PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:
2001 - 4083

(19) ČESKÁ REPUBLIKA

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.[7]:
A 61 K 39/395
A 61 P 35/00

(22) Přihlášeno: **01.05.2000**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **14.05.1999 13.08.1999**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1999/312284 1999/374028**

(33) Země priority: **US US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **14.08.2002**
(Věstník č. 8/2002)

(86) PCT číslo: **PCT/US00/11756**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO00/69459**

ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ

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

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

(74) Zástupce:
Čermák Karel Dr., Národní třída 32, Praha 1, 11000;

(54) Název přihlášky vynálezu:
Léčivo pro indikaci růstu refrakterních nádorů

(57) Anotace:

Použití účinného množství antagonisty receptoru epidermálního růstového faktoru (EGFR) pro výrobu léčiva pro inhibici růstu refrakterních nádorů.

CZ 2001 - 4083 A3

CZ 42025

04.06.02
2001-4021

Léčivo pro inhibici růstu refrakterních nádorů

Oblast techniky

Předkládaný vynález se týká způsobu inhibice růstu refrakterních nádorů, které jsou stimulovány ligandem epidermálního růstového faktoru u lidských pacientů, kterýžto způsob zahrnuje léčbu lidských pacientů účinným množstvím antagonisty receptoru pro epidermální růstový faktor.

Dosavadní stav techniky

Nádorová onemocnění jsou ve Spojených státech druhou vedoucí příčinou úmrtí po srdečních příhodách. Ve vývoji nových terapeutických postupů pro léčbu těchto devastujících onemocnění došlo k významnému pokroku. Velká část tohoto pokroku je způsobena lepším porozuměním buněčné proliferace normálních i nádorových buněk.

Normální buňky proliferují vysoce kontrolovanou aktivací receptorů pro růstové faktory svými příslušnými ligandy. Příklady těchto receptorů jsou tyrosin kinázy receptoru pro růstové faktory.

Nádorové buňky také proliferují prostřednictvím aktivace receptorů pro růstové faktory. Ztráta kontroly může být způsobena četnými faktory, jako jsou overexprese růstových faktorů a/nebo receptorů, a autonomní aktivace biochemických drah regulovaných růstovými faktory.

Některými příklady receptorů hrajícími roli v tumorigenezi jsou receptory pro epidermální růstový faktor (EGRF), růstový faktor odvozený od destiček (PDGRF), inzulinu podobný růstový faktor (IGRF), nervový růstový faktor (NGRF) a fibroblastový růstový faktor (FGF).

Jednotlivé receptory z rodiny receptorů pro epidermální růstový faktor (EGF) jsou obzvláště důležité tyrosin kinázy receptorů pro růstové faktory sdružené s tumorigenezí epidermálních buněk. První člen rodiny EGF receptorů, který byl objeven, byl glykoprotein mající zjevnou molekulární váhu přibližně 165 kD. Tento glykoprotein, který byl popsán Mendelsohnem et al. v patentu US Patent č. 4943533 je znám jako EGF receptor (EGFR) a také jako lidský EGF receptor-1 (HER1).

EGFR je overexprimován v mnoha typech epidermoidních nádorových buněk. EGF a transformující růstový faktor alfa (TGF-alfa) jsou dva známé ligandy EGFR. Příklady nádorů, které exprimují EGF receptory, zahrnují glioblastomy, stejně tak jako nádory plic, prsu, hlavy a krku. Amplifikace a/nebo overexprese EGF receptorů na membránách nádorových buněk je sdružena se špatnou prognózou.

Léčba nádorových onemocnění tradičně zahrnuje chemoterapii nebo radiační léčbu. Některé příklady chemoterapeutických látek zahrnují doxorubicin, cisplatinu a taxol. Radiační léčba může být buďto zevními paprsky nebo ze zdroje umístěného v pacientovi, tj. tzv. brachyterapie.

Další typ léčby zahrnuje antagonisty růstových faktorů nebo receptorů pro růstové faktory hrající roli v proliferaci buněk. Tyto antagonisté neutralizují aktivitu růstového faktoru nebo receptoru a inhibují růst nádorů, které exprimují receptor.

Patent US Patent č. 4943533 například popisuje myší monoklonální protilátku nazvanou 225, která se váže k EGF receptoru. Patent je připsán Kalifornské universitě a licenci

11.01.02

má exkluzívně společnost ImClone Systems Incorporated. Protilátka 225 je schopna inhibice růstu kultivovaných nádorových linií exprimujících EGRF, stejně tak jako růst těchto nádorů za podmínek in vivo, rostou-li jako xenografty na nahých myších. Viz Masui et al. Cancer Res 44, 5592-5598 (1986).

Nevýhodou použití myších monoklonálních protilátek v léčbě člověka je možnost odpovědi člověka proti myším protilákám (HAMA) v důsledku přítomnosti myších Ig sekvencí. Tato nevýhoda může být minimalizována nahrazením celé konstantní oblasti myší (nebo jiné nesavčí) protilátky lidskou konstantní oblastí. Náhrada konstantních oblastí lidskými sekvencemi je obvykle nazývána chimerizací.

Chimerizační postup může být účinnější nahrazením struktury variabilních oblastí myší oblasti odpovídajícími lidskými sekvencemi. Strukturou variabilních oblastí se rozumí variabilní oblasti protilátky jiné než hypervariabilní oblasti. Hypervariabilní oblasti jsou také známy jako komplementaritu určující oblasti (CDRs).

Nahrazení konstantních oblastí a struktur variabilních oblastí lidskými sekvencemi je obvykle nazývána humanizací. Humanizovaná protilátka je méně imunogenní (tj. vyvolává nižší HAMA odpověď), protože je více myších sekvencí nahrazeno lidskými sekvencemi. Naneštěstí nahrazením více oblastí myších protilátek lidskými sekvencemi dochází k nárůstu ceny i vynaloženého úsilí.

Není předpokládáno, že nahrazení ne-lidských konstantních oblastí lidskými konstantními oblastmi ovlivňuje aktivitu protilátek. Například Prewett et al. zaznamenali inhibici nádorové progrese dobře uchycených xenograftů nádoru prostaty

11.01.02

u myší při použití chimerické formy monoklonální protilátky anti-EGFR-225, která je diskutována výše. Chimerická forma je nazývána c225. Journal of Immunotherapy 19, 419-427)1997).

Dalším přístupem ke snížení imunogenity protilátek je použití fragmentů protilátek. Například ve článku Aboud-Piraka et al., Journal of the National Cancer Institute 80, 1605-1611 (1988) je srovnáván protinádorový účinek protilátky proti EGF receptoru nazvané 108,4 s fragmenty protilátky. Modelem nádoru byly KB buňky ve formě xenograftů nahých myší. KB buňky jsou odvozeny z lidských orálních epidermoidních karcinomů a exprimují vyšší množství EGF receptorů.

Aboud-Pirak et al. nalezli, že protilátka i bivalentní $F(ab')_2$ fragment zpomalili nádorový růst za podmínek in vivo, ačkoli $F(ab')_2$ fragment byl méně účinný. Monovalentní Fab fragment protilátky, jejíž schopnost vázat receptor sdružený s buňkou byla konzervována, však nádorový růst nezpomalil.

Byly učiněny také pokusy zlepšit léčbu nádorů kombinací některých z technik zmíněných výše. Baselga et al. například popsali v Journal of the National Cancer Institute 85, 1327-1333 (1993) protinádorové účinky chemoterapeutické látky doxorubicinu pomocí anti-EGFR monoklonální protilátky.

