

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/30 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200780024999.1

[43] 公开日 2009年7月15日

[11] 公开号 CN 101484186A

[22] 申请日 2007.7.26

[21] 申请号 200780024999.1

[30] 优先权

[32] 2006.7.27 [33] US [31] 60/833,487

[86] 国际申请 PCT/US2007/074448 2007.7.26

[87] 国际公布 WO2008/014386 英 2008.1.31

[85] 进入国家阶段日期 2008.12.30

[71] 申请人 埃姆克隆系统股份有限公司

地址 美国纽约

[72] 发明人 埃里克·罗文斯基

[74] 专利代理机构 北京邦信阳专利商标代理有限公司

代理人 黄泽雄 崔 华

权利要求书 1 页 说明书 14 页 序列表 4 页

[54] 发明名称

以表皮生长因子受体拮抗剂治疗婴幼儿患者体内的肿瘤

[57] 摘要

本发明公开了通过 EGFR 拮抗剂和化学治疗剂的给药治疗婴幼儿肿瘤的联合治疗方法。该方法还包括治疗恶性婴幼儿肿瘤。

1. 一种抑制婴幼儿患者体内肿瘤生长的方法，所述方法包括以有效量的表皮生长因子（EGFR）拮抗剂和化学治疗剂治疗婴幼儿患者。
2. 根据权利要求1所述的方法，其特征在於，所述肿瘤为恶性肿瘤。
3. 根据权利要求1所述的方法，其特征在於，所述肿瘤为神经胶质瘤。
4. 根据权利要求1所述的方法，其特征在於，所述肿瘤为成神经细胞瘤。
5. 根据权利要求1所述的方法，其特征在於，所述拮抗剂为抗体或其中的片段。
6. 根据权利要求5所述的方法，其特征在於，所述抗体或其中的片段特定与EGFR胞外结构域结合。
7. 根据权利要求5所述的方法，其特征在於，所述抗体或其中的片段特定抑制EGFR配体与EGFR结合并且中和其中的活性。
8. 根据权利要求5所述的方法，其特征在於，所述抗体为西妥昔单抗。
9. 根据权利要求5所述的方法，其特征在於，所述抗体或其中的片段为单克隆的。
10. 根据权利要求5所述的方法，其特征在於，所述抗体或其中的片段为嵌合的。
11. 根据权利要求5所述的方法，其特征在於，所述抗体或其中的片段为人源化的。
12. 根据权利要求5所述的方法，其特征在於，所述抗体或其中的片段为人类的。
13. 根据权利要求1所述的方法，其特征在於，所述化学治疗剂为依立替康。
14. 根据权利要求1所述的方法，该方法进一步包括对婴幼儿患者实施放射治疗。

以表皮生长因子受体拮抗剂治疗婴幼儿患者体内的肿瘤

有关申请的交叉引用

本申请要求 2006 年 7 月 27 日提交的、申请号为 60/833,487 的美国临时专利申请的利益，其全部内容以引入方式合并于此。

技术领域

本发明涉及通过 EGFR 拮抗剂和化学治疗剂的联合给药治疗婴幼儿患者体内的肿瘤。

背景技术

2001 年，在美国有 11,900 例的儿童和 20 岁以下的青少年被诊断出患有癌症，并且约 2,200 例死于此疾病。实体肿瘤占有儿童癌症病例的约 30%。侵入性脑神经系统癌症占有所有婴幼儿癌症的 17%，仅次于急性淋巴细胞白血病。约一半的脑瘤确诊病例是恶性的。其他常见的儿童癌症包括尤文氏肉瘤、白血病、成神经细胞瘤、骨肉瘤、横纹肌肉瘤、软组织肉瘤和肾母细胞瘤。

治疗儿童脑瘤的一个主要障碍是大脑仍在进行迅速发育，易受到来自诸如放射治疗或化学治疗毒性的伤害。其他类儿童癌症的治疗也面临同样的障碍。因此，需要有治疗婴幼儿患者体内肿瘤的新疗法。

表皮生长因子受体 (EGFR) 家族表达或过表达于各种不同癌症中，并通常涉及到肿瘤的形成。EGFR 家族包括 EGF 受体 (EGFR, 也称为 erbB-1/HER1)、HER2 (也称为 c-neu/erbB-2)、erbB-3/HER3 和 erbB-4/HER4。例如，EGFR 和 HER2 被认为在调节肿瘤细胞生长与生存的过程中起到了至关重要的作用。具体说来，EGFR 与影响存活、防止细胞凋亡、脱分化、转移 (包括细胞迁移和侵袭) 的几种通路相关联。在包括头颈癌、结肠直肠癌、胰腺癌、卵巢癌、肾细胞癌、非小细胞肺癌

