



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115569192 A

(43) 申请公布日 2023.01.06

(21) 申请号 202210862489.8

(22) 申请日 2016.12.08

(30) 优先权数据

62/266,470 2015.12.11 US

62/380,177 2016.08.26 US

(62) 分案原申请数据

201680072080.9 2016.12.08

(71) 申请人 小利兰·斯坦福大学托管委员会

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 欧文·L·唔斯曼

凯利·玛丽·麦肯纳

斯蒂芬·威林汉

桃瑞丝·波河·伊·胡

皮耶罗·D·搭勒吧

延斯-皮特·福尔克默

(74) 专利代理机构 北京弘权知识产权代理有限公司 11363

专利代理师 许伟群 李少丹

(51) Int.Cl.

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

权利要求书1页 说明书22页 附图8页

(54) 发明名称

以双重靶向CD47和EGFR来治疗癌症

(57) 摘要

提供用于以某一方案靶向包括不限于癌细胞的细胞以达成消减的方法,其包括使所靶向细胞与包括(i)阻断CD47活性的药剂;和(ii)特异性结合EGFR的抗体的药剂的组合接触。在一些实施方案中,癌细胞具有KRAS、NRAS或BRAF中的一者或多者的突变形式。相对于其中使用单一药剂的方案,对所靶向细胞的消减的水平得以增强;并且相对于其中使用单一药剂的方案,作用可为协同的。

1. 一种靶向EGFR表达性癌细胞以达成免疫消减的方法,所述方法包括:
使包含所靶向细胞的细胞群体与有效使对所靶向细胞的消减增加的剂量的(i)阻断CD47活性的药剂;和(ii)特异性结合表皮生长因子受体的抗体接触。
2. 如权利要求1所述的方法,其进一步包括测试所述EGFR表达性癌细胞在KRAS、NRAS和BRAF中的一者或多者中活化性突变的存在;以及选择其中存在活化性突变的癌细胞用于治疗。
3. 如权利要求1或权利要求2所述的方法,其中特异性结合EGFR的所述抗体是EGFR信号传导路径的拮抗剂。
4. 如权利要求1或权利要求2所述的方法,其中特异性结合EGFR的所述抗体是EGFR信号传导路径的非拮抗剂。
5. 如权利要求1-4中任一项所述的方法,其中所述接触在吞噬细胞存在下进行。
6. 如权利要求5所述的方法,其中所述接触对个别哺乳动物在体内进行。
7. 如权利要求6所述的方法,其中所述治疗提供个体的总体存活期增加。
8. 如权利要求5所述的方法,其中相对于用(i)阻断CD47活性的药剂;或(ii)抗EGFR抗体的单药疗法观察到的消减,对所述靶标细胞的消减得以增强。
9. 如权利要求1-8中任一项所述的方法,其中阻断CD47活性的所述药剂是抗CD47抗体。
10. 如权利要求9所述的方法,其中所述抗CD47抗体包含IgG4 Fc区。
11. 如权利要求10所述的方法,其中所述抗体是5F9-G4。
12. 根据权利要求1-11中任一项所述的方法,其中所述哺乳动物是小鼠。
13. 根据权利要求1-11中任一项所述的方法,其中所述哺乳动物是人。
14. 如权利要求13所述的方法,其进一步包括施用引发剂量的阻断CD47活性的所述药剂。
15. 如权利要求13所述的方法,其进一步包括施用引发剂量的红细胞生成素刺激剂。

以双重靶向CD47和EGFR来治疗癌症

[0001] 本申请是申请日为2018年6月8日、申请号为201680072080.9(国际申请号为 PCT/US2016/065641)的发明申请的分案申请。

[0002] 交叉引用

[0003] 本申请要求2016年8月26日提交的美国临时专利申请号62/380,177的权益,并且也要求2015年12月11日提交的美国临时专利申请号62/266,470的权益,所述申请以引用的方式整体并入本文。

[0004]

[0005]

技术领域

[0006] 本发明涉及用于改进治疗个体的表皮生长因子受体(EGFR)表达性癌症的方法,尤其涉及以双重靶向CD47和EGFR来治疗癌症,具体涉及一种靶向EGFR表达性癌细胞以达成免疫消减的方法。

背景技术

[0007] 基于抗体的癌症疗法已被确定为一种用于治疗患有血液学恶性肿瘤和实体肿瘤的患者成功且重要的策略。对由人癌症表达的细胞表面抗原的确定已揭示相较于正常组织过度表达、突变或选择性表达的一系列广泛靶标。关键挑战已在于鉴定适于基于抗体的治疗剂的抗原。此类治疗剂可通过介导抗原或受体功能(诸如激动剂或拮抗剂功能)的改变,调节免疫系统或递送偶联于靶向特定抗原的抗体的特定药物来起作用。

[0008] 视抗体药剂而定,杀灭癌细胞可由以下所致:受体阻断或激动剂活性、诱导凋亡、递送药物或细胞毒性剂;免疫介导的细胞杀灭机理,包括补体依赖性细胞毒性(CDC)、抗体依赖性细胞性细胞毒性(ADCC)和调控T细胞功能;以及抗体对肿瘤血管结构和基质的特定作用。抗体抑制癌症患者中的生长因子或生长因子受体,包括CEA、表皮生长因子受体(EGFR;也称为ERBB1)、ERBB2(也称为HER2)、ERBB3、MET(也称为HGFR)、胰岛素样生长因子1受体(IGF1R)、肝配蛋白(heparin)受体A3(EPHA3)、肿瘤坏死因子(TNF)相关凋亡诱导的配体受体1(TRAILR1;也称为TNFRSF10A)、TRAILR2(也称为TNFRSF10B)和核因子- κ B配体的受体活化子(RANKL;也称为 TNFSF11)。

[0009] 若干抗EGFR抗体当前处于临床使用中。**Vectibix**[®](帕尼单抗(panitumumab))是一种表皮生长因子受体拮抗剂,其被核准为用于在疾病进展时或在化学疗法方案之后治疗转移性结肠直肠癌的单一药剂。**Erbix**[®](西妥昔单抗(cetuximab))是一种表皮生长因子受体(EGFR)拮抗剂,其被核准用于治疗局部性或区域性晚期头颈部鳞状细胞癌;以及被核准为用于治疗EGFR表达性转移性结肠直肠癌的单一药剂或与伊立替康(irinotecan)组合的药剂。尼妥珠单抗(Nimotuzumab)是一种针对EGFR的人源化IgG抗体,其在亚洲、南美和非洲的一些国家被核准用于治疗头颈部癌、神经胶质瘤和鼻咽癌。

[0010] 然而,破坏生长因子信号传导的抗体在治疗其中信号传导路径被突变的肿瘤方面

可为无效的。举例来说,许多结肠直肠癌携带EGFR路径中的导致组成性活化的突变。新近证据已显示具有KRAS或NRAS中的突变的患者不对抗EGFR抗体响应,从而导致这些药剂的核准用途限于患有其中KRAS未突变的癌症的患者。曲妥珠单抗(trastuzumab)的用途也已限于具有高水平的ERBB2表达的患者,因为研究已显示这是从曲妥珠单抗治疗获得最大益处的群组。

[0011] 除靶向癌细胞增殖和存活中涉及的抗原之外,抗体也可活化或拮抗在癌症免疫监视方面重要的免疫路径。现时明确的是抗原特异性免疫应答由抗原递呈细胞、吞噬细胞、T淋巴细胞和靶标细胞之间的复杂动态相互作用所致。

[0012] 举例来说,健康细胞上的细胞表面蛋白CD47以及它与吞噬细胞受体SIRP α 的接合构成关键“别吃我(don't eat-me)”信号,其可关闭由包括凋亡细胞清除和FcR介导的吞噬作用的多种形式介导的吞噬。阻断CD47介导的与吞噬细胞上的SIRP α 的接合或在敲除小鼠中的CD47表达损失可导致对活细胞和非老化红细胞的移除。或者,阻断SIRP α 识别也使得通常不被吞噬的靶标被吞噬。

[0013] 相关出版物包括美国专利号8,728,476;Dalerba,P.,S.J.Dylla等(2007)。“Phenotypic Characterization Of Human Colorectal Cancer Stem Cells.”Proc Natl Acad Sci U S A 104(24):10158-10163;Weiskopf,K.,A.M.Ring等(2013)。“Engineered Sirp alpha Variants As Immunotherapeutic Adjuvants To Anticancer Antibodies.”Science 341(6141):88-91;Willingham,S.B.,J.P.Volkmer等(2012)。“The Cd47-Signal Regulatory Protein Alpha(Sirpa) Interaction Is A Therapeutic Target For Human Solid Tumors.”Proc Natl Acad Sci U S A 109(17):6662-6667。“Epigenetic and genetic features of 24 colon cancer cell lines”,Ahmed等,Oncogenesis,2013;Chao,M.P.,A.A.Alizadeh等(2010)。“Anti-Cd47 Antibody Synergizes With Rituximab To Promote Phagocytosis And Eradicate Non-Hodgkin Lymphoma.”Cell 142(5):699-713。

[0014] 发明概述

[0015] 提供用于改进治疗个体的表皮生长因子受体(EGFR)表达性癌症的方法,所述癌症包括但不限于任何EGFR表达性癌症,例如癌瘤,诸如腺癌、鳞状细胞癌、基底细胞癌、肾细胞癌;以及神经胶质瘤。目标癌症可包括结肠直肠癌、非小细胞肺癌(NSCLC)、卵巢癌、胰腺癌、乳腺癌、鳞状细胞癌和神经胶质瘤。在本发明的方法中,使癌细胞与(a)阻断CD47与SIRP α 之间的信号传导的药剂;和(b)特异性结合EGFR的抗体的组合接触。与在不存在CD47阻断下用已知EGFR拮抗剂抗体进行的治疗相比,本发明的方法可提供所治疗个体的总体存活期增加。

[0016] 在一些实施方案中,EGFR表达性癌细胞包含导致EGFR信号传导路径组成性活化的突变。在一些所述实施方案中,突变是一个或两个等位基因中的KRAS、NRAS或BRAF突变。在一些实施方案中,突变在KRAS的密码子12或13中。所述个体被从用抗EGFR拮抗剂抗体进行的治疗排除,但在本文中显示受益于用本发明的组合疗法进行的治疗。在其他实施方案中,具有野生型KRAS、NRAS、BRAF的个体用本发明方法治疗。

[0017] 可通过关于KRAS、NRAS和BRAF中的一者或多者确定癌细胞的基因型来选择用于治疗的个体。可选择当前由于在KRAS或NRAS中存在突变而从用抗EGFR抗体进行的治疗排除的个体来用本发明的方法治疗。也可测试个体的可检测EGFR在癌细胞上的表达,其中选

择显示EGFR表达阳性的癌症来治疗。

[0018] 相伴施用组合中的药剂,即各药剂相对于组合中的其他药剂在约45天、30天、15天、7天、3天、2天、1天内或大致上同时施用。如果施用时程使得两种药剂的血清水平均处于治疗水平下,那么药剂可被视为是组合的。本发明的一种益处可为相对于作为单药疗法所需的剂量,使用的抗EGFR抗体的剂量降低。施用可根据需要进行重复以使癌细胞群体消减。

[0019] 在一些实施方案中,在向个体施用治疗有效剂量的抗CD47药剂之前,施用引发剂(primer agent)。适合的引发剂包括红细胞生成刺激剂(ESA)和/或引发剂量的抗CD47药剂。在施用引发剂以及允许有一段时期来有效达成网织红细胞产生增加之后,施用治疗剂量的抗CD47药剂。治疗剂量可以许多不同方式施用。在一些实施方案中,在施用引发剂之后,施用两次或更多次治疗有效剂量。在一些实施方案中,抗CD47药剂的治疗有效剂量以浓度逐步升高的两次或更多次剂量施用,在其他实施方案中,剂量是相等的。

[0020] 在一些实施方案中,使本发明的药剂的组合的施用与使患者血细胞比容增加的有效剂量的药剂例如红细胞生成素刺激剂(ESA)组合。所述药剂在本领域中已知并且使用,包括例如 **Aranesp®** (阿法达贝泊汀(darbepoetin alfa))、**Epogen®NF/Procrit®NF** (阿法依伯汀(epoetin alfa))、**Omontys®** (培奈萨肽(peginesatide))、**Procrit®**等。

[0021] 用于本发明的方法中的抗CD47药剂干扰存在于癌细胞上的CD47与存在于吞噬细胞上的SIRP α 之间的结合。在抗EGFR抗体存在下,所述方法可使对癌细胞的吞噬作用增加。适合的抗CD47药剂包括可溶性SIRP α 多肽;可溶性CD47;抗CD47抗体、抗SIRP α 抗体等,其中术语抗体涵盖如本领域中所知的其抗体片段和变体。在一些实施方案中,抗CD47药剂是抗CD47抗体。在一些实施方案中,抗CD47抗体是非溶血抗体。在一些实施方案中,抗体包含人IgG4 Fc区。

[0022] 抗EGFR抗体包括不限于处于当前临床使用中以及处于临床试验中的抗体,其包括通过拮抗EGFR信号传导来起作用的抗体。尽管所述EGFR拮抗剂抗体可用于本发明的方法,但本发明的方法不要求抗EGFR抗体阻断EGFR信号传导,因此不是路径拮抗剂的抗体可用于本发明的组合治疗方法中。当前被核准用于临床使用的抗EGFR抗体的实例包括嵌合单克隆抗体西妥昔单抗,其含有mAb225的鼠可变区和人IgG1恒定区;完全人IgG2抗体帕尼单抗;以及人源化IgG1抗体尼妥珠单抗。临床开发中的其他抗体包括扎鲁木单抗(zalutumumab)和马妥珠单抗(matuzumab)。抗EGFR抗体可根据适合作为单药疗法或与化学疗法和/或放射组合的常规给药进行施用;或当与CD47阻断组合时,可调整剂量以使有效性最优化。

[0023] 接触癌细胞可在体内进行例如以达成治疗目的,以及在体外进行例如以进行筛选测定等。通过使在肿瘤细胞附近的包括吞噬细胞的免疫细胞与有效阻断CD47与SIRP α 之间的相互作用的CD47阻断剂和抗EGFR抗体的组合接触,例如癌瘤、神经胶质瘤、黑色素瘤等的肿瘤细胞被靶向以达成消减。相较于使用单一药剂,组合疗法在使吞噬作用增强以及使肿瘤细胞消除方面可为协同的。组合也可诱导抗肿瘤T细胞应答。此外,组合可提供所治疗个体的总体存活期增加。

