



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108602890 A

(43)申请公布日 2018.09.28

(21)申请号 201680080887.7

(74)专利代理机构 北京市中咨律师事务所
11247

(22)申请日 2016.12.09

代理人 史文静 黄革生

(30)优先权数据

62/266,103 2015.12.11 US

(51)Int.Cl.

G07K 16/28(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

G07K 16/32(2006.01)

2018.08.02

A61P 35/00(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

A61K 31/00(2006.01)

PCT/US2016/065925 2016.12.09

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/100642 EN 2017.06.15

(71)申请人 瑞泽恩制药公司

地址 美国纽约州

(72)发明人 C·戴利 C·卡斯塔那罗 W·张

G·瑟斯顿

权利要求书2页 说明书25页

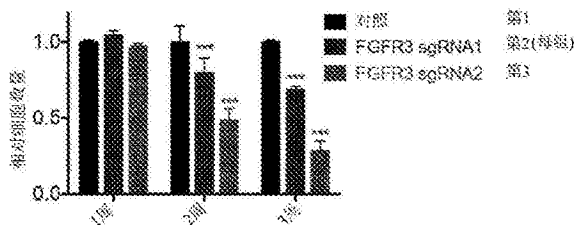
序列表2页 附图27页

(54)发明名称

用于减少或预防对EGFR和/或ERBB3阻滞剂具有抗性的肿瘤生长的方法

(57)摘要

本发明提供了用于抑制或减弱对EGFR的阻滞剂具有抗性的肿瘤生长的方法,所述方法包括向对EGFR的阻滞剂具有抗性或可能变得对EGFR的阻滞剂具有抗性的肿瘤的受试者施用EGFR抑制剂、EGFR抑制剂和FGFR抑制剂或EGFR抑制剂、FGFR抑制剂和ErbB3抑制剂。可以使用靶特异性抗体或其片段、小分子酪氨酸激酶抑制剂或其组合来实行EGFR、FGFR和/或ErbB3的阻滞。



1. 一种用于抑制或减弱对EGFR的阻滞剂具有抗性的肿瘤生长的方法,所述方法包括:向携带EGFR抗性肿瘤的受试者施用EGFR抑制剂和FGFR抑制剂。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述EGFR抑制剂是抗EGFR抗体或其片段。

3. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述EGFR抑制剂是EGFR的小分子酪氨酸激酶抑制剂。

4. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述FGFR抑制剂是抗FGFR抗体或其片段。

5. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述FGFR抑制剂是FGFR的小分子酪氨酸激酶抑制剂。

6. 根据权利要求1到5中任一项所述的方法,其中,所述FGFR抑制剂是FGFR3抑制剂。

7. 根据权利要求1到6中任一项所述的方法,进一步包括向所述受试者施用ErbB3抑制剂。

8. 根据权利要求7所述的方法,其中,所述ErbB3抑制剂是抗ErbB3抗体或其片段。

9. 根据权利要求8所述的方法,其中,所述ErbB3抑制剂是ErbB3的小分子酪氨酸激酶抑制剂。

10. 根据权利要求3所述的方法,其中,所述EGFR小分子酪氨酸激酶抑制剂选自于以下各项:盐酸埃罗替尼(erlotinib HCL)、吉非替尼(gefitinib)、拉帕替尼(lapatinib)、阿法替尼(afatinib)、卡奈替尼(canertinib)、拉帕替尼(lapatinib)、达克替尼(dacomitinib)、WZ4002、AZD8931、CUDC-101、AG-1478、PD153035、AEE788、AC480、OSI-420、WZ3146、AST-1306、瓦尼替尼(varlitinib)、埃克替尼(icotinib)、TAK-285、WHI-P154、PD168393、CNX-2006、二马来酸阿法替尼(afatinib dimaleate)、CL-387785、波齐替尼(poziotinib)、奥希替尼(osimertinib)、AZ5104或任何前述项的组合。

11. 根据权利要求5所述的方法,其中,所述FGFR是FGFR1,并且所述小分子酪氨酸激酶抑制剂选自于以下各项:普纳替尼(ponatinib)、BGJ398、尼达尼布(nintedanib)、PD173074、多韦替尼(dovitinib)、AZD4547、达鲁舍替(danusertib)、布立尼布(brivanib)、多韦替尼二乳酸(dovitinib dilactic acid)、MK-2461、丙氨酸布立尼布(brivanib alaninate)、SU5402、多韦替尼乳酸盐(dovitinib lactate)、CH5183284、LY2874455或任何前述项的组合。

12. 根据权利要求5所述的方法,其中,所述FGFR是FGFR2,并且所述小分子酪氨酸激酶抑制剂选自于以下各项:BGJ398、尼达尼布、AZD4547、MK-2461、CH5183284、LY2874455或任何前述项的组合。

13. 根据权利要求6所述的方法,其中,所述FGFR3小分子酪氨酸激酶抑制剂选自于以下各项:BGJ398、尼达尼布、多韦替尼、AZD4547、多韦替尼二乳酸、MK-2461、多韦替尼乳酸盐、CH5183284、LY2874455、PKC412或任何前述项的组合。

14. 根据权利要求5所述的方法,其中,所述FGFR是FGFR4,并且所述小分子酪氨酸激酶抑制剂选自于以下各项:BGJ398、BLU9931和LY2874455或任何前述项的组合。

15. 根据权利要求9所述的方法,其中,所述ErbB3小分子酪氨酸激酶抑制剂选自于以下各项:沙普替尼(sapitinib)、瓦尼替尼、卡奈替尼、阿姆瓦替尼(amuvatinib)或任何前述项的组合。

16. 根据权利要求1所述的方法,其中,对所述EGFR的阻滞剂具有抗性的所述肿瘤是鳞

状细胞癌、腺癌、咽癌、非小细胞肺癌、结肠直肠癌、脑癌、膀胱癌或胰腺癌。

17. 根据权利要求1到16中任一项所述的方法,其中,所述肿瘤携带FGFR3-TACC3融合蛋白。

用于减少或预防对EGFR和/或ERBB3阻滞剂具有抗性的肿瘤生长的方法

[0001] 对序列表的引用

[0002] 本申请通过引用包括作为题为10220W001-Sequence.txt的文本文件提交的呈计算机可读形式的序列表,所述序列表创建于2016年12月9日并且包含2939个字节。

技术领域

[0003] 本公开涉及用于减少或预防对EGFR靶向疗法具有抗性的肿瘤的方法和组合物。

背景技术

[0004] 表皮生长因子受体(“EGFR”)信号传导抑制剂被批准用于治疗多种人类癌症。例如,EGFR酪氨酸激酶抑制剂(TKI)用于治疗在EGFR激酶结构域中具有激活突变的非小细胞肺癌(NSCLC)患者(Paez等(2004) *Science* 304:1497-1500;Sharma等(2007) *Nat Rev Cancer* 7:169-181)。此外,在KRAS野生型结肠直肠癌(“CRC”)和头颈鳞状细胞癌(“HNSCC”)中使用阻断配体与EGFR结合的抗体(Bonner等(2006) *N Engl J Med.*354:567-578;Cunningham等(2004) *N Engl J Med.*351:337-345;Jonker等(2007) *N Engl J Med.*2007;357:2040-2048。然而,EGFR抑制剂的功效与其它靶向治疗一样受限于内在和获得性抗性的多种机制(Chong和Janne(2013) *Nat Med.*19:1389-1400;Misale等(2014) *Cancer Discov.*1269-1280)。

[0005] ErbB家族成员ErbB3的信号传导近年来已被确定为对若干肿瘤类型中靶向治疗具有抗性的突出机制(Arteaga et al.(2014) *Cancer Cell.*25:282-303;Gala et al.(2014) *Clin Cancer Res.*20:1410-1416)。例如,临床前研究已经证明ErbB3抗体可增强EGFR阻滞剂在CRC和HNSCC模型中的作用(Garner et al.(2013) *Cancer Res.*73:6024-6035;Huang et al.(2013) *Cancer Res.*73:824-833;Schaefer et al.(2011) *Cancer Cell.*20:472-486;Zhang et al.(2014) *Mol Cancer Ther.*12:1245-1355;Jiang et al.(2014) *Mol Cancer Ther.*13:1826-1836)。虽然ErbB3不具有显著的酪氨酸激酶活性,但在与其它ErbB家族成员异源二聚化后它被磷酸化(Arteaga et al.(2014);Baselga et al.2009 9(7):463-475)。磷脂酰肌醇3-激酶(“PI3K”)的调节亚基被募集到ErbB3胞质结构域中的多个磷酸酪氨酸残基,导致PI3K/AKT途径的强烈激活(Engelman et al.(2005) *Proc Natl Acad Sci USA*102:3788-3793;Holbro et al.(2003) *Proc Natl Acad Sci USA* 100:8933-8938;Soltoff et al.(1994) *Mol Cell Biol.*12:3550-3558)。在CRC和HNSCC模型中,ErbB3/HER2信号传导可能通过激活这种有效的存活途径来限制EGFR阻滞剂的作用(Zhang et al.(2014))。基于在人类癌症中阻断ErbB3的临床前理由,若干种抗ErbB3抗体正在临床中使用(Garner et al.(2013);Schaefer et al.(2011);Zhang et al.(2014);LoRusso et al.(2013) *Clin Cancer Res.*19:3078-3087;Mirschberger et al.(2013) *Cancer Res.*73:5183-5194;Schoeberl et al.(2009) *Sci Signal.*2:ra31)。

[0006] 虽然EGFR/ErbB3的阻滞剂联合可在治疗肿瘤中具有有效作用,但癌细胞中的抗性

机制限制了所述组合体内的益处。因此,需要开发新的方法来克服癌症中对EGFR和ErbB3靶向疗法的体内抗性。

发明内容

[0007] 表皮生长因子受体(EGFR)是各种癌症中的临床验证的靶标和预后指标,所述癌症包括但不限于非小细胞肺癌(NSCLC)、腺癌、咽癌、卵巢癌、宫颈癌、膀胱癌、食道癌、胰腺癌和头颈部鳞状细胞癌(HNSCC)。如西妥昔单抗等EGFR阻断抗体被批准用于各种癌症的一线治疗。尽管如此,与其它靶向治疗一样,如用EGFR和ErbB3抗体治疗等治疗方案的内在或后天抗性也限制了这些癌症治疗的疗效。

[0008] 本发明的发明人已经发现对EGFR/ErbB3阻滞剂变得具有抗性的某些癌细胞表达组成型活性FGFR3-TACC3融合蛋白作为靶向疗法抗性的内源驱动因素,从而提供对这些融合蛋白的功能能力的洞察。诸如发明人的发现强调了FGFR3途径在各种癌症中的重要性,并且表明其它蛋白质的如EGFR和FGFR的组合阻滞剂等组合阻滞剂将提供可以避免癌细胞对当前使用的靶向疗法的抗性的新疗法。这一发现导致了抑制或减弱对EGFR和ErbB3的组合阻滞剂具有抗性的肿瘤生长的新方法。

附图说明

[0009] 图1A到图1C示出了产生对EGFR/ErbB3阻滞剂具有抗性的FaDu细胞系。图1A提供了携带建立的FaDu肿瘤(体积约200mm³)的SCID小鼠,小鼠被随机化并用指定剂量的对照抗体(12.5mg/kg)、ErbB3阻断抗体(REGN1400)(2.5mg/kg)、EGFR阻断抗体(REGN955)(10mg/kg)或REGN1400与REGN955的组合进行持续治疗,这促进实质性消退(左小图)。线图显示了治疗过程中的平均肿瘤体积。误差线显示标准偏差。利用REGN1400和REGN955的组合进行治疗的小鼠在植入后约110天开始再生肿瘤(中小图),收获所述肿瘤并将肿瘤片段再植入小鼠体内。用REGN1400和REGN955的组合激发时肿瘤片段快速生长(右上小图显示个体再植入片段的生长),收获肿瘤片段并重复再植和治疗程序。在组合的EGFR/ErbB3阻滞剂下快速生长的肿瘤被收获(右下小图)并用于产生本文称为FaDu V2的细胞系。使用类似的程序来产生FaDu V1抗性细胞系。图1B和图1C示出了植入SCID小鼠中以产生肿瘤的培养的FaDu V1或V2细胞的结果。将携带已建立的肿瘤的小鼠随机化并用对照抗体或Fc蛋白(12.5mg/kg)、REGN1400(2.5mg/kg)、REGN955(10mg/kg)或REGN1400和REGN955的组合每周治疗两次。图1B和图1C中所示的线图示出了治疗过程中的平均肿瘤体积。误差线显示标准偏差。

[0010] 图2示出了REGN1400和REGN955在FaDu变体细胞系中抑制它们各自的靶标。具体地,图2示出了培养的FaDu V1细胞(左小图)和培养的FaDu V2细胞(右小图),二者在含有0.5%FBS的培养基中血清饥饿1小时,然后在对照抗体(15μg/ml)、REGN1400(5μg/ml)或REGN955(10μg/ml)存在时未治疗或用NRG1(1nM)和EGF(1nM)治疗30分钟。治疗后,将细胞裂解物用针对磷酸-ErbB3、ErbB3、磷酸-EGFR或EGFR的抗体进行免疫印迹。

[0011] 图3A到图3F提供证据表明EGFR/ErbB3阻滞剂不能抑制FaDu抗性变体细胞系中的ERK活化和细胞生长。图3A到图3C分别显示在存在对照抗体(15μg/ml)、REGN1400(5μg/ml)、REGN955(10μg/ml)或REGN1400和REGN955组合的情况下生长72小时的FaDu P1、V1或V2细胞。条形图显示了每个治疗组的相对细胞生长,如通过MTS测定所确定的。误差线显示标准

偏差, $n=8$ 。通过单因素方差分析与Tukey多重比较检验比较细胞生长 (***)表示 $P<0.001$;与对照组比较,星号仅在抑制 $>15\%$ 时显示)。图3D示出了用对照抗体 ($10\mu\text{g}/\text{ml}$)、REGN1400 ($5\mu\text{g}/\text{ml}$)、REGN955 ($10\mu\text{g}/\text{ml}$) 或REGN1400和REGN955的组合治疗2小时的FaDu P1、V1或V2细胞。治疗后,如图所示,用针对磷酸-AKT、AKT、磷酸-ERK和ERK的抗体对细胞裂解物进行免疫印迹。图3E示出了用对照抗体 ($5\mu\text{g}/\text{ml}$) 加媒介剂、REGN1400 ($5\mu\text{g}/\text{ml}$)、MEK抑制剂GSK1120212 (100nM) 或REGN1400和GSK1120212的组合治疗2小时的FaDu V2细胞。治疗后,如图所示,用针对磷酸-AKT、AKT、磷酸-ERK和ERK的抗体对细胞裂解物进行免疫印迹。图3F示出了在存在对照抗体 ($5\mu\text{g}/\text{ml}$) 加媒介剂、REGN1400 ($5\mu\text{g}/\text{ml}$)、MEK抑制剂GSK1120212 (100nM) 或REGN1400和GSK1120212的组合时生长72小时的FaDu V2细胞。条形图显示了每个治疗组的相对细胞生长,如通过MTS测定所确定的。误差线显示标准偏差, $n=8$ 。通过单因素方差分析与Tukey多重比较检验比较细胞生长 (***)表示 $P<0.001$ 。

[0012] 图4A到图4F提供证据表明FGFR3在FaDu抗性变体细胞系中被激活并在遇见EGFR阻滞剂时维持ERK信号传导。图4A示出了由FaDu P1、V1或V2细胞制备的裂解物,其用人类Phospho-RTK阵列试剂盒评估49种人类受体酪氨酸激酶 (RTKs) 的酪氨酸磷酸化,如以下材料和方法中所述。注意到的活性RTK被装箱并贴上标签。膜的角落上未标记的斑点是阳性对照。图4B示出了来自FaDu P1、V1或V2细胞的裂解物,其用针对磷酸-MET、MET和肌动蛋白的抗体进行免疫印迹。图4C示出了来自FaDu P1、V1或V2细胞的裂解物,其用琼脂糖珠缀合的抗磷酸酪氨酸抗体4G10进行免疫沉淀。免疫印迹检测免疫沉淀物中FGFR3和Src的存在。图4D示出了用对照抗体 ($10\mu\text{g}/\text{ml}$) 加媒介剂 (标记的对照)、REGN955 ($10\mu\text{g}/\text{ml}$)、 100nM PHA665752 (MET酪氨酸激酶抑制剂) 或REGN955和PHA665752的组合治疗30分钟的Fadu V2细胞。治疗后,用针对磷酸-ERK、ERK、磷酸-MET和MET的抗体对细胞裂解物进行免疫印迹。图4E示出了用媒介剂或用 25nM AZD4547 (泛-FGFR酪氨酸激酶抑制剂) 治疗1小时的FaDu V2细胞。治疗后,将细胞裂解物用缀合于琼脂糖珠的抗磷酸酪氨酸抗体4G10进行免疫沉淀。免疫印迹检测免疫沉淀物中FGFR3和Src的存在。图4F示出了用对照抗体 ($10\mu\text{g}/\text{ml}$) 加媒介剂 (标记的对照)、REGN955 ($10\mu\text{g}/\text{ml}$)、 25nM AZD4547或REGN955和AZD4547的组合治疗30分钟的Fadu V1或V2细胞。治疗后,细胞裂解物用针对磷酸-ERK、ERK、磷酸-AKT和AKT的抗体进行免疫印迹。

[0013] 图5A到图5E示出了表达组成型活性FGFR3-TACC3融合蛋白的FaDu变体细胞系。图5A示出了在FaDu V1和V2细胞中鉴定的FGFR3-TACC3融合蛋白的结构图。图5B示出了来自FaDu P1、V1或V2细胞的 100ng cDNA,其用经由RNA-seq鉴定的FGFR3-TACC3融合连接处侧翼的引物进行PCR (参见材料和方法中的引物序列)。作为cDNA完整性的对照,从所有样品扩增亲环蛋白基因的片段。等分试样的PCR反应在 2% 琼脂糖凝胶 (M, 分子量标记) 上进行。预期的PCR产物是 122bp (V1细胞) 和 95bp (V2细胞)。图5C示出了使用对FGFR3-TACC3融合转录物具有特异性的引物/探针组进行TaqMan实时PCR分析的FaDu P1、V1或V2细胞的RNA (参见材料和方法中的引物/探针序列)。对于每个样本,将对照基因亲环蛋白的阈值循环 (Ct) 值从FGFR3-TACC3融合转录物的Ct值中减去以给出 ΔCt (ΔCt) 值。条形图显示每个样本的平均 $2^{-\Delta\text{Ct}}$ 。误差线显示标准偏差, $n=3$ 。图5D示出了来自FaDu P1、V1或V2细胞的裂解物,其用TACC3抗体进行免疫沉淀,所述TACC3抗体识别存在于FGFR3-TACC3融合物中的TACC3的C端附近的表位,然后通过免疫印迹检测FGFR3或TACC3。另外,将来自FaDu P1、V1或V2细胞的裂

解物的等分试样直接进行免疫印迹(最后三条泳道)。FGFR3免疫印迹抗体识别天然FGFR3和FGFR3-TACC3融合蛋白,FGFR3-TACC3融合蛋白的迁移略微高于天然FGFR3(蛋白质在4%SDS凝胶上解析以使天然FGFR3和FGFR3-TACC3融合蛋白之间的分离最大化)。图5E示出了来自FaDu P1、V1或V2细胞的左小图裂解物,其用琼脂糖珠缀合的抗磷酸酪氨酸抗体4G10进行免疫沉淀。免疫印迹检测免疫沉淀物中TACC3和Src的存在。在右小图中,来自FaDu V2细胞的裂解物用与琼脂糖珠缀合的抗磷酸酪氨酸抗体4G10进行免疫沉淀。将多等分式样的免疫沉淀物在单一SDS凝胶上运行。来自FaDu P1亲本细胞的裂解物也运行以显示天然FGFR3和TACC3的迁移。转移后,将PVDF膜切成两半,并对FGFR3或TACC3进行免疫印迹。将膜的两半放回到一起用于信号发生和暴露,说明由FGFR3和TACC3抗体检测到的酪氨酸磷酸化蛋白质的相同迁移。

