



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104204226 A

(43) 申请公布日 2014. 12. 10

(21) 申请号 201380017091. 3

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2013. 01. 31

C12Q 1/68 (2006. 01)

(30) 优先权数据

61/592, 893 2012. 01. 31 US

61/654, 733 2012. 06. 01 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014. 09. 26

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2013/051865 2013. 01. 31

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/113796 EN 2013. 08. 08

(71) 申请人 史密斯克莱·比奇曼(科克)有限公司

地址 爱尔兰科克郡

(72) 发明人 C. F. 斯普拉格斯

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所
11105

代理人 曹立莉

权利要求书3页 说明书30页 附图7页

(54) 发明名称

治疗癌症的方法

(57) 摘要

提供了在有此需要的患者中治疗癌症的方法, 其包括: 确定所述患者是否具有 VEGFA(rs3025039, VEGFA 936C>T)、VEGFR(rs1870377, Q472H, VEGFR218487A>T, 1416A>T) 或 IGF1R(rs2037448, 229741A>G 或 rs7181022, 28322C>T) 中的至少一种多态性; 且如果所述患者具有至少一种多态性, 则向该患者给药 HER2 抑制剂。

1. 一种向有此需要的患者给药 HER2 抑制剂的方法,其包括:

确定所述患者在 VEGFA 中的 rs3025039 参考单核苷酸多态性处是否具有 936C>T 基因型;且

如果所述患者在 VEGFA 中的 rs3025039 参考单核苷酸多态性处具有 936C>T 基因型,则向所述患者给药 HER2 抑制剂。

2. 一种对有此需要的患者开处方 HER2 抑制剂的方法,其包括:

确定所述患者在 VEGFA 中的 rs3025039 参考单核苷酸多态性处是否具有 936C>T 基因型;且

如果所述患者在 VEGFA 中的 rs3025039 参考单核苷酸多态性处具有 936C>T 基因型,则向所述患者开处方 HER2 抑制剂。

3. 一种在有此需要的患者中治疗癌症的方法,其包括:

确定所述患者在 VEGFA 中的 rs3025039 参考单核苷酸多态性处是否具有 936C>T 基因型;且

如果所述患者在 VEGFA 中的 rs3025039 参考单核苷酸多态性处具有 936C>T 基因型,则向所述患者给药 HER2 抑制剂。

4. 一种在有此需要的患者中治疗癌症的方法,其包括:向所述患者给药 HER2 抑制剂;然后确定所述患者在 VEGFA 中的 rs3025039 参考单核苷酸多态性处是否具有 936C>T 基因型。

5. 权利要求 1 至 4 中任一项的方法,其中所述确定包括在 VEGFA 中的 rs3025039 参考单核苷酸多态性处向所述患者测试所述 936C>T 基因型。

6. 权利要求 1 至 4 中任一项的方法,其中所述确定包括向所述患者测试至少一种单核苷酸多态性的基因型,该单核苷酸多态性与在 VEGFA 中的 rs3025039 参考单核苷酸多态性处的 936C>T 基因型相关。

7. 一种在有此需要的患者中治疗癌症的方法,所述患者先前已经测定基因型为在 VEGFA 中的 rs3025039 参考单核苷酸多态性处具有 936C>T 基因型,该方法包括对所述患者给药 HER2 抑制剂。

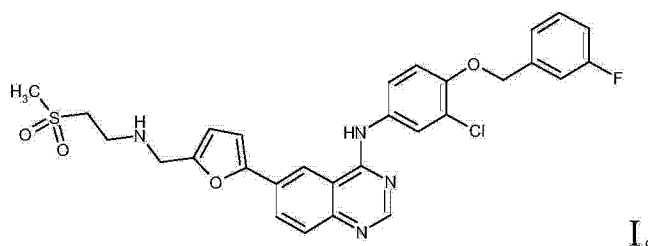
8. 权利要求 1 至 7 中任一项的方法,其中所述癌症为乳腺癌。

9. 权利要求 8 的方法,其中所述乳腺癌为转移性乳腺癌。

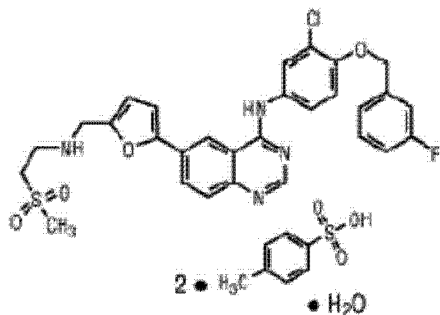
10. 权利要求 1 至 7 中任一项的方法,其中所述癌症选自以下:结肠癌、乳腺癌、转移性乳腺癌、肾细胞癌、黑素瘤、肺癌,包括非小细胞肺癌和腺癌、胃癌、结肠直肠癌、神经内分泌癌、甲状腺癌、头和颈癌、脑癌、宫颈癌、膀胱癌、食道癌、胰腺癌、前列腺癌、间皮瘤、肝-肝胆管癌、多发性骨髓瘤、白血病、甲状腺癌(包括 Hurthle 细胞)、肌肉肉瘤(平滑肌肉瘤)和骨肉瘤(软骨肉瘤)。

11. 权利要求 1 至 10 中任一项的方法,其中所述 HER2 抑制剂为双重 HER2/EGFR 抑制剂。

12. 权利要求 1 至 11 中任一项的方法,其中所述 HER2 抑制剂为式 I 化合物或其药学上可接受的盐或溶剂合物:

**I**

13. 权利要求 1 至 12 中任一项的方法, 其中所述 HER2 抑制剂为式 (I') 化合物:

(I')₀

14. 权利要求 1 至 10 中任一项的方法,其中所述 HER2 抑制剂为单克隆抗体。

15. 权利要求 14 的方法,其中所述单克隆抗体为曲妥珠单抗或帕妥珠单抗。

16. 权利要求 1 至 15 中任一项的方法,其中所述 HER2 抑制剂以单一疗法进行给药。

17. 权利要求 1 至 16 中任一项的方法,其还包括检测所述患者是否具有多态性 VEGFR218487A>T。

18. 权利要求17的方法,其还包括若所述患者具有至少一个与VEGFR218487A>T相关的单核苷酸多态性,则用拉帕替尼和曲妥珠单抗治疗所述患者。

19. 权利要求 12 或 13 的方法,其中所述 HER2 抑制剂与卡培他滨和 / 或来曲唑组合给药。

20. 权利要求 12 或 13 的方法, 其中所述 HER2 抑制剂与卡培他滨和 / 或来曲唑和 / 或曲妥珠单抗组合给药。

21. 权利要求 1 至 20 中任一项的方法,其还包括将至少一种额外的抗肿瘤药物给药至所述患者。

22. 一种在有此需要的患者中治疗癌症的方法,其包括:

确定所述患者是否具有 VEGFR218487A>T 的多态性;且

如果所述患者具有多态性 VEGFR218487A>T, 则向所述患者给药拉帕替尼和曲妥珠单抗。

23. 一种对患者治疗癌症的方法,其包括:

确定所述患者是否具有至少一种选自下组的多态性:IGF1R(rs2037448) 229741A>G 和 IGF1R(rs7181022) 28322 C>T;

如果所述患者没有至少一种选自下组的多态性:IGF1R(rs2037448)229741A>G 和 IGF1R(rs7181022)28322 C>T,则向所述患者给药拉帕替尼和曲妥珠单抗。

24. 一种在有此需要的患者中治疗癌症的方法,其包括:

确定所述患者是否具有至少一种选自下组的多态性: VEGFR218487A>T 和在 VEGFA 中的 rs3025039 参考单核苷酸多态性处的 936C>T 基因型; 且

如果所述患者具有至少一种选自下组的多态性:VEGFR218487A>T和在VEGFA中的rs3025039参考单核苷酸多态性处的936C>T基因型,则向所述患者给药酪氨酸激酶抑制剂。

治疗癌症的方法

发明领域

[0001] 本发明涉及用拉帕替尼治疗癌症的方法、用于该治疗的遗传标记,以及用于检测所述遗传标记的方法和试剂。

[0002] 发明背景

[0003] 拉帕替尼 (lapatinib) 是一种双重 HER2/EGF2 酪氨酸激酶抑制剂 (TKI), 经批准与卡培他滨 (capecitabine) 或来曲唑 (letrozole) 组合用于治疗 HER2+ 转移性乳腺癌 (MBC) 患者。与 HER2/EGFR 和其他 TKI 治疗一致, 患者的反应也是多变的, 这预示还有其他的因素影响药物的敏感性和抗性。这种探索性的药物遗传学研究试图找出宿主, 即与在 HER2+MBC 患者中的拉帕替尼治疗结果相关的种系遗传变体 (germline genetic variant)。

[0004] 使用能使患者更易于响应药用化合物的治疗的药物遗传学性质 (profile) 来治疗患者的方法是临床医学上所需的。

[0005] 发明概述

[0006] 在一个实施方案中, 提供了对此需要的患者给药 HER2 抑制剂的方法, 其包括:

[0007] 确定所述患者在 VEGFA 中的 rs3025039 参考单核苷酸多态性处是否具有 936C>T 基因型; 且

[0008] 如果所述患者在 VEGFA 中的 rs3025039 参考单核苷酸多态性处具有 936C>T 基因型, 则向所述患者给药 HER2 抑制剂。

[0009] 在一个实施方案中, 提供了对此需要的患者规定 (prescribe) HER2 抑制剂的方法, 其包括:

[0010] 确定所述患者在 VEGFA 中的 rs3025039 参考单核苷酸多态性处是否具有 936C>T 基因型; 且

[0011] 如果所述患者在 VEGFA 中的 rs3025039 参考单核苷酸多态性处具有 936C>T 基因型, 则向所述患者规定 HER2 抑制剂。

[0012] 在一个实施方案中, 提供了在对此需要的患者中治疗癌症的方法, 其包括:

[0013] 确定所述患者在 VEGFA 中的 rs3025039 参考单核苷酸多态性处是否具有 936C>T 基因型; 且

[0014] 如果所述患者在 VEGFA 中的 rs3025039 参考单核苷酸多态性处具有 936C>T 基因型, 则向所述患者给药 HER2 抑制剂。

附图说明

[0015] 附图 1: 试验 I 中的 VEGFA 936C>T 和 OS。

[0016] 附图 2: 试验 II (非试验 I) 中的 VEGFR2 18487A>T (Q472H) 和 OS。

[0017] 附图 3: 试验 II 中的 IGFR1 rs2037448&rs7181022 (靶 SNP, 非功能性) 和 OS。

[0018] 附图 4A: 元分析 (meta-analysis) 中的 NR1I3 (rs2307420) 和 PFS。

[0019] 附图 4B: 元分析中的 VEGFA (936C>T, rs3025039) 和 OS。

[0020] 附图 4C: 元分析中的 KDR/VEGFR2 (18487T>A, Q472H, rs1870377)。

[0021] 附图 5 :PFS 和 OS 的 NR1I3。

[0022] 附图 6 :PFS 和 OS 的 VEGFA (936C>T, rs3025039)。

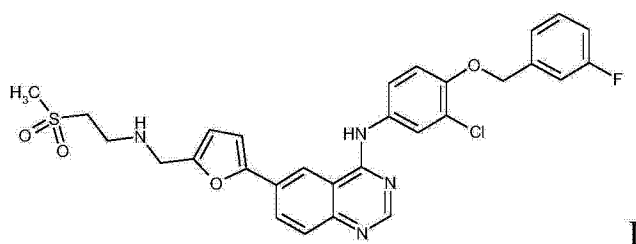
[0023] 附图 7 :PFS 和 OS 的 KDR/VEGFR2 (18487T>A, Q472H, rs1870377)。

[0024] 发明详述

[0025] 拉帕替尼是 HER2/EGFR 酪氨酸激酶抑制剂。酪氨酸激酶与至少两种致癌基因,即表皮生长因子受体 (EGFR) 和人 EGFR2 型 (Her2/neu) 有关。HER2/neu 的过表达可导致女性一些类型的高风险乳腺癌,或与之相关。在其他活性中,拉帕替尼减少了引起肿瘤的乳腺癌干细胞。拉帕替尼作用机理的一个方面是,其通过结合至 EGFR/HER2 蛋白激酶区域的 ATP 结合口袋 (ATP-binding pocket) 抑制受体信号处理,从而防止自身磷酸化作用和后续的信号机理的激活。

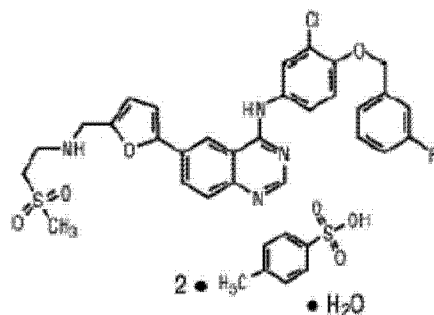
[0026] 拉帕替尼是小分子,并且是 4- 苯胺基喹唑啉类激酶抑制剂的成员。在目前的市场上,拉帕替尼以二甲苯磺酸盐的一水合物存在,其化学名称为 N-(3- 氯 -4-[(3- 氟苯基)甲基]氧基)苯基)-6-[5-({[2(甲磺酰基) 乙基] 氨基} 甲基)-2- 呋喃基]-4- 喹唑啉胺双 (4- 甲基苯磺酸盐) 一水合物。其分子式为 $C_{29}H_{26}ClFN_4O_4S(C_7H_8O_3S)_2 \cdot H_2O$, 分子量为 943.5 道尔顿。拉帕替尼式 I 具有如下化学结构:

[0027]



[0028] 拉帕替尼二甲苯磺酸盐一水合物具有如下化学结构:

[0029]



[0030] 拉帕替尼、其药学上可接受的盐或组合物、包含拉帕替尼的组合物和用途公开于例如美国专利 No. 6, 391, 874、6, 828, 320、6, 727, 256、6, 713, 485 和 7, 157, 466 中。

[0031] 将拉帕替尼或其药学上可接受的盐或组合物给药于受试者 (或用拉帕替尼“治疗”受试者) 包括本领域已知的给药方法和途径。推荐的拉帕替尼及其药学上可接受的盐或组合物的治疗方案 (剂量和时间表、血药浓度) 是本领域已知的。如本文所用的, 拉帕替尼或其药学上可接受的盐或组合物的给药不仅限于乳腺癌的治疗, 还包括其对于其他适用拉帕替尼或其药学上可接受的盐或组合物治疗的疾病的医药用途。

[0032] 如本文所用的, 药物激酶抑制剂对受试者的给药, 包括将有效量的药物给药于需要的受试者。药物的剂量可根据药物领域中已知和接受的方法确定, 并可由本领域技术人

员确定。

[0033] 如本文所用的,对受试者(或DNA或其他生物样品)基因的多态性等位基因的“基因分型(genotyping)”,是指基因或基因表达产物(例如hnRNA、mRNA或蛋白)的等位形式或多态形式存在或不存在于受试者(或样品)中的检测。从所述基因表达的相关RNA或蛋白还可用于检测多态变异。如本领域所公知,个体对于特定的等位基因可为杂合的或纯合的。可存在多于两种等位形式,因此可以有多于三种可能的基因型。对于本发明的目的,“基因分型”包括使用本领域已知的合适的技术确定种系等位基因。当排除其他可能的等位变体时,可“检测”本文所述的等位基因;例如当发现在特异性核酸位置既不是腺嘌呤(A)、胸腺嘧啶(T)也不是胞嘧啶(C)时,可推断存在于该位置上的是鸟嘌呤(G)(即在受试者中“检测或“诊断”出G)。序列变异可直接检测(例如通过测序)或间接检测(例如通过限制片段长度多态性分析,或通过检测已知序列探针的杂交,或通过参考链构象多态性(reference strand conformation polymorphism),或通过使用其他已知方法检测。

[0034] 如本文所用的,人群的“遗传亚群”由具有特定基因型的人群的成员组成。在双等位基因多态性的情况下,人群可能被分为三个亚群:等位基因1纯合(1,1)、杂合(1,2)、和等位基因2纯合(2,2)亚群。受试者的“人群”可用多种标准定义,例如用拉帕替尼治疗的个体或患有癌症的个体。

[0035] 如本文所用的,基于基因分型有特定表型响应的“素因”或“升高的风险”的受试者会比在一个或多个靶多态性基因座处具有不同基因型的个体更有可能显示该表型。当所述表型响应基于多等位多态性或基于多于一个基因的基因分型时,相对危险性在多种可能的基因型间可能不同。

[0036] 本领域能够理解,术语“野生型”指的是以没有基因变化的天然种群存在的多肽或多核苷酸序列。如本领域也能够理解,“变体”包括相对于野生型多肽和多核苷酸中的相应的氨基酸或核酸,分别具有至少一个氨基酸修饰或核酸修饰的多肽或多核苷酸序列。单核苷酸多态性(SNP)也包括在术语变体中,相较于最普遍的(野生型)核酸链,SNP中的核酸链的序列中存在单碱基对差异。本文所用的“遗传修饰”是指,但不限于,在DNA序列中发生的任何抑制、取代、敲除和/或插入一个或多个碱基。此外,如本文所用的“基因修饰的”可以指分别编码多肽或具有至少一个缺失、取代或抑制的核酸或氨基酸的多肽的基因。

[0037] 遗传变体和/或SNP可通过已知的方法鉴定。例如,野生型或SNP可通过以下方法鉴定:DNA扩增和测序技术、DNA和RNA检测技术(分别包括但不限于Northern印迹杂交和Southern印迹杂交)和/或各种生物芯片和阵列技术(array technology)。野生型和突变体多肽可以通过多种方法检测,该方法包括但不限于免疫诊断技术,例如ELISA和western印迹杂交。

[0038] 本领域技术人员将理解,也存在与[C/T]多态性相似的多态性,即[C/G]和[C/A]。当本文使用rs3025039时,是指其包括[C/T]、[C/G]和[C/A]多态性。

[0039] 使用Illumina Human 1M-Duo analysis BeadChip assay(http://www.illumina.com/products/human1m_duo_dna_analysis_beadchip_kits.ilmn),通过微点阵来分析参考单核苷酸多态性rs3025039。此外,已知的参考单核苷酸多态性rs3025039序列可通过多种寡核苷酸检测,其为本领域技术人员已知的。

