



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102334030 A

(43) 申请公布日 2012. 01. 25

(21) 申请号 201080009568. X

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2010. 03. 11

G01N 33/50(2006. 01)

(30) 优先权数据

09154964. 2 2009. 03. 12 EP

(85) PCT申请进入国家阶段日

2011. 08. 29

(86) PCT申请的申请数据

PCT/EP2010/053063 2010. 03. 11

(87) PCT申请的公布数据

W02010/103058 EN 2010. 09. 16

(71) 申请人 贝林格尔·英格海姆国际有限公司

地址 德国英格海姆

(72) 发明人 荒尾德三 工藤可苗 中川和彦

西尾和人

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 张红春

权利要求书 2 页 说明书 13 页 附图 5 页

(54) 发明名称

利用生物标记监测疗法之方法或系统

(57) 摘要

本发明系关于生物标记,以监测化合物 3-Z-[1-(4-(N-((4-甲基-哌嗪-1-基)-甲基羰基)-N-甲基-氨基)-苯胺基)-1-苯基-亚甲基]-6-甲氧羰基-2-吡啶酮或其医药上可接受的盐(及尤其系其单乙磺酸盐型)在单独或视情况与其它医药活性成分及/或其它疗法(如例如放射治疗)组合使用时之活性。

1. 一种监测使用化合物 3-Z-[1-(4-(N-((4-甲基-哌嗪-1-基)-甲基羰基)-N-甲基-氨基)-苯胺基)-1-苯基-亚甲基]-6-甲氧羰基-2-吡啶满酮或其医药上可接受的盐之个体疗法之方法或系统,该方法包括测定来自该个体之样品是否包括该疗法之指示量之生物标记。

2. 如权利要求 1 之方法或系统,其中该化合物系 3-Z-[1-(4-(N-((4-甲基-哌嗪-1-基)-甲基羰基)-N-甲基-氨基)-苯胺基)-1-苯基-亚甲基]-6-甲氧羰基-2-吡啶满酮之单乙磺酸盐型。

3. 如权利要求 1 或 2 之方法或系统,其中该生物标记指示蛋白质之表达或状态的变化或与疾病之风险或进展或该疾病对既定疗法的易感性相关之特定细胞数量的变化。

4. 如权利要求 1 或 2 之方法或系统,其中监测该疗法意指以下任一者:监测响应程度、监测响应持续时间、监测响应比率、监测稳定比率、监测稳定持续时间、监测疾病进展前之时间、监测无进展存活或监测整体存活,特别系在不损害响应持续时间但出现较少及/或麻烦较小之副作用的情况下。

5. 如权利要求 1 或 2 之方法或系统,其中系确定该数量之量。

6. 如权利要求 1 或 2 之方法或系统,其包括将该数量与参考值加以比较。

7. 如权利要求 1 或 2 之方法或系统,其中该生物标记包括呈递一些特定细胞表面抗原之细胞。

8. 如权利要求 1 或 2 之方法或系统,其中该样品系血液样品。

9. 如权利要求 1 或 2 之方法或系统,其中该生物标记系内皮细胞之磷酸-酪氨酸水平。

10. 如权利要求 1 或 2 之方法或系统,其中该生物标记系 VEGFR2⁺CD45^{dim}pY⁺ 细胞之数目。

11. 如权利要求 1 或 2 之方法或系统,其中该生物标记系 VEGFR2⁺pY⁺ 细胞之数目。

12. 如权利要求 1 或 2 之方法或系统,其中该生物标记系选自 CD34⁺CD45^{dim}CD133⁺CD117⁻ 细胞之数目、CD34⁺CD45^{dim}CD133⁻CD117⁺ 细胞之数目、CD34⁺CD45^{dim}CD133⁺ 细胞之数目及 CD34⁺CD45^{dim}CD117⁺ 细胞之数目。

13. 如权利要求 1 或 2 之方法或系统,其中该生物标记系 CD34⁺CD45^{dim}CD133⁺CD117⁺ 细胞之数目。

14. 一种决定利用化合物 3-Z-[1-(4-(N-((4-甲基-哌嗪-1-基)-甲基羰基)-N-甲基-氨基)-苯胺基)-1-苯基-亚甲基]-6-甲氧羰基-2-吡啶满酮或其医药上可接受的盐治疗病患是否有效之方法或系统,其包括以下要件:要求进行此决定之病患或医师;自该病患获取生物材料之样品;利用如权利要求 1 或 2 之监测个体疗法之方法或系统分析该样品;及将该等测试结果送回给该病患或医师。

15. 一种诊断试剂盒,其包括至少一种执行如权利要求 1 或 2 之方法或系统之构件。

16. 如权利要求 15 之诊断试剂盒,其中该试剂盒包括:选自抗体或核酸之试剂或材料,由该试剂或材料监测设定在 mRNA、蛋白质层级或在细胞或样品层级上的生物标记之表达;视情况选用之一或多种用于测试来自病患组织标本或病患样品之细胞的活性成分;及视情况选用之使用说明。

17. 一种生物标记在如权利要求 1 或 2 之方法或系统中之用途,其系用于监测利用化合物 3-Z-[1-(4-(N-((4-甲基-哌嗪-1-基)-甲基羰基)-N-甲基-氨基)-苯胺基)-1-苯

基 - 亚甲基]-6- 甲氧羰基 -2- 吡啶满酮或其医药上可接受的盐之个体疗法。

利用生物标记监测疗法之方法或系统

[0001] 本发明系关于医药领域,且尤其系关于特定化合物活性之生物标记及关于监测利用该化合物之疗法。

[0002] 本发明更明确言之系关于生物标记,以监测化合物 3-Z-[1-(4-(N-((4-甲基-哌嗪-1-基)-甲基羰基)-N-甲基-氨基)-苯胺基)-1-苯基-亚甲基]-6-甲氧羰基-2-吡啶满酮(indolinone)或其医药上可接受的盐(及尤其系其单乙磺酸盐型)在单独或视情况与其它医药活性成分及/或其它疗法(如(例如)放射治疗)组合使用时之活性。

[0003] 发明背景

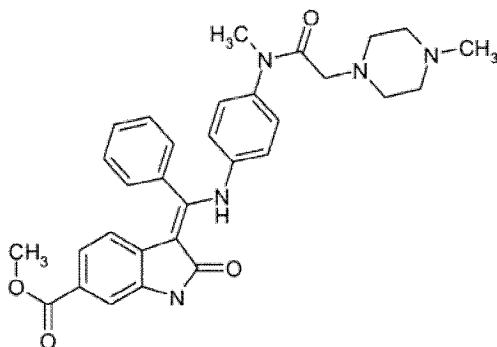
[0004] 在生物体中之分子过程及研究此等过程之技术之知识的最新进步已改善诊断及治疗疾病之方法及系统。在多个领域正进行研究以提供及/或改善治疗疾病之方法,及提供及/或改善监测疗法效果之方法及系统。

[0005] 化合物 3-Z-[1-(4-(N-((4-甲基-哌嗪-1-基)-甲基羰基)-N-甲基-氨基)-苯胺基)-1-苯基-亚甲基]-6-甲氧羰基-2-吡啶满酮系具有宝贵的药理特性之创新活性成分,尤其系用于治疗肿瘤疾病、免疫疾病或涉及免疫组分之病理状况、或纤维化疾病。

[0006] 此化合物之化学结构系如下式 A 所示。

[0007] 式 A

[0008]

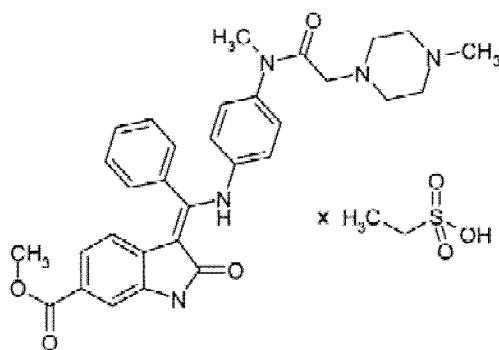


[0009] 此化合物之碱型系描述于 WO 01/27081 中,单乙磺酸盐型系描述于 WO2004/013099 中,及多种其它盐型系呈现于 WO 2007/141283 中。此分子于治疗免疫疾病或涉及免疫组分之病理状况之用途系描述于 WO 2004/017948 中,于治疗肿瘤疾病之用途系描述于 WO 2004/096224 中,及于治疗纤维化疾病之用途系描述于 WO 2006/067165 中。

