

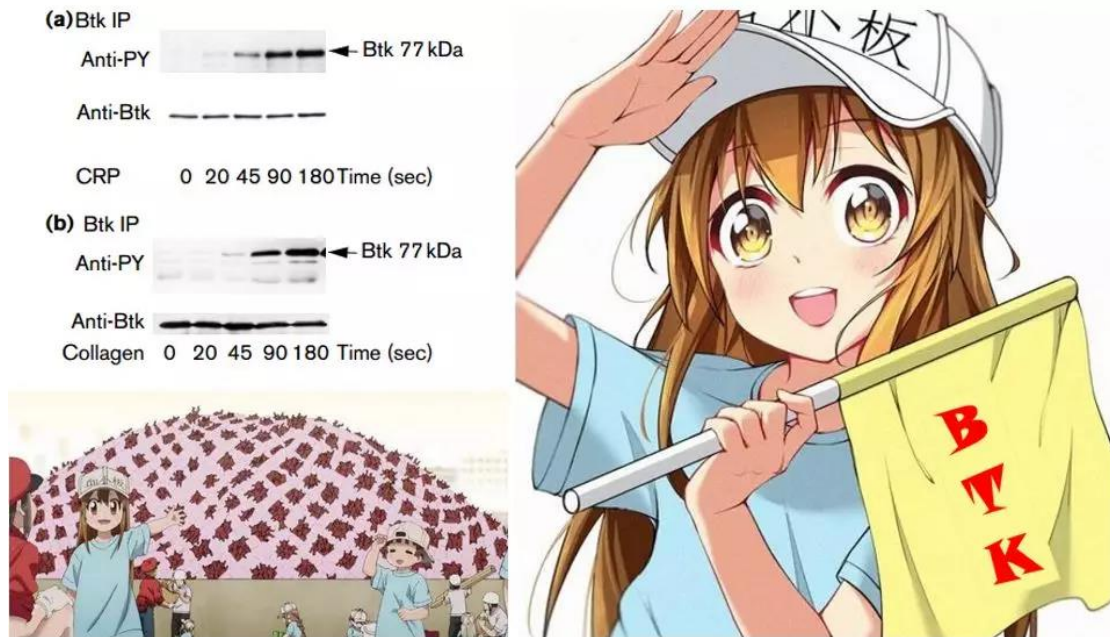
## 欧洲血液学杂志：TEC 与 BTK 抑制剂出血副作用无关

Tec 酪氨酸激酶是一种胞质内的蛋白酪氨酸激酶，在淋巴细胞发展和活化阶段，Tec 激酶在抗原受体的下游传导路径中发挥着重要的作用。在 BTK 抑制剂中，无论是 First in Class 的 Ibrutinib 还是最新的 Acalabrutinib，亦或是尚在临床试验中的 Zanubrutinib 都显示出一定的抑制作用。一些宣传认为 TEC 是 BTK 抑制剂出血副作用的主要原因，对其相对抑制力较弱的 BTK 抑制剂，其出血的副作用越小。事实真是如此吗？TEC 真的与出血具有直接的联系吗？近期，欧洲血液学杂志发表了最新的人体细胞研究，结果与体外研究结果恰恰相反，TEC 抑制强度与血小板聚集力没有直接关系，而 BTK 抑制的强度才与此有关，如果没有出血的副作用，可能对 BTK 的抑制效果反而需要打个问号了.....

### 早先的体外研究

#### BTK 与血小板凝聚相关

早在 1998 年，Current Biology 杂志就发表研究 (*Current Biology* 1998, 8:1137-1140)：BTK 参与血小板活化过程，是胶原受体糖蛋白 (GP) IV 活化的上游通路。且通过实验显示 **BTK 与胶原蛋白诱导的血小板凝聚相关。**



2003 年，BLOOD 杂志发表相关研究(*Blood. 2003 Nov 15;102(10):3592-9*), 选取 XLA (因 BTK 发生突变造成的无丙种球蛋白血症) 疾病患者的血小板以及 BTK-敲除的小鼠血小板进行检测, 结果显示血小板聚集量相对正常对照组明显减少, 且与其对应的是低浓度的胶原蛋白, 但在高浓度胶原蛋白下, 血小板聚集水平能够恢复接近正常:

