



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111437386 A

(43)申请公布日 2020.07.24

(21)申请号 202010088179.6

(51)Int.Cl.

(22)申请日 2013.09.06

A61K 39/395(2006.01)

(30)优先权数据

A61K 31/635(2006.01)

61/698379 2012.09.07 US

A61P 35/00(2006.01)

A61P 35/02(2006.01)

(62)分案原申请数据

201380057990.6 2013.09.06

(71)申请人 吉宁特有限公司

地址 美国加利福尼亚州

申请人 霍夫曼-拉罗奇有限公司

(72)发明人 D.桑帕思 C.克莱因

W.J.费尔布罗瑟

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

代理人 李唐

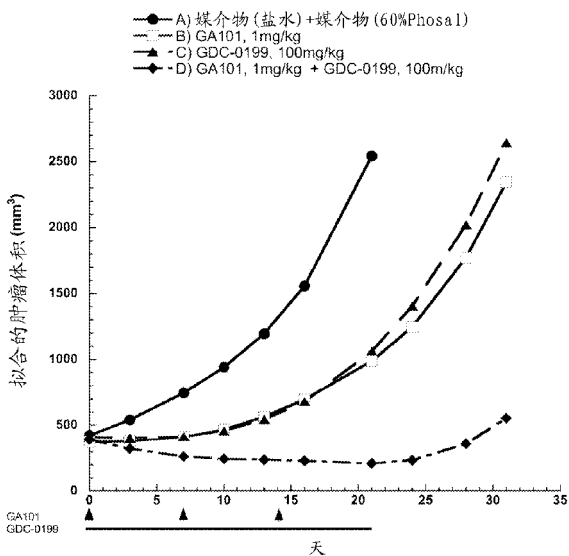
权利要求书2页 说明书27页
序列表6页 附图4页

(54)发明名称

II型抗CD20抗体与选择性Bcl-2抑制剂的组合治疗

(57)摘要

本发明涉及II型抗CD20抗体与选择性Bcl-2抑制剂的组合治疗。本发明涉及组合疗法,所述组合疗法涉及II型抗CD20抗体和选择性Bcl-2抑制剂用于治疗患有癌症特别是表达CD20的癌症的患者。



1. 2-(1*H*-吡咯并[2,3-*b*]吡啶-5-基氧基)-4-(4-((2-(4-氯苯基)-4,4-二甲基环己-1-烯基)甲基)哌嗪-1-基)-*N*-(3-硝基-4-((四氢-2*H*-吡喃-4-基)甲基氨基)苯基磺酰基)苯甲酰胺或其药学上可接受的盐和GA101抗体的组合在制备用于治疗人中表达CD20的癌症的试剂盒中的用途,所述试剂盒包含2-(1*H*-吡咯并[2,3-*b*]吡啶-5-基氧基)-4-(4-((2-(4-氯苯基)-4,4-二甲基环己-1-烯基)甲基)哌嗪-1-基)-*N*-(3-硝基-4-((四氢-2*H*-吡喃-4-基)甲基氨基)苯基磺酰基)苯甲酰胺或其药学上可接受的盐和GA101抗体,其中2-(1*H*-吡咯并[2,3-*b*]吡啶-5-基氧基)-4-(4-((2-(4-氯苯基)-4,4-二甲基环己-1-烯基)甲基)哌嗪-1-基)-*N*-(3-硝基-4-((四氢-2*H*-吡喃-4-基)甲基氨基)苯基磺酰基)苯甲酰胺或其药学上可接受的盐与GA101抗体共施用到所述人持续一个或多个给药周期,随后在不存在所述GA101抗体的情况下单独施用2-(1*H*-吡咯并[2,3-*b*]吡啶-5-基氧基)-4-(4-((2-(4-氯苯基)-4,4-二甲基环己-1-烯基)甲基)哌嗪-1-基)-*N*-(3-硝基-4-((四氢-2*H*-吡喃-4-基)甲基氨基)苯基磺酰基)苯甲酰胺或其药学上可接受的盐给所述人持续一个或多个给药周期。

2. 权利要求1的用途,其中当在不存在所述GA101抗体的情况下单独施用2-(1*H*-吡咯并[2,3-*b*]吡啶-5-基氧基)-4-(4-((2-(4-氯苯基)-4,4-二甲基环己-1-烯基)甲基)哌嗪-1-基)-*N*-(3-硝基-4-((四氢-2*H*-吡喃-4-基)甲基氨基)苯基磺酰基)苯甲酰胺或其药学上可接受的盐时的给药周期是1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14天。

3. 权利要求1的用途,其中在2-(1*H*-吡咯并[2,3-*b*]吡啶-5-基氧基)-4-(4-((2-(4-氯苯基)-4,4-二甲基环己-1-烯基)甲基)哌嗪-1-基)-*N*-(3-硝基-4-((四氢-2*H*-吡喃-4-基)甲基氨基)苯基磺酰基)苯甲酰胺或其药学上可接受的盐与所述GA101抗体共施用时的所述一个或多个周期期间,2-(1*H*-吡咯并[2,3-*b*]吡啶-5-基氧基)-4-(4-((2-(4-氯苯基)-4,4-二甲基环己-1-烯基)甲基)哌嗪-1-基)-*N*-(3-硝基-4-((四氢-2*H*-吡喃-4-基)甲基氨基)苯基磺酰基)苯甲酰胺或其药学上可接受的盐对于所述一个或多个给药周期施用一天一、二或三次并且所述GA101抗体每个给药周期施用一次,随后在不存在GA101抗体的情况下,2-(1*H*-吡咯并[2,3-*b*]吡啶-5-基氧基)-4-(4-((2-(4-氯苯基)-4,4-二甲基环己-1-烯基)甲基)哌嗪-1-基)-*N*-(3-硝基-4-((四氢-2*H*-吡喃-4-基)甲基氨基)苯基磺酰基)苯甲酰胺或其药学上可接受的盐单独施用一天一、二或三次持续1、2、3、4、5或6个给药周期。

4. 根据权利要求3的用途,其中所述GA101抗体以约500 mg至约3000 mg的量施用,且2-(1*H*-吡咯并[2,3-*b*]吡啶-5-基氧基)-4-(4-((2-(4-氯苯基)-4,4-二甲基环己-1-烯基)甲基)哌嗪-1-基)-*N*-(3-硝基-4-((四氢-2*H*-吡喃-4-基)甲基氨基)苯基磺酰基)苯甲酰胺或其药学上可接受的盐以约20 mg至约500 mg的量施用。

5. 根据权利要求3的用途,其中所述GA101抗体以800、900、1000、1100、1200、1300、1400或1500 mg的量施用,且2-(1*H*-吡咯并[2,3-*b*]吡啶-5-基氧基)-4-(4-((2-(4-氯苯基)-4,4-二甲基环己-1-烯基)甲基)哌嗪-1-基)-*N*-(3-硝基-4-((四氢-2*H*-吡喃-4-基)甲基氨基)苯基磺酰基)苯甲酰胺或其药学上可接受的盐以50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290或300 mg的量施用。

6. 根据权利要求1的用途,其中所述GA101抗体和2-(1*H*-吡咯并[2,3-*b*]吡啶-5-基氧基)-4-(4-((2-(4-氯苯基)-4,4-二甲基环己-1-烯基)甲基)哌嗪-1-基)-*N*-(3-硝基-4-((四氢-2*H*-吡喃-4-基)甲基氨基)苯基磺酰基)苯甲酰胺或其药学上可接受的盐在每个给药周期过程中相继共同施用,且每个给药周期是1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14天。

7. 根据权利要求1的用途,其中所述GA101抗体是包含以下的抗人CD20抗体:包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的HVR-H1,包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的HVR-H2,包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HVR-H3,包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的HVR-L1,包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的HVR-L2,和包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的HVR-L3。

8. 根据权利要求7的用途,其中所述GA101抗体进一步包含:包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的VH结构域和包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列的VL结构域。

9. 根据权利要求1的用途,其中所述GA101抗体包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列和SEQ ID NO:10的氨基酸序列。

10. 根据权利要求1的用途,其中所述GA101抗体为obinutuzumab。

11. 根据权利要求1的用途,其中所述GA101抗体包含与SEQ ID NO:9的氨基酸序列具有至少95%序列同一性的氨基酸序列且包含与SEQ ID NO:10的氨基酸序列具有至少95%序列同一性的氨基酸序列。

12. 根据权利要求1的用途,其中所述表达CD20的癌症选自套细胞淋巴瘤(MCL)、急性淋巴细胞性白血病(ALL)、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、B细胞弥漫性大细胞淋巴瘤(DLCL)、急性髓性白血病(AML)、伯基特氏淋巴瘤、毛细胞白血病、滤泡性淋巴瘤、多发性骨髓瘤、边缘区淋巴瘤、移植后淋巴增殖性病症(PTLD)、HIV相关淋巴瘤、瓦尔登斯特伦氏巨球蛋白血症和原发性CNS淋巴瘤。

13. 根据权利要求1的用途,其中所述表达CD20的癌症是非实体瘤。

14. 根据权利要求1的用途,其中所述表达CD20的癌症是淋巴瘤或白血病。

15. 根据权利要求1的用途,其中所述表达CD20的癌症是白血病,并且其中所述白血病是慢性淋巴细胞性白血病(CLL)。

16. 根据权利要求15的用途,其中所述人患有复发或难治型或先前未治疗的慢性淋巴细胞性白血病。

II型抗CD20抗体与选择性Bcl-2抑制剂的组合治疗

[0001] 本申请是申请日为2013年9月6日的中国专利申请201380057990.6“II型抗CD20抗体与选择性Bcl-2抑制剂的组合治疗”的分案申请。

[0002] 本申请要求2012年9月7日提交的美国临时号61/698,379的优先权,所述申请的内容以其整体通过引用并入本文。

技术领域

[0003] 本发明涉及组合疗法,所述组合疗法涉及II型抗CD20抗体和选择性Bcl-2抑制剂用于治疗患有癌症特别是表达CD20的癌症的患者。

背景技术

[0004] CD20分子(也称为人B淋巴细胞限制性分化抗原或Bp35)是一种位于前B(pre-B)和成熟B淋巴细胞上的分子量约35kD的疏水跨膜蛋白(Valentine, M.A., 等人, J. Biol. Chem. 264 (19) (1989) 11282-11287;和Einfield, D.A., 等人 EMBO J. 7(3) (1988) 711-717)。CD20见于大于90%的来自外周血或淋巴样器官的B细胞的表面上,其在早期前B细胞发育期间表达并且一直存在直至浆细胞分化。CD20存在于正常B细胞以及恶性B细胞上。具体地,CD20在大于90%的B细胞非霍奇金(Hodgkin)氏淋巴瘤(NHL)上表达(Anderson, K.C., 等人, Blood 63(6) (1984) 1424-1433),但是在造血干细胞、原B细胞、正常浆细胞、或其它正常组织上没有找到(Tedder, T.F., 等人, J. Immunol. 135(2) (1985) 973-979)。

[0005] CD20蛋白的85个氨基酸羧基末端区位于胞质中。该区的长度与其它B细胞特异的表面结构相反,上述表面结构诸如IgM、IgD和IgG重链或组织相容性抗原II类 α 或 β 链,它们具有相对短的胞质内区域,分别具有3、3、28、15和16个氨基酸(Komaromy, M., 等人, NAR 11 (1983) 6775-6785)。在最后61个羧基末端氨基酸中,21个是酸性残基,而仅有2个是碱性残基,表明该区具有强净负电荷。GenBank登记号为NP-690605。CD20被认为可能参与调节B细胞活化和分化过程中的(多个)早期步骤(Tedder, T.F., 等人, Eur. J. Immunol. 16 (1986) 881-887)并且可作为钙离子通道发挥功能(Tedder, T.F., 等人, J. Cell. Biochem. 14D (1990) 195)。

[0006] 存在在其CD20结合模式和生物学活性方面显著不同的两种不同类型的抗CD20抗体(Cragg, M.S., 等人, Blood 103 (2004) 2738-2743;和Cragg, M.S., 等人, Blood 101 (2003) 1045-1052)。I型抗体,如例如利妥昔单抗(rituximab)在补体介导的细胞毒性中是有效的,然而II型抗体,如例如托西莫单抗(Tositumomab) (B1)、11B8、AT80或人源化B-Ly1抗体经由不依赖于胱天蛋白酶的凋亡与伴随的磷脂酰丝氨酸暴露而有效启动靶细胞死亡。

[0007] 下表1中总结了I型和II型抗CD20抗体共享的共同特征。

[0008] 表1:

I型和II型抗CD20抗体的特性

I型抗CD20抗体	II型抗CD20抗体
I型CD20表位	II型CD20表位
将CD20定位至脂质筏	不将CD20定位至脂质筏
增加的CDC (如果是IgG1同种型)	降低的CDC (如果是IgG1同种型)
ADCC活性(如果是IgG1同种型)	ADCC活性(如果是IgG1同种型)
完全的结合能力	降低的结合能力
同型聚集	更强的同型聚集
交联后的细胞凋亡诱导	未交联情况的强细胞死亡诱导

[0009] Bcl-2蛋白家族调节由发育信号以及响应于多种胁迫信号触发的程序性细胞死亡 (Cory, S., and Adams, J.M., *Nature Reviews Cancer* 2 (2002) 647-656; Adams, *Genes und Development* 17 (2003) 2481-2495; Danial, N.N., and Korsmeyer, S.J., *Cell* 116 (2004) 205-219)。而Bcl-2本身和几个近亲 (Bcl-xL、Bcl-W、Mcl-1和A1) 促进细胞存活, 它们带有三个或四个保守的Bcl-2同源 (BH) 区, 凋亡由两个其它的亚家族驱动。细胞死亡的启动信号由一大类BH3-only蛋白传输, BH3-only蛋白包括Bad、Bid、Bim、Puma和Noxa, 它们的共同之处仅为小BH3相互作用结构域 (Huang and Strasser, *Cell* 103 (2000) 839-842)。然而, Bax或Bak, 含有BH1-BH3的多结构域蛋白是定型为细胞死亡所必需的 (Cheng, 等人, *Molecular Cell* 8 (2001) 705-711; Wei, M.C., 等人, *Science* 292 (2001) 727-730; Zong, W.X., 等人, *Genes and Development* 15 148 (2001) 1-1486)。当活化时, 它们可透过线粒体的外膜并释放活化去除细胞的胱天蛋白酶所需要的促凋亡因子 (pro-apoptogenic factor) (例如, 细胞色素C) (Wang, K., *Genes and Development* 15 (2001) 2922-2933; (Adams, 2003同上); Green, D.R., and Kroemer, G., *Science* 305 (2004) 626-629)。

[0010] Bcl-2家族的这三个小部分的成员之间的相互作用决定了细胞存活还是死亡。当BH3-only蛋白已活化时, 例如, 响应于DNA损害, 它们可经由其BH3结构域结合于其促生存的相对物 (relatives) 上的沟 (Sattler, 等人, *Science* 275 (1997) 983-986)。然而, BH3-only和Bcl-2样蛋白如何控制Bax和Bak的活化仍然知之甚少 (Adams, 2003同上)。大多数注意力已经集中在Bax上。该可溶性单体蛋白 (Hsu, Y.T., 等人, *Journal of Biological Chemistry* 272 (1997) 13289-1 3834; Wolter, K.G., 等人, *Journal of Cell Biology* 139 (1997) 1281-92) 通常使其膜靶向结构域插入至其沟中, 这可能解释其胞浆定位 (Nechushtan, A., 等人, *EMBO Journal* 18 (1999) 2330- 2341; Suzuki, 等人, *Cell* 103 (2000) 645-654; Schinzel, A., 等人, *J Cell Biol* 164 (2004) 1021-1032)。在Lucken-Ardjomande, S., and Martinou, J.C., *J Cell Sci* 118 (2005) 473-48中的综述中, 已经提议几种无关的肽/蛋白调控Bax活性, 但其生理学关联性仍然需要建立。或者, Bax可经由某些BH3-only蛋白的直接结合而活化 (Lucken-Ardjomande, S., and Martinou, J.C, 2005同上), 最充分记载的是Bid的截短形式, tBid (Wei, M.C., 等人, *Genes und Development* 14 (2000) 2060-2071; Kuwana, T., 等人, *Cell* 111 (2002) 331-342; Roucou, X., 等人, *Biochemical Journal* 368 (2002) 915-921; Cartron, P.F., 等人, *Mol Cell* 16 (2004) 807-818)。如别处所讨论 (Adams 2003同上), 最早的模型, 其中Bcl-2直接结合Bax (Oltvai, Z.N., 等人, *Cell* 74 (1993) 609-619), 已经变得

