

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.



# [12] 发明专利申请公布说明书

A61K 31/4188 (2006.01)

A61K 38/18 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

[21] 申请号 200580046191.4

[43] 公开日 2008年1月2日

[11] 公开号 CN 101098696A

[22] 申请日 2005.11.7

[21] 申请号 200580046191.4

[30] 优先权

[32] 2004.11.9 [33] US [31] 60/626,258

[86] 国际申请 PCT/US2005/040449 2005.11.7

[87] 国际公布 WO2006/052976 英 2006.5.18

[85] 进入国家阶段日期 2007.7.9

[71] 申请人 先灵公司

地址 美国新泽西州

[72] 发明人 C·宗 B·威诺格雷德

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 刘冬 李炳爱

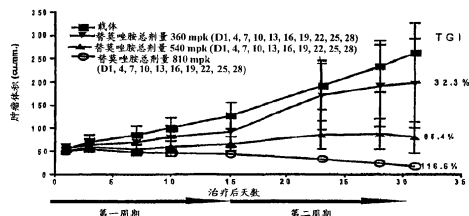
权利要求书 23 页 说明书 36 页 附图 22 页

## [54] 发明名称

基于患者 MGMT 水平来治疗癌症的替莫唑胺的改进给药方案

## [57] 摘要

本发明公开了替莫唑胺用于制造治疗需要该治疗的患者所患癌症的药物的用途，包括根据基于患者 MGMT 水平的改进给药方案和/或计划给予替莫唑胺。还公开了用替莫唑胺治疗患者的其它改进给药方案和/或计划。



1. 一种治疗神经胶质瘤患者的方法，所述方法包括：  
给予患者替莫唑胺，给药方案为：
  - I. 如果用甲基化特异性 PCR (MSP)，在得自患者的样品中检测到了 MGMT 基因的甲基化，则在 28 天的周期内给药 5 天，每天给予 150 - 200 mg/m<sup>2</sup>；或者
  - II. 如果用 MSP 在得自患者的样品中未检测到 MGMT 基因的甲基化，则根据以下方案其中之一：
    - i. 在 21 天的周期内给药 14 天，每天给予 100 mg/m<sup>2</sup>；或者
    - ii. 在 14 天的周期内给药 7 天，每天给予 150 mg/m<sup>2</sup>；或者
    - iii. 在 28 天的周期内给药 21 天，每天给予 100 mg/m<sup>2</sup>。
2. 一种治疗神经胶质瘤患者的方法，所述方法包括：
  - I. 用 MSP 评价得自患者的样品中 MGMT 基因是否甲基化；和
  - II. 给予患者替莫唑胺，给药方案为：
    - a) 如果在样品中检测到了 MGMT 基因的甲基化，则在 28 天的周期内给药 5 天，每天给予 150 - 200 mg/m<sup>2</sup>；或者
    - b) 如果在样品中未检测到 MGMT 基因的甲基化，则根据以下方案其中之一：
      - i. 在 21 天的周期内给药 14 天，每天给予 100 mg/m<sup>2</sup>；或者
      - ii. 在 14 天的周期内给药 7 天，每天给予 150 mg/m<sup>2</sup>；或者
      - iii. 在 28 天的周期内给药 21 天，每天给予 100 mg/m<sup>2</sup>。
3. 权利要求 2 的方法，其中所述样品是肿瘤活检样品。
4. 一种治疗神经胶质瘤患者的方法，所述方法包括：  
给予患者替莫唑胺，给药方案为：
  - a). 如果用 Western 印迹免疫测定法、免疫组织化学方法或 MGMT 蛋白质的酶试验法，在得自患者的样品中未检测到 MGMT 蛋白质，则在 28 天的周期内给药 5 天，每天给予 150 - 200 mg/m<sup>2</sup>；或者

b). 如果用 Western 印迹免疫测定法、免疫组织化学方法或 MGMT 蛋白质的酶试验法, 在得自患者的样品中检测到了 MGMT 蛋白质, 则根据以下方案其中之一:

- i. 在 21 天的周期内给药 14 天, 每天给予  $100 \text{ mg/m}^2$ ; 或者
- ii. 在 14 天的周期内给药 7 天, 每天给予  $150 \text{ mg/m}^2$ ; 或者
- iii. 在 28 天的周期内给药 21 天, 每天给予  $100 \text{ mg/m}^2$ .

5. 一种治疗神经胶质瘤患者的方法, 所述方法包括:

I. 进行 Western 印迹试验、免疫组织化学试验或酶试验, 以检测得自患者的样品中是否存在 MGMT 蛋白质; 和

II. 给予患者替莫唑胺, 给药方案为:

a) 如果在样品中未检测到 MGMT 蛋白质, 则在 28 天的周期内给药 5 天, 每天给予  $150 - 200 \text{ mg/m}^2$ ; 或者

b) 如果 MGMT 蛋白质存在于样品中, 则根据以下方案其中之一:

- i. 在 21 天的周期内给药 14 天, 每天给予  $100 \text{ mg/m}^2$ ; 或者
- ii. 在 14 天的周期内给药 7 天, 每天给予  $150 \text{ mg/m}^2$ ; 或者
- iii. 在 28 天的周期内给药 21 天, 每天给予  $100 \text{ mg/m}^2$ .

6. 权利要求 5 的方法, 其中所述样品是肿瘤活检样品。

7. 一种治疗神经胶质瘤患者的方法, 所述方法包括:

给予患者替莫唑胺, 给药方案为:

a) 如果得自患者的样品中测得的 MGMT 蛋白质的水平或酶活性与正常淋巴细胞中 MGMT 蛋白质的水平或酶活性相比为低度, 则根据以下两种方案的任何一种:

- i. 在 28 天的周期内给药 5 天, 每天给予  $150-200 \text{ mg/m}^2$ ; 或者
- ii. 在 28 天的周期内给药 5 天, 每天给予  $250 \text{ mg/m}^2$ , 并联合给予生长因子; 或者

b) 如果得自患者的样品中测得的 MGMT 蛋白质的水平或酶活性与正常淋巴细胞中 MGMT 蛋白质的水平或酶活性相比为中度, 则

根据以下四种方案之一:

- i. 在 28 天的周期内给药 14 天, 每天给予  $100 \text{ mg/m}^2$ ; 或者
  - ii. 在 28 天的周期内给药 5 天, 每天给予  $300 \text{ mg/m}^2$ , 并联合给予生长因子; 或者
  - iii. 在 28 天的周期内给药 21 天, 每天给予  $75 \text{ mg/m}^2$ ; 或者
  - iv. 在 56 天的周期内给药 42 天, 每天给予  $75 \text{ mg/m}^2$ ; 或者
- c) 如果得自患者的样品中测得的 MGMT 蛋白质的水平或酶活性与正常淋巴细胞中 MGMT 蛋白质的水平或酶活性相比为高度, 则根据以下三种方案之一:

- i. 在 21 天的周期内给药 14 天, 每天给予  $100 \text{ mg/m}^2$ ; 或者
  - ii. 在 14 天的周期内给药 7 天, 每天给予  $150 \text{ mg/m}^2$ ; 或者
  - iii. 在 28 天的周期内给药 21 天, 每天给予  $100 \text{ mg/m}^2$ .
8. 权利要求 7 的方法, 其中所述样品是肿瘤活检样品。
9. 一种治疗神经胶质瘤患者的方法, 所述方法包括:
- I. 评价得自患者的样品中测得的 MGMT 蛋白质的水平或酶活性, 并将所述水平或酶活性与正常淋巴细胞中 MGMT 蛋白质的水平或酶活性相比, 归为低度、中度或高度; 和
  - II. 给予患者替莫唑胺, 给药方案如下:
    - a) 如果在步骤 I 中, 患者 MGMT 蛋白质的水平或酶活性与正常淋巴细胞中 MGMT 蛋白质的水平或酶活性相比, 被归为低度, 则根据以下两种方案的其中一种:
      - i. 在 28 天的周期内给药 5 天, 每天给予  $150\text{-}200 \text{ mg/m}^2$ ; 或者
      - ii. 在 28 天的周期内给药 5 天, 每天给予  $250 \text{ mg/m}^2$ , 并联合给予生长因子; 或者
    - b) 如果患者 MGMT 蛋白质的水平或酶活性与正常淋巴细胞中 MGMT 蛋白质的水平或酶活性相比, 被归为中度, 则根据以下四种方案的其中一种:
      - i. 在 28 天的周期内给药 14 天, 每天给予  $100 \text{ mg/m}^2$ ; 或者

ii. 在 28 天的周期内给药 5 天, 每天给予  $300 \text{ mg/m}^2$ , 并联合给予生长因子; 或者

iii. 在 28 天的周期内给药 21 天, 每天给予  $75 \text{ mg/m}^2$ ; 或者

iv. 在 56 天的周期内给药 42 天, 每天给予  $75 \text{ mg/m}^2$ ; 或者

c) 如果患者 MGMT 蛋白质的水平或酶活性与正常淋巴细胞中 MGMT 蛋白质的水平或酶活性相比, 被归为高度, 则根据以下方案的其中一种:

i. 在 21 天的周期内给药 14 天, 每天给予  $100 \text{ mg/m}^2$ ; 或者

ii. 在 14 天的周期内给药 7 天, 每天给予  $150 \text{ mg/m}^2$ ; 或者

iii. 在 28 天的周期内给药 21 天, 每天给予  $100 \text{ mg/m}^2$ 。

10. 一种治疗神经胶质瘤患者的方法, 所述方法包括:

I. 评价得自患者的样品中 MGMT 基因的甲基化水平, 并将所述甲基化水平与正常淋巴细胞中 MGMT 基因的甲基化水平相比, 归为低度、中度或高度; 和

II. 给予患者替莫唑胺, 给药方案如下:

a) 如果患者 MGMT 基因的甲基化水平与正常淋巴细胞中 MGMT 基因的甲基化水平相比, 被归为低度, 则根据以下三种方案的其中一种:

i. 在 21 天的周期内给药 14 天, 每天给予  $100 \text{ mg/m}^2$ ; 或者

ii. 在 14 天的周期内给药 7 天, 每天给予  $150 \text{ mg/m}^2$ ; 或者

iii. 如果在样品中未检测到 MGMT 基因的甲基化, 则在 28 天的周期内给药 21 天, 每天给予  $100 \text{ mg/m}^2$ ; 或者

b) 如果患者 MGMT 基因的甲基化水平与正常淋巴细胞中 MGMT 基因的甲基化水平相比, 被归为中度, 则根据以下四种方案的其中一种:

i. 在 28 天的周期内给药 14 天, 每天给予  $100 \text{ mg/m}^2$ ; 或者

ii. 在 28 天的周期内给药 5 天, 每天给予  $300 \text{ mg/m}^2$ , 并联合给予生长因子; 或者

iii. 在 28 天的周期内给药 21 天, 每天给予  $75 \text{ mg/m}^2$ ; 或者  
iv. 在 56 天的周期内给药 42 天, 每天给予  $75 \text{ mg/m}^2$ ; 或者  
c) 如果患者 MGMT 基因的甲基化水平与正常淋巴细胞中 MGMT 基因的甲基化水平相比, 被归为高度, 则根据以下两种方案的其中一种:

i. 在 28 天的周期内给药 5 天, 每天给予  $150\text{-}200 \text{ mg/m}^2$ ; 或者  
ii. 在 28 天的周期内给药 5 天, 每天给予  $250 \text{ mg/m}^2$ , 并联合给予生长因子。

11. 一种治疗黑素瘤患者的方法, 所述方法包括, 如果用 MSP, 在得自患者的样品中检测到了 MGMT 基因的甲基化, 根据以下方案之一给予患者替莫唑胺:

I. 在 21 天的周期内给药 14 天, 每天给予  $100 \text{ mg/m}^2$ ; 或者  
II. 在 14 天的周期内给药 7 天, 每天给予  $150 \text{ mg/m}^2$ ; 或者  
III. 在 28 天的周期内给药 21 天, 每天给予  $100 \text{ mg/m}^2$ 。

12. 一种治疗黑素瘤患者的方法, 所述方法包括:

I. 用 MSP, 评价得自患者的样品中, MGMT 基因是否甲基化;  
和

II. 如果在样品中检测到了 MGMT 基因的甲基化, 根据以下方案之一, 给予患者替莫唑胺:

i. 在 21 天的周期内给药 14 天, 每天给予  $100 \text{ mg/m}^2$ ; 或者  
ii. 在 14 天的周期内给药 7 天, 每天给予  $150 \text{ mg/m}^2$ ; 或者  
iii. 在 28 天的周期内给药 21 天, 每天给予  $100 \text{ mg/m}^2$ 。

13. 权利要求 12 的方法, 其中所述样品是肿瘤活检样品。

14. 一种治疗黑素瘤患者的方法, 所述方法包括, 如果用 Western 印迹免疫测定法、免疫组织化学方法或 MGMT 蛋白质的酶试验法, 在得自患者的样品中未检测到 MGMT 蛋白质, 根据以下方案之一给予患者替莫唑胺:

I. 在 21 天的周期内给药 14 天, 每天给予  $100 \text{ mg/m}^2$ ; 或者

- II. 在 14 天的周期内给药 7 天, 每天给予 150 mg/m<sup>2</sup>; 或者
- III. 在 28 天的周期内给药 21 天, 每天给予 100 mg/m<sup>2</sup>。
15. 一种治疗黑素瘤患者的方法, 包括:
- I. 进行 Western 印迹试验、免疫组织化学试验或酶试验, 以检测得自患者的样品中是否存在 MGMT 蛋白质; 和
- II. 如果在样品中未检测到 MGMT 蛋白质, 根据以下方案之一给予患者替莫唑胺:
- i. 在 21 天的周期内给药 14 天, 每天给予 100 mg/m<sup>2</sup>; 或者
- ii. 在 14 天的周期内给药 7 天, 每天给予 150 mg/m<sup>2</sup>; 或者
- iii. 在 28 天的周期内给药 21 天, 每天给予 100 mg/m<sup>2</sup>。
16. 权利要求 5 的方法, 其中所述样品是肿瘤活检样品。
17. 一种治疗黑素瘤患者的方法, 所述方法包括, 如果得自患者的样品中测得的 MGMT 蛋白质或酶活性的水平与正常淋巴细胞中 MGMT 蛋白质或酶活性的水平相比为低度或中度, 根据以下三种方案之一给予患者替莫唑胺:
- i. 在 21 天的周期内给药 14 天, 每天给予 100 mg/m<sup>2</sup>; 或者
- ii. 在 14 天的周期内给药 7 天, 每天给予 150 mg/m<sup>2</sup>; 或者
- iii. 在 28 天的周期内给药 21 天, 每天给予 100 mg/m<sup>2</sup>。
18. 权利要求 17 的方法, 其中所述样品是肿瘤活检样品。
19. 一种治疗黑素瘤患者的方法, 所述方法包括:
- I. 评价得自患者的样品中测得的 MGMT 蛋白质的水平或酶活性, 并将所述水平或酶活性与正常淋巴细胞中 MGMT 蛋白质的水平或酶活性相比, 归为低度、中度或高度; 和
- II. 如果患者 MGMT 蛋白质的水平或酶活性与正常淋巴细胞中 MGMT 蛋白质的水平或酶活性相比归为低度或中度, 根据以下方案之一给予患者替莫唑胺:
- i. 在 21 天的周期内给药 14 天, 每天给予 100 mg/m<sup>2</sup>; 或者
- ii. 在 14 天的周期内给药 7 天, 每天给予 150 mg/m<sup>2</sup>; 或者

iii. 在 28 天的周期内给药 21 天，每天给予 100 mg/m<sup>2</sup>。

20. 一种治疗黑素瘤患者的方法，所述方法包括：

I. 评价得自患者的样品中 MGMT 基因的甲基化水平，并将所述甲基化水平与正常淋巴细胞中 MGMT 基因的甲基化水平相比，归为低度、中度或高度；和

II. 如果患者 MGMT 基因的甲基化水平与正常淋巴细胞中 MGMT 基因的甲基化水平相比归为中度或高度，根据以下方案之一给予患者替莫唑胺：

- i. 在 21 天的周期内给药 14 天，每天给予 100 mg/m<sup>2</sup>；或者
- ii. 在 14 天的周期内给药 7 天，每天给予 150 mg/m<sup>2</sup>；或者
- iii. 在 28 天的周期内给药 21 天，每天给予 100 mg/m<sup>2</sup>。

21. 一种治疗肺癌患者的方法，所述方法包括，如果用 MSP，在得自患者的样品中检测到了 MGMT 基因的甲基化，根据以下方案之一给予患者替莫唑胺：

- I. 在 21 天的周期内给药 14 天，每天给予 100 mg/m<sup>2</sup>；或者
- II. 在 14 天的周期内给药 7 天，每天给予 150 mg/m<sup>2</sup>；或者
- III. 在 28 天的周期内给药 21 天，每天给予 100 mg/m<sup>2</sup>。

22. 一种治疗肺癌患者的方法，所述方法包括：

I. 用 MSP，评价得自患者的样品中，MGMT 基因是否甲基化；  
和

II. 如果在样品中检测到了 MGMT 基因的甲基化，根据以下方案之一给予患者替莫唑胺：

- i. 在 21 天的周期内给药 14 天，每天给予 100 mg/m<sup>2</sup>；或者
- ii. 在 14 天的周期内给药 7 天，每天给予 150 mg/m<sup>2</sup>；或者
- iii. 在 28 天的周期内给药 21 天，每天给予 100 mg/m<sup>2</sup>。

23. 权利要求 12 的方法，其中所述样品是肿瘤活检样品。

24. 一种治疗肺癌患者的方法，所述方法包括，如果用 Western 印迹免疫测定法、免疫组织化学方法或 MGMT 蛋白质的酶试验法，



在得自患者的样品中未检测到 MGMT 蛋白质，根据以下方案之一给予患者替莫唑胺：

- i. 在 21 天的周期内给药 14 天，每天给予  $100 \text{ mg/m}^2$ ；或者
- ii. 在 14 天的周期内给药 7 天，每天给予  $150 \text{ mg/m}^2$ ；或者
- iii. 在 28 天的周期内给药 21 天，每天给予  $100 \text{ mg/m}^2$ 。

25. 一种治疗肺癌患者的方法，所述方法包括：

I. 进行 Western 印迹试验、免疫组织化学试验或酶试验，以检测得自患者的样品中是否存在 MGMT 蛋白质；和

II. 如果在样品中未检测到 MGMT 蛋白质，根据以下方案之一给予患者替莫唑胺：

- i. 在 21 天的周期内给药 14 天，每天给予  $100 \text{ mg/m}^2$ ；或者
- ii. 在 14 天的周期内给药 7 天，每天给予  $150 \text{ mg/m}^2$ ；或者
- iii. 在 28 天的周期内给药 21 天，每天给予  $100 \text{ mg/m}^2$ 。

26. 权利要求 5 的方法，其中所述样品是肿瘤活检样品。

27. 一种治疗肺癌患者的方法，所述方法包括：如果得自患者的样品中检测到的 MGMT 蛋白质的水平或酶活性与正常淋巴细胞中 MGMT 蛋白质的水平或酶活性相比，为低度或中度，则根据以下三种方案的其中一种给予患者替莫唑胺：

- i. 在 21 天的周期内给药 14 天，每天给予  $100 \text{ mg/m}^2$ ；或者
- ii. 在 14 天的周期内给药 7 天，每天给予  $150 \text{ mg/m}^2$ ；或者
- iii. 在 28 天的周期内给药 21 天，每天给予  $100 \text{ mg/m}^2$ 。

28. 权利要求 17 的方法，其中所述样品是肿瘤活检样品。

29. 一种治疗肺癌患者的方法，所述方法包括：

I. 评价得自患者的样品中 MGMT 蛋白质的水平或酶活性，并将所述水平或酶活性与正常淋巴细胞中 MGMT 蛋白质的水平或酶活性相比，归为低度、中度或高度；和

II. 如果患者 MGMT 蛋白质的水平或酶活性与正常淋巴细胞中 MGMT 蛋白质的水平或酶活性相比归为低度或中度，根据以下方案

之一给予患者替莫唑胺:

- i. 在 21 天的周期内给药 14 天, 每天给予 100 mg/m<sup>2</sup>; 或者
- ii. 在 14 天的周期内给药 7 天, 每天给予 150 mg/m<sup>2</sup>; 或者
- iii. 在 28 天的周期内给药 21 天, 每天给予 100 mg/m<sup>2</sup>。

30. 一种治疗肺癌患者的方法, 所述方法包括:

I. 评价得自患者的样品中 MGMT 基因的甲基化水平, 并将所述水平与正常淋巴细胞中 MGMT 基因的甲基化水平相比, 归为低度、中度或高度; 和

II. 如果患者 MGMT 蛋白质基因的甲基化水平与正常淋巴细胞中 MGMT 蛋白质基因的甲基化水平相比归为中度或高度, 根据以下方案之一给予患者替莫唑胺:

- i. 在 21 天的周期内给药 14 天, 每天给予 100 mg/m<sup>2</sup>; 或者
- ii. 在 14 天的周期内给药 7 天, 每天给予 150 mg/m<sup>2</sup>; 或者
- iii. 在 28 天的周期内给药 21 天, 每天给予 100 mg/m<sup>2</sup>。

31. 一种治疗淋巴瘤患者的方法, 所述方法包括, 如果用 MSP, 在得自患者的样品中检测到了 MGMT 基因的甲基化, 根据以下方案之一给予患者替莫唑胺:

- I. 在 21 天的周期内给药 14 天, 每天给予 100 mg/m<sup>2</sup>; 或者
- II. 在 14 天的周期内给药 7 天, 每天给予 150 mg/m<sup>2</sup>; 或者
- III. 在 28 天的周期内给药 21 天, 每天给予 100 mg/m<sup>2</sup>。

32. 一种治疗淋巴瘤患者的方法, 所述方法包括:

I. 用 MSP, 评价得自患者的样品中, MGMT 基因是否甲基化;  
和

II. 如果在样品中检测到了 MGMT 基因的甲基化, 根据以下方案之一给予患者替莫唑胺:

- i. 在 21 天的周期内给药 14 天, 每天给予 100 mg/m<sup>2</sup>; 或者
- ii. 在 14 天的周期内给药 7 天, 每天给予 150 mg/m<sup>2</sup>; 或者
- iii. 在 28 天的周期内给药 21 天, 每天给予 100 mg/m<sup>2</sup>。

33. 权利要求 12 的方法，其中所述样品是肿瘤活检样品。

34. 一种治疗淋巴瘤患者的方法，所述方法包括，如果用 Western 印迹免疫测定法、免疫组织化学方法或 MGMT 蛋白质的酶试验法，在得自患者的样品中未检测到 MGMT 蛋白质，根据以下方案之一给予患者替莫唑胺：