[0010] 此化合物之单乙磺酸盐型呈现之性质使此盐型尤其适于开发成为药物。3-Z-[1-(4-(N-((4-甲基-哌嗪-1-基)-甲基羰基)-N-甲基-氨基)-苯胺基)-1-苯基-亚甲基]-6-甲氧羰基-2-吡啶满酮-单乙磺酸盐之化学结构系如下式 A1 所示。

[0011] 式 A1

[0012]



[0013] 临床前研究已显示此化合物系血管内皮生长因子受体 (VEGFR), 血小板衍生长因子受体 (PDGFR) 和成纤维细胞生长因子受体 (FGFR) 之高效口服生物可利用的抑制剂, 其透过抑制肿瘤新血管生成机制抑制肿瘤生长。进一步显示此化合物抑制内皮及平滑肌细胞及周细胞之信号转导, 并降低肿瘤血管密度。

[0014] 此外, 此化合物在至今测试之所有模型中, 在良好耐受剂量下均显示活体内抗肿瘤效果。下表 1 显示在异种移植模型中及在同基因大鼠肿瘤模型中测试之活体内抗肿瘤效力之结果。

[0015] 表 1

[0016]

癌症	模型	效力
结肠直肠	HT-29 HT-29大型肿瘤	T/C 16% @ 100mg/kg/d 肿瘤体积减小
成胶质细胞瘤	GS-9L同基因大鼠	T/C 32% @ 50mg/kg/d
头部及颈部	FaDu	T/C 11% @ 100mg/kg/d
肺(非小细胞)	NCI-H460 Calu-6	T/C 54% @ 25mg/kg/d T/C 24% @ 50mg/kg/d
卵巢	SKOV3	T/C 19% @ 50mg/kg/d
前列腺(激素-依赖性)	PAC-120	T/C 34% @ 100mg/kg/d
肾	Caki-1	T/C 13% @ 100mg/kg/d
胰腺(鼠转基因)	Rip-Tag	干扰肿瘤形成

[0017]

[0018] T/C 表示相对于对照之肿瘤大小减小%

[0019] 因此, 此化合物系 (例如) 适于治疗涉及血管生成或细胞增殖之疾病。

[0020] 此化合物另外适于治疗纤维化疾病, 如 WO 2006/067165 中所述。

[0021] 尽管诸多研究着眼于发展诊断及筛检之方法, 但仍需求监测疗法之有效的方法及系统。监测并不经常可能或需要复杂、昂贵及 / 或费时的规程 (对病患而言经常不方便), 如从病患处获取样品 (例如活检样品) 并在实验室中研究此等样品。肿瘤细胞之放射学分

析系仅可能在开始肿瘤治疗后几星期进行。

[0022] 因此,根据 WO 2008/127528 提供方法及规程以监测病患之响应或确定其敏感性,以鉴定有助于治疗疾病及病症之个性化基因图谱。

[0023] 根据 WO 2008/134526,膀胱癌可藉由筛检尿液样品中存在升高水平之鉴定的生物标记检测。此文献另外描述一种藉由检测受试者尿液样品中至少一种本文鉴定的膀胱癌之生物标记(如 α -1B-糖蛋白、肝球蛋白、血清运铁蛋白、或 α -1-抗胰蛋白酶),以诊断、预后、及监测膀胱癌(如早期或晚期膀胱癌)之方法。该等生物标记可使用检测或结合至该生物标记蛋白之试剂或检测或结合至编码核酸之试剂(如:可与该生物标记蛋白或其部分特异性反应之抗体)进行检测,及视情况进行测定。

[0024] 因此,某些细胞表面分子之表达量已建议作为一种疾病或其治疗之指示。

[0025] 根据 WO 2005/083123,在来自个体样品中之 AC133 表达产物的量(即:该蛋白质或其 mRNA 的量)系指示一种疾病或其治疗。此参考文献进一步指出在未经治疗的癌症病患中,AC133 之表达显著高于健康个体。在实例中亦显示,多名肿瘤病患经治疗时,AC133 表达显著下降,但在相同治疗期间之循环之内皮细胞总量基本上仍保持相同。本质上,此参考文献进一步指出,循环之内皮细胞数量并不一定指示个体之状态,而 AC133 表达产物之总量则可指示该状态。类似地,WO 2004/019864 描述利用定量性 RT-PCR 以鉴定作为标记之 AC133 并诊断及监测血管生成。

[0026] 然而,迄今没有描述或建议利用生物标记监测上述活性成分 3-Z-[1-(4-(N-((4-甲基-哌嗪-1-基)-甲基羰基)-N-甲基-氨基)-苯胺基)-1-苯基-亚甲基]-6-甲氧羰基-2-吡啶满酮或其医药上可接受的盐,及尤其系其单乙磺酸盐型单独或视情况与其它医药活性成分及/或其它治疗(如,例如放射治疗)组合使用之个体疗法之方法及系统。现有技术亦没有预测此方法及系统。

[0027] 发明概述

[0028] 本发明之目的系提供一种方法及系统,其利用生物标记监测化合物 3-Z-[1-(4-(N-((4-甲基-哌嗪-1-基)-甲基羰基)-N-甲基-氨基)-苯胺基)-1-苯基-亚甲基]-6-甲氧羰基-2-吡啶满酮或其医药上可接受的盐,及尤其系其单乙磺酸盐型单独或视情况与其它医药活性成分及/或其它治疗(如,例如放射治疗)组合使用之个体疗法。

[0029] 因此,本发明目标之一系提供一种监测化合物 3-Z-[1-(4-(N-((4-甲基-哌嗪-1-基)-甲基羰基)-N-甲基-氨基)-苯胺基)-1-苯基-亚甲基]-6-甲氧羰基-2-吡啶满酮或其医药上可接受的盐(较佳为单乙磺酸盐型)之个体疗法之方法或系统,该方法包括测定来自该个体之样品是否包括该疗法之指示量的生物标记。

[0030] 本发明之另一目标系上述方法或系统,其中该生物标记指示蛋白质之表达或状态的变化或指示与疾病之风险或进展或与该疾病对指定疗法之易感性相关的特定细胞数量的变化。

[0031] 在根据本发明之另一项实施方案中,该生物标记系药效学生物标记。

[0032] 在根据本发明之另一项实施方案中,监测该疗法意指以下任一者:监测响应程度、监测响应持续时间、监测响应比率、监测稳定比率、监测稳定持续时间、监测疾病进展前之时间、监测无进展存活或监测整体存活,特别系在不损害响应持续时间但具有较少及/或

麻烦较小的副作用的情况下。

[0033] 本发明之另一目标系上述方法或系统,其中系定量该数量。

[0034] 本发明之另一目标系上述方法或系统,其包括比较该数量与参考值。

[0035] 本发明之另一目标系上述方法或系统,其包括比较该表达产物或特定细胞之该数量与该治疗之前自该个体获得之样品中存在的该表达产物或特定细胞的数量。

[0036] 在另一项实施方案中,多个来自该个体之样品系在开始治疗后的不同时间点获得。此作法能长时间监测治疗过程。例如,其可决定该生物标记之数量是否仍指示该疾病或其疗法。例如,此可用于在每个病患基础上建立病患的适当治疗时间表、剂量及类型。此外,其可测定是否适合在指定时间点持续治疗。

[0037] 本发明之另一目标系上述方法或系统,其中该样品系在该治疗开始一个月内获得。

[0038] 本发明之另一目标系上述方法或系统,其中该样品系在该治疗开始一周内获得。

[0039] 本发明之另一目标系上述方法或系统,其中该样品系在该治疗开始两天内获得。

[0040] 本发明之另一目标系上述方法或系统,其中该生物标记包括呈递一些特定细胞表面抗原之细胞。

[0041] 本发明之另一目标系上述方法或系统,其中该样品系血液样品。

[0042] 本发明之另一目标系上述方法或系统,其中该生物标记系内皮细胞之磷酸-酪氨酸水平。

[0043] 本发明之另一目标系上述方法或系统,其中该生物标记系 VEGFR2⁺CD45^{dim}pY⁺ 细胞之数目。

[0044] 本发明之另一目标系上述方法或系统,其中该生物标记系 VEGFR2⁺pY⁺ 细胞之数目。

[0045] 本发明之另一目标系上述方法或系统,其中该生物标记系选自 CD34⁺CD45^{dim}CD133⁺CD117⁻ 细胞之数目、CD34⁺CD45^{dim}CD133⁻CD117⁺ 细胞之数目、CD34⁺CD45^{dim}CD133⁺ 细胞之数目及 CD34⁺CD45^{dim}CD117⁺ 细胞之数目。