有问题,因为Bcl-2是膜结合的,而Bax是胞浆的,并且它们的相互作用似乎高度依赖于用于细胞裂解的去污剂(Hsu, Y.T., and Youle, 1997同上)。尽管如此,公认的是Bax的BH3区可介导与Bcl-2的结合(Zha, H., and Reed, J., *Journal of Biological Chemistry* 272 (1997) 31482-88; Wang, K., 等人, *Molecular und Cellular Biology* 18 (1998) 6083-6089),并且Bcl-2阻止Bax的寡聚化,即使检测不到任何异二聚体(Mikhailov, V., 等人, *Journal of Biological Chemistry* 276 (2001) 18361-18374)。因此,促生存蛋白是否直接或间接地限制Bax的活化仍然不清楚。

[0011] 尽管在大多数情况下Bax和Bak似乎在功能上是等效的(Lindsten, T., 等人, *Molecular Cell* 6 (2000) 1389-1399; Wei, M.C., 等人, 2001同上),从其在健康细胞中的不同定位预测它们的调节的实质差异。不像Bax,其主要在胞浆中,Bak位于健康细胞的线粒体的外膜和内质网上的复合体中(Wei, M.C., 等人, 2000同上; Zong, W.X., 等人, *Journal of Cell Biology* 162 (2003) 59-69)。尽管如此,在接收细胞毒性信号后,Bax和Bak两者都改变构象,并且Bax易位至细胞器膜上,然后在此Bax和Bax形成可结合的同型寡聚体,导致膜通透性(Hsu, Y.T., 等人, *PNAS* 94 (1997) 3668-3672; Wolter, K.G., 等人, 1997同上; Antonsson, B., 等人, *Journal of Biological Chemistry* 276 (2001) 11615-11623; Nechushtan, A., 等人, *Journal of Cell Biology* 153 (2001) 1265-1276; Wei, M.C., 等人, 2001同上; Mikhailov, V., 等人, *Journal of Biological Chemistry* 278 (2003) 5367-5376)。

[0012] 存在各种Bcl-2抑制剂,它们所有都具有抑制Bcl-2蛋白家族的促生存成员的共同特性并且因此是治疗癌症的很有前途的候选物。此类Bcl-2抑制剂是,例如,奥利美生(Oblimersen)、SPC-2996、RTA-402、棉酚(Gossypol)、AT-101、甲磺酸奥巴克拉(Obatoclox mesylate)、A-371191、A-385358、A-438744、ABT-737、ABT-263、AT-101、BL-11、BL-193、GX-15-003、2-甲氧基抗霉素A₃ (2-Methoxyantimycin A₃)、HA-14-1、KF-67544、红桔酚(Purpurogallin)、TP-TW-37、YC-137和Z-24,并且描述在例如,Zhai, D., 等人, *Cell Death and Differentiation* 13 (2006) 1419-1421中。

[0013] Smith, M. R., 等人, *Molecular Cancer Therapeutics* 3(12) (2004) 1693-1699和Ramanarayanan, J. 等人, *British Journal of Haematology* 127(5) (2004) 519-530提到了I型抗CD20抗体(利妥昔单抗)与反义Bcl-2寡核苷酸(奥利美生)的组合。

发明内容

[0014] 本文提供了用于治疗患有癌症的患者的方法,其包括向需要此类治疗的患者共同施用II型抗CD20抗体和选择性Bcl-2抑制剂。共同施用可以是同时的或以任一顺序相继的。

[0015] 用于本发明中使用的II型抗CD20抗体的实例是GA101抗体。

[0016] 在一个实施方案中,II型抗CD20抗体具有增加的抗体依赖性细胞毒性(ADCC)。

[0017] 在一个实施方案中,所述II型抗CD20抗体的Fc区的寡糖的至少40%是未岩藻糖基化的。

[0018] 在一个实施方案中,选择性Bcl-2抑制剂是GDC-0199(也称为ABT 199),或其药学上可接受的盐。

[0019] 在一个实施方案中,所述癌症是非实体瘤。

[0020] 在某些实施方案中,提供了用于治疗有需要的人中的癌症的方法,其包括在多个给药周期中向所述人施用GA101抗体和/或GDC 0199。在一个实施方案中,多个给药周期的每个给药周期持续至少1周。在一个实施方案中,多个给药周期的每个给药周期持续至少2周、至少3周、至少4周、至少5周或至少6周。

[0021] 在其中在多个给药周期中向人施用GA101抗体和GDC-0199的一个实施方案中,GA101抗体可以,例如,每个给药周期施用一次,持续多个给药周期中的一个或多个给药周期。每个剂量施用的GA101的量可以,例如,为约300 mg至约3000 mg、或约500 mg至约3000 mg、或约500 mg至约1200 mg。

[0022] 在其中在多个给药周期中向人施用GA101抗体和GDC-0199的一个实施方案中,GDC-0199可以,例如,在一个给药周期中每天施用,持续多个给药周期中的一个或多个给药周期。在一个实施方案中,GDC-0199在少于初始给药周期所有天数的天中施用,并且在初始给药周期之后的多个给药周期的给药周期的每天施用。每天施用的GDC-0199的量可以是约10 mg至约1,000 mg、约20 mg至约800 mg、约20 mg至约500 mg、或约50 mg至约300 mg。

[0023] 在一个实施方案中,GA101抗体和GDC0199在多个给药周期中的至少2、3、4、5、6、7、8或多于8个给药周期中施用于患者。

[0024] 在提供的用于治疗有需要的人中的癌症的方法(其包括向所述人施用GA101抗体和GDC 0199两者)的某些实施方案中,在多个给药周期的最后给药周期之后,单独的GDC-0199可以在GA101抗体不存在的情况下施用于人,或者单独的GA101抗体可以在不存在GDC-0199的情况下施用于患者。例如,当GDC-0199单独施用于人(例如,在其中GA101抗体和GDC 0199两者施用于人的多个给药周期的最后周期之后),GDC-0199可以施用于人,持续至少3、4、5、6、7、8或9天,或持续10天或更多天,持续20或更多天,或持续30或更多天。

[0025] 在提供的其中GA101抗体和GDC0199在多个给药周期中施用于患者的方法的又一个实施方案中,多个给药周期包含渐增给药周期,其中GDC 0199在渐增给药周期过程中以渐增每日剂量施用于患者。

[0026] 本文提供了GA101抗体用于制备用于与GDC-0199组合治疗癌症的药物的用途。本文还提供了GDC-0199用于制备用于与GA101抗体组合治疗癌症的药物的用途。

[0027] 在另一个方面,本文提供了GA101抗体和GDC-0199的组合,其用于治疗人中的癌症。所述组合可以,例如,可以根据下述给药方案施用于人。

附图说明

[0028] 图1. II型抗CD20抗体(GA101抗体,在这种情况下,obinutuzumab)与Bcl-2抑制剂(ABT-199,又名GDC 0199)的组合治疗的抗肿瘤活性。x轴下的箭头和线分别表明GA101和GDC-0199的给药日。

[0029] 图2. 用于施用GDC-199与obinutuzumab的示例性给药时间表。

[0030] 图3. 用于施用GDC-199与obinutuzumab的示例性给药时间表。

[0031] 图4. 单独使用或与GDC-0199组合使用的II型抗CD20抗体(obinutuzumab,又名R05072759)和单独使用或与GDC-0199组合使用的I型抗CD20抗体(利妥昔单抗)对人Z138套细胞淋巴瘤细胞的抗肿瘤活性。

[0032] 图5. 来自侵袭性淋巴瘤的异种移植模型的结果,其表明在GDC-0199与II型抗

CD20抗体 (GA101抗体,在这种情况下,obinutuzumab)组合之后用GDC-0199的单一药剂治疗延迟肿瘤再生长。

[0033] 发明详述

本发明涉及上述方法。

[0034] 本发明还涉及用于治疗有需要的人的方法,其包括向所述人施用有效量的GA101抗体或2-(1*H*-吡咯并[2,3-*b*]吡啶-5-基氧基)-4-(4-((2-(4-氯苯基)-4,4-二甲基环己-1-烯基)甲基)哌嗪-1-基)-*N*-(3-硝基-4-((四氢-2*H*-吡喃-4-基)甲基氨基)苯基磺酰基)苯甲酰胺或其药学上可接受的盐持续一个或多个给药周期,随后共同施用有效量的所述GA101抗体和2-(1*H*-吡咯并[2,3-*b*]吡啶-5-基氧基)-4-(4-((2-(4-氯苯基)-4,4-二甲基环己-1-烯基)甲基)哌嗪-1-基)-*N*-(3-硝基-4-((四氢-2*H*-吡喃-4-基)甲基氨基)苯基磺酰基)苯甲酰胺或其药学上可接受的盐持续一个或多个给药周期。

[0035] 本发明还涉及用于治疗有需要的人的方法,其包括向所述人施用有效量的GA101抗体或2-(1*H*-吡咯并[2,3-*b*]吡啶-5-基氧基)-4-(4-((2-(4-氯苯基)-4,4-二甲基环己-1-烯基)甲基)哌嗪-1-基)-*N*-(3-硝基-4-((四氢-2*H*-吡喃-4-基)甲基氨基)苯基磺酰基)苯甲酰胺持续0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14天,随后共同施用有效量的所述GA101抗体和2-(1*H*-吡咯并[2,3-*b*]吡啶-5-基氧基)-4-(4-((2-(4-氯苯基)-4,4-二甲基环己-1-烯基)甲基)哌嗪-1-基)-*N*-(3-硝基-4-((四氢-2*H*-吡喃-4-基)甲基氨基)苯基磺酰基)苯甲酰胺或其药学上可接受的盐持续一个或多个给药周期。

[0036] 本发明还涉及用于治疗有需要的人的方法,其包括施用有效量的所述GA101抗体持续1、2、3、4、5、6或7天,随后共同施用有效量的所述GA101抗体和2-(1*H*-吡咯并[2,3-*b*]吡啶-5-基氧基)-4-(4-((2-(4-氯苯基)-4,4-二甲基环己-1-烯基)甲基)哌嗪-1-基)-*N*-(3-硝基-4-((四氢-2*H*-吡喃-4-基)甲基氨基)苯基磺酰基)苯甲酰胺或其药学上可接受的盐持续一个或多个给药周期。

[0037] 本发明还涉及用于治疗有需要的人的方法,其包括施用有效量的2-(1*H*-吡咯并[2,3-*b*]吡啶-5-基氧基)-4-(4-((2-(4-氯苯基)-4,4-二甲基环己-1-烯基)甲基)哌嗪-1-基)-*N*-(3-硝基-4-((四氢-2*H*-吡喃-4-基)甲基氨基)苯基磺酰基)苯甲酰胺或其药学上可接受的盐持续1、2、3、4、5、6或7天,随后共同施用有效量的所述GA101抗体和2-(1*H*-吡咯并[2,3-*b*]吡啶-5-基氧基)-4-(4-((2-(4-氯苯基)-4,4-二甲基环己-1-烯基)甲基)哌嗪-1-基)-*N*-(3-硝基-4-((四氢-2*H*-吡喃-4-基)甲基氨基)苯基磺酰基)苯甲酰胺或其药学上可接受的盐持续一个或多个给药周期。

[0038] 本发明还涉及用于治疗有需要的人的方法,其包括施用每个给药周期一次的有效量的所述GA101抗体持续1、2、3、4、5或6个周期,随后共同施用有效量的所述GA101抗体每个给药周期一次和2-(1*H*-吡咯并[2,3-*b*]吡啶-5-基氧基)-4-(4-((2-(4-氯苯基)-4,4-二甲基环己-1-烯基)甲基)哌嗪-1-基)-*N*-(3-硝基-4-((四氢-2*H*-吡喃-4-基)甲基氨基)苯基磺酰基)苯甲酰胺或其药学上可接受的盐一天一、二或三次持续一个或多个给药周期。

[0039] 本发明还涉及用于治疗有需要的人的方法,其包括施用一天一、二或三次的有效量的2-(1*H*-吡咯并[2,3-*b*]吡啶-5-基氧基)-4-(4-((2-(4-氯苯基)-4,4-二甲基环己-1-烯基)甲基)哌嗪-1-基)-*N*-(3-硝基-4-((四氢-2*H*-吡喃-4-基)甲基氨基)苯基磺酰基)苯甲酰胺或其药学上可接受的盐持续1、2、3、4、5或6个给药周期,随后共同施用有效量的所述

GA101抗体每个给药周期一次和2-(1*H*-吡咯并[2,3-*b*]吡啶-5-基氧基)-4-(4-((2-(4-氯苯基)-4,4-二甲基环己-1-烯基)甲基)哌嗪-1-基)-*N*-(3-硝基-4-((四氢-2*H*-吡喃-4-基)甲基氨基)苯基磺酰基)苯甲酰胺或其药学上可接受的盐每天一、二或三次持续一个或多个给药周期。

[0040] 本发明还涉及上述方法中的任一种,其中所述GA101抗体的有效量是500、600、700、800、900、1000、1100、1200、1300、1400、1500、1600、1700、1800、1900、2000、2100、2200、2300、2400、2500、2600、2700、2800、2900或3000 mg,且2-(1*H*-吡咯并[2,3-*b*]吡啶-5-基氧基)-4-(4-((2-(4-氯苯基)-4,4-二甲基环己-1-烯基)甲基)哌嗪-1-基)-*N*-(3-硝基-4-((四氢-2*H*-吡喃-4-基)甲基氨基)苯基磺酰基)苯甲酰胺或其药学上可接受的盐的有效量是10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530 540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800、810、820、830、840、850、860、870、880、890、900、910、920、930、940、950、960、970、980、990或1000 mg。

[0041] 本发明还涉及上述方法中的任一种,其中所述GA101抗体的有效量是800、900、1000、1100、1200、1300、1400或1500 mg,且2-(1*H*-吡咯并[2,3-*b*]吡啶-5-基氧基)-4-(4-((2-(4-氯苯基)-4,4-二甲基环己-1-烯基)甲基)哌嗪-1-基)-*N*-(3-硝基-4-((四氢-2*H*-吡喃-4-基)甲基氨基)苯基磺酰基)苯甲酰胺或其药学上可接受的盐的有效量是50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290或300 mg。

[0042] 本发明还涉及上述方法中的任一种,其中当所述癌症是NHL时,所述GA101抗体的有效量是800、900、1000、1100、1200、1300、1400或1500 mg,且2-(1*H*-吡咯并[2,3-*b*]吡啶-5-基氧基)-4-(4-((2-(4-氯苯基)-4,4-二甲基环己-1-烯基)甲基)哌嗪-1-基)-*N*-(3-硝基-4-((四氢-2*H*-吡喃-4-基)甲基氨基)苯基磺酰基)苯甲酰胺或其药学上可接受的盐的有效量是50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530 540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790和800 mg。

[0043] 本发明还涉及上述方法中的任一种,其中当所述癌症是AML时,所述GA101抗体的有效量是800、900、1000、1100、1200、1300、1400或1500 mg,且2-(1*H*-吡咯并[2,3-*b*]吡啶-5-基氧基)-4-(4-((2-(4-氯苯基)-4,4-二甲基环己-1-烯基)甲基)哌嗪-1-基)-*N*-(3-硝基-4-((四氢-2*H*-吡喃-4-基)甲基氨基)苯基磺酰基)苯甲酰胺的有效量是50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530 540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790和800 mg。

[0044] 本发明还涉及上述方法中的任一种,其中所述GA101抗体和2-(1*H*-吡咯并[2,3-*b*]

吡啶-5-基氧基)-4-(4-(2-(4-氯苯基)-4,4-二甲基环己-1-烯基)甲基)哌嗪-1-基)-N-(3-硝基-4-((四氢-2H-吡喃-4-基)甲基氨基)苯基磺酰基)苯甲酰胺或其药学上可接受的盐在每个给药周期过程中相继共同施用,且每个给药周期是5、6、7、8、9、10、11、12、13或14天。

