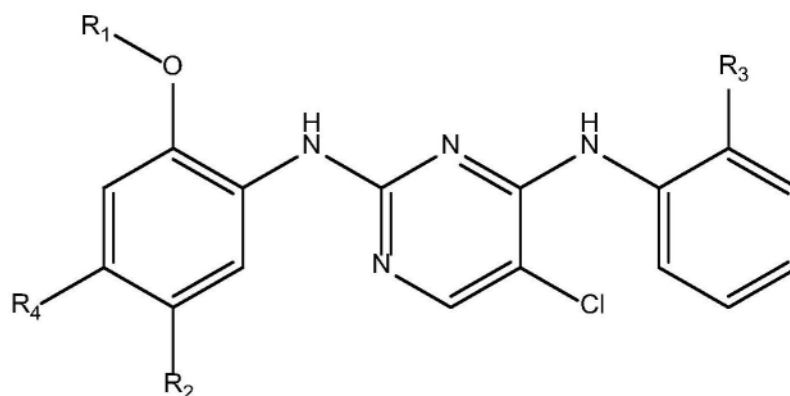
[0076] 如上所述,由于LTK和ALK在所有哺乳动物中都有表达,因此本发明提供了线性ALK抑制剂,用于治疗包括人类和非人类哺乳动物的任何哺乳动物对象中的自身免疫疾病,特别是特征为ALK^{Neg}LTK^{Pos}浆细胞产生自身抗体的自身免疫疾病。可根据本发明治疗的非人类哺乳动物包括犬科(犬科动物)、猫科(猫科动物)和马科(马科动物)。

[0077] 如上所述,已发现线性ALK抑制剂可抑制LTK。根据本发明,用于治疗癌症或浆细胞介导的疾病的ALK抑制剂因此可以是任何已知的ALK抑制剂,只要该抑制剂还具有抗LTK的活性。因此,在本文阐述和描述的本发明的各个方面中,ALK抑制剂可备选地被定义为能够抑制LTK的ALK抑制剂,或更具体地能够抑制LTK的活性的ALK抑制剂。

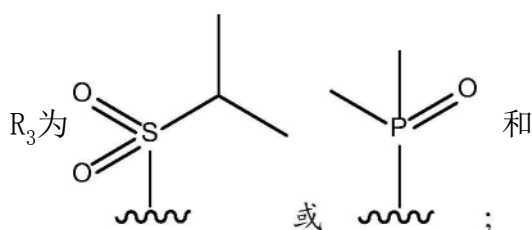
[0078] 在一个实施方案中,ALK抑制剂具有下文的式XI所示的一般结构。

式 XI:

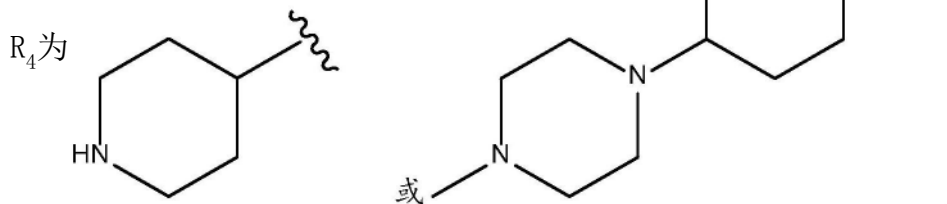
[0079]

[0080] 在式XI的ALK抑制剂中, R_1 为 CH_3 或 $i\text{Pr}$; R_2 为 H 或 CH_3 ;

[0081]



[0082]



[0083] 根据本发明使用的ALK抑制剂特别地可以是色瑞替尼(式III)。色瑞替尼的商品名为赞可达(Zykadia),也可商购(例如,来自Cayman Chemical, USA的项目编号19374)。

[0084] 色瑞替尼治疗NSCLC的标准给药方案为每日一次口服450mg。在本发明的特定实施方案中,色瑞替尼治疗包括每日施用一次剂量为约450mg的色瑞替尼,优选每日施用一次剂量为450mg的色瑞替尼。在其他实施方案中,治疗包括每日施用一次剂量为约300mg的色瑞替尼或约150mg的色瑞替尼,优选每日施用一次剂量为300mg的色瑞替尼或150mg的色瑞替尼。在特定实施方案中,治疗包括每日施用一次剂量为100-400mg的色瑞替尼,例如200-400mg、100-300mg、200-300mg或300-400mg的色瑞替尼。在其他实施方案中,治疗包括每日施用一次剂量为400-600mg的色瑞替尼,例如400-500mg、或500-600mg的色瑞替尼。在特定实施方案中,本发明提供了治疗 $\text{ALK}^{\text{Neg}}\text{LTK}^{\text{Pos}}$ 多发性骨髓瘤的方法,包括每日施用一次剂量为400-500mg的色瑞替尼,优选450mg的色瑞替尼。优选口服施用色瑞替尼。

[0085] 在特定实施方案中,本发明提供了用于治疗人类对象中ALK阴性和LTK阳性多发性骨髓瘤的色瑞替尼,其中所述治疗包括每日施用包含450mg的色瑞替尼的剂量,并且所述剂量口服施用。

[0086] 在另一实施方案中,本发明提供了用于治疗人类对象中ALK阴性和LTK阳性多发性骨髓瘤的色瑞替尼,其中所述治疗包括每日施用包含300mg的色瑞替尼的剂量,并且所述剂量口服施用。

[0087] 在另一实施方案中,本发明提供了用于治疗人类对象中ALK阴性和LTK阳性多发性骨髓瘤的色瑞替尼,其中所述治疗包括每日施用包含150mg的色瑞替尼的剂量,并且所述剂量口服施用。

[0088] 在另一实施方案中,本发明提供了用于治疗人类对象中ALK阴性和LTK阳性多发性骨髓瘤的色瑞替尼,其中所述治疗包括每日施用包含500-600mg的色瑞替尼的剂量,并且所述剂量口服施用。

[0089] 在另一实施方案中,本发明提供了用于治疗人类对象中ALK阴性和LTK阳性多发性骨髓瘤的色瑞替尼,其中所述治疗包括每日施用包含400-500mg的色瑞替尼的剂量,并且所述剂量口服施用。

[0090] 在另一实施方案中,本发明提供了用于治疗人类对象中ALK阴性和LTK阳性多发性骨髓瘤的色瑞替尼,其中所述治疗包括每日施用包含300-400mg的色瑞替尼的剂量,并且所述剂量口服施用。

[0091] 在另一实施方案中,本发明提供了用于治疗人类对象中ALK阴性和LTK阳性多发性骨髓瘤的色瑞替尼,其中所述治疗包括每日施用包含200-300mg的色瑞替尼的剂量,并且所述剂量口服施用。

[0092] 在另一实施方案中,本发明提供了用于治疗人类对象中ALK阴性和LTK阳性多发性骨髓瘤的色瑞替尼,其中所述治疗包括每日施用包含100-200mg的色瑞替尼的剂量,并且所述剂量口服施用。

[0093] 在另一实施方案中,提供了用于治疗人类对象中LTK阳性多发性骨髓瘤的色瑞替尼,其中所述治疗包括每日施用包含300-750mg的色瑞替尼的剂量,并且所述剂量口服施用。

[0094] 在另一实施方案中,提供了用于治疗人类对象中LTK阳性多发性骨髓瘤的布加替尼,其中所述治疗包括每日施用包含50-200mg的布加替尼的剂量,并且所述剂量口服施用。

[0095] 在另一实施方案中,提供了治疗被诊断患有多发性骨髓瘤、慢性淋巴细胞白血病或肝癌的患者的癌症的方法,包括以下步骤:

[0096] 从所述患者获得包含癌细胞的样本;

[0097] 对所述癌细胞进行LTK表达测定;

[0098] 以及如果癌细胞表达LTK,则向患者施用有效量的线性ALK抑制剂。

[0099] 在另一实施方案中,提供了治疗被诊断患有多发性骨髓瘤、慢性淋巴细胞白血病或肝癌的患者的癌症的方法,包括以下步骤:

[0100] 从所述患者获得包含癌细胞的样本;

[0101] 对所述癌细胞进行LTK表达测定;

[0102] 如果癌细胞表达LTK,则向患者施用有效量的ALK抑制剂,该ALK抑制剂选自色瑞替尼、布加替尼、克唑替尼、恩沙替尼和恩曲替尼。

[0103] 在另一实施方案中,提供了治疗被诊断患有狼疮或免疫性血小板减少症患者的自身免疫疾病的方法,包括以下步骤:

[0104] 从所述患者获得包含浆细胞的样本;

[0105] 对所述浆细胞进行LTK表达测定;

[0106] 以及如果浆细胞表达LTK,则向患者施用有效量的线性ALK抑制剂。

[0107] 在另一实施方案中,提供了治疗被诊断患有狼疮或免疫性血小板减少症患者的自身免疫疾病的方法,包括以下步骤:

[0108] 从所述患者获得包含浆细胞的样本;

[0109] 对所述浆细胞进行LTK表达测定;

[0110] 如果浆细胞表达LTK,则向患者施用有效量的ALK抑制剂,该ALK抑制剂选自色瑞替尼、布加替尼、克唑替尼、恩沙替尼和恩曲替尼。

[0111] 在另一实施方案中,提供了治疗患者中的移植物抗宿主病的方法,包括以下步骤:

[0112] 从所述患者获得包含浆细胞的样本;

[0113] 对所述浆细胞进行LTK表达测定;

[0114] 以及如果浆细胞表达LTK,则向患者施用有效量的线性ALK抑制剂。

[0115] 在另一实施方案中,提供了治疗患者中的移植物抗宿主病的方法,包括以下步骤:

[0116] 从所述患者获得包含浆细胞的样本;

[0117] 对所述浆细胞进行LTK表达测定;

[0118] 如果浆细胞表达LTK,则向患者施用有效量的ALK抑制剂,该ALK抑制剂选自色瑞替尼、布加替尼、克唑替尼、恩沙替尼和恩曲替尼。

[0119] 色瑞替尼可以任何合适的形式施用。已知色瑞替尼的各种晶型,详细信息请参见W02012/082972和W0 2016/098070。根据本发明,可使用任何此类晶型。优选地,施用以胶囊配制的色瑞替尼。

[0120] 在另一实施方案中,根据本发明使用的ALK抑制剂为布加替尼(式IV)。布加替尼的商品名为Alunbrig,按照标准给患者口服施用,给药方案为每日一次90mg,连续7日,然后每日一次180mg。在本发明的一个实施方案中,根据该方案施用布加替尼。在另一实施方案中,口服施用布加替尼,给药方案为每日一次60mg,连续7日,然后每日一次120mg或每日一次90mg。在另一实施方案中,以每日一次60mg的口服剂量施用布加替尼。优选施用以片剂配制的布加替尼。

[0121] 在另一实施方案中,根据本发明使用的ALK抑制剂为克唑替尼(式II)。克唑替尼(商品名Xalkori)按照标准给患者施用,给药方案为每日两次,每次250mg,口服。在本发明的一个实施方案中,根据该方案施用克唑替尼。在另一实施方案中,口服施用200mg的克唑替尼,每日两次。在另一实施方案中,以250mg口服剂量每日施用一次克唑替尼。优选施用以胶囊配制的克唑替尼。

