



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102016592 A

(43) 申请公布日 2011. 04. 13

(21) 申请号 200980115353. 3

代理人 黄革生 陈迎春

(22) 申请日 2009. 04. 28

(51) Int. Cl.

(30) 优先权数据

08155401. 6 2008. 04. 29 EP

08156856. 0 2008. 05. 23 EP

G01N 33/68 (2006. 01)

G01N 33/74 (2006. 01)

G01N 33/84 (2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010. 10. 29

(86) PCT申请的申请数据

PCT/EP2009/055127 2009. 04. 28

(87) PCT申请的公布数据

W02009/133101 EN 2009. 11. 05

(71) 申请人 诺瓦提斯公司

地址 瑞士巴塞尔

(72) 发明人 D·格劳斯 波塔 V·瓜尼亚诺

E·马雷尔 P·韦尔代什

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

权利要求书 3 页 说明书 23 页 附图 7 页

(54) 发明名称

监测成纤维细胞生长因子受体的激酶活性的
调节的方法及所述方法的应用

(57) 摘要

本发明主要涉及体外诊断的方法,特别是选自成纤维细胞生长因子 23(FGF23)、无机磷 (P)、无机磷和总钙的乘积 ($P \times tCa$)、骨桥蛋白 (OPN) 和甲状旁腺激素 (PTH) 的组中的化合物作为生物标记物的应用。该生物标记物可用于监测成纤维细胞生长因子受体 (FGFR) 激酶活性的调节,特别是其抑制,和 / 或 FGFR 抑制的继发效应的发生。本发明进一步提供了涉及这些应用的方法和试剂盒。

1. 选自成纤维细胞生长因子 23 (FGF23)、无机磷 (P)、无机磷和总钙的乘积 ($P \times tCa$)、骨桥蛋白 (OPN) 和甲状旁腺激素 (PTH) 的组中的化合物作为生物标记物的应用。

2. 如权利要求 1 所述的应用, 所述应用用于成纤维细胞生长因子受体 (FGFR) 激酶活性的调节, 优选用于 FGFR 激酶活性的抑制。

3. 如权利要求 1 或 2 所述的应用, 其中所述化合物为 FGF23。

4. 如权利要求 3 所述的 FGF23 的应用, 所述应用用于测定 FGFR 抑制剂的治疗有效性和 / 或一种或多种继发效应。

5. 如权利要求 4 所述的应用, 用于测定治疗有效性, 其中优选所述治疗有效性选自增生性疾病和 / 或非癌疾病的治疗、预防或病程延迟组成的组中。

6. 如权利要求 4 所述的应用, 用于测定 FGFR 抑制剂的一种或多种继发效应, 其中优选所述继发效应是异位矿化。

7. 如权利要求 4-6 中任一项所述的应用, 其中所述 FGFR 抑制剂为大分子或小分子量化合物, 特别地, FGFR 抑制剂选自 PD176067、PD173074、化合物 A 3-(2, 3-二氯-3, 5-二甲氧基-苯基)-1-{6-[4-(4-乙基-哌嗪-1-基)-苯基氨基]-嘧啶-4-基}-1-甲基脲、TKI258 和化合物 B ([4, 5'] 二嘧啶基-6, 4' 二胺的衍生物) 构成的组。

8. 一种测定成纤维细胞生长因子受体 (FGFR) 的激酶活性的调节的方法, 包括步骤:

- a) 对受试者给予 FGFR 抑制剂;
- b) 提供所述受试者的样品;
- c) 测定所述样品的 FGF23 水平; 和
- d) 将所述样品的 FGF23 水平与参照水平比较。

9. 如权利要求 8 所述的方法, 其中所述受试者为哺乳动物、特别是啮齿动物如小鼠或大鼠、狗、猪或人。

10. 一种测定 FGFR 抑制剂的一种或多种继发效应的方法, 包括权利要求 8 的步骤 a) 至 d), 进一步包括步骤:

- e) 将所述 FGF23 水平与一种或多种继发效应相关联; 和
- f) 测定所述 FGF23 的水平, 高于该水平时发生与所使用的治疗相关联继发效应。

11. 如权利要求 8-10 中任一项所述的方法, 其中所述 FGFR 抑制剂是大分子或小分子量化合物, 特别是 3-(2, 3-二氯-3, 5-二甲氧基-苯基)-1-{6-[4-(4-乙基-哌嗪-1-基)-苯基氨基]-嘧啶-4-基}-1-甲基脲或 TKI258。

12. 如权利要求 8-11 中任一项所述的方法, 其中与所述参照水平相比, 所述 FGF23 水平得到了提高。

13. 一种诊断试剂盒, 包括:

- a) 识别 FGF23 或其部分的分子, 该分子可以是标记形式或未标记形式;
- b) 检测选自无机磷 (P)、磷和总钙的乘积 ($P \times tCa$)、骨桥蛋白 (OPN) 和甲状旁腺激素 (PTH) 的第二生物标记物的至少一种试剂;
- c) 可选的使用指南;
- d) 可选的检测手段; 和
- e) 可选的固相。

14. 一种试剂盒的应用，所述试剂盒包括：

- a) 识别 FGF23 或其部分的分子，该分子可以是标记形式或未标记形式；
- b) 可选的使用指南；
- c) 可选的检测手段；和
- d) 可选的固相，

所述应用用于在受试者的样品中测定 FGFR 抑制剂的有效性和 / 或 FGFR 抑制剂的继发效应。

15. 一种测定 FGFR 激酶活性的调节的离体方法，所述方法包括步骤：

- a) 在开始 FGFR 抑制剂治疗之前测定患者的样品中 FGF23 水平（个体参照水平）；
- b) 在所述 FGFR 抑制剂治疗之后测定同一患者的样品中的 FGF23 水平，

其中，步骤 b) 中 FGF23 水平相比于个体参照水平的提高指示发生了 FGFR 激酶活性的调节，优选抑制。

16. 如权利要求 15 所述的方法，其中所述 FGFR 抑制剂选自 PD176067、PD173074、化合物 A 3-(2, 3-二氯-3, 5-二甲氧基-苯基)-1-{6-[4-(4-乙基-哌嗪-1-基)-苯基氨基]-嘧啶-4-基}-1-甲基脒、TKI258 和化合物 B([4, 5']二嘧啶基-6, 4'二胺的衍生物)。

17. 如权利要求 15 或 16 所述的方法，其中所述 FGFR 抑制剂为化合物 A。

18. FGFR 抑制剂在制备治疗患者的增生性疾病的药物中的应用，其中优选所述增生性疾病为癌症，其中所述患者在使用该 FGFR 受体抑制剂之后具有 FGF23 水平的升高。

19. 一种治疗患者的增生性疾病的方法，其中优选所述增生性疾病为癌症，包括对所述患者给予 FGFR 抑制剂的步骤，其中所述患者在使用该 FGFR 受体抑制剂之后具有 FGF23 水平的升高。

20. 如权利要求 18 所述的应用或如权利要求 19 所述的方法，其中所述 FGFR 抑制剂选自 PD176067、PD173074、化合物 A 3-(2, 3-二氯-3, 5-二甲氧基-苯基)-1-{6-[4-(4-乙基-哌嗪-1-基)-苯基氨基]-嘧啶-4-基}-1-甲基脒、TKI258 和化合物 B([4, 5']二嘧啶基-6, 4'二胺的衍生物)。

21. 如权利要求 18 所述的应用或权利要求 19 所述的方法，其中所述 FGFR 抑制剂为化合物 A。

22. 一种诊断试剂盒，包括：

- a) 识别 FGF23 或其部分的分子，该分子可以是标记形式或未标记形式；
- b) 能够检测选自无机磷 (P)、磷和总钙的乘积 (P x tCa)、骨桥蛋白 (OPN) 和甲状旁腺激素 (PTH) 的组中的第二生物标记物的至少一种试剂；
- c) 可选的使用指南；
- d) 可选的检测手段；和
- e) 可选的固相。

23. 一种筛选患者以确定其是否从 FGFR 抑制剂治疗中受益的方法，该方法包括步骤：

- (a) 对患者进行一段时间 FGFR 抑制剂治疗；
- (b) 在所述治疗后测量所述患者的样品中的 FGF23 水平；

(c) 将步骤 (b) 得到的 FGF23 值与个体参照水平 (该患者在开始所述 FGFR 抑制剂治疗之前的 FGF23 水平) 比较, 确定该患者是否应该继续所述 FGFR 抑制剂治疗。

监测成纤维细胞生长因子受体的激酶活性的调节的方法及 所述方法的应用

发明领域

[0001] 本发明主要涉及体外诊断方法，特别是选自成纤维细胞生长因子 23 (FGF23)、无机磷 (P)、无机磷和总钙的乘积 ($P \times tCa$)、骨桥蛋白 (OPN) 和甲状旁腺激素 (PTH) 的化合物作为生物标记物的应用。所述生物标记物可用来监测成纤维细胞生长因子受体 (FGFR) 激酶活性的调节，特别是它的抑制，和 / 或 FGFR 抑制的继发效应的发生。

背景技术

[0002] 成纤维细胞生长因子 (FGF) 家族和它们的信号受体涉及多种生物活性 (增殖、存活、凋亡、分化、活动力)，这些活性控制着从蠕虫到人类的生物生长和维持的关键过程 (发育、血管发生、代谢)。已经鉴定出来 22 个不同的 FGF，它们都含有保守的有 15-65% 序列同一性的 120 个氨基酸核心区域。FGFs 通过结合和激活下述家族来调节它们的细胞反应，该家族由 4 个 RTKs FGFR1 到 FGFR4 组成，它们都有几个同种型 (Lee PL 等人, Science 245 : 57-60 (1989) ; Givol D 等人, FASEB J.6 : 3362-9 (1992) ; Jaye M 等人, EMBO J.7 : 963-9 (1988) ; Ornitz DM & Itoh N, Genome Biol.2 (2001))。配体结合引起受体二聚作用和激酶的激活，从而导致下游分子的磷酸化和 / 或募集以及细胞内信号通路的激活。

[0003] 已经在小鼠模型上通过特殊发育系统分析、表达模式和基因打靶技术研究了 FGF/FGFR 的生物作用。这些研究已经表明它们在包括血管发生和伤口愈合、发育及代谢等许多生物功能中的作用。已经发现多种人类颅缝早闭综合征和骨骼发育不良与导致头颅、手指、骨骼严重发育障碍的 FGFR1、FGFR2 和 FGFR3 特殊功能变异有关。Webster MK & Donoghue DJ, Trends Genet.1997 13 : 178-82 (1997) ; Wilkie AO, Hum. Mol. Genet.6 : 1647-56 (1997)。

[0004] 流行病学研究报道了人类癌症中 FGF/FGFR 的遗传改变和 / 或异常表达：导致 FGFR1 激酶的构成型激活的 FGFR1 的易位和与其他基因的融合是导致 8p11 骨髓增生异常的原因 (MacDonald D & Cross NC, Pathobiology 74 : 81-8 (2007))。复发的 14q32 染色体易位至免疫球蛋白重链转换区导致了在多种骨髓瘤中 FGFR3 过表达的失调 (Chesi M 等人, Nature Genetics 16 : 260-264 (1997) ; Chesi M 等人, Blood 97 : 729-736 (2001))。已报道了乳腺肿瘤中 FGFR1, FGFR2 和 FGFR4 的基因扩增和蛋白质过表达 (Adnane J 等人, Oncogene 6 : 659-63 (1991) ; Jaakkola S 等人, Int.J.Cancer 54 : 378-82 (1993) ; Penault-Llorca F 等人, Int.J.Cancer 61 : 170-6 (1995) ; Reis-Filho JS 等人, Clin.Cancer Res.12 : 6652-62 (2006))。已知在胃癌 (Jang JH 等人, Cancer Res.61 : 3541-3 (2001)) 和子宫内膜癌 (Pollock PM 等人, Oncogene (May 21, 2007)) 中体细胞的 FGFR2 活化突变，而且已经在泌尿膀胱癌中鉴别出了导致不依赖于配体的受体构成型活化的 FGFR3 的特殊结构域的体细胞突变 (Cappellen D 等人, Nature Genetics 23 : 18-20 (1999) ; Billerey C 等人, Am.J.Pathol.158 (6) : 1955-9 (2001))。此外，FGFR3 mRNA 和蛋白质的过表达已经

发现于此类癌症中 (Gomez-RomanJJ 等人, Clin.Cancer Res.11 (2 Pt 1) : 459-65 (2005))。

[0005] 所以, 能够抑制 FGFR 的激酶活性的化合物是用于治疗具有失调的 FGFR 信号的人类癌症的可能备选物。

[0006] 已经验证了 FGFR 酪氨酸激酶的小分子量抑制剂的应用 (参见 Brown, A.P 等人 (2005), Toxicol.Pathol.33, 第 449-455 页; Xin, X. 等人 (2006), Clin.Cancer Res., 12(16) 卷, 第 4908-4915 页; Trudel, S. 等人 (2005), Blood, 105(7) 卷, 第 2941-2948 页)。

[0007] 但是, 在动物模型中这样的抑制剂治疗有效性的确定相当麻烦, 因为其涉及例如肿瘤生长的测定、FGF 受体的自磷酸化和 / 或信号级联的下游分子如 Erk1/2 磷酸化的抑制。虽然这些方法适用于临床研究的临床前设定, 但是理想的是以一种简单直接的方式测定治疗有效性的非侵入性方法。

[0008] 并且, 用 FGFR 酪氨酸激酶抑制剂 PD176067 在大鼠和狗非临床毒性研究中产生了软组织的矿化。由于这种不需要的效果出现, 因此进一步的研究是必要的, 以确定该制剂是否具有用于治疗癌症的潜力 (参见 Brown, A.P 等人 (2005), Toxicol.Pathol.33, 第 449-455 页)。

[0009] 软组织和脉管系统中的异位矿化、钙磷酸盐的不适当沉淀, 能够导致发病和死亡 (London GM 等人, Curr.Opin.Nephrol.Hypertens.2005, 14 : 525-531)。

[0010] 所以, 本领域需要用于指示 FGFR 抑制剂治疗有效性的生物标记物、可靠方法和相应的试剂盒。并且, 预测 FGFR 抑制剂给药之后的不需要的继发效应的方法, 特别是预测异位矿化的方法, 将是非常有用的。

发明内容

[0011] 已令人惊讶地发现选自由成纤维细胞生长因子 23 (FGF23)、无机磷 (P)、无机磷和总钙的乘积 ($P \times tCa$)、骨桥蛋白 (OPN) 和甲状旁腺激素 (PTH) 组成的组中的化合物是有用的生物标记物, 这些生物标记物可用来监测成纤维细胞生长因子受体 (FGFR) 抑制剂的活性, 并可进一步用于预测 FGFR 抑制作用的继发效应的发生, 特别是异位矿化的发生。