Jiní autoři se pokusili zvýšit citlivost nádorových buněk k záření prostřednictvím kombinace záření s adjuvantní látkou. Například v patentu Bonnen, US Patent 4846782 je popsána zvýšená citlivost lidských nádorů k záření, byla-li radiační léčba zkombinována s léčbou interferonem. Snelling et al zaznamenali ve II. fázi klinické studie menší zlepšení v radiační léčbě pacientů s astrocytomy s anaplastickými ložisky, byla-li radiační léčba zkombinována s anti-EGFR

11.01.02

monoklonální protilátkou značenou izotopem jódu 125. Viz Hybridoma 14, 111-114 (1995).

Podobně Balaban et al zaznamenal schopnost anti-EGFR monoklonálních protilátek senzitizovat xenografty lidského skvamózního karcinomu u myší vůči radiaci, předcházelo-li radiační léčbě podání anti-EGFR protilátky nazvané LA22. Viz Biochimica et Biophysica Acta 1314, 147-156 (1996). Salch et al. také zaznamenali lepší kontrolu nádoru za podmínek in vitro a u myší, byla-li radiační léčba zvýšena anti-EGFR monoklonálními protilátkami. Saleh et al uzavřel, že "Další studie ... mohou vést k nové modalitní RT/Mab terapii". Viz abstrakt 4197 v Proceedings of the American Association for Cancer Research 37, 612, (1996).

Navzdory výše popsaným léčebným protinádorovým postupům nebyl žádný namířen specificky na léčbu nádorů refrakterních ke konvenční léčbě a radiaci. Refrakterní nádory vedou k rychlé progresi onemocnění, obvykle se špatnou prognózou. V současnosti může být jen málo uděláno pro pacienty s nádory refrakterními ke konvenční nádorové léčbě.

V závislosti na uvedeném existuje potřeba zlepšeného způsobu refrakterních nádorů u člověka.

Popis vynálezu

Tento a další cíle, které budou zřejmé osobám běžně zkušeným v oboru, byly dosaženy poskytnutím způsobu inhibice růstu refrakterních nádorů, které jsou stimulovány ligandem receptoru pro epidermální růstový faktor (EGFR) u lidských pacientů. Způsob zahrnuje léčbu lidských pacientů účinným množstvím antagonisty EGFR/HER1.

11.01.02

V další formě vynálezu zahrnuje způsob předkládaného vynálezu léčbu lidských pacientů kombinací účinného množství antagonisty EGFR/HER1 a léčby chemoterapeutiky.

V ještě další formě vynálezu zahrnuje způsob předkládaného vynálezu léčbu lidských pacientů kombinací účinného množství antagonisty EGFR/HER1 a radiační léčby.

Detailní popis vynálezu

Předkládaný vynález poskytuje zlepšený způsob léčby refrakterních nádorů, obzvláště refrakterních maligních nádorů u lidských pacientů, kteří mají refrakterní nádor.

Refrakterní nádory

Refrakterní nádory zahrnují nádory, které neodpovídají nebo jsou rezistentní na léčbu samotnými chemoterapeutickými látkami, samotnou radiační léčbu nebo jejich kombinaci. Pro účely této specifikace zahrnují refrakterní nádory také nádory, které se zdají být inhibovány chemoterapeutickými látkami a/nebo radiační léčbou, ale které relabují do 5 let, někdy do 10 let nebo déle po ukončení léčby.

Typy refrakterních nádorů, které mohou být léčeny ve shodě s vynálezem, jsou jakékoli refrakterní nádory, které jsou stimulovány ligandem EGFR. Některé příklady ligandů, které stimulují EGFR zahrnují EGF a TGF-alfa.

Rodina receptorů EGFR zahrnuje EGFR, který je v literatuře také označován jako HER1. V této specifikaci se EGFR týká specifického členu rodiny EGFR receptorů nazývaných EGFR/HER1.

Refrakterní nádory léčitelné předkládaným vynálezem jsou endogenní nádory nativní pro lidské pacienty. Tyto nádory je mnohem obtížnější léčit než exogenní xenografty lidských

11.01.02

nádorů, které byly léčeny na zvířatech. Viz například Prewet et al. Journal of Immunotherapy 19, 419-427 (1997).

Některé příklady refrakterních nádorů zahrnují karcinomy, gliomy, sarkomy, adenokarcinomy, adenosarkomy a adenomy. Tyto nádory se vyskytují skutečně ve všech částech lidského těla a ve všech orgánech. Nádory mohou být například přítomny v prsu, srdci, plicích, tenkém střevě, tlustém střevě, slezině, ledvinách, močovém měchýři, hlavě a krku, vaječníku, prostatě, mozku, slinivce břišní, kůži, kostech, kostní dřeni, krvi, thymu, děloze, varlatech, hrdlu děložním a v játrech.

Nádory mohou exprimovat EGFR v normálním množství, nebo mohou EGFR overexprimovat v množství, které například převyšuje normální hodnoty 10, 100 nebo 1000 krát. Některé nádory, které overexprimují EGFR zahrnují nádory prsu, plic, tlustého střeva, ledvin, močového měchýře, hlavy a krku, obzvláště se jedná o skvamózní karcinom hlavy a krku, dále nádory vaječníku, prostaty a mozku.

Antagonisté EGFR/HER1

Refrakterní nádory, které jsou předmětem předkládaného vynálezu, mohou být léčeny antagonistou EGFR/HER1. Pro účely této specifikace je EGFR/HER1 jakákoli látka, která inhibuje stimulaci EGFR/HER1 ligandem EGFR/HER1.

Růst refrakterních nádorů je dostatečně inhibován u pacienta, aby se zabránila nebo snížila progrese nádoru (tj. růst, invazivita, metastázy a/nebo rekurence). EGFR antagonisté, které jsou předmětem předkládaného vynálezu, mohou být cytostatika, neboli látky inhibující růst refrakterních nádorů. Antagonista EGFR je přednostně cytolytikum, neboli látka ničící nádor.

11.01.02

Není znám žádný konkrétní mechanismus inhibice v předkládaném vynálezu. Nicméně EGFR tyrosin kinázy jsou obecně aktivovány prostřednictvím fosforylace. Proto fosforylační testy jsou užitečné pro predikci užitečnosti antagonistů v předkládaném vynálezu. Některé užitečné testy pro EGFR tyrosin kinázovou aktivitu jsou popsány v práci Panek et al., Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 283, 1433-1444 (1997) a v práci Batley et al., Life Sciences 62, 143-150 (1998). Popis těchto testů je tímto začleněn zde jako reference.

EDFR/HER1 antagonisté zahrnují biologické molekuly nebo malé molekuly. Biologické molekuly zahrnují všechny lipidy a polymery monosacharidů, aminokyselin a nukleotidů majících molekulovou váhu vyšší než 450. Biologické molekuly tedy zahrnují například oligosacharidy a polysacharidy, oligopeptidy, polypeptidy, peptidy a proteiny, a oligonukleotidy a polynukleotidy. Oligonukleotidy a polynukleotidy zahrnují například DNA a RNA.

Biologické molekuly dále zahrnují deriváty jakýchkoli molekul popsaných výše. Deriváty biologických molekul zahrnují například lipidové a glykosylační deriváty oligopeptidů, polypeptidů, peptidů a proteinů. Deriváty biologických molekul dále zahrnují lipidové deriváty oligosacharidů a polysacharidů, například lipopolysacharidů. Nejtypičtěji jsou biologické molekuly protilátky, nebo funkční ekvivalenty protilátek.

Funkční ekvivalenty protilátek mají vazebné charakteristiky srovnatelné s protilátkami a inhibují růst buněk, které exprimují EGFR. Tyto funkční ekvivalenty zahrnují například chimerizované, humanizované a jednořetězcové protilátky, stejně tak jako jejich fragmenty.