若 BTK 敲除 :

BTK↓ → 胶原蛋白↓ → 血小板聚集↓

若增加胶原蛋白:

BTK↓ → 胶原蛋白↑ → 血小板聚集↑

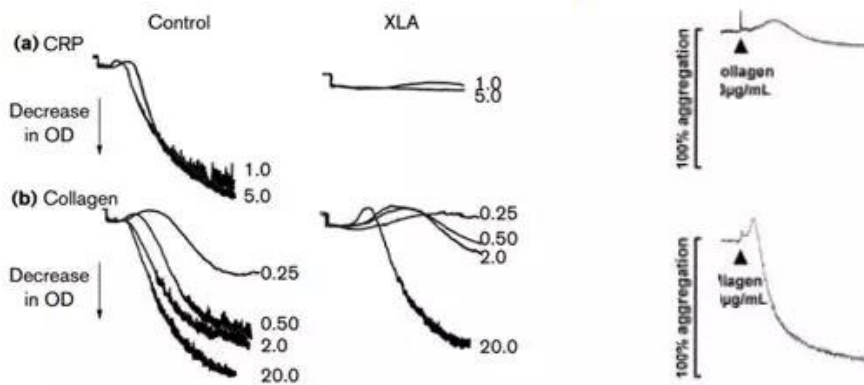


XLA

抽出血小板



BTK<sup>-/-</sup>



- XLA患者血小板聚集力相对对照组下降，而当胶原蛋白量提升后(0.25→20  $\mu\text{g/ml}$ )，血小板聚集程度开始接近。

- 大鼠BTK敲除后，血小板聚集力下降，加入大量胶原蛋白后开始恢复 (3→10  $\mu\text{g/ml}$ )