- i. 在 21 天的周期内给药 14 天，每天给予  $100 \text{ mg/m}^2$ ；或者
- ii. 在 14 天的周期内给药 7 天，每天给予  $150 \text{ mg/m}^2$ ；或者
- iii. 在 28 天的周期内给药 21 天，每天给予  $100 \text{ mg/m}^2$ 。

35. 一种治疗淋巴瘤患者的方法，所述方法包括：

I. 进行 Western 印迹试验、免疫组织化学试验或酶试验，以检测得自患者的样品中是否存在 MGMT 蛋白质；和

II. 如果在样品中未检测到 MGMT 蛋白质，根据以下方案之一给予患者替莫唑胺：

- i. 在 21 天的周期内给药 14 天，每天给予  $100 \text{ mg/m}^2$ ；或者
- ii. 在 14 天的周期内给药 7 天，每天给予  $150 \text{ mg/m}^2$ ；或者
- iii. 在 28 天的周期内给药 21 天，每天给予  $100 \text{ mg/m}^2$ 。

36. 权利要求 5 的方法，其中所述样品是肿瘤活检样品。

37. 一种治疗淋巴瘤患者的方法，所述方法包括：如果得自患者的样品中检测到的 MGMT 蛋白质的水平或酶活性与正常淋巴细胞中 MGMT 蛋白质的水平或酶活性相比，为低度或中度，则根据以下三种方案的其中一种给予患者替莫唑胺：

- i. 在 21 天的周期内给药 14 天，每天给予  $100 \text{ mg/m}^2$ ；或者
- ii. 在 14 天的周期内给药 7 天，每天给予  $150 \text{ mg/m}^2$ ；或者
- iii. 在 28 天的周期内给药 21 天，每天给予  $100 \text{ mg/m}^2$ 。

38. 权利要求 17 的方法，其中所述样品是肿瘤活检样品。

39. 一种治疗淋巴瘤患者的方法，所述方法包括：

I. 评价得自患者的样品中 MGMT 蛋白质的水平或酶活性，并将所述水平或酶活性与正常淋巴细胞中 MGMT 蛋白质的水平或酶活性

相比，归为低度、中度或高度；和

II. 如果患者 MGMT 蛋白质的水平或酶活性与正常淋巴细胞中 MGMT 蛋白质的水平或酶活性相比归为低度或中度，根据以下方案之一给予患者替莫唑胺：

- i. 在 21 天的周期内给药 14 天，每天给予 100 mg/m<sup>2</sup>；或者
- ii. 在 14 天的周期内给药 7 天，每天给予 150 mg/m<sup>2</sup>；或者
- iii. 在 28 天的周期内给药 21 天，每天给予 100 mg/m<sup>2</sup>。

40. 一种治疗淋巴瘤患者的方法，所述方法包括：

I. 评价得自患者的样品中 MGMT 基因的甲基化水平，并将所述水平与正常淋巴细胞中 MGMT 基因的甲基化水平相比，归为低度、中度或高度；和

II. 如果患者 MGMT 蛋白质基因的甲基化水平与正常淋巴细胞中 MGMT 蛋白质基因的甲基化水平相比归为中度或高度，根据以下方案之一给予患者替莫唑胺：

- i. 在 21 天的周期内给药 14 天，每天给予 100 mg/m<sup>2</sup>；或者
- ii. 在 14 天的周期内给药 7 天，每天给予 150 mg/m<sup>2</sup>；或者
- iii. 在 28 天的周期内给药 21 天，每天给予 100 mg/m<sup>2</sup>。

41. 一种治疗头颈癌患者的方法，所述方法包括，如果用 MSP，在得自患者的样品中检测到了 MGMT 基因的甲基化，根据以下方案之一给予患者替莫唑胺：

- I. 在 21 天的周期内给药 14 天，每天给予 100 mg/m<sup>2</sup>；或者
- II. 在 14 天的周期内给药 7 天，每天给予 150 mg/m<sup>2</sup>；或者
- III. 在 28 天的周期内给药 21 天，每天给予 100 mg/m<sup>2</sup>。

42. 一种治疗头颈癌患者的方法，所述方法包括：

I. 用 MSP，评价得自患者的样品中，MGMT 基因是否甲基化；  
和

II. 如果在样品中检测到了 MGMT 基因的甲基化，根据以下方案之一给予患者替莫唑胺：

- i. 在 21 天的周期内给药 14 天, 每天给予  $100 \text{ mg/m}^2$ ; 或者
- ii. 在 14 天的周期内给药 7 天, 每天给予  $150 \text{ mg/m}^2$ ; 或者
- iii. 在 28 天的周期内给药 21 天, 每天给予  $100 \text{ mg/m}^2$ 。

43. 权利要求 12 的方法, 其中所述样品是肿瘤活检样品。

44. 一种治疗头颈癌患者的方法, 所述方法包括, 如果用 Western 印迹免疫测定法、免疫组织化学方法或 MGMT 蛋白质的酶试验法, 在得自患者的样品中未检测到 MGMT 蛋白质, 根据以下方案之一给予患者替莫唑胺:

- i. 在 21 天的周期内给药 14 天, 每天给予  $100 \text{ mg/m}^2$ ; 或者
- ii. 在 14 天的周期内给药 7 天, 每天给予  $150 \text{ mg/m}^2$ ; 或者
- iii. 在 28 天的周期内给药 21 天, 每天给予  $100 \text{ mg/m}^2$ 。

45. 一种治疗头颈癌患者的方法, 所述方法包括:

I. 进行 Western 印迹试验、免疫组织化学试验或酶试验, 以检测得自患者的样品中是否存在 MGMT 蛋白质; 和

II. 如果在样品中未检测到 MGMT 蛋白质, 根据以下方案之一给予患者替莫唑胺:

- i. 在 21 天的周期内给药 14 天, 每天给予  $100 \text{ mg/m}^2$ ; 或者
- ii. 在 14 天的周期内给药 7 天, 每天给予  $150 \text{ mg/m}^2$ ; 或者
- iii. 在 28 天的周期内给药 21 天, 每天给予  $100 \text{ mg/m}^2$ 。

46. 权利要求 5 的方法, 其中所述样品是肿瘤活检样品。

47. 一种治疗头颈癌患者的方法, 所述方法包括: 如果得自患者的样品中检测到的 MGMT 蛋白质的水平或酶活性与正常淋巴细胞中 MGMT 蛋白质的水平或酶活性相比, 为低度或中度, 则根据以下三种方案的其中一种给予患者替莫唑胺:

- i. 在 21 天的周期内给药 14 天, 每天给予  $100 \text{ mg/m}^2$ ; 或者
- ii. 在 14 天的周期内给药 7 天, 每天给予  $150 \text{ mg/m}^2$ ; 或者
- iii. 在 28 天的周期内给药 21 天, 每天给予  $100 \text{ mg/m}^2$ 。

48. 权利要求 17 的方法, 其中所述样品是肿瘤活检样品。

49. 一种治疗头颈癌患者的方法，所述方法包括：

I. 评价得自患者的样品中 MGMT 蛋白质的水平或酶活性，并将所述水平或酶活性与正常淋巴细胞中 MGMT 蛋白质的水平或酶活性相比，归为低度、中度或高度；和

II. 如果患者 MGMT 蛋白质的水平或酶活性与正常淋巴细胞中 MGMT 蛋白质的水平或酶活性相比归为低度或中度，根据以下方案之一给予患者替莫唑胺：

- i. 在 21 天的周期内给药 14 天，每天给予  $100 \text{ mg/m}^2$ ；或者
- ii. 在 14 天的周期内给药 7 天，每天给予  $150 \text{ mg/m}^2$ ；或者
- iii. 在 28 天的周期内给药 21 天，每天给予  $100 \text{ mg/m}^2$ 。

50. 一种治疗头颈癌患者的方法，所述方法包括：

I. 评价得自患者的样品中 MGMT 基因的甲基化水平，并将所述水平与正常淋巴细胞中 MGMT 基因的甲基化水平相比，归为低度、中度或高度；和

II. 如果患者 MGMT 蛋白质基因的甲基化水平与正常淋巴细胞中 MGMT 蛋白质基因的甲基化水平相比归为中度或高度，根据以下方案之一给予患者替莫唑胺：

- i. 在 21 天的周期内给药 14 天，每天给予  $100 \text{ mg/m}^2$ ；或者
- ii. 在 14 天的周期内给药 7 天，每天给予  $150 \text{ mg/m}^2$ ；或者
- iii. 在 28 天的周期内给药 21 天，每天给予  $100 \text{ mg/m}^2$ 。

51. 一种治疗卵巢癌患者的方法，所述方法包括，如果用 MSP，在得自患者的样品中检测到了 MGMT 基因的甲基化，根据以下方案之一给予患者替莫唑胺：

- I. 在 21 天的周期内给药 14 天，每天给予  $100 \text{ mg/m}^2$ ；或者
- II. 在 14 天的周期内给药 7 天，每天给予  $150 \text{ mg/m}^2$ ；或者
- III. 在 28 天的周期内给药 21 天，每天给予  $100 \text{ mg/m}^2$ 。

52. 一种治疗卵巢癌患者的方法，所述方法包括：

- I. 用 MSP，评价得自患者的样品中，MGMT 基因是否甲基化；

和

II. 如果在样品中检测到了 MGMT 基因的甲基化, 根据以下方案之一给予患者替莫唑胺:

- i. 在 21 天的周期内给药 14 天, 每天给予  $100 \text{ mg/m}^2$ ; 或者
- ii. 在 14 天的周期内给药 7 天, 每天给予  $150 \text{ mg/m}^2$ ; 或者
- iii. 在 28 天的周期内给药 21 天, 每天给予  $100 \text{ mg/m}^2$ .

53. 权利要求 12 的方法, 其中所述样品是肿瘤活检样品。

54. 一种治疗卵巢癌患者的方法, 所述方法包括, 如果用 Western 印迹免疫测定法、免疫组织化学方法或 MGMT 蛋白质的酶试验法, 在得自患者的样品中未检测到 MGMT 蛋白质, 根据以下方案之一给予患者替莫唑胺:

- i. 在 21 天的周期内给药 14 天, 每天给予  $100 \text{ mg/m}^2$ ; 或者
- ii. 在 14 天的周期内给药 7 天, 每天给予  $150 \text{ mg/m}^2$ ; 或者
- iii. 在 28 天的周期内给药 21 天, 每天给予  $100 \text{ mg/m}^2$ .

55. 一种治疗卵巢癌患者的方法, 所述方法包括:

I. 进行 Western 印迹试验、免疫组织化学试验或酶试验, 以检测得自患者的样品中是否存在 MGMT 蛋白质; 和

II. 如果在样品中未检测到 MGMT 蛋白质, 根据以下方案之一给予患者替莫唑胺:

- i. 在 21 天的周期内给药 14 天, 每天给予  $100 \text{ mg/m}^2$ ; 或者
- ii. 在 14 天的周期内给药 7 天, 每天给予  $150 \text{ mg/m}^2$ ; 或者
- iii. 在 28 天的周期内给药 21 天, 每天给予  $100 \text{ mg/m}^2$ .

56. 权利要求 5 的方法, 其中所述样品是肿瘤活检样品。

57. 一种治疗卵巢癌患者的方法, 所述方法包括: 如果得自患者的样品中检测到的 MGMT 蛋白质的水平或酶活性与正常淋巴细胞中 MGMT 蛋白质的水平或酶活性相比, 为低度或中度, 则根据以下三种方案的其中一种给予患者替莫唑胺:

- i. 在 21 天的周期内给药 14 天, 每天给予  $100 \text{ mg/m}^2$ ; 或者

- ii. 在 14 天的周期内给药 7 天, 每天给予 150 mg/m<sup>2</sup>; 或者
- iii. 在 28 天的周期内给药 21 天, 每天给予 100 mg/m<sup>2</sup>。

58. 权利要求 17 的方法, 其中所述样品是肿瘤活检样品。

59. 一种治疗卵巢癌患者的方法, 所述方法包括:

I. 评价得自患者的样品中 MGMT 蛋白质的水平或酶活性, 并将所述水平或酶活性与正常淋巴细胞中 MGMT 蛋白质的水平或酶活性相比, 归为低度、中度或高度; 和

II. 如果患者 MGMT 蛋白质的水平或酶活性与正常淋巴细胞中 MGMT 蛋白质的水平或酶活性相比归为低度或中度, 根据以下方案之一给予患者替莫唑胺:

- i. 在 21 天的周期内给药 14 天, 每天给予 100 mg/m<sup>2</sup>; 或者
- ii. 在 14 天的周期内给药 7 天, 每天给予 150 mg/m<sup>2</sup>; 或者
- iii. 在 28 天的周期内给药 21 天, 每天给予 100 mg/m<sup>2</sup>。

60. 一种治疗卵巢癌患者的方法, 所述方法包括:

I. 评价得自患者的样品中 MGMT 基因的甲基化水平, 并将所述水平与正常淋巴细胞中 MGMT 基因的甲基化水平相比, 归为低度、中度或高度; 和

II. 如果患者 MGMT 蛋白质基因的甲基化水平与正常淋巴细胞中 MGMT 蛋白质基因的甲基化水平相比归为中度或高度, 根据以下方案之一给予患者替莫唑胺:

- i. 在 21 天的周期内给药 14 天, 每天给予 100 mg/m<sup>2</sup>; 或者
- ii. 在 14 天的周期内给药 7 天, 每天给予 150 mg/m<sup>2</sup>; 或者
- iii. 在 28 天的周期内给药 21 天, 每天给予 100 mg/m<sup>2</sup>。

61. 一种治疗结肠直肠癌和/或结肠癌患者的方法, 所述方法包括, 如果用 MSP, 在得自患者的样品中检测到了 MGMT 基因的甲基化, 根据以下方案之一给予患者替莫唑胺:

- I. 在 21 天的周期内给药 14 天, 每天给予 100 mg/m<sup>2</sup>; 或者
- II. 在 14 天的周期内给药 7 天, 每天给予 150 mg/m<sup>2</sup>; 或者



III. 在 28 天的周期内给药 21 天，每天给予 100 mg/m<sup>2</sup>。

62. 一种治疗结肠直肠癌和/或结肠癌患者的方法，所述方法包括：

I. 用 MSP，评价得自患者的样品中，MGMT 基因是否甲基化；  
和

II. 如果在样品中检测到了 MGMT 基因的甲基化，根据以下方案之一给予患者替莫唑胺：

- i. 在 21 天的周期内给药 14 天，每天给予 100 mg/m<sup>2</sup>；或者
- ii. 在 14 天的周期内给药 7 天，每天给予 150 mg/m<sup>2</sup>；或者
- iii. 在 28 天的周期内给药 21 天，每天给予 100 mg/m<sup>2</sup>。

63. 权利要求 12 的方法，其中所述样品是肿瘤活检样品。

64. 一种治疗结肠直肠癌和/或结肠癌患者的方法，所述方法包括，如果用 Western 印迹免疫测定法、免疫组织化学方法或 MGMT 蛋白质的酶试验法，在得自患者的样品中未检测到 MGMT 蛋白质，根据以下方案之一给予患者替莫唑胺：

- i. 在 21 天的周期内给药 14 天，每天给予 100 mg/m<sup>2</sup>；或者
- ii. 在 14 天的周期内给药 7 天，每天给予 150 mg/m<sup>2</sup>；或者
- iii. 在 28 天的周期内给药 21 天，每天给予 100 mg/m<sup>2</sup>。

65. 一种治疗结肠直肠癌和/或结肠癌患者的方法，所述方法包括：

I. 进行 Western 印迹试验、免疫组织化学试验或酶试验，以检测得自患者的样品中是否存在 MGMT 蛋白质；和

II. 如果在样品中未检测到 MGMT 蛋白质，根据以下方案之一给予患者替莫唑胺：

- i. 在 21 天的周期内给药 14 天，每天给予 100 mg/m<sup>2</sup>；或者
- ii. 在 14 天的周期内给药 7 天，每天给予 150 mg/m<sup>2</sup>；或者
- iii. 在 28 天的周期内给药 21 天，每天给予 100 mg/m<sup>2</sup>。

66. 权利要求 5 的方法，其中所述样品是肿瘤活检样品。

67. 一种治疗结肠直肠癌和/或结肠癌患者的方法，所述方法包括：如果得自患者的样品中检测到的 MGMT 蛋白质的水平或酶活性与正常淋巴细胞中 MGMT 蛋白质的水平或酶活性相比，为低度或中度，则根据以下三种方案的其中一种给予患者替莫唑胺：

- i. 在 21 天的周期内给药 14 天，每天给予  $100 \text{ mg/m}^2$ ；或者
- ii. 在 14 天的周期内给药 7 天，每天给予  $150 \text{ mg/m}^2$ ；或者
- iii. 在 28 天的周期内给药 21 天，每天给予  $100 \text{ mg/m}^2$ 。

68. 权利要求 17 的方法，其中所述样品是肿瘤活检样品。

69. 一种治疗结肠直肠癌和/或结肠癌患者的方法，所述方法包括：

I. 评价得自患者的样品中 MGMT 蛋白质的水平或酶活性，并将所述水平或酶活性与正常淋巴细胞中 MGMT 蛋白质的水平或酶活性相比，归为低度、中度或高度；和

II. 如果患者 MGMT 蛋白质的水平或酶活性与正常淋巴细胞中 MGMT 蛋白质的水平或酶活性相比归为低度或中度，根据以下方案之一给予患者替莫唑胺：

- i. 在 21 天的周期内给药 14 天，每天给予  $100 \text{ mg/m}^2$ ；或者
- ii. 在 14 天的周期内给药 7 天，每天给予  $150 \text{ mg/m}^2$ ；或者
- iii. 在 28 天的周期内给药 21 天，每天给予  $100 \text{ mg/m}^2$ 。

70. 一种治疗结肠直肠癌和/或结肠癌患者的方法，所述方法包括：

I. 评价得自患者的样品中 MGMT 基因的甲基化水平，并将所述水平与正常淋巴细胞中 MGMT 基因的甲基化水平相比，归为低度、中度或高度；和

II. 如果患者 MGMT 蛋白质基因的甲基化水平与正常淋巴细胞中 MGMT 蛋白质基因的甲基化水平相比归为中度或高度，根据以下方案之一给予患者替莫唑胺：

- i. 在 21 天的周期内给药 14 天，每天给予  $100 \text{ mg/m}^2$ ；或者

ii. 在 14 天的周期内给药 7 天, 每天给予  $150 \text{ mg/m}^2$ ; 或者

iii. 在 28 天的周期内给药 21 天, 每天给予  $100 \text{ mg/m}^2$ 。

71. 一种试剂盒, 所述试剂盒含有进行权利要求 1、11、21、31、41、51 或 61 中任一项的方法的试剂和说明。

72. 一种治疗神经胶质瘤患者的方法, 所述方法包括:

I. 评价得自患者的样品中 MGMT 蛋白质的酶活性, 基于和已知表达 MGMT 的细胞系的比较, 将酶活性归为低度、中度或高度; 和

II. 按以下方案给予患者替莫唑胺:

a) 如果步骤 I 中, 患者 MGMT 蛋白质的酶活性归为低度, 则根据以下两种方案之一:

i. 在 28 天的周期内给药 5 天, 每天给予  $150\text{-}200 \text{ mg/m}^2$ ; 或者

ii. 在 28 天的周期内给药 5 天, 每天给予  $250 \text{ mg/m}^2$ , 并联合给予生长因子; 或者

b) 如果患者 MGMT 蛋白质的酶活性归为中度, 则根据以下四种方案之一:

i. 在 28 天的周期内给药 14 天, 每天给予  $100 \text{ mg/m}^2$ ; 或者

ii. 在 28 天的周期内给药 5 天, 每天给予  $300 \text{ mg/m}^2$ , 并联合给予生长因子; 或者

iii. 在 28 天的周期内给药 21 天, 每天给予  $75 \text{ mg/m}^2$ ; 或者

iv. 在 56 天的周期内给药 42 天, 每天给予  $75 \text{ mg/m}^2$ ; 或者

c) 如果患者 MGMT 蛋白质的酶活性归为高度, 则根据以下方案之一:

i. 在 21 天的周期内给药 14 天, 每天给予  $100 \text{ mg/m}^2$ ; 或者

ii. 在 14 天的周期内给药 7 天, 每天给予  $150 \text{ mg/m}^2$ ; 或者

iii. 在 28 天的周期内给药 21 天, 每天给予  $100 \text{ mg/m}^2$ 。

73. 一种治疗黑素瘤患者的方法, 所述方法包括:

I. 评价得自患者的样品中 MGMT 蛋白质的酶活性, 基于和已知表达 MGMT 的细胞系的比较, 将酶活性归为低度、中度或高度; 和

II. 按以下方案给予患者替莫唑胺:

a) 如果步骤 I 中, 患者 MGMT 蛋白质的酶活性归为低度, 则根据以下两种方案之一:

i. 在 28 天的周期内给药 5 天, 每天给予 150-200 mg/m<sup>2</sup>; 或者

ii. 在 28 天的周期内给药 5 天, 每天给予 250 mg/m<sup>2</sup>, 并联合给予生长因子; 或者

b) 如果患者 MGMT 蛋白质的酶活性归为中度, 则根据以下四种方案之一:

i. 在 28 天的周期内给药 14 天, 每天给予 100 mg/m<sup>2</sup>; 或者

ii. 在 28 天的周期内给药 5 天, 每天给予 300 mg/m<sup>2</sup>, 并联合给予生长因子; 或者

iii. 在 28 天的周期内给药 21 天, 每天给予 75 mg/m<sup>2</sup>; 或者

iv. 在 56 天的周期内给药 42 天, 每天给予 75 mg/m<sup>2</sup>; 或者

c) 如果患者 MGMT 蛋白质的酶活性归为高度, 则根据以下方案之一:

i. 在 21 天的周期内给药 14 天, 每天给予 100 mg/m<sup>2</sup>; 或者

ii. 在 14 天的周期内给药 7 天, 每天给予 150 mg/m<sup>2</sup>; 或者

iii. 在 28 天的周期内给药 21 天, 每天给予 100 mg/m<sup>2</sup>。

74. 一种治疗肺癌患者的方法, 所述方法包括:

I. 评价得自患者的样品中 MGMT 蛋白质的酶活性, 基于和已知表达 MGMT 的细胞系的比较, 将酶活性归为低度、中度或高度; 和

II. 按以下方案给予患者替莫唑胺:

a) 如果步骤 I 中, 患者 MGMT 蛋白质的酶活性归为低度, 则根据以下两种方案之一:

i. 在 28 天的周期内给药 5 天, 每天给予 150-200 mg/m<sup>2</sup>; 或者

ii. 在 28 天的周期内给药 5 天, 每天给予 250 mg/m<sup>2</sup>, 并联合给予生长因子; 或者

b) 如果患者 MGMT 蛋白质的酶活性归为中度, 则根据以下四

种方案之一:

- i. 在 28 天的周期内给药 14 天, 每天给予  $100 \text{ mg/m}^2$ ; 或者
  - ii. 在 28 天的周期内给药 5 天, 每天给予  $300 \text{ mg/m}^2$ , 并联合给予生长因子; 或者
  - iii. 在 28 天的周期内给药 21 天, 每天给予  $75 \text{ mg/m}^2$ ; 或者
  - iv. 在 56 天的周期内给药 42 天, 每天给予  $75 \text{ mg/m}^2$ ; 或者
- c) 如果患者 MGMT 蛋白质的酶活性归为高度, 则根据以下方案之一:

方案之一:

- i. 在 21 天的周期内给药 14 天, 每天给予  $100 \text{ mg/m}^2$ ; 或者
- ii. 在 14 天的周期内给药 7 天, 每天给予  $150 \text{ mg/m}^2$ ; 或者
- iii. 在 28 天的周期内给药 21 天, 每天给予  $100 \text{ mg/m}^2$ .

