

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷
A61K 39/395



[12] 发 明 专 利 说 明 书

[21] ZL 专利号 00810321.6

[45] 授权公告日 2005 年 5 月 11 日

[11] 授权公告号 CN 1200734C

[22] 申请日 2000.5.1 [21] 申请号 00810321.6

[30] 优先权

[32] 1999. 5. 14 [33] US [31] 09/312,284

[32] 1999. 8. 13 [33] US [31] 09/374,028

[86] 国际申请 PCT/US2000/011756 2000.5.1

[87] 国际公布 WO2000/069459 英 2000.11.23

[85] 进入国家阶段日期 2002.1.14

[71] 专利权人 伊姆克罗尼系统公司

地址 美国纽约

[72] 发明人 H·W·瓦克萨尔

审查员 孙大龙

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 罗 宏 钟守期

权利要求书 3 页 说明书 16 页

[54] 发明名称 用表皮生长因子拮抗物治疗顽固性
的人肿瘤

[57] 摘要

一种抑制病人顽固性肿瘤生长的方法, 该顽固性肿瘤能被一种表皮生长因子的配体所刺激, 包括用有效剂量的表皮生长因子受体的拮抗物治疗病人。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 有效量的表皮生长因子 (EGFR) 拮抗物在制备施用于人以抑制顽固性肿瘤生长的药物中的用途, 该顽固性肿瘤在所述人中不能用抗肿瘤剂进行治疗或对所述治疗有抗性, 其中拮抗物是 EGFR 的特异性抗体或其功能等价物。

2. 有效量的 EGFR 拮抗物和化学治疗剂的组合在制备施用于人以抑制顽固性肿瘤生长的药物中的用途, 该顽固性肿瘤在所述人中不能用抗肿瘤剂进行治疗或对所述治疗有抗性, 其中拮抗物是 EGFR 的特异性抗体或其功能等价物。

3. 有效量的 EGFR 拮抗物和放射的组合在制备施用于人以抑制顽固性肿瘤生长的药物中的用途, 该顽固性肿瘤在所述人中不能用抗肿瘤剂进行治疗或对所述治疗有抗性, 其中拮抗物是 EGFR 的特异性抗体或其功能等价物。

4. 权利要求 1-3 任一项的用途, 其中顽固性肿瘤过量表达 EGFR。

5. 权利要求 1-4 任一项的用途, 其中顽固性肿瘤是乳房、心脏、肺、小肠、结肠、脾、肾、膀胱、头颈部、卵巢、前列腺、脑、胰、皮肤、骨、骨髓、血、胸腺、子宫、睾丸、宫颈或肝的顽固性肿瘤。

6. 权利要求 1-5 任一项的用途, 其中顽固性肿瘤是结肠或头颈部顽固性肿瘤。

7. 权利要求 1-5 任一项的用途, 其中顽固性肿瘤是顽固性鳞状细胞肿瘤。

8. 权利要求 1-7 任一项的用途, 其中 EGFR 拮抗物是静脉内给药。

9. 权利要求 2-8 任一项的用途, 其中 EGFR 拮抗物在化学治疗剂给药之前给药。

10. 权利要求 1-9 任一项的用途, 其中 EGFR 拮抗物以每周约 10 到约 500 mg/m^2 的剂量给药。

11. 权利要求 1-10 任一项的用途, 其中 EGFR 拮抗物抑制 EGFR 配体对其的刺激。

12. 权利要求 11 的用途, 其中 EGFR 拮抗物抑制 EGFR 对其配体的结合。

13. 权利要求 11 或 12 的用途, 其中 EGFR 拮抗物与 EGFR 外部

结合。

14. 权利要求 11-13 任一项的用途，其中 EGFR 拮抗物抑制 EGFR 磷酸化。

5 15. 权利要求 11-14 任一项的用途，其中 EGFR 拮抗物抑制 EGFR 酪氨酸激酶活性。

16. 权利要求 1-15 任一项的用途，其中抗体包括人抗体的恒定区。

17. 权利要求 16 的用途，其中抗体是包括鼠抗体可变区的嵌合抗体。

10 18. 权利要求 16 的用途，其中抗体是包括具有鼠抗体互补决定区 (CDR) 和人抗体框架区的可变区的人源化抗体。

19. 权利要求 16 的用途，其中抗体是包括人抗体可变区的人抗体。

20. 权利要求 1-19 任一项的用途，其中抗体以足以饱和 EGFR 的剂量给药。

21. 权利要求 2 或 4-20 任一项的用途，其中用途还包括给予放射。

15 22. 权利要求 3-20 任一项的用途，其中用途还包括给予化学治疗剂。

23. 权利要求 2 或 22 任一项的用途，其中用途化学治疗剂包括氮磷汀、顺式铂氨、达卡巴嗪、放线菌素 D、氮芥、链佐星、环磷酰胺、卡莫司丁、洛莫司丁、多柔比星、多柔比星脂、吉西他滨、柔红霉素、
20 丙卡巴腓、丝裂霉素、阿糖胞苷、依托泊苷、甲氧蝶呤、5-氟尿嘧啶、长春花碱、长春新碱、博来霉素、紫杉醇、多西塔可塞尔、阿地白介素、天冬酰胺酶、白消安、卡铂、克拉屈滨、喜树碱、CPT-11、10-羟基-7-乙基-喜树碱 (SN38)、达卡巴嗪、氟尿苷、氟达拉滨、羟基脲、异环磷酰胺、伊达比星、美司钠、 α 干扰素、 β 干扰素、伊立替康、
25 米托蒽酮、托普替康、亮脯利得、甲地孕酮、美法仑、巯基嘌呤、普卡霉素、米托坦、培门冬酶、喷司他丁、派泊溴烷、普卡霉素、链佐星、他莫昔芬、替尼泊苷、鞣内酯、硫鸟嘌呤、塞替派、尿嘧啶氮芥、长春瑞滨、苯丁酸氮芥或其组合。