[0014] 图6A到图6E提供了FGFR3-TACC3融合蛋白促进对EGFR/ErbB3阻滞剂的抗性的证据。图6A示出了用空载体对照慢病毒感染的亲本FaDu细胞或用编码在产生稳定细胞系的FaDu变体中鉴定的野生型FGFR3或FGFR3-TACC3融合蛋白的慢病毒感染的亲本FaDu细胞。制备细胞裂解物并用针对FGFR3、磷酸-FGFR、TACC3或肌动蛋白的抗体进行免疫印迹。图6B示出了从表达野生型FGFR3或FGFR3-TACC3融合蛋白的亲本FaDu细胞制备的裂解物,并用与琼脂糖珠缀合的抗磷酸酪氨酸抗体4G10进行免疫沉淀。免疫印迹检测免疫沉淀物中FGFR3、TACC3和Src的存在。图6C示出了用对照抗体(15 μ g/ml)、REGN1400(5 μ g/ml)或REGN955(10 μ g/ml)治疗2小时的表达野生型FGFR3或FGFR3-TACC3融合蛋白(来自V2细胞)的亲本FaDu细胞。制备细胞裂解物并用针对磷酸-ERK和ERK的抗体进行免疫印迹。图6D示出了表达野生型FGFR3或FGFR3-TACC3融合蛋白的亲本FaDu细胞,其在存在对照抗体(15 μ g/ml)、REGN1400(5 μ g/ml)、REGN955(10 μ g/ml)或REGN1400和REGN955的组合时生长72小时。条形图显示了每个治疗组的相对细胞生长,如通过MTS测定所确定的。误差线显示标准偏差,n=8。通过单因素方差分析与Tukey多重比较检验比较细胞生长(***表示P<0.001;与对照组比较,星号仅在抑制>15%时显示)。图6E示出了植入SCID小鼠中的表达野生型FGFR3或FGFR3-TACC3融合蛋白(来自FaDu V2细胞)或用空载体转导的亲本FaDu细胞。将携带已建立的肿瘤的小鼠随机化并用对照抗体(12.5mg/kg)或用REGN1400(2.5mg/kg)和REGN955(10mg/kg)的组合每周治疗两次。线图描绘了治疗过程中的平均肿瘤体积。误差线显示标准偏差。

[0015] 图7示出了表达野生型FGFR3或FGFR3-TACC3融合蛋白的FaDu P1细胞的磷酸激酶阵列。从指定的细胞系(用空载体对照慢病毒转导的FaDu P1细胞或用编码在FaDu V1或V2细胞中鉴定的野生型FGFR3或FGFR3-TACC3融合蛋白的病毒转导的FaDu P1细胞)制备裂解物。

[0016] 图8A到图8B显示经工程改造以过表达FGF1的FaDu亲本细胞在体内对EGFR/ErbB3的联合阻滞剂具有抗性。图8A了用空载体对照病毒或编码人FGF1的病毒转导的FaDu亲本细胞,其用于制备稳定的细胞系。使用来自R&D Systems的人FGF酸性Quantikine ELISA试剂盒通过ELISA确定细胞上清液中分泌的FGF1的水平。图8B了表达人FGF1的亲本FaDu细胞或用空载体转导的对照细胞,其被植入SCID小鼠中。将携带建立的肿瘤的小鼠随机分组,并用对照抗体(12.5mg/kg)或REGN1400(2.5mg/kg)和REGN955(10mg/kg)的组合每周治疗两次。线图描绘了治疗过程中的平均肿瘤体积。误差线显示标准偏差。

[0017] 图9A到9D显示FaDu变体细胞系的抗性表型需要FGFR3-TACC3融合蛋白。图9A示出

了感染慢病毒的FaDu V1或V2细胞,所述慢病毒单独表达Cas9核酸酶(对照)或表达Cas9加上对FGFR3具有特异性的单一引导RNA(sgRNA)(FGFR3基因内的sgRNA1和2靶标不同序列)。感染后10天,通过免疫印迹评估FGFR3-TACC3融合蛋白的水平。图9B示出了用对照抗体(10 μ g/ml)、REGN1400(5 μ g/ml)或REGN955(10 μ g/ml)治疗稳定表达Cas9核酸酶(对照)或Cas9核酸酶和FGFR3sgRNA的FaDu V1或V2细胞2小时。治疗后,用针对磷酸-ERK和ERK的抗体对细胞裂解物进行免疫印迹。图9C示出了稳定表达Cas9核酸酶(对照)或Cas9核酸酶加FGFR3sgRNA1或FGFR3sgRNA2的FaDu V1或V2细胞在存在对照抗体(15 μ g/ml)、REGN1400(5 μ g/ml)、REGN955(10 μ g/ml)或REGN1400加REGN955的组合时生长72小时。条形图显示了每个治疗组的相对细胞生长,如通过MTS测定所确定的。误差线显示标准偏差,n=8。通过单因素方差分析与Tukey多重比较检验比较细胞生长(***表示P<0.001;与对照组比较,星号仅在抑制>15%时显示)。图9D提供了描绘FGFR3-TACC3融合蛋白在FaDu变体细胞系中抗性的作用的模型。组成性活化的FGFR3-TACC3融合体驱动RAS/RAF/ERK途径的强烈活化,以功能性取代EGFR信号传导。

[0018] 图10示出了FaDu V2细胞中CRISPR介导的FGFR3-TACC3融合蛋白的失活导致延长培养后的生长延迟。培养稳定表达Cas9核酸酶(对照)或Cas9核酸酶和FGFR3、sgRNA1或FGFR3sgRNA2的FaDu V2细胞生长图示中所示的时间。条形图显示了每个时间点相对于对照组(设定为1.0)的活细胞数量,如通过MTS测定所确定的。误差线显示标准偏差,n=5。通过ANOVA与Tukey多重比较检验比较细胞生长(***表示与对照相比P<0.001)。

[0019] 图11A到图11F显示FGFR3-TACC3融合蛋白促进由EGFR而不是由突变的PI3K驱动的癌细胞系中的抗性。图11A示出了在对照抗体(15 μ g/ml)或REGN1400(5 μ g/ml)和REGN955(10 μ g/ml)的组合存在时表达FaDu V1或V2细胞中鉴定的野生型FGFR3或FGFR3-TACC3融合蛋白的Ca127细胞生长72小时。条形图显示了每个治疗组的相对细胞生长,如通过MTS测定所确定的。误差线显示标准偏差,n=8。图11B示出了表达野生型FGFR3或FGFR3-TACC3融合蛋白的NCI-H1975细胞在存在媒介或50nM EGFR TKI AZD9291(抑制这些细胞中表达的T790M EGFR突变体的第三代不可逆TKI)时生长72小时。条形图显示了每个治疗组的相对细胞生长,如通过MTS测定所确定的。误差线显示SD,n=8。图11C到图11D分别显示表达野生型FGFR3或FGFR3-TACC3融合蛋白的SNU1076或Detroit 562细胞在存在媒介或5 μ MPI3K抑制剂BYL719时生长72小时。条形图显示了每个治疗组的相对细胞生长,如通过MTS测定所确定的。误差线显示标准偏差,n=8。图11E示出了由稳定表达野生型FGFR3或FGFR3-TACC3融合蛋白的Detroit 562或SNU1076细胞制备的细胞裂解物,并用针对FGFR3、磷酸-FGFR或TACC3的抗体进行免疫印迹。图11F显示用媒介或5 μ MBYL719治疗60分钟的对照SNU1076或Detroit 562细胞或表达FGFR3-TACC3融合蛋白(来自FaDu V1)的细胞。制备细胞裂解物并用针对磷酸-ERK、ERK、磷酸-AKT或AKT的抗体进行免疫印迹。

[0020] 图12示出了野生型FGFR3和FGFR3-TACC3融合蛋白在稳定转导的癌细胞系中的表达和磷酸化。用空载体对照慢病毒或用编码在FaDu变体和稳定细胞系中鉴定的野生型FGFR3或FGFR3-TACC3融合蛋白的慢病毒感染Ca127(口腔腺鳞癌)和NCI-H1975(非小细胞肺癌)细胞。制备细胞裂解物并用针对FGFR3、磷酸-FGFR或TACC3的抗体进行免疫印迹。

具体实施方式

[0021] 在描述本发明之前,应该理解,本发明不限于所描述的特定方法和实验条件,因为这样的方法和条件可以变化。还应该理解的是,本文使用的术语仅用于描述具体实施例的目的,而不意在进行限制,因为本发明的范围将仅由所附权利要求限定。

[0022] 除非另外定义,否则本文使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常理解的相同的含义。如本文所使用的,术语“约”在用于提及特定所列举的数值时意指所述值可以与所列举的值相差不超过1%。例如,如本文所使用的,表述“约100”包括99和101以及之间的所有值(例如99.1、99.2、99.3、99.4等)。

[0023] 尽管在实施本发明的测试实践中可以使用与本文所描述的类型或等同的任何方法和材料,但现在描述优选的方法和材料。本说明书中提及的所有专利、申请和非专利出版物通过引用以其整体并入本文。

[0024] 6.1抗EGFR、抗ErbB3和抗FGFR抗体

[0025] 如本文所用,术语“抗体”是指包含通过二硫键互相连接的四条多肽链(两条重链(H)链和两条轻链(L))及其多聚体(例如IgM)的免疫球蛋白分子。每条重链包含重链可变区(本文缩写为HCVR或VH)和重链恒定区。所述重链恒定区包含三个结构域CH1、CH2和CH3。每条轻链包含轻链可变区(本文缩写为LCVR或VL)和轻链恒定区。所述轻链恒定区包含一个结构域(CL1)。所述VH和VL区可以进一步细分成称为互补决定区(CDR)的高变区,其散布有更保守的称为框架区(FR)的区域。每个VH和VL由三个CDR和四个FR组成,按照以下顺序从氨基末端到羧基末端排列:FR1,CDR1,FR2,CDR2,FR3,CDR3,FR4。在本发明的不同实施例中,抗ErbB3抗体(或其抗原结合部分)的FR可以与人类种系序列相同,或者可以是天然或人工修饰的。基于两个或更多个CDR的并排分析可以定义氨基酸共有序列。

[0026] 如本文所使用的,术语“抗体”还包括完整抗体分子的抗原结合片段。如本文所使用的,术语抗体的“抗原结合部分”、抗体的“抗原结合片段”等包括特异性结合抗原以形成复合物的任何天然存在的、可酶促获得的、合成的或基因工程化的多肽或糖蛋白。抗体的抗原结合片段可以使用任何合适的标准技术,诸如蛋白水解消化或涉及编码抗体可变结构域以及任选地恒定结构域的DNA的操作和表达的重组基因工程技术,从例如完整抗体分子得到。此类DNA是已知的和/或从例如商购来源、DNA文库(包括,例如,噬菌体-抗体文库)容易可得,或可以合成。DNA可以被测序并且以化学方式或通过使用分子生物学技术被操作,以例如将一个或更多个可变结构域和/或恒定结构域排列为合适的构型,或引入密码子、产生半胱氨酸残基、修饰、添加或缺失氨基酸等。

[0027] “抗原结合片段”的非限制性实例包括:(i) Fab片段;(ii) F(ab')₂片段;(iii) Fd片段;(iv) Fv片段;(v) 单链Fv(scFv)分子;(vi) dAb片段;以及(vii) 由模拟抗体高变区(例如,分离的互补决定区(CDR),诸如CDR3肽)的氨基酸残基组成的最小识别单位或受约束的FR3-CDR3-FR4肽。如本文所使用的,表述“抗原结合片段”还包括其它工程化的分子,如结构域特异性抗体、单域抗体、结构域缺失的抗体、嵌合抗体、CDR移植的抗体、双抗体、三抗体、四抗体、微抗体、纳米抗体(例如单价纳米抗体、二价纳米抗体等)、小模块免疫药物(small modular immunopharmaceuticals)(SMIP),以及鲨鱼可变IgNAR域。

[0028] 抗体的抗原结合片段通常将包含至少一个可变结构域。所述可变结构域可以为任何尺寸或可以具有任何氨基酸组成,并且通常将包含与一个或更多个框架序列相邻的或一个或更多个框架序列符合读框的至少一个CDR。在具有与VL结构域缔合的VH结构域的抗

原结合片段中,所述VH结构域和VL结构域可以以任何合适排列相对于彼此定位。例如,所述可变区可以是二聚化的且包含VH-VH、VH-VL或VL-VL二聚体。可选地,抗体的所述抗原结合片段可以包含单体VH结构域或VL结构域。

[0029] 在某些实施例中,抗体的抗原结合片段可以包含与至少一个恒定结构域共价连接的至少一个可变结构域。可以见于本发明的抗体的抗原结合片段中的可变结构域和恒定结构域的非限制性实例性构型包括:(i) VH-CH1; (ii) VH-CH2; (iii) VH-CH3; (iv) VH-CH1-CH2; (v) VH-CH1-CH2-CH3; (vi) VH-CH2-CH3; (vii) VH-CL; (viii) VL-CH1; (ix) VL-CH2; (x) VL-CH3; (xi) VL-CH1-CH2; (xii) VL-CH1-CH2-CH3; (xiii) VL-CH2-CH3; 和(xiv) VL-CL。在可变结构域和恒定结构域的任何构型中,包括以上列出的任何实例性构型中,所述可变结构域和恒定结构域可以彼此直接连接或可以由完整的或部分的铰链区或接头区域连接。铰链区可以由至少2个(例如,5个、10个、15个、20个、40个、60个或更多个)氨基酸组成,其在单个肽分子中相邻的可变结构域和/或恒定结构域之间产生柔性或半柔性的连接。此外,本发明的抗体的抗原结合片段可以包含以上列出的任何可变结构域和恒定结构域构型彼此非共价缔合和/或与一个或多个单体VH结构域或VL结构域(例如,通过二硫键)缔合的同二聚体或异二聚体(或其它多聚体)。

[0030] 如同完整抗体分子,抗原结合片段可以是单特异性或多特异性的(例如,双特异性的)。抗体的多特异性抗原结合片段通常将包含至少两个不同的可变结构域,其中每一个可变结构域能够与单独的抗原或同一抗原上的不同表位特异性结合。任何多特异性抗体格式,包括本文公开的实例性双特异性抗体格式,可以使用本领域可得的常规技术被调整用于在本发明的抗体的抗原结合片段的上下文中使用。

[0031] 如本文所用,术语“人抗体”包括具有源自人种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区的抗体。本发明的人抗体可以包括不由人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基(例如通过体外随机或位点特异性诱变或通过体内体细胞突变引入的突变),例如在CDR中并且特别是在CDR3中。然而,如本文所用,术语“人抗体”不意图包括其中来源于另一种哺乳动物物种(例如小鼠)的种系的CDR序列已被移植到人框架序列上的抗体。

[0032] 如本文所用,术语“重组人抗体”包括通过重组方式制备、表达、产生或分离的所有人抗体,诸如使用转染到宿主细胞中的重组表达载体表达的抗体(下文进一步描述)、从重组组合人抗体文库分离的抗体(在下文中进一步描述)、从对人免疫球蛋白基因转基因的动物(例如小鼠)分离的抗体(参见例如Taylor等(1992) Nucl. Acids Res. 20:6287-6295)或者通过涉及将人免疫球蛋白基因序列剪接到其它DNA序列的任何其它手段制备、表达、产生或分离的抗体。这样的重组人抗体具有源自人种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区。然而,在某些实施例中,将这样的重组人抗体进行体外诱变(或者当使用对于人Ig序列转基因的动物时,进行体内体细胞诱变),因此重组抗体的VH和VL区的氨基酸序列是尽管源自并涉及人种系VH和VL序列但在体内可能不天然存在于人抗体种系所有组成成分中的序列。

[0033] 如本文所用,“分离的抗体”是指已经从其天然环境的至少一种组分中鉴定和分离和/或回收的抗体。例如,已经从生物体的至少一种组分或从天然存在或天然产生抗体的组织或细胞分离或去除的抗体是本发明目的的“分离的抗体”。分离的抗体还包括重组细胞内的原位抗体。分离的抗体是已经过至少一次纯化或分离步骤的抗体。根据某些实施例,分离的抗体可以基本上不含其它细胞材料和/或化学物质。

[0034] 术语“特异性结合”等是指抗体或其抗原结合片段与在生理条件下相对稳定的抗原形成复合物。用于确定抗体是否特异性结合抗原的方法在本领域中是公知的，并且包括例如平衡透析，表面等离子体共振等。例如，如本发明上下文中所用的，“特异性结合”人EGFR或FGFR的抗体包括以下KD结合人EGFR或FGFR或其部分的抗体：少于约1000nM，少于约500nM，少于约300nM，少于约200nM，少于约100nM，少于约90nM，少于约80nM，少于约70nM，少于约60nM，少于约50nM，少于约40nM，少于约30nM，少于约20nM，少于约10nM，少于约5nM，少于约4nM，少于约3nM，少于约2nM，少于约2nM，少于约1nM或少于约0.5nM，如在表面等离子体共振测定中测量的（例如参见本文的实例3）。然而，特异性结合人EGFR或FGFR的分离的抗体可能与其它抗原（例如来自其它（非人类）物种的ErbB3分子）具有交叉反应性。

[0035] 如本文所用的表述“EGFR”或“EGFR片段”是指人EGFR蛋白或其片段，除非指定来自非人类物种。人EGFR的细胞外结构域具有例如第9132192号美国专利的SEQ ID NO:385的氨基酸25-645所示的氨基酸序列。

[0036] 如本文所用，表述“ErbB3”和“ErbB3片段”是指人ErbB3蛋白或其片段，除非指定来自非人类物种。人ErbB3的细胞外结构域具有例如第8791244号美国专利中公开的SEQ ID No:497-499的氨基酸1-613所示的氨基酸序列。抗-ErbB3抗体包括在第8791244号美国专利和/或第2014/0072563号美国公开中列出的抗体。ErbB3也被称为HER3。

[0037] 如本文所用的表述“FGFR”和“FGFR片段”是指人FGFR蛋白或其片段，除非指定来自非人类物种。如本文所用的“FGFR”和“FGFR片段”可以指FGFR1、FGFR2、FGFR3、FGFR4或FGFR5或其片段。在具体实施例中，“FGFR”或“FGFR片段”分别指FGFR3或FGFR3的片段。

[0038] 如本文所用，“结合EGFR的抗体”或“抗EGFR抗体”包括结合EGFR蛋白和/或细胞表面表达的EGFR的可溶性片段（例如，EGFR的细胞外结构域的一部分）的抗体及其抗原结合片段，如第9132192号美国专利所述。表述“细胞表面表达的EGFR”是指在体外或体内在细胞表面上表达的EGFR蛋白或其一部分，使得至少一部分EGFR蛋白暴露于细胞膜的细胞外侧并且可以被抗体的抗原结合部分接近。可溶性分子包括例如第9132192号美国专利的实例3中所述的单体和二聚体EGFR构建体或与其基本相似的构建体。在某些实施例中，所述EGFR抗体是第9132192号美国专利和/或第2014/0072563号美国公开中描述的抗体。在各种实施例中，抗EGFR抗体从第2014/0072563号美国公开中描述的抗体中的一个或多个中进行选择。在具体实施例中，抗EGFR抗体从H1H086N、H1H102N、H1H134P、H1H141P、H1H143P、H1H144P、H1H147P、H1H151P、H1H159P、H1H161P、H1H163P和H1H169P中选择。在具体实施例中，抗EGFR抗体是H1H141P。在其它实施例中，抗EGFR抗体从Erbbitux (ImClone)、Vectibis (Abgenix, Amgen)、Theracim (Daiichi Sankyo, YM BioSciences)、Portrazza (Imclone)、HuMax-EGFR (Genmab)、EMD72000 (Takada)、(Glycart, Roche)、ABT-414 (Abbvie, Seattle Genetics)、mAb806 (Abbott, LSP)、PIX (Adimab, Merrimack)、GT-MAB 5.2-GEX (Glycotope) 和 (J2898A (ImmunoGen) 中选择。

[0039] 如本文所用，“结合FGFR的抗体”或“抗FGFR抗体”包括结合成纤维细胞生长因子受体 (FGFR) 蛋白（例如，FGFR的细胞外结构域的一部分）和/或细胞表面表达的FGFR的可溶性片段的抗体及其抗原结合片段。在一些实施例中，抗FGFR抗体结合到特定的FGFR（例如FGFR1），但不结合到FGFR2或FGFR3。在其它实施例中，抗FGFR抗体结合到多于一种FGFR，例如，抗FGFR抗体结合到FGFR2和FGFR3。表述“细胞表面表达的FGFR”是指在体外或体内在细

胞表面上表达的EGFR蛋白或其一部分,使得FGFR蛋白的至少一部分暴露于细胞膜的细胞外侧并且可以被抗体的抗原结合部分接近。在一些实施例中,抗FGFR抗体特异性结合到一种类型的FGFR(例如FGFR3)。在其它实施例中,所述抗FGFR抗体结合到多于一种FGFR变体,例如FGFR3和FGFR1、FGFR3和FGFR2、FGFR3和FGFR4、FGFR1和FGFR4等。本领域已知各种FGFR抗体。WO2012/158704、US2014/0187754和US9085626 (Genentech)、US8236074、WO2012/015674和WO2005/037235 (Lilly)以及US8487083和WO2012/108782 (Oncomax)中公开了代表性的抗FGFR1抗体。US2014/0322220和WO2013/076186 (Bayer)、US2015/0125454和WO2013154206 (Daiichi Sankyo)中公开了代表性的抗FGFR2抗体。US 8404240、US 8182815和US 8043618 (ImClone)、US 8710189、US 8410250和US 9161977 (Genentech)中公开了代表性的抗FGFR3抗体,US2014/0037624和WO2012/138975 (Genentech)、US2011/0150903和WO2010/004204 (Sanofi-Aventis)、US8394927和WO2008/025796 (U3Pharma GmbH)和WO2014/105849 (Xoma)中公开了代表性的抗FGFR4抗体。