[0012] 具体而言, 本发明提供 FGF23 作为生物标记物的应用。在抑制 FGFR 的同时, 还发现了也可导致 FGF23 升高的抗肿瘤活性。FGF23 升高的程度与使用抑制剂的剂量相关。在某些剂量下检测到继发效应, 特别是软组织和脉管的矿化。由于这种双重涵义, FGF23 可被认为是 FGFR 抑制剂的药效学标记物。允许监测药物生物活性的药效学生物标记物的鉴定和确认可用于剂量选择和治疗优化。

[0013] 并且, 为预测和监测成纤维细胞生长因子受体调节之后的异位矿化而对潜在生物标记物进行的整体分析表明, 确认选自由 FGF23、P、 $P \times tCa$ 、OPN 和 PTH 构成的组中的化合物是异位矿化的潜在标记物。

[0014] 所以, 第一方面, 本发明提供了选自 FGF23、P、 $P \times tCa$ 、OPN 和 PTH 构成的组中的化合物作为生物标记物的应用, 特别是 FGFR 激酶活性调节的生物标记物的应用。

[0015] 在一个实施方式中, 该化合物用于监测成纤维细胞生长因子受体激酶活性的抑制。优选该化合物是 FGF23。

[0016] 本发明进一步提供了选自成纤维细胞生长因子 23 (FGF23)、无机磷 (P)、无机磷和总钙的乘积 ($P \times tCa$)、骨桥蛋白 (OPN) 和甲状旁腺激素 (PTH) 的组中的化合物作为安全生物标记物以预防继发效应、特别是异位矿化的应用。优选该化合物是 FGF23。

[0017] 在另一方面, 本发明提供测定 FGFR 激酶活性调节的方法, 特别是测定激酶活性抑制的方法, 包括下列步骤:

[0018] a) 对受试者给予 FGFR 抑制剂;

[0019] b) 提供所述受试者的样品;

[0020] c) 测定所述样品的 FGF23 水平; 和

[0021] d) 将所述样品的 FGF23 水平与参照水平比较, 其中所述参照水平是在用 FGFR 抑制剂治疗开始之前受试者的 FGF23 水平。

[0022] 此外, 还提供了测定 FGFR 抑制剂治疗有效性的方法, 包括上述方法的步骤 a) 至 d), 其中参照水平是用 FGFR 抑制剂治疗开始之前所述受试者的 FGF23 水平。

[0023] 此外, 还提供了测定 FGFR 抑制剂的一种或多种继发效应的方法, 该方法包括上述方法的步骤 a) 至 d), 其中参照水平是用 FGFR 抑制剂治疗开始之前所述受试者的 FGF23 水平。

[0024] 可用任一种选自 P、 $P \times tCa$ 、OPN 和 PTH 的化合物相似地实施此处公开的方法。

[0025] 本发明在临床设置中特别适用于剂量选择、疗程选择、患者选择和治疗优化。

[0026] 下文中将更加详细地描述本发明。可理解的是, 可按照意愿组合多种实施方式、优选方案和范围。并且, 取决于具体的实施方式, 可以不使用选择的定义、实施方式或范围。

附图说明

[0027] 图 1 是表明用化合物 A 治疗具有 NIH3T3/FGFR3^{S249C} 皮下肿瘤的雌性无胸腺裸鼠过程中肿瘤体积 (mm^3) 改变的图。白色圆圈: 化合物 A, 0mg/kg, 每日一次 (qd), 口服 (p.o.); 黑色圆圈: 化合物 A, 10mg/kg, qd, p.o.; 灰色圆圈: 化合物 A, 30mg/kg, qd, p.o.; 黑色三角: 化合物 A, 50mg/kg, qd, p.o.。

[0028] 图 2 是表明肿瘤离体 (ex vivo) 分析的照片。最后一次化合物给药后 2 小时将肿瘤切下。裂解肿瘤组织, 用特异性抗体免疫沉淀 FGFR3。用 SDS-PAGE 分析免疫复合物, 印迹到 PVDF 膜上, 用抗 pTyr 抗体探测, 以监测 FGFR3 的酪氨酸磷酸化。剥离膜, 用抗 FGFR3 抗体再次探测以监测总 FGFR3 蛋白质水平。

[0029] 图 3 是表明用化合物 A 治疗具有 RT112/荧光素 (luciferase) 皮下异种移植物的雌性无胸腺裸鼠过程中肿瘤体积 (mm^3) 改变的图。白色圆圈: 载体, 10mg/kg, qd, p.o.; 白色方框: 化合物 A, 50mg/kg, qd, p.o.; 黑色三角: 化合物 A, 75mg/kg, qd, p.o.。

[0030] 图 4 是表示具有 RT112/荧光素皮下异种移植物的雌性无胸腺裸鼠血浆样本中的 FGF23 水平的柱状图, 该血浆收集自最后一次以指定剂量的化合物 A 或载体对照给予 2 小时之后, 疗程是 14 天 ($n = 6$)。FGF23 水平用 FGF23ELISA 试剂盒监测, 以 pg/mL 为单位表示。该试剂盒来自 Kainos, 货号是 CY-4000。数据表示为平均值 $\pm$ SD。

[0031] 图 5 是实施例 2 中所述的无机磷 (P) 水平 [mg/dl] 的散点图。

[0032] 图 6 是总钙 (tCa) 血清水平 [mg/dl] 的散点图。

[0033] 图 7 是 $P \times tCa$ 的乘积血清水平 [mg^2/dl^2] 的散点图。

[0034] 图 8 是 FGF23 血清水平 [pg/ml] 的散点图。

[0035] 图 9 是表示血浆样本中 FGF23 水平的柱状图, 血浆样本分别来自治疗前或用 TKI258 每天 200、300、400 或 500mg、每天一次的连续剂量进行口服治疗, 第一个周期第 15 天和第一个周期第 26 天的黑素瘤患者。FGF23 水平用 FGF23 ELISA 试剂盒监测, 以 pg/mL 为单位表示。该试剂盒来自 Kainos, 货号是 CY-4000。数据表示为平均值 $\pm$ SD。

[0036] 图 10 示出了用 400mgTKI258 治疗的黑素瘤患者在第一个周期第 15 天肿瘤活组织检查的照片, 用识别磷酸化和活化的 FGFR 的抗体进行免疫组化分析。

[0037] 图 11 是表示在 8 个不同的肾细胞癌患者中, 基线 (C1D1) 和用 500mgTKI258 治疗第一个周期第 15 天 (C1D15) 和第一个周期第 26 天 (C1D26) 的 FGF23 水平的图, 基线表示为 1, 其余的基于基线归纳表示为倍数。

[0038] 图 12 是表明 RT112 肿瘤异种移植离体 (ex vivo) 分析的照片。化合物给药后 3 小时将肿瘤切下。裂解肿瘤组织, 使用购自 Cell Signaling 的抗体 (#3864) 用蛋白质杂交分析 FRS2 酪氨酸磷酸化水平, 该抗体当 FRS2 在 Tyr196 上磷酸化时与其识别。用检测 β -微管蛋白的 Sigma 抗体 (#T4026) 检测各成员 (membrane), 作为上样对照。

[0039] 图 13 为表示大鼠血清样本中 FGF23 水平的柱状图, 这些大鼠用所示口服剂量的 TKI258 治疗, 样本在用 TKI258 或载体对照治疗后 24 小时舌下取血得到。FGF23 水平用 FGF23ELISA 试剂盒监测, 以 pg/mL 为单位表示。该试剂盒来自 Kainos, 货号是 CY-4000。数据表示为平均值 $\pm$ SD, $n = 4$ 。用单因素 Anova post-hoc Dunnett's 分析相对于载体进行数据比较。

[0040] 图 14 为表示大鼠血清样本中 FGF23 水平的柱状图, 这些大鼠用所示口服剂量的所示化合物治疗, 样本在用化合物治疗后 24 小时舌下取血得到。FGF23 水平用 FGF23ELISA 试剂盒监测, 以 pg/mL 为单位表示。该试剂盒来自 Kainos, 货号是 CY-4000。数据表示为平均值 $\pm$ SD, $n = 6$ 。

具体实施方式

[0041] 第一方面, 本发明提供了选自成纤维细胞生长因子 23 (FGF23)、无机磷 (P)、无机磷和总钙的乘积 ($P \times tCa$)、骨桥蛋白 (OPN) 和甲状旁腺激素 (PTH) 的组中的化合物作为生物标记物的应用, 特别是作为成纤维细胞生长因子受体 (FGFR) 激酶活性调节、优选抑制的生物标记物的应用。该化合物优选是 FGF23。

[0042] 成纤维细胞生长因子 23 (FGF23) 是已知的。考虑到具有广泛生物学活性的成纤维细胞生长因子家族成员。蛋白质序列和 / 或蛋白质的编码序列可以从公众可获得的本领域已知的数据库得到。人 FGF23 在本领域也称为 ADHR ; HYPF ; HPDR2 ; PHPTC。测定方法为本领域已知, 并具体描述于下文中。

[0043] 术语“无机磷”(P) 为本领域已知, 特别指无机磷的血液水平, 例如可以通过紫外线方法用试剂盒在血清中测量, 例如购自 RANDOX Laboratories LTD, UK 的试剂盒, 也可用临床化学分析仪测量, 例如 HITACHI 717 分析仪 (Roche Diagnostics)。

[0044] 术语“总钙”(tCa)为本领域已知,特别指总钙的血液水平,例如可以通过紫外线方法用试剂盒在血清中测量,例如购自 RANDOX Laboratories LTD 的试剂盒,也可用临床化学分析仪测量,例如 HITACHI 717 分析仪。

[0045] 术语“无机磷与总钙的乘积”(P×tCa)为本领域已知,具体而言,通过将以 mg/dL 表示的无机磷(P)水平的值与总钙(tCa)水平的值相乘得到。

[0046] 骨桥蛋白(OPN)是已知的,也称作分泌型磷蛋白1、骨涎蛋白I或早期T淋巴细胞活化因子1。它被认为是细胞外结构蛋白。在本领域人骨桥蛋白已知为 SPP1。骨桥蛋白可以根据制造商建议用例如 Assay Designs, Inc., USA 的试剂盒骨桥蛋白(大鼠)EIA 试剂盒测定。

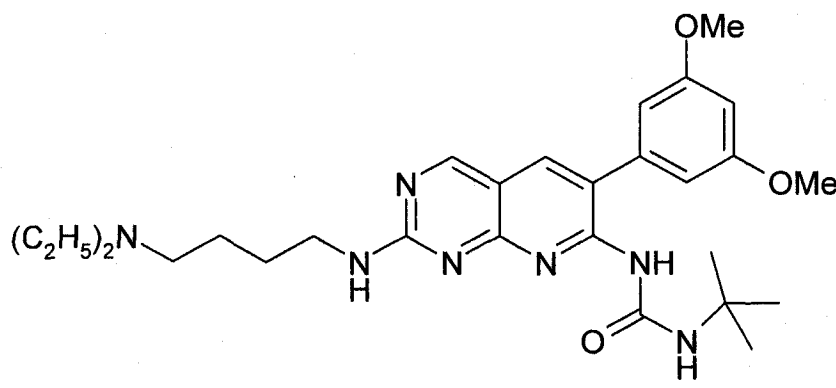
[0047] 甲状旁腺激素是已知的。认为它是血液钙水平调节中涉及的激素。例如 PTH 可以用例如可从美国 Immutopics 公司得到的固相放射免疫检测法测定。

[0048] 具体而言, FGFR 的抑制可以通过测定样本中一种或多种上述化合物、优选是 FGF23 的水平来评价。由此可以评估 FGFR 抑制剂的治疗有效性。

[0049] 本文中使用的术语“成纤维细胞生长因子受体抑制剂”或“FGFR 抑制剂”是指能够阻挡成纤维细胞生长因子受体的激酶活性的分子。它们可以是高分子,例如抗体,或小分子量的化合物。

[0050] 在此处公开的应用和方法的优选实施方式中, FGFR 抑制剂是小分子量的化合物。小分子量 FGFR 抑制剂的例子包括但不限于, PD176067、PD173074、化合物 A、TKI258 或化合物 B。PD176067 参见 Brown, CL 等人, (2005), Toxicol.Pathol, 33 卷, 第 449-455 页。PD173074 是来自 ParkeDavis 的 FGFR 抑制剂(参见 Mohammadi 等人, EMBO J.17: 5896-5904), 其特异性和效能得到了确认。其具有如下通式:

[0051]



[0052] TKI258 早前被称作 CHIR258, 并公开于 WO02/22598 的实施例 109 中, 以及 Xin, X. 等人, (2006), Clin.Cancer Res., Vol 12(16), 第 4908-4915; Trudel, S. 等人, (2005), Blood, Vol.105(7), 第 2941-2948 页) 中。化合物 A 是泛 FGFR 抑制剂, 例如公开于 WO 06/00420 实施例 145 中的 3-(2, 3-二氯-3, 5-二甲氧基-苯基)-1-{6-[4-(4-乙基-哌嗪(perpazin)-1-基)-苯基氨基]-嘧啶-4-基}-1-甲基脒。化合物 B 是 [4, 5'] 二嘧啶基-6, 4'-二胺的衍生物。其结构记载于 WO 08/008747 中(化合物号码 4, 表 1)。这些化合物可以按照公开制备, 或通过类似于这些参考文献中记载的方法而制备。

[0053] 在此处公开的方法和应用的优先实施方式中, FGFR 抑制剂是游离碱或适宜盐形式的化合物 A。

[0054] 此处使用的“治疗有效性”是指人类恶性肿瘤或病症如增生性疾病和非癌疾病的治疗、预防或病程延迟。对于增生性疾病，治疗有效性是指例如化合物降低肿瘤体积或停止肿瘤生长的能力。

[0055] 该疾病可以是但不限于良性或恶性增生性疾病，例如癌症，例如肿瘤和 / 或转移灶（无论定位于何处）。在优选的实施方式中，本发明方法的增生性疾病是癌症。优选所述癌症是由失调的 FGFR 信号引起或与之相关。