24. 权利要求 2 或 22 任一项的用途，其中化学治疗剂包括顺式铂氨、柔红霉素、紫杉醇、伊立替康 (CPT-11)、托普替康或其组合。
30

25. 权利要求 2 或 22-24 任一项的用途，其中化学治疗剂以每周约 69 到约 125 mg/m² 的剂量给药。

26. 权利要求 21-25 任一项的用途，其中放射源对病人是内部的。
27. 权利要求 21-25 任一项的用途，其中放射源对病人是外部的。
28. 权利要求 26 或 27 任一项的用途，其中放射量是约 2 到约 80 Gy.
- 5 29. 权利要求 1-28 任一项的用途，其中用途还包括给药佐剂。
30. 有效量的 EGFR 特异性嵌合抗体和顺式铂氨在制备施用于人以抑制头颈部顽固性鳞状细胞肿瘤生长的药物中的用途，该顽固性肿瘤在所述人中不能用抗肿瘤剂进行治疗或对所述治疗有抗性，其中拮抗物是 EGFR 的特异性抗体或其功能等价物。
- 10 31. 有效量的 EGFR 特异性嵌合抗体和伊立替康（CPT-11）在制备施用于人以抑制顽固性结肠肿瘤生长的药物中的用途，该顽固性肿瘤在所述人中不能用抗肿瘤剂进行治疗或对所述治疗有抗性，其中拮抗物是 EGFR 的特异性抗体或其功能等价物。

用表皮生长因子拮抗物治疗顽固性的人肿瘤

发明背景

5 在美国，癌症是仅次于心脏病的第二大主要死亡因素。治疗这种致命性疾病的新疗法已取得了重大进展。很多进展是由于对细胞包括正常细胞和癌细胞的增殖有了更好地了解。

正常细胞的增殖是通过各自的配体严格激活其生长因子受体来控制的。这类受体的实例是生长因子受体酪氨酸激酶。

10 癌细胞也是在生长因子受体的激活下增殖的，但失去了正常增殖的严格控制。这种失控可能是由很多因素引起，诸如生长因子的过度表达和/或生长因子受体的过度表达，以及由生长因子调控的生化途径的自发性激活。

一些参与致瘤的受体是表皮生长因子受体 (EGFR)、来源于血小板的生长因子受体 (PDGFR)、类胰岛素生长因子受体 (IGFR)、神经生长因子受体 (NGFR) 和成纤维生长因子受体 (FGF)。

表皮生长因子 (EGF) 受体家族的成员是都非常重要的生长因子受体酪氨酸激酶，它们与表皮细胞的致瘤有关。已发现的该家族第一个成员是表观分子量约 165kD 的糖蛋白。该糖蛋白已由 Mendelsohn
20 等在美国专利 4, 943, 533 中描述，是已知的表皮生长因子受体 (EGFR)，也称为人表皮生长因子受体-1 (HER1)。

在很多类型的拟表皮瘤细胞中都过度表达 EGFR。EGF 和 α 转化生长因子 (TGF- α) 是两个已知的 EGFR 配体。表达 EGF 受体的肿瘤包括恶性胶质瘤，还有肺癌、乳房癌、头颈部癌和膀胱癌。EGF 受体在肿瘤细胞膜上的过度表达和/或增殖是与坏的预后相联系的。
25

传统的癌症治疗包括化学治疗和放射治疗。一些化学治疗剂的实例包括多柔比星、顺式铂氨和紫杉醇。放射既可以是外部的光束，也可以是植入病人体内的放射源，即近程放射治疗。

举例来说，美国专利 4, 943, 533 中描述了一个叫 225 的鼠单克隆
30 抗体，它结合到 EGF 受体上。该专利转让给加利福尼亚大学，并许可 ImClone Systems Incorporated 公司专营。255 抗体能抑制在离体培养中表达 EGFR 的肿瘤系生长，当这些肿瘤作为异种移植在无胸腺鼠

时, 255 抗体也能抑制其活体生长。参见 Masui 等 *Cancer Res.*, 44, 5592-5598 (1986)。

在人治疗上使用鼠单克隆抗体的缺点是由于有鼠 Ig 序列, 因此存在人对抗鼠抗体 (HAMA) 反应的可能性。使用人抗体的恒定区完全替代鼠 (或其它非人哺乳动物) 抗体的恒定区, 可使这个缺点最小化。通常把用人抗体的恒定区序列替代鼠抗体的恒定区称作嵌合化。

通过使用人抗体的构架可变区替代鼠抗体的构架可变区也能非常有效地实现嵌合化。构架可变区是抗体的变异区而不是高变区。高变区也被认为是互补决定区 (CDRs)。

通常把人序列取代恒定区和构架可变区称为人源化。由于更多的鼠序列被人序列取代, 人源化的抗体就具有较小的免疫原性 (即引起较小的 HAMA 反应)。不幸的是随着更多的鼠抗体区域被人序列取代, 增加了成本和工作量。

用人恒定区取代非人恒定区不象预期那样影响抗体的活性。举例来说, Prewett 等报道, 把非常完善的前列腺肿瘤异体移植在鼠内, 用前面讨论过的抗-RGFR 255 单克隆抗体的嵌合型抑制了肿瘤的增大。这种嵌合型称为 c255。参见 *Journal of Immunotherapy* 19, 419-427 (1997)。

另一种减少抗体免疫原性的方法是使用抗体片段。举例来说, 在 Aboud-Pirak 等的论文中, *Journal of the National Cancer Institute* 80, 1605-1611 (1998), 比较了一种叫 108.4 的抗-EGF 受体抗体与抗体片段的抗肿瘤效果。肿瘤模式是基于 KB 细胞, 异体移植在无胸腺鼠内。KB 细胞来源于人口腔拟表皮癌, 它表达高水平的 EGF 受体。