[0046] 本发明之另一目标系上述方法或系统,其中该生物标记系 CD34⁺CD45^{dim}CD133⁺CD117⁺ 细胞之数目。

[0047] 本发明之另一目标系上述方法或系统,其中以来自该个体样品使用流式细胞术所测得内皮细胞之磷酸-酪氨酸水平降低来指示该疗法。

[0048] 本发明之另一目标系上述方法或系统,其中以来自该个体血液样品使用流式细胞术所测定 VEGFR2⁺CD45^{dim}pY⁺ 细胞减少来指示该疗法。

[0049] 本发明之另一目标系上述方法或系统,其中以来自该个体血液样品使用流式细胞术所测得 VEGFR2⁺pY⁺ 细胞减少来指示该疗法。

[0050] 本发明之另一目标系上述方法或系统,其中以治疗后(例如在第 29 天)所测量 CD34⁺CD45^{dim}CD133⁺CD117⁻ 细胞百分比相对于治疗前之增加来指示该疗法。

[0051] 本发明之另一目标系上述方法或系统,其中以治疗后(例如在第 29 天)所测量 CD34⁺CD45^{dim}CD133⁻CD117⁺ 细胞相对于治疗前之降低来指示该疗法。

[0052] 本发明之另一目标系上述方法或系统,其中以治疗后(例如在第 29 天)所测量 CD34⁺CD45^{dim}CD133⁺ 细胞相对于治疗前之增加来指示该疗法。

[0053] 本发明之另一目标系上述方法或系统,其中以治疗后(例如在第8天及第29天)所测量 $CD34^+CD45^{dim}CD117^+$ 细胞相对于治疗前之减少来指示该疗法。

[0054] 本发明之另一目标系上述方法或系统,其中以治疗后所测量 $CD34^+CD45^{dim}CD133^+$ 细胞比治疗前减少来指示响应(病情稳定)。

[0055] 本发明之另一目标系上述方法或系统,其中以治疗后所测量 $CD34^+CD45^{dim}CD117^+$ 细胞比治疗前减少来指示响应(病情稳定)。

[0056] 本发明之另一目标系上述方法或系统,其中以治疗后所测量 $CD34^+CD45^{dim}CD133^+CD117^+$ 细胞比治疗前减少来指示响应(病情稳定)。

[0057] 本发明之另一目标系一种确定利用化合物 3-Z-[1-(4-(N-((4-甲基-哌嗪-1-基)-甲基羰基)-N-甲基-氨基)-苯胺基)-1-苯基-亚甲基]-6-甲氧羰基-2-吡啶满酮或其医药上可接受的盐(较佳为单乙磺酸盐型)治疗病患是否有效之方法或系统,其包括以下要件:需要进行此决定之病患或医师;自该病患获取生物材料之样品;使用上述监测个体疗法之方法或系统分析该样品;及将该等测试结果送回该病患或医师。

[0058] 本发明亦提供一种诊断试剂盒,其包括至少一种执行根据本发明之方法或系统之构件。在一个方面中,该试剂盒可包括设定在 mRNA、蛋白质层级上或在细胞或样品层级上监测生物标记表达的试剂或材料(如抗体或核酸)、及视情况选用之一或多种用于测试来自病患组织标本或病患样品之活性成分、及视情况包含使用说明。

[0059] 本发明之另一目标系一种生物标记于上述监测利用化合物 3-Z-[1-(4-(N-((4-甲基-哌嗪-1-基)-甲基羰基)-N-甲基-氨基)-苯胺基)-1-苯基-亚甲基]-6-甲氧羰基-2-吡啶满酮或其医药上可接受的盐(较佳为单乙磺酸盐型)之个体疗法的方法或系统中之用途。

附图说明

[0060] 图 1:不同化合物对于经 VEGF 治疗之 HUVEC 细胞之磷酸-酪氨酸水平之影响。横坐标上:1 系未经 VEGF 治疗且未经活性成分处理之 IgG 对照;2 系未经 VEGF 治疗且未经活性成分处理之对照;3 系经 VEGF 治疗但未经活性成分处理之对照;4 系经 VEGF 治疗且经过 $1\mu M$ 化合物 A1 处理;5 系经 VEGF 治疗且经过 $5\mu M$ 化合物 A1 处理;6 系经 VEGF 治疗且经过 $1\mu M$ 化合物 AG1478 处理;7 系经 VEGF 治疗且经过 $5\mu M$ 化合物 AG1478 处理;8 系经 VEGF 治疗且经过 $1mM$ 化合物 5FU 处理;9 系经 VEGF 治疗且经过 $5mM$ 化合物 5FU 处理;

[0061] 图 2:经化合物 A1 治疗后,活体内 $VEGFR2^+CD45^{dim}pY^+$ 白血球细胞之磷酸-酪氨酸水平。横坐标上:0 表示未经处理之对照;A50 表示经 $50mg/kg$ 之化合物 A1 治疗;A100 表示经 $100mg/kg$ 之化合物 A1 治疗;

[0062] 图 3:经化合物 A1 治疗后,鼠外周血液中之 $VEGFR2^+pY^+$ 细胞之流式细胞术结果。横坐标上:0 表示未经处理之对照;A50 表示经 $50mg/kg$ 之化合物 A1 治疗;A100 表示经 $100mg/kg$ 之化合物 A1 治疗;

[0063] 图 4:在治疗前、及在经化合物 A1 治疗后第 2 天、第 8 天及第 29 天,于所采集全血中的 $CD34^+CD45^{dim}CD133+/-CD117+/-$ 细胞之百分比(象限);及

[0064] 图 5:在治疗前、及在经化合物 A1 治疗后第 2 天、第 8 天及第 29 天于有响应者及无响应者之所采集全血中的 $CD34^+CD45^{dim}CD133+/-CD117+/-$ 细胞之比例。

[0065] 发明详述

[0066] 在本发明之定义内,生物标记系用作生物状态之指示剂。其特征在于:其系客观测量并评价正常生物过程、病变过程或对于治疗干预之药理反应之指示剂。此点符合 NIH 研究群组在 1998 年所指示之定义。

[0067] 更特定而言,生物标记指示与疾病之风险或进展相关,或与疾病对指定治疗之易感性相关的变化。所建议之生物标记一旦经确认,则其可用于诊断个体中之疾病风险、疾病之存在、或用于订制个体疾病之疗法(选择药物疗法或投药方案)。在评估可能的药物疗法中,生物标记可用作自然评估指标(如生存或不可逆致病)之替代物。如果治疗改变了与改善健康有直接相关之生物标记,则该生物标记可作为评估临床效益之替代评估指标。

[0068] 本发明之方法或系统可系(例如)活体外方法,其中测量该个体内至少一种生物标记之水平之步骤包括自该个体采取生物样品,及随后测量该生物样品内之该(等)生物标记之水平。该生物样品可包括(例如)血清、新鲜全血、外周血液单个核细胞、冷冻全血、新鲜血浆、冷冻血浆、尿液、唾液、皮肤、毛囊、骨髓或肿瘤组织中至少一者。

[0069] 在本发明之范围内,分化簇分子 CD34、CD45、CD133 及 CD117 尤其可作为特定细胞类型之细胞标记。

[0070] 因此,分化簇(或指定簇,常常缩写作 CD)系一种用于鉴定及研究白血球上存在之细胞表面分子之方案。CD 命名法系在 1982 年巴黎举行的第一届人类白血球分化抗原(HLDA)国际研讨会(the 1st International Workshop and Conference on Human Leukocyte Differentiation Antigens)上提出及设立。此系统系用于多种由世界各地不同实验室产生之针对白血球(白色血液细胞)表面分子上之表位的单克隆抗体(mAb)之分类。从此以后,其用途已经延伸至多种其它细胞类型,已鉴定超过 320 种 CD 独特簇及子簇。一旦发现有两种特定的单克隆抗体(mAb)会与该分子结合,则该提出的表面分子将被指定一个 CD 编号。如果该分子不具有充分的特征,或只具有一种 mAb,其通常系给临时代号“w”(如:“CDw186”)。CD 分子可依多种方式产生作用,其常用作对细胞重要的受体或配体(活化受体之分子)。通常启动信号级联,改变该细胞之行为(细胞信号传导)。一些 CD 蛋白质在细胞信号传导中不发挥作用,但是具有其它功能,如细胞黏附。大约有 250 种不同的蛋白质。

