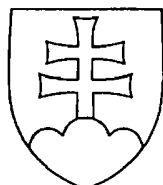


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) SK



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

ZVEREJNENÁ
PATENTOVÁ PRIHLÁŠKA

- (22) Dátum podania prihlášky: 1. 5. 2000
(31) Číslo prioritnej prihlášky: 09/312 284
09/374 028
(32) Dátum podania prioritnej prihlášky: 14. 5. 1999
13. 8. 1999
(33) Krajina alebo regionálna
organizácia priority: US, US
(40) Dátum zverejnenia prihlášky: 8. 10. 2002
Vestník ÚPV SR č.: 10/2002
(62) Číslo pôvodnej prihlášky
v prípade vylúčenej prihlášky:
(86) Číslo podania medzinárodnej prihlášky
podľa PCT: PCT/US00/11756
(87) Číslo zverejnenia medzinárodnej prihlášky
podľa PCT: WO00/69459

(11), (21) Číslo dokumentu:

1652-2001

(13) Druh dokumentu: A3

(51) Int. Cl.7 :

A61K 39/395

(71) Prihlasovateľ: IMCLONE SYSTEMS INCORPORATED, New York, NY, US;

(72) Pôvodca: Waksal Harlan W., Montclair, NJ, US;

(74) Zástupca: Bušová Eva, JUDr., Bratislava, SK;

(54) Názov: Liečivo na inhibíciu rastu refraktérnych nádorov

(57) Anotácia:
Použitie účinného množstva antagonistu receptora epider-
málneho rastového faktora (EGFR) na výrobu liečiva na
inhibíciu rastu refraktérnych nádorov.

SK 1652-2001 A3

Liečivo na inhibíciu rastu refraktérnych nádorov

Oblasť techniky

Predkladaný vynález sa týka spôsobu inhibície rastu refraktérnych nádorov, ktoré sú stimulované ligandom epidermálneho rastového faktoru u ľudských pacientov, ktorý spôsob zahrnuje liečbu ľudských pacientov účinným množstvom antagonistu receptora pre epidermálny rastový faktor.

Doterajší stav techniky

Nádorové ochorenia sú v Spojených štátoch druhou vedúcou príčinou úmrtí po srdcových príhodách. Vo vývoji nových terapeutických postupov pre liečbu týchto devastujúcich ochorení došlo k významnému pokroku. Veľká časť tohto pokroku je spôsobená lepším porozumením bunečnej proliferácie normálnych aj nádorových buniek.

Normálne bunky proliferujú vysoko kontrolovanou aktiváciou receptorov pre rastové faktory svojimi príslušnými ligandmi. Príklady týchto receptorov sú tyrozín kinázy receptora pre rastové faktory.

Nádorové bunky tiež proliferujú prostredníctvom aktivácie receptorov pre rastové faktory. Strata kontroly môže byť spôsobená četnými faktormi, ako sú overexprese rastových faktorov a/alebo receptorov, a autonómnej aktivácie biochemických dráh regulovaných rastovými faktormi.

Niektorými príkladmi receptorov hrajúcimi rolu v

tumorigenéze sú receptory pre epidermálny rastový faktor (EGRF), rastový faktor odvodený od doštičiek (PDGRF), inzulínu podobný rastový faktor (IGRF), nervový rastový faktor (NGRF) a fibroblastový rastový faktor (FGF) .

Jednotlivé receptory z rodiny receptorov pre epidermálny rastový faktor (EGF) sú zvlášť dôležité tyrozín kinázy receptorov pre rastové faktory združené s tumorigenézou epidermálnych buniek. Prvý člen rodiny EGF receptorov, ktorý bol objavený, bol glykoproteín majúci zjavnú molekulárnu váhu približne 165 kD. Tento glykoproteín, ktorý bol popísaný Mendelsohnom et al. v patente US Patent č. 4943533 je známy ako EGF receptor (EGFR) a tiež ako ľudský EGF receptor-1 (HER1) .

EGFR je overexprimovaný vo veľa typoch epidermoidných nádorových buniek. EGF a transformujúci rastový faktor alfa (TGF-alfa) sú dva známe ligandy EGFR. Príklady nádorov, ktoré exprimujú EGF receptory, zahŕňujú glioblastómy, rovnako tak ako nádory pľúc, prsníka, hlavy a krku. Amplifikácie a/alebo over expresie EGF receptorov na membránach nádorových buniek je združená so zlou prognózou.

Liečba nádorových ochorení tradične zahŕňa chemoterapiu alebo radiačnú liečbu. Niektoré príklady chemoterapeutických látok zahŕňujú doxorubicín, cisplatinu a taxol. Radiačná liečba môže byť buď to vonkajšími lúčmi alebo zo zdroja umiestneného v pacientovi, tzn. tak nazývaná brachyterapia.

Ďalší typ liečby zahŕňa antagonistov rastových faktorov alebo receptorov pre rastové faktory hrajúcich rolu v proliferácii buniek. Títo antagonisti neutralizujú aktivitu rastového faktora alebo receptora a inhibujú rast nádorov, ktoré exprimujú receptor.

Patent US Patent č. 4943533 napríklad popisuje myšaciu monoklonálnu protilátku nazývanú 225, ktorá sa viaže k EGF receptoru. Patent je pripísaný Kalifornskej univerzite a licenciu má exkluzívne spoločnosť ImClone Systems Incorporated. Protilátka 225 je schopná inhibície rastu kultivovaných nádorových línií exprimujúcich EGFR, rovnako tak ako rast týchto nádorov za podmienok in vivo, rastú-li ako xenografty na holých myšiach. Vid' Masui et al. Cancer Res 44, 5592-5598 (1986).

Nevýhodou použitia myšacích monoklonálnych protilátok v liečbe človeka je možnosť odpovedi človeka proti myšacím protilátkam (HAMA) v dôsledku prítomnosti myšacích Ig sekvencií. Táto nevýhoda môže byť minimalizovaná nahradením celej konštantnej oblasti myšacej (alebo inej necicavčej) protilátky ľudskou konštantnou oblasťou. Náhrada konštantných oblastí ľudskými sekvenciami je zvyčajne nazývaná chimerizáciou.

Chimerizačný postup môže byť účinnejší nahradením štruktúry variabilných oblastí myši oblasťou odpovedajúcimi ľudskými sekvenciami. Štruktúrou variabilných oblastí sa rozumie variabilné oblasti protilátky inej ako hypervariabilné oblasti. Hypervariabilné oblasti sú tiež známe ako komplementaritu určujúce oblasti (CDRs).

Nahradenie konštantných oblastí a štruktúr variabilných oblastí ľudskými sekvenciami je zvyčajne nazývané humanizáciou. Humanizovaná protilátka je menej imunogénna (tzn. vyvoláva nižšiu HAMA odpoveď), pretože je viac myšacích sekvencií nahradené ľudskými sekvenciami. Nanešťastie nahradením viac oblastí myšacích protilátok ľudskými sekvenciami dochádza k nárastu ceny aj vynaloženého úsilia.

Nie je predpokladané, že nahradenie nie-ludských konštantných oblastí ľudskými konštantnými oblasťami ovplyvňuje aktivitu protilátok. Napríklad Prewett et al. zaznamenali inhibíciu nádorovej progresie dobre uchytených xenograftov nádoru prostaty u myši pri použití chimerickej formy monoklonálnej protilátky anti-EGFR-225, ktorá je diskutovaná vyššie. Chimerická forma je nazývaná c225. Journal of Immunotherapy 19, 419-427 (1997).

Ďalším prístupom k zníženiu imunogenity protilátok je použitie fragmentov protilátok. Napríklad v článku Aboud-Piraka et al., Journal of the National Cancer Institute 80, 1605-1611 (1988) je zrovnávaný protinádorový účinok protilátky proti EGF receptoru nazývanej 108,4 s fragmentmi protilátky. Modelom nádoru boli KB bunky vo forme xenograftov holých myši. KB bunky sú odvodené z ľudských orálnych epidermoidných karcinómov a exprimujú vyššie množstvo EGF receptorov.

Aboud-Pirak et al. našli, že protilátka aj bivalentná $F(ab')_2$ fragment spomalili nádorový rast za podmienok in vivo, ačkoľvek $F(ab')_2$ fragment bol menej účinný. Monovalentný Fab fragment protilátky, ktorej schopnosť viazať receptor združený s bunkou bola konzervovaná, však nádorový rast nespomalil.