Aboud-Pirak 等发现抗体和二价体 $F(ab')_2$ 片段都能延缓活体肿瘤的生长, 然而 $F(ab')_2$ 片段的效果较小。虽然单价 Fab 片段结合有关细胞受体的能力是恒定不变的, 但是它不能延缓肿瘤生长。

人们已经尝试了结合前面所述的数种技术来改进癌症的治疗。举例来说, Basega 等在 *Journal of the National Cancer Institute* 85, 1327-1333 (1993) 中报道了化学治疗剂多柔比星与抗-EGFR 单克隆抗体联合的抗肿瘤效果。

其它尝试是试图通过放射与辅药联合来增加癌细胞对放射的敏

感性。举例来说, Bonnen 在美国专利 4, 846, 782 中报道, 当放射与干扰素相结合时, 增加了人癌症对放射的敏感性。Snelling 等报道, 把抗-EGFR 单克隆抗体用碘-125 放射性标记, 放射与该抗体相结合, 在二期临床试验中, 放射治疗病人整形术位点的星形细胞瘤, 效果有
5 一点改进。参见 Hybridoma 14, 111-114 (1995)。

类似地, Balaban 等报道, 在放射处理前, 先给予一个叫 LA22 的抗-EGFR 抗体, 抗-EGFR 单克隆抗体能使异体移植在鼠内的人鳞状瘤对放射变得敏感。参见 Biochimica et Biophysica Acta 1314, 147-156 (1996)。Saleh 等也报道, 当强化放射治疗时, 用抗-EGFR
10 单克隆抗体, 离体的和鼠内的肿瘤得到了较好地控制。Saleh 等得出结论: “进一步的研究...可能导致新的联合用药程式 RT/Mab 疗法。”参见 the Proceedings of the American Association for Cancer Research 37, 612 (1996) 中的第 4179 摘要。

尽管前面描述了战胜癌症的疗法, 但没有一个疗法是专一性地直
15 接针对传统的化学治疗和放射治疗难以治疗的肿瘤。顽固性肿瘤导致疾病的迅速发展, 经常伴随坏的预后。目前在治疗传统疗法难以治疗的人类肿瘤方面几乎没有什么进展。

综上所述, 需要一个治疗顽固性人类肿瘤的改进方法。

发明概述

20 显然, 对在本领域具有一般知识的人而言, 本目标和其它目标可以通过建立一种抑制顽固性肿瘤生长的方法达到, 在病人中这类顽固性肿瘤能被表皮生长因子受体 (EGFR) 所刺激。本方法包括使用有效剂量的 EGFR/HER1 拮抗物治疗病人。

在另一个实施方案中, 本发明的方法包括使用有效剂量的
25 EGFR/HER1 拮抗物和化学治疗剂联合来治疗病人。

在再一个实施方案中, 本发明的方法包括使用有效剂量的 EGFR/HER1 拮抗物和放射联合来治疗病人。

发明详述

30 本发明提供了一种治疗顽固性肿瘤的改进方法, 特别是顽固性的恶性肿瘤, 其病人患有顽固性癌症。

顽固性肿瘤

顽固性肿瘤包括这些肿瘤, 仅抗化学治疗剂治疗的肿瘤、仅抗放

射治疗的肿瘤，或抗化学治疗剂和放射联合治疗的肿瘤，或化学治疗、放射治疗和化学与放射联合治疗失败的肿瘤。在本说明书中，顽固性肿瘤也包括这些肿瘤，它们虽然表现出能被化学治疗剂和/或放射治疗所抑制，但在中断治疗后，长达5年，有时10年或更长时间内后复发的肿瘤。

根据本发明，治疗顽固性肿瘤的类型是能被EGFR配体所刺激的任何顽固性肿瘤。一些刺激EGFR配体的实例包括EGF和TGF- α 。

受体EGFR家族包括EGFR，在文献中也被称为HER1。在本说明书中，EGFR指受体EGFR家族的特殊成员，叫做EGFR/HER1。

10 本发明可以治疗的难治肿瘤是内生肿瘤，对病人来说是固有的。这些肿瘤比外部的、异体移植在动物中的人类肿瘤更加难治。实例参见Prewett等，Journal of Immunotherapy 19, 419-427 (1997)。

一些顽固性肿瘤的实例包括癌、神经胶质瘤、肉瘤、腺癌、腺肉瘤和腺瘤。这类肿瘤实质上在人体的所有部位都能发生，包括每个器官。举例来说，肿瘤可以存在于乳房、心脏、肺、小肠、结肠、脾、15 肾、膀胱、头颈部、卵巢、前列腺、脑、胰、皮、骨、骨髓、血、胸腺、子宫、睾丸、宫颈和肝中。

肿瘤可能在正常水平上表达EGFR或在不同水平上过度表达EGFR，例如至少是正常水平的10100或1000倍。一些过度表达EGFR的肿瘤包括乳房、肺、结肠、肾、膀胱、头颈部，特别是头颈部、卵巢、前列腺和脑的鳞状细胞癌。

EGFR/HER1拮抗物

在本发明中，顽固性肿瘤能被一种EGFR/HER1拮抗物治疗。就本发明而言，EGFR/HER1拮抗物是任何一种物质，它能抑制EGFR/HER1配体对EGFR/HER1的刺激作用。抑制这种刺激作用就抑制了表达EGFR/HER1细胞的生长。

充分地抑制病人顽固性肿瘤的生长，就阻止或减弱癌症的发展（即，生长、侵染力、转移和或复发）。本发明的EGFR拮抗物是细胞抑制剂或抑制顽固性肿瘤的生长。选优地，EGFR拮抗物是溶解细胞的或破坏肿瘤。