[0071] 该 CD 系统通常系用作细胞标记,因此细胞可以依据其表面上存在之分子来定义。虽然不常使用一个 CD 分子来界定种群(但仍有少数实例),但是在免疫系统内已可采用组合之标记对细胞类型进行非常明确的定义。

[0072] 使用包括流式细胞术之多种方法分选细胞时会利用到 CD 分子。细胞群通常用“+”或“-”符号定义,以指示某些细胞部分是表达或是缺少 CD 分子。例如,“CD34⁺、CD31⁻”细胞系表达 CD34,但是不表达 CD31 者。此 CD 组合一般相当于干细胞,与完全分化的内皮细胞相反。下表 2 显示一些造血干细胞及白血球细胞之 CD 标记。

[0073] 表 2

[0074]

细胞类型	CD 标记
干细胞	CD34 ⁺ , CD31 ⁻

所有白血球群	CD45+
粒细胞	CD45+, CD15+
单核细胞	CD45+, CD14+
T 淋巴细胞	CD45+, CD3+
T 辅助细胞	CD45+, CD3+, CD4+
细胞毒性 T 细胞	CD45+, CD3+, CD8+
B 淋巴细胞	CD45+, CD19+ 或 CD45+, CD20+
凝血细胞	CD45+, CD61+

[0075]

[0076] 分化簇 CD34 分子系存在于人体内某些细胞上之分子。表达 CD34 之细胞 (CD34+ 细胞) 通常系出现于脐带及骨髓中, 作为造血细胞、内皮祖细胞、血管但不是淋巴系统 (除了胸膜淋巴系统) 之内皮细胞、肥大细胞、皮肤真皮之附器周围及间质中之亚群树突状细胞 (其系 XIIIa 因子阴性), 以及一些软组织肿瘤中之细胞。其系一种细胞表面糖蛋白且具有细胞-细胞黏附因子功能。其亦可介导干细胞至骨髓细胞外基质或直接至基质细胞的附着。CD34+ 细胞可使用免疫磁性或免疫荧光方法自血液样品分离。抗体系用于定量及纯化造血祖干细胞, 供研究及临床骨髓移植。因此, 由于其等之 CD34+ 表达, 可分选出此等细胞。

[0077] 分化簇 CD45 系最初被称为白血球共同抗原之蛋白质。由此基因编码的蛋白质系蛋白酪氨酸磷酸酶 (PTP) 家族之成员。已知 PTP 系调节包括细胞生长、分化、有丝分裂周期及致癌转化之多种细胞过程之信号分子。此 PTP 含有胞外域、单个跨膜区及两个串联胞浆内催化域, 且因此属于受体类型 PTP。此基因在造血细胞中特异表达。此 PTP 已显示成为 T- 及 B- 细胞抗原受体信号传导之必不可少的调节体。其功能系透过与该抗原受体复合体组分之直接相互作用, 或藉由活化该抗原受体发送信号所需之多种 Src 家族激酶。此 PTP 亦抑制 JAK 激酶, 及因此具有作为细胞因子受体信号传导之调节体之功能。已报导此基因之四种可变剪接的转录体, 其编码不同的同等型。其系 I 型跨膜蛋白质, 呈各种型式出现在除了红血球及血浆细胞以外之所有分化造血细胞上, 并辅助活化此等细胞 (共刺激型)。其表达于淋巴瘤、B- 细胞慢性淋巴细胞性白血病、毛细胞白血病、及急性非淋巴细胞性白血病。

[0078] 分化簇分子 CD133 (亦称为 AC133) 系一种糖蛋白, 亦已知在人类及啮齿动物中作为 Prominin 1 (PROM1)。其系特定位于细胞突起之五跨膜糖蛋白 (5-跨膜, 5-TM) 之基本成员。CD133 系表达于造血干细胞、内皮祖细胞、成胶质细胞瘤、神经元及胶质干细胞及一些其它类型细胞中。

[0079] 分化簇分子 CD117 (亦称为 KIT 或 C-kit 受体) 系一种在造血干细胞及其它类型细胞之表面上表达之细胞因子受体。此受体结合至干细胞因子 (一种导致某些类型细胞生长之物质)。CD117 系用于鉴定骨髓中某些造血 (血液) 祖细胞类型之重要细胞表面标记。特别系造血干细胞 (HSC)、多能祖细胞 (MPP)、及共同髓样祖细胞 (CMP) 表达高水平之

CD117。共同淋巴样祖细胞 (CLP) 表达低表面水平之 CD117。CD117 亦鉴定胸腺中之最早的胸腺细胞祖细胞。此外,肥大细胞、在皮肤中之黑色素细胞、及在消化道中之 Cajal 间质细胞表达 CD117。CD117 亦系用于小鼠前列腺干细胞之标记。

[0080] 如下所示且根据本发明,呈递某些细胞标记之细胞适用作监测使用活性成分 3-Z-[1-(4-(N-((4-甲基-哌嗪-1-基)-甲基羰基)-N-甲基-氨基)-苯胺基)-1-苯基-亚甲基]-6-甲氧羰基-2-吡啶满酮或其医药上可接受的盐(较佳单乙磺酸盐型)之个体疗法的生物标记。

[0081] 特定言之,此包括监测响应程度、响应持续时间、响应比率、稳定比率、稳定持续时间、疾病进展前时间、无进展存活或整体存活,特别系在不损害响应持续时间但是具有较少及/或较不麻烦的副作用的情况下。

[0082] 如上所述,文中所定义之本发明疗法由于其抗血管生成及/或血管通透性作用而受到关注。许多种疾病状态会出现血管生成及/或血管通透性增加,包括癌症(包括白血病、卡波西氏肉瘤、多发性骨髓瘤及淋巴瘤)、糖尿病、银屑病、类风湿性关节炎、血管瘤、急性及慢性肾病、动脉瘤、动脉再狭窄、自体免疫疾病、急性炎症、哮喘、淋巴水肿、子宫内膜异位症、功能障碍性子宫出血、纤维化、硬化及出现视网膜血管增生的眼疾病(包括年龄相关的黄斑变性)。

[0083] 如本文定义之本发明组合疗法可藉由同时、连续或分开投与该疗法之个别组分来达成。如本文定义之组合疗法可用作唯一治疗或可涉及除本发明组合疗法以外之手术或放射治疗或额外的化疗剂或靶向剂。手术可包括在投与如本文定义之组合疗法之前、期间或之后部分或全部切除肿瘤之步骤。

[0084] 本发明之组合疗法预期特别适用于预防及治疗如癌症及卡波西氏肉瘤之疾病。特定言之,本发明之此等组合疗法预期有利减缓(例如)结肠、胰腺、脑、膀胱、卵巢、乳房/乳腺、前列腺、肺及皮肤之原发性及复发性实体肿瘤之生长。本发明之组合疗法预期有利减缓肺癌(包括恶性胸膜间皮瘤、小细胞肺癌(SCLC)及非小细胞肺癌(NSCLC))、头部及颈部癌、食道癌、胃癌、结肠直肠癌、胃肠基质瘤(GIST)、胰腺癌、肝细胞癌、乳房癌/乳腺癌、肾细胞癌及尿道癌、前列腺癌、卵巢癌、脑瘤、肉瘤、皮肤癌、及血液学瘤形成(白血病、髓发育不良、骨髓瘤、淋巴瘤)之肿瘤生长。

[0085] 更特定言之,本发明之此等组合疗法预期将抑制与包括白血病、多发性骨髓瘤、淋巴瘤之 VEGF 相关之任何形式癌症,及亦将(例如)抑制与 VEGF 相关之彼等原发性及复发性实体肿瘤之生长,尤其系彼等明显依赖 VEGF 而生长及扩散之肿瘤,其包括(例如)某些结肠(包括直肠)、胰腺、脑、肾、肝细胞癌、膀胱、卵巢、乳房/乳腺、前列腺、肺、外阴、皮肤及特别系恶性胸膜间皮瘤及 NSCLC 之肿瘤。更特定言之,本发明之组合疗法预期将有利减缓恶性胸膜间皮瘤之肿瘤生长。更特定言之,本发明之组合疗法预期将有利减缓非小细胞肺癌(NSCLC)之肿瘤生长。