[0056] 所述增生性疾病包括但不限于，具有突变的 FGFR3 和 / 或升高的 FGFR3 表达的膀胱、子宫颈或口腔鳞状细胞癌 (Cappellen 等人, *Nature Genetics* 1999, 23 : 19-20 ; van Rhijn 等人, *Cancer Research* 2001, 61 : 1265-1268 ; Billerey 等人, *Am.J.Pathol.*2001, 158 : 1955-1959, Gomez-Roman 等人, *Clin.Can.Res.*2005, 11 : 459-465 ; Tomlinson 等人, *J.Pathol.*2007213 : 91-8 ; WO 2004/085676) ; 具有 t(4, 14) 染色体易位的多发性骨髓瘤 (Chesi 等人, *Nature Genetics* 1997, 16 : 260-264 ; Richelda 等人, *Blood*1997, 90 : 4061-4070 ; Sibley 等人, *BJH* 2002, 118 : 514-520 ; Santra 等人, *Blood* 2003, 101 : 2374-2476) ; 具有 FGFR1、FGFR2 或 FGFR4 基因扩增和 / 或蛋白质过表达的乳腺癌 (Elbauomi Elsheikh 等人, *Breast Cancer Research* 2007, 9(2) ; Penault-Llorca 等人, *Int J Cancer* 1995 ; Theillet 等人, *Genes Chrom.Cancer* 1993 ; Adnane 等人, *Oncogene* 1991 ; Jaakola 等人, *Int J Cancer* 1993) ; 具有 FGFR2 突变的子宫内膜癌 (Pollock, *Oncogene* 2007, 1-5) ; 具有 FGFR3 或 FGFR4 或 FGF 配体的升高表达的肝细胞癌 (Tsou, *Genomics* 1998, 50 : 331-40 ; Hu 等人, *Carcinogenesis* 1996, 17 : 931-8 ; Qui, *World J.Gastroenterol.*2005, 11 : 5266-72 ; Hu 等人, *Cancer Letters* 2007, 252 : 36-42) ; 具有 11q13 扩增子扩增的任何类型的癌症, 11q13 扩增子包含 FGF3、FGF4 和 FGF19 基因座, 例如乳腺癌、肝细胞癌 (Berns EM 等人, *Gene* 1995, 159 : 11-8, Hu 等人, *Cancer Letters* 2007, 252 : 36-42) ; 具有异常 FGFR1 融合蛋白的 EMS 骨髓增生病 (MacDonald, *Cross Pathobiology* 2007, 74 : 81-88) ; 具有异常 FGFR3 融合蛋白的淋巴瘤 (Yagasaki 等人, *Cancer Res.*2001, 61 : 8371-4) ; 具有 FGFR1 异常表达或突变的胶质母细胞瘤 (Yamaguchi 等人, *PNAS* 1994, 91 : 484-488 ; Yamada 等人, *Glia* 1999, 28 : 66-76) ; 具有 FGFR2 突变或过表达或 FGFR3 突变的胃癌 (Nakamura 等人, *Gastroenterology* 2006, 131 : 1530-1541 ; Takeda 等人, *Clin.Can.Res.*2007, 13 : 3051-7 ; Jang 等人, *Cancer Res.*2001, 61 : 3541-3) ; 具有异常 FGFR1 或 FGFR4 表达的胰腺癌 (Kobrin 等人, *Cancer Research* 1993 ; Yamanaka 等人, *Cancer Research* 1993 ; Shah 等人, *Oncogene* 2002) ; 具有 FGFR1、FGFR4 或 FGF 配体异常表达的前列腺癌 (Giri 等人, *Clin.Cancer Res.*1999 ; Dorkin 等人, *Oncogene* 1999, 18 : 2755-61 ; Valve 等人, *Lab.Invest.*2001, 81 : 815-26 ; Wang, *Clin.Cancer Res.*2004, 10 : 6169-78) ; 具有异常 FGFR4 的垂体瘤 (Abbas 等人, *J.Clin.Endocrinol.Metab.*1997, 82 : 1160-6) 和需要血管发生的任何癌症, 因为 FGF/FGFR 也在血管发生中涉及 (参见例如 Presta 等人, *Cytokine & Growth Factors Reviews* 16, 159-178 (2005))。

[0057] 此外, 该基本可以是非癌症疾病, 例如但不限于, 具有 FGFR3 活化突变的良性皮肤肿瘤 (Logie 等人, *Hum.Mol.Genet.*2005 ; Hafner 等人, *TheJournal of Clin.Inv.*2006, 116 : 2201-2207) ; 源自 FGR 突变的骨骼疾病, 包括软骨发育不全、软骨发育不良、具

有发育延迟和黑棘皮症的严重软骨发育不全 (SADDAN) ; 致死性发育不良 (TD) (Webster 等人, Trends Genetics 13(5) : 178-182(1997) ; Tavormina 等人, Am.J.Hum.Genet.1999, 64 : 722-731) ; muenke 冠状颅缝早闭 (muenke coronal craniosynostosis) (Bellus 等人, Nature Genetics 1996, 14 : 174-176) ; Muenke 等人, Am.J.Hum.Genet.1997, 60 : 555-564) ; 具有黑棘皮症的 crouzon 综合症 (Meyers 等人, Nature Genetics 1995, 11 : 462-464) ; 家族性 Pfeiffer 综合症和散发型 Pfeiffer 综合症 (Galvin 等人, PNAS USA 1996, 93 : 7894-7899 ; Schell 等人, Hum.Mol.Gen.1995, 4 : 323-328) ; 与磷酸盐内稳态的改变相关的疾病, 如低磷酸盐血症或高磷酸盐血症, 例如 ADHR (常染色体显性的低磷性佝偻病), 与 FGF23 错义突变相关 (ADHR Consortium, Nat.Genet.200026(3) : 345-8)、XLH(x- 连锁的低磷性佝偻病) ; 与 PHEX 基因的失活突变相关的 x- 连锁显性的疾病 (White 等人, Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism 1996, 81 : 4075-4080 ; Quarles, Am.J.Physiol.Endocrinol.Metab.2003, 285 : E1-E9, 2003 ; doi : 10.1152/ajpendo.00016.2003 0193-1849/03) ; TIO (肿瘤诱导的骨软化症) ; 分离的磷酸盐消耗的获得性疾病 (Shimada 等人, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 2001 May 22 ; 98(11) : 6500-5) ; 纤维性骨发育不良 (FD) (X.Yu 等人, Cytokine & Growth Factor Reviews 2005, 16, 221-232 和 X.Yu 等人, Therapeutic Apheresis and Dialysis 2005, 9(4), 308-312) 和与 FGF23 活性丧失相关的肿瘤性钙质沉着 (Larsson 等人, Endocrinology 2005Sep ; 146(9) : 3883-91)。

[0058] 已发现 FGFR 活性的抑制代表一种治疗 T 细胞介导的炎症或自体免疫疾病的手段, 例如治疗包括但不限于类风湿性关节炎 (RA)、II 型胶原关节炎、多发性硬化症 (MS)、全身性红斑狼疮 (SLE)、牛皮癣、少年发病的糖尿病、Sjogren 氏病、甲状腺疾病、肉状瘤病、自身免疫性葡萄膜炎、炎症性肠病 (Crohn 氏和溃疡性结肠炎)、乳糜泻和重症肌无力的 T 细胞介导的炎症或自体免疫性疾病 (参见 WO 2004/110487)。

[0059] FGFR3 突变导致的疾病还记载于 WO 03/023004 和 WO 02/102972 中。

[0060] 在又一个实施方式中, 选自 FGF23、P、P×tCa、OPN 和 PTH 构成的组中的一种或多种化合物可用作安全标记物, 优选 FGF23, 以预测 FGFR 抑制剂的一种或多种继发效应, 特别是异位矿化。优选 FGF23 用作安全标记物来预测一种或多种继发效应。

[0061] 本文中使用的术语“继发效应”是指可能对受试者有害的不良效果。这样的效果对于如上所述的主要的或治疗效果是继发的。它可能产生自不适当或不正确的 FGFR 调节剂的剂量或疗程, 但是在异位矿化方面, 也可能与 FGFR 抑制剂的作用机制相关。

[0062] 异位矿化是发生在软组织中的不适宜生物矿化, 例如但不限于大动脉、心脏、肺、胃、肠、肾和骨骼肌。在钙化方面, 通常是包括羟基磷灰石的钙磷酸盐得到沉积, 但是也发现了草酸钙和磷酸八钙 (Giachelli CM, (1999), Am.J.Pathol., 154(3) 卷, 第 671-675 页)。异位矿化经常与细胞死亡相关。当发生在心血管组织、动脉中时, 其导致临床症状, 钙化与动脉粥样硬化斑负荷、增加的心肌梗死风险以及血管成形术之后解剖 (dissection following angioplasty) 的风险升高有关。

[0063] 在第二方面, 本发明提供了测定 FGFR 激酶活性的调节的方法, 所述调节优选 FGFR 激酶活性的抑制, 所述方法包括步骤:

[0064] a) 对受试者给予 FGFR 抑制剂;

[0065] b) 提供所述受试者的样品；

[0066] c) 测定所述样品的 FGF23 水平；和

[0067] d) 将所述样品的 FGF23 水平与参照水平比较。

[0068] 所述方法适用于例如测定 FGFR 抑制剂的治疗有效性和 / 或测定 FGFR 抑制剂的一种或多种继发效应。

[0069] 本发明公开的方法的受试者优选为哺乳动物、更优选为啮齿动物（如小鼠或大鼠）、狗、猪或人。

[0070] 本发明进一步提供了测定 FGFR 抑制剂治疗有效性的方法，包括上述方法的步骤 a) 至 d)，其中所述受试者为大鼠，参照水平为 745pg/mL。

[0071] 此外，本发明提供了测定 FGFR 抑制剂的一种或多种继发效应的方法，包括上述方法的步骤 a) 至 d)，其中所述受试者为大鼠，参照水平为 1371pg/mL。

[0072] 本发明的方法中所涉及的“参照水平”可通过在用 FGFR 抑制性化合物开始治疗之前测定受试者的 FGF23 水平来建立，即，测定受试者的基线水平。所以，在备选的实施方式中，该方法进一步包括测定受试者 FGF23 基线水平的步骤。另一种备选方案包括测定健康对照个体或健康对照组的 FGF23 水平，或测定用非治疗性化合物处理的患有相同或相似增生疾病的对照个体或对照组的 FGF23 水平。参照水平也可以从文献中推导出。

[0073] 优选，受试者的样本来自血液，例如血浆或血清，或尿液。但是，该方法还可以在其他身体组织或其衍生物上实施，例如细胞裂解液。应理解，本发明的方法离体实施。

[0074] 本发明提供了测定 FGFR 激酶活性的调节的离体方法，所述调节优选 FGFR 激酶活性的抑制，所述方法包括步骤：

[0075] a) 在开始 FGFR 抑制剂治疗之前测定患者的样品中 FGF23 水平（个体参照水平）；

[0076] b) 在接受该 FGFR 抑制剂治疗之后测定同一患者的样品中的 FGF23 水平。

[0077] 其中，步骤 b) 中 FGF23 水平比个体参照水平的提高指示发生了 FGFR 激酶活性的所述调节，优选抑制。

[0078] 在一个优选的实施方式中，所述患者为癌症患者。在一个优选的实施方式中，该患者的癌症是由失调的 FGFR 信号导致的，或与之相关。更优选，所述癌症为实体瘤，优选包括但不限于膀胱癌、黑素瘤和肾癌。

[0079] 虽然 FGF23 升高的程度会根据每种 FGFR 抑制剂个体的性质、剂量和治疗疗程而改变，但是 FGF23 作为生物标记物的应用还是提供了可信、方便和非侵入性的方式以监测患者对 FGFR 抑制剂治疗的反应。并且，医生可根据 FGF23 的升高值进行更好地预后、调节剂量、换成另一种治疗或密切监测和避免治疗导致的继发效应。

[0080] 优选地，步骤 b) 的 FGF23 水平比个体参照水平提高至少 1.2 倍，进一步优选至少 1.4 倍、至少 1.5 倍、至少 1.7 倍、至少 2 倍、至少 2.5 倍。对于有效的 FGFR 抑制剂，例如化合物 A，FGF23 水平可升高至少 2.5 倍、至少 3 倍、4 倍或更高。

[0081] FGFR 抑制剂治疗之后的 FGF23 水平的升高通常在具体 FGFR 抑制剂的第一次标准剂量之后观察。关于具体 FGFR 抑制剂的标准剂量的信息一般可在含有该具体 FGFR

抑制剂作为活性药物组分 (API) 的药物的标签上发现。通常,一旦 FGFR 抑制剂浓度到达其稳态,就测量 FGF23 水平。我们对用 400mg 或 500mg TKI258 治疗的黑素瘤患者和转移的肾细胞癌患者的初步观察表明,FGF23 峰值在第一轮治疗的第 15 天附近。因此,在一个优选的实施方式中,本发明的方法包括在接受所述 FGFR 抑制剂治疗至少 5 天、优选至少 5 天但不超过 30 天、优选至少 10 天但不超过 25 天、至少 10 天但不超过 20 天的同一患者的样品中测定 FGF23 水平。

[0082] 对于用每天 400mg TKI258 治疗的患者,FGF23 水平可升高至 1.96 倍至 2.1 倍。

[0083] 在一个优选的实施方式中,FGFR 抑制剂为化合物 A 或任何其可药用的盐。在一个优选的实施方式中,FGFR 抑制剂为 TKI258 或任何其可药用的盐。

[0084] 一方面,本发明提供了 FGFR 抑制剂在制备治疗患者的增生性疾病的药物中的应用,其中优选所述增生性疾病为癌症,更优选是具有失调的 FGFR 信号的癌症,其中所述患者在使用该 FGFR 受体抑制剂之后具有 FGF23 水平的升高。或者,本发明提供一种治疗患者的增生性疾病的方法,其中优选所述增生性疾病为癌症,更优选是具有失调的 FGFR 信号的癌症,包括对所述患者给予 FGFR 抑制剂的步骤,其中所述患者在使用该 FGFR 受体抑制剂之后具有 FGF23 水平的升高。FGFR 抑制剂治疗之后的 FGF23 水平的升高通常在具体 FGFR 抑制剂的第一次标准剂量之后观察。通常,一旦 FGFR 抑制剂浓度达到其稳态,就测量 FGF23 水平。所以,FGF23 作为生物标记物的应用允许根据患者对 FGFR 抑制剂的反应对患者进行分阶段 (stratification),特别是具有失调的 FGFR 信号的癌症患者。

[0085] 本申请提供了一种筛选患者以确定其是否从 FGFR 抑制剂治疗中受益的方法,该方法包括步骤:

[0086] (a) 对患者进行一段时间 FGFR 抑制剂治疗;

[0087] (b) 在所述治疗后测量所述患者的样品中的 FGF23 水平;

[0088] (c) 将步骤 (b) 得到的 FGF23 值与个体参照水平 (该患者在开始所述 FGFR 抑制剂治疗之前的 FGF23 水平) 比较,确定该患者是否应该继续所述 FGFR 抑制剂治疗。

[0089] 此处使用的术语“一段时间”是指相对短的一段时间,一般不长于 30 天,更可能不长于 15 天,可能不长于 1 周。在此“试验”阶段,根据标准疗程对该患者进行 FGFR 抑制剂治疗,或甚至以提高的剂量,或更加频繁的给药,或者既提高剂量又更加频繁给药进行治疗。

[0090] 一般该患者具有可被失调的 FGFR 信号引发或与失调的 FGFR 信号有关的症状,大多数情况下,该患者患有可被失调的 FGFR 信号引发或与失调的 FGFR 信号有关的癌症。

[0091] 与个体参照水平相比,FGF23 的升高一般为至少 1.2 倍,优选至少 1.3 倍或至少 1.5 倍。通常而且优选当 FGFR 抑制剂为 TKI258 时是这种情况。