[0040] 本文所述的“VEGF”表示血管内皮生长因子。

[0041] 本文所述的“VEGFR”表示血管内皮生长因子受体。VEGFR 的 UniGene 蛋白质序列参考为 :KDR(VEGFR2)NP_002244。

[0042] 本文所述的“IGFR1”表示胰岛素样生长因子受体 1。IGFR1 的 UniGene 蛋白质序列为 :IGF1RNP_000866.1。

[0043] 本文所述的“VEGFA”表示血管内皮生长因子 A。(UniGene 数据库说明蛋白质序列 ID 为 NP_001020537.2)。

[0044] 本文所述的“EGFR”表示表皮生长因子受体。

[0045] 本文所述的“HER2”表示 HER2(人表皮生长因子受体 2),也被称为 Neu、ErbB-2、CD340(分化抗原簇 340)或 p185,其为表皮生长因子受体(EGFR/ErbB)家族的成员。ERBB2(HER2)的 UniGene 蛋白质序列为 NP_004439.2。

[0046] 等位基因是指细胞、样品、个体或人群之中遗传序列(例如基因)的一种具体形式;在基因序列中,所述具体形式与在至少一个和常常多于一个变体位点处的相同基因的其他形式不同。不同等位基因之间,在这些变体位点的不同的序列称为“变体”、“多态性”或“突变”。通常,“多态性”用于表示人群中频率为至少 1%的变体,而术语“突变”通常用于表示人群中出现频率少于 1%的变体。在二倍体生物(例如人)中,在各个常染色体的具体染色体位置或“位点”处,个体有两个分别遗传自父母的等位基因,例如一个遗传自父亲,另一个遗传自母亲。若在所述位点上具有两个不同等位基因,则该个体是“杂合的”。若在所述位点上具有两个相同的等位基因,则该个体是“纯合的”。

[0047] 多态性可包含碱基变化、插入、重复或缺失中的一种或多种。多态性位点可与碱基对一样小。多态标记包括限制性片段长度多态性、变数串联重复(VNTR's)、高变异性区域、小卫星序列、二核苷酸重复序列、三核苷酸重复序列、四核苷酸重复序列、简单序列重复以及插入成分例如 Alu。将最初鉴定的等位形式任意地指定为参考形式,并且将其他等位形式指定为替代性或变体等位基因。有时将最频繁地发生于所选人群中的等位形式称作野生型形式。最频繁的等位基因还可称作主要等位基因,相对不频繁的等位基因称为次要等位基因。二倍体生物的等位形式可为纯合的或杂合的。双等位基因多态性有两种形式。三等位基因多态性有三种形式。两种核酸之间的多态性可天然地发生,或由暴露或接触于化学物质、酶或其他物质而导致,或由暴露于引起核酸损伤的物质(例如紫外辐射、诱变剂或致癌物)而导致。

[0048] 单核苷酸多态性(SNP)是两个替代性碱基以相当大的频率(>1%)产生于人群中的位点,并且是人遗传变异最常见的类型。人基因组的所有多态性中,大约 90%是 SNP。SNP 是 DNA 中的单碱基位点,在该位点上不同等位基因或替代性核苷酸存在于人群中。对于在各 SNP 位点的等位基因,个体可为纯合的或杂合的。在一些实例中,SNP 可称作“cSNP”,以表示含 SNP 的核苷酸序列是氨基酸编码序列。本文所述的 SNP 和 SNP 基因型包括个体 SNP 和 / 或单倍型,其一般为共同遗传的 SNP 组。与个体 SNP 相比,单倍型对于疾病或其他表型效应可具有更强的相关性,且因此在一些情况下可使诊断精确度增加(Stephens 等人, Science 293,489-493,20 Jul. 2001)。

[0049] 病因性 SNP 是在基因表达或基因产物的表达、结构和 / 或功能中产生变化的那些 SNP,且因此对于可能的临床表型最具预测性。一个所述的类型包括落入编码多肽产物的基因的区域内的 SNP,即 cSNP。这些 SNP 可导致多肽产物的氨基酸序列的变化(即非同义密

码子改变),以及引起有缺陷的或其他变体蛋白的表达。此外,在无意义突变的情况下,SNP可致使多肽产物提前终止。病理性 SNP 不必然发生于编码区域中;例如病理性 SNP 可发生于任何能够最终影响由核酸编码的蛋白的表达、结构、和/或活性的遗传区域中。所述遗传区域包括例如转录中涉及的区域,例如转录因子结合区域中的 SNP,启动子区域中的 SNP,转录物加工过程涉及的区域(例如在内含子-外显子边界处可导致有缺陷的拼接的 SNP),或 mRNA 加工信号序列例如多腺苷酸化信号区域中的 SNP。然而一些并非病理性的 SNP 与引起疾病的序列密切相关,并且因此与之分离。这种情况下,SNP 与疾病的存在或遗传缺陷或疾病发展中的高风险有关。尽管这些 SNP 并非病理性,但对于诊断、疾病遗传缺陷筛选以及其他用途仍然是有用的。

[0050] SNP 和具体病症或安全性事件或治疗结果的素因的关联研究涉及确定来自具有所述病症或感兴趣安全性事件的素因的个体的生物样品中 SNP 等位基因的存在或频率,并与对照(即没有所述病症或不经历相同安全性事件或治疗结果的个体)比较所述信息。

[0051] SNP 可在患病的组织样品或任何从个体得到的生物样品中筛选(screen),与对照样品比较,并选择器在特定病理学状况中的升高(降低)的发生。一旦在一种或多种 SNP 和感兴趣的病理症状(或其他表型)之间建立了统计学上的显著关联,那么可任选地对 SNP 周围的区域进行彻底筛选,以确定影响病理症状或表型的一种或多种病理性遗传基因座/序列(例如病理性 SNP/突变、基因、调控区域等)。

[0052] 临床试验已显示,对用药物治疗的患者响应通常是异质的。有改进药物设计和治疗的持续需要。关于这一点,SNP 可用于确定最适合用特定药物治疗的患者(这通常称为“药物基因组学”)。类似地,SNP 可用于对患者排除某些治疗,这是由于患者的升高的形成毒副作用的可能性或其不响应治疗的可能性。药物基因组学还可用于药物研究,以辅助药物的开发和选择方法。(Linder 等人(1997),*Clinical Chemistry*,43,254;Marshall(1997),*Nature Biotechnology*,15,1249;International Patent Application WO 97/40462, Spectra Biomedical;和 Schafer 等人(1998),*Nature Biotechnology*,16,3)。

[0053] 用于检测突变的若干技术,已基于杂交分析的原理研究出来。例如在引物延伸测定中,通过 PCR 或任何其他合适的扩增技术将跨越感兴趣的核苷酸的 DNA 区域扩增。扩增后,将引物杂交至靶核酸序列,其中引物 3'末端的最后一个核苷酸立即将 5'退火至待分析的靶序列上的核苷酸位点。所述退火的引物通过标记的单一核苷酸三磷酸而延长。然后检测结合的核苷酸。

[0054] 包括基因或 PCR 产物或其片段或部分的任何核酸的序列,可为通过本领域已知的任何方法测序(例如化学测序或酶测序)。DNA 的“化学测序”可表示例如 Maxam 和 Gilbert 的方法(1977)(*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:560),其中 DNA 可使用个体的碱基特异性反应随机裂解。DNA 的“酶测序”可表示例如 Sanger(Sanger 等人,(1977)*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:5463)的方法。

[0055] 常规分子生物学、微生物学和重组 DNA 技术包括本领域技术人员公知的测序技术。所述技术在文献中有完整地阐述。例如参见:Sambrook,Fritsch&Maniatis,*Molecular Cloning:A Laboratory Manual*,Second Edition(1989)Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.(本文中“Sambrook 等人,1989”);*DNA Cloning:A Practical Approach*,Volumes I and II(D.N.Glover ed.1985);*Oligonucleotide*

Synthesis(M. J. Gait ed.1984) ;Nucleic Acid Hybridization(B. D. Hames&S. J. Higgins eds. (1985)) ;Transcription And Translation(B. D. Hames&S. J. Higgins, eds. (1984)) ; Animal Cell Culture(R. I. Freshney, ed. (1986)) ;Immobilized Cells And Enzymes(IRL Press, (1986)) ;B. Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning(1984) ; F. M. Ausubel 等人 (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley&Sons, Inc. (1994)。

[0056] 肽核酸 (PNA) 亲和性测定是传统杂交测定的衍生的 (Nielsen 等人, Science 254 : 1497-1500 (1991) ;Egholm 等 人, J. Am. Chem. Soc. 114 :1895-1897 (1992) ;James 等 人, Protein Science 3 :1347-1350 (1994))。PNA 是符合沃森-克里克碱基配对规则的结构 DNA 类似物,并用于标准 DNA 杂交测定。PNA 在杂交测定中显示更大的特异性,这是因为 PNA/DNA 错配相比于 DNA/DNA 错配更不稳定,并且互补 PNA/DNA 链相比于互补 DNA/DNA 链形成更强的键。

[0057] 已研发 DNA 微阵列以检测遗传变异和多态性 (Taton 等人, Science 289 : 1757-60, 2000 ;Lockhart 等 人, Nature 405 :827-836 (2000) ;Gerhold 等 人, Trends in Biochemical Sciences 24 :168-73 (1999) ;Wallace, R. W., Molecular Medicine Today 3 : 384-89 (1997) ;Blanchard 和 Hood, Nature Biotechnology 149 :1649 (1996))。DNA 微阵列通过高速机器人技术在玻璃或尼龙基底上制造,并且包含已知鉴定的 DNA 片段 (“探针”)。所述微阵列用于根据传统碱基配对规则将已知的和未知的 DNA 片段 (“靶”) 配对。

[0058] 蛋白截短试验 (PTT) 通常也用于检测遗传多态性 (Roest 等人, Human Molecular Genetics 2 :1719-1721, (1993) ;Van Der Luit 等 人, Genomics 20 :1-4 (1994) ; Hogervorst 等人, Nature Genetics 10 :208-212 (1995))。通常在 PTT 中,将感兴趣的基因用 PCR 扩增、经体外转录 / 翻译、纯化,并用聚丙烯酰胺凝胶电泳分析。

[0059] 本文所述的“遗传试验”(又称遗传筛选)是指对取自受试者的生物样品进行试验以确定该受试者的基因型;并可用于确定受试者的基因型是否包括引起或增加对特定表型易感性的等位基因(或与引起或增加对该表型易感性的等位基因连锁不平衡的等位基因)。

[0060] “连锁不平衡”是指在不同基因组位置一起产生特异性等位基因的倾向通常高于随机发生的期望的倾向。若任何特定等位基因(或单倍型)的组合的频率是它们的个体人群频率的乘积,则给定位点的等位基因处于完全平衡。连锁不平衡的通用量度是 r :

$$[0061] \quad r = \frac{\hat{\Delta}_{AB}}{\sqrt{(\tilde{\pi}_A + \hat{D}_A)(\tilde{\pi}_B + \hat{D}_B)}}$$

[0062] 其中,

$$[0063] \quad \tilde{\pi}_A = \tilde{p}_A(1-\tilde{p}_A), \quad \tilde{\pi}_B = \tilde{p}_B(1-\tilde{p}_B), \quad \hat{D}_A = \tilde{p}_{AA} - \tilde{p}_A^2, \quad \hat{D}_B = \tilde{p}_{BB} - \tilde{p}_B^2$$

$$[0064] \quad \hat{\Delta}_{AB} = \frac{1}{n} n_{AB} - 2\tilde{p}_A\tilde{p}_B$$

[0065] 对于双等位标记, nr^2 具有的近似卡方分布具有 1 个自由度。如下的基因座被认为处于连锁不平衡中,所述基因座显示一定的 r 使得 nr^2 大于 3.84,其对应于 0.05 水平的显著卡方统计 (BS Weir 1996 Genetic Data Analysis II Sinauer Associates, Sunderland,

MD)。

[0066] 或者,连锁不平衡的标准量度可定义为:

$$[0067] \quad D_{AB}' = \begin{cases} \frac{D_{AB}}{\min(p_A p_B, p_a p_b)}, & D_{AB} < 0 \\ \frac{D_{AB}}{\min(p_A p_b, p_a p_B)}, & D_{AB} > 0 \end{cases}$$

[0068] D' 值的范围为 -1.0 至 1.0。当两种标记的统计学显著的 D' 绝对值不小于 0.3 时,认为它们处于连锁不平衡。

[0069] 本文所述的术语“单倍型”是指一组紧密连锁的等位基因,这些等位基因存在于一条倾向于共同遗传的染色体上。通过检测 VEGFA 等位基因的存在,或检测已知与 VEGFA 等位基因连锁不平衡的遗传标记,能够鉴定 VEGFA 基因型。基因型是指单一基因中确定位点的变异,例如 1, 1、1, 2、2, 2。

[0070] 本文所述的‘多位点’基因型(也作单倍型)的测定是指对个体中存在于多于一个位点上的等位基因进行检测。

[0071] 本文所述的等位基因或多态性的检测方法包括但不限于遗传方法。所检测的等位基因或多态性在功能上可参加个体表型的影响,或其可为与功能性多态性/等位基因连锁不平衡的等位基因或多态性。多态性/等位基因可从受试者基因组 DNA 得以证实,但其还可由从该区域转录或翻译的 RNA、cDNA 或蛋白序列检测,这对于本领域技术人员是显而易见的。

[0072] 在本发明的另一实施方案中,作为单一治疗将拉帕替尼或其药学上可接受的盐或组合物给药于所述人。在另一实施方案中,拉帕替尼或其药学上可接受的盐或组合物与至少一种其他抗肿瘤药物共同给药。一种其他抗肿瘤药物可选自但不限于以下药物:曲妥珠单抗、帕妥珠单抗、卡培他滨、紫杉醇、卡铂、帕唑帕尼和来曲唑(trastuzumab, pertuzumab, capecitabine, paclitaxel, carboplatin, pazopanib and letrozole)。

[0073] 本发明的方法可用于经诊断具有或罹患任何癌症的人受试者,所述癌症包括但不限于易感于 EGFR 抑制剂、HER2/erbB-2 抑制剂、VEGF 抑制剂、VEGFR 抑制剂和细胞内转导蛋白(包括但不限于 PI3K、Akt 和 mTOR)抑制剂的癌症,以及头颈癌、乳腺癌、肺癌、结肠癌、卵巢癌和前列腺癌的原发性和转移性形式。该方法还可为用于用拉帕替尼治疗的任何人受试者。

[0074] 多态性等位基因可通过确定 DNA 多聚核苷酸序列而检测,或通过检测从所述多态性基因转录的 RNA 转录物的相应序列而检测,或者当核酸多态性导致编码蛋白变化时通过检测编码蛋白中所述氨基酸序列的变化而检测;使用本领域已知的任何合适的技术。用于分型的多聚核苷酸是典型地基因组 DNA,或源自基因组多聚核苷酸序列的多聚核苷酸片段,所述基因组多聚核苷酸序列例如参见由个体基因组物质组成的文库(例如 cDNA 文库)。所述多态性的可用包括以下的方法检测:将从个体得到的多聚核苷酸或蛋白样品与该多态性的特定的结合剂接触,并确定该结合剂是否结合了所述多聚核苷酸或蛋白,此处结合表示存在该多态性。所述结合剂还可在所述多态性的一侧或两侧结合至侧翼核苷酸和氨基酸,例如总共或每侧至少 2 个、5 个、10 个、15 个或更多侧翼核苷酸或氨基酸。当在多聚核苷酸中确定所述多态性的存在的情况下,其可以以双链的形式检测,但通常以单链的形式检测。

[0075] 所述结合剂可为多聚核苷酸（单链或双链），通常长度为至少 10 个核苷酸，例如至少 15 个、20 个、30 个、或更多核苷酸。用于该方法的多聚核苷酸试剂通常以序列特异的方式（例如通过沃森 - 克里克碱基配对杂交）结合至感兴趣的多态性和所述侧翼序列，且因此典型地具有与所述多态性和侧翼区域的序列完全或部分地互补的序列。所述结合剂可为结构上类似于多聚核苷酸的分子，其包括能够参与沃森 - 克里克碱基配对的单元（例如嘌呤或嘧啶类似物、肽核酸或 RNA 衍生物，例如锁核酸（LNA））。所述结合剂可为一种蛋白，其长度通常为至少 10 个氨基酸，例如至少 20 个、30 个、50 个或 100 个或更多氨基酸。所述结合剂可为一种抗体（包括所述抗体的能够与所述多态性结合的片段）。

[0076] 在本方法的一个实施方案中，将结合剂用作探针。所述探针可标记或可被间接标记。对标记的检测可用于检测个体的多聚核苷酸或蛋白上（所结合的）探针的存在。所述探针与多聚核苷酸或蛋白的结合，既可用于固定探针也可用于固定多聚核苷酸或蛋白（且因此将其从组合物或溶液中分离）。

[0077] 在本发明的另一实施方案中，所述个体的多聚核苷酸或蛋白固定于固体载体上，然后与所述探针连接。然后检测固定于固体载体上的探针（通过其与所述多态性的结合固定）的存在，既可通过检测所述探针上的标记而直接检测，也可间接地通过将所述探针与结合所述探针的部分接触而检测。在检测多聚核苷酸多态性的情况下，所述固体载体通常由硝基纤维素或尼龙制成。在蛋白多态性的情况下，该方法可基于 ELISA 系统。

[0078] 本方法可基于寡核苷酸连接分析法，其中使用两个寡核苷酸探针。这些探针连接至具有该多态性的所述多聚核苷酸的相邻区域，这允许（结合后）这两个探针通过适当的连接酶连接在一起。然而这两个探针只会与具有所述多态性的多聚核苷酸结合（以一种允许连接的方式），且因此所述连接产物的检测可用于确定所述多态性的存在。

[0079] 在一个实施方案中，所述探针用于基于异源双链分析的系统，以检测多态性。在所述系统中，当所述探针结合至具有所述多态性的多聚核苷酸序列时，其在所述多态性产生的位点形成异源双链（即其不形成双链结构）。通过使用单链或双链特异性的酶，可检测所述异源双链结构。通常所述探针为 RNA 探针且所用酶是使所述异源双链区域裂解的 RNA 酶 H，因此能够通过检测裂解产物的方法检测所述多态性。

[0080] 该方法可基于荧光化学切割错配分析（fluorescent chemical cleavage mismatch），其公开于例如 PCR Methods and Applications 3:268-71 (1994) 和 Proc. Natl. Acad. Sci. 85:4397-4401 (1998) 中。

[0081] 在一个实施方案中，只要与具有所述多态性的多聚核苷酸结合，所述多聚核苷酸试剂就能够起到 PCR 反应引物的作用（即序列特异性或等位基因特异性 PCR 系统）。因此，只有在所述多态性存在于所述个体的多聚核苷酸中的情况下才能产生 PCR 产物，并且通过 PCR 产物的检测确定所述多态性的存在。优选所述引物与所述多态性互补的区域位于引物的 3' 末端或其附近。在该系统的一个实施方案中，所述多聚核苷酸试剂将与野生型序列结合，但不起 PCR 反应的引物的作用。