11.01.02

Funkční ekvivalenty protilátek také zahrnují polypeptidy s aminokyselinovými sekvencemi významně stejnými jako je aminokyselinová sekvence variabilních nebo hypervariabilních oblastí protilátek, které jsou předmětem vynálezu. Aminokyselinová sekvence, která je významně stejná jako další sekvence, ale která se liší od jiné sekvence jednou nebo více substitucemi, adicemi a/nebo delecemi, je považována za ekvivalentní sekvenci. Přednostně je méně než 50%, přednostněji méně než 25% a ještě přednostněji méně než 10% z počtu aminokyselinových reziduí v sekvenci substituováno za, přidáno k, nebo deletováno z proteinu.

Funkční ekvivalent protilátky je přednostně chimerizovaná nebo humanizovaná protilátka. Chimerizovaná protilátka obsahuje variabilní oblast nehumánní protilátky a konstantní oblast lidské protilátky. Humanizovaná protilátka obsahuje hypervariabilní oblast (CDRs) ne-humánní protilátky. Variabilní oblast jiná než hypervariabilní oblast, například strukturální variabilní oblast, a konstantní oblast humanizované protilátky jsou stejné jako u lidské protilátky.

Pro účely této přihlášky mohou být vhodné variabilní a hypervariabilní oblasti nehumánních protilátek odvozeny z protilátek produkovaných jakýmkoli savcem jiným než člověkem, v kterém jsou produkovány monoklonální protilátky. Vhodné příklady savců jiných než je člověk zahrnují například králíky, potkany, myši, koně, kozy nebo primáty. Preferovány jsou myši.

Funkční ekvivalenty dále zahrnují fragmenty protilátek, které mají vazebné charakteristiky, které jsou stejné jako, nebo srovnatelné s těmito charakteristikami celé protilátky. Vhodné fragmenty protilátky zahrnují jakýkoli fragment, který

11.01.02

obsahuje dostatečnou část hypervariabilní (tj. komplementaritu určující) oblast ke specifické vazbě a s dostatečnou afinitou k EGFR tyrosin kináze k inhibici růstu buněk, které exprimují tyto receptory.

Tyto fragmenty mohou například obsahovat jeden nebo oba Fab fragmenty nebo $F(ab')_2$ fragment. Fragmenty protilátky přednostně obsahují všech 6 komplementaritu určujících oblastí celé protilátky, ačkoli funkční fragmenty obsahující méně než všechny tyto oblasti, jako například tři, čtyři, nebo pět CDRs, jsou také zahrnuty.

Přednostní fragmenty jsou jednořetězcové protilátky nebo Fv fragmenty. Jednořetězcové protilátky jsou polypeptidy, které obsahují alespoň variabilní oblast těžkého řetězce protilátky navázanou k variabilní oblasti lehkého řetězce s nebo bez spojující složky. Fv fragment tedy zahrnuje celé protilátkové kombinační místo. Tyto řetězce mohou být produkovány v baktériích nebo v eukaryotických buňkách.

Protilátky a funkční ekvivalenty mohou být členy jakékoli třídy imunoglobulinů, jako jsou například IgG, IgM, IgA, IgD a IgE, a jejich podtřídy. Přednostní protilátky jsou členy podtřídy IgG1. Funkční ekvivalenty mohou být také ekvivalenty nebo kombinacemi jakékoli z výše uvedených tříd a podtříd.

Protilátky mohou být také vytvořeny z žádoucího receptoru způsoby, které jsou dobře známy v oboru. Receptory jsou buďto komerčně dostupné, nebo mohou být izolovány dobře známými způsoby. Způsoby izolace a purifikace EGFR jsou popsány například v patentu Spada, US Patent 5646153, začátek na sloupci 41, řádek 55. Způsob izolace a purifikace EGFR popsaný v tomto patentu je tímto zde začleněn jako reference.

11.01.02

Způsoby tvorby monoklonálních protilátek zahrnují imunologický způsob popsaný Kohlerem a Milsteinem v časopise Nature 256, 495-497 (1975) a Campbellem v knize "Monoclonal Antibody Technology, The Production and Characterization of Rodent and Human Hybridomas", v Burdon et al., Eds, Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Volume 13, Elsevier Science Publishers, Amsterodam (1985). Způsob rekombinantní DNA popsaný autorem Huse et al. v časopise Science 246, 1275-1281 (1989) je také vhodný.

Stručně řečeno, aby byly produkovány monoklonální protilátky, je hostitelský savec inokulován receptorem nebo fragmentem receptoru, jak je popsáno výše a poté volitelně znovu inokulován. Aby byla inokulace užitečná, musí fragment receptoru obsahovat dostatečný počet aminokyselinových reziduí, aby byl definován epitop molekuly, která má být detekována. Pokud je fragment příliš krátký, aby byl imunogenní, může být konjugován k nosičové molekule. Některé vhodné nosičové molekuly zahrnují hemocyanin a bovinní sérový albumin. Konjugace může být provedena způsoby známými v oboru. Jedním takovým způsobem je kombinace cysteinového rezidua fragmentu s cysteinovým reziduem na nosičové molekule.

Od inokulovaných zvířat jsou odebrány sleziny několik dnů po finální inokulaci. Buněčné suspenze ze slezin jsou zfúzovány s nádorovou buňkou. Výsledné hybridomové buňky, které exprimují protilátky, jsou izolovány, nechány růst a udržovány v kultuře.

Vhodné monoklonální protilátky, stejně tak jako tyrosin kinázy receptoru pro růstový faktor pro tvorbu těchto monoklonálních protilátek jsou také dostupné z komerčních zdrojů, například od společnosti Upstate Biotechnology, Santa Cruz Biotechnology of Santa Cruz, Kalifornie, Transduction Laboratories of

Lexington, Kentucky, RD Systems Inc of Minneapolis, Minnesota, a Dako Corporation of Carpinteria, Kalifornie.

Způsoby tvorby chimerických a humanizovaných protilátek jsou také známy v oboru. Například způsoby tvorby chimerických protilátek zahrnují způsoby popsané v patentech US patents, autor Boss (Celltech) a autor Cabilly (Genetech). Viz patenty US Patent č. 4816397 a 4816567. Způsoby tvorby humanizovaných protilátek jsou popsány například v patentu Winter, US Patent č. 5225539.

Přednostní způsob humanizace protilátek je nazýván CDR-grafting. U tohoto způsobu jsou oblasti myší protilátky, které přímo hrají roli ve vazbě antigenu, ve vazbě k oblasti určující komplementaritu, neboli CDRs, naroubovány na lidské variabilní oblasti za vzniku "přetvarovaných lidských" variabilních oblastí. Tyto plně humanizované variabilní oblasti jsou poté připojeny k lidským konstantním oblastem za vzniku kompletních "plně humanizovaných" protilátek.

Aby byly vytvořeny plně humanizované protilátky, které se dobře váží k antigenu, je s výhodou navrhnout přetvarované lidské variabilní oblasti pečlivě. Lidské variabilní oblasti, do kterých budou CDRs naroubovány, by měly být pečlivě vybrány a je nezbytné učinit několik aminokyselinových změn v kritických pozicích strukturálních oblastí (FR) lidských variabilních oblastí.

Přetvarované lidské variabilní oblasti mohou například obsahovat do deseti aminokyselinových změn ve FR zvolené variabilní oblasti lidského lehkého řetězce, a až dvanáct aminokyselinových změn ve FR zvolené variabilní oblasti lidského těžkého řetězce. DNA sekvence kódující geny pro tyto variabilní oblasti přetvarovaných lidských těžkých a lehkých

11.01.02

oblastí, přednostně γ1 a respektive κ. Přetvarovaná humanizovaná protilátka je poté exprimovaná v savčích buňkách a její afinita pro cíl je porovnána s afinitou odpovídající myší protilátky a chimérické protilátky.