附图说明

[0024] 当与附图结合阅读时,本发明根据以下详细描述而得以最佳了解。本专利或申请文件含有至少一个以彩色绘制的附图。具有彩色附图的本专利或专利申请公布的复本将在请求以及支付必要费用后由专利局提供。需要强调的是,根据惯例,附图的各种特征并非按比例绘制。相反,为明晰起见,各种特征的尺寸被任意扩大或缩小。附图中包括下图。

[0025] 图1. EGFR在癌干细胞上的表达。剖析患者结肠癌细胞的指示癌干细胞的标志物(CD44+CD166+)以及CD47和EGFR的表达。显示大多数(如果不是全部)CSC共同表达EGFR。

[0026] 图2. 不管EGFR信号传导路径中的下游突变如何,阻断CD47-SIRP α 路径(抗CD47 Ab Hu5F9-G4)都使由抗EGFR抗体(西妥昔单抗)达成的对EGFR表达性癌细胞的抗体依赖性细胞性吞噬(ADCP)增强。在对照IgG4(黑色)、抗CD47抗体Hu5F9-G4(红色)、抗EGFR抗体西妥昔单抗(绿色)或Hu5F9-G4与西妥昔单抗的组合(蓝色)存在下,由供体源性人巨噬细胞对一组结肠癌细胞的吞噬。KRAS和BRAF的突变状况如先前所报道(Epigentic and genetic features of 24 colon cancer cell lines, Ahmed等, Oncogenesis, 2013)。细胞根据EGFR的表达增加来组织;SW620就EGFR表达来说呈阴性,如通过流式细胞术以西妥昔单抗结合所确定。数据表示使用来自2个独立供血者的巨噬细胞获得的平均值和标准偏差。

[0027] 图3. 抗EGFR抗体(西妥昔单抗、帕尼单抗)与由抗CD47抗体(Hu5F9-G4)对CD47-SIRP α 信号传导路径的阻断的组合使体内治疗功效增强。(A). 肿瘤生长。将用GFP-荧光素酶编码慢病毒转导的UM8结肠腺癌细胞(EGFR⁺)皮下注射至NSG小鼠的背部中。在肿瘤细胞植入(通过生物发光成像确认)之后28天,每隔一天(PBS、Hu5F9-G4)或每周(帕尼单抗、西妥昔单抗)通过腹膜内注射施用PBS(黑色)、Hu5F9-G4(红色)(250 μ g)、西妥昔单抗(绿色, 120 μ g)、帕尼单抗(蓝色)(120 μ g)、Hu5F9-G4与西妥昔单抗组合(橙色)、或Hu5F9-G4与帕尼单抗组合(紫色),持续13周。通过生物发光成像测量肿瘤生长。单独施用Hu5F9-G4不抑制肿瘤生长,并且用西妥昔单抗单药疗法治疗使肿瘤生长稳定,但未能产生肿瘤消退。用帕尼单抗单药疗法治疗诱导轻微肿瘤消退,而在用Hu5F9-G4与西妥昔单抗或帕尼单抗组合治疗的所有小鼠中都观察到显著的肿瘤消退。(B). 存活曲线。

[0028] 图4. 不管EGFR信号传导路径中的下游突变如何,抗EGFR抗体(西妥昔单抗)与由抗CD47抗体(Hu5F9-G4)对CD47-SIRP α 信号传导路径的阻断的组合都使对EGFR表达性癌细胞的抗体依赖性细胞性吞噬(ADCP)增强,并且预防或消除转移。(A). 将用GFP-荧光素酶编码慢病毒转导的DLD1结肠腺癌细胞(EGFR⁺, KRAS突变体)皮下注射至NSG小鼠的背部中。在肿瘤细胞植入(通过生物发光成像确认)之后5天,每隔一天(PBS、Hu5F9-G4)或每周(西妥昔单抗)通过腹膜内注射施用PBS(黑色)、Hu5F9-G4(红色)(250 μ g)、西妥昔单抗(绿色, 120 μ g)、或Hu5F9-G4与西妥昔单抗(蓝色)组合,持续7周。通过生物发光成像测量肿瘤生长。单独施用Hu5F9-G4减缓但不抑制肿瘤生长。用西妥昔单抗单药疗法治疗不具有作用,如对于具有EGFR信号传导路径中的下游突变的肿瘤所预期。Hu5F9-G4与西妥昔单抗组合不抑制肿瘤生长,但具有使肿瘤生长减缓的最强作用。(B-C). 值得注意的是,相较于PBS对照组(LN 4/5和肺4/5),用西妥昔单抗治疗的小鼠具有较少淋巴结转移(4/5小鼠)和肺转移(1/5小鼠),但治疗作用不如Hu5F9-G4(LN 2/4和肺0/4)强效。Hu5F9-G4与西妥昔单抗组合具有最强治疗作用。在这个群组中,小鼠在治疗结束时都不具有任何转移(LN 0/5和肺0/5)。

[0029] 图5. 显示组合的给药和时机的临床试验方案的示意图。

具体实施方式

[0030] 提供用于靶向消滅受试者中的EGFR表达性癌细胞的方法,其中在与(a)阻断CD47信号传导;和(b)靶向EGFR的药剂的组合接触之后,所述癌细胞通过对活细胞的吞噬作用来被选择性消除。

[0031] 为有助于了解本发明,以下定义许多术语。

[0032] 在描述本发明活性剂和方法之前,应了解本发明不限于描述的特定方法、产品、设备和要素,因为所述方法、设备和制剂当然可变化。也应了解本文所用的术语仅出于描述特定实施方案的目的,并且不意图限制本发明的将仅由随附权利要求限制的范围。

[0033] 必须注意,除非上下文另外明确规定,否则如本文以及随附权利要求中所用,单数形式“一个(种)”、“和”以及“这个(种)”包括复数个(种)指示物。因此,举例来说,提及“一种药物候选物”是指所述候选物中的一者或混合物,并且提及“这种方法”包括提及为本领域技术人员所知的等效步骤和方法,诸如此类。

[0034] 除非另外定义,否则本文所用的所有技术和科学术语都具有与由本发明所属领域中的普通技术人员通常理解相同的含义。本文提及的所有出版物都出于描述和公开出版物中所述以及可能与当前描述的本发明关联使用的装置、制剂和方法的目的以引用的方式并入本文。

[0035] 当提供数值范围时,应了解除非上下文另外明确规定,否则在那个范围的上限与下限之间的达到下限单位的十分之一的各间插值以及在那个陈述的范围内的任何其他陈述值或间插值都涵盖在本发明内。这些较小范围的上限和下限可独立地包括在较小范围中,也涵盖在本发明内,属于陈述的范围内的任何明确排除的界限。当陈述的范围包括一个或两个界限时,排除那些包括的界限中的任一者或两者的范围也包括在本发明中。

[0036] 在以下描述中,阐述众多特定细节以提供对本发明的更彻底了解。然而,将为本领域技术人员显而易见的是本发明可在无这些特定细节中的一者或多者的情况下加以实施。在其他情况下,尚未描述为本领域技术人员熟知的熟知特征和程序以避免使本发明费解。

[0037] 通常,属于本领域的技能的常规蛋白质合成、重组细胞培养和蛋白质分离方法以及重组DNA技术用于本发明中。所述技术在文献中被充分解释,参见例如Maniatis, Fritsch 和 Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (1982); Sambrook, Russell 和 Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2001); Harlow, Lane 和 Harlow, *Using Antibodies: A Laboratory Manual: Portable Protocol No. I*, Cold Spring Harbor Laboratory (1998); 以及 Harlow 和 Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory; (1988)。

[0038] 定义

[0039] 抗CD47药剂。CD47是一种广泛表达的具有单一Ig样结构域和五个跨膜区的跨膜糖蛋白,其充当SIRP α 的细胞配体,其中结合通过SIRP α 的NH₂末端V样结构域来介导。SIRP α 主要在包括巨噬细胞、粒细胞、骨髓树突细胞(DC)、肥大细胞和它们的前体(包括造血干细胞)的骨髓细胞上表达。SIRP α 上介导CD47结合的结构决定簇由Lee等(2007) *J. Immunol.* 179:7741-7750; Hatherley等(2008) *Mol Cell.* 31(2):266-77; Hatherley等(2007) *J. B. C.* 282:14567-75论述;并且SIRP α 顺式二聚化在CD47结合中的作用由Lee等

(2010) J.B.C.285:37953-63论述。与CD47抑制对正常细胞的吞噬作用的作用一致,有证据表明它在造血干细胞(HSC)和祖细胞上只是在它们的迁移期之前和期间被短暂上调,并且CD47在这些细胞上的水平决定它们在体内被吞噬的可能性。

[0040] 如本文所用,术语“抗CD47药剂”或“提供CD47阻断的药剂”是指使CD47(例如在靶标细胞上)与SIRP α (例如在吞噬细胞上)的结合降低的任何药剂。适合的抗CD47试剂的非限制性实例包括SIRP α 试剂(包括但不限于高亲和力SIRP α 多肽)、抗SIRP α 抗体、可溶性CD47多肽和抗CD47抗体或抗体片段。在一些实施方案中,适合的抗CD47药剂(例如抗CD47抗体、SIRP α 试剂等)特异性结合CD47以使CD47与SIRP α 的结合降低。

[0041] 在一些实施方案中,适合的抗CD47药剂(例如抗SIRP α 抗体、可溶性CD47多肽等)特异性结合SIRP α 以使CD47与SIRP α 的结合降低。结合SIRP α 的适合的抗CD47药剂不使SIRP α 活化(例如在SIRP α 表达性吞噬细胞中)。适合的抗CD47药剂的功效可通过对药剂进行测定来评估。在一示例性测定中,在存在或不存在候选药剂下以及在效应细胞例如巨噬细胞或其他吞噬细胞存在下孵育靶标细胞。相较于在不存在药剂下的吞噬作用,用于本发明方法中的药剂将使吞噬作用上调至少5%(例如至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少100%、至少120%、至少140%、至少160%、至少180%、至少200%、至少500%、至少1000%)。类似地,针对SIRP α 的酪氨酸磷酸化水平的体外测定将显示相较于在不存在候选药剂下观察的磷酸化,磷酸化降低至少5%(例如至少10%、至少15%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或100%)。

[0042] 在一些实施方案中,抗CD47药剂在结合后不使CD47活化。当使CD47活化时,可发生与凋亡(即程序性细胞死亡)类似的过程(Manna和Frazier,Cancer Research,64,1026-1036,2004年2月1日)。因此,在一些实施方案中,抗CD47药剂不直接诱导CD47表达性细胞的细胞死亡。

[0043] 在一些实施方案中,在向个体施用治疗有效剂量的抗CD47药剂之前,施用引发剂。适合的引发剂包括红细胞生成刺激剂(ESA)和/或引发剂量的抗CD47药剂。在施用引发剂以及允许有一段时期来有效达成网织红细胞产生增加之后,施用治疗剂量的抗CD47药剂。施用可根据共同待决的专利申请USSN 14/769,069中所述的方法进行,所述专利申请以引用的方式明确并入本文。

[0044] SIRP α 试剂。SIRP α 试剂包含SIRP α 的足以以可辨别亲和力结合CD47,通常位于信号序列与跨膜结构域之间的部分,或其保留结合活性的片段。适合的SIRP α 试剂使天然蛋白SIRP α 与CD47之间的相互作用降低(例如阻断、阻止等)。SIRP α 试剂将通常包含SIRP α 的至少d1结构域。

[0045] 在一些实施方案中,主题抗CD47药剂是“高亲和力SIRP α 试剂”,其包括SIRP α 源性多肽及其类似物(例如CV1-hIgG4和CV1单体)。高亲和力SIRP α 试剂描述于国际申请PCT/US13/21937中,所述申请据此以引用的方式明确并入本文。高亲和力SIRP α 试剂是天然SIRP α 蛋白的变体。提供亲和力增加的氨基酸变化位于d1结构域中,因此高亲和力SIRP α 试剂包含人SIRP α 的相对于d1结构域内的野生型序列具有至少一个氨基酸变化的d1结构域。这种高亲和力SIRP α 试剂任选包含额外的氨基酸序列,例如抗体Fc序列;野生型人SIRP α 蛋白的除d1结构域以外的部分,包括但不限于天然蛋白的残基150至374或其片段,通常是与d1

结构域邻接的片段;等。高亲和力SIRP α 试剂可为单体或多聚体,即二聚体、三聚体、四聚体等。在一些实施方案中,高亲和力SIRP α 试剂是可溶性的,其中多肽缺乏SIRP α 跨膜结构域,并且相对于野生型SIRP α 序列包含至少一个氨基酸变化,并且其中所述氨基酸变化使SIRP α 多肽结合CD47的亲和力增加,例如通过使解离速率降低至少10倍、至少20倍、至少50倍、至少100倍、至少500倍或更多。

[0046] 任选地,SIRP α 试剂是融合蛋白,例如与第二多肽框内融合。在一些实施方案中,第二多肽能够使融合蛋白的大小增加,例如以使融合蛋白将不快速从循环被清除。在一些实施方案中,第二多肽是免疫球蛋白Fc区的一部分或整体。Fc区通过提供“吃我”信号而有助于达成吞噬作用,此使由高亲和力SIRP α 试剂提供的对“别吃我”信号的阻断增强。在其他实施方案中,第二多肽是大致上类似于Fc的任何适合多肽,例如提供大小增加、多聚化结构域和/或与Ig分子的额外结合或相互作用。

[0047] 抗CD47抗体。在一些实施方案中,主题抗CD47药剂是特异性结合CD47(即抗CD47抗体)以及使一种细胞(例如受感染细胞)上的CD47与另一细胞(例如吞噬细胞)上的SIRP α 之间的相互作用降低的抗体。在一些实施方案中,适合的抗CD47抗体在结合后不使CD47活化。一些抗CD47抗体不使CD47与SIRP α 的结合降低(并且因此在本文中不被视为“抗CD47药剂”),并且这种抗体可被称为“非阻断抗CD47抗体”。是“抗CD47药剂”的适合的抗CD47抗体可被称为“CD47阻断抗体”。适合的抗体的非限制性实例包括克隆B6H12、5F9、8B6和C3(例如如以引用的方式明确并入本文的国际专利公布WO 2011/143624中所述)。适合的抗CD47抗体包括所述抗体的完全人形式、人源化形式或嵌合形式。人源化抗体(例如hu5F9-G4)由于它们的抗原性较低而尤其适用于在人中进行体内应用。类似地,犬源化抗体、猫源化抗体等分别尤其适用于在狗、猫和其他物种中进行应用。目标抗体包括人源化抗体或犬源化抗体、猫源化抗体、马源化抗体、牛源化抗体、猪源化抗体等及其变体。