[0082] 该方法可为基于限制性片段长度多态性（RFLP）的系统。若所述多聚核苷酸中的所述多态性的存在产生或消失了通过限制酶识别的限制位点，那么可用该系统。因此，用具有所述多态性的多聚核苷酸的处理，可使与相应的野生型序列不同的产物生成。因此，检测特定限制性酶切消化产物的存在，可用于确定所述多态性的存在。

[0083] 根据所述多态性的存在使所述多聚核苷酸或蛋白在凝胶电泳中移动性的改变,可确定所述多态性的存在。在多聚核苷酸情况下,可使用单链构象多态性 (SSCP) 分析。该技术测量所述单链多聚核苷酸在变性凝胶上的移动性,并与相应的野生型多聚核苷酸比较,对于其移动性差异的测定表示所述多态性的存在。变性梯度凝胶电泳 (DGGE) 是一种类似的系统,其中所述多聚核苷酸在具有变性梯度的凝胶中被电泳,其相比于相应的野生型多聚核苷酸的移动性差异表示所述多态性的存在。

[0084] 可使用荧光染料和基于猝灭剂的 PCR 测定 (例如 TAQMAN™ PCR 检测系统) 来确定所述多态性的存在。在检测所述多态性的另一方法中,对包括所述多态性区域的多聚核苷酸的具有所述多态性的整个区域进行测序,以确定所述多态性的存在。

[0085] 适用于本方法的多种其他检测技术,对于熟悉检测、鉴定和 / 或识别多态性方法的人而言是显而易见的。所述检测技术包括但不限于:直接测序,使用“分子灯标”(对杂交发出荧光的寡核苷酸探针,用于实时荧光 PCR;例如参见:Marras 等人, Genet Anal 14:151(1999));电化学检测 (DNA 碱基或糖的氧化或还原;参见美国专利 No. 5,871,918, Thorp 等人);滚环扩增 (例如参见:Gusev 等人, Am J Pathol 159:63(2001));第三波技术 (Third Wave Technologies) (Madison WI) INVADER® 非基于 PCR 的检测方法 (例如参见:Lieder, Advance for Laboratory Managers, 70(2000))。

[0086] 因此,本领域已知的任何合适的检测技术可用于本方法中。

[0087] 本文所使用的“确定”受试者的基因型不要求在受试者先前已被基因分型并且可得到先前遗传试验的结果的情况下进行基因分型技术;因此确定受试者的基因型包括参考先前完成的基因分析。

[0088] 本发明还提供预测性 (患者护理) 试验或试验试剂盒。基于基因型和对治疗性化合物的表型响应之间预先确定的联系,所述试验将有助于药物化合物的治疗用途,所述药物化合物包括酪氨酸激酶抑制剂,例如拉帕替尼。所述试验可采取不同的形式,包括:

[0089] (a) 分析 DNA 或 RNA 中预先确定的等位基因和 / 或多态性存在的试验。适当的试验试剂盒可包括下列一种或多种试剂或仪器:能够作用于多聚核苷酸的酶 (通常为聚合酶或限制酶)、对于酶试剂合适的缓冲液、与所述多态性侧翼区域结合的 PCR 引物、阳性或阴性对照 (或两者),和凝胶电泳装置。所述产物可利用如其技术发展水平所述的芯片工艺之一。所述试验试剂盒包括印刷的或机器可读的说明书,该说明书阐明了特定基因型的存在与用特定药物化合物治疗的受试者经历超敏反应的可能性之间的关联;

[0090] (b) 分析源自所述受试者身体的物质的试验,所述物质例如蛋白或代谢产物,该试验表示预先确定的多态性或等位基因的存在。适当的试验试剂盒可包括分子、适体、肽或抗体 (包括抗体片段),其特异地结合至预先确定的多态性区域 (或位于所述多态性侧翼的特异区域)。所述试剂盒另外包括一种或多种其他的试剂或仪器 (本领域已知的)。所述试验试剂盒还将包括印刷的或机器上可读的说明书,该说明书阐明了特定多态性或基因型的存在与用特定的合成核苷类似物治疗的受试者经历特定表型、反应或临床结果的可能性之间的关联。

[0091] 用于试验的合适的生物样品是包括细胞和 DNA 的那些生物样品,其包括但不限于血液或血液成分,干血斑,尿,颊粘膜拭子 (buccal swabs) 和唾液。用于遗传试验和肽 / 蛋白试验的合适的样品是本领域公知的。

[0092] 通常,对治疗的易感肿瘤具有活性的任何抗肿瘤药物可以在本发明的癌症治疗中共给药。所述药物的实例可参见:V. T. Devita 和 S. Hellman(编者), *Cancer Principles and Practice of Oncology*, 6th edition (February 15, 2001), Lippincott Williams & Wilkins Publishers。本领域技术人员能够根据药物与所涉及癌症的具体特征鉴别有用的药物组合。本发明有用的典型抗肿瘤药物包括但不限于:抗微管剂,例如二萜类化合物和长春花生物碱;铂配位络合物;烷化剂,例如氮芥,氧氮磷杂环己烷,烷基磺酸盐,亚硝基脲,和三氮烯;抗生素药物,例如蒽环类抗生素,放线菌素和博来霉素;拓扑异构酶 II 抑制剂,例如表鬼臼毒素;抗代谢剂,例如嘌呤和嘧啶类似物和抗叶酸化合物;拓扑异构酶 I 抑制剂,例如喜树碱;激素和激素类似物;信号转导途径抑制剂;非受体酪氨酸激酶血管发生抑制剂;免疫治疗剂;促凋亡剂;和细胞周期信号抑制剂(anti-microtubule agents such as diterpenoids and vinca alkaloids; platinum coordination complexes; alkylating agents such as nitrogen mustards, oxazaphosphorines, alkylsulfonates, nitrosoureas, and triazenes; antibiotic agents such as anthracyclins, actinomycins and bleomycins; topoisomerase II inhibitors such as epipodophyllotoxins; antimetabolites such as purine and pyrimidine analogues and anti-folate compounds; topoisomerase I inhibitors such as camptothecins; hormones and hormonal analogues; signal transduction pathway inhibitors; non-receptor tyrosine kinase angiogenesis inhibitors; immunotherapeutic agents; proapoptotic agents; and cell cycle signaling inhibitors)。

[0093] 抗微管或抗有丝分裂剂是时相特异性药物 (phase specific agent), 其在细胞周期中的 M 期或有丝分裂期对肿瘤细胞的微管具有活性。抗微管剂的实例包括但不限于二萜类化合物和长春花生物碱 (diterpenoids and vinca alkaloids)。

[0094] 天然来源的二萜类化合物是时相特异性的抗癌剂, 其在细胞周期中的 G₂/M 期起作用。认为二萜类化合物通过与该蛋白结合, 使微管的 β -微管蛋白亚单位稳定。然后使蛋白的分解受到抑制, 有丝分裂停止, 接着发生细胞死亡。二萜类化合物的实例包括但不限于紫杉醇及其类似物多西他赛。

[0095] 紫杉醇, 5 β , 20-环氧-1, 2 α , 4, 7 β , 10 β , 13 α -六羟基紫杉-11-烯-9-酮 4, 10-二乙酸酯 2-苯甲酸酯 13-(2R, 3S)-N-苯甲酰基-3-苯基异丝氨酸酯 (5 β , 20-epoxy-1, 2 α , 4, 7 β , 10 β , 13 α -hexa-hydroxytax-11-en-9-one 4, 10-diacetate 2-benzoate 13-ester with (2R, 3S)-N-benzoyl-3-phenylisoserine), 其是从太平洋紫杉树 (*Taxus brevifolia*) 中分离出来的天然二萜产物, 且在商业上可得到可注射的溶液 **TAXOL®**。其为萜类紫杉烷家族的成员。其在 1971 年由 Wani 等人首次分离出来 (*J. Am. Chem. Soc.*, 93:2325, 1971), 并通过化学和 X-射线结晶学方法表征其结构。其活性的机理之一是关于紫杉醇能结合微管蛋白, 进而抑制癌细胞生长。Schiff 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:1561-1565 (1980); Schiff 等, *Nature*, 277:665-667 (1979); Kumar, *J. Biol. Chem.*, 256:10435-10441 (1981)。有关一些紫杉醇衍生物的合成和抗癌活性的综述, 参见 D. G. I. Kingston 等, *Studies in Organic Chemistry* vol. 26, 标题为 "New trends in Natural Products Chemistry 1986", Attaur-Rahman, P. W. Le Quesne, Eds. (Elsevier, Amsterdam, 1986) pp 219-235。

[0096] 在美国,已经批准紫杉醇的临床使用,用于治疗难治的卵巢癌 (Markman 等, *Yale Journal of Biology and Medicine*, 64:583, 1991; McGuire 等, *Ann. Intern. Med.*, 111:273, 1989) 和用于治疗乳腺癌 (Holmes 等, *J. Nat. Cancer Inst.*, 83:1797, 1991)。其为治疗皮肤癌 (Einzig 等, *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.*, 20:46) 和头颈癌 (Forastire 等, *Sem. Oncol.*, 20:56, 1990) 的可能的候选药物。该化合物还具有治疗多囊性肾病 (Woo 等, *Nature*, 368:750, 1994)、肺癌和疟疾的潜力。采用紫杉醇治疗患者,导致骨髓抑制 (多重细胞谱系 (multiple cell lineages), Ignoff, R. J. 等, *Cancer Chemotherapy Pocket Guide*, 1998), 这与高于阈浓度 (50nM) 的给药的持续时间有关 (Kearns, C. M. 等, *Seminars in Oncology*, 3(6)p. 16-23, 1995)。

[0097] 多西他赛 (Docetaxel), 5β -20-环氧- $1,2\alpha,4,7\beta,10\beta,13\alpha$ -六羟基紫杉-11-烯-9-酮-13-(2R,3S)-N-羧基-3-苯基异丝氨酸, N-叔丁基酯, 4-乙酸酯-2-苯甲酸酯, 三水合物, 在商业上可得到可注射的溶液 **TAXOTERE®**。多西他赛可用于治疗乳腺癌。多西他赛是适量 (q. v.) 紫杉醇的半合成衍生物, 其利用天然前体即从欧洲浆果紫杉树的针叶中提取的 10-去乙酰基浆果赤霉素 III 制备。多西他赛的剂量限制性毒性是嗜中性白细胞减少症。

[0098] 长春花生物碱 (Vinca alkaloids) 是来源于长春花属植物的时相特异性的抗肿瘤药物。长春花生物碱通过特异性地结合微管蛋白而在细胞周期的 M 期 (有丝分裂) 起作用。因此, 被结合的微管蛋白分子不能聚合成微管。认为有丝分裂在中期被停止, 随后细胞死亡。长春花生物碱的实例包括但不限于长春碱, 长春新碱和长春瑞滨。

[0099] 长春碱 (Vinblastine), 长春碱硫酸盐, 以 **VELBAN®** 注射液市售。尽管已经表明其有可能作为各种实体瘤的二线治疗, 但是其最初表明用于治疗睾丸癌和各种淋巴瘤, 包括霍奇金病以及淋巴细胞和组织细胞的淋巴瘤。骨髓抑制是长春碱的剂量限制性副作用。

[0100] 长春新碱 (Vincristine), 长春碱 22-氧代-硫酸盐, 以 **ONCOVIN®** 注射溶液市售。长春新碱显示用于治疗急性白血病, 还发现用于治疗多数霍奇金和非霍奇金恶性淋巴瘤。脱发和神经作用是长春新碱最常见的副作用, 并产生较小程度的骨髓抑制和胃肠粘膜炎症作用。

[0101] 长春瑞滨 (Vinorelbine), $3',4'$ -二脱氢- $4'$ -脱氧-C'-去甲长春碱 (norvincal leukoblastine) [R-(R*, R*)-2, 3-二苹果酸 (1:2) (盐)], 以长春瑞滨酒石酸盐注射液 (**NAVELBINE®**) 市售, 是半合成的长春花生物碱。长春瑞滨可作为单独的药物或与其它化学治疗剂 (如顺铂) 组合, 用于治疗各种实体瘤, 特别是非小细胞肺癌、晚期乳腺癌和激素难治的前列腺癌。骨髓抑制是长春瑞滨最常见的剂量限制性副作用。

[0102] 铂配位络合物 (Platinum coordination complex) 是非时相特异性的抗癌剂, 其与 DNA 相互作用。铂络合物进入肿瘤细胞, 进行水合作用, 并与 DNA 形成内部和相互间的交叉连接, 导致对肿瘤不利的生物学作用。铂配位络合物的实例包括但不限于顺铂和卡铂。

[0103] 顺铂, 顺式-二氨二氯合铂, 以 **PLATINOL®** 注射溶液市售。顺铂最初用于治疗转移性睾丸癌和卵巢癌以及晚期的膀胱癌。顺铂的主要剂量限制性副作用是肾毒性和耳毒性, 所述肾毒性可通过水合和利尿来控制。

[0104] 卡铂,二氨 [1, 1- 环丁烷 - 二羧酸根 (2-)-0, 0'] 合铂,以**PARAPLATIN®**注射溶液市售。卡铂最初用于晚期卵巢癌的一线和二线治疗。骨髓抑制是卡铂的剂量限制性毒性。

[0105] 烷化剂是非时相特异性的抗癌药物和强亲电试剂。通常,烷化剂借助于烷基化作用,通过 DNA 分子的亲核部分如磷酸基 (phosphate)、氨基、巯基、羟基、羧基和咪唑基,与 DNA 形成共价键。这种烷基化作用破坏核酸功能,导致细胞死亡。烷化剂的实例包括但不限于氮芥 (如环磷酰胺、美法仑和苯丁酸氮芥)、磺酸烷基酯 (如白消安、亚硝基脲如卡莫司汀),以及三氮烯 (如达卡巴嗪)。

[0106] 环磷酰胺 (Cyclophosphamide), 2-[双 (2- 氯乙基) 氨基] 四氢 -2H-1, 3, 2- 氧氮磷杂环己二烯 2- 氧化物一水合物 (2-[bis(2-chloroethyl)amino]tetrahydro-2H-1, 3, 2-oxazaphosphorine 2-oxide monohydrate),以**CYTOXAN®**注射溶液或片剂市售。环磷酰胺可作为单独的药物或与其它化学治疗剂组合,用于治疗恶性淋巴瘤、多发性骨髓瘤和白血病。脱发、恶心、呕吐和白细胞减少症是环磷酰胺最常见的剂量限制性副作用。

[0107] 美法仑 (Melfalan), 4-[双 (2- 氯乙基) 氨基]-L- 苯基 丙氨酸 (4-[bis(2-chloroethyl)amino]-L-phenylalanine),以**ALKERAN®**注射溶液或片剂市售。美法仑可用于多发性骨髓瘤和不可切除的卵巢上皮癌的姑息疗法。骨髓抑制是美法仑最常见的剂量限制性副作用。

[0108] 苯丁酸氮芥 (Chlorambucil), 4-[双 (2- 氯乙基) 氨基] 苯丁酸 (4-[bis(2-chloroethyl)amino]benzenebutanoic acid),以**LEUKERAN®**片剂市售。苯丁酸氮芥可用于慢性淋巴细胞性白血病,恶性淋巴瘤 (如淋巴肉瘤、巨滤泡性淋巴瘤和霍奇金病) 的姑息疗法。骨髓抑制是苯丁酸氮芥最常见的剂量限制性副作用。

[0109] 白消安 (Busulfan), 1, 4- 丁二醇二甲磺酸酯 (1, 4-butanediol dimethanesulfonate),以**MYLERAN®**片剂市售。白消安用于慢性髓细胞性白血病的姑息疗法。骨髓抑制是白消安最常见的剂量限制性副作用。

[0110] 卡莫司汀 (Carmustine), 1, 3-[双 (2- 氯乙基) -1- 亚硝基脲 (1, 3-[bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea),以**BiCNU®**单瓶装的冻干产物市售。卡莫司汀可作为单独的药物或与其它药物组合,用于脑瘤、多发性骨髓瘤、霍奇金病和非霍奇金淋巴瘤的姑息疗法。延迟的骨髓抑制是卡莫司汀最常见的剂量限制性副作用。

[0111] 达卡巴嗪 (Dacarbazine), 5-(3, 3- 二甲基 -1- 三氮烯基) -咪唑 -4- 甲酰胺 (5-(3, 3-dimethyl-1-triazeno)-imidazole-4-carboxamide),以**DTIC-Dome®**单瓶装的产物市售。达卡巴嗪可用于转移性恶性黑素瘤的治疗,并且可与其它药物组合,用于霍奇金病的二线治疗。恶心、呕吐和厌食是达卡巴嗪最常见的剂量限制性副作用。

[0112] 抗生素类抗癌剂 (Antibiotic anti-neoplastics) 是非时相特异性的药物,其结合或嵌入 DNA 中。通常,这种作用导致稳定的 DNA 复合物或链断裂,破坏核酸的正常功能,导致细胞死亡。抗生素类抗肿瘤药物的实例包括但不限于放线菌素 (如放线菌素 D); 蒽环类 (anthracyclins) (如柔红霉素和多柔比星); 以及博来霉素。

[0113] 放线菌素 D (Dactinomycin, 也称为 Actinomycin D),以**COSMEGEN®**注射液形式市售。放线菌素 D 可用于威尔曼瘤和横纹肌肉瘤的治疗。恶心、呕吐和厌食是放线菌素

D 最常见的剂量限制性副作用。

[0114] 柔红霉素 (Daunorubicin), (8S- 顺 -)-8- 乙酰基 -10-[(3- 氨基 -2, 3, 6- 三脱氧 - α -L- 来苏 - 己吡喃糖基) 氧基]-7, 8, 9, 10- 四氢 -6, 8, 11- 三羟基 -1- 甲氧基 -5, 12- 并四苯二酮盐酸盐 ((8S-cis)-8-acetyl-10-[(3-amino-2, 3, 6-trideoxy- α -L-lyxo-hexopyranosyl)oxy]-7, 8, 9, 10-tetrahydro-6, 8, 11-trihydroxy-1-methoxy-5, 12 naphthacenedionehydrochloride), 以 **DAUNOXOME®** 脂质体可注射形式或 **CERUBIDINE®** 可注射形式市售。柔红霉素可在急性非淋巴细胞性白血病和晚期 HIV 相关的卡波西肉瘤的治疗中用于诱导缓解。骨髓抑制是柔红霉素最常见的剂量限制性副作用。