75. 一种治疗淋巴瘤患者的方法, 所述方法包括:

I. 评价得自患者的样品中 MGMT 蛋白质的酶活性, 基于和已知表达 MGMT 的细胞系的比较, 将酶活性归为低度、中度或高度; 和

II. 按以下方案给予患者替莫唑胺:

a) 如果步骤 I 中, 患者 MGMT 蛋白质的酶活性归为低度, 则根据以下两种方案之一:

- i. 在 28 天的周期内给药 5 天, 每天给予  $150\text{-}200 \text{ mg/m}^2$ ; 或者
- ii. 在 28 天的周期内给药 5 天, 每天给予  $250 \text{ mg/m}^2$ , 并联合给予生长因子; 或者

b) 如果患者 MGMT 蛋白质的酶活性归为中度, 则根据以下四种方案之一:

- i. 在 28 天的周期内给药 14 天, 每天给予  $100 \text{ mg/m}^2$ ; 或者
  - ii. 在 28 天的周期内给药 5 天, 每天给予  $300 \text{ mg/m}^2$ , 并联合给予生长因子; 或者
  - iii. 在 28 天的周期内给药 21 天, 每天给予  $75 \text{ mg/m}^2$ ; 或者
  - iv. 在 56 天的周期内给药 42 天, 每天给予  $75 \text{ mg/m}^2$ ; 或者
- c) 如果患者 MGMT 蛋白质的酶活性归为高度, 则根据以下方

案之一:

- i. 在 21 天的周期内给药 14 天, 每天给予  $100 \text{ mg/m}^2$ ; 或者
- ii. 在 14 天的周期内给药 7 天, 每天给予  $150 \text{ mg/m}^2$ ; 或者
- iii. 在 28 天的周期内给药 21 天, 每天给予  $100 \text{ mg/m}^2$ 。

76. 一种治疗头颈癌患者的方法, 所述方法包括:

I. 评价得自患者的样品中 MGMT 蛋白质的酶活性, 基于和已知表达 MGMT 的细胞系的比较, 将酶活性归为低度、中度或高度; 和

II. 按以下方案给予患者替莫唑胺:

a) 如果步骤 I 中, 患者 MGMT 蛋白质的酶活性归为低度, 则根据以下两种方案之一:

- i. 在 28 天的周期内给药 5 天, 每天给予  $150\text{-}200 \text{ mg/m}^2$ ; 或者
- ii. 在 28 天的周期内给药 5 天, 每天给予  $250 \text{ mg/m}^2$ , 并联合给予生长因子; 或者

b) 如果患者 MGMT 蛋白质的酶活性归为中度, 则根据以下四种方案之一:

- i. 在 28 天的周期内给药 14 天, 每天给予  $100 \text{ mg/m}^2$ ; 或者
- ii. 在 28 天的周期内给药 5 天, 每天给予  $300 \text{ mg/m}^2$ , 并联合给予生长因子; 或者
- iii. 在 28 天的周期内给药 21 天, 每天给予  $75 \text{ mg/m}^2$ ; 或者
- iv. 在 56 天的周期内给药 42 天, 每天给予  $75 \text{ mg/m}^2$ ; 或者

c) 如果患者 MGMT 蛋白质的酶活性归为高度, 则根据以下方案之一:

- i. 在 21 天的周期内给药 14 天, 每天给予  $100 \text{ mg/m}^2$ ; 或者
- ii. 在 14 天的周期内给药 7 天, 每天给予  $150 \text{ mg/m}^2$ ; 或者
- iii. 在 28 天的周期内给药 21 天, 每天给予  $100 \text{ mg/m}^2$ 。

77. 一种治疗卵巢癌患者的方法, 所述方法包括:

I. 评价得自患者的样品中 MGMT 蛋白质的酶活性, 基于和已知表达 MGMT 的细胞系的比较, 将酶活性归为低度、中度或高度; 和

II. 按以下方案给予患者替莫唑胺:

a) 如果步骤 I 中, 患者 MGMT 蛋白质的酶活性归为低度, 则根据以下两种方案之一:

i. 在 28 天的周期内给药 5 天, 每天给予 150-200 mg/m<sup>2</sup>; 或者

ii. 在 28 天的周期内给药 5 天, 每天给予 250 mg/m<sup>2</sup>, 并联合给予生长因子; 或者

b) 如果患者 MGMT 蛋白质的酶活性归为中度, 则根据以下四种方案之一:

i. 在 28 天的周期内给药 14 天, 每天给予 100 mg/m<sup>2</sup>; 或者

ii. 在 28 天的周期内给药 5 天, 每天给予 300 mg/m<sup>2</sup>, 并联合给予生长因子; 或者

iii. 在 28 天的周期内给药 21 天, 每天给予 75 mg/m<sup>2</sup>; 或者

iv. 在 56 天的周期内给药 42 天, 每天给予 75 mg/m<sup>2</sup>; 或者

c) 如果患者 MGMT 蛋白质的酶活性归为高度, 则根据以下方案之一:

i. 在 21 天的周期内给药 14 天, 每天给予 100 mg/m<sup>2</sup>; 或者

ii. 在 14 天的周期内给药 7 天, 每天给予 150 mg/m<sup>2</sup>; 或者

iii. 在 28 天的周期内给药 21 天, 每天给予 100 mg/m<sup>2</sup>。

78. 一种治疗结肠直肠癌和/或结肠癌患者的方法, 所述方法包括:

I. 评价得自患者的样品中 MGMT 蛋白质的酶活性, 基于和已知表达 MGMT 的细胞系的比较, 将酶活性归为低度、中度或高度; 和

II. 按以下方案给予患者替莫唑胺:

a) 如果步骤 I 中, 患者 MGMT 蛋白质的酶活性归为低度, 则根据以下两种方案之一:

i. 在 28 天的周期内给药 5 天, 每天给予 150-200 mg/m<sup>2</sup>; 或者

ii. 在 28 天的周期内给药 5 天, 每天给予 250 mg/m<sup>2</sup>, 并联合给予生长因子; 或者

b) 如果患者 MGMT 蛋白质的酶活性归为中度, 则根据以下四种方案之一:

- i. 在 28 天的周期内给药 14 天, 每天给予  $100 \text{ mg/m}^2$ ; 或者
- ii. 在 28 天的周期内给药 5 天, 每天给予  $300 \text{ mg/m}^2$ , 并联合给予生长因子; 或者
- iii. 在 28 天的周期内给药 21 天, 每天给予  $75 \text{ mg/m}^2$ ; 或者
- iv. 在 56 天的周期内给药 42 天, 每天给予  $75 \text{ mg/m}^2$ ; 或者

c) 如果患者 MGMT 蛋白质的酶活性归为高度, 则根据以下方案之一:

- i. 在 21 天的周期内给药 14 天, 每天给予  $100 \text{ mg/m}^2$ ; 或者
- ii. 在 14 天的周期内给药 7 天, 每天给予  $150 \text{ mg/m}^2$ ; 或者
- iii. 在 28 天的周期内给药 21 天, 每天给予  $100 \text{ mg/m}^2$ 。

79. 一种试剂盒, 所述试剂盒含有进行权利要求 72-78 任一项的方法的试剂和说明。



## 基于患者 MGMT 水平来治疗癌症的替莫唑胺的改进给药方案

### 发明技术领域

本发明描述了新颖的方法和试剂盒，所述方法和试剂盒用于治疗患增生性疾病的患者，所述增生性疾病如癌症、肿瘤或转移性疾病。

### 发明背景技术

本文对参考文献的讨论或引用不应解释为承认这样的参考文献是本发明的先有技术。

文献 Stupp 等, *J. Clin. Onc.*, 20(5): 1375-1382 (2002)中报道，脑肿瘤占有恶性疾病的约 2%。但是，据称在美国每年有超过 17000 个脑肿瘤病例被诊断出来，有大约 13000 例相关的死亡，脑肿瘤的发病率为十万分之五。Stupp 等报道，成人中最常见的组织类型是 3 级间变性星形细胞瘤和 4 级多形性成胶质细胞瘤(“GBM”)。根据 Stupp 等的报道，恶性神经胶质瘤的标准处理方法包括通过外科切除术减少细胞，在可行的情况下再进行放射治疗 (RT)，放射治疗可以联合或不联合辅助的化学治疗。但是 Stupp 等报道，尽管有这样的多学科综合方法，GBM 患者的预后仍然很差。据报道，GBM 的中值存活率一般在 9 到 12 个月，2 年的存活率仅为 8% 到 12%。

亚硝基脲是用于治疗恶性脑肿瘤的主要的化学治疗药物。但是，它们仅显示出中度的抗肿瘤活性。尽管美国经常在处方中使用，但用单一药物卡莫司汀(BCNU)或洛莫司汀进行辅助的化学治疗，或者用丙卡巴肼、洛莫司汀和长春新碱联合给药进行辅助的化学治疗，其优点都从未得以确切的证明。

化学治疗的效果，即化学治疗在不产生致命的宿主毒性的情况

下消灭肿瘤细胞的能力，这依赖于药物的选择性。一类抗癌药物烷基化剂与 DNA 结合，从结构上破坏 DNA 螺旋结构，阻止 DNA 转录和翻译，从而导致细胞死亡。正常细胞中，烷基化剂的破坏作用可被细胞 DNA 修复酶，特别是 O<sup>6</sup>-甲基鸟嘌呤-DNA 甲基转移酶 (MGMT) 所修复，该酶也称作 O<sup>6</sup>-烷基鸟嘌呤-DNA-烷基转移酶 (AGAT)。肿瘤细胞中 MGMT 的水平不同，即使相同类型的肿瘤中也有不同。编码 MGMT 的基因通常不会变异或删除。相反，肿瘤细胞中 MGMT 的水平低是由于表遗传修饰造成的；MGMT 启动区被甲基化，从而抑制了 MGMT 基因的转录，并阻止 MGMT 的表达。

几条证据已经表明，甲基化在基因表达、细胞分化、肿瘤发生、X-染色体失活、基因组印迹和其它主要的生物学过程中起一定作用。真核细胞中，直接位于鸟苷 5'端的胞嘧啶残基的甲基化主要发生于胞嘧啶-鸟嘌呤 (CG) 贫乏区。相反，CpG 岛在正常细胞中仍未甲基化，除了在 X-染色体失活和亲本特异性印记期间，此处 5'调节区的甲基化可导致转录阻遏。肿瘤抑制基因的表达也可被正常未甲基化 CpG 从头的 DNA 甲基化取消。

编码 DNA 修复酶的基因过度甲基化可作为预测某些癌症治疗的临床反应的标记。某些化学治疗药物(包括例如烷基化剂)通过与 DNA 交联抑制细胞增生，导致细胞死亡。用这样的药物进行治疗的努力会受到阻碍，并且由于 DNA 修复酶除去交联结构而导致对该药物的耐药性产生。考虑到多数化疗药物的有害副作用，以及用于各种治疗的某些药物的无效性，理想的是，对于化疗药物治疗的临床反应进行预测。

美国专利 6,773,897 号公开了涉及细胞增生性疾病化学治疗的方法。特别是提供了“预测对于某些类型化疗药物的临床反应”的方法，所述药物包括特定的烷基化剂。该方法必须确定和比较需要治疗的患者与不需要治疗的患者编码 DNA 修复酶的核酸的甲基化状态。任何差异都被视作临床反应的“预示”。但是，对于“预示”结果不好的任

何患者，如何改善临床效果，该方法没有提供任何建议。

替莫唑胺是可购自 Schering Corp.的烷基化剂，在美国的商品名为 Temodar®，在欧洲的商品名为 Temodal®。口服的 Temodar®胶囊含有替莫唑胺，替莫唑胺是咪唑并四嗪衍生物。替莫唑胺的化学名是 3,4-二氢-3-甲基-4-氧代咪唑并[5,1-d]-不对称四嗪-8-羧酰胺(见美国专利 5,260,291 号)。认为替莫唑胺或其代谢物 MTIC 的细胞毒性主要是由于 DNA 的烷基化产生的。烷基化（甲基化）主要发生在鸟嘌呤的 O<sup>6</sup>位和 N<sup>7</sup>位。

Temodar®（替莫唑胺）胶囊目前在美国被用于治疗新诊断为患有多形性成胶质细胞瘤以及难治愈的间变性星形细胞瘤的成年患者，即使用包含亚硝基脲和丙卡巴肼的给药方案后经历了疾病的发展，首次复发的患者。Temodal®目前在欧洲被批准用于治疗患有例如多形性成胶质细胞瘤或间变性星形细胞瘤等恶性神经胶质瘤，并在标准治疗后复发或发展的患者。

尽管某些治疗方法对于某些增生性疾病的患者是有效的，但仍然非常需要其它的改善的治疗，特别是包括针对特殊表征患者的治疗。考虑到对于增生性疾病，特别是癌症，需要改善的治疗，因此，新颖的治疗方法会是本领域所欢迎的贡献。本发明恰恰提供了这样的治疗方法。

### 发明概述

本发明一个实施方案提供了治疗增生性疾病患者的方法，该方法包括基于得自患者的样品中 O<sup>6</sup>-甲基鸟嘌呤-DNA 甲基转移酶 (MGMT)基因的甲基化状态，给予患者标准剂量强度或增加剂量强度的替莫唑胺 (TMZ)。根据本发明实施方案的一种方式，如果得自患者的样品中编码 MGMT 的基因（例如启动区）被甲基化，则给予标准剂量强度的替莫唑胺；但是，如果编码 MGMT 的基因未被甲基化（即低于检测水平），则给予患者增加剂量强度的替莫唑胺。本

发明实施方案的一种方式包括：(1)对于得自患者的样品中的 MGMT 基因是否被甲基化进行评价；和 (2) (a) 如果检测到 MGMT 基因的甲基化，则给予患者标准剂量强度的替莫唑胺，(b) 如果未检测到 MGMT 基因的甲基化，则给予患者增加剂量强度的替莫唑胺。本发明实施方案的另一种方式包括：对于未检测到其编码 MGMT 的基因的甲基化的患者，给予增加的剂量强度。

本文所用术语替莫唑胺的“标准剂量强度”是指 5/28 的给药方案，给药计划为每天给予 150 - 200 mg/m<sup>2</sup> 的替莫唑胺，在 28 天的周期内给药 5 天，最大总剂量为 1000 mg/m<sup>2</sup>/4 周。该给药方案提供了 1.0 的“剂量强度”。

本文所用术语替莫唑胺的“增加剂量强度”是指提供一定剂量强度替莫唑胺的给药方案和/或给药计划，所述剂量强度为 1.4 - 4.2 倍，优选为 1.4 - 2.8 倍，更优选为 1.8 - 2.8 倍（与标准剂量强度相比）。提供这样的增加剂量强度的给药方案和给药计划的非限定性实例列于表 1 和表 2 中。

表 1 TMZ 给药方案和剂量强度

方 案 号	给药方案	给药计划	总剂量 (mg/m <sup>2</sup> / 4周)	剂量/ 周 (mg/m <sup>2</sup> )	剂量强度
1	5/28	150-200 mg/m <sup>2</sup> , 5天 /28天周期(200 mg)	1000	250	1
2	于5/28给予高剂 量250 mg/m <sup>2</sup>	250 mg/m <sup>2</sup> , 5/28, 同时给予生长因子	1250	312	1.2
3	14/28	100 mg/m <sup>2</sup> , 14天/ 28 天周期	1400	350	1.4
4	于5/28给予高剂 量300 mg/m <sup>2</sup>	300 mg/m <sup>2</sup> , 5/28, 同时给予生长因子	1500	375	1.5
5	21/28	75 mg/m <sup>2</sup> , 21天/ 28 天周期	1575	393.75	1.6
6	42/56	75 mg/m <sup>2</sup> , 6周/8周 周期	3150	393.75	1.6

7	21/28	85 mg/m <sup>2</sup> , 21天/ 28天周期	1785	446.25	1.8
8	于5/28给予高剂量350 mg/m <sup>2</sup>	350 mg/m <sup>2</sup> , 5/28, 同时给予生长因子	1750	437.5	1.8
9	给药14/停药7	100 mg/m <sup>2</sup> , 14天/ 21天周期	1400*	467	1.9
10	于5/28给予高剂量400 mg/m <sup>2</sup>	400 mg/m <sup>2</sup> , 5/28, 同时给予生长因子	2000	500	2.0
11	7/7	150 mg/m <sup>2</sup> , 7天/ 14天周期	2100	525	2.1
12	21/28	100 mg/m <sup>2</sup> , 21天/28天周期	2100	525	2.1
13	14/28	150 mg/m <sup>2</sup> , 14天/ 28天周期	2100	525	2.1
14	持续给药	75 mg/m <sup>2</sup> , 每天	2100	525	2.1
15	于5/28给予高剂量450 mg/m <sup>2</sup>	450 mg/m <sup>2</sup> , 5/28, 同时给予生长因子	2250	562.5	2.25
16	给药14/停药7	150 mg/m <sup>2</sup> , 14天/ 21天周期	2100*	700	2.8
17	持续给药	100 mg/m <sup>2</sup> , 每天	2800	700	2.8

\* 表示3周的周期内的总剂量

根据本发明的该实施方案, 当未检测到MGMT基因的甲基化时, 优选给药方案和/或给药计划所提供的剂量强度至少为标准剂量强度的1.6倍, 或至少为标准剂量强度的1.8倍; 这样的情况下, 更优选剂量强度至少为标准剂量强度的2.0倍。供选的实施方法中, 当未检测到MGMT基因的甲基化时, 优选9号、11号或12号的给药方案。

本领域技术人员可理解, 如果编码MGMT的基因未被甲基化, 则MGMT蛋白被表达并且可被检测(例如通过Western印迹法, 免疫组织化学方法或MGMT活性的酶试验法等), 如下文详述, 或者通过针对MGMT mRNA水平的Northern印迹法(见例如D'Atri等, *Journal of Pharmacological Exp. Ther.*, 294:664-671 (2000))或针对MGMT mRNA的RT-PCR法(见例如Patel等, *Mol. Cell Biol.*,

17(10):5813-5822 (1997); Watts 等, *Mol. Cell. Biol.*, 17(9):5612-5619 (1997)。因此, 根据本发明可选的实施方案, 对患者样品中是否存在 MGMT 蛋白质进行评价。基于患者样品中是否存在 MGMT 蛋白质, 对患者给予标准剂量强度或增加剂量强度。根据本发明这种方式, 如果检测到 MGMT 蛋白质, 优选表 1 中所示的给药方案和/或给药计划提供的剂量强度至少为标准剂量强度的 1.6 倍, 或至少为标准剂量强度的 1.8 倍; 在这样的情况下, 更优选剂量强度至少为标准剂量强度的 2.0 倍。供选的实施方案中, 当检测到 MGMT 时, 优选 9 号、11 号或 12 号的给药方案。

本发明另一实施方案提供了治疗增生性疾病患者的方法, 包括基于得自患者的样品中 MGMT 基因甲基化的程度或水平, 指定患者使用和/或对患者给予替莫唑胺的给药方案。根据本发明实施方案的一种方式, 通过测定得自患者的样品中 MGMT 蛋白的水平, 评价 MGMT 基因的甲基化水平。所述水平分为“低度”、“中度”或“高度”, 根据以下计划 1 中提出的计划, 用表 2 中提供的给药方案之一治疗患者。

表 2 TMZ 给药方案和剂量强度

方案号	给药方案	给药计划	总剂量 (mg/m <sup>2</sup> / 4周)	剂量/ 周 (mg/m <sup>2</sup> )	剂量强度
1	5/28	150-200 mg/m <sup>2</sup> , 5 天/28天周期(200 mg)	1000	250	1
2	于 5/28 给予高 剂 量 250 mg/m <sup>2</sup>	250 mg/m <sup>2</sup> , 5/28, 同时给予生长因 子	1250	312	1.2
3	14/28	100 mg/m <sup>2</sup> , 14天/ 28天周期	1400	350	1.4
4	于 5/28 给予高 剂 量 300 mg/m <sup>2</sup>	300 mg/m <sup>2</sup> , 5/28, 同时给予生长因 子	1500	375	1.5

5	21/28	75 mg/m <sup>2</sup> , 21天/ 28天周期	1575	393.75	1.6
6	42/56	75 mg/m <sup>2</sup> , 6周/8 周周期	3150	393.75	1.6
7	21/28	85 mg/m <sup>2</sup> , 21天/ 28天周期	1785	446.25	1.8
8	于5/28给予高 剂 量 350 mg/m <sup>2</sup>	350 mg/m <sup>2</sup> , 5/28, 同时给予生长因 子	1750	437.5	1.8
9	给药14/停药7	100 mg/m <sup>2</sup> , 14天/ 21天周期	1400*	467	1.9
10	于5/28给予高 剂 量 400 mg/m <sup>2</sup>	400 mg/m <sup>2</sup> , 5/28, 同时给予生长因 子	2000	500	2.0
11	7/7	150 mg/m <sup>2</sup> , 7天/ 14天周期	2100	525	2.1
12	21/28	100 mg/m <sup>2</sup> , 21天 /28天周期	2100	525	2.1
13	14/28	150 mg/m <sup>2</sup> , 14天/ 28天周期	2100	525	2.1
14	持续给药	75 mg/m <sup>2</sup> , 每天	2100	525	2.1
15	于5/28给予高 剂 量 450 mg/m <sup>2</sup>	450 mg/m <sup>2</sup> , 5/28, 同时给予生长因 子	2250	562.5	2.25
16	给药14/停药7	150 mg/m <sup>2</sup> , 14天/ 21天周期	2100*	700	2.8
17	持续给药	100 mg/m <sup>2</sup> , 每天	2800	700	2.8
18	于7/7给予高剂 量 250 mg/m <sup>2</sup>	250 mg/m <sup>2</sup> , 使用 7/7, 同时给予生 长因子	3500	875	3.5
19	于7/7给予高剂 量300 mg/m <sup>2</sup>	300 mg/m <sup>2</sup> , 使用 7/7, 同时给予生 长因子	4200	1050	4.2