Způsoby pro výběr reziduí humanizované protilátky, které mají být substituovány, a pro tvorbu substitucí jsou dobře známy v oboru. Viz například Co et al., Nature 324, 501-502 (1992), Queen et al., Proc Natl Acad Sci 86, 10029-1003 (1989) a Rodrigues et al., Int J Cancer, Supplement 7, 45-50 (1992). Způsob humanizace a přetvarování 225 anti-EGR monoklonální protilátky je popsán Goldsteinem et al. v PCT přihlášce WO 96/40210. Tento způsob může být přizpůsoben pro humanizaci a přetvarování protilátek proti jiným tyrosin kinázám receptoru pro růstový faktor.

Způsoby přípravy jednořetězcových protilátek jsou také známy v oboru. Některé vhodné příklady jsou popsány Wellsem et al v Evropské patentové přihlášce 502812 a v časopise Int J Cancer 60, 137-144 (1995).

Další způsoby přípravy funkčních ekvivalentů popsaných výše jsou uvedeny v PCT přihlášce WO 93/21319, v Evropské patentové přihlášce 239400, PCT přihlášce WO 89/09622, v Evropské patentové přihlášce 338745, v patentu US Patent 5658570, v Patentu US Patent 5693780 a v Evropské patentové přihlášce EP 332424.

Přednostní EGFR protilátky jsou chimerizované, humanizované a jednořetezcové protilátky odvozené z myší protilátky nazvané 225, která je popsána v patentu US Patent č. 4943533. Patent je připsán Kalifornské universitě a licensován exkluzivně společnosti ImClone Systems Incorporated.

11.01.02

Protilátka 225 je schopna inhibovat růst kultivovaných EGFR/HER1-exprimujících buněk za podmínek in vitro, stejně tak jako za podmínek in vivo, rostou-li jako xenografty na nahých myších. Viz Masui et al., Cancer Res. 44, 5592-5598 (1986). Nedávno bylo popsáno, že léčebný režim kombinující 225 plus doxorubicin nebo cisplatinu vykazoval léčebnou synergii proti dobře rostoucím lidským xenograftovým modelům u myší. Basalga et al., J Natl Cancer Inst 85, 1327-1333 (1993).

V jedné formě předkládaného vynálezu byli lidští pacienti s refrakterním skvamózním karcinomem hlavy a krku léčeni kombinací EGFR/HER1 antagonistou (chimerická anti EGFR monoklonální protilátka, C225) a cisplatinou. Tito pacienti byli předtím bez reakce na samotnou radiační léčbu, samotnou chemoterapii, nebo na jejich kombinaci. EGFR/HER1 antagonista inhiboval růst refrakterních nádorů.

Chimerizované, humanizované a jednořetězcové protilátky odvozené od myší protilátky 225 mohou být připraveny z protilátky 225, která je dostupná z ATCC. Alternativně mohou být různé fragmenty potřebné k přípravě chimerizovaných, humanizovaných a jednořetězcových 225 protilátek syntetizovány ze sekvence poskytnuté Wellsem et al. v Int J Cancer 60, 137-144 (1995). Chimerizovaná 225 protilátka (c225) může být připravena ve shodě se způsoby popsanými výše. Humanizovaná 225 protilátka může být připravena ve shodě se způsobem popsaným v příkladu IV PCT přihlášky WO 96/40210, která je tímto začleněna jako reference. Jednořetězcové 225 protilátky (Fv225) mohou být připraveny ve shodě se způsoby popsanými Wellsem et al. v časopise Int J Cancer 60, 137-144 (1995) a v Evropské patentové přihlášce 502812.

11.01.02

Sekvence hypervariabilních oblastí (CDR) lehkého a těžkého řetězce jsou reprodukovány níže. Aminokyselinová sekvence je indikována pod nukleotidovou sekvencí.

Hypervariabilní oblasti těžkého řetězce (VH):
CDR1
AACTATGGTGTACAC (sekvence č. 1)
N Y G V H (sekvence č. 2)

CDR2
GTGATATGGAGTGGTGGAAACACAGACTATAATACACCTTTCACATCC (sekvence č. 3)
V I W S G G N T D Y N T P F T S (sekvence č. 4)

CDR3
GCCCTCACCTACTATGATTACGAGTTTGCTTAC (sekvence č. 5
A L T Y Y D Y E F A Y (sekvence č. 6)

Hypervariabilní oblasti lehkého řetězce (VL)
CDR1
AGGGCCAGTCAGAGTATTGGCACAAACATACAC (sekvence č. 7)
R A S Q S I G T N I H (sekvence č. 8

CDR2
GCTTCTGAGTCTTATCTCT (sekvence č. 9)
A S E S I S (sekvence č. 10)

CDR3
CAACAAAATAATAACTGGCCAACCACG (sekvence č. 11)
Q Q N N N W P T T (sekvence č. 12)

Navíc k molekulám biologických molekul diskutovaným výše mohou být antagonisty užitečnými v předkládaném vynálezu také malé molekuly. Jakákoli molekula, která není biologickou molekulou

11.01.02

je považována v této specifikaci za malou molekulu. Některé příklady malých molekul zahrnují organické sloučeniny, organometalické sloučeniny, soli organických a organometalických sloučenin, sacharidy, aminokyseliny a nukleotidy. Malé molekuly dále zahrnují molekuly, které by jinak byly považovány za biologické molekuly, pokud jejich molekulová váha není větší než 450. Malé molekuly mohou být tedy lipidy, oligosacharidy, oligopeptidy a oligonukleotidy a jejich deriváty mající molekulovou váhu 450 nebo méně.

Je zdůrazňováno, že malé molekuly mohou mít jakoukoli molekulovou váhu. Jsou pouze nazývány malými molekulami, protože mají typicky molekulovou váhu menší než 450. Malé molekuly zahrnují molekuly, které jsou nacházeny v přírodě, stejně tak jako sloučeniny syntetické. Malé molekuly přednostně inhibují růst refrakterních nádorových buněk, které exprimují EGFR/HER1 tyrosin kinázu.

Byl popsán velký počet malých molekul, které inhibují EGFR. Například v patentu Spada et al., US Patent 5656655 jsou popsány styrylem substituované heteroarylové sloučeniny, které inhibují EGFR. Heteroarylová skupina je monocyklický kruh s jedním nebo dvěmi heteroatomy, nebo bicyklický kruh s 1 nebo 4 heteroatomy, sloučeniny jsou volitelně substituovány nebo polysubstituovány. Sloučeniny uvedené v patentu US Patent 5656655 jsou tímto začleněny jako reference.

Spada et al. v patentu US Patent 5646153 uvádějí bis mono a/nebo bicyklické arylové, heteroarylové, karbocyklické a heterokarbocyklické sloučeniny, které inhibují EGFR. Sloučeniny uvedené v patentu US Patent 5646153 jsou tímto začleněny jako reference.

Bridges et al. v patentu US Patent 5679683 uvádějí tricyklické pyrimidinové sloučeniny, které inhibují EGFR. Sloučeniny jsou fúzované heterocyklické pyrimidinové deriváty popsané ve sloupci 3, řádka 35 až sloupec 5, řádka 6. Popis těchto sloučenin ve sloupci 3, řádka 35 až sloupec 5, řádka 6 je začleněn tímto jako reference.

Barker v patentu US Patent 5616582 uvádí chinazolinové deriváty, které mají inhibiční aktivitu vůči receptorové tyrosin kináze. Sloučeniny uvedené v patentu US Patent 5616582 jsou tímto začleněny jako reference.

Fry et al. v časopise Science 265, 1093-1095 (1994) uvádějí sloučeninu mající strukturu inhibující EGFR. Strukturální vzorec je uveden na Obrázku 1. Sloučenina uvedená na Obrázku 1 v článku Fry et al je tímto začleněna jako reference.

Osherov et al. uvádějí tyrfostiny, které inhibují EGFR/HER1 a HER2. Sloučeniny uvedené v článku Osherova et al. a obzvláště sloučeniny v Tabulkách I, II, III a IV jsou tímto uvedené jako reference.