就象本发明开始所述，没有暗示出特殊的抑制机理。然而EGFR酪氨酸激酶通常被磷酸化过程所激活。相应地，在本发明中，磷酸化

测定在预测有效的拮抗物上是有用的。一些有用的 EGFR 酪氨酸激酶活性测定方法已由 Panek 等在 *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 283, 1433-1444 (1997) 和 Batley 等在 *Life Sciences* 62, 143-150 (1998) 中描述了。这些测定方法在此引入作为参考。

EGFR/HER1 拮抗物包括生物分子或小分子。生物分子包括所有的分子量大于 450 的脂类、单糖聚体、氨基酸和核苷酸。举例来说, 这样的生物分子包括寡糖和多糖; 寡肽、多肽、肽和蛋白质; 寡核苷酸和多核苷酸。举例来说, 寡核苷酸和多核苷酸包括 DNA 和 RNA。

生物分子进一步包括上述任何分子的衍生物。举例来说, 生物分子的衍生物包括寡肽、多肽、肽和蛋白质的脂类衍生物和糖基化衍生物。生物分子的衍生物还包括寡糖和多糖的脂类衍生物, 例如, 脂多糖类。最典型地, 生物分子是抗体或抗体的功能等同物。

抗体的功能等同物具有可比于抗体的结合特性和抑制 EGFR 表达细胞的生长。举例来说, 这些功能等同物包括嵌合的、人源化的和单链抗体及其片段。

抗体的功能等同物也包括多肽, 其氨基酸序列和本发明抗体的可变区或高变区基本上相同。一个氨基酸序列与另一个序列基本上相同, 但通过一个或多个取代、添加和/或删除, 使这个序列不同于所称另一个的序列, 这个氨基酸序列被认为是一个等同序列。优选地, 低于 50%, 更优选地, 低于 25%, 仍然更优选地低于 10% 的氨基酸残基数目从蛋白质序列中被取代、添加或删除。

抗体的功能等同物优选地是嵌合化的或人源化的抗体。嵌合化的抗体包括非人抗体的可变区和人抗体的恒定区。人源化的抗体包括非人抗体的高变区 (CDRs)。可变区不是高变区, 例如人源化抗体的可变区和恒定区是人抗体的构架可变区和恒定区。

就本发明而言, 适宜的非人抗体可变区和高变区来源于任何非人动物产生的抗体, 该非人动物用于生产单克隆抗体。举例来说, 除了人, 适宜的动物实例包括兔、大鼠、小鼠、马、山羊或灵长类。小鼠为优选。

功能等同物还包括抗体的片段, 它具有与全抗体相同或可比于全抗体的结合特性。适宜的抗体片段包括任何片段, 它包括足够的高变

(即互补决定)区部分,能特异性地结合和充分地亲和 EGFR 酪氨酸激酶,从而抑制表达这类受体的细胞生长。

举例来说,这类片段含有一个或两个 Fab 片段或 F(ab')₂ 片段。尽管含有少于 6 个片段的功能片段也包括在内,例如 3 个、4 个或 5 个 CDRs,优选地抗体片段含有全抗体的所有 6 个互补决定区。

优选的片段是单链抗体,或 Fv 片段。单链抗体是多肽,至少包括抗体重链的可变区,它和轻链的可变区相连接,有或没有相互连接的接头。这样,Fv 片段包括全抗体的结合点。这些链可以是在细菌或真核细胞中生产。

10 抗体和功能等同物可以是任何免疫球蛋白族的成员,例如,IgG,IgM,IgA,IgD 或 IgE 及其亚族成员。优选的抗体是 IgG1 亚族的成员。功能等同物也可以是上述族和亚族组合的等同物。

通过本领域内熟知的方法,用期望的受体来制备抗体。受体既可以通过购买商业上已有的,也可以采用熟知的方法分离得到。举例来说,15 分离和纯化 EGFR 的方法在 Spada 的美国专利 5,646,153 中找到,开始于第 41 段 55 行。Spada 专利中描述的分离和纯化 EGFR 方法在此引入作为参考。

制备单克隆抗体的方法包括免疫学的方法,由 Kohler 和 Milstein 在 Nature 256, 495-597(1975)中所描述,和 Campbel 20 (1989)在“单克隆抗体技术,啮齿类与人杂交瘤的制备及其特征”中描述,该文收入在 Burdon 等编著的生物化学与分子生物学实验技术 13 卷中,由 Elsevier 科学出版商在阿姆斯特丹出版(1985)。由 Huse 等在 Science 246, 1275-1281 (1989)中所描述的重组 DNA 的方法也是适用的。

25 简而言之,为了生产单克隆抗体,用前面所述的受体或受体片段接种宿主动物,然后任选地加强宿主动物对抗原的反应性。要得到有用的单克隆抗体,受体片段必须包括足够的氨基酸残基来限定被检测分子的表位。如果片段太短以致于难以免疫原性的,那么它可以混合到载体分子上。一些合适的载体分子包括匙孔血蓝蛋白和牛血清蛋白。30 混合物可以用本领域中已知的方法制备。一种方法是把片段的半胱氨酸残基与载体分子的半胱氨酸残基结合在一起。

在最后一次加强抗原反应性后的几天内,采集接种动物的脾。把

脾细胞的悬浮液与一个肿瘤细胞融合，在培养中，分离、生长和保持表达该抗体的杂交瘤细胞。

有用的单克隆抗体和生长因子受体酪氨酸激酶也能商购，如加利福尼亚的 Upstate Biotechnology, Santa Cruz Biotechnology of
5 Santa Cruz; 肯塔基的 Transduction Laboratories of Lexington; 明尼苏达州的 R&D Systems Inc of Minneapolis 和加利福尼亚的 Dako Corporation of Carpinteria.