以及神经胶质瘤的那些癌症中，表达 EGFR 是最主要的一部分。这些癌症中的多种癌症如果早期没有诊断出，其预后是不良的，并且对于晚期疾病的治疗是有限的。

目前临床研究中有各种不同的 EGFR 抑制剂用于治疗这些癌症的一些癌症。其中一个例子是西妥昔单抗[®] (cetuximab) (免疫克隆系统有限公司所造)，其为嵌合(人/鼠)单克隆抗体，阻断配体与 EGFR 结合、防止受体的激活以及抑制培养细胞的生长。另一个例子是 ABX-EGF，它是一种针对 EGFR 的完全人单克隆抗体，据报道，它可阻断转化生长因子 α (TGF- α) 和表皮生长因子 (EGF) 的结合，这是两种已知的与 EGFR 结合的配体。HERCEPTIN[®] (trastuzumab) 是一种准予治疗 HER2 阳性转移乳腺癌的人源化抗体，其被设计以标靶和阻碍 HER2 蛋白过表达的功能。

另外，目前在不同小分子 EGFR 抑制剂方面正在进行临床研究。酪氨酸激酶抑制剂的一个例子是 IRESSA[™]，它是一种小分子 EGFR 酪氨酸激酶抑制剂，据报道可抑制 EGFR 酪氨酸激酶的活性，它对表达功能性 EGFR 范围内的人类癌细胞具有抑制细胞生长的作用，能够通过上调 p27 抑制肿瘤细胞的增生。

发明内容

在一些实施方式中，本发明提供了一种通过以有效量的 EGFR 拮抗剂和化学治疗剂对婴幼儿患者进行治疗以抑制婴幼儿患者体内肿瘤生长的方法。在一个优选的实施方式中，该 EGFR 拮抗剂为特异性结合 EGFR 胞外结构域并中和其活性的 EGFR 抗体。在一个优选的实施方式中，该化学治疗剂为依立替康。

具体实施方式

本发明提供了一种通过给予有效量的 EGFR 拮抗剂和化学治疗剂以治疗婴幼儿患者体内肿瘤生长的方法。本发明婴幼儿患者是自出生至 18 岁的患者。治疗包括：(1) 预防易患该疾病但未患有或表现出该疾病症状的患者发生该疾病，例如预防临床症状的发作；(2) 抑制肿瘤的生长，

例如阻滞其发展；或（3）缓解肿瘤，例如促使肿瘤症状的消退。抑制肿瘤生长包括放慢或停止生长，也包括促使肿瘤消退。治疗疾病的有效量是指当向需要此治疗的患者给药，该量足以有效治疗上述所限定的疾病。

依照本发明所治疗的肿瘤是表达 EGFR 的任何肿瘤。此肿瘤包括胚细胞肿瘤，它包括肝母细胞瘤和成神经细胞瘤；癌科，包括腺癌；神经胶质癌，包括室鼓膜瘤、星状细胞瘤、少突胶质瘤和混合神经胶质瘤；肉瘤，包括横纹肌肉瘤和腺肉瘤；以及腺瘤。该肿瘤可基本出现在全身各处，包括例如乳房、心脏、肺、食道、小肠、结肠、直肠、胃、脾、肾、膀胱、头颈、喉、卵巢、前列腺、大脑、胰腺、皮肤、骨、骨髓、血液、胸腺、子宫、睾丸、子宫颈或肝脏。在一个优选的实施方式中，该肿瘤为神经系统肿瘤诸如神经胶质瘤和成神经细胞瘤。所治疗的肿瘤包括原发性和转移性肿瘤，也包括恶性肿瘤。“恶性肿瘤”包括对单一用化学治疗剂、抗体、放射或其组合治疗没有应答或抵抗治疗的肿瘤。恶性肿瘤还包括通过这些药剂治疗看似得到抑制但当停止治疗后至五年、有时至十年或更长时复发的肿瘤。

依照本发明的 EGFR 拮抗剂可以是细胞外拮抗剂或细胞内拮抗剂，并且可以使用一种以上的拮抗剂。细胞外拮抗剂包括但不限于蛋白质或其它与 EGFR 结合的生物分子。在本发明的一些实施方式中，细胞外拮抗剂与 EGFR 的胞外结构域结合，从而抑制 EGFR 与它的一种或多种配体结合和/或中和 EGFR 的配体诱导活性。EGFR 配体包括 EGF、TFG- α 、双调蛋白（Amphirgulin）、肝素结合型表皮生长因子受体（HB-EGF）以及 β 细胞素。细胞外 EGFR 拮抗剂还可包括抑制带有其他 EGFR 受体亚单位（即 EGFR 同型二聚体）的 EGFR 二聚体或者带有其他生长因子受体（例如 HER2）的异型二聚体的物质。

在优选的实施方式中，EGFR 拮抗剂为与 EGFR 结合和阻止配体结合的抗体。EGFR 抗体的一个实例是西妥昔单抗（IMC-C225）（GenBank 登记号：1NQLA），它是一种嵌合（人/鼠）IgG 单克隆抗体。参见例如美国专利 4,943,533（Mendelsohn 等人）、美国专利 6,217,866（Schlessinger 等人）、美国专利申请 08/973,065（Goldstein 等人）和 09/635,974

