



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102802412 A

(43) 申请公布日 2012. 11. 28

(21) 申请号 201080063016. 7

(74) 专利代理机构 北京信慧永光知识产权代理
有限责任公司 11290

(22) 申请日 2010. 12. 08

代理人 张淑珍 梁兴龙

(30) 优先权数据

61/267, 727 2009. 12. 08 US

61/295, 650 2010. 01. 15 US

61/306, 376 2010. 02. 19 US

61/312, 090 2010. 03. 09 US

61/367, 326 2010. 07. 23 US

61/411, 369 2010. 11. 08 US

(51) Int. Cl.

A01N 37/10 (2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

2012. 08. 02

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2010/059584 2010. 12. 08

(87) PCT申请的公布数据

W02011/072086 EN 2011. 06. 16

(71) 申请人 海玛奎斯特医药公司

地址 美国华盛顿州

申请人 波士顿大学董事会

(72) 发明人 苏珊·珀赖因 罗纳德·J·贝伦森

道格拉斯·V·法勒

权利要求书 2 页 说明书 53 页 附图 16 页

(54) 发明名称

用于治疗红细胞病症的方法及低剂量方案

(57) 摘要

本文公开了用于在患有红细胞病症(例如 β 地中海贫血、镰状细胞病、其他贫血、或失血)的患者体内增加胎儿血红蛋白水平的方法和低剂量方案。通过单独给予 2, 2- 二甲基丁酸类物质(DMB) 或者与羟基脲、地西他滨或 HDAC 抑制剂结合给予, 增加胎儿血红蛋白和总血红蛋白水平以及红细胞计数。治疗能够连续进行至少两周。

1. 一种用于增加受试者血液中胎儿血红蛋白百分比的方法,所述方法包括向所述受试者给予:

- a) 作为游离酸、其药学上可接受的盐或酯的 2, 2- 二甲基丁酸类物质 ;以及
 - b) 选自于由羟基脲、地西他滨和 HDAC 抑制剂所组成的组中的一种或多种药剂 ;
- 其中,在给予后,所述受试者血液中的胎儿血红蛋白百分比增加。

2. 权利要求 1 所述的方法,其中所述 2, 2- 二甲基丁酸类物质作为 2, 2- 二甲基丁酸钠进行给予。

3. 权利要求 1 所述的方法,其中所述 HDAC 抑制剂是 MS-275。

4. 权利要求 1 所述的方法,其中所述给予为通过口服给予。

5. 权利要求 1 所述的方法,其中所述受试者已被诊断患有血液病症或贫血。

6. 权利要求 5 所述的方法,其中所述血液病症是镰状细胞综合征。

7. 权利要求 5 所述的方法,其中所述血液病症是 β 地中海贫血综合征。

8. 权利要求 1 所述的方法,其中所述 2, 2- 二甲基丁酸类物质的总日剂量多于最大耐受剂量的 25%,且少于最大耐受剂量的 75%。

9. 权利要求 1 所述的方法,其中所述 2, 2- 二甲基丁酸类物质的总日剂量小于 80mg/kg。

10. 权利要求 1 所述的方法,其中所述 2, 2- 二甲基丁酸类物质的总日剂量小于 40mg/kg。

11. 权利要求 1 所述的方法,其中所述 2, 2- 二甲基丁酸类物质的总日剂量小于 20mg/kg。

12. 权利要求 1 所述的方法,其中所述 2, 2- 二甲基丁酸类物质的血浆浓度不超过 150 μ g/mL 的浓度。

13. 权利要求 1 所述的方法,其中所述受试者血液中的胎儿血红蛋白的量增加。

14. 权利要求 1 所述的方法,其中所述受试者血液中的总血红蛋白的量增加。

15. 权利要求 1 所述的方法,其中所述给予为脉冲式给予。

16. 权利要求 15 所述的方法,其中所述脉冲式给予包括给予 2, 2- 二甲基丁酸类物质约 8 周,随后约 4 周不给予 2, 2- 二甲基丁酸类物质。

17. 权利要求 15 所述的方法,其中所述脉冲式给予包括给予 2, 2- 二甲基丁酸类物质约 6 周,随后约 2 周不给予 2, 2- 二甲基丁酸类物质。

18. 权利要求 15 所述的方法,其中所述脉冲式给予包括给予 2, 2- 二甲基丁酸类物质约 4 周,随后约 2 周不给予 2, 2- 二甲基丁酸类物质。

19. 权利要求 15 所述的方法,其中所述脉冲式给予包括给予 2, 2- 二甲基丁酸类物质约 2 周,随后约 2 周不给予 2, 2- 二甲基丁酸类物质。

20. 权利要求 1 所述的方法,其中所述受试者是哺乳动物。

21. 权利要求 20 所述的方法,其中所述哺乳动物是人。

22. 权利要求 21 所述的方法,其中所述人是儿童。

23. 一种用于增加受试者血中的胎儿血红蛋白百分比的方法,所述方法包括向所述患者给予作为游离酸、其药学上可接受的盐或酯的 2, 2- 二甲基丁酸类物质 ;其中 2, 2- 二甲基丁酸类物质的总日剂量不超过 40mg/kg ;并且其中在给予后,所述受试者血液中的胎儿血

红蛋白百分比增加。

24. 权利要求 23 所述的方法,其中所述受试者已被诊断患有 β 地中海贫血。

25. 权利要求 23 所述的方法,所述方法进一步包括向所述受试者给予羟基脲、地西他滨、HDAC 抑制剂或它们的组合。

26. 权利要求 25 所述的方法,其中所述 HDAC 抑制剂是 MS-275。

27. 权利要求 23 所述的方法,其中所述 2,2-二甲基丁酸类物质作为 2,2-二甲基丁酸钠进行给予。

28. 权利要求 23 所述的方法,其中所述给予为通过口服给予。

29. 权利要求 23 所述的方法,其中 2,2-二甲基丁酸类物质的血浆浓度不超过 $90 \mu\text{g/mL}$ 的浓度。

30. 权利要求 23 所述的方法,其中所述受试者血液中的胎儿血红蛋白的量增加。

31. 权利要求 23 所述的方法,其中所述受试者血液中的总血红蛋白的量增加。

32. 权利要求 23 所述的方法,其中所述给予为脉冲式给予。

33. 权利要求 32 所述的方法,其中所述脉冲式给予包括给予 2,2-二甲基丁酸类物质约 8 周,随后约 4 周不给予 2,2-二甲基丁酸类物质。

34. 权利要求 32 所述的方法,其中所述脉冲式给予包括给予 2,2-二甲基丁酸类物质约 6 周,随后约 2 周不给予 2,2-二甲基丁酸类物质。

35. 权利要求 32 所述的方法,其中所述脉冲式给予包括给予 2,2-二甲基丁酸类物质约 4 周,随后约 2 周不给予 2,2-二甲基丁酸类物质。

36. 权利要求 32 所述的方法,其中所述脉冲式给予包括给予 2,2-二甲基丁酸类物质约 2 周,随后约 2 周不给予 2,2-二甲基丁酸类物质。

用于治疗红细胞病症的方法及低剂量方案

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请根据 35U. S. C 119 (e) 要求下述申请的优先权:2010 年 11 月 8 日提交的美国临时专利申请系列号 61/411, 369、2010 年 7 月 23 日提交的美国临时专利申请系列号 61/367, 326、2010 年 3 月 9 日提交的美国临时专利申请系列号 61/312, 090、2010 年 2 月 19 日提交的美国临时专利申请系列号 61/306, 376、2010 年 1 月 15 日提交的美国临时专利申请系列号 61/295, 650 和 2009 年 12 月 8 日提交的美国临时专利申请系列号 61/267, 727; 这些专利申请的内容通过引入以其整体并入本文。

[0003] 有关联邦政府赞助研究的声明

[0004] 本文描述的某些发明是在国立卫生研究院(National Institutes of Health)资助 DK-52962 的美国政府支持下完成的。

背景技术

[0005] 贫血,一种红细胞病症,可大体上定义为血液运送氧的能力下降。虽然红细胞病症可能由某些药物和免疫系统病症引起,但大部分是由血红蛋白表达方面的遗传缺陷引起。血红蛋白合成的病症包括:珠蛋白合成不足(deficiencies of globin synthesis),例如地中海贫血综合征;以及珠蛋白结构异常,例如镰状细胞综合征和与不稳定血红蛋白有关的综合征。

[0006] 胎儿珠蛋白(也称为 γ 珠蛋白)通常在产前与 α 珠蛋白链结合,以形成胎儿血红蛋白(HbF)。在出生后,胎儿珠蛋白被 β 珠蛋白取代,然后 β 珠蛋白与 α 珠蛋白结合形成成人血红蛋白A。胎儿珠蛋白与 β 珠蛋白具有相同的功能,可与 α 链结合以产生健康形式的血红蛋白,从而降低未匹配的 α 珠蛋白链的高浓度。

[0007] 各种类型的 β 地中海贫血是由突变引起的综合征,突变导致 β 珠蛋白链不足。在 β 地中海贫血中,未匹配的 α 珠蛋白链在红细胞(RBC)及它们的祖细胞(progenitors)内集聚,造成 RBC 及 RBC 祖细胞过早破坏,由此导致贫血、输血依赖(transfusion-dependence)、铁超负荷、器官衰竭以及早逝。

[0008] 在镰状细胞病(SCD)中, β 珠蛋白链中的一个氨基酸取代导致产生镰状形成的血红蛋白(HbS),使得在脱氧作用的反复循环下发生聚合。聚合导致 RBC “镰状形成(sickling)”。镰状形成后的 RBC 造成溶血,同时粘附的镰状 RBC 阻塞微循环,诱发广泛的组织局部缺血和器官梗死(organ infarction)。SCD 的自然病程的标志为:疼痛危象(painful crises);急性胸综合征;以及最终潜在威胁生命的后遗症,包括肾功能不全、视网膜炎、骨坏死、骨髓炎、再生障碍危象(aplastic crises)、功能性无脾(functional asplenia)、中风、阴茎异常勃起(priapism)和重度肺动脉高压(severe pulmonary hypertension)。

[0009] 本文公开的内容提供用于使患有血液病症(包括 β 地中海贫血和镰状细胞病)的患者的胎儿血红蛋白增加的新型方法和组合物。

发明内容

[0010] 本文提供用于使受试者血液中的胎儿血红蛋白的百分比增加的方法,所述方法包括对所述受试者给予:a)作为游离酸、其药学上可接受的盐或酯的2,2-二甲基丁酸类物质(DMB);以及b)选自于由羟基脲、地西他滨或HDAC抑制剂所组成的组中的一种或多种药剂,其中在给予后,受试者血液中的胎儿血红蛋白的百分比增加。在一些实施方式中,与基线相比,受试者血液中的胎儿血红蛋白的百分比在给予1周后增加。在其他实施方式中,与基线相比,受试者血液中的胎儿血红蛋白的百分比在给予2周后增加。在某些实施方式中,与基线相比,受试者血液中的胎儿血红蛋白的百分比在给予4周后增加。在一些实施方式中,与基线相比,受试者血液中的胎儿血红蛋白的百分比在给予1天后增加。在某些实施方式中,与基线相比,受试者血液中的胎儿血红蛋白的百分比在给予3天后增加。

[0011] 在用于增加胎儿血红蛋白百分比的方法的一些实施方式中,所述受试者已被诊断患有患有血液病症或贫血。在某些实施方式中,所述血液病症为镰状细胞综合征。在一些实施方式中,所述血液病症为 β 地中海贫血综合征。

[0012] 在一些实施方式中,2,2-二甲基丁酸类物质作为2,2-二甲基丁酸钠进行给予。在某些实施方式中,口服给予DMB。在一些实施方式中,所述HDAC抑制剂为MS-275。在某些实施方式中,口服给予所述的一种或多种药剂。在一些实施方式中,口服给予所述的DMB和一种或多种试剂。在某些实施方式中,以结合口服剂型给予所述的DMB和一种或多种试剂。

[0013] 在一些实施方式中,DMB的总日剂量不超过100mg/kg、不超过90mg/kg、不超过80mg/kg、不超过70mg/kg、不超过60mg/kg、不超过50mg/kg、不超过40mg/kg、不超过35mg/kg、不超过30mg/kg、不超过25mg/kg、不超过20mg/kg、不超过15mg/kg、不超过10mg/kg或不超过5mg/kg。在某些实施方式中,DMB的总日剂量为10-60mg/kg、20-70mg/kg、30-80mg/kg、40-90mg/kg或50-100mg/kg。

[0014] 在某些实施方式中,羟基脲的剂量不超过35mg/kg/天。在一些实施方式中,羟基脲的剂量小于35mg/kg/天、小于30mg/kg/天、小于25mg/kg/天、小于20mg/kg/天、小于15mg/kg/天、小于10mg/kg/天或小于5mg/kg/天。在某些实施方式中,羟基脲的剂量小于最大耐受剂量的90%。在其他实施方式中,所述羟基脲的剂量小于最大耐受剂量的80%、小于最大耐受剂量的70%、小于最大耐受剂量的60%、小于最大耐受剂量的50%、小于最大耐受剂量的40%、小于最大耐受剂量的30%、小于最大耐受剂量的20%、小于最大耐受剂量的10%。

[0015] 在一些实施方式中,地西他滨的剂量不超过15mg/m²。在某些实施方式中,地西他滨的剂量小于约15mg/m²、小于约10mg/m²、小于约5mg/m²、小于约3mg/m²、小于约2mg/m²、或小于约1mg/m²。在其他实施方式中,地西他滨以不多于约240mg、不多于约180mg、不多于约120mg、不多于约60mg或不多于约30mg的剂量进行口服给予。

[0016] 在某些实施方式中,每周所给予的MS-275的剂量不超过6mg/m²。在一些实施方式中,每周所给予的MS-275的剂量小于约6mg/m²、小于约5mg/m²、小于约4mg/m²、小于约3mg/m²、小于约2mg/m²或小于约1mg/m²。在某些实施方式中,每天给予MS-275。

[0017] 在某些实施方式中,DMB的血浆浓度不超过90 μ g/mL DMB的浓度。在其他实施方式中,血浆浓度不超过120 μ g/mL DMB的浓度。在某些实施方式中,DMB的血浆浓度不超过150 μ g/mL的浓度。在一些实施方式中,DMB的血浆浓度不超过200 μ g/mL的浓度。在某些实施方式中,DMB的血浆浓度不超过250 μ g/mL的浓度。在一些实施方式中,DMB的血浆浓度

为 20 μ g/mL 到 90 μ g/mL、或 25 μ g/mL 到 120 μ g/mL、30 μ g/mL 到 150 μ g/mL、或为 30 μ g/mL 到 250 μ g/mL。在某些实施方式中, DMB 的最大血浆浓度小于 350 μ g/mL、小于 250 μ g/mL、小于 200 μ g/mL、小于 150 μ g/mL、小于 140 μ g/mL、小于 130 μ g/mL、小于 120 μ g/mL、小于 110 μ g/mL、小于 100 μ g/mL、小于 90 μ g/mL、小于 80 μ g/mL、小于 70 μ g/mL、小于 60 μ g/mL、小于 50 μ g/mL、小于 40 μ g/mL、小于 30 μ g/mL 或小于 20 μ g/mL。

[0018] 在某些实施方式中, 受试者血液中的胎儿珠蛋白的量增加。在一些实施方式中, 受试者血液中的 F- 细胞的数目增加。在某些实施方式中, 受试者血液中的 F- 网织红细胞 (F-reticulocytes) 的数目增加。在一些实施方式中, 受试者血液中的胎儿血红蛋白的量增加。在某些实施方式中, 受试者血液中的总血红蛋白的量增加。在一些实施方式中, 受试者血液中的网织红细胞的百分比增加。在某些实施方式中, 受试者血液中的网织红细胞的数目增加。在一些实施方式中, 血细胞比容增加。在某些实施方式中, 红细胞生成增加。

[0019] 在一些实施方式中, DMB 的给予通过脉冲式给予进行。在某些实施方式中, 所述脉冲式给予包括给予 DMB 约 8 周, 随后约 4 周不给予 DMB。在一些实施方式中, 所述脉冲式给予包括给予 DMB 约 6 周, 随后约 2 周不给予 DMB。在某些实施方式中, 所述脉冲式给予包括给予 DMB 约 4 周, 随后约 2 周不给予 DMB。在一些实施方式中, 所述脉冲式给予包括给予 DMB 约 2 周, 随后约 2 周不给予 DMB。在一些实施方式中, 脉冲式给予包括给予 DMB 间隔约 1 天、约 2 天、约 3 天、约 4 天、约 5 天、约 6 天、约 7 天、约 10 天、约 2 周、约 3 周、约 4 周、约 5 周、约 6 周、约 7 周、约 8 周、约 2 个月、约 3 个月、约 4 个月、约 5 个月、约 6 个月、约 9 个月、约 12 个月。在某些实施方式中, 脉冲式给予包括不给予 DMB 的间隔约 1 天、约 2 天、约 3 天、约 4 天、约 5 天、约 6 天、约 7 天、约 10 天、约 2 周、约 3 周、约 4 周、约 5 周、约 6 周、约 7 周、约 8 周、约 2 个月、约 3 个月、约 4 个月、约 5 个月、约 6 个月、约 9 个月、约 12 个月。在一些实施方式中, 给予是连续的。在某些实施方式中, 在受试者的一生中进行给予。

[0020] 在一些实施方式中, 所述受试者是哺乳动物。在某些实施方式中, 所述哺乳动物是牲畜 (animals)。在一些实施方式中, 所述牲畜是马。在某些实施方式中, 所述哺乳动物是人。在一些实施方式中, 所述人是儿童。在某些实施方式中, 所述人的年龄在 18 岁以下。在一些实施方式中, 所述人的年龄在 10 岁以下。在一些实施方式中, 所述人的年龄在 2 岁以下。

[0021] 本文还提供用于使受试者血液中的胎儿血红蛋白的百分比增加的方法, 所述方法包括对所述受试者给予作为游离酸、其药学上可接受的盐或酯的 DMB, 其中所述 DMB 的总日剂量不多于 40mg/kg, 并且其中在给予后, 所述受试者血液中的胎儿血红蛋白的百分比增加。在某些实施方式中, 所述受试者已被诊断患有 β 地中海贫血。在一些实施方式中, 所述 DMB 的总日剂量不超过 40mg/kg、不超过 35mg/kg、不超过 30mg/kg、不超过 25mg/kg、不超过 20mg/kg、不超过 15mg/kg、不超过 10mg/kg 或不超过 5mg/kg。在某些实施方式中, 所述 DMB 的总日剂量为 5-25mg/kg、10-30mg/kg、20-40mg/kg、5-20mg/kg、10-25mg/kg、15-30mg/kg、20-35mg/kg 或 25-40mg/kg。在一些实施方式中, 所述 DMB 的总日剂量小于约 40mg/kg、小于约 35mg/kg、小于约 30mg/kg、小于约 25mg/kg、小于约 20mg/kg、小于约 15mg/kg 或小于约 10mg/kg。

[0022] 在某些实施方式中, DMB 的血浆浓度不超过 90 μ g/mL DMB 的浓度。在其他实施方式中, 所述血浆浓度不超过 120 μ g/mL DMB 的浓度。在某些实施方式中, 所述 DMB 的血浆

浓度不超过 150 $\mu\text{g/mL}$ 的浓度。在一些实施方式中,所述 DMB 的血浆浓度为 20 $\mu\text{g/mL}$ 到 90 $\mu\text{g/mL}$ 、或 25 $\mu\text{g/mL}$ 到 120 $\mu\text{g/mL}$ 、或 30 $\mu\text{g/mL}$ 到 150 $\mu\text{g/mL}$ 。在某些实施方式中,所述 DMB 的血浆浓度小于 150 $\mu\text{g/mL}$ 、小于 140 $\mu\text{g/mL}$ 、小于 130 $\mu\text{g/mL}$ 、小于 120 $\mu\text{g/mL}$ 、小于 110 $\mu\text{g/mL}$ 、小于 100 $\mu\text{g/mL}$ 、小于 90 $\mu\text{g/mL}$ 、小于 80 $\mu\text{g/mL}$ 、小于 70 $\mu\text{g/mL}$ 、小于 60 $\mu\text{g/mL}$ 、小于 50 $\mu\text{g/mL}$ 、小于 40 $\mu\text{g/mL}$ 、小于 30 $\mu\text{g/mL}$ 、或小于 20 $\mu\text{g/mL}$ 。在一些实施方式中,所述 DMB 的血浆浓度为 50 $\mu\text{g/mL}$ 到 100 $\mu\text{g/mL}$ 、40 $\mu\text{g/mL}$ 到 90 $\mu\text{g/mL}$ 、30 $\mu\text{g/mL}$ 到 80 $\mu\text{g/mL}$ 、25 $\mu\text{g/mL}$ 到 90 $\mu\text{g/mL}$ 、或 20 $\mu\text{g/mL}$ 到 100 $\mu\text{g/mL}$ 。在某些实施方式中,AUC 小于 2500h* $\mu\text{g/mL}$ 、小于 2000h* $\mu\text{g/mL}$ 、小于 1500h* $\mu\text{g/mL}$ 、小于 1000h* $\mu\text{g/mL}$ 或小于 500h* $\mu\text{g/mL}$ 。

[0023] 在一些实施方式中,与基线相比,受试者血液中的胎儿血红蛋白的百分比在给予 1 周后增加。在其他实施方式中,与基线相比,受试者血液中的胎儿血红蛋白的百分比在给予 2 周后增加。在某些实施方式中,与基线相比,受试者血液中的胎儿血红蛋白的百分比在给予 4 周后增加。在一些实施方式中,与基线相比,受试者血液中的胎儿血红蛋白的百分比在给予 1 天后增加。在某些实施方式中,与基线相比,受试者血液中的胎儿血红蛋白的百分比在给予 3 天后增加。

[0024] 在一些实施方式中,用于增加胎儿血红蛋白百分比的方法进一步包括对受试者给予羟基脲、地西他滨、HDAC 抑制剂或它们的组合。在某些实施方式中,所述 HDAC 抑制剂为 MS-275。

[0025] 在某些实施方式中,2,2-二甲基丁酸类物质作为 2,2-二甲基丁酸钠进行给予。在某些实施方式中,所述 DMB 通过口服给予进行给予。

[0026] 在某些实施方式中,受试者血液中的胎儿珠蛋白的量增加。在一些实施方式中,受试者血液中的 F- 细胞的数目增加。在某些实施方式中,受试者血液中的 F- 网织红细胞的数目增加。在一些实施方式中,受试者血液中的胎儿血红蛋白的量增加。在某些实施方式中,受试者血液中的总血红蛋白的量增加。在一些实施方式中,受试者血液中的网织红细胞的百分比增加。在某些实施方式中,受试者血液中的网织红细胞的数目增加。在一些实施方式中,血细胞比容增加。在某些实施方式中,红细胞生成增加。

[0027] 在一些实施方式中,DMB 通过脉冲式给予进行给予。在某些实施方式中,所述脉冲式给予包括给予 DMB 约 8 周,随后约 4 周不给予 DMB。在一些实施方式中,所述脉冲式给予包括给予 DMB 约 6 周,随后约 2 周不给予 DMB。在某些实施方式中,所述脉冲式给予包括给予 DMB 约 4 周,随后约 2 周不给予 DMB。在一些实施方式中,所述脉冲式给予包括给予 DMB 约 2 周,随后约 2 周不给予 DMB。在某些实施方式中,脉冲式给予包括给予 DMB 间隔约 1 天、约 2 天、约 3 天、约 4 天、约 5 天、约 6 天、约 7 天、约 10 天、约 2 周、约 3 周、约 4 周、约 5 周、约 6 周、约 7 周、约 8 周、约 2 个月、约 3 个月、约 4 个月、约 5 个月、约 6 个月、约 9 个月、约 12 个月。在某些实施方式中,脉冲式给予包括不给予 DMB 的间隔约 1 天、约 2 天、约 3 天、约 4 天、约 5 天、约 6 天、约 7 天、约 10 天、约 2 周、约 3 周、约 4 周、约 5 周、约 6 周、约 7 周、约 8 周、约 2 个月、约 3 个月、约 4 个月、约 5 个月、约 6 个月、约 9 个月、约 12 个月。在一些实施方式中,给予是连续的。在某些实施方式中,在受试者一生中给予。

附图说明

[0028] 本发明的新特征在所附的权利要求中详细给出。参考以下给出的阐明说明性实

施方式(其中利用了本发明的原理)的详细描述和附图,将会更好地理解本发明的特征和优点,附图如下:

[0029] 图 1 是用羟基脲(HU)和 2,2-二甲基丁酸类物质(DMB)治疗的狒狒体内胎儿珠蛋白(γ -珠蛋白)mRNA 的图示。

[0030] 图 2 是地西他滨和 DMB 对 F-细胞的加合效应的图示。

[0031] 图 3 是使用 DMB、丁酸精氨酸(AB)、地西他滨和 HDAC 抑制剂(MS275)观察到的对诱导 γ -珠蛋白 mRNA 的协同效应的图示。

[0032] 图 4 是在经 IV 和口服给药的狒狒体内,血浆 DMB 随时间变化的图示。

[0033] 图 5 是在重复剂量毒性研究中,Beagle 犬体内 DMB 暴露量(AUC 和 $C_{\max}$)与剂量的关系的图示。

[0034] 图 6 是在重复剂量毒性研究中,Sprague Dawley 大鼠体内 DMB 血浆水平与剂量和持续时间的关系的图示。

[0035] 图 7 是在用单一剂量的 DMB 治疗的健康人类受试者体内,血浆 DMB 浓度随时间变化的图示。

[0036] 图 8 是在用单一剂量的 DMB 治疗的健康人类受试者体内, $C_{\max}$ 与 DMB 剂量水平的关系的图示。

[0037] 图 9 是在用单一剂量的 DMB 治疗的健康人类受试者体内,AUC 与 DMB 剂量水平的关系的图示。

[0038] 图 10 是在用单一剂量 DMB 治疗的健康人类受试者体内,在禁食治疗和进食治疗两种情况下,平均血浆 DMB 浓度随时间变化的图示。

[0039] 图 11 是在对健康人类受试者体内的 DMB 进行重复剂量研究的第 0 天时,平均血浆 DMB 浓度随时间变化的图示。

[0040] 图 12 是在对健康人类受试者体内的 DMB 进行重复剂量研究的第 13 天时,平均血浆 DMB 浓度随时间变化的图示。

[0041] 图 13 是通过 Advia Coulter 计数器从基线(白条)分析的平均绝对网织红细胞的变化图示,并示出在安慰剂和活性治疗组中治疗时的峰值(黑条);在条的上方用星号标注出显著性变化。

[0042] 图 14 是在 DMB 的重复剂量研究中,在来自泰国和黎巴嫩的 β 地中海贫血患者体内,几种剂量水平下胎儿血红蛋白(HbF)百分比的变化的图示(x 表示来自泰国的患者)。

[0043] 图 15 是在 DMB 的重复剂量研究中,在来自泰国和黎巴嫩的 β 地中海贫血患者体内,几种剂量水平下胎儿血红蛋白(HbF)浓度的变化的图示(x 表示来自泰国的患者)。

[0044] 图 16 是在 DMB 的重复剂量研究中,在来自泰国和黎巴嫩的 β 地中海贫血患者体内,几种剂量水平下总血红蛋白(Hgb)的变化的图示(x 表示来自泰国的患者)。

[0045] 图 17 是 β 地中海贫血 2 期临床试验中,不同剂量水平下多名受试者的平均血浆 DMB 浓度随时间变化的图示。

[0046] 图 18 是在 DMB 的重复剂量研究中,在镰状细胞病患者体内,不同剂量水平下胎儿血红蛋白(HbF)百分比的变化的图示(x 表示还接受羟基脲的患者)。

[0047] 图 19 是在 DMB 的重复剂量研究中,在镰状细胞病患者体内,几种剂量水平下胎儿血红蛋白(HbF)浓度从基线到治疗结束时的变化的图示(x 表示还接受羟基脲的患者)。

[0048] 图 20 是在 DMB 的重复剂量研究中,在镰状细胞病患者体内,几种剂量水平下总血红蛋白(Hgb)浓度从基线到治疗结束时的变化的图示(x 表示还接受羟基脲的患者)。

[0049] 图 21 是与安慰剂患者(下图)相比,用 10mg/kg 的 DMB 治疗的三名镰状细胞病患者的前三张图中所示期间内胎儿珠蛋白 mRNA 的变化的图示。

[0050] 图 22 是在用 10mg/kg 的 DMB 治疗直到第 97 天期间及治疗后的随访期间,一名镰状细胞病患者的胎儿血红蛋白(HbF)百分比和 F- 细胞百分比的变化的图示。

具体实施方式

[0051] 正常成人血红蛋白(HbA)由两条 α 珠蛋白链和两条 β 珠蛋白链($\alpha_2\beta_2$)组成。血红蛋白病(Hemoglobinopathies)例如 β 地中海贫血和镰状细胞病(SCD),由成人血红蛋白的功能与数量或氨基酸序列的变化引起。胎儿珠蛋白(亦称 γ 珠蛋白)通常在产前与 α 珠蛋白链结合以形成胎儿血红蛋白(HbF)。

[0052] 珠蛋白基因的顺序表达(sequential expression)导致在发育的不同阶段产生特异型的血红蛋白。在妊娠期的第 12 周,发生由胚胎血红蛋白向胎儿血红蛋白($\alpha_2\gamma_2$)的转变;并在妊娠期的第 28 周, β -珠蛋白和成人血红蛋白 A (HbA, $\alpha_2\beta_2$)的量不断增加。对于形成完好的血红蛋白四聚体,类 α 珠蛋白蛋白质必须等于类 β 珠蛋白蛋白质。

[0053] 贫血

[0054] 红细胞的主要功能是将氧运送给身体的组织。其次要作用包括运送营养素、细胞间信息和细胞因子(cytokines),还包括吸收细胞代谢物。贫血或者是红细胞或红细胞容量的降低,可大体上定义为血液运送氧的能力下降。贫血可通过测定患者的红细胞总量(red blood cell mass)或血细胞比容(Hct)来测定。血细胞比容值是血样中总血红蛋白浓度的间接但相当准确的度量。由降低的 Hct 测定的贫血可能是慢性或急性的。急性贫血可能由创伤或外科手术所引起。胃肠道损伤或妇科干扰(gynecologic disturbances)通常引起慢性失血。慢性贫血可由红细胞外部异常、红细胞内部异常或红细胞生成受损(impaired production)引起。外部异常或细胞外(extra-corporeal)异常包括:抗体介导的病症,例如输血反应和成红细胞增多(erythroblastosis);红细胞的机械性创伤,例如微血管病性溶血性贫血、血栓性血小板减少性紫癜和弥散性血管内凝血。另外,寄生虫(例如疟原虫)感染、由例如铅中毒引起的化学损害、放射疗法、骨髓/干细胞移植以及例如脾功能亢进在单核系统中的隔离作用(sequestration)可造成红细胞病症和不足。

[0055] 通过干扰干细胞或定向细胞(committed cell)的增殖和分化,可能发生红细胞生成受损。一些更常见的红细胞生成疾病包括再生障碍性贫血、再生不良性贫血、单纯红细胞发育不全和与肾衰竭或内分泌病症有关的贫血。对成红细胞增殖和分化的干扰包括:DNA 合成方面的缺陷,例如维生素 B12 或叶酸的利用下降和巨幼红细胞性贫血;血红素或珠蛋白合成方面的缺陷;以及未明原因的贫血,例如铁粒幼细胞性贫血、与慢性感染(例如疟疾、锥虫病、HIV、肝炎病毒或其他病毒)有关的贫血、与慢性炎症(例如类风湿性关节炎)有关的贫血以及由骨髓不足所引起的骨髓病性贫血。

[0056] 内部异常包括遗传性病症和获得性病症。获得性病症是通过例如膜缺陷诱发的病症(例如阵发性睡眠性血红蛋白尿)。遗传性病症包括:膜细胞骨架病症,例如球形红细胞症和椭圆形红细胞症(spherocytosis and elliptocytosis);脂质合成病症,例如细胞膜的

卵磷脂含量非正常增加；红细胞酶不足，例如丙酮酸激酶、己糖激酶、谷胱甘肽合成酶和葡萄糖-6-磷酸脱氢酶的不足。虽然红细胞病症可能由某些药物和免疫系统病症引起，但大多数是由血红蛋白表达方面的遗传学缺陷引起。血红蛋白合成病症包括：珠蛋白合成的不足，例如地中海贫血综合征；以及珠蛋白结构异常，例如镰状细胞综合征和与不稳定血红蛋白有关的综合征。

[0057] β 地中海贫血

[0058] 地中海贫血综合征由或 α -珠蛋白或类 β 珠蛋白链的不足引起（分别为 α -地中海贫血和 β -地中海贫血）。当所缺乏的珠蛋白在发育期间必需时，该疾病变得明显。 α -地中海贫血在妊娠期间是有征状的，因为 α -珠蛋白为胎儿血红蛋白（HbF， $\alpha_2\gamma_2$ ）所必需。由于在出生前并未大量地需要 β 珠蛋白，所以 β -地中海贫血在直到出生后约 6 个月以前都没有征状。造成拖延胎儿 γ -珠蛋白链生成的突变可能出现得更晚，在 2-4 岁的年龄时。

[0059] 地中海贫血中的主要病理过程是 α 珠蛋白链和非 α 珠蛋白链累积的不平衡。未受影响的链以正常量产生，在红细胞生成期间沉淀。在 β -地中海贫血中，沉淀的 α -珠蛋白链尤其有毒性，损害细胞膜并引起细胞快速死亡（细胞凋亡）。除去网状内皮系统中的不正常细胞使红细胞寿命更进一步地缩短。红细胞生成素水平增加，引起红系增生（erythroid hyperplasia）。脾功能亢进造成更为严重的贫血。

[0060] β 珠蛋白通过两个基因产生，每条 11 号染色体上分别有一个。 β 地中海贫血综合征由超过 175 个影响 β 珠蛋白基因综合体的分子突变引起。每个 β 珠蛋白基因包括三个外显子（对约 146 个氨基酸进行编码）、两个内含子以及包含启动子序列的 5' - 非翻译区（untranslated region）。 β 珠蛋白的生物合成始于整个基因的转录，随后是信使 RNA 加工、通过拼接除去内含子、加入多聚腺苷酸（poly A）、加帽以及转录后修饰。成熟 mRNA 分子从核中排出并被翻译成 β 珠蛋白。已经发现这些功能中每个的缺陷都与特异性地中海贫血有关。经识别的突变包括：单个核苷酸的删除、插入和置换；移码突变（frame shift mutations）；编码或控制区域的整个片段的删除；不正确的终止信号；异常的拼接信号；以及多点突变。

