



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110801454 A

(43)申请公布日 2020.02.18

(21)申请号 201911076512.5

(51)Int.Cl.

(22)申请日 2012.10.19

A61K 31/52(2006.01)

(30)优先权数据

A61P 35/00(2006.01)

61/549,067 2011.10.19 US

A61P 35/02(2006.01)

(62)分案原申请数据

201280062429.2 2012.10.19

(71)申请人 药品循环有限责任公司

地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 J·J·巴吉 劳伦斯·埃利亚斯

格温·伊夫 埃里克·赫德里克

D·J·劳里 T·D·莫迪

(74)专利代理机构 北京安信方达知识产权代理
有限公司 11262

代理人 刘小立 郑霞

权利要求书1页 说明书149页 附图33页

(54)发明名称

布鲁顿酪氨酸激酶(BTK)抑制剂的用途

(57)摘要

本申请涉及布鲁顿酪氨酸激酶(BTK)抑制剂的用途。本申请提供了用于治疗血液癌症的方法,其包括向被鉴定为在施用不可逆Btk抑制剂后具有增加的来自恶性肿瘤的淋巴细胞亚群动员的受试者施用抗癌剂。还提供了鉴定用于治疗
的受试者和分析在施用不可逆Btk抑制剂后从血液恶性肿瘤动员的细胞的方法。

1. 一种用于在有需要的个体中治疗血液恶性肿瘤的方法,其包括向所述个体施用抗癌治疗,其中所述个体被鉴定为在向所述个体施用不可逆Btk抑制剂后具有增加的来自该恶性肿瘤的多个细胞的动员。
2. 如权利要求1所述的方法,其中所述不可逆Btk抑制剂与Btk的Cys 481共价结合。
3. 如权利要求1所述的方法,其中所述不可逆Btk抑制剂是式(D)的化合物。
4. 如权利要求1所述的方法,其中所述不可逆Btk抑制剂是(R)-1-(3-(4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)哌啶-1-基)丙-2-烯-1-酮(PCI-32765/依罗替尼)。
5. 如权利要求1所述的方法,其中所述血液恶性肿瘤是B细胞恶性肿瘤。
6. 如权利要求1所述的方法,其中所述血液恶性肿瘤是白血病、淋巴增生性疾病或髓样疾病。
7. 如权利要求1所述的方法,其中所述血液恶性肿瘤是非霍奇金淋巴瘤。
8. 如权利要求1所述的方法,其中所述血液恶性肿瘤是慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、小淋巴细胞性白血病(SLL)、高危型CLL、非CLL/SLL淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤(FL)、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、套细胞淋巴瘤(MCL)、瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症、多发性骨髓瘤(MM)、边缘区淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、非伯基特高度恶性B细胞淋巴瘤、结节外边缘区B细胞淋巴瘤、急性或慢性髓性(或髓样)白血病、骨髓增生异常综合征或急性淋巴母细胞性白血病。
9. 如权利要求1所述的方法,其中所述血液恶性肿瘤是复发性或难治性弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、复发性或难治性套细胞淋巴瘤、复发性或难治性滤泡性淋巴瘤、复发性或难治性CLL;复发性或难治性SLL;复发性或难治性多发性骨髓瘤。
10. 如权利要求1所述的方法,其中所述动员的细胞是髓样细胞或淋巴样细胞。

布鲁顿酪氨酸激酶 (BTK) 抑制剂的用途

本申请是申请日为2012年10月19日,申请号为201280062429.2,发明名称为“布鲁顿酪氨酸激酶 (BTK) 抑制剂的用途”的申请的分案申请。

交叉引用

[0001] 本申请要求2011年10月19日提交的、名称为“THE USE OF INHIBITORS OF BRUTON'S TYROSINE KINASE (BTK)”的美国临时专利申请号61/549,067的优先权,该临时申请通过引用整体并入本文。

发明背景

[0002] 布鲁顿 (Bruton's) 酪氨酸激酶 (Btk),即非受体酪氨酸激酶Tec家族的一个成员,是在除了T淋巴细胞和自然杀伤细胞之外的所有造血细胞类型中表达的关键信号酶。Btk在将细胞表面B细胞受体 (BCR) 刺激连接到下游细胞内应答的B细胞信号途径中发挥至关重要的作用。

[0003] Btk是B细胞发育、激活、信号传导和存活的关键调节剂 (Kurosaki, Curr Op Imm, 2000, 276-281; Schaeffer和Schwartzberg, Curr Op Imm 2000, 282-288)。另外, Btk在众多其它造血细胞信号途径中起作用,例如,巨噬细胞中Toll样受体 (TLR) 和细胞因子受体介导的TNF- α 产生,肥大细胞中IgE受体 (Fc ϵ RI) 的信号传导, B系淋巴样细胞中Fas/APO-1凋亡信号的抑制,和受胶原刺激的血小板聚集。参见,例如C.A.Jeffries等, (2003), Journal of Biological Chemistry 278:26258-26264; N.J.Horwood等, (2003), The Journal of Experimental Medicine 197:1603-1611; Iwaki等, (2005), Journal of Biological Chemistry 280 (48):40261-40270; Vassilev等, (1999), Journal of Biological Chemistry 274 (3):1646-1656; 和Quek等, (1998), Current Biology 8 (20):1137-1140。

发明内容

[0004] 在某些实施方案中,本文公开了一种在有需要的个体中治疗血液恶性肿瘤的方法,包括:(a)向该个体施用第一治疗,该第一治疗包含足以从该恶性肿瘤动员 (mobilize) 多个细胞的量的不可逆Btk抑制剂;和(b)分析从该个体获得的样品中的动员的多个细胞;和(c)向该个体施用第二治疗。在一些实施方案中,该不可逆Btk抑制剂的量足以诱发来自该恶性肿瘤的多个细胞的淋巴细胞增多。在一些实施方案中,该血液恶性肿瘤是B细胞恶性肿瘤。在一些实施方案中,该血液恶性肿瘤是白血病、淋巴增生性疾病或髓样疾病。在一些实施方案中,该动员的细胞是髓样细胞或淋巴样细胞。在一些实施方案中,分析该动员的多个细胞包括测量该动员的多个细胞的外周血浓度。在一些实施方案中,该方法进一步包括,在该动员的多个细胞的外周血浓度与施用Btk抑制剂之前的浓度相比增加之后,施用第二治疗。在一些实施方案中,于该动员的多个细胞的外周血浓度后续降低之后,进行第二治疗的施用。在一些实施方案中,分析该动员的多个细胞包括,测量与施用Btk抑制剂之前的浓度相比,该动员的多个细胞的外周血浓度增加的持续时间。在一些实施方案中,该方法进一步包括,在该动员的多个细胞的外周血浓度已增加预定时间长度之后,施用第二治疗。在一些实施方案中,分析该动员的多个细胞包括,对外周血中动员的多个细胞的数目进行计数。

在一些实施方案中,该方法进一步包括,在外周血中动员的多个细胞的数目与施用该Btk抑制剂之前的数目相比增加之后,施用第二治疗。在一些实施方案中,在后续外周血中动员的多个细胞的数目降低之后,进行第二治疗的施用。在一些实施方案中,分析该动员的多个细胞包括,测量与施用该Btk抑制剂之前的数目相比在外周血中动员的多个细胞数目增加的持续时间。在一些实施方案中,该方法进一步包括,在外周血中动员的多个细胞的数目已增加预定时间长度之后,施用第二治疗。在一些实施方案中,分析该动员的多个细胞包括,制备分离自多个细胞的细胞群体的生物标记谱,该生物标记谱指示生物标记的表达、生物标记的表达水平、生物标记中的突变或生物标记的存在。在一些实施方案中,该生物标记是:ZAP70;t(14,18); β -2微球蛋白;p53突变状态;ATM突变状态;del(17)p;del(11)q;del(6)q;CD5;CD11c;CD19;CD20;CD22;CD25;CD38;CD103;CD138;分泌型、表面型或细胞质型免疫球蛋白的表达; V_H 突变状态;或其组合。在一些实施方案中,该方法进一步包括基于该生物标记谱提供第二治疗。在一些实施方案中,该方法进一步包括基于该生物标记谱预测第二治疗的功效。在一些实施方案中,该血液恶性肿瘤是慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、小淋巴细胞性淋巴瘤(SLL)、高危型CLL或非CLL/SLL淋巴瘤。在一些实施方案中,该血液恶性肿瘤是滤泡性淋巴瘤、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、套细胞淋巴瘤、瓦尔登斯特伦(Waldenström)巨球蛋白血症、多发性骨髓瘤、边缘区淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、非伯基特高度恶性B细胞淋巴瘤或结节外边缘区B细胞淋巴瘤。在一些实施方案中,该血液恶性肿瘤是急性或慢性髓性(或髓样)白血病、骨髓增生异常综合征或急性淋巴母细胞性白血病。在一些实施方案中,该血液恶性肿瘤是复发性或难治性弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、复发性或难治性套细胞淋巴瘤、复发性或难治性滤泡性淋巴瘤、复发性或难治性CLL;复发性或难治性SLL;复发性或难治性多发性骨髓瘤。在一些实施方案中,该不可逆Btk抑制剂与Btk的Cys481共价结合。在一些实施方案中,该不可逆Btk抑制剂是(A)、(A1)、(B)、(B1)、(C)、(C1)、(D)、(D1)、(E)或(F)的化合物。在一些实施方案中,该不可逆Btk抑制剂是式(D)化合物。在一些实施方案中,该不可逆Btk抑制剂是(R)-1-(3-(4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)哌啶-1-基)丙-2-烯-1-酮(即,PCI-32765/依罗替尼(ibrutinib))。在一些实施方案中,第二治疗包含来那度胺。在一些实施方案中,第二治疗包含硼替佐米。在一些实施方案中,第二治疗包含索拉非尼。在一些实施方案中,第二治疗包含吉西他滨。在一些实施方案中,第二治疗包含地塞米松。在一些实施方案中,第二治疗包含苯达莫司汀。在一些实施方案中,第二治疗包含R-406。在一些实施方案中,第二治疗包含紫杉醇(taxol)。在一些实施方案中,第二治疗包含长春新碱。在一些实施方案中,第二治疗包含多柔比星。在一些实施方案中,第二治疗包含坦罗莫司。在一些实施方案中,第二治疗包含卡铂。在一些实施方案中,第二治疗包含奥法木单抗。在一些实施方案中,第二治疗包含利妥昔单抗。在一些实施方案中,第二治疗包含GA101。在一些实施方案中,第二治疗包含R-ICE(异环磷酰胺、卡铂、依托泊苷)。在一些实施方案中,该方法包括使用分析仪器来分析自个体获得的样品中的动员的多个细胞。在一些实施方案中,在向个体施用不可逆Btk抑制剂后,该个体的外周血中的绝对淋巴细胞计数增加至少约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、125%、150%、175%或200%。在一些实施方案中,在向个体施用不可逆Btk抑制剂后,该个体的外周血中的绝对淋巴细胞计数增加至少约10%-50%。在一些实施方案中,动员的细胞具有降低的CD38和CXCR4的表达。在一些实施方案中,动员

的细胞为CD19+CD5+细胞。

[0005] 在某些实施方案中,本文公开了一种在有需要的个体中治疗血液恶性肿瘤的方法,该方法包括向该个体施用抗癌治疗,其中该个体被鉴定为在向该个体施用不可逆Btk抑制剂后具有增加的来自恶性肿瘤的多个细胞的动员。在一些实施方案中,该不可逆Btk抑制剂与Btk的Cys 481共价结合。在一些实施方案中,该不可逆Btk抑制剂是(A)、(A1)、(B)、(B1)、(C)、(C1)、(D)、(D1)、(E)或(F)的化合物。在一些实施方案中,该不可逆Btk抑制剂是式(D)的化合物。在一些实施方案中,该不可逆Btk抑制剂是(R)-1-(3-(4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)哌啶-1-基)丙-2-烯-1-酮(PCI-32765/依罗替尼)。在一些实施方案中,该血液恶性肿瘤是B细胞恶性肿瘤。在一些实施方案中,该血液恶性肿瘤是白血病、淋巴增生性疾病或髓样疾病。在一些实施方案中,该血液恶性肿瘤是非霍奇金淋巴瘤。在一些实施方案中,该血液恶性肿瘤是慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、小淋巴细胞性白血病(SLL)、高危型CLL、非CLL/SLL淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤(FL)、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、套细胞淋巴瘤(MCL)、瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症、多发性骨髓瘤(MM)、边缘区淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、非伯基特高度恶性B细胞淋巴瘤、结节外边缘区B细胞淋巴瘤、急性或慢性髓性(或髓样)白血病、骨髓增生异常综合征或急性淋巴母细胞性白血病。在一些实施方案中,该血液恶性肿瘤是复发性或难治性弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、复发性或难治性套细胞淋巴瘤、复发性或难治性滤泡性淋巴瘤、复发性或难治性CLL、复发性或难治性SLL、复发性或难治性多发性骨髓瘤。在一些实施方案中,该动员的细胞是髓样细胞或淋巴样细胞。在一些实施方案中,与施用Btk抑制剂之前的浓度相比,在施用Btk抑制剂后个体具有较高的动员细胞的外周血浓度。在一些实施方案中,在该动员的多个细胞的外周血浓度已经增加预定时间长度之后,施用第二治疗。在一些实施方案中,对细胞动员的鉴定是基于对一种或多种生物标记的存在、表达或表达水平的检测。在一些实施方案中,该生物标记为:ZAP70;t(14,18); β -2微球蛋白;p53突变状态;ATM突变状态;del(17)p;del(11)q;del(6)q;CD5;CD11c;CD19;CD20;CD22;CD25;CD38;CD103;CD138;分泌型、表面型或细胞质型免疫球蛋白的表达; V_H 突变状态;或其组合。在一些实施方案中,该第二治疗包含来那度胺、硼替佐米、索拉非尼、吉西他滨、地塞米松、苯达莫司汀、R-406、紫杉醇、长春新碱、多柔比星、坦罗莫司、卡铂、奥法木单抗、利妥昔单抗、GA101、R-ICE(异环磷酰胺、卡铂、依托泊苷)、R-CHOP(利妥昔单抗、环磷酰胺、盐酸多柔比星、硫酸长春新碱和泼尼松)、BR(苯达莫司汀和利妥昔单抗)、FCR(氟达拉滨、环磷酰胺和利妥昔单抗)或其任意组合。在一些实施方案中,在向个体施用不可逆Btk抑制剂后,该个体的外周血中的绝对淋巴细胞计数增加至少约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、125%、150%、175%或200%。在一些实施方案中,在向个体施用不可逆Btk抑制剂后,该个体的外周血中的绝对淋巴细胞计数增加至少约10%-50%。在一些实施方案中,动员的细胞具有降低的CD38和CXCR4的表达。在一些实施方案中,动员的细胞为CD19+CD5+细胞。

[0006] 在某些实施方案中,本文公开了一种用于在有需要的个体中治疗进展缓慢的(indolent)血液恶性肿瘤的方法,包括:(a)向该个体施用第一治疗,该第一治疗包含足以从该进展缓慢的血液恶性肿瘤动员多个细胞的量的不可逆Btk抑制剂;(b)分析从该个体获得的样品中的动员的多个细胞;和(c)向该个体施用第二治疗。在一些实施方案中,该不可逆Btk抑制剂的量足以诱发来自该恶性肿瘤的多个细胞的淋巴细胞增多。在一些实施方案

中,动员的细胞是髓样细胞或淋巴样细胞。在一些实施方案中,分析动员的多个细胞包括测量动员的多个细胞的外周血浓度。在一些实施方案中,该方法进一步包括,在与施用Btk抑制剂之前的浓度相比该动员的多个细胞的外周血浓度增加后,施用第二治疗。在一些实施方案中,在动员的多个细胞的外周血浓度后续降低后,进行第二治疗的施用。在一些实施方案中,分析该动员的多个细胞包括测量与施用该Btk抑制剂之前的浓度相比该动员的多个细胞的外周血浓度增加的持续时间。在一些实施方案中,该方法进一步包括在该动员的多个细胞的外周血浓度已经增加预定时间长度后,施用第二治疗。在一些实施方案中,分析该动员的多个细胞包括对外周血中动员的多个细胞的数目进行计数。在一些实施方案中,该方法进一步包括,在与施用Btk抑制剂之前的数目相比外周血中动员的多个细胞的数目增加后,施用第二治疗。在一些实施方案中,在外周血中动员的多个细胞的数目后续降低之后,进行第二治疗的施用。在一些实施方案中,分析该动员的多个细胞包括测量与施用Btk抑制剂之前的数目相比在外周血中动员的多个细胞数目增加的持续时间。在一些实施方案中,该方法进一步包括在外周血中的动员的多个细胞的数目已经增加预定时间长度之后,施用第二治疗。在一些实施方案中,分析动员的多个细胞包括制备分离自多个细胞的细胞群体的生物标记谱,该生物标记谱指示生物标记的表达、生物标记的表达水平、生物标记中的突变或生物标记的存在。在一些实施方案中,该生物标记为:ZAP70;t(14,18); β -2微球蛋白;p53突变状态;ATM突变状态;del(17)p;del(11)q;del(6)q;CD5;CD11c;CD19;CD20;CD22;CD25;CD38;CD103;CD138;分泌型、表面型或细胞质型免疫球蛋白的表达; V_H 突变状态;或其组合。在一些实施方案中,该方法进一步包括基于该生物标记谱提供第二治疗。在一些实施方案中,该方法进一步包括基于该生物标记谱预测第二治疗的功效。在一些实施方案中,该不可逆Btk抑制剂与Btk的Cys 481共价结合。在一些实施方案中,该不可逆Btk抑制剂是(A)、(A1)、(B)、(B1)、(C)、(C1)、(D)、(D1)、(E)或(F)的化合物。在一些实施方案中,该不可逆Btk抑制剂是式(D)的化合物。在一些实施方案中,该不可逆Btk抑制剂是(R)-1-(3-(4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)哌啶-1-基)丙-2-烯-1-酮(即,PCI-32765/依罗替尼)。在一些实施方案中,该第二治疗包含来那度胺。在一些实施方案中,该第二治疗包含利妥昔单抗、环磷酰胺、盐酸多柔比星、硫酸长春新碱和泼尼松(R-CHOP)。在一些实施方案中,该第二治疗包含坦罗莫司。在一些实施方案中,该方法包括使用分析仪器来分析自个体获得的样品中的动员的多个细胞。在一些实施方案中,在向个体施用不可逆Btk抑制剂后,该个体的外周血中的绝对淋巴细胞计数增加至少约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、125%、150%、175%或200%。在一些实施方案中,在向个体施用不可逆Btk抑制剂后,该个体的外周血中的绝对淋巴细胞计数增加至少约10%-50%。在一些实施方案中,动员的细胞具有降低的CD38和CXCR4的表达。在一些实施方案中,动员的细胞为CD19+CD5+细胞。

[0007] 在某些实施方案中,本文公开了一种用于在有需要的个体中治疗非霍奇金淋巴瘤的方法,该方法包括:(a)向该个体施用第一治疗,该第一治疗包含足以从非霍奇金淋巴瘤动员多个细胞的量的不可逆Btk抑制剂;(b)分析从该个体获得的样品中的动员的多个细胞;和(c)向该个体施用第二治疗。在一些实施方案中,该不可逆Btk抑制剂的量足以诱发来自该恶性肿瘤的多个细胞的淋巴细胞增多。在一些实施方案中,动员的细胞是髓样细胞或淋巴样细胞。在一些实施方案中,分析动员的多个细胞包括测量动员的多个细胞的外周血

浓度。在一些实施方案中,该方法进一步包括,在与施用Btk抑制剂之前的浓度相比该动员的多个细胞的外周血浓度增加后,施用第二治疗。在一些实施方案中,在动员的多个细胞的外周血浓度后续降低后,进行第二治疗的施用。在一些实施方案中,分析该动员的多个细胞包括测量与施用该Btk抑制剂之前的浓度相比该动员的多个细胞的外周血浓度增加的持续时间。在一些实施方案中,该方法进一步包括在该动员的多个细胞的外周血浓度已经增加预定时间长度后,施用第二治疗。在一些实施方案中,分析该动员的多个细胞包括对外周血中动员的多个细胞的数目进行计数。在一些实施方案中,该方法进一步包括,在与施用Btk抑制剂之前的数目相比外周血中动员的多个细胞的数目增加后,施用第二治疗。在一些实施方案中,在外周血中的动员的多个细胞的数目后续降低之后,进行第二治疗的施用。在一些实施方案中,分析该动员的多个细胞包括测量与施用Btk抑制剂之前的数目相比在外周血中动员的多个细胞的数目增加的持续时间。在一些实施方案中,该方法进一步包括在外周血中的动员的多个细胞的数目已经增加预定时间长度之后,施用第二治疗。在一些实施方案中,分析动员的多个细胞包括制备分离自多个细胞的细胞群体的生物标记谱,该生物标记谱指示生物标记的表达、生物标记的表达水平、生物标记中的突变或生物标记的存在。在一些实施方案中,该生物标记为:ZAP70;t(14,18); β -2微球蛋白;p53突变状态;ATM突变状态;del(17)p;del(11)q;del(6)q;CD5;CD11c;CD19;CD20;CD22;CD25;CD38;CD103;CD138;分泌型、表面型或细胞质型免疫球蛋白的表达; V_H 突变状态;或其组合。在一些实施方案中,该方法进一步包括基于该生物标记谱提供第二治疗。在一些实施方案中,该方法进一步包括基于该生物标记谱预测第二治疗的功效。在一些实施方案中,该不可逆Btk抑制剂与Btk的Cys 481共价结合。在一些实施方案中,该不可逆Btk抑制剂是(A)、(A1)、(B)、(B1)、(C)、(C1)、(D)、(D1)、(E)或(F)的化合物。在一些实施方案中,该不可逆Btk抑制剂是式(D)的化合物。在一些实施方案中,该不可逆Btk抑制剂是(R)-1-(3-(4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)哌啶-1-基)丙-2-烯-1-酮(即,PCI-32765/依罗替尼)。在一些实施方案中,该第二治疗包含硼替佐米。在一些实施方案中,该第二治疗包含苯达莫司汀和利妥昔单抗(BR)。在一些实施方案中,该方法包括使用分析仪器来分析自个体获得的样品中的动员的多个细胞。在一些实施方案中,在向个体施用不可逆Btk抑制剂后,该个体的外周血中的绝对淋巴细胞计数增加至少约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、125%、150%、175%或200%。在一些实施方案中,在向个体施用不可逆Btk抑制剂后,该个体的外周血中的绝对淋巴细胞计数增加至少约10%-50%。在一些实施方案中,动员的细胞具有降低的CD38和CXCR4的表达。在一些实施方案中,动员的细胞为CD19+CD5+细胞。

[0008] 在某些实施方案中,本文公开了一种用于在有需要的个体中治疗弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)的方法,该方法包括:(a)向该个体施用第一治疗,该第一治疗包含足以从DLBCL动员多个细胞的量的不可逆Btk抑制剂;(b)分析从该个体获得的样品中的动员的多个细胞;和(c)向该个体施用第二治疗。在一些实施方案中,该不可逆Btk抑制剂的量足以诱发自该恶性肿瘤的多个细胞的淋巴细胞增多。在一些实施方案中,动员的细胞是髓样细胞或淋巴样细胞。在一些实施方案中,分析动员的多个细胞包括测量动员的多个细胞的外周血浓度。在一些实施方案中,该方法进一步包括,在与施用Btk抑制剂之前的浓度相比该动员的多个细胞的外周血浓度增加后,施用第二治疗。在一些实施方案中,在动员的多个细

胞的外周血浓度后续降低后,进行第二治疗的施用。在一些实施方案中,分析该动员的多个细胞包括测量与施用该Btk抑制剂之前的浓度相比该动员的多个细胞的外周血浓度增加的持续时间。在一些实施方案中,该方法进一步包括在该动员的多个细胞的外周血浓度已经增加预定时间长度后,施用第二治疗。在一些实施方案中,分析该动员的多个细胞包括对外周血中动员的多个细胞的数目进行计数。在一些实施方案中,该方法进一步包括在与施用Btk抑制剂之前的数目相比外周血中动员的多个细胞的数目增加后,施用第二治疗。在一些实施方案中,在外周血中的动员的多个细胞的数目后续降低之后,进行第二治疗的施用。在一些实施方案中,分析该动员的多个细胞包括测量与施用Btk抑制剂之前的数目相比在外周血中动员的多个细胞数目增加的持续时间。在一些实施方案中,该方法进一步包括在外周血中的动员的多个细胞的数目已经增加预定时间长度之后,施用第二治疗。在一些实施方案中,分析动员的多个细胞包括制备分离自多个细胞的细胞群体的生物标记谱,该生物标记谱指示生物标记的表达、生物标记的表达水平、生物标记中的突变或生物标记的存在。在一些实施方案中,该生物标记为:ZAP70;t (14,18); β -2微球蛋白;p53突变状态;ATM突变状态;del (17) p;del (11) q;del (6) q;CD5;CD11c;CD19;CD20;CD22;CD25;CD38;CD103;CD138;分泌型、表面型或细胞质型免疫球蛋白的表达; V_H 突变状态;或其组合。在一些实施方案中,该方法进一步包括基于该生物标记谱提供第二治疗。在一些实施方案中,该方法进一步包括基于该生物标记谱预测第二治疗的功效。在一些实施方案中,该不可逆Btk抑制剂与Btk的Cys 481共价结合。在一些实施方案中,该不可逆Btk抑制剂是(A)、(A1)、(B)、(B1)、(C)、(C1)、(D)、(D1)、(E)或(F)的化合物。在一些实施方案中,该不可逆Btk抑制剂是式(D)的化合物。在一些实施方案中,该不可逆Btk抑制剂是(R)-1-(3-(4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)哌啶-1-基)丙-2-烯-1-酮(即,PCI-32765/依罗替尼)。在一些实施方案中,该第二治疗包含硼替佐米。在一些实施方案中,该第二治疗包含来那度胺。在一些实施方案中,该第二治疗包含利妥昔单抗、环磷酰胺、盐酸多柔比星、硫酸长春新碱和泼尼松(R-CHOP)。在一些实施方案中,该第二治疗包含坦罗莫司。在一些实施方案中,该DLBCL是DLBCL的ABC亚型(ABC-DLBCL)。在一些实施方案中,该DLBCL是DLBCL的GCB亚型(GCB-DLBCL)。在一些实施方案中,该方法包括使用分析仪器来分析自个体获得的样品中的动员的多个细胞。在一些实施方案中,在向个体施用不可逆Btk抑制剂后,该个体的外周血中的绝对淋巴细胞计数增加至少约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、125%、150%、175%或200%。在一些实施方案中,在向个体施用不可逆Btk抑制剂后,该个体的外周血中的绝对淋巴细胞计数增加至少约10%-50%。在一些实施方案中,动员的细胞具有降低的CD38和CXCR4的表达。在一些实施方案中,动员的细胞为CD19+CD5+细胞。

[0009] 在某些实施方案中,本文公开了一种用于在有需要的个体中治疗滤泡性淋巴瘤(FL)的方法,该方法包括:(a)向该个体施用第一治疗,该第一治疗包含足以从滤泡性淋巴瘤动员多个细胞的量的不可逆Btk抑制剂;(b)分析从该个体获得的样品中的动员的多个细胞;和(c)向该个体施用第二治疗。在一些实施方案中,该不可逆Btk抑制剂的量足以诱发自该恶性肿瘤的多个细胞的淋巴细胞增多。在一些实施方案中,动员的细胞是髓样细胞或淋巴样细胞。在一些实施方案中,分析动员的多个细胞包括测量动员的多个细胞的外周血浓度。在一些实施方案中,该方法进一步包括,在与施用Btk抑制剂之前的浓度相比该动员

的多个细胞的外周血浓度增加后,施用第二治疗。在一些实施方案中,在动员的多个细胞的外周血浓度后续降低后,进行第二治疗的施用。在一些实施方案中,分析该动员的多个细胞包括测量与施用该Btk抑制剂之前的浓度相比该动员的多个细胞的外周血浓度增加的持续时间。在一些实施方案中,该方法进一步包括在该动员的多个细胞的外周血浓度已经增加预定时间长度后,施用第二治疗。在一些实施方案中,分析该动员的多个细胞包括对外周血中动员的多个细胞的数目进行计数。在一些实施方案中,该方法进一步包括在与施用Btk抑制剂之前的数目相比外周血中动员的多个细胞的数目增加后,施用第二治疗。在一些实施方案中,在外周血中的动员的多个细胞的数目后续降低之后,进行第二治疗的施用。在一些实施方案中,分析该动员的多个细胞包括测量与施用Btk抑制剂之前的数目相比在外周血中动员的多个细胞数目增加的持续时间。在一些实施方案中,该方法进一步包括在外周血中的动员的多个细胞的数目已经增加预定时间长度之后,施用第二治疗。在一些实施方案中,分析动员的多个细胞包括制备分离自多个细胞的细胞群体的生物标记谱,该生物标记谱指示生物标记的表达、生物标记的表达水平、生物标记中的突变或生物标记的存在。在一些实施方案中,该生物标记为:ZAP70;t (14,18); β -2微球蛋白;p53突变状态;ATM突变状态;del (17) p;del (11) q;del (6) q;CD5;CD11c;CD19;CD20;CD22;CD25;CD38;CD103;CD138;分泌型、表面型或细胞质型免疫球蛋白的表达; V_H 突变状态;或其组合。在一些实施方案中,该方法进一步包括基于该生物标记谱提供第二治疗。在一些实施方案中,该方法进一步包括基于该生物标记谱预测第二治疗的功效。在一些实施方案中,该不可逆Btk抑制剂与Btk的Cys 481共价结合。在一些实施方案中,该不可逆Btk抑制剂是(A)、(A1)、(B)、(B1)、(C)、(C1)、(D)、(D1)、(E)或(F)的化合物。在一些实施方案中,该不可逆Btk抑制剂是式(D)的化合物。在一些实施方案中,该不可逆Btk抑制剂是(R)-1-(3-(4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)哌啶-1-基)丙-2-烯-1-酮(即,PCI-32765/依罗替尼)。在一些实施方案中,该第二治疗包含来那度胺。在一些实施方案中,该第二治疗包含利妥昔单抗、环磷酰胺、盐酸多柔比星、硫酸长春新碱和泼尼松(R-CHOP)。在一些实施方案中,该第二治疗包含坦罗莫司。在一些实施方案中,该方法包括使用分析仪器来分析自个体获得的样品中的动员的多个细胞。在一些实施方案中,在向个体施用不可逆Btk抑制剂后,该个体的外周血中的绝对淋巴细胞计数增加至少约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、125%、150%、175%或200%。在一些实施方案中,在向个体施用不可逆Btk抑制剂后,该个体的外周血中的绝对淋巴细胞计数增加至少约10%-50%。在一些实施方案中,动员的细胞具有降低的CD38和CXCR4的表达。在一些实施方案中,动员的细胞为CD19+CD5+细胞。

[0010] 在某些实施方案中,本文公开了一种用于在有需要的个体中治疗CLL或SLL的方法,该方法包括:(a)向该个体施用第一治疗,该第一治疗包括足以从CLL或SLL动员多个细胞的量的不可逆Btk抑制剂;(b)分析从该个体获得的样品中的动员的多个细胞;和(c)向该个体施用第二治疗。在一些实施方案中,该不可逆Btk抑制剂的量足以诱发来自该恶性肿瘤的多个细胞的淋巴细胞增多。在一些实施方案中,动员的细胞是髓样细胞或淋巴样细胞。在一些实施方案中,分析动员的多个细胞包括测量动员的多个细胞的外周血浓度。在一些实施方案中,该方法进一步包括,在与施用Btk抑制剂之前的浓度相比该动员的多个细胞的外周血浓度增加后,施用第二治疗。在一些实施方案中,在动员的多个细胞的外周血浓度后续

降低后,进行第二治疗的施用。在一些实施方案中,分析该动员的多个细胞包括测量与施用该Btk抑制剂之前的浓度相比该动员的多个细胞的外周血浓度增加的持续时间。在一些实施方案中,该方法进一步包括在该动员的多个细胞的外周血浓度已经增加预定时间长度后,施用第二治疗。在一些实施方案中,分析该动员的多个细胞包括对外周血中动员的多个细胞的数目进行计数。在一些实施方案中,该方法进一步包括在与施用Btk抑制剂之前的数目相比外周血中动员的多个细胞的数目增加后,施用第二治疗。在一些实施方案中,在外周血中的动员的多个细胞的数目后续降低之后,进行第二治疗的施用。在一些实施方案中,分析该动员的多个细胞包括测量与施用Btk抑制剂之前的数目相比在外周血中动员的多个细胞数目增加的持续时间。在一些实施方案中,该方法进一步包括在外周血中的动员的多个细胞的数目已经增加预定时间长度之后,施用第二治疗。在一些实施方案中,分析动员的多个细胞包括制备分离自多个细胞的细胞群体的生物标记谱,该生物标记谱指示生物标记的表达、生物标记的表达水平、生物标记中的突变或生物标记的存在。在一些实施方案中,该生物标记为:ZAP70;t(14,18); β -2微球蛋白;p53突变状态;ATM突变状态;del(17)p;del(11)q;del(6)q;CD5;CD11c;CD19;CD20;CD22;CD25;CD38;CD103;CD138;分泌型、表面型或细胞质型免疫球蛋白的表达; V_H 突变状态;或其组合。在一些实施方案中,该方法进一步包括基于该生物标记谱提供第二治疗。在一些实施方案中,该方法进一步包括基于该生物标记谱预测第二治疗的功效。在一些实施方案中,该不可逆Btk抑制剂与Btk的Cys 481共价结合。在一些实施方案中,该不可逆Btk抑制剂是(A)、(A1)、(B)、(B1)、(C)、(C1)、(D)、(D1)、(E)或(F)的化合物。在一些实施方案中,该不可逆Btk抑制剂是式(D)的化合物。在一些实施方案中,其中该不可逆Btk抑制剂是(R)-1-(3-(4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)哌啶-1-基)丙-2-烯-1-酮(即,PCI-32765/依罗替尼)。在一些实施方案中,该第二治疗包含来那度胺。在一些实施方案中,该第二治疗包含苯达莫司汀和利妥昔单抗(BR)。在一些实施方案中,该第二治疗包含氟达拉滨、环磷酰胺和利妥昔单抗(FCR)。在一些实施方案中,该第二治疗包含奥法木单抗。在一些实施方案中,该第二治疗包含利妥昔单抗。在一些实施方案中,该方法包括使用分析仪器来分析自个体获得的样品中的动员的多个细胞。在一些实施方案中,在向个体施用不可逆Btk抑制剂后,该个体的外周血中的绝对淋巴细胞计数增加至少约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、125%、150%、175%或200%。在一些实施方案中,在向个体施用不可逆Btk抑制剂后,该个体的外周血中的绝对淋巴细胞计数增加至少约10%-50%。在一些实施方案中,动员的细胞具有降低的CD38和CXCR4的表达。在一些实施方案中,动员的细胞为CD19+CD5+细胞。

[0011] 在某些实施方案中,本文公开了一种用于在有需要的个体中治疗套细胞淋巴瘤的方法,该方法包括:(a)向该个体施用第一治疗,该第一治疗包括足以从套细胞淋巴瘤动员多个细胞的量的不可逆Btk抑制剂;(b)分析从该个体获得的样品中的动员的多个细胞;和(c)向该个体施用第二治疗。在一些实施方案中,该不可逆Btk抑制剂的量足以诱发来自该恶性肿瘤的多个细胞的淋巴细胞增多。在一些实施方案中,动员的细胞是髓样细胞或淋巴样细胞。在一些实施方案中,分析动员的多个细胞包括测量动员的多个细胞的外周血浓度。在一些实施方案中,该方法进一步包括,在与施用Btk抑制剂之前的浓度相比该动员的多个细胞的外周血浓度增加后,施用第二治疗。在一些实施方案中,在动员的多个细胞的外周血浓度后续降低后,进行第二治疗的施用。在一些实施方案中,分析该动员的多个细胞包括测

量与施用该Btk抑制剂之前的浓度相比该动员的多个细胞的外周血浓度增加的持续时间。在一些实施方案中,该方法进一步包括在该动员的多个细胞的外周血浓度已经增加预定时间长度后,施用第二治疗。在一些实施方案中,分析该动员的多个细胞包括对外周血中动员的多个细胞的数目进行计数。在一些实施方案中,该方法进一步包括在与施用Btk抑制剂之前的数目相比外周血中动员的多个细胞的数目增加后,施用第二治疗。在一些实施方案中,在外周血中的动员的多个细胞的数目后续降低之后,进行第二治疗的施用。在一些实施方案中,分析该动员的多个细胞包括测量与施用Btk抑制剂之前的数目相比在外周血中动员的多个细胞数目增加的持续时间。在一些实施方案中,该方法进一步包括在外周血中的动员的多个细胞的数目已经增加预定时间长度之后,施用第二治疗。在一些实施方案中,分析动员的多个细胞包括制备分离自多个细胞的细胞群体的生物标记谱,该生物标记谱指示生物标记的表达、生物标记的表达水平、生物标记中的突变或生物标记的存在。在一些实施方案中,该生物标记为:ZAP70;t (14,18); β -2微球蛋白;p53突变状态;ATM突变状态;del (17)p;del (11)q;del (6)q;CD5;CD11c;CD19;CD20;CD22;CD25;CD38;CD103;CD138;分泌型、表面型或细胞质型免疫球蛋白的表达; V_H 突变状态;或其组合。在一些实施方案中,该方法进一步包括基于该生物标记谱提供第二治疗。在一些实施方案中,该方法进一步包括基于该生物标记谱预测第二治疗的功效。在一些实施方案中,该不可逆Btk抑制剂与Btk的Cys 481共价结合。在一些实施方案中,该不可逆Btk抑制剂是(A)、(A1)、(B)、(B1)、(C)、(C1)、(D)、(D1)、(E)或(F)的化合物。在一些实施方案中,该不可逆Btk抑制剂是式(D)的化合物。在一些实施方案中,该不可逆Btk抑制剂是(R)-1-(3-(4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)哌啶-1-基)丙-2-烯-1-酮(即,PCI-32765/依罗替尼)。在一些实施方案中,该第二治疗包含坦罗莫司。在一些实施方案中,该方法包括使用分析仪器来分析自个体获得的样品中的动员的多个细胞。在一些实施方案中,在向个体施用不可逆Btk抑制剂后,该个体的外周血中的绝对淋巴细胞计数增加至少约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、125%、150%、175%或200%。在一些实施方案中,在向个体施用不可逆Btk抑制剂后,该个体的外周血中的绝对淋巴细胞计数增加至少约10%-50%。在一些实施方案中,动员的细胞具有降低的CD38和CXCR4的表达。在一些实施方案中,动员的细胞为CD19+CD5+细胞。

[0012] 在某些实施方案中,本文公开了一种用于在有需要的个体中治疗瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症的方法,该方法包括:(a)向该个体施用第一治疗,该第一治疗包括足以从套细胞淋巴瘤动员多个细胞的量的不可逆Btk抑制剂;(b)分析从该个体获得的样品中的动员的多个细胞;和(c)向该个体施用第二治疗。在一些实施方案中,该不可逆Btk抑制剂的量足以诱发来自该恶性肿瘤的多个细胞的淋巴细胞增多。在一些实施方案中,动员的细胞是髓样细胞或淋巴样细胞。在一些实施方案中,分析动员的多个细胞包括测量动员的多个细胞的外周血浓度。在一些实施方案中,该方法进一步包括,在与施用Btk抑制剂之前的浓度相比该动员的多个细胞的外周血浓度增加后,施用第二治疗。在一些实施方案中,在动员的多个细胞的外周血浓度后续降低后,进行第二治疗的施用。在一些实施方案中,分析该动员的多个细胞包括测量与施用该Btk抑制剂之前的浓度相比该动员的多个细胞的外周血浓度增加的持续时间。在一些实施方案中,该方法进一步包括在该动员的多个细胞的外周血浓度已经增加预定时间长度后,施用第二治疗。在一些实施方案中,分析该动员的多个细胞包括对

外周血中动员的多个细胞的数目进行计数。在一些实施方案中,该方法进一步包括在与施用Btk抑制剂之前的数目相比外周血中动员的多个细胞的数目增加后,施用第二治疗。在一些实施方案中,在外周血中的动员的多个细胞的数目后续降低之后,进行第二治疗的施用。在一些实施方案中,分析该动员的多个细胞包括测量与施用Btk抑制剂之前的数目相比在外周血中动员的多个细胞数目增加的持续时间。在一些实施方案中,该方法进一步包括在外周血中的动员的多个细胞的数目已经增加预定时间长度之后,施用第二治疗。在一些实施方案中,分析动员的多个细胞包括制备分离自多个细胞的细胞群体的生物标记谱,该生物标记谱指示生物标记的表达、生物标记的表达水平、生物标记中的突变或生物标记的存在。在一些实施方案中,该生物标记为:ZAP70;t (14,18); β -2微球蛋白;p53突变状态;ATM突变状态;del (17) p;del (11) q;del (6) q;CD5;CD11c;CD19;CD20;CD22;CD25;CD38;CD103;CD138;分泌型、表面型或细胞质型免疫球蛋白的表达; V_H 突变状态;或其组合。在一些实施方案中,该方法进一步包括基于该生物标记谱提供第二治疗。在一些实施方案中,该方法进一步包括基于该生物标记谱预测第二治疗的功效。在一些实施方案中,该不可逆Btk抑制剂与Btk的Cys 481共价结合。在一些实施方案中,该不可逆Btk抑制剂是(A)、(A1)、(B)、(B1)、(C)、(C1)、(D)、(D1)、(E)或(F)的化合物。在一些实施方案中,该不可逆Btk抑制剂是式(D)的化合物。在一些实施方案中,该不可逆Btk抑制剂是(R)-1-(3-(4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)哌啶-1-基)丙-2-烯-1-酮(即,PCI-32765/依罗替尼)。在一些实施方案中,该第二治疗包含利妥昔单抗、环磷酰胺、盐酸多柔比星、硫酸长春新碱和泼尼松(R-CHOP)。在一些实施方案中,该方法包括使用分析仪器来分析自个体获得的样品中的动员的多个细胞。在一些实施方案中,在向个体施用不可逆Btk抑制剂后,该个体的外周血中的绝对淋巴细胞计数增加至少约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、125%、150%、175%或200%。在一些实施方案中,在向个体施用不可逆Btk抑制剂后,该个体的外周血中的绝对淋巴细胞计数增加至少约10%-50%。在一些实施方案中,动员的细胞具有降低的CD38和CXCR4的表达。在一些实施方案中,动员的细胞为CD19+CD5+细胞。

[0013] 在某些实施方案中,本文公开了一种用于在有需要的个体中治疗多发性骨髓瘤(MM)的方法,该方法包括:(a)向该个体使用第一治疗,该第一治疗包含足以从MM动员多个细胞的量的不可逆Btk抑制剂;(b)分析从该个体获得的样品中的动员的多个细胞;和(c)向该个体施用第二治疗。在一些实施方案中,该不可逆Btk抑制剂的量足以诱发来自该恶性肿瘤的多个细胞的淋巴细胞增多。在一些实施方案中,动员的细胞是髓样细胞或淋巴样细胞。在一些实施方案中,分析动员的多个细胞包括测量动员的多个细胞的外周血浓度。在一些实施方案中,该方法进一步包括,在与施用Btk抑制剂之前的浓度相比该动员的多个细胞的外周血浓度增加后,施用第二治疗。在一些实施方案中,在动员的多个细胞的外周血浓度后续降低后,进行第二治疗的施用。在一些实施方案中,分析该动员的多个细胞包括测量与施用该Btk抑制剂之前的浓度相比该动员的多个细胞的外周血浓度增加的持续时间。在一些实施方案中,该方法进一步包括在该动员的多个细胞的外周血浓度已经增加预定时间长度后,施用第二治疗。在一些实施方案中,分析该动员的多个细胞包括对外周血中动员的多个细胞的数目进行计数。在一些实施方案中,该方法进一步包括在与施用Btk抑制剂之前的数目相比外周血中动员的多个细胞的数目增加后,施用第二治疗。在一些实施方案中,在外周

血中的动员的多个细胞的数目后续降低之后,进行第二治疗的施用。在一些实施方案中,分析该动员的多个细胞包括测量与施用Btk抑制剂之前的数目相比在外周血中动员的多个细胞数目增加的持续时间。在一些实施方案中,该方法进一步包括在外周血中的动员的多个细胞的数目已经增加预定时间长度之后,施用第二治疗。在一些实施方案中,分析动员的多个细胞包括制备分离自多个细胞的细胞群体的生物标记谱,该生物标记谱指示生物标记的表达、生物标记的表达水平、生物标记中的突变或生物标记的存在。在一些实施方案中,该生物标记为:ZAP70;t (14,18); β -2微球蛋白;p53突变状态;ATM突变状态;del (17) p;del (11) q;del (6) q;CD5;CD11c;CD19;CD20;CD22;CD25;CD38;CD103;CD138;分泌型、表面型或细胞质型免疫球蛋白的表达; V_H 突变状态;或其组合。在一些实施方案中,该方法进一步包括基于该生物标记谱提供第二治疗。在一些实施方案中,该方法进一步包括基于该生物标记谱预测第二治疗的功效。在一些实施方案中,该不可逆Btk抑制剂与Btk的Cys 481共价结合。在一些实施方案中,该不可逆Btk抑制剂是(A)、(A1)、(B)、(B1)、(C)、(C1)、(D)、(D1)、(E)或(F)的化合物。在一些实施方案中,该不可逆Btk抑制剂是式(D)的化合物。在一些实施方案中,该不可逆Btk抑制剂是(R)-1-(3-(4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)哌啶-1-基)丙-2-烯-1-酮(即,PCI-32765/依罗替尼)。在一些实施方案中,该第二治疗包含来那度胺。在一些实施方案中,该方法包括使用分析仪器来分析自个体获得的样品中的动员的多个细胞。在一些实施方案中,在向个体施用不可逆Btk抑制剂后,该个体的外周血中的绝对淋巴细胞计数增加至少约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、125%、150%、175%或200%。在一些实施方案中,在向个体施用不可逆Btk抑制剂后,该个体的外周血中的绝对淋巴细胞计数增加至少约10%-50%。在一些实施方案中,动员的细胞具有降低的CD38和CXCR4的表达。在一些实施方案中,动员的细胞为CD19+CD5+细胞。

[0014] 在某些实施方案中,本文公开了一种在有需要的个体中治疗血液恶性肿瘤的方法,包括:(a)向该个体施用第一治疗,该第一治疗包含足以从该恶性肿瘤动员多个细胞的量的不可逆Btk抑制剂;和(b)制备从该多个细胞中分离的细胞群体的生物标记谱。在一些实施方案中,该不可逆Btk抑制剂的量足以诱发来自该恶性肿瘤的多个细胞的淋巴细胞增多。在一些实施方案中,该生物标记表达谱用来诊断血液恶性肿瘤、确定其预后或产生其预测谱。在一些实施方案中,该生物标记谱指示生物标记的表达、生物标记的表达水平、生物标记中的突变或生物标记的存在。在一些实施方案中,该生物标记谱指示血液恶性肿瘤是否涉及Btk信号传导。在一些实施方案中,该生物标记谱指示血液恶性肿瘤的存活是否涉及Btk信号传导。在一些实施方案中,该生物标记谱指示血液恶性肿瘤不涉及Btk信号传导。在一些实施方案中,该生物标记谱指示血液恶性肿瘤的存活不涉及Btk信号传导。在一些实施方案中,该生物标记谱指示血液恶性肿瘤是否涉及BCR信号传导。在一些实施方案中,该生物标记谱指示血液恶性肿瘤的存活是否涉及BCR信号传导。在一些实施方案中,该生物标记谱指示血液恶性肿瘤不涉及BCR信号传导。在一些实施方案中,该生物标记谱指示血液恶性肿瘤的存活不涉及BCR信号传导。在一些实施方案中,该生物标记为:ZAP70;t (14,18); β -2微球蛋白;p53突变状态;ATM突变状态;del (17) p;del (11) q;del (6) q;CD5;CD11c;CD19;CD20;CD22;CD25;CD38;CD103;CD138;分泌型、表面型或细胞质型免疫球蛋白的表达; V_H 突变状态;或其组合。在一些实施方案中,该生物标记为:ZAP70;t (14,18); β -2微球蛋白;p53

突变状态;ATM突变状态;del (17) p;del (11) q;del (6) q;CD5;CD11c;CD19;CD20;CD22;CD25;CD38;CD103;CD138;分泌型、表面型或细胞质型免疫球蛋白的表达; V_H 突变状态;或其组合。在一些实施方案中,该方法进一步包括基于该生物标记谱提供第二治疗。在一些实施方案中,该方法进一步包括基于该生物标记谱预测第二治疗的功效。

具体地,本申请提供了以下内容:

1.一种用于在有需要的个体中治疗血液恶性肿瘤的方法,其包括向所述个体施用抗癌治疗,其中所述个体被鉴定为在向所述个体施用不可逆Btk抑制剂后具有增加的来自该恶性肿瘤的多个细胞的动员。

2.如项目1所述的方法,其中所述不可逆Btk抑制剂与Btk的Cys481共价结合。

3.如项目1所述的方法,其中所述不可逆Btk抑制剂是式(D)的化合物。

4.如项目1所述的方法,其中所述不可逆Btk抑制剂是(R)-1-(3-(4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)哌啶-1-基)丙-2-烯-1-酮(PCI-32765/依罗替尼)。

5.如项目1所述的方法,其中所述血液恶性肿瘤是B细胞恶性肿瘤。

6.如项目1所述的方法,其中所述血液恶性肿瘤是白血病、淋巴增生性疾病或髓样疾病。

7.如项目1所述的方法,其中所述血液恶性肿瘤是非霍奇金淋巴瘤。

8.如项目1所述的方法,其中所述血液恶性肿瘤是慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、小淋巴细胞性白血病(SLL)、高危型CLL、非CLL/SLL淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤(FL)、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、套细胞淋巴瘤(MCL)、瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症、多发性骨髓瘤(MM)、边缘区淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、非伯基特高度恶性B细胞淋巴瘤、结节外边缘区B细胞淋巴瘤、急性或慢性髓性(或髓样)白血病、骨髓增生异常综合征或急性淋巴母细胞性白血病。

9.如项目1所述的方法,其中所述血液恶性肿瘤是复发性或难治性弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、复发性或难治性套细胞淋巴瘤、复发性或难治性滤泡性淋巴瘤、复发性或难治性CLL;复发性或难治性SLL;复发性或难治性多发性骨髓瘤。

10.如项目1所述的方法,其中所述动员的细胞是髓样细胞或淋巴样细胞。

11.如项目1所述的方法,其中与施用所述Btk抑制剂之前的浓度相比,所述个体在施用所述Btk抑制剂后具有较高的动员细胞的外周血浓度。

12.如项目1所述的方法,其中在所述动员的多个细胞的外周血浓度已经增加预定的时间长度之后,施用第二治疗。

13.如项目1所述的方法,其中诊断是基于对一种或多种生物标记的存在、表达或表达水平的检测。

14.如项目13所述的方法,其中所述生物标记为:ZAP70;t (14,18); β -2微球蛋白;p53突变状态;ATM突变状态;del (17) p;del (11) q;del (6) q;CD5;CD11c;CD19;CD20;CD22;CD25;CD38;CD103;CD138;分泌型、表面型或细胞质型免疫球蛋白的表达; V_H 突变状态;或其组合。

15.如项目1所述的方法,其中所述第二治疗包含来那度胺、硼替佐米、索拉非尼、吉西他滨、地塞米松、苯达莫司汀、R-406、紫杉醇、长春新碱、多柔比星、坦罗莫司、卡铂、奥法木单抗、利妥昔单抗、GA101、R-ICE(异环磷酰胺、卡铂、依托泊苷)、R-CHOP(利妥昔单抗、环磷酰胺、盐酸多柔比星、硫酸长春新碱和泼尼松)、BR(苯达莫司汀和利妥昔单抗)、FCR(氟达拉滨、环磷酰胺和利妥昔单抗)或其任意组合。

16. 一种用于在有需要的个体中治疗血液恶性肿瘤的方法,其包括:
 - a. 向所述个体施用第一治疗,该第一治疗包含足以从所述恶性肿瘤动员多个细胞的量的不可逆Btk抑制剂;
 - b. 分析从所述个体获得的样品中的动员的多个细胞;和
 - c. 向所述个体施用第二治疗。
17. 如项目16所述的方法,其中所述不可逆Btk抑制剂的量足以诱发来自所述恶性肿瘤的多个细胞的淋巴细胞增多。
18. 如项目16所述的方法,其中所述不可逆Btk抑制剂与Btk的Cys 481共价结合。
19. 如项目16所述的方法,其中所述不可逆Btk抑制剂是式(D)的化合物。
20. 如项目16所述的方法,其中所述不可逆Btk抑制剂是(R)-1-(3-(4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)哌啶-1-基)丙-2-烯-1-酮(PCI-32765)。
21. 如项目16所述的方法,其中所述血液恶性肿瘤是B细胞恶性肿瘤。
22. 如项目16所述的方法,其中所述血液恶性肿瘤是白血病、淋巴增生性疾病或髓样疾病。
23. 如项目16所述的方法,其中所述血液恶性肿瘤是非霍奇金淋巴瘤。
24. 如项目16所述的方法,其中所述血液恶性肿瘤是慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、小淋巴细胞性白血病(SLL)、高危型CLL、非CLL/SLL淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤(FL)、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、套细胞淋巴瘤(MCL)、瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症、多发性骨髓瘤(MM)、边缘区淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、非伯基特高度恶性B细胞淋巴瘤、结节外边缘区B细胞淋巴瘤、急性或慢性髓性(或髓样)白血病、骨髓增生异常综合征或急性淋巴母细胞性白血病。
25. 如项目16所述的方法,其中所述血液恶性肿瘤是复发性或难治性弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、复发性或难治性套细胞淋巴瘤、复发性或难治性滤泡性淋巴瘤、复发性或难治性CLL;复发性或难治性SLL;复发性或难治性多发性骨髓瘤。
26. 如项目16所述的方法,其中所述动员的细胞是髓样细胞或淋巴样细胞。
27. 如项目16所述的方法,其中分析所述动员的多个细胞包括测量所述动员的多个细胞的外周血浓度。
28. 如项目27所述的方法,进一步包括在所述动员的多个细胞的外周血浓度与施用Btk抑制剂之前的浓度相比增加后,施用所述第二治疗。
29. 如项目27所述的方法,其中在动员的多个细胞的外周血浓度后续降低后,进行所述第二治疗的施用。
30. 如项目29所述的方法,其中分析所述动员的多个细胞包括测量与施用所述Btk抑制剂之前的浓度相比所述动员的多个细胞的外周血浓度增加的持续时间。
31. 如项目27所述的方法,进一步包括在所述动员的多个细胞的外周血浓度已增加预定时间长度之后,施用所述第二治疗。
32. 如项目16所述的方法,其中分析所述动员的多个细胞包括制备分离自所述多个细胞的细胞群体的生物标记谱,其中所述生物标记谱指示生物标记的表达、生物标记的表达水平、生物标记中的突变或生物标记的存在。
33. 如项目32所述的方法,其中所述生物标记为:ZAP70;t(14,18); β -2微球蛋白;p53突变状态;ATM突变状态;del(17)p;del(11)q;del(6)q;CD5;CD11c;CD19;CD20;CD22;CD25;

CD38;CD103;CD138;分泌型、表面型或细胞质型免疫球蛋白的表达; V_H 突变状态;或其组合。

34. 如项目33所述的方法,进一步包括基于所述生物标记谱预测所述第二治疗的功效。

35. 如项目16所述的方法,其中所述第二治疗包含来那度胺、硼替佐米、索拉非尼、吉西他滨、地塞米松、苯达莫司汀、R-406、紫杉醇、长春新碱、多柔比星、坦罗莫司、卡铂、奥法木单抗、利妥昔单抗、GA101、R-ICE (异环磷酰胺、卡铂、依托泊苷)、R-CHOP (利妥昔单抗、环磷酰胺、盐酸多柔比星、硫酸长春新碱和泼尼松)、BR (苯达莫司汀和利妥昔单抗)、FCR (氟达拉滨、环磷酰胺和利妥昔单抗)或其任意组合。

36. 一种用于在有需要的个体中治疗血液恶性肿瘤的方法,其包括:

a. 向所述个体施用第一治疗,该第一治疗包含足以从所述恶性肿瘤动员多个细胞的量的不可逆Btk抑制剂;和

b. 制备分离自所述多个细胞的细胞群体的生物标记谱。

37. 如项目36所述的方法,其中所述不可逆Btk抑制剂的量足以诱发来自所述恶性肿瘤的多个细胞的淋巴细胞增多。

38. 如项目36所述的方法,其中所述生物标记表达谱用来诊断血液恶性肿瘤、确定其预后或产生其预测谱。

39. 如项目36所述的方法,其中所述生物标记谱指示生物标记的表达、生物标记的表达水平、生物标记中的突变或生物标记的存在。

40. 如项目36所述的方法,其中所述生物标记谱指示:

(a) 所述血液恶性肿瘤或所述血液恶性肿瘤的存活涉及Btk信号传导;

(b) 所述血液恶性肿瘤或所述血液恶性肿瘤的存活不涉及Btk信号传导;

如果血液恶性肿瘤的存活涉及Btk信号传导;

(c) 所述血液恶性肿瘤或所述血液恶性肿瘤的存活涉及BCR信号传导;或

(d) 所述血液恶性肿瘤或所述血液恶性肿瘤的存活不涉及BCR信号传导。

41. 如项目36所述的方法,其中所述生物标记是ZAP70、t (14, 18)、 β -2微球蛋白、p53突变状态、ATM突变状态、del (17) p、del (11) q、del (6) q、CD5、CD11c、CD19、CD20、CD22、CD25、CD38、CD103、CD138、CXCR4、分泌型、表面型或细胞质型免疫球蛋白的表达; V_H 突变状态,或其组合。

42. 如项目36所述的方法,进一步包括基于所述生物标记谱提供第二抗癌治疗。

43. 如项目36所述的方法,进一步包括基于所述生物标记谱预测第二抗癌治疗的功效。

44. 如项目1、17或36中任一项所述的方法,其中所述血液恶性肿瘤是套细胞淋巴瘤(MCL)、复发性或难治性MCL、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、复发性或难治性CLL、小淋巴细胞性白血病(SLL)、复发性或难治性SLL、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)或复发性或难治性DLBCL。

45. 如项目1、17或36中任一项所述的方法,其中在向所述个体施用不可逆Btk抑制剂之后,所述个体的外周血中的绝对淋巴细胞计数的浓度增加至少约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、125%、150%、175%或200%。

46. 如项目1、17或36中任一项所述的方法,其中所述动员的细胞为CD19+CD5+细胞。

47. 如项目1、17或36中任一项所述的方法,其中所述动员的细胞具有降低的CD38和CXCR4的表达。

48. 如项目1、17或36中任一项所述的方法,包括使用分析仪器来分析从所述个体获得的样品中的所述动员的多个细胞。

附图说明

[0015] 图1显示了Btk活性在导致疾病发病机理的慢性淋巴细胞性白血病 (CLL) 细胞中的多个过程中的作用。

[0016] 图2显示了罹患CLL的患者中的淋巴结 (LN) 反应。左图显示用不可逆Btk抑制剂 (PCI-32765) 治疗之前的LN,而右图显示用不可逆Btk抑制剂 (PCI-32765) 治疗后的LN。

[0017] 图3显示了在包括对复发难治性 (R/R) CLL/SLL患者以420mg/天或840mg/天施用不可逆Btk抑制剂 (PCI-32765) 的临床试验中,治疗过程中肿瘤负荷的变化百分比。

[0018] 图4呈现了在用不可逆Btk抑制剂 (PCI-32765) 治疗过程中,施用420mg/天PCI-32765的初治(虚线)或R/R CLL/SLL(实线)患者的绝对淋巴细胞计数 (ALC) 和淋巴结 (LN) 直径乘积之和 (SPD)。

[0019] 图5呈现了在连续治疗周期中施用420mg/天PCI-32765的初治患者中的累积最佳反应。CR=完全反应。PR=部分反应。

[0020] 图6呈现了在连续治疗周期中施用420mg/天PCI-32765的R/R CLL/SLL患者中的累积最佳反应。CR=完全反应。PR=部分反应。

[0021] 图7呈现了在连续治疗周期中施用420mg/天PCI-32765的R/R CLL/SLL患者 (RR) 与初治 (TN) 患者中的累积最佳反应的比较。CR=完全反应。PR=部分反应。

[0022] 图8显示了对患有滤泡性淋巴瘤的个体(其达到完全或部分反应 (CR/PR)) 施用Btk抑制剂之后的绝对淋巴细胞计数 (ALC) /109L对比于周期天数。Y轴显示按照X轴上的周期数和天数,在每个时间点的绝对淋巴细胞计数 (ALC)。所有患者(除了Pt32009之外)按照4周治疗紧接一周停止的时间表进行治疗。因此,对于这些患者,每个周期的第1天是紧接在停药一周之后的。注意到在大多数患者的大部分周期期间ALC增加,并且在后续周期开始时ALC减少。这种模式通常随着患者响应于治疗而在后面的周期中变平。患者32009在无干扰的情况下接受治疗,而没有显示这种周期性模式,但是在第1周期的第15天确实显示增加,并且在第2周期至第5周期期间逐渐增加。

[0023] 图9显示了对患有滤泡性淋巴瘤的个体(其在治疗期间病情稳定 (SD)) 施用Btk抑制剂之后的绝对淋巴细胞计数 (ALC) /109L对比于周期天数。Y轴显示按照X轴上的周期数和天数,在每个时间点的绝对淋巴细胞计数 (ALC)。所有患者按照4周治疗紧接一周停止的时间表进行治疗。因此,对于这些患者,每个周期的第1天是紧接在停药一周之后的。注意到患者32004的血液ALC动员逐渐增加,他在开始时稳定但之后疾病进展 (PD)。

[0024] 图10显示了对患有滤泡性淋巴瘤的PD个体施用Btk抑制剂之后的绝对淋巴细胞计数 (ALC) /109L对比于周期天数。Y轴显示按照X轴上的周期数和天数,在每个时间点的绝对淋巴细胞计数 (ALC)。除了38010之外的所有患者按照4周治疗紧接一周停止的时间表进行治疗。因此,对于这些患者,每个周期的第1天是紧接在停药一周之后的。注意到缺少动员,特别是患者38010和32001。患者323001在离开研究之前具有有限的治疗。淋巴细胞反应提示,如果能够留在治疗更久的话,这名患者可能已经有反应。

[0025] 图11显示了对患有DLBCL的PR和SD个体施用Btk抑制剂之后的绝对淋巴细胞计数

(ALC)/109L对比于周期天数。Y轴显示按照X轴上的周期数和天数,在每个时间点的绝对淋巴细胞计数(ALC)。患者38011按照4周治疗紧接一周停止的时间表进行治疗。因此,对于这名患者,每个周期的第1天是紧接在停药一周之后的。患者38008和324001用连续的每日剂量进行治疗。

[0026] 图12显示了对患有DLBCL的PD个体施用Btk抑制剂之后的绝对淋巴细胞计数(ALC)/109L对比于周期天数。Y轴显示按照X轴上的周期数和天数,在每个时间点的绝对淋巴细胞计数(ALC)。所有患者按照4周治疗紧接一周停止的时间表进行治疗。因此,对于这些患者,每个周期的第1天是紧接在停药一周之后的。注意到4名患者中的3名缺少动员。患者32002只接受一个治疗周期。

[0027] 图13显示了对患有套细胞淋巴瘤的个体施用Btk抑制剂之后的绝对淋巴细胞计数(ALC)/109L对比于周期天数。Y轴显示按照X轴上的周期数和天数,在每个时间点的绝对淋巴细胞计数(ALC)。患者32006、38003和38004按照4周治疗紧接一周停止的时间表进行治疗。因此,对于这些患者,每个周期的第1天是紧接在停药一周之后的。其他患者用连续的每日给药进行治疗。注意到具有初始PD的患者(32014)并未显示动员。

[0028] 图14显示了对图12所示的患有套细胞淋巴瘤个体施用Btk抑制剂之后的绝对淋巴细胞计数(ALC)/109L对比于周期天数。与图12相比,改变轴来展示低幅波动。注意到所有响应的患者显示出一定程度的动员。

[0029] 图15展示了当疾病响应时淋巴细胞动员减少,特别是B细胞类型,这与淋巴瘤细胞一致。组群4的患者32007具有3级滤泡性淋巴瘤,其逐渐地从SD退回CR。虽然在这个例子中ALC的变化不显著,但响应于Btk抑制剂的治疗,B细胞部分经历特有的周期性增加。也注意到逐周期递减的变化幅度与累积的疾病控制一致。

[0030] 图16展示了随着疾病进展,B细胞动员增加。组群2的患者32004患有1级滤泡性淋巴瘤,其在第6周期之后从开始时的SD进展成PD。

[0031] 图17显示了在响应的套细胞淋巴瘤患者200-005中CD45^{DIM} B细胞亚群的早期动员和最终减少。该亚群具有典型的MCL免疫表型(CD45^{DIM}),且不同于正常淋巴细胞的免疫表型。

[0032] 图18显示了在CR DLBCL Pt324001中异常高的光散射CD19⁺细胞动员及随后的消退。在上图中具有光散射的这些CD45⁺细胞(SSC-H)被门控(gated upon),而它们的CD3对比于CD19的染色显示在下图中。在这里,推定的恶性细胞“隐藏”在通常限定单核细胞的大MNC窗中。动员之后发生反应的顺序类似于其它实例。

[0033] 图19呈现了在连续治疗周期中施用560mg/天PCI-32765的R/R MCL患者中的累积最佳反应。CR=完全反应。PR=部分反应。SD=病情稳定。PD=疾病进展。

[0034] 图20呈现了在用不可逆Btk抑制剂(PCI-32765)治疗过程中,在第1周期期间施用420mg/天PCI-32765持续28天的CLL/SLL患者中,单独的或与奥法木单抗联合的PCI-32756的绝对淋巴细胞计数(ALC)(左)或淋巴结(LN)直径乘积之和(SPD)(右图)。在第2周期的第1天施用300mg奥法木单抗,随后在第2周期的第8、15和22天,第3周期的第1、8、15和22天,然后在第5-8周期的第1天施用2000mg。

[0035] 图21呈现了组织学数据,显示在如图20所示的CLL/SLL患者中,在420mg/天的PCI-32765与奥法木单抗联合治疗12个周期之后的淋巴细胞动员。

[0036] 图22呈现了在用不可逆Btk抑制剂(PCI-32765)治疗过程中,在28天周期中施用420mg/天PCI-32765的CLL/SLL患者中,单独的或与苯达莫司汀联合的PCI-32756的绝对淋巴细胞计数(ALC)(左)或淋巴结(LN)直径乘积之和(SPD)(右图)。苯达莫司汀以70mg/m²(d1-2)进行施用,而利妥昔单抗以375mg/m²(第1周期)或500mg/m²(第2-6周期)施用6个周期。

[0037] 图23呈现了显示Btk抑制剂(PCI-32765)与卡铂或万珂(Velcade)的组合在DoHH2细胞中的结果的数据。

[0038] 图24呈现了显示Btk抑制剂(PCI-32765)与地塞米松或来那度胺的组合在DoHH2细胞中的结果的数据。

[0039] 图25呈现了显示Btk抑制剂(PCI-32765)与坦罗莫司或R406的组合在DoHH2细胞中的结果的数据。

[0040] 图26呈现了显示Btk抑制剂(PCI-32765)与吉西他滨或多柔比星的组合在DoHH2细胞中的结果的数据。

[0041] 图27呈现了显示Btk抑制剂(PCI-32765)与Ca1-101的组合在TMD8细胞中的结果的数据。

[0042] 图28呈现了显示Btk抑制剂(PCI-32765)与R406的组合在TMD8细胞中的结果的数据。

[0043] 图29呈现了显示Btk抑制剂(PCI-32765)与长春新碱的组合在TMD8细胞中的结果的数据。

[0044] 图30呈现了显示Btk抑制剂(PCI-32765)与多柔比星的组合在TMD8细胞中的结果的数据。

[0045] 图31呈现了显示Btk抑制剂(PCI-32765)与来那度胺(lenalidomide)的组合在TMD8细胞中的结果的数据。

[0046] 图32呈现了显示Btk抑制剂(PCI-32765)与万珂的组合在TMD8细胞中的结果的数据。

[0047] 图33呈现了显示Btk抑制剂(PCI-32765)与氟达拉滨的组合在TMD8细胞中的结果的数据。

[0048] 图34呈现了Btk抑制剂(PCI-32765)与紫杉醇的组合在TMD8细胞中的结果的数据。

[0049] 图35呈现了数据,显示在PCI-32756(依罗替尼)治疗(560mg/天)7天之前或之后来自典型MCL受试者的PBMC样品的门控淋巴细胞的流式图。PBMC用CD3、CD19和CD5染色。注意到在药物治疗7天后CD19⁺CD3⁻和CD19⁺CD5⁺群体增加。

[0050] 图36呈现了数据,显示CD19⁺CD5⁺细胞在PCI-32765(依罗替尼)治疗后具有降低的CXCR4、CD38和Ki67。(A)在依罗替尼治疗一周后CD19⁺CD5⁺细胞中的表面CXCR4表达显著降低。(B)在用依罗替尼治疗的4名受试者中,在4周治疗过程中,CD19⁺CD5⁺而非CD19⁺CD5⁻细胞中的CD38表达降低。(C)在治疗1周后表面CD38表达(p<0.01)(左图)和细胞内Ki67(p<0.05)(右图)显著降低。在治疗前(D1)以及治疗1周后(D8),来自健康受试者或用依罗替尼治疗的MCL患者的CD20⁺CD5⁺PBMC的细胞内磷酸-Erk(pT202/Y204/Erk1/2)的MFI(下图)。(D)来自3名未用药物治疗的MCL淋巴瘤患者(受试者A、B、C)的淋巴结活检和PBMC的CXCR4和CD38表达。(E)依罗替尼治疗的MCL患者在第8天(左)或第29天(右)与治疗前相比,血浆趋化因子和

细胞因子浓度的变化百分比 (n=9)。

[0051] 图37呈现了数据,显示PCI-32765(依罗替尼)抑制基质细胞下方MCL细胞的迁移(假伸入(pseudoemperipoliesis))和CXCL12刺激的皮质肌动蛋白的形成。(A) Mino细胞用剂量逐渐增加的依罗替尼或载体预处理30min,然后放置到基质细胞聚集的板上。4hr后,将共同培养物洗涤数次,在用hCD19染色并对CD19⁺群体进行评分后,在流式细胞仪中用标有刻度的珠子对迁移的和粘附的Mino细胞进行评分和计数。百日咳毒素和依罗替尼均剂量依赖性地抑制迁移的和粘附的Mino细胞(左图)。将用CXCL12刺激并用载体或药物处理的Mino细胞用鬼笔环肽染色,并且使用流式细胞术确定其强度(右图)。(B) 依罗替尼(100nM)抑制与M2基质细胞共培养的原代MCL(hCD19⁺细胞)的假伸入(左图)。

具体实施方式

[0052] 目前需要用于治疗(包括诊断)包括复发性和难治性B细胞恶性肿瘤及ABC-DLBCL在内的血液恶性肿瘤的方法。本申请是部分地基于以下意外发现:Btk抑制剂诱导实体血液恶性肿瘤中淋巴样细胞的动员(或者,在一些情况下,为淋巴细胞增多)。淋巴样细胞的动员增加了它们对额外的癌症治疗的暴露以及它们对于生物标记筛查的可用性。

[0053] 在某些实施方案中,本文公开了一种在有需要的个体中治疗血液恶性肿瘤的方法,其包括:(a)向该个体施用第一治疗,该第一治疗包含足以从该恶性肿瘤动员多个细胞的量的不可逆Btk抑制剂;(b)分析从该个体获得的样品中的动员的多个细胞;和(c)向该个体施用第二治疗。在一些实施方案中,该不可逆Btk抑制剂的量足以诱发来自该恶性肿瘤的多个细胞的淋巴细胞增多。在一些实施方案中,该血液恶性肿瘤是B细胞恶性肿瘤。在一些实施方案中,该血液恶性肿瘤是白血病、淋巴增生性疾病或髓样疾病。在一些实施方案中,动员的细胞是髓样细胞或淋巴样细胞。在一些实施方案中,分析动员的多个细胞包括测量动员的多个细胞的外周血浓度。权利要求6的方法,该方法进一步包括,在与施用Btk抑制剂之前的浓度相比该动员的多个细胞的外周血浓度增加后,施用第二治疗。在一些实施方案中,在动员的多个细胞的外周血浓度后续降低后,进行第二治疗的施用。在一些实施方案中,分析该动员的多个细胞包括测量与施用该Btk抑制剂之前的浓度相比该动员的多个细胞的外周血浓度增加的持续时间。在一些实施方案中,该方法进一步包括在该动员的多个细胞的外周血浓度已经增加预定时间长度后,施用第二治疗。在一些实施方案中,分析该动员的多个细胞包括对外周血中动员的多个细胞的数目进行计数。在一些实施方案中,该方法进一步包括在与施用Btk抑制剂之前的数目相比外周血中动员的多个细胞的数目增加后,施用第二治疗。在一些实施方案中,在外周血中的动员的多个细胞的数目后续降低之后,进行第二治疗的施用。在一些实施方案中,分析该动员的多个细胞包括测量与施用Btk抑制剂之前的数目相比在外周血中动员的多个细胞数目增加的持续时间。在一些实施方案中,该方法进一步包括在外周血中的动员的多个细胞的数目已经增加预定时间长度之后,施用第二治疗。在一些实施方案中,分析动员的多个细胞包括制备分离自多个细胞的细胞群体的生物标记谱,该生物标记谱指示生物标记的表达、生物标记的表达水平、生物标记中的突变或生物标记的存在。在一些实施方案中,该生物标记为:ZAP70;t(14,18); β -2微球蛋白;p53突变状态;ATM突变状态;del(17)p;del(11)q;del(6)q;CD5;CD11c;CD19;CD20;CD22;CD25;CD38;CD103;CD138;分泌型、表面型或细胞质型免疫球蛋白的表达;V_H突变状

态;或其组合。在一些实施方案中,该方法进一步包括基于该生物标记谱提供第二治疗。在一些实施方案中,该方法进一步包括基于该生物标记谱预测第二治疗的功效。在一些实施方案中,该血液恶性肿瘤是慢性淋巴细胞性白血病 (CLL)、小淋巴细胞性白血病 (SLL)、高危型CLL或非CLL/SLL淋巴瘤。在一些实施方案中,该血液恶性肿瘤是滤泡性淋巴瘤、弥漫性大B细胞淋巴瘤 (DLBCL)、套细胞淋巴瘤、瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症、多发性骨髓瘤、边缘区淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、非伯基特高度恶性B细胞淋巴瘤或结节外边缘区B细胞淋巴瘤。在一些实施方案中,该血液恶性肿瘤是急性或慢性髓性(或髓样)白血病、骨髓增生异常综合征或急性淋巴母细胞性白血病。在一些实施方案中,该血液恶性肿瘤是复发性或难治性弥漫性大B细胞淋巴瘤 (DLBCL)、复发性或难治性套细胞淋巴瘤、复发性或难治性滤泡性淋巴瘤、复发性或难治性CLL、复发性或难治性SLL、复发性或难治性多发性骨髓瘤。在一些实施方案中,该不可逆Btk抑制剂是(R)-1-(3-(4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)哌啶-1-基)丙-2-烯-1-酮(即,PCI-32765/依罗替尼)。在一些实施方案中,第二治疗包含来那度胺。在一些实施方案中,第二治疗包含硼替佐米。在一些实施方案中,第二治疗包含索拉非尼。在一些实施方案中,第二治疗包含吉西他滨。在一些实施方案中,第二治疗包含地塞米松。在一些实施方案中,第二治疗包含苯达莫司汀。在一些实施方案中,第二治疗包含R-406。在一些实施方案中,第二治疗包含紫杉醇。在一些实施方案中,第二治疗包含长春新碱。在一些实施方案中,第二治疗包含多柔比星。在一些实施方案中,第二治疗包含坦罗莫司。在一些实施方案中,第二治疗包含卡铂。在一些实施方案中,第二治疗包含奥法木单抗。在一些实施方案中,第二治疗包含利妥昔单抗。在一些实施方案中,第二治疗包含GA101。在一些实施方案中,第二治疗包含R-ICE(异环磷酰胺、卡铂、依托泊苷)。在一些实施方案中,该方法包括使用分析仪器来分析自个体获得的样品中的动员的多个细胞。

[0054] 在某些实施方案中,本文公开了一种用于在有需要的个体中治疗进展缓慢的血液恶性肿瘤的方法,其包括:(a)向该个体施用第一治疗,该第一治疗包含足以从该进展缓慢的血液恶性肿瘤动员多个细胞的量的不可逆Btk抑制剂;(b)分析从该个体获得的样品中的动员的多个细胞;和(c)向该个体施用第二治疗。在一些实施方案中,该不可逆Btk抑制剂的量足以诱发来自该恶性肿瘤的多个细胞的淋巴细胞增多。在一些实施方案中,动员的细胞是髓样细胞或淋巴样细胞。在一些实施方案中,分析动员的多个细胞包括测量动员的多个细胞的外周血浓度。在一些实施方案中,该方法进一步包括,在与施用Btk抑制剂之前的浓度相比该动员的多个细胞的外周血浓度增加后,施用第二治疗。在一些实施方案中,在动员的多个细胞的外周血浓度后续降低后,进行第二治疗的施用。在一些实施方案中,分析该动员的多个细胞包括测量与施用该Btk抑制剂之前的浓度相比该动员的多个细胞的外周血浓度增加的持续时间。在一些实施方案中,该方法进一步包括在该动员的多个细胞的外周血浓度已经增加预定时间长度后,施用第二治疗。在一些实施方案中,分析该动员的多个细胞包括对外周血中动员的多个细胞的数目进行计数。在一些实施方案中,该方法进一步包括在与施用Btk抑制剂之前的数目相比外周血中动员的多个细胞的数目增加后,施用第二治疗。在一些实施方案中,在外周血中的动员的多个细胞的数目后续降低之后,进行第二治疗的施用。在一些实施方案中,分析该动员的多个细胞包括测量与施用Btk抑制剂之前的数目相比在外周血中动员的多个细胞数目增加的持续时间。在一些实施方案中,该方法进一步包括在外周血中的动员的多个细胞的数目已经增加预定时间长度之后,施用第二治疗。在

一些实施方案中,分析动员的多个细胞包括制备分离自多个细胞的细胞群体的生物标记谱,该生物标记谱指示生物标记的表达、生物标记的表达水平、生物标记中的突变或生物标记的存在。在一些实施方案中,该生物标记为:ZAP70;t (14,18); β -2微球蛋白;p53突变状态;ATM突变状态;del (17) p;del (11) q;del (6) q;CD5;CD11c;CD19;CD20;CD22;CD25;CD38;CD103;CD138;分泌型、表面型或细胞质型免疫球蛋白的表达; V_H 突变状态;或其组合。在一些实施方案中,该方法进一步包括基于该生物标记谱提供第二治疗。在一些实施方案中,该方法进一步包括基于该生物标记谱预测第二治疗的功效。在一些实施方案中,该不可逆Btk抑制剂是(R)-1-(3-(4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)哌啶-1-基)丙-2-烯-1-酮(即,PCI-32765/依罗替尼)。在一些实施方案中,第二治疗包含来那度胺。在一些实施方案中,第二治疗包含利妥昔单抗、环磷酰胺、盐酸多柔比星、硫酸长春新碱和泼尼松(R-CHOP)。在一些实施方案中,第二治疗包含坦罗莫司。在一些实施方案中,该方法包括使用分析仪器来分析自个体获得的样品中的动员的多个细胞。

[0055] 在某些实施方案中,本文公开了一种用于在有需要的个体中治疗非霍奇金淋巴瘤的方法,该方法包括:(a)向该个体施用第一治疗,该第一治疗包含足以从非霍奇金淋巴瘤动员多个细胞的量的不可逆Btk抑制剂;(b)分析从该个体获得的样品中的动员的多个细胞;和(c)向该个体施用第二治疗。在一些实施方案中,该不可逆Btk抑制剂的量足以诱发来自该恶性肿瘤的多个细胞的淋巴细胞增多。在一些实施方案中,动员的细胞是髓样细胞或淋巴样细胞。在一些实施方案中,分析动员的多个细胞包括测量动员的多个细胞的外周血浓度。在一些实施方案中,该方法进一步包括,在与施用Btk抑制剂之前的浓度相比该动员的多个细胞的外周血浓度增加后,施用第二治疗。在一些实施方案中,在动员的多个细胞的外周血浓度后续降低后,进行第二治疗的施用。在一些实施方案中,分析该动员的多个细胞包括测量与施用该Btk抑制剂之前的浓度相比该动员的多个细胞的外周血浓度增加的持续时间。在一些实施方案中,该方法进一步包括在该动员的多个细胞的外周血浓度已经增加预定时间长度后,施用第二治疗。在一些实施方案中,分析该动员的多个细胞包括对外周血中动员的多个细胞的数目进行计数。在一些实施方案中,该方法进一步包括在与施用Btk抑制剂之前的数目相比外周血中动员的多个细胞的数目增加后,施用第二治疗。在一些实施方案中,在外周血中的动员的多个细胞的数目后续降低之后,进行第二治疗的施用。在一些实施方案中,分析该动员的多个细胞包括测量与施用Btk抑制剂之前的数目相比在外周血中动员的多个细胞数目增加的持续时间。在一些实施方案中,该方法进一步包括在外周血中的动员的多个细胞的数目已经增加预定时间长度之后,施用第二治疗。在一些实施方案中,分析动员的多个细胞包括制备分离自多个细胞的细胞群体的生物标记谱,该生物标记谱指示生物标记的表达、生物标记的表达水平、生物标记中的突变或生物标记的存在。在一些实施方案中,该生物标记为:ZAP70;t (14,18); β -2微球蛋白;p53突变状态;ATM突变状态;del (17) p;del (11) q;del (6) q;CD5;CD11c;CD19;CD20;CD22;CD25;CD38;CD103;CD138;分泌型、表面型或细胞质型免疫球蛋白的表达; V_H 突变状态;或其组合。在一些实施方案中,该方法进一步包括基于该生物标记谱提供第二治疗。在一些实施方案中,该方法进一步包括基于该生物标记谱预测第二治疗的功效。在一些实施方案中,该不可逆Btk抑制剂是(R)-1-(3-(4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)哌啶-1-基)丙-2-烯-1-酮(即,PCI-32765/依罗替尼)。在一些实施方案中,第二治疗包含硼替佐米。在一些实施方案

中,第二治疗包含苯达莫司汀和利妥昔单抗(BR)。在一些实施方案中,该方法包括使用分析仪器来分析自个体获得的样品中的动员的多个细胞。

[0056] 在某些实施方案中,本文公开了一种用于在有需要的个体中治疗弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)的方法,该方法包括:(a)向该个体施用第一治疗,该第一治疗包含足以从DLBCL动员多个细胞的量的不可逆Btk抑制剂;(b)分析从该个体获得的样品中的动员的多个细胞;和(c)向该个体施用第二治疗。在一些实施方案中,该不可逆Btk抑制剂的量足以诱发自该恶性肿瘤的多个细胞的淋巴细胞增多。在一些实施方案中,动员的细胞是髓样细胞或淋巴样细胞。在一些实施方案中,分析动员的多个细胞包括测量动员的多个细胞的外周血浓度。在一些实施方案中,该方法进一步包括,在与施用Btk抑制剂之前的浓度相比该动员的多个细胞的外周血浓度增加后,施用第二治疗。在一些实施方案中,在动员的多个细胞的外周血浓度后续降低后,进行第二治疗的施用。在一些实施方案中,分析该动员的多个细胞包括测量与施用该Btk抑制剂之前的浓度相比该动员的多个细胞的外周血浓度增加的持续时间。在一些实施方案中,该方法进一步包括在该动员的多个细胞的外周血浓度已经增加预定时间长度后,施用第二治疗。在一些实施方案中,分析该动员的多个细胞包括对外周血中动员的多个细胞的数目进行计数。在一些实施方案中,该方法进一步包括在与施用Btk抑制剂之前的数目相比外周血中动员的多个细胞的数目增加后,施用第二治疗。在一些实施方案中,在外周血中的动员的多个细胞的数目后续降低之后,进行第二治疗的施用。在一些实施方案中,分析该动员的多个细胞包括测量与施用Btk抑制剂之前的数目相比在外周血中动员的多个细胞数目增加的持续时间。在一些实施方案中,该方法进一步包括在外周血中的动员的多个细胞的数目已经增加预定时间长度之后,施用第二治疗。在一些实施方案中,分析动员的多个细胞包括制备分离自多个细胞的细胞群体的生物标记谱,该生物标记谱指示生物标记的表达、生物标记的表达水平、生物标记中的突变或生物标记的存在。在一些实施方案中,该生物标记为:ZAP70;t(14,18); β -2微球蛋白;p53突变状态;ATM突变状态;del(17)p;del(11)q;del(6)q;CD5;CD11c;CD19;CD20;CD22;CD25;CD38;CD103;CD138;分泌型、表面型或细胞质型免疫球蛋白的表达; V_H 突变状态;或其组合。在一些实施方案中,该方法进一步包括基于该生物标记谱提供第二治疗。在一些实施方案中,该方法进一步包括基于该生物标记谱预测第二治疗的功效。在一些实施方案中,该不可逆Btk抑制剂是(R)-1-(3-(4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)哌啶-1-基)丙-2-烯-1-酮(即,PCI-32765/依罗替尼)。在一些实施方案中,第二治疗包含硼替佐米。在一些实施方案中,第二治疗包含来那度胺。在一些实施方案中,第二治疗包含利妥昔单抗、环磷酰胺、盐酸多柔比星、硫酸长春新碱和泼尼松(R-CHOP)。在一些实施方案中,第二治疗包含坦罗莫司。在一些实施方案中,该DLBCL是DLBCL的ABC亚型(ABC-DLBCL)。在一些实施方案中,该DLBCL是DLBCL的GCB亚型(GCB-DLBCL)。在一些实施方案中,该方法包括使用分析仪器来分析自个体获得的样品中的动员的多个细胞。