[0040] 如本文所用,“结合ErbB3的抗体”或“抗ErbB3抗体”包括结合ErbB3蛋白(例如ErbB3的细胞外结构域的一部分)和/或细胞表面表达的ErbB3的可溶性片段的抗体及其抗原结合片段。表述“细胞表面表达的ErbB3”是指在体外或体内在细胞表面上表达的ErbB3蛋白或其一部分,使得ErbB3蛋白的至少一部分暴露于细胞膜的细胞外侧并且可以被抗体的抗原结合部分接近。在一些实施例中,抗ErbB抗体特异性结合一种类型的ErbB(例如ErbB3),但不结合另一种ErbB(例如ErbB2)。在其它实施例中,抗ErbB抗体结合到ErbB3和另一蛋白(包括但不限于EGFR、Her2/neu、IGF-1R、cMet、Her4和VEGF)。在各种实施例中,抗ErbB3抗体阻断神经调节蛋白1b与人ErbB3的结合。在其它实施例中,抗ErbB3抗体内化细胞表面ErbB3。在其它实施例中,抗ErbB3抗体抑制Akt磷酸化。在进一步的实施例中,抗ErbB3抗体抑制A431表皮样癌细胞生长。在某些实施例中,所述抗ErbB3抗体从第8791244号美国专利描述的那些抗体中选择。在另外的实施例中,所述抗ErbB3抗体包括但不限于H4H1819N、H4H1821N、H4H2084P、H4H2092P、H4H2098P、H4H2132P、H4H2138P、H4H2148P和H4H2290P,如第8791244号美国专利所描述的。

[0041] 在另外的实施例中,所述抗-ErbB3抗体抑制ErbB3和Akt的磷酸化。WO2011/144749、US2013/0136748和EP2571901 (Ablynx NV)、US2013/0330772、US2014/0242597、US8481687和WO2011/136911 (AVEO Pharmaceuticals, Inc.)、US9192663、US8735551 (MorphoSys, Novartis)、WO2013/148315 (Genentech)、US9085622 (Glaxo)、US9034328 (KHK)、US2014/0363429、WO2015/157634、WO2015/048008、WO2013078191 (Kolltan Pharmaceuticals/Medimmune)、US8859737、US9180185 (Roche Glycart, Roche)、US9127065 (Millegen)、US2013/0224220 (Medpharma S.R.L.)、US 7705130 (Amgen, Daiichi Sankyo, U3Pharma GmbH)、WO2015/049355 (Roche)、WO2013/016714 (Sea Lane)、US8895001、US8961966、US 8691225 (Merrimack Pharmaceuticals, Inc., Sanofi-aventis)、US2014/0120092 (Sorento Therapeutics, Inc.)、US2013/0287684、US9155802 (Symphogen A/S)、US2014/0017259 (Takis)、US8828388、US8362215 (Trellis Bioscience)公开了代表性抗ErbB3抗体。US8597652、US2014/0056899 (Genentech/Roche)、US 8329873、US8580263 (Fox Chase)和WO2015/130172 (Merus)中公开了结合ErbB3和EGFR二者的代表性多特异性抗体。结合ErbB3和HER2/neu二者的代表性多特异性抗体包括US8980258 (FoxChase)、WO2015/

130173 (Merus)、US2014/0079703、US7846440 (Merrimack Pharmaceuticals)、W02015/173248 (Roche)、W02015/066543 (U. Texas) 和 W02014/182970 (Zymeworks)。结合 ErbB3 和 IGF-1R 二者的代表性多特异性抗体包括 US8476409、US2012/0244163 和 W02015/130554 (Dyax Corp./Merrimack Pharmaceuticals, Inc.)。结合 ErbB3 和 cMet 的代表性多特异性抗体包括 US2015/0322165 和 US2015/0210766 (Samsung)。

[0042] 本发明包括具有修饰的糖基化模式的抗 EGFR 抗体、抗 ErbB3 抗体和/或抗 FGFR 抗体。在某些实施例中,修饰以去除不期望的糖基化位点可能是有用的,或者缺乏存在于寡糖链上的岩藻糖部分的抗体,以例如增加抗体依赖性细胞毒性 (ADCC) 功能 (参见例如 Shield 等 (2002) JBC 277:26733)。在其它实施例中,可以进行半乳糖基化修饰以修饰补体依赖性细胞毒性 (CDC)。

[0043] 在各种实施例中,本文所述方法中使用的抗体可通过补体依赖性细胞毒性 (CDC) 或抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC) 发挥作用。“补体依赖性细胞毒性” (CDC) 是指在补体存在时用本文所述方法中使用的抗体裂解抗原表达细胞。“抗体依赖性细胞介导的细胞毒性” (ADCC) 指细胞介导的反应,其中表达 Fc 受体 (FcR) 的非特异性细胞毒性细胞 (例如自然杀伤细胞、嗜中性粒细胞和巨噬细胞) 识别靶细胞 (即癌细胞) 上的结合抗体,从而导致所述细胞的裂解。CDC 和 ADCC 可以通过本领域已知的测定来测量。(参见,例如美国专利 5500362 和 5821337,以及 Clynes 等. (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 95:652-656 (1998))。本文描述的抗体的恒定区在抗体固定补体并介导细胞依赖性细胞毒性的能力中是重要的。因此,抗体的同种型可以基于是否期望抗体介导细胞毒性来选择。

[0044] 与衍生抗体的相应种系序列相比,本文所述方法中公开的抗 EGFR 抗体、抗 ErbB3 抗体和/或抗 FGFR 抗体可以在重链和轻链可变结构域的框架区和/或 CDR 区中包含一个或更多个氨基酸取代、插入和/或缺失。此类突变可以通过将本文公开的氨基酸序列与从例如公共抗体序列数据库可得的种系序列进行比较而容易地确定。本发明包括来源于本文公开的任何氨基酸序列的抗体及其抗原结合片段,其中在一个或更多个框架区和/或 CDR 区中的一个或更多个氨基酸被突变为衍生抗体的种系序列的相应残基或另一人种系序列的相应残基或相应种系残基的保守氨基酸取代 (此类序列改变在本文被统称为“种系突变”)。本领域普通技术人员从本文公开的重链和轻链可变区序列出发,可以容易地产生包含一个或更多个个体种系突变或其组合的许多抗体和抗原结合片段。在某些实施例中,在 VH 结构域和/或 VL 结构域中的所有框架和/或 CDR 残基被突变为衍生抗体的原始种系序列中发现的残基。在其它实施例中,仅某些残基被突变回种系序列,例如,仅在 FR1 的前 8 个氨基酸中或在 FR4 的最后 8 个氨基酸中发现的突变残基,或仅在 CDR1、CDR2 或 CDR3 中发现的突变残基被突变回种系序列。在其它实施例中,框架和/或 CDR 残基中的一个或更多个被突变为不同种系序列 (即,不同于原始衍生抗体的种系序列的种系序列) 的相应残基。此外,本发明的抗体可以包含在框架区和/或 CDR 区中的两个或更多个种系突变的任何组合,例如,其中某些个体残基被突变为特定种系序列的相应残基,而某些与原始种系序列不同的其它残基得以维持或突变成不同种系序列的相应残基。在获得后,可以容易地测试包含一个或更多个种系突变的抗体和抗原结合片段的一种或更多种期望的特性,诸如改进的结合特异性、增加的结合亲和力、改进的或增强的拮抗或激动生物学特性 (可以视情况而定)、降低的免疫原性等。以这种一般方式获得的抗体和抗原结合片段被涵盖在本发明中。

[0045] 在各种实施例中,EGFR、ErbB3和/或FGFR抗体是人抗体,其包括具有源自人种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区的抗体。本文所述方法中使用的人抗体包括不由人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基,例如通过体外随机或位点特异性诱变或通过体内体细胞突变(例如在CDR中)引入的突变。如本文所用的短语“人抗体”不意在包括其中来源于另一种哺乳动物物种(如小鼠)的种系的CDR序列已经移植到人框架序列上的抗体。用于本文所述方法的人抗体可以以与铰链异质性有关的两种形式存在。因此,在一些实施例中,免疫球蛋白分子包含约150-160kDa的稳定四链构建体,其中二聚体通过链间重链二硫键保持在一起。在其它实施例中,在第二种形式中,二聚体不通过链间二硫键连接,并且形成由共价结合的轻链和重链(半抗体)组成的约75-80kDa的分子。在具体的实施例中,四链构建体和半抗体都存在于治疗组合物中。

[0046] 如本文所用,“中和”或“阻断”抗体意在是指与其靶标(例如EGFR、ErbB3或FGFR)的结合(i)干扰EGFR或EGFR片段与EGFR配体(例如EGF、TGF- α)之间的相互作用或干扰ErbB3或ErbB3片段与ErbB3配体(例如调蛋白和NRG-2)之间的相互作用或干扰FGFR或FGFR片段与FGFR配体(例如FGF1、FGF7)之间的相互作用和/或(ii)导致EGFR、ErbB3或FGFR的至少一种生物学功能被抑制的抗体。由EGFR、ErbB3或FGFR中和或阻断抗体引起的抑制不需要是完全的,只要它可以使适当的测定法检测即可。

[0047] 当应用于多肽时,术语“实质相似性”或“实质上相似”意指当两个肽序列如通过程序GAP或BESTFIT使用缺省缺口权重进行最佳比对时共享至少95%序列同一性,如至少约98%或99%的序列同一性。优选地,不相同的残基位置因保守氨基酸取代而不同。“保守氨基酸取代”是其中氨基酸残基被具有相似化学性质(例如电荷或疏水性)的侧链(R基团)的另一氨基酸残基取代的取代。通常,保守的氨基酸取代不会实质上改变蛋白质的功能特性。在两个或更多个氨基酸序列彼此通过保守取代彼此不同的情况下,可以向上调整百分比序列同一性或相似性程度以校正所述取代的保守性质。为进行这些调整的各种装置可以在Pearson(1994) *Methods Mol. Biol.* 24:307-331)。优选的保守性氨基酸取代基团对于本领域技术人员是已知的,并在第9132192号美国专利和Gonnet等(1992) *Science* 256:14433-14445)。多肽的序列相似性(或序列同一性)通常是使用分配给各种取代、缺失和其它修饰(包括保守氨基酸取代,例如Gap或Bestfit)的相似性度量进行测量的。

[0048] 抗-EGFR、抗-ErbB3和抗-FGFR抗体及其抗原结合片段分别以高亲和力结合单体或二聚体EGFR、ErbB3或FGFR,例如以小于约如通过使用第9132192号美国专利的实例3中描述的测定形式由表面等离子体共振测量的20pM的KD结合二聚体EGFR、ErbB3或FGFR。在各种实施例中,抗体或抗原结合片段以通过表面等离子体共振测量的小于约15pM、小于约10pM、小于约8pM、小于约6pM、小于约4pM、小于约2pM或小于约1pM的KD结合二聚体EGFR、ErbB3或FGFR。其它合适的抗体包括以由表面等离子体共振测量的 $t_{1/2}$ 结合二聚体EGFR、ErbB3或FGFR的EGFR、ErbB3或FGFR抗体及其抗原结合片段, $t_{1/2}$ 由通过表面等离子体共振测量而大于约200分钟、大于约210分钟、大于约220分钟、大于约250分钟、大于约260分钟、大于约280分钟、大于约300分钟、大于约320分钟、大于约340分钟、大于约360分钟、大于约380分钟、大于约400分钟、大于约450分钟、大于约500分钟、大于约550分钟、大于约600分钟、大于约650分钟、大于约800分钟、大于约1000分钟或更多。

[0049] 在各种实施例中,抗EGFR抗体及其抗原结合片段和/或抗FGFR抗体及其抗原结合

片段和/或抗ErbB3抗体分别抑制EGFR表达和/或FGFR表达和/或ErbB3表达肿瘤细胞的生长。此外,本发明还包括抗EGFR抗体及其抗原结合片段、任何抗-ErbB3抗体及其抗原结合片段以及诱导分别表达EGFR和/或FGFR和/或ErbB3的抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)的细胞的抗-FGFR抗体和抗原结合片段。此外,本发明包括产生大于约25%的最大细胞杀伤百分比的抗EGFR抗体和/或抗FGFR抗体和/或ErbB3抗体,例如约30%、约40%、约45%、约50%、约55%、约60%、约65%、约70%、约75%或更多的最大细胞杀死百分比,如在第9132192号美国专利中列出的ADCC测定格式中测量的。

[0050] 在各种实施例中,本发明包括在体外或在体内抑制肿瘤生长的抗EGFR抗体及其抗原结合片段和/或ErbB2抗体及其抗原结合片段和/或抗FGFR抗体及其抗原结合片段。在某些实施例中,抗体或其抗原结合片段引起肿瘤消退或缩小。在各种实施例中,抗体及其抗原结合片段单独或组合抑制肿瘤细胞生长的效果比对照抗体的效果多50%以上,例如约55%、约60%、约65%、约70%、约75%、约80%、约85%、约90%、约95%或更多。

[0051] 本发明的抗EGFR、抗ErbB3和抗FGFR抗体和抗体片段包含具有与所述抗体不同但保留分别结合EGFR、ErbB3和FGFR的能力的氨基酸序列的蛋白质。这种变体抗体和抗体片段在与亲本序列比较时包含一个或多个氨基酸添加、缺失或取代,但表现出与所述抗体基本上相同的生物学活性。例如,如果两种抗原结合蛋白或抗体是药物等同物或药学替代物(在相似的实验条件下以相同摩尔剂量施用时的吸收速率和程度没有显示出显著差异,无论是单剂量或多剂量),则它们被认为是生物等效的。

[0052] 抗EGFR、抗ErbB3和抗FGFR抗体还包括多特异性抗体。在各种实施例中,抗EGFR和/或抗-ErbB3和/或抗-FGFR抗体可以是多特异性的,在于它们可以对一个靶多肽的不同表位具有特异性,或可以含有对多于一个靶多肽特异的抗原结合结构域。因此,多特异性抗体或抗体片段可以包括对EGFR具有特异性的免疫球蛋白的一个臂和对FGFR(即诸如FGFR3)具有特异性的免疫球蛋白的第二臂。实例性的双特异性抗体形式可以在第9132192号美国专利中找到。

[0053] 在各种实施例中,本发明提供了抗体-药物缀合物(ADCs),其包含缀合到治疗性部分(例如细胞毒性剂、化学治疗药物或放射性同位素)的抗EGFR抗体或其抗原结合片段、缀合到治疗性部分(例如细胞毒性剂、化学治疗药物或放射性同位素)的抗ErbB3抗体或其抗原结合片段与缀合到治疗性部分(例如细胞毒性剂、化学治疗药物或放射性同位素)的抗FGFR抗体或其抗原结合片段。

[0054] 细胞毒性剂包括对细胞的生长、活力或增殖有害的任何试剂。根据本发明的所述方面可以缀合到抗EGFR、抗ErbB3和/或抗FGFR抗体的合适的细胞毒性剂和化学治疗剂的实例包括例如1-(2-氯乙基)-1,2-二甲磺酰肼、1,8-二羟基-双环[7.3.1]十三碳-4,9-二烯-2,6-二炔-13-酮、1-脱氢睾酮、5-氟尿嘧啶、6-巯基嘌呤、6-巯鸟嘌呤、9-氨基喜树碱、放线菌素D、鹅膏蕈碱、氨基蝶呤、氨基嘌呤、蛇形菌素、蒽环霉素、安曲霉素(AMC)、auristatin、博来霉素、白消安、丁酸、卡利奇霉素、喜树碱、洋红霉素、卡莫司汀、cemadotins、顺铂、秋水仙碱、考布他汀、环磷酰胺、阿糖胞苷、细胞松弛素B、更生霉素、柔红霉素、氮烯咪胺、diacetoxypentylidoxorubicin、二溴甘露醇、二羟基炭疽菌素二酮、disorazoles、尾海兔素(例如dolastatin 10)、阿霉素、duocarmycin、棘霉素、软珊瑚醇、吐根碱、埃博霉素、埃斯培拉霉素、estramustines、溴化乙锭、依托泊苷、氟二氧嘧啶、格尔德霉素、短杆菌肽D、糖皮质

激素、伊立替康、驱动蛋白纺锤体蛋白 (KSP) 抑制剂、leptomycins、leurosines、利多卡因、洛莫司汀 (CCNU)、美登素、二氯甲基二乙胺、美法仑、mercatopurines、methopterin、甲氨蝶呤、光神霉素、丝裂霉素、米托蒽醌、N8-acetyl spermidine、鬼臼毒素、普鲁卡因、普萘洛尔、喋啶、嘌呤霉素、吡咯并苯并二氮杂革类 (PBDs)、根霉素、链脲佐菌素、利苏霉素、紫杉醇、鬼臼噻吩甙、丁卡因、苯丁酸氮芥、tomaymycins、托泊替康、tubulysin、长春花碱、长春新碱、长春地辛、长春瑞滨以及前述内容的任何衍生物。根据某些实施例，缀合到抗EGFR、抗ErbB3和/或抗FGFR抗体的细胞毒性剂是美登素如DM1或DM4、茅屋霉素衍生物或多拉司他汀衍生物。根据某些实施例，与抗-EGFR、抗-ErbB3和/或抗-FGFR抗体缀合的细胞毒素剂是auristatin，如MMAE、MMAF或其衍生物。本领域已知的其它细胞毒性剂包括在本发明范围内，包括例如蛋白质毒素，例如蓖麻毒蛋白、艰难梭菌毒素、假单胞菌外毒素、蓖麻毒蛋白、白喉毒素、肉毒杆菌毒素、异株泻根毒蛋白、皂草素、美洲商陆毒素 (即，*phytolaccatoxin*和*phytolaccigenin*) 以及Sapra等 (2013) *Pharmacol. & Therapeutics* 138:452-469所列出的其它。

[0055] 本发明还包括抗体-放射性核素偶联物 (ARC)，其包含偶联于一种或多种放射性核素的抗-EGFR、抗-ErbB3和/或抗-FGFR抗体。可用于本发明这一方面背景下的实例性放射性核素包括但不限于例如²²⁵Ac、²¹²Bi、²¹³Bi、¹³¹I、¹⁸⁶Re、²²⁷Th、²²²Rn、²²³Ra、²²⁴Ra和⁹⁰Y。

[0056] 在本发明的某些实施例中，提供ADC，其包含通过接头分子与细胞毒性剂 (例如上文公开的任何细胞毒性剂) 缀合的抗EGFR、抗ErbB3和/或抗FGFR。本领域已知的任何接头分子或接头技术可用于产生或构建本发明的ADC。在某些实施例中，接头是可切割的接头。根据其它实施例，接头是不可切割的接头。可用于本发明背景下的实例性接头包括具有或由例如MC (6-马来酰亚胺己酰基)、MP (马来酰亚胺丙酰基)、val-cit (缬氨酸-瓜氨酸)、val-ala (缬氨酸-丙氨酸)、蛋白酶可切割接头中的二肽位点、ala-phe (丙氨酸-苯丙氨酸)、蛋白酶可切割接头中的二肽位点、PAB (p-aminobenzyloxycarbonyl)、SPP (N-琥珀酰亚胺基4-(2-吡啶硫基) 戊酸酯) SMCC (N-琥珀酰亚胺基4-(N-马来酰亚胺甲基) 环己烷-1羧酸酯)、SIAB (N-琥珀酰亚胺基 (4-碘-乙酰基) 氨基苯甲酸酯) 及其变体和组合组成的接头。可用于本发明背景下的接头的另外实例公开于例如US 7754681和Ducry (2010) *Bioconjugate Chem.* 21:5-13以及其中引用的参考文献中，上述内容通过引用以其整体并入本文。