因此进一步验证：

**BTK 通过 GP IV 通路，控制胶原蛋白，进一步控制血小板聚集**

**BTK → 胶原蛋白 → 血小板聚集**

**BTK/TEC 与血小板凝聚**

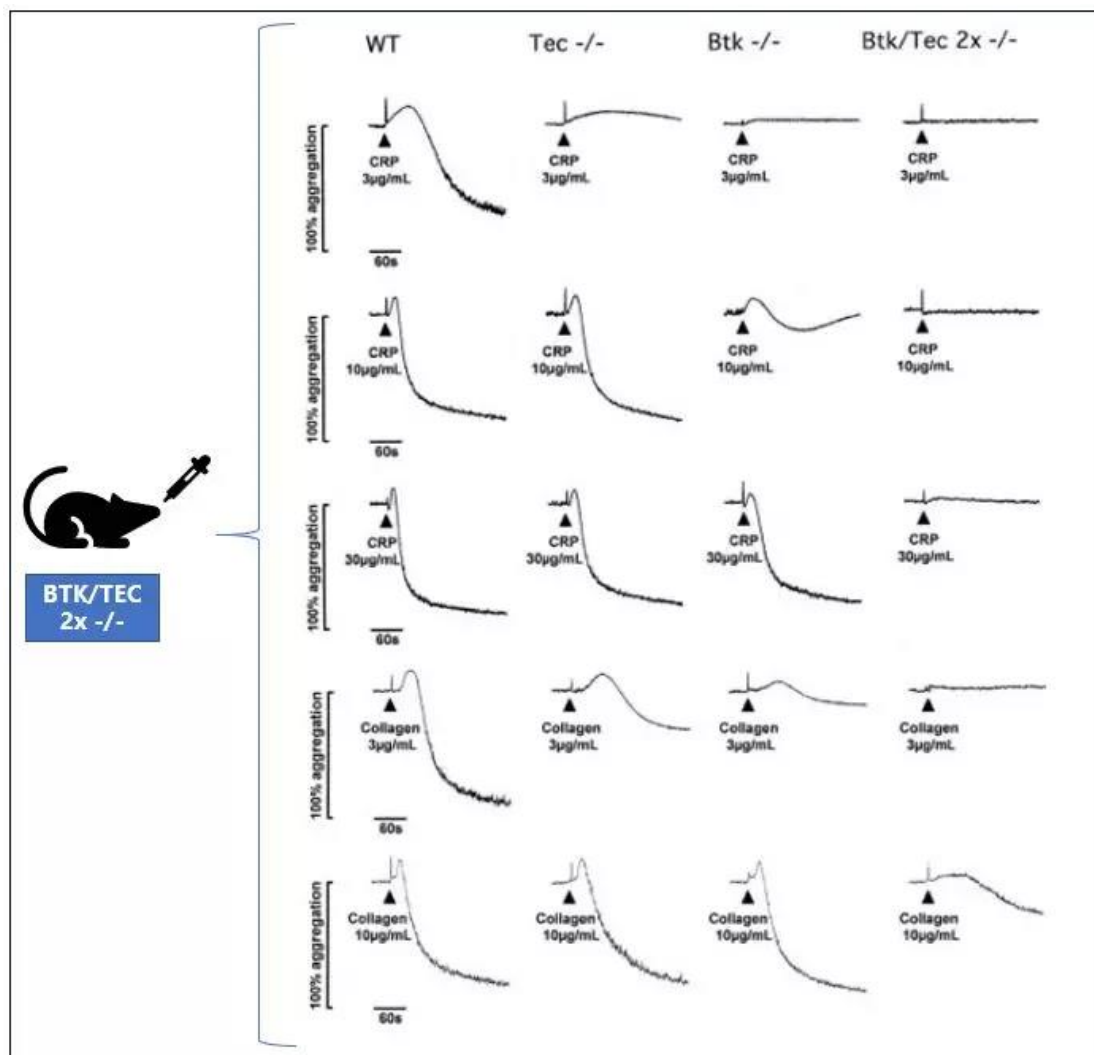
众所周知 BTK/TEC 有协同作用，那两者对血小板聚集是否也有协同作用。在

Blood 研究中发现，若小鼠的 BTK/TEC 同时被敲除，其血小板聚集能力确实

显著下降，胶原蛋白需要继续升高至 10 $\mu\text{g/ml}$  才能让血小板聚集能力开始有所

恢复。因此认为在小鼠体内，TEC 可部分代偿 BTK 功能的功能，并就此推断对 TEC 抑制会造成血小板聚集能力更严重下降。

BTK/TEC 同时敲除的大鼠，其血小板凝聚力进一步下降



体外研究缺陷：

- 只评估 IC50 在体外进行血小板化验来测量，并且没有考虑到每一种 BTK 抑制剂所表现出的不同临床意义的人类血浆暴露水平（如一些 BTK 抑制剂需多次服用，导致在血浆中暴露的水平更高）。
- 对 BTK 抑制剂所定义的体外潜能进行简单的比较，可能会导致在临床环境中得出不准确的结论。

本次欧洲血液学杂志针对体外研究的缺陷，进行了人体细胞的研究，主要针对三个方面：

- 1、激酶的选择性，寻找是否具备 BTK 选择性更强的抑制剂
- 2、靶标的选择性，检验哪个 BTK 抑制剂具有较强 OFF-TARGET
- 3、出血的副作用，是否是 TEC 抑制造成了使用 BTK 抑制剂出血的副作用

## 欧洲血液学杂志发表研究

1、激酶检测

### BTK 抑制剂：

ibrutinib, acalabrutinib, tirabrutinib, RN486, and zanubrutinib

### 检测方法：

- 1、Caliper LabChip：微流体移动移位分析
- 2、HotSpotSM：放射性同位素过滤结合试验
- 3、LanthaScreen™：荧光共振转移测试
- 4、KINOMEscan：活性位点定向检测分析

应用四种不同的检测方法检测相应 BTK 抑制剂在对于 BTK 及 TEC 的抑制强度

### 检测结果：

不同分析平台显示，其结果也并非得到一致性的结果，在 BTK 抑制能力方面，

**伊布替尼较 Acalabrutinib 在三个平台上均体现出其对 BTK 强大的抑制能**

**力。**

However, ibrutinib was consistently more potent than acalabrutinib in all three catalytic activity platforms that measured on-target BTK activity, with IC50 values ranging from 0.13 to 1.18 nM, in contrast with 2.79 to 135 nM for acalabrutinib.