制备嵌合化和人源化抗体的方法在领域也是已知的。举例来说，制备嵌合化抗体的方法包括 Boss(Celltech)和 Cabilly(Genentech)
10 在美国专利中所描述的方法。分别参见美国专利 4,816,397 和 4,816,567。举例来说，制备人源化抗体的方法在 Winter 的美国专利 5,225,539 中已描述。

抗体的人源化优选方法叫做 CDR-移植 (CDR-grafting)。在 CDR-移植中，把鼠抗体的直接抗原结合区，互补决定区或 CDRs，移植到人
15 可变区，产生“重构人”可变区。把这些全人源化的可变区连接到人恒定区，就产生了完整的全人源化的抗体。

为了制备与抗原能很好结合的全人源化抗体，谨慎设计重构人可变区是有帮助的。应该谨慎选择要移植入 CDRs 的人可变区，而且通常必须在人可变区的构架区 (FRs) 内的关键位点，改变几个氨基酸残
20 基。

举例来说，重构人可变区包括在选定人轻链可变区的 FRs 有多达 10 个氨基酸残基的变化，和在选定人重链可变区的 FRs 有多达 12 个氨基酸残基的变化。这些重构人轻链和重链可变区基因的 DNA 序列连接到编码人轻链和重链恒定区基因的 DNA 序列上，优选地分别是 $\gamma 1$
25 和 κ 。然后在哺乳动物细胞中表达重构人源化的抗体，它对靶点的亲和性可比于相应的鼠抗体和嵌合抗体。

选择取代人源化抗体残基的方法和进行取代的方法在本领域是熟知的。举例来说，参见以下文章，Co 等 Nature 351, 501-502 (1992); Queen 等 Proc. Natl. Acad. Sci. 86, 10029-1003 (1989) 和
30 Rodrigues 等 Int. J. Cancer, 增刊 7, 45-50 (1992)。另一种制备人源化和新型 255 抗-EGFR 单克隆抗体的方法在 Goldstein 等的 PCT 专利 WO 96/40210 已描述。该方法可用来人源化和新型化抗其它生长

因子受体酪氨酸激酶的抗体。

制备单链抗体的方法在本领域也是已知的。一些适当的实例包括 Wels 等在欧洲专利 502 812 和 Int. J. Cancer 60, 137-144 (1995) 中已描述的方法。

- 5 在以下专利中公开了制备前面所述的功能等同物的其它方法：
PCT 申请 WO 93/21319, 欧洲专利申请 239 400, PCT 申请 WO 89/09622, 欧洲专利申请 338 745, 美国专利 5,658,570, 美国专利 5,693,780 以及欧洲专利申请 EP 332 424。

- 10 优选的 EGFR 抗体是嵌合化的、人源化的单链抗体，来源于一个
叫 255 的鼠抗体，该抗体已在美国专利 4,943,533 中描述。该专利转
让给加利福尼亚大学，并为 ImClone Systems Incorporated 公司专
营。

- 15 255 抗体能抑制离体培养的 EGFR/HER1 表达的肿瘤细胞的生长，
也能抑制异体移植在无胸腺鼠中活体培养的 EGFR/HER1 表达的肿瘤细
胞的生长。参见 Masui 等 Cancer Res. 44, 5592-5598 (1986)。更
最新的一个治疗进展是，255 与多柔比星或顺式铂氨联合，对在小鼠
中已建立的几个人异体移植模型的治疗表现出协同作用。Basalga 等
J. Natl. Cancer Inst. 85, 1327-1333 (1993)。

- 20 在本发明的一个实施方案中，患有顽固性头颈部鳞状细胞瘤的病
人，用一种 EGFR/HER1 的拮抗物（嵌合抗-EGFR 单克隆抗体，C255）
和顺式铂氨联合来治疗，EGFR/HER1 拮抗物抑制了顽固性肿瘤的生
长。然而仅用放射治疗、仅用化学治疗或放射与化学治疗联合治疗这
些病人都失败了。

- 25 来源于鼠抗体 225 的嵌合化的、人源化的单链抗体能用 255 抗体
制备，它可从 ATCC 中得到。另一种方法，制备嵌合化的、人源化的
单链 255 抗体的不同片段，是根据 Wels 等在 Int. J. Cancer 60,
137-144 (1995) 中所提供的序列来合成。嵌合化的 225 抗体(c225)
可根据前面所描述的方法来制备。人源化的 225 抗体可根据 PCT 申请
WO 96/40201 实施例 4 中所描述的方法来制备，在此引入作为参考。
30 单链 225 抗体(Fv225)可根据 Wels 等在 Int. J. Cancer 60, 137-144
(1995) 中所描述的方法和欧洲专利申请 502 812 中所描述的方法来制
备。

轻链和重链高变 (CDR) 区序列复制如下。氨基酸序列在核苷酸序列的下面。

¹重链高变区 (VH):

AACTATGGTGTACAC (SEQ ID 1)

N Y G V H (SEQ ID 2)

CDR2

GTGATATGGAGTGGTGGAAACACAGACTATAATACACCTTTCACATCC

(SEQ ID 3)

V I W S G G N T D Y N T P F T S (SEQ ID 4)

CDR3

GCCCTCACCTACTATGATTACGAGTTTGCTTAC (SEQ ID 5)

A L T Y Y D Y E F A Y (SEQ ID 6)

轻链高变区 (VL)

CDR1

AGGGCCAGTCAGAGTATTGGCACAAACATACAC (SEQ ID 7)

R A S Q S I G T N I H (SEQ ID 8)

CDR2

GCTTCTGAGTCTATCTCT (SEQ ID 9)