[0057] 本发明包括ADC，其中接头通过抗体或抗原结合分子内特定氨基酸处的附连将抗EGFR、抗ErbB3和/或抗FGFR抗体或抗原结合分子连接到药物或细胞毒素。可以用于本发明的这个方面背景下的实例性氨基酸附连包括例如赖氨酸 (参见例如US 5208020; US 2010/0129314; Hollander等 (2008) *Bioconjugate Chem.*, 19:358-361; WO 2005/089808; US 5714586; US 2013/0101546; 和US 2012/0585592)、半胱氨酸 (参见例如US 2007/0258987; WO 2013/055993; WO 2013/055990; WO 2013/053873; WO 2013/053872; WO 2011/130598; US 2013/0101546以及US 7750116)、硒代半胱氨酸 (参见例如W02008/122039; 和Hofer等, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* (2008) 105:12451-12456)、甲酰甘氨酸 (参见, 例如Carrico等, *Nat. Chem. Biol.* (2007) 3:321-322; Agarwal等, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* (2013) 110:46-51和Rabuka等, *Nat. Protocols* (2012) 10:1052-1067)、非天然氨基酸 (参见例如W02013/068874和W02012/166559) 以及酸性氨基酸 (参见例如W02012/05982)。接头也可以通过附连到碳水化合物 (参见例如US 2008/0305497、WO 2014/065661和Ryan等, *Food & Agriculture*

Immunol. (2001) 13:127-130) 和二硫键接头 (例如参见W02013/085925、W02010/010324、W02011/018611和Shaunak等, Nat. Chem. Biol. (2006) 2:312-313) 而与抗原结合蛋白偶联。

[0058] 根据某些实施例, 本发明提供了ADC, 其中本文所述的抗EGFR、抗ErbB3和/或抗FGFR抗体缀合到于2014年3月14日提交的国际专利申请号PCT/US14/29757 (例如, 化合物“7”, 在本文中也称为“M0026”) 中所列的接头-药物组合物, 其公开内容通过引用以其整体并入本文。

[0059] 本领域已知用于将化学部分缀合到肽、多肽或其它大分子的任何方法可用于本发明的背景下以制备抗EGFR、抗ErbB3和/或抗FGFR ADC。这些方法的变型将被本领域的普通技术人员所理解, 并且在本发明的范围内。

[0060] 本文所述的抗体和ADC可以通过本领域已知的任何方法制备。在具体实施例中, 抗EGFR和/或抗-ErbB3和/或抗-FGFR抗体通过美国专利号9132192、美国专利号8791244和美国专利号2014/0072563中公开的方法制备, 并且ADC通过PCT/US14/29757中提出的方法制造。

[0061] 6.2小分子酪氨酸激酶抑制剂 (TKI)

[0062] 表述“小分子FGFR抑制剂”是指与一种或更多种如FGFR2和FGFR3等FGFR结合的酪氨酸激酶结合的小分子。在一些实施例中, FGFR是FGFR1, 并且小分子抑制剂选自于以下各项: 普纳替尼 (ponatinib)、BGJ398、尼达尼布 (nintedanib)、PD173074、多韦替尼 (dovitinib)、AZD4547、达鲁舍替 (danusertib)、布立尼布 (brivanib)、多韦替尼二乳酸 (dovitinib dilactic acid)、MK-2461、丙氨酸布立尼布 (brivanib alaninate)、SU5402、多韦替尼乳酸盐 (dovitinib lactate)、CH5183284和LY2874455。在具体实施例中, 所述抑制剂抑制FGFR3酪氨酸激酶并且选自于以下各项: 普纳替尼、BGJ398、尼达尼布、PD173074、多韦替尼、多韦替尼乳酸盐、SU5402、BLU9931、AZD4547、CH5183284、达鲁舍替、LY2874455、SSR128129E和MK-2461。在其它实施例中, FGFR是FGFR2, 并且小分子抑制剂选自于以下各项: BGJ398、尼达尼布、AZD4547、MK-2461、CH5183284和LY2874455。在其它实施例中, FGFR是FGFR3, 并且小分子抑制剂选自于以下各项: BGJ398、尼达尼布、多韦替尼、AZD4547、多韦替尼二乳酸、MK-2461、多韦替尼乳酸盐、CH5183284、LY2874455和PKC412 (参见Chen等, (2005) Oncogene 24:8259-8267)。在其它实施例中, FGFR是FGFR4, 并且小分子抑制剂选自于以下各项: BGJ398、BLU9931和LY2874455或任何前述项的组合。

[0063] 表述“小分子EGFR抑制剂”是指结合到EGFR的酪氨酸激酶的小分子。在具体实施例中, EGFR酪氨酸激酶抑制剂选自于以下各项: 盐酸厄洛替尼 (erlotinib HCL)、吉非替尼 (gefitinib)、拉帕替尼 (lapatinib)、阿法替尼 (afatinib)、卡奈替尼 (canertinib)、拉帕替尼 (lapatinib)、达克替尼 (dacomitinib)、WZ4002、AZD8931、CUDC-101、AG-1478、PD153035、AEE788、AC480、OSI-420、WZ3146、AST-1306、瓦尼替尼 (varlitinib)、埃克替尼 (icotinib)、TAK-285、WHI-P154、PD168393、CNX-2006、二马来酸阿法替尼 (afatinib dimaleate)、CL-387785、波齐替尼 (poziotinib)、奥希替尼 (osimertinib)、AZ5104或任何前述项的组合。

[0064] 表述“小分子ErbB3抑制剂”是指结合到ErbB3的酪氨酸激酶的小分子。在具体实施例中, ErbB3酪氨酸激酶抑制剂选自但不限于AZD8931 (沙普替尼 (sapitinib))、瓦尼替尼、卡奈替尼和阿姆瓦替尼 (amuvatinib)。

[0065] 在各种实施例中,小分子酪氨酸激酶抑制剂或酪氨酸激酶抑制剂可以与其它小分子酪氨酸激酶抑制剂组合使用。在其它实施例中,小分子酪氨酸激酶抑制剂可以与本文所述的一种或多种抗体一起使用。本领域技术人员将会理解,小分子FGFR酪氨酸激酶抑制剂、小分子EGFR酪氨酸激酶抑制剂和/或ErbB3酪氨酸激酶抑制剂还可以抑制其它酪氨酸激酶(例如,EGFR酪氨酸激酶抑制剂可以抑制ErbB1酪氨酸激酶)并在选择用于治疗方案的一种或更多种抑制剂时考虑到这一点。

[0066] 6.3治疗制剂和施用

[0067] 本发明提供了包含抗-FGFR抗体、并且在具体实施例中包含抗-FGFR3抗体和抗-EGFR抗体或其抗原结合片段的药物组合物。在某些实施例中,抗-FGFR抗体和抗-EGFR抗体处于相同的组合物中。在其它实施例中,抗-FGFR抗体和抗-EGFR抗体处于不同的组合物中。本发明的药物组合物与合适的载体、赋形剂以及提供改善的转移、递送、耐受性等其它试剂一起配制。在所有药物化学家已知的制剂中可以找到多种合适的制剂:Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Easton, PA。这些制剂包括例如粉末、糊剂、软膏、凝胶剂、蜡、油、脂质、含囊泡(如LIPOFECTIN™)的脂质(阳离子或阴离子)、DNA缀合物、无水吸收膏、水包油和油包水乳液、聚乙二醇乳液(各种分子量的聚乙二醇)、半固体凝胶和含有聚乙二醇的半固体混合物(参见Powell等“Compendium of excipients for parenteral formulations”PDA(1998) J Pharm Sci Technol 52:238-311)。

[0068] 给予患者的EGFR和/或FGFR抗体的剂量可以根据患者的年龄和体量、目标疾病、病症、给药途径等而变化。优选剂量通常根据体重或体表面积来计算。当本发明的抗体用于治疗成年患者的与EGFR和/或FGFR活性相关的病症或疾病时,通常以约0.01mg/kg到约20mg/kg体重的单一剂量静脉内施用本发明的抗体可能是有利的,更优选地为约0.02mg/kg到约7mg/kg、约0.03mg/kg到约5mg/kg或约0.05mg/kg到约3mg/kg体重。根据病症的严重程度,可以调整治疗的频率和持续时间。用于施用抗-EGFR抗体或抗-FGFR抗体的有效剂量和时间表可凭经验确定;例如,可以通过定期评估监测患者进展情况,并相应调整剂量。此外,剂量的种间类推可以使用本领域熟知的方法进行(例如,Mordenti等,1991,Pharmaceut. Res. 8: 1351)。

[0069] 各种递送系统是已知的并且可以用于施用本发明的药物组合物,例如包封在脂质体、微粒、微胶囊、能够表达突变病毒的重组细胞、受体介导的内吞作用中(参见例如Wu等,1987, J. Biol. Chem. 262:4429-4432)。引入方法包括但不限于皮内、肌肉内、腹膜内、静脉内、皮下、鼻内、硬膜外和口服途径。所述组合物可以通过任何方便的途径施用,例如通过输注或推注、通过上皮或皮肤粘膜衬里(例如口腔粘膜、直肠和肠粘膜等)吸收,并且可以与其它生物活性剂一起施用。施用可以是全身的或局部的。

[0070] 本发明的药物组合物可以使用标准针和注射器皮下或静脉内递送。另外,关于皮下递送,笔递送装置容易地具有递送本发明的药物组合物的应用。这种笔递送装置可以是可重复使用的或一次性的。可重复使用的笔递送装置通常使用含有药物组合物的可更换药筒。一旦药筒内的所有药物组合物已经被施用并且药筒是空的,则空药筒可以容易地被丢弃并且被包含药物组合物的新药筒替换。笔递送装置然后可以被重新使用。在一次性笔递送装置中,没有可更换的药筒。相反,一次性笔递送装置预装有保持在所述装置内的储存器中的药物组合物。一旦储存器中的药物组合物被清空,整个装置就被丢弃。

[0071] 许多可重复使用的笔和自动注射器递送装置具有皮下递送本发明药物组合物的应用。实例包括但不限于AUTOPENTM (Owen Mumford, Inc., 英国, 伍德斯托克)、DISETRONICTM笔 (Disetronic Medical Systems, 瑞士, 伯格多夫)、HUMALOG MIX75/25TM笔、HUMALOGTM笔、HUMALIN 70/30TM笔 (Eli Lilly and Co., Indianapolis, IN)、NOVOPENTM I、II和III (Novo Nordisk, 丹麦, 哥本哈根)、NOVOPEN JUNIORTM (Novo Nordisk, 丹麦, 哥本哈根)、BDTM笔 (Becton Dickinson, 富兰克林湖, 新泽西州)、OPTIPENTM、OPTIPEN PROTM、OPTIPEN STARLETT和OPTICLIKTM (sanofi-aventis, 德国, 法兰克福) 等。具有皮下递送本发明药物组合物应用的一次性笔递送装置的实例包括但不限于SOLOSTARTM笔 (sanofi-aventis)、FLEXPENTM (Novo Nordisk) 和KWIKPENTM (Eli Lilly)、SURECLICKTM自动注射器 (Amgen, Thousand Oaks, CA)、PENLETTM (Haselmeier, 德国, 斯图加特)、EPIPEN (Dey, LP) 和HUMIRATM笔 (Abbott Labs, Abbott Park IL) 等。

[0072] 在某些情况下, 药物组合物可以在控释系统中递送。在一个实施例中, 可以使用泵 (参见Langer, 同上; Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201)。在另一实施例中, 可以使用聚合物材料; (参见Medical Applications of Controlled Release, Langer and Wise (eds.), 1974, CRC Pres., Boca Raton, Florida)。在又一实施例中, 可以将控释系统放置在组合物的靶标附近, 因此仅需要全身剂量的一部分 (参见例如Goodson, 1984, Medical Applications of Controlled Release, 同上, 第2卷, 第115-138页)。其它控释系统在Langer, 1990, Science 249:1527-1533的综述中进行了讨论。

[0073] 可注射制剂可以包括用于静脉内、皮下、皮内和肌内注射剂、滴注剂等的剂型。这些可注射制剂可以通过公知的方法制备。例如, 可以通过例如将所述抗体或其盐制成溶于、悬浮或乳化于常规用于注射的无菌水性介质或油性介质中来制备可注射制剂。作为注射用水性介质, 例如有生理盐水、含有葡萄糖等助剂的等渗溶液等, 其可以与例如醇 (例如乙醇)、多元醇 (例如丙二醇、聚乙二醇)、非离子表面活性剂 [例如聚山梨醇酯80、HCO-50 (氢化蓖麻油的聚氧乙烯 (50mol) 加合物)] 等适当的增溶剂组合使用。作为油性介质, 采用了例如芝麻油、大豆油等, 这些油性介质可以与增溶剂 (如苯甲酸苄酯、苯甲醇等) 组合使用。由此制备的注射剂优选填充在合适的安瓿中。

[0074] 有利地, 将上述用于口服或肠胃外使用的药物组合物制备成适于适合活性成分的剂量的单位剂量的剂型。单位剂量的这种剂型包括例如片剂、丸剂、胶囊剂、注射剂 (安瓿)、栓剂等。上述抗体的包含量在单位剂量中通常为每剂量约5mg到约500mg; 特别是以注射剂的形式, 对于其它剂型, 上述抗体优选地含有约5mg到约100mg和约10mg到约250mg。

[0075] 本领域技术人员将理解, 在一些实施例中, 抗EGFR抗体和抗FGFR抗体以相同的制剂施用。在其它实施例中, 抗EGFR抗体和抗FGFR抗体以不同的制剂在相同的时间或在不同的时间施用, 并且可以以相同的频率或以不同的频率施用 (即, 一种抗体7天施用一次, 而另一种抗体每3天施用一次)。本领域技术人员还将理解, 抗EGFR抗体和抗FGFR抗体可以通过相同的途径或通过不同的途径以相同或不同的剂量形式施用 (例如, 一种抗体可以通过输注施用而另一种抗体可以通过口服施用)。

[0076] 6.4抗EGFR和抗FGFR阻滞剂的治疗用途

[0077] 本发明的抗EGFR和抗FGFR抗体尤其可用于治疗、预防和/或缓解使用已知的组合抗体和/或小分子阻滞剂 (例如施用EGFR抗体和ErbB3抗体的组合作为治疗性阻滞剂) 获得

对治疗具有抗性的疾病或病症。在各种实施例中,抗性细胞是癌细胞。在某些实施例中,抗性细胞是癌,包括但不限于转移性肺癌(例如非小细胞肺癌)、结肠直肠癌、胰腺癌和头颈部癌(例如鳞状细胞癌)。在具体实施例中,抗性细胞产生融合蛋白(例如FGFR3-TACC3融合体)作为抵抗ErbB受体阻断的天然机制。在具体实施例中,疾病或病症与EGFR和/或FGFR(例如FGFR3)的表达或活性相关或由其介导。例如,本发明的抗体和抗原结合片段可用于治疗表达高水平EGFR和/或高水平FGFR(如FGFR3)的肿瘤。本发明的抗体和抗原结合片段可以用于治疗对EGFR阻滞剂具有抗性的任何疾病或病症,包括但不限于脑和脑膜、口咽、肺和支气管树、胃肠道、男性和女性生殖道、肌肉、骨骼、皮肤和附件、结缔组织、脾脏、免疫系统、造血细胞和骨髓、肝和尿道以及特殊感觉器官(如眼睛)中出现的肿瘤。在某些实施例中,本发明的抗体和抗原结合片段用于治疗一种或多种以下癌症:肾细胞癌、胰腺癌、乳腺癌、头颈癌、前列腺癌、恶性神经胶质瘤、骨肉瘤、结肠直肠癌、胃癌(例如,具有MET扩增的胃癌)、恶性间皮瘤、多发性骨髓瘤、卵巢癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌(例如EGFR依赖性非小细胞肺癌)、滑膜肉瘤、甲状腺癌或黑素瘤。

[0078] 6.5联合疗法和制剂

[0079] 本发明包括治疗性施用方案,其包括施用抗-EGFR抗体(例如美国专利5637361中描述的抗-EGFR抗体)和/或抗FGFR3抗体与至少一种另外的治疗活性成分组合。此类另外的治疗活性成分的非限制性实例包括:其它EGFR拮抗剂(例如第二抗EGFR抗体[例如西妥昔单抗或帕尼单抗]或EGFR的小分子抑制剂[例如吉非替尼或厄洛替尼]),另一种EGFR家族成员(例如Her2/ErbB2、ErbB3或ErbB4)的拮抗剂(例如抗ErbB2、抗ErbB3或抗ErbB4抗体或ErbB2、ErbB3或ErbB4活性的小分子抑制剂),EGFRvIII的拮抗剂(例如特异性结合EGFRvIII的抗体),cMET拮抗剂(例如抗cMET抗体),IGF1R拮抗剂(例如抗IGF1R抗体),B-raf抑制剂(例如威罗菲尼、索拉非尼、GDC-0879、PLX-4720),PDGFR- α 抑制剂(例如抗-PDGFR- α 抗体),PDGFR- β 抑制剂(例如抗-PDGFR- β 抗体),VEGF拮抗剂(例如VEGF-Trap,参见例如US 7087411(在本文中也称为“VEGF抑制性融合蛋白”),抗VEGF抗体(例如贝伐单抗),VEGF受体的小分子激酶抑制剂(例如舒尼替尼、索拉非尼或帕唑帕尼)、DLL4拮抗剂(例如US2009/0142354中公开的抗DLL4抗体,例如REGN421),Ang2拮抗剂(例如,公开于US2011/0027286的抗Ang2抗体,如H1H685P)等。

[0080] 其它治疗活性成分的非限制性实例包括FGFR拮抗剂,例如普纳替尼、BGJ398、尼达尼布、PD173074、多韦替尼、多韦替尼乳酸盐、SU5402、BLU9931、AZD4547、CH5183284、danusertib、LY2874455、SSR128129E、MK-2461、PKC412、CHIR-258、SU-5402、PD-173074、CHIR-258、TKI-258、美国专利8815906中公开的化合物。在一些实施例中,FGFR拮抗剂是另一FGFR家族成员的拮抗剂,比如例如FGFR1、FGFR2或FGFR4。

[0081] 可以与抗EGFR抗体和FGFR抗体组合有利地施用的其它药剂包括细胞因子抑制剂(例如小分子细胞因子抑制剂)和结合到如IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-9、IL-11、IL-12、IL-13、IL-17、IL-18等细胞因子或结合到其各自的受体的抗体。

[0082] 本发明还包括使用包含本文提及的任何抗EGFR抗体和/或抗FGFR3抗体的治疗组合和FGFR3、VEGF、Ang2、DLL4、ErbB2、ErbB3、ErbB4、EGFRvIII、cMet、IGF1R、B-raf、PDGFR- α 、PDGFR- β 中的一个或更多个的抑制剂或者任何上述细胞因子,其中所述抑制剂是适体、反义分子、核酶、siRNA、肽体、纳米抗体或抗体片段(例如Fab片段;F(ab')₂片段;Fd片段;Fv片

段;scFv;dAb片段;或如双抗体、三抗体、四抗体、微型抗体和最小识别单位等其它工程化分子)。抗EGFR抗体或抗FGFR3抗体还可以与抗病毒剂、抗生素、镇痛剂、皮质类固醇和/或NSAID联合施用和/或共同配制。抗EGFR或抗FGFR3抗体也可作为还包括放射治疗和/或常规化疗的治疗方案的一部分而施用。

[0083] 可以在施用抗EGFR抗体和/或抗FGFR3抗体之前、同时或之后立即施用另外的治疗活性成分;(为了本公开的目的,这样的施用方案被认为是“结合”另外的治疗活性成分施用抗EGFR抗体)。本发明包括药物组合物,其中抗EGFR抗体和/或抗FGFR3抗体与本文其它地方所述的一种或更多种另外的治疗活性组分共同配制。在一些实施例中,共同配制抗EGFR抗体和抗FGFR3抗体。

[0084] 本发明还包括包含“降解抗体”和“配体阻断抗体”的组合的方法。“降解抗体”是指分别引起细胞中EGFR和FGFR3降解而不一定阻断配体-受体相互作用的抗EGFR抗体和/或抗FGFR3抗体。抗EGFR降解抗体的非限制性实例是如美国专利号9132192中所述的称为H1H134P的抗体。“配体阻断抗体”是指阻断EGFR或FGFR3与其一种或更多种配体(例如EGF、TGF- α 或FGF1)之间相互作用的抗EGFR或抗FGFR3抗体。配体阻断EGFR抗体的非限制性实例是美国专利9132192中所述称为H1H141P的抗体。配体阻断抗体的另一实例是西妥昔单抗。本发明人设想将降解抗体和配体阻断抗体组合以协同或以其它方式改善抗肿瘤功效。因此,本发明包括含有至少一种降解抗体和至少一种配体阻断性抗体的药物组合物。本发明还包括治疗方法,其包括向受试者施用降解抗体和配体阻断抗体的组合(作为分开的施用或作为共同制剂)。

[0085] 7.实例

[0086] 提出以下实例是为了向本领域普通技术人员提供关于如何制造和使用本发明的方法和组合物的完整公开和描述,并且不意在限制发明人认为的他们的发明的范围。已经努力确保所使用数字(例如数量、温度等)的准确性,但是应该考虑到一些实验误差和偏差。除非另有说明,否则份数是重量份,分子量是平均分子量,温度是摄氏度,压力是在大气压或接近大气压。