在对 BTK 选择性分析方面在四种检测中各不相同。在 LabChip®和 KINOMEScan®检测中, ibrutinib 与 acalabrutinib 在 TEC/BTK 的比值上均不到两倍, 从数值上看 Acalabrutinib 相较对 BTK 有着略高的选择性, 但是两者没有达到统计学差异。但与之相反, 在 LanthaScreen™ 以及 TRFRET HotSpotSM 这两个检测平台上, Acalabrutinib 对 BTK 的选择性低于在 Ibrutinib, 并且有显著的统计学差异。

In the LabChip® and KINOMEScan® assay, the difference in the TEC/BTK ratio between ibrutinib and acalabrutinib was less than two-fold, with acalabrutinib being slightly more selective for BTK, although the differences did not reach statistical significance. In contrast, acalabrutinib was much less selective than ibrutinib in the LanthaScreen™ TRFRET and HotSpotSM assays and the differences were statistically significant.

**Table 1.** Comparison of kinase activity of ibrutinib and acalabrutinib on BTK and TEC by multiple assay platforms

Assay Platform	Test facility	Unit	Ibrutinib对BTK选择性强			Acalabrutinib对BTK选择性强		
			BTK	TEC	Ratio (TEC/BTK)	BTK	TEC	Ratio (TEC/BTK)
Caliper LabChip®	Nanosyn	IC <sub>50</sub> (nM)	0.29±0.12*	0.58±0.15 <sup>†</sup>	2.00	2.79±1.40	8.60±1.10 <sup>‡</sup>	3.08
LanthaScreen™	Aptuit	IC <sub>50</sub> (nM)	1.18±0.41	0.83±0.09	0.70	135±30.01	10.13±2.02 <sup>‡</sup>	0.075 <sup>‡</sup>
HotSpot <sup>SM</sup>	Reaction Biology Corp	IC <sub>50</sub> (nM)	0.13±0.01	1.31±0.25 <sup>†</sup>	10.08	19.7±9.2	65.75±44.5 <sup>†</sup>	3.34 <sup>‡</sup>
KINOMEScan®	DiscoverX	K <sub>d</sub> (nM)	0.89±0.11	1.25±0.45	1.40	11.45±1.97	17.75±8.77	1.55

\*Data are expressed as mean ± SD.

<sup>†</sup>p=0.057 for difference of IC<sub>50</sub> between BTK and TEC.

<sup>‡</sup>p<0.05 for difference of IC<sub>50</sub> between BTK and TEC, or difference in TEC/BTK ratio between ibrutinib and acalabrutinib.

而在 LabChip®平台对多个 BTK 抑制剂进行比较 (包括对 BTK 具有超高选择性的 RN486), 研究发现 Ibrutinib 对 BTK 的效力比其他共价 BTK 抑制剂更有效, 并且在所有四种抑制剂中具有最高的效应。而检测显示, 对于 BTK 靶向的选择性方面, 几个 BTK 抑制剂并没有差异。因此, 在多个检测分析平台上并

无法证明, Acalabrutinib 等其他新 BTK 抑制剂对 BTK 具有更强的选择性。

*Thus, we were unable to demonstrate that Acalabrutinib was significantly more selective towards BTK over TEC compared with ibrutinib using multiple assay platforms.*

