



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109310657 B

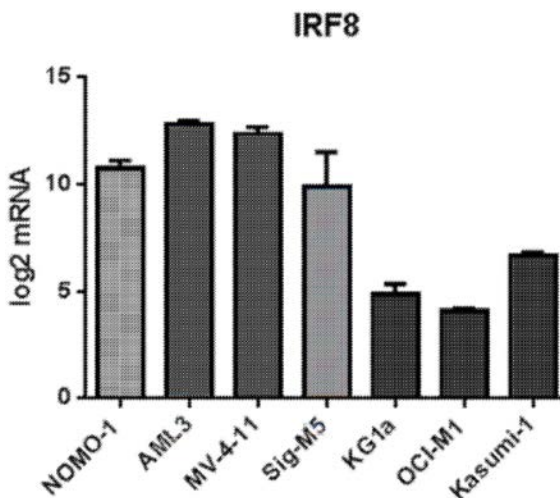
(45) 授权公告日 2022.12.13

(21) 申请号 201780032969.9	(51) Int.Cl.
(22) 申请日 2017.04.07	A61K 31/192 (2006.01)
(65) 同一申请的已公布的文献号	A61K 31/167 (2006.01)
申请公布号 CN 109310657 A	A61K 31/232 (2006.01)
(43) 申请公布日 2019.02.05	A61K 31/235 (2006.01)
(30) 优先权数据	A61K 31/25 (2006.01)
62/320,352 2016.04.08 US	A61K 31/353 (2006.01)
(85) PCT国际申请进入国家阶段日	A61K 31/40 (2006.01)
2018.11.28	A61K 31/4025 (2006.01)
(86) PCT国际申请的申请数据	A61K 31/4155 (2006.01)
PCT/US2017/026657 2017.04.07	A61K 31/426 (2006.01)
(87) PCT国际申请的公布数据	A61K 31/44 (2006.01)
W02017/177167 EN 2017.10.12	A61K 31/4436 (2006.01)
(73) 专利权人 赛罗斯制药有限公司	A61K 31/498 (2006.01)
地址 美国马萨诸塞州	A61K 31/519 (2006.01)
(72) 发明人 M·R·麦基翁 C·菲奥里	A61K 31/5377 (2006.01)
M·L·伊顿 E·P·李	A61K 31/55 (2006.01)
C·弗里茨	A61K 31/551 (2006.01)
(74) 专利代理机构 北京律盟知识产权代理有限	A61K 31/553 (2006.01)
责任公司 11287	A61K 31/573 (2006.01)
专利代理师 章蕾	A61K 31/69 (2006.01) (续)
	(56) 对比文件
	CN 107613969 A, 2018.01.19 (续)
	审查员 郑梅

权利要求书3页 说明书42页 附图22页

(54) 发明名称  
用于治疗AML和MDS的RARA激动剂

(57) 摘要  
本文描述了限定对RARA激动剂敏感的细胞群体并鉴定将受益于用RARA激动剂治疗的患者群体的方法。所述方法可包括向患者群体施用RARA激动剂。



CN 109310657 B

[接上页]

(51) Int.Cl.

*A61K 31/695* (2006.01)  
*A61K 31/706* (2006.01)  
*A61K 31/7068* (2006.01)  
*A61K 31/704* (2006.01)  
*A61K 33/24* (2019.01)  
*A61K 33/36* (2006.01)  
*A61K 45/06* (2006.01)

*A61P 35/00* (2006.01)

*A61P 35/02* (2006.01)

*A61P 35/04* (2006.01)

*G01N 33/48* (2006.01)

(56) 对比文件

WO 2015085172 A2, 2015.06.11

WO 2015101618 A1, 2015.07.09

EP 2404596 A1, 2012.01.11

1. 一种他米巴罗汀和第二治疗剂在制备用于通过组合疗法治疗患有非急性早幼粒细胞白血病急性髓性白血病(非APL AML)或骨髓增生异常综合征(MDS)的成年人类受试者的药物中的用途,其中来自所述受试者的生物样本经判断具有IRF8生物标志物和/或视黄酸受体 $\alpha$ (RARA)生物标志物,其中:

所述IRF8生物标志物是或包括(a)相对于预定阈值水平升高的IRF8 RNA转录物水平或(b)与IRF8基因相关的超级增强子;

所述RARA生物标志物是或包括(a)相对于预定阈值水平升高的RARA RNA转录物水平或(b)与RARA基因相关的超级增强子;并且

所述第二治疗剂是阿扎胞苷、米哌妥林、阿糖胞苷、柔红霉素、甲氨蝶呤、伊达比星、索拉非尼、地西他滨、奎扎替尼、ABT199、JQ1、泼尼松、SAHA、GSKJ4或EPZ6438。

2. 如权利要求1所述的用途,其中所述成年人类受试者是年老的。

3. 如权利要求2所述的用途,其中年老的所述成年人类受试者是不健康的。

4. 如权利要求1-3中任一项所述的用途,其中所述第二治疗剂是阿扎胞苷。

5. 如权利要求1-3中任一项所述的用途,其中所述第二治疗剂是米哌妥林。

6. 如权利要求1-3中任一项所述的用途,其中所述他米巴罗汀和所述第二治疗剂同时使用。

7. 如权利要求1-3中任一项所述的用途,其中所述他米巴罗汀和所述第二治疗剂顺序使用。

8. 如权利要求1-3中任一项所述的用途,其中所述升高的RARA RNA转录物水平和/或所述升高的IRF8 RNA转录物水平使用荧光杂交、PCR、qPCR、qRT-PCR、RNA测序、RNA杂交和信号扩增或RNA印迹独立判断。

9. 如权利要求1-3中任一项所述的用途,其中所述受试者患有非APL AML。

10. 如权利要求1-3中任一项所述的用途,其中所述受试者患有MDS。

11. 如权利要求1-3中任一项所述的用途,其中获得自所述受试者的所述生物样本是骨髓抽吸物或全血。

12. 如权利要求11所述的用途,其中所述骨髓抽吸物或全血经处理以从中去除一种或多种组分。

13. 如权利要求11所述的用途,其中所述全血经处理以获得外周血单核细胞(PBMC)级分或PBMC级分进一步富集的特定的胚细胞。

14. 如权利要求1-3中任一项所述的用途,其中获得自所述受试者的所述生物样本经判断具有所述IRF8生物标志物。

15. 如权利要求14所述的用途,其中所述IRF8 RNA转录物转录自基因组DNA序列,所述基因组DNA序列编码干扰素共有序列结合蛋白或其剪接变体并且特别地排除包含IRF8基因的全部或部分的基因融合体,并且所述IRF8基因位于基因组构建hg19的chr16:85862582-85990086处。

16. 如权利要求1-3中任一项所述的用途,其中获得自所述受试者的所述生物样本经判断具有所述RARA生物标志物。

17. 如权利要求16所述的用途,其中所述RARARNA转录物转录自基因组DNA序列,所述基因组DNA序列编码功能性视黄酸受体- $\alpha$ 基因并且特别地排除包含RARA基因的全部或部分的

基因融合体,并且所述RARA基因位于chr17:38458152-38516681处。

18.如权利要求1-3中任一项所述的用途,其中所述IRF8 RNA转录物是IRF8 mRNA。

19.如权利要求1-3中任一项所述的用途,其中所述RARA RNA转录物是RARAMRNA。

20.如权利要求1-3中任一项所述的用途,其中所述第二治疗剂是柔红霉素。

21.如权利要求1-3中任一项所述的用途,其中所述第二治疗剂是阿糖胞苷(ara-C)。

22.如权利要求1-3中任一项所述的用途,其中所述第二治疗剂是甲氨蝶呤。

23.如权利要求1-3中任一项所述的用途,其中所述第二治疗剂是地西他滨。

24.如权利要求1-3中任一项所述的用途,其中所述第二治疗剂是索拉非尼。

25.如权利要求1-3中任一项所述的用途,其中所述第二治疗剂是伊达比星。

26.如权利要求1-3中任一项所述的用途,其中所述第二治疗剂是ABT199。

27.如权利要求1-3中任一项所述的用途,其中所述第二治疗剂是奎扎替尼。

28.如权利要求1-3中任一项所述的用途,其中所述第二治疗剂是JQ1。

29.如权利要求1-3中任一项所述的用途,其中所述第二治疗剂是泼尼松。

30.如权利要求1-3中任一项所述的用途,其中所述第二治疗剂是SAHA。

31.如权利要求1-3中任一项所述的用途,其中所述第二治疗剂是GSKJ4。

32.如权利要求1-3中任一项所述的用途,其中所述第二治疗剂是EPZ6438。

33.如权利要求1-3中任一项所述的用途,其中所述预定阈值水平通过在正常血细胞、AML细胞系、AML患者衍生的异种移植模型的相当的样本中观察到的RNA转录水平确定,或由患有非APL AML或MDS患者群体确定。

34.一种他米巴罗汀和第二治疗剂在制备用于通过组合疗法治疗患有非急性早幼粒细胞白血病急性髓性白血病(非APL AML)或骨髓增生异常综合征(MDS)的儿科人类受试者的药物中的用途,

其中来自所述受试者的生物样本经判断具有IRF8生物标志物和/或视黄酸受体 $\alpha$ (RARA)生物标志物,其中:

所述IRF8生物标志物是或包括(a)相对于预定阈值水平升高的IRF8 RNA转录物水平或(b)与IRF8基因相关的超级增强子;

所述RARA生物标志物是或包括(a)相对于预定阈值水平升高的RARA RNA转录物水平或(b)与RARA基因相关的超级增强子;并且

所述第二治疗剂是阿扎胞苷、米哌妥林、阿糖胞苷、柔红霉素、甲氨蝶呤、伊达比星、索拉非尼、地西他滨、奎扎替尼、ABT199、JQ1、泼尼松、SAHA、GSKJ4或EPZ6438。

35.如权利要求34所述的用途,其中所述第二治疗剂是阿扎胞苷。

36.如权利要求34所述的用途,其中所述第二治疗剂是米哌妥林。

37.如权利要求34所述的用途,其中所述他米巴罗汀和所述第二治疗剂同时使用。

38.如权利要求34所述的用途,其中所述他米巴罗汀和所述第二治疗剂顺序使用。

39.如权利要求34所述的用途,其中所述升高的RARA RNA转录物水平和/或所述升高的IRF8 RNA转录物水平使用荧光杂交、PCR、qPCR、qRT-PCR、RNA测序、RNA杂交和信号扩增或RNA印迹独立判断。

40.如权利要求34所述的用途,其中所述受试者患有非APL AML。

41.如权利要求34所述的用途,其中所述受试者患有MDS。

42. 如权利要求34所述的用途,其中获得自所述受试者的所述生物样本是骨髓抽吸物或全血。

43. 如权利要求42所述的用途,其中所述骨髓抽吸物或全血经处理以从中去除一种或多种组分。

44. 如权利要求43所述的用途,其中所述全血经处理以获得外周血单核细胞(PBMC)级分或PBMC级分进一步富集的特定的胚细胞。

45. 如权利要求34所述的用途,其中获得自所述受试者的所述生物样本经判断具有所述IRF8生物标志物。

46. 如权利要求45所述的用途,其中所述IRF8 RNA转录物转录自基因组DNA序列,所述基因组DNA序列编码干扰素共有序列结合蛋白或其剪接变体并且特别地排除包含IRF8基因的全部或部分的基因融合体,并且所述IRF8基因位于基因组构建hg19的chr16:85862582-85990086处。

47. 如权利要求34所述的用途,其中获得自所述受试者的所述生物样本经判断具有所述RARA生物标志物。

48. 如权利要求47所述的用途,其中所述RARA RNA转录物转录自基因组DNA序列,所述基因组DNA序列编码功能性视黄酸受体- $\alpha$ 基因并且特别地排除包含RARA基因的全部或部分的基因融合体,并且所述RARA基因位于chr17:38458152-38516681处。

49. 如权利要求34所述的用途,其中所述IRF8 RNA转录物是IRF8 mRNA。

50. 如权利要求34所述的用途,其中所述RARA RNA转录物是RARA mRNA。

51. 如权利要求34所述的用途,其中所述第二治疗剂是柔红霉素。

52. 如权利要求51所述的用途,其中所述第二治疗剂是ara-C。

53. 如权利要求34所述的用途,其中所述第二治疗剂是甲氨蝶呤。

54. 如权利要求34所述的用途,其中所述第二治疗剂是地西他滨。

55. 如权利要求34所述的用途,其中所述第二治疗剂是索拉非尼。

56. 如权利要求34所述的用途,其中所述第二治疗剂是伊达比星。

57. 如权利要求34所述的用途,其中所述第二治疗剂是ABT199。

58. 如权利要求34所述的用途,其中所述第二治疗剂是奎扎替尼。

59. 如权利要求34所述的用途,其中所述第二治疗剂是JQ1。

60. 如权利要求34所述的用途,其中所述第二治疗剂是泼尼松。

61. 如权利要求34所述的用途,其中所述第二治疗剂是SAHA。

62. 如权利要求34所述的用途,其中所述第二治疗剂是GSKJ4。

63. 如权利要求34所述的用途,其中所述第二治疗剂是EPZ6438。

64. 如权利要求34所述的用途,其中所述预定阈值水平通过在正常血细胞、AML细胞系、AML患者衍生的异种移植模型的相当的样本中观察到的RNA转录水平确定,或由患有非APL AML或MDS患者群体确定。

## 用于治疗AML和MDS的RARA激动剂

### [0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2016年4月8日提交的美国临时专利申请序列号62/320,352的优先权,所述申请的公开内容据此以全文引用方式并入。

### 背景技术

[0003] 类视色素是一类与维生素A结构有关的化合物,其包括天然和合成化合物。已发现几个系列的类视色素在临床上可用于治疗皮肤病学和肿瘤学疾病。视黄酸及其它天然存在的类视色素类似物(9-顺式视黄酸、全反式3,4-二脱氢视黄酸、4-氧代视黄酸和视黄醇)是多效调节化合物,其调节各种炎症、免疫和结构细胞的结构和功能。它们是肺中上皮细胞增殖、分化和形态发生的重要调节剂。类视色素通过一系列激素核受体发挥其生物学效应,所述激素核受体是属于类固醇/甲状腺受体超家族的配体诱导型转录因子。

[0004] 类视色素受体分为两类,视黄酸受体(RAR)和类视色素X受体(RXR),各自由三种不同的亚型( $\alpha$ 、 $\beta$ 和 $\gamma$ )组成。RAR基因家族的每个亚型编码由两个主要RNA转录物的差异剪接产生的可变数目的同种型。全反式视黄酸是视黄酸受体的生理激素,并且与所有三种RAR亚型以大致相等的亲和力结合,但不与RXR受体结合,其中9-顺式视黄酸是天然配体。类视色素具有抗炎作用,改变上皮细胞分化的进程,并且抑制基质细胞基质的产生。这些特性导致了用于皮肤病学病症(诸如牛皮癣、痤疮和肥厚性皮肤瘢痕)的局部和全身类视色素治疗剂的发展。其它应用包括控制急性早幼粒细胞白血病、腺瘤和鳞状细胞癌以及肝纤维化。

[0005] 类视色素的治疗用途的局限性源于用天然存在的类视色素,全反式视黄酸和9-顺式视黄酸观察到的相对毒性。这些天然配体在RAR亚型方面是非选择性的,并且因此在整个身体中具有多效性,其经常是有毒的。

[0006] 已描述了各种类视色素,其选择性地或特异性地与RAR或RXR受体或与一类内的特定亚型( $\alpha$ 、 $\beta$ 和 $\gamma$ )相互作用。RARA特异性激动剂对癌症的治疗具有很高的前景,并且许多已进入人体临床试验。然而,仅一种RARA特异性激动剂他米巴罗汀(tamibarotene)被批准用于治疗癌症。此外,尽管在美国和欧洲进行了试验,但他米巴罗汀仅在日本获得批准,并且仅用于治疗急性早幼粒细胞白血病。RARA激动剂在癌症中的理论功效与缺乏对此类药剂的监管批准之间的脱节提出了为什么此类激动剂在人体中不是有效和安全的问题。因此,需要更好地理解为什么RARA激动剂没有达到其治疗潜力。

[0007] 基因组技术的最新进展和对基因调节回路的理解导致了超级增强子的发现。鉴于给定组织或癌症类型中的许多基因可能受到基因编码区附近增强子的存在的调节,其中少数增强子代表相对于所有其它活性基因的高度不对称和不成比例的大量转录标记和机制。最近的发现表明,此类增强子与携带它们的细胞的功能和存活特别相关的基因联系在一起。因此,超级增强子与基因的缔合表明所述基因对所述细胞存活的相对重要性。

### 发明内容

[0008] 本公开提供了用于检测一种或多种IRF8生物标志物(例如,一种或多种IRF8基因

组分或产物的存在、水平、形式和/或活性,包括例如IRF8超级增强子强度、序数等级或患病率等级和IRF8 mRNA水平或患病率等级)的技术。本公开证明了含有一种或多种IRF8生物标志物的细胞(例如,癌细胞或来自患有非APL AML或MDS的受试者的细胞)更易受RARA激动剂(诸如他米巴罗汀)的影响,其中IRF8生物标志物是或包括表达升高的IRF8 mRNA水平或与IRF8基因相关的超级增强子中的一个或多个。

[0009] 本发明的各种实施方案、方面和替代方案解决了限定哪些细胞群体对视黄酸受体 $\alpha$ 的激动剂(“RARA”)敏感的问题,从而鉴定将受益于用RARA激动剂治疗的患者群体(例如,将患者分层以使用RARA激动剂治疗;将RARA激动剂响应者与无响应者分开)并提供针对此类患者群体的治疗疗法。所述解决方案至少部分地基于我们以下的发现:某些癌细胞中一种或多种IRF8生物标志物的升高表达表明,此类细胞将比没有升高的IRF8生物标志物的类似细胞显著更响应于用RARA激动剂(例如,他米巴罗汀)治疗。

[0010] 在一些实施方案中,本公开涉及一种基于受试者癌细胞中IRF8 mRNA的水平治疗受试者(例如,人)的癌症(例如,非APL AML或MDS)的方法,其中所述方法包括向受试者施用有效治疗所述疾病的量的RARA激动剂(例如,他米巴罗汀)的步骤。在这些实施方案的一些方面,受试者癌细胞中IRF8 mRNA的水平等于或高于预定阈值水平。

[0011] 在一些实施方案中,本公开涉及一种治疗癌症的方法,其中所述方法包括向患有癌症的受试者施用他米巴罗汀的步骤,其中确定所述癌症具有IRF8生物标志物,其中IRF8生物标志物是或包括表达升高的IRF8 mRNA水平或与IRF8基因相关的超级增强子中的一个或多个。

[0012] 在一些实施方案中,本公开涉及一种方法,其包括以下步骤:向确定不表达升高的RARA mRNA水平或与RARA基因相关的超级增强子中的一个或多个;以及不表达升高的IRF8 mRNA水平或与IRF8基因相关的超级增强子中的一个或多个的受试者施用疗法,其中所述疗法不包括施用他米巴罗汀。

[0013] 在一些实施方案中,本公开涉及一种治疗癌症的方法,所述方法包括以下步骤:向确定(a)不表达升高的RARA mRNA水平或不具有其强度和/或序数等级高于预定阈值的与RARA基因相关的超级增强子中的一个或多个;以及(b)表达升高的IRF8 mRNA水平或与IRF8基因相关的超级增强子中的一个或多个的受试者施用疗法,其中所述疗法是他米巴罗汀。

[0014] 在一些实施方案中,本公开涉及一种治疗癌症的方法,所述方法包括以下步骤:向确定不表达升高的RARA mRNA水平或与RARA基因相关的超级增强子中的一个或多个;以及表达升高的IRF8 mRNA水平或与IRF8基因相关的超级增强子中的一个或多个的受试者施用疗法,其中所述疗法是他米巴罗汀。

[0015] 在一些实施方案中,本公开涉及一种治疗癌症的方法,所述方法包括接收与患有癌症的受试者中IRF8 mRNA水平有关的信息的步骤;并且如果所述信息表明IRF8 mRNA水平或超级增强子水平等于或高于参考水平,则向受试者施用他米巴罗汀。在一些方面,参考是预定阈值。在一些方面,预定阈值是截止值或患病率截止。

[0016] 在一些实施方案中,本公开涉及一种治疗癌症的方法,所述方法包括接收与患有癌症的受试者中与IRF8基因有关的超级增强子的存在有关的信息的步骤;并且如果所述信息表明超级增强子与IRF8基因相关,则向受试者施用他米巴罗汀。

[0017] 在一些实施方案中,本公开涉及一种预测RARA激动剂在癌症治疗中的功效的方

法,其包括以下步骤:确定所述癌症是否包含IRF8 mRNA水平等于或高于参考水平的细胞,其中IRF8 mRNA水平等于或高于参考水平可预测治疗中RARA激动剂的功效。在一些方面,参考是预定阈值。在一些方面,预定阈值是截止值或患病率截止。

[0018] 在一些实施方案中,本公开涉及一种预测RARA激动剂在癌症治疗中的功效的方法,其包括以下步骤:确定在患有癌症的受试者中,所述癌症是否包含具有与IRF8基因相关的超级增强子的细胞,其中与IRF8基因相关的超级增强子的存在表明用RARA激动剂有效治疗癌症。

[0019] 在一些实施方案中,本公开涉及一种方法,其包括以下步骤:获得包含来自患有癌症的受试者的癌细胞的生物样本;并且在所述生物样本中检测IRF8 mRNA水平等于或高于参考水平;或与IRF8基因相关的超级增强子中的一个或多个。在一些方面,参考是预定阈值。在一些方面,预定阈值是截止值或患病率截止。

[0020] 在一些实施方案中,本公开涉及一种诊断、预后或治疗患有癌症的受试者的方法,其包括以下步骤:从受试者获得癌症样本;并且在所述样本中测定受试者中IRF8 mRNA水平或与IRF8基因相关的超级增强子的存在中的一个或多个。

[0021] 在一些实施方案中,本公开涉及一种诊断、预后或治疗患有癌症的受试者的方法,其包括以下步骤:从受试者获得癌症样本;在所述样本中测定受试者中IRF8 mRNA水平或与IRF8基因相关的超级增强子的存在;并且如果存在以下中的一个或多个:(a) IRF8 mRNA水平等于或高于参考水平;或(b)与IRF8基因相关的超级增强子,则施用包含RARA激动剂的治疗组合物。在一些方面,参考是预定阈值。在一些方面,预定阈值是截止值或患病率截止。

[0022] 在一些实施方案中,本公开涉及一种方法,其包括检测从患有癌症的受试者获得的生物样本中RARA mRNA水平或者与RARA基因相关的超级增强子的强度或序数等级中的一个或多个;并且如果所述生物样本不表达等于或高于参考水平的升高的RARA mRNA水平或者其强度或序数等级等于或高于预定阈值的与RARA基因相关的超级增强子中的一个或多个,则检测所述生物样本中IRF8 mRNA水平或与IRF8基因相关的超级增强子中的一个或多个。在一些方面,参考是预定阈值。在一些方面,预定阈值是截止值或患病率截止。

[0023] 在一些实施方案中,本公开涉及一种方法,其包括检测从患有癌症的受试者获得的生物样本中RARA mRNA水平或者与RARA基因相关的超级增强子的强度或序数等级中的一个或多个;并且如果所述生物样本表达等于或高于参考水平的升高的RARA mRNA水平或者等于或高于预定阈值的与RARA基因相关的超级增强子的强度或序数等级中的一个或多个,则检测所述生物样本中IRF8 mRNA水平或与IRF8基因相关的超级增强子中的一个或多个。

[0024] 在一些实施方案中,本公开涉及一种方法,其包括检测从患有癌症的受试者获得的生物样本中IRF8 mRNA水平或与IRF8基因相关的超级增强子中的一个或多个;并且如果所述生物样本不表达等于或高于参考水平的升高的IRF8 mRNA水平或与IRF8基因相关的超级增强子中的一个或多个,则检测所述生物样本中RARA mRNA水平或者与RARA基因相关的超级增强子的强度或序数等级中的一个或多个。

[0025] 在一些实施方案中,本公开涉及一种方法,其包括检测从患有癌症的受试者获得的生物样本中IRF8 mRNA水平或与IRF8基因相关的超级增强子中的一个或多个;并且如果所述生物样本表达等于或高于参考水平的升高的IRF8 mRNA水平或与IRF8基因相关的超级增强子中的一个或多个,则检测所述生物样本中RARA mRNA水平或者与RARA基因相关的超



级增强子的强度或序数等级中的一个或多个。

[0026] 在一些实施方案中,本公开涉及一种诊断并且治疗患有选自非APL AML和MDS的疾病的人受试者的方法,所述方法包括:

[0027] a. 基于先前确定存在于来自受试者的患病细胞样本中的IRF8 mRNA水平,诊断受试者是否具有所述疾病的他米巴罗汀敏感形式;以及

[0028] b. 向受试者施用有效治疗所述疾病的量的他米巴罗汀。

[0029] 在这些实施方案的一些方面,IRF8 mRNA的水平等于或高于预定阈值。

[0030] 在包括用他米巴罗汀治疗受试者的任何前述实施方案的一些方面,向受试者施用他米巴罗汀和第二治疗剂的组合。

[0031] 在一些实施方案中,本公开涉及一种基于受试者癌细胞中RARA mRNA水平和或IRF8 mRNA水平治疗受试者中选自非APL或MDS的癌症的方法,其中所述治疗包括向受试者施用他米巴罗汀和第二治疗剂的组合。在这些实施方案的一些方面,受试者具有等于或高于阈值的RARA mRNA水平。在这些实施方案的一些方面,受试者具有等于或高于阈值的IRF8 mRNA水平。在这些实施方案的一些方面,受试者具有等于或高于阈值的RARA mRNA水平和等于或高于阈值的IRF8 mRNA水平两者。在这些实施方案的一些方面,受试者患有非APL AML。

## 附图说明

[0032] 图1描绘了七种不同AML细胞系中的IRF8 mRNA水平。由红色条表示的细胞系表明对他米巴罗汀治疗的实质性响应。由蓝色条表示的细胞系表明对他米巴罗汀治疗的很小或没有响应。

[0033] 图2示出了如通过RNA-seq测量的他米巴罗汀抗增殖效力( $EC_{50}$ 值,nM)与IRF8 mRNA水平的相关性。注意,具有IRF8 mRNA水平=1 ( $\log_{10}$ )和设算为 $50\mu\text{M}$ (无响应)的他米巴罗汀 $EC_{50}$ 值的左上角点表示来自具有低IRF8 mRNA水平且对他米巴罗汀没有抗增殖响应的2个AML细胞系的数据。他米巴罗汀敏感性与IRF8 mRNA水平的相关性高度显著( $p=0.0001$ , Spearman相关,双尾)。

[0034] 图3描绘了如通过RNA-Seq测量的个体患者AML样本和AML细胞系中IRF8 mRNA水平的等级顺序图。指示了AML细胞系PL21,其是具有任何响应细胞系的最低IRF8 mRNA水平的细胞系,以及Kasumi,其是具有对他米巴罗汀无响应的任何细胞系的最高IRF8 mRNA水平的细胞系。在此群体中,25%患病率截止等于大约 $\log_2(7)$ 的RNA-Seq TPM值。

[0035] 图4描绘了测试其对他米巴罗汀响应的非APL AML细胞系中IRF8 mRNA水平与RARA mRNA水平之间的相关性。

[0036] 图5描绘了AML患者样本群中IRF8 mRNA水平与RARA mRNA水平之间的相关性。虚线表示每种mRNA的25%患病率截止。

[0037] 图6示出了AML细胞系中他米巴罗汀抗增殖效力与IRF8增强子强度的相关性。AML细胞系他米巴罗汀敏感性( $EC_{50}$ 值,nM)随IRF8 RECOMB增强子评分变化的图。注意,具有IRF8增强子评分=0和设算为 $50\mu\text{M}$ (无响应)的他米巴罗汀 $EC_{50}$ 值的左上角点表示不具有可检测IRF8增强子峰且对他米巴罗汀没有抗增殖响应的3个AML细胞系的结果。

[0038] 图7描绘了AML患者样本中的IRF8增强子强度。对于66个AML患者样本,根据RECOMB评分方法的IRF8增强子强度的等级顺序图。每个条代表单个AML患者的IRF8增强子强度。Y

轴展示单个IRF8增强子强度,其作为超级增强子(>1.0)与典型增强子(≤1.0)之间的截止(定义为1.0,由虚线表示)的倍数。高于此阈值的患者样本显示为白色填充,而低于此阈值的那些患者样本显示为黑色填充。66个患者样本中的14个(所述群体的21%)超过1.0阈值并被认为具有IRF8 SE。

[0039] 图8示出了AML患者样本中IRF8 mRNA水平与IRF8增强子强度的相关性。通过分位数归一化RNA-seq的IRF8 mRNA转录物丰度( $\log_2$ TPM;Y-轴)随49个主要患者样本(具有增强子和表达值的那些)的IRF8 RECOMB增强子强度(X-轴)变化的图。Spearman Rho相关估计值为约0.81,其中p值为 $2.2 \times 10^{-12}$ 。