[0092] 对于一种有效的 FGFR 抑制剂,可期望 FGF23 升高更多。对于化合物 A,该升高为至少 1.3 倍,优选至少 1.5 倍,更优选至少 2 倍,更优选至少 3 倍。

[0093] FGFR 抑制剂优选选自 PD176067、PD173074、化合物 A 3-(2,3-二氯-3,5-二甲氧基-苯基)-1-{6-[4-(4-乙基-哌嗪(perpazin)-1-基)-苯基氨基]-嘧啶-4-基}-1-甲基脒、TKI258 和化合物 B([4,5']二嘧啶基-6,4'二胺的衍生物)。

[0094] 在一个优选的实施方式中，FGFR 抑制剂为化合物 A 或任何其可药用的盐。在一个优选的实施方式中，FGFR 抑制剂为 TKI258 或任何其可药用的盐。

[0095] 为了检测的目的，可以进一步处理所述样品，例如，可以用本领域技术人员公知的技术分离蛋白质。

[0096] 通常，通过用适宜检测试剂测量受试者的所述样品中 FGF23 多肽的存在来测定 FGF23 的水平。优选的检测本发明多肽的试剂是能够结合到本发明标记物相应多肽的抗体，优选带有可检测标记物的抗体。抗体可以是多克隆的，或更优选是单克隆的。可以使用完整抗体或其片段，例如 Fab 或 $F(ab')_2$ 。

[0097] 在另一个实施方式，FGF23 编码序列的表达可以通过例如测定相应 RNA 水平来在所述样品中检测。适宜检测试剂是探针，即与靶核酸序列互补的短核酸序列。

[0098] 在本发明的优选实施方式中，检测 FGF23 多肽。

[0099] 检测试剂可直接或间接检测，优选该检测试剂是标记的检测试剂。对于探针或抗体，术语“标记的”意为包括利用偶联可检测物质到探针或抗体上达成的探针或抗体的直接标记，即，将可检测物质物理连接到探针或抗体上，以及，通过与直接标记的另一种试剂反应对探针或抗体进行间接标记。间接标记的实例包括用荧光标记的二抗检测一抗，和用生物素末端标记 DNA 探针，从而使其能够用荧光标记的链霉抗生物素检测。

[0100] 该标记可以是常规标记，例如生物素，或酶，如碱性磷酸酶 (AP)、辣根过氧化物酶 (HRP) 或过氧化物酶 (POD) 或荧光分子，例如荧光染料，例如异硫氰酸荧光素。

[0101] 在本发明的优选实施方式中，该检测方法包括抗体，包括抗体衍生物或其片段，例如识别 FGF23 的抗体，例如携带标记的 FGF23 识别抗体。在另一方面，FGF23 水平用 FGF23 特异性抗体测定。

[0102] 检测试剂，例如带有标记的抗体，可以根据常规方法检测，例如通过荧光测量或酶检测方法，包括常规的本领域检测方法，例如免疫测定，例如酶联免疫测定 (ELISA)，荧光类测定，例如解离放大镧系荧光免疫分析 (DELFI) 或放射测量方法例如放射免疫法 (RIA)。进一步适宜的实例包括但不限于，EIA 和 Western 印迹分析。本领域技术人员可容易地将已知的蛋白质 / 抗体检测方法应用于测定 FGF23 水平。

[0103] 可以理解的是，可用选自 P、P x tCa、OPN 和 PTH 的组中的化合物相似地实施此处公开的方法。

[0104] 在优选的实施方式中，选自 FGF23、P、P x tCa、OPN 和 PTH 组成的组中的两种或多种化合物用于此处公开的方法中，最优选地，FGF23 联合选自 P、P x tCa、OPN 和 PTH 组成的组中的一种或多种化合物使用。利用多重生物标记物，增强了测定 FGFR 抑制剂的治疗有效性和 / 或一种或多种继发效应的精确性。

[0105] 当选自 FGF23、P、P x tCa、OPN 和 PTH 组成的组中的一种或多种化合物用作安全性生物标记物时，上述测定 FGFR 抑制剂的一种或多种继发效应的方法可进一步包括步骤：

[0106] e) 将选自 FGF23、P、P x tCa、OPN、PTH 构成的组中的一种或多种化合物的水平与一种或多种继发效应关联；和

[0107] f) 测定所述化合物的如下所述水平，即高于该水平会发生继发效应，与所使用的治疗相关联。

[0108] 优选地，与参照水平相比，FGF23、P、 $P \times tCa$ 、OPN 水平得到了提高。

[0109] 优选，与参照水平相比，PTH 水平降低。

[0110] 另一方面，本发明提供了测定患有 FGFR 相关疾病的患者对 FGFR 抑制剂治疗性治疗的反应的方法，包括在患者的血浆或血清中测定选自 FGF23、P、 $P \times tCa$ 、OPN、PTH 组成的组中的一种或多种化合物水平、优选 FGF23 水平的步骤。

[0111] 此处使用的“治疗性治疗”是指 FGFR 相关性疾病（优选增生性疾病，更优选癌症）的治疗、预防或病程延迟。

[0112] 又一方面，本发明提供了包括下列元素 a) 至 d) 的诊断试剂盒。具体而言，本发明涉及测定 FGFR 抑制剂有效性和 / 或 FGFR 抑制剂继发效应的试剂盒，优选在患者的样品中进行上述测定，该试剂盒包括：

[0113] a) 识别选自 FGF23、P、 $P \times tCa$ 、OPN 和 PTH 中的一种或多种化合物或其部分的分子，该分子可以是标记的形式或未标记的形式；

[0114] b) 可选的使用指南；

[0115] c) 可选的检测手段；和

[0116] d) 可选的固相。

[0117] 进一步地，本发明提供测定 FGFR 抑制剂有效性和 / 或 FGFR 抑制剂继发效应的所述试剂盒的应用，优选在患者的样品中进行上述测定。

[0118] 在一个优选的实施方式中，本发明提供一种诊断试剂盒，包括：

[0119] a) 识别 FGF23 或其部分的分子，该分子可以是标记形式或未标记形式；

[0120] b) 能够检测选自无机磷 (P)、无机磷和总钙的乘积 ($P \times tCa$)、骨桥蛋白 (OPN) 和甲状旁腺激素 (PTH) 的组中的第二生物标记物的至少一种试剂；

[0121] c) 可选的使用指南；

[0122] d) 可选的检测手段；和

[0123] e) 可选的固相。

[0124] 进一步地，本发明提供在患者的样品中测定 FGFR 抑制剂有效性和 / 或 FGFR 抑制剂继发效应的上述试剂盒的应用。

[0125] 在一个优选的实施方式中，该试剂盒包括能够检测第二生物标记物是无机磷 (P) 的至少一种试剂。

[0126] 为了更充分地描述本发明的优选实施方式，提供下列实施例。这些实施例不应理解为对本发明范围的限制，本发明的范围由所附权利要求书所限定。

[0127] 实施例 1

[0128] 化合物 A 对肿瘤同种移植物的剂量依赖性抑制；FGF23 作为监测成纤维细胞生长因子受体激酶活性的生物标记物。

[0129] 1.1 方法

[0130] 动物

[0131] 实验在购自瑞士巴塞尔的 Novartis Pharma AG 的实验动物服务站 (Laboratory Animal Services) 的雌性 HsdNpa：无胸腺 Nude-nu 小鼠上进行。将动物在 Makrolon III 型笼子中（每笼最多 10 只动物）保持在 OHC 条件下，12 小时黑夜、12 小时光照（早晨 6 点开灯，晚上 6 点熄灭）。动物自由取食和饮水。在巴塞尔州立兽医办公室 (Basel Cantonal

Veterinary Office) 许可的批准文号 1762 和批准文号 1763 下进行实验。所有的侵入性操作都在异氟烷麻醉下进行。

[0132] 裸鼠中 NIH3T3/FGFR3^{S249C} 肿瘤同种移植模型的建立

[0133] 已验证 NIH3T3/FGFR3^{S249C} 模型, 并将其表征为用于体内描绘 FGFR 抑制剂的皮下鼠肿瘤模型。亲本 NIH3T3 细胞系最初来源于小鼠胚成纤维细胞的无限增殖化。用表达带有活化突变 S249C 的 FGFR3 的逆转录病毒载体感染亲本 NIH3T3 成纤维细胞, 产生 NIH3T3/FGFR3^{S249C} 细胞。建立 G418 抗性的 NIH3T3^{S249C} 细胞库, 并表征其 FGFR 表达和酪氨酸磷酸化。为了产生同种移植瘤, 重悬于 PBS 中的 5×10^5 个 NIH3T3/FGFR3^{S249C} 细胞皮下注入裸鼠中 (0.2ml/ 小鼠)。

[0134] 裸鼠中 RT112/luc1 肿瘤异种移植模型的建立

[0135] 表达高水平野生型 FGFR3 的亲本 RT-112 人膀胱移行细胞癌细胞系最初来自 1973 年的一位患有未治疗的初级膀胱移行细胞癌 (组织学级别 G2, 未记录期) 的女患者 (Marshall 等人, 1977, Masters 等人, 1986)。用于本研究的 RT112 细胞的原始储存管得自 DSMZ ACC#418。

[0136] 将细胞培养在补充有 10% 胎牛血清、1% 丙酮酸钠和 1% L- 谷氨酰胺的 MEM 培养基中。细胞培养试剂购自 BioConcept (Allschwil, 瑞士)。

[0137] 用逆转录病毒表达载体 pLNCX2/luc1 感染亲本 RT112 细胞系, 建立 G418 抗性细胞库, 表征其荧光酶表达。荧光酶的 CMV 驱动表达使得可以在注入 D- 荧光素之后用 Xenogen IVISTM 相机检测肿瘤。

[0138] 通过向右侧腹皮下注射含 50 % Matrigel (BD#356234) 的 100 μ IHBSS (Sigma#H8264) 中的 5×10^6 个细胞, 建立 RT112/luc1 异种移植瘤。

[0139] 抗肿瘤活性评价

[0140] 对于 NIH3T3/FGFR3^{S249C} 模型, 当平均肿瘤体积达到大约 100mm³ 时, 开始治疗。以规律间隔监测肿瘤的生长和体重。用测径器手工测量肿瘤大小。用下列公示估算肿瘤体积: $(W \times L \times H \times \pi / 6)$, 其中宽度 (W)、长度 (L) 和高度 (H) 为三个最大直径。

[0141] 对于 RT112/luc1 模型, 当平均肿瘤体积达到大约 180mm³ 时开始治疗, 每天治疗小鼠, 共治疗 14 天。每周记录体重和肿瘤体积两次。用测径器测量肿瘤体积, 并根据公式 (长度 $\times$ 直径² $\times$ $\pi / 6$) 确定体积。

[0142] 统计分析

[0143] 适用时结果表示为平均值 $\pm$ SEM。用 ANOVA 以 post hoc Dunnett' s 检验分析肿瘤和体重数据, 以比较治疗组和对照组。post hoc Tukey 检验用于组内比较。实验开始和结束时的组内体重变化的显著性水平用成对 t- 检验测定。用 GraphPad prism 4.02 (GraphPad 软件) 进行统计学分析。

[0144] 作为抗肿瘤有效性的量度, 根据如下公式在治疗开始后在一定天数时计算 % T/C 值: $(\text{治疗组动物的肿瘤体积平均变化} / \text{对照组动物肿瘤体积平均变化}) \times 100$ 。适用时, 根据公式 (肿瘤体积平均变化 / 平均初始肿瘤体积) $\times 100$ 计算 % 消退。

[0145] 化合物配方和动物治疗

[0146] 化合物 A 配制为 PEG300/D5W (2 : 1v/v, D5W = 5% 葡萄糖水溶液) 中的悬浮液, 并每天通过管饲法施用。载体由 PEG300/D5W 组成。使用体积为 10ml/kg。

[0147] 组织处理用于离体分析

[0148] 实验最后，最后一次化合物给药后 2 小时，收集肿瘤样品和血液。

[0149] 将肿瘤样品切下并于液氮中闪冻。用振动粉碎机 (RETSCH MM200) 粉碎肿瘤材料。在加入冰冻的肿瘤样品之前先将研磨缸和球在干冰上冷却半小时。以 100% 强度运行振动粉碎机 20 秒。将肿瘤粉末转移到 14mL 聚丙烯中（所有步骤在干冰上操作），并储存在 -80℃ 直至使用。

[0150] 称取 50mg 肿瘤粉末的等份样品，置于冰上，并立即以 1 : 10 (w/v) 的比例重悬于冰冷的裂解缓冲液 (50mM Tris pH7.5, 150mM NaCl, 1mM EGTA, 5mM EDTA, 1% Triton, 2mM 钒酸钠, 1mM PMSF 和蛋白酶抑制剂混合物 (Roche#11873580001)) 中。在冰上进行裂解 30 分钟，12000×g 离心 15 分钟，澄清裂解物，用 DC 蛋白质分析试剂 (Bio Rad#500-0116) 和 BSA 标准测定蛋白质浓度。

[0151] 用 23 号针头从腔静脉收集血液至含有 70 μl 的 1000IU/ml 肝素溶液的 1ml 注射器中。在冰上储存血液 30 分钟，直至离心 (10,000g, 5min)，然后收集血浆。

[0152] 免疫沉淀和 Western 印迹分析

[0153] 用蛋白 A-琼脂糖预澄清等量的蛋白质裂解物，然后与 1 μg 的 α-FGFR3 抗体（兔多克隆抗体，Sigma#F3922）在冰上孵育 2 小时。用蛋白 A-琼脂糖收集免疫复合物，并用裂解缓冲液洗涤 3 次。通过在样品缓冲液 (20% SDS, 20% 甘油, 160mM Tris pH6.8, 4% β-巯基乙醇, 0.04% 溴酚蓝) 中煮沸来释放结合的蛋白质。

[0154] 对样品进行 SDS-PAGE，并将蛋白质印迹到 PVDF 膜上。用含 20% 马血清、0.02% Tween 20 的 PBS/O 封闭该滤膜 1 小时，室温下加入以 1 : 1000 稀释的抗-p 酪氨酸抗体 4G10 (Upstate) 2 小时。利用 SuperSignal® WestDura Extended Duration Substrate 检测系统 (Pierce#34075)，用偶联有过氧化物酶的抗小鼠抗体 (Amersham#NA931V) 可视蛋白质。此外，在 62.5mM Tris-HCl pH6.8 ; 2% SDS ; 1/125 β-巯基乙醇中、60℃ 下对膜进行剥离反应 30 分钟，再次用 α-FGFR3 抗体探测（兔多克隆，Sigma#F3922），然后用过氧化物酶偶联的抗兔抗体 (Amersham#NA934V) 探测。如上所述可视蛋白质。