(Teufel)、WO 99/60023 (Waksal 等人) 和 WO 00/69459, 上述所有的内容通过引用合并于此。西妥昔单抗特异性地与 EGFR 结合, 并且阻碍结合配体诸如 EGF。西妥昔单抗 Fab 含有西妥昔单抗 Fab 片段, 即鼠抗体 M225 的重链和轻链的可变区序列 (美国申请 2004/00612, 通过引用合并于此) 与人类 IgG1 C_{H1} 的重链和 κ 轻链恒定区。(西妥昔单抗包括所有三种 IgG1 重链恒定区。) 西妥昔单抗重链 CDR 区域具有下列序列: 带有 NYGVH 序列的 CDR1 区域 (SEQ ID NO: 1)、带有 VIWSGGNTDYNTPF_{TS} 序列的 CDR2 区域 (SEQ ID NO: 2) 以及带有 ALTYDYEFAY 序列的 CDR3 区域 (SEQ ID NO: 3)。西妥昔单抗轻链 CDR 区域具有下列序列: 带有 RASQSIGTNIH 序列的 CDR1 区域 (SEQ ID NO: 4)、带有 YASESIS 序列的 CDR2 区域 (SEQ ID NO: 5) 以及带有 QQNNNWPTT 序列的 CDR3 区域 (SEQ ID NO: 6)。

EGFR 抗体的另一实例是 ABX-EGF, 它是特定于 EGFR 的完全人类 IgG₂ 单克隆抗体。ABX-EGF 结合 EGFR 具有高度专一性, 可阻碍 EGFR 与其两个配体 EGF 和 TGF- α 的结合。参见例如 Figlin 等人于 2001 年 5 月 12-15 日在加利福尼亚州旧金山召开的第三十七次 ASCO 年度会议上所作的摘要 1102, 通过引用合并于此。以前称为克隆 E7.6.3 的 ABX-EGF 序列及其表征公开于美国专利 6,235,883 (美国 Abgenix 有限公司) 第 28 栏第 62 行至第 29 栏第 36 行和图示 29-34, 通过引用合并于此 (也参见 Yang 等人, 《Critical Rev. Oncol./Hematol.》, 38(1): 17-23, 2001, 通过引用合并于此)。

EGFR 抗体的另一实例是赫赛汀[®] (trastuzumab), 它是 DNA 同源重组人源化单克隆抗体, 其在细胞水平分析方面 (K_d 为 5 nM) 与人类 EGFR2 蛋白质 HER2 的胞外结构域高亲和力地选择性结合。该抗体为 IgG₁- κ 型, 其含有带有与 HER2 结合的鼠抗体 (4D5) 决定互补性区域的人骨架区。参见国际专利出版物 WO 01/89566 (Mass), 通过引用合并于此。

其他 EGFR 抗体包括: EMD72000 (Merck KGaA 公司), 它是鼠抗 EGFR 单克隆抗体 EMD55900 的人源化形式; h-R3 (TheraCIM), 人源化

抗 EGFR 单克隆抗体; Y10, 鼠单克隆抗体, 曾视为抵抗人 EGFRvIII 变异体的鼠同源体; 以及 MDX-447 (Medarex)。参见美国专利 5,558,864 (Bendig 等人)、5,884,093 (Kettleborough 等人) 和 5,891,996 (Mateo de Acosta del Rio 等人), 所有内容通过引用合并于此。

细胞外 EGFR 拮抗剂可为生物分子, 但通常为小分子, 诸如直接作用于 EGFR 胞质结构域以抑制 EGFR 介质信号转导的合成酶抑制剂。小分子 EGFR 拮抗剂的一个例子是 IRESSA™ (ZD1939), 它是作为模拟 ATP 以抑制 EGFR 的喹咪啉 (quinoxaline) 衍生物。参见美国专利 5,616,582 (Zeneca 有限公司)、WO 96/33980 (Zeneca 有限公司) 的第 4 页 (Zeneca 有限公司), 也可参见 Rowinsky 等人于 2001 年 5 月 12-15 日在加利福尼亚州旧金山召开的第三十七次 ASCO 年度会议上所作的摘要 5, 也可参见 Anido 等人于 2001 年 5 月 12-15 日在加利福尼亚州旧金山召开的第三十七次 ASCO 年度会议上所作的摘要 1712。小分子 EGFR 拮抗剂的另一实例是 TARCEVA® (OSI-774), 它是 4-(取代的苯胺基) 喹咪啉衍生物 [6,7-双(2-甲氧基-乙氧基)-喹咪啉-4-基]-(3-乙炔基-苯基) 胺盐酸盐]EGFR 抑制剂。参见 WO 96/30347 (Pfizer 有限公司) 例如第 2 页第 12 行至第 4 页第 34 行以及第 19 页第 14-17 行。也可参见 Moyer 等人, 《Cancer Res.》, 57: 4838-48 (1997), Pollack 等人, 《J. Pharmacol》, 291: 739-48 (1999)。TARCEVA® 通过抑制 EGFR 的磷酸化及其下游的 PI3/Akt 和 MAP (促分裂素原活化蛋白) 激酶信号转导通路发挥作用以导致 p27 调节细胞周期停滞。参见 Hidalgo 等人于 2001 年 5 月 12-15 日在加利福尼亚州旧金山召开的第三十七次 ASCO 年度会议上所作的摘要 281。