[0061] β^0 -地中海贫血的特点在于完全没有任何 β 珠蛋白链。 β^+ -地中海贫血的特点在于可检测到所存在的 β 链的量降低。 β 地中海贫血有三种主要类型：重型地中海贫血、中间型地中海贫血和轻型地中海贫血。

[0062] 根据贫血的严重程度对地中海贫血综合征进行分级。重型地中海贫血表现为在婴儿期出现严重的贫血，它由两个严重受损的 β -珠蛋白等位基因的遗传引起。当胎儿珠蛋白链的生成增加或当 α 地中海贫血的共同遗传使 α -珠蛋白与 β -珠蛋白的净失衡（net imbalance）降低时，上述纯合（homozygous）或双重杂合病状（conditions）有着较轻微的表现。地中海贫血特征（trait）（单个有缺陷的等位基因的遗传）其特点在于轻微的小细胞低色素性贫血，并无需治疗。中间型地中海贫血（TI）造成中度贫血，总血红蛋白水平为 6.0-10.0g/dL。这些患者受感染时需要临时输血，但在孩童时期不需要定期输血，然而许多人在以后的生活中病情恶化，并出现类似于重型地中海贫血中的并发症。

[0063] β 地中海贫血特征还能够与变体血红蛋白（variant hemoglobins）结合，产生其他相关的血液病症。血红蛋白 E 特征是最常见的异常血红蛋白之一。在一些情况下，人类携带 β 地中海贫血特征和血红蛋白 E 特征会导致 HbE β 地中海贫血，这是一种中度严重的

贫血,与中间型 β 地中海贫血具有类似症状,但有时可能与重型地中海贫血一样严重。通常见于东南亚世系的人,例如柬埔寨人、越南人和泰国人。

[0064] 在某些情况下,人类携带 β 地中海贫血特征和血红蛋白 S 特征(在患有镰状细胞病的人体内发现的异常血红蛋白),导致 HbS β 地中海贫血。这一病状的严重程度根据由 β 珠蛋白基因产生的正常 β 珠蛋白的量而变化。当 β 珠蛋白基因不产生 β 珠蛋白时,该病状几乎与镰状细胞病相同。当 β 珠蛋白基因产生一些 β 珠蛋白时,该病状不太严重。血红蛋白 S 特征通常见于非洲或地中海世系的人,例如非洲人、意大利人、希腊人、土耳其人和来自加勒比海的人。

[0065] 在重型 β -地中海贫血中,红细胞(RBC)输血是支持疗法的支柱。输血应该使血红蛋白水平理想地保持在 10.5-11g/dL 以上(10.5-13g/dL 的范围)。输血可传播感染,包括肝炎病毒、HIV、CMV 及其他病原体。当铁沉积引起心、肝、和内分泌器官功能障碍时,会出现由输血疗法引起的进一步并发症。常见的有胰岛素依赖性糖尿病的葡萄糖不耐性、原发性甲状腺功能减退、甲状旁腺功能减退、青春期延迟、闭经和骨质减少(osteopenia);随甲状旁腺功能减退而继发的含铁血黄素沉着和低血钙症经常促成心律不齐。在 13 岁前对生长激素作出生长迟缓的响应。肝脏的铁和丙型肝炎造成纤维化和肝硬化。心脏功能障碍可通过心血管磁共振和 T2* 测定结果 $<20\text{ms}$ 以及射血分数降低进行早期检测,并出现疲劳、心律不齐或心包炎,发展到以下症状:充血性心力衰竭是输血患者死亡主要的原因(60%),随后是感染(13%),以及包括肝细胞癌在内的肝疾病(6%)。肺动脉高血压在患有溶血的未输血中型患者中发生;TR 喷射速度 >2 与 25% 死亡率相关联。

[0066] 骨质减少出现在约 55% 的重型地中海贫血和中间型地中海贫血患者中。在某些情况下,它很严重并造成骨折,因此甚至出现在幼童时期的输血患者中。在有些情况下,受影响的患者靠元素钙(1500mg/天)和维生素 D(400IU/天)得以维持。在某些情况下,用双膦酸盐类物质(bisphosphonates)治疗骨质疏松。

[0067] 应监控患者骨髓扩张、面部畸形、脾肿大、生长迟缓、内分泌病和骨质减少。最近认识到肺动脉高血压有风险,与未输血患者的慢性溶血相关。三尖瓣反流(TR 喷射 >2)与 25% 死亡率有关,因此应该进行输血。患有 β +地中海贫血和基线红细胞生成素水平 $<130\text{mU/mL}$ 的患者需要红细胞生成素和胎儿珠蛋白刺激物。

[0068] 中间型地中海贫血中增生性的骨髓刺激肠内铁吸收,最终如同重型地中海贫血那样出现铁超负荷和内分泌不足,但是更慢;而在未输血的患者体内未发生心肌病。避免富铁肉类和定期喝茶可降低铁吸收。骨质减少发生在 55% 的重型和中间型患者中。高凝状态和血栓栓塞事件(hypercoagulability and thromboembolic events)尤其出现在脾切除患者中,与血小板增多和肝功能障碍相关。应该利用叶酸和抗氧化补充物。对于在下肢方面急性或不断增加的虚弱、麻木(numbness)和反射消失(医疗急救),应该怀疑由胸部或脊椎的椎旁骨髓(thoracic or vertebral paraspinal bone marrow)引起的脊柱压迫综合征。

[0069] 在一些情况下,确定患者体内 β 地中海贫血的基因型的测试包括但不限于:血红蛋白电泳、珠蛋白链电泳、分子突变分析、家族研究和数量性状基因座(QTL)分析。

[0070] 在某些情况下, β 珠蛋白基因复合体的分裂(disruption)导致非 α 珠蛋白链与 α 珠蛋白链的合成比率降低、过量失衡的 α 珠蛋白链沉淀以及成红细胞在其发育初期的程序性细胞死亡。受影响的患者直到胎儿(γ)珠蛋白基因在发育方面沉默才变成贫血。

具有持续高水平胎儿珠蛋白的患者通常患有不太严重的贫血(轻微的临床综合征),并且通常不依赖输血。因而 β 地中海贫血是几个临床病状之一,该临床病状中,在胎儿期瞬时表达的基因可在功能上取代在随后的发育中正常表达的突变基因。胎儿(γ)珠蛋白表达的再激活(reactivation)作为 β 地中海贫血的治疗方法而吸引人,这是因为胎儿珠蛋白基因普遍存在,并且在几乎所有人的造血干细胞内的 β 珠蛋白基因座中适当地前后整合(contextually integrated)。

[0071] 镰状细胞病

[0072] 在镰状细胞病(SCD)中, β 珠蛋白链中的一个氨基酸取代导致生成血红蛋白 S (HbS)。脱氧后,HbS 分子进行聚集和聚合,最终导致红细胞的形态畸变,获得镰状或冬青叶(holly-leaf)的形状。镰状形成有两个主要后果:造成组织缺血性损伤的小血管阻塞和慢性溶血性贫血。此外,当暴露于低氧张力时,聚合作用将含 HbS 的血液从自由流动的液体转变为粘稠的凝胶。因此,在某些情况下,与镰状细胞病有关的病理程度(degree of pathology)与患者系统中 HbS 的相对量有关。HbS 聚合还受细胞中血红蛋白浓度的显著影响。HbS 浓度越高,两个或多个 HbS 分子间接触的机会越大。在一些情况下,脱水作用增加血红蛋白浓度并大大促进镰状形成。

[0073] 在某种程度上,镰状形成是可逆现象。随着氧张力增加,镰状形成的细胞解聚。这个聚合-解聚过程对红细胞膜非常具有破坏性,并最终导致不可逆镰状细胞(ISC),该不可逆镰状细胞即使被完全氧化也保持它们的异常形状。与正常的 120 天寿命相比,ISC 在体内平均存活约 20 天。

[0074] 患有 HbS 综合征的个体具有频繁感染、伴有显著的网织红细胞增多的慢性溶血以及高胆红素血的情况。上述疾病的病程通常被各种疼痛危象(称为血管阻塞性危象)打断(punctuated)。这些危象表明器官、腹部、胸、四肢或关节的缺氧损伤和梗死的发作。腿部溃疡是这一疾病的血管阻塞趋势另外的表现。中枢神经系统受累(involve ment)通常引起癫痫甚至中风。同样常见的再生障碍危象表明骨髓活动的临时中断,在某些情况下由感染、叶酸缺乏或两者同时引起。危象是偶发的(episodic)且可逆的,但可能是致命的。由危象发作引起的损害有累积的趋势,甚至在那些患有较轻微形式镰状细胞病的个体中,寿命也可能大大降低。在没有替代干预(alternative intervention)的情况下,患者通常在 30 岁前死亡。

[0075] 患有重度 SCD 的个体直到出生后约五到六个月后才出现症状。在这些婴儿中,胎儿血红蛋白(HbF)不与 HbS 相互作用,并且只要存在足够量的 HbF,就能够调节 HbS 的作用。HbF 水平在 20% 以上通常被认为足以消除与镰状细胞病有关的症状。

[0076] 血液病症

[0077] 镰状细胞病和地中海贫血可以称为“血液病症”,由珠蛋白基因异常引起。血液病症包括可治疗、预防的病症,或者还包括可通过给予本发明的化合物或组合物予以改善的其它病症。血液病症是血液和造血器官的任何病症。术语“血液病症”包括:营养性贫血,例如铁缺乏性贫血、缺铁性吞咽困难(sideropenic dysphasia)、Plummer-Vinson 综合征、维生素 B12 缺乏性贫血、由于内因子(intrinsic factor)引起的维生素 B12 缺乏性贫血、恶性贫血、叶酸缺乏性贫血及其他营养性贫血;骨髓增生异常综合征;骨髓衰竭或由化疗、放疗或其他试剂或疗法引起的贫血;溶血性贫血,例如由于酶病症引起的贫血、由于磷酸脱

氢酶(G6PD)缺乏引起的贫血(蚕豆病)、由于谷胱甘肽代谢引起的贫血、由于糖酵解酶病症引起的贫血、由于核苷酸代谢病症引起的贫血以及由于非特定酶病症引起的贫血;地中海贫血, α -地中海贫血、 β -地中海贫血(例如血红蛋白 E β 地中海贫血)、 $\delta\beta$ -地中海贫血、地中海贫血特征、遗传性胎儿血红蛋白持存(HPFP)及其它地中海贫血;镰状细胞病症,具有危象的镰状细胞性贫血、没有危象的镰状细胞性贫血、双杂合性镰状形成病症、镰状细胞特征及其他镰状细胞病症;遗传性溶血性贫血,遗传性球形红细胞增多症、遗传性椭圆形红细胞增多症、其他的血红蛋白病及其他特定的遗传性溶血性贫血(例如口形红细胞增多症(stomatocytosis));获得性溶血性贫血,例如药物诱发的自身免疫性溶血性贫血、其他自身免疫性溶血性贫血(例如温抗体型自身免疫性溶血性贫血)、药物诱发的非自身免疫性溶血性贫血、溶血性尿毒症综合征及其他非自身免疫性溶血性贫血(例如微血管病性溶血性贫血);再生障碍性贫血,例如获得性纯红细胞再生障碍(成红细胞减少症)、其他的再生障碍性贫血(例如体质性再生障碍性贫血和 fanconi 贫血)、急性失血性贫血和慢性疾病中的贫血;凝血缺陷、例如弥散性血管内凝血(去纤维蛋白综合征),遗传因子 VIII 缺乏(甲型血友病)、遗传因子 IX 缺乏(Christmas 病)及其他凝血缺陷(例如 Von Willebrand 氏病、遗传因子 XI 缺乏(丙型血友病));紫癜,例如血小板质量缺陷和 Glanzmann 氏病;中性粒细胞减少、粒细胞缺乏、多形核中性粒细胞功能病症;其他的白细胞病症,例如嗜酸细胞增多、白细胞增多、淋巴细胞增多、淋巴细胞减少、单核细胞增多和浆细胞增多;脾疾病;高铁血红蛋白血症;其他的血液和造血器官疾病,例如家族性红细胞增多、继发性红细胞增多症、特发性血小板增多和嗜碱细胞增多;血小板减少;传染性贫血;造血障碍性贫血或再生不良性贫血;血红蛋白 C、血红蛋白 D 和血红蛋白 E 疾病;血红蛋白 Lepore 疾病;以及 HbH 与 HbS 疾病;由于失血、放射疗法或化学疗法引起的贫血;或由于放射疗法或化学疗法引起的血小板减少和中性粒细胞减少;铁粒幼细胞性贫血;抗体介导的贫血;以及某些涉及淋巴网状组织和网状组织细胞系统的疾病,例如 Langerhans 氏细胞组织细胞增多、嗜酸细胞性肉芽肿、Hand-Schuller-Christian 病、嗜血细胞性淋巴组织细胞增生和与感染有关的噬血细胞综合征。

[0078] 疗法选择

[0079] 患有 β 地中海贫血和 SCD 的美国患者平均存活年龄分别为约 26 岁和 40 岁。

[0080] 在中间型 β 地中海贫血(TI)和 SCD 中,在得到适当的支持性护理、例如在生病(如感染)或怀孕时进行输血的情况下,大部分受影响的个体可维持日常生活的活动。随着时间的推移,输血需要更加频繁,因为病状发展成为更为严重、晚期的疾病。许多患者患上铁超负荷(多次输血的并发症)及其他与输血有关的并发症(例如上文所述)。在世界上血液产品筛选未达最佳标准的地区,频繁输血也使上述患者承担潜在血源性病原的风险。由丙型肝炎引起的肝硬化常见于世界许多地区患者中。采用输血疗法,许多患者变成同种免疫(alloimmunized),增加过敏性反应的风险,并由于逐渐降低的 RBC 存活率而增加输血需求。

[0081] 胎儿血红蛋白的作用

[0082] 对于虽未形成成人 β 珠蛋白、但避免严重并发症的健康个体,已经确定其遗传型变异。在某些情况下,这些患者以足以取代缺失的 β 珠蛋白链的量表达胎儿珠蛋白。在一些情况下,这种胎儿血红蛋白的遗传性持存(hereditary persistence)涉及一个或两个胎

儿珠蛋白基因。在某些情况下,胎儿珠蛋白的稳定生成完成了异常或缺失的 β 珠蛋白链的必要功能。

[0083] 胎儿血红蛋白(HbF)表达的水平为患有 SCD 患者疾病表达的最重要的调节剂(modifier)之一。HbF 的百分比(%HbF)影响患有 SCD 的儿童和成人的实验室值和临床特点。在一种情况下,每个红细胞中有 30%HbF 为临床镰状形成的高效抑制剂,而 60%-70% 的细胞中有 15%-22%HbF 对沙特阿拉伯和印度患者有益。在更多情况下,升高的 %HbF 已显著关系到疼痛血管阻塞事件较少、急性胸综合征的发作较少和早逝减少。增加的 HbF 水平与器官损伤的减少和患者存活率的提高相关联。

[0084] 在 β 地中海贫血患者体内,较高的 HbF 生成伴有(parallels)较高的血红蛋白水平,这类似于镰状细胞病中的发现。在某些情况下,用羟基脲治疗的 β 地中海贫血患者的 HbF 水平增加,并且危象频率明显下降。例如,患有 HbE β 地中海贫血疾病的患者体内两种主要的血红蛋白组分为 HbE 和 HbF, HbF 的水平由 30% 变为 70%。有些情况下,在患有 HbE β 地中海贫血疾病的患者的某些组中,血红蛋白水平与 HbF 生成的量存在着良好的相关性。利用羟基脲可实现与 α 珠蛋白/非- α 珠蛋白生成增加有关的 HbF 生成增加。在有些情况下,在 %HbF 增加(以及 %HbE 相应减少)和总血红蛋白增加之间的时间关系(temporal relationship)与红细胞生成的增加一致。例如,在一项研究中,几乎所有用羟基脲治疗的 HbE β 地中海贫血患者都响应出 HbF 水平增加以及 %HbE 的相应减少,网织红细胞增多症减少,并且血红蛋白水平有统计学上显著的些许增加, α 珠蛋白链/非- α 珠蛋白链比值的平衡性得到提高。

[0085] 在某些情况下,使胎儿珠蛋白再活化为 α -珠蛋白链合成的约 60-70% 在 β 地中海贫血中改善了贫血,从而足以消除输血需求。在临床试验中,正在评价化疗剂(羟基脲和 5-氮杂胞苷或地西他滨)、短链脂肪酸衍生物(SCFAD)和促红细胞生成素(EPO),在基线(未输血)HbF 水平 >50%、促红细胞生成素水平 >130mU/mL 的患者中观察到最高的血液学反应。在一些情况下,需要将这些试剂结合起来以消除重度 β 地中海贫血患者定期的输血需求。与用于终身治疗的化学疗法相比,优选不致突变、无细胞毒性的试剂。在未输血的患者中,苯基丁酸钠(Buphenyl)和丁酸精氨酸使总血红蛋白在基线以上增加了 1-4g/dL,但分别需要大量片剂或静脉内输注。患有 β^+ 地中海贫血且基线 EPO 水平 <80mU/ml 的患者对丁酸盐/酯和 EPO 的结合疗法作出了最好的响应。长效 EPO 制剂达贝泊汀(darbepoietin)增加一些患者的血红蛋白。这些疗法需要补充口服铁以使得即使出现铁蛋白水平升高也会有效,因为存储的铁未必能用于红细胞生成,而且常常需要几个月的治疗。经过评价,新的口服短链脂肪酸衍生物表现出更容易耐受。

[0086] 羟基脲

[0087] 已经表明多种小分子影响胎儿血红蛋白或胎儿珠蛋白的表达。例如,发现羟基脲(HU)刺激珠蛋白表达(Letvin, N. L. 等人,1984N. Engl. J. Med. 310:869-73)。然而,刺激对胎儿珠蛋白没有表现出非常具有特异性(Charache, S. 等人,1987Blood 69:109-16)。

[0088] 羟基脲是第一种和唯一一种经 FDA 批准用于治疗 SCD 的潜在病理学(underlying pathology)的药品,其通过增加胎儿珠蛋白水平起作用。然而,由于若干原因羟基脲仅用于小部分患者。它在许多 SCD 患者体内并未增加胎儿珠蛋白,并且仅在 40-50% 的患者中观察到了临床受益。此外,羟基脲是与潜在的致癌性和致畸性有关的、致突变的癌症化学疗法。

[0089] 用羟基脲治疗患者可能并发严重的、有时危及生命的副作用。羟基脲会导致突变和致染色体断裂(clastogenic),并造成细胞转化为致癌表型。因此,羟基脲具有明确的基因毒性并且推测是跨物种的(trans-species)致癌物质,这意味对人类有致癌风险。在长期接受羟基脲治疗骨髓增殖性疾病(例如真性红细胞增多和血小板增多)的患者中,已经报导了继发性白血病。

[0090] 羟基脲不是唯一的具有细胞毒性和骨髓抑制作用的试剂。此外,羟基脲具有窄的治疗指数,用羟基脲进行有效治疗需要小心地将剂量逐步上升直至最大耐受剂量(MTD)或规定的最大剂量。羟基脲的初剂量为单次剂量 15mg/kg/ 天。必须每两周监控患者的血细胞计数。如果血细胞计数处于可接受范围,所述剂量每 12 周可增加 5mg/kg/ 天直到达到最大耐受剂量(超过连续 24 周不产生有毒血细胞计数的最高剂量)或 35mg/kg/ 天。如果血细胞计数在可接受范围和有毒范围之间,不增加剂量。如果认为血细胞计数有毒,应该停止羟基脲直到血液学意义上复原。然后,在将剂量由与血液学毒性有关的剂量降低 2.5mg/kg/天后,可恢复治疗。接下来,羟基脲可能或上调或下调进行观察(titrated up or down),每 12 周增加 2.5mg/kg/ 天,直到患者处于 24 周不导致血液学毒性的稳定剂量。不应再次试验使患者两次产生血液学毒性的任何剂量。

[0091] 除了羟基脲,其他的癌症试剂(例如 5- 氮杂胞苷和 5- 氮杂 -2' - 脱氧胞苷)也在小的 SCD 临床试验中显示了功效,但这些药物的毒性和致突变性限制了它们的临床发展和广泛应用。至于 β 地中海贫血,骨髓(或干细胞)移植是唯一有效的疗法,但仅在具有匹配良好捐献者和大量资金来源或健康保险的少数患者中可行。

[0092] 已表明红细胞生成刺激剂(ESA)、例如促红细胞生成素(EPO)和达贝泊汀的外源性给予能够增加 β 地中海贫血患者的 RBC 计数和总 Hgb 水平,但无法修正珠蛋白链的失衡。

[0093] 2, 2- 二甲基丁酸类物质(DMB)

[0094] 2, 2- 二甲基丁酸类物质(DMB)是一类被称为短链脂肪酸(SCFA)和短链脂肪酸衍生物(SCFAD)的药剂中的新型化合物。DMB 是增强胎儿珠蛋白基因启动子表达、从而增加胎儿珠蛋白合成的几种 SCFA 之一。2, 2- 二甲基丁酸类物质(DMB)指 2, 2- 二甲基丁酸的游离酸、药学上可接受的盐或酯(例如 2, 2- 二甲基丁酸钠)。

[0095] 丁酸精氨酸(AB)是成功用在 β 地中海贫血患者的小型研究中以刺激胎儿珠蛋白表达并增加总血红蛋白(Hgb)水平的上一代 SCFA。AB 研究中招收的几名患者进行长期家庭疗法达 7 年的情况下,变得不依赖输血。另一种 SCFA 苯基丁酸钠(SPB)使得未输血 β 地中海贫血患者 50% 的总血红蛋白水平在基线以上增加 2g/dL。然而,AB 和 SPB 均是抑制细胞生长并抑制红细胞生成的组蛋白去乙酰化酶(HDAC)抑制剂,对克服患者贫血起反作用。

[0096] 在进行 β 地中海贫血的开放性初步临床研究(open-label pilot clinical studies)中,在 DMB 之前评价的 SCFA、例如苯基丁酸类物质和丁酸精氨酸(AB)增加胎儿珠蛋白合成和总血红蛋白水平,足以使一些以前依赖输血的患者能够变成不依赖输血。然而,这些早期的 SCFA 治疗剂快速代谢,因而为了达到效果需要大剂量和 / 或长期的静脉内(IV)输注。此外,用这些化合物进行的连续治疗抑制红细胞生成(一种降低胎儿珠蛋白表达净收益、并且可在间歇地给予药物时得以改善的作用)。苯基丁酸钠(SPB)和 AB 都增加 SCD 患者的 HbF 和总血红蛋白(Hgb)水平。用于 β 地中海贫血或 SCD 患者的治疗剂的目标产品

特性为同时刺激胎儿珠蛋白基因表达和增强红细胞生成的口服给予用药。

[0097] DMB 是生物可口服利用的第三代 SCFA,并具有比 AB 或 SPB 更长的半衰期。此外,DMB 没有表现出在与生物活性有关的浓度抑制红细胞生成,反而刺激细胞增殖并抑制所培养的来自地中海贫血患者的红系祖细胞(erythroid progenitor)的细胞凋亡。在另外的情况下,DMB 刺激红系细胞(erythroid cell)增殖和存活,并增加经放血的贫血狒狒的总血红蛋白水平。DMB 不是 HDAC 抑制剂,但在某些情况下,会通过延长转录因子 STAT-5 的磷酸化而促进红细胞生成,同时仍诱导胎儿珠蛋白基因启动子的表达。DMB 是靶向启动子的口服胎儿珠蛋白基因刺激剂,同时延长红系细胞存活和增殖,并在 1 期临床试验正常的自愿者中已显示出有利的药代动力学(PK)特性和安全特性。

[0098] 在由地中海贫血患者培养的红系祖细胞中以及在红系细胞系、报告基因分析的实验室研究中,DMB 诱导胎儿珠蛋白表达。通过用网织红细胞、总血红蛋白(Hgb)和血细胞比容(Hct)进行分析,在转基因小鼠和贫血狒狒上进行的体内研究也表现出胎儿珠蛋白水平增加以及 RBC 生成的增加。

[0099] 在一些实施方式中,作为用于 SCD 和 β 地中海贫血的治疗剂,DMB 诱导胎儿珠蛋白合成,分别替代突变体或缺失的 β 珠蛋白链。在 β 地中海贫血中,胎儿珠蛋白链可与 α 链结合,降低未匹配 α 珠蛋白链的高浓度。在 SCD 中,胎儿珠蛋白抑制 HbS 的聚合,这使 RBC 的镰状形成降低,从而减少局部缺血事件和溶血性贫血。

[0100] DMB 的临床前研究和临床研究

[0101] 在 26 周中每天向 Sprague Dawley 大鼠给予高剂量的 DMB (采用高达 500mg/kg/天 [人等效剂量(HED)=81mg/kg/天] 的每日口服剂量完成)表明 DMB 耐受良好,仅在几只雌性大鼠的肝功能试验中为可逆增加。对 Beagle 犬进行的 26 周研究采用高达 300mg/kg/天(HED=167mg/kg)的每日口服剂量的 DMB 完成,结果是和对照动物相比仅体重增加稍微滞后,该滞后与进食或活动方面的变化无关,另外 DMB 耐受良好。在异速放大(allometric scaling)后,犬和大鼠的这些剂量达到了人类受试者 20mg/kg 剂量的 1.2 和 2.9 倍的累积药物浓度(表 7 和表 8)。

[0102] 在实验室研究中,已经证明 DMB 能够通过 STAT-5 信号通路(由促红细胞生成素促进剂激活的相同通路)刺激红系细胞增殖。此外,DMB 通过延长 Bcl-xL (抗凋亡蛋白复合物)的表达来减少地中海贫血的红系祖细胞过早死亡。

[0103] 迄今为止,已经在有 55 名健康人类受试者的 2 个临床试验中对 DMB 进行了评价。在单一剂量的 1 期研究中,以 2-20mg/kg 的剂量水平用单一剂量的 DMB 对受试者进行治疗。在没有发现临床上显著的不良事件(AE)的情况下完成了这一研究,表明可用 10mg/kg 以上的剂量实现具有生物活性的血浆药物水平(此前用来自中间型地中海贫血(TI)患者的全血进行的体外试验中确定的水平)。

[0104] 在 41 名健康人类受试者的多剂量 1 期临床研究中,连续 14 天的 DMB 重复日剂量(5-15mg/kg/天)耐受良好,没有观察到临床上显著的 AE 或实验室异常。

[0105] 此外,已经在 21 名中间型地中海贫血患者中(以 8 周内 10mg/kg、20mg/kg、30mg/kg 和 40mg/kg 的重复剂量)以及 25 名镰状细胞病患者中(以 6 周内 10mg/kg、20mg/kg 和 30mg/kg 的重复剂量)对 DMB 进行了评价。

[0106] 脉冲式给予

[0107] 在一些实施方式中,脉冲式给予比连续治疗更有效,因为总的脉冲剂量常常比连续给予相同组合物期望的剂量低。每次脉冲剂量能够被降低,从而使治疗过程给予的药物总量最小。

[0108] 在传统的疗法形式中,重复给予是为了保持活性成分在体内的期望水平。常常可将产生的并发症归因于虽然有效、但对正常细胞接近有毒或有害的剂量水平。相反,采用脉冲治疗,体内药物水平降低到低于有效连续治疗所需的水平。因此,脉冲并不仅仅是给予足够大的快速灌注(bolus)从而长时间存在治疗上足够的可利用的药物。脉冲式给予能够实质上降低每剂或每个总治疗方案所给予患者的组合物的量,同时增加有效性。这表现出在时间、人力和费用方面的显著节约,更重要的是,较低的有效剂量实质上使患者可能经受的并发症的数量和严重程度减少。

[0109] 单个脉冲可在几小时(例如约2小时、4小时、6小时、8小时、10小时、12小时、14小时或16小时)或几天(例如2天、3天、4天、5天、6天或7天)的时间段内连续递送至患者,优选约1小时到约24小时,更优选约3小时到约9小时。或者,周期性剂量能够以将组合物进行单次快速灌注或少次注射的形式在短时间内(通常小于1或2小时)给予。例如,丁酸精氨酸已通过以下方式给予:在4天内,每日输注8小时或过夜输注,随后7天内不进行治疗。已经证明这是对许多地中海贫血病症有效的方案。胎儿血红蛋白水平实质上升高,且成人血红蛋白表达细胞和胎儿血红蛋白表达细胞的数目都有显著上升。在某些情况下,HbF显著上升意味着对于提高患者的生活标准存在积极影响,例如增加的活动性或移动性、较少副作用、较短的住院期或看病次数、或者较少的输血。例如,通常认为HbF水平高于20%足以消除与镰状细胞病有关的症状。

[0110] 脉冲之间的间隔或不进行递送的间隔大于24小时,优选大于48小时,并且甚至能够更长、例如3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天或10天、2周、3周或4周或更长的时间。通常,通过在递送下次脉冲前无法再检测到患者体内的组合物或组合物的活性组分时给予另一剂组合物,可以计算脉冲之间的间隔。还可由组合物的体内半衰期计算间隔。可计算出间隔大于体内半衰期,或比组合物半衰期大2倍、3倍、4倍、5倍、甚至10倍。对于具有相当快半衰期的组合物,间隔可以是化学组合物半衰期的25倍、50倍、100倍、150倍、200倍、250倍、300倍、甚至500倍。单个疗法方案中脉冲的数目可少达2个,但通常为约5-10个、10-20个、15-30个或更多。在一些实施方式中,患者根据本发明的方法终身接受药物,而没有与目前疗法有关的问题和不便。

[0111] 在某些实施方式中,组合物通过大多数任意手段进行给予,但更优选作为注射剂(例如静脉内、皮下、动脉内)、输液剂或滴注剂递送至患者,更优选通过口服摄取。

[0112] 用于增加%HbF和/或总血红蛋白的方法

[0113] 本文提供用于增加受试者血液中的胎儿血红蛋白百分比的方法,包括向所述受试者给予:a)作为游离酸、其药学上可接受的盐或酯的2,2-二甲基丁酸类物质;以及b)选自由羟基脲、地西他滨或HDAC抑制剂所组成的组中的一种或多种试剂;其中,受试者血中的胎儿血红蛋白百分比在给予后增加。在一些实施方式中,与基线相比,受试者血液中的胎儿血红蛋白百分比在给予1周后增加。在其他的实施方式中,与基线相比,受试者血液中的胎儿血红蛋白百分比在给予2周后增加。在某些实施方式中,与基线相比,受试者血液中的胎儿血红蛋白百分比在给予4周后增加。在一些实施方式中,与基线相比,受试者血液中的

胎儿血红蛋白百分比在给予 1 天后增加。在某些实施方式中,与基线相比,受试者血液中的胎儿血红蛋白百分比在给予 3 天后增加。

[0114] 在一些用于增加胎儿血红蛋白百分比的方法的实施方式中,所述受试者被诊断为患有血液病症或贫血。在某些实施方式中,所述血液病症是镰状细胞综合征。在一些实施方式中,所述血液病症是 β 地中海贫血综合征。

[0115] 在一些实施方式中,2,2-二甲基丁酸类物质作为 2,2-二甲基丁酸钠进行给予。2,2-二甲基丁酸类物质包括但不限于:2,2-二甲基丁酸、2,2-二甲基丁酸钠、2,2-二甲基丁酸钾、2,2-二甲基丁酸镁、2,2-二甲基丁酸钙、2,2-二甲基丁酸精氨酸、2,2-二甲基丁酸赖氨酸、2,2-二甲基丁酸胆碱、2,2-二甲基丁酸甲酯(2,2-二甲基丁酸甲基酯)、2,2-二甲基丁酸乙酯、2,2-二甲基丁酸丙酯、2,2-二甲基丁酸异丙酯或 2,2-二甲基丁酸叔丁酯。

[0116] 在某些实施方式中,口服给予 DMB。在一些实施方式中,HDAC 抑制剂为 MS-275。在某些实施方式中,口服给予一种或多种药剂。在一些实施方式中,口服给予 DMB 和一种或多种药剂。在某些实施方式中,以结合口服剂型给予 DMB 和一种或多种药剂。

[0117] 在一些实施方式中,DMB 的总日剂量不超过 100mg/kg、不超过 90mg/kg、不超过 80mg/kg、不超过 70mg/kg、不超过 60mg/kg、不超过 50mg/kg、不超过 40mg/kg、不超过 35mg/kg、不超过 30mg/kg、不超过 25mg/kg、不超过 20mg/kg、不超过 15mg/kg、不超过 10mg/kg、或不超过 5mg/kg。在某些实施方式中,DMB 的总日剂量为 10-60mg/kg、20-70mg/kg、30-80mg/kg、40-90mg/kg 或 50-100mg/kg。在一些实施方式中,DMB 的总日剂量小于 100mg/kg、小于 90mg/kg、小于 80mg/kg、小于 70mg/kg、小于 60mg/kg、小于 50mg/kg、小于 40mg/kg、小于 35mg/kg、小于 30mg/kg、小于 25mg/kg、小于 20mg/kg、小于 15mg/kg 或小于 10mg/kg。

[0118] 在某些实施方式中,羟基脲的剂量不超过 35mg/kg/天。在一些实施方式中,羟基脲的剂量小于 35mg/kg/天、小于 30mg/kg/天、小于 25mg/kg/天、小于 20mg/kg/天、小于 15mg/kg/天、小于 10mg/kg/天或小于 5mg/kg/天。在某些实施方式中,羟基脲的剂量小于最大耐受剂量的 90%。在其他的实施方式中,羟基脲的剂量小于最大耐受剂量的 80%、小于最大耐受剂量的 70%、小于最大耐受剂量的 60%、小于最大耐受剂量的 50%、小于最大耐受剂量的 40%、小于最大耐受剂量的 30%、小于最大耐受剂量的 20%、小于最大耐受剂量的 10%。

[0119] 在一些实施方式中,地西他滨的剂量不超过 15mg/m²。在某些实施方式中,地西他滨的剂量小于约 15mg/m²、小于约 10mg/m²、小于约 5mg/m²、小于约 3mg/m²、小于约 2mg/m² 或小于约 1mg/m²。在其他的实施方式中,以不超过约 240mg、不超过约 180mg、不超过约 120mg、不超过约 60mg 或不超过约 30mg 的剂量口服给予地西他滨。