[0057] 在某些实施方案中,本文公开了一种用于在有需要的个体中治疗滤泡性淋巴瘤(FL)的方法,该方法包括:(a)向该个体施用第一治疗,该第一治疗包含足以从滤泡性淋巴瘤动员多个细胞的量的不可逆Btk抑制剂;(b)分析从该个体获得的样品中的动员的多个细胞;和(c)向该个体施用第二治疗。在一些实施方案中,该不可逆Btk抑制剂的量足以诱发自该恶性肿瘤的多个细胞的淋巴细胞增多。在一些实施方案中,动员的细胞是髓样细胞或

淋巴样细胞。在一些实施方案中,分析动员的多个细胞包括测量动员的多个细胞的外周血浓度。在一些实施方案中,该方法进一步包括,在与施用Btk抑制剂之前的浓度相比该动员的多个细胞的外周血浓度增加后,施用第二治疗。在一些实施方案中,在动员的多个细胞的外周血浓度后续降低后,进行第二治疗的施用。在一些实施方案中,分析该动员的多个细胞包括测量与施用该Btk抑制剂之前的浓度相比该动员的多个细胞的外周血浓度增加的持续时间。在一些实施方案中,该方法进一步包括在该动员的多个细胞的外周血浓度已经增加预定时间长度后,施用第二治疗。在一些实施方案中,分析该动员的多个细胞包括对外周血中动员的多个细胞的数目进行计数。在一些实施方案中,该方法进一步包括在与施用Btk抑制剂之前的数目相比外周血中动员的多个细胞的数目增加后,施用第二治疗。在一些实施方案中,在外周血中的动员的多个细胞的数目后续降低之后,进行第二治疗的施用。在一些实施方案中,分析该动员的多个细胞包括测量与施用Btk抑制剂之前的数目相比在外周血中动员的多个细胞数目增加的持续时间。在一些实施方案中,该方法进一步包括在外周血中的动员的多个细胞的数目已经增加预定时间长度之后,施用第二治疗。在一些实施方案中,分析动员的多个细胞包括制备分离自多个细胞的细胞群体的生物标记谱,该生物标记谱指示生物标记的表达、生物标记的表达水平、生物标记中的突变或生物标记的存在。在一些实施方案中,该生物标记为:ZAP70;t(14,18); β -2微球蛋白;p53突变状态;ATM突变状态;del(17)p;del(11)q;del(6)q;CD5;CD11c;CD19;CD20;CD22;CD25;CD38;CD103;CD138;分泌型、表面型或细胞质型免疫球蛋白的表达; V_H 突变状态;或其组合。在一些实施方案中,该方法进一步包括基于该生物标记谱提供第二治疗。在一些实施方案中,该方法进一步包括基于该生物标记谱预测第二治疗的功效。在一些实施方案中,该不可逆Btk抑制剂是(R)-1-(3-(4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)哌啶-1-基)丙-2-烯-1-酮(即,PCI-32765/依罗替尼)。在一些实施方案中,第二治疗包含来那度胺。在一些实施方案中,第二治疗包含利妥昔单抗、环磷酰胺、盐酸多柔比星、硫酸长春新碱和泼尼松(R-CHOP)。在一些实施方案中,第二治疗包含坦罗莫司。在一些实施方案中,该方法包括使用分析仪器来分析自个体获得的样品中的动员的多个细胞。

[0058] 在某些实施方案中,本文公开了一种用于在有需要的个体中治疗CLL或SLL的方法,该方法包括:(a)向该个体施用第一治疗,该第一治疗包含足以从CLL或SLL动员多个细胞的量的不可逆Btk抑制剂;(b)分析从该个体获得的样品中的动员的多个细胞;和(c)向该个体施用第二治疗。在一些实施方案中,该不可逆Btk抑制剂的量足以诱发来自该恶性肿瘤的多个细胞的淋巴细胞增多。在一些实施方案中,动员的细胞是髓样细胞或淋巴样细胞。在一些实施方案中,分析动员的多个细胞包括测量动员的多个细胞的外周血浓度。在一些实施方案中,该方法进一步包括,在与施用Btk抑制剂之前的浓度相比该动员的多个细胞的外周血浓度增加后,施用第二治疗。在一些实施方案中,在动员的多个细胞的外周血浓度后续降低后,进行第二治疗的施用。在一些实施方案中,分析该动员的多个细胞包括测量与施用该Btk抑制剂之前的浓度相比该动员的多个细胞的外周血浓度增加的持续时间。在一些实施方案中,该方法进一步包括在该动员的多个细胞的外周血浓度已经增加预定时间长度后,施用第二治疗。在一些实施方案中,分析该动员的多个细胞包括对外周血中动员的多个细胞的数目进行计数。在一些实施方案中,该方法进一步包括在与施用Btk抑制剂之前的数目相比外周血中动员的多个细胞的数目增加后,施用第二治疗。在一些实施方案中,在外周

血中的动员的多个细胞的数目后续降低之后,进行第二治疗的施用。在一些实施方案中,分析该动员的多个细胞包括测量与施用Btk抑制剂之前的数目相比在外周血中动员的多个细胞数目增加的持续时间。在一些实施方案中,该方法进一步包括在外周血中的动员的多个细胞的数目已经增加预定时间长度之后,施用第二治疗。在一些实施方案中,分析动员的多个细胞包括制备分离自多个细胞的细胞群体的生物标记谱,该生物标记谱指示生物标记的表达、生物标记的表达水平、生物标记中的突变或生物标记的存在。在一些实施方案中,该生物标记为:ZAP70;t (14,18); β -2微球蛋白;p53突变状态;ATM突变状态;del (17) p;del (11) q;del (6) q;CD5;CD11c;CD19;CD20;CD22;CD25;CD38;CD103;CD138;分泌型、表面型或细胞质型免疫球蛋白的表达; V_H 突变状态;或其组合。在一些实施方案中,该方法进一步包括基于该生物标记谱提供第二治疗。在一些实施方案中,该方法进一步包括基于该生物标记谱预测第二治疗的功效。在一些实施方案中,其中该不可逆Btk抑制剂是(R)-1-(3-(4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)哌啶-1-基)丙-2-烯-1-酮(即,PCI-32765/依罗替尼)。在一些实施方案中,第二治疗包含来那度胺。在一些实施方案中,第二治疗包含苯达莫司汀和利妥昔单抗(BR)。在一些实施方案中,第二治疗包含氟达拉滨、环磷酰胺和利妥昔单抗(FCR)。在一些实施方案中,第二治疗包含奥法木单抗。在一些实施方案中,第二治疗包含利妥昔单抗。在一些实施方案中,该方法包括使用分析仪器来分析自个体获得的样品中的动员的多个细胞。

[0059] 在某些实施方案中,本文公开了一种用于在有需要的个体中治疗套细胞淋巴瘤的方法,该方法包括:(a)向该个体施用第一治疗,该第一治疗包含足以从套细胞淋巴瘤动员多个细胞的量的不可逆Btk抑制剂;(b)分析从该个体获得的样品中的动员的多个细胞;和(c)向该个体施用第二治疗。在一些实施方案中,该不可逆Btk抑制剂的量足以诱发来自该恶性肿瘤的多个细胞的淋巴细胞增多。在一些实施方案中,动员的细胞是髓样细胞或淋巴样细胞。在一些实施方案中,分析动员的多个细胞包括测量动员的多个细胞的外周血浓度。在一些实施方案中,该方法进一步包括,在与施用Btk抑制剂之前的浓度相比该动员的多个细胞的外周血浓度增加后,施用第二治疗。在一些实施方案中,在动员的多个细胞的外周血浓度后续降低后,进行第二治疗的施用。在一些实施方案中,分析该动员的多个细胞包括测量与施用该Btk抑制剂之前的浓度相比该动员的多个细胞的外周血浓度增加的持续时间。在一些实施方案中,该方法进一步包括在该动员的多个细胞的外周血浓度已经增加预定时间长度后,施用第二治疗。在一些实施方案中,分析该动员的多个细胞包括对外周血中动员的多个细胞的数目进行计数。在一些实施方案中,该方法进一步包括在与施用Btk抑制剂之前的数目相比外周血中动员的多个细胞的数目增加后,施用第二治疗。在一些实施方案中,在外周血中的动员的多个细胞的数目后续降低之后,进行第二治疗的施用。在一些实施方案中,分析该动员的多个细胞包括测量与施用Btk抑制剂之前的数目相比在外周血中动员的多个细胞数目增加的持续时间。在一些实施方案中,该方法进一步包括在外周血中的动员的多个细胞的数目已经增加预定时间长度之后,施用第二治疗。在一些实施方案中,分析动员的多个细胞包括制备分离自多个细胞的细胞群体的生物标记谱,该生物标记谱指示生物标记的表达、生物标记的表达水平、生物标记中的突变或生物标记的存在。在一些实施方案中,该生物标记为:ZAP70;t (14,18); β -2微球蛋白;p53突变状态;ATM突变状态;del (17) p;del (11) q;del (6) q;CD5;CD11c;CD19;CD20;CD22;CD25;CD38;CD103;CD138;分泌型、表面

型或细胞质型免疫球蛋白的表达;V_H突变状态;或其组合。在一些实施方案中,该方法进一步包括基于该生物标记谱提供第二治疗。在一些实施方案中,该方法进一步包括基于该生物标记谱预测第二治疗的功效。在一些实施方案中,该不可逆Btk抑制剂是(R)-1-(3-(4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)哌啶-1-基)丙-2-烯-1-酮(即,PCI-32765/依罗替尼)。在一些实施方案中,第二治疗包含坦罗莫司。在一些实施方案中,该方法包括使用分析仪器来分析自个体获得的样品中的动员的多个细胞。

[0060] 在某些实施方案中,本文公开了一种用于在有需要的个体中治疗瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症的方法,包括:(a)向该个体施用第一治疗,该第一治疗包括足以从套细胞淋巴瘤动员多个细胞的量的不可逆Btk抑制剂;(b)分析从该个体获得的样品中的动员的多个细胞;和(c)向该个体施用第二治疗。在一些实施方案中,该不可逆Btk抑制剂的量足以诱发来自该恶性肿瘤的多个细胞的淋巴细胞增多。在一些实施方案中,动员的细胞是髓样细胞或淋巴样细胞。在一些实施方案中,分析动员的多个细胞包括测量动员的多个细胞的外周血浓度。在一些实施方案中,该方法进一步包括,在与施用Btk抑制剂之前的浓度相比该动员的多个细胞的外周血浓度增加后,施用第二治疗。在一些实施方案中,在动员的多个细胞的外周血浓度后续降低后,进行第二治疗的施用。在一些实施方案中,分析该动员的多个细胞包括测量与施用该Btk抑制剂之前的浓度相比该动员的多个细胞的外周血浓度增加的持续时间。在一些实施方案中,该方法进一步包括在该动员的多个细胞的外周血浓度已经增加预定时间长度后,施用第二治疗。在一些实施方案中,分析该动员的多个细胞包括对外周血中动员的多个细胞的数目进行计数。在一些实施方案中,该方法进一步包括在与施用Btk抑制剂之前的数目相比外周血中动员的多个细胞的数目增加后,施用第二治疗。在一些实施方案中,在外周血中的动员的多个细胞的数目后续降低之后,进行第二治疗的施用。在一些实施方案中,分析该动员的多个细胞包括测量与施用Btk抑制剂之前的数目相比在外周血中动员的多个细胞数目增加的持续时间。在一些实施方案中,该方法进一步包括在外周血中的动员的多个细胞的数目已经增加预定时间长度之后,施用第二治疗。在一些实施方案中,分析动员的多个细胞包括制备分离自多个细胞的细胞群体的生物标记谱,该生物标记谱指示生物标记的表达、生物标记的表达水平、生物标记中的突变或生物标记的存在。在一些实施方案中,该生物标记为:ZAP70;t(14,18); β -2微球蛋白;p53突变状态;ATM突变状态;del(17)p;del(11)q;del(6)q;CD5;CD11c;CD19;CD20;CD22;CD25;CD38;CD103;CD138;分泌型、表面型或细胞质型免疫球蛋白的表达;V_H突变状态;或其组合。在一些实施方案中,该方法进一步包括基于该生物标记谱提供第二治疗。在一些实施方案中,该方法进一步包括基于该生物标记谱预测第二治疗的功效。在一些实施方案中,该不可逆Btk抑制剂是(R)-1-(3-(4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)哌啶-1-基)丙-2-烯-1-酮(即,PCI-32765/依罗替尼)。在一些实施方案中,第二治疗包含利妥昔单抗、环磷酰胺、盐酸多柔比星、硫酸长春新碱和泼尼松(R-CHOP)。在一些实施方案中,该方法包括使用分析仪器来分析自个体获得的样品中的动员的多个细胞。

[0061] 在某些实施方案中,本文公开了一种用于在有需要的个体中治疗多发性骨髓瘤(MM)的方法,该方法包括:(a)向该个体使用第一治疗,该第一治疗包含足以从MM动员多个细胞的量的不可逆Btk抑制剂;(b)分析从该个体获得的样品中的动员的多个细胞;和(c)向该个体施用第二治疗。在一些实施方案中,该不可逆Btk抑制剂的量足以诱发来自该恶性肿

瘤的多个细胞的淋巴细胞增多。在一些实施方案中,动员的细胞是髓样细胞或淋巴样细胞。在一些实施方案中,分析动员的多个细胞包括测量动员的多个细胞的外周血浓度。在一些实施方案中,该方法进一步包括,在与施用Btk抑制剂之前的浓度相比该动员的多个细胞的外周血浓度增加后,施用第二治疗。在一些实施方案中,在动员的多个细胞的外周血浓度后续降低后,进行第二治疗的施用。在一些实施方案中,分析该动员的多个细胞包括测量与施用该Btk抑制剂之前的浓度相比该动员的多个细胞的外周血浓度增加的持续时间。在一些实施方案中,该方法进一步包括在该动员的多个细胞的外周血浓度已经增加预定时间长度后,施用第二治疗。在一些实施方案中,分析该动员的多个细胞包括对外周血中动员的多个细胞的数目进行计数。在一些实施方案中,该方法进一步包括在与施用Btk抑制剂之前的数目相比外周血中动员的多个细胞的数目增加后,施用第二治疗。在一些实施方案中,在外周血中的动员的多个细胞的数目后续降低之后,进行第二治疗的施用。在一些实施方案中,分析该动员的多个细胞包括测量与施用Btk抑制剂之前的数目相比在外周血中动员的多个细胞数目增加的持续时间。在一些实施方案中,该方法进一步包括在外周血中的动员的多个细胞的数目已经增加预定时间长度之后,施用第二治疗。在一些实施方案中,分析动员的多个细胞包括制备分离自多个细胞的细胞群体的生物标记谱,该生物标记谱指示生物标记的表达、生物标记的表达水平、生物标记中的突变或生物标记的存在。在一些实施方案中,该生物标记为:ZAP70;t (14,18); β -2微球蛋白;p53突变状态;ATM突变状态;del (17)p;del (11)q;del (6)q;CD5;CD11c;CD19;CD20;CD22;CD25;CD38;CD103;CD138;分泌型、表面型或细胞质型免疫球蛋白的表达; V_H 突变状态;或其组合。在一些实施方案中,该方法进一步包括基于该生物标记谱提供第二治疗。在一些实施方案中,该方法进一步包括基于该生物标记谱预测第二治疗的功效。在一些实施方案中,该不可逆Btk抑制剂是(R)-1-(3-(4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)哌啶-1-基)丙-2-烯-1-酮(即,PCI-32765/依罗替尼)。在一些实施方案中,第二治疗包含来那度胺。在一些实施方案中,该方法包括使用分析仪器来分析自个体获得的样品中的动员的多个细胞。

[0062] 在某些实施方案中,本文公开了一种在有需要的个体中治疗血液恶性肿瘤的方法,该方法包括:(a)向该个体施用第一治疗,该第一治疗包含足以从该恶性肿瘤动员多个细胞的量的不可逆Btk抑制剂;和(b)制备从该多个细胞中分离的细胞群体的生物标记谱。在一些实施方案中,该不可逆Btk抑制剂的量足以诱发来自该恶性肿瘤的多个细胞的淋巴细胞增多。在一些实施方案中,该生物标记表达谱用来诊断血液恶性肿瘤、确定其预后或产生其预测谱。在一些实施方案中,该生物标记谱指示生物标记的表达、生物标记的表达水平、生物标记中的突变或生物标记的存在。在一些实施方案中,该生物标记谱指示血液恶性肿瘤是否涉及Btk信号传导。在一些实施方案中,该生物标记谱指示血液恶性肿瘤的存活是否涉及Btk信号传导。在一些实施方案中,该生物标记谱指示血液恶性肿瘤不涉及Btk信号传导。在一些实施方案中,该生物标记谱指示血液恶性肿瘤的存活不涉及Btk信号传导。在一些实施方案中,该生物标记谱指示血液恶性肿瘤是否涉及BCR信号传导。在一些实施方案中,该生物标记谱指示血液恶性肿瘤的存活是否涉及BCR信号传导。在一些实施方案中,该生物标记谱指示血液恶性肿瘤不涉及BCR信号传导。在一些实施方案中,该生物标记谱指示血液恶性肿瘤的存活不涉及BCR信号传导。在一些实施方案中,该生物标记为:ZAP70;t (14,18); β -2微球蛋白;p53突变状态;ATM突变状态;del (17)p;del (11)q;del (6)q;CD5;CD11c;

CD19;CD20;CD22;CD25;CD38;CD103;CD138;分泌型、表面型或细胞质型免疫球蛋白的表达; V_H 突变状态;或其组合。在一些实施方案中,该生物标记为:ZAP70;t(14,18); β -2微球蛋白;p53突变状态;ATM突变状态;del(17)p;del(11)q;del(6)q;CD5;CD11c;CD19;CD20;CD22;CD25;CD38;CD103;CD138;分泌型、表面型或细胞质型免疫球蛋白的表达; V_H 突变状态;或其组合。在一些实施方案中,该方法进一步包括基于该生物标记谱提供第二治疗。在一些实施方案中,该方法进一步包括基于该生物标记谱预测第二治疗的功效。

某些术语

[0063] 除非另外定义,本文中使用的所有技术和科学术语与所请求保护的主体所属领域的技术人员所一般了解的意义相同。如果本文的术语有多个定义,则以本章节中的定义为准。当提到URL或其它此类标识符或地址时,应当理解,此类标识符可以改变,并且因特网上的特定信息可能时有时无,但是等同的信息可以通过搜索因特网而找到。对其之提及证明了此信息的可获得性和公开发布。

[0064] 应当理解,前面的一般性描述和下面的详细描述仅是示例性的和说明性的,并不是对所请求保护的主体任何主题的限制。在本申请中,除非另有特别说明,单数形式的使用包括复数形式。必须注意,除非上下文另有明确说明,本说明书和所附的权利要求书中使用的单数形式“一个”、“一种”和“该”包括复数形式的指示物。在本申请中,除非另有说明,“或”的使用意为“和/或”。此外,术语“包括”以及其它形式如“包含”、“含有”和“具有”的使用不是限制性的。

[0065] 本文中所使用的章节标题仅用于组织目的,不应解释为限制所描述的主题。在本申请中引用的所有文件或文件的部分,包括但不限于专利、专利申请、文章、书籍、手册和论文,均在此通过引用明确地整体并入本文以用于任何目的。

[0066] 标准化学术语的定义可在文献著作中找到,包括Carey和Sundberg的“ADVANCED ORGANIC CHEMISTRY第四版”A卷(2000)和B卷(2001),Plenum Press,NewYork。除非另有说明,否则使用本领域技术范围内的质谱法、NMR、HPLC、蛋白质化学、生物化学、重组DNA技术和药理学等常规方法。除非提供具体的定义,否则与本文描述的分析化学、有机合成化学以及医学和药物化学关联使用的命名及其实验室程序和技术是本领域已知的。标准技术可用于化学合成、化学分析、药物制备、配制和递送以及患者的治疗。标准技术可用于重组DNA、寡核苷酸合成以及组织培养和转化(例如电穿孔、脂质体转染)。例如,可按照制造商的试剂盒的说明书,或如本领域通常所进行的,或如本文所述的,来实施反应和纯化技术。前述的技术和程序通常可以本领域熟知的常规方法以及如本说明书通篇所引用和讨论的各种一般和更具体的参考文献中所述的那样来实施。

[0067] 应当理解,本文描述的方法和组合物不限于本文描述的具体方法、方案、细胞系、构建体和试剂,而本身可有变化。还应当理解,本文所用的术语仅用于描述特定实施方案,并非意图限制本文描述的方法和组合物的范围,其仅受所附的权利要求限制。

[0068] 本文中所提到的所有出版物和专利均通过引用整体并入本文,用于描述和公开,例如在出版物中描述的构建体和方法,其可与本文所述的方法、组合物和化合物联合使用。本文中所讨论的出版物仅仅是为了其在本申请的申请日之前的公开内容而提供的。此处的任何内容不应解释为承认由于在先发明或任何其它理由而使此处所述发明人无法享有先于此公开内容的权利。

[0069] “烷基”基团是指脂肪族烃基。烷基部分可以是“饱和的烷基”基团,这意味着其不含有任何烯烃或炔烃部分。烷基部分也可以是“不饱和的烷基”部分,这意味着其含有至少一个烯烃或炔烃部分。“烯烃”部分是指具有至少一个碳碳双键的基团,而“炔烃”部分是指具有至少一个碳碳叁键的基团。烷基部分,不管是饱和的还是不饱和的,可以是支链、直链或环状的。取决于结构,烷基可以是单价基团或双价基团(即亚烷基)。烷基也可以是具有1至6个碳原子的“低级烷基”。

[0070] 如本文所用的 C_1-C_x 包括 C_1-C_2 、 C_1-C_3 ... C_1-C_x 。

[0071] “烷基”部分可具有1至10个碳原子(每当在本文中出现时,数值范围如“1至10”是指给定范围内的各个整数;例如,“1至10个碳原子”意指该烷基可具有1个碳原子、2个碳原子、3个碳原子等等,直到10个碳原子并且包括10个碳原子,虽然本定义也涵盖未指定数值范围的术语“烷基”的存在)。本文所述的化合物的烷基可以被指定为“ C_1-C_4 烷基”或类似的指定。仅举例来说,“ C_1-C_4 烷基”表示在烷基链中有1-4个碳原子,即该烷基链选自甲基、乙基、丙基、异丙基、正丁基、异丁基、仲丁基和叔丁基。因此, C_1-C_4 烷基包括 C_1-C_2 烷基和 C_1-C_3 烷基。烷基可以是取代的或未取代的。典型的烷基包括但绝不限于甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、异丁基、叔丁基、戊基、己基、乙烯基、丙烯基、丁烯基、环丙基、环丁基、环戊基、环己基等。

[0072] 如本文所用的术语“非环状烷基”是指不是环状的烷基(即,含有至少一个碳原子的直链或支链)。非环状烷基可以是完全饱和的,或者可以含有非环状烯烃和/或炔烃。非环状烷基可以任选地被取代。

[0073] 术语“烯基”是指一类烷基,其中烷基的前两个原子形成双键,该双键不是芳香基团的一部分。即,烯基始于原子 $-C(R)=C(R)-R$,其中R是指该烯基的剩余部分,它们可以是相同的或不同的。烯基部分可以是支链、直链或环状的(在该情况下,它也可被称作“环烯基”)。取决于结构,烯基可以是单价基团或双价基团(即亚烯基)。烯基可以任选地被取代。烯基的非限制性实例包括 $-CH=CH_2$ 、 $-C(CH_3)=CH_2$ 、 $-CH=CHCH_3$ 、 $-C(CH_3)=CHCH_3$ 。亚烯基包括但不限于 $-CH=CH-$ 、 $-C(CH_3)=CH-$ 、 $-CH=CHCH_2-$ 、 $-CH=CHCH_2CH_2-$ 和 $-C(CH_3)=CHCH_2-$ 。烯基可以具有2-10个碳。烯基还可以是具有2-6个碳原子的“低级烯基”。

[0074] 术语“炔基”是指一类烷基,其中烷基的前两个原子形成叁键。即,炔基始于原子 $-C$ 基始于原,其中R是指该炔基的剩余部分,它可以是相同的或不同的。炔基部分的“R”部分可以是支链、直链或环状的。取决于结构,炔基可以是单价基团或双价基团(即亚炔基)。炔基可以任选地被取代。炔基的非限制性实例包括但不限于-代。炔基、 $-C$ 。炔基的₃、--。炔基的₂CH₃、-CH。炔和-C。炔基的₂-。炔基可具有2-10个碳。烯基还可以是具有2-6个碳原子的“低级炔基”。

[0075] “烷氧基”是指(烷基)O-基团,其中烷基如本文所定义。

[0076] “羟烷基”是指被至少一个羟基取代的如本文所定义的烷基。羟烷基的非限制性实例包括但不限于羟甲基、2-羟乙基、2-羟丙基、3-羟丙基、1-(羟甲基)-2-甲基丙基、2-羟丁基、3-羟丁基、4-羟丁基、2,3-二羟基丙基、1-(羟甲基)-2-羟乙基、2,3-二羟丁基、3,4-二羟丁基和2-(羟甲基)-3-羟丙基。

[0077] “烷氧基烷基”是指被如本文所定义的烷氧基所取代的如本文所定义的烷基。

[0078] “烯氧基”是指(烯基)O-基团,其中烯基如本文所定义。

[0079] 术语“烷基氨基(alkylamine)”是指-N(烷基)_xH_y基团,其中x和y选自x=1、y=1和x=2、y=0。当x=2时,烷基与它们所连接的N原子一起可以任选地形成环状环系。

[0080] “烷基氨基烷基”是指被如本文所定义的烷基氨基取代的如本文所定义的烷基。

[0081] “酰胺基(amide)”是具有式-C(O)NHR或-NHC(O)R的化学部分,其中R选自烷基、环烷基、芳基、杂芳基(通过环上的碳键合)和杂脂环基(通过环上的碳键合)。酰胺部分可在氨基酸或肽分子和本文描述的化合物之间形成连接,从而形成前药。本文描述的化合物上的任何胺或羧基侧链都可以被酰胺化。制备此类酰胺的程序和具体基团是本领域技术人员已知的,并且可在例如Greene和Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 第三版, John Wiley&Sons, New York, NY, 1999的文献资源中容易地找到,该文献通过引用整体并入本文。

[0082] 术语“酯”是指具有式-COOR的化学部分,其中R选自烷基、环烷基、芳基、杂芳基(通过环上的碳键合)和杂脂环基(通过环上的碳键合)。本文描述的化合物上的任何羟基或羧基侧链都可以被酯化。制备此类酯的程序和具体基团是本领域技术人员已知的,并且可在例如Greene和Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 第三版, John Wiley&Sons, New York, NY, 1999的文献资源中容易地找到,该文献通过引用整体并入本文。

[0083] 如本文所用的术语“环”是指任意的共价闭合的结构。环包括例如碳环(例如芳基和环烷基)、杂环(例如杂芳基和非芳香族杂环)、芳环(例如芳基和杂芳基)和非芳环(例如环烷基和非芳香族杂环)。环可以任选地被取代。环可以是单环或多环。

[0084] 如本文所用的术语“环系”是指一个或超过一个的环。

[0085] 术语“…元环”可包括任意环状结构。术语“元”意在表示构成环的骨架原子的数目。因此,例如,环己基、吡啶、吡喃和噻喃是6元环,而环戊基、吡咯、呋喃和噻吩是5元环。

[0086] 术语“稠合的”是指其中两个或多个环共用一个或多个键的结构。

[0087] 术语“碳环的”或“碳环”是指其中构成环的每个原子都是碳原子的环。碳环包括芳基和环烷基。该术语因而区分了碳环和杂环(“杂环的”),杂环中的环骨架含有至少一个不是碳的原子(即杂原子)。杂环包括杂芳基和杂环烷基。碳环和杂环可以任选地被取代。

[0088] 术语“芳香族”是指具有包含4n+2个 π 电子的离域 π 电子系统的平面环,其中n是整数。芳环可以由五、六、七、八、九个或超过九个原子构成。芳环可以任选地被取代。术语“芳香族”既包括碳环芳基(例如苯基)也包括杂环芳基(或“杂芳基”或“芳杂环”)基团(例如吡啶)。该术语包括单环或稠环多环(即共用相邻碳原子对的环)基团。

[0089] 如本文所用的术语“芳基”是指其中构成环的每个原子都是碳原子的芳环。芳基环可以由五、六、七、八、九个或超过九个碳原子构成。芳基可以任选地被取代。芳基的实例包括但不限于苯基、萘基、菲基、蒽基、茚基和茛基。取决于结构,芳基可以是单价基团或双价基团(即亚芳基)。

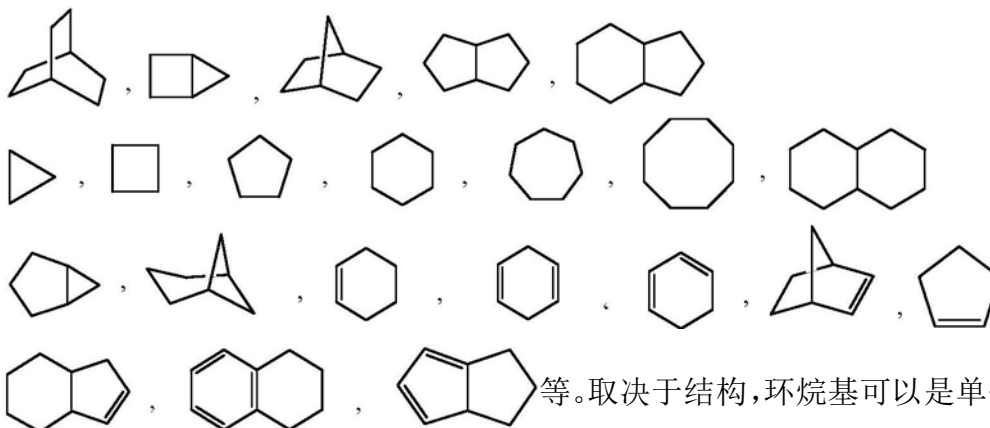
[0090] “芳氧基”是指(芳基)O-基团,其中芳基如本文所定义。

[0091] “芳烷基”意指被芳基取代的如本文所定义的烷基。非限制的芳烷基包括苄基、苯乙基等。

[0092] “芳烯基”意指被如本文所定义的芳基取代的如本文所定义的烯基。

[0093] 术语“环烷基”是指单环或多环基团,其仅含有碳和氢,并且可以是饱和的、部分不饱和的或完全不饱和的。环烷基包括具有3-10个环原子的基团。环烷基的说明性实例包括

以下部分：



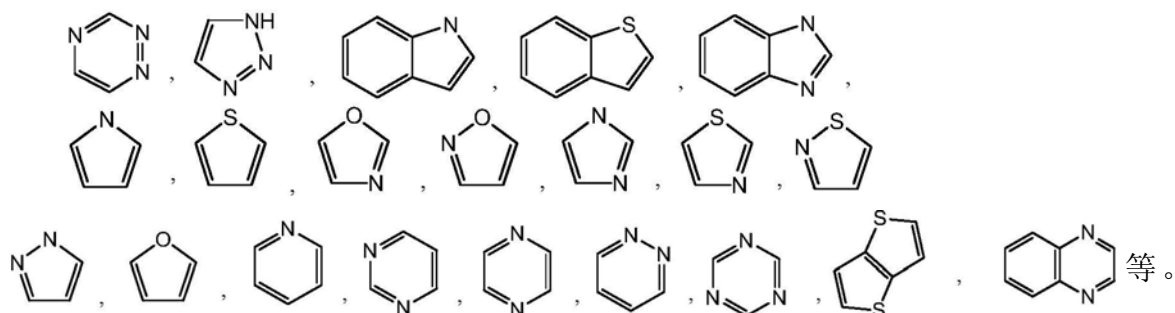
双价基团（例如亚环烷基）。环烷基也可以是具有3-8个碳原子的“低级环烷基”。

[0095] “环烷基烷基”意指被环烷基取代的如本文所定义的烷基。非限制性的环烷基烷基包括环丙基甲基、环丁基甲基、环戊基甲基、环己基甲基等。

[0096] 术语“杂环”是指含有1-4个各自选自O、S和N的杂原子的芳香杂环和杂脂环基团，其中各个杂环基团在其环系中具有4-10个原子，且条件是所述基团的环不包含两个相邻的O或S原子。在本文中，每当指定杂环中的碳原子数目（例如C₁-C₆杂环）时，该环中必然存在至少一个其它原子（杂原子）。诸如“C₁-C₆杂环”的指定仅指该环中的碳原子数目，而并非指该环中的原子总数。可以理解，杂环基团可以在环中含有额外的杂原子。诸如“4-6元杂环”的指定是指环中包含的原子总数（即4元、5元或6元环，其中至少一个原子是碳原子，至少一个原子是杂原子，而剩下的2-4个原子是碳原子或杂原子）。在含有两个或多个杂原子的杂环中，该两个或多个杂原子可以是相同的或彼此不同的。杂环可以任选地被取代。与杂环的结合可以是在杂原子上或通过碳原子。非芳香族杂环基团包括在其环系中仅含有4个原子的基团，而芳香族杂环基团在其环系中必须含有至少5个原子。杂环基团包括苯并稠合的环系。4元杂环基团的一个实例是氮杂环丁烷基（衍生自氮杂环丁烷）。5元杂环基团的一个实例是噻唑基。6元杂环基团的一个实例是吡啶基，而10元杂环基团的一个实例是喹啉基。非芳香族杂环基团的实例是吡咯烷基、四氢呋喃基、二氢呋喃基、四氢噻吩基、四氢吡喃基、二氢吡喃基、四氢噻喃基、哌啶子基、吗啉基、硫代吗啉基、噻噁烷基、哌嗪基、氮杂环丁烷基、氧杂环丁烷基、硫杂环丁烷基、高哌啶基、氧杂环庚烷基、硫杂环庚烷基、氧氮杂茛基、二氮杂茛基、硫氮杂茛基、1,2,3,6-四氢吡啶基、2-吡咯啉基、3-吡咯啉基、二氢吲哚基、2H-吡喃基、4H-吡喃基、二氧杂环己烷基、1,3-二氧杂环戊烷基、吡唑啉基、二噻烷基、二硫杂环戊烷基、二氢吡喃基、二氢噻吩基、二氢呋喃基、吡唑烷基、咪唑啉基、咪唑烷基、3-氮杂双环[3.1.0]己烷基、3-氮杂双环[4.1.0]庚烷基、3H-吲哚基和喹啉基。芳香族杂环基团的实例是吡啶基、咪唑基、嘧啶基、吡唑基、三唑基、吡嗪基、四唑基、呋喃基、噻吩基、异噻唑基、噻唑基、噁唑基、异噻唑基、吡咯基、喹啉基、异喹啉基、吲哚基、苯并咪唑基、苯并呋喃基、噌啉基、吲唑基、吲嗪基、酞嗪基、哒嗪基、三嗪基、异吲哚基、蝶啶基、嘌呤基、噁二唑基、噻二唑基、呋咱基、苯并呋咱基、苯并噻吩基、苯并噻唑基、苯并噁唑基、喹唑啉基、喹喔啉基、蔡啶基和呋喃并吡啶基。前述基团，如由上面列出的基团衍生的，只要可能的话，可以是C-连接的或N-连接的。例如，由吡咯衍生的基团可以是吡咯-1-基（N-连接的）或吡咯-3-基（C-连接

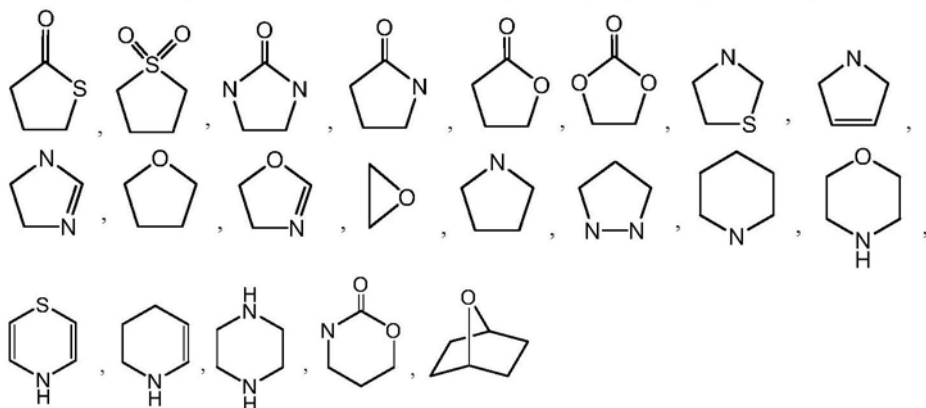
的)。此外,由咪唑衍生的基团可以是咪唑-1-基或咪唑-3-基(均为N-连接的)或咪唑-2-基、咪唑-4-基或咪唑-5-基(均为C-连接的)。杂环基团包括苯并稠合的环系和被一个或两个氧代(=O)部分取代的环系,例如吡咯烷-2-酮。取决于结构,杂环基团可以是单价基团或双价基团(即亚杂环基)。

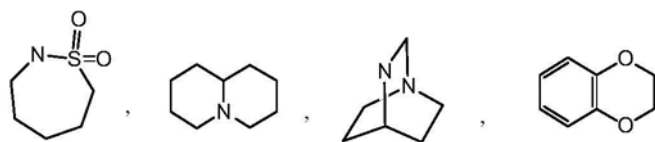
[0097] 术语“杂芳基”或者“芳香杂环”是指包含一个或多个选自氮、氧和硫的环杂原子的芳基基团。包含N的“芳香杂环”或“杂芳基”部分是指其中环上的至少一个骨架原子是氮原子的芳香族基团。杂芳基的说明性实例包括以下部分：



取决于结构,杂芳基可以是单价基团或双价基团(即亚杂芳基)。

[0098] 如本文所用的术语“非芳香族杂环”、“杂环烷基”或“杂脂环基”是指其中构成环的一个或多个原子是杂原子的非芳香族环。“非芳香族杂环”或“杂环烷基”基团是指包含至少一个选自氮、氧和硫的杂原子的环烷基。该基团可以与芳基或杂芳基稠合。杂环烷基环可以由三、四、五、六、七、八、九个或超过九个原子构成。杂环烷基环可以任选地被取代。在某些实施方案中，非芳香族杂环含有一个或多个羰基或硫代羰基，例如包含氧代和硫代的基团。杂环烷基的实例包括但不限于内酰胺、内酯、环亚胺、环硫代亚胺、环氨基甲酸酯、四氢噻喃、4H-吡喃、四氢吡喃、哌啶、1,3-二噁英、1,3-二氧杂环己烷、1,4-二噁英、1,4-二氧杂环己烷、哌嗪、1,3-氧硫杂环己烷、1,4-氧硫杂环己二烯、1,4-氧硫杂环己烷、四氢-1,4-噻嗪、2H-1,2-噻嗪、马来酰亚胺、琥珀酰亚胺、巴比妥酸、硫代巴比妥酸、二氧哌嗪、乙内酰脲、二氢尿嘧啶、吗啉、三氧杂环己烷、六氢-1,3,5-三嗪、四氢噻吩、四氢呋喃、吡咯啉、吡咯烷、吡咯烷酮、吡咯烷二酮、吡唑啉、吡唑烷、咪唑啉、咪唑烷、1,3-二氧杂环戊烯、1,3-二氧杂环戊烷、1,3-二硫杂环戊烯、1,3-二硫杂环戊烷、异噁唑啉、异噁唑烷、噁唑啉、噁唑烷、噁唑烷酮、噁唑啉、噁唑烷和1,3-氧硫杂环戊烷。杂环烷基，也被称作非芳香族杂环，其说明性实例包括：





等。术语杂脂环还包括所有环形式的

碳水化合物,包括但不限于单糖、二糖和寡糖。取决于结构,杂环烷基可以是单价基团或双价基团(即亚杂环烷基)。

[0099] 术语“卤代”,或者“卤素”或“卤化物”,是指氟、氯、溴和碘。

[0100] 术语“卤代烷基”、“卤代烯基”、“卤代炔基”和“卤代烷氧基”包括其中的至少一个氢被替换成卤素原子的烷基、烯基、炔基和烷氧基结构。在其中的两个或更多个氢原子被替换成卤素原子的某些实施方案中,卤素原子全是彼此相同的。在其中的两个或更多个氢原子被替换成卤素原子的其它实施方案中,卤素原子不全是彼此相同的。

[0101] 如本文所用的术语“氟烷基”是指其中的至少一个氢被替换成氟原子的烷基。氟烷基的实例包括但不限于 $-\text{CF}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{CF}_3$ 、 $-\text{CF}_2\text{CF}_3$ 、 $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CF}_3$ 等。

[0102] 如本文所用的术语“杂烷基”、“杂烯基”和“杂炔基”是指任选地取代的烷基、烯基和炔基,其中的一个或多个骨架链原子是杂原子,例如氧、氮、硫、硅、磷或其组合。杂原子可置于杂烷基的任意内部位置或者在杂烷基与该分子的剩余部分连接的位置处。实例包括但不限于 $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}(\text{O})-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}(\text{O})_2-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}=\text{CH}-\text{O}-\text{CH}_3$ 、 $-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{N}-\text{OCH}_3$ 和 $-\text{CH}=\text{CH}-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_3$ 。另外,多达两个杂原子可以是连续的,例如,举例来说, $-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{OCH}_3$ 和 $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ 。

[0103] 术语“杂原子”是指碳或氢以外的原子。杂原子一般独立地选自氧、硫、氮、硅和磷,但不限于这些原子。在其中存在两个或更多个杂原子的实施方案中,该两个或更多个杂原子可以全是彼此相同的,或者该两个或更多个杂原子中的一些或全部可以各自与其余的不同。

[0104] 术语“键”或“单键”是指两个原子之间的化学键,或者当由该键连接的原子被视作更大的亚结构的一部分时,是指两个部分之间的化学键。

[0105] “异氰酸基”是指 $-\text{NCO}$ 基团。

[0106] “异硫氰酸基”是指 $-\text{NCS}$ 基团。

[0107] 术语“部分”是指分子的特定区段或官能团。化学部分通常被认为是嵌入分子中或附加在分子上的化学实体。

[0108] “亚磺酰基”是指 $-\text{S}(=\text{O})-\text{R}$ 。

[0109] “磺酰基”是指 $-\text{S}(=\text{O})_2-\text{R}$ 。

[0110] “硫代烷氧基”或“烷硫基”是指 $-\text{S}-$ 烷基。

[0111] “烷硫基烷基”是指被 $-\text{S}-$ 烷基取代的烷基。

[0112] 如本文所用的术语“O-羧基”或“酰氧基”是指式 $\text{RC}(=\text{O})\text{O}-$ 的基团。

[0113] “羧基”意指 $-\text{C}(\text{O})\text{OH}$ 基。

[0114] 如本文所用的术语“乙酰基”是指式 $-\text{C}(=\text{O})\text{CH}_3$ 的基团。

[0115] “酰基”是指 $-\text{C}(\text{O})\text{R}$ 基团。

[0116] 如本文所用的术语“三卤甲烷磺酰基”是指式 $\text{X}_3\text{CS}(=\text{O})_2-$ 的基团,其中X是卤素。

[0117] 如本文所用的术语“氰基”是指式 $-\text{CN}$ 的基团。

- [0118] “氰基烷基”意指被至少一个氰基取代的如本文所定义的烷基。
- [0119] 如本文所用的术语“N-磺酰胺基”或“磺酰基氨基”是指式 $\text{RS}(=\text{O})_2\text{NH}-$ 的基团。
- [0120] 如本文所用的术语“O-氨甲酰基”是指式 $-\text{OC}(=\text{O})\text{NR}_2$ 的基团。
- [0121] 如本文所用的术语“N-氨甲酰基”是指式 $\text{ROC}(=\text{O})\text{NH}-$ 的基团。
- [0122] 如本文所用的术语“O-硫代氨甲酰基”是指式 $-\text{OC}(=\text{S})\text{NR}_2$ 的基团。
- [0123] 如本文所用的术语“N-硫代氨甲酰基”是指式 $\text{ROC}(=\text{S})\text{NH}-$ 的基团。
- [0124] 如本文所用的术语“C-酰胺基”是指式 $-\text{C}(=\text{O})\text{NR}_2$ 的基团。
- [0125] “氨基羰基”是指 $-\text{CONH}_2$ 基。
- [0126] 如本文所用的术语“N-酰胺基”是指式 $\text{RC}(=\text{O})\text{NH}-$ 的基团。
- [0127] 如本文所用的取代基“R”，当单独出现且没有指定数目时，是指选自烷基、环烷基、芳基、杂芳基(通过环上的碳键合)和非芳族杂环(通过环上的碳键合)的取代基。
- [0128] 术语“任选地被取代”或“取代的”意思是所提及的基团可以被一个或多个额外的基团取代，这些额外基团分别且独立地选自烷基、环烷基、芳基、杂芳基、杂脂环基、羟基、烷氧基、芳氧基、烷硫基、芳硫基、烷基亚砷、芳基亚砷、烷基砷、芳基砷、氰基、卤代、酰基、硝基、卤代烷基、氟烷基、氨基(包括单取代和二取代的氨基)及其受保护的衍生物。举例来说，任选的取代基可以是 L_sR_s ，其中各个 L_s 独立地选自键、 $-\text{O}-$ 、 $-\text{C}(=\text{O})-$ 、 $-\text{S}-$ 、 $-\text{S}(=\text{O})-$ 、 $-\text{S}(=\text{O})_2-$ 、 $-\text{NH}-$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})-$ 、 $-\text{C}(\text{O})\text{NH}-$ 、 $-\text{S}(=\text{O})_2\text{NH}-$ 、 $-\text{NHS}(=\text{O})_2-$ 、 $-\text{OC}(\text{O})\text{NH}-$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{O}-$ 、-(取代或未取代的 C_1-C_6 烷基)或-(取代或未取代的 C_2-C_6 烯基)；而且各个 R_s 独立地选自H、(取代或未取代的 C_1-C_4 烷基)、(取代或未取代的 C_3-C_6 环烷基)、杂芳基或杂烷基。可形成上述取代基的保护性衍生物的保护基是本领域技术人员所知的，并且可在例如上述Greene和Wuts的文献著作中找到。
- [0129] 术语“迈克尔受体部分(Michael acceptor moiety)”是指可参与迈克尔反应的官能团，该反应中在迈克尔受体部分的一部分和供体部分之间形成新共价键。迈克尔受体部分是亲电体，而“供体部分”是亲核体。
- [0130] 术语“亲核体”或“亲核的”是指富电子的化合物或其部分。亲核体的一个实例包括但绝不限于分子的半胱氨酸残基，诸如Btk的Cys481。
- [0131] 术语“亲电体”或“亲电的”是指电子不足的或缺电子的分子或其部分。亲电体的实例包括但绝不限于迈克尔受体部分。
- [0132] 本文中针对制剂、组合物或成分所使用的术语“可接受的”或“药学上可接受的”，意思是对被治疗的受试者的一般健康状况没有持续的不利影响，或者不会消除化合物的生物活性或性质，并且相对无毒。
- [0133] 如本文所用的“B细胞淋巴增生性疾病(BCLD)生物标记”是指作为BCLD相关状况或疾病的指征的任何生物分子(可在血液、其它体液或组织中发现)或任何染色体异常。
- [0134] 如本文所用的“肿瘤”是指所有的赘生性细胞生长和增殖，不论其为恶性还是良性，以及所有的癌前和癌细胞和组织。如本文所用的“赘生性”是指任何形式的失调的或不受调控的细胞生长，不论其为恶性还是良性，从而导致异常组织生长。因此，“赘生性细胞”包括具有失调的或不受调控的细胞生长的恶性细胞和良性细胞。
- [0135] 术语“癌症”和“癌性的”是指或描述哺乳动物中的生理状况，该状况的特征典型地是不受调控的细胞生长。癌症的实例包括但不限于B细胞淋巴增生性疾病(BCLD)，诸如淋巴

瘤和白血病,及实体瘤。“B细胞相关的癌症”或“B细胞谱系的癌症”是指其中失调的或不受调控的细胞生长与B细胞相关的任何类型的癌症。

[0136] 在癌症背景下所谓的“难治性”意指特定的癌症对于使用特定治疗剂的治疗有抗性或无反应。癌症对于使用特定治疗剂的治疗是难治性的可能是始于用该特定治疗剂开始治疗时(即,对初始治疗剂暴露就是无反应的),或者是由于在使用该治疗剂的首次治疗期的过程中或在使用该治疗剂的后续治疗期的过程中对该治疗剂发展出抗性。

[0137] 所谓“激动剂活性”意指物质作为激动剂起作用。激动剂与细胞上的受体结合,并且启动与该受体的天然配体所启动的反应或活性相似或相同的反应或活性。

[0138] 所谓“拮抗剂活性”意指物质作为拮抗剂起作用。Btk的拮抗剂防止或减少由Btk所介导的任何应答的诱发。

[0139] 所谓“显著的”激动剂活性意指如在B细胞应答试验中所测量到的,比由中性物质或阴性对照物所诱导的激动剂活性高出至少30%、35%、40%、45%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%的激动剂活性。优选地,“显著的”激动剂活性是这样的激动剂活性:如在B细胞应答试验中所测量到的,该活性为由中性物质或阴性对照物所诱导的激动剂活性的至少2倍或至少3倍。因此,例如,当感兴趣的B细胞应答是B细胞增殖时,“显著的”激动剂活性将是对B细胞增殖水平的诱导,该B细胞增殖水平是由中性物质或阴性对照物所诱导的细胞增殖水平的至少2倍或至少3倍。

[0140] “没有显著的激动剂活性”的物质会展现出这样的激动剂活性:如在B细胞应答试验中所测量到的,比由中性物质或阴性对照组所诱导的激动剂活性高出不超过约25%,优选地,比由中性物质或阴性对照物所诱导的激动剂活性高出不超过约20%、15%、10%、5%、1%、0.5%或甚至不超过约0.1%。

[0141] 在一些实施方案中,Btk抑制剂治疗剂是拮抗剂抗Btk抗体。当此类抗体与人细胞中的Btk抗原结合时,此类抗体没有如上所述的显著的激动剂活性。在本发明的一个实施方案中,拮抗剂抗Btk抗体在一种细胞应答中没有显著的激动剂活性。在本发明的另一个实施方案中,拮抗剂抗Btk抗体在超过一种细胞应答(例如增殖和分化,或增殖、分化,以及对于B细胞的抗体产生)的试验中没有显著的激动剂活性。

[0142] 所谓“由Btk介导的信号传导”意指任何直接地或间接地依赖于Btk活性的生物活性。由Btk介导的信号传导的实例是导致Btk表达细胞的增殖和存活以及在Btk表达细胞内的一个或多个Btk信号传导途径的刺激信号。

[0143] Btk“信号传导途径”或“信号转导途径”意指由Btk的活性所导致的至少一个生化反应或一组生化反应,其产生一种信号,当该信号通过该信号途径传送时,该信号会导致信号传导级联中一种或多种下游分子的激活。信号转导途径涉及若干信号转导分子,这些信号转导分子会导致信号从细胞表面跨过细胞质膜传递,并通过一系列信号转导分子中的一种或多种,通过该细胞的细胞质,且在一些情况下,进入细胞核中。本发明特别感兴趣的是Btk信号转导途径,其经由NF- κ B信号传导途径最终调控(增强或者抑制)NF- κ B的激活。

[0144] 本发明的方法指向用于治疗癌症的方法,在某些实施方案中,该方法利用抗体来测定在这些方法中某些BCLD生物标记的表达或存在。以下术语和定义适用于此类抗体。

[0145] “抗体”和“免疫球蛋白”(Ig)是具有相同结构特征的糖蛋白。这些术语作为同义词使用。在一些情况下,免疫球蛋白的抗原特异性可能是已知的。

[0146] 术语“抗体”在最广泛的意义上使用,并且涵盖完全组装的抗体、可以结合抗原的抗体片段(例如Fab、F(ab')₂、Fv、单链抗体、双体抗体(diabody)、抗体嵌合体、杂合抗体、双特异抗体、人源化抗体等)和包含前述的重组肽。

[0147] 如本文所用的术语“单克隆抗体”和“mAb”是指从基本上同质的抗体群体中获得的抗体,即,除了可能少量存在可能天然发生的突变外,构成该群体的单个抗体是相同的。

[0148] “天然抗体”和“天然免疫球蛋白”通常是约150,000道尔顿的杂四聚糖蛋白,由两条相同的轻(L)链和两条相同的重(H)链构成。每条轻链经由一个共价二硫键连接到重链上,而二硫键的数目随着不同免疫球蛋白同种型的重链而有所不同。每条重链和轻链也具有规律间隔的链内二硫键。每条重链在一个末端具有可变域(V_H),随后是数个恒定域。每条轻链在一个末端具有可变域(V_L)且在另一末端具有恒定域;轻链的恒定域与重链的第一个恒定域对齐,而轻链的可变域与重链的可变域对齐。一般认为,特定的氨基酸残基在轻链和重链的可变域之间形成界面。

[0149] 术语“可变”是指在抗体之间可变域的某些部分在序列上广泛不同的事实。可变区赋予了抗原结合特异性。然而,可变性并非均匀地分布在整个抗体的可变域中。在轻链以及重链的可变域中,可变性集中在三个被称为互补决定区(CDR)或高变区的区段。可变域中更高度保守的部分被称为框架(FR)区。天然重链和轻链的可变域各包含四个FR区,主要采用β折叠片构型,经由三个CDR连接,其形成连接β折叠片结构的环,并且在一些情况下形成β折叠片结构的一部分。每条链中的CDR通过FR区近距离地靠在一起,并与另一条链的CDR一起促成形成抗体的抗原结合位点(参见Kabat等(1991)NIH PubL.No.91-3242,卷I,647-669页)。恒定域不直接参与抗体与抗原的结合,但展现出多种效应物功能,诸如Fc受体(FcR)结合、抗体依赖性细胞毒性中抗体的参与、补体依赖性细胞毒性的引发和肥大细胞的脱粒。

[0150] 当在本文中使用时,术语“高变区”是指负责抗原结合的抗体的氨基酸残基。高变区包含来自“互补决定区”或“CDR”的氨基酸残基(即,轻链可变域中的残基24-34(L1)、50-56(L2)和89-97(L3),以及重链可变域中的残基31-35(H1)、50-65(H2)和95-102(H3);Kabat等(1991)Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版,Public Health Service,National Institute of Health,Bethesda,Md.),和/或来自“高变环”的那些残基(即,轻链可变域中的残基26-32(L1)、50-52(L2)和91-96(L3),以及重链可变域中的残基(H1)、53-55(H2)和96-101(H3);Clothia和Lesk,(1987)J.Mol.Biol.,196:901-917)。“框架”或“FR”残基是如同在本文中所认为的,除高变区残基之外的那些可变域残基。

[0151] “抗体片段”包含完整抗体的一部分,优选完整抗体的抗原结合区或可变区。抗体片段的实例包括Fab、Fab₂、F(ab')₂和Fv片段;双体抗体;线性抗体(Zapata等(1995)Protein Eng.10:1057-1062);单链抗体分子;和由抗体片段形成的多特异性抗体。抗体经木瓜蛋白酶消化会产生两个相同的抗原结合片段(被称为“Fab”片段,其各带有一个抗原结合位点),以及残余的“Fc”片段,其名称反映出它容易结晶的能力。胃蛋白酶处理则产生F(ab')₂片段,其具有两个抗原结合位点,并且依然能够交叉连接抗原。

[0152] “Fv”是最小的抗体片段,其含有完整的抗原识别和结合位点。这个区域由紧密、非共价缔合的一个重链和一个轻链可变域的二聚体构成。就是以这种构型,每个可变域的三个CDR相互作用而限定出VH-VL二聚体表面上的抗原结合位点。六个CDR共同地给抗体赋予了抗原结合特异性。然而,甚至单一可变域(或是半个Fv,其只包含三个对抗原具有特异性

的CDR)也具有识别并结合抗原的能力,虽然比完整的结合位点具有较低的亲和力。

[0153] Fab片段也含有轻链的恒定域和重链的第一恒定域(C_{H1})。Fab片段与Fab'片段的不同在于,在重链 C_{H1} 域的羧基末端添加了几个残基,包括来自抗体铰链区的一个或多个半胱氨酸。Fab'-SH是本文中对Fab'的指定,其中恒定域的半胱氨酸残基带有游离的巯基。Fab'片段通过还原F(ab')₂片段的重链二硫键而产生。抗体片段的其它化学耦合也是已知的。

[0154] 来自任何脊椎动物物种的抗体(免疫球蛋白)的“轻链”,基于其恒定域的氨基酸序列,可以归为两种截然不同的类型(称为 κ (kappa)和 λ (lambda))之一。

[0155] 取决于其重链的恒定域的氨基酸序列,免疫球蛋白可以归为不同的类别。有五种主要的人免疫球蛋白类别:IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,并且其中的数种可进一步被分为亚类(同种型),例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2。对应于不同免疫球蛋白类别的重链恒定域分别被称为 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 。不同免疫球蛋白类别的亚单位结构和三维构型是公知的。不同的同种型具有不同的效应物功能。例如,人IgG1和IgG3同种型具有ADCC(抗体依赖性细胞介导的细胞毒性)活性。

[0156] 当在本文中使用时,单词“标记”是指直接或间接地偶联至抗体从而产生“标记的”抗体的可检测的化合物或组合物。标记可以本身就是可检测的(例如放射性同位素标记或荧光标记),或者在酶标记的情况下,可以催化可检测的底物化合物或组合物的化学改变。

[0157] 本文中针对制剂、组合物或成分使用的术语“可接受的”或“药学上可接受的”,意思是对被治疗的受试者的一般健康状况没有持续的不利影响,或者不消除化合物的生物活性或性质,并且相对无毒。

[0158] 如本文所用的术语“激动剂”是指这样的化合物,由其存在而导致的蛋白质(例如Btk)的生物活性与由该蛋白质的天然存在的配体的存在而导致的生物活性是相同的。

[0159] 如本文所用的术语“部分激动剂”是指这样的化合物,由其存在而导致的蛋白质的生物活性与由该蛋白质的天然存在的配体的存在而导致的生物活性是同一类型的,但程度较低。

[0160] 如本文所用的术语“拮抗剂”是指这样的化合物,其存在导致蛋白质的生物活性的程度下降。在某些实施方案中,拮抗剂的存在导致蛋白质例如Btk的生物活性被完全抑制。在某些实施方案中,拮抗剂是抑制剂。

[0161] 如本文所用的术语“布鲁顿酪氨酸激酶(Btk)”是指来自智人(*Homo sapiens*)的布鲁顿酪氨酸激酶,如在例如美国专利号6,326,469中公开的(GenBank登录号NP_000052)。

[0162] 如本文所用的术语“布鲁顿酪氨酸激酶同源物”是指布鲁顿酪氨酸激酶的直系同源物,例如来自小鼠(GenBank登录号AAB47246)、狗(GenBank登录号XP_549139)、大鼠(GenBank登录号NP_001007799)、鸡(GenBank登录号NP_989564)或斑马鱼(GenBank登录号XP_698117)的直系同源物,以及对布鲁顿酪氨酸激酶的一种或多种底物(例如具有氨基酸序列“AVLESEEELYSSARQ”的肽底物)显示出激酶活性的任意前述的融合蛋白。

[0163] 如本文所用的术语“共同施用”或“联合疗法”和类似用语意在涵盖对单一患者施用选定的治疗剂,而且意在包括通过相同或不同的施用途径或者在相同或不同的时间施用该药剂的治疗。

[0164] 如本文所用的术语“有效量”是指施用的Btk抑制剂或Btk抑制剂化合物的足够量,其将足以造成血液中淋巴细胞亚群的增加或出现(例如药物缩减(pharmaceutical

debulking))。例如,用于诊断和/或预后应用的“有效量”是包括如本文所公开化合物的组合物的量,该量是提供血液中淋巴细胞亚群的临床上显著增加或出现而没有过度的不利副作用所需要的。在任何个别的情况下,适当的“有效量”可使用诸如剂量递增研究等技术来确定。

[0165] 如本文所用的术语“治疗有效量”是指施用的药剂或化合物的足够量,其将足以在一定程度上减轻B细胞淋巴增生性疾病(BCLD)的一种或多种症状。结果可以是BCLD的体征、症状或起因的减少和/或减轻,或者生物系统的任何其它希望的变化。术语“治疗有效量”包括例如预防有效量。本文公开的化合物的“有效量”是有效地达到所需药理效果或治疗改善而没有过度的不利副作用的量。可以理解,由于任何式(A)、式(B)、式(C)或式(D)化合物的代谢,受试者的年龄、体重、一般情况,所治疗的状况,所治疗的状况的严重程度,和处方医师的判断的不同,“有效量”或“治疗有效量”在受试者与受试者之间可以不同。仅举例来说,治疗有效量可通过包括但不限于剂量递增临床试验的常规实验来确定。

[0166] 术语“增强”意指在效力或持续时间上增加或延长所需的效果。举例来说,“增强”治疗剂的效果是指在疾病、病症或状况的治疗期间,在效力或持续时间上增加或延长治疗剂效果的能力。如本文所用的“增强有效量”是指在疾病、病症或状况的治疗中,足以增强治疗剂效果的量。当在患者中使用时,对这种应用有效的量将取决于疾病、病症或状况的严重程度和进程,先前的治疗,患者的健康状况和对药物的反应,以及治疗医师的判断。

[0167] 如本文所用的术语“同源半胱氨酸”是指在与本文定义的布鲁顿酪氨酸激酶的半胱氨酸481的序列位置同源的序列位置内发现的半胱氨酸残基。例如,半胱氨酸482是布鲁顿酪氨酸激酶的大鼠直系同源物的同源半胱氨酸;半胱氨酸479是鸡直系同源物的同源半胱氨酸;而半胱氨酸481是斑马鱼直系同源物中的同源半胱氨酸。在另一个实例中,与布鲁顿酪氨酸相关的Tec激酶家族成员TXK的同源半胱氨酸是Cys 350。也参见在万维网 kinase.com/human/kinome/phylogeny.html 上公布的酪氨酸激酶(TK)的序列比对。

[0168] 如本文所用的术语“相同的”是指两个或更多个序列或子序列是相同的。另外,如本文所用的术语“基本上相同的”是指两个或更多个序列,当在比较窗口内针对最大对应度进行比较和比对时,或者使用比较算法或通过手工比对和目测来测量指定区域时,它们具有一定百分比的相同序列单元。仅举例来说,如果在指定区域内序列单元是约60%相同的、约65%相同的、约70%相同的、约75%相同的、约80%相同的、约85%相同的、约90%相同的或约95%相同的,则两个或更多个序列可以是“基本上相同的”。这样的百分比描述了两个或更多个序列的“百分比同一性”。序列的同一性可以存在于长度至少为约75-100个序列单元的区域,长度约为50个序列单元的区域,或者,在未指定时,存在于整个序列中。该定义也指测试序列的互补序列。仅举例来说,当氨基酸残基相同时,两个或更多个多肽序列是相同的;而如果在指定区域内氨基酸残基是约60%相同的、约65%相同的、约70%相同的、约75%相同的、约80%相同的、约85%相同的、约90%相同的或约95%相同的,那么两个或更多个多肽序列是“基本上相同的”。同一性可以存在于长度至少为约75-100个氨基酸的区域,长度约为50个氨基酸的区域,或者,在未指定时,存在于多肽序列的整个序列中。另外,仅举例来说,当核酸残基相同时,两个或更多个多核苷酸序列是相同的;而如果在指定区域内核酸残基是约60%相同的、约65%相同的、约70%相同的、约75%相同的、约80%相同的、约85%相同的、约90%相同的或约95%相同的,那么两个或更多个多核苷酸序列是

“基本上相同的”。同一性可以存在于长度至少为约75-100个核酸的区域内,长度约为50个核酸的区域内,或者,在未指定时,存在于多核苷酸序列的整个序列中。

[0169] 如本文所用的术语“抑制”或“抑制剂”是指对磷酸转移酶的酶活性的抑制。

[0170] 如本文所用的术语“不可逆抑制剂”是指这样一种化合物,当其与靶蛋白(例如激酶)接触时,导致与该蛋白质形成或在该蛋白质内形成新的共价键,从而减弱或消除了靶蛋白的一种或多种生物活性(例如磷酸转移酶活性),不管该不可逆抑制剂随后存在还是不存在。

[0171] 如本文所用的术语“不可逆Btk抑制剂”是指Btk的抑制剂,其可以与Btk的氨基酸残基形成共价键。在一个实施方案中,Btk的不可逆抑制剂可以与Btk的Cys残基形成共价键;在特定的实施方案中,不可逆抑制剂可以与Btk的Cys 481残基(或其同源物)或另一种酪氨酸激酶的同源对应位置的半胱氨酸残基形成共价键。

[0172] 如本文所用的术语“分离的”是指将目标成分从非目标成分中分开并移走。分离的物质可以处于干或半干状态,或者处于溶液中,包括但不限于水溶液中。分离的成分可以处于均质状态,或者分离的成分可以是包含额外的药学上可接受的载体和/或赋形剂的药物组合物的一部分。仅举例来说,当核酸或蛋白质不含自然状态下与之关联的至少一些细胞成分,或者核酸或蛋白质已浓缩到大于其体内或体外产生的浓度的水平时,这样的核酸或蛋白质是“分离的”。同样地,举例来说,当基因与位于该基因两侧并且编码与目标基因不同的蛋白质的开放阅读框分开时,该基因是分离的。

[0173] 本文公开的化合物的“代谢物”是当该化合物代谢时所形成的该化合物的衍生物。术语“活性代谢物”是指当该化合物代谢时所形成的化合物的生物活性衍生物。如本文所用的术语“代谢”是指生物体借此改变特定物质的过程的总和(包括但不限于水解反应和由酶催化的反应,诸如氧化反应)。因此,酶可使得化合物产生特定结构改变。例如,细胞色素P450催化多种氧化和还原反应,而二磷酸尿苷葡萄糖醛酸基转移酶催化激活的葡萄糖醛酸分子向芳族醇、脂肪醇、羧酸、胺和游离巯基的转移。关于代谢的进一步信息可获自The Pharmacological Basis of Therapeutics,第9版,McGraw-Hill(1996)。本文公开的化合物的代谢物可以通过向宿主施用化合物并分析取自该宿主的组织样品,或者通过在体外将化合物与肝细胞一起温育并分析所得的化合物来鉴定。这两种方法都是本领域所熟知的。在一些实施方案中,化合物的代谢物通过氧化过程形成,且对应于相应的含羟基化合物。在一些实施方案中,化合物被代谢成药理学活性代谢物。

[0174] 如本文所用的术语“调节”是指与靶标直接或间接地相互作用,以便改变靶标的活性,仅举例来说,包括增强靶标的活性,抑制靶标的活性,限制靶标的活性,或扩展靶标的活性。

[0175] 如本文所用的术语“调节剂”是指改变分子的活性的化合物。例如,与不存在调节剂时分子的某种活性的程度相比,该调节剂可以导致该活性的程度增加或下降。在某些实施方案中,调节剂是抑制剂,其降低分子的一种或多种活性的程度。在某些实施方案中,抑制剂完全阻止分子的一种或多种活性。在某些实施方案中,调节剂是激活剂,其增加分子的至少一种活性的程度。在某些实施方案中,调节剂的存在导致在不存在调节剂时不出现的活性。

[0176] 如本文所用的术语“选择性结合化合物”是指选择性地与一种或多种靶蛋白的任

意部分结合的化合物。

[0177] 如本文所用的术语“选择性结合”是指选择性结合化合物与靶蛋白例如Btk结合的能力,其亲和力大于它与非靶蛋白结合的亲和力。在某些实施方案中,特异性结合是指与靶标的结合,其亲和力至少是与非靶标结合的亲和力的10倍、50倍、100倍、250倍、500倍、1000倍或更多倍。

[0178] 如本文所用的术语“选择性调节剂”是指相对于非靶活性,选择性地调节靶活性的化合物。在某些实施方案中,特异性调节剂是指对靶活性的调节至少为对非靶活性的调节的10倍、50倍、100倍、250倍、500倍、1000倍。

[0179] 如本文所用的术语“基本纯化的”是指可以基本或实质上不含在纯化前通常与目标成分相伴或与之相互作用的其它成分的目标成分。仅举例来说,当目标成分的制品含有低于约30%、低于约25%、低于约20%、低于约15%、低于约10%、低于约5%、低于约4%、低于约3%、低于约2%或低于约1% (以干重计) 的掺杂成分时,目标成分可以是“基本纯化的”。因此,“基本纯化的”目标成分可以具有约70%、约75%、约80%、约85%、约90%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或更高的纯度水平。

[0180] 如本文所用的术语“受试者”是指作为治疗、观察或实验对象的动物。仅举例来说,受试者可以是但不限于哺乳动物,包括但不限于人。

[0181] 如本文所用的术语“靶活性”是指能够被选择性调节剂所调节的生物活性。某些示例性的靶活性包括但不限于结合亲和力、信号转导、酶活性、肿瘤生长、对B细胞淋巴增生性疾病的病理学相关的特定生物标记的影响。

[0182] 如本文所用的术语“靶蛋白”是指能够被选择性结合化合物结合的分子或蛋白质的一部分。在某些实施方案中,靶蛋白是Btk。

[0183] 如本文所用的术语“治疗”包括减轻、缓和或改善疾病或状况或其症状;控制疾病或状况或其症状;预防额外的症状;改善或预防症状的潜在的代谢原因;抑制疾病或状况,例如阻止疾病或状况的发展;缓解疾病或状况;使疾病或状况消退、缓解疾病或状况引起的状况;或者停止疾病或状况的症状。术语“治疗”包括但不限于预防性和/或治疗性治疗。

[0184] 如本文所用的 IC_{50} 是指特定测试化合物的量、浓度或剂量,其在测量这样的反应的试验中,达到最大反应的50%抑制,例如Btk的抑制。

[0185] 如本文所用的 EC_{50} 是指特定测试化合物的剂量、浓度或量,其引起的剂量依赖性反应处于由特定测试化合物诱导、引起或加强的特定反应的最大表达的50%。

血液恶性肿瘤

[0186] 在某些实施方案中,本文公开了一种在有需要的个体中治疗血液恶性肿瘤的方法,该方法包括:(a) 向该个体施用第一治疗,该第一治疗包含足以从该恶性肿瘤动员多个细胞的量的不可逆Btk抑制剂;(b) 分析从该个体获得的样品中的动员的多个细胞;和(c) 向该个体施用第二治疗。在一些实施方案中,该血液恶性肿瘤是慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、小淋巴细胞性白血病(SLL)、高危型CLL或非CLL/SLL淋巴瘤。在一些实施方案中,该血液恶性肿瘤是滤泡性淋巴瘤、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、套细胞淋巴瘤、瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症、多发性骨髓瘤、边缘区淋巴瘤、伯基特淋巴瘤、非伯基特高度恶性B细胞淋巴瘤或结节外边缘区B细胞淋巴瘤。在一些实施方案中,该血液恶性肿瘤是急性或慢性髓性(或髓样)白血病、骨髓增生异常综合征或急性淋巴母细胞性白血病。在一些实施方案中,该

血液恶性肿瘤是非霍奇金淋巴瘤 (NHL)。在一些实施方案中,该血液恶性肿瘤是慢性淋巴细胞性白血病 (CLL)。在一些实施方案中,该血液恶性肿瘤是套细胞淋巴瘤 (MCL)。在一些实施方案中,该血液恶性肿瘤是弥漫性大B细胞淋巴瘤 (DLBCL)。在一些实施方案中,该血液恶性肿瘤是弥漫性大B细胞淋巴瘤 (DLBCL) 的ABC亚型。在一些实施方案中,该血液恶性肿瘤是弥漫性大B细胞淋巴瘤 (DLBCL) 的GCB亚型。在一些实施方案中,该血液恶性肿瘤是瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症 (WM)。在一些实施方案中,该血液恶性肿瘤是多发性骨髓瘤。在一些实施方案中,该血液恶性肿瘤是伯基特淋巴瘤。在一些实施方案中,该血液恶性肿瘤是滤泡性淋巴瘤。在一些实施方案中,该血液恶性肿瘤是转化的滤泡性淋巴瘤。在一些实施方案中,该血液恶性肿瘤是边缘区淋巴瘤。

[0187] 在某些实施方案中,本文公开了一种在有需要的个体中治疗血液恶性肿瘤的方法,包括:(a) 向该个体施用第一治疗,该第一治疗包含足以从该恶性肿瘤动员多个细胞的量的不可逆Btk抑制剂;(b) 分析从该个体获得的样品中的动员的多个细胞;和(c) 向该个体施用第二治疗。在一些实施方案中,该血液恶性肿瘤是复发性或难治性的。在一些实施方案中,该血液恶性肿瘤是复发性或难治性弥漫性大B细胞淋巴瘤 (DLBCL)、复发性或难治性套细胞淋巴瘤、复发性或难治性滤泡性淋巴瘤、复发性或难治性CLL;复发性或难治性SLL;复发性或难治性多发性骨髓瘤。在一些实施方案中,该不可逆Btk抑制剂的量足以诱发来自该恶性肿瘤的多个细胞的淋巴细胞增多。在一些实施方案中,分析动员的多个细胞包括测量动员的多个细胞的外周血浓度。在一些实施方案中,该方法进一步包括,在与施用Btk抑制剂之前的浓度相比该动员的多个细胞的外周血浓度增加后,施用第二治疗。在一些实施方案中,在动员的多个细胞的外周血浓度后续降低后,进行第二治疗的施用。在一些实施方案中,分析该动员的多个细胞包括测量与施用该Btk抑制剂之前的浓度相比该动员的多个细胞的外周血浓度增加的持续时间。在一些实施方案中,该方法进一步包括在该动员的多个细胞的外周血浓度已经增加预定时间长度后,施用第二治疗。在一些实施方案中,分析该动员的多个细胞包括对外周血中动员的多个细胞的数目进行计数。在一些实施方案中,该方法进一步包括在与施用Btk抑制剂之前的浓度相比外周血中动员的多个细胞的数目增加后,施用第二治疗。在一些实施方案中,在外周血中的动员的多个细胞的数目后续降低之后,进行第二治疗的施用。在一些实施方案中,分析该动员的多个细胞包括测量与施用Btk抑制剂之前的数目相比在外周血中动员的多个细胞数目增加的持续时间。在一些实施方案中,该方法进一步包括在外周血中的动员的多个细胞的数目已经增加预定时间长度之后,施用第二治疗。

[0188] 在某些实施方案中,本文公开了一种在有需要的个体中治疗血液恶性肿瘤的方法,包括:(a) 向该个体施用第一治疗,该第一治疗包含足以从该恶性肿瘤动员多个细胞的量的不可逆Btk抑制剂;(b) 分析从该个体获得的样品中的动员的多个细胞;和(c) 向该个体施用第二治疗。在一些实施方案中,该血液恶性肿瘤是被分类为高危型的血液恶性肿瘤。在一些实施方案中,该血液恶性肿瘤是高危型CLL或高危型SLL。在一些实施方案中,该不可逆Btk抑制剂的量足以诱发来自该恶性肿瘤的多个细胞的淋巴细胞增多。在一些实施方案中,分析动员的多个细胞包括测量动员的多个细胞的外周血浓度。在一些实施方案中,该方法进一步包括,在与施用Btk抑制剂之前的浓度相比该动员的多个细胞的外周血浓度增加后,施用第二治疗。在一些实施方案中,在动员的多个细胞的外周血浓度后续降低后,进行第二

治疗的施用。在一些实施方案中,分析该动员的多个细胞包括测量与施用该Btk抑制剂之前的浓度相比该动员的多个细胞的外周血浓度增加的持续时间。在一些实施方案中,该方法进一步包括在该动员的多个细胞的外周血浓度已经增加预定时间长度后,施用第二治疗。在一些实施方案中,分析该动员的多个细胞包括对外周血中动员的多个细胞的数目进行计数。在一些实施方案中,该方法进一步包括在与施用Btk抑制剂之前的浓度相比外周血中动员的多个细胞的数目增加后,施用第二治疗。在一些实施方案中,在外周血中的动员的多个细胞的数目后续降低之后,进行第二治疗的施用。在一些实施方案中,分析该动员的多个细胞包括测量与施用Btk抑制剂之前的数目相比在外周血中动员的多个细胞数目增加的持续时间。在一些实施方案中,该方法进一步包括在外周血中的动员的多个细胞的数目已经增加预定时间长度之后,施用第二治疗。

[0189] 在某些实施方案中,本文公开了一种在有需要的个体中治疗血液恶性肿瘤的方法,包括:(a)向该个体施用第一治疗,该第一治疗包含足以从该恶性肿瘤动员多个细胞的量的不可逆Btk抑制剂;(b)分析从该个体获得的样品中的动员的多个细胞;和(c)向该个体施用第二治疗。在一些实施方案中,该血液恶性肿瘤是进展缓慢的血液恶性肿瘤。在一些实施方案中,该不可逆Btk抑制剂的量足以诱发来自该恶性肿瘤的多个细胞的淋巴细胞增多。在一些实施方案中,分析动员的多个细胞包括测量动员的多个细胞的外周血浓度。在一些实施方案中,该方法进一步包括,在与施用Btk抑制剂之前的浓度相比该动员的多个细胞的外周血浓度增加后,施用第二治疗。在一些实施方案中,在动员的多个细胞的外周血浓度后续降低后,进行第二治疗的施用。在一些实施方案中,分析该动员的多个细胞包括测量与施用该Btk抑制剂之前的浓度相比该动员的多个细胞的外周血浓度增加的持续时间。在一些实施方案中,该方法进一步包括在该动员的多个细胞的外周血浓度已经增加预定时间长度后,施用第二治疗。在一些实施方案中,分析该动员的多个细胞包括对外周血中动员的多个细胞的数目进行计数。在一些实施方案中,该方法进一步包括在与施用Btk抑制剂之前的浓度相比外周血中动员的多个细胞的数目增加后,施用第二治疗。在一些实施方案中,在外周血中的动员的多个细胞的数目后续降低之后,进行第二治疗的施用。在一些实施方案中,分析该动员的多个细胞包括测量与施用Btk抑制剂之前的数目相比在外周血中动员的多个细胞数目增加的持续时间。在一些实施方案中,该方法进一步包括在外周血中的动员的多个细胞的数目已经增加预定时间长度之后,施用第二治疗。在一些实施方案中,第二治疗是来那度胺。在一些实施方案中,第二治疗是利妥昔单抗、环磷酰胺、盐酸多柔比星、硫酸长春新碱和泼尼松(R-CHOP)。在一些实施方案中,第二治疗是坦罗莫司。

[0190] 在某些实施方案中,本文公开了一种在有需要的个体中治疗血液恶性肿瘤的方法,包括:(a)向该个体施用第一治疗,该第一治疗包含足以从该恶性肿瘤动员多个细胞的量的不可逆Btk抑制剂;(b)分析从该个体获得的样品中的动员的多个细胞;和(c)向该个体施用第二治疗。在一些实施方案中,该血液恶性肿瘤是转化的血液恶性肿瘤。在一些实施方案中,该不可逆Btk抑制剂的量足以诱发来自该恶性肿瘤的多个细胞的淋巴细胞增多。在一些实施方案中,分析动员的多个细胞包括测量动员的多个细胞的外周血浓度。在一些实施方案中,该方法进一步包括,在与施用Btk抑制剂之前的浓度相比该动员的多个细胞的外周血浓度增加后,施用第二治疗。在一些实施方案中,在动员的多个细胞的外周血浓度后续降低后,进行第二治疗的施用。在一些实施方案中,分析该动员的多个细胞包括测量与施用该

Btk抑制剂之前的浓度相比该动员的多个细胞的外周血浓度增加的持续时间。在一些实施方案中,该方法进一步包括在该动员的多个细胞的外周血浓度已经增加预定时间长度后,施用第二治疗。在一些实施方案中,分析该动员的多个细胞包括对外周血中动员的多个细胞的数目进行计数。在一些实施方案中,该方法进一步包括在与施用Btk抑制剂之前的浓度相比外周血中动员的多个细胞的数目增加后,施用第二治疗。在一些实施方案中,在外周血中的动员的多个细胞的数目后续降低之后,进行第二治疗的施用。在一些实施方案中,分析该动员的多个细胞包括测量与施用Btk抑制剂之前的数目相比在外周血中动员的多个细胞数目增加的持续时间。在一些实施方案中,该方法进一步包括在外周血中的动员的多个细胞的数目已经增加预定时间长度之后,施用第二治疗。

[0191] B细胞淋巴增生性疾病(BCLD)是血液的肿瘤,并且包括,尤其是,非霍奇金淋巴瘤、多发性骨髓瘤和白血病。BCLD可起源于淋巴组织中(如在淋巴瘤的情况下)或骨髓中(如在白血病和骨髓瘤的情况下),并且它们都与淋巴细胞或白细胞的不受控生长有关。BCLD存在多种亚型,例如,慢性淋巴细胞性白血病(CLL)和非霍奇金淋巴瘤(NHL)。BCLD的病程和治疗取决于BCLD亚型;然而,甚至在每个亚型中,临床表现、形态外观和对治疗的反应都是不均一的。

[0192] 恶性淋巴瘤是主要存在于淋巴样组织中的细胞的致瘤性转化。两组恶性淋巴瘤是霍奇金淋巴瘤和非霍奇金淋巴瘤(NHL)。这两种类型的淋巴瘤均浸润网状内皮组织。然而,它们在赘生性起源细胞、病变部位、全身症状的出现和对治疗的反应上存在不同(Freedman等,“Non-Hodgkin’s Lymphomas”第134章,Cancer Medicine,(美国癌症学会(American Cancer Society)的核准出版物,B.C.Decker Inc.,Hamilton,Ontario,2003)。

非霍奇金淋巴瘤

[0193] 在某些实施方案中,本文公开了一种用于在有需要的个体中治疗非霍奇金淋巴瘤的方法,包括:(a)向该个体施用第一治疗,该第一治疗包含足以从该恶性肿瘤动员多个细胞的量的不可逆Btk抑制剂;(b)分析从该个体获得的样品中的动员的多个细胞;和(c)向该个体施用第二治疗。在一些实施方案中,该不可逆Btk抑制剂的量足以诱发来自该恶性肿瘤的多个细胞的淋巴细胞增多。在一些实施方案中,分析动员的多个细胞包括测量动员的多个细胞的外周血浓度。在一些实施方案中,该方法进一步包括,在与施用Btk抑制剂之前的浓度相比该动员的多个细胞的外周血浓度增加后,施用第二治疗。在一些实施方案中,在动员的多个细胞的外周血浓度后续降低后,进行第二治疗的施用。在一些实施方案中,分析该动员的多个细胞包括测量与施用该Btk抑制剂之前的浓度相比该动员的多个细胞的外周血浓度增加的持续时间。在一些实施方案中,该方法进一步包括在该动员的多个细胞的外周血浓度已经增加预定时间长度后,施用第二治疗。在一些实施方案中,分析该动员的多个细胞包括对外周血中动员的多个细胞的数目进行计数。在一些实施方案中,该方法进一步包括在与施用Btk抑制剂之前的浓度相比外周血中动员的多个细胞的数目增加后,施用第二治疗。在一些实施方案中,在外周血中的动员的多个细胞的数目后续降低之后,进行第二治疗的施用。在一些实施方案中,分析该动员的多个细胞包括测量与施用Btk抑制剂之前的数目相比在外周血中动员的多个细胞数目增加的持续时间。在一些实施方案中,该方法进一步包括在外周血中的动员的多个细胞的数目已经增加预定时间长度之后,施用第二治疗。在一些实施方案中,第二治疗是硼替佐米。在一些实施方案中,第二治疗是苯达莫司汀和利

妥昔单抗 (BR)。

[0194] 在某些实施方案中,本文进一步公开了一种在有需要的个体中治疗复发性或难治性非霍奇金淋巴瘤的方法,其包括:向该个体施用治疗有效量的(R)-1-(3-(4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)哌啶-1-基)丙-2-烯-1-酮(即,PCI-32765/依罗替尼)。在一些实施方案中,该非霍奇金淋巴瘤是复发性或难治性弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、复发性或难治性套细胞淋巴瘤或复发性或难治性滤泡性淋巴瘤。

[0195] 非霍奇金淋巴瘤(NHL)是主要为B细胞起源的不同种类的恶性肿瘤。NHL可在任何与淋巴系统相关的器官如脾脏、淋巴结或扁桃体中发展,并且可以在任何年龄时发生。NHL通常以淋巴结增大、发烧及体重减轻为特征。NHL被分类为B细胞或T细胞NHL。与骨髓或干细胞移植后的淋巴增生性疾病相关的淋巴瘤通常为B细胞NHL。在工作分类方案中,根据它们的自然史,已将NHL分为低度、中度和高度恶性类别(参见“The Non-Hodgkin’s Lymphoma Pathologic Classification Project,”Cancer 49(1982):2112-2135)。低度恶性的淋巴瘤是进展缓慢的,具有5至10年的生存中值(Horning和Rosenberg(1984) N.Engl.J.Med.311:1471-1475)。尽管化学治疗可以诱导大部分缓慢进展淋巴瘤的缓解,但治愈是罕见的,大多数患者最终会复发,需要进一步的治疗。中度和高度恶性的淋巴瘤是更具侵袭性的肿瘤,但其采用化学治疗治愈的机会更大。然而,相当比例的这些患者将会复发且需要进一步的治疗。

[0196] B细胞NHL的非限制性列表包括伯基特淋巴瘤(例如,地方性伯基特淋巴瘤和散发性伯基特淋巴瘤)、皮肤B细胞淋巴瘤、皮肤边缘区淋巴瘤(MZL)、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、弥散性混合小细胞和大细胞淋巴瘤、弥散性小卵裂细胞、弥散性小淋巴细胞性淋巴瘤、结节外边缘区B细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、滤泡性小卵裂细胞(1级)、滤泡性混合小卵裂和大细胞(2级)、滤泡性大细胞(3级)、血管内大B细胞淋巴瘤、血管内淋巴瘤病、大细胞免疫母细胞性淋巴瘤、大细胞淋巴瘤(LCL)、淋巴母细胞性淋巴瘤、MALT淋巴瘤、套细胞淋巴瘤(MCL)、免疫母细胞性大细胞淋巴瘤、前体B-淋巴母细胞性淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)/小淋巴细胞性淋巴瘤(SLL)、结节外边缘区B细胞淋巴瘤-粘膜相关淋巴样组织(MALT)淋巴瘤、纵膈大B细胞淋巴瘤、结节边缘区B细胞淋巴瘤、脾边缘区B细胞淋巴瘤、原发性纵膈B细胞淋巴瘤、淋巴浆细胞性淋巴瘤(lymphoplasmocytic lymphoma)、毛细胞性白血病、瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症和原发性中枢神经系统(CNS)淋巴瘤。其它非霍奇金淋巴瘤包含在本发明的范围内,并且对本领域普通技术人员而言是显而易见的。