[0048] 在一些实施方案中,抗CD47抗体包含人IgG Fc区,例如IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3、IgG4恒定区。在一优选实施方案中,IgG Fc区是IgG4恒定区。IgG4较链可通过氨基酸取代S241P来稳定(参见Angal等(1993) Mol. Immunol. 30 (1):105-108,其以引用的方式明确并入本文)。

[0049] 抗SIRP α 抗体。在一些实施方案中,主题抗CD47药剂是特异性结合SIRP α (即抗SIRP α 抗体)并且使一种细胞(例如受感染细胞)上的CD47与另一细胞(例如吞噬细胞)上的SIRP α 之间的相互作用降低的抗体。适合的抗SIRP α 抗体可结合SIRP α ,而不活化或刺激通过SIRP α 进行的信号传导,因为SIRP α 的活化将抑制吞噬作用。作为替代,适合的抗SIRP α 抗体有助于使对受影响细胞的吞噬优先于对正常细胞的吞噬。相对于其他细胞(非受感染细胞),表达较高水平的CD47的那些细胞(例如受感染细胞)将被优先吞噬。因此,适合的抗SIRP α 抗体特异性结合SIRP α (而不足够活化/刺激用以抑制吞噬作用的信号传导应答),并且阻断SIRP α 与CD47之间的相互作用。适合的抗SIRP α 抗体包括所述抗体的完全人形式、人源化形式或嵌合形式。人源化抗体由于它们的抗原性较低而尤其适用于在人中进行体内应用。类似地,犬源化抗体、猫源化抗体等分别尤其适用于在狗、猫和其他物种中进行应用。目标抗体包括人源化抗体或犬源化抗体、猫源化抗体、马源化抗体、牛源化抗体、猪源化抗体等及其变体。

[0050] 可溶性CD47多肽。在一些实施方案中,主题抗CD47药剂是特异性结合SIRP α 以及

使一种细胞(例如受感染细胞)上的CD47与另一细胞(例如吞噬细胞)上的SIRP α 之间的相互作用降低的可溶性CD47多肽。适合的可溶性CD47多肽可结合SIRP α ,而不活化或刺激通过SIRP α 进行的信号传导,因为SIRP α 的活化将抑制吞噬作用。作为替代,适合的可溶性CD47多肽有助于使对受感染细胞的吞噬优先于对非受感染细胞的吞噬。相对于正常非靶标细胞(正常细胞),表达较高水平的CD47的那些细胞(例如受感染细胞)将被优先被吞噬。因此,适合的可溶性CD47多肽特异性结合SIRP α ,而不足够活化/刺激用以抑制吞噬作用的信号传导应答。

[0051] 在一些情况下,适合的可溶性CD47多肽可为融合蛋白(例如如以引用的方式明确并入本文的美国专利公布US20100239579中在结构上所述)。然而,仅有不活化/刺激SIRP α 的融合蛋白适于本文提供的方法。适合的可溶性CD47多肽也包括可特异性结合SIRP α 以及抑制CD47与SIRP α 之间的相互作用,而不刺激足以抑制吞噬作用的SIRP α 活性的任何肽或肽片段,其包含变异或天然存在CD47序列(例如细胞外结构域序列或细胞外结构域变体)。

[0052] 在某些实施方案中,可溶性CD47多肽包含CD47的细胞外结构域,包括信号肽,以致CD47的细胞外部分的长度通常是142个氨基酸。本文所述的可溶性CD47多肽也包括CD47细胞外结构域变体,其包含具有至少65%-75%、75%-80%、80-85%、85%-90%、或95%-99%同一性(或在65%至100%之间未明确列举的任何同一性百分比)的氨基酸序列,所述变体保留结合SIRP α 而不刺激SIRP α 信号传导的能力。

[0053] 在某些实施方案中,信号肽氨基酸序列可用源于另一多肽(例如像免疫球蛋白或CTLA4)的信号肽氨基酸序列取代。举例来说,不同于横穿外部细胞膜的细胞表面多肽的全长CD47,可溶性CD47多肽被分泌;因此,编码可溶性CD47多肽的多核苷酸可包括编码与通常从细胞分泌的多肽相伴的信号肽的核苷酸序列。

[0054] 在其他实施方案中,可溶性CD47多肽包含CD47的缺乏信号肽的细胞外结构域。如本文所述,信号肽不暴露于分泌蛋白或跨膜蛋白的细胞表面上,因为信号肽在所述蛋白的易位期间被裂解,或信号肽保持锚定在外部细胞膜中(这种肽也被称为信号锚(signal anchor))。CD47的信号肽序列据信在体内从前体CD47多肽裂解。

[0055] 在其他实施方案中,可溶性CD47多肽包含CD47细胞外结构域变体。这种可溶性CD47多肽保留结合SIRP α 而不刺激SIRP α 信号传导的能力。CD47细胞外结构域变体可具有与天然CD47序列具有至少65%-75%、75%-80%、80-85%、85%-90%、或95%-99%同一性(此包括在任一所述范围之间的任何同一性百分比)的氨基酸序列。

[0056] EGFR。表皮生长因子受体(EGFR)存在于细胞表面上,并且通过结合它的特定配体(包括表皮生长因子和转化生长因子 α (TGF α))而活化。在由它的生长因子配体活化后,EGFR经历从非活性单体形式向活性二聚体的转变。EGFR二聚化刺激它的固有细胞内蛋白质-酪氨酸激酶活性。因此,发生EGFR的C末端结构域中的若干酪氨酸(Y)残基的自体磷酸化。这个自体磷酸化通过若干其他蛋白质来引发下游活化和信号传导,所述蛋白质通过它们自身的磷酸酪氨酸结合性SH2结构域来与磷酸化酪氨酸缔合。这些下游信号传导蛋白引发导致DNA合成和细胞增殖的若干信号转导级联,主要是MAPK、Akt和JNK路径。

[0057] EGFR活化的下游作用包括调节三个主要路径。当磷酸化EGFR通过GRB2和SHC衔接蛋白来募集鸟嘌呤-核苷酸交换因子(此使RAS活化)时,发生对RAS-RAF-MAPK路径的诱导。这个步骤随后刺激RAF和MAP激酶路径,从而最终影响细胞增殖、肿瘤侵袭和转移。RAS涉及

于EGFR信号传导路径中对于用抗EGFR拮抗剂抗体进行治疗 具有重要性。尽管EGFR表达水平较高,但EGFR抑制剂仅在小型患者子组中有效。一些癌症似乎获得对EGFR抑制剂的抗性,并且多种机理似乎潜伏于对靶向疗法缺乏敏感性之下,包括EGFR基因自身中以及下游效应物诸如RAS、RAF和AKT中的与差异性 临床效果相关的突变。

[0058] EGFR基因存在于染色体7p11.2上,并且具有编码具有464个氨基酸的跨膜受体蛋白质的28个外显子。在EGFR内,外显子5-7和13-16编码配体结合结构域,而外显子18-24编码TK结构域。自体磷酸化发生在由外显子25-28编码的区域中。

[0059] EGFR或家族成员的突变、扩增或错误调控牵涉于所有上皮癌的约30%中。尽管突变可发生在TK结构域内的任何地方,但观察到在肺癌的情况下在外显子18-21中的一组重要EGFR突变。这些突变中最频繁的是外显子19中的发生在约45%的病例中的框内缺失,其次是外显子21中的在40-45%的病例中的点突变。尽管观察到外显子19中超过20种不同缺失,但外显子21中的L858R是检测到的最常见点突变。已知新生突变会发生在EGFR内,所述突变使受体组成性开启。尽管这些突变中最重要的是T790M,即外显子20中占约50%的病例的点突变,但外显子20中发生在约5%的病例中的插入性突变也已与抗性相关联。

[0060] KRAS中在密码子12和13处的突变发生在约15-50%的NSCLC患者中,而在1-2%的肺癌患者中检测到BRAF突变。KRAS和EGFR突变在NSCLC的情况下似乎互相排斥,其中EGFR突变发生在非吸烟者中,而KRAS突变发生在吸烟者中。已知约30%至50%的结肠直肠癌具有突变KRAS基因。存在于5%至10%的肿瘤中的突变BRAF基因也可影响对抗EGFR抗体的响应。

[0061] KRAS、NRAS、BRAF突变。多个研究已显示患者的肿瘤具有KRAS或NRAS外显子2、3或4中的突变预示缺乏对与化学疗法组合给与的抗EGFR抗体疗法的响应 (Ciardiello等2014; Douillard等2013; Karthaus等2013; Peeters等2014; Stintzing 等2014; Tejpar等2014)。特定目标突变包括密码子12或13中的KRAS突变,包括但不限于KRAS c.34G>T (G12C); KRAS c.34G>C (G12R); KRAS c.34G>A (G12S); KRAS c.35G>C (G12A); KRAS c.35G>A (G12D); KRAS c.35G>T (G12V); KRAS c.37G>T (G13C); KRAS c.37G>C (G13R); KRAS c.37G>A (G13S); KRAS c.38G>C (G13A); KRAS c.38G>A (G13D); NRAS c.34G>T (G12C); NRAS c.34G>A (G12S); NRAS c.35G>C (G12A); NRAS c.35G>A (G12D); NRAS c.35G>T (G12V)。四个最频繁KRAS突变G12D、G12V、G13D、G12C占有所有KRAS突变的83%。参见例如Peeters等JCO 2013年2月20日第31卷第6期759-765; Stoltze等Scientific Reports 5, 文章编号:8535 (2015)。

[0062] 本领域中已知的各种方法可用于分析这些基因的基因型。用于检测突变的传统方法涉及通过对肿瘤组织进行直接DNA测序来筛选。桑格 (Sanger) 测序技术在大多数分子诊断实验室中可用,并且它具有在整个基因中检测改变(包括新型变体)的卓越优势。新近方法已集中于靶向筛选突变以实现更快速、强力和灵敏的测试。分子诊断实验室当前使用多种方法,包括扩增阻滞突变系统、焦磷酸测序、智能扩增方法、高分辨率熔解分析和限制片段长度多态性,仅举几例。这些方法全都在目标区域内在突变DNA与野生型DNA之间进行区分。与直接测序相比,靶向分析的检测限是正常DNA的背景中约1-5%突变DNA。

[0063] 大多数实验室使用福尔马林固定、石蜡包埋 (FFPE) 组织来测试突变。少许实验室也使用冷冻肿瘤组织。然而,筛选FFPE样品造成重大挑战,包括成功提取DNA,来自用于包埋组织的固定剂的干扰,以及最重要地,获得较短扩增子以达成有效分析,特别是如果使

用基于PCR的方法的话。替代性样品类型诸如细针抽吸物和胸腔积液当前被评估为使得能够较快较易于诊断恶性肿瘤的可行选项。在测试之前对肿瘤进行显微解剖也有帮助,因为这有效富集样品,由此使灵敏性增加。

[0064] 用于这个目的的可商购获得的测试是therascreen KRAS RGQ (Rotor-Gene Q) PCR (聚合酶链式反应) 试剂盒。可对来自原发性肿瘤或转移的福尔马林固定、石蜡包埋组织进行KRAS基因的密码子12或13中的突变测试。可对来自原发性肿瘤或转移的福尔马林固定、石蜡包埋组织进行针对BRAF V600E突变状况的PCR扩增和DNA序列分析 或等位基因特异性PCR。

[0065] 抗EGFR抗体。特异性结合和抑制人EGFR的许多临床适用抗体是可用的,并且适用于本发明的方法中。抗EGFR单克隆抗体例如西妥昔单抗、帕尼单抗、尼妥珠单抗、扎鲁木单抗和马妥珠单抗结合EGFR单体的细胞外结构域,并且竞争由内源性配体达成的受体结合,从而触发受体内化和阻断配体诱导的受体活化。结合EGFR的L2结构域的西妥昔单抗是一种由分别来自小鼠来源和人来源的可变区和恒定区组成的嵌合蛋白抗体,而帕尼单抗和尼妥珠单抗是人抗体和人源化抗体。迄今为止,食品与药物管理局已核准EGFR靶向mAb用于晚期结肠直肠癌、神经胶质瘤和头颈部肿瘤。

[0066] 抗体可如当前所指定加以使用,或可改变剂量以使组合疗法最优化。举例来说,西妥昔单抗当前被指定以 $400\text{mg}/\text{m}^2$ 的剂量作为初始剂量,随后以 $250\text{mg}/\text{m}^2$ 进行每周输注。对于非严重输注反应,可使剂量降低50%。帕尼单抗当前被指定每14天以 $6\text{mg}/\text{kg}$ 进行静脉内输注。对于非严重输注反应,可使剂量降低50%。

[0067] 举例来说,抗EGFR抗体可以约 $0.05\text{mg}/\text{kg}$ 、 $0.1\text{mg}/\text{kg}$ 、 $0.5\text{mg}/\text{kg}$ 、 $1\text{mg}/\text{kg}$ 、 $2.5\text{mg}/\text{kg}$ 、 $5\text{mg}/\text{kg}$ 、 $7.5\text{mg}/\text{kg}$ 、 $10\text{mg}/\text{kg}$ 、 $12.5\text{mg}/\text{kg}$ 、 $15\text{mg}/\text{kg}$ 的剂量或根据需要以更大剂量施用。给药可每日、每隔一天、半周、每周、每14天等进行,持续足以实现所需结果的时期,例如约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12周或更久。在一些实施方案中,用于组合疗法的剂量低于作为单药疗法达成有效性所需的剂量。

[0068] 除直接抑制EGFR信号传导的抗体之外,本发明的组合方法适于与例如如国际专利申请W02012058592(以引用的方式明确并入本文)中所述的非拮抗性抗体;非拮抗性抗EGFR抗体13A9;等一起使用。