\* 表示3周的周期内的总剂量

## 计划 I

方案号	剂量强度	病人MGMT蛋白质水平		
		低	中	高
1	1	+		
2	1.2	+		
3	1.4		+	
4	1.5		+	
5	1.6		+	
6	1.6		+	
7	1.8			+
8	1.8			+
9	1.9			+
10	2.0			+
11	2.1			+
12	2.1			+
13	2.1			+
14	2.1			+
15	2.25			+
16	2.8			+
17	2.8			+
18	3.5			+
19	4.2			+

得自患者的细胞样品中 MGMT 蛋白的程度或水平可通过各种方法中的任一种评价。根据本发明实施方案的一种方式，例如通过使用 MGMT 特异性抗体的 Western 印迹法，测定 MGMT 蛋白质，以评价患者的细胞所表达的 MGMT 蛋白质的水平。将该水平与已知的表达 MGMT 的正常淋巴细胞所表达的水平进行比较。患者 MGMT 蛋白质水平分类如下：低度 = 正常淋巴细胞所表达的 MGMT 水平的 0-30%；中度 = 正常淋巴细胞所表达的 MGMT 水平的 31% - 70%；高度 = 正常淋巴细胞所表达的 MGMT 水平的 71% - 300%或更高。根据该实施方案，当患者的 MGMT 蛋白质水平高时，优选 9 号、11 号



或 12 号方案。

根据该实施方案的另一方式，用免疫组织化学方法对规定数量的患者细胞进行 MGMT 蛋白质的测定，例如采用 MGMT 特异性的标记抗体进行测定，并将测得的水平与同样规定数量的已知表达 MGMT 的正常淋巴细胞所表达的水平进行比较，从而评价患者细胞所表达的 MGMT 蛋白质的水平。患者 MGMT 水平分类如下：低度 = 正常淋巴细胞所表达的 MGMT 水平的 0-30%；中度 = 正常淋巴细胞所表达的 MGMT 水平的 31% - 70%；高度 = 正常淋巴细胞所表达的 MGMT 水平的 71% - 300%或更高。根据该实施方案，当患者的 MGMT 蛋白质水平高时，优选 9 号、11 号或 12 号方案。

根据该实施方案的又一方式，通过患者样品细胞表达的 MGMT 的酶试验评价 MGMT 的水平。例如，使蛋白质从患者样品中细胞的溶解产物中免疫沉淀出来，对酶活性，也就是使 DNA 的 O<sup>6</sup> 或 N<sup>7</sup> 鸟嘌呤位置甲基化的能力进行评价，并将此酶活性与已知表达 MGMT 的正常淋巴细胞的酶活性进行比较。患者 MGMT 水平分类如下：低度 = 正常淋巴细胞 MGMT 酶活性的 0-30%；中度 = 正常淋巴细胞 MGMT 酶活性的 31% - 70%；高度 = 正常淋巴细胞 MGMT 酶活性的 71% - 300%或更高。根据该实施方案，当患者的 MGMT 酶活性水平高时，优选 9 号、11 号或 12 号方案。

供选的实施方式中，对 MGMT 的比活性进行评价，MGMT 的比活性基于和已知的表达 MGMT 的细胞系的比较，分类如下：低度 = 小于 20fmol/mg；中度 = 20-60fmol/mg；或高度 = 大于 60fmol/mg；LOX 细胞中 MGMT 的比活性为 6-9 fmol/mg，DAOY 细胞中 MGMT 的比活性为 60-100 fmol/mg，A375 细胞中 MGMT 的比活性为 80-150 fmol/mg。根据该供选的实施方式，当患者 MGMT 酶活性水平高时，优选 9 号、11 号或 12 号方案。

根据该实施方案的又一方式，通过定量测定编码 MGMT 的基因的甲基化，评价 MGMT 的甲基化水平。该方式使用被称作组合亚硫

酸氢盐限制分析法 (COBRA) (Xiong 等, *Nuc. Acids Res.*, 25:2532-2534(1997))的定量方法。将患者细胞中编码 MGMT 的基因的甲基化水平与已知表达 MGMT 的相等数量的正常淋巴细胞的基因甲基化水平进行比较。本领域技术人员可以理解, 表达 MGMT 的正常淋巴细胞 MGMT 基因的甲基化水平低; 相反, MGMT 基因甲基化水平高的细胞表达低水平的 MGMT 蛋白质(见例如 Costello 等, *J. Biol. Chem.*, 269(25):17228-17237 (1994); Qian 等, *Carcinogen*, 16(6):1385-1390 (1995))。患者的甲基化的 MGMT 基因的水平分类如下: 低度 = MGMT 基因的启动区内 0 - 20%的 CpG 被甲基化; 中度 = MGMT 基因的启动区内 21% - 50%的 CpG 被甲基化; 高度 = MGMT 基因的启动区内 51% - 100%的 CpG 被甲基化。一旦对 MGMT 基因甲基化的水平进行了评价, 并将患者分类后, 用计划 2 中提出的计划, 用表 2 中的给药方案治疗患者。

#### 计划 2

方案号	剂量强度	病人MGMT基因甲基化水平		
		低	中	高
1	1			+
2	1.2			+
3	1.4		+	
4	1.5		+	
5	1.6		+	
6	1.6		+	
7	1.8	+		
8	1.8	+		
9	1.9	+		
10	2.0	+		
11	2.1	+		
12	2.1	+		
13	2.1	+		
14	2.1	+		
15	2.25	+		

16	2.8	+		
17	2.8	+		
18	3.5	+		
19	4.2	+		

根据该实施方案的方式，当患者的 MGMT 基因的甲基化水平低时，优选 9 号、10 号或 11 号方案。

根据本实施方案的又一方式，对 MGMT 基因的甲基化水平进行定量评价，以确定样品中 MGMT 等位基因被甲基化的百分率。本发明该方式中所用的例证性的定量方法参见例如 2001 年 12 月 18 日授予的美国专利 6,331,393 号；Eads 等，Nuc. Acids Res., 28(8):e32 (2000)，这些文献以引用的方式并入本文。

患者 MGMT 甲基化水平被测定并分类如下：低度 = 0 - 20% 的细胞具有甲基化的 MGMT 基因；中度 = 21% - 50% 的细胞具有甲基化的 MGMT 基因；高度 = 51% - 100% 的细胞具有甲基化的 MGMT 基因。一旦对甲基化的水平进行了评价，并将患者分类后，用以上计划 2 中提出的计划，用表 2 中的给药方案治疗患者。

本发明另一供选的实施方式提供了用于治疗增生性疾病患者的改善的方法，包括根据以上表 1 中的方案 3-16，给予患者一定剂量强度的替莫唑胺，所述剂量强度为标准剂量强度的 1.4 - 2.8 倍。

本文所用的“治疗”是指缓和或减轻哺乳动物，例如人的细胞增生性疾病。

本文所述的细胞增生性疾病可以是肿瘤。这样的肿瘤是良性的或者是恶性的。术语“肿瘤”是指细胞新的异常生长或者比正常细胞复制更快的异常细胞的生长。肿瘤产生结构不清的团块（瘤），可能是良性的或是恶性的。术语“良性”是指非癌的肿瘤，例如肿瘤细胞不侵害周围组织，也不转移至更远位置。术语“恶性”是指癌性、转移性的肿瘤，该肿瘤侵害相邻组织，或不再处于正常的细胞增长控制之下。优选的实施方式中，本发明的方法和试剂盒用于治疗增生性疾病，所述增生性疾病包括但不限于：黑素瘤、神经胶质瘤、前列腺

增生性疾病、肺癌、乳腺癌、卵巢增生性疾病、睾丸癌、肝增生性疾病、肾增生性疾病、脾脏增生性疾病、膀胱增生性疾病、结肠直肠癌和/或结肠癌、头颈增生性疾病、癌、肉瘤、淋巴瘤、白血病或蕈样霉菌病。更优选的实施方案中，本发明的方法和试剂盒用于治疗黑素瘤、神经胶质瘤、肺癌、淋巴瘤、结肠直肠癌和/或结肠癌、头颈增生性疾病或卵巢癌。

本文所用的得自患者的“样品”可以是以下样品或者是由以下分离而得的样品：肿瘤组织、脑组织、脑脊髓液、血液、血浆、血清、淋巴、淋巴结、脾、肝、骨髓或者含有 MGMT 蛋白质或含有 MGMT 基因的核酸的任何其它生物样本。

本发明还提供了用于治疗增生性疾病患者的试剂盒。所述试剂盒包含：（1）本发明方法中所用的试剂；和（2）进行本文所述方法的说明。该试剂盒可进一步包含替莫唑胺。

本领域技术人员可理解，本发明的用替莫唑胺治疗增生性疾病患者的新颖的方法和试剂盒可以用作单一疗法，或者可以与放射疗法和/或其它细胞毒性药物和/或细胞生长抑制剂或激素药物和/或其它辅助疗法联合使用。

#### 附图简单说明

图 1 表示 4 天的 TMZ 治疗周期后 DAOY 人类神经胶质瘤细胞集落（一种高 MGMT 水平细胞系）的数量，根据以下两种不同的给药计划之一给予 TMZ：(i)连续的每日给药(第 1-4 天)；或(ii)单脉冲给药(第 1 天)。

图 2 表示 4 天的 TMZ 治疗周期后 A375 人类黑素瘤细胞集落（一种高 MGMT 水平细胞系）的数量，根据以下两种不同的给药计划之一给予 TMZ：(i)连续的每日给药(第 1-4 天)；或(ii)单脉冲给药(第 1 天)。

图 3A 表示 4 天的 TMZ 治疗周期后 LOX 人类黑素瘤细胞集落（一

种低 MGMT 水平细胞系)的数量,根据以下两种不同的给药计划之一给予 TMZ: (i)连续的每日给药(第 1-4 天);或(ii)单脉冲给药(第 1 天)。

图 3B 表示 8 天的 TMZ 治疗周期后 LOX 人类黑素瘤细胞集落(一种低 MGMT 水平细胞系)的数量,根据以下三种不同的给药计划之一给予 TMZ: (i)连续的每日给药(第 1-8 天);(ii)连续给药 2 天(第 1-2 天);或(ii)间歇性地给药 2 天(第 1 天、第 5 天)。

图 4A 表示 TMZ 治疗后, A375 人类黑素瘤细胞(一种高 MGMT 水平细胞系)中 MGMT 酶活性的水平。

图 4B 表示 TMZ 治疗后, A375 人类黑素瘤细胞(一种高 MGMT 水平细胞系)中 MGMT 蛋白质的水平。泳道 1-4 反映 TMZ 治疗 72 小时后制备的细胞溶解产物。泳道 5-8 反映 TMZ 治疗 72 小时后,再经过没有 TMZ 治疗的 72 小时,然后制备的细胞溶解产物。

图 5A 表示连续 2 个 15 天的连续性每日给药的 TMZ 治疗周期(第 1-15 天(第一周期),第 16-30 天(第二周期))之后, DAOY 人类神经胶质瘤异种移植肿瘤(一种高 MGMT 水平细胞系)的平均肿瘤生长曲线;所给予的 TMZ 的总剂量为 0、360、540 或 810mg/kg(mpk)。

图 5B 表示连续 2 个 15 天的连续给药 5 天的 TMZ 治疗周期(第 1-5 天(第一周期),第 16-20 天(第二周期))之后, DAOY 人类神经胶质瘤异种移植肿瘤(一种高 MGMT 水平细胞系)的平均肿瘤生长曲线;所给予的 TMZ 的总剂量为 0、360、540 或 810mpk。

图 5C 表示连续 2 个 15 天的间歇性给药 5 天的 TMZ 治疗周期(第 1、4、7、10、13 天(第一周期),第 16、19、22、25、28 天(第二周期))之后, DAOY 人类神经胶质瘤异种移植肿瘤(一种高 MGMT 水平细胞系)的平均肿瘤生长曲线;所给予的 TMZ 的总剂量为 0、360、540 或 810mpk。

图 6 表示在 15 天的 TMZ 治疗周期之后的第 15 天, A375 人类黑素瘤异种移植肿瘤(一种高 MGMT 水平细胞系)的单个肿瘤体积,

其中，根据以下三种不同的给药计划之一给予 TMZ: (i)连续的每日给药(第 1-15 天); (ii)连续给药 5 天(第 1-5 天); 或(ii)间歇性地给药 5 天(第 1、4、7、10、13 天); 所给予的 TMZ 的总剂量为 0、180、270 或 405mpk。

图 7 表示在 12 天的 TMZ 治疗周期之后的第 18 天，LOX 人类黑色素瘤异种移植肿瘤(一种低 MGMT 水平细胞系)的单个肿瘤体积，其中，根据以下两种不同的给药计划之一给予 TMZ: (i)连续的每日给药(第 1-12 天); 或(ii)连续给药 4 天(第 1-4 天); 所给予的 TMZ 的总剂量为 0、36、72 或 144mpk。

图 8 表示 TMZ 连续治疗 5 天后(给予的 TMZ 的总剂量为 0 或 405mpk)，单个 DAOY 人类神经胶质瘤异种移植肿瘤(一种高 MGMT 水平细胞系)中 MGMT 酶活性的水平; 以及由细胞培养获得的未治疗的 DAOY 人类神经胶质瘤细胞中 MGMT 酶活性的水平。C1、C2 和 C3 表示分离自用载体治疗的三只不同的小鼠的肿瘤，而 T1、T2、T3 表示分离自用 TMZ 治疗的另三只不同的小鼠的肿瘤。

图 9 表示 4 天的 TMZ 治疗周期之后，DAOY 人类神经胶质瘤细胞集落(一种高 MGMT 水平细胞系)的数量。

图 10 表示 4 天的 TMZ 治疗周期之后，A375 人类黑色素瘤细胞集落(一种高 MGMT 水平细胞系)的数量。

图 11 表示 4 天的 TMZ 治疗周期之后，LOX 人类黑色素瘤细胞集落(一种低 MGMT 水平细胞系)的数量。

图 12 表示 8 天的 TMZ 治疗周期之后，LOX 人类黑色素瘤细胞集落(一种低 MGMT 水平细胞系)的数量。

图 13 表示 4 天的 TMZ 治疗周期之后，DAOY 人类神经胶质瘤细胞集落形成的抑制百分率。

图 14 表示 4 天的 TMZ 治疗周期之后，A375 人类黑色素瘤细胞集落形成的抑制百分率。

图 15 表示 4 天的 TMZ 治疗周期之后，LOX 人类黑色素瘤细胞集

落形成的抑制百分率。

图 16 表示 8 天的 TMZ 治疗周期之后，LOX 人类黑素瘤细胞集落形成的抑制百分率。

图 17 表示两个 15 天的 TMZ 治疗周期之后，DAOY 人类神经胶质瘤异种移植肿瘤（一种高 MGMT 水平细胞系）的肿瘤体积，剂量强度为 1、1.5 或 2.25。

图 18 表示 15 天的 TMZ 治疗周期之后，A375 人类黑素瘤异种移植肿瘤（一种高 MGMT 水平细胞系）的肿瘤体积，剂量强度为 1、1.5 或 2.25。

图 19 表示 12 天的 TMZ 治疗周期之后，LOX 人类黑素瘤异种移植肿瘤（一种低 MGMT 水平细胞系）的肿瘤体积，剂量强度为 1、2 或 4。

图 20 表示两个 15 天的 TMZ 治疗周期之后，DAOY 人类神经胶质瘤异种移植肿瘤的肿瘤生长抑制（%），剂量强度为 1、1.5 或 2.25。

图 21 表示 15 天的 TMZ 治疗周期之后，A375 人类黑素瘤异种移植肿瘤的肿瘤生长抑制（%），剂量强度为 1、1.5 或 2.25。

图 22 表示 12 天的 TMZ 治疗周期之后，DAOY 人类黑素瘤异种移植肿瘤的肿瘤生长抑制（%），剂量强度为 1、2 或 4。

### 发明详细描述

本发明提供了用于治疗增生性疾病患者的新颖的方法和试剂盒，包括基于得自患者的样品中 MGMT 基因的甲基化状态，给予患者标准剂量强度或更强的剂量强度。某些实施方案中，通过确定 MGMT 基因是否甲基化，以评价甲基化状态。某些其它的实施方案中，通过定量测定 MGMT 基因的甲基化水平，以评价甲基化状态。另一些其它的实施方案中，通过确定 MGMT 蛋白质是否被表达，或者通过测定 MGMT 蛋白质被表达的水平或通过测定患者样品中 MGMT 的酶活性，从而评价甲基化状态。

本发明一个实施方案提供了治疗增生性疾病患者的方法，包括基于得自患者的样品中 O<sup>6</sup>-甲基鸟嘌呤-DNA 甲基转移酶(MGMT)基因的甲基化状态，给予患者标准剂量强度的或增加剂量强度的替莫唑胺(TMZ)。根据本发明实施方案的一种方式，如果得自患者的样品中编码 MGMT 的基因(如启动区)被甲基化，则给予标准剂量强度的替莫唑胺；但是，如果编码 MGMT 的基因未被甲基化(即低于检测水平)，则给予患者增加剂量强度的替莫唑胺。本发明实施方案的一种方式包括：(1)对于得自患者的样品中的 MGMT 基因是否被甲基化进行评价；和(2)(a)如果检测到 MGMT 基因的甲基化，则给予患者标准剂量强度的替莫唑胺，或(b)如果未检测到 MGMT 基因的甲基化，则给予患者增加剂量强度的替莫唑胺。本发明实施方案的另一种方式包括：对于未检测到其编码 MGMT 的基因的甲基化的患者，给予增加的剂量强度。

本文所用术语替莫唑胺的“标准剂量强度”是指 5/28 的给药方案，给药计划为每天给予 150 - 200 mg/m<sup>2</sup>的替莫唑胺，在 28 天的周期内给药 5 天，最大总剂量为 1000 mg/m<sup>2</sup>/4 周。该给药方案提供了 1.0 的“剂量强度”。

本文所用术语替莫唑胺的“增加剂量强度”是指提供一定剂量强度替莫唑胺的给药方案和/或给药计划，所述剂量强度为 1.2 - 2.8 倍(与标准剂量强度相比)。提供这样的增加剂量强度的给药方案和给药计划的非限定性实例列于表 1 和表 2 中。

根据本发明的该实施方案，当未检测到 MGMT 基因的甲基化时，优选给药方案和/或给药计划所提供的剂量强度至少为标准剂量强度的 1.6 倍，或至少为标准剂量强度的 1.8 倍；这样的情况下，更优选剂量强度至少为标准剂量强度的 2.0 倍。供选的实施方式中，当未检测到 MGMT 基因的甲基化时，优选 9 号、11 号或 12 号的给药方案。

可用本领域技术人员已知的任何方法评价 MGMT 基因是否被甲基化。可用于检测基因或核酸甲基化的方法包括但不限于以下文献



所述的方法: Ahrendt 等, *J. Natl. Cancer Inst.*, 91:332-339 (1999); Belsinky 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 95:11891 -11896 (1998); Clark 等, *Nucleic Acids Res.*, 22:2990-2997 (1994); Herman 等, *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 93:9821-9826 (1996); Xiong 和 Laird, *Nucleic Acids Res.*, 25:2532-2534 (1997); Eads 等, *Nuc. Acids. Res.*, 28:e32 (2002); Cottrell 等, *Nucleic Acids Res.*, 32:1-8 (2004), 这里引用的所有参考文献均以引用的方式并入本文。

甲基化特异性 PCR(MSP; Herman 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93(18):9821 -9826 (1996); Esteller 等, *Cancer Res.*, 59:793-797 (1999); 也可参见 1998 年 7 月 28 日授予的美国专利 5,786,146 号; 2000 年 1 月 25 日授予的美国专利 6,017,704 号; 2001 年 3 月 13 日授予的美国专利 6,200,756 号; 和 2001 年 7 月 24 日授予的美国专利 6,265,171 号; 2004 年 8 月 10 日授予的美国专利 6,773,897 号; 各参考文献的全部内容以引用的方式并入本文)可快速地评价 CpG 岛内几乎任何组 CpG 位置的甲基化状态, 且不依赖于甲基化敏感性限制酶的使用。该试验必须用亚硫酸氢钠对 DNA 进行最初的修饰, 将所有未甲基化的而非已甲基化的胞嘧啶转变成尿嘧啶, 然后用对于甲基化的 DNA 具有专属性(相对于未甲基化的 DNA 而言)的引物进行扩增。MSP 仅需要少量 DNA, 对于给定的 CpG 岛基因座的 0.1% 的甲基化等位基因敏感, 可用提取自石蜡包埋样品的 DNA 进行 MSP。之前的基于 PCR 的方法依赖于有差异的限制酶切割, 以区分甲基化 DNA 与未甲基化 DNA, MSP 消除了该方法固有的假阳性结果。MSP 方法很简单, 可用于少量的组织或很少的细胞。本领域技术人员可理解, 如果编码 MGMT 的基因未被甲基化, 则 MGMT 蛋白质被表达并且可以被检测(例如通过 Western 印迹法、免疫组织化学方法或 MGMT 活性的酶试验法等), 如下文的详细描述。因此, 根据本发明供选的实施方 案, 评价患者的样品中是否存在 MGMT 蛋白质。基于患者样品中是否存在 MGMT 蛋白质, 对患者给予标准剂量强度或增加剂量强度。

根据本发明所述不存在 (absence) 方式, 如果检测到 MGMT 蛋白质, 优选表 1 中所示的给药方案和/或给药计划提供的剂量强度至少为标准剂量强度的 1.6 倍, 或至少为标准剂量强度的 1.8 倍; 在这样的情况下, 更优选剂量强度至少为标准剂量强度的 2.0 倍。供选的实施方 案中, 当检测到 MGMT 时, 优选 9 号、11 号或 12 号的给药方案。

Li 等的美国专利 5,817,514 号中提供了本发明实施方案中用以测定患者样品中 MGMT 蛋白质水平的 Western 印迹试验法的例证性实例, 该专利全部的公开内容以引用的方式并入本文。Li 等描述了能够特异性结合天然的人类 MGMT 蛋白质或能够特异性结合具有烷基化的活性位点的人类 MGMT 蛋白质的单克隆抗体。美国专利 5,407,804 号中提供了本发明实施方案用于测定患者样品中 MGMT 蛋白质水平的免疫组织化学方法的例证性实例, 该专利的全部公开内容以引用的方式并入本文。公开的单克隆抗体能够特异性地结合单细胞制品 (免疫组织化学染色试验法) 中和细胞提取物 (免疫测定法) 中的 MGMT 蛋白质。描述了荧光读数和数字化细胞图像的联合使用, 这样的联合使用可以定量地测定患者样品和对照样品中 MGMT 的水平, 所述样品包括但不限于肿瘤活检样品。