[0155] FGF23ELISA 检测。使用来自日本 KAINOS Laboratories, Inc. 的 FGF23ELISA 分析（货号 #CY-4000），监测血浆或血清样品的 FGF23 水平。简言之，使用结合全长 FGF23 的两种特异性小鼠单克隆抗体。第一抗体固定在微滴定板孔上，用来捕获，第二抗体缀合到 HRP 上（辣根过氧化物酶）用于检测。第一反应中，将血浆或血清样品加入到用抗 FGF23 抗体包被的微滴定板孔上，使其结合。洗涤孔，以去除未结合的 FGF23 和其他成分。在第二反应中，固定化的 FGF23 与 HRP 标记的抗体孵育，形成“三明治”复合物。

[0156] 已经验证过此 ELISA 分析在检测小鼠、大鼠和狗的血清和血浆中 FGF23 中有效。

[0157] 1.2 结果和讨论

[0158] 化合物 A 在 NIH3T3/FGFR3^{S249C} 模型中的活性

[0159] 在皮下 NIH3T3/FGFR3^{S249C} 模型中评价化合物 A 的抗肿瘤效果。检测 10、30 和 50mg/kg 剂量水平。当估计平均肿瘤大小达到 100mm³ 时开始治疗（第 0 天），治疗动物 8 天。用单因素 ANOVA 在治疗第 8 天评价肿瘤大小和体重。与载体治疗的动物相比，

所有剂量水平下都观察到了统计学有意义的抗肿瘤效果 (ANOVA post hoc Dunnett’ s)，在 10 和 30mg/kg 下，T/C 值分别为 34%和 4%，而在 50mg/kg 剂量下，肿瘤减小为 40%（表 1，图 1）。在治疗期间，这两个最高的剂量水平得到了统计学显著的体重降低。但是，在载体治疗组和 10mg/kg 治疗组，至少部分由于肿瘤质量的原因，观察到了额外的体重增加。

[0160] 表 1

[0161]

		肿瘤的反应			宿主的反应	
化合物	剂量、给药途径、时间表	T/C (%)	Regr. (%)	Δ 肿瘤体积(平均值 mm ³ ± SEM)	Δ 体重 (平均值 g ± SEM)	Δ 体重 (%) ± SEM)
载体	10ml/kg, p.o., qd	100	NA	3853 ± 473	4.1 ± 0.5	16.9 ± 2
化合物 A	10mg/kg, p.o., qd	34	NA	1320 ± 245*	4.2 ± 0.7	18.0 ± 3.2
化合物 A	30mg/kg, p.o., qd	4	NA	156 ± 56*	1.6 ± 0.7	7.0 ± 3.1*
化合物 A	50mg/kg, p.o., qd	NA	40	-43 ± 28*	1.1 ± 0.5	4.6 ± 2.2*

[0162] 用化合物 A 治疗时的 FGFR3 酪氨酸磷酸化的药效学

[0163] 用 10、30 或 50mg/kg qd 或载体治疗的动物的 NIH3T3/FGFR3^{S249C} 肿瘤在最后一次给药后 2 小时解剖，这时间点以前的药代动力学研究中建立的 tmax 间隔内。NIH3T3/FGFR3^{S249C} 移植肿瘤的离体分析表明了 FGFR3 酪氨酸磷酸化的剂量依赖性抑制，但整体受体水平恒定（图 2）。其药效学效果与抗肿瘤效果相关（图 1）。

[0164] RT112/luc1 模型中化合物 A 的活性

[0165] 在两个不同剂量水平评估化合物 A 的抗肿瘤活性：50 和 75mg/kg，每天对裸鼠口服给药。这两个剂量产生了统计学显著的肿瘤消退 (p < 0.01，ANOVA post hoc Dunnett’ s)。对于 50 和 75mg/kg 的化合物 A，消退值分别是 67%和 74%（表 2，图 3）。在实验过程中，在载体治疗组和化合物 A 的 50mg/kg/ 天治疗组中，体重的统计学显著升高表明治疗得到了很好的耐受。用 75mg/kg 化合物 A 治疗的组表现出轻微的体重下降，虽然不是统计学显著的下降。发现体重升高在用 75mg/kg 化合物 A 治疗的组中和载体对照组中显著不同 (p < 0.01，ANOVA，post hoc Dunnett’ s)。并且，75mg/kg 化合物 A 治疗组表现出与所有其他组统计学显著的体重变化差异 (p < 0.05，ANOVA，post hoc Tukey)。

[0166] [表 2]

[0167]

化 合 物	剂量、给药途径、时间表	肿瘤的反应			宿主的反应	
		T/C (%)	缩 小 (%)	Δ 肿瘤体积 (平均值 $\text{mm}^3 \pm \text{SEM}$)	Δ 体重 (平均值 $\text{g} \pm \text{SEM}$)	Δ 体重 (%) $\pm \text{SEM}$
载体	10ml/kg, p.o., qd	100	NA	500 ± 54	$3.3 \pm 0.6^*$	13.5 ± 2.7
化 合 物 A	50mg/kg, p.o., qd	NA	67	$-120 \pm 12^*$	$2.6 \pm 1.0^*$	10.8 ± 4.1
化 合 物 A	75mg/kg, p.o., qd	NA	74	$-133 \pm 13^*$	-1.1 ± 1.1	-4.0 ± 4.5

[0168] 裸鼠血浆样品中的 FGF23 水平

[0169] 作为 1.1 节中描述的研究的一部分，在最后一个给药 2 小时后测定来自用 50 或 75mg/kg/qd 化合物 A 或载体治疗的小鼠血浆样品中的 FGF23 水平。与载体治疗组相比，用化合物 A 治疗的小鼠表现出升高的 FGF23 血浆水平（图 4），这与观察到的这两个化合物剂量的抗肿瘤有效性（图 3）相关。

[0170] 结论：该实验数据说明，体内抑制 FGFR3 而且在两种小鼠肿瘤模型中产生统计学显著的抗肿瘤效果的化合物 A 的剂量还以一种剂量依赖的方式导致血浆 FGF23 水平的升高。

[0171] 实施例 2

[0172] 大鼠机制研究

[0173] 2.1 方法

[0174] 动物

[0175] 实验在来自德国 Sulzfeld 的 Charles River Laboratories Germany GmbH, Research Models and Services 的雄性 Crl:WI(Han) 大鼠（开始给药时 14-17 周龄）中进行。在 MakrolonIV 型笼子中，理想卫生条件 (OHC)、12 小时黑夜、12 小时光照条件下饲养动物。片状标准食物和水自由食用。根据《瑞士动物福利法》，具体而言是依据 'Kantonales **Veterinär**amt Baselland' (Cantonal Veterinary Office, Baselland) 的动物许可证号 5075 进行该研究。

[0176] 化合物配方和动物治疗

[0177] 在醋酸-醋酸盐缓冲液 (pH4.6)/PEG300 (2 : 1v/v) 中将化合物 A 配制成溶液，每天通过管饲法施用。载体由醋酸-醋酸盐缓冲液 (pH4.6)/PEG300 (2 : 1v/v) 构成。使用体积为 5ml/kg。

[0178] 研究设计。

[0179] 将化合物 A 以 10mg/kg 的剂量对 10 只雄大鼠的组口服给药 1、3、7 和 15 天，

或以 20mg/kg 的剂量口服给药 1、3 和 6 天，每天一次。以 20mg/kg 治疗的动物在第六次给药之后，由于严重的体重减少，不得不提前终止实验。对照动物接受载体 1、3、7 和 15 天。引入接受化合物 A（剂量：10mg/kg，3、7 和 15 天；20mg/kg，1 和 3 天）或载体的另外的组（每组 10 只雄大鼠），以进一步研究治疗相关效应，并监测在 4、7 或 14 天恢复之后选定临床化学参数的变化。

[0180] 2.2 结果和讨论

[0181] 与 FGFR 抑制相关的组织病理学发现

[0182] 在以 10 和 20mg/kg/ 天的剂量治疗动物三天后检测生长板的加厚（Growth plate thickening）。这是抑制 FGFR3 的结果，主要是在软骨细胞中。实际上，由于肥大区增长体积导致的生长板的加厚，已经表明也发生于 FGFR3 靶向破坏的小鼠纯合子中，即，缺乏 FGFR 表达的小鼠纯合子中（Colvin 等，Nature Genetics 1996，12：390-397）。这种发现说明 FGFR3 在调节生长板增大的过程中发挥作用。因此，涉及生长板的该发现被认为是 FGFR 抑制剂的药理学表现，而且是 FGFR 抑制剂，即对 FGFR 的抑制，有效性的指征。在用 10mg/kg/ 天治疗 15 天和恢复期 4 天，以及用 20mg/kg/ 天治疗 3 天和恢复期 4 天（滞后效应）的动物中，以及用 20mg/kg/ 天治疗 6 天的动物中注意到骨重建事件的信号。在用化合物 A 以 20mg/kg/ 天治疗 3 天的动物中在 4 天恢复期之后检测到软组织 / 血管矿化，以 20mg/kg/qd 剂量治疗 6 天后的动物中检测到软组织 / 血管矿化。这种现象在 10mg/kg/qd 化合物 A 给药组没有出现。

[0183] 临床化学参数

[0184] 测定无机磷（P）、无机磷和总钙的的乘积（ $P \times tCa$ ）、甲状旁腺激素（PTH）、骨桥蛋白（OPN）和 FGF23，评价其作为预测和监测药理学（生长板加厚）和病理学（骨重建和异位矿化）事件发生的标记物的应用。P、tCa、其的乘积和 FGF23 的血清水平的变化分别在图 5、6、7 和 8 中以散点图表示。每个曲线（灰阶方框表示单个动物）报告为标记物外周浓度（Y 轴）和化合物 A 剂量（x- 轴）的函数。不同的灰色阴影对应特定的治疗阶段。使用 Spotfire 8.2 进行数据可视化。

[0185] 生物标记物验证方法

[0186] 在大鼠探索性研究中测量的选定标记物性能的定量评估用受者作用特征（ROC）分析进行，一种通常用于评价药物实验的方法，其通过测量 ROC 曲线下面积（AUC）来测定给定测试的诊断能力。Swets JA，Science.240：1285-93(1988)；Swets JA 等，Scientific American.283：82-7(2000)。

[0187] 选定标记物性能的评估

[0188] 通过对治疗阶段得到数据应用 ROC 分析得到的标记物性能评定（AUC），记载于表 3 中。

[0189] [表 3]

[0190]

药理学				病理学			
标记物	AUC	SE	p 值	标记物	AUC	SE	p 值
FGF23	0.92	0.03	0.0E + 00	FGF23	1.00	0.00	0.0E + 00
P x tCa	0.90	0.03	0.0E + 00	OPN	1.00	0.00	0.0E + 00
PTH	0.90	0.03	0.0E + 00	P	0.90	0.03	0.0E + 00
P	0.89	0.03	0.0E + 00	P x tCa	0.87	0.04	0.0E + 00
OPN	0.84	0.07	8.4E-07	PTH	0.75	0.07	3.1E-04

[0191] SE = AUC 的标准误。 p 值 = 得到相应 AUC 值的几率。

[0192] ROC 分析用于进行 FGF23 性能的进一步评价，考虑其延迟病理效果。这样的分析使其可以测定该标记物的药理学和安全性阈值（表 4）。在此分析考虑中，药理学阈值是 745pg/mL，表示 FGF23 水平高于这一值时会在治疗过程中观察到生长板加厚。安全性阈值是 1371pg/mL，表示在此分析考虑的治疗过程中允许的最高 FGF23 水平，保证没有延迟的病理学效果（骨重建和异位矿化）。

[0193] [表 4]

	FGF23	
评估	AUC	阈值(pg/mL)
药理学	1.00	745
病理学	0.99	1371

[0195] 结论

[0196] 在大鼠中进行的该项研究测量的临床参数中，发现有几个适用于作为药效学标记物。这些标记物呈现“好”至“非常高”水平的性能，如表 3 中相应的 AUC 值所示。另外，如表 4 所示，该研究表明 FGF23 是监测生长板加厚（治疗有效性 / 药理学）的产生和防止骨重建和异位矿化（安全性 / 病理学）的产生的预测性生物标记物。已经建立了在该研究和该分析所考虑的治疗的情况下的 FGF23 的药理学和安全性阈值。

[0197] 实施例 3

[0198] 化合物 A 在狗中的 FGF23 诱导

[0199] 3.1 方法

[0200] 动物。实验在狗中实施：

[0201]

动物种类和品系:	狗, 比格犬
研究中动物数量:	8
年龄:	13-18 个月 (开始给药时)。
体重范围:	7-11 kg (开始给药时)。
提供的兽医治疗:	抗寄生虫治疗和对于犬瘟热、犬传染性肝炎、副流感、细螺旋体病、细小病毒、腺病毒和狂犬病的疫苗接种。

[0202] 化合物配方和动物治疗

[0203] 化合物 A 被配制为 0.5% HPMC603 中的悬浮液, 通过管饲法每天口服给药一次。载体由 0.5% HPMC603 构成。使用体积为 2ml/kg。

[0204] 研究设计。

[0205] 用载体或化合物按下表所示处理狗:

[0206] 表 1

[0207]

组别	剂量 (mg/kg/天) *	每种性别 动物数	雄性好	雌性好	剂量体积 (mg/kg/天) *
1	0*	1	451	452	2
2	3 / 100**	1	453	454	2
3	30*	1	455	456	2
4	300***	1	457	458	2

[0208] * 组 1 和组 3 连续治疗 15 天。

[0209] ** 组 2 以 3mg/kg/ 天治疗 8 天。从第 9 天至第 18 天, 剂量升高至 100mg/kg/ 天; 从第 19 天至第 21 天, 为动物的休药期, 在第 22 天和第 23 天重新给药 (100mg/kg : 10 天给药, 3 天不给药, 2 天给药)。

[0210] *** 组 3 连续 8 天接受 300mg/kg/ 天的剂量。

[0211] 血液取样用于离体分析

[0212] 在给药阶段的末段, 最后一次化合物给药之后 1 小时, 从颈静脉和前臂头静脉 (vena cephalica antebrachii) 收集全血至 EDTA- 包被的管中, 并保存在冰水中直至下一步操作。离心标本, 将血浆转移至 Eppendorf 管中, 置于干冰上。

[0213] FGF23 ELISA 检测。使用来自日本 KAINOS Laboratories, Inc. 的 FGF23 ELISA 分析 (货号 #CY-4000), 监测血浆样品的 FGF23 水平。简言之, 使用结合全长 FGF23 的两种特异性小鼠单克隆抗体。第一抗体固定在微滴定板上, 用来捕获, 第二抗体缀合到 HRP 上 (辣根过氧化物酶) 用于检测。第一反应中, 将血浆样品加入到用抗 FGF23 抗体包被的微滴定板孔上, 使其结合。洗涤孔, 以去除未结合的 FGF23 和其他成分。在第二反应中, 固定化的 FGF23 与 HRP 标记的抗体孵育, 形成 “三明治” 复合物。