[0069] 如本文所用,“抗体”包括指代与特定抗原具有免疫反应性的免疫球蛋白分子,并且包括多克隆抗体与单克隆抗体两者。所述术语也包括遗传工程改造形式,诸如嵌合抗体(例如人源化鼠抗体)和异源偶联抗体。术语“抗体”也包括抗体的抗原结合形式,包括具有抗原结合能力的片段(例如Fab'、 $F(ab')_2$ 、Fab、Fv和rIgG)。所述术语也指重组单链Fv片段(scFv)。术语抗体也包括二价或双特异性分子、双链抗体、三链抗体和四链抗体。

[0070] 对抗体的选择可基于多种准则,包括选择性、亲和力、细胞毒性等。短语“特异性(或选择性)结合”抗体或“与……具有特异性(或选择性)免疫反应性”在提及蛋白质或肽时是指结合反应确定在蛋白质和其他生物制剂的异质群体中存在所述蛋白质。因此,在指定免疫测定条件下,指定抗体结合特定蛋白质序列是背景的至少两倍,并且更通常是背景的10倍以上至100倍。一般来说,在效应细胞(诸如天然杀伤细胞或巨噬细胞)存在下,本发明的抗体结合靶标细胞的表面上的抗原。效应细胞上的Fc受体识别结合的抗体。

[0071] 与特定抗原具有免疫反应性的抗体可通过重组方法,诸如选择重组抗体于噬菌体

或类似载体中的文库,或通过用所述抗原或用编码所述抗原的DNA使动物免疫来产生。制备多克隆抗体的方法为熟练技术人员所知。或者,抗体可为单克隆抗体。单克隆抗体可使用杂交瘤方法制备。在杂交瘤方法中,通常用免疫剂使适当宿主动物免疫以引发产生或能够产生将特异性结合所述免疫剂的抗体的淋巴细胞。或者,可在体外使淋巴细胞免疫。接着使用适合的融合剂诸如聚乙二醇使淋巴细胞与永生化细胞系融合以形成杂交瘤细胞。

[0072] 可使用本领域中已知的各种技术包括噬菌体展示文库来产生人抗体。类似地,人抗体可通过将人免疫球蛋白基因座引入转基因动物中来制备,所述转基因动物例如其中内源性免疫球蛋白基因已被部分或完全失活的小鼠。在激发后,观察到人抗体产生,此在所有方面都密切类似于在人中所见的抗体产生,所述方面包括基因重排、装配和抗体谱系。

[0073] 抗体也以由用各种肽酶消化所产生的许多充分表征的片段形式存在。因此,胃蛋白酶在铰链区中二硫键以下消化抗体以产生 $F(ab)'_2$,即自身是轻链通过二硫键接合于 V_H-C_{H1} 的Fab的二聚体。可使 $F(ab)'_2$ 在温和条件下还原以使铰链区中的二硫键断裂,由此使 $(ab)'_2$ 二聚体转变成Fab'单体。Fab'单体本质上是具有铰链区的一部分的Fab。尽管各种抗体片段根据对完整抗体的消化来定义,但技术人员将了解所述片段可以化学方式或通过使用重组DNA方法重新合成。因此,如本文所用的术语抗体也包括通过修饰完整抗体产生的抗体片段,或使用重组DNA方法重新合成的那些(例如单链Fv),或使用噬菌体展示文库鉴定的那些。

[0074] “人源化抗体”是含有源于非人免疫球蛋白的最小序列的免疫球蛋白分子。人源化抗体包括人免疫球蛋白(接受者抗体),其中来自接受者的互补决定区(CDR)的残基来自诸如小鼠、大鼠或兔的非人物种(供者抗体)的具有所需特异性、亲和力和能力的CDR的残基替换。在一些情况下,人免疫球蛋白的Fv框架残基用相应非人残基替换。人源化抗体也可包含既不见于接受者抗体中也不见于输入CDR或框架序列中的残基。一般来说,人源化抗体将包含大致上全部至少一个,并且通常两个可变结构域,其中全部或大致上全部CDR区对应于非人免疫球蛋白的那些,并且全部或大致上全部框架(FR)区是人免疫球蛋白共有序列的那些。人源化抗体最佳也将包含免疫球蛋白恒定区(Fc)的至少一部分,通常是人免疫球蛋白的至少一部分恒定区。

[0075] 可测试目标抗体诱导ADCC(抗体依赖性细胞性细胞毒性)或ADCP(抗体依赖性细胞性吞噬)的能力。可通过检测标记或乳酸脱氢酶从经溶解细胞的释放,或检测降低的靶细胞活力(例如膜联蛋白测定)来监测和定量抗体相关的ADCC活性。可通过末端脱氧核苷酰基转移酶介导的地高辛-11-dUTP切口末端标记(TUNEL)测定(Lazebnik等,Nature: 371,346(1994))来进行凋亡测定。也可通过本领域中已知的检测试剂盒诸如来自Roche Applied Science(Indianapolis,Ind.)的细胞毒性检测试剂盒来直接检测细胞毒性。

[0076] 出于本发明的目的,“患者”包括人与其他动物两者,特别是哺乳动物,包括宠物和实验室动物,例如小鼠、大鼠、兔等。因此,方法可适用于人疗法与兽医学应用两者。在一个实施方案中,患者是哺乳动物,优选是灵长类动物。在其他实施方案中,患者是人。

[0077] 术语“受试者”、“个体”和“患者”在本文中可互换用于指代针对治疗加以评估和/或所治疗的哺乳动物。在一实施方案中,哺乳动物是人。术语“受试者”、“个体”和“患者”涵盖不限于患有癌症的个体。受试者可为人,但也包括其他哺乳动物,特别是适用作人疾病

的实验室模型的那些哺乳动物,例如小鼠、大鼠等。

[0078] 术语“癌”、“赘瘤”和“肿瘤”在本文中可互换用于指代以下细胞:其展现自主不受调控生长,以致它们展现特征在于对细胞增殖的控制显著丧失的异常生长表型。本申请中用于检测、分析或治疗的目标细胞包括癌前(例如良性)细胞、恶性细胞、转移前细胞、转移细胞和非转移细胞。实际上每种组织的癌症都是已知的。短语“癌负荷”是指受试者中的癌细胞量或癌体积。因此,降低癌负荷是指降低受试者中的癌细胞数目或癌体积。如本文所用的术语“癌细胞”是指癌细胞或源于癌细胞的任何细胞,例如癌细胞的克隆。许多类型的癌症为本领域技术人员所知,包括实体肿瘤诸如癌瘤、肉瘤、胶质母细胞瘤、黑素瘤、淋巴瘤、骨髓瘤等,以及循环癌症诸如白血病。癌症的实例包括但不限于卵巢癌、乳腺癌、结肠癌、肺癌、前列腺癌、肝细胞癌、胃癌、胰腺癌、子宫颈癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、泌尿道癌、甲状腺癌、肾癌、癌瘤、黑素瘤、头颈部癌和脑癌。

[0079] 癌症的“病变”包括损害患者的健康的所有现象。这包括但不限于异常或不可控制细胞生长、转移、干扰邻近细胞的正常功能、以异常水平释放细胞因子或其他分泌产物、抑制或恶化炎症性应答或免疫应答、赘瘤形成、恶性肿瘤前期、恶性肿瘤、侵袭周围或远端组织或器官诸如淋巴结等。

[0080] 如本文所用,术语“癌症复发”和“肿瘤复发”及其语法变化形式是指在癌症诊断之后赘生性或癌性细胞进一步生长。特定来说,当进一步癌性细胞生长发生在癌性组织中时,可发生复发。类似地,当肿瘤的细胞散播至局部或远端组织和器官中时,发生“肿瘤扩散”;因此,肿瘤扩散涵盖肿瘤转移。当肿瘤生长在局部铺展以通过压制、破坏或阻止正常器官功能来损害所涉及的组织的功能时,发生“肿瘤侵袭”。

[0081] 如本文所用,术语“转移”是指癌性肿瘤在与具有原始癌性肿瘤的器官不直接相关的器官或身体部分中生长。转移应被理解为包括微转移,所述微转移是在与具有原始癌性肿瘤的器官不直接相关的器官或身体部分中存在不可检测量的癌性细胞。转移也可定义为过程的若干步骤,诸如癌细胞从原始肿瘤部位脱离,以及癌细胞向身体的其他部分迁移和/或侵袭。

[0082] 关于患者的术语“样品”涵盖血液和其他生物来源液体样品、固体组织样品诸如活检航班或组织培养物或由其获得的细胞及其子代。所述定义也包括在取得样品之后以任何方式,诸如通过用试剂处理;洗涤;或使诸如癌细胞的某些细胞群体富集加以操作的样品。所述定义也包括特定类型的分子例如核酸、多肽等已被富集的样品。术语“生物样品”涵盖临床样品,并且也包括通过手术切除获得的组织、通过活检获得的组织、所培养的细胞、细胞上清液、细胞溶解产物、组织样品、器官、骨髓、血液、血浆、血清等。“生物样品”包括从患者的癌细胞获得的样品,例如包含从患者的癌细胞获得的多核苷酸和/或多肽的样品(例如包含多核苷酸和/或多肽的细胞溶解产物或其他细胞提取物);以及包含来自患者的癌细胞的样品。包含来自患者的癌细胞的生物样品也可包括非癌性细胞。

[0083] 术语“诊断”在本文中用于指代鉴定分子或病理状态、疾病或病状,诸如鉴定乳腺癌、前列腺癌或其他类型的癌症的分子亚型。

[0084] 术语“预后”在本文中用于指代预测诸如卵巢癌的赘生疾病的可归因于癌症的死亡或进展(包括复发、转移性扩散和药物抗性)的可能性。术语“预测”在本文中用于指代基于观察、经验或科学推理进行预告或估计的行为。在一个实例中,医师可预测在手术移

除原发性肿瘤和/或化学疗法之后,患者将在无癌症复发下持续某一时期存活的可能性。

[0085] 如本文所用,术语“治疗(treatment/treating)”等是指施用药剂或执行程序以达成获得作用的目的。作用就完全或部分预防疾病或其症状而言可为防治性的,和/或就实现对疾病和/或所述疾病的症状的部分或完全治愈而言可为治疗性的。如本文所用的“治疗”可包括治疗哺乳动物中,特别是人中的肿瘤,并且包括:(a)预防疾病或疾病的症状在可易患所述疾病但尚未被诊断为患有它(例如包括可与原发性疾病相关或由原发性疾病引起的疾病)的受试者中发生;(b)抑制疾病,即遏止它的发展;以及(c)缓解疾病,即导致疾病消退。

[0086] 治疗可指在治疗或改善或预防癌症方面的任何成功迹象,包括任何客观或主观参数,诸如减除;缓解;减弱症状或使得疾病状况更可为患者所耐受;减缓变性或衰退速率;或使得变性终点的致衰弱性较小。对症状的治疗或改善可基于客观或主观参数;包括由医师进行的检查的结果。因此,术语“治疗”包括施用本发明的化合物或药剂以预防或延迟、减轻、或遏止或抑制与癌症或其他疾病相关的症状或病状的发展。术语“治疗作用”是指减轻、消除或预防受试者的疾病、疾病的症状、或疾病的副作用。

[0087] 在某些实施方案中,“与……组合”、“组合疗法”和“组合产品”是指向患者并行施用第一治疗剂和如本文所用的化合物。当组合施用,各组分可同时施用,或在不同时间点以任何顺序依序施用。因此,各组分可单独但在时间上足够接近地加以施用以便提供所需治疗作用。

[0088] 癌症治疗性药物、ESA或肿瘤定向抗体与本发明的药物组合物的“相伴施用”意指在使得药物、ESA或抗体与本发明组合物两者均将具有治疗作用的时间下与高亲和力CD47试剂一起施用。所述相伴施用可涉及相对于施用本发明化合物,并行(即同时)、先前或后续施用药物、ESA或抗体。本领域普通技术人员将不难以确定特定药物和本发明组合物的适当施用时机、顺序和剂量。

[0089] 如本文所用,治疗终点将被赋予如本领域中所知以及如由食品与药物管理局所用的含义。

[0090] 总体存活期定义为从随机化直至由任何原因所致的死亡的时间,并且在意图治疗群体中进行测量。存活期被视为最可靠的癌症终点,并且当可进行研究以充分评估存活期时,它通常是优选终点。这个终点是准确的,并且易于测量,根据死亡日期加以记载。倚靠不是终点测量时的因素。存活期改善应以风险-益处分析形式进行分析以评估临床益处。可在随机化对照研究中评估总体存活期。如果毒性概况可接受,并且已常常支持新药核准,那么对总体存活期的统计显著改善的证明可被视为在临床上显著。本发明方法的益处可包括患者的总体存活期增加。

[0091] 基于肿瘤评估的终点包括DFS、ORR、TTP、PFS和治疗失败时间(TTF)。对于这些时间依赖性终点的数据的收集和分析基于间接评估、计算和估计(例如肿瘤测量)。无疾病存活期(DFS)定义为从随机化直至肿瘤复发或由任何原因所致的死亡的时间。这个终点的最频繁使用是在确定性手术或放射疗法之后的辅助环境下。当较大百分比的患者在化学疗法的情况下实现完全响应时,DFS也可为重要终点。

[0092] 客观响应率。ORR定义为肿瘤尺寸减小预定量以及所述减小持续最短时期的患者的比例。响应持续时间通常从初始响应的时间直至记载的肿瘤进展加以测量。通常,FDA已

将ORR定义为部分响应加上完全响应的总和。当以这种方式定义时,ORR是药物抗肿瘤活性的直接量度,其可在单组别研究加以评估。

[0093] 进展时间和无进展存活期。TTP和PFS已充当药物核准的主要终点。TTP定义为从随机化直至客观肿瘤进展的时间;TTP不包括死亡。PFS定义为从随机化直至客观肿瘤进展或死亡的时间。对肿瘤进展的准确定义是重要的,并且应在方案中仔细详述。

[0094] 如本文所用,术语“关联”或“与……相关联”和类似术语是指在两个事件的情况之间具有统计关联性,其中事件包括数目、数据集等。举例来说,当事件涉及数目时,正性相关(在本文中也称为“直接相关”)意指当一者增加时,另一者也增加。负性相关(在本文中也称为“逆相关”)意指当一者增加时,另一者降低。