[0122] 在另一实施方案中,根据本发明使用的ALK抑制剂为恩沙替尼(式V)。恩沙替尼可口服施用,每日一次,剂量为225mg。

[0123] 在另一实施方案中,根据本发明使用的ALK抑制剂为艾乐替尼(式VI)。艾乐替尼(商品名Alecensa)按照标准给患者施用,给药方案为每日两次,每次600mg,口服。在本发明的一个实施方案中,根据该方案施用艾乐替尼。在另一实施方案中,口服施用450mg的艾乐替尼,每日两次。在另一实施方案中,口服施用300mg的艾乐替尼,每日两次。优选施用以胶囊配制的艾乐替尼。

[0124] 在另一实施方案中,根据本发明使用的ALK抑制剂为恩曲替尼(式VII)。恩曲替尼(商品名Rozlytrek)按照标准给患者施用,给药方案为每日一次,每次600mg,口服。在本发明的一个实施方案中,根据该方案施用恩曲替尼。在另一实施方案中,口服施用500mg的恩

曲替尼, 每日一次。在另一实施方案中, 口服施用400mg的恩曲替尼, 每日一次。在另一实施方案中, 口服施用300mg的恩曲替尼, 每日一次。在另一实施方案中, 口服施用200mg的恩曲替尼, 每日一次。优选施用以胶囊配制的恩曲替尼。

[0125] 可备选地, 本发明中可使用WO 2008/073687、WO 2009/126514或WO 2010/002655 (均通过引用并入本文) 中公开的任何一种线性ALK抑制剂。

[0126] 对于每种药物, 熟练的医生可以选择合适的给药计划, 例如根据临床研究或患者对药物的反应。目前已知ALK抑制剂用于口服施用, 但可根据需要使用替代施用途径, 例如静脉施用。根据本发明使用的ALK抑制剂优选以药物组合物的形式施用。合适的药物组合物可包括液体溶液或糖浆, 固体组合物, 例如粉末、颗粒、片剂或胶囊, 以及乳膏和软膏。优选地, 如上文所述, 每种ALK抑制剂将以其被许可用于治疗ALK^{Pos} NSCLC的形式施用。

[0127] 用于此类组合物的药理学上可接受的稀释剂、载体和赋形剂在本领域是众所周知的。例如, 合适的赋形剂包括乳糖、乙醇酸淀粉钠、玉米淀粉或其衍生物、硬脂酸或其盐、植物油、蜡、脂肪和多元醇。合适的载体或稀释剂包括羧甲基纤维素(CMC)、甲基纤维素、微晶纤维素、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素(HPMC)、葡聚糖、海藻糖、脂质体、聚乙烯醇、医药级淀粉、甘露醇、乳糖、硬脂酸镁、糖精钠、滑石、纤维素、葡萄糖、蔗糖(和其他糖)、碳酸镁、二氧化硅、明胶、油、醇、洗涤剂 and 乳化剂如聚山梨醇酯。也可使用稳定剂、润湿剂、乳化剂、甜味剂等。

[0128] 在优选的实施方案中, 根据本发明使用的ALK抑制剂用赋形剂等配制, 其用途先前已获得批准。这些信息可以在FDA或EMA发布的这些药物的监管批准中找到。

[0129] 如本文所用, 术语“治疗”包括治愈性治疗(或旨在治愈的治疗)和姑息性治疗(即, 仅设计用于限制、缓解或改善癌症或浆细胞介导的疾病的症状的治疗)。

[0130] 在一个实施方案中, 根据本发明使用的ALK抑制剂可用作单一治疗剂, 例如用于治疗癌症或浆细胞介导的疾病。根据本发明, 可以串联使用ALK抑制剂。这意味着第一ALK抑制剂可用于患者的癌症治疗, 随后将其停止(例如, 由于患者对药物产生不良反应, 或癌症对药物产生耐药性)。在停止施用第一ALK抑制剂后, 然后向患者施用第二(不同的)ALK抑制剂。然后也可以停止施用, 并使用第三不同的ALK抑制剂(依此类推)。如果有必要治疗浆细胞介导的疾病, 可以应用类似的原则。

[0131] 在另一实施方案中, 根据本发明使用的ALK抑制剂形成组合疗法的一部分。例如, 在癌症治疗中, ALK抑制剂可与至少一种另外的抗肿瘤药物或抗肿瘤疗法一起使用。另外的抗肿瘤药物/疗法不是ALK抑制剂。例如, ALK抑制剂的施用可与传统化疗药物、放射治疗、激素治疗或免疫治疗或第二靶向/精确小分子治疗等组合。在根据本发明的浆细胞介导的疾病的治疗中, ALK抑制剂可与合适的第二治疗分子组合使用。例如, 在自身免疫疾病的治疗中, ALK抑制剂可与用于治疗自身免疫疾病的药物(例如非甾体抗炎药(NSAID))或免疫抑制剂(例如皮质类固醇)组合使用。

[0132] 根据本发明, ALK抑制剂特别地可与蛋白酶体抑制剂组合用于治疗ALK^{Neg}LTK^{Pos}多发性骨髓瘤。根据本发明使用的ALK抑制剂可与上述任何一种蛋白酶体抑制剂组合使用。例如, 色瑞替尼可与硼替佐米、卡非佐米或伊沙佐米组合使用。

[0133] 通过参考下面的非限制性实例和附图, 可以进一步理解本发明。

附图说明

[0134] 图1:ER应激中的LTK敲低结果。

[0135] 图中显示了LTK敲低对蛋白质分泌过多引起的ER应激的影响。用对照或LTK siRNA转染编码可诱导表达的IgM(重链和轻链)的HeLa细胞。72小时后,用米非司酮处理细胞以诱导IgM表达,然后进行裂解(在诱导后的指定时间)和针对指定蛋白质的免疫印迹。

[0136] 图2:LTK允许细胞应对高分泌负荷。

[0137] A,用5 μ M的克唑替尼处理L363细胞,并在处理后4、8和12小时测定剪接与非剪接XBP1和ATF4的表达。XBP1的剪接和ATF4的积累是ER应激诱导的标志。B,用5 μ M的克唑替尼处理硼替佐米耐药性L363aBTZ细胞,并在处理后4、8和12小时测定剪接与非剪接XBP1和ATF4的表达。C,用米非司酮处理表达诱导型IgM(重链和轻链)的HeLa细胞以在2周时间段内诱导IgM表达。然后,用1 μ M的克唑替尼处理细胞24小时,然后对剪接的XBP1进行裂解和免疫印迹以测量ER应激。+和-分别表示使用或不使用米非司酮治疗的细胞。诱导的细胞被视为分泌过多细胞,且非诱导的细胞具有正常的分泌水平。印迹上方的数字显示了三次独立实验的密度测量的定量 $\pm$ SD。请注意,分泌过多的细胞在克唑替尼治疗后表现出更高水平的ER应激。D,通过定量PCR比较未过表达IgM的HeLa细胞中与IgM过表达延长(14天)的细胞中的LTK mRNA的表达。

[0138] 图3:ALK^{Neg}LTK^{Pos}细胞易受克唑替尼治疗的影响并经历凋亡。

[0139] 图中显示抑制分泌过多细胞中的LTK降低其生存力。在A中,表达可诱导的IgM(重链和轻链)的HeLa细胞用米非司酮处理以在2周时间段内诱导IgM表达。然后,用1 μ M的克唑替尼处理细胞24小时,然后裂解并对半胱天冬酶3进行免疫印迹。上部印迹显示未切割的半胱天冬酶3,下部印迹显示切割的半胱天冬酶3。半胱天冬酶3的切割提示凋亡诱导。+和-分别表示使用或不使用米非司酮治疗的细胞。B,克唑替尼治疗(24小时)对三种不同骨髓瘤细胞系生存力影响的浓度-响应曲线。结果为三次独立实验的平均值。C,通过qPCR测定所指示的骨髓瘤细胞系中LTK和ALK mRNA的表达水平。

[0140] 图4:ALK^{Neg}LTK^{Pos}细胞系易受ALK抑制剂处理的影响。

[0141] 该图显示了色瑞替尼、艾乐替尼、恩沙替尼、劳拉替尼、恩曲替尼和克唑替尼(24小时治疗)对骨髓瘤细胞系L363和AM0-1及其硼替佐米耐药克隆(L363-BTZ和AM0-1-BTZ)的生存力影响的浓度-响应曲线。结果为3次独立实验的平均值。注意骨髓瘤细胞生存力的浓度依赖性降低。

[0142] 图5:LTK调节分泌;线性ALK抑制剂减少分泌。

[0143] 该图显示了色瑞替尼的LTK抑制对蛋白质分泌的影响。在A中,表达flag标记的LTK的HeLa细胞用1 μ M的克唑替尼或色瑞替尼处理30分钟。然后,对细胞进行裂解并对磷酸化的LTK进行免疫印迹,磷酸化的LTK用作LTK活性形式的替代物。下部印迹显示细胞中的总LTK的水平。B,用1 μ M的色瑞替尼处理HeLa细胞30分钟,然后固定和染色Sec31A以标记ERES。通过共聚焦显微镜对细胞成像,并使用ImageJ对ERES进行计数。C,稳定表达mCherry标记的甘露糖苷酶II RUSH报道基因的HeLa细胞。用生物素处理细胞以从ER释放报道基因。20分钟后,即其中大多数报告基因到达高尔基体的时间点,将细胞固定并进行GM130免疫染色,以标记高尔基器。图像显示了添加生物素20分钟后细胞的代表性实例,其中克唑替尼处理的细胞显示在高尔基体区域的报告基因较少。右侧的图表显示了高尔基体(绿色)区域中报告

基因荧光(红色)比率的量化。D,用指定剂量的克唑替尼处理IgA分泌的AM0-1细胞3小时,并通过ELISA测定细胞上清液中IgA的量。

[0144] 图6:患者的多发性骨髓瘤细胞易受克唑替尼治疗的影响。

[0145] 该图显示了克唑替尼治疗(72小时)对从7名患者分离的纯化CD138+多发性骨髓瘤细胞生存力影响的剂量-响应曲线,如图所示。用CellTiterGlo法测定生存力。

[0146] 图7:骨髓瘤患者多发性骨髓瘤细胞中LTK和ALK表达。

[0147] A和B显示了衍生自CoMMpass研究IA-13构建的组学数据。数据包括来自多发性骨髓瘤研究基金会个性化医疗倡议的767份多发性骨髓瘤样本(www.themmr.org) (<https://research.themmr.org>)。RNA序列数据表示为每千碱基转录本每百万次映射读取的片段数,FPKM。

[0148] A.CoMMpass研究中767名患者多发性骨髓瘤细胞的RNA序列数据。显示了LTK和分泌途径基因的表达,如ERGIC-53(LMAN1)、VIP36(LMAN2)、SURF4、BiP(HSP5A)、ALK基因和阴性对照IL-2。IL-2在多发性骨髓瘤细胞中不表达(表达低于FPKM=1的截止点,点线)。小提琴图包括中位数(虚线)和四分位数(点线)。