DLBCL

[0197] 在某些实施方案中,本文公开了一种用于在有需要的个体中治疗DLBCL的方法,其包括:(a)向该个体施用第一治疗,该第一治疗包含足以从该恶性肿瘤动员多个细胞的量的不可逆Btk抑制剂;(b)分析从该个体获得的样品中的动员的多个细胞;和(c)向该个体施用第二治疗。在一些实施方案中,该不可逆Btk抑制剂的量足以诱发来自该恶性肿瘤的多个细胞的淋巴细胞增多。在一些实施方案中,分析动员的多个细胞包括测量动员的多个细胞的外周血浓度。在一些实施方案中,该方法进一步包括,在与施用Btk抑制剂之前的浓度相比该动员的多个细胞的外周血浓度增加后,施用第二治疗。在一些实施方案中,在动员的多个细胞的外周血浓度后续降低后,进行第二治疗的施用。在一些实施方案中,分析该动员的多个细胞包括测量与施用该Btk抑制剂之前的浓度相比该动员的多个细胞的外周血浓度增加

的持续时间。在一些实施方案中,该方法进一步包括在该动员的多个细胞的外周血浓度已经增加预定时间长度后,施用第二治疗。在一些实施方案中,分析该动员的多个细胞包括对外周血中动员的多个细胞的数目进行计数。在一些实施方案中,该方法进一步包括在与施用Btk抑制剂之前的浓度相比外周血中动员的多个细胞的数目增加后,施用第二治疗。在一些实施方案中,在外周血中的动员的多个细胞的数目后续降低之后,进行第二治疗的施用。在一些实施方案中,分析该动员的多个细胞包括测量与施用Btk抑制剂之前的数目相比在外周血中动员的多个细胞数目增加的持续时间。在一些实施方案中,该方法进一步包括在外周血中的动员的多个细胞的数目已经增加预定时间长度之后,施用第二治疗。在一些实施方案中,第二治疗是来那度胺。在一些实施方案中,第二治疗是利妥昔单抗、环磷酰胺、盐酸多柔比星、硫酸长春新碱和泼尼松(R-CHOP)。在一些实施方案中,第二治疗是坦罗莫司。在一些实施方案中,第二治疗是硼替佐米。

[0198] 如本文所用的术语“弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)”是指具有弥散性生长模式以及高-中度增殖指数的生发中心B淋巴细胞的肿瘤。DLBCL占全部淋巴瘤的大约30%,并且可能以若干形态学变异形式呈现,包括中心母细胞性、免疫母细胞性、富含T细胞/组织细胞的、间变性和浆母细胞性亚型。遗传试验已表明存在不同亚型的DLBCL。这些亚型似乎对治疗有不同的前景(预后)和反应。DLBCL可以影响任何年龄组,但大多在老年人中出现(平均年龄是60多岁)。

[0199] 在某些实施方案中,本文公开了一种用于在有需要的个体中治疗弥漫性大B细胞淋巴瘤ABC-亚型(ABC-DLBCL)的方法,该方法包括:(a)向该个体施用第一治疗,该第一治疗包含足以从该恶性肿瘤动员多个细胞的量的不可逆Btk抑制剂;(b)分析从该个体获得的样品中的动员的多个细胞;和(c)向该个体施用第二治疗。在一些实施方案中,该不可逆Btk抑制剂的量足以诱发来自该恶性肿瘤的多个细胞的淋巴细胞增多。在一些实施方案中,分析动员的多个细胞包括测量动员的多个细胞的外周血浓度。在一些实施方案中,该方法进一步包括,在与施用Btk抑制剂之前的浓度相比该动员的多个细胞的外周血浓度增加后,施用第二治疗。在一些实施方案中,在动员的多个细胞的外周血浓度后续降低后,进行第二治疗的施用。在一些实施方案中,分析该动员的多个细胞包括测量与施用该Btk抑制剂之前的浓度相比该动员的多个细胞的外周血浓度增加的持续时间。在一些实施方案中,该方法进一步包括在该动员的多个细胞的外周血浓度已经增加预定时间长度后,施用第二治疗。在一些实施方案中,分析该动员的多个细胞包括对外周血中动员的多个细胞的数目进行计数。在一些实施方案中,该方法进一步包括在与施用Btk抑制剂之前的浓度相比外周血中动员的多个细胞的数目增加后,施用第二治疗。在一些实施方案中,在外周血中的动员的多个细胞的数目后续降低之后,进行第二治疗的施用。在一些实施方案中,分析该动员的多个细胞包括测量与施用Btk抑制剂之前的数目相比在外周血中动员的多个细胞数目增加的持续时间。在一些实施方案中,该方法进一步包括在外周血中的动员的多个细胞的数目已经增加预定时间长度之后,施用第二治疗。在一些实施方案中,第二治疗是来那度胺。在一些实施方案中,第二治疗是利妥昔单抗、环磷酰胺、盐酸多柔比星、硫酸长春新碱和泼尼松(R-CHOP)。在一些实施方案中,第二治疗是坦罗莫司。在一些实施方案中,第二治疗是硼替佐米。

[0200] 弥漫性大B细胞淋巴瘤的ABC亚型(ABC-DLBCL)被认为是从浆细胞分化期间停滞的

后生发中心B细胞产生的。DLBCL的ABC亚型(ABC-DLBCL)占全部DLBCL诊断的大约30%。其被认为是DLBCL分子亚型中最难治愈的,因此,被诊断为患有ABC-DLBCL的患者与患其它类型的DLBCL的个体相比,通常显现出显著降低的存活率。ABC-DLBCL最常见地是与解除对生发中心主调节物BCL6的调节的染色体易位相关,并与使编码浆细胞分化所需的转录阻遏物的PRDM1基因失活的突变相关。

[0201] ABC-DLBCL的发病机制中特别相关的信号传导途径是由核因子(NF)- κ B转录复合物介导的途径。NF- κ B家族包括5个成员(p50、p52、p65、c-rel和RelB),它们形成同二聚体和异二聚体,并作为转录因子起作用来介导多种增殖、细胞凋亡、炎症和免疫应答,对正常的B细胞发育和存活是至关重要的。NF- κ B被真核细胞广泛用作控制细胞增殖和细胞存活的基因的调节物。因此,许多不同类型的人类肿瘤具有错误调控的NF- κ B;换言之,NF- κ B具有组成性活性。活性NF- κ B开启了基因的表达,该基因保持细胞增殖并保护细胞免于遭受能通过细胞凋亡使其死亡的状况。

[0202] ABC DLBCL对NF- κ B的依赖性取决于由CARD11、BCL10和MALT1构成(CBM复合物)的I κ B激酶上游的信号传导途径。CBM途径的干扰压制了ABC DLBCL细胞中的NF- κ B信号传导,并诱导细胞凋亡。NF- κ B途径的组成性活性的分子基础是目前研究的课题,但ABC DLBCL基因组的一些体细胞改变显然唤醒了此途径。例如,在DLBCL中,CARD11的卷曲螺旋域的体细胞突变使该信号传导支架蛋白能够自发地在与MALT1和BCL10的蛋白质-蛋白质相互作用中起核心作用(nucleate),导致IKK活性和NF- κ B激活。B细胞受体信号传导途径的组成性活性已经涉及到野生型CARD11对ABC DLBCL中的NF- κ B的激活,并且这与B细胞受体亚单位CD79A和CD79B的胞质尾区内的突变相关。信号传导衔接子MYD88中的致癌性激活突变激活了NF- κ B,并在维持ABC DLBCL细胞存活上与B细胞受体信号传导协同作用。此外,NF- κ B途径的负调节物A20中的失活突变几乎仅出现在ABC DLBCL中。

[0203] 实际上,最近已经在超过50%的ABC-DLBCL患者中鉴定出影响NF- κ B信号传导途径多个组分的遗传改变,其中这些损伤促进组成型NF- κ B激活,从而有助于淋巴瘤生长。其包括CARD11突变(~10%的病例),CARD11是一种能与MALT1和BCL10一起形成BCR信号小体的淋巴细胞特异性胞质支架蛋白,能将信号从抗原受体传递至NF- κ B激活的下游调节物。更高比例的病例(~30%)携带使负向NF- κ B调节物A20失活的双等位基因遗传损伤。此外,已经在ABC-DLBCL肿瘤样品中观察到NF- κ B靶基因的高水平表达。参见,例如,U.Klein等,(2008),*Nature Reviews Immunology* 8:22-23;R.E.Davis等,(2001),*Journal of Experimental Medicine* 194:1861-1874;G.Lentz等,(2008),*Science* 319:1676-1679;M.Compagno等,(2009),*Nature* 459:712-721;和L.Srinivasan等,(2009),*Cell* 139:573-586。

[0204] ABC亚型的DLBCL细胞,如OCI-Ly10,具有长期活性的BCR信号传导,并且对本文所述的Btk抑制剂非常敏感。本文所述的不可逆Btk抑制剂强有力地并且不可逆地抑制OCI-Ly10的生长(EC_{50} 持续暴露=10nM, EC_{50} 1小时脉冲=50nM)。此外,在OCI-Ly10中观察到细胞凋亡的诱导,如胱天蛋白酶(caspase)激活、膜联蛋白V流式细胞术和亚-G0组分的增多所示。敏感性和抗性细胞两者均表达相似水平的Btk,并且在两者中Btk的活性位点均完全被该抑制剂占据,如使用荧光标记的亲合探针所示。OCI-Ly10细胞被证明具有向NF- κ B的长期活性BCR信号传导,NF- κ B剂量依赖性地被本文所述的Btk抑制剂所抑制。Btk抑制剂在本文

所研究的细胞系中的活性也通过比较在存在及不存在BCR刺激时的信号转导谱(Btk、PLC γ 、ERK、NF- κ B、AKT)、细胞因子分泌谱和mRNA表达谱进行了表征,并且观察到这些谱中的显著差异,导致能识别对Btk抑制剂治疗最敏感的患者群体的临床生物标记。参见美国专利号7,711,492和Staudt等,Nature,Vol.463,Jan.7,2010,pp.88-92,其内容通过引用整体并入。

[0205] 在某些实施方案中,本文公开了一种用于在有需要的个体中治疗弥漫性大B细胞淋巴瘤GCB亚型(GCB-DLBCL)的方法,其包括:(a)向该个体施用第一治疗,该第一治疗包含足以从该恶性肿瘤动员多个细胞的量的不可逆Btk抑制剂;(b)分析从该个体获得的样品中的动员的多个细胞;和(c)向该个体施用第二治疗。在一些实施方案中,该不可逆Btk抑制剂的量足以诱发来自该恶性肿瘤的多个细胞的淋巴细胞增多。在一些实施方案中,分析动员的多个细胞包括测量动员的多个细胞的外周血浓度。在一些实施方案中,该方法进一步包括,在与施用Btk抑制剂之前的浓度相比该动员的多个细胞的外周血浓度增加后,施用第二治疗。在一些实施方案中,在动员的多个细胞的外周血浓度后续降低后,进行第二治疗的施用。在一些实施方案中,分析该动员的多个细胞包括测量与施用该Btk抑制剂之前的浓度相比该动员的多个细胞的外周血浓度增加的持续时间。在一些实施方案中,该方法进一步包括在该动员的多个细胞的外周血浓度已经增加预定时间长度后,施用第二治疗。在一些实施方案中,分析该动员的多个细胞包括对外周血中动员的多个细胞的数目进行计数。在一些实施方案中,该方法进一步包括在与施用Btk抑制剂之前的浓度相比外周血中动员的多个细胞的数目增加后,施用第二治疗。在一些实施方案中,在外周血中的动员的多个细胞的数目后续降低之后,进行第二治疗的施用。在一些实施方案中,分析该动员的多个细胞包括测量与施用Btk抑制剂之前的数目相比在外周血中动员的多个细胞数目增加的持续时间。在一些实施方案中,该方法进一步包括在外周血中的动员的多个细胞的数目已经增加预定时间长度之后,施用第二治疗。在一些实施方案中,第二治疗是来那度胺。在一些实施方案中,第二治疗是利妥昔单抗、环磷酰胺、盐酸多柔比星、硫酸长春新碱和泼尼松(R-CHOP)。在一些实施方案中,第二治疗是坦罗莫司。在一些实施方案中,第二治疗是硼替佐米。

滤泡性淋巴瘤

[0206] 在某些实施方案中,本文公开了一种用于在有需要的个体中治疗滤泡性淋巴瘤的方法,该方法包括:(a)向该个体施用第一治疗,该第一治疗包含足以从该恶性肿瘤动员多个细胞的量的不可逆Btk抑制剂;(b)分析该动员的多个细胞,和(c)向该个体施用第二治疗。在一些实施方案中,该不可逆Btk抑制剂的量足以诱发来自该恶性肿瘤的多个细胞的淋巴细胞增多。在一些实施方案中,分析动员的多个细胞包括测量动员的多个细胞的外周血浓度。在一些实施方案中,该方法进一步包括,在与施用Btk抑制剂之前的浓度相比该动员的多个细胞的外周血浓度增加后,施用第二治疗。在一些实施方案中,在动员的多个细胞的外周血浓度后续降低后,进行第二治疗的施用。在一些实施方案中,分析该动员的多个细胞包括测量与施用该Btk抑制剂之前的浓度相比该动员的多个细胞的外周血浓度增加的持续时间。在一些实施方案中,该方法进一步包括在该动员的多个细胞的外周血浓度已经增加预定时间长度后,施用第二治疗。在一些实施方案中,分析该动员的多个细胞包括对外周血中动员的多个细胞的数目进行计数。在一些实施方案中,该方法进一步包括在与施用Btk抑制剂之前的浓度相比外周血中动员的多个细胞的数目增加后,施用第二治疗。在一些实施

方案中,在外周血中的动员的多个细胞的数目后续降低之后,进行第二治疗的施用。在一些实施方案中,分析该动员的多个细胞包括测量与施用Btk抑制剂之前的数目相比在外周血中动员的多个细胞数目增加的持续时间。在一些实施方案中,该方法进一步包括在外周血中的动员的多个细胞的数目已经增加预定时间长度之后,施用第二治疗。在一些实施方案中,第二治疗是来那度胺。在一些实施方案中,第二治疗是利妥昔单抗、环磷酰胺、盐酸多柔比星、硫酸长春新碱和泼尼松(R-CHOP)。在一些实施方案中,第二治疗是坦罗莫司。

[0207] 如本文所用的术语“滤泡性淋巴瘤”是指若干非霍奇金淋巴瘤类型中的任意一种,其中淋巴瘤细胞聚簇成结节或滤泡。使用术语滤泡性是因为细胞在淋巴结内趋于以环状或结节状模式生长。患有这种淋巴瘤的人的平均年龄为大约60岁。

CLL/SLL

[0208] 在某些实施方案中,本文公开了一种用于在有需要的个体中治疗CLL或SLL的方法,包括:(a)向该个体施用第一治疗,该第一治疗包含足以从该恶性肿瘤动员多个细胞的量的不可逆Btk抑制剂;(b)分析从该个体获得的样品中的动员的多个细胞;和(c)向该个体施用第二治疗。在一些实施方案中,该CLL或SLL是高危型的。在一些实施方案中,该不可逆Btk抑制剂的量足以诱发来自该恶性肿瘤的多个细胞的淋巴细胞增多。在一些实施方案中,分析动员的多个细胞包括测量动员的多个细胞的外周血浓度。在一些实施方案中,该方法进一步包括,在与施用Btk抑制剂之前的浓度相比该动员的多个细胞的外周血浓度增加后,施用第二治疗。在一些实施方案中,在动员的多个细胞的外周血浓度后续降低后,进行第二治疗的施用。在一些实施方案中,分析该动员的多个细胞包括测量与施用该Btk抑制剂之前的浓度相比该动员的多个细胞的外周血浓度增加的持续时间。在一些实施方案中,该方法进一步包括在该动员的多个细胞的外周血浓度已经增加预定时间长度后,施用第二治疗。在一些实施方案中,分析该动员的多个细胞包括对外周血中动员的多个细胞的数目进行计数。在一些实施方案中,该方法进一步包括在与施用Btk抑制剂之前的浓度相比外周血中动员的多个细胞的数目增加后,施用第二治疗。在一些实施方案中,在外周血中的动员的多个细胞的数目后续降低之后,进行第二治疗的施用。在一些实施方案中,分析该动员的多个细胞包括测量与施用Btk抑制剂之前的数目相比在外周血中动员的多个细胞数目增加的持续时间。在一些实施方案中,该方法进一步包括在外周血中的动员的多个细胞的数目已经增加预定时间长度之后,施用第二治疗。在一些实施方案中,第二治疗是苯达莫司汀和利妥昔单抗(BR)。在一些实施方案中,第二治疗是氟达拉滨、环磷酰胺和利妥昔单抗(FCR)。在一些实施方案中,第二治疗是奥法木单抗。在一些实施方案中,第二治疗是利妥昔单抗。在一些实施方案中,第二治疗是来那度胺。

[0209] 慢性淋巴细胞性白血病和小淋巴细胞性淋巴瘤(CLL/SLL)通常被认为是具有略微不同的表现的同一种疾病。癌细胞在何处聚集决定了其被称为CLL还是SLL。当癌细胞主要发现于淋巴结,即淋巴系统(体内发现的主要为微小脉管的系统)的利马豆状结构中时,称其为SLL。SLL占有淋巴瘤的约5%至10%。当大多数癌细胞在血流和骨髓中时,称其为CLL。

[0210] CLL和SLL两者均为缓慢生长的疾病,尽管更为常见的CLL倾向于生长得更慢。用相同的方式治疗CLL和SLL。通常认为它们用标准治疗是无法治愈的,但取决于疾病的阶段和生长速度,大多数患者能存活超过10年。偶尔随着时间推移,这些缓慢生长的淋巴瘤可能转

化为更具侵袭性的淋巴瘤类型。

[0211] 慢性淋巴样白血病 (CLL) 是最常见的白血病类型。据估计,美国有100,760人患有CLL或处于CLL缓解期。大部分(>75%)新近诊断为患有CLL的人超过50岁。目前CLL治疗主要集中在控制疾病及其症状而不是完全治愈。CLL用化学疗法、放射疗法、生物疗法或骨髓移植来治疗。有时候通过手术(脾切除术去除增大的脾脏)或放射疗法(“缩减”肿大的淋巴结)来治疗症状。尽管在大多数病例中CLL进展缓慢,但一般认为它是不可治愈的。某些CLL被归类为高危型。如本文所用的“高危型CLL”意指其特征为以下至少一种的CLL:1) 17p13-;2) 11q22-;3) 未突变的IgVH与ZAP-70+和/或CD38+;或4) 12号染色体三体。

[0212] CLL治疗通常在当患者的临床症状或血细胞计数表明疾病已经进展到一个可能影响患者生活质量的节点时施用。

[0213] 小淋巴细胞性白血病 (SLL) 同以上描述的CLL非常类似,也是一种B细胞癌症。在SLL中,异常的淋巴细胞主要影响淋巴结。然而,在CLL中,异常细胞主要影响血液和骨髓。在这两种状况下,脾脏均可能受到影响。SLL占有非霍奇金淋巴瘤病例的约1/25。它可以在从成年早期到老年的任何时间发生,但在50岁以下罕见。SLL被认为是一种缓慢进展的淋巴瘤。这意味着该疾病进展非常缓慢,患者常常在诊断后存活许多年。然而,大多数患者被诊断为疾病晚期,并且尽管SLL对多种化学治疗药物有很好的反应,但是一般认为它是不可治愈的。尽管一些癌症倾向于更经常地出现在一个性别或另一个性别中,但由SLL引起的病例和死亡平均分布在男性和女性之间。诊断时的平均年龄为60岁。

[0214] 尽管SLL进展缓慢,但其持续进展。此疾病的通常模式是对放射疗法和/或化学疗法的高反应率中的一种,具有疾病缓解期。数月或数年后必然复发。再治疗会再次引起反应,但疾病会再次复发。这意味着尽管SLL的短期预后相当好,但是随着时间的推移,许多患者出现复发性疾病的致命性并发症。考虑到通常被诊断为CLL和SLL的个体的年龄,本领域需要一种简单有效的、副作用最小因而不会妨碍患者生活质量的治疗此疾病的疗法。本发明满足了本领域中的这一长期存在的需要。

套细胞淋巴瘤

[0215] 在某些实施方案中,本文公开了一种用于在有需要的个体中治疗套细胞淋巴瘤的方法,其包括:(a) 向该个体施用第一治疗,该第一治疗包含足以从该恶性肿瘤动员多个细胞的量的不可逆Btk抑制剂;(b) 分析从该个体获得的样品中的动员的多个细胞;和(c) 向该个体施用第二治疗。在一些实施方案中,该不可逆Btk抑制剂的量足以诱发来自该恶性肿瘤的多个细胞的淋巴细胞增多。在一些实施方案中,分析动员的多个细胞包括测量动员的多个细胞的外周血浓度。在一些实施方案中,该方法进一步包括,在与施用Btk抑制剂之前的浓度相比该动员的多个细胞的外周血浓度增加后,施用第二治疗。在一些实施方案中,在动员的多个细胞的外周血浓度后续降低后,进行第二治疗的施用。在一些实施方案中,分析该动员的多个细胞包括测量与施用该Btk抑制剂之前的浓度相比该动员的多个细胞的外周血浓度增加的持续时间。在一些实施方案中,该方法进一步包括在该动员的多个细胞的外周血浓度已经增加预定时间长度后,施用第二治疗。在一些实施方案中,分析该动员的多个细胞包括对外周血中动员的多个细胞的数目进行计数。在一些实施方案中,该方法进一步包括在与施用Btk抑制剂之前的浓度相比外周血中动员的多个细胞的数目增加后,施用第二治疗。在一些实施方案中,在外周血中的动员的多个细胞的数目后续降低之后,进行第二治

疗的施用。在一些实施方案中,分析该动员的多个细胞包括测量与施用Btk抑制剂之前的数目相比在外周血中动员的多个细胞数目增加的持续时间。在一些实施方案中,该方法进一步包括在外周血中的动员的多个细胞的数目已经增加预定时间长度之后,施用第二治疗。在一些实施方案中,第二治疗是坦罗莫司。

[0216] 如本文所用的术语“套细胞淋巴瘤”是指B细胞淋巴瘤的一种亚型,它是由围绕正常生发中心滤泡的外套层内的CD5阳性的、未接触过抗原的生发中心前B细胞引起的。由于DNA中的t(11;14)染色体易位,MCL细胞通常过表达细胞周期蛋白D1。更具体地,该易位位于t(11;14)(q13;q32)。只有约5%的淋巴瘤属于这种类型。细胞是从小到中等大小。男性最常受到影响。患者的平均年龄是60岁出头。淋巴瘤在确诊时通常已广泛分布,累及淋巴结、骨髓,并且很常见的是累及脾脏。套细胞淋巴瘤不是生长非常快的淋巴瘤,但是难以治疗。

边缘区B细胞淋巴瘤

[0217] 在某些实施方案中,本文公开了一种在有需要的个体中治疗边缘区B细胞淋巴瘤的方法,其包括:(a)向该个体施用第一治疗,该第一治疗包含足以从该恶性肿瘤动员多个细胞的量的不可逆Btk抑制剂;(b)分析从该个体获得的样品中的动员的多个细胞;和(c)向该个体施用第二治疗。在一些实施方案中,该不可逆Btk抑制剂的量足以诱发来自该恶性肿瘤的多个细胞的淋巴细胞增多。在一些实施方案中,分析动员的多个细胞包括测量动员的多个细胞的外周血浓度。在一些实施方案中,该方法进一步包括,在与施用Btk抑制剂之前的浓度相比该动员的多个细胞的外周血浓度增加后,施用第二治疗。在一些实施方案中,在动员的多个细胞的外周血浓度后续降低后,进行第二治疗的施用。在一些实施方案中,分析该动员的多个细胞包括测量与施用该Btk抑制剂之前的浓度相比该动员的多个细胞的外周血浓度增加的持续时间。在一些实施方案中,该方法进一步包括在该动员的多个细胞的外周血浓度已经增加预定时间长度后,施用第二治疗。在一些实施方案中,分析该动员的多个细胞包括对外周血中动员的多个细胞的数目进行计数。在一些实施方案中,该方法进一步包括在与施用Btk抑制剂之前的浓度相比外周血中动员的多个细胞的数目增加后,施用第二治疗。在一些实施方案中,在外周血中的动员的多个细胞的数目后续降低之后,进行第二治疗的施用。在一些实施方案中,分析该动员的多个细胞包括测量与施用Btk抑制剂之前的数目相比在外周血中动员的多个细胞数目增加的持续时间。在一些实施方案中,该方法进一步包括在外周血中的动员的多个细胞的数目已经增加预定时间长度之后,施用第二治疗。

[0218] 如本文所用的术语“边缘区B细胞淋巴瘤”是指一组相关的B细胞肿瘤,其累及边缘区的淋巴样组织,边缘区即滤泡外套层外部的缀块状区域。边缘区淋巴瘤占淋巴瘤的大约5%至10%。这些淋巴瘤的细胞在显微镜下看起来很小。边缘区淋巴瘤有3种主要类型,包括结节外边缘区B细胞淋巴瘤、结节边缘区B细胞淋巴瘤和脾边缘区淋巴瘤。

MALT

[0219] 在某些实施方案中,本文公开了一种在有需要的个体中治疗MALT的方法,其包括:(a)向该个体施用第一治疗,该第一治疗包含足以从该恶性肿瘤动员多个细胞的量的不可逆Btk抑制剂;(b)分析从该个体获得的样品中的动员的多个细胞;和(c)向该个体施用第二治疗。在一些实施方案中,该不可逆Btk抑制剂的量足以诱发来自该恶性肿瘤的多个细胞的淋巴细胞增多。在一些实施方案中,分析动员的多个细胞包括测量动员的多个细胞的外周

血浓度。在一些实施方案中,该方法进一步包括,在与施用Btk抑制剂之前的浓度相比该动员的多个细胞的外周血浓度增加后,施用第二治疗。在一些实施方案中,在动员的多个细胞的外周血浓度后续降低后,进行第二治疗的施用。在一些实施方案中,分析该动员的多个细胞包括测量与施用该Btk抑制剂之前的浓度相比该动员的多个细胞的外周血浓度增加的持续时间。在一些实施方案中,该方法进一步包括在该动员的多个细胞的外周血浓度已经增加预定时间长度后,施用第二治疗。在一些实施方案中,分析该动员的多个细胞包括对外周血中动员的多个细胞的数目进行计数。在一些实施方案中,该方法进一步包括在与施用Btk抑制剂之前的浓度相比外周血中动员的多个细胞的数目增加后,施用第二治疗。在一些实施方案中,在外周血中的动员的多个细胞的数目后续降低之后,进行第二治疗的施用。在一些实施方案中,分析该动员的多个细胞包括测量与施用Btk抑制剂之前的数目相比在外周血中动员的多个细胞数目增加的持续时间。在一些实施方案中,该方法进一步包括在外周血中的动员的多个细胞的数目已经增加预定时间长度之后,施用第二治疗。

[0220] 如本文所用的术语“粘膜相关淋巴样组织 (MALT) 淋巴瘤”是指边缘区淋巴瘤的结节外临床表现形式。大多数MALT淋巴瘤是低度恶性的,尽管小部分最初表现为中度恶性的非霍奇金淋巴瘤 (NHL),或从低度恶性形式演变而来。大多数MALT淋巴瘤发生在胃部,大致70%的胃MALT淋巴瘤与幽门螺杆菌感染相关。已经确定了若干细胞遗传异常,其中最常见的是3号染色体三体或t(11;18)。这些其它MALT淋巴瘤中的许多也已经与细菌或病毒感染联系起来。MALT淋巴瘤患者的平均年龄为约60岁。

结节边缘区B细胞淋巴瘤

[0221] 在某些实施方案中,本文公开了一种在需要的个体中治疗结节边缘区B细胞淋巴瘤的方法,其包括:(a)向该个体施用第一治疗,该第一治疗包含足以从该恶性肿瘤动员多个细胞的量的不可逆Btk抑制剂;(b)分析从该个体获得的样品中的动员的多个细胞;和(c)向该个体施用第二治疗。在一些实施方案中,该不可逆Btk抑制剂的量足以诱发来自该恶性肿瘤的多个细胞的淋巴细胞增多。在一些实施方案中,分析动员的多个细胞包括测量动员的多个细胞的外周血浓度。在一些实施方案中,该方法进一步包括,在与施用Btk抑制剂之前的浓度相比该动员的多个细胞的外周血浓度增加后,施用第二治疗。在一些实施方案中,在动员的多个细胞的外周血浓度后续降低后,进行第二治疗的施用。在一些实施方案中,分析该动员的多个细胞包括测量与施用该Btk抑制剂之前的浓度相比该动员的多个细胞的外周血浓度增加的持续时间。在一些实施方案中,该方法进一步包括在该动员的多个细胞的外周血浓度已经增加预定时间长度后,施用第二治疗。在一些实施方案中,分析该动员的多个细胞包括对外周血中动员的多个细胞的数目进行计数。在一些实施方案中,该方法进一步包括在与施用Btk抑制剂之前的浓度相比外周血中动员的多个细胞的数目增加后,施用第二治疗。在一些实施方案中,在外周血中的动员的多个细胞的数目后续降低之后,进行第二治疗的施用。在一些实施方案中,分析该动员的多个细胞包括测量与施用Btk抑制剂之前的数目相比在外周血中动员的多个细胞数目增加的持续时间。在一些实施方案中,该方法进一步包括在外周血中的动员的多个细胞的数目已经增加预定时间长度之后,施用第二治疗。

[0222] 术语“结节边缘区B细胞淋巴瘤”是指多见于淋巴结中的进展缓慢的B细胞淋巴瘤。此疾病是罕见的,只占有非霍奇金淋巴瘤 (NHL) 的1%。最常见的是在老年患者中确诊,女

性比男性更易感。因为突变发生在B细胞的边缘区,所以此疾病被归类为边缘区淋巴瘤。由于其限制在淋巴结中,此疾病也被归类为结节淋巴瘤。

脾边缘区B细胞淋巴瘤

[0223] 在某些实施方案中,本文公开了一种用于在有需要的个体中治疗脾边缘区B细胞淋巴瘤的方法,其包括:(a)向该个体施用第一治疗,该第一治疗包含足以从该恶性肿瘤动员多个细胞的量的不可逆Btk抑制剂;(b)分析从该个体获得的样品中的动员的多个细胞;和(c)向该个体施用第二治疗。在一些实施方案中,该不可逆Btk抑制剂的量足以诱发来自该恶性肿瘤的多个细胞的淋巴细胞增多。在一些实施方案中,分析动员的多个细胞包括测量动员的多个细胞的外周血浓度。在一些实施方案中,该方法进一步包括,在与施用Btk抑制剂之前的浓度相比该动员的多个细胞的外周血浓度增加后,施用第二治疗。在一些实施方案中,在动员的多个细胞的外周血浓度后续降低后,进行第二治疗的施用。在一些实施方案中,分析该动员的多个细胞包括测量与施用该Btk抑制剂之前的浓度相比该动员的多个细胞的外周血浓度增加的持续时间。在一些实施方案中,该方法进一步包括在该动员的多个细胞的外周血浓度已经增加预定时间长度后,施用第二治疗。在一些实施方案中,分析该动员的多个细胞包括对外周血中动员的多个细胞的数目进行计数。在一些实施方案中,该方法进一步包括在与施用Btk抑制剂之前的浓度相比外周血中动员的多个细胞的数目增加后,施用第二治疗。在一些实施方案中,在外周血中的动员的多个细胞的数目后续降低之后,进行第二治疗的施用。在一些实施方案中,分析该动员的多个细胞包括测量与施用Btk抑制剂之前的数目相比在外周血中动员的多个细胞数目增加的持续时间。在一些实施方案中,该方法进一步包括在外周血中的动员的多个细胞的数目已经增加预定时间长度之后,施用第二治疗。

[0224] 术语“脾边缘区B细胞淋巴瘤”是指世界卫生组织(World Health Organization)分类中所含的特定的低度恶性小B细胞淋巴瘤。特有的特征在于脾肿大,具有绒毛形态的中度淋巴细胞增多,累及多个器官尤其是骨髓的窦状腺内模式,以及病程相对进展缓慢。在少数患者中观察到肿瘤进展伴随着母细胞形式(blastic form)和侵袭性行为增多。分子和细胞遗传学研究显示出不一致的结果,这可能是因为缺乏规范化的诊断标准。

伯基特淋巴瘤

[0225] 在某些实施方案中,本文公开了一种在有需要的个体中治疗伯基特淋巴瘤的方法,其包括:(a)向该个体施用第一治疗,该第一治疗包含足以从该恶性肿瘤动员多个细胞的量的不可逆Btk抑制剂;(b)分析从该个体获得的样品中的动员的多个细胞;和(c)向该个体施用第二治疗。在一些实施方案中,该不可逆Btk抑制剂的量足以诱发来自该恶性肿瘤的多个细胞的淋巴细胞增多。在一些实施方案中,分析动员的多个细胞包括测量动员的多个细胞的外周血浓度。在一些实施方案中,该方法进一步包括,在与施用Btk抑制剂之前的浓度相比该动员的多个细胞的外周血浓度增加后,施用第二治疗。在一些实施方案中,在动员的多个细胞的外周血浓度后续降低后,进行第二治疗的施用。在一些实施方案中,分析该动员的多个细胞包括测量与施用该Btk抑制剂之前的浓度相比该动员的多个细胞的外周血浓度增加的持续时间。在一些实施方案中,该方法进一步包括在该动员的多个细胞的外周血浓度已经增加预定时间长度后,施用第二治疗。在一些实施方案中,分析该动员的多个细胞包括对外周血中动员的多个细胞的数目进行计数。在一些实施方案中,该方法进一步包括

在与施用Btk抑制剂之前的浓度相比外周血中动员的多个细胞的数目增加后,施用第二治疗。在一些实施方案中,在外周血中的动员的多个细胞的数目后续降低之后,进行第二治疗的施用。在一些实施方案中,分析该动员的多个细胞包括测量与施用Btk抑制剂之前的数目相比在外周血中动员的多个细胞数目增加的持续时间。在一些实施方案中,该方法进一步包括在外周血中的动员的多个细胞的数目已经增加预定时间长度之后,施用第二治疗。

[0226] 术语“伯基特淋巴瘤”是指一类通常影响儿童的非霍奇金淋巴瘤(NHL)。它是一类高度侵袭性的B型细胞淋巴瘤,通常起始于并累及淋巴结以外的身体部位。伯基特淋巴瘤尽管具有快速生长的性质,但是用现代的强化治疗通常是可以治愈的。伯基特淋巴瘤有两大类型——散发性和地方性类型。

[0227] 地方性伯基特淋巴瘤:该疾病涉及儿童远多于成人,并且在95%的病例中与EB病毒(EBV)感染相关。它主要发生在赤道非洲地区,在这里所有儿童癌症中约一半是伯基特淋巴瘤。它特征性地具有累及颞骨的高几率,这是在散发性伯基特淋巴瘤中罕见的区别性特征。它通常也累及腹部。

[0228] 散发性伯基特淋巴瘤:影响世界其它地区(包括欧洲和美洲)的伯基特淋巴瘤类型是散发性类型。同样,这也主要是儿童中的疾病。它与EB病毒(EBV)之间的关联性不如地方性类型强,尽管五分之一的患者中存在EBV感染的直接证据。除了累及淋巴结,在超过90%的儿童中,显著受到影响的是腹部。骨髓累及比在散发性类型中更为常见。

瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症

[0229] 在某些实施方案中,本文公开了一种用于在有需要的个体中治疗瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症的方法,其包括:(a)向该个体施用第一治疗,该第一治疗包含足以从该恶性肿瘤动员多个细胞的量的不可逆Btk抑制剂;(b)分析从该个体获得的样品中的动员的多个细胞;和(c)向该个体施用第二治疗。在一些实施方案中,该不可逆Btk抑制剂的量足以诱发来自该恶性肿瘤的多个细胞的淋巴细胞增多。在一些实施方案中,分析动员的多个细胞包括测量动员的多个细胞的外周血浓度。在一些实施方案中,该方法进一步包括,在与施用Btk抑制剂之前的浓度相比该动员的多个细胞的外周血浓度增加后,施用第二治疗。在一些实施方案中,在动员的多个细胞的外周血浓度后续降低后,进行第二治疗的施用。在一些实施方案中,分析该动员的多个细胞包括测量与施用该Btk抑制剂之前的浓度相比该动员的多个细胞的外周血浓度增加的持续时间。在一些实施方案中,该方法进一步包括在该动员的多个细胞的外周血浓度已经增加预定时间长度后,施用第二治疗。在一些实施方案中,分析该动员的多个细胞包括对外周血中动员的多个细胞的数目进行计数。在一些实施方案中,该方法进一步包括在与施用Btk抑制剂之前的浓度相比外周血中动员的多个细胞的数目增加后,施用第二治疗。在一些实施方案中,在外周血中的动员的多个细胞的数目后续降低之后,进行第二治疗的施用。在一些实施方案中,分析该动员的多个细胞包括测量与施用Btk抑制剂之前的数目相比在外周血中动员的多个细胞数目增加的持续时间。在一些实施方案中,该方法进一步包括在外周血中的动员的多个细胞的数目已经增加预定时间长度之后,施用第二治疗。在一些实施方案中,第二治疗是利妥昔单抗、环磷酰胺、盐酸多柔比星、硫酸长春新碱和泼尼松(R-CHOP)。

[0230] 术语“瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症”,也称为淋巴浆细胞性淋巴瘤,是涉及到被称为淋巴细胞的白细胞亚型的癌症。其特征在于终末分化的B淋巴细胞的不受控制的克隆增

殖。其特征还在于产生被称为免疫球蛋白M (IgM) 的抗体的淋巴瘤细胞。IgM抗体大量在血液中循环,并导致血液的液体部分增稠,像糖浆一样。这可导致流向许多器官的血流减少,这可引起视力方面的问题(因为眼睛后部血管中的循环较差),以及由于脑部血流不畅引起神经方面的问题(如头痛、头晕和意识错乱)。其它症状可包括感到疲倦和虚弱,和容易出血的倾向。根本的病因尚未完全了解,但已经确定了一些危险因素,包括6号染色体上的基因座6p21.3。有自身免疫疾病个人病史、具有自身抗体的人患WM的风险增加2至3倍,患有肝炎、人免疫缺陷病毒、立克次体病的人的风险尤其增加。

多发性骨髓瘤

[0231] 在某些实施方案中,本文公开了一种在有需要的个体中治疗骨髓瘤的方法,其包括:(a)向该个体施用第一治疗,该第一治疗包含足以从该恶性肿瘤动员多个细胞的量的不可逆Btk抑制剂;(b)分析从该个体获得的样品中的动员的多个细胞;和(c)向该个体施用第二治疗。在一些实施方案中,该不可逆Btk抑制剂的量足以诱发来自该恶性肿瘤的多个细胞的淋巴细胞增多。在一些实施方案中,分析动员的多个细胞包括测量动员的多个细胞的外周血浓度。在一些实施方案中,该方法进一步包括,在与施用Btk抑制剂之前的浓度相比该动员的多个细胞的外周血浓度增加后,施用第二治疗。在一些实施方案中,在动员的多个细胞的外周血浓度后续降低后,进行第二治疗的施用。在一些实施方案中,分析该动员的多个细胞包括测量与施用该Btk抑制剂之前的浓度相比该动员的多个细胞的外周血浓度增加的持续时间。在一些实施方案中,该方法进一步包括在该动员的多个细胞的外周血浓度已经增加预定时间长度后,施用第二治疗。在一些实施方案中,分析该动员的多个细胞包括对外周血中动员的多个细胞的数目进行计数。在一些实施方案中,该方法进一步包括在与施用Btk抑制剂之前的浓度相比外周血中动员的多个细胞的数目增加后,施用第二治疗。在一些实施方案中,在外周血中的动员的多个细胞的数目后续降低之后,进行第二治疗的施用。在一些实施方案中,分析该动员的多个细胞包括测量与施用Btk抑制剂之前的数目相比在外周血中动员的多个细胞数目增加的持续时间。在一些实施方案中,该方法进一步包括在外周血中的动员的多个细胞的数目已经增加预定时间长度之后,施用第二治疗。在一些实施方案中,第二治疗是来那度胺。

[0232] 多发性骨髓瘤,也称为MM、骨髓瘤、浆细胞骨髓瘤,或称为卡勒氏病(取名于Otto Kahler),是一种被称为浆细胞的白细胞的癌症。一类B细胞,即浆细胞,是人类和其它脊椎动物中负责产生抗体的免疫系统的重要部分。它们在骨髓中生成并通过淋巴系统运送。

白血病

[0233] 在某些实施方案中,本文公开了一种在有需要的个体中治疗白血病的方法,其包括:(a)向该个体施用第一治疗,该第一治疗包含足以从该恶性肿瘤动员多个细胞的量的不可逆Btk抑制剂;(b)分析从该个体获得的样品中的动员的多个细胞;和(c)向该个体施用第二治疗。在一些实施方案中,该不可逆Btk抑制剂的量足以诱发来自该恶性肿瘤的多个细胞的淋巴细胞增多。在一些实施方案中,分析动员的多个细胞包括测量动员的多个细胞的外周血浓度。在一些实施方案中,该方法进一步包括,在与施用Btk抑制剂之前的浓度相比该动员的多个细胞的外周血浓度增加后,施用第二治疗。在一些实施方案中,在动员的多个细胞的外周血浓度后续降低后,进行第二治疗的施用。在一些实施方案中,分析该动员的多个细胞包括测量与施用该Btk抑制剂之前的浓度相比该动员的多个细胞的外周血浓度增加的

持续时间。在一些实施方案中,该方法进一步包括在该动员的多个细胞的外周血浓度已经增加预定时间长度后,施用第二治疗。在一些实施方案中,分析该动员的多个细胞包括对外周血中动员的多个细胞的数目进行计数。在一些实施方案中,该方法进一步包括在与施用Btk抑制剂之前的浓度相比外周血中动员的多个细胞的数目增加后,施用第二治疗。在一些实施方案中,在外周血中的动员的多个细胞的数目后续降低之后,进行第二治疗的施用。在一些实施方案中,分析该动员的多个细胞包括测量与施用Btk抑制剂之前的数目相比在外周血中动员的多个细胞数目增加的持续时间。在一些实施方案中,该方法进一步包括在外周血中的动员的多个细胞的数目已经增加预定时间长度之后,施用第二治疗。

[0234] 白血病是一种血液或骨髓癌症,其特征血细胞,通常是白血球(白细胞)的异常增加。白血病是一个涵盖一系列疾病的广义术语。第一级划分是其急性和慢性形式:(i) 急性白血病的特征在于未成熟血细胞的快速增多。这种拥挤使得骨髓无法产生健康的血细胞。急性白血病需要立即治疗,因为恶性细胞会迅速发展并积累,随后蔓延到血流中,并扩散至身体的其它器官。白血病的急性形式是儿童白血病的最常见的形式;(ii) 慢性白血病的特征在于相对成熟但仍异常的白细胞的过度积聚。其进展通常需要数月或数年,这些细胞以比正常细胞高得多的速度产生,导致血液中存在许多异常白细胞。慢性白血病大多发生于老年人中,但理论上可以在任何年龄组中发生。此外,根据受影响的血细胞种类,可细分该疾病。这种区分将白血病分成淋巴母细胞性或淋巴细胞性白血病和髓样或髓性白血病:(i) 淋巴母细胞性或淋巴细胞性白血病,癌变发生于一类通常继续形成淋巴细胞的骨髓细胞中,淋巴细胞是抗击感染的免疫系统细胞;(ii) 髓样或髓性白血病,癌变发生在一类通常继续形成红细胞、一些其它类型的白细胞和血小板的骨髓细胞中。

[0235] 在这些主要类别中,存在几个亚类,包括但不限于急性淋巴母细胞性白血病(ALL)、急性髓性白血病(AML)、慢性髓性白血病(CML)和毛细胞性白血病(HCL)。

Btk抑制剂

[0236] 本文还提出了用于在受试者中治疗癌症(例如,仅举例来说,BCLD)的方法,其中该受试者已利用Btk抑制剂给药进行过治疗。在以下对适用于本文所述方法的不可逆Btk化合物的描述中,涉及的标准化学术语的定义可以在文献著作中找到(如果本文中并没有另外定义的话),包括Carey和Sundberg的“Advanced Organic Chemistry第四版”四A卷(2000)和B卷(2001),Plenum Press,New York。除非另有说明,否则采用本领域普通技术范围内的质谱法、NMR、HPLC、蛋白质化学、生物化学、重组DNA技术和药理学等常规方法。另外,Btk(例如人Btk)的核酸和氨基酸序列是本领域已知的,例如公开在美国专利号6,326,469中。除非提供具体的定义,否则与本文描述的分析化学、有机合成化学以及药物和制药化学关联使用的命名及其实验室程序和技术都是本领域已知的。标准技术可以用于化学合成、化学分析、药物制备、配制和递送以及患者的治疗。

[0237] 本文描述的Btk抑制剂化合物对于Btk和在酪氨酸激酶的氨基酸序列位置中具有半胱氨酸残基的激酶具有选择性,所述酪氨酸激酶与Btk中的半胱氨酸481的氨基酸序列位置是同源的。通常,在本文描述的方法中使用的Btk的不可逆抑制剂化合物在体外试验例如无细胞生物化学试验或细胞功能试验中进行鉴定或表征。这类试验可用于测定不可逆Btk抑制剂化合物的体外IC₅₀。

[0238] 例如,无细胞激酶试验可以用来存在或不存在一定浓度范围的候选不可逆Btk

抑制剂化合物的情况下温育激酶后确定Btk活性。如果候选化合物实际上是不可逆Btk抑制剂,则通过使用不含抑制剂的培养基反复洗涤,Btk激酶活性将不会恢复。参见,例如J.B.Smaill等(1999),J.Med.Chem.42(10):1803-1815。再者,Btk和候选不可逆Btk抑制剂之间共价复合物的形成是Btk的不可逆抑制的有用指示,其可以通过本领域已知的许多方法(例如质谱法)容易地确定。例如,一些不可逆Btk-抑制剂化合物能与Btk的Cys 481形成共价键(例如通过迈克尔反应)。

[0239] 针对Btk抑制作用的细胞功能试验包括在存在或不存在一定浓度范围的候选不可逆Btk抑制剂化合物的情况下,测定响应于在细胞系中刺激Btk介导的途径(例如,Ramos细胞中的BCR活化)的一种或多种细胞终点。用于确定对BCR活化作用的响应的有用终点包括,例如,Btk的自磷酸化、Btk靶蛋白(例如,PLC- γ)的磷酸化和胞质钙通量。

[0240] 用于许多无细胞生化试验(例如激酶试验)和细胞功能试验(例如钙通量)的高通量试验是本领域普通技术人员所熟知的。另外,高通量筛选系统是可商业购买的(参见,例如Zymark Corp.,Hopkinton,MA;Air Technical Industries,Mentor,OH;Beckman Instruments,Inc.Fullerton,CA;Precision Systems,Inc.,Natick,MA等)。这些系统一般使全部程序自动化,包括所有样品和试剂的吸移、液体分配、计时温育和在适合该试验的检测器中对微量板的最终读数。自动化系统因此允许对大量不可逆Btk化合物进行鉴定和表征,而无需过多的劳动。

[0241] 在一些实施方案中,所述Btk抑制剂选自有机小分子、大分子、肽或非肽。

[0242] 在一些实施方案中,本文提供的Btk抑制剂是可逆的或不可逆的抑制剂。在某些实施方案中,该Btk抑制剂是不可逆抑制剂。

[0243] 在一些实施方案中,不可逆Btk抑制剂与布鲁顿酪氨酸激酶、布鲁顿酪氨酸激酶同源物或Btk酪氨酸激酶半胱氨酸同源物的半胱氨酸侧链形成共价键。

[0244] 不可逆Btk抑制剂化合物可用于制备治疗任何前述状况(例如,自身免疫疾病、炎症性疾病、变态反应疾病、B细胞增殖性疾病或血栓栓塞病症)的药物。

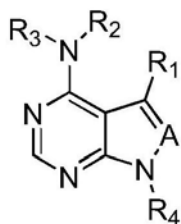
[0245] 在一些实施方案中,用于本文所述方法的不可逆Btk抑制剂化合物抑制Btk或Btk同源物激酶活性,其体外IC₅₀小于10 μ M(例如,小于1 μ M、小于0.5 μ M、小于0.4 μ M、小于0.3 μ M、小于0.1 μ M、小于0.08 μ M、小于0.06 μ M、小于0.05 μ M、小于0.04 μ M、小于0.03 μ M、小于0.02 μ M、小于0.01 μ M、小于0.008 μ M、小于0.006 μ M、小于0.005 μ M、小于0.004 μ M、小于0.003 μ M、小于0.002 μ M、小于0.001 μ M、小于0.00099 μ M、小于0.00098 μ M、小于0.00097 μ M、小于0.00096 μ M、小于0.00095 μ M、小于0.00094 μ M、小于0.00093 μ M、小于0.00092或小于0.00090 μ M)。

[0246] 在一个实施方案中,不可逆Btk抑制剂化合物选择性地并且不可逆地抑制其目标酪氨酸激酶的活化形式(例如,酪氨酸激酶的磷酸化形式)。例如,活化的Btk在酪氨酸551处被转磷酸化。因此,在这些实施方案中,不可逆Btk抑制剂仅在目标激酶被信号传导事件激活时抑制细胞中的目标激酶。

[0247] 在其它实施方案中,在本文所述的方法中使用的Btk抑制剂具有式(A)、式(B)、式(C)、式(D)、式(E)或式(F)中的任一种的结构。本文还描述了此类化合物的药学上可接受的盐、药学上可接受的溶剂化物、药学活性代谢物和药学上可接受的前药。提供了药物组合物,其包含至少一种这样的化合物或这种化合物的药学上可接受的盐、药学上可接受的溶剂化物、药学活性代谢物或药学上可接受的前药。在一些实施方案中,当本文公开的化合物

含有可氧化的氮原子时,可用本领域所熟知的方法将该氮原子转化为N-氧化物。在某些实施方案中,还提供了具有式(A)、式(B)、式(C)、式(D)、式(E)或式(F)中的任一种所代表的结构的化合物的异构体和化学保护形式。

[0248] 式(A)如下:



式(A)

其中:

A独立地选自N或CR₅;

R₁是H、L₂- (取代的或未取代的烷基)、L₂- (取代的或未取代的环烷基)、L₂- (取代的或未取代的烯基)、L₂- (取代的或未取代的环烯基)、L₂- (取代的或未取代的杂环)、L₂- (取代的或未取代的杂芳基)或L₂- (取代的或未取代的芳基),其中L₂是键、O、S、-S(=O)、-S(=O)₂、C(=O)、-(取代的或未取代的C₁-C₆烷基)或-(取代的或未取代的C₂-C₆烯基);

R₂和R₃独立地选自H、低级烷基和取代的低级烷基;

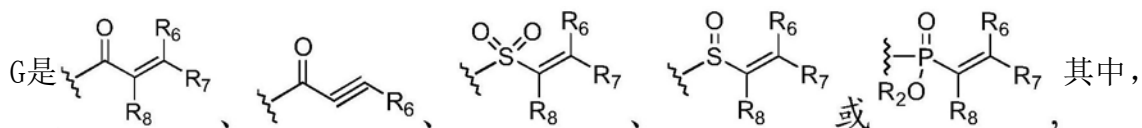
R₄是L₃-X-L₄-G,其中,

L₃是任选的,并且当存在时是键、任选地取代的或未取代的烷基、任选地取代的或未取代的环烷基、任选地取代的或未取代的烯基、任选地取代的或未取代的炔基;

X是任选的,并且当存在时是键、O、-C(=O)、S、-S(=O)、-S(=O)₂、-NH、-NR₉、-NHC(O)、-C(O)NH、-NR₉C(O)、-C(O)NR₉、-S(=O)₂NH、-NHS(=O)₂、-S(=O)₂NR₉、-NR₉S(=O)₂、-OC(O)NH、-NHC(O)O、-OC(O)NR₉、-NR₉C(O)O、-CH=NO、-ON=CH、-NR₁₀C(O)NR₁₀、杂芳基、芳基、-NR₁₀C(=NR₁₁)NR₁₀、-NR₁₀C(=NR₁₁)、-C(=NR₁₁)NR₁₀、-OC(=NR₁₁)或-C(=NR₁₁)O-

L₄是任选的,并且当存在时是键、取代的或未取代的烷基、取代的或未取代的环烷基、取代的或未取代的烯基、取代的或未取代的炔基、取代的或未取代的芳基、取代的或未取代的杂芳基、取代的或未取代的杂环;

或L₃、X和L₄一起形成含氮的杂环状环;



R₆、R₇和R₈独立地选自H、低级烷基或取代的低级烷基、低级杂烷基或取代的低级杂烷基、取代的或未取代的低级环烷基和取代的或未取代的低级杂环烷基;

R₅是H、卤素、-L₆- (取代的或未取代的C₁-C₃烷基)、-L₆- (取代的或未取代的C₂-C₄烯基)、-L₆- (取代的或未取代的杂芳基)或-L₆- (取代的或未取代的芳基),其中L₆是键、O、S、-S(=O)、S(=O)₂、NH、C(O)、-NHC(O)O、-OC(O)NH、-NHC(O)或-C(O)NH;

每个R₉独立地选自H、取代的或未取代的低级烷基和取代的或未取代的低级环烷基;

每个 R_{10} 独立地为H、取代的或未取代的低级烷基或取代的或未取代的低级环烷基；或者

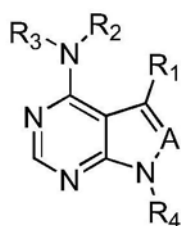
两个 R_{10} 基团可一起形成5、6、7或8元杂环状环；或者

R_9 和 R_{10} 可一起形成5、6、7或8元杂环状环；或者

每个 R_{11} 独立地选自H、 $-S(=O)_2R_8$ 、 $-S(=O)_2NH_2$ 、 $-C(=O)R_8$ 、 $-CN$ 、 $-NO_2$ 、杂芳基或杂烷基；

及其药学活性代谢物、药学上可接受的溶剂化物、药学上可接受的盐或药学上可接受的前药。

[0249] 在一个方面为具有式(A1)结构的化合物：



式(A1),

其中

A独立地选自N或 CR_5 ；

R_1 是H、 L_2 -（取代的或未取代的烷基）、 L_2 -（取代的或未取代的环烷基）、 L_2 -（取代的或未取代的烯基）、 L_2 -（取代的或未取代的环烯基）、 L_2 -（取代的或未取代的杂环）、 L_2 -（取代的或未取代的杂芳基）或 L_2 -（取代的或未取代的芳基），其中 L_2 是键、O、S、 $-S(=O)$ 、 $-S(=O)_2$ 、 $C(=O)$ 、-（取代的或未取代的 C_1 - C_6 烷基）或-（取代的或未取代的 C_2 - C_6 烯基）；

R_2 和 R_3 独立地选自H、低级烷基和取代的低级烷基；

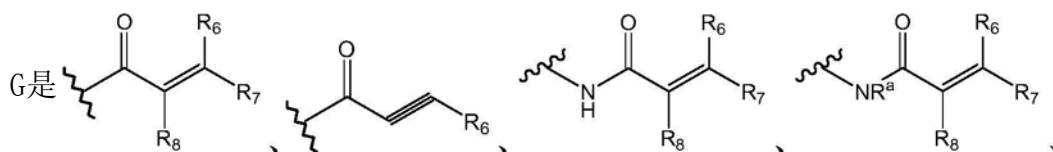
R_4 是 L_3 -X- L_4 -G，其中，

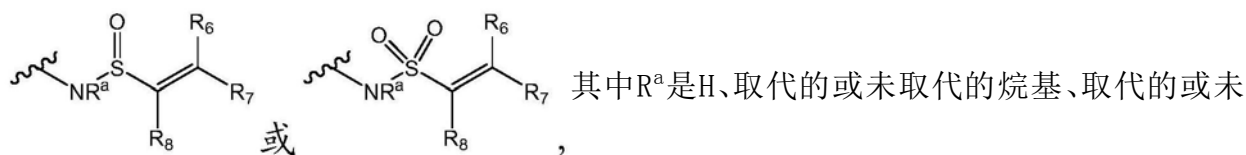
L_3 是任选的，并且当存在时是键，或任选取代的选自烷基、杂烷基、芳基、杂芳基、烷基芳基、烷基杂芳基或烷基杂环烷基的基团；

X是任选的，并且当存在时是键、O、 $-C(=O)$ 、S、 $-S(=O)$ 、 $-S(=O)_2$ 、 $-NH$ 、 $-NR_9$ 、 $-NHC(=O)$ 、 $-C(=O)NH$ 、 $-NR_9C(=O)$ 、 $-C(=O)NR_9$ 、 $-S(=O)_2NH$ 、 $-NHS(=O)_2$ 、 $-S(=O)_2NR_9$ 、 $-NR_9S(=O)_2$ 、 $-OC(=O)NH$ 、 $-NHC(=O)O$ 、 $-OC(=O)NR_9$ 、 $-NR_9C(=O)O$ 、 $-CH=NO$ 、 $-ON=CH$ 、 $-NR_{10}C(=O)NR_{10}$ 、杂芳基、芳基、 $-NR_{10}C(=NR_{11})NR_{10}$ 、 $-NR_{10}C(=NR_{11})$ 、 $-C(=NR_{11})NR_{10}$ 、 $-OC(=NR_{11})$ 或 $-C(=NR_{11})O$ ；

L_4 是任选的，并且当存在时是键、取代的或未取代的烷基、取代的或未取代的环烷基、取代的或未取代的烯基、取代的或未取代的炔基、取代的或未取代的芳基、取代的或未取代的杂芳基、取代的或未取代的杂环；

或者 L_3 、X和 L_4 一起形成含氮的杂环状环，或任选取代的选自烷基、杂烷基、芳基、杂芳基、烷基芳基、烷基杂芳基或烷基杂环烷基的基团；





R_6 是H、取代的或未取代的 C_1 - C_4 烷基、取代的或未取代的 C_1 - C_4 杂烷基、 C_1 - C_8 烷基氨基烷基、 C_1 - C_8 羟烷基氨基烷基、 C_1 - C_8 烷氧基烷基氨基烷基、取代的或未取代的 C_3 - C_6 环烷基、取代的或未取代的 C_1 - C_8 烷基 C_3 - C_6 环烷基、取代的或未取代的芳基、取代的或未取代的 C_2 - C_8 杂环烷基、取代的或未取代的杂芳基、 C_1 - C_4 烷基(芳基)、 C_1 - C_4 烷基(杂芳基)、 C_1 - C_8 烷基醚、 C_1 - C_8 烷基酰胺或 C_1 - C_4 烷基(C_2 - C_8 杂环烷基)；

R_6 和 R_8 为H；

R_7 是H、取代的或未取代的 C_1 - C_4 烷基、取代的或未取代的 C_1 - C_4 杂烷基、 C_1 - C_8 烷基氨基烷基、 C_1 - C_8 羟烷基氨基烷基、 C_1 - C_8 烷氧基烷基氨基烷基、取代的或未取代的 C_3 - C_6 环烷基、取代的或未取代的 C_1 - C_8 烷基 C_3 - C_6 环烷基、取代的或未取代的芳基、取代的或未取代的 C_2 - C_8 杂环烷基、取代的或未取代的杂芳基、 C_1 - C_4 烷基(芳基)、 C_1 - C_4 烷基(杂芳基)、 C_1 - C_8 烷基醚、 C_1 - C_8 烷基酰胺或 C_1 - C_4 烷基(C_2 - C_8 杂环烷基)；或者

R_6 和 R_8 一起形成键；

R_7 是H、取代的或未取代的 C_1 - C_4 烷基、取代的或未取代的 C_1 - C_4 杂烷基、 C_1 - C_8 烷基氨基烷基、 C_1 - C_8 羟烷基氨基烷基、 C_1 - C_8 烷氧基烷基氨基烷基、取代的或未取代的 C_3 - C_6 环烷基、取代的或未取代的 C_1 - C_8 烷基 C_3 - C_6 环烷基、取代的或未取代的芳基、取代的或未取代的 C_2 - C_8 杂环烷基、取代的或未取代的杂芳基、 C_1 - C_4 烷基(芳基)、 C_1 - C_4 烷基(杂芳基)、 C_1 - C_8 烷基醚、 C_1 - C_8 烷基酰胺或 C_1 - C_4 烷基(C_2 - C_8 杂环烷基)；或者

R_5 是H、卤素、 $-L_6-$ (取代的或未取代的 C_1 - C_3 烷基)、 $-L_6-$ (取代的或未取代的 C_2 - C_4 烯基)、 $-L_6-$ (取代的或未取代的杂芳基)或 $-L_6-$ (取代的或未取代的芳基)、其中 L_6 是键、O、S、 $-S(=O)$ 、 $S(=O)_2$ 、NH、C(O)、 $-NHC(O)O$ 、 $-OC(O)NH$ 、 $-NHC(O)$ 或 $-C(O)NH$ ；

每个 R_9 独立地选自H、取代的或未取代的低级烷基和取代的或未取代的低级环烷基；

每个 R_{10} 独立地为H、取代的或未取代的低级烷基或取代的或未取代的低级环烷基；或者

两个 R_{10} 基团可一起形成5、6、7或8元杂环状环；或者

R_9 和 R_{10} 可一起形成5、6、7或8元杂环状环；或者

每个 R_{11} 独立地选自H、 $-S(=O)_2R_8$ 、 $-S(=O)_2NH_2$ 、 $-C(O)R_8$ 、 $-CN$ 、 $-NO_2$ 、杂芳基或杂烷基；及其药学活性代谢物、药学上可接受的溶剂化物、药学上可接受的盐或药学上可接受的前药。

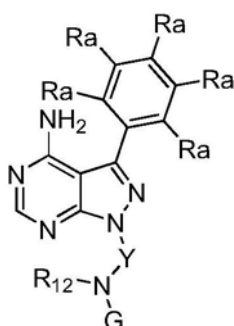
[0250] 在另一个实施方案中，提供了式(A1)化合物的药学上可接受的盐。仅举例来说，是氨基与诸如盐酸、氢溴酸、磷酸、硫酸和高氯酸等无机酸或与诸如乙酸、草酸、马来酸、酒石酸、柠檬酸、琥珀酸或丙二酸等有机酸形成的盐。更多的盐包括其中抗衡离子是阴离子的盐，例如己二酸盐、藻酸盐、抗坏血酸盐、天冬氨酸盐、苯磺酸盐、苯甲酸盐、硫酸氢盐、硼酸盐、丁酸盐、樟脑酸盐、樟脑磺酸盐、柠檬酸盐、环戊烷丙酸盐、二葡萄糖酸盐、十二烷基硫酸盐、乙磺酸盐、甲酸盐、富马酸盐、葡庚糖酸盐、甘油磷酸盐、葡萄糖酸盐、半硫酸盐、庚酸盐、己

酸盐、氢碘酸盐、2-羟基-乙磺酸盐、乳糖醛酸盐、乳酸盐、月桂酸盐、月桂基硫酸盐、苹果酸盐、马来酸盐、丙二酸盐、甲烷磺酸盐、2-萘磺酸盐、烟酸盐、硝酸盐、油酸盐、草酸盐、棕榈酸盐、双羟萘酸盐、果胶酸盐、过硫酸盐、3-苯基丙酸盐、磷酸盐、苦味酸盐、三甲基乙酸盐、丙酸盐、硬脂酸盐、琥珀酸盐、硫酸盐、酒石酸盐、硫氰酸盐、对甲苯磺酸盐、十一酸盐和戊酸盐。更多的盐包括其中抗衡离子是诸如钠、锂、钾、钙、镁、铵和季铵(被至少一个有机部分取代的)阳离子等阳离子的盐。

[0251] 在另一个实施方案中是式(A1)化合物的药学上可接受的酯,包括其中酯基团选自甲酸酯、乙酸酯、丙酸酯、丁酸酯、丙烯酸酯和乙基琥珀酸酯的那些酯。

[0252] 在另一个实施方案中是式(A1)化合物的药学上可接受的氨基甲酸酯。在另一个实施方案中是式(A1)化合物的药学上可接受的N-酰基衍生物。N-酰基的实例包括N-乙酰基和N-乙氧羰基。

[0253] 在进一步的实施方案中,式(A)化合物具有以下式(B)的结构:

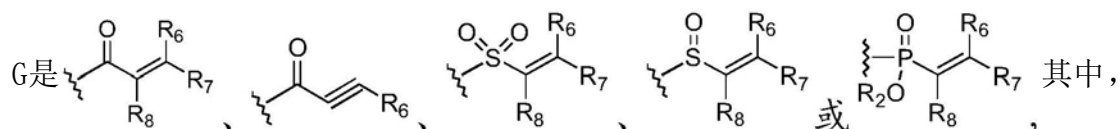


式(B)

其中:

Y是烷基或取代的烷基或4元、5元或6元环烷基环;

每个Ra独立地为H、卤素、-CF₃、-CN、-NO₂、OH、NH₂、-La- (取代的或未取代的烷基)、-La- (取代的或未取代的烯基)、-La- (取代的或未取代的杂芳基) 或 -La- (取代的或未取代的芳基), 其中La是键、O、S、-S(=O)、-S(=O)₂、NH、C(O)、CH₂、-NHC(O)O、-NHC(O) 或 -C(O)NH;



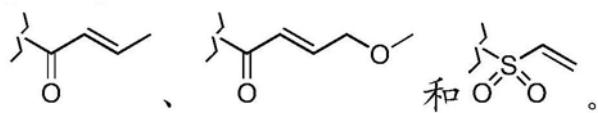
R₆、R₇和R₈独立地选自H、低级烷基或取代的低级烷基、低级杂烷基或取代的低级杂烷基、取代的或未取代的低级环烷基和取代的或未取代的低级杂环烷基;

R₁₂是氢或低级烷基;或者

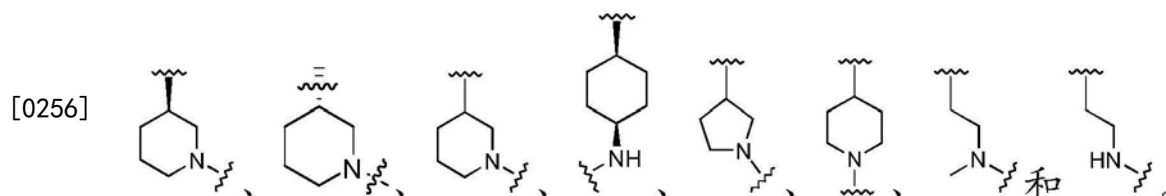
Y和R₁₂一起形成4元、5元或6元杂环状环;以及

其药学上可接受的活性代谢物、药学上可接受的溶剂化物、药学上可接受的盐或药学上可接受的前药。

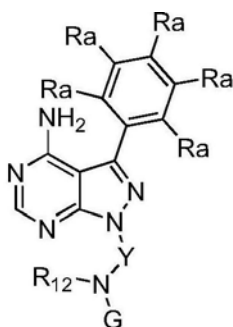
[0254] 在进一步的实施方案中, G选自



[0255] 在进一步的实施方案中， $\text{Y}-\text{N}-\text{R}_{12}$ 选自



[0257] 在进一步的实施方案中，式 (A1) 的化合物具有以下式 (B1) 的结构：

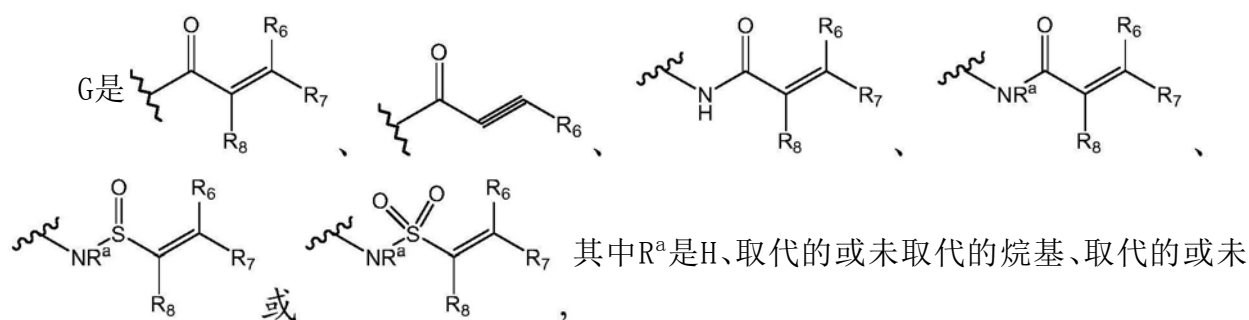


式 (B1)，

其中：

Y 是任选取代的选自亚烷基、亚杂烷基、亚芳基、亚杂芳基、亚烷基亚芳基、亚烷基亚杂芳基和亚烷基亚杂环烷基的基团；

每个 Ra 独立地为 H 、卤素、 $-\text{CF}_3$ 、 $-\text{CN}$ 、 $-\text{NO}_2$ 、 OH 、 NH_2 、 $-\text{La}-$ (取代的或未取代的烷基)、 $-\text{La}-$ (取代的或未取代的烯基)、 $-\text{La}-$ (取代的或未取代的杂芳基) 或 $-\text{La}-$ (取代的或未取代的芳基)，其中 La 是键、 O 、 S 、 $-\text{S}(=\text{O})$ 、 $-\text{S}(=\text{O})_2$ 、 NH 、 $\text{C}(\text{O})$ 、 CH_2 、 $-\text{NHC}(\text{O})\text{O}$ 、 $-\text{NHC}(\text{O})$ 或 $-\text{C}(\text{O})\text{NH}$ ；



取代的环烷基；并且，或者

R_7 和 R_8 是 H ；

R_6 是 H 、取代的或未取代的 C_1 - C_4 烷基、取代的或未取代的 C_1 - C_4 杂烷基、 C_1 - C_8 烷基氨基烷基、 C_1 - C_8 羟烷基氨基烷基、 C_1 - C_8 烷氧基烷基氨基烷基、取代的或未取代的 C_3 - C_6 环烷基、取代的或未取代的 C_1 - C_8 烷基 C_3 - C_6 环烷基、取代的或未取代的芳基、取代的或未取代的 C_2 - C_8 杂环烷基、取代的或未取代的杂芳基、 C_1 - C_4 烷基 (芳基)、 C_1 - C_4 烷基 (杂芳基)、 C_1 - C_8 烷基醚、 C_1 - C_8

烷基酰胺或C₁-C₄烷基 (C₂-C₈杂环烷基) ;

R₆和R₈是H;

R₇是H、取代的或未取代的C₁-C₄烷基、取代的或未取代的C₁-C₄杂烷基、C₁-C₈烷基氨基烷基、C₁-C₈羟烷基氨基烷基、C₁-C₈烷氧基烷基氨基烷基、取代的或未取代的C₃-C₆环烷基、取代的或未取代的C₁-C₈烷基C₃-C₆环烷基、取代的或未取代的芳基、取代的或未取代的C₂-C₈杂环烷基、取代的或未取代的杂芳基、C₁-C₄烷基 (芳基)、C₁-C₄烷基 (杂芳基)、C₁-C₈烷基醚、C₁-C₈烷基酰胺或C₁-C₄烷基 (C₂-C₈杂环烷基) ;或者

R₆和R₈一起形成键;

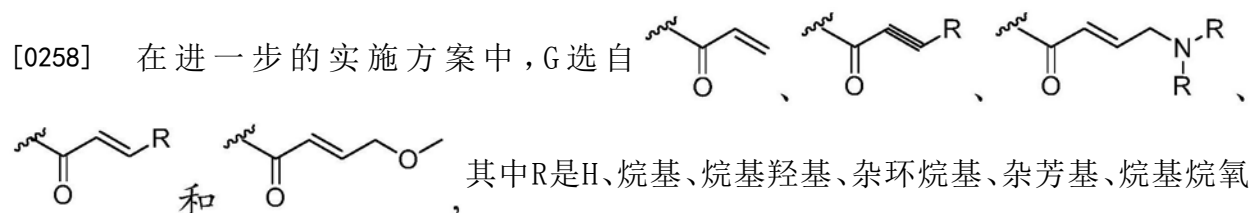
R₇是H、取代的或未取代的C₁-C₄烷基、取代的或未取代的C₁-C₄杂烷基、C₁-C₈烷基氨基烷基、C₁-C₈羟烷基氨基烷基、C₁-C₈烷氧基烷基氨基烷基、取代的或未取代的C₃-C₆环烷基、取代的或未取代的C₁-C₈烷基C₃-C₆环烷基、取代的或未取代的芳基、取代的或未取代的C₂-C₈杂环烷基、取代的或未取代的杂芳基、C₁-C₄烷基 (芳基)、C₁-C₄烷基 (杂芳基)、C₁-C₈烷基醚、C₁-C₈烷基酰胺或C₁-C₄烷基 (C₂-C₈杂环烷基) ;

R₁₂是氢或低级烷基;或者

Y和R₁₂一起形成4元、5元或6元杂环状环;以及

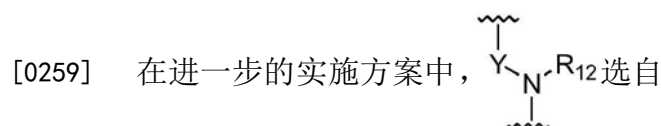
其药学上可接受的活性代谢物、药学上可接受的溶剂化物、药学上可接受的盐或药学上可接受的前药。

[0258] 在进一步的实施方案中, G选自

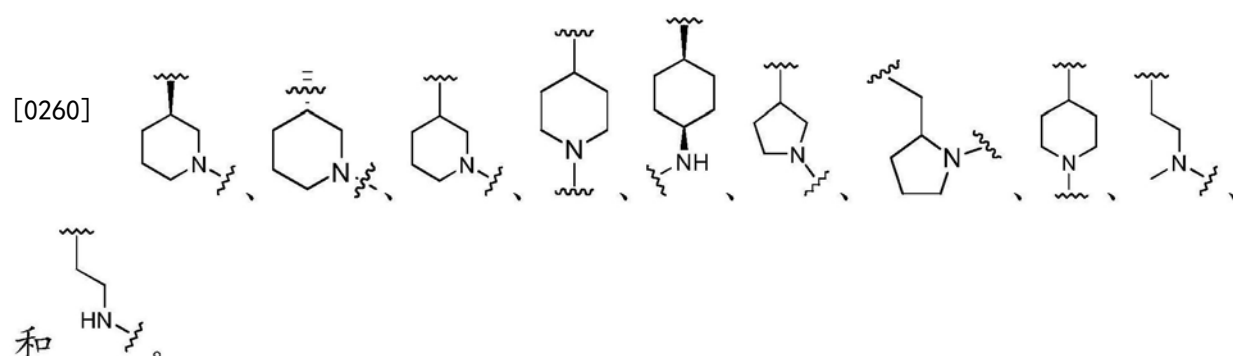


其中R是H、烷基、烷基羟基、杂环烷基、杂芳基、烷基烷氧基、烷基烷氧基烷基。

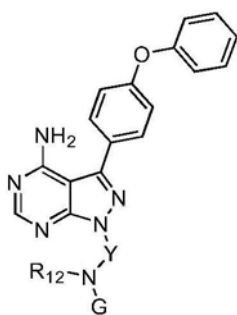
[0259] 在进一步的实施方案中, $\text{Y}-\text{N}-\text{R}_{12}$ 选自



[0260]



[0261] 在进一步的实施方案中, 式 (B) 化合物具有以下式 (C) 的结构:

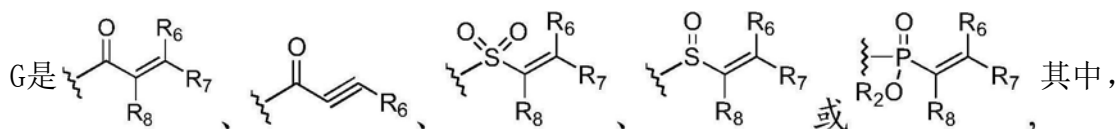


式(C)

Y是烷基或取代的烷基或4元、5元或6元环烷基环；

R₁₂是氢或低级烷基；或者

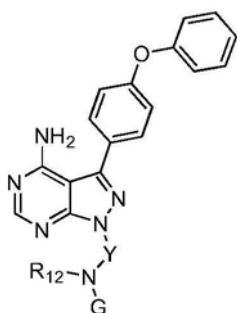
Y和R₁₂一起形成4元、5元或6元杂环状环；



R₆、R₇和R₈独立地选自H、低级烷基或取代的低级烷基、低级杂烷基或取代的低级杂烷基、取代的或未取代的低级环烷基和取代的或未取代的低级杂环烷基；以及

其药学上可接受的活性代谢物、药学上可接受的溶剂化物、药学上可接受的盐或药学上可接受的前药。

[0262] 在进一步的实施方案中,式(B1)的化合物具有以下式(C1)的结构:

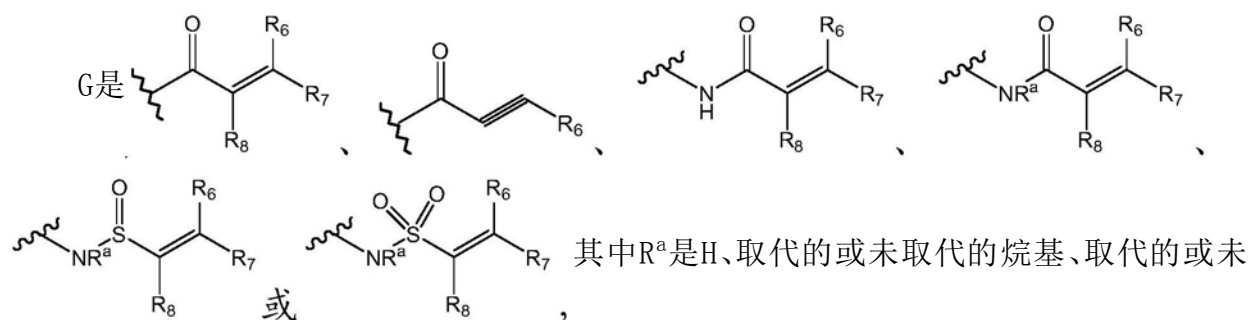


式(C1),

Y是任选取代的选自烷基、杂烷基、芳基、杂芳基、烷基芳基、烷基杂芳基和烷基杂环烷基的基团；

R₁₂是氢或低级烷基；或者

Y和R₁₂一起形成4元、5元或6元杂环状环；



取代的环烷基;并且,或者

R₇和R₈是H;

R₆是H、取代的或未取代的C₁-C₄烷基、取代的或未取代的C₁-C₄杂烷基、C₁-C₈烷基氨基烷基、C₁-C₈羟烷基氨基烷基、C₁-C₈烷氧基烷基氨基烷基、取代的或未取代的C₃-C₆环烷基、取代的或未取代的C₁-C₈烷基C₃-C₆环烷基、取代的或未取代的芳基、取代的或未取代的C₂-C₈杂环烷基、取代的或未取代的杂芳基、C₁-C₄烷基(芳基)、C₁-C₄烷基(杂芳基)、C₁-C₈烷基醚、C₁-C₈烷基酰胺或C₁-C₄烷基(C₂-C₈杂环烷基);

R₆和R₈是H;

R₇是H、取代的或未取代的C₁-C₄烷基、取代的或未取代的C₁-C₄杂烷基、C₁-C₈烷基氨基烷基、C₁-C₈羟烷基氨基烷基、C₁-C₈烷氧基烷基氨基烷基、取代的或未取代的C₃-C₆环烷基、取代的或未取代的C₁-C₈烷基C₃-C₆环烷基、取代的或未取代的芳基、取代的或未取代的C₂-C₈杂环烷基、取代的或未取代的杂芳基、C₁-C₄烷基(芳基)、C₁-C₄烷基(杂芳基)、C₁-C₈烷基醚、C₁-C₈烷基酰胺或C₁-C₄烷基(C₂-C₈杂环烷基);或者

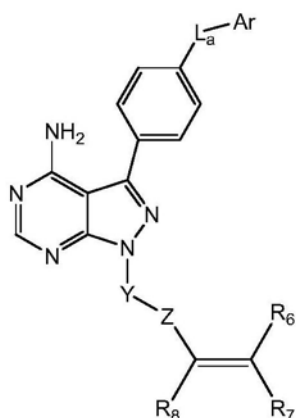
R₆和R₈一起形成键;

R₇是H、取代的或未取代的C₁-C₄烷基、取代的或未取代的C₁-C₄杂烷基、C₁-C₈烷基氨基烷基、C₁-C₈羟烷基氨基烷基、C₁-C₈烷氧基烷基氨基烷基、取代的或未取代的C₃-C₆环烷基、取代的或未取代的C₁-C₈烷基C₃-C₆环烷基、取代的或未取代的芳基、取代的或未取代的C₂-C₈杂环烷基、取代的或未取代的杂芳基、C₁-C₄烷基(芳基)、C₁-C₄烷基(杂芳基)、C₁-C₈烷基醚、C₁-C₈烷基酰胺或C₁-C₄烷基(C₂-C₈杂环烷基);以及

其药学上可接受的活性代谢物、药学上可接受的溶剂化物、药学上可接受的盐或药学上可接受的前药。

[0263] 在进一步或备选的实施方案中,式(A1)、式(B1)或式(C1)中的任一个的“G”基团是用来修改(tailor)分子的物理和生物性质的任何基团。此类修改/修饰使用调节分子的迈克尔受体化学反应反应性、酸性、碱性、亲脂性、溶解性和其它物理性质的基团来实现。由此类对G的修饰所调节的物理和生物性质包括,仅举例来说,增强迈克尔受体基团的化学反应性、溶解性、体内吸收和体内代谢。另外,体内代谢包括,仅举例来说,控制体内PK性质、脱靶活性、与cypP450相互作用有关的潜在毒性、药物-药物相互作用等等。此外,对G的修饰允许通过调节例如特异性和非特异性蛋白质与血浆蛋白质的结合以及脂质和组织的体内分布来修改化合物的体内功效。

[0264] 在另一个实施方案中,本文提供式(D)化合物。式(D)如下所示:



式(D)

其中：

L_a 是 CH_2 、O、NH或S；

Ar是取代的或未取代的芳基或取代的或未取代的杂芳基；

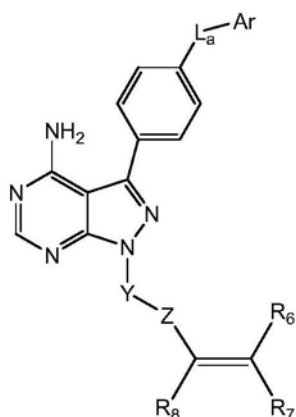
Y是任选取代的选自烷基、杂烷基、环烷基、杂环烷基、芳基和杂芳基的基团；

Z是 $C(=O)$ 、 $OC(=O)$ 、 $NHC(=O)$ 、 $C(=S)$ 、 $S(=O)_x$ 、 $OS(=O)_x$ 、 $NHS(=O)_x$ ，其中x为1或2；

R_6 、 R_7 和 R_8 各自独立地选自H、取代的或未取代的 C_1 - C_4 烷基、取代的或未取代的 C_1 - C_4 杂烷基、取代的或未取代的 C_3 - C_6 环烷基、取代的或未取代的 C_2 - C_6 杂环烷基、 C_1 - C_6 烷氧基烷基、 C_1 - C_8 烷基氨基烷基、取代的或未取代的 C_3 - C_6 环烷基、取代的或未取代的芳基、取代的或未取代的杂芳基、取代的或未取代的 C_1 - C_4 烷基(芳基)、取代的或未取代的 C_1 - C_4 烷基(杂芳基)、取代的或未取代的 C_1 - C_4 烷基(C_3 - C_8 环烷基)或取代的或未取代的 C_1 - C_4 烷基(C_2 - C_8 杂环烷基)；或者

R_7 和 R_8 一起形成键；及其药学活性代谢物或药学上可接受的溶剂化物、药学上可接受的盐或药学上可接受的前药。

[0265] 在一个实施方案中是具有式(D1)结构的化合物：



式(D1)

其中

L_a 是 CH_2 、O、NH或S；

Ar是任选取代的芳香族碳环或芳香族杂环；

Y是任选取代的选自亚烷基、亚杂烷基、亚芳基、亚杂芳基、亚烷基亚芳基、亚烷基亚杂

芳基和亚烷基亚杂环烷基或其组合的基团；

Z是C(=O)、NHC(=O)、NR^aC(=O)、NR^aS(=O)_x，其中x为1或2，且R^a是H、取代的或未取代的烷基、取代的或未取代的环烷基；并且，或者

R₇和R₈是H；

R₆是H、取代的或未取代的C₁-C₄烷基、取代的或未取代的C₁-C₄杂烷基、C₁-C₈烷基氨基烷基、C₁-C₈羟烷基氨基烷基、C₁-C₈烷氧基烷基氨基烷基、取代的或未取代的C₃-C₆环烷基、取代的或未取代的C₁-C₈烷基C₃-C₆环烷基、取代的或未取代的芳基、取代的或未取代的C₂-C₈杂环烷基、取代的或未取代的杂芳基、C₁-C₄烷基(芳基)、C₁-C₄烷基(杂芳基)、C₁-C₈烷基醚、C₁-C₈烷基酰胺或C₁-C₄烷基(C₂-C₈杂环烷基)；