[0120] 在某些实施方式中,每周所给予的 MS-275 的剂量不超过 6mg/m²。在一些实施方式中,每周所给予的 MS-275 的剂量小于约 6mg/m²、小于约 5mg/m²、小于约 4mg/m²、小于约 3mg/m²、小于约 2mg/m² 或小于约 1mg/m²。在某些实施方式中,每天给予 MS-275。

[0121] 在一些实施方式中,DMB 的总日剂量多于 90mg/kg、多于 80mg/kg、多于 70mg/kg、多于 60mg/kg、多于 50mg/kg、多于 40mg/kg、多于 30mg/kg、多于 20mg/kg 或多于 10mg/kg。

[0122] 在某些实施方式中,DMB 的血浆浓度不超过 90 μ g/mL DMB 的浓度。在其他实施方式中,所述血浆浓度不超过 120 μ g/mL DMB 的浓度。在某些实施方式中,DMB 的血浆浓度不超过 150 μ g/mL 的浓度。在一些实施方式中,DMB 的血浆浓度不超过 200 μ g/mL 的浓度。在某些实施方式中,DMB 的血浆浓度不超过 250 μ g/mL 的浓度。在一些实施方式中,DMB 的血浆

浓度为 20 $\mu\text{g/mL}$ 到 90 $\mu\text{g/mL}$ 、或 25 $\mu\text{g/mL}$ 到 120 $\mu\text{g/mL}$ 、30 $\mu\text{g/mL}$ 到 150 $\mu\text{g/mL}$ 、或 30 $\mu\text{g/mL}$ 到 250 $\mu\text{g/mL}$ 。在某些实施方式中,DMB 的最大血浆浓度小于 400 $\mu\text{g/mL}$ 、小于 350 $\mu\text{g/mL}$ 、小于 300 $\mu\text{g/mL}$ 、小于 250 $\mu\text{g/mL}$ 、小于 200 $\mu\text{g/mL}$ 、小于 150 $\mu\text{g/mL}$ 、小于 140 $\mu\text{g/mL}$ 、小于 130 $\mu\text{g/mL}$ 、小于 120 $\mu\text{g/mL}$ 、小于 110 $\mu\text{g/mL}$ 、小于 100 $\mu\text{g/mL}$ 、小于 90 $\mu\text{g/mL}$ 、小于 80 $\mu\text{g/mL}$ 、小于 70 $\mu\text{g/mL}$ 、小于 60 $\mu\text{g/mL}$ 、小于 50 $\mu\text{g/mL}$ 、小于 40 $\mu\text{g/mL}$ 、小于 30 $\mu\text{g/mL}$ 或小于 20 $\mu\text{g/mL}$ 。

[0123] 在一些实施方式中,受试者血液中的胎儿珠蛋白的量增加。在一些实施方式中,受试者血液中的 F- 细胞的数目增加。在某些实施方式中,受试者血液中的 F- 网织红细胞的数目增加。在一些实施方式中,受试者血液中的胎儿血红蛋白的量增加。在某些实施方式中,受试者血液中的总血红蛋白的量增加。在一些实施方式中,受试者血液中的网织红细胞百分比增加。在某些实施方式中,受试者血液中的网织红细胞的数目增加。在一些实施方式中,血细胞比容增加。在某些实施方式中,红细胞生成增加。

[0124] 在某些实施方式中,每天给予 DMB。在进一步的实施方式中,给予是连续的。在一些实施方式中,DMB 的给予通过脉冲式给予进行。在某些实施方式中,脉冲式给予包括给予 DMB 脉冲约 1 天、约 2 天、约 3 天、约 4 天、约 5 天、约 6 天、约 7 天、约 10 天、约 2 周、约 3 周、约 4 周、约 5 周、约 6 周、约 7 周、约 8 周、约 2 个月、约 3 个月、约 4 个月、约 5 个月、约 6 个月、约 9 个月、约 12 个月。在一些实施方式中,脉冲式给予包括不给予 DMB 的间隔约 1 天、约 2 天、约 3 天、约 4 天、约 5 天、约 6 天、约 7 天、约 10 天、约 2 周、约 3 周、约 4 周、约 5 周、约 6 周、约 7 周、约 8 周、约 2 个月、约 3 个月、约 4 个月、约 5 个月、约 6 个月、约 9 个月、约 12 个月。在某些实施方式中,在受试者的一生中进行给药。

[0125] 在一些实施方式中,DMB 的给予通过脉冲式给予进行。在某些实施方式中,所述脉冲式给予包括给予 DMB 约 8 周,随后约 4 周不给予 DMB。在一些实施方式中,所述脉冲式给予包括给予 DMB 约 6 周,随后约 2 周不给予 DMB。在某些实施方式中,所述脉冲式给予包括给予 DMB 约 4 周,随后约 2 周不给予 DMB。在一些实施方式中,所述脉冲式给予包括给予 DMB 约 2 周,随后约 2 周不给予 DMB。在一些实施方式中,脉冲式给予包括给予 DMB 约 1 天、约 2 天、约 3 天、约 4 天、约 5 天、约 6 天、约 7 天、约 10 天、约 2 周、约 3 周、约 4 周、约 5 周、约 6 周、约 7 周、约 8 周、约 2 个月、约 3 个月、约 4 个月、约 5 个月、约 6 个月、约 9 个月、约 12 个月。在某些实施方式中,脉冲式给予包括不给予 DMB 的间隔约 1 天、约 2 天、约 3 天、约 4 天、约 5 天、约 6 天、约 7 天、约 10 天、约 2 周、约 3 周、约 4 周、约 5 周、约 6 周、约 7 周、约 8 周、约 2 个月、约 3 个月、约 4 个月、约 5 个月、约 6 个月、约 9 个月、约 12 个月。在一些实施方式中,给予是连续的。在某些实施方式中,在受试者的一生中进行给予。

[0126] 在一些实施方式中,所述受试者是哺乳动物。在某些实施方式中,所述哺乳动物是牲畜。在一些实施方式中,所述牲畜是马。在某些实施方式中,所述哺乳动物是人。在一些实施方式中,所述人是儿童。在某些实施方式中,所述人的年龄在 18 岁以下。在一些实施方式中,所述人的年龄在 10 岁以下。在一些实施方式中,所述人的年龄在 2 岁以下。

[0127] 本文进一步提供用于增加受试者血液中的胎儿血红蛋白百分比的方法,所述方法包括向所述受试者给予作为游离酸、其药学上可接受的盐或酯的 DMB,其中在给予后,所述受试者血液中的胎儿血红蛋白百分比增加。在一些实施方式中,DMB 的总日剂量不超过 100mg/kg、不超过 90mg/kg、不超过 80mg/kg、不超过 70mg/kg、不超过 60mg/kg、不超过 50mg/kg、

kg、不超过 40mg/kg、不超过 35mg/kg、不超过 30mg/kg、不超过 25mg/kg、不超过 20mg/kg、不超过 15mg/kg、不超过 10mg/kg 或不超过 5mg/kg。在某些实施方式中, DMB 的总日剂量为 10-30mg/kg、20-40mg/kg、30-50mg/kg、40-60mg/kg 或 5-20mg/kg。在某些实施方式中, DMB 的总日剂量为 10-60mg/kg、20-70mg/kg、30-80mg/kg、40-90mg/kg 或 50-100mg/kg。在一些实施方式中, DMB 的总日剂量小于约 80mg/kg、小于约 70mg/kg、小于约 60mg/kg、小于约 50mg/kg、小于约 40mg/kg、小于约 35mg/kg、小于约 30mg/kg、小于约 25mg/kg、小于约 20mg/kg、小于约 15mg/kg 或小于约 10mg/kg。

[0128] 本文还提供用于增加受试者血液中的胎儿血红蛋白百分比的方法, 所述方法包括向所述受试者给予作为游离酸、其药学上可接受的盐或酯的 DMB, 其中 DMB 的总日剂量不多于 40mg/kg, 并且其中在给予后, 所述受试者血液中的胎儿血红蛋白百分比增加。在某些实施方式中, 所述受试者已被诊断患有 β 地中海贫血。在一些实施方式中, DMB 的总日剂量不超过 40mg/kg、不超过 35mg/kg、不超过 30mg/kg、不超过 25mg/kg、不超过 20mg/kg、不超过 15mg/kg、不超过 10mg/kg、不超过 5mg/kg、不超过 2mg/kg 或不超过 1mg/kg。在某些实施方式中, DMB 的总日剂量为 5-25mg/kg、10-30mg/kg、20-40mg/kg、5-20mg/kg、10-25mg/kg、15-30mg/kg、20-35mg/kg 或 25-40mg/kg。在一些实施方式中, DMB 的总日剂量小于约 40mg/kg、小于约 35mg/kg、小于约 30mg/kg、小于约 25mg/kg、小于约 20mg/kg、小于约 15mg/kg 或小于约 10mg/kg。

[0129] 在某些实施方式中, DMB 的血浆浓度不超过 90 μ g/mL DMB 的浓度。在其他实施方式中, 所述血浆浓度不超过 120 μ g/mL DMB 的浓度。在一些实施方式中, DMB 的最大血浆浓度小于 150 μ g/mL、小于 140 μ g/mL、小于 130 μ g/mL、小于 120 μ g/mL、小于 110 μ g/mL、小于 100 μ g/mL、小于 90 μ g/mL、小于 80 μ g/mL、小于 70 μ g/mL、小于 60 μ g/mL、小于 50 μ g/mL、小于 40 μ g/mL、小于 30 μ g/mL 或小于 20 μ g/mL。在一些实施方式中, DMB 的血浆浓度为 50-100 μ g/mL、40-90 μ g/mL、30-80 μ g/mL、25-90 μ g/mL 或 20-100 μ g/mL。在某些实施方式中, DMB 的血浆浓度为 20 μ g/mL 到 90 μ g/mL, 或为 25 μ g/mL 到 120 μ g/mL, 或为 30 μ g/mL 到 150 μ g/mL。在一些实施方式中, AUC 小于 2500h* μ g/mL、小于 2000h* μ g/mL、小于 1500h* μ g/mL、小于 1000h* μ g/mL 或小于 500h* μ g/mL。

[0130] 在一些实施方式中, 与基线相比, 受试者血液中的胎儿血红蛋白百分比在给予 1 周后增加。在其他实施方式中, 与基线相比, 受试者血液中的胎儿血红蛋白百分比在给予 2 周后增加。在某些实施方式中, 与基线相比, 受试者血液中的胎儿血红蛋白百分比在给予 4 周后增加。在一些实施方式中, 与基线相比, 受试者血液中的胎儿血红蛋白百分比在给予 1 天后增加。在某些实施方式中, 与基线相比, 受试者血液中的胎儿血红蛋白百分比在给予 3 天后增加。

[0131] 在一些实施方式中, 用于增加胎儿血红蛋白百分比的方法进一步包括向所述受试者给予羟基脲、地西他滨、HDAC 抑制剂或它们的组合。在某些实施方式中, 所述 HDAC 抑制剂为 MS-275。

[0132] 在某些实施方式中, 2, 2-二甲基丁酸类物质作为 2, 2-二甲基丁酸钠进行给予。在某些实施方式中, 所述 DMB 通过口服给予进行给予。

[0133] 在某些实施方式中, 受试者血液中的胎儿珠蛋白的量增加。在一些实施方式中, 受试者血液中的 F- 细胞的数目增加。在某些实施方式中, 受试者血液中的 F- 网织红细胞的

数目增加。在一些实施方式中,受试者血液中的胎儿血红蛋白的量增加。在某些实施方式中,受试者血液中的总血红蛋白的量增加。在一些实施方式中,受试者血液中的网织红细胞百分比增加。在某些实施方式中,受试者血液中的网织红细胞的数目增加。在一些实施方式中,血细胞比容增加。在某些实施方式中,红细胞生成增加。

[0134] 在一些实施方式中,DMB 通过脉冲式给予进行给予。在某些实施方式中,所述脉冲式给予包括给予 DMB 约 8 周,随后约 4 周不给予 DMB。在一些实施方式中,所述脉冲式给予包括给予 DMB 约 6 周,随后约 2 周不给予 DMB。在某些实施方式中,所述脉冲式给予包括给予 DMB 约 4 周,随后约 2 周不给予 DMB。在一些实施方式中,所述脉冲式给予包括给予 DMB 约 2 周,随后约 2 周不给予 DMB。在一些实施方式中,脉冲式给予包括给予 DMB 的间隔约 1 天、约 2 天、约 3 天、约 4 天、约 5 天、约 6 天、约 7 天、约 10 天、约 2 周、约 3 周、约 4 周、约 5 周、约 6 周、约 7 周、约 8 周、约 2 个月、约 3 个月、约 4 个月、约 5 个月、约 6 个月、约 9 个月、约 12 个月。在某些实施方式中,脉冲式给予包括不给予 DMB 的间隔约 1 天、约 2 天、约 3 天、约 4 天、约 5 天、约 6 天、约 7 天、约 10 天、约 2 周、约 3 周、约 4 周、约 5 周、约 6 周、约 7 周、约 8 周、约 2 个月、约 3 个月、约 4 个月、约 5 个月、约 6 个月、约 9 个月、约 12 个月。在一些实施方式中,给予是连续的。在某些实施方式中,在受试者一生中给予。

[0135] 本文进一步提供用于使被诊断患有镰状细胞病的受试者血液中的胎儿血红蛋白百分比增加的方法,所述方法包括向所述受试者给予作为游离酸、其药学上可接受的盐或酯的 DMB,其中在给予后,所述受试者血液中的胎儿血红蛋白百分比增加。在一些实施方式中,DMB 的总日剂量不超过 100mg/kg、不超过 90mg/kg、不超过 80mg/kg、不超过 70mg/kg、不超过 60mg/kg、不超过 50mg/kg、不超过 40mg/kg、不超过 35mg/kg、不超过 30mg/kg、不超过 25mg/kg、不超过 20mg/kg、不超过 15mg/kg 或不超过 10mg/kg。在某些实施方式中,DMB 的总日剂量为 10-30mg/kg、20-40mg/kg、30-50mg/kg、40-60mg/kg、50-70mg/kg、40-80mg/kg、50-90mg/kg、60-100mg/kg、30-70mg/kg、20-60mg/kg、10-50mg/kg 或 5-20mg/kg。在一些实施方式中,DMB 的总日剂量小于约 100mg/kg、小于约 90mg/kg、小于约 80mg/kg、小于约 70mg/kg、小于约 60mg/kg、小于约 50mg/kg、小于约 40mg/kg、小于约 35mg/kg、小于约 30mg/kg、小于约 25mg/kg、小于约 20mg/kg、小于约 15mg/kg 或小于约 10mg/kg。

[0136] 在某些实施方式中,DMB 的血浆浓度不超过 90 μ g/mL DMB 的浓度。在其他实施方式中,所述血浆浓度不超过 120 μ g/mL DMB 的浓度。在某些实施方式中,DMB 的血浆浓度不超过 150 μ g/mL 的浓度。在一些实施方式中,DMB 的血浆浓度不超过 200 μ g/mL 的浓度。在某些实施方式中,DMB 的血浆浓度不超过 250 μ g/mL 的浓度。在一些实施方式中,DMB 的血浆浓度为 20 μ g/mL 到 90 μ g/mL、或 25 μ g/mL 到 120 μ g/mL、30 μ g/mL 到 150 μ g/mL、或 30 μ g/mL 到 250 μ g/mL。在某些实施方式中,DMB 的最大血浆浓度小于 300 μ g/mL、小于 250 μ g/mL、小于 200 μ g/mL、小于 150 μ g/mL、小于 140 μ g/mL、小于 130 μ g/mL、小于 120 μ g/mL、小于 110 μ g/mL、小于 100 μ g/mL、小于 90 μ g/mL、小于 80 μ g/mL、小于 70 μ g/mL、小于 60 μ g/mL、小于 50 μ g/mL、小于 40 μ g/mL、小于 30 μ g/mL 或小于 20 μ g/mL。在某些实施方式中,AUC 小于 3500h* μ g/mL、小于 3000h* μ g/mL、小于 2500h* μ g/mL、小于 2000h* μ g/mL、小于 1500h* μ g/mL、小于 1000h* μ g/mL 或小于 500h* μ g/mL。

[0137] 本文还提供用于增加受试者血液中的胎儿血红蛋白百分比的方法,所述方法包括向所述受试者给予作为游离酸、其药学上可接受的盐或酯的 2,2-二甲基丁酸类物质

(DMB), 其中 DMB 的总日剂量小于最大耐受剂量。本文还提供用于增加受试者血液中的胎儿血红蛋白百分比的方法, 所述方法包括向所述受试者给予作为游离酸、其药学上可接受的盐或酯的 DMB, 其中 DMB 的总日剂量小于最大耐受剂量的 80%, 并且其中在给予后, 所述受试者血液中的总血红蛋白百分比增加。本文进一步提供用于增加受试者血液中的胎儿血红蛋白百分比的方法, 所述方法包括向所述受试者给予作为游离酸、其药学上可接受的盐或酯的 DMB, 其中 DMB 的总日剂量小于最大耐受剂量。本文还提供用于使受试者体内的总血红蛋白、血细胞比容、红细胞或它们的组合增加的方法, 所述方法包括向所述受试者给予作为游离酸、其药学上可接受的盐或酯的 DMB, 其中 DMB 的总日剂量小于最大耐受剂量。

[0138] 在一些实施方式中, 所述方法进一步包括向所述受试者给予羟基脲、地西他滨、HDAC 抑制剂或它们的组合。在某些实施方式中, 所述 HDAC 抑制剂为 MS-275。在一些实施方式中, 2, 2-二甲基丁酸类物质作为 2, 2-二甲基丁酸钠进行给予。在某些实施方式中, 口服给予所述 2, 2-二甲基丁酸类物质。

[0139] 在一些实施方式中, DMB 的总日剂量大于最大耐受剂量的 25% 且小于最大耐受剂量的 75%。在其他实施方式中, DMB 的总日剂量小于最大耐受剂量的 80%、小于最大耐受剂量的 75%、小于最大耐受剂量的 70%、小于最大耐受剂量的 65%、小于最大耐受剂量的 60%、小于最大耐受剂量的 55%、小于最大耐受剂量的 50%、小于最大耐受剂量的 45%、小于最大耐受剂量的 40%、小于最大耐受剂量的 35%、小于最大耐受剂量的 30%、小于最大耐受剂量的 25%、小于最大耐受剂量的 20%、小于最大耐受剂量的 15%、小于最大耐受剂量的 10%、小于最大耐受剂量的 5%、小于最大耐受剂量的 2% 或小于最大耐受剂量的 1%。

[0140] 在某些实施方式中, DMB 的总日剂量小于约 100mg/kg、小于约 90mg/kg、小于约 80mg/kg、小于约 70mg/kg、小于约 60mg/kg、小于约 50mg/kg、小于约 40mg/kg、小于约 35mg/kg、小于约 30mg/kg、小于约 25mg/kg、小于约 20mg/kg 或小于约 10mg/kg。在一些实施方式中, 所述总日剂量为约 100mg/kg、约 90mg/kg、约 80mg/kg、约 70mg/kg、约 60mg/kg、约 50mg/kg、约 40mg/kg、约 35mg/kg、约 30mg/kg、约 25mg/kg、约 20mg/kg、约 10mg/kg 或约 5mg/kg。在具体的实施方式中, 所述总日剂量小于约 40mg/kg。

[0141] 在一些实施方式中, 血浆浓度不超过 90 μ g/mL DMB 的浓度。在某些实施方式中, DMB 的平均血浆浓度小于 150 μ g/mL、小于 140 μ g/mL、小于 130 μ g/mL、小于 120 μ g/mL、小于 110 μ g/mL、小于 100 μ g/mL、小于 90 μ g/mL、小于 80 μ g/mL、小于 70 μ g/mL、小于 60 μ g/mL、小于 50 μ g/mL、小于 40 μ g/mL、小于 30 μ g/mL、小于 20 μ g/mL 或小于 15 μ g/mL。

[0142] 在某些实施方式中, 所述受试者被诊断患有血液病症。在其他实施方式中, 所述受试者被诊断患有贫血。在一些实施方式中, 所述血液病症为镰状细胞病。在其他实施方式中, 所述血液病症为 β 地中海贫血病症或综合征。在某些实施方式中, 所述 β 地中海贫血病症或综合征为中间型 β 地中海贫血。在一些实施方式中, 所述 β 地中海贫血为重型 β 地中海贫血。在某些实施方式中, 所述 β 地中海贫血为轻型 β 地中海贫血 (β 地中海贫血特征)。在一些实施方式中, 所述 β 地中海贫血为 HbE β 地中海贫血。在某些实施方式中, 所述 β 地中海贫血为 HbS β 地中海贫血。

[0143] 在某些实施方式中, 受试者血液中的胎儿血红蛋白的量增加。在其他实施方式中, 受试者血液中的总胎儿血红蛋白的量增加。

[0144] 在一些实施方式中, 所述受试者是哺乳动物。在某些实施方式中, 所述哺乳动物是

牲畜。在一些实施方式中,所述牲畜是马。在某些实施方式中,所述哺乳动物是人。在一些实施方式中,所述人是儿童。在某些实施方式中,所述人的年龄在 18 岁以下。在一些实施方式中,所述人的年龄在 10 岁以下。在一些实施方式中,所述人的年龄在 2 岁以下。

[0145] 在一些实施方式中,给予 DMB 在与生物活性有关的浓度不抑制红细胞生成。在某些实施方式中,给予 DMB 刺激细胞增殖。在一些实施方式中,给予 DMB 抑制红系祖细胞的细胞凋亡。在进一步的实施方式中,给予 DMB 刺激红系细胞增殖和存活。在一些实施方式中,给予 DMB 刺激红系细胞增殖。在某些实施方式中,给予 DMB 刺激红系细胞存活。在一些实施方式中,给予 DMB 刺激红细胞生成。在某些实施方式中,给予 DMB 导致镰状血细胞存活更久。

[0146] 在一些实施方式中,给予 DMB 刺激红细胞生成。在某些实施方式中,给予 DMB 诱导胎儿珠蛋白基因启动子的表达。在一些实施方式中,给予 DMB 提高胎儿珠蛋白水平。在某些实施方式中,给予 DMB 增加 RBC 生成。在一些情况中,增加的 RBC 生成通过网织红细胞、总血红蛋白(Hgb)和红细胞比容(Hct)来进行分析。

[0147] 在某些实施方式中,给予 DMB 增加受试者血液中的胎儿珠蛋白的量。在一些实施方式中,给予 DMB 增加受试者血液中的胎儿血红蛋白的量。在某些实施方式中,给予 DMB 增加受试者血液中的总血红蛋白的量。在一些实施方式中,给予 DMB 增加受试者血液中的网织红细胞百分比。在某些实施方式中,给予 DMB 增加受试者血液中的网织红细胞的数目。在一些实施方式中,给予 DMB 增加红细胞比容。

[0148] 与羟基脲相反,在增加 %HbF 方面,DMB 在低于最大耐受剂量的总日剂量有效。在一些情况下,给予 DMB 并不需要小心的剂量调整(为目前使用羟基脲的治疗所需)。此外,在某些情况下,在增加患有血液病症的受试者血液中的 HbF 百分比方面,DMB 出乎意料地在低的日剂量比在接近 MTD 的更高日剂量更为有效(参见实施例 12)。

[0149] 此外,在增加 HbF 百分比方面有效的 DMB 总日剂量明显低于其他 SCFAD(如丁酸精氨酸)所需要的剂量,使得能够口服给予 DMB。通过将丁酸精氨酸给予 β 地中海贫血患者来增加 HbF 百分比和治疗 β 地中海贫血需要 500-750mg/kg/ 天的总日剂量,在大多数情况下必须每天输注 10-16 小时。相反,在一些情况下,DMB 的总日剂量仅为 5-40mg/kg/ 天,这在大多数情况下能够口服给予。

[0150] 此外,在一些实施方式中,仅为 5-40mg/kg/ 天的 DMB 总日剂量刺激红系细胞增殖和 / 或存活,使得总血红蛋白水平升高。

[0151] 在本文所述方法的一些实施方式中,2,2-二甲基丁酸类物质作为 2,2-二甲基丁酸钠进行给予。2,2-二甲基丁酸类物质包括但不限于:2,2-二甲基丁酸、2,2-二甲基丁酸钠、2,2-二甲基丁酸钾、2,2-二甲基丁酸镁、2,2-二甲基丁酸钙、2,2-二甲基丁酸精氨酸、2,2-二甲基丁酸赖氨酸、2,2-二甲基丁酸胆碱、2,2-二甲基丁酸甲酯(2,2-二甲基丁酸甲基酯)、2,2-二甲基丁酸乙酯、2,2-二甲基丁酸丙酯或 2,2-二甲基丁酸异丙酯。

[0152] 在本文所述方法的某些实施方式中,每天给予 DMB。在进一步的实施方式中,给予是连续的。在一些实施方式中,给予 DMB 通过脉冲式给予进行。在某些实施方式中,所述脉冲式给予包括给予 DMB 脉冲约 1 天、约 2 天、约 3 天、约 4 天、约 5 天、约 6 天、约 7 天、约 10 天、约 2 周、约 3 周、约 4 周、约 5 周、约 6 周、约 7 周、约 8 周、约 2 个月、约 3 个月、约 4 个月、约 5 个月、约 6 个月、约 9 个月、约 12 个月。在一些实施方式中,脉冲式给予包括不给予

DMB 的间隔约 1 天、约 2 天、约 3 天、约 4 天、约 5 天、约 6 天、约 7 天、约 10 天、约 2 周、约 3 周、约 4 周、约 5 周、约 6 周、约 7 周、约 8 周、约 2 个月、约 3 个月、约 4 个月、约 5 个月、约 6 个月、约 9 个月、约 12 个月。在某些实施方式中,在受试者的一生中进行给予。

[0153] 在一些实施方式中,每隔一天给予 DMB。在某些实施方式中,脉冲式给予包括每周约 5 天给予 DMB。在一些实施方式中,所述脉冲式给予包括给予 DMB 约 5 天,随后约 2 天不给予 DMB。在某些实施方式中,所述脉冲式给予包括给予 DMB 约 2 周,随后约 1 周不给予 DMB。在一些实施方式中,所述脉冲式给予包括给予 DMB 约 2 周,随后约 2 周不给予 DMB。在某些实施方式中,所述脉冲式给予包括给予 DMB 约 4 周,随后约 1 周不给予 DMB。在一些实施方式中,所述脉冲式给予包括给予 DMB 约 4 周,随后约 2 周不给予 DMB。在进一步的实施方式中,所述脉冲式给予包括给予 DMB 约 6 周,随后约 2 周不给予 DMB。在某些实施方式中,所述脉冲式给予包括给予 DMB 约 8 周,随后约 2 周不给予 DMB。在一些实施方式中,所述脉冲式给予包括给予 DMB 约 8 周,随后约 4 周不给予 DMB。

[0154] 在一些情况下,相比于将 DMB 给予具有不同基因型的 β 地中海贫血的受试者,将 DMB 给予具有一种基因型的 β 地中海贫血的受试者在升高 %HbF 方面更有效。本文进一步提供下述方法,所述方法包括:诊断患者的 β 地中海贫血的基因型;考虑 β 地中海贫血的基因型后确定治疗计划;以及任选地增加患者血液中的胎儿血红蛋白百分比,包括向所述患者给予作为游离酸、其药学上可接受的盐或酯的 DMB,其中 DMB 的总日剂量小于最大耐受剂量。

[0155] 本文还提供用于增加受试者血液中的胎儿血红蛋白百分比的方法,所述方法包括以至多约 1mg/kg、约 2mg/kg、约 5mg/kg、约 10mg/kg、约 15mg/kg、约 20mg/kg、约 25mg/kg、约 30mg/kg、约 35mg/kg 或约 40mg/kg 的单位剂量向所述受试者给予作为游离酸、其药学上可接受的盐或酯的 DMB 的口服制剂。

[0156] 本文进一步提供增加受试者血液中的胎儿血红蛋白百分比的方法,所述方法包括提供胶囊剂或片剂形式的单位剂量,所述胶囊剂或片剂包含:约 2000mg、约 1750mg、约 1500mg、约 1250mg、约 1000mg、约 900mg、约 800mg、约 750mg、约 700mg、约 600mg、约 500mg、约 400mg、约 300mg、约 250mg、约 200mg、约 175mg、约 150mg、约 125mg、约 100mg、约 75mg 或约 50mg 的 DMB、或其药学上可接受的盐或酯;以及药学上可接受的赋形剂。在一些情况下,单位剂量与一种或多种赋形剂(例如,乳糖、纤维素、乙醇酸盐/酯和/或硬脂酸镁)一起配制在明胶胶囊中。每单位剂的毫克数可表示游离酸形式的 DMB 或者盐或酯形式的 DMB。

[0157] 本文还提供用于使被诊断患有血液病症的人的血液中胎儿血红蛋白百分比增加的方法,所述方法包括向所述受试者给予 DMB 钠,其中 DMB 钠的总日剂量小于 80mg/kg/天,并且其中在给予后,受试者血液中的胎儿血红蛋白百分比增加。

[0158] 本文进一步提供下述方法,所述方法包括:诊断患者的 β 地中海贫血综合征的类型;考虑 β 地中海贫血综合征的类型后确定治疗计划;以及任选地增加患者血液中的胎儿血红蛋白百分比,包括向所述患者给予作为游离酸、其药学上可接受的盐或酯的 DMB,其中 DMB 的总日剂量小于最大耐受剂量。

[0159] 接受任一种本文所述 DMB 制剂的受试者还接受一种或多种以下治疗:羟基脲、地西他滨、叶酸、阿片样物质(opioids)、止痛剂、抗生素、多种形式的红细胞生成素、或 HDAC 抑制剂。因此,本发明考虑了对患有血液病症的受试者进行治疗的下述方法:以本文所述的

剂量水平和 / 或剂量单位将任一种本文所述 DMB 制剂和一种或多种其他的治疗剂给予所述受试者,上述治疗剂例如选自于由羟基脲、地西他滨、叶酸、阿片样物质、止痛剂、抗生素、多种形式的红细胞生成素、和 HDAC 抑制剂所组成的组中的任一种,但不限于此。

[0160] 本文使用的术语“受试者”是脊椎动物,优选哺乳动物,更优选灵长类动物,进一步更优选人类。哺乳动物包括但不限于人类、灵长类动物、野生动物、野化动物(feral animals)、家畜(farm animals)、运动动物和宠物。在某些实施方式中,所述受试者是哺乳动物。在一些实施方式中,所述哺乳动物为牲畜。在某些实施方式中,所述牲畜为马。在具体的实施方式中、所述哺乳动物为人。在一些实施方式中,所述人为儿童。在某些实施方式中,所述人的年龄在 18 岁以下。在一些实施方式中,所述人的年龄在 10 岁以下。在一些实施方式中,所述人的年龄在 2 岁以下。

[0161] Freireich 等人在 Cancer Chemother Rep 50:219 (1966)中描述了用于动物和人类的剂量的相互关系(基于毫克每平方米体表面)。体表面积可根据患者的高度和重量大体上确定。参见例如 Scientific Tables,Geigy Pharmaceuticals,Ardley,N. Y. ,1970,537。

[0162] 治疗方法

[0163] 在有些情况下,直接通过与常规药物(例如,用于某些血液病症的羟基脲、HDAC 抑制剂或促红细胞生成素)进行比较来测定血液病症对本发明所述治疗方法的响应性,或是基于对疾病病因和发展的理解进行推断。例如,有许多本领域广泛接受的、作为体内效应预测的 HbF 表达分析系统。因此,这些分析中本发明所述治疗方法产生诱导 HbF 表达的表现是这些药物用于治疗 SCD 和 / 或地中海贫血(即血液病症)的临床应用的证据。

[0164] 在本发明的一个实施方式中,“治疗”是指对 SCD 和 / 或地中海贫血(即血液病症)或它们的至少一种可觉察的(discernible)症状进行改善。在另外的实施方式中,“治疗”是指对患者未必能觉察的至少一个可测定的物理参数进行改善。在又一个实施方式中,“治疗”是指抑制 SCD 和 / 或地中海贫血(即血液病症)的发展,可以在身体方面(例如可觉察的症状得以稳定)或生理方面(例如物理参数得以稳定)或者两方面都得到抑制。在又一个实施方式中,“治疗”是指使 SCD 和 / 或地中海贫血(即血液病症)或它们的症状延迟发作。

[0165] 在用于人类之前,根据本发明的方法所给予的组合物能够在体外或体内分析所需的治疗或预防活性。在有些情况下,用动物模型系统来证实本发明所述化合物的安全性和有效性。

[0166] 不希望受理论的限制,相信实施本发明所述治疗方法的结果是诱导基因表达(例如,胎儿血红蛋白表达),因而实现治疗或预防 SCD 和 / 或地中海贫血(即血液病症)。然而,应当注意所述治疗方法可能通过次要活性或不同活性发挥它们的作用,例如但不限于刺激造血作用、红细胞生成以及提高正常干细胞的自我更新。

[0167] 本文提供用于治疗受试者血液病症的方法,所述方法包括向所述受试者给予:a)作为游离酸、其药学上可接受的盐或酯的 2,2-二甲基丁酸类物质(DMB);以及 b)选自于由羟基脲、地西他滨或 HDAC 抑制剂所组成的组中的一种或多种药剂。在某些实施方式中,受试者血液中的胎儿血红蛋白百分比在给予后增加。在一些实施方式中,与基线相比,受试者血液中的胎儿血红蛋白百分比在给予 1 周后增加。在其他的实施方式中,与基线相比,受试者血液中的胎儿血红蛋白百分比在给予 2 周后增加。在某些实施方式中,与基线相比,受试者血液中的胎儿血红蛋白百分比在给予 4 周后增加。在一些实施方式中,与基线相比,受试

者血液中的胎儿血红蛋白百分比在给予 1 天后增加。在某些实施方式中,与基线相比,受试者血液中的胎儿血红蛋白百分比在给予 3 天后增加。

[0168] 在一些用于治疗受试者血液病症的方法的实施方式中,所述血液病症是贫血。在某些实施方式中,所述血液病症是镰状细胞综合征。在一些实施方式中,所述血液病症是 β 地中海贫血综合征。

[0169] 在一些实施方式中,2,2-二甲基丁酸类物质作为 2,2-二甲基丁酸钠给予。在某些实施方式中,口服给予 DMB。在一些实施方式中,HDAC 抑制剂为 MS-275。在某些实施方式中,口服给予所述的一种或多种药剂。在一些实施方式中,口服给予 DMB 和所述的一种或多种药剂。在某些实施方式中,以结合口服剂型给予 DMB 和所述的一种或多种试剂。