[0115] 多柔比星 (Doxorubicin), (8S, 10S)-10-[(3- 氨基 -2, 3, 6- 三脱氧 - α -L- 来苏 - 己吡喃糖基) 氧基]-8- 乙醇酰基 -7, 8, 9, 10- 四氢 -6, 8, 11- 三羟基 -1- 甲氧基 -5, 12- 并四苯二酮盐酸盐 ((8S, 10S)-10-[(3-amino-2, 3, 6-trideoxy- α -L-lyxo-hexopyranosyl)oxy]-8-glycoloyl, 7, 8, 9, 10-tetrahydro-6, 8, 11-trihydroxy-1-methoxy-5, 12 naphthacenedione hydrochloride), 以 **RUBEX®** 或 **ADRIAMYCIN RDF®** 注射溶液市售。多柔比星主要用于急性成淋巴细胞性白血病和急性骨髓细胞性白血病的治疗, 但也是治疗某些实体瘤和淋巴瘤的有用组分。骨髓抑制是多柔比星最常见的剂量限制性副作用。

[0116] 博来霉素 (Bleomycin), 是从轮丝链霉菌 (*streptomyces verticillus*) 菌株中分离出来的细胞毒素糖肽类抗生素的混合物, 以 **BLENOXANE®** 市售。博来霉素可作为单独的药物或与其它药物组合, 用于鳞状细胞癌、淋巴瘤和睾丸癌的姑息疗法。肺部和皮肤毒性是博来霉素最常见的剂量限制性副作用。

[0117] 拓扑异构酶 II 抑制剂包括但不限于表鬼臼脂毒素。

[0118] 表鬼臼脂毒素 (Epipodophyllotoxins) 是来源于曼德拉草 (mandrake) 植物的时相特异性的抗肿瘤药物。表鬼臼脂毒素通常通过与拓扑异构酶 II 和 DNA 形成三元复合物, 导致 DNA 链断裂来影响处于细胞周期的 S 和 G₂ 期的细胞。链断裂积聚, 接着细胞死亡。表鬼臼脂毒素的实例包括但不限于依托泊苷和替尼泊苷。

[0119] 依托泊苷 (Etoposide), 4'- 去甲基 - 表鬼臼脂毒素 9[4, 6-O-(R)- 亚乙基 - β -D- 吡喃葡萄糖苷], 以 **VePESID®** 注射溶液或胶囊市售, 并且常称之为 VP-16。依托泊苷可作为单独的药物或与其它化疗剂组合, 用于治疗睾丸癌和非小细胞肺癌。骨髓抑制是依托泊苷最常见的副作用。白细胞减少症的发生率 (incidence) 倾向于比血小板减少症的发生率更严重。

[0120] 替尼泊苷 (Teniposide), 4'- 去甲基 - 表鬼臼脂毒素 9[4, 6-O-(R)- 噻吩亚甲基 - β -D- 吡喃葡萄糖苷], 以 **VUMON®** 注射溶液市售, 并且通常称之为 VM-26。替尼泊苷可作为单独的药物或与其它化疗剂组合, 用于治疗儿童急性白血病。骨髓抑制是替尼泊苷最常见的剂量限制性副作用。替尼泊苷可引起白细胞减少症和血小板减少症。

[0121] 抗代谢肿瘤药物 (Antimetabolite neoplasti) 是时相特异性的抗肿瘤药物, 其作用于细胞周期的 S 期 (DNA 合成), 通过抑制 DNA 的合成, 或者通过抑制嘌呤或嘧啶碱基的合成进而限制 DNA 的合成。因此, S 期不能继续下去, 接着细胞死亡。抗代谢类抗肿瘤药物的

实例包括但不限于氟尿嘧啶、甲氨蝶呤、阿糖胞苷、巯基嘌呤、硫鸟嘌呤,以及吉西他滨 (flourouracil, methotrexate, cytarabine, mecaptopurine, thioguanine, and gemcitabine)。

[0122] 5- 氟尿嘧啶, 5- 氟 -2, 4-(1H, 3H) 嘧啶二酮, 以氟尿嘧啶市售。5- 氟尿嘧啶的给药导致胸苷酸合成的抑制, 并且还掺入到 RNA 和 DNA 中。结果通常是细胞死亡。5- 氟尿嘧啶可作为单独的药物或与其它化疗剂组合, 用于治疗乳腺癌、结肠癌、直肠癌、胃癌和胰腺癌。骨髓抑制和粘膜炎是 5- 氟尿嘧啶的剂量限制性副作用。其它的氟嘧啶类似物包括 5- 氟脱氧尿嘧啶核苷 (氟尿苷) 和 5- 氟脱氧尿嘧啶核苷一磷酸。

[0123] 阿糖胞苷 (Cytarabine), 4- 氨基 -1- β -D- 阿拉伯呋喃糖基 -2(1H)- 嘧啶酮 (4-amino-1- β -D-arabinofuranosyl-2(1H)-pyrimidinone), 以 **CYTOSAR-U®** 市售, 并且通常称之为 Ara-C。认为阿糖胞苷在 S- 期具有细胞时相特异性, 其通过将阿糖胞苷末端掺入到生长的 DNA 链中而抑制 DNA 链的延长。阿糖胞苷作为单独的药物或与其它化疗剂组合, 用于治疗急性白血病。其它的胞苷类似物包括 5- 氮杂胞苷和 2', 2'- 二氟脱氧胞苷 (吉西他滨)。阿糖胞苷引起白细胞减少症、血小板减少症和粘膜炎。

[0124] 巯基嘌呤, 1, 7- 二氢 -6H- 嘌呤 -6- 硫酮一水合物 (1, 7-dihydro-6H-purine-6-thione monohydrate), 以嘌呤 **THOL®** 市售。巯基嘌呤在 S- 期通过至今尚未清楚的机理抑制 DNA 的合成具有细胞时相特异性。巯基嘌呤可作为单独的药物或与其它化疗剂组合, 用于治疗急性白血病。预期骨髓抑制和胃肠粘膜炎是高剂量巯基嘌呤的副作用。可使用的巯基嘌呤类似物是硫唑嘌呤。

[0125] 硫鸟嘌呤 (Thioguanine), 2- 氨基 -1, 7- 二氢 -6H- 嘌呤 -6- 硫酮 (2-amino-1, 7-dihydro-6H-purine-6-thione), 以 **TABLOID®** 市售。硫鸟嘌呤在 S- 期通过至今尚未清楚的机理抑制 DNA 的合成具有细胞时相特异性。硫鸟嘌呤可作为单独的药物或与其它化疗剂组合, 用于治疗急性白血病。骨髓抑制, 包括白细胞减少症、血小板减少症和贫血是给药硫鸟嘌呤最常见的剂量限制性副作用。然而, 还发生胃肠副作用, 而且该副作用可能是剂量限制性的。其它的嘌呤类似物包括喷司他丁、赤式羟基壬基腺嘌呤、磷酸氟达拉滨和克拉屈滨 (pentostatin, erythrohydroxynonyladenine, fludarabine phosphate, and cladribine)。

[0126] 吉西他滨 (Gemcitabine), 2'- 脱氧 -2', 2'- 二氟胞苷一盐酸盐 (β - 异构体), 以 **GEMZAR®** 市售。吉西他滨通过阻断细胞通过 G1/S 边界的发展在 S- 期具有细胞时相特异性。吉西他滨可与顺铂组合, 用于治疗局部的晚期非小细胞肺癌, 也可以单独地用于治疗局部的晚期胰腺癌。骨髓抑制 (包括白细胞减少症、血小板减少症和贫血) 是给药吉西他滨最常见的剂量限制性副作用。

[0127] 甲氨蝶呤, N-[4[(2, 4- 二氨基 -6- 蝶啶基) 甲基] 甲基氨基] 苯甲酰基]-L- 谷氨酸, 以甲氨蝶呤钠市售。甲氨蝶呤在 S- 期具有细胞时相特异性作用, 其通过抑制合成嘌呤核苷酸和胸苷酸所需的脱氢叶酸还原酶来抑制 DNA 的合成、修复和 / 或复制。甲氨蝶呤可作为单独的药物或与其它化疗剂组合, 用于治疗绒毛膜癌、脑膜白血病、非霍奇金淋巴瘤, 以及乳腺癌、头癌、颈癌、卵巢癌和膀胱癌。预期骨髓抑制 (白细胞减少症、血小板减少症和贫血) 和粘膜炎是给药甲氨蝶呤的副作用。

[0128] 喜树碱 (Camptothecins), 包括喜树碱和喜树碱衍生物, 其可作为拓扑异构酶 I 抑

制剂来使用或开发。认为喜树碱细胞毒素活性与其拓扑异构酶 I 抑制活性相关。喜树碱的实例包括但不限于伊立替康、托泊替康,以及下述 7-(4- 甲基哌嗪基 - 亚甲基)-10, 11- 亚乙二氧基 -20- 喜树碱的各种旋光体。

[0129] 盐酸伊立替康 (Irinotecan HCl), (4S)-4, 11- 二乙基 -4- 羟基 -9-[(4- 哌啶子基哌啶子基) 羰基氧基]-1H- 吡喃并 [3', 4', 6, 7] 中氮茛并 [1, 2-b] 喹啉 -3, 14 (4H, 12H)- 二酮盐酸盐, 以 **CAMPTOSAR®** 注射溶液市售。

[0130] 伊立替康 (Irinotecan) 是喜树碱的衍生物, 其与其活性代谢物 SN-38 一起结合在拓扑异构酶 I-DNA 复合物上。认为由于双链不可修复的 (irreparable) 断裂, 导致出现细胞毒性, 所述断裂是由拓扑异构酶 I :DNA :伊立替康或 SN-38 三元复合物与复制酶之间的相互作用引起的。伊立替康可用于治疗结肠或直肠的转移癌。盐酸伊立替康的剂量限制性副作用是骨髓抑制, 包括嗜中性白细胞减少症, 以及包括腹泻的 GI 效应。

[0131] 盐酸托泊替康 (Topotecan HCl), (S)-10-[(二甲基氨基) 甲基]-4- 乙基 -4, 9- 二羟基 -1H- 吡喃并 [3', 4', 6, 7] 中氮茛并 [1, 2-b] 喹啉 -3, 14-(4H, 12H)- 二酮一盐酸盐 ((S)-10-[(dimethylamino)methyl]-4-ethyl-4, 9-dihydroxy-1H-pyrano[3', 4', 6, 7] indo lizino[1, 2-b]quinoline-3, 14-(4H, 12H)-dione monohydrochloride), 以 **HYCAMTIN®** 注射溶液市售。托泊替康是喜树碱的衍生物, 其与拓扑异构酶 I-DNA 复合物结合, 并阻止单链断裂的再连接, 所述单链断裂是拓扑异构酶 I 响应 DNA 分子的扭转张力 (torsional strain) 所引起的。托泊替康用于卵巢转移癌和小细胞肺癌的二线治疗。盐酸托泊替康的剂量限制性副作用是骨髓抑制, 主要是嗜中性白细胞减少症。

[0132] 利妥昔单抗 (Rituximab) 是嵌合的单克隆抗体, 以 **RITUXAN®** 和 **MABTHERA®** 市售。利妥昔单抗结合 B 细胞上的 CD20, 并导致细胞凋亡。利妥昔单抗经静脉内给药, 且已被批准用于治疗类风湿关节炎和 B 细胞非霍奇金淋巴瘤。

[0133] 奥法木单抗 (Ofatumumab) 是全人源化单克隆抗体, 以 **ARZERRA®** 市售。奥法木单抗结合 B 细胞上的 CD20, 并用于治疗慢性淋巴细胞白血病 CLL; 一类成人的白血细胞癌症, 其难以用氟达拉滨 (Fludara) 和阿仑单抗 (Campath) 治疗。

[0134] 曲妥珠单抗 (**HEREPTIN®**) 是人源化单克隆抗体, 其结合 HER2 受体。它最初的适应症是 HER2 阳性乳腺癌。

[0135] 西妥昔单抗 (**ERBITUX®**) 是人鼠嵌合性抗体, 其抑制表皮生长因子受体 (EGFR)。

[0136] 帕妥珠单抗 (也称为 2C4, 商品名称 Omnitarg) 是单克隆抗体。它是第一个被称为“HER 二聚化抑制剂”的单克隆抗体。通过结合 HER2, 阻滞了 HER2 与其它 HER 受体的二聚化, 这被假设减缓了肿瘤的生长。帕妥珠单抗被描述于 W001/00245, 公开于 2001 年 1 月 4 日。

[0137] mTOR 抑制剂包括但不限于雷帕霉素 (FK506) 及其类似物、RAD001 或依维莫司 (Afinitor)、CCI-779 或替西罗莫司、AP23573、AZD8055、WYE-354、WYE-600、WYE-687 和 Pp121。

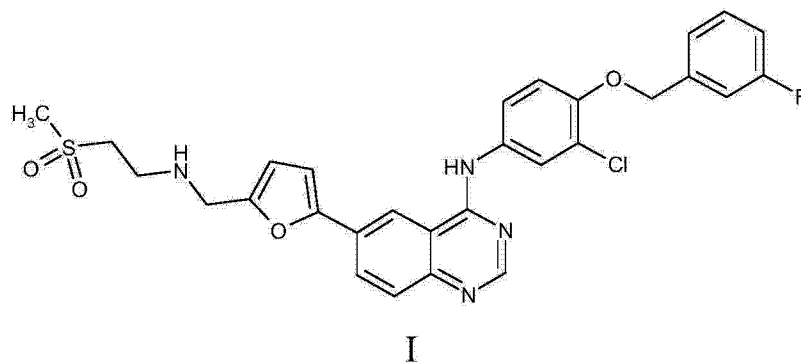
[0138] 贝沙罗汀 (Bexarotene), 以 **Targretin®** 市售, 且其为选择性地激活视黄醇类 X 受体 (RXRs) 的类视黄醇的亚类的一员。这些类视黄醇受体具有不同于视黄酸受体的生物活

性。贝沙罗汀的化学名为 4-[1-(5,6,7,8-四氢-3,5,5,8,8-五甲基-2-萘基)乙烯基]苯甲酸。贝沙罗汀用于治疗皮肤 T 细胞淋巴瘤 CTCL, 其为一类人的皮肤癌, 所述疾病无法用至少一种其它药物成功地治疗。

[0139] 索拉非尼 (Sorafenib), 以 Nexavar® 市售, 其属于被称为多激酶抑制剂的药物类。它的化学名为 4-[4-[[4-氯-3-(三氟甲基)苯基]氨基甲酰基氨基]苯氧基]-N-甲基-吡啶-2-甲酰胺 (4-[4-[[4-chloro-3-(trifluoromethyl)phenyl]carbamoylamino]phenoxy]-N-methyl-pyridine-2-carboxamide)。索拉非尼用于治疗晚期肾细胞癌 (一类始于肾脏的癌症)。索拉非尼也用于治疗不能被切除的肝细胞癌 (一类不能进行手术治疗的肝癌)。

[0140] erbB 抑制剂的实例包括拉帕替尼、厄洛替尼 (erlotinib) 和吉非替尼 (gefitinib)。拉帕替尼, N-(3-氯-4-[[3-(氟苯基)甲基]氧基]苯基)-6-[5-({[2-(甲基磺酰基)乙基]氨基}甲基)-2-呋喃基]-4-喹唑啉胺 (N-(3-chloro-4-[[3-(fluorophenyl)methyl]oxy}phenyl)-6-[5-({[2-(methylsulfonyl)ethyl]amino}methyl)-2-furanyl]-4-quinazolinamine) (用式 I 表示, 如图所示), 是一种有效的口服的小分子 erbB-1 和 erbB-2 (EGFR 和 HER2) 酪氨酸激酶双重抑制剂, 其被批准与卡培他滨组合治疗 HER2 阳性转移性乳腺癌。

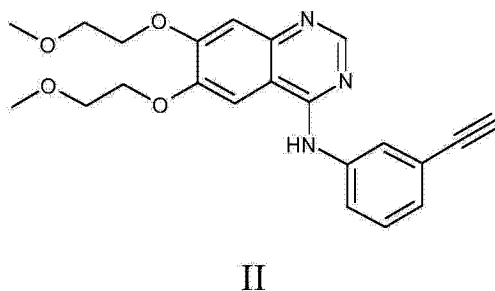
[0141]



[0142] 式 (I) 化合物的游离碱、HCl 盐和二甲苯磺酸盐 (ditosylate) 可以根据公开在 W0 99/35146 (公布于 1999 年 7 月 15 日); 和 W0 02/02552 (公布于 2002 年 1 月 10 日) 的操作制备。

[0143] 厄洛替尼, N-(3-乙炔基苯基)-6,7-二{{[2-(甲基氧基)乙基]氧基}-4-喹唑啉胺 (N-(3-ethynylphenyl)-6,7-bis{{[2-(methyloxy)ethyl]oxy}-4-quinazolinamine), 市售商品名称 Tarceva, 其表示为式 II, 如图所示:

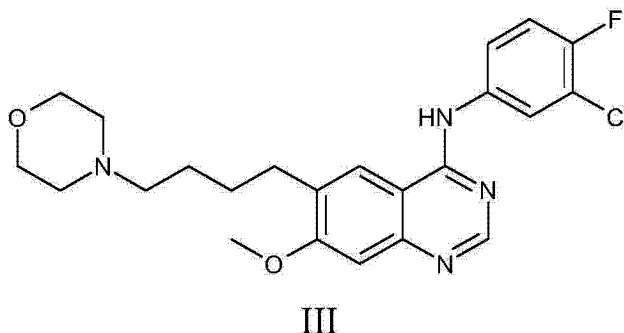
[0144]



[0145] 厄洛替尼的游离碱和 HCl 盐可根据例如 U. S. 5, 747, 498, 实施例 20 制备。

[0146] 吉非替尼, N-(3-氯-4-氟苯基)-7-甲氧基-6-[3-(4-吗啉)丙氧基]-4-喹啉胺 (4-quinazolinamine, N-(3-chloro-4-fluorophenyl)-7-methoxy-6-[3-(4-morpholin)propoxy]) 用式 III 表示, 如图所示:

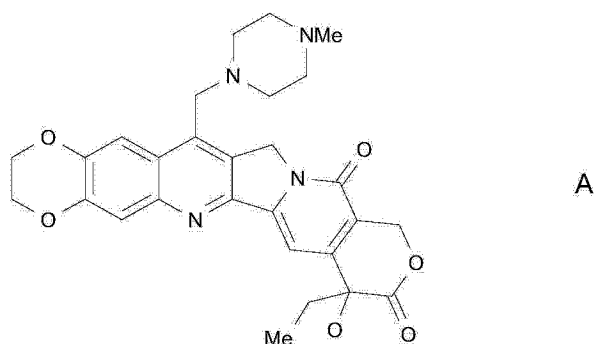
[0147]