R₆和R₈是H；

R₇是H、取代的或未取代的C₁-C₄烷基、取代的或未取代的C₁-C₄杂烷基、C₁-C₈烷基氨基烷基、C₁-C₈羟烷基氨基烷基、C₁-C₈烷氧基烷基氨基烷基、取代的或未取代的C₃-C₆环烷基、取代的或未取代的C₁-C₈烷基C₃-C₆环烷基、取代的或未取代的芳基、取代的或未取代的C₂-C₈杂环烷基、取代的或未取代的杂芳基、C₁-C₄烷基(芳基)、C₁-C₄烷基(杂芳基)、C₁-C₈烷基醚、C₁-C₈烷基酰胺或C₁-C₄烷基(C₂-C₈杂环烷基)；或者

R₆和R₈一起形成键；

R₇是H、取代的或未取代的C₁-C₄烷基、取代的或未取代的C₁-C₄杂烷基、C₁-C₈烷基氨基烷基、C₁-C₈羟烷基氨基烷基、C₁-C₈烷氧基烷基氨基烷基、取代的或未取代的C₃-C₆环烷基、取代的或未取代的C₁-C₈烷基C₃-C₆环烷基、取代的或未取代的芳基、取代的或未取代的C₂-C₈杂环烷基、取代的或未取代的杂芳基、C₁-C₄烷基(芳基)、C₁-C₄烷基(杂芳基)、C₁-C₈烷基醚、C₁-C₈烷基酰胺或C₁-C₄烷基(C₂-C₈杂环烷基)；

或其组合；以及

其药学活性代谢物或药学上可接受的溶剂化物、药学上可接受的盐或药学上可接受的前药。

[0266] 在另一个实施方案中提供了式(D1)化合物的药学上可接受的盐。仅举例来说，是氨基与诸如盐酸、氢溴酸、磷酸、硫酸和高氯酸等无机酸或与诸如乙酸、草酸、马来酸、酒石酸、柠檬酸、琥珀酸或丙二酸等有机酸形成的盐。更多的盐包括其中抗衡离子是阴离子的盐，例如己二酸盐、藻酸盐、抗坏血酸盐、天冬氨酸盐、苯磺酸盐、苯甲酸盐、硫酸氢盐、硼酸盐、丁酸盐、樟脑酸盐、樟脑磺酸盐、柠檬酸盐、环戊烷丙酸盐、二葡萄糖酸盐、十二烷基硫酸盐、乙磺酸盐、甲酸盐、富马酸盐、葡庚糖酸盐、甘油磷酸盐、葡萄糖酸盐、半硫酸盐、庚酸盐、己酸盐、氢碘酸盐、2-羟基-乙磺酸盐、乳糖醛酸盐、乳酸盐、月桂酸盐、月桂基硫酸盐、苹果酸盐、马来酸盐、丙二酸盐、甲烷磺酸盐、2-萘磺酸盐、烟酸盐、硝酸盐、油酸盐、草酸盐、棕榈酸盐、双羟萘酸盐、果胶酸盐、过硫酸盐、3-苯基丙酸盐、磷酸盐、苦味酸盐、三甲基乙酸盐、丙酸盐、硬脂酸盐、琥珀酸盐、硫酸盐、酒石酸盐、硫氰酸盐、对甲苯磺酸盐、十一酸盐和戊酸盐。更多的盐包括其中抗衡离子是诸如钠、锂、钾、钙、镁、铵和季铵(被至少一个有机部分取代的)阳离子等阳离子的盐。

[0267] 在另一个实施方案中是式(D1)化合物的药学上可接受的酯，包括其中酯基团选自甲酸酯、乙酸酯、丙酸酯、丁酸酯、丙烯酸酯和乙基琥珀酸酯的那些酯。

[0268] 在另一个实施方案中是式(D1)化合物的药学上可接受的氨基甲酸酯。在另一个实

施方案中是式 (D1) 化合物的药学上可接受的N-酰基衍生物。N-酰基的实例包括N-乙酰基和N-乙氧羰基。

[0269] 在进一步的实施方案中, L_a 是O。

[0270] 在进一步的实施方案中, Ar是苯基。

[0271] 在进一步的实施方案中, Z是C(=O)、NHC(=O) 或NCH₃C(=O)。

[0272] 在进一步的实施方案中, 每个R₁、R₂和R₃是H。

[0273] 在一个实施方案中是式 (D1) 化合物, 其中R₆、R₇和R₈都是H。在另一个实施方案中, R₆、R₇和R₈并非全是H。

[0274] 对于任何和所有的实施方案, 取代基可以选自所列出的备选物的子集中。例如, 在一些实施方案中, L_a 是CH₂、O或NH。在其它实施方案中, L_a 是O或NH。在另外其它的实施方案中, L_a 是O。

[0275] 在一些实施方案中, Ar是取代或未取代的芳基。在另外其它的实施方案中, Ar是6元芳基。在一些其它的实施方案中, Ar是苯基。

[0276] 在一些实施方案中, x为2。在另外其它的实施方案中, Z是C(=O)、OC(=O)、NHC(=O)、S(=O)_x、OS(=O)_x或NHS(=O)_x。在一些其它的实施方案中, Z是C(=O)、NHC(=O) 或S(=O)₂。

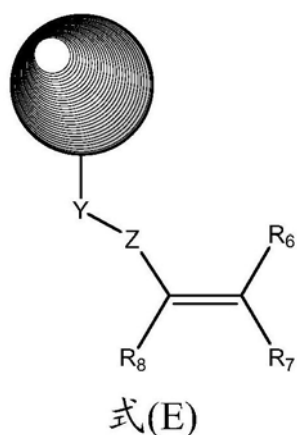
[0277] 在一些实施方案中, R₇和R₈独立地选自H、未取代的C₁-C₄烷基、取代的C₁-C₄烷基、未取代的C₁-C₄杂烷基和取代的C₁-C₄杂烷基; 或者R₇和R₈一起形成键。在另外其它的实施方案中, 每个R₇和R₈均是H; 或者R₇和R₈一起形成键。

[0278] 在一些实施方案中, R₆是H、取代或未取代的C₁-C₄烷基、取代或未取代的C₁-C₄杂烷基、C₁-C₆烷氧基烷基、C₁-C₂烷基-N(C₁-C₃烷基)₂、取代或未取代的芳基、取代或未取代的杂芳基、C₁-C₄烷基(芳基)、C₁-C₄烷基(杂芳基)、C₁-C₄烷基(C₃-C₈环烷基)或C₁-C₄烷基(C₂-C₈杂环烷基)。在一些其它的实施方案中, R₆是H、取代或未取代的C₁-C₄烷基、取代或未取代的C₁-C₄杂烷基、C₁-C₆烷氧基烷基、C₁-C₂烷基-N(C₁-C₃烷基)₂、C₁-C₄烷基(芳基)、C₁-C₄烷基(杂芳基)、C₁-C₄烷基(C₃-C₈环烷基)或C₁-C₄烷基(C₂-C₈杂环烷基)。在另外其它的实施方案中, R₆是H、取代或未取代的C₁-C₄烷基、-CH₂-O-(C₁-C₃烷基)、-CH₂-N(C₁-C₃烷基)₂、C₁-C₄烷基(苯基)或C₁-C₄烷基(5元或6元杂芳基)。在一些实施方案中, R₆是H、取代或未取代的C₁-C₄烷基、-CH₂-O-(C₁-C₃烷基)、-CH₂-N(C₁-C₃烷基)₂、C₁-C₄烷基(苯基)或C₁-C₄烷基(含有1或2个N原子的5元或6元杂芳基)或C₁-C₄烷基(含有1或2个N原子的5元或6元杂环烷基)。

[0279] 在一些实施方案中, Y是任选取代的选自烷基、杂烷基、环烷基和杂环烷基的基团。在其它实施方案中, Y是任选取代的选自C₁-C₆烷基、C₁-C₆杂烷基、4元、5元、6元或7元环烷基和4元、5元、6元或7元杂环烷基的基团。在另外其它的实施方案中, Y是任选取代的选自C₁-C₆烷基、C₁-C₆杂烷基、5元或6元环烷基和含有1或2个N原子的5元或6元杂环烷基的基团。在一些其它的实施方案中, Y是5元或6元环烷基或含有1或2个N原子的5元或6元杂环烷基。

[0280] 本文涉及以上对于各种变量所述的基团的任意组合。可以理解, 本文提供的化合物上的取代基和取代模式可以由本领域普通技术人员选择, 以提供在化学上稳定并且可以通过本领域已知的和本文阐述的技术来合成的化合物。

[0281] 在一个实施方案中, 激酶的不可逆抑制剂具有式 (E) 的结构:



其中：

其中  是结合到激酶的活性位点的部分，该激酶包括酪氨酸激酶，进一步包括

Btk激酶半胱氨酸同源物；

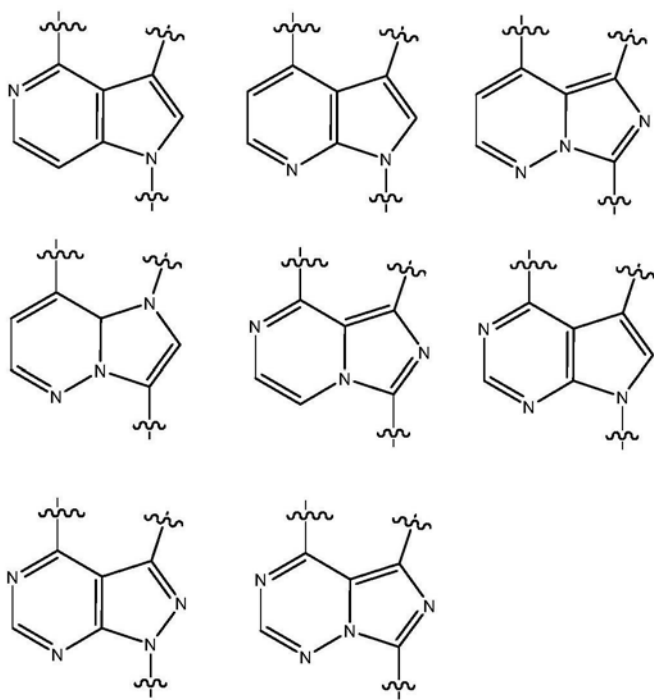
Y是任选取代的选自亚烷基、亚杂烷基、亚芳基、亚杂芳基、亚杂环烷基、亚环烷基、亚烷基亚芳基、亚烷基亚杂芳基、亚烷基亚环烷基和亚烷基亚杂环烷基的基团；

Z是C(=O)、OC(=O)、NHC(=O)、NCH₃C(=O)、C(=S)、S(=O)_x、OS(=O)_x、NHS(=O)_x，其中x为1或2；

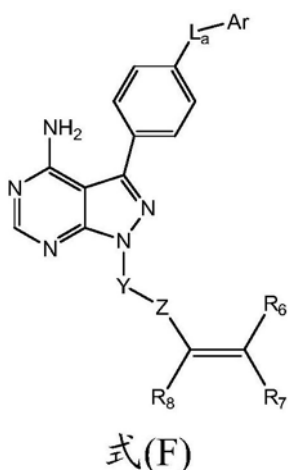
R₆、R₇和R₈各自独立地选自H、取代的或未取代的C₁-C₄烷基、取代的或未取代的C₁-C₄杂烷基、取代的或未取代的C₃-C₆环烷基、取代的或未取代的C₂-C₆杂环烷基、C₁-C₆烷氧基烷基、C₁-C₈烷基氨基烷基、取代的或未取代的C₃-C₆环烷基、取代的或未取代的芳基、取代的或未取代的杂芳基、取代的或未取代的C₁-C₄烷基(芳基)、取代的或未取代的C₁-C₄烷基(杂芳基)、取代的或未取代的C₁-C₄烷基(C₃-C₈环烷基)或取代的或未取代的C₁-C₄烷基(C₂-C₈杂环烷基)；或者

R₇和R₈一起形成键；及其药学活性代谢物或药学上可接受的溶剂化物、药学上可接受的盐或药学上可接受的前药。

[0282] 在一些实施方案中， 是取代的稠合联芳基部分，该部分选自



[0283] 在一个方面,本文提供式(F)化合物。式(F)如下所示:



其中

L_a 是 CH_2 、 O 、 NH 或 S ;

Ar 是取代的或未取代的芳基或取代的或未取代的杂芳基;并且,或者

(a) Y 是任选取代的选自亚烷基、亚杂烷基、亚芳基、亚杂芳基、亚烷基亚芳基、亚烷基亚杂芳基、亚烷基亚环烷基和亚烷基亚杂环烷基的基团;

Z 是 $C(=O)$ 、 $NHC(=O)$ 、 $NR_aC(=O)$ 、 $NR_aS(=O)_x$,其中 x 为1或2,且 R_a 是 H 、取代或未取代的烷基、取代或未取代的环烷基;并且,或者

(i) R_6 、 R_7 和 R_8 各自独立地选自 H 、取代或未取代的 C_1 - C_4 烷基、取代或未取代的 C_1 - C_4 杂烷基、取代或未取代的 C_3 - C_6 环烷基、取代或未取代的 C_2 - C_6 杂环烷基、 C_1 - C_6 烷氧基烷基、 C_1 - C_8 烷基氨基烷基、取代或未取代的 C_3 - C_6 环烷基、取代或未取代的芳基、取代或未取代的杂芳基、取代或未取代的 C_1 - C_4 烷基(芳基)、取代或未取代的 C_1 - C_4 烷基(杂芳基)、取代或未取代的 C_1 - C_4 烷基(C_3 - C_8 环烷基)或取代或未取代的 C_1 - C_4 烷基(C_2 - C_8 杂环烷基);

(ii) R_6 和 R_8 是 H ;

R₇是H、取代或未取代的C₁-C₄烷基、取代或未取代的C₁-C₄杂烷基、C₁-C₈烷基氨基烷基、C₁-C₈羟烷基氨基烷基、C₁-C₈烷氧基烷基氨基烷基、取代或未取代的C₃-C₆环烷基、取代或未取代的C₁-C₈烷基C₃-C₆环烷基、取代或未取代的芳基、取代或未取代的C₂-C₈杂环烷基、取代或未取代的杂芳基、C₁-C₄烷基(芳基)、C₁-C₄烷基(杂芳基)、C₁-C₈烷基醚、C₁-C₈烷基酰胺或C₁-C₄烷基(C₂-C₈杂环烷基)；

或者

(iii) R₇和R₈一起形成键；

R₆选自H、取代或未取代的C₁-C₄烷基、取代或未取代的C₁-C₄杂烷基、取代或未取代的C₃-C₆环烷基、取代或未取代的C₂-C₆杂环烷基、C₁-C₆烷氧基烷基、C₁-C₈烷基氨基烷基、取代或未取代的C₃-C₆环烷基、取代或未取代的芳基、取代或未取代的杂芳基、取代或未取代的C₁-C₄烷基(芳基)、取代或未取代的C₁-C₄烷基(杂芳基)、取代或未取代的C₁-C₄烷基(C₃-C₈环烷基)或取代或未取代的C₁-C₄烷基(C₂-C₈杂环烷基)，或者

(b) Y是任选取代的选自亚环烷基或亚杂环烷基的基团；

Z是C(=O)、NHC(=O)、NR^aC(=O)、NR^aS(=O)_x，其中x为1或2，并且R^a是H、取代的或未取代的烷基、取代的或未取代的环烷基；并且，或者

(i) R₇和R₈是H；

R₆是取代或未取代的C₁-C₄烷基、取代或未取代的C₁-C₄杂烷基、C₁-C₈烷基氨基烷基、C₁-C₈羟烷基氨基烷基、C₁-C₈烷氧基烷基氨基烷基、取代或未取代的C₃-C₆环烷基、取代或未取代的C₁-C₈烷基C₃-C₆环烷基、取代或未取代的芳基、取代或未取代的C₂-C₈杂环烷基、取代或未取代的杂芳基、C₁-C₄烷基(芳基)、C₁-C₄烷基(杂芳基)、C₁-C₈烷基醚、C₁-C₈烷基酰胺或C₁-C₄烷基(C₂-C₈杂环烷基)；

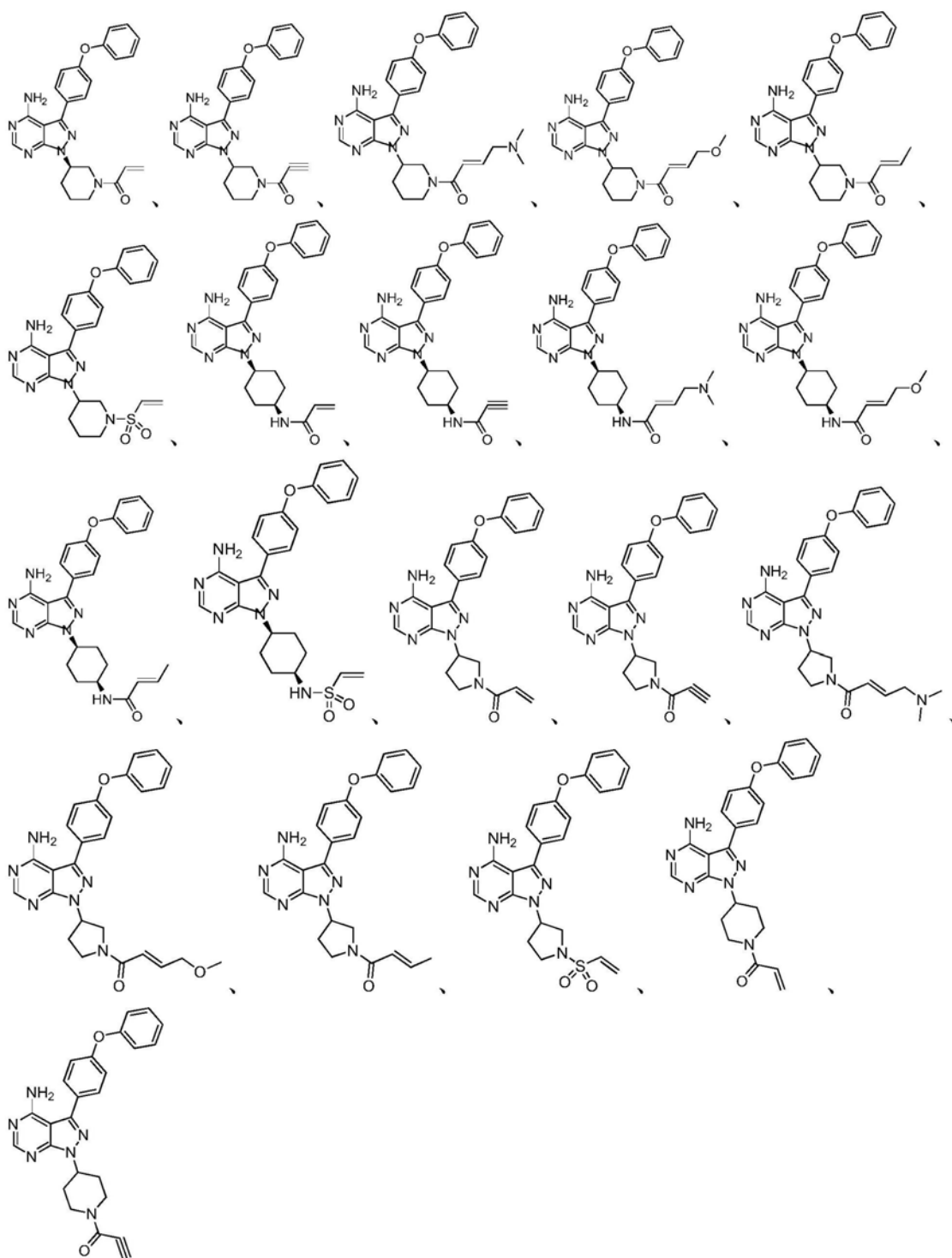
(ii) R₆和R₈是H；

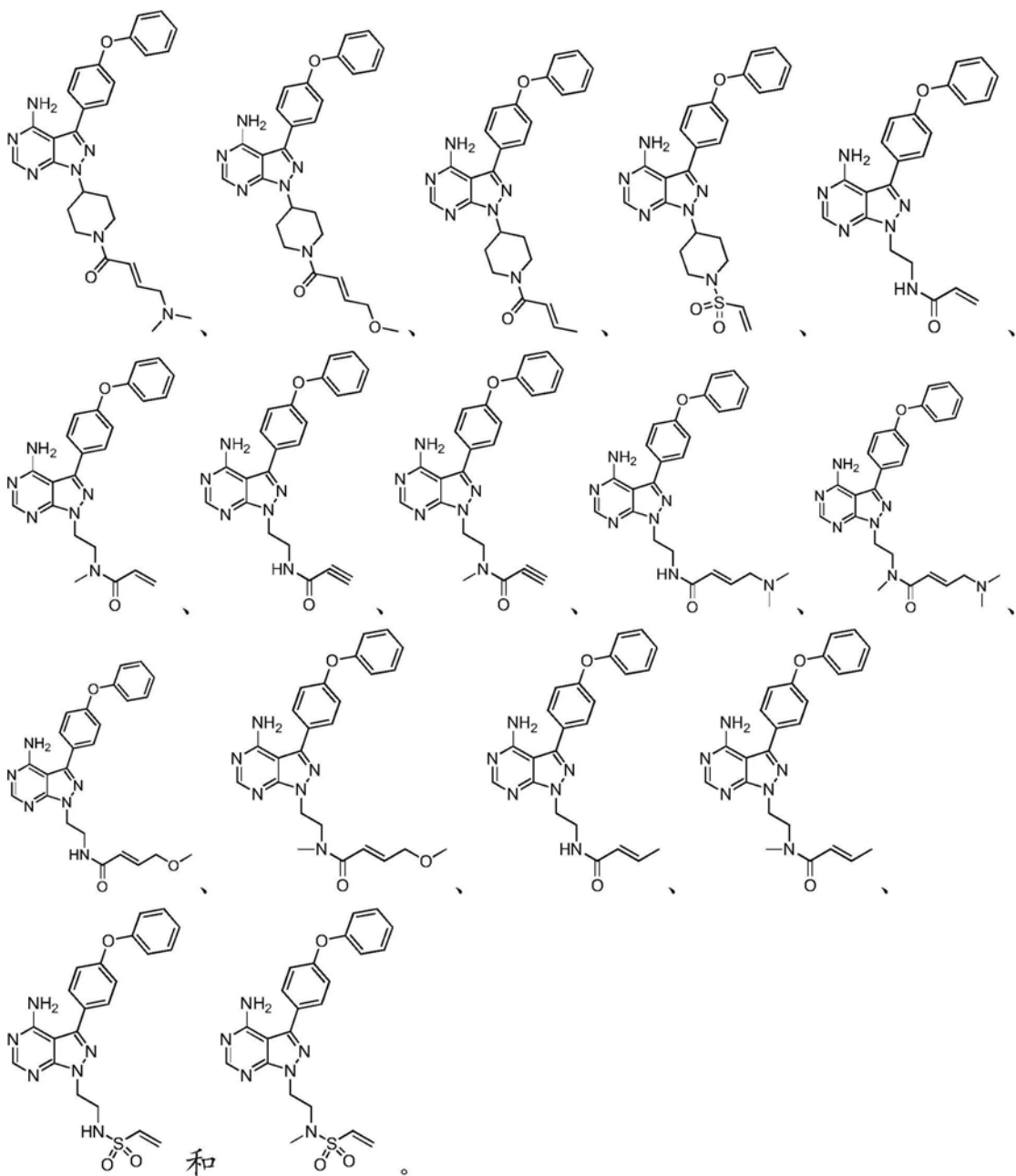
R₇是取代或未取代的C₁-C₄烷基、取代或未取代的C₁-C₄杂烷基、C₁-C₈烷基氨基烷基、C₁-C₈羟烷基氨基烷基、C₁-C₈烷氧基烷基氨基烷基、取代或未取代的C₃-C₆环烷基、取代或未取代的C₁-C₈烷基C₃-C₆环烷基、取代或未取代的芳基、取代或未取代的C₂-C₈杂环烷基、取代或未取代的杂芳基、C₁-C₄烷基(芳基)、C₁-C₄烷基(杂芳基)、C₁-C₈烷基醚、C₁-C₈烷基酰胺或C₁-C₄烷基(C₂-C₈杂环烷基)；或者

(iii) R₇和R₈一起形成键；

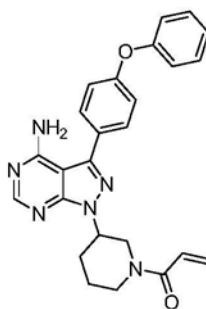
R₆是取代或未取代的C₁-C₄烷基、取代或未取代的C₁-C₄杂烷基、C₁-C₈烷基氨基烷基、C₁-C₈羟烷基氨基烷基、C₁-C₈烷氧基烷基氨基烷基、取代或未取代的C₃-C₆环烷基、取代或未取代的C₁-C₈烷基C₃-C₆环烷基、取代或未取代的芳基、取代或未取代的C₂-C₈杂环烷基、取代或未取代的杂芳基、C₁-C₄烷基(芳基)、C₁-C₄烷基(杂芳基)、C₁-C₈烷基醚、C₁-C₈烷基酰胺或C₁-C₄烷基(C₂-C₈杂环烷基)；及其药学活性代谢物或药学上可接受的溶剂化物、药学上可接受的盐或药学上可接受的前药。

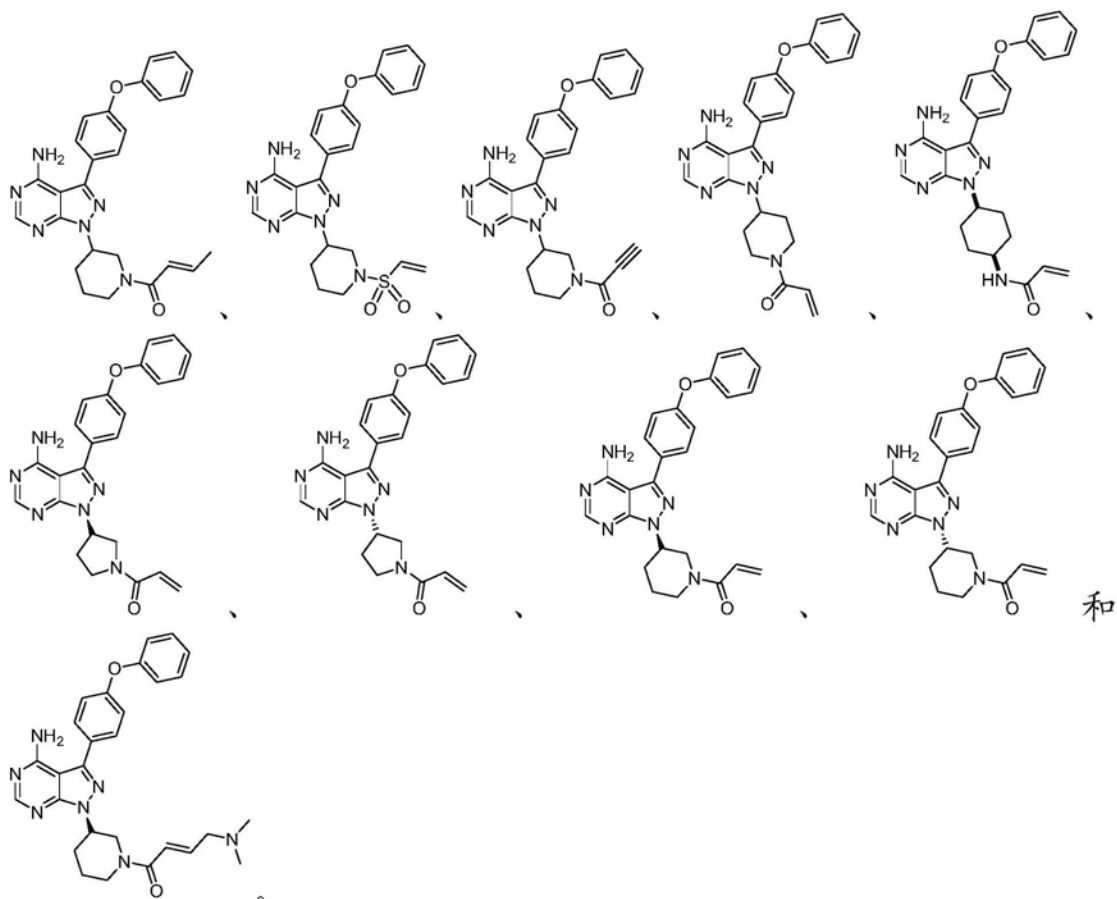
[0284] 式(A)、式(B)、式(C)、式(D)化合物的进一步实施方案包括但不限于选自下组的化合物：





[0285] 在又一实施方案中,本文提供的化合物选自:

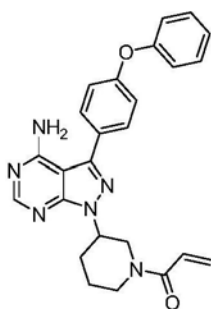




[0286] 在一个方面,本文提供的是选自以下的化合物:1-(3-(4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)哌啶-1-基)丙-2-烯-1-酮(化合物4);(E)-1-(3-(4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)哌啶-1-基)丁-2-烯-1-酮(化合物5);1-(3-(4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)哌啶-1-基)磺酰基乙炔(化合物6);1-(3-(4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)哌啶-1-基)丙-2-炔-1-酮(化合物8);1-(4-(4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)哌啶-1-基)丙-2-烯-1-酮(化合物9);N-((1s,4s)-4-(4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)环己基)丙烯酰胺(化合物10);1-((R)-3-(4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)吡咯烷-1-基)丙-2-烯-1-酮(化合物11);1-((S)-3-(4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)吡咯烷-1-基)丙-2-烯-1-酮(化合物12);1-((R)-3-(4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)哌啶-1-基)丙-2-烯-1-酮(化合物13);1-((S)-3-(4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)哌啶-1-基)丙-2-烯-1-酮(化合物14);和(E)-1-(3-(4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)哌啶-1-基)-4-(二甲基氨基)丁-2-烯-1-酮(化合物15)。

[0287] 在一些实施方案中,Btk抑制剂具有结构:

[0288]



[0289] 在一些实施方案中,Btk抑制剂是(R)-1-(3-(4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)哌啶-1-基)丙-2-烯-1-酮(即,PCI-32765/依罗替尼)。

[0290] 在一个实施方案中,该Btk抑制剂是 α -氰基- β -羟基- β -甲基-N-(2,5-二溴苯基)丙烯酰胺(LFM-A13)、AVL-101、4-叔丁基-N-(3-(8-(苯基氨基)咪唑并[1,2-a]吡嗪-6-基)苯基)苯甲酰胺、5-(3-氨基-2-甲基苯基)-1-甲基-3-(4-(吗啉-4-羰基)苯基氨基)吡嗪-2(1H)-酮、N-(2-甲基-3-(4-甲基-6-(4-(吗啉-4-羰基)苯基氨基)-5-氧代-4,5-二氢吡嗪-2-基)苯基)乙酰胺、4-叔丁基-N-(2-甲基-3-(4-甲基-6-(4-(吗啉-4-羰基)苯基氨基)-5-氧代-4,5-二氢吡嗪-2-基)苯基)苯甲酰胺、5-(3-(4-叔丁基苄基氨基)-2-甲基苯基)-1-甲基-3-(4-(吗啉-4-羰基)苯基氨基)吡嗪-2(1H)-酮、5-(3-(3-叔丁基苄基氨基)-2-甲基苯基)-1-甲基-3-(4-(吗啉-4-羰基)苯基氨基)吡嗪-2(1H)-酮、3-叔丁基-N-(2-甲基-3-(4-甲基-6-(4-(吗啉-4-羰基)苯基氨基)-5-氧代-4,5-二氢吡嗪-2-基)苯基)苯甲酰胺、6-叔丁基-N-(2-甲基-3-(4-甲基-6-(4-(吗啉-4-羰基)苯基氨基)-5-氧代-4,5-二氢吡嗪-2-基)苯基)烟酰胺和土曲霉素。

[0291] 在整篇说明书中,基团及其取代基可由本领域技术人员选择,以提供稳定的部分和化合物。

化合物的制备

[0292] 式D化合物可使用本领域技术人员已知的标准合成技术或使用本领域已知的方法与本文所述方法的组合来合成。另外,本文提出的溶剂、温度和其它反应条件可依据本领域技术人员的选择有所变化。作为进一步的指导,也可运用以下的合成方法。

[0293] 反应可以以线性顺序使用,以提供本文描述的化合物,或者它们可用来合成片段,这些片段随后通过本文描述的和/或本领域所知的方法连接起来。

通过亲电体和亲核体的反应形成共价键

[0294] 本文描述的化合物可以使用各种亲电体或亲核体进行修饰,以形成新的官能团或取代基。标题为“共价键及其前体的实例”的表1列出了共价键和前体官能团的所选实例,它们产生可用的多种亲电体和亲核体组合,并且可用作对这些组合的指导。前体官能团作为亲电子基团和亲核基团示出。

表1:共价键及其前体的实例

共价键产物	亲电体	亲核体
羧酰胺	活化的酯	胺/苯胺
羧酰胺	酰基叠氮	胺/苯胺
羧酰胺	酰卤	胺/苯胺
酯	酰卤	醇/苯酚
酯	酰肼	醇/苯酚
羧酰胺	酰肼	胺/苯胺
亚胺	醛	胺/苯胺
腓	醛或酮	肼
肼	醛或酮	羟胺
烷基胺	烷基卤	胺/苯胺
酯	烷基卤	羧酸
硫醚	烷基卤	硫醇
醚	烷基卤	醇/苯酚
硫醚	烷基磺酸酯	硫醇
酯	烷基磺酸酯	羧酸
醚	烷基磺酸酯	醇/苯酚

酯	酐	醇/苯酚
羧酰胺	酐	胺/苯胺
苯硫酚	芳基卤	硫醇
芳胺	芳基卤	胺
硫醚	氮丙啶(Azindine)	硫醇
硼酸酯	硼酸酯	甘醇
羧酰胺	羧酸	胺/苯胺
酯	羧酸	醇
肼	酰肼	羧酸
N-酰基脲或酐	碳二亚胺	羧酸
酯	重氮烷	羧酸
硫醚	环氧化物	硫醇
硫醚	卤代乙酰胺	硫醇
三嗪胺	卤代三嗪	胺/苯胺
三嗪基醚	卤代三嗪	醇/苯酚
脘	亚胺酯	胺/苯胺
脲	异氰酸酯	胺/苯胺
氨基甲酸酯	异氰酸酯	醇/苯酚
硫脲	异硫氰酸酯	胺/苯胺
硫醚	马来酰亚胺	硫醇
亚磷酸酯	亚磷酰胺	醇
硅醚	甲硅烷基卤	醇
烷基胺	磺酸酯	胺/苯胺
硫醚	磺酸酯	硫醇
酯	磺酸酯	羧酸
醚	磺酸酯	醇
磺酰胺	磺酰卤	胺/苯胺
磺酸酯	磺酰卤	苯酚/醇
烷基硫醇	α,β -不饱和酯	硫醇

烷基醚	α,β -不饱和酯	醇
烷基胺	α,β -不饱和酯	胺
烷基硫醇	乙烯基砜	硫醇
烷基醚	乙烯基砜	醇
烷基胺	乙烯基砜	胺
乙烯基硫化物	炔丙基酰胺	硫醇

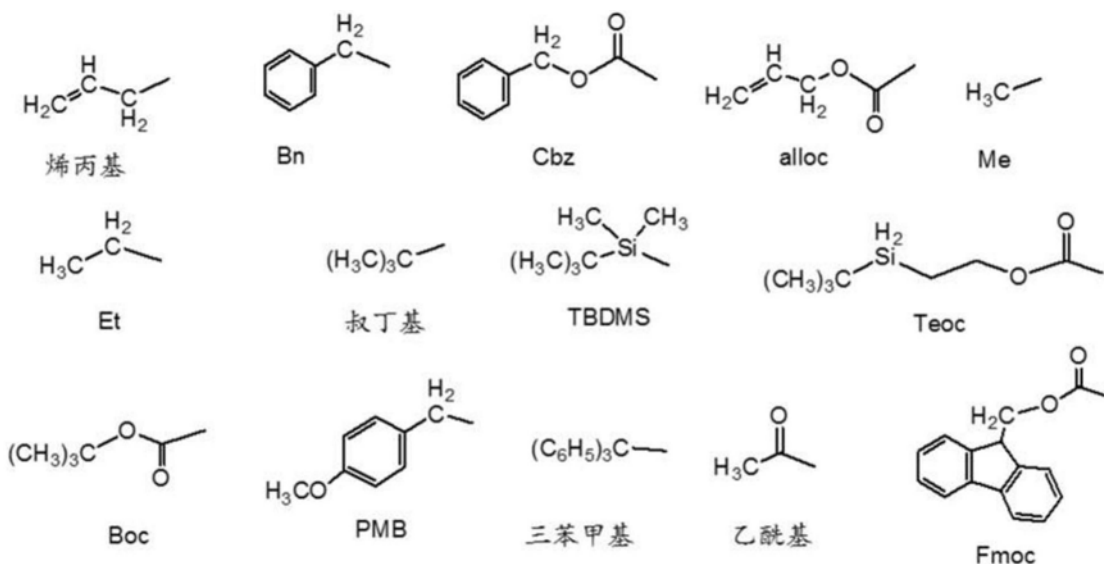
保护基的使用

[0295] 在描述的反应中,可能需要保护反应性官能团,例如羟基、氨基、亚氨基、硫代或羧基,以避免它们不必要地参与反应,这些官能团是终产物中所需的。保护基用来封闭一些或全部的反应性部分,并阻止这样的基团参与化学反应,直至该保护基团被去除。在一个实施方案中,各个保护基可通过不同的手段去除。在完全不同的反应条件下被切割的保护基满足了差异性去除的需求。保护基可以通过酸、碱和氢解作用去除。诸如三苯甲基、二甲氧基三苯甲基、乙缩醛和叔丁基二甲基甲硅烷基的基团是酸不稳定的,并且在存在用通过氢解作用可去除的Cbz基团和碱不稳定的Fmoc基团保护的氨基时,可用于保护羧基和羟基反应性部分。在存在用酸不稳定的基团如氨基甲酸叔丁酯或用酸和碱都稳定但水解可去除的氨基甲酸酯封闭的胺时,羧酸和羟基反应性部分可以用例如但不限于甲基、乙基和乙酰基的碱不稳定的基团来封闭。

[0296] 羧酸和羟基反应性部分也可以用水解可去除的保护基如苄基来封闭,而能够与酸形成氢键的胺基团可以用碱不稳定的基团如Fmoc来封闭。羧酸反应性部分可以如本文示例的那样通过转化成简单的酯化合物而受保护,或者它们可以用可氧化去除的保护基例如2,4-二甲氧苄基来封闭,而同时存在的氨基可以用氟化物不稳定的氨基甲酸甲硅烷酯来封闭。

[0297] 当存在酸和碱保护基时,烯丙基封端基团是有用的,因为它稳定并且随后可以通过金属或 π 酸催化剂去除。例如,在酸不稳定的氨基甲酸叔丁酯或碱不稳定的乙酸酯胺保护基的存在下,烯丙基封闭的羧酸可以用Pd⁰-催化的反应去保护。保护基的另一种形式是化合物或中间体可以附着到其上的树脂。只要残余物附着于树脂,该官能团就被封闭,并且不能反应。一旦从树脂上释放,该官能团就可用于反应。

[0298] 典型地,封闭/保护基可以选自:



[0299] 其它保护基,加上适用于创建保护基和去除它们的技术的详细描述,在Greene和Wuts, *Protective Groups in Organic Synthesis*, 第三版, John Wiley&Sons, New York, NY, 1999; 和Kocienski, *Protective Groups*, Thieme Verlag, New York, NY, 1994中描述,其公开内容通过引用整体并入本文。

化合物的其它形式

[0300] 本文描述的化合物可具有一个或多个立构中心,而且各个中心可以以R或S构型存在。本文提出的化合物包括所有非对映异构、对映异构和差向异构形式,及其适当混合物。如果需要的话,通过本领域已知的方法可以获得立体异构体,例如经手性色谱柱分离立体异构体。

[0301] 基于其理化差异,通过已知的方法,例如通过色谱法和/或分级结晶,可将非对映异构体混合物分离成其单独的非对映异构体。在一个实施方案中,对映异构体可以通过手性色谱柱分离。在其它实施方案中,对映异构体可以如下分离:通过与适当的旋光化合物(例如醇)反应而将对映异构体混合物转化成非对映异构体混合物,分离非对映异构体,并将单独的非对映异构体转化(例如水解)成相应的纯的对映异构体。所有这样的异构体,包括非对映异构体、对映异构体及其混合物,被认为是本文所述的组合物的一部分。

[0302] 本文所述的方法和制剂包括使用本文所述的化合物的N-氧化物、结晶形式(也称作多晶型物)或药学上可接受的盐,以及这些化合物的具有相同类型活性的活性代谢物。在一些情况下,化合物可作为互变异构体存在。所有的互变异构体都包括在本文提出的化合物的范围内。另外,本文所述的化合物可以以非溶剂化的形式存在,也可以与药学上可接受的溶剂例如水、乙醇等组成溶剂化物的形式存在。本文提出的化合物的溶剂化形式也被认为在本文中公开。

[0303] 通过在0到80℃下,用诸如但不限于硫、二氧化硫、三苯基膦、硼氢化锂、硼氢化钠、三氯化磷、三溴化物等还原剂,在诸如但不限于乙腈、乙醇、二氧杂环己烷水溶液等合适的惰性有机溶剂中处理,可以由式D化合物的N-氧化物制备出未氧化形式的式D化合物。

[0304] 在一些实施方案中,将本文所述的化合物制备为前药。“前药”是指在体内被转化为母体药物的药剂。前药通常是有用的,因为在一些情况下,它们比母体药物更易于施用。例如,它们可通过口服施用而可生物利用,而母体药物则不能。前药在药物组合物中也可具

有比母体药物改善的溶解度。前药的一个非限制性实例是本文所述的化合物,其作为酯(“前药”)施用,以促进跨过其中水溶性对移动性不利的细胞膜的输送,但其随后一旦在水溶性有利的细胞内部则被代谢水解成羧酸(活性实体)。前药的另一实例可以是与酸基团键合的短肽(聚氨基酸),其中该肽经代谢以显露活性部分。在某些实施方案中,在体内施用时,前药经化学转化为生物学上、药学上或治疗上活性形式的化合物。在某些实施方案中,前药通过一个或多个步骤或过程经酶代谢为生物学上、药学上或治疗上活性形式的化合物。为了产生前药,修饰药学活性的化合物,使得在体内施用时将该活性化合物再生。前药可设计成改变药物的代谢稳定性或输送特性、掩饰副作用或毒性、改善药物味道或改变药物的其它特性或性质。凭借对体内药效过程和药物代谢的认识,本领域技术人员一旦知道了药学活性化合物,就可以设计出该化合物的前药。(参见,例如Nogrady (1985) *Medicinal Chemistry A Biochemical Approach*, Oxford University Press, New York, 第388-392页; Silverman (1992), *The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action*, Academic Press, Inc., San Diego, 第352-401页, Saulnier等, (1994), *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 第4卷, 第1985页)。

[0305] 本文所述的化合物的前药形式(其中该前药在体内代谢产生如本文所阐述的衍生物)包括在权利要求书的范围内。在一些情况下,一些本文描述的化合物可为另一种衍生物或活性化合物的前药。

[0306] 前药通常是有用的,因为在一些情况下,它们可比母体药物更易于施用。例如,它们可通过口服施用而可生物利用,而母体药物则不能。前药在药物组合物中也可具有比母体药物改善的溶解度。前药可设计成可逆的药物衍生物,以用作提高药物向位点特异性组织输送的调节剂。在一些实施方案中,前药的设计增加有效水溶性。参见,例如Fedorak等, *Am. J. Physiol.*, 269:G210-218 (1995); McLoed等, *Gastroenterol*, 106:405-413 (1994); Hochhaus等, *Biomed. Chrom.*, 6:283-286 (1992); J. Larsen和H. Bundgaard, *Int. J. Pharmaceutics*, 37, 87 (1987); J. Larsen等, *Int. J. Pharmaceutics*, 47, 103 (1988); Sinkula等, *J. Pharm. Sci.*, 64:181-210 (1975); T. Higuchi和V. Stella, *Pro-drugs as Novel Delivery Systems*, A.C.S. 学术讨论会丛刊第14卷; 和Edward B. Roche, *Bioreversible Carriers in Drug Design*, American Pharmaceutical Association and Pergamon Press, 1987, 所有文献均全文并入本文中。

[0307] 式D化合物的芳族环部分上的位点可能易受各种代谢反应的影响,因此在芳族环结构上并入适当的取代基,仅举例来说,如卤素,可以减少、最小化或排除这个代谢途径。

[0308] 本文所述的化合物包括同位素标记的化合物,它们与本文提出的各种通式和结构中列举的化合物除了以下事实外是相同的:一个或多个原子被替换成具有的原子质量或质量数与自然界中通常发现的原子质量或质量数不同的原子。可以并入本发明化合物的同位素的实例包括氢、碳、氮、氧、硫、氟和氯的同位素,分别如 ^2H 、 ^3H 、 ^{13}C 、 ^{14}C 、 ^{15}N 、 ^{18}O 、 ^{17}O 、 ^{35}S 、 ^{18}F 、 ^{36}Cl 。某些同位素标记的本文所述的化合物,例如并入了放射性同位素例如 ^3H 和 ^{14}C 的化合物,在药物和/或底物组织分布试验中是有用的。此外,用同位素例如氘(即 ^2H)替换,可以提供某些由更高的代谢稳定性带来的治疗优势,例如延长的体内半衰期或减少的剂量需求。

[0309] 在另外的或进一步的实施方案中,本文所述的化合物当施用到有需要的生物体时被代谢,以生成代谢物,该代谢物随后用来产生所需的效果,包括所需的疗效。

[0310] 本文所述的化合物可形成为和/或用作药学上可接受的盐。药学上可接受的盐的类型包括但不限于：(1) 酸加成盐，它们是通过使化合物的游离碱形式与药学上可接受的酸反应而形成的，所述酸包括：无机酸，例如盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸、磷酸、偏磷酸等；或有机酸，例如乙酸、丙酸、己酸、环戊烷丙酸、羟基乙酸、丙酮酸、乳酸、丙二酸、琥珀酸、苹果酸、马来酸、反丁烯二酸、三氟乙酸、酒石酸、柠檬酸、苯甲酸、3-(4-羟基苯甲酰基) 苯甲酸、肉桂酸、扁桃酸、甲磺酸、乙磺酸、1,2-乙二磺酸、2-羟基乙磺酸、苯磺酸、甲苯磺酸、2-萘磺酸、4-甲基双环-[2.2.2] 辛-2-烯-1-羧酸、葡庚糖酸、4,4'-亚甲基双-(3-羟基-2-烯-1-羧酸)、3-苯基丙酸、三甲基乙酸、叔丁基乙酸、十二烷基硫酸、葡萄糖酸、谷氨酸、羟基萘甲酸、水杨酸、硬脂酸、粘康酸等；(2) 当母体化合物中存在的酸性质子被置换成金属离子例如碱金属离子（例如锂、钠、钾）、碱土金属离子（例如镁或钙）或铝离子或与有机碱配位时形成的盐。可接受的有机碱包括乙醇胺、二乙醇胺、三乙醇胺、氨丁三醇、N-甲基葡糖胺等。可接受的无机碱包括氢氧化铝、氢氧化钙、氢氧化钾、碳酸钠、氢氧化钠等。

[0311] 药学上可接受的盐的对应的抗衡离子可以使用各种方法来分析和鉴别，包括但不限于离子交换色谱法、离子色谱法、毛细管电泳、电感耦合等离子体、原子吸收光谱法、质谱法或其任意组合。

[0312] 盐使用以下技术中的至少一种来回收：过滤、用非溶剂沉淀后过滤、蒸发溶剂或（在水溶液情况下）冻干。

[0313] 应当理解，提及药学上可接受的盐，包括溶剂添加形式或其晶体形式，特别是溶剂化物或多晶型物。溶剂化物包含化学计量的或非化学计量的量的溶剂，并且可以在与药学上可接受的溶剂如水、乙醇等结晶化的过程期间形成。当溶剂是水时，形成水合物，或者，当溶剂是醇时，形成醇化物。本文所述的化合物的溶剂化物可以在本文所述的过程期间方便地制备或形成。另外，本文提供的化合物可以以非溶剂化的以及溶剂化的形式存在。通常，对于本文提供的化合物和方法而言，溶剂化形式被认为与非溶剂化形式是等价的。

[0314] 应当理解，提及盐，包括溶剂添加形式或其晶体形式，特别是溶剂化物或多晶型物。溶剂化物包含化学计量的或非化学计量的量的溶剂，并且通常在与药学上可接受的溶剂如水、乙醇等结晶化的过程期间形成。当溶剂是水时，形成水合物，或者，当溶剂是醇时，形成醇化物。多晶型物包括化合物的相同元素组成的不同晶体堆积排列。多晶型物通常具有不同的X射线衍射图样、红外光谱、熔点、密度、硬度、晶形、光电性质、稳定性和溶解度。诸如再结晶溶剂、结晶速率和储存温度等各种因素都可能导致单一晶型占优势。

[0315] 本文所述的化合物可以处于各种形式，包括但不限于无定形形式、碾碎形式和纳米微粒形式。另外，本文所述的化合物包括结晶形式，也称作多晶型物。多晶型物包括化合物的相同元素组成的不同晶体堆积排列。多晶型物通常具有不同的X射线衍射图样、红外光谱、熔点、密度、硬度、晶形、光电性质、稳定性和溶解度。诸如再结晶溶剂、结晶速率和储存温度等各种因素都可能导致单一晶型占优势。

[0316] 药学上可接受的盐、多晶型物和/或溶剂化物的筛选和表征可以使用多种技术来完成，包括但不限于热分析、X射线衍射、光谱法、蒸汽吸附和显微术。热分析方法针对于热化学降解或热物理过程，包括但不限于多晶转变，并且此类方法用于分析多晶型之间的关系，确定重量损失，以发现玻璃化转变温度，或用于赋形剂相容性研究。此类方法包括但不限于差示扫描量热法 (DSC)、调制式差示扫描量热法 (MDSC)、热重量分析 (TGA) 以及热重量

和红外分析(TG/IR)。X射线衍射法包括但不限于单晶和粉末衍射仪和同步加速器源。使用的各种光谱技术包括但不限于拉曼、FTIR、UVIS和NMR(液态和固态)。各种显微镜检查技术包括但不限于偏振光显微术、具有能量色散X射线分析(EDX)的扫描电子显微术(SEM)、具有EDX的环境扫描电子显微术(在气体或水蒸汽气氛中)、IR显微术和拉曼显微术。

[0317] 在整篇说明书中,基团及其取代基可由本领域技术人员选择,以提供稳定的部分和化合物。

药代动力学

[0318] 在某些实施方案中,本文公开了一种在有需要的个体中治疗血液恶性肿瘤的方法,包括:向该个体施用第一治疗,该第一治疗包含足以从该恶性肿瘤动员多个细胞的量的不可逆Btk抑制剂。在一些实施方案中,该方法进一步包括向该个体施用第二治疗。

[0319] 在一些实施方案中,该Btk抑制剂具有40mg/mL至400ng/mL的第1天 C_{max} 。在一些实施方案中,该Btk抑制剂具有45mg/mL至390ng/mL的第1天 C_{max} 。在一些实施方案中,该Btk抑制剂具有48.7ng/mL至383ng/mL的第1天 C_{max} 。在一些实施方案中,该Btk抑制剂具有40-50ng/mL的第1天 C_{max} 。在一些实施方案中,该Btk抑制剂具有80-90ng/mL的第1天 C_{max} 。在一些实施方案中,该Btk抑制剂具有90-100ng/mL的第1天 C_{max} 。在一些实施方案中,该Btk抑制剂具有100-110ng/mL的第1天 C_{max} 。在一些实施方案中,该Btk抑制剂具有110-120ng/mL的第1天 C_{max} 。在一些实施方案中,该Btk抑制剂具有120-130ng/mL的第1天 C_{max} 。在一些实施方案中,该Btk抑制剂具有130-140ng/mL的第1天 C_{max} 。在一些实施方案中,该Btk抑制剂具有140-150ng/mL的第1天 C_{max} 。在一些实施方案中,该Btk抑制剂具有150-160ng/mL的第1天 C_{max} 。在一些实施方案中,该Btk抑制剂具有160-170ng/mL的第1天 C_{max} 。在一些实施方案中,该Btk抑制剂具有170-180ng/mL的第1天 C_{max} 。在一些实施方案中,该Btk抑制剂具有180-190ng/mL的第1天 C_{max} 。在一些实施方案中,该Btk抑制剂具有190-200ng/mL的第1天 C_{max} 。在一些实施方案中,该Btk抑制剂具有200-300ng/mL的第1天 C_{max} 。在一些实施方案中,该Btk抑制剂具有300-400ng/mL的第1天 C_{max} 。

[0320] 在一些实施方案中,该Btk抑制剂具有40mg/mL至400ng/mL的第1天 C_{max} 。在一些实施方案中,该Btk抑制剂具有48.7ng/mL至383ng/mL的第1天 C_{max} 。在一些实施方案中,1.25mg/kg剂量的Btk抑制剂具有48.7ng/mL的第1天 C_{max} 。在一些实施方案中,2.5mg/kg剂量的Btk抑制剂具有90.4ng/mL的第1天 C_{max} 。在一些实施方案中,5mg/kg剂量的Btk抑制剂具有86.1ng/mL的第1天 C_{max} 。在一些实施方案中,8.3mg/kg剂量的Btk抑制剂具有135ng/mL的第1天 C_{max} 。在一些实施方案中,12.5mg/kg剂量的Btk抑制剂具有383ng/mL的第1天 C_{max} 。在一些实施方案中,560mg/天剂量的Btk抑制剂具有156ng/mL的第1天 C_{max} 。

[0321] 在一些实施方案中,该Btk抑制剂具有20mg/mL-300ng/mL的稳态 C_{max} 。在一些实施方案中,该Btk抑制剂具有20mg/mL-30ng/mL的稳态 C_{max} 。在一些实施方案中,该Btk抑制剂具有30mg/mL-50ng/mL的稳态 C_{max} 。在一些实施方案中,该Btk抑制剂具有50mg/mL-70ng/mL的稳态 C_{max} 。在一些实施方案中,该Btk抑制剂具有70mg/mL-90ng/mL的稳态 C_{max} 。在一些实施方案中,该Btk抑制剂具有90mg/mL-100ng/mL的稳态 C_{max} 。在一些实施方案中,该Btk抑制剂具有100mg/mL-110ng/mL的稳态 C_{max} 。在一些实施方案中,该Btk抑制剂具有110mg/mL-120ng/mL的稳态 C_{max} 。在一些实施方案中,该Btk抑制剂具有120mg/mL-130ng/mL的稳态 C_{max} 。在一些实施方案中,该Btk抑制剂具有130mg/mL-140ng/mL的稳态 C_{max} 。在一些实施方案中,该Btk抑

制剂具有140mg/mL-150ng/mL的稳态 $C_{\max}$ 。在一些实施方案中,该Btk抑制剂具有150mg/mL-160ng/mL的稳态 $C_{\max}$ 。在一些实施方案中,该Btk抑制剂具有160mg/mL-170ng/mL的稳态 $C_{\max}$ 。在一些实施方案中,该Btk抑制剂具有170mg/mL-180ng/mL的稳态 $C_{\max}$ 。在一些实施方案中,该Btk抑制剂具有180mg/mL-190ng/mL的稳态 $C_{\max}$ 。在一些实施方案中,该Btk抑制剂具有200mg/mL-240ng/mL的稳态 $C_{\max}$ 。

[0322] 在一些实施方案中,该Btk抑制剂具有27ng/mL-236ng/mL的稳态 $C_{\max}$ 。在一些实施方案中,1.25mg/kg剂量的Btk抑制剂具有27ng/mL的稳态 $C_{\max}$ 。在一些实施方案中,2.5mg/kg剂量的Btk抑制剂具有114ng/mL的稳态 $C_{\max}$ 。在一些实施方案中,5mg/kg剂量的Btk抑制剂具有112ng/mL的稳态 $C_{\max}$ 。在一些实施方案中,8.3mg/kg剂量的Btk抑制剂具有183ng/mL的稳态 $C_{\max}$ 。在一些实施方案中,12.5mg/kg剂量的Btk抑制剂具有236ng/mL的稳态 $C_{\max}$ 。在一些实施方案中,560mg/天剂量的Btk抑制剂具有122ng/mL的稳态 $C_{\max}$ 。

[0323] 在一些实施方案中,该Btk抑制剂具有1-2.5小时的 $T_{\max}$ 。在一些实施方案中,该Btk抑制剂具有1.5-2.3小时的 $T_{\max}$ 。在一些实施方案中,该Btk抑制剂具有1.7-2.3小时的 $T_{\max}$ 。在一些实施方案中,该Btk抑制剂具有1.8-2.2小时的 $T_{\max}$ 。

[0324] 在一些实施方案中,1.25mg/kg剂量的Btk抑制剂具有1小时的 $T_{\max}$ 。在一些实施方案中,2.5mg/kg剂量的Btk抑制剂具有2.1小时的 $T_{\max}$ 。在一些实施方案中,5mg/kg剂量的Btk抑制剂具有2.3小时的 $T_{\max}$ 。在一些实施方案中,8.3mg/kg剂量的Btk抑制剂具有1.8小时的 $T_{\max}$ 。在一些实施方案中,12.5mg/kg剂量的Btk抑制剂具有1.7小时的 $T_{\max}$ 。在一些实施方案中,560mg/天剂量的Btk抑制剂具有1.8小时的 $T_{\max}$ 。

[0325] 在一些实施方案中,该Btk抑制剂的 $T_{\max}$ 后平均半衰期为1.5-3小时。在一些实施方案中,该Btk抑制剂具有1.5-2.7小时的 $T_{\max}$ 后平均半衰期。在一些实施方案中,该Btk抑制剂具有1.5-2.5小时的 $T_{\max}$ 后平均半衰期。在一些实施方案中,该Btk抑制剂具有1.5-2.2小时的 $T_{\max}$ 后平均半衰期。在一些实施方案中,该Btk抑制剂具有1.5-1.7小时的 $T_{\max}$ 后平均半衰期。在一些实施方案中,该Btk抑制剂具有2-3小时的 $T_{\max}$ 后平均半衰期。在一些实施方案中,该Btk抑制剂具有2.5-3小时的 $T_{\max}$ 后平均半衰期。在一些实施方案中,该Btk抑制剂具有2.5-2.9小时的 $T_{\max}$ 后平均半衰期。在一些实施方案中,该Btk抑制剂具有2.5-2.8小时的 $T_{\max}$ 后平均半衰期。在一些实施方案中,该Btk抑制剂具有2.5-2.7小时的 $T_{\max}$ 后平均半衰期。

[0326] 在一些实施方案中,1.25mg/kg剂量的Btk抑制剂具有1.7小时的 $T_{\max}$ 后平均半衰期。在一些实施方案中,2.5mg/kg剂量的Btk抑制剂具有1.5小时的 $T_{\max}$ 后平均半衰期。在一些实施方案中,5mg/kg剂量的Btk抑制剂具有2.5小时的 $T_{\max}$ 后平均半衰期。在一些实施方案中,8.3mg/kg剂量的Btk抑制剂具有2.1小时的 $T_{\max}$ 后平均半衰期。在一些实施方案中,12.5mg/kg剂量的Btk抑制剂具有1.5小时的 $T_{\max}$ 后平均半衰期。在一些实施方案中,560mg剂量的Btk抑制剂具有2.65小时的 $T_{\max}$ 后平均半衰期。

[0327] 在一些实施方案中,该Btk抑制剂具有100-2000ng·h/mL的第1天 $AUC_{0-\infty}$ 。在一些实施方案中,该Btk抑制剂具有150-1600ng·h/mL的第1天 $AUC_{0-\infty}$ 。在一些实施方案中,该Btk抑制剂具有150-1100ng·h/mL的第1天 $AUC_{0-\infty}$ 。在一些实施方案中,该Btk抑制剂具有150-1000ng·h/mL的第1天 $AUC_{0-\infty}$ 。在一些实施方案中,该Btk抑制剂具有150-750ng·h/mL的第1天 $AUC_{0-\infty}$ 。在一些实施方案中,该Btk抑制剂具有150-500ng·h/mL的第1天 $AUC_{0-\infty}$ 。在一些实施方案中,该Btk抑制剂具有100-200ng·h/mL的第1天 $AUC_{0-\infty}$ 。在一些实施方案中,该Btk抑

制剂具有400–500ng · h/mL的第1天AUC_{0–∞}。在一些实施方案中,该Btk抑制剂具有400–800ng · h/mL的第1天AUC_{0–∞}。在一些实施方案中,该Btk抑制剂具有400–1000ng · h/mL的第1天AUC_{0–∞}。在一些实施方案中,该Btk抑制剂具有700–1000ng · h/mL的第1天AUC_{0–∞}。在一些实施方案中,该Btk抑制剂具有700–800ng · h/mL的第1天AUC_{0–∞}。

[0328] 在一些实施方案中,1.25mg/kg剂量的Btk抑制剂具有181ng · h/mL的第1天AUC_{0–∞}。在一些实施方案中,2.5mg/kg剂量的Btk抑制剂具有494ng · h/mL的第1天AUC_{0–∞}。在一些实施方案中,5mg/kg剂量的Btk抑制剂具有419ng · h/mL的第1天AUC_{0–∞}。在一些实施方案中,8.3mg/kg剂量的Btk抑制剂具有923ng · h/mL的第1天AUC_{0–∞}。在一些实施方案中,12.5mg/kg剂量的Btk抑制剂具有1550ng · h/mL的第1天AUC_{0–∞}。在一些实施方案中,560mg剂量的Btk抑制剂具有749ng · h/mL的第1天AUC_{0–∞}。

[0329] 在一些实施方案中,Btk抑制剂的体重标准化给药(mg/kg/天)导致可变的第1天AUC_{0–∞}和稳态AUC_{0–24}。

[0330] 在一些实施方案中,该Btk抑制剂具有300–3000ng · h/mL的稳态AUC_{0–24}。在一些实施方案中,该Btk抑制剂具有300–2500ng · h/mL的稳态AUC_{0–24}。在一些实施方案中,该Btk抑制剂具有300–2000ng · h/mL的稳态AUC_{0–24}。在一些实施方案中,该Btk抑制剂具有300–1600ng · h/mL的稳态AUC_{0–24}。在一些实施方案中,该Btk抑制剂具有1500–2500ng · h/mL的稳态AUC_{0–24}。在一些实施方案中,该Btk抑制剂具有1500–2000ng · h/mL的稳态AUC_{0–24}。在一些实施方案中,该Btk抑制剂具有1500–1900ng · h/mL的稳态AUC_{0–24}。在一些实施方案中,该Btk抑制剂具有1500–1600ng · h/mL的稳态AUC_{0–24}。

[0331] 在一些实施方案中,1.25mg/kg剂量的Btk抑制剂具有301ng · h/mL的稳态AUC_{0–24}。在一些实施方案中,2.5mg/kg剂量的Btk抑制剂具有1840ng · h/mL的稳态AUC_{0–24}。在一些实施方案中,5mg/kg剂量的Btk抑制剂具有1580ng · h/mL的稳态AUC_{0–24}。在一些实施方案中,8.3mg/kg剂量的Btk抑制剂具有2330ng · h/mL的稳态AUC_{0–24}。在一些实施方案中,12.5mg/kg剂量的Btk抑制剂具有2936ng · h/mL的稳态AUC_{0–24}。在一些实施方案中,560mg剂量的Btk抑制剂具有1553ng · h/mL的稳态AUC_{0–24}。

[0332] 在一些实施方案中,该Btk抑制剂的未结合分数为1%–5%。在一些实施方案中,该Btk抑制剂的未结合分数为1.5%–4%。在一些实施方案中,该Btk抑制剂的未结合分数为2%–3%。在一些实施方案中,该Btk抑制剂的未结合分数为2.5%。

第二治疗

[0333] 在某些实施方案中,本文公开了一种在有需要的个体中治疗血液恶性肿瘤的方法,该方法包括:(a)向该个体施用包含一定量的不可逆Btk抑制剂的第一治疗;和(b)向该个体施用第二治疗。在某些实施方案中,本文进一步公开了一种在有需要的个体中治疗血液恶性肿瘤的方法,该方法包括:(a)向该个体施用第一治疗,该第一治疗包含足以从该恶性肿瘤动员多个细胞的量的不可逆Btk抑制剂;(b)分析从该个体获得的样品中的动员的多个细胞;和(c)向该个体施用第二治疗。在一些实施方案中,该不可逆Btk抑制剂的量足以诱发自该恶性肿瘤的多个细胞的淋巴细胞增多。在一些实施方案中,分析动员的多个细胞包括测量动员的多个细胞的外周血浓度。在一些实施方案中,该方法进一步包括,在与施用Btk抑制剂之前的浓度相比该动员的多个细胞的外周血浓度增加后,施用第二治疗。在一些实施方案中,在动员的多个细胞的外周血浓度后续降低后,进行第二治疗的施用。在一些实

施方案中,分析该动员的多个细胞包括测量与施用该Btk抑制剂之前的浓度相比该动员的多个细胞的外周血浓度增加的持续时间。在一些实施方案中,该方法进一步包括在该动员的多个细胞的外周血浓度已经增加预定时间长度后,施用第二治疗。在一些实施方案中,分析该动员的多个细胞包括对外周血中动员的多个细胞的数目进行计数。在一些实施方案中,该方法进一步包括在与施用Btk抑制剂之前的数目相比外周血中动员的多个细胞的数目增加后,施用第二治疗。在一些实施方案中,在外周血中的动员的多个细胞的数目后续降低之后,进行第二治疗的施用。在一些实施方案中,分析该动员的多个细胞包括测量与施用Btk抑制剂之前的数目相比在外周血中动员的多个细胞数目增加的持续时间。在一些实施方案中,该方法进一步包括在外周血中的动员的多个细胞的数目已经增加预定时间长度之后,施用第二治疗。

[0334] 在一些实施方案中,在第二治疗之前施用Btk抑制剂减少了对于第二治疗的免疫介导的反应。在一些实施方案中,在奥法木单抗之前施用Btk抑制剂减少了对于奥法木单抗的免疫介导的反应。

[0335] 在一些实施方案中,该第二治疗包含化学治疗剂、类固醇、免疫治疗剂、靶向疗法或其组合。在一些实施方案中,该第二治疗包含B细胞受体途径抑制剂。在一些实施方案中,该B细胞受体途径抑制剂是CD79A抑制剂、CD79B抑制剂、CD19抑制剂、Lyn抑制剂、Syk抑制剂、PI3K抑制剂、Blnk抑制剂、PLC γ 抑制剂、PKCB抑制剂或其组合。在一些实施方案中,该第二治疗包含抗体、B细胞受体信号传导抑制剂、PI3K抑制剂、IAP抑制剂、mTOR抑制剂、放射免疫治疗剂、DNA损伤剂、蛋白体抑制剂、组蛋白脱乙酰酶抑制剂、蛋白激酶抑制剂、刺猬(hedgehog)抑制剂、Hsp90抑制剂、端粒酶抑制剂、Jak1/2抑制剂、蛋白酶抑制剂、PKC抑制剂、PARP抑制剂或其组合。

[0336] 在一些实施方案中,该第二治疗包含苯丁酸氮芥、异环磷酰胺、多柔比星、美沙拉嗪、沙利度胺、来那度胺、坦罗莫司、依维莫司、氟达拉滨、福他替尼(fostamatinib)、紫杉醇、多西紫杉醇、奥法木单抗、利妥昔单抗、地塞米松、强的松、CAL-101、替伊莫单抗、托西莫单抗、硼替佐米、喷司他丁、内皮他丁或其组合。

[0337] 在一些实施方案中,该第二治疗包含来那度胺。

[0338] 在一些实施方案中,该第二治疗包含硼替佐米。

[0339] 在一些实施方案中,该第二治疗包含索拉非尼。

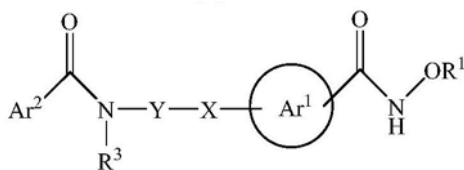
[0340] 在一些实施方案中,该第二治疗包含吉西他滨。

[0341] 在一些实施方案中,该第二治疗包含地塞米松。

[0342] 在一些实施方案中,该第二治疗包含苯达莫司汀。

[0343] 在一些实施方案中,该第二治疗包含R-406。

[0344] 在一些实施方案中,该第二治疗包含HDAC抑制剂。在一些实施方案中,该HDAC抑制剂具有式(I)的结构:



式(I)

其中：

R^1 是氢或烷基；

X是 $-O-$ 、 $-NR^2-$ 或 $-S(O)_n$ ，其中n为0-2，且 R^2 是氢或烷基；

Y是任选地被环烷基取代的亚烷基、任选取代的苯基、烷基硫基、烷基亚磺酰基、烷基磺酰基、任选取代的苯基烷基硫基、任选取代的苯基烷基磺酰基、羟基或任选取代的苯氧基；

Ar^1 是亚苯基或亚杂芳基，其中所述 Ar^1 任选地被独立地选自烷基、卤代、羟基、烷氧基、卤代烷氧基或卤代烷基的一个或两个基团所取代；

R^3 是氢、烷基、羟基烷基或任选取代的苯基；且

Ar^2 是芳基、芳烷基、芳烯基、杂芳基、杂芳烷基、杂芳烯基、环烷基、环烷基烷基、杂环烷基或杂环烷基烷基；

及其单独的立体异构体、单独的几何异构体或其混合物；或其药学上可接受的盐。

在一些实施方案中，所述组蛋白脱乙酰酶抑制剂是3-((二甲基氨基)甲基)-N-(2-(4-(羟基氨基甲酰基)苯氧基)乙基)苯并呋喃-2-甲酰胺。

[0345] 在一些实施方案中，该第二治疗包含紫杉醇。

[0346] 在一些实施方案中，该第二治疗包含长春新碱。

[0347] 在一些实施方案中，该第二治疗包含多柔比星。

[0348] 在一些实施方案中，该第二治疗包含坦罗莫司。

[0349] 在一些实施方案中，该第二治疗包含卡铂。

[0350] 在一些实施方案中，该第二治疗包含奥法木单抗。

[0351] 在一些实施方案中，该第二治疗包含利妥昔单抗。

[0352] 在一些实施方案中，该第二治疗包含环磷酰胺、羟基柔红霉素、长春新碱和强的松，以及任选的利妥昔单抗。

[0353] 在一些实施方案中，该第二治疗包含苯达莫司汀和利妥昔单抗。

[0354] 在一些实施方案中，该第二治疗包含氟达拉滨、环磷酰胺和利妥昔单抗。

[0355] 在一些实施方案中，该第二治疗包含环磷酰胺、长春新碱和强的松，以及任选的利妥昔单抗。

[0356] 在一些实施方案中，该第二治疗包含依托泊苷、多柔比星、长春新碱、环磷酰胺、泼尼松龙，以及任选的利妥昔单抗。

[0357] 在一些实施方案中，该第二治疗包含地塞米松和来那度胺。

[0358] 额外的癌症治疗包括：氮芥类，例如苯达莫司汀、苯丁酸氮芥、氮芥(chlormethine)、环磷酰胺、异环磷酰胺、美法仑、泼尼莫司汀、曲磷胺；烷基磺酸酯类，如白消安、甘露舒凡、曲奥舒凡；乙撑亚胺类，如卡波醌、塞替派、三亚胺醌；亚硝基脲类，如卡莫司汀、福莫司汀、洛莫司汀、尼莫司汀、雷莫司汀、司莫司汀、链佐星；环氧化物类，诸如依托格鲁；其它烷化剂，诸如达卡巴嗪、二溴甘露醇、哌泊溴烷、替莫唑胺；叶酸类似物，诸如甲氨蝶呤、培美曲塞(permetrexed)、普拉曲沙、雷替曲塞；嘌呤类似物，诸如克拉屈滨、氟达拉滨、氟达拉滨、硫嘌呤、奈拉滨、硫鸟嘌呤；嘧啶类似物，诸如阿扎胞苷、卡培他滨、卡莫氟、阿糖胞苷、地西他滨、氟尿嘧啶、吉西他滨、替加氟；长春花生物碱类，诸如长春碱、长春新碱、长春地辛、长春氟宁、长春瑞滨；鬼臼毒素衍生物，诸如依托泊苷、替尼泊苷；秋水仙碱衍生物，诸如秋水仙胺；紫杉烷类，诸如多西紫杉醇、紫杉醇、聚谷紫杉醇(paclitaxel)。

poliglumex);其它植物生物碱类和天然产物,诸如曲贝替定;放线菌素类,诸如放线菌素D;蒽环类,诸如阿柔比星、柔红霉素、多柔比星、表柔比星、伊达比星、米托蒽醌、吡柔比星、戊柔比星、佐柔比星;其它细胞毒性抗生素类,诸如博来霉素、伊沙匹隆、丝裂霉素、普卡霉素;铂化合物,诸如卡铂、顺铂、奥沙利铂、沙铂(satraplatin);甲基胍类,诸如丙卡巴胍;敏化剂,诸如氨基酮戊酸、乙法昔罗、甲基氨基酮戊酸盐、吡吩姆钠、替莫泊芬;蛋白激酶抑制剂,诸如达沙替尼、埃罗替尼、依维莫司、吉非替尼、伊马替尼、拉帕替尼、尼洛替尼、帕唑帕尼(pazopanib)、索拉非尼、舒尼替尼、坦罗莫司;其它抗肿瘤剂,诸如阿利维A酸、六甲蜜胺、安吡啶、阿那格雷、三氧化二砷、天冬酰胺酶、贝沙罗汀、硼替佐米、塞来昔布、地尼白介素2、雌氮芥、羟基脲、伊立替康、氟尼达明、马索罗酚、米替福新、米托胍脲、米托坦、奥利美生、培门冬酶、喷司他丁、罗米地辛、塞西马集(sitimagene ceradenovec)、噻唑呋林、托泊替康、维甲酸、伏林司他;雌激素类,诸如己烯雌酚(diethylstilbenol)、炔雌醇、磷雌酚、聚磷酸雌二醇;孕激素类,诸如孕诺酮、甲羟孕酮、甲地孕酮;促性腺素释放激素类似物,诸如布舍瑞林、戈舍瑞林、亮丙瑞林、曲普瑞林;抗雌激素类,诸如氟维司群、它莫西芬、托瑞米芬;抗雄激素类,诸如比卡鲁胺、氟他胺、尼鲁米特、酶抑制剂、氨鲁米特、阿那曲唑、依西美坦、福美坦、来曲唑、伏氯唑;其它激素拮抗剂类,诸如阿巴瑞克、地加瑞克;免疫刺激剂类,诸如二盐酸组胺、米法莫肽、匹多莫德、普乐沙福、罗喹美克、胸腺五肽;免疫抑制剂类,诸如依维莫司、胍立莫司、来氟米特、霉酚酸、西罗莫司;钙依赖磷酸酶抑制剂类,诸如环孢素、他克莫司;其它免疫抑制剂类,诸如硫唑嘌呤、来那度胺、甲氨蝶呤、沙利度胺;以及放射性药剂类,诸如碘苄胍。

[0359] 额外的癌症治疗包括干扰素类、白介素类、肿瘤坏死因子类、生长因子类,等等。

[0360] 额外的癌症治疗包括:免疫刺激剂类,诸如安西司亭、非格司亭、来格司亭、莫拉司亭、培非司亭、沙格司亭;干扰素类,诸如天然干扰素 α 、干扰素 α -2a、干扰素 α -2b、干扰素 α facon-1、干扰素 α -n1、天然干扰素 β 、干扰素 β -1a、干扰素 β -1b、干扰素 γ 、聚乙二醇干扰素 α -2a、聚乙二醇干扰素 α -2b;白介素类,诸如阿地白介素、奥普瑞白介素;其它免疫刺激剂类,诸如BCG疫苗、醋酸格拉默、二盐酸组胺、免疫花青、香菇多糖、黑色素瘤疫苗、米法莫肽、培加酶、匹多莫德、普乐沙福、聚I:C、聚ICLC、罗喹美克、他索纳明、胸腺五肽;免疫抑制剂类,诸如阿巴西普、阿贝莫司、阿来西普、抗淋巴细胞免疫球蛋白(马)、抗胸腺细胞免疫球蛋白(兔)、依库珠单抗、依法珠单抗、依维莫司、胍立莫司、来氟米特、莫罗单抗-CD3、霉酚酸、那他珠单抗、西罗莫司;TNF α 抑制剂类,诸如阿达木单抗、阿非莫单抗、培化舍珠单抗、依那西普、戈利木单抗、英利昔单抗;白介素抑制剂类,诸如阿那白滞素、巴利昔单抗、卡那奴单抗、达克珠单抗、美泊珠单抗、利纳西普、托珠单抗、乌司奴单抗;钙依赖磷酸酶抑制剂,诸如环孢素、他克莫司;其它免疫抑制剂类,诸如硫唑嘌呤、来那度胺、甲氨蝶呤、沙利度胺。

[0361] 额外的癌症治疗包括阿达木单抗、阿仑珠单抗、巴利昔单抗、贝伐珠单抗、西妥昔单抗、培化舍珠单抗、达克珠单抗、依库珠单抗、依法珠单抗、吉妥珠单抗、替伊莫单抗、英利昔单抗、莫罗单抗-CD3、那他珠单抗、帕木单抗、雷珠单抗、利妥昔单抗、托西莫单抗、曲妥珠单抗等等,或其组合。

[0362] 额外的癌症治疗包括:单克隆抗体,诸如阿仑珠单抗、贝伐珠单抗、卡妥索单抗、西妥昔单抗、依决洛单抗、吉妥珠单抗、奥法木单抗、帕木单抗、利妥昔单抗、曲妥珠单抗;免疫抑制剂类,依库珠单抗、依法珠单抗、莫罗单抗-CD3、那他珠单抗;TNF α 抑制剂类,诸如阿达

木单抗、阿非莫单抗、培化舍珠单抗、戈利木单抗、英利昔单抗；白介素抑制剂类，巴利昔单抗、卡那奴单抗、达克珠单抗、美泊珠单抗、托珠单抗、乌司奴单抗；放射性药剂类，替伊莫单抗、托西莫单抗；其它单克隆抗体，诸如阿巴伏单抗、阿德木单抗、阿仑珠单抗、抗CD30单克隆抗体Xmab2513、抗MET单克隆抗体MetMab、阿泊珠单抗、apomab、阿西莫单抗、巴利昔单抗、双特异性抗体2B1、兰妥莫单抗、brentuximab vedotin、卡罗单抗喷地肽、西妥木单抗、claudiximab、可那木单抗、达西珠单抗、地舒单抗、依库珠单抗、依帕珠单抗、依帕珠单抗、厄马索单抗、埃达珠单抗、芬妥木单抗、夫苏木单抗、加利昔单抗、ganitumab、吉妥珠单抗奥佐米星、glembatumumab、替伊莫单抗、伊珠单抗奥加米星、伊匹木单抗、来沙木单抗、林妥珠单抗、林妥珠单抗、鲁卡木单抗、马帕木单抗、马妥珠单抗、米拉珠单抗、单克隆抗体CC49、奈昔木单抗、尼妥珠单抗、奥法木单抗、奥戈伏单抗、培妥珠单抗、ramacurimab、雷珠单抗、西利珠单抗、sonopelizumab、他尼珠单抗、托西莫单抗、曲妥珠单抗、曲美木单抗、西莫白介素单抗、维妥珠单抗、维西珠单抗、伏洛昔单抗、扎芦木单抗。

[0363] 额外的癌症治疗包括影响肿瘤微环境的药剂，诸如细胞信号网络（例如磷脂酰肌醇3-激酶（PI3K）信号途径、来自B细胞受体和IgE受体的信号传导）。在一些实施方案中，第二药剂是PI3K信号传导抑制剂或syk激酶抑制剂。在一个实施方案中，该syk抑制剂是R788。在另一个实施方案中是PKC γ 抑制剂，仅举例来说，如恩扎妥林。

[0364] 影响肿瘤微环境的药剂的实例包括PI3K信号抑制剂、syk激酶抑制剂、蛋白激酶抑制剂诸如达沙替尼、埃罗替尼、依维莫司、吉非替尼、伊马替尼、拉帕替尼、尼洛替尼、pazopanib、索拉非尼、舒尼替尼、坦罗莫司；其它血管生成抑制剂，诸如GT-111、JI-101、R1530；其它激酶抑制剂，诸如AC220、AC480、ACE-041、AMG 900、AP24534、ARRY-614、AT7519、AT9283、AV-951、阿西替尼、AZD1152、AZD7762、AZD8055、AZD8931、巴氟替尼、BAY 73-4506、BGJ398、BGT226、BI 811283、BI6727、BIBF 1120、BIBW 2992、BMS-690154、BMS-777607、BMS-863233、BSK-461364、CAL-101、CEP-11981、CYC116、DCC-2036、dinaciclib、乳酸度维替尼、E7050、EMD 1214063、ENMD-2076、福他替尼二钠、GSK2256098、GSK690693、INCB18424、INNO-406、JNJ-26483327、JX-594、KX2-391、linifanib、LY2603618、MGCD265、MK-0457、MK1496、MLN8054、MLN8237、MP470、NMS-1116354、NMS-1286937、ON 01919、Na、OSI-027、OSI-930、Btk抑制剂、PF-00562271、PF-02341066、PF-03814735、PF-04217903、PF-04554878、PF-04691502、PF-3758309、PHA-739358、PLC3397、progenipoiectin、R547、R763、雷莫芦单抗、瑞戈非尼、R05185426、SAR103168、S3333333CH 727965、SGI-1176、SGX523、SNS-314、TAK-593、TAK-901、TKI258、TLN-232、TTP607、XL147、XL228、XL281R05126766、XL418、XL765。

[0365] 与Btk抑制剂化合物联合使用的抗癌剂的其它实例包括促分裂原活化的蛋白激酶信号传导的抑制剂，例如U0126、PD98059、PD184352、PD0325901、ARRY-142886、SB239063、SP600125、BAY 43-9006、渥曼青霉素或LY294002；Syk抑制剂；mTOR抑制剂；和抗体（例如美罗华（rituxan））。

[0366] 可以与Btk抑制剂化合物联合使用的其它抗癌剂包括阿霉素、放线菌素D、博来霉素、长春碱、顺铂、阿西维辛；阿柔比星；盐酸阿考达唑；阿克罗宁；阿多来新；阿地白介素；六甲蜜胺；安波霉素；醋酸阿美蒽醌；氨鲁米特；安吡啶；阿那曲唑；安曲霉素；天冬酰胺酶；曲林菌素；阿扎胞苷；阿扎替派；阿佐霉素；巴马司他；苯佐替派；比卡鲁胺；盐酸比生群；二甲磺酸双奈法德；比折来新；硫酸博来霉素；布喹那钠；溴匹立明；白消安；放线菌素C；卡普唑

酮;卡醋胺;卡贝替姆;卡铂;卡莫司汀;盐酸卡柔比星;卡折来新;西地芬戈;苯丁酸氮芥;西罗霉素;克拉屈滨;甲磺酸克立那托;环磷酰胺;阿糖胞苷;达卡巴嗪;盐酸柔红霉素;地西他滨;右奥马铂;地扎胍宁;甲磺酸地扎胍宁;地吡酮;多柔比星;盐酸多柔比星;屈洛昔芬;柠檬酸屈洛昔芬;丙酸屈他雄酮;达佐霉素;依达曲沙;盐酸依氟鸟氨酸;依沙芦星;恩洛铂;恩普氨酯;依匹哌啉;盐酸表柔比星;厄布洛唑;盐酸依索比星;雌莫司汀;雌莫司汀磷酸钠;依他硝唑;依托泊苷;磷酸依托泊苷;氯苯乙酰胺;盐酸法倔唑;法扎拉滨;芬维A胺;氟尿苷;磷酸氟达拉滨;氟尿嘧啶;氟西他滨;磷嗪酮;福司曲星钠;吉西他滨;盐酸吉西他滨;羟基脲;盐酸伊达比星;异环磷酰胺;伊莫福新;白介素II (包括重组白介素II或rIL2)、干扰素 α -2a;干扰素 α -2b;干扰素 α -n1;干扰素 α -n3;干扰素 β -1a;干扰素 γ -1b;异丙铂;盐酸依立替康;醋酸兰瑞肽;来曲唑;醋酸亮丙瑞林;盐酸利阿唑;洛美曲索钠;洛莫司汀;盐酸洛索萘醌;马索罗酚;美登素;盐酸氮芥;醋酸甲地孕酮;醋酸美仑孕酮;美法仑;美诺立尔;巯基嘌呤;甲氨蝶呤;甲氨蝶呤钠;氯苯氨啉;美妥替哌;米丁度胺;米托克星;丝裂红素;米托洁林;米托马星;丝裂霉素;丝裂帕菌素;米托坦;盐酸米托萘醌;麦考酚酸;诺考达唑;诺拉霉素;奥马铂;奥昔舒仑;培门冬酶;培利霉素;戊氮芥;硫酸培洛霉素;培磷酰胺;哌泊溴烷;哌泊舒凡;盐酸吡罗萘醌;普卡霉素;普洛美坦;吡吩姆钠;泊非霉素;泼尼莫司汀;盐酸丙卡巴肼;嘌罗霉素;盐酸嘌罗霉素;吡唑呋喃菌素;利波腺苷;罗谷亚胺;沙芬戈;盐酸沙芬戈;司莫司汀;辛曲秦;磷乙酰天冬氨酸钠;司帕霉素;盐酸锗螺胺;螺莫司汀;螺铂;链黑菌素;链佐星;磺氯苯脲;他利霉素;替可加兰钠;替加氟;盐酸替洛萘醌;替莫泊芬;替尼泊苷;替罗昔隆;睾内酯;硫咪嘌呤;硫鸟嘌呤;塞替派;噻唑呋林;替拉扎明;柠檬酸托瑞米芬;醋酸曲托龙;磷酸曲西立滨;三甲曲沙;三甲曲沙葡萄糖醛酸盐;曲普瑞林;盐酸妥布氯唑;乌拉莫司汀;乌瑞替派;伐普肽;维替泊芬;硫酸长春碱;硫酸长春新碱;长春地辛;硫酸长春地辛;硫酸长春匹定;硫酸长春甘酯;硫酸长春罗新;酒石酸长春瑞滨;硫酸长春罗定;硫酸长春利定;伏氯唑;折尼铂;净司他丁;盐酸佐柔比星。