[0045] 本文中以最广泛的含义使用术语“抗体”,且涵盖各种抗体结构,包括但不限于单克隆抗体、多克隆抗体、多特异性抗体(例如双特异性抗体)和抗体片段,只要它们显示期望的抗原-结合活性。

[0046] 如本文所使用的术语“单克隆抗体”是指获自基本上同质的抗体群体的抗体,即,组成群体的个别抗体相同和/或结合相同的表位,除了可能的变体抗体(例如含有天然存在的突变或在产生单克隆抗体制剂的过程中产生)之外,此类变体通常以较小的量存在。与通常包含针对不同决定簇(表位)的不同抗体的多克隆抗体制剂不同,单克隆抗体制剂的每种单克隆抗体针对抗原上的单个决定簇。因此,修饰词“单克隆”是指抗体获自基本上同质的抗体群体的特征,而不解释为需要通过任何具体的方法来产生抗体。例如,待根据本发明使用的单克隆抗体可以通过多种技术制备,所述技术包括但不限于杂交瘤方法、重组DNA方法、噬菌体展示法、和利用含有人免疫球蛋白基因座的所有或部分的转基因动物的方法,此类用于制备单克隆抗体的方法和其它示例性方法在本文中描述。

[0047] 在一个实施方案中,所述II型抗CD20抗体是单克隆抗体。

[0048] 术语“嵌合抗体”是指通常通过重组DNA技术制备的包含来自一种来源或物种的可变区(即结合区)和源自不同来源或物种的恒定区的至少一部分的单克隆抗体。包含鼠可变区和人恒定区的嵌合抗体是特别优选的。此类鼠/人嵌合抗体是包含编码鼠免疫球蛋白可变区的DNA区段和编码人免疫球蛋白恒定区的DNA区段的所表达免疫球蛋白基因的产物。本发明所涵盖的“嵌合抗体”的其它形式是其中类别或亚类已经从初始抗体的类别或亚类修饰或改变的那些。此类“嵌合”抗体又称为“类别转换抗体”。用于生成嵌合抗体的方法涉及本领域现在众所周知的常规重组DNA和基因转染技术。参见例如Morrison, S.L., 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (1984) 6851-6855; US 5,202,238 and US 5,204,244。

[0049] 术语“人源化抗体”是指其中框架或“互补决定区”(CDR)已经进行修饰以包含与亲本免疫球蛋白的特异性相比特异性不同的免疫球蛋白的CDR的抗体。在一个优选的实施方案中,将鼠CDR嫁接入人抗体的框架区中以制备“人源化抗体”。参见例如Riechmann, L., 等人, Nature 332 (1988) 323-327;和Neuberger, M.S., 等人, Nature 314 (1985) 268-270。特别优选的CDR对应于代表上文对嵌合和双功能性抗体记录的识别抗原的序列的那些。

[0050] 如本文所使用,术语“人抗体”意图包括具有自人种系免疫球蛋白序列衍生的可变和恒定区的抗体。人抗体是现有技术中众所周知的(van Dijk, M.A., and van de Winkel, J.G., Curr. Opin. Pharmacol. 5 (2001) 368-374)。基于此类技术,可以生成针对极其多种目标的人抗体。人抗体的实例描述于例如Kellermann, S. A., 等人, Curr Opin Biotechnol. 13 (2002) 593-597。

[0051] 如本文所使用,术语“重组人抗体”意图包括通过重组手段制备、表达、生成或分离的所有人抗体,诸如从宿主细胞诸如NS0或CHO细胞或者从对于使用转染入宿主细胞中的重组表达载体表达的人免疫球蛋白基因或抗体而言转基因的动物(例如小鼠)分离的抗体。此

类重组人抗体源自重排形式的人种系免疫球蛋白序列的可变和恒定区。根据本发明的重组人抗体已经进行体内体细胞超突变。因此,重组抗体的VH和VL区的氨基酸序列是尽管源自人种系VH和VL序列且与其相关,但可以不天然存在于体内的人抗体种系全集内的序列。

[0052] 如本文所使用,“特异性结合”或“与…特异性结合”是指足够选择性结合目标以便区分其与结合不想要或非特异性的目标(例如,与人CD20特异性结合的抗体)。在一个实施方案中,本发明的GA101抗体具有 $\leq 1\mu\text{M}$ 、 $\leq 100\text{ nM}$ 、 $\leq 10\text{ nM}$ 、 $\leq 1\text{ nM}$ 、 $\leq 0.1\text{ nM}$ 、 $\leq 0.01\text{ nM}$ 或 $\leq 0.001\text{ nM}$ (例如 10^{-8} M 或更低,例如 10^{-8} M 至 10^{-13} M ,例如 10^{-9} M 至 10^{-13} M)的针对人CD20的(Kd)。在又一个实施方案中,KD是 10^{-10} mol/l 或更低(例如, 10^{-12} mol/l)。结合亲和力采用标准的结合测定法诸如斯卡恰特作图分析(Scatchard图分析)在CD20表达细胞上测定。

[0053] 如本文所使用,术语“核酸分子”意图包括DNA分子和RNA分子。核酸分子可以是单链或双链。在一个实施方案中,它是双链DNA。

[0054] “恒定结构域”不直接参与抗体对抗原的结合,但是参与效应物功能(ADCC、补体结合、和CDC)。

[0055] 术语“可变区”或“可变结构域”是指抗体重链或轻链参与抗体结合抗原的结构域。天然抗体的重链和轻链(分别地,VH和VL)的可变结构域通常具有类似的结构,其中每个结构域包含四个保守的构架区(FR)和三个高变区(HVR)。(参见,例如,Kindt等人. *Kuby Immunology*, 第6版, W.H. Freeman and Co., 第91页(2007).)

如本文所使用,术语“高变区”或“HVR”是指抗体可变结构域的序列高变(“互补决定区”或“CDR”)和/或形成结构上定义的环(“高变环”)和/或含有抗原接触残基(“抗原接触”)的区域中的每一个。通常,抗体包含六个HVR: VH中三个(H1、H2、H3)和VL中三个(L1、L2、L3)。本文中的示例性HVR包括:

(a) 在氨基酸残基26-32(L1)、50-52(L2)、91-96(L3)、26-32(H1)、53-55(H2)和96-101(H3)处存在的高变环(Chothia和Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917(1987));

(b) 在氨基酸残基24-34(L1)、50-56(L2)、89-97(L3)、31-35b(H1)、50-65(H2)和95-102(H3)处存在的CDR(Kabat等人, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第5版. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD(1991));

(c) 在氨基酸残基27c-36(L1)、46-55(L2)、89-96(L3)、30-35b(H1)、47-58(H2)和93-101(H3)处存在的抗原接触(MacCallum等人. *J. Mol. Biol.* 262: 732-745(1996));和

(b) (a)、(b)和/或(c)的组合,包括HVR氨基酸残基46-56(L2)、47-56(L2)、48-56(L2)、49-56(L2)、26-35(H1)、26-35b(H1)、49-65(H2)、93-102(H3)和94-102(H3)。

[0056] 如本领域中所认可,CD20的同义词包括B淋巴细胞抗原CD20、B淋巴细胞表面抗原B1、Leu-16、Bp35、BM5、和LF5。

[0057] 根据本发明的术语“抗CD20抗体”是特异性结合CD20抗原的抗体。根据抗CD20抗体对CD20抗原的结合特性和生物学活性,两种类型的抗CD20抗体(I型和II型抗CD20抗体)可以根据Cragg, M.S., 等人, *Blood* 103(2004) 2738-2743; 和Cragg, M.S., 等人, *Blood* 101(2003) 1045-1052区分,参见表2。

[0058] 表2:

I型和II型抗CD20抗体的特性

I型抗CD20抗体	II型抗CD20抗体
I型CD20表位	II型 CD20表位
将CD20定位至脂质筏	不将CD20定位至脂质筏
增加的CDC (如果是IgG1同种型)	降低的CDC (如果是IgG1同种型)
ADCC活性(如果是IgG1同种型)	ADCC活性(如果是IgG1同种型)
完全的结合能力	降低的结合能力
同型聚集	更强的同型聚集
交联后的细胞凋亡诱导	未交联情况下的强细胞死亡诱导

[0059] I型和II型抗CD20抗体的一种特性是其结合模式。I型和II型抗CD20抗体可通过所述抗CD20抗体的与Raji细胞(ATCC编号:CCL-86)上CD20的结合能力与利妥昔单抗相比较的比率来分类。

[0060] II型抗CD20抗体具有的所述抗CD20抗体的与Raji细胞(ATCC编号:CCL-86)上CD20的结合能力与利妥昔单抗的比率为0.3至0.6,并且在一个实施方案中为0.35至0.55,并且在另一个实施方案中为0.4至0.5。此类II型抗CD20抗体的实例包括,例如,托西莫单抗(B1 IgG2a),GA101抗体IgG1(如WO 2005/044859中所公开的嵌合人源化IgG1抗体)、11B8 IgG1(如WO 2004/035607中所公开的)和AT80 IgG1。在一个实施方案中,所述II型抗CD20抗体是与GA101抗体(如WO 2005/044859中所公开的)结合相同的表位的单克隆抗体。

[0061] “抗CD20抗体的与Raji细胞(ATCC编号:CCL-86)上CD20的结合能力与利妥昔单抗的比率”通过直接免疫荧光测量法(测量平均荧光强度(MFI))使用与Cy5缀合的所述抗CD20抗体和与Cy5缀合的利妥昔单抗与Raji细胞(ATCC编号:CCL-86)在FACSArray(Becton Dickinson)中测定,如实施例2中所述,并且如下进行计算:

与Raji细胞(ATCC-No. CCL-86)上的CD20的结合能力的比率 =

$$\frac{\text{MFI}(\text{Cy5- 抗-CD20 抗体})}{\text{MFI}(\text{Cy5- 利妥昔单抗})} \times \frac{\text{Cy5- 标记比率}(\text{Cy5- 利妥昔单抗})}{\text{Cy5- 标记比率}(\text{Cy5- 抗-CD20 抗体})}。$$

[0062] MFI是平均荧光强度。如本文所使用的“Cy5-标记比率”是指每分子抗体的Cy5-标记分子的数目。

[0063] 通常,所述II型抗CD20抗体具有的所述二级抗CD20抗体与Raji细胞(ATCC编号:CCL-86)上CD20的结合能力与利妥昔单抗相比较的比率为0.3至0.6,并且在一个实施方案中为0.35至0.55,并且在又一个实施方案中为0.4至0.5。

[0064] 在一个实施方案中,所述II型抗CD20抗体,例如GA101抗体具有增加的抗体依赖性细胞的细胞毒性(ADCC)。

[0065] “具有增加的抗体依赖性细胞的细胞毒性(ADCC)的抗体”意指具有如通过本领域普通技术人员已知的任何合适的方法测定的增加的ADCC的抗体,如该术语在本文中所定义。一种接受的体外ADCC测定法如下:

- 1) 该测定法使用已知表达抗体的抗原结合区识别的靶抗原的靶细胞;
- 2) 该测定法使用从随机选择的健康供体的血液分离的人外周血单核细胞(PBMC)作为效应细胞;

3) 根据下列方案来实施测定法:

i) 使用标准的密度离心程序来分离PBMC,并将其以 5×10^6 个细胞/ml在RPMI细胞培养基中悬浮;

ii) 将靶细胞通过标准的组织培养方法来培养,从具有高于90%的活力的指数生长期收获,在RPMI细胞培养基中洗涤,用100微居里 ^{51}Cr 标记,用细胞培养基洗涤两次,并以 10^5 个细胞/ml的密度在细胞培养基中重悬浮;

iii) 将100微升上述最终靶细胞悬浮液转移至96孔微量滴定板的每孔;

iv) 将抗体在细胞培养基中连续稀释,从4000ng/ml至0.04ng/ml,并将50微升所得的抗体溶液添加至96孔微量滴定板中的靶细胞,一式三份测试覆盖上述整个浓度范围的多种抗体浓度;

v) 对于最大释放(MR)对照,含有经标记的靶细胞的平板中的3个另外的孔接受50微升非离子型去污剂(Nonidet, Sigma, St. Louis)的2%(VN)水溶液,代替抗体溶液(上述第iv点);

vi) 对于自发释放(SR)对照,含有经标记的靶细胞的平板中的3个另外的孔接受50微升RPMI细胞培养基,代替抗体溶液(上述第iv点);

vii) 然后,将96孔微量滴定板以 $50 \times g$ 离心1分钟,并于 4°C 孵育1小时;

viii) 将50微升PBMC悬浮液(上述第i点)添加至每孔以产生效应:靶细胞比率25:1,并将平板在培养箱中在5% CO_2 气氛下于 37°C 放置4小时;

ix) 收获来自每孔的无细胞上清液,并使用 γ 计数器来定量实验释放的放射性(ER);

x) 根据公式 $(\text{ER}-\text{MR}) / (\text{MR}-\text{SR}) \times 100$ 对每个抗体浓度计算比裂解的百分比,其中ER是对所述抗体浓度定量(参见上述第ix点)的平均放射性,MR是对MR对照(参见上述第v点)定量(参见上述第ix点)的平均放射性,而SR是对SR对照(参见上述第vi点)定量(参见上述第ix点)的平均放射性;

4) 增加的ADCC”定义为上文测试的抗体浓度范围内观察到的比裂解(specific lysis)的最大百分比的增加和/或达到上文测试的抗体浓度范围内观察到的比裂解的最大百分比的一半所需要的抗体浓度降低。在一个实施方案中,ADCC的增加相对于这样的ADCC,所述ADCC用上述测定法测量,使用本领域技术人员已知的相同的标准生成、纯化、配制和储存方法,由相同类型的宿主细胞产生的相同抗体介导,除了比较抗体(缺乏增加的ADCC)不是由经工程改造以过表达GnTIII和/或经工程改造以减少从岩藻糖基转移酶8(FUT8)基因的表达(例如,包括,经工程改造用于FUT8敲除)的宿主细胞产生。

[0066] 可以通过例如所述抗体的突变和/或糖工程改造来获得所述“增加的ADCC”。在一个实施方案中,将抗体糖工程改造以具有连接至抗体Fc区域的两分型寡糖(被GlcNAc两分),例如,在W0 2003/011878 (Jean-Mairet等人);美国专利号6,602,684 (Umana等人);US 2005/0123546 (Umana等人), Umana, P., 等人, Nature Biotechnol.17 (1999) 176-180)。在另一个实施方案中,将抗体糖工程改造以便通过在蛋白岩藻糖基化缺陷的宿主细胞(例如,Lec13 CHO细胞或 α -1,6-岩藻糖基转移酶基因(FUT8)缺失或FUT基因表达敲低的细胞(参见,例如,Yamane-Ohnuki等人. Biotech. Bioeng. 87:614 (2004);Kanda, Y.等人, Biotechnol.Bioeng., 94(4):680-688 (2006);和W02003/085107))中表达抗体而在连接至Fc区的碳水化合物上缺乏岩藻糖。在又一个实施方案中,已经将抗体序列在

其Fc区中工程改造以增强ADCC(例如,在一个实施方案中,此类工程改造的抗体变体包含在Fc区的位置298、333和/或334(残基的EU编号)处具有一个或多个氨基酸取代的Fc区)。

[0067] 术语“补体依赖性细胞毒性(CDC)”是指在补体存在的情况下根据本发明的抗体对人肿瘤靶细胞的裂解。可以通过在补体存在的情况下用根据本发明的抗CD20抗体处理表达CD20的细胞的制剂来测量CDC。如果抗体在浓度100nM时在4小时后诱导20%或更多的肿瘤细胞裂解(细胞死亡),则发现CDC。在一个实施方案中,用⁵¹Cr或Eu标记的肿瘤细胞和释放的⁵¹Cr或Eu的测量来实施测定。对照包括将肿瘤靶细胞与补体但不与抗体一起孵育。

[0068] 如本文所使用,术语“GA101抗体”是指以下结合人CD20的抗体中的任一种:(1)包含以下的抗体:包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的HVR-H1;包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的HVR-H2;包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HVR-H3;包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的HVR-L1;包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的HVR-L2;和包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的HVR-L3;(2)包含以下的抗体:包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的VH结构域和包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列的VL结构域;(3)包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列和SEQ ID NO:10的氨基酸序列的抗体;(4)被称为obinutuzumab的抗体;或(5)包含与SEQ ID NO:9的氨基酸序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列和包含与SEQ ID NO:10的氨基酸序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列的抗体。在一个实施方案中,GA101抗体是IgG1同种型抗体。