[0095] “剂量单位”是指适合于待治疗的特定个体的呈单位剂量形式的物理离散单位。各单位可含有被计算来产生所需治疗作用的预定量的活性化合物以及所需药物载体。剂量单位形式的规格可由以下决定:(a) 活性化合物的独特特征和待实现的特定治疗作用,和(b) 混配所述活性化合物的领域中固有的限制。

[0096] “药学上可接受的赋形剂”意指适用于制备药物组合物的通常安全、无毒以及合乎需要的赋形剂,并且包括可为兽医学使用以及人药物使用所接受的赋形剂。所述赋形剂可为固体、液体、半固体,或在气雾剂组合物的情况下可为气体。

[0097] “药学上可接受的盐和酯”意指药学上可接受,并且具有所需药理学性质的盐和酯。所述盐包括当存在于化合物中的酸性质子能够与无机或有机碱反应时可形成的盐。适合无机盐包括与碱金属例如钠和钾、镁、钙和铝形成的那些。适合有机盐包括与有机碱,诸如胺碱,例如乙醇胺、二乙醇胺、三乙醇胺、缓血酸胺、N甲基葡糖胺等形成的那些。所述盐也包括与无机酸(例如盐酸和氢溴酸)和有机酸(例如乙酸、柠檬酸、顺丁烯二酸以及烷烃磺酸和芳烃磺酸诸如甲烷磺酸和苯磺酸)形成的酸加成盐。药学上可接受的酯包括由存在于化合物中的羧基、磺酰基氧基和膦酰氧基形成的酯,例如C₁₋₆烷基酯。当有两个酸性基团存在时,药学上可接受的盐或酯可为单酸-单盐或单酯或二盐或二酯;并且类似地,当有超过两个酸性基团存在时,一些或所有所述基团可被盐化或酯化。本发明中命名的化合物可以未盐化或未酯化形式,或以盐化和/或酯化形式存在,并且对所述化合物的命名意图包括原始(未盐化和未酯化)化合物与它的药学上可接受的盐和酯两者。此外,本发明中命名的某些化合物可以超过一种立体异构形式存在,并且对所述化合物的命名意图包括所有单一立体异构体和所述立体异构体的所有混合物(无论是外消旋混合物还是另外混合物)。

[0098] 术语“药学上可接受的”、“生理上可耐受的”及其语法变化形式在它们涉及组合物、载体、稀释剂和试剂时可互换使用,并且表示物质能够向人或对人施用,而不在将禁止施用组合物的程度上产生不合需要的生理作用。

[0099] “治疗有效量”意指在向受试者施用以治疗疾病时,足以实现对那个疾病的治疗的量。

[0100] 使用方法

[0101] 提供用于以某一方案治疗或减轻原发性或转移性癌症,具体来说包括EGFR表达性上皮癌,例如腺癌、结肠直肠癌;鳞状细胞癌;基底细胞癌;卵巢癌、胰腺癌、乳腺癌、NSCLC;EGFR表达性神经胶质瘤;等的方法,所述方案包括使所靶向细胞与(i) 阻断CD47活性的药

剂;和(ii)特异性结合EGFR的抗体的药剂的组合接触。所述方法包括向需要治疗的受试者施用治疗有效量或有效剂量的本发明的组合药剂,包括但不限于试剂与化学治疗药物、放射疗法或ESA的组合。

[0102] 本发明的组合药剂用于治疗癌症的有效剂量视许多不同因素而变化,所述因素包括施用手段、靶标部位、患者的生理状态、患者是人还是动物、施用的其他药物以及治疗是防治性的还是治疗性的。通常,患者是人,但也可治疗非人哺乳动物,例如伴侣动物诸如狗、猫、马等,实验室哺乳动物诸如兔、小鼠、大鼠等,诸如此类。可滴定治疗剂量以使安全性和功效最优化。

[0103] 在一些实施方案中,各药剂的治疗剂量可在约0.0001至100mg/kg,并且更通常0.01至5mg/kg宿主体重的范围内。举例来说,剂量可为1mg/kg体重,或10mg/kg体重,或在1-10mg/kg的范围内。示例性治疗方案需要每两周一次或一个月一次或每3至6个月一次进行施用。通常在多个时刻施用本发明的治疗实体。单次剂量之间的间隔可为每周、每月或每年。如通过测量患者中治疗实体的血液水平所指示,间隔也可为不定期的。或者,本发明的治疗实体可以持续释放制剂形式施用,在所述情况下,需要的施用频率较小。剂量和频率视多肽在患者中的半衰期而变化。

[0104] 在防治性应用中,可历经长久时期以相对不频繁间隔施用相对较低剂量。一些患者持续他们的剩余生命持续接受治疗。在其他治疗性应用中,有时需要以相对短暂间隔使用相对较高剂量直至疾病的进展得以降低或终止,并且优选地,直至患者显示疾病的症状的部分或完全改善。此后,可向患者施用防治性方案。

[0105] 在其他实施方案中,本发明的方法包括治疗、降低或预防包括癌瘤、神经胶质瘤等的癌的肿瘤生长、肿瘤转移或肿瘤侵袭。对于防治性应用,以足以消除或降低疾病风险、减轻疾病严重性或延迟疾病起始的量向易患疾病或另外处于疾病的风险下的患者施用药物组合物或药剂,所述疾病包括所述疾病的生物化学症状、组织学症状和/或行为症状、它的并发症和在所述疾病的发展期间呈现的中间病理性表型。

[0106] 用于治疗癌症的组合物可通过胃肠外、经局部、静脉内、肿瘤内、口服、皮下、动脉内、颅内、腹膜内、鼻内或肌肉内手段施用。典型施用途径是静脉内或肿瘤内,但其他途径可同等有效。

[0107] 通常,组合物被制备成呈液体溶液或混悬液形式的可注射剂;也可制备适于在注射之前溶解或混悬于液体媒介物中的固体形式。也可将制剂乳化或囊封在脂质体或微粒诸如聚丙交酯、聚乙交酯或共聚物中以达成增强的辅助作用,如上所讨论。Langer, Science 249:1527,1990以及Hanes,Advanced Drug Delivery Reviews 28:97-119,1997。本发明的药剂可以积存注射液或植入制剂形式施用,所述形式可以允许活性成分持续或脉冲释放的方式配制。药物组合物通常被配制成无菌大致上等张的药物组合物,并且完全符合美国食品与药物管理局的所有良好制造规范(GMP)规定。

[0108] 本文所述的组合药剂的毒性可通过标准药物程序在细胞培养物或实验动物中来测定,例如通过测定LD₅₀(对于群体的50%具有致死性的剂量)或LD₁₀₀(对于群体的100%具有致死性的剂量)。毒性作用与治疗作用之间的剂量比率是治疗指数。从这些细胞培养测定和动物研究获得的数据可用于配制对于在人中使用无毒的剂量范围。本文所述的蛋白质的剂量优选处于具有少许毒性或不具有毒性的包括有效剂量的循环浓度的范围内。

视采用的剂型和利用的施用途径而定,剂量可在这个范围内变化。确切制剂、施用途径和剂量可由个别医师鉴于患者的状况加以选择。

[0109] 视施用方法而定,药物组合物可以多种单位剂型施用。举例来说,适于口服施用的单位剂型包括但不限于粉末、片剂、丸剂、胶囊和糖锭。应认识到本发明的组合物在口服施用时应被保护免遭消化。这通常通过使分子与组合物复合以致使它们对酸性和酶促水解具有抗性,或通过将分子包装在具有适当抗性的载体诸如脂质体或保护屏障中来实现。保护药剂免遭消化的手段在本领域中是熟知的。

[0110] 用于施用的组合物将通常包含溶解于药学上可接受的载体(优选是水性载体)中的抗体或其他消除剂。可使用多种水性载体,例如缓冲盐水等。这些溶液是无菌的,并且通常不含不合需要的物质。这些组合物可通过常规熟知灭菌技术来灭菌。组合物可含有如为接近生理条件所需的药学上可接受的辅助物质,诸如pH调整剂和缓冲剂、毒性调整剂等,例如乙酸钠、氯化钠、氯化钾、氯化钙、乳酸钠等。这些制剂中的活性剂的浓度可广泛变化,并且将主要根据所选特定施用模式和患者的需要,基于流体体积、粘度、体重等来选择(例如Remington's Pharmaceutical Science(第15版,1980)以及Goodman和Gillman,The Pharmacological Basis of Therapeutics(Hardman等编,1996))。

[0111] 也在本发明的范围内的是包括本发明的组合物(例如抗EGFR抗体;抗CD47药剂及其制剂)和使用说明书的试剂盒。试剂盒可进一步含有至少一种额外试剂,例如化学治疗药物、ESA等。试剂盒通常包括指示试剂盒的内含物的预定用途的标签。术语标签包括在试剂盒上或与试剂盒一起提供,或另外伴随试剂盒的任何书面材料或记录材料。

[0112] 可施用组合物以达成治疗性治疗。如上所述以足以大致上消除所靶向细胞的量向患者施用组合物。足以达成这个作用的量定义为“治疗有效剂量”,其可提供总体存活率的改善。视如由患者所需以及所耐受的剂量和频率而定,可施用单次或多次组合物施药。为治疗所需的特定剂量将取决于哺乳动物的医学状况和历史,以及其他因素诸如年龄、重量、性别、施用途径、功效等。

[0113] 实验

[0114] 实施例1

[0115] 用组合CD47阻断和EGFR抗体治疗结肠直肠癌

[0116] 所有方法先前都已描述,所述参考文献以引用的方式明确并入本文:

[0117] • Dalerba, P., S.J. Dylla等(2007). "Phenotypic Characterization Of Human Colorectal Cancer Stem Cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(24):10158-10163.

[0118] • Weiskopf, K., A.M. Ring等(2013). "Engineered Sirp alpha Variants As Immunotherapeutic Adjuvants To Anticancer Antibodies." *Science* 341(6141):88-91.

[0119] • Willingham, S.B., J.P. Volkmer等(2012). "The Cd47-Signal Regulatory Protein Alpha (Sirpa) Interaction Is A Therapeutic Target For Human Solid Tumors." *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(17):6662-6667.

[0120] • Epigenetic and genetic features of 24 colon cancer cell lines, Ahmed等, *Oncogenesis*, 2013

[0121] 癌细胞。在补充有10%胎牛血清(Omega Scientific)、100U/mL青霉素和100μg/mL

链霉素(ThermoFisher S.)的RPMI(ThermoFisher S.) (DLD1)、EMEM(ThermoFisher S.) (CACO-2、LS174T)、McCoy's 5A(ThermoFisher S.) (HT29、HCT116)或Leibovitz's L-15(ThermoFisher S.) (SW48、SW 620)中培养DLD1细胞(ATCC)、HT29细胞(ATCC)、SW620细胞(ATCC)、SW48细胞(ATCC)、LS174T细胞(ATCC)、HCT116细胞(ATCC)和CACO-2细胞(ATCC)。通过使用被工程改造来表达eGFP-荧光素酶 2 (pg14)融合蛋白的pCDH-CMV-MCS-EF1 puro HIV基慢病毒载体(Systems Biosciences)进行转导来产生GFP-荧光素酶+DLD1细胞系。通过在FACS Aria II细胞分选仪(BD Biosciences)上针对GFP表达进行分选来产生稳定株系。UM8患者异种移植癌细胞(T3N0Mx乙状结肠腺癌)已从先前建立和表征这些癌细胞的P.Dalerba处获得(Dalerba, P., S.J. Dylla等(2007). "Phenotypic Characterization Of Human Colorectal Cancer Stem Cells." Proc Natl Acad Sci U S A 104(24):10158-10163)。在含有6 μ g/mL聚凝胺(polybrene)的培养基中,用慢病毒对肿瘤细胞进行过夜转导。次日,反复洗涤细胞以移除聚凝胺和细胞外慢病毒。稍后通过FACS从异种移植肿瘤分离经转导的(GFP+)细胞。

[0122] 体外吞噬测定。通过密度梯度离心来富集外周血液单核细胞,并且用抗CD14微珠粒(Miltenyi)纯化单核细胞以及通过在补充有10%AB-人血清(Invitrogen)和100U/mL青霉素和100 μ g/mL链霉素(Invitrogen)的IMDM+GlutaMax(Invitrogen)中培养7-10天来使其分化成巨噬细胞。通过以下方式进行吞噬测定:将50,000个巨噬细胞与100,000个GFP+肿瘤细胞共培养2小时,接着使用具有高通量进样器的LSR Fortessa细胞分析仪(BD Biosciences)进行分析。用于处理的抗体包括:IgG4同种型对照、抗CD47克隆Hu5F9-G4(Stanford)和抗EGFR西妥昔单抗(Bristol-Myers Squibb)。通过使用抗CD206抗体进行流式细胞术来鉴定巨噬细胞。通过用DAPI(Sigma)染色,从分析排除死细胞。将吞噬评估为GFP+巨噬细胞的百分比,并且相对于由各独立供体针对各细胞系达成的最大应答加以标准化。

[0123] 小鼠。使用6-8周龄NSG(NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wj1/SzJ)小鼠。这些小鼠的Stanford群体由购自Jackson Labs(储备号005557)的小鼠建立。

[0124] 体内成像。在IVIS Spectrum(Caliper Life Science)上进行生物发光成像,并且使用Living Image 4.0软件进行定量。通过将1g溶解于60mL PBS中制备D-虫荧光素(萤火虫)钾盐(Biosynth)溶液。用200 μ L虫荧光素溶液对小鼠进行腹膜内注射。在虫荧光素注射之后20分钟,从肿瘤植入的解剖区域获得总通量(光子数/秒)值。

[0125] 离体检测转移。通过用配备有DFC 500照相机(Leica)的M205 FA荧光解剖显微镜(Leica)检测肺和淋巴结中的GFP+癌细胞来观察向肺和淋巴结的转移。

[0126] 异种移植肿瘤模型。将50,000个GFP-荧光素酶+DLD1细胞或240,000个GFP-荧光素酶+UM8细胞与50%基质胶(BD)一起移植于NSG小鼠的背部上。在两个模型中,在通过生物发光成像确认肿瘤植入后开始治疗,并且如所指示继续。对于所有治疗,如下通过腹膜内注射(100 μ L)施用抗体:PBS和Hu5F9-G4(250 μ g),每隔一天;西妥昔单抗(120 μ g)和帕尼单抗(120 μ g),每周一次。通过生物发光成像监测肿瘤生长。对于DLD1模型,在完成指示的治疗时期之后,通过用荧光解剖显微镜检测肺和淋巴结中的GFP+癌细胞来分析小鼠中肺和淋巴结转移的存在。