[0087] 实例1:材料和方法

[0088] 产生ErbB3和EGFR阻断抗体。如前所述(Zhang等(2014)和美国专利号8791244、9132192和美国公开号2014/0072563)使用VelocImmune®小鼠产生针对人ErbB3(REGN1400)和人EGFR(REGN955)的阻断抗体。这些抗体以高亲和力与其各自的靶标相互作用并且有力地阻断配体结合。先前已经描述了(Zhang等(2014))这些抗体在体外和在肿瘤异种移植模型中的功能特征。

[0089] 人类肿瘤细胞系。人类肿瘤细胞系FaDu, Ca127, NCI-H1975和Detroit 562从ATCC获得。SNU1076细胞从韩国细胞系银行获得。细胞系通过在ATCC/Promega上的短串联重复谱分析进行鉴定。所有实验均用低传代细胞培养物进行(<第10代)。所有细胞系均在培养基中培养,并由供应商推荐补充。

[0090] 产生FaDu抗性变体细胞系。为了产生FaDu V2细胞系(参见图1A),通过将 5×10^6 FaDu细胞皮下植入6-8周龄的C.B.-17SCID小鼠的后肋,形成亲本FaDu肿瘤。一旦建立肿瘤(约 200mm^3 体积),将小鼠随机化并用对照抗体(12.5mg/kg)、REGN1400(2.5mg/kg)、REGN955(10mg/kg)或REGN955加REGN1400的组合进行持续治疗。在持续药物治疗下,在植入

后约110天(组合治疗开始后92天),一个肿瘤开始再生。收获所述肿瘤并将肿瘤片段重新植入SCID小鼠中。当用REGN955加REGN1400组合治疗激发时,一些肿瘤碎片能够快速生长。收获一个这样的肿瘤并将所述肿瘤片段再次植入SCID小鼠中。在REGN955和REGN1400组合治疗的情况下快速生长的肿瘤片段被收集、切碎并上下移液以打碎大细胞团块。将细胞悬液铺在组织培养皿中,每隔一天更换培养基以除去残骸和死细胞,直至获得均匀的单层肿瘤细胞(1-2周)。

[0091] 除了使用Regeneron EGFR/ErbB3双特异性抗体而不是REGN955和REGN1400的组合来实现EGFR/ErbB3阻断之外,使用与上述相同的程序产生FaDu V1细胞系。所述双特异性抗体提供与所述抗体组合相同程度的FaDu肿瘤消退。此外,体内重新传代两次以产生FaDu V1细胞系的肿瘤最初是基于其对抗体再激发无反应性而不是在连续抗体治疗下再生长而最初收获的。所有程序均根据Regeneron机构动物护理和使用委员会的指导方针进行。

[0092] 肿瘤细胞生长测定。为了评估肿瘤细胞生长,将2000-3000个细胞在含血清培养基中铺在96孔板(n=每个治疗组8个重复孔)中。铺板后一天,通过使用CellTiter96 Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega)的MTS分析测定确定基线(0小时)细胞数。然后用图例中所示浓度的REGN1400、REGN955、MEK抑制剂GSK1120212 (Selleckchem)、EGFR TKI AZD9291 (Selleckchem)或PI3K抑制剂BYL719 (Selleckchem)治疗细胞。72小时后,通过MTS测定确定最终细胞数。通过从最终MTS读数中减去基线MTS读数来确定每个治疗组的相对细胞生长。

[0093] 肿瘤细胞信号传导的分析。为了通过免疫印迹分析细胞信号传导,用以下试剂处理肿瘤细胞: ErbB3阻断REGN1400, EGFR阻断抗体REGN955, MEK抑制剂GSK1120212 (Selleckchem), FGFR TKI AZD4547 (Selleckchem), MET TKI PHA665752 (Sigma), PI3K抑制剂BYL719, 人NRG1 (R&D Systems), 人EGF (R&D Systems)。处理后,使用以下抗体对细胞裂解物进行免疫印迹: 磷酸-ErbB3 (Cell Signaling Technology (CST), cat.#4561), EGFR (CST, cat.#2646), 磷酸-EGFR (CST, cat.#2234), Akt (CST, cat.#9272), 磷酸-Akt (CST, cat.#4060), ERK (CST, cat.#4695), 磷酸-ERK (CST, cat.#4370), MET (CST, cat.#8198), 磷酸-MET (CST, cat.#3077), ErbB3 (CST, cat.#4754), 磷酸-FGFR (CST, cat.#3476)。

[0094] 使用人类Phospho-RTK阵列试剂盒(R&D Systems)评估49种人类受体酪氨酸激酶(RTKs)的酪氨酸磷酸化状态。简而言之,将FaDu亲本或变体肿瘤细胞铺在含有血清的培养基中的6孔板中并培养直至细胞几乎汇合。然后用PBS洗涤细胞并刮入补充有Halt蛋白酶和磷酸酶抑制剂混合物(Thermo Scientific)的0.2ml裂解缓冲液(在试剂盒中提供)中。根据试剂盒说明检测细胞裂解物中的磷酸化RTK。

[0095] FaDu变体细胞系中FGFR3-TACC3融合转录物的鉴定。为了鉴定FaDu变体对亲本FaDu细胞独特的遗传改变,使用Dynabeads® mRNA纯化试剂盒(Invitrogen)从5µg的总RNA中纯化mRNA。使用ScriptSeq™ mRNA-Seq文库制备试剂盒(Epicentre)制备链特异性RNA-seq文库。进行12个循环的PCR以扩增文库。使用0.7X SPRIselect珠(Beckman Coulter)纯化扩增的文库以富集大于300bp的片段。通过多重配对读数运行2×100个循环,在IlluminaHiSeq®2500上进行测序。

[0096] 为了确认RNA-seq在FaDu V1和V2细胞中鉴定的融合转录物的连接处的序列,将100ng来自FaDu P1、V1或V2细胞的cDNA进行PCR。为了扩增FGFR3外显子18-TACC3内含子9-

TACC3外显子11融合连接处(V1)侧翼区域,使用FGFR3外显子17(5'-AGAGGCCACCTTCAAGC)(序列ID号:1)中的正向引物和TACC3外显子16(5'-CAGATCCTGGTCAGTCCTC)(序列ID号:2)中的反向引物进行巢式PCR的第一次反应。第二次PCR反应使用FGFR3外显子18(5'-AGCTCCTCAGGGGACGACTC)(序列ID号:3)中的正向引物和TACC3外显子11(5'-TCACACCTGCTCCTCAGC)(序列ID号:(图4))。为了扩增FGFR3外显子17-TACC3外显子9融合接头(V2)侧翼区域,使用FGFR3外显子17(5'-ATGCGGGAGTGCTGGCATG)(序列ID号:5)中的正向引物和TACC3外显子9(5'-ACGTCCTGAGGGAGTCTCATTTG)(序列ID号:6)。作为cDNA样品完整性的对照,管家基因亲环蛋白片段也被扩增。反应产物在2%琼脂糖凝胶上分离,切下目的条带,纯化并进行Sanger测序。

[0097] 为了通过Taqman实时PCR对FaDu V1和V2细胞中FGFR3-TACC3融合转录物的表达进行定量,提取总RNA并使用高容量RNA与cDNA主混合物(Applied Biosystems)合成cDNA。为了检测FGFR3外显子18-TACC3内含子9-TACC3外显子11转录物(V1),使用上述正向FGFR3外显子18引物和反向TACC3外显子11引物以及探针5'-CGAAGCGACACAGGAGGAGAACC(序列ID号:7)。为了检测FGFR3外显子17-TACC3外显子9转录物(V2),使用上述正向FGFR3外显子17引物和反向TACC3外显子9引物以及探针5'-CCTCCCAGAGGCCACCTTCAAG(序列ID号:8)。使用自动设置确定阈值循环,在ABI 7900HT仪器上在标准Taqman条件下运行所述测定。所有探针都是双标记的5'FAM/3'BHQ-1(Biosearch Technologies, Inc.)。

[0098] FaDu变体细胞系中FGFR3-TACC3融合蛋白的检测。为了评估FaDu V1和V2细胞系中FGFR3-TACC3融合蛋白的酪氨酸磷酸化状态,将10cm培养皿中生长的细胞在含有Halt蛋白酶和磷酸酶抑制剂混合物(Thermo Scientific)的1ml缓冲液(150mM NaCl/20mM Tris, pH7.5/1% Triton X-100)中裂解。溶解后,通过与25 μ l蛋白A/G PLUS-琼脂糖珠(Santa Cruz Biotechnology)在4 $^{\circ}$ C下温育1小时、然后与20 μ l的4G10铂抗磷酸酪氨酸琼脂糖缀合物(EMD Millipore)在4 $^{\circ}$ C下温育16小时以预先澄清裂解物。然后用冷裂解缓冲液洗涤珠子并重悬于SDS样品缓冲液中,以使用针对FGFR3(Santa Cruz Biotechnology, 克隆B-9)、TACC3(R&D Systems, cat.#AF5720)或Src(CST, cat.#2123)的抗体进行免疫印迹分析。

[0099] 为了通过免疫沉淀检测FGFR3-TACC3融合蛋白,将生长在10cm培养皿中的FaDu P1、V1和V2细胞在含有Halt蛋白酶和磷酸酶抑制剂混合物(Thermo Scientific)的1ml缓冲液(150mM NaCl/20mM Tris, pH7.5/1% Triton X-100)中裂解。通过与25 μ l蛋白A/G PLUS-琼脂糖珠在4 $^{\circ}$ C下温育1小时来预先澄清细胞裂解物。然后将裂解物与5 μ g的TACC3抗体在4 $^{\circ}$ C下温育16小时。通过与25 μ l的蛋白A/G PLUS-琼脂糖珠在4 $^{\circ}$ C下温育1小时来收集免疫复合物。用冷裂解缓冲液洗涤珠子并重悬于SDS样品缓冲液中,以使用针对FGFR3和TACC3的抗体进行免疫印迹分析。在旨在从天然FGFR3分离FGFR3-TACC3融合蛋白的实验中,采用4% SDS凝胶,因为它们比用于其它免疫印迹的4-20%梯度凝胶能够获得更好的分辨率。FGFR3-TACC3融合蛋白也在FaDu V1和V2细胞中通过用FGFR3抗体对细胞裂解物进行直接免疫印迹来检测。

[0100] 产生表达FGFR3-TACC3融合蛋白的细胞系。为了能够在癌细胞中表达野生型FGFR3和FaDu V1和V2FGFR3-TACC3融合蛋白,将编码这些蛋白质的DNA片段克隆到其中CMV启动子被EF1a启动子置换的慢病毒表达载体pLVX-IRES-Neo中。为了产生慢病毒,使用FuGENE 6转染试剂(Promega),用各种pLVX-IRES-Neo质粒加上包装载体psPAX2和包膜载体pMD2.G共转

染293T细胞。转染后72小时,收集并过滤含有病毒的上清液。为了产生汇集的稳定细胞系,用各种慢病毒以0.3的MOI感染细胞(FaDu亲本, Ca127, NCI-H1975, SNU1076, Detroit 562),并在400-800 μ g/ml G418中选择约2周。对于使用工程化FaDu亲本细胞的肿瘤异种移植实验,将 5×10^6 个细胞皮下植入6-8周龄的C.B.-17SCID小鼠的后肋。一旦建立肿瘤(体积约200mm³),将小鼠随机化并用抗体治疗,如以上附图说明中所示。

[0101] 使用CRISPR/Cas9破坏FGFR3-TACC3融合基因。为了能够用CRISPR/Cas9技术使FGFR3-TACC3融合基因失活,将编码对FGFR3特异性的单一指导RNA(sgRNA)的双链寡核苷酸克隆到lentiCRISPR质粒中,所述质粒是编码Cas9内切核酸酶、sgRNA和嘌呤霉素选择标记的慢病毒表达载体(参见Shalem等,(2014) Science 343:84-87)。为了产生慢病毒,使用FuGENE 6转染试剂(Promega),用lentiCRISPR质粒加上包装载体psPAX2和包膜载体pMD2.G共转染293T细胞。转染后72小时,收集含病毒的上清液,过滤并通过超速离心进行浓缩。使用编码Cas9内切核酸酶加FGFR3sgRNA1或FGFR3sgRNA2的慢病毒或使用仅编码Cas9核酸内切酶的对照慢病毒以0.3的MOI感染FaDuV1和V2细胞。编码FGFR3sgRNA1的CRISPR RNA部分的DNA的序列是5'-GGGGACGGAGCAGCGCGTCG(序列ID号:9)(结合于FGFR3外显子2),编码FGFR3sgRNA2的CRISPR RNA部分的DNA的序列是5'-CGCGCTGCGTGAGCCGCTGC(序列ID号:10)(结合于FGFR3外显子3)。感染后约24小时,用1 μ g/ml嘌呤霉素处理细胞以杀死未感染的细胞。在感染后10-14天之间将稳定转导的细胞用于实验(细胞生长或细胞信号传导)。

[0102] 实例2:选择用于对表达活化的FGFR3-TACC3融合蛋白的EGFR/ErbB3阻滞剂具有抗性的头颈癌细胞

[0103] 之前已经公开了对于EGFR(REGN955)和ErbB3(REGN1400)具有特异性的阻断抗体的产生并证明这些抗体的组合促进了FaDu HNSCC异种移植肿瘤的实质性消退(参见Zhang等(2014))。在FaDu细胞中,EGFR的阻滞剂主要抑制ERK通路的激活,而ErbB3阻滞剂主要抑制AKT通路的激活,这可能解释了Zhang等(2014)公开的组合治疗的优越功效。

[0104] 为了发现介导FaDu肿瘤对EGFR/ErbB3的联合阻滞剂的获得性抗性的分子机制,如图1所概述的那样产生对这种治疗呈现完全抗性的变体细胞系。用REGN955和REGN1400进行组合治疗的FaDu肿瘤缩小并且几乎检测不到,这表明大多数肿瘤细胞已经经历细胞凋亡(图1A,第一小图)。然而,最终发现个体肿瘤再生(图1A,第二小图)。在药物治疗下收获再生的肿瘤,进行片段化并在体内重新传代(图1A,第三小图和第四小图)。在体内重新传代两次后,使用显示出对组合的EGFR/ErbB3阻滞剂具有抗性的肿瘤来产生细胞系。由两种这样的变体细胞系FaDu V1和FaDu V2形成的肿瘤显示出对EGFR/ErbB3阻滞剂的完全抗性(分别为图1B和图1C)。称为FaDuP1的对照细胞系通过在体内重新传代亲本FaDu肿瘤片段而产生,除了小鼠用对照蛋白人Fc处理之外。FaDu P1细胞系是比较细胞系,用于抗性变体的后续遗传和生物化学表征。

[0105] 为了排除FaDu V1和V2细胞系对EGFR/ErbB3阻滞剂的抗性是由于抗体不能结合到V1和V2细胞系的可能性,我们证明REGN955和REGN1400抗体结合并且阻断它们在这些细胞中的各自靶标(图(图2))。这证实变体不表达不能被这些抗体抑制的EGFR或ErbB3的突变形式。为了研究变体细胞系抗性的分子基础,评估了REGN955和REGN1400体外抑制这些细胞生长的能力。EGFR加ErbB3的联合阻滞剂抑制FaDu P1亲本细胞的生长约80%(如Zhang等(2014)所示),而仅抑制FaDu V1和V2细胞的生长约25%(图3A到图3C),表明促进这些细胞

系体内抗性的机制在体外也很大程度上起作用。有趣的是,EGFR阻断抗体能够显著抑制亲本细胞的生长(约40%抑制),但在变体细胞系中几乎没有作用(仅5-10%抑制)(图3A到图3C)。相反,ErbB3阻断抗体的效果在亲本细胞系和变体细胞系中是相似的(图3A到图3C)。

[0106] 为了评估EGFR/ErbB3阻滞剂对FaDu V1和V2细胞生长的相对较弱的作用是否反映了未能抑制下游信号传导途径,测试了EGFR/ErbB3阻滞剂对AKT和ERK活化的影响。有趣的是,在FaDu V1和V2细胞二者中,REGN1400与其在FaDu P1细胞中一样有效抑制AKT活化(图3D)。然而,与在FaDu P1细胞中观察到的几乎完全的ERK抑制(图3D)相比,REGN955以及REGN955和REGN1400的组合都不能有效抑制FaDu V1或V2细胞中的ERK活化(图3D)。因此,尽管REGN955能够有效抑制变体细胞系中的EGFR(图2),但所述抗体不能阻断下游ERK活化。与EGFR阻滞剂对后持续激活MAP激酶途径是抗性表型的关键因素一致的是,与REGN1400加MEK抑制剂GSK1120212(trametinib,GSK)的联合治疗有效地阻断了FaDu V2细胞中的AKT和ERK磷酸化(图3E)并且抑制细胞生长约70%(图3F),类似于组合的EGFR/ErbB3阻滞剂对亲本FaDu细胞生长的作用。

[0107] 这些发现表明当EGFR被阻断时,另一种在FaDu P1亲本细胞中不活跃的受体酪氨酸激酶(RTK)在FaDu V1和V2细胞系中维持ERK信号传导。因此,使用磷酸-TKK阵列评估FaDu P1、V1和V2细胞中所有RTK的活化状态。如先前所示,亲本FaDu细胞表现出EGFR、HER2和ErbB3的活化(图4A)。这些RTK在FaDu V1和V2细胞中也有活性,但这两种抗性细胞系也表达活化的FGFR3,这在亲本细胞中是不可检测的(图4A)。另外,FaDu V2细胞比FaDu P1或FaDu V1细胞显示更强的MET活化(图4A)。全细胞裂解物的免疫印迹分析证实了FaDu V2细胞中MET磷酸化增加(图4B)。用抗磷酸酪氨酸抗体进行免疫沉淀,然后进行FGFR3的免疫印迹检测,证实FaDu V1和V2细胞中都存在活化的FGFR3,但FaDu P1细胞中不存在(FaDu V2细胞中存在更高水平的磷酸-FGFR3)(图4C)。作为免疫沉淀的对照,我们显示从FaDu P1、V1和V2细胞裂解物中回收等量的酪氨酸磷酸化的Src(图4C)。

[0108] FaDu V1和V2细胞中存在活化的FGFR3以及FaDu V2细胞中存在活化的MET表明了当EGFR被阻断时这些RTK中的一者或两者在这些细胞系中维持ERK活化的可能性。为了研究这种可能性,测试了MET TKI PHA665752对REGN955抑制FaDu V2细胞中ERK活化的能力的作用。尽管完全阻断了MET磷酸化,但MET TKI本身或与REGN955组合并不抑制ERK活化(图4D),表明REGN955抑制FaDu V2细胞中ERK的失败不是MET活化增加的结果。

[0109] 我们接下来评估用选择性泛FGFR TKI(AZD4547)和REGN955的联合治疗是否可以有效抑制变体细胞系中的ERK活化。如图4E所示,用25nM AZD4547处理FaDu V2细胞完全阻断了FGFR3磷酸化(我们通过RTK阵列在这些细胞中检测到唯一的磷酸化FGFR)。在FaDu V1细胞和V2细胞二者中,AZD4547加REGN955的组合完全抑制ERK活化,而单一药剂无效或部分有效(图4F)。这一发现表明,当EGFR被阻断时,活性FGFR3对于维持FaDu变体细胞中的ERK活化是必需的。AZD4547单独或与REGN955组合对AKT活化没有影响(图4F),表明FGFR3信号传导对于FaDu变体细胞中AKT的活化不是必需的,这与单独抑制ErbB3单独导致这些细胞中几乎完全丧失活化的AKT的观察结果一致(图3D)。

[0110] FaDu变体细胞系中FGFR3的活化可以由FGFR3的配体依赖性刺激的增加或FGFR3的遗传性改变引起。例如,在多种癌症中已经鉴定出FGFR3中的激活点突变,最突出的是在膀胱癌中(参见Knowles(2008)Future Oncol.4:71-83)。因此,我们进行了RNA-seq来鉴定