[0040] 图9示出了AML细胞系中IRF8增强子强度的分布。对于26个AML细胞系,根据RECOMB评分方法的IRF8增强子强度的图。每个条代表单个AML细胞系的IRF8增强子强度。Y轴示出单个IRF8增强子强度,其作为超级增强子(>1.0)与典型增强子(≤1.0)之间的截止(定义为1.0,由虚线表示)的倍数。高于此阈值的细胞系显示为白色填充,而低于此阈值的那些细胞系显示为黑色填充。26个AML细胞系中的9个(所述群体的34%)超过1.0阈值并被认为具有IRF8 SE。

[0041] 图10示出了AML细胞系中IRF8 mRNA水平与IRF8增强子强度的相关性。其中RNA-seq和ChIP-seq数据两者均可用的所有非APL AML细胞系中,通过分位数归一化RNA-seq的IRF8 mRNA转录物丰度TPM(Y-轴)随IRF8 RECOMB增强子强度(X-轴)变化的图。Spearman Rho相关估计值为约0.82,其中p值为约 $2 \times 10^{-6}$ 。

[0042] 图11描绘了两种不同的源自患者的小鼠异种移植物AML模型中,如通过CD45<sup>+</sup>细胞%测量的对他米巴罗汀的每日剂量的响应。图11还描绘了不同器官和生物体液中的CD45<sup>+</sup>细胞%,以及小鼠模型的存活时间。

[0043] 图12描绘了两种另外的源自患者的小鼠异种移植物AML模型中,如通过CD45<sup>+</sup>细胞%测量的对他米巴罗汀的每日剂量的响应。图12还描绘了那些模型中不同器官和生物体液中的CD45<sup>+</sup>细胞%,以及那些模型中的存活时间。

[0044] 图13描绘了在图11和12中描绘的异种移植实验中使用的四个AML患者样本中的每个中的IRF8 mRNA水平和RARA mRNA水平。仅他米巴罗汀响应的AM8096(其产生了他米巴罗汀响应性异种移植物),证明了IRF8 mRNA高于100TPM阈值。AM8096和AM5512(其表现出对他米巴罗汀的一些响应性)证明了RARA mRNA水平高于10TPM阈值。

[0045] 图14描绘了在多种AML细胞系、AML原发性患者样本、正常血细胞和AML PDX中检测到的IRF8 mRNA水平的等级排序。

[0046] 图15描绘了在各种AML细胞系中他米巴罗汀和阿扎胞苷的组合的等效线图。星号表示等效线图最大值之外的数据点。

[0047] 图16描绘了在各种AML细胞系中他米巴罗汀和三氧化二砷的组合的等效线图。星号表示等效线图最大值之外的数据点。

[0048] 图17描绘了在各种AML细胞系中他米巴罗汀和Ara-C的组合的等效线图。星号表示等效线图最大值之外的数据点。

[0049] 图18描绘了在各种AML细胞系中他米巴罗汀和柔红霉素的组合的等效线图。星号表示等效线图最大值之外的数据点。

[0050] 图19描绘了在各种AML细胞系中他米巴罗汀和甲氨蝶呤的组合的等效线图。星号

表示等效线图最大值之外的数据点。

[0051] 图20描绘了在各种AML细胞系中他米巴罗汀和伊达比星的组合的等效线图。星号表示等效线图最大值之外的数据点。

[0052] 图21描绘了在各种AML细胞系中他米巴罗汀和索拉非尼的组合的等效线图。星号表示等效线图最大值之外的数据点。

[0053] 定义

[0054] 在本申请中,除非从上下文清楚指出,否则(i)术语“一个”可理解为意指“至少一个”;(ii)术语“或”可理解为意指“和/或”;(iii)术语“包含”和“包括”可理解为涵盖逐项列出的组分或步骤,无论是由它们自己呈现还是与一个或多个另外组分或步骤一起呈现;以及(iv)术语“约”和“大约”可理解为允许如本领域普通技术人员所理解的标准变化;以及(v)如果提供范围,则包括端点。

[0055] 本领域技术人员将理解,其结构在本文中被描绘的一种或多种化学化合物可具有一种或多种异构(例如,对映异构、非对映异构和几何(或构象))和/或互变异构形式;例如,每个不对称中心的R和S构型、Z和E双键异构体,以及Z和E构象异构体。在一些实施方案中,本文包括的教导可适用于和/或涵盖任何和所有此类形式。因此,除非另外说明,否则本发明化合物的单一立体化学异构体以及对映异构、非对映异构和几何(或构象)的混合物可全部在本发明的范围内。类似地,除非另外说明,否则本发明化合物的所有互变异构形式均在本发明的范围内。此外,本领域技术人员将理解,在一些实施方案中,本文描绘的化学结构可涵盖仅在一个或多个富含同位素的原子存在下不同的化合物。例如,除用氘或氚替换氢,或用富含<sup>13</sup>C或<sup>14</sup>C的碳替换碳之外,其结构与所描绘结构相同的化合物也在本发明的范围内。在某些实施方案中,此类化合物可用作例如分析工具、作为生物测定中的探针,和/或作为根据本发明的治疗剂。

[0056] 激动剂:如本文所用,术语“激动剂”可用于指其存在、水平、程度、类型或形式与另一种药剂(即,激动剂)的水平或活性增加相关的药剂、病状或事件。通常,激动剂可以是或包括任何化学类别的药剂,包括例如小分子、多肽、核酸、碳水化合物、脂质、金属和/或示出相关活化活性的任何其它实体。在一些实施方案中,激动剂可以是直接的(在这种情况下,它直接对其靶标发挥其影响);在一些实施方案中,激动剂可以是间接的(在这种情况下,它通过与其靶标结合之外的其它方式发挥其影响;例如,通过与靶标的调节剂相互作用,从而改变靶标的水平或活性)。

[0057] 激动剂疗法:如本文所用,术语“激动剂疗法”是指施用激动特定感兴趣靶标的激动剂以实现所需的治疗效果。在一些实施方案中,激动剂疗法包括施用单剂量的激动剂。在一些实施方案中,激动剂疗法包括施用多剂量的激动剂。在一些实施方案中,激动剂疗法包括例如根据已知或预期实现治疗效果的给药方案施用激动剂,因为例如通过对相关群体的管理,已将这种结果建立到指定的统计置信度。

[0058] 拮抗剂:如本文所用,术语“拮抗剂”可用于指其存在、水平、程度、类型或形式与另一种药剂(例如,抑制剂或靶标)的水平或活性降低相关的药剂、病状或事件。通常,拮抗剂可以是或包括任何化学类别的药剂,包括例如小分子、多肽、核酸、碳水化合物、脂质、金属和/或示出相关抑制活性的任何其它实体。在一些实施方案中,拮抗剂可以是直接的(在这种情况下,它直接对其靶标发挥其影响);在一些实施方案中,拮抗剂可以是间接的(在这种

情况下,它通过与其靶标结合之外的其它方式发挥其影响;例如,通过与靶标的调节剂相互作用,从而改变靶标的水平或活性)。

[0059] 大约:如本文所用,当应用于一个或多个感兴趣值时,术语“大约”或“约”是指与所述参考值类似的值。在某些实施方案中,术语“大约”或“约”是指在所说明的参考值的任一方向上的(大于或小于)25%、20%、19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%或更小范围内的值范围,除非另外说明或以另外的方式从上下文显而易见(除了这样的数值将超过可能值的100%)。

[0060] 急性早幼粒细胞白血病:如本文所用,术语“急性早幼粒细胞白血病”或“APL”是指急性髓性白血病(“AML”)的亚型,其特征在于人染色体15与17之间的遗传易位。因此,术语“非APL AML”是指未以这种遗传易位为特征的任何AML亚型。

[0061] 生物样本:如本文所使用,术语“生物样本”是指从患有待通过本发明方法治疗的疾病的个体获得的任何样本,包括组织样本(诸如组织切片和组织针穿刺活检);细胞样本(例如,细胞学涂片(诸如Pap或血涂片)或通过显微切割获得的细胞样本);骨髓样本(其全部、完整细胞级分或其中的细胞亚群体);或细胞级分、片段或细胞器(诸如通过裂解细胞并通过离心或其它方式分离其组分而获得)。生物样本的其它实例包括血液、血清、尿液、精液、粪便物质、脑脊液、间质液、粘液、泪液、汗液、脓液、活检组织(例如,通过外科活检或针穿刺活检获得)、乳头吸出物、乳、阴道液、唾液,拭子(诸如口腔拭子),或含有衍生自第一生物样本的生物分子的任何材料。在一些方面,来自患有非APL AML或MDS的受试者的生物样本是骨髓抽吸物。在其它方面,来自患有非APL AML或MDS的受试者的生物样本是分级的全血样本。在更具体的方面,来自患有非APL AML或MDS的受试者的生物样本是来自受试者全血的PBMC级分(“PBMC样本”)。在仍更具体的方面,来自患有非APL AML或MDS的受试者的PBMC样本使用各种富集技术进一步富集特定的胚细胞,所述富集技术诸如抗体连接的珠粒富集方案、荧光标记细胞分选或本领域已知的其它技术(“富集的PBMC样本”)。在一些实施方案中,如根据上下文将明确的是,术语“样本”是指通过处理(例如通过移除一种或多种组分和/或通过添加一种或多种试剂)初级样本获得的制备物。所述“处理的样本”可包括例如自样本提取或通过使初级样本经受诸如扩增或反转录mRNA、分离和/或纯化某些组分等的技术获得的核酸或蛋白质。

[0062] 生物标志物:如本文所用的,术语“生物标志物”是指其存在、水平或形式与特定生物事件或感兴趣状态相关的实体,使得其被认为是所述事件或状态的“标志物”。仅给出几个实例,在一些实施方案中,生物标志物可以是或包括特定疾病状态或阶段的标志物,或者特定疾病、病症或病状可能发展的可能性的标志物。在一些实施方案中,生物标志物可以是或包括特定疾病或治疗结果或其可能性的标志物。因此,在一些实施方案中,生物标志物是预测性的,在一些实施方案中,生物标志物是预后的,在一些实施方案中,生物标志物是相关生物学事件或感兴趣状态的诊断。生物标志物可以是任何化学类别的实体。例如,在一些实施方案中,生物标志物可以是或包括核酸、多肽、脂质、碳水化合物、小分子、无机试剂(例如,金属或离子)或其组合。在一些实施方案中,生物标志物是细胞表面标志物。在一些实施方案中,生物标志物是细胞内的。在一些实施方案中,在细胞外发现生物标志物(例如,分泌或以其它方式产生或存在于细胞外,例如在体液(诸如血液、尿液、泪液、唾液、脑脊液等)中。在一些实施方案中,术语是指基因表达产物,其特征在于特定肿瘤、肿瘤亚类、肿瘤阶段

等。可替代地或另外地,在一些实施方案中,特定标志物的存在或水平与例如可能是特定肿瘤类别的特征的特定信号传导途径的活性(或活性水平)相关。生物标志物的存在或不存在的统计显著性可根据特定的生物标志物而变化。在一些实施方案中,生物标志物的检测具有高度特异性,因为其反映了肿瘤具有特定亚类的高可能性。这种特异性可能以敏感性为代价(例如,即使肿瘤是预期表达生物标志物的肿瘤,也可能发生阴性结果)。在一些实施方案中,生物标志物可以是或包括IRF8生物标志物(例如,一种或多种IRF8基因组分或产品的存在、水平、形式和/或活性,包括例如IRF8超级增强子强度、序数等级或患病率等级和IRF8 mRNA水平或患病率等级)。在一些实施方案中,生物标志物可包括RARA生物标志物(例如,一种或多种RARA生物标志物(例如,一种或多种RARA基因组分或产品的存在、水平、形式和/或活性,包括例如RARA超级增强子强度、序数等级或患病率等级和RARA mRNA水平或患病率等级)。在一些实施方案中,生物标志物是指一种或多种生物标志物的组合,诸如IRF8和RARA。

[0063] 癌症:如本文所用,术语“癌症”是指恶性肿瘤或肿瘤(Stedman's Medical Dictionary,第25版;Hensly编;Williams&Wilkins:Philadelphia,1990)。术语“肿瘤(neoplasm)”和“肿瘤(tumor)”在本文中可互换使用,并且是指组织的异常团块,其中团块的生长超过正常组织的生长并且与正常组织的生长不协调。“恶性肿瘤”通常分化较差(退化发育)并且具有特征性的快速生长,伴随着周围组织的进行性浸润、侵袭和破坏。此外,恶性肿瘤通常具有转移至远端部位的能力。在一些实施方案中,癌症是任何恶性肿瘤或肿瘤,其中IRF8生物标志物与对RARA激动剂(诸如他米巴罗汀)的响应性相关。在一些实施方案中,癌症是急性髓细胞白血病(AML)。在一些实施方案中,癌症是非APL AML。

[0064] 组合疗法:如本文所用,术语“组合疗法”是指其中受试者同时暴露于两种或更多种治疗方案(例如,两种或更多种治疗剂)的那些情况。在一些实施方案中,两种或更多种药剂或可同时施用;在一些实施方案中,此类药剂可顺序施用;在一些实施方案中,此类药剂以重叠给药方案施用。在一些实施方案中,组合疗法的“施用”可包括向接受组合中的其它药剂的受试者施用一种或多种药剂。为清楚起见,组合疗法不要求单独的药剂在单一组合物中一起施用(或甚至必须同时施用),尽管在一些实施方案中,两种或更多种活性剂、实体或级分可在组合组合物中,或甚至在组合化合物(例如,作为单一化学络合物或共价实体的一部分)中一起施用。

[0065] 截止值:如本文所用,术语“截止”和“截止值”意指在测定中测量的值,其定义群体的两个子集(例如,响应者和无响应者)之间的分界线。因此,等于或高于截止值的值定义了群体的一个子集;并且低于截止值的值定义了群体的另一个子集。

[0066] 诊断信息:如本文所用,“诊断信息”或“用于诊断的信息”是用于确定患者是否患有疾病、病症或病状和/或用于将疾病、病症或病状分类为表型类别或对疾病、病症或病状的预后具有重要意义或可能响应于疾病、病症或病状的治疗(一般治疗或任何特定治疗)的任何类别的信息。类似地,“诊断”是指提供任何类型的诊断信息,包括但不限于受试者是否可能患有或发展疾病、病症或病状,受试者中表现出的疾病、病症或病状的状态、阶段或特征,与肿瘤的性质或分类有关的信息,与预后有关的信息和/或在选择适当治疗中有用的信息。治疗的选择可包括选择特定治疗剂或其它治疗模式(诸如手术、放射等)的选择、关于是否拒绝或提供治疗的选择、与给药方案有关的选择(例如,特定治疗剂或治疗剂组合的一种或多种剂量的频率或水平)等。

[0067] 剂型或单位剂型:本领域技术人员将理解术语“剂型”可用于指活性剂(例如治疗剂或诊断剂)物理上离散的单位以便向受试者施用。通常,每个这样的单位含有预定量的活性剂。在一些实施方案中,这样的量是适合于根据给药方案施用的单位剂量(或其整个部分),所述给药方案已被确定为当(即,用治疗给药方案)向相关群体施用时间与所需或有益的结果相关。本领域普通技术人员理解,向特定受试者施用的治疗组合物或药剂的总量由一名或多名主治医师确定,并且可包括施用多种剂型。

[0068] 给药方案:本领域技术人员将理解术语“给药方案”可用于指通常相隔多段时间来个别地向受试者施用的一组单位剂量(通常一个以上)。在一些实施方案中,给定治疗剂具有可涉及一个或多个剂量的推荐给药方案。在一些实施方案中,给药方案包括多个剂量,每个剂量在时间上与其它剂量分开。在一些实施方案中,多个剂量彼此按相同长度的时间段分开;在一些实施方案中,给药方案包括多个剂量和使单独剂量分开的至少两个不同的时间段。在一些实施方案中,给药方案内的所有剂量都具有相同单位给药量。在一些实施方案中,给药方案内的不同剂量具有不同量。在一些实施方案中,给药方案包括以第一给药量施用的第一剂量,随后是一个或多个以不同于所述第一给药量的第二给药量施用的另外剂量。在一些实施方案中,给药方案包括以第一给药量施用的第一剂量,随后是一个或多个以与所述第一给药量相同的第二给药量施用的另外剂量。在一些实施方案中,当在相关群体中施用时间,给药方案与所需或有益的结果相关(即,是治疗给药方案)。

[0069] 有效量:如本文所用,本文所述化合物(诸如式(I)的化合物)的“有效量”是指足以引发所需生物响应,即治疗所述病状的量。如本领域普通技术人员将理解的,本文所述化合物(诸如式(I)的化合物)的有效量可根据如所需生物学终点、化合物的药代动力学、待治疗的病状、施用模式、以及受试者的年龄和健康状况的此类因素而变化。有效量涵盖治疗和预防性治疗。例如,在治疗癌症中,有效量的本发明化合物可减轻肿瘤负荷或阻止肿瘤的生长或扩散。

[0070] 增强子:如本文所用,术语“增强子”是指基因组DNA区域,其用于调节距离高达1Mbp的基因。增强子可重叠,但经常不由基因编码区组成。增强子经常由转录因子结合并由特定的组蛋白标志物指定。

[0071] 水合物:如本文所用,术语“水合物”是指与水缔合的化合物。通常,化合物水合物中含有的水分子的数量与水合物中化合物分子的数量成一定比率。因此,化合物的水合物可例如由通式 $R \cdot x H_2O$ 表示,其中R是化合物并且其中x是大于0的数。给定的化合物可形成多于一种类型的水合物,包括例如一水合物(x是1)、低水合物(x是大于0且小于1的数,例如半水合物( $R \cdot 0.5H_2O$ ))和多水合物(x是大于1的数,例如二水合物( $R \cdot 2H_2O$ )和六水合物( $R \cdot 6H_2O$ ))。

[0072] IRF8基因:如本文所用,术语“IRF8基因”是指编码干扰素共有序列结合蛋白或其剪接变体的基因组DNA序列,并且特别地排除包含IRF8基因的全部或部分的基因融合体。在一些实施方案中,IRF8基因位于基因组构建hg19的chr16:85862582-85990086处。

[0073] “改进”“增加”或“减少”:如本文所用或其语法等价物,表示与参考测量值(诸如在起始本文所述的治疗之前的同一个体中的测量值,或在不存在本文所述的治疗时的对照个体(或多个对照个体)中的测量值)相关的值。在一些实施方案中,“对照个体”是患有与被治疗个体相同形式的疾病或损伤的个体。

[0074] 信使RNA转录物:如本文所用,术语“信使RNA转录物”或mRNA是指来自包括一个或多个基因编码区的DNA序列的RNA转录产物。

[0075] 序数等级:如本文所用,术语指定值的“序数等级”意指所述值与一组其它值相比的等级顺序。例如,与测试细胞中其它超级增强子相比,测试细胞中与RARA基因相关的超级增强子的强度方面的序数等级为100意味着测试细胞中的99个其它超级增强子具有比与RARA基因相关的超级增强子更大的强度。

[0076] 患者:如本文所用,术语“患者”或“受试者”是指向其施用或可向其施用所提供组合物的任何生物体,例如用于实验、诊断、预防、美容和/或治疗目的。典型患者包括动物(例如,哺乳动物诸如小鼠、大鼠、兔、非人灵长类动物和/或人)。在某些实施方案中,患者为人。人包括出生前和出生后形式。在一些实施方案中,患者患有或易患一种或多种病症或病状。在一些实施方案中,患者显示出病症或病状的一种或多种症状。在一些实施方案中,患者已被诊断为患有的一种或多种病症或病状。

[0077] 药学上可接受的盐:如本文所用,术语“药学上可接受的盐”是指那些盐在可靠的医疗判断范围内适合用于接触人和低级动物的组织而不具有异常的毒性、刺激性、过敏反应等,并且与合理的获益/风险比相对应。药学上可接受的盐在本领域中是熟知的。例如,Berge等在以引用方式并入本文的J.Pharmaceutical Sciences,1977,66,1-19中详细描述了药学上可接受的盐。本发明化合物的药学上可接受的盐包括那些由合适的无机和有机酸及碱所衍生的盐。药学上可接受的无毒酸加成盐的实例是氨基与无机酸(诸如盐酸、氢溴酸、磷酸、硫酸和高氯酸)或与有机酸(诸如乙酸、草酸、顺丁烯二酸、酒石酸、柠檬酸、丁二酸或丙二酸)或通过使用本领域中已知的其它方法(诸如离子交换)形成的盐。其它药学上可接受的盐包括己二酸盐、海藻酸盐、抗坏血酸盐、天冬氨酸盐、苯磺酸盐、苯甲酸盐、硫酸氢盐、硼酸盐、丁酸盐、樟脑酸盐、樟脑磺酸盐、柠檬酸盐、环戊烷丙酸盐、二葡萄糖酸盐、十二烷基硫酸盐、乙烷磺酸盐、甲酸盐、反丁烯二酸盐、葡庚糖酸盐、甘油磷酸盐、葡萄糖酸盐、半硫酸盐、庚酸盐、己酸盐、氢碘酸盐、2-羟基-乙烷磺酸盐、乳糖酸盐、乳酸盐、月桂酸盐、月桂基硫酸盐、苹果酸盐(MALATle)、顺丁烯二酸盐、丙二酸盐、甲烷磺酸盐、2-萘磺酸盐、烟碱酸盐、硝酸盐、油酸盐、草酸盐、棕榈酸盐、双羟萘酸盐(pamoate)、果胶酸盐(pectinate)、过硫酸盐、3-苯基丙酸盐、磷酸盐、苦味酸盐、特戊酸盐、丙酸盐、硬脂酸盐、丁二酸盐、硫酸盐、酒石酸盐、硫氰酸盐、对甲苯磺酸盐、十一酸盐、戊酸盐等。衍生自适合的碱的盐包括碱金属盐、碱土金属盐、铵盐和 $N^+(C_{1-4}\text{烷基})_4$ 盐。代表性碱金属或碱土金属盐包括钠、锂、钾、钙、镁等。适当时,其它药学上可接受的盐包括使用平衡离子,诸如卤离子、氢氧根、羧酸根、硫酸根、磷酸根、硝酸根、低烷基磺酸根和芳基磺酸根形成的无毒铵、季铵和胺阳离子。

[0078] 群体:如本文所用,术语“群体”或“样本群体”意指足够数量(例如,至少30、40、50或更多个)的不同样本,其合理地反映在较大组中测量的值的分布。样本群体中的每个样本可以是细胞系、从生物获得的生物样本(例如,活检或体液样本),或从异种移植物获得的样本(例如,通过植入细胞系或患者样本在小鼠中生长的肿瘤),其中每个样本来自患有相同疾病、病状或病症的生物或来自表现相同疾病、病状或病症的细胞系或异种移植物。

[0079] 患病率截止:如本文所用,术语“患病率截止”对于指定值(例如,与IRF8基因相关的超级增强子的强度)意指定义群体的两个子集(例如,响应者和无响应者)之间的分界线的患病率等级。因此,等于或高于(例如,较低百分比值)患病率截止的患病率等级定义所述

群体的一个子集;并且低于(例如,较高百分比值)患病率截止的患病率等级定义所述群体的另一个子集。

[0080] 患病率等级:如本文所用,术语“患病率等级”对于指定值(例如,与IRF8基因相关的超级增强子的强度)意指等于或大于所述特定值的群体的百分比。例如,对于测试细胞中与IRF8基因相关的超级增强子的强度,35%患病率等级意味着所述群体的35%具有其强度等于或大于测试细胞的IRF8基因增强子。

[0081] 预后和预测信息:如本文所用,术语“预后信息”和“预测信息”用于指在不存在或存在治疗时可用于指示疾病或病状病程的任何方面的任何信息。此类信息可包括但不限于患者的平均预期寿命、患者将在给定时间(例如,6个月、1年、5年等)内存活的可能性、患者将治愈疾病的可能性、患者的疾病将响应于特定疗法的可能性(其中响应可以多种方式中的任一种来定义)。预后和预测信息包含在广泛的诊断信息类别中。

[0082] 等级排序:如本文所用,术语“等级排序”意指从最高到最低或从最低到最高将值排序。

[0083] RARA基因:如本文所用,术语“RARA基因”是指编码功能性视黄酸受体- $\alpha$ 基因的基因组DNA序列,并且特别地排除包含RARA基因的全部或部分的基因融合体。在一些实施方案中,RARA基因位于基因组构建hg19的chr17:38458152-38516681处。

[0084] 参考:如本文所用,描述了相对于其进行比较的标准或对照。例如,在一些实施方案中,将感兴趣的药剂、动物、个体、群体、样本、序列或值与参考或对照试剂、动物、个体、群体、样本、序列或值进行比较。在一些实施方案中,基本上与感兴趣的测试或确定同时测试和/或确定参考或对照。在一些实施方案中,参考或对照是历史参考或对照,任选地体现在有形介质中。通常,如本领域技术人员所理解的,参考或对照在与评估下那些相当的条件或环境下确定或表征。当存在足够的相似性以证明依赖于和/或与特定可能的参考或对照进行比较时,本领域技术人员将理解。

[0085] 响应:如本文所用,对治疗的响应可指由于治疗而发生或与治疗相关的受试者病状的任何有益改变。这种改变可包括稳定病状(例如,预防在不存在治疗时可能发生的恶化)、改善病状的一种或多种症状、延迟其发作和/或降低其频率,和/或改善病状治愈的前景等。在一些情况下,响应可能是受试者的响应;在一些情况下,响应可能是肿瘤的反应。

[0086] 溶剂合物:如本文所用,术语“溶剂合物”是指通常通过溶剂分解反应与溶剂缔合的化合物的形式。这种物理缔合可包括氢键合。常规溶剂包括水、甲醇、乙醇、乙酸、DMSO、THF、乙醚等。本文所述的化合物(诸如式(I)的化合物)可例如以结晶形式制备,并且可以是溶剂化的。合适的溶剂合物包括药学上可接受的溶剂合物,并且还包括化学计量的溶剂合物和非化学计量的溶剂合物两者。在某些情况下,溶剂合物将能够分离,例如当一个或多个溶剂分子合并于结晶固体的晶格中时。“溶剂合物”涵盖溶液相和可分离的溶剂合物两者。代表性的溶剂合物包括水合物、乙醇化物(ethanolates)和甲醇化物(methanolates)。

[0087] 强度:如本文所用,术语“强度”,当提及增强子或超级增强子的一部分时,如本文所用,意指相对于分析的基因组DNA片段长度绘制的H3K27Ac或其它基因组标志物读数的曲线下面积。因此,“强度”是在定义选择测量的区域的碱基对的跨度上由测量给定碱基对处的标志物所得到的信号的积分。

[0088] 受试者:如本文所用,预期施用的“受试者”是人(例如,任何年龄组的男性或女性,



例如儿科受试者(例如,婴儿、儿童、青少年)或成人受试者(例如,年轻成人、中年成人或高龄成人)。

[0089] 超级增强子:如本文所用,术语“超级增强子”是指增强子的一个子集,其相对于特定细胞中其它增强子含有不成比例的组蛋白标志物和/或转录蛋白。因此,预测由超级增强子调节的基因对所述细胞的功能具有高度重要性。超级增强子通常通过基于强度并使用可用软件诸如ROSE([https://bitbucket.org/young\\_computation/rose](https://bitbucket.org/young_computation/rose))确定等级排序细胞中的所有增强子来确定,增强子的所述子集具有比细胞中的中值增强子显著更高的强度(参见例如,美国专利9,181,580,其以引用方式并入本文)。

[0090] 阈值:如本文所用,术语“阈值”和“阈值水平”意指定义群体的两个子集(例如,响应者和无响应者)之间的分界线的水平。阈值或阈值水平可以是患病率截止或截止值。

[0091] 治疗:如本文所用,术语“治疗(treatment)”、“治疗(treat)”和“治疗(treating)”是指本文所述的“病理状况”(例如,疾病、病症或病状,或其一种或多种体征或症状)的逆转、缓解、延迟其发作或抑制其进展。在一些实施方案中,“治疗(treatment)”、“治疗(treat)”和“治疗(treating)”需要已发展或已观察到疾病病症或病状的体征或症状。在其它实施方案中,治疗可在不存在疾病或病状的体征或症状时施用(例如,根据症状病史和/或根据遗传或其它易感因素)。在症状消退后也可继续治疗,例如以延迟或预防复发。

[0092] 如本文所用,术语“病状”、“疾病”和“病症”可互换使用。

## 具体实施方式

[0093] RARA和IRF8

[0094] 视黄酸受体亚型 $\alpha$ (RARA)是核激素受体,其在被拮抗剂未结合或结合时充当转录阻遏物,并且在激动剂结合状态下充当基因活化剂。RARA的天然配体是视黄酸,也称为全反式视黄酸(ATRA),其由维生素A产生。