[0170] 在一些实施方式中,DMB 的总日剂量小于 100mg/kg、小于 90mg/kg、小于 80mg/kg、小于 70mg/kg、小于 60mg/kg、小于 50mg/kg、小于 40mg/kg、小于 30mg/kg、小于 20mg/kg 或小于 10mg/kg。在某些实施方式中,平均血浆浓度不超过 90 μ g/mL DMB 的浓度。在一些实施方式中,DMB 的平均血浆浓度小于 300 μ g/mL、小于 250 μ g/mL、小于 200 μ g/mL、小于 150 μ g/mL、小于 140 μ g/mL、小于 130 μ g/mL、小于 120 μ g/mL、小于 110 μ g/mL、小于 100 μ g/mL、小于 90 μ g/mL、小于 80 μ g/mL、小于 70 μ g/mL、小于 60 μ g/mL、小于 50 μ g/mL、小于 40 μ g/mL、小于 30 μ g/mL、小于 20 μ g/mL、小于 15 μ g/mL、小于 10 μ g/mL 或小于 5 μ g/mL。

[0171] 在某些实施方式中,受试者血液中的胎儿珠蛋白的量增加。在一些实施方式中,受试者血液中的 F- 细胞的数目增加。在某些实施方式中,受试者血液中的 F- 网织红细胞的数目增加。在一些实施方式中,受试者血液中的胎儿血红蛋白的量增加。在某些实施方式中,受试者血液中的总血红蛋白的量增加。在一些实施方式中,受试者血液中的网织红细胞百分比增加。在某些实施方式中,受试者血液中的网织红细胞的数目增加。在一些实施方式中,血细胞比容增加。在某些实施方式中,红细胞生成增加。

[0172] 在一些实施方式中,给予 DMB 通过脉冲式给予进行。在某些实施方式中,所述脉冲式给予包括给予 DMB 约 8 周,随后约 4 周不给予 DMB。在一些实施方式中,所述脉冲式给予包括给予 DMB 约 6 周,随后约 2 周不给予 DMB。在某些实施方式中,所述脉冲式给予包括给予 DMB 约 4 周,随后约 2 周不给予 DMB。在一些实施方式中,所述脉冲式给予包括给予 DMB 约 2 周,随后约 2 周不给予 DMB。在一些实施方式中,脉冲式给予包括给予 DMB 的脉冲约 1 天、约 2 天、约 3 天、约 4 天、约 5 天、约 6 天、约 7 天、约 10 天、约 2 周、约 3 周、约 4 周、约 5 周、约 6 周、约 7 周、约 8 周、约 2 个月、约 3 个月、约 4 个月、约 5 个月、约 6 个月、约 9 个月、约 12 个月。在某些实施方式中,脉冲式给予包括不给予 DMB 的间隔约 1 天、约 2 天、约 3 天、约 4 天、约 5 天、约 6 天、约 7 天、约 10 天、约 2 周、约 3 周、约 4 周、约 5 周、约 6 周、约 7 周、约 8 周、约 2 个月、约 3 个月、约 4 个月、约 5 个月、约 6 个月、约 9 个月、约 12 个月。在一些实施方式中,给予是连续的。在某些实施方式中,在受试者的一生中进行给予。

[0173] 在一些实施方式中,所述受试者是哺乳动物。在某些实施方式中,所述哺乳动物是牲畜。在一些实施方式中,所述牲畜是马。在某些实施方式中,所述哺乳动物是人。在一些实施方式中,所述人是儿童。在某些实施方式中,所述人的年龄在 18 岁以下。在一些实施方式中,所述人的年龄在 10 岁以下。在一些实施方式中,所述人的年龄在 2 岁以下。

[0174] 本文进一步提供用于治疗受试者的方法,所述方法包括向所述受试者给予作为游离酸、其药学上可接受的盐或酯的 DMB,其中 DMB 的总日剂量不多于 40mg/kg。在一些实施

方式中,所述受试者血液中的胎儿血红蛋白百分比在给予后增加。在某些实施方式中,所述受试者已被诊断患有 β 地中海贫血。在一些实施方式中,DMB的总日剂量小于约40mg/kg、小于约35mg/kg、小于约30mg/kg、小于约25mg/kg、小于约20mg/kg、小于约15mg/kg或小于约10mg/kg。

[0175] 在一些实施方式中,与基线相比,受试者血液中的胎儿血红蛋白百分比在给予1周后增加。在其他实施方式中,与基线相比,受试者血液中的胎儿血红蛋白百分比在给予2周后增加。在某些实施方式中,与基线相比,受试者血液中的胎儿血红蛋白百分比在给予4周后增加。在一些实施方式中,与基线相比,受试者血液中的胎儿血红蛋白百分比在给予1天后增加。在某些实施方式中,与基线相比,受试者血液中的胎儿血红蛋白百分比在给予3天后增加。

[0176] 在某些实施方式中,用于治疗受试者的方法进一步包括向所述受试者给予羟基脲、地西他滨、HDAC抑制剂或它们的组合。在某些实施方式中,所述HDAC抑制剂为MS-275。

[0177] 在一些实施方式中,2,2-二甲基丁酸类物质作为2,2-二甲基丁酸钠进行给予。在某些实施方式中,DMB的给予通过口服给予进行。

[0178] 在某些实施方式中,DMB的血浆浓度不超过90 μ g/mL DMB的浓度。在其他的实施方式中,所述血浆浓度不超过120 μ g/mL DMB的浓度。在某些实施方式中,DMB的血浆浓度不超过150 μ g/mL DMB的浓度。在一些实施方式中,DMB的最大血浆浓度小于300 μ g/mL、小于250 μ g/mL、小于200 μ g/mL、小于180 μ g/mL、小于170 μ g/mL、小于160 μ g/mL、小于150 μ g/mL、小于140 μ g/mL、小于130 μ g/mL、小于120 μ g/mL、小于110 μ g/mL、小于100 μ g/mL、小于90 μ g/mL、小于80 μ g/mL、小于70 μ g/mL、小于60 μ g/mL、小于50 μ g/mL、小于40 μ g/mL、小于30 μ g/mL或小于20 μ g/mL。在某些实施方式中,DMB的血浆浓度不超过90 μ g/mL DMB的浓度。在其他的实施方式中,所述血浆浓度不超过120 μ g/mL DMB的浓度。在某些实施方式中,DMB的血浆浓度不超过150 μ g/mL的浓度。在一些实施方式中,DMB的血浆浓度不超过200 μ g/mL的浓度。在某些实施方式中,DMB的血浆浓度不超过250 μ g/mL的浓度。在一些实施方式中,DMB的血浆浓度为20 μ g/mL到90 μ g/mL、或25 μ g/mL到120 μ g/mL、30 μ g/mL到150 μ g/mL、或30 μ g/mL到250 μ g/mL。在某些实施方式中,AUC小于3500h* μ g/mL、小于3000h* μ g/mL、小于2500h* μ g/mL、小于2000h* μ g/mL、小于1500h* μ g/mL、小于1000h* μ g/mL、或小于500h* μ g/mL。

[0179] 在一些实施方式中,受试者血液中的胎儿珠蛋白的量增加。在一些实施方式中,受试者血液中的F-细胞的数目增加。在某些实施方式中,受试者血液中的F-网织红细胞的数目增加。在一些实施方式中,受试者血液中的胎儿血红蛋白的量增加。在某些实施方式中,受试者血液中的总血红蛋白的量增加。在一些实施方式中,受试者血液中的网织红细胞百分比增加。在某些实施方式中,受试者血液中的网织红细胞的数目增加。在一些实施方式中,血细胞比容增加。在某些实施方式中,红细胞生成增加。

[0180] 在一些实施方式中,DMB的给予通过脉冲式给予进行。在某些实施方式中,所述脉冲式给予包括给予DMB约8周,随后约4周不给予DMB。在一些实施方式中,所述脉冲式给予包括给予DMB约6周,随后约2周不给予DMB。在某些实施方式中,所述脉冲式给予包括给予DMB约4周,随后约2周不给予DMB。在一些实施方式中,所述脉冲式给予包括给予DMB约2周,随后约2周不给予DMB。在一些实施方式中,脉冲式给予包括给予DMB的脉冲约1

天、约 2 天、约 3 天、约 4 天、约 5 天、约 6 天、约 7 天、约 10 天、约 2 周、约 3 周、约 4 周、约 5 周、约 6 周、约 7 周、约 8 周、约 2 个月、约 3 个月、约 4 个月、约 5 个月、约 6 个月、约 9 个月、约 12 个月。在某些实施方式中,脉冲式给予包括不给予 DMB 的间隔约 1 天、约 2 天、约 3 天、约 4 天、约 5 天、约 6 天、约 7 天、约 10 天、约 2 周、约 3 周、约 4 周、约 5 周、约 6 周、约 7 周、约 8 周、约 2 个月、约 3 个月、约 4 个月、约 5 个月、约 6 个月、约 9 个月、约 12 个月。在一些实施方式中,给予是连续的。在某些实施方式中,在受试者的一生中进行给予。

[0181] 本文还提供用于治疗受试者血液病症的方法,该方法包括向所述受试者给予作为游离酸、其药学上可接受的盐或酯的 2, 2- 二甲基丁酸类物质(DMB),其中 2, 2- 二甲基丁酸类物质的总日剂量小于最大耐受剂量。本文还提供用于治疗受试者血液病症的方法,该方法包括向所述受试者给予作为游离酸、其药学上可接受的盐或酯的 DMB,其中 DMB 的总日剂量小于最大耐受剂量的 80%,并且其中所述受试者血液中的总血红蛋白百分比在给予后增加。在一些实施方式中,所述血液病症是镰状细胞病。在其他的实施方式中,所述血液病症是 β 地中海贫血。在一些实施方式中,2, 2- 二甲基丁酸类物质作为 2, 2- 二甲基丁酸钠进行给予。在某些实施方式中,口服给予 2, 2- 二甲基丁酸类物质。

[0182] 在一些实施方式中,所述的方法进一步包括向所述受试者给予羟基脲、地西他滨、HDAC 抑制剂或它们的组合。在某些实施方式中,所述 HDAC 抑制剂为 MS-275。在一些实施方式中,2, 2- 二甲基丁酸类物质作为 2, 2- 二甲基丁酸钠进行给予。在某些实施方式中,口服给予 2, 2- 二甲基丁酸类物质。

[0183] 在一些实施方式中,所述受试者已被诊断患有血液病症,所述血液病症是贫血。在一些实施方式中,所述血液病症是镰状细胞综合征。在其他的实施方式中,所述血液病症是 β 地中海贫血病症或综合征。在某些实施方式中,所述 β 地中海贫血病症或综合征是中间型 β 地中海贫血。

[0184] 在一些实施方式中,2, 2- 二甲基丁酸类物质的总日剂量大于最大耐受剂量的 25% 并小于最大耐受剂量的 75%。在其他的实施方式中,2, 2- 二甲基丁酸类物质的总日剂量小于最大耐受剂量的 80%、小于最大耐受剂量的 75%、小于最大耐受剂量的 70%、小于最大耐受剂量的 65%、小于最大耐受剂量的 60%、小于最大耐受剂量的 55%、小于最大耐受剂量的 50%、小于最大耐受剂量的 45%、小于最大耐受剂量的 40%、小于最大耐受剂量的 35%、小于最大耐受剂量的 30%、小于最大耐受剂量的 25%、小于最大耐受剂量的 20%、小于最大耐受剂量的 15%、小于最大耐受剂量的 10%、小于最大耐受剂量的 5%、小于最大耐受剂量的 2% 或小于最大耐受剂量的 1%。在某些实施方式中,2, 2- 二甲基丁酸类物质的总日剂量小于 80mg/kg、小于 60mg/kg、小于 40mg/kg、小于 30mg/kg、小于 20mg/kg 或小于 10mg/kg。在一些实施方式中,平均血浆浓度不超过 90 μ g/mL 2, 2- 二甲基丁酸类物质的浓度。在某些实施方式中,2, 2- 二甲基丁酸类物质的平均血浆浓度小于 150 μ g/mL、小于 140 μ g/mL、小于 130 μ g/mL、小于 120 μ g/mL、小于 110 μ g/mL、小于 100 μ g/mL、小于 90 μ g/mL、小于 80 μ g/mL、小于 70 μ g/mL、小于 60 μ g/mL、小于 50 μ g/mL、小于 40 μ g/mL、小于 30 μ g/mL、小于 20 μ g/mL、小于 15 μ g/mL、小于 10 μ g/mL 或小于 5 μ g/mL。

[0185] 在某些实施方式中,受试者血液中的胎儿珠蛋白的量增加。在一些实施方式中,受试者血液中的胎儿血红蛋白的量增加。在某些实施方式中,受试者血液中的总血红蛋白的量增加。在一些实施方式中,受试者血液中的网织红细胞百分比增加。在某些实施方式中,

受试者血液中的网织红细胞的数目增加。在一些实施方式中,血细胞比容增加。在某些实施方式中,红细胞生成增加。

[0186] 在一些实施方式中,2,2-二甲基丁酸类物质的给予通过脉冲式给予进行。在某些实施方式中,所述脉冲式给予包括给予2,2-二甲基丁酸类物质约8周,随后约4周不给予2,2-二甲基丁酸类物质。在一些实施方式中,所述脉冲式给予包括给予2,2-二甲基丁酸类物质约6周,随后约2周不给予2,2-二甲基丁酸类物质。在某些实施方式中,所述脉冲式给予包括给予2,2-二甲基丁酸类物质约4周,随后约2周不给予2,2-二甲基丁酸类物质。在一些实施方式中,所述脉冲式给予包括给予2,2-二甲基丁酸类物质约2周,随后约2周不给予2,2-二甲基丁酸类物质。在一些实施方式中,脉冲式给予包括给予2,2-二甲基丁酸类物质的脉冲约1天、约2天、约3天、约4天、约5天、约6天、约7天、约10天、约2周、约3周、约4周、约5周、约6周、约7周、约8周、约2个月、约3个月、约4个月、约5个月、约6个月、约9个月、约12个月。在某些实施方式中,脉冲式给予包括不给予2,2-二甲基丁酸类物质的间隔约1天、约2天、约3天、约4天、约5天、约6天、约7天、约10天、约2周、约3周、约4周、约5周、约6周、约7周、约8周、约2个月、约3个月、约4个月、约5个月、约6个月、约9个月、约12个月。在一些实施方式中,给予是连续的。在某些实施方式中,在受试者的一生中进行给予。

[0187] 在一些实施方式中,所述受试者是哺乳动物。在某些实施方式中,所述哺乳动物是牲畜。在一些实施方式中,所述牲畜是马。在某些实施方式中,所述哺乳动物是人。在一些实施方式中,所述人是儿童。在某些实施方式中,所述人的年龄在18岁以下。在一些实施方式中,所述人的年龄在10岁以下。在一些实施方式中,所述人的年龄在2岁以下。

[0188] 接受任一种本文所述2,2-二甲基丁酸类物质制剂的受试者还可接受一种或多种下列治疗:羟基脲、地西他滨、叶酸、阿片样物质、止痛剂、抗生素、多种形式的红细胞生成素。因此,本发明考虑了对患有血液病症的受试者进行治疗的下述方法:以本文所述的剂量水平和/或剂量单位将任一种本文所述2,2-二甲基丁酸类物质制剂和一种或多种其他的治疗剂给予所述受试者,上述治疗剂例如选自由羟基脲、地西他滨、叶酸、阿片样物质、止痛剂、抗生素和多种形式的红细胞生成素所组成的组中的任一种,但不限于此。

[0189] 本文还提供了治疗受试者血液病症的方法,所述方法包括以至多5mg/kg、10mg/kg、15mg/kg、20mg/kg、25mg/kg、30mg/kg、40mg/kg的单位剂量向所述受试者给予作为游离酸、其药学上可接受的盐或酯的DMB的口服制剂。在一些实施方式中,向患有血液病症的患者给予作为游离酸、其药学上可接受的盐或酯的DMB的口服制剂,总日剂量至多100mg/kg/天、至多90mg/kg/天、至多80mg/kg/天、至多70mg/kg/天、至多60mg/kg/天、至多50mg/kg/天、至多40mg/kg/天、至多30mg/kg/天、至多20mg/kg/天、至多15mg/kg/天、至多10mg/kg/天或至多5mg/kg/天。

[0190] 本文还提供一种治疗受试者血液病症的方法,该方法包括提供胶囊剂或片剂,所述胶囊剂或片剂包含:约2000mg、约1750mg、约1500mg、约1250mg、约1000mg、约900mg、约800mg、约750mg、约700mg、约600mg、约500mg、约400mg、约300mg、约250mg、约200mg、约175mg、约150mg、约125mg、约100mg、约75mg或约50mg的DMB或其药学上可接受的盐或酯;以及药学上可接受的赋形剂。在一些情况下,单位剂量与一种或多种赋形剂(例如,乳糖、纤维素、乙醇酸盐/酯和/或硬脂酸镁)一起配制在明胶胶囊中。每单位剂量的毫克数可表示

游离酸形式的 DMB 或者盐或酯形式的 DMB。

[0191] 本发明的方法可进一步包括监控受试者的步骤,例如监控任何与临床结果改善相关的参数。可在一个或多个下列期间监控受试者:在治疗开始之前;在治疗期间;或在治疗的一个或多个要素已经给予之后。监控可用来评价对采用根据本发明所述方法给予的组合物作进一步治疗的需要,或评价对采用另外的药剂作额外治疗的需要。可以记录有关监控的信息,例如以电子或数字的形式。

[0192] 本文公开的方法可与一种或多种另外的治疗形式结合使用,所述另外的治疗形式包括但不限于外科手术、放射疗法和化学疗法。

[0193] 结合疗法

[0194] 在某些实施方式中,将药物组合物进行单独给予,或与其他已知的用于治疗受试者(例如哺乳动物)血液病症的组合物进行结合给予。在一些实施方式中,哺乳动物包括猫、犬、猪、马、牛、大鼠、小鼠、猴子、黑猩猩、狒狒和人类。在具体的实施方式中,所述哺乳动物是人类。在一些实施方式中,所述人类是儿童。在某些实施方式中,所述人的年龄在 18 岁以下。在一些实施方式中,所述人的年龄在 10 岁以下。在一些实施方式中,所述人的年龄在 2 岁以下。在一个实施方式中,所述受试者患有血液病症。在另一个实施方式中,所述受试者处于患有血液病症的风险中。

[0195] 用语“与已知的组合物结合”意在包括:同时给予本发明的组合物和已知的组合物;首先给予本发明的组合物,随后给予已知的组合物;首先给予已知的组合物,随后给予本发明的组合物。本领域已知的任何用于治疗血液病症的组合物可用于本发明的方法中。

[0196] 本文进一步描述了如下发现:2, 2-二甲基丁酸钠(DMB 钠)连同羟基脲(HU)、地西他滨和/或组蛋白去乙酰化酶(HDAC)抑制剂显示出加合活性和/或协同活性。简言之,已发现 DMB 在与羟基脲(HU)、地西他滨或组蛋白去乙酰化酶(HDAC)抑制剂一起给予时能诱导较高的 γ -珠蛋白表达水平。

[0197] 因此,一方面,本发明针对用于增加受试者血液中的胎儿血红蛋白的方法,该方法包括向所述受试者给予包含作为游离酸、其药学上可接受的盐或酯的 DMB 以及羟基脲的药物组合物。另一方面,本发明针对用于增加受试者血液中的胎儿血红蛋白的方法,该方法包括向所述受试者给予包含作为游离酸、其药学上可接受的盐或酯的 DMB 以及地西他滨的药物组合物。另一方面,本发明针对用于增加受试者血液中的胎儿血红蛋白的方法,该方法包括向所述受试者给予包含作为游离酸、其药学上可接受的盐或酯的 DMB 以及 HDAC 抑制剂的药物组合物。在又一个方面,本发明针对用于增加受试者血液中的胎儿血红蛋白的方法,该方法包括向所述受试者给予包含以下物质的药物组合物:i) 作为游离酸、其药学上可接受的盐或酯的 DMB;以及 ii) 羟基脲、地西他滨和/或 HDAC 抑制剂。在本发明所述方法的一个实施方式中,HDAC 抑制剂是 MS-275。

[0198] 另外一个方面,本发明针对用于治疗受试者血液病症的方法,该方法包括向所述受试者给予包含作为游离酸、其药学上可接受的盐或酯的 DMB 以及羟基脲的药物组合物。另一方面,本发明针对用于治疗受试者血液病症的方法,该方法包括向所述受试者给予包含作为游离酸、其药学上可接受的盐或酯的 DMB 以及地西他滨的药物组合物。另一方面,本发明针对用于治疗受试者血液病症的方法,该方法包括向所述受试者给予包含作为游离酸、其药学上可接受的盐或酯的 DMB 以及 HDAC 抑制剂的药物组合物。另一方面,本发明针

对用于治疗受试者血液病症的方法,该方法包括向所述受试者给予包含以下物质的药物组合物:i)作为游离酸、其药学上可接受的盐或酯的DMB;以及ii)羟基脲、地西他滨和/或HDAC抑制剂。在本发明所述方法的一个实施方式中,HDAC抑制剂是MS-275。

[0199] 在本发明所述方法的一个实施方式中,所述血液病症是地中海贫血。在另一个实施方式中,所述地中海贫血选自重型 β 地中海贫血、中间型地中海贫血和血红蛋白E β 地中海贫血。

[0200] 在一些实施方式中,除了将DMB用于治疗血液病症,还伴随给予其他的药物和营养品化合物。例如,对患有镰状细胞病的人给予DMB和羟基脲(以降低疼痛的发生)、叶酸补充物(用于血细胞生成)、阿片样物质或止痛剂(用于疼痛管理)和/或抗生素(用于治疗继发性感染)。在进一步的实施方式中,用于治疗血液病症的DMB给予与天然或合成的红细胞生成素的给予相结合。在某些情况下,DMB和第二药剂伴随治疗同时进行,或在不同方案计划中进行。

[0201] DMB是生物可口服利用的化合物,该化合物以良好的耐受剂量具有活性。DMB不是全面的HDAC抑制剂,而是延长STAT-5活化的温和的红细胞生成刺激剂。此外,DMB在包括灵长类动物在内的多个物种中特性良好,半衰期为9-11小时,并且在正常的志愿者中具有良好的安全特性。

[0202] 在一些情况下,当将羟基脲(HU)和DMB给予贫血狒狒并分析 γ -珠蛋白mRNA时, γ -珠蛋白mRNA随DMB剂量的增加而增加。在顺序地给予HU(3天/星期)进行治疗的狒狒体内, γ -珠蛋白mRNA在基线以上增加了80-120%,DMB的治疗使 γ -珠蛋白mRNA在基线以上增加了290%;而用HU和DMB两种药剂结合进行治疗时,使 γ -珠蛋白mRNA增加了360%。与单独给予HU或DMB相比,HU和DMB一起给药时,观察到 γ -珠蛋白mRNA明显更大的增加(图1)。

[0203] 在更进一步的情况下,在红系祖细胞的培养物中以结合方式评价了HbF诱导物,当DMB和地西他滨一起给药时,观察到了加合效应(图2)。在Bfu-e培养物中,比较DMB在有或无地西他滨时的情况,F-细胞在用DMB单独处理的培养物中在基线以上增加了32-71%,单独用地西他滨处理时增加了66-104%,而用二种药剂的结合处理时在对照培养物中的F-细胞水平上增加了147%。

[0204] 在一些情况下,当DMB和HDAC抑制剂一起给药时,在诱导 γ -珠蛋白mRNA方面观察到了显著的协同效应。该增加比任一试剂单独给药大数倍(图3)。

[0205] 在一些实施方式中,DMB作为不抑制红系细胞增殖的双效口服 γ -珠蛋白诱导物,当与HU、地西他滨或HDAC抑制剂结合时,具有加合活性或协同活性。在某些实施方式中,DMB与HU、地西他滨、HDAC抑制剂或它们的组合相结合进行给予,用于治疗血液病症。在一些实施方式中,所述血液病症为镰状细胞病。在其他的实施方式中,血液病症是地中海贫血。在某些实施方式中,DMB与HU、地西他滨、HDAC抑制剂或它们的组合相结合进行给予,用于增加受试者血液中的胎儿血红蛋白百分比。在其他的实施方式中,所述结合用于增加受试者血液中的总血红蛋白、血细胞比容或血细胞。

[0206] 在一些实施方式中,本文所述的方法包括向受试者给予有效量的DMB和有效量的一种或多种其他治疗剂。在本发明的一个将另一种治疗剂给予受试者的实施方式中,根据本发明的方法给予的、包含DMB的组合物的有效量小于不给予另一种治疗剂时的有效量。

在另一个实施方式中,另一种治疗剂的有效量小于在不给予根据本发明的方法给予的组合物时的有效量。

[0207] 在本文描述的一些方面中,所述方法包括另外的治疗形式。在一些实施方式中,所述另外的治疗形式为 HDAC 抑制剂。在某些实施方式中,所述另外的治疗形式为地西他滨。在另外的实施方式中,所述另外的治疗形式为羟基脲。

[0208] 地西他滨(5-氮杂-2'-脱氧胞苷)为核苷类似物药物——一种模拟 DNA 天然组分的药物。地西他滨和相关化合物 5-氮杂胞苷在核苷类似物药物大家族中是独一无二的,因为它可与 DNA 甲基-转移酶 1 (DNMT1) 结合并使其减少(deplete)。DNMT1 是在阻遏(repress)基因的机构(machinery)中起关键和核心作用的酶。体内大多数细胞(包括癌细胞或血液病症细胞,例如镰状细胞)包含相同的整套基因(complement of genes)。因此,细胞的功能和特化由这些基因中哪个开启(活化)和哪个关闭(阻遏)来决定。活化是指基因所编码的蛋白的表达,而基因的阻遏意味着基因所编码的蛋白以较低水平表达或根本不表达。因此,改变细胞内 DNMT1 的水平可以对基因表达的模式、细胞的功能和特化产生巨大影响。

[0209] 组蛋白去乙酰化酶抑制剂(HDAC 抑制剂)是一类干扰组蛋白去乙酰化酶功能的化合物,被考虑作为另外的药剂用于结合疗法。HDAC 抑制剂包括但不限于:异羟肟酸类(例如,曲古抑菌素 A)、环四肽类(例如,trapoxin B)、缩酚酸肽类(例如,罗咪酯肽)、苯甲酰胺类、亲电的酮类、脂肪酸化合物(例如,苯基丁酸类物质、丙戊酸)、SAHA/伏立诺他、FK228、Belinostat/PXD101、帕比司他、MS-275、LAQ824/LBH589、CI994、MGCD0103、烟酰胺、NAD 衍生物、二氢香豆素、萘并吡喃酮(naphthopyranone)和 2-羟基萘甲醛。

[0210] 在一些实施方式中,DMB 在与羟基脲、地西他滨或 HDAC 抑制剂结合时具有加合的 HbF- 诱导活性。在一些情况下,需要多种药剂克服 β 重型地中海贫血。在某些实施方式中,具有互补分子机制(complementary molecular mechanisms)的药剂比单独一种药剂诱导出更高的 γ -珠蛋白表达水平。理想情况下,抑制细胞增殖的药剂不与结合疗法一起使用。

[0211] 参考本文公开的方法,术语“结合”是指利用一种或多种另外的药剂或疗法来治疗同一名患者,其中所述药剂或疗法的使用或作用在时间上重叠。另外的药剂或疗法可以在给予根据本发明所述方法给予的组合物的同时给予,或按任何次序顺序地给予。顺序给予是在不同的时间进行给予。一种药剂与另一种药剂给予之间的时间可以是数分钟、数小时、数天或数周。

[0212] 本申请文件中公开的所有特征能够以任意组合的方式相结合。本申请文件中公开的每个特征可被用于相同、等同或类似目的的替代特征所替换。因此,除非另外明确指明,所公开的每个特征仅是等同或类似特征的上位系列的实例。根据上述描述和接下来的实施例,本领域技术人员可容易地确定本发明的本质特征,并且在不背离其精神和范围的情况下,可以对本发明作出各种改变和改进以使其适应于各种用法和条件。例如,本发明的化合物可用作研究工具(例如,用于分离进行药物发现的新目标)。所述化合物例如可以进行放射性同位素标记,用于组织或器官成像或用于形成生物缀合物用于亲合力分析。本发明所述化合物和组合物的这些及其他用途和实施方式对于本领域普通技术人员而言将会是显而易见的。

[0213] 结合疗法可以包括给予降低其他疗法副作用的药剂。结合疗法还可以包括给予降低其他疗法给予频率的药剂。本领域技术人员将会理解和明了有用的结合疗法。上述结合疗法的潜在优点包括能使用较少的每种单独活性成分来使毒副作用最小、协同提高功效、提高给予或使用的方便性和 / 或降低化合物制备或制剂的总体费用。

[0214] 药物组合物

[0215] 在一些实施方式中,根据被治疗的受试者的体重、体表面积和病状,根据本发明所述方法给予的药物组合物以有效剂量进行口服给予。在一些情况下,根据被治疗的受试者的物种、对所述药剂的个体反应以及所选取的药物制剂的种类和进行给予的时间和间隔来发生变化。

[0216] 在一些实施方式中,根据本发明所述方法给予药物组合物以单剂量的或多剂量进行。例如,所述组合物可以以各种不同的剂型进行给予,即,可与各种药学上可接受的惰性载体以片剂、糖衣剂(dragees)、胶囊剂、锭剂(lozenges)、锭剂(troches)、硬糖剂、水性悬浮剂、酏剂、糖浆剂等形式相结合。上述载体包括固体稀释剂或填充剂、无菌水性介质和各种无毒的有机溶剂等等。此外,口服的药物组合物可适当地加甜和 / 或调味。

[0217] 在某些实施方式中,本发明的药物组合物适于口服。适用于口服的药物组合物可为胶囊剂、片剂、丸剂、锭剂(lozenges)、扁囊剂(cachets)、糖衣剂、粉末、颗粒的形式;或作为处于水性液体或非水性液体中的溶液或悬浮液;或作为水包油或油包水的液体乳剂;或作为酏剂或糖浆剂等;每个包含预定量的本发明的化合物作为活性成分。当打算以固体剂型(即,作为胶囊剂、片剂、丸剂等)口服给予时,本发明所述的药物组合物通常包含:作为活性成分的本发明所述化合物;以及一种或多种药学上可接受的载体,例如柠檬酸钠或磷酸二钙(dicalcium phosphate)。作为任选或替代,上述的固体剂型还可包含:填充剂或扩充剂(filters or extenders),例如淀粉、微晶纤维素、乳糖、蔗糖、葡萄糖、甘露糖醇和 / 或硅酸;粘合剂,例如羧甲基纤维素、海藻酸盐 / 明胶、聚乙烯基吡咯烷酮、蔗糖和 / 或阿拉伯胶;保湿剂(humectant),例如甘油;崩解剂,例如琼脂、碳酸钙、马铃薯淀粉或木薯淀粉、海藻酸、某些硅酸盐 / 酯和 / 或碳酸钠;溶液阻滞剂,例如石蜡;吸收加速剂,例如季铵化合物;润湿剂(wetting agent),例如鲸蜡醇和 / 或单硬脂酸甘油酯;吸收剂,例如高岭土和 / 或膨润土;润滑剂,例如滑石、硬脂酸钙、硬脂酸镁、固态聚乙二醇、十二烷基硫酸钠和 / 或它们的混合物;着色剂;和缓冲剂。

[0218] 类似类型的固体组合物也可用作明胶胶囊中的填充剂;这方面优选的材料还包括乳糖(lactose or milk sugar)以及高分子量聚乙二醇。在希望口服给予水性悬浮剂和 / 或酏剂时,活性成分可与各种甜味剂或调味剂、色素或染料结合;如果需要的话,还可与乳化剂和 / 或悬浮剂以及稀释剂(例如水、乙醇、丙二醇、甘油和它们的各种类似组合)一起进行结合。

[0219] 在本发明的药物组合物中还可以存在释放剂(release agents)、润湿剂、包衣剂、甜味剂、调味剂和增香剂、防腐剂和抗氧化剂。药学上可接受的抗氧化剂的实例包括:水溶性抗氧化剂,例如抗坏血酸、半胱氨酸盐酸盐、硫酸氢钠、偏硫酸氢钠(sodium metabisulfate)、亚硫酸钠等;油溶性抗氧化剂,例如抗坏血酸棕榈酸酯、丁基化羟基茴香醚(BHA)、丁基化羟基甲苯(BHT)、卵磷脂、没食子酸丙酯、 α -生育酚等;以及金属螯合剂,例如柠檬酸、乙二胺四乙酸(EDTA)、山梨醇、酒石酸、磷酸等。用于片剂、胶囊剂、丸剂等的包

衣剂包括用于肠溶衣的包衣剂,例如邻苯二甲酸醋酸纤维素(CAP)、邻苯二甲酸聚醋酸乙烯酯(PVAP)、邻苯二甲酸羟丙基甲基纤维素、甲基丙烯酸-甲基丙烯酸酯共聚物、偏苯三酸醋酸纤维素(CAT)、羧甲基乙基纤维素(CMEC)、琥珀酸醋酸羟丙基甲基纤维素(HPMCAS)等。

[0220] 此外,本发明的所述的药物组合物可任选地包含遮光剂,并可进行配制从而使它们仅释放活性成分,或优先地在胃肠道的某部分释放,任选地以延缓的方式进行。可用的嵌入组合物的实例包括聚合物物质以及蜡。活性成分还可以是微囊密封(micro-encapsulated)形式,如果合适,还可以使用一种或多种上述赋形剂。

[0221] 如果需要,还可对本发明的药物组合物进行配制来提供活性成分的缓释或控释,上述配制通过利用例如下述物质:不同比例的羟丙基甲基纤维素;或其他的聚合物基质、脂质体和/或微球。可配制包括下述组合物的缓释组合物,在所述组合物中,活性组分用可差别降解的包衣例如通过微囊密封、多层包衣等进行衍生化。

[0222] 应明白的是,用于给定疗法中的活性化合物实际优选的量会根据配制的具体组合物而变化。对于给定的给药计划(protocol)最佳的给予速率,可由本领域技术人员根据前述指导采用常规的剂量确定试验容易地确定。

[0223] 还应理解的是,关于本发明所述化合物的给予,通常会采取常规上已知的正常防范措施来确保它们在正常使用环境下的功效。尤其是在用于对人类和动物进行体内治疗时,医师应该采取所有合理的防范措施以避免常规上已知的矛盾和有毒影响。

[0224] 本发明所述剂型的组成、形状和种类通常会根据它们的应用而变化。本发明的这方面对于本领域技术人员而言是显而易见的。参见例如,Remington's Pharmaceutical Sciences (1990)第18版,Mack Publishing,Eastern Pa。