Levitzki et al. v patentu US Patent 5196446 uvádějí heteroaryletendiylové nebo heteroaryletendiylarylové sloučeniny, které inhibují EGFR. Sloučeniny uvedené v patentu US Patent 5196446 od sloupce 2, řádka 42 do sloupce 3, řádka 40 jsou tímto začleněny jako reference.

Panek et al. v časopise Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 283, 1433-1444 (1997) uvádějí sloučeninu identifikovanou jako PD 166285, která inhibuje EGFR, PDGFR a FGFR rodiny receptorů. PD 166285 je identifikována jako 6-(2,6-dochlorofenyl) -2- (4-(2-dietylaminoetoxy)fenylamino) -8- metyl -8H- pyrido (2,3-d)

pyrimidin -7- on mající strukturální vzorec uvedený na Obrázku 1 na straně 1436. Sloučenina popsaná na Obrázku 1 na straně 1436 článku Panek et al. je tímto začleněna jako reference.

Podání EGFR/HER1 antagonistů

Předkládaný vynález zahrnuje podání účinného množství EGFR/HER1 antagonisty lidským pacientů. Podání EGFR/HER1 antagonisty může být provedeno různými způsoby včetně systémového parenterálními a enterálními cestami. EGFR/HER1 antagonisté, které jsou předmětem předkládaného vynálezu mohou být snadno podány intravenózně (například intravenózní injekcí), což je přednostním způsobem podání. Intravenózní podání může být provedeno kontaktem EGFR/HER1 antagonistů s vhodným farmaceutickým nosičem (vehikulem) nebo excipientní látkou, jak je rozuměno osobami znalými oboru. EGFR/HER1 anatgonista může být podán s adjuvantní látkou, jako jsou například BCG, stimulátory imunního systému a chemoterapeutické látky.

EGFR/HER1 antagonisté, které jsou malé molekuly nebo biologické léky, mohou být podány, jak je popsáno v patentu Spada, US Patent 5646153 ve sloupci 57, řádka 47 až sloupec 59, řádka 67. Popis podání malých molekul je tímto začleněn jako reference.

EGFR/HER1 antagonisté, které jsou předmětem předkládaného vynálezu účinně inhibují růst refrakterních nádorových buněk, jsou-li podány lidskému pacientu v účinném množství. Jak je zde použito, účinné množství je takové množství, které je nezbytné k dosažení specifického výsledku inhibice růstu refrakterního nádoru.

EGFR/HER1 antagonista je přednostně podán k nádoru v množství, které inhibuje nádorový růst bez narušení růstu normální

11.01.02

tkáně. EGFR/HER1 antagonisté přednostně inhibují nádorový růst bez závažných vedlejších účinků. Některé závažné vedlejší účinky zahrnují útlum kostní dřen, anémii a infekci.

Optimální dávky EGFR/HER1 antagonistů, které jsou protilátkami a funkčními ekvivalenty, mohou být určeny lékaři na základě celé řady parametrů zahrnujících například věk, pohlaví, váhu závažnost onemocnění, které má být léčeno, protilátku, která má být podána a způsobu podání. Obecně je žádoucí sérová koncentrace polypeptidů a protilátek, které umožňují saturaci cílového receptoru. Například koncentrace v nadbytku přibližně 0,1 nM je normálně dostatečná. Například dávka 100 mg/m^2 C225 poskytuje sérovou koncentraci přibližně 20 nM po dobu 8 dnů.

Jako orientační pokyn mohou být dávky protilátek podávány týdně v množství 10-300 mg/m^2. Ekvivalentní dávky protilátkových fragmentů by měly být používány v četnějších intervalech, aby se udržela sérová koncentrace vyšší než je koncentrace, která umožňuje saturaci receptorů.

Kombinační terapie

V jedné přednostní formě vynálezu může být refrakterní nádor léčen účinným množstvím EGFR/HER1 antagonistou, chemoterapeutickými látkami, radiační léčbou, nebo jejich kombinacemi.

Příklady chemoterapeutických látek nebo chemoterapie zahrnují alkylační látky, například nitrogen mustard, etyleniminové sloučeniny, alkyl sulfonáty a další sloučeniny s alkylačním účinkem, jako jsou například nitrosourea, cisplatina a dakarbazin, antimetabolity, například kyselina listová, antagonisté purinů a pyrimidinů, inhibitory mitózy, například vinca alkaloidy deriváty podofylotoxinů, cytotoxická antibiotika a deriváty kamtotecinu.

11.01.02

Kamptotecinové deriváty zahrnují například kamptotecin, 7-etyl kamptotecin, 10-hydroxy -7- etyl-kamtotecin (SN38), 9-amino kamptotecin, 10,1- metylendioxy-kamptotecin (MDCPT a topotekan. Takové kamptotecinové deriváty také zahrnují laktonové stabilní preparáty 7-etyl-kamptotecinu uvedené v patentu US Patent 5604233, jenž je celý tímto začleněn jako reference.

Předkládaný vynález zahrnuje vysoce lipofilní kamptotecinové deriváty, jako jsou například 10,11-metylendioxy-kamptotecin, 10,11-etylendioxy-kamptotecin, 9-etyl-kamptotecin, 7-etyl-10-hydroxy-kamptotecin, 9-metyl-kamptotecin, 9-chloro-10,11-metylendioxy-kamptotecin, 9-chlorokamptotecin, 10-hydroxy-kamptotecin, 9,10-dichlorokamptotecin, 10-bromo-kamptotecin, 10-chlorokamptotecin, 9-fluoro-kamptotecin, 10-metyl kamptotecin, 10-flurokamptotecin, 9-metoxykamptotecin, 9-chloro -7- etyl-kamptotecin a 11-fluoro-kamptotecin. Takové vysoce lipofilní kamptotecinové deriváty jsou uvedeny v patentu US Patent č. 5880133, jenž je celý tímto začleněn jako reference.

Ve vodě rozpustné kamptotecinové deriváty zahrnují například ve vodě rozpustná analoga kamptotecinu známá jako CPT-11, 11-hydroxy -7- alkoxy - kamptotecin, 11-hydroxy -7- metoxy kamptotecin (11,7-HMCPT) a 11-hydroxy -7- etyl kamtotecin (11,7-HECPT), 7-dimetylaminometylen -10,11- metylendioxy -20(R,S)- kamptotecin, 7-dimetylaminometylen -10,11-metylendioxy -20(S)- kamptotecin, 7-dimetylaminometylen -10,11- etylendioxy -20(R,S)- kamptotecin a 7-morfolinometylen -10,11- etylendioxy -20(S)-kamptotecin. Takové ve vodě rozpustné kamptotecinové deriváty jsou uvedeny v patentu US Patent č. 5559235 a 5468754, jež jsou celé tímto začleněny jako reference.

Přednostní chemoterapeutické látky nebo chemoterapie zahrnují amifostin (etyol), cisplatinu, dakarbazin (DTIC), daktinomycin, mechloretamin (nitrogen mustard), streptozocin, cyklofosfamid, karmustin (BCNU), lomustin (CCNU), doxorubicin (adriamycin), doxorubicin lipo (doxil), gemcitabin (gemzar), daunorubicin, daunorubicin lipo (daunoxom), prokarbazin, mitomycin, cytarabin, etoposid, metotrexát, 5-fluorouracil, vinblastin, vincristin, bleomycin, paclitaxel (taxol), docetaxel (taxotere), aldesleukin, aspariginázu, busulfan, karboplatinu, kladribin, kamptotecin, CPT-11, 10-hydroxy -7-etyl-kamptotecin (SN38), dakarbazin, floxouridin, fludarabin, hydroxyureu, itofosfamid, idarubicin, mesnu, interferon alfa, interferon beta, irinotekan, mitoxantron, topotekan, leuprolid, megestrol, melfalan, merkaptopurin, plicamycin, mitotan, pegaspargázu, pentostatin, pipobroman, plicamycin, streptozocin, tamoxifen, teniposid, testolakton, thioguanin, thiotepu, uracil mustard, vinorelbin, chlorambucil a jejich kombinace.