Boli urobené také pokusy zlepšiť liečbu nádorov kombináciou niektorých z techník spomínaných vyššie. Baselga et al. napríklad popísali v Journal of the National Cancer Institute 85, 1327-1333 (1993) protinádorové účinky chemoterapeutickej látky doxorubicínu pomocou anti-EGFR monoklonálnej protilátky.

Iní autori sa pokúsili zvýšiť citlivosť nádorových buniek k žiareniu prostredníctvom kombinácie žiarenia s adjuvantnou látkou. Napríklad v patente Bonnen, US Patent 4846782 je

popísaná zvýšená citlivosť ľudských nádorov k žiareniu, ak bola radiačná liečba skombinovaná s liečbou interferónom. Snelling et al zaznamenali v II. fáze klinickej štúdie menšie zlepšenie v radiačnej liečbe pacientov s astrocytómami s anaplastickými ložiskami, ak bola radiačná liečba skombinovaná s anti-EGFR monoklonálnou protilátkou označenou izotopom jódu 125. Viď Hybridoma 14, 111-114 (1995).

Podobne Balaban et al zaznamenal schopnosť anti-EGFR monoklonálnych protilátok senzitivizovať xenografty ľudského skvamózneho karcinómu u myši voči radiácii, ak predchádzalo radiačnej liečbe podanie anti-EGFR protilátky nazývanej LA22. Viď Biochimica et Biophysica Acta 1314, 147-156 (1996). Salch et al. tiež zaznamenali lepšiu kontrolu nádoru za podmienok in vitro a u myši, ak bola radiačná liečba zvýšená anti-EGFR monoklonálnymi protilátkami. Saleh et al uzavrel, že "Ďalšie štúdie ... môžu viesť k novej modalitnej RT/Mab terapii". Viď abstrakt 4197 v Proceedings of the American Association for Cancer Research 37, 612, (1996).

Naprotiveň vyššie popísaným liečebným protinádorovým postupom nebol žiadny namierený špecificky na liečbu nádorov refraktérnych ku konvenčnej liečbe a radiácii. Refraktérne nádory vedú k rýchlej progresii ochorenia, zvyčajne s špatnou prognózou. V súčasnosti môže byť len málo urobené pre pacientov s nádormi refraktérnymi ku konvenčnej nádorovej liečbe.

V závislosti na uvedenom existuje potreba zlepšeného spôsobu refraktérnych nádorov u človeka.

Popis vynálezu

Tento a ďalšie ciele, ktoré budú zrejmé osobám bežne

skúseným v obore, boli dosiahnuté poskytnutím spôsobu inhibície rastu refraktérnych nádorov, ktoré sú stimulované ligandom receptora pre epidermálny rastový faktor (EGFR) u ľudských pacientov. Spôsob zahrnuje liečbu ľudských pacientov účinným množstvom antagonistu EGFR/HERI.

V ďalšej forme vynálezu zahrnuje spôsob predkladaného vynálezu liečbu ľudských pacientov kombináciou účinného množstva antagonistu EGFR/HER1 a liečby chemoterapeutikami.

V ešte ďalšej forme vynálezu zahrnuje spôsob predkladaného vynálezu liečbu ľudských pacientov kombináciou účinného množstva antagonistu EGFR/HERI a radiačnej liečby.

Detailný popis vynálezu

Predkladaný vynález poskytuje zlepšený spôsob liečby refraktérnych nádorov, zvlášť refraktérnych malígnych nádorov u ľudských pacientov, ktorí majú refraktérny nádor.

Refraktérne nádory

Refraktérne nádory zahrnujú nádory, ktoré neodpovedajú alebo sú rezistentné na liečbu samotnými chemoterapeutickými látkami, samotnú radiačnú liečbu alebo ich kombináciu. Pre účely tejto špecifikácie zahrnujú refraktérne nádory tiež nádory, ktoré sa zdajú byť inhibované chemoterapeutickými látkami a/alebo radiačnou liečbou, ale ktoré relabujú do 5 rokov, niekedy do 10 rokov alebo dlhšie po ukončení liečby.

Typy refraktérnych nádorov, ktoré môžu byť liečené v zhode s vynálezom, sú akékoľvek refraktérne nádory, ktoré sú stimulované ligandom EGFR. Niektoré príklady ligandov, ktoré stimulujú EGFR zahrnujú EGF a TGF-alfa.

Rodina receptorov EGFR zahŕnuje EGFR, ktorý je v literatúre tiež označovaný ako HER1. V tejto špecifikácii sa EGFR týka špecifického člena rodiny EGFR receptorov nazývaných EGFR/HER1.

Refraktérne nádory liečiteľné predkladaným vynálezom sú endogénne nádory natívne pre ľudských pacientov. Tieto nádory je o veľa obťažnejšie liečiť ako exogénne xenografty ľudských nádorov, ktoré boli liečené na zvieratách. Viď napríklad Prewet et al. Journal of Immunotherapy 19, 419-427 (1997).

Niektoré príklady refraktérnych nádorov zahŕňujú karcinómy, gliómy, sarkómy, adenokarcinómy, adenosarkómy a adenómy. Tieto nádory sa vyskytujú skutočne vo všetkých častiach ľudského tela a vo všetkých orgánoch. Nádory môžu byť napríklad prítomné v prsníku, srdci, pľúcach, tenkom čreve, hrubom čreve, slezine, obličkách, močovom mechúre, hlave a krku, vaječníku, prostate, mozgu, podžalúdkovej žľaze, koži, kostiach, kostnej dreni, krvi, thymu, maternici, miešku, krčku maternicovom a v pečeni.

Nádory môžu exprimovať EGFR v normálnom množstve, alebo môžu EGFR overexprimovať v množstve, ktoré napríklad prevyšuje normálne hodnoty 10, 100 alebo 1000 krát. Niektoré nádory, ktoré overexprimujú EGFR zahŕňujú nádory prsníka, pľúc, tlstého čreva, obličiek, močového mechúra, hlavy a krku, zvlášť sa jedná o skvamózny karcinóm hlavy, a krku, ďalej nádory vaječníku, prostaty a mozgu.

Antagonisti EGFR/HER1

Refraktérne nádory, ktoré sú predmetom predkladaného vynálezu, môžu byť liečené antagonistom EGFR/HER1. Pre účely

tejto špecifikácie je EGFR/HER1 akákoľvek látka, ktorá inhibuje stimuláciu EGFR/HER1 ligandom EGFR/HER1.

Rast refraktérnych nádorov je dostatočne inhibovaný u pacienta, aby sa zabránila alebo znížila progresia nádoru (tzn. rast, invazivita, metastázy a/alebo rekurencia). EGFR antagonisti, ktoré sú predmetom predkladaného vynálezu, môžu byť cytostatiká, alebo látky inhibujúce rast refraktérnych nádorov. Antagonista EGFR je prednostne cytolytikum, alebo látka ničiaca nádor.

Nie je známy žiadny konkrétny mechanizmus inhibície v predkladanom vynálezu. Ale však EGFR tyrozín kinázy sú obecné aktivované prostredníctvom fosforylácie. Preto fosforylačné testy sú užitočné pre predikciu užitočnosti antagonistov v predkladanom vynálezu. Niektoré užitočné testy pre EGFR tyrozín kinázovú aktivitu sú popísané v práci Panek et al., Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 283, 1433-1444 (1997) a v práci Batley et al., Life Sciences 62, 143-150 (1998). Popis týchto testov je týmto začlenený tu ako referencia.

EGFR/HER1 antagonisti zahŕňujú biologické molekuly alebo malé molekuly. Biologické molekuly zahŕňujú všetky lipidy a polyméry monosacharidov, aminokyselín a nukleotidov majúcich molekulovú váhu vyššiu ako 450. Biologické molekuly teda zahŕňujú napríklad oligosacharidy a polysacharidy, oligopeptidy, polypeptidy, peptidy a proteíny, a oligonukleotidy a polynukleotidy. Oligonukleotidy a polynukleotidy zahŕňujú napríklad DNA a RNA.

Biologické molekuly ďalej zahŕňujú deriváty akýchkoľvek molekúl popísaných vyššie. Deriváty biologických molekúl zahŕňujú napríklad lipidové a glykosylačné deriváty

oligopeptidov, polypeptidov, peptidov a proteínov. Deriváty biologických molekúl ďalej zahŕňujú lipidové deriváty oligosacharidov a polysacharidov, napríklad lipopolysacharidov. Najtypickejšie sú biologické molekuly protilátky, alebo funkční ekvivalenty protilátok.