[0367] 可以与Btk抑制剂化合物联合使用的其它抗癌剂包括:20-表-1,25-二羟基维生素D3;5-乙炔基尿嘧啶;阿比特龙;阿柔比星;酰基富烯;腺环戊醇;阿多来新;阿地白介素;ALL-TK拮抗剂;六甲蜜胺;氨莫司汀;2,4-二氯苯氧乙酸;氨磷汀;氨基酮戊酸;氨柔比星;安吡啉;阿那格雷;阿那曲唑;穿心莲内酯;血管生成抑制剂;拮抗剂D;拮抗剂G;安雷利克斯;抗背部化形态发生蛋白-1;抗雄激素;前列腺癌;抗雌激素;抗瘤酮;反义寡核苷酸;甘氨酸阿非科林;凋亡基因调节剂;凋亡调节剂;脱嘌呤核酸;ara-CDP-DL-PTBA;精氨酸脱氨酶;9-[2-甲氧基-4-(甲基磺酰基氨基)苯基氨基]-N,5-二甲基-4-吡啶甲酰胺(asulacrine);阿他美坦;阿莫司汀;axinastatin 1;axinastatin 2;axinastatin3;阿扎司琼;阿扎毒素;重氮酪氨酸;浆果赤霉素III衍生物;巴兰醇(balanol);巴马司他;BCR/ABL拮抗剂;苯并绿素类;苯甲酰基星孢菌素; β 内酰胺衍生物; β -alethine;贝塔克拉霉素(betaclamycin)B;白桦脂酸;bFGF抑制剂;比卡鲁胺;比生群;二氮丙啶基精胺;双奈法德;二枸橼酸环己噻萘酯A;比折来新;布福雷(breflate);溴匹立明;布度钛;丁硫氨酸亚砷胺;卡泊三醇;钙感光蛋白C(calphostin C);喜树碱衍生物;金丝雀痘IL-2;卡培他滨;甲酰胺-氨基-三唑;羧基酰胺基三唑;CaRest M3;CARN 700;软骨源的抑制剂;卡折来新;酪蛋白激酶抑制剂(ICOS);栗精胺;天蚕抗菌肽B;西曲瑞克;二氢卟吩(chlorins);磺胺氯喹啉;西卡前列素;顺式卟啉;克拉屈滨;氯米芬类似物;克霉唑;考利丝霉素(collismycin)A;考利丝霉素B;考布他汀A4;

考布他汀类似物;conagenin;crambescidin 816;克立那托;自念珠藻环肽8;自念珠藻环肽A衍生物;curacin A;环戊蒽醌;环铂(cycloplatam);赛可霉素(cypemycin);阿糖胞苷十八烷基磷酸钠;细胞裂解因子;磷酸己烷雌酚;达昔单抗;地西他滨;脱氢的环羧酚酸肽(dehydrodidemnin)B;地洛瑞林;地塞米松;右异环磷酰胺;右雷佐生;右维拉帕米;地吡醌;膜海鞘素B;3,4-二羟基苯并氧肟酸(didox);二乙基去甲精胺;二氢-5-氮杂胞苷;9-二草霉素;二苯基螺莫司汀;二十二烷醇;多拉司琼;去氧氟尿苷;屈洛昔芬;屈大麻酚;多卡霉素(duocarmycin)SA;依布硒;依考莫司汀;依地福新;依决洛单抗;依氟鸟氨酸;榄香烯;乙噻替氟;表柔比星;爱普列特;雌莫司汀类似物;雌激素激动剂;雌激素拮抗剂;依他硝唑;磷酸依托泊苷;依西美坦;法倔唑;法扎拉滨;芬维A胺;非格司亭;非那雄胺;夫拉平度;氟卓斯汀;茈萸固酮;氟达拉滨;盐酸氟道诺霉素;福酚美克;福美坦;福司曲星;福莫司汀;得克萨菲琳钆;硝酸镓;加洛他滨;加尼瑞克;明胶酶抑制剂;吉西他滨;谷胱甘肽抑制剂;氨基磺酸1,7-庚烷二基酯(hepsulfam);神经生长因子(heregulin);六亚甲基二乙酰胺;金丝桃素;伊班膦酸;伊达比星;艾多昔芬;伊决孟酮;伊莫福新;伊洛马司他;咪唑并吡啶酮;咪喹莫特;免疫刺激肽;胰岛素,如,生长因子-1受体抑制剂;干扰素激动剂;干扰素;白介素;碘苄胍;碘多柔比星;4-甘薯醇;伊罗普拉;伊索拉定;异邦格唑(isobengazole);isohomohalicondrin B;伊他司琼;jasplakinolide;kahalalide F;三乙酸片螺素-N;兰瑞肽;雷那霉素(leinamycin);来格司亭;硫酸香菇多糖;leptolstatin;来曲唑;白血病抑制因子;白细胞 α 干扰素;亮丙瑞林+雌激素+孕酮;亮丙瑞林;左旋咪唑;利阿唑;线形聚胺类似物;亲脂性二糖肽;亲脂性铂化合物;lissoclinamide 7;洛铂;蚯蚓磷脂;洛美曲索;氯尼达明;洛索蒽醌;洛伐他汀;洛索立宾;勒托替康;得克萨菲琳钆;1-((R)-5-羟基己基)可可碱(lysofylline);裂解肽;美坦新;mannostatin A;马立马司他;马索罗酚;乳腺丝氨酸蛋白酶抑制蛋白(maspin);基质溶解素抑制剂;基质金属蛋白酶抑制剂;美诺立尔;美巴龙;美替瑞林;甲硫氨酸酶;甲氧氯普胺;MIF抑制剂;米非司酮;米替福新;米立司亭;错配的双链RNA;米托胍脲;二溴卫矛醇;丝裂霉素类似物;米托蒽胺;迈托毒素(mitotoxin)成纤维细胞生长因子-皂草素;米托蒽醌;莫法罗汀;莫拉司亭;单克隆抗体,人绒毛膜促性腺激素;单磷酸基脂质A+分支杆菌细胞壁sk;莫哌达醇;多药抗药性基因抑制剂;基于多肿瘤抑制剂1的治疗;芥抗癌剂;mycaperoxide B;分枝杆菌细胞壁提取物;myriaporone;N-乙酰基地那林;N-取代苯甲酰胺;那法瑞林;nagrestip;纳洛酮+镇痛新;napavin;萘萘二醇;那托司亭;奈达铂;奈莫柔比星;奈立膦酸;中性肽链内切酶;尼鲁米特;尼沙霉素(nisamycin);一氧化氮调节剂;硝基氧抗氧化剂;nitrullyn;06-苄基鸟嘌呤;奥曲肽;okicenone;寡核苷酸;奥那司酮;昂丹司琼;昂丹司琼;双氯非那胺(oracin);口服细胞因子诱导剂;奥马铂;奥沙特隆;奥沙利铂;奥克萨霉素(oxaunomycin);帕劳胺;棕榈酰根瘤菌素;帕米膦酸;人参三醇;帕诺米芬;六配位儿茶胺铁螯合剂副菌铁素(parabactin);帕折普汀;培门冬酶;培得星;戊聚糖聚硫酸钠;喷司他丁;盘托唑(pentrozole);潘氟隆;培磷酰胺;紫苏子醇;吩嗪霉素(phenazinomycin);乙酸苯酯;磷酸酶抑制剂;毕西巴尼;盐酸匹鲁卡品;吡柔比星;吡曲克辛;胎盘素(placetin)A;胎盘素(placetin)B;纤溶酶原激活剂的抑制剂;铂复合物;铂化合物;铂-三胺复合物;吡吩姆钠;泊非霉素;泼尼松;丙基二-吡啶酮;前列腺素J2;蛋白酶体抑制剂;基于蛋白A的免疫调节剂;蛋白激酶C抑制剂;蛋白激酶C抑制剂,微藻;蛋白酪氨酸磷酸酶抑制剂;嘌呤核苷磷酸化酶抑制剂;羟基茜草素;吡唑啉吡啶;吡醇羟乙酯化血红蛋白

聚氧乙烯共轭物;raf拮抗剂;雷替曲塞;雷莫司琼;ras法呢基蛋白转移酶抑制剂;ras抑制剂;ras-GAP抑制剂;去甲基瑞替普汀;依替膦酸铈Re 186;根霉素;核酶;RII维A胺;罗谷亚胺;罗希吐碱;罗莫肽;罗喹美克;rubiginone B1;ruboxyl;沙芬戈;saintopin;SarCNU;肌植醇(sarcophytol)A;沙格司亭;Sdi 1模拟物;司莫司汀;衰老源的抑制剂1;有义寡核苷酸;信号转导抑制剂;信号转导调节剂;单链抗原结合蛋白;西佐喃;索布佐生;硼卡钠;苯乙酸钠;solverol;生长调节素结合蛋白;索纳明;膦门冬酸;斯拜可霉素(spicamycin)D;螺莫司汀;脾脏五肽;CD-螺环缩酮前体 δ -内酯1;鲨胺;干细胞抑制剂;干细胞分裂抑制剂;stipiamide;基质溶解素抑制剂;sulfinosine;强效的血管活性肠肽拮抗剂;suradista;舒拉明;苦马豆碱;合成的糖胺聚糖;他莫司汀;他莫昔芬甲碘化物;牛磺莫司汀;他扎罗汀;替可加兰钠;替加氟;tellurapyrylium;端粒酶抑制剂;替莫泊芬;替莫唑胺;替尼泊苷;十氧化四氯;四氮胺(tetrazomine);唐松草碱;噻可拉林;血小板生成素;血小板生成素模拟物;胸腺法新;胸腺生成素受体激动剂;胸腺曲南;促甲状腺激素;乙基锡初紫红素;替拉扎明;二氯钛烯;topsentin;托瑞米芬;全能干细胞因子;翻译抑制剂;维甲酸;三乙酰基尿苷;曲西立滨;三甲曲沙;曲普瑞林;托烷司琼;妥罗雄脲;酪氨酸激酶抑制剂;酪氨酸磷酸化抑制剂(tyrphostins);UBC抑制剂;乌苯美司;泌尿生殖窦源的生长抑制因子;尿激酶受体拮抗剂;伐普肽;variolin B;载体系统,红细胞基因治疗;维拉雷琐;藜芦胺;verdins;维替泊芬;长春瑞滨;长春磷汀;维他辛(vitaxin);伏氯唑;扎诺特隆;折尼铂;亚苄维C;和净司他丁斯酯。

[0368] 可以与Btk抑制剂化合物联合使用的又一些其它的抗癌剂包括烷化剂、抗代谢物、天然产物或激素,例如氮芥类(例如氮芥、环磷酰胺、苯丁酸氮芥等)、烷基磺酸酯(例如白消安)、亚硝基脲(例如卡莫司汀、洛莫司汀等)或三氮烯类(氮烯咪胺等)。抗代谢物的实例包括但不限于叶酸类似物(例如甲氨蝶呤)或嘧啶类似物(例如阿糖胞苷)、嘌呤类似物(例如巯基嘌呤、硫鸟嘌呤、喷司他丁)。

[0369] 可以与Btk抑制剂化合物联合使用的烷化剂的实例包括但不限于氮芥类(例如氮芥、环磷酰胺、苯丁酸氮芥、美法仑等)、乙烯亚胺和甲基三聚氰胺(例如六甲基三聚氰胺、塞替派)、烷基磺酸酯(例如白消安)、亚硝基脲(例如卡莫司汀、洛莫司汀、司莫司汀、链佐星等)或三氮烯类(氮烯咪胺等)。抗代谢物的实例包括但不限于叶酸类似物(例如甲氨蝶呤)或嘧啶类似物(例如氟尿嘧啶、氟尿苷、阿糖胞苷)、嘌呤类似物(例如巯基嘌呤、硫鸟嘌呤、喷司他丁)。

[0370] 通过由于稳定化微管来将细胞阻滞于G2-M期而起作用并且可以与Btk抑制剂化合物联合使用的抗癌剂实例包括但不限于下列市售药物和开发中的药物:厄布洛唑(Erbulazole,也称为R-55104)、多拉司他汀10(Dolastatin 10,也称为DLS-10和NSC-376128)、羟乙基磺酸米伏布林(Mivobulin isethionate,也称为CI-980)、长春新碱、NSC-639829、圆皮海绵内酯(Discodermolide,也称为NVP-XX-A-296)、ABT-751(Abbott,也称为E-7010)、阿托瑞亭(Altorhyrtin,诸如阿托瑞亭A和阿托瑞亭C)、海绵抑素(Spongistatin,诸如海绵抑素1、海绵抑素2、海绵抑素3、海绵抑素4、海绵抑素5、海绵抑素6、海绵抑素7、海绵抑素8和海绵抑素9)、盐酸西马多丁(Cemadotin hydrochloride,也称为LU-103793和NSC-D-669356)、埃博霉素类(诸如埃博霉素A、埃博霉素B、埃博霉素C(也称为脱氧埃博霉素A或dEpoA)、埃博霉素D(也称为KOS-862、dEpoB和脱氧埃博霉素B)、埃博霉素E、埃博霉素F、

埃博霉素BN-氧化物、埃博霉素A N-氧化物、16-氮杂埃博霉素B、21-氨基埃博霉素B(也称为BMS-310705)、21-羟基埃博霉素D(也称为脱氧埃博霉素F和dEpoF)、26-氟埃博霉素)、阿瑞他丁PE(Auristatin PE,也称为NSC-654663)、索利多丁(Soblidotin,也称为TZT-1027)、LS-4559-P(Pharmacia,也称为LS-4577)、LS-4578(Pharmacia,也称为LS-477-P)、LS-4477(Pharmacia)、LS-4559(Pharmacia)、RPR-112378(Aventis)、硫酸长春新碱、DZ-3358(Daiichi)、FR-182877(Fujisawa,也称为WS-9885B)、GS-164(Takeda)、GS-198(Takeda)、KAR-2(Hungarian Academy of Sciences)、BSF-223651(BASF,也称为ILX-651和LU-223651)、SAH-49960(Lilly/Novartis)、SDZ-268970(Lilly/Novartis)、AM-97(Armad/Kyowa Hakko)、AM-132(Armad)、AM-138(Armad/Kyowa Hakko)、IDN-5005(Indena)、念珠藻环肽52(Cryptophycin 52,也称为LY-355703)、AC-7739(Ajinomoto,也称为AVE-8063A和CS-39.HCl)、AC-7700(Ajinomoto,也称为AVE-8062、AVE-8062A、CS-39-L-Ser.HCl和RPR-258062A)、Vitilevuamide、Tubulysin A、Canadensol、矢车菊黄素(Centaureidin,也称为NSC-106969)、T-138067(Tularik,也称为T-67, TL-138067和TI-138067)、COBRA-1(Parker Hughes Institute,也称为DDE-261和WHI-261)、H10(Kansas State University)、H16(Kansas State University)、奥可西丁A1(Oncocidin A1,也称为BT0-956和DIME)、DDE-313(Parker Hughes Institute)、Fijianolide B、Laulimalide、SPA-2(Parker Hughes Institute)、SPA-1(Parker Hughes Institute,也称为SPIKET-P)、3-IAABU(细胞骨架/Mt.Sinai School of Medicine,也称为MF-569)、宁咳平(Narcosine)(也称为NSC-5366)、那可丁(Nascapine)、D-24851(Asta Medica)、A-105972(Abbott)、哈密特林(Hemiasterlin)、3-BAABU(细胞骨架/Mt.Sinai School of Medicine,也称为MF-191)、TMPN(Arizona State University)、双钒乙酰丙酮化物、T-138026(Tularik)、Monsatrol、Inanocine(也称为NSC-698666)、3-1AABE(细胞骨架/Mt.Sinai School of Medicine)、A-204197(Abbott)、T-607(Tularik,也称为T-900607)、RPR-115781(Aventis)、艾榴素(Eleutherobin,诸如去甲基艾榴素、去乙酰基艾榴素、异艾榴素A和Z-艾榴素)、Caribaeoside、Caribaeolin、软海绵素B(Halichondrin B)、D-64131(Asta Medica)、D-68144(Asta Medica)、含氯环肽A(Diazonamide A)、A-293620(Abbott)、NPI-2350(Nereus)、根薯酮内酯A(Taccalonolide A、TUB-245(Aventis)、A-259754(Abbott)、Diozostatin、(-)-Phenylahistin(也称为NSCL-96F037)、D-68838(Asta Medica)、D-68836(Asta Medica)、肌基质蛋白B(Myoseverin B)、D-43411(Zentaris,也称为D-81862)、A-289099(Abbott)、A-318315(Abbott)、HTI-286(也称为SPA-110,三氟醋酸盐)(Wyeth)、D-82317(Zentaris)、D-82318(Zentaris)、SC-12983(NCI)、Resverastatin磷酸钠、BPR-0Y-007(National Health Research Institutes)和SSR-250411(Sanofi)。

生物标记

[0371] 在某些实施方案中,本文公开了一种在有需要的个体中治疗血液恶性肿瘤的方法,包括:(a)向该个体施用第一治疗,该第一治疗包含足以从该恶性肿瘤动员多个细胞的量的不可逆Btk抑制剂;和(b)制备从该多个细胞中分离的细胞群体的生物标记谱。在一些实施方案中,该不可逆Btk抑制剂的量足以诱发来自该恶性肿瘤的多个细胞的淋巴细胞增多。

[0372] 在一些实施方案中,该生物标记表达谱用于诊断血液恶性肿瘤、确定其预后或产

生其预测谱。在一些实施方案中,该生物标记谱指示生物标记的表达、生物标记的表达水平、生物标记中的突变或生物标记的存在。

[0373] 在一些实施方案中,该生物标记谱指示血液恶性肿瘤是否涉及Btk信号传导。在一些实施方案中,该生物标记谱指示血液恶性肿瘤的存活是否涉及Btk信号传导。

[0374] 在一些实施方案中,该生物标记谱指示血液恶性肿瘤不涉及Btk信号传导。在一些实施方案中,该生物标记谱指示血液恶性肿瘤的存活不涉及Btk信号传导。

[0375] 在一些实施方案中,该生物标记谱指示血液恶性肿瘤是否涉及BCR信号传导。在一些实施方案中,该生物标记谱指示血液恶性肿瘤的存活是否涉及BCR信号传导。

[0376] 在一些实施方案中,该生物标记谱指示血液恶性肿瘤不涉及BCR信号传导。在一些实施方案中,该生物标记谱指示血液恶性肿瘤的存活不涉及BCR信号传导。

[0377] 在一些实施方案中,该血液恶性肿瘤是CLL。在一些实施方案中,该血液恶性肿瘤是弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)。在一些实施方案中,该血液恶性肿瘤是弥漫性大B细胞淋巴瘤ABC-亚型(ABC-DLBCL)。在一些实施方案中,该血液恶性肿瘤是套细胞淋巴瘤(MCL)。在一些实施方案中,该血液恶性肿瘤是滤泡性淋巴瘤(FL)。

[0378] 在一些实施方案中,该生物标记是任何细胞遗传、细胞表面分子或蛋白质或RNA表达标记。在一些实施方案中,该生物标记是:ZAP70;t(14,18); β -2微球蛋白;p53突变状态;ATM突变状态;del(17)p;del(11)q;del(6)q;CD5;CD11c;CD19;CD20;CD22;CD25;CD38;CD103;CD138;分泌型、表面型或细胞质型免疫球蛋白表达; V_H 突变状态;或其组合。

[0379] 在一些实施方案中,该方法进一步包括基于该生物标记谱向个体提供第二治疗。在一些实施方案中,该方法进一步包括基于该生物标记谱不施用不可逆Btk抑制剂。在一些实施方案中,该方法进一步包括基于该生物标记谱不施用第二治疗。在一些实施方案中,该方法进一步包括基于该生物标记谱预测治疗的功效。

[0380] 在某些实施方案中,该方法包括基于某些生物标记的表达或存在诊断血液恶性肿瘤、确定其预后或产生其预测谱。在其它实施方案中,该方法进一步包括基于受影响的淋巴细胞中某些生物标记的表达或存在将患者群体分层。在另外其它的实施方案中,该方法进一步包括,基于受影响的淋巴细胞中某些生物标记的表达或存在,为受试者确定治疗剂(therapeutic)。在又其它的实施方案中,该方法进一步包括,基于受影响的淋巴细胞中某些生物标记的表达或存在,预测受试者中对于疗法的反应。

[0381] 在某些方面,本文提供在受试者中诊断血液恶性肿瘤、确定其预后或产生其预测谱的方法,包括:(a)向该受试者施用足以造成血液中淋巴细胞亚群的增加或出现的Btk抑制剂;和(b)测定一个或多个淋巴细胞亚群中一种或多种生物标记的表达或存在;其中一种或多种生物标记的表达或存在用于诊断血液恶性肿瘤、确定血液恶性肿瘤的预后,或产生血液恶性肿瘤的预测谱。在一个实施方案中,血液中淋巴细胞亚群的增加或出现通过免疫表型分型来测定。在另一个实施方案中,血液中淋巴细胞亚群的增加或出现通过荧光激活细胞分选(FACS)来测定。

[0382] 在其它方面,本文提供将患有血液恶性肿瘤的患者群体分层的方法,包括:(a)向受试者施用足以造成血液中淋巴细胞亚群的增加或出现的Btk抑制剂;和(b)测定一个或多个淋巴细胞亚群中一种或多种生物标记的表达或存在;其中一种或多种生物标记的表达或存在用于将患者针对血液恶性肿瘤的治疗进行分层。在一个实施方案中,血液中淋巴细胞

亚群的增加或出现通过免疫表型分型来测定。在另一个实施方案中,血液中淋巴细胞亚群的增加或出现通过荧光激活细胞分选 (FACS) 来测定。

[0383] 在另外其它方面,本文提供在患有血液恶性肿瘤的受试者中确定治疗剂的方法,包括:(a) 向该受试者施用足以造成血液中淋巴细胞亚群的增加或出现的Btk抑制剂;和(b) 测定一个或多个淋巴细胞亚群中一种或多种生物标记的表达或存在;其中一种或多种生物标记的表达或存在用于为血液恶性肿瘤的治疗确定治疗剂。在一个实施方案中,血液中淋巴细胞亚群的增加或出现通过免疫表型分型来测定。在另一个实施方案中,血液中淋巴细胞亚群的增加或出现通过荧光激活细胞分选 (FACS) 来测定。

[0384] 在另外其它方面,本文提供预测患有血液恶性肿瘤的受试者中对于疗法的方法,包括:(a) 向该个体施用足以造成血液中淋巴细胞亚群的增加或出现的Btk抑制剂;和(b) 测定一个或多个淋巴细胞亚群中一种或多种生物标记的表达或存在;其中一种或多种生物标记的表达或存在用于预测受试者对于血液恶性肿瘤的疗法的反应。在一个实施方案中,血液中淋巴细胞亚群的增加或出现通过免疫表型分型来测定。在另一个实施方案中,血液中淋巴细胞亚群的增加或出现通过荧光激活细胞分选 (FACS) 来测定。

[0385] 在某些方面,本文提供在受试者中诊断血液恶性肿瘤、确定其预后或产生其预测谱的方法,包括测定已经接受了Btk抑制剂剂量的受试者的一个或多个淋巴细胞亚群中一种或多种生物标记的表达或存在,其中一种或多种生物标记的表达或存在用于诊断血液恶性肿瘤、确定血液恶性肿瘤的预后或产生血液恶性肿瘤的预测谱。在一个实施方案中,Btk抑制剂的剂量足以造成血液中淋巴细胞亚群的增加或出现,该增加或出现通过免疫表型分型来界定。在另一个实施方案中,测定一个或多个淋巴细胞亚群中一种或多种生物标记的表达或存在进一步包括分离、检测或测量一种或多种类型的淋巴细胞。在又一个实施方案中,该Btk抑制剂是可逆的或不可逆的抑制剂。

[0386] 在其它方面,本文提供将患有血液恶性肿瘤的患者群体分层的方法,包括测定已经接受了Btk抑制剂剂量的受试者的一个或多个淋巴细胞亚群中一种或多种生物标记的表达或存在,其中一种或多种生物标记的表达或存在用于将患者针对血液恶性肿瘤的治疗进行分层。在一个实施方案中,Btk抑制剂的剂量足以造成血液中淋巴细胞亚群的增加或出现,该增加或出现通过免疫表型分型来界定。在另一个实施方案中,测定一个或多个淋巴细胞亚群中一种或多种生物标记的表达或存在进一步包括分离、检测或测量一种或多种类型的淋巴细胞。在又一个实施方案中,该Btk抑制剂是可逆的或不可逆的抑制剂。

[0387] 在另外其它方面,本文提供在患有血液恶性肿瘤的受试者中确定治疗剂的方法,包括测定已经接受了Btk抑制剂剂量的受试者的一个或多个淋巴细胞亚群中一种或多种生物标记的表达或存在,其中一种或多种生物标记的表达或存在用于为血液恶性肿瘤的治疗确定治疗剂。在一个实施方案中,Btk抑制剂的剂量足以造成血液中淋巴细胞亚群的增加或出现,该增加或出现通过免疫表型分型来界定。在另一个实施方案中,测定一个或多个淋巴细胞亚群中一种或多种生物标记的表达或存在进一步包括分离、检测或测量一种或多种类型的淋巴细胞。在又一个实施方案中,该Btk抑制剂是可逆的或不可逆的抑制剂。

[0388] 在另外其它方面,本文提供预测患有血液恶性肿瘤的受试者中对疗法的反应的方法,包括测定已经接受了Btk抑制剂剂量的受试者的一种或多种循环淋巴细胞中一种或多种生物标记的表达或存在,其中一种或多种生物标记的表达或存在用于预测受试者对血液

恶性肿瘤疗法的反应。在一个实施方案中,Btk抑制剂的剂量足以造成血液中淋巴细胞亚群的增加或出现,该增加或出现通过免疫表型分型来界定。在另一个实施方案中,测定一个或多个淋巴细胞亚群中一种或多种生物标记的表达或存在进一步包括分离、检测或测量一种或多种类型的淋巴细胞。在又一个实施方案中,该Btk抑制剂是可逆的或不可逆的抑制剂。

[0389] 如此处所预期的,在一些实施方案中,任何与血液恶性肿瘤有关的生物标记使用于本方法中。这些生物标记包括任何生物分子(发现于血液、其它体液或组织中)或任何是血液恶性肿瘤的指征的染色体异常。在某些实施方案中,生物标记包括但不限于TdT、CD5、CD11c、CD19、CD20、CD22、CD79a、CD15、CD30、CD38、CD138、CD103、CD25、ZAP-70、p53突变状态、ATM突变状态、IgV_H突变状态、17号染色体缺失(del17p)、6号染色体缺失(del6q)、7号染色体缺失(del7q)、11号染色体缺失(del11q)、12号染色体三体、13号染色体缺失(del13q)、t(11:14)染色体易位、t(14:18)染色体易位、CD10、CD23、 β -2微球蛋白、bcl-2表达、CD9、幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*)的存在、CD154/CD40、Akt、NF- κ B、WNT、Mtor、ERK、MAPK和Src酪氨酸激酶的表达。在某些实施方案中,生物标记包括ZAP-70、CD5、t(14:18)、CD38、 β -2微球蛋白、p53突变状态、ATM突变状态、染色体17p缺失、染色体11q缺失、表面或细胞质免疫球蛋白、CD138、CD25、6q缺失、CD19、CD20、CD22、CD11c、CD103、染色体7q缺失、V_H突变状态或其组合。

[0390] 在某些实施方案中,通过针对本领域已知的一种或多种临床上有用的生物标记筛查候选受试者,来鉴定患有会受益于已知治疗的血液恶性肿瘤或癌前的患者亚群。可以使用任何本领域技术人员已知的临床上有用的预后标记。在一些实施方案中,该亚群包括患有慢性淋巴细胞性白血病(CLL)的患者,且特别感兴趣的临床上有用的预后标记包括但不限于ZAP-70、CD38、 β 2微球蛋白,和细胞遗传标记,例如p53突变状态、ATM突变状态、染色体缺失,诸如染色体17p缺失和染色体11q缺失,所有以上标记均是该疾病的临床上有用的预后标记。

[0391] ZAP-70是一种酪氨酸激酶,其与T细胞抗原受体(TCR) ζ 亚单位缔合,并且在T细胞激活和发育中起关键作用(Chan等(1992)Cell171:649-662)。ZAP-70经历酪氨酸磷酸化,并且是介导TCR刺激之后的信号转导所必需的。酪氨酸激酶的过度表达或组成性激活经证实涉及若干恶性肿瘤,包括白血病和数种类型的实体瘤。举例来说,增加的ZAP-70RNA表达水平是慢性淋巴细胞性白血病(CLL)的预后标记(Rosenwald等(2001)J.Exp.Med.194:1639-1647)。ZAP-70在T细胞和自然杀伤细胞中表达,但尚未发现它们会在正常B细胞中表达。然而,ZAP-70在慢性淋巴细胞性白血病/小淋巴细胞性淋巴瘤(CLL/SLL)患者的B细胞中高水平表达,且更具体地,在CLL患者的亚组中高水平表达,该亚组的患者倾向于具有在带有未突变Ig基因的CLL/SLL患者中所发现的更有侵略性的临床进程(Wiestner等(2003)Blood 101:4944-4951;美国专利申请公开号20030203416)。由于ZAP-70表达水平与Ig基因突变状态的相关性,ZAP-70可以用作预后指标,以鉴定哪些患者可能具有严重疾病(高ZAP-70,未突变的Ig基因),而他们因此成为侵略性疗法的候选者。

[0392] CD38是一种信号转导分子,同时也是一种催化环ADP核糖(cADPR)的合成和降解的外酶。CD38的表达以高水平存在于骨髓前体B细胞中,在静息的正常B细胞中下调,然后在终末分化的浆细胞中再表达(Campana等(2000)Chem.Immunol.75:169-188)。CD38是一种可靠

的B-CLL预后指标,CD38的表达通常指示不乐观的结果(D'Arena等(2001) *Leuk. Lymphoma* 42:109; Del Poeta等(2001) *Blood* 98:2633; Durig等(2002) *Leukemia* 16:30; Ibrahim等(2001) *Blood* 98:181; Deaglio等(2003) *Blood* 102:2146-2155)。与CD38表达有关联的不乐观的临床指征包括疾病晚期、对化学疗法的反应性不佳、需要初始治疗前的时间较短,和较短的存活时间(Deaglio等(2003) *Blood* 102:2146-2155)。最初,观察到CD38表达与IgV基因突变之间的强相关性,具有未突变V基因的患者比具有突变V基因的患者展现出更高百分比的CD38⁺B-CLL细胞(Damle等(1999) *Blood* 94:1840-1847)。然而,后续研究已经表明,CD38表达并非总是与IgV基因的重排相关(Hamblin等(2002) *Blood* 99:1023; Thunberg等(2001) *Blood* 97:1892)。

[0393] p53是一种作为肿瘤抑制剂的核磷蛋白。野生型p53参与调节细胞生长和分裂。p53与DNA结合,刺激蛋白质(p21)的产生,该蛋白质(p21)与细胞分裂刺激蛋白(cdk2)相互作用。当p21与cdk2结合时,会阻断细胞进入细胞分裂的下一个阶段。突变型p53不能有效地结合DNA,因此阻止了p21作为细胞分裂的停止信号起作用,导致不受控制的细胞分裂和肿瘤形成。p53也调控响应于DNA损伤、细胞应激或一些癌基因的异常表达的程序性细胞死亡(凋亡)的诱发。已证实在一些癌细胞系中野生型p53的表达可恢复生长抑制的控制(Casey等(1991) *Oncogene* 6:1791-1797; Takahashi等(1992) *Cancer Res.* 52:734-736)。p53的突变在大部分的肿瘤类型中发现,包括结肠、乳房、肺、卵巢、膀胱和很多其它器官的肿瘤。已经发现p53突变与伯基特淋巴瘤、L3-型B细胞急性淋巴母细胞性白血病、B细胞慢性淋巴细胞性白血病有关(Gaidano等(1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88:5413-5417)。还发现p53的异常与B细胞幼淋巴细胞白血病有关(Lens等(1997) *Blood* 89:2015-2023)。p53的基因位于17号染色体的短臂上,在17p13.105-p12处。

[0394] β 2-微球蛋白是一种细胞外蛋白质,它与I类主要组织相容性复合物(MHC)的 α 链非共价缔合。它在血清中是可检测的,并且是CLL(Keating等(1998) *Blood* 86:606a)和霍奇金淋巴瘤(Chronowski等(2002) *Cancer* 95:2534-2538)的一种不利的预后指标。它在临床上用于淋巴增生性疾病,包括白血病、淋巴瘤和多发性骨髓瘤,其中血清 β -2-微球蛋白水平与肿瘤细胞负荷、预后和疾病活动性有关(Bataille等(1983) *Br. J. Haematol.* 55:439-447; Aviles等(1992) *Rev. Invest. Clin.* 44:215-220)。 β 2微球蛋白在对骨髓瘤患者进行分期方面也是有用的(Pasqualetti等(1991) *Eur. J. Cancer* 27:1123-1126)。

[0395] 细胞遗传性畸变也可用作标记,以产生血液恶性肿瘤的预测谱。举例来说,染色体异常在高比例的CLL患者中发现,并且有助于预测CLL的进程。举例来说,17p缺失预示侵略性的疾病进展。另外,已知具有染色体17p缺失或p53突变或两者的CLL患者对化疗药物和利妥昔单抗的反应不佳。染色体17p上的等位基因缺失也可能是结直肠癌的有用的预后标记,其中具有17p缺失的患者与结直肠癌中疾病播散的上升趋势有关联(Khine等(1994) *Cancer* 73:28-35)。

[0396] 11号染色体长臂(11q)的缺失是各种类型的淋巴增生性疾病中最常见的结构性染色体畸变之一。具有染色体11q缺失和可能的ATM突变的CLL患者与没有这一缺陷或17p缺失的患者相比具有较差的存活。此外,11q缺失经常伴随有广泛的淋巴结累及(Dohner等(1997) *Blood* 89:2516-2522)。这一缺失也鉴定出在高剂量疗法和自体移植之后处于疾病持久性高风险中的患者。

[0397] 共济失调性毛细血管扩张突变 (ATA4) 基因是一种参与细胞周期停滞、细胞凋亡和 DNA 双链断裂的修复的肿瘤抑制基因。它在 11 号染色体上发现。ATM 突变与具有乳腺癌家族史 (Chenevix-Trench 等 (2002) *J. Natl. Cancer Inst.* 94:205-215; Thorstenson 等 (2003) *Cancer Res.* 63:3325-3333) 和/或早发型乳腺癌 (Izatt 等 (1999) *Genes Chromosomes Cancer* 26:286-294; Teraoka 等 (2001) *Cancer* 92:479-487) 的女性中罹患乳腺癌的风险增加有关联。横纹肌肉瘤与 ATM 基因突变/缺失也存在高频率的相关性 (Zhang 等 (2003) *Cancer Biol. Ther.* 1:87-91)。

[0398] 检测患者中的染色体异常的方法是本领域所熟知的 (参见, 例如 Cuneo 等 (1999) *Blood* 93:1372-1380; Dohner 等 (1997) *Blood* 89:2516-2522)。测量突变蛋白质如 ATM 的方法是本领域所熟知的 (参见, 例如 Butch 等 (2004) *Clin. Chem.* 50:2302-2308)。

[0399] 因此, 本文所述的方法中所评估的生物标记包括上文所述的细胞存活和凋亡蛋白以及在与血液恶性肿瘤有关的信号传导途径中涉及的蛋白质。测定表达或存在可以在蛋白质或核酸水平上进行。因此, 生物标记包括这些蛋白质和编码这些蛋白质的基因。当检测在蛋白质水平上进行时, 生物标记蛋白质包含全长多肽或其任何可检测的片段, 并且可以包括这些蛋白质序列的变体。相似地, 当检测在核苷酸水平上进行时, 生物标记核酸包括 DNA, 该 DNA 包含全长编码序列、全长编码序列的片段、这些序列的变体 (例如自然发生的变体或剪切变体) 或此序列的互补序列。生物标记核酸还包括 RNA, 例如 mRNA, 其包含编码感兴趣的生物标记蛋白质的全长序列、感兴趣的全长 RNA 序列的片段或这些序列的变体。生物标记蛋白质和生物标记核酸还包括这些序列的变体。所谓“片段”意指多核苷酸的一部分或氨基酸序列的一部分, 以及由其编码的蛋白质。是生物标记核苷酸序列的片段的多核苷酸通常包含至少 10、15、20、50、75、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、800、900、1,000、1,100、1,200、1,300, 或 1,400 个连续的核苷酸, 或至多为本文公开的全长生物标记多核苷酸中存在的核苷酸数目。生物标记多核苷酸的片段通常会编码至少 15、25、30、50、100、150、200 或 250 个连续氨基酸, 或至多为本发明的全长生物标记蛋白质中存在的氨基酸总数。“变体”意指基本上相似的序列。一般来说, 如通过本领域所知的序列比对程序所确定的, 本发明的特定生物标记的变体与该生物标记将会具有至少约 40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或更高的序列同一性。

[0400] 如上文所提供的, 本领域已知的任何方法可以在测定本文所述的生物标记的表达或存在的方法中使用。从候选受试者取得的血液样品中的生物标记的循环水平可以通过例如 ELISA、放射免疫测定 (RIA)、电化学发光 (ECL)、Western 印迹法、多路技术或其它类似的方法来测量。生物标记的细胞表面表达可以通过例如流式细胞术、免疫组织化学、Western 印迹法、免疫沉淀、磁珠分选法和表达这些细胞表面标记中任何一个的细胞的定量来测量。生物标记 RNA 的表达水平可通过 RT-PCR、Q_t-PCR、微阵列、Northern 印迹法或其它类似的技术来测量。

[0401] 如先前所提及的, 在蛋白质或核苷酸水平上测定感兴趣的生物标记的表达或存在可以使用本领域技术人员已知的任何检测方法来完成。所谓“检测表达”或“检测其水平”意指测定生物样品中生物标记蛋白质或基因的表达水平或存在。因此, “检测表达”涵盖其中的生物标记经测定为不被表达、不被可检测地表达、以低水平表达、以正常水平表达或过度

表达的情况。

[0402] 在本文提供的方法的某些方面,分离、检测或测量一个或多个淋巴细胞亚群。在某些实施方案中,使用免疫表型分型技术分离、检测或测量一个或多个淋巴细胞亚群。在其它实施方案中,使用荧光激活细胞分选 (FACS) 技术分离、检测或测量一个或多个淋巴细胞亚群。

[0403] 在本文提供的方法的某些实施方案中,一种或多种生物标记包含ZAP-70、CD5、t(14;18)、CD38、 β -2微球蛋白、p53突变状态、ATM突变状态、染色体17p缺失、染色体11q缺失、表面或细胞质免疫球蛋白、CD138、CD25、6q缺失、CD19、CD20、CD22、CD11c、CD103、染色体7q缺失、VH突变状态或其组合。

[0404] 在本文所述的方法的某些方面,测定步骤需要测定生物标记的组的表达或存在。在某些实施方案中,生物标记的组合是CD19和CD5或CD20和CD5。

[0405] 在某些方面,在生物样品中的这些不同的生物标记和任何临床上有用的预后标记的表达或存在,可以使用例如免疫组织化学技术或基于核酸的技术如原位杂交和RT-PCR,在蛋白质或核酸水平上进行检测。在一个实施方案中,一种或多种生物标记的表达或存在经由核酸扩增的手段、核酸测序的手段、利用核酸微阵列 (DNA和RNA) 的手段或使用特异性标记探针的原位杂交的手段来进行。

[0406] 在其它实施方案中,测定一种或多种生物标记的表达或存在通过凝胶电泳来进行。在一个实施方案中,该测定通过转移到膜上并用特异性探针杂交来进行。

[0407] 在其它实施方案中,测定一种或多种生物标记的表达或存在通过诊断成像技术来进行。

[0408] 在另外其它的实施方案中,测定一种或多种生物标记的表达或存在通过可检测的固体底物来进行。在一个实施方案中,可检测的固体底物是用抗体功能化的顺磁性纳米颗粒。

[0409] 在另一方面,本文提供用于检测或测量在治疗进程之后的残留淋巴瘤的方法,以便指导继续治疗或停止治疗或从一种治疗剂改变为另一种治疗剂,该方法包括测定受试者的一个或多个淋巴细胞亚群中一种或多种生物标记的表达或存在,其中该治疗进程是用Btk抑制剂的疗法。

[0410] 用于检测本文所述的生物标记和任选的细胞因子标记在测试和对照生物样品中的表达的方法,包括在核酸或蛋白质水平上测定这些标记的量或存在的任何方法。此类方法是本领域所熟知的,且包括但不限于Western印迹法、Northern印迹法、ELISA、免疫沉淀、免疫荧光、流式细胞术、免疫组织化学、核酸杂交技术、核酸逆转录方法和核酸扩增方法。在特定的实施方案中,使用例如针对特定生物标记蛋白质的抗体在蛋白质水平上检测生物标记的表达。这些抗体可以用于各种方法,诸如Western印迹法、ELISA、多路技术、免疫沉淀或免疫组织化学技术。在一些实施方案中,细胞因子标记的检测通过电化学发光 (ECL) 来完成。

[0411] 可以想到用于特异性地鉴定和量化候选受试者的生物样品中的生物标记 (例如生物标记、细胞存活或增殖的生物标记、细胞凋亡的生物标记、由Btk介导的信号传导途径的生物标记) 的任何手段。因此,在一些实施方案中,生物样品中感兴趣的生物标记蛋白质的表达水平借助于能够特异性地与该生物标记蛋白质或其生物活性变体相互作用的结合蛋

白质来检测。优选地,可使用标记的抗体、其结合部分或其它结合配偶体。当在本文中使用时,单词“标记”是指直接地或间接地偶联到抗体上以产生“标记的”抗体的可检测的化合物或组合物。标记可能是本身就是可检测的(例如放射性同位素标记或荧光标记),或者在酶标记的情况下,可以催化可检测的底物化合物或组合物的化学改变。

[0412] 用于检测生物标记蛋白质的抗体在来源上可以是单克隆或多克隆的,或者可以经合成或经重组产生。复合蛋白质的量,例如与结合蛋白质(例如与生物标记蛋白质特异性结合的抗体)缔合的生物标记蛋白质的量,使用本领域技术人员所知的标准蛋白质检测方法来测定。免疫试验的设计、理论和方案的详尽综述可以在本领域的大量文本中找到(参见,例如Ausubel等,编(1995) *Current Protocols in Molecular Biology* (Greene Publishing and Wiley-Interscience, NY)); Coligan等,编(1994) *Current Protocols in Immunology* (John Wiley & Sons, Inc., New York, N.Y.)。

[0413] 用于标记抗体的标记的选择根据其应用将会有所不同。但是,标记的选择可容易地由本领域技术人员确定。这些标记的抗体可用于免疫试验以及组织学应用,以检测任何感兴趣的生物标记或蛋白质的存在。标记的抗体可以是多克隆或单克隆的。此外,供检测感兴趣的蛋白质使用的抗体可以用放射性原子、酶、发色团或荧光部分或比色标签来标记,如本文别处所描述的。标记的标记物的选择也将取决于所需的检测限制。酶试验(ELISA)通常允许检测通过酶标记的复合物与酶底物的相互作用而形成的有色产物。可以作为可检测标记的放射性核素包括,例如I-131、I-123、I-125、Y-90、Re-188、Re-186、At-211、Cu-67、Bi-212和Pd-109。可以作为可检测标记的酶的实例包括但不限于辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶和葡萄糖-6-磷酸脱氢酶。发色团部分包括但不限于荧光素和若丹明。通过本领域所知的方法可将抗体偶联至这些标记。举例来说,借助于偶联剂如二醛、碳二亚胺、二马来酰亚胺(dimaleimides)等可将酶和发色团分子偶联至抗体。或者,偶联可通过配体-受体对进行。合适的配体-受体对的实例是生物素-亲和素或生物素-链霉亲和素及抗体-抗原。

[0414] 在某些实施方案中,通过放射免疫测定或酶联免疫测定(ELISA)、竞争性结合酶联免疫测定、斑点印迹法(参见,例如Promega Protocols and Applications Guide(第二版; Promega Corporation(1991)、Western印迹法(参见,例如Sambrook等(1989) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 第3卷, 第18章 (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, N.Y.)、色谱法(优选高效液相色谱法(HPLC))或其它本领域所知的试验,来测定生物样品(例如体液样品)中一种或多种生物标记或感兴趣的其它蛋白质的表达或存在。因此,检测试验可以包括诸如但不限于免疫印迹、免疫扩散、免疫电泳或免疫沉淀的步骤。

[0415] 在某些其它的实施方案中,本发明的方法可用于鉴定和治疗对于一线肿瘤治疗剂治疗为难治性的(即,有抗性的或已经成为有抗性的)血液恶性肿瘤,包括以上所列的那些血液恶性肿瘤。

[0416] 本文所述的一种或多种生物标记的表达或存在还可以在核酸水平上进行测定。用于评估表达的基于核酸的技术是本领域所熟知的,包括例如测定生物样品中生物标记mRNA的水平。许多表达检测方法使用分离的RNA。任何不会针对mRNA的分离进行选择的RNA分离技术可以用于RNA的纯化(参见,例如Ausubel等,编(1987-1999) *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley & Sons, New York)。另外,大量的组织样品可以容易地使用本

领域技术人员所熟知的技术来处理,例如在美国专利号4,843,155中公开的一步RNA分离法。

[0417] 因此,在一些实施方案中,生物标记或其它感兴趣的蛋白质的检测使用核酸探针在核酸水平上进行分析。术语“核酸探针”是指任何能够选择性结合到特定预期的靶核酸分子例如核苷酸转录物的分子。探针可以由本领域技术人员合成,或从适当的生物制品衍生。探针可以特别地设计为被标记的,例如用放射性标记、荧光标记、酶、化学发光标签、比色标签或其它上文所讨论的或本领域所知的标记或标签来标记。可用作探针的分子的实例包括但不限于RNA和DNA。

[0418] 举例来说,分离的mRNA可以在杂交或扩增试验中使用,该试验包括但不限于Southern或Northern分析、聚合酶链反应分析和探针阵列。用于检测mRNA水平的一种方法包括使分离的mRNA接触可以与所检测的基因所编码的mRNA杂交的核酸分子(探针)。核酸探针可以是例如全长cDNA或其部分,如至少7、15、30、50、100、250或500个核苷酸长度的寡核苷酸,并且在严格条件下足以特异性地与编码上文所述的生物标记的mRNA或基因组DNA杂交。mRNA与探针的杂交指示了生物标记或其它感兴趣的靶蛋白得到表达。

[0419] 在一个实施方案中,将mRNA固定在固体表面上并与探针接触,例如通过使分离的mRNA在琼脂糖凝胶上跑胶并且将mRNA从凝胶转移到诸如硝化纤维的膜上。在备选的实施方案中,将探针固定在固体表面上并且使mRNA与探针接触,例如在基因芯片阵列中。本领域技术人员可以容易地改变已知的mRNA检测方法,以用于检测编码生物标记或其它感兴趣的蛋白质的mRNA的水平。

[0420] 用于测定样品中感兴趣的mRNA的水平的备选方法包括核酸扩增过程,例如通过RT-PCR(参见,例如美国专利号4,683,202)、连接酶链反应(Barany(1991) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 88:189-193)、自动维持序列复制(Guatelli等(1990) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 87:1874-1878)、转录扩增系统(Kwoh等(1989) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86:1173-1177)、Q- β 复制酶(Lizardi等(1988) Bio/Technology 6:1197)、滚环复制(美国专利号5,854,033)或任何其它核酸扩增方法,接着使用本领域技术人员熟知的技术检测扩增的分子。如果核酸分子以非常低的数目存在,则这些检测方案特别可用于此核酸分子的检测。在本发明的特定方面,生物标记表达通过定量荧光RT-PCR(即TaqMan® System)来评估。

[0421] 感兴趣的RNA的表达水平可使用膜印迹(例如用于杂交分析,如Northern、斑点分析等)或微孔、样品管、凝胶、珠或纤维(或任何包含了结合的核酸的固相支持体)来监测。参见美国专利号5,770,722、5,874,219、5,744,305、5,677,195和5,445,934,它们通过引用并入本文。表达的检测还可包括在溶液中使用核酸探针。

[0422] 在本发明的一个实施方案中,利用微阵列来测定一种或多种生物标记的表达或存在。由于不同实验之间的再现性,微阵列特别适合于这个目的。DNA微阵列提供一种用于同时测量大量基因的表达水平的方法。每一个阵列由可再现模式的附着在固相支持体上的捕获探针所组成。标记的RNA或DNA与阵列上的互补探针杂交,然后通过激光扫描来检测。测定阵列上每一个探针的杂交强度并将其转换为代表相对基因表达水平的定量值。参见美国专利号6,040,138、5,800,992和6,020,135、6,033,860和6,344,316,它们通过引用并入本文。高密度寡核苷酸阵列特别可用于测定样品中的大量RNA的基因表达谱。

[0423] 使用机械合成方法合成这些阵列的技术在例如美国专利号5,384,261中描述,该专利通过引用整体并入本文。虽然平面阵列表面是优选的,但阵列可构建在几乎任何形状的表面或甚至多重表面上。阵列可以是位于珠、凝胶、聚合物表面、纤维如光纤、玻璃或任何其它适当底物上的肽或核酸,参见美国专利号5,770,358、5,789,162、5,708,153、6,040,193和5,800,992,每个上述专利就所有目的通过引用整体并入本文。阵列可以这样的方式包装,以便允许诊断或全包括性装置的其它操作。参见,例如美国专利号5,856,174和5,922,591,它们通过引用并入本文。

药物组合物/制剂

[0424] 药物组合物可以使用一种或多种生理学上可接受的载体以常规方式来配制,该载体包括赋形剂和辅料,其有利于将活性化合物加工为可药学使用的制品。合适的制剂取决于选择的给药途径。任何公知的技术、载体和赋形剂可以适当地并且如本领域所理解的那样来使用。本文所述的药物组合物的概述可见于例如Remington:The Science and Practice of Pharmacy,第十九版(Easton,Pa.:Mack Publishing Company,1995);Hoover,John E.,Remington's Pharmaceutical Sciences,Mack Publishing Co.,Easton,Pennsylvania 1975;Lieberman,H.A.和Lachman,L.编,Pharmaceutical Dosage Forms,Marcel Decker,New York,N.Y.,1980;和Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems,第七版(Lippincott Williams&Wilkins1999),其通过引用整体并入本文。

[0425] 如本文所用的药物组合物是指本文所述的化合物例如式D化合物或第二药剂与其它化学成分如载体、稳定剂、稀释剂、分散剂、悬浮剂、增稠剂和/或赋形剂的混合物。药物组合物有助于化合物对生物体的施用。在本文提供的治疗方法或用途的实践中,治疗有效量的本文描述的化合物在药物组合物中对患有待治疗的疾病、病症或状况的哺乳动物施用。优选地,该哺乳动物是人。治疗有效量可以根据疾病的严重程度、受试者的年龄和相对健康、所用化合物的效力和其它因素而变化很大。化合物可以单独使用,或与作为混合物的成分的一种或多种治疗剂联合使用。

[0426] 在某些实施方案中,组合物还可以包含一种或多种pH调节剂或缓冲剂,包括酸,如乙酸、硼酸、柠檬酸、乳酸、磷酸和盐酸;碱,如氢氧化钠、磷酸钠、硼酸钠、柠檬酸钠、乙酸钠、乳酸钠和三羟甲基氨基甲烷;和缓冲剂,如柠檬酸盐/右旋糖、碳酸氢钠和氯化铵。这类酸、碱和缓冲剂以使组合物的pH维持在可接受的范围内所需的量被包括在其中。

[0427] 在其它实施方案中,组合物还可包含一种或多种盐,其量是使该组合物的摩尔渗透压浓度处于可接受的范围内所需要的量。此类盐包括具有钠、钾或铵阳离子和氯离子、柠檬酸根、抗坏血酸根、硼酸根、磷酸根、碳酸氢根、硫酸根、硫代硫酸酸根或亚硫酸氢根阴离子的盐;合适的盐包括氯化钠、氯化钾、硫代硫酸钠、亚硫酸氢钠和硫酸铵。

[0428] 如本文所用的术语“药物组合”意指通过混合或组合超过一种活性成分而得到的产品,并且包括活性成分的固定和非固定组合。术语“固定组合”意指活性成分例如本文所述的化合物和助剂两者以单一实体或剂量的形式同时向患者施用。术语“非固定组合”意指活性成分例如本文所述的化合物和助剂作为单独的实体同时、并行或相继地向患者施用,没有具体的间隔时间限制,其中这样的施用在患者体内提供这两种化合物的有效水平。后者也适用于鸡尾酒疗法,例如三种或更多种活性成分的施用。

[0429] 本文所述的药物制剂可通过多种给药途径对受试者施用,该途径包括但不限于口服、肠胃外(例如静脉内、皮下、肌肉内)、鼻内、颊部、局部、直肠或经皮给药途径。本文所述的药物制剂包括但不限于水性液体分散体、自乳化分散体、固溶体、脂质体分散体、气雾剂、固体剂型、粉末、立即释放制剂、控制释放制剂、速熔制剂、片剂、胶囊、丸剂、延迟释放制剂、延长释放制剂、脉冲式释放制剂、多颗粒制剂和混合的立即释放和控制释放制剂。

[0430] 包含本文所述的化合物的药物组合物可以以常规方式制备,例如,仅举例来说,通过常规的混合、溶解、制粒、包糖衣、研细、乳化、囊封、包封或压制工艺。

[0431] “消泡剂”减少加工过程中的泡沫形成,这种泡沫形成可以造成水性分散体的凝聚、完成的膜中的气泡或一般受损的加工。示例性的消泡剂包括硅乳化剂或失水山梨糖醇倍半油酸酯(sorbitan sesquoleate)。

[0432] “抗氧化剂”包括例如丁羟甲苯(BHT)、抗坏血酸钠、抗坏血酸、偏亚硫酸氢钠和生育酚。在某些实施方案中,如需要,抗氧化剂增强化学稳定性。

[0433] 在某些实施方案中,本文提供的组合物还可包含一种或多种防腐剂,以抑制微生物活性。合适的防腐剂包括含汞物质,如硼酸苯汞(merfen)和硫柳汞;稳定的二氧化氯;和季铵化合物,如苯扎氯铵、十六烷基三甲基溴化铵和氯化十六烷基吡啶。

[0434] 本文所述的制剂可受益于抗氧化剂、金属螯合剂、含巯基(thiol)化合物和其它普通稳定剂。此类稳定剂的实例包括但不限于:(a)约0.5%至约2%w/v的甘油,(b)约0.1%至约1%w/v的甲硫氨酸,(c)约0.1%至约2%w/v的硫代甘油,(d)约1mM至约10mM EDTA,(e)约0.01%至约2%w/v的抗坏血酸,(f)0.003%至约0.02%w/v的聚山梨酯80,(g)0.001%至约0.05%w/v的聚山梨酯20,(h)精氨酸,(i)肝素,(j)硫酸葡聚糖,(k)环糊精,(l)戊聚糖多硫酸酯和其它类肝素,(m)二价阳离子如镁和锌;或(n)其组合。

[0435] “粘合剂”赋予粘着性质,并且包括例如藻酸及其盐;纤维素衍生物,如羧甲基纤维素、甲基纤维素(例如Methocel[®])、羟丙基甲基纤维素、羟乙基纤维素、羟丙基纤维素(例如Klucel[®])、乙基纤维素(例如Ethocel[®])和微晶纤维素(例如Avicel[®]);微晶右旋糖;直链淀粉;硅酸镁铝;多糖酸;皂土;明胶;聚乙烯吡咯烷酮/醋酸乙烯酯共聚物;交聚维酮;聚维酮;淀粉;预胶化淀粉;黄蓍胶,糊精,糖,如蔗糖(例如Dipac[®])、葡萄糖、右旋糖、糖蜜、甘露醇、山梨糖醇、木糖醇(例如Xylitab[®])和乳糖;天然或合成树胶,如阿拉伯树胶、黄蓍胶、印度胶、isapol皮的胶浆、聚乙烯吡咯烷酮(例如Polyvidone[®] CL、Kollidon[®] CL、Polyplasdone[®] XL-10)、落叶松聚阿拉伯半乳聚糖(larch arabogalactan)、Veegum[®]、聚乙二醇、蜡、藻酸钠等。

[0436] “载体”或“载体材料”包括制药学中任何常用的赋形剂,且应当基于与本文公开的化合物如任何式D化合物和第二药剂的相容性以及所需剂型的释放谱性质进行选择。示例性的载体材料包括,例如粘合剂、悬浮剂、崩解剂、填充剂、表面活性剂、增溶剂、稳定剂、润滑剂、湿润剂、稀释剂等。“药学上相容的载体材料”可包括但不限于阿拉伯树胶、明胶、胶态二氧化硅、甘油磷酸钙、乳酸钙、麦芽糊精、丙三醇、硅酸镁、聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、胆固醇、胆固醇酯、酪蛋白酸钠、大豆卵磷脂、牛磺胆酸、磷脂酰胆碱、氯化钠、磷酸三钙、磷酸二钾、纤维素和纤维素缀合物、糖、硬脂酰乳酸钠、角叉菜胶、甘油单酯、甘油二酯、预胶化淀粉等。

参见,例如Remington:The Science and Practice of Pharmacy,第十九版(Easton,Pa.: Mack Publishing Company,1995);Hoover,JohnE.,Remington's Pharmaceutical Sciences,Mack PublishingCo.,Easton,Pennsylvania1975;Lieberman,H.A.和Lachman,L.编,Pharmaceutical Dosage Forms,Marcel Decker,New York,N.Y.,1980;和Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems,第七版(Lippincott Williams&Wilkins1999)。

[0437] “分散剂”和/或“粘度调节剂”包括通过液体介质或制粒方法或混合方法来控制药物的扩散和均匀性的材料。在一些实施方案中,这些试剂还有助于包衣或可蚀性基质的有效性。示例性扩散辅助剂/分散剂包括例如亲水性聚合物、电解质、吐温® 60或80、PEG、聚乙烯吡咯烷酮(PVP;商业上称为Plasdone®),和基于碳水化合物的分散剂,例如羟丙基纤维素(例如HPC、HPC-SL和HPC-L)、羟丙基甲基纤维素(例如HPMC K100、HPMC K4M、HPMC K15M和HPMC K100M)、羧甲基纤维素钠、甲基纤维素、羟乙基纤维素、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素邻苯二甲酸酯、羟丙基甲基纤维素乙酸酯硬脂酸酯(HPMCAS)、非结晶纤维素、硅酸镁铝、三乙醇胺、聚乙烯醇(PVA)、乙烯基吡咯烷酮/醋酸乙烯酯共聚物(S630)、4-(1,1,3,3-四甲基丁基)-酚与环氧乙烷和甲醛的聚合物(也称为泰洛沙泊(tyloxapol))、泊洛沙姆(例如Pluronic F68®、F88®和F108®,它们是环氧乙烷和环氧丙烷的嵌段共聚物);和泊洛沙胺(poloxamines)(例如Tetronic 908®,也称为泊洛沙胺908®,其为通过将环氧丙烷和环氧乙烷相继添加到乙二胺上而衍生的四官能嵌段共聚物(BASF Corporation, Parsippany,N.J.))、聚乙烯吡咯烷酮K12、聚乙烯吡咯烷酮K17、聚乙烯吡咯烷酮K25或聚乙烯吡咯烷酮K30、聚乙烯吡咯烷酮/醋酸乙烯酯共聚物(S-630)、聚乙二醇(例如聚乙二醇可以具有约300至约6000或约3350至约4000或约7000至约5400的分子量)、羧甲基纤维素钠、甲基纤维素、聚山梨醇酯-80、藻酸钠、树胶如黄蓍胶和阿拉伯树胶、瓜尔豆胶、黄原胶类(包括黄原胶)、糖、纤维素制品如羧甲基纤维素钠、甲基纤维素、羧甲基纤维素钠、聚山梨醇酯-80、藻酸钠、聚乙氧基化失水山梨糖醇单月桂酸酯、聚乙氧基化失水山梨糖醇单月桂酸酯、聚维酮、卡波姆、聚乙烯醇(PVA)、藻酸盐、壳聚糖及其组合。增塑剂如纤维素或三乙基纤维素也可以用作分散剂。在脂质体分散体和自乳化分散体中特别有用的分散剂是二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱、来自蛋类的天然磷脂酰胆碱、来自蛋类的天然磷脂酰甘油、胆固醇和肉豆蔻酸异丙酯。

[0438] 一种或多种蚀解促进剂与一种或多种扩散辅助剂的组合也可以用于本组合物中。

[0439] 术语“稀释剂”是指在递送之前用于稀释感兴趣的化合物的化学化合物。稀释剂也可以用来稳定化合物,因为他们可以提供更稳定的环境。在本领域中溶解于缓冲溶液(其还可以提供pH控制或维持)的盐类用作稀释剂,包括但不限于磷酸盐缓冲溶液。在某些实施方案中,稀释剂增加组合物的体积,以便于压制或产生对于用于胶囊充填的均质共混物而言足够的体积。此类化合物包括例如乳糖、淀粉、甘露醇、山梨糖醇、右旋糖、微晶纤维素如Avicel®;磷酸氢钙、磷酸二钙二水合物;磷酸三钙、磷酸钙;无水乳糖、喷雾干燥的乳糖;预胶化淀粉、可压缩糖如Di-Pac® (Amstar);甘露醇、羟丙基甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素乙酸酯硬脂酸酯、基于蔗糖的稀释剂、糖粉;磷酸二氢钙一水合物、硫酸钙二水合物;乳酸钙三水合物、葡萄糖结合剂(dextrates);水解的谷物固形物、直链淀粉;粉状纤维素、碳酸钙;

甘氨酸、高岭土；甘露醇、氯化钠；肌醇、皂土等。

[0440] 术语“崩解”包括当剂型与胃肠液接触时的溶解以及分散。“崩解剂”有助于物质的分解或崩解。崩解剂的实例包括淀粉，例如天然淀粉，如玉米淀粉或土豆淀粉、预胶化淀粉如National1551或Amijel[®]或羧基乙酸淀粉钠如Promogel[®]或Explotab[®]，纤维素如木制品、甲基结晶纤维素例如Avicel[®]、Avicel[®] PH101、Avicel[®] PH102、Avicel[®] PH105、Elcema[®] P100、Emcocel[®]、Vivacel[®]、Ming Tia[®]和Solka-Floc[®]、甲基纤维素、交联羧甲基纤维素或交联纤维素如交联羧甲基纤维素钠(Ac-Di-Sol[®])、交联羧甲基纤维素或交联的交联羧甲基纤维素，交联淀粉如羧基乙酸淀粉钠，交联聚合物如交聚维酮、交联聚乙烯吡咯烷酮，藻酸盐如藻酸或藻酸的盐如藻酸钠，粘土如Veegum[®] HV (硅酸镁铝)，胶如琼脂、瓜尔豆胶、刺槐豆胶、刺梧桐胶、果胶或黄蓍胶，羧基乙酸淀粉钠，皂土，天然海绵，表面活性剂，树脂如阳离子交换树脂，柑橘渣，十二烷基硫酸钠，十二烷基硫酸钠与淀粉的组合，等等。

[0441] “药物吸收”或“吸收”一般是指药物从药物施用部位通过屏障移动到血管或作用部位内的过程，例如药物从胃肠道移动到门静脉或淋巴系统。

[0442] “肠溶衣”是一种物质，其在胃中基本上保持完整但在小肠或结肠中溶解并释放出药物。一般来说，肠溶衣包含聚合材料，该材料在胃的低pH环境中阻止释放但在较高的pH下（一般为6至7的pH值）离子化，而因此充分地溶解在小肠或结肠中以释放出其中的活性剂。

[0443] “蚀解促进剂”包括控制特定物质在胃肠液中的蚀解的材料。蚀解促进剂一般为本领域技术人员所知。示例性的蚀解促进剂包括例如亲水性聚合物、电解质、蛋白质、肽和氨基酸。

[0444] “填充剂”包括诸如乳糖、碳酸钙、磷酸钙、磷酸氢钙、硫酸钙、微晶纤维素、纤维素粉末、右旋糖、葡萄糖结合剂、葡聚糖、淀粉、预胶化淀粉、蔗糖、木糖醇、乳糖醇、甘露醇、山梨糖醇、氯化钠、聚乙二醇等化合物。

[0445] 适用于本文所述制剂的“调味剂”和/或“甜味剂”包括例如阿拉伯树胶糖浆、安赛蜜K、阿力甜、大茴香、苹果、阿斯巴甜、香蕉、巴伐利亚奶油、浆果、黑加仑、奶油糖果、柠檬酸钙、樟脑、焦糖、樱桃、樱桃奶油、巧克力、肉桂、泡泡糖、柑橘、柑橘潘趣酒(citrus punch)、柑橘奶油、棉花糖、可可、可乐、冷樱桃、冷柑橘、甜蜜素、cyclamate、右旋糖、桉树、丁香酚、果糖、水果潘趣酒(fruit punch)、姜、甘草亭酸盐、甘草(欧亚甘草)糖浆、葡萄、葡萄柚、蜂蜜、异麦芽酮糖醇、柠檬、酸橙、柠檬奶油、甘草酸单铵盐(MagnaSweet[®])、麦芽酚、甘露醇、枫树、药蜀葵(marshmallow)、薄荷醇、薄荷奶油、混合浆果、新橙皮苷DC、纽甜、橙子、梨、桃、胡椒薄荷、胡椒薄荷奶油、Prosweet[®]粉末、覆盆子、沙士、朗姆酒、糖精、黄樟素、山梨糖醇、留兰香、留兰香奶油、草莓、草莓奶油、甜菊糖、三氯蔗糖、蔗糖、糖精钠、糖精、阿斯巴甜、安赛蜜钾、甘露醇、talin、sylitol、三氯蔗糖、山梨糖醇、瑞士奶油、塔格糖、橘子、奇异果甜蛋白、百果糖、香草、胡桃、西瓜、野樱桃、冬青、木糖醇，或这些调味成分的任何组合，例如大茴香-薄荷醇、樱桃-大茴香、肉桂-橙子、樱桃-肉桂、巧克力-薄荷、蜂蜜-柠檬、柠檬-酸橙、柠檬-薄荷、薄荷醇-桉树、橙子-奶油、香草-薄荷，及其混合物。

[0446] “润滑剂”和“助流剂”是可阻止、减少或抑制物质的粘附或摩擦的化合物。示例性

的润滑剂包括例如硬脂酸,氢氧化钙,滑石,硬脂酰富马酸钠,碳氢化合物如矿物油,或氢化植物油如氢化大豆油(**Sterotex[®]**),高级脂肪酸及其碱金属和碱土金属盐如铝盐、钙盐、镁盐、锌盐,硬脂酸,硬脂酸钠,甘油,滑石,蜡、**Stearowet[®]**,硼酸,苯甲酸钠,乙酸钠,氯化钠,亮氨酸,聚乙二醇(例如PEG-4000)或甲氧基聚乙二醇如Carbowax[™],油酸钠,苯甲酸钠,山萘酸甘油酯,聚乙二醇,十二烷基硫酸镁或十二烷基硫酸钠,胶态二氧化硅如Syloid[™]、**Cab-O-Sil[®]**,淀粉如玉米淀粉,硅油,表面活性剂,等等。

[0447] “可测量的血清浓度”或“可测量的血浆浓度”描述血清或血浆浓度,通常以施用后吸收到血流中的每ml、dl或l血清中的mg、 μ g或ng治疗剂来测量。如本文所用的可测量的血浆浓度一般以ng/ml或 μ g/ml来测量。

[0448] “药效学”是指决定在作用部位相对于药物浓度观察到的生物反应的因素。

[0449] “药代动力学”是指决定在作用部位达到和保持适当药物浓度的因素。

[0450] “增塑剂”是用来软化微胶囊化材料或薄膜包衣以使它们较不易碎的化合物。合适的增塑剂包括例如聚乙二醇如PEG300、PEG400、PEG600、PEG1450、PEG3350和PEG800、硬脂酸、丙二醇、油酸、三乙基纤维素和三醋精。在一些实施方案中,增塑剂还可以起分散剂或湿润剂的作用。

[0451] “增溶剂”包括诸如三醋精、柠檬酸三乙酯、油酸乙酯、辛酸乙酯、十二烷基硫酸钠、多库酯钠、维生素E TPGS、二甲基乙酰胺、N-甲基吡咯烷酮、N-羟乙基吡咯烷酮、聚乙烯吡咯烷酮、羟丙基甲基纤维素、羟丙基环糊精、乙醇、正丁醇、异丙醇、胆固醇、胆盐、聚乙二醇200-600、糖原质、还氧二元醇(transcutol)、丙二醇和二甲基异山梨醇酯等化合物。

[0452] “稳定剂”包括诸如任何抗氧化剂、缓冲剂、酸、防腐剂等化合物。

[0453] 如本文所用的“稳态”是当在一个给药间隔内药物施用量等于药物排除量时,导致平稳的或恒定的血浆药物暴露。

[0454] “悬浮剂”包括如下的化合物,如聚乙烯吡咯烷酮例如聚乙烯吡咯烷酮K12、聚乙烯吡咯烷酮K17、聚乙烯吡咯烷酮K25或聚乙烯吡咯烷酮K30、乙烯基吡咯烷酮/醋酸乙烯酯共聚物(S630),聚乙二醇(例如聚乙二醇可以具有约300至约6000或约3350至约4000或约7000至约5400的分子量),羧甲基纤维素钠,甲基纤维素,羟丙基甲基纤维素,羟甲基纤维素乙酸酯硬脂酸酯,聚山梨醇酯-80,羟乙基纤维素,藻酸钠,树胶例如黄蓍胶和阿拉伯树胶,瓜尔豆胶,黄原胶类(包括黄原胶),糖,纤维素制品例如羧甲基纤维素钠、甲基纤维素、羧甲基纤维素钠、羟丙基甲基纤维素、羟乙基纤维素,聚山梨醇酯-80,藻酸钠,聚乙氧基化失水山梨糖醇单月桂酸酯,聚乙氧基化失水山梨糖醇单月桂酸酯,聚维酮等。

[0455] “表面活性剂”包括如下的化合物,如十二烷基硫酸钠、多库酯钠、吐温60或80、三醋精、维生素E TPGS、失水山梨糖醇单油酸酯、聚氧乙烯失水山梨糖醇单油酸酯、聚山梨醇酯、泊洛沙姆(polaxomers)、胆盐、单硬脂酸甘油酯、环氧乙烷和环氧丙烷的共聚物例如**Pluronic[®]**(BASF)等。一些其它的表面活性剂包括聚氧乙烯脂肪酸甘油酯和植物油,例如聚氧乙烯(60)氢化蓖麻油;及聚氧乙烯烷基醚和烷基苯基醚,例如辛苯聚醇10、辛苯聚醇40。在一些实施方案中,可包含表面活性剂来增强物理稳定性或用于其它目的。

[0456] “粘度增强剂”包括例如甲基纤维素、黄原胶、羧甲基纤维素、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素乙酸酯硬脂酸酯、羟丙基甲基纤维素邻苯二甲酸酯、卡波

姆、聚乙烯醇、藻酸盐、阿拉伯树胶、壳聚糖及其组合。

[0457] “湿润剂”包括诸如油酸、单硬脂酸甘油酯、失水山梨糖醇单油酸酯、失水山梨糖醇单月桂酸酯、三乙醇胺油酸酯、聚氧乙烯失水山梨糖醇单油酸酯、聚氧乙烯失水山梨糖醇单月桂酸酯、多库酯钠、油酸钠、十二烷基硫酸钠、多库酯钠、三醋精、吐温80、维生素E TPGS、铵盐等化合物。

剂型

[0458] 本文所述的组合物可以经由任何常规手段配制以供施用于受试者,包括但不限于口服、肠胃外(例如静脉内、皮下或肌肉内)、颊部、鼻内、直肠或透皮施用途径。如本文所用的术语“受试者”用于指动物,优选哺乳动物,包括人或非人动物。术语患者和受试者可交换使用。

[0459] 此外,本文所述的包含式D的任意化合物或第二药剂的药物组合物可以配制为任意合适的剂型,包括但不限于水性口服分散体、液体、凝胶、糖浆、酏剂、浆剂、悬浮液等(以供待治疗的患者口服摄入),固体口服剂型、气雾剂、控制释放制剂、速熔制剂、泡腾制剂、冻干制剂、片剂、粉末、丸剂、糖锭剂、胶囊、延迟释放制剂、延长释放制剂、脉冲式释放制剂、多颗粒制剂和混合的立即释放和控制释放制剂。

[0460] 供口服使用的药物制剂可以如下获得:将一种或多种固体赋形剂与一种或多种本文描述的化合物混合,任选地研磨得到的混合物,并在加入合适的辅料后(如果需要的话)加工颗粒混合物,以获得片剂或糖锭芯。合适的赋形剂包括例如填充剂,例如糖,包括乳糖、蔗糖、甘露醇或山梨糖醇;纤维素制品,例如玉米淀粉、小麦淀粉、水稻淀粉、土豆淀粉、明胶、黄蓍胶、甲基纤维素、微晶纤维素、羟丙基甲基纤维素、羧甲基纤维素钠;或其它,例如:聚乙烯吡咯烷酮(PVP或聚维酮)或磷酸钙。如果需要的话,可以加入崩解剂,例如交联的交联羧甲基纤维素钠、聚乙烯吡咯烷酮、琼脂、或者藻酸或其盐例如藻酸钠。

[0461] 糖锭芯具有合适的包衣。为了这一目的,可使用浓缩的糖溶液,其可任选地包含阿拉伯树胶、滑石、聚乙烯吡咯烷酮、卡波姆凝胶、聚乙二醇和/或二氧化钛、漆溶液,以及合适的有机溶剂或溶剂混合物。染料或色素可以加入到片剂或糖锭包衣中,以识别或表征活性化合物剂量的不同组合。

[0462] 可以口服使用的药物制剂包括由明胶制成的推入配合式胶囊,以及由明胶和增塑剂如甘油或山梨糖醇制成的密封软胶囊。推入配合式胶囊可以包含与诸如乳糖的填充剂、诸如淀粉的粘合剂和/或诸如滑石或硬脂酸镁的润滑剂以及任选的稳定剂混合的活性成分。在软胶囊中,活性化合物可溶解或悬浮在合适的液体如脂肪油、液体石蜡或液体聚乙二醇中。另外,可加入稳定剂。供口服施用的所有制剂应当处于适合此类施用的剂量。

[0463] 在一些实施方案中,本文公开的固体剂型可处于片剂(包括混悬片剂、速熔片剂、咀嚼崩解片剂、快速崩解片剂、泡腾片剂或小胶囊)、丸剂、粉末(包括无菌包装的粉末、可分配的粉末或泡腾粉末)、胶囊(包括软胶囊或硬胶囊,例如用动物来源的明胶或植物来源的HPMC制成的胶囊,或“撒布胶囊”)、固体分散体、固溶体、生物蚀解剂型、控制释放制剂、脉冲式释放剂型、多颗粒剂型、丹剂、颗粒或气雾剂的形式。在其它实施方案中,药物制剂处于粉末形式。在另外其它的实施方案中,药物制剂处于片剂形式,包括但不限于速熔片剂。此外,本文描述的药物制剂可以作为单一胶囊或多胶囊剂型施用。在一些实施方案中,药物制剂以两个或三个或四个胶囊或片剂施用。

[0464] 在一些实施方案中,固体剂型,例如片剂、泡腾片剂和胶囊,通过将式(A1-A6)、式(B1-B6)、式(C1-C6)或式(D1-D6)的任何化合物的颗粒与一种或多种药物赋形剂混合以形成大体积共混组合物来制备。当这些大体积共混组合物被称作均质时,意思是式(A1-A6)、式(B1-B6)、式(C1-C6)或式(D1-D6)的任何化合物的颗粒遍布组合物均匀地分散,使得该组合物可被轻易地细分成等效的单位剂型,例如片剂、丸剂和胶囊。单个单位剂量也可以包含薄膜包衣,该薄膜包衣在口服摄入时或与稀释剂接触时崩解。这些制剂可以通过常规药理学技术制造。

[0465] 常规药理学技术包括例如下列方法之一或其组合:(1)干混,(2)直接压制,(3)碾磨,(4)干法或非水法制粒,(5)湿法制粒,或(6)融合。参见,例如,Lachman等,The Theory and Practice of Industrial Pharmacy(1986)。其它方法包括例如喷雾干燥、锅包衣、熔融制粒、制粒、流化床喷雾干燥或包衣(例如沃斯特包衣法)、切向包衣、顶部喷雾、制片、挤出等。

[0466] 本文描述的固体剂型可以包含本文描述的化合物和一种或多种药学上可接受的添加剂,例如相容的载体、粘合剂、填充剂、悬浮剂、调味剂、甜味剂、崩解剂、分散剂、表面活性剂、润滑剂、着色剂、稀释剂、增溶剂、润湿剂、增塑剂、稳定剂、渗透促进剂、湿润剂、消泡剂、抗氧化剂、防腐剂,或其一种或多种组合。在又一些其它方面,使用标准包衣程序,例如在Remington's Pharmaceutical Sciences,第20版(2000)中描述的那些程序,围绕式(A1-A6)、式(B1-B6)、式(C1-C6)或式(D1-D6)的任何化合物的制剂提供薄膜包衣。在一个实施方案中,式(A1-A6)、式(B1-B6)、式(C1-C6)或式(D1-D6)的任何化合物的一些或全部颗粒被包衣。在另一个实施方案中,式(A1-A6)、式(B1-B6)、式(C1-C6)或式(D1-D6)的任何化合物的一些或全部颗粒被微胶囊化。在又一个实施方案中,式(A1-A6)、式(B1-B6)、式(C1-C6)或式(D1-D6)的任何化合物的颗粒未被微胶囊化也未被包衣。

[0467] 用于本文描述的固体剂型中的合适的载体包括但不限于阿拉伯树胶、明胶、胶态二氧化硅、甘油磷酸钙、乳酸钙、麦芽糊精、丙三醇、硅酸镁、酪蛋白酸钠、大豆卵磷脂、氯化钠、磷酸三钙、磷酸氢二钾、硬脂酰乳酸钠、角叉菜胶、甘油单酯、甘油二酯、预胶化淀粉、羟丙基甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素乙酸酯硬脂酸酯、蔗糖、微晶纤维素、乳糖、甘露醇等。

[0468] 用于本文描述的固体剂型中的合适的填充剂包括但不限于乳糖、碳酸钙、磷酸钙、磷酸氢钙、硫酸钙、微晶纤维素、纤维素粉末、右旋糖、葡萄糖结合剂、葡聚糖、淀粉、预胶化淀粉、羟丙基甲基纤维素(HPMC)、羟丙基甲基纤维素邻苯二甲酸酯、羟丙基甲基纤维素乙酸酯硬脂酸酯(HPMCAS)、蔗糖、木糖醇、乳糖醇、甘露醇、山梨糖醇、氯化钠、聚乙二醇等。

[0469] 为了将式(A1-A6)、式(B1-B6)、式(C1-C6)或式(D1-D6)的任何化合物从固体剂型基质中尽可能有效地释出,在制剂中常常使用崩解剂,特别是当剂型用粘合剂压制时。当水分被吸收到剂型中时,崩解剂通过膨胀或毛细作用帮助破裂剂型基质。用于本文描述的固体剂型中的合适的崩解剂包括但不限于天然淀粉如玉米淀粉或土豆淀粉,预胶化淀粉如National 1551或Amijel[®]或羧基乙酸淀粉钠如Promogel[®]或Explotab[®],纤维素如木制品,甲基结晶纤维素例如Avicel[®]、Avicel[®] PH101、Avicel[®] PH102、Avicel[®] PH105、Elcema[®] P100、Emcocel[®]、Vivacel[®]、Ming Tia[®]和Solka-Floc[®]、甲基纤维素,交联羧甲基纤维素,或交联的纤维素如交联的羧甲基纤维素钠(Ac-Di-Sol[®])、交联的羧

甲基纤维素或交联的交联羧甲基纤维素,交联的淀粉如羧基乙酸淀粉钠,交联的聚合物如交聚维酮,交联的聚乙烯吡咯烷酮,藻酸盐如藻酸或藻酸的盐如藻酸钠,粘土如**Veegum**[®] HV(硅酸镁铝),胶如琼脂、瓜尔豆胶、刺槐豆胶、刺梧桐胶、果胶或黄蓍胶,羧基乙酸淀粉钠,皂土,天然海绵,表面活性剂,树脂如阳离子交换树脂,柑橘渣,十二烷基硫酸钠,十二烷基硫酸钠与淀粉的组合,等等。

[0470] 粘合剂赋予固体口服剂型制剂粘结性:对于粉末填充的胶囊制剂,它们有助于可以被填充到软或硬壳胶囊中的填塞体的形成,而对片剂制剂,它们确保片剂在压制后保持完整,并且在压制或填充步骤前帮助保证共混物的均匀度。在本文描述的固体剂型中适合作粘合剂的材料包括但不限于羧甲基纤维素,甲基纤维素(例如**Methocel**[®]),羟丙基甲基纤维素(例如Hypromellose USP Pharmaccoat-603,羟丙基甲基纤维素乙酸酯硬脂酸酯(Aquate HS-LF和HS),羟乙基纤维素,羟丙基纤维素(例如**Klucel**[®]),乙基纤维素(例如**Ethocel**[®]),和微晶纤维素(例如**Avicel**[®]),微晶右旋糖,直链淀粉,硅酸镁铝,多糖酸,皂土,明胶,聚乙烯吡咯烷酮/醋酸乙烯酯共聚物,交聚维酮,聚维酮,淀粉,预胶化淀粉,黄蓍胶,糊精,糖例如蔗糖(例如**Dipac**[®])、葡萄糖、右旋糖、糖蜜、甘露醇、山梨糖醇、木糖醇(例如**Xylitab**[®])、乳糖,天然或合成的树胶例如阿拉伯树胶、黄蓍胶、印度胶、isapol皮的胶浆,淀粉,聚乙烯吡咯烷酮(例如**Povidone**[®] CL、**Kollidon**[®] CL、**Polyplasdone**[®] XL-10和**Povidone**[®] K-12),落叶松阿拉伯半乳聚糖,**Veegum**[®],聚乙二醇,蜡,藻酸钠,等等。

[0471] 一般而言,在粉末填充的明胶胶囊制剂中使用20-70%的粘合剂水平。无论是直接压制、湿法制粒、碾压还是使用其它赋形剂(例如自身可充当适度的粘合剂的填充剂),片剂制剂中的粘合剂使用水平是变化的。本领域中熟练的配制者可以为制剂确定粘合剂水平,但最高达70%的粘合剂使用水平在片剂制剂中是常见的。

[0472] 用于本文描述的固体剂型中的合适的润滑剂或助流剂包括但不限于硬脂酸,氢氧化钙,滑石,玉米淀粉,硬脂酰富马酸钠,碱金属和碱土金属盐例如铝盐、钙盐、镁盐、锌盐,硬脂酸,硬脂酸钠,硬脂酸镁,硬脂酸锌,蜡,**Stearowet**[®],硼酸,苯甲酸钠,醋酸钠,氯化钠,亮氨酸,聚乙二醇或甲氧基聚乙二醇例如Carbowax[™]、PEG 4000、PEG 5000、PEG 6000,丙二醇,油酸钠,山萘酸甘油酯,棕榈酸硬脂酸甘油酯,苯甲酸甘油酯,十二烷基硫酸镁或十二烷基硫酸钠,等等。

[0473] 用于本文描述的固体剂型中的合适的稀释剂包括但不限于糖(包括乳糖、蔗糖和右旋糖)、多糖(包括葡萄糖结合剂和麦芽糊精)、多元醇(包括甘露醇、木糖醇和山梨糖醇)、环糊精等。

[0474] 术语“非水溶性稀释剂”代表在药物制剂中典型地使用的化合物,例如磷酸钙、硫酸钙、淀粉、改性淀粉和微晶纤维素,以及微纤维素(例如,具有约0.45g/cm³的密度,例如**Avicel**、粉状纤维素)和滑石。

[0475] 用于本文描述的固体剂型中的合适的湿润剂包括例如油酸、单硬脂酸甘油酯、失水山梨糖醇单油酸酯、失水山梨糖醇单月桂酸酯、三乙醇胺油酸酯、聚氧乙烯失水山梨糖醇单油酸酯、聚氧乙烯失水山梨糖醇单月桂酸酯、季铵化合物(例如**Polyquat 10**[®])、油酸钠、

十二烷基硫酸钠、硬脂酸镁、多库酯钠、三醋精、维生素E TPGS等。

[0476] 用于本文描述的固体剂型中的合适的表面活性剂包括例如十二烷基硫酸钠、失水山梨糖醇单油酸酯、聚氧乙烯失水山梨糖醇单油酸酯、聚山梨醇酯、泊洛沙姆(polaxomers)、胆盐、单硬脂酸甘油酯、环氧乙烷和环氧丙烷的共聚物例如Pluronic®(BASF),等等。

[0477] 用于本文描述的固体剂型中的合适的悬浮剂包括但不限于聚乙烯吡咯烷酮,例如聚乙烯吡咯烷酮K12、聚乙烯吡咯烷酮K17、聚乙烯吡咯烷酮K25或聚乙烯吡咯烷酮K30,聚乙二醇,例如聚乙二醇可具有约300到约6000或约3350到约4000或约7000到约5400的分子量,乙烯基吡咯烷酮/醋酸乙烯酯共聚物(S630),羧甲基纤维素钠,甲基纤维素,羟丙基甲基纤维素,聚山梨醇酯-80,羟乙基纤维素,藻酸钠,树胶,例如黄蓍胶和阿拉伯树胶,瓜尔豆胶,黄原胶类(包括黄原胶),糖,纤维素制品,例如羧甲基纤维素钠、甲基纤维素、羧甲基纤维素钠、羟丙基甲基纤维素、羟乙基纤维素,聚山梨醇酯-80,藻酸钠,聚乙氧基化失水山梨糖醇单月桂酸酯,聚乙氧基化失水山梨糖醇单月桂酸酯,聚维酮等。