[0148] 吉非替尼, 其市售商品名称为 **IRESSA®** (Astra-Zenenca), 是 erbB-1 抑制剂, 其被指示在用基于铂和多西他奇的化学疗法都失败后, 作为单一疗法用于对患有局部晚期或转移性非小细胞肺癌的患者的进行治疗。吉非替尼的游离碱、HCl 盐和二盐酸盐可以根据国际专利申请 No. PCT/GB96/00961 (提交于 1996 年 4 月 23 日) 和 WO 96/33980 (公开于 1996 年 10 月 31 日) 的操作制备。

[0149] 在目前的发明中, 同样感兴趣的是以下式 A 的喜树碱衍生物, 包括外消旋混合物 (R, S) 形式以及 R 和 S 对映异构体:

[0150]



[0151] 已知为化学名“7-(4-甲基哌嗪基-亚甲基)-10,11-亚乙二氧基-20(R,S)-喜树碱 (7-(4-methylpiperazino-methylene)-10,11-ethylenedioxy-20(R,S)-camptothecin) (外消旋混合物) 或“7-(4-甲基哌嗪基-亚甲基)-10,11-亚乙二氧基-20(R)-喜树碱 (7-(4-methylpiperazino-methylene)-10,11-ethylenedioxy-20(R)-camptothecin (R enantiomer)) (R 对映异构体) 或“7-(4-甲基哌嗪基-亚甲基)-10,11-亚乙二氧基-20(S)-喜树碱 (7-(4-methylpiperazino-methylene)-10,11-ethylenedioxy-20(S)-camptothecin (S enantiomer)) (S 对映异构体)。该化合物以及相关化合物 (包括制备方法) 公开在美国专利 6,063,923 ;5,342,947 ;5,559,235 ;5,491,237 和于 1997 年 11 月 24 日提交的审查中的美国专利申请 08/977,217 中。

[0152] 激素和激素类似物为治疗癌症有用的化合物, 其中激素和癌症的生长和 / 或停止生之间存在关系。用于治疗癌症的激素和激素类似物的实例包括, 但不限于, 肾上腺皮质类固醇类 (adrenocorticosteroids) (例如泼尼松 (prednisone) 和泼

尼松龙 (prednisolone)), 其用于治疗儿童的恶性淋巴瘤和急性白血病; 氨鲁米特 (aminoglutethimide) 和其它芳香酶抑制剂 (例如阿那曲唑 (anastrozole)、来曲唑 (letrozole)、vorazole 和依西美坦 (exemestane)), 其用于治疗肾上腺皮质癌和包含雌激素受体的激素依赖性乳腺癌; 孕酮 (例如醋酸甲地孕酮), 其用于治疗激素依赖性乳腺癌和子宫内膜癌; 雌激素、雄激素以及抗雄激素 (例如氟他胺、尼鲁米特、比卡鲁胺、醋酸环丙孕酮) 和 5α -还原酶 (例如非那雄胺和度他雄胺), 其用于治疗前列腺癌和良性前列腺肥大; 抗雌激素 (例如他莫昔芬、托瑞米芬、雷洛昔芬、屈洛昔芬、iodoxyfene, 以及美国专利 5,681,835、5,877,219 和 6,207,716 中公开的选择性雌激素受体调节剂 (SERMS)), 其用于治疗激素依赖性乳腺癌和其它易发性癌症; 以及促性腺素-释放激素 (GnRH) 及其类似物, 其刺激黄体生成激素 (LH) 和 / 或促卵泡激素 (FSH) 的释放, 用于治疗前列腺癌, 例如, LHRH 激动剂和拮抗剂, 例如醋酸戈舍瑞林和 luprolide。

[0153] 来曲唑 (商品名称 Femara) 是一种口服的非甾体芳香化酶抑制剂, 其用于治疗手术后激素依赖性 (hormonally-responsive) 乳腺癌。雌激素通过如下产生的: 通过芳香酶的活性将雄激素转化)。然后, 雌激素结合至雌激素受体, 导致细胞分裂。来曲唑通过竞争性、可逆性地结合其细胞色素 P450 单位的血红素来防止芳香酶产生雌激素。该操作是特异的, 且来曲唑并不会降低盐皮质激素或皮质激素的产生。

[0154] 信号转导途径抑制剂为阻断或抑制引起细胞内变化的化学过程的那些抑制剂。本文所用的该变化为细胞增殖或分化。用于本发明的信号转导抑制剂包括受体酪氨酸激酶、非-受体酪氨酸激酶、SH2/SH3 区域阻断剂、丝氨酸 / 苏氨酸激酶、磷脂酰肌醇-3 激酶、肌醇信号, 以及 Ras 癌基因的抑制剂。

[0155] 多种蛋白酪氨酸激酶催化细胞生长的调节中涉及的多种蛋白中的特定酪氨酸残基的磷酸化。该蛋白酪氨酸激酶可以大致分类为受体或非-受体激酶。

[0156] 受体酪氨酸激酶为跨膜蛋白, 其具有胞外配体结合区域、跨膜区域, 以及酪氨酸激酶区域。受体酪氨酸激酶涉及细胞生长的调节, 并通常称为生长因子受体。许多这些激酶的不合适的或不受控制的活化, 即异常激酶生长因子受体活化 (例如过表达或突变), 已经显示出导致不受控制的细胞生长。因此, 该激酶的异常活性已经与恶性组织生长联系起来。因此, 该激酶的抑制剂可以提供癌症治疗方法。生长因子受体包括, 例如, 表皮生长因子受体 (EGFr)、血小板衍生生长因子受体 (PDGFr)、erbB2、erbB4、血管内皮生长因子受体 (VEGFr)、具有免疫球蛋白-样和表皮生长因子同源性区域的酪氨酸激酶 (TIE-2)、胰岛素生长因子-I (IGFI) 受体、巨噬细胞集落刺激因子 (cfms)、BTK、ckit、cmet、成纤维细胞生长因子 (FGF) 受体、Trk 受体 (TrkA、TrkB 和 TrkC)、ephrin(eph) 受体, 以及 RET 原癌基因。生长受体的多种抑制剂处于研发之中, 包括配体拮抗剂、抗体、酪氨酸激酶抑制剂和反义寡核苷酸。生长因子受体和抑制生长因子受体功能的药剂公开在, 例如, Kath, John C., Exp. Opin. Ther. Patents (2000) 10 (6): 803-818; Shawver 等, DDT Vol 2, No. 2 February 1997; 以及 Lofts, F. J. 等, "Growth factor receptors as 靶s", New Molecular 靶s for Cancer Chemotherapy, ed. Workman, Paul and Kerr, David, CRC press 1994, London 中。

[0157] 酪氨酸激酶 (其不是生长因子受体激酶) 被称为非-受体酪氨酸激酶。用于本发明的非-受体酪氨酸激酶, 其为抗癌药物的靶点或潜在靶点, 包括 cSrc、Lck、Fyn、Yes、Jak、cAbl、FAK (黏着斑激酶)、Brutons 酪氨酸激酶, 以及 Bcr-Abl。该非-受体激

酶和抑制非-受体酪氨酸激酶功能的药剂公开在 Sinh, S. 和 Corey, S. J., (1999) Journal of Hematotherapy and Stem Cell Research 8(5):465-80; 以及 Bolen, J. B., Brugge, J. S., (1997) Annual review of Immunology. 15:371-404 中。

[0158] SH2/SH3 区域阻断剂为断裂多种酶或适体 (adaptor) 蛋白中的 SH2 或 SH3 区域结合的药剂, 包括 PI3-K p85 亚单位、Src 家族激酶、适体分子 (Shc、Crk、Nck、Grb2) 和 Ras-GAP。SH2/SH3 区域作为抗癌药物的靶点公开在 Smithgall, T. E. (1995), Journal of Pharmacological and Toxicological Methods. 34(3)125-32 中。

[0159] 丝氨酸/苏氨酸激酶的抑制剂包括 MAP 激酶级联阻断剂, 其包括 Raf 激酶 (rafk)、促分裂原或胞外调节的激酶 (MEK), 以及胞外调节的激酶 (ERK) 的阻断剂; 并且蛋白激酶 C 家族成员阻断剂包括 PKC(alpha、beta、gamma、epsilon、mu、lambda、iota、zeta)、I κ B 激酶家族 (IKK α 、IKK β)、PKB 家族激酶、AKT 激酶家族成员以及 TGF β 受体激酶的阻断剂。该丝氨酸/苏氨酸激酶及其抑制剂公开在 Yamamoto, T., Taya, S., Kaibuchi, K., (1999), Journal of Biochemistry. 126(5)799-803; Brodt, P., Samani, A., 和 Navab, R. (2000), Biochemical Pharmacology, 60. 1101-1107; Massague, J., Weis-Garcia, F. (1996) Cancer Surveys. 27: 41-64; Philip, P. A., 和 Harris, A. L. (1995), Cancer Treatment and Research. 78: 3-27; Lackey, K. 等, Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, (10), 2000, 223-226; 美国专利号 6, 268, 391; 以及 Martinez-Iacaci, L. 等, Int. J. Cancer (2000), 88(1), 44-52 中。

[0160] 包括 PI3- 激酶、ATM、DNA-PK, 以及 Ku 的阻断剂的磷脂酰肌醇-3 激酶家族成员的抑制剂也用于本发明。该激酶公开在 Abraham, R. T. (1996), Current Opinion in Immunology. 8(3)412-8; Canman, C. E., Lim, D. S. (1998), Oncogene 17(25)3301-3308; Jackson, S. P. (1997), International Journal of Biochemistry and Cell Biology. 29(7):935-8; 以及 Zhong, H. 等, Cancer res, (2000)60(6), 1541-1545 中。

[0161] 本发明还关注肌醇信号抑制剂, 例如磷脂酶 C 阻断剂以及肌醇类似物。该信号抑制剂公开在 Powis, G., 和 Kozikowski A., (1994) New Molecular Targets for Cancer Chemotherapy ed., Paul Workman and David Kerr, CRC press 1994, London 中。

[0162] 信号转导途径抑制剂的其它类型为 Ras 癌基因的抑制剂。该抑制剂包括法呢基转移酶、牻牛儿基-牻牛儿基转移酶、CAAX 蛋白酶、反义寡核苷酸、核糖酶和免疫疗法的抑制剂。该抑制剂已经显示出在含有野生型突变 ras 的细胞中阻断 ras 激活, 因此作为抗增殖药剂。Ras 癌基因的抑制在 Scharovsky, O. G., Rozados, V. R., Gervasoni, S. I. Matar, P. (2000), Journal of Biomedical Science. 7(4)292-8; Ashby, M. N. (1998), Current Opinion in Lipidology. 9(2)99-102; 以及 Bennett, C. F. 和 Cowser, L. M. Biochim. Biophys. Acta, (1999)1489(1):19-30 中讨论。

[0163] 如上所述, 拮抗受体激酶配体结合的抗体也用作信号转导抑制剂。该类信号转导途径抑制剂包括使用人化的抗体至受体酪氨酸激酶的胞外配体结合区域。例如 Imclone C225 EGFR 特异性抗体 (见 Green, M. C. 等, 单克隆抗体 Therapy for Solid Tumors, Cancer Treat. Rev., (2000), 26(4), 269-286); Herceptin® erbB2 抗体 (见 Tyrosine Kinase Signalling in Breast cancer:erbB Family Receptor Tyrosine Kinases, Breast cancer Res., 2000, 2(3), 176-183); 以及 2CB VEGFR2 特异性抗体 (见 Brekken, R. A. 等

人, Selective Inhibition of VEGFR2 Activity by a monoclonal Anti-VEGF antibody blocks tumor growth in mice, *Cancer Res.* (2000) 60, 5117-5124)。

[0164] 非-受体激酶血管生成抑制剂也有用于本发明。血管生成相关的 VEGFR 和 TIE2 的抑制剂在上文信号转导抑制剂中讨论(两种受体均为受体酪氨酸激酶)。血管生成通常与 erbB2/EGFR 信号转导联系起来, 因为 erbB2 和 EGFR 的抑制剂已经显示出抑制血管生成, 主要地 VEGF 表达。因此, 非-受体酪氨酸激酶抑制剂也可以与本发明的化合物组合使用。例如, 抗-VEGF 抗体, 其不识别 VEGFR(受体酪氨酸激酶), 但是结合配体; 将抑制血管生成的整联蛋白的 ($\alpha_v \beta_3$) 的小分子抑制剂; 内皮他丁 (endostatin) 和血管他丁 (angiostatin) (非-RTK) 也得以证明用于与公开的化合物组合。(见 Bruns CJ 等 (2000), *Cancer Res.*, 60:2926-2935; Schreiber AB, Winkler ME, 和 Derynck R. (1986), *Science*, 232:1250-1253; Yen L 等, (2000), *Oncogene* 19:3460-3469)。

[0165] 用于免疫治疗方案的药剂也可用于与式 (I) 化合物组合。存在许多产生免疫响应的免疫策略。这些策略通常在肿瘤疫苗的范围。免疫方法的有效性可以经过使用小分子抑制剂结合抑制信号途径得以大大增强。对抗 erbB2/EGFR 的免疫/肿瘤疫苗方法的讨论可见于 Reilly RT 等. (2000), *Cancer Res.* 60:3569-3576; 以及 Chen Y, Hu D, Eling DJ, Robbins J, 和 Kipps TJ. (1998), *Cancer Res.* 58:1965-1971。

[0166] 用于促细胞凋亡方案的药剂(例如, bcl-2 反义寡核苷酸)也可用于本发明的组合中。蛋白的 Bcl-2 家族的成员阻断凋亡。上调的 bcl-2 因此已经与化学抗性联系起来。研究显示表皮生长因子 (EGF) 刺激 bcl-2 家族(即, mcl-1) 的抗凋亡成员。因此, 设计的下调 bcl-2 在肿瘤中的表达的策略已经证明临床有益, 而且现已进入 II/III 期临床试验, 即 Genta 的 G3139 bcl-2 反义寡核苷酸。使用对 bcl-2 的该反义寡核苷酸策略的促细胞凋亡策略在 Water JS 等. (2000), *J. Clin. Oncol.* 18:1812-1823; 以及 Kitada S 等. (1994), *Antisense Res. Dev.* 4:71-79 中讨论。

[0167] 细胞周期信号转导抑制剂抑制参与细胞周期控制的分子。蛋白激酶的家族称为细胞周期蛋白依赖激酶 (CDK), 而且它们与称为细胞周期蛋白的蛋白家族的相互作用控制真核细胞周期的进展。不同细胞周期蛋白/CDK 复合物的协调活化和失活对于细胞周期的正常进展至关重要。细胞周期信号转导的多种抑制剂处于研发之中。例如, 细胞周期蛋白依赖激酶, 包括 CDK2、CDK4 和 CDK6 以及它们的抑制剂的实例公开在, 例如, Rosania 等, *Exp. Opin. Ther. Patents* (2000) 10(2):215-230 中。

[0168] 在一个实施方案中, 提供了对此需要的患者给药 HER2 抑制剂的方法, 其包括:

[0169] 确定所述患者在 VEGFA 中的 rs3025039 参考单核苷酸多态性处是否具有 936C>T 基因型; 且

[0170] 如果所述患者在 VEGFA 中的 rs3025039 参考单核苷酸多态性处具有 936C>T 基因型, 则向所述患者给药 HER2 抑制剂。

[0171] 在一个实施方案中, 提供了对此需要的患者规定 HER2 抑制剂的方法, 其包括:

[0172] 确定所述患者在 VEGFA 中的 rs3025039 参考单核苷酸多态性处是否具有 936C>T 基因型; 且

[0173] 如果所述患者在 VEGFA 中的 rs3025039 参考单核苷酸多态性处具有 936C>T 基因型, 则向所述患者规定 HER2 抑制剂。

[0174] 在一个实施方案中,提供了在有此需要的患者中治疗癌症的方法,其包括:

[0175] 确定所述患者在 VEGFA 中的 rs3025039 参考单核苷酸多态性处是否具有 936C>T 基因型;且

[0176] 如果所述患者在 VEGFA 中的 rs3025039 参考单核苷酸多态性处具有 936C>T 基因型,则向所述患者给药 HER2 抑制剂。

[0177] 在一个实施方案中,提供了在有此需要的患者中治疗癌症的方法,所述患者已预先测定基因型,其在 VEGFA 的 rs3025039 参考单核苷酸多态性具有 936C>T 基因型,该方法包括向所述患者给药 HER2 抑制剂。在进一步的实施方案中,所述癌症为转移性乳腺癌。也在进一步的实施方案中,所述癌症为在用 HER2 抑制剂给药或治疗后进一步需要治疗的患者的转移性乳腺癌。在进一步的实施方案中,所述进一步需要治疗在给药 HER2 抑制剂(其为单克隆抗体,包括但不限于曲妥珠单抗)之后。

[0178] 另一个实施方案为在有此需要的患者中治疗癌症的方法,其包括:给药所述患者 HER2 抑制剂;然后确定所述患者是否在 VEGFA 的 rs3025039 参考单核苷酸多态性具有 936C>T 基因型。在进一步的实施方案中,提供在有此需要的患者中治疗癌症的方法,其包括:给药所述患者第一 HER2 抑制剂;然后确定所述患者是否在 VEGFA 的 rs3025039 参考单核苷酸多态性具有 936C>T 基因型,然后如果发现患者在 VEGFA 的 rs3025039 参考单核苷酸多态性具有 936C>T 基因型,则用第二 HER2 抑制剂进行治疗。

[0179] 本发明的方法包括测试患者是否在 VEGFA 的 rs3025039 参考单核苷酸多态性具有 936C>T 基因型。该方法还包括,但不限于测试至少有一个单核苷酸多态性基因型的患者,该单核苷酸多态性与在 VEGFA 的 rs3025039 参考单核苷酸多态性的 936C>T 基因型相关。

[0180] 在一个实施方案中,拉帕替尼用于在被分类为应答者的人中治疗癌症,其中该应答者的特征在于在 VEGFA 的 rs3025039 参考单核苷酸多态性具有 936C>T 基因型。在另一个实施方案中,拉帕替尼用于在被分类为拉帕替尼的应答者的人中治疗癌症,其中该应答者的特征在于在 VEGFA 的 rs3025039 参考单核苷酸多态性具有 936C>T 基因型。在进一步的实施方案中,所述癌症为在用 HER2 抑制剂给药或治疗后需要进一步治疗的患者的转移性乳腺癌。在进一步的实施方案中,所述需要的进一步的治疗在给药 HER2 抑制剂(其为单克隆抗体,包括但不限于曲妥珠单抗)之后。

[0181] 在另一个实施方案中的是拉帕替尼在制备用于在分类为拉帕替尼应答者的人中治疗癌症的药物中的用途,其中该应答者的特征在于在 VEGFA 的 rs3025039 参考单核苷酸多态性处具有 936C>T 基因型。