Podání chemoterapeutických látek může být provedeno celou řadou způsobů zahrnujících systémové podání parenterálním a enterálním způsobem. Chemoterapeutická látka je přednostně podávána intravenózně v kombinaci chemoterapeutické látky s vhodným nosičem (vehikulem), nebo excipientní látkou, jak je rozuměno osobami znalými oboru. Dávka chemoterapeutické látky závisí na četných faktorech, jak je dobře známo v oboru. Tyto faktory zahrnují věk, pohlaví, váhu, závažnost onemocnění, které má být léčeno, a způsob podání. Cisplatina může být například pohodlně podávána v dávce okolo 100 mg/m^2. Mělo by však být zdůrazněno, že vynález není omezen na žádnou konkrétní dávku.

11.01.02

V ještě další formě vynálezu může být refrakterní nádor léčen účinným množstvím EGFR/HER1 antagonisty v kombinaci s radiační léčbou. Zdroj záření může být buďto externí nebo interní ve vztahu k léčenému pacientovi. Pokud je zdroj externí, nazývá se léčba radiační léčbou zevním paprskem (EBRT). Pokud je zdroj záření interní ve vztahu k pacientovi, je léčba nazývána brachyterapií (BT).

Léčba zářením je prováděna ve shodě s dobře známými standardními technikami se standardním vybavením vyrobeným pro tento účel, jako je například AECL Theraton a Varian Clinac. Dávka záření závisí na četných faktorech, jak je dobře známo v oboru. Takové faktory zahrnují typ léčeného orgánu, přítomnost zdravých orgánů v cestě záření, které mohou být nežádoucím způsobem poškozeny, toleranci pacienta k radiační léčbě a plochu těla, kterou je potřeba léčit. Dávka bude typicky mezi 1 a 100 Gy, a specifičtěji mezi 2 a 80 Gy. Některé dávky, které byly zaznamenány, zahrnují 35 Gy na míchu, 15 Gy na ledviny, 20 Gy na játra a 65-80 Gy na prostatu. Mělo by být však zdůrazněno, že vynález není omezen na žádnou konkrétní dávku. Dávka bude určena ošetřujícím lékařem ve shodě s konkrétními faktory v dané situaci, včetně faktorů zmíněných výše.

Vzdálenost mezi zdrojem zevního záření a vstupem do pacienta může být jakákoli vzdálenost, která reprezentuje přijatelnou rovnováhu mezi zabitím cílových buněk a minimalizací vedlejších účinků. Zdroj zevního záření je typicky mezi 70 a 100 cm od bodu vstupu do pacienta.

Brachyterapie je obvykle prováděna umístěním zdroje záření do pacienta. Zdroj záření je typicky umístěn přibližně 0-3 cm od tkáně, která má být léčena. Známé techniky zahrnují intersticiální, intrakavitární a povrchovou brachyterapii.

Radioaktivní sondy mohou být implantovány permanentně nebo dočasně. Některé typické radioaktivní atomy, které byly použity v permanentních implantátech zahrnují jód 125 a radon. Některé typické atomy, které byly použity v dočasných implantátech zahrnují rádium, cesium-137 a iridium-192. Některé další radioaktivní atomy, které byly použity v brachyterapii zahrnují americium-241 a zlato-198.

Dávka záření pro brachyterapii může být stejná, jako je zmíněno výše pro radiační léčbu zevním paprskem. Navíc k faktorům zmíněným výše pro určení dávky radiační léčby zevním paprskem, je do úvahy pro určení dávky brachyterapie také vzat charakter použitého radioaktivního atomu.

V přednostní formě vynálezu existuje synergie v léčbě refrakterních nádorů lidských pacientů léčených EGFR/HER1 antagonistou a chemoterapeutickými látkami nebo radiační léčbou, nebo jejich kombinacemi. Jinými slovy dochází ke zvýšení inhibice nádorového růstu EGFR/HER1 antagonistou, je-li zkombinován s chemoterapeutickou látkou nebo radiační léčbou, nebo jejich kombinacemi. Synergie může být prokázána například větší inhibicí růstu refrakterního nádoru kombinační léčbou, než by byla očekávána při léčbě buďto EGFR/HER1 antagonistou, chemoterapeutickou látkou nebo radiační léčbou samotnými. Synergie je přednostně demonstrována remisí nádorového onemocnění, kde remise není očekávána při léčbě EGFR/HER1 antagonistou, chemoterapeutickou látkou nebo radiační léčbou samotnými.

EGFR/HER1 antagonista je podáván před, během nebo po zahájení léčby chemoterapeutickou látkou nebo zářením, stejně tak jako jejich kombinacemi, tj. před a během, před a po, během a po, nebo před, během a po zahájení léčby chemoterapeutickou látkou nebo zářením. Pokud je například EGFR/HER1 antagonista

protilátkou, je typicky podáván mezi prvním a třicátým dnem, přednostně mezi třetím a dvacátým dnem, přednostněji mezi pátým a dvanáctým dnem před zahájením radiační léčby a/nebo léčby chemoterapeutickými látkami.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1

Klinická studie

V klinické studii byli léčeni lidští pacienti s **refrakterním skvamózním karcinomem hlavy a krku pomocí kombinace EGFR/HER1 antagonisty (chimerická anti-EGFR monoklonální protilátka, C225) a** cisplatinou. Pacienti byli léčeni dvakrát týdne infúzemi C225 při zahajovacích/udržovacích dávkách 100/100, **400/250, nebo 500/250 mg/m^2 v kombinaci s 100 mg/m^2 cisplatiny** každé tři týdny. Vzorky nádoru byly získány před zahájení léčby, 24 hodin po iniciální infúzi a 24 hodin před třetí infúzí za účelem posouzení saturace nádoru EGFR a jeho funkce. **Saturace EGFR byla posouzena imunohistochemicky (IHC) za** použití M225 (myší protějšek C225) jako primární protilátky a **antimyší** IgG jako sekundární protilátky za účelem detekce **neokupovaného EGFR. EGFR funkce byla posuzována pomocí IHC za** použití protilátky specifické pro aktivovaná EGFR **(Transduction** Labs) a měřením EGFR **tyrosin kinázové aktivity na** lyzátech nádoru po odstranění C225-EGFR komplexů. Bylo **zaznamenáno na dávce závislé zvýšení saturace receptoru s více** než 70% saturací receptoru při 500/250 mg/m^2 dávce. Podobně bylo zaznamenáno významné snížení EGFR **tyrosin kinázové aktivity s** nedetekovatelnou aktivitou u 67% pacientů při **dávkách 100/100 mg/m^2,** což naznačuje funkční saturaci. Nežádoucími účinky byly horečka, alergické reakce a kožní toxicita, která se manifestovala jako folikulární vyrážka nebo změny nehtového lůžka, které plně ustoupily po skončení léčby. U sedmi hodnocených pacientů došlo k jedné minimální, pěti parciální, a jedné kompletní remisi, jak bylo určeno

11.01.02

fyzikálním vyšetřením a laboratorními hodnotami. Kompletní odpověď byla pozorována u jednoho pacienta, který byl předtím léčen cisplatinou. Parciální odpověď byla pozorována u pěti pacientů, čtyři byli předtím léčeni chemoterapií a jeden měl předtím radiační léčbu. Minimální odpověď byla pozorována u jednoho pacienta s předchozí radiační léčbou. Tyto výsledky jsou uvedeny v tabulce, kde CR znamená kompletní odpověď, PR znamená částečnou odpověď a MR znamená minimální odpověď.