[0095] 超级增强子(SE)是大的、高活性的染色质区域,其调节关键细胞身份基因,包括恶性细胞中的癌基因。使用基因控制平台,我们在60个原发性AML患者样本中鉴定了SE全基因组,以发现新的肿瘤脆弱性。在患者样本中表现出差异存在的SE中的一个与编码RARA的RARA基因相关。

[0096] 研究已表明,他米巴罗汀响应性与RARA超级增强子强度和mRNA水平之一或两者之间存在良好的相关性。然而,对于这些潜在RARA生物标志物中的每个,均存在其中他米巴罗汀响应性是混合的中间范围。本公开提供了帮助解决此类模糊的响应性结果的见解和技术,并提供了各种组合物和方法,其尤其可用于基于对他米巴罗汀疗法的可能响应表征、鉴定、选择或分层患者。例如,本公开提供了体现、定义和/或利用一种或多种IRF8生物标志物(例如,一种或多种IRF8基因组分或产物的存在、水平、形式和/或活性,包括例如IRF8超级增强子强度、序数等级、患病率等级或IRF8 mRNA水平)的技术,并证明了它们在癌症疗法中的有用性。

[0097] 使用先前分析了RARA增强子的强度和序数、RARA mRNA水平和对他米巴罗汀的响应性的各种AML细胞系和患者样本,我们寻找与对他米巴罗汀的响应性相关的另外生物标志物。发现干扰素响应因子8(IRF8)mRNA水平在相似的患者群体中如RARA一样被上调。IRF8是干扰素响应性转录因子,已知其对造血是至关重要的并且其信号传导丢失导致未成熟骨

髓细胞的异常扩增。在AML中,观察到IRF8过表达并且可能与不良临床结果相关。尽管存在这种上调,但当其处于SE驱动的抑制状态时,IRF8信号传导实际上受到抑制性转录因子和潜在RARA的损害。此外,干扰素- $\alpha$ 本身(IRF的上游信号传导配体)在AML中表现出前分化作用并且与RARA途径发生信号传导串扰。

[0098] 本公开描述了一组AML患者肿瘤样本和细胞系的全基因组表达和增强子水平分析,以检查IRF8基因增强子强度、IRF8 mRNA水平和对他米巴罗汀的敏感性的相关性。AML细胞系的组先前已进行了测试,并且示出其RARA激动剂他米巴罗汀的抗增殖作用的敏感性与RARA增强子强度和RARA mRNA水平两者之间的相关性。在本申请中,我们证明了在具有升高的RARA mRNA水平的AML细胞系和AML患者样本中IRF8 mRNA水平也升高了,并且IRF8 mRNA水平与对RARA激动剂(诸如他米巴罗汀)的响应性之间存在相关性。我们还证明了IRF8增强子强度(例如,与IRF8相关的超级增强子的存在)、IRF8 mRNA水平、RARA mRNA水平与对他米巴罗汀的响应性之间存在相关性。因此,IRF8增强子强度或IRF8 mRNA水平可单独使用,或与RARA增强子强度或RARA mRNA水平结合使用,以鉴定将响应于用RARA激动剂(诸如他米巴罗汀)治疗的患者。

#### [0099] IRF8和RARA超级增强子鉴定和阈值水平的测定

[0100] 增强子或超级增强子的鉴定可通过本领域已知的各种方法来实现,例如Cell 2013, 155, 934-947和PCT/US2013/066957中所述,这两篇文献均以引用方式并入本文。在一些实施方案中,通过从患者的癌症样本(例如,从活检)中获得细胞材料和DNA来实现超级增强子的鉴定。增强子测量的重要度量在两个维度中发生-在其上连续检测基因组标志物(例如H3K27Ac)的DNA的长度-以及沿着构成所述量值的DNA跨度的每个碱基对处的基因组标志物的编译发生率。由长度和量值分析的积分产生的曲线下面积(“AUC”)的测量确定了增强子的强度。其是相对于对照的IRF8或RARA超级增强子的强度,其在本发明的一个方面中用于确定受试者是否将响应于RARA激动剂(例如,他米巴罗汀)。鉴于本说明书,本领域技术人员将容易明白,如果在其上检测基因组标志物的DNA的长度对于IRF8或RARA和对照两者均是相同的,则IRF8或RARA超级增强子相对于对照的量值比率将等于强度,并且也可用于确定受试者是否将响应于RARA激动剂。在一些实施方案中,在与其它样本比较之前,将细胞中IRF8或RARA增强子的强度归一化。通过与同一细胞中已知包含在所有细胞中以相似水平存在的普遍存在的超级增强子或增强子的区域进行比较来实现标准化。这种普遍存在的超级增强子区域的一个实例是MALAT1超级增强子基因座(chr11:65263724-65266724)(基因组构建hg19)。

[0101] 已通过H3K27Ac ChIP-seq方法确定在chr17:38458152-38516681(基因组构建hg19)处存在与RARA基因相关的超级增强子基因座,并且在chr16:85862582-85990086(基因组构建hg19)处存在与IRF8基因相关的超级增强子基因座。

[0102] ChIP测序,也称为ChIP-seq,用于分析蛋白质与DNA的相互作用,ChIP-seq将染色质免疫沉淀(ChIP)与大规模平行DNA测序相结合,以鉴定DNA相关蛋白的结合位点。其可用于对任何感兴趣蛋白质的全局结合位点进行精确作图。先前,ChIP-on-chip是用于研究这些蛋白质-DNA关系的最常用技术。成功的ChIP-seq取决于许多因素,包括超声强度和缓冲液组成、抗体质量和细胞数量;参见例如,T.Furey,Nature Reviews Genetics 13, 840-852(2012年12月);M.L.Metzker,Nature Reviews Genetics 11,31-46(2010年1月);

以及P.J Park,Nature Reviews Genetics 10,669-680(2009年10月)。可用于使用ChIP-seq鉴定超级增强子的除H3K27Ac之外的基因组标志物包括P300、CBP、BRD2、BRD3、BRD4、介体复合物的组分(J Loven等,Cell,153(2):320-334,2013)、组蛋白3赖氨酸4单甲基化(H3K4me1)或其它组织特异性增强子结合转录因子(E Smith和A Shilatifard,Nat Struct Mol Biol,21(3):210-219,2014)(S Pott和Jason Lieb,Nature Genetics,47(1):8-12,2015)。

[0103] 在一些实施方案中,已存在细胞系或患者样本的整个基因组的H3K27Ac或其它标志物ChIP-seq数据超级增强子图。在一些实施方案中,可简单地确定在chr17:38458152-38516681(基因组构建hg19)基因座处此类图中的增强子或超级增强子的强度或序数等级是否等于或高于预定阈值水平。在一些实施方案中,可简单地确定在chr16:85862582-85990086(基因组构建hg19)基因座处此类图中的增强子或超级增强子的强度或序数等级是否等于或高于预定阈值水平。

[0104] 应理解,IRF8、RARA和MALAT1的特定染色体位置可针对不同基因组构建和/或针对不同细胞类型而不同。然而,鉴于本说明书,本领域技术人员可通过在此类其它基因组构建中定位对应于基因组构建hg 19中的RARA和/或MALAT1基因座的特定序列来确定此类不同位置。

[0105] 用于鉴定超级增强子的其它方法包括染色质免疫沉淀(JE Delmore等,Cell,146(6)904-917,2011)和芯片阵列(ChIP-芯片),以及染色质免疫沉淀随后是使用相同免疫沉淀的基因组标志物与chr17:38458152-38516681(基因组构建hg19)RARA基因座或chr16:85862582-85990086(基因组构建hg19)IRF8基因座杂交的寡核苷酸序列的qPCR(ChIP-qPCR)。在ChIP-芯片的情况下,通常通过由探针和输入测定样本的杂交产生的强度荧光检测信号,如同基于其它阵列的技术一样。对于ChIP-qPCR,将仅在嵌入PCR反应中生成的双链DNA后变为荧光的染料用于测量模板的扩增。

[0106] 在一些实施方案中,通过将测试细胞中的IRF8增强子强度与细胞样本群体中的对应IRF8强度进行比较来实现确定细胞是否具有等于或高于所需阈值水平的IRF8超级增强子强度,其中每个细胞样本获自反映待治疗的相同疾病的不同来源(例如,不同受试者、不同细胞系、不同异种移植)。在这些实施方案的一些方面,仅使用来自受试者的原发性肿瘤细胞样本来确定阈值水平。在这些实施方案的一些方面,已测试了群体中的至少一些样本将对特定RARA激动剂的响应性,以便建立:a)群体中样本响应于所述特定RARA激动剂的最低IRF8增强子强度(“最低响应者”);以及,任选地,b)群体中样本不响应于所述特定RARA激动剂的最高IRF8增强子强度(“最高无响应者”)。在这些实施方案中,设定IRF8增强子强度的截止(高于所述截止,测试细胞将被认为响应于所述特定RARA激动剂):i)等于或高达高于群体的最低响应者中IRF8增强子强度的5%;或ii)等于或高达高于群体的最高无响应者中IRF8增强子强度的5%;或iii)群体的最低响应者与最高无响应者的IRF8增强子强度之间的值。

[0107] 应理解,在以上实施方案中,并非必须测试群体中所有样本对RARA激动剂的响应性,但测量所有样本的IRF8增强子强度和/或IRF8 mRNA水平。在一些实施方案中,基于IRF8增强子强度将样本等级排序。用于建立所述截止的上述三种方法中的哪一种的选择将取决于群体的最低响应者与最高无响应者之间的IRF8增强子强度的差异以及目标是否是最小

化假阳性的数量或最小化遗漏潜在响应样本或受试者的机会。当最低响应者与最高无响应者之间的差异很大时(例如,当在IRF8增强子强度的等级排序中,存在许多样本未测试在最低响应者与最高无响应者之间的响应性时),所述截止通常被设定为等于或高达高于群体的最低响应者中IRF8增强子强度的5%。此截止最大化了潜在响应者的数量。当此差异很小时(例如,当在IRF8增强子强度的等级排序中,存在很少或没有样本未测试在最低响应者与最高无响应者之间的响应性时),所述截止通常被设定为最低响应者与最高无响应者的IRF8增强子强度之间的值。此截止最小化了假阳性的数量。当最高无响应者的IRF8增强子强度大于最低响应者时,所述截止值通常被设定为等于或高达高于群体的最高无响应者中IRF8增强子强度5%的值。此方法还最小化了假阳性的数量。

[0108] 在一些实施方案中,通过将测试细胞中的IRF8增强子强度的序数与细胞样本群体中的IRF8增强子强度的序数进行比较来实现确定细胞是否具有等于或高于所需阈值水平的IRF8超级增强子,其中每个细胞样本获自不同来源(例如,不同受试者、不同细胞系、不同异种移植体)。在这些实施方案中,已测试了群体中的至少一些样本将对特定RARA激动剂的响应性,以便建立:a)群体中样本响应于所述特定RARA激动剂的最低IRF8增强子强度序数(“最低序数响应者”);以及,任选地,b)群体中样本不响应于所述特定RARA激动剂的最高IRF8增强子强度序数“最高序数无响应者”)。在这些实施方案中,设定IRF8增强子强度序数的截止(高于所述截止,测试细胞将被认为响应于所述特定RARA激动剂):i)等于或高达高于群体的最低序数响应者中IRF8增强子强度序数的5%;或ii)等于或高达高于群体的最高序数无响应者中IRF8增强子强度序数的5%;或iii)群体的最低序数响应者与最高序数无响应者的IRF8增强子强度序数之间的值。

[0109] 应理解,在以上实施方案中,通常不需要测试群体中所有样本对RARA激动剂的响应性,但测量所有样本与同一样本中已建立的其它增强子相比的IRF8增强子强度和IRF8增强子强度的序数。序数通常通过测量细胞中所有其它增强子的强度并确定IRF8增强子与其它增强子相比在强度方面具有的等级(例如,序数)来获得。

[0110] 在一些实施方案中,基于IRF8增强子强度的序数将样本等级排序。使用上述三种方法中的哪一种以便建立所述截止的选择将取决于群体的最低序数响应者与最高序数无响应者之间的IRF8增强子强度的序数差异以及所述截止是否被设计用于最小化假阳性或最大化响应者的数量。当此差异很大时(例如,当在IRF8增强子强度的序数的等级排序中,存在许多样本未测试在最低序数响应者与最高序数无响应者之间的响应性时),所述截止通常被设定为等于或高达高于群体的最低序数响应者中IRF8增强子强度的序数的5%。当此差异很小时(例如,当在IRF8增强子强度的序数的等级排序中,存在很少或没有样本未测试在最低序数响应者与最高序数无响应者之间的响应性时),所述截止通常被设定为最低序数响应者与最高序数无响应者的IRF8增强子强度的序数之间的值。当最高序数无响应者的IRF8增强子强度大于最低响应者时,所述截止值通常被设定为等于或高达高于群体的最高序数无响应者中IRF8增强子强度的序数5%的值。

[0111] 在将测试细胞或样本与群体进行比较的一些实施方案中,将针对群体获得的截止值(例如,IRF8增强子强度或IRF8增强子序数)转换为患病率等级并且将所述截止表示为具有截止值或更高例如患病率截止的群体的百分比。不受理论束缚,申请人相信无论用于确定IRF8增强子强度的方法如何,测试样本的患病率等级将是相似的。因此,针对一个参数

(例如, IRF8增强子强度序数) 确定的患病率截止是便携的并且可应用于另一个参数(例如, IRF8 mRNA水平) 以确定所述另一个参数的截止值。这允许确定任何参数的截止值, 而不必通过实验确定这种参数的水平与对RARA激动剂的响应性之间的相关性。所有需要确定的是这样的其它参数的水平对应于群体中先前确定的患病率截止。

[0112] 在一些实施方案中, 可采用以上讨论的方法简单地确定来自受试者的患病细胞是否具有与IRF8基因相关的超级增强子。在这些实施方案中, IRF8相关的超级增强子的存在表明受试者将响应于RARA激动剂。在这些实施方案的一个方面, 当IRF8相关的增强子的强度等于或高于与MALAT-1相关的增强子时, 确定细胞具有与IRF8基因相关的超级增强子。在这些实施方案的替代方面, 当IRF8相关的增强子的强度比细胞中所有增强子的中值强度至少大10倍时, 确定细胞具有与IRF8基因相关的超级增强子。在这些实施方案的其它替代方面, 当在细胞中每个增强子的强度的等级排序图中, IRF8相关的增强子的强度高于其中切线的斜率是1的点时, 确定细胞具有与IRF8基因相关的超级增强子。

[0113] 在一些实施方案中, 可采用以上讨论的方法另外确定来自受试者的患病细胞是否表达与RARA基因相关的超级增强子, 其具有等于或高于预定阈值水平的强度、序数等级或患病率等级。在这些实施方案的一些方面, 确定: a) 患病细胞具有与IRF8基因相关的超级增强子(或者这种超级增强子具有等于或高于预定阈值水平的强度或序数等级; 或b) 患病细胞具有与RARA基因相关的超级增强子, 其具有等于或高于预定阈值水平的强度或序数等级, 表明受试者将响应于RARA激动剂。在这些实施方案的其它方面, 确定: a) 患病细胞具有与IRF8基因相关的超级增强子(或者这种超级增强子具有等于或高于预定阈值水平的强度或序数等级; 和b) 患病细胞具有与RARA基因相关的超级增强子, 其具有等于或高于预定阈值水平的强度或序数等级, 表明受试者将响应于RARA激动剂。

#### [0114] IRF8 mRNA水平测定

[0115] 在一些实施方案中, 可使用IRF8mRNA水平代替超级增强子强度或序数等级来确定对RARA激动剂的敏感性。可量化IRF8 mRNA并且其与所述基因座处的超级增强子强度非常相关(图10)。我们已确定编码IRF8的mRNA转录物与对RARA激动剂的敏感性相关(图8), 并且因此在一些实施方案中, IRF8 mRNA水平可用于鉴定将响应于RARA激动剂的细胞。

[0116] 在一些实施方案中, 评估一种或多种生物标志物(例如, 表观遗传标志物, 例如转录物水平) 的序列。在一些实施方案中, DNA测序可用于确定单个基因、较大遗传区域(例如基因或操纵子的簇)、完整染色体或整个基因组的序列。在一些实施方案中, 可使用RNA测序。本领域技术人员将理解可用于确定单个基因、较大遗传区域(例如基因或操纵子的簇)、完整染色体或整个基因组的序列的各种方法。在一些实施方案中, 可使用下一代测序。在一些实施方案中, 可使用下一代全基因组测序。在一些实施方案中, 可利用测序来量化转录物的水平。

[0117] 在一些实施方案中, 使用相同的测定法将受试者(例如, 肿瘤样本中、癌细胞样本中、血液样本中等) 中的IRF8 mRNA水平与具有相同疾病或病状的受试者群体中的IRF8 mRNA水平进行比较以鉴定RARA激动剂响应者。在这些实施方案中, 已测试了群体中的至少一些样本将对特定RARA激动剂的响应性, 以便建立: a) 群体中样本响应于所述特定RARA激动剂的最低IRF8 mRNA水平(“最低mRNA响应者”); 以及, 任选地, b) 群体中样本不响应于所述特定RARA激动剂的最高IRF8 mRNA水平(“最高mRNA无响应者”)。在这些实施方案中, 设定

IRF8 mRNA水平的截止(高于所述截止,测试细胞将被认为响应于所述特定RARA激动剂):i) 等于或高达高于群体的最低mRNA响应者中IRF8 mRNA水平的5%;或ii) 等于或高达高于群体的最高mRNA无响应者中IRF8 mRNA水平的5%;或iii) 群体的最低mRNA响应者与最高mRNA无响应者的IRF8 mRNA水平之间的值。

[0118] 在一些实施方案中,不需要测试群体中的所有样本对RARA激动剂的响应性,但测量所有样本的IRF8 mRNA水平。在一些实施方案中,基于IRF8 mRNA水平将样本等级排序。使用上述三种方法中的哪一种以建立所述截止的选择将取决于群体的最低mRNA响应者与最高mRNA无响应者之间的IRF8 mRNA水平的差异以及所述截止是否被设计用于最小化假阳性或最大化潜在响应者的数量。当此差异很大时(例如,当在IRF8 mRNA水平的等级排序中,存在许多样本未测试在最低mRNA响应者与最高mRNA无响应者之间的响应性时),所述截止通常被设定为等于或高达高于群体的最低mRNA响应者中IRF8 mRNA水平的5%。当此差异很小时(例如,当在IRF8 mRNA水平的等级排序中,存在很少或没有样本未测试在最低mRNA响应者与最高mRNA无响应者之间的响应性时),所述截止通常被设定为最低mRNA响应者与最高mRNA无响应者的IRF8 mRNA水平之间的值。当最高mRNA无响应者的IRF8 mRNA水平大于最低mRNA响应者时,所述截止值通常被设定为等于或高达高于群体的最高mRNA无响应者中IRF8 mRNA水平5%的值。

[0119] 在一些实施方案中,基于IRF8 mRNA水平将群体等级排序。在这些实施方案中,测量每个样本中的IRF8 mRNA水平,并与细胞中所有其它mRNA的mRNA水平进行比较,以获得IRF8 mRNA水平的序数等级。然后基于测试对RARA激动剂的响应性的群体中的样本,以与先前用于确定IRF8超级增强子强度序数截止相同的方式,确定基于IRF8 mRNA序数等级的截止。然后直接使用确定的IRF8 mRNA序数截止或确定患病率截止,接着将其中的任一个用于对另外的样本进行分层以得到对RARA激动剂的潜在响应性。

[0120] 在一些实施方案中,如上所述,使用基于IRF8增强子强度或IRF8增强子强度序数建立的患病率截止来确定IRF8 mRNA水平的截止。在这些实施方案的一些方面,测量群体的mRNA水平,并将先前确定的患病率截止应用于所述群体以确定mRNA截止水平。在这些实施方案的一些方面,产生群体中IRF8 mRNA水平的等级-顺序标准曲线,并将预定的患病率截止应用于所述标准曲线以确定IRF8 mRNA截止水平。

[0121] 在将测试细胞或样本与群体进行比较的实施方案的一些方面,将针对群体获得的截止mRNA水平值转换为患病率等级,并且将mRNA水平截止表示为具有截止值或更高例如患病率截止的群体的百分比。

[0122] 不受理论束缚,申请人相信无论用于确定IRF8 mRNA水平的方法如何,测试样本的患病率等级和群体中的患病率截止将是相似的。

[0123] 在这些实施方案的一些方面,如果受试者的IRF8 mRNA水平对应于如通过群体中IRF8 mRNA水平确定的约80%、79%、78%、77%、76%、75%、74%、73%、72%、71%、70%、69%、68%、67%、66%、65%、64%、63%、62%、61%、60%、59%、58%、57%、56%、55%、54%、43%、42%、51%、50%、49%、48%、47%、46%、45%、44%、43%、42%、41%、40%、39%、38%、37%、36%、35%、34%、33%、32%、31%、30%、29%、28%、27%、26%、25%、24%、23%、22%、21%或20%群体中的患病率等级,则将受试者鉴定为RARA激动剂响应者。在一些实施方案中,基于针对IRF8增强子强度建立的患病率截止建立截止值。在一些实施

方案中,基于针对IRF8增强子强度序数建立的患病率截止建立截止值。在一些实施方案中,基于IRF8 mRNA水平建立截止值。在一些实施方案中,基于针对IRF8增强子强度序数确定的患病率值建立AML、非APL AML或MDS患者的截止值,并且将所述患病率值用于确定IRF8 mRNA水平的截止值。在一些实施方案中,使用约20-45%之间(例如,约20-25%、25-30%、25-35%、25-40%、20-30%、20-35%、20-40%、20-45%、21-34%、22-34%、25-34%、21-25%、22-25%、23-25%、24-25%或21-22%之间)的患病率截止确定AML、非APL AML或MDS患者的截止值。在一些实施方案中,使用34%的患病率值确定AML、非APL AML或MDS患者的截止值。在一些实施方案中,使用25%的患病率值确定AML、非APL AML或MDS患者的截止值。在一些实施方案中,使用22%的患病率值确定AML、非APL AML或MDS患者的截止值。在一些实施方案中,使用21%的患病率值确定AML、非APL AML或MDS患者的截止值。

[0124] 在仍其它实施方案中,群体可被分成三组-响应者、部分响应者和无响应者,并且设定两个截止值或患病率截止。部分响应者组可包括响应者和无响应者,以及那些其对RARA激动剂的响应不如响应者组高的群体成员。在这些实施方案中,确定两个截止值或患病率截止。当在群体中最高IRF8 mRNA无响应者具有大于最低RARA mRNA响应者的IRF8 mRNA水平时,这种类型的分层可能特别有用。在这种情况下,将响应者与部分响应者之间的截止水平或患病率截止设定为等于或高达高于最高IRF8 mRNA无响应者的IRF8 mRNA水平的5%;并且将部分响应者与无响应者之间的截止水平或患病率截止设定为等于或高达低于最低IRF8 mRNA响应者的IRF8 mRNA水平的5%。确定部分响应者是否应施用RARA激动剂将取决于治疗医师的判断和/或管理机构的批准。

[0125] 量化细胞或生物样本中的特定RNA序列的方法是本领域已知的,并且包括但不限于荧光杂交,诸如在由NanoString Technologies提供的服务和产品中使用、基于阵列的技术(Affymetrix)、逆转录酶qPCR如使用SYBR®Green(Life Technologies)或TaqMan®技术(Life Technologies)、RNA测序(例如,RNA-seq)、RNA杂交和信号扩增,如与RNAScope®(Advanced Cell Diagnostics)或RNA印迹一起使用。

[0126] 在这些实施方案的一些方面,在比较之前,将测试细胞和对照细胞两者或群体的所有成员中的RNA转录物(mRNA或另一种RARA或IRF8转录物)水平归一化。标准化涉及通过与两种细胞中天然存在并以相同水平存在的另一种RNA转录物(例如,GADPH mRNA、18S RNA),或在超级增强子强度测定之前将其“掺入”每种细胞的样本中的固定水平的外源RNA比较,调整IRF8或RARA RNA转录物的确定水平(J Lovén等,Cell,151(3):476-82(2012);J Kanno等,BMC Genomics 7:64(2006);J Van de Peppel等,EMBO Rep 4:387-93(2003))。

[0127] 癌症和其它疾病

[0128] 本公开的方法可用于治疗任何癌症,其特征在于超级增强子与IRF8的缔合或IRF8mRNA水平等于或高于此类癌症中的阈值水平。超级增强子相关的IRF8基因在某些类型的癌症中可能比其它癌症更普遍。在一些实施方案中,超级增强子相关的IRF8基因在非APL AML和MDS中可能比其它癌症或癌前病状更普遍。

[0129] 在一些实施方案中,在本发明的方法中待治疗的疾病是癌症。在一些实施方案中,待治疗的疾病选自非APL AML和MDS。在一些实施方案中,待治疗的疾病是非APL AML和MDS,其不以涉及IRF8基因的染色体易位为特征。

[0130] 在一些实施方案中,待用RARA激动剂(例如,他米巴罗汀)治疗的受试者患有复发

或难治性非APL AML。如果受试者：a) 在第一循环诱导化学疗法后未表现出部分响应；或b) 在第二循环诱导化学疗法后未表现出完全响应；或c) 在常规化学疗法后复发；或d) 复发正在经历单一干细胞移植，则受试者被归类为患有复发或难治性非APL AML。

[0131] 在一些实施方案中，待用RARA激动剂（例如，他米巴罗汀）治疗的受试者患有难治性MDS。如果受试者：a) 被归类为具有高风险或中间-2MDS（如使用国际预后分期系统（“IPSS”）确定），并且在用降低甲基化试剂（例如阿扎胞苷、地西他滨）进行至少4个循环诱导治疗后未能实现任何血液学改善（如通过IWG 2006标准测量），或在完全或部分响应的任何持续时间后复发；或b) 被归类为IPSS中间-1或低风险MDS，并且是输血依赖性的或用红细胞生成刺激剂（ESA）治疗失败，则受试者被分类为患有难治性MDS。

[0132] 在其它实施方案中，待用RARA激动剂（例如，他米巴罗汀）治疗的受试者是年老的不健康的受试者。如本文所用的术语“年老的不健康”意指受试者是至少60岁的人，并且其由医师确定不是标准诱导疗法的候选者。

[0133] RARA激动剂

[0134] 用于治疗被鉴定为具有超级增强子水平的患者的RARA激动剂的选择可由本领域已知的任何RARA激动剂制成。优选地，在本发明方法中使用的RARA激动剂对RARA特异并且具有显著更小（至少小10倍、至少小100倍、小至少1,000倍、至少小10,000倍、至少100,000倍）的针对其它形式RaR（例如RaR- $\beta$ 和RaR- $\gamma$ ）的激动活性。

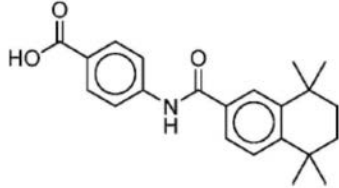
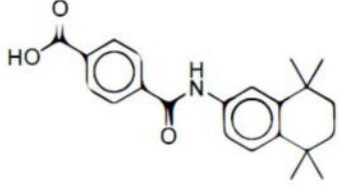
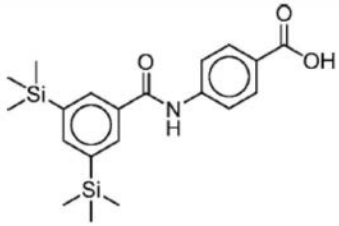
[0135] 在一些实施方案中，RARA激动剂选自以下美国专利中任一项公开的化合物或落入以下美国专利中任一项列出的属中的任何化合物：US 4,703,110、US 5,081,271、US 5,089,509、US 5,455,265、US 5,759,785、US 5,856,490、US 5,965,606、US 6,063,797、US 6,071,924、US 6,075,032、US 6,187,950、US 6,355,669、US 6,358,995和US 6,387,950，所述专利各自以引用方式并入。

[0136] 在一些实施方案中，RARA激动剂选自表1中列出的任何以下已知的RARA激动剂，或其药学上可接受的盐，或前述的溶剂合物或水合物：

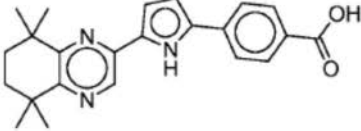
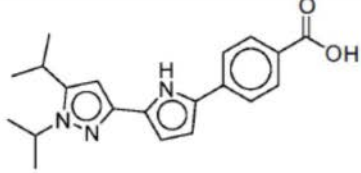
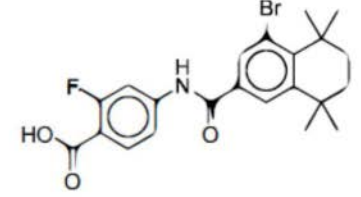
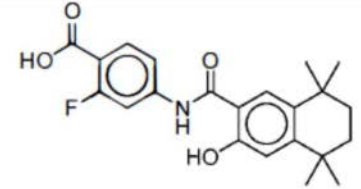
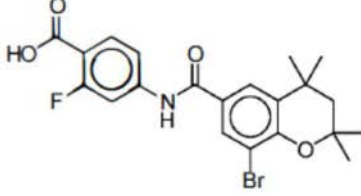
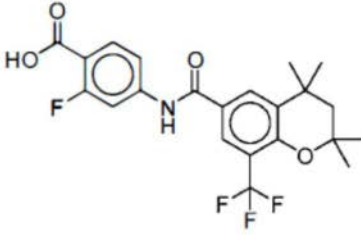
[0137] 表1. 可用于本发明的示例性RARA激动剂。