可用于测定 MGMT 蛋白质酶活性的方法包括但不限于以下文献所述的方法: Myrnes 等, *Carcinogenesis*, 5:1061-1064 (1984); Futscher 等, *Cancer Comm.*, 1 : 65- 73 (1989); Kreklaw 等, *J. Pharmacol. Exper. Ther.*, 297(2): 524-530 (2001); 和 Nagel 等, *Anal. Biochem.*, 321(1):38-43 (2003), 所有公开的内容以引用的方式并入本文。

本发明另一实施方案提供了治疗增生性疾病患者的方法, 包括基于得自患者的样品中 MGMT 基因甲基化的程度或水平, 指定患者使用和/或对患者给予替莫唑胺的给药方案。根据本发明实施方案的一种方式, 通过测定得自患者的样品中 MGMT 蛋白的水平, 评价 MGMT 基因的甲基化水平。所述水平分为“低度”、“中度”或“高度”, 根据以上计划 1 中提出的计划, 用表 2 中提供的给药方案之一治疗

患者。

得自患者的细胞样品中 MGMT 蛋白质的程度或水平可通过各种方法中的任何方法评价(见上文)。

根据本发明实施方案的一种方式,通过测定 MGMT 蛋白质,评价患者细胞所表达的 MGMT 蛋白质的水平,例如,通过使用 MGMT 特异性抗体的 Western 印迹法进行测定,见例如 Li 等的美国专利 5,817,514 号(上述)关于用 Western 印迹法测定 MGMT 水平的描述。将该水平与已知的表达 MGMT 的正常淋巴细胞所表达的水平进行比较。患者 MGMT 蛋白质水平分类如下:低度 = 正常淋巴细胞所表达的 MGMT 水平的 0-30%;中 = 正常淋巴细胞所表达的 MGMT 水平的 31% - 70%;高 = 正常淋巴细胞所表达的 MGMT 水平的 71% - 300% 或更高。根据该实施方案,当患者的 MGMT 蛋白质水平高时,优选 9 号、11 号或 12 号方案。

根据该实施方案的另一方式,用免疫组织化学方法对规定数量的患者细胞进行 MGMT 蛋白质的测定,例如采用 MGMT 特异性的标记抗体进行测定,并将测得的水平与同样规定数量的已知表达 MGMT 的正常淋巴细胞所表达的水平进行比较,从而评价患者细胞所表达的 MGMT 蛋白质的水平(见例如 Yarosh 的美国专利 5,407,804 号关于有用的免疫组织化学定量测定的描述)。患者 MGMT 水平分类如下:低度 = 正常淋巴细胞所表达的 MGMT 水平的 0-30%;中度 = 正常淋巴细胞所表达的 MGMT 水平的 31% - 70%;高度 = 正常淋巴细胞所表达的 MGMT 水平的 71% - 300% 或更高。根据该实施方案,当患者的 MGMT 蛋白质水平高时,优选 9 号、11 号或 12 号方案。

根据该实施方案的又一方式,通过患者样品中细胞表达的 MGMT 的酶试验评价 MGMT 的水平。例如,使蛋白质从患者样品中细胞的溶解产物中免疫沉淀出来,对酶活性,也就是使 DNA 的 O<sup>6</sup> 或 N<sup>7</sup> 鸟嘌呤位置甲基化的能力进行评价,并将此酶活性与已知表达 MGMT 的正常淋巴细胞的酶活性进行比较(见上文关于对测定 MGMT 蛋白质

酶活性有用的方法的描述)。患者 MGMT 水平分类如下：低度 = 正常淋巴细胞 MGMT 酶活性的 0-30%；中度 = 正常淋巴细胞 MGMT 酶活性的 31% - 70%；高度 = 正常淋巴细胞 MGMT 酶活性的 71% - 300% 或更高。根据该实施方案，当患者的 MGMT 酶活性水平高时，优选 9 号、11 号或 12 号方案。

供选的实施案中，对 MGMT 的比活性进行评价，MGMT 的比活性基于和已知的表达 MGMT 的细胞系的比较，分类如下：低度 = 小于 20fmol/mg；中度 = 20-60fmol/mg；或高度 = 大于 60fmol/mg；LOX 细胞中 MGMT 的比活性为 6-9 fmol/mg，DAOY 细胞中 MGMT 的比活性为 60-100 fmol/mg，A375 细胞中 MGMT 的比活性为 80-150 fmol/mg。根据该供选的实施案，当患者 MGMT 酶活性水平高时，优选 9 号、11 号或 12 号方案。

根据该实施方案的又一方式，通过定量测定编码 MGMT 的基因的甲基化，评价 MGMT 的甲基化水平。该方式使用被称作 COBRA(Xiong 等, *Nuc. Acids Res.*, 25:2532-2534(1997))的定量方法。Eads 等, *Nuc. Acids Res.*, 28(8):e32 (2000); 美国专利 6,331,393 号的“甲基光 (methyl light)”方法也可用于该方式的定量测定。将患者细胞中编码 MGMT 的基因的甲基化水平与已知表达 MGMT 的相等数量的正常淋巴细胞的基因甲基化水平进行比较。本领域技术人员可以理解，表达 MGMT 的正常淋巴细胞 MGMT 基因的甲基化水平低；相反，MGMT 基因甲基化水平高的细胞表达低水平的 MGMT 蛋白质(见例如 Costello 等, *J. Biol. Chem.*, 269(25):17228-17237 (1994); Qian 等, *Carcinogen*, 16(6):1385-1390 (1995))。患者的甲基化的 MGMT 基因的水平分类如下：低度 = MGMT 基因的启动区内 0 - 20%的 CpG 被甲基化；中度 = MGMT 基因的启动区内 21% - 50%的 CpG 被甲基化；高度 = MGMT 基因的启动区内 51% - 100%的 CpG 被甲基化。一旦对 MGMT 基因甲基化的水平进行了评价，并将患者分类后，用上文计划 2 中提出的计划，用表 2 中的给药方案治疗患者。

根据该实施方案的方式,当患者 MGMT 基因的甲基化水平低时,优选 9 号、10 号或 11 号方案。

如上所述,可使用称为 COBRA (Xiong et al., *Nucleic Acids Res.*, 25(12):2532-2534 (1997))的定量方法以定量地测定少量基因组 DNA 中特定基因座的 DNA 甲基化水平。用限制酶消化,揭示亚硫酸氢钠处理的 DNA 的 PCR 产物的甲基化依赖性序列差异(Tano 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:686-690 (1990)描述了人类 MGMT 基因的分离及其序列)。,原始 DNA 样品中的甲基化水平由消化的 PCR 产物和未消化的 PCR 产物以线性定量方式相对于大范围的 DNA 甲基化水平的相对量表示。该方法可以可靠地应用于得自显微解剖的石蜡包埋组织样品的 DNA。因此,COBRA 结合了以下几个有效特征:易于使用、定量准确和与石蜡切片相容。

Watts 等, *Mol. Cell. Biol.*, 17(9):5612-5619 (1997)中描述了用以评价 MGMT mRNA 水平的 RT-PCR 试验的例证性实例。简言之,通过异硫氰酸胍的细胞溶解作用,再以 205,000 x g,通过 5.7 M CsCl 梯度离心 2.5 小时,从而分离全部的细胞 RNA。在 Beckman TL-100 分光光度计中测定 260nm 的吸收度,对 RNA 定量。将 40  $\mu$ l 反应混合物在 42 $^{\circ}$ C 下孵育 60 分钟,从而使所有细胞 RNA 反转录,所述反应混合物含有 200 ng RNA; 1 x PCR 缓冲液(10 mM Tris [pH 8.3], 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>); dATP、dCTP、dGTP 和 dTTP 各 1 mM; 200 pmol 随机六聚物、40 U Rnasin 和 24 U 禽类成髓细胞性白血病病毒反转录酶(Boehringer Mannheim, Indianapolis, Ind.)。然后在 99 $^{\circ}$ C 孵育 10 分钟,停止该反应。按以下方法进行 MGMT 特异性的 PCR: 向 20  $\mu$ l 反转录反应混合物中加入 80  $\mu$ l 扩增反应缓冲液(1 x PCR 缓冲液, 25 pmol MGMT 特异性引物和/或对照序列, 和 2 U Taq DNA 聚合酶),然后在 94 $^{\circ}$ C 5 分钟;接着进行 30 次以下的循环: 94 $^{\circ}$ C 1 分钟, 60 $^{\circ}$ C 15 秒及 72 $^{\circ}$ C 1 分钟; 72 $^{\circ}$ C 最终延伸 5 分钟;快速冷却至 4 $^{\circ}$ C。例如,可使用 MGMT 基因的外显子 4(nt 665 至 684)的上游引物序列。核苷

酸位置可得自 cDNA 序列(Tano 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:686-690 (1990))。可在同样的 cDNA 反应中使用对照引物序列(例如组蛋白 3.3 基因的引物)。为进行分析,各 PCR 产物的 10% 通过 3% 的琼脂糖凝胶分离,并通过溴乙锭染色观察。

D'Atri 等, Journal of Pharmacological Exp. Ther., 294:664-671 (2000)中描述了用以评价 MGMT mRNA 水平的 Northern 印迹法的例证性实例。简言之,用硫氰酸胍-苯酚-氯仿法提取所有的细胞 RNA(Chomczynski and Sacchi, Anal Biochem, 162(1):156-159 (1987))。接着,在含有甲醛的 1.2% 的琼脂糖凝胶上通过电泳法将样品组分进行分离,用溴乙锭将该凝胶染色后,通过观察证实 RNA 完整性。然后将 RNA 转移至尼龙膜(Genescreen Plus; New England Nuclear, Boston, MA),与  $^{32}\text{P}$ -标记的 MGMT 探针和对照探针(例如甘油醛-3 磷酸脱氢酶(GAPDH))在  $42^\circ\text{C}$  杂交 24 小时。例如,所述 MGMT 探针可以是在 Molt-4 细胞的 RNA 反转录之后得到的、聚合酶链反应衍生的 cDNA 探针(Lacal 等, J Pharmacol Exp Ther, 279(1):416-422 (1996))。在室温下用 0.1 x 标准柠檬酸盐水(10 mM 氯化钠, 1.5 mM 柠檬酸钠)清洗 30 分钟后,将印迹的膜于  $-80^\circ\text{C}$  下暴露于 X 射线胶片(Kodak, Rochester, NY)。可以用成像密度计 GS-670 (Bio-Rad, Richmond, CA)对印迹进行二维密度测定。

本发明另一供选的实施方案提供了用于治疗增生性疾病患者的改善的方法,包括按上述表 1 的方案 3-16,给予患者一定剂量强度的替莫唑胺,所述剂量强度与标准剂量强度相比为 1.4-2.8。

本发明还包括如上文所述给予替莫唑胺,并联合 PARP 抑制剂的方法。聚(ADP-核糖)聚合酶(PARP)在对于基因毒性应激的细胞反应中所起的作用方面,引人注目的证据是,促进了作为治疗药物、用以加强 DNA 破坏性抗癌治疗的抑制剂的开发。过去的二十年中,用结构活性关系(SAR)和晶体结构分析开发出了有效的 PARP 抑制剂。这些方法确定了对于有效的抑制剂-酶相互反应而言主要的所需

特征。所产生的 PARP 抑制剂的效果高达经典的苯甲酰胺类效果的 1000 倍。这些新颖的有效的抑制剂帮助确定了 PARP 抑制的治疗潜能。PARP 抑制剂可增加三类抗癌药物的抗肿瘤活性,其中包括替莫唑胺。给予 PARP 抑制剂可在按本文所述给予替莫唑胺之前、同时或之后。例证性的 PARP 抑制剂包括 CEP-6800 (Cephalon;描述于 Miknyoczki 等, *Mol Cancer Ther*, 2(4):371-382 (2003)); 3-氨基苯甲酰胺(也称作 3-AB; Inotek; 描述于 Liaudet 等, *Br J Pharmacol*, 133(8):1424-1430 (2001)); PJ34 (Inotek; 描述于 Abdelkarim 等, *Int J Mol Med*, 7(3):255-260 (2001)); 5-碘-6-氨基-1,2-苯并吡喃酮(也称作 INH(2)BP; Inotek;描述于 Mabley 等, *Br J Pharmacol*, 133(6):909-919 (2001)); GPI 15427 (描述于 Tentori 等, *Int J Oncol*, 26(2):415-422 (2005)); 1,5-二羟基异喹啉(也称作 DIQ;描述于 Walisser 和 Thies, *Exp Cell Res*, 251(2):401-413 (1999)); 5-氨基异喹啉酮(也称作 5-AIQ; 描述于 Di Paola 等, *Eur J Pharmacol*, 492(2-3):203-210 (2004)); AG14361 (描述于 Bryant 和 Helleday, *Biochem Soc Trans*, 32(Pt 6):959-961 (2004); Veuger 等, *Cancer Res*, 63(18):6008-6015 (2003);和 Veuger 等, *Oncogene*, 23(44):7322-7329 (2004)); ABT-472 (Abbott); INO-1001 (Inotek); AAI-028 (Novartis); KU-59436 (KuDOS;描述于 Farmer 等,“靶向 BRCA 突变细胞中的 DNA 修复缺陷的治疗策略 (Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy) ”*Nature*, 434(7035):917-921 (2005)); 以及描述于以下文献中的 PARP 抑制剂: Jagtap 等, *Crit Care Med*, 30(5):1071-1082 (2002); Loh 等, *Bioorg Med Chem Lett*, 15(9):2235-2238 (2005); Ferraris 等, *J Med Chem*, 46(14):3138-3151 (2003); Ferraris 等, *Bioorg Med Chem Lett*, 13(15):2513-2518 (2003); Ferraris 等, *Bioorg Med Chem*, 11(17):3695-3707 (2003); Li 和 Zhang *IDrugs*, 4(7):804-812 (2001); Steinhagen 等, *Bioorg Med Chem Lett*, 12(21):3187-3190 (2002)); WO 02/06284 (Novartis); 和 WO 02/06247 (Bayer)。另外, Dillon 等, *J Biomol Screen*,

8(3):347-352 (2003)中描述了 PARP-1 抑制剂的高通量筛选。

一种治疗方法包含改善治疗过程中给予哺乳动物的替莫唑胺和/或放射治疗的效果,包括给予哺乳动物有效量的 PARP 抑制剂(化合物、药学上可接受的盐、前药、活性代谢物或溶剂合物),并联合给予替莫唑胺和/或放射治疗。

O<sup>6</sup>-苯甲基鸟嘌呤是本领域技术人员已知的。为了增强造血毒性,可用 O<sup>6</sup>-苯甲基鸟嘌呤(O<sup>6</sup>BG)使干细胞(或肿瘤细胞)中 MGMT 的内源性活性失活。本发明还包括使用上述的给药方案和/或给药计划,将替莫唑胺和 O<sup>6</sup>-苯甲基鸟嘌呤(O<sup>6</sup>BG)联合用于癌症治疗。给予 O<sup>6</sup>BG 可在按本文所述给予替莫唑胺之前、同时或之后。

如以上表 1 和表 2 所述,本发明某些给药方案中,尤其是 4、8、10 和 15 号方案,包括联合给予生长因子和替莫唑胺。根据优选的实施方案,所述生长因子为 GM-CSF、G-CSF、IL-1、IL-3、IL-6 或促红细胞生成素。生长因子的非限定性实例包括 Epogen® (依泊汀 α)、Procrit® (依泊汀 α)、Neupogen® (非格斯亭,人类 G-CSF)、Aranesp® (高糖基化的重组 darbepoetin α)、Neulasta® (也以 Neupopeg 为商标、聚乙二醇化(pegylated)重组非格斯亭,聚乙二醇化非格斯亭(pegfilgrastim))、Albupoietin™ (长效促红细胞生成素)和 Albugranin™ (白蛋白 G-CSF,长效 G-CSF)。根据更优选的实施方案,所述生长因子是 G-CSF。

本文所用术语"GM-CSF"是指满足以下条件的蛋白质:(a)氨基酸序列与 Lee 等, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 82:4360 (1985)所述的成熟的(即缺乏信号肽的)人类 GM-CSF 的序列基本相同;且(b)具有天然 GM-CSF 所共有的生物学活性。

氨基酸序列的实质同一性是指序列相同,或者因一种或多种氨基酸改变(删除、添加、替换)而不同,但所述改变不显著减弱生物学活性。观察到了人类 GM-CSF 的核苷酸序列和氨基酸异质性。例如,在人类 GM-CSF 的 100 位(相对于氨基酸序列 N 末端位而言)



观察到了苏氨酸和异亮氨酸。另外, Schrimsher 等, *Biochem. J.*, 247:195 (1987)公开了人类 GM-CSF 的变异体, 其中 80 位的甲硫氨酸残基已被异亮氨酸残基所代替。本发明也考虑了其它生物的 GM-CSF, 例如小鼠、长臂猿(仅含 3 个甲硫氨酸)和大鼠。原核表达体系中产生的重组 GM-CSF 也可含有另外的 N 末端甲硫氨酸残基, 这是本领域已知的。本发明包括符合实质同一性要求的任何 GM-CSF, 无论是糖基化的(即天然来源的或来自真核表达体系的)还是未糖基化的(即来自原核表达体系的或化学合成的)。

用于本发明的 GM-CSF 可得自天然来源(美国专利 4,438,032 号; Gasson 等, 上文; Burgess 等, 上文; Sparrow 等, Wu 等, 上文)。本发明可使用具有与天然存在的 GM-CSF 基本相同的氨基酸序列和活性的 GM-CSF。许多实验室已对 GM-CSF 的互补 DNA(cDNA)进行了克隆和测序, 例如 Gough 等, *Nature*, 309:763 (1984) (小鼠); Lee 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:4360 (1985) (人); Wong 等, *Science*, 228:810 (1985) (人和长臂猿); Cantrell 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:6250 (1985) (人), Gough 等, *Nature*, 309:763 (1984) (小鼠); Wong 等, *Science*, 228:810 (1985) (人和长臂猿); Cantrell 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 82:6250 (1985) (人)。

GM-CSF 也可得自 Seattle, Wash 的 Immunex 和 Kenilworth, N.J. 的 Schering-Plough Corporation; 以及 Boston, Mass 的 Genzyme Corporation。

本发明有利的实施方案中, 可根据本文教导的方法给予替莫唑胺, 并与抗呕吐药联合。使用 5HT<sub>3</sub>-受体拮抗剂帕洛诺司琼、托烷司琼、昂丹司琼、格拉司琼、贝美司琼或至少两种前述选择性很强的药物的组合作为抗呕吐药。这方面, 优选一个剂量单位中所述活性抗呕吐物质的量为 2 至 10mg, 尤其优选一个剂量单位中活性物质的量为 5 至 8mg。日剂量单位一般包含活性物质的量为 2 至 20mg。特别优选活性物质的量为 5 至 16mg。本发明方法中, 也可在使用或不

使用 5HT<sub>3</sub>-受体拮抗剂的情况下使用例如阿瑞匹坦 (aprepitant) 等 NK-1 拮抗剂(神经激肽-1 拮抗剂), NK-1 拮抗剂可以单独使用或与地塞米松等类固醇联合使用。如果必要, 本领域技术人员也知道如何根据需要改变剂量单位中的活性物质或每日剂量水平。技术人员将对体重、总体的体质、对治疗的反应等决定性因素进行持续地监测, 以便能作出相应的反应, 并在必要时调整剂量单位中活性物质的量或调整每日剂量。

根据又一实施方案, 用本文教导的方法给予替莫唑胺, 并联合法呢基蛋白转移酶抑制剂。

根据其它实施方案, 替莫唑胺可与另外的抗肿瘤药一起给予。其它可用的抗肿瘤药的非限定性实例包括乌拉莫司汀、氮芥、环磷酰胺、异环磷酰胺、美法仑、苯丁酸氮芥、哌泊溴烷、曲他胺、塞替派、白消安、卡莫司汀、洛莫司汀、链佐星、达卡巴嗪、甲氧蝶呤、5-氟尿嘧啶、氟尿苷、阿糖胞苷、6-巯基嘌呤、6-硫鸟嘌呤、磷酸氟达拉滨、喷司他丁、吉西他滨、长春碱、长春新碱、长春地辛、博来霉素、放线菌素 D、柔红霉素、多柔比星、表柔比星、伊达比星、紫杉醇、光辉霉素、脱氧考福霉素、丝裂霉素-C、L-天冬酰胺酶、干扰素、依托泊苷、替尼泊苷、17 $\alpha$ -炔雌醇、己烯雌酚、睾酮、泼尼松、氟甲睾酮、丙酸屈他雄酮、睾内酯、甲地孕酮、他莫昔芬、甲泼尼龙、泼尼松龙、曲安西龙、羟孕酮、氨鲁米特、雌氮芥、醋酸甲羟孕酮、亮丙立德、氟他米特、托瑞米芬、戈舍瑞林、顺铂、卡铂、羟基脲、安吡啶、丙卡巴肼、米托坦、米托蒽醌、左旋咪唑、诺维本 (Navelbene)、阿那曲唑、来曲唑 (Letrozole)、卡培他滨、雷洛昔芬 (Reloxafine)、屈洛昔芬 (Droloxafine)、六甲蜜胺、奥沙利铂(Eloxatin®)、Iressa (吉非替尼 (gefitinib), Zd1839)、XELODA® (卡培他滨)、Tarceva® (埃罗替尼 (erlotinib))、阿扎胞苷(5-氮杂胞苷; 5-AzaC)及其混合物。

替莫唑胺可与其它抗癌药联合给予, 所述其它抗癌药例如以下

文献公开的抗癌药：美国专利 5,824,346 号、5,939,098 号、5,942,247 号、6,096,757 号、6,251,886 号、6,316,462 号、6,333,333 号、6,346,524 号和 6,703,400 号，以上所有文献以引用的方式并入本文。

### 试验

如下所述，进行了一系列试验研究。

### 集落形成试验

如下文详细描述，用不同的 TMZ 给药计划处理体外集落形成试验中的 DAOY 人类神经胶质瘤细胞(高 MGMT 水平)、A375 人类黑色素瘤细胞(高 MGMT 水平)和 LOX 人类黑色素瘤细胞(低 MGMT 水平)。简单说，在接种于六孔板中之前，将含有细胞(DAOY、A375 或 LOX)的亚融汇板用胰蛋白酶处理，然后冲洗并悬浮于适当的培养基中。将细胞在 37°C 下培养 18-24 小时，让细胞贴壁。将梯度浓度的 TMZ 或等体积的稀释剂按一式三份加入。每次加入 TMZ 持续 24 小时。例如，整个周期内，每 24 小时，用含有 TMZ 的培养基对接受 TMZ 连续每日给药的细胞进行处理。周期中最后一次给予 TMZ 之后，除去含有 TMZ 的培养基，并在剩余的培养期代以不含 TMZ 的新鲜培养基。所得的集落用结晶紫溶液染色，并用 ImageProPlus 软件(Empire Imaging Systems, Inc. Asbury, N.J.)定量。