Tabulka 1

Klinická studie

Pacient	Předchozí léčba	Celková odpověď
1	Cisplatina	CR
2	Ad p53	PR
3	Cisplatina	PR
4	Cisplatina	PR
5	Samotné záření	PR
6	Chemoterapie	PR
7	Samotné záření	MR

Příklad 2

Klinická studie

V klinické studii byl léčen jeden lidský pacient s refrakterním nádorem tlustého střeva pomocí kombinace EGFR/HER1 antagonisty (chimerická anti-EGFR monoklonální protilátka, C225) a CPT-11. Pacient byl léčen týdenními infúzemi C225 při zahajovací dávce 250 mg/m2 v kombinaci s 125 mg/m2 CPT-11. Udržovací dávky 250 mg/m^2 C225 v kombinaci s 69-125 mg/m^2 CPT-11 byly podávány jednou týdně. Klinicky pacient dosáhl kompletní remise. Dávkovací schéma je sumarizováno v Tabulce 2 níže.

11.01.02

Tabulka 2

Klinická studie

C225/CPT-11, týdenní dávka v mg/m^2	C225/CPT-11 (skutečná dávka v mg)	C225 infúzní doba (minuty)	CPT-11 infúzní doba (minuty)
400/125	576/180	120	90
250/125	360/180	60	90
250/CPT-11, udržováno	360/0	60	N/A
250/94	360/135	50	75
250/69	360/100	60	85
250/69	360/100	60	75

04.06.02

2001-4013

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Použití účinného množství antagonisty receptoru epidermálního růstového faktoru (EGFR) pro výrobu léčiva pro inhibici růstu refrakterních nádorů.

2. Použití účinného množství kombinace antagonisty EGFR a chemotherapeutického činidla pro výrobu léčiva pro inhibici růstu refrakterních nádorů.

3. Použití účinného množství kombinace antagonisty EGFR a ozařování pro výrobu léčiva pro inhibici růstu refrakterních nádorů.

4. Použití podle některého z nároků 1 až 3, kde refrakterní nádor nadexprimuje EGFR.

5. Použití podle některého z nároků 1 až 4, kde refrakterním nádorem je nádor prsu, srdce, plic, tenkého střeva, tlustého střeva, sleziny, ledvin, močového měchýře, hlavy a krku, vaječníku, prostaty, mozku, slinivky břišní, kůže, kosti, kostní dřeně, krve, thymu, dělohy, varlat, hrdla děložního a jater.

6. Použití podle některého z nároků 1 až 5, kde léčba refrakterního nádoru byla neúspěšná nebo kde nádor vykazoval resistenci vůči léčbě.

7. Použití podle některého z nároků 1 až 4, kde refrakterním nádorem je nádor tlustého střeva, hlavy a krku.

8. Použití podle některého z nároků 1 až 7, kde refrakterním nádorem je nádor šupinaté buňky.

04.06.02

9. Použití podle některého z nároků 1 až 8, kde antagonista EGFR se podává intravenosně.

10. Použití podle některého z nároků 1 až 8, kde antagonista EGFR se podává perorálně.

11. Použití podle některého z nároků 2 až 10,kde antagonista EGFR se podává před podáním chemoterapeutického činidla.

12. Použití podle některého z nároků 1 až 11, kde antagonista EGFR se podává v dávce od asi 10 do asi 500 mg/m^2 za týden.

13. Použití podle některého z nároků 1 až 12, kde antagonista EGFR inhibuje stimulaci EGFR jeho ligandem.

14. Použití podle nároku 13, kde antagonista EGFR inhibuje vazbu EGFR k jeho ligandu.

15. Použití podle nároku 13 nebo 14, kde antagonista EGFR externě váže EGFR.

16. Použití podle nároku 13 nebo 14, kde antagonista EGFR interně váže EGFR.

17. Použití podle některého z nároků 13 až 16, kde antagonista EGFR inhibuje vazbu ATP k EGFR.

18. Použití podle některého z nároků 13 až 17, kde antagonista EGFR soutěží s ATP o vazbu k EGFR.

19. Použití podle některého z nároků 13 až 18, kde antagonista EGFR inhibuje fosforylaci EGFR.

04.06.02

20. Použití podle některého z nároků 13 až 19, kde antagonista EGFR inhibuje tyrosin kinasovou aktivitu EGFR.

21. Použití podle některého z nároků 1 až 20, kde antagonista EGFR obsahuje protilátku nebo její funkční ekvivalent, které jsou specifické pro EGFR.

22. Použití podle nároku 21, kde protilátka zahrnuje konstantní oblast lidské protilátky.

23. Použití podle nároku 21 nebo 22, kde protilátka je chimérická protilátka obsahující variabilní oblast myší protilátky.

24. Použití podle některého z nároků 21 až 23, kde protilátkou je humanizovaná protilátka obsahující variabilní oblast obsahující oblasti určující komplementaritu (CDR) myší protilátky a rámcové oblasti lidské protilátky.

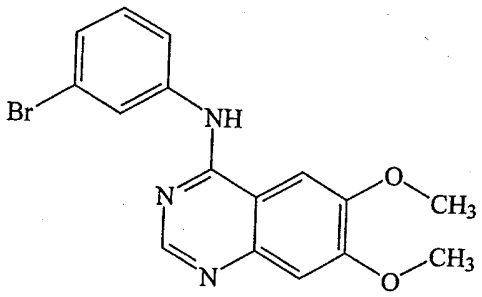
25. Použití podle některého z nároků 21 až 24, kde protilátkou je lidská protilátka obsahující variabilní oblast lidské protilátky.

26. Použití podle některého z nároků 1 až 25, kde protilátka se podává v dávce postačující pro nasycení EGFR.

27. Použití podle některého z nároků 1 až 26, kde antagonista EGFR zahrnuje malou molekulu.

28. Použití podle nároku 27, kde malá molekula zahrnuje sloučeninu PD 153035 mající následující strukturu

04.06.02

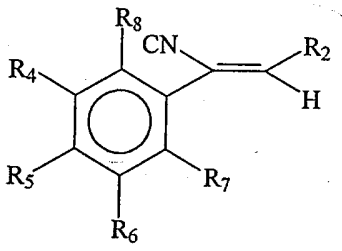


29. Použití podle nároku 27, kde malá molekula zahrnuje benzylidenmalonnitril nebo malonnitrilovou nebo tyrfostinovou sloučeninu.

30. Použití podle nároku 27, kde malá molekula zahrnuje styryl- substituovanou heteroarylovou sloučeninu.

31. Použití podle nároku 30, kde styrylsubstituovaná heteroarylová sloučenina zahrnuje monocyklický kruh s 1 nebo 2 heteroatomy nebo bicyklický kruh s 1 až asi 4 heteroatomy, který je popřípadě jednou nebo vícekrát substituován.

32. Použití podle nároku 30 nebo 31, kde styrylsubstituovaná heteroarylová sloučenina má strukturu odpovídající obecnému vzorci



kde

R představuje atom vodíku, alkylskupinu nebo aralkylskupinu;

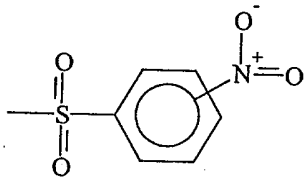
R_2 představuje asi 8- až 12-členný bicyklický arylový kruh obsahující 1 až asi 4 atomy dusíku, kyslíku nebo síry nebo 1 až asi 4 N-oxidové skupiny, kterýžto kruh je popřípadě

04.06.02

substituován 1 až asi 3 substituenty R_9, které nemají společná místa připojení k tomuto kruhu;

R_4, R_5, R_6, R_7 a R_8 představuje každý nezávisle atom vodíku, kyanoskupinu, alkylskupinu, halogen, skupinu vzorce OR, CHO, COOH, NRR nebo její N-oxid, skupinu vzorce NO_2, $NHCOCH_3$, SR, CF_3, CH=CH-COOH, $NHCO(CH_2)_2COOH$, heterocyklylskupinu nebo heteroarylskupinu a

R_9 nezávisle představuje vždy alkylskupinu, halogen, skupinu vzorce OR, CHO, COOH, NRR nebo její N-oxid, skupinu vzorce NO_2, $NHCOCH_3$, SR, CF_3, CH=CH-COOH, $NHCO(CH_2)_2COOH$, heterocyklylskupinu nebo heteroarylskupinu nebo skupinu vzorce



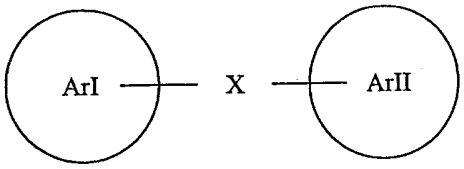
33. Použití podle nároku 27, kde malá molekula zahrnuje tricyklickou pyrimidinovou sloučeninu.