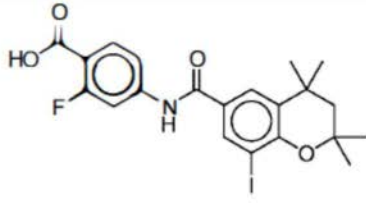
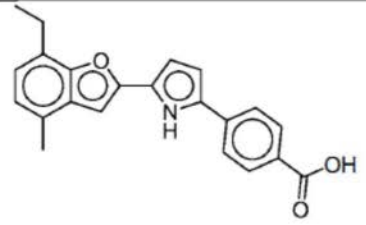
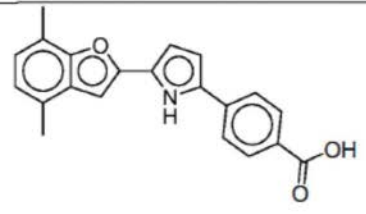
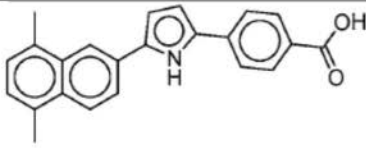
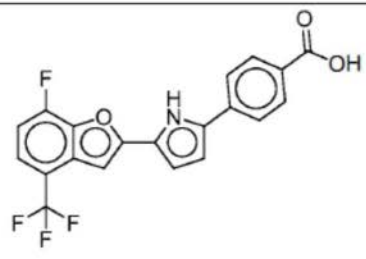
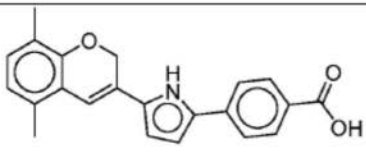
[0138]

结构	代码名称
	Am-580; CD-336; Ro-40-6055
	AM-80; INNO-507; NSC-608000; OMS-0728; TM-411; TOS-80; TOS-80T; Z-208; 他米巴罗汀
	Am-555S; TAC-101; amsilarotene

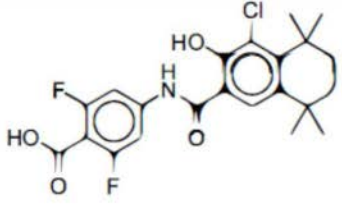
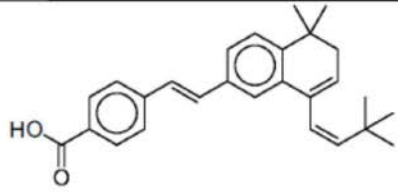
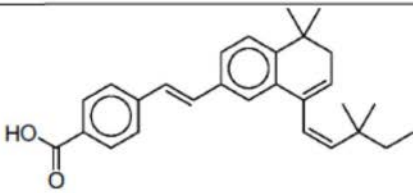
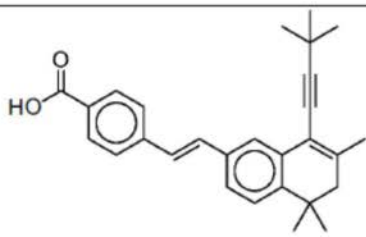
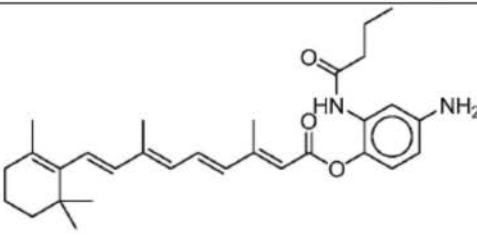
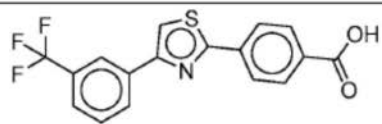
[0139]

结构	代码名称
	ER-34617
	ER-38930
	
	
	
	

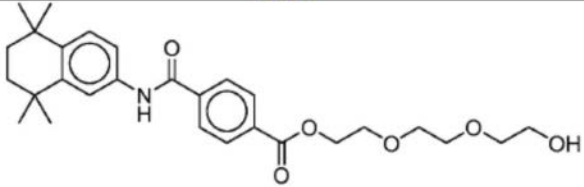
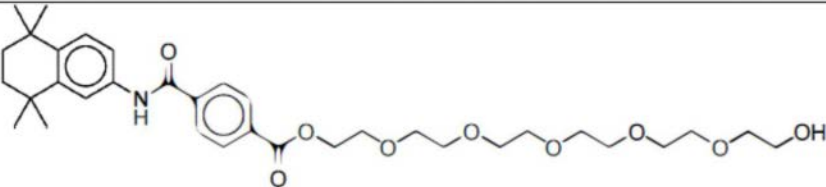
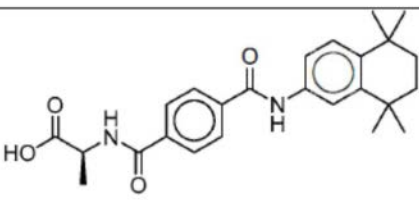
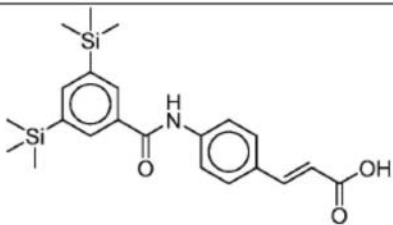
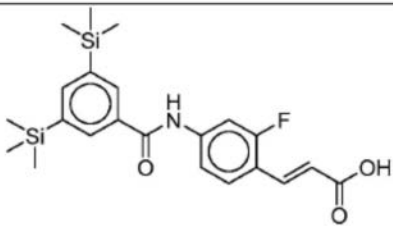
[0140]

结构	代码名称
	
	ER-65250
	ER-38925
	ER-35368
	E-6060
	ER-41666

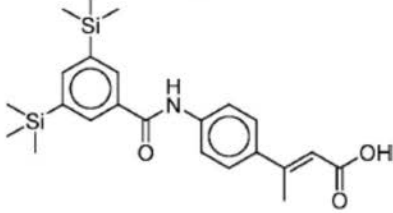
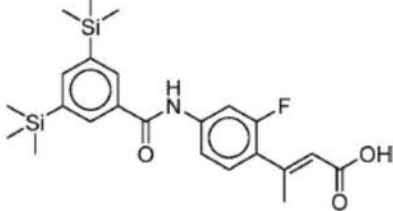
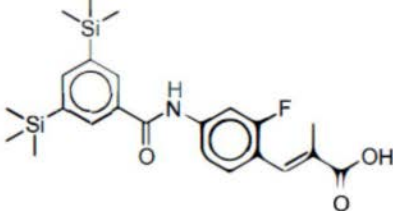
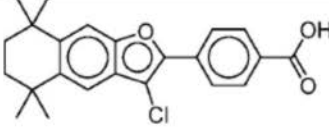
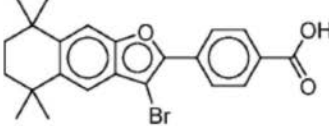
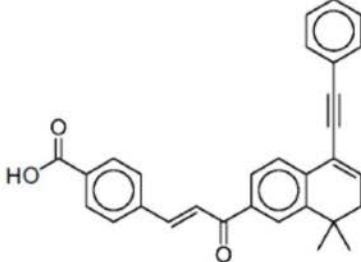
[0141]

结构	代码名称
	AGN-195183; NRX-195183; VTP-195183; VTP-5183  IRX-5183
	BMS-228987
	BMS-276393
	BMS-231974
	ABPN; CBG-41
	PTB

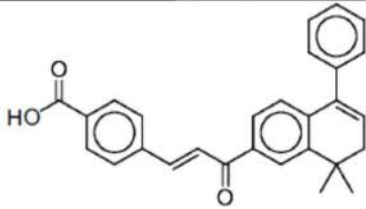
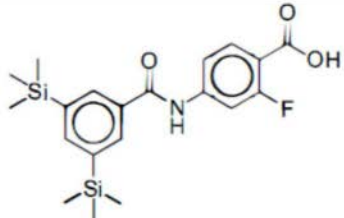
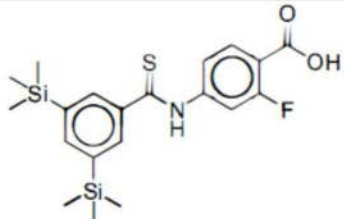
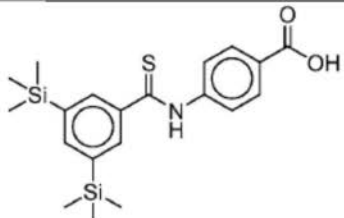
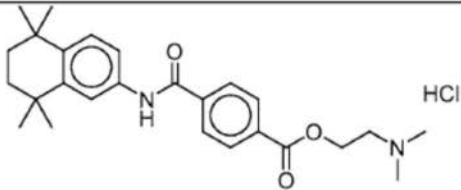
[0142]

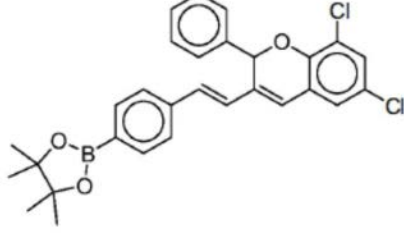
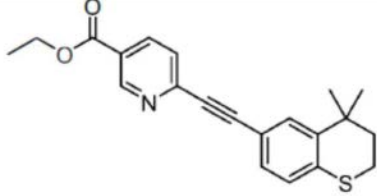
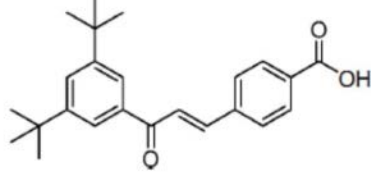
结构	代码名称
	
	
	
	
	

[0143]

结构	代码名称
	
	
	
	
	
	

[0144]

结构	代码名称
	
	
	
	
	A-112

	结构	代码名称
		BD-4; BJ-1
[0145]		他扎罗汀; AGN-190168
		Ch-55

[0146] 在一些实施方案中,RARA激动剂是他米巴罗汀。

[0147] 治疗方案

[0148] 标志物和表征

[0149] 在一些实施方案中,本公开提供的技术涉及评估患者所患癌症的类型。在一些实施方案中,患者患有非APL急性髓细胞白血病(AML)。在一些实施方案中,患者患有或骨髓增生异常综合征(MDS)。

[0150] 通常,本公开提供了根据其分析和/或评估受试者的一个或多个标志物或特征的技术;在一些实施方案中,基于这种分析和/或评估做出治疗决定。

[0151] 在一些实施方案中,标志物是其存在、形式、水平和/或活性在相关群体中与相关特征(例如,癌症的类型或阶段)相关的试剂或实体。在一些实施方案中,本公开考虑了与用RARA激动剂治疗非APL AML相关的一种或多种生物标志物的鉴定、分类和/或表征。在一些实施方案中,本公开考虑了与用RARA激动剂治疗MDS相关的一种或多种生物标志物的鉴定、分类和/或表征。

[0152] 在一些实施方案中,患有特定类型癌症的患者的分类可能涉及癌症阶段的评估。在一个实施方案中,患有特定类型癌症的患者的分类可能涉及评估患者的疾病负担(例如,癌细胞的数量、肿瘤的大小和/或体内癌症的量)。

[0153] 通常,可通过任何适当的测定根据本发明评估癌症的类型,如本领域普通技术人员将容易理解的。本领域已知多种癌症类型的测定,包括例如利用以下的那些:组织学评估(例如,活检样本)、成像(例如,磁共振成像(MRI)、正电子发射断层扫描(PET)、计算机断层扫描(CT)超声、内窥镜检查、x射线(例如,乳房X线照片、钡吞咽、panorex)、管腔造影或骨扫描。

[0154] 在一些实施方案中,RARA激动剂疗法包括评估指示非APL AML或MDS的阶段或形式的一种或多种生物标志物的水平。在一些实施方案中,RARA激动剂疗法包括评估IRF8 mRNA



水平和任选的RARA mRNA水平。在一些实施方案中,RARA激动剂疗法包括存在与IRF8基因相关的超级增强子,以及任选地与RARA基因相关的超级增强子的强度或序数等级。在一些实施方案中,RARA激动剂疗法包括评估IRF8 mRNA水平或与IRF8基因相关的超级增强子的存在,以及任选地RARA mRNA水平、与RARA基因相关的超级增强子的强度或序数等级。

[0155] 不受理论束缚,申请人相信仅具有CD34或CD117标志物之一的PBMC子集也可有效地用于确定IRF8 mRNA或超级增强子水平。此外,某些IRF8 mRNA分析技术,诸如RNAScope®,在分析之前不需要富集PBMC样本,因为这些技术基于使用特异性寡核苷酸杂交/扩增程序提供来自所需细胞的mRNA的分析富集。

[0156] 患者群体

[0157] 在一些实施方案中,如本文所述,将RARA激动剂疗法根据本公开向一个或多个患者(例如,患者群体)施用。

[0158] 在一些实施方案中,患者群体包括患有癌症的一个或多个受试者(例如,包括受试者或由受试者组成)。在一些实施方案中,患者群体包括患有非APL AML的一个或多个受试者。在一些实施方案中,患者群体包括患有MDS的一个或多个受试者。

[0159] 在一些实施方案中,患者群体包括接受过用于治疗癌症(例如,非APL AML或MDS)的先前疗法的一个或多个受试者(例如,包括受试者或由受试者组成)。在一些实施方案中,患者群体包括未接受过用于治疗癌症(例如,非APL AML或MDS)的先前疗法的一个或多个受试者(例如,包括受试者或由受试者组成)。在一些实施方案中,患者群体包括未接受过用于治疗非APL AML或MDS的先前疗法的患者或由其组成。

[0160] 在一些实施方案中,接受先前疗法的患者可能已接受了选自以下组成的组的先前疗法:化学疗法、免疫疗法、放射疗法、姑息治疗、手术及其组合。在一些实施方案中,患者已接受了移植。在一些实施方案中,患者已接受了标准细胞毒性化学疗法。在一些实施方案中,标准细胞毒性化学疗法包括阿糖胞苷和/或蒽环霉素。在一些实施方案中,标准细胞毒性化学疗法可包括另外的化学疗法和/或造血干细胞移植(HSTC)。在一些实施方案中,患者已接受了降低甲基化试剂。在一些实施方案中,患者已接受了来那度胺。

[0161] 在一些实施方案中,患者群体包括已接受和/或正在接受其它疗法的一个或多个受试者(例如,包括受试者或由受试者组成),例如,使得RARA激动剂疗法(例如,他米巴罗汀)组合物与其它疗法(例如,化学疗法药剂)组合施用。在一些实施方案中,此类其它疗法可包括以下或由以下组成:癌症(例如,如本文所述)、疼痛、恶心、便秘的疗法,用于治疗与癌症治疗相关的一种或多种副作用(例如,瘙痒、脱发、失眠等)的疗法等或其任何组合。本发明提供了一种治疗非APL AML或MDS的方法,其包括用治疗有效量的RARA激动剂疗法(例如,他米巴罗汀)或其药学上可接受的盐治疗被鉴定为患有非APL AML或MDS的患者。

[0162] 在一些实施方案中,本发明提供了一种预防或延迟非APL AML或MDS发作的方法,其包括向被鉴定为需要预防或延迟非APL AML或MDS发作的患者施用预防有效量的RARA激动剂疗法(例如,他米巴罗汀)或其药学上可接受的盐。

[0163] 在一些实施方案中,本发明提供了一种用于通过向患者施用治疗有效量的RARA激动剂疗法(例如,他米巴罗汀)或其药学上可接受的盐,治疗这种患者的先前用包括化学疗法的治疗方案治疗的非APL AML或MDS的方法。在一些实施方案中,本公开提供了一种用于治疗患者的非APL AML或MDS的方法,其中不存在标准疗法。在一些实施方案中,本公开提供

了一种用于治疗不适合标准疗法的患者的方法。

[0164] 在一些实施方案中,患者也可能患有与MDS相关的疾病,诸如骨髓衰竭、外周血血细胞减少以及贫血、感染或出血的相关并发症。在一些实施方案中,患者可能患有进展为AML的MDS。

[0165] 在一些实施方案中,患者或患者群体可能不是(例如,可排除)怀孕或可能怀孕的患者。在一些实施方案中,可在施用RARA激动剂疗法之前和/或期间监测患者或患者群体的怀孕、分娩和/或哺乳的一种或多种体征。在一些实施方案中,对于确定显示怀孕、分娩和/或哺乳的一种或多种体征的患者,可减少、暂停或终止RARA激动剂疗法。

[0166] 在一些实施方案中,患者或患者群体可能不是(例如,可排除)具有对他米巴罗汀成分过敏的先前病史的患者。在一些实施方案中,患者或患者群体可能不是(例如,可排除)正在接受维生素A制剂的患者。在一些实施方案中,患者或患者群体可能不是(例如,可排除)患有维生素A过多症的患者。

[0167] 在一些实施方案中,患者或患者群体可能不是(例如,可排除)老年患者。在一些实施方案中,患者或患者群体可以是或包括一个或多个老年患者。在一些实施方案中,与一个或多个较年轻的患者相比,可更频繁地监测老年患者以检测潜在的不良事件(包括例如,低水平的血清白蛋白和/或升高浓度的血浆中游离药物等)。在一些实施方案中,对于确定显示这种不良事件的一种或多种体征的老年患者,可减少、暂停和/或终止RARA激动剂疗法。

[0168] 在一些实施方案中,患者或患者群体可能不是(例如,可排除)儿科患者。在一些实施方案中,患者或患者群体可以是或包括一个或多个儿科患者。在一些实施方案中,与一个或多个较老的患者相比,可更频繁地监测儿科患者以检测潜在的不良事件(包括例如,增加的颅内压等)。在一些实施方案中,对于确定显示这种不良事件的一种或多种体征的儿科患者,可减少、暂停和/或终止RARA激动剂疗法。

[0169] 在一些实施方案中,如果并且当患者发展一种或多种不良反应,例如像头痛、皮疹、皮肤干燥、湿疹、剥脱性皮炎、骨痛、关节疼痛、发热、白细胞计数增加、血红蛋白减少、AST增加、ALT增加、LDH增加、ALP增加、TG增加、TC增加、folliculitis、毛囊炎、CRP增加及其组合时,则对于特定患者减少、暂停或终止根据本公开的RARA激动剂疗法。可替代地或另外地,在一些实施方案中,如果并且当患者发展一种或多种不良反应,例如像血栓形成(例如,脑梗塞、肺梗塞、动脉血栓形成、静脉血栓形成等)、血管炎、谵妄、中毒性表皮坏死(莱尔氏综合征(Lyell syndrome))、多形性红斑,颅内压增高及其组合时,则对于特定患者减少、暂停或终止根据本公开的RARA激动剂疗法。

[0170] 在一些实施方案中,本发明提供了化合物(例如,他米巴罗汀)或其药学上可接受的盐在制造用于治疗、预防或延迟非APL AML或MDS发作的药物方面的用途。在一些实施方案中,患者患有癌症(例如,非APL AML或MDS)。在一些实施方案中,患者患有对其它疗法(例如,化学疗法)具有抗性的癌症(例如,非APL AML或MDS)。在一些实施方案中,确定所述癌症具有IRF8生物标志物,其中IRF8生物标志物是或包括表达升高的IRF8 mRNA水平或与IRF8基因相关的超级增强子中的一个或多个。在一些实施方案中,确定癌症表达升高的RARA mRNA水平或与RARA基因相关的超级增强子或更多。在一些实施方案中,确定癌症不表达升高的RARA mRNA水平或与RARA基因相关的超级增强子或更多。

[0171] 剂型和给药方案

[0172] 通常,根据本发明使用的每种活性剂(例如,他米巴罗汀)使用符合良好医疗实践且适合于相关药剂和受试者的药物组合物和给药方案,以治疗有效量被配制、给药和施用。原则上,治疗组合物可通过本领域已知的任何适当方法施用,包括但不限于口服、粘膜、通过吸入、局部、颊面、鼻腔、直肠或肠胃外(例如,静脉内、输注、瘤内、结节内、皮下、腹膜内、肌肉内、皮内、透皮或其它种类的施用)。在一些实施方案中,将口服施用RARA激动剂(例如,他米巴罗汀)。

[0173] 在一些实施方案中,特定活性剂的给药方案可涉及间歇或连续施用,例如以在正在接受疗法的受试者中,在一种或多种感兴趣的组织或体液中实现特定的所需药代动力学特征或其它暴露模式。

[0174] 在一些实施方案中,组合施用的不同药剂可通过不同的递送途径和/或根据不同的计划施用。可替代地或另外地,在一些实施方案中,一种或多种剂量的第一活性剂基本上与一种或多种其它活性剂同时施用,并且在一些实施方案中通过共同途径和/或作为单一组合物的一部分与一种或多种其它活性剂同时施用。

[0175] 在优化给定治疗方案的途径和/或给药计划时待考虑的因素可包括,例如,正在治疗的特定适应症、受试者的临床状况(例如,年龄、总体健康、接受的先前疗法和/或其响应等)、药剂的递送部位、药剂的性质、药剂的施用模式和/或途径、组合疗法的存在或不存在,以及医学从业者已知的其它因素。例如,在癌症的治疗中,待治疗的适应症的相关特征尤其可包括癌症类型、阶段、位置等中的一个或多个。

[0176] 在一些实施方案中,特定药物组合物和/或所用剂量方案的一个或多个特征可随时间修改(例如,增加或减少任何个体剂量中活性物质的量、增加或减少剂量之间的时间间隔),例如以便优化所需的治疗效果或响应。

[0177] 通常,根据本发明的活性剂给药的类型、量和频率取决于当向哺乳动物,优选人施用相关药剂时适用的安全性和功效要求。通常,选择给药的此类特征以提供与不存在疗法时观察到的特征相比的特定且通常可检测的治疗响应。在一些实施方案中,将连续施用RARA激动剂(例如,他米巴罗汀)。

[0178] 在本发明的上下文中,示例性所需的治疗响应可包括但不限于抑制和/或减少肿瘤生长、肿瘤大小、转移、与肿瘤相关的一种或多种症状和副作用,以及肿瘤细胞的凋亡增加、一种或多种细胞标志物或循环标志物等的治疗相关的减少或增加。可通过文献中公开的多种免疫学、细胞学和其它方法中的任一种容易地评估此类标准。

[0179] 在一些实施方案中,可能需要定制给药方案,并且特别是基于诱导型标志物的时间和/或阈值表达水平来设计顺序给药方案,无论是对于特定类型的肿瘤、特定肿瘤、特定患者群体(例如,携带遗传标志物)和/或特定患者。在一些此类实施方案中,治疗给药方案可根据在疗法之前和/或期间评估一种或多种诱导型标志物的表达的检测方法进行组合或调整。

[0180] 在一些实施方案中,RARA激动剂(例如,他米巴罗汀)疗法方案包含约 $1\text{mg}/\text{m}^2$ 、 $2\text{mg}/\text{m}^2$ 、 $3\text{mg}/\text{m}^2$ 、 $4\text{mg}/\text{m}^2$ 、 $5\text{mg}/\text{m}^2$ 、 $6\text{mg}/\text{m}^2$ 、 $7\text{mg}/\text{m}^2$ 、 $8\text{mg}/\text{m}^2$ 、 $9\text{mg}/\text{m}^2$ 、 $10\text{mg}/\text{m}^2$ 、 $11\text{mg}/\text{m}^2$ 、 $12\text{mg}/\text{m}^2$ 、 $13\text{mg}/\text{m}^2$ 、 $14\text{mg}/\text{m}^2$ 、 $15\text{mg}/\text{m}^2$ 、 $16\text{mg}/\text{m}^2$ 的至少一个(或包括或恰好由其组成)剂量或这些值中任两个之间的剂量的他米巴罗汀。在一些实施方案中,他米巴罗汀疗法方案包含 $6\text{mg}/\text{m}^2$ 的剂量。在一些实施方案中,他米巴罗汀疗法方案包含 $4\text{mg}/\text{m}^2$ 的剂量。在一些实施方案中,他米巴罗汀

疗法方案包含 $2\text{mg}/\text{m}^2$ 的剂量。在一些实施方案中,他米巴罗汀疗法方案包含 $1\text{mg}/\text{m}^2$ 的剂量。

[0181] 在一些实施方案中,RARA激动剂(例如,他米巴罗汀)疗法方案包含多个剂量的他米巴罗汀组合物。在一些此类实施方案中,他米巴罗汀疗法方案包含例如2、5、10、20、30、60、90、180、365个剂量或这些值中任两个之间的多个剂量和/或包含重复的剂量模式(例如,两个日剂量的至少一个循环,所述循环可重复,任选地具有一段时间替代施用,或任选地不施用,从而分开不同的循环)。在一些实施方案中,他米巴罗汀疗法方案每天施用两次。在一些实施方案中,他米巴罗汀疗法方案每天施用一次。在一些实施方案中,他米巴罗汀疗法方案包含 $6\text{mg}/\text{m}^2$ 的总剂量,划分为每日两次口服给药。

[0182] 在一些实施方案中,可将RARA激动剂(例如,他米巴罗汀)疗法方案向已知在施用之前、期间或之后消耗或未消耗一定量食物的受试者或患者群体施用。关于食物摄取的术语“施用之前”和“施用之后”可指在施用之前或之后约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、14、16、18、20、22、24、30、42或72小时或更长时间的时间段。在一些实施方案中,术语“关于食物摄取施用...”意味着受试者或患者群体在施用之前消费食物(例如,进食状态)。在一些实施方案中,术语“关于食物摄取施用...”意味着受试者或患者群体在施用之后消费食物。在一些实施方案中,术语“关于食物摄取施用...”意味着受试者或患者群体在施用期间消费食物。可替代地,在一些实施方案中,术语“关于食物摄取施用...”意指受试者或患者群体在施用期间处于禁食状态下。

[0183] 在一些实施方案中,食物摄取包括高脂肪食物或高脂肪饮食。在一些实施方案中,将RARA激动剂(例如,他米巴罗汀)疗法方案向处于禁食状态下的受试者施用。一些实施方案中,将RARA激动剂(例如,他米巴罗汀)疗法方案向处于进食状态下的受试者施用。

[0184] 制剂

[0185] 药物组合物,如本文所用,是指化合物(诸如他米巴罗汀)与其它化学成分(诸如载剂、稳定剂、稀释剂、分散剂、悬浮剂、增稠剂和/或赋形剂)的混合物。药物组合物有助于向生物体施用所述化合物。含有化合物的药物组合物可通过本领域已知的任何常规形式和途径(包括但不限于:静脉内、口服、直肠、气雾剂、肠胃外、眼、肺、透皮、阴道、耳、鼻、鼻腔和局部施用)以治疗有效量施用。

[0186] 可以局部而非全身方式施用化合物,例如,通过经常以长效或缓释制剂形式,将化合物直接注射到器官中。此外,可在靶向药物递送系统中,例如,在涂有器官特异性抗体的脂质体中施用含有化合物的药物组合物。脂质体将被靶向并被器官选择性地吸收。此外,含有化合物的药物组合物可以快速释放制剂的形式、以延长释放制剂的形式或以中间释放制剂的形式被提供。在一些实施方案中,延长释放制剂释放化合物超过1小时、超过2小时、超过3小时、超过4小时、超过6小时、超过12小时、超过24小时或更长时间。在一些实施方案中,延长释放制剂以稳定速率释放化合物超过1小时、超过2小时、超过3小时、超过4小时、超过6小时、超过12小时、超过24小时或更长时间。

[0187] 对于口服施用,可通过将活性化合物与本领域熟知的药学上可接受的载剂或赋形剂组合来容易地配制化合物。此类载剂允许本文所述的化合物被配制成用于由待治疗受试者口服摄取的片剂、粉剂、丸剂、糖衣剂、胶囊剂、液体、凝胶、糖浆、酏剂、浆液、混悬剂等。通常,赋形剂诸如填充剂、崩解剂、助流剂、表面活性剂、重结晶抑制剂、润滑剂、颜料、粘合剂、调味剂等可用于常规目的并且以通常的量使用而不影响组合物的特性。在一些实施方案

中,赋形剂是乳糖水合物、玉米淀粉、羟丙基纤维素和/或硬脂酸镁中的一种或多种。在一些实施方案中,他米巴罗汀可与乳糖水合物、玉米淀粉、羟丙基纤维素和/或硬脂酸镁中的一种或多种一起配制。