FaDu变体细胞系中可能影响抗性表型的FGFR3和/或其它基因的遗传改变。与变体细胞系中激活的FGFR3的存在一致,我们在FaDu V1和V2细胞中都鉴定到FGFR3-TACC3融合转录物(每个细胞系表达了不同的融合转录物),但在亲本FaDu细胞中未鉴定到融合转录物。最近在多种人类癌症中鉴定出FGFR3-TACC3融合蛋白,并且在所有情况下,这些融合蛋白包含大部分FGFR3蛋白,包括酪氨酸激酶结构域和TACC3卷曲螺旋结构域,表明融合蛋白的组成型二聚化由TACC3卷曲螺旋结构域介导是FGFR3激酶活化的基础(参见例如Parker等(2013) Clin Invest. 123:855-865; Singh等(2012) Science 337:1231-1265; Williams等(2013) Hum Mol Genet. 22:795-803; Wu等(2013) Cancer Discov. 3:636-647)。在FaDu V1和V2细胞中鉴定的融合转录物与之前报道的融合转录物类似(图5A)。RT-PCR(带有推定融合连接侧翼的引物)证实FaDu V1和V2细胞中存在各自的融合转录物(图5B)。与此发现一致,定量实时PCR揭示了FaDu V1和V2细胞中各自融合转录物的显著表达,但亲本FaDu细胞中没有融合转录物的显著表达,其中这些转录物不可检测到(图5C)。

[0111] 与亲本细胞相比,对来自FaDu亲本细胞系和变体细胞系的全细胞裂解物用FGFR3抗体进行免疫印迹显示了在V1和V2细胞中都存在更高分子量的含FGFR3的蛋白质(图5D,最后3个泳道)。FaDu V1和V2细胞中较大的含FGFR3的蛋白以与我们鉴定的融合转录物一致的分子量进行迁移,即比天然FGFR3(其在约110-130kDa下迁移)大约20kDa。为了证实在FaDu变体细胞系中表达的较大的含有FGFR3的蛋白质是FGFR3-TACC3融合体,使用识别存在于推定的FGFR3-TACC3融合蛋白质中的C端TACC3表位的TACC3抗体对细胞裂解物进行免疫沉淀。如图5D所示,TACC3抗体选择性免疫沉淀来自FaDu V1和V2细胞的较大的含FGFR3的蛋白质,但不能免疫沉淀来自任何细胞系的天然FGFR3。天然TACC3从所有三种细胞系中免疫沉淀,控制免疫沉淀程序(图5D,底部小图)。FGFR3-TACC3融合蛋白以比天然TACC3低得多的水平表达,解释了为什么只有天然TACC3在图5D底部小图所示的暴露中可见。因此,TACC3抗体能够特异性地从FaDu变体细胞系中免疫沉淀含有FGFR3的蛋白质,证实这些细胞系中FGFR3-TACC3融合蛋白的表达。

[0112] 如图4C所示,在来自FaDu V1和V2细胞的抗磷酸酪氨酸免疫沉淀物中检测到FGFR3,但未从亲本细胞中检测到FGFR3。如果这些酪氨酸磷酸化的含FGFR3的蛋白质是FGFR3-TACC3融合蛋白质,则它们也应该可以用TACC3抗体通过免疫印迹检测到。如图5E所示,在来自FaDu V1和V2细胞的抗磷酸酪氨酸免疫沉淀物中检测到TACC3(如FGFR3),但是没有从FaDu P1细胞中检测到。来自FGFR3和TACC3抗体识别的FaDu V2细胞的酪氨酸磷酸化蛋白在SDS凝胶中相同地迁移(图5E,右小图),证实它们是相同的蛋白质。因此,是FaDuV1和V2细胞系而不是亲本FaDu细胞表达酪氨酸磷酸化的FGFR3-TACC3融合蛋白,其在遇见EGFR阻滞剂时似乎维持ERK信号传导并且可能在这两种细胞系的抗性表型中起作用。

[0113] 实例3:FGFR3-TACC3融合蛋白促进亲本FaDu细胞对EGFR/ErbB3阻滞剂的抗性。

[0114] 为了评估在FaDu V1和V2细胞中鉴定的FGFR3-TACC3融合蛋白驱动抗性的能力,在FaDu P1亲本细胞中稳定表达融合蛋白(和作为对照的野生型FGFR3)。所述细胞系由低MOI(0.3)的慢病毒感染产生,以最小化由于多重整合引起的过表达。如图6A所示,在稳定转导的FaDu亲本细胞中检测到野生型FGFR3和FGFR3-TACC3融合蛋白的强表达。尽管野生型FGFR3被磷酸化到一定程度,如通过磷酸-FGFR抗体的免疫印迹评估的,两种FGFR3-TACC3融合蛋白被更大程度地磷酸化(图6A),表明更高水平的组成性活性。当归一化为总蛋白质水

平时,来自FaDu V1和V2细胞的FGFR3-TACC3融合蛋白分别以比野生型FGFR3高约20和约4倍的水平磷酸化。TACC3的免疫印迹证实了稳定表达的FGFR3-TACC3融合蛋白中存在TACC3序列(图6A)。如图6A所示的暴露中,在用空载体转导的FaDu亲本细胞中,内源性FGFR3的表达是不可检测的,这表明慢病毒编码的蛋白实际上过表达。然而,使用磷酸激酶阵列分析下游信号传导的变化揭示了FGFR3-TACC3融合体的表达不促进亲本FaDu细胞中信号传导途径的一般重新连线。实际上,观察到很少变化(图7)。

[0115] 用磷酸酪氨酸抗体免疫沉淀细胞裂解物证实与野生型FGFR3相比,FGFR3-TACC3融合蛋白的磷酸化增加(图6B)。与EGFR阻滞剂未能抑制FaDu变体细胞中的ERK活化的观察结果一致(图3D),是FGFR3-TACC3融合蛋白而不是野生型FGFR3的表达阻止REGN955显著抑制FaDu亲本细胞中的ERK活化(图6C),证实所述融合蛋白驱动ERK途径的强烈激活。

[0116] 为了确定FGFR3-TACC3融合蛋白的表达是否足以驱动抗性,用REGN1400和REGN955处理表达野生型FGFR3或融合蛋白的亲本FaDu细胞。尽管表达野生型FGFR3的亲本细胞仍然对生长抑制敏感,但表达任一种FGFR3-TACC3融合蛋白的细胞是抗性的(图6D)。与融合蛋白在体外驱动抗性的能力一致,是来自FaDu V2细胞的FGFR3-TACC3融合蛋白而不是野生型FGFR3足以促进FaDu亲本肿瘤异种移植对组合EGFR/ErbB3阻滞剂的抗性(图6E)。与活化的FGFR3在抗性中的重要作用一致,经工程改造以过表达FGF1配体的亲本FaDu肿瘤在体内表现出对EGFR/ErbB3阻滞剂的完全抗性(图8)。

[0117] 实例4:FaDu变体的抗性需要FGFR3-TACC3融合蛋白。

[0118] 为了研究在FaDu变体中表达的内源性FGFR3-TACC3融合蛋白是否对抗性表型负责,我们使用CRISPR/Cas9技术(Sander et al. (Nat Biotechnol. (2014) 32:347-55)来灭活FGFR3-TACC3融合基因。我们使用慢病毒将Cas9核酸酶和单引导RNA (sgRNA) 递送到FaDu V1和V2细胞。测试了靶向FGFR3中早期外显子(外显子2或外显子3)的四种sgRNA,并且四种sgRNA中的两种几乎完全消除FaDu V1和V2细胞中FGFR3-TACC3融合蛋白(和天然FGFR3)的表达(图9A)。与我们先前的发现一致,即用FGFR TKI和EGFR抗体REGN955联合治疗有效地阻断了抗性细胞中的ERK活化(图4D),CRISPR介导的FGFR3-TACC3融合蛋白的失活使REGN955能够抑制V1和V2细胞系中的ERK活化(图9B),证明当EGFR被阻断时,这些融合蛋白的信号传导维持ERK活化。

[0119] 与此观察一致,CRISPR介导的用sgRNA1或sgRNA2对FGFR3-TACC3的灭活使得REGN955作为单一药剂抑制FaDu V1和V2细胞的生长并显著增强由REGN1400介导的生长抑制(图9C)。在FGFR3-TACC3失活的FaDu V1和V2细胞中,由REGN955加REGN1400组合介导的生长抑制的程度与在亲本FaDu细胞中观察到的相似(图3A)。因此,尽管我们不能排除额外的抗性机制参与FaDu变体,但是我们的数据表明抗性表型的实质组分可归因于FGFR3-TACC3融合蛋白的信号传导(参见图9D的模型)。

[0120] 实例5:FGFR3-TACC3融合蛋白在由EGFR而不是突变的PI3K驱动的癌细胞系中促进对靶向治疗的抗性。

[0121] 为了进一步研究FGFR3-TACC3融合蛋白的功能性能,我们评估了它们促进另外的癌细胞系对靶向治疗的抗性的能力。由于最近的基因组数据显示PIK3CA基因在HNSCC中经常发生突变,因此我们使用了由EGFR/ErbB3信号传导(Ca127HNSCC)、突变EGFR(NCI-H1975NSCLC)或突变PI3K(SNU1076和Detroit 562HNSCC)驱动的癌细胞系,这表明PI3K是这

一适应症的重要驱动因素。参见Cancer Genome Atlas N.Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas.Nature(2015) 517: 576-582。如在FaDu亲本细胞中一样,FGFR3-TACC3融合蛋白(但不是野生型FGFR3)能够促进Ca127细胞对组合的EGFR/ErbB3阻滞剂的抗性(图11A)并促进NCI-H1975细胞对EGFR TKI AZD9291的抗性(图11B;参见Supp.图12用于证实这些细胞系中融合蛋白的表达和磷酸化)。

[0122] 相反,FGFR3-TACC3融合蛋白都不能赋予SNU1076或Detroit 562细胞对PI3K抑制剂BYL719 (alpelisib,Novartis)的实质性抗性(图11C,11D),尽管融合蛋白的高表达和磷酸化(图11E)。类似于我们在FaDu细胞中的观察结果,FGFR3-TACC3融合蛋白在这两种细胞系中强烈激活ERK信号传导,或者在存在PI3K抑制剂时完全恢复ERK信号传导(SNU1076细胞)或者显著增加ERK活化的基线水平(Detroit562细胞)(图11F)。FGFR3-TACC3融合蛋白在遇见PI3K阻滞剂时不恢复AKT活化(图11F),尽管即使FGFR3-TACC3融合体能够在这些细胞中激活AKT,但是PI3K抑制剂也可能阻止它。因此,FGFR3-TACC3融合蛋白对ERK信号传导的强烈激活不补偿对PI3K途径“上瘾”的HNSCC细胞中PI3K/AKT信号传导的丧失,表明FGFR3-TACC3融合蛋白不可能是PIK3CA-突变体HNSCC中对PI3K抑制剂具有抗性的相关介质。

[0123] 本发明的范围不受本文描述的具体实施例的限制。实际上,根据前面的描述和附图,除了本文所述的那些之外,本发明的各种修改对于本领域技术人员而言将变得明显。这些修改意图意在落入所附权利要求的范围内。

序列表

<110>	瑞泽恩制药公司(Regeneron Pharmaceuticals, Inc.) C·戴利(Daly, Christopher) C·卡斯塔那罗(Castanaro, Carlo) W·张(Zhang, Wen) G·泰斯顿(Thurston, Gavin)	
<120>	用于减少或预防对EGFR和/或ERBB3抑制剂具有抗性的肿瘤生长的方法	
<130>	057766-488736	
<150>	US 62/266,103	
<161>	2015-12-11	
<166>	10	
<170>	PatentIn 版本3.5	
<210>	1	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<220>		
<221>	misc feature	
<223>	FCFR3外显子17中的正向引物	
<400>	1	18
	agagggccac cttbaagc	
<210>	2	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<220>		
<221>	misc feature	
<223>	TACC3外显子16中的反向引物	
<400>	2	20
	cagatcttgg tcagctctc	
<210>	3	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<220>		
<221>	misc feature	
<223>	FCFR3外显子18中的正向引物	
<400>	3	20
	agcctctcag gggacgactc	
<210>	4	
<211>	18	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<220>		
<221>	misc feature	
<223>	TACC3外显子11中的反向引物	
<400>	4	18
	tcacacctgc tctcagc	
<210>	5	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<220>		
<221>	misc feature	
<223>	FCFR3外显子17中的正向引物	
<400>	5	19
	atggggagc gclygcacg	
<210>	6	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<220>		
<221>	misc feature	
<223>	TACC3外显子9中的反向引物	
<400>	6	23
	acgctctgag ggagtcscat ttg	

[0001]

	<210> 7	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<223> 探针	
	<400> 7	
	cgaagcgac acaggagag aacc	24
	<210> 8	
	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<223> 探针	
[0002]	<400> 8	
	ccctccagag gccaccctc aag	23
	<210> 9	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<223> 编码FCFR3 sgRNA1的CRISPR RNA部分的DNA	
	<400> 9	
	ggggacggag`cagcgcgtcg	20
	<210> 10	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成的	
	<220>	
	<221> misc_feature	
	<223> 编码FCFR3 sgRNA2的CRISPR RNA部分的DNA	
	<400> 10	
	cgcgctcgt gagccgtgc	20