### DAOY 人类神经胶质瘤细胞系(高 MGMT 水平)

如图 1 所示，进行集落形成试验，根据以下两种不同的 TMZ 给药计划的其中之一，对 DAOY 人类神经胶质瘤细胞(高 MGMT)进行周期为 4 天的处理：(i)连续每日给药（即每日给予总量四分之一的药物，连续给药 4 天；第 1-4 天）；或者(ii)单脉冲给药（即在 1 天内给予总量的药物；第 1 天）；其中，给予的 TMZ 的总量为 0、93、186、373 和 746  $\mu\text{g}$ 。简单地说，已证明在 TMZ 总水平为 186、373 和 746  $\mu\text{g}$

时，单脉冲给药与连续每日给药相比，能够更好地抑制集落形成。

#### A375 人类黑素瘤细胞系(高 MGMT 水平)

如图 2 所示，进行集落形成试验，根据以下两种不同的 TMZ 给药计划的其中之一，对 A375 人类黑素瘤细胞(高 MGMT)进行周期为 4 天的处理：(i)连续每日给药（第 1-4 天）；或者(ii)单脉冲给药（第 1 天）；其中，给予的 TMZ 的总量为 0、62、124、249 或 497  $\mu\text{g}$ 。有趣的是，在 A375 人类黑素瘤细胞中观察到了与 DAOY 人类神经胶质瘤细胞模式类似的反应。两种 TMZ 给药计划都证明了 TMZ 的剂量依赖性的抑制作用，但是，当 TMZ 总水平为 62、124、249、497  $\mu\text{g}$  时，单脉冲给药比连续每日给药产生了更好的集落形成抑制效果。

#### LOX 人类黑素瘤细胞系(低 MGMT 水平)

如图 3A 和 3B 所示，进行集落形成试验，以周期为 4 天（图 3A）或 8 天（图 3B）的 TMZ 给药计划，处理 LOX 人类黑素瘤细胞（低 MGMT）。

如图 3A 所示的 4 天的周期中，根据以下两种不同给药计划的其中之一给予 TMZ：(i)连续每日给药（第 1-4 天）；或者(ii)单脉冲给药（第 1 天）；其中，给予的 TMZ 的总量为 0、16、31、62 或 124  $\mu\text{g}$ 。已证明单脉冲给药比连续每日给药更好地抑制了集落形成。

如图 3B 所示的 8 天的周期中，根据以下三种不同给药计划的其中之一给予 TMZ：(i)连续每日给药（第 1-8 天）；(ii)连续给药 2 天（第 1-2 天）；或者(ii)间歇性给药 2 天（第 1 天、第 5 天）；其中，给予的 TMZ 的总量为 0、31、62、124 或 248  $\mu\text{g}$ 。间歇性给药 2 天比连续每日给药更好地抑制了集落形成。已证明 TMZ 总剂量相同的情况下，间歇性给药 2 天比连续 2 天每日给药更好地抑制了集落形成。

### MGMT 试验

如以下详细描述,以不同浓度水平(0、10、40 和 160  $\mu\text{M}$ )的 TMZ 进行以下处理后,测定 A375 人类黑素瘤细胞中 MGMT 的酶活性和蛋白质水平:(i)TMZ 处理 72 小时;或者(ii)TMZ 处理 72 小时,再经过另外的不用 TMZ 处理的 72 小时。

### MGMT 酶活性试验

简单地说,由小牛胸腺 DNA 制备  $^3\text{H}$ -甲基化的 DNA 底物。将该底物与 50  $\mu\text{g}$  细胞提取物在  $37^\circ\text{C}$  下培养 45 分钟。在放射能完全转移至 MGMT 蛋白质后,将过量的 DNA 水解,并用三氯乙酸(TCA)清洗。通过闪烁计数测定转移至 MGMT 蛋白质的放射能。

如图 4A 所示,在以不同浓度水平(0、10、40 和 160  $\text{mM}$ )的 TMZ 处理后,测定 A735 黑素瘤细胞中的 MGMT 酶活性水平。用 TMZ 处理 72 小时导致了 MGMT 剂量依赖性的减少。而且,为了评价排除药物处理后,MGMT 活性的下降可持续多久,还对平行的细胞组进行了酶活性测定,该组细胞在经过 72 小时的处理后,被清洗,并在不含 TMZ 的培养基中再维持 72 小时。有趣的是,在排除药物后,酶活性仍以剂量依赖性的方式维持下降 72 小时。这说明 TMZ 的高剂量脉冲处理对于 MGMT 的水平具有持久作用,也说明继续给予 TMZ 处理这些细胞,可加强 TMZ 的细胞毒性。

### MGMT Western 印迹

将肿瘤细胞( $5 \times 10^5$ )接种于 100 mm x 20 mm 的培养板内,该培养板含 10 ml 90%的 DMEM (GIBCO, N.Y.)和 10%的胎牛血清。用浓度递增的 TMZ 或等体积的稀释剂处理细胞。在处理后的不同时间,在含有 10 mM Tris-HCl (pH7.5)、10 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{NaHPO}_4$ 、130 mM NaCl、1% Triton X-100、10 mM PPI (BD Biosciences Pharmingen)的溶液中制备全细胞溶解产物。将等量的总蛋白质在 4-12%的 SDS-聚

丙烯酰胺凝胶上电泳，并电转移至聚偏二氟乙烯膜。用 5% 的脱脂奶粉/Tris 缓冲盐水(TBS)封闭 (block) 印迹，并用抗 MGMT (BD Bioscience Pharmingen)或抗 GAPDH (USBiological)的特异性抗体作为内标探测。

如图 4B 所示，在不同浓度水平(0、10、40、160  $\mu\text{M}$ )的 TMZ 处理之后，用 Western 印迹法测定 A375 黑素瘤细胞中 MGMT 蛋白质的水平。泳道 1-4 反映了 TMZ 处理 72 小时后制备的细胞溶解产物。泳道 5-8 反映了 TMZ 处理 72 小时，再经过不用 TMZ 处理的 72 小时之后制备的细胞溶解产物。测得的 MGMT 蛋白质的水平与图 4A 中所述经类似处理的细胞中测得的 MGMT 比活性的水平相关。两项试验中都检测到了 MGMT 蛋白质水平剂量依赖性的减少。

#### 体内研究

如以下详细描述，在用 DAOY 人类神经胶质瘤细胞(高 MGMT 水平)、A375 人类黑素瘤细胞(高 MGMT 水平)和 LOX 人类黑素瘤细胞(低 MGMT 水平)形成的异种移植肿瘤中评价不同的 TMZ 给药计划。

简单地说，将得自 Charles River Laboratories 的雌性无胸腺裸鼠或雌性 SCID 小鼠 (4-6 周) 维持在 VAF 障碍设施中。按照实验室动物护理和使用的 N.I.H.指南中提出的规则进行动物程序。

在动物的右肋皮下接种 DAOY 人类神经胶质瘤细胞( $5 \times 10^6$ )、LOX 人类黑素瘤细胞( $5 \times 10^5$ )和 A375 人类黑素瘤细胞( $5 \times 10^6$ )(对 SCID 小鼠接种 LOX; 对裸鼠接种 DAOY 和 A375)。为促进体内生长，在接种前，将 Matrigel 与 DAOY 细胞和 A375 细胞混合 (50%)。当肿瘤体积约为  $100\text{mm}^3$  时，将动物随机分组( $n = 10$ )。用 Labcat™ 计算机应用(Innovative Progaming Associates, NJ. )每周测定 2 次肿瘤体积和动物体重。肿瘤体积通过公式  $(W \times L \times H) \times \pi \times 1/6$  计算。

通过腹膜内注射给予 TMZ，以 20% 的 HP $\beta$ CD(含 1% DMSO)作

为载体。用三种不同给药计划的其中一种，治疗带有 DAOY 人类神经胶质瘤细胞（高 MGMT 水平细胞系）的异种移植肿瘤的小鼠。15 天的周期中，在相同的总剂量水平下，小鼠接受一种下述的 TMZ 治疗：(i)第 1 天至第 15 天给药；(ii)第 1 天至第 5 天给药；或(iii)第 1、4、7、10 和 13 天的间歇性给药。对于所有给药计划，均使用三种不同的剂量水平(180、270 和 405 mg/kg 总剂量)。

用三种不同给药计划，治疗带有 A375 人类黑素瘤细胞(高 MGMT 水平细胞系)的异种移植肿瘤的小鼠。与用于 DAOY 模型的给药计划相似，15 天的周期中，在相同的总剂量水平下，小鼠接受一种下述的 TMZ 治疗：(i)第 1 天至第 15 天给药；(ii)第 1 天至第 5 天给药；或(iii)第 1、4、7、10 和 13 天的间歇性给药。对于所有给药计划，均使用三种不同的剂量水平(180、270 和 405 mg/kg 总剂量)。

用两种不同的给药计划，用 TMZ 治疗带有 LOX 人类黑素瘤细胞（低 MGMT 水平细胞系）异种移植肿瘤的小鼠。给予相同的总剂量，将该总剂量按(i) 4 天或(ii) 12 天平均分配。通过腹腔内注射给予 TMZ，累积总剂量水平为 36、72 或 144 mg/kg。

如图 5 所示，用三种不同的 TMZ 给药计划，以剂量依赖性的方式，治疗带有 DAOY 人类神经胶质瘤细胞（高 MGMT 水平细胞系）的异种移植肿瘤的裸鼠。图 5A 表示用 TMZ 治疗，经过 2 个连续的 15 天的周期后，DAOY 人类神经胶质瘤异种移植肿瘤的平均的肿瘤生长曲线，所述 15 天的周期中连续每天给药（第 1-15 天（第一周期），第 16-30 天（第二周期））；给予的 TMZ 的总剂量为 0、360、540 或 810 mg/kg (mpk)。图 5B 表示用 TMZ 治疗，经过 2 个间歇性的 15 天的周期后，DAOY 人类神经胶质瘤异种移植肿瘤的平均的肿瘤生长曲线，所述 15 天的周期中连续给药 5 天（第 1-5 天（第一周期），第 16-20 天（第二周期））；给予的 TMZ 的总剂量为 0、360、540 或 810mpk。图 5C 表示用 TMZ 治疗，经过 2 个连续的 15 天的周期后，DAOY 人类神经胶质瘤异种移植肿瘤的平均的肿瘤生长曲线，

所述 15 天的周期中间歇性给药 5 天（第 1、4、7、10、13 天（第一周期），第 16、19、22、25、28 天（第二周期））；给予的 TMZ 的总剂量为 0、360、540 或 810mpk。值得注意的是，表示了治疗期间各治疗组的平均肿瘤体积。肿瘤模型中，连续给药 5 天的给药计划和间歇性给药 5 天的给药计划都显示出比连续每天给药计划（第 1-15 天）更好的肿瘤生长抑制作用。实际上，用两种较高剂量水平的 TMZ (54 或 81 mg/kg/天)连续 5 天给药，以及用最高的 TMZ 剂量水平(81 mg/kg/天)以间歇性给药计划给药，仅在一个治疗周期之后，即出现了肿瘤退化。

如图 6 所示，用与上述 DAOY 人类神经胶质瘤异种移植肿瘤研究中的小鼠相同的给药计划，治疗带有 A375 人类黑素瘤细胞（高 MGMT 水平细胞系）的异种移植肿瘤的裸鼠。对于 A375 人类黑素瘤异种移植肿瘤，观察到了与 DAOY 神经胶质瘤异种移植肿瘤类似的结果。值得注意的是，两个较高剂量水平的间歇式给药计划（第 1、4、7、10、13 天）和最高剂量水平的连续给药 5 天的给药计划（第 1-5 天）所产生的效果，明显优于相等剂量水平下连续每天给药计划（第 1-15 天）的效果。

如图 7 所示，用两种不同的 12 天周期的给药计划，治疗带有 LOX 黑素瘤细胞（低 MGMT 水平细胞系）异种移植肿瘤的 SCID 小鼠：(i) 连续给药 4 天（第 1-4 天）；或者(ii)连续每天给药(第 1-12 天)。在使用中间剂量(72 mg/kg)时，4 天的治疗计划产生的效果(88% TGI)明显优于 12 天治疗计划的效果(50% TGI)。相反，使用较高和较低剂量水平时，没有观察到具有统计学意义的差异。TMZ 的效果是依赖于给药计划的，连续给药 4 天的给药计划产生了更大的效果。

#### 肿瘤内 MGMT 酶活性

简单地说，用 81 mg/kg TMZ 或载体进行连续 5 天的治疗后，收集三个取自小鼠的 DAOY 肿瘤。将各个肿瘤均质化并处理，进行治



疗后的 MGMT 酶活性测定。也测定了未治疗的 DAOY 细胞的 MGMT 活性，作为对照。

如图 8 所示，用载体治疗的肿瘤与采集自细胞培养物的 DAOY 细胞相比具有类似的 MGMT 活性水平，与此不同，用 TMZ 连续治疗 5 天的肿瘤几乎未检测到 MGMT 活性。

### 总结

为说明的目的，再将得自上述试验的数据亚组表示于图 9-22 中。另外，以下的表 3-5 总结了相同的数据亚组。

表 3

### 集落形成试验

细胞类型	给药方案		总TMZ (µg)	与未经治疗细胞相比的抑制百分比(%)
DAOY	4-天周期-持续每日给药	第1-4天 (每天 1/4 TMZ 总剂量)	93	-8
DAOY	4-天周期-单脉冲式给药	第1天	93	-37
DAOY	4-天周期-单脉冲式给药	第1天	186	20
DAOY	4-天周期-单脉冲式给药	第1天	373	75
A375	4-天周期-持续每日给药	第1-4天 (每天 1/4 TMZ 总剂量)	62	17.4
A375	4-天周期-单脉冲式给药	第1天	62	76
A375	4-天周期-单脉冲式给药	第1天	124	88
A375	4-天周期-单脉冲式给药	第1天	249	96

LOX	4-天周期- 持续每日给药	第1-4天 (每天 1/4 TMZ 总剂量)	16	7
LOX	4-天周期- 单脉冲式给药	第1天	16	66
LOX	4-天周期- 单脉冲式给药	第1天	31	87
LOX	4-天周期- 单脉冲式给药	第1天	62	84
LOX	8-天周期- 持续每日给药	第1-8天 (每天 1/8 TMZ总 剂量)	31	-5
LOX	8-天周期- 连续2天给药	第1天、第2天(每 天 1/2 总 TMZ 剂 量)	31	45
LOX	8-天周期- 连续2天给药	第1天、第2天(每 天 1/2 总 TMZ 剂 量)	62	92
LOX	8-天周期- 连续2天给药	第1天、第2天(每 天 1/2 总 TMZ 剂 量)	124	98
LOX	8-天周期- 间歇性给药2天	第1天、第5天(每 天 1/2 总 TMZ 剂 量)	31	78
LOX	8-天周期- 间歇性给药2天	第1天、第5天(每 天 1/2 总 TMZ 剂 量)	62	98
LOX	8-天周期- 间歇性给药2天	第1天、第5天(每 天 1/2 总 TMZ 剂 量)	124	99

表 4

DAOY 人类神经胶质瘤异种移植肿瘤模型

细胞类型	给药方案		每脉冲 TMZ剂量 (mpk)	TMZ 总剂量 (mpk)	剂量 强度	与用载体处 理的肿瘤相 比的抑制百 分比(%)
DAOY	两个15-天周 期-持续给药	第1天-30 (每天1/30 总剂量)	12	360	1	66
DAOY	两个15-天周 期-连续给药 5天	第1天-5, 第1天6-20 (每天1/10 总剂量)	54	540	1.5	118
DAOY	两个15-天周 期-连续给药 5天	第1-5天, 第16-20天 (每天1/10 总剂量)	81	810	2.25	124
DAOY	两个15-天周 期-间歇性给 药5天	第1, 4, 7, 10, 13, 16, 19, 22, 25, 28天 (每天1/10 总剂量)	54	540	1.5	85
DAOY	两个15-天周 期-间歇性给 药5天	第1, 4, 7, 10, 13, 16, 19, 22, 25, 28天 (每天1/10 总剂量)	81	810	2.25	117

表 5

A375 和 LOX 人类黑素瘤异种移植肿瘤模型

细胞类型	给药方案		每次间 歇 TMZ 剂量 (mpk)	总 TMZ 剂量 (mpk)	剂量 强度	与用载体处 理的肿瘤相 比的抑制百 分比(%)
A375	15-天周期- 持续每天给药	第1-15天 (每天1/15总剂量)	12	180	1	34

A375	15-天周期- 5天给药	第1-5天 (每天1/5总剂量)	54	270	1.5	29
A375	15-天周期-连续5天给药	第1-5天 (每天1/5总剂量)	81	405	2.25	68
A375	15-天周期-间歇性给药5天	第1, 4, 7, 10, 13天 (每天1/5总剂量)	54	270	1.5	58
A375	15-天周期-间歇性给药5天	第1, 4, 7, 10, 13天 (每天1/5总剂量)	81	405	2.25	73
LOX	12-天周期-持续每天给药	第1-12天 (每天1/12总剂量)	3	36	1	37
LOX	12-天周期-连续4天给药	第1-4天 (每天1/4总剂量)	18	72	2	88
LOX	12-天周期-连续4天给药	第1-4天 (每天1/4总剂量)	36	144	4	94

发明人得出结论，这些研究证明了，经异种移植肿瘤模型的检验，增加 TMZ 总剂量的给药计划对于抑制高水平 MGMT 肿瘤细胞系的细胞生长更加有效。特别是，TMZ 剂量强度增加（例如剂量强度大于 1）的给药计划比标准剂量强度（例如剂量强度为 1）的给药计划在抑制源于高水平 MGMT 细胞系的异种移植肿瘤中的细胞生长方面更加有效。

虽然本文描述了本发明某些目前优选的实施方案，但对于本发明所述领域的技术人员显而易见的是，在不脱离本发明精神和范围的前提下，可对所述实施方案进行变化和修改。因此，仅希望将本发明限制至所附权利要求需要的程度。