[0478] 用于本文描述的固体剂型中的合适的抗氧化剂包括例如丁羟甲苯(BHT)、抗坏血酸钠和生育酚。

[0479] 应当意识到,在本文描述的固体剂型中使用的添加剂之间存在相当大的重叠。因此,上面列出的添加剂应当仅被认为是示例性的,而非限制本文描述的固体剂型中可以包含的添加剂的类型。本领域技术人员依照所需的特定性质,可以轻易地确定此类添加剂的量。

[0480] 在其它实施方案中,药物制剂的一个或多个层被增塑。说明性地,增塑剂一般是高沸点的固体或液体。合适的增塑剂可以添加包衣组合物的约0.01%到约50%重量(w/w)。增塑剂包括但不限于邻苯二甲酸二乙酯、柠檬酸酯、聚乙二醇、甘油、乙酰化甘油酯、三醋精、聚丙二醇、聚乙二醇、柠檬酸三乙酯、癸二酸二丁酯、硬脂酸、油脂剂、硬脂酸盐和蓖麻油。

[0481] 压制的片剂是通过压制上面描述的制剂的大体积共混物而制备的固体剂型。在各种实施方案中,被设计为在口中溶解的压制片剂将包含一种或多种调味剂。在其它实施方案中,压制片剂将包含围绕最终的压制片剂的薄膜。在一些实施方案中,薄膜包衣可以提供式D的任意化合物或第二药剂从制剂中的延迟释放。在其它实施方案中,薄膜包衣有助于患者的依从性(例如Opadry®包衣或糖衣)。薄膜包衣,包括Opadry®,一般为片重的约1%到约3%。在其它实施方案中,压制的片剂包含一种或多种赋形剂。

[0482] 例如通过将上面描述的式D的任意化合物或第二药剂的制剂的大体积共混物放置到胶囊内部,可以制备胶囊。在一些实施方案中,制剂(非水性悬浮液和溶液)被放置在明胶软胶囊中。在其它实施方案中,制剂被放置在标准明胶胶囊或非明胶胶囊例如包含HPMC的胶囊中。在其它实施方案中,制剂被放置在撒布胶囊中,其中该胶囊可以被整个吞下或者可以在食用前打开该胶囊并将内容物撒布到食物上。在一些实施方案中,将治疗剂量分到多个(例如二、三或四个)胶囊中。在一些实施方案中,制剂的全部剂量以一个胶囊的形式递送。

[0483] 在各种实施方案中,将式D的任意化合物或第二药剂的颗粒和一种或多种赋形剂干混并压制成药片,例如片剂,其具有的硬度足以提供在口服施用后少于约30分钟、少于约35

分钟、少于约40分钟、少于约45分钟、少于约50分钟、少于约55分钟或少于约60分钟内基本崩解从而将制剂释放到胃肠液中的药物组合物。

[0484] 另一方面,剂型可以包括微胶囊化的制剂。在一些实施方案中,微胶囊化材料中存在一种或多种其它相容的材料。示例性的材料包括但不限于pH调节剂、蚀解促进剂、消泡剂、抗氧化剂、调味剂和载体材料如粘合剂、悬浮剂、崩解剂、填充剂、表面活性剂、增溶剂、稳定剂、润滑剂、湿润剂和稀释剂。

[0485] 对本文描述的微胶囊化有用的材料包括与式D的任意化合物或第二药剂相容的材料,其足以隔离式D的任意化合物或第二药剂和其它不相容的赋形剂。与式D的任意化合物或第二药剂相容的材料是在体内延迟式D的任意化合物或第二药剂的释放的那些材料。

[0486] 对延迟包含本文描述的化合物的制剂的释放有用的示例性微胶囊化材料包括但不限于:羟丙基纤维素醚(HPC)如Klucel[®]或Nisso HPC,低取代的羟丙基纤维素醚(L-HPC),羟丙基甲基纤维素醚(HPMC)例如Seppifilm-LC、Pharmacoat[®]、Metolose SR、Methocel[®]-E、Opadry YS、PrimaFlo、Benecel MP824和Benecel MP843,甲基纤维素聚合物例如Methocel[®]-A,羟丙基甲基纤维素醋酸酯硬脂酸酯Acoat (HF-LS、HF-LG、HF-MS) 和 Metolose[®],乙基纤维素(EC)及其混合物例如E461、Ethocel[®]、Aqualon[®]-EC、Surelease[®],聚乙烯醇(PVA)例如Opadry AMB,羟乙基纤维素例如Natrosol[®],羧甲基纤维素(CMC)和羧甲基纤维素的盐例如Aqualon[®]-CMC,聚乙烯醇和聚乙二醇的共聚物例如Kollicoat IR[®],甘油单酯(Myverol),甘油三酯(KLX),聚乙二醇,改性食物淀粉,丙烯酸聚合物和丙烯酸聚合物与纤维素醚的混合物例如Eudragit[®] EP0、Eudragit[®] L30D-55、Eudragit[®] FS 30D、Eudragit[®] L100-55、Eudragit[®] L100、Eudragit[®] S100、Eudragit[®] RD100、Eudragit[®] E100、Eudragit[®] L12.5、Eudragit[®] S12.5、Eudragit[®] NE30D和Eudragit[®] NE 40D,纤维素醋酸酯邻苯二甲酸酯,sepi films例如HPMC和硬脂酸的混合物,环糊精,以及这些材料的混合物。

[0487] 在又一些其它的实施方案中,增塑剂,例如聚乙二醇如PEG 300、PEG 400、PEG 600、PEG 1450、PEG 3350和PEG 800,硬脂酸,丙二醇,油酸和三醋精被并入到微胶囊化材料中。在其它实施方案中,对延迟药物组合物的释放有用的微胶囊化材料来自USP或国家处方集(NF)。在又一些其它的实施方案中,微胶囊化材料是Klucel。在又一些其它的实施方案中,微胶囊化材料是methocel。

[0488] 微胶囊化的式D的任意化合物或第二药剂可以通过本领域普通技术人员已知的方法配制。此类已知方法包括例如喷雾干燥法、旋转盘-溶剂法、热熔法、喷雾冷却法、流化床、静电沉积、离心挤出、旋转悬浮分离、液-气或固-气界面聚合、压力挤出或喷雾溶剂萃取浴。除了这些方法以外,还可以使用数种化学技术,例如复合凝聚、溶剂蒸发、聚合物-聚合物不相容性、液体介质中的界面聚合、原位聚合、液中干燥和在液体介质中的去溶剂化。此外,也可以使用其它方法,例如碾压、挤出/滚圆、凝聚或纳米颗粒包衣。

[0489] 在一个实施方案中,式D的任意化合物或第二药剂的颗粒在被配制成以上形式之

一之前被微胶囊化。在又一个实施方案中,一些或大多数颗粒在进一步配制之前通过使用标准包衣程序进行包衣,例如在Remington's Pharmaceutical Sciences,第20版(2000)中描述的那些程序。

[0490] 在其它实施方案中,式D的任意化合物或第二药剂的固体剂量制剂被增塑(包衣)了一层或多层。说明性地,增塑剂一般是高沸点的固体或液体。合适的增塑剂可以添加包衣组合物的约0.01%到约50%重量(w/w)。增塑剂包括但不限于邻苯二甲酸二乙酯、柠檬酸酯、聚乙二醇、甘油、乙酰化甘油酯、三醋精、聚丙二醇、聚乙二醇、柠檬酸三乙酯、癸二酸二丁酯、硬脂酸、油脂剂、硬脂酸盐和蓖麻油。

[0491] 在其它实施方案中,包括本文描述的式D的任意化合物或第二药剂的制剂的粉末可以被配制为包含一种或多种药物赋形剂和调味剂。这样的粉末可以通过例如将制剂和任选的药物赋形剂混合形成大体积共混组合物来制备。另外的实施方案还包括悬浮剂和/或湿润剂。这一大体积共混物被均匀细分成单位剂量包装或多剂量包装单位。

[0492] 在又一些其它的实施方案中,泡腾粉末也依照本公开内容制备。已经使用泡腾盐来将药物分散在水中供口服施用。泡腾盐是在干混合物中包含药剂的颗粒或粗粉,通常由碳酸氢钠、柠檬酸和/或酒石酸组成。当本文描述的组合物的盐加入到水中时,酸和碱反应释放出二氧化碳气体,从而导致了“泡腾”。泡腾盐的实例包括例如以下成分:碳酸氢钠或碳酸氢钠和碳酸钠的混合物、柠檬酸和/或酒石酸。任何导致二氧化碳释放的酸碱组合都可以用于代替碳酸氢钠与柠檬酸和酒石酸的组合,只要这些成分适合药用,并且得到约6.0或更高的pH。

[0493] 在一些实施方案中,本文描述的固体剂型可以被配制为肠溶衣延迟释放口服剂型,即,如本文描述的药物组合物的口服剂型,其利用肠溶衣影响在胃肠道的小肠中的释放。肠溶衣剂型可以是压制或模制或挤出的片剂/模(包衣或未包衣的),包含活性成分和/或其它组合物成分的颗粒、粉末、小丸、珠或颗粒,它们自身是包衣或未包衣的。肠溶衣口服剂型还可以是胶囊(包衣或未包衣的),包含固体载体或组合物的小丸、珠或颗粒,它们自身是包衣或未包衣的。

[0494] 本文所用的术语“延迟释放”是指这样的递送,其使得释放可以在肠道中的一些通常可预测的位置完成,该位置比如果无延迟释放改变时释放会完成的位置更居于远端。在一些实施方案中,延迟释放的方法是包衣。任何包衣应当以足够的厚度应用,使得整个包衣不在pH低于约5的胃肠液中溶解,但在pH约5及以上确实溶解。可以预期,显示pH依赖的溶解度谱的任意阴离子聚合物可以在本文描述的方法和组合物中用作肠溶衣,以实现向下胃肠道的递送。在一些实施方案中,本文描述的聚合物是阴离子羧酸聚合物。在其它实施方案中,聚合物及其相容的混合物,以及它们的一些性质,包括但不限于:

[0495] 紫胶,也叫做纯化虫胶,是由昆虫的树脂分泌物获得的精制产物。该包衣在pH>7的介质中溶解;

[0496] 丙烯酸聚合物。丙烯酸聚合物的性能(主要是它们在生物流体中的溶解度)可以基于取代的程度和类型而变化。合适的丙烯酸聚合物的实例包括甲基丙烯酸共聚物和甲基丙烯酸铵共聚物。Eudragit系列E、L、S、RL、RS和NE(Rohm Pharma)可在有机溶剂、水性分散液或干粉中溶解而应用。Eudragit系列RL、NE和RS在胃肠道中是不溶的,但是可渗透的,而且主要用于靶向结肠。Eudragit系列E在胃中溶解。Eudragit系列L、L-30D和S在胃中是不溶

的,而在肠中溶解;

[0497] 纤维素衍生物。合适的纤维素衍生物的实例是:乙基纤维素;纤维素的部分醋酸酯与邻苯二甲酸酐的反应混合物。基于取代的程度和类型,性能可以变化。纤维素醋酸酯邻苯二甲酸酯(CAP)在 $\text{pH} > 6$ 时溶解。Aquateric (FMC) 是基于水性的体系,而且是颗粒 $< 1\mu\text{m}$ 的喷雾干燥的CAP假胶乳。Aquateric中的其它成分可以包括Pluronic、吐温和乙酰化甘油单酯。其它合适的纤维素衍生物包括:纤维素醋酸酯偏苯三酸酯(Eastman);甲基纤维素(Pharmacoat, Methocel);羟丙基甲基纤维素邻苯二甲酸酯(HPMCP);羟丙基甲基纤维素琥珀酸酯(HPMCS);和羟丙基甲基纤维素醋酸酯琥珀酸酯(例如AQOAT (Shin Etsu))。基于取代的程度和类型,性能可以变化。举例来说,HPMCP例如HP-50、HP-55、HP-55S、HP-55F级是合适的。基于取代的程度和类型,性能可以变化。例如,合适级别的羟丙基甲基纤维素醋酸酯琥珀酸酯包括但不限于AS-LG (LF),其在 $\text{pH} 5$ 时溶解;AS-MG (MF),其在 $\text{pH} 5.5$ 时溶解;和AS-HG (HF),其在更高的 pH 时溶解。这些聚合物作为颗粒或细粉提供,用于水性分散液;聚乙烯基醋酸酯邻苯二甲酸酯(PVAP)。PVAP在 $\text{pH} > 5$ 时溶解,而且它对水汽和胃液具有相当低的渗透性。

[0498] 在一些实施方案中,包衣可以而且通常确实包含增塑剂和其它可能的包衣赋形剂例如着色剂、滑石和/或硬脂酸镁,这些是本领域熟知的。合适的增塑剂包括柠檬酸三乙酯(Citroflex 2)、三醋精(三醋酸甘油酯)、乙酰基柠檬酸三乙酯(Citroflex A2)、Carbowax 400(聚乙二醇400)、邻苯二甲酸二乙酯、柠檬酸三丁酯、乙酰化甘油单酯、甘油、脂肪酸酯、丙二醇和邻苯二甲酸二丁酯。特别地,阴离子羧酸丙烯酸聚合物通常将包含10-25重量%的增塑剂,特别是邻苯二甲酸二丁酯、聚乙二醇、柠檬酸三乙酯和三醋精。使用常规的包衣技术例如喷雾或锅包衣来施加包衣。包衣厚度必须足以确保口服剂型在到达肠道中的所需局部递送部位前保持完整。

[0499] 除了增塑剂以外,着色剂、防粘剂、表面活性剂、消泡剂、润滑剂(例如棕榈蜡或PEG)也可以加入到包衣中,以溶解或分散包衣材料,并改善包衣性能和包衣产物。

[0500] 在其它实施方案中,本文描述的包含式D化合物或第二药剂的制剂使用脉冲剂型来递送。脉冲剂型能够在受控的延迟时间后在预定的时间点或在特定部位提供一个或多个即释脉冲。许多其它类型的控制释放系统是本领域普通技术人员已知的,并且适合与本文描述的制剂一起使用。此类递送系统的实例包括例如基于聚合物的系统,例如聚乳酸和聚羟基乙酸、聚酐和聚己内酯;多孔基质;为脂质的基于非聚合物的系统,包括甾醇如胆固醇、胆固醇酯和脂肪酸,或中性脂肪如单-、二-和三甘油酯;水凝胶释放系统;硅橡胶系统;基于肽的系统;蜡包衣,可生物蚀解的剂型,使用常规粘合剂压制的片剂,等等。参见,例如Liberman等,Pharmaceutical Dosage Forms,第2版,第1卷,209-214页(1990);Singh等,Encyclopedia of Pharmaceutical Technology,第2版,751-753页(2002);美国专利号4,327,725、4,624,848、4,968,509、5,461,140、5,456,923、5,516,527、5,622,721、5,686,105、5,700,410、5,977,175、6,465,014和6,932,983,其各自特此通过引用而并入。

[0501] 在一些实施方案中,提供药物制剂,其包含本文描述的式D的任意化合物或第二药剂的颗粒和至少一种分散剂或悬浮剂,以供对受试者口服施用。该制剂可以是用于悬浮的粉末和/或颗粒,并且当与水混合时获得基本均匀的悬浮液。

[0502] 供口服施用的液体制剂剂型可以是水性悬浮液,其选自包括但不限于药学上可接

受的水性口服分散液、乳液、溶液、酞剂、凝胶和糖浆的组。参见,例如Singh等, *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*, 第2版, 754-757页 (2002)。除了式 (A1-A6) 的化合物的颗粒以外, 该液体剂型还可以包含添加剂, 例如: (a) 崩解剂; (b) 分散剂; (c) 湿润剂; (d) 至少一种防腐剂; (e) 粘度增强剂; (f) 至少一种甜味剂; 和 (g) 至少一种调味剂。在一些实施方案中, 水性分散液可以进一步包含结晶抑制剂。

[0503] 本文描述的水性悬浮液和分散液可以保持在均匀状态, 如USP药剂师药典 (2005版, 第905章) 中所定义的, 至少保持4小时。均匀性应当通过跟测定整个组合物的均匀性一致的取样方法来测定。在一个实施方案中, 水性悬浮液可以通过持续不到1分钟的物理搅拌而重悬为均匀悬浮液。在另一个实施方案中, 水性悬浮液可以通过持续不到45秒的物理搅拌而重悬为均匀悬浮液。在又一个实施方案中, 水性悬浮液可以通过持续不到30秒的物理搅拌而重悬为均匀悬浮液。在又一个实施方案中, 不需要搅拌来保持均匀的水性分散液。

[0504] 在水性悬浮液和分散液中使用的崩解剂的实例包括但不限于淀粉例如天然淀粉, 例如玉米淀粉或土豆淀粉, 预胶化淀粉例如National 1551或Amijel[®], 或羧基乙酸淀粉钠例如 Promogel[®] 或 Explotab[®]; 纤维素例如木制品, 甲基结晶纤维素例如 Avicel[®]、Avicel[®] PH 101、Avicel[®] PH102、Avicel[®] PH105、Elcema[®] P100、Emcocel[®]、Vivacel[®]、Ming Tia[®]和Solka-Floc[®], 甲基纤维素, 交联羧甲基纤维素, 或交联的纤维素例如交联的羧甲基纤维素钠(Ac-Di-Sol[®])、交联的羧甲基纤维素或交联的交联羧甲基纤维素; 交联的淀粉例如羧基乙酸淀粉钠; 交联的聚合物例如交联的聚维酮; 交联的聚乙烯吡咯烷酮; 藻酸盐例如藻酸或藻酸的盐如藻酸钠; 粘土例如Veegum[®] HV (硅酸镁铝); 树胶例如琼脂、瓜尔豆胶、刺槐豆胶、刺梧桐胶、果胶或黄蓍胶; 羧基乙酸淀粉钠; 皂土; 天然海绵; 表面活性剂; 树脂例如阳离子交换树脂; 柑橘渣; 十二烷基硫酸钠; 十二烷基硫酸钠与淀粉的组合; 等等。

[0505] 在一些实施方案中, 适合本文描述的水性悬浮液和分散液的分散剂是本领域已知的, 并且包括例如亲水聚合物、电解质、吐温[®] 60或80、PEG、聚乙烯吡咯烷酮 (PVP; 商业上称作Plasdone[®]) 和基于碳水化合物的分散剂, 例如羟丙基纤维素和羟丙基纤维素醚 (例如HPC、HPC-SL和HPC-L)、羟丙基甲基纤维素和羟丙基甲基纤维素醚 (例如HPMC K100、HPMC K4M、HPMC K15M和HPMC K100M)、羧甲基纤维素钠、甲基纤维素、羟乙基纤维素、羟丙基甲基纤维素邻苯二甲酸酯、羟丙基甲基纤维素醋酸酯硬脂酸酯、非结晶纤维素、硅酸镁铝、三乙醇胺、聚乙烯醇 (PVA)、聚乙烯吡咯烷酮/醋酸乙烯酯共聚物 (Plasdone[®], 例如S-630)、4-(1,1,3,3-四甲基丁基)-苯酚与环氧乙烷和甲醛的聚合物 (也称作泰洛沙泊)、泊洛沙姆 (例如Pluronic F68[®]、F88[®]和F108[®], 它们是环氧乙烷和环氧丙烷的嵌段共聚物); 和泊洛沙胺 (例如Tetronic 908[®], 也称作泊洛沙胺908[®], 它是通过将环氧丙烷和环氧乙烷相继添加到乙二胺上而衍生的四官能嵌段共聚物 (BASF Corporation, Parsippany, N.J.))。在其它实施方案中, 分散剂选自不包含以下试剂之一的组: 亲水聚合物; 电解质; 吐温[®] 60或80; PEG; 聚乙烯吡咯烷酮 (PVP); 羟丙基纤维素和羟丙基纤维素醚 (例如HPC、HPC-SL和HPC-L); 羟丙基甲基纤维素和羟丙基甲基纤维素醚 (例如HPMC K100、HPMC K4M、HPMC K15M、

HPMC K100M和Pharmacoat[®] USP 2910 (Shin-Etsu)); 羧甲基纤维素钠; 甲基纤维素; 羟乙基纤维素; 羟丙基甲基纤维素邻苯二甲酸酯; 羟丙基甲基纤维素醋酸酯硬脂酸酯; 非结晶纤维素; 硅酸镁铝; 三乙醇胺; 聚乙烯醇 (PVA); 4-(1,1,3,3-四甲基丁基)-苯酚与环氧乙烷和甲醛的聚合物; 泊洛沙姆 (例如Pluronic F68[®]、F88[®]和F108[®], 它们是环氧乙烷和环氧丙烷的嵌段共聚物); 或泊洛沙胺 (例如Tetronic 908[®], 也称作泊洛沙胺 908[®])。

[0506] 适合于本文描述的水性悬浮液和分散液的湿润剂是本领域已知的, 并且包括但不限于十六醇、单硬脂酸甘油酯、聚氧乙烯失水山梨糖醇脂肪酸酯 (例如可商业购买的吐温[®], 例如吐温 20[®]和吐温 80[®] (ICI Specialty Chemicals)) 和聚乙二醇 (例如Carbowaxs 3350[®]和1450[®]以及Carbopol 934[®] (Union Carbide))、油酸、单硬脂酸甘油酯、失水山梨糖醇单油酸酯、失水山梨糖醇单月桂酸酯、三乙醇胺油酸酯、聚氧乙烯失水山梨糖醇单油酸酯、聚氧乙烯失水山梨糖醇单月桂酸酯、油酸钠、十二烷基硫酸钠、多库酯钠、三醋精、维生素E TPGS、牛磺胆酸钠、二甲基硅油、磷脂酰胆碱等。

[0507] 适合于本文描述的水性悬浮液或分散液的防腐剂包括例如山梨酸钾、对羟基苯甲酸酯 (例如对羟基苯甲酸甲酯和对羟基苯甲酸丙酯), 苯甲酸及其盐, 对羟基苯甲酸的其它酯如对羟基苯甲酸丁酯, 醇如乙醇或苯甲醇, 酚类化合物如苯酚, 或季铵化合物如苯扎氯铵。如本文所用的防腐剂以足以抑制微生物生长的浓度并入到剂型中。

[0508] 适合于本文描述的水性悬浮液或分散液的粘度增强剂包括但不限于甲基纤维素、黄原胶、羧甲基纤维素、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、Plasdon[®] S-630、卡波姆、聚乙烯醇、藻酸盐、阿拉伯树胶、壳聚糖及其组合。粘度增强剂的浓度将取决于选择的药剂和所需的粘度。

[0509] 适合于本文描述的水性悬浮液或分散液的甜味剂的实例包括例如阿拉伯树胶糖浆、安赛蜜K、阿力甜、大茴香、苹果、阿斯巴甜、香蕉、巴伐利亚奶油、浆果、黑加仑、奶油糖果、柠檬酸钙、樟脑、焦糖、樱桃、樱桃奶油、巧克力、肉桂、泡泡糖、柑橘、柑橘潘趣酒 (citrus punch)、柑橘奶油、棉花糖、可可、可乐、冷樱桃、冷柑橘、甜蜜素、cyclamate、右旋糖、桉树、丁香酚、果糖、水果潘趣酒 (fruit punch)、姜、甘草亭酸盐、甘草 (欧亚甘草) 糖浆、葡萄、葡萄柚、蜂蜜、异麦芽酮糖醇、柠檬、酸橙、柠檬奶油、甘草酸单铵盐 (MagnaSweet[®])、麦芽酚、甘露醇、枫树、药蜀葵、薄荷醇、薄荷奶油、混合浆果、新橙皮苷DC、纽甜、橙子、梨、桃、胡椒薄荷、胡椒薄荷奶油、Prosweet[®]粉末、覆盆子、沙士、朗姆酒、糖精、黄樟素、山梨糖醇、留兰香、留兰香奶油、草莓、草莓奶油、甜菊糖、三氯蔗糖、蔗糖、糖精钠、糖精、阿斯巴甜、安赛蜜钾、甘露醇、talin、三氯蔗糖、山梨糖醇、瑞士奶油、塔格糖、橘子、奇异果甜蛋白、百果糖、香草、胡桃、西瓜、野樱桃、冬青、木糖醇, 或这些调味成分的任意组合, 例如大茴香-薄荷醇、樱桃-大茴香、肉桂-橙子、樱桃-肉桂、巧克力-薄荷、蜂蜜-柠檬、柠檬-酸橙、柠檬-薄荷、薄荷醇-桉树、橙子-奶油、香草-薄荷, 及其混合物。在一个实施方案中, 水性液体分散液可以包含浓度范围为水性分散液体积的约0.001%到约1.0%的甜味剂或调味剂。在另一个实施方案中, 水性液体分散液可以包含浓度范围为水性分散液体积的约0.005%到约0.5%的甜味剂或调味剂。在又一个实施方案中, 水性液体分散液可以包含浓度范围为水性分散液体积

的约0.01%到约1.0%的甜味剂或调味剂。

[0510] 除了上面列出的添加剂以外,液体制剂还可以包含本领域常用的惰性稀释剂,例如水或其它溶剂、增溶剂和乳化剂。示例性的乳化剂是乙醇,异丙醇,碳酸乙酯,乙酸乙酯,苯甲醇,苯甲酸苯甲酯,丙二醇,1,3-丁二醇,二甲基甲酰胺,十二烷基硫酸钠,多库酯钠,胆固醇,胆固醇酯,牛磺胆酸,磷脂酰胆碱,油例如棉籽油、花生油、玉米胚芽油、橄榄油、蓖麻油和芝麻油,甘油,四氢糠醇,聚乙二醇,失水山梨糖醇的脂肪酸酯,或这些物质的混合物,等等。

[0511] 在一些实施方案中,本文描述的药物制剂可以是自乳化药物递送系统(SED DS)。乳液是不混溶的一个相在另一个相中的分散液,通常为小滴的形式。一般地,乳液通过剧烈的机械分散而生成。与乳液或微乳液相反,SED DS在加入到过量的水中时不需任何外部机械分散或搅拌,即可自发形成乳液。SED DS的一个优点是让小滴遍布在溶液中分配仅需要轻柔的混合。此外,水或水相可以在施用前即刻加入,这确保了不稳定的或疏水性的活性成分的稳定性。因此,SED DS提供了用于口服和肠胃外递送疏水活性成分的有效递送系统。SED DS可以提供疏水活性成分的生物利用度的改善。生产自乳化剂型的方法是本领域已知的,并且包括但不限于例如美国专利号5,858,401、6,667,048和6,960,563,其各自特此通过引用而并入。

[0512] 应当意识到,在本文描述的水性分散液或悬浮液中使用的上面列出的添加剂之间存在重叠,因为给定的添加剂经常被该领域中的不同从业者进行不同的分类,或者常常针对数种不同功能中的任一种来使用。因此,上面列出的添加剂应当仅被认为是示例性的,而不是限制本文描述的制剂中可以包含的添加剂的类型。本领域技术人员依照所需的特定性质,可以轻易地确定此类添加剂的量。

鼻内制剂

[0513] 鼻内制剂是本领域已知的,并且在例如美国专利号4,476,116、5,116,817和6,391,452中描述,其各自特此通过引用而并入。依照本领域熟知的这些和其它技术制备的包含式(A1-A6)、式(B1-B6)、式(C1-C6)或式(D1-D6)的任意化合物的制剂,使用苯甲醇或其它合适的防腐剂、氟碳化合物和/或其它本领域已知的增溶剂或分散剂,在盐水中制备为溶液。参见,例如Ansel,H.C.等,Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery Systems,第六版(1995)。优选地,这些组合物和制剂使用合适的无毒的药学上可接受的成分来制备。这些成分是熟悉鼻腔剂型制备的技术人员已知的,并且其中一些可以在本领域的标准参考书REMINGTON:THE SCIENCE AND PRACTICE OF PHARMACY,第21版,2005中找到。合适的载体的选择高度依赖于所需鼻腔剂型的确切性质,例如溶液、悬浮液、软膏或凝胶。除了活性成分以外,鼻腔剂型一般还包含大量水。还可以存在少量其它成分,例如pH调节剂、乳化剂或分散剂、防腐剂、表面活性剂、胶凝剂或缓冲剂以及其它稳定剂和增溶剂。鼻腔剂型应当与鼻腔分泌物等渗。

[0514] 对于通过吸入施用,本文描述的式D的任意化合物或第二药剂可以处于气雾剂、薄雾或粉末的形式。本文描述的药物组合物方便地使用合适的推进剂从增压包装或喷雾器中以气雾剂喷雾表现形式递送,该推进剂例如是二氯二氟甲烷、三氯氟甲烷、二氯四氟乙烷、二氧化碳或其它合适的气体。在增压气雾剂的情况下,通过提供阀来递送计量的量,可以确定剂量单位。在吸入器或吹入器中使用的(例如,仅举例来说)明胶的胶囊和药筒,可以被配

制为包含本文描述的化合物与合适的粉末基质如乳糖或淀粉的粉末混合物。

口腔制剂

[0515] 包含式D的任意化合物或第二药剂的口腔制剂可以使用本领域已知的多种制剂来施用。例如,此类制剂包括但不限于美国专利号4,229,447、4,596,795、4,755,386和5,739,136,其各自特此通过引用而并入。另外,本文描述的口腔剂型可以进一步包含生物可蚀解(可水解)的聚合物载体,该聚合物载体也用于将剂型粘附至颊粘膜。制备口腔剂型,以便于在预定的时间段内逐步蚀解,其中基本上自始至终提供式D的任意化合物或第二药剂的递送。如本领域技术人员将意识到的,颊部药物递送避免了口服药物施用所遇到的缺点,例如缓慢吸收、活性剂被胃肠道中存在的流体降解和/或在肝脏中的首过失活。对于生物可蚀解(水解)的聚合物载体,将意识到,实际上可以使用任意此类载体,只要不危害所需的药物释放谱即可,并且载体与式D的任意化合物或第二药剂和可能在口腔剂量单位中存在的任何其它成分相容。一般地,聚合物载体包含粘附在颊粘膜的湿表面上的亲水(水可溶的和可膨胀的)聚合物。本文中有用的聚合物载体的实例包括丙烯酸聚合物和共聚物,例如称作“卡波姆”的那些(Carbopol[®],可从B.F.Goodrich获得,是一种这样的聚合物)。其它成分也可以并入到本文描述的口腔剂型中,包括但不限于崩解剂、稀释剂、粘合剂、润滑剂、调味剂、着色剂、防腐剂等。对于颊部或舌下施用,组合物可以采取以常规方式配制的片剂、锭剂或凝胶的形式。

透皮制剂

[0516] 本文描述的透皮制剂可以使用本领域已描述过的多种装置施用。例如,此类装置包括但不限于美国专利号3,598,122、3,598,123、3,710,795、3,731,683、3,742,951、3,814,097、3,921,636、3,972,995、3,993,072、3,993,073、3,996,934、4,031,894、4,060,084、4,069,307、4,077,407、4,201,211、4,230,105、4,292,299、4,292,303、5,336,168、5,665,378、5,837,280、5,869,090、6,923,983、6,929,801和6,946,144,其各自特此通过引用而整体并入。

[0517] 本文描述的透皮剂型可以并入某些本领域常规的药学上可接受的赋形剂。在一个实施方案中,本文描述的透皮制剂包含至少三种成分:(1)式D的任意化合物或第二药剂的制剂;(2)渗透促进剂;和(3)水性佐剂。另外,透皮制剂可以包含另外的成分,例如但不限于胶凝剂、乳膏和软膏基质等。在一些实施方案中,透皮制剂可以进一步包含织造或非织造的背衬材料,以增强吸收并防止透皮制剂从皮肤上移除。在其它实施方案中,本文描述的透皮制剂可以保持饱和或过饱和状态,以促进向皮肤中的扩散。

[0518] 适合于本文描述的化合物的透皮施用的制剂可以使用透皮递送装置和透皮递送贴剂,并且可以是亲脂性乳液或缓冲的水溶液,溶解和/或分散在聚合物或粘合剂中。此类贴剂可以被构造为用于药剂的连续、脉冲或按需递送。更进一步地,本文描述的化合物的透皮递送可以借助于离子电渗贴剂等来完成。此外,透皮贴剂可以提供式D的任意化合物或第二药剂的受控递送。通过使用速率控制膜,或者通过将化合物捕获在聚合物基质或凝胶内,可以减慢吸收速率。相反,可以使用吸收促进剂来增加吸收。吸收促进剂或载体可以包括可吸收的药学上可接受的溶剂,以协助穿过皮肤。例如,透皮装置为绷带形式,其包含背衬部件;储库,其包含化合物,任选地包含载体;任选的速率控制屏障,以在延长的时间段内以受控的预定速率向宿主的皮肤递送化合物;和将该装置固定在皮肤上的工具。

可注射的制剂

[0519] 适合于肌肉内、皮下或静脉内注射的包含式D的任意化合物或第二药剂的制剂可以包括生理学上可接受的无菌水性或非水性溶液、分散液、悬浮液或乳液,以及用于重建成无菌的可注射溶液或分散液的无菌粉末。合适的水性和非水性载体、稀释剂、溶剂或赋形剂的实例包括水、乙醇、多元醇(丙二醇、聚乙二醇、甘油、克列莫佛(cremophor)等)、其合适的混合物、植物油(例如橄榄油)和可注射的有机酯如油酸乙酯。例如,通过使用包衣如卵磷脂,在分散液的情况下通过保持所需颗粒大小,以及通过使用表面活性剂,可以保持适当的流动性。适合皮下注射的制剂还可以包含添加剂如防腐剂、湿润剂、乳化剂和分散剂。通过各种抗菌剂和抗真菌剂例如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、山梨酸等,可以确保阻止微生物的生长。也可能需要包含等渗剂如糖、氯化钠等。可注射的药物形式的延长吸收可以通过使用诸如单硬脂酸铝和明胶等吸收延迟剂来实现。

[0520] 对于静脉内注射,本文描述的化合物可以在水性溶液中配制,优选地在生理学上相容的缓冲液如汉克斯液、林格液或生理盐水缓冲液中配制。对于经粘膜施用,在制剂中使用适合于所渗透的屏障的渗透剂。此类渗透剂是本领域公知的。对于其它肠胃外注射,适当的制剂可以包括水性或非水性溶液,优选地包含生理学上相容的缓冲液或赋形剂。此类赋形剂是本领域公知的。

[0521] 肠胃外注射可以包括快速浓注或连续输注。用于注射的制剂可以呈现于单位剂型例如安瓿中或添加了防腐剂的多剂量容器中。本文描述的药物组合物可以处于适合肠胃外注射的形式,作为在油性或水性载体中的无菌悬浮液、溶液或乳液,并且可以包含配制用剂如悬浮剂、稳定剂和/或分散剂。用于肠胃外施用的药物制剂包括水溶性形式的活性化合物的水性溶液。此外,活性化合物的悬浮液可以制备成适当的油性注射悬浮液。合适的亲脂性溶剂或载体包括脂肪油如芝麻油,或合成的脂肪酸酯如油酸乙酯或甘油三酯,或脂质体。水性注射悬浮液可以包含增加悬浮液粘度的物质,例如羧甲基纤维素钠、山梨糖醇或葡聚糖。任选地,悬浮液还可以包含合适的稳定剂或增加化合物溶解度的用剂,以允许制备高度浓缩的溶液。或者,活性成分可以处于粉末形式,以供在使用前用合适的载体例如无菌无热原水重建。

其它制剂

[0522] 在某些实施方案中,可以使用药物化合物的递送系统,例如脂质体和乳液。在某些实施方案中,本文提供的组合物还可以包含粘膜粘附聚合物,其选自例如羧甲基纤维素、卡波姆(丙烯酸聚合物)、聚(甲基丙烯酸甲酯)、聚丙烯酰胺、聚卡波非、丙烯酸/丙烯酸丁酯共聚物、藻酸钠和葡聚糖。

[0523] 在一些实施方案中,本文描述的化合物可以局部施用,并且可以配制成多种可局部施用的组合物,例如溶液、悬浮液、洗液、凝胶、糊剂、药棒、香膏、乳膏或软膏中。此类药物化合物可以包含增溶剂、稳定剂、张力增强剂、缓冲剂和防腐剂。

[0524] 本文描述的化合物还可以配制成直肠组合物,如灌肠剂、直肠凝胶、直肠泡沫、直肠气雾剂、栓剂、胶状栓剂或保留灌肠剂,其含有常规栓剂基质如可可脂或其它甘油酯,以及合成的聚合物如聚乙烯吡咯烷酮、PEG等。在组合物的栓剂形式中,首先融化的是低熔点蜡,例如但不限于脂肪酸甘油酯的混合物,任选地与可可脂联合。

给药和治疗

[0525] 在某些实施方案中,本文公开了一种在有需要的个体中治疗血液恶性肿瘤的方法,其包括:(a)向该个体施用第一治疗,该第一治疗包含足以从该恶性肿瘤动员多个细胞的量的不可逆Btk抑制剂;和(b)分析该动员的多个细胞。在一些实施方案中,该不可逆Btk抑制剂的量足以诱发来自该恶性肿瘤的多个细胞的淋巴细胞增多。在一些实施方案中,该不可逆Btk抑制剂的量是从300mg/天直到并且包括1000mg/天。在一些实施方案中,该不可逆Btk抑制剂的量是从420mg/天直到并且包括840mg/天。在一些实施方案中,该不可逆Btk抑制剂的量是约420mg/天、约560mg/天或约840mg/天。在一些实施方案中,该不可逆Btk抑制剂的量是约420mg/天。在一些实施方案中,该Btk抑制剂的AUC₀₋₂₄是约150至约3500ng*h/mL。在一些实施方案中,该Btk抑制剂的AUC₀₋₂₄是约500至约1100ng*h/mL。在一些实施方案中,该Btk抑制剂是口服施用的。在一些实施方案中,该Btk抑制剂每天施用一次、每天施用两次或每天施用三次。在一些实施方案中,施用该Btk抑制剂直到疾病进展、无法接受的毒性或个体选择。在一些实施方案中,每天施用该Btk抑制剂直到疾病进展、无法接受的毒性或个体选择。在一些实施方案中,每隔一天施用该Btk抑制剂直到疾病进展、无法接受的毒性或个体选择。在一些实施方案中,该Btk抑制剂是一种维持疗法。

[0526] 本文描述的化合物可用于制备抑制Btk或其同系物或治疗至少部分将受益于Btk或其同系物的抑制的疾病或状况(包括诊断为患有血液恶性肿瘤的患者和/或受试者)的药物。另外,在需要此类治疗的受试者中治疗本文描述的任意疾病或状况的方法包括以治疗有效量对所述受试者施用药物组合物,该药物组合物包含至少一种本文描述的式(A)、式(B)、式(C)或式(D)的任意化合物或其药学上可接受的盐、药学上可接受的N-氧化物、药学活性代谢物、药学上可接受的前药或药学上可接受的溶剂化物。

[0527] 含有本文所述化合物的组合物可以为了预防性、治疗性或维持性治疗而施用。在一些实施方案中,含有本文所述化合物的组合物为了治疗性应用而施用(例如,对诊断为患有血液恶性肿瘤的患者施用)。在一些实施方案中,含有本文所述化合物的组合物为了治疗性应用而施用(例如,对易患血液恶性肿瘤或处于发展成血液恶性肿瘤的风险中的患者施用)。在一些实施方案中,含有本文所述化合物的组合物向处于缓解期的患者施用,作为维持疗法。

[0528] 本文公开的化合物的量将取决于其用途(例如治疗、预防或维持)。本文公开的化合物的量将取决于疾病或状况的严重程度和进程、先前的治疗、患者的健康状态、体重和对药物的反应,以及主治医师的判断。通过例行实验(包括但不限于剂量递增临床试验)来确定此类治疗有效量被认为属于本领域的技能范围内。在一些实施方案中,该不可逆Btk抑制剂的量是从300mg/天直到并且包括1000mg/天。在一些实施方案中,该不可逆Btk抑制剂的量是从420mg/天直到并且包括840mg/天。在一些实施方案中,该Btk抑制剂的量是从400mg/天直到并且包括860mg/天。在一些实施方案中,该Btk抑制剂的量是约360mg/天。在一些实施方案中,该Btk抑制剂的量是约420mg/天。在一些实施方案中,该Btk抑制剂的量是约560mg/天。在一些实施方案中,该Btk抑制剂的量是约840mg/天。在一些实施方案中,该Btk抑制剂的量是从2mg/kg/天直到并且包括13mg/kg/天。在一些实施方案中,该Btk抑制剂的量是从2.5mg/kg/天直到并且包括8mg/kg/天。在一些实施方案中,该Btk抑制剂的量是从2.5mg/kg/天直到并且包括6mg/kg/天。在一些实施方案中,该Btk抑制剂的量是从2.5mg/kg/天直到并且包括4mg/kg/天。在一些实施方案中,该Btk抑制剂的量是约2.5mg/kg/天。在

一些实施方案中,该Btk抑制剂的量是约8mg/kg/天。

[0529] 在一些实施方案中,每天施用本文公开的Btk抑制剂。在一些实施方案中,每隔一天施用本文公开的Btk抑制剂。

[0530] 在一些实施方案中,本文公开的Btk抑制剂每天施用一次。在一些实施方案中,本文公开的Btk抑制剂每天施用两次。在一些实施方案中,本文公开的Btk抑制剂每天施用三次。在一些实施方案中,本文公开的Btk抑制剂每天施用数次。

[0531] 在一些实施方案中,施用该Btk抑制剂直到疾病进展、无法接受的毒性或个体选择。在一些实施方案中,每天施用该Btk抑制剂直到疾病进展、无法接受的毒性或个体选择。在一些实施方案中,每隔一天施用该Btk抑制剂直到疾病进展、无法接受的毒性或个体选择。

[0532] 在患者的状态确实改善的情况下,根据医生的裁量,化合物的施用可以连续给予;或者,施用的药物剂量可以暂时减少或暂时中止某段时间(即“休药期”)。休药期的长度可以在2天到1年之间不等,仅举例来说,包括2天、3天、4天、5天、6天、7天、10天、12天、15天、20天、28天、35天、50天、70天、100天、120天、150天、180天、200天、250天、280天、300天、320天、350天或365天。休药期期间的剂量减少可以为10%–100%,仅举例来说,包括10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%。

[0533] 一旦患者状况发生改善,如果必要的话,施用维持剂量。随后,剂量或施用频率或二者可以根据症状的变化减少到疾病、病症或状况的改善得以保持的水平。但是,当症状有任何复发时,患者可能需要长期的间歇性治疗。

[0534] 对应于此量的给定药剂的量将根据诸如特定的化合物、疾病的严重程度、需要治疗的受试者或宿主的特性(例如体重)等因素而变化,不过仍可以根据该病例的特定情况以本领域已知的方式进行例行确定,所述情况包括例如施用的具体药剂、施用途径和所治疗的受试者或宿主。但是,一般而言,对成人治疗使用的剂量将一般在每天0.02–5000mg或每天约1–1500mg的范围内。所需剂量可方便地在单一剂量中或作为分开的剂量呈现,所述分开的剂量同时(或在短时间内)或以适当的间隔施用,例如每天二次、三次、四次或更多次亚剂量。

[0535] 本文所述的药物组合物可以处于适合单一施用精确剂量的单位剂型中。在单位剂型中,制剂被分成含有适量的一种或多种化合物的单位剂量。单位剂量可以是含有离散量的制剂的包装的形式。非限制性实例是包装的片剂或胶囊,和小瓶或安瓿中的粉末。水性悬浮组合物可以包装在不可再次盖紧的单剂量容器中。或者,可以使用可再次盖紧的多剂量容器,在该情况下,组合物中一般包含防腐剂。仅举例来说,用于肠胃外注射的制剂可以呈现于包括但不限于安瓿的单位剂型中,或添加了防腐剂的多剂量容器中。在一些实施方案中,每单位剂型包含210mg本文公开的化合物。在一些实施方案中,每天向个体施用1份单位剂型。在一些实施方案中,每天向个体施用2份单位剂型。在一些实施方案中,每天向个体施用3份单位剂型。在一些实施方案中,每天向个体施用4份单位剂型。

[0536] 前述范围仅是建议性的,因为关于个体治疗方案的变量数目很大,并且距离这些推荐值的相当大的偏离也并非不常见的。此类剂量可以根据许多变量而改变,这些变量不限于所使用的化合物的活性、所治疗的疾病或状况、给药模式、受试个体的需求、所治疗的

疾病或状况的严重程度,以及从业医生的判断。

[0537] 此类治疗剂的毒性和治疗效果可以通过标准药理学程序在细胞培养物或实验动物中确定,包括但不限于LD₅₀值(群体的50%致死剂量)和ED₅₀值(群体的50%治疗有效剂量)的确定。毒性和治疗效果之间的剂量比是治疗指数,并且它可以表示成LD₅₀值和ED₅₀值之间的比值。显示出高治疗指数的化合物是优选的。从细胞培养试验和动物研究获得的数据可以用于制定在人体中使用的剂量范围。此类化合物的剂量优选地处于包括ED₅₀且具有最小毒性的循环浓度的范围内。剂量可以在该范围内变化,这取决于所使用的剂型和所使用的给药途径。

试剂盒/制品

[0538] 本发明也涵盖用于实施本发明方法的试剂盒。举例来说,该试剂盒可以包含能够在蛋白质或核酸水平上检测生物样品中本文所述的生物标记(例如细胞凋亡、细胞增殖或存活或由Btk介导的信号途径的生物标记)的标记化合物或试剂,以及在使样品与感兴趣的BCLD治疗剂一起温育之后用于测定该样品中生物标记的量的手段(例如,可与编码感兴趣的生物标记的RNA结合的抗体或寡核苷酸探针)。试剂盒可以包装为允许检测多种目标生物标记,这是通过包括能够检测每种单独的目标生物标记的单独标记化合物或试剂以及用于测定样品中每种生物标记的量的手段而实现的。

[0539] 所使用的第二药剂的具体选择将取决于主治医师的诊断和他们对于患者状况的判断以及适当的Btk抑制剂治疗方案。

实施例

[0540] 以下具体且非限制性的实施例将被解释为仅为说明性的,并不以任何方式限制本公开内容。无需进一步阐述,一般认为,本领域技术人员基于本文的描述能够最大限度地利用本公开内容。所有在本文中引用的出版物特此通过引用整体并入本文。当提到URL或其它此类标识符或地址时,应当理解,此类标识符可以改变,并且因特网上的特定信息可能时有时无,但是等同的信息可以通过搜索因特网而找到。对其之提及证明了此信息的可获得性和公开发布。

[0541] 在下文提供的临床研究用不可逆Btk抑制剂(R)-1-(3-(4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)哌啶-1-基)丙-2-烯-1-酮(即,PCI-32765/依罗替尼)来例证。在一些实施方案中,使用式(A)、(A1)、(B)、(B1)、(C)、(C1)、(D)、(D1)、(E)或(F)中任一个的Btk抑制剂进行此类研究。在一些实施方案中,使用式D的Btk抑制剂进行此类研究。

实施例1:用于确定Btk抑制剂PCI-32765的安全性和有效性的临床试验

[0542] 对PCI-32765的首次人体剂量递增研究的主要终点是确定不良事件谱;确定Btk活性位点的占用;找出最大耐受剂量(MTD)(如果未达到MTD,则最大剂量为高于获得完全Btk占用的剂量的3倍剂量水平);以及确定PCI-32765的药代动力学(PK)。次要终点为评估肿瘤对PCI-32765单一疗法的反应。

[0543] 该开放标签试验的剂量递增部分纳入了患有B细胞恶性肿瘤的受试者(组织学在以下的表2中列出)并且现已完成。

[0544] 使用给药28天及停药7天的治疗时间表来测试5种剂量水平(总共n=56);剂量水平为1.25(n=7)、2.5(n=9)、5.0(n=6)、8.3(n=8)和12.5(n=7)mg/kg/天。两个额外的患者组按35天时间表接受连续每日给药:一组接受8.3mg/kg/天(n=10),而另一组接受

560mg/天(“固定”组群;n=9)。ABC DLBCL患者以560mg/天进行治疗;已经完成了具有其它组织学的患者的入选,并且已经报道了来自这些患者的数据(Advani等,2010)。

[0545] 在总共56名患者中记录到7例完全反应(CR)和23例部分反应(PR);另外10名受试者病情稳定(SD)。在所有剂量水平上以及在所有组织学中均观察到了反应。反应数据总结于表2中(如下)。

表2.对PCI-32765的临床反应

	患者	CR	PR	SD	PD	不可评估	ORR (可评估的患者)	ORR (ITT ^a)
CLL/SLL	16	1	10	3	0	2	79%	69%
FL	16	3	3	3	4	3	46%	38%
MCL	9	3	4	1	1	0	78%	78%
DLBCL	7	0	2	1	4	0	29%	29%
MZL/MALT	4	0	1	1	1	1	33%	25%
WM	4	0	3	1	0	0	75%	75%
总计	56	7	23	10	10	6	60%	54%

^a意向性治疗

[0546] 未达到MTD。记录到两种剂量限制性毒性(DLT):1名受试者在2.5mg/kg/天剂量水平时具有延长的中性粒细胞减少,另一名受试者在8.3mg/kg/天剂量水平时具有变态反应。在最终剂量水平(12.5mg/kg/天)未观察到DLT。在2.5mg/kg剂量水平时在所有患者中均观察到完全Btk占用。

[0547] 第1天和第8天(稳态)药代动力学结果在以下表3和表4中示出。式D化合物的总血浆浓度(总量=结合的部分+未结合的部分)通常随着第1天1.25、2.5、5.0、8.3和12.5mg/kg的体重标准化剂量的增加而增加。

表3.第1天式D化合物的平均(变异系数)药代动力学参数

组群	N	剂量 (mg/kg)	C _{max} ^a (ng/mL)	T _{max} (h)	AUC _{0-∞} (ng·h/mL)	t _{1/2} ^b (h)
1	5 ^c	1.25	48.7 (54%)	1.0 (0%)	181 (50%)	1.7 (27%)
2	9	2.5	90.4 (92%)	2.1 (60%)	494 (83%)	1.5 (33%)
3	6	5	86.1 (136%)	2.3 (59%)	419 (95%)	2.5 (51%)
4	8	8.3	135 (71%)	1.8 (59%)	923 (84%)	2.1 (28%)
CD	10	8.3	155 (81%)	2.2 (49%)	1027 (77%)	2.1 (35%)
5	7	12.5	383 (72%)	1.7 (28%)	1550 (57%)	1.5 (27%)
固定的	9	560mg 固定剂量	156 (91%)	1.8 (55%)	749 (69%)	2.65 (69%)

AUC=曲线下面积;CD=连续给药;C_{max}=观察到的最大药物浓度;t_{1/2}=半衰期;

$T_{\max}$ = 达到最大浓度的时间;

a PCI-32765的定量下限为0.050ng/mL

b从 $T_{\max}$ 到给药后6小时的半衰期

c 7名受试者中的2名被认为是异常值

表4. 在稳态下(第8天) PCI-32765的平均(变异系数)药代动力学参数(试验PCYC-04753)

组群	N	剂量 (mg/kg)	$C_{\max}^a$ (ng/mL)	$C_{\max}$ /剂量 (g/L)	AUC_{0-24h} (ng·h/mL)	AUC_{0-24h} /剂 量 (g·h/L)
1	5	1.25	27.0 (56%)b	22.3 (49%)	301 (61%)	250 (53%)
2	9	2.5	114 (93%)	37.2 (108%)	1840 (122%)	408 (114%)
3	6	5	112 (96%)	22.4 (96%)	1580 (89%)	291 (94%)
4	8	8.3	183 (124%)	22.0 (124%)	2330 (121%)	281 (121%)
CD	10	8.3	130 (84%)	15.6 (84%)	1545 (89%)	186 (89%)
5	7	12.5	236 (67%)	18.9 (67%)	2936 (67%)	235 (68%)
固定的	9	560mg 固定剂量	122 (29%)	---	1553 (25%)	---

AUC = 曲线下面积; CD = 连续给药; $C_{\max}$ = 观察到的最大药物浓度

a PCI-32765的定量下限为0.050ng/mL

[0548] 评估第1天从0到无穷大 ($AUC_{0-\infty}$) 以及给药后0到24小时稳态 (AUC_{0-24h}) 的曲线下面积值。 $C_{\max}$ 和AUC值随着第1天和稳态的从1.25到12.5mg/kg的剂量增加而增加。稳态下剂量标准化的 $C_{\max}$ 和AUC值通常显示剂量成比例的增加,然而在第1天和稳态下在2.5-mg/kg剂量水平时观察到超过与剂量成比例的增加。达到最大血浆浓度的时间 ($T_{\max}$) 为1.0到2.3小时。 $T_{\max}$ 后式D化合物的平均半衰期为1.5-2.5小时。在接受体重标准化的剂量 (mg/kg/天) 的患者中,在所有剂量水平均观察到关于第1天 $AUC_{0-\infty}$ 和平均稳态(第8天) AUC_{0-24h} 的受试者间的高可变性。560mg/天固定剂量的施用导致对式D化合物的平均系统性暴露,测量为 $AUC_{0-\infty}$,其为在5和8.3mg/kg剂量水平时测量的平均暴露值的中间值。在稳态下(第8天),与接受体重标准化的剂量的受试者中的暴露值相比,接受560-mg固定剂量的受试者中的系统性暴露值具有较低的受试者间可变性(测量为 AUC_{0-24h} 的变异系数)。

[0549] 对第1天的PK和药效学谱的分析表明,在AUC值 $\geq 200\text{ng} \cdot \text{h/mL}$ 时,给药后4和24小时Btk活性位点占用饱和。在稳态下,接受 $\geq 2.5\text{mg/kg/天}$ 剂量的所有受试者都具有 $\geq 245\text{ng} \cdot \text{h/mL}$ 的AUC值。这表明,尽管PCI-32765化合物的血浆半衰期短,但其在至少24小时内为有效的不可逆抑制剂,因此每日一次给药足以维持Btk活性位点的完全占用。

[0550] 在CLL中,PCI-32765抑制趋化因子分泌和由趋化因子介导的恶性细胞迁移和粘附。作为临床试验内的相关研究,将患者的原代肿瘤样品与类抚育细胞(nurse-like cell)共同培养,并与1nM PCI-32765一起温育24小时。处理后,CCL3的分泌水平从 $393 \pm 172\text{pg}/\mu\text{L}$ 降低至 $54 \pm 46\text{pg}/\mu\text{L}$ ($p < 0.05$),并且CCL4的水平从 $2550 \pm 678\text{pg}/\mu\text{L}$ 降低至 $394 \pm 188\text{pg}/\mu\text{L}$ ($p < 0.05$)。此外,在由来自相同试验的患者样品衍生的原代CLL培养物中,1 μM PCI-32765降低了由CXCL12介导的趋化性(对照的 $57 \pm 9\%$, $n = 10$)和由CXCL13介导的趋化性(对照的 $46 \pm$

5%，n=10)。来自该试验的CLL患者的血浆样品显示出高的处理前CCL3/4水平，并且这些水平在处理后显著降低：在PCI-32765的首剂量后24小时，CCL3水平从 $60 \pm 29 \text{ pg/mL}$ 降低至 $16 \pm 13 \text{ pg/mL}$ ，并且CCL4的处理前水平从 $106 \pm 55 \text{ pg/mL}$ 降低至 $23 \pm 12 \text{ pg/mL}$ (n=6)。

实施例2：在CLL患者中使用PCI-32765的临床试验

[0551] 进行Ib/II期临床试验来研究PCI-32765对患有复发性或难治性 (R/R) 慢性淋巴细胞白血病/小淋巴细胞性淋巴瘤 (CLL/SLL) 的个体的效果。

[0552] 研究类型: 介入性

[0553] 分配: 非随机的

[0554] 终点分类: 安全性研究

[0555] 介入模式: 平行分配

[0556] 掩盖: 开放标签

[0557] 主要目的: 治疗

[0558] 第I组 (老年人, 初治, 个体) 接受420mg/天的PCI-32765。第II组 (老年人, 初治, 个体) 接受840mg/天的PCI-32765。第III组 (已用福达华 (fludara) 治疗两次的R/R个体) 接受420mg/天的PCI-32765。第IV组 (已用福达华治疗两次的R/R个体) 接受840mg/天的PCI-32765。患者的特征总结在表5和表6中。

表5: 患者特征

	第I组 - 初治 420 mg/d (N=26)	第II组 - 初治 840 mg/d (N=5)	总计 (N=31)
年龄, 岁 中值: =70岁, # (%)	71 (66 – 84) 20 (77)	71 (65 – 77) 3 (60)	71 (65 – 84) 23 (74)
ECOG体力状态, # (%) 0 1	18/25 (72) 7/25 (28)	2 (40) 3 (60)	20/30 (67) 10/30 (33)
$\beta 2$微球蛋白 > 3mg/L	7 (27)	0	7 (23)
基线血细胞减少, # (%) HGB < 11g/dL 血小板 < 100,000/ μL HGB < 11g/dL或PLT < 100,000 μL	8 (31) 11 (42) 16 (62)	2 (40) 1 (20) 3 (60)	10 (32) 12 (39) 19 (61)
预后标记, # (%) 未突变的IgVH: Del(17p):	11 (42) 2 (8)	2/4 (50) 0	13/30 (43) 2 (6)

	第III组 - R/R CLL 420 mg/d (N=27)	第IV组 - R/R CLL 840 mg/d (N=34)	总计 (N=61)
年龄, 岁 中值: 范围: =70岁, # (%)	64 40 - 81 9 (33)	64 44 - 80 10 (29)	64 40 - 81 19 (31)
诊断, # (%) CLL: SLL:	26 (96) 1 (4)	33 (97) 1 (3)	59 (97) 2 (3)
ECOG体力状态, # (%) 0 1/2	11 (41) 16 (59)	13 (38) 21 (62)	24 (39) 37 (61)
先前的治疗方案(Rx), # 中值: 范围:	3 2 - 10	5 1 - 12	4 1 - 12
先前的治疗, # (%) 核苷类似物 利妥昔单抗	27 (100) 25 (93) 24 (89)	34 (100) 33 (97) 28 (82)	61 (100) 58 (95) 52 (85)
烷化剂 阿仑珠单抗 苯达莫司汀 奥法木单抗	5 (19) 8 (30) 8 (30)	3 (9) 13 (38) 10 (29)	8 (13) 21 (34) 18 (30)
块状病变, # (%) ≥ 5 cm ≥ 10 cm	13 (48) 1 (4)	20 (59) 9 (26)	33 (54) 10 (16)
基线血细胞减少, # (%) ANC < 1500/ μ L HGB < 11g/dL 血小板 < 100,000/ μ L HGB < 11g/dL或PLT < 100,000 μ L	7 (26) 4 (15) 8 (30) 9 (33)	17 (50) 18 (53) 24 (71) 27 (79)	24 (39) 22 (36) 32 (52) 36 (59)
嘌呤类似物难治性, # (%) (在嘌呤类似物方案后< 12个月的无治疗间隔)	10 (37)	18 (53)	28 (46)
预后标记, # (%) 未突变的 IgVH: Del(17p): Del(11q): β 2微球蛋白 > 3mg/L	19/25 (76) 9/24 (38) 8/24 (33) 9/25 (36)	23/28 (82) 11/32 (34) 14/32 (44) 20/32 (63)	42/53 (79) 20/56 (36) 22/56 (39) 29/57 (51)

[0559] 每2个治疗周期进行肿瘤评估。

[0560] 研究目的:

[0561] 1. 描述PCI-32765在患有CLL/SLL的个体中的抗肿瘤效果的特征,例如淋巴结病/脾肿大的降低,以及绝对淋巴细胞计数(ACL)变化的动力学。

[0562] 2. 总结PCI-32765的安全性概况。

[0563] 入选标准:

● 仅针对初治组:男性和女性, ≥ 65 岁,确诊为CLL/SLL,需要按照NCI或国际工作组指

南11-14进行治疗。

●仅针对复发性/难治性组：男性和女性， ≥ 18 岁，确诊为对治疗无反应的复发性/难治性CLL/SLL（即， ≥ 2 次在先CLL/SLL治疗失败，并且对于患有CLL的受试者，至少1个方案中必须曾有嘌呤类似物[例如，氟达拉滨]）。

●体重 $\geq 40\text{kg}$

●ECOG体力状态 ≤ 2

●如果是性活跃的并且能够生育，需同意在研究期间以及最后一剂研究药物施用后的30天采取避孕措施

●愿意并能够参与本研究方案中所要求的所有评估和程序，包括无困难地吞咽胶囊

●能够理解本研究的目的和风险，并且提供签署姓名和日期的知情同意书和授权使用受保护的健康信息的授权书（根据国家和地方的个人隐私法规）

[0564] 排除标准：

●具有在研究者看来可能会危及受试者的安全、干扰口服PCI-32765的吸收或代谢或使研究结果处于不应有的风险中的危及生命的疾病、身体状况或器官系统功能障碍

●在施用第一剂研究药物前的4周内接受过任何免疫疗法、化学疗法、放射疗法或实验性疗法（用于疾病相关症状的皮质类固醇是允许的，但需要在研究药物施用前进行1周的洗脱）

●淋巴瘤累及中枢神经系统（CNS）

●在施用第一剂研究药物之前的4周内进行过手术

●肌酸酐 $> 1.5 \times$ 规定的正常值上限（ULN）；总胆红素 $> 1.5 \times$ ULN（除非由于吉耳伯病）；和天冬氨酸转氨酶（AST）或丙氨酸转氨酶（ALT） $> 2.5 \times$ ULN，除非与疾病相关

●伴随使用已知会导致QT延长或尖端扭转型室速的药物

●显著的筛查心电图（ECG）异常，包括左束支传导阻滞、II型II度AV传导阻滞、III度阻滞、心动过缓和QTc > 470 毫秒

●哺乳或妊娠

[0565] 反应标准：

[0566] NHL IWG标准无需修改即适用于SLL病例。

[0567] 2008CLL IWG标准经以下修改应用于CLL病例：

[0568] 1) 孤立的淋巴细胞增多，在缺乏其它符合PD标准的参数的情况下，不考虑为PD

[0569] 2) 将经历淋巴细胞增多但通过其它可测量参数获得PR的患者归类为“节点（nodal）”反应，直至ALC距基线有50%的降低，在这种情况下将他们归类为PR。

[0570] 3) 在基线时具有正常ALC（ $< 5K$ ）并且具有治疗相关的淋巴细胞增多的患者需要标准化为 $< 5K$ 才能被归类为PR。

[0571] 结果：

[0572] 研究结果示于表6-11。

表6：受试者处置-初治

	第I组 - 初治 420 mg/d (N=26)	第II组 - 初治 840 mg/d (N=5)
受试者中止, # (%)	4 (15)	1 (20)
中止的主要原因, # (%)		
疾病进展	1 (4) ^a	0 (0)
不良事件	2 (8) ^{b,c}	1 (20) ^e
无关的: 病毒性综合征		
无关的: 日益恶化的胃肠道出血		
可能相关的: 疲劳		
受试者撤回同意书	1 (4) ^d	
“期望的更快反应”		
研究中死亡, # (%)	0	0

#使用依罗替尼的天数:a) 280天;b) 41天;c) 115天;d) 41天;e) 9天

表7: 受试者处置-R/RCLL

	第III组- R/R CLL 420 mg/d (N=27)	第IV组 - R/R CLL 840 mg/d (N=34)
受试者中止, # (%)	7 (26)	8 (24)
中止的主要原因, # (%)		
疾病进展	2 (7)	1 (3)
不良事件	1 (4)	1 (3)
其它 ²	1 (4) ^d	
研究中死亡 ¹	1 (4)	2 (6)

¹死亡原因: 1例肺炎, 1例ARDS/隐球菌性肺炎, 1例组织细胞肉瘤

²其它: 5例移植, 1例在第5天诊断为NSCLC, 1例停用研究药物>2周

表8: 最佳反应-初治

	第I组 - 初治 420 mg/d (N=26) 中值f/u = 14.4个月 #(%)	组II - 初治 840 mg/d (N=5) 中值f/u = 7.4个月 #(%)	总计 (N=31) 中值f/u = 12.8个月 #(%)
CR	3 (12)	0	3 (10)
PR	18 (69)	2 (40)	20 (65)
ORR (遵照 IWCLL 2008 标准)	81%	40%	74%
节点	3 (12)	1 (20)	4 (13)
SD	1 (4)	1 (20)	2 (6)
PD	0	0	0
NE	1 (4)	1 (20)	2 (6)

表9: 最佳反应-R/R CLL

	组III - R/R CLL 420 mg/d (N=27) 中值f/u = 14.4个月 #(%)	组IV - R/R CLL 840 mg/d (N=34) 中值f/u = 7.4个月 #(%)	总计 (N=31) 中值f/u = 12.8个月 #(%)
CR	1 (4)	0	1 (2)
PR	17 (63)	23 (68)	40 (66)
ORR (遵照 IWCLL 2008 标准)	67%	6 %	67%
Nodal	6 (22)	8 (24)	12 (23)
SD	1 (4)	1 (3)	2 (3)
PD	1 (4)	0	1 (2)
NE	1 (4)	2 (6)	3 (5)

表10:按照风险特征的最佳反应-初治

	N	ORR % (n)	CR % (n)
所有患者	31	74 (23)	10 (3)
≥ 70 岁	23	70 (16)	13 (3)
筛查时 Hgb < 11 g/dL 或 PLT < 100K/μL	19	79 (15)	11 (2)
未突变的 IgVH	13	92 (12)	15 (2)
存在 Del17p	2	100 (2)	0 (0)
β2 微球蛋白 > 3mg/L	7	86 (6)	29 (2)

表11:按照风险特征的最佳反应-R/R CLL

	n/N	ORR %
所有患者	41/61	67
≥ 70 岁	13/19	68
块状病变≥5 cm	24/33	73
块状病变≥10 cm	7/10	70
在筛查时 Hgb < 11 g/dL 或 PLT < 100K/μL	22/36	61
未突变的 IgVH	31/42	74
存在 Del17p	13/20	65
存在 Del11q	16/22	73
β2 微球蛋白 > 3mg/L	19/29	66
嘌呤类似物难治性 (从任何嘌呤类似物到下一治疗>12 个月)	17/28	61

[0573] 本研究的结果进一步总结于图2-7中。图2显示了患有CLL的患者在用PCI-32765治疗之前和之后的LN反应。图3显示了在施用420mg/天或840mg/天的PCI-32765的R/R CLL患者中,用PCI-32765治疗的过程中肿瘤负荷的减少。图4呈现了在施用420mg/天PCI-32765的初治或R/R CLL患者中,用PCI-32765治疗的过程中的绝对淋巴细胞计数(ALC)和淋巴结(LN)直径乘积总和(SPD)。图5呈现了施用420mg/天PCI-32765的初治患者在连续治疗周期(第2、5、8、11周期和最佳反应)中的累积最佳反应。图6呈现了施用420mg/天PCI-32765的R/R CLL患者在连续治疗周期(第2、5、8、11周期和最佳反应)中的累积最佳反应。图7呈现了施用420mg/天PCI-32765的R/R CLL患者(RR)与初治(TN)患者在连续治疗周期中的累积最佳

反应之间的比较。

[0574] 结论:

[0575] II期中期数据证实PCI-32765在初治和复发性/难治性CLL/SLL患者中是高度有效的。在大多数患者中观察到类别特异性快速淋巴结减少伴淋巴细胞增多。2008CLL IWG客观反应(PR+CR)和节点反应似乎是持久的并且不依赖于高危基因组特征。高比例(86%)的复发或难治性患者在12个月时无进展(420mg组群)。

实施例3:对服用PCI-32765的个体的长期随访试验

[0576] 本研究的目的是确定PCI-32765的固定剂量、每日方案在患有B细胞淋巴瘤或慢性淋巴细胞性白血病/小淋巴细胞性白血病(CLL/SLL)的受试者中的长期安全性。

[0577] 研究类型:介入性

[0578] 分配:非随机的

[0579] 终点分类:安全性研究

[0580] 介入模式:单组分配

[0581] 掩盖:开放标签

[0582] 主要目的:治疗

[0583] 干预措施:420mg/天的PCI-32765

[0584] 适用疾病:B细胞慢性淋巴细胞性白血病;小淋巴细胞性白血病;弥漫性高分化淋巴瘤;B细胞淋巴瘤;滤泡性淋巴瘤;套细胞淋巴瘤;非霍奇金淋巴瘤;瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症;伯基特淋巴瘤;B细胞弥漫性淋巴瘤

[0585] 主要结果指标:

[0586] 不良事件/安全耐受性[时间范围:最后一剂研究药物后30天]-不良事件的频率、严重程度和关联性

[0587] 次要结果指标:

[0588] 1. 肿瘤反应[时间范围:按照监护标准进行的肿瘤评估的频率]-按照确立的反应标准对肿瘤反应进行评估。本研究将捕获到达疾病进展的时间和反应的持续时间。

[0589] 2. 肿瘤反应[时间范围:到达疾病进展的时间]-通过针对B细胞淋巴瘤和慢性淋巴细胞性白血病确立的反应标准测量的反应持续时间

[0590] 入选标准:

●男性和女性,患有B细胞淋巴瘤或CLL/小淋巴细胞性白血病(SLL),在先前的PCI-32765研究中病情稳定或者对口服PCI-32765的反应持续至少6个月并且想继续应用研究药物,或者在PCYC-04753研究中疾病进展并且想尝试更高的剂量

●东部肿瘤协作组(Eastern Cooperative Oncology Group)(ECOG)体力状态 ≤ 2

●如果是性活跃的并且能够生育,需同意在研究期间以及最后一剂研究药物施用后的30天采取避孕措施

●愿意并能够参与本研究方案中所要求的所有评估和程序,包括无困难地吞咽胶囊

●能够理解本研究的目的是风险,并且提供签署姓名和日期的知情同意书和授权使用受保护的健康信息的授权书(根据国家和地方的个人隐私法规)

[0591] 排除标准:

●具有在研究者看来可能会危及受试者的安全、干扰口服PCI-32765的吸收或代谢或

使研究结果处于不应有的风险中的危及生命的疾病、身体状况或器官系统功能障碍

●伴随免疫疗法、化学疗法、放射疗法、皮质类固醇(剂量等同于>20mg/天的泼尼松)或实验疗法

●伴随使用已知会导致QT延长或尖端扭转型室速的药物

●淋巴瘤累及中枢神经系统(CNS)

●肌酸酐 $>1.5 \times$ 规定的正常值上限(ULN);总胆红素 $>1.5 \times$ ULN(除非由于吉耳伯病);和天冬氨酸转氨酶(AST)或丙氨酸转氨酶(ALT) $>2.5 \times$ ULN,除非与疾病相关

●哺乳或妊娠

实施例4:PCI-32765在复发性/难治性MCL中的II期研究

[0592] 本研究的目的是:评估PCI-32765在先前未使用硼替佐米和先前使用过硼替佐米的复发性/难治性MCL受试者中的功效。次要目的是评估PCI-32765胶囊的固定每日给药方案在该群体中的安全性。

[0593] 研究类型:介入性

[0594] 分配:非随机的

[0595] 终点分类:安全性/功效研究

[0596] 介入模式:平行分配

[0597] 掩盖:开放标签

[0598] 主要目的:治疗

[0599] 干预措施:560mg/天的PCI-32765

[0600] 主要结果测量:

[0601] 测量对研究药物具有反应的参与者的数目[时间范围:追踪参与者直至疾病进展或开始另一抗癌治疗。]

[0602] 次要结果测量

[0603] 1.测量发生不良事件的参与者的数目作为安全性和耐受性的量度[时间范围:追踪参与者直至疾病进展或开始另一抗癌治疗。]

[0604] 2.测量参与者药代动力学的数目以帮助确定身体对研究药物如何反应[时间范围:在接受研究药物的第一个月内将进行的程序。]

[0605] 3.患者报告的结果[时间范围:追踪参与者直至疾病进展或开始另一抗癌治疗。]

[0606] 4.测量参与者报告结果的数目以确定健康相关的生活质量。

[0607] 入选标准:

●男性和女性 ≥ 18 岁

●ECOG体力状态 ≤ 2

●在病理上确诊为MCL,有记录表明细胞周期蛋白D1过度表达或t(11;14),在横截面成像上有可测量的病变,最长直径 ≥ 2 cm并且在2个垂直维度上是可测量的

●有记录表明使用最新治疗方案未能至少达到部分反应(PR),或有记录表明在接受最新治疗方案后疾病进展

●经历过至少1个但不超过5个针对MCL的在先治疗方案(注意:已经接受了 ≥ 2 个周期的硼替佐米在先治疗(无论是作为单一药剂还是作为联合治疗方案的一部分)的受试者将被认为是硼替佐米暴露的))

●愿意并能够参与本研究方案中所要求的所有评估和程序,包括无困难地吞咽胶囊

●能够理解本研究的目的是风险,并且提供签署姓名和日期的知情同意书和授权使用受保护的健康信息的授权书(根据国家和地方的个人隐私法规)

[0608] 主要排除标准:

●在施用第一剂研究药物之前的3周内进行过在先化学疗法、之前4周内施用过治疗性抗癌抗体、之前10周内施用过放射-或毒素-免疫偶联物、之前3周内施用过放射疗法,或之前2周内进行过大手术

●具有在研究者看来可能会危及受试者的安全、干扰PCI-32765胶囊的吸收或代谢或者使研究结果处于不应有的风险中的任何危及生命的疾病、身体状况或器官系统功能障碍

●患有临床上显著的心血管疾病,如不受控制的或有症状的心律失常,充血性心力衰竭,或筛查6个月内的心肌梗死,或如纽约心脏协会功能分类(New York Heart Association Functional Classification)所定义的任何3级或4级心脏病

●患有吸收不良综合征、显著影响胃肠功能的疾病,或胃或小肠的切除或溃疡性结肠炎、有症状的炎性肠病,或部分或完全肠梗阻

●有以下任何实验室检查异常:中性粒细胞绝对计数(ANC) <750 个细胞/ mm^3 ($0.75 \times 10^9/\text{L}$),除非有记录表明骨髓累及;血小板计数 $<50,000$ 个细胞/ mm^3 ($50 \times 10^9/\text{L}$),不依赖于输血支持,除非有记录表明骨髓累及;血清天冬氨酸转氨酶(ALT/SGOT)或丙氨酸转氨酶(ALT/SGPT) $\geq 3.0 \times$ 正常值上限(ULN);肌酸酐 $>2.0 \times$ ULN。

[0609] 加入该研究的患者的特征在以下表12和13中示出。

表12

	未用过硼替佐米的 (N=41)	硼替佐米暴露的 (N=27)	总计 (N=68)
年龄: 中值:	66	69	67
范围:	47 - 83	54 - 83	47 - 83
性别: 男性	31(76)	23 (85)	54 (79)
距初次诊断的时间, # (%)			
到第一剂 <3 年	20 (49)	6 (22)	26 (38)
到第一剂 ≥ 3 年	21(51)	21(78)	42 (62)
ECOG 状态 0	24 (59)	13 (48)	37 (54)
1	12 (29)	12 (44)	24 (35)
2	5 (12)	2 (7)	7 (10)
在先方案, # (%)			
中值	2	3	2
范围	1- 5	1- 5	1- 5
<3 个方案	28 (68)	11 (41)	39 (57)
≥ 3 个方案	13 (32)	16 (59)	29 (43)

表13

	未用过硼替佐米的 (N=41)	硼替佐米暴露的 (N=27)	总计 (N=68)
在先的高强度治疗, # (%)			
高 CVAD	17 (41)	11 (41)	28 (41)
干细胞移植	5 (12)	2 (7)	7 (10)
铂类挽救疗法	2 (5)	0 (0)	2 (3)
MIPI 评分, # (%)			
低风险	7 (17)	3 (11)	10 (15)
中等风险	16 (39)	10 (37)	26 (38)
高风险	17 (41)	11 (41)	28 (41)
块状病变 (团块≥10 cm LD), # (%)	5 (12)	4 (15)	9 (13)
IV 期疾病, # (%)	32 (78)	23 (85)	55 (81)
难治性疾病*, # (%)	14 (34)	13 (48)	27 (40)

MIPI=MCL国际预后指标;LD=最长直径

*难治性疾病=对进入研究之前的最后治疗至少未达到PR

[0610] 本研究的患者处置在表14中示出。

表14

	未用过硼替佐米的 (N=41)	硼替佐米暴露的 (N=27)	总计 (N=68)
研究时间(月), #			
N	36	25	61
中值	3.7	3.7	3.7
范围	0.9 - 7.0	0.7 - 7.5	0.7 - 7.5
仍处于研究治疗中的患者, # (%)	29 (71)	19 (70)	48 (71)
中止治疗的患者, # (%)	12 (29)	8 (30)	20 (29)
中止的主要原因, # (%)			
疾病进展	7 (17)	6 (22)	13 (19)
不良事件	2 (5)	1 (4)	3 (4)
发起方的决定	1 (2)	0 (0)	1 (1)
研究者的决定	2 (5)	1 (4)	3 (4)
研究中死亡¹, # (%)	0 (0)	1 (4)	1 (2)

¹死亡原因:肺炎

[0611] 结果:

[0612] 未用过硼替佐米和硼替佐米暴露的复发性或难治性MCL患者的最佳反应结果在图19和以下的表15中示出。

表15

	n/N	ORR %
所有患者	35/51	69
块状病变	4/7	57
难治性		
是	14/21	67
否	21/30	70
在先癌症治疗		
<3 个方案	23/30	77
≥3 个方案	12/21	57
在先高强度治疗		
是	22/31	71
否	13/20	65
MIPI 评分: 低风险	6/8	75
中等风险	13/20	65
高风险	15/20	75

[0613] PCI-32765诱发了对复发性或难治性MCL的高反应率,并且与有利的安全性概况相关。在研究期间未观察到患者中显著的骨髓抑制。

实施例5:PCI-32765+奥法木单抗在复发性/难治性CLL中的II期研究

[0614] 本研究的目的是确定口服施用的PCI-32765联合奥法木单抗的固定剂量、每日方案在患有复发性/难治性CLL/SLL和相关疾病的受试者中的功效和安全性。

[0615] 研究类型:介入性

[0616] 分配:非随机的

[0617] 终点分类:安全性研究

[0618] 介入模式:单组分配

[0619] 掩盖:开放标签

[0620] 主要目的:治疗

[0621] 干预措施:420mg/天的PCI-32765,标准剂量的奥法木单抗

[0622] 适用疾病:B细胞慢性淋巴细胞性白血病;小淋巴细胞性白血病;弥漫性高分化淋巴瘤;幼淋巴细胞白血病;里希特转化(Richter's Transformation)

[0623] 主要结果指标:

[0624] PCI-32765的反应和安全性[时间范围:在第1周期和第3周期结束时]

[0625] 慢性淋巴细胞性白血病的最新指南所定义的反应率

[0626] 次要结果指标:

[0627] 1.药代动力学/药效学评价[时间范围:在1-2个周期中]

[0628] 2.PCI-32765的药效学(即,Btk的药物占用以及对PCI-32765的1/2生物市场的影响)((drug occupancy of Btk and effect on biological market 1/2) of PCI-32765)

[0629] 3.肿瘤反应[时间范围:在第2、4和6周期结束时(每个周期28天)]

[0630] 4.CLL的最新指南所定义的总反应率

[0631] 入选标准:

[0632] 受试者患有由WHO的造血系肿瘤分类所定义的组织学确诊的慢性淋巴细胞性白血病 (CLL)、小淋巴细胞性白血病 (SLL)、幼淋巴细胞白血病 (PLL) 或由CLL/SLL引起的里希特转化,并且满足 ≥ 1 个以下条件:

●通过身体检查或影像学研究确定的进行性脾肿大和/或淋巴结病;由于骨髓累及而导致的贫血 ($< 11\text{g/dL}$) 或血小板减少 ($< 100,000/\mu\text{L}$);

●与前6个月相比有 $> 10\%$ 的非故意体重减轻;

●NCI CTCAE 2级或3级疲劳;

●发热 > 100.5 度或夜间盗汗 > 2 周,无感染证据

●进行性淋巴细胞增多,在2个月时间内增加 $> 50\%$,或者预期倍增时间 < 6 个月

●在干细胞移植前需要减少细胞

●如果对于该治疗无禁忌,则受试者必须具有失败的 ≥ 2 次包括核苷类似物的CLL在先治疗或 ≥ 2 次不包括核苷类似物的在先治疗

●肿瘤细胞上的CD20表达 $> 10\%$

●ECOG体力状态 ≤ 2

●预期寿命 ≥ 12 周

●受试者必须具有如下定义的器官和骨髓功能:

●在不存在骨髓累及的情况下嗜中性粒细胞绝对计数 (ANC) $\geq 1000/\mu\text{L}$,血小板 $\geq 30,000/\mu\text{L}$,总胆红素 $\leq 1.5 \times$ 规定的正常值上限 (除非由于吉耳伯病),AST (SGOT) $\leq 2.5 \times$ 规定的正常值上限 (除非由于肝浸润),肌酸酐 $\leq 2.0\text{mg/mL}$ 或肌酸酐清除率 $\geq 50\text{mL/min}$

●无对利妥昔单抗的在先过敏反应史

●无奥法木单抗在先接触史

●年龄 ≥ 18 岁

●体重 $\geq 40\text{kg}$

●能够无困难地吞咽胶囊并且无以下病史:吸收不良综合征、显著影响胃肠功能的疾病,或胃或小肠的切除或溃疡性结肠炎、有症状的炎症肠病,或部分或完全肠梗阻

[0633] 排除标准:

[0634] 具有在研究者看来可能会危及受试者的安全、干扰口服PCI-32765的吸收或代谢或使研究结果处于不应有的风险中的危及生命的疾病、身体状况或器官系统功能障碍

[0635] 在施用第一剂研究药物之前的4周内进行过任何抗癌免疫疗法、化学疗法、放射疗法或实验疗法。用于疾病相关症状的皮质类固醇是允许的,但需进行1周的洗脱。

[0636] 淋巴瘤引起的活跃的中枢神经系统 (CNS) 累及

[0637] 在施用第一剂研究药物之前的4周内进行过大手术

[0638] 哺乳或妊娠

[0639] 在先的恶性肿瘤病史,除非是经充分治疗的基底细胞或皮肤鳞状细胞癌、原位宫颈癌或其它癌症,受试者已不具有该疾病至少2年或者该疾病不会将生存期限制为 < 2 年

[0640] 在先抗癌治疗后续的 ≥ 2 级毒性 (非脱发) 的病史。

[0641] 加入本研究的患者的特征在以下表16和表17中示出。

表16

		(N=27)
年龄, 岁	中值 范围 ≥70 岁, # (%)	66 51 - 85 12 (44)
诊断, # (%)	CLL SLL PLL 里希特病	22 (81) 1 (4) 1 (4) 3 (11)
ECOG PS, # (%)	0 1	10 (37) 17 (63)
在先治疗方案	中值: 范围: ≥3 个方案	3 2 -10 16 (59)
mRai 分期, # (%)	低风险 中等风险 高风险	1 (4) 13 (48) 13 (48)

表17

	(N=27) (%)
嘌呤类似物难治性, # (%)	11 (41)
基线血细胞减少, # (%)	
ANC < 1500/μL	4 (15)
HGB < 11g/dL	9 (33)
血小板 < 100,000/μL	9 (33)
HGB < 11g/dL 或 PLT <100,000 μL	13 (48)
预后标记	
未突变的 IgVH:	20/22 (91)
Del(17p):	10 (37)
Del(11q):	9 (33)

[0642] 患者处置数据在表18中示出。

表18

	(N=27)
随访 中值(月)	9.8
范围	5.2-12.9
仍处于研究中的患者, # (%)	24 (89)
中止的患者, # (%)	3 (11)
中止的主要原因, # (%)	
进行移植	1 (4)
疾病进展	1 (4)
死亡	1 (4)

[0643] 结果:

[0644] 在表19中示出了最佳反应率的结果。图20示出了用PCI-32756治疗或与奥法木单抗联合治疗后淋巴细胞的动员和淋巴结大小的降低。联合治疗降低了循环中淋巴细胞的总数。图21示出了患者中的骨髓反应的组织学。

表18

	CLL/SLL/PLL (N=24)	里希特病 (N=3)
	# (%)	# (%)
CR	1 (4%)	0
PR	23 (96%)	2 (67%)
ORR	100%	67%
SD	0	1 (33%)
PD	0	0
NE	0	0

[0645] PCI-32756与奥法木单抗联合在R/R CLL/SLL/PLL患者中耐受性良好,并且具有高活性。评估了6名患者到第2周期结束时的剂量限制性毒性(DLT)。在这些患者中未出现DLT。4名患者进行了第3周末扫描和血液计数。根据IWG标准,4名中有3名为反应者。在这些CLL/SLL/PLL患者中,联合治疗导致100%ORR,不考虑基因组学。

实施例6:PCI-32765联合利妥昔单抗在复发性/难治性CLL中的II期研究

[0646] 具有高危疾病特征的CLL患者经过常规化学免疫治疗具有较短的缓解和不良的结果,尤其是在复发性疾病的情况下。布鲁顿酪氨酸激酶(BTK)抑制剂依罗替尼(PCI-32765)阻碍B细胞受体(BCR)信号传导,并且对于成熟B细胞恶性肿瘤患者,尤其是CLL患者而言是一种有希望的新型靶向疗法。1/2期试验数据表明高危型CLL患者与低危患者对依罗替尼的反应相当。依罗替尼单一药剂治疗的CLL患者特有地具有延迟反应或由持续淋巴细胞增多导致的稳定疾病,淋巴细胞增多是由组织定居(resident)CLL细胞再分配至外周血中而导致的。为了加速和改善反应并扩展高危型CLL患者中的依罗替尼经验,进行了依罗替尼+利妥昔单抗的2期单中心临床试验。

[0647] 每天口服依罗替尼420mg联合每周施用利妥昔单抗(375mg/m²)来治疗患者,持续1-4周(第1周期),然后每天施用依罗替尼+每月施用利妥昔单抗直至第6个周期,随后每天

施用单一药剂依罗替尼。研究需要包含高危疾病 (del17p或TP53突变[治疗的或未治疗的]), 在前线化学免疫疗法后PFS<36个月的患者,或具有del11q的复发性CLL患者。