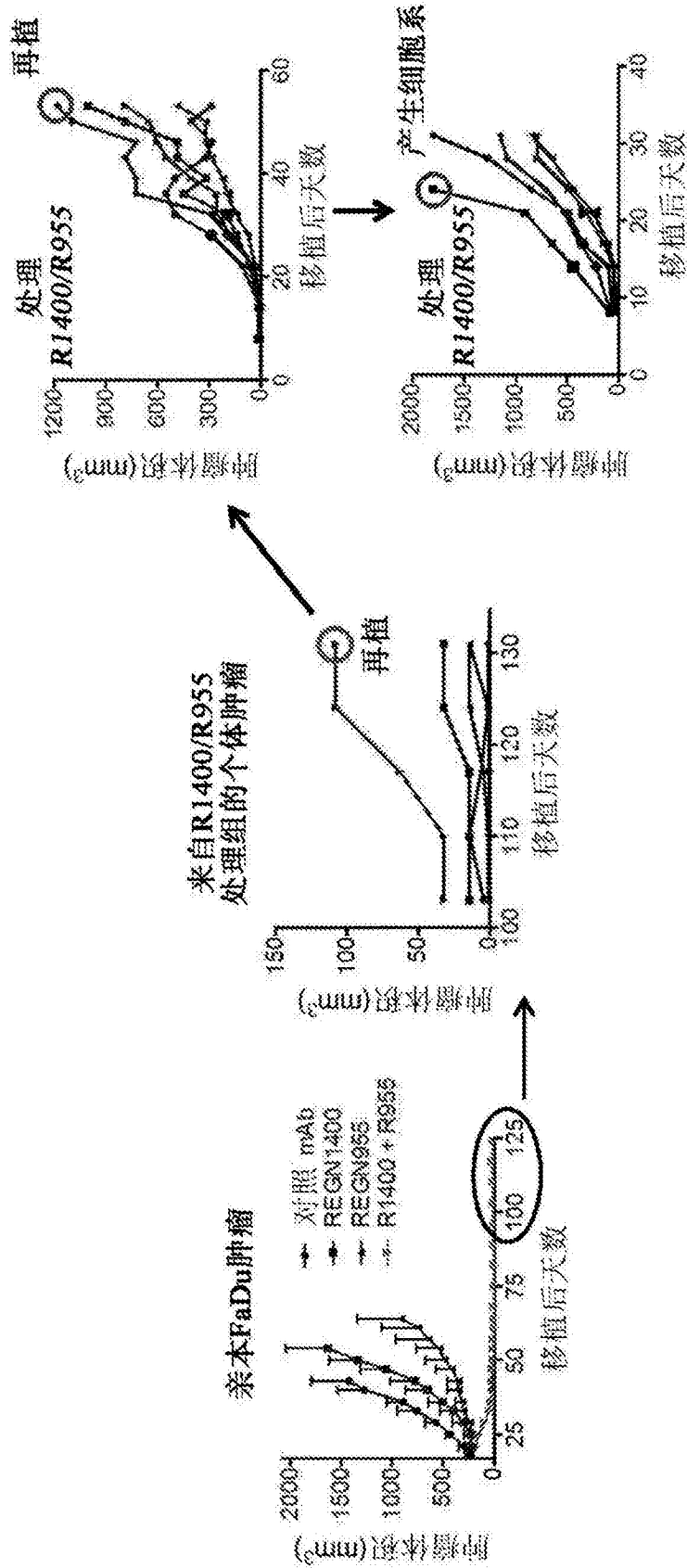


图1A

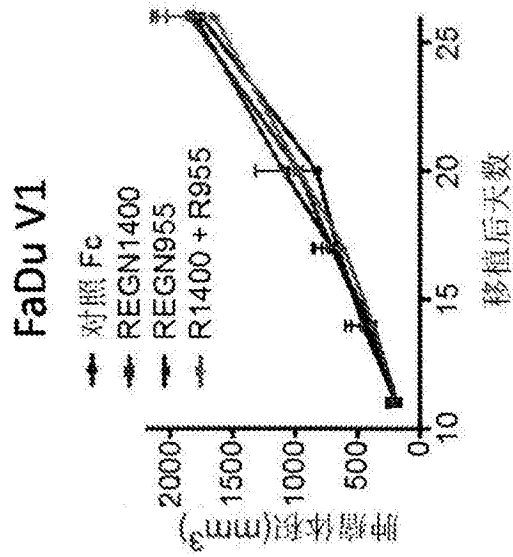


图1B

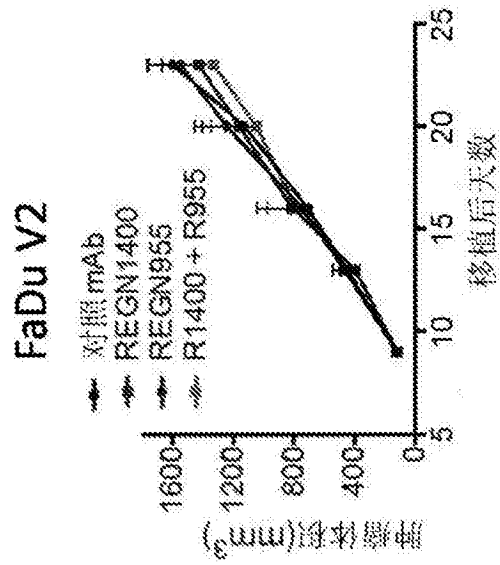


图1C

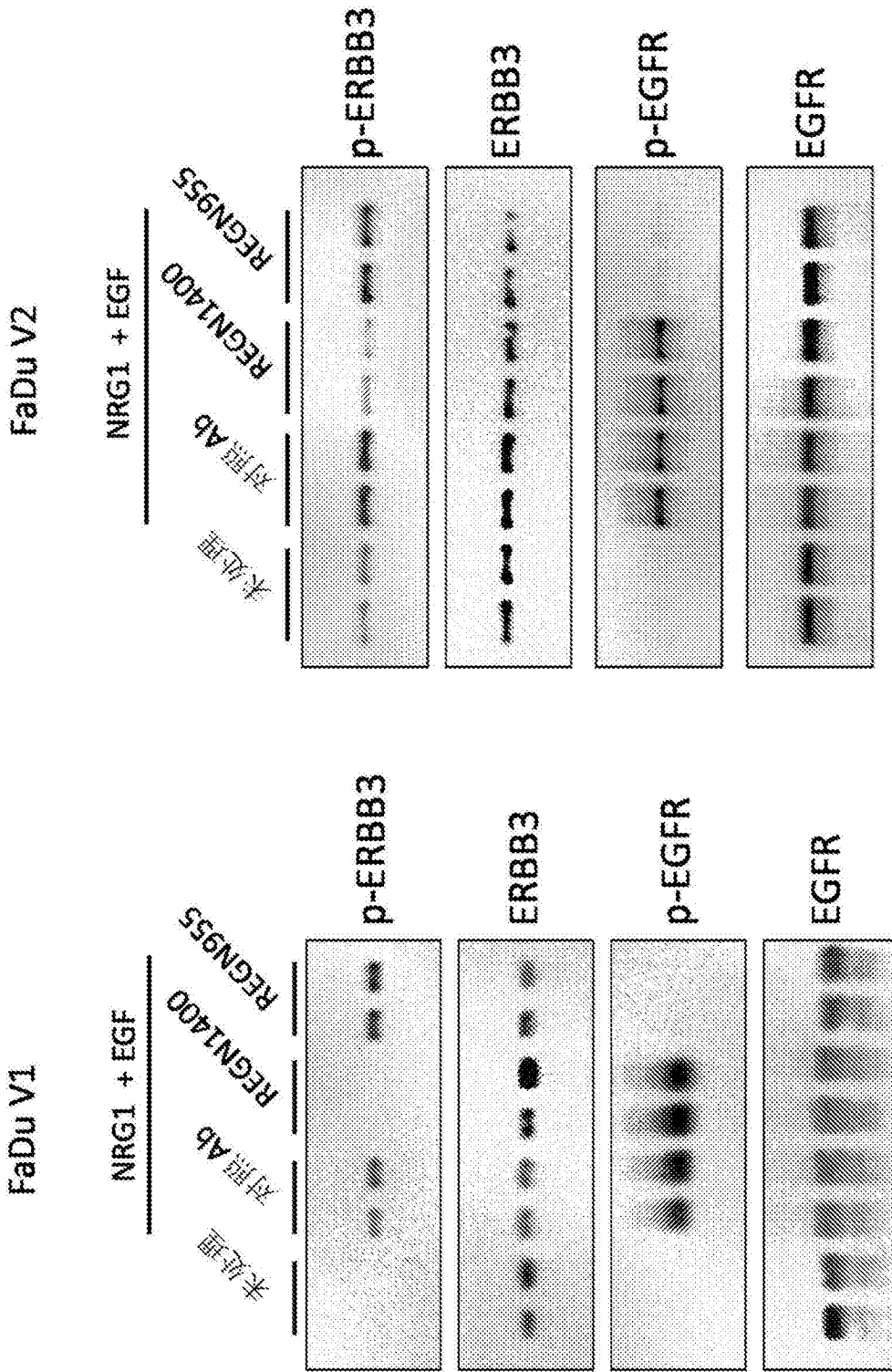


图2

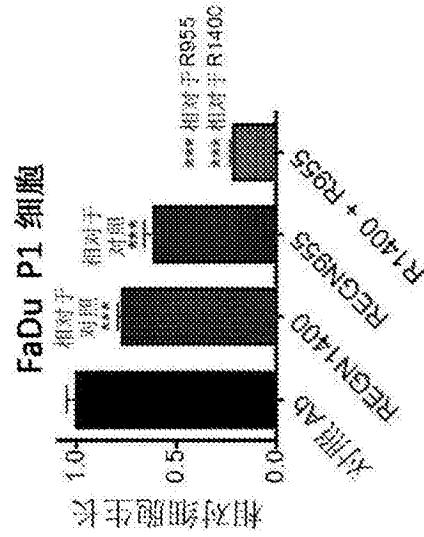


图3A

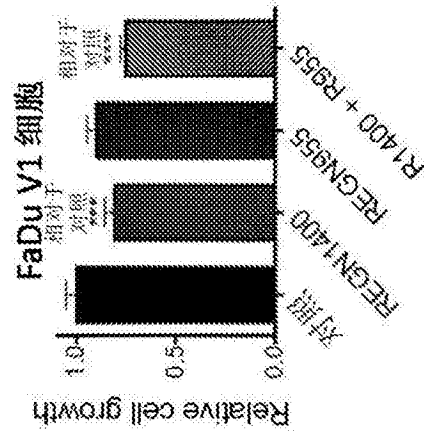


图3B

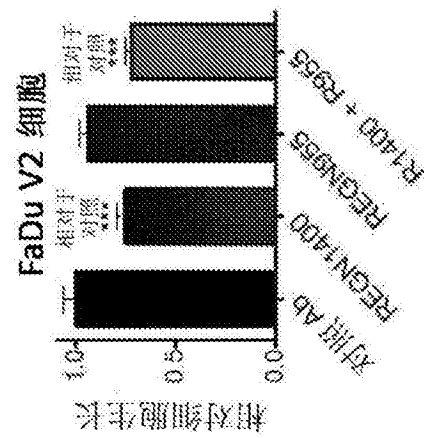


图3C

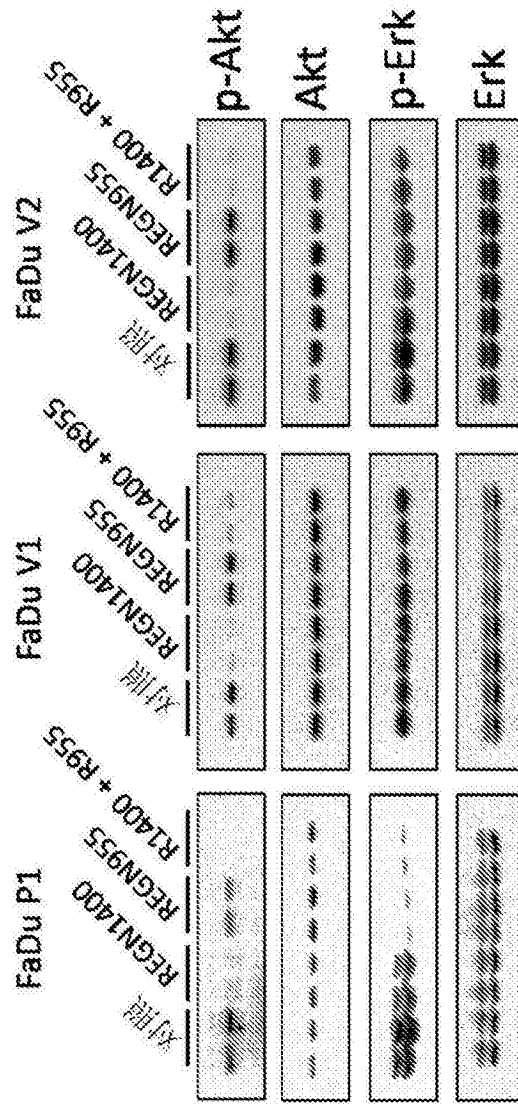


图3D

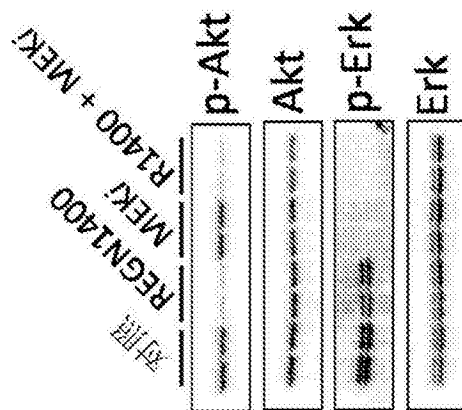


图3E

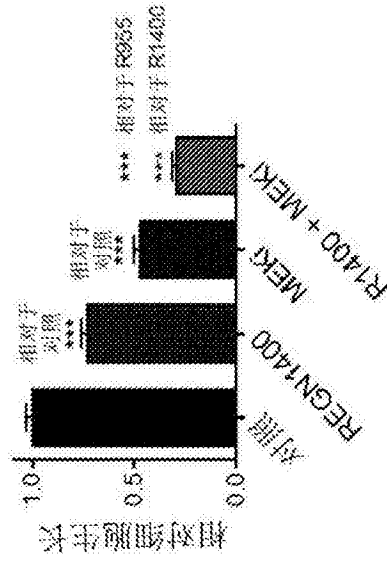


图3F

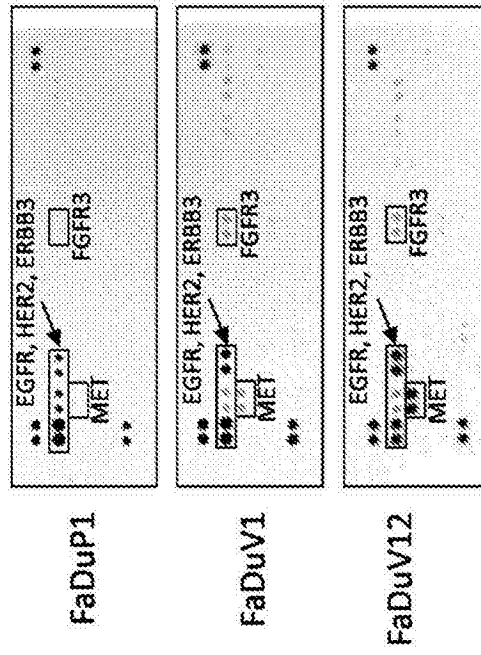


图4A

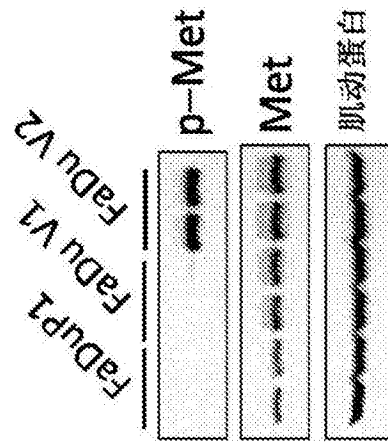


图4B

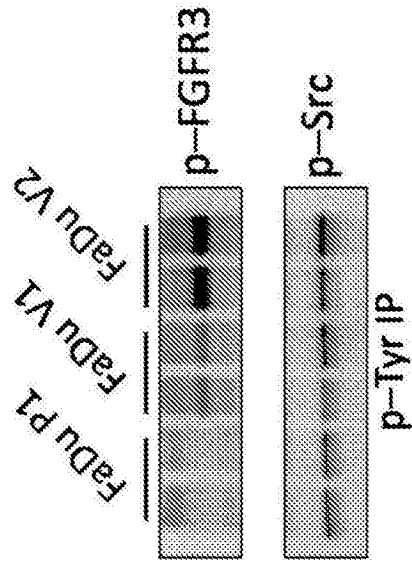


图4C

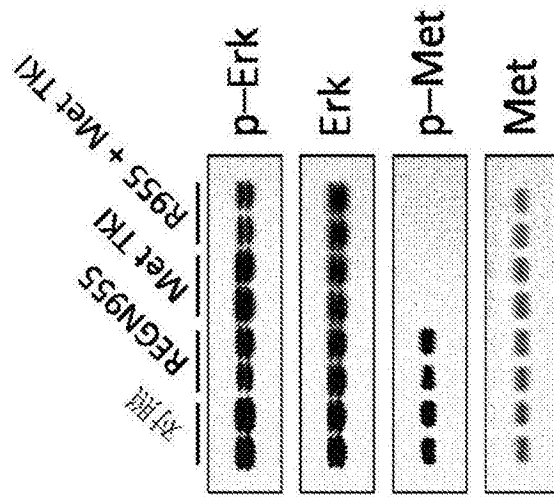


图4D

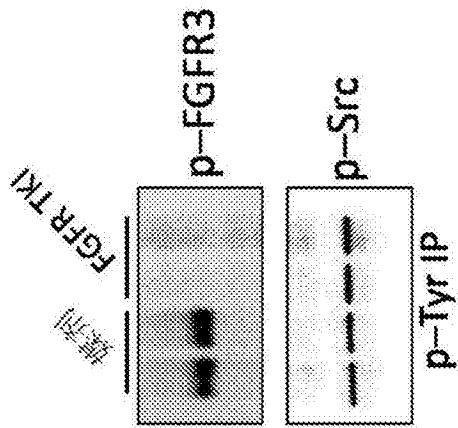


图4E

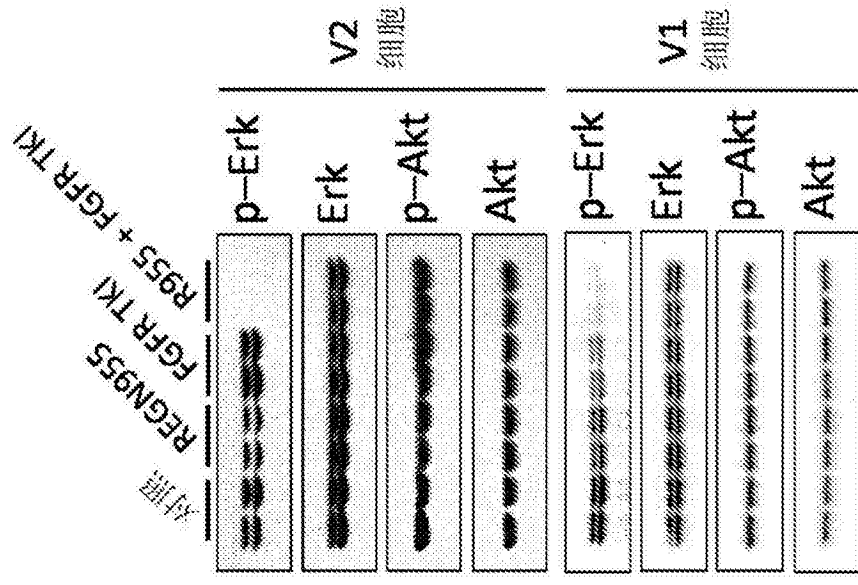


图4F

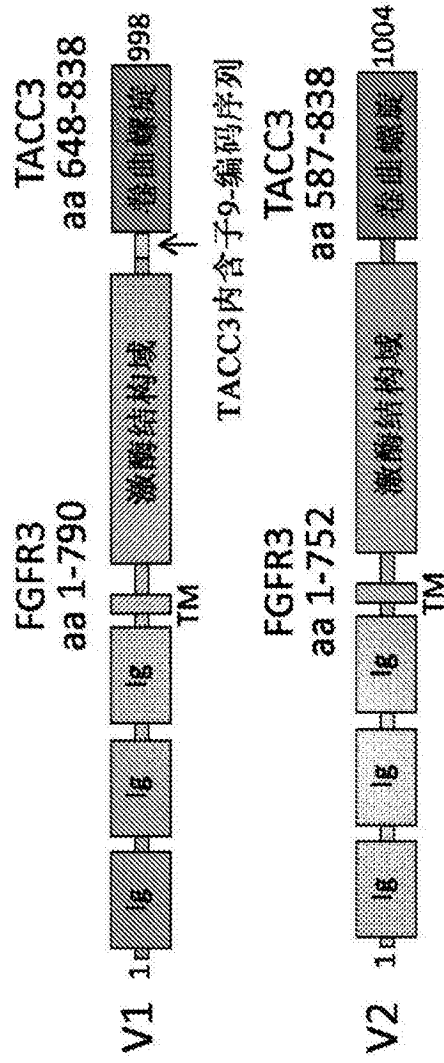


图5A

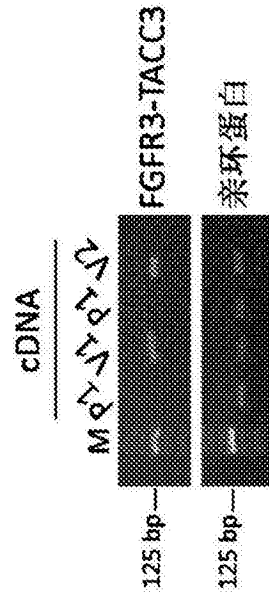


图5B

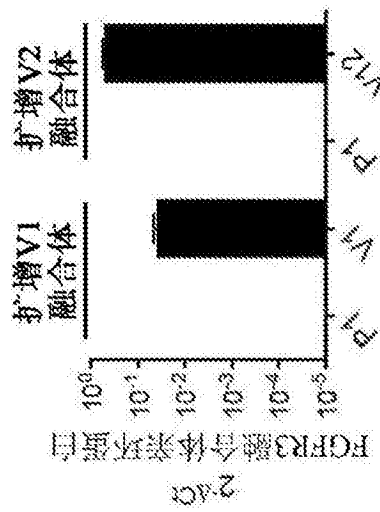


图5C

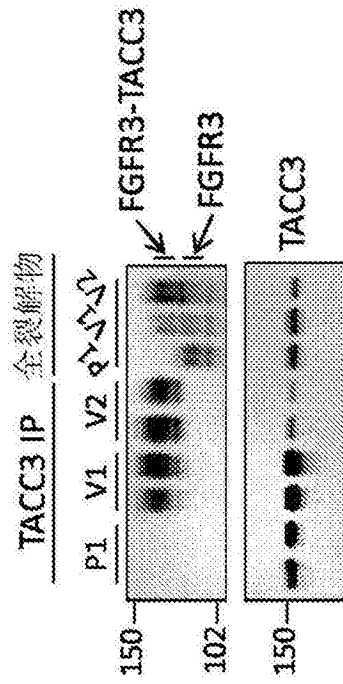