也报道有抑制 EGFR 的其他小分子, 其中许多被认为对 EGFR 酪氨酸激酶结构域具有特异性。这些小分子 EGFR 拮抗剂的一些实例述及于 WO 91/116051、WO 96/30347、WO 96/33980、WO 97/27199 (Zeneca 有限公司)、WO 97/30034 (Zeneca 有限公司)、WO 97/42187 (Zeneca 有限公司)、WO 97/49688 (Pfizer 有限公司)、WO 98/33798 (Warner Lambert 公司)、WO 00/18761 (American Cyanamid 公司) 和 WO 00/31048 (Warner Lambert 公司)。特异性小分子 EGFR 拮抗剂的实例

包括 CI-1033 (Pfizer), 即酪氨酸激酶的喹咪啉 (N-[4-(3-氯-4-氟-苯胺)-7-(3-吗啡啉-4-基-丙氧基)-喹唑啉-6-基]-丙烯酰胺) 抑制剂, 特别是 EGFR, 述及于 WO 00/31048 的第 8 页第 22-6 行; PKI-166 (Novartis), 它是 EGFR 的吡咯并嘧啶抑制剂并述及于 WO 97/27199 的第 10-12 页; GW2016 (Glaxo SmithKline), 它是 EGFR 和 HER2 的抑制剂; EKB569 (Wyeth), 报道它可抑制体内过表达 EGFR 或 HER2 的肿瘤细胞的生长; AG-1478 (Tryphostin), 它是抑制来自 EGFR 和 erB-2 信号的喹咪啉小分子; AG-1478 (Sugen), 它是也可抑制蛋白激酶 CK2 的双底物抑制剂; PD 153035 (Parke-Davis), 报道可抑制 EGFR 激酶活性和肿瘤生长、诱发培养细胞凋亡、增强细胞毒素化学治疗剂的细胞毒性; SPM-924 (Schwarz Pharma), 靶向治疗前列腺癌的酪氨酸激酶抑制剂; CP-546,989 (OSI Pharmaceuticals), 报道为源于治疗实体肿瘤的抑制剂; ADL-681, 靶向治疗肿瘤的 EGFR 激酶抑制剂; PD 158780, 它是报道以抑制鼠体内 A4431 肿瘤移植的肿瘤生长率的吡咯并嘧啶; CP-358,774, 它是以抑制鼠体内 HN5 肿瘤移植的自身磷酸化的喹咪啉; ZD 1839, 它是报道具有鼠体内肿瘤移植模式的抗肿瘤活性的喹咪啉, 其中包括外阴癌、NSCLC 癌、前列腺癌、卵巢癌、结直肠癌; CGP 59326A, 它是报道抑制鼠体内 EGFR 阳性肿瘤移植生长的吡咯并嘧啶; PD 165557 (Pfizer); CGP54211 和 CGP53353 (Novartis), 它们是双苯胺亚氮邻苯二甲酰亚胺 (dianilnophthalimides)。天然产生的 EGFR 酪氨酸激酶抑制剂包括染料木黄酮、除莠霉素 A、栎精和制表霉素。

报道以抑制 EGFR 并且因此在本发明范围内的进一步的小分子为如下分子: 诸如述及于美国专利 5,679,683 的化合物的三环化合物; 诸如述及于美国专利 5,616,582 的化合物的喹咪啉衍生物; 诸如述及于美国专利 5,196,446 的化合物的吡啶化合物。

应当理解为, 本发明所用的有用小分子为 EGFR 抑制剂, 但不必完全特异于 EGFR。

在优选实施方式中, EGFR 拮抗剂是指具有一种或多种下述性能的抗 EGFR 抗体:

1) 该抗体与 EGFR 的外结构域结合并且抑制配体的结合。例如, 通过利用纯化的或膜结合配体进行的直接结合检定可测定其抑制。在该实施方式中, 本发明中的抗体或其中的片段优选以至少如 EGFR 的天然配体 (EGF, TGF- α) 一样强的与 EGFR 结合。