[0648] 患者特征包括年龄中值为65 (范围35-82);在先治疗中值为2,14名女性和26名男性患者。Rai期中值为4 (范围1-4), $\beta 2$ 微球蛋白4.2mg/L (2.2-12.3),31名患者具有未突变的IGHV,仅1名患者具有突变的IGHV,其余患者具有非结论性的IGHV结果。19名患者具有del17p或TP53突变 (4名无在先治疗),13名患者具有del11q。在中值为4个月的随访中,40名患者中有38名继续治疗,而无疾病进展。1名患者死于无关的感染并发症,并且1名患者在开始治疗前撤回同意书。在20名在3个月时可对早期反应评估进行评价的患者中,有17名患者达到了部分缓解 (PR),ORR为85%,而3名达到了PR并具有持续的淋巴细胞增多。有趣的是,在该联合试验中,再分配淋巴细胞增多较早地达到峰值并且持续时间比单一药剂依罗替尼更短 (见图),这可能是由于利妥昔单抗的加入。

[0649] 治疗的耐受性良好,仅有13例3级 (n=11) 或4级 (n=2) 毒性,其主要是无关的且短暂的,如嗜中性粒细胞减少、疲劳、肺炎 (n=1)、失眠和骨痛。问卷调查揭示了可评估的患者 (n=21) 在3个治疗周期后改善的总体健康和生活质量。结论:依罗替尼联合利妥昔单抗对于高危型CLL患者而言是安全、耐受性良好的方案,其诱发非常高的早期反应率。

实施例7:PCI-32765联合苯达莫司汀和利妥昔单抗在复发性/难治性非霍奇金淋巴瘤患者中的I期研究

[0650] 该I期研究被设计为确定R-苯达莫司汀联合依罗替尼在复发性/难治性NHL患者中的最大耐受剂量、剂量限制性毒性 (DLT)、毒性和初步功效。

[0651] 合格者包括患有复发性/难治性FL、MZL、MCL、转化的NHL和DLBCL的患者,以及患有先前未得到治疗的MCL并且不是自体干细胞移植 (ASCT) 的候选人的患者。进入研究时需要ANC>1000/mm³,血小板>50,000/mm³,且肌酸酐<2.0mg/dL。在先的ASCT、利妥昔单抗、苯达莫司汀和依罗替尼是允许的。治疗由第1天的R 375mg/m²、第1天和第2天的苯达莫司汀90mg/m²和第1-28天 (每个周期28天持续6个周期) 的递增剂量的依罗替尼 (280mg或560mg) 组成。在每个剂量水平有6名患者加入。有反应的患者在第6周期后可以继续单独施用依罗替尼直至疾病进展或出现不可接受的毒性。在第1-6周期期间对于具有4级嗜中性粒细胞减少的患者允许使用培非司亭。在第3周期和第6周期后通过国际协调标准 (International Harmonization Criteria (Cheson, JCO 2007)) 来评估反应。

[0652] 有11名患者 (9名男性) 入选,它们的年龄中值为72 (范围45-84),先前用中值为3次的在先疗法 (范围0-10) 进行过治疗。6名患者对于其最近的治疗是难治性的,4名患者进行了在先的ASCT,2名患者接受了在先的苯达莫司汀,而没有患者接受在先的依罗替尼。其它特征包括82%的III-IV期疾病,64%的升高的IPI>3,64%的结节外累及,45%的块状腺病>5cm,45%的B-症状,和36%的升高的LDH。组织学包括MCL (n=3)、DLBCL (n=3)、转化的NHL (n=2)、FL (n=2)、MZL (n=1)。9名患者用280mg依罗替尼 (n=6) 和560mg依罗替尼 (n=3) 完成了两个或更多个周期的治疗 (中值为3,范围为1-6),将在分别以280mg和560mg依罗替尼完成第1周期之前因为疾病进展 (PD) 而中止治疗的2名患者替换掉。6名患者继续接受方案治疗。5名退出研究的患者包括2名患有DLBCL和转化的NHL的患者 (他们在完成第1周期之前因为PD而被替换),2名在第3周期和第4周期后具有DLBCL和PD的患者,和1名MCL患者,其接受280mg依罗替尼和苯达莫司汀 (90mg/m²),由于在第4周期后3级嗜中性粒细胞减少持续>

14天而中止治疗。未观察到DLT。3-4级事件包括淋巴细胞减少(64%)、嗜中性粒细胞减少(27%)、血小板减少(18%)、胰腺炎(9%)、呕吐(9%)、带状疱疹(9%)和皮疹(9%)。3名患者由于3级血小板减少、胰腺炎和皮疹而需要将剂量从280mg依罗替尼降低至140mg。1名患者由于3级血小板减少而需要将苯达莫司汀剂量降低至60mg/m²。4名患者由于血小板减少(n=1)、嗜中性粒细胞减少(n=1)、胰腺炎(n=1)和皮疹(n=1)而发生剂量延迟。在8名可评价的患者中ORR为38%，其中3名患者当前正接受治疗方案，他们尚未经历再分期扫描。在3名MCL患者中，反应包括2例完全反应和1例部分反应。结论：依罗替尼与R-苯达莫司汀的联合耐受性良好，没有意料之外的毒性，并且在患有先前未治疗的和复发性MCL的患者中具有显著的活性。另外3名患者将归入560mg剂量水平和扩展组群，尤其是在FL、DLBCL和MCL患者中检查该组合。

实施例8:PCI-32765联合苯达莫司汀和利妥昔单抗或FCR在复发性/难治性CLL中的II期研究

[0653] 本研究的目的是确认口服施用的PCI-32765联合氟达拉滨/环磷酰胺/利妥昔单抗(FCR)和苯达莫司汀/利妥昔单抗(BR)在慢性淋巴细胞性白血病(CLL)/小淋巴细胞性白血病(SLL)患者中的安全性。

[0654] 研究类型:介入性

[0655] 分配:非随机的

[0656] 终点分类:安全性研究

[0657] 介入模式:单组分配

[0658] 掩盖:开放标签

[0659] 主要目的:治疗

[0660] 干预措施:420mg/天PCI-32765,标准FCR或BR方案

[0661] 适用疾病:B细胞慢性淋巴细胞性白血病;小淋巴细胞性白血病;弥漫性高分化淋巴细胞淋巴瘤

[0662] 主要结果测量:

[0663] 测量具有延长的血液毒性的参与者的数目[时间范围:从第一剂量起8周]

[0664] 次要结果测量:

[0665] 1.测量发生不良事件的参与者的数目作为安全性和耐受性的量度[时间范围:最后一剂PCI-32765后持续30天]

[0666] 2.通过测量淋巴结中病变的增加或减少和/或血液检验结果来测量对治疗发生反应的患者的数目[时间范围:患者可处于研究中直至最后加入的受试者完成最多12个周期的PCI-32765。在此时仍接受PCI-32765的任何受试者可加入长期随访研究以继续接受PCI-32765胶囊]

[0667] 入选标准:

[0668] 组织学确诊的CLL或SLL,并满足至少一项以下需要进行治疗的标准:

- 通过身体检查或影像学研究确定的进行性脾肿大和/或淋巴结病
- 由于骨髓累及导致的贫血(<11g/dL)或血小板减少(<100,000/ μ L)
- 与前6个月相比有>10%的非故意体重减轻
- NCI CTCAE 2级或3级疲劳

- 发热 $>100.5^{\circ}\text{C}$ 或夜间盗汗 >2 周,无感染证据
- 进行性淋巴细胞增多,在2个月时间内增加 $>50\%$,或者预期倍增时间 <6 个月
- 1-3个针对CLL/SLL的在先治疗方案
- ECOG体力状态 ≤ 1
- ≥ 18 岁
- 愿意并能够参与本研究方案中所要求的所有评估和程序,包括无困难地吞咽胶囊
- 能够理解本研究的目的和风险,并且提供签署姓名和日期的知情同意书和授权使用受保护的健康信息的授权书(根据国家和地方的个人隐私法规)

[0669] 排除标准:

- 第一剂研究药物4周内的任何化学疗法、治疗性抗肿瘤抗体(不包括放射-或毒素-免疫偶联物)、放射疗法或实验性抗肿瘤疗法,第一剂研究药物10周内的放射性或毒素-偶联抗体疗法
- 伴随使用已知会导致QT延长或尖端扭转型室速的药物
- 转化的淋巴瘤或里希特转化
- 具有在研究者看来可能会危及受试者的安全、干扰口服PCI-32765的吸收或代谢或使研究结果处于不应有的风险中的任何危及生命的疾病、身体状况或器官系统功能障碍
- 有以下任何实验室检查异常:中性粒细胞绝对计数(ANC) <1000 个细胞/ mm^3 ($1.0 \times 10^9/\text{L}$);血小板计数 $<50,000/\text{mm}^3$ ($50 \times 10^9/\text{L}$);血清天冬氨酸转氨酶(AST/SGOT)或丙氨酸转氨酶(ALT/SGPT) $\geq 3.0 \times$ 正常值上限(ULN);肌酸酐 $>2.0 \times$ ULN或肌酸酐清除率 $<40\text{mL}/\text{min}$

[0670] 加入本研究的患者的特征在表19和表20中示出。

表19

	依罗替尼+BR (N=30)
年龄, 岁 中值: 范围: ≥ 70 岁, # (%)	61.5 41-82 7 (23)
诊断, # (%) CLL SLL	29 (97) 1 (3)
ECOG 体力状态, # (%) 0 1	15 (50) 15 (50)
在先治疗方案, # (%) 中值: 范围: 3 个在先方案:	2 1-3 12 (40)
块状病变, # (%) ≥ 5 cm	16 (53)
筛查时 Hgb < 11 g/dL 或 PLT < 100 K/ μL	14 (47)

表20

	依罗替尼+BR (N=30)
嘌呤类似物难治性, # (%) (在嘌呤类似物方案后≤12个月的无治疗间隔)	11 (37)
苯达莫司汀难治性, # (%) (在含有苯达莫司汀的方案后≤12个月的无治疗间隔)	4 (13)
预后标记, # (%)	
Del(17p):	7 (23)
Del(11q):	13 (43)
β2 微球蛋白 > 3 mg/L	16 (59)

[0671] 患者处置在表21中示出。

表21

	依罗替尼+BR (N=30)
随访	
中值(月)	8.1
范围	2.7-11.3
仍处于研究中的患者, # (%)	23 (77)
中止的患者, # (%)	7 (23)
中止的主要原因, # (%)	
进行 SCT	5 (17)
疾病进展	2 (7)

[0672] 对治疗方案的总结在表22中示出。

表22

	依罗替尼+BR (N=30)
接受苯达莫司汀的周期数	
中值	6
范围	2-6
接受利妥昔单抗的周期数	
中值	6
范围	2-6
依罗替尼占计划接受的总剂量的%	
中值	97
范围	73-100
剂量改变的受试者, # (%)	
苯达莫司汀	7 (23)
利妥昔单抗	0
依罗替尼	1 (3)

[0673] 结果:

[0674] 最佳反应率的结果在表23和表24中示出。图22显示了用PCI-32756治疗或与苯达莫司汀和利妥昔单抗联合治疗后淋巴细胞的动员和淋巴结大小的降低。联合治疗降低了循

环中的淋巴细胞的总数。

表23

	依罗替尼+BR (N=30) 8.1 个月中值 f/u
	# (%)
CR	4 (13)
PR	24 (80)
ORR	93%
节点	1 (3)
SD	0 (0)
PD	1 (3)
NE	0 (0)

表24

	N	ORR%	CR%
所有患者	30	93	13
≥70岁	7	86	29
在先治疗方案, =3个方案	12	83	0
Hgb<11g/dL或PLT<100K/μL	14	93	7
存在De1 11q	13	100	15
β2微球蛋白>3mg/L	16	94	0
嘌呤类似物难治性	11	91	0
苯达莫司汀难治性	4	75	0
存在De1 17p	7	71	14

[0675] PCI-32765联合苯达莫司汀和利妥昔单抗的施用导致93%的患者达到IWCLL反应, 其中13%完全反应(CR)。当向苯达莫司汀和利妥昔单抗中加入PCI-32765时, 未观察到增加的毒性。在先前的研究中, 苯达莫司汀和利妥昔单抗联合治疗仅获得59%的反应, 包括9%的CR。因此, 当与苯达莫司汀和利妥昔单抗联合施用时, PCI-32765显著增强了治疗。

[0676] PCI-32765联合FCR在CLL/SLL患者中的研究正在进行。3名患者在初始研究中治疗6个周期。治疗在所有3名患者中耐受性良好, 总反应为100% (3/3), 其中2名确认为MRD阴性CR (在 10^{-4} 时为MRD阴性)。所有3名患者经PCI-32765保持无进展, 随访中值为8.5个月。

实施例9: PCI-32765在复发性/难治性DLBCL中的II期研究

[0677] 本研究的目的是评估PCI-32765在复发性/难治性从头激活的B细胞(ABC)和生发细胞B细胞(GCB)弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)中的功效。

[0678] 研究类型: 介入性

[0679] 分配: 非随机的

[0680] 终点分类: 安全性研究

[0681] 介入模式: 单组分配

[0682] 掩盖: 开放标签

[0683] 主要目的: 治疗

[0684] 干预措施:560mg/天PCI-32765

[0685] 主要结果测量:

[0686] 测量对研究药物具有反应的患者的数目[时间范围:从第一剂量起24周]。追踪参与者直至疾病进展或开始另一抗癌治疗。

[0687] 次要结果测量:

[0688] 1.测量发生不良事件的患者的数目作为安全性和耐受性的量度[时间范围:最后一剂PCI-32765后持续30天]。追踪参与者直至疾病进展或开始另一抗癌治疗。

[0689] 2.测量参与者药代动力学的数目以帮助确定身体对研究药物如何反应[时间范围:在接受研究药物的第1个月期间进行该程序]。

[0690] 入选标准:

- 男性和女性, ≥ 18 岁
- 东部肿瘤协作组 (ECOG) 体力状态 ≤ 2 。
- 病理上确诊的从头DLBCL;受试者必须有可用的存档组织对于中心检查来说是合格的。

- 复发性或难治性疾病,定义为以下的任何一种:1) 疾病在完全缓解 (CR) 后复发,或者2) 在进入研究之前的治疗方案完成时部分反应 (PR)、病情稳定 (SD) 或疾病进展 (PD) (残留疾病):受试者先前必须接受了适当的一线治疗方案。在加入研究前不久的治疗方案之后具有疑似残留疾病的受试者必须具有残留DLBCL的活检证据。

- 未接受高剂量化学疗法/自体干细胞移植 (HDT/ASCT) 的受试者对于HDT/ASCT必须是不合格的,如满足以下标准中的任何一种所定义的:

- 年龄 ≥ 70 岁
- 通过肺功能检查 (PFT) 确定的肺一氧化碳弥散量 (DLCO) $< 50\%$
- 通过多门控采集 (MUGA) /超声心动图 (ECHO) 测量的左心室射血分数 (LVEF) $< 50\%$
- 其它器官功能障碍或并存病,在不可接受的治疗相关发病率风险的基础上排除HDT/ASCT的使用

- 受试者拒绝HDT/ASCT

- 受试者在计算机断层 (CT) 扫描上必须具有 ≥ 1 个可测量 (最长维度 $> 2\text{cm}$) 的病变部位。

[0691] 排除标准:

- 转化的DLBCL或DLBCL,具有共存的组织学 (例如,滤泡性或粘膜相关淋巴组织 [MALT] 淋巴瘤)

- 原发性纵隔 (胸腺) 大B细胞淋巴瘤 (PMBL)
- 已知的中枢神经系统 (CNS) 淋巴瘤
- 第一剂研究药物3周内的任何化学疗法、外线束放射疗法或抗癌抗体
- 第一剂研究药物10周内的放射-或毒素-免疫偶联物
- 第一剂研究药物2周内进行过大手术
- 具有在研究者看来可能会危及受试者的安全或使研究结果处于不合理的风险中的任何危及生命的疾病、身体状况或器官系统功能障碍
- 患有临床上显著的心血管疾病,如不受控制的或有症状的心律失常,充血性心力衰

竭,或筛查6个月内的心肌梗死,或如纽约心脏协会功能分类所定义的任何3级或4级心脏病

●不能吞咽胶囊或患有吸收不良综合征、显著影响胃肠功能的疾病,或胃或小肠的切除或溃疡性结肠炎、有症状的炎性肠病,或部分或完全肠梗阻

●有以下任何实验室检查异常:

■嗜中性粒细胞绝对计数 (ANC) <750 个细胞/ mm^3 ($0.75 \times 10^9/\text{L}$), 除非有记录表明骨髓累及;

■血小板计数 $<50,000$ 个细胞/ mm^3 ($50 \times 10^9/\text{L}$), 不依赖于输血支持, 除非有记录表明骨髓累及;

■血清天冬氨酸转氨酶 (AST/SGOT) 或丙氨酸转氨酶 (ALT/SGPT) ≥ 3.0 正常值上限 (ULN);

■肌酸酐 $>2.0 \times \text{ULN}$

实施例10: PCI-32765在B细胞淋巴瘤衍生的细胞系的亚组中引起的生长抑制

[0692] PCI-32765抑制B细胞淋巴瘤衍生的细胞系的亚组的生长, GI_{50} 值为 $0.1-5.5 \mu\text{M}$ (参见以下表5)。

[0693] 在细胞系中, 已证明PCI-32765与来那度胺、硼替佐米、索拉非尼、吉西他滨、地塞米松、苯达莫司汀、3-((二甲基氨基) 甲基)-N-(2-(4-(羟基氨基甲酰基) 苯氧基) 乙基) 苯并咪唑-2-甲酰胺和Syk抑制剂R-406具有弱协同作用; 并且与紫杉醇、长春新碱、多柔比星、坦罗莫司和卡铂具有加成性。最近已经开始在异种移植物中进行联合药物检测; 在DLBCL异种移植物中的初始实验证明了PCI-32765和硼替佐米大于加成性。

[0694] 用 $0.01-100 \text{mcM}$ 的PCI-32765处理原代CLL细胞导致: 1) 剂量和时间依赖性细胞凋亡, 2) 不受已知可预测对其它药剂的不良反应的遗传变化 (即, $\text{del}11\text{q}$ 、 $\text{del}17\text{p}$ 和 IgVH 基因突变状态) 影响的细胞凋亡; 3) 细胞毒性伴随PARP裂解和胱天蛋白酶-3活性的诱导; 和4) 不依赖于纤连蛋白或Hs5基质细胞系的存在或不存在的细胞凋亡, 提示PCI-32765的活性不被微环境影响削弱。

[0695] PCI-32765抑制B细胞淋巴瘤衍生的细胞系的亚组的生长, GI_{50} 值为 $0.1-5.5 \mu\text{M}$ (参见以下表25)。

表25. PCI-32765在人淋巴瘤细胞系的亚组中引起的生长抑制

B 淋巴瘤细胞系	来源	亚型	GI ₅₀ (μM)
LY10	DLBCL	ABC	0.10
DHL-6	DLBCL	GCB	0.18
DHL-4	DLBCL	GCB	0.53
DHL-10	DLBCL	GCB	3.7
LY3	DLBCL	ABC (CARD11)	>10
LY19	DLBCL	GCB (CARD11)	>10
DB	DLBCL	na	>10
WSU-NHL	FL-转化的	na	0.12
DOHH2	FL-转化的	na	0.12
WSU-DLCL2	FL-转化的	na	0.5
Ramos	伯基特	na	5.5
Mino	套细胞	na	0.15
Granta-519	套细胞	na	>10
Jeko-1	套细胞	na	>10

na=不适用
实施例11: Btk抑制剂组合在DLBCL细胞中的体外分析

[0696] 使用DoHH2细胞来分析Btk抑制剂PCI-32765与另外的抗癌剂的组合。DOHH2是一种DLBCL (弥漫性大B细胞淋巴瘤) 细胞系, 来自于转化的滤泡性淋巴瘤患者。该细胞系对PCI-32765中度敏感。PCI-32765与其它癌症药物一起温育2天。该分析为阿尔玛蓝 (Alamar Blue) 分析。

[0697] 测试的组合为:

[0698] PCI-32765和吉西他滨;

[0699] PCI-32765和地塞米松;

[0700] PCI-32765和来那度胺;

[0701] PCI-32765和R-406;

[0702] PCI-32765和坦罗莫司;

[0703] PCI-32765和卡铂;

[0704] PCI-32765和硼替佐米; 以及

[0705] PCI-32765和多柔比星。

[0706] 结果在图23-25中示出。

实施例10: Btk抑制剂组合在ABC-DLBCL细胞中的体外分析

[0707] 使用TMD8细胞对Btk抑制剂PCI-32765与另外的抗癌剂的组合进行分析。TMD8是一种NF-κB信号依赖性ABC-DLBCL细胞系。它对低纳摩尔浓度的单独Btk抑制剂是敏感的 (GI₅₀ ~1-3nM)。Btk抑制剂与其它癌症药物一起温育2天。该分析为阿尔玛蓝分析。

[0708] 测试的组合为:

[0709] PCI-32765和CAL-101;

[0710] PCI-32765和来那度胺;

[0711] PCI-32765和R-406;

[0712] PCI-32765和硼替佐米;

- [0713] PCI-32765和长春新碱；
[0714] PCI-32765和紫杉醇；
[0715] PCI-32765和氟达拉滨；以及
[0716] PCI-32765和多柔比星。
[0717] 结果在图26-33中示出。

实施例11:Btk抑制剂联合BR的临床试验

[0718] 进行临床试验来确定联合Btk抑制剂(例如,PCI-32765)和BR(苯达莫司汀和利妥昔单抗)在非霍奇金淋巴瘤患者中的效果。施用Btk抑制剂。在外周血中的淋巴样细胞的浓度增加之后施用BR。

实施例12:Btk抑制剂联合硼替佐米的临床试验

[0719] 开始临床试验来确定联合Btk抑制剂(例如,PCI-32765)和硼替佐米在非霍奇金淋巴瘤患者中的效果。施用Btk抑制剂。在外周血中的淋巴样细胞的浓度增加之后施用硼替佐米。

实施例13:Btk抑制剂联合BR的临床试验

[0720] 进行临床试验来确定联合Btk抑制剂(例如,PCI-32765)和BR(苯达莫司汀和利妥昔单抗)在CLL患者中的效果。施用Btk抑制剂。在外周血中的淋巴样细胞的浓度增加之后施用BR。

实施例14:Btk抑制剂联合FCR的临床试验

[0721] 进行临床试验来确定联合Btk抑制剂(例如,PCI-32765)和FCR(氟达拉滨、环磷酰胺、利妥昔单抗)在CLL患者中的效果。施用Btk抑制剂。在外周血中的淋巴样细胞的浓度增加之后施用BR。

实施例15:Btk抑制剂联合奥法木单抗的临床试验

[0722] 进行临床试验来确定联合Btk抑制剂(例如,PCI-32765)和奥法木单抗在CLL患者中的效果。施用Btk抑制剂。在外周血中的淋巴样细胞的浓度增加之后施用奥法木单抗。

实施例16:Btk抑制剂联合利妥昔单抗的临床试验

[0723] 进行临床试验来确定联合Btk抑制剂(例如,PCI-32765)和利妥昔单抗在CLL患者中的效果。施用Btk抑制剂。在外周血中的淋巴样细胞的浓度增加之后施用利妥昔单抗。

实施例17:Btk抑制剂联合来那度胺的临床试验

[0724] 进行临床试验来确定联合Btk抑制剂(例如,PCI-32765)和来那度胺在复发性或难治性B细胞恶性肿瘤患者中的效果。施用Btk抑制剂。在外周血中的淋巴样细胞的浓度增加之后施用来那度胺。

实施例18:Btk抑制剂联合来那度胺的临床试验

[0725] 进行临床试验来确定联合Btk抑制剂(例如,PCI-32765)和来那度胺在DLBCL、进展缓慢的B细胞淋巴瘤、CLL和多发性骨髓瘤患者中的效果。施用Btk抑制剂。在外周血中的淋巴样细胞的浓度增加之后施用来那度胺。

实施例19:Btk抑制剂联合R-CHOP的临床试验

[0726] 进行临床试验来确定联合Btk抑制剂(例如,PCI-32765)和R-CHOP(利妥昔单抗、环磷酰胺、盐酸多柔比星、硫酸长春新碱、泼尼松)在复发性或难治性B细胞恶性肿瘤患者中的效果。施用Btk抑制剂。在外周血中的淋巴样细胞的浓度增加之后施用R-CHOP。

实施例20:Btk抑制剂联合R-CHOP的临床试验

[0727] 进行临床试验来确定联合Btk抑制剂(例如,PCI-32765)和R-CHOP在DLBCL、进展缓慢的B细胞淋巴瘤和瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症患者中的效果。施用Btk抑制剂。在外周血中的淋巴样细胞的浓度增加之后施用R-CHOP。

实施例21:Btk抑制剂联合坦罗莫司的临床试验

[0728] 进行临床试验来确定联合Btk抑制剂(例如,PCI-32765)和坦罗莫司在复发性或难治性B细胞恶性肿瘤患者中的效果。施用Btk抑制剂。在外周血中的淋巴样细胞的浓度增加之后施用坦罗莫司。

实施例22:Btk抑制剂联合坦罗莫司的临床试验

[0729] 进行临床试验来确定联合Btk抑制剂(例如,PCI-32765)和坦罗莫司在MCL、DLBCL和进展缓慢的B细胞淋巴瘤患者中的效果。施用Btk抑制剂。在外周血中的淋巴样细胞的浓度增加之后施用坦罗莫司。

实施例23:Btk抑制剂联合第二治疗的体外分析

[0730] 使用TMD8细胞对Btk抑制剂PCI-32765与第二治疗的联合进行分析。

[0731] TMD8是一种NF- κ B信号依赖性ABC-DLBCL细胞系。它对低纳摩尔浓度的单独Btk抑制剂是敏感的($GI_{50} \sim 1-3nM$)。Btk抑制剂与其它癌症药物一起温育2天。分析为阿尔玛蓝分析。

[0732] 组合为:

[0733] PCI-32765与来那度胺和地塞米松

[0734] PCI-32765和硼替佐米

[0735] PCI-32765和R-CHOP(环磷酰胺、羟基柔红霉素、长春新碱和泼尼松,以及任选的利妥昔单抗)

[0736] PCI-32765和R-EPOCH(依托泊苷、多柔比星、长春新碱、环磷酰胺、泼尼松龙,以及任选的利妥昔单抗)

[0737] PCI-32765和R-ICE(异环磷酰胺、卡铂、依托泊苷)

[0738] PCI-32765和奥法木单抗

[0739] PCI-32765和利妥昔单抗

[0740] PCI-32765和GA101(Genentech)

[0741] PCI-32765和BR(苯达莫司汀/利妥昔单抗)。

实施例24:药物组合物:

[0742] 为了说明性目的,提出下面所述的含有式(D)化合物的组合物;在此类药物组合物中可以使用式(A)、(B)、(C)或(D)中任一个的任意化合物。在特定的实施例中,化合物是(R)-1-(3-(4-氨基-3-(4-苯氧基苯基)-1H-吡唑并[3,4-d]嘧啶-1-基)哌啶-1-基)丙-2-烯-1-酮(即,PCI-32765/依罗替尼)。

实施例24a:肠胃外组合物

[0743] 为了制备适合通过注射给药的肠胃外药物组合物,将100mg式(D)化合物(例如,PCI-32765/依罗替尼)的水溶性盐溶解在DMSO中,然后与10mL 0.9%无菌盐水混合。将混合物掺入到适合通过注射给药的剂量单位形式中。

实施例24b:口服组合物

[0744] 为了制备用于口服递送的药物组合物,将100mg式(D)化合物(例如,PCI-32765/依罗替尼)与750mg淀粉混合。将混合物掺入到适合口服给药的口服剂量单位如硬明胶胶囊中。

实施例24c:舌下(硬锭剂)组合物

[0745] 为了制备用于颊部递送的药物组合物,例如硬锭剂,将100mg式(D)化合物(例如,PCI-32765/依罗替尼)与420mg糖粉混合,该糖粉已混合有1.6mL低度玉米糖浆、2.4mL蒸馏水和0.42mL薄荷提取物。将混合物轻柔地共混,并倒入模具中,以形成适合颊部给药的锭剂。

实施例24d:吸入组合物

[0746] 为了制备用于吸入递送的药物组合物,将20mg式(D)化合物(例如,PCI-32765/依罗替尼)与50mg无水柠檬酸和100mL 0.9%氯化钠溶液混合。将混合物掺入到适合吸入给药的吸入递送单位如喷雾器中。

实施例24e:直肠凝胶组合物

[0747] 为了制备用于直肠递送的药物组合物,将100mg式(D)化合物(例如,PCI-32765/依罗替尼)与2.5g甲基纤维素(1500mPa)、100mg对羟基苯甲酸甲酯、5g甘油和100mL纯净水混合。然后将得到的凝胶混合物掺入到适合直肠给药的直肠递送单位如注射器中。

实施例24f:局部凝胶组合物

[0748] 为了制备局部凝胶药物组合物,将100mg式(D)化合物(例如,PCI-32765/依罗替尼)与1.75g羟丙基纤维素、10mL丙二醇、10mL肉豆蔻酸异丙酯和100mL纯化的醇USP混合。然后将得到的凝胶混合物掺入到适合局部给药的容器如管中。

实施例24g:眼用溶液组合物

[0749] 为了制备眼用溶液药物组合物,将100mg式(D)化合物(例如,PCI-32765/依罗替尼)与0.9g NaCl在100mL纯净水中混合,并使用0.2微米滤器过滤。然后将得到的等渗溶液掺入到适合眼部给药的眼部递送单位如滴眼液容器中。

实施例25:PCI-32765对套细胞淋巴瘤中淋巴细胞动员的效应

[0750] 慢性淋巴细胞性白血病(CLL)患者在用依罗替尼治疗后常常具有显著的但短暂的循环CLL淋巴细胞增多,如利用B细胞受体(BCR)途径的其它抑制剂所见到的。在依罗替尼的I期研究过程中,在患有包括套细胞淋巴瘤(MCL)在内的其它类型非霍奇金淋巴瘤(NHL)的患者中注意到类似的效应。在本实施例中,我们表征了在MCL患者中动员的细胞的模式和表型,并且进一步研究了该效应的机理。发现来自用依罗替尼(PCI-32765)治疗7天后的MCL患者的外周血CD19+CD5+细胞与治疗前相比,其CXCR4、CD38和Ki67表达显著降低。此外,血浆趋化因子如MDC、MIP-1 β 和CXCL13在治疗1周后降低40-60%。在机理上,我们发现依罗替尼抑制BCR和趋化因子介导的MCL细胞系的粘附和趋化作用,并且剂量依赖性地抑制BCR、基质细胞以及pBtk、pPLC γ 2、pErk或pAkt的CXCL12/CXCL13刺激。重要的是,依罗替尼剂量依赖性地抑制共培养物中的MCL的假伸入(pseudoemperipoleisis)。我们提出,Btk对于MCL细胞向次级淋巴样器官内的归巢是必不可少的,并且其抑制导致恶性细胞释出到外周血内。

材料与方法

[0751] 来自药物治疗的患者的原代人MCL标本:根据由ICH提供的GCP指南和赫尔辛基宣言知情同意原则,并按照由相关机构审查委员会批准的方案,从加入美国PCYC-04753或PCYC-1104研究的MCL患者中抽取血液。将全血样品抽到肝素钠CPT管(BD)中,混合5min,然

后在采集地点于1500rcf下离心20min。将样品在36小时内连夜运送至Pharmacyclics。在层流洁净工作台中,从管的顶层取出PBMC,用PBS洗涤,并在90%FBS+10%DMSO (Sigma, St Louis, MO) 中液氮冻存,直至使用。

[0752] 用于离体研究的细胞系和原材料:MCL细胞系HBL2 (由德国基尔大学病理学系的Wolfram Klapper博士惠赠)、JeKo1 (由荷兰格罗宁根大学医学中心病理学系的Lydia Visser博士惠赠) 和Mino (DSMZ, 德国) 培养在补充有10%热灭活的胎牛血清、2mM L-谷氨酰胺、100U/ml青霉素和100μg/ml链霉素 (Life Technologies, 荷兰) 的RPMI 1640中。用于共培养分析和迁移试验的Mino细胞以及鼠基质细胞系M2-10B4从ATCC获得,并且分别保持在补充有15%或10%胎牛血清的RPMI培养基中。所有细胞培养试剂都从Life Technologies (Grand Island, NY) 获得。

[0753] 对于离体研究,来源于MCL患者的外周血由阿姆斯特丹科学医学中心 (AMC) 的血液科提供,PBMC用Ficoll分离,B细胞使用采用阴性选择的MACS (Miltenyi Biotec) 纯化。本研究是由AMC人体实验医学委员会进行和批准的。根据赫尔辛基宣言获得知情同意。

[0754] 利用根据赫尔辛基宣言的知情同意和NIH机构审查委员会的批准,外周血 (PB) 和淋巴结活检 (LN) 从加入国家癌症研究所研究#05-C-0170 (<http://clinicaltrials.gov> 标识符:NCT00114738) 的初治MCL患者中采集。在同一天获得匹配的PB和LN样品,处理,并平行地进行分析。单核细胞通过密度梯度离心分离 (Ficoll淋巴细胞分离介质; ICN Biomedicals), 并且保持存活地在90%胎牛血清 (FBS)、10%二甲基亚砷 (DSMO) (Sigma) 中于液氮中冻存,直至使用。

[0755] 抗体:在流式细胞术中使用的抗体购自BD (San Jose, CA) 并根据说明进行使用:CD3-V500、CD19-APCCy7、CD19-APC、CD5-PerCPCy5.5、CD5-FITC、CXCR4-PECy7、CXCR4-PE、CD38-PE、CD62L-PE、CCR7-V450、CXCR3-Alexa488、CXCR5-Alexa647、CD49d-APC、CD29-PE、CD44-V450、CD54-PE、CD11a-APC、CD11c-V450、CD18-FITC、CD40-PECy7、Ki67-Alexa488、Igκ轻链-APC、Ig轻链-FITC。用于Western印迹法的抗体:针对ERK1和2的磷酸-p44/42MAP激酶 [T202/Y204]、针对PKB/AKT的磷酸-AKT [Ser473] (New England Biolabs, Ipswich, MA)、针对BTK的磷酸-BTK [Y551] (BD Biosciences)、针对BTK的磷酸-BTK [Y223] (Epitomics, Burlingame, CA) 和针对PLC γ 2的磷酸-PLC γ 2 [Y759] (BD Biosciences); 抗-ERK2 (C-14; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA)、抗-AKT (H-136; Santa Cruz Biotechnology)、抗-BTK (克隆53; BD Biosciences)、山羊F(ab')₂抗-人IgM (LE/AF; Southern Biotech, Birmingham, AL)、辣根过氧化物酶 (HRP)-偶联的兔抗小鼠和HRP-偶联的山羊抗兔 (DAKO, Houston, TX)。

[0756] 用于体外实验的化合物和试剂:依罗替尼来自Pharmacyclics (Sunnyvale, CA), R406来自Axon Medchem (Groningen, Netherlands), 渥曼青霉素和佛波醇12-肉豆蔻酸酯13-乙酸酯 (PMA) 购自Sigma-Aldrich (St Louis, MO); 重组人sVCAM-1、人血浆纤连蛋白、BSA (V部分)、rhCXCL12和rhCXCL13来自R&D Systems (Minneapolis, MN), rhCCL19和rhCCL21来自MT-diagnostics (Netherlands, BV), 聚-L-赖氨酸 (PLL) 来自Sigma-Aldrich。

[0757] MCL表型分型:将冷冻的PBMC在37℃水浴中解冻,在RPMI+10%FBS中重悬,并且在表型分析之前在37℃、5%CO₂培养箱中于5ml聚丙烯管 (BD-Falcon) 中复苏2小时。PBMC用PBS+2%FBS洗涤,沉淀,并重悬于含有表型分型表面抗体的PBS+2%FBS中。所有染色混合物

在一式两份的管中进行。将细胞染色30分钟,用PBS洗涤,在1300rpm下沉淀5min,然后在PBS+1.6%低聚甲醛(Electron Microscopy Services,Hatfield,PA)中固定。将要用Ki67进行增殖分析的细胞在-20℃下用70%乙醇通透化过夜,用PBS再水化,并且用Ki-67抗体染色。

[0758] 流式细胞术:BD FACS Canto II (BD, San Jose, CA) 用于所有流式细胞术收集。该仪器根据生产商的建议进行维护。CS&T珠 (BD) 根据生产商的说明每天用于基线和再现性测量。Phosphoflow试验如所述的那样染色并进行。上述抗体与BD CompBead Plus一起使用以建立补偿设置和抗体染色一致性。从每个染色的样品收集10,000个CD19⁺细胞。使用FlowJo7.6 (Tree Star, Ashland, OR) 对数据进行分析 and 定量。

[0759] 共培养物分析:根据Burger等Blood.1999;94(11):3658-3667的方法建立M2-10B4基质细胞和B细胞系Mino的共培养物。Mino细胞用载体、百日咳毒素 (Sigma) 或依罗替尼在37℃下处理1小时,用培养基洗涤,然后加至含有基质细胞的汇合单层的板中。将共培养物在37℃下温育5小时至过夜以允许基质细胞层下方的Mino细胞迁移,之后将其充分洗涤以去除未迁移的细胞。对于使用活细胞示踪染料的共培养物,首先根据生产商的说明向细胞加载Alexa Fluor CellTracker (Life Technologies, Grand Island, NY)。对于显微镜检查,将细胞用低聚甲醛固定并利用DAPI封固剂 (Vectashield, Vector Laboratories, Burlingame, CA) 封固在载玻片上。为了通过流式细胞术量化共培养物中Mino细胞的迁移,将细胞用胰蛋白酶消化并用APC-Cy7-标记的抗-CD19抗体 (BD Laboratories) 染色。在BD CantoII流式细胞仪上使用CountBright绝对计数珠 (Life Technologies) 对细胞进行计数。

[0760] Mino细胞中的肌动蛋白聚合:使Mino细胞在无血清培养基中于37℃粘附至盖玻片30min,然后用DMSO、百日咳毒素或依罗替尼处理1hr。将细胞用低聚甲醇固定,用Triton X-100进行通透化,并用Alexa Fluor495标记的鬼笔环肽 (Molecular Probes, Grand Island, NY) 进行染色。使用含有DAPI的Vectashield封固剂 (Vector Laboratories) 将盖玻片封固在载玻片上。在Zeiss AxioPlan2显微镜上使用63x/1.40油浸Plan-Apochromat物镜进行显微镜检查,并利用Zeiss AxioCam MRm CCD相机和AxioVision v.4.8软件获取图像。对于光密度测定法,每种条件至少对30个细胞进行成像。

[0761] 粘附分析:细胞粘附分析基本上如前所述进行。具体地,粘附分析在EIA/RIA 96-孔板 (Costar) 上一式三份地进行,该EIA/RIA 96-孔板用含有10μg/ml纤连蛋白或500ng/ml VCAM-1、4%BSA的PBS在4℃下包被过夜,或用1mg/mL聚-L-赖氨酸 (PLL) 在37℃下包被15min,并用含有4%BSA的RPMI 1640在37℃下封闭2h。细胞用100nM依罗替尼、100nM渥曼青霉素、1μM R406或在37℃下于含有1%BSA的RPMI中预处理1h。随后,用100ng/ml山羊 (Fab')₂抗-人IgM或50ng/mL PMA刺激细胞,立即将 1.5×10^5 个Namalwa或 3×10^5 个CLL细胞以100μl/孔进行平板接种,并在37℃下温育30min。在用含有1%BSA的RPMI充分洗涤培养板以去除未粘附的细胞之后,将粘附的细胞用PBS中的10%戊二醛固定10min,随后用20%甲醇中的0.5%结晶紫染色45min。用水充分洗涤之后,在甲醇中洗脱染料,并在40min后于分光光度计 (Multiskan RC分光光度计, Thermo Fisher Scientific, Philadelphia, PA) 上测量570nm处的吸光度。减除背景吸光度 (未加入细胞)。如在用4%BSA包被的孔中测量的,由于非特异性粘附产生的吸光度总是低于抗-IgM刺激的细胞的吸光度的10%。通过将细胞施加至PLL包被的孔中,而在固定之前不对孔进行洗涤,来确定最大粘附 (100%)。将未预处理

的、抗-IgM刺激的细胞的粘附标准化为100%，线条代表独立实验的平均值+SEM，每个一式三份地进行分析。

[0762] 趋化因子介导的粘附如上所述进行分析，不同之处在于，趋化因子100ng/mL CXCL12、100ng/mL CXCL13、100ng/mL CCL19或100ng/mL CCL21与500ng/mL VCAM-1共同固定。将细胞施加至培养板后立即将板旋转，并使细胞粘附2min。

[0763] 或者，首先刺激血清饥饿的细胞并如所述的那样使之粘附，之后加入依罗替尼(1 μ M)，在37℃下2h，随后洗涤培养板以去除未结合的细胞。

[0764] 迁移试验：迁移试验基本上如所述的那样进行(de Gorter等Immunity.2007;26(1):93-104;de Gorter等Blood.2008;111(7):3364-3372)。具体地，利用500ng/mL VCAM-1包被的侵袭小室(transwell)(孔径5 μ m, Costar)一式三份进行迁移试验。下方隔室含有100ng/mL CXCL12。将在含有0.5%BSA的RPMI中用100nM依罗替尼于37℃预处理1h的细胞施加到上方隔室中，并使之在37℃下迁移2h。通过FACS确定迁移的活细胞的量并表示为输入的百分比。

[0765] 免疫印迹法：免疫印迹法基本上如所述的那样进行(de Rooij等Blood.2012;119(11):2590-2594;de Gorter等Blood.2008;111(7):3364-3372)。具体地，10⁷个细胞/mL RPMI在37℃下用100nM依罗替尼预处理1h。用100ng/mL山羊抗-人IgM(Fab')₂或100ng/mL CXCL12刺激5min(或如所示)后，将细胞直接在SDS-PAGE样品缓冲液中裂解。将2 $\times$ 10⁵个细胞施加到10%SDS-PAGE凝胶上，并用兔抗-磷酸-ERK1/2(Cell Signaling, Danvers, MA)、兔抗-磷酸-AKT、小鼠抗-磷酸-BTK或小鼠抗- β -肌动蛋白，随后用HRP偶联的山羊抗-兔或兔抗-小鼠进行印迹，并通过增强的化学发光(GE Healthcare, Piscataway, NJ)进行显影。为了确认相等的表达和加载，将印迹切下，并与兔抗-ERK2、兔抗-AKT和小鼠抗-BTK抗体一起温育。

[0766] 统计分析：使用GraphPad Prism 4.0(San Diego, CA)进行分析。使用具有Bonferroni事后比较的ANOVA或非配对双尾Student t-检验确定统计学显著性差异，该检验用于确定两个平均值之间的差异的显著性。单样品t-检验用于确定平均值与标准化的值(100%)之间的差异的显著性。*p<0.05;**p<0.01;***p<0.001。

结果

向MCL患者施用依罗替尼后绝对淋巴细胞计数(ALC)暂时增加

[0767] 在选入患有多种B细胞恶性肿瘤细胞的患者的I期研究中，在35天的周期中用依罗替尼治疗MCL患者(n=9)，其中该药物每天施用一次，持续28天，在周期之间具有7天的休药期。在这些情况下，观察到增加和降低ALC的循环模式。这得到以下结果的证明：在前几周的治疗后ALC增加，随后在7天的休药期后回归至基线。这种循环ALC模式在治疗的持续时间内持续。在依罗替尼治疗的过程中，在2、4和6个治疗周期后的评估期间，如通过垂直直径的总和(SPD)所确定的，肿瘤体积平均减小了80%。因此，在前6个治疗周期期间，我们在这些患者中观察到外周血ALC增加和降低的锯齿图形，伴随有节点反应。在后续(2期)研究中观察到相同的ALC增加，其中用没有休药期的每天560mg的固定剂量来治疗MCL患者。在该试验中，在药物治疗2-4周后ALC增加100-150%。ALC的增加是短暂的，到第二周期结束时观察到ALC的显著减少。观察到ALC的继续减少，直至在第4-5周期逐渐消失。

ALC升高是由于轻链限制的CD19⁺CD5⁺细胞的增加

[0768] 为了限定由于依罗替尼而增加的淋巴细胞群体,在治疗之前(D1)和治疗1周之后(D8)分离的患者的PBMC用CD3、CD19、CD5进行染色,并通过流式细胞术进行分析。增加的淋巴细胞的特征为CD3⁻CD19⁺CD5⁺,淋巴细胞群体中CD19⁺CD5⁺细胞的绝对计数和百分比在依罗替尼治疗一周后均显著增加($p < 0.05$),而CD19⁺CD5⁻群体未显著增加。图35中显示了一名说明性的患者,其中在药物治疗前CD19⁺CD3⁻和CD19⁺CD5⁺群体分别为9.29%和84.4%,并且在治疗一周之后增加至63%和98.8%。CD19⁺CD3⁻CD5⁺细胞为轻链限制的(数据未示出),从而可能反映出在药物治疗一周后外周中循环MCL细胞的增加。在一些情况下,动员的细胞包含CD45^{dim}小细胞的一个独特亚组,该亚组与MCL也是一致的。

[0769] 为了确认在这些患者中获得了靶BTK的完全抑制,使用竞争性结合荧光探针试验在来自MCL患者的PBMC中评估依罗替尼对BTK活性位点的占用。在治疗1周后的患者中观察到平均超过90%的靶标占用。

外周CD19⁺CD5⁺群体是CXCR4^{lo}CD38^{lo}并且在药物治疗后Ki67减少。

[0770] 接下来我们分析了CD19⁺CD5⁺细胞的CXCR4表达,CXCR4是一种已知参与向组织迁移和归巢的趋化因子受体。药物治疗一周后,CD19⁺CD5⁺群体中CXCR4的表面表达显著降低($p < 0.05$) (图36的A图)。已报道,与外周血中的CLL细胞相比,CLL患者中的CXCR4和CD38表达在淋巴结定居细胞中较低。正因为如此,我们分析了患者匹配的淋巴结和外周血定居MCL细胞上的CXCR4和CD38表达。在检查的所有3名患者中,从LN分离的MCL细胞中的CXCR4表达比外周血更低(图36的D图)。这与最近观察到的循环CXCR4^{lo} MCL细胞群体是一致的,并且与来源于组织如LN的动员细胞是一致的。该观点进一步得到在同一时期观察到的淋巴结病的显著降低的支持。对动员群体的进一步研究揭示了与LN定居MCL细胞中发现的CD38表达增加相对应的高CD38⁺表达(图36的B/D图)。CD38⁺细胞的这种初始增加在CD19⁺CD5⁺细胞中在治疗后显著降低($p < 0.01$),而CD19⁺CD5⁻细胞(其一贯具有低CD38表达)无显著变化(图36的B/C图)。

[0771] 接下来我们检查了增殖能力的标记的变化以及在动员的部分中的归巢和迁移。细胞内Ki67表达在治疗后显著降低($p < 0.05$) (图36的C图)。如通过磷酸流式细胞术所证明的,治疗前和治疗后来自患者的CD20⁺CD5⁺亚群中的磷酸化ERK也减少。与健康志愿者相比,MCL患者的CD20⁺CD5⁺细胞中的pErk表达通常较高,并且通过依罗替尼治疗而降低(图36的C图,下图),虽然这些差异不是统计学显著的。

[0772] 此外,在归巢中至关重要的趋化因子(MDC、MIP-1 β 、CXCL13和CXCL17)在治疗一周后平均减少超过50%。到第一治疗周期结束时,除了MIP-1 β 和MDC减少外,IL-10和TNF- α 也减少了50% (图36的E图)。

依罗替尼抑制MCL/基质共培养物中的假伸入

[0773] 用依罗替尼治疗的MCL患者中ALC的短暂增加可能是由于淋巴结或组织区室内的细胞粘附和迁移的破坏。为了对此进行研究,我们建立了MCL-基质细胞共培养物来确定药物的体外效应。原代MCL细胞或Mino细胞系与鼠骨髓基质细胞M2-10B4共培养生长。我们发现原代MCL细胞或Mino细胞均在M2-10B4细胞下方粘附并快速迁移(假伸入)。观察到依罗替尼对假伸入的显著抑制,如通过光学显微镜检查所证明的,并且在共培养物中保留的Mino细胞或原代MCL的数目通过对共培养4小时后经轻柔洗涤而收获的hCD19⁺细胞进行流式细胞术来定量(图37的A图和图37的B图,左图)。依罗替尼剂量依赖性地抑制基质细胞下方的

Mino细胞的迁移,并且该抑制在100nM ($p<0.01$) 和1000nM ($p<0.001$) 下是显著的。用作Mino细胞迁移抑制的阳性对照的百日咳毒素(一种得到充分研究的GPCR抑制剂)在200ng/mL下显著抑制迁移 ($p<0.001$)。此外,如通过鬼笔环肽荧光显微镜检查所评估的,CXCL12(一种对B细胞归巢重要的趋化因子,并且由基质细胞产生)增加了Mino细胞的皮质肌动蛋白,并且这种反应也剂量依赖性地且显著地受到10和100nM的依罗替尼治疗的抑制 ($p<0.001$) (图37的A图右图)。依罗替尼在100nM下也抑制了共培养物中原代MCL的肌动蛋白聚合 ($p<0.001$) (图37的B图,右图)。

依罗替尼抑制MCL/基质共培养物中的Btk活性并抑制基质细胞诱导的趋化因子和细胞因子分泌

[0774] 为了进一步理解药物对与基质细胞共培养的MCL细胞的效应,用药物处理Mino细胞,并且将其与鼠基质细胞(M2-10B4)共培养或用抗-IgM刺激。依罗替尼剂量依赖性地抑制单独的或与M2细胞共培养的Mino细胞中的pBtk、pPLC γ 2和pAkt。由依罗替尼处理的、单独的或与M2基质细胞共培养的或用抗-IgM刺激的MCL细胞系来确定条件培养基的趋化因子和细胞因子的浓度。尽管在与M2共培养后缺乏可检测的信号蛋白的激活,但Mino细胞增加了BCR刺激或共培养后趋化因子和细胞因子的分泌。用Jeko细胞系观察到相似的结果。依罗替尼剂量依赖性地并有效地抑制了BCR激活后或共培养物中人IL-10、MDC、MIP-1 α 、MIP-1 β 、TNF α 、CCL17和CCL21的产生,而单独的鼠基质细胞不产生人趋化因子或细胞因子。类似地,依罗替尼抑制了与M2-10B4或人基质细胞系HS-5共培养的Jeko1细胞的IL-10、MDC、MIP-1 α 、MIP-1 β 、TNF α 的产生。使用MCL细胞系获得的这些体外结果与依罗替尼治疗的患者中血浆趋化因子/细胞因子的降低具有很好的相关性。

依罗替尼在体外抑制BCR和趋化因子介导的粘附和迁移

[0775] 我们测量了依罗替尼对MCL细胞系Mino、Jeko1和JVM-1的迁移和粘附的直接效应。首先,在这些MCL细胞中确定了依罗替尼对Btk信号传导的效应。正如所预期的,依罗替尼抑制了抗IgM和趋化因子CXCL12和CXCL13刺激之后Btk和下游信号蛋白PLC γ 2、MAP激酶Erk、JNK和Akt的磷酸化。CXCR4、CXCR5、CCR7、表面IgM和 α 4 β 1整联蛋白的细胞表面表达通过流式细胞术得到证实,并且利用药物进行后续体外粘附和趋化性分析。依罗替尼在100nM(依罗替尼的临床相关浓度)下显著抑制抗-IgM刺激的Jeko1和HBL1细胞向纤连蛋白或VCAM1上的粘附,具有超过50-70%的抑制。依罗替尼对粘附的抑制也是剂量依赖性的。同样,在CXCL12或CXCL13激活后,Mino和Jeko1细胞向VCAM1或纤连蛋白的粘附也受到100nM依罗替尼的抑制。Mino细胞中的抑制程度(50-70%)大于Jeko1细胞中的抑制程度(20-30%)。除了粘附变化之外,我们发现依罗替尼还剂量依赖性地抑制CXCL12诱导的Mino、Jeko1和JVM-1细胞的迁移,其中Mino和Jeko1细胞比JVM-1细胞对药物更加敏感。依罗替尼从1nM到1 μ M还剂量依赖性地显著抑制CXCL13刺激的Mino细胞的迁移。

[0776] 接着,我们检查了依罗替尼对原代MCL细胞中信号传导和粘附的效应。与正常B淋巴细胞相比,MCL细胞中的Y223的磷酸化增加,这与恶性B细胞中升高的BCR信号传导相一致。在10nM及以上的浓度下,依罗替尼抑制了原代MCL和正常B细胞中Y223(Btk的自磷酸化位点)和Y551(被Src-家族激酶磷酸化的酪氨酸)上的pBtk,并且降低了Y759和Y1217上的pPLC γ 2。这些结果证明了依罗替尼直接抑制MCL原代细胞中的Btk活性。重要的是,依罗替尼在100nM下还抑制了原代MCL细胞中CXCL12或CXCL13激活的对VCAM1的粘附以及BCR激活

的对纤连蛋白的粘附。在这些原代细胞中的抑制程度为约10-20%，并且其大小与MCL细胞系相比并不惊人，但该抑制是统计学显著的。

[0777] 这些研究共同证明了，依罗替尼抑制MCL细胞系以及原代MCL细胞由BCR和CXCL12、CXCL13激活的粘附和迁移，这与这些细胞中的Btk抑制有关。

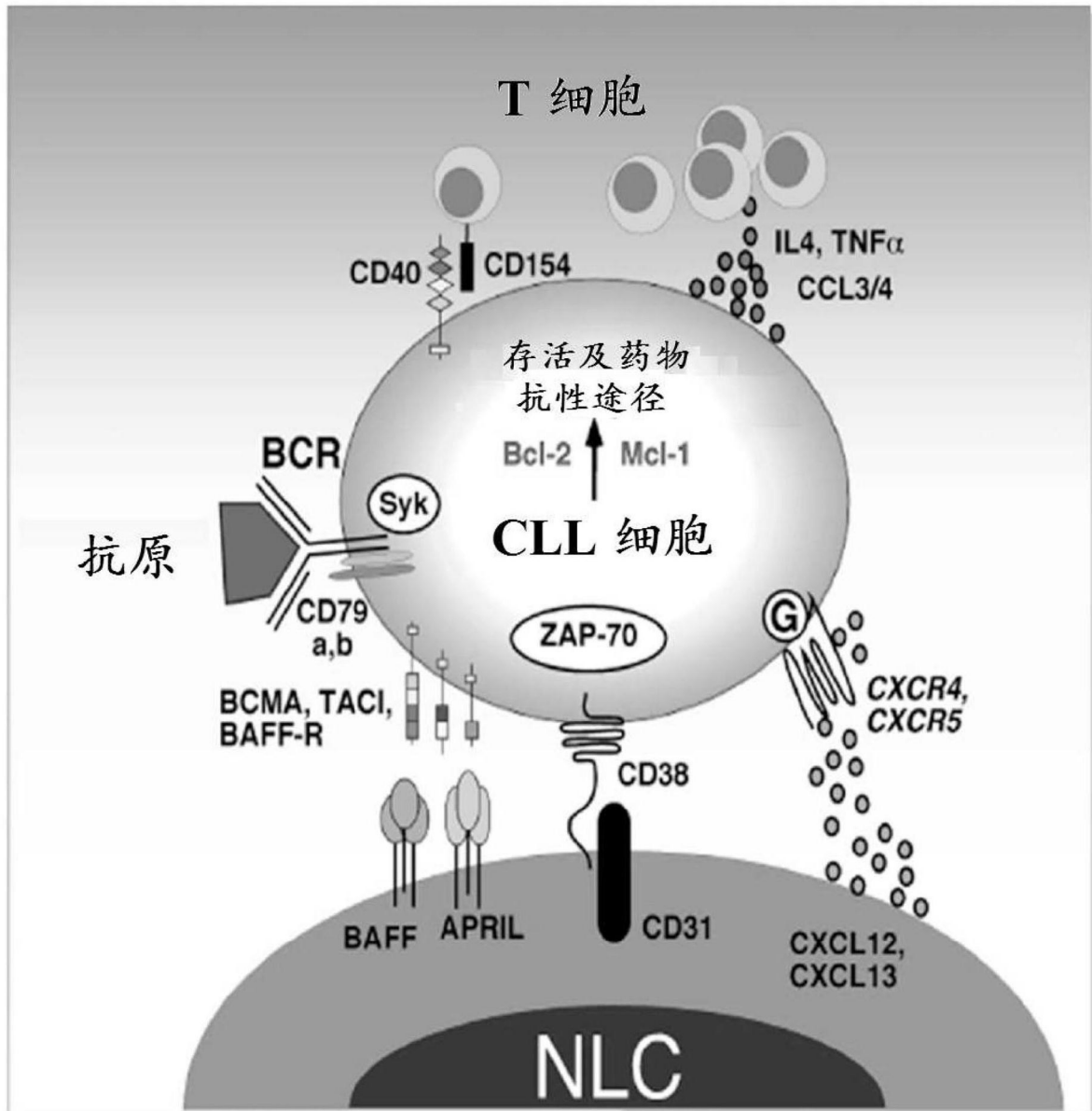


图1

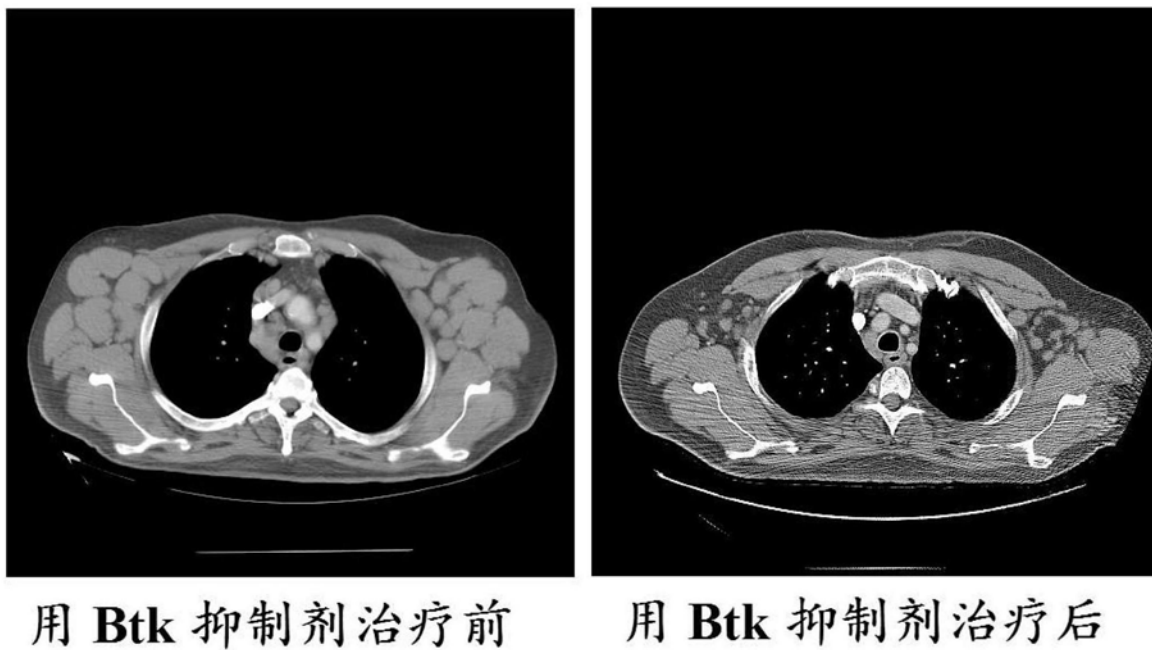
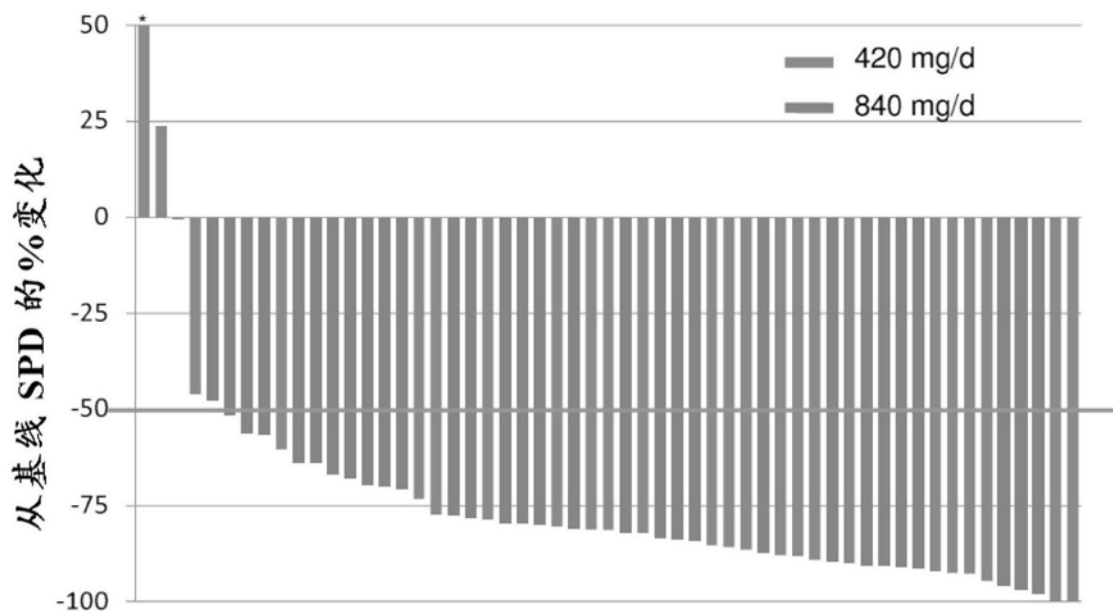


图2

肿瘤负荷的最大变化



*患者发展为进行性疾病，但是没有可以获得的肿瘤测量值¹³
仅限于在基线时具有可测量的病变的患者(n=55)

图3

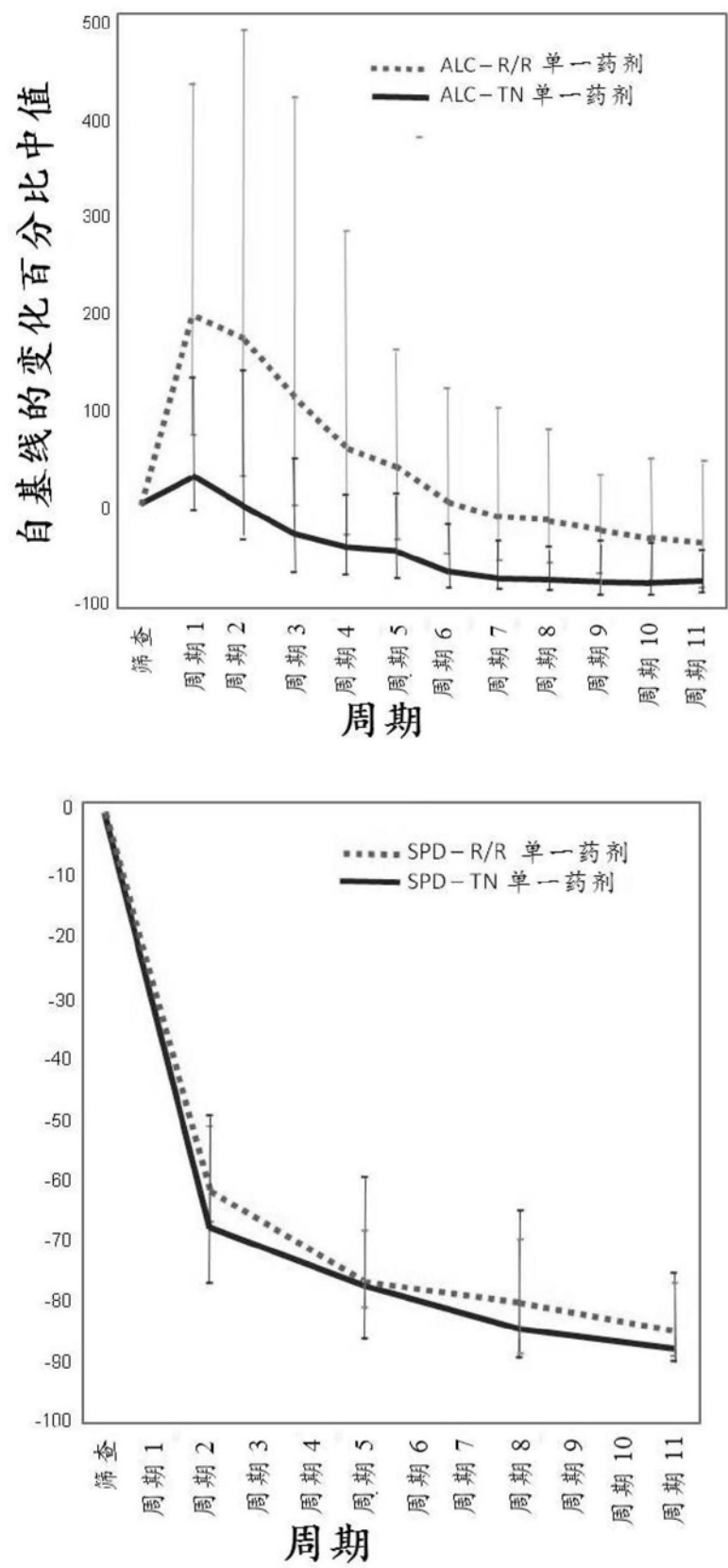


图4

累积最佳反应——初治 ≥ 65 岁

420 mg/d 组群 (n=26)— 中值 f/u 14.4 个月

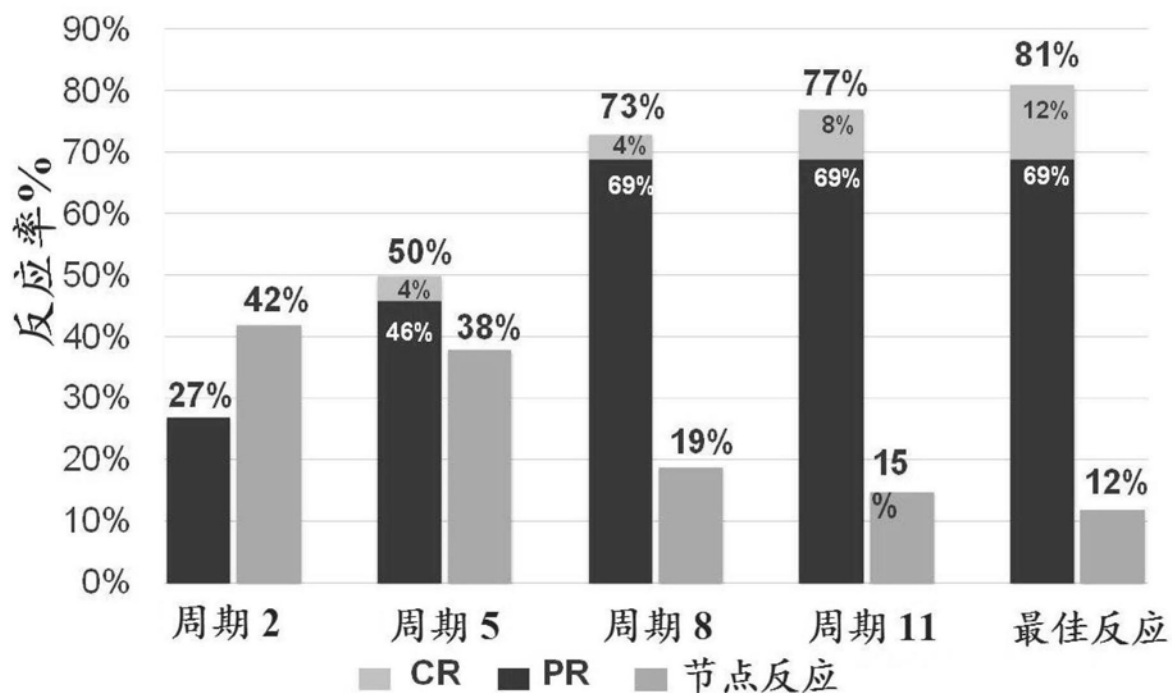
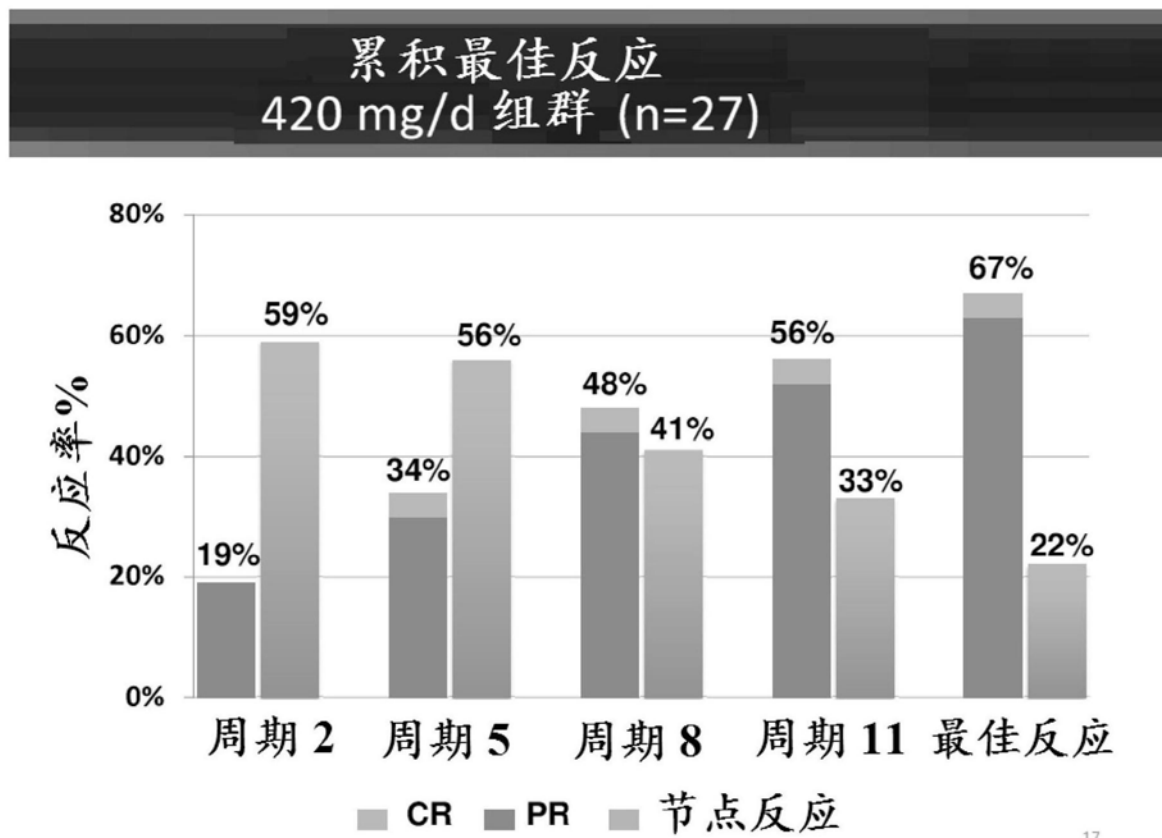


图5



17

图6

累积最佳反应：在 420mg 下复发性/难治性(n=27)和初治
≥65 岁(n=26)群体的比较

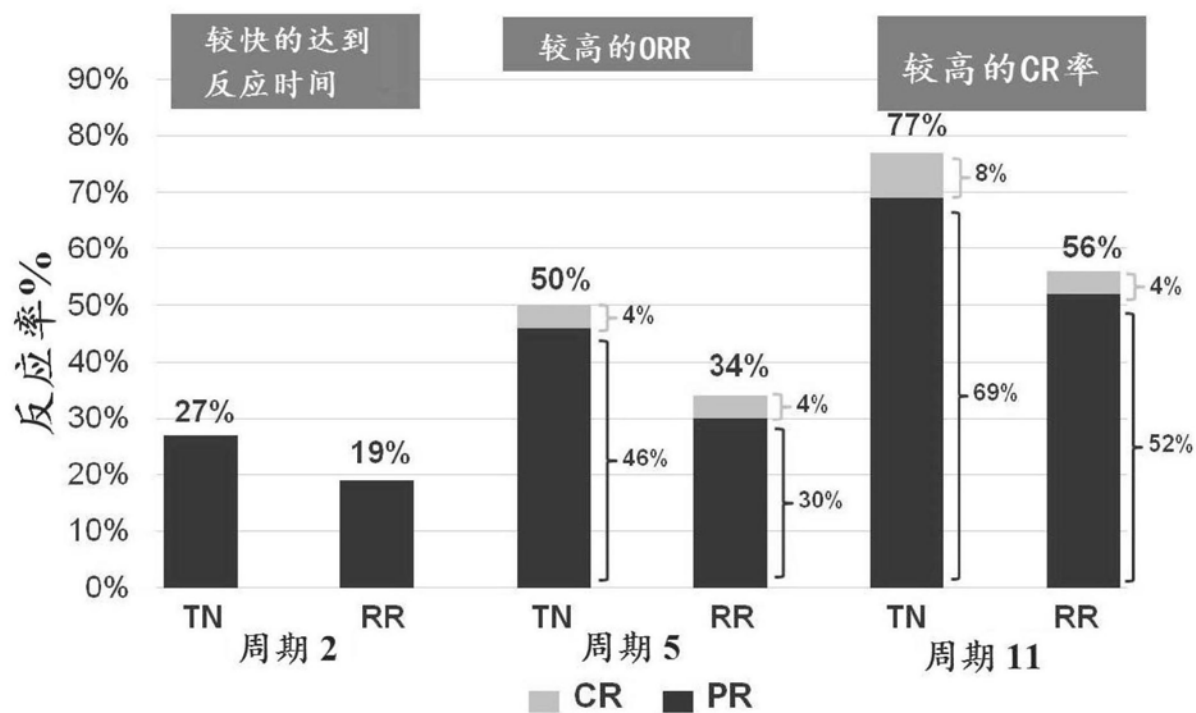
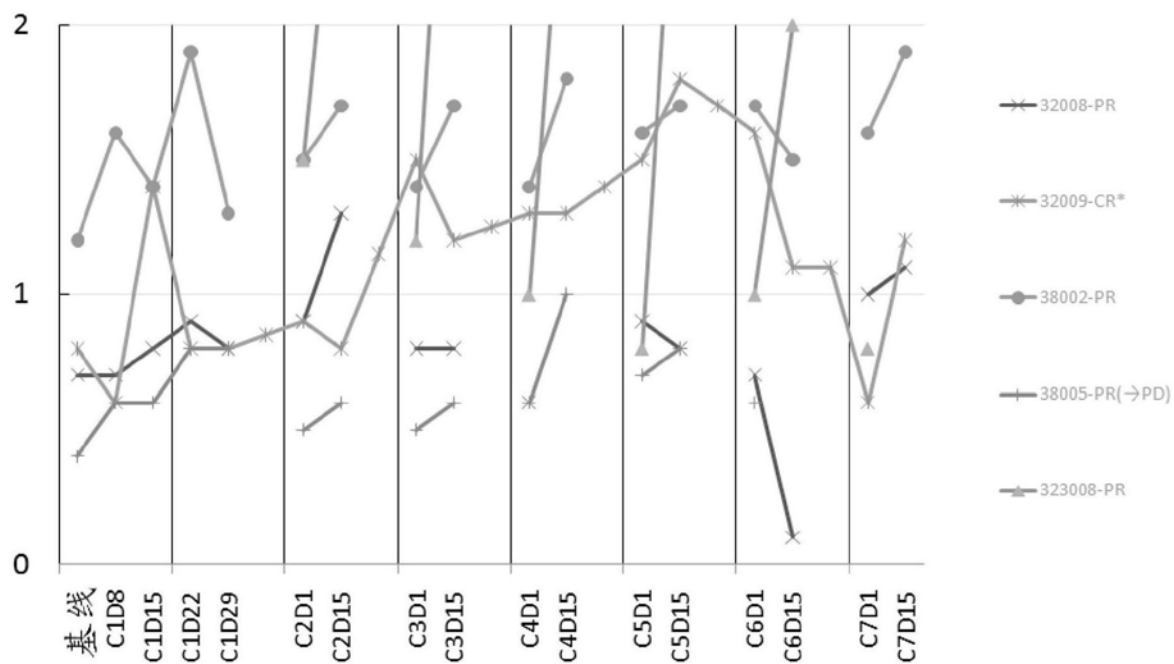
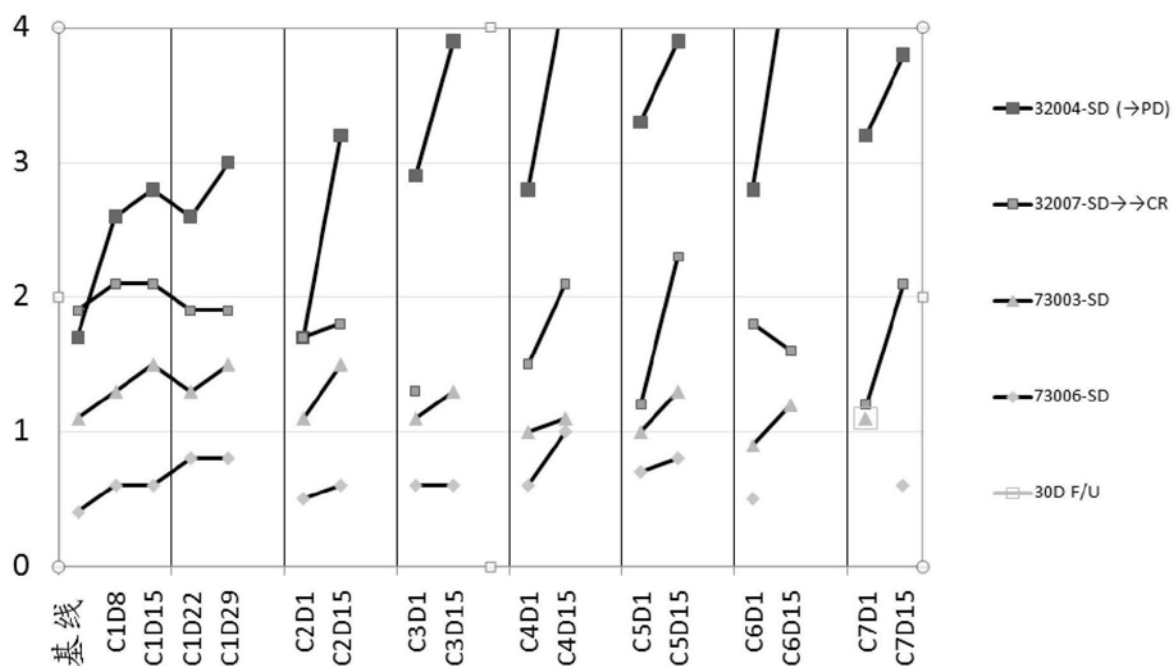


图7



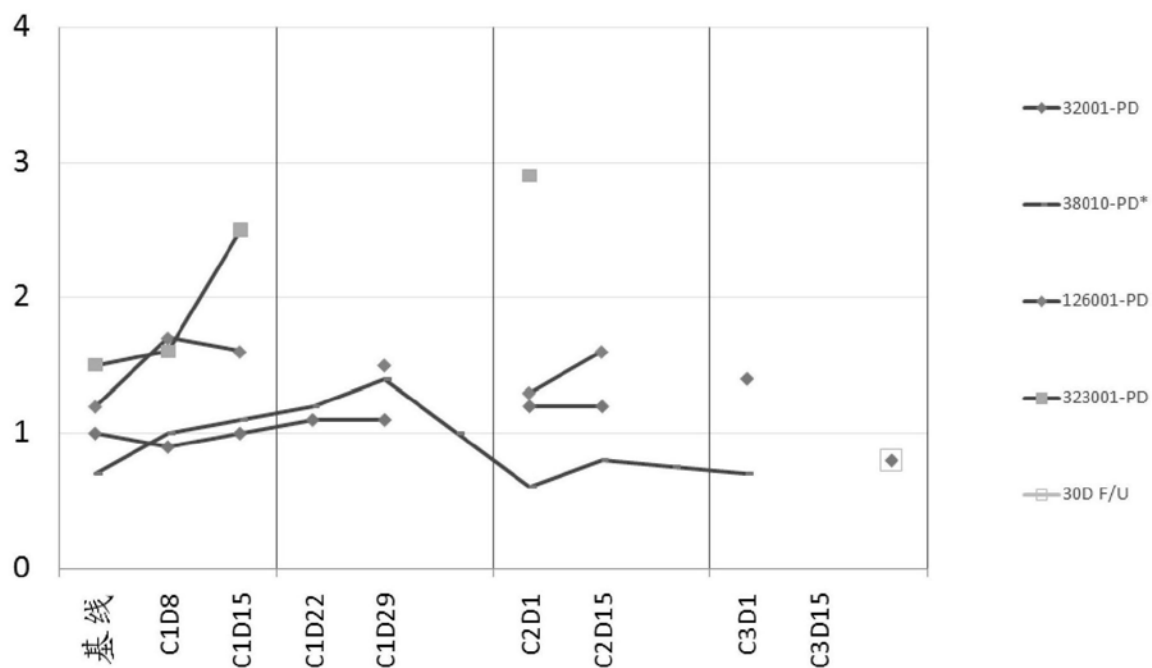
*连续给药，周期之间的次数进行插值

图8



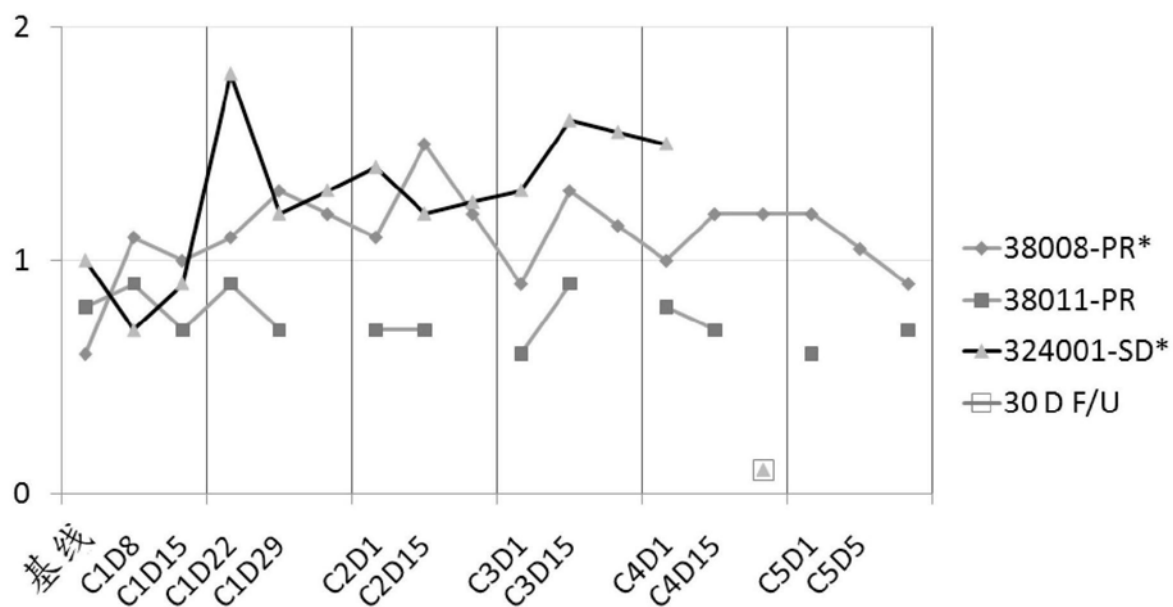
*连续给药，周期之间的次数进行插值

图9



*连续给药，周期之间的次数进行插值

图10



*连续给药，周期之间的次数进行插值

图11

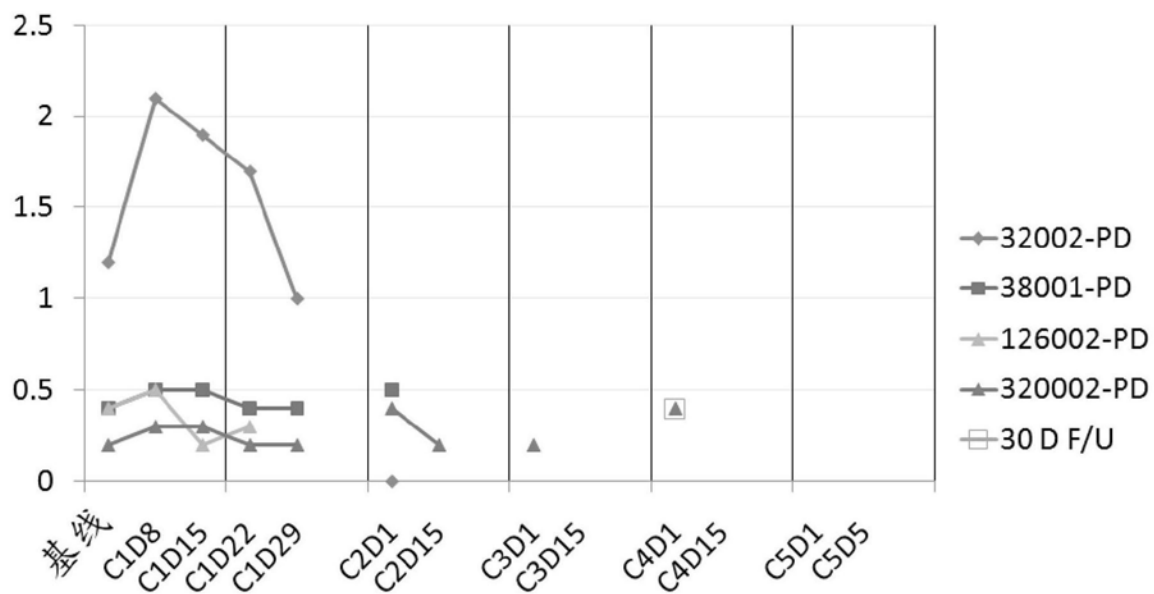
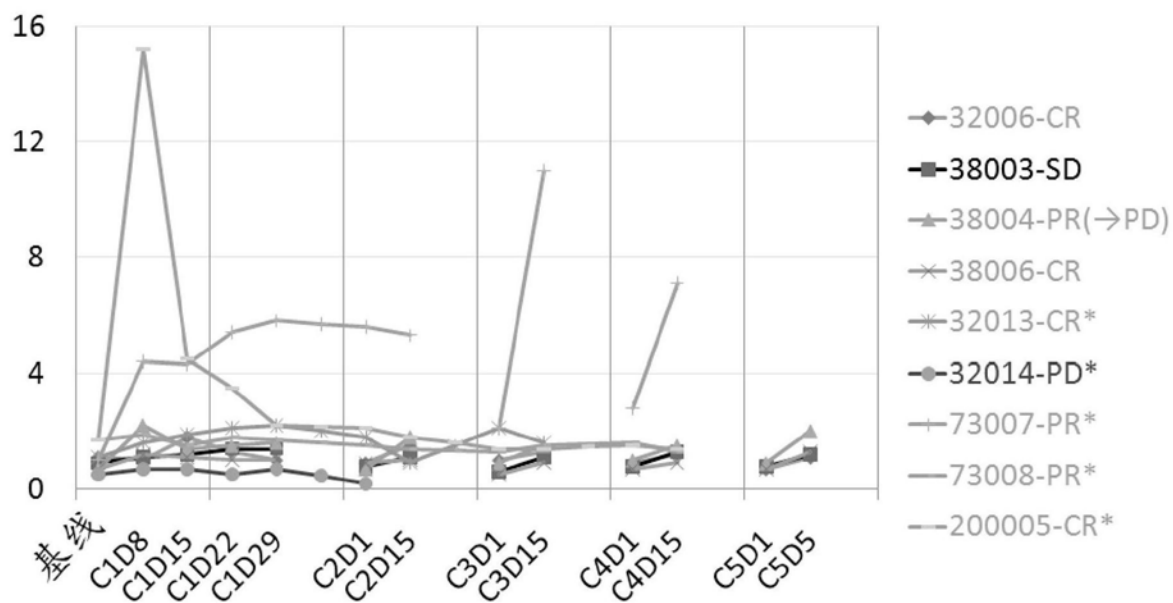