[0149] B.点状图显示767名患者的LTK与ALK表达。点线显示LTK和ALK的表达截止值(FPKM=1)。

[0150] 图8:NSG小鼠异种移植的人多发性骨髓瘤细胞易受克唑替尼的影响。

[0151] 在该图中,免疫低下的NSG小鼠经股间注射人L363-BTZ(硼替佐米耐药的)骨髓瘤细胞。这些细胞装有荧光素酶,用于在体内监测疾病进展。10天后,小鼠在7天内静脉注射硼替佐米两次,并在7天内每天口服克唑替尼。左侧的图像显示了不同组在治疗第4天和第7天(肿瘤接种后第14天和第17天)的肿瘤负荷实例,右侧的图表描绘了在治疗第0天(肿瘤接种后第10天)正常化的每个队列(n=4)中每只小鼠的平均荧光素酶信号。各组之间的统计显著性采用双因素方差分析进行评估,时间点之间的统计显著性采用单因素方差分析和Tukey事后检验法进行评估。

[0152] 图9:慢性淋巴细胞白血病(CLL)细胞中LTK和ALK的表达。

[0153] 对107例患者的CLL细胞样本的基因表达数据进行了LTK和ALK表达分析。如图所示,107名患者中有94名(88%)的CLL样本在截止点(点线)上表达LTK,而没有一个样本表达ALK(右直方图)。

[0154] 图10:患者的CLL细胞易受线性ALK抑制剂克唑替尼的影响。

[0155] 该图显示了激活的增殖的CLL母细胞响应于线性ALK抑制剂的反应。

[0156] 左:21名患者CLL细胞的剂量响应曲线。

[0157] 中:IC₅₀值显示在小提琴图中,该图显示了17个对克唑替尼敏感的样本。这些显示为超敏感(3名患者的CLL细胞)、高度敏感(3名患者)和敏感(11名患者)。

[0158] 右:药物敏感性评分(DSS,Yadav等人,Scientific Reports 4:5193,2014)在高通量化合物试验研究中整合多剂量-响应关系。CLL样本的DSS表明,三分之一的患者具有对克唑替尼高度敏感的CLL细胞。

[0159] 图11:IgVH^{Unmut}患者的CLL细胞易受克唑替尼的影响。

[0160] 图10中的CLL样本根据免疫球蛋白可变重链(IgVH)基因的突变状态进行分裂。

[0161] 左:六份IgVH^{Unmut} CLL患者样本中有四份对克唑替尼高度敏感。IgVH^{Unmut}样本都不

显示低灵敏度。

[0162] 右:15份IgVH^{Mut} CLL样本中有三份对克唑替尼高度敏感。其中一个几乎不符合突变条件(具有97.9%的同源性的CLL168)。15个IgVH^{Mut}样本中有四个显示出低灵敏度。

[0163] 图12:患者的CLL细胞易受ALK抑制剂治疗的影响。

[0164] 对12名患者的CLL细胞进行ALK抑制剂治疗的响应测试,使用布加替尼、色瑞替尼、恩沙替尼、恩曲替尼和劳拉替尼。显示了药物敏感性评分(DSS,Yadav等人,Scientific Reports 4:5193,2014)。截止线设置在DSS=10,点线。

[0165] 图13:LTK和ALK在B细胞分化中的表达。

[0166] 该图分析了人类B细胞亚群中ALK和LTK的表达。在A中,显示B细胞亚群的表达信号:LTK表达(左图)和ALK表达(右图)。LTK在记忆细胞、浆母细胞和浆细胞中表达超过截止值。ALK在B细胞亚群中不表达。

[0167] B.RNA序列数据是从健康献血者外周血单核细胞(PBMC)级分中的29种免疫细胞类型的沉降的RNA序列和流式细胞术数据中下载的。数据显示,初始B细胞具有低LTK表达(105个细胞中有18个呈阳性),而对ALK呈阴性。记忆B细胞和浆细胞对LTK阳性,且对ALK均呈阴性。记忆B细胞和浆细胞为ALK^{Neg}LTK^{Pos}。

[0168] 图14:体外产生的浆细胞对克唑替尼敏感。

[0169] 用表达CD40L、BAFF和April的贴壁小鼠L细胞刺激5名血库供者的CD19⁺B细胞,持续3天,以产生B细胞母细胞(浆母细胞/细胞)。检测浆母细胞/细胞对克唑替尼的敏感性,持续72小时(CellTiterGlo)。

[0170] 左:克唑替尼治疗的5个正常浆母细胞/细胞药敏曲线中的相对细胞生存百分比。

[0171] 右:用克唑替尼处理的5个正常浆母细胞/细胞的IC₅₀。

[0172] 图15:体外产生的浆细胞对线性ALK抑制剂克唑替尼和色瑞替尼敏感。

[0173] 用sCD40L、IL-21、IL-4刺激血库供者阴性选择的正常B细胞时间为5天。该方案允许产生表达IRF4和BLIMP1的10-20%终末分化的浆细胞。从第5-7天起,将细胞暴露于滴定的A中的克唑替尼或B中的色瑞替尼。

[0174] 在A和B中,显示了门控CD19⁺B细胞中的IRF4与BLIMP1。IRF4和BLIMP1双阳性细胞代表终末期浆细胞。这些浆细胞是门控的(蓝色椭圆形区域),并显示浆细胞的百分比。浓度为0.01μM、0.1μM、1μM、10μM和100μM时,显示了无抑制剂(0)和具有线性ALK抑制剂(克唑替尼,A;色瑞替尼,B)的条件。

[0175] 图C显示了响应于克唑替尼和色瑞替尼剂量的计算出的浆细胞生存力百分比,如图所示。

[0176] 图16:浆细胞在体内对克唑替尼敏感且在体外减少Ig的分泌。

[0177] 将荧光素酶⁺L363wt浆细胞系股间注射到免疫低下的NSG小鼠体内。10天后,小鼠每天用克唑替尼(50mg/kg,口服,每日)治疗7天。

[0178] 左:克唑替尼杀死异种移植小鼠中的浆细胞系。在第10、14和17天,在IVIS光学成像仪上对小鼠进行成像。显示了3只(共4只)小鼠的腹侧面。小鼠接受溶媒(顶部)或克唑替尼(底部)。克唑替尼显著降低了4只小鼠中3只的浆细胞信号。

[0179] 右:色瑞替尼减少Ig的分泌。洗涤浆细胞系AMO-1,并在滴定的色瑞替尼存在下将其添加到孔(10⁶个细胞/孔)中持续3小时。使用人类IgA ELISA试剂盒(Abcam,Cambridge,

UK) 对上清液进行 AMO-1 细胞分泌的 IgA 分析。

[0180] 图17:肝细胞癌是 $ALK^{Neg}LTK^{Pos}$ 且对克唑替尼诱导的细胞凋亡敏感。

[0181] 来自365名肝细胞癌(HCC)的RNA序列数据由癌症基因组图谱(TCGA)生成,报告为FPKM(每千碱基的外显子每百万次读取的片段数)。研究了365名肝细胞癌患者样本中的LTK和ALK的表达。在A中,左图显示了LTK与ALK,其截止值如点线所示。所有患者的样本均为 ALK^{Neg} 。大约四分之一的样本是 LTK^{Pos} ,因此是 $ALK^{Neg}LTK^{Pos}$ 。

[0182] 在B中,肝细胞癌细胞(HepG2)用DMSO(未处理的)或增加浓度(1、2和5 μ M)的阿霉素处理24小时,并通过免疫印迹法评估切割的半胱天冬酶3的凋亡。注意,5 μ M的阿霉素仅弱诱导细胞死亡。在1 μ M的克唑替尼的存在下,细胞也用相同浓度的阿霉素处理24小时。注意,克唑替尼的存在使HepG2细胞对诱导凋亡药物阿霉素更敏感,表明提供线性ALK抑制剂可使HCC细胞对凋亡敏感。

实施例

[0183] 骨髓瘤实验、材料和方法

[0184] 患者样本和原发性多发性骨髓瘤细胞样本处理

[0185] 多发性骨髓瘤患者来自奥斯陆大学医院奥斯陆骨髓瘤中心。该研究获得了挪威东南部医学和健康研究伦理区域委员会的批准(REC#2016/947和2012/174);骨髓抽吸物是根据赫尔辛基宣言在签署知情同意后从多发性骨髓瘤患者中获得的。

[0186] 包括7名多发性骨髓瘤患者样本。患者在第二次复发(患者编号1701)、第三次复发(2101、2021、1802、9041、2504)或第四次复发(2201)后应接受治疗。所有患者在至少一个疗程中均接受蛋白酶体抑制剂(硼替佐米或卡非佐米)。

[0187] 骨髓单核细胞(BMMC)由患者骨髓抽吸物通过淋巴准备密度梯度离心制备。在用Dynabeads(Life Technologies)去除CD8后,随后通过在人T-激活剂CD3/CD28 Dynabeads(Life Technologies)和100U/ml人白细胞介素-2(hIL-2,Roche,Mannheim,Germany)存在下扩增Th细胞刺激BMMC。48小时后,对BMMC进行CD138⁺富集,以使用MACS CD138⁺微球分离多发性骨髓瘤浆细胞(Milteny Biotec,Bergisch Gladbach,Germany)。

[0188] 药物处理和细胞生存力测定(多发性骨髓瘤患者细胞)

[0189] 在384孔板中测试激活分析中的CD138⁺多发性骨髓瘤细胞(5,000-10,000个细胞/孔)对克唑替尼的响应。在10倍稀释液中测试6种克唑替尼浓度,覆盖0.1-10,000nM浓度范围(由回声声学分配器,LabCyte Inc.,San Jose,CA,USA分配板)。

[0190] 在37 $^{\circ}$ C和5%CO₂的潮湿环境中孵育板。72小时后,根据制造商的说明,使用CellTiterGlo(Promega,Madison,WI,USA)ATP测定法,并使用Envision Xsite酶标仪(Perkin Elmer,Shelton,CT,USA)测定细胞生存力。通过将每个孔的发光单位归一化为阴性对照(DMSO 0.1%)和阳性对照孔(100 μ M BzCl),计算细胞生存力的相对百分比(%),并进行曲线拟合,以获得IC₅₀值。

[0191] 细胞培养和转染

[0192] HeLa细胞在补充有10%FCS和1%青霉素/链霉素(GIBCO)的DMEM(GIBCO)中培养。对于质粒的过表达,使用Fugene 6或反式IT-LT1(Mirus)转染细胞。对于敲低实验,根据制造商的说明,使用HiPerfect(Qiagen)将10nM siRNA(最终浓度)反向转染细胞。

[0193] 细胞裂解和免疫印迹

[0194] 用PBS洗涤细胞两次,并收集在补充有蛋白酶和磷酸酶抑制剂(皮尔斯蛋白酶和磷酸酶抑制剂迷你片剂,无EDTA)的裂解缓冲液(50mM Tris-HCl,pH7.4;1mM EDTA,100mM NaCl,0.1%SDS和1%NP-40)中。将裂解物在冰上孵育10分钟,然后在4℃下以20000×g进行透明离心10分钟。将上清液转移到新鲜试管中,并添加还原负载缓冲液。对裂解物进行SDS-PAGE,并使用半干转膜将其转移到硝化纤维素膜上。将膜堵塞(在R0TI缓冲液(Roth)或PBS中的5%牛奶(含0.1%吐温)中),并用适当的一级抗体进行探测。随后用辣根过氧化物酶缀合的二级抗体孵育膜。使用化学发光试剂(ECL clarity,BioRad)开发免疫印迹,并使用ChemiDoc(BioRad)成像。