34. Použití podle nároku 33, kde tricyklická pyrimidinová sloučenina zahrnuje 4-(3-bromanilino)benzothieno[3,2-d]-pyrimidin; 4-(3-bromanilino)-8-nitrobenzothieno[3,2-d]pyrimidin, 8-amino-4-(3-bromanilino)benzothieno[3,2-d]pyrimidin nebo 4-(3-bromanilino)-8-methoxybenzothieno[3,2-d]pyrimidin.

35. Použití podle nároku 27, kde malá molekula zahrnuje bismono nebo bicyklickou aryl, heteroaryl, karbocyklickou nebo heterokarbocyklickou sloučeninu.

36. Použití podle nároku 27, kde malá molekula zahrnuje sloučeninu obecného vzorce

04.06.02



kde

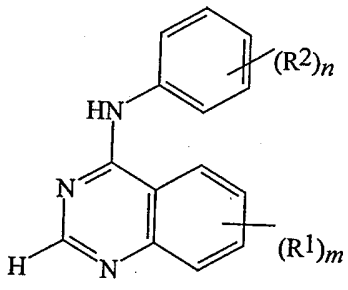
ArI a ArII nezávisle představuje substituovaný nebo nesubstituovaný mono- nebo bicyklický kruh, z nichž každý je popřípadě substituován 1 až asi 3 skupinami R;

X představuje skupinu vzorce $(CHR_1)_{0-4}$ nebo $(CHR_1)_m$-Z-$(CHR_1)_n$, kde Z znamená O, NR', S, SO nebo SO_2, m a n znamená číslo 0 až 3, přičemž součet m+n má hodnotu v intervalu 0 až 3 a R_1 a R' nezávisle představuje každý atom vodíku nebo alkylskupinu;

nebo její farmaceuticky vhodnou sůl.

37. Použití podle nároku 27, kde malá molekula zahrnuje derivát chinazolinu.

38. Použití podle nároku 37, kde derivát chinazolinu zahrnuje sloučeninu obecného vzorce



kde

m znamená číslo 1, 2 nebo 3;

R^1 představuje hydroxyskupinu, aminoskupinu, karboxyskupinu, karbamoylskupinu, ureidoskupinu, alkoxykarbonylskupinu s 1

04.06.02

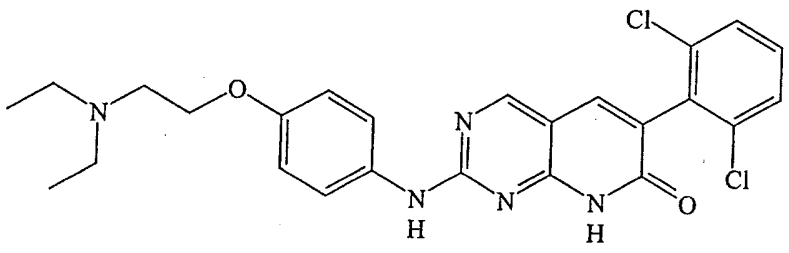
až 4 atomy uhlíku v alkoxylové části, N-alkylkarbamoylskupinu s 1 až 4 atomy uhlíku v alkylové části, N,N-dialkylkarbamoylskupinu s 1 až 4 atomy uhlíku v každé z alkylových částí, hydroxyaminoskupinu, alkoxyaminoskupinu s 1 až 4 atomy uhlíku, alkanoyloxyaminoskupinu se 2 až 4 atomy uhlíku, trifluormethoxyskupinu, alkylskupinu s 1 až 4 atomy uhlíku, alkoxyskupinu s 1 až 4 atomy uhlíku a alkylendioxyskupinu s 1 až 3 atomy uhlíku;

n - znamená číslo 1 nebo 2; a

R^2 představuje atom vodíku, hydroxyskupinu, halogen, trifluormethylskupinu, aminoskupinu, nitroskupinu, kyanoskupinu nebo alkylskupinu s 1 až 4 atomy uhlíku;

nebo jejich farmaceuticky vhodnou sůl.

39. Použití podle nároku 27, kde malá molekula zahrnuje sloučeninu PD 166285 vzorce



40. Použití podle kteréhokoliv z nároků 2 nebo 4 až 39, které dále zahrnuje aplikaci ozařování.

41. Použití podle kteréhokoliv z nároků 3 až 40, které dále zahrnuje podávání chemotherapeutického činidla.

04.06.02

42. Použití podle kteréhokoliv z nároků 2 nebo 4 až 41, kde chemoterapeutické činidlo zahrnuje amifostin, cisplatinu, dakarbazin, daktinomycin, mechloretamin, streptozocin, cyklofosfamid, karmustin, lomustin, doxorubicin, doxorubicin lipo, gemcitabin, daunorubicin, prokarbazin, mitomycin, cytarabin, etoposid, metotrexát, 5-fluorouracil, vinblastin, vincristin, bleomycin, paclitaxel, docetaxel, aldesleukin, asparaginázu, busulfan, karboplatinu, kladribin, kamptotecin, CPT-11, 10-hydroxy-7-etyl-kamptotecin (SN38), dakarbazin, floxuridin, fludarabin, hydroxymočovinu, ifosfamid, idarubicin, mesnu, interferon alfa, interferon beta, irinotekan, mitoxantron, topotekan, leuprolid, megestrol, melfalan, merkaptopurin, plicamycin, mitotan, pegaspargázu, pentostatin, pipobroman, plicamycin, streptozocin, tamoxifen, teniposid, testolakton, thioguanin, thiotepu, uracil-isothiokyanát, vinorelbin, chlorambucil a jejich kombinace.

43. Použití podle kteréhokoliv z nároků 2 nebo 4 až 42, kde chemotherapeutické činidlo zahrnuje cisplatinu, doxorubicin, paclitaxel, Irinotekan (CPT-11) nebo topotekan nebo jejich kombinaci.

44. Použití podle kteréhokoliv z nároků 2 nebo 4 až 43, kde chemotherapeutické činidlo se podává v dávce od asi 69 do asi 125 mg/m^2 za týden.

45. Použití podle kteréhokoliv z nároků 3 až 44, kde ozařování se aplikuje ze zdroje, který je vzhledem k pacientovi vnitřní.

46. Použití podle kteréhokoliv z nároků 3 až 45, kde ozařování se aplikuje ze zdroje, který je vzhledem k pacientovi vnější.

47. Použití podle kteréhokoliv z nároků 3 až 46, kde ozařování se podává v dávce v rozmezí od asi 2 do asi 80 Gy.

04.06.02

48. Použití podle kteréhokoliv z nároků 1 až 47, které dále zahrnuje podávání adjuvantu.

49. Použití účinného množství kombinace chimerické protilátky, která je specifická pro EGFR, a cisplatiny pro výrobu léčiva pro inhibici růstu refrakterního nádoru šupinatých buněk hlavy a krku.

50. Použití účinného množství kombinace chimerické protilátky, která je specifická pro EGFR, a Irinotekanu (CPT-11) pro výrobu léčiva pro inhibici růstu refrakterního nádoru tlustého střeva.