Funkčné ekvivalenty protilátok majú väzobné charakteristiky zrovnateľné s protilátkami a inhibujú rast buniek, ktoré exprimujú EGFR. Tieto funkčné ekvivalenty zahŕňujú napríklad chimerizované, humanizované a jednoreťazcové protilátky, rovnako tak ako ich fragmenty.

Funkčné ekvivalenty protilátok tiež zahŕňujú polypeptidy s aminokyselinovými sekvenciami významne rovnakými ako je aminokyselinová sekvencia variabilných alebo hypervariabilných oblastí protilátok, ktoré sú predmetom vynálezu.

Aminokyselinová sekvencia, ktorá je významne rovnaká ako ďalšie sekvencie, ale ktorá sa líši od inej sekvencie jednou alebo viacej substitúciami, adíciami a/alebo deléciami, je považovaná za ekvivalentnú sekvenciu. Prednostne je menej ako 50%, prednostnejšie menej ako 25% a ešte prednostnejšie menej ako 10% z počtu aminokyselinových rezíduí v sekvencii substituované za, pridané k, alebo deletované z proteínu.

Funkčný ekvivalent protilátky je prednostne chimerizovaná alebo humanizovaná protilátka. Chimerizovaná protilátka obsahuje variabilnú oblasť nehumánnej protilátky a konštantná oblasť ľudskej protilátky. Humanizovaná protilátka obsahuje hypervariabilnú oblasť (CDRs) nie-humánnej protilátky. Variabilná oblasť iná ako hypervariabilná oblasť, napríklad štruktúrna variabilná oblasť, a konštantná oblasť humanizovanej protilátky sú rovnaké ako u ľudskej protilátky. Pre účely tejto prihlášky môžu byť vhodné variabilné a hypervariabilné oblasti nehumánnych protilátok odvodené z

protilátok produkovaných akýmkoľvek cicavcom iným ako človekom, v ktorom sú produkované monoklonálne protilátky. Vhodné príklady cicavcov iných ako je človek zahŕňujú napríklad králiky, potkany, myši, kone, kozy alebo primáty. Preferované sú myši.

Funkčné ekvivalenty ďalej zahŕňujú fragmenty protilátok, ktoré majú väzobné charakteristiky, ktoré sú rovnaké ako, alebo zrovnateľné s týmito charakteristikami celej protilátky. Vhodné fragmenty protilátky zahŕňujú akýkoľvek fragment, ktorý obsahuje dostatočnú časť hypervariabilnú (tzn. komplementaritu určujúcu) oblasť k špecifickej väzbe a s dostatočnou afinitou k EGFR tyrozín kináze k inhibícii rastu buniek, ktoré exprimujú tieto receptory.

Tieto fragmenty môžu napríklad obsahovať jeden alebo oba Fab fragmenty alebo $F(ab')_2$ fragment. Fragmenty protilátky prednostne obsahujú všetkých 6 komplementaritu určujúcich oblastí celej protilátky, ačkoľvek funkčné fragmenty obsahujúce menej ako všetky tieto oblasti, ako napríklad tri, štyri, alebo päť CDRs, sú také zahrnuté.

Prednostné fragmenty sú jednoreťazcové protilátky alebo Fv fragmenty. Jednoreťazcové protilátky sú polypeptidy, ktoré obsahujú aspoň variabilnú oblasť ťažkého reťazca protilátky naviazanú k variabilnej oblasti ľahkého reťazca s alebo bez spojujúcej zložky. Fv fragment teda zahŕňa celé protilátkové kombinačné miesto. Tieto reťazce môžu byť produkované v baktériách alebo v eukaryotických bunkách.

Protilátky a funkčné ekvivalenty môžu byť členmi akékoľvek triedy imunoglobulínov, ako sú napríklad IgG, IgM, IgA, IgD a IgE, a ich podtriedy. Prednostné protilátky sú členmi podtriedy IgG1. Funkčné ekvivalenty môžu byť tiež ekvivalentmi

alebo kombináciami akékoľvek z vyššie uvedených tried a podtried.

Protilátky môžu byť tiež vytvorené z žiadúceho receptora spôsobmi, ktoré sú dobre známe v obore. Receptory sú buď to komerčne dostupné, alebo môžu byť izolované dobre známymi spôsobmi. Spôsoby izolácie a purifikácie EGFR sú popísané napríklad v patente Spada, US Patent 5646153, začiatok na stĺpci 41, riadok 55. Spôsob izolácie a purifikácie EGFR popísaný v tomto patente je týmto tu začlenený ako referencie.

Spôsoby tvorby monoklonálnych protilátok zahŕňujú imunologický spôsob popísaný Kohlerom a Milsteinom v časopise Nature 256, 495-497 (1975) a Campbellom v knihe "Monoclonal Antibody Technology, The Production and Characterization of Rodent and Human Hybridomas", v Burdon et al., Eds, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Volume 13, Elsevier Science Publishers, Amsterdam (1985). Spôsob rekombinantnej DNA popísaný autorom Huse et al. v časopise Science 246, 1275-1281 (1989) je tiež vhodný.

Stručne povedané, aby boli produkované monoklonálne protilátky, je hostiteľský cicavec inokulovaný receptorom alebo fragmentom receptora, ako je popísané vyššie a potom voliteľne znovu inokulovaný. Aby bola inokulácia užitočná, musí fragment receptora obsahovať dostatočný počet aminokyselinových reziduí, aby bol definovaný epítóp molekuly, ktorá má byť detekovaná. Pokiaľ je fragment príliš krátky, aby bol imunogénny, môže byť konjugovaný k nosičovej molekule. Niektoré vhodné nosičové molekuly zahŕňujú hemocyanín a bovinný sérový albumín. Konjugácia môže byť prevedená spôsobmi známymi v obore. Jedným takým spôsobom je kombinácia cysteínového rezídua fragmentu s cysteínovým rezíduom na nosičovej molekule.

Od inokulovaných zvierat sú odobraté sleziny niekoľko dní po finálnej inokulácii. Bunečné suspenzie zo slezín sú sfúzované s nádorovou bunkou. Výsledné hybridómovej bunky, ktoré exprimujú protilátky, sú izolované, nechajú rásť a udržiavané v kultúre.

Vhodné monoklonálne protilátky, rovnako tak ako tyrozín kinázy receptora pre rastový faktor pre tvorbu týchto monoklonálnych protilátok sú tiež dostupné z komerčných zdrojov, napríklad od spoločnosti Upstate Biotechnology, Santa Cruz Biotechnology of Santa Cruz, Kalifornia, Transduction Laboratories of Lexington, Kentucky, RD Systems Inc of Minneapolis, Minnesota, a Dako Corporation of Carpinteria, Kalifornia.

Spôsoby tvorby chimerických a humanizovaných protilátok sú tiež známe v obore. Napríklad spôsoby tvorby chimerických protilátok zahŕňujú spôsoby popísané v patentoch US patents, autor Boss (Celltech) a autor Cabilly (Genetech). Viď patenty US Patent č. 4816397 a 4816567. Spôsoby tvorby humanizovaných protilátok sú popísané napríklad v patente Winter, US Patent č. 5225539.

Prednostný spôsob humanizácie protilátok je nazývaný CDR-grafting. U tohto spôsobu sú oblasti myšacej protilátky, ktoré priamo hrajú rolu vo väzbe antigénu, vo väzbe k oblasti určujúcej komplementaritu, alebo CDRs, navrhované na ľudskej variabilnej oblasti za vzniku "pretvarovaných ľudských" variabilných oblastí. Tieto plne humanizované variabilné oblasti sú potom pripojené k ľudským konštantným oblastiam za vzniku kompletných "plne humanizovaných" protilátok.

Aby boli vytvorené plne humanizované protilátky, ktoré sa

dobre viažu k antigénu, je s výhodou navrhnuté pretvarované ľudské variabilné oblasti starostlivo. Ľudské variabilné oblasti, do ktorých budú CDRs navrhované, by mali byť starostlivo vybraté a je dôležité urobiť niekoľko aminokyselinových zmien v kritických pozíciách štrukturálnych oblastí (FR) ľudských variabilných oblastí.

Pretvarované ľudské variabilné oblasti môžu napríklad obsahovať do desať aminokyselinových zmien vo FR zvolenej variabilnej oblasti ľudského ľahkého reťazca, a až dvanásť aminokyselinových zmien vo FR zvolenej variabilnej oblasti ľudského ťažkého reťazca. DNA sekvencie kódujúce gény pre tieto variabilné oblasti pretvarovaných ľudských ťažkých a ľahkých oblastí, prednostne y1 a respektíve x. Pretvarovaná humanizovaná protilátka je potom exprimovaná v cicavčích bunkách a jej afinita pre cieľ je porovnaná s afinitou odpovedajúcou myšacej protilátky a chimérickej protilátky.