[0069] 寡糖组分可以显著影响与治疗性糖蛋白的功效有关的特性,包括物理稳定性、对蛋白酶攻击的抗性、与免疫系统的相互作用、药代动力学、和特定生物学活性。此类特性可能不仅取决于寡糖的存在或不存在,而且还取决于寡糖的特定结构。可以做出寡糖结构与糖蛋白功能间的一些概括。例如,某些寡糖结构经由与特定碳水化合物结合蛋白的相互作用而介导糖蛋白从血流的快速清除,而其它可以被抗体结合,并触发不想要的免疫反应(Jenkins, N., 等人, Nature Biotechnol. 14 (1996) 975-981)。

[0070] 由于哺乳动物细胞以对于人应用最相容的形式糖基化蛋白的能力,它们是用于生成治疗性糖蛋白的优选的宿主(Cumming, D.A., 等人, Glycobiology 1 (1991) 115-130; Jenkins, N., 等人, Nature Biotechnol. 14 (1996) 975-981)。细菌非常罕见糖基化蛋白,并且与其它类型的常见宿主,诸如酵母、丝状真菌、昆虫和植物细胞一样,其产生与从血流快速清除、不想要的免疫相互作用和在一些特定的情况下,降低的生物学活性有关的糖基化模式。在哺乳动物细胞中,在过去二十年期间最常使用中国仓鼠卵巢(CHO)细胞。除了给予合适的糖基化模式以外,这些细胞允许遗传稳定的、高生产性克隆细胞系的一致生成。它们可以使用无血清培养基在简单的生物反应器中培养至高密度,并允许开发安全且可再现的生物工艺。其它通常使用的动物细胞包括幼仓鼠肾(BHK)细胞、NS0和SP2/0小鼠骨髓瘤细胞。新近,还已经测试了从转基因动物的生成(Jenkins, N., 等人, Nature Biotechnol. 14 (1996) 975-981)。

[0071] 所有抗体在重链恒定区中的保守位置处都含有碳水化合物结构,其中每种同种型都拥有独特的一批N连接的碳水化合物结构,其可变地影响蛋白装配、分泌或功能活性(Wright, A., and Monison, S. L., Trends Biotech. 15 (1997) 26-32)。根据加工程度,结合的N连接的碳水化合物结构变化得相当大,并且可以包括高甘露糖的、多分支的以及双触角的复合寡糖(Wright, A., and Morrison, S. L., Trends Biotech. 15 (1997)

26-32)。通常,存在特定糖基化位点处结合的核心寡糖结构的异质加工,使得即使单克隆抗体也以多种糖形存在。同样地,已经显示了细胞系间存在抗体糖基化的主要差异,而且甚至对不同培养条件下培养的给定细胞系也看到次要差异(Lifely, M. R., 等人, *Glycobiology* 5 (1995) 813-822)。

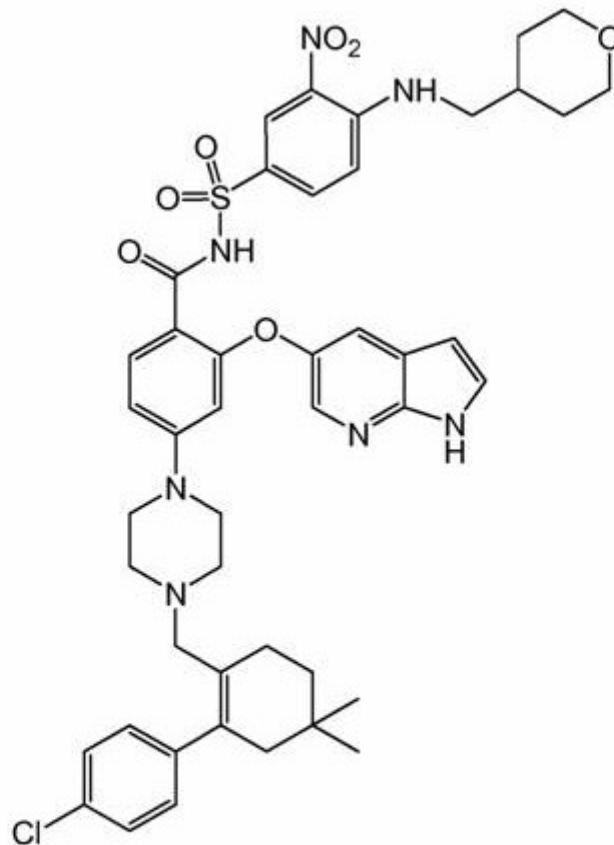
[0072] 一种在维持简单的生成过程并潜在地避免显著的、不想要的副作用的情况下获得效力大幅增加的方式是通过工程改造单克隆抗体的寡糖组分来增强其天然的、细胞介导的效应物功能,如描述于Umaña, P., 等人, *Nature Biotechnol.* 17 (1999) 176-180和US 6,602,684。IgG1型抗体(在癌症免疫疗法中最常用的抗体)是在每个CH2结构域中的Asn297处具有保守的N连接的糖基化位点的糖蛋白。结合于Asn297的两个复合双触角寡糖掩埋于各CH2结构域之间,与多肽骨架形成广泛的接触,并且其存在对于抗体介导效应物功能诸如抗体依赖性细胞的细胞毒性(ADCC)是至关重要的(Lifely, M. R., 等人, *Glycobiology* 5 (1995) 813-822; Jefferis, R., 等人, *Immunol. Rev.* 163 (1998) 59-76; Wright, A., and Morrison, S. L., *Trends Biotechnol.* 15 (1997) 26-32)。

[0073] 先前显示了 $\beta(1,4)$ -N-乙酰葡萄糖胺转移酶III (“GnTIII”) (一种催化两分型寡糖形成的糖基转移酶)在中国仓鼠卵巢(CHO)细胞中的过表达显著提高由工程改造的CHO细胞生成的抗成神经细胞瘤嵌合单克隆抗体(chCE7)的体外ADCC活性(参见Umaña, P., 等人, *Nature Biotechnol.* 17 (1999) 176-180;和WO 99/154342,其全部内容在此通过引用并入)。抗体chCE7属于具有高肿瘤亲和力和特异性,但是在缺乏GnTIII酶的标准工业细胞系中生产时具有太小效力以致在临床上无用的一大类未缀合的单克隆抗体(Umaña, P., 等人, *Nature Biotechnol.* 17 (1999) 176-180)。该研究第一次显示了可以通过工程改造抗体生成细胞以表达GnTIII来获得ADCC活性的大幅增加,其还导致恒定区(Fc)结合的两分型寡糖(包括两分型非岩藻糖基化寡糖)比例的增加,高于天然存在的抗体中发现的水平。

[0074] 在一个实施方案中,本发明的包含GA101抗体的组合物包含经工程改造以具有增加的ADCC活性的GA101抗体。

[0075] 如本文所使用,术语“Bcl-2”是指Bcl-2蛋白(Swiss Prot ID编号P10415),其是Bcl-2蛋白家族成员(Cory, S., and Adams, J.M., *Nature Reviews Cancer* 2 (2002) 647-656; Adams, *Genes und Development* 17 (2003) 2481-2495; Danial, N.N., and Korsmeyer, S.J., *Cell* 116 (2004) 205-219; Petros, A. M., *Biochim Biophys Acta* 1644 (2004) 83-94)。

[0076] 如本文所使用,术语“选择性Bcl-2抑制剂”是指2-(1*H*-吡咯并[2,3-*b*]吡啶-5-基氧基)-4-(4-((2-(4-氯苯基)-4,4-二甲基环己-1-烯基)甲基)哌嗪-1-基)-*N*-(3-硝基-4-((四氢-2*H*-吡喃-4-基)甲基氨基)苯基磺酰基)苯甲酰胺(又名ABT-199或GDC-0199),式I的Bcl-2抑制剂,如描述于国际公开号W02010/138588和美国公开号US2010/0305122(其通过引用并入本文)。



2-(1H-吡咯并[2,3-b]吡啶-5-基氧基)-4-(4-((2-(4-氯苯基)-4,4-二甲基环己-1-烯基)甲基)哌嗪-1-基)-N-(3-硝基-4-((四氢-2H-吡喃-4-基)甲基氨基)苯基磺酰基)苯甲酰胺

式I.

[0077] 术语“表达CD20”抗原意图指示细胞(例如,T或B细胞)中的CD20抗原的显著水平的表达。在一个实施方案中,待根据本发明的方法治疗的患者在B细胞肿瘤或癌症上表达显著水平的CD20。具有“表达CD20的癌症”的患者可以通过本领域已知的标准测定法来确定。例如,使用免疫组织化学(IHC)检测、FACS或者经由相应mRNA的基于PCR的检测来测量CD20抗原表达。

[0078] 如本文所使用,术语“表达CD20的癌症”是指癌细胞显示CD20抗原表达的所有癌症。此类表达CD20的癌症可以是,例如,淋巴瘤、淋巴细胞性白血病、肺癌、非小细胞肺(NSCL)癌、细支气管肺泡细胞肺癌、骨癌、胰腺癌、皮肤癌、头或颈癌、皮肤或眼内黑色素瘤、子宫癌、卵巢癌、直肠癌、肛区癌、胃癌(stomach cancer)、胃癌(gastric cancer)、结肠癌、乳腺癌、子宫癌、输卵管癌、子宫内膜癌、宫颈癌、阴道癌、外阴癌、霍奇金(Hodgkin)氏病、食管癌、小肠癌、内分泌系统癌、甲状腺癌、甲状旁腺癌、肾上腺癌、软组织肉瘤、尿道癌、阴茎癌、前列腺癌、膀胱癌、肾或输尿管癌、肾细胞癌、肾盂癌、间皮瘤、肝细胞癌、胆癌(biliary cancer)、中枢神经系统(CNS)赘生物、脊柱轴肿瘤、脑干胶质瘤、多形性成胶质细胞瘤(glioblastoma multiforme)、星形细胞瘤、神经鞘瘤(schwannoma)、室鼓膜瘤(ependymoma)、髓母细胞瘤、脑脊膜瘤、鳞状细胞癌、垂体腺瘤,包括任何上述癌症的难治性形式、或一种或多种上述癌症的组合。

[0079] 在一个实施方案中,如本文所使用的表达CD20的癌症是指淋巴瘤(例如B细胞非霍

奇金氏淋巴瘤(NHL))和淋巴细胞性白血病。此类淋巴瘤和淋巴细胞性白血病包括例如a)滤泡性淋巴瘤、b)小无核裂细胞淋巴瘤(Small Non-Cleaved Cell Lymphoma)/伯基特(Burkitt)氏淋巴瘤(包括地方性伯基特氏淋巴瘤、散发性伯基特氏淋巴瘤和非伯基特氏淋巴瘤)、c)边缘区淋巴瘤(包括结外边缘区B细胞淋巴瘤(粘膜相关淋巴组织淋巴瘤,MALT)、结边缘区B细胞淋巴瘤和脾边缘区淋巴瘤)、d)套细胞淋巴瘤(MCL)、e)大细胞淋巴瘤(包括B细胞弥漫性大细胞淋巴瘤(DLCL)、弥漫性混合细胞淋巴瘤、免疫母细胞性淋巴瘤、原发性纵隔B细胞淋巴瘤、血管中心性淋巴瘤-肺B细胞淋巴瘤)、f)毛细胞白血病、g)淋巴细胞性淋巴瘤、瓦尔登斯特伦(waldenstrom)氏巨球蛋白血症、h)急性淋巴细胞性白血病(ALL)、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)/小淋巴细胞性淋巴瘤(SLL)、B细胞幼淋巴细胞白血病、i)浆细胞赘生物、浆细胞骨髓瘤、多发性骨髓瘤、浆细胞瘤、j)霍奇金氏病、k)急性髓性白血病(AML);和其它类型的淋巴瘤和淋巴细胞性白血病。

[0080] 在一个实施方案中,表达CD20的癌症是B细胞非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)。在另一个实施方案中,表达CD20的癌症是套细胞淋巴瘤(MCL)、急性淋巴细胞性白血病(ALL)、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、B细胞弥漫性大细胞淋巴瘤(DLCL)、急性髓性白血病(AML)、伯基特氏淋巴瘤、毛细胞白血病、滤泡性淋巴瘤、多发性骨髓瘤、边缘区淋巴瘤、移植后淋巴增殖性病征(PTLD)、HIV相关淋巴瘤、瓦尔登斯特伦氏巨球蛋白血症、或原发性CNS淋巴瘤。

[0081] 如本文所使用,“复发性或难治性”CLL包括已经接受至少1个先前含有化疗的治疗方案的CLL患者。复发性患者通常在响应于先前含有化疗的治疗方案之后已经发展进行性疾病。难治性患者已经通常未能对上次先前含有化疗的方案响应或者在6个月内复发。

[0082] 如本文所使用,“先前未治疗的”CLL包括诊断具有CLL、但通常未接受先前化疗或免疫疗法的患者。具有紧急情况、局部区域放疗(例如,用于缓解压力体征或症状)或皮质类固醇的历史的患者仍可以被认为先前未治疗。

[0083] 如本文所使用,术语“治疗”,除非另外指明,意指逆转、减轻、抑制患者的肿瘤生长、肿瘤转移,或其它致癌或肿瘤细胞的进展,或者,部分地或完全地阻止患者的肿瘤生长、肿瘤转移,或其它致癌或肿瘤细胞。如本文所使用,术语“治疗”,除非另外指明,还指治疗的行动。

[0084] 术语“治疗方法”或其等同术语当应用于例如癌症时是指设计为降低或消除患者中的癌细胞数目,或者减轻癌症症状的程序或作用过程。癌症或另一种增殖性病征的“治疗方法”不必意味着实际上会消除癌细胞或其它病症,实际上会降低细胞数目或病症,或实际上会减轻癌症或其它病症的症状。经常,会进行即使具有较低的成功可能性,但是然而鉴于医疗史和估计的患者存活预期认为诱导总体有益的作用过程的治疗方法。术语“共同施用”(“co-administration”或“co-administering”)是指作为两种分开的制剂施用所述II型抗CD20抗体和所述选择性Bcl-2抑制剂。共同施用可以是同时的或者以任一次序相继的。在一个进一步实施方案中,存在两种(或所有)活性剂同时发挥其生物学活性的时间段。同时或相继(例如经由静脉内(i.v.)通过连续输注;对于抗体一次,和最终对于Bcl-2抑制剂一次;或者口服施用Bcl-2抑制剂)共同施用所述II型抗CD20抗体和所述选择性Bcl-2抑制剂。当两种治疗剂相继共同施用,所述药剂以通过“特定时间段”分开的两次单独施用进行施用。术语特定时间段意指1小时至15天的任何时间段。例如,药剂之一可以从另一种药剂的施用起约15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1天、或24、23、22、21、20、19、

18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1小时内施用,并且,在一个实施方案中,特定时间段是10、9、8、7、6、5、4、3、2或1天、或24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1小时。

[0085] 术语“同时”是指在相同时间或在短时间段(通常少于1小时)内。

[0086] 如本文所使用,给药期意指这样的时间段,在该时间段期间,各治疗剂已经施用至少一次。给药周期通常为约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30天,并且在一个实施方案中,6、7、8、9、10、11、12、13或14天,例如7或14天。

[0087] 在某些实施方案中,给药期是给药周期。

[0088] 不证自明的是,以“治疗有效量”(或简称“有效量”)对患者施用抗体,所述治疗有效量是相应化合物或组合会引发研究人员、兽医、医学医生或其他临床医生寻求的组织、系统、动物或人的生物学或医学应答的量。有效量的治疗剂的施用可以是单次施用或分剂量施用。“分剂量施用”意指有效量被分成多个剂量,优选为2个剂量,并且在1或2天内施用。例如,如果100 mg选择性BCL-2抑制剂被视为有效的,则它可以以一次100 mg施用或两次50 mg施用进行施用。分剂量施用有时在给药周期的开始时对于减少副作用是期望的。当有效量以分割给药施用时,其仍然被认为是有效量的一次施用。例如,当100 mg是有效量的选择性Bcl-2抑制剂且所述量经一段时间(例如2天)以两个50 mg剂量施用时,只有一个有效量在该段时间过程中施用。