**Table 2.** Kinase activity for four BTK inhibitors and their TEC/BTK ratio using LabChip® assay platform

Inhibitor	Activity (IC <sub>50</sub> , nM); n=4					
	BTK	TEC	Ratio (TEC/BTK)	ITK	TXK	BMX
Ibrutinib	0.29±0.12*	0.58±0.15	2.00	58.30±4.79	0.62±0.17	0.44±0.17
Acalabrutinib	2.79±1.40	8.60±1.10 <sup>†</sup>	3.08	4,620±530	207±31	46±7
Tirabrutinib	2.57±1.10	4.28±1.66	1.67	>10,000	131±64	9.10±2.76
RN486	0.28±0.29	34.78±5.71 <sup>†</sup>	124 <sup>‡</sup>	>1,500 <sup>§</sup>	>10,000	60±10

\*Data are expressed as mean±SD.

<sup>†</sup>p<0.05 for difference of IC<sub>50</sub> between BTK and TEC.

<sup>‡</sup>For TEC/BTK ratio, only RN486 was statistically different from the other 3 compounds (p<0.05), and there were no differences among the other 3 compounds.

<sup>§</sup>IC<sub>50</sub> ranges from >1,500 nM to >10,000 nM.

TEC/BTK选择性方面无统计学差异

## 2、靶标研究

研究对 BTK 抑制剂进行了相关细胞分析。

### BTK 靶标:

1、**CD69**: 在 B 细胞中, BCR-介导的 CD69 已被证明是独立依赖于 BTK 增殖。

2、**TMD8 细胞**: 一种 ABC-DLBCL 细胞株, 已被证实依赖于 BTK 活动增殖。

因此, 通过测量在 DoHH2 细胞和人的血液中的 CD69, 以及测量 TMD8 细胞的生长抑制, 来评估 BTK 抑制剂的靶细胞活性。

### 脱靶靶点:

利用 T 细胞受体 (TCR) ——由 Jurkat 急性 T 白血病细胞的刺激 IL-2 分泌, 以及 Jurkat 和 A549 肺腺癌细胞的扩散分析, 对 BTK 抑制剂的 off-target 进行了评估。

**Table 3.** Cellular activity of four BTK inhibitors on B cells and non-B cells

Inhibitor	Cellular Activity (EC <sub>50</sub> , μM); n≥3					
	On-target			Off-target		
	CD69 DoHH2 (αIG)*	Growth TMD8 (DLBCL) <sup>†</sup>	CD69 Whole Blood (αIGM) <sup>‡</sup>	IL-2 Jurkat (αCD3/28)	Proliferation Assays Jurkat (TCL) A549 (Lung)	
Ibrutinib	0.006±0.004 <sup>†</sup>	0.002±0.001	0.024±0.025	0.175±0.034	>3	>10
Acalabrutinib	0.016±0.011	0.005±0.002	0.044±0.017	3.642±0.294	>10	>10
Tirabrutinib	0.022±0.025	0.003±0.002	0.047±0.034	2.103±1.350	>3	>10
RN486	0.074±0.035	0.013±0.001	0.045±0.029	3.868±2.987	>10	>10

**BTK相关靶点均显示Ibrutinib具有更强的作用；而对于OFF-TARGET靶标，几个BTK抑制剂并未体现统计学差异**

<sup>†</sup>Ibrutinib vs. acalabrutinib: p<0.01; ibrutinib vs. tirabrutinib: p<0.05; ibrutinib vs. RN486: p<0.01; acalabrutinib vs. tirabrutinib: not significant; acalabrutinib vs. RN486: p<0.01; tirabrutinib vs. RN486: p<0.01.

<sup>‡</sup>Data are expressed as mean ± SD.

<sup>§</sup>Ibrutinib vs. acalabrutinib: p<0.05; ibrutinib vs. tirabrutinib: not significant; ibrutinib vs. RN486: p<0.01; acalabrutinib vs. tirabrutinib: not significant; acalabrutinib vs. RN486: p<0.01; tirabrutinib vs. RN486: p<0.05.

<sup>¶</sup>Ibrutinib vs. acalabrutinib: p<0.05; ibrutinib vs. tirabrutinib: not significant; ibrutinib vs. RN486: p<0.01; acalabrutinib vs. tirabrutinib: not significant; acalabrutinib vs. RN486: not significant; tirabrutinib vs. RN486: not significant.