[0225] 在某些实施方式中,本发明的药物组合物以单位剂型进行包装。术语“单位剂型”或“单位剂量”是指适合于给予患者的、物理上独立的单位,即,每个单位包含预定量的活性剂,所述活性剂经计算与一种或多种另外的单位结合以产生所希望的治疗效果或单独产生所希望的治疗效果。例如,上述的单位剂型可以是胶囊剂、片剂、丸剂等。还可将单位剂量制备为包含任何有用量的活性成分(例如,DMB钠)。例如,单位剂量可包含每单位剂量10mg、20mg、30mg、40mg、50mg、60mg、70mg、80mg、90mg、100mg、110mg、120mg、125mg、130mg、140mg、150mg、160mg、170mg、175mg、180mg、190mg、200mg、210mg、220mg、225mg、230mg、240mg、250mg、260mg、270mg、275mg、280mg、290mg、300mg、310mg、320mg、325mg、330mg、340mg、350mg、360mg、370mg、375mg、380mg、390mg、400mg、410mg、420mg、425mg、430mg、440mg、450mg、460mg、470mg、475mg、480mg、490mg、500mg、510mg、520mg、525mg、530mg、540mg、550mg、560mg、570mg、575mg、580mg、590mg、600mg、625mg、650mg、675mg、700mg、750mg、800mg、850mg、900mg、950mg、1000mg、1100mg、1200mg、1250mg、1300mg、1400mg、1500mg、1600mg、1700mg、1750mg、1800mg、1900mg、或2000mg的DMB。每单位剂量的毫克数可表示游离酸形式的DMB或者盐或酯形式的DMB。在一些实施方式中,将单位剂量包装插页(insert)的试剂盒中,所述插页用于就合适的剂量对受试者进行指导。

[0226] 给予可在连续的或非连续的多天重复进行。因此,每天给予可进行2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、25个、30个、35个、40个、45个、50个、55个、60个或更多个连续天数。例如,每天两次给予10mg/kg的DMB(以20mg/kg的总日剂量),连续给予14天。或者,给予可在多天中

进行,但在被 1 天、2 天、3 天、4 天、5 天、6 天、7 天、8 天、9 天、10 天或更多天隔开的非连续天数中进行。例如,在治疗开始后每隔一天进行给予 15mg/kg 的 DMB。在另一情况下,给予 DMB 每周进行 5 天。上述的给药方案(dosing regimens)能够基于任何临床上的相关参数为个体患者定制,所述参数包括但不限于毒性、耐受度、副作用、有效性等。

[0227] 实施例

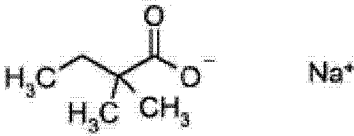
[0228] 至今进行的非临床研究揭露了 DMB 具有显著的生物活性以及振奋人心的非临床安全特性。人类红系祖细胞培养物中胎儿珠蛋白表达、红细胞生成以及 F- 细胞生成(在 50-200 μ g/mL DMB 容易实现)的浓度依赖性增加表明,这种化合物可显著提高血红蛋白病患者的治疗效果。

[0229] 至今,已经在有 55 名健康受试者的两个 1 期临床试验中,对 DMB 进行了评价。此外,已经在有 21 名中间型地中海贫血患者和 25 名镰状细胞病患者的两个 2 期临床试验中,对 DMB 进行了评价。此外,在几个非临床研究中,对 DMB 的安全性和功效进行了评价。

[0230] 表 1 示出 DMB 和示例性制剂的某些性能。

[0231] 表 1 :药学性能和制剂

[0232]

药物名称	2,2-二甲基丁酸钠 (DMB)
化学名称	2,2-二甲基丁酸钠
化学类型	短链羧酸
CAS 注册号	钠盐的 CAS 号: 3934-02-9 羧酸的 CAS 号为 595-37-9
化学结构	 2,2-二甲基丁酸钠盐
物理外观	白色结晶固体
分子式	C ₆ H ₁₁ NaO ₂
分子量	138.07 AU (2,2-二甲基丁酸钠) 116.15 AU (2,2-二甲基丁酸)
熔点	>400°C
溶解性	>500mg/mL (在水中)
制剂	胶囊剂
建议的给予途径	口服
储存和操作	室温

[0233] 实施例 1:非临床药理学

[0234] 已经进行了多个体外和体内非临床研究,评价 DMB 的主要药效学(primary pharmacodynamics)。体外研究探讨了胎儿珠蛋白诱导相对于总珠蛋白的水平。体内试验探讨胎儿珠蛋白诱导以及对红细胞生成和血红蛋白水平的刺激,该体内试验在正常小鼠、包含 β 珠蛋白人类基因基因座的转基因小鼠以及贫血狒狒中进行。

[0235] 体外胎儿珠蛋白表达

[0236] 在用 μ LCR 转染的鼠红白血病(GM979)细胞中(μ LCR 连接至 β - 和 γ - 珠蛋白基因启动子,该启动子连接至不同的荧光素酶基因),就在双荧光素酶报告分析中诱导 γ - 珠蛋白表达的能力而言,对 DMB 与丁酸精氨酸(AB)进行比较。将结果与对照进行统计学比较,如表 2 所示。

[0237] 表 2:荧光素酶活性的诱导

	化合物	活性浓度 (mM)	$\gamma/(\gamma+\beta)$ 珠蛋白表达 范围	平均增加倍数
[0238]	对照, 未处理	0	0.015-0.022	基线
	丁酸精氨酸	0.5	0.029-0.047	1.8*
	DMB	0.5	0.033-0.052	2.2*

[0239] * $p \leq 0.01$; AB 或 DMB 与未处理的对照相比。

[0240] 转基因小鼠体内的胎儿珠蛋白诱导和红系细胞生成

[0241] 使用对于 ϵ -、 γ - 和 β - 珠蛋白基因显示出正确发育调节作用的(在成体阶段具有沉默的 γ - 珠蛋白基因)、含有处于酵母人工染色体(β YAC)中的人 β 珠蛋白基因基团座的转基因小鼠, 研究 DMB 对 γ - 珠蛋白诱导和红系细胞生成的作用。在 μ LCR- 人 A γ - 珠蛋白转基因小鼠中, 在用 DMB 治疗后, γ - 珠蛋白 mRNA 表达相对于鼠 α - 珠蛋白 mRNA 在基线以上平均增加了 1.8 倍。在以 500mg/kg/ 天的腹膜内(IP) 剂量处理的 β YAC 转基因小鼠中, DMB 在人类 γ - 珠蛋白 mRNA 合成方面相对于总非 α - 珠蛋白诱导出 2 倍的增加。这种诱导水平类似于用 1,000mg/kg/ 天的丁酸类物质所见的水平, 并且从治疗开始后第 3 天观察到了变化, 该变化一直持续到治疗终止后第 3-5 天。

[0242] 当以 500mg/kg/ 天给予时, DMB 治疗使网织红细胞计数增加约 6.7 倍。从第 3 天到第 12 天(在采样结束时)观察到了网织红细胞增多。贫血的狒狒体内的胎儿珠蛋白诱导和红系细胞生成

[0243] 在灵长类动物模型中对 γ - 珠蛋白的表达和红系细胞生成进行了评价, 在该模型中每天对狒狒进行放血以模拟与血红蛋白病有关的慢性 RBC 破坏。在该模型中, 对 2-3 岁的狒狒每天抽取 2.5-7mL/kg 的血液, 并用等体积的生理盐水代替该血量。血红蛋白水平相对于对照水平较低, 但保持在 6.5-7.5g/dL 之间, 该水平为这个动物物种体内珠蛋白基因的调整所必需。为该动物补充右旋糖酐铁和叶酸。放血方案每 10-20 天有效地交换动物的总血量。

[0244] 在治疗前以及治疗后的第 2 天和第 4 天, 利用 ^3H - 亮氨酸标记的网织红细胞对用 DMB 治疗的动物测定珠蛋白链蛋白合成。每周对全血细胞计数和网织红细胞计数监控 3 次, 并测定试验品的血浆浓度。在起始剂量为 500-800mg/kg 的剂量升高计划中, 静脉内(IV, 每天)给予 DMB 或通过鼻饲法在轻微麻醉下口服(每周交替 3 天, 持续 6 周)给予 DMB。如果观察到 γ 珠蛋白诱导, 测试较低的剂量(40-200mg/kg)。在单独的疗程中还以 300U/kg 的剂量将重组人红细胞生成素(rhu-EPO)皮下给予 2 只狒狒, 每周三次, 作为 DMB 对红细胞生成作用的阳性对照。治疗在各只狒狒上进行。

[0245] γ 珠蛋白链表达的诱导通过测定 γ 珠蛋白蛋白合成进行评价。在 3 只用 DMB 治疗的动物的每只中, 观察到了相对于未治疗、放血基线的增加(参见表 3)。

[0246] 表 3: 贫血的狒狒体内 γ 珠蛋白链蛋白合成的增加

	% γ 珠蛋白链合成		增加	
[0247]	DMB 治疗	基线	治疗	% γ 珠蛋白链合成
	三只动物的平均值	3.4	10.0	2.9

[0248] 在贫血狒狒模型中, 通常在治疗开始的 2-3 天内观察到 F- 网织红细胞的增加, 在

治疗停止的 3-5 天内减少。每日(IV)或隔日(口服)给予时,DMB 治疗使得 F- 网织红细胞增加 3.8-15 倍(参见表 4)。

[0249] 表 4:贫血狒狒体内 F- 网织红细胞生成的诱导

[0250]	化合物	剂量	给予方法	平均增加倍数
	DMB	150mg/kg/天	IV, 5 天	5
	DMB	200mg/kg/天	IV, 5 天/周	15
	DMB	500-700mg/kg/第 2 天	口服	3.8
	DMB	500mg/kg/第 2 天	口服, 5 天/周, 2 周	3.8

[0251] 对在此方案中用以诱导狒狒体内胎儿珠蛋白诱导的大量每日放血(使得每 10-20 天有效地交换动物的总血量)的需求,通常不会引起新的 Hgb 积聚。然而,在 DMB 给予后,在几只狒狒体内观察到了 RBC 的增加。在增加放血量以保持 Hgb 水平在 6.5-7.5g/dL 的范围后,首先察觉到 RBC 的增加。无论 Hgb 或血细胞比容(Hct)水平增加与否,这种红细胞生成效果通过保持稳定的每日放血量进行评价,并比较 rhu-EPO 和 DMB 对这些参数的影响。

[0252] 实施例 2:非临床安全性药理学

[0253] 体外和 Beagle 犬体内的心脏复极研究

[0254] 心血管安全药理学评定包括:用以评价 DMB 对心脏离子通道影响的体外筛选;以及对 Beagle 犬的心血管和血流动力学的作用进行体内评价。电生理作用在实验室研究中利用电压-钳位(voltage-clamped)的人胚胎肾细胞(由腺病毒 cDNA 转化、并用 cDNA 转染)进行评价,以便稳定地表达人 ether a-go-go 相关基因(hERG)。在 DMB 浓度至多 1mM (138 μ g/mL)时评价对细胞 hERG 通道的影响。这些发现支持了 DMB 实质上对 hERG 通道功能没有活性的结论。

[0255] 在 28 天的 Beagle 犬研究中,没有观察到对全身血流动力学的影响。然而,在最大剂量 500mg/kg/天时,在发现与基线没有统计学差异($p>0.05$)的情况下,仅雌性 Beagle 犬的心率校正的 QT 间隔(QTc)的心电图(ECG)间隔测定结果平均延长了 14%。由于如上述 hERG 通道研究(缺乏剂量反应效应)并由于它仅在所测试的单一性别的 Beagle 犬中出现,QTc 延长与 DMB 给予间的因果联系被认为不太可能。在以下描述的 26 周重复剂量的 Beagle 犬研究(实施例 5)中,注意到对 ECG 的测定结果没有生物学上显著的影响。

[0256] Sprague Dawley 大鼠的中枢神经系统效应

[0257] 将 DMB 以 200mg/kg、600mg/kg 和 1,000mg/kg 的剂量口服给予 Sprague-Dawley 大鼠($n=5$ /性别/组),连续给予 14 天,并在第 15 天测定治疗对行为的功能观察组合试验(FOB)的影响。根据 FOB 测定结果,DMB 对雌性的作用表现出比对雄性的作用更明显。在 600mg/kg/天和 1,000mg/kg/天两组中雌雄两者都观察到在身体健壮(body tone)方面下降。然而,减少运动活动、降低直肠温度、直接边缘效应、例如在旷场中后肢拖动、运动失调、视觉触觉放置准确度不足、以及握力下降和神经运动-神经肌肉的不足仅在 600mg/kg 时在雌性大鼠中得到记录。在雄性大鼠中,这些效应仅出现在用 1,000mg/kg 治疗的动物中。在 2 周的无药物期后,没有残留的 FOB 效应。作为这些数据的结果,确定对中枢神经系统(CNS)作用而言无可见不良作用水平(NOAE)在雌性 Sprague Dawley 大鼠中为 200mg/kg/天,在雄性 Sprague Dawley 大鼠中为 600mg/kg/天。

[0258] 实施例 3: 狒狒体内的药代动力学和代谢

[0259] 已经对狒狒、犬和大鼠用 DMB 和用 L- 精氨酸中和的 2, 2- 二甲基丁酸进行了药代动力学分析。每剂量 AUC 随动物不同而变化。中值半衰期为 2.7 小时(范围为 1.2-7.9)。24 小时的口服生物利用率 >60%、常常 >90%, 并且对于 DMB 或用 L- 精氨酸中和的 2, 2- 二甲基丁酸二者表现类似。对大鼠的代谢研究表明化合物被羟基化和葡萄糖醛酸化(glucuronidated); 在狒狒中, 仅发现葡萄糖醛酸化代谢物。

[0260] 以 33.3mg/kg 到 167mg/kg 游离酸的剂量单一剂量给予 5 只狒狒的药代动力学评价

[0261] 对 2, 2- 二甲基丁酸类物质作为钠盐或 L- 精氨酸盐进行了药代动力学分析: 以 33.3mg/kg、83.3mg/kg、100mg/kg、125mg/kg 或 167mg/kg 游离酸的剂量经由口服途径或静脉内途径作为单一剂量给予 5 只狒狒。

[0262] 以在血浆中收集的有关 DMB 的数据评估药代动力学参数; 然而, 由于在最终消除阶段未对一些狒狒进行采集时间点, 所以这些测定是初步的。每剂量 AUC 随动物不同而变化。在口服给予 83.3mg/kg 或 125mg/kg 游离酸(对于盐为 100mg/kg 和 150mg/kg) 的 DMB 后, 血浆浓度时间 - 曲线下面积(AUC_{0-24hr})为 1962-9363 $\mu\text{mol} \cdot \text{h/L}$ (226-1077 $\mu\text{g} \cdot \text{h/L}$)。清除率为 0.05-0.42L/kg, 在稳态中估计的分布体积(V_{ss})<2L $\times$ h/kg。5 只狒狒体内的中值半衰期为 2.7 小时(范围=1.2-7.9)。在估计的治疗剂量, DMB 钠 24 小时的口服生物利用度大于 60%; 并对于作为钠盐的 DMB 或用 L- 精氨酸中和的 DMB, 口服生物利用度相似。

[0263] 在一只雌狒狒体内对 50mg/kg 静脉内剂量和 100mg/kg、150mg/kg 和 200mg/kg 口服剂量进行的药代动力学评价

[0264] 另外, 对接受 50mg/kg IV 剂量和 100mg/kg、150mg/kg 和 200mg/kg 的单一口服剂量的雌狒狒对 DMB 的药代动力学特性进行了评价。继 IV 给予后, DMB 浓度在剂量给予结束时达到峰值并且以对数线性方式衰减, 而没有明显出现分布阶段; 口服给予后, 浓度在给药后 2 小时内达到峰值并随后在所有三个剂量水平都以对数线性方式衰减。在给予 200mg/kg 口服剂量后 6 个小时, 出现 DMB 次峰(图 4)。

[0265] 继口服给予后, 在给药后 1.5-2.0 小时观察到最大浓度(T_{MAX})值, 表明快速吸收 DMB, C_{MAX} 值增加得比与给予的剂量成比例的值稍大。估计的半衰期值是可变的, 为 2.89-6.92 小时, 但没有表现出剂量依赖性。AUC_{INF} 值与 100-150mg/kg 的剂量成比例增加, 但随剂量从 150mg/kg 增加到 200mg/kg 该值增加超过 5 倍。对于 100mg/kg 和 150mg/kg 的剂量, 表观清除率(CL/F)值相似; 但对于 200mg/kg 的剂量, CL/F 约为较低剂量的 1/4。这些结果表明 DMB 可显示非线性的药代动力学, 可能是在最高剂量水平的代谢饱和所致。随着增加剂量, V_z/F 一直较小。绝对生物利用度(由在 100mg/kg 剂量的 IV 和口服数据计算)高达 71.8%, 表明该化合物容易为口服途径所吸收。

[0266] 对人肝微粒体细胞色素 P450 的抑制潜力

[0267] 在体外利用人肝微粒体, 对于 DMB 对人细胞色素 P450 活性(在非那西汀 O- 脱乙基酶(CYP1A2)、安非他酮羟化酶(CYP2B6)、阿莫地喹 N- 脱乙基酶(CYP2C8)、双氯酚酸 4' - 羟化酶(CYP2C9)、S- 美芬妥英 4' - 羟化酶(CYP2C19)、丁呋洛尔 1' - 羟化酶(CYP2D6)、睾酮 6 β - 羟化酶(CYP3A)和咪达唑仑 1' - 羟化酶(CYP3A)的代谢中涉及)的抑制潜力进行了评价。在不存在 DMB 和存在 DMB (在 0.1-300 μM 的浓度)的情况下, 用同工酶选择性的

底物在接近 K_m 值的浓度对微粒体进行培养。通过比较来自对照和用 DMB 处理的微粒体的活性,对抑制程度进行评价。DMB 没有对这些细胞色素 P450 活性产生显著抑制。对于所有细胞色素 P450 分析而言,百分比活性保持很高,与对照活性相比保持 80% 活性。这些数据表明,浓度高达 300 μM 的 DMB 不是常见人细胞色素 P450 的可逆型抑制剂。

[0268] 毒理学

[0269] 用 DMB 进行的完全毒理学研究包括在 Sprague-Dawley 大鼠中的单一剂量毒性研究、在 Beagle 犬中的升高剂量毒性研究、在 Sprague-Dawley 大鼠中持续 14 天的重复剂量研究、在 Sprague Dawley 大鼠和 Beagle 犬中持续 28 天的重复剂量毒性研究、以及在 Sprague-Dawley 大鼠和 Beagle 犬中的 26 周研究。28 天研究和 26 周研究没有逆转组。生殖毒性研究包括 2 个剂量范围探寻研究,一个在 Sprague-Dawley 大鼠中进行,另一个在新西兰白兔中进行。通过填喂法(gavage)口服给予 DMB,一日一次(QD);剂量以钠盐表示。此外,用 DMB 进行一系列基因毒性研究。研究列表(包括 GLP 状态)示于表 5 和表 9 中。表 6 中提供了在较长期治疗方案中试验的剂量列表和人等效剂量。

[0270] 表 5 :DMB 毒理学研究

[0271]

研究类型 (GLP 状态)	途径	物种/品种	剂量水平
单一剂量毒性研究			
剂量范围探寻的毒性 (非 GLP)	口服 填喂法 QD	大鼠/Sprague-Dawley	0、100、500 和 1,000mg/kg/天
重复剂量毒性研究			
2 周 (15 天) 重复剂量毒性研究, 两周无药物期 (GLP)	口服 填喂法 QD	大鼠/Sprague-Dawley	0、200、600 和 1,000mg/kg/day
28 天毒性 (GLP, 除血浆中 DMB 浓度的生物分析外)	口服 填喂法 QD	大鼠/Sprague-Dawley	0、100、500、1,000 和 2,000/1,500 ^a mg/kg/ 天
26 周重复剂量毒性研究 (GLP)	口服 填喂法 QD	大鼠/Sprague-Dawley	0、50、100 和 500mg/kg/天
2 周升高剂量/MTD 毒性 (GLP)	口服 填喂法 QD	犬/Beagle	250-1,000mg/kg 和 500mg/kg/天
28 天重复剂量毒性研究 (GLP)	口服 填喂法 QD	犬/Beagle	0、50、150 和 500mg/kg/天
26 周重复剂量毒性研究 (GLP)	口服 胶囊剂 QD	犬/Beagle	0、50、150 和 300mg/kg/天
生殖毒性			
DMB 对大鼠胚胎/胎儿发育影响的 剂量范围探寻研究 (GLP)	口服 填喂法 QD	大鼠/Sprague-Dawley	0、50、150、500 和 1,000mg/kg/天
DMB 对兔胚胎/胎儿发育影响的 剂量范围探寻研究 (GLP)	口服 填喂法 QD	兔/ 新西兰白兔	0、50、150、300 和 600mg/kg/天

[0272] ^a 在第 5 天, 2,000mg/kg/ 天的高剂量降低到 1,500mg/kg/ 天。

[0273] 缩写: QD= 每日一次

[0274] 表 6: 来自重复剂量研究剂量等效值

[0275]

重复剂量长度和试验对象	剂量 (mg/kg/d)	剂量 ^a (mg/m ²)	人等效 剂量 (mg/kg/天)
14 天重复剂量大鼠研究 (Sprague Dawley)			
	200	1,200	32
	600	3,600	97
	1,000	6,000	162
28 天重复剂量大鼠研究 (Sprague Dawley)			
	100	600	16
	500	3,000	81
	1,000	6,000	162
	2,000/ 1,500	12,000/ 9,000	324/ 243
14 天剂量升高和最大耐受剂量犬研究 (Beagles)			
	250	5,000	135
	500	10,000	270
28 天重复剂量犬研究 (Beagles)			
	150	3,000	81
	500	10,000	270
26 周重复剂量大鼠研究 (Sprague Dawley)			
	100	600	16
	500	3000	81
26 周重复剂量犬研究 (Beagles)			
	50	1000	27
	300	6000	162
^a 体表面积剂量 (mg/m ²), 对于大鼠由给予剂量 (mg/kg) 乘以 6 得到, 对于犬由给予剂量 (mg/kg) 乘以 20 得到, 对于人由给予剂量 (mg/kg) 乘以 37 得到。			

[0276] 实施例 4 和 5 :在 Sprague Dawley 大鼠和 Beagle 犬中的 26 周重复剂量研究

[0277] 在 Sprague Dawley 大鼠和 Beagle 犬中的 26 周研究已经完成, 没有报告不良作用。用 300mg/kg/ 天治疗的 Beagle 犬组的体重增加稍慢于对照动物, 但不认为这是不良结果。临床病理学的发现包括选择血清化学以及 RBC 参数和指标的增加, 但除了 Sprague Dawley 大鼠在最高剂量水平 (仅 500mg/kg/ 天) 时的碱性磷酸酶水平稍微升高外其他都不显著。组织病理学评定仅显示 Sprague Dawley 大鼠在最高剂量水平 (500mg/kg) 时的轻微胆管增生。Beagle 犬在直至 300mg/kg/ 天的任何剂量水平没有显示实验室异常或病理学异常。

[0278] 在 26 周的 Sprague Dawley 大鼠每日口服给予 DMB 中, 没有与测试品有关的死亡或临床观察。在以 500mg/kg/ 天剂量水平治疗的雌性和雄性 Sprague Dawley 大鼠上观察: 红系细胞的参数 (例如, 红细胞计数、血红蛋白 (Hgb) 和血细胞比容 (Hct)) 和指标 (例如, 平

均红细胞体积(MCV)、平均红细胞血红蛋白和平均红细胞血红蛋白浓度(MCHC))、选择血清化学(例如,钾浓度和碱性磷酸酶活性)以及绝对和相对的平均选择器官重量(例如,肝、心脏和肾)。在中间时间点和终端时间点,500mg/kg/天雄性 Sprague Dawley 大鼠的活化部分凝血活酶时间(APTT)明显较短。还在 500mg/kg/天 Sprague Dawley 的雌性和雄性大鼠中都观察到了最小的胆管增生。没有观察到与肾或大脑重量增高有关的宏观或微观异常。不认为这些与治疗有关的发现是不良的。认为向 Sprague Dawley 大鼠给予 DMB 最少 181 天的 NOAEL 是 500mg/kg/天,而对于雌性 Sprague-Dawley 大鼠的 NOEL 为 100mg/kg/天。

[0279] 在对 Beagle 犬每天给予 DMB 26 周后,没有与治疗有关的重要临床观察。基于此研究的结果,雌性和雄性 Beagle 犬中 DMB 的 NOEL 为 50mg/kg/天;雌性和雄性 Beagle 犬中 DMB 的 NOAEL 至少为 300mg/kg/天,为 26 周治疗期间给予的最高剂量。

[0280] 中枢神经系统的效应

[0281] 测定对中枢神经系统(CNS)效应的无可见不良作用水平(NOAE),在雌性 Sprague Dawley 大鼠中为 200mg/kg/天,在雄性 Sprague Dawley 大鼠中为 600mg/kg/天。在 26 周研究中,Sprague Dawley 大鼠和 Beagle 犬在分别高达 500mg/kg 和 300mg/kg 的剂量水平在中枢神经系统中没有显示异常。

[0282] 肝脏的效应

[0283] 在 28 天 Sprague Dawley 大鼠研究中,在绝对和相对的平均肝重方面,与测试品有关的、统计学上显著的增加在 1,000mg/kg/天时见于雄性大鼠中,在 $\geq 1,000$ mg/kg/天时见于雌性大鼠中。血清酶的稍稍增加包括:在 $\geq 1,000$ mg/kg/天时的雄性大鼠中以及在 2,000/1,500mg/kg/天时的雌性大鼠中的丙氨酸转氨酶(ALT);以及在 $\geq 1,000$ mg/kg/天时的雄性大鼠中的天冬氨酸转氨酶(AST)。这些发现之间没有组织学关联。在 26 周的 Sprague Dawley 大鼠研究中,碱性磷酸酶水平稍稍升高,并且仅在最高的剂量水平(500mg/kg/天)观察到轻微胆管增生,同时在该剂量水平下雌性大鼠的绝对和相对平均肝重相应增加。在器官重量方面的这些变化与异常的病理学无关,并不认为是不良的。在 26 周的一日一次剂量给予后,Beagle 犬在高达 300mg/kg/天的任何剂量水平没有表现出异常。

[0284] 肾的效应

[0285] 在 28 天 Sprague Dawley 大鼠研究中,在 500mg/kg/天和 1000mg/kg/天的雄性大鼠中以及在 $\geq 1,000$ mg/kg/天的雌性大鼠中,见到在绝对和相对的平均肾重方面与测试品有关的、统计学上显著的增加。在单独存活的 2,000/1,500mg/kg/天雄性大鼠中肾重量没有增加。对于这些变化没有见到组织学关联。在 2 周研究中注意到了类似变化,在停止治疗后发生逆转。在 26 周 Sprague Dawley 大鼠研究中,在 500mg/kg/天的雌性和雄性 Sprague Dawley 大鼠中以及在 100mg/kg/天的雄性 Sprague Dawley 大鼠中,见到了在绝对和相对的平均肾重方面与测试品有关的增加。在任一剂量水平,没有与绝对肾重或相对肾重增加相一致的、与测试品有关的组织形态学改变。在 26 周(6 个月)Beagle 犬研究中,在任何剂量水平没有观察到实验室研究或组织学方面的异常。

[0286] 病理学变化

[0287] 在 28 天 Sprague Dawley 大鼠研究中,出现了若干临床病理学变化。在 2,000/1,500mg/kg/天中,注意到了 RBC、淋巴细胞和白细胞计数的降低,认为上述降低暗示着应激反应或免疫抑制。在 $\geq 1,000$ mg/kg/天的剂量,观察到了 Hgb、Hct、MCV 和 MCHC

的减少。在 500mg/kg 天雌性大鼠中,还观察到了 Hgb、Hct 和 MCV 的减少。在 $\geq 1,000\text{mg/kg/}$ 天雄性大鼠中和 2,000/1,500mg/kg/ 天雌性大鼠中,活化部分凝血活酶时间减少;在两组雄性大鼠中,前凝血酶时间增加。在 $\geq 1,000\text{mg/kg/}$ 天的剂量见到,血液尿素氮、白蛋白、白蛋白/珠蛋白比值和无机磷增加,胆固醇和珠蛋白降低。这些血清化学变化与在这些组的体重和食量中所见到的降低有关。此外,血清酶的稍稍增加包括:在 $\geq 1,000\text{mg/kg/}$ 天雄性大鼠中和在 2,000/mg/kg/ 天雌性大鼠中的 ALT;以及 $\geq 1,000\text{mg/kg/}$ 天雄性中的 AST。在 Sprague Dawley 大鼠或 Beagle 犬 26 周(6 个月)研究中,除了在以最高剂量水平治疗的 Sprague Dawley 大鼠中的轻微胆管增生外,没有观察到异常。

[0288] 实施例 6:毒代动力学

[0289] 总的说来,在 Sprague Dawley 大鼠和 Beagle 犬中,对 DMB 的暴露随剂量增加而增加。Beagle 犬在暴露中显示一些性别差异,雌性具有较高并且持续较久的 DMB 血浆水平。图 5 中示出的来自这些研究的数据表明,仅在血清水平超过 $500\mu\text{g/mL}$ 时才出现预测的毒理学效应。在 Sprague Dawley 大鼠中的毒代动力学

[0290] 以 100mg/kg/ 天到 2,000/1,500mg/kg/ 天的剂量经由口服填喂法将 DMB 每天给予 Sprague Dawley 大鼠,持续 4 周。在第 1 天和第 28 天给药后 1 小时和 6 小时,测定血浆水平。图 6 示出这些值的平均值和标准偏差。没有观察到与性别有关的差异。DMB 浓度在第 1 天和第 28 天都随剂量增加而增加。

[0291] 以 50mg/kg/ 天、 100mg/kg/ 天和 500mg/kg/ 天的剂量经由口服填喂法将 DMB 每天给予 Sprague Dawley 大鼠,持续 26 周。在第 1 天和第 181 天给药后 1-24 小时,测定 DMB 血浆水平。在第 0 天给药后 1 小时和第 181 天给药后 1-4 小时观察到峰值血浆浓度。全身暴露随剂量水平的增加而增加,并且大于第 0 天和第 181 天与剂量成比例的量。Sprague Dawley 大鼠对 DMB 的全身暴露的峰值和程度在雄性和雌性大鼠中相似。在第 181 天的全身暴露值为第 0 天全身暴露值的 137% 到 218%,表明 DMB 在这段时间内发生积聚。

[0292] 在 Beagle 犬中的毒代动力学

[0293] 以 50mg/kg/ 天、 150mg/kg/ 天和 500mg/kg/ 天的剂量经由口服填喂法将 DMB 每天给予 Beagle 犬,持续 4 周。利用有效的分析在第 1 天和第 28 天给药后 0.5-24 小时,测定血浆水平(图 5)。血浆水平表现出随剂量的增加而增加,但不随重复给药而变化。在暴露方面没有见到显著的性别差异。

[0294] 以 0mg/kg/ 天、 50mg/kg/ 天、 150mg/kg/ 天和 300mg/kg/ 天的剂量通过口服胶囊将 DMB 每天给予 Beagle 犬,持续 26 周。在第 1 天和第 181 天给药后 1 到 24 小时,测定 DMB 血浆水平。在 26 周期间,在第 0 天给药后 1-4 小时和第 181 天给药后 1-8 小时,测定峰值血浆浓度。全身暴露随剂量水平的增加而增加,且大于第 0 天和第 26 周与剂量成比例的量。对于剂量水平由 50mg/kg/ 天到 300mg/kg/ 天增加 6 倍而言,雄性在第 0 天的暴露值出现 12.85 倍的增加,雌性出现 10.31 倍的增加。在第 26 周,雄性的暴露值出现 8.35 倍的增加,雌性的暴露值出现 7.58 倍的增加。Beagle 犬对 DMB 全身暴露的峰值和程度在雄性和雌性中相似。对于 50mg/kg ,在第 26 周的全身暴露值为第 0 天全身接触值的 138% 到 153%,对于 150mg/kg 为 130%,对于 300mg/kg 的剂量水平为 100% 到 102%,表明在 50mg/kg 和 150mg/kg 剂量水平下 DMB 在这段时间积聚,而在 300mg/kg 剂量水平下没有积聚。

[0295] 在为 I 期试验挑选的人类剂量水平下 26 周非临床研究中暴露的比较

[0296] 将来自 26 周大鼠毒性研究(表 7)和 26 周犬毒性研究(表 8)的毒代动力学信息与临床研究中确定的全身暴露(AUC)水平进行比较。

[0297] 表 7:人类剂量和 26 周 Sprague Dawley 大鼠研究的暴露表

		人类剂量水平 / AUC _{0-∞} 值			
		2mg/kg	5mg/kg	10mg/kg	20mg/kg
[0298]	Sprague Dawley 大鼠剂量水平 ¹	38±23	320±40	538±125	1190±243
	AUC _{0-∞} (μg*h/mL)				
	50mg/kg	125	3.2X	0.4X	0.2X
	100mg/kg	278	7.3X	0.9X	0.5X
	500mg/kg (NOAEL)	3439	91X	10.7X	6.4X

[0299] ¹ 在各剂量水平雌性和雄性大鼠的平均值

[0300] 表 8:人类剂量和 26 周 Beagle 犬研究的暴露表

		人类剂量水平/AUC _{0-∞} 值			
		2mg/kg	5mg/kg	10mg/kg	20mg/kg
[0301]	Beagle 犬剂量水平 ¹	38±23	320±40	538±125	1190±243
	AUC _{0-∞} (μg*h/mL)				
	50mg/kg	127	3.3X	0.4X	0.2X
	150mg/kg	473	12.4X	1.5X	0.9X
	300mg/kg (NOAEL)	1466	38.6X	4.6X	2.7X

[0302] ¹ 在各剂量水平雌性和雄性 Beagle 犬的平均值

[0303] NOAEL 或“无可见不良作用水平”表示研究期间见到的,但由于严重程度低、缺少生物学显著性、可逆性或缺少明确的剂量反应而并不认为不良的与治疗有关的作用。犬和大鼠中的 NOAEL 剂量表示经异速放大后,在人受试者中评价的 20mg/kg 剂量 1.2 和 2.9 倍的药物浓度。

[0304] 实施例 7:生殖毒性

[0305] 在 Sprague Dawley 大鼠和新西兰白兔中完成了剂量范围探寻发育毒性研究,以确定合适的 DMB 剂量水平用于这些物种中的定形(definitive)胚胎/胎儿发育毒性研究。