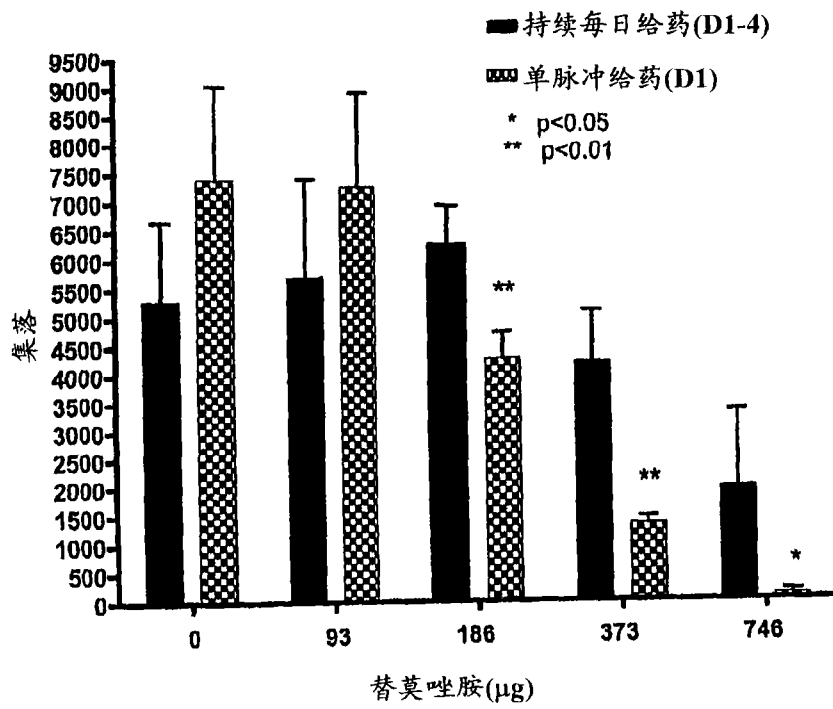


图 1

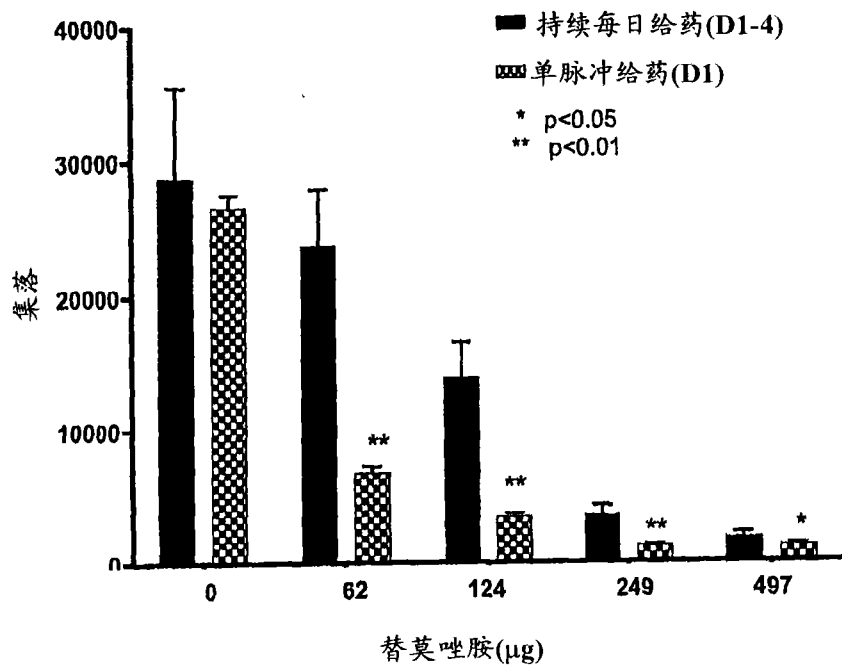


图 2

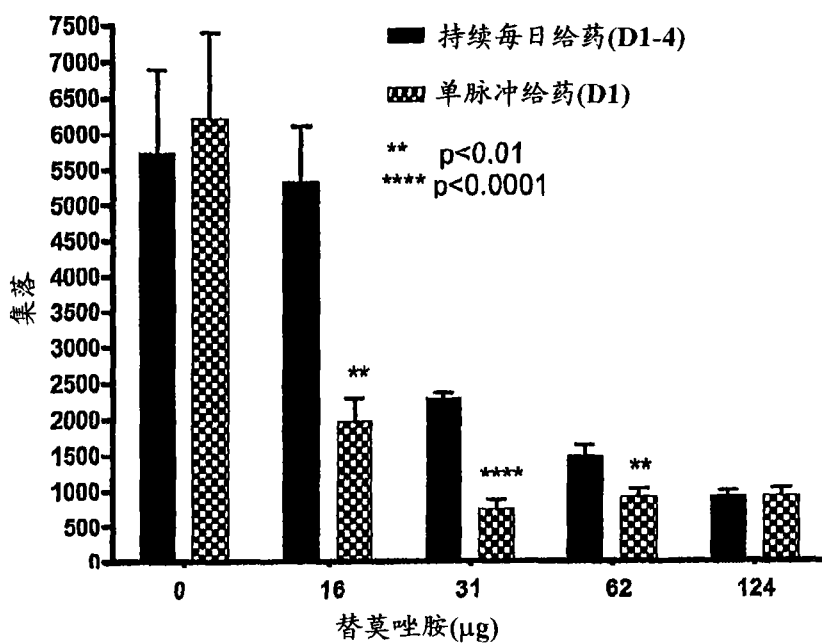


图 3A

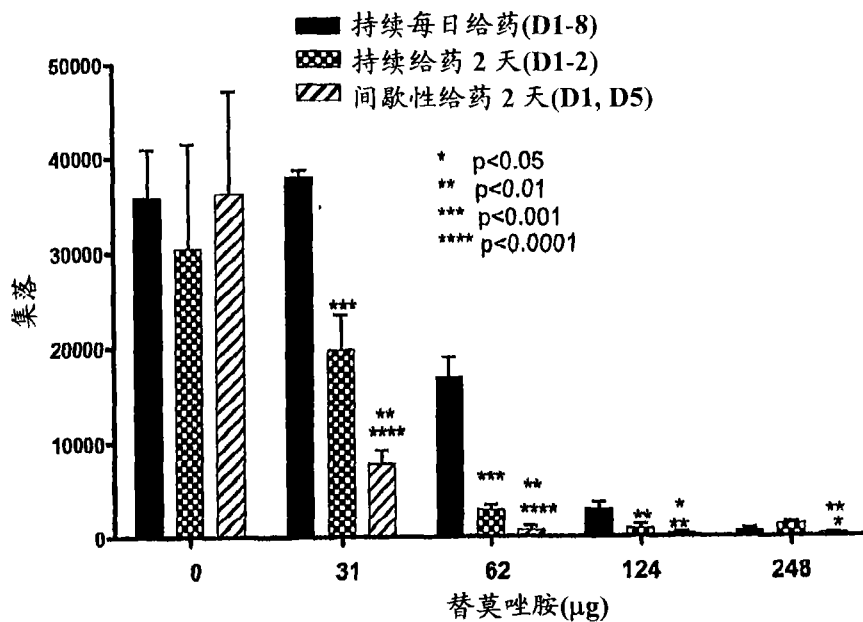


图 3B

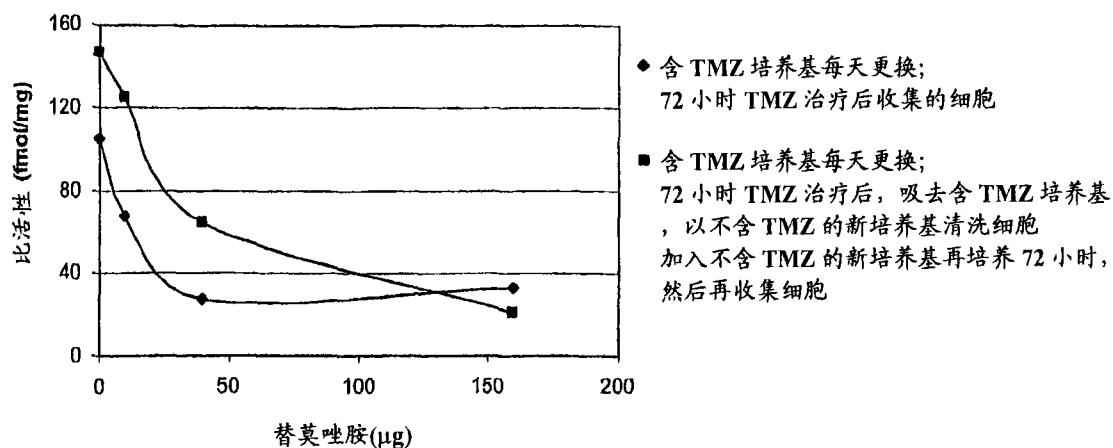


图 4A

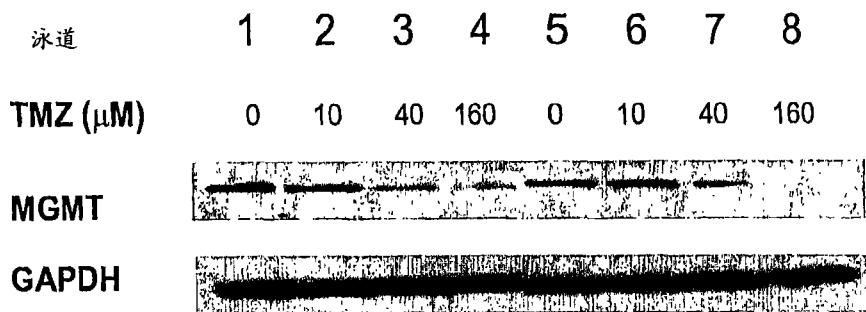


图 4B



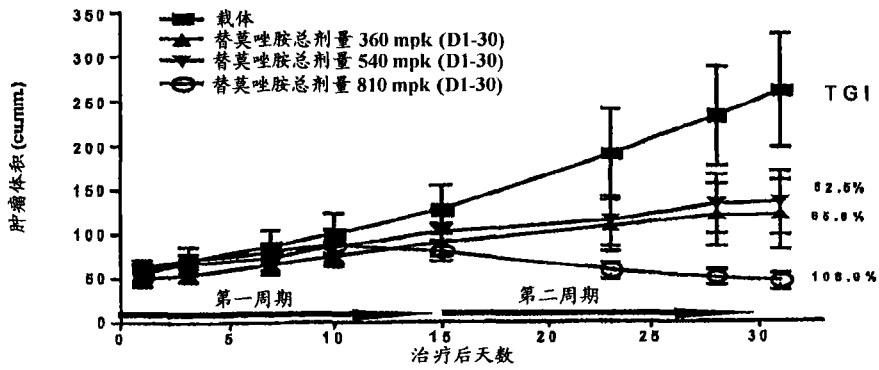


图 5A

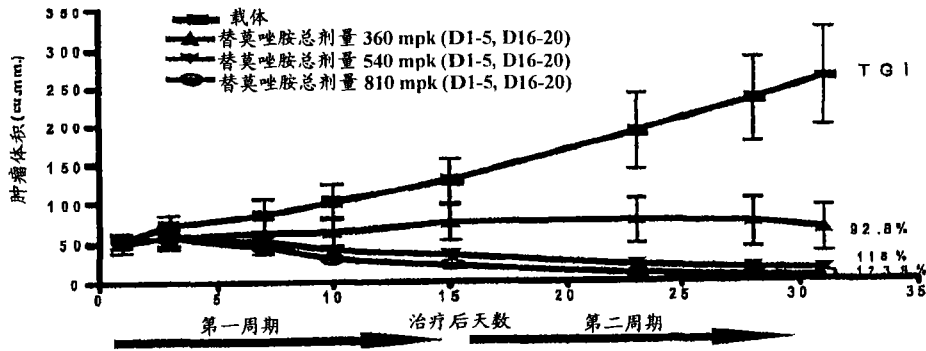


图 5B

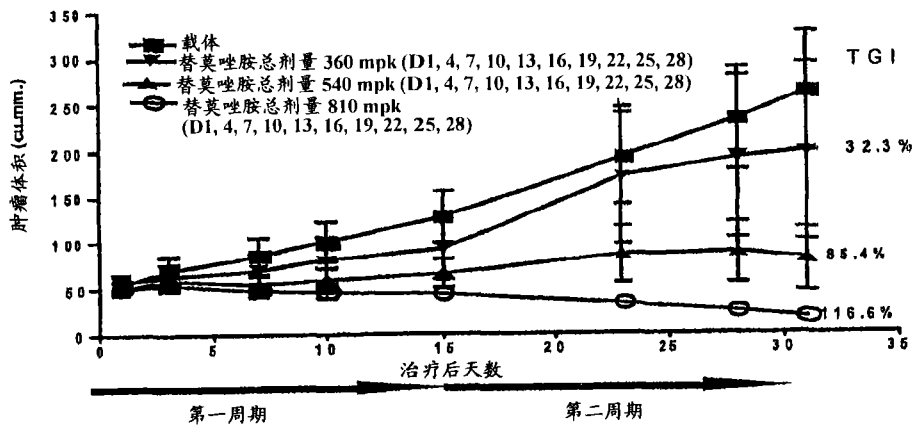


图 5C

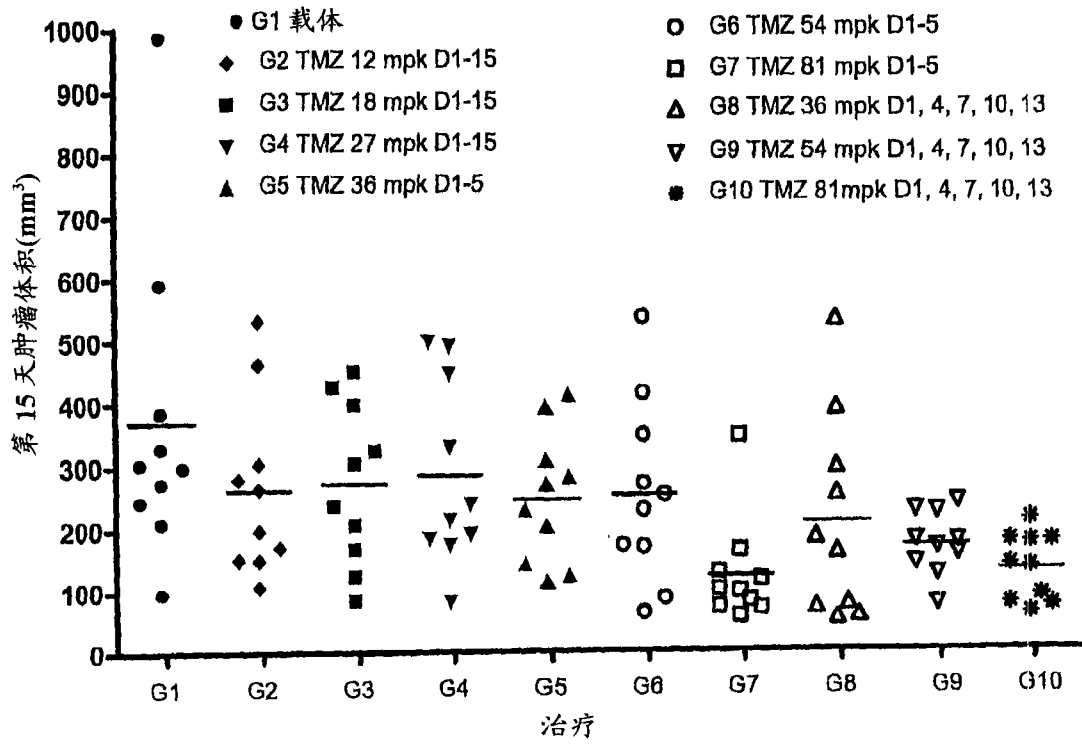


图 6



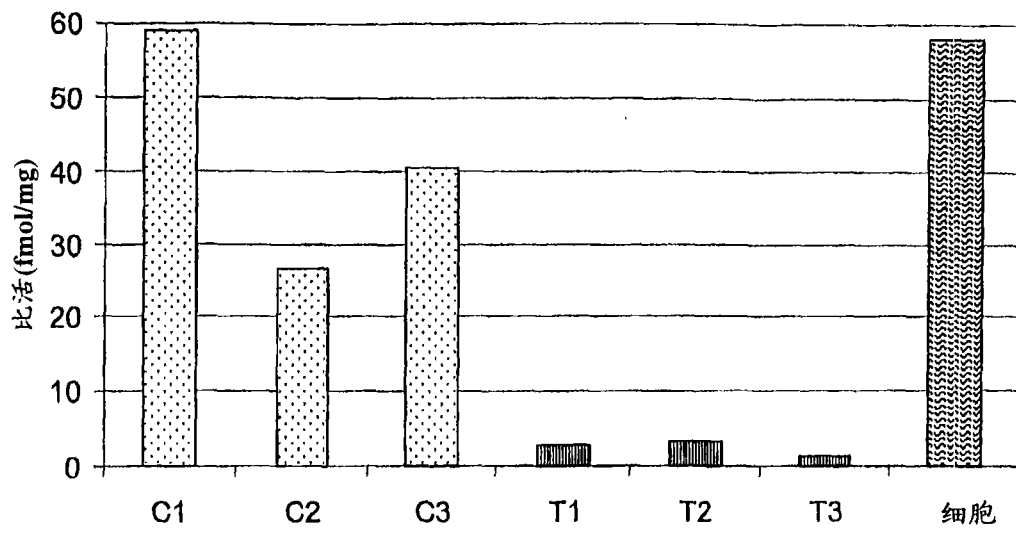


图 8

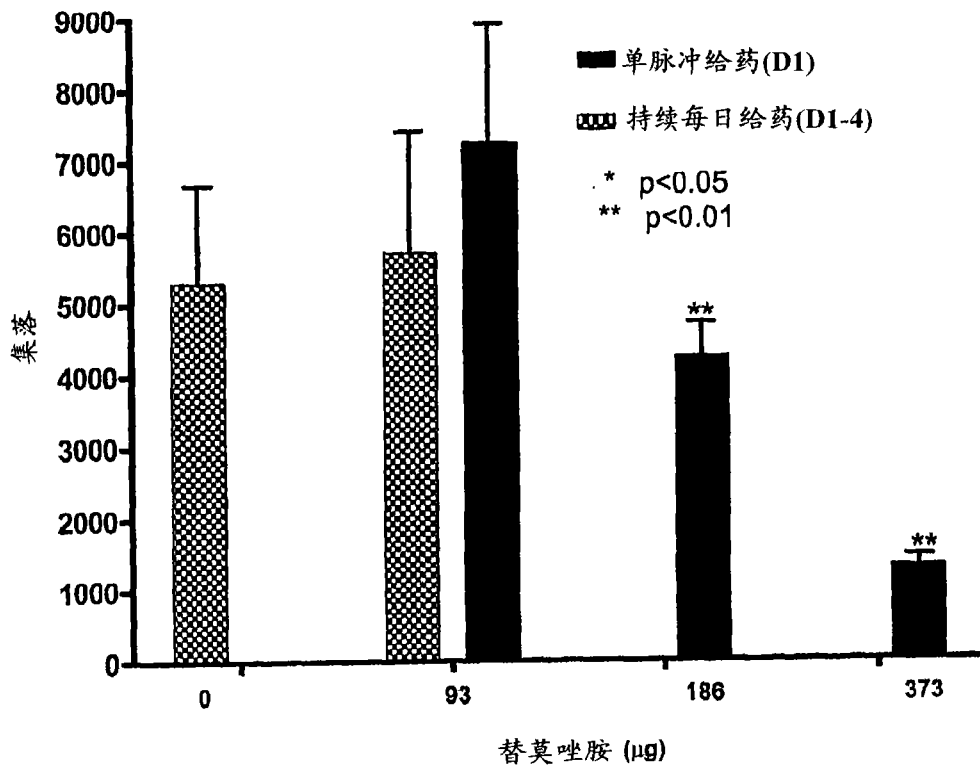


图 9

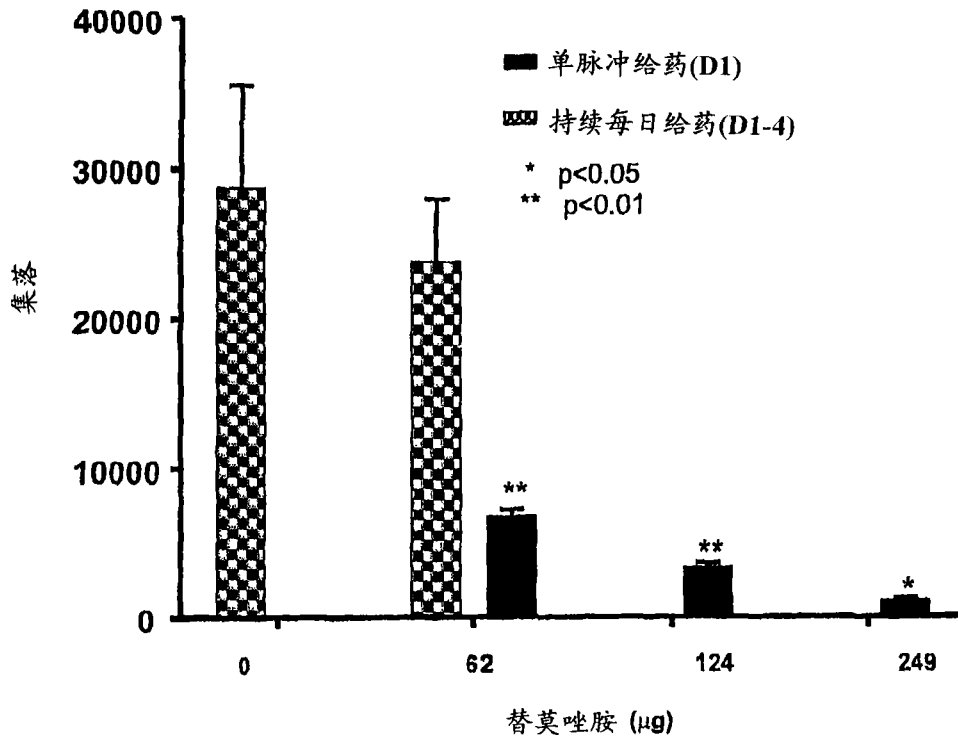