A S E S I S (SEQ ID 10)

CDR3

CAACAAAATAATAACTGGCCAACCACG (SEQ ID 11)

Q Q N N N W P T T (SEQ ID 12)

5

除了前面讨论过的生物分子外，在本发明中有用的拮抗物也可以是小分子。在本说明书中，不是生物分子的任何分子被认为是小分子。一些小分子的实例包括有机化合物、有机金属化合物、有机和有机金属化合物盐、糖、氨基酸和核苷酸。小分子进一步包括，除了它们的分子量不大于 450 之外，也被认为是生物分子的分子。这样小分子可以是脂类、寡糖、寡肽和寡核苷酸及其它们的衍生物，其分子是 450 或低于 450。

10

需要强调的是小分子可以有任意分子量。它们仅被称为小分子，

是因为它们具有典型的低于 450 的分子量。小分子包括自然界中发现的化合物和合成的化合物。优选地，小分子抑制表达 EGFR/HER1 酪氨酸激酶的顽固性肿瘤细胞的生长。

很多小分子被描述为抑制 EGFR 是有效的。举例来说，Spada 等的
5 美国专利 5,656,655，公开了苯乙烯基取代杂芳香基化合物，抑制 EGFR。杂芳香基组是具有 1 或 2 个杂原子的单环或具有 1-4 个杂原子的 2 环化合物，该化合物被任意取代或多取代。公开于美国专利 5,656,655 的化合物在此引入作为参考。

Spada 等在美国专利 5,646,153 中公开了双单环和/或二环芳香
10 基的杂芳香基、碳环和杂碳环化合物抑制 EGFR。公开于美国专利 5,646,153 的化合物在此引入作为参考。

Bridges 等在美国专利 5,679,683 中公开了三环嘧啶化合物抑制 EGFR。从第 3 栏 35 行到第 5 栏 6 行描述了稠杂环嘧啶衍生物。这些化合物的描述在此引入作为参考。

15 Barker 在美国专利 5,616,582 中公开了喹唑啉衍生物具有受体酪氨酸激酶抑制的活性。公开于美国专利 5,616,582 的化合物在此引入作为参考。

Fry 等在 Science 265, 1093-1095 (1994) 中公开了一种具有抑制 EGFR 结构的化合物。其结构图 1 所示，该化合物在此引入作为参
20 考。

Osherov 等公开了酪氨酸磷酸化抑制剂抑制 EGFR/HER1 和 HER2。在 Osherov 等人的论文中公开的化合物，特别是在表 1、表 2、表 3 和表 4 中的化合物在此引入作为参考。

Levitzki 等在美国专利 5,196,446 公开了杂芳香基乙烯炔或杂
25 芳香基乙烯炔芳香基化合物抑制 EGFR。这些化合物公开在美国专利 5,196,446 的第 2 栏 42 行到第 3 栏 40 行，在此引入作为参考。

Panek 等在 Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 283, 1433-1444 (1997) 中公开了一种被鉴定为 PD166285 的化合物，它抑制 EGFR、PDGFR 和 FGFR 受体家族。PD166285
30 被定为是 6-(2,6-二氯苯基)-2-(-4-(2-二乙氨基乙氧基)苯氨基)-8-甲基-8 氢-吡啶(2,3-d)嘧啶-7-酮，具有图 1 中所示的结构，图 1 在 1436 页。在 Panek 等论文的 1436 页所示图 1 的化合物在此引

入作为参考。

EGFR/HER1 拮抗物的给药

5 本发明包括给病人给药有效剂量的 EGFR/HER1 拮抗物。可以用不同的方法给药 EGFR/HER1 拮抗物，包括系统的非肠道和肠道途径。举例来说，本发明的 EGFR/HER1 拮抗物容易通过静脉给药（如静脉注射），这是优选的给药途径。静脉给药时，可以按照本领域的技术员所理解的那样，把 EGFR/HER1 拮抗物与一种适当的药物携带者（载体）或赋形剂结合在一起。EGFR/HER1 拮抗物还可以通过辅药一起给药，举例来说，诸如 DCG、免疫系统刺激剂和化学治疗剂。

10 如果 EGFR/HER1 拮抗物是小分子或生物药，可以按 Spada 在美国专利 5,646,153 的第 57 栏 47 行至第 59 栏 67 行中的描述来给药。给药小分子的描述在此引入作为参考。

15 本发明的 EGFR/HER1 拮抗物，按有效剂给病人量给药时，显著地抑制了顽固性肿瘤细胞的生长。给药时，有效剂量是指该剂量能有效的达到抑制顽固性肿瘤生长的特定结果。

优选地，EGFR/HER1 拮抗物的给药剂量，是抑制肿瘤生长而对正常组织的生长没有干扰的剂量。最优选地，EGFR/HER1 拮抗物的剂量是抑制肿瘤生长而没有严重的副作用。一些严重的副作用包括骨髓抑制、贫血和感染。

20 如果 EGFR/HER1 拮抗物是抗体和抗体的功能等同物，其最佳剂量由医师根据很多因素来确定，举例来说，这些因素包括年龄、性别、体重、给药条件的严格程度、给药的抗体及其给药的方法。一般地，取能使靶受体饱和的多肽和抗体的血清浓度。举例来说，在正常情况下，超过大约 0.1 nM 浓度是就足够了。再举例来说，C225 的剂量为 25 100 mg/m² 时，可使大约 20 nM 的血清浓度维持大约 8 天。