[0195] 多发性骨髓瘤细胞系、细胞培养和生存力测定

[0196] 使用的细胞系为人多发性骨髓瘤细胞系L363(DSMZ目录号ACC 49)、AMO-1(DSMZ目录号ACC 538)和ARH-77(ATCC CRL-1621)。

[0197] 多发性骨髓瘤细胞系保持在RPMI-1640培养基(Sigma-Aldrich,Buchs,Switzerland)中,该培养基补充有10%热灭活胎牛血清(FBS)、100μg/ml链霉素和100U/ml青霉素/链霉素(Sigma-Aldrich,Buchs,Switzerland)。通过连续大于12个月的药物暴露于其亲本细胞系,从其亲本细胞系建立并维持硼替佐米耐药细胞系(Soriano等人,Leukemia 30:2198-2207,2016)。

[0198] 按照制造商的说明,使用细胞计数Kit-8(CCK-8;MedChemExpress,NJ,USA)在处理24小时后测定细胞的生存力。

[0199] 基因表达分析

[0200] 组学数据从CoMMpassSM研究IA-13构建中下载,包括767个多发性骨髓瘤样本(www.themmrf.org)。这些数据作为多发性骨髓瘤研究基金会个性化医疗计划的一部分生成(<https://research.themmrf.org>)。RNA序列数据表示为每千碱基转录本每百万次映射读取的片段数,FPKM。FKPM<1被视为阴性。

[0201] RNA分离和RT-PCR(s/u XBP1和ATF4诱导)

[0202] 使用Trizol(Ambion/Thermo Fisher Scientific,MA,USA)和Direct zol RNA MiniPrep(Zymo Research,CA,USA)从细胞系中分离总RNA。按照制造商的说明,使用高容量cDNA逆转录试剂盒(Applied Biosystems/Thermo Fisher Scientific,MA,USA)逆转录500ng的总RNA。随后,在每次qPCR反应中使用10ng的cDNA,2倍PowerUp SYBR绿色主混合料(Applied Biosystems/Thermo Fisher Scientific,MA,USA)和以下引物:剪接、未剪接和总XBP1和ATF4(Oslowski&Urano,Methods in Enzymology 490:71-92,2011),GAPDH作为QuantStudio5实时PCR系统(Applied Biosystems/Thermo Fisher Scientific,MA,USA)上的管家基因控制。

[0203] ELISA

[0204] 将 1×10^6 /ml IgA分泌IgA的AMO-1细胞接种在新鲜培养基中,并增加感兴趣的化合物的剂量,持续3小时。随后,收集培养基,稀释20倍,并根据制造商的说明,使用人IgA ELISA试剂盒(Abcam,UK;产品编号ab137980)测定细胞培养上清液中IgA抗体的水平。

[0205] 体内实验

[0206] NSG(NOD-scid IL2Rgamma^{null})小鼠从杰克逊实验室(编号005557,CA,USA)获得,

并保存在隔离的通风笼中,自由取食。年龄匹配(6-8周龄)小鼠注射 0.5×10^5 L363-BTZ_Luc+_TdTomato+多发性骨髓瘤细胞(配备用于监测的荧光素酶载体,从Addgene:#72486获得)到右侧股骨。在注射荧光素后的一周内,对肿瘤生长进行两次监测(150mg/kg,获自BioVision,CA,USA)。肿瘤接种后10天,开始使用克唑替尼(50mg/kg,口服,每日)、硼替佐米(1mg/kg,7天内静脉注射两次)或溶媒处理,持续7天。该研究是根据3Rs原则进行的。实验由动物实验委员会(St Gallen,Switzerland)批准,申请号30177。硼替佐米和克唑替尼购自MedChemExpress,NJ,USA。

[0207] CLL实验、材料和方法

[0208] 基因表达数据

[0209] CLL细胞的基因表达数据通过分析之前在<http://www.genomicscape.com/microarray>平台获得的数据集得到。对107名CLL患者的CLL细胞数据进行LTK和ALK基因表达分析。数据来自Herold,慢性淋巴细胞白血病,HGU133P(107个样本)数据集,来自Affymetrix人类基因组U133 Plus 2.0阵列(Herold等人,Leukemia 25(10):1639-45,2011),使用稳健多阵列平均(RMA)进行归一化。

[0210] CLL样本的剂量反应实验

[0211] 用表达CD40L、BAFF和April的贴壁小鼠L细胞刺激患者的CLL细胞24小时。然后通过免疫磁分离去除L细胞。洗涤的CLL细胞铺板在384孔板格式(10,000个细胞/孔)中,并在10倍稀释液中以5种浓度对克唑替尼检测(由回声声学分配器,LabCyte Inc.,San Jose,CA,USA分配板)。在37°C和5%CO₂的潮湿环境中孵育板。72小时后,根据制造商的说明,使用CellTiter Glo(PerkinElmer,Shelton,CT,USA)ATP分析,并使用Envision 2102多标签阅读器(PerkinElmer,Shelton,CT,USA)测定细胞生存力。通过将每个孔的发光单位归一化为阴性(DMSO 0.1%)和阳性(100μM BzCl)对照孔,计算相对细胞生存力百分比。进行曲线拟合以获得IC₅₀值。

[0212] 单个药物的差异药物敏感性定量评分计算为药物敏感性评分(DSS值,Yadav等人,Scientific Reports 4:5193,2014)。如图所示,计算高通量化合物试验中综合多剂量-响应关系的DSS值。

[0213] 人B细胞的基因表达分析

[0214] 人类中B细胞分化的基因表达数据通过分析在<http://www.genomicscape.com/microarray>平台获得的数据集得到。GEP数据集来源于人类浆细胞分化,在Affymetrix人类基因组U133 Plus 2.0阵列上通过MAS5归一化(Jourdan等人,Leukemia 28(8):1647-56,2014;Jourdan等人,Journal of Immunology 187(8):3931-41,2011;Jourdan等人,Blood 114(25):5173-81,2009;Caron等人,Journal of Immunology 182(12):7595-602,2009)。

[0215] 对供体的数据进行分析,用于人类B淋巴细胞生成中LTK和ALK基因的表达。B细胞分类为以下亚群:1.初始B-细胞(n=5);2.中心母细胞(n=4);3.中心细胞(n=4);4.记忆B细胞(n=5);5.前浆母细胞(n=5);6.浆母细胞(n=5);7.早期浆细胞(n=5);8.骨髓浆细胞(n=5)。

[0216] RNA序列数据是从存储的数据下载的(Monaco等人,Cell Reports 26(6):1627-40,2019)。使用RNA序列和流式细胞术分析健康供者外周血单核细胞(PBMC)级分中29种免疫细胞类型的数据。来自初始B细胞的数据来自Schmiedel等人,Cell 175(6):1701-15,

2018)。

[0217] 药物敏感性筛选激活的B细胞母细胞/浆细胞

[0218] 用表达CD40L、BAFF和April的贴壁小鼠L细胞刺激5名血库供者的CD19⁺B细胞,持续3天,以产生B细胞母细胞(浆母细胞/细胞)。将洗涤的浆母细胞/细胞分离并铺板在384孔格式(10,000个细胞/孔),并在覆盖 10^{-3} -10 μ M的浓度范围的10倍稀释液中以6种浓度对克唑替尼进行检测。72小时后使用CellTiterGlo测定细胞生存力。通过将每个孔的发光单位归一化为阴性对照(DMSO 0.1%)和阳性对照孔(100 μ M BzCl),计算细胞生存力的相对百分比,并进行曲线拟合,以获得IC₅₀。

[0219] 结果

[0220] LTK是蛋白质稳态网络中的调节节点

[0221] 数学模型表明,LTK是由分泌通量激活的ER输出的正调节因子。为了在实验上验证这一预测,使用了可诱导表达IgM的HeLa细胞(Bakunts等人,上文)。如XBP1水平升高所示,24小时的诱导IgM表达导致UPR(这是ER应激的标志物)轻度激活(图1)。当LTK表达沉默时,细胞在诱导IgM表达时会对更高水平的ER应激做出响应(图1)。这证实LTK是蛋白质稳态网络的调节节点。

[0222] LTK帮助多发性骨髓瘤细胞应对高分泌负荷

[0223] 多发性骨髓瘤的特征为分泌过量的免疫球蛋白。为了确定LTK抑制是否诱导多发性骨髓瘤细胞系中的ER应激,用克唑替尼处理L363细胞,克唑替尼是先前已被证明能抑制LTK及其对分泌的影响的化合物(Centonze等人,上文)。克唑替尼处理可诱导ER应激,如通过增加XBP1的剪接和诱导ATF4所证实的(图2A)。对硼替佐米耐药的L363-BTZ细胞也进行类似的观察(图2B)。值得注意的是,L363细胞及其硼替佐米耐药性克隆对LTK呈阳性,但对ALK呈阴性(见下文),从而最大限度地减少克唑替尼的脱靶效应的可能性。

[0224] 为了检测LTK是否有助于细胞适应高分泌载量负荷,使用一种系统,该系统允许直接比较同一细胞是否过多分泌。而不是仅在短期内使用脉冲诱导IgM产生和分泌,诱导IgM产生持续14天,以考虑到分泌蛋白慢性过表达的潜在适应性细胞机制。将诱导过表达IgM持续14天的HeLa细胞与未诱导的HeLa细胞进行比较。用LTK抑制剂克唑替尼处理非诱导细胞并没有导致ER应激的任何明显增加(图2C),而长时间经历增加的分泌负荷的细胞表现出2.5倍更高的ER应激水平(图2C)。分泌过多细胞对LTK的高度依赖性与分泌过多细胞表现出LTK表达增加4倍的观察结果一致(图2D)。

[0225] 靶向LTK降低多发性骨髓瘤细胞生存力

[0226] LTK抑制在分泌过多细胞中诱导ER应激的观察结果促使发明人测试它是否也会导致细胞死亡。研究了克唑替尼对伴有或不伴有IgM分泌过多的HeLa细胞中半胱天冬酶3切割的影响。非分泌细胞对克唑替尼处理没有显示任何凋亡反应(图3A),这与观察到的这些细胞对ER应激没有响应是一致的。然而,慢性分泌负荷增加的细胞在克唑替尼处理后的凋亡显著增加(图3A)。然后用克唑替尼处理两个多发性骨髓瘤细胞系(L363和ARH77),在药理学相关药物浓度下观察到细胞生存力明显降低。对硼替佐米耐药的L363克隆也是如此(图3B)。值得注意的是,这些细胞对LTK呈阳性,但对ALK呈阴性(图3C),从患者身上获得的多发性骨髓瘤细胞也是如此(见下文)。

[0227] 与克唑替尼类似,发现其他线性ALK抑制剂,如色瑞替尼、艾乐替尼、恩沙替尼和恩

曲替尼,对多发性骨髓瘤细胞显示细胞毒性活性(图4,左图)。环状ALK抑制剂劳拉替尼不能有效杀伤骨髓瘤细胞。在受试的细胞系中获得色瑞替尼的以下 IC_{50} 值(单位: μM)。L363中为1.03,L363-BTZ中为0.79,AM0-1中为2.09且AM0-1-BTZ中为2.77。在受试的细胞系中获得克唑替尼的以下 IC_{50} 值(单位: μM)。L363中为3.323,L363-BTZ中为4.15,AM0-1中为3.92且AM0-1-BTZ中为6.477。在受试的细胞系中获得艾乐替尼的以下 IC_{50} 值(单位: μM)。L363中为6.12,L363-BTZ中为6.22,AM0-1中为13.31且AM0-1-BTZ中为17.6。对硼替佐米耐药的L363和AM0-1版本观察到对LTK抑制的相似敏感性(图4,右图)。这表明LTK作用于蛋白质稳态网络的蛋白酶体依赖部分,多发性骨髓瘤中的蛋白酶体抑制剂耐药性可通过抑制LTK来克服。这可以通过使用批准的ALK抑制药物来实现。