[0306] Sprague Dawley 大鼠中的生殖毒性

[0307] 从怀孕第 6 天到第 17 天,通过填喂法以 50mg/kg/天、150mg/kg/天、500mg/kg/天和 1000mg/kg/天的剂量水平,每日一次将 DMB 口服给予 4 组 8 只繁殖的雌性 Sprague Dawley 大鼠。由 8 只雌性大鼠组成的并行对照组以类似方案接受辅料(去离子水)。在怀孕第 20 天,对各只存活的雌性大鼠进行经腹子宫切除术。在 50mg/kg/天和 150mg/kg/天的组中没有母体毒性迹象。对于基于母体毒性(垂死、临床体征、平均体重增量减小或体重降低、以及食量降低)和胚胎/胎儿毒性(包括着床后损失和/或较低的胎儿体重)的定形胚胎/胎儿发育毒性研究而言,认为≥ 500mg/kg/天的剂量是不可接受的。在 150mg/kg/天的剂量下,注意到着床后损失增加,每窝可生存的胎儿比例相应较低。在 50mg/kg/天的剂量水平下,没有观察到母体效应或胎儿效应。

[0308] 在新西兰白兔中的生殖毒性

[0309] 从怀孕第 7 天到第 20 天,通过填喂法以 50mg/kg/ 天、150mg/kg/ 天、300mg/kg/ 天和 600mg/kg/ 天的剂量水平,每日一次将 DMB 口服给予 4 组 8 只同期怀孕(time-mated)的雌性新西兰白兔。由 8 只同期怀孕的雌性组成的并行对照组以类似方案仅接受辅料(去离子水)。在任何剂量水平,没有观察到明显的母体宏观发现。在尸体剖检中的所有发现都零星地出现在单个的雌性中,在对照组中和 / 或以非剂量相关方式具有类似频率,认为这些发现都是偶然的且与给予 DMB 无关。在 $\geq 600\text{mg/kg/ 天}$ 的组中的平均胎儿重量比对照组低 8.6%。在 50mg/kg/ 天、150mg/kg/ 天、300mg/kg/ 天组中的胎儿重量以及所有剂量水平中的胎儿存活率和外部形态不受给予试验品的影响。对于基于母体毒性(垂死 / 流产、平均母体体重减少以及平均食量相应降低)和胚胎 / 胎儿毒性(胎儿重量降低)的定形胚胎 / 胎儿发育毒性研究而言,认为 600mg/kg/ 天的剂量是不可接受的。在 300mg/kg/ 天的剂量下,注意到平均母体体重增量减少以及平均食量相应降低。在 50mg/kg/ 天和 150mg/kg/ 天剂量水平下,没有观察到与试验品相关的母体效应或胎儿效应。

[0310] 实施例 8 :基因毒性

[0311] 仅用给予 14 天 1,000mg/kg DMB 的雄性 Sprague Dawley 大鼠证明了在 DMB 暴露后微核化(micronucleated)细胞数目的显著增加。这种效应在雌性 Sprague Dawley 大鼠中没有观察到,且观察到的微核化细胞数目处于历史上未治疗的对照值范围内,但远低于在历史上阳性对照(例如环磷酰胺)中所见到的数目。进一步分析表明,这种活性仅在 DMB 血浆水平超过 $500\text{ }\mu\text{g/mL}$ (比正在进行和计划进行的临床试验中测试的剂量所期望的水平高数倍的水平)的存在下发生。DMB 对导致基因毒性显示出有限的潜力,这基于包括以下结果的证据:在细菌致突变性(Ames 分析)和人外周血淋巴细胞中染色体畸变中的阴性结果;以及微核中的结果,该结果显示具有生物学显著性存疑的微弱反应。

[0312] 表 9 示出用于基因毒性研究的 DMB 剂量,其后是详细的发现。

[0313] 表 9 :DMB 基因毒性研究

[0314]

基因毒性			
Ames 分析 (GLP)	体外	细菌 / 大肠杆菌 (1 菌株) 和 鼠伤寒沙门氏菌 (4 菌株)	100、333、1,000、3,330 和 5,000 μg/板 (有 S9 和没有 S9)
染色体畸变 (GLP)	体外	人外周血淋巴 细胞	没有 S9, 3 小时: 2,450、3,500 和 5,000 μg/mL。 有 S9, 3 小时: 2,450、3,500 和 5,000 μg/mL。 没有 S9, 22 小时: 288、412 和 588 μg/mL。
大鼠微核分析 (GLP)	体内	大鼠/Sprague- Dawley	0、200、600、1,000mg/kg/天: 14 天

[0315] 体外遗传毒性试验

[0316] 用 DMB 进行一组标准的体外遗传毒性试验。根据所接受的指导原则,采用阳性和辅料对照进行这些试验,代谢活化的有视情况而定。

[0317] 对于 Ames (反向细菌致突变试验), 用于致突变分析中的试验菌株为鼠伤寒沙门氏菌试验菌株 TA98、TA100、TA1535 和 TA1537 以及大肠杆菌试验菌株 WP2uvrA。该分析用并行的辅料和阳性对照在存在 S9 混合物和不存在 S9 混合物两种情况下进行, 每剂量使用三块板。在存在和不存在 S9 混合物的致突变分析中测试的剂量均为 $100 \mu\text{g}/\text{板}$ 、 $333 \mu\text{g}/\text{板}$ 、 $1000 \mu\text{g}/\text{板}$ 、 $3330 \mu\text{g}/\text{板}$ 和 $5000 \mu\text{g}/\text{板}$ 。如正常背景菌苔(lawn)生长表明的那样, 在任何浓度没有见到突变计数增加, 且没有观察到细胞毒性。

[0318] 在存在和不存在外源性代谢活化体系(S9 混合物)的情况下, 检验了 DMB 对诱导人外周血淋巴细胞中染色体畸变的潜力。在 3 小时的培养(不进行活化或进行活化)中, 分析了最高的三个浓度($2450 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $3500 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、和 $5000 \mu\text{g}/\text{mL}$)的染色体畸变。在 22 小时处理中, 分析了 $288 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $412 \mu\text{g}/\text{mL}$ 和 $588 \mu\text{g}/\text{mL}$ 的染色体畸变。与辅料处理的培养物相比, 在每个细胞的结构畸变数目、具有结构畸变的细胞百分比或具有多于一种结构畸变的细胞百分比方面, 没有与试验品有关的增加。

[0319] 在任何培养中, 在数目畸变(多倍体或核内复制)方面没有观察到与试验品有关的增加。对照培养中的畸变处于历史范围之内。因此认为, DMB 在有无代谢活化的情况下, 在诱导人类外周血淋巴细胞中染色体的结构或数目畸变方面都呈阴性。

[0320] 体内遗传毒性试验

[0321] 将 DMB 诱导体内微核形成的潜力作为初始 14 天毒性重复剂量毒性研究的一部分进行评价, 该研究在持续 14 天给予 $0\text{mg}/\text{kg}/\text{天}$ 、 $200\text{mg}/\text{kg}/\text{天}$ 、 $600\text{mg}/\text{kg}/\text{天}$ 和 $1,000\text{mg}/\text{kg}/\text{天}$ 剂量的大鼠上进行。在雄性大鼠上观察到微核化红细胞(PCE)的频率与对照相比在统计学上显著地增加, 但仅在最高剂量组中观察到该效应, 与雌性辅料对照中观察到的结果重叠, 且该效应不如采用阳性对照(环磷酰胺)的历史研究中观察到的高。这种效应在回归趋势测试中($p < 0.05$)中得到证实。在任何雌性组或在给予较低日剂量 DMB 的两个雄性组中都没有观察到这种结果。在任何剂量水平, 对雄性或者雌性大鼠的 PCE 百分比都没有影响。

[0322] 尽管增加(平均—— $3.3 \pm 0.16\text{MN PCE}/1,000\text{PCE}$)在统计学上显著, 但认为它缺乏作为染色体损伤或致突变性的预测变量(predictor)的生物学显著性, 理由如下: (1) 两个体外试验(Ames 和染色体畸变分析)都显示阴性的基因毒性潜力; (2) 仅在接触最高剂量($1,000\text{mg}/\text{kg}/\text{天}$)的雄性中观察到了增加; (3) 该增加处于历史阴性对照值的范围内($0-3.5\text{MN PCE}/1,000\text{PCE}$, 平均 $\pm\text{SD}$ —— $1.0 \pm 0.9\text{MN}$); (4) 该增加接近雌性辅料对照值($3.0 \pm 11.2\text{MN PCE}/1,000\text{PCE}$); (5) 该增加远低于历史阳性对照(环磷酰胺)值的范围($9-27\text{MN PCE}/1,000\text{PCE}$, 平均 $\pm\text{SD}$ —— $19.2 \pm 15.5\text{MN PCE}/1,000\text{PCE}$); 以及(6) 雌性表现出受到测试品诱导的毒性的严重影响, 而显示出对微核化 PCE 无影响。

[0323] 实施例 9: 免疫毒性

[0324] 在重复剂量的 Sprague Dawley 大鼠和 Beagle 犬的研究中, 已通过对产生的数据进行证据权重分析(weight-of-evidence analysis)评价了 DMB 的免疫毒性潜力。在两个研究中, 治疗对 WBC 水平或淋巴结组织病理都没有影响, 这预示着潜在的免疫毒性。DMB 对这些测定结果缺乏作用表明, 药物对免疫系统具有毒性的潜力低。

[0325] 临床研究

[0326] 对于健康人类受试者临床研究的起始剂量的选择基于从 28 天重复剂量毒理学研究中获得的数据。基于这些数据, 最敏感性别/物种(雌性 Sprague Dawley 大鼠)中的

NOAEL 为 200mg/kg/天, 等于 32mg/kg 的人类剂量(HED)。为第一例在人类中进行的研究所挑选的保守起始剂量(2mg/kg/天)小于 HED 的 1/15, 与目前的指导规范一致。

[0327] 至今, 已经在 2 个临床试验的 55 名健康人类受试者中对 DMB 进行了评价。在第一个研究中, 以 2-20mg/kg 的剂量水平用单一剂量的 DMB 对 24 名受试者进行治疗。完成这个研究没有观察到显著的 AE, 并且该研究揭示了生物学上活性的血浆药物水平(在先前来自 T1 患者的全血完成的体外研究中确定的水平)可用 10mg/kg 以上的剂量实现。来自这一研究中另外的发现记载于下文中。在第二个研究中, 用 DMB (n=31) 以 5mg/kg、10mg/kg 和 15mg/kg 的剂量水平或安慰剂(n=10), 对总共 41 名健康人类受试者连续治疗 14 天。所有受试者都在安全的情况下完成了给药, 临床和实验室数据可以从所有受试者中获得。没有观察到 SAE 和与治疗有关的显著 AE, 更多细节记载于下文中。

[0328] 此外, 已经在 21 名中间型地中海贫血患者中(以 10mg/kg、20mg/kg、30mg/kg 和 40mg/kg 的重复剂量, 8 周内)和在 25 名镰状细胞病患者中(以 10mg/kg、20mg/kg 和 30mg/kg 的重复剂量, 6 周内)对 DMB 进行了评价。

[0329] 实施例 10 : 1 期单一剂量临床研究

[0330] 第一个临床研究为 DMB 的耐受性、安全性和药代动力学的 1 期双盲、安慰剂对照的单一剂量研究, 在 32 名健康志愿者中进行。健康的禁食成人志愿者以四种剂量水平(2mg/kg、5mg/kg、10mg/kg 和 20mg/kg)之一接受单一口服剂量的 DMB 或安慰剂胶囊。在每个剂量水平下, 6 名受试者接受研究药物(总共 24 名受试者), 2 名受试者接受安慰剂。8 名安慰剂受试者接受仅包含赋形剂(来自包含活性剂的胶囊)的胶囊。在禁食剂量后一周, 接受 20mg/kg 的受试者在指定的餐后还接受第二剂研究药物。

[0331] 安全性观察

[0332] 在整个研究中, 身体检查、生命体征和神经检查均正常。没有观察到有临床意义的征象或症状。一名受试者给药后产生短暂的轻微低血压, 临床上无征状, 主要研究者认为这一发现没有临床意义。没有评价血压和脉搏的体位变化(postural change)。在用活性研究药物治疗的患者中有 3 名出现心电图异常, 安慰剂受试者中有 3 名出现心电图异常, 这些都被认为没有临床意义。除了一名受试者被诊断出尿路感染(在给予研究测试品之前没有披露), 所有实验室研究(包括化学分析、凝血研究、血液学研究和尿分析)都正常或没有临床意义。下表 10 列出所有观察到的 AE, 以组的形式呈现。为各组(包括 N 名接受安慰剂或研究药物的受试者)报告数据。主要研究者将所有事件都评定为轻微。下表 10 按组示出所报告的 AE。认为可能或者大概与研究药物有关的仅有的 AE 包括: 上腹痛, 出现在 2mg/kg 治疗组中的一名受试者; 安慰剂治疗组中的一名受试者出现眩晕; 10mg/kg 治疗组中一名受试者出现烦躁不安。没有受试者由于 AE 中止治疗, 在这个研究中没有报告 SAE。

[0333] 表 10 : 受试者的 AE 发生率(按频率降序排列)

[0334]

不良事件总结		
不良事件列表	安慰剂 N=8 (%)	DMB N=24 (%)
头痛	25	29
血管穿刺处血肿	13	17
眩晕	25	13
恶心	13	8
URI	13	8
腹泻		8
咳嗽	25	4
上腹痛		4
腹部压痛		4
味觉障碍 (dysguesia)		4
烦躁不安		4
瘀斑		4
鼻出血		4
疲劳		4
失眠		4
肌痛		4
吞咽痛		4
心悸		4
血管迷走性晕厥		4
焦虑	13	
痛经	13	
充血	13	
月经过多	13	
肢体末端疼痛 (pain in extremity)	13	
咽炎	13	
咽喉疼痛	13	
涎腺炎	13	

[0335] N= 各治疗组中受试者的数目 ;%= 经历 AE 的受试者百分比, AE 用来自 MedRA v10 的优选术语进行编码。

[0336] 对于出现编码为一个优选术语的多个事件的受试者, 仅计算一次。药代动力学观察

[0337] 在口服给予后快速吸收 DMB, DMB 的峰值浓度出现在给药后 0.5-3 小时, 随后是单指数衰减阶段, 与线性药代动力学一致(图 7 ;图 8)。在主要 PK 参数方面, 受试者间变动表现得不高, 尤其是在较高剂量时。与禁食情况相比, 在进食情况(在 20mg/kg 剂量水平进行试验)下给予 DMB 造成药物吸收速率(而非总吸收量)的延迟。平均半衰期范围为 5.5-11.6

小时,并随所给予剂量的增加而增加。AUC 值随所给予剂量的增加而增加,范围为从 5mg/kg 剂量时的平均 $38.3\text{h} \cdot \mu\text{g/mL}$ 到 20mg/kg 剂量时的 $1190\text{h} \cdot \mu\text{g/mL}$ (图 9)。

[0338] 相对少的分布量 0.204-0.426L/kg 表明 DMB 的分布小于身体总水量,因此在整个身体内没有广泛分布。CL/F 值低,范围为 0.016-0.062L/h/kg,并且除了低剂量外表现出不依赖所给予的剂量,表明 DMB 在 10-20mg/kg 剂量范围内显示出线性药代动力学。

[0339] 在第 4 组中治疗的受试者在进食和禁食情况下都接受 DMB。食品的存在引起 $T_{\max}$ 延迟,并使平均 $C_{\max}$ 从 $89\mu\text{g/mL}$ 降到了 $60\mu\text{g/mL}$ 。然而,没有观察到对 AUC_{INF} 的影响,表明随膳食给予 DMB 可能引起吸收速率(而非吸收程度)降低或延迟。图 10 说明了这一点。

[0340] 实施例 11:1 期重复剂量临床研究

[0341] 在安慰剂对照、随机、重复剂量 1 期临床研究中评价了 DMB,该研究对健康志愿者的耐受性、安全性和药代动力学进行评价。总共 41 名受试者(31 名接受活性药物,10 名接受安慰剂)完成了连续 14 天日剂量水平为 5mg/kg、10mg/kg 或 15mg/kg (10 名受试者接受安慰剂)的研究药物。考虑到铁在红细胞生成中的重要性以及在用其他红细胞生成药剂诱导 HbF 方面对补充铁的要求,所有 3 种剂量水平的受试者都在研究药物当日接受口服的葡萄糖酸亚铁。除了一个组(5mg/kg,第 1 组)外,所有组都随食物给予 DMB。在开始给药后将受试者送入病房并观察 24 小时。此后,除研究的最后一天外,在家每天服用一次研究药物。每周监控受试者,持续 6 周。37 名受试者完成了研究,4 名受试者由于冲突而退出。在这些受试者上可获得安全性和 PK 数据。

[0342] 治疗组包括:第 1 组:5mg/kg、禁食,6 名用活性剂,2 名用安慰剂;第 2 组:随食物给予 5mg/kg,7 名用活性剂,2 名用安慰剂(3 名退出);第 3 组:用食品和铁补充物给予 5mg/kg,6 名用活性剂,2 名用安慰剂(1 名退出);第 4 组:随食品和铁补充物给予 10mg/kg,6 名用活性剂,2 名用安慰剂;以及第 5 组:随食品和铁补充物给予 15mg/kg,6 名用活性剂,2 名用安慰剂。第 3、4 和 5 组中的受试者接受单一日剂量的葡萄糖酸亚铁(325mg)。给予铁补充物的目的是评价与铁一起摄取时研究药物的耐受性。没有受试者因 AE 或安全性顾虑而中断。在进餐后最高剂量组(20mg/kg)中,报告事件的受试者少于较低剂量组(2mg/kg、5mg/kg 和 10mg/kg)。

[0343] 安全性观察

[0344] 表 11 描述了这个研究中观察到的 AE。所有事件都被主要研究者评价为轻微,并在研究中或研究后得到解决。没有报告 SAE。两名受试者患有短暂性淋巴结病,但不认为与研究药物有关。除了一名患者产生尿路感染外,没有观察到显著的实验室异常。没有观察到有临床意义的 ECG 异常。

[0345] 表 11:受试者的 AE 发生率(按频率降序排列)

[0346]

不良事件列表	安慰剂 N=10 (n=%)	DMB N=31 (n=%)
头痛	40	23
经期痉挛	10	6
腹泻		6
气胀		6
恶心		6
咽炎		6
疲劳	10	3
腹股沟淋巴结病	10	3
腹痛		3
肘部挫伤		3
胃炎		3
肠胃炎		3
轻度头晕		3
咽部红斑		3
怀孕		3
反流性食管炎		3
食管痉挛		3
晒伤		3
上呼吸道感染		3
尿路感染		3
阴道念珠菌病		3
腹胀	10	
手挫伤	10	
消化不良	10	
呕吐	10	
欣快	10	
足痛	10	
眼内感染	10	
腋窝淋巴结病	10	

[0347] N= 各治疗组中受试者的数目 ;%= 经历 AE 的受试者百分比, AE 用来自 MedRA v10 的优选术语进行编码。

[0348] 对于出现编码为一个优选术语的多个事件的受试者, 仅计算一次。

[0349] 在没有发生 SAE、临床意义的 AE 或需要停用研究药物的 AE 的情况下, 完成了这一研究。最常见的 AE 为轻微头痛, 在安慰剂治疗和 DMB 治疗的受试者中以相同的比率出现。没有观察到剂量限制性毒性。

[0350] 在研究完成之后, 从现场实验室报告了升高的肌酸磷酸激酶(CPK)水平, 该水平在此之前表现正常或没有临床意义。主要研究者(PI)和医院主管都指出, 轻微到中度 CPK 的

升高可能反映了之前的运动,并且在健康受试者群体中常见。在这个研究 HQP 2008-002 中,没有受试者具有相关的肌肉疼痛、客观无力(objective weakness)、晨僵、皮疹、尿色深、肌肉压痛、萎缩或暗示临床肌病过程的肌束震颤(fasciculations)。

[0351] DMB 疗法不大可能与 CPK 的升高有因果关联,这是因为在安慰剂和 DMB 受试者中都观察到了 CPK 升高,在许多受试者中在基线处观察到了 CPK 升高,DMB 给药与 CPK 升高之间没有明确的剂量反应关系,在 CPK 升高的受试者中没有肌病临床发现,主要研究者和医疗监控都报告说升高的 CPK 是 I 期临床试验场所中常见的偶然发现,很可能归因于在此之前受试者的运动,并认为升高的 CPK 值与研究药物暴露没有因果关联。然而,DMB 与升高的 CPK 水平之间的关系不能完全地排除。

[0352] 药代动力学数据和分析

[0353] 个体受试者血浆浓度-时间数据的药代动力学(PK)分析在多剂量研究的第 0 天(首次剂量)和第 13 天(处于稳态)进行。在单一剂量(第 0 天)和重复剂量(第 13 天)的样品中,DMB 药代动力学分析都显示受试者间的变动低、 $C_{\max}$ 和 AUC 线性增加、以及 10mg/kg 和 15mg/kg 剂量的平均 $T_{1/2}$ 为 11 小时。进食条件下的给予显示与禁食情况类似的 AUC,但 $T_{\max}$ 被推迟到 2.5-4.4 小时。PK 数据的分析表明,在 10mg/kg 和 15mg/kg 的剂量水平,血浆药物水平 $>20 \mu\text{g/mL}$ 持续超过 10 小时。

[0354] 在重复剂量临床研究中,示出治疗组第 0 天(图 11)和第 13 天(图 12)的 DMB 平均血浆浓度。基于对个体受试者浓度-时间数据的非房室分析,估计的平均 DMB 血浆 $C_{\max}$ 随剂量线性增加,在第 0 天单次给药(进食受试者)后,5mg/kg、10mg/kg 和 15mg/kg 剂量的 $C_{\max}$ 分别平均为 $16.3 \mu\text{g/mL}$ 、 $30.6 \mu\text{g/mL}$ 和 $48.3 \mu\text{g/mL}$ 。在 $5 \mu\text{g/kg}$ 、 $10 \mu\text{g/kg}$ 和 $15 \mu\text{g/kg}$ 的第 13 天的 $C_{\max}$ 值分别为 $24.8 \mu\text{g/mL}$ 、 $35.7 \mu\text{g/mL}$ 和 $67.6 \mu\text{g/mL}$,上述值在第 13 天比在第 0 天稍高,并且也随剂量线性增加。在随食物给药后,所有剂量水平下的 $T_{\max}$ 在第 0 天和第 13 天平均都为 2.5-4.4 小时。

[0355] AUC 值显示出与 $C_{\max}$ 类似的模式。在 5mg/kg、10mg/kg 和 15mg/kg 时, AUC_{0-24} 随剂量线性增加,在第 0 天给予单一剂量(进食的受试者)后分别平均为 $226\text{h} \cdot \mu\text{g/mL}$ 、 $441\text{h} \cdot \mu\text{g/mL}$ 和 $697\text{h} \cdot \mu\text{g/mL}$ 。在 5mg/kg、10mg/kg 和 15mg/kg 的剂量,第 13 天的 AUC τ 值分别为 $360\text{h} \cdot \mu\text{g/mL}$ 、 $538\text{h} \cdot \mu\text{g/mL}$ 和 $958\text{h} \cdot \mu\text{g/mL}$,比第 0 天的值稍大,并且随剂量线性增加。

[0356] 对于 5mg/kg 剂量,给予铁或不给予铁的平均 $C_{\max}$ 值相似,第 0 天平均为 $16.3 \mu\text{g/mL}$ 和 $17.7 \mu\text{g/mL}$,在第 13 天为 $24.8 \mu\text{g/mL}$ 和 $22.4 \mu\text{g/mL}$ 。在给予铁和不给予铁的情况下, AUC_{0-24} 在第 0 天分别平均为 $226\text{h} \cdot \mu\text{g/mL}$ 和 $241\text{h} \cdot \mu\text{g/mL}$,AUC τ 值分别平均为 $360\text{h} \cdot \mu\text{g/mL}$ 和 $312\text{h} \cdot \mu\text{g/mL}$,表明与铁共同给予不影响 DMB 的 PK 特性。

[0357] 在单一剂量给药后或在多剂量稳态时,食物的存在使 $T_{\max}$ 延迟并稍稍降低了 $C_{\max}$,但对 AUC 没有影响。在进食状态中,铁与 DMB 相伴给予对药物的 PK 特性没有影响。当与铁在进食状态下给予时,在单一剂量和多剂量给药后,DMB 在 5-15mg/kg 的剂量范围都显示线性药代动力学。目标血浆浓度在 10mg/kg 和 15mg/kg 的剂量水平保持超过 10 小时。

[0358] 药代动力学数据和分析

[0359] 将这个研究设计为用于评价 DMB 安全性和 PK,并不提供充分持续时间的给药以完全表征 DMB 的药代动力学。尽管如此,在重复剂量研究中收集的有限的药代动力学数据揭示了绝对网织红细胞在平均基线和峰值之间的变化,该峰值通常在完成研究给药后 2 周

(在第 27 天)出现,与红细胞前体成熟所需要的时间一致,如图 13 所示。在基线和第 27 天,安慰剂组中的平均绝对网织红细胞(10^9 细胞/L)分别为 51 ± 12 和 62 ± 20 ,在统计学上不显著($p=0.19$)。在接受研究药物的受试者中,平均绝对网织红细胞在平均基线值以上平均从 50% 增加到 60%。例如,第 1 组(5mg/kg, 禁食)基线处的平均绝对网织红细胞为 50 ± 12 ,平均峰值网织红细胞为 81 ± 24 , ($p=0.02$);第 4 组(10mg/kg) 中的平均基线网织红细胞为 58 ± 8 ,平均峰值网织红细胞为 84 ± 14 , ($p=0.003$);第 5 组(15mg/kg; 进食) 中的平均基线网织红细胞为 46 ± 11 ,平均峰值水平为 72 ± 11 ,增加 50%($p=0.001$)。在没有溶血作用的情况下绝对网织红细胞的增加表明了 2 周的给药研究中,所有剂量水平下的红细胞生成效应,其为红细胞生成效应的早期指示。

[0360] 实施例 12:中间型地中海贫血患者中的 2 期临床试验

[0361] 随机、双盲、安慰剂对照、多个递增剂量 I/II 期试验在 21 名患有中间型 β 地中海贫血的成人患者中进行,这些患者包括患有 HbE/ β^0 地中海贫血的 14 名泰国患者和患有 β^+/β^0 地中海贫血(包括 12 种不同的 β 珠蛋白基因突变)的 7 名患者。将研究药物以 DMB 单一日剂量服用 8 周,随后最少是 4 周的中断和跟踪期。在前一次给药后,在 4 个剂量水平组中对四个递增的剂量水平(10mg/kg/天、20mg/kg/天、30mg/kg/天、和 40mg/kg/天)顺序地进行评价,由独立非盲的安全监控委员会确定该计划是安全的。

[0362] 所有治疗组都有两名安慰剂患者;第一剂量组中安慰剂患者随机接受第二剂量组中的治疗。10 名泰国患者(均为 HbE 类型)用 10mg/kg (8 活性剂/2 安慰剂)进行治疗,然后,经治疗的 8 名泰国患者随后用 30mg/kg (6 活性剂/2 安慰剂)进行治疗。11 名患者(4 名泰国人,7 名黎巴嫩人)用 20mg/kg 进行治疗,随后用 40mg/kg (9 活性剂 [6 黎巴嫩人/3 泰国人]/2 安慰剂)进行治疗。患者年龄为 17-49 岁,中值年龄为 31 岁,由 16 名女性和 5 名男性组成。

[0363] 表 12: β 地中海贫血临床试验中招收的患者的特征

	安慰剂 (n=8)	10mg/kg (n=8)	20mg/kg (n=9)	30mg/kg (n=6)	40mg/kg (n=9)
性别					
男性	2(25%)	1(13%)	2(22%)	2(33)	2(22)
女性	6(75%)	7(87%)	7(78%)	4(67)	7(78)
年龄					
中值	31	34	24	30	32
范围	17-49	20-45	20-35	17-35	21-49
基线 HbF(%)					
中值	29.7	31.5	32.1	38.9	25.9
范围	13.2-52.7	9.0-53.7	9.5-87.6	21.9-47.8	15.7-92.7
基线 Hb(g/dL)					
中值	6.6	7.7	7.2	8.7	6.1
范围	5.5-9.6	6.0-9.6	5.6-9.2	5.8-9.9	5.3-9.2
地区					
泰国	6(75%)	8(100%)	3(33.3%)	6(100%)	3(33.3%)
黎巴嫩	2(25%)	0(0%)	6(66.7%)	0(0%)	6(66.7%)

[0365] 在实验室研究、身体检查和不良事件方面每 2 周对患者进行监控。另外,随后对患者进行血液学参数监控,主要是集中于血红蛋白和胎儿血红蛋白(HbF)。此外,在第 0 天和第 13 天给药前和给药后第 2、4、6、8、12 和 24 小时,获取药代动力学样品。在各个部位采用标准血液学设备测量血红蛋白。使用 Varian HPLC 测量 HbF。DMB 耐受良好。所治疗的受试者中的不良事件包括头痛、上呼吸道感染、发热、疲劳、恶心和眩晕,但上述的事件的比率与在安慰剂治疗的受试者中观察到的比率没有明显不同。在这个研究中,在不良事件方面没有观察到的剂量反应。

[0366] 表 13 :β 地中海贫血临床试验中不良事件(在汇总后的 DMB 治疗受试者中大于 15% 的发生率)的总结

[0367]	事件	安慰剂 n (%)	10mg/kg n (%)	20mg/kg n (%)	30mg/kg n (%)	40mg/kg n (%)
	头痛	2 (25)	5 (63)	3 (33)	2 (33)	1 (11)
	上呼吸道感染	3 (38)	5 (63)	2 (22)	1 (17)	1 (11)
	发热	2 (25)	3 (38)	0	2 (33)	1 (11)
	疲劳	1 (13)	1 (13)	0	0	4 (44)
	恶心	0	0	2 (22)	0	3 (33)
	眩晕	0	2 (25)	2 (22)	0	1 (11)

[0368] 总共 5 名受试者经历了 5 种严重不良事件(SAE)。认为所有 SAE 不大可能与研究药物有关、或与研究药物无关。三名受试者经历了导致研究药物停用的不良事件。两名接受 10mg/kg DMB 的受试者由于贫血停用研究药物 ;认为这两名受试者与研究药物无关。

[0369] 表 14 :严重不良事件的总结

[0370]	事件	安慰剂 n (%)	HQK-1001 n (%)	是否与治疗相关
	心悸	0	1 (13) 10mg/kg	与治疗无关
	耻骨痛	0	1 (11) 20mg/kg	不大可能与治疗有关
	胃炎	0	1 (11) 40mg/kg	与治疗无关
	肠胃炎	1 (13)	0	与治疗无关
	上呼吸道感染	1 (13)	0	与治疗无关

[0371] 在第 55 天,与在安慰剂组所见到的最小变化相比,在所有 4 个 DMB 剂量组中都观察到 HbF 的中等程度增加。HbF 最大增加时的剂量水平为 20mg/kg 的组(图 14)。对于绝对胎儿血红蛋白的变化,观察到类似的趋势(图 15)。总血红蛋白从基线到第 55 天的中等程度变化表明,总血红蛋白在包括安慰剂组在内的所有组中都降低,但总血红蛋白在一些患者中增加,这些患者例如 :在 20mg/kg 组 9 名患者中的 2 名,包括 6 名患有 β 地中海贫血突变而没有 HbE 的黎巴嫩患者中的 2 名(图 16)。

[0372] 使用稳态浓度 - 时间数据对第 13 天进行非房室 PK 分析。在所研究的剂量范围内,通过 AUC 测量的总暴露中与剂量成比例增加的范围为 579-2110h*μ g/mL。最大浓度(C_{max})随剂量增加而增加,在 10-40mg/kg 剂量范围内平均浓度范围为 41. 2-154μ g/mL。达到峰值血浆浓度的时间(T_{max})为 2. 5-3. 1 小时,而 DMB 钠的终末半衰期(T_{1/2})由 10mg/kg 剂量组的 12. 1 小时降低到 40mg/kg 剂量组的 10. 3 小时(图 17)。

[0373] 在特定情况下,400–600 μ M 的 DMB 浓度相当于约 55–80 μ g/mL 的血浆浓度,该浓度以约 20mg/kg 的剂量实现。给予 30mg/kg 或 40mg/kg 实现约 120–140 μ g/mL 的峰值浓度,等同于约 1000 μ M。

[0374] 来自此临床试验的观察结果表明,DMB 在与对 HbF 有利的初始药效学作用有关的剂量时具有良好的耐受性。这些剂量低于最大耐受剂量。

[0375] 实施例 13:镰状细胞病患者中的 2 期临床试验

[0376] 随机、盲法剂量范围 1/2 期临床试验在 24 名镰状细胞病(包括 HbSS 或 S/ β 地中海贫血)美国人和牙买加成人患者中完成。每天给予 DMB 一次,持续进行以六周为一个循环的每日疗法,在两个循环之间有 2 周治疗中断,然后最后 4 周不进行治疗。顺序地研究三个剂量水平(10mg/kg/天、20mg/kg/天、30mg/kg/天)。24 名受试者中 4 名用安慰剂治疗,有 21 名受试者可以进行评价。在研究中,对患者进行随机安排,使 10mg/kg 有 7 名患者(5 活性剂/2 安慰剂)、20mg/kg 有 6 名患者(5 活性剂/1 安慰剂),30mg/kg 有 9 名患者(7 活性剂/1 安慰剂)。患者年龄在 14 岁到 56 岁,中值年龄为 31 岁,这些患者由 10 名女性和 15 名男性组成。随后评价患者的血液学参数,集中于胎儿血红蛋白(HbF)。通过具有 Synchropak CM-300 柱的 Waters Empower 32HPLC 系统测定 HbF。

[0377] DMB 耐受良好,没有与药物有关的显著的不良事件。在这个研究中,对于不良事件没有观察到剂量反应。

[0378] 在第 97 天,与安慰剂组中 HbF 百分比降低相比,在所有 3 个 DMB 剂量组中都观察到了 HbF 百分比的中等程度增加,如图 18 所示。HbF 最大增加的剂量水平为 30mg/kg 组。随着剂量由 10mg/kg 增加到 20mg/kg 以及到 30mg/kg,初步数据表明更高数量级效果的趋势。与安慰剂组中绝对 HbF 较低增加相比,于第 97 天在所有三个 DMB 剂量组中还观察到了绝对 HbF 的中等程度增加,如图 19 所示。此外,如图 20 所示,与安慰剂组中总 Hgb 降低相比,于第 97 天在所有三个 DMB 剂量组中都观察到了总 Hgb 的中等程度增加。类似于在 HbF 方面所见到的效应,总 Hgb 最大增加时的剂量水平为 30mg/kg 组。随着剂量由 10mg/kg 增加到 20mg/kg 以及到 30mg/kg,在 Hgb 增加方面观察到了与 HbF 增加所观察到的趋势相类似的趋势,但数量级更高。