[0089] 所述II型抗CD20抗体和所述Bcl-2抑制剂的共同施用量和共同施用时机将取决于所治疗患者的类型(物种、性别、年龄、重量等)和状况和所治疗疾病或状况的严重性。可以一次或经一系列治疗对患者合适地共同施用所述II型抗CD20抗体和所述Bcl-2抑制剂。根据疾病的类型和严重性,约1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 至50 mg/kg (例如0.1-20 mg/kg)所述II型抗CD20抗体和0.1 mg/kg 至200 mg/kg (例如10-150 mg/kg)所述选择性Bcl-2抑制剂是对患者共同施用这两种药物的初始候选剂量。如果施用是静脉内的,则所述II型抗CD20抗体或所述Bcl-2抑制剂的初始输注时间可以比随后的输注时间更长,例如初始输注为约90分钟,而随后的输注为约30分钟(如果初始输注耐受良好的话)。

[0090] 在一个实施方案中,所述II型抗CD20抗体的优选剂量将在约0.05 mg/kg 至约30 mg/kg 的范围内,优选1 mg/kg 至30 mg/kg ;或500 mg -3000 mg 平剂量(flat dose)。因此,可以对患者共同施用一个或多个剂量的约0.5 mg/kg 、2.0 mg/kg 、4.0 mg/kg 、10 mg/kg 或30 mg/kg 或500 mg -3000 mg 平剂量(或其任何组合)。所述Bcl-2抑制剂的优选剂量将在20 mg/kg 至约150 mg/kg 、优选1 mg/kg 至10 mg/kg 的范围内。根据患者的类型(物种、性别、年龄、重量等)和状况和抗CD20抗体和Bcl-2抑制剂的类型,所述抗CD20抗体的剂量和施用时间表可以与Bcl-2抑制剂的剂量不同。例如,可以例如每1至3周施用所述抗CD20抗体,并且可以每天或每2至10天施用所述Bcl-2抑制剂。也可以施用较高的初始负荷剂量,随后是一个或多个较低剂量。

[0091] 本发明部分涉及包含II型抗CD20抗体和选择性Bcl-2抑制剂选择性Bcl-2抑制剂的组合物。

[0092] 在一个优选的实施方案中,本发明的组合物可用于预防或降低患有表达CD20的癌症的此类患者中的转移或进一步散布。组合物可用于增加此类患者的存活持续时间,增

加此类患者的无进展存活,增加响应的持续时间,导致经治疗的患者的统计学显著且临床上有意义的改善,如通过存活的持续时间、无进展存活、响应率或响应的持续时间所测量。在一个优选的实施方案中,组合物可用于增加患者组中的响应率。

[0093] 在本发明的背景下,可以在表达CD20 的癌症的II型抗CD20抗体和Bcl-2抑制剂组合治疗中使用额外的其它细胞毒剂、化疗剂或抗癌剂、或增强此类药剂的效果的化合物(例如细胞因子)。合适地,此类分子以对于意图目的有效的量组合存在。优选地,II型抗CD20抗体和Bcl-2抑制剂组合治疗在没有所述额外的细胞毒剂、化疗剂或抗癌剂、或增强此类药剂的效果的化合物的情况下使用。

[0094] 此类药剂包括例如:烷化剂或具有烷基化作用的药剂,诸如环磷酰胺(cyclophosphamide) (CTX;例如cytoxan®)、苯丁酸氮芥(chlorambucil) (CHL;例如LEUKERAN®)、顺铂(cisplatin) (CisP;例如PLATINOL®)、白消安(busulfan) (例如MYLERAN®)、美法仑(melphalan)、卡莫司汀(carmustine) (BCNU)、链脲菌素(streptozotocin)、三乙基三聚氰胺(triethylenemelamine) (TEM)、丝裂霉素C(mitomycin C),等;抗代谢物,诸如甲氨蝶呤(methotrexate) (MTX)、依托泊苷(etoposide) (VP16;例如VEPESID®)、6-巯嘌呤(6-mercaptopurine) (6MP)、6-硫鸟嘌呤(6-thioguanine) (6TG)、阿糖胞苷(cytarabine) (Ara-C)、5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil) (5-FU)、卡培他滨(capecitabine) (例如XELODA®)、达卡巴嗪(dacarbazine) (DTIC),等;抗生素,诸如放线菌素D(actinomycin D)、多柔比星(doxorubicin) (DXR;例如ADRIAMYCIN®)、柔红霉素(daunorubicin) (道诺霉素(daunomycin))、博来霉素(bleomycin)、光神霉素(mithramycin),等;生物碱,诸如长春花生物碱诸如长春新碱(vincristine) (VCR)、长春碱(vinblastine),等;和其它抗肿瘤剂,诸如帕西他赛(paclitaxel) (例如TAXOL®)和帕西他赛衍生物、细胞抑制剂、糖皮质激素诸如地塞米松(dexamethasone) (DEX;例如DECADRON®)和皮质类固醇诸如泼尼松(prednisone)、核苷酶抑制剂诸如羟基脲、氨基酸消减酶(amino acid depleting enzyme) 诸如天冬酰胺酶、甲酰四氢叶酸(leucovorin) 和其它叶酸衍生物和相似的多种多样的抗肿瘤剂。也可以使用下列药剂作为额外的药剂:氨磷汀(arnifostine) (例如ETHYOL®)、更生霉素(dactinomycin)、双氯乙基甲胺(mechlorethamine) (氮芥)、链佐星(streptozocin)、环磷酰胺(cyclophosphamide)、洛莫司汀(lomustine) (CCNU)、多柔比星脂质体(doxorubicin lipo) (例如DOXIL®)、吉西他滨(gemcitabine) (例如GEMZAR®)、柔红霉素脂质体(daunorubicin lipo) (例如DAUNOXOME®)、丙卡巴肼(procarbazine)、丝裂霉素(mitomycin)、多西他赛(docetaxel) (例如TAXOTERE®)、阿地白介素(aldesleukin)、卡铂(carboplatin)、奥沙利铂(oxaliplatin)、克拉屈滨(cladribine)、喜树碱(camptothecin)、CPT 11(伊立替康(irinotecan))、10-羟基-7-乙基-喜树碱(SN38)、氟尿苷(floxuridine)、氟达拉滨(fludarabine)、异环磷酰胺(ifosfamide)、伊达比星(idarubicin)、美司钠(mesna)、干扰素 β 、干扰素 α 、米托蒽醌(mitoxantrone)、托泊替康(topotecan)、亮丙瑞林(leuprolide)、甲地孕酮(megestrol)、美法仑(melphalan)、巯嘌呤、普卡霉素(plicamycin)、米托坦(mitotane)、培门冬酶(pegaspargase)、喷司他丁(pentostatin)、哌泊溴烷(pipobroman)、普卡霉素(plicamycin)、他莫昔芬(tamoxifen)、替尼泊苷(teniposide)、睾内酯(testolactone)、硫鸟嘌呤(thioguanine)、塞替派(thiotepa)、尿嘧啶芥(uracil mustard)、长春瑞滨

(vinorelbine)、苯丁酸氮芥(chlorambucil)。优选地,II型抗CD20抗体和Bcl-2抑制剂组合治疗在没有此类额外的药剂的情况下使用。

[0095] 上文所述的细胞毒剂和抗癌剂以及抗增殖性目标特异性抗癌药物,像蛋白激酶抑制剂在化学疗法方案中的使用通常在癌症疗法领域中得到充分表征,并且其在本文中的使用归入关于监测耐受性和有效性和关于控制施用途径和剂量的相同考虑,伴有一些调整。例如,细胞毒剂的实际剂量可以随通过使用组织培养方法测定的患者的培养细胞应答而变化。通常,与在额外的其它药剂不存在的情况下使用的量相比,将降低剂量。

[0096] 有效细胞毒剂的典型剂量可以在制造商推荐的范围中,并且在通过体外应答或动物模型中的应答指示的情况下,可以降低多至约一个数量级的浓度或量。因此,实际剂量将取决于医生的判断、患者的状况和治疗方法的有效性,所述治疗方法基于原代培养的恶性细胞或组织培养的组织样品的体外响应性,或合适的动物模型中观察到的响应。

[0097] 在本发明的背景下,除了表达CD20的癌症的II型抗CD20抗体和Bcl-2抑制剂组合治疗以外,可以实施有效量的电离辐射和/或可以使用放射性药物。放射源可以是在所治疗的患者外部或内部。当来源在患者外部时,疗法称为外部束放射疗法(EBRT)。当放射源在患者内部时,治疗称作近程疗法(BT)。本发明的背景下使用的放射性原子可以选自下组,包括但不限于镭、铯-137、铷-192、镅-241、金-198、钴-57、铜-67、镓-99、碘-123、碘-131、和碘-111。也可能用此类放射性同位素标记抗体。优选地,II型抗CD20抗体和Bcl-2抑制剂组合治疗在没有此类电离辐射的情况下使用。

[0098] 放射疗法是一种用于控制不可切除的或不能手术的肿瘤和/或肿瘤转移的标准治疗。当已经组合放射疗法与化学疗法时看到改善的结果。放射疗法基于如下的原理,即对靶区域递送的高剂量放射会导致肿瘤和正常组织两者中的生殖细胞(reproductive cell)死亡。放射剂量方案一般在放射吸收剂量(Gy)、时间和分级方面定义,并且必须由肿瘤学家小心定义。患者接受的放射量会取决于各种考虑因素,但是两项最重要的是肿瘤相对于身体的其它重要结构或器官的位置和肿瘤已经扩散的程度。经历放射疗法的患者的一种典型治疗过程会是在1至6周时间段里的治疗时间表,以单一每日分数约1.8至2.0Gy一周5天对患者施用10-80Gy的总剂量。在本发明的一个优选的实施方案中,当用本发明的组合治疗和放射来治疗人患者中的肿瘤时,存在协同作用。换言之,当与放射(任选与额外的化学治疗剂或抗癌剂一起)组合时,借助包含本发明组合的药剂对肿瘤生长的抑制得到增强。辅助放射疗法的参数,例如,包含在W099/60023中。

[0099] 根据已知的方法通过静脉内施用(以推注或者通过经一段时间连续输注),通过肌肉内、腹膜内、脑脊髓内、皮下、关节内、滑膜内、或鞘内路径对患者施用II型抗CD20抗体。优选静脉内或皮下施用抗体。

[0100] 根据已知的方法,例如,通过静脉内施用(以推注或者通过经一段时间连续输注),通过肌肉内、腹膜内、脑脊髓内、皮下、关节内、滑膜内、鞘内或经口(peroral)途径对患者施用Bcl-2抑制剂。优选静脉内、皮下或口服施用Bcl-2抑制剂。

[0101] 本发明涉及一种试剂盒,其包含用于组合治疗患有表达CD20的癌症的患者的II型抗CD20抗体和选择性Bcl-2抑制剂。

[0102] 在本发明的一个实施方案中,该试剂盒进一步包含药学上可接受的载体。该试剂盒可进一步包含无菌稀释剂,其优选地储存在独立的额外容器中。该试剂盒可进一步包含

包装插页,该插页包含指导使用该组合治疗作为表达CD20的癌症疾病、优选B细胞非霍奇金淋巴瘤(NHL)的治疗方法的印刷说明书。

[0103] 术语“包装插页”是指习惯上包括在治疗产品的商业包装中的说明书,其可包括关于涉及此类治疗产品的应用的适应证、用法、剂量、施用、禁忌症和/或警告的信息。

[0104] 在一个优选的实施方案中,产品容器的物品可进一步包括药学上可接受的载体。产品的物品可进一步包括无菌稀释剂,其优选地储存在单独的额外容器中。

[0105] 如本文所使用,“药学上可接受载体”意图包括与药物施用相容的任何和所有材料,包括溶剂、分散介质、包衣、抗细菌和抗真菌剂、等张和吸收延迟剂和与药物施用相容的其它材料和化合物。除非任何常规的介质或药剂与活性化合物不相容,否则考虑其在本发明的组合物中的使用。还可以将补充性活性化合物掺入组合物中。

[0106] 药物组合物和方法

可以通过用药学上可接受的无机或有机载体加工根据本发明的II型抗CD20抗体或抗-Bcl-2活性剂来获得药物组合物。可以使用乳糖、玉米淀粉或其衍生物、滑石、硬脂酸或其盐等,例如,诸如用于片剂、包衣片剂、锭剂和硬明胶胶囊的载体。适合于软明胶胶囊的载体是例如植物油、蜡、脂肪、半固体和液体多元醇等。然而,根据活性物质的性质,通常在软明胶胶囊的情况下不需要载体。适合于生成溶液和糖浆剂的载体是例如水、多元醇、甘油、植物油等。适合于栓剂的载体是例如天然的或硬化的油、蜡、脂肪、半液体或液体多元醇等。

[0107] 此外,药物组合物可以含有防腐剂、增溶剂、稳定剂、湿润剂、乳化剂、增甜剂、着色剂、香料、用于改变渗透压的盐、缓冲剂、掩蔽剂或抗氧化剂。它们也可以含有还有其它治疗上有价值的物质。

[0108] 所述药物组合物可以进一步包含一种或多种药学上可接受载体。

[0109] 本发明进一步提供了特别在癌症中使用的药物组合物,其包含(i)第一有效量的II型抗CD20抗体,或(ii)第二有效量的选择性Bcl-2抑制剂。任选地,此类组合物包含药学上可接受载体和/或赋形剂。

[0110] 通过将具有期望纯度的抗体与任选的药学上可接受载体、赋形剂或稳定剂(Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980))混合以冻干制剂或水溶液形式制备根据本发明使用的单独II型抗CD20抗体的药物组合物,用于储存。可接受的载体、赋形剂、或稳定剂在所采用的剂量和浓度对于受体无毒,并且包括缓冲剂诸如磷酸盐、柠檬酸盐、和其它有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸和甲硫氨酸;防腐剂(诸如十八烷基二甲基苄基氯化铵;氯化己烷双胺;苯扎氯铵、苄索氯铵;酚、丁醇或苯甲醇;对羟基苯甲酸烷基酯,诸如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯;邻苯二酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇;和间甲酚);低分子量(小于约10个残基)多肽;蛋白,诸如血清白蛋白、明胶、或免疫球蛋白;亲水性聚合物诸如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸诸如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸、或赖氨酸;单糖、二糖、和其它碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖、或右旋糖;螯合剂诸如EDTA;糖诸如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨糖醇;成盐抗衡离子诸如钠;金属络合物(例如Zn-蛋白复合物);和/或非离子型表面活性剂诸如TWEEN™、PLURONICS™或聚乙二醇(PEG)。

[0111] 单独抗Bcl-2活性剂,例如Bcl-2抑制剂的药物组合物,取决于其药学特性;例如,对于小化学化合物诸如,例如,ABT-737、ABT-199或ABT-263,例如,一种剂型可以如下:

a) 片剂制剂(湿法制粒):

项	成分	mg/片剂			
1.	式(I)的化合物	5	25	100	500
2.	乳糖无水DTG	125	105	30	150
3.	Sta-Rx 1500	6	6	6	30
4.	微晶纤维素	30	30	30	150
5.	硬脂酸镁	1	1	1	1
	总共	167	167	167	831

制备步骤:

1. 将第1、2、3和4项混合并用纯水制粒。
- [0112] 2. 将颗粒在50°C下干燥。
- [0113] 3. 使颗粒通过适当的研磨装置。
- [0114] 4. 加入第5项并混合3分钟;在适当的压片机上挤压。

[0115] b) 胶囊制剂:

项	成分	mg/胶囊			
1.	式(I)的化合物	5	25	100	500
2.	水合乳糖	159	123	148	---
3.	玉米淀粉	25	35	40	70
4.	滑石	10	15	10	25
5.	硬脂酸镁	1	2	2	5
	总共	200	200	300	600

制备步骤:

1. 将第1、2和3项在适当的混合机中混合30分钟。
 - [0116] 2. 加入第4和5项并混合3分钟。
 - [0117] 3. 填充至适当的胶囊中。
- [0118] 在本发明的一个进一步实施方案中,根据本发明的药物组合物是关于所述II型抗CD20抗体和所述Bcl-2抑制剂的两个单独的制剂。
- [0119] 活性成分也可以包载于例如通过凝聚技术或通过界面聚合制备的微胶囊中(例如分别是羟甲基纤维素或明胶微胶囊和聚(甲基丙烯酸甲酯)微胶囊),在胶状药物递送系统中(例如脂质体、白蛋白微球体、微乳剂、纳米颗粒和纳米胶囊),或在粗滴乳状液中。此类技术公开于例如Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)。
- [0120] 可以制备持续释放制剂。持续释放制剂的合适实例包括含有抗体的固体疏水性聚合物半透性基质,该基质是定型产品的形式,例如薄膜或微胶囊。持续释放基质的实例包括聚酯、水凝胶(例如聚(2-羟乙基-甲基丙烯酸酯)或聚(乙烯醇))、聚交酯(US 3,773,919)、

L-谷氨酸和 γ -乙基-L-谷氨酸酯的共聚物、不可降解的乙烯-乙烯基乙酸酯、可降解的乳酸-乙醇酸共聚物诸如LUPRON DEPOT™(由乳酸-乙醇酸共聚物和醋酸亮丙瑞林构成的可注射微球体)、和聚-D-(-)-3-羟基丁酸。

[0121] 待用于体内施用的制剂必须是无菌的。这容易通过过滤通过无菌滤膜来实现。

[0122] 在某些实施方案中,提供了制备方法,其中制备有效量的GA-101抗体用于与有效量的GDC-0199组合治疗癌症。

[0123] 在一些实施方案中,提供了制备方法,其中制备有效量的GDC-0199用于与有效量的GA-101抗体组合治疗癌症。

[0124] 在提供的制备方法中,制备的GA-101抗体的有效量可以,例如,是500 mg至1 g,或者可以,例如,是上述在上述段落中讨论的有效量。在提供的制备方法中,GDC-0199的有效量可以,例如,是20 mg至1 g,或者可以,例如,是上述在上述段落中讨论的有效量。待治疗的癌症可以,例如,是本申请中任何在别处讨论的那些。

[0125] 本发明部分涉及用于治疗患有癌症、特别是表达CD20的癌症的患者的方法,其包括向需要此类治疗的患者共同施用II型抗CD20抗体和选择性Bcl-2抑制剂。所述II型抗CD20抗体和抗Bcl-2活性剂以有效量施用。

[0126] 在某些实施方案中,给药周期持续28天。

[0127] 在本文提供的治疗患者中的癌症的方法的某些实施方案中,所述方法包括将所述II型抗CD20抗体和所述选择性Bcl-2持续一个或多个给药周期施用于患者。在一个实施方案中,一个或多个给药周期各自持续至少一周。在另一个实施方案中,一个或多个给药周期各自持续至少两周、三周、四周、五周、六周、七周、八周、九周或多于九周。在一个实施方案中,每个给药周期是四周。

[0128] 在一个实施方案中,将治疗剂持续一个给药周期施用于患者。

[0129] 在另一个实施方案中,将治疗剂持续多于一个给药周期,例如,持续两个、三个、四个、五个、六个、七个或多于七个给药周期施用于患者。作为实例,当给药周期是4周且经六个给药周期向患者施用一种或两种治疗剂时,治疗方案将持续24周,诸如图3中显示的给药方案中所示。

[0130] 在某些实施方案中,提供了用于治疗有需要的患者中的癌症的方法,其包括在多个给药周期中向所述人施用GA101抗体和/或GDC 0199。

[0131] 在某些实施方案中,将GA101抗体和GDC199两者在多个给药周期中的一个或多个给药周期中施用于患者,并且将GA101抗体和GDC-0199之一在多个给药周期中的一个或多个给药周期中施用。

[0132] 在本文提供的治疗方法的某些实施方案中,将治疗剂在包含两个或三个治疗阶段的给药方案中施用于患者,其中每个治疗阶段包含与其它治疗阶段的给药周期不同的至少一个给药周期。例如,在其中给药周期包含四周的一个实施方案中,II型抗CD20抗体可以持续第一给药周期(例如,第一治疗阶段)的两个或更多周每周一次施用于患者,且在第一给药周期之后的给药周期(例如,第二治疗阶段)中每个给药周期施用一次。

[0133] 在本文提供的治疗方法的某些实施方案中,将II型抗CD20抗体持续给药周期的至少一周每周一次施用于患者。在一些实施方案中,当给药周期持续两周或更多周时,将II型抗CD20抗体每个给药周期一次施用于患者。

[0134] 在本文提供的治疗方法的某些实施方案中,将GDC-0199在给药周期的每天施用一次。

[0135] 可以将GDC-0199和II型抗CD20抗体两者,例如,在一个给药周期中施用于患者。在某些给药周期中,将单独的一种治疗剂施用于患者。

[0136] 在提供的其中将治疗剂在包括多个给药周期的给药方案中施用于患者的方法的某些实施方案中,多个给药周期包含具有给药周期的第一治疗阶段,其中在每个给药周期中,将II型抗CD20抗体每个给药周期施用一次,且将GDC-0199在给药周期的每天施用。第一治疗阶段中的此类给药周期可以,例如,各自持续四周。在一些实施方案中,多个给药周期可一进一步包含第二治疗阶段,其中将单独的II型抗CD20抗体施用于患者,或者其中将单独的GDC-0199施用于患者(例如,维持阶段)。

[0137] 在本文提供的其中将II型抗CD20抗体和GDC-0199两者持续一个或多个给药周期(例如,在一个治疗阶段中)施用于患者的一些实施方案中,然后可以向患者施用单独的GDC-0199(例如,在维持阶段中)。

[0138] 在其中在组合治疗后将单独的GDC-0199施用于患者的某些实施方案中,可以将GDC-0199,例如,每天一次,每隔一天一次,每三天、四天、五天或六天一次,或每周一次,施用于患者。

[0139] 在其中在组合治疗后将单独的II型抗CD20抗体施用于患者的某些实施方案中,可以将II型抗CD20抗体,例如,每周一次,每两周一次或每个月一次,施用于患者。

[0140] 在本文提供的治疗方法的某些实施方案中,待施用于患者的每个剂量的GDC-0199的量在第一给药周期过程中增加。参见,例如,图2,这是一个示例性给药方案,其中在第一给药周期中施用于患者的GDC-0199的量从第一周的50 mg剂量增加至第二周的100 mg剂量,至第三周的300 mg剂量)。

[0141] 在某些实施方案中,在施用II型抗CD20抗体之前,将渐增剂量的GDC-0199施用于患者。在其它实施方案中,在已经将II型抗CD20抗体施用于患者之后,将渐增剂量的GDC-0199施用于患者。

[0142] 在本文提供的治疗方法的一些实施方案中,每个剂量施用于患者的GDC-0199的量在第一给药周期过程中从10 mg至80 mg的初始量增加至190 mg至400 mg的最终量。在某些实施方案中,施用于患者的每个剂量的GDC-0199的量以50 mg或100 mg开始,并且增加至每个剂量300 mg。在一些实施方案中,施用于患者的初始剂量中GDC-0199的量可以,例如,是20 mg至60 mg(例如,20 mg、25 mg、30 mg、35 mg、40 mg、45 mg、50 mg、55 mg或60 mg剂量)、随后为100 mg、200 mg、300 mg或更多GDC-0199的剂量。

[0143] 在本文提供的方法的某些实施方案中,在第一次施用II型抗CD20抗体之前,将GDC-0199的剂量以渐增剂量施用于患者。在一些实施方案中,在第一次施用II型抗CD20抗体之后,将GDC-0199的剂量以渐增量施用于患者。

[0144] 如本文所使用,术语“患者”通常是指出于任何目的需要用II型抗CD20抗体治疗的人(例如患有表达CD20的癌症的患者),且在一个实施方案中,需要此类治疗以治疗癌症、或癌前状况或损伤的人。然而,术语“患者”也可以是指非人动物,优选哺乳动物诸如犬、猫、马、牛、猪、绵羊和非人灵长类等。

[0145] 本发明进一步包括用于与选择性Bcl-2抑制剂组合治疗表达CD20的癌症的II型抗

CD20抗体。

[0146] 本发明进一步包括用于与选择性Bcl-2抑制剂组合治疗患有表达CD20的癌症的患者的II型抗CD20抗体。

[0147] 本发明进一步包括用于治疗表达CD20的癌症的II型抗CD20抗体和选择性Bcl-2抑制剂。

[0148] 本发明进一步包括用于治疗患有表达CD20的癌症的患者的II型抗CD20抗体和选择性Bcl-2抑制剂。

[0149] 在一个实施方案中,所述选择性Bcl-2抑制剂是ABT-199。

[0150] 在一个实施方案中,所述II型抗CD20抗体具有的所述II型CD20抗体与Raji细胞(ATCC编号:CCL-86)上CD20的结合能力与利妥昔单抗相比较的比率为0.3至0.6,并且在一个实施方案中为0.35至0.55,并且在另一个实施方案中为0.4至0.5。

[0151] 在一个实施方案中,所述II型抗CD20抗体是GA101抗体。

[0152] 在一个实施方案中,所述II型抗CD20抗体具有增加的抗体依赖性细胞毒性(ADCC)

在本文提供的治疗患者中的癌症的方法的某些实施方案中,癌症是非实体瘤。在一个实施方案中,所述非实体瘤是表达CD20的非实体瘤。可以在本文提供的方法中治疗的示例性非实体瘤包括,例如,白血病或淋巴瘤。在一个实施方案中,所述非实体瘤是B细胞淋巴瘤。

[0153] 在一个实施方案中,所述表达CD20的癌症是B细胞非霍奇金淋巴瘤(NHL)。

[0154] 在一个实施方案中,所述II型抗CD20抗体是单克隆抗体。

[0155] 本发明还包括以下实施方案:

1. 用于治疗有需要的人中的癌症的方法,其包括向所述人施用有效量的GA101抗体或2-(1*H*-吡咯并[2,3-*b*]吡啶-5-基氧基)-4-(4-((2-(4-氯苯基)-4,4-二甲基环己-1-烯基)甲基)哌嗪-1-基)-*N*-(3-硝基-4-((四氢-2*H*-吡喃-4-基)甲基氨基)苯基磺酰基)苯甲酰胺或其药学上可接受的盐持续一个或多个给药周期,随后共同施用有效量的所述GA101抗体和2-(1*H*-吡咯并[2,3-*b*]吡啶-5-基氧基)-4-(4-((2-(4-氯苯基)-4,4-二甲基环己-1-烯基)甲基)哌嗪-1-基)-*N*-(3-硝基-4-((四氢-2*H*-吡喃-4-基)甲基氨基)苯基磺酰基)苯甲酰胺或其药学上可接受的盐持续一个或多个给药周期。

[0156] 用于治疗有需要的人中的癌症的方法,其包括向所述人施用有效量的GA101抗体或2-(1*H*-吡咯并[2,3-*b*]吡啶-5-基氧基)-4-(4-((2-(4-氯苯基)-4,4-二甲基环己-1-烯基)甲基)哌嗪-1-基)-*N*-(3-硝基-4-((四氢-2*H*-吡喃-4-基)甲基氨基)苯基磺酰基)苯甲酰胺或其药学上可接受的盐持续0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14天,随后共同施用有效量的所述GA101抗体和2-(1*H*-吡咯并[2,3-*b*]吡啶-5-基氧基)-4-(4-((2-(4-氯苯基)-4,4-二甲基环己-1-烯基)甲基)哌嗪-1-基)-*N*-(3-硝基-4-((四氢-2*H*-吡喃-4-基)甲基氨基)苯基磺酰基)苯甲酰胺或其药学上可接受的盐持续一个或多个给药周期。

[0157] 实施方案1的方法,其包括施用有效量的所述GA101抗体每个给药周期一次持续1、2、3、4、5或6个周期,随后共同施用有效量的所述GA101抗体每个给药周期一次和2-(1*H*-吡咯并[2,3-*b*]吡啶-5-基氧基)-4-(4-((2-(4-氯苯基)-4,4-二甲基环己-1-烯基)甲基)哌嗪-1-基)-*N*-(3-硝基-4-((四氢-2*H*-吡喃-4-基)甲基氨基)苯基磺酰基)苯甲酰胺或其药学上可接受的盐一天一、二或三次持续一个或多个给药周期。

[0158] 实施方案1的方法,其包括施用有效量的2-(1*H*-吡咯并[2,3-*b*]吡啶-5-基氧基)-4-(4-((2-(4-氯苯基)-4,4-二甲基环己-1-烯基)甲基)哌嗪-1-基)-*N*-(3-硝基-4-((四氢-2*H*-吡喃-4-基)甲基氨基)苯基磺酰基)苯甲酰胺或其药学上可接受的盐一天一、二或三次持续1、2、3、4、5或6个给药周期,随后共同施用有效量的所述GA101抗体每个给药周期一次和2-(1*H*-吡咯并[2,3-*b*]吡啶-5-基氧基)-4-(4-((2-(4-氯苯基)-4,4-二甲基环己-1-烯基)甲基)哌嗪-1-基)-*N*-(3-硝基-4-((四氢-2*H*-吡喃-4-基)甲基氨基)苯基磺酰基)苯甲酰胺或其药学上可接受的盐一天一、二或三次持续一个或多个给药周期。

[0159] 根据实施方案2-4中任一项的方法,其中所述GA101抗体的有效量是约500 mg至约3000 mg,且2-(1*H*-吡咯并[2,3-*b*]吡啶-5-基氧基)-4-(4-((2-(4-氯苯基)-4,4-二甲基环己-1-烯基)甲基)哌嗪-1-基)-*N*-(3-硝基-4-((四氢-2*H*-吡喃-4-基)甲基氨基)苯基磺酰基)苯甲酰胺或其药学上可接受的盐的有效量是约20 mg至约500 mg。

[0160] 根据实施方案2-4中任一项的方法,其中所述GA101抗体的有效量是800、900、1000、1100、1200、1300、1400、1500 mg,且2-(1*H*-吡咯并[2,3-*b*]吡啶-5-基氧基)-4-(4-((2-(4-氯苯基)-4,4-二甲基环己-1-烯基)甲基)哌嗪-1-基)-*N*-(3-硝基-4-((四氢-2*H*-吡喃-4-基)甲基氨基)苯基磺酰基)苯甲酰胺或其药学上可接受的盐的有效量是50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290或300 mg。

[0161] 根据实施方案1-6中任一项的方法,其中所述GA101抗体和2-(1*H*-吡咯并[2,3-*b*]吡啶-5-基氧基)-4-(4-((2-(4-氯苯基)-4,4-二甲基环己-1-烯基)甲基)哌嗪-1-基)-*N*-(3-硝基-4-((四氢-2*H*-吡喃-4-基)甲基氨基)苯基磺酰基)苯甲酰胺或其药学上可接受的盐在每个给药周期过程中相继共同施用,且每个给药周期是1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14天。

[0162] 根据实施方案1-7中任一项的方法,其中所述GA101抗体是包含以下的抗人CD20抗体:包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的HVR-H1,包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的HVR-H2,包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HVR-H3,包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的HVR-L1,包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的HVR-L2,和包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的HVR-L3。

[0163] 根据实施方案8的方法,其中所述GA101抗体进一步包含:包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的VH结构域和包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列的VL结构域。

[0164] 根据实施方案1-7中任一项的方法,其中所述GA101抗体包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列和SEQ ID NO:10的氨基酸序列。

[0165] 根据实施方案1-8中任一项的方法,其中所述GA101抗体已知为obinutuzumab。

[0166] 根据实施方案1-8中任一项的方法,其中所述GA101抗体包含与SEQ ID NO:9的氨基酸序列具有至少95%序列同一性的氨基酸序列且包含与SEQ ID NO:10的氨基酸序列具有至少95%序列同一性的氨基酸序列。

[0167] 根据实施方案1-12中任一项的方法,其中所述癌症是表达CD20的癌症。

[0168] 根据实施方案13的方法,其中所述癌症是非实体瘤。

[0169] 根据实施方案13的方法,其中所述癌症是淋巴瘤或白血病。

[0170] 根据实施方案13的方法,其中所述白血病是慢性淋巴细胞白血病 (CLL)。

[0171] 根据实施方案16的方法,其中所述患者患有复发或难治型或先前未治疗的慢性淋

巴细胞白血病。

[0172] 用于治疗有需要的人中的癌症的方法,其包括在给药周期中向所述人施用有效量的GA101抗体和2-(1*H*-吡咯并[2,3-*b*]吡啶-5-基氧基)-4-(4-((2-(4-氯苯基)-4,4-二甲基环己-1-烯基)甲基)哌嗪-1-基)-*N*-(3-硝基-4-((四氢-2*H*-吡喃-4-基)甲基氨基)苯基磺酰基)苯甲酰胺,其中在给药周期中,所述GA101抗体以500-3000 mg每周施用,且2-(1*H*-吡咯并[2,3-*b*]吡啶-5-基氧基)-4-(4-((2-(4-氯苯基)-4,4-二甲基环己-1-烯基)甲基)哌嗪-1-基)-*N*-(3-硝基-4-((四氢-2*H*-吡喃-4-基)甲基氨基)苯基磺酰基)苯甲酰胺以50-300mg每天1-3次施用。