[0182] 在不同的实施方案中的是拉帕替尼的用途,其特征在于其用于制备用于在分类为拉帕替尼应答者的人中治疗癌症的药物,其中该应答者的特征在于在 VEGFA 的 rs3025039 参考单核苷酸多态性处具有 936C>T 基因型。

[0183] 在包括确定在 VEGFA 的 rs3025039 参考单核苷酸多态性处具有 936C>T 基因型存在的本文的方法或用途的实施方案中,或者在确定在 VEGFA 的 rs3025039 参考单核苷酸多态性处具有 936C>T 基因型存在的患者或人的本文的方法或用途中,方法还包括在用拉帕替尼治疗或给药后,观察或确定或检测总体存活的改善。

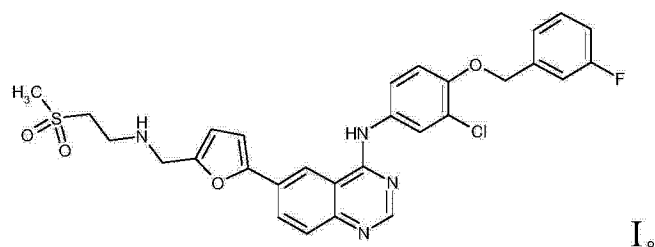
[0184] 在一些方面,所述癌症为乳腺癌。该癌症可为转移性乳腺癌,例如在使用拉帕替尼的本文的发明的每一个实施方案中。癌症选自下组:结肠癌、乳腺癌、转移性乳腺癌、

肾细胞癌、黑素瘤、肺癌（包括非小细胞肺癌和肺腺癌）、胃癌、结肠直肠癌、神经内分泌癌、甲状腺癌、头和颈癌、脑癌、宫颈癌、膀胱癌、食道癌、胰腺癌、前列腺癌、间皮瘤、肝-肝胆癌、多发性骨髓瘤、白血病、甲状腺癌，包括 Hurthle 细胞、肌肉肉瘤（平滑肌肉瘤）和骨肉瘤（软骨肉瘤）(colon cancer, breast cancer, metastatic breast cancer, renal cell carcinoma, melanoma, lung cancer including non-small cell lung cancer and adenocarcinoma, gastric cancer, colorectal cancer, neuroendocrine cancer, thyroid cancer, head and neck cancer, brain cancer, cervical cancer, bladder cancer, esophageal cancer, pancreatic cancer, prostate cancer, mesothelioma, liver-hepatobiliary cancer, multiple myeloma, leukemia, thyroid cancer including Hurthle cell, muscle sarcoma (leiomyosarcoma) and bone sarcoma (chondrosarcoma))。

[0185] 在一个实施方案中，所述 HER2 抑制剂为双重靶抑制剂 HER2/EGFR 抑制剂。

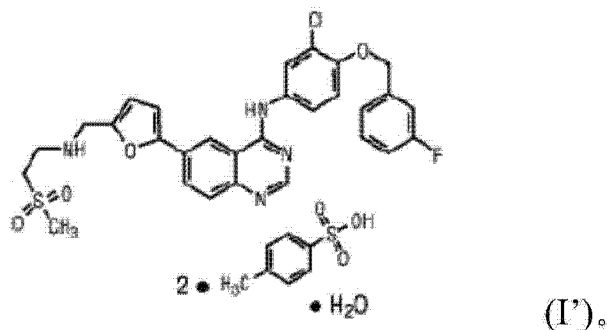
[0186] 在一方面，所述 HER2 抑制剂包括式 I 化合物或其药学上可接受的盐或溶剂合物：

[0187]



[0188] 在另一方面，所述 HER2 抑制剂为式 I' 化合物：

[0189]



[0190] 在一个方面，所述 HER2 抑制剂为单克隆抗体。该单克隆抗体可为曲妥珠单抗、帕妥珠单抗或两者的组合。在一个方面，所述 HER2 抑制剂以单一疗法给药。在一个方面，所述 HER2 抑制剂为拉帕替尼或其药学上可接受的盐，且与卡培他滨和 / 或来曲唑组合给药。在另一个方面，所述 HER2 抑制剂为拉帕替尼或其药学上可接受的盐，且与卡培他滨和 / 或来曲唑和 / 或曲妥珠单抗组合给药。

[0191] 本文还提供了治疗癌症患者的方法，其还包括检测所述患者是否具有 VEGFR218487A>T 多态性。该多态性为非同义的，即 Q472H，其在 472 位编码氨基酸从谷氨酰胺 (Q) 变为组氨酸 (H) 的氨基酸变化。在一个方面，该方法包括如果所述患者具有至少一个与 VEGFR218487A>T 相关的单核苷酸多态性，则用拉帕替尼和曲妥珠单抗治疗所述患者。

[0192] 本文还提供了在有此需要的患者中治疗癌症的方法，其包括：

[0193] 确定所述患者是否具有多态性 VEGFR218487A>T；且

[0194] 如果所述患者具有多态性 VEGFR2 18487A>T, 向所述患者给药拉帕替尼和曲妥珠单抗。

[0195] 在一些实施方案中, 本文提供了在有此需要的患者中治疗癌症的方法, 该患者已预先测定基因型, 其在 VEGFR2 的 rs1870377 参考单核苷酸多态性处具有 18487A>T 基因型, 该方法包括向所述患者给药 HER2 抑制剂。在进一步实施方案中, 所述癌症为转移性乳腺癌。也在进一步的实施方案中, 所述癌症为在用 HER2 抑制剂给药或治疗后进一步需要治疗的患者中的转移性乳腺癌。在进一步的实施方案中, 所述进一步需要的治疗在给药 HER2 抑制剂 (其为单克隆抗体, 包括但不限于曲妥珠单抗) 之后。

[0196] 另一个实施方案为在有此需要的患者中治疗癌症的方法, 其包括: 向所述患者给药 HER2 抑制剂; 然后确定所述患者在 VEGFR2 的 rs1870377 参考单核苷酸多态性处是否具有 18487A>T 基因型。在进一步的实施方案中, 提供了在有此需要的患者中治疗癌症的方法, 其包括: 向所述患者给药第一 HER2 抑制剂; 然后确定所述患者在 VEGFR2 的 rs1870377 参考单核苷酸多态性处是否具有 18487A>T 基因型; 然后如果发现患者在 VEGFR2 的 rs1870377 参考单核苷酸多态性处具有 18487A>T 基因型, 则用至少一种额外的 HER2 抑制剂进行治疗。在进一步实施方案中, 第一 HER2 抑制剂为曲妥珠单抗。在进一步实施方案中, 至少一种额外的 HER2 抑制剂为拉帕替尼。在进一步实施方案中, 该方法包括用至少一种额外的 HER2 抑制剂 (其为拉帕替尼) 治疗, 还包括用曲妥珠单抗治疗。

[0197] 本发明的方法包括对患者测试在 VEGFR2 的 rs1870377 参考单核苷酸多态性处的 18487A>T 基因型。该方法还包括但不限于对患者测试至少一个与在 VEGFR2 的 rs1870377 参考单核苷酸多态性处的 18487A>T 基因型相关的单核苷酸多态性基因型。

[0198] 在一个实施方案中是拉帕替尼, 其用于在分类为应答者的人中治疗癌症, 其中该应答者的特征在于在 VEGFR2 的 rs1870377 参考单核苷酸多态性处存在 18487A>T 基因型。在另一个实施方案中是拉帕替尼, 其用于在分类为拉帕替尼的应答者的人中治疗癌症, 其中该应答者的特征在于在 VEGFR2 的 rs1870377 参照单核苷酸多态性处存在 18487A>T 基因型。在进一步的实施方案中, 所述癌症为在用 HER2 抑制剂给药或治疗后进一步需要治疗的患者的转移性乳腺癌。在进一步的实施方案中, 所述进一步需要的治疗在给药 HER2 抑制剂 (其为单克隆抗体, 包括但不限于曲妥珠单抗) 之后。

[0199] 在另一个实施方案中是拉帕替尼在制备用于在分类为拉帕替尼应答者的人中治疗癌症的药物中的用途, 其中该应答者的特征在于在 VEGFR2 的 rs1870377 参考单核苷酸多态性处存在 18487A>T 基因型。

[0200] 在不同的实施方案中是拉帕替尼的用途, 其特征在于其用于制备用于在分类为拉帕替尼的应答者的人中治疗癌症的药物, 其中该应答者的特征在于在 VEGFR2 的 rs1870377 参考单核苷酸多态性处存在 18487A>T 基因型。

[0201] 在包括确定在 VEGFA 的 rs3025039 参考单核苷酸多态性处 936C>T 基因型的存在的本文的方法或用途的实施方案中, 或者在确定为在 VEGFA 的 rs3025039 参考单核苷酸多态性处存在 936C>T 基因型的患者或人的本文的方法或用途中, 本方法还包括在用拉帕替尼治疗或给药后和 / 或用拉帕替尼和曲妥珠单抗治疗或给药后, 观察或确定或检测总体存活的改善。

[0202] 在包括确定或检测 18487A>T VEGFR2 基因型 (或在 VEGFA 的参考单核苷酸多态性

rs1870377 处的 18487A>T 基因型) 的本发明的其他实施方案中, 通过使用检测 VEGFR2 基因的基因产物中的非同义突变 (即检测和 / 或确定在 VEGFR2 蛋白的 Q472H 突变) 的方法来检测和 / 或确定所述 18487A>TVEGFR2 基因型。使用蛋白质的此类检测方法是本领域众所周知的。

[0203] 本文还提供了治疗癌症患者的方法, 其包括:

[0204] 确定所述患者是否具有至少一种选自下组的多态性: IGF1R(rs2037448) 229741A>G 和 IGF1R(rs7181022) 28322 C>T; 且

[0205] 若所述患者没有至少一种选自下组的多态性: IGF1R(rs2037448) 229741A>G 和 IGF1R(rs7181022) 28322 C>T, 则向所述患者给药拉帕替尼和曲妥珠单抗。

[0206] 在一个实施方案中的是拉帕替尼, 其用于在没有选自 IGF1R(rs2037448) 229741A>G 和 IGF1R(rs7181022) 28322 C>T 的多态性的分类为应答者的人 (例如在分类为拉帕替尼的应答者的人) 中治疗癌症。在进一步实施方案中的是在拉帕替尼外曲妥珠单抗的用途, 用于在没有选自 IGF1R(rs2037448) 229741A>G 和 IGF1R(rs7181022) 28322 C>T 的多态性的分类为应答者的人 (例如分类为拉帕替尼的应答者的人) 中治疗癌症。

[0207] 在另一个实施方案中的是拉帕替尼或拉帕替尼和曲妥珠单抗的用途, 用于制备用于在没有选自 IGF1R(rs2037448) 229741A>G 和 IGF1R(rs7181022) 28322 C>T 的多态性的分类为应答者的人 (例如分类为拉帕替尼的应答者的人) 中治疗癌症的药物。在另一个实施方案中的是拉帕替尼或拉帕替尼和曲妥珠单抗的用途, 其特征在于所述拉帕替尼, 或所述拉帕替尼和曲妥珠单抗用于制备药物, 该药物用于治疗没有选自 IGF1R(rs2037448) 229741A>G 和 IGF1R(rs7181022) 28322 C>T 的多态性的分类为应答者的人 (例如在被分类为拉帕替尼的应答者的人) 中的癌症。在进一步的实施方案中的是拉帕替尼, 或拉帕替尼和曲妥珠单抗在没有选自 IGF1R(rs2037448) 229741A>G 和 IGF1R(rs7181022) 28322 C>T 的多态性的人或患者中的治疗或用途, 所述癌症为转移性乳腺癌。

[0208] 在另一个实施方案中, 提供了在有此需要的患者中治疗癌症的方法, 其包括:

[0209] 确定所述患者在 VEGFA 的 rs3025039 参考单核苷酸多态性处是否具有至少一种选自下组的多态性: VEGFR218487A>T 和 936C>T 基因型; 和

[0210] 如果所述患者在 VEGFA 的 rs3025039 参考单核苷酸多态性处具有至少一种选自下组的多态性: VEGFR218487A>T 和 936C>T 基因型, 则向所述患者给药酪氨酸激酶抑制剂。

[0211] 本文还提供了在有此需要的患者中治疗癌症的方法, 其包括:

[0212] 确定所述患者是否具有多态性 VEGFR218487A>T; 和

[0213] 如果患者具有多态性 VEGFR218487A>T, 则向所述患者给药拉帕替尼和曲妥珠单抗。

[0214] 在一些实施方案中, 提供了在有此需要的患者中治疗癌症的方法, 所述患者已预先测定基因型, 其在 NR1I3 具有标签 SNP rs2307420, 该方法包括向所述患者给药 HER2 抑制剂。在进一步的实施方案中, 所述癌症为转移性乳腺癌。也在进一步的实施方案中, 所述癌症为在用 HER2 抑制剂给药或治疗后需要进一步治疗的患者的转移性乳腺癌。在进一步的实施方案中, 所述需要的进一步的治疗在给药 HER2 抑制剂 (其为单克隆抗体, 包括但不限于

于曲妥珠单抗)之后。

[0215] 另一个实施方案为在有此需要的患者中治疗癌症的方法,其包括:向所述患者给药 HER2 抑制剂;然后确定所述患者是否在 NR1I3 基因中具有标签单核苷酸多态性 rs2307420。在进一步的实施方案中,提供了在有此需要的患者中治疗癌症的方法,其包括:向所述患者给药第一 HER2 抑制剂;然后确定所述患者是否在 NR1I3 中具有标签单核苷酸多态性 rs2307420,然后如果发现患者在 NR1I3 中具有标签单核苷酸多态性 rs2307420,则用至少一种额外的 HER2 抑制剂治疗。在进一步实施方案中,第一 HER2 抑制剂为曲妥珠单抗。在进一步实施方案中,所述至少一种额外的 HER2 抑制剂为拉帕替尼。在进一步实施方案中,该方法包括用至少一种额外的 HER2 抑制剂(其为拉帕替尼)治疗,和还包括用曲妥珠单抗治疗。

[0216] 本发明的方法包括测试患者是否在 NR1I3 具有标签单核苷酸多态性 rs2307420。该方法还包括但不限于对患者测试至少一个与在 NR1I3 具有标签单核苷酸多态性 rs2307420 相关的单核苷酸多态性基因型。

[0217] 在一个实施方案中的是拉帕替尼,其用于在被分类为应答者的人中治疗癌症,其中该应答者的特征在于 NR1I3 的标签单核苷酸多态性 rs2307420 的存在。在另一个实施方案中的是拉帕替尼,其用于在分类为拉帕替尼的应答者的人中治疗癌症,其中该应答者的特征在于 NR1I3 的标签单核苷酸多态性 rs2307420 的存在。在进一步的实施方案中,所述癌症为在用 HER2 抑制剂给药或治疗后需要进一步治疗的患者的转移性乳腺癌。在进一步的实施方案中,所述需要的进一步的治疗在给药 HER2 抑制剂(其为单克隆抗体,包括但不限于曲妥珠单抗)之后。

[0218] 在另一个实施方案中的是拉帕替尼在制备用于治疗分类为拉帕替尼的应答者的人中的癌症的药物中的用途,其中该应答者的特征在于 NR1I3 中的标签单核苷酸多态性 rs2307420 的存在。

[0219] 在不同的实施方案中的是拉帕替尼的用途,特征在于其用于制备治疗分类为拉帕替尼的应答者的人中的癌症的药物,其中该应答者的特征在于 NR1I3 中的标签单核苷酸多态性 rs2307420 的存在。

[0220] 在包括检测或确定在 NR1I3 的标签单核苷酸多态性 rs2307420 的方法的本文的实施方案中,或者在治疗已经测定为具有 NR1I3 中的标签单核苷酸多态性 rs2307420 的患者或人中,本方法还包括在用拉帕替尼治疗后或在使用拉帕替尼和曲妥珠单抗治疗后,观察或确定或检测无进展存活的改善。

[0221] 本文还提供了用于癌症治疗或疗法的生物标记。在一个实施方案中,用于癌症治疗或疗法的所述生物标记选自以下:在 VEGFA 的 rs3025039 参考单核苷酸多态性处 936C>T 基因型的存在、多态性 VEGFR218487A>T 的存在、在 VEGFR2 蛋白中 Q472H 突变的存在、在 NR1I3 中的标签单核苷酸多态性 rs2307420 的存在、不存在 IGF1R(rs2037448) 229741A>G 多态性和不存在 IGF1R(rs7181022) 28322 C>T 多态性。在进一步实施方案中,所述生物标记用于转移性乳腺癌的治疗或疗法。在进一步实施方案中,所述生物标记用于转移性乳腺癌的拉帕替尼治疗或疗法。在进一步实施方案中,所述生物标记为所述组中的 2、3、4、5 种多态性的结合。

[0222] 在进一步实施方案中,本发明的方法还包括将至少一种额外的抗肿瘤药物给药至

所述患者。

[0223] 本发明还用以下非限制性实施例进一步解释说明。

实施例

[0224] 实施例 1

[0225] 拉帕替尼组合是治疗患有转移性乳腺癌 (MBC) 且其肿瘤过表达 Her2 的患者的有效疗法。与 HER2/EGFR 和其它酪氨酸激酶抑制剂 (TKI) 疗法一致, 患者的反应也是多变的, 这预示敏感性和抗性的其他决定因素。宿主, 即种系遗传变异已经与用来治疗其他癌症的 TKI 联系起来。这种探索性的药物遗传学研究试图鉴定种系遗传变体, 其与在 HER2+MBC 患者中的区别拉帕替尼治疗结果相关联。

[0226] 实验方法

[0227] 目的: 鉴别种系遗传变体, 该种系遗传变体预测 HER2 阳性女性中对拉帕替尼治疗的区别患者反应, 其通过测量以下患者人群的无进展存活 (PFS) 和总体存活 (OS) 的主要端点进行:

[0228] • 临床试验 I: 在基于曲妥珠单抗的全身治疗和颅放射治疗后患有复发性脑转移瘤的 HER2+MBC 患者中的拉帕替尼单一疗法研究 (N = 120)。

[0229] • 临床试验 II: 基于曲妥珠单抗的治疗后, 具有疾病进展的 HER2+MBC 患者中的拉帕替尼加曲妥珠单抗 (n = 92) 和拉帕替尼单一疗法 (n = 103) 研究。

[0230] 实验评估了 24 个候选基因中的带有功能性结果的 55 个单核苷酸多态性 (SNP)。用于检测这些单核苷酸多态性的基因型的检测平台为 Illumina Human1M-Duo BeadChip。本实验的候选基因在下方列出。

[0231]