[0228] 就机制而言,线性ALK抑制剂如色瑞替尼抑制LTK(图5A),LTK抑制ER向高尔基体转运(图5B、C),因此也抑制免疫球蛋白分泌(图5D)。

[0229] 然后,对从处于第3-5线治疗的复发患者获得的原发性骨髓瘤细胞测试克唑替尼的效果。用IL-2中的抗CD3/CD28珠刺激CD8缺失的骨髓源性单核细胞。这种策略刺激CD4+辅助T细胞(Th细胞),其为多发性骨髓瘤细胞激活提供支持。48小时后,将来自15名患者的每一个的CD138+多发性骨髓瘤细胞在滴定的克唑替尼存在下转移到孔中,并计算浓度-响应曲线(图6)。LTK抑制对所有患者来源的多发性骨髓瘤细胞都有显著影响, IC_{50} 水平在0.8-5 μM 之间。值得注意的是,对767名多发性骨髓瘤患者的队列分析表明,LTK mRNA的平均表达水平为8.18,而ALK的平均表达水平为0.02(图7A),低于截止值(100)。患者分为以下几类:发现767名患者中有636名(83%)的骨髓瘤细胞为 $Alk^{Neg}LTK^{Pos}$;767名患者中130名(17%)骨髓瘤细胞为 $Alk^{Neg}LTK^{Neg}$;767名患者中仅有1名为 $Alk^{Pos}LTK^{Pos}$ 骨髓瘤(0.001%) (图7B)。由于ALK抑制剂缺乏ALK作为靶点,克唑替尼对原发性骨髓瘤细胞的杀伤可能是LTK抑制的结果。

[0230] 然后检测克唑替尼对多发性骨髓瘤细胞的体内作用。为此,将表达荧光素酶的硼替佐米耐药L363细胞注射到免疫低下小鼠的股骨中。为了便于在体内监测肿瘤生长,将细胞工程化为表达荧光素酶。该模型既考虑了蛋白酶体抑制剂耐药的多发性骨髓瘤细胞的特殊生物学特性,也考虑了骨髓微环境的保护和耐药性促进特性,这些特性对体内多发性骨髓瘤生物学至关重要。克唑替尼处理开始于肿瘤易于检测的阶段(肿瘤接种后10天),模拟临床情况。小鼠也接受硼替佐米处理,由于使用了硼替佐米耐药的L363细胞,预计其不会有任何效果,但证实了蛋白酶体抑制剂耐药性。小鼠每日口服施用克唑替尼7天(50mg/kg)。在此期间,硼替佐米静脉施用两次(1mg/kg)。与基线以及未处理对照和硼替佐米处理的小鼠相比,克唑替尼处理可减少肿瘤负担(图8)。这表明用LTK抑制剂处理可以克服多发性骨髓瘤中的蛋白酶体抑制剂耐药性。

[0231] 原代CLL细胞为 $ALK^{Neg}LTK^{Pos}$

[0232] 关于慢性淋巴细胞白血病(CLL),我们研究了ALK和LTK的转录,发现107个CLL细胞样本中有94个(88%)是 LTK^{Pos} ,且所有107个样本都是 ALK^{Neg} (图9)。因此,CLL是这样一种其中大多数患者都有 $ALK^{Neg}LTK^{Pos}$ CLL细胞的癌症。CLL是这样一种其中血液中的白血病细胞处于静止状态或凋亡前的癌症。CLL细胞分裂发生在淋巴结、脾脏或骨髓内的特殊微环境中。在这里,分裂的CLL母细胞与微环境中的刺激细胞(所谓的假滤泡)并置,支持胚芽生殖和有丝分裂。在此阶段,CLL细胞分泌过多,在进行细胞分裂之前分泌单克隆抗体(Darwiche等人,上文)。

[0233] 原代CLL细胞对线性ALK抑制剂敏感

[0234] 提供对CLL细胞激活起重要作用的微环境因素 (Patten等人, Blood 111:5173-5181, 2008; Bagnara等人, Blood 117:5463-5472, 2011; Hall等人, Blood 105:2007-2015, 2005; Os等人, Cell Reports 4 (3) :566-577, 2013) 并检测增殖的CLL细胞对线性ALK抑制剂的敏感性。我们发现21名患者样本中有17名 (81%) 具有对线性ALK抑制剂克唑替尼敏感的CLL细胞 (图10)。其中, 11名正常敏感 ($IC_{50} < 2\mu M$), 3名高度敏感 ($IC_{50} < 2 \times 10^{-1}\mu M$), 且3名超敏 ($IC_{50} < 10^{-2}\mu M$)。在我们的高通量化合物试验中进一步整合多剂量-响应关系, 我们发现药物敏感性评分 (DSS) 表明, 三分之一的患者具有对克唑替尼高度敏感的CLL细胞。

[0235] 不良预后患者通常具有对线性ALK抑制剂敏感的CLL细胞

[0236] 根据上文详述的重链 (IgVH) 免疫球蛋白可变基因的V区的突变负荷, CLL分为两个亚型。IgVH未突变亚型具有不良预后, 而IgVH突变 (与种系同源性小于98%) 在惰性CLL中发现, 预后较好。结果表明, 不良预后亚型对线性ALK抑制剂有较高的反应率和敏感性 (图11)。这表明线性ALK抑制剂对于治疗IgVH未突变、不良预后的亚型尤其相关。

[0237] 对12名新患者的CLL细胞进行ALK抑制剂敏感性测试。几乎所有患者的CLL细胞都显示出对色瑞替尼、克唑替尼、恩沙替尼和恩曲替尼的敏感性 (当使用DSS=10的截止值时, 结果为11/12、10/12、11/12、12/12), 如图12所示。布加替尼抑制4/12患者的CLL细胞, 劳拉替尼抑制0/12患者的CLL细胞。

[0238] 正常记忆B细胞、浆母细胞和浆细胞为ALK^{Neg}LTK^{Pos}

[0239] 接下来, 我们转向正常B细胞和B细胞分化谱系, 其中包括初始成熟的B细胞、生发中心成中心母细胞、生发中心中心细胞、记忆B细胞、前浆母细胞、浆母细胞、早期浆细胞和骨髓浆细胞。基因表达 (基于阵列) 和RNA测序表明, 记忆B细胞浆母细胞和浆细胞均表达LTK, 但不表达ALK (图13)。因此, 记忆B细胞、浆母细胞和浆细胞是ALK^{Neg}LTK^{Pos}。

[0240] 正常记忆B细胞、浆母细胞和浆细胞对线性ALK抑制剂敏感

[0241] 激活的B细胞在3天后变成B细胞母细胞。这种增大的细胞分泌高水平的抗体, 因此分泌过多。用线性ALK抑制剂培养受刺激的第3天B细胞另外3天。所有样品对克唑替尼具有相似的敏感性, IC_{50} 在1至1.5 μM 之间 (图14)。结果表明, 在处理的3天内, 至少有一半的母细胞样B细胞 (记忆B细胞母细胞、浆母细胞和浆细胞) 被杀死。为了进一步研究细胞亚型的敏感性, 我们刺激B细胞5天以使浆细胞发育。终末期浆细胞通常表达IRF4和BLIMP1 (图15), 并分泌高水平的抗体。暴露于线性ALK抑制剂 (克唑替尼或色瑞替尼) 高效杀死高灵敏度的浆细胞。浆细胞响应于 IC_{50} 为0.8 μM (克唑替尼) 和<0.001 μM (色瑞替尼) 表明浆细胞对线性ALK抑制剂非常敏感。观察到所有其他激活的B细胞亚群和浆母细胞均减少, 但浆细胞对线性ALK抑制剂最敏感, 且浆细胞对色瑞替尼超敏感。

[0242] 克唑替尼杀死异种移植的NSG小鼠的浆细胞

[0243] 我们将ALK^{Neg}LTK^{Pos}浆细胞细胞系股间注射到NSG小鼠体内。用克唑替尼处理小鼠降低浆细胞密度 (图16, 荧光素酶依赖信号, 在光学IVIS成像中), 表明浆细胞细胞系也可在体内受到抑制。

[0244] 色瑞替尼体外抑制浆细胞的抗体分泌

[0245] 我们测试线性ALK抑制剂是否抑制浆细胞分泌 (图16)。如图5A-C所示, 三小时暴露降低浆细胞细胞系分泌的免疫球蛋白水平, 表明阻断了ER-→高尔基体转运。

[0246] 肝细胞癌 (HCC) 细胞为 $ALK^{Neg}LTK^{Pos}$ 且对克唑替尼敏感

[0247] 来自365名HCC的RNA序列数据显示,所有患者的HCC样本均为 ALK^{Neg} 。大约四分之一的样本是 LTK^{Pos} , 因此是 $ALK^{Neg}LTK^{Pos}$ 。我们发现,在实验中来自分化良好的HCC细胞系HepG的细胞对线性ALK抑制剂克唑替尼敏感,其中该药物与细胞抑制药物阿霉素协同作用(图17)。因此,克唑替尼使HepG HCC细胞对凋亡敏感。