[0214] 3.2 结果和讨论

[0215] 狗血浆样品中的 FGF23 水平

[0216] 与载体治疗组比较, 用化合物 A 治疗的狗表现出升高的 FGF23 血浆水平 (表 2), 大体上是剂量依赖的。对于组 2 的相比于剂量成比例升高的降低可以通过在以 3mg/kg/天给药的过程中的适应机制来解释。或者, 10 天给药后三天不给药可能导致了 FGF23 的降低。

[0217] 表 2

[0218]

组别	mg/kg/ 天	动物号	FGF-23 浓度 (pg/mL)
1	基线	# 451	173.9
		# 452	205.8
2	3 → 100	# 453	262.5
		# 454	211.3
3	30	# 455	534.3
		# 456	322.7
4	300	# 457	824.6
		# 458	614.8

[0219] 结论。实验数据说明化合物 A 导致狗的血浆 FGF23 水平升高。

[0220] 实施例 4

[0221] 用 TKI258 治疗过的黑素瘤癌症患者的血浆样品中的 FGF23 测定。

[0222] 4.1 方法

[0223] 化合物

[0224] TKI258 是多激酶抑制剂, 在细胞实验中分别以 166、78 和 55nM 的 IC₅₀ 值抑制 FGFR1、FGFR2 和 FGFR3。

[0225] 患者和治疗

[0226] 每天以指定剂量将 TKI258 口服给药来治疗转移性黑素瘤患者。在指定天数和周期进行血液取样。测量血浆中的 FGF23 水平。设定 C1D1 的值为基线值。

[0227] FGF23 ELISA 检测

[0228] 使用来自日本 KAINOS Laboratories, Inc. 的 FGF23 ELISA 分析 (货号 #CY-4000), 如实施例 3 所述监测患者的 FGF23 血浆样品。

[0229] 4.2 结果和讨论

[0230] 三个不同患者的 FGF23 数据示于表 3 中:

[0231] 表 3

[0232]

患者	剂 量 [mg]	治疗周期(C) / 治 疗天(D)	FGF23 [pg/mL]	诱导的 倍数
A	200	C1D1	36.4	1.00
		C1D15	39.8	1.09
		C1D26	24.4	0.67
		C3D26	31.8	0.87
		C6D26	21.1	0.58
		C9D26	39.6	1.09
B	400	C1D1	72.3	1.00
		C1D15	94.1	1.30
		C3D26	88.5	1.22
		C4D26	141.5	1.96
C	400	C1D1	41.1	1.00
		C1D15	86.5	2.10

[0233] 以 200mg TKI258 治疗的患者 A 在整个治疗中表现出相似的 FGF23 水平。在用 400mg TKI258 治疗的患者 B 和 C 中, FGF23 水平分别升高至基线水平的 1.96 倍和 2.1 倍。

[0234] 实施例 5 :

[0235] 用 TKI258 治疗过的黑素瘤癌症患者的血浆样品中的 FGF23 测定。

[0236] 5.1 方法

[0237] 方法

[0238] 以 200、300、400 或 500mg/ 天、每天一次的连续剂量疗程, 经口服治疗患者。MTD 限定为 400mg/ 天。收集 43 个患者的血浆样品。TKI258 的血浆浓度用 LC/MS/MS 测量。用 ELISA 评价血浆 FGF23。

[0239] FGF23 ELISA 检测

[0240] 使用来自日本 KAINOS Laboratories, Inc. 的 FGF23 ELISA 分析 (货号 #CY-4000), 如前文实施例所述监测患者的 FGF23 血浆样品。

[0241] 5.2 结果和讨论

[0242] 每天用 200mg、300mg、400mg 或 500mg 剂量的 TKI258 治疗的患者的 FGF23 数据示于图 9 中。数据表示为指定数量患者的平均值。在 400mg 或 500mg 连续每天给药之后, 平均血浆暴露 (AUC_{24hr}) 分别大约为 3000ng/mL*h 和 4100ng/mL*h。在 400mg 或以下剂量下没有观察到 TKI258 血浆暴露的积聚, 而在 500mg 日剂量的第 15 天观察到积聚至 2.5 倍。在第一治疗周期的末段, 平均血浆 FGF23 水平比基线提高了 68%, 而在第

一治疗周期的第 15 天该升高为 63%。在第一个周期第 15 天，用 400mg TKI258 治疗的一个患者表现出比基线高 98% 的血浆 FGF23 水平（从 40pg/ml 的基线水平至约 80pg/ml）。在第一个周期第 15 天同一个患者的肿瘤组织活检，用免疫组化分析表明显著的 pFGFR 抑制（图 10）。结果表明 TKI258 治疗后血浆 FGF23 的诱导与肿瘤组织中 FGFR 靶向抑制相关。

[0243] 结论：血浆 FGF23 的诱导表明 FGFR 可以被 400mg/ 天和更高的剂量所抑制。

[0244] 实施例 6：

[0245] 在 I 期临床实验中，用 TKI258 治疗的转移肾细胞癌（mRCC）患者的血浆样品中的 FGF23 测定。

[0246] 6.1 方法

[0247] 患者和治疗

[0248] I 期临床的主要目的是在标准治疗难治的 mRCC 患者中测定 TKI258 的最大耐受剂量（MTD），在重复的 28 天周期中，该 TKI258 以 5 天给药 / 2 天停药的时间表口服给药。用两参数 Bayesian logistic 回归模型和至少 21 个病人的安全性数据测定 MTD。

[0249] FGF23 ELISA 检测。使用来自日本 KAINOS Laboratories, Inc. 的 FGF23 ELISA 分析（货号 #CY-4000），如前文实施例所述监测患者的 FGF23 血浆样品。

[0250] 6.2 结果和讨论

[0251] 结果：进行 I 期临床研究。在 2008 年 12 月，登记 11 个病人（9 男 2 女），年龄中值 55 岁（29–66 岁）。四个病人以 500mg/ 天（起始剂量）治疗：2 个在周期（C）7 还可进行；1 个由于 PD 停药，1 个由于窦性心动过缓停药。5 个病人接受 600mg/ 天的剂量：2 个 DLT（G4 高血压和 G3 疲劳 – 病人停药）导致所有病人的剂量减少至 500mg/ 天；2 个病人在 C5 和 C4，一个病人因为 PD 停药。两个病人刚刚进入 500mg 的延长组。其他 ≥G2 的毒性包括疲劳、恶心、呕吐、痢疾、嗜中性白血球减少症、毛囊炎和眩晕。PK 数据表明 C_{Max} 范围（180–487ng/mL，n = 8）和 AUC 范围（2200–8251ng/mL*h）。初步生物标记物数据表明患者具有高基线 VEGF（ 506 ± 203 pg/ml，n = 6）和 bFGF（ 220 ± 185 pg/ml，n = 6）水平，这可能表现为早前抗 VEGF 剂的失效。在第一 500mg/ 天剂量人群的患者中观察到血浆 FGF23（FGFR 抑制的药效学生物标记物）水平的诱导（用 TKI258 治疗的 RCC 患者个体的 FGF23 数据示于图 11 中）。一个轻微反应（在 C4 为 -17%）、4 个稳定疾病和 1 个急剧收缩 / 一些靶损伤的坏死（淋巴结和肾上肿块）观察到有效性的初步证据。

[0252] 结论：

[0253] TKI258 500mg/ 天似乎是重度治疗前 mRCC 患者可行的疗程，具有一些临床有益的指征。某些治疗过的患者具有清楚地 FGF23 水平升高，而有一些患者则没有这种升高。对于具有 FGF23 升高的患者，FGF23 水平的峰似乎在第一周期第 15 天附近。与基线水平比，FGF23 水平得到了在 1.35–1.75 的范围内的升高。

[0254] 实施例 7：

[0255] TKI258 在大鼠中的 FGF23 诱导与 RT112 皮下肿瘤异种移植物的 FGFR3 抑制相关联。

[0256] 7.1 方法

[0257] 动物

[0258] 在雌性 Rowett 大鼠 Hsd:RH-Fox1rnu 中进行实验。这些无胸腺的裸鼠得自 Harlan (荷兰)。

[0259] 化合物配方和动物处理

[0260] 将 TKI258 配制在醋酸-醋酸盐缓冲液 (pH4.6)/PEG300 (2 : 1v/v) 中, 每天通过管饲法应用。载体由醋酸-醋酸盐缓冲液 (pH4.6)/PEG300 (2 : 1v/v) 构成。使用体积为 5ml/kg。

[0261] 研究设计

[0262] 通过向右侧腹皮下注射含 50 % Matrigel (BD#356234) 的 100 μ IHBSS (Sigma#H8264) 中的 1×10^6 个 RT112 细胞, 对大鼠皮下移植 RT112 异种移植瘤。当肿瘤达到平均体积为 400mm³ 时, 大鼠接受 10mg/kg、25mg/kg 或 50mg/kg TKI258 或载体的单次口服给药。

[0263] 血液和组织取样用于体外分析

[0264] 化合物给药后 3 小时、7 小时和 24 小时舌下抽取血液样品。从各个血液样品制备血浆和血清。同样时间点, 将肿瘤切下, 并冷冻于液氮中。

[0265] RT112 肿瘤异种移植物的离体分析

[0266] RT112 膀胱癌细胞表达高水平的 FGFR3, 这些细胞中的 FGFR3 活性可以通过测量 FGFR 底物 FRS3 酪氨酸磷酸化的改变来监测。用振动粉碎机 (RETSCH, MM2 或 MM200) 粉碎肿瘤材料。50mg 肿瘤粉末的等份样品在冰冷的裂解缓冲液 (50mM Tris pH7.5, 150mM NaCl, 1mM EGTA, 5mMEDTA, 1% Triton, 2mM 钒酸钠, 1mM PMSF 和蛋白酶抑制剂混合物 (Roche#11873580001)) 中裂解。12000 $\times$ g 离心 15 分钟, 澄清裂解物, 用 DC 蛋白质分析试剂 (Bio Rad#500-0116) 和 BSA 标准测定蛋白质浓度。对全细胞裂解物进行 SDS-PAGE, 并将蛋白质印迹到 PVDF 膜上。用 5% BSA 封闭滤膜, 将滤膜进一步与一抗 p-FRS2 (Tyr196) (Cell Signaling#3864); β -微管蛋白 (Sigma#T4026) 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。利用 SuperSignal[®] WestDura Extended Duration Substrate 检测系统 (Pierce#34075), 用偶联有过氧化物酶的抗小鼠或抗兔抗体可视蛋白质。

[0267] FGF23 ELISA 检测

[0268] 使用来自日本 KAINOS Laboratories, Inc. 的 FGF23 ELISA 分析 (货号 #CY-4000), 如前文实施例所述监测血清样品的 FGF23 水平。

[0269] 7.2 结果和讨论

[0270] 在给予大鼠 TKI258 时 RT112 异种移植瘤中 FRS2 酪氨酸磷酸化的调节

[0271] FRS2 是 FGFR 的底物, 其被激活的 FGFR 在酪氨酸残基处磷酸化, 所以可以作为 FGFR 活性的读出结果。用 10、25 或 50mg/kg TKI258 或载体治疗的动物, 对在治疗后 3 小时切下的 RT112 肿瘤进行分析表明 TKI258 以剂量依赖的方式抑制 FRS2 酪氨酸磷酸化 (图 12)。

[0272] 在 Rowett 大鼠血清样品中的 FGF23 水平

[0273] 在用 TKI258 或载体治疗的大鼠给药后 24 小时的血清样品中测定 FGF23 水平。与载体治疗组比较, 用 TKI258 治疗的大鼠表现出剂量依赖的 FGF23 血清水平的升高 (图 13), 该升高是统计学显著的。 ($p < 0.01$, ANOVA post hoc Dunnett' s 检验)。数据表

示为平均值 $\pm$ SEM。

[0274] 结论。当前的实验数据说明体内抑制 FGFR3 的 TKI258 剂量，如通过 FRS2 酪氨酸磷酸化的抑制所测定的，也以剂量依赖的方式导致 FGF23 血清水平的升高。

[0275] 实施例 8：

[0276] PD173074 在大鼠中的 FGF23 诱导，以及与化合物 A 和 TKI258 的比较

[0277] 8.1 方法

[0278] 动物。实验在雌性 wistar 大鼠 furth WF/Ico 中进行。

[0279] 化合物、配方和动物处理

[0280] PD173074、化合物 A 和 TKI258 被配制为 NMP (1- 甲基 -2- 吡咯烷酮) / PEG300 1 : 9 (1ml NMP+9ml PEG300) 的溶液，并每天通过管饲法给药。使用体积为 5ml/kg。

[0281] 研究设计

[0282] 用 PD173074 (50mg/kg)、化合物 A (10mg/kg) 或 TKI258 (50mg/kg) 或载体单次口服给药来处理大鼠。

[0283] 血液和组织取样用于离体分析

[0284] 化合物给药后 24 小时舌下抽取血液样品。从各个血液样品制备血浆和血清样品。

[0285] FGF23 ELISA 检测

[0286] 使用来自日本 KAINOS Laboratories, Inc. 的 FGF23 ELISA 分析 (货号 #CY-4000)，如前文实施例所述监测血清样品的 FGF23 水平。

[0287] 8.2 结果和讨论

[0288] 在 wister 大鼠血清样品中的 FGF23 水平

[0289] 与载体治疗组比较，用 PD173074 或化合物 A 或 TKI258 治疗的大鼠表现出统计学显著的 FGF23 血清水平的升高 (图 14)，($p < 0.01$ ，ANOVA post hoc Dunnett's 检验)。数据表示为平均值 $\pm$ SEM。