[0379] 在某些情况下,总血红蛋白增加是对刺激红细胞生成和/或镰状血细胞较长时间存活的指示。乳酸脱氢酶(LDH)在接受 30mg/kg 剂量的 5 名相应受试者的 4 名中下降,LDH 是组织分解的标志物,这是由于 LDH 在红细胞中很丰富并能起到作为溶血作用标志物的作用。

[0380] 在整个研究期间,用 10mg/kg 剂量治疗的患者中的胎儿珠蛋白 mRNA 相对于受试者基线增加 4–9 倍,并且在给药期结束时仍在增加,表明 HbF 表达尚未达到峰值(图 21)。在安慰剂治疗的患者中没有观察到胎儿珠蛋白 mRNA 如此大量的增加。其他的胎儿珠蛋白诱导药剂(例如羟基脲)需要以接近最大耐受剂量的水平治疗 6–9 个月来实现对 HbF 的最佳效果。

[0381] 在一些情况下,F-细胞百分比以及胎儿血红蛋白百分比在整个治疗期间都增加。此外,在治疗后(在第 97 天之后),一些受试者体内的 F-细胞和胎儿血红蛋白的百分比继续增加(图 22)。

[0382] 虽然本发明的最优实施方式已经在本文示出并进行了描述,但对于本领域技术人

员而言是显而易见的是,上述实施方式仅通过举例的方式提供。在不背离本发明的情况下,本领域技术人员现在会想到许多变形、变化和替换。应理解的是,对本文描述的本发明所述实施方式的各种替换可用于对本发明进行实践。所附权利要求意在限定本发明的范围,并意在覆盖这些权利要求范围内的方法和结构以及它们的等同物。