2) 该抗体中和 EGFR。配体与 EGFR 外部的胞外结构域的结合激发了酪氨酸激酶的活性以及受体磷酸化和/或涉及不同信号通路的其他蛋白的磷酸化。EGFR 的中和包括与信号转导正常相关的一种或多种活性的抑制、减弱、失活和/或中断。利用例如组织、培养细胞或纯化后细胞成分可测定体内、离体或体外的中和。

EGFR 中和的一种测定是抑制受体酪氨酸激酶的活性。利用公知方法即可检定酪氨酸激酶的抑制; 例如, 通过测定重组激酶受体的自身磷酸化水平和/或天然或合成底物的磷酸化。因此, 磷酸化检定用于测定本发明内容中的中和抗体。例如在 ELISA 测定或免疫印迹法中, 利用抗体特异于磷酸化酪氨酸可检测磷酸化。有关酪氨酸激酶活性的一些检测述及于 Panek 等人, 《*J. Pharmacol. Exp. Thera.*》 283: 1433-44 (1997) 和 Batley 等人, 《*Life Sci.*》 62:143-50 (1998)。本发明抗体引起应答配体的细胞中的 EGFR 的酪氨酸磷酸化降低至少约 75%、优选至少约 85% 以及更优选至少约 90%。

EGFR 中和的另一种测定是抑制 EGFR 下游底物的磷酸化。因而, 能够测定出 MEK 和 ERK 的磷酸化水平。磷酸化的减弱程度为至少约 40%, 并且可为至少约 60% 或至少约 80%。

另外, 可利用检测蛋白表达的检测方法测定 EGFR 中和, 其中通过 EGFR 酪氨酸激酶活性调节所测定的蛋白质。这些方法包括检测蛋白表达的免疫组织化学 (IHC)、检测基因增殖的荧光原位杂交 (FISH)、竞争放射性配体结合分析法, 固体基质印迹技术, 诸如 RNA 和 DNA 印迹法、逆转录酶聚合酶链反应 (RT-PCR) 和 ELISA。参见例如, Grandis 等人, 《*Cancer*》, 78:1284-92 (1996); Shimizu 等人, 《*Japan J. Cancer Res.*》, 85:567-71 (1994); Sauter 等人, 《*Am. J. Path.*》, 148:1047-53 (1996); Collins, 《*Glia*》 15:289-96 (1995); Radinsky 等人, 《*Clin. Cancer Res.*》. 1:19-31

(1995); Petrides 等人, 《*Cancer Res.*》 50:3934-39 (1990); Hoffmann 等人, 《*Anticancer Res.*》 17:4419-26 (1997); Wikstrand 等人, 《*Cancer Res.*》 55:3140-48 (1995)。

离体检定也可用于测定 EGFR 中和。例如通过利用存在和不存在抑制剂的情况下的受体配体所激发的细胞系的促细胞分裂检定可观察到细胞系受体酪氨酸激酶抑制。此促细胞分裂检定的一个实例是 3T3 细胞促细胞分裂检定(源自美国维吉尼亚州马纳萨斯的美国细胞库的 3T3(克隆 A31-714)细胞)。另一方法涉及测试抑制 EGFR 表达肿瘤细胞或转染以表达 EGFR 的细胞的生长。利用肿瘤模型例如注射入鼠体内的人的肿瘤细胞也可观察抑制。

本发明的抗体并不受限于 EGFR 中和的任何特定机制。本发明的抗 EGFR 抗体可与 EGFR 细胞表面受体进行外部结合、阻碍结合配体以及后续的经受体所关联的酪氨酸激酶介导的信号转导、并且避免 EGFR 和信号转导级联中其他下游蛋白质的磷酸化。

3) 该抗体向下调制 EGFR。存在于细胞表面的 EGFR 的数量取决于受体蛋白的产生、内在化、降解。通过检测受体的内在化或受体结合的分子能够间接地测定出细胞表面上所存有的 EGFR 的数量。例如, 通过带标记抗体接触表达 EGFR 的细胞可测定出受体的内在化。然后对膜结合抗体进行分离、收集、计数。通过溶解细胞并检测溶解产物中的标记测定内在化的抗体。

另一途径是直接测定存于细胞上的受体数量, 然后用抗 EGFR 抗体或其他物质处理, 例如通过用于 EGFR 表面表达的染色细胞的荧光激活细胞分类检测法。在 37°C 下培育染色细胞并随时间测定荧光密度。作为对照, 一部分染色群体在 4°C 下培育(该条件下受体内在化停止)。

向下调节的另一措施是减少细胞内所存的总受体蛋白数, 以及反映内受体的降解。因而, 用本发明所用抗体处理细胞(特别是肿瘤细胞)将导致总的细胞 EGFR 的减少。在一个优选实施方式中, 该减少程度为至少约 70%, 更优选至少约 80%, 甚至更优选至少约 90%。