[0290] 结论：当前的实验数据说明 FGFR 抑制剂 PD173074、化合物 A 或 TKI258 引起大鼠 FGF23 血清水平的升高。

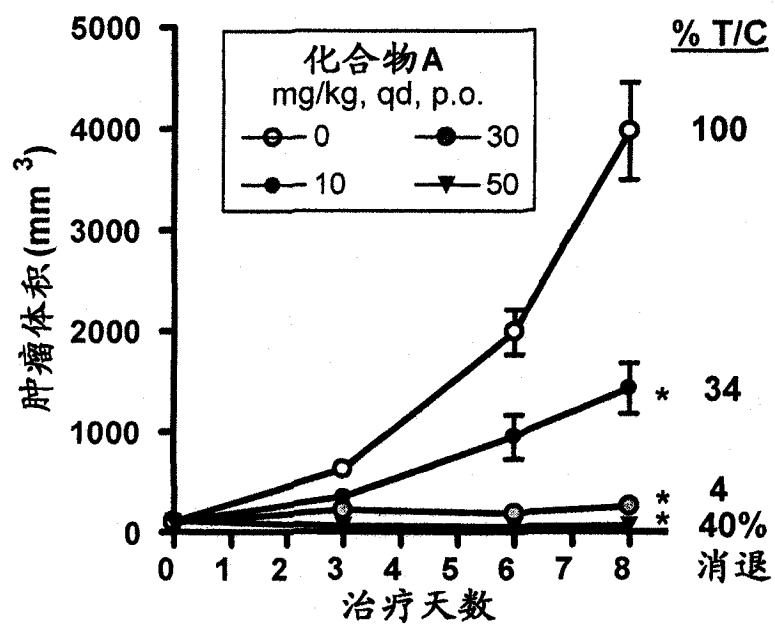


图 1

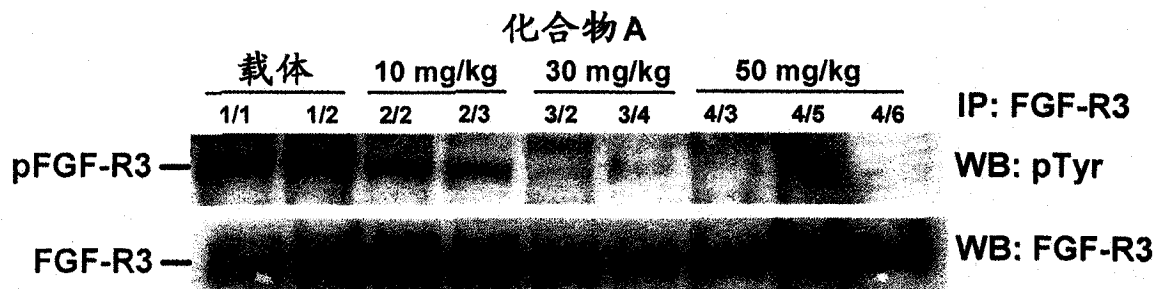


图 2

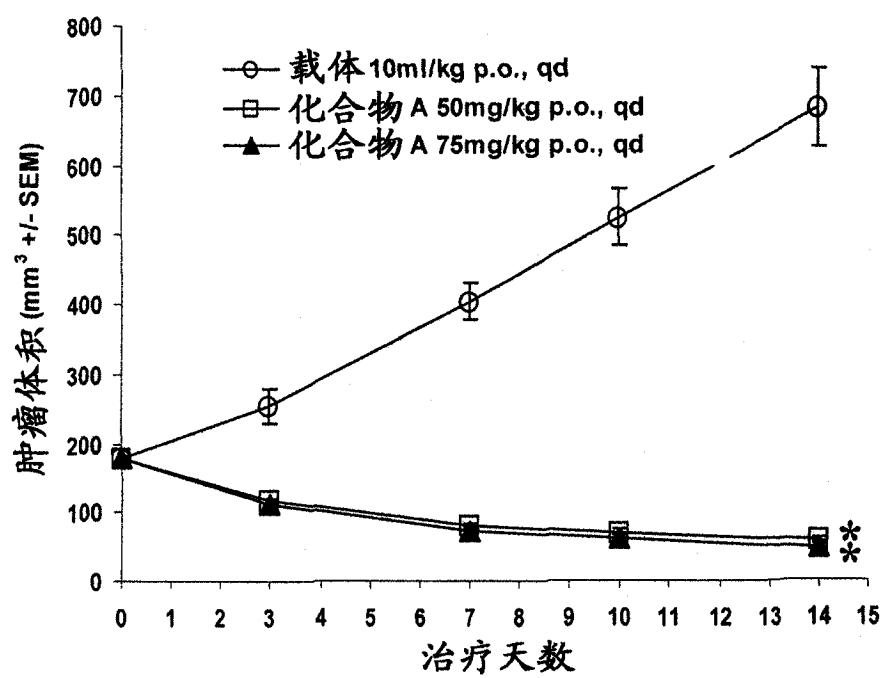


图 3

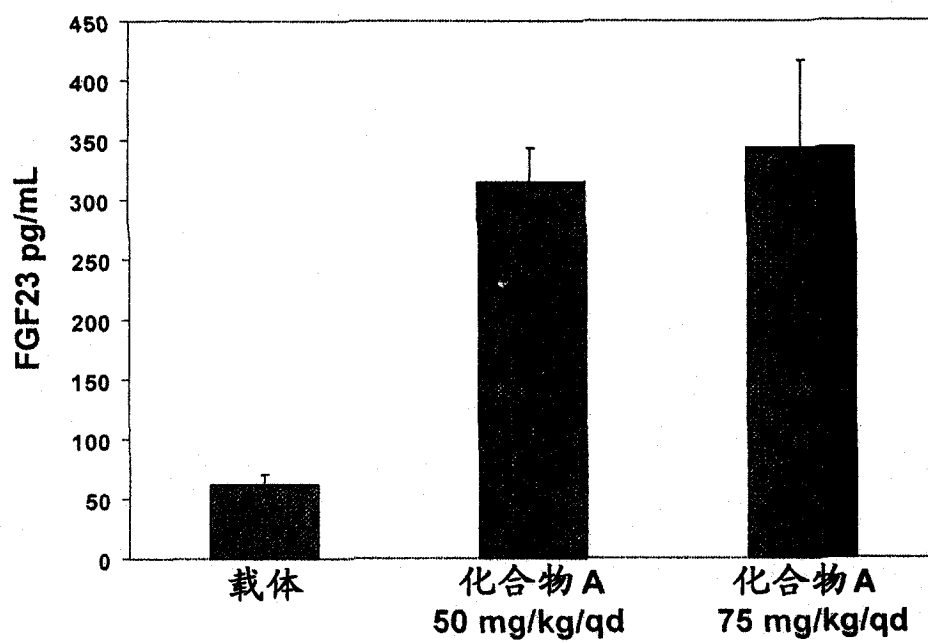


图 4

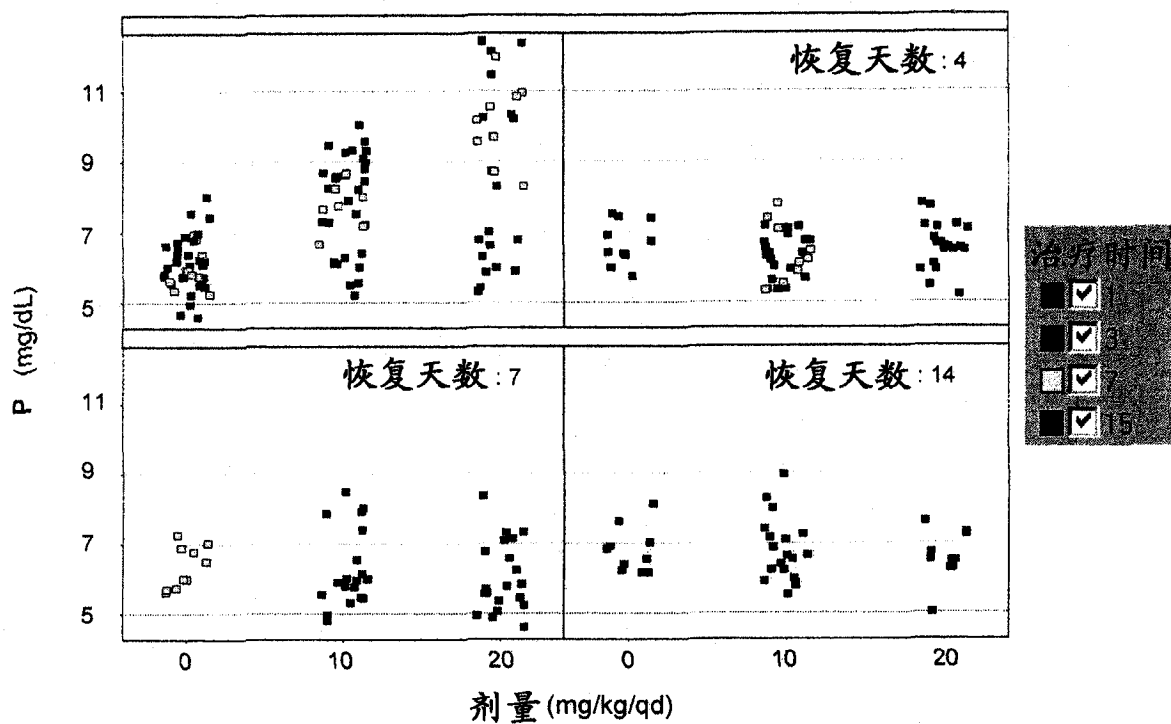


图 5

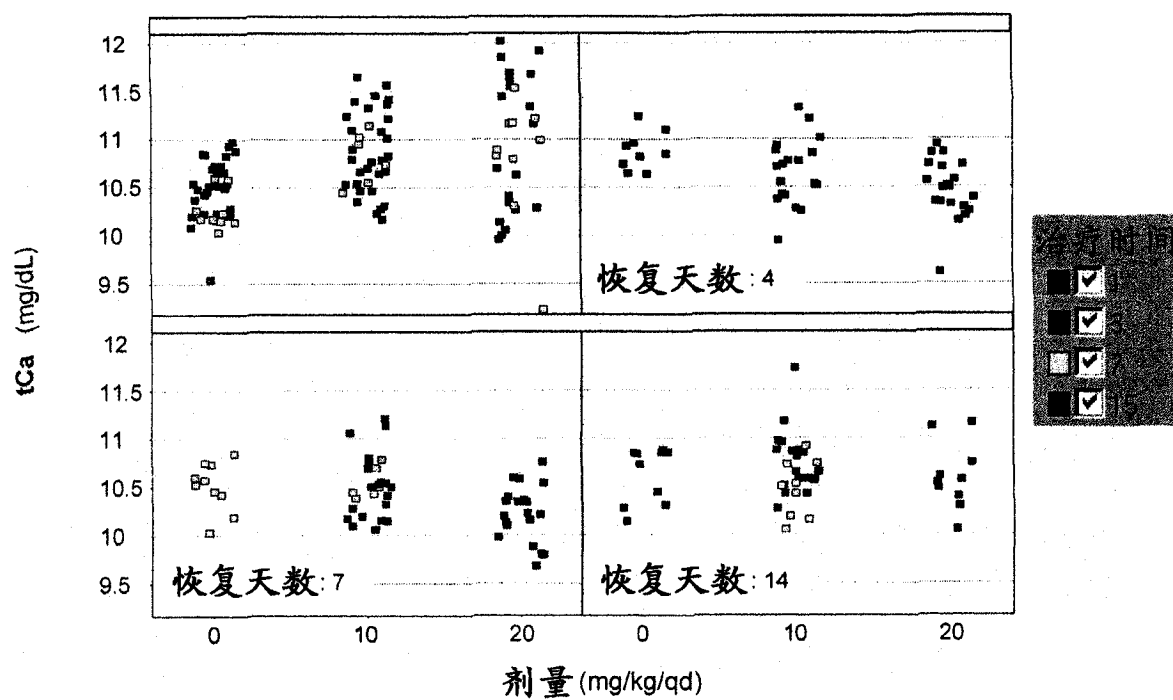


图 6