Spôsoby pre výber reziduí humanizovanej protilátky, ktoré majú byť substituované, a pre tvorbu substitúcií sú dobre známe v obore. Vid' napríklad Co et al. , Nature 324, 501-502 (1992) , Queen et al., Proc Natl Acad Sci 86, 10029-1003 (1989) a Rodrigues et al., Int J Cancer, Supplement 7, 45-50 (1992). Spôsob humanizácie a pretvarovanie 225 anti-EGR monoklonálnej protilátky je popísaný Goldsteinom et al. v PCT prihláške WO 96/40210. Tento spôsob môže byť prispôsobený pre humanizáciu a pretvarovanie protilátok oproti iným tyrozín kinázam receptora pre rastový faktor.

Spôsoby prípravy jednoreťazcových protilátok sú tiež známe v obore. Niektoré vhodné príklady sú popísané Wellsom et al v Európskej patentovej prihláške 502812 a v časopise Int J Cancer 60, 137-144 (1995).

Ďalšie spôsoby prípravy funkčných ekvivalentov popísaných vyššie sú uvedené v PCT prihláške WO 93/21319, v Európskej patentovej prihláške 239400, PCT prihláške WO 89/09622, v Európskej patentovej prihláške 338745, v patente US Patent 5658570, v Patente US Patent 5693780 a v Európskej patentovej prihláške EP 332424.

Prednostné EGFR protilátky sú chimerizované, humanizované a jednoreťazcové protilátky odvodené z myšacej protilátky nazývanej 225, ktorá je popísaná v patente US Patent č. 4943533. Patent je pripísaný Kalifornskej univerzite a licenzovaný exkluzívne spoločnosťou ImClone Systems Incorporated.

Protilátka 225 je schopná inhibovať rast kultivovaných EGFR/HER1-exprimujúcich buniek za podmienok in vitro, rovnako tak ako za podmienok in vivo, ak rastú ako xenografty na holých myšiach. Viď Masui et al., Cancer Res. 44, 5592-5598 (1986). Nedávno bolo popísané, že liečebný režim kombinujúci 225 plus doxorubicín alebo cisplatinu vykazoval liečebnú synergiiu proti dobre rastúcim ľudským xenograftovým modelom u myši. Basalga et al., J Natl Cancer Inst 85, 1327-1333 (1993).

V jednej forme predkladaného vynálezu boli ľudskí pacienti s refraktérnym skvamóznym karcinómom hlavy a krku liečení kombináciou EGFR/HER1 antagonistom (chimerická anti EGFR monoklonálna protilátka, C225) a cisplatinou. Títo pacienti boli predtým bez reakcie na samotnú radiačnú liečbu, samotnú chemoterapiu, alebo na ich kombináciu. EGFR/HER1 antagonista inhiboval rast refraktérnych nádorov.

Chimerizované, humanizované a jednoreťazcové protilátky odvodené od myšacej protilátky 225 môžu byť pripravené z protilátky 225, ktorá je dostupná z ATCC. Alternatívne môžu

byť rôzne fragmenty potrebné k príprave chimerizovaných, humanizovaných a jednoreťazcových 225 protilátok syntetizované zo sekvencie poskytnutej Wellsom et al. v Int J Cancer 60, 137-144 (1995). Chimerizovaná 225 protilátka (c225) môže byť pripravená v zhode so spôsobmi popísanými vyššie. Humanizovaná 225 protilátka môže byť pripravená v zhode so spôsobom popísaným v príklade IV PCT prihlášky WO 96/40210, ktorá je týmto začlenená ako referencia. Jednoreťazcové 225 protilátky (Fv225) môžu byť pripravené v zhode so spôsobmi popísanými Wellsom et al. v časopise Int J Cancer 60, 137-144 (1995) a v Európskej patentovej prihláške 502812.

Sekvencie hypervariabilných oblastí (CDR) ľahkého a ťažkého reťazca sú reprodukované nižšie. Aminokyselinová sekvencia je indikovaná pod nukleotidovou sekvenciou.

Hypervariabilné oblasti ťažkého reťazce (VH):

CDR1

AACTATGGTGTACAC (sekvencia č. 1)

N Y G V H (sekvencia č. 2)

CDR2

GTGATATGGAGTGGTGGAAACACAGACTATAATACACCTTTCACATCC (sekvencia č. 3)

V I W S G G N T D Y N T P F T S (sekvencia č. 4)

CDR3

GCCCTCACCTACTATGATTACGAGTTTGCTTAC (sekvencia č. 5)

A L T Y Y D Y E F A Y (sekvencia č. 6)

Hypervariabilné oblasti ľahkého reťazce (VL)

CDR1

AGGGCCAGTCAGAGTATTGGCACAAACATACAC (sekvencia č. 7)

R A S Q S I G T N I H (sekvencia č. 8)

CDR2

GCTTCTGAGTCTTATCTCT (sekvencia č. 9)

A S E S I S (sekvencia č. 10)

CDR3

CAACAAAATAATAACTGGCCAACCACG (sekvencia č. 11)

Q Q N N N W P T T (sekvencia č. 12)

Naviac k molekulám biologických molekúl diskutovaným vyššie môžu byť antagonistami užitočnými v predkladanom vynáleze tiež malé molekuly. Akákoľvek molekula, ktorá nie je biologickou molekulou je považovaná v tejto špecifikácii za malú molekulu. Niektoré príklady malých molekúl zahŕňujú organické zlúčeniny, organometalické zlúčeniny, soli organických a organometalických zlúčenín, sacharidy, aminokyseliny a nukleotidy. Malé molekuly ďalej zahŕňujú molekuly, ktoré by ináč boli považované za biologické molekuly, pokiaľ ich molekulová váha nie je väčšia ako 450. Malé molekuly môžu byť teda lipidy, oligosacharidy, oligopeptidy a oligonukleotidy a ich deriváty majúce molekulovou váhu 450 alebo menej.

Je zdôrazňované, že malé molekuly môžu mať akúkoľvek molekulovú váhu. Sú iba nazývané malými molekulami, pretože majú typicky molekulovú váhu menšiu ako 450. Malé molekuly zahŕňujú molekuly, ktoré sa nachádzajú v prírode, rovnako tak ako zlúčeniny syntetické. Malé molekuly prednostne inhibujú rast refrakterných nádorových buniek, ktoré exprimujú EGFR/HER1 tyrozín kinázu.

Bol popísaný veľký počet malých molekúl, ktoré inhibujú EGFR. Napríklad v patente Spada et al., US Patent 5656655 sú popísané styrylom substituované heteroarylové zlúčeniny, ktoré

inhibujú EGFR. Heteroarylová skupina je monocyklický kruh s jedným alebo dvomi heteroatómami, alebo bicyklický kruh s 1 alebo 4 heteroatómami, zlúčeniny sú voliteľne substituované alebo polysubstituované. Zlúčeniny uvedené v patente US Patent 5656655 sú týmto začlenené ako referencie.

Spada et al. v patente US Patent 5646153 uvádzajú bis mono a/alebo bicyklické arylové, heteroarylové, karbocyklické a heterokarbocyklické zlúčeniny, ktoré inhibujú EGFR. Zlúčeniny uvedené v patente US Patent 5646153 sú týmto začlenené ako referencie.

Bridges et al. v patente US Patent 5679683 uvádzajú tricyklické pyrimidínové zlúčeniny, ktoré inhibujú EGFR. Zlúčeniny sú fúzované heterocyklické pyrimidínové deriváty popísané v stĺpci 3, riadok 35 až stĺpec 5, riadok 6. Popis týchto zlúčení v stĺpci 3, riadok 35 až stĺpec 5, riadok 6 je začlenený týmto ako referencia.

Barker v patente US Patent 5616582 uvádza chinazolínové deriváty; ktoré majú inhibičnú aktivitu voči receptorovej tyrozín kináze. Zlúčeniny uvedené v patente US Patent 5616582 sú týmto začlenené ako referencie.

Fry et al. v časopise Science 265, 1093-1095 (1994) uvádzajú zlúčeninu majúcu štruktúru, ktorá inhibuje EGFR. Štrukturálny vzorec je uvedený na Obrázku 1. Zlúčenina uvedená na Obrázku 1 v článku Fry et al je týmto začlenená ako referencia.