[0086] 本发明另一方面,该疗法预期将抑制彼等与 VEGF 相关之原发性及复发性实体肿瘤生长,尤其系彼等明显依赖 VEGF 而生长及扩散之肿瘤。

[0087] 以下研究意欲阐述本发明。此等研究及整篇本发明描述中所用之缩写解释于以下表中。

[0088] 缩写列表

- [0089] APC 别藻蓝蛋白
- [0090] BSA 牛血清清蛋白
- [0091] CEC 循环内皮成熟细胞
- [0092] CEP 循环内皮祖细胞
- [0093] Cy5.5 花青 5.5
- [0094] EGFR 表皮生长因子受体
- [0095] FCM 流式细胞术
- [0096] FITC 荧光素异硫氰酸盐
- [0097] FSC 前向散射
- [0098] HepG2 人类肝细胞的肝癌细胞系
- [0099] HUVEC 人类脐静脉内皮细胞
- [0100] PBL 外周血液白血球
- [0101] PBS 磷酸盐缓冲盐水
- [0102] PD 渐进疾病
- [0103] -PE 用藻红蛋白标记
- [0104] PerCP 多甲藻黄素叶绿素蛋白
- [0105] PY 或 pY 磷酸 - 酪氨酸
- [0106] RES 有响应者
- [0107] SSC 侧散射
- [0108] TKI 酪氨酸激酶抑制剂
- [0109] VEGFR 血管内皮生长因子受体 2
- [0110] 临床前研究

[0111] 进行以下活体外及活体内实验,评价化合物 A1 对肝细胞癌之抗肿瘤活性,且鉴定血液样品中新的药效学生物标记,即内皮细胞之磷酸 - 酪氨酸水平、VEGFR2⁺CD45^{dim}pY⁺ 细胞之数目及 VEGFR2⁺pY⁺ 细胞之数目。

[0112] HUVEC 细胞实验 (图 1)

[0113] 使 HUVEC 细胞接受化合物 A1 (1 μ M 及 5 μ M)、EGFR 抑制剂 AG1478 (1 μ M 及 5 μ M) 及 5FU (5- 氟尿嘧啶, 1mM 及 5mM) 处理 3h, 并在采集细胞前 5min 添加 20ng/ml VEGF。将采集的细胞用 PBS 清洗两次, 并在 50 μ l 染色缓冲液中离心 (300g, 5min)。吸除上清液后, 将细胞离心块溶解于 250 μ l 固定 / 透化溶液中, 并在冰上保留 20min。添加 PY-100Alexa 488 抗体及磷酸酶抑制剂。将细胞保留在黑暗中及冰上 30min, 并用 Perm/Wash 缓冲液清洗两次, 再次将细胞溶解于 500 μ l 染色缓冲液中。随后藉由流式细胞仪 (FACS Calibur, BD) 检测该等细胞。自 Cell Quest 软件 (BD) 获得数据, 并藉由 WinMDI 2.9 (免费软件) 分析。

[0114] 鼠血液样品之活体内研究 (图 2 及 3)

[0115] 将接种 HepG2 细胞之小鼠依肿瘤大小随机分为 3 个群组, 并用媒剂 (对照)、化合物 A1 (50mg/kg, p. o.) 或化合物 A1 (100mg/kg, p. o.) 处理 14 天。将小鼠处死并自腹主动脉或心脏吸出采集鼠全血样品。藉由溶血剂在室温下将血液溶血 10min。离心 (500g, 5min) 之后, 用 1mL 染色缓冲液清洗该等细胞。随后, 将该等细胞在黑暗中用 100 μ l 染色缓冲液及 5 μ l VEGFR2-PE 抗体培养 15min。随后, 将该等细胞在 500 μ l 固定 / 透化溶液中清洗

并培养 20min, 且用 Perm/Wash 缓冲液清洗两次。随后, 添加磷酸酶抑制剂及抗体 (PY-100、CD45-PerCP-Cy5.5, 各 5 μ l) 的混合物, 并在黑暗中培养 30min。将该等细胞清洗, 并藉由流式细胞术 (FACS Calibur, BD) 分析。自 Cell Quest 软件 (BD) 获得数据, 并藉由 WinMDI 2.9 (免费软件) 分析。

[0116] 抗体

[0117] PY-100 (磷酸 - 酪氨酸) Alexa Fluor 488 缀合物 (Cell Signaling, #9414)

[0118] VEGFR2-PE (BD pharm, 555308)

[0119] CD45-PerCP-Cy5.5 (BD Pharm, 340953)

[0120] Alexa Fluor 488 小鼠 IgG κ 同种型对照 (BD Pharm, 557702)

[0121] 缓冲液

[0122] BD Cytofix/Cytoperm, 固定 / 透化试剂盒 (Cat. 554714)

[0123] 染色缓冲液 (补充 1% 热灭活的 FCS 及 0.09% (w/v) 叠氮化钠之 Dulbecco 氏 PBS (不含 Mg^{2+} 、 Ca^{2+}), 将 pH 调整至 7.4 至 7.6)

[0124] 10 倍裂解缓冲液 (NH_4Cl 82.6g、 $NaHCO_3$ 11.9g、 $EDTA2Na$ 0.378g, 用 H_2O 加至 1L, 将 pH 调整至 7.3)

[0125] 结果

[0126] 在活体外研究中, 如图 1 可看到, HUVEC 细胞之磷酸 - 酪氨酸水平被化合物 A1 抑制, 但是没有被 AG1478 (EGFR-TKI) 及 5FU 抑制。

[0127] 在活体内研究中, 如图 2 可看到, 化合物 A1 似乎减少 VEGFR2⁺CD45^{dim}pY⁺ 细胞之数目。此外, 如图 3 可看到, 用化合物 A1 处理, 可抑制鼠外周血液中之 VEGFR2⁺pY⁺ 细胞。

[0128] 结论

[0129] 使用流式细胞术检测内皮细胞之磷酸 - 酪氨酸水平下降系抗血管生成抑制剂化合物 A1 的一种药效学生物标记。

[0130] 使用流式细胞术检测 VEGFR2⁺CD45^{dim}pY⁺ 细胞减少系抗血管生成抑制剂化合物 A1 的一种药效学生物标记。

[0131] 使用流式细胞术检测 VEGFR2⁺pY⁺ 细胞减少系抗血管生成抑制剂化合物 A1 的一种药效学生物标记。

[0132] I 期临床研究

[0133] 进行另一研究 (即 I 期研究), 以研究化合物 A1 在罹患晚期实体肿瘤 (ST) 之病患中之抗肿瘤活性, 并确认 CD133⁻ 及 CD117⁻ 阳性细胞可用作此活性成分活性之生物标记。

[0134] 方法

[0135] 在处理前 (第 1 天)、及在处理第 2、8 及 29 天采集全血。自全血中鉴定之 CD34⁺CD45^{dim} 外周血液细胞之子群组系进一步使用流式细胞术之 CD133 及 CD117 细胞表面标记鉴定。使用 4.5mL 0.2% BSA-PBS 补充全血 (800 μ L) 并离心 5min (1500rpm)。吸除上清液后, 添加 4.5mL 0.2% BSA-PBS 并离心。将该细胞离心块与 50 μ L 人类 γ -球蛋白混合。添加抗体 (CD34-FITC、CD117-PE、CD45-PerCP 及 CD133-APC) 并在 4°C 保持 45min。添加溶血剂 (4.5mL) 并培养 10min。离心 (1500rpm, 5min) 之后, 将上清液清洗两次。随后添加 0.2% BSA-PBS (4.5mL), 并离心 (1500rpm, 5min) 移除该上清液。在该细胞离心块中添加 BSA-PBS 至 800 μ L 并藉由流式细胞术分析。分析 CD34⁺CD45^{dim}CD133⁺/⁻CD117⁺/⁻ 细胞之百