结果显示，所有 BTK 抑制剂均在 BTK 上显示了有效的活性，而 Ibrutinib 显示出最大的效应。而在脱靶点上，几个 BTK 抑制剂并未有体现统计学差异。但值得注意的是，Ibrutinib 减少了 Jurkat T 细胞的 IL-2 分泌，即便细胞数量增加到 3 μM 以上，这也可能是由于 Ibrutinib 多靶点针对 ITK 起效的原因。

### 3、血小板聚集与 BTK、TEC 的关系

研究随后进一步确定 BTK 和 TEC 活性对胶原蛋白诱导的血小板聚集的相关性。

在多个健康者血小板聚集分析中测量四种 BTK 抑制剂的 IC<sub>50</sub> 值。Ibrutinib 的平均 IC<sub>50</sub> 是(0.35 ± 0.07)μM (n=7) ，这与先前的报告一致。与此相反，acalabrutinib 与 tirabrutinib 的 IC<sub>50</sub> 值分别为 1.85μM 和 3.15μM，相对血小板聚集抑制减少。但是需要注意的是，相对一天一次口服的 Ibrutinib，acalabrutinib 与 tirabrutinib 这两个化合物表现出更高的临床药物血浆暴露水平 (Acalabrutinib 临床剂量 100mg，每日两次)。稳态 C<sub>max</sub> 水平，Acalabrutinib 与 Tirabrutinib 分别为 1.78 和 2.76μM；Ibrutinib 则为 0.31μM，每天一次 420mg/d。（Zanubrutinib 在使用 80mg/d 的 IC<sub>50</sub> 为 0.44 ± 0.10 μM，其 C<sub>max</sub> 水平为 0.37 μM，在 LTA 分析中，也证明了 C<sub>max</sub> 和 IC<sub>50</sub> 之间的密切关系。）



**Table 4.** Comparison between  $C_{max}$  and platelet aggregation potency for ibrutinib, acalabrutinib, and tirabrutinib in subjects with B-cell malignancy