ER 应激中的 LTK 敲低结果

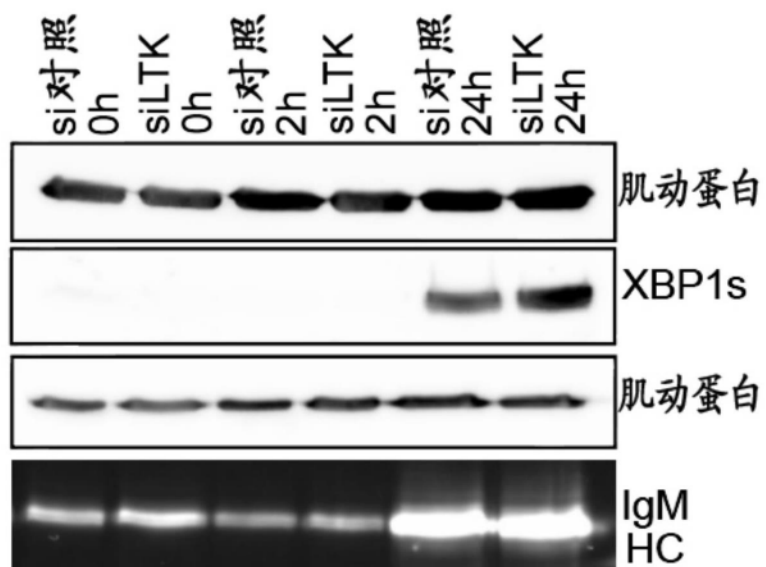


图1

LTK 允许细胞应对高分泌负荷

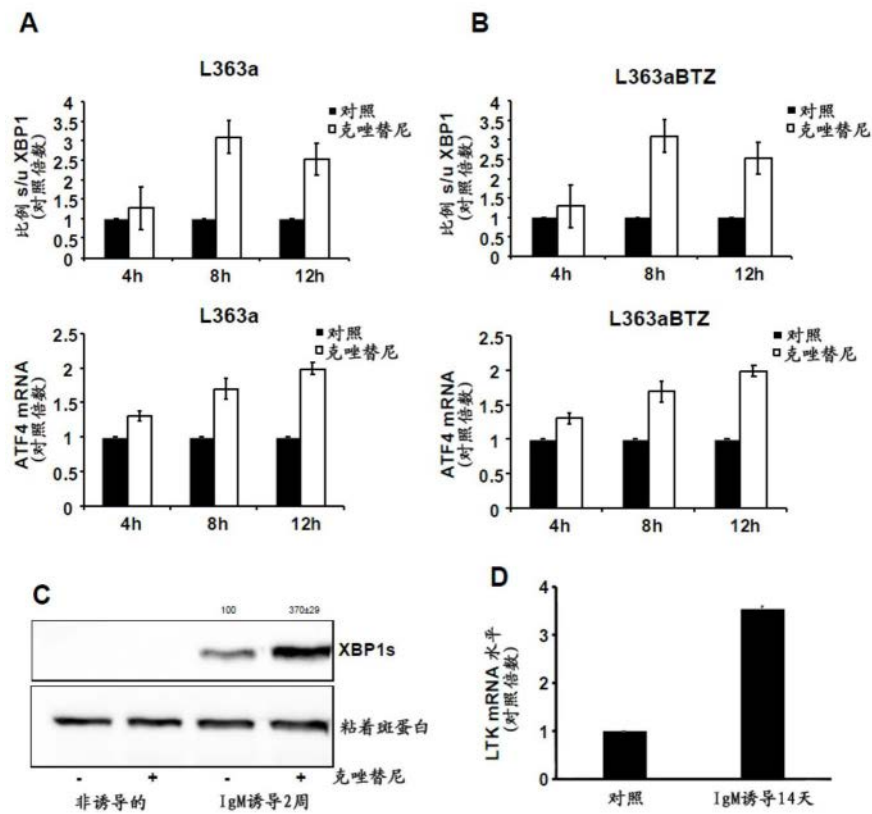


图2

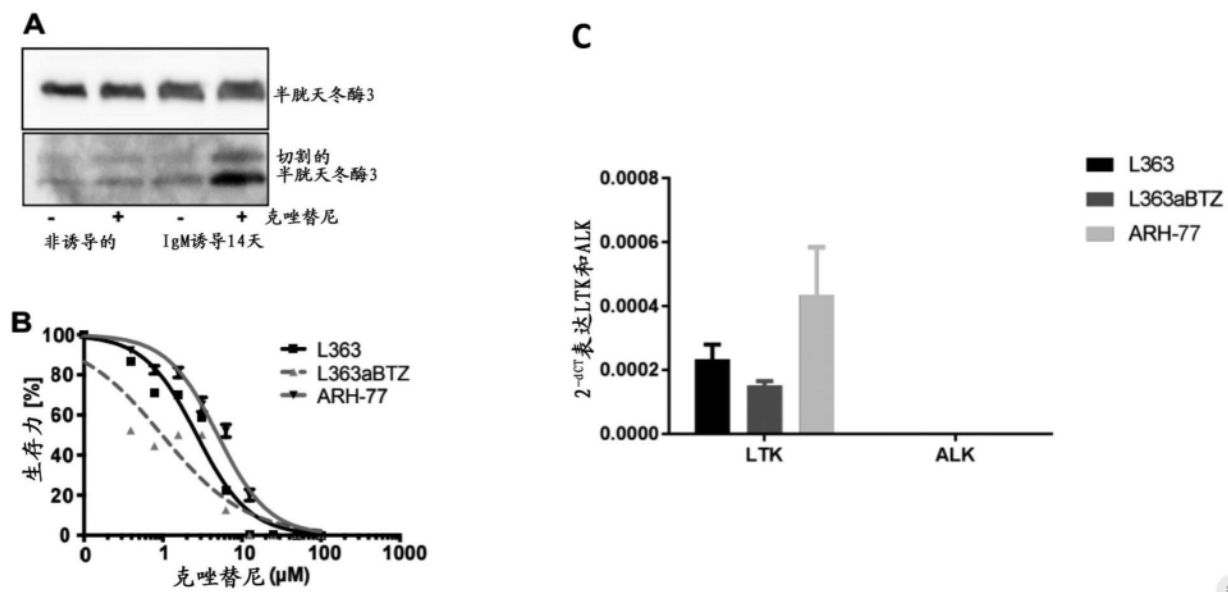
ALK^{Neg}LTK^{Pos} 细胞易受克唑替尼治疗的影响并经历凋亡

图3

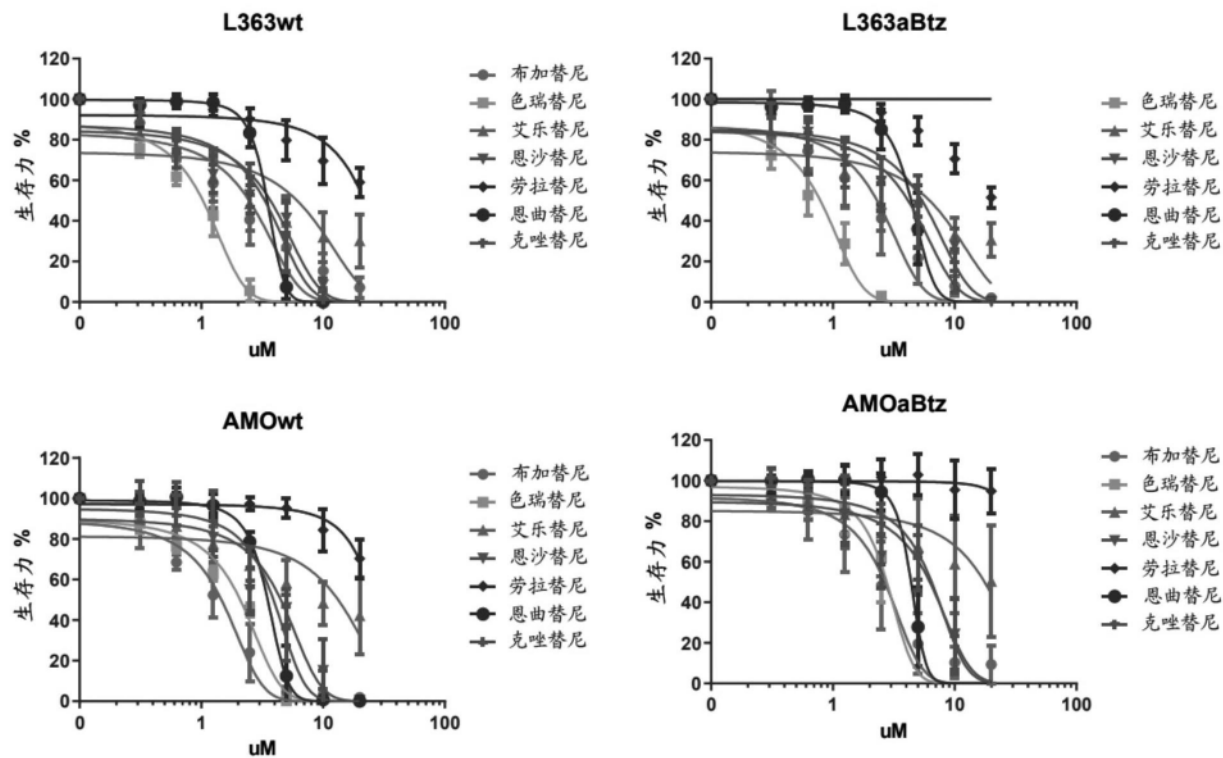
ALK^{Neg}LTK^{Pos} 细胞系易受 ALK 抑制剂处理的影响

图4

LTK 调节分泌，线性 ALK 抑制剂减少分泌

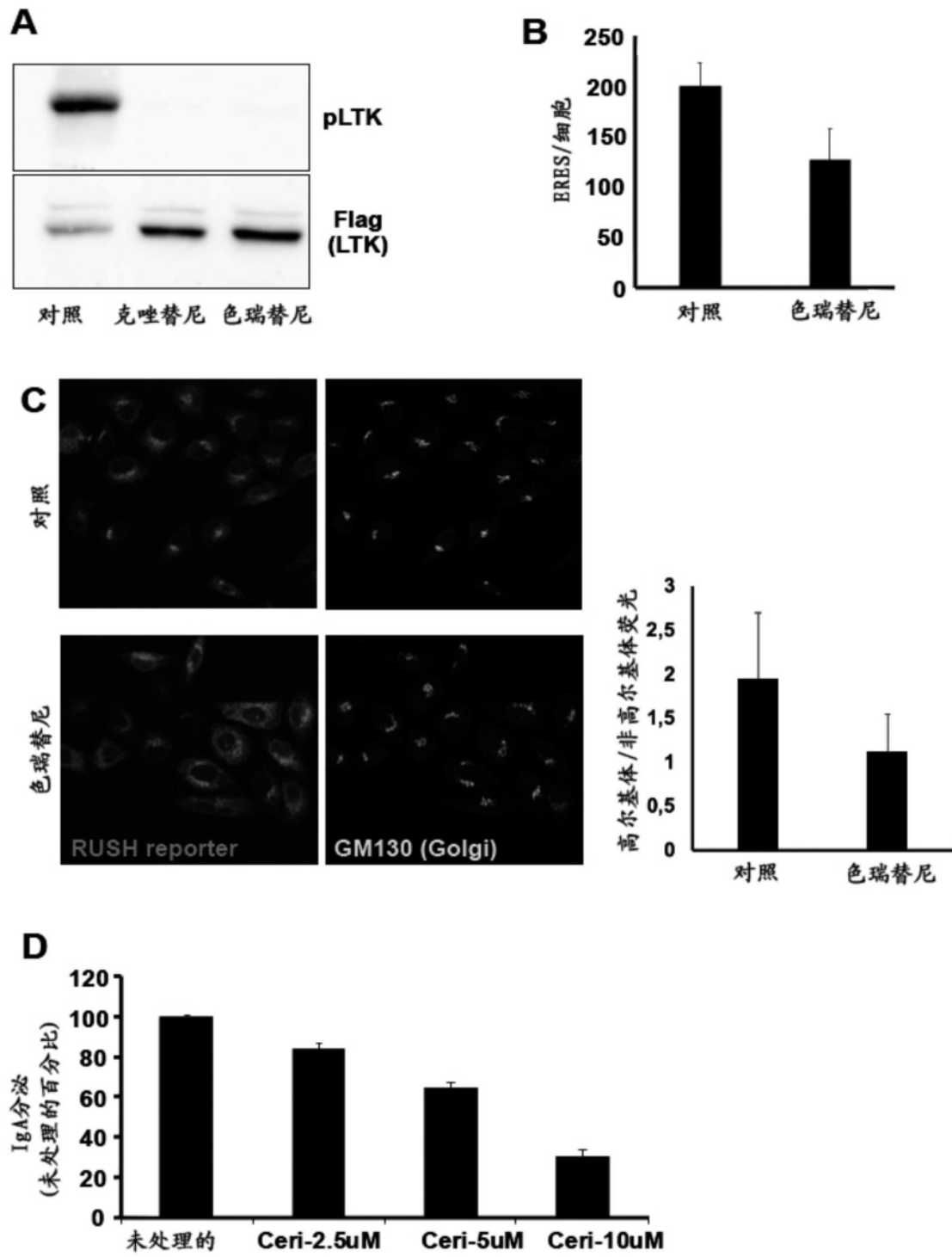