图5D

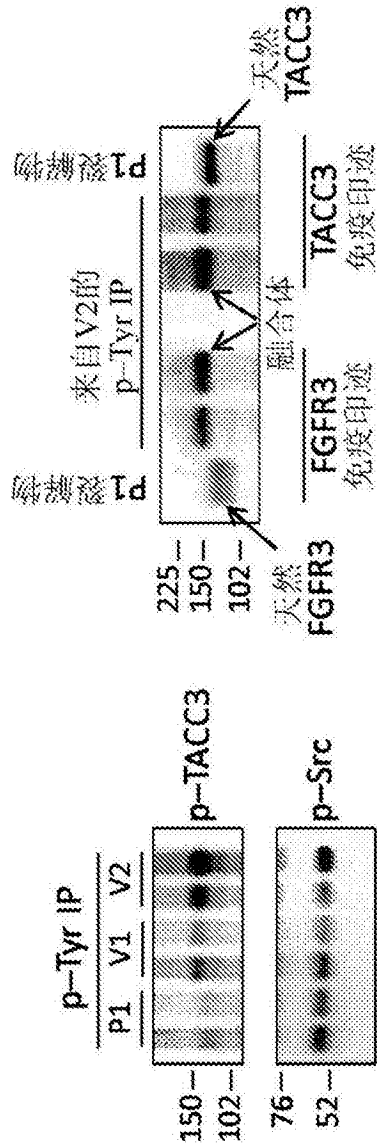


图5E

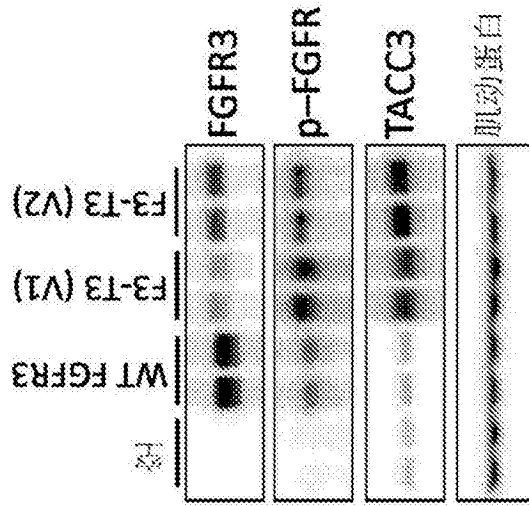


图6A

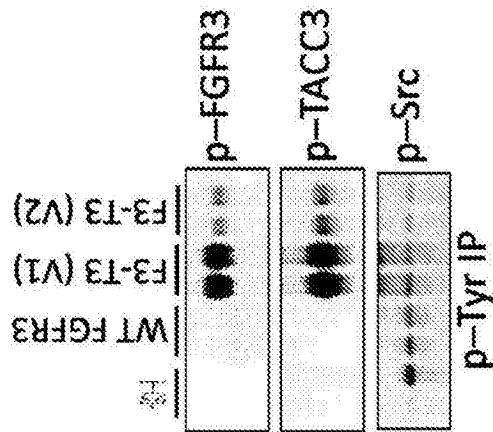


图6B

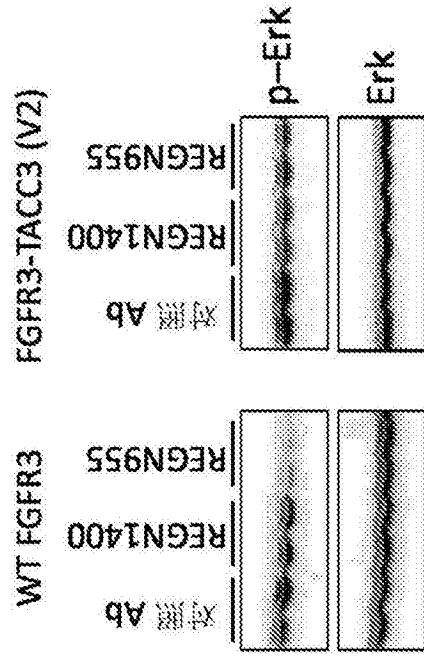


图6C

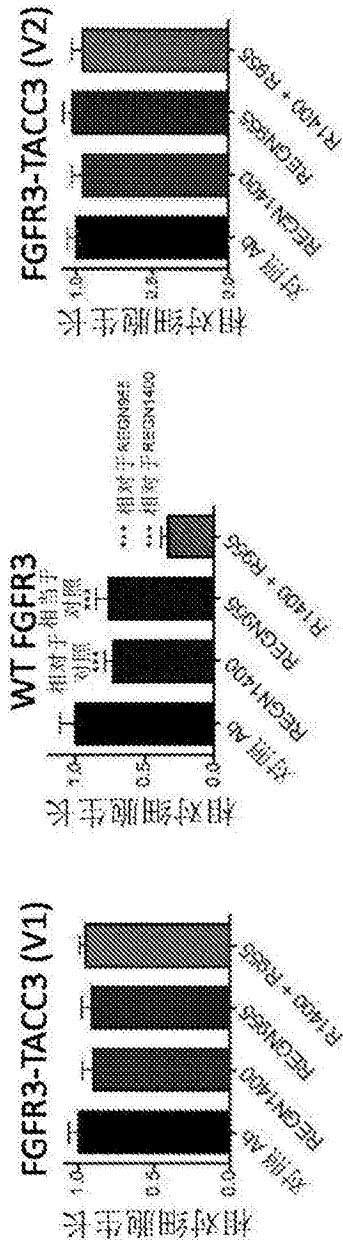


图6D

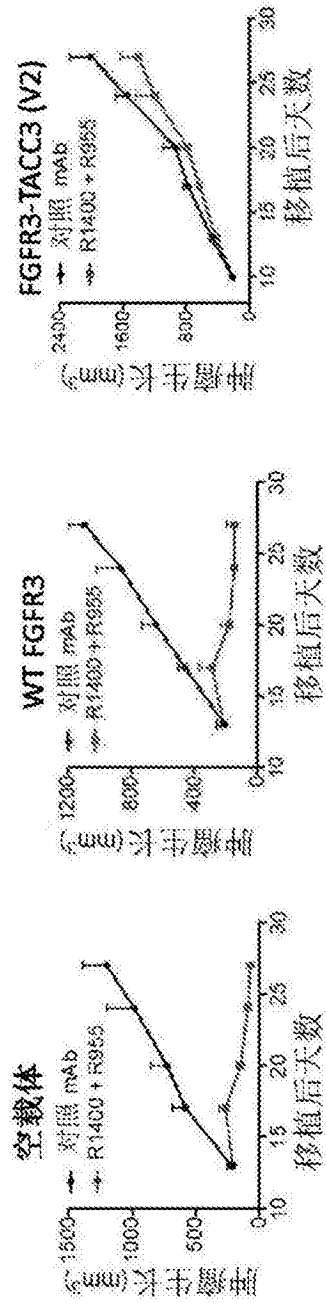


图6E

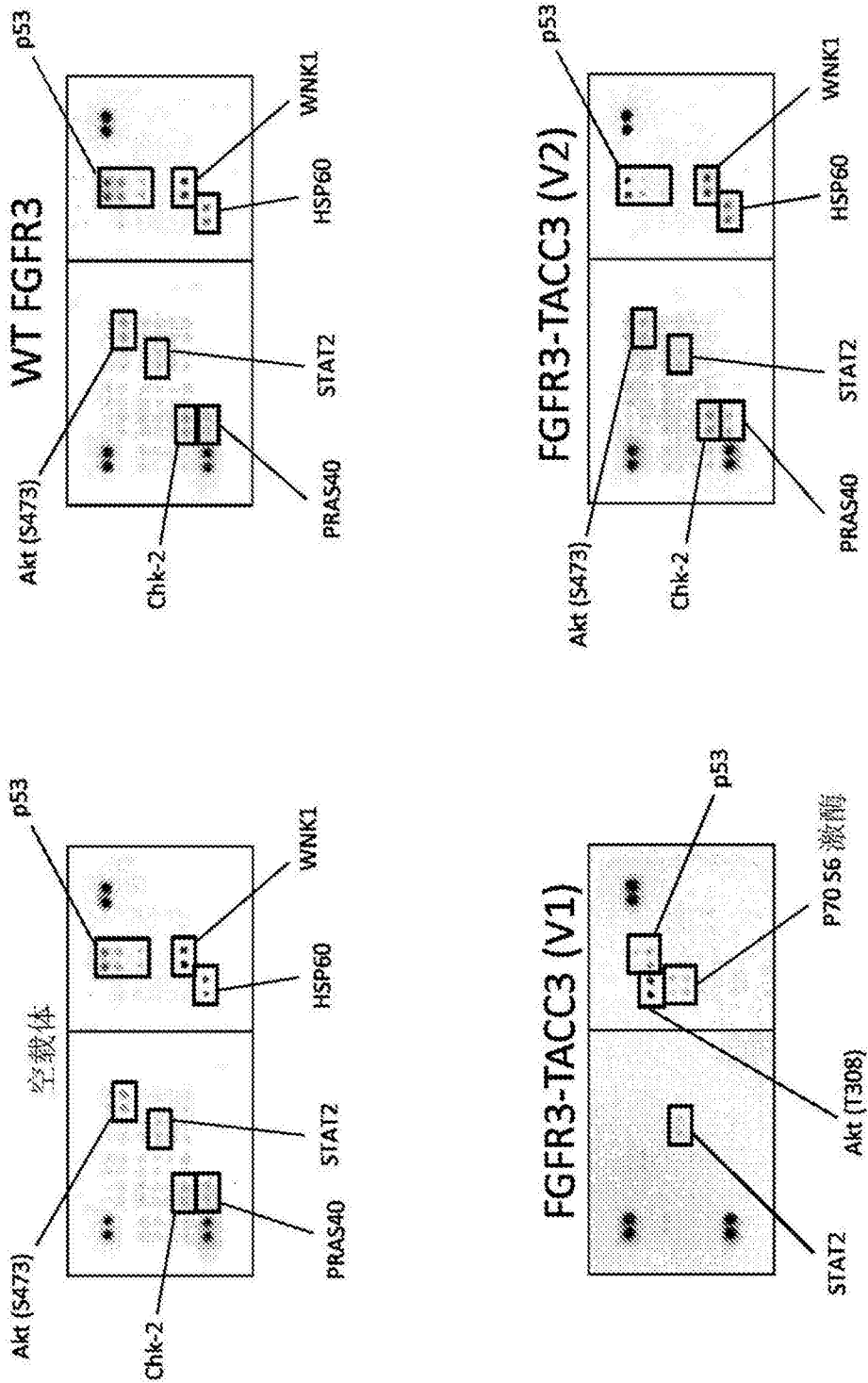


图7

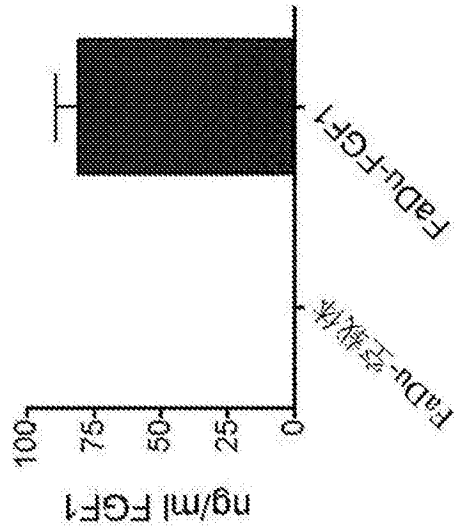


图8A

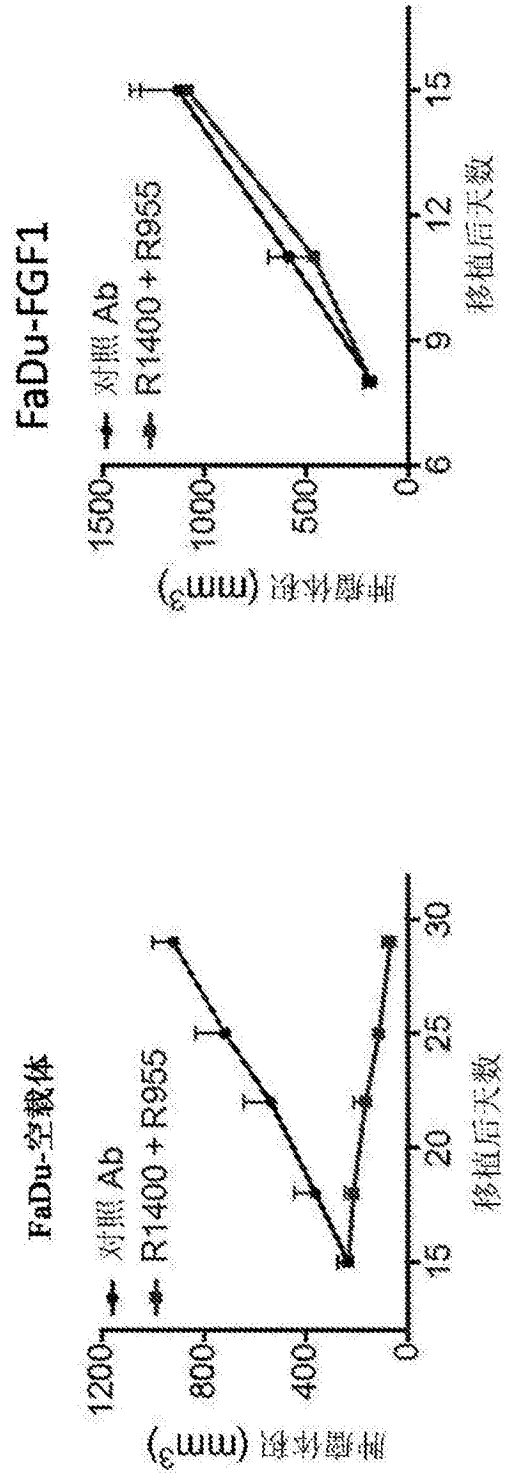


图8B

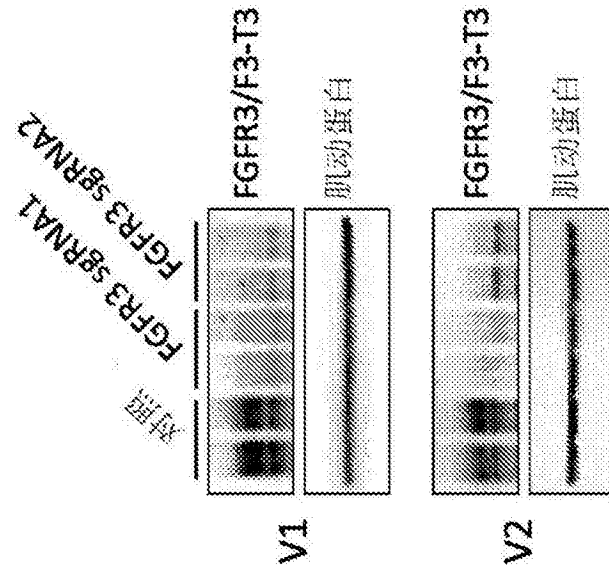


图9A

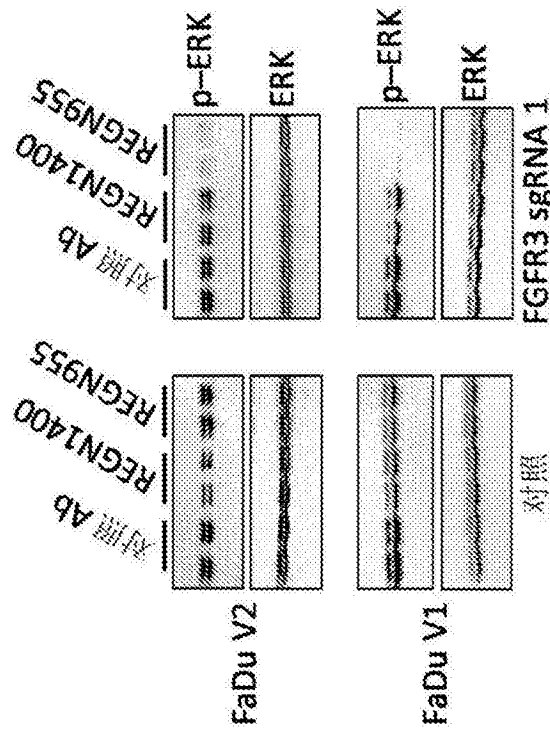


图9B

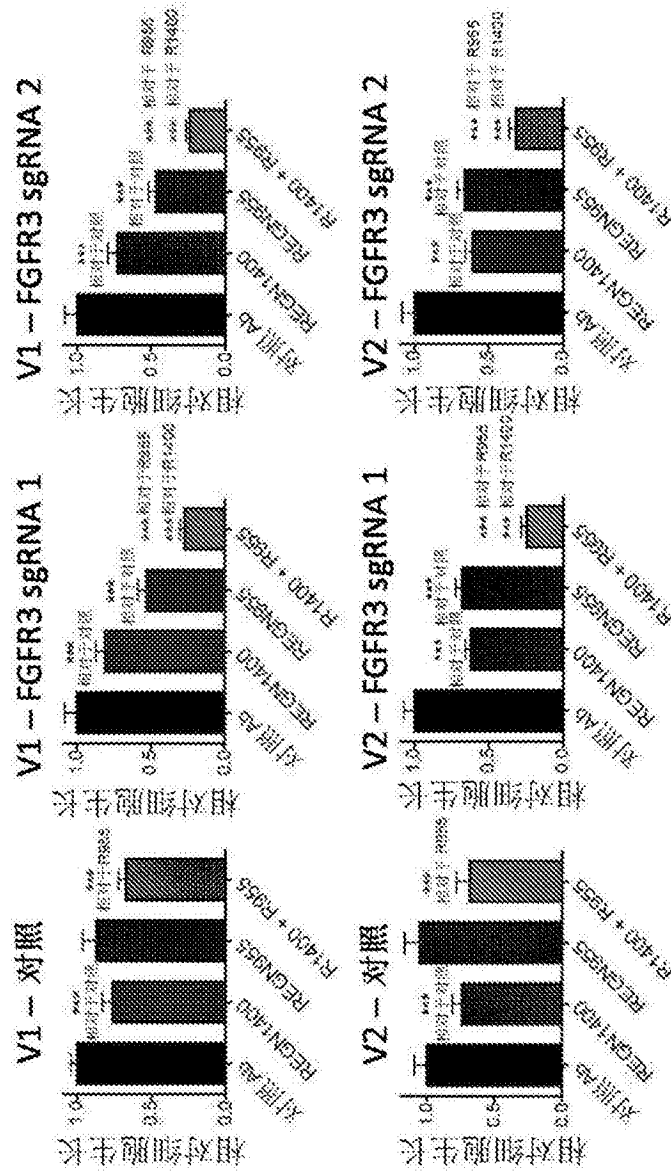


图9C

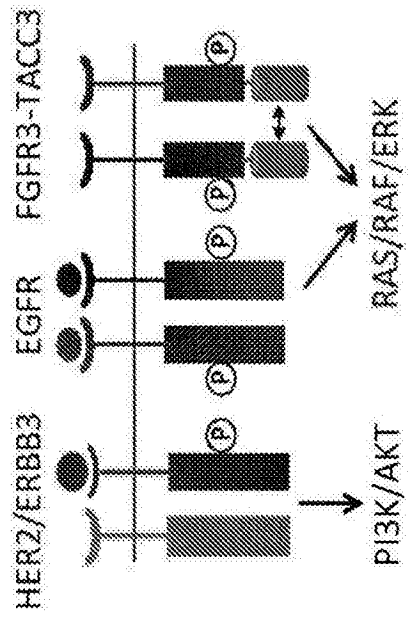


图9D

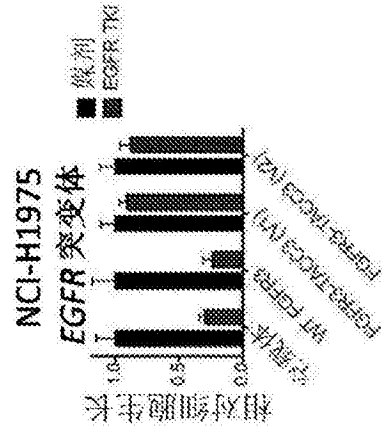


图11B

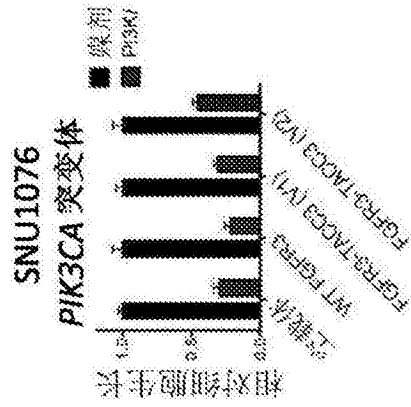


图11C

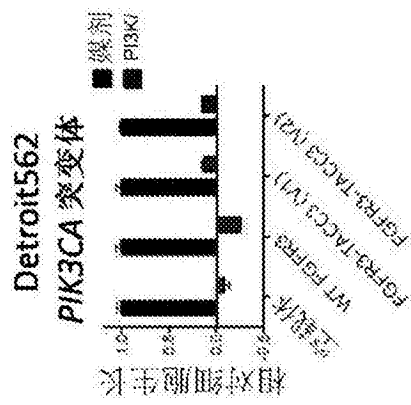


图11D

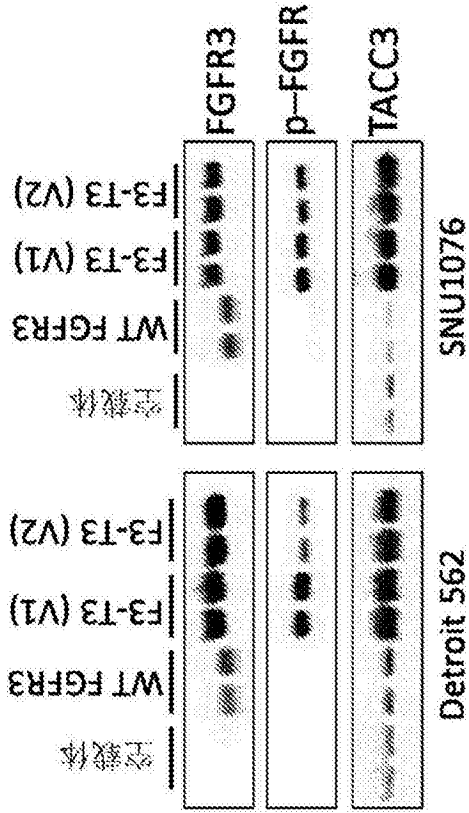


图11E

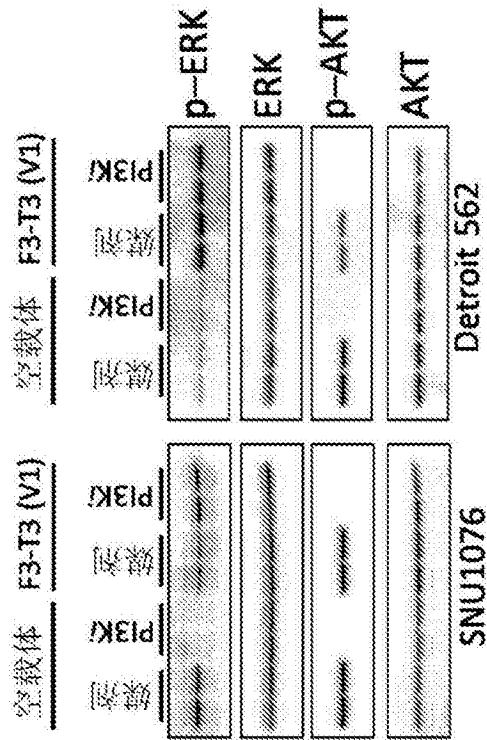


图11F

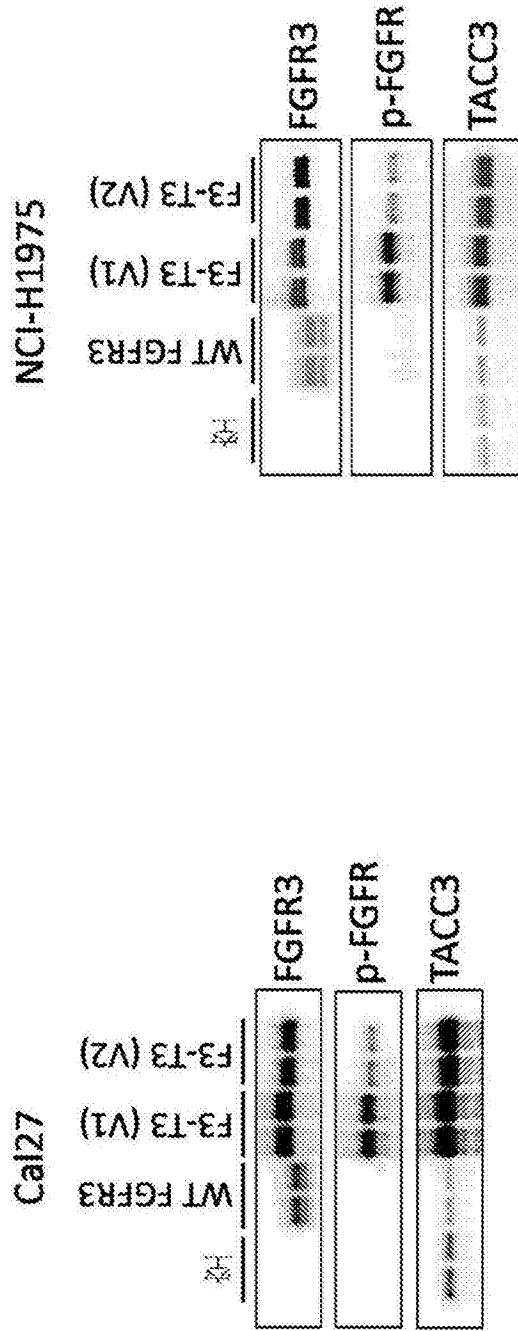


图12