Osherov et al. uvádzajú tyrfostíny, ktoré inhibujú EGFR/HER1 a HER2. Zlúčeniny uvedené v článku Osheroва et al. a zvlášť zlúčeniny v Tabuľkách I, II, III a IV sú týmto uvedené ako referencie.

Levitzki et al. v patente US Patent 5196446 uvádzajú heteroaryleténdiyllové alebo heteroaryleténdiylarylové zlúčeniny, ktoré inhibujú EGFR. Zlúčeniny uvedené v patente US Patent 5196446 od stĺca 2, riadok 42 do stĺpca 3, riadok 40 sú týmto začlenené ako referencie.

Panek et al. v časopise Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 283, 1433-1444 (1997) uvádzajú zlúčeninu identifikovanú ako PD 166285, ktorá inhibuje EGFR, PDGFR a FGFR rodiny receptorov. PD 166285 je identifikovaná ako 6-(2,6-dochlorofenyl) -2- (4-(2-dietylaminoetoxyl)fenylamino) -8- metyl -8H- pyrido (2,3-d) pyrimidín -7- ón majúci štrukturálny vzorec uvedený na Obrázku 1 na strane 1436. Zlúčenina popísaná na Obrázku 1 na strane 1436 článku Panek et al. je týmto začlenená ako referencia.

Podanie EGFR/HER1 antagonistov

Predkladaný vynález zahrnuje podanie účinného množstva EGFR/HER1 antagonistu ľudským pacientom. Podanie EGFR/HER1 antagonistu môže byť prevedené rôznymi spôsobmi vrátane systémového parenterálnymi a enterálnymi cestami. EGFR/HER1 antagonisti, ktoré sú predmetom predkladaného vynálezu môžu byť ľahko podané intravenózne (napríklad intravenóznou injekciou), čo je prednostným spôsobom podania. Intravenózne podanie môže byť prevedené kontaktom EGFR/HER1 antagonistov s vhodným farmaceutickým nosičom (vehikulom) alebo excipientnou látkou, ako sa rozumie osobám znalými oboru. EGFR/HER1 antagonista môže byť podaný s adjuvantnou látkou, ako sú napríklad BCG, stimulátory imúnneho systému a chemoterapeutické látky.

EGFR/HER1 antagonisti, ktoré sú malé molekuly alebo

biologické lieky, môžu byť podané, ako je popísané v patente Spada, US Patent 5646153 v stĺpci 57, riadok 47 až stĺpec 59, riadok 67. Popis podania malých molekúl je týmto začlenený ako referencia.

EGFR/HER1 antagonisti, ktoré sú predmetom predkladaného vynálezu účinne inhibujú rast refraktérnych nádorových buniek, ak sú podané ľudskému pacientovi v účinnom množstve. Ak je tu použité, účinné množstvo je také množstvo, ktoré je nutné k dosiahnutiu špecifického výsledku inhibície rastu refraktérneho nádoru.

EGFR/HER1 antagonista je prednostne podaný k nádoru v množstve, ktoré inhibuje nádorový rast bez narušenia rastu normálneho tkaniva. EGFR/HER1 antagonisti prednostne inhibujú nádorový rast bez závažných vedľajších účinkov. Niektoré závažné vedľajšie účinky zahŕňujú útlm kostnej drene, anémiu a infekciu.

Optimálne dávky EGFR/HER1 antagonistov, ktoré sú protilátkami a funkčnými ekvivalentmi, môžu byť určené lekármi na základe celého radu parametrov zahrnujúcich napríklad vek, pohlavie, váhu, závažnosť ochorenia, ktoré má byť liečené, protilátku, ktorá má byť podaná a spôsobu podania. Obecne je žiadúca sérová koncentrácia polypeptidov a protilátok, ktoré umožňujú saturáciu cieľového receptora. Napríklad koncentrácie v nadbytku približne 0,1 nM je normálne dostatočná. Napríklad dávka 100 mg/m² C225 poskytuje sérovú koncentráciu približne 20 nM po dobu 8 dní.

Ako orientačný pokyn môžu byť dávky protilátok podávané týždne v množstve 10-300 mg/m². Ekvivalentní dávky protilátkových fragmentov by mali byť používané v četnejších intervaloch, aby sa udržala sérová koncentrácia vyššia ako je

koncentrácia, ktorá umožňuje saturáciu receptorov.

Kombinačná terapia

V jednej prednostnej forme vynálezu môže byť refraktérny nádor liečený účinným množstvom EGFR/HER1 antagonistu, chemoterapeutickými látkami, radiačnou liečbou, alebo ich kombináciami.

Príklady chemoterapeutických látok alebo chemoterapie zahŕňujú alkylačné látky, napríklad nitrogén mustard, etylénimínové zlúčeniny, alkyl sulfonáty a ďalšie zlúčeniny s alkylačným účinkom, ako sú napríklad nitrózourea, cisplatína a dakarbazín, antimetabolity, napríklad kyselina listová, antagonistov purínov a pyrimidínov, inhibítory mitózy, napríklad vinca alkaloidy deriváty podofylotoxínov, cytotoxické antibiotiká a deriváty kamptotecínu.

Kamptotecínové deriváty zahŕňujú napríklad kamptotecín, 7-etyl kamptotecín, 10-hydroxy -7- etyl-kamptotecín (SN38), 9-amino kamptotecín, 10,1- metyléndioxy-kamptotecín (MDCPT a topotekán. Také kamptotecínové deriváty tiež zahŕňujú laktónové stabilné preparáty 7-etyl-kamptotecínu uvedené v patente US Patent 5604233, ktorý je celý týmto začlenený ako referencie.

Predkladaný vynález zahŕňa vysoko lipofilné kamptotecínové deriváty, ako sú napríklad 10,11-metyléndioxy-kamptotecín, 10,11-etyléndioxy-kamptotecín, 9-etyl-kamptotecín, 7-etyl-10-hydroxy-kamptotecín, 9-metyl-kamptotecín, 9-chloro-10,11-metyléndioxy-kamptotecín, 9-chlorokamptotecín, 10-hydroxykamptotecín, 9,10-dichlorokamptotecín, 10-bromo-kamptotecín, 10-chlorokamptotecín, 9-fluoro-kamptotecín, 10-metyl kamptotecín,

10-fluorokamptotecín, 9-metoxykamptotecín, 9-chloro -7- etyl-kamptotecín a 11-fluoro-kamptotecín. Také vysoko lipofilné kamptotecínové deriváty sú uvedené v patente US Patent č. 5880133, ktorý je celý týmto začlenený ako referencia.

Vo vode rozpustné kamptotecínové deriváty zahŕňujú napríklad vo vode rozpustné analógy kamptotecínu známe ako CPT-11, 11-hydroxy -7- alkoxy - kamptotecín, 11-hydroxy -7- metoxy kamptotecín (11,7-HMCPT) a 11-hydroxy -7- etyl kamptotecín (11,7-HECPT), 7-dimetylaminometylén -10,11-metyléndioxy 20(R,S)- kamptotecín, 7-dimetylaminometylén -10,11-metyléndioxy -20(S)- kamptotecín, 7-dimetylaminometylén 10,11- etyléndioxy -20(R,S)- kamptotecín a 7-morfolinometylén -10,11- etyléndioxy -20(S)-kamptotecín. Také vo vode rozpustné kamptotecínové deriváty sú uvedené v patente US Patent č. 5559235 a 5468754, ktoré sú celé týmto začlenené ako referencie.

Prednostné chemoterapeutické látky alebo chemoterapia zahŕňujú amifostín (etyol), cisplatinu, dakarbazín (DTIC), daktinomycín, mechlóretamín (nitrogén mustard), streptozocín, cyklofosfamid, karmustín (BCNU), lomustín (CCNU), doxorubicín (adriamycín), doxorubicín lipo (doxil), gemcitabín (gemzar), daunorubicín, daunorubicín lipo (daunoxóm), prokarbazín, mitomycín, cytarabín, etopozid, metotrexát, 5-fluorouracil, vinblastín, vincristín, bleomycín, paclitaxel (taxol), docetaxel (taxotere), aldesleukín, aspariginázu, busulfán, karboplatinu, kladribín, kamptotecín, CPT-11, 10-hydroxy -7- etyl-kamptotecín (5N38), dakarbazín, floxouridín, fludarabín, hydroxyureu, itofosfamid, idarubicín, mesnu, interferón alfa, interferón beta, irinotekán, mitoxantrón, topotekán, leuprolid, megestrol, melfalán, merkaptopurín, plicamycín, mitotán, pegaspargázu, pentostatín, pipobroman, plicamycín, streptozocín, tamoxifén, tenipozid, testolaktón, tioguanín,

tiotepu, uracil mustard, vinorelbín, chlórambucil a ich kombinácie.