基因	类别	功能
ABCB1	ADME	(P-GP)拉帕替尼为底物
ABCG2	ADME	(BCRP)拉帕替尼为底物
AKT1	通路	与抗凋亡和促细胞增值相关
CXCL12	通路, 或者血管再生	也称为 SDF1, 调节血管再生过程中的内皮祖细胞
CYP3A4	ADME	拉帕替尼为底物和抑制剂
CYP3A5	ADME	CYP3A4 类似物
EGF	通路	拉帕替尼和曲妥珠单抗靶。ErbB2 的杂二聚体形式。
EGFR	通路	拉帕替尼和曲妥珠单抗靶。ErbB2 的杂二聚体形式。
ErbB2	通路	拉帕替尼和曲妥珠单抗靶。EGFR/ErbB1、ErbB3 和 IGF1R 的杂二聚体形式。
ErbB3	通路	(Her3)ErbB2 的杂二聚体形式。
FGF2	通路, 或者血管再生	FGFR2 配体
FGFR2	通路, 或者血管再生	调节血管再生。与 BC 风险多次复发相关。
FLT4	血管再生	(VEGFR3)
HIF1A	通路, 或者血管再生	MEK 的配体, 其调节血管再生。在 mRCC 中与帕唑帕尼响应相关的 A558T 多态性
IGF1	通路, 或者细胞信号传导	调节胰岛素平衡。与 BC 风险相关。与在 mCRC 中的西妥昔单抗反应相关。通过 TGF 活化的 IGF1R/EGFR 异二聚体。IGF1R 抑制作用提高曲妥珠单抗细胞系反应。
IGF1R	通路, 或者细胞信号传导	ErbB2 的杂二聚体形式。与 EGFR 和 HER2 抑制剂抵抗力相关。与在 mCRC 中的西妥昔单抗反应相关。
IGFBP3	通路, 或者细胞信号传导	阻断 IGF1 的循环。高水平表现对癌症的保护作用
IL8	通路, 或者血管再生	血管再生的细胞因子调节剂。在 mRRC 中与 VEGFR 抑制剂的弱响应有关的高血清 IL8
IL8RB	通路, 或者血管再生	IL8 的(CXCR2)受体
KDR	血管再生	(VEGFR2)在 mRRC 中与帕唑帕尼相关的突变
NR1I2	ADME	(PXR)调控 CYP3A4 的表达, 在 mRRC 中与帕唑帕尼相关的多态性
NR1I3	ADME	(RXR)调控 CYP3A4 的表达。在 mRRC 中与舒尼替尼相关

[0232]

		的多态性
TGFa	通路, 或者细胞信号传导	EGFR 配体, 与拉帕替尼、吉非替尼和曲妥珠单抗的弱响应有关的高血清 TGFa
VEGFA	血管再生	VEGFR2 配体, 在 mRRC 中与帕唑帕尼响应相关的多态性

[0233] 使用叠加测试评估遗传关联的统计分析。对于从叠加测试发现的任何显著的标

记,将探索不同基因型之间的感兴趣的特异性对比 (specific contrast),以确定风险基因型。Cox 比例危险率用 Firth 方法建模。多元 Cox 模型中在 $p \leq 0.05$ 显著的任何协变量将包括在内。

[0234] 结果:

[0235] 在参与两个临床试验的 MBC 患者的子集中评估 24 个候选基因中的带有功能性结果的 55 个单核苷酸多态性 (SNP): 临床试验 I: 曲妥珠单抗和颅放射治疗后患有复发性脑转移瘤的 HER2+MBC 患者中的拉帕替尼单一疗法研究 ($N = 120$) 和临床试验 II: 曲妥珠单抗后具有疾病进展的 HER2+MBC 患者中的拉帕替尼加曲妥珠单抗 ($n = 92$) 和拉帕替尼单一疗法 ($n = 103$) 研究。在调整协变量的情况下使用 Cox 比例风险的方法实施在拉帕替尼治疗过程中测试单核苷酸多态性与无进展存活 (PFS) 和总体存活 (OS) 的关联。若标记实现预定义的多重测试阈值 $p < 0.0003$, 则认为该标记是显著关联的。

[0236] 在任一研究中,没有单核苷酸多态性与无进展存活 (PFS) 是统计学显著相关的。

[0237] VEGFA 中的单核苷酸多态性 (rs3025039, 936C>T) 与总体存活 (OS) 在统计学上显著相关 ($p = 0.0002$), 在试验 I 中 T 等位基因携带者具有改善的 OS, 等位基因危害比为 0.21 (0.08-0.52), 但这种关联在试验 II 中没有看到。所述单核苷酸多态性位于 3' UTR 基因区, 调节血清 VEGFA 水平, 且与乳腺癌风险相关 [Krippel 等人, 2003, Int J Cancer 106: 468; Kataoka 等人, 2006, Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 15: 1148]。

[0238] 试验 II 中, VEGFR2 中的单核苷酸多态性 (rs1870377, 18487A>T, Q472H, NP_0022441) 与总体存活 (OS) 在统计学上显著相关 ($p = 0.0004$)。当该单核苷酸多态性没有达到用于该分析的高度保守的 Bonferroni 阈值 ($p < 0.0003$), 则该单核苷酸多态性被认为是名义上显著的。试验 II 中, VEGFR2 (rs1870377, 18487A>T, Q472H) 的等位基因危害比为 0.47 (0.3-0.73), T 等位基因携带者显示改善的 OS, 但这种关联在试验 I 中没有看到。VEGFR2 18487A>T 是非同义的 (472Q>H), 且被报告为调节 VEGF 对 VEGFR2 的结合, T 等位基因提高受体功能 (VEGF 结合和 VEGFR2 受体磷酸化)。

[0239] 在试验 I 和 II 两者中, IGF1R 中的两个单核苷酸多态性 (rs2037448, 229741A>G 和 rs7181022, 28322C>T, NP_000866.1) 均是和总体存活 (OS) 名义上相关 ($p < 0.05$)。这些单核苷酸多态性彼此之间具有低的连锁不平衡关系, 并且组合这些单核苷酸多态性以在分类为在 rs2037448-T 或 rs7181022-G 的次要等位基因方面异质的患者的情况下分析。任一特定的 IGF1R 次要等位基因的携带 (carriage) 导致如下的患者组, 该患者组与野生型相比与较差的总体存活 (OS) 是统计学上显著相关的 ($p = 0.00028$), 试验 II 中等位危害比为 5.0 (2.2-10.0)。试验 I 中观察到关联的类似趋势, 但是该试验没有实现显著关联的 Bonferroni 阈值 ($p = 0.075$)。这些单核苷酸多态性的功能还未被确定。

[0240] 结论: VEGFA 的种系变体对于拉帕替尼在患有脑转移瘤的 MBC 患者中可能与存活结果相关。这可表示 VEGF 血管发生途径的活化克服在携带较高表达基因型的患者中的 HER2 抑制。对 VEGFR2 中的 SNP (rs1870377) 和 IGF1R 中的两个 SNP (rs2037448 和 rs7181022) 观察到与 OS 的名义关联 (Nominal associations with OS were observed for a SNP in VEGFR2 (rs1870377) and two SNPs in IGF1R (rs2037448 and rs7181022))。

[0241] 试验 I 和试验 II 的进一步分析

[0242] 使用试验 I 和 II (上文中描述) 中的患者, 既使用候选基因选择又使用全基因组

关联分析,进行额外的药物遗传学分析。(GWAS, 1M Genome-Wide SNPs(Illumina human 1M duo))。如之前所述进行基因分型 (Spraggs 等人, 2011, J Clin Oncol 29 :667)。检测的基因按如下分为 3 级:

[0243] I 级:先前与表达、替代信号传导或 TKI 治疗反应中的 ADME 或乳腺癌易感性相关的 7 个单核苷酸多态性。

[0244] II 级:选自以下范畴的 23 个候选基因的 48 个功能变体:

[0245] • 拉帕替尼 ADME (ABCB1、ABCG2、CYP3A4、CYP3A5、NR1I2、NR1I3)

[0246] • 拉帕替尼通路 (EGFR、ERBB2、ERBB3、IGF1、IGF1R、IGFBP3、EGF、AKT1)

[0247] • 与 TKI 抗性相关 (HIF1A、IL8、IL8RB、CXCL12、VEGFA、VEGFR2、VEGFR3)

[0248] • 乳腺癌易感性 (FGF2、FGFR2)

[0249] III 级:在上述 23 个候选基因中的 1472 个靶单核苷酸多态性和 TGF α (无对 TGF α 确定的共同功能变体)。

[0250] 使用叠加基因测试来评估关联性,其使用多元 Cox 比例危险率模型校正显著的临床协变量和种族/族裔差异。Firth 方法和基因对照方法 (Genomic Control methods) 分别用于候选基因和 GWAS,用以控制假阳性结果。主要端点是无进展存活 (PFS),次要终点是总体存活 (OS)。

[0251] 除了每一个独特的研究治疗组内的测试,还使用通过逆方差法进行的元分析来组合结果。将变体以不同的关联显著性阈值分配到各级进行分析,并且如下将这些变体在分析前规定,以调整 SNP 检测的数目,但不调整终点和组的数目:

[0252] • 候选基因:

[0253]

层	#SNPs	Alpha 消耗	显著性阈值
I	7	0.03	0.004
II	48	0.015	0.0003
III	1472	0.005	3.40×10^{-6}
Total	1515	0.05	

[0254] • GWAS 单核苷酸多态性:显著性的 Bonferroni 阈值 $p = 0.05/1M = 5 \times 10^{-8}$

[0255] 结果

[0256] 在元分析中,对于 PFS, NR1I3(rs2307420) 标记通过 3.4×10^{-6} 的 p 值阈值。NR1I3 为组成型雄甾烷 (androdane) 受体,且调控 CYP3A4 的表达。效果通过携带低频率的 G 等位基因 ($n < 5$) 驱动。rs2307420 为靶单核苷酸多态性,其为非功能性的。

[0257] 在临床试验 I (拉帕替尼单一疗法) 中,对于 OS, VEGFA(936C>T, rs3025039) 标记通过 $p < 0.0003$ 的阈值。效果由临床试验 I (单一疗法组) 分析的结果得出,但相反的效果在临床试验 II (拉帕替尼加曲妥珠单抗组) 中出现。VEGFA936C>T(rs3025039) 位于 3' UTR, 且调节 VEGF 的表达。CC 比 CT/TT 具有更高的 VEGF 表达 (Formento 等人, 2009, Pharmacogenomics, 10 :1277 ;Krippel 等人, 2003, Int J Cancer 106 :

468, Kataoka 等人, 2006, Cancer Epidemiol Biomarker Prev, 15 :1148)。结果显示在附图中。

[0258] 对于 OS, 也有微小的关联 (在临床试验 II 中 (拉帕替尼加曲妥珠单抗), 对于 KDR/VEGFR2, $p = 0.0005$)。结果显示在附图 4C。