[0173] 用于治疗有需要的人中的癌症的方法,其包括在多个给药周期中向所述人施用GA101抗体和2-(1*H*-吡咯并[2,3-*b*]吡啶-5-基氧基)-4-(4-((2-(4-氯苯基)-4,4-二甲基环己-1-烯基)甲基)哌嗪-1-基)-*N*-(3-硝基-4-((四氢-2*H*-吡喃-4-基)甲基氨基)苯基磺酰基)苯甲酰胺,其中每个给药周期持续至少2、3、4、5或6周,并且500 mg至3000 mg的GA101抗体每个给药周期施用一次,持续多个给药周期中的一个或多个给药周期,且10 mg至300 mg的2-(1*H*-吡咯并[2,3-*b*]吡啶-5-基氧基)-4-(4-((2-(4-氯苯基)-4,4-二甲基环己-1-烯基)甲基)哌嗪-1-基)-*N*-(3-硝基-4-((四氢-2*H*-吡喃-4-基)甲基氨基)苯基磺酰基)苯甲酰胺每个给药周期每天施用,持续多个给药周期中的一个或多个给药周期。

[0174] 实施方案19的方法,其中所述GA101抗体和2-(1*H*-吡咯并[2,3-*b*]吡啶-5-基氧基)-4-(4-((2-(4-氯苯基)-4,4-二甲基环己-1-烯基)甲基)哌嗪-1-基)-*N*-(3-硝基-4-((四氢-2*H*-吡喃-4-基)甲基氨基)苯基磺酰基)苯甲酰胺两者在多个给药周期中的至少2、3、4、5、6、7、8或多于8个给药周期中施用于患者。

[0175] 实施方案19的方法,其中在多个给药周期中的最后一个给药周期之后,在不将所述GA101抗体施用于患者的情况下向患者施用2-(1*H*-吡咯并[2,3-*b*]吡啶-5-基氧基)-4-(4-((2-(4-氯苯基)-4,4-二甲基环己-1-烯基)甲基)哌嗪-1-基)-*N*-(3-硝基-4-((四氢-2*H*-吡喃-4-基)甲基氨基)苯基磺酰基)苯甲酰胺的剂量。

[0176] 实施方案21的方法,其中在所述GA101抗体不存在的情况下向患者施用的2-(1*H*-吡咯并[2,3-*b*]吡啶-5-基氧基)-4-(4-((2-(4-氯苯基)-4,4-二甲基环己-1-烯基)甲基)哌嗪-1-基)-*N*-(3-硝基-4-((四氢-2*H*-吡喃-4-基)甲基氨基)苯基磺酰基)苯甲酰胺的剂量是约10 mg至约300 mg 2-(1*H*-吡咯并[2,3-*b*]吡啶-5-基氧基)-4-(4-((2-(4-氯苯基)-4,4-二甲基环己-1-烯基)甲基)哌嗪-1-基)-*N*-(3-硝基-4-((四氢-2*H*-吡喃-4-基)甲基氨基)苯基磺酰基)苯甲酰胺。

[0177] 实施方案22的方法,其中将在所述GA101抗体不存在的情况下向患者施用的2-(1*H*-吡咯并[2,3-*b*]吡啶-5-基氧基)-4-(4-((2-(4-氯苯基)-4,4-二甲基环己-1-烯基)甲基)哌嗪-1-基)-*N*-(3-硝基-4-((四氢-2*H*-吡喃-4-基)甲基氨基)苯基磺酰基)苯甲酰胺的剂量施用于患者,持续至少3、4、5、6、7、8天,或持续10或更多天,20或更多天,或30或更多天。

[0178] 实施方案19的方法,其中多个给药周期包含渐增给药周期,其中在所述渐增给药周期过程中将2-(1*H*-吡咯并[2,3-*b*]吡啶-5-基氧基)-4-(4-((2-(4-氯苯基)-4,4-二甲基环己-1-烯基)甲基)哌嗪-1-基)-*N*-(3-硝基-4-((四氢-2*H*-吡喃-4-基)甲基氨基)苯基磺酰基)苯甲酰胺以渐增每日剂量施用于患者。

[0179] 实施方案24的方法,其中所述渐增每日剂量包含10 mg的初始每日剂量和300 mg的最终每日剂量。

[0180] 根据实施方案19-25中任一项的方法,其中所述癌症是非实体瘤。

[0181] 根据实施方案19-25中任一项的方法,其中所述癌症是慢性淋巴细胞白血病(CLL)。

[0182] 根据实施方案13的方法,其中所述癌症是非霍奇金淋巴瘤(NHL)。

[0183] 根据实施方案13的方法,其中所述癌症是急性髓性白血病(AML)。

具体实施方式

[0184] 提供以下实施例、序列和图以帮助理解本发明,其真正的范围在所附权利要求中列出。应当理解,可以在不背离本发明精神的情况下对列出的程序做出修改。

实施例

[0185] 实施例1. 用GDC-0199和obinutuzumab的组合治疗淋巴瘤。

[0186] 非临床数据支持以下假设:GDC-0199和GA101(在这种情况下,obinutuzumab)的组合将显示与单独施用每种药物时相比更高的抗肿瘤活性。该研究使用侵袭性淋巴瘤的非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)异种移植模型,弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)来源的细胞系SU.DHL-4。Obinutuzumab以1 mg/kg IV的剂量施用,每周一次,持续3周,并且实现了肿瘤停滞和随后的生长延迟。GDC-0199以100 mg/kg QD施用21天,并且也展示停滞和随后的肿瘤生长延迟。然而,GDC-0199和obinutuzumab的组合诱导了大于相加的效应,导致肿瘤消退(5/8的部分消退(PR);参见图1)。组合治疗三周导致增强的肿瘤生长抑制(TGI)(118% TGI),相比之下,用单一药剂施用观察到的TGI为76%(GA101)和80%(GDC 0199)(参见图1)。当GA101与GDC 0199组合时,与单一药剂施用相比,也观察到增加的肿瘤消退(5 PR)。此外,治疗在第21天结束后,TGI在组合治疗组中持续,因为在第31天(给药结束后10天)观察到116% TGI,相比之下,使用GA101作为单一药剂的TGI为30%,使用GDC 0199作为单一药剂的TGI为25%。总之,在NHL异种移植模型中,与分别施用的每种药剂相比,GA101与GDC 0199的组合导致增加的TGI和肿瘤消退。

[0187] 在本研究中,用于GA-101和GDC-0199的媒介物分别是盐水和60% phosal。在图1中,GDC-0199的剂量表示为以mg/kg体重计的游离碱当量。结果表示为通过线性混合效应模型针对每个治疗组测定的拟合肿瘤体积vs.时间(以天计),其中第0天是治疗的第一天。

[0188] 实施例2. 具有复发或难治性或先前未治疗的慢性淋巴细胞白血病的患者中的GDC-0199和Obinutuzumab的Ib期多中心研究。

[0189] 将评估两个时间表:时间表A(图2),由持续3周以渐增剂量施用GDC-0199和然后第一次obinutuzumab输注组成,和时间表B(图3),由第一次施用obinutuzumab和然后渐增剂量水平的GDC-0199组成。

[0190] 时间表A和时间表B的组群1将平行录取。此外,剂量发现阶段将评估施用GDC-0199、然后第一次obinutuzumab输注(时间表A)是否将导致输注反应的较低发生率,从而减少对拆分剂量的obinutuzumab和皮质类固醇的需要。

[0191] 扩展阶段将包括各自20个患者的两个扩展组群(复发/难治性和先前未治疗的白

血病),并且将评估所选组合剂量和时间表的安全性和初步效力。

[0192] 在时间表A中,GDC-0199和obinutuzumab的组合治疗将施用总共7个周期,每个周期28天,包括总共8次输注obinutuzumab和GDC-0199 QD。

[0193] 在时间表B中,GDC-0199和obinutuzumab的组合治疗将施用总共6个周期,每个周期28天,包括总共9次输注obinutuzumab(8个剂量;第一个剂量将被分成两次输注)和GDC-0199 QD。

[0194] GDC-0199单一疗法可以在患者中继续超出上述6-7个周期的组合治疗(例如,如果他(她)们具有可接受的毒性,并且尚未实现最大临床反应(即,具有肿瘤负担的连续改善/减少,即尚未稳定至少2个月))。此类患者可以继续GDC-0199单一治疗,直到他(她)们已经实现最大反应或在最后一个患者入组后长达1年,无论哪个首先发生。

[0195] 图3. GDC-0199和II型抗CD20抗体(obinutuzumab)的组合治疗相比于GDC-0199和I型抗CD20抗体(利妥昔单抗)的组合治疗的抗肿瘤活性。

[0196] 测试剂。II型抗CD20抗体是GA101抗体IgG1(如WO 2005/044859中公开的嵌合人源化IgG1抗体(其中被称为B-HH6-B-KV1 GE,也称为obinutuzumab或R05072759),其作为来自Roche GlycArt, Schlieren, Switzerland的储备溶液(浓度9.4mg/ml)提供。抗体缓冲液包括组氨酸、海藻糖和聚山梨酯20。注射前将抗体溶液从储液在PBS中适当稀释。GDC-0199获得自Genentech Inc., CA, USA。

[0197] 细胞系和培养条件。将人Z138套细胞淋巴瘤细胞系在补充10%胎牛血清(PAA Laboratories, Austria)和2mM L-谷氨酰胺的DMEM中在37°C在水饱和的气氛中在5% CO₂常规培养。将细胞与基质胶(Matrigel)共同注射。

[0198] 动物。将雌性SCID米色小鼠;到达时5-6周龄(购自Charles River, Sulzfeld, Germany)在无特定病原体条件下以12小时光照/12小时黑暗的每日周期根据承诺的准则(GV-Solas; Felasa; TierschG)维持。实验研究方案得到当地政府审查并批准(Regierung von Oberbayern; 注册号 55.2-1-54-2531.2-26-09)。到达后,将动物在动物房的检疫部分中维持一周以习惯于新环境且进行观察。定期实施连续健康监测。任意提供饮食食物(Altromin Spezialfutter GmbH & Co. KG)和水(过滤的)。

[0199] 监测。对动物每天控制临床症状,并检测副作用。为了在整个实验中监测,将动物的体重每周记录两次,并在分期后通过测径器测量肿瘤体积。

[0200] 动物的处理。肿瘤细胞接种后18天在随机化当天开始动物处理。R05072759或利妥昔单抗作为单一药剂施用,i.p.,每周一次(第18、25、32天),持续3周,剂量为1mg/kg。在同一天施用相应的媒介物。GDC-0199每日一次(从第18天至第34天)p.o.给予,经17天,剂量为100 mg/kg。在组合治疗组中,所述抗体和GDC-0199以相同剂量且在同一天施用。

[0201] 体内肿瘤生长抑制研究。治疗对肿瘤体积发展的结果显示于图4。在肿瘤细胞接种后第35天,与对照组相比,给予利妥昔单抗、GDC-0199、R05072759、GDC-0199加上利妥昔单抗的组合或GDC-0199加上R05072759的组合的动物中分别存在32%、59%、73%、96%或106%(消退)的肿瘤生长抑制。

[0202] 实施例4. 在与obinutuzumab组合之后施用作为单一药剂的GDC-0199导致肿瘤再生长的显著延迟。

[0203] 本实施例描述了使用上述实施例1中讨论的DLBCL SU-DHL-4异种移植模型的结

果。最初,将GDC-0199与GA101(在本实施例中,obinutuzumab)组合以1 mg/kg口服给药连续21天,持续3周。后者导致增强的TGI(91%),相比之下,用单独的单一药剂观察到的TGI为54%(GA101)和24%(GDC-0199)(图5)。在第22天,组合组群中的携带肿瘤的小鼠继续用单独的GDC-0199以100 mg/kg给药,持续额外24天。后者导致了相比于用GA101和GDC-0199的组合经21天期间治疗的小鼠的肿瘤再生长的显著延迟(至组合群组肿瘤进展的时间=38天 vs. 用GDC-0199继续治疗 = 45天(图5)。因此,在与GA101组合之后用GDC-0199的单一药剂治疗维持了体内效力。这些结果支持用GDC-0199的维持治疗的益处。

[0204] 在图5中,对照是用于GA101的盐水媒介物加上用于GDC-0199的60%phosal媒介物。持续3周每周一次(QW)静脉内给药GA101,并且持续21天(QD x 21) 每天一次(QD)口服给药GDC-0199,作为单一药剂或组合。如上所解释,组合治疗在第21天(QD x 45)结束之后,还用单独的GDC-0199给药携带肿瘤的小鼠群组额外24天。在x轴下,治疗周期通过用于组合群组的黑色实线(—)表示,而继续单一药剂GDC-0199治疗通过黑色虚线(---)表示。

[0205] 本说明书中引用的所有公开和专利申请都通过引用并入本文,如同每个单独的公开或专利申请被特定并单独地指示通过引用并入。尽管已经出于清楚理解的目的通过阐释和实施例的方式详细描述了前述发明,但鉴于本发明的教导,对于本领域普通技术人员显而易见的是,在不脱离所附权利要求的精神或范围的情况下,可以对其进行某些变化和改变。

序列表

- <110> Genentech, Inc.
 Sampath, Deepak
 Fairbrother, Wayne J.
 Klein, Christian
- <120> II型抗CD20抗体与选择性BCL-2抑制剂的组合治疗
 <130> 12655-087-999
 <140> 未指定
 <141> Herewith
 <150> 61/698,379
 <151> 2012-09-07
 <160> 10
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工
 <220>
 <223> GA101抗体的HVR-H1的序列
 <400> 1
 Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr
 1 5
 <210> 2
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工
 <220>
 <223> GA101抗体的HVR-H2的序列
 <400> 2
 Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp
 1 5
 <210> 3
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工
 <220>
 <223> GA101抗体的HVR-H3的序列
 <400> 3

Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr

1 5 10

<210> 4

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> GA101抗体的HVR-L1的序列

<400> 4

Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr

1 5 10 15

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> GA101抗体的HVR-L2的序列

<400> 5

Gln Met Ser Asn Leu Val Ser

1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> GA101抗体的HVR-L3的序列

<400> 6

Ala Gln Asn Leu Glu Leu Pro Tyr Thr

1 5

<210> 7

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> GA101抗体的VH的序列

<400> 7

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr Ser

	20		25		30												
Trp	Ile	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met		
	35						40					45					
Gly	Arg	Ile	Phe	Pro	Gly	Asp	Gly	Asp	Thr	Asp	Tyr	Asn	Gly	Lys	Phe		
	50					55						60					
Lys	Gly	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Lys	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr		
65					70					75					80		
Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys		
				85					90					95			
Ala	Arg	Asn	Val	Phe	Asp	Gly	Tyr	Trp	Leu	Val	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly		
			100					105					110				
Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser											

<210> 8

<211> 115

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> GA101抗体的VL的序列

<400> 8

Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Thr	Pro	Leu	Ser	Leu	Pro	Val	Thr	Pro	Gly		
1				5					10					15			
Glu	Pro	Ala	Ser	Ile	Ser	Cys	Arg	Ser	Ser	Lys	Ser	Leu	Leu	His	Ser		
			20					25				30					
Asn	Gly	Ile	Thr	Tyr	Leu	Tyr	Trp	Tyr	Leu	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser		
			35				40					45					
Pro	Gln	Leu	Leu	Ile	Tyr	Gln	Met	Ser	Asn	Leu	Val	Ser	Gly	Val	Pro		
			50			55						60					
Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Lys	Ile		
65					70					75					80		
Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Glu	Asp	Val	Gly	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Gln	Asn		
				85					90					95			
Leu	Glu	Leu	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys		
			100					105					110				
Arg	Thr	Val															