分比（象限）。

[0136] 抗体

[0137] CD34FITC, BECKMANCOULTER(目录号 IM1870)。

[0138] CD117PE, BECKMANCOULTER(目录号 IM2732)。

[0139] CD45PerCP, BD Biosciences(目录号 347464)。

[0140] CD133APC, Miltenyi Biotec(目录号 130-090-854)。

[0141] 结果

[0142] 化合物 A1 疗法及 CD133CD117 细胞：流式细胞术分析显示，相较于治疗前，利用化合物 A1 治疗时，在第 29 天显著提高 CD34⁺CD45^{dim}CD133⁺CD117⁻ 细胞之百分比 ($p < 0.001$)，而 CD34⁺CD45^{dim}CD133⁻CD117⁺ 细胞反而减少 ($p < 0.01$, 图 4A)；在第 29 天，CD34⁺CD45^{dim}CD133⁺ 细胞显著增加（图 4B）；及在第 8 天及第 29 天 CD34⁺CD45^{dim}CD117⁺ 细胞显著减少（图 4C）。化合物 A1 响应及 CD133CD117 细胞：有响应者（病情稳定）之 CD34⁺CD45^{dim}CD133⁺ 细胞及 CD34⁺CD45^{dim}CD117⁺ 细胞有减少趋势，但并不显著（图 5A）；虽然数据系自非常小的样本量 (RES $n = 12$, PD $n = 4$) 及有限的证据中获得，但是治疗后，相较于无响应者，有响应者（病情稳定）之 CD34⁺CD45^{dim}CD133⁺CD117⁺ 细胞有减少趋势（图 5B）。

[0143] 结论

[0144] 血液样品中之抗血管生成抑制剂化合物 A1 药效学生物标记系：

[0145] CD34⁺CD45^{dim}CD133⁺CD117⁻ 细胞、

[0146] CD34⁺CD45^{dim}CD133⁻CD117⁺ 细胞、

[0147] CD34⁺CD45^{dim}CD133⁺ 细胞、及

[0148] CD34⁺CD45^{dim}CD117⁺ 细胞。

[0149] 血液样品中之抗血管生成抑制剂化合物 A1 预测生物标记系 CD34⁺CD45^{dim}CD133⁺CD117⁺ 细胞。

[0150] 其它实施例

[0151] 可用化合物 3-Z-[1-(4-(N-((4-甲基-哌嗪-1-基)-甲基羰基)-N-甲基-氨基)-苯胺基)-1-苯基-亚甲基]-6-甲氧羰基-2-吡啶满酮或其医药上可接受的盐，及尤其系其单乙磺酸盐型单独或视情况与其它医药活性成分及/或其它疗法（如，例如放射治疗）组合使用治疗之疾病系涉及骨髓瘤细胞之细胞增殖、迁移或凋亡、血管生成或纤维化之疾病。

[0152] 在较佳实施方案中，该疾病包括肿瘤的存在。

[0153] 在另一项实施方案中，该疾病系渐进性肿瘤。

[0154] 在另一项实施方案中，该疾病系纤维变性疾病，如（例如）特发性 (idiopathic) 肺纤维化。

[0155] 在另一项实施方案中，该疾病系选自以下各者：癌症（包括卡波西氏肉瘤、白血病、多发性骨髓瘤及淋巴瘤）、糖尿病、银屑病、类风湿性关节炎、血管瘤、急性及慢性肾病、动脉瘤、动脉再狭窄、自体免疫疾病、急性炎症、哮喘、淋巴水肿、子宫内膜异位症、功能障碍性子官出血、纤维化、硬化及出现视网膜血管增生的眼疾病（包括年龄相关的黄斑变性）。

[0156] 在另一项实施方案中，该疾病系选自以下各者：非小细胞肺癌 (NSCLC)、小细胞肺癌 (SCLC)、恶性胸膜或腹膜间皮瘤、头部及颈部癌、食道癌、胃癌、结肠直肠癌、胃肠基质瘤

(GIST)、胰腺癌、肝细胞癌、乳房癌 / 乳腺癌、肾细胞癌、尿道癌、前列腺癌、卵巢癌、脑瘤、肉瘤、皮肤癌及血液学瘤形成 (白血病、髓发育不良、骨髓瘤、淋巴瘤) 。

[0157] 除彼等前文已描述者,该化合物 3-Z-[1-(4-(N-((4-甲基-哌嗪-1-基)-甲基羰基)-N-甲基-氨基)-苯胺基)-1-苯基-亚甲基]-6-甲氧羰基-2-吡啶满酮之其它医药上可接受的盐可 (例如) 包括酸加成盐。此等酸加成盐包括 (例如) 与提供医药上可接受的阴离子之无机或有机酸所形成的盐,如与卤化氢或与硫酸或磷酸、或与三氟乙酸、柠檬酸或马来酸形成的盐。此外,医药上可接受的盐可系与提供医药上可接受的阳离子之无机或有机碱形成的盐。此等与无机或有机碱之盐包括 (例如) 碱金属盐 (如钠或钾盐) 及碱土金属盐 (如钙或镁盐) 。

[0158] 根据本发明,该等化合物可使用一或多种医药上可接受的适宜赋形剂或载体调配。在本发明范围之内,可使用的适宜配制剂已描述于此等化合物之相关文献及专利申请案中。此等配制剂将以引用的方式并入本文中。

[0159] 在根据本发明之一项实施例中,用于式 A1 化合物之调配物系该活性物质之脂质悬浮液,其较佳包括脂质载体、增稠剂及助流剂 / 增溶剂,最佳系其中该脂质载体选自以下各者:玉米油甘油酯、二乙二醇单乙基醚、乙醇、甘油、聚乙二醇四氢呋喃甲基醚 (glycofurol)、聚乙二醇甘油 (macrogolglycerol) 辛基癸酸酯、聚乙二醇甘油亚油酸酯、中链部分甘油酯、中链甘油三酯、聚乙二醇 300、聚乙二醇 400、聚乙二醇 600、聚氧蓖麻油、聚氧氢化蓖麻油、丙二醇单辛酸酯、丙二醇单月桂酸酯、精制豆油、三醋酸甘油酯、柠檬酸三乙酯、或其混合物,该增稠剂系选自形成油凝胶 (oleogel) 之赋形剂,如胶体硅石或膨润土、高黏度之亲脂性或两亲性赋形剂,如聚氧氢化蓖麻油、氢化植物油聚乙二醇甘油-羟基硬脂酸酯、聚乙二醇甘油-蓖麻油酸酯或硬脂肪,及该助流剂 / 增溶剂系选自卵磷脂,视情况另外包括一或多种聚乙二醇甘油类,较佳选自聚乙二醇甘油-羟基硬脂酸酯或聚乙二醇甘油-蓖麻油酸酯。该脂质悬浮液配制剂可藉由文献中已知生产配制剂之常规方法制备,即藉由在预定温度,依预定顺序混合该等成分,获得均质悬浮液。

[0160] 较佳可将上述配制剂并入医药胶囊内,较佳为软质明胶胶囊,其特征在于该胶囊壳包括 (例如) 作为增塑剂之甘油,或硬明胶或羟丙基甲基纤维素 (HPMC) 胶囊,视情况可密封或带状包装。该胶囊医药剂型可藉由文献中已知生产胶囊之常规方法制备。该软质明胶胶囊可藉由文献中已知生产软质明胶胶囊之常规方法制备,如 (例如) “旋转模规程 (rotary die procedure)”,其描述 (例如) 于 Swarbrick, Boylann, Encyclopedia of pharmaceutical technology, Marcel Dekker, 1990, 第 2 卷, 第 269 页中或于 Lachmann 等人, “The Theory and Practice of Industrial Pharmacy”, 第二版, 第 404 至 419 页, 1976 中, 或其它规程, 如彼等描述 (例如) 于 Jimerson R.F. 等人, “Soft gelatin capsule update”, Drug Dev. Ind. Pharm., 第 12 卷, 第 8-9 期, 第 1133 至 44 页, 1986 中者。

[0161] 以上定义之配制剂或以上定义之胶囊可依 0.1mg 至 20mg 活性物质 /kg 体重, 较佳 0.5mg 至 4mg 活性物质 /kg 体重之剂量范围使用。

[0162] 以上定义之胶囊可包装于适宜的玻璃容器或柔软塑料容器、或于铝袋或双层聚乙烯 (poly) 袋中。

[0163] 剂量及时间表可根据特定疾病状态及病患之整体状况变化。如果除了使用本发明之化合物 A 或其医药上可接受的盐治疗以外, 还使用一或多种额外的化疗剂时, 则剂量及