Podanie chemoterapeutických látok môže byť prevedené celým radom spôsobov zahrnujúcich systémové podanie parenterálnym a enterálnym spôsobom. Chemoterapeutická látka je prednostne podávaná intravenózne v kombinácii chemoterapeutickej látky s vhodným nosičom (vehikulom), alebo excipientnou látkou, ako sa rozumie osobám znalými oboru. Dávka chemoterapeutickej látky závisí na četných faktoroch, ako je dobre známe v obore. Tieto faktory zahrnujú vek, pohlavie, váhu, závažnosť ochorenia, ktoré má byť liečené a spôsob podania. Cisplatina môže byť napríklad pohodlne podávaná v dávke okolo 100 mg/m². Malo by však byť zdôraznené, že vynález nie je obmedzený na žiadnu konkrétnu dávku.

V ešte ďalšej forme vynálezu môže byť refraktérny nádor liečený účinným množstvom EGFR/HER1 antagonistu v kombinácii s radiačnou liečbou. Zdroj žiarenia môže byť buď to externý alebo interný vo vzťahu k liečenému pacientovi. Pokiaľ je zdroj externý, nazýva sa liečba radiačnou liečbou vonkajším lúčom (EBRT). Pokiaľ je zdroj žiarenia interný vo vzťahu k pacientovi, je liečba nazývaná brachyterapiou (BT).

Liečba žiarením je prevádzaná v zhode s dobre známymi štandardnými technikami so štandardným vybavením vyrobeným pre tento účel, ako je napríklad AECL Theraton a Varian Clinac. Dávka žiarenia závisí na četných faktoroch, ako je dobre známe v obore. Také faktory zahrnujú typ liečeného orgánu, prítomnosť zdravých orgánov v ceste žiarenia, ktoré môžu byť nežiadúcim spôsobom poškodené, toleranciu pacienta k radiačnej liečbe a plochu tela, ktorou je potreba liečiť. Dávka bude typicky medzi 1 a 100 Gy, a špecifickejšie medzi 2 a 80 Gy. Niektoré dávky, ktoré boli zaznamenané, zahrnujú 35 Gy na

miechu, 15 Gy na obličky, 20 Gy na pečeň a 65-80 Gy na prostatu. Malo by byť však zdôraznené, že vynález nie je obmedzený na žiadnu konkrétnu dávku. Dávka bude určená ošetrovúcim lekárom v zhode s konkrétnymi faktormi v danej situácii, vrátane faktorov spomínaných vyššie.

Vzdialenosť medzi zdrojom vonkajšieho žiarenia a vstupom do pacienta môže byť akákoľvek vzdialenosť, ktorá reprezentuje prijateľnú rovnováhu medzi zabitím cieľových buniek a minimalizáciou vedľajších účinkov. Zdroj vonkajšieho žiarenia je typicky medzi 70 a 100 cm od bodu vstupu do pacienta.

Brachyterapia je obvykle prevádzaná umiestnením zdroja žiarenia do pacienta. Zdroj žiarenia je typicky umiestnený približne 0-3 cm od tkaniva, ktoré má byť liečené. Známe techniky zahrnujú intersticiálnu, intrakavitárnu a povrchovú brachyterapiu.

Rádioaktívne sondy môžu byť implantované permanentne alebo dočasne. Niektoré typické rádioaktívne atómy, ktoré boli použité v permanentných implantátoch zahrnujú jód 125 a radón. Niektoré typické atómy, ktoré boli použité v dočasných implantátoch zahrnujú rádium, cézium-137 a irídium-192. Niektoré ďalšie rádioaktívne atómy, ktoré boli použité v brachyterapii zahrnujú amerícium-241 a zlato-198.

Dávka žiarenia pre brachyterapiu môže byť rovnaká, ako je spomínané vyššie pre radiačnú liečbu vonkajším lúčom. Navyše k faktorom spomínaným vyššie pre určenie dávky radiačnej liečby vonkajším lúčom, je do úvahy pre určenie dávky brachyterapie tiež vzatý charakter použitého rádioaktívneho atómu.

V prednostnej forme vynálezu existuje synergia v liečbe refraktérnych nádorov ľudských pacientov liečených EGFR/HER1

antagonistom a chemoterapeutickými látkami alebo radiačnou liečbou, alebo ich kombináciami. Inými slovami dochádza k zvýšeniu inhibície nádorového rastu EGFR/HER1 antagonistom, ak je skombinovaný s chemoterapeutickou látkou alebo radiačnou liečbou, alebo ich kombináciami. Synergia môže byť preukázaná napríklad väčšou inhibíciou rastu refraktérneho nádoru kombinačnou liečbou, ako by bola očakávaná pri liečbe buď to EGFR/HER1 antagonistom, chemoterapeutickou látkou alebo radiačnou liečbou samotnými. Synergia je prednostne demonštrovaná remisiou nádorového ochorenia, kde remisia nie je očakávaná pri liečbe EGFR/HER1 antagonistom, chemoterapeutickou látkou alebo radiačnou liečbou samotnými.

EGFR/HER1 antagonista je podávaný pred, počas alebo po zahájení liečby chemoterapeutickou látkou alebo žiarením, rovnako tak ako ich kombináciami, tzn. pred a počas, pred a po, počas a po, alebo pred, počas a po zahájení liečby chemoterapeutickou látkou alebo žiarením. Pokiaľ je napríklad EGFR/HER1 antagonista protilátkou, je typicky podávaný medzi prvým a tridsiatym dňom, prednostne medzi tretím a dvadsiatym dňom, prednostnejšie medzi piatym a dvanástym dňom pred zahájením radiačnej liečby a/alebo liečby chemoterapeutickými látkami.

Príklady prevedenia vynálezu

Príklad 1

Klinická štúdie

V klinickej štúdii boli liečení ľudskí pacienti s refraktérnym skvamóznym karcinómom hlavy a krku pomocou kombinácie EGFR/HER1 antagonistu (chimerická anti-EGFR monoklonálna protilátka, C225) a cisplatinou. Pacienti boli

liečenie dvakrát týždne infúziami C225 pri otváracích /udržiavacích dávkach 100/100, 400/250, alebo 500/250 mg/m² v kombinácii s 100 mg/m² cisplatiny každé tri týždne. Vzorky nádoru boli získané pred zahájením liečby, 24 hodín po iniciálnej infúzii a 24 hodín pred tretou infúziou za účelom posúdenia saturácie nádoru EGFR a jeho funkcie. Saturácia EGFR bola posúdená imunohistochemicky (IHC) za použitia M225 (myšacia protichodnosť C225) ako primárne protilátky a antimyšacej IgG ako sekundárnej protilátky za účelom detekcie neokupovaného EGFR. EGFR funkcia bola posudzovaná pomocou IHC za použitia protilátky špecifickej pre aktivované EGFR (Transduction Labs) a meraním EGFR tyrozín kinázovej aktivity na lyzátach nádoru po odstránení C225-EGFR komplexov. Bolo zaznamenané na dávke závislej na zvýšení saturácie receptora s viacej ako 70% saturáciou receptora pri 500/250 mg/m² dávke. Podobne bolo zaznamenané významné zníženie EGFR tyrozín kinázovej aktivity s nedetekovateľnou aktivitou u 67% pacientov pri dávkach 100/100 mg/m², čo naznačuje funkčnú saturáciu. Nežiadúcimi účinkami boli horúčka, alergické reakcie a kožná toxicita, ktorá sa manifestovala ako folikulárna vyrážka alebo zmeny nechťového lôžka, ktoré plne ustúpili po skončení liečby. U siedmich hodnotených pacientov došlo k jednej minimálnej, piatim parciálnym, a jednej kompletnej remisii, ako bolo určené fyzikálnym vyšetrením a laboratórnymi hodnotami. Kompletná odpoveď bola pozorovaná u jedného pacienta, ktorý bol predtým liečený cisplatinou. Parciálna odpoveď bola pozorovaná u piatich pacientov, štyri boli predtým liečení chemoterapiou a jeden mal predtým radiačnú liečbu. Minimálna odpoveď bola pozorovaná u jedného pacienta s predchádzajúcou radiačnou liečbou. Tieto výsledky sú uvedené v tabuľke, kde CR znamená kompletnú odpoveď, PR znamená čiastočnú odpoveď a MR znamená minimálnu odpoveď.