为了治疗人类受试者, 本发明中的抗体优选人类。二者择一地, 该

抗体可源自于非人灵长类或其他哺乳动物、或者人源化或嵌合抗体。

本发明抗体片段能够通过裂解整个抗体、或表达编码片段的 DNA 进行生成。通过由 Lamoyi 等人,《*J. Immunol. Methods*》, 56: 235-243 (1983) 和《*Parham, J. Immunol.*》 131: 2895-2902 (1983)所描述的方法可以制备抗体片段。此片段可包含 Fab 片段或 F(ab')₂ 片段的一种或两种。此片段还可包含单链片段可变区抗体, 即 ScFv 抗体、二聚体或其他抗体片段。产生此功能性等同物的方法公开于 PCT 申请 WO 93/21319、欧洲专利申请 EP 239400、PCT 申请 WO 89/09622、欧洲专利申请 EP 338745 和欧洲专利申请 EP 332424 中。

用于本发明中的媒介物转化和抗体表达的优选寄主细胞是例如 COS-7 细胞、中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞的哺乳动物细胞, 以及源自诸如淋巴瘤、骨髓瘤 (例如 NS0) 或杂肿瘤的淋巴细胞系。可选择性地使用其他真核寄主诸如酵母菌。

所转化的寄主细胞可在含有如下所述碳的可同化源的液体介质中通过本领域所熟知的方法培育: 碳 (碳水化合物诸如葡萄糖或乳糖)、氮 (氨基酸、多肽、蛋白质或降解产物诸如蛋白胨、铵盐或其类似物) 以及无机盐 (硫酸盐、磷酸盐和/或钠、钾、镁和钙的碳酸盐)。该介质进一步包含例如生长促进物质, 诸如微量元素例如铁、锌、镁等。

可从由人类重链和轻链可变区基因构建的噬菌体抗体库分离出本发明中的高亲和力抗 EGFR 抗体。例如, 可从含有重组可变区基因的外周血淋巴细胞获得本发明的可变结构域。二者择一地, 从不同源可获得可变结构域部分诸如 CDR 和 FW 区域, 并且可进行重组。此外, 可变结构域部分 (例如 FW 区域) 可为合成共有序列。

例如可从自然发生的抗体或者 Fab 或 scFv 噬菌体库获得本发明的抗体和抗体片段。可以理解为, 为从含有 V_H 和 V_L 域的抗体制得单结构域抗体, 可期望 CDRs 外部的一些氨基酸替代物增强结合、表达或溶解。例如, 可期望修饰未隐藏于 V_H-V_L 界面内的氨基酸残基。

进而, 利用产生人类免疫球蛋白 γ 重链和 κ 轻链的转基因鼠 (例如来自加利福尼亚州圣何塞 Medarex 的昆明种小鼠) 通过标准交瘤技术可

得到本发明中的抗体和抗体片段(Harlow & Lane, ed., 抗体: 实验室手册, 冷泉港实验室, 211-213 (1998), 通过引入合并于此)。在优选的实施方式中, 产生基因组的人类抗体的实质部分被插入鼠基因组内, 并补偿产生内源性鼠抗体的不足。利用根据需要带有激发剂的 PDGFRa (通常在完全佐剂中) 对此种小鼠进行皮下(小大写字体)免疫。免疫方法是本领域所熟知的。

本发明中可使用的抗体包括完全免疫球蛋白、免疫球蛋白的抗原结合段, 和包括包含免疫球蛋白的抗原结合段的抗原结合蛋白。免疫球蛋白的抗原结合段包括例如 Fab、Fab'和 F(ab')₂。已经开发出保留结合特异性但具有可期望的其他特性的其他抗体形式包括例如双特异性、多价(多于两个结合位置)、紧凑尺寸(例如单独结合域)。

单链抗体缺乏所衍生的整个抗体的某些或全部恒定区。因此, 它们能够克服与使用整个抗体有关联的一些问题。例如, 单链抗体被认为没有重链恒定区和其他生物分子之间的某种所不期望的相互作用。另外, 单链抗体比整个抗体小得多, 而比整个抗体具有更好的渗透性, 从而允许单链抗体更有效地定位并结合靶向抗原结合位点。而且, 与整个抗体相比, 相对小尺寸的单链抗体使其本身更小可能性地激起受体内不想要的免疫反应。

每个单链具有由第一多肽接头共价键合的一个 V_H 和一个 V_L 结构域的多个单链抗体, 可由至少一个或多个多肽接头共价键合以形成可为单特异性或多特异性的多价的单链抗体。多价单链抗体的每个链包括可变轻链片段和可变重链片段, 并由多肽接头与至少一个其他链连接。该肽接头由至少十五个氨基酸残基组成。基酸残基的最大数目为约一百个。

两个单链抗体可组合形成二聚体, 也可称作二价二聚体。二聚体具有两个链和两个结合位点, 并可为单特异性或双特异性。该二聚体的每个链包括与 V_L 结构域连接的 V_H 结构域。该结构域与短得足以防止相同链上的结构域之间配对的接头连接, 因而促使不同链上的互补结构域之间进行配对以重新创建该两个抗原结合位点。