图5

患者的多发性骨髓瘤细胞易受克唑替尼治疗的影响

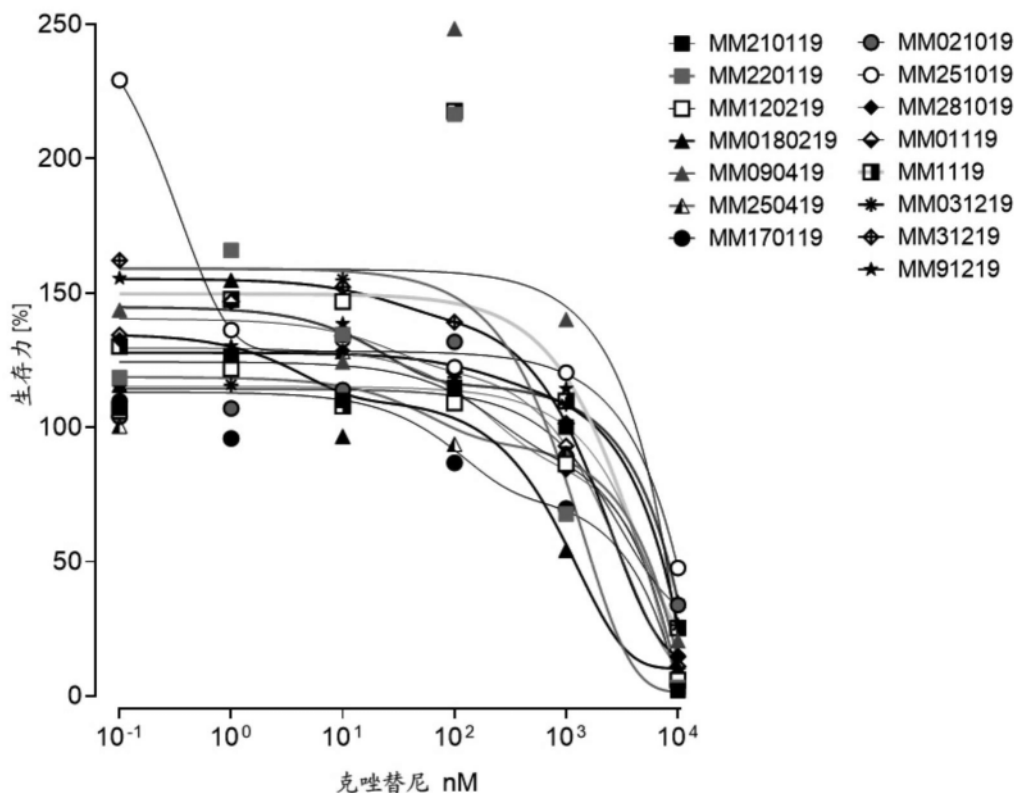


图6

骨髓瘤患者多发性骨髓瘤细胞中 LTK 和 ALK 表达: 83 % 的多发性骨髓瘤细胞为

ALK^{Neg}LTK^{Pos}

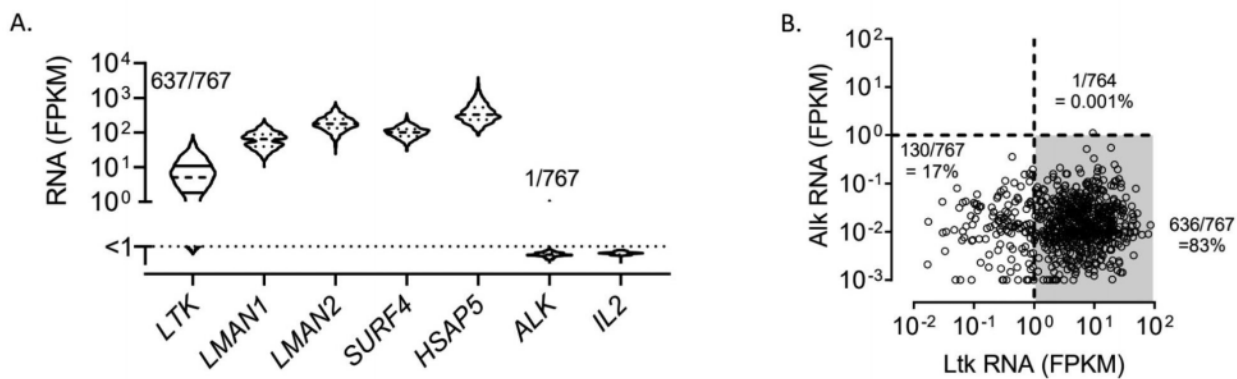


图7

NSG 小鼠异种移植的人多发性骨髓瘤细胞易受克唑替尼的影响

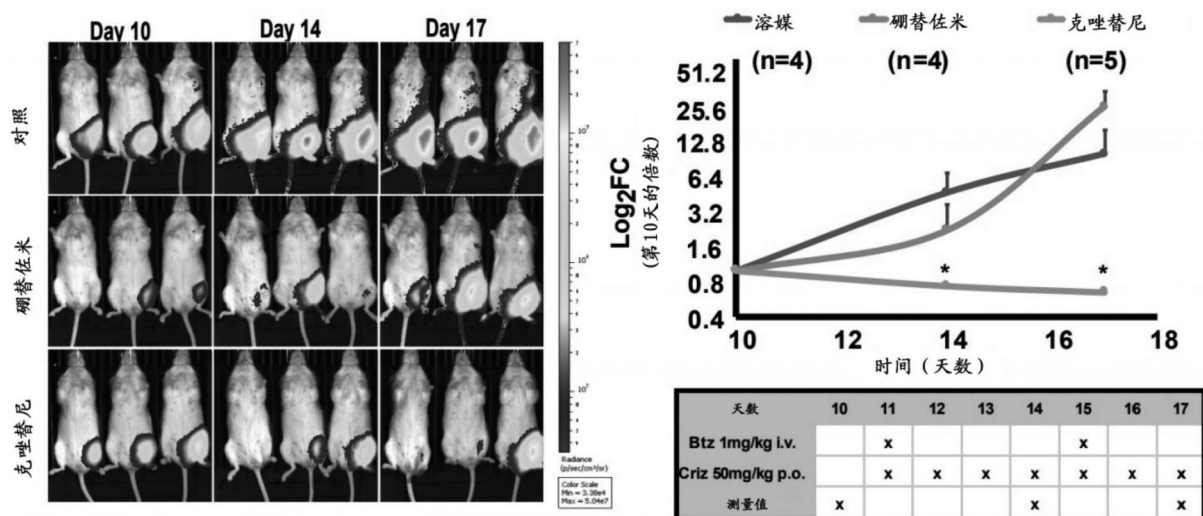


图8

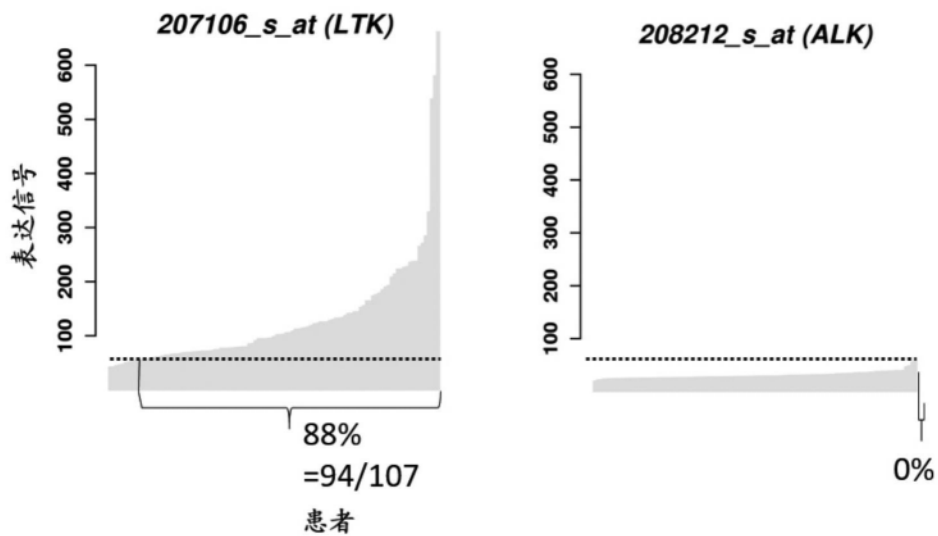
慢性淋巴细胞白血病 (CLL) 细胞中 LTK 和 ALK 的表达: 88 % 为 ALK^{Neg}LTK^{Pos}