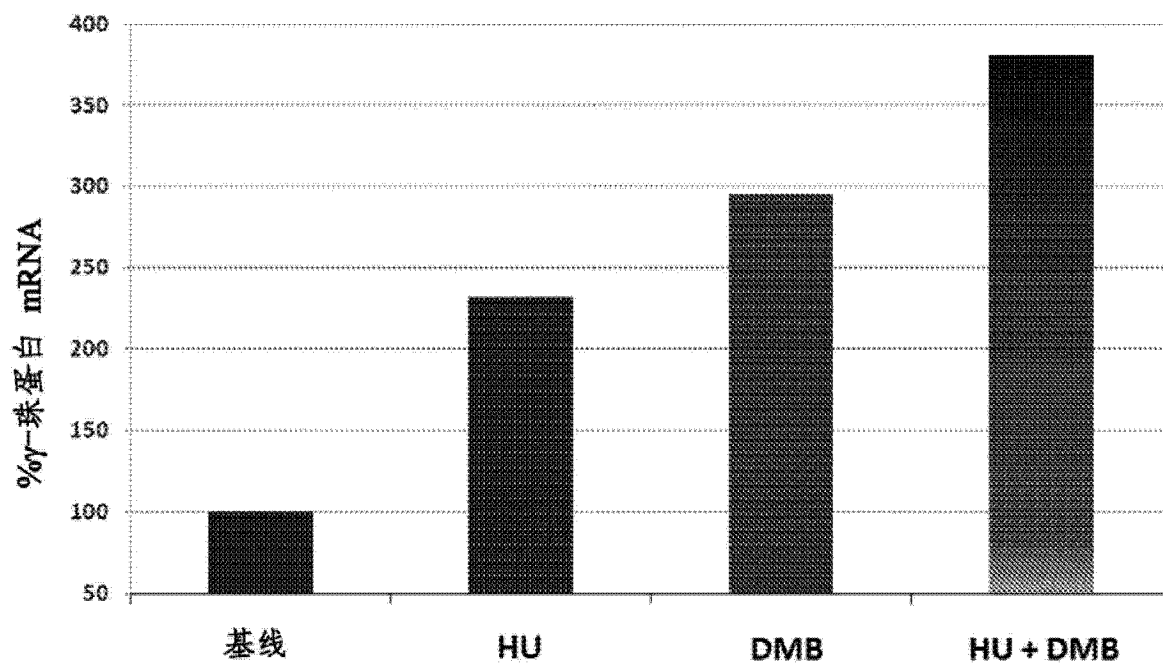


图 1

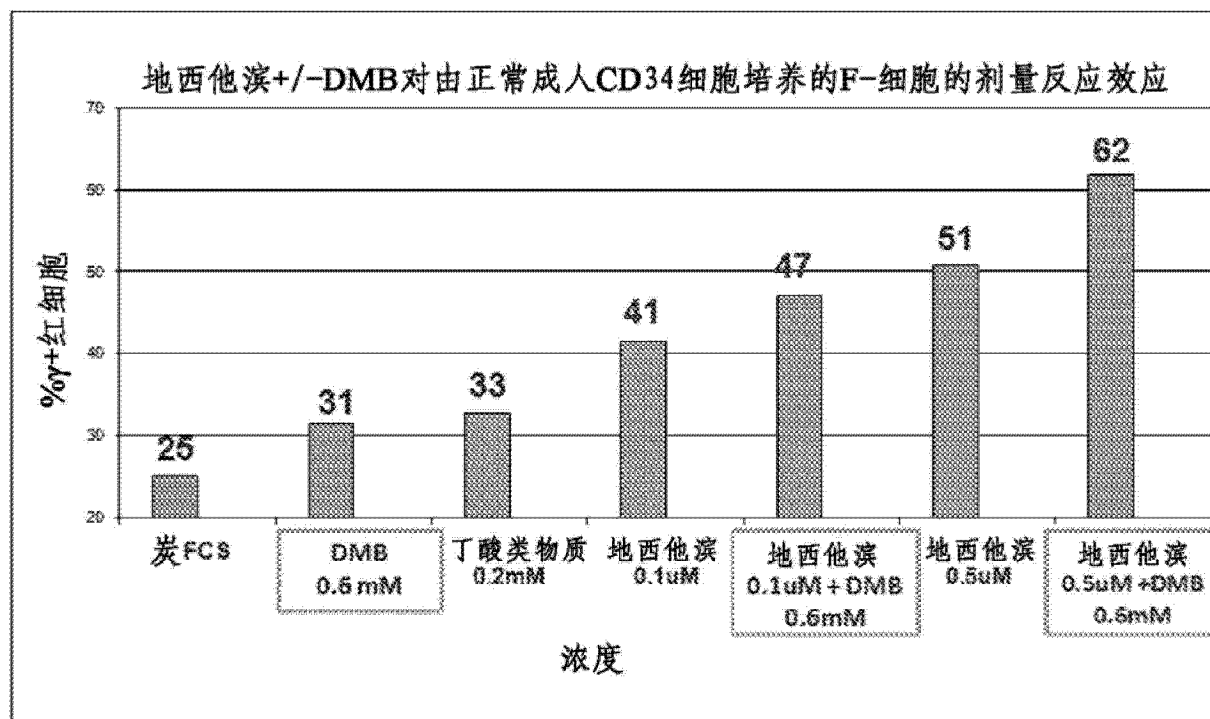


图 2

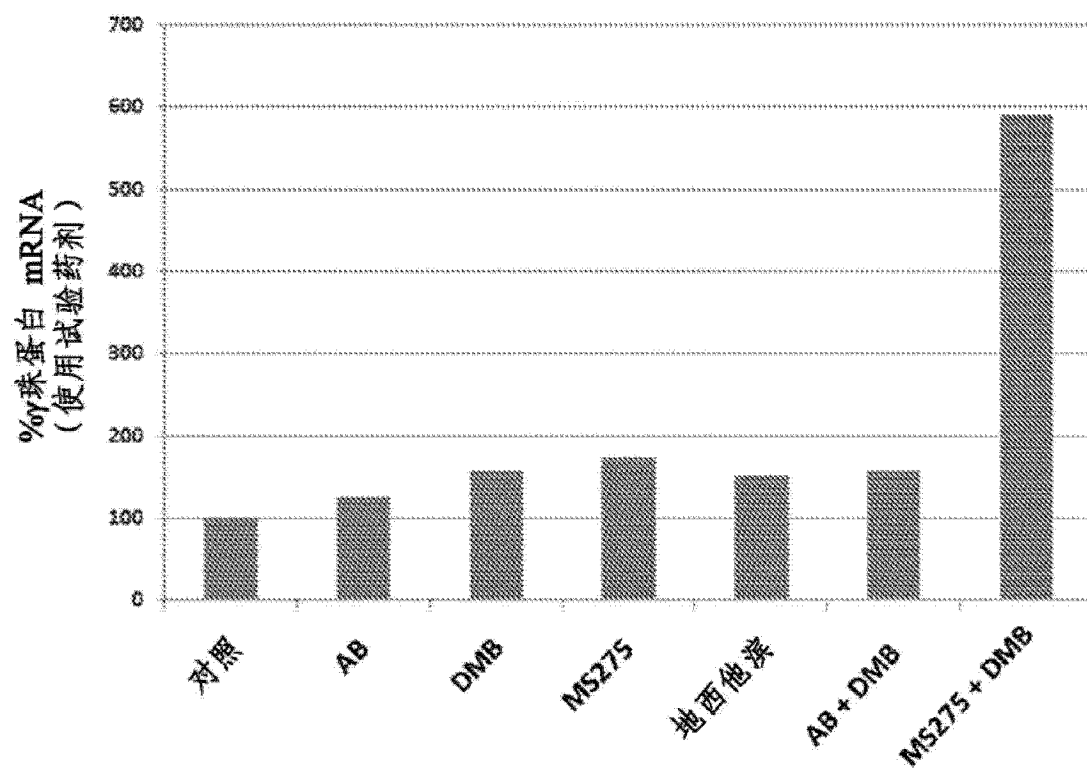


图 3

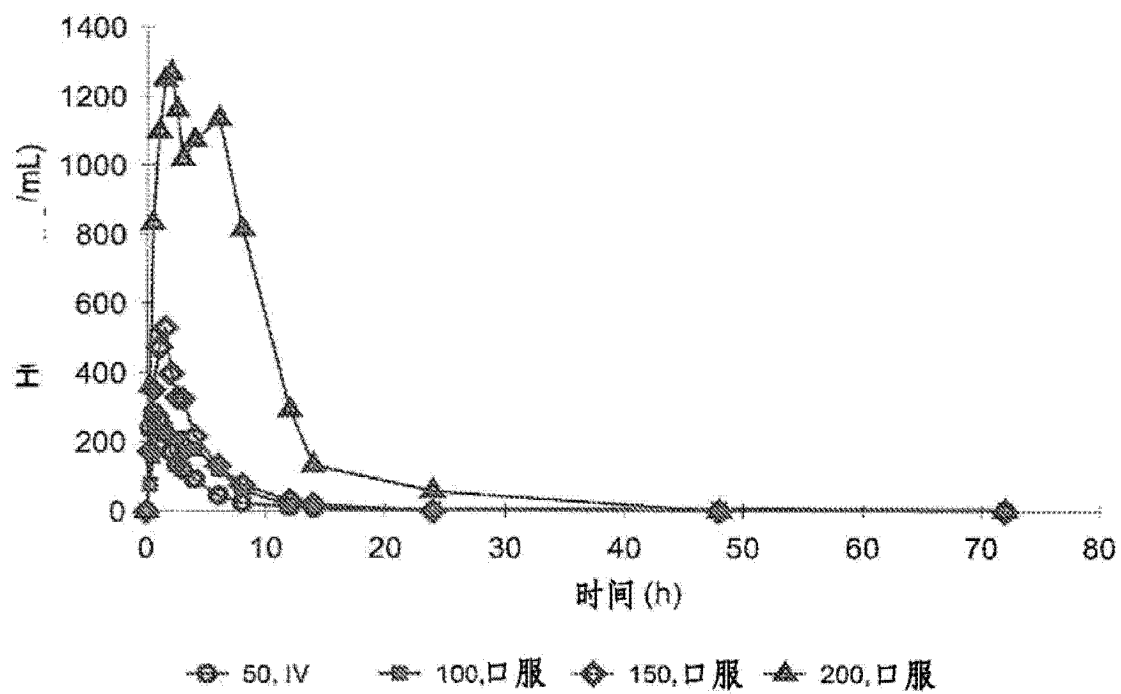


图 4

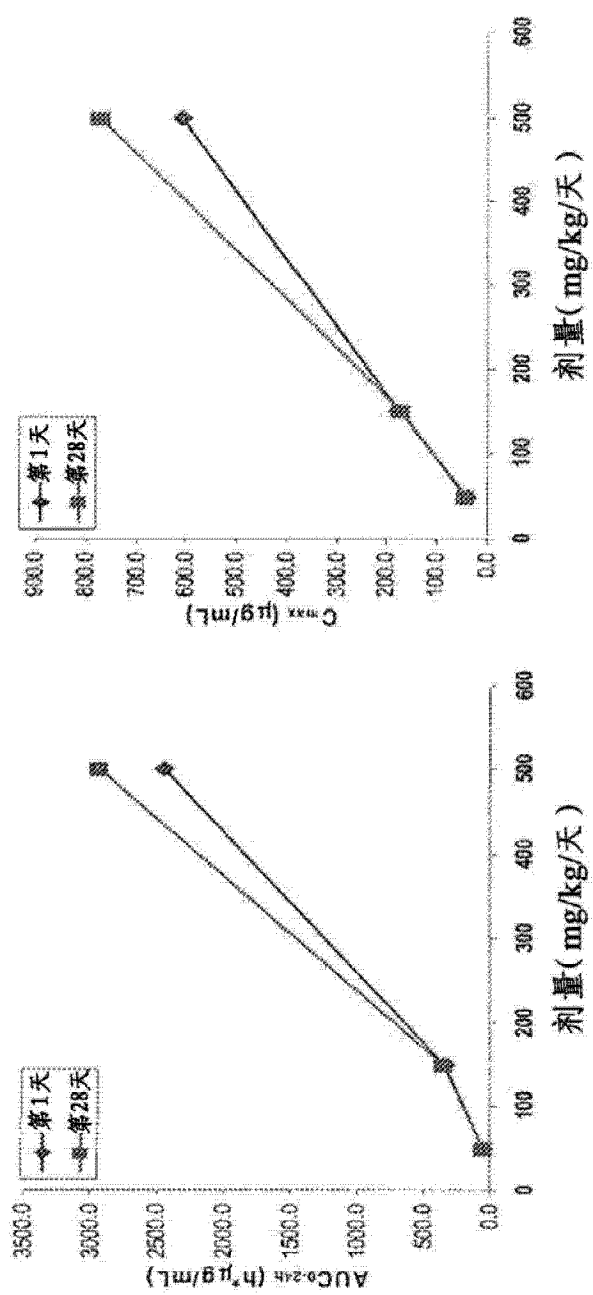


图 5

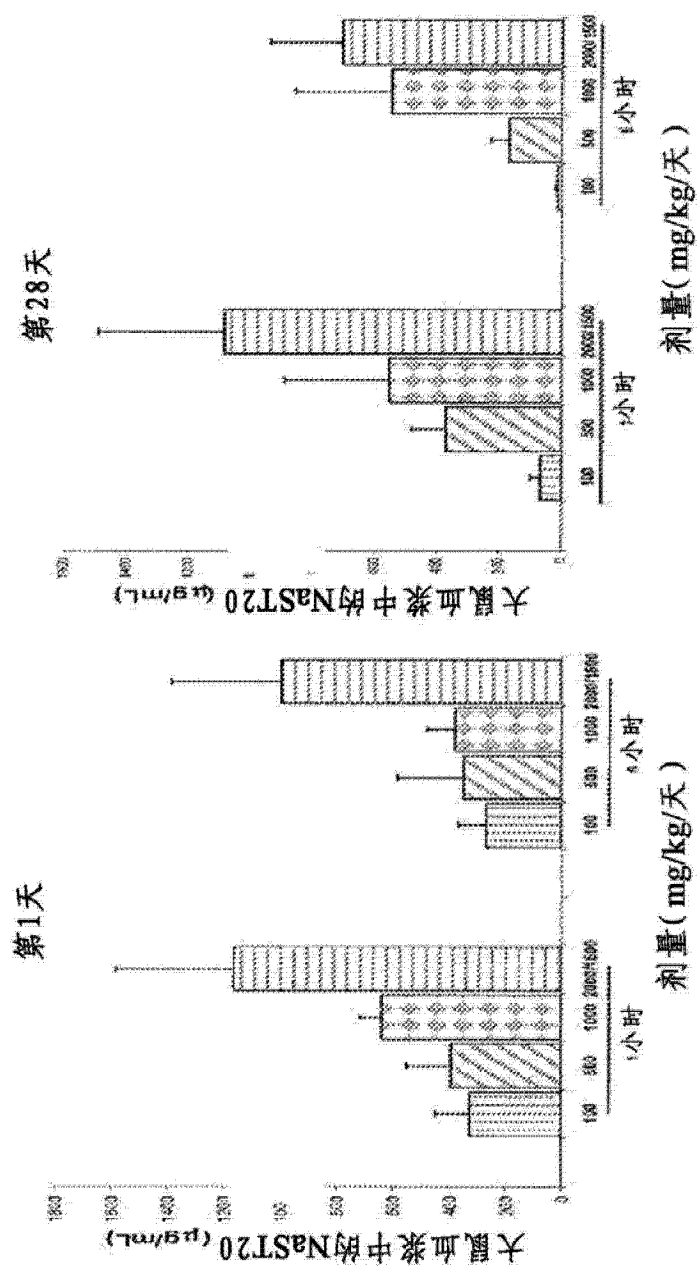


图 6

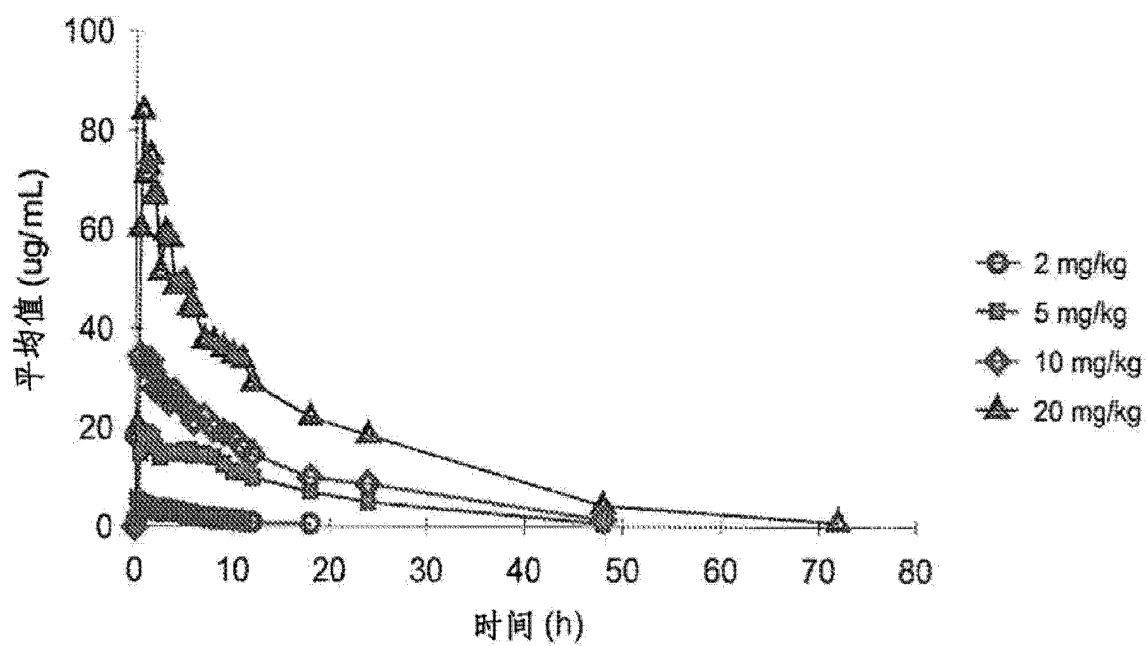


图 7

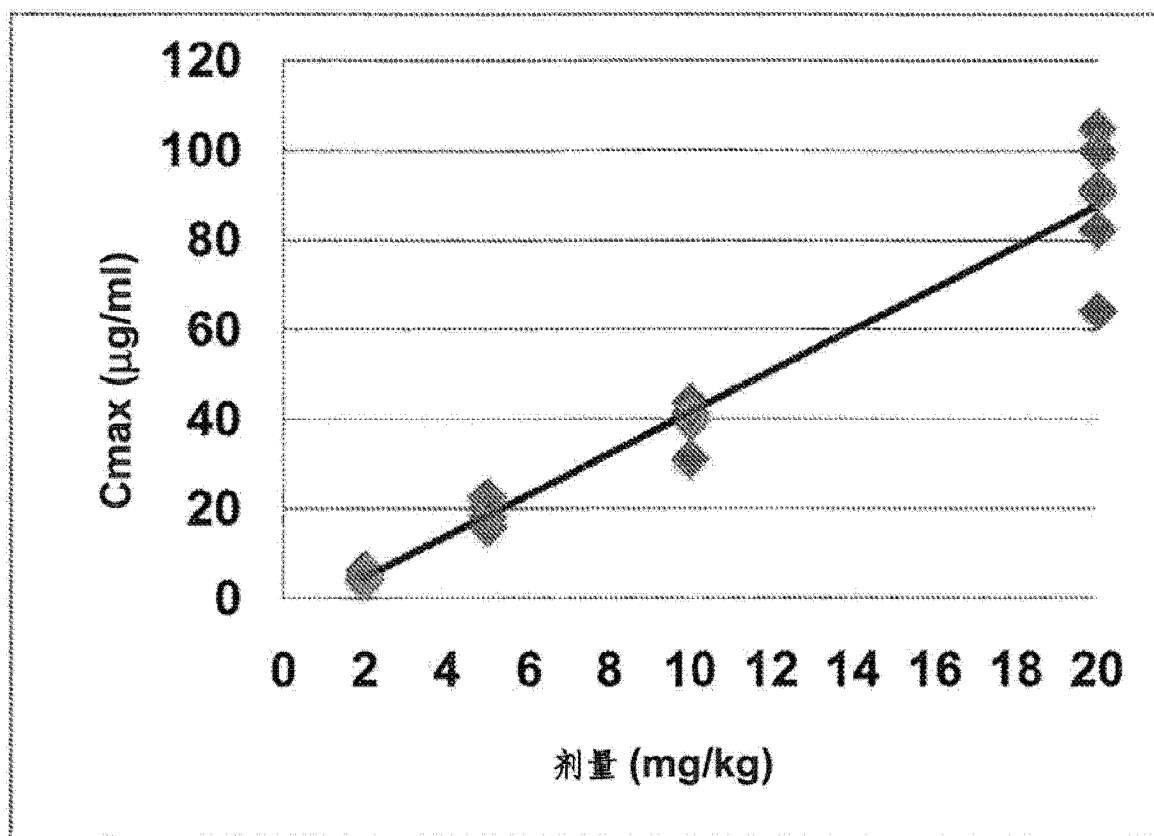


图 8

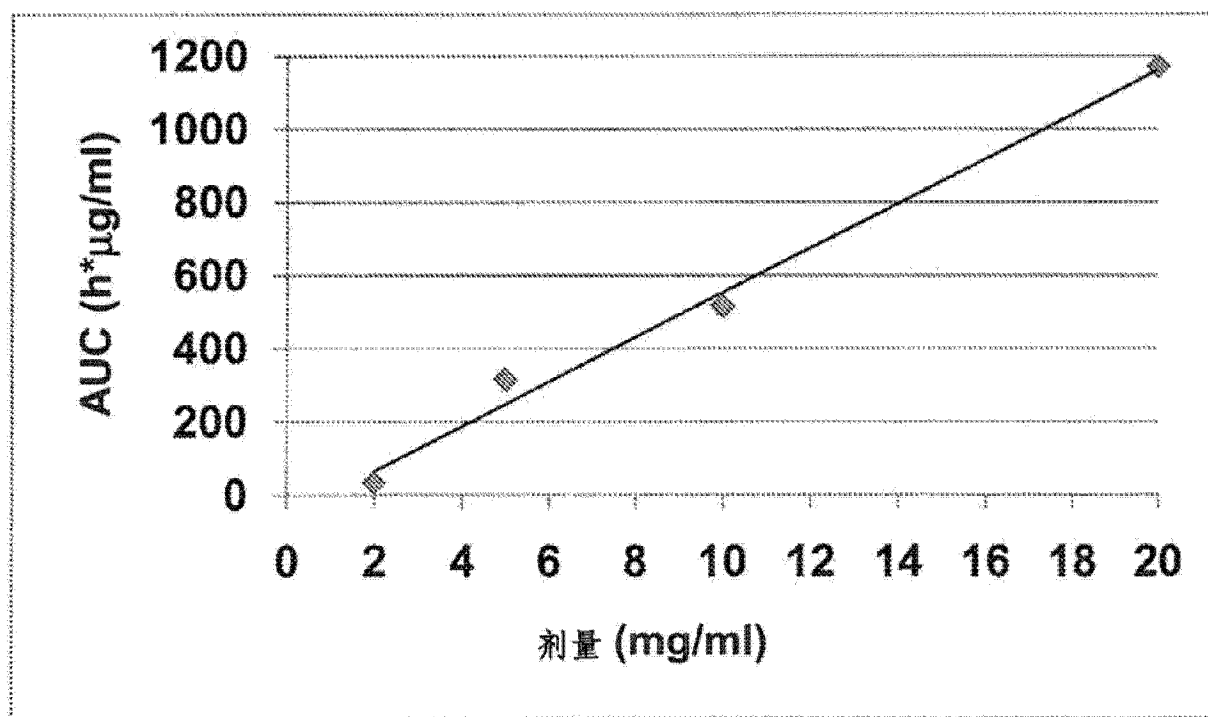


图 9

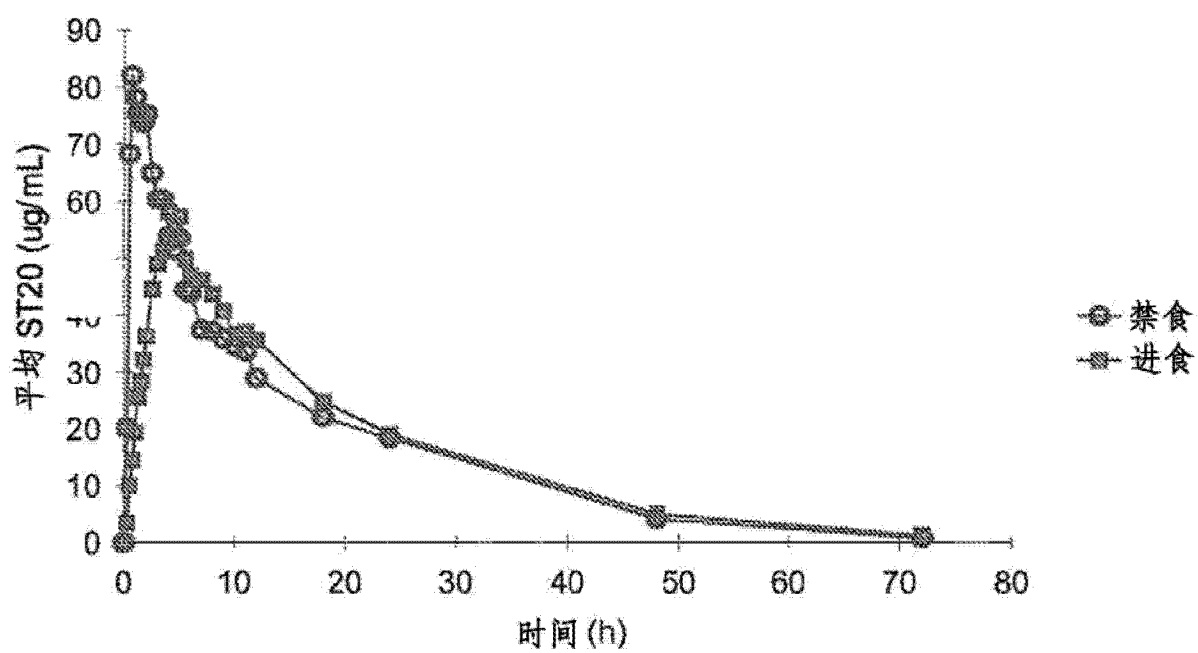


图 10

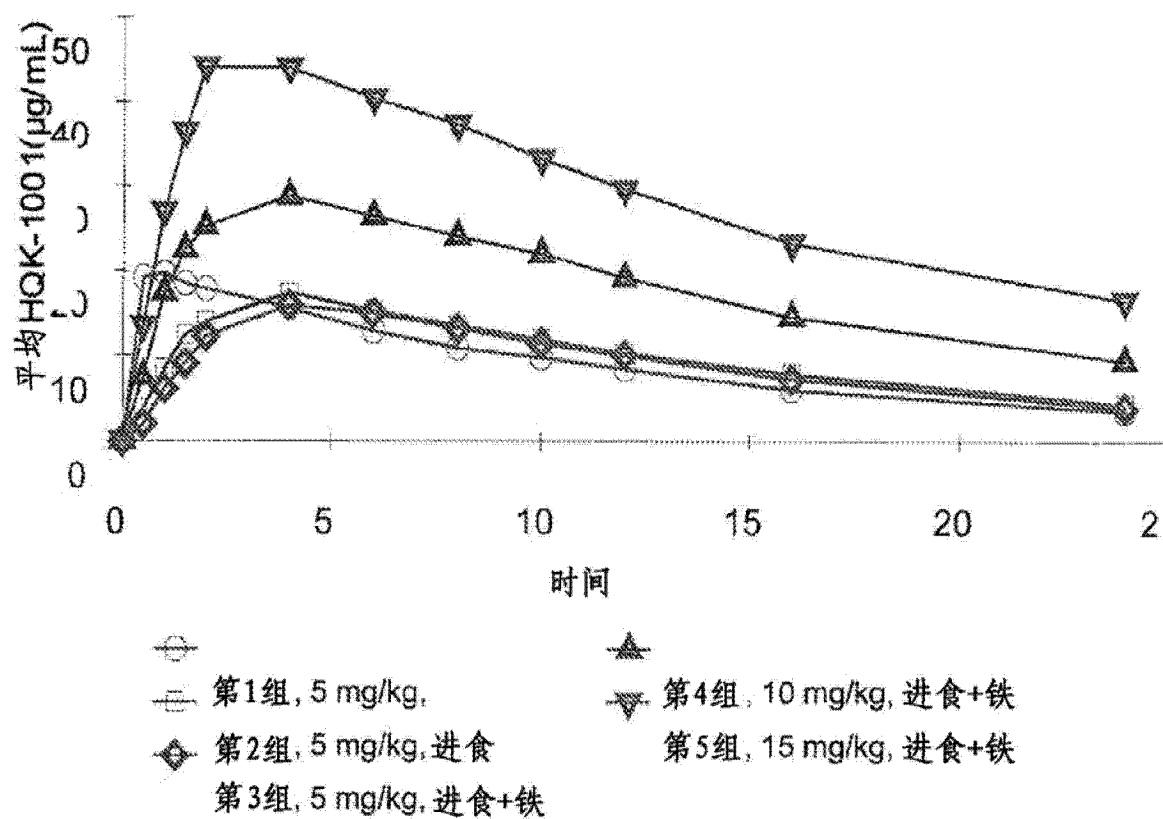


图 11

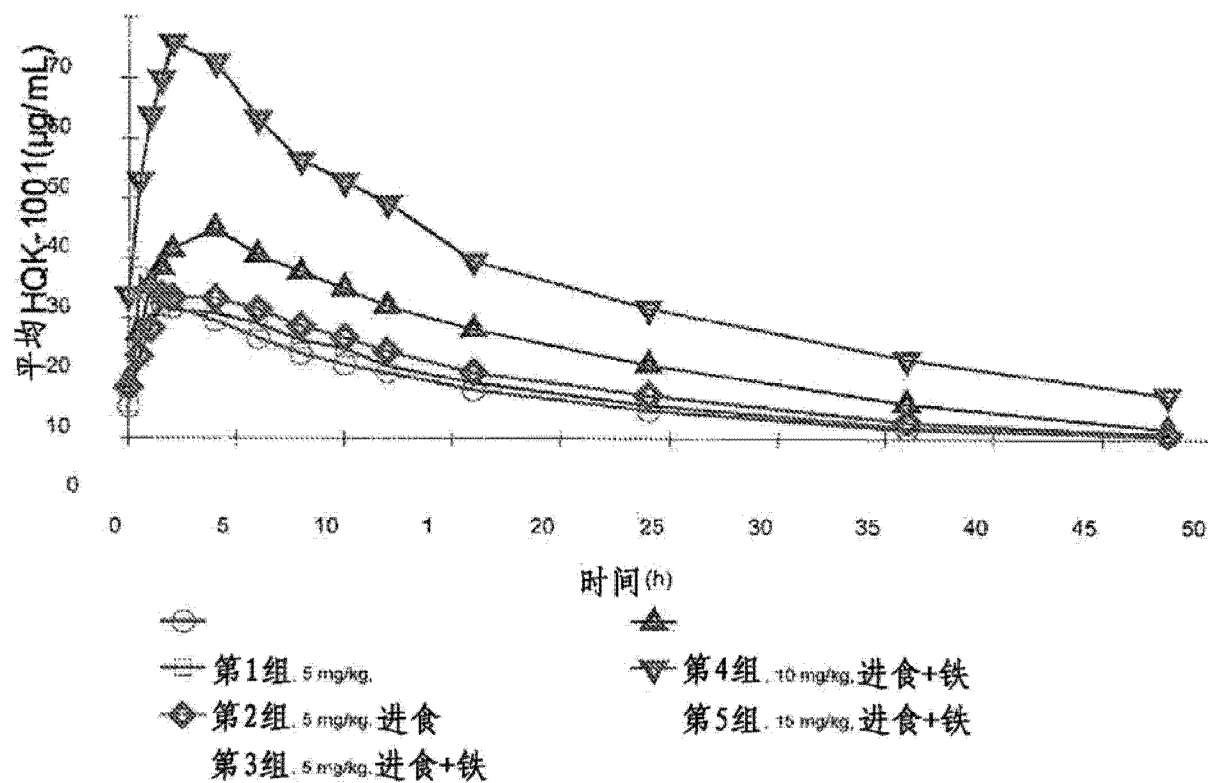


图 12

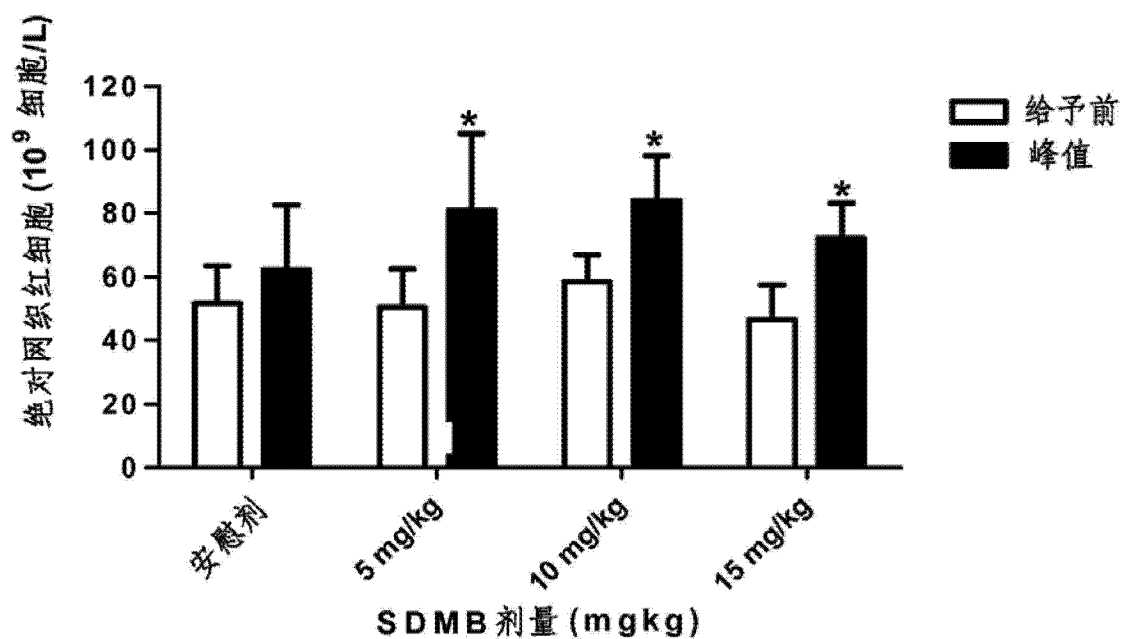


图 13

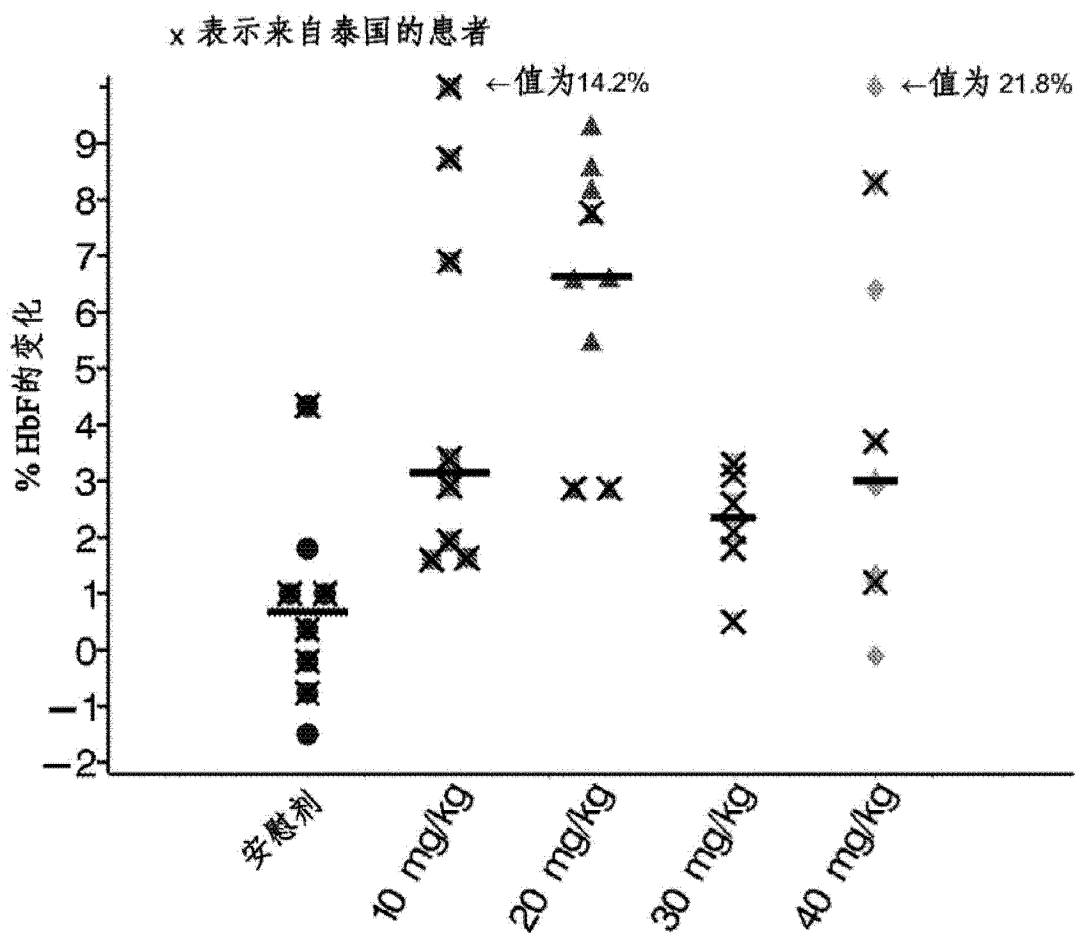


图 14

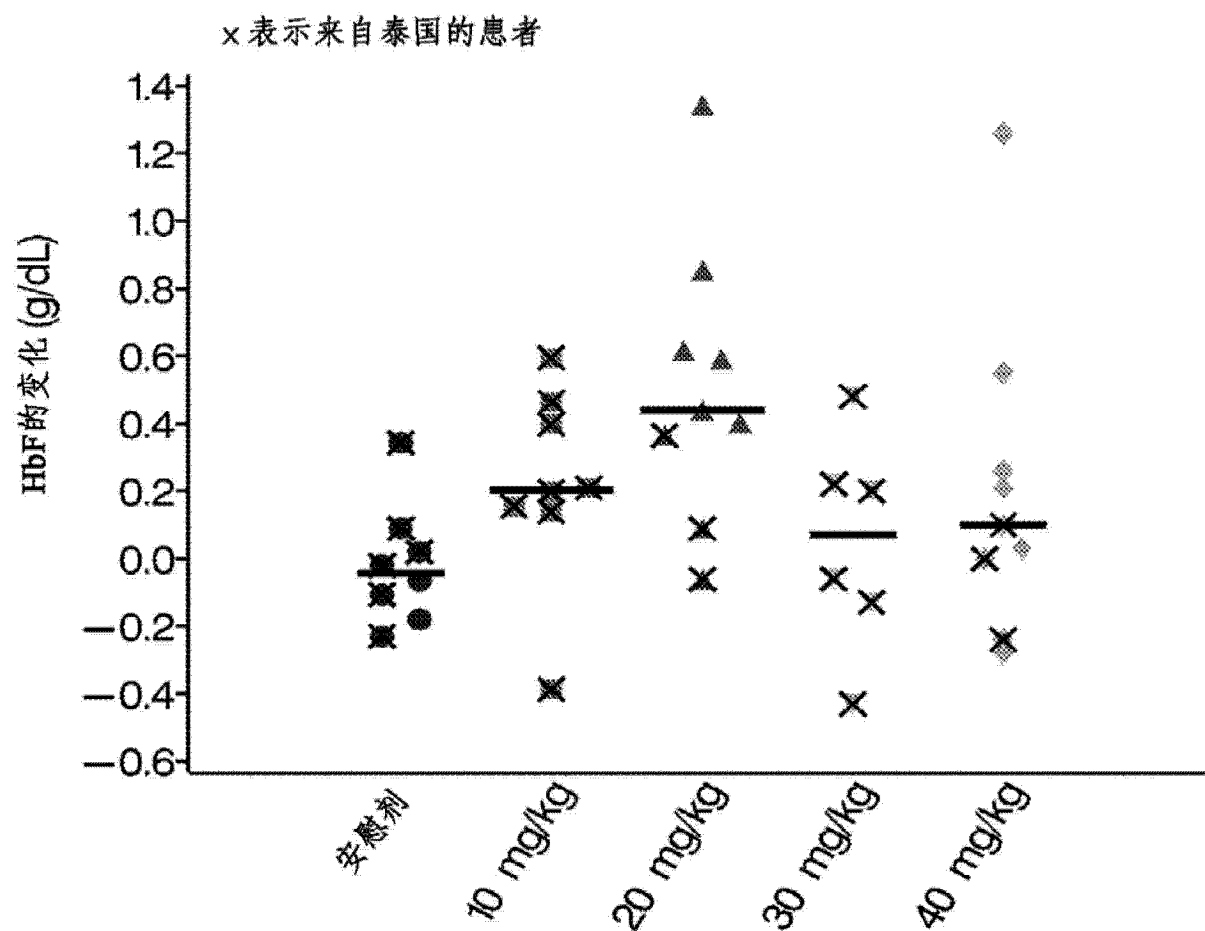


图 15

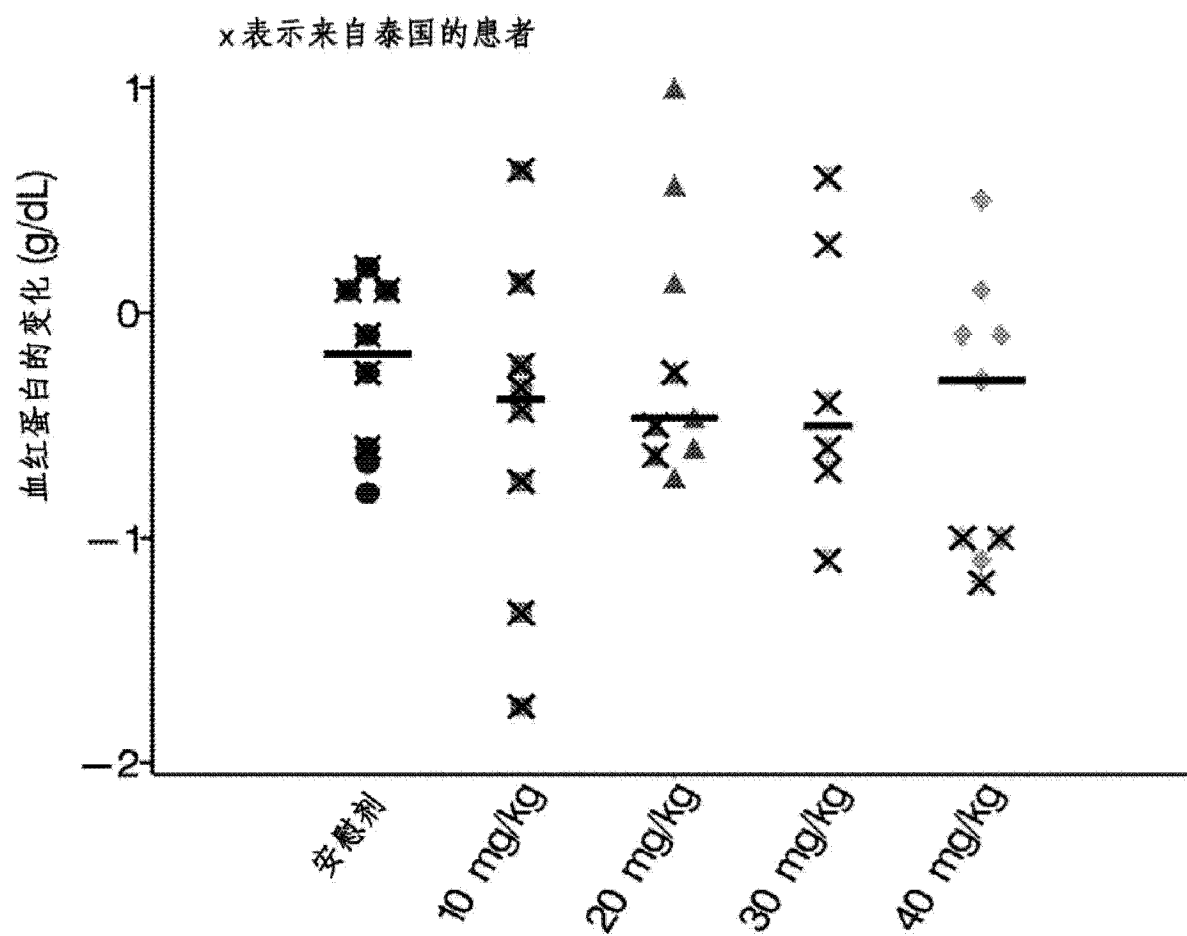


图 16

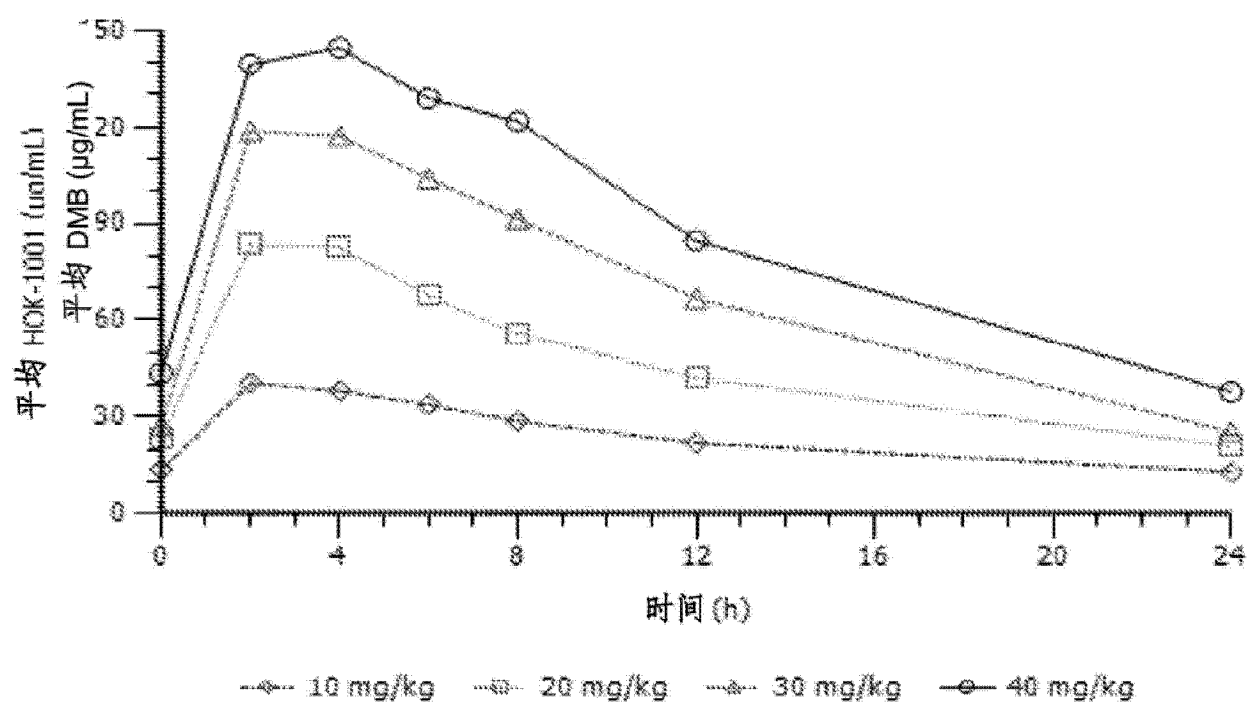


图 17

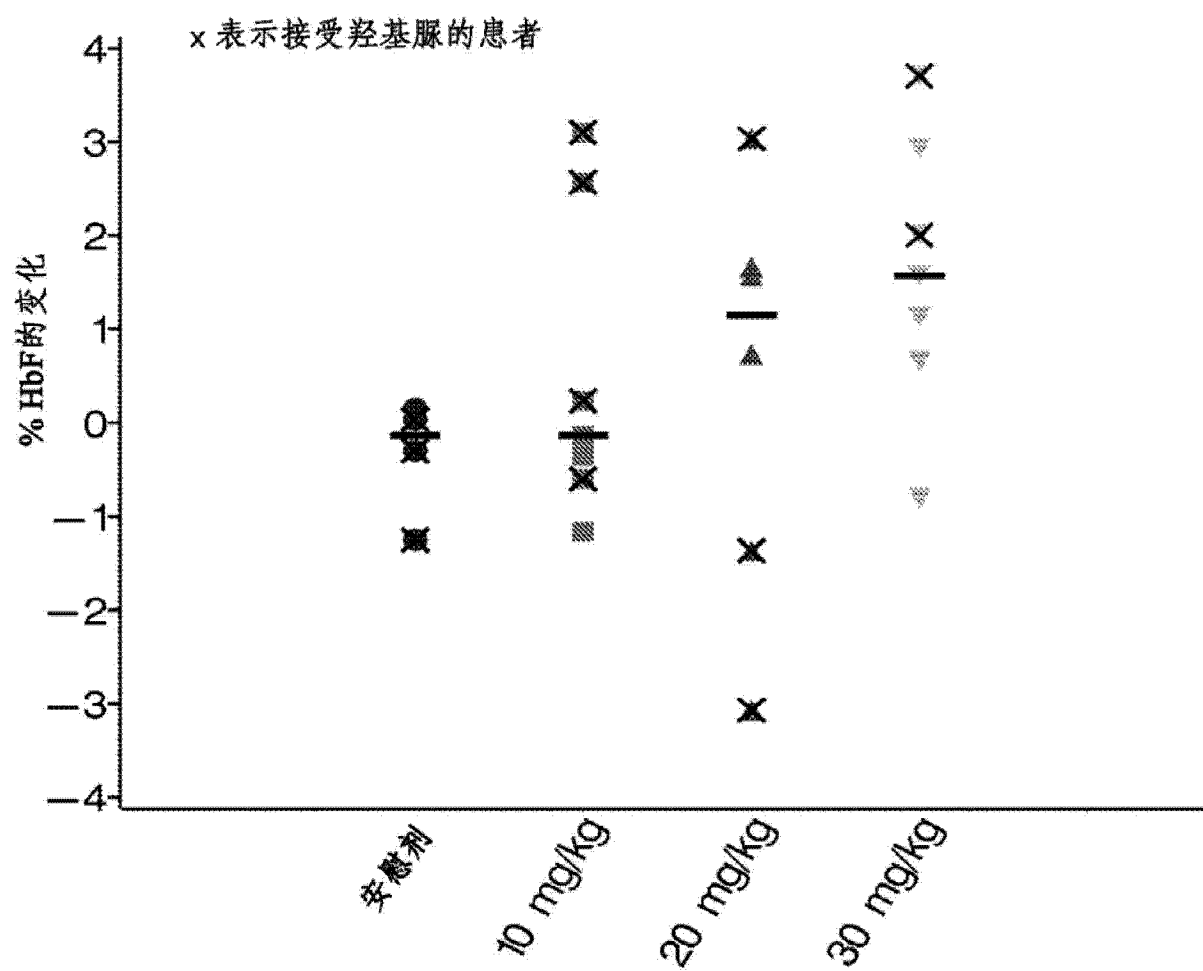


图 18

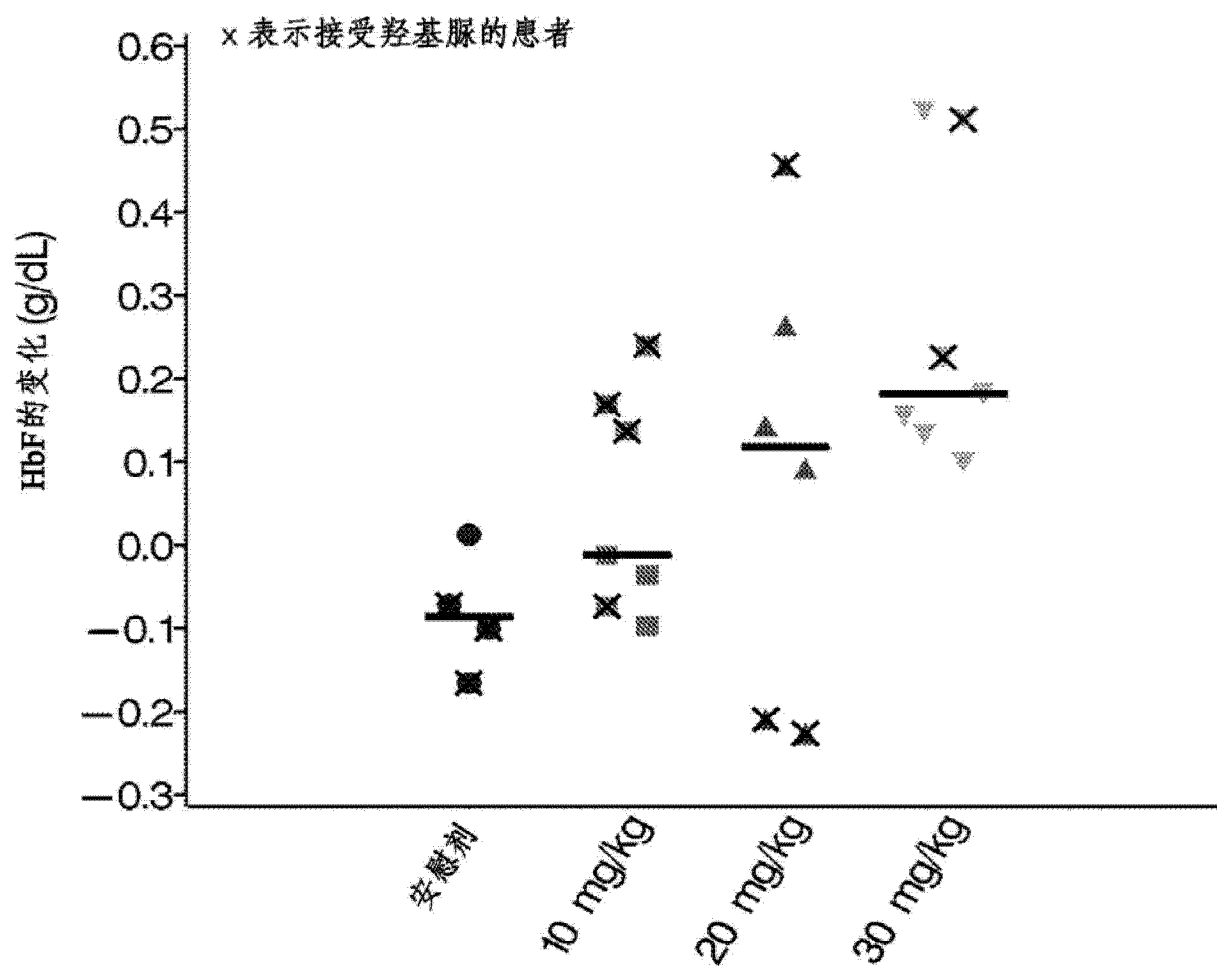


图 19

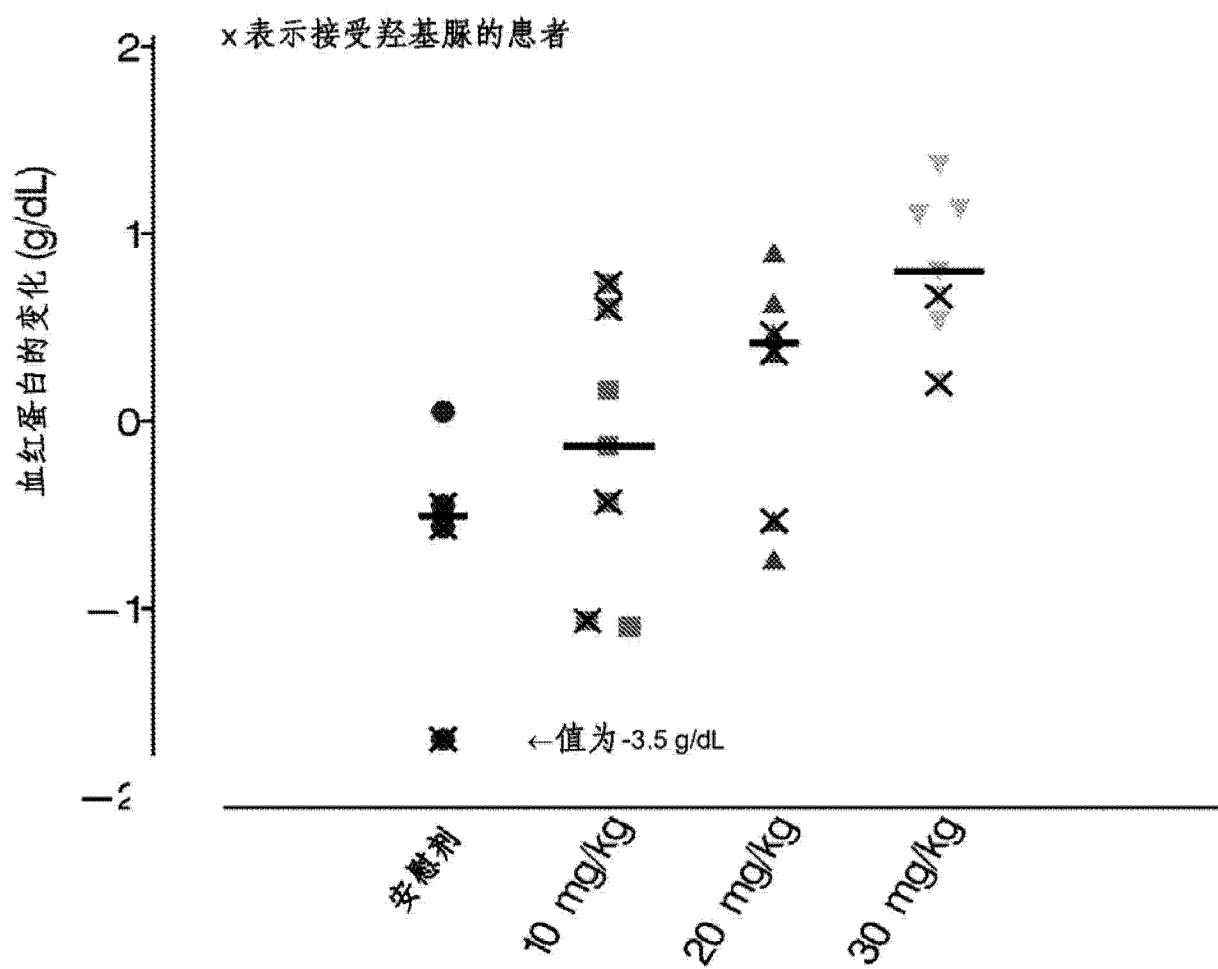


图 20

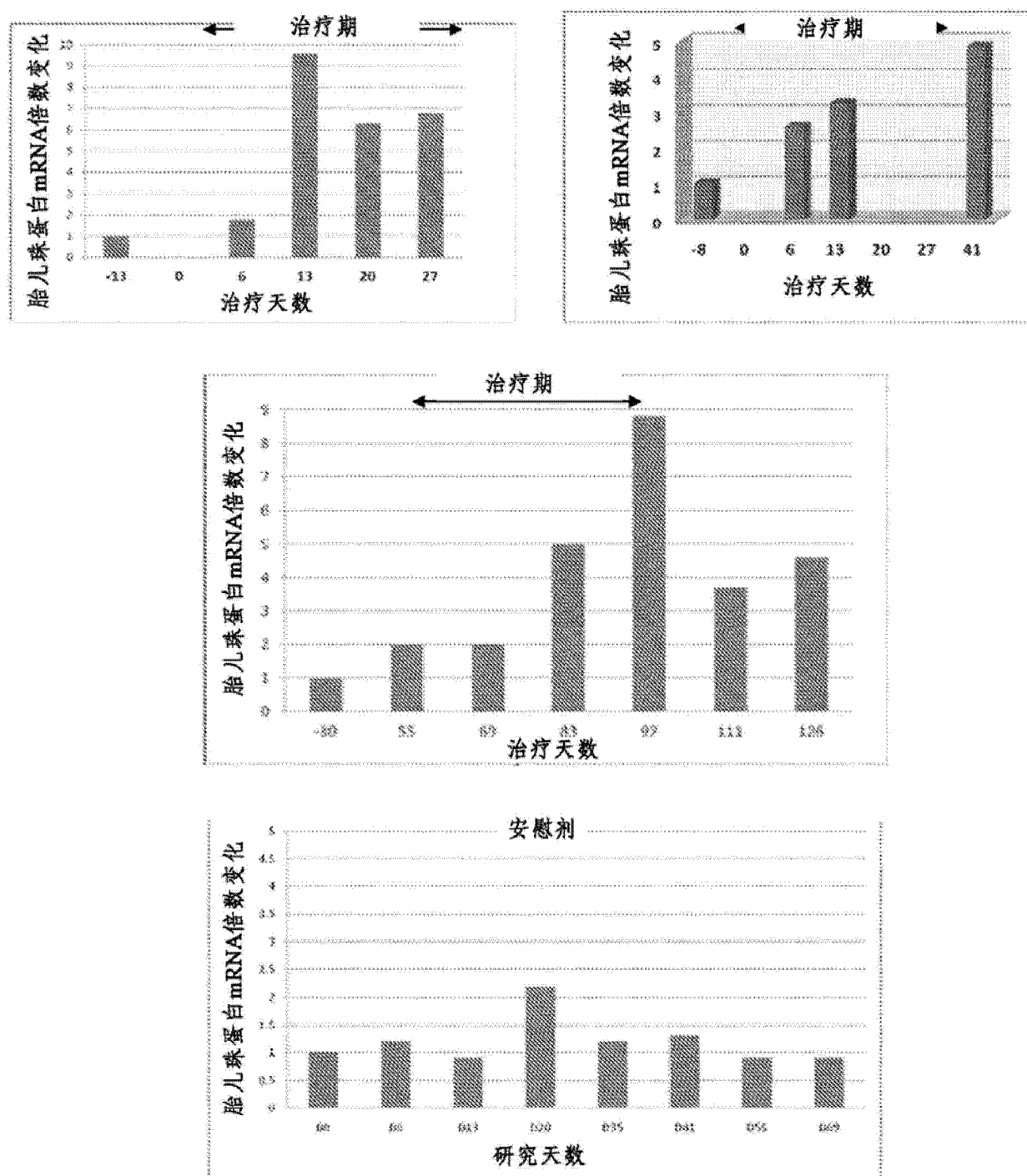


图 21

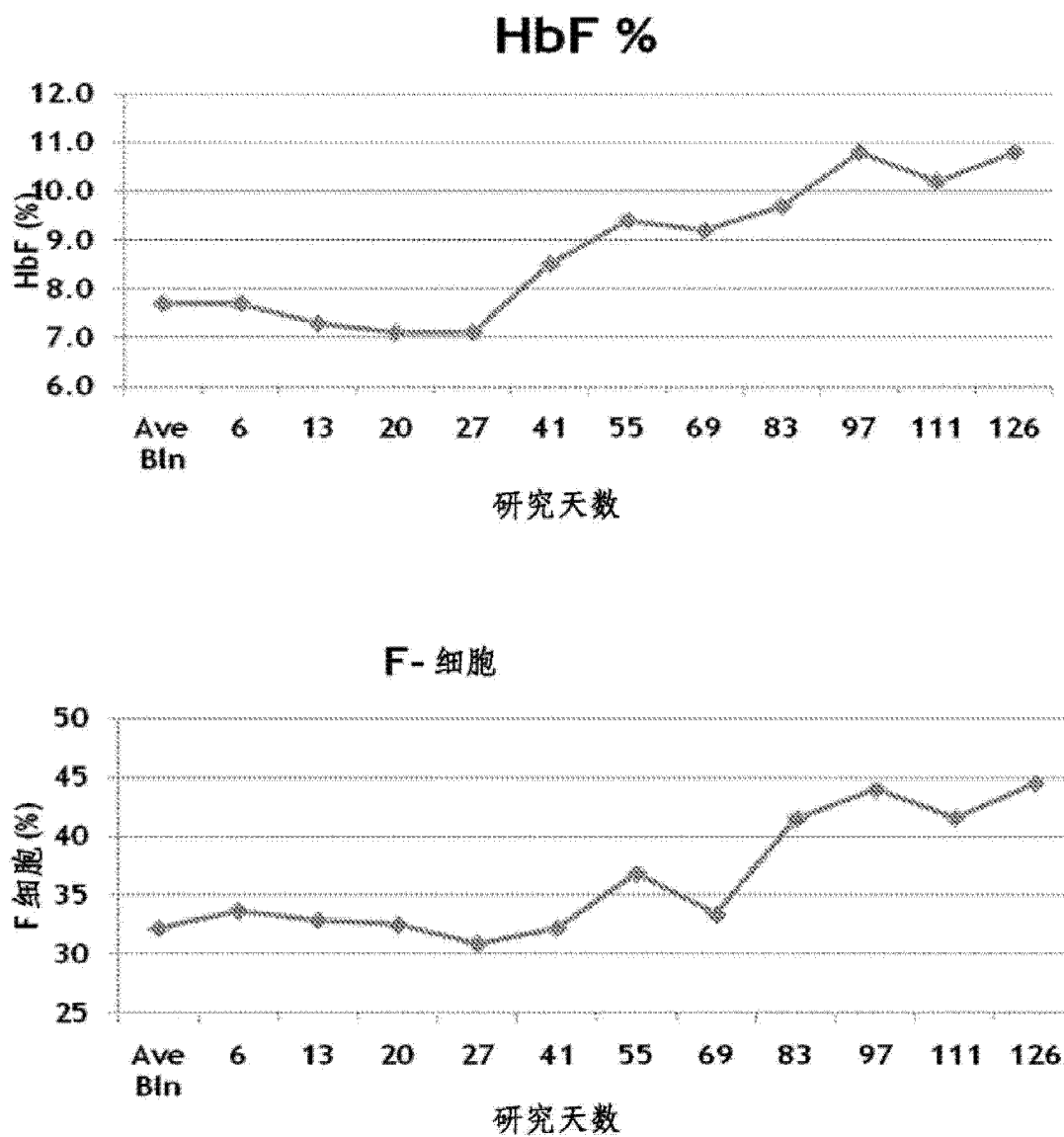


图 22