三个单链抗体可组合形成三聚体, 也称为三价三聚体。三聚体可由

与 V_L 结构域或 V_H 结构域的羧基末端直接结合在一起的 V_L 结构域或 V_H 结构域的氨基酸末端构成，即没有任何接头序列。该三聚体具有头尾相连的环状形方式排列的多肽的三个 Fv 首端。该三聚体的可能构型是平面结构，三个结合位点位于一个平面、彼此间形成 120° 。三聚体可为单特异性、双特异性或三特异性。

因此，本发明的抗体及其片段包括但不限于特定与抗原结合的自然形成的抗体、二价片段诸如 $F(ab')_2$ 、单价片段诸如 Fab、单链抗体、单链 Fv(scFv)、单结构域抗体、多价单链抗体、二聚体、三聚体等。

依照本发明，EGFR 拮抗剂与一种或多种抗肿瘤药物联合给药。正如此处所用的，该术语“抗肿瘤”药物不包括 EGFR 拮抗剂，除非其他情况特指。可使用任何合适的抗肿瘤药物，诸如化学治疗剂、辐射线或其组合。该抗肿瘤药物可为烷化剂或抗代谢物。烷化剂的实例包括但不限于顺铂、环磷酰胺、美法仑以及氮烯唑胺。抗代谢物的实例包括但不限于阿霉素、柔红霉素 (doxorubicin)、紫杉醇和吉西他滨。

在一个优选实施方式中，该抗肿瘤药物是化学治疗剂。优选的化学治疗剂包括氮磷汀、顺铂、氮烯唑胺 (DTIC)、更生霉素、二氯甲基二乙胺 (氮芥)、链佐星、环磷酰胺、卡氮芥 (BCNU)、氮芥 (CCNU)、亚德里亚霉素 (阿霉素)、阿霉素脂质体 (doxil)、吉西他滨 (gemzar)、柔红霉素、柔红霉素脂质体 (daunoxome)、甲苄胍、丝裂霉素、阿糖胞苷、足叶乙甙、氨甲叶酸、氟尿嘧啶、长春碱、长春新碱、博来霉素、紫杉醇 (taxol)、多西紫杉醇 (taxotere)、阿地白介素、天(门)冬酰胺酶、白消安、碳水化合物食品、克拉屈滨、喜树碱、CPT-11、10-羟基-7-乙基-喜树碱 (SN38)、达卡巴嗪、尿苷、氟达拉滨、羟基脲、异环磷酰胺、依得如比脆 (idarubicin)、美司钠、干扰素 α 、干扰素 β 、依立替康、米托蒽醌、拓扑替康、亮丙瑞林、甲地孕酮、美法仑、巯(基)嘌呤、普卡霉素、米托坦、培门冬酶、喷司他丁、哌泊溴烷、普卡霉素、链佐星、它莫西芬、替尼泊苷、鞣内脂、硫鸟嘌呤、噻替派、乌拉莫司汀、长春瑞滨、苯丁酸氮芥以及上述的组合。在一个更优选的实施方式中，该化学治疗剂是依立替康。

依照包装说明书和/或患者的临床反应按时按剂量进行包括化学治疗剂和/或抗代谢物在内的抗肿瘤药物的给药。此剂量对于本领域的普通技术人员来说是显而易见的，无需非正当实验。例如，优选对依立替康进行推荐剂量范围为约 50 mg/m² 至约 350 mg/m² 的给药，不过该剂量可或高或低，这要取决于患者的临床反应。其他药物每次给药和/或治疗方案的剂量范围为约 1 mg/m² 至约 1,000 mg/m²。基于合适的临床试验方案和/或本领域技术人员的临床经验实施放射治疗。

在联合治疗中，在开始用另一药物治疗之前、期间或之后进行 EGFR 拮抗剂的给药，也可为其任何组合方式，即在开始抗肿瘤药物治疗之前和期间、之前和之后、期间和之后或之前、期间和之后。例如，开始放射治疗之前，可在 1 天至 30 天、优选 3 天至 20 天、更优选 5 天至 12 天之间进行 EGFR 抗体的给药。在本发明的优选实施方式中，化疗可与抗体治疗同时实施，或者更优选在抗体治疗之后实施化疗。

在本发明中，可利用任何合适方法或途径进行本发明拮抗剂的给药，并且可选择地，与抗肿瘤药物和/或其他受体抑制剂联合给药。依照本发明所利用抗肿瘤药物的方案包括被认为是最合适于治疗患者肿瘤的任何方案。不同肿瘤需要使用特定的抗肿瘤抗体和特定的抗肿瘤药物，要根据患者的耐受基础进行实施。给药途径包括例如口服、静脉注射给药、腹腔内给药、皮下注射给药或肌肉注射给药。拮抗剂的给药剂量取决于诸多因素，包括例如拮抗剂类型、所治疗肿瘤的类型和严重性以及拮抗剂的给药途径。但是应该强调的是，本发明并不限于任何特定给药方法或途径。