<210> 9

<211> 448

<212> PRT

275	280	285
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val		
290	295	300
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu		
305	310	315
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys		
325	330	335
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr		
340	345	350
Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr		
355	360	365
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu		
370	375	380
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu		
385	390	395
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys		
405	410	415
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu		
420	425	430
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly		
435	440	445
<210> 10		
<211> 219		
<212> PRT		
<213> 人工		
<220>		
<223> GA101抗体的轻链全序列的序列		
<400> 10		
Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly		
1	5	10
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser		
20	25	30
Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser		
35	40	45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Val Ser Gly Val Pro		
50	55	60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile		
65	70	75
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Asn		

	85	90	95
Leu Glu Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys			
	100	105	110
Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu			
	115	120	125
Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe			
	130	135	140
Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln			
145	150	155	160
Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser			
	165	170	175
Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu			
	180	185	190
Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser			
	195	200	205
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys			
	210	215	

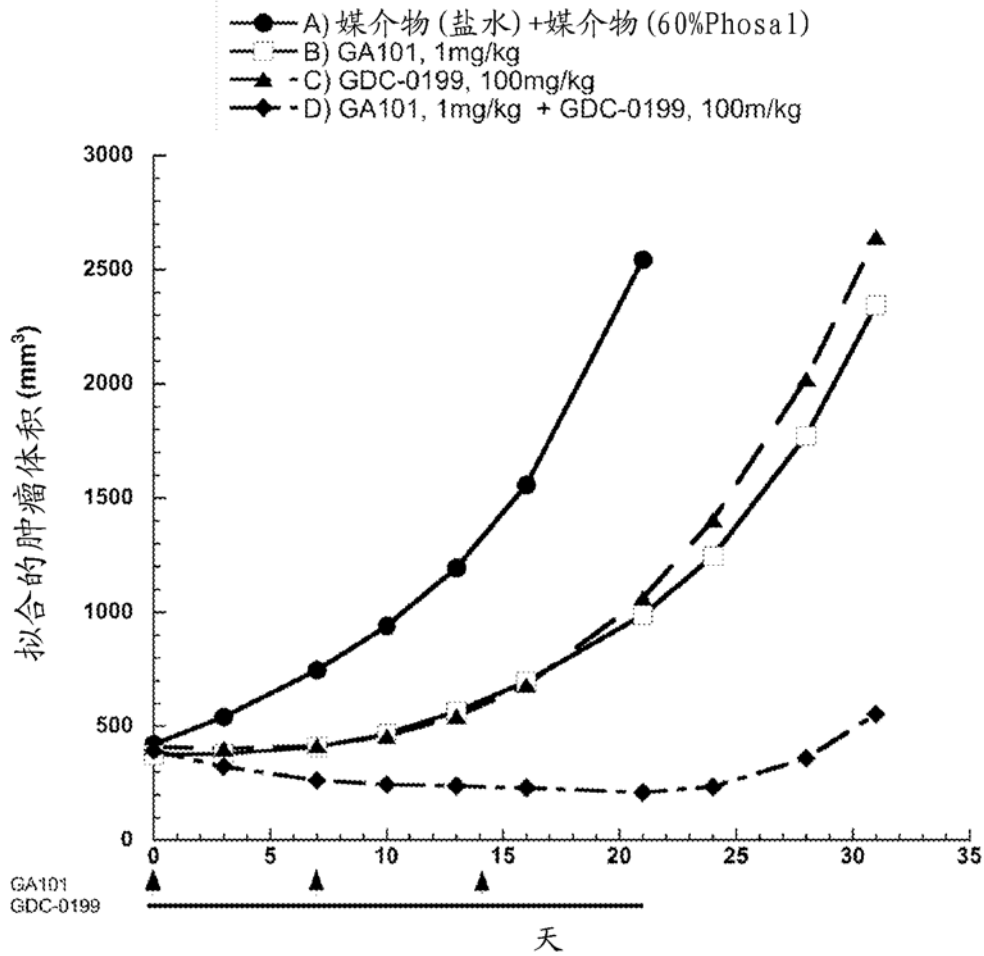
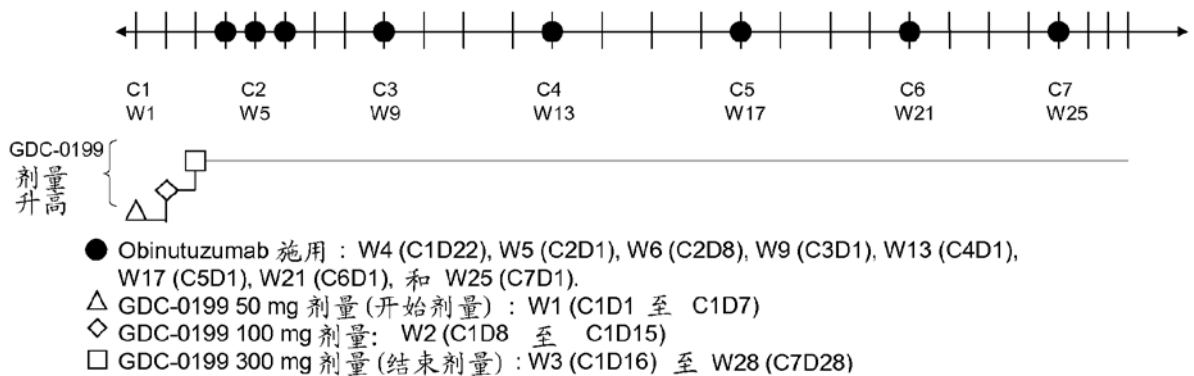


图 1

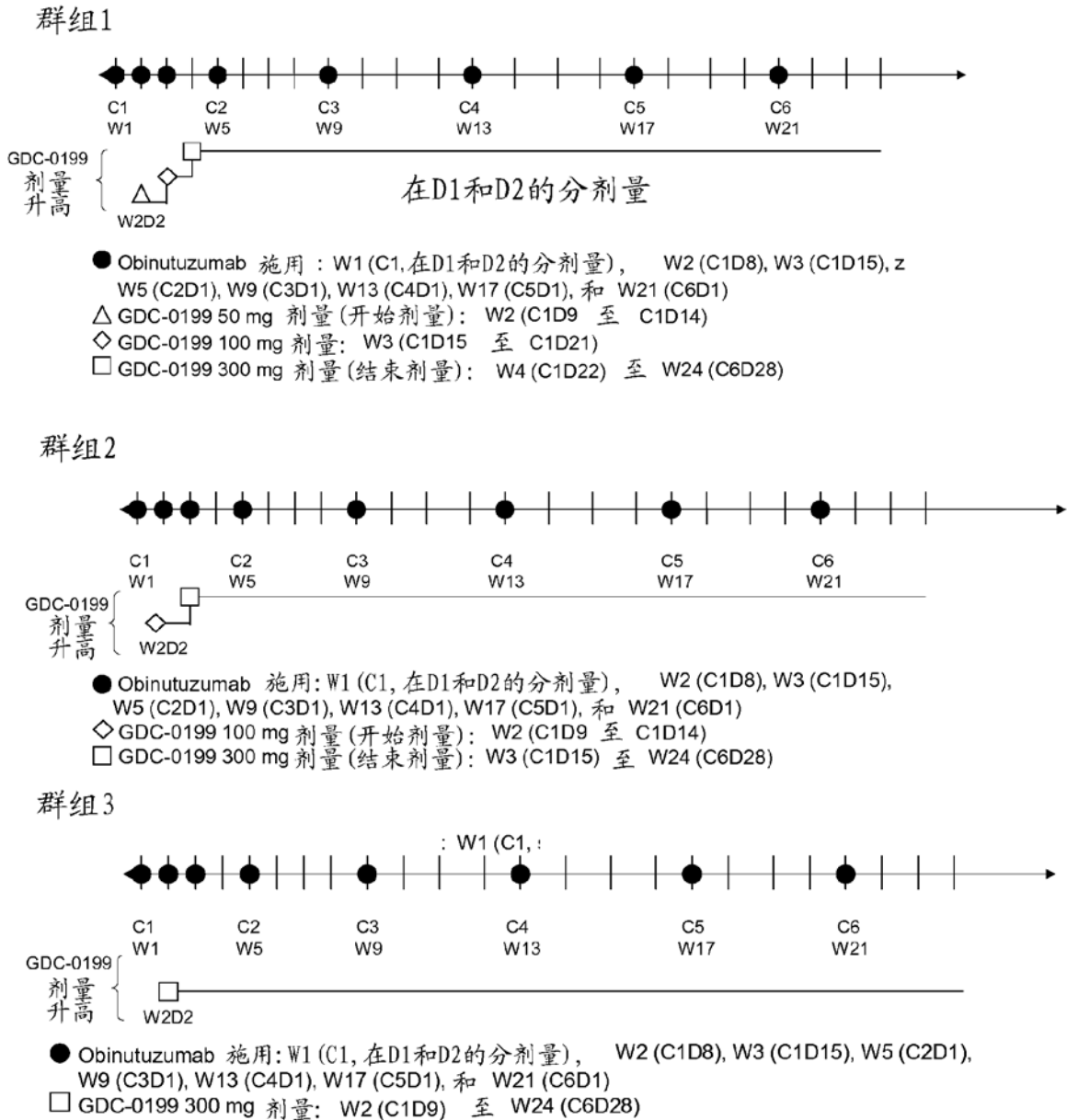
时间表A给药方案: 开始Obinutuzumab前持续三周的
GDC-0199逐步升高给药



C=周期; D=天; W=周

图 2

时间表B给药方案: GDC-0199剂量升高前
施用的Obinutuzumab



C=周期; D=天; W=周

时间表B包括顺序入组的约3个给药组群

图 3

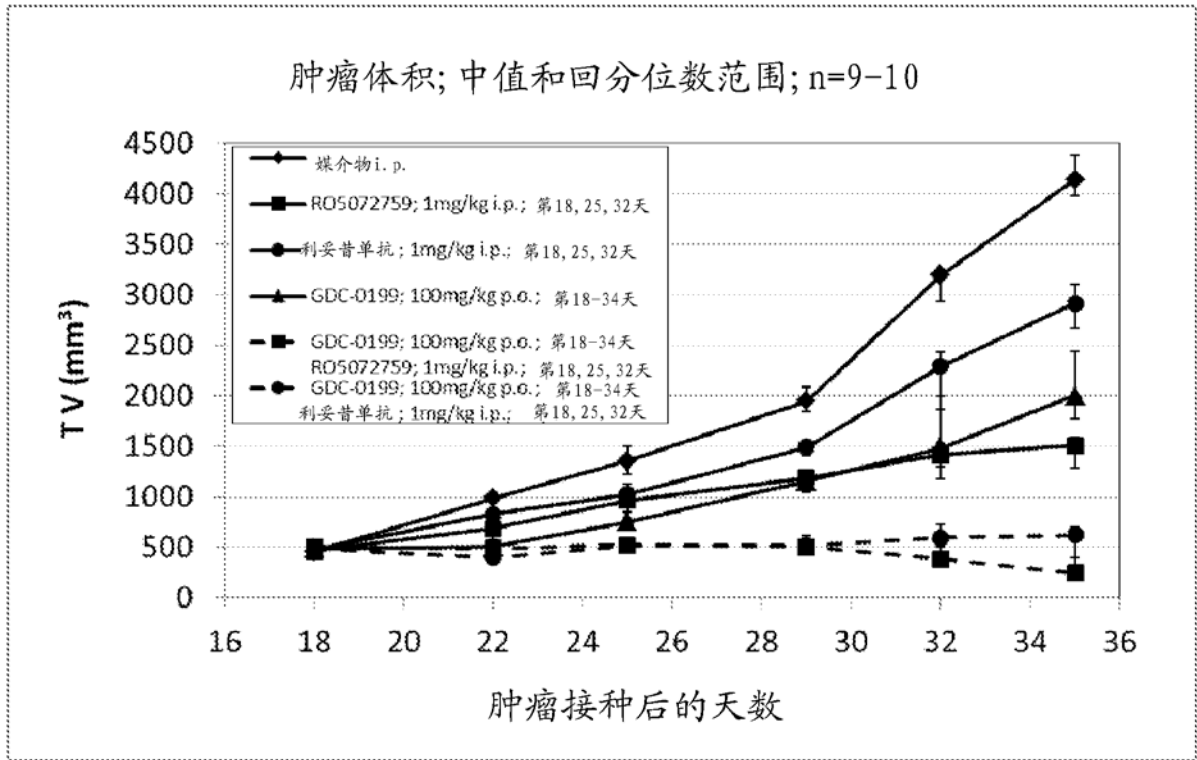


图 4

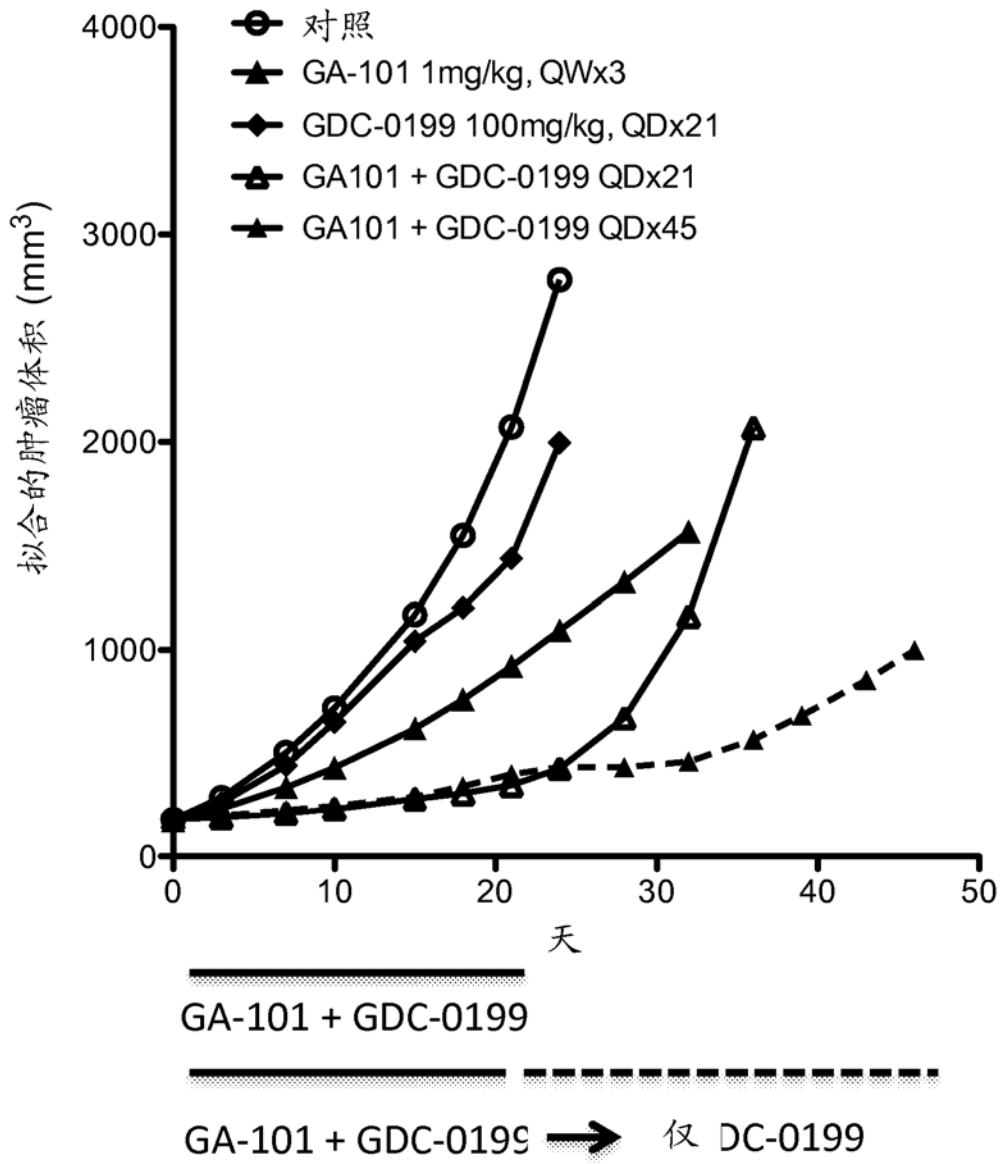


图 5