作用一种常规原则，抗体的剂量可以是每周 10-300 mg/m²。如果用相同剂量的抗体片段，应该以更频繁的次数给药，以便保持血清水平过量于液体饱和的浓度。

联合治疗

30 在一个优选的实施例中，有效剂量的 EGFR/HER1 拮抗物与化学治疗剂、放射联合或与化学治疗剂和放射的组合物联合治疗顽固性肿瘤。

化学治疗剂或化学治疗的实例包括烷化剂，例如氮芥子气、乙烯亚胺化合物、烷基磺酸盐，及其它具有烷化作用的化合物，例如亚硝基脲、顺式铂氨和达卡巴嗪；抗代谢物，例如叶酸、嘌呤或嘧啶的拮抗物；有丝分裂抑制剂，例如长春花碱、鬼臼毒素(podophyllotoxin)的衍生物；细胞毒素的抗生素和喜树碱衍生物。

举例来说，喜树碱衍生物包括喜树碱、7-乙基-喜树碱、10-羟基-7-乙基-喜树碱(SN38)、9-氨基喜树碱、10,11-亚甲基双氧-喜树碱(MDCPT)和托普替康(topotecan)。这类喜树碱衍生物也包括7-乙基-喜树碱的内酯稳定剂，该剂型在美国专利5,604,233中公开，整个公开内容在此引入作为参考。

本发明包括高亲脂性喜树碱衍生物，举例来说，诸如10,11-亚甲基双氧-喜树碱、9-乙基-喜树碱、7-乙基-10-羟基-喜树碱、9-甲基-喜树碱、9-氯-10,11-亚甲基双氧-喜树碱、9-氯喜树碱、10-羟基-喜树碱、9,10-二氯喜树碱、10-溴-喜树碱、10-氯-喜树碱、9-氯-喜树碱、10-甲基-喜树碱、10-氟-喜树碱、9-甲氧基-喜树碱、9-氯-7-乙基-喜树碱和11-氯-喜树碱。这类高亲脂性喜树碱衍生物已在美国专利6,880,133中公开，整个公开内容在此引入作为参考。

水溶性喜树碱衍生物，举例来说，包括水溶性喜树碱类似物，已知有：CPT-11、11-羟基-7-烷氧基-喜树碱、11-羟基-7-甲氧基喜树碱(11,7-HMCPT)和11-羟基-7-乙基喜树碱(11,7-HECPT)、7-二甲氨基亚甲基-10,11-亚甲基双氧-20(R,S)-喜树碱、7-二甲氨基亚甲基-10,11-亚甲基双氧-20(S)-喜树碱、7-二甲氨基亚甲基-10,11-次乙基双氧-20(R,S)-喜树碱和7-吗啉代亚甲基-10,11-次乙基双氧-20(S)-喜树碱。这些水溶性喜树碱衍生物已在美国专利5,559,235和5,468,754中公开，整个公开内容在此引入作为参考。

优选的化学治疗剂或化学治疗包括氮磷汀(ethyol)、顺式铂氨、达卡巴嗪(DTIC)、放线菌素D、氮芥(氮芥子气)、链佐星、环磷酰胺、卡莫司丁(BCNU)、洛莫司丁(CCNU)、多柔比星(亚德里亚霉素)、多柔比星脂(doxil)、吉西他滨(gemzar)、柔红霉素、柔红霉素脂(daunoxome)、丙卡巴肼、丝裂霉素、阿糖胞苷、依托泊苷、甲氧蝶呤、5-氟尿嘧啶、长春花碱、长春新碱、博来霉素、紫杉醇(taxol)、多西塔可塞尔(taxotere)、阿地白介素、天冬酰胺

胺酶、白消安、卡铂、克拉屈滨、喜树碱、CPT-11、10-羟基-7-乙基-喜树碱(SN38)、达卡巴嗪、氟尿苷、氟达拉滨、羟基脲、异环磷酰胺、伊达比星、美司钠、 α 干扰素、 β 干扰素、伊立替康、米托蒽酮、托普替康、亮脯利得(leupruride)、甲地孕酮、美法仑、巯基嘌呤、普卡霉素、米托坦、培门冬酶、喷司他丁、派泊溴烷、普卡霉素、链左星、他莫昔芬、替尼泊苷、睾内酯、硫鸟嘌呤、塞替派、尿嘧啶氮芥、长春瑞滨、苯丁酸氮芥及其组合物。

有多种给药化学治疗剂的方法，包括全身的经肠和非经肠途径。优选地，化学治疗剂的给药是通过静脉给药，可以按照本领域的技术人员所理解的那样，把化学治疗剂与一种适当的药物携带者(载体)或赋形剂结合在一起。化学治疗剂的剂量依赖于很多本领域熟知的因素，如年龄、性别、体重、给药条件的严格程度、给药的药物和给药的方法。一般地，取能使靶受体饱和的多肽和抗体的血清浓度。举例来说，顺式铂氨可以方便按约 100 mg/m^2 的剂量给药。然而，应该强调的是本發明没有限制任何特定的剂量。

在另一个实施例中，把有效剂量的 EGFR/HER1 拮抗物与放射联合，治疗顽固性肿瘤。对病人而言，放射源可以是外部的，也可以是内部的。当放射源在外部时，治疗被称为外射线放射治疗(EBRT)。当放射源在内部时，治疗叫做近程放射治疗(BT)。

根据熟知的标准技术和为此目的而制造的标准仪器进行放射治疗，例如 AECL Theratron 和 Varian Clinac。放射剂量依赖于很多本领域熟知的因素。这类因素包括治疗的器官，在治疗路径上的健康器官可能无意地受到不良影响，病人对放射治疗的忍耐性和需要治疗的身体区域。典型的剂量是 $1 - 100 \text{ Gy}$ ，更具体的是 $2 - 80 \text{ Gy}$ 。一些已报道的剂量包括用 35 Gy 治疗脊髓、用 15 Gy 治疗肾、 20 Gy 治疗肝和 $60 - 80 \text{ Gy}$ 治疗前列腺。然而，应该强调的是本發明没有限制任何特定的剂量。剂量将由治疗医师在一个给定的条件下，根据特定的因素，包括前面所述的因素而确定。