[0127] 实施例2

[0128] 在实体肿瘤和晚期转移性结肠直肠癌患者中进行的Hu5F9-G4与西妥昔单抗组合的1b/2 期试验

[0129] CRC是美国癌症相关死亡的第三主要原因,其中20%的患者患有转移性疾病。在一线治疗失败之后,用于转移性CRC患者的治疗选项是有限的。因此,需要新型和有效的疗法。Hu5F9-G4是靶向在癌干细胞上表达的抗吞噬信号CD47的首创类单克隆抗体,其中抗肿瘤功效通过由巨噬细胞和T细胞诱导的消除使CRC和癌干细胞消减来实现。临床前研究已证明当Hu5F9-G4与临床核准的抗EGFR单克隆抗体西妥昔单抗组合时,具有显著的协同抗肿瘤作用。这个协同功效延伸至KRAS突变患者,所述KRAS突变患者占有CRC患者的多达40%,具有有限治疗选项,并且因此单一药剂西妥昔单抗由于缺乏抗肿瘤活性而未被FDA核准。因此,Hu5F9-G4可挽救以及增强西妥昔单抗在伴有高度未满足医学需要的这个群体中的活性。这些临床前数据形成在提出的1b/2期临床试验中测试临床抗肿瘤概念验证的基础,所述临床试验在为抗EGFR疗法所难治的复发/难治性KRAS突变转移性CRC和KRAS野生型转移性患者中进行。

[0130] 转移性结肠直肠癌是伴有高复发率和不良长期存活期的肿瘤。在KRAS野生型患者中,EGFR靶向抗体诸如西妥昔单抗和帕尼单抗已使预后显著改善。然而,占结肠直肠癌的约40-50%的具有KRAS突变的患者不对抗EGFR抗体疗法响应。因此,额外疗法为解决这个高度未满足医学需要所需。

[0131] Hu5F9-G4是一种靶向抗吞噬细胞表面蛋白CD47的单克隆抗体。临床前研究已证明通过这个抗体来阻断CD47信号传导会通过促进由巨噬细胞达成的吞噬作用来使包括结肠直肠癌的人肿瘤细胞消除。额外临床前研究证明抗CD47抗体可与包括西妥昔单抗和帕尼单抗的Fc受体活化性抗癌抗体协同。相较于任一单独药剂,用Hu5F9-G4和抗EGFR抗体进行的组合疗法已在RAS野生型体内模型与突变体内模型两者中均导致显著响应。

[0132] 测试Hu5F9-G4和西妥昔单抗的组合在实体肿瘤患者(包括结肠直肠癌)中的安全耐受性。1b/2期试验确定向晚期实体肿瘤患者和晚期转移性结肠直肠癌患者静脉内施用的Hu5F9-G4与西妥昔单抗组合的安全性和可耐受性以及最优给药策略。在试验的1b 期部分中,在所有参加者实体肿瘤群体中评估组合,强调的是治疗患有CRC、头颈癌、乳腺癌、胰腺癌和卵巢癌的患者。

[0133] 处于300mg/m²的起始西妥昔单抗剂量下继之以200mg/m²的每周剂量的患者分别从西妥昔单抗的完全单一药剂剂量降低25%和20%。Hu5F9-G4的初始剂量由1mg/kg 的引发剂量,继之以10mg/kg的每周维持剂量组成。在下一群组中,使西妥昔单抗逐步升高至400mg/m²的完全单一药剂剂量,继之以每周250mg/m²。后续剂量群组使Hu5F9-G4的剂量逐步升高至完全单一药剂剂量,包括组合中的负荷剂量策略。评估的最大剂量不超过各个别抗体的单一药剂推荐剂量和时程。在试验的2期部分中,在所选CRC患者群体中,以组合的推荐2期剂量探究初步抗肿瘤活性。

[0134] 关键纳入标准

[0135] 1. 成人≥18岁

[0136] 2. 组织学诊断

[0137] a. 仅1b期:组织学或细胞学确认晚期实体恶性肿瘤,着重是CRC、头颈癌、乳腺癌、胰腺癌和卵巢癌,已用至少一种先前全身性疗法方案治疗,或拒绝全身性疗法,以及对于

所述癌症无可治愈性疗法；

[0138] b. 2期RAS突变CRC:组织学确认晚期/转移性RAS突变CRC,已进展或对于基于伊立替康的化学疗法与基于奥沙利铂(oxaliplatin)的化学疗法两者来说不合格,或

[0139] c. 2期RAS野生型CRC:组织学确认晚期/转移性RAS野生型CRC,已进展或对于基于伊立替康的化学疗法与基于奥沙利铂的化学疗法两者来说不合格,以及处于复发的情况下或为包括抗EGFR抗体诸如西妥昔单抗、帕尼单抗或其他抗体的至少1种先前全身性疗法所难治

[0140] 3. ECOG评分0-2

[0141] 4. 对于仅2期部分:根据RECIST 1.1可测量或可评估疾病响应

[0142] 5. 实验室测量,血细胞计数:

[0143] 血红蛋白 ≥ 9.5 g/dL

[0144] ANC $\geq 1.0 \times 10^9$ /mL

[0145] 血小板 $\geq 75 \times 10^9$ /mL

[0146] 6. 实验室测量,肝功能:

[0147] AST/ALT ≤ 5 X ULN

[0148] 胆红素 ≤ 1.5 X ULN,或如果患者具有吉尔伯特氏综合征(Gilbert's syndrome)或遗传等状况的记载历史,那么胆红素 ≤ 3.0 X ULN且主要未偶联

[0149] 7. 实验室测量,肾功能:

[0150] 血清肌酐 ≤ 1.5 X ULN,或如果升高,那么计算GFR ≤ 40 mL/min/1.73m²

[0151] 8. 对于具有分娩能力的妇女,在施用Hu5F9-G4之前30天内尿或血清妊娠测试呈阴性

[0152] 9. 具有分娩能力的女性必须愿意在研究期间使用2种有效避孕方法,并且在末次剂量的研究药物之后持续6个月

[0153] 10. 男性必须愿意在研究期间使用1种高度有效避孕方法,并且如果伴侣是具有分娩能力的女性,那么在末次剂量的研究药物之后持续6个月

[0154] 11. 受试者已提供知情同意书

[0155] 12. 必须愿意和能够遵循研究方案中概述的临床诊视和程序

[0156] 13. 仅2期:愿意同意进行1次强制治疗前和1次治疗时肿瘤活检,除非由研究者确定为不可行(原因包括但不限于缺乏活检可及的肿瘤组织以及患者安全性问题)

[0157] 排除标准

[0158] 1. 患者具有活动性脑转移(患者具有稳定经治疗CNS病变,停用皮质类固醇和放射疗法至少3周不被视为具有活动性)

[0159] 2. 在Hu5F9-G4给药之前在2周内或在至少4个半衰期(直至最多4周)内(以更长久的时间为准)使用先前抗癌疗法,包括化学疗法、激素疗法或探究性药剂。采用局部非CNS放射疗法,预先存在用LHRH激动剂进行的激素疗法,采用低剂量类固醇(口服泼尼松(prednisone)或等效物 \leq 每天20mg),而用双膦酸盐(bisphosphonate)和RANKL抑制剂治疗不是排除标准。

[0160] 3. 先前用CD47或SIRP α 靶向剂治疗

[0161] 4. 已知活动性或慢性乙型或丙型肝炎感染或HIV

[0162] 5. RBC输注依赖性, 定义为在第一剂量的Hu5F9-G4之前在4周时期期间需要超过2个单位的RBC输注。在筛选期间以及在招募以满足血红蛋白纳入标准之前允许进行RBC输注。

[0163] 6. 具有在过去3个月内的溶血性贫血或埃文斯综合征 (Evans syndrome) 的历史

[0164] 7. 仅2期: 第二恶性肿瘤, 例外之处是经治疗的基底细胞或局部鳞状皮肤癌, 或治疗在至少3年前完成以及不存在复发迹象的其他恶性肿瘤

[0165] 8. 如由研究者和发起者所评估的将使参与研究的风险/益处比率实质上增加的重大医学疾病或病状。这包括但不限于在过去6个月内的急性心肌梗塞、不稳定绞痛、不受控制的糖尿病、重大活动性感染、重度免疫损害状态和NYHA II-IV类充血性心脏衰竭

[0166] 9. 具有可能干扰遵循方案要求或给出知情同意书的能力的精神病或物质滥用的历史

[0167] 10. 妊娠或处于进行中的哺乳

[0168] 11. 直接抗球蛋白测试 (DAT) 呈阳性

[0169] 测定Hu5F9-G4与西妥昔单抗组合在患有RAS突变和RAS野生型CRC的患者中的客观响应率 (ORR)。次要目标包括评估Hu5F9-G4与西妥昔单抗组合的药物动力学 (PK) 概况。在2期中, 评估用Hu5F9-G4与西妥昔单抗组合治疗的患有RAS突变和RAS野生型CRC的患者的次要功效参数, 诸如响应持续时间 (DOR)、无进展存活期 (PFS)、肿瘤进展时间和总体存活期。

[0170] 评估Hu5F9-G4与西妥昔单抗组合的药效学 (PD) 标志和预测性标志, 包括免疫细胞子组频率和肿瘤渗透。评估在CRC的各种分子亚型中的功效。

[0171] Hu5F9-G4是一种针对CD47的人源化单克隆抗体, 并且西妥昔单抗是一种针对EGFR的嵌合单克隆抗体。两种药物均在静脉内施用。在第1循环中, 在第1天施用引发剂量的Hu5F9, 接着每周施用西妥昔单抗和Hu5F9, 其中各循环是28天。在第1循环中, 在第8天施用第一负荷剂量的西妥昔单抗, 继之以在第9天施用第一维持剂量的Hu5F9-G4, 但在第15天开始, 组合的所有后续剂量都在同一天施用。在同时施用的那些天, 在施用Hu5F9-G4之前首先输注西妥昔单抗。这个时程在下表中说明:

剂量 群组	药物/剂量 (IV)	给药时程 (每28天循环的时日)	
		第1循环	第2+循环
1	Hu5F9-G4 1 mg/kg (引发)	第1天	—
	Hu5F9-G4 10 mg/kg (维持)	第9、15、22天	第1、8、15、22天
	西妥昔单抗 300 mg/m ² (负荷)	第8天	
	西妥昔单抗 200 mg/m ² (维持)	第15、22天	第1、8、15、22天
2	Hu5F9-G4 1 mg/kg (引发)	第1天	—
	Hu5F9-G4 10 mg/kg (维持)	第9、15、22天	第1、8、15、22天
	西妥昔单抗 400 mg/m ² (负荷)	第8天	
	西妥昔单抗 250 mg/m ² (维持)	第15、22天	第1、8、15、22天
3	Hu5F9-G4 1 mg/kg (引发)	第1天	—
	Hu5F9-G4 20 mg/kg (维持)	第9、15、22天	第1、8、15、22天
	西妥昔单抗 400 mg/m ² (负荷)	第8天	
	西妥昔单抗 250 mg/m ² (维持)	第15、22天	第1、8、15、22天
4 ^a	Hu5F9-G4 1 mg/kg (引发)	第1天	—
	Hu5F9-G4 20 mg/kg (负荷)	第9和11天	—
	Hu5F9-G4 10-20 mg/kg (维持)	第15、22天	第1、8、15、22天
	西妥昔单抗 400 mg/m ² (负荷)	第8天	—
	西妥昔单抗 250 mg/m ² (维持)	第15、22天	第1、8、15、22天

[0172]

[0173] a如果由CTSC视为必要,那么可增加潜在负荷剂量群组。

[0174] 对于研究的A部分,用Hu5F9-G4和西妥昔单抗治疗患者8周。用于确定MTD的 DLT安全性评估将在前4周内进行。将每2个循环进行响应评估(根据经修改RECIST 准则)。将从治疗开始直至疾病进展,每两个循环进行响应评估。

[0175] 2期包括两个组,一个包括患有RAS突变CRC的患者,并且另一个包括患有RAS 野生型CRC的患者。对于西蒙(Simon)两阶段设计的第一阶段,将患者治疗8周,接着评估响应率。根据经修改的RECIST 1.1准则测定客观响应率(ORR)(CR+PR)。将从治疗开始直至疾病进展,每两个循环进行响应评估。2期中招募最多88名患者(每个组44名患者)。2期的样本大小基于对各群组的西蒙氏两阶段极小极大设计,对于各群组,基于5%响应率的虚无假设相较于15%的备择假设,使用0.10的单侧 α 水平和0.80的功效(power)。

[0176] 1b期总体:15至24名患者。2期:总体多达88名患者(各群组中44名)在各群组中:西蒙两阶段设计,阶段1=29名患者;阶段2=15名额外患者。

[0177] 本说明书中引用的各出版物据此出于所有目的以引用的方式整体并入本文。

[0178] 应了解本发明不限于描述的特定方法、方案、细胞系、动物物种或属类以及试剂,因为所述各物可变化。也应了解本文所用的术语仅出于描述特定实施方案的目的,并且不意图限制本发明的将仅由随附权利要求限制的范围。

[0179] 除非上下文另外明确规定,否则如本文所用,单数形式“一个(种)”和“这个(种)”包括复数个(种)指示物。因此,举例来说,提及“一个(种)细胞”包括复数个(种)所述细胞,并且提及“这个(种)培养物”包括提及一个(种)或多个(种)培养物及其为本领域技术人员