[0188] 他米巴罗汀的可接受制剂的鉴定可通过本领域已知的各种方法实现,例如US20100048708中所述,其以引用方式并入本文。

[0189] 组合疗法

[0190] 阅读本公开的本领域普通技术人员将容易理解,如本文所述,RARA激动剂(例如,他米巴罗汀)在某些实施方案中可与其它抗癌疗法组合,包括例如施用化学治疗剂、其它免疫调节剂、放射疗法、高频超声疗法、手术、FDA批准的治疗癌症的疗法等。

[0191] 在一些实施方案中,RARA激动剂与一种或多种其它治疗剂或方式组合使用。在一些实施方案中,所述一种或多种其它治疗剂或模式也是抗癌剂或模式;在一些实施方案中,所述组合在治疗癌症中显示出协同效应。

[0192] 在治疗癌症中显示出治疗功效的已知化合物或治疗可包括,例如,一种或多种烷化剂、抗代谢物、抗微管剂、拓扑异构酶抑制剂、细胞毒性抗生素、血管生成抑制剂、免疫调节剂、疫苗、基于细胞的疗法、器官移植、放射疗法、手术等。

[0193] 在一些实施方案中,RARA激动剂(和/或与其组合的其它疗法)可与一种或多种姑息(例如,止痛、抗恶心、抗呕吐等)疗法组合,特别是当缓解已知与相关癌症,或与特定癌症患者易感或特定癌症患者所患的另一种疾病、病症或病状相关的一种或多种症状时。

[0194] 在一些实施方案中,组合使用的药剂根据其被批准用于个体使用的给药方案施用。然而,在一些实施方案中,与RARA激动剂(例如,他米巴罗汀)组合允许根据涉及与在没有RARA激动剂(例如,他米巴罗汀)的情况下施用药剂时所使用相比的一种或多种较低和/或较小频率的剂量,和/或减少的循环次数的给药方案施用另一种药剂。可替代地或另外地,在一些实施方案中,适当的给药方案涉及与在没有RARA激动剂(例如,他米巴罗汀)的情况下施用药剂时所使用相比的更高和/或更频繁的剂量,和/或增加的循环次数。

[0195] 在一些实施方案中,同时施用一个或多个剂量的组合施用的药剂;在一些此类实施方案中,药剂可在相同的组合物中施用。然而,更常见的是,药剂以不同的组合物和/或在不同的时间施用。在一些实施方案中,他米巴罗汀与其它治疗剂(例如,化学疗法)顺序和/或同时施用。

[0196] 在一些实施方案中,本文公开的组合疗法仅在受试者具有等于或高于阈值的RARA mRNA水平的情况下施用。在一些实施方案中,本文公开的组合疗法仅在受试者具有等于或高于阈值的IRF8 mRNA水平的情况下施用。在一些实施方案中,本文公开的组合疗法仅向RARA mRNA水平等于或高于阈值且IRF8 mRNA水平等于或高于阈值的受试者施用。在任何这些实施方案的一些方面,受试者患有非APL AML。

[0197] 在一些实施方案中,与RARA激动剂(例如他米巴罗汀)组合的治疗剂选自DNA甲基转移酶抑制剂、DNA合酶抑制剂、拓扑异构酶抑制剂、FLT3抑制剂、叶酸抑制剂、BRD4抑制剂、Zn指转录因子抑制剂、GCR抑制剂、CDK7抑制剂、HDAC抑制剂、JMJD3/JARID1B抑制剂或EZH2抑制剂。在其它具体方面,第二药剂选自LSD1抑制剂、蛋白酶体抑制剂、DNA损伤修复抑制剂、PARP抑制剂、mTOR抑制剂、DOT1L抑制剂、微管蛋白抑制剂、PLK抑制剂或Aurora激酶抑制剂。

[0198] 在一些实施方案中,RARA激动剂(例如,他米巴罗汀)可与地西他滨、阿扎胞苷、ara-C、柔红霉素、伊达比星、三氧化二砷和/或FLT3抑制剂一起施用。在一些实施方案中,RARA激动剂(例如,他米巴罗汀)可与IDH抑制剂、BRD4抑制剂(例如JQ1)、HDAC抑制剂(例如SAHA和MC1568)、HMT抑制剂(例如EPZ6438、UNC0638、SGC707、EPZ5676、UNC037和PFI-2)和/或KDM抑制剂(例如GSKJ4、RN-1和GSK-LSD1)一起施用。

[0199] 在一些实施方案中,受试者患有AML,并且他米巴罗汀与选自以下的第二药剂组合施用:氮杂胞苷、三氧化二砷、米哌妥林(仅在那些以高FLT3mRNA水平为特征的AML受试者中)、阿糖胞苷、柔红霉素、甲氨蝶呤、伊达比星、索拉非尼(仅在那些以高FLT3mRNA水平为特征的AML受试者中)、地西他滨、奎扎替尼(仅在那些以高FLT3mRNA水平为特征的AML受试者中)、JQ1(BRD4抑制剂)、ATO、泼尼松(仅在那些以高GCR mRNA水平为特征的AML受试者中)、SAHA和GSKJ4(仅在那些以高JMJD3/JARID1B mRNA水平为特征的AML受试者中)。

#### [0200] 试剂盒

[0201] 可在试剂盒中提供包含一种或多种用于检测一种或多种IRF8生物标志物的试剂的试剂盒。在一些情况下,所述试剂盒包括本发明的封装药物组合物,其包含书面插入物或标签,其具有在患有癌症的受试者中使用RARA激动剂(例如,他米巴罗汀)的说明,确定具有与IRF8基因相关的超级增强子,所述IRF8基因具有强度,或序数等级等于或高于阈值水平,或IRF8 mRNA水平等于或高于参考(例如,阈值水平)。如以上详细描述,阈值水平在来自诊断为患有相同疾病的受试者或与所述药物组合物指示用于治疗的疾病相同的疾病的细胞系或异种移植模型的样本群体中确定。说明书可粘附或以其它方式附着到包含RARA激动剂的容器。可替代地,说明书和包含RARA激动剂的容器将彼此分开,但在单个试剂盒、包装、盒子或其它类型的容器中一起存在。

[0202] 试剂盒中的说明书通常将由批准RARA激动剂的治疗用途的政府机构强制要求或推荐。说明书可包括确定超级增强子是否与IRF8基因相关的特定方法,以及用于确定与IRF8基因相关的增强子是否是超级增强子的量化方法、用于确定IRF8 mRNA水平的量化方法;和/或此时推荐使用包装的RARA激动剂治疗和/或假定其治疗有效的超级增强子或IRF8 mRNA的阈值水平。在一些方面,说明书指示将组合物向其IRF8 mRNA水平落入已测量了其IRF8 mRNA水平的群体的至少第30个百分位的受试者施用。在这些实施方案的一些方面,如果受试者的IRF8 mRNA水平患病率等级为已测量了其IRF8 mRNA水平的群体的约80%、79%、78%、77%、76%、75%、74%、73%、72%、71%、70%、69%、68%、67%、66%、65%、64%、63%、62%、61%、60%、59%、58%、57%、56%、55%、54%、43%、42%、51%、50%、49%、48%、47%、46%、45%、44%、43%、42%、41%、40%、39%、38%、37%、36%、35%、34%、33%、32%、31%、30%、29%、28%、27%、26%、25%、24%、23%、22%、21%或20%,则将所述受试者鉴定为RARA激动剂响应者。在一些方面,说明书指示将组合物施向其IRF8 mRNA水平如通过特定测定法测量的受试者。

[0203] 说明书可任选地包括给药信息、批准用RARA激动剂治疗的癌症类型、关于RARA激动剂的物理化学信息;关于RARA激动剂的药代动力学信息、药物-药物相互作用信息。在一些实施方案中,说明书指示将组合物向诊断为患有AML的受试者施用。在一些实施方案中,说明书指示将组合物向诊断为患有非APL AML的受试者施用。在一些方面,说明书指示将组合物向诊断为患有MDS的受试者施用。在一些方面,药物组合物包含他米巴罗汀。

[0204] 实施例

[0205] 为了可更全面地理解本文所述的发明,提出了以下实施例。提供本申请中描述的合成和生物实施例以说明本文提供的化合物、药物组合物和方法,并且不应以任何方式解释为限制其范围。

[0206] 实施例1:非APL AML细胞系中的IRF8 mRNA水平与对RARA激动剂的响应性相关

[0207] 我们先前测试了几种AML细胞系对他米巴罗汀的敏感性,并且证明了所述敏感性与RARA超级增强子强度、RARA超级增强子强度序数和RARA mRNA水平中的每个均非常相关。这是如下所述完成的。

[0208] 在实验当天,使用Accumax (EMD Millipore) 将细胞匀浆、计数,并且在适当的生长培养基中调节至60,000个细胞/mL。使用Biotek EL406,将50 $\mu$ l细胞分配到白色(ATPlite)或黑色(CyQuant) 384孔板(Thermo)中。将细胞放回37 $^{\circ}$ C培养箱中以使其粘附。三小时后,使用Janus工作站上的20nl 384孔销转移歧管将化合物添加到板中。将原液在384孔复合板中的DMSO原液中以10点一式四份剂量响应排列。加入化合物后,将板在37 $^{\circ}$ C培养箱中温育5或10天。

[0209] 使用ATPlite (Perkin Elmer) 或CyQuant (Life Technologies) 读出细胞活力。对于ATPlite,将板从培养箱中取出并在使用之前升至室温。将ATPlite试剂的冻干粉末重悬于裂解缓冲液中并用蒸馏水1:2稀释。使用Biotek液体处理器将25 $\mu$ L所述溶液加入到每个孔中。将板在室温下温育15分钟,然后在Envision Plate Reader (Perkin Elmer) 上读取发光信号。对于CyQuant,按照制造商的说明在PBS (Gibco) 中混合试剂。使用多通道移液管添加试剂,并在Envision Plate Reader (Perkin Elmer) 上读出之前在培养箱中更换板30分钟。

[0210] 存储如所述获取的数据并在Microsoft Excel中分组,并使用GraphPad Prism软件进行分析。曲线拟合以计算 $EC_{50}$ 和 $E_{max}$ 在GraphPad Prism 6.0版中使用四个参数(不假设Hill斜率等于1)非线性回归进行,其中当归一化至包含在板上的仅DMSO处理的孔时,化合物浓度的log<sub>10</sub>转化数据相对于细胞的活力百分比作图。边缘孔被排除。

[0211] 我们使用Affymetrix GeneChip<sup>®</sup> PrimeView<sup>™</sup>人基因表达阵列来初步检查这些AML细胞系中的7个(对他米巴罗汀敏感的4个-NOMO-1、OCI-AML3、MV-4-11和Sig-M5;以及3个不敏感的-KG1a、OCI-M1和Kasumi-1)用于可能在他米巴罗汀敏感细胞系中特异性升高的其它mRNA,并鉴定出IRF8 mRNA作为潜在候选物。然后通过进行如下所述的RNA-seq分析,在先前的7个AML细胞系以及测试了对他米巴罗汀的敏感性的几种其它AML细胞系的每个中量化IRF8 mRNA水平。前7个细胞系的结果如图1所示。有趣的是,NOMO-1没有高RARA mRNA水平,但响应于他米巴罗汀。NOMO-1具有升高的IRF8 mRNA水平的事实有助于澄清这种看似不一致性,并进一步验证了使用IRF8 mRNA水平来预测对他米巴罗汀的响应性。

[0212] RNA制备:将细胞悬浮液转移至微量离心管中并用1mL PBS洗涤。将细胞沉淀物重悬于200 $\mu$ L TRIzol中。加入20 $\mu$ L来自Ambion miRvana miRNA分离试剂盒(AM1561)的miRNA匀浆添加剂,混合并在冰上温育10分钟。加入20 $\mu$ L溴氯丙烷、混合、在室温下温育5分钟,并在4 $^{\circ}$ C下以12,000x g离心10分钟。将62 $\mu$ L水相加入到78 $\mu$ L乙醇中并转移至过滤柱中。根据Ambion的总RNA分离方案继续分离。在生物分析仪上测试样本的质量控制,并且然后将其送至Whitehead测序中心(Cambridge,MA)进行测序。

[0213] RNA-seq数据处理:使用rsem v1.2.21软件(rsem-计算-表达;参数=-p 4--samtools-sort-mem 3G--ci-memory 3072--bowtie-chunkmbs 1024--quiet--output-genome-bam--bowtie2--bowtie2-path/data/devtools/bowtie2-2.0.5--strand-specific)将读数与HG19转录组比对,并且然后使用相同rsem套件(rsem-parse-alignments,rsem-build-read-index,rsem-run-em)进行mRNA量化并以百万分之一的转录物(TPM)报告。然后为每个样本提取所有蛋白质编码基因,并将其评分进行分位数归一化。

[0214] 然后我们将对他米巴罗汀的敏感性与IRF8 mRNA水平进行比较,如图2和表1所示。

[0215] 表1:AML细胞系IRF8 mRNA水平和他米巴罗汀抗增殖效力

细胞系	IRF8 mRNA (TPM)	他米巴罗汀抗增殖效力 (EC <sub>50</sub> , nM)
EOL-1	484.38	0.89
Kasumi-1	16.34	>50000
KG-1a	1.84	>50000
PL21	190.02	1.41
MV4-II	699.41	0.17
HL60*	6.73	1.64
OCI-AML3	739.29	0.34
OCI-AML2	451.94	0.34
Nomo-1	242.19	0.48
OCI-M1	1.02	>50000
HEL	1.00	>50000

[0217] \*HL60是APL细胞系。

[0218] 如从上表中可看出,除HL60之外,所有他米巴罗汀-响应性细胞系在测定中具有大于190TPM( $\log_2(7.57)$ )的IRF8 mRNA水平,而非响应性细胞系均具有小于16.5TPM( $\log_2(4.03)$ )的IRF8 mRNA水平。HL60对他米巴罗汀的响应性没有伴随的高水平IRF8 mRNA(6.73TPM)表明IRF8 mRNA水平与他米巴罗汀敏感性之间的相关性可能不适用于APL,并且因此可能更适合患有非APL AML的分层受试者。图2移除了HL60的数据点。

[0219] 确定了大量不同类型样本-正常血细胞、AML细胞系、原发性AML患者样本和AML PDX的IRF8 mRNA水平。获得的数据以等级顺序绘制,并且结果以图形方式呈现在图14中。如可看出,图14未示出IRF8 mRNA水平与疾病的存在之间的任何相关性;并且与病变细胞、细胞系和PDX相比,IRF8水平似乎在正常细胞中以相当类似的方式分布。

[0220] 实施例2:RARA激动剂治疗中IRF8 mRNA阈值的测定

[0221] AML细胞系结果表明RNA-Seq测定中的截止值在15.5与190TPM之间(即在 $\log_2(4.03)$ 与 $\log_2(7.57)$ 之间)。我们选择了AML患者样本的群体(由斯坦福大学友情提供),以便检查IRF mRNA水平的分布并且基于截断值确定患病率截止。我们添加到所述群体AML细胞系中,并且然后生成等级排序图。图3示出IRF8 mRNA水平在组合的患者样本/AML细胞系群体中的等级-排序分布。我们确定了25%的患病率截止对应于大约 $\log_2(7)$ 的IRF mRNA值。

[0222] 实施例3:IRF8 mRNA与RARA mRNA水平的相关性

[0223] 我们接下来比较了AML细胞系和患者群体中的IRF8和RARA mRNA水平,以确定相关



性。图4示出响应于他米巴罗汀的一些细胞系具有相对低的RARA mRNA,但高水平的IRF8 mRNA。图5示出,患者的子集也表现出高IRF8 mRNA水平,但相对低的RARA mRNA水平,并且反之亦然。这支持了这样的想法:如果任一mRNA水平高于阈值可优化可治疗的患者群体,则测量患者中的IRF8和RARA mRNA两者并选择所述患者用RARA激动剂(诸如他米巴罗汀)治疗。

[0224] 实施例4:与IRF8相关的超级增强子与对RARA激动剂治疗的响应性相关

[0225] 我们接下来如下检查几种AML细胞系和患者样本中的IRF8增强子强度。

[0226] 细胞固定:对于悬浮细胞,通常将1/10体积的新鲜11%甲醛溶液加入到细胞悬浮液中,混合并使混合物在室温(RT)下静置8分钟。然后加入1/20体积的2.5M甘氨酸或1/2体积的1M Tris pH 7.5以淬灭甲醛并温育至少1分钟。用20-50mL冷的1x磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗细胞3次,以1250x g离心5分钟以在每次洗涤之前和之后使细胞沉淀。然后将细胞转移至15mL锥形管中,并在4°C下以1250x g离心5分钟。除去上清液,用Kimwipe轻拍除去残留的液体,并且然后将沉淀的细胞在液氮中快速冷冻并储存在-80°C下。

[0227] 珠粒制备:每2mL免疫沉淀物(Invitrogen)使用大约60μL的Dynabeads®蛋白G。在1.5-mL Eppendorf管中将珠粒用1.0mL封闭缓冲液(PBS中0.5%BSA w/v)洗涤3次,每次5分钟。每次洗涤后,使用磁体(Invitrogen)收集珠粒(并允许磁体结合至少1分钟),并且然后吸出上清液。将洗涤的珠粒重悬于250μL封闭缓冲液中,向其中加入6μg抗体,并允许混合物以上下翻转混合过夜(最少6小时)温育。将结合抗体的珠粒用1mL封闭缓冲液洗涤3次,每次5分钟,并且重悬于封闭缓冲液(每IP 60μL)中。一旦细胞进行超声处理(参见9.1.1.3)并且恰好在过夜免疫沉淀之前进行最后的洗涤和再悬浮。

[0228] 细胞裂解:在使用前,将1x的蛋白酶抑制剂(Complete,Roche;通过将一片在1mL H<sub>2</sub>O中溶解50x溶液并在-20°C下以等分试样储存制备)加入到所有裂解缓冲液中。将每管细胞(大约5x10<sup>7</sup>个细胞)重悬于5-10mL裂解缓冲液1(LB1;140mM NaCl,1mM EDTA,10%甘油,0.5%NP-40,0.25%Triton X-100)中并在4°C下摇动10分钟。将细胞在台式离心机中于4°C下以1250x g离心5分钟并吸出上清液。将细胞重悬于5mL裂解缓冲液2(LB2;200mM NaCl,1mM EDTA,0.5mM EGTA,10mM Tris pH 8)中并在4°C下上下翻转温育10分钟。在4°C下在台式离心机中将细胞再次以1250x g沉淀5分钟,并在2-5mL Covaris超声缓冲液(10mM Tris pH 8.0,1mM EDTA,0.1%SDS)中洗涤。将沉淀物在台式离心机中于4°C下以1250x g离心5分钟。将细胞在台式离心机中于4°C下以1250x g沉淀5分钟,并以20-500,000,000个细胞/1mL Covaris超声缓冲液的浓度重悬。

[0229] 染色质免疫沉淀:将如上所述制备的50μL抗体-缀合的珠粒加入到1.5mL管中的澄清细胞提取物(如上文在细胞裂解中所述)溶液中,并且在4°C下摇动过夜(最少8小时)以免免疫沉淀DNA-蛋白质复合物。

[0230] 洗涤、洗脱和交联反转:在这些步骤中使用的所有缓冲液均是冰冷的。使用磁力架沉淀磁珠,洗涤3次,每次5分钟,与1mL洗涤缓冲液1(50mM HEPES pH 7.5;140mM NaCl;1mM EDTA;1mM EGTA;0.75%Triton-X;0.1%SDS;0.05%DOC)轻轻上下翻转混合;用1mL洗涤缓冲液2(50mM HEPES pH 7.5;500mM NaCl;1mM EDTA;1mM EGTA;0.75%Triton-X;0.1%SDS;0.05%DOC)洗涤一次5分钟;并且用1mL洗涤缓冲液3(10mM Tris pH 8.0;1mM EDTA;50mM NaCl)洗涤一次5分钟。吸出所有残留的洗涤缓冲液,并且将珠粒以1250x g轻轻离心1分钟;将管更换到磁体上并除去所有痕量的缓冲液。加入体积为210μL的洗脱缓冲液(50mM Tris

pH 8;10mM EDTA;1%SDS),并在65℃下洗脱60分钟,进行短暂涡旋以每15分钟使珠粒重悬。使用磁体将珠粒与上清液分离,并且取出200μL上清液并置于干净的管中进行反向交联。使IP和全细胞提取物级分两者在65℃下反向x-连接过夜(最少8小时,但最多18小时)。然后通过65℃下温育过夜(最少8小时,但最多18小时),使用加热分别使用于免疫沉淀的样本和全细胞提取物级分两者反向交联。加热促进了甲醛交联的水解。

[0231] DNA的清除和纯化:将Tris-EDTA缓冲液(50mM Tris pH 8;1mM EDTA)和2.7μL的30mg/ml RNA酶A(0.2mg/mL最终浓度)以200μL的体积加入到每个样本中,混合并在37℃下温育2小时。然后将5μL氯化钙溶液(在10mM Tris pH 8.0中的300mM CaCl<sub>2</sub>)与4μL的20mg/ml蛋白酶K(0.2mg/mL最终浓度)一起加入到每个样本中,混合并在55℃下温育60分钟。然后将400μL苯酚:氯仿:异戊醇以25:24:1的比率(Sigma Aldrich#P3803)加入到每个管中,在低设定(5/10)的涡旋混合器上混合,并将每个管倒置以进一步混合。

[0232] 通过在室温下以10,000RPM将管离心30秒,为每个样本制备PhaseLock Gel™管(Qiagen,3Prime)。接下来,将苯酚:氯仿:异戊醇中的样本DNA加入到PhaseLock Gel™管中,并在室温下以12,000-16,000x g离心2分钟。然后将水性溶液转移至新的1.6mL管(顶部馏分)中,加入20μL 5M NaCl和1.5μL 20μg/μL糖原(总共30μg),然后加入1mL EtOH,并通过涡旋或倒置混合。然后将样本在-20℃下温育过夜(6-16小时)。将混合物在4℃下以20,000x g离心20分钟以沉淀DNA,用1mL移液管尖端除去上清液,将沉淀物在800μL 80%EtOH中洗涤,在4℃下以20,000x g离心20分钟,并且用1mL移液管尖端除去上清液。将样本再次以20,000x g离心1分钟,除去上清液,并且使沉淀物风干5-20分钟。沉淀物周围不应有水晕,并且应是玻璃状或片状干燥。然后将沉淀物溶于60μL水中,使用50μL进行测序。

[0233] ChIP-seq数据处理:使用Bowtie2v.2.0.5软件(参数=-p 4-敏感)将ChIP-seq IP和IN两者的读数与HG19基因组比对。这产生总结了IP和IN两者测序实验的比对的全基因组BAM文件。

[0234] 创建通用IRF8增强子评分数据集:生成了可用于所有下游分析的通用IRF8增强子评分数据集。将使用比对的IP BAM在用MACS v1.4的比对的H3K27Ac读出数据中观察到的全基因组的峰定为ChIP-seq前景数据,并且将比对的IN BAM作为对照背景数据。使用了严格的p值截止10<sup>-9</sup>,但否则使用默认参数。然后,如果在人参考基因组中它们之间具有≥12,500个碱基对,则合并这些峰。将这组峰称为ROSE峰,并且对于给定样本,将与IRF8转录物重叠的评分最高的ROSE峰的等级记录为所述样本的“IRF8 ROSE等级”。

[0235] 然后过滤ROSE峰的集合如由ENCODE(<https://sites.google.com/site/anshulkundaje/projects/blacklists>)和ENCODE Project Consortium(2012)定义的“黑名单区域”,以除去ChIP-seq伪影。

[0236] 然后通过将来自给定样本的每个峰的坐标与其它样本重叠的所有峰并集,将来自主要患者样本的过滤的一组ROSE峰合并为通用H3K27Ac富集图。这生成了H3K27Ac富集的通用图。然后,对于给定区域,在每个样本(包括细胞系)内的所述通用图中量化每个富集区域,对在所述区域内映射的IP读数的数量进行求和,并除以完整实验中映射的读数的数量乘以一百万(“每百万读数”,或RPM)。计算IN读数的类似RPM评分。从IP RPM中减去IN RPM以实现给定样本的通用图中给定区域的总评分。使用R MASS文库v7.3.45中的fitdistr函数,将负二项分布拟合到给定样本的评分。将分布的尾部定位为所述负二项式的累积分布函数

超过0.99(相当于p值为0.01)的点。在这一点上所有样本区域的总评分被划分,使得在拟合负二项分布的最低99%评分的任何富集区域评分低于1(视为“典型增强子”)和评分高于99%的任何区域评分高于1(视为“超级增强子”)。这些分数被称为针对通用图的每个样本的“RECOMB”评分。然后使用分位数归一化将每个样本的RECOMB评分相对于所有其它样本进行归一化,并且将底线值设定为0。

[0237] ChIP-seq数据的可视化:在使用MACS2将BAM文件转换为IGV格式的t文件以创建堆积(extsize 200)和igvtools v2.3.9软件的igvtools toTDF命令之后,使用Integrative Genomics Viewer (IGV)版本2.3.60可视化H3K27Ac的全基因组定位。将每个轨道的Y轴设定为刚好在噪声的水平(0.25)之上,并且在近似于在以MALAT1基因为中心的对照区域上观察峰的全部高度所需水平的一半的水平处结束。

[0238] 表2. AML细胞系IRF8增强子强度、mRNA水平和他米巴罗汀抗增殖效力

细胞系	IRF8增强子 (RECOMB)	IRF8 mRNA ( $\log_2$ )	他米巴罗汀抗增殖效力 ( $EC_{50}$ , nM)
EOL-1	0.77	8.96	0.89
Kasumi-1	1.22	4.06	>50000
KG-1a	0.00	0.68	>50000
PL21	3.10	7.69	1.41
MV4-11	2.44	9.48	0.17
[0239] HL60*	0.17	2.63	1.64
OCI-AML3	1.72	9.65	0.34
OCI-AML2	1.36	8.88	0.34
Nomo-1	1.58	8.04	0.48
OCI-M1	0.00	0.04	>50000
HEL	0.00	0.00	>50000
Sig-M5	1.53	8.53	0.46
THP-1	1.87	8.73	0.95

[0240] \*HL60是APL细胞系。

[0241] 以上数据表明IRF8 RECOMB增强子评分 $\geq 1.0$ (RECOMB评分 $\geq 1.0$ 定义超级增强子)与对他米巴罗汀的响应性非常相关。排除HL60APL细胞系,所述截止值在测试的12个非APL AML细胞系中产生1个假阳性(Kasumi-1)和1个假阴性(EOL-1)。将截止提高至RECOMB评分 $\geq 1.25$ 将消除假阳性,而将截止降低至RECOMB评分 $\geq 0.75$ 将消除假阴性。此数据也以图表形式呈现在图6中。还观察到IRF8 mRNA水平与对他米巴罗汀的响应性之间的类似相关性,其中细胞系具有大于4.25的IRF8 mRNA TPM( $\log_2$ )值均表明他米巴罗汀敏感性。

[0242] 然后,我们将ChIP-seq的增强子分析应用于AML患者样本的子集。在66个AML患者样本中,IRF8基因座增强子强度变化很大,其中21%(14/66)的患者具有由RECOMB评分超过1.0表示的SE(图7)。大多数患者样本表现出最小的增强子活性,包括最低的14%(9/66),其没有可量化的IRF8增强子。

[0243] 实施例5:IRF8 mRNA与IRF8增强子强度的相关性

[0244] IRF8增强子的量化与ChIP-seq和RNA-seq数据的相关性:将分位数归一化的RECOMB评分在所有患者中用于在IRF8:chr16:85862582-85990086重叠的通用图中被称为

增强子的区域。这与使用Spearman相关性的来自RSEM的完整IRF8基因模型的分位数归一化TPM表达估计相关。仅使用具有RNA-seq和ChIP-seq两者的患者。在细胞系中进行相同的分析,但排除了APL细胞系。

[0245] 为了通过IRF8 mRNA测量实现IRF8SE的代理估计,在相同的AML患者群组中检查两者之间的相关性。将由RNA-seq测量的IRF8 mRNA与由H3K27ac的RECOMB评分测量的IRF8基因座增强子进行比较(图8)。IRF8 mRNA水平在此群组中的样本中也变化很大,并且IRF8 mRNA水平与IRF8增强子强度高度相关(Spearman Rho相关性估计值为约0.81,p值为 $2.2 \times 10^{-12}$ )。

[0246] 我们还分析了26个AML细胞系中IRF8增强子强度和IRF8 mRNA水平的值。先前测试了这些细胞系中的几种对他米巴罗汀的抗增殖敏感性(参见表2)。如在AML患者样本中观察到的,AML细胞系表现出IRF8增强子强度的广泛分布(图9)。IRF8增强子强度和IRF8 mRNA水平在26个AML细胞系中也变化很大,其中9个(34%)的IRF8RECOMB值 $\geq 1.0$ 。

[0247] 与AML患者样本一样,AML细胞系表现出IRF8 mRNA水平与IRF8增强子强度的强相关性(图10;Spearman Rho相关性估计值为约0.82,p值为 $2 \times 10^{-6}$ ),由此支持IRF8 mRNA作为IRF8增强子强度的代理量度。