时间表亦可变化。可由治疗任何特定病患之开业医师决定时间表。

[0164] 可根据临床放射治疗中已知之实践投与放射治疗。电离辐射之剂量系彼等已知用于临床放射治疗者。所采用之放射治疗将包括(例如)使用 γ -射线、X-射线、及/或来自放射性同位素之辐射之定向传递。其它形式之DNA损伤因子亦包含于本发明中,如,微波及UV照射。举例而言,X-射线可依1.8至2.0Gy之每天剂量,一周5天进行5至6周。通常分次总剂量将在45至60Gy范围内。单次较大剂量(例如5至10Gy)可作为放射治疗疗程之一部分投与。单次剂量可在手术中投与。可使用高分次放射治疗,藉此在一段时期内规律投与小剂量之X-射线,例如在几天内,每小时投与0.1Gy。放射性同位素之剂量范围变化极宽广,且取决于该同位素之半衰期、所发射辐射之强度及类型、及取决于由细胞吸收量。

[0165] 治疗性或预防性治疗特定疾病状态所需之各疗法之剂量大小必然随所治疗的主体、投药途径及接受治疗之疾病的严重程度变化。因此,最佳剂量可由治疗任何特定病患之开业医师决定。例如,其可能必需或想要减少组合疗法中组分之上述剂量,以减少毒性。