所知的等效物,等。除非另外明确指示,否则本文所用的所有技术和 科学术语都具有与为本发明所属领域中的普通技术人员通常理解相同的含义。

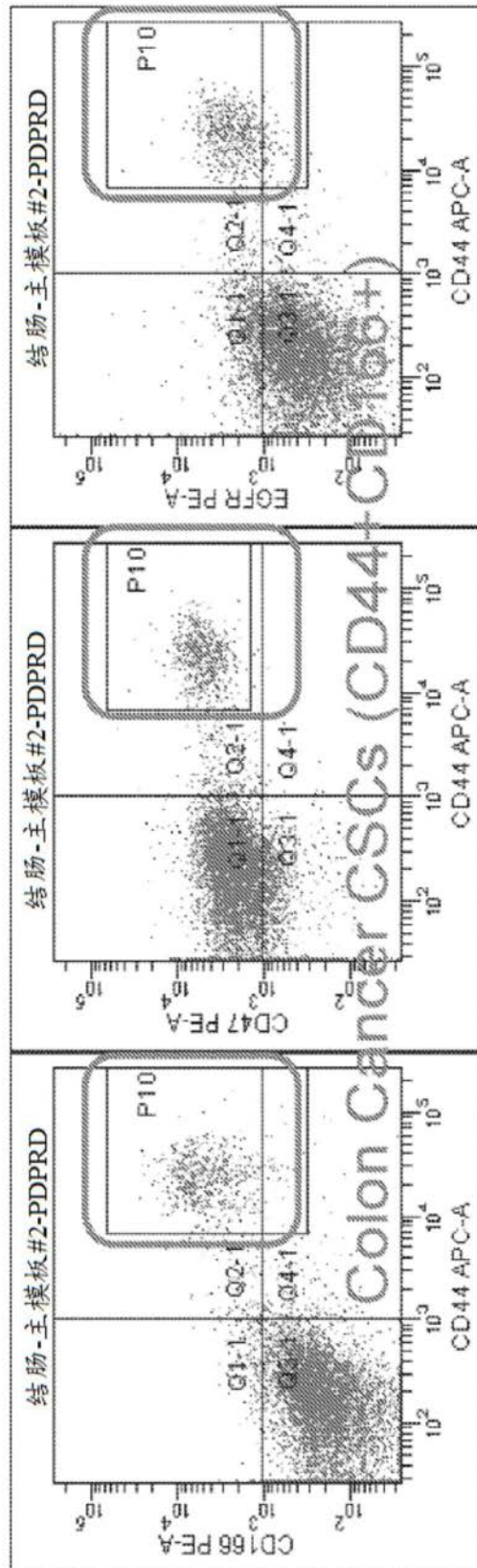


图1

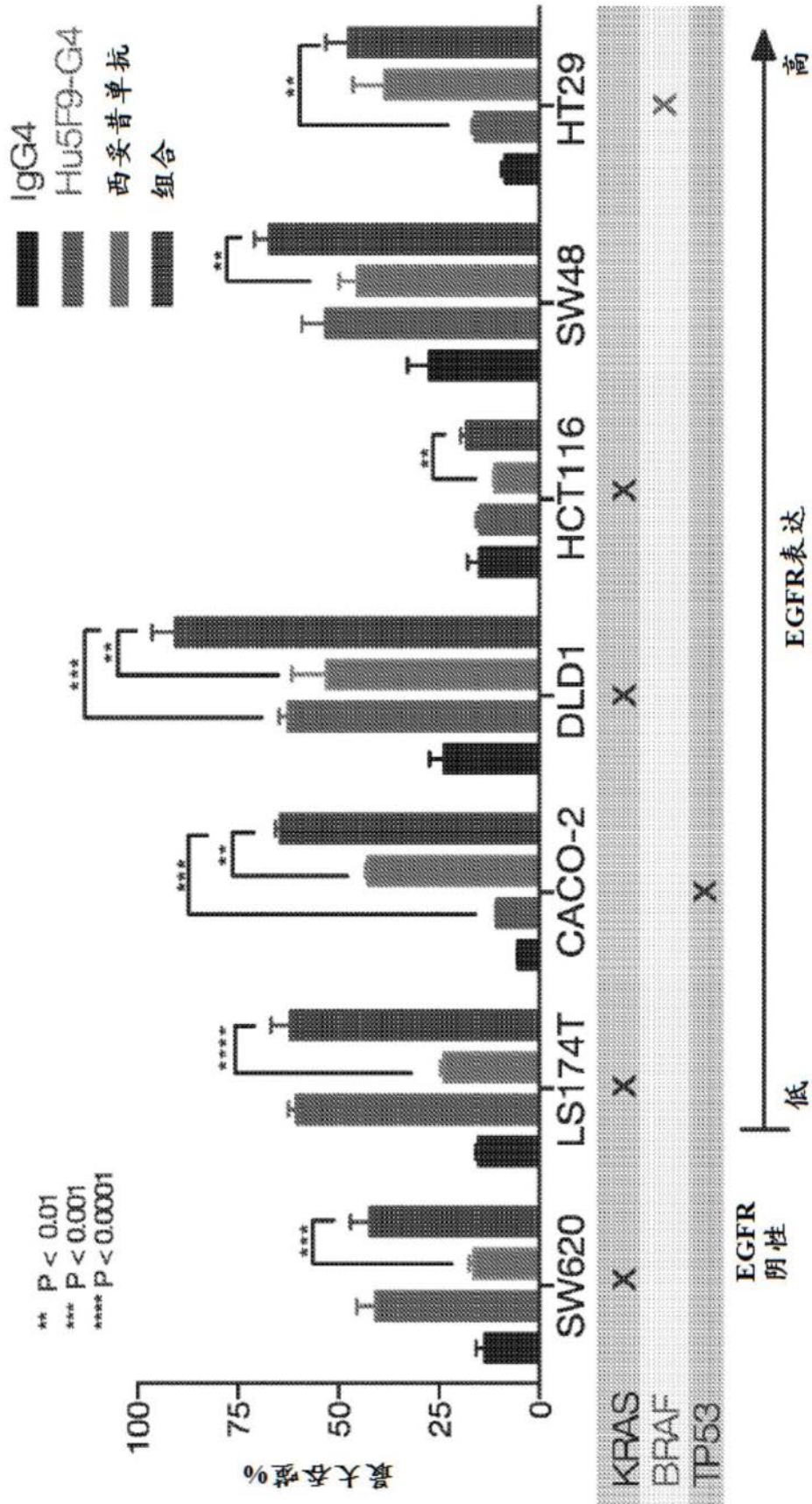


图2

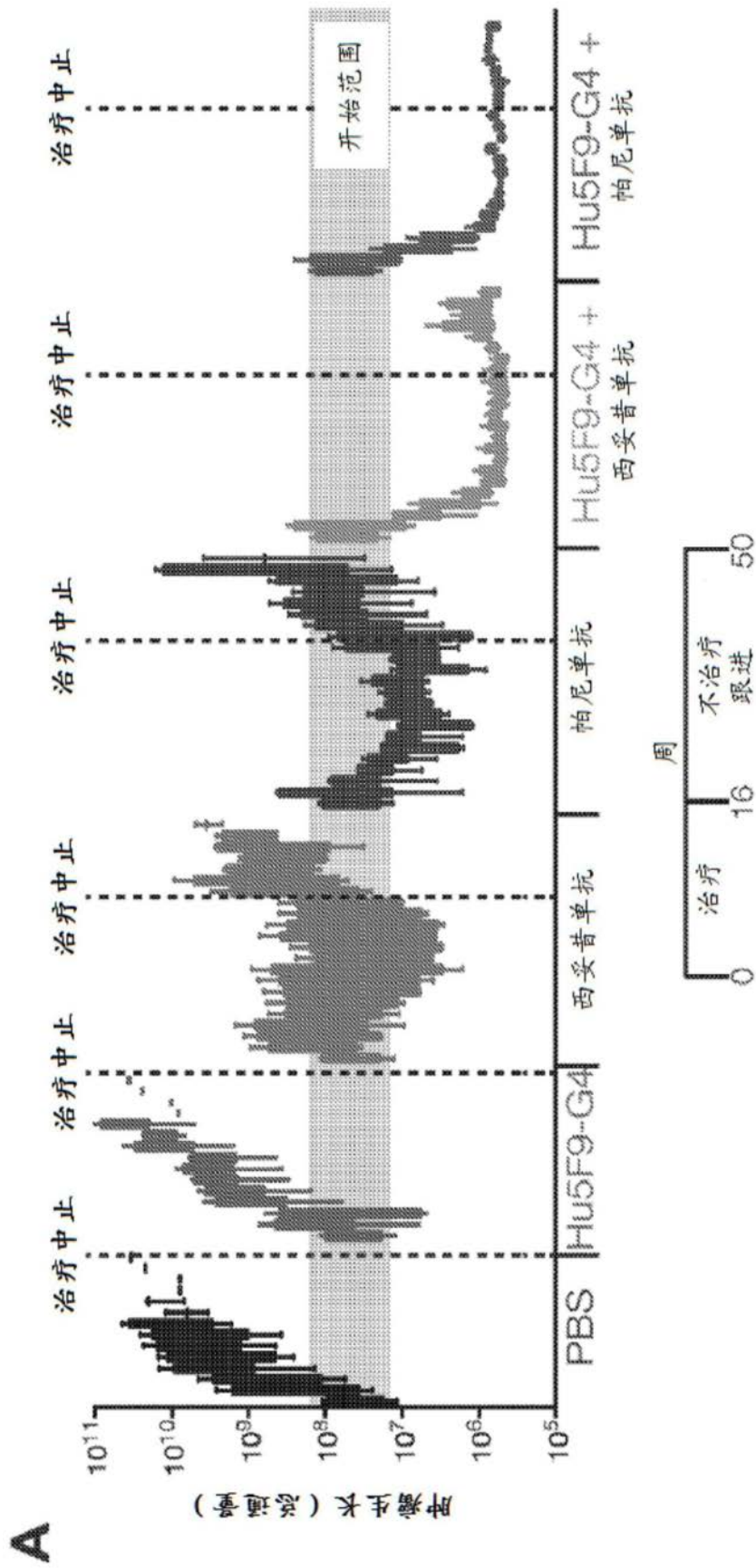


图3

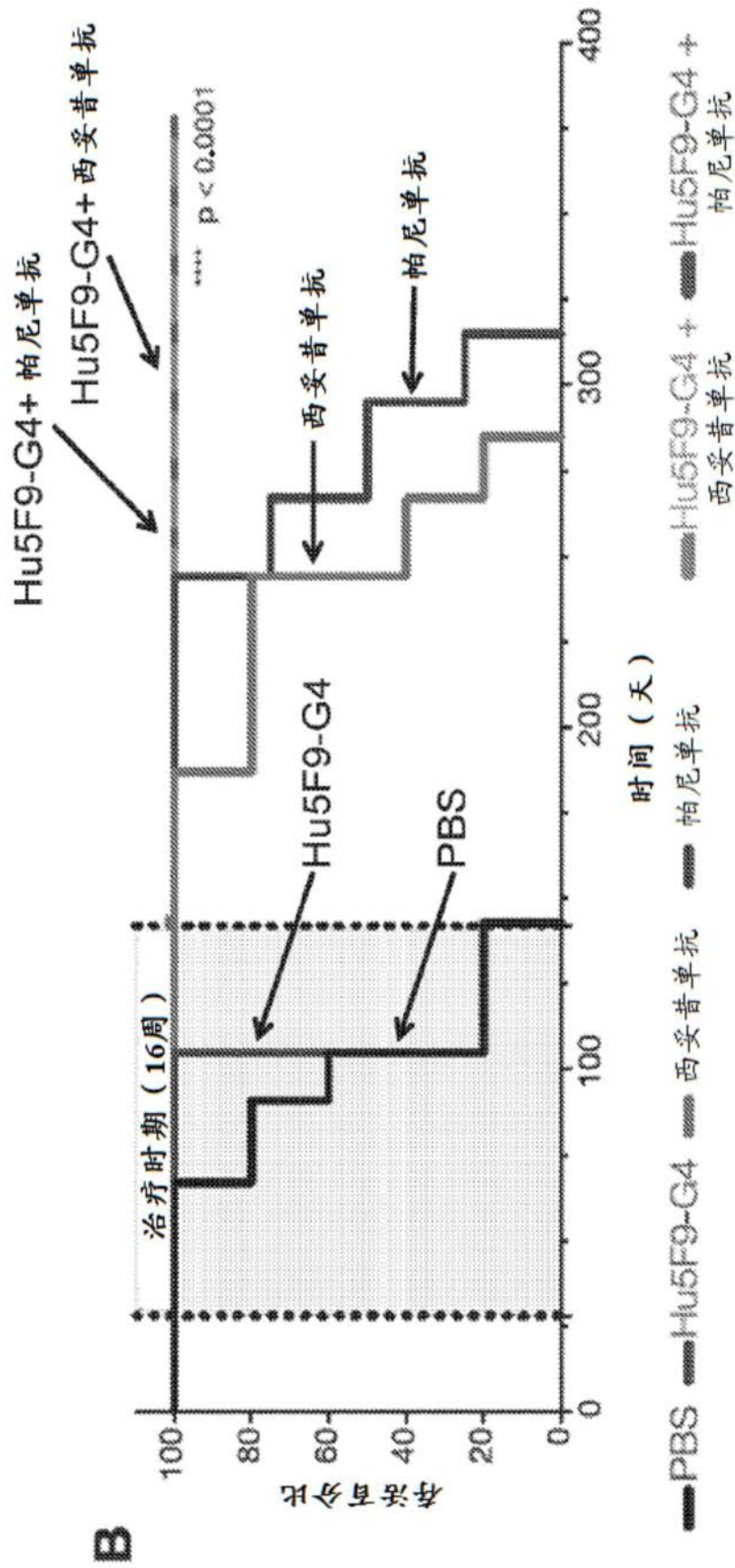


图3(续)