[0248] 实施例6:PDX模型对他米巴罗汀的响应及其与IRF8 mRNA水平的相关性

[0249] BALB/c裸免疫受损小鼠中的不同AML患者样本(AM8096、AM5512、AM7577和AM7440)衍生的异种移植模型由Crown Biosciences(中国北京)基本上如下制备。

[0250] 将来自每个患者样本的大约 $2 \times 10^6$ 个细胞悬浮在100 $\mu$ L PBS中,并通过IV尾注射注射到单独的小鼠中(对于每个不同的患者样本和对照,n=3)。对于AM5512、AM7577和AM7440异种移植,当人CD45<sup>+</sup>细胞的浓度在动物的外周血中达到约1-5%时,肿瘤负荷被认为足够高以开始治疗。使用荧光激活细胞分选器和FITC抗人CD45(Biolegend,目录号304037)在小鼠血液中(通过眼睛出血获得)检测人CD45<sup>+</sup>细胞。对于AM8096异种移植,在注射细胞后40天开始治疗。

[0251] 他米巴罗汀在pH 8调节的PBS,1%DMSO中以每日计划口服施用,其最终剂量为6mg/kg体重,体积为10ml/kg。媒介物组中的小鼠被给予相同的计划、体积和配方,但缺乏他米巴罗汀。每周一次测量来自治疗动物和对照动物的外周血中的人CD45<sup>+</sup>细胞水平。

[0252] AM5512和AM8096异种移植显示,在治疗35天后,与媒介物对照相比,当用他米巴罗汀治疗时,CD45<sup>+</sup>细胞的总%以及血液、骨髓和脾脏中CD45<sup>+</sup>细胞的%显著降低(图11)。另一方面,AM7577和AM7440在他米巴罗汀处理的与媒介物处理的动物之间或者在血液、骨髓或脾脏总体或任一个中没有显示出肿瘤体积的显著减少(图12)。

[0253] 然后我们测量了在异种移植研究中使用的四个患者样本中的每个中的IRF8和RARA mRNA水平两者(图13)。异种移植研究中的两个无响应者AM7577和AM7440具有在测定中远低于100TPM的IRF8 mRNA水平。响应者中的一个,AM8096具有高于350TPM的IRF8 mRNA水平。另一个响应者,AM5512具有非常低的IRF8 mRNA水平。有趣的是,这四个样本显示出类似的RARA mRNA水平模式,其中AM7577和AM7440具有低于任何确定的患病率截止的RARA mRNA水平(例如,36%患病率截止);AM8096显著高于所述患病率截止,并且AM5512也低于所述患病率截止,但具有显著高于AM7577或AM7440无响应者的RARA mRNA。

[0254] 实施例7:获得和制备用于确定IRF8 mRNA水平和ChIP测序的患者样本

[0255] 从非APL AML患者中抽取血液(8mL)并收集到8mL BD Vacutainer CPT柠檬酸钠管中。在血液收集后,将管轻轻地手动倒置8-10次,以确保抗凝剂的充分缺失。在离心之前将管直立在室温下储存,所述离心在收集后2小时内进行。然后将血液样本在室温(18-25℃)下以1500-1800RCF(相对离心力)离心20分钟。在离心后,血液分层。在凝胶塞下方的底层是绝对底部处的红色层(红细胞)和在其上方的细灰色层(粒细胞和密度溶液)。在凝胶塞的正上方是透明的密度溶液层,然后是白色层(单核细胞和血小板)和顶部上的黄色层(血浆)。在用巴斯德吸管离心后立即除去含有PBMC的白色层(体积高达1mL)。如果需要,可将PBMC储存在含有逐滴加入的20%v/vBloodStor®冷冻培养基(BioLife Solutions)的冷冻管中,随后轻轻地手动倒置混合。

[0256] 然后按照制造商关于标记细胞的磁性标记和磁性分离的说明书,用人CD117微珠(Miltenyi Biotec)和人CD34微珠(Miltenyi Biotec)同时处理在前一步骤中获得的PBMC级分(如果预先冷冻则解冻)。然后从分离的CD34<sup>+</sup>/CD117<sup>+</sup>细胞中提取信使RNA,并如上所述使用qPCR进行量化。

[0257] 实施例8:他米巴罗汀与其它药剂之间的协同作用与RARA mRNA水平相关。

[0258] 使用Biotek EL406,将50μL含有20-60,000个细胞/ml的细胞培养基分配到白色384孔Nunc板(Thermo)中。然后悬浮细胞立即接受化合物,同时给予粘附细胞系一小时以在添加化合物之前重新附着到板的表面。将他米巴罗汀和待测试的第二药剂溶解在DMSO中,并排列在384孔化合物储存板(Greiner)上。对于给定的细胞系,每个化合物板以5个不同的剂量接受他米巴罗汀和一个第二药剂,每个剂量大约以给定化合物的EC<sub>50</sub>为中心,从而提供两种药剂总共25种不同的剂量组合。

[0259] 使用Janus MDT工作站(Perkin Elmer)上的20nl 384-孔销转移歧管将化合物阵列分配到测定板。除每种化合物的五个剂量本身一式四份之外,每个板含有8个重复的全部5乘5化合物浓度。加入化合物后,将细胞板在37℃培养箱中温育5天。按照制造商的方案使用ATPlite(Perkin Elmer)评估细胞活力。使用可商购获得的CalcuSyn软件分析数据,并使用GraphPad Prism软件可视化。生成了绘制他米巴罗汀和第二药剂的25种剂量组合中的每一种的等效线图,并分析了协同作用的存在。在等效线图中,连接横坐标和纵坐标值1.0的直线表示对于两种化合物的组合而言相加的生长抑制。落在直线下方的曲线表示协同生长抑制,其中落在所述线下方的曲线以及连接横坐标和纵坐标值0.75的曲线表示温和协同作用。落在连接横坐标和纵坐标值0.75的线与连接横坐标和纵坐标值0.25的线之间的曲线表示适度的协同作用。落在连接横坐标和纵坐标值0.25的线下方的曲线表示强的协同作用。每个等效线图中超出最大值的数据点由等效线图右上角的星号数表示,并表示无协同作用的数据点。

[0260] 我们测试了氮杂胞苷、三氧化二砷、米哌妥林、阿糖胞苷、柔红霉素、甲氨蝶呤、伊达比星、索拉非尼、地西他滨、奎扎替尼、ABT199(BCL2抑制剂)、JQ1(BRD4抑制剂)、AT0、泼尼松、SAHA、GSKJ4(JMID3/JARID1B抑制剂)和EPZ6438(EZH2抑制剂)作为针对各种AML细胞系的这些测定中的第二药剂。图15-21描绘了在不同细胞系中与他米巴罗汀组合的各种第二药剂的等效线图。

[0261] 针对氮杂胞苷和他米巴罗汀的组合,对于Sig-M5观察到中等至强的协同作用;对于KG-1a和NOMO-1观察到中等协同作用;对于MV-4-11观察到温和至中等的协同作用(参见

图15)。对于Kasumi-1或OCI-M1没有观察到协同作用(数据未示出)。

[0262] 针对三氧化二砷和他米巴罗汀的组合,对于Sig-M5和MV411观察到强的协同作用;对于NOMO-1观察到中等协同作用(参见图16)。对于Kasumi-1观察到无至温和协同作用,并且未观察到OCI-M1的协同作用(数据未示出)。

[0263] 针对阿糖胞苷(Ara-C)和他米巴罗汀的组合,对于KG-1a和OCI-M1观察到一些中等协同作用,但对于HL-60没有观察到协同作用(参见图17)。对于MV-411,最大值之外的大量数据点(25个中的7个)和显示强协同作用的大量数据使得解释变得困难。

[0264] 针对柔红霉素和他米巴罗汀的组合,对于Kasumi-1和NOMO-1观察到强协同作用;并且对于Sig-M5和MV-4-11观察到中等协同作用(参见图18)。没有观察到OCI-M1协同作用(数据未示出)。

[0265] 针对甲氨蝶呤和他米巴罗汀的组合,对于NOMO-1、Sig-M5和MV-4-11观察到中等协同作用(参见图19)。对于Kasumi-1观察到无至温和协同作用,并且对于OCI-M1未观察到协同作用(数据未示出)。

[0266] 针对伊达比星和他米巴罗汀的组合,对于NOMO-1、Sig-M5和MV411观察到中等协同作用(参见图20)。对于Kasumi-1或OCI-M1没有观察到协同作用(数据未示出)。

[0267] 由于在最大值之外的大量数据点,在MV411、NOMO-1、KG-1a和Sig-M5中观察到索拉非尼和他米巴罗汀的组合的不确定结果(参见图21),但在OCI-M1中没有观察到所述组合的协同作用(数据未示出)。索拉非尼是FLT3抑制剂,并且我们还在一些细胞系中观察到他米巴罗汀和其它FLT3抑制剂(诸如米哌妥林和奎扎替尼)的组合的协同作用。不受理论束缚,我们相信与FLT3抑制剂的协同作用需要高RARA和/或高IRF8 mRNA水平,以及高FLT3mRNA水平两者。这种“条件性”协同作用也见于GCR抑制剂泼尼松,它似乎需要高GCR mRNA水平以及高RARA和/或高IRF8 mRNA水平。还观察到JMJD3/JARID1B抑制剂GSKJ4,其似乎需要高JMJD3/JARID1B mRNA水平以及高RARA和/或高IRF8 mRNA水平以看到协同作用。

[0268] 我们在任何测试BCL2抑制剂ABT199和他米巴罗汀组合的细胞系中未观察到协同作用。我们也没有观察到EZH2抑制剂EPZ6438和他米巴罗汀的组合的协同作用。

[0269] 然而,我们观察到HDAC抑制剂SAHA和他米巴罗汀的组合在高RARA和/或高IRF8 mRNA AML细胞系中的协同作用。

[0270] 此外,观察到地西他滨和他米巴罗汀的组合在HL-60和KG-1a细胞中的强协同作用(数据未示出)。

[0271] 我们还观察到Zn指转录因子抑制剂ATO和他米巴罗汀的组合的协同作用。

[0272] 不受任何特定理论的束缚,可假设以高RARA水平、高IRF8水平或两者的组合为特征的非APL AML可能协同地响应于他米巴罗汀和以下中的一种或多种的组合:氮杂胞苷、三氧化二砷、米哌妥林(在以高FLT3mRNA水平为特征的AML中)、阿糖胞苷、柔红霉素、甲氨蝶呤、伊达比星、索拉非尼(在以高FLT3mRNA水平为特征的AML中)、地西他滨、奎扎替尼(在以高FLT3mRNA水平为特征的AML中)、JQ1(BRD4抑制剂)、ATO、泼尼松(在以高GCR mRNA水平为特征的AML中)、SAHA和GSKJ4(在以高JMJD3/JARID1B mRNA水平为特征的AML中)。

[0273] 参考文献

[0274] 1.Niederreither,K.&Dollé,P.Retinoic acid in development:towards an integrated view.Nat.Rev.Genet.9,541-553(2008).

- [0275] 2.Chapuy,B.et al.Discovery and Characterization of Super-Enhancer-Associated Dependencies in Diffuse Large B Cell Lymphoma.Cancer Cell 24,777-790 (2013) .
- [0276] 3.Tamura,T.,Kurotaki,D.&Koizumi,S.Regulation of myelopoiesis by the transcription factor IRF8.Int.J.Hematol.101,342-351 (2015) .
- [0277] 4.Yang,J.et al.Cutting Edge:IRF8 Regulates Bax Transcription In Vivo in Primary Myeloid Cells.J.Immunol.187,4426-4430 (2011) .
- [0278] 5.Pogosova-Agadjanyan,E.L.et al.The Prognostic Significance of IRF8 Transcripts in Adult Patients with Acute Myeloid Leukemia.PLoS ONE 8,e70812 (2013) .
- [0279] 6.Sharma,A.et al.Constitutive IRF8 expression inhibits AML by activation of repressed immune response signaling.Leukemia 29,157-168 (2015) .
- [0280] 7.Smits,E.L.J.M.,Anguille,S.&Bememan,Z.N.Interferon  $\alpha$  may be back on track to treat acute myeloid leukemiaOncoImmunology 2,e23619 (2013) .
- [0281] 8.Chelbi-Alix,M.K.&Pelicano,L.Retinoic acid and interferon signaling cross talk in normal and RA-resistant APL cells.Leuk.08876924 13,(1999) .
- [0282] 9.Encode Project Consortium,An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome.Nature 489:57-74 (2012) .
- [0283] 10.SY-1425-P003:Effects of tamibarotene (SY-1425) on proliferation of Acute Myeloid Leukemia (AML) cell lines in comparison to all-trans retinoic acid (ATRA)
- [0284] 11.SY-1425-P006:Characterization of the RARA enhancer and RAR $\alpha$  mRNA in AML patient samples and cell lines.