外放射源与射线进入病人的靶点之间的距离可以是任意的，它表示既能杀死靶细胞，又能使副作用最小化，是这二者之间的一种可接受的平衡。典型地，外放射源与射线进入病人的靶点之间的距离在 $70 - 100 \text{ cm}$ 之间。

通常把放射源植入病人体内进行近程放射治疗。典型地，把放射源放在距被治疗的组织约 0-3 cm 处。已知技术包括间质、腔间和表面近程放射治疗。放射源可以是永久性或临时性植入。一些典型的永久性植入的放射原子包括碘-125 和氪。一些典型的临时性植入的放射原子包括镭、铯-137 和铀-129。其它一些应用于近程放射治疗的放射原子包括镅-241 和金-198。

近程放射治疗的放射剂量可以是与前面所述的外射线放射治疗相同的剂量。在确定近程放射治疗的剂量时，除了前面所述影响放射治疗剂量的因素外，也要考虑所用放射原子的性质。

10 在一个优选的实施方案中，把 EGFR/HER1 拮抗物与化学治疗剂或与放射二者联合或三者联合，对病人顽固性肿瘤的治疗表现出协同作用。换句话说，当与化学治疗剂或与放射或与化学治疗剂和放射联合使用时，加强了 EGFR/HER1 拮抗物对肿瘤生长的抑制作用。举例来说，联合治疗显示出协同作用，顽固性肿瘤的生长比单独使用 EGFR/HER1
15 拮抗物、化学治疗剂或放射抑制效果更大。优选地，单独使用 EGFR/HER1 拮抗物、化学治疗剂或放射治疗时，癌症没有得到预期的缓解，但在联合治疗时，协同作用使癌症得到缓解。

EGFR/HER1 拮抗物可在开始化学治疗剂或放射治疗之前或期间或之后给药，也可以是其任意组合，即在开始化学治疗剂和/或放射治疗之前及其治疗期间给药，或在开始化学治疗剂和/或放射治疗之前及其治疗之后给药，或在开始化学治疗剂和/或放射治疗期间及其治疗之后给药，或开始用化学治疗剂和/或放射治疗之前、治疗期间和治疗之后给药。举例来说，当 EGFR/HER1 拮抗物是一种抗体时，典型地在开始放射治疗和/或化学治疗剂治疗之前 1-30 天之间给药，优
20 选地在 3-20 天之间给药，更优选地在 5-12 天之间给药。

实施例 1. 临床试验

在临床试验中，用 EGFR/HER1 拮抗物（嵌合的抗-EGFR 单克隆抗体，C225）与顺式铂氨联合来对患有顽固性头颈部鳞状细胞癌的病人进行治疗。按荷载/保持的剂量分别为 100/100、400/250 或 500/250
30 mg/m² 给病人每周输注 C225，同时每 3 周给病人 100 mg/m² 的顺式铂氨。分别在基线、初次输注后 24 小时和第三次输注前 24 小时，采集肿瘤样品，评价肿瘤 EGFR 饱和作用及功能。在免疫组织化学（IHC）

- 评价肿瘤 EGFR 饱和作用时，用 M225 (C225 的鼠对应物) 作为第一抗体和鼠抗 IgG 作为第二抗体检测未被结合的 EGFR。在 IHC 评价 EGFR 功能时，用对激活的 EGFR (转导实验室) 有特异性的抗体，在清除 C225-EGFR 复合体后，测定肿瘤的溶解产物中 EGFR 酪氨酸激酶活性。
- 5 结果观察到受体饱和作用呈现剂量依赖性增加，在 500/250 mg/m² 剂量水平上，有大于 70% 的受体饱和。类似地，在 100/100 mg/m² 的剂量时，观察到 EGFR 酪氨酸激酶活性显著下降，67% 的病人未检测到活性，暗示功能的饱和作用。副作用是发烧、变态反应和皮肤毒性，出现小泡囊疹和甲床 (nail bed) 的改变，但在停止治疗后这些症状
- 10 完全消失。在 7 个可评价的病人中，体格检查和化验数据显示，其中一个反应最小，5 个部分反应，1 个完全反应。完全反应的这个病人是先给药了顺式铂氨。5 个部分反应的病人中，4 个先进行了化学治疗，1 个先进行了放射治疗。反应最小的这个病人是先进行了放射治疗。结果如表 1 所示，其中 CR 表示完全反应，PR 表示部分反应，MR
- 15 表示最小反应。

表 1
临床试验

病人	治疗前处理	综合反应
1	顺铂	CR
2	Ad p53	PR
3	顺铂	PR
4	顺铂	PR
5	仅放射治疗	PR
6	化学治疗	PR
7	仅放射治疗	MR

实施例 2. 临床试验

- 20 在临床试验中，用 EGFR/HER1 拮抗物 (嵌合的抗-EGFR 单克隆抗体，C225) 与 CPT-11 联合来对患有顽固性结肠癌的病人进行治疗。按荷载剂量的组合 C225 为 400 mg/m² 和 CPT-11 为 125 mg/m² 给病人每周输注。保持剂量的组合 C225 为 250 mg/m² 和 CPT-11 为 69-125

mg/m²，以一周为基础输注。不偏不倚地，病人表现完全反应。剂量表总结于下面的表 2 中。

表 2 临床试验

C225/CPT 周剂量, mg/m ²	C225/CPT-11 实际剂量, mg	C225 输注时间 (分钟)	CPT-11 输注时间 (分钟)
400/125	576/180	120	90
250/125	360/180	60	90
250/CPT-11 保持	360/0	60	N/A
250/94	360/135	50	75
250/69	360/100	60	85
250/69	360/100	60	75