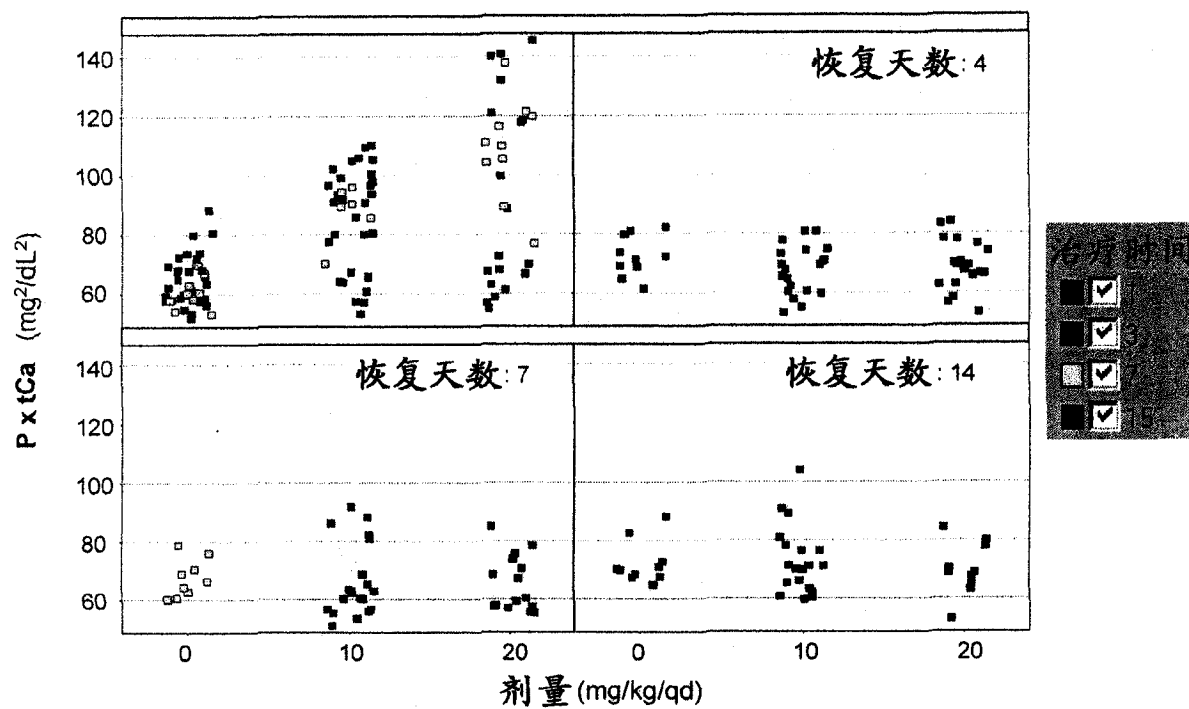


图 7

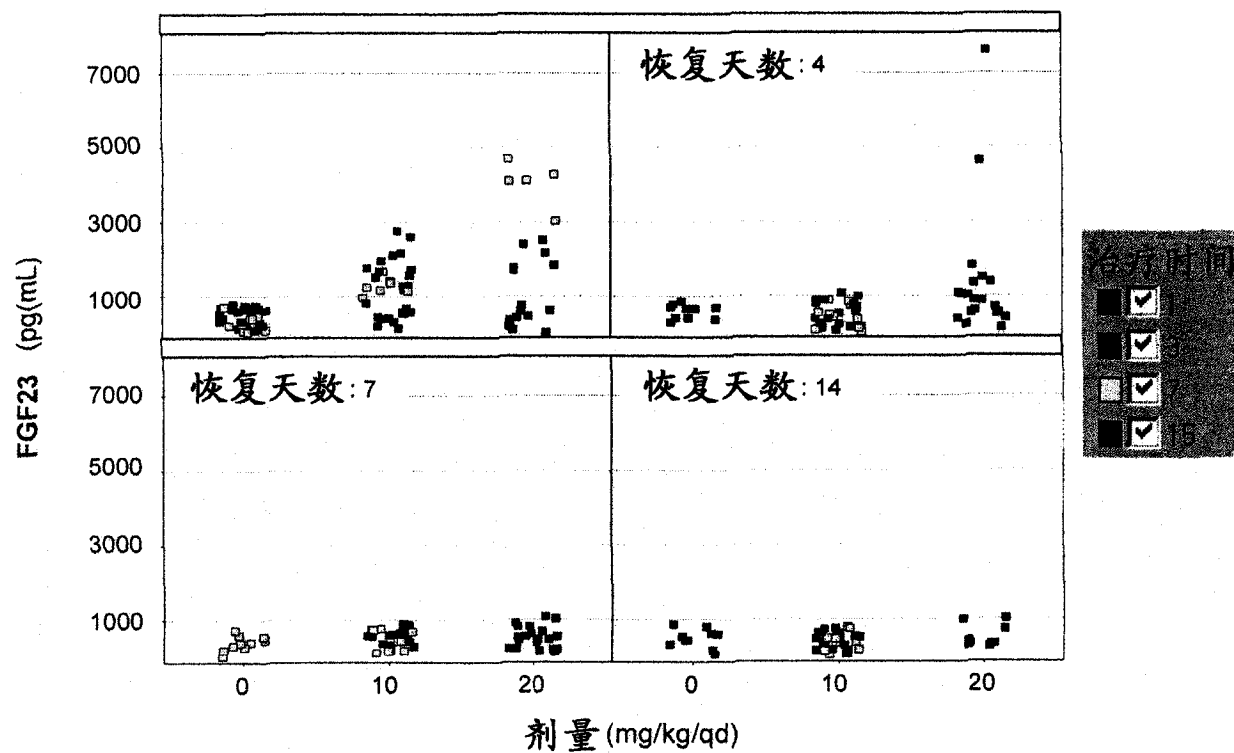


图 8

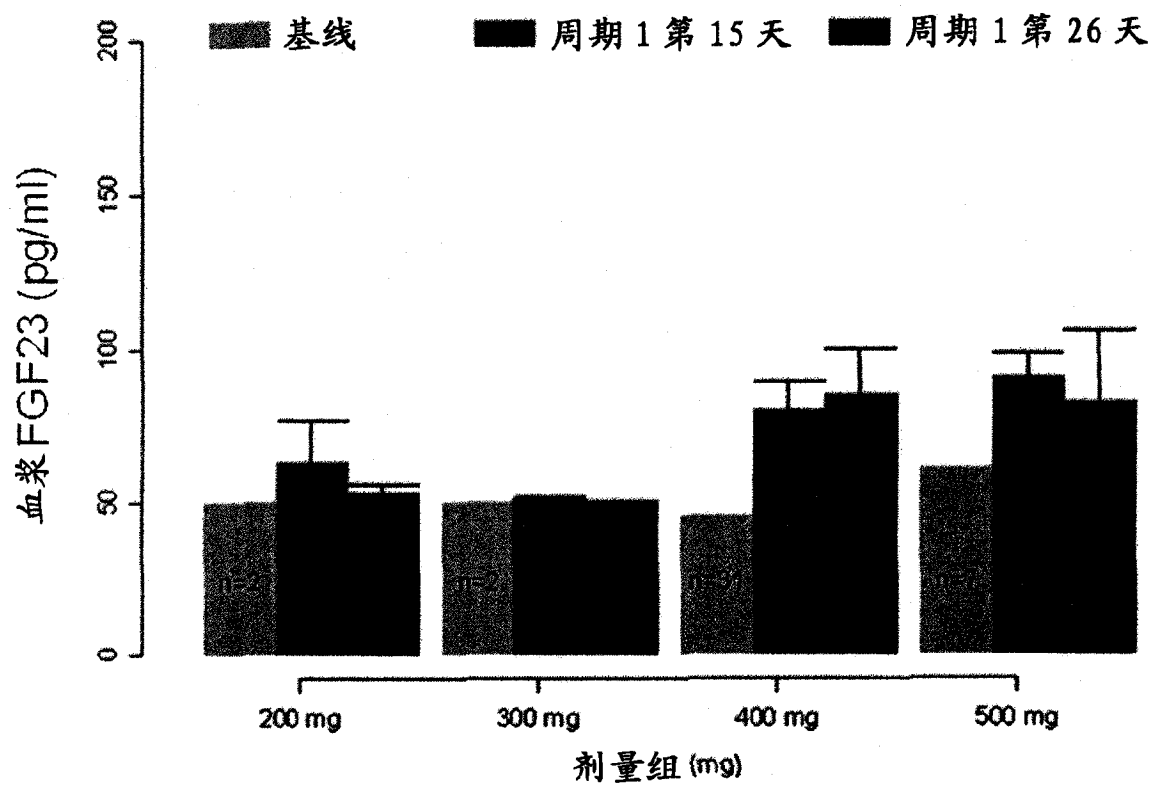


图 9

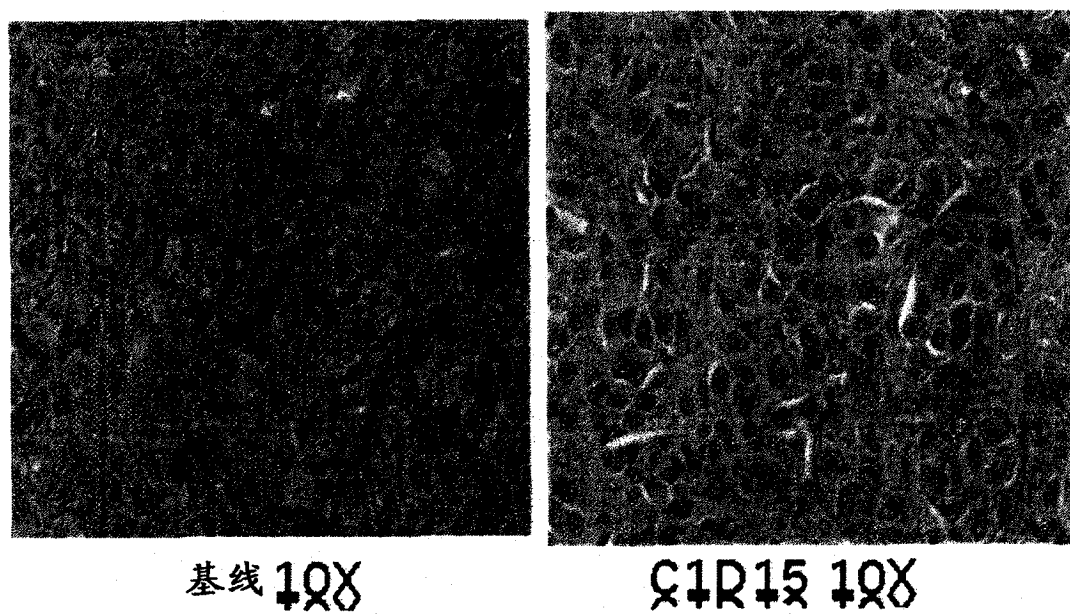


图 10

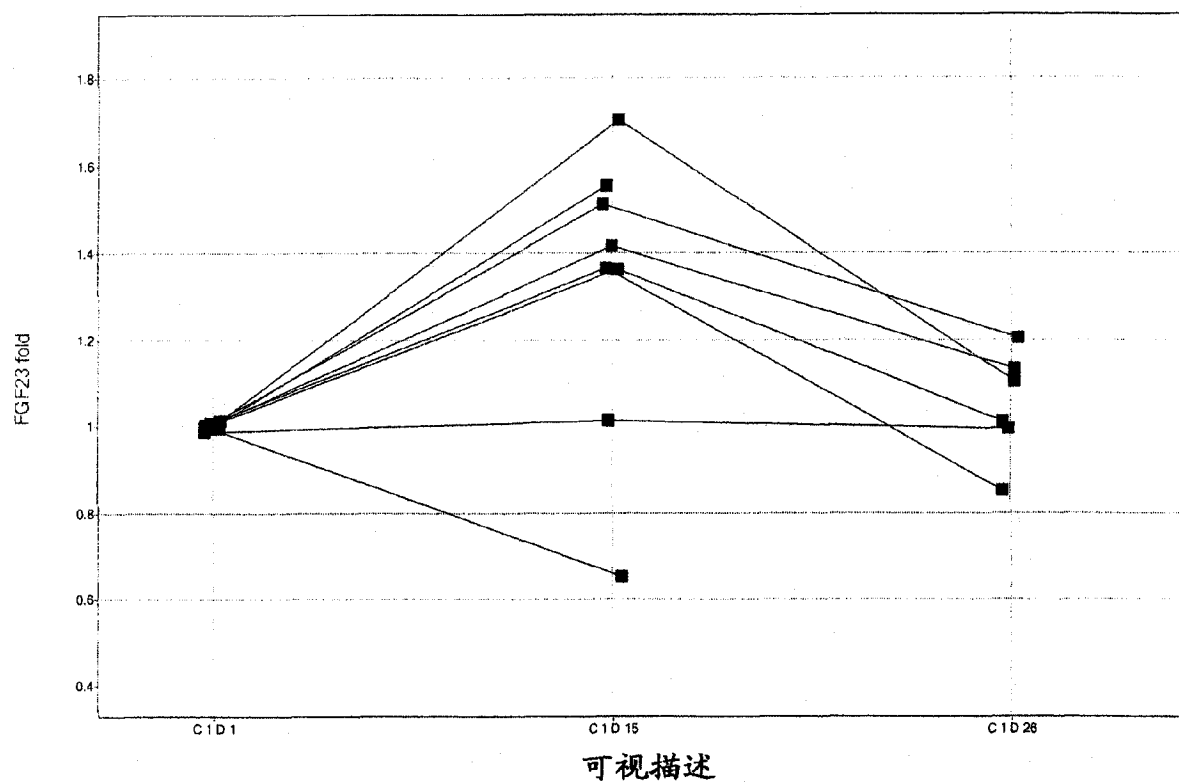


图 11

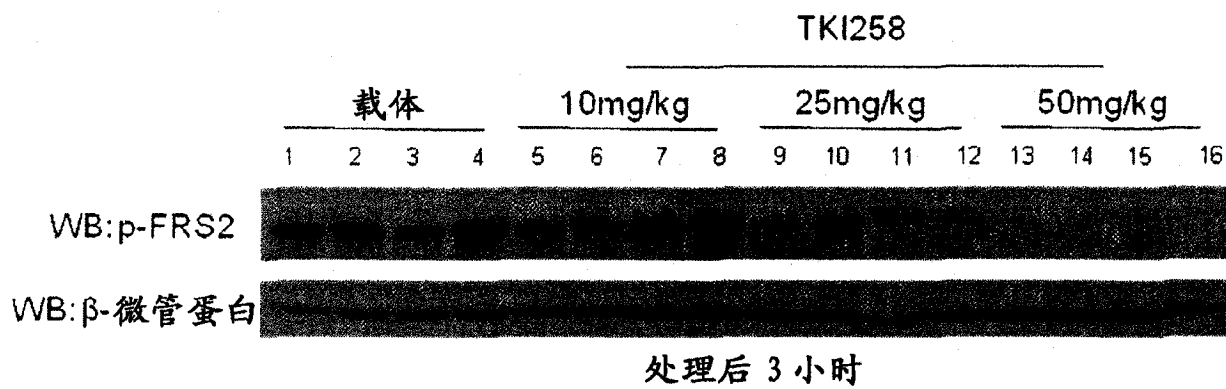


图 12

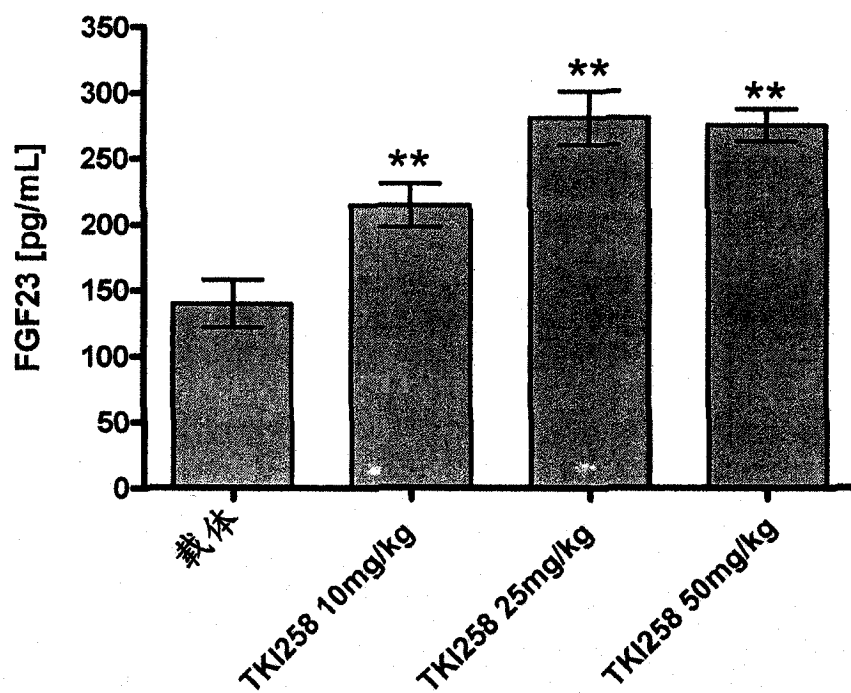


图 13

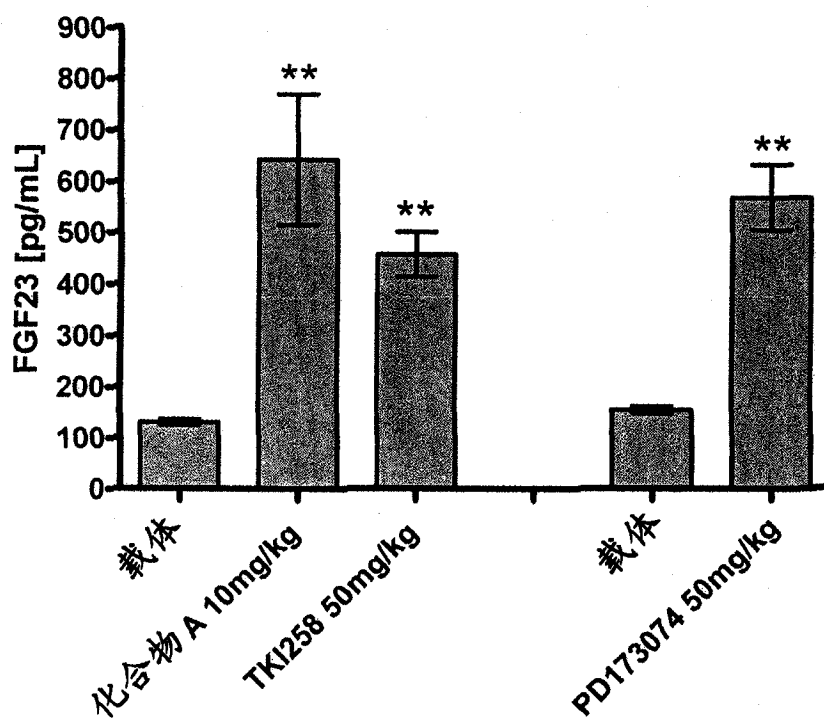


图 14