图12



*连续给药，周期之间的次数进行插值

图13

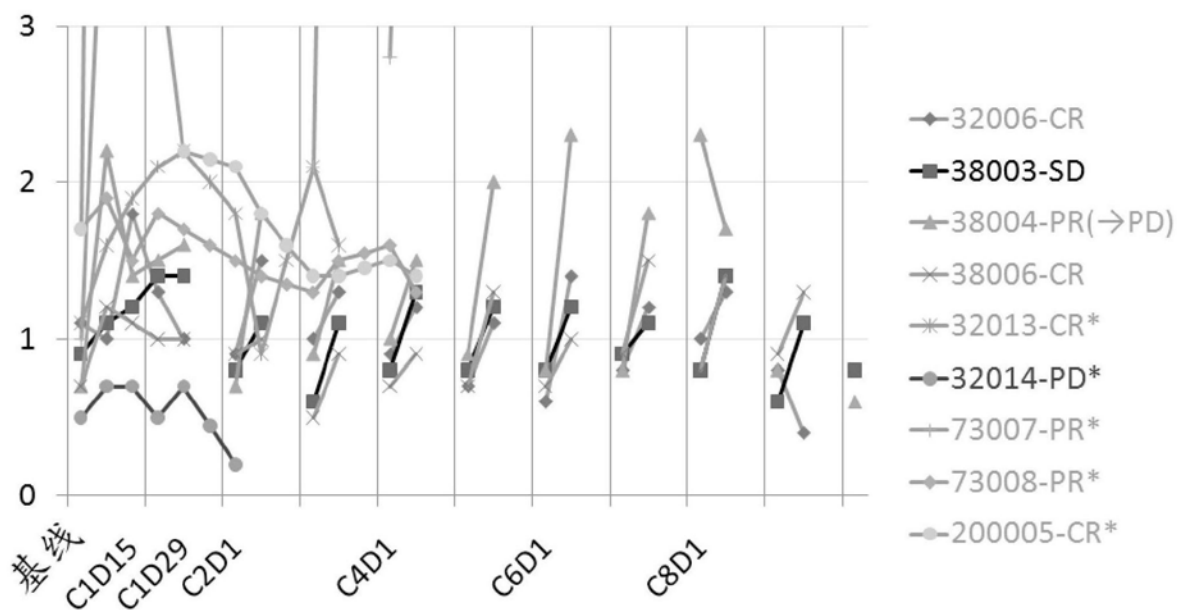


图14

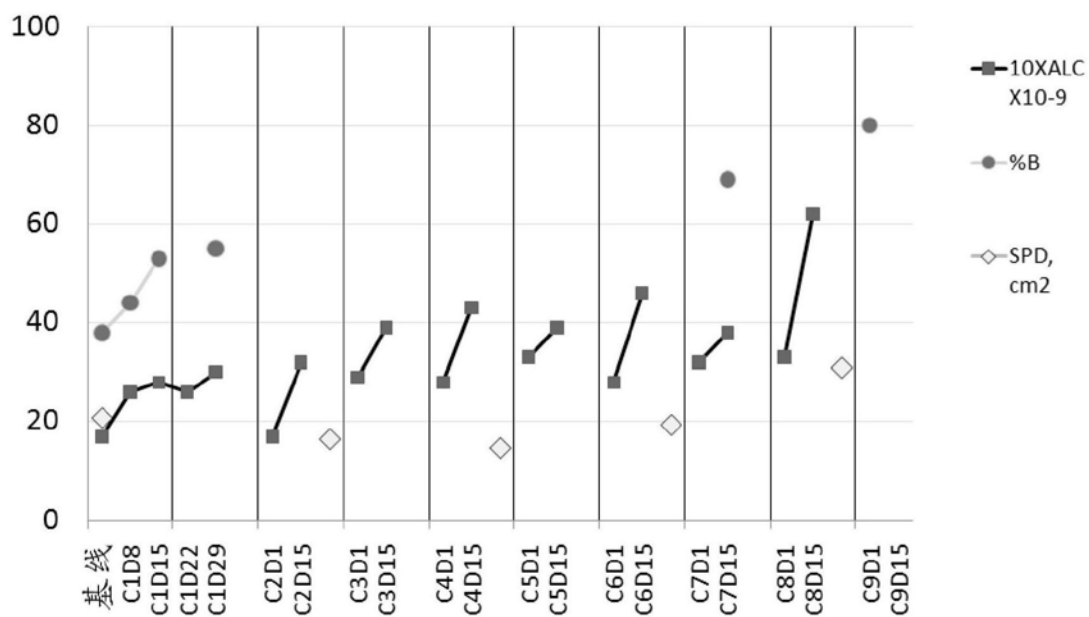


图15

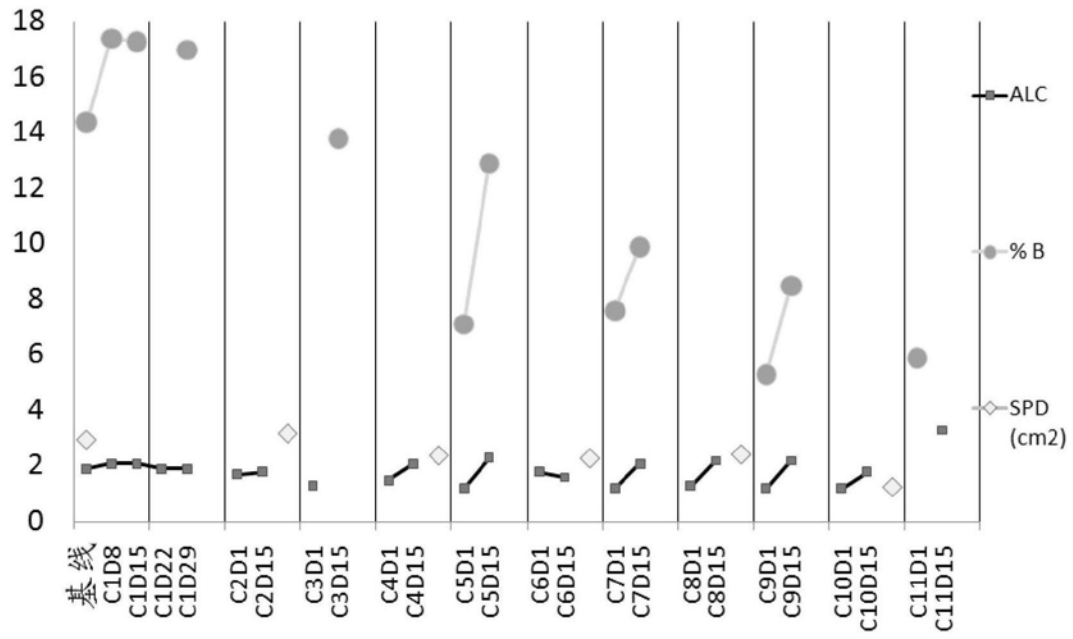


图16

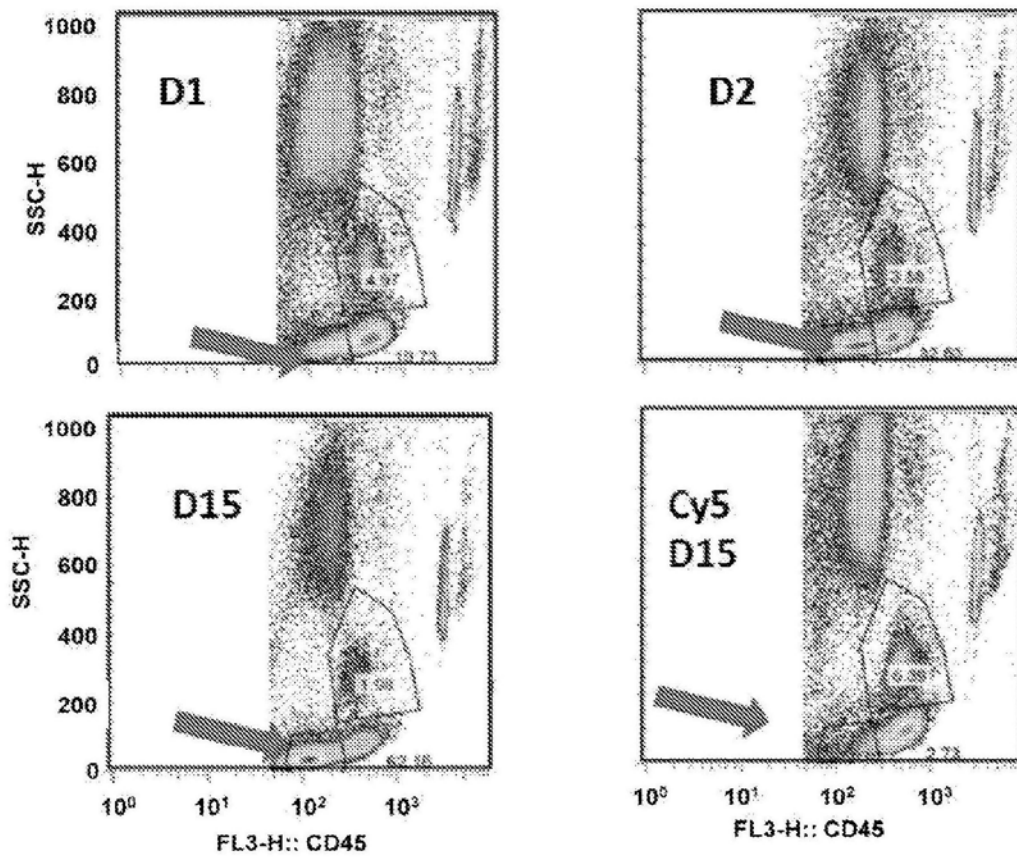


图17

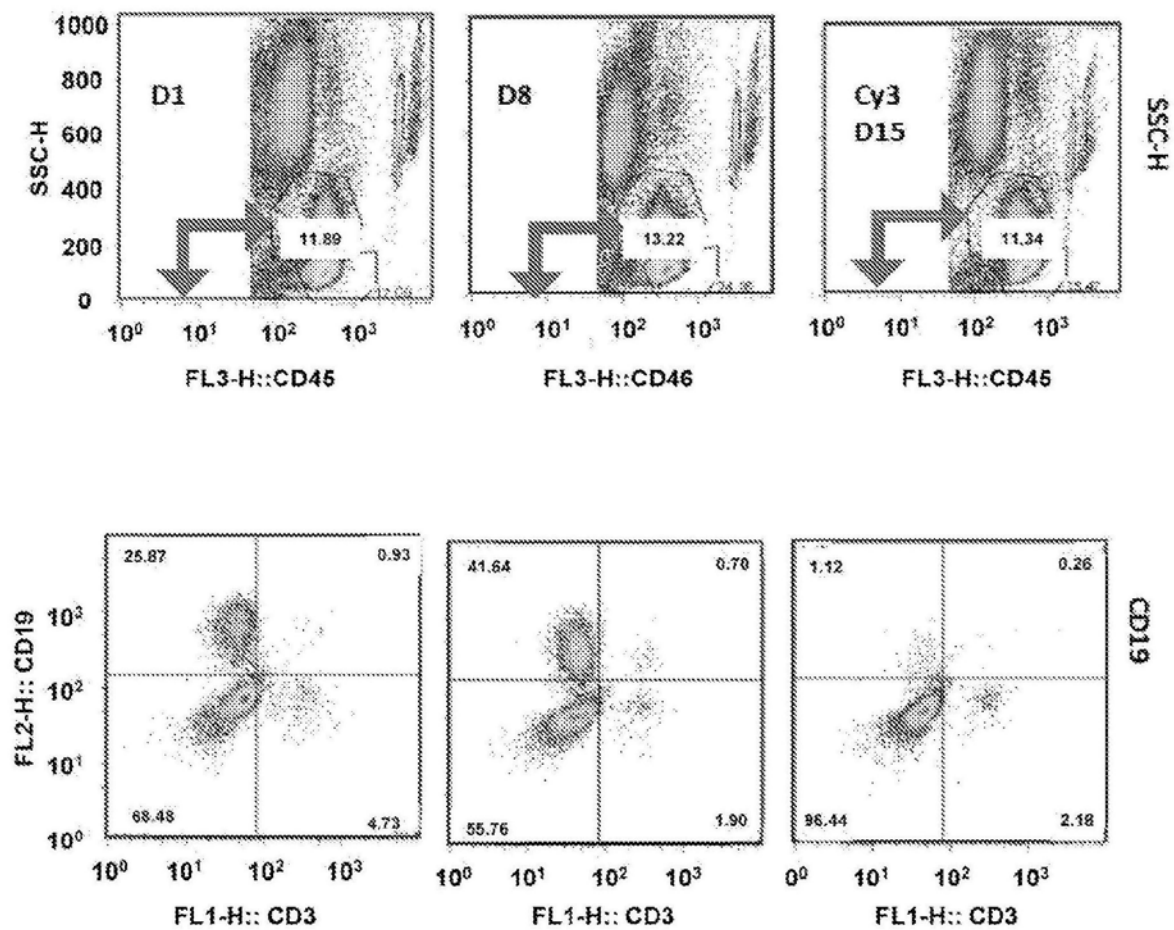
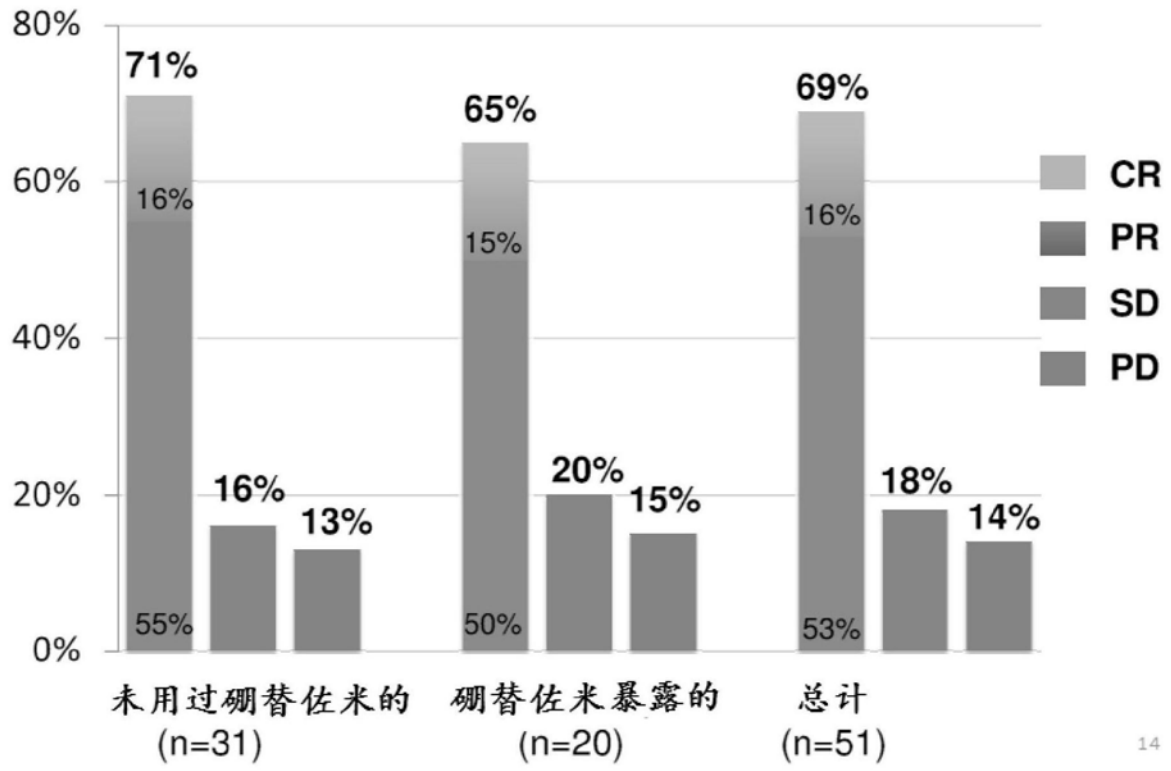


图18



14

图19

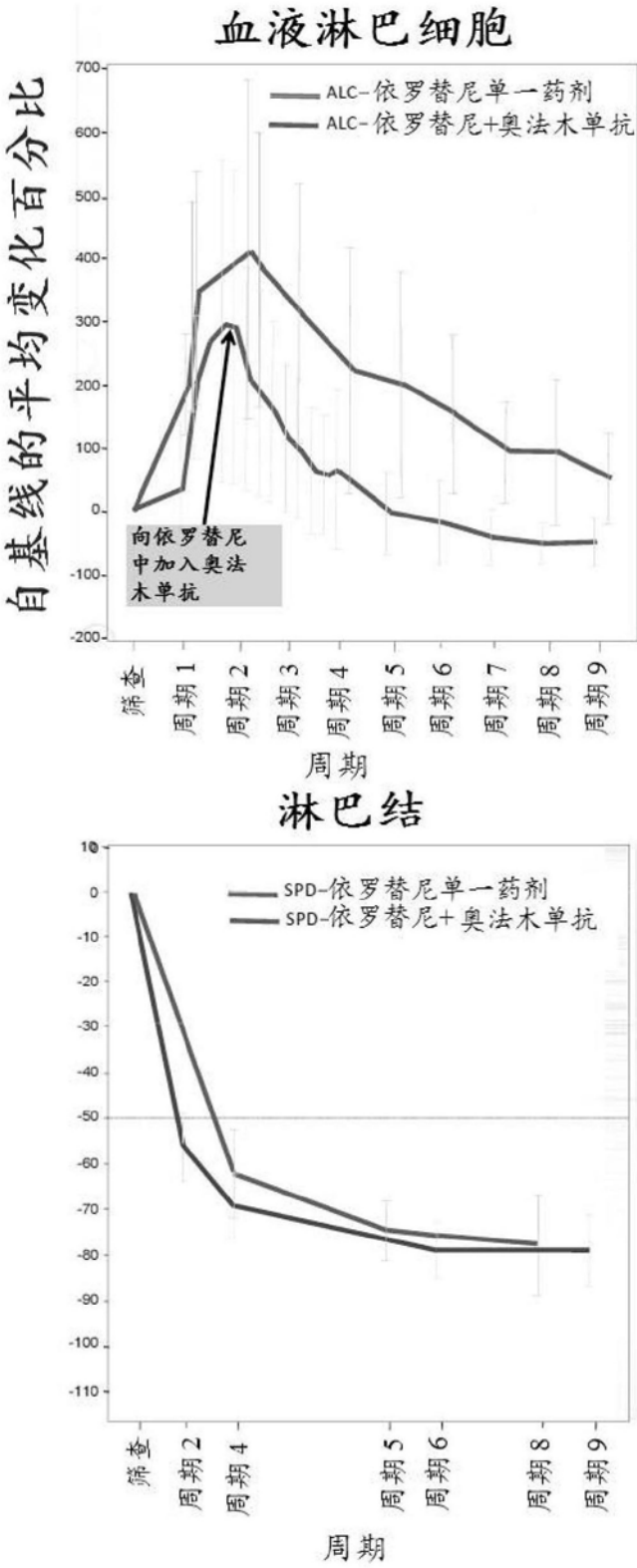
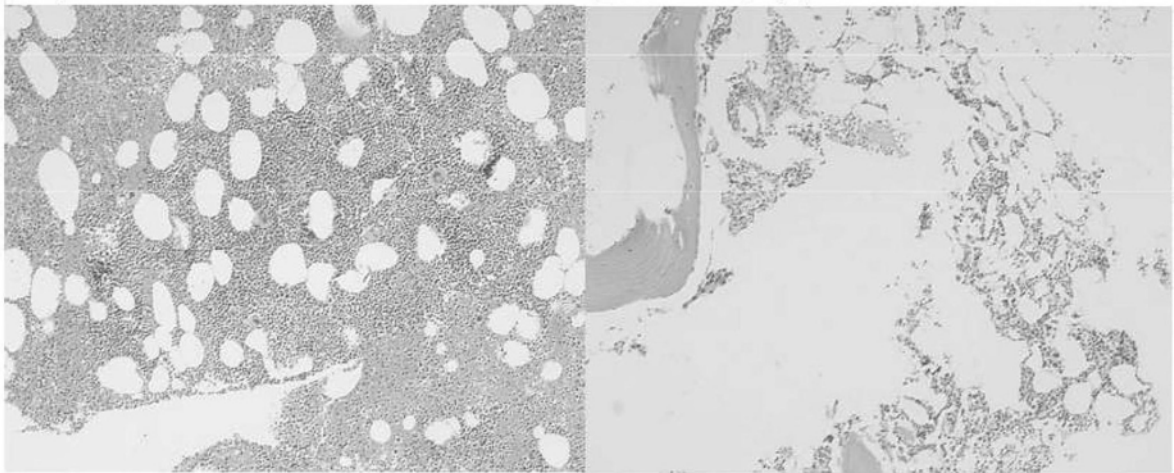


图20

筛查

第 12 周期



del17p/C1D1 ALC 145; C12D1 ALC 5 的 77 岁男性

图21

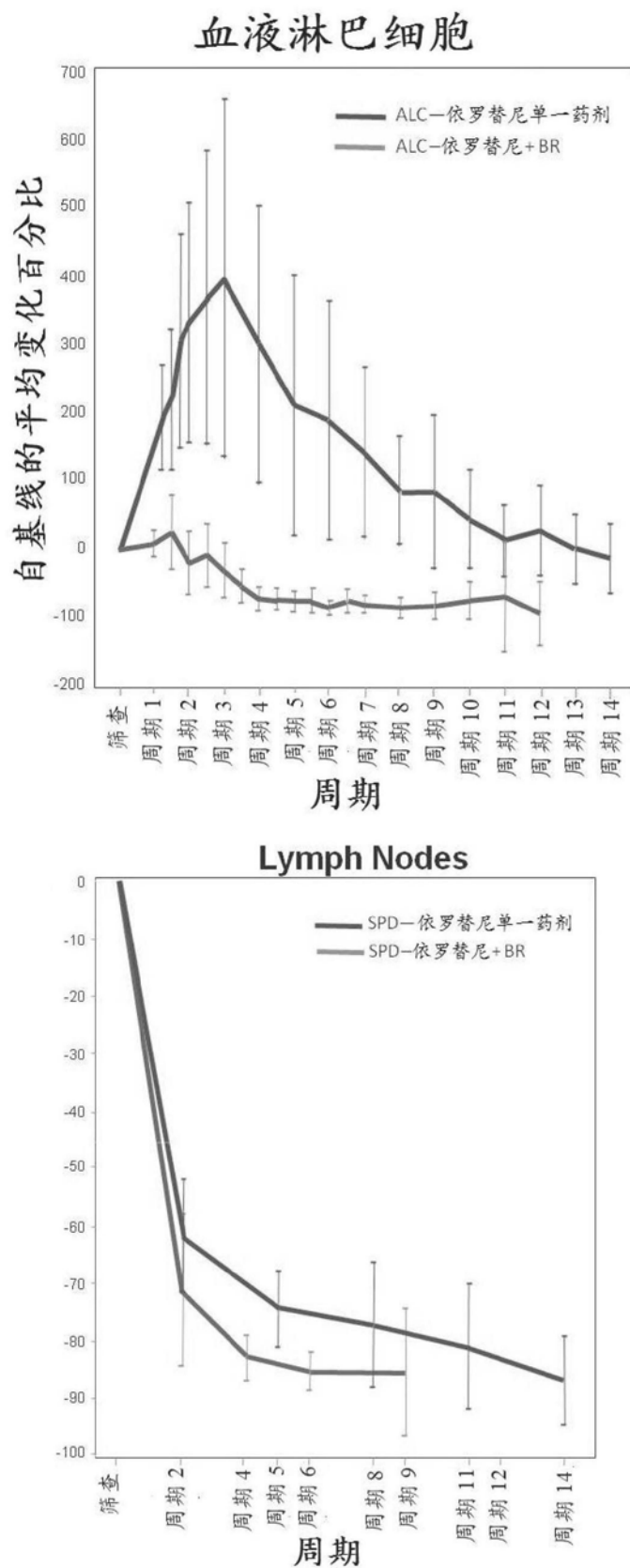
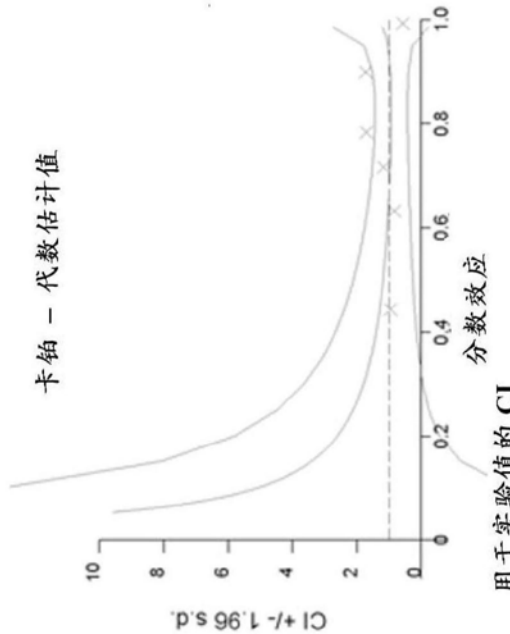


图22

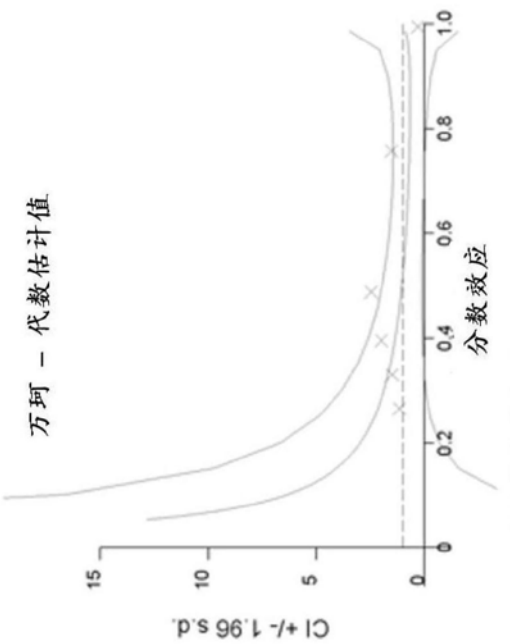
	Btk 抑制剂 (uM)	万珂 (uM)
GI50	0.176	5.434
r:	0.986	0.850

	Btk 抑制剂 (uM)	卡铂(uM)
GI50	0.096	15.382
r:	0.994	0.990



用于实验值的 CI

Btk 抑制剂 (uM)	卡铂 (uM)	Fa	CI
0.03125	6.25	0.443223	0.954
0.0625	12.5	0.632339	0.828
0.125	25	0.715772	1.165
0.25	50	0.783398	1.718
0.5	100	0.899868	1.74
1	200	0.993211	0.564



用于实验值的 CI

Btk 抑制剂 (uM)	万珂 (nM)	Fa	CI
0.03125	0.625	0.265657	1.16
0.0625	1.25	0.329518	1.487
0.125	2.5	0.394877	2.011
0.25	5	0.48706	2.488
0.5	10	0.756802	1.505
1	20	0.99494	0.314

图23

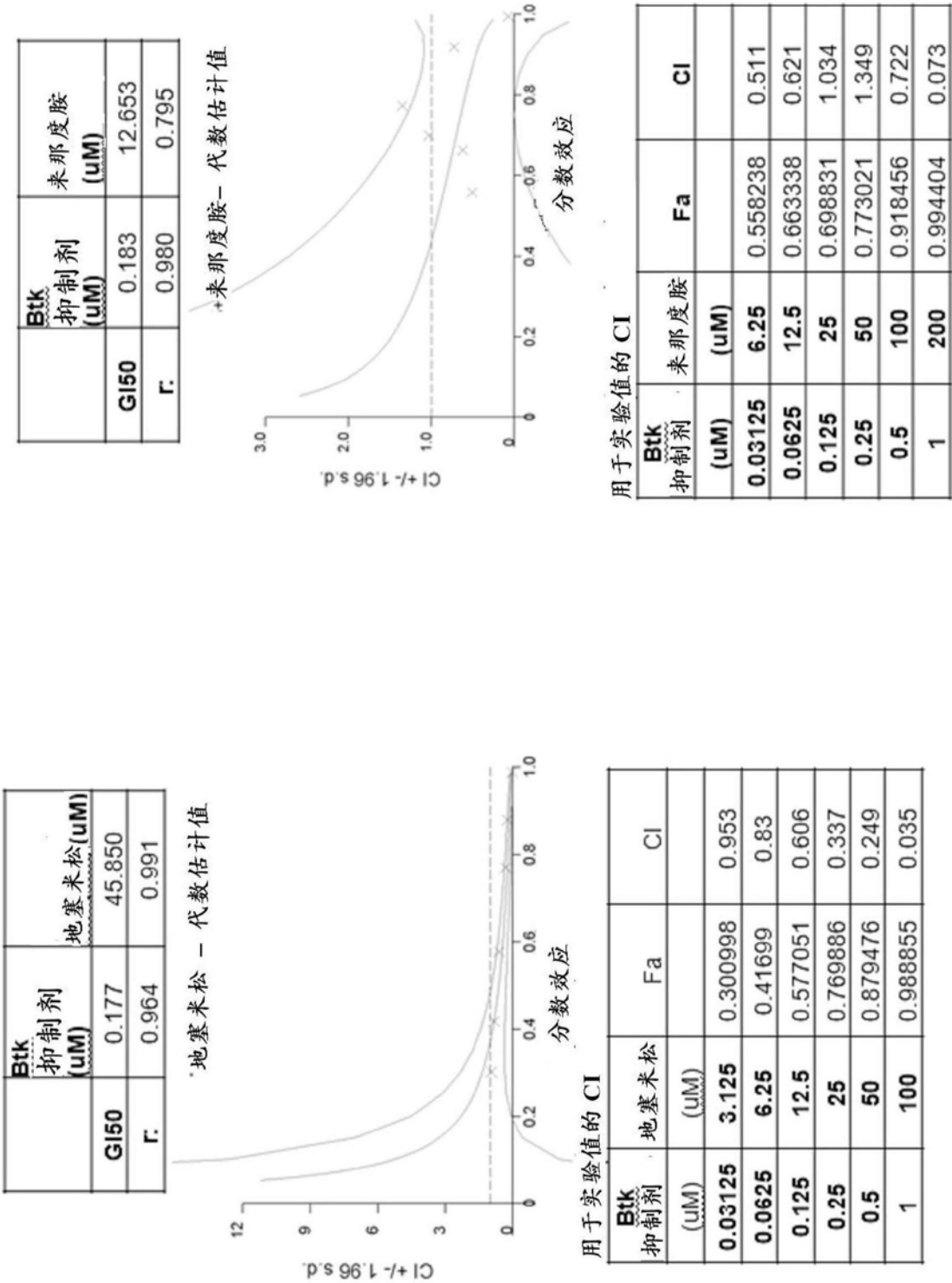
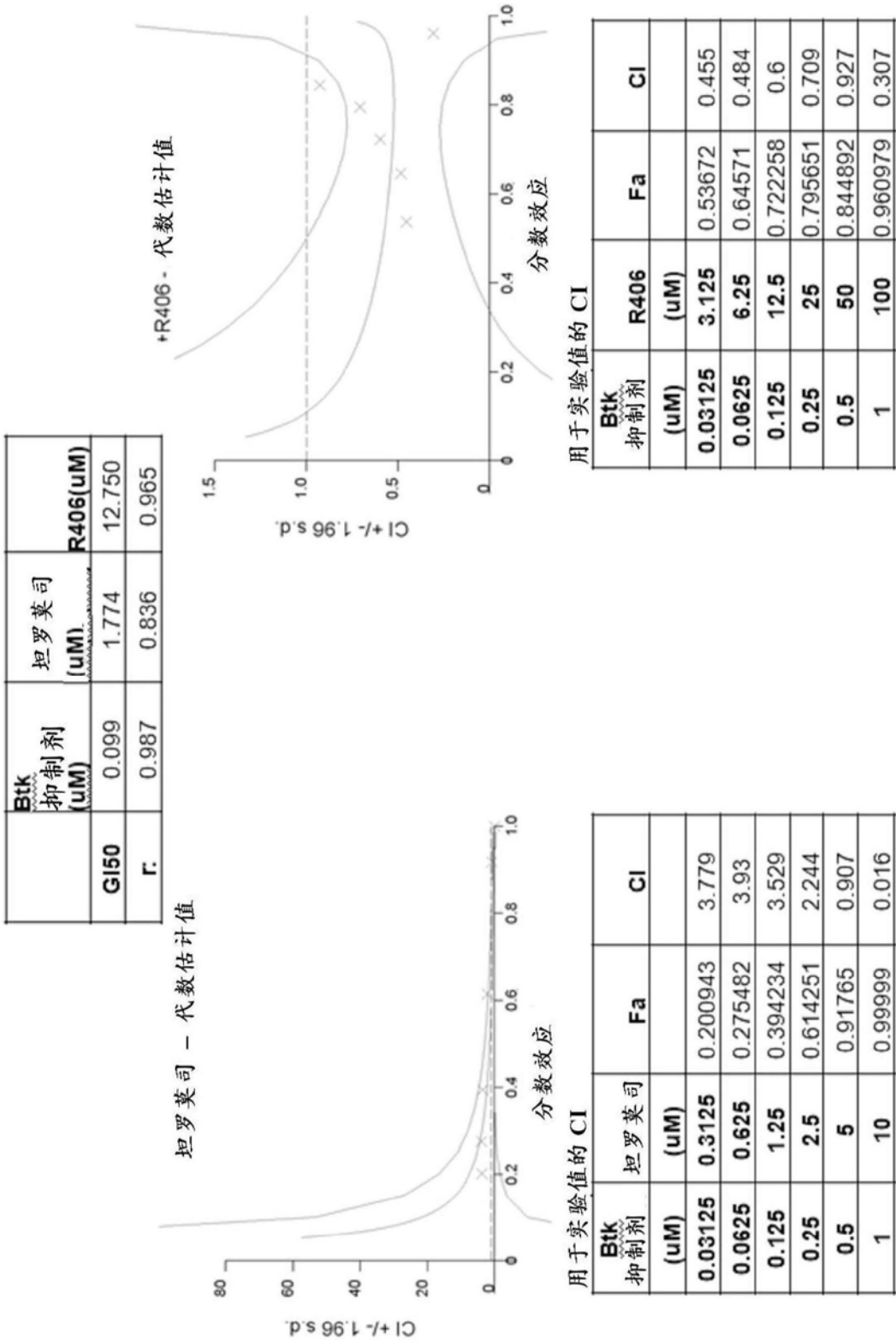


图24



+R406 - 代数估计值

用于实验值的 CI

Btk抑制剂(uM)	R406(uM)	Fa	CI
0.03125	3.125	0.53672	0.455
0.0625	6.25	0.64571	0.484
0.125	12.5	0.722258	0.6
0.25	25	0.795651	0.709
0.5	50	0.844892	0.927
1	100	0.960979	0.307

图25

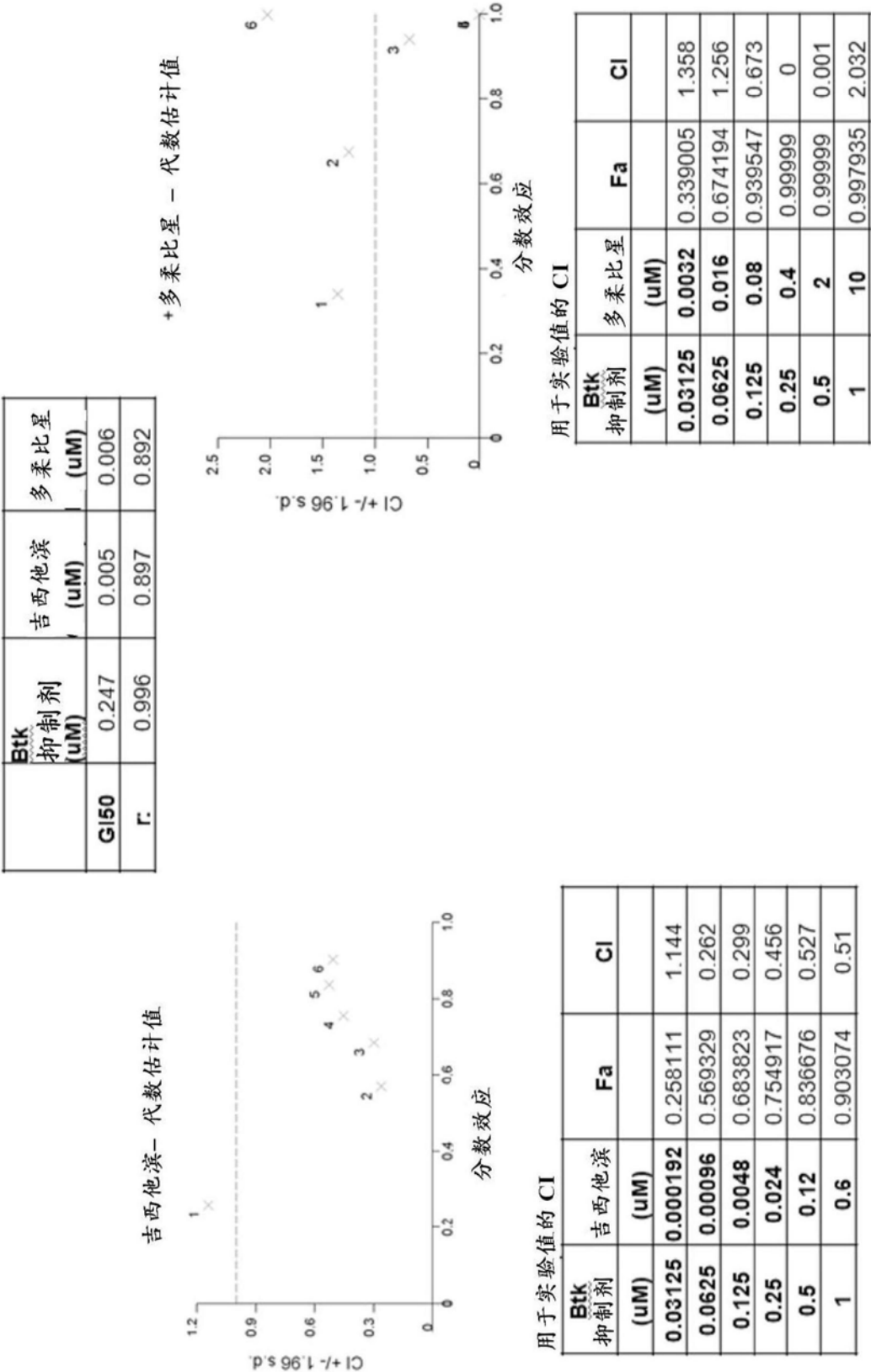


图26

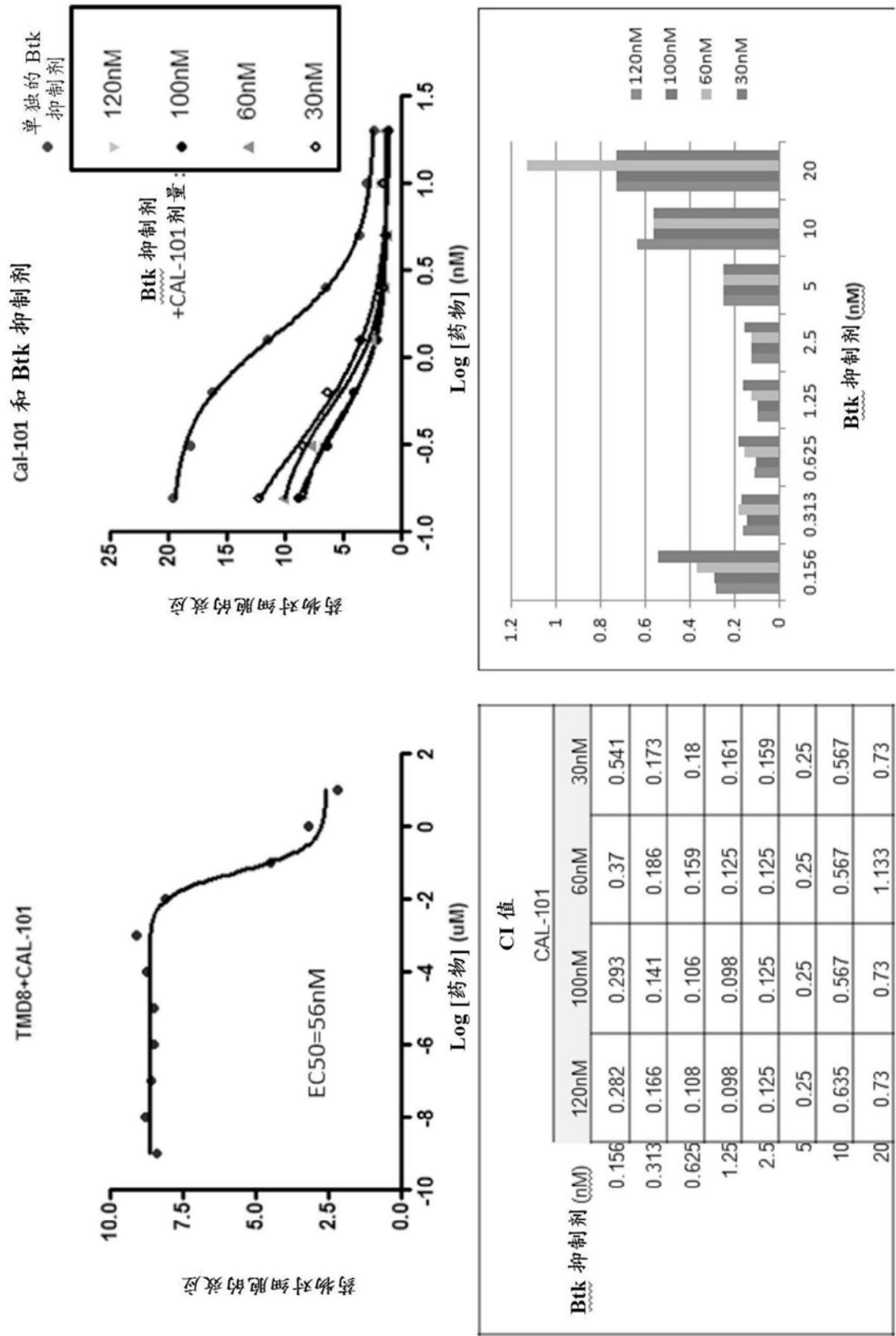


图27

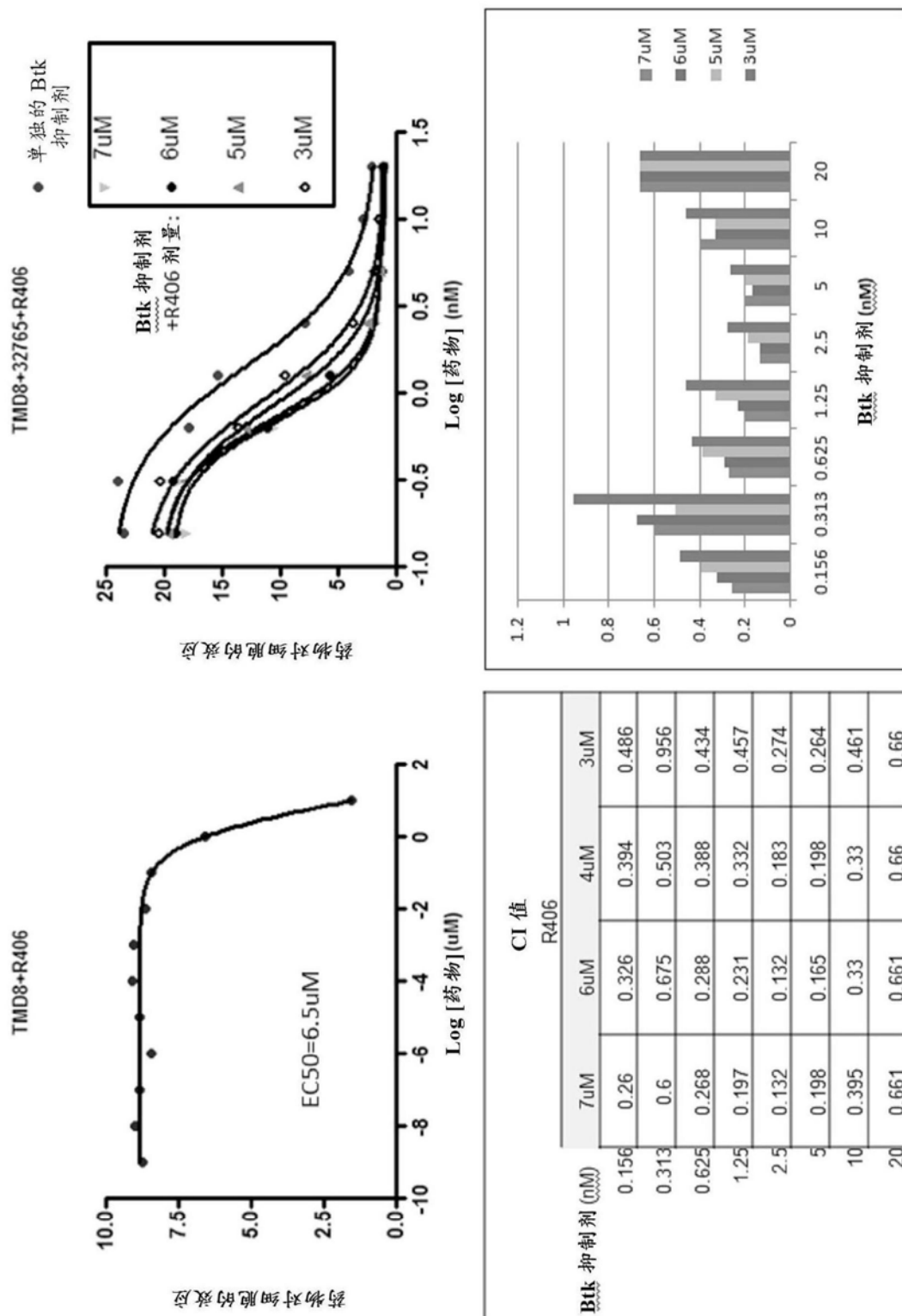


图28

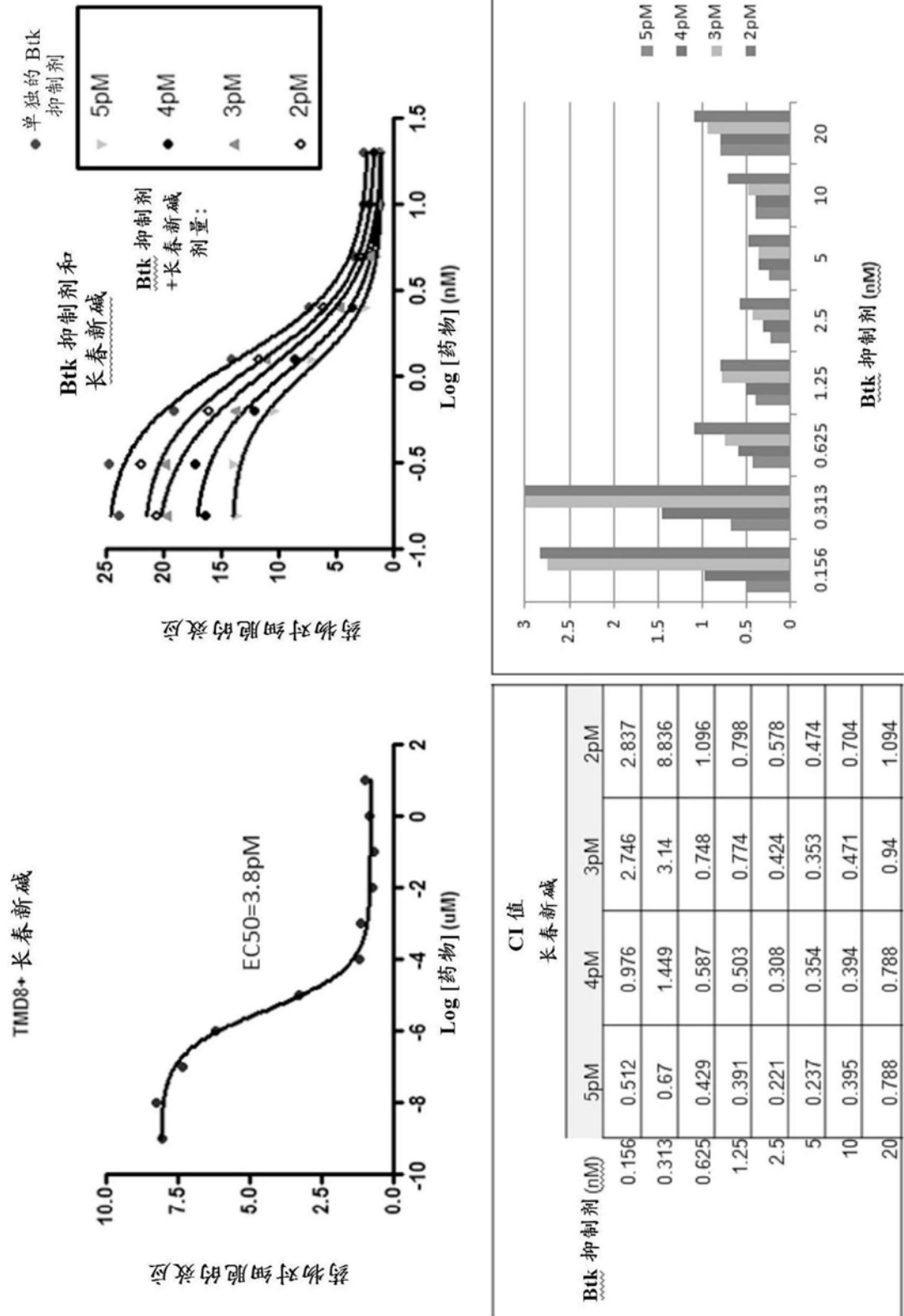


图29

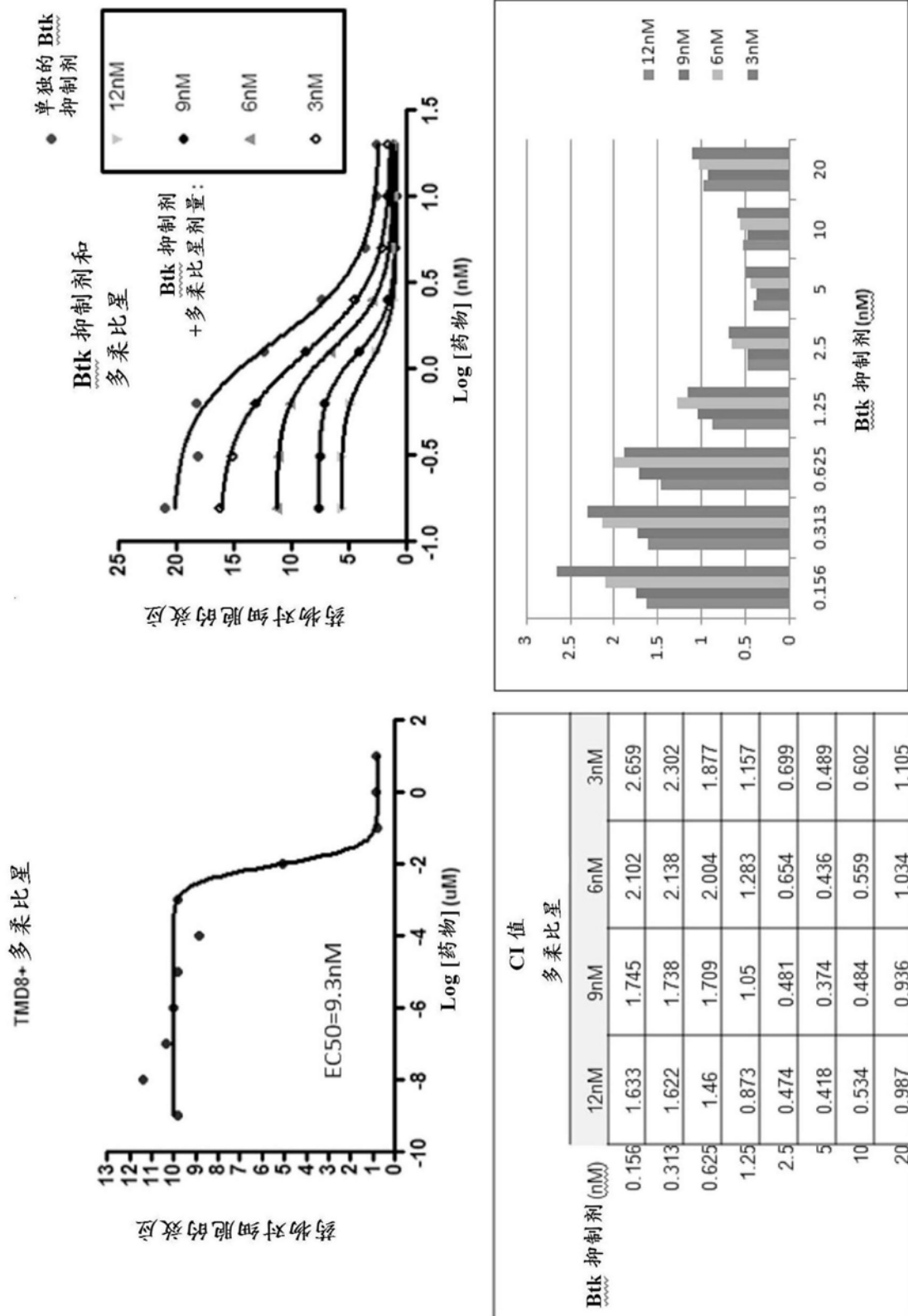
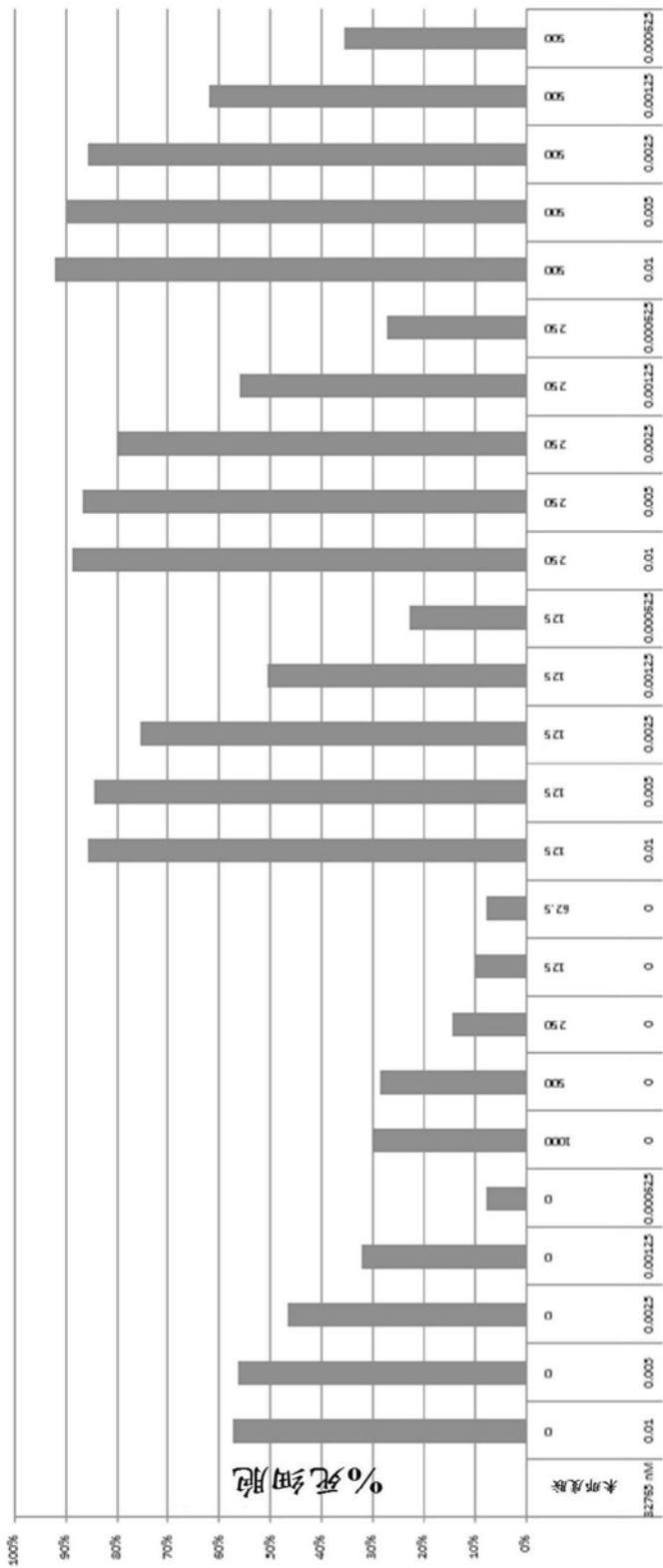


图30

阿尔玛蓝：TMD8 Btk 抑制剂+来那度胺



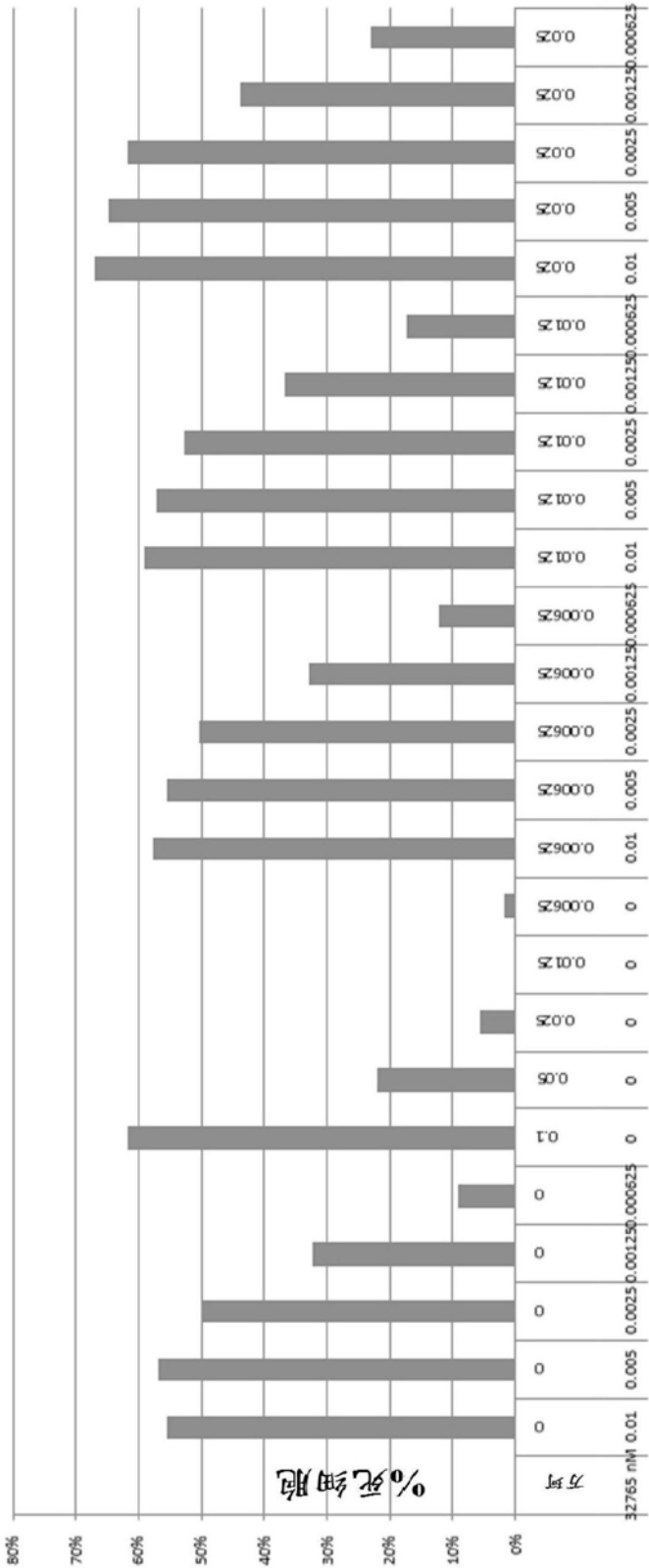
Btk 抑制剂 nM	来那度胺 nM	CI
0.000625	125	0.77
0.00125	125	0.311
0.0025	125	0.175
0.005	125	0.188
0.01	125	0.332

Btk 抑制剂 nM	来那度胺 nM	CI
0.000625	250	0.773
0.00125	250	0.271
0.0025	250	0.136
0.005	250	0.154
0.01	250	0.25

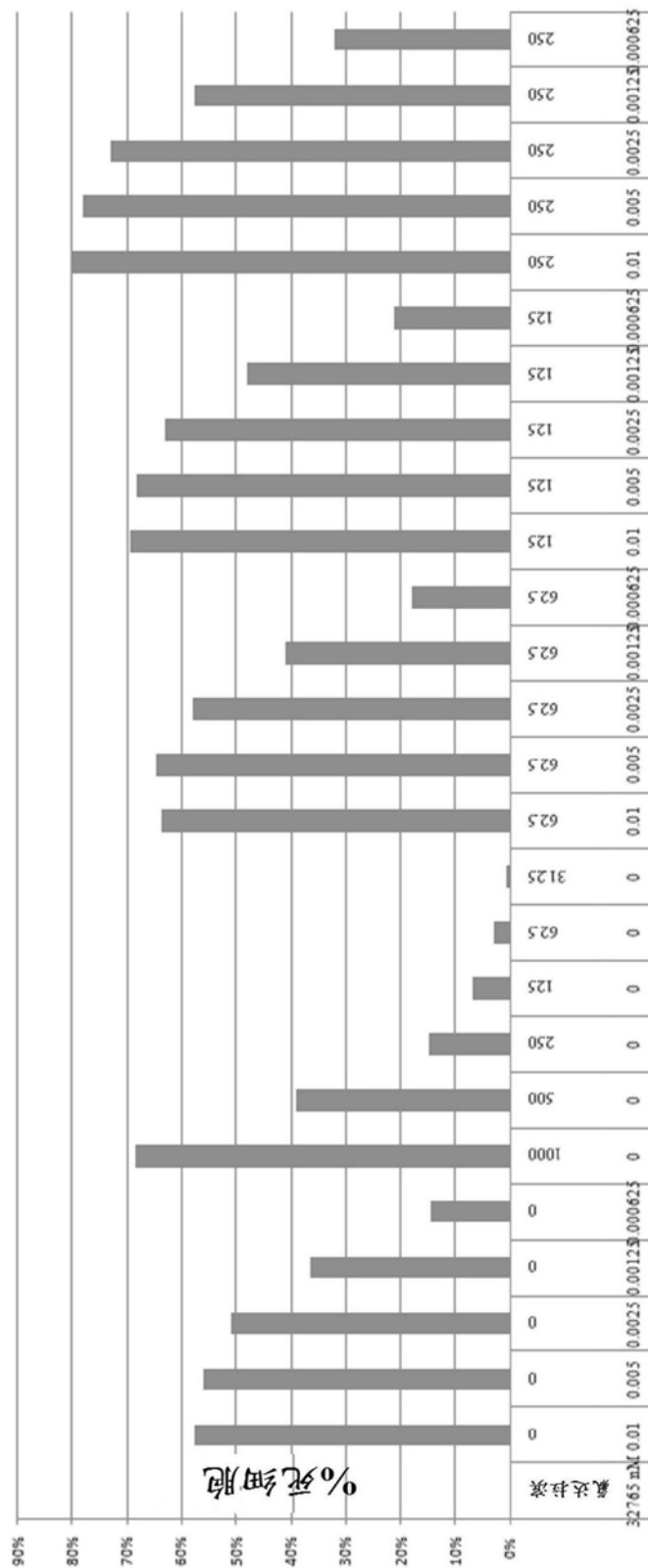
Btk 抑制剂 nM	来那度胺 nM	CI
0.000625	500	0.668
0.00125	500	0.244
0.0025	500	0.093
0.005	500	0.119
0.01	500	0.163

图31

阿尔玛蓝：TMD8 Btk 抑制剂+万珂



阿尔玛蓝:TMD8 Btk 抑制剂+氟达拉滨



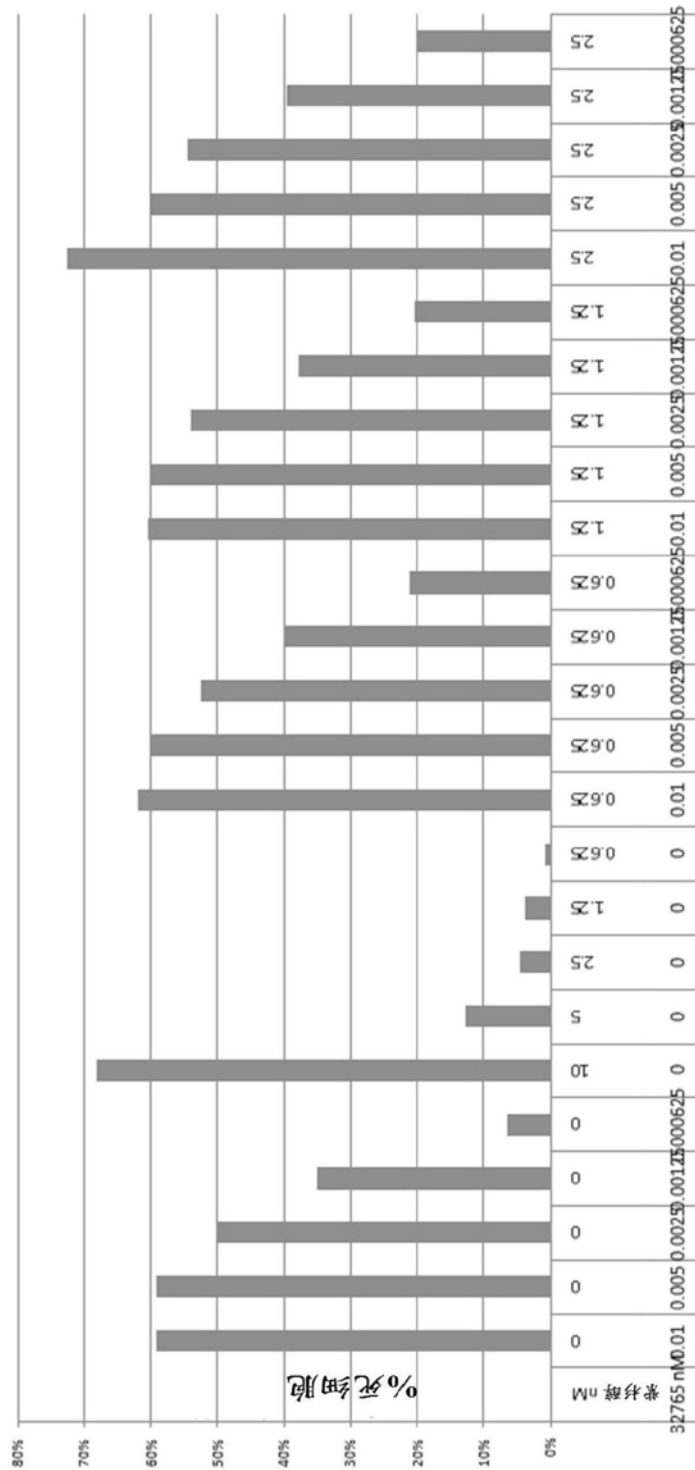
Btk 抑制剂 nM	氟达拉滨 nM	Cl
0.00625	250	1.055
0.0125	250	0.518
0.0025	250	0.356
0.005	250	0.383
0.01	250	0.518

Btk 抑制剂 nM	羧达拉滨 nM	CI
0.00625	125	1.389
0.0125	125	0.548
0.0025	125	0.427
0.005	125	0.542
0.01	125	0.889

Btk 抑制剂 nM	氟达拉滨 nM	Cl
0.00625	62.5	1.551
0.0125	62.5	0.636
0.0025	62.5	0.474
0.005	62.5	0.598
0.01	62.5	1.116

图33

阿尔玛蓝：TMD8 Btk 抑制剂+紫杉醇



Btk 抑制剂	紫杉醇 nM	CI
0.000625	2.5	1.13
0.00125	2.5	0.784
0.0025	2.5	0.735
0.005	2.5	1.007
0.01	2.5	1.084

Btk 抑制剂	紫杉醇 nM	CI
0.000625	1.25	0.85
0.00125	1.25	0.664
0.0025	1.25	0.634
0.005	1.25	0.918
0.01	1.25	1.703

Btk 抑制剂	紫杉醇 nM	CI
0.000625	0.625	0.683
0.00125	0.625	0.535
0.0025	0.625	0.612
0.005	0.625	0.865
0.01	0.625	1.556

图34

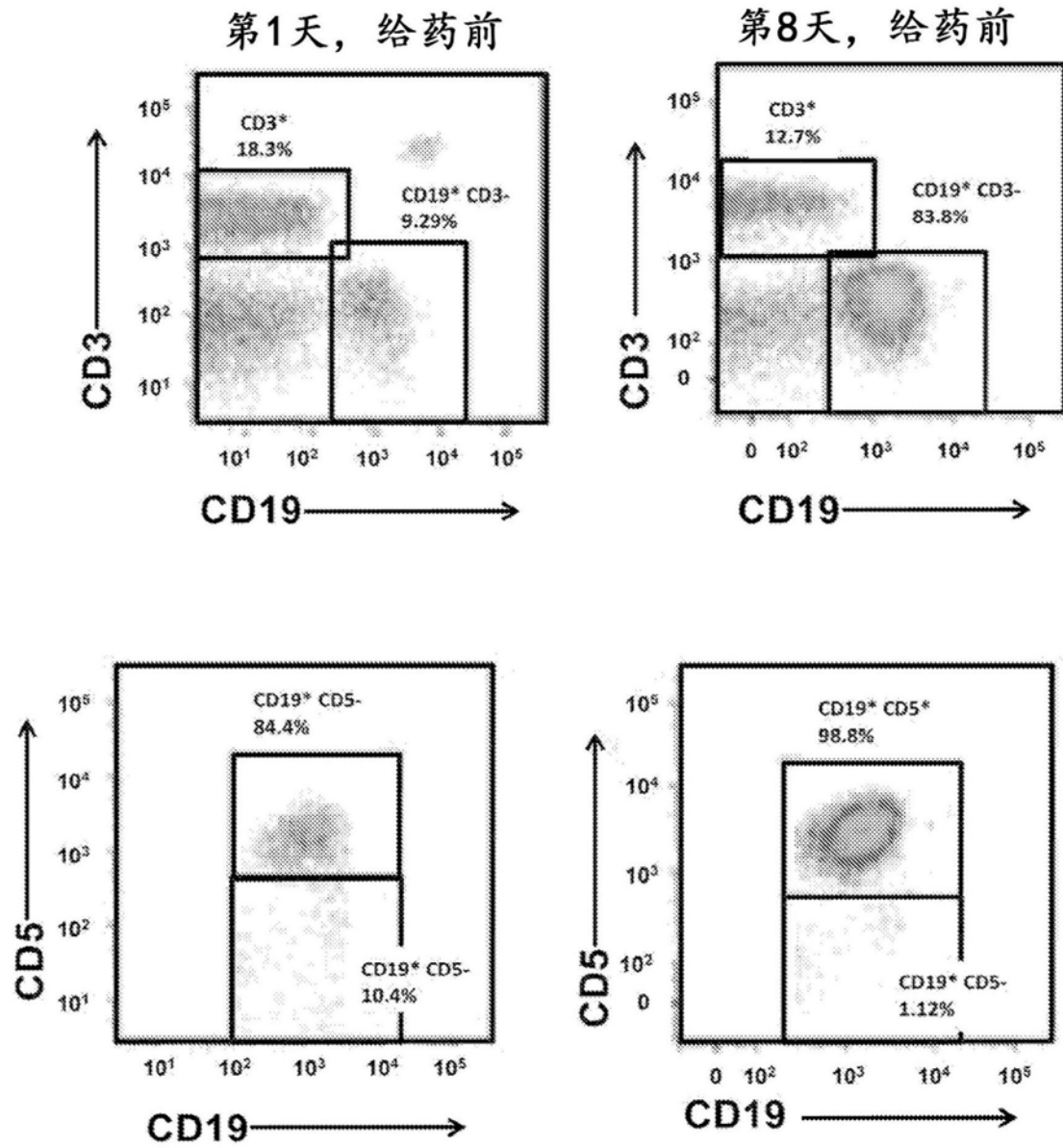
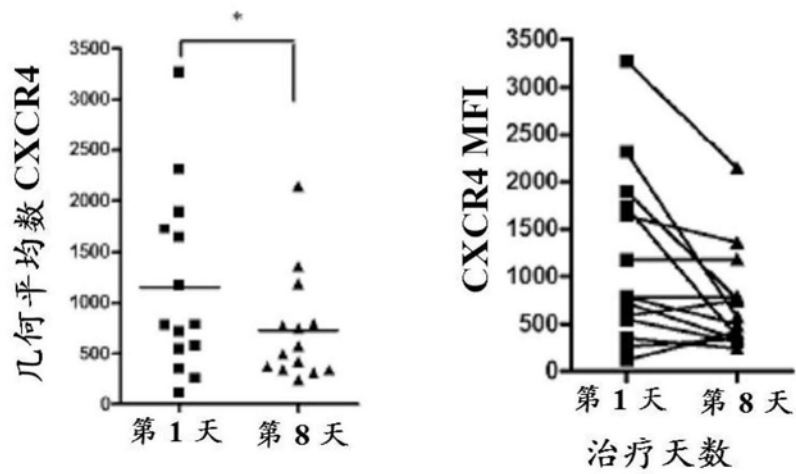


图35

A.



B.

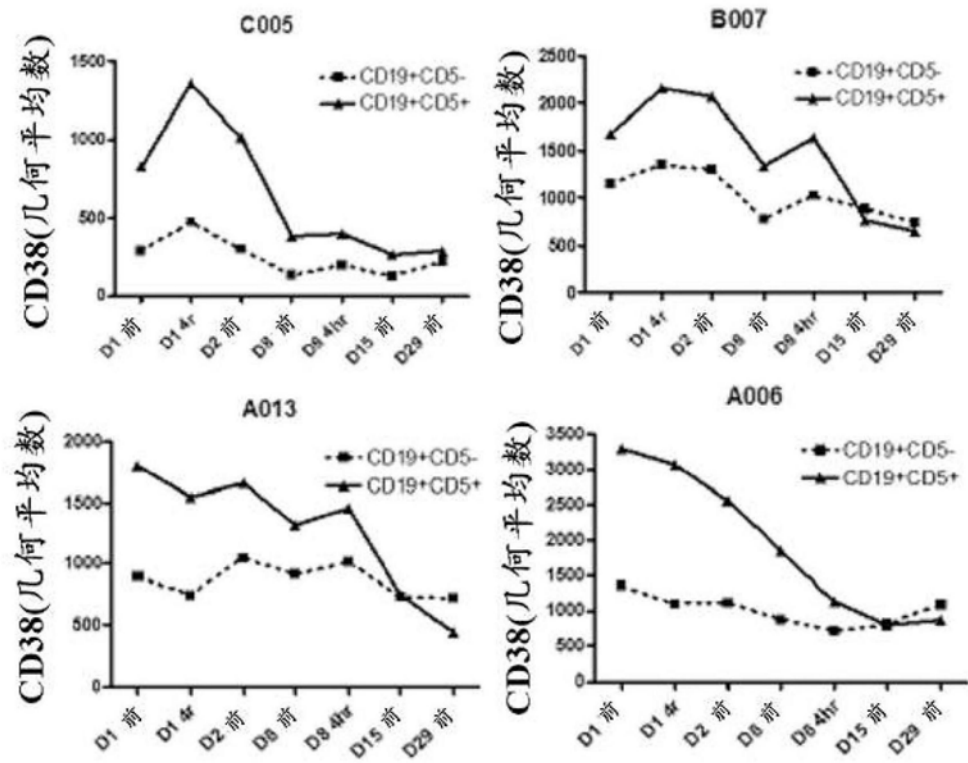
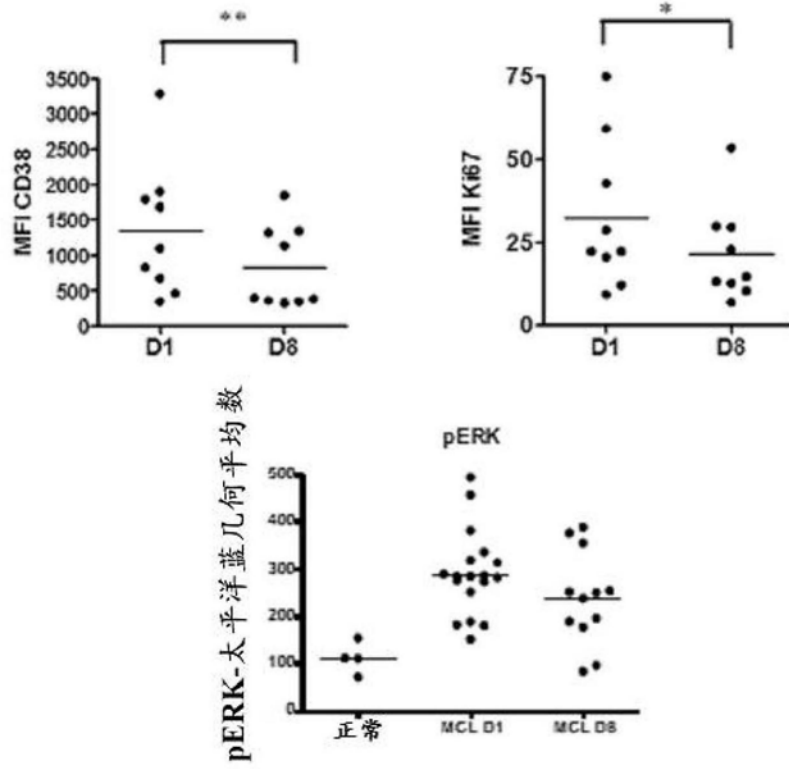


图36

C.



D.

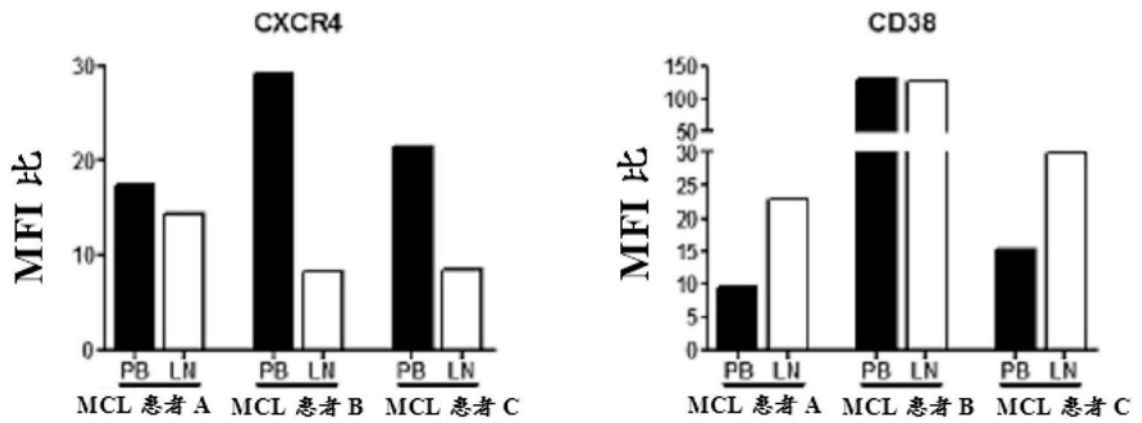


图36 (续)

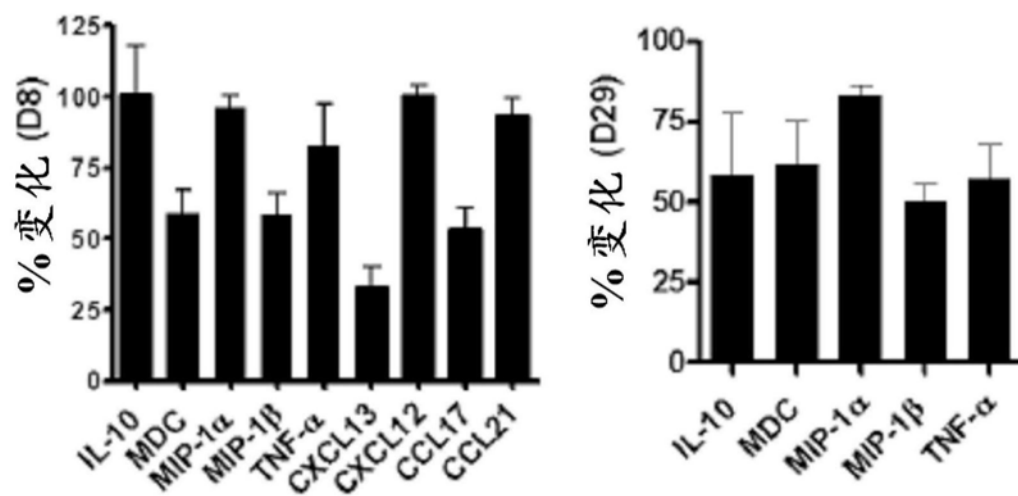
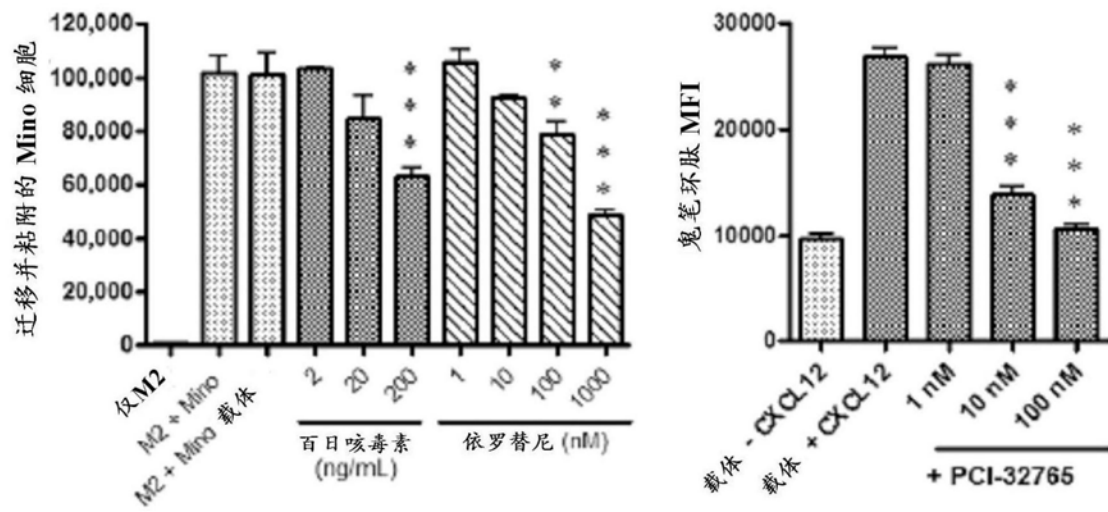
E.

图36 (续)

A



B

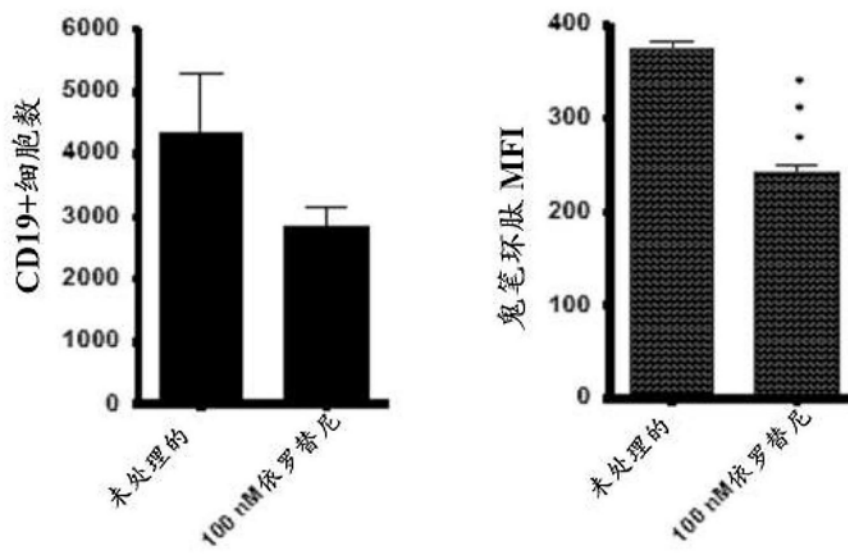


图37