[0259] GWAS 分析显示, 具有相同的标记 ($MAF > 5\%$) 的试验或研究组中无强信号 ($p < 5 \times 10^{-8}$)。

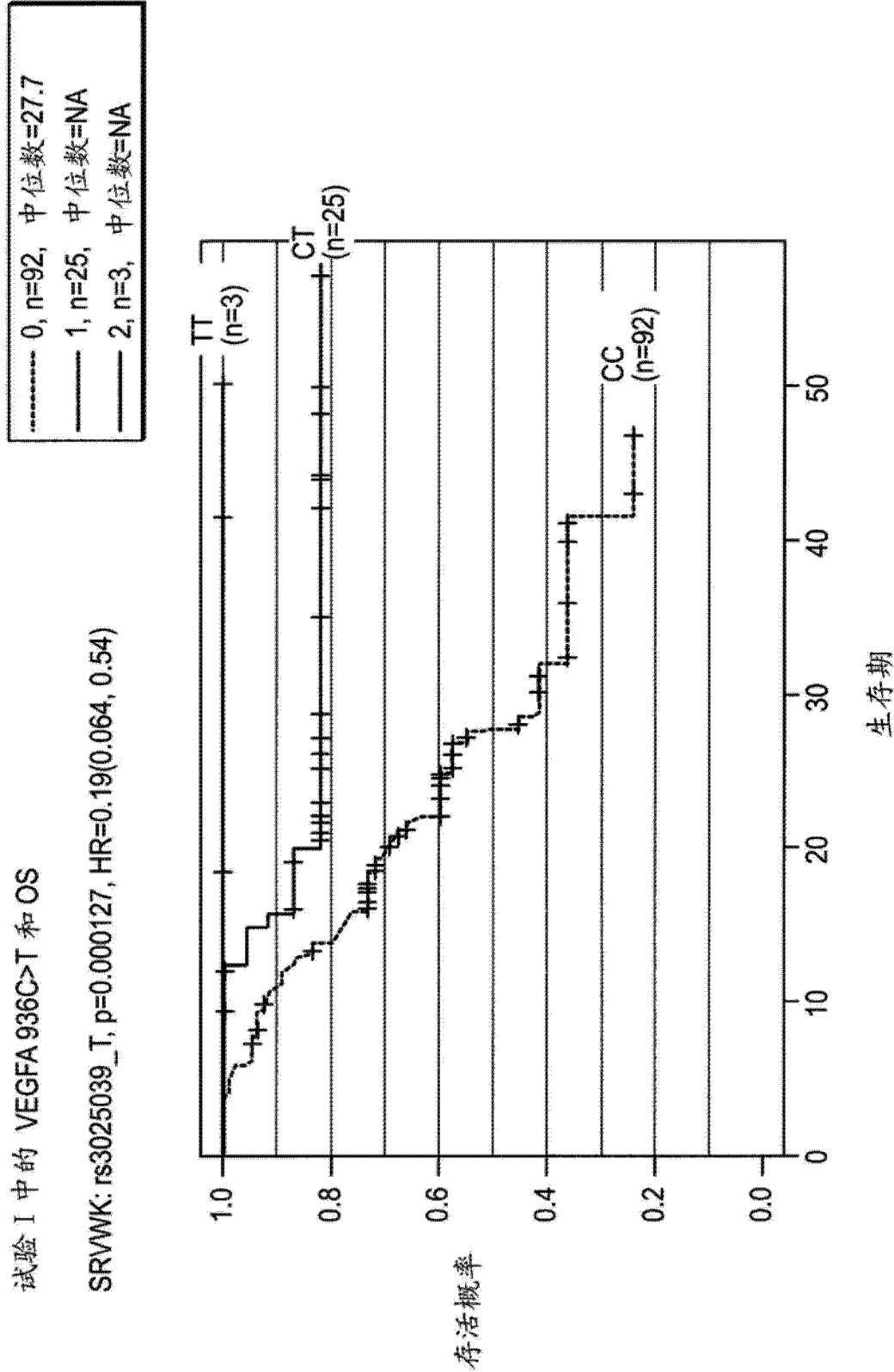


图 1

试验 II 中的 VEGFR2 18487A>T (Q472H) 和 OS

SRVWK: rs1870377_A, $p=0.000438$, $HR=0.47(0.3, 0.73)$

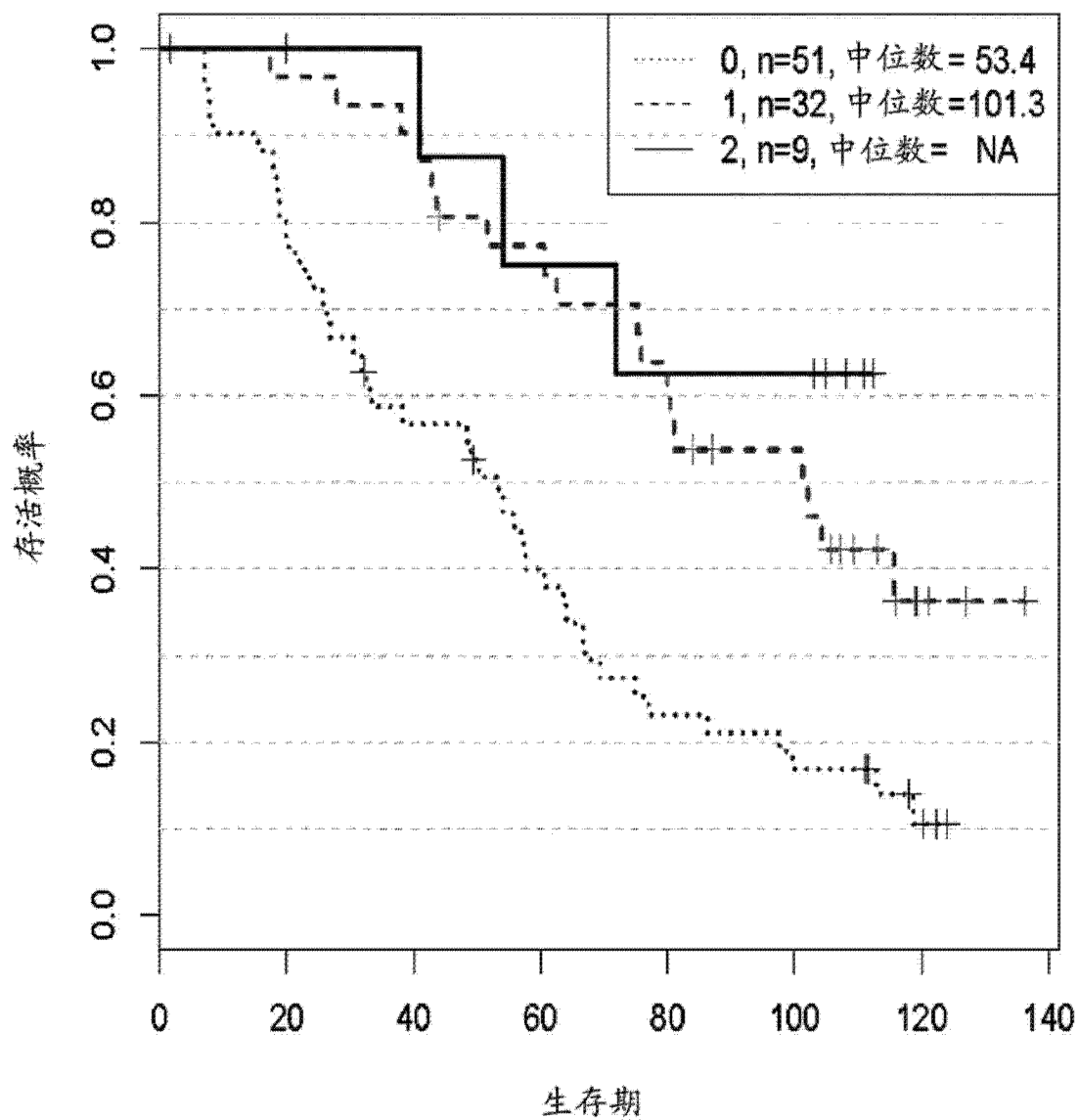


图 2

试验 II 中的 IGFR1 rs2037448 & rs7181022 (标签 SNPs, 非功能性) 和 OS

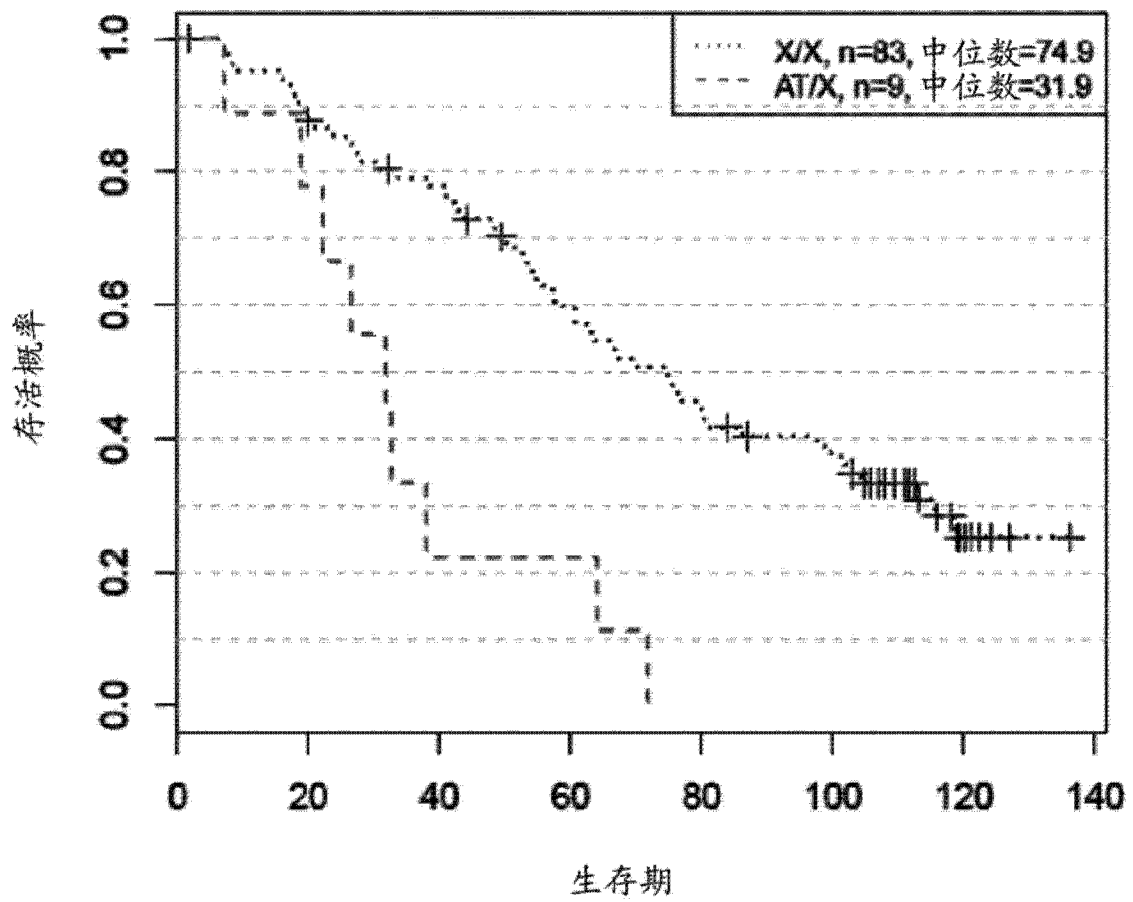
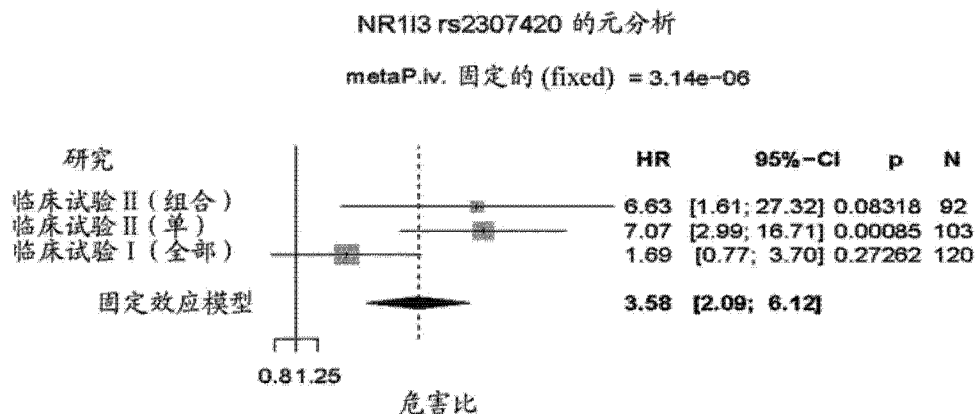
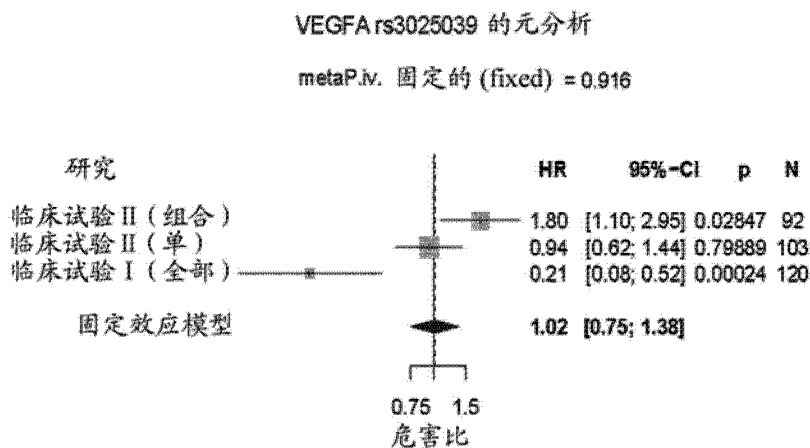


图 3

A) NR1I3 (标签 SNP, rs2307420) 和 PFS



B) VEGFA (936C>T, rs3025039) 和 OS



C) KDR/VEGFR2 (18487T>A, Q472H, rs1870377) 和 OS

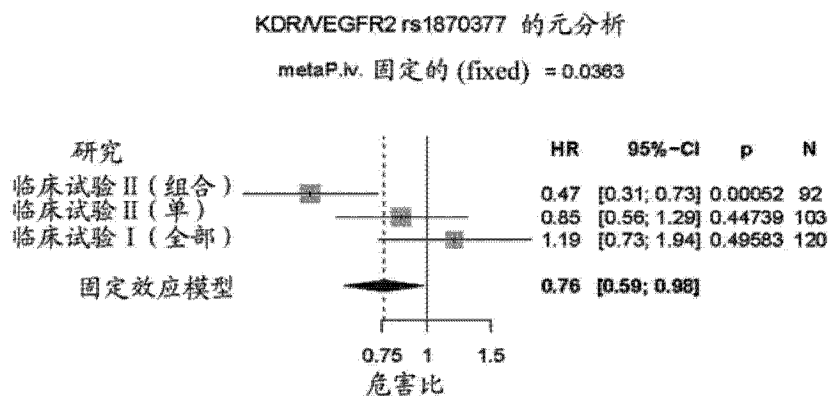


图 4

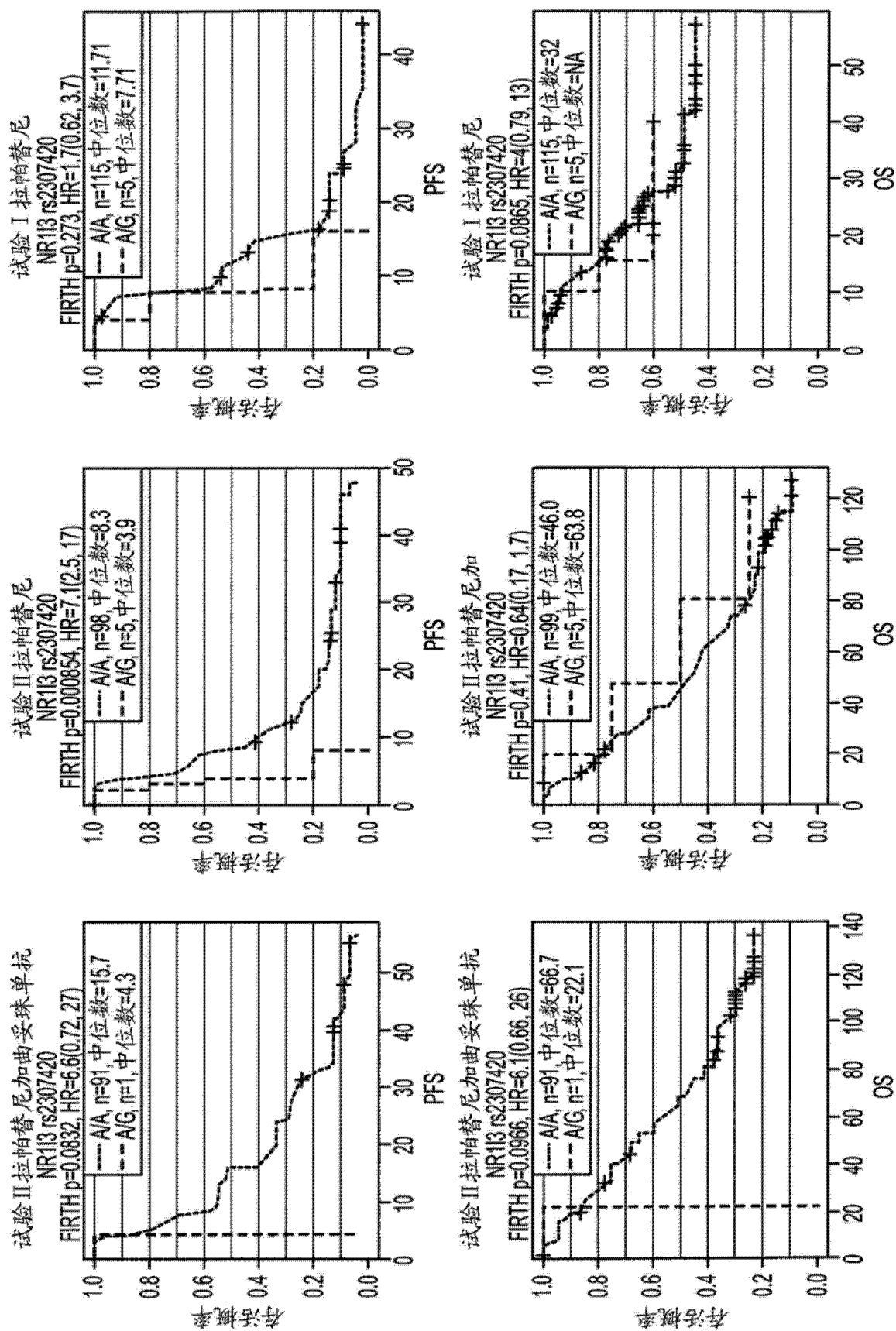


图 5

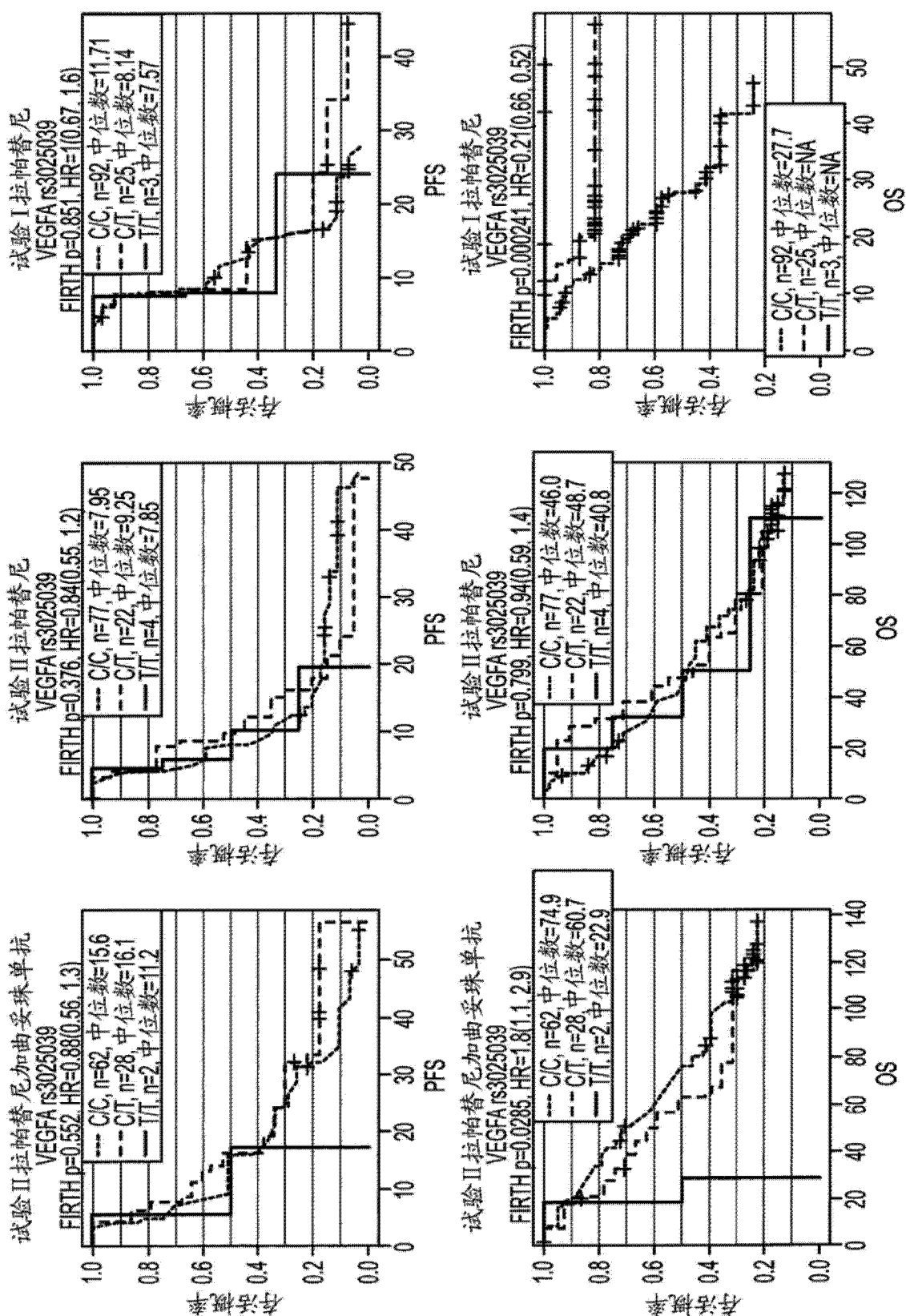


图 6

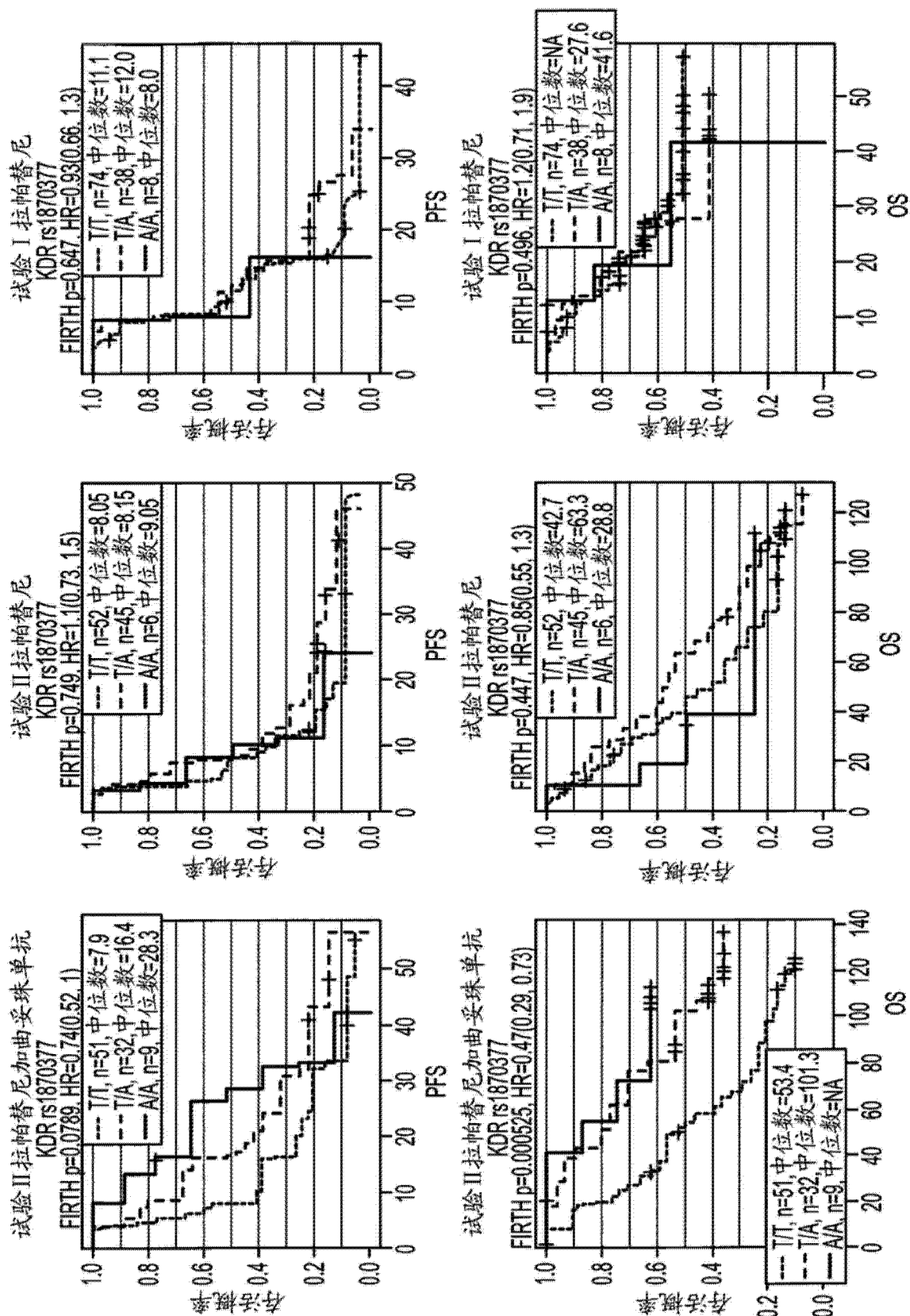


图 7