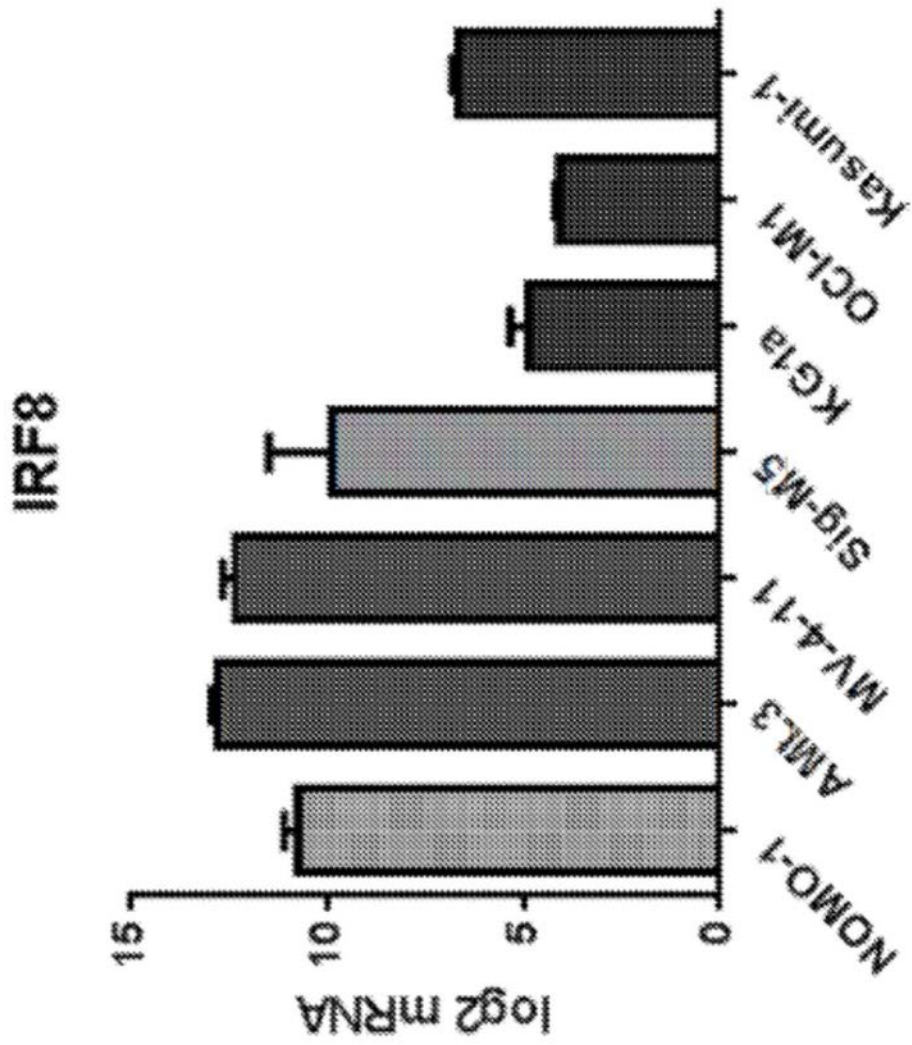


图1



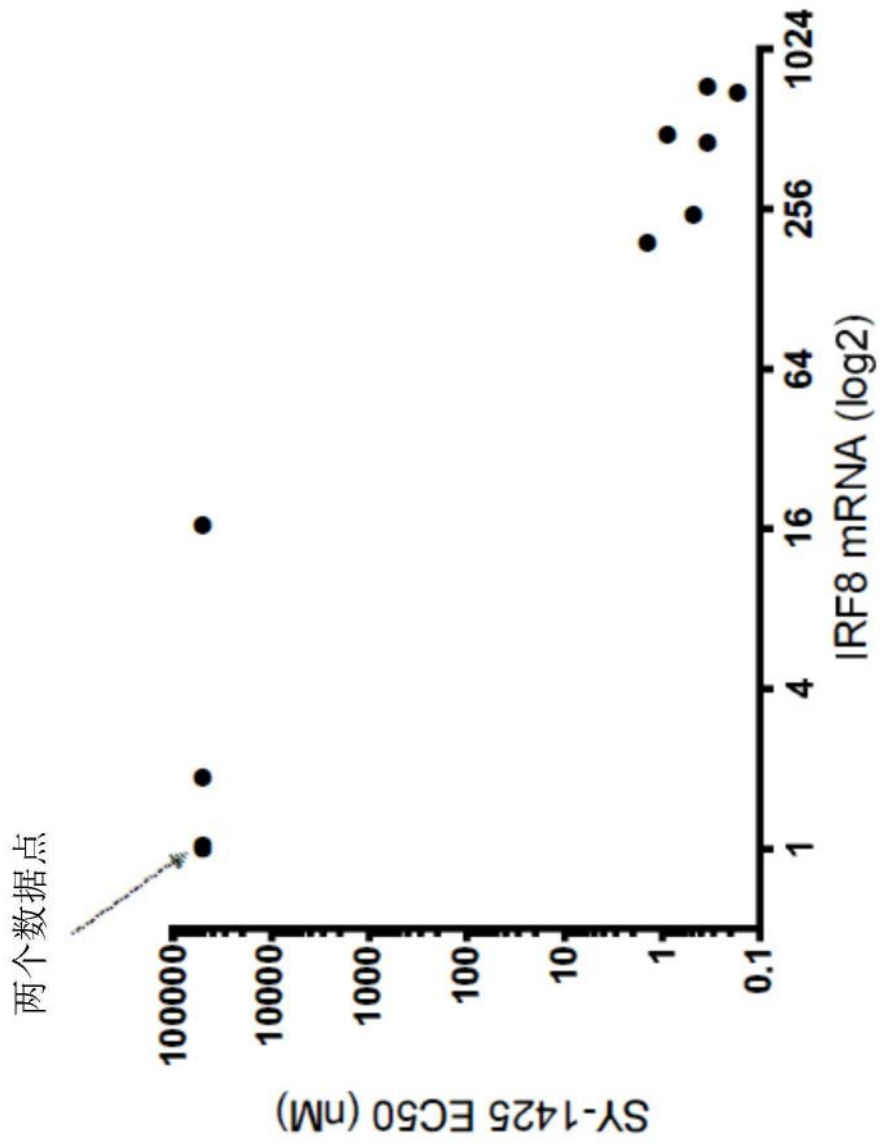


图2

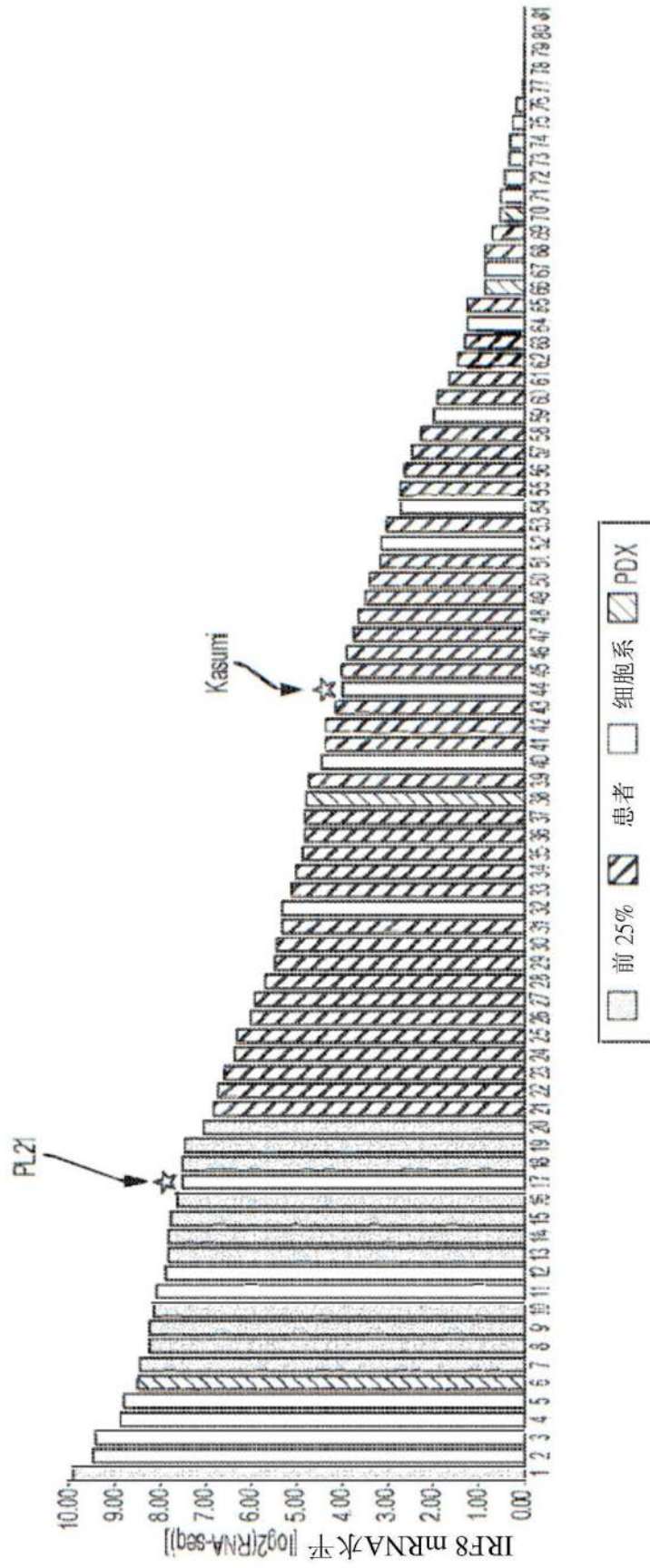


图3

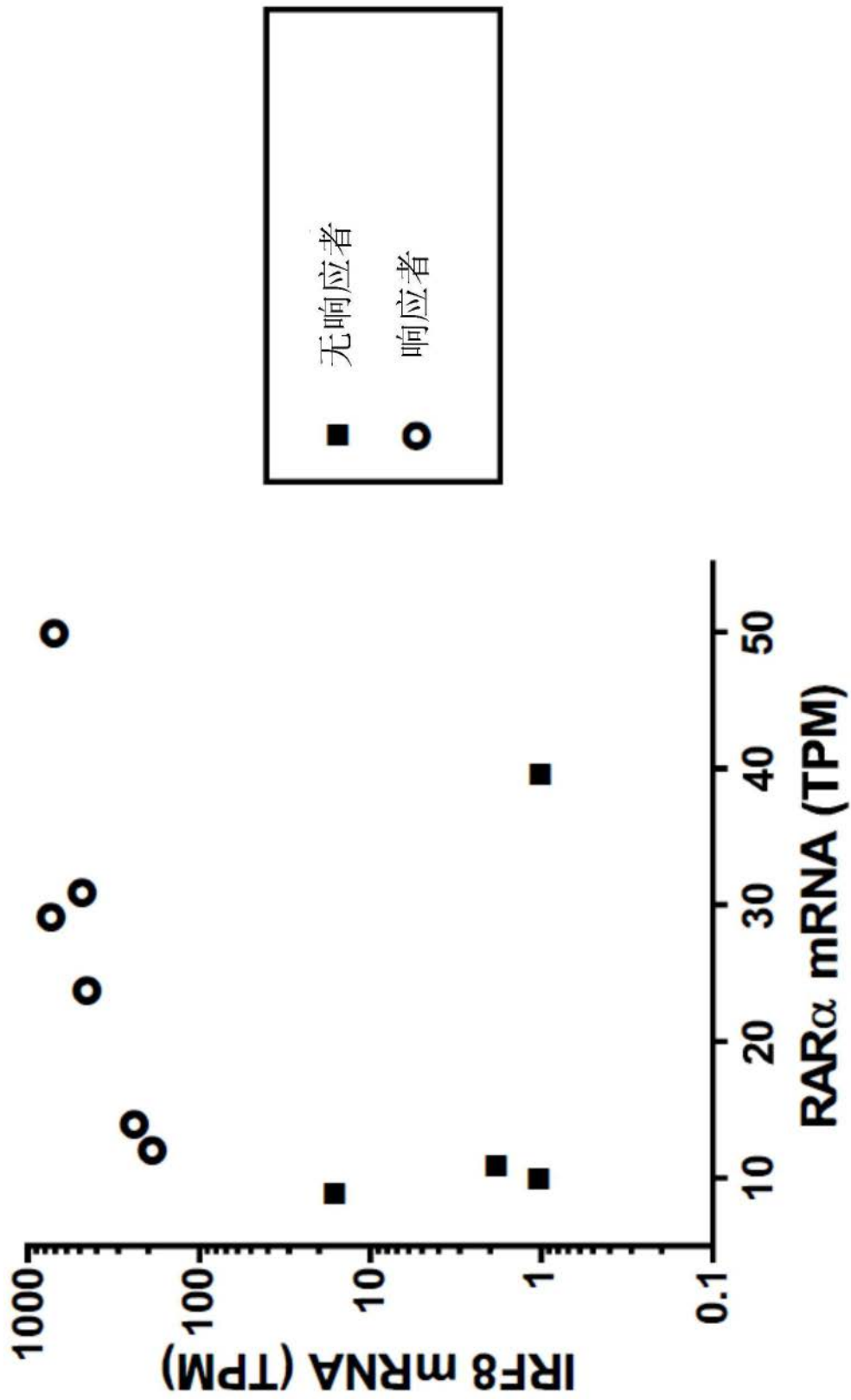


图4

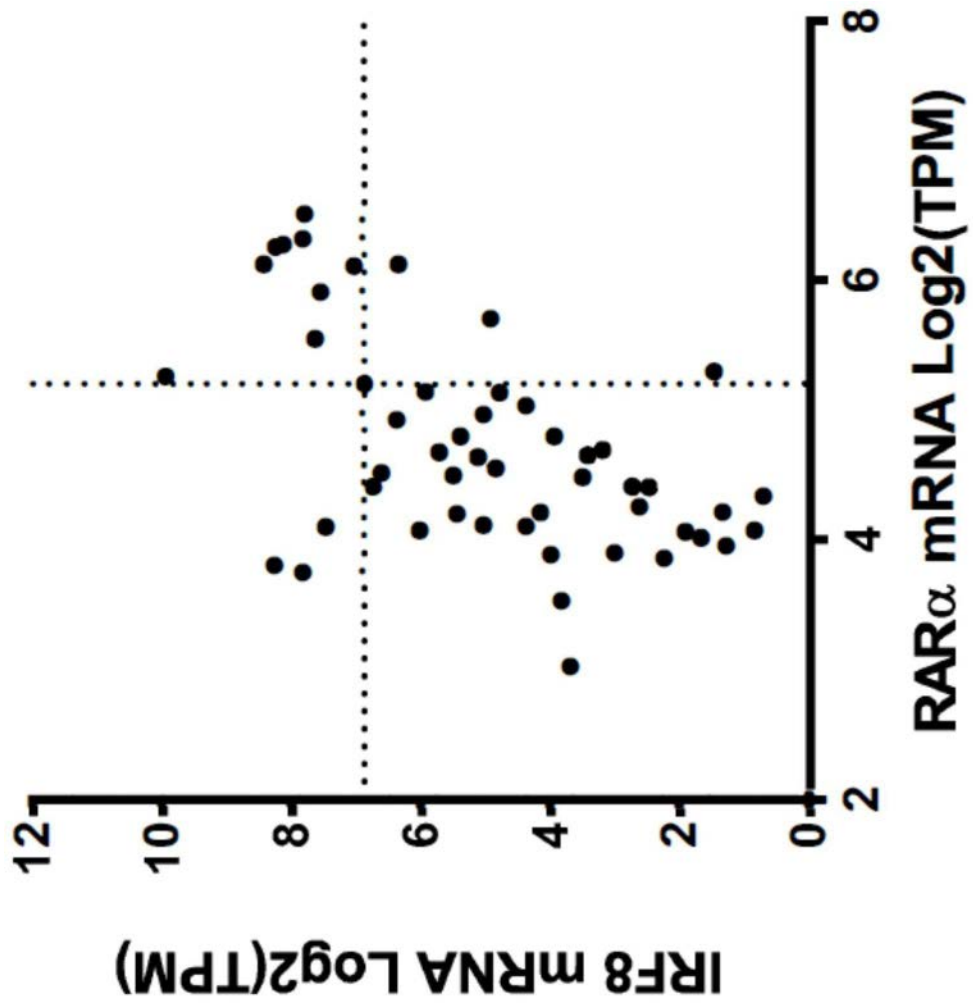


图5

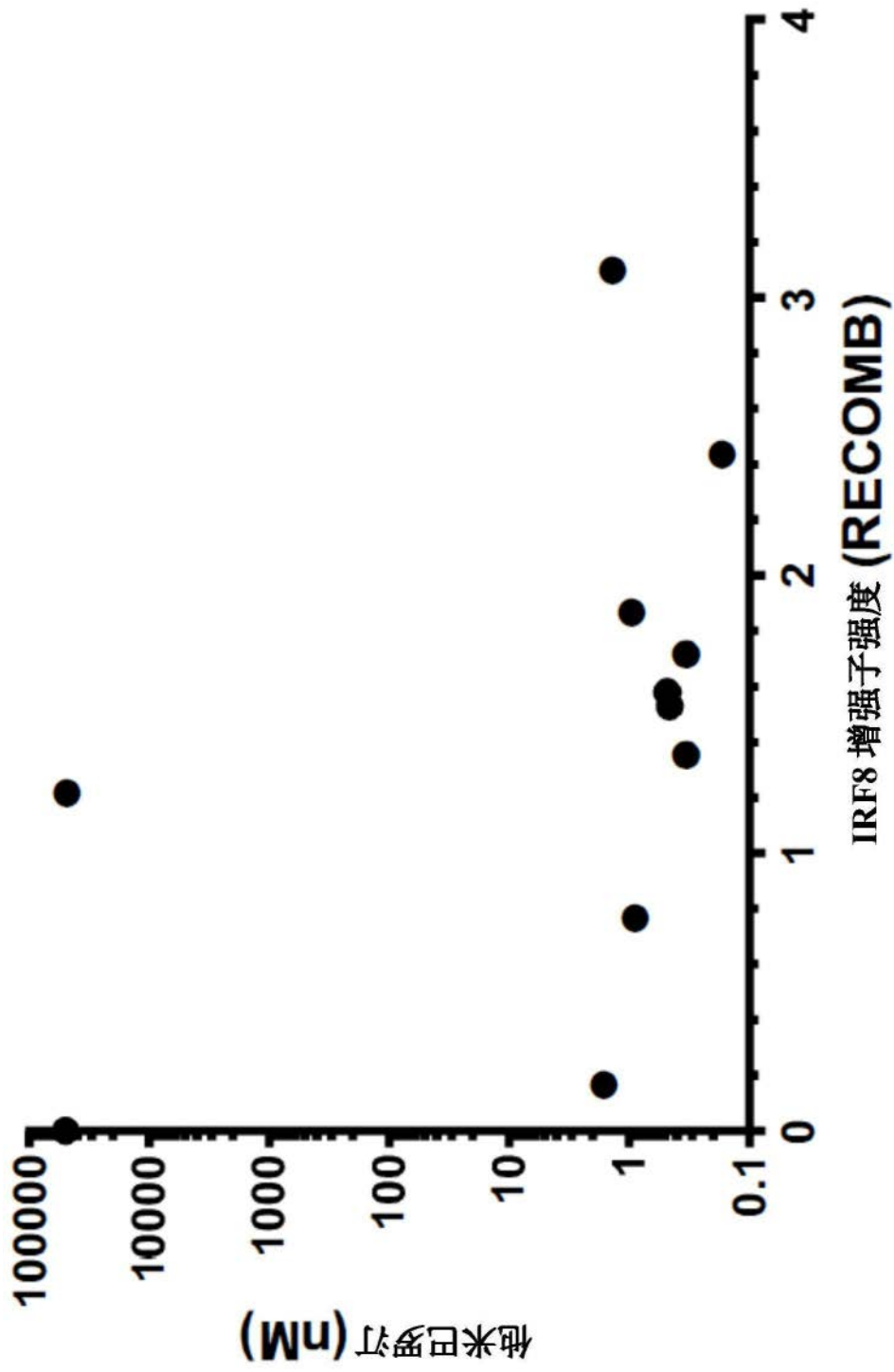


图6

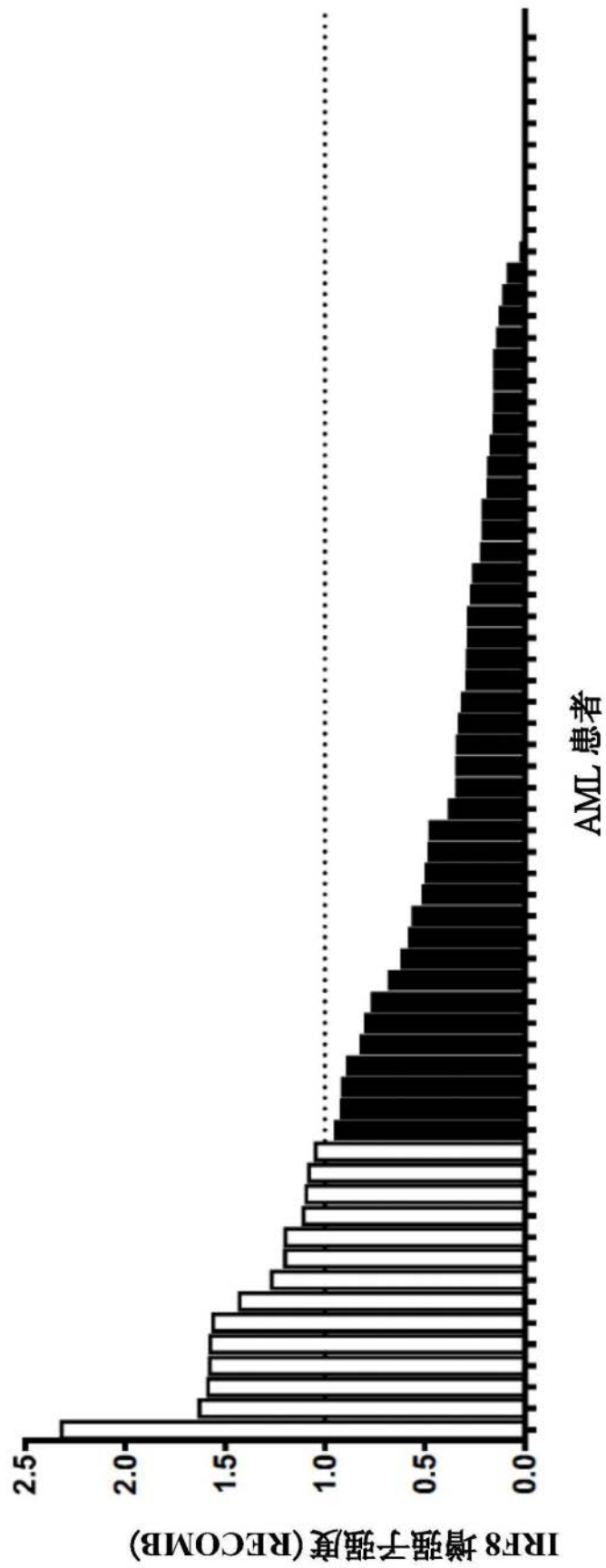


图7

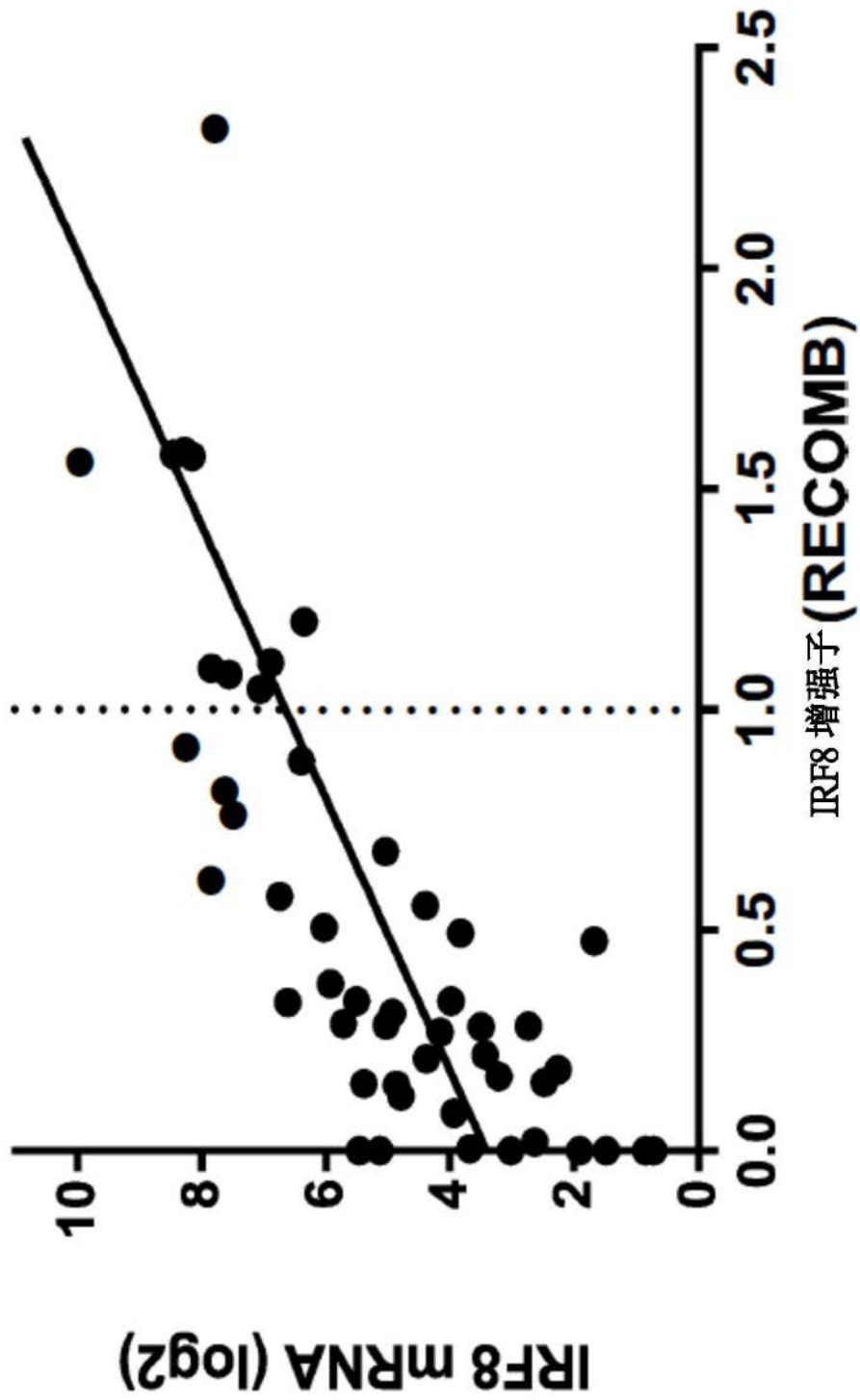


图8

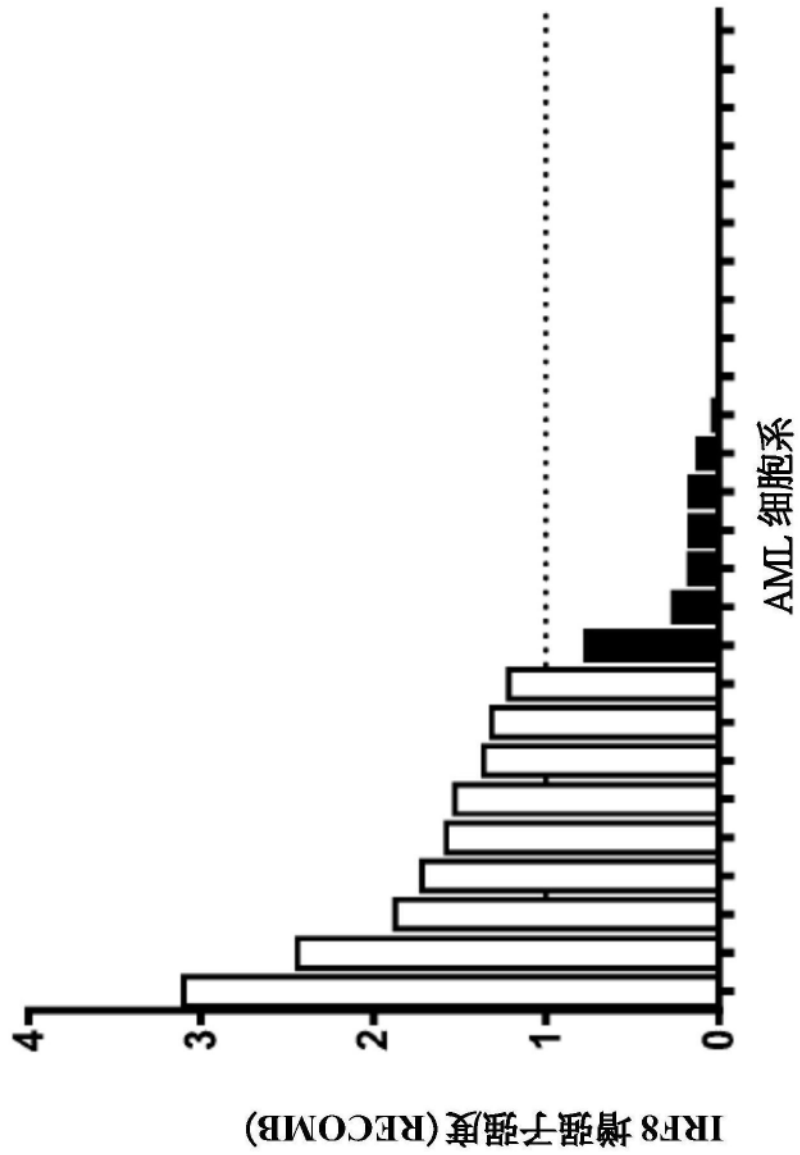


图9



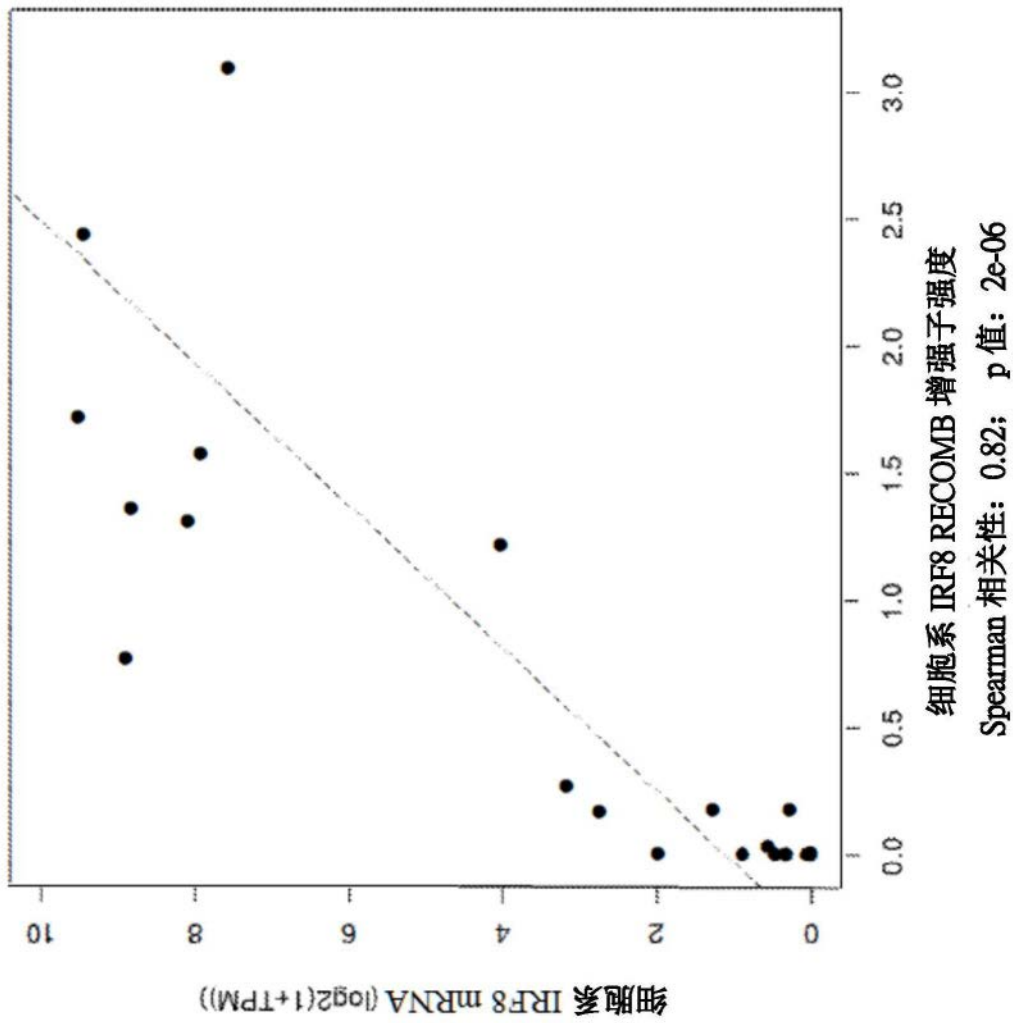


图10

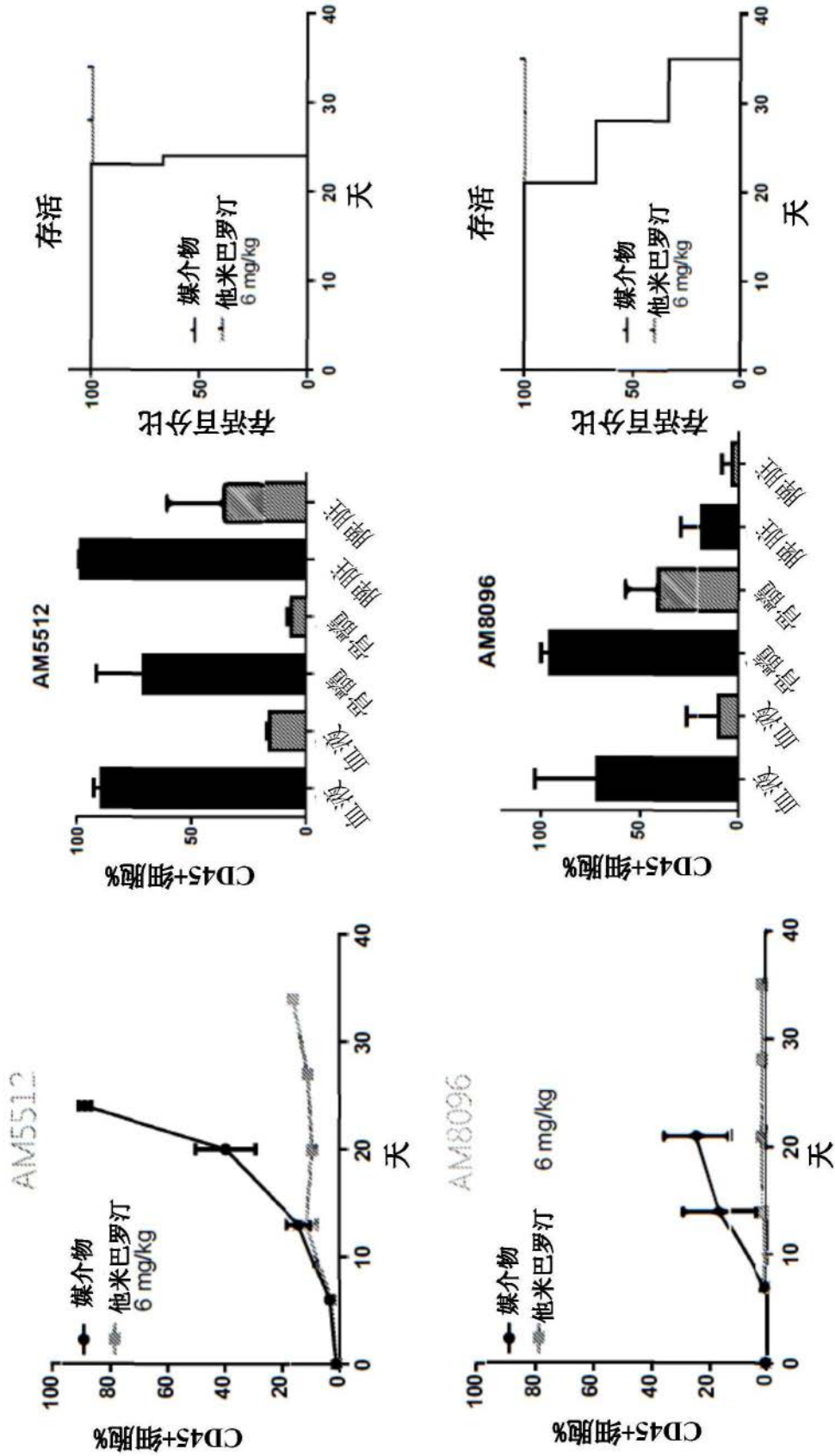


图11