本领域的技术人员将理解到，治疗剂量和频次取决于个体患者的耐受量以及所用阻断剂或抑制剂的药理学和药动学性质。理想的情况是实现所用药物的可饱和性药动学。抗 EGFR 抗体的负荷剂量范围可为例如约 10 mg/m² 至约 1000 mg/m²，优选约 200 mg/m² 至约 400 mg/m²。此后为几个附加日剂量或周剂量范围，例如约 200 mg/m² 至约 400 mg/m²。对患者所表现出的副作用实施监控，当此副作用严重时停止治疗。

本领域的技术人员也将会明白，如何监控治疗进程以确定有效剂量。

例如，一种途径是监控 MRI、CT 或其他脑部检查。

实施例

实施例 1: 下述实施例公开了通过依立替康和 EGFR 抗体的联合给药治疗恶性实体肿瘤的方法。

自 2005 年 8 月至 2006 年 3 月，对患有恶性实体肿瘤和预期寿命为至少 8 周的 20 个婴幼儿患者进行依立替康和不同剂量水平的西妥昔单抗的给药。以下述肿瘤类型把患者分成两组（年龄为 1-12 岁的为群体 A，年龄为 13-18 岁的为群体 B）：脑干胶质细胞瘤/星状细胞瘤（10）、肝胚细胞瘤、骨肉瘤（1）、室鼓膜瘤（1）、成神经细胞瘤（1）、横纹肌肉瘤（1）和其他瘤（5）。依立替康的给药剂量为 60 分钟输注 20 mg/m²/天，每周 5 天，共两周，每 21 天一个疗程。下表 1 为剂量方案和带有剂量限制性毒性（DLTs）的受试者数量：

表 1

群体	剂量水平	西妥昔单抗 (mg/m ² /天, 1 天、8 天、15 天)	依立替康 (mg/m ² /天, 1-5 天和 8-12 天)	受试者数量	带有 DLT (剂量限制性毒性) 的受试者数量
A	1	75	20	6	1 (第 3 级腹泻)
A	2	150	20	6	2 (第 4 级嗜中性白血球减少, 第 3 级腹泻)
B	1	75	20	8	1 (第 3 级腹泻)

由于群体 A、剂量水平 2 的六个患者中的两个患者有 DLTs 的经历，被认为相关于依立替康，将依立替康逐步降级为 16 mg/m²。群体 B 中的一个患者经历了第 3 级输液反应，因而停止治疗。其他所观察到的毒性包括第 1 级皮疹。

患有 EGFR 阴性的高级神经胶质瘤 (A 组、剂量水平 1) 的一个受试者实现部分缓解并且目前处于周期 13 中。患有成神经细胞瘤 (A 组、剂量水平 1) 的一个受试者经历轻微缓解并且目前经历周期 9。七位受试者具有平均 3.4 月病情稳定的最佳应答 (介于不足两个月至七个月多的时间范围)。

总之, 依立替康和西妥昔单抗的组合显示出在恶性实体肿瘤中所希望的抗肿瘤活性。

上述已阐述的说明和实施例仅用于描述本发明, 并不认为对本发明的限制。可认为每一所公开的本发明的观点和实施方式为独立的或者与本发明的其他观点、实施方式及变型的组合。而且, 当本发明的实施方式中的一些特征仅在一些图示中显示时, 这些特征可合并于其他图示所表示的实施方式中, 同时仍处于本发明的保护范围之内。另外, 除非在其他情况特定, 本发明的任何方法步骤都限定任何实施的特定次序。本领域的技术人员容易想到合并本发明的精神和主旨的所公开实施方式的变型, 这种变型均在本发明的范围之内。而且, 所有引用的全部参考内容合并于此, 以作参考。

<110> 埃姆克隆系统股份有限公司 (IMCLONE SYSTEMS, INC.)

<120> 以表皮生长因子受体抗结剂治疗婴幼儿体内的肿瘤

<130> 1017.52210-PCT

<140>

<141>

<150> 60/833,487

<151> 2006-07-27

<160> 6

<170> PatentIn 3.3 版

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的表述: 合成肽

<400> 1

Asn Tyr Gly Val His

1

5

<210> 2

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的表述: 合成肽

<400> 2

Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Thr Pro Phe Thr Ser

1

5

10

15

<210> 3

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的表述: 合成肽

<400> 3

Ala Leu Thr Tyr Tyr Asp Tyr Glu Phe Ala Tyr

1

5

10

<210> 4

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的表述: 合成肽

<400> 4

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn Ile His

1

5

10

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的表述: 合成肽

<400> 5

Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser

1

5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的表述: 合成肽

<400> 6

Gln Gln Asn Asn Asn Trp Pro Thr Thr

1

5