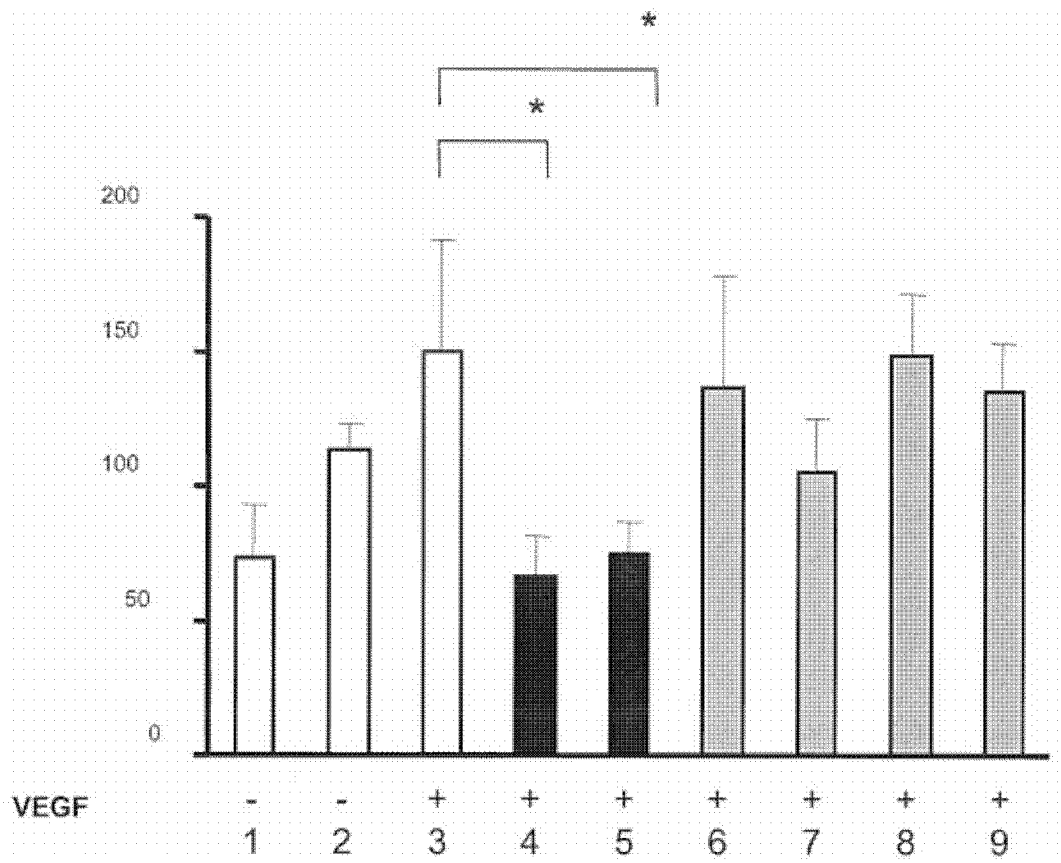


图 1

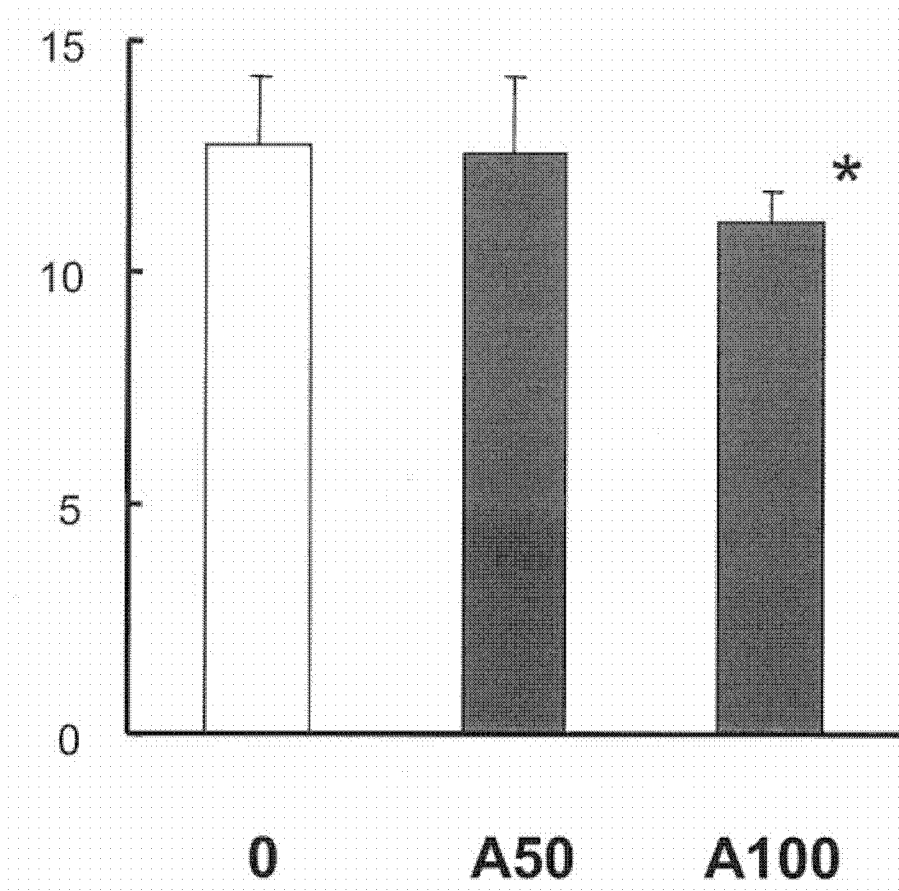


图 2

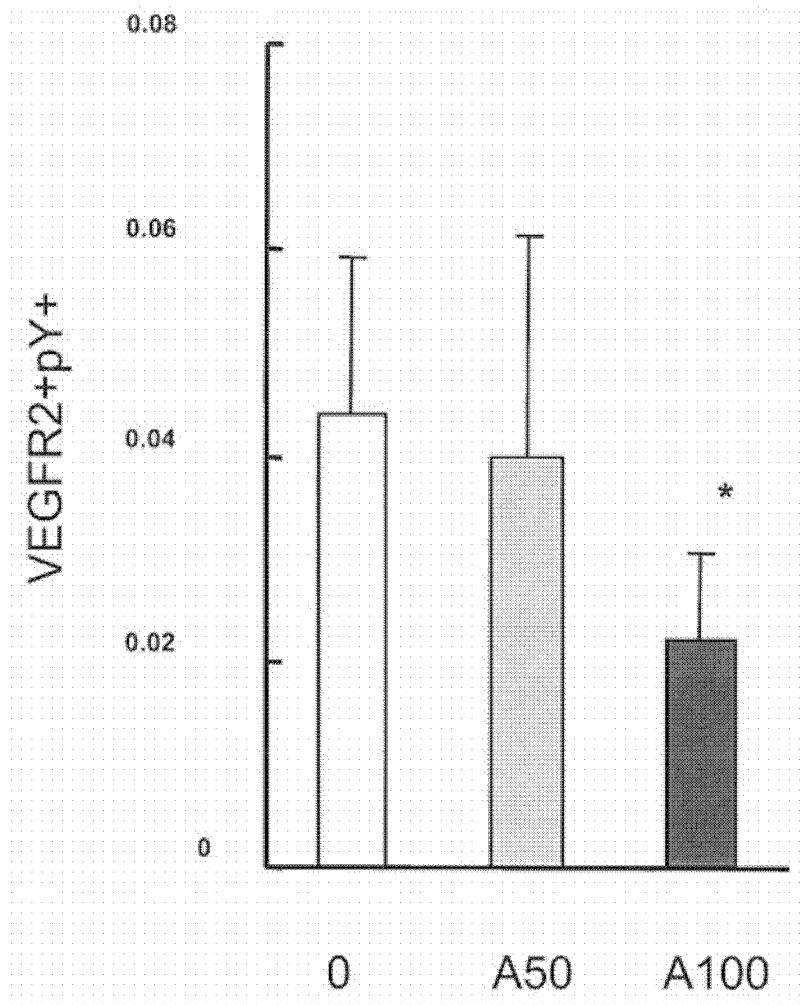


图 3

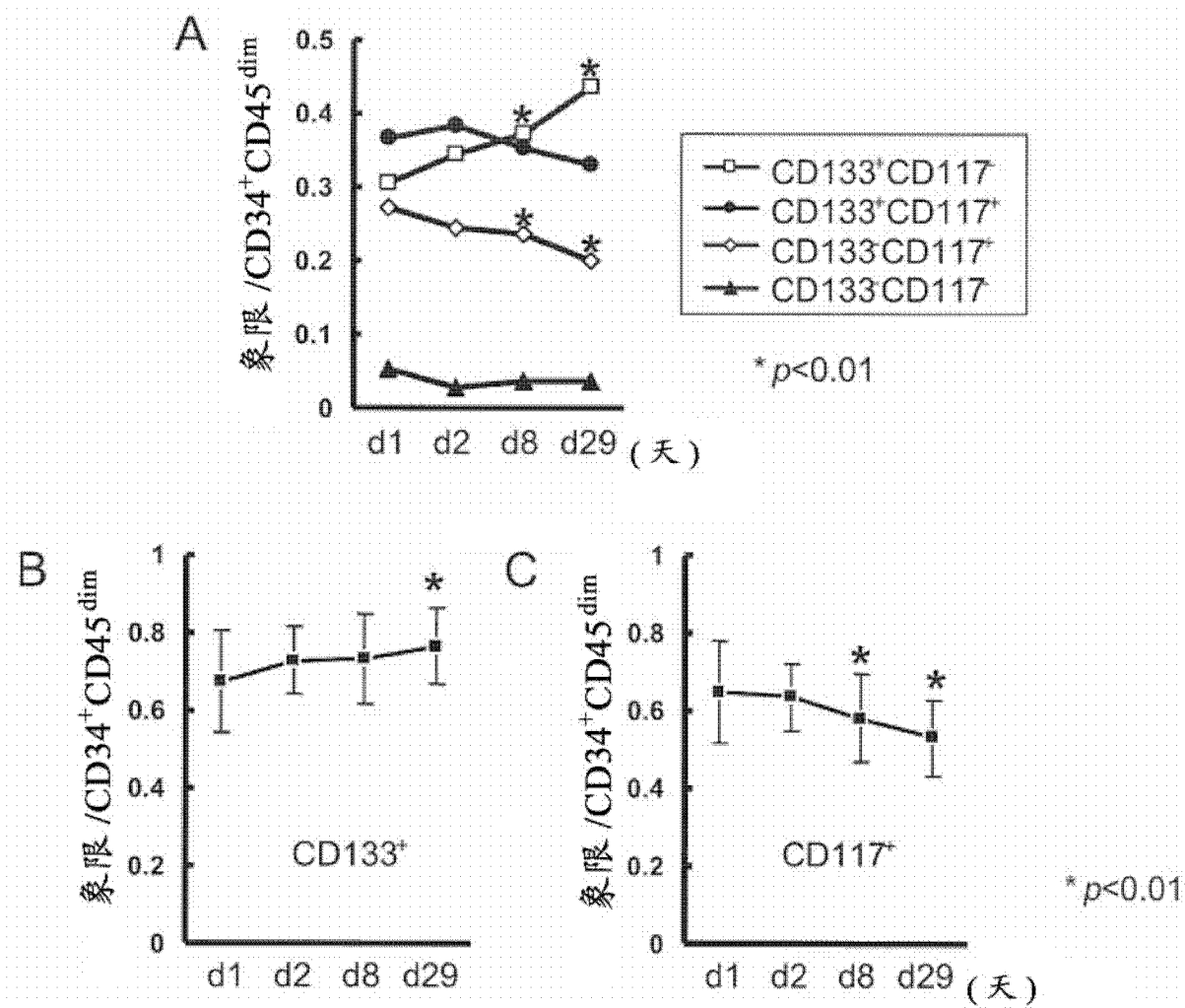


图 4

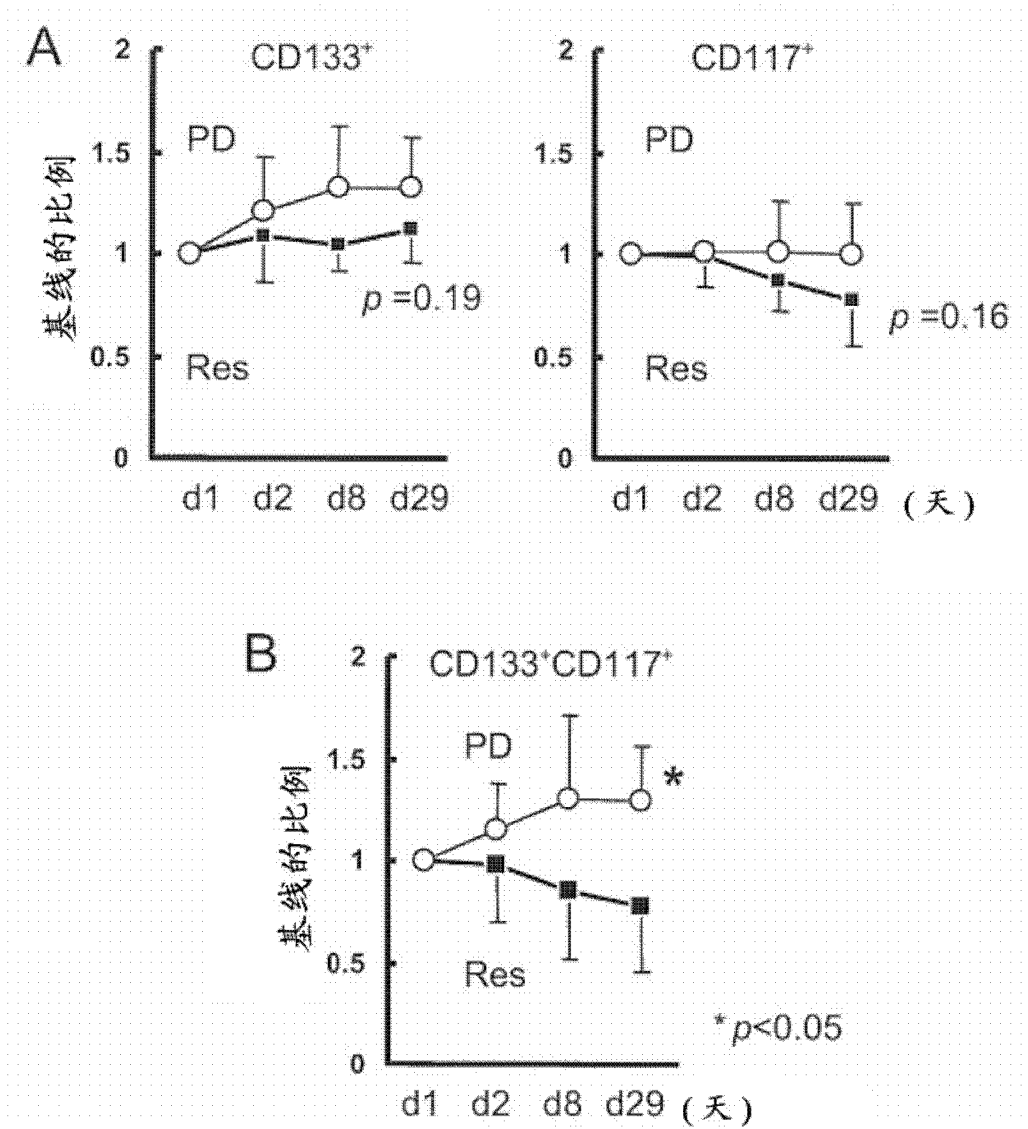


图 5