图9

患者的 CLL 细胞易受克唑替尼的影响

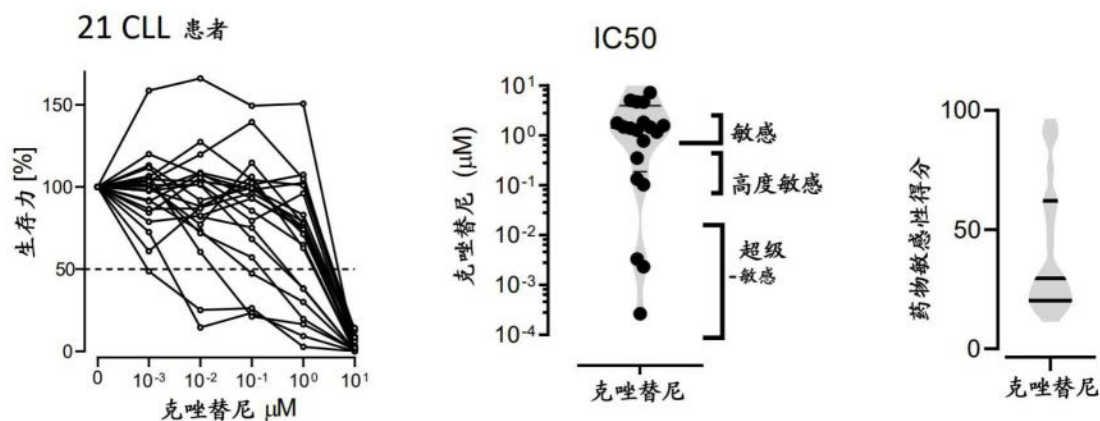


图10

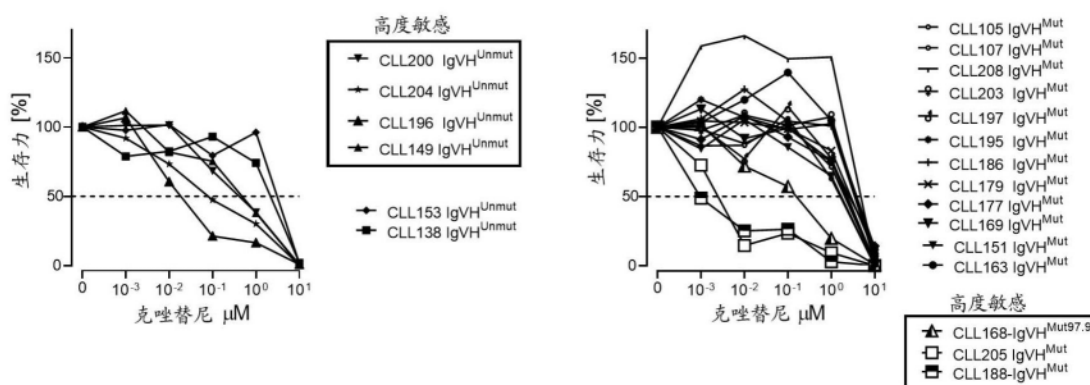
IgVH^{Unmut} 患者的 CLL 细胞易受克唑替尼的影响

图11

患者的 CLL 细胞易受 ALK 抑制剂治疗的影响

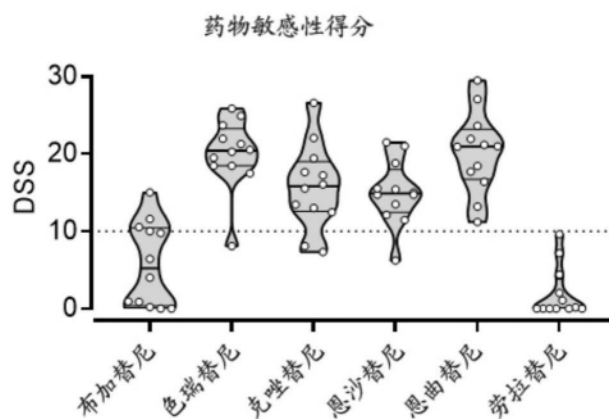


图12

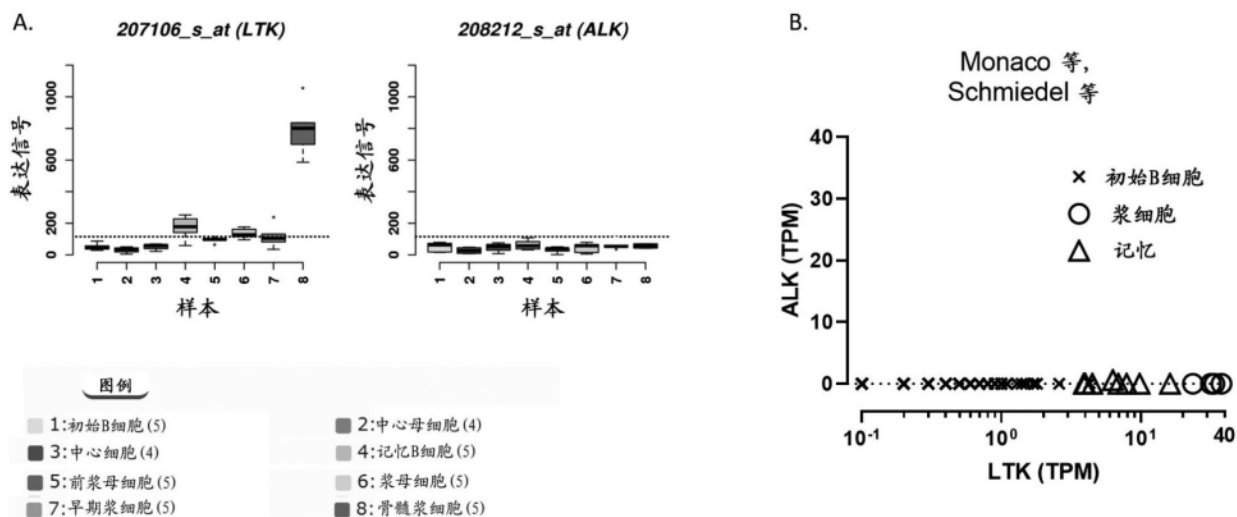
LTK 和 ALK 在 B 细胞分化中的表达: 记忆 B 细胞和浆细胞为 ALK^{Neg}LTK^{Pos}

图13

体外产生的浆细胞对克唑替尼敏感

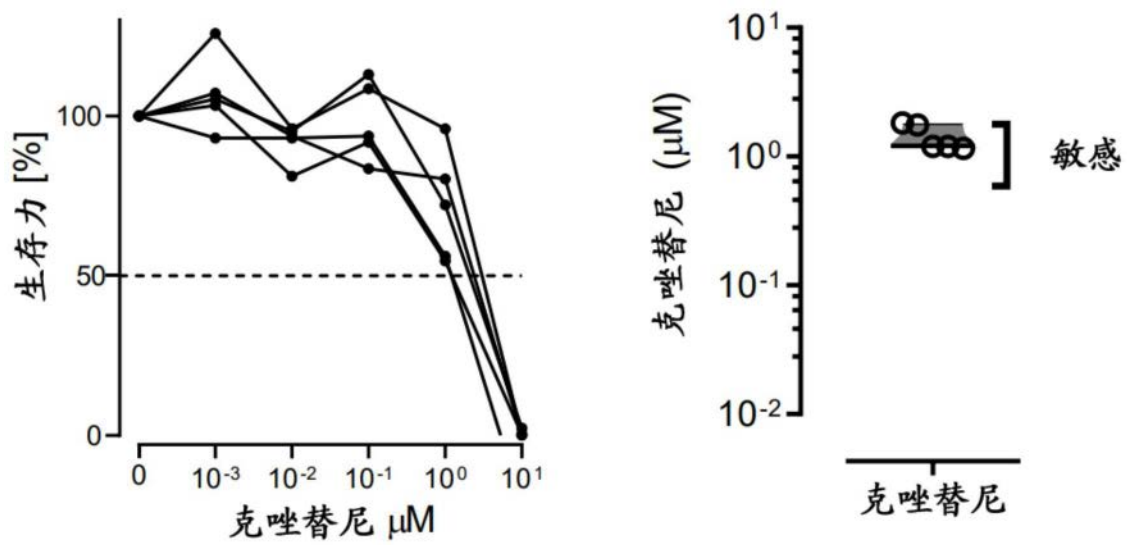


图14

体外产生的浆细胞对线性 ALK 抑制剂克唑替尼和色瑞替尼敏感

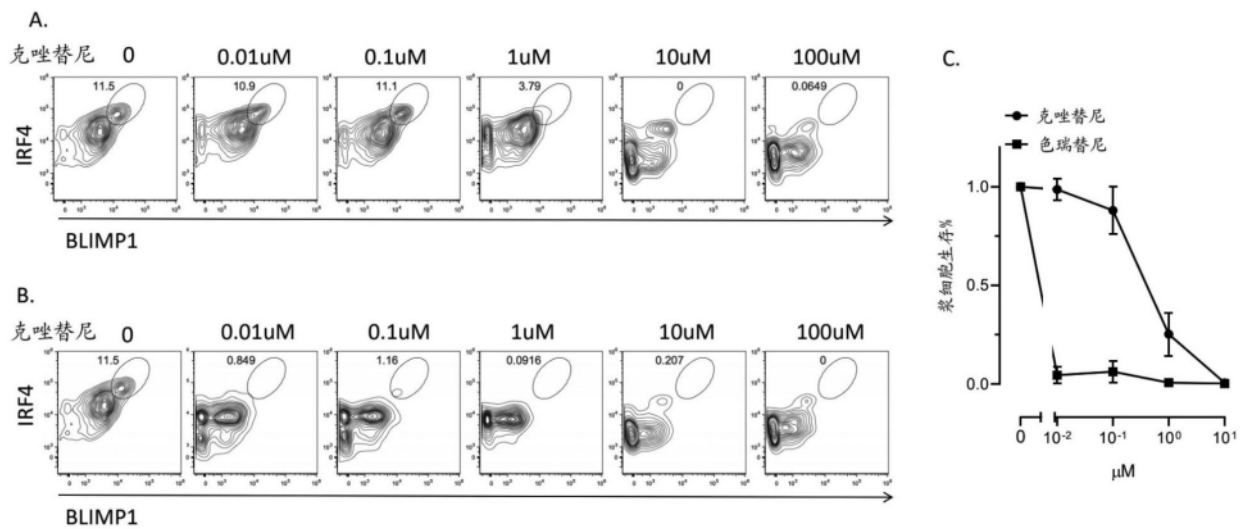


图15

浆细胞在体内对克唑替尼敏感且在体外减少 Ig 的分泌

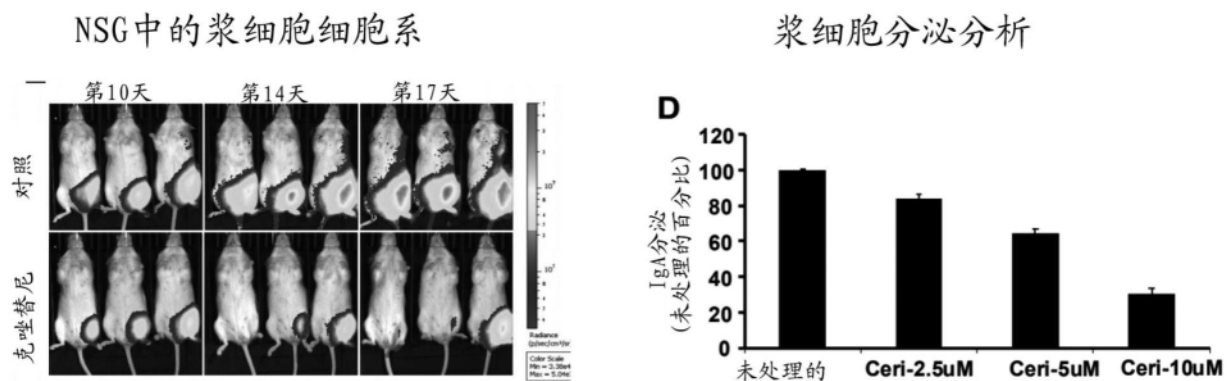


图16

肝细胞癌是 $ALK^{Neg}LTK^{Pos}$ 且对克唑替尼诱导的细胞凋亡敏感

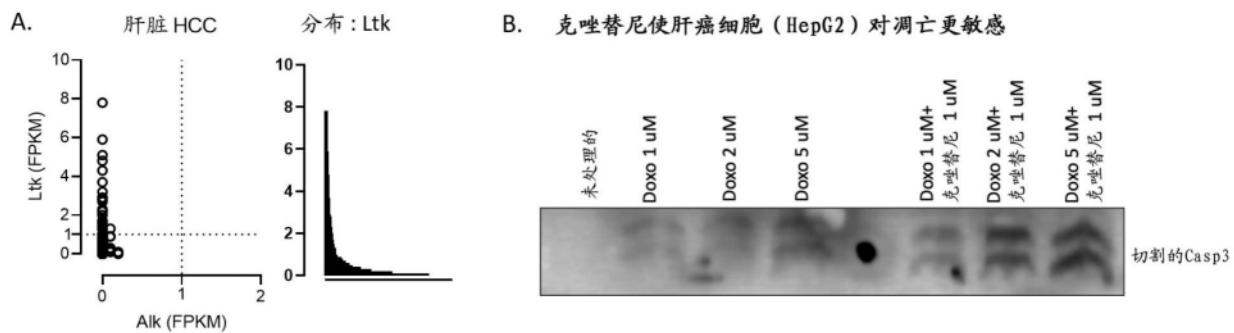


图17