图 10

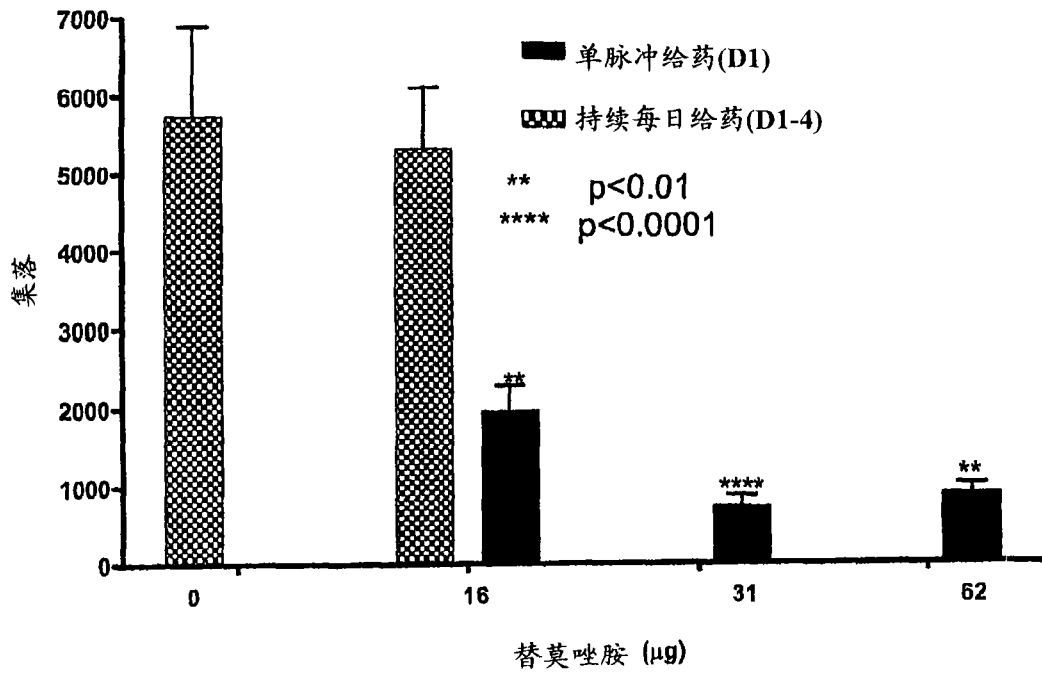


图 11

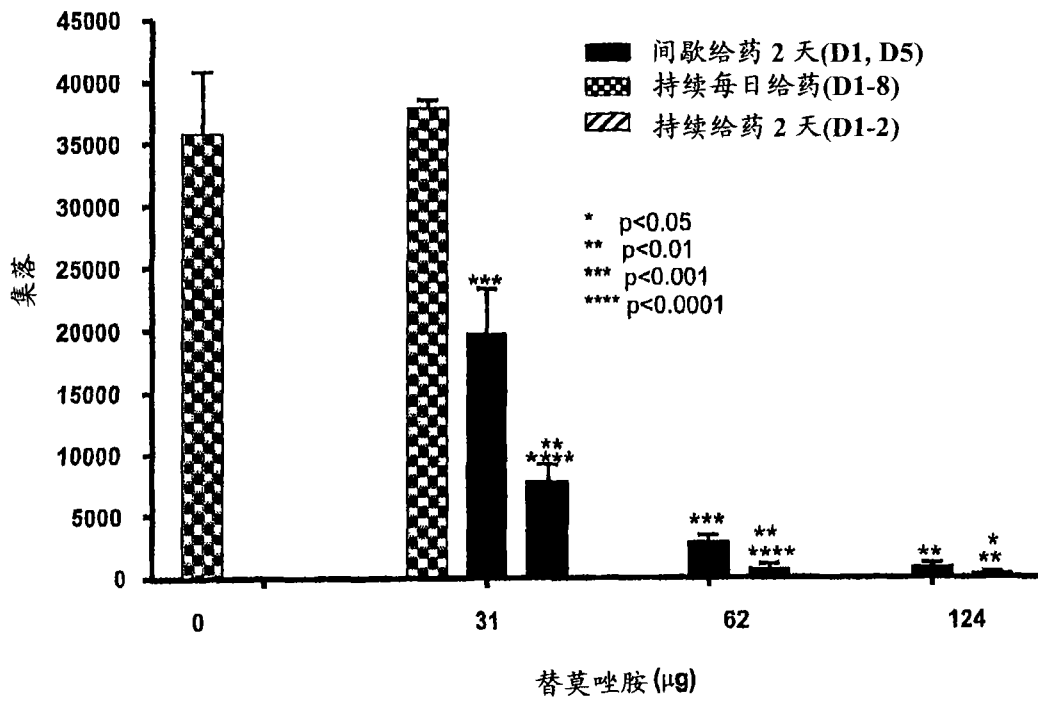


图 12



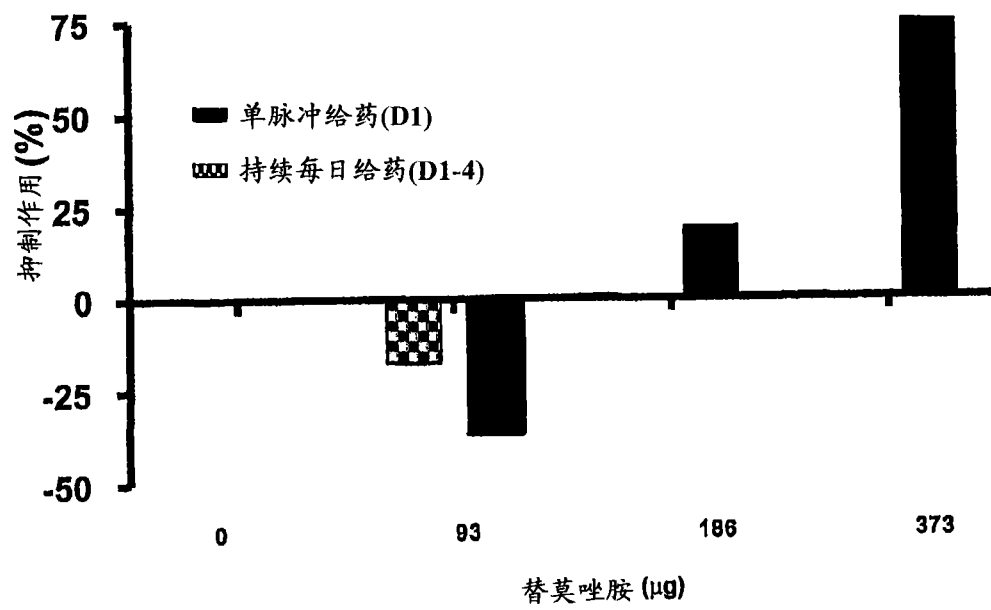


图 13

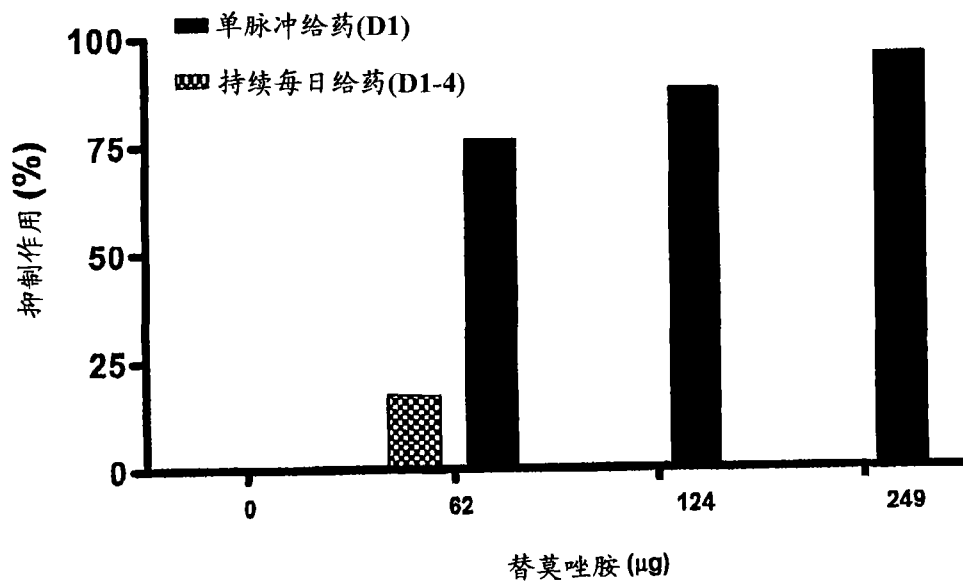


图 14

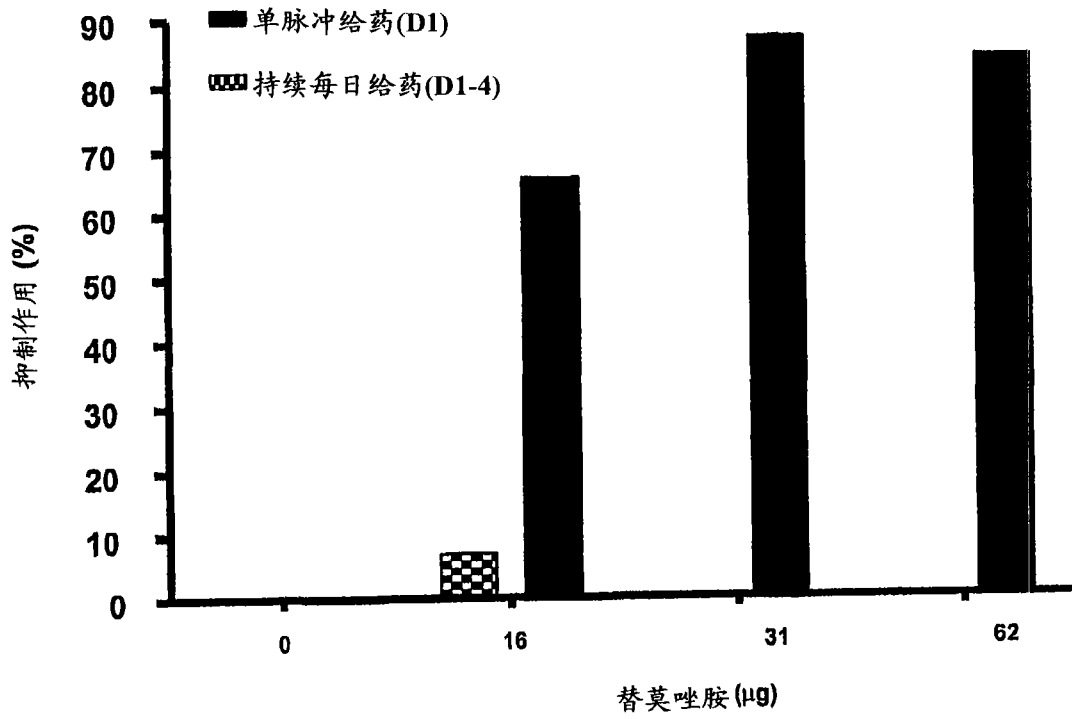


图 15

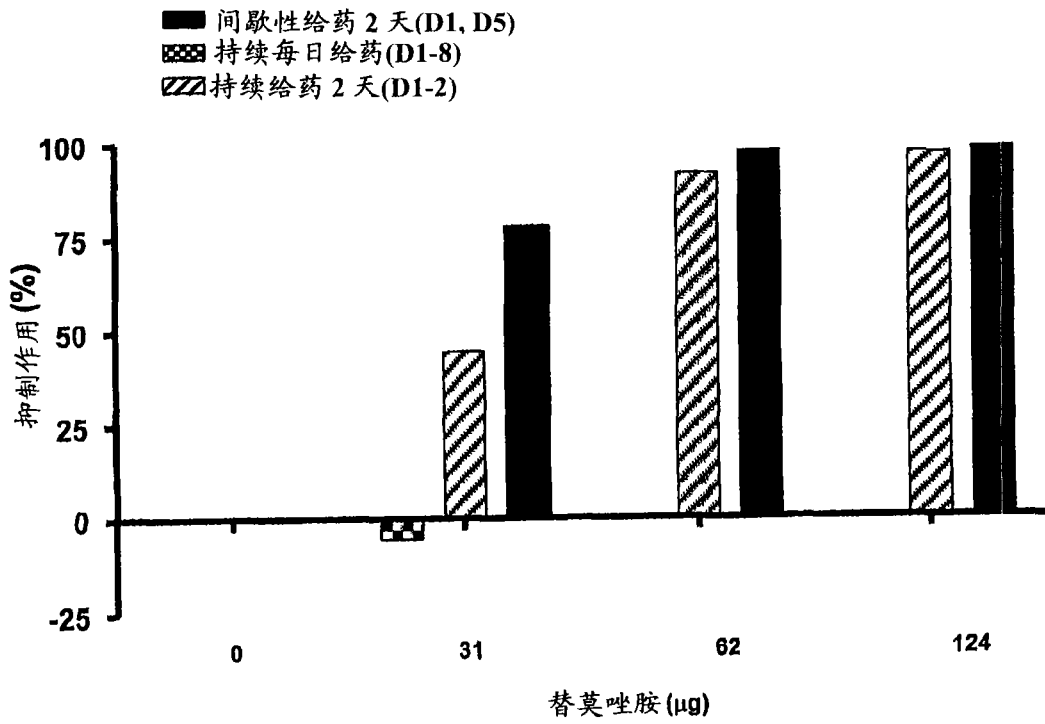


图 16

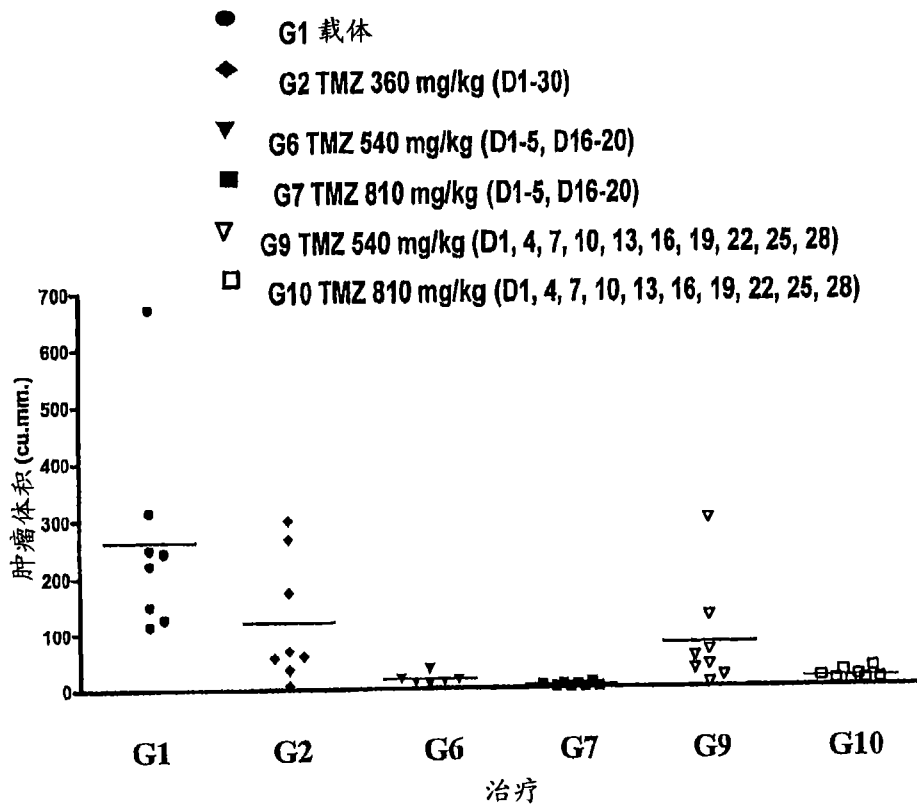


图 17

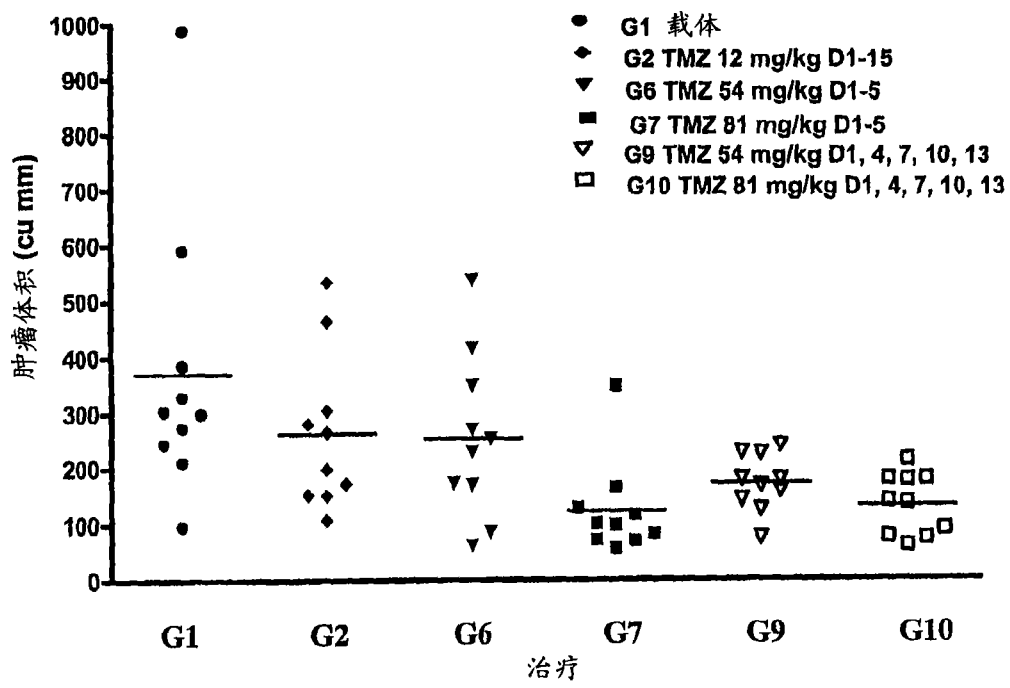


图 18

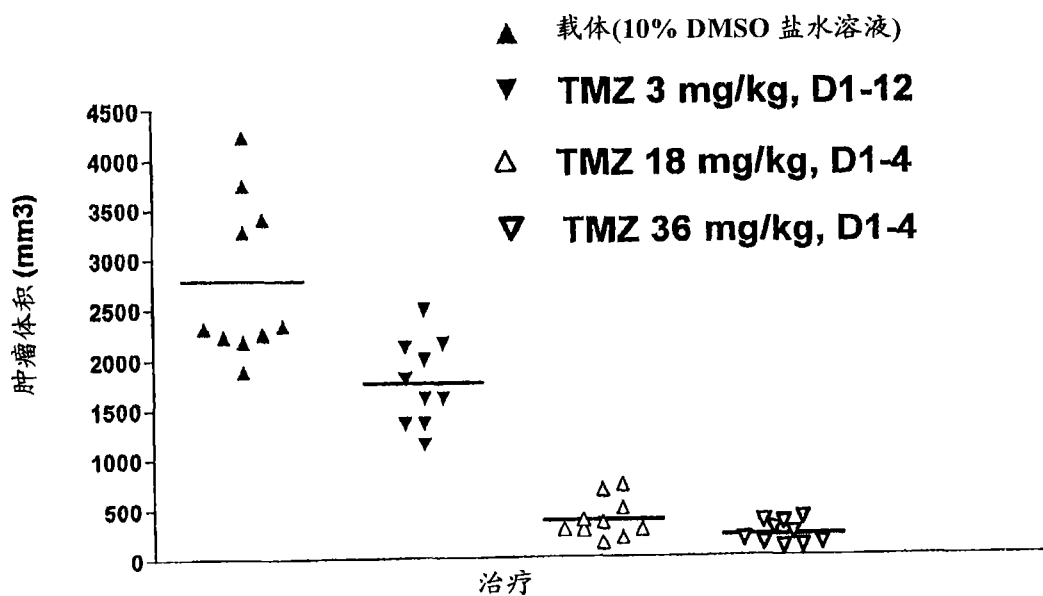


图 19

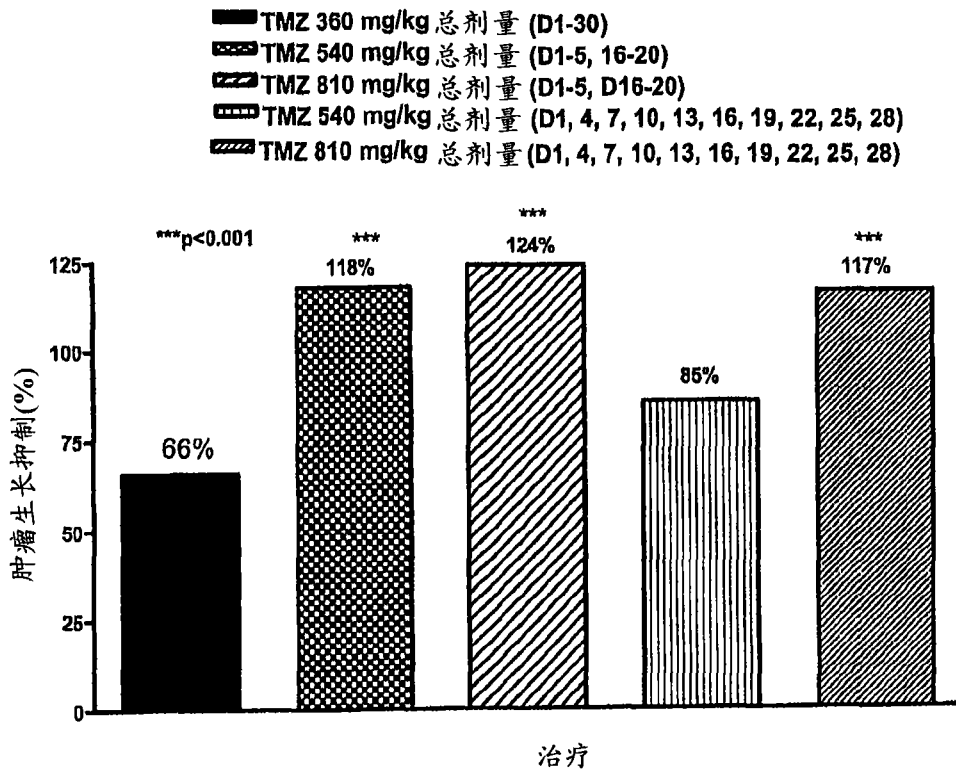


图 20



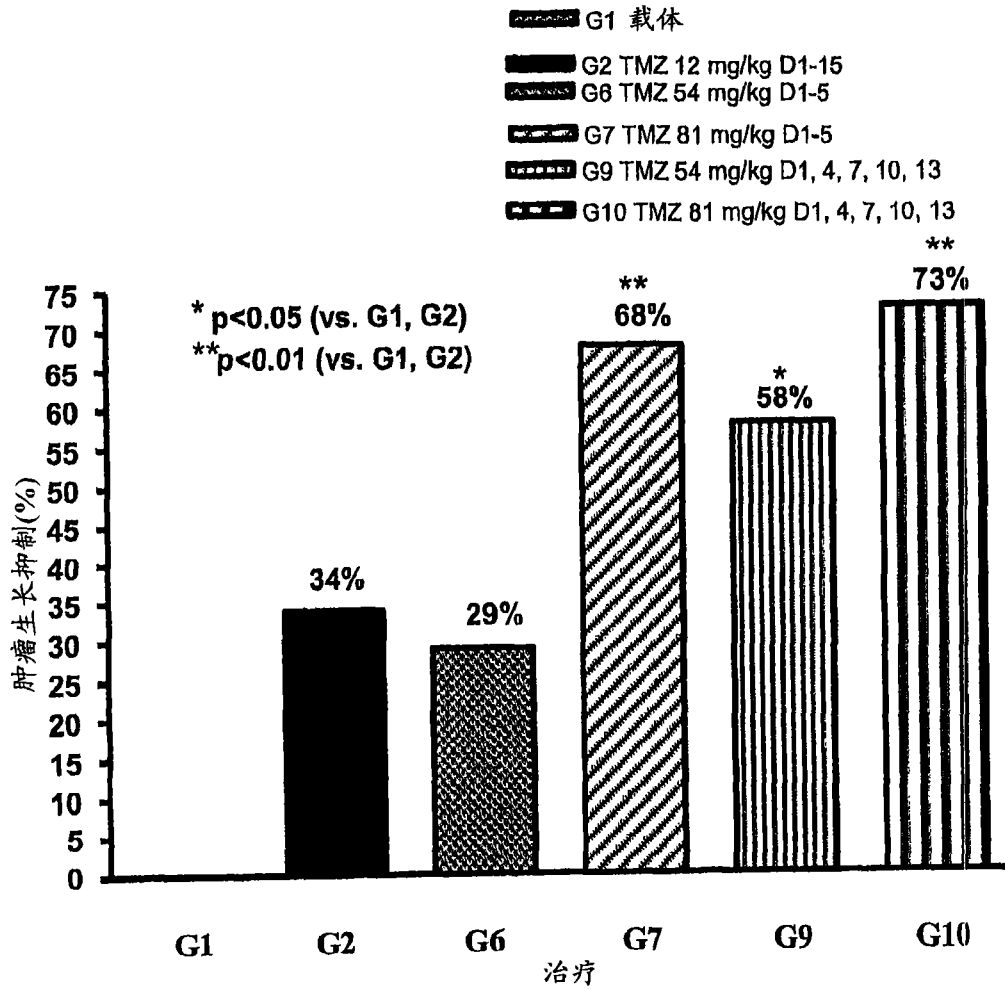


图 21

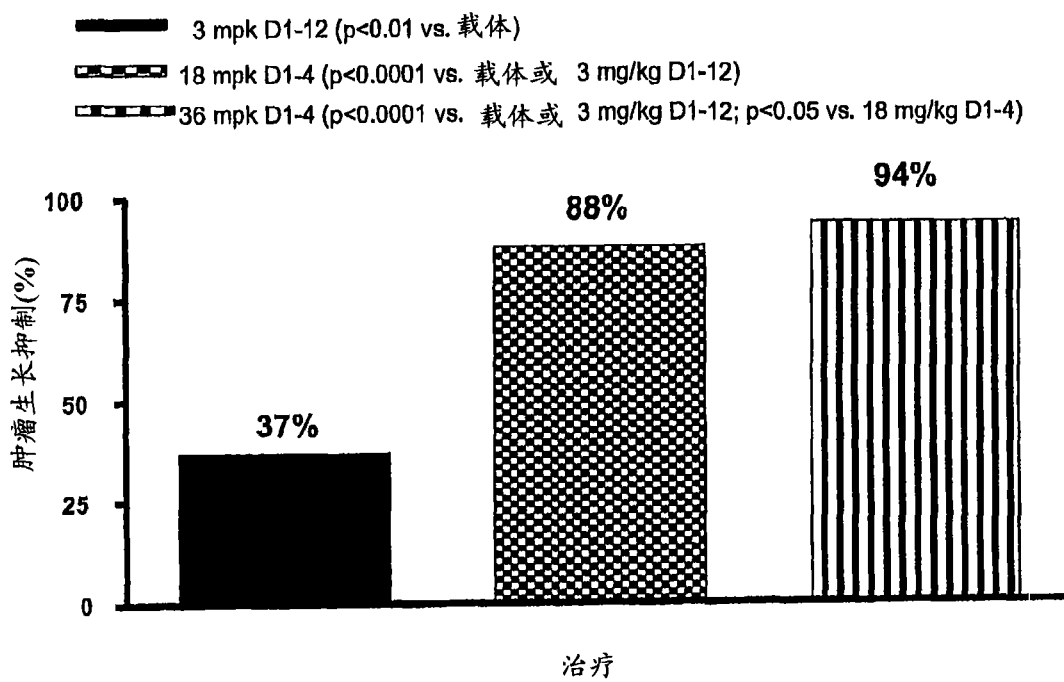


图 22