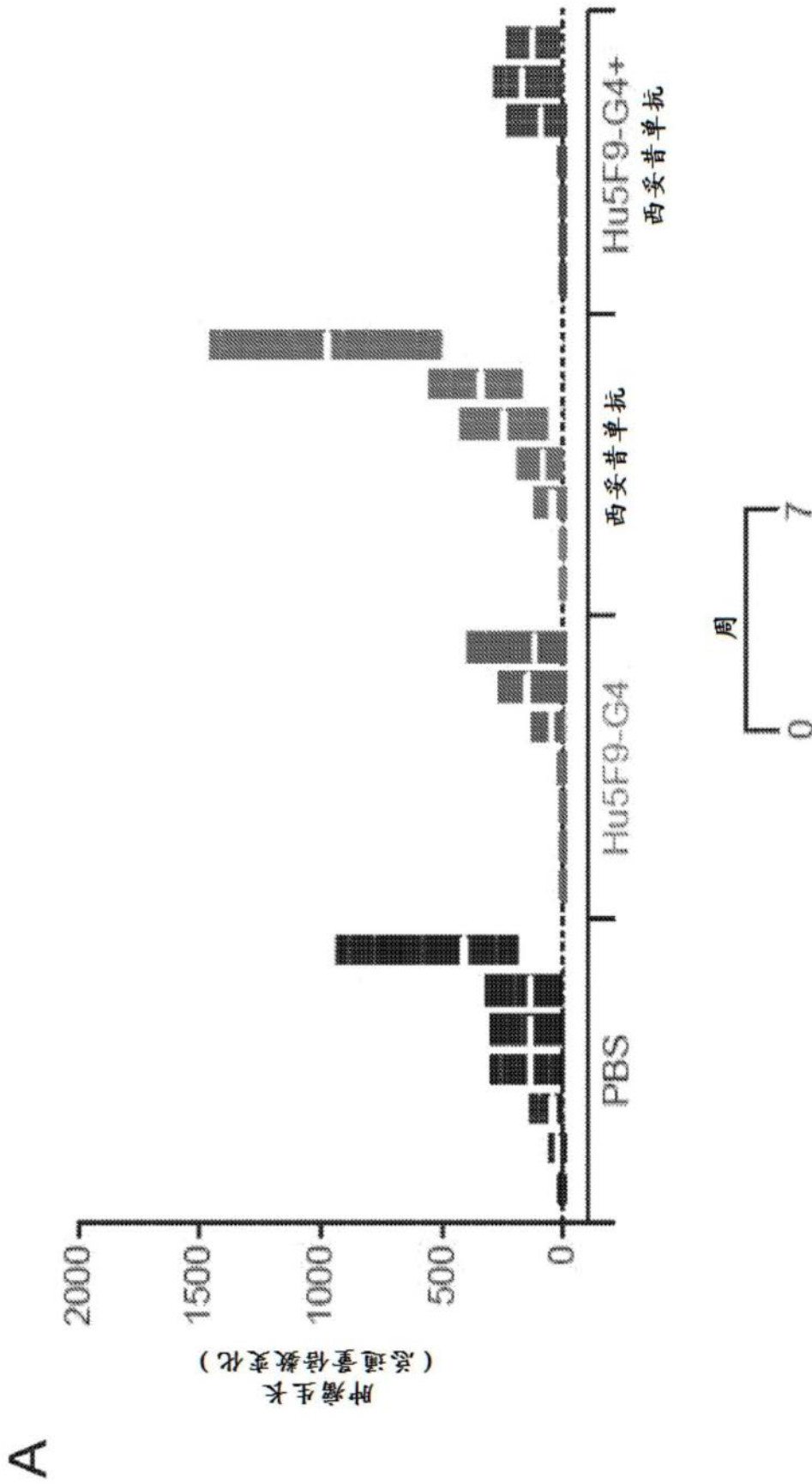


图4

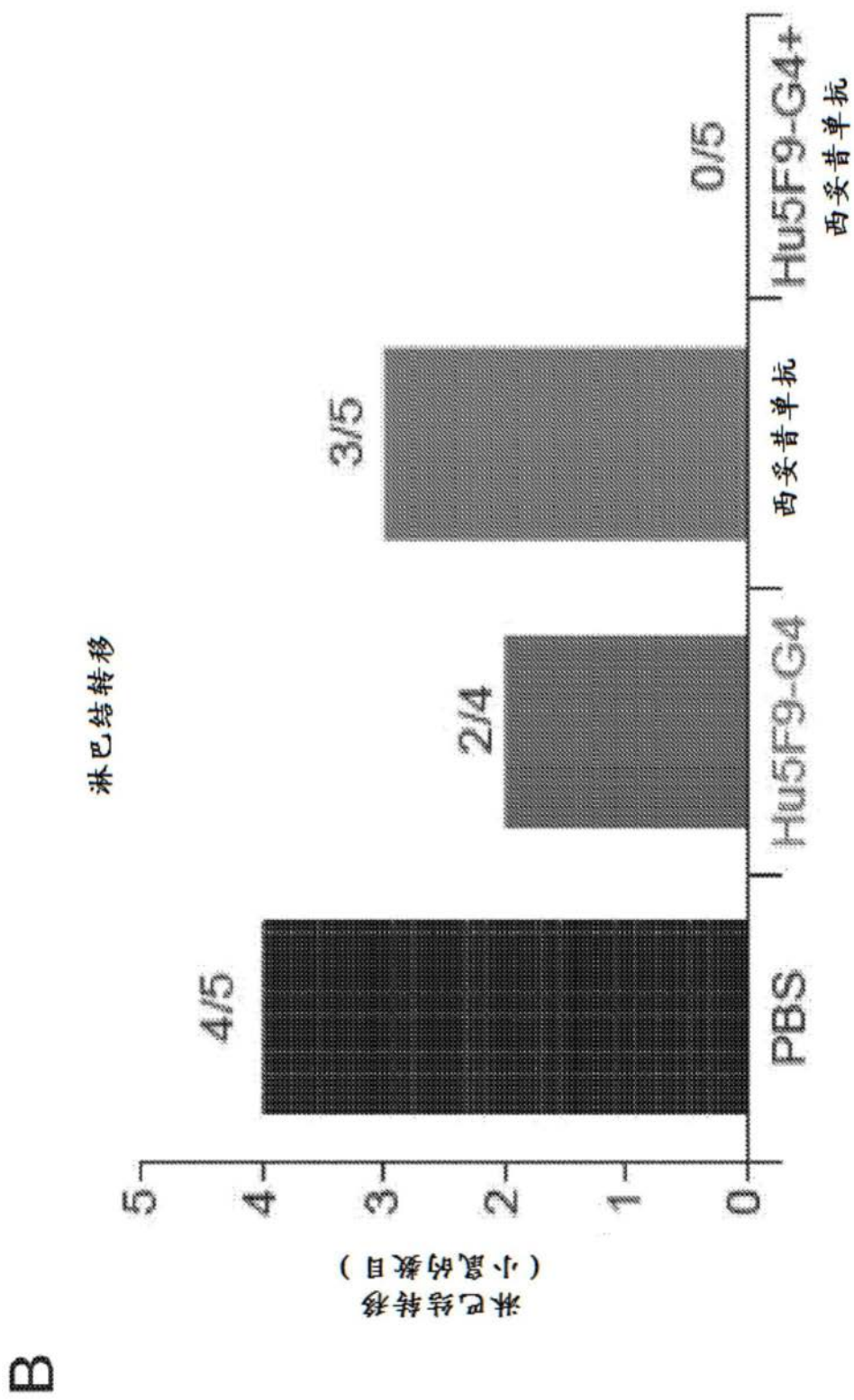


图4(续)

C

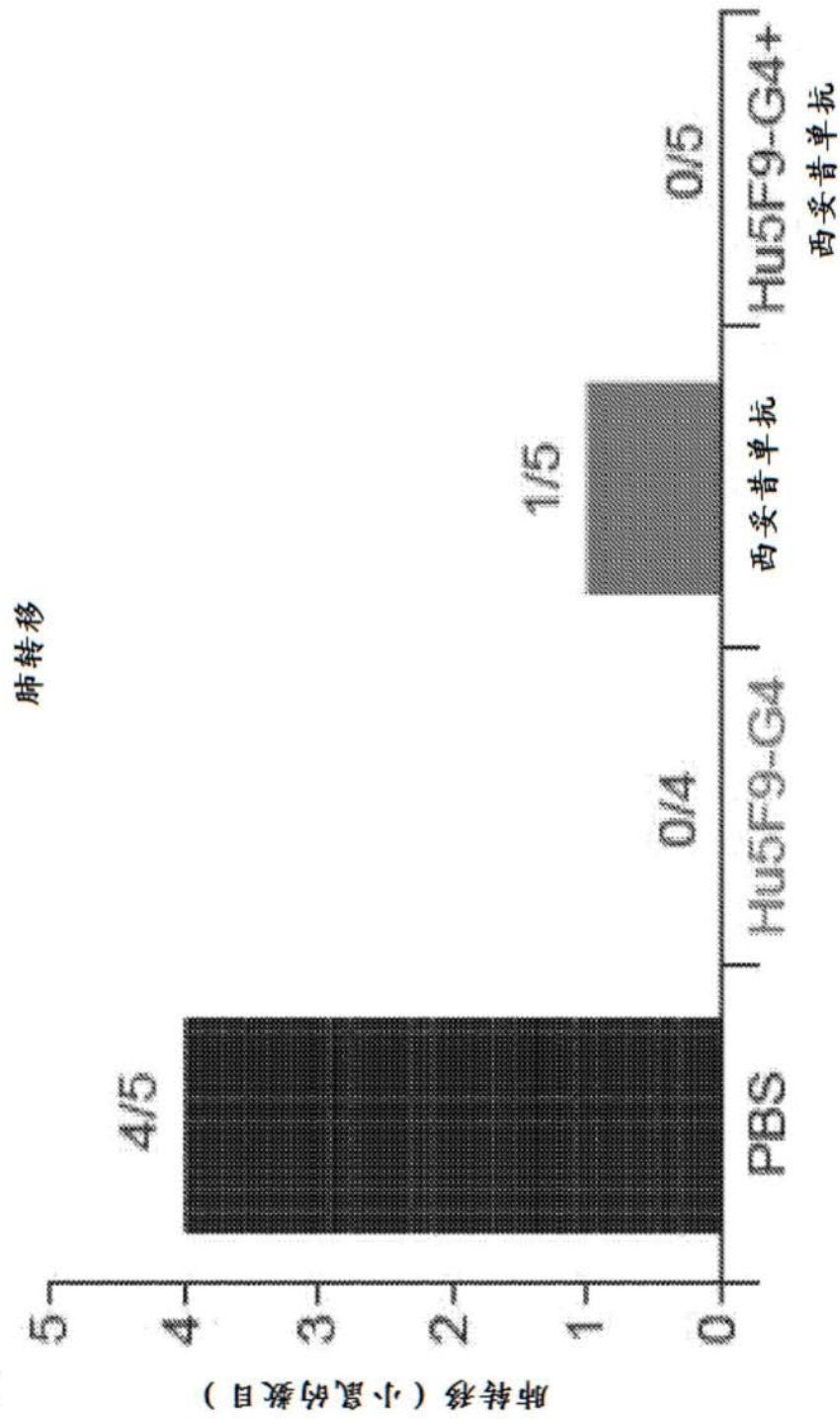
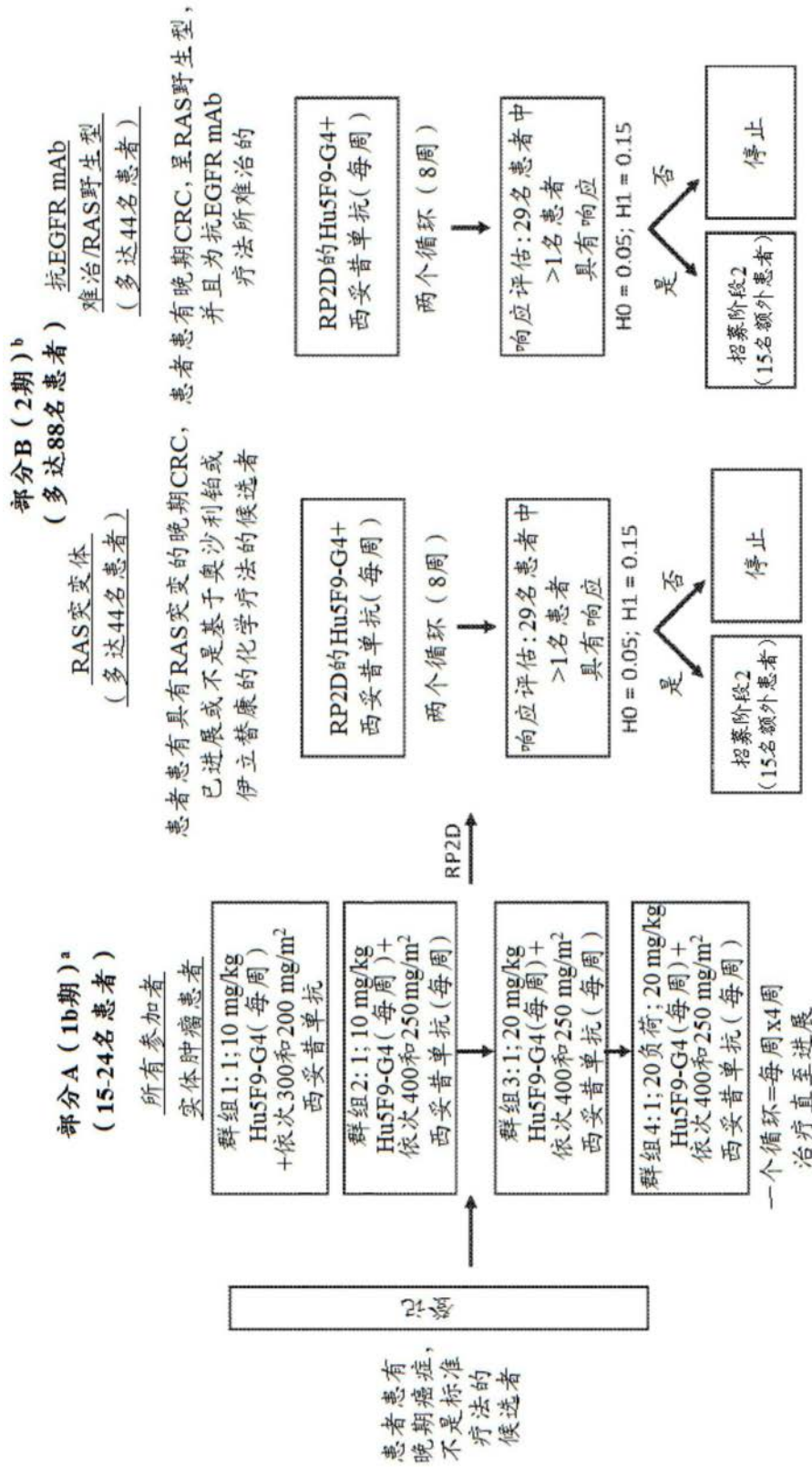


图4 (续)



^a 3+3剂量逐步升高设计

^b 西蒙两阶段设计, 采用 $\alpha=0.10$ 和功效=0.80

图5