Tabuľka 1
Klinická štúdie

Pacient	Predchádzajúca liečba	Celková odpoveď
1	Cisplatina	CR
2	Ad p53	PR
3	Cisplatina	PR
4	Cisplatina	PR
5	Samotné žiarenie	PR
6	Chemoterapia	PR
7	Samotné žiarenie	MR

Príklad 2

Klinická štúdie

V klinickej štúdii bol liečený jeden ľudský pacient s refraktérnym nádorom tlstého čreva pomocou kombinácie EGFR/HER1 antagonistu (chimerická anti-EGFR monoklonálna protilátka, C225) a CPT-11. Pacient bol liečený týždennými infúziami C225 pri otváracej dávke 250 mg/m^2 v kombinácii s 125 mg/m^2 CPT-11. Udržiavacie dávky 250 mg/m^2 C225 v kombinácii s $69\text{--}125 \text{ mg/m}^2$ CPT-11 boli podávané raz týždeň. Klinicky pacient dosiahol kompletnej remisie. Dávkovacia schéma je sumarizovaná v Tabuľke 2 nižšie.

Tabuľka 2
Klinická štúdie

C225/CPT-11, týždenná dávka v mg/m ²	C225/CPT-11 (skutočná dávka v mg)	C225 infúzna doba (minúty)	CPT-11 infúzna doba (minúty)
400/125	576/180	120	90
250/125	360/180	60	90
250/CPT-11, udržiavané	360/0	60	N/A
250/94	360/135	50	75
250/69	360/100	60	85
250/69	360/100	60	75

P A T E N T O V É N Á R O K Y

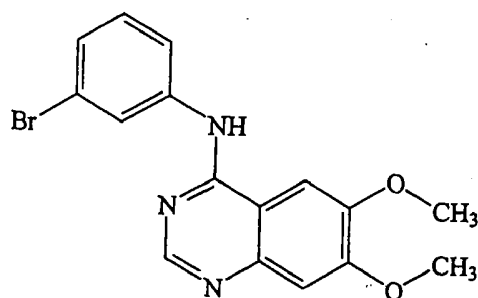
1. Použitie účinného množstva antagonistu receptora epidermálneho rastového faktoru (EGFR) na výrobu liečiva na inhibíciu rastu refraktérnych nádorov.
2. Použitie účinného množstva kombinácie antagonistu EGFR a chemoterapeutického činidla na výrobu liečiva na inhibíciu rastu refraktérnych nádorov.
3. Použitie účinného množstva kombinácie antagonistu EGFR a ožarovania na výrobu liečiva na inhibíciu rastu refraktérnych nádorov.
4. Použitie podľa niektorého z nárokov 1 až 3, kde refraktérny nádor nadexprimuje EGFR.
5. Použitie podľa niektorého z nárokov 1 až 4 , kde refraktérnym nádorom je nádor prsníka, srdca, pľúc, tenkého čreva, hrubého čreva, sleziny, ľadvín, močového mechúra, hlavy a krku, vaječníkov, prostaty, mozgu, slinivky brušnej, kože, kosti, kostnej drene, krvi, thymu, maternice, semenníkov, maternicového hrdla a pečene.
6. Použitie podľa niektorého z nárokov 1 až 5, kde liečenie refraktérneho nádoru bolo neúspešné alebo kde nádor vykazoval rezistenciu voči liečeniu.
7. Použitie podľa niektorého z nárokov 1 až 4, kde refraktérnym nádorom je nádor hrubého čreva, hlavy a krku.

8. Použitie podľa niektorého z nárokov 1 až 7, kde refraktérnym nádorom je nádor šupinatej bunky.
9. Použitie podľa niektorého z nárokov 1 až 8, kde antagonista EGFR sa podáva intravenózne.
10. Použitie podľa niektorého z nárokov 1 až 8, kde antagonista EGFR sa podáva perorálne.
11. Použitie podľa niektorého z nárokov 2 až 10, kde antagonista EGFR sa podáva pred podaním chemoterapeutického činidla.
12. Použitie podľa niektorého z nárokov 1 až 11, kde antagonista EGFR sa podáva v dávke od asi 10 do asi 500 mg/m² za týždeň.
13. Použitie podľa niektorého z nárokov 1 až 12, kde antagonista EGFR inhibuje stimuláciu EGFR jeho ligandom.
14. Použitie podľa nároku 13, kde antagonista EGFR inhibuje väzbu EGFR k jeho ligandu.
15. Použitie podľa nároku 13 alebo 14, kde antagonista EGFR externe viaže EGFR.
16. Použitie podľa nároku 13 alebo 14, kde antagonista EGFR interne viaže EGFR.
17. Použitie podľa niektorého z nárokov 13 až 16, kde antagonista EGFR inhibuje väzbu ATP k EGFR.

18. Použitie podľa niektorého z nárokov 13 až 17, kde antagonist EGFR súťaží s ATP o väzbu k EGFR.
19. Použitie podľa niektorého z nárokov 13 až 18, kde antagonist EGFR inhibuje fosforyláciu EGFR.
20. Použitie podľa niektorého z nárokov 13 až 19, kde antagonist EGFR inhibuje tyrosín kinasovú aktivitu EGFR.
21. Použitie podľa niektorého z nárokov 1 až 20, kde antagonist EGFR obsahuje protilátku alebo jej funkčný ekvivalent, ktoré sú špecifické pre EGFR.
22. Použitie podľa nároku 21, kde protilátka zahŕňa konštantnú oblasť ľudskej protilátky.
23. Použitie podľa nároku 21 alebo 22, kde protilátka je chimerická protilátka obsahujúca variabilnú oblasť myšacej protilátky.
24. Použitie podľa niektorého z nárokov 21 až 23, kde protilátkou je humanizovaná protilátka obsahujúca variabilnú oblasť obsahujúcu oblasti určujúce komplementaritu (CDR) myšacej protilátky a rámcové oblasti ľudskej protilátky.
25. Použitie podľa niektorého z nárokov 21 až 24, kde protilátkou je ľudská protilátka obsahujúca variabilnú oblasť ľudskej protilátky.
26. Použitie podľa niektorého z nárokov 1 až 25, kde protilátka sa podáva v dávke dostatočnej na nasýtenie EGFR.

27. Použitie podľa niektorého z nárokov 1 až 26, kde antagonist EGFR zahŕňa malú molekulu.

28. Použitie podľa nároku 27, kde malá molekula zahŕňa zlúčeninu PD 153035 majúcu nasledujúcu štruktúru

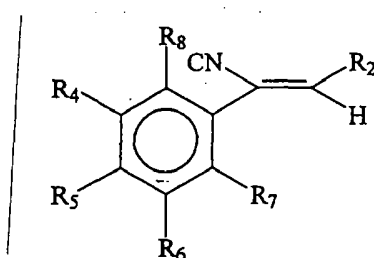


29. Použitie podľa nároku 27, kde malá molekula zahŕňa benzylidenmalonnitril alebo malonnitrilovú alebo tyrfostínovú zlúčeninu.

30. Použitie podľa nároku 27, kde malá molekula zahŕňa styryl- substituovanú heteroarylovú zlúčeninu.

31. Použitie podľa nároku 30, kde styrylsubstituovaná heteroarylová zlúčenina zahŕňa monocyklický kruh s 1 alebo 2 heteroatómami alebo bicyklický kruh s 1 až asi 4 heteroatómami, ktorý je prípadne raz alebo viackrát substituovaný.