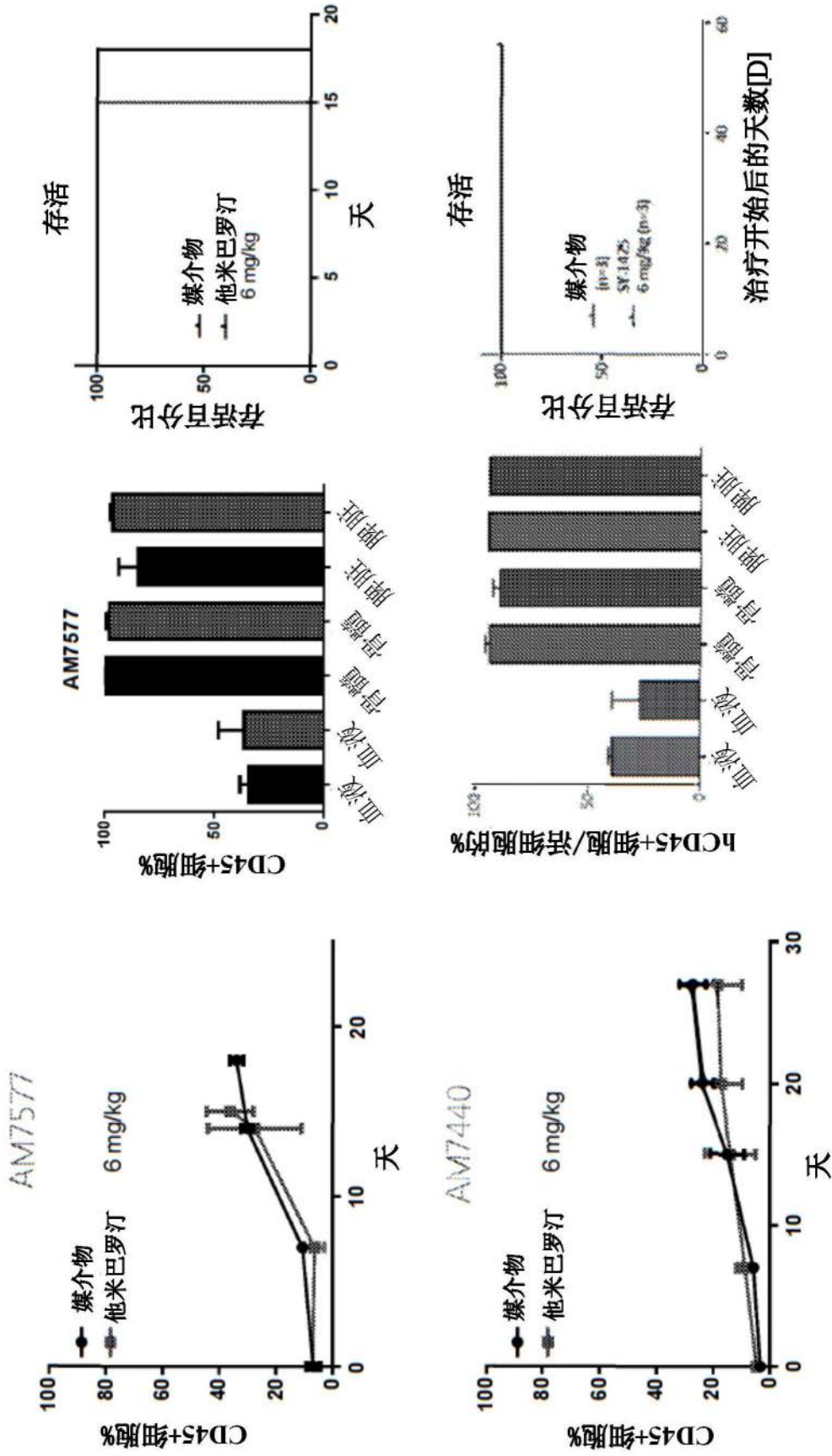


图12

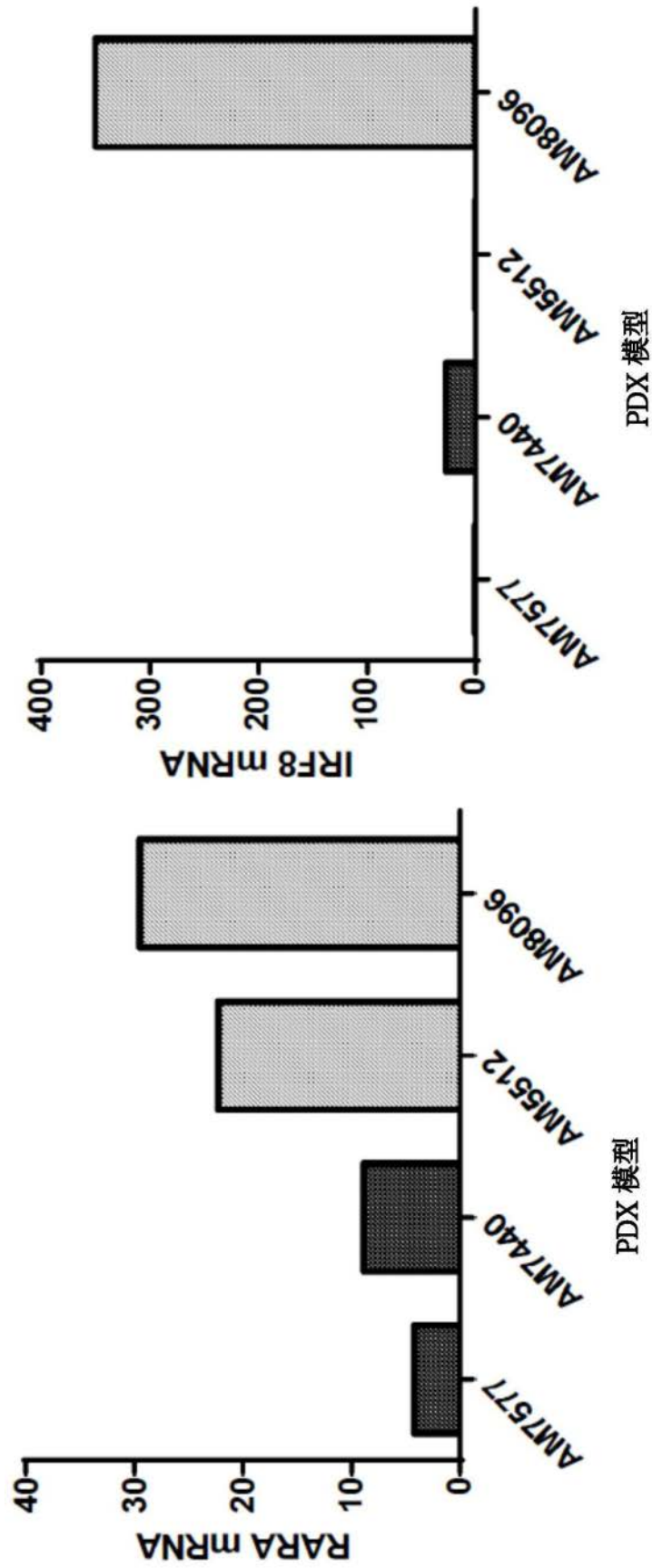


图13

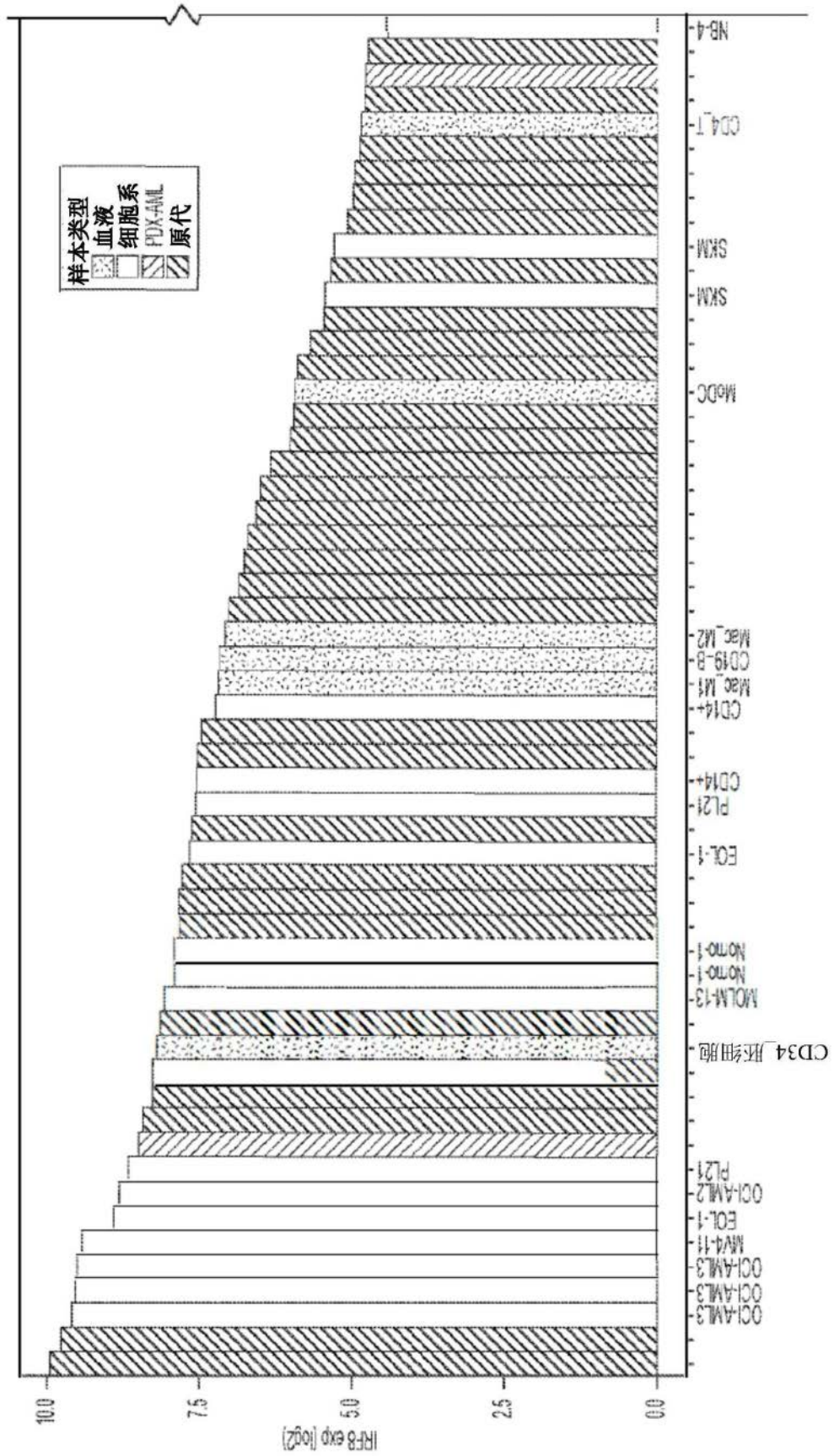


图14

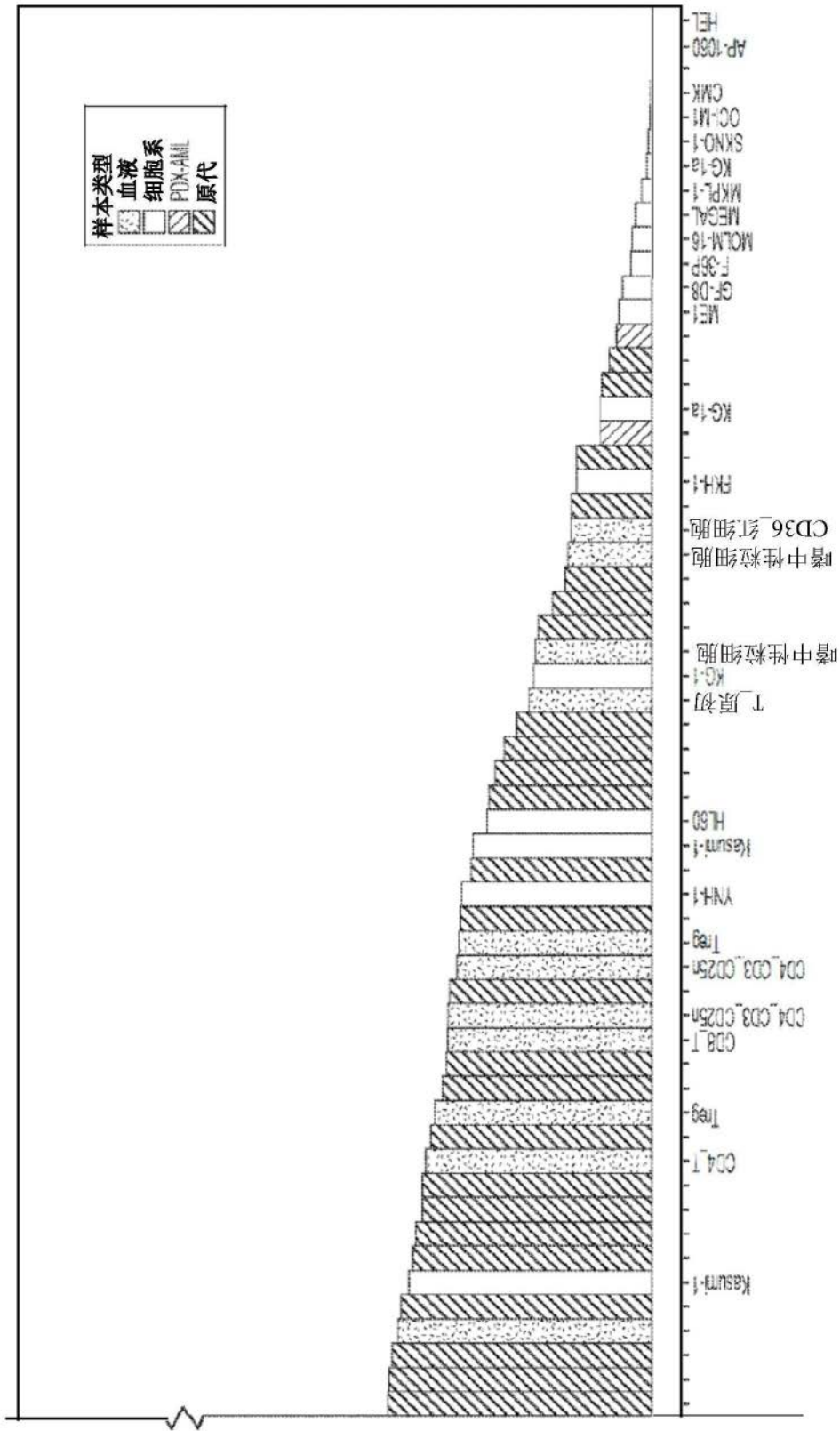


图14续

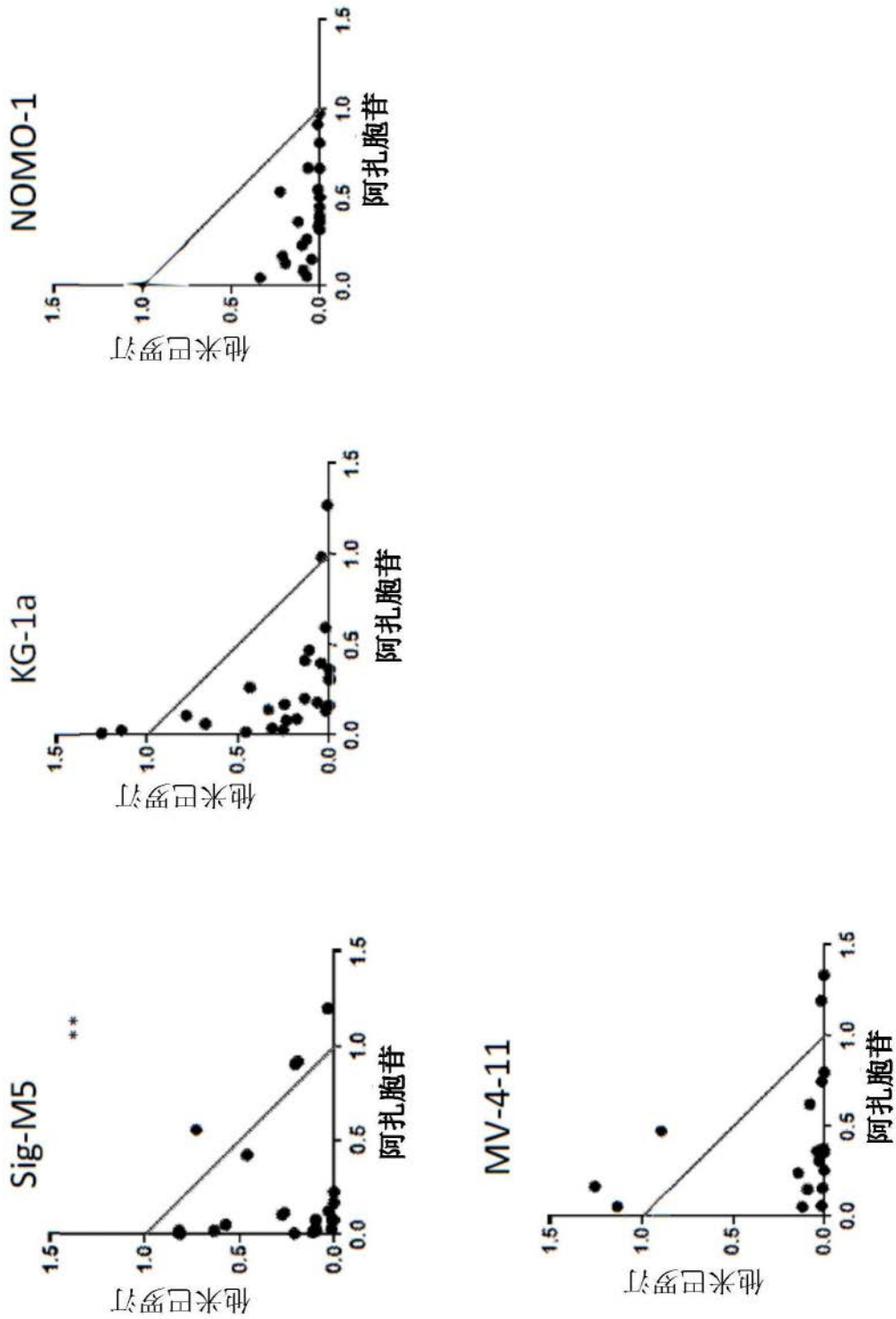


图15

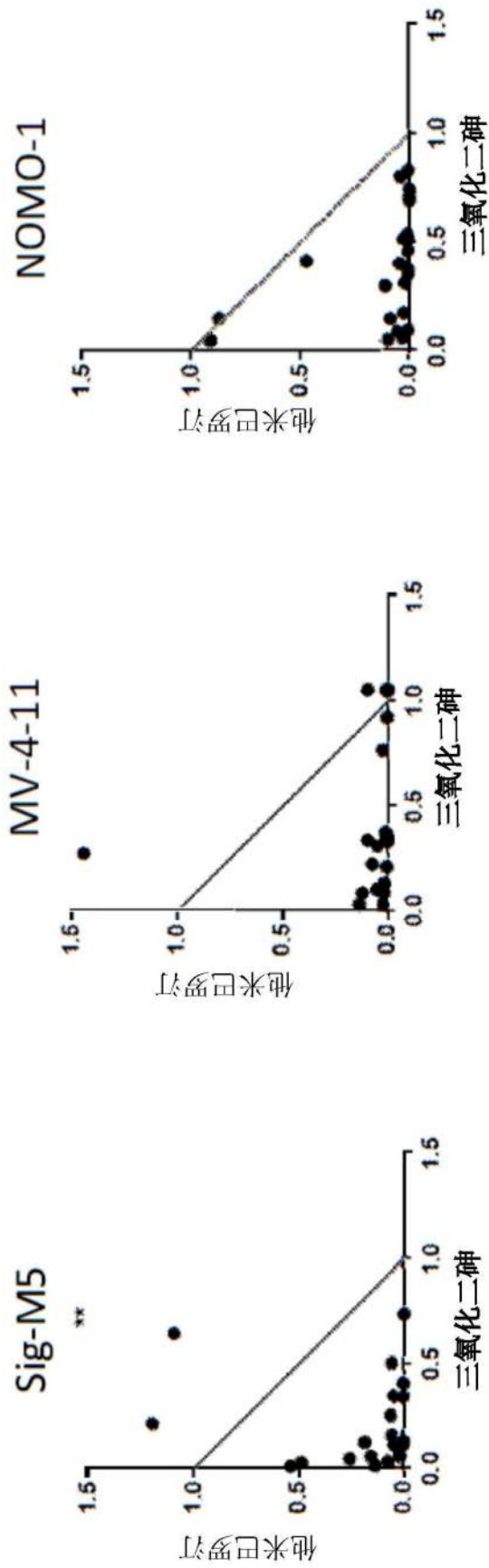


图16



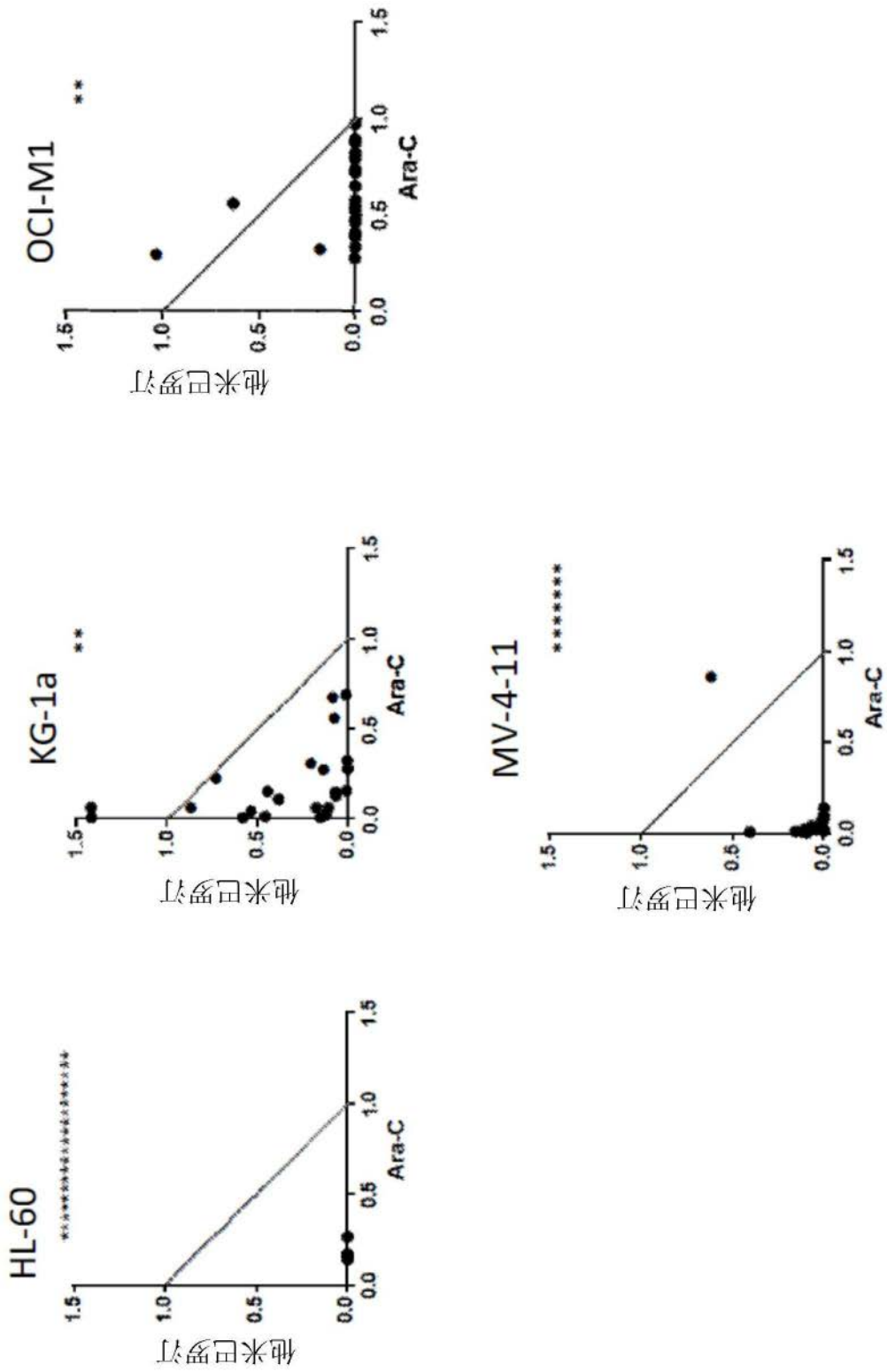


图17

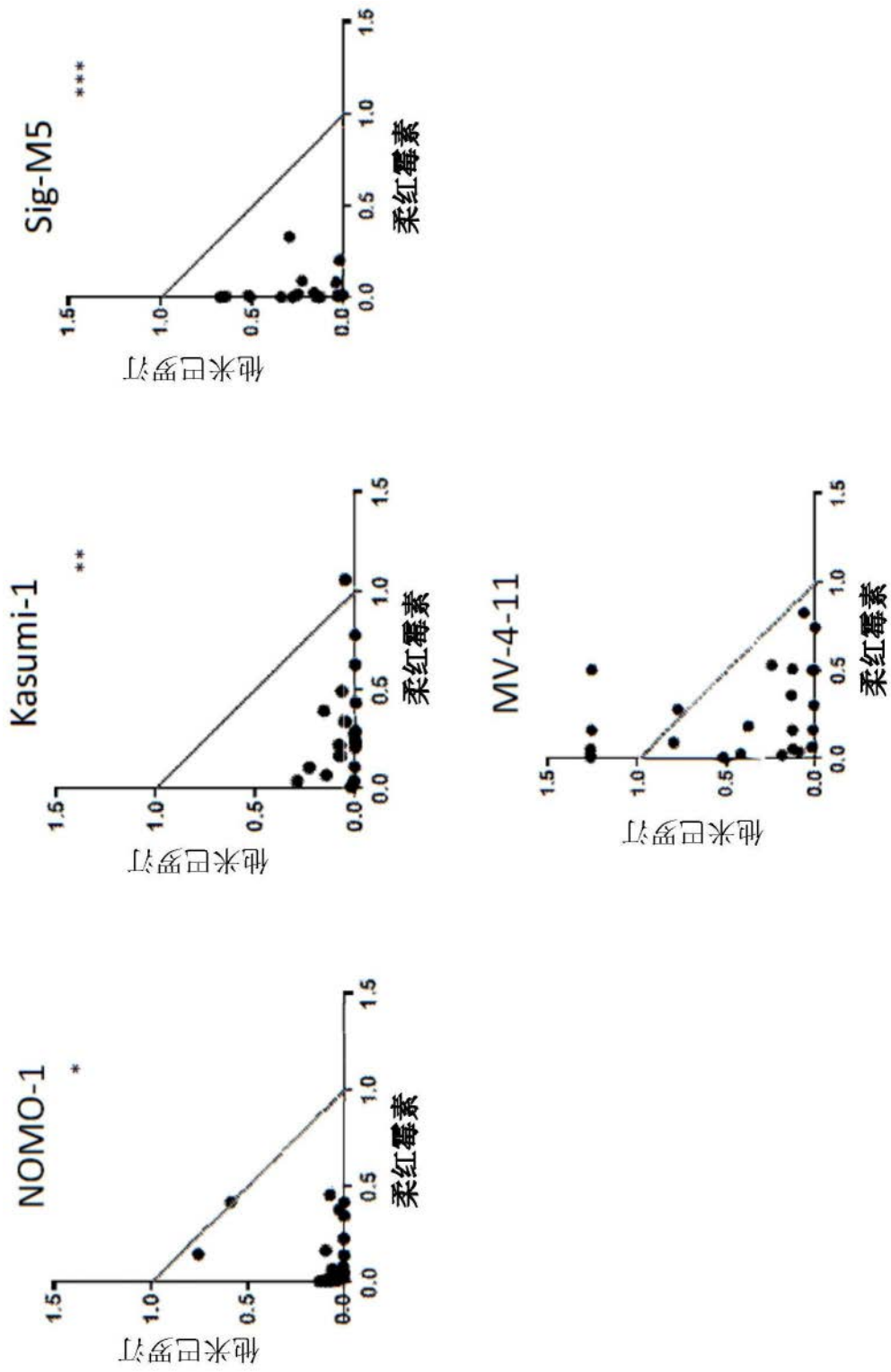


图18

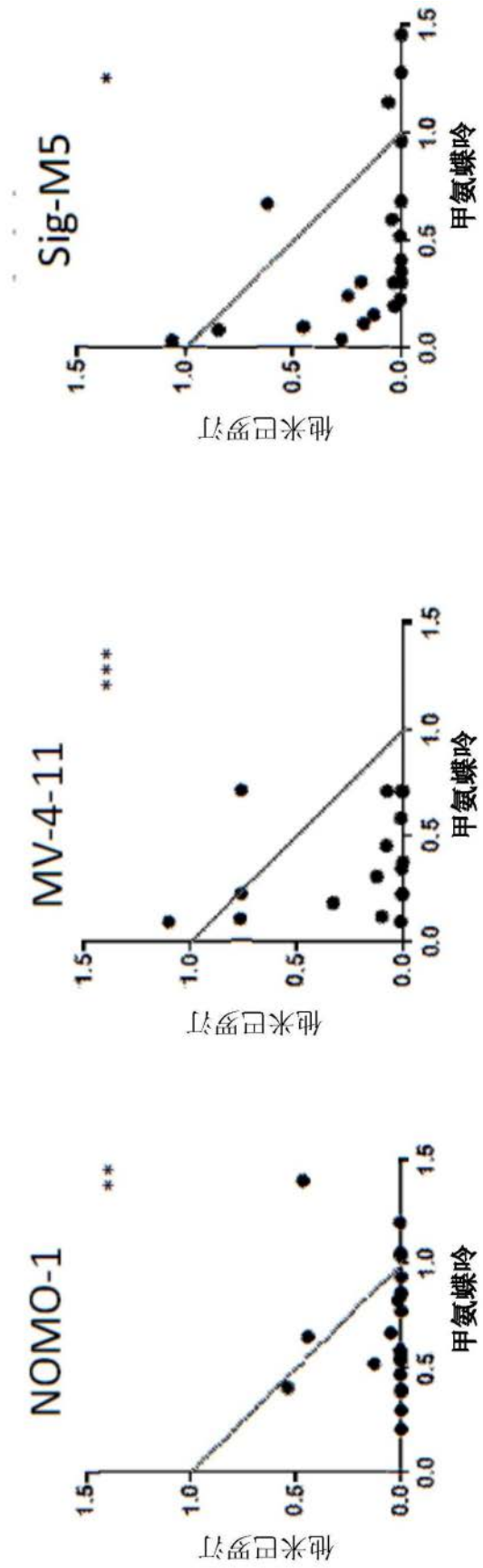


图19

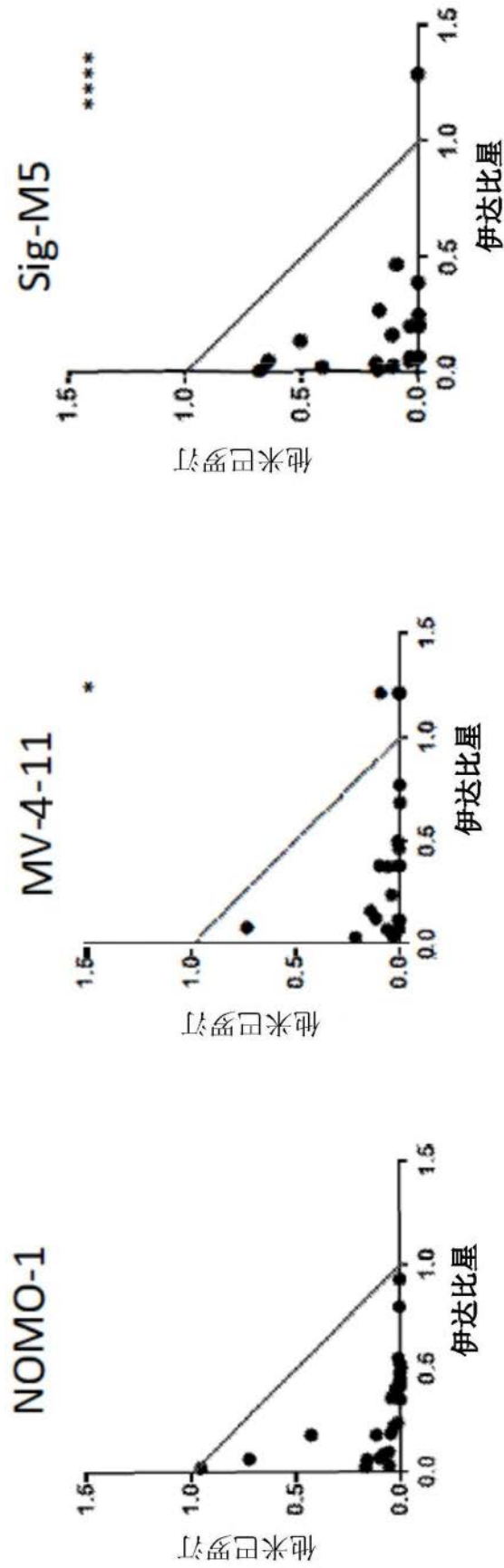


图20

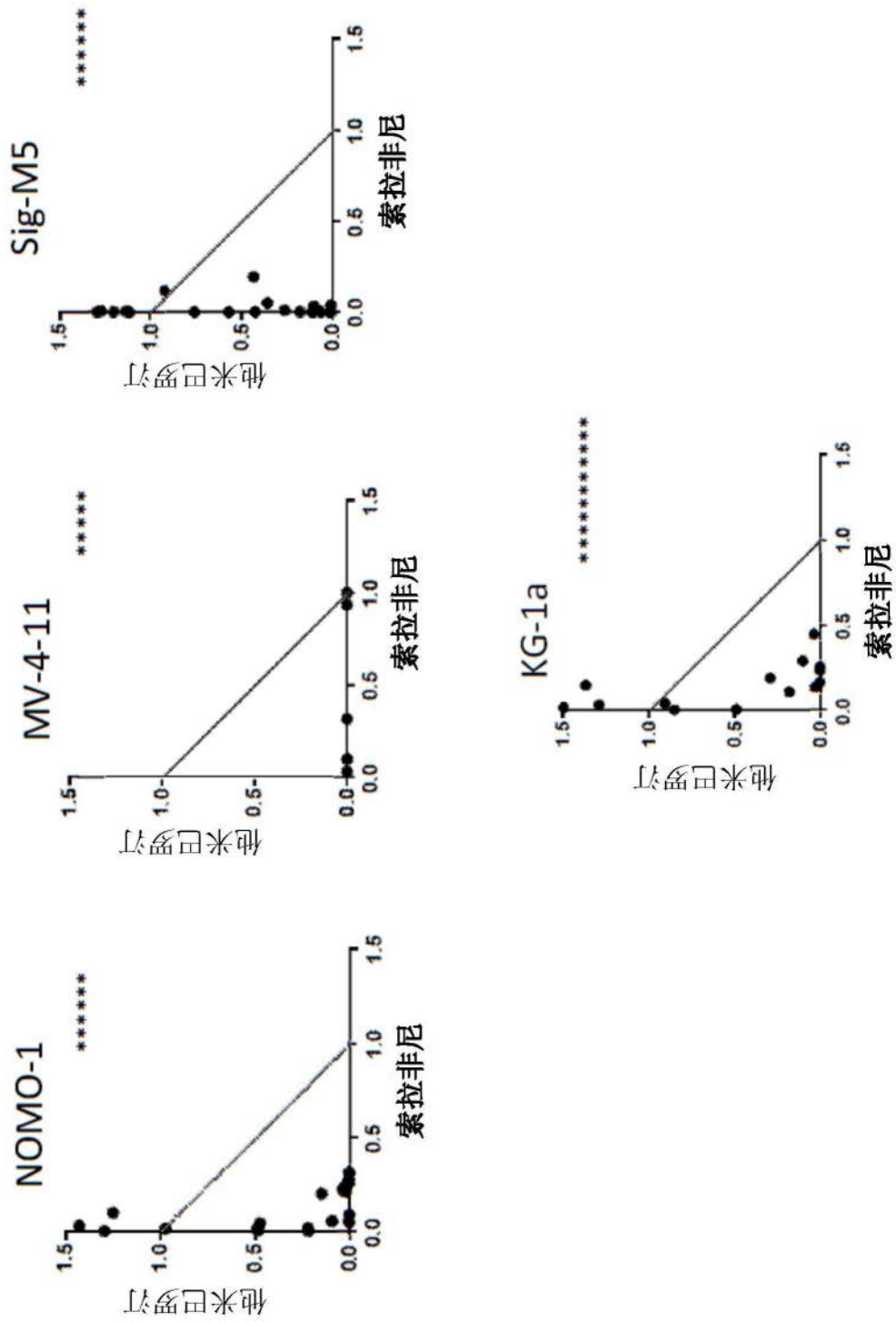


图21