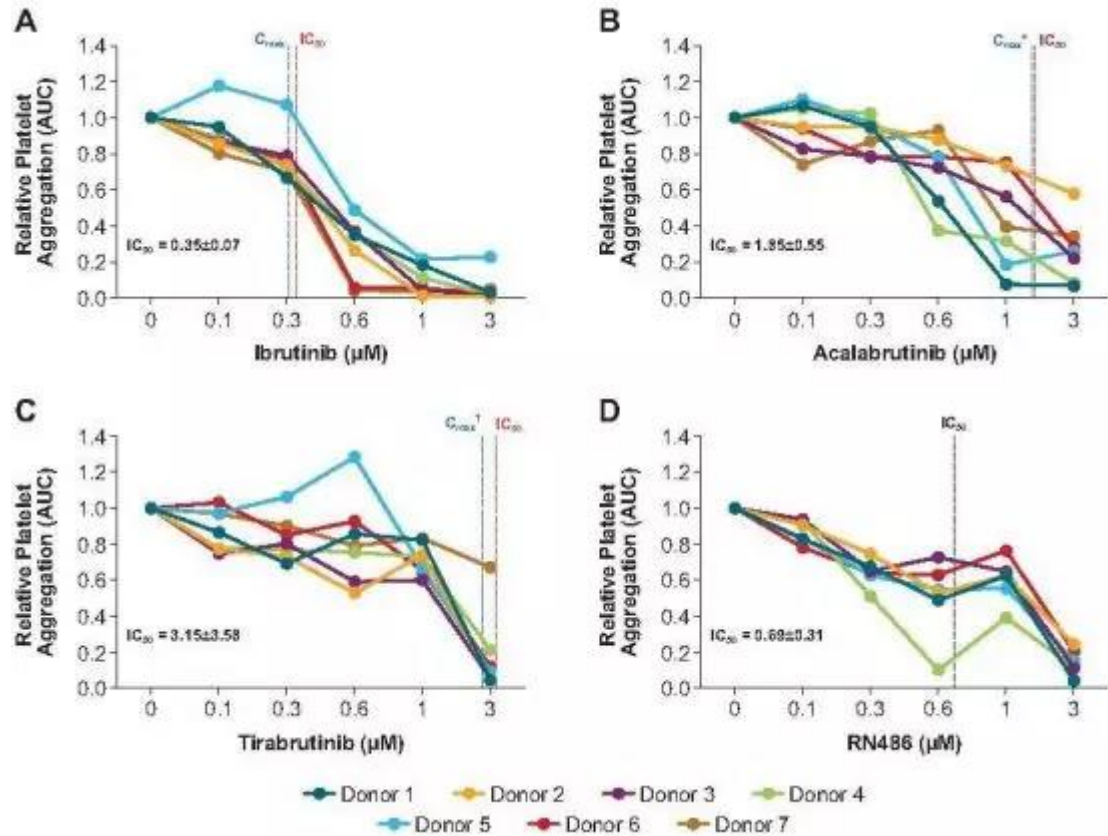
Ibrutinib		Acalabrutinib*		Tirabrutinib*	
Inhibition of platelet aggregation $IC_{50}=0.35\pm 0.07$ $\mu M$ (n=7 <sup>†</sup> )		Inhibition of platelet aggregation $IC_{50}=1.85\pm 0.55$ $\mu M$ (n=7)		Inhibition of platelet aggregation $IC_{50}=3.15\pm 3.58$ $\mu M$ (n=7)	
Dose level (mg)	$C_{max}$ ( $\mu M$ )	Dose level (mg)	$C_{max}$ ( $\mu M$ )	Dose level (mg)	$C_{max}$ ( $\mu M$ )
420 q.d.	0.31	100 q.d.	1.14	160 q.d.	1.14
560 q.d.	0.37	175 q.d.	1.73	320 q.d.	1.95
840 q.d.	0.48	100 b.i.d.	1.78	400 q.d.	2.76
		250 q.d.	2.90	480 q.d.	2.36
		400 q.d.	1.94	500 q.d.	3.63
				600 q.d.	3.31

b.i.d., twice daily; q.d., once daily.

\*Pharmacokinetic data for acalabrutinib are from reference (26), and for tirabrutinib are from reference (28).

<sup>†</sup>Volunteer number.

从每个药物的  $C_{max}$  以及各自的  $IC_{50}$  值来看, 用药后, 每个 BTK 抑制剂的水平稳态  $C_{max}$  浓度均接近其  $IC_{50}$  值, 并在临床环境中对血小板聚集进行的抑制。



研究证实，在 B 细胞中血小板聚集和 CD69 诱导的效力之间存在明显的相关性，与 BTK 活动明显相关。与此相反，TEC 与血小板聚集并无直接关联（见下图），这表明 BTK 在调节信号传导在诱导人类样本中的血小板聚集方面起着主导作用。

★ 欧洲血液学杂志研究报道总结 ★

- 激酶的选择性：** BTK 抑制剂在四个不同检测平台上对 BTK 与 TEC 选择性检测的结果并不相同，因此多个检测分析平台上结果的不同，暂时并无法证明哪种 BTK 抑制剂具有更强的 BTK 选择性。
- 靶标研究：** 所有 BTK 抑制剂均在 BTK 上显示了有效的活性，而 Ibrutinib 显示出最大的效应。而在脱靶点上，几个 BTK 抑制剂之间比较并未有体现统计学差异，因此无法对所谓的脱靶状况进行描述。

3、**出血的副作用**：研究确认血小板聚集与 BTK 活动明显相关。并进一步证明，**TEC 与血小板聚集并无直接关联，这表明 BTK 在调节信号传导在诱导人类样本中的血小板聚集方面起着主导作用，BTK 抑制性越强对血小板聚集抑制可能越强，而非所谓的脱靶 TEC 效应导致的 BTK 抑制剂出血的副作用。**