32. Použitie podľa nároku 30 alebo 31, kde styrylsubstituovaná heteroarylová zlúčenina má štruktúru zodpovedajúcu všeobecnému vzorcu



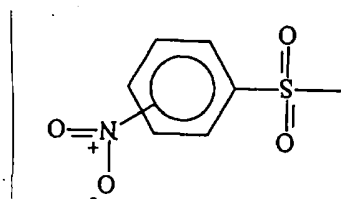
kde

R predstavuje atóm vodíka, alkylskupinu alebo aralkylskupinu;

R₂ predstavuje asi 8- až 12-členný bicyklický arylový kruh obsahujúci 1 až asi 4 atómy dusíka, kyslíka alebo síry alebo 1 až asi 4 N-oxidové skupiny, a tento kruh je prípadne substituovaný 1 až asi 3 substituentami R₉, ktoré nemajú spoločné miesta pripojenia k tomuto kruhu;

R₄, R₅, R₆, R₇ a R₈ predstavuje každý nezávisle atóm vodíka, kyanoskupinu, alkylskupinu, halogén, skupinu vzorca OR, CHO, COOH, NRR alebo jej N-oxid, skupinu vzorca NO₂, NHCOCH₃, SR, CF₃, CH=CH-COOH, NHCO(CH₂)₂COOH, heterocyklylskupinu alebo heteroarylskupinu a

R₉ nezávisle predstavuje vždy alkylskupinu, halogén, skupinu vzorca OR, CHO, COOH, NRR alebo jej N-oxid, skupinu vzorca NO₂, NHCOCH₃, SR, CF₃, CH=CH-COOH, NHCO(CH₂)₂COOH, heterocyklylskupinu alebo heteroarylskupinu alebo skupinu vzorca



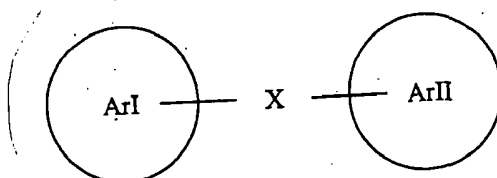
33. Použitie podľa nároku 27, kde malá molekula zahŕňa tricyklickú pyrimidínovú zlúčeninu.

34. Použitie podľa nároku 33, kde tricyklická pyrimidínová zlúčenina zahŕňa 4-(3-

brómanilino)benzotieno[3,2-d]-pyrimidín; 4-(3-brómanilino)-8-nitrobenzotieno[3,2-d]pyrimidín, 8-amíno-4-(3-brómanilino)benzotieno[3,2-d]pyrimidín alebo 4-(3-brómanilino)-8-metoxybenzotieno[3,2-d]pyrimidín.

35. Použitie podľa nároku 27, kde malá molekula zahŕňa bismono alebo bicyklickú aryl, heteroaryl, karbocyklickú alebo heterokarbocyklickú zlúčeninu.

36. Použitie podľa nároku 27, kde malá molekula zahŕňa zlúčeninu všeobecného vzorca



kde

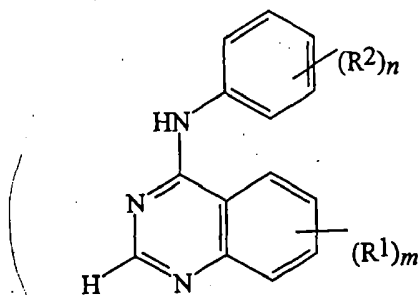
ArI a ArII nezávisle predstavuje substituovaný alebo nesubstituovaný mono- alebo bicyklický kruh, z ktorých každý je prípadne substituovaný 1 až asi 3 skupinami R;

X predstavuje skupinu vzorca $(CHR_1)_{0-4}$ alebo $(CHR_1)_m-Z-(CHR_1)_n$, kde Z znamená O, NR', S, SO alebo SO₂, m a n znamená číslo 0 až 3, pričom súčet m+n má hodnotu v intervale 0 až 3 a R₁ a R' nezávisle predstavuje každý atóm vodíka alebo alkylskupinu;

alebo jej farmaceuticky vhodnú soľ.

37. Použitie podľa nároku 27, kde malá molekula zahŕňa derivát chinazolínu.

38. Použitie podľa nároku 37, kde derivát chinazolínu zahŕňa zlúčeninu všeobecného vzorca



kde

m znamená číslo 1, 2 alebo 3;

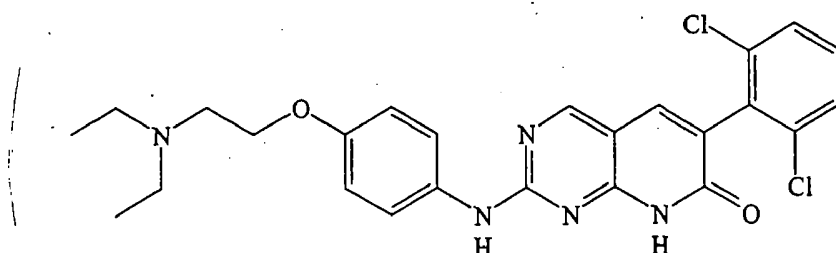
R_1 predstavuje hydroxyskupinu, amínoskupinu, karboxyskupinu, karbamoylskupinu, ureidoskupinu, alkoxykarbonylskupinu s 1 až 4 atómami uhlíka v alkoxylovej časti, N-alkylkarbamoylskupinu s 1 až 4 atómami uhlíka v alkylovej časti, N,N-dialkylkarbamoylskupinu s 1 až 4 atómami uhlíka v každej z alkylových častí, hydroxyamínoskupinu, alkoxyamínoskupinu s 1 až 4 atómami uhlíka, alkanoyloxyamínoskupinu s 2 až 4 atómami uhlíka, trifluórmtoxyskupinu, alkylskupinu s 1 až 4 atómami uhlíka, alkoxyskupinu s 1 až 4 atómami uhlíka a alkylendioxyskupinu s 1 až 3 atómami uhlíka;

n znamená číslo 1 alebo 2; a

R^2 predstavuje atóm vodíka, hydroxyskupinu, halogén, trifluórmetylskupinu, amínoskupinu, nitroskupinu, kyanoskupinu alebo alkylskupinu s 1 až 4 atómami uhlíka;

alebo ich farmaceuticky vhodnú soľ.

39. Použitie podľa nároku 27, kde malá molekula zahŕňa zlúčeninu PD 166285 vzorca



40. Použitie podľa ktoréhokoľvek z nárokov 2 alebo 4 až 39, ktoré ďalej zahŕňa aplikáciu ožarovania.

41. Použitie podľa ktoréhokoľvek z nárokov 3 až 40, ktoré ďalej zahŕňa podávanie chemoterapeutického činidla.

42. Použitie podľa ktoréhokoľvek z nárokov 2 alebo 4 až 41, kde chemoterapeutické činidlo zahŕňa amifostín, cisplatinu, dekarbazín, daktinomycín, mechlóretamín, streptozocín, cyklofosfamíd, karmustín, lomustín, doxorubicín, doxorubicín lipo, gemcitabín, daunorubicín, prokarbazín, mitomycín, cytarabín, etoposid, metotrexát, 5-fluorouracil, vinblastín, vincristín, bleomycín, paclitaxel, docetaxel, aldesleukín, asparaginázu, busulfan, karboplatinu, kladribín, kamptotecín, CPT-11, 10-hydroxy-7-etyl-kamptotecín (SN38), dakarbazín, floxuridín, fludarabín, hydroxymočovinu, ifosfamíd, idarubicín, mesnu, interferon alfa, interferon beta, irinotekan, mitoxantron, topotekan, leuproid, megestrol, melfalan, merkaptopurín, plicamycín, mitotan, pegaspargázu, pentostatín, pipobroman, plicamycín, streptozocín, tamoxifen, teniposid, testolakton, tioguanín, tiotepu, uracilizotiokyanát, vinorelbín, chlórambucil a ich kombinácie.

43. Použitie podľa ktoréhokoľvek z nárokov 2 alebo 4 až 42, kde chemoterapeutické činidlo zahŕňa cisplatinu, doxorubicín, paclitaxel, Irinotekan (CPT-11) alebo topotekan alebo ich kombináciu.

44. Použitie podľa ktoréhokoľvek z nárokov 2 alebo 4 až 43, kde chemoterapeutické činidlo sa podáva v dávke od asi 69 do asi 125 mg/m² za týždeň.

45. Použitie podľa ktoréhokoľvek z nárokov 3 až 44, kde ožarovanie sa aplikuje zo zdroja, ktorý je vzhľadom k pacientovi vnútorný.

46. Použitie podľa ktoréhokoľvek z nárokov 3 až 45, kde ožarovanie sa aplikuje zo zdroja, ktorý je vzhľadom k pacientovi vonkajší.

47. Použitie podľa ktoréhokoľvek z nárokov 3 až 46, kde ožarovanie sa podáva v dávke v rozmedzí od asi 2 do asi 80 Gy.

48. Použitie podľa ktoréhokoľvek z nárokov 1 až 47, ktoré ďalej zahŕňa podávanie adjuvantu.

49. Použitie účinného množstva kombinácie chimerickej protilátky, ktorá je špecifická pre EGFR, a cisplatiny na výrobu liečiva na inhibíciu rastu refraktérneho nádoru šupinatých buniek hlavy a krku.

50. Použitie účinného množstva kombinácie chimerickej protilátky, ktorá je špecifická pre EGFR, a Irinotekanu (CPT-11) na výrobu liečiva na inhibíciu rastu refraktérneho nádoru hrubého čreva.